

平成20年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 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り、専門分野を全く異にする6研究室から成り立っており、それぞれが一つの研究班となつてその専門性の研究基盤に基づいたサブテーマを設定し、異なる専門分野の他班の支援を得て研究を推進している。その結果、平成20年度は下記の成果をあげた。

- 1) 別府班は、マクロファージの表面に存在する多機能タンパク質ヌクレオリンが脳内の貪食細胞であるミクログリアの表面にも存在すること、そしてミクログリア表面のヌクレオリンがアルツハイマー病の原因物質と考えられている β アミロイド ($A\beta$) を結合し貪食除去することを見だし、アルツハイマー病の予防や治療がミクログリア表面ヌクレオリンの活性制御を通じてできる可能性を示した。
- 2) 田野中班は、心筋梗塞後の不全心でのミトコンドリア機能障害について検討し、ミトコンドリア電子伝達系の複合体I及びIVの活性低下が心不全に密接に関連していることを見いだした。また、心筋梗塞後の心筋ミトコンドリアでは、薬物代謝酵素として知られるグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)が減少していることを見だし、ミトコンドリアのGSTが心機能低下による心不全発症と相関することを示した。

- 3) 大野班は、血管炎発症に関わる *Candida* 由来の多糖成分の構造と血管炎誘導能との関連性を明確にする目的で、精製度の高いマンナンを *C. albicans* の培養菌体より抽出し、マンナン構造中の β -1,2-マンナン含量低下と炎症惹起反応とに関連があることを明らかにした。また、ラット *dectin-1* の遺伝子クローニングを行い、マウスに加え、ラットでの炎症応答における *dectin-1* の役割の解析を可能とした。
- 4) 伊東班は、がん細胞表面に高発現し、その浸潤や転移に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)誘導因子(EMMPRIN)が関節リウマチ(RA)患者の滑膜にも高発現していることに着目し、ヒト滑膜細胞における EMMPRIN の機能を検討した。その結果、EMMPRIN はヒト滑膜細胞において炎症性サイトカインの proMMPs-1 および-3 産生促進作用を特異的に増強する因子として働き、関節破壊を惹起することを見いだした。
- 5) 平塚班は、乳がん治療薬である抗エストロゲン薬タモキシフェン(TAM)の代謝とそれに伴う活性変動を TAM 服用患者の血漿と尿を用いて解析した。その結果、ヒト体内では幾何異性体の生じる代謝物は全て trans 体優位であることが明らかとなり、また、がん再発患者の血漿 4-OH-TAM および 4-OH-NDM それぞれの trans/cis-比が高いことより、TAM の幾何異性体の存在量比の違いが、がん再発と関連している可能性が示唆された。
- 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法に加えて、超音波造影ガス封入リポソームと超音波照射を併用することによって遺伝子導入効果を増強することに成功し、DDS への実用に向けて前進した。

まとめ：本研究プロジェクトは平成 20 年度で 3 年を経過したが、上記のように 6 つの全ての班が、それぞれの分担課題研究を他班の助言と支援のもとで着実に実施し成果をあげており、次年度、次次年度（最終年度）にも、大きな成果が十分に期待できると思われる。

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ャ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。

これまでに、本研究においてマクロファージ細胞表面ヌクレオリンのアポトーシス細胞認識に関わる分子内ドメインを明らかにし、また、変性タンパク質や変性リポタンパク質などを認識除去するスカベンジャーレセプターとしての機能を有することを明らかにしてきた。

平成20年度は、これらの結果をふまえて、脳に存在する貪食細胞であり、脳内のマクロファージに相当する貪食細胞として知られるミクログリアに注目し、1) ミクログリア表面にヌクレオリンが存在するかどうか、存在するならば、2) ミクログリア細胞表面ヌクレオリンが脳内においてもアポトーシス細胞を除去するレセプターとして機能しているかどうか、また、3) ヌクレオリンは、アルツハイマー病発症の原因タンパク質と考えられている脳内のアミロイドβ (Aβ) を結合し貪食除去する機能を有するかどうか等について検討することとした。

2. 研究成果の概要

(1) ミクログリア細胞表面ヌクレオリンの発現の有無の検討

ミクログリアとしてはマウスのミクログリアを不死化した細胞を用いた。このミクログリア細胞について、細胞表面にヌクレオリンが発現しているかどうか、ヌクレオリンに対する抗体を用いてフローサイトメトリーによって解析したところ、細胞表面にヌクレオリンが発現していることが確認できた。

(2) ミクログリア細胞表面ヌクレオリンのアポトーシス細胞除去機能の検討

脳神経系変性疾患におけるアポトーシスの要因として小胞体ストレスが注目されていることから、アポトーシス誘導は小胞体ストレスにより行うこととした。小胞体には多種多様な分子シャペロンやフォールディング酵素が存在し、新生タンパク質の高次構造形成に

関わっているが、新生タンパク質が高次構造形成に失敗し、小胞体内に蓄積するとそれが「小胞体ストレス」となってアポトーシスが引き起こされるとされている。そこで本研究では、小胞体ストレスによるアポトーシス誘導の場合にも、ミクログリアがヌクレオリンを介してアポトーシス細胞を認識除去するかどうか検討した。

小胞体ストレス誘導剤として知られている thapsigargin を用いて Jurkat 細胞にアポトーシスを誘導したところ、時間依存的、濃度依存的に caspase3 の活性が上昇した。マウス由来の培養ミクログリア細胞を用いて thapsigargin で 2 h、20 h 処理した Jurkat 細胞と結合実験を行うと高い結合性を示した。ミクログリアとこれらのアポトーシス Jurkat 細胞との結合は、1) anti-CD43 抗体で Jurkat 細胞を予め処理した場合、2) ポリラクトサミン含有オリゴ糖鎖を共存させた場合、3) anti-rNUC 抗体でミクログリア細胞を処理した場合、阻害された。また、thapsigargin 20 h 処理した Jurkat 細胞では、phosphatidylserine (PS)の露出はわずかに起こるものの、PS 結合性タンパク質 annexin V によって、結合は阻害されなかった。また、thapsigargin 処理 20 h 以降で PS の露出が増えはじめる頃にはネクローシスも増えはじめて速やかにネクローシスに移行してしまうことが判明した。以上のことから、thapsigargin により誘導されたアポトーシス Jurkat 細胞では PS の露出期間が短く、ミクログリア細胞による認識除去では、Jurkat 細胞表面 CD43 のシアリルポリラクタサミン型糖鎖が ligand となり、ミクログリア細胞表面ヌクレオリンが receptor として働く糖鎖認識が主たる認識機構であろうと考えられた。

(3) ミクログリア細胞表面ヌクレオリンの A β 除去機能の検討

アルツハイマー病では脳への老人斑アミロイドの蓄積が見られ、主成分であるアミロイド β ペプチド (A β) の不溶化防止や分解、除去などが予防や治療の戦略として考えられている。A β は 37 から 43 個のアミノ酸残基からなるペプチドで、疎水性で凝集しやすい性質を持つ。主要分子種は A β 1-42 と A β 1-40 であり、A β 1-42 の方が、毒性が強く、また凝集性も高いことから、初期に沈着し、AD の発症に強く関係しているといわれている。本研究では、ヌクレオリンに A β との結合性があるかどうかを知るために、まず、図 1 のような各種のリコンビナントヌクレオリン (rNUC) を用いて、A β (1-42 及び 1-40) との結合性の有無を Surface Plasmon Resonance 法 (SPR 法) で検討した。

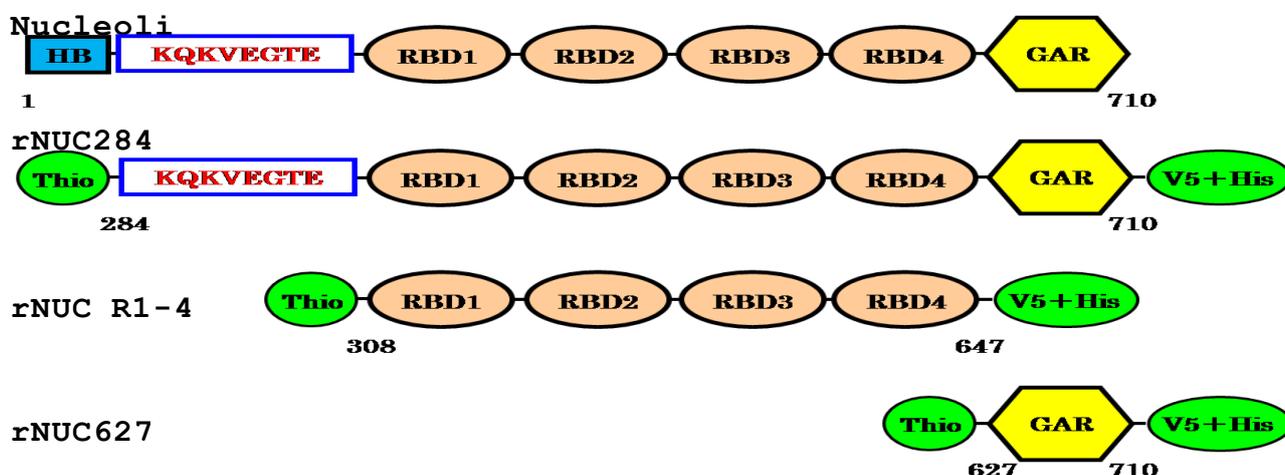


図 1 A β との結合実験に用いたヌクレオリンの各種リコンビナント体

まず、rNUC284 に対する monomer の $A\beta$ (1-42 及び 1-40) の結合性を SPR 法により測定したところ、 $A\beta$ 1-42 は濃度依存的に結合し、 $A\beta$ 1-40 はほとんど結合しないことがわかった。また、 $A\beta$ とヌクレオリンの結合がヌクレオリンのどの部位によるものかを調べるために、ヌクレオリンの部分配列のリコンビナント体 (2 種類) と $A\beta$ の結合性を検討した結果、 $A\beta$ 1-42 は 4 つの RNA binding domain (RBD) のみからなる rNUC R1-4、Glycine-Arginine Rich domain (GAR domain) のみからなる rNUC627 のいずれに対しても濃度依存的に結合すること、また、その結合量は rNUC627 の方が多いことが判明した。一方、 $A\beta$ 1-40 はいずれに対してもほとんど結合性を示さなかった。これらの結果から、ヌクレオリンは $A\beta$ と結合すること、そしてその結合にはヌクレオリンの RBD および GAR domain が関与しており、とりわけ GAR domain の関与が大きいことが明らかとなった。

