

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：悪性黒色腫における TRAIL 耐性機構の解明と新規併用療法の試み

2. 研究開発代表者：柳 輝希

(当該年度 3 月 31 日時点の所属:国立大学法人北海道大学 北海道大学病院 医員)

3. 研究開発の成果

本年度は、悪性黒色腫 A2058 細胞を用いて siRNA スクリーニングを行った。siRNA ライブラリーとして Human Kinome library (LifeTechnologies、1 遺伝子あたり 3 の siRNA)を使用した。トランスフェクションの方法としては、96 well white plate に、1 ウェルあたり 5000 個の細胞になるように播種し、そこに Opti-MEM および RNAiMAX 試薬 (ともに Invitrogen)と混合した RNA (最終濃度 5nM)を添加した。48 時間培養したところで、TRAIL (0, 3, 10 ng/ml) を含んだ培地と交換し、さらに 24 時間培養した。その後、Cell Titer Glo Ver.2 (プロメガ)にて Cell viability を測定し、siRNA によって TRAIL 感受性が変化したかどうかを検討した。およそ 50 の遺伝子のノックダウンによって、Proapoptotic に働くことがわかった。続いて、Public database を用いた絞り込みを行ったところ、これまで Apoptosis 経路には知られていなかった候補遺伝子を 5 つ検出することができた。さらに得られた 5 遺伝子について、ほかの癌細胞 (悪性黒色腫 A375 細胞、前立腺癌 PPC1 細胞)を用いて、同様の実験を行った。その結果、5 つの遺伝子のうちの 3 つで再現性を得られた。また、免疫ブロット法を用いて Cleaved-caspase-3 の発現を解析したところ、認められた Cell viability の低下が Apoptosis であることを確認できた。現在、この新規候補分子 3 分子について、テトラサイクリン誘導性 shRNA (Invitrogen Tet-inducible shRNA)などの手法を用いて、さらに詳しい解析を実施中である。また、得られた 3 候補分子の発現ベクターを作成し、その過剰発現による細胞表現型を解析し、また TRAIL 感受性についても検討を行う。

続いて、候補分子についての抗体性能評価をおこなった。シグマ社から購入したウサギポリクローナル抗体を用いて、内在性および過剰発現させた候補分子の免疫ブロット法を実施し、その性能を評価した。今後凍結保存検体や FFPE 検体を用いた腫瘍組織の免疫染色を実施する予定である。

4. その他