

phase.

5-①-1.

分子標的薬 Gefitinib の副次的標的分子 GAK によるオートファジーフラックスの制御機構

(大学院修士課程2年生化学分野)

○宮崎 誠也

(生化学分野)

平本 正樹、風間 宏美、高野 直治

宮澤 啓介

目的：分子標的薬 Gefitinib は、EGFR を標的分子とするチロシンキナーゼ阻害薬であるが、GAK など副次的な標的分子も報告されている。我々は以前に、EGFR 非発現細胞でも Gefitinib 添加によってオートファジーフラックス (AF) が変動すること、また GAK 遺伝子のノックアウトによっても AF の変動が生じることを報告した。GAK はクラスリン小胞の脱被覆などに関与することが報告されているが、オートファジーとの関連は不明である。そこで今回、GAK による AF の制御機構について解析した。

方法：肺癌細胞株 A549 において、CRISPR/Cas9 システムにより GAK をノックアウトした細胞株 (GAK-KO 細胞) を樹立した。オートファジーについては、免疫ブロットティング (IB 法) で評価するとともに、AF 評価用プロベ GFP-LC3-mCherry-LC3ΔG (ΔG 法) の安定導入株を樹立し、解析を行った。また、オートファゴソーム・オートリソソーム形成を可視化するため、mCherry-GFP-LC3 (Tandem 法) の安定導入株も樹立した。リソソームについては飢餓条件下などにおいて蛍光免疫染色 (IF 法) で評価した。

結果・考察：GAK-KO 細胞では、A549 細胞との比較で以下のことが示された。1) オートファジーの指標となる LC3B-II の発現量が多い (IB 法)。2) オートファジー阻害剤 Bafilomycin A1 による AF 阻害効果が弱く、栄養飢餓による AF 誘導作用が遅い (ΔG 法)。3) 飢餓誘導後に蓄積するオートリソソームの数が多量 (Tandem 法)。4) LAMP2 陽性のリソソーム (オートリソソーム) のサイズが大きく、細胞全体に散在する (IF 法)。5) リソソーム膜透過性亢進剤 LLOMe 添加により、細胞内膜損傷の指標となる Galectin-3 と LAMP2 との共局在が増加す

る (IF 法)。以上より GAK-KO 細胞では、刺激に対するオートファジー関連変化が鈍いことから、AF が遅滞していることが示唆され、またリソソームの膨化、脆弱性などから、リソソームの機能あるいは再生過程の障害がその原因として考えられた。

5-①-2.

プロスタグランジン E 受容体 EP4 の発達段階における発現の検討

(大学院修士課程1年細胞生理学分野)

○岡 沙由稀

(横浜市立大学附属病院：小児科、大学：細胞生理学分野)

黒田 浩行

(細胞生理学分野)

横山 詩子

【背景】 動脈管は出生後、肺呼吸の開始により新生児循環に移行すると速やかに閉鎖する。動脈管の閉鎖に主要な役割を果たすプロスタグランジン E2 は EP4 受容体を介して作用する。胎生満期のラット動脈管では EP4 mRNA が大動脈よりも多く発現し、出生後減少することが報告されている。しかしながら、EP4 を検出する特異性の高い抗体が存在しない為、発達段階における詳細な EP4 の発現分布は未だ明らかになっていない。そこで本研究では EP4 レポーターマウスを用いて動脈管における EP4 の発現変化を検討した。

【方法】 EP4 レポーターマウスはマウス EP4 に IRES-nLacZ (核移行シグナル付き LacZ) 配列を組み込み、EP4 の機能に影響を与えずに β-galactosidase が発現するように設計した。このマウスは EP4 を発現している細胞では核内に集積した β-galactosidase が X-gal 染色によって青色に呈色する。胎生満期～生後 14 日の EP4 レポーターマウスから胸部臓器を取り出し実験に使用した。臓器全体を X-gal 染色したのちにパラフィン切片を作製して観察した。また、各臓器から作成した凍結切片を用いた X-gal 染色を行なった。

【結果】 パラフィンおよび凍結切片による検討から、胎生満期から生後 7 日の動脈管は X-gal 染色により青色に染色された。核染色をした動脈管の切片では、X-gal 染色による青色が核に存在する様子が

観察された。また、出生後0~7日までの間にX-gal染色による青色は肺動脈と大動脈側で均等に薄くなり、生後14日の動脈管は青色に染まらなかった。さらに、出生後0~7日のマウスで冠動脈や肺静脈、心房の一部が青色に染色されたが、生後14日のマウスでは青色に染色されなかった。

【考察】胎生満期の動脈管にはEP4が多く発現しており、出生後数日間で減少することが示された。さらに出生後14日間で冠動脈や肺静脈、心房の一部でもEP4発現が変化していることが示唆された。

5-①-3.

