

平成19年度 ハイテク・リサーチ・センター整備事業 研究成果報告書

ドラッグラショナル研究開発センター（プロジェクト3）

研究プロジェクト名 生活習慣病治療を指向した新規標的分子および医薬品の探索と作用機序研究

研究代表者及び分担者

研究室名	職名	氏名	研究の役割分担
環境生体応答学	教授	別府 正敏	研究総括 生活習慣病治療の新規細胞表面標的候補分子ヌクレオリンの機能解明と機能制御
分子細胞病態薬理学	准教授	田野中浩一	心不全病態に関わるミトコンドリアタンパク質に関する研究
免疫学	教授	大野 尚仁	動脈硬化の危険因子としての微生物成分と自然免疫系認識分子との関連性の検討
生化学・分子生物学	教授	伊東 晃	マトリックスメタロプロテアーゼ誘導因子EMMPRINの新規機能探索とそれを分子標的とする生活習慣病治療薬の開発
薬物代謝安全性学	教授	平塚 明	がん細胞の抗がん剤耐性化因子としての薬物代謝酵素の役割
薬物送達学	教授	新槇 幸彦	生活習慣病治療を指向した標的細胞選択的遺伝子デリバリーシステムに関する研究

研究成果の概要

本プロジェクトは循環器疾患やがんなどの生活習慣病治療に向けての標的分子や薬物の研究、及びその薬物治療におけるドラッグデリバリーシステムの研究プロジェクトである。このプロジェクトを構成する6研究室（研究班）は専門領域を異にしており、それぞれの研究基盤に基づきサブテーマを設定し、他の班とも連携して研究を推進している。その結果、平成19年度は下記の成果を得た。

- 1) 別府班は、多機能タンパク質ヌクレオリン(NUC)には陰性荷電に親和性があることに着目し、マクロファージ細胞表面 NUC が、変性 LDL や変性タンパク質などを細胞内に取り込み分解するスカベンジャーレセプター機能を有する可能性をタンパク質、細胞レベルで検討した。その結果、スカベンジャーレセプター機能を有することが判明し、変性 LDL 等の除去やその破綻による動脈硬化薬形成に NUC が関与する可能性を示した。
- 2) 田野中班は、心不全発症の仕組みを心筋ミトコンドリアの機能変化の観点から追求した。その結果、不全心ではミトコンドリア膜に酸化的な傷害が起きており、Hsp60 の発現が増大していること、心不全治療薬は心筋ミトコンドリアの Hsp60 増加を抑制し、ミトコンドリア機能を回復させることなどを見出し、心不全発症とミトコンドリアのエネルギー産生低下および Hsp60 の発現に密接な関連があることを明らかにした。

- 3) 大野班は、真菌の多糖類が血管炎誘発因子となって動脈硬化形成に関わる可能性に注目し、真菌の培養条件によって産生される多糖の構造や活性が異なること、マクロファージの β グルカン受容体 **dectin-1** の β グルカン結合活性は植物や藻類由来 β グルカンより真菌由来が最も強いこと、**dectin-1** を介したマクロファージ細胞内への情報伝達経路は **Toll-like receptor(TLR)**を介した経路と異なること、などを明らかにした。
- 4) 伊東班は、がん細胞表面に発現し、その浸潤を促進するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)誘導因子(**EMMPRIN**)の機能の一つである **proMMP** 産生誘導には **EMMPRIN** のループ I ドメイン内 **EM1** 配列が関わることを明らかにした。また、**EMMPRIN** の新たな機能としてがん細胞の移動活性促進作用を見出し、これに関わる配列としてループ II ドメイン内 **EM9** を同定し、これら各種ペプチドががん転移阻害薬となりうる可能性を示した。
- 5) 平塚班は、がん細胞における薬物代謝酵素の過剰発現が、抗がん剤耐性獲得を引き起こし得ることに着目し、作成したタモキシフェン(**TAM**)特異的薬物代謝酵素 **UGT1A4** 高発現培養乳がん細胞株を用いて、**TAM** 及び **trans-4-HO-TAM** の代謝様式を検討した。その結果、**TAM** が N-グルクロン酸抱合を受けて極性化され、細胞外への排泄が促進されることにより細胞内濃度が低下することが耐性化の一要因になり得ることを示した。
- 6) 新槇班は、がん細胞や血管内皮細胞などの細胞表面分子 **Syndecan** に選択的に結合するラミニン由来のペプチド **AG73** を付与したリポソームに対してプラスミド DNA を内封し、これを用いて **Syndecan** 高発現がん細胞に対する遺伝子導入に成功した。また、他のがん細胞株や血管内皮細胞に対しても同様に遺伝子導入が可能であることを示した。さらに、血中安定性の高い、遺伝子内封型 **AG73** 修飾リポソームの作製にも成功した。

以上のように各班は着実に分担課題の研究を実施し、大きな成果をあげている。また、上記の成果には、班同士での協力や連携、助言などに基づく成果も多い。本研究プロジェクトが進行するにつれ、また、年次が進むにつれ、多くの成果が蓄積し、班同士での連携も拡大していくと予想される。

本プロジェクトは次年度においても更なる進展と成果が期待できる。

生活習慣病治療の新規細胞表面標的候補分子ヌクレオリンの機能解明と機能制御

別府 正敏（環境生体応答学教室・教授）

1. 当初の研究目標

細胞の核小体、細胞質で見出されたタンパク質ヌクレオリンは、核小体クロマチンの凝縮と脱凝縮、リボソームの生合成、rRNAの核外輸送など、細胞の増殖制御に関わるタンパク質として知られているが、近年、各種の細胞表面でも存在が確認され、マクロファージの表面ではアポトーシス初期の細胞を貪食除去するレセプターとして、他の細胞表面ではLDL、ラミニン、ミッドカイン、ラクトフェリンなどの各種生理活性タンパク質の細胞内への取込みや、ある種のウイルス、バクテリアの感染レセプターとして機能する多機能シヤトルタンパク質であることが明らかにされてきた。本研究は、細胞表面のヌクレオリン分子に注目し、その多様な機能を解明し、それらの機能を薬物により人為的に制御することを通じて生活習慣病の治療、とりわけ細胞死やタンパク質変性が病態形成に関わる脳神経疾患などのコンフォーメーション病や循環器疾患などの治療への利用の可能性を探ることを目的としている。

ヌクレオリンは核内や細胞質ではRNAやDNAなどの核酸分子に結合して様々な働きをしており、また、マクロファージの細胞表面ではアポトーシス初期細胞の陰性荷電を帯びた表面糖鎖クラスターをリガンドとして認識し、アポトーシス細胞の貪食除去に関わっている。このように、ヌクレオリンは陰性荷電を帯びた分子や粒子に親和性を有することを考えると、マクロファージ表面ヌクレオリンは、生体内に発生する陰性荷電を帯びた各種の変質変性タンパク質や変性粒子を除去するスカベンジャーレセプター (scavenger receptor:SR)として機能している可能性が考えられる。マクロファージ表面にはすでにclass A SR (SR-AI, SR-AII, SR-CL)、class B SR (SR-BI, SR-BII, CD36)、LOX-1、SRECなどの各種のスカベンジャーレセプター分子が見出されているが、さらに、ヌクレオリンも同様の機能を有している可能性がある。一般に、マクロファージのスカベンジャーレセプターは生体内に発生する変性・変質した高分子や粒子を除去して生体恒常性を維持していると考えられるが、一方で、変性LDLを過剰に取り込んだ血管壁マクロファージが泡沫細胞となり、動脈硬化形成の要因となっているとも考えられており、マクロファージ表面のヌクレオリンにスカベンジャーレセプター活性があれば、その活性を薬物で制御することにより動脈硬化の生成を抑制または予防することが可能となるかもしれない。

平成19年度はこのような考えに基づいて、マクロファージ表面のヌクレオリンにスカベンジャーレセプター活性があるかどうかを下記の実験系で検討することとした。

(1) Cell-free系における可溶性リコンビナントヌクレオリンと各種のスカベンジャーレセプターリガンドとの結合実験

リガンド：ウシ血清アルブミン (BSA) の化学修飾体 (maleylBSA、酸化BSA、糖化BSA(AGE-BSA))、LDLの化学修飾体 (acetylLDL)、各種ポリアニオン類など

測定系：Western blotting, 表面プラズモン共鳴法 (SPR法)

(2) マクロファージ細胞表面ヌクレオリンに対するリガンド結合及び取込実験

リガンド：蛍光標識maleylBSA、蛍光または放射性標識変性LDL(acetylLDL)

測定系：Flow cytometry、またはラジオアイソトープ計測

2. 研究成果の概要

(1) ヌクレオリンの各種ポリアニオン、化学修飾タンパク質および化学修飾 LDL に対する結合活性

ヒトヌクレオリンのリコンビナント体を作成し、cell free の実験系で表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance:SPR) 装置を用いて、ヌクレオリンと各種のスカベンジャーレセプターリガンドの結合性を検討した。ヌクレオリンは全長のリコンビナント体を作成することが困難なので、284 番目のメチオニンから C 末端までの部分配列ヌクレオリン (rNUC284) (図 1 参照) を作成しこれを用いた。rNUC284 を SPR 測定用 CM5 センサーチップに固定化し、各種スカベンジャーレセプターリガンドの溶液を注入してセンサーチップに対する結合量 (質量) を SPR 法により定量的に測定した。その結果、スカベンジャーレセプターのリガンドとして知られる各種のポリアニオン類 (fucoidan、polyinosinic acid (poly I)、polycytidylic acid (poly C))、化学修飾タンパク質 (maleylBSA)、化学修飾 LDL (acetylLDL) との結合が濃度依存的に認められた。poly inosinic acid-polycytidylic acid (poly I/C)、AGE-BSA、酸化 BSA、BSA、LDL には結合性は見られなかった。この結合特異性は既知の各種スカベンジャーレセプターに類似しており、ヌクレオリンはスカベンジャーレセプターと同様なリガンド特異性を有することが明らかになった。

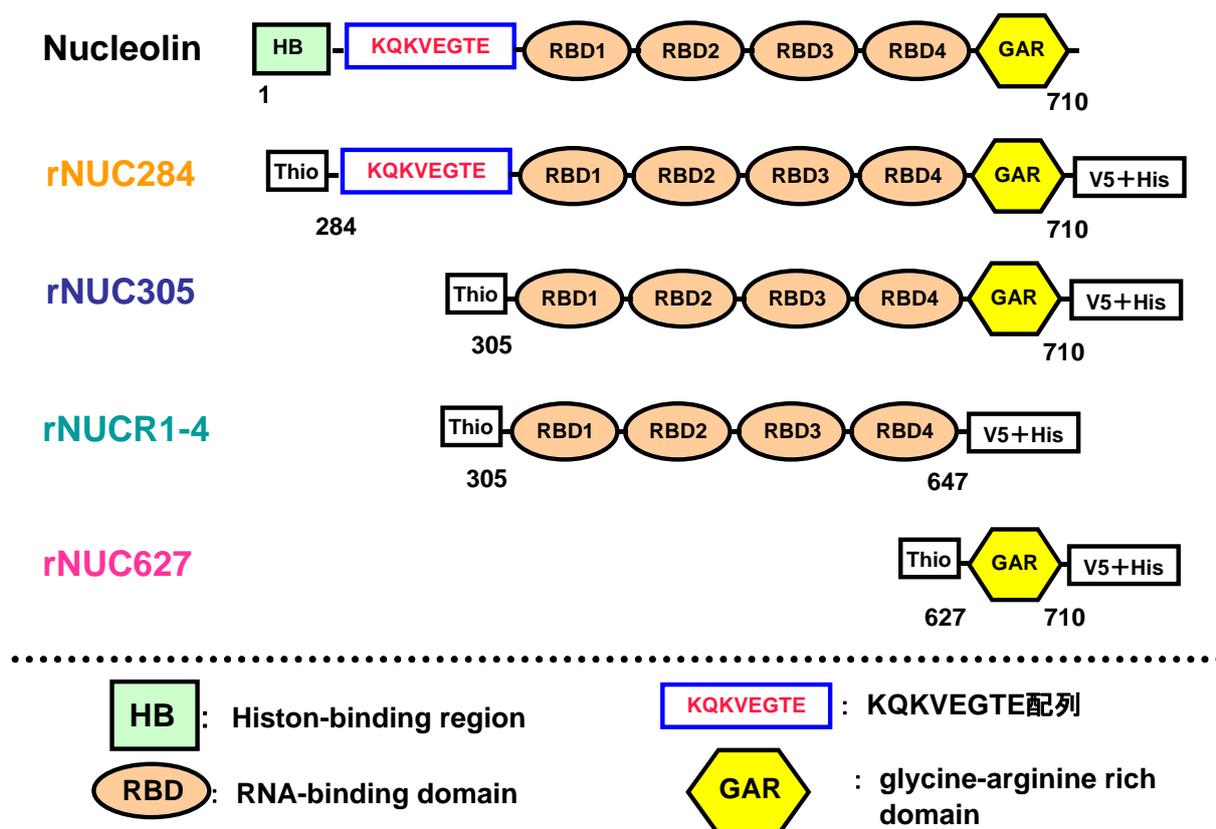
次に、マクロファージ表面に発現しているヌクレオリンが実際、スカベンジャーレセプターとして化学修飾タンパクや化学修飾 LDL を結合し、細胞内に取り込む機能を有しているかどうか明らかにするため、Alexa488 で蛍光標識した蛍光標識 maleylBSA、1,1-dioctadecyl thiocarbocyanine perchlorate (DiI) で蛍光標識した蛍光標識 acetylLDL を作製し、ヒト培養単球 (THP-1 マクロファージ)、マウス腹腔マクロファージによる結合および取り込みに対する抗ヌクレオリン抗体 (rNUC284 抗体) の阻害効果を検討した。その結果、蛍光標識 maleylBSA と蛍光標識 acetylLDL はヒト培養単球またはマウス腹腔マクロファージに結合し取り込まれること、そしてこの結合と取り込みは抗ヌクレオリン抗体により部分的に阻害されることがわかった。マウス腹腔マクロファージにおける maleylBSA、acetylLDL の結合・取り込みは anti-rNUC 抗体によりそれぞれ、30.6%、32.1% 阻害された。このことから、単球・マクロファージの細胞表面ヌクレオリンはスカベンジャーレセプター活性を有し、変性タンパク質や変性 LDL の結合・取り込みにも関与していると考えられた。

(2) 各種リコンビナントヌクレオリン (rNUC305、rNUC627、rNUCR1-4) の各種ポリアニオン、化学修飾タンパク質および化学修飾 LDL に対する結合活性

