

氏名(本籍) 深見 忠輝(大分県)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 博士第490号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与年月日 平成17年3月25日

学位論文題目 Hyperthermia induces translocation of apoptosis-inducing factor(AIF) and apoptosis in human glioma cell lines

(ヒトグリオーマ細胞株に対する温熱刺激によるAIFの移行とアポトーシスの誘導について)

審査委員 主査 教授 佐藤 浩

副査 教授 清水 猛史

副査 教授 山本 学

## 論文内容要旨

※整理番号	494	(ふりがな) 氏名	みかみ たかてる 深見 忠輝
学位論文題目	HYPERTHERMIA INDUCES TRANSLOCATION OF APOPTOSIS-INDUCING FACTOR(AIF) AND APOPTOSIS IN HUMAN GLIOMA CELL LINES (ヒトグリオーマ細胞株に対する温熱刺激による AIF の移行とアポトーシスの誘導について)		
[研究目的]	AIF は caspase 非依存性にアポトーシスを生じる。ヒトグリオーマ細胞株に対する温熱刺激の効果の検証とともに、p53 非依存性にアポトーシスを誘導しうる AIF の関与の解明を目的として研究を行った。		
[研究方法]	<u>(細胞株及び温熱刺激方法)</u> ヒトグリオーマ細胞株として A172 (野生型 p53)、T98G,U251MG,YKG-1(変異型 p53)を用意。温熱刺激はウォーターバス内で、43℃、45℃、47℃各1時間行った。 <u>(Western blotting)</u> 温熱刺激後のp53、p21の動向、AIFのミトコンドリアから核への移行、cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への放出を分析。 <u>(Immunocytochemistry)</u> 温熱刺激後のAIF核移行細胞数の光学顕微鏡下での定量及びAIFの核移行の共焦点レーザー顕微鏡での観察。 <u>(Flow cytometry)</u> 温熱刺激後の Annexin-V/PI(propidium iodide)法を用いたアポトーシス細胞の定量。 <u>(細胞増殖分析)</u> 温熱刺激後の増殖曲線を作成。増殖率は同一細胞株のコントロール群との比で算出。 <u>(統計演算)</u> t-test を用いた。p<0.05 を有意とした。		
[結果]	<u>(Western blotting)</u> ①p53、p21 の発現に対する温熱刺激の影響：p53 蛋白及び p21 蛋白の発現の状況から、A172 は野生型 p53 遺伝子を、他の3細胞株は変異型 p53 遺伝子を有すことを確認。②AIF の核移行について：A172 で温度依存性の移行を確認。T98G と U251MG では、45℃以上の温熱刺激で温度依存性の顕著な移行を確認。YKG-1 では、47℃群のみで強く認めた。③cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への放出について：すべての細胞株で温度依存性に認めた。 <u>(Immunocytochemistry)</u> ①AIF 核移行細胞の定量：すべての細胞株で 45℃刺激まで温度依存性に陽性細胞は増加したが、47℃刺激では減少。47℃群の YKG-1 を除き、コントロール群と比べすべての温度群で優位に増加(p<0.05)。45℃群の T98G と U251MG、47℃群の T98G における陽性細胞は、A172 と比較し優位に増加 (p<0.05)。②共焦点レーザー顕微鏡による AIF 核移		

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

行の観察について：温熱刺激を加えたすべての細胞株で AIF の核移行を可視化。*(Flow cytometry)* アポトーシス細胞は、温度依存性に増加。特に 45°C 群の A172、T98G、U251MG と、47°C 群の A172、U251MG、YKG-1 では著明に増加。コントロール群と 43°C 群において、T98G は A172 と比較し、統計学的に少なかったが、45°C 群の U251MG は A172 と比べ統計学的に優位に多かった ( $p < 0.05$ )。ネクローシス細胞の割合も温度依存性に増加。*(細胞増殖分析)* A172 は 43°C 群で温熱 54 時間後より増殖を確認されたが、43°C 群の T98G、U251MG、YKG-1 は 30 時間後に増殖が確認された。45°C 群、47°C 群では、すべての細胞株で増殖は停止。コントロール群と比較し、すべての細胞株においてすべての時系列において増殖は抑制された ( $p < 0.05$ )。

#### [考察]

細胞増殖の検討における野生型 p53 を有する A172 と変異型 p53 を有する T98G、U251MG、YKG-1 の 43°C 刺激での増殖抑制の違いと、フローサイトメータ分析での、43°C 群での A172 ではコントロール群或いは T98G、U251MG、YKG-1 と比較し、アポトーシス細胞は増加しなかったという結果から、43°C 群での A172 の細胞増殖遅延は、一部野生型 p53 により誘導された p21 による細胞周期停止によると考えられた。フローサイトメータ分析から、45°C 以上の温熱刺激は変異型 p53 を有するグリオーマにもアポトーシスを誘導すると判明した。

免疫細胞化学的分析では、温熱刺激での AIF 核移行が p53 非依存性に生じたことを示唆し、変異型 p53 を有する細胞株種によっては、野生型 p53 を有する細胞株よりも AIF 核移行細胞が多くなることも認められた。

Western blotting での分析では、温度依存性に核分画内の AIF の増加を認めた。一方で免疫細胞化学的分析では、すべての細胞株の 47°C 群で AIF 核移行細胞の割合は減少した。この相反する結果は免疫細胞化学的分析での核の強染像を呈したものを陽性細胞とした定義のためと考えられる。47°C 群での AIF 核移行細胞の割合は過小評価した可能性がある。

ミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の温度依存性放出が認められ、AIF 核移行パターンと類似していた。AIF 関連のアポトーシス経路と cytochrome c 関連のアポトーシス経路の間には一部交差性があるとされる。AIF と cytochrome c に関する我々の western blotting の結果はこの考えを支持するものである。

#### [結果]

変異型 p53 を有する細胞株において、温熱刺激がミトコンドリアから核への AIF 移行を誘導することを明らかにした。また、AIF が一度核へ移行すると他の蛋白によってアポトーシスの発現は抑制できないとの報告があること、及びフローサイトメータ分析から、温熱刺激による AIF の核移行によりアポトーシスを生じることが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	494	氏名	深見 忠輝
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>野生型 p53 を有するグリオーマでは、温熱刺激により p53 依存性アポトーシスを生じることが報告されているが、変異型 p53 を有する場合、そのアポトーシス誘導経路は不明である。本研究は、p53 野生型ヒトグリオーマ細胞株として A172、p53 変異型ヒトグリオーマ細胞株として T98G,U251MG,YKG-1 を用い、様々な温度条件で温熱刺激を加え、結果生じてくる p53 非依存性アポトーシス経路としての AIF(apoptosis-inducing factor)の関与について検討したものである。</p> <p>その結果、変異型 p53 を有するヒトグリオーマ細胞株においても、温熱刺激は AIF の核への移行と、これに伴うアポトーシスを誘導することが示唆された。</p> <p>このように本論文は、p53 の状態に関わらず、温熱刺激がヒトグリオーマ細胞株に対して、AIF を介した経路でのアポトーシス誘導を起こしうることを初めて示唆したものである。この成果は変異型 p53 を有するグリオーマに対する既出の理論とは違った新たな治療戦略の可能性を示したものであり、博士(医学)の学位論文に値するものである。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成 17 年 2 月 2 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 17 年 2 月 9 日)			