

討するため、種々のチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) との併用による殺細胞効果などについて解析を行った。

【方法】 肺癌細胞株 A549 と膵癌細胞株 PANC-1 を用い、TKI として Sorafenib (Sor) などを併用した。細胞生存率は CellTiter-Blue 試薬を用いて評価した。オートファジーフラックスは、オートファジー阻害剤との組み合わせによるイムノプロット法と、GFP-LC3-RFP-LC3ΔG 導入細胞株における GFP/RFP 蛍光強度比の評価により行った。オートファゴソーム形成については mCherry-GFP-LC3 導入細胞株を用いて、共焦点顕微鏡によるタイムラプス撮影を行った。細胞の形態観察はメイギムザ染色により行った。

【結果】 高濃度の FTY は単剤で、A549 細胞に対し殺細胞効果を発揮したが、種々の TKI を殺細胞効果が顕著でない濃度で併用したところ、より低濃度の FTY で殺細胞効果が見られた。また、FTY は濃度依存的にオートファジーを阻害し、Sor は濃度依存的にオートファジーを亢進することが示された。タイムラプス撮影では、FTY 添加によってオートファゴソームの形成とともに、著明な空胞形成が観察された。メイギムザ染色ではアポトーシス様の細胞死は観察されず、イムノプロット法でも PARP および Caspase-3 の切断は検出されなかった。

【結語】 FTY の抗腫瘍効果は、TKI を併用することにより顕著に増強された。現在、細胞死の様式と、細胞死に繋がる分子メカニズムについて、さらに解析を進めている。

### P3-45.

#### MB231-ERAI-venus システムを用いた難治性乳癌に対する「ER ストレス負荷療法」の確立

(生化学)

○風間 宏美、平本 正樹、高野 直治  
宮澤 啓介

(乳腺科)

宮原 かな

ユビキチン (Ub)・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系は、細胞内タンパク質の二大分解機構である。Ub 化タンパク質はプロテアソームで分解されるが、この処理能を超えたタンパク質は

微小管上を微小管形成中心 (MTOC) に向かって輸送されアグリソームを形成する。さらにアグリソームの一部はオートファジーで分解される。これよりプロテアソーム、オートファジー、アグリソーム間の協調的ネットワークが想定される。筆者らは、プロテアソーム/オートファジー阻害剤ならびにアグリソーム形成を抑制するための微小管形成阻害剤を用いてこの“ネットワーク”を包括的に阻害することで、ER ストレス負荷を介した強力な乳癌細胞死を誘導することを報告した (Miyahara K, Kazama H, et al. Int J Oncol. 2016)。

今回、ER ストレスの定量的・経時的アッセイ系を確立し、「ER ストレス負荷療法」のための薬剤選択を試みた。ERAI-venus バクターを MB231 細胞に導入し、強力な XBP1 スプライシングシグナルを発現する安定導入株を作成した。生細胞イメージングシステム IncuCyte を用いて経時的に venus 蛍光強度を測定し、培養細胞密度 (cell confluency) で補正を行った。蛍光強度は GRP78、IRE1、CHOP の誘導および eIF2α のリン酸化を含めた他の小胞体ストレス応答と良好な相関を示した。さらにプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BZ) と各種薬剤とのコンビネーションにおいても、BZ+CAM は BZ+AZM より高い蛍光強度を示し、また、BZ+VNR (微小管重合阻害剤) は BZ+PTX (脱重合阻害剤) よりも高い値を示した。さらに venus 蛍光強度は MB231 細胞に対する殺細胞効果と強い相関性を認めた。

以上より MB231-ERAI-venus システムは ER ストレス負荷療法の薬剤選択に極めて有用であると考えられる。

### P3-46.

#### CDK4/6 阻害薬アベマシクリブによる非アポトーシス/非ネクロトーシス細胞死を介した抗腫瘍効果の検討

(生化学)

○日野 浩嗣、風間 宏美、森谷 昇太  
高野 直治、平本 正樹、宮澤 啓介

(中央校舎共同利用研究室)

國場 寛子

細胞周期における G1 期から S 期への移行はサイ