

$\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT)  
欠乏によるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の  
発現上昇に依存したがん細胞老化の誘導

2016 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

松村 健吾

# 課程博士学位論文 内容の要旨

氏名 (英字名) 松村 健吾 (Kengo Matsumura)

学位論文題目  $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) 欠乏によるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の発現上昇に依存したがん細胞老化の誘導

## 序章

Chromosome 7 open reading frame 24 (C7orf24) は、膀胱癌に高発現する機能不明のタンパク質として2007年に影山らによって見出された。その後、C7orf24はグルタミル回路において $\gamma$ -グルタミルアミノ酸を5-オキソプロリンに変換する $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) 活性をもつことが2008年にOakleyらによって報告された。また、尿路系癌のみならず、乳癌や肺癌や子宮頸癌等の様々な癌種において、正常組織に比べ癌組織でGGCTが高発現していること、腫瘍組織における高いGGCT発現レベルは予後不良因子であることが示されている。一方、GGCTの発現抑制は、*in vitro*において肺癌や前立腺癌や乳癌を含む様々な癌細胞の増殖抑制とそれに引き続く癌細胞死を誘導することが明らかとなっている。また、*in vivo*においてもGGCT-siRNAによる腫瘍縮小効果が報告されている。これらの背景からGGCTは有望ながん治療標的分子であると考えられる。しかしながら、GGCT欠乏による癌細胞の増殖抑制の機序は未だ不明である。そこで本研究では、癌細胞培養系においてGGCTを人為的に欠乏させた場合に発揮される細胞増殖抑制効果に伴う細胞生物学的現象とその分子メカニズムを解析し、細胞老化の誘導が重要な役割を果たすことを明らかにした。

## 第1章 GGCT欠乏による増殖抑制作用の定量的評価

ヒト乳癌細胞株のMCF7細胞、MDA-MB-231細胞に、GGCTに対するsiRNAをリポフェクション法で導入した。GGCTの発現低下はウエスタンブロッティング法で確認した。細胞増殖をトリパンブルー染色法によって解析した。その結果、GGCT-siRNA導入後4日の時点で細胞播種からの生細胞数の相対値は、コントロール群のそれと比較して低かった (MCF7細胞: control群  $2.47 \pm 0.34$ , GGCT-siRNA群  $0.84 \pm 0.17$ , Student's t-test,  $P=0.01$ ; MDA-MB-231細胞: control群  $5.61 \pm 0.40$ , GGCT-siRNA群  $2.20 \pm 0.74$ , Student's t-test,  $P<0.01$ )。GGCT-siRNA導入後5日以降に細胞死が増加し、7日の時点での死細胞の割合は顕著に増加していた (MCF7細胞: control群  $4.89 \pm 0.8\%$ , GGCT-siRNA群  $27.50 \pm 5.3\%$ , Student's t-test,  $P<0.01$ ; MDA-MB-231細胞: control群  $11.03 \pm 1.5\%$ , GGCT-siRNA群  $46.79 \pm 4.9\%$ , Student's t-test,  $P<0.01$ )。MCF7細胞において、カスパーゼの活性化、形態学的な核の断片化、細胞周期解析におけるsub-G1期細胞の増加など、アポトーシス細胞死を示す特徴はいずれも認められなかった。GGCT-siRNA導入後4日以降で生存している細胞は、平坦で大型の細胞に形態が変化していることが観察された。

## 第2章 GGCT欠乏によるがん細胞の細胞老化誘導

GGCT-siRNA導入後4日以降に観察された細胞形態変化が、細胞老化に特徴的な形態であると考えられたため、細胞老化マーカーであるSenescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) 染色法を用いて細胞老化を評価した。その結果、MCF7細胞、MDA-MB-231細胞をはじめとしてPC3細胞、LNCaP

細胞 (前立腺癌)、A172 細胞 (神経膠芽細胞腫)、Hela 細胞 (子宮頸癌)において、SA-β-Gal 染色陽性の細胞の割合は GGCT-siRNA 導入群において増加していた。また、細胞老化誘導因子の発現量をウェスタンブロッティング法で検討した結果、GGCT 発現低下によって、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子(CDKI)である、p21<sup>WAF/CIP1</sup> もしくは p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子産物の発現量が顕著に増加することを見いだした。これらの結果から GGCT の人為的欠乏は種々の癌細胞に細胞老化を誘導することが明らかとなった。

### 第3章 GGCT 欠乏による CDKI 誘導依存的な細胞老化と細胞死

GGCT 発現低下によって誘導される CDKI は細胞種によって異なっていた。細胞老化の誘導に対する発現誘導された CDKI の寄与を検討するために、GGCT と同時に p21<sup>WAF/CIP1</sup> もしくは p16<sup>INK4A</sup> に対する siRNA を導入することにより、GGCT が欠乏しても p21<sup>WAF/CIP1</sup> もしくは p16<sup>INK4A</sup> が誘導されなくなった細胞を作成し、細胞老化誘導を評価した。その結果、MCF7 細胞では p21<sup>WAF/CIP1</sup> の発現を同時に低下させると細胞老化の誘導が抑制されたが、p16<sup>INK4A</sup> を低下させても抑制されなかった。また、Propidium Iodide (PI) 染色法を用いて細胞周期解析を行ったところ、前述の結果と合致して MCF7 細胞では GGCT 欠乏によって G0/G1 期での細胞周期停止が誘導されたが、p21<sup>WAF/CIP1</sup> を同時に発現低下させることにより G0/G1 期の細胞集団の増加が顕著に抑制された。トリパンブルー染色法による細胞増殖と細胞死の割合についても検討したところ、p21<sup>WAF/CIP1</sup>-siRNA 導入細胞では細胞死誘導が抑制され、細胞増殖も回復することが明らかとなった。一方、MDA-MB-231 細胞では p16<sup>INK4A</sup> に対する siRNA を同時に導入することにより、GGCT 欠乏によって誘導される細胞老化と引き続いて生じる細胞死が抑制され細胞増殖が回復した。以上の実験結果から GGCT 欠乏による細胞老化と引き続く細胞死の誘導を伴う増殖抑制効果は、MCF7 細胞では p21<sup>WAF/CIP1</sup>、MDA-MB-231 細胞では p16<sup>INK4A</sup> の発現レベルの増加に依存していることが示唆された。

### 総括

以上の結果から、癌細胞における GGCT の欠乏は、CDKI の発現量増加による細胞周期の停止が遷延することで細胞老化が誘導され、非アポトーシス細胞死を介して細胞増殖抑制効果を発揮すると考えられた。本研究の成果は、GGCT を治療標的とした抗腫瘍効果の機序の一端を明らかにし、今後の GGCT 標的治療薬の開発に寄与するものと期待される。

# 目次

略語表 .....	1
序章 .....	2
第 1 章 GGCT 欠乏による増殖抑制作用の定量的評価	
緒言 .....	7
実験材料及び方法 .....	8
実験成績 .....	10
考察 .....	15
第 2 章 GGCT 欠乏によるがん細胞の細胞老化誘導	
緒言 .....	16
実験材料及び方法 .....	17
実験成績 .....	18
考察 .....	23
第 3 章 GGCT 欠乏による CDKI 誘導依存的な細胞老化と細胞死	
緒言 .....	25
実験材料及び方法 .....	26
実験成績 .....	28
考察 .....	39
総括 .....	42
引用文献 .....	44
研究業績目録 .....	48

## 【略語表】

ARF1	ADP-ribosylation factor 1
CDK	cyclin-dependent kinase
C7orf24	Human chromosome 7 ORF 24
GAPDH	glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase
GGCT	$\gamma$ -glutamylcyclotransferase
pRb	protein retinoblastoma
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RNAi	RNA interference
SA- $\beta$ -Gal	senescence-associated $\beta$ -galactosidase
siRNA	small interfering RNA

## 序章

今回研究対象にした蛋白質分子について、私が所属する研究グループでは長く研究を積み重ねてきた歴史があり、しかも同分子を治療標的とする新規抗がん剤開発へ向けて今後の発展性が大いに期待できるため、これまでの歴史と背景について最初に述べる。

研究の端緒は、1990年代の終わりに遡る。当該研究の端緒となった基本技術はプロテオミクスである。質量分析を基本として、測定した対象ポリペプチドの質量に合致する既知のアミノ酸配列をデータベースから探し出すという原理を考えれば、プロテオミクス実施のためには全ゲノム情報が必要であるが、我々の研究グループはゲノムプロジェクト終了前からこの新技術に挑戦を始めた。

具体的には二次元電気泳動法や質量分析法による蛋白質同定技術を用いる実験系にいち早く着手し、前立腺特異抗原 (PSA) のプロテオーム解析では20種類もの様々な分子種をカタログ化した。この結果から、癌性 PSA と非癌性 PSA が異なる分子集団であることを世界で始めて明らかにした。前立腺癌マーカーである前立腺特異抗原 (PSA) は完全長で血清中に存在するのではなく、誰も予想していなかった現象であるが、様々なサイズに断片化していたのである。さらに、癌細胞由来の PSA と非癌性 PSA の断片化の状態に明らかな違いがあり、前立腺癌と非癌性前立腺疾患由来の PSA を区別することも突き止めた (1)。

原理上、未知の遺伝子配列の蛋白質に対してプロテオミクスは無力であるため、ゲノムプロジェクト終了を待ってプロテオミクス実験を本格化させた。正常組織と癌組織の比較研究のために、一般には深く考察されることもなくプロテオミクスが行われているが、本来ヒト組織は構成蛋白質組成が異なる多彩な細胞集団であるため、正常と疾患状態の比較検討を成立させることは容易ではない。その点、尿路上皮粘膜は結合織から剥離しやすく、しかも構成細胞は移行上皮という単一集団とされており、プロテオミクスの対象として最適の組織である。幸いなことに、これまで我々の研究グループは尿路上皮癌の診断・治療の標的となる特異的蛋白質を求めて長年研究してきた。

膀胱癌を代表とする尿路上皮癌は泌尿器癌の中では前立腺癌に次いで罹患者が多い。経尿道的膀胱腫瘍切除術を受けた患者の約7割が膀胱内再発を繰り返すことから経過観察症例を含めて常時数万人におよぶ患者数が推測される。また、尿路上皮癌を示唆する最も重要な症状として血尿が挙げられるが、集団検診では成年女子の7%、男子の3%に顕微鏡的血尿を認め (木下ほか、日本医事新報 3097: 29, 1983)、尿路上皮癌のスクリーニング検査を要する被験者は数十～数百万人に達すると見込まれる。このように検査対象者が膨大であるにもかかわらず、尿路上皮癌の診断は必ずしも簡便ではない。通常、内視鏡検査が確定診断の決め手となるが、侵襲的な上に高コストでマススクリーニングには適さない。だが、多くの非癌患者も除外診断のためにこの侵襲的検査を受けているのも事実である。尿を用いた補助診断法として尿細胞診があるが、特異度 (95~100%) に優れているものの感度 (40~60%) は低く、殊に高分化癌では著しく不良である (0~15%)。また、主観的判定ゆえ診断士間の結果の相違もありうる。最近、BTA test や NMP22 といった尿中腫瘍マーカーが保険適応となり臨床の場で用いられつつあるが、尿細胞診に比べ感度が向上したものの特異度が低いのが難点である。より高い感度・特異度であることはもちろん、非侵襲的、低コスト、多数の検体に対応可能、短時間で結果が得られる、といった特長をもつ検査法の開発が急務である。

我々のグループではこれらの問題点を解決できるような尿路上皮癌に特異的な蛋白質を求めて、プ

ロテオミクス黎明期から積み重ねてきたノウハウを最大限に活用し、尿路上皮癌組織と正常尿路上皮組織を試料とした二次元電気泳動法によるプロテオームデファレンシャルディスプレイを行ってきた(2001年日本泌尿器科学会総会、2002年日本癌学会総会)。スクリーニングの具体的方法は尿路上皮癌組織と正常尿路上皮とを試料とし、二次元電気泳動法、質量分析およびペプチドマスフィンガープリント法から成る網羅的プロテオーム解析である。これにより尿路上皮癌で高発現している蛋白質群を同定した(3,4)。膀胱癌マーカー候補であるカルレティキュリン(calreticulin、以下CRT)はこれらのうちのひとつとして同定されたものである。膀胱癌においては、primary cultureのプロテオーム解析で得られた発現増強スポットの一つとして報告した論文(5)が唯一報告されているに過ぎない。各種癌とも腫瘍マーカーとしての検討は全く行われていなかった蛋白質である。

最近、プロテオミクス関連論文が幾何級数的に増加しているが、具体的にある種の疾患マーカーの確立に至った例はほとんど報告されていない。そのため、当該研究の成果はプロテオミクスによる診断マーカー開発のプロトタイプとして大きな意義がある。さらに、最も確立された診断法である尿細胞診が陰性であった癌の約70%を検出できたことは特筆すべき特徴である。現在保険適応のある尿路上皮癌マーカーとの同一尿検体による比較では、BFPの感度が40.0%、NMP22が50.0%であったのに対し、それぞれの患者群でCRTは93.3%、86.4%という圧倒的に高い検出率を示した。CRTをマーカーとして用いることは世界初の試みであるだけでなく、当該疾患の診断能を大いに向上させることが期待できる。

今回研究対象としたC7orf24(別名GGCT)も上記の蛋白質群の一つとして同定したものである(4)。同蛋白質が同定された2001年当時、機能はおろか蛋白質としての存在も明らかではなかった。影山らは解析結果からこの蛋白質の実在を確信し、遺伝子組み換え蛋白質を作製してモノクローナル抗体の樹立に成功した。当初の結果を検証すべく、ウェスタンブロット解析で多数の臨床検体を検討し、やはり癌組織で実在する蛋白質であり、しかも正常組織に比べて明らかに高発現していることを確認した。また、膀胱癌に限らず、前立腺癌を含む各種の癌細胞株でも高発現していることを確かめた。続いてGGCTの癌細胞における機能を明らかにする目的で、遺伝子導入および抑制実験を行った。NIH3T3細胞にGGCT遺伝子を導入した安定発現株を樹立し増殖促進が見られることを確認した。一方、悪性形質転換は認めず癌化能はないものと結論した。その上で、当該蛋白質を高発現している株細胞を対象にRNA干渉を実施したところ、明らかな癌細胞増殖抑制効果を認めた(4)。そこで、これまで不十分ながら治療効果が確認されている抗がん剤に同分子を標的とするRNA干渉を組み合わせれば、一層の癌細胞増殖抑制効果が得られるのではないかと期待した。

近年まで実在する蛋白質との認知が無かったためGGCTに関する論文は数少ない。2008年Oakleyらはγグルタミル回路で長年未同定であった酵素gamma-glutamyl cyclotransferase(GGCT:γ-グルタミルアミノ酸を5-オキソプロリンに変換するγ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ活性)として報告し(5)、現在データベース上ではこの名称が用いられている。彼等の報告内容は新酵素の発見、立体構造決定、酵素活性の解析で、癌との関わりには触れていない(6)。2009年、Kageyamaらは正常組織での基礎検討としてラットにおけるC7orf24 mRNAの臓器分布を報告した(8)。肝、腎に比較的多く発現しているものの、全般的に諸臓器で低発現であった。このことは、GGCTを治療標的とした場合に正常組織への傷害が軽微である可能性を示唆していると解釈可能である。未発表データながら、同遺伝子のノックアウトマウスを作製したところ、胎生致死にならず、子を産することが確認できている

ことも治療標的としての安全性を裏付ける。

それまでの報告の多くは基礎的知見のみで、同分子の臨床的意義、殊に癌での意義は不明であった。しかし、2010年 Gromov らは大変興味深い報告をした(7)。乳癌123例の臨床検体を試料として同様の二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行い、同じく GGCT が高発現蛋白質であると同定した。彼等はポリクローナル抗体を作製し、免疫組織学的検討を行ったところ46%の陽性率であった。また、高発現症例は有意に生存率が低いことも示した。さらに2000例以上の他癌種でも検討しており、子宮癌で58%、肺癌で38%、大腸癌で72%の陽性率であり、多くの癌でも高発現していると報告した。このことは Kageyama, et al が各種癌細胞株での高発現を証明してきたことと合致する結果であった。2011年 Kageyama らのグループに所属する Uejima が骨肉腫を対象とした論文を発表した(8)。骨肉腫手術標本40例での GGCT mRNA 発現は全例で対照とした正常骨芽細胞株より高値(1.3~21.8倍、平均8.7倍)を示した。蛋白質レベルでも骨肉腫細胞5株すべてで正常骨芽細胞株より高い発現が確認された。骨肉腫細胞株 HOS 細胞を試料としてマトリゲルチャンバーを用いた検討では、siRNA 投与により HOS 細胞の遊走能と浸潤能の双方が抑制された。増殖だけでなく遊走、浸潤といった癌細胞の特徴的性質のいずれにも GGCT が深くかかわっていることが示唆された。以上から GGCT の働きを効率よく抑制できる方法を確立すれば、全く新しい癌治療法の発展が期待できるものと思われる。

一連の研究の最大の特色・独創性は、治療標的の対象になったことがない新しい蛋白質という新規性である。上記の通り、ようやく出始めた諸家の報告は基礎的なものが多く、臨床材料を元にした研究は少ない。次に挙げられる特色としては、幅広く他の癌種にも応用できる可能性である。Gromov らの研究では多種の癌で GGCT 高発現が認められており、治療効果が実証されれば多くの癌種への応用性を秘めていると考えられる。また、これまでの予備検討では正常細胞における siRNA 投与での細胞増殖抑制効果は見られない。これは正常細胞での GGCT 低発現に由来するものと推測される。すなわち、抗 GGCT 治療において正常組織への重大な有害事象を呈さない可能性があり、このことも GGCT を治療標的とした際の魅力のひとつである。

我々は核酸医薬開発だけでなく、薬学部ならではの総合力を生かし、癌細胞増殖抑制効果を持つペプチド型阻害剤の設計と合成を進めている。C7orf24 について想定される GGCT としての酵素反応機構(γグルタミルシステインが基質)から、基質遷移状態に基づいてペプチド型阻害剤を設計・合成し、まず *in vitro* で細胞増殖抑制効果を、次にマウス移植腫瘍モデルに対する全身投与実験でも腫瘍増殖抑制効果を確認したところである。

