

(様式4)

学位論文の内容の要旨

馬 洪玉 印

(学位論文のタイトル)

Targeting of carbon ion-induced G₂ checkpoint activation in lung cancer cells
using Wee-1 inhibitor MK-1775

(肺癌細胞における炭素線による細胞周期G₂チェックポイントの活性化を標的とする
Wee-1阻害剤MK-1775)

(学位論文の要旨)

【目的】

細胞が放射線を浴びると、細胞周期チェックポイントで停止し、放射線によるDNA損傷が完全に修復されるまでの時間稼ぎをすることで、放射線抵抗性をもたらすと考えられている。細胞周期調節因子Wee-1阻害剤MK-1775は放射線によるG₂停止を解除することにより、ヒト非小細胞肺癌(non-small-cell lung cancer: NSCLC)細胞のX線感受性を高めることが報告されている。しかし、MK-1775の炭素線に対する増感効果は未だ不明である。

そこで本研究では、ヒトNSCLC細胞の炭素線による殺細胞効果をさらに高めることを目指し、Wee-1を標的とした阻害剤MK-1775の炭素線増感効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】

がん抑制遺伝子TP53欠損型、変異型、野生型ヒトNSCLC細胞株H1299を用いた。放射線照射24時間前に、細胞をフラスコに播き、異なる濃度のMK-1775を照射6時間前に培地に添加し、X線照射装置(TITAN-225S, Shimadzu)にてX線照射(200 kV, 14.6 mA)または群馬大学重粒子線照射装置にて6-cm spread-out Bragg peak(SOBP)炭素線照射(290 MeV/u, 50 keV/μm)した。PI蛍光染色、分裂期特異的なヒストンH3のser10のリン酸化および細胞周期G₂停止特異的なcyclin-dependent kinase 1のpY15リン酸化(Cdk1^{pY15}: Wee-1の下流にあるG₂停止調節因子)染色後、フローサイトメトリー法およびWestern法でMK-1775の放射線によるG₂停止の抑制効果を調べた。また、照射18時間後に培地を交換し、7-9日後、コロニー形成法で放射線感受性を調べた。MK-1775による炭素線増感のメカニズムを解明するため、DNA二本鎖切断の指標としてリン酸化H2AX(γH2AX)量をフローサイトメトリー法で調べた。分裂期崩壊(mitotic catastrophe; MC)についてはTime-lapse法で調べた。

【結果】

X線に比べて炭素線の生物学的効果比(relative biological effectiveness: RBE)は、10%生存率で2.4と高く、その値はG₂停止の約2.3と同様であった。このG₂停止はMK-1775の濃度依存的に解除された。また、放射線照射後3時間で分裂期の減少、照射後12時間でCdk1^{pY15}の増加が見られ、100 nM MK-1775を加えることで分裂期の減少が回復し、Cdk1^{pY15}の増加を抑制した。100 nM MK-1775による両放射線の増感効果は、TP53の遺伝子型非依存的に認められた。更に、MK-1775は両放射線で照射した細胞のγH2AXとMCの顕著な増加をもたらした。

【考察】

これまでに、MK-1775は、従来の放射線によるG₂停止を解除することで、分裂期の減少を回復し、Cdk1^{PY15}の増加を抑制することが報告されている。本研究は、炭素線においても、MK-1775がG₂停止を解除することを明らかにした初めての報告である。Wee-1について、Yoshidaらの報告ではNSCLC病理組織の65.8%で発現が認められていないのに対して、過剰発現している報告もあり、本研究でも発現を認めた。Yoshidaらとの相違の原因として、細胞の遺伝的背景の違いが影響した可能性が考えられる。

MK-1775による従来の放射線による増感効果については数多くの報告がある。本研究では、炭素線と同様の増感比を認めた。従来の放射線において、G₂停止の解除にはたらくMK-1775は、G₂停止が最後の砦となるTP53が機能しない細胞のみで増感する報告もあるが、本研究ではTP53遺伝子型非依存的に増感した。TP53野生型の正常細胞に対する効果は調べていないが、Kawabeらの報告では合成致死の原理で、TP53はG₁停止以外にG₂停止にもある程度関わるため、TP53非依存的なG₂停止（Wee-1経路など）のみを阻害する場合、正常細胞への影響が少ないと考えられる。

また、MK-1775は、従来の放射線照射後、がん細胞のγH2AXとMCを増加させることが報告されている。炭素線照射後、細胞致死は主にMCを介し、Amornwicheeららの報告と一致する結果であった。放射線によるG₂停止が解除され、DNA損傷を持ったまま、分裂期に入り、異常な分裂による分裂崩壊を引き起こしたと考えられる。

結論として、X線と同様に炭素線においても、細胞周期調節を分子標的増感候補としてMK-1775を用いることで、ヒト肺がん細胞の殺細胞効果をさらに高めることができた。