

ER ストレス定量解析法でも、両薬剤併用で顕著にストレス負荷が増大し、小胞体の膨化も観察された。一方、MitoSOX プローブでは ROS の産生は検出されず、ミトコンドリア電子伝達系に由来しない ROS 産生が示唆された。また、Annexin-V 陽性/PI 陰性細胞の出現ならびに Caspase-3 の活性化が弱いことから、古典的アポトーシス経路を介さない細胞死誘導が示唆された。さらに、ROS の scavenger である N-acetyl cysteine および glutathione ethyl ester の存在下では、ROS 産生、ER ストレス負荷、殺細胞増強効果の全てがほぼ完全にキャンセルされた。また、*de novo* タンパク質合成を抑制するシクロヘキサミドを同時添加すると、BTZ+RCS による ER ストレス、ROS 産生、および殺細胞増強効果は全て抑制された。

以上より、BTZ+RCS 併用において、翻訳に伴う小胞体内の ROS 産生亢進と ER ストレス負荷が相互に関連して、強力ながん細胞死を誘導していると考えられる。

3-6.

個別化治療マーカーを目指した膵癌における miR141/200c による抗癌剤耐性メカニズムの検討

(八王子：消化器外科・移植外科)

○落合 成人、千葉 斉一、安藤 彰俊
木村 信、中川 雅、小金澤 樹
横塚 慧、小林 敏倫、佐野 達
菊池 勇次、富田 晃一、新後閑正敏
田淵 悟、日高 英二、河地 茂行

【背景】 膵癌治療における課題の一つとして、癌細胞の抗癌剤に対する耐性と抗癌剤に対する効果予測因子が挙げられる。我々の研究成果により、miR141 と miR200c が上皮間質移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)、TGF β 経路、血管新生因子を通じて癌の転移や浸潤に関わる因子であることが示されている。膵癌における miR141/200c 発現による EMT を介した抗癌剤耐性獲得と分子標的治療薬の感受性メカニズムを明らかにすることによって、膵癌治療における個別化治療に対するバイオマーカーの確立を目的として本研究を立案した。

【方法】 膵癌細胞株において miR141 と miR200c を

導入して、EMT marker の変化、StemCell marker の変化、TGF β 経路と血管新生因子の変動を検討した。また膵癌根治切除例 107 例に対して切除検体の癌細胞中 miR141 と miR200c を qrtPCR にて測定し、二つの miRNA の組み合わせで高発現群と低発現群の 2 群に分けその遠隔成績を比較検討した。

【結果】 膵癌細胞株 (Panc1, MiaPaCa2) において、miR141 と miR200c の導入により、細胞形態の間質上皮移行 (Mesenchymal-Epithelial Transition; MET) 様変化と EMT マーカーの変動を確認した。そして Flow Cytometry を用いて CD44+/CD24- population を検討したところ、miR141 と miR200c によって Cancer Stem Cell like population の減少を認めた。さらには、miR141 と miR200c によって TGF β 経路 signature と血管新生因子の減弱を認めた。最後に、膵癌根治切除例 107 例に対して切除検体の癌細胞中 miR141 と miR200c を qrtPCR にて測定し、二つの miRNA の組み合わせで高発現群と低発現群の 2 群に分け、miR141/200c 発現が無再発生存率・累積生存率の有意な予後因子であることが示唆された。

【結語】 膵癌において miR141 と miR200c は TGF β 経路を介して EMT メカニズムと Cancer Stem Cell に関与していることが考えられ、その結果として転移・浸潤における重要な経路の一つである可能性が示唆された。

3-7.

低酸素環境下における肺癌細胞のオートファジーを標的としたアジスロマイシンによる新規治療法の開発

(茨城：呼吸器内科)

○鳥山 和俊、中村 博幸、青柴 和徹

(大学病院：呼吸器内科)

鳥山 和俊、阿部 信二

肺癌の治療薬として新しい抗癌剤が次々と登場しているが、その治療効果は十分ではない。その原因のひとつとして、腫瘍中心部では低酸素のために癌細胞の耐性が獲得されて抗癌剤の効果が低下することが指摘されている。一方、低酸素環境の癌細胞はオートファジーの機構を巧みに利用して自らの生存を可能にしている。したがってオートファジーの阻害は腫瘍中心部に残存した肺癌細胞を除去する新し