我々の研究グループがプロテオミクスを用いて癌に特異性が高い蛋白質を検索し、現在の段階に至った経緯と実績を列挙する。

- 1) 2002年、癌性・非癌性 PSA が異なる分子集団であることを解明(1)
- 2) 2004年、カルレティキュリンを膀胱癌マーカーとして同定(2)
- 3) 同蛋白質のプロトタイプ ELISA 測定系試作(3)
- 4) 2004年、3種類の蛋白質を組み合わせた複合マーカー研究(2)
- 5) 2007年、C7orf24 を多数の癌腫で高発現する蛋白質として同定(4)
- 6) 細胞増殖促進機能を持ち、RNA 干渉での発現阻害によりアポトーシスとは異なる機構での腫瘍細胞増殖抑制効果があることを発表(上島ら、日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会)

- 7) 正常臓器での発現は極めて低く、相対的に肝・腎に多い (9)
- 8) 骨肉腫では、ヒト臨床検体 (n=40) 全例で当該 mRNA が高発現 (~22 倍) しており、RNA 干渉では細胞増殖の抑制だけでなく、遊走能・浸潤能が低下 (8)
- 9) マウス皮下移植腫瘍 (肺癌細胞株 EBC-1) に対し、RNA 干渉で明らかな副作用が無く、腫瘍増殖抑制効果は明瞭 (10)
- 10) iPS 細胞では、初期化前の元の線維芽細胞に比得当該分子の発現量は約 7 倍に増加 (京都大学 iPS 細胞研究所: 未発表データ)

以上から、C7orf24 を標的とした治療薬開発は既に POC (Proof of Concept) がとられており、十分に妥当性があり、副作用のリスクが少なく、独自の作用機構で高い効果を期待できる。siRNA だけではなく、我々が新たに創出したペプチド型阻害剤を適切な DDS 技術を用いて医薬品開発をすることも有望であり、さらにはこれをミミックする低分子化合物開発を目指す点で、極めて独自性の高い有用な研究である。

新規蛋白質の発見から創薬まで走り切ったグループは世界中で皆無であり、我々のグループは誰も成し遂げることがない仕事をおこなっている。ただ、創薬を進める上で、細胞死を起こす仕組みが明らかでないことは是非とも解決すべき重要な問題であった。その障壁を突破すべく、細胞死機構解明の扉を開けた本研究は非常に画期的な意義深い業績である、と位置付けることができる。

細胞老化は、細胞がある一定回数細胞分裂を重ねた際に細胞分裂を停止させ恒常的な細胞増殖停止を起こす細胞現象である (11)。細胞老化を起こす主な原因は、正常細胞が分裂する際のテロメア短縮とがん遺伝子の活性化、活性酸素、化学療法剤暴露など様々な要因による DNA 損傷の蓄積によるものと考えられている。アポトーシスと同様に正常組織における細胞老化は、細胞ストレスをかかえた正常細胞のがん化予防機構であると考えられている (12)。細胞老化を起こした細胞は、平坦で大型化した特徴的な細胞形態を有し Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) 染色陽性を示す (13)。

細胞老化は正常細胞だけでなく癌細胞でも誘導される (14-16)。治療によって誘導される細胞老化は Therapy-induced senescence (TIS) と知られ (17)、乳癌細胞株の MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞におけるアドリマイシン投与、大腸癌細胞株の HCT116 におけるカンプトテシン投与、鼻咽頭癌の CNE1 におけるシスプラチン投与など、化学療法剤は様々な癌細胞で細胞老化を起こすことが報告されている (18-22)。最近、メラノーマ細胞において分子標的薬の BRAF 阻害剤が細胞老化を誘導することで抗癌作用を示したことも報告されている (23)。*In vivo* においても、ヒト線維肉腫細胞の HT1080 細胞を移植したマウスにドキシソルビシンを投与することで細胞老化が誘導された (24)。術前化学療法として CAF 療法を受けた乳癌患者の臨床検体において、SA- $\beta$ -Gal 染色陽性割合が上昇し、p53 および p16<sup>INK4A</sup> の染色陽性割合も高かったことが報告され (24,25)、臨床的にも化学療法によって腫瘍細胞に対し細胞老化を誘導することが明らかにされている。

細胞老化の誘導を制御する重要な機構として、p53-p21<sup>WAF1/CIP1</sup> および p16<sup>INK4A</sup>-pRb 経路が挙げられる (26,27)。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> および p16<sup>INK4A</sup> はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) である (28,29)。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> は p53 転写因子の直接的な下流標的遺伝子であり、CDK2 あるいは CDK1 複合体に結合し阻害することで G1 期における細胞周期進行を調節している。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現誘導は G1 期に細胞周期を停止させ細胞老化を誘導する。p16<sup>INK4A</sup> は CDK4 あるいは CDK6 と結合し、その機能を阻害することで Rb タンパクのリン酸化を阻害する。その結果、Rb タンパクが E2F 複合体から解離することを

阻害することで E2F の DNA への結合を阻害する。E2F は転写因子として細胞周期進行に関わる遺伝子発現を調節していることから、p16<sup>INK4A</sup> は細胞周期停止と細胞老化の誘導に関与している (30)。

以上のことから、GGCT 欠乏が引き起こす細胞現象とその現象機構の解明は、がん細胞における GGCT 欠乏による細胞現象と増殖抑制の機序を解明する上で重要である。そこで本研究では、がん細胞培養系において GGCT を人為的に欠乏させた場合に発揮される細胞増殖抑制効果に伴う細胞生物学的現象とその分子メカニズムを解析し、細胞老化の誘導が重要な役割を果たすことを明らかにした。

## 第1章 GGCT 欠乏による増殖抑制作用の定量的評価

### 緒言

膀胱尿路上皮癌に高発現するタンパク質として同定された C7orf24 は、その後 GGCT と同定され様々ながんで高発現することが明らかとなった。さらに、GGCT の高発現は乳癌の予後不良因子であると報告された (7)。一方で、GGCT の発現量を抑制することは、*in vitro* において前立腺癌や肺癌や大腸癌など様々ながん細胞の増殖抑制効果を示すことが明らかとなっている (7)。マウスに肺癌細胞である EBC-1 細胞を移植し、その移植片に GGCT-siRNA を投与することで腫瘍増大が抑制されたと報告されており (10)、GGCT をがん細胞標的とする抗腫瘍効果は *in vitro* のみならず *in vivo* においても明らかになりつつある。

しかしながら、GGCT の発現量を抑制することで誘導される細胞死の機序についてはほとんど解明されていない。そこで本章では、臨床的に予後との相関が示されている乳癌 (7) に着目し、代表的な乳癌細胞株である MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞等を用い、GGCT に対する siRNA を導入して、GGCT 欠乏によるがん細胞の増殖抑制効果を解析し、さらに MCF7 細胞における GGCT 欠乏によるカスパーゼ活性化を伴うアポトーシス細胞死の関与について検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 細胞と培養条件

MCF7 細胞、MDA-MB-231 細胞、HL-60 細胞は RIKEN BRC または ATCC より購入した。MCF7 細胞、MDA-MB-231 細胞は DMEM (Wako Pure Chemical Industries)、HL-60 は RPMI-1640 (Wako Pure Chemical Industries) に 10% ウシ胎児血清 (HyClone, South Logan) および 1% penicillin/streptomycin (それぞれ 100 units/ml、100 µg/ml) を加えた培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

### 2. 抗体

一次抗体には、マウス由来 IgG 抗体として、GGCT (1:1000; 6-1E, Cosmo Bio)  $\beta$ -actin (1:1000; 017-24551, Wako Pure Chemical Industries)、ウサギ由来 IgG 抗体として、PARP-1 (1:4000; ALX-210-302-R100, Enzo Life Science)、Caspase-3 (1:1000; #9665, Cell Signaling Technology) を用いた。二次抗体には、Horse anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) を Vector Laboratories、Goat anti-rabbit IgG-HRP を Jackson Immuno Research Laboratories からそれぞれ購入し用いた。

### 3. GGCT-siRNA 導入リポフェクション条件

5.0 x 10<sup>4</sup> 個 / well の MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞を 6-well ディッシュに播種した。24 時間後、30 pmol / well の Non-targeting-siRNA (control-siRNA) もしくは GGCT-siRNA と 5µl の Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen) 試薬を含むトランスフェクション用無血清培地 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 中で混合し、5 分間、室温にて静置させ、血清を除去した培地に交換した培養細胞に添加し、終濃度 10 nM の siRNA の存在下でトランスフェクションを行った。使用した siRNA 配列を以下の表に示す。

Target gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')
Non targeting	GUACCGCACGUCAUUCGUAUC	UACGAAUGACGUGCGGUACGU
GGCT	UGACUAUACAGGAAAGGUCTT	GACCUUCCUGUAUAGUCATT

### 4. ウェスタンブロッティング法

培養細胞を PBS で洗浄したのち、室温下約 5 分間のトリプシン処理にて細胞を接着面から遊離させ遠心処理にて細胞を回収した。回収した細胞を RIPA Buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate-Na, and 0.1% SDS) にプロテアーゼ阻害剤 (Nacalai Tesque) を加えたもので溶解し、氷冷させながらホモジナイザーにより超音波処理にて完全に破碎した。溶解液を 4°C、10,000×g の条件下で 15 分間遠心分離を行い不溶性の成分を除去し、上清に含まれる可溶性の蛋白抽出液を回収した。抽出液は BCA タンパク質測定法 (Bio-RAD) を用いてタンパク質濃度を決定し、それぞれ 1 サンプルあたりタンパク質量として 20 µg に sample Buffer (125mM Tris-HCl, 4% SDS, 20%グリセロール, 10% 2-メルカプトエタノール, 0.04% ブロモフェノールブルー) を加え、95°C、5 分間熱変性を行い、10% ポ

リアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した。セミドライ式転写装置、25V 50 分で、PVDF メンブレン (Millipore) に転写した後、5% スキンミルクおよび 0.05% Tween-20 を含有するリン酸緩衝溶液 (PBST) で室温下、1 時間ブロッキングした後、メンブレンを上記の希釈率で調製した一次抗体を、4°C 一晩、インキュベートした。PBST にて 5 分間、3 回洗浄したのち、1/2000 希釈した二次抗体を室温、1 時間、作用させた。抗体希釈液には 3% BSA 液を使用した。タンパク質の発現シグナルは、Clarity Western ECL Substrate (Bio-RAD) を用いて発色させ、ChemiDoc XRS Plus (Bio-RAD) の CCD カメラで検出した。

## 5. 細胞周期解析

$5.0 \times 10^4$  個 / well の MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞を 6-well ディッシュに播種し、24 時間後に control-siRNA および GGCT-siRNA を 3. で用いた siRNA 導入リポフェクション条件にて細胞に siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクションしてから 4 日後に、浮遊した細胞は遠心処理で回収し、接着した細胞は PBS で洗浄したのち、室温下約 5 分間のトリプシン処理にて細胞を接着面から遊離させ遠心処理にて回収した。回収した細胞を、-20°C の 70% エタノールを含む PBS にて一晩作用させエタノール固定を行った。次に、 $20,000 \times g$  で 5 分間遠心し、70% エタノールを除去した後、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A を含む PBS で懸濁し 37°C で 30 分間静置し、RNA の消化を行った。その後、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  propidium iodide (PI) を含む PBS で懸濁し遮光、室温にて 30 分間静置させ含有する DNA を染色した。ナイロンメッシュを用いて凝集塊を除去したのち、FACS Calibur (BD Bioscience) を用いて DNA 含有量を解析した。それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

## 6. トリパンプルー排出実験

$5.0 \times 10^4$  個 / well の MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞を 6-well ディッシュに播種し、24 時間後に control-siRNA および GGCT-siRNA を 3. で用いた siRNA 導入リポフェクション条件にて細胞に siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクション後 4 日目もしくは 7 日目にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液に等量の 0.4% トリパンプルー (Wako) を添加し、10  $\mu\text{l}$  の細胞懸濁液を血球計算盤に血球計算盤とカバーガラスの隙間全体に広がるように入れた。トリパンプルーを排出し透明であった細胞を生細胞、排出されずに青色に染色された細胞を死細胞としてカウントした。血球計算盤において 4 カ所の計測平均値をそれぞれ生細胞数および死細胞数とした。

## 7. 統計学的処理

全てのデータはそれぞれ独立した 3 回以上の実験を解析した。特に表示がなければ、データは平均値  $\pm$  標準偏差 (S.D.) にて表示した。p 値の検定には *Student's t-test* 両側検定を用いて、得られた p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

## 実験成績

### 1. GGCT 欠乏によるがん細胞増殖抑制

代表的な乳癌細胞株である MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞に対して GGCT-siRNA を導入し細胞増殖を検討した。ウエスタンブロッティング法により、用いた siRNA が高効率に GGCT の発現レベルを減少させることを両細胞株において確認した (Fig.1 a)。トリパンプルー染色法にて細胞増殖を解析したところ、siRNA 導入後 4 日目、7 日目の MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞における siRNA 導入後 1 日目の細胞数を 1 とした場合の生細胞相対値は、control 群と比較して GGCT-siRNA 群は有意に低かった (Fig 1b, Table 1)。(siRNA 導入後 4 日目の生細胞相対値 MCF7 細胞: control 群  $2.47 \pm 0.34$ , GGCT-siRNA 群  $0.84 \pm 0.17$  Student's t-test,  $p = 0.01$ ; MDA-MB-231 細胞: control 群  $5.61 \pm 0.40$ , GGCT-siRNA 群  $2.20 \pm 0.74$  Student's t-test,  $p < 0.01$ 、siRNA 導入後 7 日目の生細胞相対値 MCF7 細胞: control 群  $9.42 \pm 0.93$ , GGCT-siRNA 群  $2.48 \pm 1.56$  Student's t-test,  $p = 0.02$ ; MDA-MB-231 細胞: control 群  $25.38 \pm 0.23$ , GGCT-siRNA 群  $1.94 \pm 0.18$  Student's t-test,  $p < 0.01$ ) GGCT-siRNA 導入後 5 日目以降に細胞死が増加し、7 日目の死細胞割合は GGCT-siRNA 群で顕著に増加していた (Fig 1c, Table 2)。(MCF7 細胞: control 群  $4.89 \pm 0.8\%$ , GGCT-siRNA 群  $27.50 \pm 5.3\%$  Student's t-test,  $p < 0.01$ ; MDA-MB-231 細胞: control 群  $11.03 \pm 1.5$ , GGCT-siRNA 群  $46.79 \pm 4.9$  Student's t-test,  $p < 0.01$ )

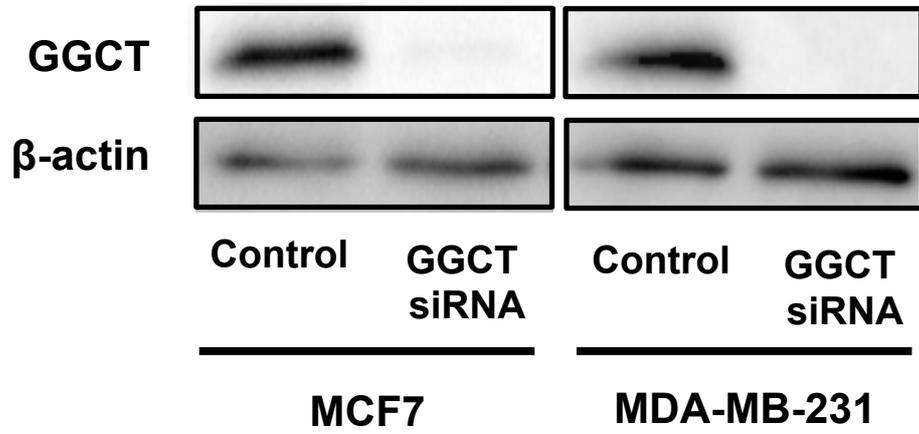
**Table 1 Relative viable cell number**

	MCF7		MDA-MB-231	
	DAY4	DAY7	DAY4	DAY7
Control	$2.5 \pm 0.3$	$9.4 \pm 0.9$	$5.6 \pm 0.4$	$25 \pm 0.2$
GGCT siRNA	$0.8 \pm 0.2$	$2.5 \pm 1.6$	$2.2 \pm 0.7$	$1.9 \pm 0.2$
<i>p</i>	0.01	0.02	< 0.01	< 0.01

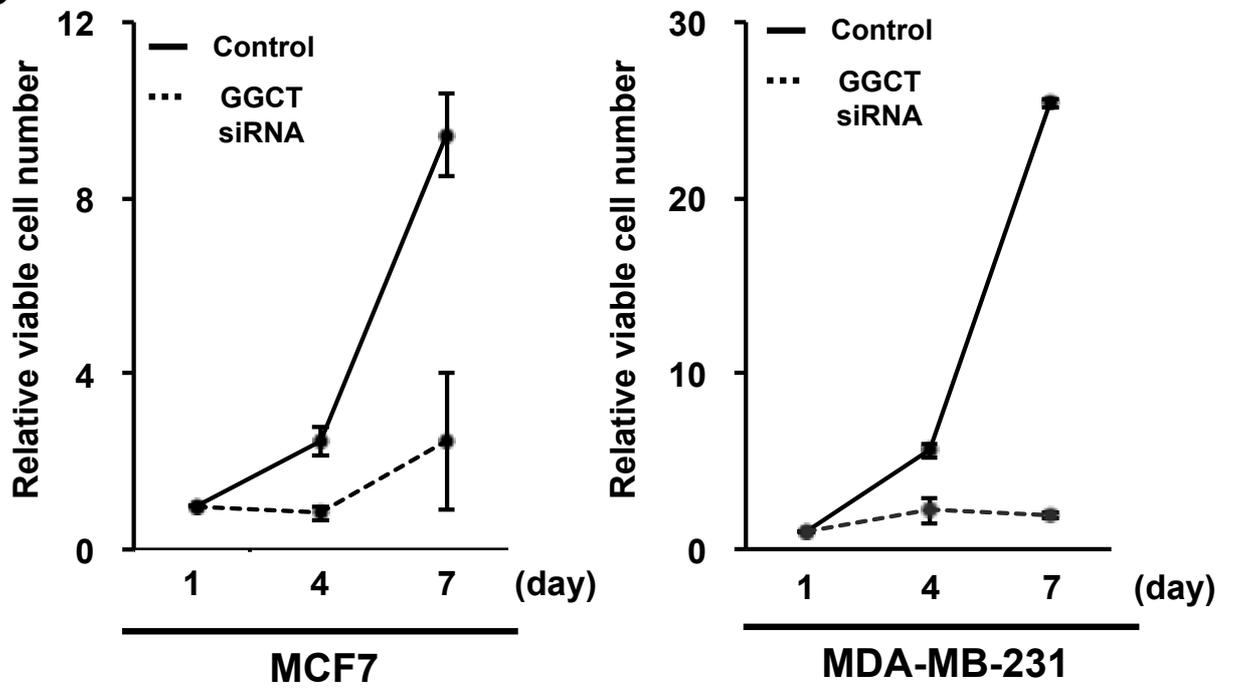
**Table 2 Dead cell (%)**

	MCF7	MDA-MB-231
Control	$4.9 \pm 0.8$	$11 \pm 1.5$
GGCT siRNA	$28 \pm 5.3$	$47 \pm 4.9$
<i>p</i>	< 0.01	< 0.01

