

が重要である。現在 HPV 感染を確認するには細胞から RNA を抽出し、逆転写反応、PCR 反応、電気泳動による確認といった複雑な過程が必要であり、外来で短時間に行うことは不可能であった。MNAzyme は酵素活性を持つ短鎖核酸であり、標的配列を認識することにより基質を切断し、蛍光を発する。MNAzyme の欠点としては活性の低さがあったが、我々が開発した cationic polymer を加えることにより飛躍的に反応を促進させ、10 分程度で蛍光を検出できるようになったことから、我々は MNAzyme を用いた高病原性 HPV-18 の検出法を検討し、将来的に外来で使用可能な検出法の開発に挑んだ。

【結果】 合成標的 RNA (E6, E7) については nM 以下のレベルで検出が可能であったが、細胞から抽出した RNA から E6, E7 を直接検出することはできなかったため、塩基配列を改変し反応温度を調節することで、HPV18 陽性子宮頸癌細胞株 Hela 細胞から抽出した total RNA より E7 遺伝子を検出することに成功した。

【今後の課題】 HPV18-E7 を検出することはできたものの、検出感度としては未だ改善の余地があるため、今後検討を重ね、将来的には擦過細胞診検体から直接 HPV の検出ができるようにしていきたい。

P3-41.

多発性骨髄腫細胞の浸潤様式の解明を目的とした *in vitro* および *in vivo* モデル系の構築

(大学院修士課程 2 年分子腫瘍研究部門)

○小澤ひとみ

(血液内科)

梅津 知宏、川名 千晶

(医学総合研究所 分子腫瘍研究部門)

東 剣虹、今西 哲、大屋敷純子

【背景と目的】 多発性骨髄腫患者の骨髄内は腫瘍性に増殖した形質細胞の集積により、さらなる低酸素状態に陥っていると考えられる。当研究室では患者骨髄内に近い培養モデル系として、慢性的な低酸素環境でも増殖可能な骨髄腫細胞株を樹立した。本研究では、この低酸素耐性株を用いて、多発性骨髄腫治療薬を含む各薬剤の細胞遊走能に対する影響を解析した。

【方法】 ヒト多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226 から樹立された低酸素耐性株 RPMI8226-HR は、低酸素状態 (1% O₂) で継代培養した。細胞遊走解析では、低酸素耐性株 (5×10⁴ cells/well) を 8 μm ポアサイズのカルチャーインサート内に播種し、24 時間後にポアを通過した細胞数を計測した。さらに、人工骨髄モデルとしてハイドロキシアパタイト (HA) 含有の多孔子スキャフォールド (GC Biolabs) に低酸素耐性株 (1×10⁵ cells) を充填し、ヌードマウス皮下に移植した。

【結果・考察】 *in vitro* 解析において、低酸素耐性株は親株と比較して細胞遊走が亢進していた。そこで、細胞増殖には影響を及ぼさない濃度で各薬剤 (Bortezomib (0.1-10 nM)、Thalidomide (0.1-10 μM)、Lenalidomide (0.1-5 μM)、Pomalidomide (0.1-5 μM)、Dexamethazone (0.1-10 nM)、Paclitaxel (0.1-10 nM)、Zoledronic acid (0.5-50 μM)、Fingolimod (0.1-5 μM)) を添加して細胞遊走への影響を検討した結果、免疫調整薬 IMiDs および微小管障害薬 Paclitaxel、免疫抑制剤 Fingolimod で細胞遊走の阻害が観察された (P<0.05)。

次に、*in vivo* 解析のために GFP を恒常的に発現した低酸素耐性株を新たに樹立し、これらを充填した HA 含有スキャフォールドをヌードマウス皮下に移植した。その結果、人工骨髄内で生着した GFP 陽性細胞を確認した。以上より、この *in vivo* 人工骨髄モデルは薬剤投与による多発性骨髄腫細胞の浸潤阻害の解析に有用と考えられる。

P3-42.

