

G2期チェックポイント阻害による 放射線誘導細胞致死効果のメカニズムに関する研究

学位論文内容の要旨

近年、がんの放射線治療において化学療法剤と放射線の併用が、両者の作用を増強する方法として臨床において試みられている。当研究室の以前の研究で、ECydと放射線を併用することで放射線照射単独ではアポトーシスを引き起こさないがん細胞においてアポトーシス誘導の増強ならびに細胞増殖死誘導の増強を見いだした。その際、G2期チェックポイント関連たんぱく質発現や抗アポトーシスタンパク質発現の低下が重要であることが明らかにされた。しかしながら、ECydの非特異的なRNA合成阻害効果により、どの分子がこの放射線誘発アポトーシスの鍵になっているのか明らかとなっていない。近年、G2期チェックポイントの制御因子であるCdc2が抗アポトーシスタンパク質であるsurvivinの活性を調節することが報告された。survivinはG2/M期において発現量が最大になり、Cdc2によってリン酸化されるとcaspase-3と複合体を形成するため、アポトーシス誘導が阻害されることが知られている。本研究では、放射線照射された細胞において、G2期チェックポイントを標的とし、その活性化を阻害することにより、細胞死を増強できないか検討するために、このG2期チェックポイントの主要な制御因子であるCdc2に着目し、Cdc2キナーゼ活性阻害剤であるpurvalanol Aを用いた。

放射線照射されたMKN45細胞で、Cdc2キナーゼ活性の上昇、G2期チェックポイント関連たんぱく質(リン酸化Cdc2, cyclin B1)の増加とそれに続くG2期チェックポイントの活性化が観察されたが、purvalanol Aを処理することにより、Cdc2キナーゼ活性とG2期チェックポイント関連たんぱく質発現を抑制し、細胞周期のG2/M期分画を減少させた。さらに、この処理は野生型p53を持つMKN45細胞と変異型p53を持つMKN28細胞においても、放射線誘発アポトーシス誘導のみならず、細胞増殖死の増強を引き起こした。IAPファミリーメンバーであるsurvivinとXIAP、Bcl-2ファミリーメンバーであるBcl-X_LとBcl-2といった抗アポトーシスタンパク質の発現は、放射線照射の有無に関わらずpurvalanol A処理によって有意に減少した。また、放射線照射でミトコンドリアからのcytochrome cの放出が促進されており、purvalanol Aと放射線によるcaspase-3の活性化断片がpurvalanol A単独と比較して有意に増加していたことから、放射線照射されたがん細胞においてミトコンドリア/caspase-3依存性アポトーシスシグナル伝達経路に対する抑制的な機構をpurvalanol Aが解除するということが強く示唆された。

結論として、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤である purvalanol A は放射線誘発 Cdc2 キナーゼ活性化と G2 期のチェックポイントに関わる制御因子の発現を効率的に抑制することが示された。その上、purvalanol A 処理は放射線誘発細胞増殖死の有意な増加を引き起こした。このように purvalanol A による Cdc2 キナーゼ活性阻害により G2 期チェックポイントを抑制することで放射線誘発細胞死が増強できることから、G2 期チェックポイント阻害ががんの放射線治療の標的となりうることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 桑 原 幹 典
副 査 教 授 松 田 彰
副 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 助 教 授 稲 波 修

学 位 論 文 題 名

G2期チェックポイント阻害による 放射線誘導細胞致死効果のメカニズムに関する研究

放射線と抗がん剤の併用処理によりがんの治療効率が上がることが知られている。実際に、以前の研究で、X線照射と抗がん剤エチニルシチジンとを併用処理することにより、放射線抵抗性がん細胞においてアポトーシスならびに増殖死がともに増強されることを報告した。そのメカニズムとして、エチニルシチジンによるG2期チェックポイント関連蛋白質発現ならびに抗アポトーシス蛋白質の発現抑制が考えられた。しかしながら、エチニルシチジンがRNA合成全体を阻害する薬剤であることから、併用処理効果と関係する蛋白質を特定することは困難であった。近年、G2期チェックポイント制御因子であるCdc2 (サイクリン依存性キナーゼ) が抗アポトーシス蛋白質サバイビンの活性を調節することが報告された。さらに、サバイビンの発現はG2期で最大になり、Cdc2によりリン酸化され、カスパーゼ-3と複合体を形成することによりアポトーシスを阻害することも報告された。本研究では、このG2期チェックポイント主要制御因子であるCdc2に着目し、Cdc2に対し強い阻害効果を有するパーバラノールAを用い、X線との併用で細胞死増強が起こるか否かを検討した。

実験に用いた細胞は、人胃がん細胞株MKN45とMKN28で、それぞれがん抑制遺伝子*p53*が野生型と変異型の株である。MKN45細胞において、X線照射後、G2期停止とともにCdc2活性の上昇、G2期チェックポイント関連蛋白質(リン酸化Cdc2, サイクリン B1等)の発現増加が観察された。一方、パーバラノールAとの併用処理では、G2期停止解除とともにCdc2活性の抑制とG2期チェックポイント関連蛋白質の発現抑制が観察され、これらの現象と平行して、X線誘発アポトーシスならびに増殖死の増強が観察された。MKN28細胞でも同様の結果が得られた。さらに、パーバラノールA処理によりサバイビン、Bcl-X_L、Bcl-2等の抗アポトーシス蛋白質のmRNA発現が有意に減少し、その結果、それらの蛋白質そのものの発現も有意に減少していることが観察された。また、X線照射細胞でミトコンドリアからのシトクロームcの放出が観察されたが、アポトーシス誘導は観察されず、パーバラノールAと併用処理したときのみ、カスパーゼ-3の活性化とともに、アポトーシスが観察された。このことから、パーバラノールAがミトコンドリアからカスパーゼ-3を介してアポトーシスに至る経路に作用し、アポトーシスを誘導している可能性も示唆した。

以上、X線照射とパーバラノールAの併用処理により、*p53*野生型および変異型を問わず細胞死すなわちアポトーシスならびに増殖死が増強されることが観察された。そのメカニズムとして、パーバラノールAによるCdc2阻害に加え、G2期チェックポイント関連蛋白質の発現ならびに抗アポトーシス蛋白質の発現抑制が考えられた。

パーバラノールAによるG2期チェックポイント関連蛋白質の発現ならびに抗アポトーシス蛋白質の発現抑制は、パーバラノールAの新たな性質を示したものであり、その発見の意義は大きい。このように、本研究によりG2期チェックポイントを制御するCdc2の役割が明らかにされ、その蛋白質が放射線によるがん治療にとって重要な位置を占めていることが示唆された。

本研究は、がんの放射線治療に一つの方向性を与えたものであり、その意義は大きい。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者飯塚大輔氏の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規定第6条の規定により本研究科が行う博士論文の審査に合格と認めた。