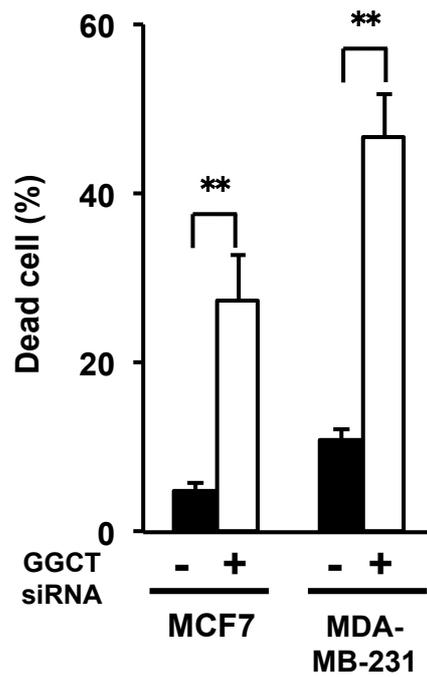
**a**



**b**



**C**



**Fig. 1 GGCT knockdown suppresses the growth of MCF7 and MDA-MB-231 cells.**

a MCF7 and MDA-MB-231 cells were transfected with siRNA targeting GGCT or non-target control siRNA, and the expression levels of GGCT in total cell lysates harvested 4 days after the transfection were analyzed by Western blotting.  $\beta$ -actin is shown as a loading control. b MCF7 and MDA-MB-231 cells were treated with GGCT siRNA or non-target siRNA. The relative number of trypan blue-negative viable cells at 1, 4, and 7 days after the transfection are shown. c Proportion of trypan blue-positive dead cells at 6 days after transfection. (\*\*  $p < 0.01$ ). This figure was cited from Fig.1 in *BMC Cancer.*, **16**, 748, 2016

2. MCF7細胞においてGGCT欠乏により惹起される細胞死に対するアポトーシスの寄与

GGCT欠乏による細胞死が、アポトーシスによる細胞死であるか検証するため、カスパーゼとPARPの発現量、細胞周期解析によるsub-G1期の細胞集団について検討した。HL-60においてエトポシド投与群ではcleaved PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-8のタンパク質発現量がcontrol群のそれと比較して顕著に増加していた。これに対し、GGCT-siRNAを導入しても、これらのアポトーシス関連因子の発現量に変化を認めなかった (Fig. 2)。また、PI染色法を用いた核の断片化の定量においても、sub-G1期の細胞集団の割合はGGCTを欠乏させてもほとんど変化はなかった (Fig. 3)。(control群:  $1.2 \pm 0.3\%$ 、GGCT-siRNA群:  $0.9 \pm 0.1\%$ )。一方、GGCTを欠乏させることでG0/G1期の細胞集団の割合は顕著に増加していた。(control群:  $52.3 \pm 4.3\%$ 、GGCT-siRNA群:  $80.4 \pm 0.7\%$  Student's t-test,  $p < 0.01$ )。さらに、それに伴いS期とG2/M期はそれぞれ有意に減少していた (Fig. 3)。(S期 control群:  $25.9 \pm 4.7\%$ 、GGCT-siRNA群:  $6.1 \pm 1.5\%$  Student's t-test,  $p < 0.01$ ; G2/M期 control群:  $19.6 \pm 1.4\%$ 、GGCT-siRNA群:  $12.1 \pm 0.8\%$  Student's t-test,  $p < 0.01$ )

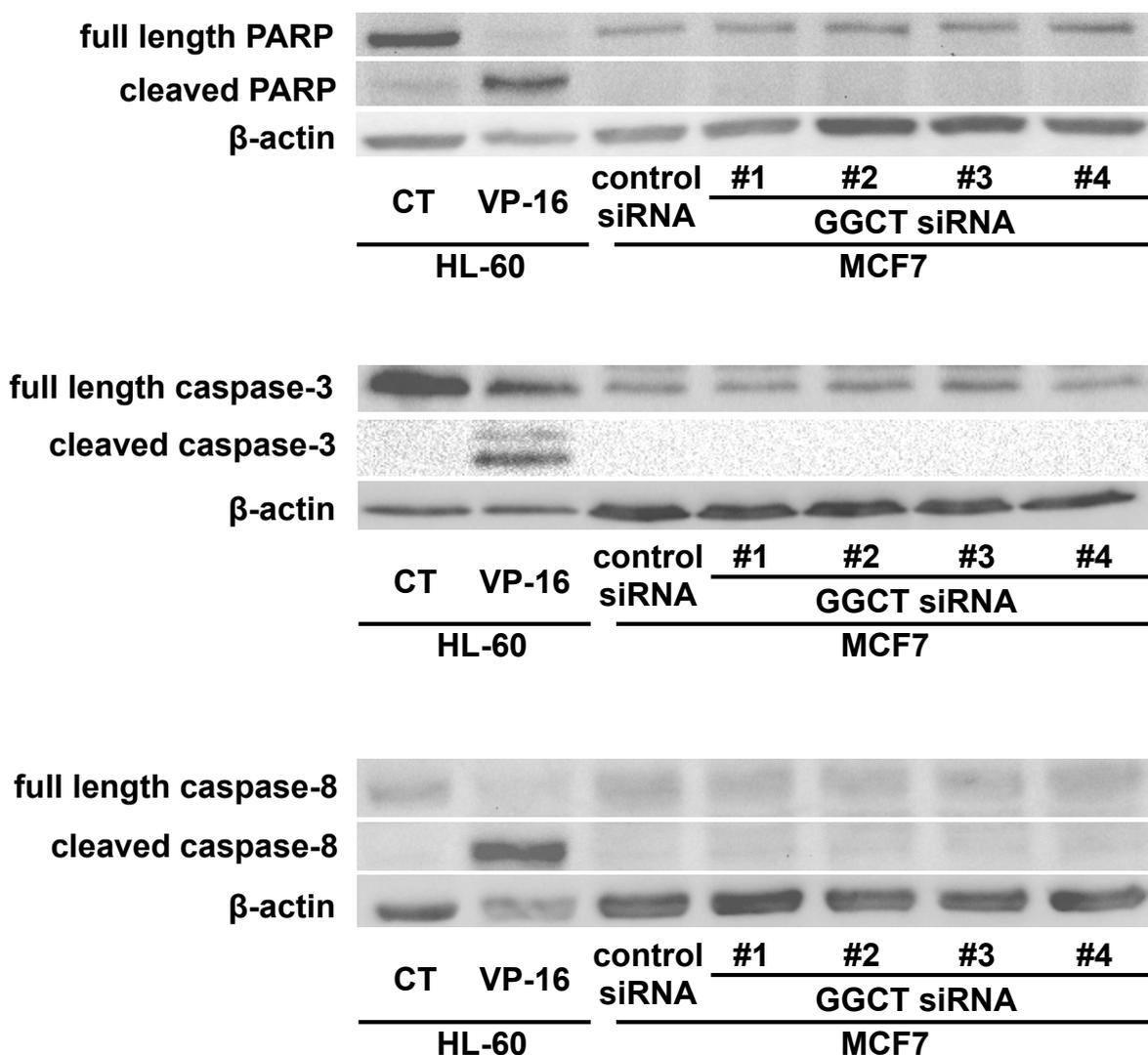
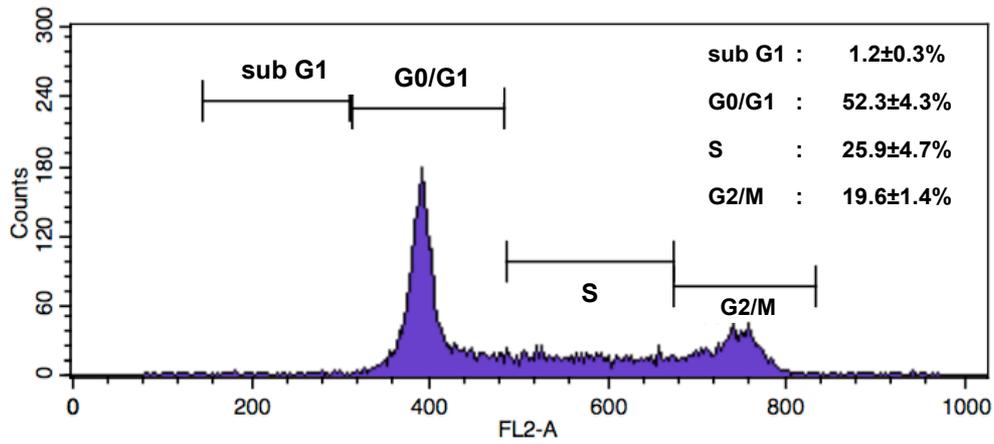


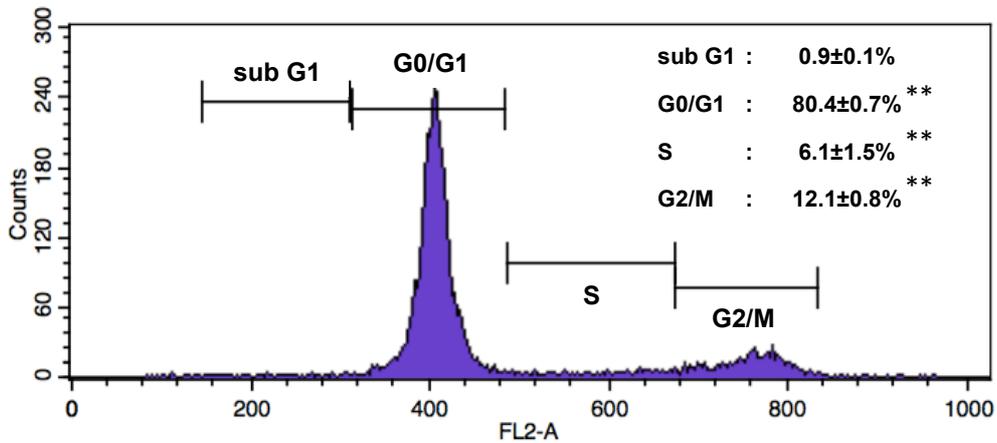
Fig. 2 Apoptosis is not involved in cell death induced by GGCT knockdown MCF7 cells.

The expression levels of PARP, caspase-3, and caspase-8 in MCF7 cells harvested 6 days after transfection with

the indicated siRNAs indicated were analyzed by western blotting.  $\beta$ -actin is shown as the loading control. One  $\mu$ M Etoposide (VP-16) treated HL60 cells were used as positive controls to detect the cleaved forms of PARP and caspases. This figure was cited from Supplementary Figure 2 in *BMC Cancer.* , **16**, 748, 2016



### Control



### GGCT siRNA

**Fig. 3 GGCT depletion induced G0/G1 arrest in MCF7**

Cell cycle analysis of MCF7 cells on 4 days after the transfection. In each sample, 10,000-gated events were acquired. The results shown are indicative of 3 individual experiments. (\*\*  $p < 0.01$ )

## 考 察

本章では、癌細胞における GGCT 欠乏の細胞増殖抑制効果およびカスパーゼの活性化を伴うアポトーシス細胞死の関与の有無について GGCT-siRNA 導入乳癌細胞株を用いて検討した。GGCT は様々ながん細胞に高発現するが、特に乳癌では予後不良因子として報告されている (7)ことから乳癌細胞株である MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞を用いて検討した。その結果、MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞において GGCT 欠乏は細胞増殖を抑制し細胞死を誘導することが明らかとなった。さらに、MCF7 細胞において GGCT 欠乏による細胞死はカスパーゼの活性化を伴うアポトーシスとは異なる、別個の機序によるものであることが明らかとなった。

GGCT 欠乏によって細胞死が誘導された MCF7 細胞では、球形の形態を示し接着能を失って浮遊する死細胞が観察された。そのため、その細胞死機序についてアポトーシス細胞死が関与する可能性を検証するため、アポトーシス細胞死の特徴であるカスパーゼの活性化、PARP の開裂、核の断片化、sub-G1 期の細胞集団の割合を検討したが、いずれもアポトーシス細胞死関連シグナル経路の活性化は認めず断片化した DNA を含有するアポトーシス小体も検出されなかった。死細胞の多くが細胞接着から浮遊するため、アノイキスの可能性も考えられたが、アノイキスも細胞接着を喪失することによってアポトーシスシグナルが活性化するため可能性は低いと考えられた。細胞の膨化や細胞膜の崩壊などのネクロシスの所見も認められなかった。そのため、GGCT 欠乏による細胞死機構は、何らかの非アポトーシス細胞死による可能性が示唆されたが、詳細な機序は不明であり今後の検討課題である。

一方、GGCT を欠乏させた MCF7 細胞を用いた細胞周期解析において、核が断片化した sub-G1 期の細胞集団の増加はみられなかったが、顕著な G0/G1 期での細胞周期停止を認めた (Fig. 3)。この結果から、GGCT 欠乏が細胞周期の停止を誘導し、何らかの非アポトーシス細胞死の誘導を惹起し、細胞増殖を抑制していると考えられた。

GGCT は正常組織と比較して、様々ながんにおいて高発現しており (7)、GGCT の発現量抑制は、正常細胞の細胞増殖を抑制せず、がん細胞の増殖を抑制させると報告されている (4)。本研究においても乳癌細胞株において細胞増殖の抑制のみならず、細胞死も顕著に増加させることが明らかとなった (Fig. 1, Table 1)。GGCT を標的とするがん治療は正常細胞には影響を与えずがん細胞に選択的に細胞死を誘導する可能性があり、GGCT は有望ながん治療標的分子であると考えられた。

## 第 2 章 GGCT 欠乏によるがん細胞の細胞老化誘導

### 緒 言

近年、正常細胞だけでなくがん細胞においても、いわゆる細胞老化と呼ばれる現象が誘導されることが報告され、注目されている (14-16)。がん細胞において、抗悪性腫瘍治療薬剤を含む、種々の治療によって誘導される細胞老化は、Therapy-induced senescence (TIS)と知られ (17)、本研究において実験材料として用いる乳癌細胞株の MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞においても、アドリアマイシン投与によって細胞老化が検出されることが報告されている (18)。術前化学療法として CAF 療法を受けた乳癌患者の臨床検体において、SA- $\beta$ -Gal 染色陽性割合が上昇し、p53 および p16<sup>INK4A</sup> の染色陽性割合も高かったことが報告され (24, 25)、臨症的にも化学療法によって腫瘍細胞に対し細胞老化を誘導することが明らかにされている。

GGCT-siRNA を導入した乳がん培養細胞株において、siRNA 導入後 4 日目までは明らかな死細胞の増加は認められなかったが、接着細胞の細胞質が拡大し大型化する形態変化が観察された。この細胞形態は細胞老化に特徴的な細胞形態であると考えられた (13)。他のがん細胞においても GGCT-siRNA 導入後に生存する細胞はこのような細胞老化様の形態が観察されたことから、本章では GGCT-siRNA を導入した様々ながん細胞株に対し、細胞老化マーカーである Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) 染色法を用いて細胞老化を評価した。また、GGCT 欠乏が細胞老化を惹起するメカニズムを明らかにするために、細胞老化の誘導において重要な役割を果たすことが知られている、p21<sup>WAF1/CIP1</sup> および p16<sup>INK4A</sup> を含むサイクリン依存性キナーゼ抑制因子(CDKI)の発現量の変化、および細胞内活性酸素種レベルに関して解析を行った。

## 実験材料および方法

### 1. 細胞と培養条件

PC3細胞、A172細胞、Hela細胞はRIKEN BRC またはATCC より購入した。それぞれの細胞はDMEM (Wako Pure Chemical Industries)に 10%ウシ胎児血清 (HyClone, South Logan) および 1% penicillin/streptomycin (それぞれ 100 units/ml、100 µg/ml)を加えた培地を用いて 5% CO<sub>2</sub>、37°Cで培養した。MDA-MB-231細胞は、第1章で述べた培養条件で培養した。

### 2. 抗体

一次抗体は第1章で述べた物に加え、さらにマウス由来 IgG 抗体として、GAPDH (1:1000; 014-25524, Wako Pure)、p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (1:200; 556430, BD biosciences)、ウサギ由来 IgG 抗体として、p16<sup>INK4A</sup> (1:1000; ab51243, Abcam)を用いた。二次抗体は第1章で述べた抗体を用いた。

### 3. GGCT-siRNA 導入リポフェクション条件

リポフェクションは第1章で述べた条件と同一条件で実験を行った。

### 4. Senescence-associated $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) 染色

1 well あたり  $5.0 \times 10^4$  個のがん細胞を 6-well ディッシュに播種し、24 時間後に Non-targeting-siRNA (control-siRNA) および GGCT-siRNA をトランスフェクションした。導入後 4 日目において細胞老化染色キット (OZ Bioscience) を用いて、添付文書のプロトコールに従って Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal)を染色した。染色溶媒で 37 °C一晩反応させ、SA- $\beta$ -Gal に青く染まったものを老化細胞としてカウントした。それぞれの実験において 400 以上の細胞数をカウントし、少なくとも 12 個の視野で評価した。