い治療法になると考えられる。これまでの本学生化学分野の研究においては、マクロライド系抗菌薬がオートファジーを阻害すること、さらに癌細胞にマクロライド系抗菌薬とチロシンキナーゼ阻害薬、プロテアソーム阻害薬、DNA 障害性抗癌剤などを併用すると抗癌作用が増強することが報告されている。そこで私たちはマクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシン (AZM) が癌細胞の低酸素環境におけるオートファジーを阻害して殺細胞効果を発揮するのではないかと考えて研究を行った。

非小細胞肺癌細胞株である A549 細胞を正常 (20%) または低酸素 (0.3%) 環境下で培養した。AZM は正常酸素下では A549 細胞の生存率には影響しなかったが、低酸素下では濃度依存性に殺細胞効果を発揮した。AZM は塩化コバルトを用いた疑似低酸素曝露実験においても殺細胞効果を発揮した。このような低酸素下における AZM の殺細胞効果は、カスパーゼ依存性のアポトーシスによるものであった。低酸素環境ではミトコンドリアの機能障害が生じてオートファジー (マイトファジー) の機序で除去されることが報告されているが、本研究では AZM が低酸素下のマイトファジーを阻害するために、機能障害に陥ったミトコンドリアが細胞内で蓄積してアポトーシスを引き起こしていることが明らかになった。以上の結果から、腫瘍中心部で抗癌剤耐性を獲得した肺癌細胞を除去する治療法として AZM の臨床応用が期待される。

3-8.

セリン代謝亢進による細胞外小胞の分泌を介したがん転移機構

(大学：医学総合研究所 分子細胞治療研究部門)

○山元 智史、吉岡 祐亮、落谷 孝広

(大学：分子病理学分野)

黒田 雅彦

近年、がん細胞由来の細胞外小胞はがんの発生から浸潤・転移まで影響を与えることが明らかとなっている (Kosaka, et al., JBC, 2010, Yokoi, et al., Nat. Commun., 2017)。これまでに、我々は前立腺がん細胞株特異的な細胞外小胞の分泌経路について報告した (Urabe et al., Sci. Adv., 2020)。一般的にがん細胞は細胞外小胞の分泌量が多いことを鑑みると、がん

細胞に共通した細胞外小胞分泌機構が存在すると考えられる。しかしながら、がん細胞に共通する細胞外小胞の分泌経路は明らかとなっていない。今回、我々は miRNA ライブラリーと当研究室の Exo-Screen 法を用いたスクリーニングを行い、新たに細胞外小胞分泌を制御する因子として、miR-891b およびそのターゲット遺伝子である Phosphoserine Aminotransferase 1 (PSAT1) を同定した。PSAT1 はセリン合成における代謝酵素であり、がん細胞では一般的にセリン消費が亢進している。多くのがん組織において PSAT1 発現量が上昇しており、それらの組織由来のがん細胞株において、PSAT1 をノックダウンすることで細胞外小胞の分泌が抑制されることを見出した。すなわち、PSAT1 を介した細胞外小胞分泌は複数のがん種に共通した機構であることを示唆している。次に、乳がん細胞株から樹立された高転移株 (肺転移・リンパ節転移・骨転移) における PSAT1 発現を検討した結果、各種高転移株において PSAT1 発現量の増大と細胞外小胞の分泌亢進が確認された。最後に PSAT1 の転移への影響を検討したところ、PSAT1 過剰発現細胞は破骨細胞を顕著に活性化し、骨転移を促進した。これらより、多くのがん細胞ではセリン代謝が亢進しており、セリン代謝異常が機能を持った細胞外小胞の分泌促進に寄与していることが明らかとなった。

3-9.

Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection and recurrence biomarkers for pancreatic cancer

(大学：医学総合研究所 分子細胞治療研究部門)

○吉岡 祐亮、落谷 孝広

Early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is essential for improving patient survival rates, and non-invasive biomarkers are urgently required to identify patients who are eligible for curative surgery. Here, we examined extracellular vesicles (EVs) from the serum of PDAC patients to determine their ability to detect early-stage disease. EV-associated proteins purified by ultracentrifugation and affinity columns underwent proteomic analysis to identify novel PDAC markers GPRC5C and EPS8. To verify the potency of