

論文の内容の要旨

論文題目 Role of DNA-PK and ATM in cellular heat or radiation sensitivity

和訳 細胞の温熱および放射線感受性における DNA-PK、ATM の役割

指導教官 鈴木 紀夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 富田 雅典

「背景と目的」

癌治療における治療効果の指標として、これまで clonogenic な増殖死を用いてきたが、近年、アポトーシスの分子機構が解明されるにつれ、癌研究におけるアポトーシスの重要性が指摘されるようになってきた。その根拠のひとつとして、アポトーシス関連タンパク質の異常が、細胞の癌化の要因となるとともに、治療抵抗性の原因となることがあげられる。

DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) は、DNA 結合性 Ku ヘテロダイマー (Ku70、Ku86) と触媒サブユニット (DNA-PKcs) からなる複合体である。DNA-PKcs および毛細血管拡張性運動失調症 (AT) の原因遺伝子産物である ATM は、ともに PI3 キナーゼ (PI3K) と相同的な活性部位を有するプロテインキナーゼである。DNA-PK および ATM は、これまでの研究から、DNA 2 本鎖切断修復および細胞周期チェックポイントに重要であることが知られているが、放射線感受性への関与については、主にコロニー形成能を指標として研究されており、アポトーシスについては十分検討されていなかった。

温熱は、時に放射線と組み合わせて、癌治療に用いられている。研究室では、

温熱処理が DNA-PK 活性に及ぼす影響について検討し、44℃温熱処理により、DNA-PK 活性が著しく損なわれることをこれまでに明らかにしている (Matsumoto et al. 1997)。

プロテインキナーゼ阻害剤は、細胞内におけるプロテインキナーゼの機能を推定する上で有効である。Wortmannin は、PI3K の阻害剤として知られているが、PI3K の阻害濃度より 100 倍以上高い数 μM の濃度で、DNA-PK、ATM 両者を同時に阻害し、細胞の放射線感受性を高めることが明らかにされている (Hosoi et al. 1998)。

本研究では、細胞の温熱および X 線誘発アポトーシスにおける DNA-PK、ATM の役割を明らかにすることを目的とし、wortmannin や遺伝子欠損細胞を用いて検討した。

「材料と方法」

1. 本研究で用いた細胞を以下に示す。

Chinese hamster V79 細胞、Chinese hamster XR-V15B 細胞、*scid* マウス由来 SCF 細胞、C.B17 マウス由来 CBF 細胞、ATM^{+/+}、ATM^{+/-}、ATM^{-/-} マウス由来細胞、ヒト T 細胞白血病 MOLT-4 細胞、マウス *bcl-2* 遺伝子導入 MOLT-4 細胞。

2. 温熱処理は、44.0℃恒温水槽中に培養フラスコを沈めることにより行った。X 線照射は、Pantak 社製 X 線発生装置 (200kV-20 mA) を用いて行った。

3. Wortmannin および Caspase 阻害剤 (Z-VAD-FMK、Ac-DEVD-CHO 他) は、DMSO で溶解し、温熱処理および X 線照射 1 時間前に培養液中に添加した。

4. 細胞生存率はコロニー形成法により、viability はエリスロシン B 染色による色素排除試験により求めた。アポトーシスの誘導は、annexin V および TUNEL 陽性細胞の出現、Western blot 法による PARP の切断などを指標として求めた。種々のタンパク質の蓄積、リン酸化をリン酸化特異的抗体などを用いて、Western blot 法により検出した。

「結果と考察」

1) Wortmannin による温熱誘発アポトーシスの促進と DNA-PK、ATM の関与

Wortmannin が細胞の温熱感受性に及ぼす影響を、細胞の感受性測定に最も良く用いられている細胞の一つであり、DNA 断片化を伴う温熱誘発アポトーシスを生じることを明らかにしている (Sakai et al. 1997)、Chinese hamster V79 細胞を用いて検討した。Wortmannin により、V79 細胞が X 線だけでなく、

温熱に対しても高感受性になることを初めて示した。増感作用は、温熱処理に先駆けて wortmannin を添加した場合に顕著であり、DNA-PK、ATM が細胞内で阻害される数 μM 以上の濃度で認められた。Wortmannin が温熱による細胞死の促進に及ぼす影響を調べたところ、wortmannin の添加により温熱処理後の viability の低下、DNA ラダーおよび PARP 切断断片の出現が著しく促進された。一方、HSP70 の蓄積も阻害されたが、PARP の切断に遅れて認められた現象であったことから、積極的には関与していないと考えられた。以上の結果から、wortmannin が温熱誘発アポトーシスを促進することが示唆された。

