

平尾朋仁 論文内容の要旨

主論文

Dehydroepiandrosterone augments sensitivity to γ -ray irradiation in human H4 neuroglioma cells through down-regulation of Akt signaling

(性ホルモン DHEA はヒト神経膠腫 H4 細胞で Akt シグナルを介して放射線感受性を増加させる)

平尾朋仁、浦田芳重、陰山寛、池崎みどり、川勝美穂、松瀬美智子、松尾孝之、秋下雅弘、永田泉、近藤宇史
(**Free Radical Research**, 42:957-965, 2008)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(指導教授：近藤宇史 教授)

[緒言]

Dehydroepiandrosterone (DHEA)が酸化ストレスによる細胞傷害を防御する働きがあることや、血中に高濃度に存在して Estradiol などの他の性ホルモンとは関係せずに抗老化に働くことが知られている。しかし、その分子機構は不明であり、放射線による酸化ストレス傷害に及ぼす影響についても不明である。多くのストレスや受容体を介した情報伝達は、細胞内の酸化還元（レドックス）状態によって制御されること、その制御に thioredoxin family が重要であること、レドックス制御は受容体、シグナル伝達因子、更にタンパク質脱リン酸化酵素 2A(PP2A) などの Cys 残基を標的にしていることが明らかにされてきている。本研究では、ヒト神経膠腫 H4 細胞株を用いて放射線照射によってもたらされる細胞内情報伝達機構に及ぼす DHEA の働きを詳細に検討することを目的とした。DHEA が PP2A のレドックス調節を介して放射線感受性を増加させる機構を明らかにしたので報告する。

[対象と方法]

- 1) 細胞株：ヒト脳神経組織由来の神経膠腫 H4 細胞を用い、10% FBS を含む DMEM 中で培養し、実験 24 時間前に FBS を 0.5%にした。
- 2) 細胞数と細胞増殖：18 時間前に 200 nM DHEA で処理した細胞に 3 -Gy の γ -線を照射した。細胞数は Nucleo counter で、apoptosis は TUNNEL アッセイで各々測定した。
- 3) 細胞周期の解析: Cell Cycle software を用いて Flow Cytometer で測定した。

- 4) 免疫学的測定：タンパクを SDS-PAGE で展開後、ニトロセルロース膜に移し immunoblot 法で測定した。
- 5) PP2A 活性：Ser/Thr phosphatase assay を分光光度法で測定した。
- 6) 定量 RT-PCR: グルタチオン合成の律速酵素 γ -glutamylcysteine synthetase (GCS) 重鎖の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法で解析した。GCS の 546-bp nucleotide と β -actin の 404-bp nucleotide を合成して測定に用いた。

[結果]

- 1) γ -線照射に反応して上昇する Akt の Ser473 リン酸化が、DHEA で前処理した細胞では抑制された。Akt シグナルの下流に存在して Akt によって負の制御を受ける p21^{walfl} の発現は上昇した。Akt によって正の制御を受ける Rb のリン酸化は減少した。P53 のタンパクレベルとリン酸化には変化が認められなかった。
- 2) DHEA は放射線に対する apoptosis を増加させた。細胞周期では、DHEA は G₂/M arrest を生じた。
- 3) DHEA は Akt の脱リン酸化に働く PP2A 活性を上昇させた。PP2A タンパク発現の変動は認められなかった。
- 4) DHEA は GCS の遺伝子発現を増加させた。この結果細胞内の GSH/GSSG 比が上昇し還元型（活性型）PP2A が維持されることが認められた。

[考察]

放射線照射に対して細胞の生存と抗 apoptosis に働く Akt シグナルの重要性は知られている。本研究では DHEA によって放射線照射に反応する Akt シグナルが抑制されることを初めて明らかにした。PP2A は種々の kinase に働くことが知られているが、Akt の脱リン酸化はこの PP2A によってのみ引き起こされる。このことより、DHEA が γ -線照射に対して細胞生存に働く Akt の PP2A による脱リン酸化を介して放射線感受性増加に作用すると考えられた。PP2A は触媒部位を有する c-subunit (PP2Ac) のほか、Scaffold subunit と Regulatory subunit からなる。このうち PP2Ac のレドックス状態がカルシウムイオンなどで制御されていることが明らかにされている。本研究では、DHEA が PP2c を還元型に維持することによって活性を維持することを見出した。

P21^{walfl} や Rb は細胞周期を制御する重要な因子である。DHEA が放射線照射後 p53 非依存性に p21^{walfl} の発現を上昇させ、Rb リン酸化を減少させて G₂/M 期の cell cycle arrest を引き起こしたことからも、DHEA が Akt シグナルに負の制御に働くことが放射線感受性の重要な制御機構であることを示している。更に、今回これらの DHEA の働きが GSH 依存性レドックスシステムに働く遺伝子の発現上昇によるものであることを明らかにした。これらの結果は腫瘍細胞の増殖や癌化を回避するように働く DHEA の意義を示したものであると考えられる。