

審査の結果の要旨

氏名 笹野 仲史

本研究はフリーラジカルスカベンジャーとして知られており、臨床的にも脳梗塞の治療薬として広く使用されているエダラボンが、細胞の放射線感受性にどのような影響を与えるか、in vitroのレベルで解析したもので、下記の結果を得ている。

1. ヒトT細胞白血病細胞株MOLT-4細胞において、エダラボンを放射線照射前に様々な濃度で投与した後、色素排除試験によって細胞の生存率を調べた。2.7-3 mg/mlの濃度（高濃度）で投与した場合には、投与しない場合に比べて細胞の生存率が改善し、放射線防護効果を示した。0.15-1.5 mg/mlの濃度（低濃度）では、投与しない場合に比べて細胞の生存率は逆に低下し、放射線増感効果を認めた。このように高濃度で放射線防護効果、低濃度で放射線増感効果を示す薬剤は他に知られていない。
2. MOLT-4細胞においてAnnexin V-PI染色の結果を行ったところ、高濃度エダラボンによる放射線防護効果はアポトーシスを抑制することにより起こっていることが分かった。また、低濃度エダラボンによる放射線増感効果はアポトーシスを亢進させることにより起こっていることが分かった。
3. ウェスタンブロット法による発現タンパクの解析や、CM-H₂-DCFDAを用いた細胞内ROSの定量を行った結果、高濃度エダラボンは細胞内ROSを除去して、p53の蓄積やリン酸化を抑制し、カスパーゼの活性化を抑制することにより、MOLT-4細胞のアポトーシスを抑制していることが分かった。
4. 低濃度エダラボンによる放射線増感効果はMOLT-4細胞以外に、ヒト前B細胞白血病細胞株Na1m-6や、ヒト肝細胞癌細胞株HepG2でも観察された。ウェスタンブロット法による発現タンパクの解析を行った結果、照射前に低濃度のエダラボンを投与すると、投与せずに照射した場合に比べて、p53のSerine15, 20残基のリン酸化が亢進していることが分かった。MOLT-4細胞において、p53をsiRNAでノックダウンして、低濃度エダラボンを投与して照射した場合と、投与せずに照射した場合で、色素排除試験で細胞の生存率を比較したところ、両者に変化が見られなかった。すなわちエダラボンの放射線増感効果が打ち消されていた。このことから、p53がエダラボンの放射線増感効果に深く関与していることが示唆された。p53標的分子の一つで、アポトーシスに関与しているとされるPUMAの活性化は、低濃度エダラボンを照射前に投与することにより、投与しない場合に比べて亢進していたが、別のp53標的分子であり、細胞周期制御に関与しているとされるp21^{WAF1}は抑制されていた。p21^{WAF1}

はルシフェラーゼアッセイによって転写レベルでも抑制が確認された。PUMAの亢進、p21^{WAF1}の抑制ともアポトーシス促進に働くとされており、これらがエダラボンによる放射線増感効果に関与している可能性が示唆された。p21^{WAF1}の抑制により、細胞周期制御が困難となるため、アポトーシスが促進することは、外因性のCDK阻害剤であるロスコビチンを低濃度エダラボンとともに投与すると、放射線増感効果が打ち消されることから示唆された。

以上、本論文はエダラボンが高濃度で放射線防護効果を示すことと、低濃度で放射線増感効果を示すこと、およびその分子機構の一部を明らかにした。エダラボンは臨床的に使用されている薬剤であり、放射線防護剤あるいは放射線増感剤として、将来的に臨床応用も期待できる。本研究は今後の放射線治療の効率化に寄与する可能性を十分に秘めており、学位の授与に値するものと考えられる。