上述した各種ポリアニオン、化学修飾タンパク質 (maleylBSA)、化学修飾 LDL (acetylLDL) の認識にヌクレオリンのどの部位が関与するかを、rNUC284 の部分フラグメントリコンビナント体である rNUC305、rNUC627、rNUCR1-4 (図 1 参照) を用いて SPR 法により検討した。その結果、rNUC305、rNUCR1-4 では NUC284 と同様に fucoidan、poly I、poly C、maleylBSA、acetylLDL で濃度依存的に結合性を示したが、RNA binding domain (RBD) 領域を含まない rNUC627 に対しては、poly C、maleylBSA、acetylLDL では濃度依存的な結合性を示さなかった。RBD は核酸のような陰性荷電を帯びた生体高分子に結合することか

ら、ヌクレオリンとポリアニオン、化学修飾タンパク質および化学修飾 LDL の結合には、RBD 領域が必要であることが示唆された。また、ヌクレオリンのアポトーシス細胞認識には 295 番目のアミノ酸から始まる KQKVEGTE 配列が必要であることが既に判明しているが、この配列を欠くりコンビナント体でもリガンド結合性には変化がなかったことから、ヌクレオリンのアポトーシス細胞認識部位とスカベンジャーレセプター活性部位は異なっていると考えられた (表 1 参照)。

図 1 各種リガンドの結合実験に用いたヌクレオリンの各種リコンビナント体



以上の結果をまとめると、1) リコンビナントヌクレオリン分子は各種ポリアニオン、化学修飾タンパク質、化学修飾 LDL と結合し、スカベンジャーレセプターと同様なリガンド特異性を示すこと、単球やマクロファージによる化学修飾タンパク質、化学修飾 LDL の結合・取り込みは抗 rNUC 抗体により約 30%阻害されることから、単球・マクロファージ表面ヌクレオリンにはスカベンジャーレセプター機能があることが明らかになった。また、ヌクレオリンのスカベンジャーレセプターリガンドとの結合には、アポトーシス細胞認識に必要である KQKVEGTE 配列は必要なく、RBD 領域が必要であることが示唆された。したがって、単球・マクロファージ表面ヌクレオリンはアポトーシス細胞を貪食除去するだけでなく、変性タンパク質や変性 LDL をも認識し除去するスカベンジャーレセプターとしても機能していると考えられる。

	Acetyl LDL	LDL	Maleyl BSA	BSA	Fucoidan	Poly I	Poly C	Poly I/C
rNUC 284 284 710 	++	-	+++	-	++	++	+++	-
rNUC 305 305 710 	++	-	++	-	++	++	+	-
rNUC R1-4 305 647 	++	-	++	-	++	++	+	-
rNUC 627 627 710 	-	-	-	-	++	++	-	-

: KQKVEGTE配列
 : RNA-binding domain
 : glycine-arginine rich domain

表1 スカベンジャーレセプター各種リガンドとヌクレオリン各種リコンビナント体との結合性

3. 研究評価および今後の研究計画

(1) 研究評価

平成19年度当初の研究計画は、マクロファージ細胞表面のヌクレオリン分子が陰性荷電を帯びた核酸やタンパク質、糖蛋白質などに親和性を有する傾向があること、また、生体内では変質変性タンパク質や酸化LDLのような変性粒子が発生し、これらは一般的に陰性荷電を帯びること、に着目して、マクロファージ細胞表面のヌクレオリンは後者の変性粒子を結合し、細胞内に取込んで分解するいわゆるスカベンジャーレセプターとしての機能も有するのではないかと推定し、その可能性について検討することであった。そして実際、平成19年度は、この可能性の検討に着手し、当初の計画に従って、まず、Cell-free系における可溶性リコンビナントヌクレオリンと各種のスカベンジャーレセプターリガンドとの結合実験を表面プラズモン共鳴法（SPR法）にて実施した。リガンドとしては maleylBSA、酸化BSA、糖化BSA (AGE-BSA)、LDLの化学修飾体 (acetylLDL)、各種ポリアニオン類などを用いた。その結果、ヌクレオリンにはこれらを結合する性質があることが明快に示された。但し、用いたヌクレオリンのリコンビナント体は、技術的な限界から、全長ヌクレオリンではなく、ヒストンH1結合ドメイン(HBD)及び核移行シグナルの一部の配列(N末端側アミノ酸1-283)を欠いたヌクレオリン(rNUC284)を用いることとなった。しかし、このrNUC284に明確にスカベンジャーレセプター活性が認められたことから、全長のヌクレオリンにも同様の活性があるであろうと推定され、大きな問題点とはならなかった。

さらに、マクロファージ細胞表面のヌクレオリンそのもののスカベンジャーレセプター

活性（結合及び細胞内への取込み）を抗ヌクレオリン抗体を用いて判定することにより、マクロファージ細胞表面ヌクレオリンが実際、蛍光標識 maleylBSA や蛍光標識 acetylLDL に対するレセプター活性を有することが示され、マクロファージ表面の全長ヌクレオリンがスカベンジャーレセプターとして機能していることが強く示唆された。

以上のように、平成 19 年度の本研究では、当初の研究計画が順調に実施でき、かつ期待通りの実験結果が得られ、研究の実施、その結果とも十分に達成できたといえる。

この研究項目でさらに必要な検討課題は、変性 LDL として、acetylLDL だけではなく、生体内で実際に生成するとされている酸化 LDL を用いることであり、酸化 LDL もヌクレオリンのリガンドになりうることを確認する必要がある。

(2) 今後の研究計画

1) 脳ミクログリア（脳内マクロファージ）表面ヌクレオリンによるアポトーシス細胞およびβアミロイドタンパク質（Aβ）の除去に関する研究

ミクログリア培養細胞株を用いてアポトーシス細胞の貪食除去およびβアミロイド変性タンパク質（Aβ）の貪食除去におけるヌクレオリンの役割を検討する。

脳にはマクロファージに相当する貪食細胞としてミクログリアが存在し、死細胞や老廃細胞、変性タンパク質を貪食除去していると考えられている。次年度は、このミクログリアに注目し、脳内においてもこれまでマクロファージについて認められた細胞表面ヌクレオリンを介した死細胞や変性タンパク質の除去、アルツハイマー病発症の原因タンパク質βアミロイドタンパク質（Aβ）の除去におけるヌクレオリンの関与について検討する。

具体的には下記の検討を行う。

1. ミクログリアによる死細胞（アポトーシス細胞）の認識・貪食、および変性タンパク質の結合・取り込みにおける細胞表面ヌクレオリンの関与の検討。
2. リコンビナントヌクレオリンのAβに対する結合性の検討。
3. ミクログリアによるAβの結合・取り込みにおける細胞表面ヌクレオリンの関与。

また、新たな研究項目として、がん細胞表面のヌクレオリンを分子標的として作製された新規抗がん薬候補物質の核酸アプタマー「AS1411」を用いて次の検討を行う。

4. ヌクレオリンアプタマーAS1411のヌクレオリン機能ブロッカーツールとしての可能性の検討
5. 別の抗がん剤を封入したリポソーム表面へのAS1411導入によるがん細胞へのDDSおよび殺腫瘍作用の増強の試み。

4. 研究成果の発表

国際学会発表

(1) Beppu, M., Hiroyama, S.

Recognition and clearance of early and late apoptotic cells by microglia.

Gordon Research Conference on Apoptotic Cell Recognition and Clearance

2007/6, Lewiston, USA

(2) Hirano, K., Yoshida, Y., Hara, Y., Miki, Y., Beppu, M.

Characterization of macrophage cell-surface nucleolin, a receptor for early apoptotic

cells:

Its domains attaching to macrophage membrane

Gordon Research Conference on Apoptotic Cell Recognition and Clearance

2007/6, Lewiston, USA

- (3) Miki, Y., Itoh, T., Eda, S., Hirano, K., Yamanaka, M., Beppu, M.
Mechanism of oxidized-cell clearance by macrophages: Involvement of macrophage recognition of apoptotic cells through apoptotic cell-surface sugar chains and macrophage-surface nucleolin
Gordon Research Conference on Apoptotic Cell Recognition and Clearance
2007/6, Lewiston, USA

国内学会発表

- (1) 原ゆかり, 鍋村実希, 松本達也, 三木雄一, 平野和也, 別府正敏
アポトーシス細胞認識に関わるマクロファージ表面 nucleolin の結合様式の検討
第 51 回日本薬学会関東支部大会, 2007 年 10 月, 東京
- (2) 小澤大輔, 廣山昭太郎, 三木雄一, 別府正敏
小胞体ストレスで誘導されたアポトーシス細胞のミクログリアによる認識機構
第 51 回日本薬学会関東支部大会, 2007 年 10 月, 東京
- (3) 松島秀樹, 鍋村実希, 柴田裕子, 三木雄一, 平野和也, 別府正敏
マクロファージ細胞表面の新たなスカベンジャーレセプター候補分子ヌクレオリン
フォーラム 2007: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2007 年 11 月, 大阪
- (4) 原ゆかり, 松本達也, 三木雄一, 平野和也, 別府正敏
アポトーシス細胞認識に関わるマクロファージ細胞表面ヌクレオリンの機能及び存在様式
日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜
- (5) 松島秀樹, 鍋村実希, 三木雄一, 平野和也, 別府正敏
マクロファージ細胞表面ヌクレオリンの変性タンパク質結合活性
日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜
- (6) 小澤大輔, 廣山昭太郎, 別府正敏
小胞体ストレスで誘導されるアポトーシス細胞の膜変化とミクログリアによる認識機構
日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜

心不全病態に関わるミトコンドリアタンパク質に関する研究

田野中浩一（分子細胞病態薬理学教室・准教授）

1. 当初の研究目標

心臓は生体内の全ての組織に血液を介して酸素およびエネルギー基質など細胞生存に必須の物質を供給する生体ポンプである。この心ポンプ機能が低下する状態は心不全と総称される。心臓は全身の組織が機能するために必要な酸素およびエネルギー産生基質を血流を常に介して供給し続けている。心筋の収縮弛緩運動を発揮させるには、大量のエネルギーが消費される。このエネルギー産生を担うオルガネラがミトコンドリアである。心筋細胞ではミトコンドリアと筋原線維で細胞容積の 80% 以上を占めており、心筋は生体内で最もミトコンドリアの活性が高い組織の一つで、その酸素消費も生体内では最も高いレベルにある。この全身組織に血液を供給する心ポンプ機能はミトコンドリアからのエネルギー供給により支えられている。ミトコンドリアはエネルギーを産生するだけでなく、細胞質の Ca^{2+} 濃度を調節する重要な機能も担っており細胞内代謝を制御するオルガネラでもある。近年、アポトーシスの誘導にもミトコンドリアが関与することが報告され、ミトコンドリアによる細胞死の制御あるいは進展の機序が注目されている。不全心ではミトコンドリアのエネルギー産生能が低下するだけでなく、 Ca^{2+} 代謝異常およびアポトーシス誘導頻度の上昇が報告されており、ミトコンドリアは心筋代謝を支える重要なオルガネラであるだけではなく、心不全の発症とその進展に重要な役割を演ずると推測されるが、その詳細は明らかにされていない。心不全はその発症のパターンから心機能が急激に低下する急性心不全と機能低下が経時的に進行する慢性心不全に大別される。急性および慢性心不全での心筋ミトコンドリア機能低下が、ミトコンドリア内の同じ作用点によるものか、あるいは前者と後者の病態で異なった作用点を介して現れるかについて検討し、これら不全心でのミトコンドリアタンパク質の変化と心機能低下の関係を明らかにし、心不全治療薬の新たな作用点を検索する目的で本研究は企画された。さらに、不全心でのミトコンドリア機能低下に関与する新たな因子の検索も行い、虚血心筋障害あるいは慢性心不全の新たな発症機序についても検討を行う。

2. 研究成果の概要

虚血性心疾患の中で最も重篤な心筋梗塞は、心筋組織を壊死させ、心筋梗塞巣を形成する。この梗塞巣の形成により左心室自由壁の運動能が低下するため、収縮弛緩速度の低下および左心室収縮期圧の低下が誘発される。心臓の最も重要な機能は、それ自身を含めた全身の組織に血液を介して、組織を構成する細胞に栄養素および酸素を供給することである。虚血後の初期には上述したように心筋組織の運動能は低下するものの、心臓が駆出する血液量、すなわち心ポンプ機能は様々な生理学的代償機序を働かせて維持される。この心ポンプ機能を維持するには、ミトコンドリアからのエネルギー供給が必須である。ミトコンドリアのエネルギー産生は、TCA cycle の酸化還元反応で生じた電子を電子伝達系での酸化的リン酸化反応で ADP を ATP に再生産することにより行われる。心ポンプ機能を発揮させるため、心筋ミトコンドリアは生体内で最も高い活性

を維持しなければならない。この酸化還元反応で産生された電子は、通常は酸化的リン酸化反応の中で化学的エネルギーへと変換されるが、その一方で、活性酸素種を形成し、ミトコンドリア内膜のタンパク質を酸化するという障害的な働きも有する。通常、細胞には細胞内および細胞外からの障害性の因子（ストレス性障害）から細胞を保護する一連のタンパク質、つまりストレスタンパク質あるいは分子シャペロンと呼ばれるファミリーが存在する。ミトコンドリアには Hsp60 と呼ばれる分子シャペロンが存在している。ミトコンドリアを構成するタンパク質の遺伝子は、一部、ミトコンドリアが有するオルガネラ特有のプラスミド DNA 中にコードされるが、その大半は核 DNA にコードされている。核 DNA から転写された mRNA は細胞質でミトコンドリアタンパク質を翻訳し、タンパク質を完成させる。このタンパク質はミトコンドリア内へ移行しなければ機能しない。しかしながら、細胞質で合成されたミトコンドリアタンパク質はミトコンドリア内膜をそのままでは透過できない。そこで、細胞質側の分子シャペロンの Hsp73 がミトコンドリアタンパク質の高次構造を解くことでミトコンドリア内膜を透過させ、ミトコンドリア内に入った変性タンパク質が Hsp60 の働きで再度高次構造が復元され、その機能を発揮すると考えられている。ミトコンドリア分子シャペロンはミトコンドリアへのタンパク質移行だけでなく、ストレスにより変性したタンパク質の修復あるいはその分解にも関与すると考えられているが、心筋梗塞後の心不全発症に及ぼす役割については明らかにされていない。そこで、本研究では心筋梗塞後不全心ミトコンドリアの Hsp60 変動とそれに及ぼす心不全治療薬の効果について検討を行った。

実験は雄性 Wistar ラットの左冠状動脈を永久結紮することにより心筋梗塞を誘発した。梗塞後 2 週目では心筋の収縮能の指標の左心室収縮気圧および左心室収縮速度の指標の $+dP/dt$ が低下したが、心ポンプ機能の指標の左心室拍出量は維持されており、心機能が代償されている機能代償期であった。一方、梗塞後 8 週目では左心室拍出量が低下し、心不全に陥ったことが示された（心不全期）。これら心機能代償期と心不全期の心筋 Hsp60 含量を定量したところ、代償期では心筋 Hsp60 含量は正常心筋のそれと同様の含量にあったが、心不全期では正常心筋のそれの約 2 倍に増加した。さらに、ミトコンドリア画分での Hsp60 含量を定量したところ、代償期では正常心筋ミトコンドリアのそれと同じ含量であったが、不全心では増加しており、不全心での Hsp60 含量増加がミトコンドリア画分での増加に由来することが明らかにされた。

