

8-メトキシソラレン+長波長紫外線のサイクリンA,B mRNAに対する影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9199

8-メトキシソラレン+長波長紫外線の サイクリンA, B mRNA に対する影響

金沢大学医学部医学科皮膚科学講座 (主任: 竹原和彦教授)
白 崎 文 朗

G1/S 期境界部に同調させた HeLa 細胞に対して 8-メトキシソラレン (8-methoxypsoralen, 8MOP) 添加後, 長波長紫外線 (long wavelength ultraviolet light, UVA) 照射 (PUVA) 1 回処置を行い, 細胞動態学的変動を検討した. 細胞動態学的指標として, フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) により測定された G2+M 期細胞の分画 (G2+M 分画) および G2+M 分画における M 期細胞の比率を用いた. さらに, 細胞周期において G2 期から M 期への進行を制御していると考えられているサイクリン A, B mRNA の発現量をノーザンブロット法を用いて経時的に測定した. 8MOP 添加も UVA 照射も行わなかった群 (無処置群), 8MOP を添加せず UVA 照射を行った群 (UVA 照射群) および 8MOP を添加し UVA 照射を行わなかった群 (8MOP 添加群) では, 7.5 時間後に G2+M 分画が最大となり, これにはほぼ一致してサイクリン A, B mRNA の発現量のピークが認められた. さらに 12 時間後には大部分の細胞が G1 期に移行し, 15 時間後までにはサイクリン A, B mRNA の発現量は 0 時間後のレベルにまで減少した. 一方, PUVA 1 回処置を行った群 (PUVA 処置群) では 27 時間後に G2 分画の割合が 60% を越え, その後 96 時間後までは大部分の細胞が G2 期にとどまっていたが, サイクリン A, B mRNA の発現量の増加は, 観察した時間内ではほとんど認められなかった. 得られた成績から, PUVA により生じた G2 蓄積には, サイクリン A および B の発現抑制が関与していることが示唆された.

Key words flow cytometry, PUVA therapy, epidermal cell kinetics, cyclin A, cyclin B

PUVA 療法は, 8-メトキシソラレン (8-methoxypsoralen, 8MOP) を内服あるいは外用後, 長波長紫外線 (long wavelength ultraviolet light, UVA) を照射する光化学療法の 1 つであり, 臨床的には表皮の増殖活性の亢進を特徴とする尋常性乾癬に有効な治療法として広く応用されている¹⁰⁾. それとともに PUVA の表皮細胞動態に及ぼす影響も実験的に研究され, 試験管内実験ならびに生体内実験の両者において, PUVA は正常表皮ケラチノサイトの DNA 合成と核分裂を抑制することが示されている⁹⁻¹¹⁾. 最近, PUVA 1 回照射後の非同調培養ヒト表皮ケラチノサイトにおける細胞動態学的変化について, フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) などの手技を用い検討され, その結果, PUVA 処置直後に細胞は G1 期で停止するが, G1 ブロック解除後部分的に同調した細胞集団が S 期に流入すること, さらに G2 期から M 期へ流入する細胞の減少により, G2 期における細胞蓄積を誘導し, このことにより細胞増殖が抑制されることが明らかにされた^{9,10)}. しかし, PUVA 処置による G2 蓄積の機序は充分解明されていない.

細胞周期の制御機構については, 近年生化学, 分子生物学的側面からの報告が増加している. 1983 年 Evans ら¹¹⁾ はウニの卵割周期に同調して合成と分解を繰り返すタンパク質を発見しサイクリンと命名した. その後現在までに A, B および数種類の G1 サイクリンが同定され, それぞれ細胞周期の異なった時期

に発現することが知られている. 特にサイクリン B は 1971 年に Masui ら¹²⁾ により減数分裂を誘導する活性としてカエル卵に見出されていた M 期促進因子 (M-phase promoting factor, MPF) の構成蛋白であることが明らかにされており, G2 期から M 期への進行を制御していると考えられている. またサイクリン A は, サイクリン B と比較してより細胞周期の早い時期に活性化されるが, 機能的にも M 期の開始だけではなく, S 期の開始にも関与していると考えられ, DNA の複製開始のシグナルや転写を制御する因子として働いていると考えられている¹³⁾.

そこで本研究では PUVA 処置後観察される G2 蓄積の起こる機序を解明するために, PUVA 1 回処置を同調 HeLa 細胞に行い, その後誘導される細胞動態およびサイクリン A, B mRNA 発現量の経時的変動について検討した.

材料および方法

1. 細胞培養および同調培養

1. 使用細胞とその培養条件

HeLa 細胞を 1 ディッシュ当たり 5.0×10^6 個の密度で, 直径 100mm の Falcon 組織培養ディッシュ (Becton Dickinson, Lincoln Park, U.S.A.) 内で分散培養した. 培養液には, 10% ウシ胎児血清 (I.C.N. Biomedicals, Costa Mesa, U.S.A.), 2mM グルタミン (大日本製薬, 東京), 100units/ml ペニシリン G

平成 7 年 12 月 11 日受付, 平成 8 年 1 月 29 日受理

Abbreviations: CV, coefficient of variation; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FCM, flow cytometry; 8MOP, 8-Methoxypsoralen; MOPS, morpholinopropanesulfonic acid; MPF, M-phase promoting factor; PBS, phosphate-buffered saline; UVA, long wavelength ultraviolet light

(Gibco, Grand Island, U.S.A.), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (Gibco) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) (コスモバイオ, 東京) を用いた。培養細胞は 5% 炭酸ガス通気の培養装置内において 37°C で培養した。

