



Title	Antisense Inhibition of the RAD51 Enhances Radiosensitivity
Author(s)	瀧, 琢有
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40927">https://hdl.handle.net/11094/40927</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	滝 琢 有
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 13464 号
学位授与年月日	平成 9 年 12 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Antisense Inhibition of the RAD51 Enhances Radiosensitivity (RAD51 antisense による細胞増殖抑制および放射線感受性増強効果)
論文審査委員	(主査) 教授 早川 徹 (副査) 教授 井上 俊彦 教授 中村 仁信

### 論文内容の要旨

#### [目的]

マウス RAD51 遺伝子は *E. coli* recA の homologue と考えられ、DNA の相同組換えや DNA 二本鎖切断の修復に関与していることが示唆されている。本研究では antisense oligonucleotides を用いて RAD51 発現を抑制することにより細胞増殖抑制および放射線感受性増強効果が得られるか否かを明らかにすることを目的とした。

#### [方法]

RAD51 cDNA にたいする二種類の antisense (AS) phosphothioate oligonucleotides (ODN) 15 bp を作製した。antisense ODN はマウスとヒトの RAD51 mRNA 配列の共通部位にて作成した。対照 ODN として 15 bp の sense ODN および scrambled ODN をそれぞれ合成した。細胞にマウス細胞株 M5S を用い細胞内への AS ODN とりこみは蛍光色素をラベルした AS にて顕微鏡下に確認した。mRNA 発現の抑制は Northern blot で、蛋白発現抑制は免疫染色および Western blot にて確認した。細胞増殖抑制効果は MTT assay にて検討した。また、対数増殖期にある M5S 細胞に各 [ODN] を作用させ、<sup>137</sup>Cs ガンマユニットを用いて放射線照射を行った。放射線治療効果は colony forming assay にて検討した。

#### [結果]

各 ODN を 12 時間毎に 3 回計 30 時間、M5S 細胞に作用させた。50 nM AS ODN 作用時、RAD51 mRNA は densitometry 測定上、control 群と比較して 99% 以上の発現抑制効果を認め、100 および 200 nM AS では、明らかな RAD51 mRNA 発現を認めなかった。また 100 nM および 200 nM AS ODN にて、蛋白発現も Western blotting 上 80% 以上の発現抑制効果を認めた。MTT assay による cytotoxic assay では、IC<sub>50</sub> は AS では 45 nM であるのにたいし、sense および scrambled では各々 350 nM、100 nM であった。また、AS の作用時間を延長するほど細胞増殖抑制効果は増強された。放射線感受性試験では、AS 群の D<sub>0</sub> は 50 nM、100 nM、においてそれぞれ 0.72 Gy、0.52 Gy であったのに比較して、sense 群では 1.62 Gy (50 nM)、1.91 Gy (100 nM)、scrambled 群では 1.91 Gy (50 nM)、1.98 Gy (100 nM) であった。

## [総括]

これまで RAD51 蛋白は腫瘍細胞を始めとする増殖細胞においてその発現が認められることが知られている。本研究において RAD51 が細胞の増殖に必須であることを明らかにした。RAD51 蛋白は DNA の組換え修復や二本鎖切断の修復に関与していることが示唆されており、本研究においても RAD51 発現抑制が放射線感受性を増強することが示された。RAD51 の発現を抑制することにより、抗癌剤や放射線による DNA 二重鎖切断の修復を傷害し、これらの治療の増強効果をもたらすことが期待された。

## 論文審査の結果の要旨

マウス RAD51 遺伝子は *E. coli* recA の homologue と考えられ、DNA の相同組換えや修復に関与していることが示唆されている。本研究は、antisense oligonucleotides を用いて RAD51 発現を抑制することにより細胞増殖抑制および放射線感受性増強効果が得られるか否かを明らかにすることを目的とした。RAD51 cDNA に対する antisense phosphothioate oligonucleotides を12時間毎に 3 回計30時間、マウス纖維芽細胞 m5S に作用させると、mRNA の発現は99%以上、蛋白発現も80%以上の発現抑制効果を認めた。Antisense の作用時間を延長するほど細胞増殖抑制効果は増強され、<sup>137</sup>Cs ガンマユニットを用いた  $\gamma$  線照射を行うと、放射線感受性が増強した。これはマウス悪性グリオーマの治療にも効果的であった。

本研究により RAD51 が細胞の増殖に必須であることを明らかにされ、また RAD51 発現抑制が放射線感受性を増強することが示された。本研究の成果は、RAD51 の発現を抑制することで、抗癌剤や放射線による DNA 二重鎖切断の修復を障害し、悪性脳腫瘍の治療成績を向上させ得る可能性を示唆したものであり、今後の臨床応用が期待され、本研究は学位に値するものと考える。