

養した。継代培地には10%牛胎仔血清含有のRPMI1640 (Gibco) を用いて、1週間おきに1/2量で継代した。また、樹立された低酸素耐性株からtotal RNAを抽出し、TaqMan miRNA assay (Life Technologies) を用いてmiR-210の発現量をリアルタイムPCRにて解析した。

【結果・考察】 3ヶ月間の長期的な低酸素環境での培養の結果、低酸素環境でも増殖することが可能な亜株（低酸素耐性株IM-9-HR）を樹立した。IM-9-HRは親株IM-9と比較して形態的な変化は見られなかったが、増殖速度が親株IM-9の1/2になっていた。また、低酸素環境下で培養しているIM-9-HRでは、低酸素応答性miRNAであるmiR-210の発現が顕著に上昇していることが明らかとなった。このIM-9-HRは低酸素環境である骨髓内に存在する骨髓腫細胞のモデル系として有用であると考えられた。

P1-20.

クロマチン制御標的剤によるアザシチジン耐性克服法の開発

(大学院修士課程1年 医学総合研究所 分子腫瘍研究部門)

○大須賀美穂

(東京薬科大学：生命科学部4年)

高橋 諒子

(大学病院：先端分子探索寄附講座)

梅津 知宏、小林 千晶

(大学病院：血液内科学分野)

片桐誠一朗、大屋敷一馬

(大学：医学総合研究所 分子腫瘍研究部門)

今西 哲、大屋敷純子

【背景と目的】 骨髓異形成症候群の治療においてアザシチジン (AZA) への耐性化は大きな問題であり、その克服法の開発が求められている。我々は、ATM/BRCA1 シグナルによるDNA修復の恒常的活性化がAZA耐性に必須の役割を果たすことと、AZA耐性細胞ではDNAが極端に低メチル化していることを報告した。これらの現象から、AZA耐性にはクロマチン制御機構が深く関与している可能性が考えられた。そこで、クロマチン制御標的剤、特にプロモドメイン阻害剤に着目して、AZA耐性克

服法の開発を目的に研究を行った。

【方法】 実験にはヒト白血病細胞株 (U937、HL-60) と、これらに由来するAZA耐性株 (R-U937、R-HL-60) を用いた。これらの細胞にプロモドメイン阻害剤I-BET151を添加し72時間後に、WST-8法による生細胞数の測定、アポトーシス、細胞周期とDNA障害の測定を行った。

【結果】 生細胞数測定の結果、R-U937はU937よりも強い感受性を示したが、R-HL-60とHL-60の感受性には顕著な差は見られなかった。アネキシン-PI二重染色の結果、I-BET151はこれらの細胞にアポトーシスを誘導することが確認された。p-H2AX免疫染色と7-AADによる二重染色をFACSで解析したところ、R-U937とU937ではG1/S停止がみられ、R-U937では顕著なDNA障害が生じていることが明らかになった。一方、R-HL-60とHL-60ではともにS期への移行と、顕著なDNA障害が見られた。I-BET151はアポトーシス阻害因子BCL2の発現を抑制することが報告されているため、BCL2タンパク質の発現量をウェスタンブロッティングによって調べたが、I-BET151処理による減少はみとめられなかった。

【考察】 プロモドメインタンパク質はアセチル化ヒストンに結合して、クロマチン構造を安定に保つと同時に、DNA修復の制御にも関与することが知られている。I-BET151はクロマチン構造を不安定にし、DNA修復を攪乱することで、AZA耐性の細胞にアポトーシスを誘導すると考えられた。

P1-21.

アザシチジン耐性白血病細胞におけるヒストン化学修飾の役割の解明

(東京薬科大学：生命科学部4年)

○高橋 諒子

(大学病院：先端分子探索寄附講座)

梅津 知宏、小林 千晶

(大学病院：血液内科学分野)

大屋敷一馬

(大学：医学総合研究所 分子腫瘍研究部門)

今西 哲、大須賀美穂、大屋敷純子

【背景と目的】 アザシチジン (AZA) は骨髓異形成症候群の治療において重要な薬剤であるが、容易

に耐性化してしまうことが知られている。我々は AZA 耐性白血病細胞の解析の結果、DNA の低メチル化が AZA 耐性細胞の特徴であることを報告した。一方で、AZA 耐性細胞における DNA メチル化以外のクロマチン制御機構は不明である。そこで、AZA 耐性細胞におけるクロマチン維持に、ヒストン化学修飾が果たす役割を解明することを目的に以下の検討を行った。