次いで、細胞表面のヌクレオリンが実際、 $A\beta$ 1-42 を結合するかどうか検討した。

単球系細胞による $A\beta$ の結合・取り込みにおけるヌクレオリンの関与

ヒト単球系の THP-1 細胞を用いて、細胞表面ヌクレオリンが monomer $A\beta$ の結合及び取り込みに関与しているかどうかを検討した。結果、monomer $A\beta$ (1-42 及び 1-40) の濃度依存的な結合、取り込みの増加が認められた。そこで、この結合及び取り込みに細胞表面ヌクレオリン が関与しているかどうかを anti-rNUC 抗体を用いた阻害実験で検討したところ、 $A\beta$ 1-42 では結合及び取り込み全量の 15.7%、 $A\beta$ 1-40 では 7.9% が阻害された。従って、THP-1 細胞表面のヌクレオリンは monomer $A\beta$ の結合及び取り込みに関与していると考えられた。また、THP-1 細胞による monomer $A\beta$ の結合及び取り込みは、 $A\beta$ 除去レセプターとして知られる Scavenger receptor A (SRA)、CD36 の抗体 (anti-SRA 抗体、anti-CD36 抗体) のいずれによっても阻害されなかった。従って、monomer 状態の $A\beta$ の結合、取り込みには SRA、CD36 の関与は無く、ヌクレオリンの寄与が大きいと考えられる。

ミクログリア細胞による $A\beta$ の結合・取り込みにおけるヌクレオリンの関与

細胞表面のヌクレオリンが monomer $A\beta$ の結合、取り込みに関与していることがわかったため、脳内の貪食細胞であるミクログリアの細胞表面ヌクレオリンが monomer $A\beta$ の結合及び取り込みに関与しているかどうかを EOC2 細胞を用いて検討した。その結果、THP-1 細胞の結果と同様、monomer $A\beta$ (1-42 及び 1-40) の濃度依存的な結合、取り込みの増加が認められ、anti-rNUC 抗体により $A\beta$ 1-42 の結合、取り込み全量が 17.4% 阻害された。一方、 $A\beta$ 1-40 では阻害効果は認められなかった。さらに、完全長のヌクレオリンを HEK293 細胞に発現させ、ヌクレオリンの $A\beta$ 認識機能について検討したところ、ヌクレオリンを発現させることにより、monomer $A\beta$ 1-42 の結合及び取り込み全量が 46.8% 増加した。しかし、monomer $A\beta$ 1-40 の結合、取り込み増加効果は認められなかった。これらの結果から、ミクログリア細胞表面ヌクレオリンは $A\beta$ 1-42 認識レセプター分子として機能していると考えられた。

以上の検討から、遊離のヌクレオリン及び細胞表面のヌクレオリンは、monomer $A\beta$ 1-42 を結合することが明らかとなった。また、この結合には、ヌクレオリンの RBD 及

び GAR domain が関与していることが考えられた。ミクログリア細胞表面のヌクレオリンを介する monomer A β 1-42 の結合・取り込み量は、ミクログリアへの全結合取り込み量の約 17% であり、アルツハイマー病の発症防止に一定の役割を担っている可能性も考えられる。とりわけ、毒性の強い fibril 化 A β が生成する前に A β を除去するヌクレオリンのこのような機能はアルツハイマー病の発症防止の観点からも注目すべき性質であろうと思われる。

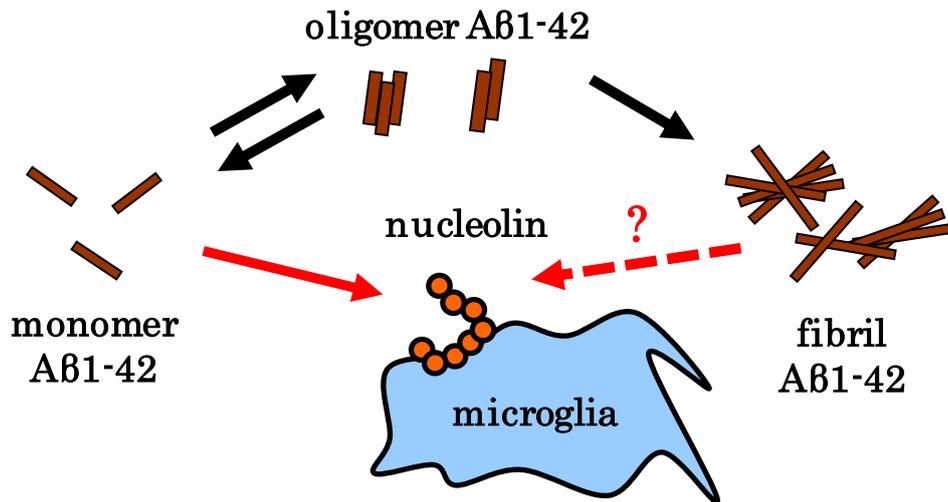


図2 ミクログリア細胞表面のヌクレオリンの A β 1-42 結合性

3. 研究評価および今後の研究計画

(1) 研究評価

平成 20 年度の当初研究計画は、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（A β ）の除去に関する研究であり、当初の計画に沿って概ね予定通り取り組むことができた。そもそも、本分担プロジェクトは、ヌクレオリンという多機能性のシャトルタンパク質（分子シャペロン）が各種の細胞表面にも発現していることに着目し、その多様な機能を人為的に制御できれば様々な生活習慣病の予防や治療に利用できるのではないかと考えて構想・企画したものである。本プロジェクト初年度の平成 18 年度の取り組み課題は「ヌクレオリンの細胞表面での存在様式」であり、細胞膜タンパク質の機能に直結する細胞表面での存在様式に焦点を絞って検討し、その結果、ヌクレオリン分子の各ドメインの細胞表面での配置の概要が明らかになり、その後、ヌクレオリン機能を解析する重要な情報となっている。翌平成 19 年度の取り組み課題は、細胞表面ヌクレオリンが動脈硬化発症に関連の深い、マクロファージ細胞表面のスカベンジャーレセプターとして働いている可能性についての検討であり、その結果、やはり、スカベンジャーレセプターとしての機能を有することが示唆され、その予防や治療にヌクレオリンが利用できる可能性が示唆された。そして、今回報告書で上述したように昨年度（平成 20 年度）の検討では、脳ミクログリア表面のヌクレオリンには A β を結合し、取込み除去する機能があることが示唆され、アルツハイマー病の予防や治療の分指標的として利用できる可能性が示唆された。以上のように、ヌクレオリンは当

初の狙い通り、各種の生活習慣病の人為的制御のための分指标的としての様々なレセプター機能を有するタンパク質であることが明らかになってきており、本研究は概ね当初の狙いどおりに順調に進行しているといえる。

(2) 今後の研究計画

LPS との結合性に関する検討

ヌクレオリンの新たな機能をさらに探索する目的で、感染時に細菌から放出されるリポ多糖 (Lipopolysaccharide:LPS) に対し、マクロファージ表面ヌクレオリンが結合・応答し得るかどうか検討する。

1. LPS とヌクレオリンの結合性 (無細胞系、細胞系) の検討
2. LPS 刺激による炎症性サイトカイン TNF の産生におけるヌクレオリン関与の検討

細胞表面ヌクレオリンの機能の人為的制御のための調査

細胞表面ヌクレオリン分子の機能制御を念頭に、ヌクレオリンに対するアプタマーや他の薬物、生理活性物質等を用いてヌクレオリンの機能への影響を調べる。

1. ヌクレオリンの核酸アプタマー (AS1411) の影響。
2. 細胞接着タンパク質 (フィブロネクチンなど) の影響。
3. Ca^{2+} イオノフォアおよび Ca^{2+} 情報伝達系阻害剤の影響。
4. 細胞骨格系阻害剤の影響。
5. 酸化ストレス、抗酸化物質の影響
6. タンパク質リン酸化、脱リン酸化阻害剤の影響。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Miki, Y., Itoh, T., Hirano, K., Eda, S., Hayashi, A., Yamanaka, M., and Beppu, M.

