

**P1-15.
Macrolide Antibiotics Exhibit Cytotoxic Effect under Amino Acid-Depleted Culture Condition via Blocking Autophagy Flux in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines**

(耳鼻咽喉科頭頸部外科学)

○平澤 一浩、塚原 清彰

(生化学)

森谷 昇太、風間 宏美、廣田 綾子

武村 淳、阿部 晃久、平本 正樹

宮澤 啓介

(乳腺科学)

宮原 かな

(医学総合研究所)

稲津 正人

オートファジー (自食) は細胞内タンパク質のリサイクル機構で、タンパク質合成に必要とされる細胞内アミノ酸プールの維持に必須である。我々はこれまでに、マクロライド系抗菌薬である Azithromycin (AZM)、Clarithromycin (CAM) がオートファジー阻害活性を持ち、Gefitinib、Bortezomib 等の分子標的薬剤との併用により種々の癌細胞のアポトーシス誘導を増強することを報告してきた。オートファジーの本質的役割はアミノ酸プールの維持であり、特に飢餓状態においては必要度が高まる。癌細胞はその増殖速度ゆえに正常細胞よりアミノ酸需要が高いが、中でも頭頸部癌を含む固形腫瘍では、中心部が常に乏血・乏栄養状態に曝されており、オートファジーへの依存度も高い。

アミノ酸飢餓培地で AZM、CAM を頭頸部癌細胞株 CAL27、Detroit562 に添加したところ、著明な殺細胞効果が発揮された。一方、通常の培養条件下では抗腫瘍効果は発揮されなかった。また、アミノ酸飢餓状態で CAL27 細胞に AZM/CAM を添加すると、アポトーシスと小胞体ストレス性転写因子 CHOP (GADD153) の強力な誘導も観察された。CAL27 細胞で CHOP knockdown により細胞死は有意に減弱し、CHOP^{-/-}MEF においても CHOP^{+/+}MEF に比べて細胞死が抑制された。Atg5 tet-off m5-7 株を用いて、アミノ酸飢餓条件下で atg5 knockout によりオートファジーを完全阻害した場合にも、CHOP の誘導と連動して細胞死が増強し

た。また、これらの系にアミノ酸を再添加することで、細胞死ならびに CHOP 誘導は完全に阻害された。

以上より、アミノ酸飢餓でマクロライドによりオートファジーを阻害すると、アミノ酸プールが枯渇し CHOP 誘導を介してアポトーシスをおこすと考えられた。癌治療におけるマクロライドを用いた「アミノ酸飢餓誘導療法」の可能性が示唆される。

**P1-16.
Targeting bortezomib-induced aggresome formation using vinorelbine enhances the cytotoxic effect along with ER-stress loading in breast cancer cell lines**

(乳腺科学)

○宮原 かな、小松誠一郎、石川 孝

(生化学)

風間 宏美、森谷 昇太、廣田 綾子

武村 淳、阿部 晃久、平本 正樹

宮澤 啓介

(耳鼻咽喉科・頭頸部外科学)

平澤 一浩

(中央校舎共同利用研究室)

國場 寛子

プロテアソーム系とオートファジー系は細胞内タンパク質 2 大分解系である。ユビキチン (Ub) 化タンパク質の大半はプロテアソームによって分解されるが、その処理能を超えたタンパク質は、微小管に沿って核近傍に輸送されてアグリソームを形成し、その一部はオートファジー系で分解される。今回、不良タンパク質輸送経路である微小管に着目し、乳癌細胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-468 におけるプロテアソーム阻害剤と微小管阻害剤との併用効果を検討した。

蛍光顕微鏡および電子顕微鏡を用いた解析において、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ (BZ) の添加により、vimentin、Ub、p62 を含む凝集体・アグリソームが核近傍に形成されることを確認した。微小管脱重合阻害剤パクリタキセル (PTX) と微小管重合阻害剤ビノレルビン (VNR) をそれぞれ BZ と併用したところ、いずれも BZ 誘導性のアグリソーム形成が阻害された。しかし、抗 Ub 抗体を用いた immunoblotting 法では、PTX に比べ VNR

との併用の方がアグリソーム形成を阻害している可能性が示唆された。

細胞増殖試験および flow cytometry による解析では、BZ+VNR 併用が BZ+PTX 併用に比べて、より強力にアポトーシスを誘導することを明らかにした。また、real-time PCR 法により、小胞体ストレス関連遺伝子 GRP78, CHOP の発現が、BZ+VNR 併用でより強く増強されることが明らかとなり、細胞死誘導と小胞体ストレス負荷との連動も確認された。

本研究において、BZ と VNR との顕著な相乗効果が観察された。癌細胞で「細胞保護的」に機能しているアグリソーム形成を標的としたプロテアソーム阻害剤と VNR との併用は、難治性転移性乳癌における新規治療法として有効な手段になり得ることが示唆された。

P1-17.

Regulation of tau phosphorylation on N-terminal domain by multiple microtubule-associated tau kinases

(細胞生理学)

○橋口美津子

Abnormally hyper-phosphorylated tau proteins (PHF-tau) are known as one of the hallmarks of Alzheimer's disease (AD) patient's brains. According to the evidence that phosphorylation level of PHF-tau correlates with neuronal cell death, hyper-phosphorylation of tau proteins might be a key event for AD pathology. CDK5 and GSK3 β have been reported to be highly expressed especially in AD brains and major kinases to induce PHF-tau and may cause cell death in AD brains. Tau proteins are expressed with many microtubule (MT)-binding proteins, CDK5, GSK3 β , and PKA. We have proposed that these protein complex associates with MT as a tau phosphorylation protein complex (TPPC) and maintain MT functions.

We conducted *in vitro* kinase assay using multiple combinations of two or three kinases (GSK3 β , CDK5, and PKA) to investigate protein-protein interactions on phosphorylation at N-terminal proline-rich domain. Phosphorylation was analyzed by Western blot using

anti-phospho-tau antibodies (pS199, pS202, pT205, pT212, pS214, pT231, pS235, and AT8).

Multiple combinations of two kinases showed mostly stimulatory effects. Pre-incubation of GSK3 β induced inhibition of CDK5 or PKA activity. On the other hand, that of CDK5 evoked stimulation of GSK3 β or PKA activity. PKA preincubation showed inhibitory or stimulatory effects on CDK5 or GSK3 β , respectively. Second, we examined interactions of three kinases. Surprisingly CDK5 and PKA activity were inhibited by pre-incubations of multiple combinations of other kinases. On the other hand, GSK3 β activities were stimulated by the pre-incubations of multiple combinations of PKA and CDK5 and these kinase combinations are the only steps to induce hyper-phosphorylation on PHF-tau (AT8, AT100) specific sites.

These results suggest that tau phosphorylation level might be maintained low by TPPC in a physiological condition.

P1-18.

Analysis of relationship between BTBD10 and TBK1 in ALS-related neuronal cell death

(薬理学)

○名和 幹朗

(薬理学、神経皮膚連携分子医学講座)

松岡 正明

※抄録の掲載は辞退する。

P1-19.

柏崎厚生病院における統合失調症医療保護入院患者の再入院に関わる因子の検討

(精神医学、立川メディカルセンター柏崎厚生病院：精神科)

○赤羽 学爾

(立川メディカルセンター柏崎厚生病院：精神科)

野村健太郎、石黒 裕美、川村 剛

吉濱 淳、鈴木 康一、松田ひろし

一般的に統合失調症は慢性的な経過をたどり、寛解と増悪を繰り返すとされ、退院後1年以内の再入