

Translocation of nuclear chromatin distribution to the periphery reflects dephosphorylated threonine-821/826 of the retinoblastoma protein (pRb) in T24 cells treated with Bacillus Calmette-Guérin

上原, 俊貴

<https://hdl.handle.net/2324/6787495>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (保健学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)

氏 名：上原 俊貴

論 文 名：Translocation of nuclear chromatin distribution to the periphery reflects dephosphorylated threonine-821/826 of the retinoblastoma protein (pRb) in T24 cells treated with Bacillus Calmette-Guérin

(Bacillus Calmette-Guérin を曝露した T24 細胞におけるクロマチンの核辺縁への移動は網膜芽細胞腫タンパク質 (pRb) のスレオニン 821/826 脱リン酸化を反映している)

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

序 論

膀胱がんは、世界で 10 番目に多いがんであり、日本では 13 番目に多いがんである。膀胱がんの症例の約 70% は、診断時に非筋層浸潤性膀胱がん (NMIBC) である。

NMIBC の経尿道的切除を行った後の標準的補助療法は、Bacillus Calmette-Guérin (BCG; Mycobacterium bovis の弱毒化生菌株) の膀胱内注入療法である。しかし、BCG 治療に反応しない膀胱がん患者群 (BCG unresponsive) が問題となっている。

尿細胞診は膀胱がんのスクリーニング、モニタリング、サーベイランスにおける非侵襲的、簡便かつ費用対効果の高い検査法であり、BCG 治療を含む NMIBC 治療後に再発のリスクが高い患者を検出する上で不可欠な検査法である。

尿細胞診における判定基準 (核クロマチンパターン等) は、悪性細胞の検出精度が高いことが示されているが、BCG 治療に対する治療効果判定基準はまだ知られていない。また、BCG 治療が膀胱がん細胞に作用する詳細な細胞学的メカニズムを明らかにする検討も報告されていない。

pRb は細胞周期制御や細胞増殖の維持に重要な役割を果たしており、過リン酸化により G1/S 移行として知られる制限点 (R point) の通過が制御されている。pRb と膀胱がんの予後との関係の報告はいくつかあるが、pRb リン酸化のレベルおよび／または部位については検討されていない。従って、BCG 曝露における核のクロマチンパターンと pRb リン酸化の状態との関係はほとんど理解されていない。本研究では、いくつかのがん細胞株を用いて、核クロマチンパターンと (i) 細胞増殖、(ii) BCG 曝露、(iii) pRb リン酸化の関係について検討した。

結 果

クロマチンパターンは細胞増殖状態を反映している可能性がある

目視にて分類した 4 つのクロマチンパターンと細胞増殖状態の関係を調べるために、増殖曲線、細胞周期解析、核形態について調べた。3 種類の細胞 (HeLa 細胞、TMCC-1 細胞、T24 細胞) の増殖の経過は類似しており、3~5 日目に指数関数的な増殖期、5~7 日目に増殖のピークを迎え、10 日目に完全に増殖能が消失した。

細胞周期解析では、7日目および10日目のG2M期比率は、HeLa(2.7%と0.0%)、TMCC-1(0.0%と0.4%)、T24(0.0%と0.3%)とほぼ0%であった。これらの結果から、7日目と10日目の細胞は、細胞周期から逸脱していたことが示唆された。

3つの細胞株のクロマチンパターンは類似していた。3-7日目の間、fineからmediumが優勢であった。coarseは、3-5日目にはfineやmediumに比べて有意に少なく、経過と共にcoarseが増加した。興味深いことに、peripheralは10日目にのみ出現した。これらの結果は、クロマチンパターンが細胞増殖状態の指標となる可能性を示唆するものであった。

2回目のBCG曝露により、T24細胞のクロマチン分布に変化が生じた

クロマチンパターンとBCG曝露の関係を調べるために、T24細胞をBCGに6回曝露したときのクロマチンパターンの指標となるRD値を求めた。

結果として、コントロール群ではほとんど変化がなかった一方で、BCG曝露群では、2回目曝露時のRD値は上昇し、この上昇は6回目曝露時まで続いた。

これらの結果は、T24細胞のBCG曝露が核クロマチンの分布に影響を与えたことを示唆している。興味深いことに、核クロマチンの分布の変化は、2回目のBCG曝露後に誘導されることが明らかとなった。

2回目のBCG曝露でpRb-T821/826の脱リン酸化が誘導された

BCG曝露回数とpRbのリン酸化の関係を調べるために、3種類の抗体を用いて、6回のBCG曝露におけるpRbの核内リン酸化の状態を調べた。pRbのC末端を標的とするpRb-total、G1期初期・中期を示すpRb-S780、G1期後期を示すpRb-T821/826を使用した。pRb-S780とpRb-T821/826は、pRbのC末端の領域に存在する。そこで、pRb-S780またはpRb-T821/826の発現の変化を評価するために、pRb-totalを用いてpRbの発現量も確認した。

結果として、pRb-totalとpRb-S780の陽性率に関して差はなかった。一方、BCG群のpRb-T821/826の発現は、2回目の曝露後減少した。この現象、いわゆる「脱リン酸化」は6回目のBCG曝露まで続いた。これより、pRb-T821/826の脱リン酸化は、BCG複数回曝露の影響を受けていることが示唆された。

以上の結果から、6回のBCG曝露におけるpRb-T821/826の脱リン酸化のダイナミズムは、クロマチン分布と逆になっていると推測した。

まとめ

今回の結果から、(i)パパニコロウ染色された細胞核のクロマチンパターンは細胞増殖と関係があること、また(ii) coarseクロマチンパターンやperipheralクロマチンパターンは細胞周期停止やアポトーシスの状態を示すことが示唆された。これらの結果は細胞診断に役立つと思われる。我々の知る限り、本研究はBCG曝露によるT24細胞のpRb-T821/826の脱リン酸化とクロマチン分布変化の関係を初めて明らかにしたものである。また、尿細胞診検体中の尿路上皮細胞の核内クロマチン分布の測定は、BCG治療効果の指標として有用である可能性が示唆された。