Clearance of oxidatively damaged cells by macrophages: recognition of glycoprotein clusters by macrophage-surface nucleolin as early apoptotic cells
Biol. Pharm. Bull., **32**, 564-572 (2009)

国内学会発表

(1) 別府正敏

マクロファージ細胞表面ヌクレオリンによるアポトーシス細胞の認識除去 (講演)
第 17 回日本アポトーシス研究会学術集会, 2008 年 8 月, 京都

(2) 鍋村実希, 松島秀樹, 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分子ヌクレオリン
第 9 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 2008 年 6 月, 東京

(3) 三木雄一, 伊藤隆司, 田澤朋己, 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による酸化細胞の糖鎖依存性認識とその機構

第9回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 2008年6月, 東京

- (4) 中村卓史, 小澤大輔, 別府正敏

ミクログリア細胞表面ヌクレオリンのベータアミロイド除去機能

第52回 日本薬学会関東支部大会, 2008年10月, 千葉

- (5) 松本達也, 平野和也, 三木雄一, 別府正敏

ヌクレオリンに結合する生体内タンパク質の網羅的解析

第52回 日本薬学会関東支部大会, 2008年10月, 千葉

- (6) 鍋村実希, 松島秀樹, 三木雄一, 平野和也, 別府正敏

マクロファージ表面ヌクレオリンのスカベンジャーレセプター機能

第52回 日本薬学会関東支部大, 2008年10月, 千葉

- (7) 鍋村実希, 松島秀樹, 三木雄一, 平野和也, 大野尚人, 別府正敏

マクロファージ細胞表面ヌクレオリンのスカベンジャーレセプターとしての結合特性

日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都

- (8) 中村卓史, 小澤大輔, 三木雄一, 平野和也, 別府正敏

ミクログリア細胞表面ヌクレオリンによるベータアミロイドの結合と除去

日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都

- (9) 松本達也, 平野和也, 関 貴之, 長澤圭大, 三木雄一, 別府正敏

Yeast two-hybrid 法による多機能タンパク質ヌクレオリンのリガンドの検索

日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都

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・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

前年度までの研究成果で、心筋梗塞後不全心ではミトコンドリア機能低下が分子シャペロンなどの細胞内タンパク質の恒常性に影響を与えることを示した。平成 20 年度の研究では、1) 心筋梗塞後不全心でのミトコンドリア機能障害が他の不全心でも生じるのか、および 2) ミトコンドリア機能低下による心筋細胞内酸化・還元制御系障害に伴う薬物代謝酵素の変化について検討を行った。特に、後者の心筋細胞内酸化・還元制御系の変化に関する研究では、心筋組織での GST の役割について解析を行うため、平塚班員の研究グループとの新たな研究が開始された。

まず、心不全の中では最も重篤かつ有効な薬物治療法が確立されていない右室不全心でのミトコンドリア機能障害について検討した。実験は、アルカロイドの一種であるモノクロタリンを投与し、肺高血圧症を発症させた。この動物では右心室肥大および過度

の線維化が誘発され、重篤な心筋リモデリングが引き起こされる。この心筋組織でも心筋梗塞後不全心のそれと同様にミトコンドリア呼吸能が低下した。ミトコンドリア呼吸能の低下は、ミトコンドリアでのエネルギー産生能の低下を示しており、ミトコンドリア電子伝達系の活性低下が推測された。そこで、右室不全心および正常心臓の右心室筋から **skinned bundle** を作成し、右心室筋組織内の電子伝達系構成因子の複合体 I から IV までの活性を測定した。その結果、複合体 I および複合体 IV の活性が低下していた。いずれの複合体の活性も、心臓のポンプ機能の直接指標の心拍出量係数の減少に伴って低下しており、ミトコンドリア複合体活性と心機能の間には密接な相関のあることが示された。

ミトコンドリアは細胞内の酸化および還元を制御を行う重要なオルガネラである。前々年度の研究成果で、不全心のミトコンドリア内膜では酸化ストレスの指標であるチオバルビツール酸反応性物質の増加を確認した。このことは、ミトコンドリアでの酸化・還元平衡が崩れ、酸化状態に陥っていることを示すものである。心臓は生体内で最も高いミトコンドリアエネルギー産生能を維持するための酸素消費量が多い臓器である。そのため、細胞内酸化・還元平衡を維持するためのグルタチオン含量が生体内で最も多い臓器の一つである。グルタチオンは薬物代謝酵素の補酵素として抱合反応に関与するだけでなく、細胞内で産生された活性酸素を消去するラジカルスカベンジャーの機能も発揮する。このグルタチオンを補酵素とする酵素には **glutathione peroxidase** および **glutathione S-transferase (GST)** がある。虚血/再灌流心筋での前者の変動についてはいくつかの知見があるものの、後者の GST に関して、心筋組織での発現量、細胞内局在および疾患との関連についての知見はない。心筋梗塞後 2 週目で心筋ミトコンドリア画分の **GSTA4-4** および **GSTM3-3** が正常動物のそれらの約 80% まで減少した。心ポンプ機能が顕著に低下し、心不全に陥る心筋梗塞後 8 週目では、これら GST isoform はそれぞれ正常動物のそれら含量の約 20% まで減少した。一方、心筋ミトコンドリア画分の **GSTP1-1** 含量は、心筋梗塞後 2 週目および 8 週目で、正常動物のそれらの約 50% および 40% まで減少した。つまり、**GSTA4-4** と **GSTM3-3** は、心筋梗塞後の心ポンプ機能が代償された状態から、ポンプ機能が十分に発揮できない心不全に至る段階で、心不全症状の進展とともにミトコンドリア画分の酵素含量が低下することを発見できた。通常、細胞質画分にこれら酵素は存在すると考えられているので、細胞質画分のこれら酵素含量変化についても検討した。その結果、細胞質画分に存在する **GSTA4-4** は心筋梗塞後、正常動物のそれらの約 70% まで減少した。代償期から心不全期に移行しても細胞質画分の **GSTA4-4** 含量は正常動物のそれらの約 70% で、心機能が代償されている梗塞心のそれと同様の値となった。**GSTM3-3** は心筋梗塞後 2 週目で正常動物のそれらの約 80% に減少した。心不全期での細胞質の **GSTM3-3** 含量は正常心筋のそれらの約 60% となり、病態の進展とともにさらに減少した。一方、細胞質画分の **GSTP1-1** は、心筋梗塞後のいずれの時点でも正常動物のそれと同様の含量となり、心筋梗塞の有無に関わらず変化しないことが明らかにされた。

上述したように、GST は、生体内の異物を排除するためのグルタチオン抱合反応に関与する薬物代謝酵素と理解されてきた。しかしながら、GST は心筋組織でも発現しており、本酵素の isoform の一部がミトコンドリアに会合することを示した。さらに、

その会合量は心不全の発症・進展に伴うミトコンドリア機能低下により減少することも明らかにされた。

3. 研究評価及び今後の研究計画

平成 20 年度の研究では、心筋ミトコンドリア機能低下が心筋梗塞後心不全の心筋組織だけではなく、右心室不全の不全心でも誘発されることを示した。このミトコンドリア機能低下は、電子伝達系の複合体 I と複合体 IV の活性低下に起因することが示され、特に電子伝達系の機能の律速段階とされる複合体 I での機能低下が、不全心でのミトコンドリアのエネルギー産生能低下に大きく寄与すると推測された。心筋梗塞後不全心でのミトコンドリアエネルギー産生能低下も、本研究結果で得られた電子伝達系複合体 I および IV の活性低下に起因すると考えられるので、不全心のエネルギー産生能低下が心収縮不全の共通した誘因になることが示された。この様に、慢性心不全での心機能低下に直接関与する誘因を初めて明らかにしたという点で、平成 20 年度の研究の前半部分は評価されるものと確信する。

慢性心不全での心機能低下が、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I および IV の活性低下に起因する可能性を示すことが出来た。ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の機能低下は、ミトコンドリアからの電子の漏出を誘発し、その結果、活性酸素種の産生増加の誘因となると考えられている。事実、心筋梗塞後不全心のミトコンドリア膜画分の過酸化脂質の指標が増加しており、細胞内が酸化状態に陥っていることが示唆されている。心筋細胞内の酸化・還元平衡に関与する物質としてグルタチオンが知られている。本研究では、グルタチオンを補酵素とする酵素として GST に注目した。GST は薬物代謝酵素としての役割は良く知られているものの、心臓での本酵素の細胞内分布および病態との関連については全く知られていない。そこで、平成 20 年度後半では、平塚班員の研究グループとともに心筋組織での GST isoforme の存在の有無および心筋梗塞後不全心での心不全を発症する段階での GST 酵素群の細胞内分布について検討を行った。その結果、心筋組織でも GST isoforme の一部が発現していることを示すことが出来た。一般的に GST は cytosolic enzyme の一種とされ、生体内で産生された異物の排泄促進に関与する酵素と理解されている。本研究で新たに発見されたことは、心筋組織で発現している GST は細胞質だけでなく、ミトコンドリアにリンクした形で存在することが示された。ミトコンドリア外膜に会合する形で存在すると推測されるが、その詳細を明らかにすることも新たな課題となった。心筋梗塞後の心不全発症の過程でのミトコンドリア画分および細胞質画分の GST 酵素タンパク質量の変動を比較すると、ミトコンドリア画分の GST 減少の度合いの方が、細胞質画分のそれよりもミトコンドリア機能低下、すなわち心機能低下による心不全発症と相関することが示された。これらの結果を纏め、日本薬学会第 129 年会にて発表された。

次年度は、心筋組織での GST の役割に関する解析を進めると同時に、新たな細胞内情報伝達因子として別府班員が解析を進めているヌクレオリンの心筋組織での研究を開始する予定である。上述したように、細胞での酸化・還元平衡は細胞内環境を決定する重要な要因の一つであり、GST の変動による不全心筋での細胞内環境がヌクレオリンの細胞内情報伝達に及ぼす影響について解析を進めたい。本研究により、ミトコンドリア

アを中心とした心不全の新たな病態像が把握されると期待される。

4. 研究成果の発表

原著・論文

- (1) Daicho T, Yagi T, Abe Y, Ohara M, Marunouchi T, Takeo S, Tanonaka K.
Possible involvement of mitochondrial energy-producing ability in the development of right ventricular failure in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats
J. Pharmacol. Sci., *in press*.