次に、心筋ミトコンドリアのエネルギー産生能を評価するため、skinned bundle を用いて、その酸素消費能を測定した。この方法は、心筋組織内にあるミトコンドリアの酸素消費能を評価することにより、ミトコンドリア活性、すなわちミトコンドリアのエネルギー産生能を評価する方法である。その結果、心筋梗塞後 2 週目の代償期ではミトコンドリア酸素消費能は正常動物のそれと同じレベルにあり、ミトコンドリアのエネルギー産生能は保持されていた。心筋梗塞後 8 週目ではミトコンドリア酸素消費能が、正常動物のそれの約 50%まで低下し、ミトコンドリアのエネルギー産生能が低下していることが示された。ミトコンドリアのエネルギー産生能低下は、ミトコンドリア内膜の電子伝達系の機能低下によりと考えられており、ミトコンドリアから漏出した電子が細胞内の酸化還元平衡を破綻させ、膜脂質およびタンパク質の過酸化を誘発すると推測されている。そこで、ミトコンドリア膜脂質の過酸化の度合いを thiobarbiturate-reacting

substance (TRS) 含量で評価したところ、ミトコンドリア膜画分の TRS 含量が不全心で増加した。この結果は、ミトコンドリアのエネルギー産生能低下がミトコンドリア膜からの電子漏出による膜脂質過酸化促進に関与することを示唆するものである。

心不全治療薬として用いられている angiotensin I-converting enzyme inhibitor (ACEI) の trandolapril (Tra) を心筋梗塞後 2 週目から 3 mg/kg/day p.o. 投与すると心筋梗塞後の心ポンプ機能低下が軽減され、心機能が改善された。心筋ミトコンドリア Hsp60 含量の増加も抑制され、これに伴ってミトコンドリアのエネルギー産生能も正常心筋のそのレベルに保持された。

さらに、薬物未処置群および処置群の心筋梗塞動物のミトコンドリア酸素消費能と Hsp60 含量の関係について検討したところ、ミトコンドリア画分の Hsp60 含量が増加するとミトコンドリアのエネルギー産生能が低下するという両者間に負の相関のあることが明らかにされた。心不全の間接的な血行動力学的指標の左心室拡張末期圧 (LVEDP) 上昇とミトコンドリア画分 Hsp60 含量との間には正の相関があり、LVEDP の上昇、すなわち心不全症状の進展に伴って Hsp60 含量が増加することも示された。

これらの結果は、心不全の発症に伴いミトコンドリアへのストレスが負荷され、ミトコンドリア機能を維持するため、生体防御の一機序として Hsp60 含量を増加させ、ミトコンドリア機能維持を介して心機能を保持しようとする新たな生体の適用反応を示すことができた。

3. 研究評価及び今後の研究計画

ミトコンドリアは真核細胞の他のオルガネラと異なり、独自の遺伝子およびタンパク質合成系を有している。分子シャペロンは、通常、細胞内のタンパク質合成・分解およびタンパク質複合体を構成するサブユニットとして働いている。ミトコンドリアには真核細胞とは異なる独自の分子シャペロンを有しており、その一つが Hsp60 である。Hsp60 は恒常的にミトコンドリアで発現しており、前述したように細胞質からミトコンドリアへのタンパク質の輸送およびミトコンドリア内でのタンパク質修復で重要な役割を演じていると考えられている。ストレス誘発障害への耐性あるいは適応への Hsp72 の役割に関する研究は多くの研究者によって行われているものの、Hsp60 の細胞保護および病態進展での役割については不明な点が多い。本研究では、ミトコンドリアの酸素消費能、すなわちエネルギー産生能の低下がミトコンドリア画分での Hsp60 含量増加と相関することが初めて示された。さらに、この Hsp60 増加は心不全症状の進展、つまり心機能低下とも相関した。ACEI は心筋梗塞後の Hsp60 増加を抑制し、これに伴ってミトコンドリア機能低下を改善し、心機能低下を軽減することも示すことができた。これらの知見は、不全心のミトコンドリア内膜では、電子伝達系活性低下により酸化還元平衡が破綻し、TRS 増加で観察される膜脂質過酸化が進行すると考えられた。以上、本研究により、心筋梗塞後、心筋ミトコンドリアのエネルギー産生能低下が Hsp60 増加を介して心機能低下に関与するという心筋代謝の側面からの心不全発症の機序を提案することができた。さらに、心不全治療薬として用いられている ACEI は、ミトコンドリアに作用し、その分子シャペロン Hsp60 の発現量を調節することにより心筋代謝を改善する可能性が示された。

本年度の研究結果から、心筋梗塞後不全心ではミトコンドリア電子伝達系に障害を生じ、細胞内が酸化状態にあることが示唆された。生命活動に必須の生化学的な反応の大半は酸化還元反応であり、電子伝達系機能低下に起因するミトコンドリア障害は細胞内の酸化還元平衡を破綻させると推測される。近年、心臓にも薬物代謝酵素の一種の **CYP isozyme** の存在が報告されている。**CYP** とともにグルクロン酸抱合も薬物代謝では重要な酵素であるが、この酵素の心筋組織での発現および不全心での発現量の変化については未だに明らかにされていない。そこで、次年度は心筋梗塞後不全心の酸化還元平衡破綻がグルクロン酸抱合酵素 (**UGT**) の発現量に及ぼす影響について平塚班員とともに検討する予定である。さらに、心不全では白血球系の細胞が活性化されており、これら細胞との相互作用についても考慮する必要がある。**Nucleorine** は白血球の情報伝達で重要な役割を担うタンパク質であるが、心筋組織での発現およびその役割についての知見はない。そこで、本研究では別府班員とともに心筋組織でのこのタンパク質の発現の有無と病態時の発現量の変化を追跡し、新たな細胞内情報伝達系の解析を開始する予定である。

4. 研究成果の発表

原著・論文

Toga W, Tanonaka K, Takeo S.

Changes in Hsp60 level of the failing heart following acute myocardial infarction and the effect of long-term treatment with trandolapril.

Biol Pharm Bull. 2007; 30(1):105-110.

国内学会発表

田野中浩一, 茂木奏尊, 竹永悠司, 高木教夫, 竹尾 聡

虚血心筋での $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibitor の新たな心筋保護の機序

第 81 回 日本薬理学会、2008 年 3 月、横浜

動脈硬化の危険因子としての微生物成分と自然免疫系認識分子との関連性の検討

大野 尚仁（免疫学教室・教授）

1. 当初の研究目標

動脈硬化の危険因子としての微生物成分と自然免疫系認識分子との関連性を解析する目的で、19年度は真菌多糖の物性解析及びその多糖成分に対する反応性に関わる受容体機能及びその発現細胞の生物活性解析を中心に行なうこととした。真菌 *Candida albicans* の培養上清から得られる水溶性高分子成分CAWSは、マウスに投与すると冠状動脈炎を誘発することが明らかになっている。また、*Candida* で代表される真菌の細胞壁成分は様々な炎症反応を誘発することが古くから知られている。これらの成分には(1→3)-β-D-グルカン、マンノプロテインが含まれることがNMR等の解析により示唆されているが、各成分の詳細な物性ならびにこれらに対する免疫細胞上の受容体や免疫細胞の反応性などの詳細については明らかになっていない点が多い。そこで本研究では、CAWSやその含有成分に特異的な受容体分子の結合反応性を検討する一方で、各受容体を発現する細胞機能を解析することを目的とし、特に自然免疫系細胞の多糖受容体機能、微生物成分による炎症反応に関わる現象を検討した。血管炎を発症するマウスモデルを用いて炎症部位の集積細胞の解析、各細胞が発現する免疫関連分子パターンなどを抗体や反応性プローブを用いて検討することも予定していたが、昨年度、真菌多糖の生物活性におけるdectinの重要性を見出し、dectin受容体の関連性を解析することも重要な知見をもたらすものと考えられたため、血管炎のみならず、真菌多糖により誘導される様々な炎症反応についても受容体機能の観点から検討した。以下に項目ごとの研究目標を示す。

(1) 異なる培養条件下における微生物由来活性型多糖構造の解析

Candida albicans の培養上清中に産生されるCAWSに含まれるマンノプロテインは、血管炎を誘発する。その誘発活性と構造の相関性を検討する目的で、培養条件の違いによるCAWSの構造並びに菌体細胞壁多糖組成を解析することにした。

(2) 真菌β-グルカンdectin-1受容体の真菌多糖結合活性の検討

Candida albicans などの真菌細胞壁多糖による炎症性反応誘導メカニズムを解析するために、多糖受容体としてその機能が重要視されつつあるdectin-1のβ-グルカン反応性を検討する目的でリコンビナントキメラ型タンパクを作製し、分子間相互作用の検討、結合における多糖構造活性相関を検討した。

(3) 真菌β-グルカン受容体Dectin-1の細胞内シグナル伝達経路の検討

Candida 菌などの真菌細胞壁に存在する(1→3)-β-D-グルカンに対する受容体候補としてDectin-1が知られている。*Candida* 由来のβ-グルカンに対するDectin-1の細胞シグナルを調べる目的でDectin-1および類縁のC型レクチンのリコンビナントタンパクの作製、Dectin-1に対する中和抗体の作製およびそれらを用いた(1→3)-β-D-グルカンに対する受容体機能の解析を昨年に引き続き行なった。

以上、本共同研究ではこれらの点に着目して研究を遂行し、最終的に微生物成分による血管炎誘導メカニズムの解析とその治療法開発のモデル応用の可能性について検証する。

2. 研究成果の概要

上記の観点から、まず、血管炎誘発活性を持つことが明らかとなっている多糖成分の分取条件の検討と得られた多糖成分の物性解析を行った。また、多糖成分で誘導される炎症性反応条件の検討、さらには多糖成分の反応に関わる自然免疫系受容体、特に β -グルカン受容体の1つであるDectin-1の多糖反応特異性やその細胞活性化シグナル機構について検討した。その成果の概要は以下のようになる。

(1) 異なる培養条件下における微生物由来活性型多糖構造の解析

*Candida*可溶性多糖画分 (CAWS) はマウスモデルにおいて静脈内投与ではアナフィラキシー様ショックを、腹腔内投与では血管炎を発症することが明らかになっているが、CAWSの構造と血管炎誘発活性との相関性は明確になっていない。そこで様々な培養条件下で得られた*Candida albicans*の多糖画分の血管炎誘導活性を検討し、さらに各条件下で得られたCAWSの構造をNMRにより解析した。*Candida albicans*の培養温度及び培養液のpHコントロールにより、血管炎の誘導活性が低下し、中性条件下で得られたCAWSは免疫化学的及びNMRによる構造解析の結果、 β -1,2-マンナン含量が低下し、血管炎誘導活性が高く、 β -マンナンが多いものほど、これらの活性が弱いことが示された。またこれらのマンナン構造の違いは分泌多糖のみならず、細胞壁上でも類似していることがマンナン抗体反応性により示唆された。

(2) 真菌 β -グルカンdectin-1受容体の真菌多糖結合活性の検討

*Candida albicans*などの真菌細胞壁多糖成分にはマンナン以外に β -グルカンが含有されている。真菌菌体は免疫機能を活性化させる一方、強い炎症反応を誘発させる可能性も報告されている。また、それらの活性に白血球の受容体dectin-1が深く関与することを昨年度明らかにした。しかし、多様な β -グルカン構造とdectin-1結合活性がどの程度相関しているのか詳細には解析されていない。そこで、まず真菌細胞壁より、 β -グルカン成分を精製し、得られた多糖成分を用い、dectin-1との結合活性を検討することにした。dectin-1は細胞表面の膜貫通型受容体であるが結合親和性を簡便に解析する目的で可溶性dectin-1を作製し、その可溶性受容体タンパクと β -グルカン結合活性を評価するモデルを構築した。その結果、真菌由来の(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンには強い結合活性を有し、植物や藻類由来の β -グルカンとの結合活性は低下することが示された。

(3) 真菌 β -グルカン受容体Dectin-1の細胞内シグナル伝達経路の検討

自然免疫機構において重要な役割を果たす細胞群の一角を占めるマクロファージには様々な糖鎖認識受容体が存在する。特にC型レクチンファミリーの1つであるDectin-1は真菌細胞壁の(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンを特異的に認識し、真菌の貪食、その後

の活性酸素産生やサイトカイン産生に必須であることを昨年度報告している。しかし、真菌細胞壁にはマンナンや脂溶性成分なども含まれており、これらは Mannose 受容体や TLR に作用してマクロファージを活性化すると推測され、Dectin-1 が真菌感染及び真菌菌体認識後に誘導される様々な免疫応答にどの程度関わっているか明確ではない。

Dectin-1 に依存した免疫応答を細胞内シグナル分子のレベルで明確にする目的で、①リコンビナント Dectin-1 の発現系を作製し、その細胞表面発現および免疫機能活性化における Dectin-1 の NF- κ B 活性化への影響についての解析、②真菌由来の β -グルカンで誘導される食細胞及び樹状細胞のサイトカイン産生促進作用における Dectin-1 の役割の解析、③Candida 以外の真菌成分に対する dectin-1 依存的な免疫応答の解析。について検討した。

