

学) 学位論文に十分値すると判断された。

|              |   |
|--------------|---|
| 氏 名          | いけ だ まさと<br>池 田 昌 人                               |
| 学位の種類        | 博 士 (医学)  |
| 学位記番号        | 医 第 8 7 9 号                                       |
| 学位授与の日付      | 平 成 18 年 3 月 22 日                                 |
| 学位授与の要件      | 学位規則第 4 条第 1 項該当                                  |
| 学位論文題目       | 肺癌細胞株におけるultraviolet C照射時のsurvivin発現調節機構とその生物学的役割 |
| 論文審査委員 (主 査) | 教 授 福 岡 正 博                                       |
| (副主査)        | 教 授 重 吉 康 史                                       |
| (副主査)        | 教 授 西 村 恭 昌                                       |

## 論文内容の要旨

### 【目的】

survivin はアポトーシス阻害蛋白の一つで、肺癌など多くの癌種において予後不良因子である。また p53 は癌抑制遺伝子で、細胞傷害により活性化されアポトーシスに関与する。今回、我々は肺癌細胞株での UVC 照射時の survivin 発現調節機構とその生物学的役割を調べるために野生型 p53 を有する肺癌細胞株 A549 を用いて UVC 照射時の細胞増殖抑制、細胞周期および蛋白の変動について検討した。さらに siRNA を用いて survivin を阻害することの細胞増殖と細胞周期について検討した。

### 【方法】

肺癌細胞株 A549 に UVC を照射し、細胞増殖抑制と細胞周期の経時的变化を調べた。また、その時の p53, survivin, cdc2, cdc25C, caspase-3 の発現の経時的な変動を Western-Blotting 法を用いて観察した。また siRNA を用いて p53 を阻害し、UVC 照射時の survivin 発現量の変化を Western-Blotting 法により評価した。siRNA を用いて survivin 発現を抑制し、経時的な細胞増殖抑制と細胞周期の経時的变化を調べた。

### 【結果】

UVC 照射 48 時間後より細胞増殖は有意に抑制され、G2/M 期で細胞周期停止が認められた。UVC 照射後 p53 の発現誘導が起こり、その後 survivin の発現は低下したが、cdc2, cdc25C, caspase-3 の発現の変化は認められなかった。siRNA を用いて p53 を阻害すると survivin の発現低下は抑制された。siRNA を用いた survivin 阻害は、細胞増殖を有意に抑制し、G2/M 期で細胞周期停止が認められた。

### 【考察】

A549 に UVC を照射すると細胞増殖が抑制されるが、それは G2/M 期での細胞周期停止による。その時に p53 の発現誘導が起こり、survivin の発現を抑制した。また siRNA による p53 阻害が survivin の発現を高めた。すなわち survivin は p53 経路の下流に存在し、p53 により負の発現調節をされていると考えられる。さらに siRNA による survivin 阻害は細胞増殖抑制を招くが、それは G2/M 期での細胞周期停止を促すことで細胞の増殖を抑制すると考えられる。以上より、UVC 照射後の p53 を介した survivin の低下は、UVC 照射後の G2/M 期への細胞の集積の機序の一つであると考えられる。

### 【結論】

A549 において、UVC 照射後の p53 を介した survivin の低下は、UVC 照射後の G2/M 期への細胞の集積の機序の一つであると考えられる。

|           |                  |                                   |
|-----------|------------------|-----------------------------------|
| 博士論文の印刷公表 | 公 表 年 月 日        | 出版物の種類及び名称                        |
|           | 平成 17 年 月 日 公表予定 | 出版物名<br>近畿大学医学会雑誌<br>第 30 巻 第 2 号 |
|           | 公 表 内 容          | 平成 17 年 月 日 発行予定                  |
|           | 全 文              |                                   |

## 論文審査結果の要旨

survivin は IAP(Inhibitor of Apoptosis Protein、アポトーシス阻害蛋白)family の一つであり、種々の癌細胞、癌組織において特異的に発現している。また survivin の過剰発現は肺癌や胃癌などにおいて予後不良因子とされている。survivin はアポトーシス経路の下流にある caspase 3 や caspase 7 と結合し、その活性化を阻害している。また survivin の発現は細胞周期に依存しており、すなわち G2/M 期において発現量が高まり、微小管との結合により細胞分裂の進行を安定化している。一方 p53 は癌抑制遺伝子の一つであり、癌細胞では高頻度に変異している。この p53 の重要な役割の一部として、DNA の障害に応じて遺伝子の修復因子を発現することや、アポトーシスの誘導が挙げられる。一般に p53 は転写因子として種々の遺伝子の発現を増多させることにより、細胞増殖や細胞死を調整している。

近年、p53 が survivin の発現を抑制することが示唆されているが、その機序や様々な細胞傷害時の survivin の発現調節機序については未だ十分に解明されておらず、さらなる研究が求められている。本研究では、ultraviolet C (UVC) を利用して、それらについて検討を行った。

#### 方法

実験 1、UVC 照射による細胞増殖抑制の経時的変化について調べるため、肺癌細胞株 A549 に対し、EC<sub>50</sub> 相当線量(30J/m<sup>2</sup>)の UVC を照射し、UVC 照射後 0、6、18、24、48、72 時間後の生細胞数を測定した。またその時の細胞周期の変動をフローサイトメトリーを用いて観察した。

実験 2、UVC 照射後 0、6、18、24、48、72 時間後の細胞を回収し、p53 蛋白、survivin 蛋白、caspase-3 蛋白の発現量を Western-Blotting 法により解析した。

