

プロトンビーム照射後の増殖因子誘導における転写因子の寄与

Contribution of Transcriptional Regulator on the Expression of Growth Factors after the Irradiation of Proton Beams

畑下昌範^{*1}、高城啓一^{*1}、久米恭^{*2}、福田茂一^{*2}、松本英樹^{*3}

Masanori HATASHITA, Keiichi TAKAGI, Kyo KUME, Shigekazu FUKUDA and Hideki MATSUMOTO

Abstract

Growth factors play important roles in proliferation and differentiation, which is associated with tumor growth. Recent studies have shown that the p53 gene, one of the transcriptional regulators, is one of the factors for determining cellular radiosensitivity. Previously, we have reported that the cellular radiosensitivity of wild-type (wt) p53 cells was higher than that of p53-deficient or mutant (m) p53 cells. We have also found that the radiosensitivity of wtp53 tumors was higher than that of mp53 tumors. These findings suggest that the induction or suppression of growth factors due to a p53-dependent manner may contribute to the kinetics of tumor regrowth after irradiation. However, the correlation of p53 functions and the induction of growth factors by irradiation remains unclear. In the present study using human glioblastoma cells and human lung cancer cells, we analyzed the expressions of vascular endothelial growth factor and Thrombospondin-1 induced by proton beam irradiation.

要約

増殖因子は細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしている。最近の研究において、転写因子の一つである p53 が細胞の放射線感受性を決定する一つの因子であることが明らかにされた¹⁾。野生型の p53 を有する細胞の放射線感受性が p53 欠損細胞や変異型の p53 を有する細胞のそれに比べて高いことを報告した¹⁾。更に、移植腫瘍においても野生型 p53 腫瘍が変異型 p53 腫瘍よりも放射線感受性が高いことを見出した¹⁾。これらのことは放射線照射後の p53 に依存した増殖因子の誘導もしくは抑制がその後の細胞増殖に寄与している可能性を示唆している。しかし、p53 の機能と照射後の増殖因子の誘導との関係については依然として不明である。本研究ではヒト神経膠芽腫細胞及びヒト肺がん細胞を用いて、プロトンビーム照射後に起こる vascular endothelial growth factor 及び Thrombospondin-1 の転写レベルでの発現状態について検討した。

I. 緒言

放射線照射後の細胞増殖の動態は、放射線による直接的な致死効果と細胞が存在する微小環境に依存した間接的な致死効果の総和としてとらえることが出来る。細胞の増殖や分化に関わる増殖因子はこの微小環境に密接に関連している。増殖因子の一つである vascular endothelial growth factor は、細胞増殖や遊走、分化を刺激することが知られているが、最も重要な役割は血管新生であり、細胞増殖に必要な栄養や酸素を取り込む手段を与えている。一方、Thrombospondin-1 は血管新生阻害作用を有し、内皮細胞の増殖を抑制することが知られている。

p53 は転写因子の一つであり、DNA 修復や細胞周期制御、アポトーシスに深く関与していることが知られている。今までの研究から、野生型 p53 細胞は変異型 p53 細胞よりも放射線感受性が高く、照射時のアポトーシス誘発頻度が高いことが明らかになっている。半数以上の悪性腫瘍において、p53 遺伝子の変異や欠失が認められ

^{*1} 研究開発部・生物資源グループ、^{*2} 研究開発部・粒子線医療研究室、^{*3} 福井大学医学部

ており、p53 は細胞の増殖に深く関わっている。本研究では、p53 が照射後の上記増殖因子の誘導に関わっているのか否かについて検討を行った。

II. 方法

1. 細胞

野生型 p53 遺伝子を有するヒト神経膠芽腫細胞及び変異型 p53 遺伝子を有するヒト神経膠芽腫細胞を用いた。野生型 p53 遺伝子を有する非小細胞肺癌細胞及び変異型 p53 遺伝子を有する非小細胞肺癌細胞を用いた。

2. 照射実験

細胞を播種したフラスコに 200MeV のプロトンビームを 5Gy 照射した。

3. RNA 抽出

照射後 3, 6, 12 時間後の試料から RNeasy Mini Kit を用いて、各々 RNA を抽出した。対照として、非照射の試料からも RNA を抽出した。

4. 逆転写反応

Reverse transcriptase と random 6-mer を用いて、cDNA を合成した。

5. リアルタイム PCR

対象とする遺伝子は、vascular endothelial growth factor, Thrombospondin-1 でいずれも細胞の増殖促進や抑制に関わる遺伝子である。上記の cDNA に対し、各遺伝子毎に設定したプライマーと蛍光プローブを用いて、FastStart Universal Probe Master(ROX)により、PCR 反応を行った。ABI7700 シーケンスデテクターを用い、95 10 分の後に、95 15 秒-60 1 分を 40 サイクル行い、蛍光強度の時間変化を追った。段階希釈した標準試料による検量線から、未知試料の初期の cDNA 量を求めた。ハウスキーピング遺伝子 GAPDH の発現量をもとに、各遺伝子の発現量を規格化した。さらに野生型 p53 細胞での非照射時の発現量をもとに照射後の経時的な発現量の変化を相対値化した。

III. 結果

図 - 1 にヒト神経膠芽腫細胞に対し、プロトンビームを 5Gy 照射した後の vascular endothelial growth factor の発現パターンを示す。左図が野生型 p53 遺伝子を有する細胞の結果で、右図が変異型 p53 遺伝子を有する細胞の結果である。

定常状態における vascular endothelial growth factor の発現量は、変異型 p53 細胞の方が野生型 p53 細胞のそれを上回っていた。プロトン照射により、変異型 p53 細胞においては顕著な発現誘導が認められた。この発現誘導は照射後 12 時間後においても続いていた。