上記の解析によって次の点が確認された。

- ① 以前の解析で我々は Dectin-1 の変異体発現細胞を TLR2 共発現系で作製し、 β -グルカン結合部位に関わる Dectin-1 の構造、N 型糖鎖修飾部位は細胞表面発現と NF- κ B 活性化能と密接に関係することが明らかしている。今年度は dectin-1 単独での 293 発現細胞における NF- κ B 活性化作用を検討したところ、dectin-1 単独発現では 293 細胞における NF- κ B の活性化が全く認められず、293 細胞はシグナル伝達に必要な分子を欠いている可能性が示唆された。一方、酵母由来の zymosan では dectin-1/TLR2 発現 293 細胞の NF- κ B 細胞を活性化することから、dectin-1 単独のシグナル伝達経路は TLR2 とは異なっていることが示唆された。そこで、dectin-1 の下流のシグナル伝達分子の影響を検討する目的で、近年明らかにされた syk チロシンキナーゼ、CARD9 及び Bcl10 アダプタータンパク、の関与について検討した。その結果、syk/CARD9/Bcl10 を dectin-1 と共に細胞内に遺伝子導入することで 293 細胞においても NF- κ B 活性化が Candida 由来の 精製粒子状 β -グルカン OX-CA で有意に上昇することが明らかとなり、TLR とは異なる dectin-1 独自のシグナル伝達経路を有していることを報告した。
- ② 昨年度の解析で、真菌菌体に対する免疫応答は dectin-1 遺伝子ノックアウトマウスで低下する場合と TLR 系アダプタータンパク MyD88 遺伝子ノックアウトマウスで低下する経路があり、真菌の β -グルカンに対応する dectin-1 の依存性が必ずしも明確ではなかった。この現象には用いた菌体成分の β -グルカン精製度が関わる可能性が示された。そこで精製した β -グルカンで誘導されるサイトカイン産生における dectin-1 の役割を解析する目的で、dectin-1 遺伝子ノックアウトマウス (dectin-1KO) を用いて、Candida 由来の粒子状 β -グルカン、可溶性の β -グルカン、その他の真菌由来の β -グルカンによるマウス細胞のサイトカイン産生についても検討した。その結果、dectin-1KO マウスマクロファージや樹状細胞は精製 β -グルカンで誘導されるサイトカイン産生がほとんど認められなくなり、精製度が高い真菌 β -グルカンは dectin-1 を介して免疫応答を誘導していることが示された。一方、dectin-1/syk/CARD9/Bcl10 導入 293 細胞で活性が認められなかった可溶性 β -グルカンでも、樹状細胞では dectin-1 依存的なサイトカイン産生が誘導されることが明らかになった。これらの結果は 293 細胞への遺伝子導入によって構築された dectin-1 シグナル伝達経路が樹状細胞がもつ経路とは異なっており、樹状細胞はさ

らに可溶性 β -グルカンでも **dectin-1** を介してシグナルを伝達できる分子等を有している可能性を示唆した。

- ③ 真菌成分との相互作用による炎症反応を解析する目的で、*Candida* 菌以外の微生物成分に対する自然免疫応答を解析した。その結果、*Aspergillus* や *Saccharomyces* 由来の菌体も **dectin-1** 依存的な活性を誘導することが示された。また、*Saccharomyces* 由来の菌体成分を脱脂することによって、TLR2 依存的な自然免疫応答活性を消失させることができたが、**dectin-1/ syk/CARD9/Bcl10** 依存的な NF- κ B 活性化能は殆ど減少なく維持されていた。また、可溶性 **dectin-1** 分子の結合活性も維持されていたことから、真菌成分の脂溶性画分は TLR2 を介し、脱脂操作抵抗性の β -グルカン成分は **dectin-1** を介して自然免疫系受容体に影響を及ぼすことが示された。

3. 研究評価及び今後の研究計画

血管炎発症に関連すると予想される *Candida* 由来の多糖成分 (CAWS) の構造については培養条件の違いによって得られた多糖成分の血管炎誘導能との比較により、誘導活性にはマンナン構造中の β -1,2-マンナン含量と関連があることが示唆された。また、 β -マンナン生成には培地 pH も影響することが強く示唆された。血管炎誘導活性における活性成分の完全解析には到っていないが、18年度の解析結果を裏付けるように CAWS の活性成分中にはマンナン以外にも β -グルカンは共在しており、マンナンに加え β -グルカンの影響にも着目する必要があることが依然残されている。*C. albicans* 以外のカンジダ菌によっても同様な多糖構造が形成されるのか興味を持たれる。

真菌細胞壁多糖成分、特に *Candida* β -グルカン、で促進される炎症性シグナリング解析を行い、TLR リガンドを含まない精製 β -グルカンでも強い炎症応答を誘導することが明らかとなった。これらの炎症反応におけるマクロファージあるいは樹状細胞の受容体レベルの同定については 19 年度の検討では明らかに出来なかったが、その現象と密接に関係する可能性がある真菌 β -グルカンの受容体、**dectin-1** を介した細胞内シグナル伝達経路を解析する細胞発現系を得ることができた。また、可溶性 **dectin-1** の発現系も作製することに成功し、これらの分子を用いて、様々な多糖成分への結合反応性を検出可能であることが示された。これらの発現細胞や分子を用いて血管炎誘発に関わる *Candida* 菌体やその多糖 CAWS への反応性を今後解析したいと予定している。

Dectin-1 の自然免疫系における機能解析の一環として **dectin-1** 可溶性分子、発現細胞に加えて **Dectin-1** 遺伝子欠損 KO マウスの食細胞や樹状細胞を用いた解析が可能になった。本 KO マウスを用いて真菌由来の各種 β -グルカンへの反応性を検討することができた。19 年度はそれらマウスの樹状細胞やマクロファージを用いて *in vitro* における菌体成分や精製 β -グルカンに対する反応性をそのサイトカイン産生能の観点から解析した。その結果、**dectin-1** は β -グルカンの反応性には必要不可欠な受容体であり、さらに粒子状のみならず可溶性のものであっても樹状細胞のサイトカイン産生を誘導できることが示された。これらの現象は遺伝子導入によって **dectin-1** シグナリング経路を構築した細胞と異なった物性活性相関を示すことを意味しており、樹状細胞は

dectin-1 と未知のシグナル伝達物質を介して β -グルカンの認識情報を伝えている可能性が示唆されたことから、さらなる細胞活性化メカニズムを解析する課題が生じた。これらの解析に向けて、各受容体分子間の相互作用、細胞内シグナル分子の相互調節機構をタンパク質アダプター分子の活性調節、リン酸化タンパク質の変動、核内因子の活性化機構を免疫学的手法、分子生物学的手法により詳細に解析する予定である。

以上、19年度は真菌誘発性炎症病変解析に必要な真菌多糖の構造情報、候補成分及びその受容体解析に必要な可溶性受容体分子発現系、遺伝導入による dectin-1 介在性シグナル伝達経路の解析ツールの構築に関して成果をあげることが出来た。これらの知見及びマウスや発現細胞の材料を活かし、次年度は免疫細胞活性化機構、血管炎発症に関わる多糖成分の解析を通じて発症機序の検討へ展開できるものと期待される。

4. 研究成果の発表

原著論文

(1) Harada, T., Ohno, N.

Contribution of dectin-1 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) to immunomodulating actions of beta-glucan.

Int Immunopharmacol., 8 (4), 556-866 (2008).

(2) Tada, R., Adachi, Y., Ishibashi, K., Tsubaki, K., Ohno, N.

Binding capacity of a barley beta-D-glucan to the beta-glucan recognition molecule dectin-1.

J Agric Food Chem., 56 (4), 1442-1450, (2008).

(3) Toyotome, T., Adachi, Y., Watanabe, A., Ochiai, E., Ohno, N., Kamei., K.

Activator protein 1 is triggered by *Aspergillus fumigatus* beta-glucans surface-exposed during specific growth stages.

Microb Pathog., 44 (2), 141-150, (2008).

(4) Ikeda, Y., Adachi, Y., Ishii, T., Miura, N., Tamura, H., Ohno, N.

Dissociation of Toll-like receptor 2-mediated innate immune response to Zymosan by organic solvent-treatment without loss of Dectin-1 reactivity.

Biol Pharm Bull., 31 (1),13-18, (2008).

(5) Tada, R., Harada, T., Nagi-Miura, N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., Ohno, N.

NMR characterization of the structure of a beta-(1->3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*.

Carbohydr Res., 342 (17), 2611-2618, (2007).

- (6) Ikeda, Y., Adachi, Y., Ishii, T., Tamura, H., Aketagawa, J., Tanaka, S., Ohno, N.

Blocking effect of anti-Dectin-1 antibodies on the anti-tumor activity of 1,3-beta-glucan and the binding of Dectin-1 to 1,3-beta-glucan.

Biol Pharm Bull., 30(8), 1384-1389, (2007).

- (7) Tada, R., Nagi-Miura, N., Adachi, Y., Ohno, N.

An unambiguous assignment and structural analysis using solution NMR experiments of O-antigen from Escherichia coli ATCC23505 (Serotype O9).

Chem Pharm Bull. (Tokyo), 55 (7), 992-995, (2007).

総説・著書等

- (1) Adachi, Y.

Role of the 1,3- β -D-glucan receptor Dectin-1 in fungal infection and activation of innate and anti-tumor immunity.

Trends Glycosci. Glyc., 19 (108-109), 195-207, 2007.

国際学会発表

- (1) Harada, T., Kawaminami, H., Miura, N. N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., Ohno, N.

Immunomodulation by orally administered beta-glucan from Sparassis crispa.

13th International Congress of Mucosal Immunology, 2007/7, Tokyo, Japan

- (2) Adachi, Y., Ikeda, Y., Harada, T., Ishibashi, K., Miura, N. N., Saijo, S., Iwakura, Y., Tamura, H., Ohno, N.

Innate immune response to fungal 1,3- β -glucans via a β -glucan receptor Dectin-1.

Glyco19 (XIX International Symposium on Glycoconjugates), 2007/7, Cairns, Australia

- (3) Harada, T., Kawaminami, H., Miura, N. N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., Ohno, N.

Contribution of dectin-1 on immunomodulating activity of soluble beta-glucan SCG from Sparassis crispa in mice.

4th International Medicinal Mushroom Conference 2007/9, Ljubljana, Slovenia

- (4) Takata, H., Kakutani, R., Kajiura, H., Furuyashiki, T., Akiyama, T., Adachi, Y., Ohno, N., Kuriki, T.

A New method for in vitro glycogen synthesis, and immunostimulating activity of glycogen.

2007 International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology, 2007/11, Taichung, Taiwan

国内学会発表

- (1) 池田 義彦, 安達 禎之, 石井 崇司, 田村 弘志, 大野 尚仁
Dectin-1 抗体投与による(1→3)- β -D-グルカンの抗腫瘍活性抑制作用
第 27 回日本糖質学会年会, 2007 年 8 月, 福岡
- (2) 多田 暎, 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁
培養環境変化による病原性真菌 *Candida albicans* 細胞壁多糖の血管炎形成および急性致死活性への影響
第 27 回日本糖質学会年会, 2007 年 8 月, 福岡
- (3) 安達 禎之, 三浦 典子, 大野 尚仁
Dectin-1 モノクローナル抗体の反応性と免疫賦活活性の抑制効果
第 51 回日本医真菌学会総会, 2007 年 11 月, 岐阜
- (4) 西城 忍, 藤門 範行, 安達 禎之, 大野 尚仁, 古田 隆久, 仲村 究, 川上 和義, 岩倉 洋一郎
Dectin-1 の生体防御機構における役割
第 51 回日本医真菌学会総会, 2007 年 11 月, 岐阜
- (5) 豊留 孝仁, 安達 禎之, 渡辺 哲, 落合 恵理, 大野 尚仁, 亀井 克彦
Aspergillus fumigatus 処理による宿主転写因子 AP-1
第 51 回日本医真菌学会総会, 2007 年 11 月, 岐阜
- (6) 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁
CAWS 血管炎惹起の分子メカニズム
第 51 回日本医真菌学会総会, 2007 年 11 月, 岐阜
- (7) 池田太, 安達禎之, 大野尚仁
真菌細胞壁表面物質に対する可溶性 Dectin-1 キメラタンパク結合性の検討
第 51 回日本医真菌学会総会, 2007 年 11 月, 岐阜
- (8) 立石 亘, 石橋 健一, 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁
真菌細胞壁 β -グルカンに対するモノクローナル抗体の作製と反応性の検討
第 51 回日本医真菌学会総会, 2007 年 11 月, 岐阜

- (9) 吉川 雅志, 原田 敏江, 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁
F1 マウスを用いた B グルカン応答性の系統間格差の検討
第 37 回日本免疫学会総会, 2007 年 11 月, 東京
- (10) 三浦 典子, 駒井 元彦, 高野 雄介, 安達 禎之, 鈴木 和男, 大野 尚仁
CAWS 血管炎惹起の分子メカニズム血管炎発症制御機構の検討
第 37 回日本免疫学会総会, 2007 年 11 月, 東京
- (11) 角谷 亮, 安達 禎之, 梶浦 英樹, 高田 洋樹, 栗木 隆, 大野 尚仁
酵素合成グリコーゲンのマクロファージ活性化作用と免疫賦活作用の検討
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 2007 年
12 月 横浜
- (12) 豊留 孝仁, 安達 禎之, 渡辺 哲, 落合 恵理, 大野 尚仁, 亀井 克彦
Aspergillus fumigatus により誘導される宿主 AP-1 活性化と TNF- α 産生についての
解析
真菌症フォーラム 第 9 回学術集会 2008 年 2 月 東京
- (13) Hirata, N., Ishibashi, K., Usui, T., Yoshioka, J., Ohta, S., Ohno, N.
The Cardiac function of CAWS-induced aortitis in DBA/2 mouse, as a model of
heart failure
第 72 回日本循環器学会総会・学術集会 2008 年 3 月 福岡

マトリックスメタロプロテアーゼ誘導因子 EMMPRIN の新規機能検索とそれを分子標的とする生活習慣病治療薬の開発

伊東 晃(生化学・分子生物学教室・教授)

1. 当初の研究目標

がん細胞の浸潤・転移過程は、①正常細胞のがん化およびがん細胞の異常増殖、②がん細胞の原発巣から脈管系への浸潤、③がん細胞の脈管系から転移臓器への接着および浸潤、ならびに④転移臓器組織でのがん細胞の増殖に大別される。この過程において、がん細胞の脈管系および転移臓器への浸潤にはプロテアーゼによる細胞外マトリックス(ECM)の破壊が必須であり、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)がこのECM破壊の中心的役割を担っている。一方、MMP産生能が低いがん細胞もしばしば高い浸潤活性を示し、この場合がん細胞は近傍の正常細胞由来MMPを利用して浸潤能を獲得するものと考えられている。これに関わる因子として、がん細胞膜上に高発現し、周囲の正常細胞に対してコラゲナーゼ-1/MMP-1、ゼラチナーゼ A/MMP-2、ストロムライシン-1/MMP-3および膜結合型MMP (MT1-MMP)の産生を促進するextracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (別名:CD147, basigin)が同定されている。

EMMPRINは免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞外に2つのループ構造(ループIおよびII)をもつ膜結合型糖タンパク質である。また、EMMPRINはMMP産生誘導のみならず、血管内皮増殖因子(VEGF)の産生促進による血管新生、ヒアルロン酸産生促進による細胞増殖および薬剤耐性獲得等、がん細胞の活動に広く関わる。一方、がん細胞の移動活性(運動性)も浸潤・転移および腫瘍形成の重要な要素のひとつであるが、EMMPRINのがん細胞移動活性に対する役割についてはこれまでに報告がない。

EMMPRINによるMMP産生促進には、そのループIドメインが重要な役割を担っていると考えられており、細胞膜上においてEMMPRINがループIドメインを介してホモ二量体を形成すること、そのホモ二量体形成がMMP産生促進に寄与することが報告されている。しかしながら、MMP産生誘導活性以外にも様々な活性を示すEMMPRINが分子内のどの部位によってその機能を発揮するのか、その詳細な機能部位の同定には至っていない。そこで、EMMPRINを分子標的としたがん治療薬開発の一環として、MMP産生促進に寄与するEMMPRINの機能部位同定を行った。また、EMMPRINの新たな機能として細胞移動活性におよぼす作用を検討し、さらにその分子内機能部位の同定を試みた。

