PP-212 樹状細胞療法における B7-H1 シグナル阻害 22日(金) ポスター会場1 の有用性に関する考察

東京都立多摩総合医療センター泌尿器科¹⁾, ジョーンズホプキンス大学シドニーキンメル癌センター腫瘍科²⁾, 東京大学大学院医学系研究科泌尿器外科学³⁾

東 剛司¹⁾, 佐藤 陽介¹⁾, 又吉 幸秀¹⁾, 田嶋 健一¹⁾, 長瀬 泰¹⁾, 押 正也¹⁾, Lieping Chen²⁾, 本間 之夫³⁾

【目的】我々は、B7-H1 ノックアウトマウスを用いた樹状細胞療法を行い樹状細胞療法における、B7-H1 シグナル阻害の効果を解析した。【方法】Ovalubumin と H-Y 抗原由来のペプチドをそれぞれ GFP と DSRed2 と連結した mini gene を作成し、MB49 に遺伝子導入し MB49^{OVApep}、MB49^{H-Ypep} クローンを作製した。抗原特異的 T 細胞(CTLs) は OT-1、H-Y、OT-1^{PD-1KO}、H-Y^{PD-1KO} より採取し、樹状細胞は、骨髓より GM-CSF と IL-4 を用い作成した。マウスに day0 に CTLs を、day1 に抗原をパルスした DCs を静注、day5 に脾臓を採取し解析し、あるいは day7 に腫瘍細胞を皮下注射した。【結果】腫瘍細胞 MB49^{OVApep} 単独に対しては DCs^{B7-H1KO} 治療群が優位に効果を認めた。しかし MB49^{OVApep} に MB49^{H-Ypep} を加えて投与すると DCs^{WT} 治療群が優位であった。原因として Subdominant CTLs にはより長い priming を要することより、DCs^{B7-H1KO} 上に 2 つの抗原が存在する場合は、Dominant CTLs の活性は増強されるが、Subdominant CTLs は逆に活性が弱くなること、さらにこの現象は Dominant CTLs 上に発現している PD-1 を介していることがわかった。【考察】B7-H1 シグナル阻害併用により樹状細胞療法の効果を増強するが、複数の抗原を投与する場合は、Dominant CTLs のみを賦活し、Subdominant CTLs の賦活が不十分となりうる事が確認された。

PP-213 膀胱癌の浸潤能に関与する invadopodia 形成 22日(金) ポスター会場1 には formin-binding protein 17 が必須である

むつ総合病院¹⁾, 鷹揚卿腎研究所弘前病院²⁾, 弘前大学大学院医学研究科³⁾

山本 勇人¹⁾, 吉川 和暁¹⁾, 須藤 美穂子²⁾, 橋本 安弘²⁾, 坪井 滋²⁾, 山谷 金光²⁾, 齋藤 久夫²⁾, 舟生 富壽²⁾, 畠山 真吾³⁾, 米山 高弘³⁾, 古家 琢也³⁾, 神村 典孝³⁾, 大山 力³⁾

【背景】癌細胞における基底膜への浸潤には浸潤突起(invadopodia)が重要であることが明らかになった(Bhavik et al. JBC, 2008)。また癌細胞において formin-binding protein (FBP) 17 の発現が亢進していることも報告されており(Ishida, Hokkaido Igaku Zasshi, 2004)、癌の浸潤過程における両者の役割は興味深いテーマである。しかし、膀胱癌の浸潤過程における両者の関係と意義については検討されていない。【対象と方法】筋層浸潤膀胱癌由来の細胞株 YTS-1、T24、筋層非浸潤膀胱癌由来の細胞株 KK-47、RT4 を使用した。invadopodia 形成と FBP17 発現の確認は共焦点レーザー顕微鏡を使用した。また FBP17 を発現抑制した筋層浸潤膀胱癌細胞株において invadopodia 形成能と浸潤能を確認した。【結果】YTS-1 と T24 は、KK47、RT4 に比べ、高い浸潤能を示した。また前者において invadopodia の存在を確認したが、後者では認められなかった。さらに前者において FBP17 が invadopodia に局在していることを確認した。FBP17 を発現抑制した筋層浸潤膀胱癌では浸潤突起形成能、浸潤能は有意に低下していた。【結語】invadopodia が膀胱癌細胞の浸潤過程において重要な役割を果たすことを確認した。さらに、invadopodia 形成には FBP17 が必要不可欠であり、浸潤性膀胱癌の治療においても新規標的分子となる可能性が示唆された。