2. 同調培養

G1/S 期境界部での同調培養は, Heintz ら¹⁴⁾ の方法で行った。すなわち培養開始 2 日後, 培養液中に 2.5mM のチミジン (Sigma Chemical, St. Louis, U.S.A.) を加え, 12 時間培養した。DMEM で 3 回洗浄後, 通常の培養液で 16 時間培養を継続した後, DNA ポリメラーゼ α 特異的阻害剤であるアフジコリン (和光純薬, 大阪: 以下試薬類で特に記載のないものは当社の製品を用いた。) を 5 μ g/ml 加え, さらに 12 時間培養した。

II. PUVA 処置

アフジコリンを除いた後, PUVA 処置群は培養細胞を暗所において 1 μ g/ml 8MOP (Sigma chemical) 添加培養液に 37°C で 20 分浸漬したのち, UVA 0.4J/cm² を 1 回照射した。光源にはブラックランプ東芝 FL20S-BLB (波長領域 300~430nm, ピーク波長 352 \pm 5nm, 東芝, 東京) が 2 本並列した装置を使用した。照射時には波長 320nm 以下の中波長紫外線を完全に遮断するため紫外線透過フィルター UV-34 (HOYA, 東京) を使用し, ディッシュ下面より UVA を照射した。なお, 照射前に毎回紫外線強度計 UVR-305/365D 型 (東芝光学, 東京) で照射強度を検定した。

対照として, 8MOP 添加ならびに UVA 照射ともに行わなかった無処置群, UVA 照射のみを行い, 8MOP 添加を行わなかった UVA 照射群, 8MOP 添加のみを行い, UVA 照射を行わなかった 8MOP 添加群の 3 群を用いた。

G1/S 境界部へ同調した HeLa 細胞は, DMEM で 3 回洗浄しブロックを解除した。各群ともブロック解除 1 時間以内にそれぞれの処置を行い, 処置直後を 0 時間とし, 0 から 15 時間後までの種々の時点で細胞を採取した。さらに PUVA 処置群は 96 時間後まで細胞の採取を行った。なお, いずれの実験も少なくとも 4 回行った。

III. FCM 測定

細胞の採取は培養液を除いた後, リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で 2 回洗浄し, 0.25% トリプシン (Sigma chemical) と 0.02% EDTA の等量混和液を加えて行った。0.1% のトリプシンインヒビター (Sigma chemical) で反応を止めた後, 採取した細胞を PBS で 2 回洗浄し, 細胞浮遊液を作成した。この細胞浮遊液を -20°C の 70% エタノールで 1 時間固定し, 0.1M トリシュー塩酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄後, 0.1% RNA 分解酵素 (Type II-A, Sigma chemical) 含有 0.1M トリシュー塩酸緩衝液に 37°C で 30 分浸した。遠心後上清を除き, 沃化プロピジウム (propidium iodide) (Sigma chemical) 50 μ g/ml 含有 0.18M トリシュー塩酸緩衝液 (pH7.4) を加え, 1 時間暗所で染色し, FCM 測定に供した。凝集した細胞を除去するため, 測定の直前に浮遊細胞を 40 μ m ナイロンメッシュで濾過した。FCM 測定にはフローサイトメーター FCS-1 型 (日本分光, 東京) を使用し, 毎回 30,000 個の細胞を計測した。

G1 期細胞分画 (G1 分画), S 期細胞分画 (S 分画), G2+M 期細胞分画 (G2+M 分画) の値は, フローサイトメーターに直結したコンピューターを用いて DNA ヒストグラムから算定し, いずれも全細胞数に対する百分率で表した。解析試料のすべて

において, G1 ピークの変動係数 (coefficient of variation, CV) の値は 5% 以下であった。

IV. G2+M 分画における M 期細胞の比率の算定

対照群の 9 時間後および PUVA 処置を行った 48, 72, 96 時間後の試料の細胞浮遊液をエタノールに固定後, 細胞をスライドガラス上に塗布し, ギムザ染色を行った。光学顕微鏡で 500 個細胞を鏡検し, 分裂前期から分裂後期までの核分裂像を示す細胞数を求め, M 期細胞の比率を全 G2+M 期細胞数に対する百分率で算定した。

V. mRNA の解析

1. 全 RNA の抽出

全 RNA の抽出は FCM と同じディッシュの細胞を用いて行い, Chomczynski ら¹⁵⁾ の酸性グアニジウムチオシトネートフェノールクロロホルム法に従って行った。すなわちトリプシン処理により調整した各細胞浮遊液を 1.5ml のサンプリングチューブに入れ遠心し, 上清を除いた沈渣に, 400 μ l のグアニジウムチオシトネート溶液 [4M グアニジウムチオシトネート (Fluka, Buchs, Switzerland), 25mM クエン酸ナトリウム, 0.5% N-ラウロイルサルコシン (Sigma Chemical), 0.1M 2-メルカプトエタノール] を加えて, 充分に攪拌した。等量のフェノール, 1/5 容量のクロロホルム, 1/10 容量の 2M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4) をこれに加え, 充分攪拌後遠心した。水層を別のサンプリングチューブに入れ, 等量のイソプロパノールを加え遠心後, 上清を除き, RNA の沈殿に 70% エタノールを加えてこれを洗浄した。この RNA の沈殿を, 0.1% のジエチルピロカルボネート (Sigma Chemical) で処理した蒸留水で溶解後, 260nm の吸光度を測定し, 総 RNA 濃度を求めた。