国際学会発表

- (1) T. Daicho, T. Yagi, Y. Abe, M. Ohara, Y. Daisho, T. Marunouchi, S. Takeo, K. Tanonaka
Changes in mitochondrial energy-producing ability in the right ventricular muscle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats.
The 25th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section 2008年12月、横浜

国内学会発表

- (1) 大長卓也、大聖頼子、小島 秀、高野幸織、手島悠吾、丸ノ内徹郎、高木教夫、竹尾 聡、田野中浩一
Monocrotaline 誘発肺高血圧症ラットの右心室 dystrophin-related glycoprotein 複合体の含量変化
第18回日本循環薬理学会 2008年11月、千葉
- (2) 田野中浩一、丸ノ内 徹郎、椿原裕太郎、高木教夫、西山貴仁、小倉健一郎、平塚 明
心筋梗塞不全心でのグルタチオン S-トランスフェラーゼの変化
日本薬学会第129年会 2009年3月、京都

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、20年度は真菌多糖の NMR による詳細構造の解析、その多糖成分への生体反応に関わる C 型レクチン受容体機能の動物種差の解析、及び C 型レクチン受容体発現細胞の作製と受容体機能の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物性解析により示唆されているが、各成分の詳細な構造差異ならびにこれらに対する細胞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 やその含有成分の詳細構造や糖鎖特異的な受容体分子、特に C 型レクチンに焦点を絞り、その受容体機能をヒトやげっ歯類間での種差別に検討する一方で、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糖鎖認識受容体の特徴及び受容体発現細胞における活性化機構を検討した。以下に項目ごとの研究目標を示す。

(1) 真菌細胞壁多糖の構造解析

Candida albicans の各種培養条件によって得られる多糖画分の活性糖鎖構造を 2D-NMR により解析し、受容体結合特異性を考察するための詳細な構造情報を得ることを目標にした。

(2) C 型レクチン受容体 (CLR) 機能の種差の検討

真菌多糖反受容体に関連した C 型レクチン受容体 (dectin-1, dectin-2 など) の遺伝子クローニングをマウス、ラット、ヒトなどについて行い、可溶性受容体タンパクの分取、多糖結合性の解析を経て、結合機能などの動物種差を検討する。

(3) CLR 発現細胞の作製と受容体機能の解析

dectin-1、dectin-2 などの CLR の細胞機能への影響を検討する目的で各種細胞株 (上皮系、リンパ球系、単球系等) への遺伝子導入により発現細胞を作製し、炎症性サイトカイン、活性酸素産生、増殖因子、アポトーシスへの影響など炎症と細胞増殖の観点から菌体成分結合と受容体機能との関連性を検討する。

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及び非活性多糖成分の詳細な構造を比較するため 2D-NMR による解析を行った。また、

昨年度、誘発活性に関与する可能性が示唆された *dectin-1* の構造機能解析をマウス以外の動物種で比較するため、ラット *dectin-1* の遺伝子クローニング及びその炎症活性発現機構解析、さらには *Dectin-1* 類縁の自然免疫受容体 *Dectin-2* の発現系作製について検討した。その成果の概要は以下のようになる。

(1) 真菌細胞壁多糖の構造解析

これまでの解析で *Candida* 可溶性多糖画分 (CAWS) はマウスモデルにおいて腹腔内投与では血管炎を発症すること。CAWS の構造と血管炎誘発活性との相関性を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 により解析した結果、 β -マンナンが多いものほど誘導活性が弱いことが示された。これを更に詳細に構造解析する目的で、20 年度は、*Candida albicans* の培養条件を変えて、マンナン精製画分を 4 種調製し、それらの血管炎誘導活性と 2D-NMR により解析したアノマーコンフォメーションとの相関性を検討した。その結果、4 種 (C27, C37, Y27, Y37) のうち、C27 及び C37 の C-limiting 合成培地で培養した菌体から抽出されたマンナンは β -マンノースに帰属される 10 箇所シグナルが消失していた。また、YPD 天然培地で培養した菌体では 37°C 培養で C27, C37 と同様のシグナルを示し、 β -マンナンが著しく消失していることが明らかとなった。一方で YPD 培地 27°C 培養の Y27 は他の 3 種とは異なり、 β -マンノース残基を有していることが明らかとなった。また、4 種の血管炎誘導活性を比較したところ、C27, C37, Y37 では CAWS と同等の血管炎誘導活性を示したが、Y27 では全く誘導しなかった。また尾静脈投与で誘導されるアナフィラキシー様致死活性も Y27 で著しい活性低下が認められ、 β -マンナンの有無は生体内反応に著しい影響を及ぼすことが明らかとなった。これらのことから、CAWS や菌体抽出細胞壁マンナンのうち、 β -マンナン欠如により露出した α -マンナン部分が、血管炎やアナフィラキシー様炎症反応の惹起に関わっている可能性が強く示唆された。

CAWS には、抽出マンナン画分に比べると β -グルカンも含まれ、微量に混在する 1,3- β -グルカンが活性に関与する可能性も残されている。一方で β -グルカンは病原性真菌だけでなく担子菌キノコからも得られることが分かっており、これらの β -グルカン種の違いを明確にすることも重要である。そこで、大量に入手可能な担子菌 *Grifola frondosa* より得た β -グルカン *grifolan* の 2D-NMR による完全帰属を行なった。まず、1D- ^1H NMR によりグルコース C1 のアノメリックシグナル 4 種は全て β 結合であることが明らかとなった。さらに 2D-TOCSY、HSQC、H2BC により、4 種のグルコース残基の相互結合様式を明らかできた。*Grifolan* の構造は *Candida albicans* 細胞壁より抽出された β -グルカンとは、1,6-分岐構造が異なることが明らかとなった。この違いが CAWS による血管炎誘導にどの様に関わるか今後の課題のひとつである。

(2) C 型レクチン受容体 (CLR) 機能の種差の検討

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。新楨班の指導のもと、 β -グルカン処置が炎症反応を悪化させるマ

ウス疾患モデルを作製し、組織変形を伴う不可逆的な炎症反応にも関わることを報告した。また、その β -グルカン活性に白血球の β -グルカン受容体 *dectin-1* が関与することをこれまで明らかにした。*dectin-1* はマウス及びヒトの遺伝子より発現系を構築し、その遺伝子変異体の作製を通して β -グルカン受容体機能に必要なアミノ酸配列の推定などがこれまで行なわれている。しかし、実験動物として汎用されるラットについては *dectin-1* の遺伝子が明確にされていない。そこで、ラット cDNA ライブラリーより *dectin-1* 相同遺伝子を RACE-PCR などにより単離し、その核酸配列を解析した。その結果、データベース上の推測配列とは異なり、細胞内領域がマウスよりも短い分子であることが明らかとなった。*dectin-1* の受容体機能に重要な細胞内領域の 3 連続産生アミノ酸、ITAM 様配列、及び細胞外の β -グルカン認識溝のアミノ酸配列はよく保存されていたが、細胞外発現に影響する N-Gly 糖鎖修飾部位が、マウスが 2 箇所であるのに対して 1 箇所のみであることが明らかとなった。単離されたラット *dectin-1* 遺伝子を導入した HEK293T 細胞での β -グルカン結合活性及び NF- κ B 活性化はマウスと同様に増強されることが明らかとなり、マウス、ヒト、ラットとも *Candida albicans* などの真菌細胞壁 β -グルカンの認識とその後の炎症応答に関わることを明らかとなった。

(3) CLR 発現細胞の作製と受容体機能の解析

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-グルカンの特異的に認識し、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報告している。しかし、真菌細胞壁にはマンナンなども含まれ、そのマンノース残基の認識に関わる受容体は複数あることから、どのマンナン受容体が真菌菌体認識後に誘導される様々な炎症応答にどの程度関わっているか明確ではない。そこで、*dectin-1* 近縁の C 型レクチン受容体である *dectin-2* について調査することにした。*Dectin-2* に依存した免疫応答を明確にする目的で、*dectin-2* の発現系を作製し、その細胞表面発現および糖鎖認識ドメイン (CRD) の可溶性タンパク発現系を作成した。可溶性 *dectin-2* タンパクは *Candida* 菌に結合し、その結合は CAWS で抑制されることが示された。免疫機能活性化における *dectin-2* の NF- κ B 活性化への影響について HEK293T 細胞を用いたレポーターアッセイで検討したが、CAWS や *Candida* 菌体による活性化は認められなかった。*dectin-2* の細胞内構造は *dectin-1* とは大きく異なることから、*dectin-2* は *dectin-1* とは異なる細胞内シグナル伝達機構で活性誘導する可能性が示された。今後さらに解析する予定である。

3. 研究評価及び今後の研究計画

血管炎発症に関わる *Candida* 由来の多糖成分 (CAWS) の構造と血管炎誘導能との関連性を明確にする目的で、より精製度の高いマンナンを *C. albicans* の培養菌体より抽出し、マンナン構造中の β -1,2-マンナン含量低下と炎症惹起反応とに関連があることを明確にした。19 年度からの課題であるマンナン構造解析において 2D-NMR により β -マンノース残基の帰属が完遂できたことは大きな成果である。しかし、 α -マンナンは α 1,3-、1,2-、1,6 など複数の結合様式を含んでおり、これらのどのマンノース糖鎖が血管炎発症に強く関係しているか明らかにすることが、今後の課題である。CAWS の活性成分中に