### 5. 細胞内活性酸素種の測定

$5.0 \times 10^4$  個 /well の MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞を 6-well ディッシュに播種し、24 時間後に control-siRNA および GGCT-siRNA を 3. で用いた siRNA 導入リポフェクション条件にて細胞にトランスフェクションした。細胞内活性酸素種を検出するための陽性コントロールとして、100 µM の過酸化水素処理を行った MCF7 細胞を準備した。トランスフェクションしてから 4 日後に、浮遊した細胞は遠心処理で回収し、接着した細胞は PBS で洗浄したのち、室温下約 5 分間のトリプシン処理にて細胞を接着面から遊離させ遠心処理にて回収した。回収した細胞を、活性酸素種 (ROS) 検出用試薬キット (Invitrogen) を用い、色素濃度を 10 µM として添付文書のプロトコールに従い実験を行った。ナイロンメッシュを用いて凝集塊を除去したのち、FACS Fortessa (BD Bioscience)を用いて細胞内に含有する活性酸素種を蛍光強度として定量的に解析した。

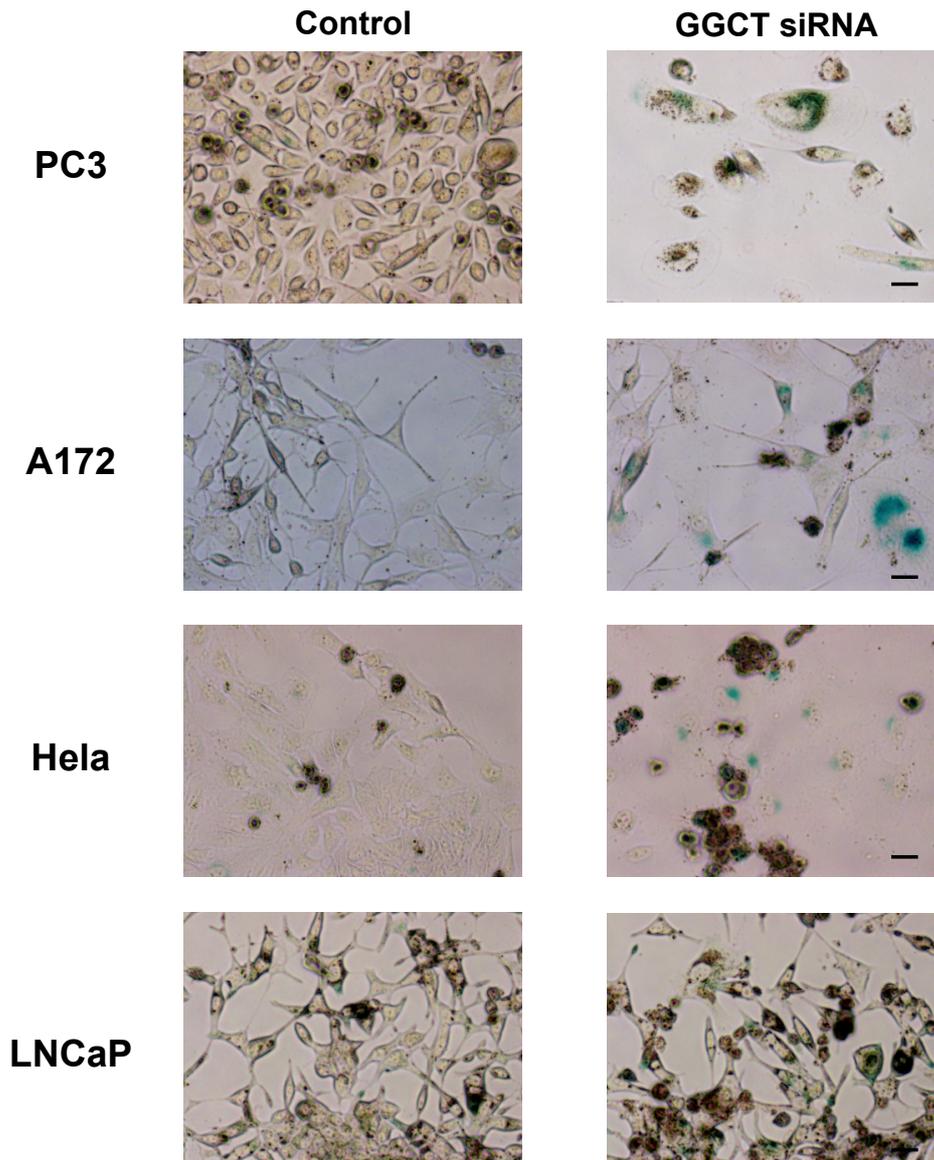
### 6. 統計学的処理

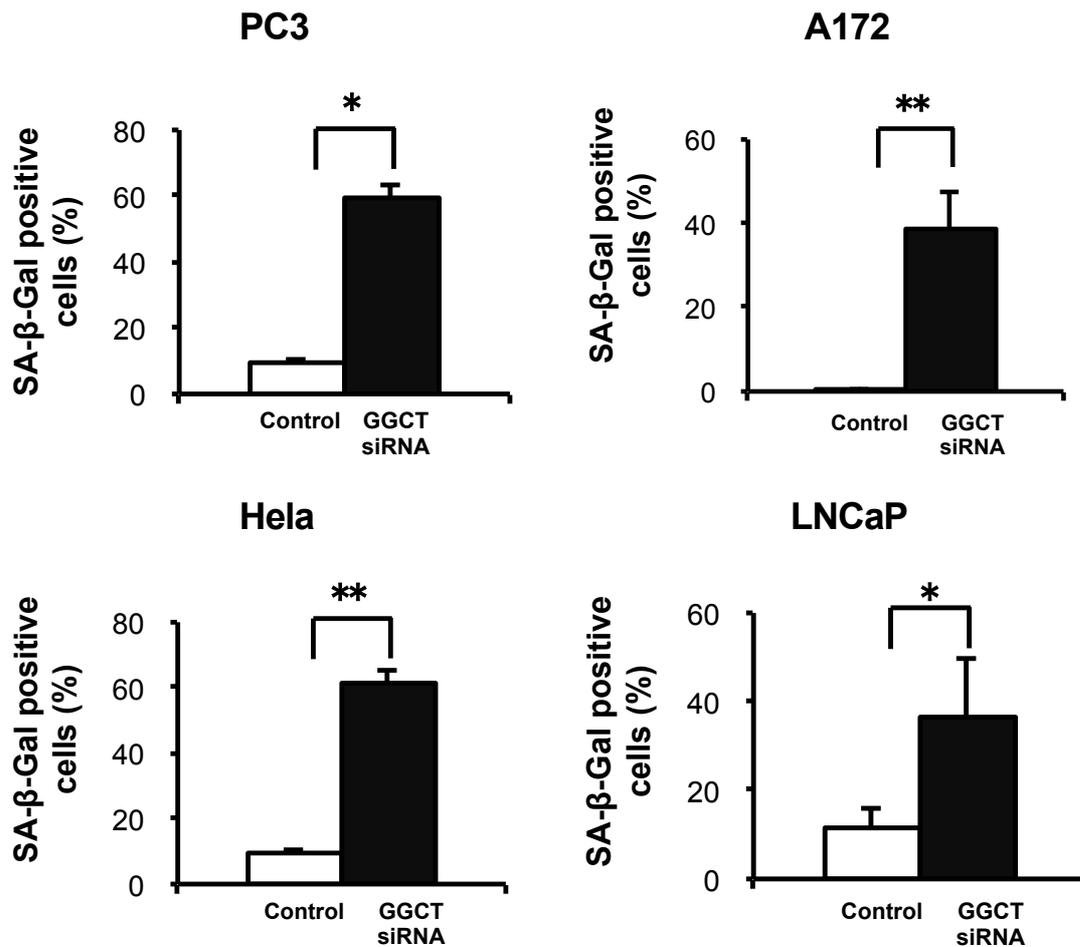
第1章で用いた統計学処理と同様の方法で処理した。

## 実験成績

### 1. GGCT 欠乏によるがん細胞の細胞老化誘導

細胞老化マーカーである SA- $\beta$ -Gal (31) の酵素活性を利用して細胞を染色する、いわゆる SA- $\beta$ -Gal 染色法を用いて、GGCT-siRNA を導入した種々のがん培養細胞における細胞老化を評価した。PC3 細胞、A172 細胞、Hela 細胞、LNCaP 細胞の全てにおいて、GGCT 欠乏によって大型で平坦な細胞老化様形態を伴う細胞が増加し、SA- $\beta$ -Gal 染色法において陽性となる細胞の割合が増加した。そのため、細胞老化様形態を伴う細胞は GGCT 欠乏による老化細胞と考えられた (Fig. 4)。



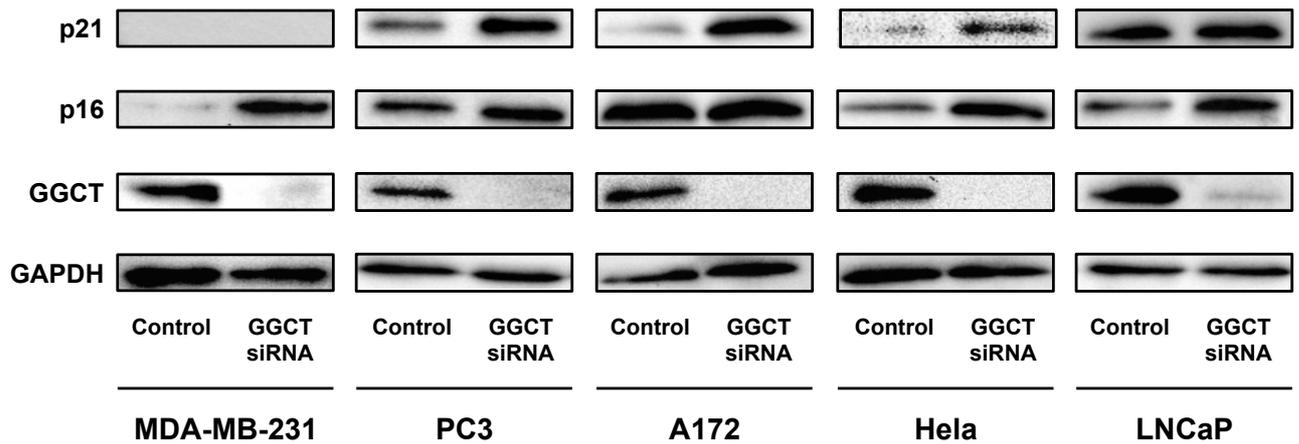


**Fig. 4 Depletion of GGCT induces cellular senescence in various cancer cells.**

The indicated cancer cell lines were transfected with siRNA targeting GGCT or non-target control siRNA, and cellular senescence was evaluated by SA-β-Gal staining at 4 days after transfection. Representative images and proportion of SA-β-Gal positive cells are shown. Scale bar represents 50 μm. This figure was cited from Fig.2 in *BMC Cancer.* , **16**, 748, 2016

## 2. GGCT 欠乏させた種々のがん細胞株における CDKI 発現レベルの検討

GGCT 欠乏によって細胞老化を起こした細胞において、細胞老化を誘導させる CDKI として報告があった (26,27) p21<sup>WAF1/CIP1</sup> および p16<sup>INK4A</sup> の発現量を検証した。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現量は、PC3 細胞、A172 細胞、Hela 細胞において GGCT-siRNA 群で顕著に上昇していた。一方、p16<sup>INK4A</sup> の発現量は、MDA-MB-231 細胞、PC3 細胞、Hela 細胞、LNCaP 細胞において GGCT-siRNA 群で顕著に上昇していた (Fig. 5)。



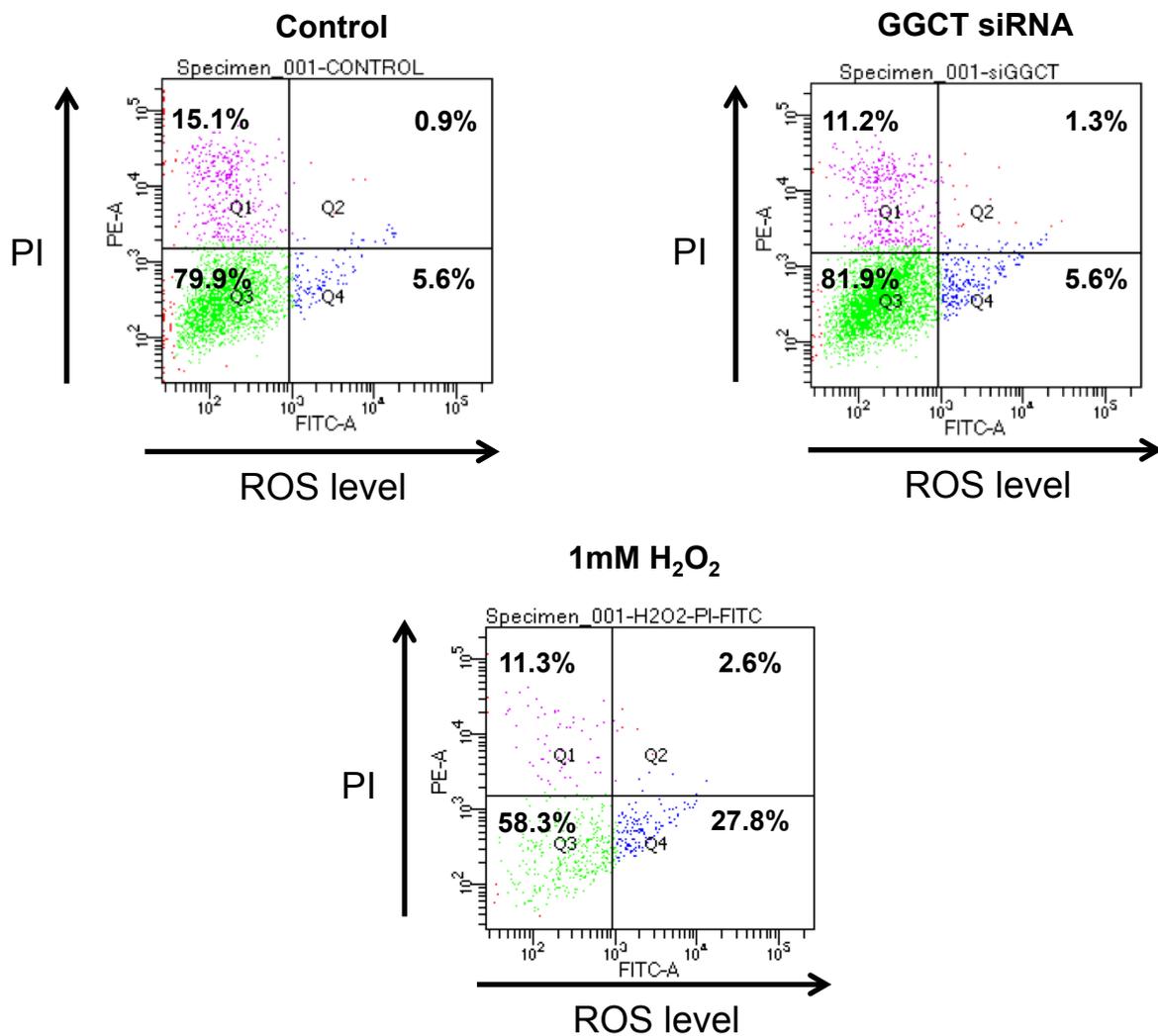
**Fig. 5 Knockdown of GGCT upregulates p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and/or p16<sup>INK4A</sup> in various cancer cells.**

Expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p16<sup>INK4A</sup> protein in various cancer cells at 4 days after transfection were analyzed by Western blotting. This figure was cited from Supplementary Figure 1 in *BMC Cancer*, **16**, 748, 2016

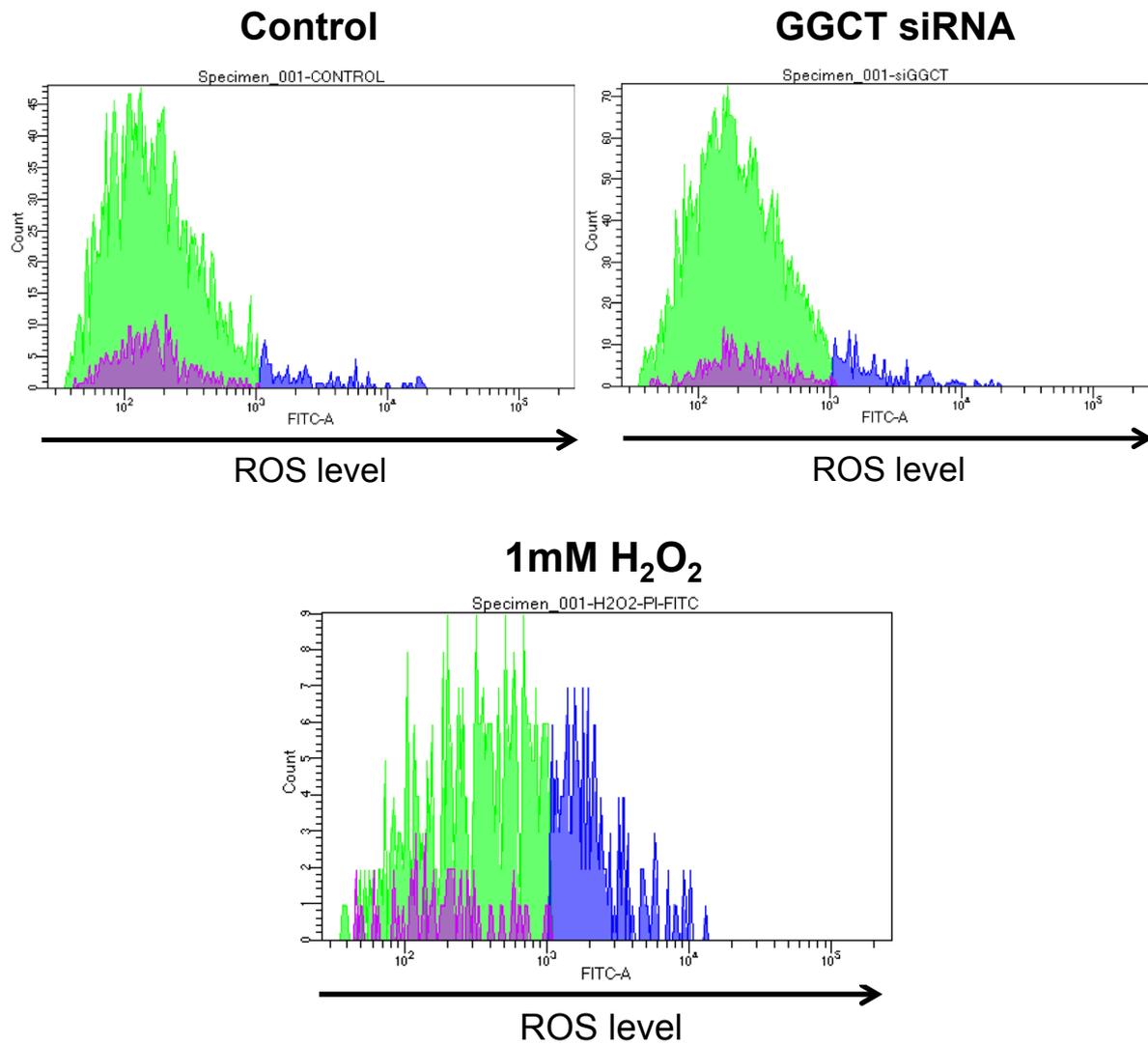
### 3. GGCT 欠乏による細胞内活性酸素種量に対する影響

GGCT 欠乏によって引き起こされる細胞老化の誘導に、活性酸素種 (ROS) の増加が寄与しているかを検証するため、GGCT 欠乏によって細胞老化を起こした細胞において、ROS の測定を行った。過酸化水素水で処理した MCF7 細胞では、細胞内 ROS の増加がフローサイトメトリー解析によって検出されたのに対し、細胞老化の誘導が認められた GGCT に対する siRNA を導入して 4 日後の MCF7 細胞では、ROS レベルはコントロール細胞と比較して変化を認めなかった (Fig. 6)。この実験結果から、GGCT 欠乏によって誘導される細胞老化の誘導は、細胞内活性酸素種の増加とは別の原因によるものと考えられた。

a



**b**



**Fig. 6 ROS generation was not enhanced by GGCT knockdown in MCF7 cells.**

Effect of GGCT-depletion on ROS levels in MCF7 cells. a ,b Intracellular ROS levels in MCF7 measured by CM-H<sub>2</sub>DCFDA analyzed by (a) dot plots or (b) histograms, respectively. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated MCF7 cells were shown as positive control.