2. ノーザンブロッティング

抽出した全 RNA 10 μ g を 50% ホルムアミド (Fluka), 17.5% ホルマリンを含む 2% 3-N-モルホリノプロパンスルホン酸 (morpholinopropanesulfonic acid, MOPS) 緩衝液 (10mM MOPS, 4mM 酢酸ナトリウム緩衝液, 0.5mM EDTA) (pH7.0) に溶解し, 65°C で 15 分間反応させて, 2.2M のホルムアルデヒド含有 1% アガロースゲルを用い, 1 \times MOPS 緩衝液中で電気泳動した。泳動後のゲルは 20 \times SSC (3M 塩化ナトリウム, 0.3M クエン酸ナトリウム) で洗浄し, 20 \times SSC を使用してニトロセルロースフィルター (Schleicher&Schuell, Dassel, Germany) にキャピラリーブロッティング法で転写した。転写後フィルターを 6 \times SSC で洗浄し, 乾燥させ, さらに紫外線クロスリンカー (Stratagene, LA Jolly, U.S.A.) を用いて RNA をフィルターに固定させた。

3. プローブの作成

ヒトサイクリン A, B の cDNA は東京薬科大学生命科学部ゲノム染色体機能学安田秀世教授より, また β アクチンの cDNA は金沢大学第二生化学山本博教授より供与されたものを使用した。これらの cDNA をそれぞれ 25ng ずつ, ランダムプライマー DNA ラベリングキット (宝酒造, 京都) を用い ³²P-dCTP で標識し, 1.0 \times 10⁶cpm/ μ g 以上の比活性をもつプローブを作成した。

4. ハイブリダイゼーション

RNA を固定したフィルターを 6 \times SSC で浸漬し, ハイブリバック (コスモバイオ) に入れ, 6 \times SSC, 5 \times デンハルト液 [1% フィコール, 1% ポリビニルピロリドン, 1% ウシアルブミン (すべて Sigma chemical), 0.5% SDS, 100 μ g/ml サケ精子

DNA (ペーリンガー・マンハイム山之内, 東京) からなるプレハイブリダイゼーション液を 3ml 加え, 68°C で 4 時間反応させた. 反応後標識したプローブを 3×10^6 cpm 加え, さらに 16 時間, 68°C で反応させた. 反応終了後, フィルターを 0.1% SDS 含有 $2 \times$ SSC を用い, 室温で 5 分 3 回洗浄し, さらに 0.1% SDS 含有 $0.2 \times$ SSC を用い, 65°C で 30 分 2 回洗浄した. 洗浄後フィルターをサイクリン A は 24 時間, サイクリン B, β アクチ

ンは 12 時間室温で露光させ, バイオイメージアナライザー BAS2000 (富士写真フィルム, 東京) を用いてバンドの相対強度を定量した. この際サイクリン A, B の値は, β アクチンの値で除して補正した. その後それぞれのフィルターを, サイクリン A は 72 時間, サイクリン B, β アクチンは 24 時間のオートラジオグラフィーに供した. なお各バンドの大きさは, リボゾーム RNA の位置から計算した.

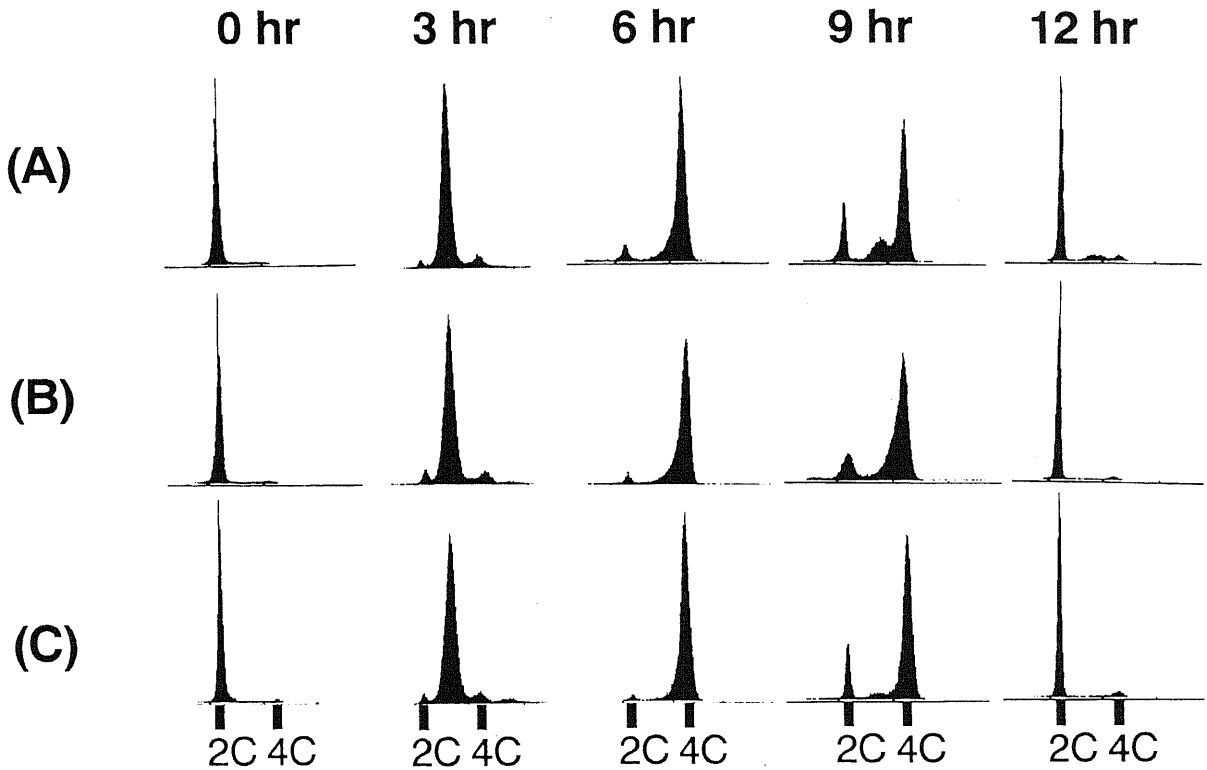


Fig. 1. DNA histograms of the control HeLa cells after release from a G1/S boundary block measured by flow cytometry. HeLa cells were synchronized at the G1/S boundary by a sequential thymidine and aphidicolin double block. (A) Cells without 8MOP addition nor UVA radiation. (B) Cells treated with 0.4 J/cm^2 UVA radiation. (C) Cells treated with $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 8MOP addition. 2C, diploid chromosomal complement; 4C, tetraploid chromosomal complement.