はマンナン以外にも β -グルカンが共存しており、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。 β -グルカンの構造解析にも 2D-NMR を応用し、担子菌 β -グルカン *Grifolan* の構造を解析することができた。この構造は *C. albicans* の β -グルカンとは側鎖構造が大きく異なることから血管炎発症への β -グルカンの間接的関与を比較検討するのに利用できると思われる。

真菌細胞壁多糖成分、特に *Candida* β -グルカン、で促進される強い炎症応答に関係する β -グルカンの受容体 *dectin-1* の分子構造と活性との関連性を理解すること、実験動物として汎用されるラットの *dectin-1* の分子クローニングを行なうことを目的としてラット *dectin-1* の遺伝子クローニングを行い、その遺伝子配列を決定することができた。

また、マウスの *dectin-1* に加え *dectin-2* の発現系も作製することに成功し、可溶性糖鎖認識タンパク分子を用いて、*C. albicans* への結合性を検討したところ、*dectin-1* のみならず *dectin-2* も細胞表面に結合することが示された。これらの発現細胞やタンパク分子を用いて血管炎誘発に関わる *Candida* 菌体やその多糖 CAWS への反応特異性及び認識糖鎖構造を今後解析したいと予定している。当初の計画では、これらの CLR を上皮系、リンパ球系、単球系等の細胞に遺伝子導入してその機能を解析する予定であったが、遺伝子導入やその細胞調製に問題があり、十分な解析が行えなかった。別府班や新楨班との連携によってこれらの問題を解決し、21 年度に再度検討する予定である。また、本活性に重要な α -マンノース残基との関連性を調べる目的で細胞壁糖鎖合成に関わる *Candida* の変異株などを用いることも計画している。

以上、20 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、などの解析ツールの種類を増やすことが出来た。これらの材料を活かし、次年度は血管炎発症に関わる多糖成分の解析を通じて発症機序解析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) Tada, R., Nagi-Miura, N., Adachi, Y., Ohno, N.
The influence of culture conditions on vasculitis and anaphylactoid shock induced by fungal pathogen *Candida albicans* cell wall extract in mice
Microb Pathog., 44, 379-388 (2008).
- (2) Kato, Y., Adachi, Y., Ohno, N.
Characterization of rat beta-glucan receptor *dectin-1*
Microbiol Immunol., 52, 418-428 (2008).
- (3) Tada, R., Adachi, Y., Ishibashi, K., Ohno, N.
An unambiguous structural elucidation of a 1,3- β -D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments
Carbohydr Res., 344, 400-404 (2008).

総説・著書等

- (1) 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
日本医真菌学会誌, 49, 287-292 (2008).

国際学会発表

- (1) Adachi, Y., Kato, Y., Ishibashi, K., Nagi-Miura, N., Ohno, N.
Molecular characterization and cellular function of rat dectin-1.
10th International Endotoxin and Innate Immunity Society meeting, 2008/07,
Edinburgh, UK

国内学会発表

- (1) 多田 墨, 安達 禎之, 石橋 健一, 久下 高生, 椿 和文, 大野 尚仁
大麦由来 beta-glucan の beta-glucan 受容体 dectin-1 への結合性の検討
第 28 回日本糖質学会年会, 2008 年 8 月, 茨城
- (2) 高野 雄介, 多田 墨, 新井 美紀, 三浦 典子, 安達 禎之, 鈴木 和男, 大野 尚仁
Candida metapsilosis 由来菌体外多糖の生体防御機能に与える影響
第 28 回日本糖質学会年会, 2008 年 8 月, 茨城
- (3) 加藤 雄也, 安達 禎之, 石橋 健一, 三浦 典子, 大野 尚仁
ラット dectin-1 の性状と β -グルカン受容体機能の解析
第 28 回日本糖質学会年会, 2008 年 8 月, 茨城
- (4) 安達 禎之, 池田 義彦, 加藤 雄也, 池田 太, 石井 崇司, 多田 墨, 石橋 健一,
三浦 典子, 新楨 幸彦, 大野 尚仁
 β -グルカン受容体 dectin-1 の真菌認識と免疫活性化機構の解析
第 20 回微生物シンポジウム, 2008 年 8 月, 岐阜
- (5) Sakuraba, D., Kato, Y., Adachi, Y., Ishibashi, K., Nagi-Miura, N., Ohno, N.
Comparative study of receptor functions of dectin-1 in rodents and human.
第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2008 年 9 月, 兵庫
- (6) Adachi, Y., Ikeda, F., Ikeda, Y., Harada, T., Ishibashi, K., Nagi-Miura, N.,
Saijo, S., Iwakura, Y., Ohno, N.
Specificity of dectin-1 on binding and innate immune response to fungal
beta-glucans and *Candida albicans*.
第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2008 年 9 月, 兵庫
- (7) 池田 太, 安達 禎之, 大野 尚仁
Candida albicans 細胞壁組成と dectin-1 介在性免疫応答の関連性に関する研究
第 52 回日本医真菌学会総会, 2008 年 9 月, 長崎
- (8) 安達 禎之, 石橋 健一, 三浦 典子, 大野 尚仁
ラット dectin-1 の cDNA 配列と β -グルカン受容体機能の解析
第 52 回日本医真菌学会総会, 2008 年 9 月, 長崎
- (9) 吉川 雅志, 飛田 敏江, 石橋 健一, 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁
Soluble β グルカンと particle β グルカンの生物活性の比較
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年 12 月, 京都

- (10) 青木厚介，安達禎之，山口敦子，石橋健一，三浦典子，新槇幸彦，大野尚仁
病原性真菌多糖による皮膚炎増悪作用の解析
日本薬学会第 129 年会，2009 年 3 月，京都
- (11) 山本歩，三浦維子，三浦典子，石橋健一，安達禎之，長尾朋和，別府正敏，
鈴木和男，大野尚仁
固相化免疫グロブリン製剤による PBMC からのサイトカイン産生の解析
日本薬学会第 129 年会，2009 年 3 月，京都

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)

1. 当初の研究目標

関節リウマチ (RA)は、複数の関節に滑膜炎を生じ、骨・軟骨破壊により関節機能が著しく低下する自己免疫疾患である。その主病変となる滑膜は、関節周囲を取り囲む関節包の内側に存在し、通常 1 ないし 2 層の滑膜細胞からなる。しかし、RA では滑膜細胞の異常増殖ならびにマクロファージや T-リンパ球の浸潤・集積により滑膜組織の肥厚と共に組織障害性肉芽組織 (パンヌス)を形成し、これにより骨・軟骨が侵食される。この骨・軟骨破壊に関わる酵素が matrix metalloproteinase (MMP)であり、中でも interstitial collagenase/MMP-1 および stromelysin-1/MMP-3 は RA 病態において中心的役割を担うものと考えられている。両酵素は滑膜細胞において炎症性サイトカインである interleukin-1 β (IL-1 β)や tumor necrosis factor α (TNF α)によりその発現が強力に促進される。MMP-1 は、滑膜細胞および軟骨細胞より産生され、I, II および III 型コラーゲンの分解に関わる酵素であり、RA での産生高進が知られている。MMP-3 は関節液中および血清中の濃度が RA における関節破壊の進行度とよく相関することから、臨床において RA の診断マーカーとしても用いられている。一方、MMP 産生に関わる因子として炎症性サイトカインや増殖因子の他に extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)/CD147 が知られている。EMMPRIN は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜結合型糖タンパク質であり、主にガン細胞に高発現することが知られている。すなわち、ガン細胞上の EMMPRIN は周囲の正常細胞にはたらき、MMP-1, MMP-3 をはじめ種々の MMP 産生を誘導する。さらに、EMMPRIN は vascular endothelial growth factor (VEGF)産生促進を介した血管新生やヒアルロン酸産生促進に基づくガン細胞の増殖、薬剤耐性獲得等にも関わる。このような作用に基づき EMMPRIN はガン細胞の増殖や浸潤・転移能に深く関わるものと考えられており、事実 EMMPRIN 発現量とガンの悪性度は正の相関を示すことが知られている。さらに EMMPRIN は proMMP-1 と特異的に結合し、細胞膜上における proMMP-1 捕捉分子として機能することが知られている。

一方、EMMPRIN は RA 患者の滑膜においても高発現していることが報告がされており、前述の EMMPRIN の機能を考慮すると EMMPRIN はガンのみならず RA 病態にも深く関わっていることが推察される。しかしながら、RA における EMMPRIN の機能的役割については不明である。本年度は、ヒト滑膜細胞における EMMPRIN の機能を明らかにするために、siRNA 法により EMMPRIN をノックダウンしたヒト滑膜細胞および抗 EMMPRIN 抗体による膜上 EMMPRIN の機能阻害モデルを駆使して、当該分子の MMP 産生におよぼす影響を検討する。また、細胞周囲の細胞外マトリックス破壊促進に寄与する膜上での EMMPRIN-proMMP-1 複合体形成の可能性についてもヒト滑膜細胞において検討する。

2. 研究成果の概要

(1) ヒト滑膜細胞における EMMPRIN の発現とその発現調節

初めに滑膜細胞における EMMPRIN の発現を正常滑膜細胞, 変形性関節症 (OA)患者由来滑膜細胞 (OA 滑膜細胞), リウマチ(RA)患者由来滑膜細胞 (RA 滑膜細胞)において検討した. 滑膜細胞において EMMPRIN は細胞表層に局在していることが免疫染色法により明らかとなった(Fig. 1A). また, 回収した細胞溶解液を用いて各細胞における EMMPRIN 発現量を Western blot 法により比較検討したところ, 正常滑膜細胞および OA 滑膜細胞と比べて RA 滑膜細胞では EMMPRIN 発現が約 2 倍高いことが判明した.