## 考 察

本章では、がん細胞における GGCT 欠乏による細胞老化誘導を検証した。本研究で用いた様々ながん細胞において GGCT 欠乏は細胞老化を惹起することが明らかとなり、細胞老化を起こしたがん細胞では p21<sup>WAF1/CIP1</sup> もしくは p16<sup>INK4A</sup> の発現量が上昇していた。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> および p16<sup>INK4A</sup> の発現量上昇は細胞種に依存すると考えられた。

細胞老化は、1965 年に Hayflick らによって提唱された。彼らは、細胞の増殖には限界点があり一定数の細胞分裂を経ると非可逆的に細胞増殖が停止することを報告し (11)、これが細胞老化という概念の起源となっている。正常細胞において細胞老化は、細胞分裂に伴うテロメアの短縮および細胞ストレスによる DNA 損傷の蓄積によって誘導される (32, 33)。一方で、がん細胞は細胞分裂を起こしてもテロメアの短縮を伴わないが、テロメアの短縮以外にも細胞老化を誘導させる原因として、活性酸素種、電離放射線、化学療法剤の暴露などの細胞ストレスが報告されている (12, 15)。これらによって細胞ストレスが加わると、正常細胞のみならずがん細胞も DNA 損傷を起こし細胞老化が誘導される (13, 16, 17, 34, 35)。本研究において、GGCT を欠乏させたがん細胞には細胞老化様の形態が認められ、それらは SA-β-Gal 染色において陽性として検出された。これらの実験結果から、がん細胞において GGCT を欠乏させた際に細胞老化が誘導されていると考えられた。現在までに、p53、p21<sup>WAF1/CIP1</sup>、p16<sup>INK4A</sup>、p27 等 CDKI の発現量上昇、もしくは DNA damage response (DDR) が細胞老化マーカーとして提唱されてきた (36, 37)。しかしながら、p53 や CDKI 等は細胞老化誘導時に発現上昇はするものの、必ずしも細胞老化に特異的とはいえない。また、DDR に関して、腫瘍抑制因子 phosphatase and tensin homolog (PTEN) の欠損や、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 変異等の DDR 以外の因子によっても細胞老化は誘導され、細胞老化に特異的とはいえない (36, 38)。そのため、多くの細胞老化マーカーとされている因子や現象は細胞老化に対する特異性が乏しい。そのなかで SA-β-Gal 染色は比較的、特異性の高い細胞老化マーカーとされている (37)。SA-β-Gal は β-Gal 染色のうち pH6 においてのみ染色されるものであり、その原理は、老化細胞では細胞内リソソーム量が亢進しその酵素活性が上昇することを応用し、青色に染色することが可能である (31)。必ずしも SA-β-Gal の活性検出が全ての老化細胞に必須である普遍的なマーカーとはいえないまでも、SA-β-Gal は汎用性が高く、染色方法も簡便なことから広く使用されている。本研究でも細胞老化用形態を伴う細胞の大部分は SA-β-Gal 染色で陽性として検出された (Fig. 4)。

GGCT の欠乏により、乳癌細胞のみならず本研究で検討した全てのがん細胞において細胞老化が誘導された (Fig. 4)。このことは、GGCT の欠乏によって細胞老化が誘導される現象が、乳がん細胞のみに起こるのではなく、様々な種類の悪性細胞において起こりうることを示唆している。老化誘導された細胞では p21<sup>WAF1/CIP1</sup> または p16<sup>INK4A</sup> のいずれか、もしくは両方の発現量が上昇していた (Fig. 5)。発現上昇する CDKI の組合せと、がん細胞が由来する組織の間に共通する因子は認められず、CDKI の発現上昇は個々の細胞種に依存していると考えられた。また、個々のウェスタンブロット解析において、検討した種々のがん細胞株における GGCT 発現レベルは様々であったが、そのもともとの GGCT 発現レベルと、p21<sup>WAF1/CIP1</sup> または p16<sup>INK4A</sup> のいずれが上昇するかについては、明らかな傾向はみられなかった。この結果は、もともとの GGCT 発現レベルは最も重要な因子ではなく、それぞれの細胞種の増殖が培養条件下において GGCT にどの程度依存しているかが重要である可能性が示唆された。本

研究ではまず、GGCT 欠乏による細胞老化の誘導という現象に対し、これらの CDKI の発現上昇という応答が果たす役割についてさらに詳細に検討することとした。

上述のように、細胞老化を誘導する因子の一つとして、細胞内活性酸素種の増加が挙げられる。そのため、GGCT 欠乏により細胞老化を起こしている細胞において細胞内活性酸素種の増加を伴うかどうかを検証したところ、活性酸素種レベルには顕著な変化はみられないことが明らかとなった。この結果から、GGCT を欠乏したがん細胞では、活性酸素種レベルの変動を介するのではなく、何らかの別の原因によって、p21<sup>WAF1/CIP1</sup> または p16<sup>INK4A</sup> などの遺伝子発現の変化が引き起こされ、それによって細胞老化という現象が惹起されているものと考えられた。

### 第 3 章 GGCT 欠乏による CDKI 誘導依存的な細胞老化と細胞死

#### 緒 言

GGCT 欠乏により細胞老化を起こした細胞では  $p21^{WAF1/CIP1}$  もしくは  $p16^{INK4A}$  の発現量が上昇していることを見いだした (Fig. 4, 5)。これまでに、 $p53$ - $p21^{WAF1/CIP1}$  経路および  $p16^{INK4A}$ - $pRb$  経路は、細胞老化を誘導する重要な経路として報告されている (26)。 $p21^{WAF1/CIP1}$  と  $p16^{INK4A}$  は両方ともにサイクリン依存性キナーゼ阻害因子(CDKI) である (28, 29)。 $p21^{WAF1/CIP1}$  は  $p53$  の下流で制御される重要な標的遺伝子であり、細胞周期の調節に重要な機能を果たす。 $p16^{INK4A}$  は Rb タンパクの脱リン酸化と活性化を制御する重要な因子であり、 $pRb$  のリン酸化を抑制することで  $pRb$  が E2F の複合体から解離することを阻害し E2F の活性化を抑制する。それにより、細胞周期の制御に重要な働きをするとともに、細胞老化の誘導にも寄与することが知られている (26)。GGCT の欠乏によって発現レベルが上昇した  $p21^{WAF1/CIP1}$  もしくは  $p16^{INK4A}$  の CDKI が、癌細胞の細胞老化の誘導に直接的に寄与しているかを検証する目的で、MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞に GGCT と同時に  $p21^{WAF1/CIP1}$  もしくは  $p16^{INK4A}$  に対する siRNA を導入し、GGCT が欠乏しても  $p21^{WAF1/CIP1}$  もしくは  $p16^{INK4A}$  が誘導されなくなった細胞を作成し、細胞老化を評価した。また、 $p21^{WAF1/CIP1}$  の発現調節因子として重要な転写因子である、癌抑制遺伝子  $p53$  の発現量の変動の有無を検証した。さらに、 $p21^{WAF1/CIP1}$  もしくは  $p16^{INK4A}$  といった CDKI の発現レベル上昇が、GGCT 欠乏による細胞増殖抑制と引き続いて起こる細胞死の誘導に寄与しているか検討するため、GGCT と同時に  $p21^{WAF1/CIP1}$  もしくは  $p16^{INK4A}$  に対する siRNA を導入し、細胞周期の解析および細胞増殖を解析した。

## 実験材料および方法

### 1. 細胞と培養条件

MCF7 細胞、MDA-MB-231 細胞は、第 1 章で述べた培養条件で培養した。

### 2. 抗体

抗体は第 1 章、第 2 章で述べた抗体に加えて、さらにウサギ由来 IgG 抗体として p53 (1:1000; #9282, Cell Signaling Technology)を用いた。

### 3. GGCT-siRNA 導入リポフェクション条件

第 1 章で述べた条件と同一条件でリポフェクションを行った。Non targeting-siRNA および GGCT-siRNA は第 1 章で述べた siRNA と同一の siRNA を用いた。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> および p16<sup>INK4A</sup> の siRNA 配列は以下に示す。

#### Small interfering RNA sequences

Target gene	Sense(5'→3')	Anti-sense(5'→3')
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -1	CUGUACUGUUCUGUGUCUU	AAGACACAGAACAGUACAG
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -2	CUUCGACUUUGUCACCGAG	CUCGGUGACAAAGUCGAAG
p16 <sup>INK4A</sup> -1	CGCACCGAAUAGUUACGGUTT	ACCGUAACUAUUCGGUGCGTT
p16 <sup>INK4A</sup> -2	GAGGAGGUGCGGGCGCUGCTT	GCAGCGCCCGCACCUCCTT

### 4. 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)

細胞を Trizol (Thermo Fisher Scientific) に溶解し、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて全 RNA 抽出物を精製した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)および Light Cycler Nano System (Roche Diagnostics) を用いて qRT-PCR 分析を行った。全 RNA 精製、逆転写反応、primer 反応のすべての反応系において添付文書のプロトコールに従い実験を行った。得られた mRNA 発現量はハウスキーピング遺伝子の ARF1 の mRNA 発現量を用いて補正した。各 Primer の配列は以下に示す。

## Quantitative Real-Time PCR primer sequences

Target gene	Forward	Reverse
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>	CGATGGAACTTCGACTTTGTCA	GCACAAGGGTACAAGACAGTG
ARF1	GACCACGATCCTCTACAAGC	TCCCACACAGTGAAGCTGATG

### 5. SA- $\beta$ -Gal 染色

第2章で述べた方法により解析した。

### 6. 細胞周期解析

第1章で述べた方法により解析した。

### 7. トリパンブルー排出実験

第1章で述べた方法により解析した。

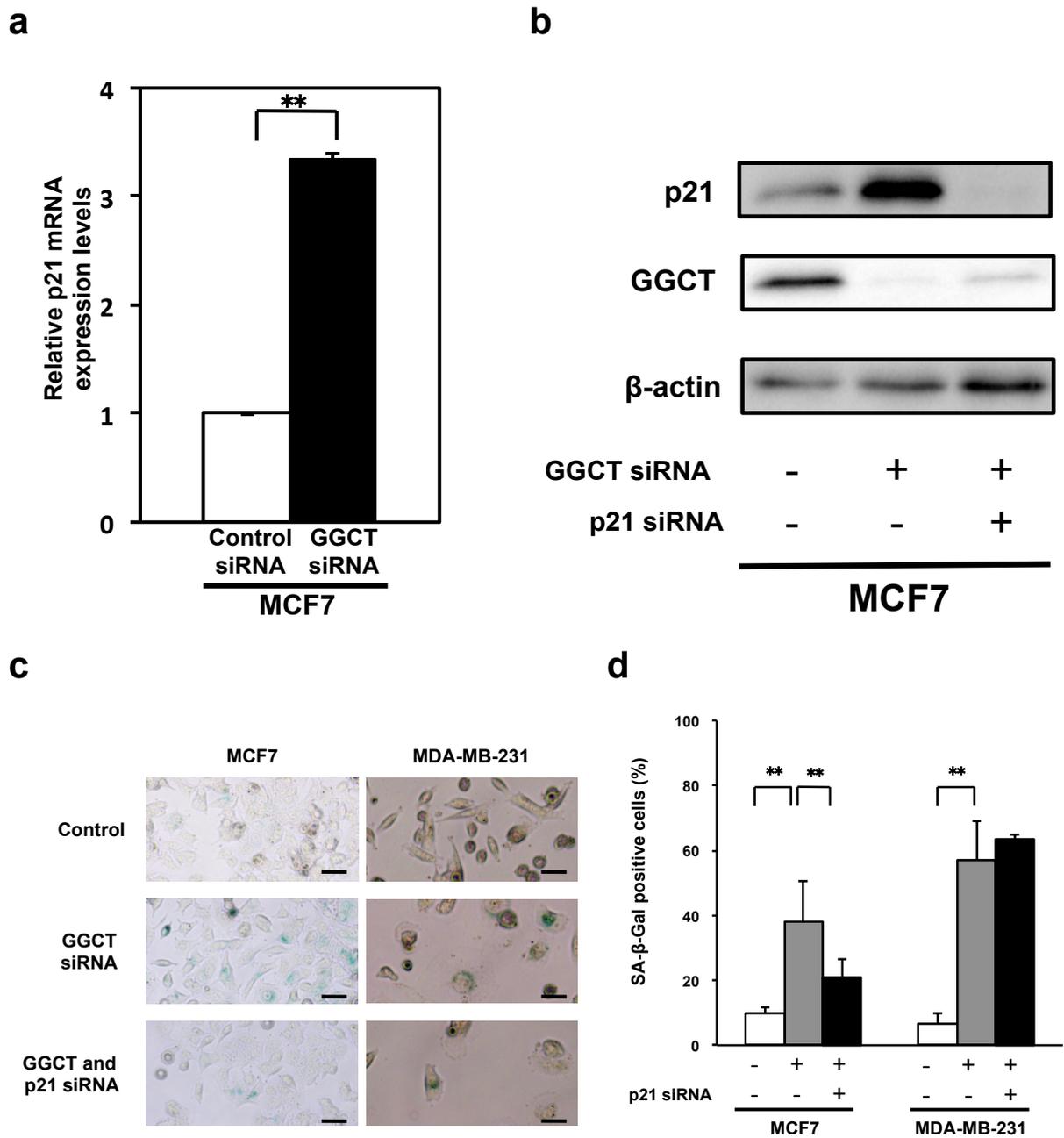
### 8. 統計学的処理

第1章で用いた統計学処理と同様の方法で処理した。

## 実験成績

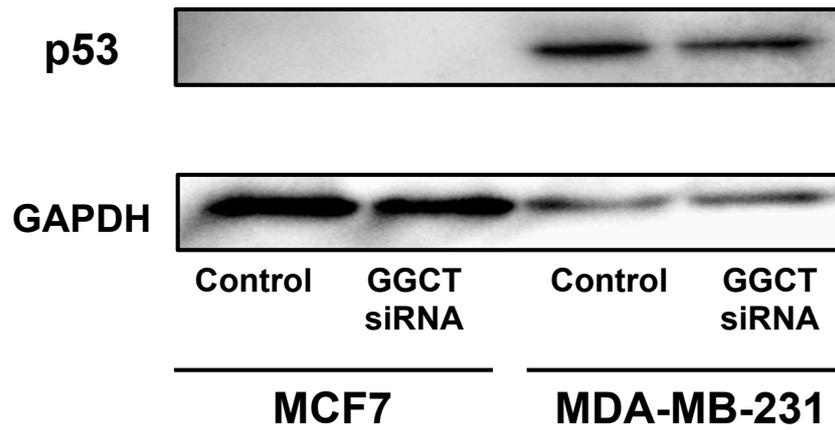
### 1. MCF7 細胞における GGCT 欠乏による細胞老化誘導と p21<sup>WAF1/CIP1</sup> および p53 の発現量変化

MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞において、GGCT 欠乏によって大型で平坦な細胞老化様形態を伴う細胞が増加し、SA-β-Gal 染色陽性となる細胞の割合が増加した (Fig. 7 c)。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> は細胞老化に重要な誘導因子であることが報告されているため (15, 26, 36, 38)、GGCT と同時に p21<sup>WAF1/CIP1</sup> に対する siRNA を導入することにより GGCT が欠乏しても p21<sup>WAF1/CIP1</sup> が誘導さなくなった細胞株を作成し、細胞老化誘導を評価した。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の mRNA およびタンパク質の発現量を定量 real-time PCR とウエスタンブロッティング法を用いて解析したところ、GGCT-siRNA 群において mRNA およびタンパク質ともに p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現量は顕著に上昇していた (Fig. 7 a,b)。MCF7 細胞において GGCT-siRNA 導入によって顕著に発現量が上昇した p21<sup>WAF1/CIP1</sup> タンパク質発現は、p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-siRNA を同時に導入することで効率良く抑制された (Fig. 7 b)。GGCT 欠乏によって顕著に増加した SA-β-Gal 陽性細胞割合は、GGCT に加えて p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現量を抑制することで有意に減少した (Fig. 7 c,d)。一方で、MCF7 細胞に認められた p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現量上昇は MDA-MB-231 細胞においては認められず (Fig. 5)、GGCT 欠乏によって顕著に増加した SA-β-Gal 陽性細胞割合は p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現量を抑制しても減少しなかった (Fig. 7d) (SA-β-Gal 陽性細胞割合 MCF7 細胞 control 群: 8.6 ± 1.56%, GGCT-siRNA 群: 40.6 ± 10.7%, GGCT and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-siRNA 群: 16.8 ± 6.3% control vs. GGCT-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ , GGCT-siRNA vs. GGCT and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ ; MDA-MB-231 細胞 control 群: 8.3 ± 4.42%, GGCT-siRNA 群: 54.9 ± 12.5%, GGCT and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-siRNA 群: 59.8 ± 1.6% control vs. GGCT-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ )。MCF7 細胞において p21 の発現量が GGCT 欠乏により上昇していたことから、p21 の直接的な上流因子である p53 の発現量について検討した。MCF7 細胞、MDA-MB-231 細胞において GGCT 欠乏による p53 の発現上昇は認められなかった (Fig. 8)。