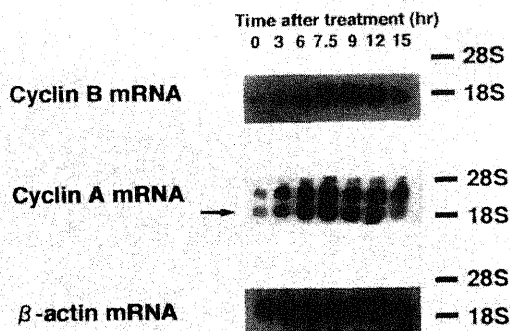


Fig. 2. Expression of cyclin B, cyclin A and β -actin mRNA level in UVA-irradiated HeLa cells by a northern blot analysis. A cyclin B probe made by random primer labeling of the 1.6 kbp cyclin B cDNA. Arrow indicates a cyclin A mRNA of 2.2 kbp. 18S and 28S ribosomal RNA were used as size markers.

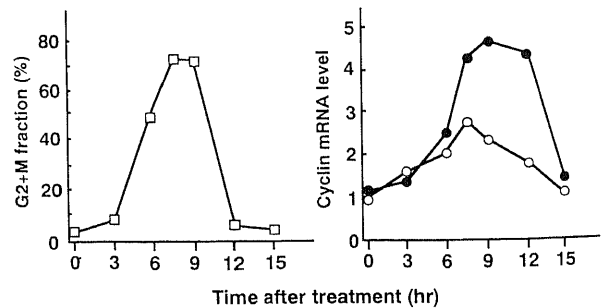


Fig. 3. The proportions of cells in G2+M phase and relative intensity of cyclin B and A mRNA levels in UVA irradiated HeLa cells from the northern blots which measured by an image-analyzer and normalized to that of β -actin. □, percentage of cells in G2+M fraction plotted against the time; ●, level of cyclin B mRNA; ○, level of cyclin A mRNA.

成 績

I. 対照群の細胞周期分布の変動

無処置群では同調解除直後、ほとんどの細胞が G1/S 期境界部に存在していたが、3 時間後には同調したまま S 期に移動し、6 時間後には G2+M 期に達し、12 時間後までには大部分の細胞は再び G1 期に移行した (図 1A)。UVA 照射群 (図 1B)、8MOP 添加群 (図 1C) でも無処置群とほぼ同様の経時的変動が認められた。G2+M 分画における M 期細胞の比率は無処置群の 9 時間後では 43% であった。

II. UVA 照射群の G2+M 分画およびサイクリン A, B mRNA の変動 (図 2, 3)

G2+M 分画の値は UVA 照射 7.5~9 時間後に 60% を超える高い値を示した。サイクリン B mRNA 量は 6 時間後より増加し始め、9 時間後に最大となり、15 時間後には急速に減少した。一方サイクリン A mRNA 量はサイクリン B より早く 7.5 時間後に最大となり、以後漸減した。それぞれ 0 時間の値に比べて、ピーク時ではサイクリン B は約 5 倍、サイクリン A は約 3 倍の発現量の増加が認められた。β アクチン mRNA はすべて

の時間においてほぼ同量の発現が認められた。両サイクリン mRNA 量のピークは G2+M 分画のピークにほぼ一致していた。無処置群、8MOP 添加群でも UVA 照射群と同様の経時的変動が認められた。

III. PUVA 処置群の細胞周期分布の変動 (図 4)

PUVA 処置群の細胞は対照群に比べてより遅い速度で S 期を進行した。すなわち 6 時間後、12 時間後においてはまだ大部分の細胞は S 期に存在し、24 時間後にはその一部が G2+M 期に入り、36 時間後にはほとんどの細胞が G2+M 期に達した。大部分の細胞は 48, 72, 96 時間後でも G2+M 期に存在し、G1 期の細胞はほとんど認められなかった。G2+M 分画における M 期細胞の比率は、48, 72, 96 時間後にそれぞれ 9%, 11%, 8% と著明に減少していた。

IV. PUVA 処置群の G2+M 分画およびサイクリン A, B mRNA の変動 (図 5, 6, 7)

PUVA 処置後サイクリン A, B mRNA 量の発現の増加は検出されず、G2+M 分画の比率が 60% を超えた 27 時間後においても、その増加は認められなかった。さらに、48, 72, 96 時間後においてもサイクリン A, B mRNA 量の増加は認められな

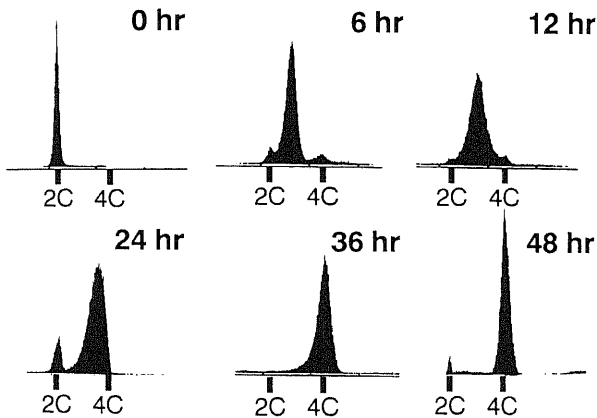


Fig. 4. DNA histograms of the PUVA treated HeLa cells after release from a G1/S boundary block by flow cytometry. 2C, diploid chromosomal complement; 4C, tetraploid chromosomal complement.

