

による殺細胞増強効果はキャンセルされた。

結語：VK2 + VEN 併用により MM 細胞株に対するアポトーシス誘導が顕著に増強した。この分子基盤として、VK2 で ROS 産生 → NOXA 発現 → MCL-1 低下を誘導し、一方、VEN で BCL-2 を抑制することで、両 BCL-2 ファミリーの機能が解除され、これにより BAK/BAX 活性化によるアポトーシス誘導が増強したと想定される。現在、より詳細な解析を進めている。

3-2.

骨髄由来間葉系幹細胞の培養上清によるインスリン様成長因子結合蛋白質-4 を介した抗腫瘍効果

(大学院修士課程 2 年医学総合研究所 免疫制御研究部門)

○古阪 悠馬、溝口 出、片平 泰弘
宮川 聡美、関根 碧水、坂本 恵梨
渡邊 有麻、善本 隆之

(東京医科大学 分子病理学分野)

梅津 知宏

間葉系幹細胞 (MSC) は、多分化能や組織修復再生能を有する体性幹細胞で、その細胞療法が再生医療等製品として認可されているが、体内に投与すると癌細胞周辺に集積し腫瘍の増悪化が懸念されるため、癌患者は適応外となっている。MSC による治療効果は、主に分泌される液性因子のパラクリン効果によると考えられていることから、当研究室では、MSC の培養上清 (MSC-CM) による細胞フリー療法の治療効果について検討を行っている。本研究ではヒト骨髄由来 MSC-CM による抗腫瘍効果およびその作用機序についての検討を行った。

まず、*in vitro* において MSC-CM を各腫瘍細胞株に加えると有意に容量依存的な増殖抑制効果を示した。さらに、*in vivo* においてマウス扁平上皮癌 SS-CVII 腫瘍細胞を同系 C3H マウスに移植し触知可能後に MSC-CM を 5 日連日皮内投与すると新生血管の減少と共に腫瘍の増大を有意に抑制した。そこで、抗体アレイを用いてサイトカイン・増殖因子の定量解析を行うと、MSC-CM 中にはインスリン様成長因子結合蛋白質 (IGFBP) などの発現が高かった。IGFBP は、インスリン様成長因子 (IGF) に結合し

細胞増殖を調節する。この中、濃度の高かった IGFBP-4 は、*in vitro* において組換え IGFBP-4 を各腫瘍細胞に加えると有意に濃度依存的な増殖抑制効果と、さらに血管内皮細胞を用いた管腔形成アッセイにより血管新生抑制効果を示した。さらに抗 IGFBP-4 抗体を用いた免疫沈降反応により IGFBP-4 を除去した MSC-CM を各腫瘍細胞に加えると *in vitro* および *in vivo* において腫瘍新生血管の減少と共に腫瘍増殖抑制効果が有意にキャンセルされた。以上の結果より、MSC-CM は腫瘍増殖抑制効果を示し、その作用機序として IGFBP-4 が関与していることが示された。よって、細胞フリー療法として用いる MSC-CM は、仮に腫瘍があっても増悪化する可能性は低く、むしろその抑制効果が期待され安全性が高いことが示唆された。

3-3.

Elucidation for the mechanism of lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by extracellular vesicles

(社会人大学院博士課程 2 年消化器・小児外科学分野)

○木谷 嘉孝

(大学：消化器・小児外科学分野)

木谷 嘉孝、永川 裕一

(大学：分子細胞治療研究部門)

