

氏名(本籍)	つち だ ゆき ひろ 土 田 幸 広 (東 京 都)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 2377 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	培養ヒト神経膠芽細胞株に対する重イオン線の作用およびカフェインとインターフェロンの放射線増感作用に関する基礎的研究
主 査	筑波大学教授 博士(医学) 秋 根 康 之
副 査	筑波大学教授 医学博士 庄 司 進 一
副 査	筑波大学助教授 博士(医学) 大 原 潔
副 査	筑波大学助教授 医学博士 今 門 純 久

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

p53 statusの異なる培養ヒト神経膠芽腫細胞株に対する重イオン線(炭素線)の殺細胞効果を、従来用いられてきたコロニー形成法のみならず、より直接的な細胞死を評価すると考えられる色素排除法, lactate dehydrogenase release assay (LDH release assay) を用い多角的に評価することを目的とした。更に、カフェインあるいはインターフェロンベータ (IFN- β) のヒト神経膠芽腫細胞に対するガンマ線増感作用に関する研究も行った。

(対象と方法)

炭素線の効果に対してはヒト神経膠芽腫細胞株 A172, TK1 を用いた。炭素線照射は放射線医学総合研究所の Heavy Ion Medical Accelerator (HIMAC) により加速された 290MeV/u の炭素線により行った。用いた Linear Energy Transfer (LET) は 20, 40 および 80keV/ μ m である。増殖死はコロニー形成法にて評価した。色素排除法, LDH release assay は、10Gy 一回照射後下記のごとく行った。すなわち照射後 1, 4, 7 日目に培養フラスコに付着している細胞をトリプシン処理にてはがし、培養液中の浮遊細胞とともに遠心機を使用し集め、エリスロシン B にて染色し血球計算板で全細胞数及び染色された細胞数を算出し Cell Death Index (CDI) を求めた。LDH release assay は照射後 1, 4, 7 日目に培養上清中野 LDH 活性を市販のキット(極東製薬工業)を用い測定した。アポトーシスの検出には細胞を 2% グルタルアルデヒドで 1 晩以上固定した後、ヘキスト 33342 で染色し、蛍光顕微鏡にて行い、全細胞数に対するアポトーシス細胞の割合を求めた (Apoptosis Index ; AI)。ガンマ線 10Gy 照射後同様の実験を比較実験として行った。次にカフェインのガンマ線増感作用を見るために、A172, TK1, U251MG を用い以下に示した実験を行った。ガンマ線照射後直ちに培地をカフェインを 5 mM を含む培地と交換し更に培養を続けた。カフェインとともに培養後 3 日および 7 日目に色素排除法と、ヘキスト 33342 染色による核の形態学的観察を行った。アポトーシスの有無の評価には DNA 電気泳動によるラダー検出を試みた。カフェイン添加後の細胞周期の変化は flow cytometry を用い解析した。コロニー形成法は標準的な方法を用いた。更に、IFN- β の放射線増感作用を見るために A172, TK1, U87MG, U373MG を対象としてコロニー形成法を行い、IFN- β が細胞周期に及ぼす影響を見るために flow cytometry にて DNA histogram の解析を行った。ウェスタンブロット法により各細胞株での IFN receptor 蛋白の発現を解析した。

(結果)

コロニー形成法の結果、両細胞株において炭素線のガンマ線に対するrelative biological effectiveness (RBE)はLET依存性に上昇したが、この傾向はガンマ線に対して強い抵抗性を示すTK1においてより顕著であった。CDIは80keV/ μ m照射後7日目にA172で50.2%、TK1で37.5%と最大値を示した。LDH release assayの結果も80keV/ μ m照射後7日目にA172で4、TK1で3.1と最大値を示した。AIも同様にA172で7%、TK1で4%であった。またカフェインは3種類の細胞株に対し放射線増感作用を示した。DNA電気泳動の結果放射線照射とカフェインを併用されたものではDNA ladderが認められた。また、flow cytometryの結果、カフェイン添加により放射線照射後に起こるS及びG2/M期でのcheckpointが解除されることがわかった。更に、IFN- β はU87MG、U373MGに対し若干の放射線増感作用を示すことが認められた。IFN- β をくわえるとU87MG以外の細胞では、S期での細胞周期停止が認められた。IFN receptor 蛋白の発現は各細胞株間で大きな差は認められなかった。

(考察)

放射線照射後の細胞死の評価法としては従来コロニー形成法によるいわゆる増殖死による評価法が使われてきたが、臨床的に放射線治療の効果を評価する場合、腫瘍の消失あるいは縮小が必要であり、これは増殖死の評価のみでは判定不能と考えられる。そこで著者は、重イオン線の効果を評価するのにコロニー形成法のみではなく、色素排除法、LDH release assayによる細胞死の検出を試みた。これらの結果はすべて、LET依存性にアポトーシスを含めた細胞死が増加することを示しており、更に細胞株のp53 statusには関係なかった。したがって、従来より治療抵抗性とされてきた差異p53 statusには関係なかった。したがって、従来より治療抵抗性とされてきた変異p53を持つ腫瘍に対してもその効果が期待される。カフェインやIFN- β の放射線増感作用の機序に関しては未だに不明な点が多いが、少なくとも細胞周期制御機構の変化がその作用に重要な役割を持っていることが強く示唆された。

(結論)

神経膠芽腫に対する炭素線照射後の細胞死はLET依存性に上昇した。また、炭素線照射によりp53変異株に対してもアポトーシスが誘導された。重イオン線治療は今後悪性脳腫瘍の治療の一手段として重要な位置を占めると思われる。カフェインは用いたすべての細胞株に対して、IFN- β は細胞株特異性に放射線増感作用を示した。カフェインの放射線増感作用の機序として、p34^{cdc2}のリン酸化あるいはさらに上流のATMの直接抑制によるG2/M blockの解除や潜在的致命的損傷の増強などが考えられている。今後更にこれらの機序が解明され、腫瘍細胞に対してのみ放射線感受性をあげることができれば従来用いられているガンマ線あるいはX線の効果を更に強めうる事が期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は炭素線の神経膠芽腫に対する生物学的効果をいくつかの方法を用いて明らかにした。また、カフェインとIFN- β の放射線増感作用を細胞周期との関連で解明しようとしたものである。放射線療法は腫瘍細胞と正常細胞の両者への効果の差を利用するものである。著者が今後さらに腫瘍細胞のみならず正常細胞への効果についても研究を進め、難治悪性腫瘍である神経膠芽腫に対する治療研究の一翼を担う事を期待する。

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。