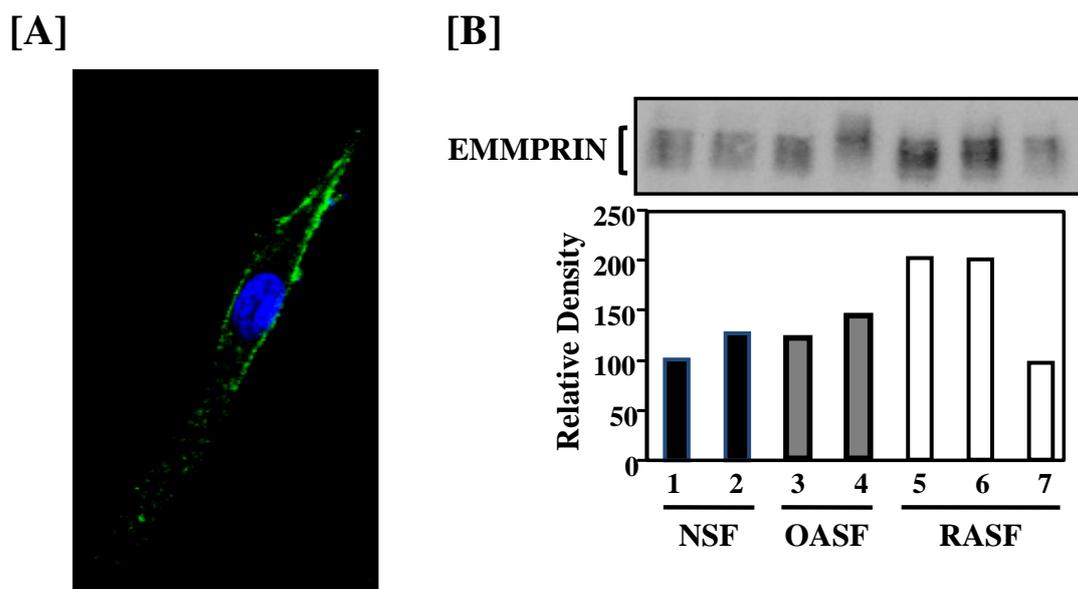


Fig. 1 Expression of EMMPRIN in synovial fibroblasts derived from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis

[A]: Immunostaining for EMMPRIN. Human synovial fibroblasts derived from rheumatoid arthritis were cultured in Lab-Tek chamber slides, and fixed with 4%(w/v) paraformaldehyde/PBS (-), and then subjected to immunostaining for EMMPRIN (green) using mouse FITC-conjugated anti-(human CD147) monoclonal antibody. [B]: Western blot analysis for the production of EMMPRIN in human synovial fibroblasts derived from normal (NSF), osteoarthritis (OASF), and RA (RASF).

(2) ヒト滑膜細胞における EMMPRIN 発現の炎症性サイトカインによる調節

RA 滑膜細胞において EMMPRIN の高発現が見られたことからその発現促進因子を同定すべく, RA 病態において中心的役割を担う炎症性サイトカインの IL-1 β , TNF α および IL-6 の EMMPRIN 発現に及ぼす影響を検討した. その結果, いずれのサイトカインも EMMPRIN mRNA 発現ならびにタンパク質産生への影響は見られなかった. しかしながら, IL-1 β 処理により RA 滑膜細胞膜上における EMMPRIN 蓄積量の増加が認められた. すなわち, IL-1 β は EMMPRIN 産生に影響しないものの, 膜上でのその局在性を変化させることが示唆された.

(3) RA 滑膜細胞における炎症性サイトカインの MMP 産生促進に対する EMMPRIN ノックダウンの効果

RA 滑膜細胞における EMMPRIN の MMP 産生に対する役割を検討するため、EMMPRIN 特異的 siRNA の導入効果を検討した。なお、siRNA の効率的導入法を確立するために薬物送達学教室と連携を取り、患者由来細胞に最適な導入試薬の選定、siRNA 濃度および導入時間を決定した。その結果、未処理群に対し EMMPRIN siRNA 処理群において約 8 割の EMMPRIN mRNA 発現抑制が確認され、同時にそのタンパク質量の減少も認められた。次に EMMPRIN ノックダウン RA 滑膜細胞において TNF α (10 ng/ml)による MMP 産生について検討したところ、TNF α による proMMPs-1 および-3 産生促進作用が EMMPRIN ノックダウンにより抑制された(Fig. 2)。しかし、progelatinase A/proMMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 および IL-1 β 産生に対して EMMPRIN siRNA は影響を及ぼさなかった。同様の結果は、IL-1 β

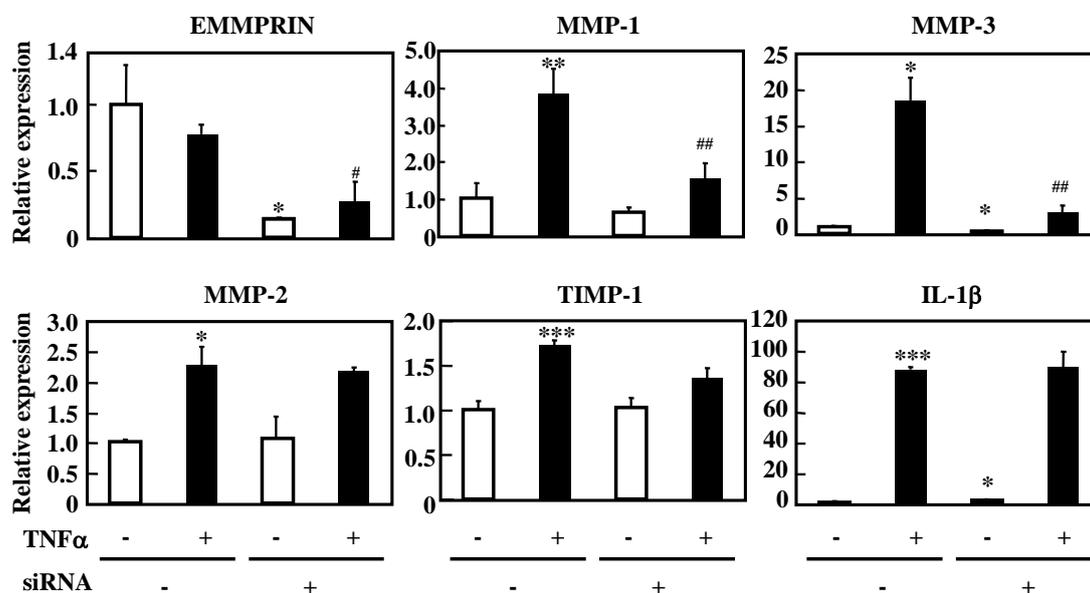


Fig. 2 Effects of EMMPRIN knockdown on TNF α -mediated MMPs-1, -2, and -3, TIMP-1, and IL-1 β mRNA expression in synovial fibroblasts derived from RA

Cells transfected with or without EMMPRIN siRNA-1 were treated with TNF α (10 ng/ml) for 72 h, and total RNA was subjected to real-time RT-PCR for MMPs-1, -2, and -3, TIMP-1 and IL-1 β mRNA expression. Data are the mean \pm S.D. of triplicate wells. *, **, and ***, significantly different from untreated control cells ($p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively). # and ##, significantly different from the cells treated with TNF α alone ($p < 0.05$ and 0.01, respectively).

(10 ng/ml)処理においても観察された。さらに、抗 EMMPRIN 抗体を用いた中和実験においても、IL-1 β による proMMP-3 産生促進作用は特異的に抑制された。すなわち、EMMPRIN はこれら炎症性サイトカインによる proMMPs-1 および-3 産生促進を特異的に増強する機能を担う分子であることが初めて明らかとなった。一方、正常滑膜細胞では、

RA 滑膜細胞において見られたような IL-1 β の proMMPs-1 および-3 産生促進に対する EMMPRIN ノックダウンの抑制作用は観察されなかった (Fig. 3). このことから, 炎症性サイトカインによる proMMPs-1 および-3 産生促進における EMMPRIN の介在は RA 滑膜細胞に特異的であることが示唆された.