温熱増感作用が DNA-PK および ATM が阻害される濃度域で認められたことから、次に DNA-PK、ATM のどちらがターゲットであるのかを解明するため、遺伝子欠損細胞を用いて検討した。Ku86 欠損 XR-V15B 細胞および DNA-PKcs 欠損 SCF 細胞は、コントロール細胞である V79 細胞、CBF 細胞と比べ、コロニー形成能、色素排除能を指標とした温熱感受性に顕著な差は認められなかった。一方、ATM^{-/-}細胞は、ATM^{+/+}、ATM^{+/-}細胞と比べて温熱高感受性であり、viability の減少、annexin V および TUNEL 陽性細胞の出現、PARP の切断、が著しく促進された。以上の結果から、ATM が細胞の温熱感受性に関与し、温熱誘発アポトーシスを抑制することが示唆された。

以上の結果を踏まえ、wortmannin の増感作用が、ATM の阻害によって生じるのか検討したが、ATM^{-/-}細胞でも、相加的な増感効果が認められた。よって、少なくとも ATM の阻害が、wortmannin による増感作用の要因の一部であると思われるが、ATM 以外の DNA-PK や他の PI3K ファミリー、未知のキナーゼの関与も否定できない。

2) Wortmannin による X 線誘発アポトーシスの促進と DNA-PK、ATM の関与

V79 細胞において、wortmannin の添加により X 線照射後の色素排除能の低下、PARP の切断が促進されたことから、X 線誘発アポトーシスの促進が示唆された。次に、アポトーシスの促進に関与するシグナル伝達機構を解明するため、p53 および JNK の活性化を伴う X 線誘発アポトーシスを生じる MOLT-4 細胞を用いて、DNA-PK、ATM、p53、Akt/PKB、JNK/SAPK などのリン酸化や活性化を検討した。

MOLT-4 細胞は、1-2 μM 以上の wortmannin を添加した場合に顕著な放射線増感作用を示した。一方、V79 細胞を含めた、これまでに報告されている線維

芽細胞に比べ、MOLT-4 細胞では、wortmannin 単独での毒性が強く認められたが、増感作用は、それを上回って相乗的であった。DNA-PK、ATM の細胞内リン酸化基質である XRCC4、p53 Ser15 のリン酸化を指標として、DNA-PK、ATM 活性化の阻害効果を検討したところ、増感作用が認められる 1 μ M 以上の濃度で両者の活性は抑制された。よって、MOLT-4 細胞においても、wortmannin による増感作用は、DNA-PK、ATM の阻害に起因すると示唆された。

Annexin V 陽性細胞の誘導が、1 μ M 以上の wortmannin により促進され、Z-VAD-FMK の添加、マウス *bcl-2* 導入により抑制された。同様に PARP の切断も wortmannin により促進され、Ac-DEVD-CHO により抑制された。よって、wortmannin は、カスパーゼの活性化を伴う X 線誘発アポトーシスを促進することが明らかになった。

1 μ M 以上の wortmannin により、X 線照射後の JNK のリン酸化および c-Jun のリン酸化を指標とした JNK の活性化が著しく増強、持続されたが、p53 の活性化 (p53 Ser15 のリン酸化、p53 および WAF1 の蓄積) は阻害された。一方、Akt/PKB の PI3K 依存的な恒常的リン酸化は、X 線照射に影響されず、増感作用が認められない 0.1 μ M で、完全に阻害されていた。MOLT-4 細胞の X 線誘発アポトーシスが、p53 の活性化によって誘導される (Nakano et al. 2001) ことを考えると、wortmannin による X 線誘発アポトーシス促進作用および JNK 活性化の増強は、p53 非依存的であることが示唆される。

「結語」

Wortmannin (DNA-PK、ATM、PI3K の阻害剤) は、細胞の X 線のみならず温熱感受性をも高めること、およびこれまで知られていた増殖死における repair の抑制に加え、JNK 活性化の増強を伴うアポトーシス促進作用があることを明らかにした。濃度依存性の結果は、DNA-PK もしくは ATM (あるいは両者) のアポトーシスへの関与を示唆するが、温熱および放射線感受性における役割の解明には、今後、DNA-PK および ATM 欠損細胞を用いた分子機構の詳細な検討が必要である。