

氏 名（本籍）	さい 齋 とう 藤 りゅう 竜 た 太
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 2084 号
学位授与年月日	平 成 16 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学位論文題目	DNase- γ 遺伝子導入による神経膠腫細胞のアポ トーシス

（主 査）

論文審査委員	教授 富 永 悌 二	教授 笹 野 公 伸
	教授 石 岡 千加史	教授 糸 山 泰 人

論文内容要旨

研究目的

神経膠腫細胞のアポトーシスに関与すると考えられる新規 DNA エンドヌクレアーゼである DNase- γ に関して、この遺伝子の強制過剰発現が神経膠腫細胞にもたらす影響を観察し、抗腫瘍効果の有無を検討した。

研究方法

多重膜陽電荷リポソームを用いた遺伝子導入法により、3種類のヒト神経膠腫細胞株に対して DNase- γ の遺伝子導入を行った。遺伝子導入後の本タンパク質の発現をウエスタンブロット法にて検討した。活性型酵素のみを認識する抗体を用いた免疫細胞化学法により遺伝子導入細胞で強制過剰発現した DNase- γ が実際に活性型酵素として働いているかを検討した。また、それらの細胞で実際にクロマチン DNA の断片化が起こることを DNA 電気泳動により検討した。続いて、DNase- γ 遺伝子導入がヒト神経膠腫細胞の増殖に与える影響を *in vitro* でのトリパンブルー除去アッセイ法にて検討した。DNase- γ 遺伝子導入により誘導される細胞死に関して、その形態変化を高倍率下で生細胞を観察できるビデオ強化型顕微鏡を用いて観察した。さらに、多重膜陽電荷リポソームを用いた遺伝子導入法において問題となる遺伝子導入効率の低さを克服する方法として、DNase- γ 遺伝子含有リポソームの反復投与を行い、その効果を検討した。

研究結果

多重膜陽電荷リポソームを用いた遺伝子導入法によりヒト神経膠腫細胞に DNase- γ 遺伝子を導入することは可能であり、DNase- γ タンパク質の強制過剰発現が確認された。免疫細胞化学法により、実際に遺伝子導入細胞で DNase- γ が活性型酵素として働いていることが判明し、これらの細胞で DNA の断片化を認めた。さらに遺伝子が強制発現したヒト神経膠腫細胞では細胞増殖が抑制され、DNase- γ 遺伝子が神経膠腫に対して細胞増殖抑制効果を有することが示された。この細胞増殖抑制効果の機序としては、細胞死が誘導されることが判明し、その形態変化を経時的に観察したところ、細胞の萎縮、細胞膜の突起状の変化、アポトーシス小体の形成というアポトーシスに特徴的な形態変化を認めた。以上より、DNase- γ 遺伝子強制過剰発現がヒト神経膠腫細胞にアポトーシスを誘導することが示された。また、DNase- γ 遺伝子含有リポソームの反復投与による遺伝子発現効率の向上と相関して細胞増殖能抑制効果が増加した。

結 論

多重膜陽電荷リボソームを用いたヒト DNase- γ の遺伝子導入は、ヒト神経膠腫細胞に対して細胞増殖抑制効果を発揮した。この機序は強制発現した DNase- γ が活性型酵素として DNA の断片化を引き起こすことによるアポトーシス細胞死であることが確認された。

研究の意義, 独創的な点

本研究においてアポトーシス経路の最終段階と考えられる DNA エンドヌクレアーゼの遺伝子導入によってヒト神経膠腫細胞にアポトーシスを誘導できることが示され、神経膠腫を含めてアポトーシス耐性機序を有する様々な悪性腫瘍の治療においてこの方法が有用であることが示唆された点に研究の意義があると考えられる。

審査結果の要旨

脳腫瘍の研究においては、薬剤に対する感受性を左右する分子生物学的機序の解明が注目されている。さらに、そこで得られた知見をもとにして、薬剤抵抗性を克服する試みは非常に重要である。本論文は神経膠腫の治療にひろく用いられているインターフェロン β タンパクに対する神経膠腫細胞の感受性を左右する細胞内機序から得られた知見を背景として、そこで感受性を左右する重要な分子の1つと考えられたDNAエンドヌクレアーゼ(DNase- γ)の遺伝子導入による強制過剰発現が神経膠腫細胞に与える影響について検討し、さらにはDNase- γ が神経膠腫細胞にアポトーシスを誘導する遺伝子治療に応用できるかを検討した基礎研究である。

DNase- γ はアポトーシスの最終段階に関与すると考えられているDNAエンドヌクレアーゼのひとつであり、まだ正確には解明されていないものの、アポトーシス刺激を受けて活性化され、細胞のヌクレオソームDNAを断片化する酵素である。インターフェロン β が誘導する神経膠腫細胞のアポトーシスにおいて、感受性細胞でこの酵素の活性化が認められた。一方で、アポトーシス抵抗性を示す細胞の一部で実行カスパーゼ(カスパーゼ7)の活性化とカスパーゼ基質(PARP(ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ))の分解を認めながら、DNase- γ の活性化を認めず、ヌクレオソームDNAの断片化も起こさない細胞の存在が認められ、神経膠腫細胞のアポトーシスにおけるDNase- γ 活性化の重要性が示唆された。本研究では、神経膠腫細胞に陽電荷リポソームを用いたリポフェクション法を用いてDNase- γ 遺伝子を導入し、強制過剰発現されたDNase- γ が活性化し、神経膠腫細胞にアポトーシスを誘導できることを示している。様々なアポトーシス誘導刺激に対してもDNA断片化を起こし難い神経膠腫瘍細胞においてDNase- γ の遺伝子導入による強制活性化がヌクレオソームDNAの断片化を誘導し得ることは、アポトーシスにおけるDNase- γ の重要性を示唆しており、非常に意義深い。

治療への応用を考えた際に欠点となる遺伝子導入効率に関しても反復投与により克服できる可能性を示している。DNAエンドヌクレアーゼの活性化は、細胞のアポトーシスにおける最終段階と考えられており、DNase- γ 遺伝子導入によりアポトーシスを誘導できることは、様々なアポトーシス抵抗性機序を有することが知られている神経膠腫にも有効な治療法となり得る可能性を示唆している。

すでに確立された神経膠腫細胞株を用い、遺伝子導入後の強制過剰発現の確認、その過剰発現したタンパクの活性化の確認、機能(ヌクレオソームDNAの断片化、抗腫瘍効果)の確認、また細胞死の形態変化の観察を一般的な研究手法により行っており、対象、方法とも妥当である。適切な考察もなされており、学位論文に相当すると考える。