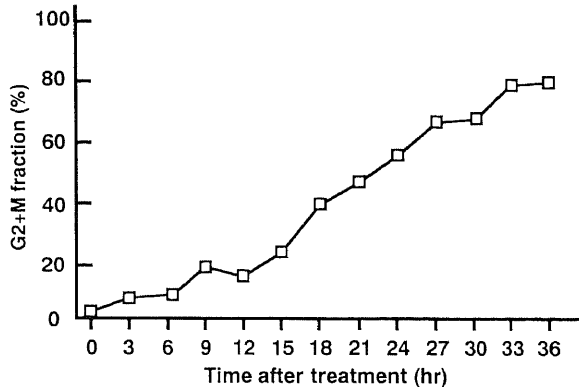


Fig. 6. The proportions of cells in G2+M phase. □, percentage of cells in G2+M fraction plotted against the time.

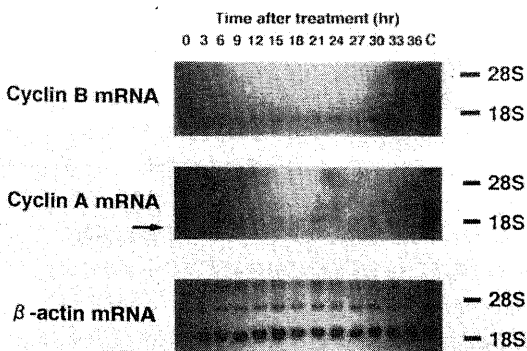


Fig. 5. Expression of cyclin B, cyclin A and β-actin mRNA levels in PUVA treated HeLa cells by a northern blot analysis. Arrow indicates a cyclin A mRNA of 2.2 kbp. 18S and 28S ribosomal RNA were used as size markers. C, control sample of 9 hr after UVA irradiation.

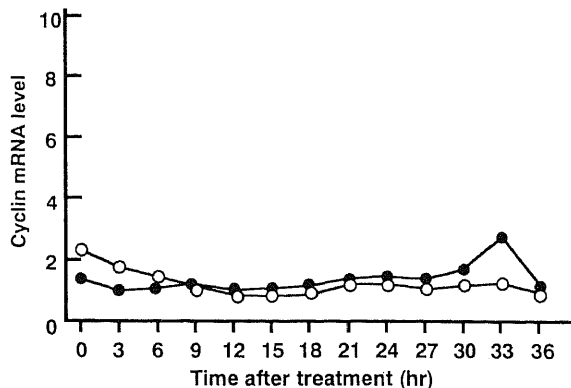


Fig. 7. Relative intensity of cyclin B and A mRNA levels in PUVA treated HeLa cells from the northern blots which measured by a image-analyzer and normalized to that of β-actin. ●, level of cyclin B mRNA; ○, level of cyclin A mRNA.

かった。

考 察

PUVA 処置の表皮に対する細胞動態学的作用に関しては、種々の実験成績が報告されている。Walter ら⁹⁾は器官培養されたマウス表皮において、PUVA 処置後早期に DNA 合成の減少が起こることを観察している。その後チミジン標識指数を用いた経時的観察で⁹⁾、マウス表皮において DNA 合成は最初の数時間は抑制されるが、その後数日間は逆に亢進することが見出され、これは PUVA 処置後の G1/S 境界ブロックによる S 期細胞の減少と同ブロック解除後の S 期細胞の増加による現象であると後に推測されている⁹⁾。一方 G2 および M 期の細胞の変動に関しては、1981 年 Johnsen ら¹⁰⁾が、培養表皮ケラチノサイトに 1J/cm² の PUVA 処置を行い、照射後細胞増殖の抑制と M 期細胞の減少が起こり、また多倍体細胞が認められたと報告している。1982 年 Hyodo ら¹⁰⁾は、マウス乳がん細胞の樹立株 (FM3A) に 0.1J~0.5J/cm² の PUVA 処置を行い、12~30 時間後に DNA ヒストグラムの G2+M ピークはより高くなるが、同時期に核分裂指数はほとんど増加しないことを観察し、細胞は G2 期で停止することを明らかにした。また最近われわれの教室の Kawara ら⁹⁾、坂井¹⁰⁾は、非同調の培養ヒト表皮ケラチノサイトに 0.4J/cm² の PUVA 処置を行い、FCM による DNA ヒストグラム解析を行ったところ、PUVA 処置 24 時間後より、M 期細胞の比率の著明な減少を伴う G2+M 期細胞の増加を見出した。さらに Ki-67 抗原と DNA 量の同時測定により、G2 期に蓄積した細胞の多くは Ki-67 陰性細胞であることを示し、大部分の G2 蓄積細胞は細胞周期から離脱した細胞、すなわち G2Q 細胞であると推論している。このように PUVA 照射により細胞は G2 期に蓄積することが明らかにされているが、この現象がどのような機序で起こっているかは現在まで明確にされていない。