吉岡 祐亮、落谷 孝広

Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is a lethal disease; the 5-year survival of ESCC is 44.4%, recurrence rate after radical resection is 29-41%, median survival time is 5-10 months after recurrence. Though lymph node metastasis is a poor prognostic factor of ESCC and can develop even in superficial cancer, the detailed mechanisms of that are not elucidated well. Recently, various studies have indicated that extracellular vesicles (EVs) were involved in tumor progression and metastasis. We studied the mechanism underlying lymph node metastasis of ESCC by EVs. To evaluate the lymph node metastatic potential of tumor cell lines (TE-4, TE-8, KYSE30, KYSE70, EC-GI-10), each cell lines were transplanted in abdominal esophagus of C.B-17/scid mouse. TE-4, TE-8, and KYSE30 could estab-

lish an orthotopic model. In addition, TE-4 and TE-8 could induce lymph node metastasis. Subsequently, we analyzed whether EVs promoted lymphangiogenesis by adding EVs from the supernatant of ESCCs to human lymphatic endothelial cells (HLECs). EVs from ESCCs promoted proliferation, migration, and tube formation abilities of HLEC. We have evaluated whether lymph node metastasis is induced by tail vein injection of EVs derived from TE-4 and TE-8 to the orthotopic mouse models in vivo because EVs from TE-4 and TE-8 have lymph node metastatic potential. We try to analyze what specific molecules in EVs influence lymph node metastasis and find the biomarker of lymph node metastasis in the future.

3-4.

p53 regulates lysosomal membrane permeabilization (LMP) and autophagy in response to DNA damage

(社会人大学院博士課程3年耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野)

○山下 凱

(大学：生化学分野)

高野 直治、風間 宏美、宮澤 啓介

(大学病院：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野)

塚原 清彰

Lysosomes contain more than 60 hydrolytic enzymes and degrade macromolecular compounds transported by endocytosis, phagocytosis, and autophagy. Various forms of stress can induce lysosomal membrane permeabilization (LMP), resulting in the translocation of intralysosomal components, such as cathepsins, to the cytoplasm inducing lysosomal-dependent cell death (LDCD). We previously reported that treatment of cancer cells with a DNA-damaging drug induces LMP in a p53-dependent manner with unknown molecular mechanisms (Cancer Sci 2021). Here we have elucidated the underlying mechanism of this LMP induction.

As compared with TP53-knockout A549 (TP53-KO A549) cells, treatment of wild-type TP53 A549 cells with DNA-damaging drugs namely, doxorubicin, carboplatin, and etoposide, all induced LMP and accelerated

cell death more rapidly. The LMP was induced by up-regulation and activation of BID in wild-type TP53 A549 cells and followed by translocation of truncated BID to lysosomes. Simultaneously autophagy for the elimination of the damaged lysosomes (i.e. lysophagy) was activated via the p53-mTOR-TEFB/TFE3 pathways in response to DNA damage. These data suggested the dual functions of p53 for the LMP regulation; induction via p53-BID axis whereas repression of LMP via the p53-mTOR-TFEB / TFE3 pathway. Thus, blocking autophagy with hydroxychloroquine or azithromycin as well as ATG5 KO resulted in enhanced LMP and LDCD induction after exposure to DNA-damaging drugs. Furthermore, stabilization of lysosomal membrane using U18666A, an inhibitor of NPC1, resulted in suppression of LMP as well as LDCD in wild-type TP53 A549 cells but not in TP53-KO A549 cells. All these data indicated that LMP is finely regulated by TP53 after exposure to DNA-damaging drugs.

3-5.

乳癌細胞におけるHDAC6阻害剤とプロテアソーム阻害剤との併用によるROS産生と小胞体ストレス負荷を介した新規細胞死誘導法の開発

(大学：生化学)

○風間 宏美、高野 直治、平本 正樹

宮澤 啓介

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であるリコリノスタット (RCS) は特にHDAC6に対する阻害活性が高く、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BTZ) と共に多発性骨髄腫への治療応用が進行中である。今回、難治性乳癌治療を目的として両薬剤併用の効果を検討した。

乳癌細胞株MDA-MB231、MDA-MB468、SKBR3細胞において、BTZ+RCS同時添加によりROS産生が顕著に上昇し、かつ、全細胞株で単剤添加と比較して相乗的な殺細胞増強効果を認めた。この増強効果はHDAC6の特異的阻害剤TubacinとBTZとの併用でも同様に観察された。また、ERストレスを示すGRP78、リン酸化PERK、リン酸化eIF2 α の発現上昇を伴い、ERAI-XBP1-Venusプロローブを用いた