実験 3、肺癌細胞株 A549 に対し、siRNA 法を用いて p53 の発現を阻害した。siRNA 導入後に EC<sub>50</sub> 相当線量(30J/m<sup>2</sup>)の UVC を照射し、UVC 照射後 0、18、72 時間後の細胞を回収し、p53 蛋白、survivin 蛋白の発現について Western-Blotting 法により解析した。

実験 4、肺癌細胞株 A549 に対し、siRNA 法により survivin の発現を阻害した。survivin 蛋白の発現量を Western-Blotting 法により解析し、生細胞数を数えることで細胞増殖を評価した。またその時の細胞周期の変動をフローサイトメトリーを用いて観察した。

#### 結果

実験 1、UVC 照射後 48 時間後に非照射群の約 70% (p<0.05)、72 時間後には約 60% (p<0.05) の細胞増殖抑制が認められた。細胞周期の変動をフローサイトメトリーを用いて観察すると、UVC 照射群と非照射群ではアポトーシス細胞の割合に差を認めなかったが、UVC 照射群において G2/M 期の細胞の割合が有意に増加した。

実験 2、UVC 照射後 6 時間後より p53 の発現誘導がもたらされ、24 時間後に最大となった。さらに survivin は 48 時間後すなわち p53 の活性化後に減少し始めた。caspase-3 については有意な変化は観察されなかった。

実験 3、コントロール群では p53 蛋白の発現は認められたものの、siRNA 導入 UVC 照射後 18 時間で p53 を標的とする siRNA 導入群において p53 蛋白の発現は完全に抑制された。survivin 蛋白はコントロール群で UVC 照射後 72 時間で発現は低下したが、p53 を標的とする siRNA 導入群ではその発現の低下は認められなかった。

実験 4、survivin を標的とする siRNA の導入群では survivin の発現量はコントロール群に比して減少した。さらにこれらの生細胞数を確認すると、導入後 48 時間で survivin 標的とする siRNA 導入群でコントロール群の約 60% (p<0.05)、72 時間後では約 70% (p<0.05) の細胞増殖抑制が認められた。細胞周期の変動をフローサイトメトリーを用いて観察すると、survivin 標的とする siRNA 導入群では、コントロール群と比較して、siRNA の導入 48 時間後より G2/M 期の集積が認められた。一方、何れの群においてもアポトーシス細胞の増加は認められなかった。

#### 考察

本研究において、野生型 p53 を有する肺癌細胞株 A549 に UVC を照射すると細胞増殖が抑制され、細胞周期の検討では細胞死は認められず、G2/M 期の細胞が増加した。また、蛋白発現の検討では p53 の発現誘導及び survivin の発現抑制が観察された。我々は p53 を標的とする siRNA の導入を用い、UVC 照射後の

p53 の発現誘導を完全に抑制した.そのような状況において、UVC 照射による survivin 発現低下が認められないことより、p53 発現誘導に依存して survivin 発現が低下することを明らかにした.p53 による survivin 発現抑制の機序についての詳細は不明であるが、過去の報告において、p53 が survivin 遺伝子のプロモーターに結合することにより、転写抑制が起こり、結果として survivin の発現が抑制されることが示唆されている。

また UVC 照射後の survivin 発現低下の生物学的意義を検討するために、siRNA を用いて survivin 発現を阻害した.その結果、細胞増殖は抑制され、UVC 照射時と同様に G2/M 期で細胞周期が集積した.survivin は IAP の一つであり、その阻害によりアポトーシスが促進されると考えられたが、本研究では G2/M 期での細胞周期の集積が認められた.過去の報告において、survivin 発現を阻害すると細胞増殖抑制が起こるが、その原因として細胞周期の停止が原因である場合と、アポトーシスの誘導が強い場合がある.survivin の発現を抑制した時の細胞増殖抑制機序の違いについては不明であるが、使用する細胞株や実験系の違いによると考えられる。

近年、survivin が細胞分裂の調節に重要な役割を果たすリン酸化酵素(Aurora B kinase)と結合し、活性化することが報告されている.細胞分裂中期から終期にかけて survivin と Aurora B kinase は動原体から中心体にかけて集積している.siRNA により Aurora B kinase の発現を抑制すると、分裂後期の形態を呈する細胞や、細胞質分裂が阻害され膨化や多核化した細胞が多く認められ、survivin の発現を siRNA により抑制すると同様の形態変化が起こることや、分裂前期の

動原体にみられるはずの Aurora B kinase が消失することも報告されている.本研究での survivin 阻害時の細胞周期の停止の一因は survivin による細胞分裂不全の可能性もある.また p53 を有する細胞を siRNA を用いて survivin 発現を阻害すると、G2/M 期で細胞周期が停止するが、p53 を有しない細胞においては細胞周期の停止は減少し、多核細胞が増加するという報告がある.これより survivin による G2/M 期での細胞周期調節が p53 の下流にある可能性が示唆される.このことは survivin 発現阻害による G2/M 期での細胞集積が p53 発現誘導に依存することを支持するものである。

本研究では UVC 照射後の p53 を介した survivin 発現低下は UVC 照射後の G2/M 期への細胞集積の機序の一つであることを明らかにしている.このことは今後の癌治療において、survivin を標的とする治療と化学療法や放射線治療の併用療法の可能性を導き出したものであり、学位論文として価値ある研究と判断した。