

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791562

研究課題名 (和文) I型、II型子宮体癌に着目した新規分子標的治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of novel molecular-target therapy focus on type I, type II uterine endometrial cancer

研究代表者

井上 貴史 (TAKAFUMI INOUE)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70380417

研究成果の概要 (和文)：

【目的】 p53 依存的 p21 の発現亢進は細胞老化誘導の分子ターゲットである。このプロセスには活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) が関与する。活性化型 K-ras により造腫瘍能を獲得した NIH3T3 細胞をモデルとした細胞増殖、老化誘導機構に細胞内 ROS がどう関与するか検討した。

【方法】 1) 活性化型 K-ras および dominant negative ER (DNER) を単独または共に発現する NIH3T3 細胞 (K12V、K12VDNER 細胞) を樹立し、細胞増殖能を解析した。2) 老化誘導能を β -galactosidase (β -gal) 染色、細胞内 ROS レベルを aminophenyl-fluorescein (APF) 蛍光染色後に FACS 法を用いて解析した。3) ROS 緩衝剤である N-acetyl-L-cystein (NAC) を用いて細胞老化誘導能の変化を観察した。4) 各蛋白発現を Western blots 法で検討した。

【成績】 1) K12V 細胞は ER の転写活性機能が亢進し、K12VDNER 細胞では ER の機能が抑制された。K12VDNER 細胞は K12V 細胞に比べ、細胞形態は大型かつ扁平化し、細胞周期は G1 期に集積して増殖能は有意に抑制されていた。2) 7 日間培養後の β -gal 陽性細胞数はコントロール細胞 (mock) と K12V 細胞ではそれぞれ 1.0%、4.7%であったのに対し、K12VDNER 細胞では 32%と増加し細胞老化が誘導された。3) mock に比べ K12VDNER 細胞では 2.2 倍に細胞内 ROS レベルが増加していた。4) ROS 緩衝剤 NAC の添加により K12VDNER 細胞の SA- β gal 陽性細胞が 7.3%に減少する一方で増殖能は増大した。4) K12VDNER 細胞では、K12V 細胞に比べて p38MAPK、p53、p21 の発現亢進を認めた。

【結論】 活性化型 K-ras により亢進した内因性 ER 機能を抑制することにより誘導される細胞老化には、細胞内 ROS 産生が関与する。ROS を阻害すると細胞老化誘導が回避できることから、ROS を介する細胞老化シグナルの存在が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Objectives: Increased expression level of p21 induced by p53 is one of the molecular target of premature senescence. Reactive oxygen species (ROS) is involved in this process. In this study, we investigated how ROS is mediated with the cell growth and mechanism of cellular senescence by suppressed ER using the model of NIH3T3 cell transformed by oncogenic K-ras.

Materials and Methods: 1) We established two NIH3T3 cell lines that expressed only oncogenic K-ras (K12V) or co-expressed dominant negative ER (K12VDNER) and analyzed the cell growth. 2) Induction of senescence was evaluated by β -gal staining. Intracellular levels of ROS were measured by FACS using Aminophenyl fluorescein (APF). 3) Inhibitor

of ROS, N-acetyl-L-cystein (NAC), was added onto the cell lines, and effect against the induction of senescence was evaluated. 4) Several proteins related with ras signaling was evaluated with immunoblots.

Results: 1) Cell growth of K12VDNER cells were markedly suppressed compared to mock or K12V cells accompanied with senescence by the appearance of multi-nucleated flat cells and significant increase of positive β -gal staining. 3) Intracellular levels of ROS were increased about two times in K12VDNER cells accompanying with induction of senescence. 3) In K12VDNER cell, positive β -gal staining cells were decreased and cell growth was recovered by the addition of NAC. 4) Expression level of p21 was increased in K12VDNER cell compared to mock or K12V cell.

Conclusion: Cellular senescence mediated with oncogenic K-ras and ER related with ROS. We suggested the pathway of senescence via ROS because inhibition of ROS rescued the induction of senescence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮体がん、アポトーシス、活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

我々は以前から癌細胞における老化誘導に着目し、複数の老化に関するシグナルソームを癌に再構築し、細胞老化を標的とした癌分子標的療法の開発の研究に力をいれている。今までの予備的実験から、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性をもつバルプロ酸 (VPA) や分化誘導剤である cAMP が癌細胞に細胞老化を誘導することで抗腫瘍効果を示すことを確認している。その分子生物学的機序は、臨床応用されている分子標的治療薬とは別のシグナル経路を介した癌細胞抑制効果を示しているため、その併用によって治療効果を増強し、新たな分子標的治療の開発につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

p53 依存的 p21 の発現亢進は細胞老化誘導の分子ターゲットである。このプロセスには活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) が関与する。活性化型 K-ras により造腫瘍能を獲得した NIH3T3 細胞をモデルとした細胞増殖、老化誘導機構に細胞内 ROS がどう関与するか検討した。