一方、野生型 p53 細胞においては vascular endothelial growth factor の発現誘

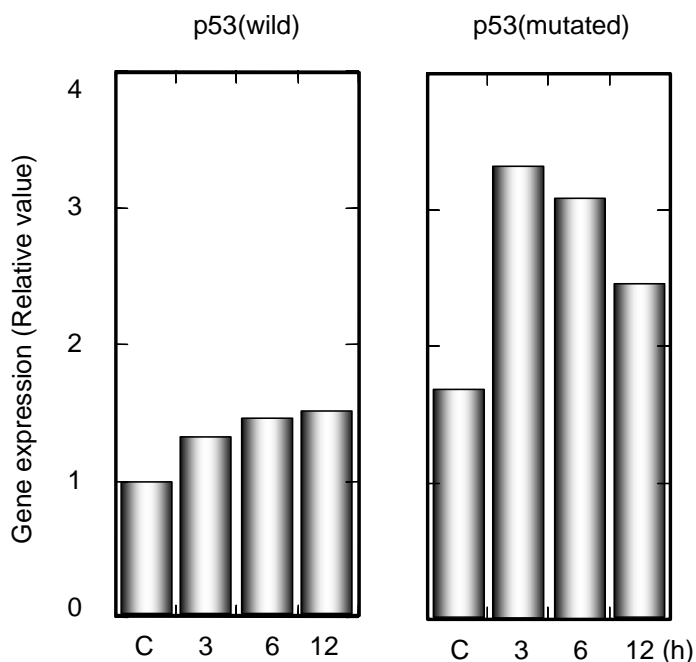


図 - 1 vascular endothelial growth factor の発現パターン

横軸は 5Gy のプロトンビームを照射した後の経過時間を表し、縦軸は野生型 p53 細胞での非照射時(C)の発現量を 1 としたときの相対発現量を示す

導は経過時間とともに漸増した。しかし、変異型 p53 細胞における定常状態における発現量程度までしか増加しなかった。

図 - 2 に非小細胞肺癌細胞に対し、プロトンビームを 5Gy 照射した後の Thrombospondin-1 の発現パターンを示す。左図が野生型 p53 遺伝子を有する細胞の結果で、右図が変異型 p53 遺伝子を有する細胞の結果である。

定常状態における Thrombospondin-1 の発現量は、野生型 p53 細胞及び変異型 p53 細胞ともほぼ同等であった。

プロトン照射により、野生型 p53 細胞においては顕著な発現誘導が認められた。この発現誘導は照射後 12 時間後においても続いていた。

一方、変異型 p53 細胞においては Thrombospondin-1 の発現誘導は照射による変化はほとんど見られなかった。

以上より、野生型 p53 細胞においては、照射により、増殖を促進する因子である vascular endothelial growth factor の発現誘導はあまり見られなかった一方、増殖を抑制する因子である Thrombospondin-1 の発現誘導は顕著に認められた。変異型 p53 細胞においては、照射により、vascular endothelial growth factor の発現誘導は顕著に認められた一方、Thrombospondin-1 の発現誘導はほとんど見られなかった。これらの結果は、プロトンビーム照射後の増殖因子誘導に転写因子である p53 が関与していることを示している。

結語

転写因子の一つである p53 が放射線照射後の増殖因子の誘導に関与しているか否かについて、野生型 p53 遺伝子を有する細胞及び変異型 p53 細胞を有する細胞を用いて、リアルタイム PCR 法を用いて解析した。プロトンビーム照射による増殖因子や増殖阻害因子の発現誘導に p53 依存的な制御が認められた。

参考文献

- 1) H. Matsumoto, A. Takahashi, X. Wang, K. Ohnishi, T. Ohnishi, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 38(5) (1997) 1089

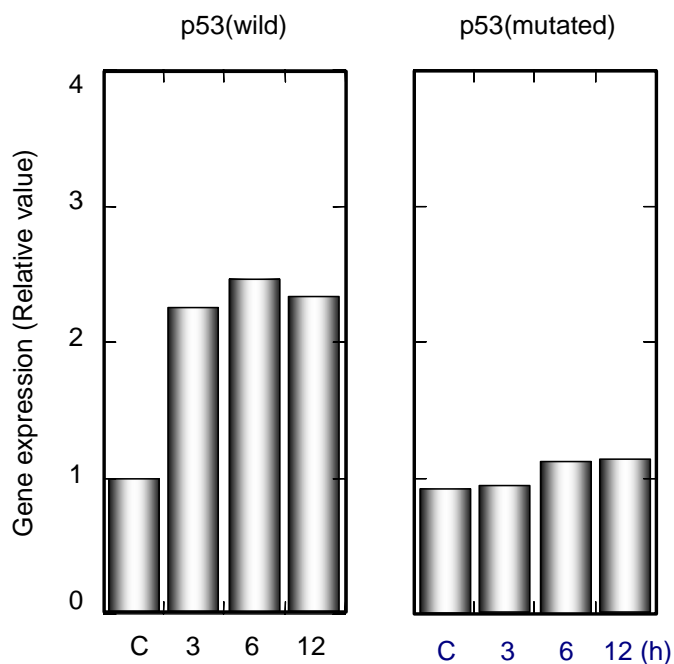


図 - 2 Thrombospondin-1 の発現パターン

横軸は5Gyのプロトンビームを照射した後の経過時間を表し、縦軸は野生型 p53 細胞での非照射時(C)の発現量を1としたときの相対発現量を示す