腹部大動脈瘤形成におけるVersicanとヒアルロン酸の役割の検討

(細胞生理学分野、横浜市立大学医学部医学研究科救急医学教室)

○廣見 太郎

(細胞生理学分野)

谷藤 章太、横山 詩子

(横浜市立大学医学部医学研究科救急医学教室)

竹内 一郎

【背景】腹部大動脈瘤(AAA)の根本治療は外科的加療に限られ、破裂後に緊急手術となった場合の30日死亡率は28%といまだ高い。我々は血管平滑筋にプロスタグランジンE₂(PGE₂)受容体EP4を過大発現させると、AAAの破裂で全例マウスが死亡することを見出した。そこで、網羅的遺伝子解析を行ったところ、血管平滑筋細胞ではEP4刺激によりVersicanとヒアルロン酸合成酵素(HAS1)が著明に増加していた。Versicanは細胞外基質の構成成分でヒアルロン酸や免疫細胞と結合し、大動脈の弾性の減少や炎症の誘導に関与する可能性が報告されている。

【目的】Versicanとヒアルロン酸のマウスやヒトAAAでの発現を検討する。

【方法】Cre-loxPシステムを使用し血管平滑筋特異的にEP4を過大発現したEP4-TgマウスにアンジオテンシンII(Ang II, 1 µg/kg/min)を投与しAAA疾患モデルマウスとした。AAA疾患モデルマウスの大動脈組織、手術時に採取したヒトAAA組織や非AAA患者の剖検から採取した大動脈組織中のVersicanの発現量を免疫組織染色で評価した。EP4-

Tgマウスの大動脈から血管平滑筋細胞を初代培養し、Versican、Has1のmRNAの発現量を定量的PCRで評価した。

【結果】EP4-Tgマウスから初代培養した血管平滑筋細胞にONO-AE1-329(EP4 agonist)を投与すると時間依存的かつ容量依存的にVersican、Has1のmRNAの発現量が増加した。Sulprostone(EP1, 3 agonist)

とButaprost(EP2 agonist)の投与ではVersican、Has1のmRNAの発現量は増加しなかった。Ang IIを投与したEP4-Tgマウスの大動脈平滑筋層では、Versicanが高発現していたが、同様にAng IIを投与した野生型マウスやAng II非投与のEP4-Tgマウスでは、Versicanの発現は少なかった。またヒトAAA組織で非AAA大動脈組織に比較してVersicanの発現量の増加を認めた。

【結語】大動脈血管平滑筋におけるEP4シグナルは大動脈中膜細胞外基質におけるVersicanとヒアルロン酸を増加させる。この細胞外基質の変化が血管弾性を減少させ、炎症を誘導することによりAAA形成に関与する可能性が示唆された。今後、VersicanやHas1のAAA形成への作用をさらに検討したい。

5-①-4.

一分子動態解析法を用いた抗腫瘍免疫におけるCAR-T細胞活性化の分子基盤

(免疫学分野)

○町山 裕亮、若松 英、矢那瀬紀子

古畑 昌枝、豊田 博子、横須賀 忠

(Baylor College of Medicine)

Mamonkin Maksim, Brenner Malcolm K

がん治療における細胞療法への期待は近年益々高まっており、中でもB細胞リンパ腫に絶大な効果を示すキメラ抗原受容体CAR-T細胞療法は注目を集めている。CAR-T細胞療法は腫瘍細胞を特異的に認識して細胞内シグナルに変換できるように設計されたCAR分子を細胞障害性T細胞(CTL)に発現させる養子免疫療法である。CTLの場合、標的細胞上の抗原を抗原受容体TCRで感知すると、共受容体CD8との相互作用によりLckキナーゼがTCRに移動しTCRをリン酸化することが活性化の