一方、細胞周期の制御機構についての研究は遺伝子レベルにおいて近年急速に進みつつある。1988 年 Lohka ら¹¹⁾は MPF を精製し、MPF は分子量 34kDa と 45kDa の 2 種類のタンパク質で構成されており、H1 ヒストンキナーゼ活性を有することを明らかにした。34kDa のタンパク質は、H1 ヒストンキナーゼ活性をもつ cdc2 キナーゼ¹²⁾、45kDa のタンパク質はサイクリン B¹³⁾であることが後に同定されている。現在までこの複合体による G2 期から M 期、次の G1 期への進行の制御は種々の実験結果から次のように結論されている²⁰⁾。すなわち S 期で合成されたサイクリン B が cdc2 キナーゼと結合すると、cdc2 キナーゼの 15 番目のチロシン残基が wee1 キナーゼによりリン酸化され、直ちにこの複合体は不活性型にかわる。サイクリン B の合成の増加につれて、不活性型のサイクリン B・cdc2 複合体は細胞内に蓄えられ、DNA 合成が終了すると、この複合体のリン酸化されていたチロシン残基が脱リン酸化され、急激に活性型となる。活性型となった複合体はセリン/スレオニンプロテインキナーゼ活性を有し、この活性により染色体凝集、微小管再構成、核膜崩壊などの M 期の一連の現象が引き起こされる。その後サイクリン B のユビキチン化が起こり、サイクリン B は特異的プロテアーゼにより分解を受け、cdc2 キナーゼは活性を失う。これにより M 期は終了し、細胞は G1 期に進行することになる。

またサイクリン A は、その mRNA をアフリカツメガエルの

卵母細胞に注入すると卵成熟が誘導されることや²¹⁾、G2 期の HeLa 細胞に抗サイクリン A 抗体を注入すると、M 期への移行が抑制されること²²⁾より、サイクリン B と同様に G2 期から M 期への進行に関連していると考えられている。しかしサイクリン B と異なり、G1 期に抗サイクリン A 抗体をラットの線維芽細胞や HeLa 細胞に注入すると、DNA 合成が抑制されること^{23,24)}より、S 期の開始にも関与していることが知られている。またその他に S 期においては、転写因子 E2F、癌抑制遺伝子 Rb (retinoblastoma) の関連タンパク質 p107 とともにキナーゼ活性を持つ複合体を形成し、標的遺伝子の DNA 結合蛋白をリン酸化し、転写を促進させる働きもある²⁵⁾ことが示唆されている。

以上のことより、G2 期から M 期への移行においてサイクリン A、B が主に関与していると考えられる。そこで著者は、PUVA 処置により G2 期から M 期への進行が阻害される機序の解明のため、HeLa 細胞を用いてサイクリン A、B の mRNA 量を PUVA 処置後経時的に測定し、PUVA 処置による細胞動態の変動およびサイクリン A、B mRNA 発現量の経時的変動を検討した。

その結果、UVA 照射群において同調した細胞群はすみやかに G1 期から S 期に移行し、12 時間後には同調したまま再び G1 期に戻ることが示された。また、サイクリン B mRNA 量は S 期後期から増加し始め、M 期で最大となり、G1 期に入りしばらくは引き続いて存在したが、15 時間後には急速に減少した。サイクリン A mRNA 量はほぼ同様の変動パターンを示したが、サイクリン B のピークに比べより早い時間にピークに達し、以後漸減した。これらサイクリン A、B mRNA 量の変動パターンは、これまでに報告されている結果^{26,27)}とほぼ同じであった。また無処置群、8MOP 添加群でも UVA 照射群と同様の結果であったことより、UVA 単独、8MOP 単独の処置は細胞動態およびサイクリン A、B の発現に影響を及ぼさないことが確認された。

一方、PUVA 処置群の細胞は、対照群と比べ明らかに異なる細胞動態を示した。すなわち PUVA 処置後の細胞は処置後 S 期を対照に比べてより緩徐に進行し、36 時間後には大部分の細胞が G2+M 期に移行した。しかし大部分の G2+M 期の細胞はそのまま 96 時間後まで G1 期に移行しなかった。この蓄積した G2+M 期の細胞は鏡検により、大部分が G2 期の細胞であることが明らかにされ、同調した HeLa 細胞でも培養ケラチノサイトと同様に、PUVA 処置により G2 期蓄積が惹起されることが確認された。

さらに、PUVA 処置はサイクリン A、B mRNA の発現に対しても同様に影響を及ぼすことが明らかにされた。すなわち、サイクリン A、B mRNA は両者とも細胞群が G1 期から S 期に移行した 6~12 時間後の時点、G2 期に 60% 以上移行した 27 時間後の時点、そして大部分の細胞が G2 期に蓄積していた 96 時間後の時点でも PUVA 処置直後と同じレベルにとどまり、発現量の増加は観察されなかった。また、この mRNA 合成の抑制は同時に測定した β アクチン mRNA の発現レベルが PUVA 処置の影響を受けなかったことから、PUVA 処置による細胞の致死的作用によるものではないと考えられた。著者の実験結果から PUVA 処置によりサイクリン A、B mRNA 合成が著明に抑制されることが明らかになり、PUVA 処置後に誘導される G2 蓄積にはサイクリン A および B の合成抑制が強く

関与していることが示唆された。

Muschel ら²⁹⁾はX線照射が HeLa 細胞のサイクリンの発現に及ぼす影響について検討し、放射線による細胞分裂の遅延にサイクリンBの発現抑制が関与していることを示唆している。また一時的な G2 蓄積を誘導する 6 グレイの照射量では、細胞が G2 期に蓄積している間サイクリンB mRNA の抑制とサイクリンA mRNA の増加が、恒久的な G2 蓄積を誘導する10グレイでは、サイクリンA, B mRNA の抑制が観察されることから、サイクリンAとBではX線処理による発現パターンに違いがある²⁹⁾とも述べている。今回著者の行った紫外線による実験では、観察時間において細胞は G2 期に蓄積し続け、この時点でのサイクリンA, B mRNA の発現はいずれも抑制され、Muschel らの行った恒久的な G2 蓄積を誘導する実験成績と同様の結果と考えられた。

