

P3-76 Sp1 阻害剤 (mithramycin) の婦人科癌細胞増殖抑制機構の解析

九州大生体防御医学研究所ゲノム創薬・治療学¹, 九州大²
 大神達寛¹, 加藤聖子¹, 小林裕明², 山口真一郎¹, 米田智子¹, 和氣徳夫²

【目的】子宮体癌・卵巣癌の発癌機構には p53 を介するシグナル経路が関与する。p53 の標的遺伝子であり、負の調節因子でもある MDM2 は、その promoter 領域に Sp1 結合部位を有する。本研究では Sp1 阻害剤である mithramycin (MTH) を用いて癌細胞増殖特性・造腫瘍性への影響および作用機構を解析した。【方法】1) 子宮体癌細胞株 3 株、卵巣癌細胞株 3 株を用いた。2) MTH を培養液に添加し細胞増殖能、細胞周期の変化を解析した。3) 各蛋白発現を Western blot 法で、p53 非依存性 mdm2-P1 promoter 活性および p53 依存性 mdm2-P2 promoter 活性を RT-PCR 法で、p53 の転写活性を luciferase assay で解析した。4) MDM2 と p53 の結合を阻害する nutlin-3 との併用効果を解析した。5) ノードマウスの皮下に癌細胞を移植後、MTH を腹腔内に投与し造腫瘍性の変化を解析した。【成績】1) MTH は野生型 p53 を有する癌細胞の増殖を濃度依存性に抑制した。2) 細胞周期は sub-G1 期に集積し、アポトーシスが誘導された。3) p53 の標的遺伝子である PUMA・p21 の発現が誘導された。p53 の転写活性、mdm2-P2 promoter 活性の変化と一致して、MDM2 発現は MTH 添加後一過性に減少し、その後増加した。mdm2-P2 promoter 領域に遺伝子多型 (SNP309G) を有する細胞株では、p53 依存性 mdm2-P2 promoter 活性の亢進が顕著であった。4) MTH と nutlin-3 の併用は相乗的に p53 機能を亢進し、細胞増殖を抑制した。5) MTH のノードマウス腹腔内投与は皮下腫瘍形成を抑制した。【結論】1) MTH は p53 機能を亢進し、癌細胞の増殖を抑制する。2) MTH 投与後、MDM2 は p53 の標的遺伝子として増加するが、p53 との結合を阻害する nutlin-3 の同時投与により増殖抑制効果の増強が可能である。

P3-77 ユビキチンリガーゼ Fbxw7 による細胞周期制御と細胞分化制御

九州大
 小野山一郎, 恒松良祐, 小林裕明, 和氣徳夫

【目的】ユビキチンリガーゼ Fbxw7 は細胞周期を正に制御する c-Myc, サイクリン E, Notch などのユビキチン化依存的な分解を担うタンパク質である。近年、FBXW7 遺伝子は子宮体癌、卵巣癌を含む種々のヒト悪性腫瘍において変異が報告されており、癌抑制遺伝子として非常に注目されてきている。特に子宮体癌ではその 16% に変異があると報告されている。我々は生体内における Fbxw7 の生理学的役割を検討することとし、組織特異的な条件的 (コンディショナル) ノックアウトマウスを作製して解析を行った。【方法】施設内の動物実験指針遵守のもと発生日工的手法を用いて作製した Fbxw7 コンディショナルノックアウトを各臓器特異的に Cre recombinase を発現する種々のトランスジェニックマウスと交配して解析を行った。【成績】各臓器特異的なノックアウトマウスの解析から、Fbxw7 は胸腺において T 細胞の細胞周期からの脱出を制御していること、骨髄において造血幹細胞の維持に重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、乳腺上皮細胞において Fbxw7 を欠損すると妊娠後期から授乳期において乳腺上皮細胞がアポトーシスに陥った。胸腺、骨髄、乳腺の各臓器において Fbxw7 を欠損すると、それぞれ T 細胞リンパ腫、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病、乳癌を発症した。【結論】本研究より、Fbxw7 は種々の臓器において基質タンパク質を分解することで細胞周期制御、幹細胞の維持などに重要な役割を担っていることが示唆された。今後は本研究で用いた発生日工的手法に加えて臨床検体の解析を行い、子宮および卵巣における Fbxw7 の生理的役割および癌化に関連した変化について研究を行っていく予定である。

P3-78 Terminal transferase-dependent PCR (TD-PCR) 法のキャピラリー DNA シーケンサーを用いた改良とその応用

信州大
 鈴木昭久, 堀内晶子, 塩沢丹里

【目的】DNA 損傷は癌発生に深く関与するが、外因物質などによる DNA 損傷部位の同定と定量化は発がん過程の解明に重要である。TD-PCR 法は PCR 伸長反応を利用した DNA 損傷検出法で DNA strand break や DNA adducts を含む各種の DNA 損傷を配列特異的に検出することが可能とされるが、RI 被爆や煩雑な手技、解析の定量性に問題があった。今回、TD-PCR 法にキャピラリー DNA シーケンサーを応用することで TD-PCR 法の簡易化と定量化を試みた。【方法】1) p53 および PTEN を標的遺伝子としてこれらに特異的な TD-PCR primer と検出用の 6-FAM 修飾 primer を設定した。蛍光検出にはキャピラリー DNA シーケンサーを用いた。内膜癌細胞株 Ishikawa 細胞から DNA を抽出し、amplicon 内に存在する制限酵素認識配列に対し制限酵素処理を行い、TD-PCR 法により切断部位の認識が可能か検討した。2) Ishikawa 細胞に cisplatin, estradiol, cathecolestrogen を添加後、DNA を回収し TD-PCR 法を施行して DNA 損傷の定量的な検出を試みた。【成績】1) 制限酵素による切断が予想される部位に蛍光の peak が認められた。2) cisplatin 添加により control に比較して複数の peak が強く検出された。3) cathecolestrogen 添加により estradiol 添加に比較し peak の増加が確認された。【結論】シーケンサーを利用した本法は様々な DNA 損傷を配列特異的に認識し定量化することが可能で、発がん過程解析の新たなツールとなる可能性が示唆された。