

審査の結果の要旨

氏名 朱 瑾

本研究は、p41 タンパク質の誘導阻害作用が見いだされていたオルトバナジウム酸ナトリウム (Vanadate) の照射後 MOLT-4 細胞への作用、特に p41 誘導阻害と細胞死について、とそのメカニズムを解明しようとしたものである。

1. 照射と添加タイミングと濃度について検討し、原則として 1 mM Vanadate を照射直後に加えることとした。MOLT-4 は、X 線単独では、10 Gy 照射 24 時間後の Viability は 5.5%を示したのに対し、1 mM Vanadate の存在下では、10 Gy 照射 24 時間後、37% の Viability にまで細胞死が抑制された。
2. X 線照射単独では 6 時間後、p41 の出現とカスパーゼ-3、-7、-9 の活性化が検出され、9 時間後から DNA 断片化が見られるが、X 線照射後 Vanadate を添加すると、p41 の生成、照射後のカスパーゼ-3、-7、-9 の活性化、DNA 断片化のいずれも阻害されることが明らかとなった。
3. X 線照射単独では 6 時間で、シトクローム *c* のミトコンドリアから細胞質への放出が検出されが、Vanadate 存在下では 24 時間までの間、ミトコンドリアのシトクローム *c* 放出と膜電位低下が抑制された。また、Ac-DEVD-pNA 基質としてリコンビナントの活性化カスパーゼ-7 を用いた *in vitro* での活性測定では、Vanadate は直接カスパーゼ活性を阻害しなかった。これらの結果から、Vanadate はミトコンドリア又はその上流にし、作用していると考えられた。
4. MOLT-4 は p53 wild と報告されているが、Western Blotting による p53 の照射後の蓄積については 1mM Vanadate による抑制効果は顕著ではなかった。2 次元電気泳動法によ

る p53 のリン酸化スポット量の比較を試み、同様のリン酸化抑制効果がみられる様であるが確定的ではない。一方、研究室作製した p53 Ser-15 のリン酸化抗体を用いて調べた結果、照射単独では3時間後、Ser-15 のリン酸化が検出されたのが、Vanadate 存在下では抑制されていた。p53 によって転写誘導される細胞周期調節因子 p21/Waf1 の誘導も Vanadate 存在下で抑制されていた。

5. p53 によって転写誘導され細胞死誘導に関与するとして、これまでに Bax、PIG3、Noxa、PUMA 等が提示されている。そこで、MOLT-4 のアポトーシス様放射線細胞死にこれらの因子の遺伝子発現が関わっているか、RT-PCR 法と Western Blotting 法により、これらの mRNA やタンパクの定量を行って検討し、Vanadate の効果を調べた。その結果、Bax、PIG3、PUMA は変化があまり見られず、一方、Noxa は、RT-PCR で照射1時間後から、Western Blotting でも照射3時間後から発現の増加が認められ、時間的な誘導のタイミングはカスパーゼの活性化が生じる照射後6時間より前であり、Vanadate 処理の抑制効果も見られ、MOLT-4 細胞死の誘導に関わっている可能性が示唆された。
6. 以上の結果は p53 の経路が MOLT-4 の照射細胞死とその Vanadate 作用点としての可能性を示唆するが、確定的とは言いがたく、Bcl-2 や Akt、あるいは JNK/SAPK 経路等、本研究でも部分的に調べられていた他の可能性も含めた、より詳細なメカニズムについて検討の余地は残る。

以上、本論文は確定的なメカニズムの解明には至らなかったが、Vanadate 存在下にミトコンドリアからのシトクロム c の放出とカスパーゼの活性化の抑制を伴って X 線照射 MOLT-4 細胞の放射線細胞死が抑制されていることを明らかにした。本研究は、放射線高感受性 MOLT-4 細胞の放射線誘発細胞死の機構や制御の解明に重要な知見を与えられ、学位の授与に値するものと考えられる。