

腎がん細胞における 15d-PGJ2 の細胞死への影響

1 メンバー	5名
2 研究概要	<p>① シクロペンテン型プロスタグランジ 15-deoxy Δ 12,14 prostaglandin J2 とトポイソメラーゼ阻害剤の相乗効果にユビキチン-プロテアソーム経路は関与しているか</p> <p>② 15d-PGJ2 との相乗効果が期待できるトポイソメラーゼ II 阻害剤以外の薬剤の模索</p>
3 目的	<p>① 現状 RCC (腎細胞がん) は化学療法に対して高い耐性を維持している。私たちは、先輩方が示した、15d-PGJ2 とトポイソメラーゼ阻害剤の細胞死における相乗効果について、ユビキチン-プロテアソーム経路が関与しているかどうかを調べる。 ⇒15d-PGJ2 による細胞死の機構解明は、神経変性疾患と癌の両者の発症機序解明に繋がり、治療薬開発の契機となる。</p> <p>② 現在、腎がん治療の臨床において、複数の抗がん剤が併用されている事例が多いので、15d-PGJ2 においても、トポイソメラーゼ阻害剤以外の抗がん剤との併用が細胞死における相乗効果をもたらすのかを調べる。 ⇒抗癌活性をより低濃度かつ短時間で示す薬を発見し、副作用の低減と治療の効率化を図る。</p>
4 方法	<p>① ユビキチン阻害剤、プロテアソーム阻害剤を用いてユビキチン-プロテアソーム経路を阻害した上で抗がん剤を投与し、15d-PGJ2 と併用したときの効果と比較する。</p> <p>② 15d-PGJ2 と併用し、細胞傷害性について相乗効果が見られるものを探す。</p>
4' 解析手法	<p>実験は 96 ウェルプレートにおいて薬剤を含む培地上で 37°C、CO₂5% で培養し、20~30 時間後に次の i~v の手順で計数を行う。</p> <p>i 顕微鏡による肉眼観察 (細胞の形態への影響の指標) : 顕微鏡を用いて手作業で形態変化が起きた細胞を計数する。</p> <p>ii MTT アッセイ (ミトコンドリアの変質の指標) : MTT 溶液(生きている細胞にのみ取り込まれ、還元されて紫色に変化する物質)を利用して、分光光度計で吸光度を測定し、生きている細胞の割合を調べる。</p> <p>iii クロマチン凝集 (核の変質の指標) : Hoechst33342 (生きている細胞に取り込まれて DNA に結合し紫外線を当てると蛍光を発する物質) で染色した細胞を蛍光顕微鏡で観察・撮影する。クロマチン凝集が起きると <u>DNA が密集し、明るく光るので、それを利用して死細胞数を数える。</u></p> <p>iv PI 染色 (細胞膜の変質の指標) : ヨウ化プロピジウム (生きている細胞では選択的に排出される物質で、<u>死んだ細胞のみが染色される</u>) に細胞を漬け、写真を撮影して、死亡した細胞の数を数える。</p> <p>v caspase-3 活性 (細胞膜の変質の指標) : caspase-3 蛍光測定アッセイキットを利用して、染色液(Ac-DEVD-AMC)で細胞を染色する。Caspase-3 の酵素活動によって AMC が生成され、その時に蛍光を発することを利用して、プレートリーダーで死細胞数を測定する。</p>
5 今後の予定	<p>姫路獨協大学薬学部医療薬学科生理学研究室 矢上達郎教授のご指導の下で</p> <ul style="list-style-type: none"> ・課題研究としては、夏休み中に 15 回程度研究室を訪問し、実験を行う。2 学期以降はデータまとめ、論文・ポスター作成、英訳を中心に、追加実験の有無などを決定する。 ・薬理研究としては、春休み中に追加実験を行い、来年 7 月の学会発表に向けて追加実験・発表練習などを重ねる。

※参考

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide : C₁₈H₁₆BrN₅S

Hoechst33342 : 2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride
: C₂₇H₃₁C₁₃N₆O

PI : ヨウ化プロピジウム : C₂₇H₃₄N₄I₂

Ac-DEVD-AMC : Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (AMC = 7-Amino-4-methylcoumarin) : C₃₀H₃₇N₅O₁₃