CRISPR/cas9 を用いたゲノム編集と shRNA 発現ウイルスベクターを用いた遺伝子発現抑制効果の比較

(東京薬科大学：薬学部)

○内藤 大樹、畝崎 榮

(消化器・小児外科)

征矢 良子、高橋 恒輔、和田 貴宏

粕谷 和彦、太田 嘉洋、渡辺 隆文

立花 慎吾、永川 裕一、勝又 健次

土田 明彦

【背景】 CRISPR/cas9 を用いたゲノム編集はゲノム配列の削除、挿入、置換が従来法に比し、格段に容

易になった。今回我々は食道癌細胞株においてこの手法を用い、SMARCB1/INI1（以下INI1）のノックアウトを試みた。INI1はSWI/SNF型クロマチン再構成因子複合体を構成する1因子で、正常細胞や上皮系癌細胞に普遍的に存在している。ゲノム編集と並行してshRNA発現ウイルスベクターを用いた同遺伝子のノックダウンを行い、両者を比較した。

【方法】 低分化型食道癌細胞株KYSE150、高分化型食道癌細胞株KYSE30を用い、遺伝子導入効率は全細胞数に対するGFP発現細胞の割合を計測し、算出した。

【結果】 遺伝子導入効率はゲノム編集した細胞では5~10%であった。ウイルスベクターによる導入効率は平均90%であった。ウエスタンブロッティングによる発現解析を行ったところ、ゲノム編集を行った方がよりINI1タンパク質発現を抑制していた。

【結論】 遺伝子導入効率の改善あるいは導入細胞の選択的培養を行えばCRISPR/cas9を用いたゲノム編集は従来法に比べ非常に有用である。

P3-43.

ハルミンはヒトメラノーマ細胞G361において抗アポトーシスタンパク質であるサバイビンとMcl-1のユビキチン-プロテアソーム系による分解を促進しアポトーシスを誘導する

(生化学)

○阿部 晃久、森谷 昇太、平本 正樹
風間 宏美、宮澤 啓介

古くから南米やアフリカにおいて薬用植物として用いられてきたharmala alkaloidsは β -carbolineを基本構造とする一群であり、民間治療薬として様々な症状に用いられてきた。我々はこれまで、 β -Carboline alkaloids (β -CAs)の抗腫瘍作用について研究を行ってきたが、今回はその一種であるharmineの、ヒトメラノーマG361細胞における作用について調べたので報告する。Harmineは濃度及び時間依存的に細胞死を誘導したことからカスパーゼ活性を調べたところ、カスパーゼ-3、および-9活性の上昇とPARPの開裂が観察された。同時に抗アポトーシスタンパク質であるsurvivinおよびBcl-2ファミリータンパク質であるMcl-1の発現の

減少も観察された。そこでsiRNA処理によりsurvivin及びMcl-1をノックダウンしたところ、共に細胞死を増強したことからharmineによるアポトーシス誘導はこれらのタンパク質の減少との関連が考えられた。興味深いことに、アポトーシスが誘導されるより前に細胞質に空胞形成が見られたため電子顕微鏡による観察を行ったところオートファゴソーム形成が見られたことから、harmineはアポトーシスに先行してオートファジーを誘導することが判った。次に、このオートファジーとアポトーシスとの関連を調べるために、オートファジー阻害剤である3-メチルアデニン(3-MA)及びクロロキン(CQ)とharmineの共処理を行った。その結果、早期オートファジー阻害剤である3-MAとの共処理ではsurvivinとMcl-1の減少が抑制されたが、後期オートファジー阻害剤であるCQとの共処理では発現は減少したままであった。Survivin及びMcl-1はユビキチン-プロテアソーム系により分解されることが知られている。今回の結果はharmineによるオートファジー誘導がユビキチン-プロテアソーム系を活性化してサバイビンとMcl-1の分解を促進し、その結果アポトーシスが誘導された可能性を示唆している。

P3-44.

多発性硬化症治療薬FTY720の抗腫瘍効果の検討

(医学部医学科4年)

○太田 行紀
(医学部医学科5年)
大熊 堯

(Universita degli Studi di Milano)

Alberto L.

(生化学)

平本 正樹、日野 浩嗣、風間 宏美
森谷 昇太、高野 直治、宮澤 啓介

【目的】 多発性硬化症治療薬FTY720 (FTY)はスフィンゴシン1リン酸(S1P)の構造類似体であり、S1P₁受容体アンタゴニストとして作用する。一方、抗腫瘍効果やオートファジーへの影響に関する報告もあるが、そのメカニズムは明らかとなっていない。我々は今回、FTYの抗腫瘍薬としての可能性を検