

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	高安 武志
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
<p>p16 gene transfer induces centrosome amplification and abnormal nucleation associated with survivin down-regulation in glioma cells</p> <p>(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)</p>			
論文審査担当者			
主 査	教 授	武島 幸男	印
審査委員	教 授	田代 聡	
審査委員	准教授	沼本 通孝	
〔論文審査の要旨〕			
<p>p16 は CDK4/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、グリオーマ細胞への p16 遺伝子で、G1/S 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)。</p> <p>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。</p> <p>survivin は腫瘍細胞に特異的に発現するアポトーシス阻害因子の一つであり、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 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、中心体増幅を伴って異数倍体が増加し、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、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、その点では 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。</p>			

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。それぞれウイルス感染から約 12 時間後にガンマセルで 4Gy の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。中心体を構成蛋白に対する蛍光免疫染色で、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、Western blot 法により、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。

結果は以下のごとくまとめられる。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おり、DNA は CDT1 によるライセンス化が終了した不安定状態と考えられた。実際、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、核の形態異常、すなわち不安定状態に合致すると考えられた。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。

以上の結果から、本論文は p16 遺伝子強制発現により、G1/S 期であっても、グリオーマ細胞に中心体過剰複製が生じることを報告した。また、p16 および survivin の重要性を示し、これら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意義深いことを提案した。これらの成果は今後の悪性脳腫瘍治療における基礎的・臨床的意義が高いと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が申請者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。