

P-57 β -catenin 遺伝子欠失ヒト胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28 における β -catenin の細胞生物学的意義の検討

宇佐美範恭^{1,2}・前田 修¹・森 正一^{1,2}・吉岡 洋¹

今泉 宗久²・上田 裕一³・下方 薫⁴・関戸 好孝¹

¹名古屋大学 医学部附属病院 予防医療部；²名古屋大学大学院医学研究科 胸部構築外科学；³名古屋大学大学院医学研究科 胸部機能外科学；⁴名古屋大学大学院医学研究科 機能調節内科学

【目的】我々は以前ヒト胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28 において β -catenin を含む染色体 3p21.3 領域のホモザイグス欠失を同定した。 β -catenin を遺伝子導入することにより、この細胞株における β -catenin 遺伝子欠失の生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】野生型 β -catenin (WT), S37C の点変異体 (S37C), C 末端欠失型 (Δ C) の発現ベクターを作成して NCI-H28 株に遺伝子導入し、immunofluorescence 法による細胞内局在の確認、colony formation assay による増殖抑制性の検討、および TCF-luciferase を用いた reporter-assay による転写活性の解析を行った。さらに AnnexinV 法と TUNEL 法を用いてアポトーシスの検討を行った。

【結果】WT と Δ C は細胞質と細胞膜に局在が認められたのに対して、S37C は核に強く局在が認められた。colony formation assay では vector (100%) に対し WT (50±23%) および S37C (41±13%) でコロニー数の抑制が見られた。TCF-luciferase による reporter-assay では S37C で最も強い TCF 転写活性が見られた。colony formation assay による増殖抑制がアポトーシスによるものであるかを検討するために、AnnexinV と TUNEL 法による染色をしたところ、WT と S37C を transfection した細胞で陽性が確認された。

【結論】以上より NCI-H28 株では β -catenin がアポトーシスを誘導し、増殖抑制性に機能することが明らかにされた。この細胞株にとって、 β -catenin 遺伝子欠失がその腫瘍形成過程に大きく関与したことが強く示唆された。

P-59 非小細胞肺癌組織における EphA2 レセプターの発現の意義

平井 恭二・小泉 潔・岡田 大輔・山岸 茂樹・木下 康裕

川島 徹生・榎本 豊・岡本 淳一・平田 知己・清水 一雄

日本医科大学 第 2 外科

Eph ファミリーチロシンキナーゼレセプターの 1 つである EphA2 レセプターはそのリガンドの ephrin-A1 とともに神経系のネットワーク形成と動脈の分化、血管新生に関与している。Eph/ephrin の相互作用による変化が細胞内シグナル伝達経路にどのように関与しているかは不明な部分が多いが、EphA2 レセプターの過剰発現が乳癌、前立腺癌などで認められ、癌においては Ras 遺伝子による細胞内シグナルや E-Cadherin, p53 ファミリーにより制御され、腫瘍細胞の浸潤や血管新生の誘導に重要な役割を果たすことが報告されている。＜目的＞非小細胞肺癌における EphA2 レセプターの発現の意義の検討を行った。＜対象と方法＞非小細胞肺癌切除例 (41 例：IA 期 14 例，III 期 27 例) に対し、EphA2 レセプター、CD34, E-Cadherin の発現を免疫組織化学的に検索し、腫瘍内での微小血管密度との相関さらには E-Cadherin との関与を検討した。パラフィン連続切片を作成し、各々の因子の発現を評価した。EphA2 と E-Cadherin の発現の評価は腫瘍細胞内の 10% 以上の発現を陽性とした。微小血管密度 (MVD) は 200 倍の数視野での CD34 陽性血管総数の平均で評価した。また、臨床病理学的因子、予後に関する検討も行った。RT-PCR 法により癌部における EphA2 と ephrin-A1 の mRNA の発現を検討した。＜結果＞EphA2 の発現率は IA 期 38.5% (5/13)，III 期 78.6% (22/28) と発現差を認めた ($P=0.017$)。4 年生存率は EphA2 陽性群で 45.1%，陰性群で 71.6% ($P=0.028$) であった。MVD (Mean±SE) は EphA2 陽性群で 64.5 ± 5.4 ，陰性群で 41.1 ± 3.8 と両群間に有意差を認めた ($P=0.006$)。E-Cadherin の発現は 73.2% (30/41) で EphA2 の発現との相関がみられた ($P=0.016$)。癌部における EphA2 と ephrin-A1 の mRNA の発現を伴って確認できた。＜結論＞EphA2 レセプターは E-Cadherin を介して発現し、血管新生因子さらには予後不良因子になり得る可能性が示唆された。

