

奥永 知宏 論文内容の要旨

主 論 文

Calreticulin, a Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum, Modulates
Radiosensitivity of Human Glioblastoma U251MG Cells

(分子シャペロン・カルレティキュリンの放射線感受性制御機構に関する検討)

(Cancer Research 66:8662-8671, 2006)

奥永知宏、 浦田芳重、 後藤信治、 松尾孝之、 溝田新吾、
堤 圭介、 永田 泉、 近藤宇史、 井原義人

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：永田 泉教授)

【緒 言】

Glioblastoma は放射線および化学療法に耐性を示す中枢神経系悪性腫瘍の一つである。近年定位放射線治療などの新たな技術の出現でその治療効果は上昇してきているが、依然完全なる腫瘍制御には至っていない。このように放射線治療は脳腫瘍治療の重要な戦略の一つであるが、その細胞障害の分子機構の解明は放射線生物学においても重要な課題である。放射線による細胞障害の分子機構の一つに、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの破綻を介したアポトーシスの誘導機構が示唆されている。本研究では、小胞体(ER)の分子シャペロンで Ca^{2+} 結合タンパクでもあるカルレティキュリン(CRT)の発現レベルの放射線感受性に対する影響を明らかとし、更に CRT がその制御にどう関わるのか、細胞生存シグナルと Ca^{2+} 代謝制御の観点から、その分子機構について解析を試みた。

【材料と方法】

Human Glioblastoma 細胞(U251MG, T98G)、Human Glioma 細胞(H4)は American Type Culture Collection から入手した。CRT 遺伝子高発現細胞株は、マウス CRT 遺伝子発現ベクターを U251MG に導入し、G418 耐性細胞をスクリーニング、モノクローン化することにより樹立した(CRT-M5, M6)。放射線照射は 線を用い、総線量 0-10Gy 照射後の細胞について解析した。細胞内のタンパク質やリン酸化タンパク質の発現量は特異抗体を用いたイムノプロット法により解析した。放射線感受性は Colony Forming Assay により解析した。放射線誘導性アポトーシスは TUNEL 法により、フローサイトメーターで解析した。細胞への Ca^{2+} の取り込みは $^{45}Ca^{2+}$ の細胞内取り込みをシンチレーションカウンターで測定した。細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度は Fura-2-AM を細胞内へ導入後、

2 波長測定仕様の蛍光分光光度計により蛍光強度を測定し、データ解析ソフトを用いて解析した。

【結 果】

- 1) Glioblastoma 細胞株と Glioma 細胞株における CRT 発現レベルの検討；Glioblastoma 細胞株での発現が Glioma 細胞株に比べ、相対的に抑制されていた。一方でカルネキシン(CNX)の発現量には差異が見られなかった。
- 2) CRT 高発現 U251MG 株の作成と放射線感受性の検討；放射線感受性と CRT 発現レベルの関係を検討するため、CRT 遺伝子を定常的に高発現する U251MG 株を樹立した。高発現株では、コロニー形成率の低下が観察され、CRT 高発現は放射線感受性を増強することが明らかとなった。
- 3) 放射線照射の細胞生存シグナル Akt キナーゼ経路への影響に関する解析；コントロールでは照射後 3 時間で Akt のリン酸化が見られたが、CRT 高発現株では Akt のリン酸化が抑制されていた。
- 4) CRT 高発現株における PP2A の活性と発現量；Akt の脱リン酸化と失活に関わる Protein phosphatase 2A(PP2A)の放射線照射前後の活性を測定した。放射線照射により、PP2A 活性は減少するものの、CRT 高発現株はコントロールに比べて活性値を相対的に高値で保っていた。また PP2A の活性触媒サブユニットである PP2Ac の転写レベルの増加が認められた。
- 5) CRT 高発現の Ca^{2+} ホメオスタシスへの影響；放射線照射後の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 $[Ca^{2+}]_i$ の変化をコントロールと CRT 高発現細胞で解析した。放射線照射により、両者とも明らかに $[Ca^{2+}]_i$ の一過性増加が見られたが、CRT 高発現細胞では明らかに $[Ca^{2+}]_i$ のレベルの上昇が見られた。
- 6) CRT 高発現 U251MG 株における PP2A 遺伝子発現の Ca^{2+} 依存性制御；CRT 高発現細胞における PP2Ac 遺伝子の発現誘導について、PP2Ac 遺伝子プロモーター活性をコントロールと CRT 高発現株で測定した。PP2Ac 遺伝子プロモーターのうち全長と c-AMP response element(CRE)を含む断片を挿入したリポーターベクター、及び CRE サイトに変異を加えたものを作成し、これらのリポーター遺伝子を細胞に導入しプロモーター活性を測定した。その結果 CRT 高発現株における活性がコントロールに比べて増加していた。またこの導入細胞に Thapsigargin, 或いは BAPTA-AM で処理することでプロモーター活性にそれぞれ上昇、抑制が見られた。

【考 察】

放射線誘導性アポトーシスは p53 status, Bcl-2 family, caspase pathway など種々のメカニズムで制御されていることが知られている。また一方で放射線照射により細胞内の分子シャペロンの発現が誘導されることも以前より知られていた。しかし、その誘導の生理的意義と分子作用機構についてはあまり知られていない。

Glioblastoma 細胞株と Glioma 細胞株で CRT 発現量、放射線感受性が異なったこと、CRT 遺伝子を導入することで放射線感受性が増加したことは、CRT が放射線誘導性アポトーシスに関与していることを示している。

またその分子機構には、 Ca^{2+} ホメオスタシスへの影響を介した、PP2A 遺伝子の発現の増強と、その結果としての Akt シグナルの抑制が重要であることが分かった。

本知見は、放射線感受性制御機構の一つとして、ER シャペロンの発現バランスの変化を介した Akt シグナルの制御と言う新たな分子機構の存在を示唆するものと考えられる。