2. 研究成果の概要

(1)ヒト子宮頸部扁平上皮がん SKG-II 細胞とヒト子宮頸管線維芽細胞(HUCF)との共存培養により促進した proMMP 産生に対する膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン欠損 EMMPRIN(Δ TM-EMP)ならびにループ I ドメイン EMMPRIN(EC1-EMP)の作用

SKG-II 細胞と HUCF との共存培養により SKG-II 細胞表層の EMMPRIN を介して HUCF の proMMP-1 および proMMP-3 産生が誘導される。また、この EMMPRIN による proMMP 産生誘導には EMMPRIN 分子内に存在する糖鎖ならびに EMMPRIN 同士のホモ二量体形成が必要であると考えられている。そこで、糖鎖のない大腸菌発現型膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン欠損 EMMPRIN (Δ TM-EMP)および EMMPRIN 細胞外領域のループ I のみを大腸菌に発現させた

EC1-EMP の分子活性を野生型 EMMPRIN による proMMP 産生促進の抑制的調節の観点から SKG-II 細胞と HUCF との共存培養系において評価した。

Fig. 1A に示したように、SKG-II 細胞と HUCF との共存培養により増加した proMMP-1 産生は Δ TM-EMP (4 および 40 nM)により減少する傾向を示した。また、同条件下にて増加した proMMP-3 産生は Δ TM-EMP (4 および 40 nM)により濃度依存的に減少した(Fig. 1B)。同様に EC1-EMP (4 および 40 nM)も共存培養による proMMP-1 および proMMP-3 産生に対して抑制作用を示した (Fig. 2A および B)。一方、Fig. 1 および Fig. 2 に示したように、SKG-II 細胞と HUCF の共存培養において HUCF 由来の内因性 MMP 阻害因子である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 および TIMP-2 産生は Δ TM-EMP (パネル C) および EC1-EMP (パネル D) (4 および 40 nM)の添加により変化しなかった。

これらの結果より、大腸菌発現型の Δ TM-EMP および EC1-EMP が EMMPRIN 依存的 proMMP 産生を抑制することが判明した。また、 Δ TM-EMP および EC1-EMP は同細胞が産生する TIMP に対して影響をおよぼさず、それらの作用が MMP に特異的であることが明らかとなった。

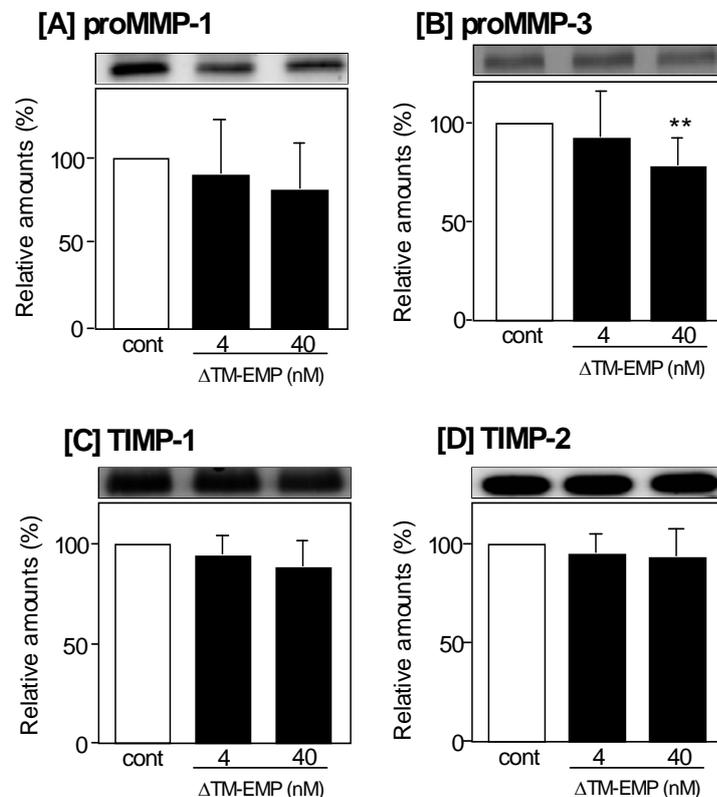


Fig. 1. Δ TM-EMP interferes with wild-type EMMPRIN-induced production of proMMP-1 and proMMP-3 but does not alter the production of TIMP-1 and TIMP-2 in human uterine cervical fibroblasts co-cultured with human uterine cervical carcinoma SKG-II cells

Confluent human uterine cervical fibroblasts were co-cultured with human uterine cervical carcinoma SKG-II cells at the cell ratio 2:1 for 24 h, and then treated with Δ TM-EMP (4 and 40 nM) for another 24 h. Harvested culture media were subjected to Western blotting for proMMP-1 [A], proMMP-3 [B], TIMP-1 [C], and TIMP-2 [D]. The relative amounts of proMMP-1, proMMP-3, TIMP-1, and TIMP-2 were quantified by densitometric scanning and expressed by taking untreated cells as 100%. Data are shown as mean \pm SD of three [A], six [B and C], and four independent experiments [D]. **, significantly different from untreated cells (cont) ($p < 0.01$).

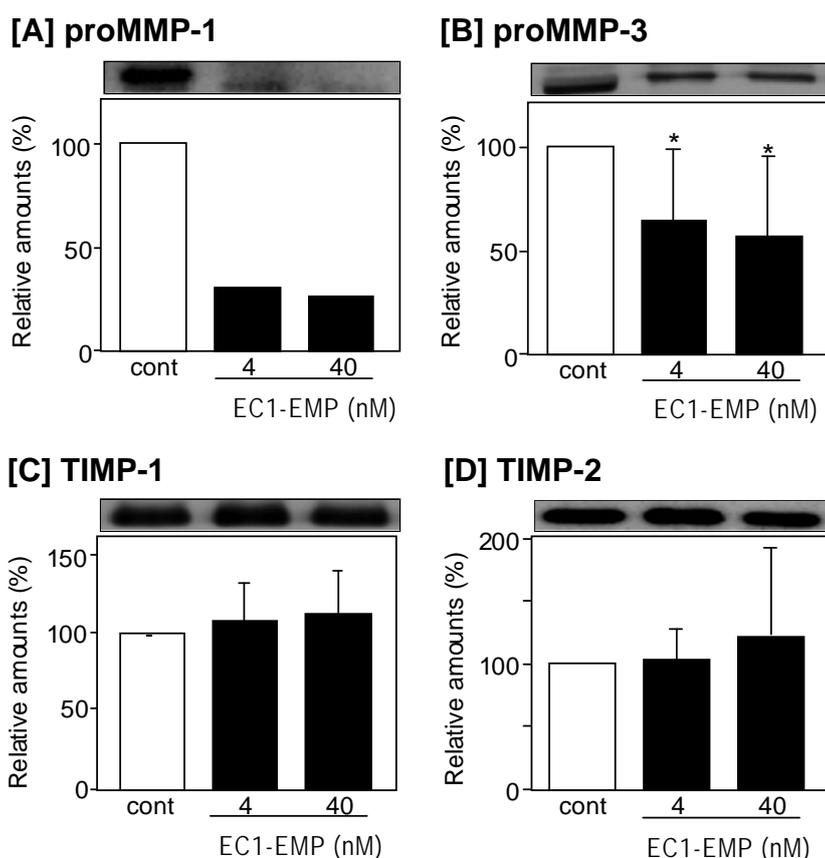


Fig. 2. EC1-EMP interferes with wild-type EMMPRIN-induced production of proMMP-1 and proMMP-3 but does not alter the production of TIMP-1 and TIMP-2 in human uterine cervical fibroblasts co-cultured with human uterine cervical carcinoma SKG-II cells

Confluent human uterine cervical fibroblasts co-cultured with human uterine cervical carcinoma SKG-II cells as shown in Fig. 1 were treated with EC1-EMP (4 and 40 nM) for 24 h. Harvested culture media were subjected to Western blotting for proMMP-1 [A], proMMP-3 [B], TIMP-1 [C], and TIMP-2 [D]. The relative amounts of proMMP-1, proMMP-3, TIMP-1, and TIMP-2 were quantified by densitometric scanning and expressed by taking untreated cells as 100%. Data are shown as mean (\pm SD) of two [A], four [B and C], and three independent experiments [D]. *, significantly different from untreated cells (cont) ($p < 0.05$).

(2) SKG-II 細胞と HUCF との共存培養により増加した proMMP-1 産生に対する EMMPRIN ペプチドの作用

Δ TM-EMP および EC1-EMP が EMMPRIN による proMMP 産生を抑制したことから、EMMPRIN の細胞外ドメインを網羅する合成ペプチドの proMMP-1 産生に対する作用を SKG-II 細胞と HUCF との共存培養系において検討した。まず EMMPRIN のループ I ドメインをコードする 12-16 アミノ酸残基から成る合成ペプチドを 4 種類作製した (Fig. 3A)。これらのペプチドのうち、EM1 (SLNDSATEVTGHRWLK) (10-60 μ g/ml) は濃度依存的に proMMP-1 産生を抑制した (Fig. 3B)。しかしながら、EM2 (RWLKGGVVLKEDALPG)、EM3 (ALPGQKTEFKVDS) および EM4

(KVDSDDQWGEYS)は proMMP-1 産生に影響をおよぼさなかった(Fig. 3B). また, 同様の実験を EMMPRIN のループ IIドメインをコードする 15 アミノ酸残基から成る 5 種の合成ペプチド(Fig. 4A)においても実施した. その結果, EM6 (AWYKITDSEDKALMN), EM8 (VSSSQGRSELHIENL)および EM9 (HIENLNMEADPGQYR)は高濃度(60 $\mu\text{g/ml}$)において proMMP-1 産生を有意に抑制した(Fig. 4B). しかしながら, EM5 (KSESVPPVTDWAWYK)および EM7 (ALMNGSESRRFFVSSS)は proMMP-1 産生に影響をおよぼさなかった(Fig. 4B).

これらの結果より, $\Delta\text{TM-EMP}$ および EC1-EMP による MMP 産生抑制には EMMPRIN のループ I ドメイン内のアミノ酸配列(SLNDSATEVTGHRWLK)が重要な役割を担っていると示唆された. また, そのループ IIドメイン内にも MMP 産生調節に関与する機能部位の存在が示唆された.

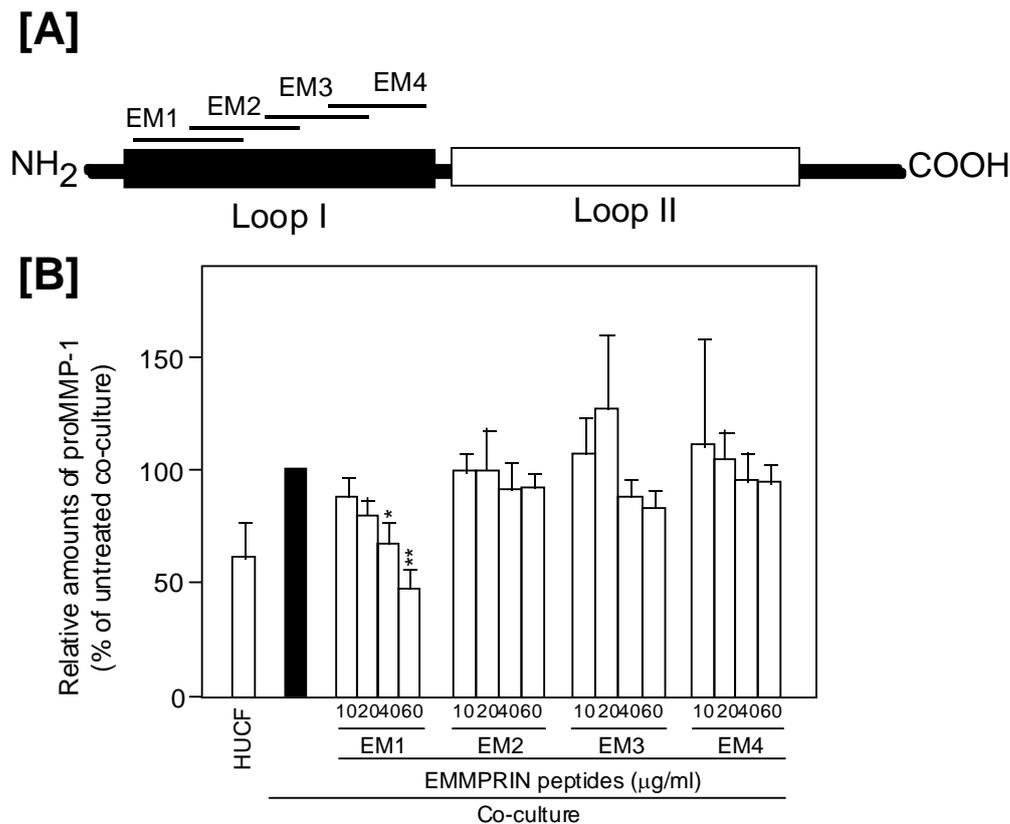


Fig. 3. Effects of EMMPRIN peptides cording loop I domain on the production of proMMP-1 in co-culture of human uterine cervical fibroblasts and human uterine cervical carcinoma SKG-II cells

Confluent human uterine cervical fibroblasts (HUCF) co-cultured with human uterine cervical carcinoma SKG-II cells as shown in Fig. 1 were treated with EMMPRIN peptides (EM1-4) (10-60 $\mu\text{g/ml}$) cording loop I domain [A] for 24 h. Harvested culture media were subjected to Western blotting for proMMP-1. [B], the relative amounts of proMMP-1 were quantified by densitometric scanning and expressed by taking co-culture as 100%. Data are shown as mean \pm SD of four independent experiments. * and **, significantly different from co-culture (p < 0.05 and < 0.01, respectively).

