

# 論 文 内 容 要 旨

## p16 gene transfer induces centrosome amplification and abnormal nucleation associated with survivin down-regulation in glioma cells

(グリオーマ細胞への p16 遺伝子導入は survivin の発現低下を伴った中心体増幅と核形態異常をもたらす)

Pathobiology, in press.

主指導教員：栗栖薫教授

(応用生命科学部門 脳神経外科学)

副指導教員：松本昌泰教授

(応用生命科学部門 脳神経内科学)

副指導教員：杉山一彦教授

(広島大学病院 がん化学療法科学)

高安 武志

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

p16 は CDK4 および CDK6 に結合することで、それらの cyclin-D への結合を阻害して、細胞周期の G1 停止を起こす。以前に、我々は、グリオーマ細胞に p16 遺伝子を導入すると、G1/S 期での細胞周期停止を起こし、核の形態異常を伴って放射線感受性が増強し、非アポトーシス細胞死となることを報告した(Br J Cancer, 2003)。

中心体は細胞分裂時の微小管形成中心の主要因子である。二つの中心体が細胞分裂時の紡錘極を形成する。中心体の適切な複製が紡錘体の形成と、正確な染色体配分に重要である。中心体複製の制御が乱れ、中心体が 2 個よりも多い状態である中心体増幅となると、染色体配分に混乱が起きて核の形態異常が生じる。

survivin はアポトーシス阻害因子の一つであり、また、スピンドルチェックポイントや染色体の適正な配分・整列の制御にも関与するとされる蛋白である。その合成は細胞周期 G1 期で増加し、G2/M 期にピークとなる。survivin を siRNA で抑制すると G2/M 期停止となり、中心体増幅を伴った異数倍体が増加し、放射線感受性が高まることも以前に示した(Br J Cancer, 2008)。中心体増幅は染色体不安定性を引き起こすことが知られているが、主に G2/M 期の現象として報告されていた。核の形態異常と異数倍体はともに染色体不安定性を示す所見であり、この染色体不安定性をもたらしたという点で、p16 遺伝子導入および survivin 抑制は共通している。そこで、G1/S 期においても、p16 遺伝子導入により中心体過剰複製が生じるかどうか検討した。

ヒト・グリオーマ細胞株の U251MG(p53 変異型)および D54MG(p53 野生型)を使用した。p16 遺伝子導入はアデノウイルスベクターを用い、コントロールとして遺伝子発現しない mock ウイルスを使用した。放射線照射した細胞と、非照射の細胞との比較を行なった。Day3 および day5 で細胞を回収した。中心体を構成する主要蛋白である  $\gamma$ -tubulin に対する抗体で蛍光免疫染色を行い、中心体の個数をカウントして中心体過剰複製を評価した。また、細胞から抽出した蛋白で、Western blot 法を用い、survivin の発現程度、さらに DNA 複製のライセンス化因子である CDT1 と、その阻害因子である geminin などの細胞周期関連蛋白の発現を評価した。

通常、細胞では中心体は 1 または 2 個が正常である。3 個以上に増幅した中心体を有する細胞を中心体過剰複製ありとした。各条件下の細胞で、それぞれ 200 個以上を観察し、中心体過剰複製を生じた細胞の割合を求めた。コントロールと比較して、p16 遺伝子導入後の細胞群で中心体過剰複製を起こした細胞の割合が増加しており、放射線照射を行った細胞ではさらに著明な中心体過剰複製が観察された。U251MG 細胞においては day3 から顕著な中心体過剰複製が観察されたが、D54MG は day3 ではそれほど増加しておらず、day5 になって U251MG と同等の中心体過剰複製が観察され、p53 の差異によるものと考えられた。Western blot 法の結果では、geminin はいずれの細胞でも不変であったが、CDT1 は p16 遺伝子導入後の細胞で低下していた。CDT1 により DNA は既にライセンス化が終了しながら、CDK4/6 の不活化により S 期の進行が妨げられていると考えられた。一方で、以前の研究データで p16 遺伝子導入細胞の遺伝子量のばらつきが示されており、これはライ

センス化後のために部分的に複製されたことが示唆され、核の形態異常、すなわち不安定状態に結びつくと考えられた。cyclin-E は中心体と DNA の合成に関与するとされており、p16 遺伝子導入後の細胞でも cyclin-E は低下しておらず、中心体は複製されうる状態を維持しているとみなされた。

また、p16 導入細胞で survivin の低下を認めた。survivin は微小管の安定化や、紡錘体の形成にも寄与しているとされ、G2/M 期のみならず、G1/S 期の進行にも関与していることが近年報告されている。従って、p16 導入細胞における survivin の低下は染色体分配の異常を引き起こし、染色体不安定性につながっている可能性がある。

p16 遺伝子強制発現によりグリオーマ細胞に中心体過剰複製が生じた。中心体過剰複製と染色体不安定性については、主に G2/M 期の現象として報告されていたが、今回の実験で G1/S 期にも起こり得ること、p16 および survivin の重要性が示唆された。中心体過剰複製と染色体不安定性は放射線感受性に関連すると考えられており、p16 および survivin の機能のさらなる解明が悪性グリオーマの放射線感受性改善につながるものと期待される。