PP-214 膀胱癌細胞株染色体欠失領域 (4p15.31) に 22日(金) ポスター会場1 マップされる miR-218 は膀胱癌において癌抑制遺伝子として機能する

鹿児島大学医歯学総合研究科泌尿器科学分野¹⁾, 千葉大学大学院機能ゲノム学講座²⁾

鏑野 秀一¹⁾, 千代丸 剛¹⁾, 榎田 英樹¹⁾, 川上 一盛¹⁾, 吉野 裕史¹⁾, 西山 賢龍¹⁾, 関 直彦²⁾, 中川 昌之²⁾

【目的】microRNA (miRNA) の発現異常は癌の進展に関わるとされる。arrayCGH アレイから、染色体欠失領域に存在する miRNA をマッピングし、膀胱癌細胞株における癌抑制機能を有する miRNA の探索を行った。【対象と方法】膀胱癌細胞株の欠失領域のうち、多くの miRNA が存在する領域に注目し、miRNA の発現を PCR により検証した。候補 miRNA の機能解析として、mature miRNA をトランスフェクションし、XTT assay, wound healing assay, invasion assay, flow cytometry apoptosis assay を行い、増殖、遊走、浸潤能、およびアポトーシス誘導を評価した。候補 miRNA の標的遺伝子については、網羅的な遺伝子発現解析により解析を行った。トランスフェクタントを用いて oligo-microarray で解析した。【結果】4 番染色体は 4 つの膀胱癌細胞株に共通する欠失領域であった。4 番染色体欠失領域に存在する miRNA のうち、臨床検体において発現が有意に低下していたのは miR-218 (P<0.01) であった。miR-218 は膀胱癌細胞株の増殖、遊走、浸潤能を有意に抑制し、アポトーシスを誘導した (P<0.01)。oligo-microarray では、標的遺伝子の探索から、癌の進展に関与する多くの遺伝子の発現が影響を受けていた。【結語】miR-218 は染色体欠失領域に存在する、癌抑制的な miRNA と考えられた。

PP-215 膀胱癌における TAGLN2 制御を介した miR-1 22日(金) ポスター会場1 の癌抑制的機能

鹿児島大学医学部泌尿器科¹⁾, 千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学²⁾

吉野 裕史¹⁾, 千代丸 剛¹⁾, 川上 一盛¹⁾, 鏑野 秀一¹⁾, 榎田 英樹¹⁾, 西山 賢龍¹⁾, 関 直彦²⁾, 中川 昌之²⁾

【目的】膀胱癌において癌抑制的に働く miRNA を探索し、その標的遺伝子の同定を行った。【対象と方法】臨床膀胱癌 5、正常 11 検体を用いて miRNA アレイ解析を行った。癌で低発現であった miRNA の発現を real-time PCR で多数の臨床検体において検証した。標的遺伝子については、候補 miRNA のトランスフェクタントを用いてオリゴマイクロアレイで解析した。標的遺伝子への結合を検証するためにルシフェラーゼアッセイを行った。標的遺伝子の臨床検体における発現を免疫染色で評価した。またトランスフェクタントにおける gain-of-function study を行い、増殖、遊走、浸潤能、およびアポトーシス誘導を評価した。【結果】miR-1 は膀胱癌において最も発現が抑制され、また腫瘍抑制効果は最も大きかった。TAGLN2 を miR-1 の標的遺伝子とし実験を行った。ルシフェラーゼアッセイで miR-1 が TAGLN2 の 3'UTR に結合することを確認した。TAGLN2 は増殖・遊走・浸潤・アポトーシスに関与することが示唆された。免疫染色では TAGLN2 の発現強度と Grade に有意な相関関係を認めた。【結語】膀胱癌の miRNA 発現プロファイルから、癌抑制的に働く miR-1 とその標的遺伝子で癌遺伝子的作用を有する TAGLN2 を同定した。