P-58 術前化学療法でプラチナ製剤耐性を示した症例に対する蛋白 Reticulocalbin-1 の検討

垣花 昌俊・中嶋 英治・前田 純一・Gong Yumbo

寿 延寧・八島 孝一・吉田 浩一・本多 英俊

田口 史子・大平 達夫・池田 徳彦・平野 隆

加藤 治文

東京医科大学 外科第一講座

【目的】近年、術前化学療法における腫瘍縮小効果は様々な癌腫において盛んに研究されている。これらの研究により、定められた病期における各種癌に対する抗癌剤の腫瘍縮小効果を評価することができる。肺癌の抗癌剤治療においてプラチナ製剤はその効果が評価されており様々な組み合わせの中で頻りに用いられている。しかしながら、肺癌の中でもプラチナ製剤に対して耐性を示すものが存在することも知られている。今回我々はプラチナ製剤を用いた術前化学療法に対して耐性を示した症例を過去に遡り集積し、切除標本から腫瘍部位における蛋白 Reticulocalbin-1 の発現について検討した。蛋白 Reticulocalbin-1 は CDDP 耐性株で著名に発現が低下することが知られているため、今回集積された肺癌でも蛋白 Reticulocalbin-1 の発現低下が認められれば従来の説を裏打ちすることとなる。

【対象と方法】プラチナ製剤を用いた術前化学療法を施行し術前化学療法の効果が認められなかった非小細胞肺癌症例 20 例を検討対象とした。パラフィン包埋標本を用いて、肺癌腫瘍部の Reticulocalbin-1 発現について免疫化学染色による評価を施行した。【結果と考察】今回集積された肺癌症例では蛋白 Reticulocalbin-1 の発現が低下する傾向を示していた。この結果からもプラチナ製剤に対する薬剤耐性と蛋白 Reticulocalbin-1 の発現低下が相関していることが示唆され、従来のデータを裏付けることとなった。これにより肺癌のプラチナ製剤を中心とした抗癌剤治療を行う上で、蛋白 Reticulocalbin-1 発現の評価が有用であると考えられる。

P-60 Gefitinib が EGFR 非発現 BCRP 過剰発現耐性細胞株の抗癌剤排出機能に与える影響についての検討

中村 洋一¹・岡 三喜男¹・早田 宏¹・伊藤 明子²

塩澤 健¹・中富 克己¹・北崎 健¹・土井 誠志¹

吉川 恵美²・池上 洋二²・吉田 久博²・河野 茂¹

¹長崎大学 医学部 第二内科；²明治薬科大学 薬学部 薬物体内動態学教室

【目的】上皮成長因子レセプター (EGFR) の選択的チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) である Gefitinib (ZD1839: Iressa) は抗癌剤との併用下で相乗的な抗腫瘍効果を示すことが実験レベルで知られているが、その機序の詳細については不明である。そこで今回我々は、Gefitinib が細胞の薬剤排出機構に与える影響を調べるため、EGFR 非発現 Breast cancer resistance protein (BCRP) 過剰発現の抗癌剤耐性細胞株の抗癌剤感受性が Gefitinib 併用下でどのような影響を受けるかを検討した。【方法】実験には EGFR 非発現ヒト小細胞肺癌細胞株 PC-6 (親株)、EGFR 非発現 BCRP 過剰発現ヒト小細胞肺癌細胞株 PC-6/SN2-5H (耐性株) を用いた。1) MTT assay を用い、非毒性濃度の Gefitinib 併用下での抗癌剤への感受性の変化を調べた。2) Flow cytometric assay にて、Gefitinib 併用下で BCRP の基質である topotecan (TPT) の細胞外への能動輸送の変化を測定した。3) ショ糖不連続密度勾配遠心分離により調製した各細胞株膜小胞を用いた膜輸送活性測定を行ない、HPLC により膜小胞内の Gefitinib 及び TPT 濃度の変化を測定した。【結果・考察】1) 耐性株において、Gefitinib 10 μ M (親株、耐性株の IC10 に相当する濃度) 併用下で抗癌剤の感受性は親株と同等のレベルにまで回復した。2) Gefitinib 併用下で耐性細胞内の TPT 濃度が上昇することが確かめられた。3) 耐性株膜小胞を用いた実験より、TPT の ATP 依存的膜輸送活性は観察されたが、Gefitinib では全く観察されなかった。また、両薬剤併用下では TPT 膜輸送活性は抑制され、その阻害様式は TPT に対し競合的であった。以上の結果より Gefitinib は BCRP に直接作用してその薬剤排出機構を阻害することが示された。