The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mitotic slippage underlines the relationship between p53 dysfunction and the induction of large micronuclei by colcemid
Author(s)	橋本, 清弘
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34242
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[Format-P02R]

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	橋本　清弘
論文題名 Title	Mitotic slippage underlies the relationship between p53 dysfunction and the induction of large micronuclei by colcemid （p53機能障害株にコルセミドが大きな小核を誘発するメカニズムにM期停止の解除が果たす役割）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

染色体異常誘発物質は2つの異なるメカニズムで哺乳類培養細胞に「小核」を誘発する。電離放射線、活性酸素種、アルキル化剤などで生じた染色体断片が細胞分裂時に娘細胞に分配されず、無動原体染色体断片が主核と別に核膜に囲まれて小核形成する構造異常タイプ。また、紡錘糸阻害剤が染色体の極への分配を妨げて、有動原体染色体が小核形成する異数性タイプ。構造異常誘発物質と異なり、異数性誘発物質は安全域でのリスク評価が可能でもあり、医薬品開発研究においては両者の鑑別は重要な意味をもつ。

本研究では異数性誘発物質が大きな小核を誘発し易いという知見に着目し、チャイニーズハムスター肺（CHL）細胞を用い、既知の構造異常誘発物質及び異数性誘発物質が誘発する小核をサイズ別に測定し、大きな小核（主核直径の1/4～1/2）の出現頻度を指標として異数性誘発物質を鑑別する基準を設定した。さらに、ヒトリンパ芽球由来のTK6細胞及びそのp53遺伝子ノックアウト株であるNH32細胞を用いて異数性誘発物質による大きな小核誘発にp53機能が関与することを示した。そして、p53機能障害株で異数性誘発物質が大きな小核を高頻度に誘発するメカニズムを解明するため、コルセミドをモデル化合物として動原体プローブを用いたFISH法で検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

1. CHL、TK6及びNH32細胞を構造異常誘発物質及び異数性誘発物質（各6化合物）で24時間処理し、Giemsa染色標本を顕微鏡下で観察した。異数性誘発物質は大きな小核を誘発し易く、p53遺伝子欠損細胞株で大きな小核の誘発が亢進したことから、p53機能と大きな小核誘発が密接に関与すると考えられた。
2. コルセミド処理したTK6及びNH32細胞を全染色体の動原体領域とハイブリダイズするプローブを用いたFISH法で解析した。複数の動原体シグナルを持つ小核数はNH32細胞で多く認められたことから、p53が欠損すると娘細胞に正常分配されない染色体数が増え、これらが小核を形成すると大きな小核になる可能性が考えられた。
3. 細胞質分裂阻害剤（cytochalasin B）存在下でTK6、NH32細胞をコルセミド処理し、8番染色体プローブを用いたFISHを行い、主核に4つシグナルを持つ4倍体単核細胞の出現頻度を比較したところ、NH32細胞の方が高頻度だった。細胞質分裂阻害作用で大半の細胞は2核細胞となるが、コルセミド処理でM期停止が長時間継続すると、分裂を経ずに次のG1期に移行して4倍体細胞を生じる「mitotic slippage」を経ると4倍体単核細胞となるため、NH32細胞ではmitotic slippageを経た細胞数がTK6細胞より多いと考えられた。
4. 4倍体細胞における8番染色体の分布を精査したところ、動原体シグナルを持つ小核の出現頻度はNH32細胞で多く認められたことから、p53欠損によりmitotic slippageを経た細胞が増加すること及び同細胞において染色体分配異常に起因する小核が形成されやすいことが示唆された。
5. TK6細胞をカスパーゼ阻害剤（Z-VAD、50,100,200 mmol/L）で前処理後、コルセミド処理し、誘発された大きな小核の頻度を非カスパーゼ阻害剤処理と比較した結果、Z-VADの濃度依存的に大きな小核頻度が増加した。従って、mitotic slippageを経た小核を持つ4倍体細胞の除去にアポトーシスが関与していると考えられた。

〔総　括(Conclusion)〕

医薬品候補化合物の遺伝毒性評価として重要な小核試験において、誘発小核のサイズに着目した評価が、構造異常誘発物質及び異数性誘発物質の鑑別に有用であることを示した。異数性誘発物質であるコルセミドの大きな小核誘発機序をp53機能正常株及び障害株を用いて解析した結果、大きな小核の誘発は、通常の分裂を経た細胞ではなく、M期停止を経てG1期に移行した（mitotic slippage）4倍体細胞で正常分配されなかった染色体に起因する小核によること、さらに、その小核保有細胞はp53依存性アポトーシスで除かれることを示した。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　橋本　清弘

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	藤堂　剛
	副　査	大阪大学教授	宮崎　純一
	副　査	大阪大学教授	竹内　孝

論文審査の結果の要旨

染色体異常誘発物質により哺乳類培養細胞に誘発される「小核」は、簡便性・良好な再現性から医薬品の遺伝毒性評価に用いられている。小核には「構造異常タイプ」と「異数性タイプ」が知られている。特に後者は安全域でのリスク評価が可能であり、その識別及び形成メカニズムは重要な意味をもつ。本研究では異数性誘発物質が大きな小核を誘発し易いという知見に着目し、既知の構造異常誘発物質及び異数性誘発物質が誘発する小核をサイズ別に測定し、大きな小核の出現頻度を指標として異数性誘発物質を鑑別ずる基準を設定するとともに、p53遺伝子ノックアウト細胞を用い、その形成メカニズムの解明を行った。誘発小核のサイズに着目した評価が、構造異常誘発物質及び異数性誘発物質の鑑別に有用であることを示した。また異数性誘発物質による大きな小核誘発機序を、p53機能障害株を用いて解析した結果、大きな小核の誘発は、M期停止を経てG1期に移行する「 mitotic slippage」により形成された4倍体細胞において正常分配されなかった染色体に起因すること、さらに、その小核保有細胞はp53依存性アポトーシスで除かれることを示した。

この研究は、医薬品のリスク評価のみならず、小核形成メカニズムを明らかにしたものであり、学位に値するものであると認める。