**Fig. 7 Induction of senescence by GGCT knockdown depends on p21<sup>WAF1/CIP1</sup> upregulation in MCF7 cells.**

a-b The expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (a) mRNA and (b) protein in MCF7 cells harvested 4 days after transfection with the indicated siRNAs were analyzed by qRT-PCR and western blotting, respectively. c Representative images of SA- $\beta$ -Gal staining 4 days after transfection with the indicated siRNAs in MCF7 and MDA231-MB cells. Scale bar represents 50  $\mu$ m. d The numbers of SA- $\beta$ -Gal positive cells were counted and their ratios in total cells are shown. (\*\*  $p < 0.01$ ) This figure was cited from Fig.3 in *BMC Cancer.* , **16**, 748, 2016



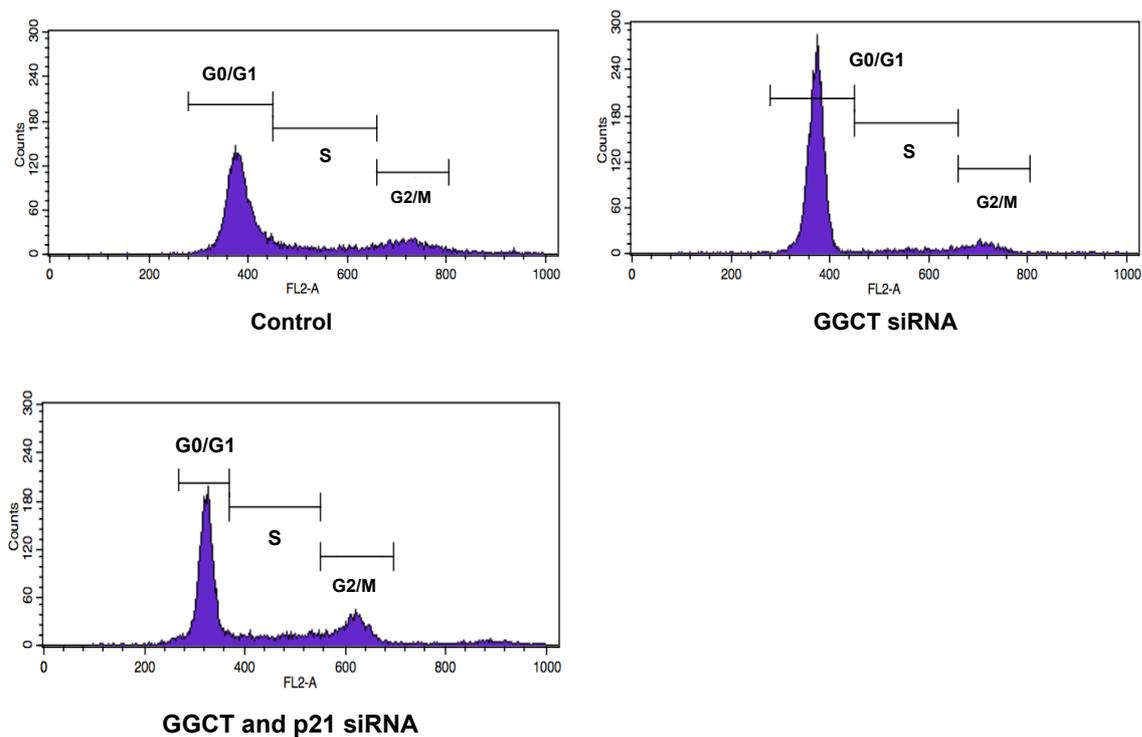
**Fig. 8** The expression levels of p53 protein in MCF7 and MDA-MB-231

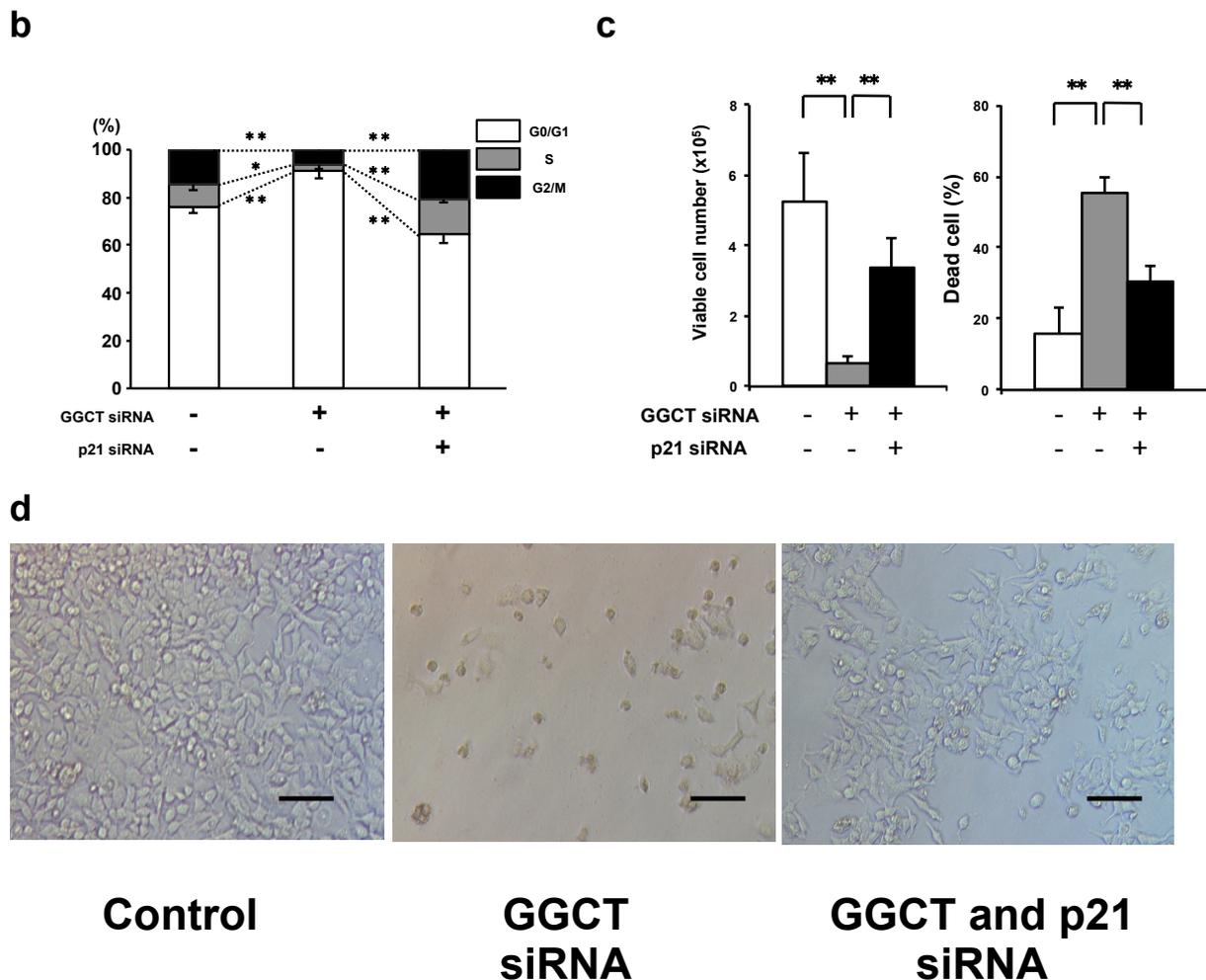
Expression levels of p53 protein in GGCT-depleted MCF7 and MDA-MB-231 cells were analyzed by Western blotting. GAPDH is shown as a loading control. This figure was cited from Supplementary Figure 3 in *BMC Cancer*, **16**, 748, 2016

## 2. MCF7細胞におけるp21<sup>WAF1/CIP1</sup>の発現量変化と細胞周期および細胞増殖に与える影響

p21<sup>WAF1/CIP1</sup>発現量の増加が細胞老化誘導に寄与していたMCF7細胞において、GGCT欠乏によるG0/G1期での細胞周期停止 (Fig. 2) にもp21<sup>WAF1/CIP1</sup>の発現量上昇が影響を与えるのか検証した。GGCT欠乏によって顕著に増加したG0/G1期の細胞集団はGGCTに加えてp21<sup>WAF1/CIP1</sup>の発現を抑制することでcontrol群と同程度にまで減少した。また、p21<sup>WAF1/CIP1</sup>の発現を抑制することでS期の細胞集団もcontrol群と同程度にまで回復した (Fig. 9 a,b Table 3)。GGCT発現量を抑制することで顕著に抑制された生細胞数はGGCTおよびp21<sup>WAF1/CIP1</sup>の発現を抑制することで有意に増加した。さらに、GGCT発現量を抑制することで顕著に増加した死細胞の割合が、GGCTに加えてp21<sup>WAF1/CIP1</sup>の発現を抑制することで有意に減少した (Fig. 9 c,d)。 (生細胞数 control群:  $5.2 \pm 1.42 \times 10^5$ , GGCT-siRNA群:  $0.6 \pm 0.2 \times 10^5$ , GGCT and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-siRNA群:  $3.4 \pm 0.82 \times 10^5$  control vs. GGCT-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ , GGCT-siRNA vs. GGCT and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ ; 死細胞の割合 control群:  $15.8 \pm 7.4\%$ , GGCT-siRNA群:  $55.6 \pm 4.3\%$ , GGCT and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-siRNA群:  $30.6 \pm 4.2\%$  control vs. GGCT-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ , GGCT-siRNA vs. GGCT and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ )

**a**





**Fig. 9 Upregulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> is critical for G0/G1 arrest and consequent growth inhibition by GGCT knockdown.**

a-b The distribution of cell cycle phases in MCF7 cells was analyzed by flow cytometry 4 days after transfection with the indicated siRNAs. Representative histograms (a) and quantified distributions are shown (b). In each sample, 10,000 gated events were acquired. (c) The number of Trypan blue-negative viable MCF cells and the proportion of dead cells at 7 days after transfection with the indicated siRNAs are shown. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) (d) The phase contrast images of MCF7 cells at 7 days after transfection. This figure was cited from Fig.4 in *BMC Cancer*, **16**, 748, 2016

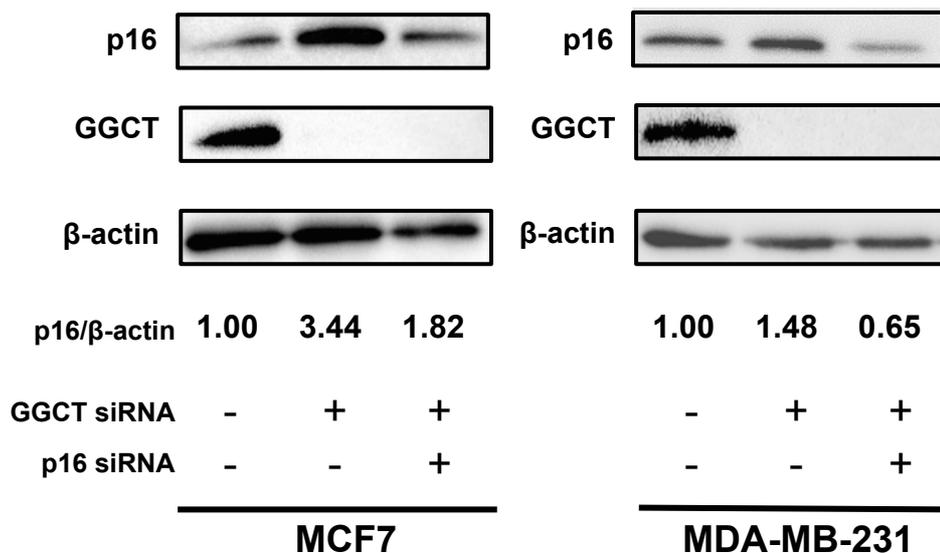
**Table 3 The cell cycle distribution of MCF7 cells**

	control (%)	GGCT siRNA (%)	GGCT and p21 siRNA (%)
<b>G0/G1</b>	74.7 ± 2.5	90.4 ± 31.1	62.3 ± 3.7
<b>S</b>	9.3 ± 2.3	3.0 ± 1.9	14.2 ± 1.4
<b>G2/M</b>	14.4 ± 1.3	6.1 ± 1.2	20.2 ± 1.2

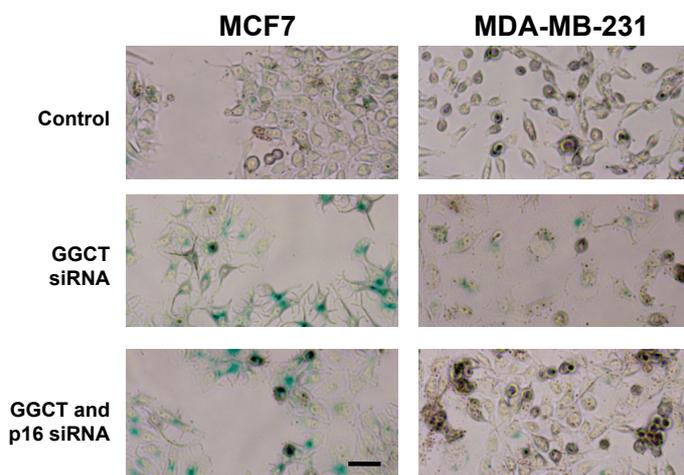
### 3. 乳癌細胞株における GGCT 欠乏による細胞老化誘導と p16<sup>INK4A</sup> の発現量

MCF7 細胞において p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現量変化が細胞老化の誘導に大きく影響していることが明らかとなったが、MDA-MB-231 細胞では GGCT 欠乏による p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現量上昇は認められなかった (Fig. 4)。そこで、乳癌細胞において p16<sup>INK4A</sup> の発現量とその細胞老化誘導に対する影響を検証した。MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞において GGCT-siRNA 導入によって上昇した p16<sup>INK4A</sup> のタンパク質発現量は、同時に p16<sup>INK4A</sup> の siRNA を導入することにより効率良く抑制された (Fig. 10 a)。MDA-MB-231 細胞において GGCT を欠乏させることで増加した SA-β-Gal 陽性細胞割合は、GGCT および p16<sup>INK4A</sup> の発現量を抑制することで有意に減少した。一方で、MCF7 細胞においては GGCT に加えて p16<sup>INK4A</sup> の発現量を抑制しても MDA-MB-231 細胞に認められたような SA-β-Gal 陽性細胞割合の減少は認められなかった (Fig. 10 b,c)。(SA-β-Gal 陽性細胞割合 MCF7 細胞 control 群: 33.8 ± 4.39%, GGCT-siRNA 群: 75.8 ± 1.5%, GGCT and p16<sup>INK4A</sup>-siRNA 群: 78.1 ± 1.4% control vs. GGCT-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ ; MDA-MB-231 細胞 control 群: 2.5 ± 0.3%, GGCT-siRNA 群: 43.1 ± 5.1%, GGCT and p16<sup>INK4A</sup>-siRNA 群: 18.4 ± 6.2%, control vs. GGCT-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ , GGCT-siRNA vs. GGCT and p16<sup>INK4A</sup>-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ )

