

Title	Micronuclei in EM9 cells expressing polymorphic forms of human XRCC1
Author(s)	屈, 田力
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46138
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 屈 田 力

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 第 19913 号

学位授与年月日 平成 18 年 2 月 20 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科社会医学専攻

学位論文名 Micronuclei in EM9 cells expressing polymorphic forms of human *XRCC1*
(ヒト *XRCC1* の多型を発現した EM9 細胞内の小核)

論文審査委員 (主査)

教授 森本 兼曩

(副査)

教授 花岡 文雄 教授 田中亀代次

論文内容の要旨

[目的]

EM9 細胞は CHO 細胞から派生して、XRCC1 遺伝子全て欠損の特徴を持っている細胞で、ペアレント細胞は AA8 細胞である。EM9 細胞にヒト XRCC1 遺伝子を導入することにより、これらの修復欠損の回復することを示す。ヒト XRCC1 遺伝子は 633 のコドンより構成されている。三種の hXRCC1 多型はヒトに普遍的に存在している。この三種の多型は Arg194Trp、Arg280His、Arg399Gln であるが、さまざまな癌のリスクと相関するという報告があるが、癌と相関しないという報告もある。これらの報告には、サンプルのサイズ、調査対象の人種、癌の種類などの相異があったので、ベースとなる *in vitro* の実験が必要であると考えた。本研究の目的は、EM9 細胞にこれらの多型を含む hXRCC1 遺伝子を組み込み発現させ、染色体変異測定方法 (小核 (MN) 分析) を用いて、hXRCC1 遺伝子の多型がその DNA 修復能力におよぼす影響を評価する事である。

[方法及び成績]

方法：健康なドナーに由来する XRCC1 遺伝子を Ecor1 と Xba1 をカットして、ベクターに組み込んだ。このプラスミドを E-coli に transformate して、作製した。次に、作製した遺伝子を lipofectimain 2000 を使って、EM9 細胞内に導入し、この新しいセルラインを ExhX-1 と名付けた。194Trp、280His、399Gln、それぞれ 1 つずつ変異を入れた遺伝子を作製し、そして、ベクターに組み込んで、EM9 細胞に導入し、三つの新しいセルラインを作った。それぞれ Exm6X-1、Exm9X-1、Exm10X-1 と名付けた。また、同時にベクターだけを EM9 細胞内に導入して、ネガティブコントロールを作り、これを EXV を名付けた。RT-PCR 及び Western Blot を行い、細胞中の hXRCC1 遺伝子の蛋白質の発現量を検討した。さらに、DNA ダメージを評価するために、Bleomycin で 48 時間処理した後、Cytochalasin B を投入し、binucleat 細胞内の小核数を測定した、変異した hXRCC1 遺伝子のファンクションを検討した。

成績：Exm6X-1、Exm9X-1 と Exm10X-1 セルラインの中の hXRCC1 遺伝子発現量を比較したところ、この三つのセルラインは hXRCC1 遺伝子発現量がほぼ等しかった。小核分析の結果では、ノーマル hXRCC1 遺伝子を持つ ExhX-1 セルの小核数が EM9 セルより有意に低かった ($p < 0.05$, sample-dependent *t*-test)。また、Exm10X-1 セ

ルの小核数が ExhX-1 と比べて有意に高かった ($p < 0.05$, sample-dependent *t*-test)。しかし、Exm6X-1、Exm9X-1 と ExhX-1 比べて有意ではなかった。故に、194Trp と 280His は XRCC1 遺伝子のファンクションに影響を与えていないが、399Gln は XRCC1 のファンクションに影響を与えていると考えられる。

[総括]

本研究の結論は、XRCC1 遺伝子が欠損している EM9 細胞の hXRCC1 遺伝子を導入すると、EM9 細胞は hXRCC1 遺伝子を持つ DNA 修復能力を回復した。さらに、hXRCC1 遺伝子では、コドン 399 が hXRCC1 のファンクションにおいて重要な役割を担っていることが解明された。

論文審査の結果の要旨

ヒト XRCC1 遺伝子における 3 種類の多型 (Arg194Trp、Arg280His、及び、Arg399Gln) は一般人間集団に高い頻度で発現されている。また、人種による発現頻度の差も見られる。XRCC1 の多型性により様々な癌のリスクが変化することが報告されているが、しかし、この 3 多型と癌の関係を認めない報告も存在する。本研究は、*In vitro* において、XRCC1 の 3 多型と細胞の DNA 修復能力の関係を明らかにすることを目指した。XRCC1 遺伝子全て欠損の特徴を持っている EM9 細胞を新たに作製し、DNA 損傷の分析手法として小核分析を行うことにより、効果的に XRCC1 の 3 多型と DNA 修復能力の関係の解明に成功している。その結果、Arg399Gln はヒト XRCC1 の DNA 修復機能に関係することが明らかとなった。以上の研究成果は、社会医学研究に新たな展開をもたらす重要なものであり、本研究は学位の授与に値すると考えられる。