

P1-190 p21 発現に伴う細胞内活性酸素種の変化と癌細胞死誘導能との解析九州大¹, 国立病院機構北海道がんセンター²井上貴史¹, 浅野間和夫¹, 加藤聖子¹, 小林裕明¹, 和氣徳夫¹, 加藤秀則²

【目的】CDK インヒビターである p21 は、細胞老化やアポトーシスに重要な役割を果たすことが知られている。また癌細胞株において、p53 の細胞死誘導には活性酸素種 (ROS) が関与することが報告されている。そこで我々は、p21 による細胞死と細胞内 ROS との関与を検討し、その作用機構を解明することを目的とした。【方法】1) 卵巣癌細胞株 SKOV3 細胞、子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞、大腸癌細胞株 HCT116 細胞の 3 株へ、野生型ヒト p21cDNA を、アデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入した。2) 細胞周期変化を FACS 法、細胞老化誘導能を β -gal 染色、細胞内 ROS レベルを蛍光色素である Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて FACS 法で解析した。3) siRNA を用いて、p53 を抑制した状態で p21 を過剰発現させ、細胞死の変化を解析した。【成績】1) 全ての細胞株で p21 の過剰発現は、G1 期を増加させ細胞老化死を誘導した。2) p53 が野生型である HCT116 細胞では、p21 発現量を約 2 倍にすると、核の断片化および subG1 期への集積を認め、アポトーシスが誘導された。p53 が変異型、あるいは不活化されている残りの 2 株ではアポトーシスは認めなかった。3) 細胞内 ROS レベルは、p21 発現の細胞老化死誘導に伴い約 2 倍に、アポトーシス誘導に伴い約 4 倍に増加した。4) アポトーシス誘導時に p53 発現の亢進を認め、siRNA による p53 発現の抑制時には、p21 過剰発現に伴うアポトーシスを抑制できた。【結論】1) p21 は細胞内 ROS レベルを増加させることにより、細胞死を誘導する。2) p21 により誘導される細胞内 ROS レベルにより、細胞老化死あるいはアポトーシスが選択される。3) p21 によるアポトーシス誘導には p53 が関与する可能性が示唆された。

P1-191 SP1 阻害剤 (Mithramycin) の癌細胞増殖抑制効果九州大生体防御医学研究所ゲノム創薬・治療学分野¹, 九州大²大神達寛¹, 加藤聖子¹, 米田智子¹, 山口真一郎¹, 浅野間和夫¹, 和氣徳夫²

【目的】子宮体癌・卵巣癌の造腫瘍能獲得には様々なシグナル伝達系が関与する。SP1 は多様な作用をもつ転写因子であるが、その Sp1 の選択的阻害剤 (Mithramycin) が癌細胞増殖に与える効果や作用機構を解析した。【方法】(1) 子宮体癌細胞株 3 株 (Hec1, Hec6, HHUA), 卵巣癌細胞株 2 株 (KF, SKOV) を用いた。(2) 各細胞株における SP1 および MDM2 の発現量を Western blot で解析した。(3) Mithramycin を 0~600nM の濃度で投与し、細胞増殖に与える効果を解析した。(4) 細胞増殖抑制機構の解明のため、FACS による細胞周期の解析、Western blot による各タンパク発現量の解析、RT-PCR または Luciferase assay による MDM2 および p53 promoter 活性の評価を行った。【成績】(1) 全細胞株で SP1 および MDM2 タンパクの発現亢進を認め、p53 や p14^{ARF} の変異の有無との関連はなかった。(2) 20nM 以上の Mithramycin 投与により全細胞株で濃度依存的に増殖抑制効果を認め、野生型 p53 を発現する細胞株でその効果が顕著であった。細胞周期解析では全細胞株で S 期の減少を認め、野生型 p53 を発現する細胞株においては subG1 への集積も認められた。(3) p53 の変異の有無に関わらず、全細胞株で Rb の脱リン酸化が認められ、野生型 p53 を発現する細胞株においては p53/p21, MDM2 の発現誘導も認められた。(4) 野生型 p53 を発現し、MDM2 promoter 領域の SP1 結合部位に遺伝子多型 (SNP309: T→G) を有する細胞株で、Mithramycin 投与により MDM2 promoter 活性が著しく亢進した。【結論】(1) SP1 阻害剤である Mithramycin の細胞増殖抑制機構に p53 依存性経路があることが示された。(2) Promoter 領域に SNP309 をもつ MDM2 も p53 の標的遺伝子として同時に誘導され、Mithramycin の細胞増殖抑制効果に影響する。

P1-192 ヒト IL-1 β により誘導される炎症による腫瘍進展への影響

富山大

中村隆文, 日高隆雄, 斎藤 滋

【目的】SV40T 抗原を水晶体上皮細胞に発現するトランスジェニックマウス (α T3 マウス) に発生した水晶体上皮悪性腫瘍に炎症反応を惹起した場合の癌進展の影響について検討した。【方法】HPV E6E7 蛋白と同様に SV40T 抗原は、p53 と pRB の機能を同時に抑制する。水晶体上皮特異的プロモーターを用いて SV40T 抗原を水晶体上皮に発現する α T3 マウスを作製した。またヒト IL-1 β 遺伝子を同様に水晶体上皮に発現する α IL-1 β マウスを作製した。 α T3 マウスと α IL-1 β マウスとの交配実験を行い α T3/ α IL-1 β マウスを作製し、ヒト IL-1 β を水晶体腫瘍に発現させ、腫瘍の発生・増殖・進展と担癌マウスの寿命を観察した。また α T3/ α IL-1 β マウスにマクロファージ阻害剤である 2-chloroadenosine を継続的に毎週 1 回 50 μ g 腹腔内に投与したマウスも観察した。【成績】1) α T3 マウスは多段階発癌を示し、時間的、空間的に極めて均一な扁平上皮癌を発生するモデルマウスであり、HPV が子宮頸癌を発症する経過と病理学的に酷似していた。最終的には脳組織に浸潤転移することにより悪疫質になり死亡した。2) ヒト IL-1 β 遺伝子を導入した α T3/ α IL-1 β マウスは病理組織検査で腫瘍局所にマクロファージが浸潤しており炎症反応が認められた。3) α T3/ α IL-1 β マウスの腫瘍進展は早く、 α T3 マウスより有意に寿命は短縮した。4) 2-chloroadenosine を投与した α T3/ α IL-1 β マウスの寿命は延長する傾向があった。【結論】ヒト IL-1 β 遺伝子導入して腫瘍局所に炎症を惹起すると、腫瘍増殖および進展を促進する可能性があり、そのため担癌マウスの寿命が短縮した。局所の炎症特にマクロファージの浸潤が癌の浸潤進展を促進的に働く可能性を示唆した。