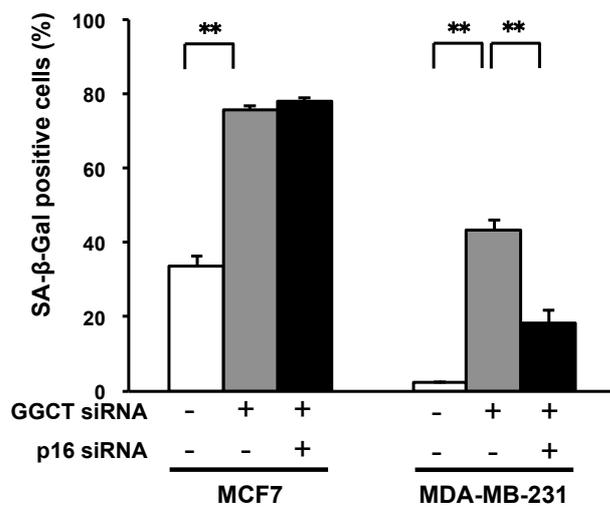
**a**



**b**



**C**

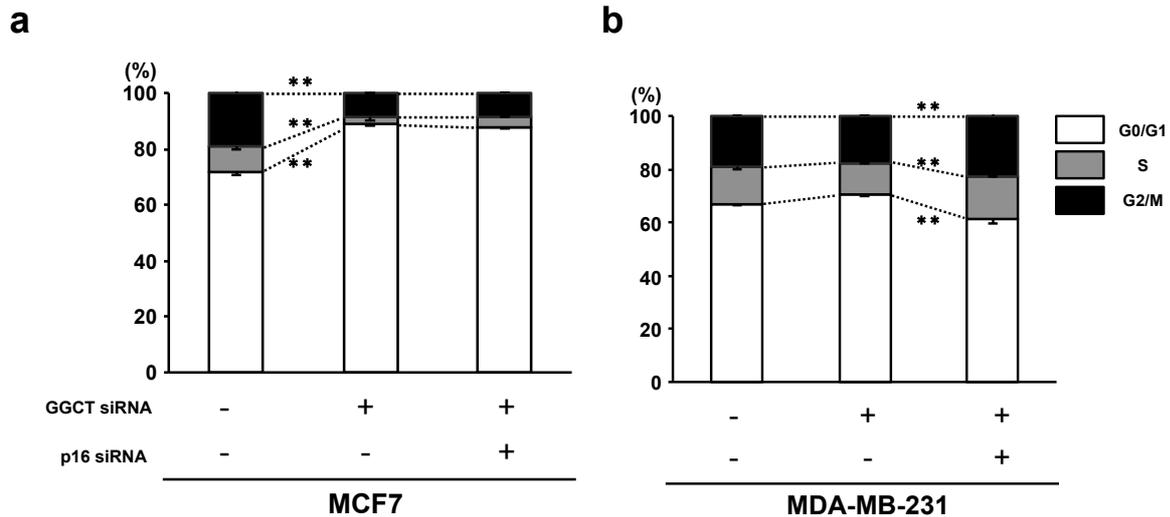


**Fig. 10** p16<sup>INK4A</sup> regulates GGCT knockdown-induced senescence in MDA-MB-231 cells.

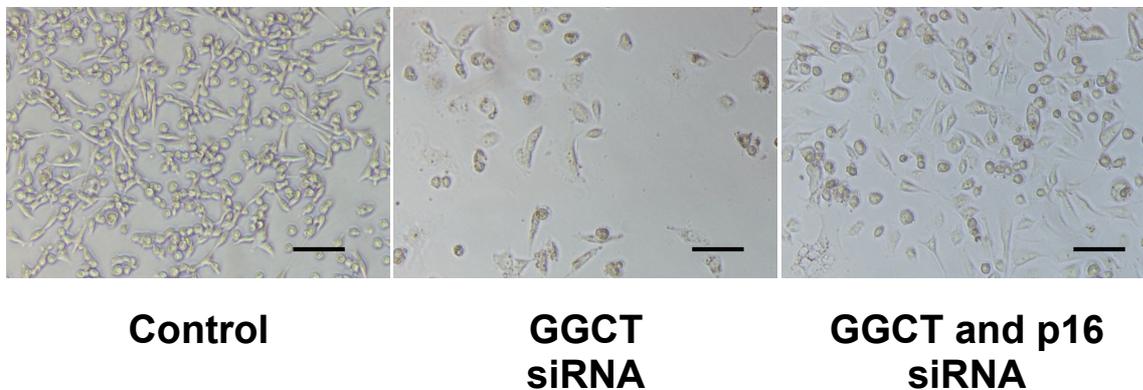
a The expression levels of p16<sup>INK4A</sup> in MCF7 and MDA-MB-231 cells harvested 4 days after transfection with the indicated siRNAs were analyzed by western blotting. β-actin is shown as loading controls. b Representative images of SA-β-Gal staining 4 days after transfection with the indicated siRNAs in MCF7 and MDA231-MB cells. Scale bar represents 50 μm. c The number of SA-β-Gal positive cells was counted and their ratios in total cells are shown. (\*\*  $p < 0.01$ ) This figure was cited from Fig.5 in *BMC Cancer.* , **16**, 748, 2016

4. 乳癌細胞株における p16<sup>INK4A</sup> の発現量変化とその細胞増殖への影響

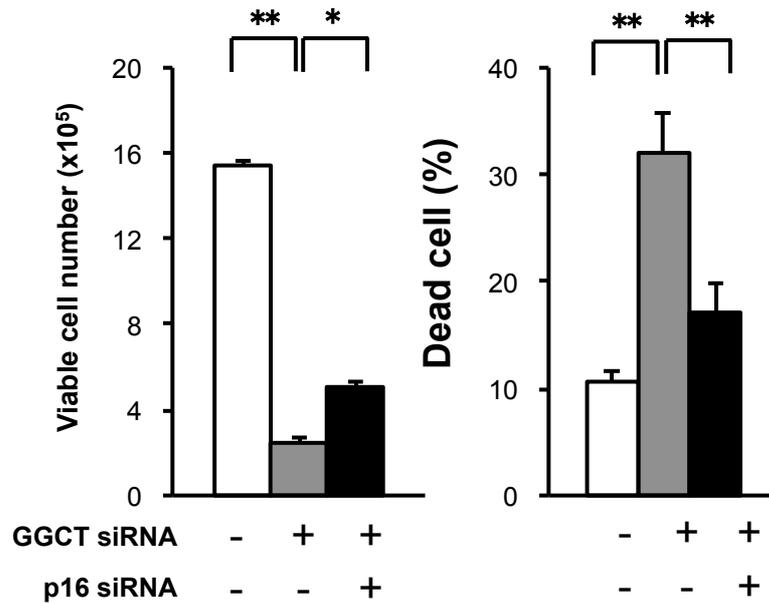
MDA-MB-231 細胞において p16<sup>INK4A</sup> 発現の増加が細胞周期および細胞増殖抑制に寄与しているか検証するため、GGCT および p16<sup>INK4A</sup> の siRNA 導入細胞を作成し解析した。MCF7 細胞において GGCT 欠乏によって顕著に増加した G0/G1 期の細胞集団は、GGCT に加え p16<sup>INK4A</sup> の発現量を抑制しても増加したままだった。MDA-MB-231 細胞において GGCT 欠乏によってわずかに増加した G0/G1 期の細胞集団は、GGCT に加え p16<sup>INK4A</sup> の発現量を抑制すると GGCT-siRNA 群と比較して有意に減少した (Fig. 11 a,b Table 4)。MDA-MB-231 細胞において GGCT のみならず p16<sup>INK4A</sup> の発現量を抑制することで、GGCT 欠乏によって抑制された細胞増殖は回復していた。細胞死割合に関しても GGCT のみ発現抑制させた場合よりも有意に減少していた (Fig. 11 c,d)。 (生細胞数 control 群:  $15.4 \pm 0.26 \times 10^5$ , GGCT-siRNA 群:  $2.5 \pm 0.19 \times 10^5$ , GGCT and p16<sup>INK4A</sup>-siRNA 群:  $5.0 \pm 0.32 \times 10^5$  control vs. GGCT-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ , GGCT-siRNA vs. GGCT and p16<sup>INK4A</sup>-siRNA Student's t-test,  $p = 0.025$ ; 死細胞の割合 control 群:  $10.6 \pm 0.9\%$ , GGCT-siRNA 群:  $32.0 \pm 3.8\%$ , GGCT and p16<sup>INK4A</sup>-siRNA 群:  $17.0 \pm 2.9\%$  control vs. GGCT-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ , GGCT-siRNA vs GGCT and p16<sup>INK4A</sup>-siRNA Student's t-test,  $p < 0.01$ )



c



d



**Fig. 11 Blockage of p16INK4A induction attenuates cell cycle arrest and growth inhibition caused by GGCT knockdown.**

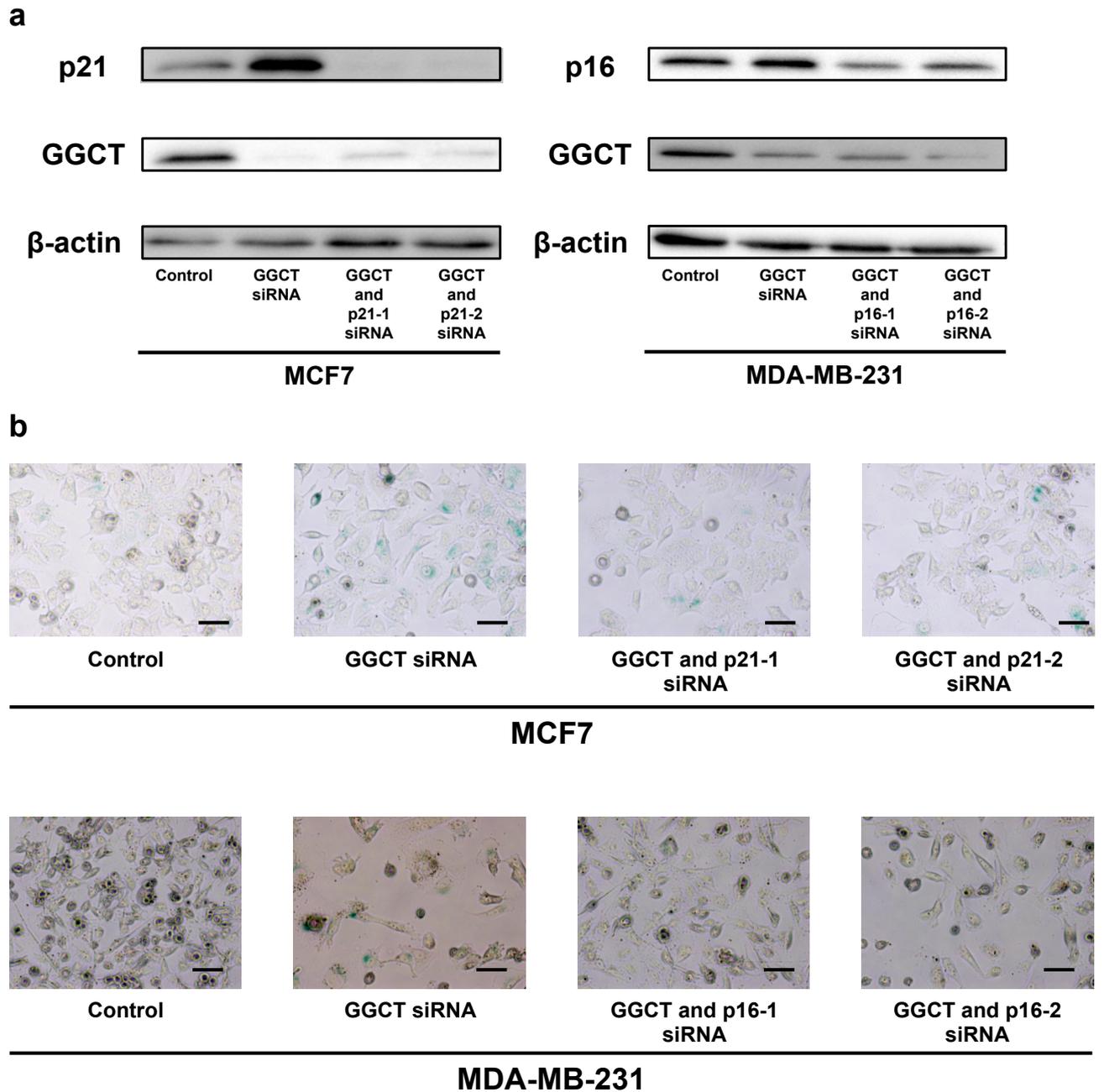
a-b The distribution of cell cycle phases in MCF7 (A) and MDA-MB-231 (b) cells was analyzed by flow cytometry 4 days after transfection with the siRNAs indicated. c-d Representative images of MDA-MB-231 cells (c), the number of Trypan blue-negative viable MDA-MB-231 cells (d, left panel), and the proportion of dead cells (d, right panel) at 7 days after transfection with the indicated siRNAs are shown. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) This figure was cited from Fig.6 in *BMC Cancer.*, **16**, 748, 2016

**Table 4 The cell cycle distribution of MCF7 and MDA-MB-231 cells**

	MCF7			MDA-MB-231		
	control (%)	GGCT siRNA (%)	GGCT and p21 siRNA (%)	control (%)	GGCT siRNA (%)	GGCT and p21 siRNA (%)
<b>G0/G1</b>	71.4 ± 1.0	87.3 ± 0.5	87.3 ± 0.6	66.0 ± 0.5	68.7 ± 0.9	60.0 ± 1.7
<b>S</b>	8.9 ± 0.8	2.5 ± 1.4	3.6 ± 0.1	13.5 ± 0.7	11.6 ± 0.5	15.4 ± 0.1
<b>G2/M</b>	19.3 ± 1.9	8.6 ± 0.3	8.3 ± 0.8	19.0 ± 0.4	17.1 ± 0.5	22.4 ± 1.4

## 5. siRNA オフターゲット効果の確認

今回の実験系で用いた siRNA による細胞現象がオフターゲット効果によるものではないことを確認するために、p21<sup>WAF/CIP1</sup> および p16<sup>INK4A</sup> の siRNA について全く配列の異なる siRNA を作成しそれぞれ p21-2 siRNA もしくは p16-2 siRNA としてノックダウン効率および細胞老化誘導の抑制効果を確認した。p21<sup>WAF/CIP1</sup> および p16<sup>INK4A</sup> についてタンパク質発現レベルは、p21-1 もしくは p16-1 と同様に抑制されていた (Fig. 12 a)。ノックダウンによる細胞老化発現についても p21-1 もしくは p16-1 と同様に、GGCT 欠乏によって誘導された細胞老化割合が p21<sup>WAF/CIP1</sup> および p16<sup>INK4A</sup> の siRNA を導入することにより減少していた。なお、GGCT に対する siRNA コンストラクトに関しても、我々の研究グループでは既報告において、2 種類の siRNA 配列が同様の増殖抑制効果と接着細胞に対する形態変化作用を示すことを確認している (4, 8)。



**Fig. 12 Cellular senescence was not rescued by p21<sup>WAF/CIP1</sup> or p16<sup>INK4A</sup> siRNA off target effects.**

a p21<sup>WAF/CIP1</sup> or p16<sup>INK4A</sup> expression levels of MCF7 depleted GGCT by transfection of p21<sup>WAF/CIP1</sup> or p16<sup>INK4A</sup> siRNA-1 and -2 were analyzed by Western blotting. b Representative images of SA-β-Gal staining 4 days after transfection with the siRNA-1 and -2 in MCF7 and MDA231-MB cells. Scale bar represents 50 μm.

## 考 察

本章では GGCT 欠乏によって引き起こされる細胞周期停止および細胞老化を介した細胞増殖抑制が、MCF7 細胞においては  $p21^{WAF/CIP1}$  発現レベルの上昇に依存すること、MDA-MB-231 細胞においては  $p16^{INK4A}$  の発現レベルの上昇が重要な因子であることを示す。また、MCF7 細胞において  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現誘導は  $p53$  非依存的な機序によることを明らかにした。

細胞老化は恒常的な細胞周期停止と定義され、老化細胞は細胞増殖能を失っている (14, 15)。細胞老化誘導機構には様々な機序が提唱されているが (14, 26, 36)、中でも  $p21^{WAF/CIP1}$  は細胞老化誘導因子として多くの報告がされている (15, 26, 36, 38)。マイクロアレイ分析によって老化と関連する因子として  $p21^{WAF/CIP1}$  が見出されたという報告や (39)、細胞老化誘導の初期において  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量が上昇することを示した報告などがある (27)。本研究においても MCF7 細胞において GGCT の発現量を抑制させると mRNA およびタンパク質レベルで  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量上昇が認められた (Fig. 7 a,b)。  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量上昇に伴って GGCT-siRNA 導入 MCF7 細胞では SA- $\beta$ -Gal 陽性の老化細胞が顕著に上昇していたが、 $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量を抑制することで老化細胞の割合は減少した (Fig. 7 c,d)。このことは MCF7 細胞において  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量上昇に依存して細胞老化が誘導されたことを示唆する。一方、GGCT-siRNA 導入により  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量上昇が認められなかった MDA-MB-231 細胞に、 $p21^{WAF/CIP1}$ -siRNA 導入しても、細胞老化の誘導に影響を与えなかった (Fig. 7 c,d)。この結果は、MCF7 細胞に  $p21^{WAF/CIP1}$ -siRNA が与えた影響の特異性を示唆していると考えられる。

$p53$  は  $p21^{WAF/CIP1}$  の重要な転写活性化因子である (40)。MCF7 細胞は wild-type の  $p53$  を有するが (20)、MCF7 細胞において GGCT 欠乏は  $p53$  の発現量上昇を誘導しなかった (Fig. 8)。この結果は、MCF7 細胞において  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現誘導が  $p53$  非依存的であることを示唆している。さらに、 $p53$  を完全に欠損する PC3 細胞においても GGCT 欠乏によって  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量が有意に上昇したことから (Fig. 5)、GGCT 欠乏によって誘導される  $p53$  非依存的な  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現誘導機構の存在が示唆される。実際に、様々な  $p53$  非依存的な  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現誘導機構の報告があり (41)、これらも GGCT 欠乏による  $p53$  非依存的な  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現誘導機構の存在を支持する。MCF7 細胞における詳細な  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現誘導機構については今後の重要な検討課題であると考えている。また、MCF7 細胞をはじめ、これらの乳癌細胞株のみならず多数のがん細胞株において、いわゆる古典的がん化学療法剤処理や放射線照射などによって DNA 損傷を受けると、 $p53$  蛋白質が顕著に誘導されることが知られている。GGCT 欠乏が内因性  $p53$  蛋白質発現量を誘導しなかった実験結果は、これらの乳癌細胞株における GGCT 発現量の減少は、それによって DNA 損傷を惹起することで  $p53$ - $p21^{WAF/CIP1}$  経路を活性化しているものではないと考察された。

$p21^{WAF/CIP1}$  は細胞老化の制御のみならず、細胞周期進行の制御やアポトーシス経路の調節など様々な役割がある (38, 42)。 $p21^{WAF/CIP1}$  は、CDKI の Cip と Kip ファミリーの一つとして G1 期と S 期のチェックポイント機構に中心的な役割を果たす調節因子であり、 $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量上昇は、CDK2 の機能を阻害することで細胞周期を G0/G1 期に停止させる (38, 42)。このことは、MCF7 細胞において GGCT の発現量を抑制すると G0/G1 期に細胞周期が停止したが、GGCT に加え  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量も抑制することで細胞周期停止が解除された実験結果と合致する (Fig. 9 a,b, Table 3)。さらに、MCF7 細胞において  $p21^{WAF/CIP1}$  の発現量抑制は、GGCT 欠乏によって顕著に抑制された細胞増殖を回復し、細胞死の

誘導も抑制した (Fig. 9 c,d)。これらのことから、MCF7 細胞において GGCT 欠乏は p21<sup>WAF/CIP1</sup> の発現量上昇を介して遷延する細胞周期停止を誘導し、さらにそれに引き続き細胞老化を経て最終的に細胞死を誘導していることが示唆された。p21<sup>WAF/CIP1</sup> は、MCF7 細胞において GGCT 欠乏性細胞増殖抑制の重要な制御因子であると考えられた。

