

P-09

細胞がネクローシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを制御する因子の探索研究

¹ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (薬)

○佐藤 聡、大見 拓也、山本 朗央、綿矢 有佑、
金 恵淑、

[目的] 我々はチミジル酸合成酵素阻害剤 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR) を作用させるとネクローシスを起こすマウス乳がん由来 FM3A 細胞野生株 F28-7 株とアポトーシスを起こす変異株 F28-7-A 株を有している。ネクローシスとアポトーシスとを決定する因子の特定を目的に、これら細胞株を用いて mRNA、タンパク質レベルで発現量の異なる因子を網羅的に解析した。[方法] F28-7 株及び F28-7-A 株に FUdR を作用させ、経時的にサンプリングした後、GeneChip Mouse Expression set を用いてトランスクリプトーム解析を行った。プロテオーム解析は二次元電気泳動法と MALDI-TOF/TOF/MS 及び Nano LC-MS/MS を用いて行った。[結果及び考察] トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析から同定した候補因子のうち、F28-7 株で発現量の多い核膜の構造タンパク質 Lamin-B1、細胞骨格タンパク質 Cytokeratin-19、転写因子の転写因子 X に着目し、siRNA を用いてそれぞれの因子のノックダウンを行った。Lamin-B1、Cytokeratin-19、転写因子 X をそれぞれノックダウンした F28-7 株に FUdR を作用させるとアポトーシスに特徴的な細胞死形態を示すことがわかった。以上の結果より、Lamin-B1、Cytokeratin-19、転写因子 X は細胞がアポトーシスで死ぬかネクローシスで死ぬかを決定づける因子であると考えている。

P-10

Anti-oncogenic MicroRNA-203 Induces Senescence by Targeting E2F3 in Human Melanoma Cells

¹ 岐阜大学・院・連合創薬

² 岐阜大学・院・連獣、

○野口 俊助¹、山田 名美²、赤尾 幸博¹

これまでに我々は microRNA (miRNA; miR)-203 がメラノーマ細胞において発現低下しており、細胞へ導入することにより増殖抑制効果を示すことを報告した。しかし、miR-203 の細胞増殖抑制メカニズムについては未だ明らかとはなっていない。そこで、本研究では miR-203 の抗がんメカニズムを解明することを目的とした。ヒトメラノーマ細胞 Mewo に miR-203 を導入すると、細胞老化を誘導することが Senescence Associated- β -Galactosidase (SA- β -Gal) 染色により明らかとなった。また、SIRT1 の発現低下も認められた。我々は細胞老化誘導が miR-203 の抗がんメカニズムの一つであると考え、細胞老化誘導に関わる miR-203 の標的遺伝子の同定を行った。TargetScan データベースより標的遺伝子の候補として *E2F3* と *ZBP-89* が考えられた。miR-203 を導入した細胞では、E2F3 の 2 種類のバリエーションである E2F3a、E2F3b および ZBP-89 いずれもタンパク質発現は顕著に抑制された。ルシフェラーゼアッセイにより miR-203 は E2F3 および ZBP-89 をともに標的遺伝子とすることが明らかとなった。次に、これらの遺伝子の抑制が細胞老化に関わっているかを検証するため、siRNA を用いたジーンサイレンシングを行ったところ、E2F3 のノックダウンにより細胞老化が誘導された。また、E2F3a の高発現ベクターを作製し、E2F3a を高発現させることにより miR-203 による細胞増殖抑制効果および細胞老化誘導は減弱された。さらに、フローサイトメトリーにより miR-203 あるいは E2F3 に対する siRNA を導入された細胞では G₀/G₁ 期細胞の割合の増加が認められた。以上の所見より、miR-203 はメラノーマ細胞において *E2F3* を標的遺伝子として抑制することにより細胞周期の停止を引き起こし、その結果、細胞老化を誘導することが示唆された。