PP-216 膀胱癌細胞株において miR-133a は GSTP1 22日(金) ポスター会場1 を直接制御しアポトーシスを誘導する

鹿児島大学医学部泌尿器科¹⁾, 千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学²⁾

内田 洋介¹⁾, 千代丸 剛¹⁾, 川上 一盛¹⁾, 榎田 英樹¹⁾, 鏑野 秀一¹⁾, 吉野 裕史¹⁾, 西山 賢龍¹⁾, 関 直彦²⁾, 中川 昌之²⁾

【目的】我々はこれまでに、miR-133a が膀胱癌において発現が低下しており腫瘍抑制的に働くことを報告した。今回、miR-133a の新規標的癌遺伝子を探知し、膀胱癌の新規分子ネットワークの解明を試みた。【対象と方法】標的遺伝子探索には miR-133a を導入した膀胱癌細胞株を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。標的遺伝子の 3'非翻訳領域に miR-133a が直接結合するかを検証するためにルシフェラーゼアッセイを行った。miR-133a と標的遺伝子の機能解析として XTT assay, flow cytometry を行った。臨床検体における標的遺伝子発現を real-time RT-PCR にて評価した。【結果】miR-133a の標的遺伝子として GSTP1 を探索した。miR-133a 導入細胞では GSTP1 の発現が著明に抑制された。ルシフェラーゼアッセイで miR-133a が標的遺伝子の 3'非翻訳領域に直接結合することを確認した。miR-133a 導入細胞および si-GSTP1 導入細胞において癌細胞の増殖能は有意に抑制され、アポトーシスを誘導した。臨床検体において GSTP1 の発現は膀胱癌において有意に高かった。【結語】膀胱癌細胞において、癌抑制遺伝子 miR-133a は GSTP1 を制御しており、miR-133a-GSTP1 の分子ネットワークはアポトーシス誘導に重要な標的であることが判明した。

PP-217 膀胱癌細胞株における miR-517a のアポトーシスを介した腫瘍抑制機能 22日(金) ポスター会場1

鹿児島大学医歯学総合研究科泌尿器科学分野¹⁾, 千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学²⁾

吉富 孝之¹⁾, 川上 一盛¹⁾, 千代丸 剛¹⁾, 榎田 英樹¹⁾, 鏑野 秀一¹⁾, 吉野 裕史¹⁾, 加々良 一朗¹⁾, 西山 賢龍¹⁾, 関 直彦²⁾, 中川 昌之²⁾

【目的】膀胱癌細胞株における脱メチル化剤処理前後のマイクロ RNA 発現解析の結果から、DNA メチル化による発現制御を受け、腫瘍抑制的にはたらくマイクロ RNA を同定する。【対象と方法】膀胱癌細胞株において脱メチル化剤処理前後でマイクロ RNA 発現解析を行なった。処理後に発現が著明に回復した miR-520g と miR-517a についてリアルタイム RT-PCR による検証と cell proliferation assay を行なった。細胞増殖を有意に抑制した miR-517a についてアポトーシス解析を行なった。細胞増殖を有意に変動する遺伝子を探知するため、miR-517a を導入した細胞を用いて遺伝子発現解析を行なった。【結果】マイクロ RNA 発現解析により抽出された miR-520g と miR-517a はリアルタイム RT-PCR において脱メチル化処理により発現が回復することが確認された。Cell proliferation assay において miR-517a を導入した細胞では control に比べ、著明に細胞増殖が抑制された。アポトーシス解析では miR-517a 導入細胞においてアポトーシスの亢進が確認された。miR-517a を導入した細胞において amphiregulin (AREG) の発現が低下し、BCL2-associated transcription factor 1 (BCLAF1) の発現が亢進していた。【結語】miR-517a は膀胱癌細胞株においてアポトーシスの誘導を介して細胞増殖を抑制し、腫瘍抑制的にはたらくことが示唆された。