

谷 政治 論文内容の要旨

Hammerhead Ribozyme against γ -Glutamylcysteine Synthetase Attenuates Resistance to Ionizing Radiation and Cisplatin in Human T98G Glioblastoma Cells

抗 γ -Glutamylcysteine Synthetase ハンマーヘッド型リボザイムはヒト神経膠芽腫細胞株 T98G における放射線およびシスプラチン耐性を減じる。

谷政治、後藤信治、鎌田健作、森勝春、浦田芳重、井原義人、鬼島宏、上山義人、柴田尚武、近藤宇史

Japanese Journal of Cancer Research 93:716-722, June 2002

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻
(指導教授：永田 泉教授)

【はじめに】Glioblastoma は放射線および化学療法に対する耐性を示す中枢神経系悪性腫瘍のひとつである。以前より glioblastoma ではグルタチオン (γ -glutamylcysteinylglycine, GSH)が高いことが知られている。GSH は抗癌剤により誘導される酸化ストレスの消去や抗癌剤の GSH 抱合を介した解毒作用があるとされている。GSH は γ -GCS (律速酵素)と GSH synthetase の 2 酵素の働きで合成される。Glioblastoma は放射線照射によって γ -GCS の発現が誘導されて GSH 量が増すことが報告されている。その他、Cisplatin(CDDP)や doxorubicin 等の抗癌剤に耐性を示す悪性腫瘍細胞でも γ -GCS の発現上昇が報告されており、GSH が放射線耐性と抗癌剤耐性の獲得機構に関与することが示唆されている。

リボザイムは特定の RNA 分子を相補鎖で認識し切断する機能を持つ。今回、 γ -GCS 重鎖 (γ -GCS_H)に対するハンマーヘッド型リボザイムを作製し T98G 内の γ -GCS_H の遺伝子発現を恒常的に抑制することを試み、そのリボザイム導入で放射線および CDDP 感受性がどのように変化するかを検討した。

【方法】細胞株はヒト神経膠芽腫細胞株 T98G を用いた。ハンマーヘッド型リボザイムは γ -GCS_H mRNA 塩基配列の 350 番目にあたる GUU の 3 側で切断するように設計したものを pH plasmid に組み込んだ。これをリポフェクションで T98G にトランスフェクトさせ、G418 を 500 μ g/ml 混じた DMEM 培地で 4 週間継代してコロニーをピックアップした。対照としてリボザイム活性中心の 1 塩基のみ変異させたものを同様の手法で作製(disabled ribozyme)、コロニーをピックアップした。 γ -GCS_H mRNA の発現は特異的プライマーを用いて RT-PCR

で評価し、GSH量は酵素リサイクリング法により定量した。

細胞傷害の定量は96穴プレートに1穴あたり1500個の細胞を蒔きMTT assayにて行った。放射線は放射線発生装置(Toshiba EXS-300)を用いて室温でプレート全面に放射線を照射し、照射後0、1、3、5、7日目の細胞を実験に用いた。CDDPは各濃度で暴露し、72時間後に定量を行った。

細胞周期の分析はFACScan flow cytometer(Becton Dickinson, Mansfield, MA)を用いて行った。

【結果】リボザイム導入 T98G 細胞ではコントロールに比べ γ -GCSH mRNA の発現、GSH 量ともに有意に減少し、MTT assay による細胞増加率も有意に低下していた。放射線 10Gy 照射ではリボザイム導入細胞の細胞増加率はコントロールと比べ低下が顕著であった。細胞周期の解析ではリボザイム導入細胞において G0/G1 期の分布が高かった。CDDP 暴露時もしリボザイム導入細胞ではコントロールに比べ有意に細胞増加率が抑制された。

【考察】抗 γ -GCSH リボザイムを導入することによって、glioblastoma 細胞株で放射線感受性が増加したことは、放射線照射で生じる OH \cdot などの活性酸素種を消去する GSH の働きを減少させたことによると考えられる。GSH の特異的な拮抗剤である buthionine sulfoximine(BSO)で処理した T98G 細胞に放射線照射を行うと NF- κ B を介した γ -GCSH の誘導をきたすことが報告されている。これは BSO 処理を行うと GSH により抑制されていた NF- κ B の DNA 結合活性が増すことによると考えられる。このように GSH による転写因子およびシグナル伝達のレドックス制御も放射線感受性を規定する因子であろうと予想される。

CDDP 解毒の機序に GSH と CDDP の複合体が形成され細胞外に排出されることや、核 DNA と CDDP との cross linking を防御する働きがあることからもしリボザイムによる選択的 γ -GCSH の発現抑制が CDDP の細胞毒性を高めたものと思われる。

抗 γ -GCSH ハンマーヘッド型リボザイムを用いて T98G 細胞で γ -GCSH の遺伝子発現および GSH 合成を恒常的に抑制することで、放射線および CDDP 耐性を減じる効果が見られることを示した。これは GSH が放射線や CDDP による細胞傷害に対する防御に関わっていることを示すものである。