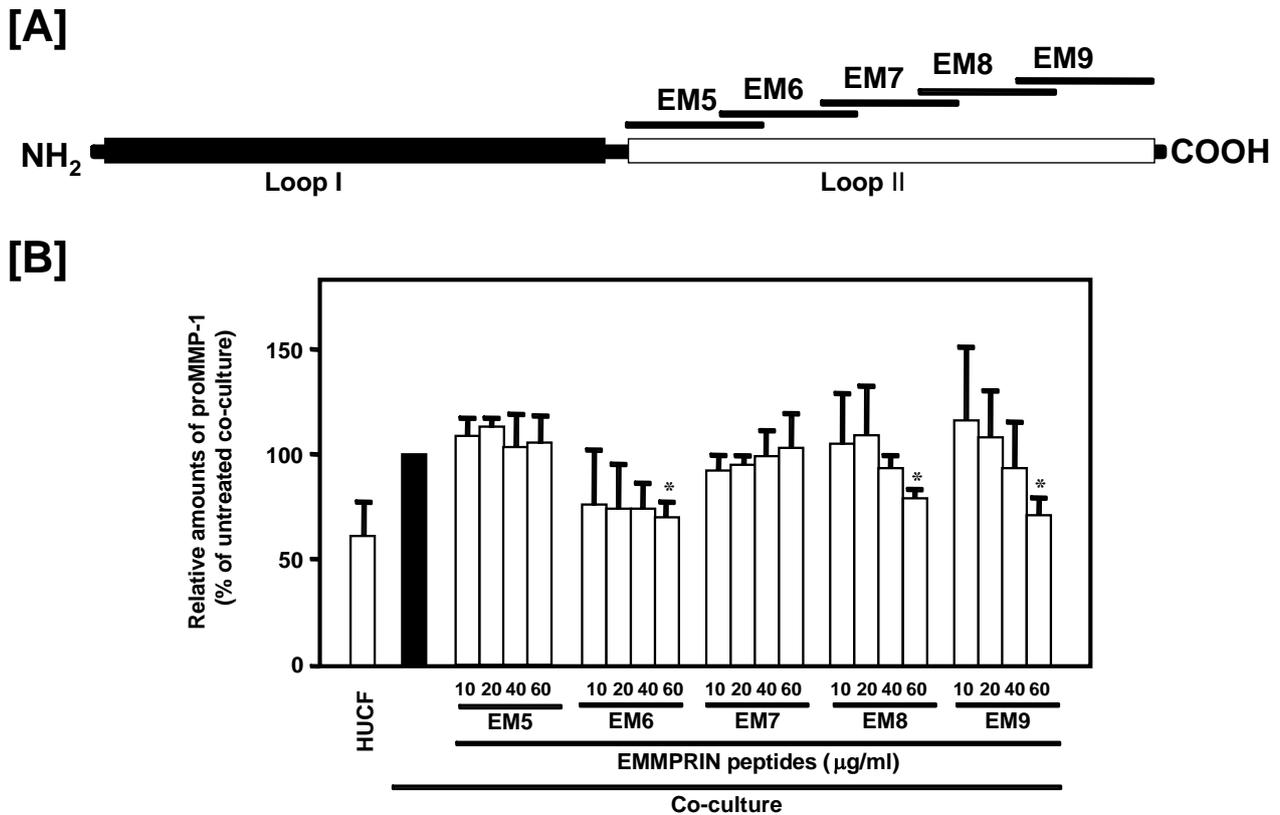


Fig. 4. Effects of EMMPRIN peptides cording loop II domain on the production of proMMP-1 in co-culture of human uterine cervical fibroblasts and human uterine cervical carcinoma SKG-II cells

Confluent human uterine cervical fibroblasts (HUCF) co-cultured with human uterine cervical carcinoma SKG-II cells as shown in Fig. 1 were treated with EMMPRIN peptides (EM5-9) (10-60 µg/ml) cording loop II domain [A] for 24 h. Harvested culture media were subjected to Western blotting for proMMP-1. [B], the relative amounts of proMMP-1 were quantified by densitometric scanning and expressed by taking co-culture as 100%. Data are shown as mean \pm SD of four independent experiments. *, significantly different from co-culture ($p < 0.05$).

(3) Δ TM-EMP によるがん細胞の移動活性促進作用

がん細胞の転移促進には MMP の発現増加のみならず, がん細胞の移動活性促進も重要な要因であると考えられている. そこで, SKG-II 細胞の移動活性に対する Δ TM-EMP の作用を wound assay 法により検討した. すなわち, confluent まで培養した SKG-II 細胞をプラスチックチップの先端で一定幅削除することにより間隙を作製し, 一定時間におけるその間隙への SKG-II 細胞の移動距離から 2 次元方向への移動活性を測定した. その結果, Δ TM-EMP は SKG-II 細胞の移動活性を濃度依存的に促進することが判明した(Fig. 5). したがって, Δ TM-EMP はがん細胞の移動活性促進作用を有することが初めて明らかとなった.

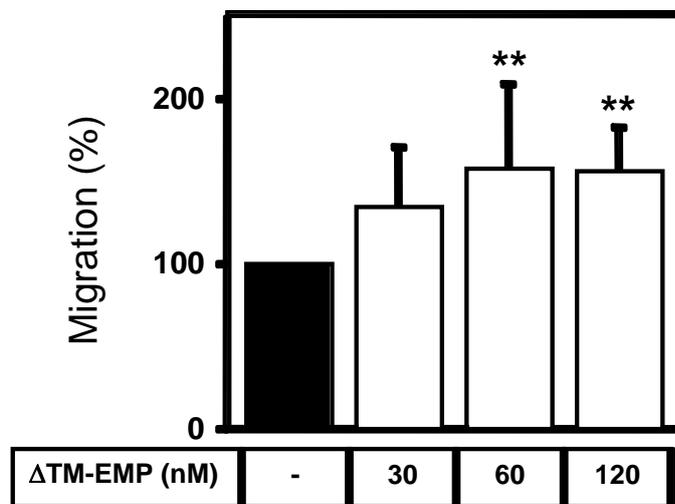


Fig. 5 Dose-dependent increase in SKG-II cell migration by Δ TM-EMP

Confluent SKG-II cells (2×10^6 cells/dish) in 35 mm dish were treated with Δ TM-EMP (30-120 nM) for 14 h. Cell migration distance (μm) was measured, and then relative cell migration was expressed by taking untreated cells as 100%. Data are indicated as mean \pm SD of six individual areas. **, significantly different from untreated cells ($p < 0.01$).

(4) EMMPRIN による SKG-II 細胞の移動活性調節に関与する機能部位の同定

Fig. 3 および Fig. 4 で使用した EMMPRIN ペプチドを用いて SKG-II 細胞の移動活性におよぼす影響を検討したところ, EM4 (KVDSDDQWGEYS), EM5 (KSESVPPVTDWAWYK) および EM9 (HIENLNMEADPGQYR) は SKG-II 細胞の移動を促進し, その促進活性は EM9 > EM4, EM5 であることが判明した (Fig. 6). また, EM9 に対する EMMPRIN ペプチド抗体 (EM9-pAb) を用いて, Δ TM-EMP による細胞の移動活性促進に寄与する活性部位の同定を行った. その結果, EM9-pAb は Δ TM-EMP により増加した SKG-II 細胞の移動活性を阻害した (85% 抑制) (Fig. 7). しかしながら, 同様に EM1 に対する EMMPRIN ペプチド抗体 (EM1-pAb) は全く影響をおよぼさなかった (Fig. 7). したがって, Δ TM-EMP によるがん細胞移動活性促進にはループ II 領域の HIENLNMEADPGQYR 配列 (EM9) の関与が大きいといえる.

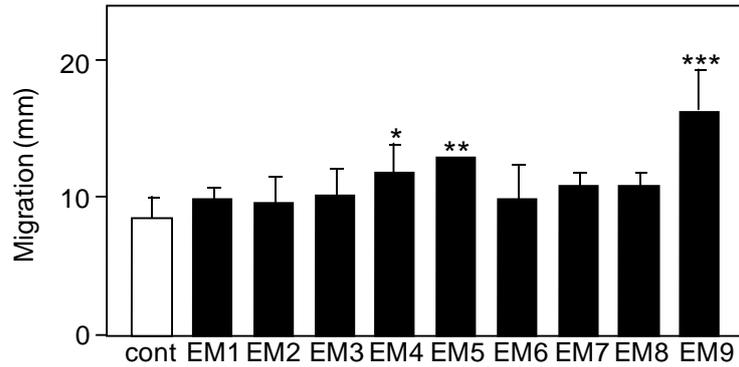


Fig. 6. Effects of EMMPRIN peptides on tumor cell migration

Human uterine cervical carcinoma SKG-II cells (6×10^5 cells) in Matrigel-coated 35-mm dish were scratched with a pipet tip and then treated with EMMPRIN peptides (EM1-9) (60 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. After fixing cells, a cell migration distance (mm) was measured and then data are shown as mean \pm SD of three independent experiments. *, **, and ***, significantly different from untreated cells (cont) ($p < 0.05$, < 0.01 , and < 0.001 , respectively).

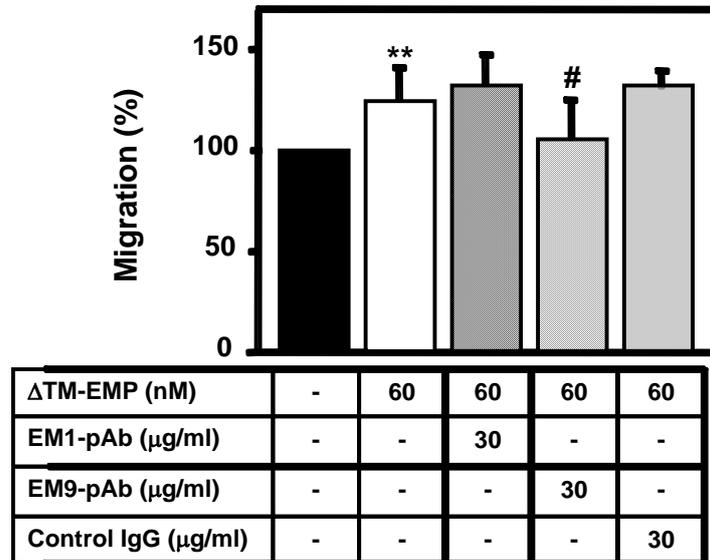


Fig. 7 $\Delta\text{TM-EMP}$ -augmented cell migration is inhibited by EM9-pAb, but not EM1-pAb, in SKG-II cells

Confluent SKG-II cells (2×10^6 cells/dish) in 35 mm dish were treated with $\Delta\text{TM-EMP}$ (60 nM) in the presence of EM1-pAb, EM9-pAb, and control rabbit IgG (30 $\mu\text{g/ml}$, respectively) for 14 h. Cell migration distance (mm) was measured, and then relative cell migration was expressed by taking untreated cells as 100%. Data are indicated as mean \pm SD of six individual areas. **, significantly different from untreated cells ($p < 0.01$). #, significantly different from $\Delta\text{TM-EMP}$ -treated cells ($p < 0.05$).

3. 研究評価及び今後の研究計画

本研究により, EMMPRIN の機能のひとつである proMMP 産生誘導には EMMPRIN のループ I ドメイン内に位置する SLNDSATEVTGHRWLK (EM1)配列が関わること, また, EMMPRIN の新たな機能としてがん細胞の移動活性促進作用を見出し, これに関わる配列としてループ II ドメイン内に位置する HIENLNMEADPGQYR(EM9)を同定した. さらに, これらの EMMPRIN ペプチドは, EMMPRIN 機能の選択的制御に応用できるものと示唆される. すなわち, 合成した EMMPRIN ペプチドは EMMPRIN 依存的ながん細胞の浸潤・転移を特異的に阻害する新規がん転移阻害薬として有用であると期待される. したがって, 本年度の研究目標は十分に達成することができたと考えられる.

今後は, H18 年度および H19 年度研究において明らかとなったがん細胞における EMMPRIN の機能とその分子機構に関する知見を踏まえ, がんと同様に EMMPRIN の関与が指摘されている関節リウマチに焦点を当て, 関節リウマチにおける EMMPRIN の機能的役割と分子標的としての妥当性, さらには薬剤耐性等への影響について検討する予定である.

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Miyata, Y., Sato, T., Imada, K., Dobashi, A., Yano, M., and Ito, A.

A citrus polymethoxyflavonoid, nobiletin, is a novel MEK inhibitor that exhibits antitumor metastasis in human fibrosarcoma HT-1080 cells

Biochem. Biophys. Res. Commun. 366(1), 168-173 (2008)

国際学会発表

- (1) Ishii, M., Sato, T., Watanabe, M., Imada, K., Nomizu, M., and Ito, A.

Augmentation of tumor cell migration by whole molecule EMMPRIN secreted from cell surface: Loop II domain of EMMPRIN contains an active site for migration.

7th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2007/10, Cairns, Australia

国内学会発表

- (1) 石井美和, 佐藤 隆, 渡邊真実, 今田啓介, 伊東 晃

低細胞密度のヒト子宮頸部がん細胞 SKG-II からの PKC 依存的な EMMPRIN の細胞外分泌促進

第 39 回日本結合組織学会学術大会・第 54 回日本マトリックス研究会大会合同学術集会, 2007 年 5 月, 東京

- (2) 佐藤 隆, 渡邊真実, 太田智子, 今田啓介, 野水基義, 伊東 晃

分泌型 EMMPRIN によるがん細胞の移動活性促進作用とその活性部位の同定

第 39 回日本結合組織学会学術大会・第 54 回日本マトリックス研究会大会合同学術集会, 2007 年 5 月, 東京

- (3) 塩野智康, 佐藤 隆, 渡邊真実, 太田智子, 今田啓介, 伊東 晃, 野水基義

分泌型 EMMPRIN の新規がん転移促進機構: 分子内ループ II による糖鎖非依存的な細胞移動活性促進

- 第 59 回西東京内分泌代謝研究会, 2007 年 6 月, 東京
- (4) 石井美和, 佐藤 隆, 渡邊真実, 今田啓介, 伊東 晃
膜結合型がん転移促進因子 EMMPRIN はがん細胞より全分子型として分泌される
第 59 回西東京内分泌代謝研究会, 2007 年 6 月, 東京
- (5) 塩野智康, 佐藤 隆, 渡邊真実, 今田啓介, 野水基義, 伊東 晃
膜結合型がん転移促進因子 EMMPRIN/CD147 の細胞外分泌とがん細胞移動活性促進
作用
第 51 回日本薬学会関東支部大会, 2007 年 10 月, 東京
- (6) 石井美和, 佐藤 隆, 渡邊真実, 今田啓介, 伊東 晃
膜結合型がん転移促進因子 EMMPRIN のプロテオリシスを介さない全分子型としての分
泌
第 51 回日本薬学会関東支部大会, 2007 年 10 月, 東京
- (7) 伊東 晃, 佐藤 隆, 今田啓介
マトリックスメタロプロテアーゼ:細胞-細胞外マトリックスインターフェイスでのプロテオリシス
による細胞機能調節
日本エラスチン研究会, 2007 年 12 月, 東京

