

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 富田 雅典

本研究は、DNA 2 本鎖切断修復や細胞周期チェックポイントの初期段階において重要なプロテインキナーゼである DNA-PK および ATM の温熱および放射線 (X 線) 誘発アポトーシスにおける役割を解析するため、両者の阻害剤である wortmannin や欠損細胞を用いた系にて、温熱処理および X 線照射後の細胞致死効率や細胞致死過程の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Wortmannin が細胞の温熱感受性に及ぼす影響を Chinese hamster V79 細胞を用いて検討した結果、温熱に対して高感受性になることを初めて示した。増感作用は、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 が温熱誘発細胞死に及ぼす影響を調べたところ、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。一方で、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された。

2. 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、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^{+/+}、^{+/-}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 の切断が促進された。しかしながら、ATM^{-/-}細胞でも、wortmannin による相加的な増感効果が認められた。よって、ATM が温熱誘発アポトーシスに関与することが示唆されるが、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は否定できない。今後、ATM^{-/-}細胞への ATM 遺伝子の導入や、シグナル伝達機構の検討が必要である。

3. 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 MOLT-4 細胞を用いて調べた。MOLT-4 細胞では、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。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濃度で、両者の活性は抑制された。Annexin V 陽性細胞の誘導が、1 μM 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 μM 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 (Ser 15 のリン酸化、p53 および WAF1 の蓄積) は阻害された。一方、Akt/PKB の PI3 キナーゼ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 μM では完全に阻害されていた。よって、wortmannin が DNA-PK、ATM を抑制するとともに、JNK 活性化を増強、持続し、X 線誘発アポトーシスを促進することが示唆されたが、今後、DNA-PK、ATM の X 線誘発アポトーシスへの直接的な関与を欠損細胞を用いて検討する必要がある。

以上、本論文は、wortmannin (DNA-PK、ATM、PI3K の阻害剤) により、細胞の X 線のみならず温熱感受性をも高めうること、および 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。また、ATM が温熱誘発アポトーシスに関与することが示唆された。本研究は、wortmannin および DNA-PK、ATM 欠損細胞を用いたアポトーシス促進作用の解明を通じて、細胞の温熱および放射線 (X 線) 感受性における DNA-PK、ATM の役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。