乾癬患者の病変部では、表皮の細胞周期時間が正常表皮に比べ1/8に短縮し、胚芽細胞に対する細胞周期を回転している細胞の割合が増加していることが知られている²⁹⁾。筒井⁹⁾はテープストリッピングにより増殖活性が亢進したモルモット表皮に PUVA 処置を行い、G2 期での細胞蓄積とそれに伴う核分裂の減少が正常表皮に比べて、増殖が亢進した表皮ではより長く継続することを報告し、PUVA の細胞周期の進行に対する主要な作用は細胞の G2 期での蓄積であると推論している。著者の実験成績からも PUVA 処置により、細胞の G2 蓄積が生じることが確認され、この G2 蓄積はサイクリンA, B mRNA の発現抑制が強く関与していることが示された。PUVA の作用機序としては細胞周期に対する直接的な影響の他に、ランゲルハンス細胞を介した遅延型過敏反応の抑制³⁰⁾も考えられているが、著者の実験結果から、サイクリンA, B mRNA の発現抑制を介した表皮細胞の増殖抑制が PUVA の作用機序の一つとして重要であることが示唆された。

PUVA 処置がサイクリンAおよびBの発現を抑制する機序についてはなお不明であるが、PUVA の DNA に対する作用の一つとして UVA 照射によりソラレンがピリミジン塩基との間に架橋構造を形成することが知られている³¹⁾。このことにより正しい転写が不能となり、結果的にサイクリンの発現抑制を介して細胞周期の進行がブロックされたものと推察される。放射線による G2 ブロックは、放射線による DNA 損傷があっても G2 ブロックが生じない出芽酵母の変異株 rad9 の研究により、RAD9 遺伝子より合成されたタンパク質が wee1 キナーゼを活性化し、cdc2・サイクリンB複合体が活性化されなくなるために生じることが明らかにされている³²⁾。しかし今回の実験で観察されたサイクリンA, B mRNA の発現低下が、PUVA 処置による直接的なものなのか、それとも他の遺伝子や遺伝子産物による制御を受けているものかについては、今後検討すべき課題であると思われる。

結 論

G1/S 期境界部に同調させた HeLa 細胞に対して PUVA 0.4J/cm², 1 回処置を行い、FCM による細胞動態学的観察と同時にサイクリンA, B mRNA の発現量を経時的に観察した。得られた成績は次のようである。

1. UVA 照射群では大部分の細胞が G2+M 期に存在する時にはほぼ一致して、サイクリンA, B mRNA の発現量のピークが認められ、細胞が G1 期に入るとともに減少した。

2. 無処置群, 8MOP 添加群では、UVA 照射群とほぼ同様の成績が得られた。

3. PUVA 処置群では27時間後には G2+M 期細胞の割合が60%を超え、その後96時間後までは大部分の細胞が G2+M 期にあった。

4. PUVA 処置群の G2+M 期に蓄積していた細胞の大部分は、G2 期細胞であった。

5. PUVA 処置群では観察された時間内に、サイクリンA, B mRNA の発現量の増加は認められなかった。

得られた成績から、PUVA により生じた細胞の G2 蓄積には、サイクリンA, B mRNA の発現抑制が関与しているものと示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導および御校閲いただきました広根孝衛名誉教授、竹原和彦教授ならびに御助言いただきました川原 繁講師に深甚の謝意を表します。また、mRNA の定量に際して御教示、御協力いただきました金沢大学第一生化学福田龍二教授、愛知県心身障害コロニー発達障害研究所生化学部第三研究室滝沢剛則室長に深謝いたします。さらに、cDNA を快く供与下さいました東京薬科大学生命科学部ゲノム染色体機能学安田秀世教授、金沢大学第二生化学山本 博教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は日本研究皮膚科学会第19回年次学術大会(平成6年、大阪市)において発表した。

文 献

- 1) Parrish, J. A., Fitzpatrick, T. B., Tanenbaum, L. & Pathak, M. A.: Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *New. Engl. J. Med.*, 291, 1207-1211 (1974).
- 2) 水野信行, 大野盛秀, 植松茂生: 尋常性乾癬の 8-methoxypsoralen 光療法. *日皮会誌*, 85, 577-586 (1975).
- 3) Walter, J. F., Voorhees, J. J., Kelsey, W. H., Duell, E. A. & Mich, A. A.: Psoralen plus black light inhibits epidermal DNA synthesis. *Arch. Dermatol.*, 107, 861-865 (1973).
- 4) Johnsen, A. S., Digernes, V. & Rugstad, H. E.: Effect of PUVA on human skin epithelial cell line. *Virchows Arch.*, 37, 61-69 (1981).
- 5) Epstein, J. H. & Fukuyama, K.: Effects of 8-methoxypsoralen-induced phototoxic effects on mammalian epidermal macromolecule synthesis in vivo. *Photochem. Photobiol.*, 21, 325-330 (1975).
- 6) Pullmann, H., Galosi, A., Jakobeit, C. & Steigleder, G. K.: Effects of selective ultraviolet phototherapy (SUP) and local PUVA treatment on DNA synthesis in guinea pig skin. *Arch. Dermatol. Res.*, 267, 37-45 (1980).
- 7) 東 見: 8-MOP+長波長紫外線照射後のモルモット皮膚における表皮細胞動態の変動. *十全医会誌*, 95, 748-757 (1980).
- 8) 筒井清広: Tape stripping により増殖活性の亢進したモルモット表皮に対する PUVA 1 回処置の細胞動態学的作用. *日皮会誌*, 100, 1415-1421 (1990).
- 9) Kawara, S., Sakai, H. & Hirone, T.: Cell cycle progression of cultured human epidermal keratinocytes after a single treatment with PUVA. *Proceedings of the Fifth*