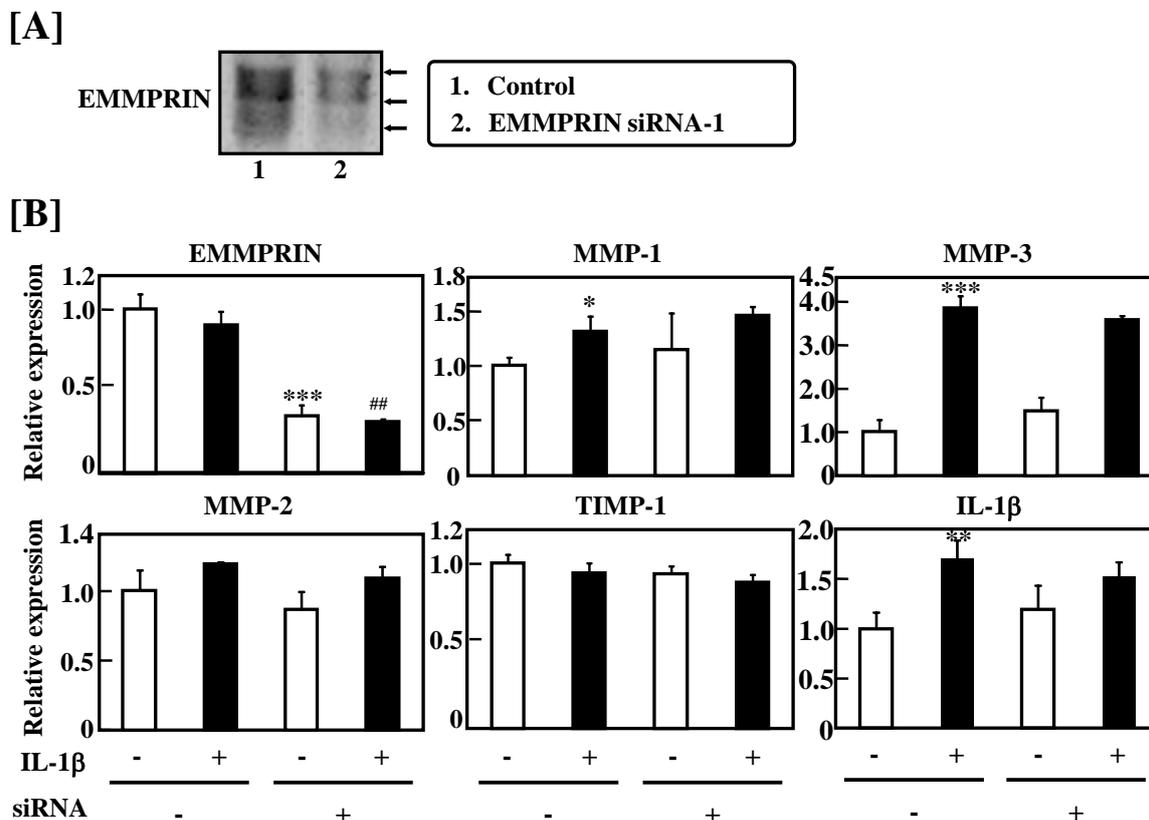


Fig. 3 Effects of EMMPRIN knockdown on IL-1 β -mediated EMMPRIN, MMPs-1, -2, and -3, TIMP-1, and IL-1 β mRNA expression in normal synovial fibroblasts

[A]: Western blot analysis for EMMPRIN. Cells were transfected with EMMPRIN siRNA-1 (lane 2) for 72 h, and then cell lysates were subjected to Western blot analysis for EMMPRIN. Control cells were treated with transfection reagent alone (lane 1). [B], Real-time RT-PCR analysis for EMMPRIN, MMPs-1, -2, and -3, TIMP-1, and IL-1 β mRNA expression. Cells transfected with or without EMMPRIN siRNA-1 were treated with or without IL-1 β (10 ng/ml) for 72 h, and total RNA was subjected to real-time RT-PCR for EMMPRIN, MMPs-1, -2, and -3, TIMP-1, and IL-1 β mRNA expression. Data are the mean \pm S.D. of triplicate wells. *, **, and ***, significantly different from untreated control cells ($p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively). ##, significantly different from the cells treated with IL-1 β alone ($p < 0.01$).

(4) RA 滑膜細胞表層における EMMPRIN を介した proMMP-1 の局在

ガン細胞において EMMPRIN は proMMP-1 捕捉分子として機能し, 細胞膜上への proMMP-1 の局在をもたらすことが報告されている. そこで免疫染色法によりヒト滑膜細胞における proMMP-1 の局在を検討したところ, 細胞表層に EMMPRIN と proMMP-1 の

共局在が観察され、その量は IL-1 β 処理により増加することが判明した(Fig. 4). また、EMMPRIN をノックダウンした RA 滑膜細胞の膜上では EMMPRIN と proMMP-1 の共局在シグナルが消失した. すなわち EMMPRIN は RA 病態において proMMPs-1 および-3 産生のみならず、滑膜細胞表層への proMMP-1 局在にも関与することが示唆された.

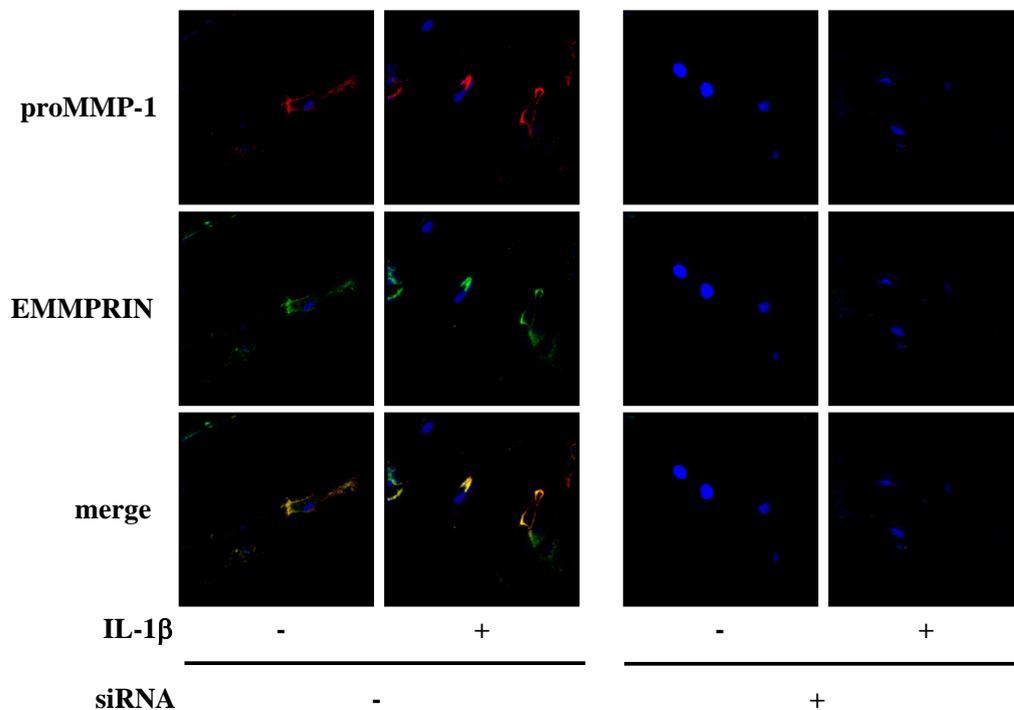


Fig. 4 ProMMP-1 was co-localized with EMMPRIN on the cell surface of synovial fibroblasts derived from RA

Synovial fibroblasts derived from RA transfected with or without EMMPRIN siRNA were treated with or without IL-1 β (10 ng/ml) for 24 h, and then fixed with 4% paraformaldehyde/PBS (-). Cells were subjected to immunostaining for EMMPRIN (green) using FITC-conjugated mouse anti-(human CD147) monoclonal antibody, and MMP-1 (red) using rabbit anti-(human MMP-1) antiserum. Nuclei (blue) were stained with DAPI.

3. 研究評価及び今後の研究計画

本研究により、ヒト滑膜細胞において EMMPRIN が炎症性サイトカインの proMMPs-1 および-3 産生促進作用を特異的に増強する因子として働き、関節破壊を惹起すること、その機能が滑膜細胞に特異的であることが初めて明らかとなった. また、炎症性サイトカインは EMMPRIN の産生量自体には影響を与えないが、細胞膜上の EMMPRIN 量を増加させること、さらに EMMPRIN が proMMP-1 を滑膜細胞表層に捕捉することに加え、EMMPRIN ノックダウン細胞では効果的に細胞表層の proMMP-1 が消失することが判明した. 従来より IL-1 β および TNF α は proMMPs-1 および-3 産生の強力な促進因子として知られているが、本研究結果はその産生調節メカニズムに EMMPRIN が介在するといっ

た新たな概念を提唱するものであり、EMMPRIN を分子標的とする新規リウマチ治療法の提案に繋がるものと期待される。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、ガン細胞の浸潤・転移における細胞膜上での EMMPRIN 機能発現の分子機構を明らかにするために、本年度に開発した内因性 EMMPRIN をノックダウンする siRNA を駆使して、EMMPRIN と相互作用する機能分子とそれに関わる EMMPRIN の活性部位、また EMMPRIN 依存的 MMP 産生およびガン細胞移動活性調節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) Imada, K., Lin, N., Liu, C., Lu, A, Chen, W., Yano, M., Sato, T., and Ito, A.
Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and production of aggrecanases-1 and -2 in collagen-induced arthritic mice.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 373(2), 181-185 (2008)
- (2) Kizaki, K., Ushizawa, K., Takahashi, T., Yamada, O, Todoroki, J., Sato, T., Ito, A., and Hashizume, K.
Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium
Reprod. Biol. Endocrinol., 6, 66 (2008)

総説・著書等

- (1) 今田啓介, 佐藤 隆, 伊東 晃
ノビレチンの関節保護作用
果樹試験研究推進協議会会報 8, 7-9, (2008)

