

# 放射線誘導アポトーシスにおけるサバイビンの 役割とレドックス制御

## 学位論文内容の要旨

放射線治療は現在多くの癌治療の臨床現場で用いられている。放射線の生体に対する標的はDNAであり、DNA損傷によりミトコンドリアからシトクロムcが遊離して下流のカスパーゼが活性化し、細胞の自殺であるアポトーシスが誘導されると考えられている。しかしながら、末梢リンパ球や白血病などの一部の造血系由来の腫瘍細胞を除き、多くの固形腫瘍細胞では放射線を照射しても数十時間以内の細胞周期の間期にはアポトーシスをほとんど起さない。この放射線抵抗性の一因として、腫瘍細胞内ではアポトーシスを回避するための機構が亢進していることが知られている。本研究の第一章では、腫瘍細胞特異的に過剰発現してアポトーシス抑制に寄与しているサバイビンに着目し、放射線抵抗性の固形腫瘍細胞におけるサバイビンの役割と放射線増感の標的としての可能性を検討した。

まず、放射線単独によりアポトーシス経路が活性化するか調べたところ、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出は起きていたがカスパーゼ3の活性化およびアポトーシスは観察されなかった。サバイビンを機能的に阻害するため、リン酸化部位である34番目のスレオニン残基をアラニン残基に変異させたT34AならびにSmac/DIABLO結合部位である53番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に変異させたD53Aをコードするアデノウイルスベクターを作製した。これらをヒト肺腺癌由来A549細胞ならびにヒト子宮頸部癌由来HeLa細胞に過剰発現させて放射線を照射すると、48時間後に生じるアポトーシスはWTを過剰発現させた細胞に比較して有意に増加した。さらに、Smac/DIABLO抗体を用いた免疫沈降により、リン酸化を受けないT34AはWTに比べて顕著にSmac/DIABLOとの結合活性が減弱していることが観察された。以上の結果から、サバイビンは腫瘍細胞においてSmac/DIABLOと直接結合してその機能を阻害することにより放射線誘導アポトーシスを抑制しており、変異サバイビンの導入によりその機能を阻害することで放射線誘導アポトーシスを有意に増加できることが明らかになった。

一方、放射線照射後数分から数時間後に細胞内の酸化還元システムの関与により二次的なROSが生じ、これらがシグナル伝達物質としてアポトーシス誘導を制御していることが近年明らかになってきた。よって第二章では、固形腫瘍細胞においてX線照射後二次的にミトコンドリアからのROS産生が上昇するの

か、またそれらが放射線誘導アポトーシス経路におけるミトコンドリアからのシトクロムc遊離に関与しているのか検討を行った。

X線照射により誘導されたミトコンドリアからのシトクロムc遊離は、抗酸化剤NAC、Trolox、S-PBNならびにフラビンタンパク質阻害剤DPIの照射後処理により強く抑制された。細胞内のROSを検出する蛍光試薬2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)を用いたフローサイトメトリーおよびミトコンドリア由来のROSを検出する新規蛍光プローブMitoARを用いた生細胞の観察により、照射から6時間後には細胞内、特にミトコンドリアでのROS産生が増加することが明らかになった。さらに、細胞から単離したミトコンドリアを用いてスピントラップ剤CYPMPOによるESR-スピントラップ法を行ったところ、照射によりミトコンドリア呼吸鎖基質NADH/succinate依存性スーパーオキシド生成が増加した。また、照射によりミトコンドリアの膜電位差の増大、ESRオキシメトリーによる酸素消費量の増加およびBaxの発現増加とミトコンドリアへの集積が観察された。以上の結果から、X線照射によりミトコンドリアへ集積したBaxがミトコンドリア呼吸鎖を活性化し、それによって産生が増加したスーパーオキシドが増放射線誘導アポトーシスに重要なミトコンドリアからのシトクロムc遊離を引き起こしていることが明らかになった。

以上のように放射線抵抗性の固形腫瘍細胞における放射線誘導アポトーシス経路とその抵抗性を明らかにすることは、新たな分子標的を見つけ効果的な癌治療を行う上で重要であると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

|    |      |    |    |
|----|------|----|----|
| 主査 | 教授   | 稲波 | 修  |
| 副査 | 教授   | 木村 | 和弘 |
| 副査 | 准教授  | 太田 | 利男 |
| 副査 | 名誉教授 | 桑原 | 幹典 |

