OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	DNA Damage Enhanced by the Attenuation of SLD5 Delays Cell Cycle Restoration in Normal Cells but Not in Cancer Cells
Author(s)	宮, 志遠
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51918
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　　名 Name	宮　志遠
論文題名 Title	DNA Damage Enhanced by the Attenuation of SLD5 Delays Cell Cycle Restoration in Normal Cells but Not in Cancer Cells (SLD5の発現抑制によって増加するDNA損傷は正常細胞では細胞周期の回復を遅延させるが癌細胞では遅延させない)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

SLD5はPSF1, PSF2そしてPSF3と四つのサブユニットのGINS複合体を形成する。GINSは真核細胞において、DNA複製の開始と進行に非常な作用がある。そして、がん組織においてGINS遺伝子の発現は高く、発現レベルはがん悪性度と関係がある。また、高発現するGINS遺伝子は細胞増殖を引き起こすのみならず、化学治療に抵抗する可能性がある。しかし、今まで、GINSはDNA損傷修復反応に関与することは解明されなかった。そのため本研究では、SLD5はDNA損傷と修復に対して重要な作用があることを検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

DNA二本鎖損傷を引き起こすため、トポイソメラーゼ2のインヒビターであるエトポシドが使われた。エトポシドでMEF、B16とcolon26細胞を処理し、二本鎖損傷のマーカーとしてγ-H2AX を用いて、細胞損傷を測った。また、エトポシドを抜いた後、DNA修復に重要なタンパク質であるRad51因子を利用して、細胞の修復を測定した。

まず、MEF細胞のような正常細胞において、SLD5はDNA損傷反応との関連性を検討した。エトポシドでwild-typeとSLD5ヘテロMEF細胞を処理し、ウェスタンブロッティング方法でγ-H2AXを測定した。結果から、ヘテロMEFのγ-H2AXはwildより強く起こった。それから、処理した細胞を細胞培養液で培養し、各時点にsampleを回収し、ウェスタンブロッティングでRad51発現量とトリパンブルー色素排除試験法で細胞の増殖能力を測定した。結果から、SLD5ヘテロMEFはwild MEF細胞より、Rad51発現量は遅く増加し、長時間で高いレベルを維持した。そして、SLD5ヘテロMEF細胞はwild type細胞より、細胞の増殖が遅くなり、DNA修復時間が長くなった。以上より、正常細胞において、SLD5発現抑制により、DNA損傷が増加し、DNA修復反応及び細胞周期回復が遅延した。

次にがん細胞において、SLD5とDNA損傷反応の関連性について検討した。siRNA方法を用いて、B16及びcolon26がん細胞のSLD5遺伝子をノックダウンした。エトポシドで処理した後、siRNA B16及びsiRNA colon26細胞にH2AXのリン酸化はコントロールであるSCRより強く起こった。結果から、SLD5はがん細胞にDNA損傷と関連性があることを示した。それから、処理したB16及びcolon26がん細胞を細胞培養液で培養し、各時点にsampleを回収し、Rad51発現量及び細胞の増殖能力を測定した。結果から、Rad51発現量がこの４種類の細胞に速く増加した。そして、SCR B16及びSCR colon26 DNAと比べ、siRNA B16細胞及びsiRNA colon26細胞の細胞周期は一時的に遅延したが、長時間であまり変わらなかった。これらのデータから、がん細胞において、SLD5発現抑制により、DNA損傷が増加したが、DNA修復反応及び細胞周期回復に影響がなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

がん細胞と正常細胞においてSLD5の発現抑制により、DNA損傷が増加するため、SLD5はDNA損傷を抑制することが明らかになった。しかし、正常細胞ではSLD5の発現抑制により、 DNA修復反応と細胞周期回復が遅延したが、がん細胞ではこの反応が生じなかった。そこで、SLD5の抑制はがん微小環境の間質細胞の増殖を抑制することでがんの増大を抑制できる可能性があり、SLD5は一つ新しいターゲットとして、がん治療に応用できることを期待している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　宮　志遠

論文審査担当者	（職）	氏　名
主　査	大阪大学教授	島倉伸幸
副　査	大阪大学教授	岡田雅人
副　査	大阪大学教授	三木裕明

論文審査の結果の要旨

SLD5はPSF1, PSF2そしてPSF3とGINS複合体を形成し、真核細胞のDNA複製開始と進行に必要である。そして、GINS構成分子は癌細胞に高発現し、癌細胞の増殖と化学治療の抵抗性と関連性があることが示唆されてきた。しかし、今までGINSはDNA損傷修復反応に関与するか否かは解明されていなかった。

本研究ではSLD5がDNA損傷と修復に対して作用を解明するため、正常細胞とがん細胞を用い、etoposideにより二重鎖切断損傷を誘導し、DNA損傷の程度をγ-H2AX、相同組換え修復はRad51の発現で解析した。その結果、正常細胞でもがん細胞でもSLD5はDNA損傷を抑制する作用があることが判明した。一方、正常細胞ではSLD5の発現抑制により、DNA修復反応と細胞周期回復が遅延することが明らかになった。

この結果によって、SLD5は腫瘍環境細胞のターゲットとして、がん治療の発展に貢献するものとして評価できるため、博士の学位授与に値すると考えられた。