

Title	Overexpression of GML Promotes Radiation-induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis
Author(s)	香川, 一史
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40794
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	香川一史
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13744 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Overexpression of GML Promotes Radiation-induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis (GMLの強制発現による放射線誘導性 Cell Cycle Arrestとアポトーシスの亢進)
論文審査委員	(主査) 教授 井上 俊彦 (副査) 教授 秋山 徹 教授 木下タロウ

論文内容の要旨

【目的】

発癌抑制蛋白 p53によって転写が活性化される遺伝子は多数同定されており、各遺伝子は異なる機序により細胞周期の制御やアポトーシスに関与している。

本研究では、p53 binding siteをもつヒト新規遺伝子 GML (GPI-anchored molecule-like protein) の推定翻訳産物に対する抗体を作成し、培養細胞中の GML の発現を確認することを目的とした。さらに GML の生理的機能を明らかにするため、GML-inducible clone を樹立して培養細胞の γ 線照射実験を行い、GML の発現が細胞の電離放射線感受性に及ぼす影響を検討した。

【方法】

抗体：大腸菌内で合成した GST-GML 融合蛋白でウサギを免疫し、得られた抗 GST-GML 血清から affinity chromatography により抗 GML 抗体を精製した。

細胞培養と transfection：マウス線維芽細胞 NIH3T3 とサル腎細胞 COS7, ヒト骨肉腫細胞 HOS は DMEM 培地中で、ヒト食道癌細胞 TE2 と TE10 は RPMI1640 培地中で培養した。培養細胞への外来 DNA の導入は、プラスミド DNA の lipofection により行った。

免疫沈降と Western blotting：抗 GML 抗体により in vitro translation 産物の [35 S] GML が免疫沈降可能なことを確認した後、cell lysate 中に存在する in vivo 発現の GML の免疫沈降を行った。沈降された GML を SDS-PAGE して PVDF 膜に転写後、抗 GML 抗体、抗ウサギ IgG 抗体と incubate し、酵素反応の発色でシグナルの検出を行った。

Colony Formation Assay: GML 発現ベクターと空ベクターが導入された細胞を、400 μ g/ml G418 に対する耐性で選択し、形成されるコロニー数を比較した。

培養細胞の電離放射線照射：非同調の培養細胞に対し、Gammacell 40 Exactor 照射装置により線量率約 1.27Gy/min の γ 線照射を行った。

細胞周期解析：8 時間毎に回収した約 10^6 個の細胞を固定、定法に従って propidium iodide 染色後、flow cytometry により DNA 蛍光を計測した。

放射線誘導性アポトーシスの確認：カバーガラス上の細胞を Hoechst 33258 染色後、蛍光顕微鏡で核の形態的变化を確認した。

【成績】

抗 GST-GML 抗体を用いた Western blotting では、p53 が野生型の NIH3T3 と TE2 で分子量約 21kDa の蛋白を検出した。このシグナルは COS7 を用いた強制発現実験で増幅され、cell lysate からの免疫沈降実験で GST-GML により拮抗されたことから、GML は生体内で約 21kDa の蛋白として存在することが確認された。

GML の transient の強制発現実験では TE10 では対照株との間に有意のコロニー形成の差を認めなかった。

次いで TE10 と HOS に pT2-pTAhyg 系を用いて GML の全長 cDNA を導入し、培地中の 2 μ g/ml tetracycline 除去により GML の発現をコントロール可能な GML-inducible clone を樹立した。TE10/GML では tetracycline 除去後に有意のコロニー形成抑制効果は見られず、HOS/GML ではわずかに増殖抑制が認められた。

TE10/GML と対照の TE10/vector, HOS/GML と対照の HOS/vector をそれぞれ培地中の tetracycline の有無を変えて培養後 8Gy の γ 線照射をしたところ、GML 発現株で強力な増殖抑制が認められた。

上記の細胞について γ 線照射後 8 時間毎に flow cytometry で細胞周期変動を調べたところ、GML 発現株では照射後の G2/M arrest の延長が認められた。さらに γ 線照射後の細胞株を Hoechst 33258 で染色したところ、GML 発現株でより高率にアポトーシス細胞の出現が認められた。

【総括】

p53 の新規ターゲット遺伝子 GML の翻訳産物では分子量約 21kDa の蛋白として存在した。GML-inducible clone を用いた実験では GML 発現に伴い、細胞の γ 線感受性が亢進し、 γ 線照射後、高率に放射線誘導性 G2/M arrest とアポトーシスを示した。食道癌細胞株で GML 発現に伴い taxol 投与後のアポトーシスが高率に起こることが報告されているが、本結果と併せ GML は p53 の制御下に電離放射線と抗癌剤による細胞障害性刺激を増強する因子として作用していることが確認された。

論文審査の結果の要旨

癌抑制遺伝子 p53 は修復不能な DNA 損傷を負った細胞を死に至らすことにより細胞の腫瘍性増殖を防ぐとともに、電離放射線や抗癌剤に対する細胞の感受性を増強することが知られている。近年の研究で、p53 遺伝子がコードする転写因子は多数の遺伝子の発現を促し、これらのターゲット遺伝子が各々異なる機序で細胞周期やアポトーシスを制御することにより抗腫瘍効果が得られることが解明されてきた。本研究では転写因子 p53 の新規ターゲット遺伝子としてヒト cDNA ライブラリーから単離された遺伝子 GML の塩基配列をもとに、推定翻訳産物に対する特異的抗体を作成し、哺乳類培養細胞中の GML の発現を証明した。さらに GML の生理的機能を検討するため GML-inducible stable clone を樹立して実験を行った。GML の強制発現単独では細胞種依存性に軽度の増殖抑制効果を認めたのに対し、GML の強制発現に加えて培養細胞 γ 線照射を行ったところ、GML 発現株では γ 線に対する感受性の著明な増強が認められた。その機序としては放射線誘導性の G2/M arrest とアポトーシスの亢進が存在することを明らかにした。

悪性腫瘍の放射線治療の臨床においては、照射効果の向上を目的として増感化学物質、組織加温、高圧酸素など多くの併用療法が試みられてきた。しかし未だ決定的なものはなく、近年では生命科学分野において急速に解明が進んでいる DNA damage の修飾因子群に注目が集まっている。本研究の結果は、癌抑制遺伝子 p53 を介する系では、p53 依存性の下流遺伝子 GML の発現が細胞の放射線感受性の決定に関わっていることを示唆しており、放射線治療の予後診断や併用療法の研究上、重要な知見であると考えられる。本研究の特記すべき点は、実際の臨床研究で抗腫瘍効果が広く認められている癌抑制遺伝子 p53 による増殖抑制作用を下流遺伝子のレベルで明らかにしたことであり、この知見は現在進行中の p53 研究に直結して速やかに臨床応用されることが期待される。今後の発展性や生命科学への貢献度から鑑み、博士（医学）の学位授与に値するものと認める。