

Title	Control of Radiosensitivity of F9 Mouse Teratocarcinoma Cells by Regulation of Histone H2AX Gene Expression using a Tetracycline Turn-Off System
Author(s)	吉田, 佳世
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46358
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	吉田佳世
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19699 号
学位授与年月日	平成 17 年 4 月 28 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	Control of Radiosensitivity of F9 Mouse Teratocarcinoma Cells by Regulation of Histone <i>H2AX</i> Gene Expression using a Tetracycline Turn-Off System (テトラサイクリン抑制系を利用したヒストン <i>H2AX</i> 遺伝子発現の調節による F9 マウステラトカルシノーマ細胞の放射線感受性の制御)
論文審査委員	(主査) 教授 品川日出夫 (副査) 教授 田中亀代次 教授 竹日 潤二

論文内容の要旨

〔目的〕

ヒストン H2AX は、ヒストン H2A のマイナーなコンポーネントであり、その C 末端が 13 アミノ酸だけ長い。動物細胞に放射線が照射されると、DNA が二重鎖切断を受けそのシグナルが ATM を活性化し、DNA 損傷部のヒストン H2AX の C 末端部をリン酸化する。リン酸化されたヒストン H2AX (γ -H2AX) は、NBS1、MRE11、RAD50 などのタンパクを集合させて、損傷した DNA の付近に修復タンパクのフォーカスを形成し、非同源的 DNA 末端結合や相同組換え修復を促進すると考えられる。本研究の目的は、ヒストン H2AX がマウス組織でどのように発現し、リン酸化されるかを検討することである。さらに、*H2AX* 遺伝子の発現をテトラサイクリン (あるいは Doxycycline) を用いた制御系により抑制した場合、細胞の放射線感受性にどのような影響を与えるか *in vivo* で検討する。

〔方法ならびに成績〕

(1) マウス組織でのヒストン H2AX の発現とリン酸化

ヒストン *H2AX* 遺伝子が、精巣、胸腺、脾臓、小腸のような細胞分裂の盛んな細胞で発現していることをノーザンブロットにより明らかにした。さらに、ヒストン H2AX タンパクは、どの組織にも存在するが、リン酸化されたヒストン H2AX は体細胞では検出されなかった。精巣では、減数分裂前期のレプトテン期の精母細胞で検出され、減数分裂開始期に起こる DNA 二重鎖切断に関連していると考えられる。マウスに 30 Gy の X 線を照射すると、胸腺、脾臓、小腸のいずれの組織においても、ヒストン H2AX のリン酸化がみられ、ヒストン H2AX が放射線による DNA の損傷に密接に関わっていることが明らかとなった。また、減数分裂期に特異的な組換え遺伝子 *Dmc1* の欠損マウスは、相同染色体の対合不全により、減数分裂が停止するが、このマウスの精巣においてもヒストン H2AX のリン酸化が強くみられた。これは、レプトテン期の精母細胞が減数分裂停止により蓄積した結果であると考えられる。

(2) ヒストン *H2AX* 遺伝子の Tet-Off システムによる抑制

マウスヒストン *H2AX* 遺伝子に Tet-Off の系を結合したターゲティングベクターを作製し、マウステラトカルシノ

ーマ F9 細胞に導入して、ホモの相同組換え細胞 F9 ($H2AX^{Tet/Tet}$) を得た。この細胞を種々の Doxycycline 濃度で培養すると、ヒストン H2AX のタンパク量は Doxycycline の増加とともに減少し、Doxycycline 10 ng/ml では 0.02% になった。このことから、Tet-Off の系がヒストン $H2AX$ 遺伝子の抑制に有効に作用していることが確かめられた。

(3) ヒストン $H2AX$ 遺伝子の抑制による放射線感受性の増加

種々の Doxycycline 濃度で培養した F9 ($H2AX^{Tet/Tet}$) 細胞に X 線を照射し、MTT アッセイによって細胞毒性を検討した。野生型では、MTT の OD 値を 50% に減少させる線量は 2.39 Gy であるのに対し、F9 ($H2AX^{Tet/Tet}$) 細胞でヒストン H2AX の発現を強く抑制した条件 (Doxycycline 10 ng/ml) では、1.22 Gy になった。この時、RAD51 や KU80 のタンパク量の著しい変化はみられなかったことから、X 線に対する増感効果はヒストン H2AX タンパクおよびリン酸化された H2AX の量に依存することが明らかとなった。

さらに、F9 ($H2AX^{Tet/Tet}$) 細胞を 129Sv マウスの皮下に移植後、X 線を照射し、その後の癌の増殖を経時的に測定した。その結果、X 線高感受性となった F9 ($H2AX^{Tet/Tet}$) 細胞は、野生型より増殖が有意に抑制された。このことから、腫瘍形成についてもヒストン $H2AX$ 遺伝子の抑制は、放射線に対する増感効果を有することが示された。

[総括]

本研究では Tet-Off のシステムを用いて、マウスメラトカルシノーマ F9 細胞の内在性ヒストン $H2AX$ 遺伝子の発現を抑制できる系を作製した。この細胞の放射線感受性はヒストン H2AX の量及び、リン酸化されたヒストン H2AX の量に相関し、この遺伝子が癌細胞などの放射線感受性を左右する遺伝子の一つであることを明らかにした。このことは、ヒストン H2AX を標的としてその遺伝子発現を抑制することが、放射線増感に有効であることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

ヒストン H2AX タンパクは、放射線照射によりリン酸化され、種々の DNA 修復タンパクを集合させると考えられている。H2AX の放射線に対する機能を解析するため、Tet-Off システムを用いて、内在性ヒストン H2AX を発現抑制する系を作製した。マウス $H2AX$ 遺伝子の翻訳開始点から、Tet 制御性転写活性化因子 (tTA) を結合し、その下流に Tet 応答性因子 (TRE) 及びヒストン H2AX のコード領域を結合したベクターを作製した。このベクターをマウスメラトカルシノーマ F9 細胞に導入し、相同組換えによりホモの組換え細胞を得た。この細胞に Doxycycline を添加することにより、H2AX タンパクの合成を抑制することができた。また、この細胞について X 線照射すると、H2AX の発現を抑制した細胞は野生型に比べ、明らかに放射線感受性が上昇した。さらに、この細胞をマウスに移植することにより形成された腫瘍についても放射線増感効果が得られた。このことは、ヒストン $H2AX$ 遺伝子が放射線などによる DNA 損傷の修復に密接に関与していることを示すものであり、学位に値するものと認める。