【方法】 実験にはヒト白血病細胞株 (U937、HL-60) と、これらに由来する AZA 耐性株 (R-U937、R-HL-60) を用いた。ヒストン H3 のリシン 4 番 (H3K4)、9 番 (H3K9)、27 番 (H3K27) の修飾 (アセチル化: ac、トリメチル化: me3) をウエスタンブロットによって比較した。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 SAHA 0.5 μ M を添加して 72 時間後の細胞数を測定し、24、48 時間後のそれぞれの細胞株のヒストン修飾を比較した。

【結果と考察】 ウエスタンブロットの結果、R-U937、R-HL-60 では U937、HL-60 に比べ、H3K4ac と H3K27me3 が増加していた。また U937 と比較して R-U937 では H3K9ac の増加がみられたのに対し、R-HL-60 では HL-60 と比較して H3K9me3 が減少していた。SAHA 添加後 72 時間の細胞数は、U937 と R-U937、HL-60 と R-HL-60 の間で違いはなく、AZA 感受性細胞と耐性細胞の SAHA への感受性に差はみられなかった。SAHA 添加後、U937、HL-60 では H3K4、H3K9、H3K27 全てのアセチル化の蓄積が見られ HDAC 阻害作用が確認された。一方、R-U937、R-HL-60 では、SAHA 添加後に H3K4ac が減少することが明らかになった。今回の検討より、AZA 耐性細胞におけるクロマチンの維持には、ヒストンの化学修飾、特に H3K4ac と H3K27me3 が重要な役割を果たしていると共に、その制御は感受性の細胞とは異なっていることが示唆された。

P1-22.

両側卵巣肺型小細胞癌の 1 剖検例とその生前の腹水細胞診像

(社会人大学院博士課程 3 年分子病理学講座)

○橋本 浩次

(大学: 分子病理学)

橋本 浩次、倉田 厚、藤田 浩司

黒田 雅彦

(大学病院: 病理診断部)

永井 毅

(大学病院: 産科・婦人科)

嶋田 秀仁、寺田 秀昭

卵巣肺型小細胞癌は英文で 25 例のみしか報告されていない極めて珍しい腫瘍であり、その予後は極めて悪いとされていた。しかし、その腹腔液細胞像はまだ報告されていない。我々は卵巣肺型小細胞癌の 1 剖検例を経験したので、生前の腹腔液細胞所見とともに報告する。症例は 2 経妊 2 経産の 75 歳女性。死亡より約 2 か月前に腰部～下腹部痛を自覚し、その後、大量腹水にて腹水穿刺を施行。その時の腹腔液細胞診で、強い重積性が見られる、核偏在性の異型細胞集塊が目立ち、class V (adenocarcinoma, suspected) と診断した。手術予定を組まれていたが、全身状態は急激に悪化し、婦人科初診から約 1 か月の急激な経過で死亡した。剖検にて、開腹時、腹腔内に 2,450 ml の血性腹水を認め、腹膜に、径 1 cm 大までの乳白色調の充実性腫瘍が多発していた。卵巣には両側とも径 5 cm 大の出血、壊死を伴った充実性腫瘍を認めた。組織学的には、やや小型～中型の異型細胞が充実性胞巣を形成して増殖する像を呈し、大型・奇怪な細胞も散見された。免疫組織化学的に、神経内分泌細胞への分化傾向を示し、卵巣肺型小細胞癌と診断された。腹腔穿刺細胞診を review したところ、強い重積性が見られる細胞集塊の他に、裸核状の異型細胞の索状配列や木目込み像も見られた。腹水細胞診の cell block を用いてこれらの細胞の免疫細胞化学的検索をしたところ、剖検時と同様に、神経内分泌細胞への分化傾向が認められた。卵巣原発小細胞癌、特に肺型は稀ではあるが、腹腔液細胞診で示唆することが可能となる可能性がある。文献的検索を行ったところ、卵巣肺型小細胞癌の約 2/3 が腹腔液細胞診に腫瘍細胞が見られる可能性が