## 学位論文題名

### 放射線誘導アポトーシスにおけるサバイビンの 役割とレドックス制御

固形腫瘍の放射線治療において、その治療効果を妨げる1つの要因として腫瘍細胞内の致死に対する抵抗性を与えるタンパク質が高発現していることが挙げられる。放射線による細胞致死の重要なメカニズムとして、DNA損傷が引き金となってミトコンドリアからシトクロムc(cyt-c)ならびにSmac/DIABLOを遊離させて下流のカスパーゼを活性化し、アポトーシスを誘導する経路が報告されている。しかし、実際、多くの固形腫瘍細胞では放射線単独ではアポトーシスを起こしにくいことが知られており、このミトコンドリアを介するアポトーシスシグナルに対して抵抗性を示すInhibitor of Apoptosis Protein (IAP)ファミリーに属する幾つかのタンパク質が知られている。第一章ではこの中で固形腫瘍細胞において高発現しているサバイビンに着目し、これを標的とした放射線増感効果とそのアポトーシス抑制機構について検討した。

申請者は固形腫瘍細胞として主にヒト肺腺がん由来A549細胞を用いて検討を行った。10 Gyの高線量のX線を腫瘍細胞に照射してもアポトーシス誘導は少なくとも照射後48時間以内には殆ど見られなかったが、ミトコンドリアからのcyt-cの遊離は照射後24時間には明確に観察された。しかし、サバイビンのリン酸化部位ならびにSmac/DIABLO結合部位にそれぞれ変異を導入したT34AならびにD53Aサバイビンをアデノベクターにより腫瘍細胞に一過性過剰発現させると、X線照射によりアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。また、T34AならびにD53Aサバイビンは正常サバイビンと比較してSmac/DIABLOとの結合活性が顕著に低下していることが免疫沈降法によって明らかになった。以上の結果は、サバイビンは固形腫瘍細胞においてSmac/DIABLOの阻害を介してX線誘導アポトーシスを強く抑制しており、その機能を阻害することで放射線によるアポトーシス誘導できることを示すものである。

第二章ではミトコンドリアからのcyt-cの遊離のメカニズムを明らかにする目的で研究を進めた。申請者はDNA損傷が引き金となって細胞内活性酸素種(ROS)が上昇し、それがアポトーシス誘導に関与するという以前の報告に着目し、ROS生成とそのミトコンドリアからのcyt-cの遊離への関与について検討した。A549細胞にX線照射によって誘導されるミトコンドリアからのcyt-cの遊離は、照射直後にROSを消去する抗酸化物質を培地に加えると、強く抑制されることが観察された。さらに、T34AならびにD53Aサバイビンの導入細胞で見られるX線誘導アポトーシスについても抗酸化物質の照射後処理により強く抑制された。また、ROS検出のための蛍光プローブを用いた実験により、照射後、6時間以降からミトコンドリアでのROS産生が増加することが明らかになった。このようにミトコンドリアがROSの産生源であることが明らかになったので、次に単離したミトコンドリアでのスーパーオキシド( $O_2^-$ )生成能を評価するために電子スピン共鳴(ESR) -スピントラップ法を用いた実験を行ったところ、ミトコンドリアの呼吸鎖基質依存性 $O_2^-$ 生成能

がX線照射により増加することが示された。以上の結果は、腫瘍細胞にX線照射すると、照射後に遅れてミトコンドリアを発生源とする $O_2$ 生成の増加が起こり、この $O_2$ がミトコンドリアからのcyt-cの遊離の引き金となっている可能性を強く示唆している。

本研究では、サバイビンを分子標的にすることにより、固形腫瘍細胞でもアポトーシス増強により放射線致死効果を高められることを示したものであり、さらにそのアポトーシス誘導に重要であるcyt-cのミトコンドリアからの遊離機構にレドックス制御が関与していることを明らかにしたものである。これらの知見は固形腫瘍の放射線治療のために重要であり、今後の制がん剤や放射線増感剤などの開発においてもその意義は大きいものである。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者小倉亜希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。