

24OP1-15

神経芽腫細胞株でのグルタミン枯渇は細胞内グルタチオン低下を介し細胞増殖を抑制し L-PAM 感受性を増強する

井崎 桜子、後藤 裕明、黒木 文子、横田 俊平

横浜市立大学医学部付属病院

＜背景＞グルタミンはグルタチオン (GSH) 生合成に必要なアミノ酸であり、神経芽腫細胞において細胞内 GSH 量は培養上清中のグルタミン濃度に依存すると報告されている。GSH は細胞内の主要な抗酸化分子であり、buthionine sulfoximine を用いた GSH 合成阻害は神経芽腫に酸化ストレスによる細胞死を誘導する。今回我々は神経芽腫細胞株を用いてグルタミン枯渇による細胞内 GSH 濃度、酸化ストレスや薬剤感受性への影響につき検討した。

＜方法＞神経芽腫細胞培養株 (SMS-KCNR, SMS-KANR, SMS-LHN) を異なる濃度のグルタミン (2 mM, 0.2 mM, 0mM) を含む培地にて、低酸素下 (5% O<sub>2</sub>) または通常濃度の酸素下 (20% O<sub>2</sub>) で培養した。細胞の増殖速度、薬剤感受性は MTT assay を用いて検討した。細胞内 GSH 濃度は DTNB-GSSG reductase 法により測定した。細胞内活性酸素 (ROS) はフローサイトメトリーにより測定した。

＜結果＞2mM と比較して低グルタミン濃度下における細胞内 GSH 濃度は、いずれの細胞においても 0.2mM において 74.3 ~ 81.4%、0mM において 67.2 ~ 72.0% に低下し、低グルタミン濃度下ではより細胞内 ROS が蓄積する傾向にあった。また、いずれの細胞株においても低グルタミン濃度下で増殖抑制がみられた。SMS-KCNR では培養開始から 7 日目の生細胞数はコントロール (2mM グルタミン) に対し、グルタミン 0.2mM 下で 58.2% (P < 0.01)、グルタミン 0.2mM + 1mM GSH 存在下で 67.0% であった。低酸素下では、グルタミン 0.2mM 下での生細胞数がコントロールの 77.3% であり、グルタミン濃度による細胞増殖への影響が少なかった。いずれの細胞株においても L-PAM の殺細胞効果は低グルタミン濃度下で増強した。低グルタミン濃度下においても、培地への GSH 添加により L-PAM の殺細胞効果は低下した。

＜結論＞環境中のグルタミン濃度低下は神経芽腫細胞内の GSH 濃度減少を介して細胞増殖速度を低下させ、L-PAM に対する薬剤感受性を増強する

24OP1-16

p63 : 神経芽腫がん幹細胞マーカーとしての可能性について

竹信 尚典<sup>1)</sup>、川崎 篤<sup>1)</sup>、大平 美紀<sup>1)</sup>、中村 洋子<sup>1)</sup>、磯貝 恵理子<sup>1)</sup>、尾崎 俊文<sup>1)</sup>、Ross Robert A.<sup>2)</sup>、上條 岳彦<sup>1)</sup>、中川原 章<sup>1)</sup>

千葉県がんセンター研究所 生化学研究部<sup>1)</sup>、Fordham University<sup>2)</sup>

【背景と目的】近年、固形腫瘍の再発・転移にがん幹細胞が深く関わっていることが推測されている。Biedler らは、ヒト神経芽腫細胞株が多分化能を有することに着目し、複数の同一親株から、neuroblastic (N-type)、substrate-adherent (S-type) および intermediate (I-type) の 3 種を分離、樹立した。I-type の細胞は、マウス移植時の造腫瘍能が高く、分化能を示すことから、がん幹細胞の性質を持つと推測される。これまでに我々は I-type 細胞に特異的な遺伝子を 6 種同定した。その中から、p53 がん抑制遺伝子のファミリーである p63 について興味ある知見を得たので報告する。

【方法と結果】p63 は、2 種類の細胞株系統において I-type 細胞特異的に発現していた。I-type 細胞に発現する遺伝子は、がん幹細胞のマーカーとしての可能性を持つことから、神経芽腫細胞株および初代培養細胞を用いて p63 の解析を行った。神経芽腫細胞株における p63 の発現量は非常に微量であり、I-type 以外の細胞での検出は困難であった。RT-PCR の結果、N-type や S-type で発現が検出できないことから、I-type から分化することにより、発現が減少することが示唆された。神経芽腫がん幹細胞と p63 発現の間に機能的意義があるかどうか明らかにするために、p63 の N 末端アイソフォームである TAp63 (転写活性化ドメインを有し、がん抑制遺伝子的機能)、Δ Np63 (転写活性化ドメインを欠如し、オンコジーン機能) を特異的に認識する抗体を作成した。その抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果、細胞に発現させた TAp63 は細胞質と核に、Δ Np63 は核に検出された。これらの抗体を用いて神経芽腫の初代培養の免疫染色を行った結果、一部の細胞で TAp63 は細胞質、Δ Np63 は核においてシグナルを検出した。この結果は、ウエスタンブロッティングの結果とおおむね合致していた。また、初代培養での p63 の発現は、ステージ 4 の神経芽腫において低下している傾向が見られた。

【考察】p63 は、p53 ファミリー遺伝子 (p53, p63, p73) の中でも最も分子進化が古く、すでに、p63 は正常上皮の幹細胞マーカーであることが知られている。今回の我々の結果は、p63 が神経芽腫のがん幹細胞マーカーとなり得る可能性を示唆するものであった。