

氏名(国籍)	ミヨ ミン(ミャンマー)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2,142号		
学位授与年月日	平成11年3月25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	Time course for occurrence of radiation-induced apoptosis assessed with cell cycle progression analysis and its relationship to loss of clonogenicity. (細胞周期解析法により分析した放射線誘発アポトーシスの発生経過及びそのコロニー形成能喪失との関係)		
主査	筑波大学教授	医学博士	濱口秀夫
副査	筑波大学教授	医学博士	林英生
副査	筑波大学教授	博士(医学)	秋根康之
副査	筑波大学助教授	医学博士	長田道夫
副査	筑波大学教授	農学博士	倉園久生

論文の内容の要旨

(目的)

がんの放射線療法の原理は、電離放射線のがん細胞殺傷作用を最大限に活用することである。従来、電離放射線はDNA障害に基づく分裂死(mitotic death)をもたらすことが知られていた。分裂死は*in vitro*コロニー形成アッセイ(CFA, colony forming assay)によりコロニー形成能喪失として分析できる。一方、放射線がアポトーシスを誘発し、殺細胞作用を呈することも明らかになってきた。最近、アポトーシス分析による細胞の放射線感受性とCFAにより分析した放射線感受性との関係を調べた研究報告がなされている。しかし、リンパ球などのいわゆる放射線高感受性細胞を用いた短時間の観察結果の報告が多く、長時間にわたり細胞周期進行と関連づけた研究はほとんど行われていない。

本研究は、中等度感受性を示すとされる上皮性がん細胞を用いて電離放射線アポトーシスの発生経過を長時間分析し、放射線誘発アポトーシスの時間経過、アポトーシスとコロニー形成能喪失との関係、及びアポトーシスの時間経過と細胞周期進行との関係を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

使用したがん細胞は、株化ラット大腸腺がん細胞のACL-15細胞である。この細胞の細胞周期時間は21時間であった。放射線照射は γ 線を用い、*in vitro*の細胞培養系で行った。放射線照射細胞のアポトーシスは、蛍光色素Hoechst 33342及びpropidium iodide染色を用いた形態学的方法により分析した。細胞のクローン化の喪失はCFAにより分析した。細胞周期の進行はflow cytometry法により測定したDNA量の分布に基づいて分析した。

(結果と考察)

2Gy, 16Gy, 30Gyの放射線照射後に、アポトーシスを起していない細胞の割合を分析したところ、4時間後でそれぞれ0.98, 0.94, 0.94, 24時間後でそれぞれ0.95, 0.97, 0.92であった。168時間(7日)後ではその割合はそれぞれ0.83, 0.63, 0.52に減少していた。この結果は、放射線照射24時間以内に起こるアポトーシス(以下rapid apoptosisと呼ぶ)よりも、24時間後から7日までに起きるアポトーシス(以下delayed apoptosisと呼ぶ)の方が多ことを示している。

コロニー形成態からみた生存率は、2Gy照射で0.76, 16Gy照射で0.005, 30Gy照射で0.000であった。この結

果は、少なくとも ACL15細胞ではアポトーシスは細胞死の一部にしか関わっていないことを示している。一方、アポトーシスのデータとコロニー形成能のデータの比較から、2Gy 照射では delayed apoptosis の法が rapid apoptosis よりも細胞死により大きく寄与していることが示唆された。

アポトーシスを起こした細胞の DNA 量分布パターンの分析から、2Gy 照射細胞で最も多かったのは、照射 4 時間後で G₁ 期の細胞 40%、12 時間後で G₁ 期の細胞 48%、24 時間後でサブ G₁ 期の 38%、2 日後で G₂/M 期の細胞 79%、7 日後で G₁ 期の細胞 54% であった。一方、16Gy 照射細胞では、4 時間後で G₂/M 期の細胞 47%、12 時間後で G₂/M 期の細胞 43%、24 時間後でサブ G₁ 期の細胞 28%、2 日後では各細胞周期の phase にほぼ均等分布、4 日後でサブ G₁ 期の細胞 33%、7 日後でサブ G₁ 期の細胞 39% であった。これらの結果から、1 細胞周期の時間内で起こる放射線誘発アポトーシスは、低線量 (2Gy) の場合も高線量 (16Gy) の場合も間期細胞死 (interphase cell death) が多いことが示唆された。このタイプのアポトーシスは rapid interphase apoptosis と名づけることができる。また、低線量照射細胞では少なくとも 1 回細胞分裂を経た後に遅れてアポトーシスを起こす細胞が少なくないことが示唆された。このタイプのアポトーシスは delayed post-mitotic apoptosis とよぶことができる。一方、高線量照射により遅れて起こるアポトーシスは細胞分裂を伴わない間期細胞死が多いことが推察された。このタイプのアポトーシスは delayed interphase apoptosis と名づけることができる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

最近、電離放射線によって誘発される細胞のアポトーシスの研究報告が数多くなされている。しかし、放射線照射後長時間にわたり、細胞周期の進行とも関連づけてアポトーシスを分析した研究報告はほとんどない。本研究で筆者は、株化ラット大腸腺がん細胞に γ 線を照射して 7 日間アポトーシスと細胞周期進行との関係を分析し、さらにコロニー形成能を分析した。分析した細胞は 1 種類にすぎないが、ラット上皮性がん細胞 ALC-15 では、(1) 放射線照射後 24 時間以降 7 日までに起こるアポトーシスの方が 24 時間以内に起こるアポトーシスより多く、細胞死により大きく寄与していること、(2) しかしコロニー形成能喪失で示される細胞死におけるアポトーシスの割合は小さいこと、(3) 低線量または高線量照射後 24 時間以内に起こるアポトーシスの多くは細胞分裂を伴わない間期細胞死であるが、低線量照射後 4 日以降 7 日までに起こるアポトーシスは少なくとも 1 回の細胞分裂を経た post-mitotic apoptosis が多いことを記載し、放射線誘発アポトーシスにおける delayed apoptosis の重要性を示すとともに、delayed apoptosis には delayed interphase apoptosis と delayed post-mitotic apoptosis の 2 つのタイプが存在する可能性を示唆したことが評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。