がん細胞の抗がん剤耐性化因子としての薬物代謝酵素の役割

平塚 明（薬物代謝安全性学教室・教授）

1.当初の研究目標

乳癌は女性の癌による死因の主たるもので近年より増加傾向を示しており、日本人女性の約 80 人に 1 人は乳癌を発病していることが示されている。乳癌の発生とその増殖にはエストロゲンが関与しているとされ、特に 17 β -estradiol (E2)が細胞の癌化の過程とその増殖に重大な影響を及ぼすことが示されている。E2 は乳癌細胞の核内に存在するエストロゲン受容体 (ER) に結合し、転写共役因子を介して、DNA の特定領域の転写を活性化する。こうして誘導された細胞増殖因子により、乳癌細胞増殖が促進する。このようなホルモン依存性の癌とされる乳癌の治療には、様々な内分泌療法剤が用いられており、特に triphenylethylene 系の tamoxifen (TAM)は非ステロイド性の抗エストロゲン薬として世界中で汎用されている。乳癌に対する TAM の作用機序は、E2 の ER への結合を競合的に阻害することによるものである。

近年、TAM は比較的副作用が少ないこと、そして術後の予後改善効果も期待できることから、TAM を用いた長期投与療法が行われてきた。しかし、その長期投与により TAM に耐性を示す乳癌細胞の出現が深刻な問題となっている。そして、これまで多くの TAM 耐性化に関する研究がなされ、様々な耐性化機構が提唱されてきた。なかでも TAM 耐性患者の腫瘍組織中の TAM ならびに *cis*-および *trans*-4-HO-TAM の存在量について検討した報告では、TAM 耐性患者の腫瘍組織中において、TAM 濃度の著しい低下と、*cis*-4-HO-TAM の方が *trans* 体よりも多く存在していることを明らかにしている。なお、TAM 感受性の腫瘍組織中では、*cis* 体よりも *trans* 体の濃度の方が高い値を示す。このように腫瘍組織における TAM およびその代謝物の存在量やその薬理作用と、TAM 耐性化機構との関連性が注目されている。

既に我々は、*in vitro* において TAM が直接 *N*-グルクロン酸抱合を受けること、そしてそれには UGT1A4 が特異的に関与することを示し、TAM の新規代謝経路を明らかにした。また、TAM の活性代謝物とされる *trans*-4-HO-TAM も UGT1A4 により *N*-グルクロン酸抱合を受けることも明らかしている。仮に TAM および *trans*-4-HO-TAM の *N*-グルクロン酸抱合に特異的に関与する UGT1A4 が乳癌細胞中で過剰に発現した場合には、TAM および *trans*-4-HO-TAM の抱合代謝が促進されることにより細胞増殖抑制効果の減弱、すなわち TAM 耐性化が予想される。この仮説が正しければ、乳癌患者の腫瘍組織中における UGT1A4 の発現を調べることでその患者における TAM の薬理効果を事前に予測することも可能となる。

既に、平成 18 年度本研究において、UGT を継続的に発現する安定発現細胞株を樹立し、この UGT1A4 発現ヒト乳がん培養細胞が TAM および 4-HO-TAM の増殖抑制効果に対して耐性化していることを明らかにした。そこで、平成 19 年度は、この UGT 発現細胞における TAM および *trans*-4-HO-TAM の代謝様式を検討することを目的とした。

2. 研究成果の概要

1) MCF-7 細胞における TAM の細胞内および細胞外濃度の測定

MCF-7-UGT1A4 細胞を用いて、TAM の細胞内動態について検討した。すなわち、MCF-7-UGT1A4 および wild type MCF-7 細胞を用いて培地に TAM (0.1 μ M、0.5 μ M、1.0 μ M) を添加し 24 hr あるいは 48 hr 培養後における細胞内および細胞外 TAM 濃度の測定を行った。その結果、Fig. 1 に示すように細胞内濃度測定では両細胞ともに、いずれの TAM 添加濃度においても

培養時間に依存し、細胞内 TAM 濃度は増加していた。しかしながら、MCF-7-UGT1A4 細胞内の TAM 濃度は、wild type MCF-7 細胞と比較すると、いずれの条件下においても約 40~60% 低いものであった。さらに、培地に残存している TAM の細胞外濃度測定を行った結果、wild type MCF-7 細胞培養系においては 48 hr 後に

おける残存 TAM はほとんど変わらないか、僅かな減少が認められるだけなのに対して、MCF-7-UGT1A4 細胞培養系においてはいずれの TAM 添加濃度においても 48 hr 後の TAM 濃度は減少傾向を示した (Fig. 2)。その結果、MCF-7-UGT1A4 細胞では、wild type MCF-7 細胞と比較し、細胞内 TAM 濃度は著しく低下していた。そして、同条件下において TAM 代謝物の同定を行ったところ、MCF-7-UGT1A4 細胞において TAM N^{α} -glucuronide が主代謝物として生成していた。

同条件下において TAM 代謝物の同定を行ったところ、MCF-7-UGT1A4 細胞において TAM N^{α} -glucuronide が主代謝物として生成していた。

同条件下において TAM 代謝物の同定を行ったところ、MCF-7-UGT1A4 細胞において TAM N^{α} -glucuronide が主代謝物として生成していた。

同条件下において TAM 代謝物の同定を行ったところ、MCF-7-UGT1A4 細胞において TAM N^{α} -glucuronide が主代謝物として生成していた。

2) MCF-7-UGT1A4 細胞における TAM N^{α} -glucuronide 生成量

各種濃度の TAM 添加培地により培養した MCF-7-UGT1A4 の細胞中および培地中の TAM N^{α} -glucuronide の経時的な生成量の変化について検討した結果、細胞中 TAM N^{α} -glucuronide 生成量は、TAM の濃度に依存して高くなり、いずれの TAM 濃度においても 24 hr を最大にして、48 hr 後にはやや減少していた (Fig. 3)。一方、培地中の TAM N^{α} -glucuronide 量は TAM の濃度に依存して高くなったが、48 hr まで時間依存的に上昇した (Fig. 4)。

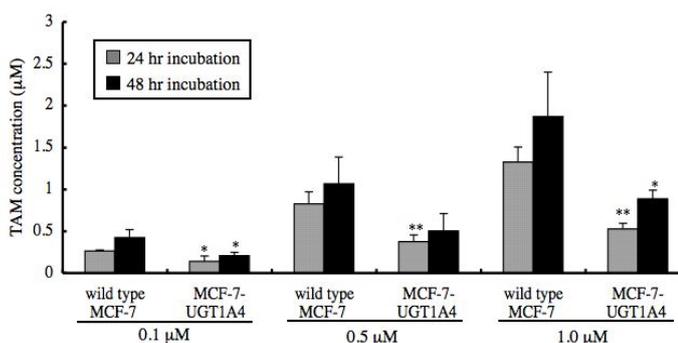


Fig. 1. Intracellular Concentration of TAM in MCF-7 Cells

MCF-7-UGT1A4 cells and wild-type MCF-7 cells were cultured for 24 and 48 days in the presence of 0.1 μ M, 0.5 μ M and 1.0 μ M TAM. Data are shown as means \pm S.D. of three different experiments. * and **, significantly different from control value (wild-type MCF-7 cells) at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively (Student's t test).

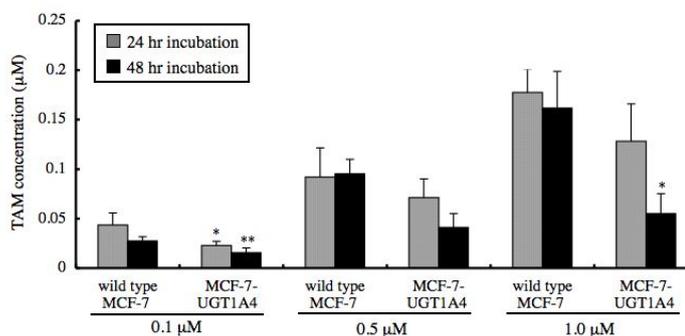


Fig. 2. Extracellular Concentration of TAM in Medium Used for Culture of MCF-7 Cells

MCF-7-UGT1A4 cells and wild-type MCF-7 cells were cultured for 24 and 48 days in the presence of 0.1 μ M, 0.5 μ M and 1.0 μ M TAM. Data are shown as means \pm S.D. of three different experiments. * and **, significantly different from control value (wild-type MCF-7 cells) at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively (Student's t test).

3) TAM 反復暴露時における MCF-7 細胞中 TAM の蓄積

MCF-7-UGT1A4 細胞および wild type MCF-7 細胞を用いて 14 日間において TAM (0.1 μ M) を反復暴露し細胞中 TAM 蓄積量の測定を行った。その結果、両細胞株ともに培養時間に依存し細胞中 TAM 蓄積量は増加していた。しかし、MCF-7-UGT1A4 細胞では wild type MCF-7 細胞に比べて、細胞中 TAM 蓄積量は有意に減少していた (Fig. 5)。

4) UGT1A4 阻害剤の MCF-7-UGT1A4 細胞の TAM 代謝に及ぼす影響

UGT1A4 の阻害剤である TFP を用い、TFP (1 μ M) 存在下で TAM (0.1 μ M) を反復暴露し、MCF-7-UGT1A4 細胞および wild type MCF-7 細胞の細胞中 TAM 蓄積量の測定を行った。

まず、TFP の単独添加実験を行った結果、MCF-7-UGT1A4 細胞および wild type MCF-7 細胞の細胞増殖効果に対して影響を及ぼさなかった。続いて、TFP 存在下で TAM を反復暴露し、MCF-7-UGT1A4 細胞および wild type MCF-7 細胞の細胞中 TAM 蓄積量の測定を行った。その結果、TFP を共存させることによって MCF-7-UGT1A4 細胞の細胞中 TAM 蓄積量の減少は抑制された。一方で、wild type MCF-7 細胞の細胞中 TAM 蓄積量は TFP の添加に対して影響を示さなかった (Fig. 6)。

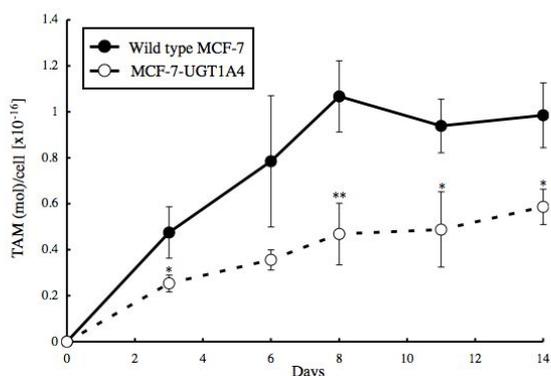


Fig. 5. Accumulation of TAM in MCF-7 Cells Cultured in the Presence of TAM

MCF-7-UGT1A4 cells and wild-type MCF-7 cells were cultured for the indicated times in the presence of 0.1 μ M TAM. Data are shown as means \pm S.D. of three different experiments. * and **, significantly different from control value (wild-type MCF-7 cells) at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively (Student's *t* test).

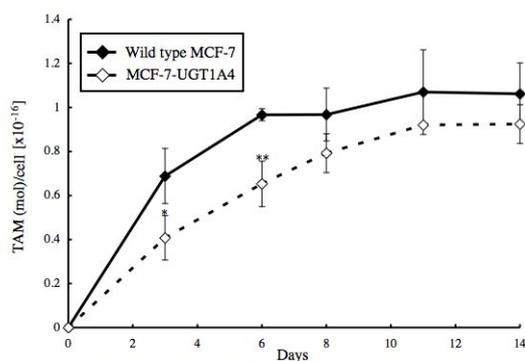


Fig. 6. Effect of TFP, an Inhibitor of UGT1A4, on Accumulation of TAM in MCF-7 Cells Cultured in the Presence of TAM

MCF-7-UGT1A4 cells and wild-type MCF-7 cells were cultured for the indicated times in the presence of 0.1 μ M TAM. Data are shown as means \pm S.D. of three different experiments. * and **, significantly different from control value (wild-type MCF-7 cells) at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively (Student's *t* test).

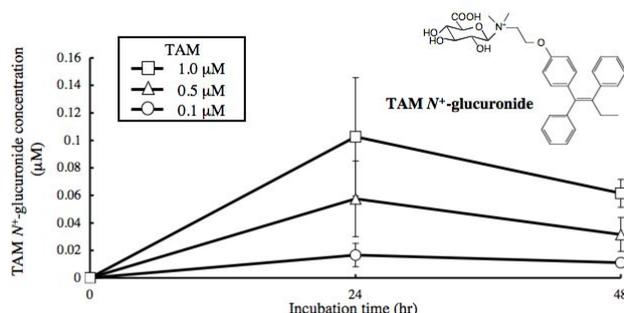


Fig. 3. Intracellular Concentration of TAM N^+ -glucuronide in MCF-7 Cells

MCF-7-UGT1A4 cells and wild-type MCF-7 cells were cultured for 24 and 48 days in the presence of 0.1 μ M, 0.5 μ M and 1.0 μ M TAM. Data are shown as means \pm S.D. of three different experiments. Data are expressed as production of TAM N^+ -glucuronide in MCF-7-UGT1A4 cells. TAM N^+ -glucuronide was not detected in wild-type MCF-7 cells.

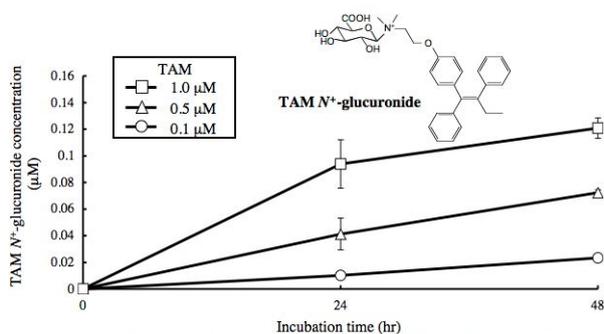


Fig. 4. Extracellular Concentration of TAM N^+ -glucuronide in Medium Used for Culture of MCF-7 Cells

MCF-7-UGT1A4 cells and wild-type MCF-7 cells were cultured for 24 and 48 days in the presence of 0.1 μ M, 0.5 μ M and 1.0 μ M TAM. Data are shown as means \pm S.D. of three different experiments. Data are expressed as production of TAM N^+ -glucuronide in MCF-7-UGT1A4 cells. TAM N^+ -glucuronide was not detected in wild-type MCF-7 cells.

