

Title	Role of Mitochondrial DNA in Radiation Exposure
Author(s)	吉田, 謙
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41788">https://hdl.handle.net/11094/41788</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	吉田 啓謙
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15299 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Role of Mitochondrial DNA in Radiation Exposure. (放射線照射に対するミトコンドリア DNA の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 井上 俊彦  (副査) 教授 野村 大成 教授 岡田伸太郎

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ミトコンドリアは独自の核外 DNA (mtDNA) をもち細胞のエネルギー生成 (ATP 産生) に関わっている。また mtDNA は電子伝達系構成蛋白の一部をコードしておりその異常は老化、神経筋疾患、糖尿病および癌化の発症に関与することが知られている。mtDNA は外的刺激に対する細胞応答にも関与しており、人為的に mtDNA を欠失させた線維芽細胞において mtDNA 欠失株は正常株と比較して高濃度酸素暴露に強い抵抗性を示すことが報告されている。しかし同様なストレスである放射線照射に対して mtDNA の有無が与える影響は解明されていないため、私は同様の細胞実験系を導入し  $\gamma$  線照射における mtDNA の役割を検討した。

#### 【方法ならびに成績】

細胞はヒト骨肉腫細胞 143B.TK- ( $\rho^+$ ; ATCC CRL 8303) および低濃度エチジウムブロマイド処理により mtDNA を欠失させた 143B.  $\rho^{0206}$  ( $\rho^0$ ) を用いた。 $\rho^0$  細胞は呼吸鎖依存性のジヒドロオロチン酸脱水素酵素が機能しなくなるためウリジン要求性となる。これらに対して  $^{137}\text{Cs}$  による  $\gamma$  線照射 (線量率 1.2 Gy/min.) をおこなった。実験としては以下のものをおこなった。

##### ① コロニー形成試験

Plating efficiency は  $\rho^+$  細胞は 75%、 $\rho^0$  細胞は 73% であった。 $\gamma$  線照射後のコロニー形成率は 2 Gy において  $\rho^+$  細胞は  $0.83 \pm 0.02$ 、 $\rho^0$  細胞は  $0.79 \pm 0.02$  であり、8 Gy では  $\rho^+$  細胞は  $0.09 \pm 0.05$ 、 $\rho^0$  細胞では  $0.06 \pm 0.01$  であった。両群の間に統計学的有意差を認めなかった。

##### ② 細胞分裂阻害微小核形成試験

サイトカラシン  $0.5 \mu\text{g/ml}$  処理後に二核細胞数が最大になる時間 (24 ないし 48 時間) を至適測定時間とした。細胞は 4、6-diamidino-2-phenylindole により染色し、蛍光顕微鏡にて検鏡した。全二核細胞中に占める微小核形成細胞の比率は 0 Gy で  $\rho^+$  細胞において  $0.02 \pm 0.02$ 、 $\rho^0$  細胞では  $0.03 \pm 0.02$  と同様であったのに対して、4 Gy で  $\rho^+$  細胞は  $0.49 \pm 0.06$ 、 $\rho^0$  細胞は  $0.25 \pm 0.04$  と  $\rho^+$  細胞において有意に高い微小核形成細胞出現を認めた ( $p = 0.005$ )。同様に一つの二核細胞あたりの平均微小核数も評価した。0 Gy で  $\rho^+$  細胞において  $0.02 \pm 0.02$ 、 $\rho^0$  細胞では  $0.04 \pm 0.03$  と同様であったのに対して、4 Gy で  $\rho^+$  細胞は  $0.92 \pm 0.13$ 、 $\rho^0$  細胞は  $0.4 \pm 0.03$  とやはり有意差を認めた ( $p = 0.01$ )。

### ③ 倍加時間測定

$\gamma$ 線照射後の増殖曲線をトリパンプルーを用いた Dye exclusion test を用いて作成し、その対数増殖期における倍加時間を測定した。 $\rho^+$ 細胞は 5 Gy 照射により倍加時間が 0 Gy 時の 15 時間から 26 時間と延長した (1.7 倍) のに対して  $\rho^0$ 細胞は 21 から 33 時間 (1.6 倍) に延長した。5 Gy 照射による倍加時間の遅延については両群の間に統計学的有意差を認めなかった。

#### 【総括】

骨肉腫細胞に対する  $\gamma$ 線照射の及ぼす影響を検討したところ、コロニー形成能および倍加時間遅延においては mtDNA の有無による両細胞株間に差は認められなかった。しかし、微小核形成率によって示される DNA 障害は mtDNA 欠失株においては正常株と比較して有意に少なかった。このことから、mtDNA は放射線照射後の増殖能 (コロニー形成能) には影響を与えないが、微小核形成で表される DNA 障害に影響を与えることが明らかにされた。

すなわち従来のコロニー形成能で表される増殖死とは別個に微小核形成能により表現される mtDNA が関与する放射線細胞障害経路があることを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

本研究はミトコンドリア DNA (mtDNA) が細胞の放射線感受性に与える影響を検討したものである。従来の放射線生物学においてはミトコンドリアと放射線照射との関係はあまり注目されていなかったが、近年はアポトーシスへの関与という意味でミトコンドリアの役割が注目されている。しかし、mtDNA が放射線照射後の細胞応答に与える影響を検討した報告はなく、本研究がそのさきがけとなるものである。ヒト骨肉腫細胞のミトコンドリア DNA 欠失株を用いた実験により、mtDNA が欠失することでコロニー形成率においては差が認められないにも拘わらず微小核形成率が低下することが分かった。このことから、従来のコロニー形成能で表される増殖死とは別個に微小核形成能により表現される mtDNA が関与する放射線細胞障害経路があることが明らかになった。この結果は、今後細胞死の本態を解明していくうえで、非常に有用であると考えられる。以上より、本研究は学位に値すると考える。