

Title	Overexpression of CDC25B overrides radiation-induced G2/M arrest and results in increased apoptosis in esophageal cancer cells
Author(s)	宮田, 博志
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43751
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	宮 田 博 志
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 16416 号
学位授与年月日	平成13年5月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Overexpression of CDC25B overrides radiation-induced G2/M arrest and results in increased apoptosis in esophageal cancer cells (食道癌における CDC25B の過剰発現が放射線誘導の G2/M 期停止およびアポトーシスに及ぼす影響について)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 野口眞三郎 教授 青笹 克之

論文内容の要旨

【目的】

放射線照射は食道癌に対する有効な治療の一つである。放射線照射による DNA damage により癌細胞は G1 期、S 期、G2/M 期のチェックポイントで制御される。今まで臨床材料を用いて、放射線感受性と細胞周期制御分子との関係を調べたところ、CDC25B 発現と放射線感受性の間に相関がみられた。CDC25B は CDC2 を脱リン酸化することで G2/M 期進行を制御する癌遺伝子である。そこで今回、CDC25B 発現と放射線感受性との関係を明らかにするために、食道癌細胞において CDC25B の過剰発現が放射線誘導の G2/M 期停止およびアポトーシスに及ぼす影響を検討した。

【方法】

食道癌細胞株 TE8 に CDC25B 遺伝子を lipofectin 法により導入し、CDC25B 過剰発現細胞株 (TE8-CDC25B) と vector control (TE8-neo) を作成した。両細胞株に放射線 2、4、6、8 Gy を照射し、14日間培養後のコロニー形成率を測定した。また放射線10Gy照射後、0、12、24、36、48時間の細胞周期およびアポトーシスを flow cytometry により解析した。細胞周期制御因子 (cyclinB1、cyclinD1、CDC2、CDC25B、CDC25C) の変化は Western blotting で、CDC 2 のチロシンリン酸化は免疫沈降法で調べた。また double thymidine block 法により細胞周期を同調させた後、放射線10Gyを照射し0、0.5、1、3、6、10時間後に CDC2 活性を測定した。

【成績】

非照射時においては TE8-CDC25B と TE8-neo の間で増殖速度、細胞周期、アポトーシスに差はなかった。TE8-CDC25B は TE8-neo に比べて放射線照射後のコロニー形成率が低く、放射線感受性が高いと考えられた。

放射線10Gy照射後の細胞周期は、両群とも G1 期停止はみられなかったが、24時間を最大として G2/M 期停止がみられた。しかし、このときの G2/M 期停止の割合は TE8-CDC25B で33.1%、TE8-neo では54.0%と、TE8-CDC25B では G2/M 期停止が減少していた。さらに TE8-CDC25B では36時間でほぼ正常な細胞周期に回復したのに対して、TE8-neo では48時間後まで G2/M 期停止が遷延した。アポトーシスは、両群とも G2/M 期停止が顕著な12時間まではほとんどみられず、G2/M 期停止から正常な細胞周期に回復をみせる36時間後に最大となった。しかし、このときのアポトーシスの割合は TE8-CDC25B で56.7%、TE8-neo では34.8%と、TE8-CDC25B でアポトーシスが增大していた。

放射線照射後、CDC25B の蛋白発現量は著明に減少したが TE8-CDC25B では TE8-neo に比べてその減少が少なかった。CDC25B は CDC2 の脱リン酸化酵素であるため、放射線照射後の CDC25B の減少に伴って CDC2 のリン酸化レベルは上昇した。しかし、TE8-CDC25B ではその上昇は軽度であった。また CDC2 はリン酸化により不活性化されるため、放射線後の CDC2 リン酸化レベルの上昇に平行して CDC2 活性は低下した。しかし、その低下は TE8-CDC25B では軽度であった。cyclin B1、cyclin D1、CDC2、CDC25C の蛋白発現量については両群間に差をみなかった。

【総括】

CDC25B の過剰発現により放射線照射後の CDC2 活性の低下の抑制、G2/M 期停止の回避、アポトーシスの増大を認めた。放射線照射後の G2/M 期停止は DNA 修復に必要である。CDC25B 過剰発現細胞は、G2/M 期停止の回避によって DNA 修復が不完全な状態で分裂期を迎え、チェックポイント機構によりアポトーシスに至ると考えられた。CDC25B は多くの癌でその過剰発現がみられる癌遺伝子であるが、今回の検討で放射線感受性を増大することが明らかになった。CDC25B を過剰発現する食道癌症例は、放射線治療のよい適応であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

放射線照射は食道癌に対する有効な治療の一つである。本研究は、G2/M 期進行を制御する癌遺伝子である CDC25B の食道癌における発現と放射線感受性との関係を明らかにするために、CDC25B の過剰発現が放射線誘導の G2/M 期停止およびアポトーシスに及ぼす影響について検討したものである。

まず CDC25B を過剰発現する食道癌細胞株を作製し、CDC25B 過剰発現細胞株では放射線照射後のコロニー形成率が減少し放射線感受性が増大することを示した。次に放射線照射後の細胞周期、アポトーシス、および細胞周期制御蛋白の発現の変化を経時的に調べた。その結果、放射線照射によって CDC25B の発現が減少し CDC2 活性が低下するため G2/M 期停止が起こるが、CDC25B が過剰発現することで CDC2 のチロシンリン酸化が減少し、CDC2 活性の減少が抑制されること、さらにそのため、放射線照射後の G2/M 期停止が回避され、アポトーシスが増大することを明らかにした。

これらの知見は、食道癌をはじめとして多くの癌でその過剰発現がみられる CDC25B が放射線感受性を増大することを初めて明らかにしたもので、学位の授与に値すると思われる。