3. 研究評価及び今後の研究計画

a)研究評価

本年度研究において、ヒト UGT1A4 を安定に発現する MCF-7 細胞中における TAM ならびにその *N*-グルクロン酸抱合体の濃度の経時的変化を検討した。すなわち、TAM が *N*-グルクロン酸抱合を受けて極性化され、細胞外への排泄が促進されたことにより細胞内 TAM 濃度が減少するという機構が耐性化の一要因となり得ることが明らかになった。

b)今後の研究計画

本年度研究において、乳癌細胞中での UGT1A4 を過剰発現させた MCF-7-UGT1A4 細胞では、TAM の *N*-グルクロン酸抱合体への変換が促進され、細胞中の TAM 濃度が著しく減少することが明らかになり、UGT1A4 の発現による耐性化機構の存在が示唆された。しかしながら、作製した MCF-7-UGT1A4 細胞においても既に報告されている乳癌細胞の TAM 耐性化に関与する細胞内因子が働いている可能性も考えられる。そこで今後は MCF-7-UGT1A4 細胞における各種耐性化因子の変動について検討を行う予定である。

4. 研究成果の公表

a)学術論文発表

- (1) Takahito Nishiyama, Miki Fujishima, Yasuhiro Masuda, Tadashi Izawa, Tomokazu Ohnuma, Kenichiro Ogura, Akira Hiratsuka, Amino acid positions 69–132 of UGT1A9 are involved in the C-glucuronidation of phenylbutazone. *Arc. Biochem. Biophys.*, in press (2008).

b)学会発表

- (1) Tandai Kyota, Kenichiro Ogura, Tomokazu Ohnuma, Takahito Nishiyama, and Akira Hiratsuka, Relation between tamoxifen resistance of MCF-7 cells and overexpression of UDP-glucuronosyltransferase 1A4. 8th International ISSX Meeting, 2007, Sendai, Japan.

生活習慣病治療を指向した標的細胞選択的遺伝子デリバリーシステムに関する研究

新楨 幸彦（薬物送達学教室・教授）

1. 当初の研究目標

がんや循環器疾患の遺伝子治療の臨床応用に向けて、生体内での安定性や安全性を改善するような非ウイルスベクターの開発が活発に行われているものの、標的指向性や治療効果の観点から実用化するには至っていない。

近年、リポソームは、膜透過性ペプチドとして Tat - ペプチドやアルギニン 8 残基含有ペプチド (R8) を表面に修飾することで、遺伝子を内封したリポソームの細胞内への取り込み効率が上昇し、その結果として遺伝子発現が上昇することが報告されている。このようなリポソームは有用な遺伝子ベクターとして期待されている。我々は、さらにリポソームに標的志向性を付与する目的で、がんや血管内皮細胞選択的な移行性を付与する物質として、細胞の基底膜成分の一つであるラミニン由来ペプチドに着目した。これらのペプチドは、細胞膜貫通型プロテオグリカンである Syndecan をレセプターとして細胞種特異的に接着すると考えられている。

そこで本研究では、がん細胞や血管内皮細胞などに特徴的な細胞表面分子の一つである Syndecan に選択的に結合するリガンドとしてラミニン由来のペプチドを付与し、標的細胞選択的リポソームに遺伝子(プラスミドDNA)やsiRNA などの核酸を内封し、がんや循環器疾患治療を指向した遺伝子医薬の開発を行うことを目標とした。

すでに平成18年度研究において、標的細胞選択的遺伝子導入に利用可能な細胞膜表面分子の探索を行う目的で基底膜成分の一つであるラミニン由来の細胞接着に関与する数種の構成ペプチドを用いて、生体適合性の高いリポソームを表面修飾し、がん細胞や血管内皮細胞に対する選択性を調べた結果から、AG73ペプチドで修飾したリポソームが最もがん細胞や血管内皮細胞と強固に相互作用し、がん細胞や血管内皮細胞への標的指向性を持たせるリポソームの調製にAG73ペプチドが有用であることを報告している。また、リポソーム表面にステアリン酸修飾したAG73 (St-AG73)を添加することで、*in vivo*でも利用可能なナノ粒子サイズのリポソームの調製が可能であることも示した。さらにFACS解析の結果から AG73修飾リポソームはSyndecan-2を介してがん細胞に取り込まれていることも明らかとしている。

以上の結果をもとに、19年度計画では、遺伝子内封ペプチド修飾リポソームの調製および機能評価を行う目的で以下の項目について検討した。

(1) 遺伝子内封ペプチド修飾リポソームの調製－ DOPG/DOPEを構成脂質とするリポソームに遺伝子(ルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNA)を正電性のポリマーを用いてコンパクションし、内封を行う。調製されたりポソームの表面にステアリン酸修飾AG73ペプチドで修飾することで遺伝子内封ペプチド修飾リポソームとする。また、作製したリポソームの血中安定性の増大を図る目的でpolyethyleneglycol (PEG)修飾したAG73修飾PEGリポソームの調製も試みる。

(2) 遺伝子内封ペプチド修飾リポソームの機能評価 – 調製された遺伝子内封ペプチド修飾リポソームをがん細胞株や血管内皮細胞に添加し、ルシフェラーゼ活性測定を確認し、ペプチド修飾リポソームの遺伝子キャリアとしての有用性を調べる。

2. 研究成果の概要

(1) 遺伝子内封ペプチド修飾リポソームの調製

クロロホルムにそれぞれ 1 mg/ml の濃度で溶解した 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DOPG) 及び 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)のストック溶液から、脂質組成が DOPG:DOPE=2:9 となるようにそれぞれの脂質溶液をネジ付き試験管に分取した。窒素気流下、溶媒をロータリーエバポレーターにて減圧留去し、デシケーターを用いて 1 時間乾、させ、lipid film を調製した。調製した総脂質量 137.5 nmol の lipid film に DPC (HEPES buffer (10 mM; pH 7.4)に 0.1 mg/ml の濃度で溶解した 125 μ l の poly-L-lysine (PLL)と、等量のプラスミド DNA (0.1 mg/ml)を混合し vortex することで静電的に相互作用させた DNA・ポリカチオン複合体) を加え、vortex して lipid film を懸濁し 10 分間室温で静置した。これをバス型ソニケーター (BRANSONIC 2510; BRANSON)を用い 5 分間超音波処理してリポソームを微粒子化し、総脂質量の 5 mol%の St-AG73 を加えて攪拌し、30 分間室温でインキュベートすることで AG73 修飾リポソームを作製した。

引き続き AG73 修飾リポソームの物性評価をおこなった。AG73 修飾リポソームに何も封入していない empty liposomes, pDNA と PLL の複合体 (DPC)、およびリポソームに DPC を封入した DPC liposomes についてそれぞれの平均粒子サイズと ζ 電位を測定したところ、empty liposomes、DPC liposomes いずれも総脂質量に対して 5 mol%の St-AG73 を修飾することにより平均粒子サイズは増大した。また AG73 のスクランブルペプチドである AG73T で修飾した場合も粒子サイズの増大が観察された。さらに ζ 電位に関して若干の上昇が確認された。また、DPC が正電荷を帯びていることから DPC liposomes の ζ 電位は empty liposomes に比べ約 30 mV 上昇していることが判明した。

(2) DNA封入AG73 修飾リポソームによる遺伝子導入条件の検討

これまでに AG73 修飾リポソームは Syndecan-2 を高発現している細胞と選択的に相互作用することを明らかとしていることから、AG73 修飾リポソームを用いた遺伝子導入解析は、293T-Syn2 細胞を用いて検討を加えた。

(a) AG73 修飾リポソームによる遺伝子導入

ルシフェラーゼをコードした pDNA (pCMV-GL3)と PLL との静電的相互作用により調製した複合体 (DPC)を含む水溶液で lipid film を水和して調製したリポソームにステアрилペプチドを添加して作成したペプチド修飾リポソーム (10 nmol/well)を 293T 細胞および 293T-Syn2 細胞に添加した。血清を含有しない培地で 4 時間トランスフェクション後、洗浄し、10%血清を含有する培地で 20 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

ペプチド修飾していないリポソーム (naked liposomes)と比較して、AG73 修飾リポソームでは 293T-Syn2 細胞において 100 倍以上の顕著に高いルシフェラーゼ活性を示した。

一方、293T細胞ではルシフェラーゼ活性は *naked liposomes* の場合と同等であった。また、AG73のスクランブルペプチドであるAG73Tを5%修飾したリポソームを用いた場合においては、両細胞とも *naked liposomes* で遺伝子導入したときのルシフェラーゼ活性と同等であった。

また、AG73修飾リポソームの細胞障害性についても検討を行ったところ、いずれの処理群においても293T細胞および293T-Syn2細胞に顕著な細胞障害性は観察されなかった。以上の知見より、AG73修飾リポソームは *in vitro* において293T-Syn2細胞に選択的にpDNAを送達することが可能であり、また *naked liposomes* と比較して100倍以上高い導入効率を有していることが明らかとなった。

(3) DNA封入AG73修飾PEGリポソームによる遺伝子導入

(a) AG73修飾PEGリポソームの物性評価

DOPG、DOPE、DSPE-PEG₂₀₀₀-OMeまたはDSPE-PEG₂₀₀₀-Malを脂質組成とするリポソームにCys-AG73を添加し、PEG末端をAG73で修飾したAG73修飾PEGリポソームを調製し、その平均粒子サイズおよび ζ 電位を測定した。その結果、ペプチド修飾していないDSPE-PEG₂₀₀₀-OMeを組成とするコントロールリポソームに対し、Cys-AG73でPEG末端(総脂質量の5%)を修飾したリポソームではいずれも平均粒子サイズは若干大きいことが確認された。また ζ 電位もペプチド修飾により若干の上昇が観察されたが表面電位としては負電荷であった。

(b) AG73修飾PEGリポソームによる遺伝子導入

AG73修飾PEGリポソームを用いて293T細胞および293T-Syn2細胞に遺伝子導入した。PEGリポソームと比較して、Cys-AG73を5%修飾したAG73修飾PEGリポソームでは293T-Syn2細胞においておよそ20倍の顕著に高いルシフェラーゼ活性を示したが、293T細胞ではほとんどルシフェラーゼ活性に変化を認めず、AG73修飾の効果が認められた。しかしながら、AG73修飾リポソームと比較し、ルシフェラーゼ発現の程度は低値であった。

(c) 血清存在下でのPEG修飾による遺伝子発現の影響

AG73修飾PEGリポソームによる遺伝子導入効率におよぼす血清の影響について検討を加えた。

総脂質量の5%のPEG末端をAG73で修飾したAG73修飾PEGリポソーム、またはPEG修飾をしていないAG73修飾リポソームを、無血清または血清を10%含有した培地中に添加し遺伝子導入を行った。PEG修飾をしていないAG73修飾リポソームでは無血清培地で遺伝子導入した群と、血清を10%含有する培地で遺伝子導入した群においてルシフェラーゼ活性の有意な減弱が観察された。一方、AG73修飾PEGリポソームでは結成の有無による有意な差は観察されなかったことから、*in vivo* への応用にはAG73修飾PEGリポソームを用いた遺伝子導入法が有効であることが推測された。

(d) 他のがん細胞株や血管内皮細胞を用いた遺伝子導入

他のがん細胞株や血管内皮細胞に対するAG73修飾PEGリポソームの遺伝子導入能を明らかにするために、大腸がん由来細胞株(colon26)、メラノーマ由来細胞株(B16F10)、HUVECを用いて、同様の遺伝子導入を行った。その結果、293T-Syn2細胞を用いた場合

とほぼ同等の遺伝子導入効率が得られた。

以上の結果から、DNA 封入 AG73 修飾リポソーム、また、polyethyleneglycol (PEG) 修飾を施した DNA 封入 AG73 修飾 PEG リポソームの有効性が明らかとなった。

3. 研究評価及び今後の研究計画

本研究目標は、がん細胞や血管内皮細胞などと相互作用するラミニン由来のペプチドをリポソームの表面分子として付与し、標的細胞選択的リポソームに核酸を内封し、がんや循環器疾患治療を指向した遺伝子医薬の開発を行うことである。すでに平成18年度研究において数種のペプチドをリポソーム表面に修飾し、がん細胞や血管内皮細胞との相互作用を比較検討した結果、AG73 ペプチドで表面修飾したリポソームが、がん細胞や血管内皮細胞への選択的な核酸デリバリーツールとなりうることを示してきた。

そこで平成19年度研究では、上記の可能性を明らかとするために AG73 修飾リポソームにプラスミド DNA を内封したリポソームの調製に着手し、実際に AG73 のレセプターである Syndecan-2 の高発現細胞に対して選択的に遺伝子導入させ、遺伝子発現が可能となることを明らかとした。さらに *in vivo* での応用を踏まえ、AG73 修飾 PEG リポソームに polyethyleneglycol (PEG) 修飾を行うことで、血中安定性の高い、遺伝子内封型 AG73 修飾 PEG リポソームとなり、実際に血清存在下でも遺伝子の細胞内導入と高い発現が維持されることも明らかとした。

以上のことから本年度における「ラミニン由来ペプチド(AG73)を利用した遺伝子内封ペプチド修飾リポソームの調製および機能評価を行う」という目標を十分に達成することができた。また、リポソームの調製に PEG を用いることで血清中での遺伝子導入が可能であったことから、今後のがんや循環器疾患治療を指向した遺伝子医薬開発への応用に繋がるものと予想される。

平成20年度計画では、AG73 ペプチド修飾リポソームの疾患治療に向けた核酸デリバリーデバイスの実用化に向けて、細胞内への遺伝子導入能を増強させることを目的とし、超音波エネルギー併用による遺伝子導入効果の増強を試みる。

1) 超音波照射による遺伝子内封ペプチド修飾リポソームの細胞内挙動解析

超音波エネルギーを併用することで遺伝子内封ペプチド修飾リポソームが細胞質内に効率よく導入されるか否かを明らかにするために、蛍光ラベルした遺伝子内封ペプチド修飾リポソームをHUVECに添加し、一定時間相互作用させた後、超音波照射し、その後のリポソームおよび内封遺伝子の挙動を共焦点レーザー顕微鏡で解析する。

2) 遺伝子内封ペプチド修飾リポソームと超音波照射併用による遺伝子導入

血管内皮細胞に選択的なペプチド (AG73, A99など) で修飾したリポソームに、遺伝子 (ルシフェラーゼ、または、EGFPをコードしたプラスミドDNA) を内封する。本リポソームを血管内皮細胞に添加後、細胞内への透過性を高める目的で、さらに超音波エネルギーを照射 (照射強度: 1-2 W/cm, 照射時間: 10-60秒) し、ルシフェラーゼ活性測定、または、蛍光顕微鏡によるEGFPの発現を確認し、超音波照射併用による遺伝子導入システムの最適化を行う。

3) 循環器疾患モデルにおける虚血部位への遺伝子導入

循環器疾患モデル動物として、下肢虚血マウスを作製し、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA を搭載した遺伝子内封ペプチド修飾リポソームを静脈内投与し、虚血部位に経皮的に超音波照射を行い、数日後の虚血部位での遺伝子発現を解析する。

4. 研究成果の発表

国内学会発表

(1) 飯島 浩，根岸 洋一，野水 基義，新槇 幸彦

AG73 修飾リポソームの細胞選択的移行性と遺伝子発現

日本薬剤学会第 22 年会，2007 年 5 月，大宮

(2) 角田 由佳，根岸 洋一，遠藤 葉子，鈴木 亮，滝澤 知子，高木 教夫，

野水 基義，丸山 一雄，新槇 幸彦

AG73 ペプチド修飾バブルリポソームと超音波併用による遺伝子導入法の開発

日本薬学会第 128 年会，2008 年 3 月，横浜