3. 研究の方法

- 1) 活性化型 K-ras および dominant negative ER (DNER) を単独または共に発現する NIH3T3 細胞 (K12V、K12VDNER 細胞) を樹立し、細胞増殖能を解析した。
- 2) 老化誘導能を β -galactosidase (β -gal) 染色、細胞内 ROS レベルを aminophenyl-fluorescein (APF) 蛍光染色後に FACS 法を用いて解析した。
- 3) ROS 緩衝剤である N-acetyl-L-cystein (NAC) を用いて細胞老化誘導能の変化を観察した。
- 4) 各蛋白発現を Western blots 法で検討した。

4. 研究成果

- 1) K12V 細胞は ER の転写活性機能が亢進し、K12VDNER 細胞では ER の機能が抑制された。K12VDNER 細胞は K12V 細胞に比べ、細胞形態は大型かつ扁平化し、細胞周期は G1 期に集積して増殖能は有意に抑制されていた。
- 2) 7日間培養後の β -gal 陽性細胞数はコントロール細胞 (mock) と K12V 細胞ではそれぞれ 1.0%、4.7%であったのに対し、K12VDNER 細胞では 32%と増加し細胞老

化が誘導された。(Fig. 1, 2)

3) mock に比べ K12VDNER 細胞では 2.2 倍に細胞内 ROS レベルが増加していた。(Fig. 3)

4) ROS 緩衝剤 NAC の添加により K12VDNER 細胞の SA-β gal 陽性細胞が 7.3% に減少する一方で増殖能は増大した。(Fig. 4)

5) K12VDNER 細胞では、K12V 細胞に比べて p38MAPK、p53、p21 の発現亢進を認めた。(Fig. 5)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

The Level of Reactive Oxygen Species induced by p21^{WAF1/CIP1} is critical for the determination of cell fate.

Takafumi Inoue et. al. Cancer Science 2009 (100), 1275-1283

Low-dose mithramycin exerts its anticancer effect via the p53 signaling pathway and synergizes with nutlin-3 in gynecologic cancers.

Tatsuhiko Ohgami Takafumi Inoue et. al. Cancer Science 2010 (101), 1387-1395

[学会発表] (計 1 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

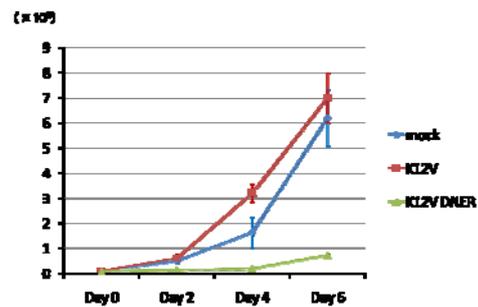
(1) 研究代表者

井上 貴史 (TAKAFUMI INOUE)

九州大学・大学病院・助教

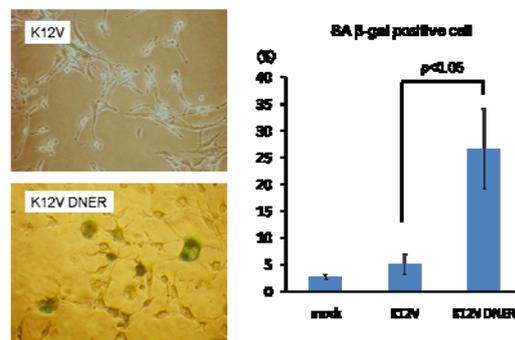
研究者番号：21791562

細胞増殖能の検討



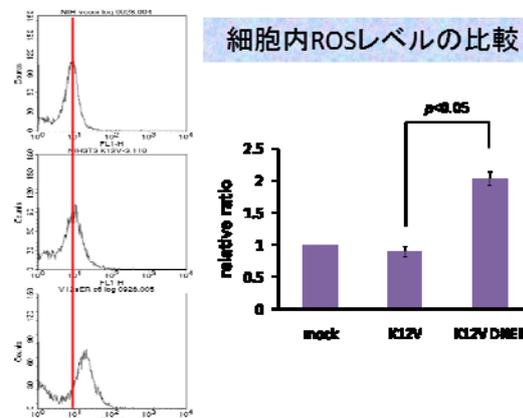
(Fig. 1)

細胞老化誘導の検討



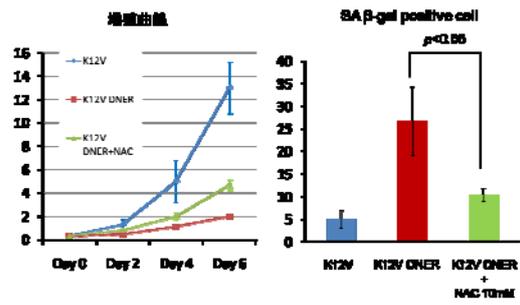
(Fig. 2)

細胞内ROSレベルの比較



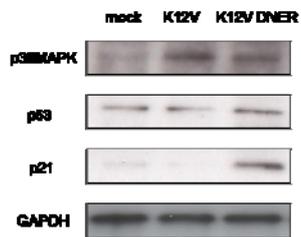
(Fig. 3)

NAC(活性酸素緩衝剤)による検討



(Fig. 4)

タンパク発現レベルの変化



(Fig. 5)