MCF7 細胞において p21<sup>WAF/CIP1</sup> の発現上昇が認められた一方で、MDA-MB-231 細胞では p21<sup>WAF/CIP1</sup> の発現上昇は認められず、p16<sup>INK4A</sup> の発現量増加が認められた (Fig. 10)。p16<sup>INK4A</sup> も p21<sup>WAF/CIP1</sup> と同様に CDKI として細胞老化を調節する因子の一つであるが、その細胞周期停止機構と細胞老化誘導機構は p53 非依存的である (40, 41)。MDA-MB-231 細胞において、p16<sup>INK4A</sup> の発現量抑制は GGCT 欠乏による細胞老化誘導を抑制し (Fig. 10 b,c)、少なくとも部分的には細胞死を回避した (Fig. 11 c,d)。このことから MDA-MB-231 細胞において GGCT 欠乏は p16<sup>INK4A</sup> の発現量上昇を介して細胞老化とそれに引き続く細胞死を誘導していることが示唆された。しかしながら、MDA-MB-231 細胞における p16<sup>INK4A</sup> の発現量抑制による細胞老化の抑制効果は、MCF7 細胞における p21<sup>WAF/CIP1</sup> の発現量の抑制と比較して、やや顕著ではなかった。このことは MDA-MB-231 細胞における GGCT 欠乏性細胞老化誘導には p16<sup>INK4A</sup> 以外の因子が関与している可能性が考えられた。

MCF7 細胞において GGCT 欠乏は p21<sup>WAF/CIP1</sup>、MDA-MB-231 細胞においては p16<sup>INK4A</sup> の発現誘導が細胞老化とその後引き続いて起こる非アポトーシス細胞死に必須であることが明らかとなったが、細胞老化と非アポトーシス細胞死の間の直接の関連は完全には明らかになっていない。この原因は、細胞周期の停止や非アポトーシス細胞死などの他の現象に全く影響を与えず、細胞老化のみを阻害する実験手法の欠如によるところが大きい。これまでの実験結果からは、p21<sup>WAF/CIP1</sup> または p16<sup>INK4A</sup> の誘導による細胞周期の停止が強く起こり過ぎたために連続的に非アポトーシス細胞死に陥った場合のような直接の因果関係が存在するのか、もしくは、これら CDKI の誘導による細胞周期の停止はこの非アポトーシス細胞死の誘導に確かに必須であるものの、非アポトーシス細胞死が細胞周期の停止とは全く独立した別個の機序である可能性を排除出来ないため、決定することは出来ない。現在までのところ、細胞老化が誘導された後の細胞が生体内でいかに排除されるのかについては、ほとんど明らかになっていない。細胞レベルでの研究においても、細胞老化後の細胞死については不明な点が多く、詳細な分子メカニズムや細胞死の様式などについては、今後の研究課題であると考えられる。この GGCT 欠乏による細胞周期停止、細胞老化から非アポトーシス細胞死に至る一連の現象は、この現在のところ全く解明されていない「細胞老化後の細胞死」の様式を解明するうえにおいても、有用なモデルである可能性がある。

一方、GGCT は、グルタミル回路における  $\gamma$ -グルタミルアミノ酸を 5-オキソプロリンに変換する  $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ活性をもつことが、その分子機能である。今回、解析した乳癌細胞における GGCT 欠乏による現象が、この  $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ活性の欠乏そのものによるものか、もしくは GGCT が現在未知の他の分子機能を担っており、その他の機能が不全となって引き起こされているのかについては、現在のところ不明である。この点を明らかにするためには、GGCT の  $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ活性のみを阻害する特異的な阻害剤を開発することで、酵素活性を阻害して同様の現象がみられるのか検証する、もしくは  $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ酵素という分子機能に対する、いわゆるドミナント・ネガティブ型変異体を作成することで、酵素活性を阻害して同様の現象がみられるのか検証する、といったより酵素活性に焦点をあ

てた研究戦略が必要であると考えられる。また、GGCT を人為的に欠乏させた場合に、グルタミン回路における GGCT の基質の蓄積や、反応生成物の枯渇といった生化学的な量的変化が実際に細胞内で起こっているかについては、未だ不明である。この点を明らかにするためには、質量分析器を主体とした、いわゆるメタボローム解析を推進する必要があると考えられる。これにより、グルタミン回路に関連するアミノ酸代謝物もしくは代謝基質のうち、がん細胞にとって必須もしくは重要な物質、あるいは、がん細胞に対する阻害活性の高い物質を、具体的に明らかにすることが出来れば、がん細胞のアミノ酸代謝の変化や異常に関連する「がんのメタボローム」を標的とした、今までに無い、全く新しい治療戦略の創出に結びつけることが出来るかも知れない。

## 総括

GGCTは、様々ながんを高発現しているタンパク質として見いだされ、その発現量を低下させることで認められる抗腫瘍効果から、有望な新規治療標的分子と考えられてきた。本研究では、現在まで不明であった、がん細胞のGGCT発現抑制による増殖抑制効果を惹起する細胞生物学的現象とそのメカニズムを、主にsiRNA技術を用いたGGCT欠乏がん培養細胞モデルで明らかにした。

第1章では、GGCT-siRNAを導入することで作成したGGCTを欠乏した乳癌細胞を用いて、GGCT欠乏による癌細胞の増殖抑制には細胞死誘導が伴うことを明らかにした。さらにMCF7乳癌細胞においてPARPの切断、カスパーゼの活性化、核の断片化といった、典型的なアポトーシス細胞死経路の活性化が認められないことを見出し、GGCT欠乏性細胞死に非アポトーシス細胞死機構が存在する可能性が示唆された。

第2章では、GGCTを欠乏した様々ながん細胞において、SA- $\beta$ -Galで標識される、いわゆる細胞老化と呼ばれる現象が顕著に誘導されていることを、本研究で初めて明らかにした。さらに、細胞老化の誘導に重要な働きをすることが知られている遺伝子産物p21<sup>WAF/CIP1</sup>が、p53非依存的にmRNAレベルおよびタンパク質レベルで顕著に誘導されることを見いだした。さらに、多数の培養細胞株で検討した結果、細胞種によって、p21<sup>WAF/CIP1</sup>もしくはp16<sup>INK4A</sup>の少なくとも一方のCDKIの発現量が顕著に上昇することを示した。

第3章では、第2章において明らかにした、GGCT欠乏によって発現が上昇するp21<sup>WAF/CIP1</sup>およびp16<sup>INK4A</sup>が果たす、細胞老化誘導に対する機能的な寄与について、乳癌細胞のMCF7細胞およびMDA-MB-231細胞に対する二因子同時発現抑制モデルを用いて詳細に解析した。その結果、GGCT欠乏による細胞老化と引き続く細胞死の誘導を伴う細胞増殖抑制効果は、MCF7細胞ではp21<sup>WAF/CIP1</sup>の発現量の上昇に依存すること、またMDA-MB-231細胞ではp21<sup>WAF/CIP1</sup>は関与せず、p16<sup>INK4A</sup>の発現量の上昇に少なくとも部分的には依存していることを明らかにした。

以上の研究成果から、GGCTを欠乏したがん細胞は、p21<sup>WAF/CIP1</sup>もしくはp16<sup>INK4A</sup>といったCDKIの発現量増加による細胞周期停止の遷延および細胞老化が誘導され、それに引き続き細胞死に至っていると考えられる。GGCT欠乏による細胞死は、非アポトーシス性の細胞死機構を介しているが、その詳細な細胞死の様式とメカニズムは今後の検討課題である。

本研究の成果は、GGCTをがん治療標的とした抗腫瘍効果の機序の一旦を明らかにし、がん細胞において細胞老化誘導するという新たな治療戦略を提唱した。このことは、今後のGGCT標的治療薬開発に寄与するものと期待される。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、御懇篤なる御指導と御助言を賜りました京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 吉貴 達寛 教授、中田 晋 准教授に深甚なる謝意を表します。吉貴教授には懇切丁寧なる研究の御指導を賜りましたことに深く敬意と謝意を表します。中田准教授には研究技術や論文作成に至るまで研究の基礎から細部にわたり御指導、御鞭撻を頂き、さらに将来展望につきましてもご助言頂きましたことに深く感謝し、心より御礼申し上げます。

本論文の査読ならびに御指導賜りました本学 生化学分野 中山 祐治 教授、臨床薬理学分野 中田 徹男 教授に篤く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、実験を協力して頂きました臨床腫瘍学分野大学院生の谷口 恵香 学士をはじめとする大学院生と大学生の皆様に感謝の意を表すると共に益々のご活躍を祈念いたします。

また、円滑な研究室運営を頂きました臨床腫瘍学分野 飯居 宏美 助教に心より御礼申し上げます。

大学院生生活における経済的支援と発表の機会を賜りました、本学制度とがんプロフェッショナル養成基盤推進プラン制度に心より御礼申し上げます。

最後に、日々の生活を支えてくれた妻に心から感謝するとともに、研究生活を様々な面で支えて頂いたすべての皆様に深く感謝いたします。

## 引用文献

1. Isono T, Tanaka T, Kageyama S, et al., Structural diversity of cancer-related and non-cancer-related prostate-specific antigen. *Clin Chem.*, **12**, 2187-94, 2002
2. Kageyama S, Isono T, Iwaki H, et al., Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine. *Clin Chem.* , **50**, 857-66, 2004
3. Kageyama S , Isono T, Matsuda S, et al., Urinary calreticulin in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma. , **5**, 481-6, 2009
4. Kageyama S, Iwaki H, Inoue H, et al., A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma. *Proteomics Clin Appl.*, **1**, 192-9, 2007
5. Oakley AJ, Yamada T, Liu D, et al., The identification and structural characterization of C7orf24 as gamma-glutamyl cyclotransferase. An essential enzyme in the gamma-glutamyl cycle. *J Biol Chem.*, **283**, 22031-42, 2008
6. Celis A, Rasmussen HH, Celis P, et al., Short-term culturing of low-grade superficial bladder transitional cell carcinomas leads to changes in the expression levels of several proteins involved in key cellular activities. *Electrophoresis.*, **2**, 355-61, 1999
7. Gromov P, Gromova I, Friis E, et al., Proteomic profiling of mammary carcinomas identifies C7orf24, a gamma-glutamyl cyclotransferase, as a potential cancer biomarker. *J Proteome Res.*, **9**, 3941-53, 2010
8. Uejima D, Nishijo K, Kajita Y, et al., Involvement of cancer biomarker C7orf24 in the growth of human osteosarcoma. *Anticancer Res.*, **4**, 1297-305, 2011
9. Oda K, Makino S, Masuda C, et al., The mRNA distribution of C7orf24, a gamma-glutamyl cyclotransferase, in rat tissues. *J Histochem Cytochem.*, **12**, 1121-6, 2009
10. Hama S, Arata M, Nakamura I, et al., Prevention of tumor growth by needle-free jet injection of anti-C7orf24 siRNA. *Cancer Gene Ther.*, **19**, 553-7, 2012
11. Hayflick L, The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.*, **37**, 614-36, 1965
12. S Courtois-Cox, et al., Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene.*, **27**, 2801-09, 2008

13. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, et al., The essence of senescence. *Genes Dev.*, **24**, 2463-79, 2010
14. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, et al., Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.*, **15**, 1139-53, 2014
15. Collado M, Serrano M, Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer.*, **10**, 51-7, 2010
16. Roninson IB, Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.*, **63**, 2705-15, 2003
17. Ewald, J.A. et al., Therapy-induced senescence in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **102**, 1536-46, 2010
18. Song YS, Lee BY, Hwang ES, Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mech Ageing Dev.*, **126**, 580-90, 2005
19. Elmore LW, Rehder CW, Di X, et al., Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem.*, **277**, 35509-15, 2002
20. Chang BD, Xuan Y, Broude EV, et al., Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene.*, **18**, 4808-18, 1999
21. Han Z, Wei W, Dunaway S, et al., Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem.*, **277**, 17154-60, 2002
22. Wang X, Wong SC, Pan J, et al., Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res.*, **58**, 5019-22, 1998
23. Li Z, Jiang K, Zhu X, et al., Encorafenib (LGX818), a potent BRAF inhibitor, induces senescence accompanied by autophagy in BRAFV600E melanoma cells. *Cancer Lett.*, **370**, 332-344, 2016
24. Roninson IB, Broude EV, Chang BD, If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat.*, **4**, 303-13, 2001
25. te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, et al., DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, **62**, 1876-83, 2002
26. Campisi J, d'Adda di Fagagna F, Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **8**, 729-40, 2007

27. Johmura Y, Shimada M, Misaki T, et al., Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Mol Cell.*, **55**, 73-84, 2014
28. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.*, **75**, 817-25, 1993
29. Harper JW, Adami GR, Wei N, et al., The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.*, **75**, 805-816, 1993
30. Roninson IB, Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.*, **179**, 1-14, 2002
31. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **92**, 9363-7, 1995
32. d'Adda di Fagagna, F. , Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer.*, **8**, 512–522, 2008
33. Harley, C.B. et al., Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.*, **345**, 458–460, 1990
34. Dorr, J.R. et al., Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature.*, **501**, 421–425, 2013
35. Nardella, C. et al., Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer.*, **11**, 503–511, 2011
36. Salama R, Sadaie M, Hoare M, et al., Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.*, **28**, 99-114, 2014
37. Di Mitri D, Alimonti A et al., Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. *Trends Cell Biol.*, **26**, 215-26, 2016
38. Romanov VS, Pospelov VA, Pospelova TV, Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochemistry (Mosc.)*, **77**, 575-84, 2012
39. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, et al., Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97**, 4291-6, 2000

40. Lowe SW, Cepero E, Evan G, Intrinsic tumour suppression. *Nature.*, **432**, 307-15, 2004
41. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES, Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer.*, **130**, 1715-25, 2012
42. Abbas T, Dutta A, p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.*, **9**, 400-14, 2009

## 研究業績目録

学位論文の基礎となる報文及び該当する章

- 1) **Kengo Matsumura**, Susumu Nakata, Keiko Taniguchi, Hiromi Ii, Eishi Ashihara, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Tatsuhiko Yoshiki: Depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase inhibits breast cancer cell growth via cellular senescence induction mediated by CDK inhibitor upregulation., *BMC Cancer*, **16**, 748-752, 2016 [第1-3章]

その他の原著論文

- 1) **松村健吾**, 大谷祐基, 大村友博, 米澤 淳, 津田真弘, 池見泰明, 中川俊作, 今井哲司, 中川貴之, 矢野育子, 吉貴達寛, 松原和夫: LC/QTOF-MSによるフィルグラスチムバイオ後続品の定性・成分分析, *医療薬学*, **42**, 613-619, 2016

発表学会

- 1) **松村健吾**, 飯居宏美, 吉貴達寛: 正常細胞とかがん細胞における C7orf24 発現量の比較および C7orf24 ノックダウン細胞における細胞増殖抑制. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2014.10.
- 2) **松村健吾**, 飯居宏美, 花田英紀, 影山進, 吉貴達寛: siRNA と抗がん剤の併用による C7orf24 阻害はがん細胞の増殖を抑制する. 第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2014.9.
- 3) **松村健吾**, 大谷祐基, 大村友博, 米澤淳, 津田真弘, 吉貴達寛, 松原和夫: LC/TOF-MS による G-CSF バイオ後続品の定性分析. 第 24 回日本医療薬学会年会 (名古屋), 2014.9.
- 4) 大谷祐基, **松村健吾**, 米澤淳, 大村友博, 津田真弘, 中川貴之, 松原和夫: LC/TOF-MS を用いた抗体医薬品の糖鎖解析. 第 24 回日本医療薬学会年会 (名古屋), 2014.9.
- 5) **Kengo Matsumura**: Down regulation of cancer cell growth by C7orf24 knockdown and additional effects with anti-cancer drugs. Joint Cancer Symposium between National Taiwan University and Kyoto University And four universities in Kyoto (台湾), 2015.1.
- 6) **Kengo Matsumura**, Hiromi Ii, Eiki Hanada, Susumu Kageyama, Tatsuhiko Yoshiki: Down regulation of cancer cell growth by C7orf24 knock down and additional effects with anti-cancer drugs. The 3rd International Symposium of Training Plan for Oncology Professionals (大阪), 2015.2.

- 7) **Kengo Matsumura**: The depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase induced cellular senescence and cell cycle arrest.、Kyoto University Hospital Exchange Program (シンガポール), 2016.1.
- 8) **Kengo Matsumura**, Susumu Nakata, Hiromi Ii, Eishi Ashihara, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Tatsuhiro Yoshiki: Depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase inhibits cancer cell growth via cellular senescence caused by CDK inhibitor induction. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (英国), 2016.7.
- 9) **松村 健吾**, 中田 晋, 飯居 宏美, 芦原 英司, 影山 進, 河内 明宏, 吉貴 達寛: CDKI 誘導を介した  $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼの抑制による細胞老化誘導. 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2016.10.
- 10) **松村 健吾**: 癌細胞における  $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ欠乏はCDKIを誘導し細胞老化を惹起する. 平成28年度5大学連携「医療フォーラム」(京都), 2016.11.
- 11) **Kengo Matsumura**, Susumu Nakata, Keiko Taniguchi, Hiromi Ii, Eishi Ashihara, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Tatsuhiro Yoshiki: Depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase inhibits cancer cell growth through cellular senescence induction. 2016 ASCB Annual Meeting (米国), 2016.12.
- 12) 谷口 恵香, 中田 晋, **松村 健吾**, 飯居 宏美, 影山 進, 河内 明宏, 吉貴 達寛: Gamma-glutamylcyclotransferase (GGCT) の発現低下は乳癌細胞にオートファジーを誘導する. 日本薬学会第137年会 (仙台), 2017.3
- 13) **Kengo Matsumura**, Susumu Nakata, Keiko Taniguchi, Hiromi Ii, Eishi Ashihara, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Tatsuhiro Yoshiki: The depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase induces cellular senescence and cell death via CDKIs upregulation. The 5th International Symposium of Training Plan for Oncology Professionals (大阪), 2017.3
- 14) **松村 健吾**: 新規がん標的分子 C7orf24 の研究を通して伝えたいこと～薬剤師が学位を取得する意義～ 日本臨床腫瘍薬学会学術大会(新潟), 2017.3