- Japan-United States Symposium on the biology of the Epidermis, 151-159 (1992).
- 10) 坂井秀彰: 培養ヒト表皮ケラチノサイトに対する 8-メトキシソラレン+長波長紫外線照射の細胞動態学的作用. 十全医会誌, 102, 627-634 (1993).
 - 11) Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. & Hunt, T.: Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33, 389-396 (1983).
 - 12) Masui, Y. & Markert, C. L.: Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 177, 129-146 (1971).
 - 13) Pines, J.: Cyclins:wheels within wheels. *Cell Growth & Differ.*, 2, 305-310 (1991).
 - 14) Heintz, N., Sive, H. L. & Roeder, R. G.: Regulation of human histone gene expression: Kinetics of accumulation and changes in the rate of synthesis and in the half-lives of individual histone mRNA during the HeLa cell cycle. *Mol. Cell. Biol.*, 3, 539-550 (1983).
 - 15) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159 (1987).
 - 16) Hyodo, M., Fujita, H., Suzuki, K., Yosino, K., Matsuo, I. & Ohkido, M.: DNA replication and cell-cycle progression of cultured mouse FM3A cells after treatment with 8-methoxypsoralen plus near-UV radiation. *Mutat. Res.*, 94, 199-211 (1982).
 - 17) Lohka, M. J., Hayes, M. K. & Maller, J. L.: Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85, 3009-3013 (1988).
 - 18) Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D. & Newport, J.: The xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*, 54, 423-431 (1988).
 - 19) Labbe, J. C., Capony, J. P., Caput, D., Cavadore, J. C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J. M., card, A. & Doree, M.: MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.*, 8, 3053-3058 (1989).
 - 20) Nurse, P.: Uuiversal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344, 503-508 (1990).
 - 21) Swenson, K. I., Farrell, K. M. & Ruderman. J. V.: The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in xenopus oocytes. *Cell*, 47, 861-870 (1986).
 - 22) Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. & Draetta. G.: Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.*, 11, 961-971 (1992).
 - 23) Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. & Lamb, N. C.: Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67, 1169-1179 (1991).
 - 24) Devoto, S., Mudryj, M., Pines, J., Hunter, T. & Nevins, J. R.: A cyclin A-protein kinase complex possesses sequence-specific DNA binding activity: p33cdc2 is a component of the E2F-cyclin A complex. *Cell*, 68, 167-176 (1992).
 - 25) Pines, J. & Hunter, T.: Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, 346, 760-763 (1990).
 - 26) Pines, J. & Hunter, T.: Isolation of a human cyclin cDNA: Evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell*, 58, 833-846 (1989).
 - 27) Muschel, R. J., Zhang, H. B., Iliakis, G. & McKenna, G.: Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation. *Cancer Res.*, 51, 5113-5117 (1991).
 - 28) Muschel, R. J., Zhang, H. B. & McKenna, G.: Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells. *Cancer Res.*, 53, 1128-1135 (1993).
 - 29) Weinstein, G. D., McCullough, J. L. & Ross, P. A.: Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 85, 579-583 (1985).
 - 30) Okamoto, H. & Horio, T.: The effect of 8-methoxypsoralen and long-wave ultraviolet light on langerhans cell. *J. Invest. Dermatol.*, 77, 345-346 (1981).
 - 31) Cole, R. S.: Light induced cross linking of DNA in the presence of a furocoumarin (psoralen): studies with phage γ , *Escherichia coli*, and mouse leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 217, 30-39 (1970).
 - 32) Rowley, R., Hudson, J. & Young, P. G.: The weel protein kinase is required for radiation-induced mitotic delay. *Nature*, 356, 353-355 (1992).

The Effect of Single PUVA Treatment on Cyclin A and B mRNA Expression in HeLa Cells Fumiaki Shirasaki,
Department of Dermatology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **105**, 222—229
(1996)

Key words flow cytometry, PUVA therapy, epidermal cell kinetics, cyclin A, cyclin B

Abstract

The present study investigated the effect of single treatment with 8-methoxypsoralen (8MOP)+long wavelength ultraviolet light (PUVA) on the cell cycle kinetics and the cyclin A and B mRNA expression in HeLa cells. The cells were synchronized at the G1/S boundary by thymidine and aphidicolin application, and were sequentially harvested after PUVA treatment. Untreated cells and the cells treated with UVA radiation or 8MOP application were used as a control. Flow cytometry was used to determine the proportions of cells in S- and G2+M- phase. The proportion of M-phase cells in the G2+M compartment was estimated by microscopic examination. The expression of cyclin A and B mRNA was detected by northern blot analysis, and was quantified by image-analyzer. In the controls, the cohort of synchronized cells proceeded through S, G2 and M-phase, and then reentered the G1-phase at 12 hr after treatment. The levels of cyclin A and B mRNA peaked in G2+M phase and decreased to the base line level by 15 hr after treatment. In contrast, PUVA-treated cells proceeded slowly in the S phase and then accumulated in G2+M phase until 96 hr after PUVA treatment. The percentage of cells in M-phase showed a marked decrease in the accumulated G2+M compartment. Both the cyclin A and B mRNA expression were strongly suppressed by PUVA treatment at the time when most of the cells accumulated in G2 phase. These results suggest that G2 accumulation induced by PUVA treatment is intimately associated with a decreased expression of cyclin A and B mRNA.