国際学会発表

- (1) Imada, K., Sato, T., Visse, R., Nagase, H., and Ito, A.
Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)/CD147-mediated localization of interstitial collagenase/MMP-1 on the tumor cell surface is a crucial step for tumor invasion and metastasis
The 9th International Congress on Cell Biology, 2008/10, Seoul, Korea
- (2) Sawada, S., Imada, K., Sato, T., Yamamoto, K., and Ito, A.
Pathophysiological roles of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)/CD147 in rheumatoid arthritis
The 9th International Congress on Cell Biology, 2008/10, Seoul, Korea
- (3) Ito, A., Sato, T., Visse, R., Nagase, H., and Imada, K.
Binding of interstitial procollagenase to EMMPRIN on tumor cell surface is crucial for MMP-1 to promote cellular invasion and metastasis
Cancer Degradome Symposium, 2008/10, London, UK

国内学会発表

- (1) 佐藤 隆, 今田啓介, 伊東 晃
ガン細胞の浸潤・転移促進に寄与する EMMPRIN/basigin の機能部位
第 40 回日本結合組織学会学術大会・第 55 回日本マトリックス研究会大会合同学術集会, 2008/5, 東京
- (2) 今田啓介, 佐藤 隆, 伊東 晃
コンドロイチン硫酸の関節保護作用機構
第 40 回日本結合組織学会学術大会・第 55 回日本マトリックス研究会大会合同学術集会, 2008/5, 東京
- (3) 澤田賢志, 今田啓介, 佐藤 隆, 伊東 晃
関節リウマチにおける滑膜 EMMPRIN の関節破壊への関与
第 40 回日本結合組織学会学術大会・第 55 回日本マトリックス研究会大会合同学術集会, 2008/5, 東京
- (4) 塩野智康, 今田啓介, 佐藤 隆, Visse, R., Nagase, H., 伊東 晃
EMMPRIN を介して細胞表層に局在する間質プロコラゲナーゼ/proMMP-1 の活性化とガン細胞浸潤能の促進
第 40 回日本結合組織学会学術大会・第 55 回日本マトリックス研究会大会合同学術集会, 2008/5, 東京
- (5) 澤田賢志, 今田啓介, 佐藤 隆, 山本謙吾, 伊東 晃
ヒアルロン酸の新たな作用メカニズム: EMMPRIN/CD147 発現抑制に基づく抗リウマチ作用
第 13 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2008/8, 大阪
- (6) 今田啓介, 佐藤 隆, Visse, R., Nagase, H., 伊東 晃
間質コラゲナーゼ/MMP-1 ヒンジ領域ペプチドによるガン浸潤転移制御
第 13 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2008/8, 大阪
- (7) Birendra, M., 木崎景一郎, 牛澤浩一, 高橋 透, 佐藤 隆, 伊東 晃, 橋爪一善
Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and its related extracellular matrix degradation enzymes in the bovine endometrium during estrous cycle
第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008/9, 宮崎
- (8) 石井美和, 佐藤隆, 伊東 晃
ガン転移促進因子 EMMPRIN のラフト依存的遺伝子発現調節
第 52 回日本薬学会関東支部大会, 2008/10, 千葉
- (9) 塩野智康, 今田啓介, 佐藤 隆, Visse, R., Nagase, H., 伊東 晃
ガン細胞表層における間質プロコラゲナーゼ/proMMP-1 の活性化と浸潤促進
ファーマ・バイオフィォラム 2008, 2008/11, 東京
- (10) 澤田賢志, 今田啓介, 佐藤 隆, 山本謙吾, 伊東 晃
ヒト滑膜細胞における extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) の機能解析

ファーマ・バイオフォーラム 2008, 2008/11, 東京

- (11) 石井美和, 佐藤隆, 今田啓介, 伊東 晃

ガン転移促進因子 EMMPRIN の発現および分泌調節機構

ファーマ・バイオフォーラム 2008, 2008/11, 東京

- (12) 今田啓介, 澤田賢志, 佐藤 隆, 新楨幸彦, 小坂泰一, 山本謙吾, 伊東 晃

関節リウマチにおけるガン転移促進因子 **Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN/CD147)** の関節破壊に対する役割

日本薬学会第 129 年会, 2009/3, 京都

- (13) 橋本 圭, 佐藤 隆, 今田啓介, 野水基義, 伊東 晃

ガン転移促進因子 EMMPRIN/CD147 の新機能：細胞膜上での Syndecan-1 との複合体形成によるガン細胞移動活性の制御

日本薬学会第 129 年会, 2009/3, 京都

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 17β -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にしている。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 19 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 UGT 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。そのため、TAM *N*⁺-glucuronide の生成は TAM 耐性化の一要因となりうる可能性が示されたが、現在までにヒト生体内において TAM *N*⁺-glucuronide が生成するかについては明らかになっていない。

そこで、平成 20 年度は TAM 服用患者の血漿および尿中の TAM および 4-OH-TAM の

両幾何異性体の N^+ -glucuronide の同定ならびに定量を第一の目的とした。また、上述したように TAM 代謝物には幾何異性体が存在し、それぞれの生理活性が異なる。そこで、TAM 服用患者より TAM の代謝物を幾何異性体別に分離および定量することを第二の目的とした。

2. 研究成果の概要

1) TAM 服用乳癌患者の生体試料からの TAM N^+ -glucuronide および 4-OH-TAM N^+ -glucuronide の同定と定量

乳癌除去手術後、再発防止の目的で TAM を服用している乳癌患者 20 名の血漿および尿試料について固相抽出後 HPLC-ESI-MS/MS 分析を行った結果、TAM N^+ -glucuronide および *trans*-4-OH-TAM

N^+ -glucuronide の存在がそれぞれの合成標品と同定することで証明された (Fig. 1)。なお、*cis*-4-OH-TAM N^+ -glucuronide は血漿および尿中において検出限界以下であった。

TAM N^+ -glucuronide および *trans*-4-OH-TAM N^+ -glucuronide のそれぞれの平均血漿中濃度は 0.07 nM、1.54 nM であった。また、平均尿中濃度はそれぞれ、0.63 nM、4.62 nM であった。以上より TAM および *trans*-4-OH-TAM の N^+ -glucuronide がヒト生体内で生成していることが初めて明らかになった。

2) TAM 服用乳癌患者の生体試料における TAM の各種酸化的代謝物とそれらの glucuronide の定量

TAM 服用乳癌患者の血漿および尿中より TAM の酸化的代謝物およびその抱合体を幾何異性体別に分離・定量した。その結果、血漿中代謝物としては NDM の濃度が圧倒的に高く、他の各種代謝物は *trans*-および *cis*-体の 4-OH-TAM、4-OH-NDM、4-OH-TAM *O*-glucuronide、4-OH-TAM N^+ -glucuronide、そして TAM N^+ -glucuronide が検出された。それぞれの幾何異性体別濃度では *trans/cis* 比としていずれも約 5~10 であり、*trans* 体優位であった。尿中においてもそれぞれの代謝物が検出・同定され、同様に *trans* 体が優位に排泄されていた (Fig. 2)。しかしながら血漿とは異なり、尿中では TAM や NDM に比べて 4-位の水酸化体ならびにそのグルクロン酸抱合体濃度が同等かそれ以上の濃度であった。なお、

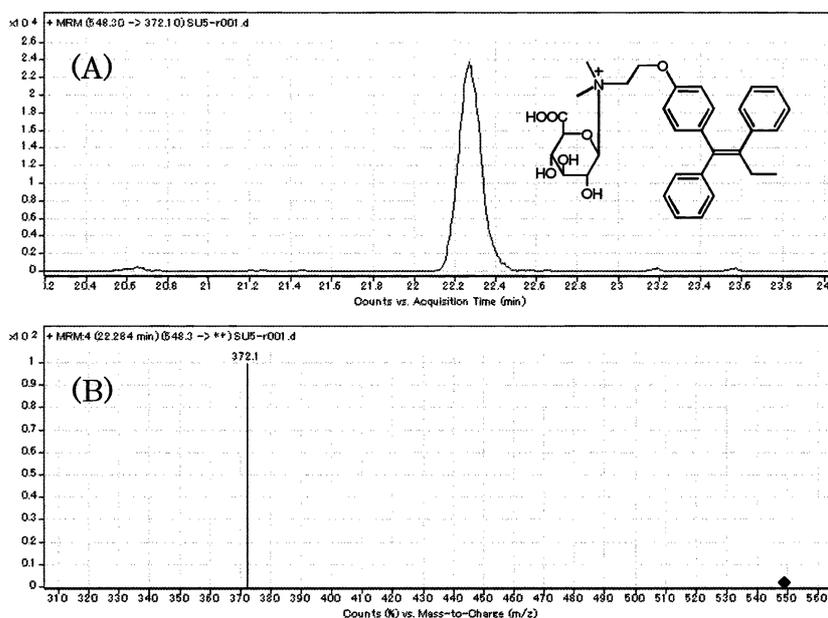


Fig. 1. Identification of TAM N^+ -glucuronide in urine extracts from patients taking TAM

A representative MRM chromatogram of TAM N^+ -glucuronide (A) and its MS/MS spectrum (B) in the urine sample from patient No. 5. HPLC was performed with an HPLC system using a reverse partition column (ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 x 150 mm, 3.5 μ , Agilent). The elution was performed at a flow rate of 0.4 ml/min with 50 mM AcONH₄ (pH 5.0):MeOH (50:50 (0-10 min)-30:70 (20 min)-10:90 (25 min)).

試料提供者に転移再発例が一例含まれていたが、興味深いことに血漿中の4-OH-TAM および4-OH-NDMの *trans/cis* の比が非再発患者に比べて2倍以上の値を示した。現在のところ、その理由は不明であるが、TAMの幾何異性体の存在比の違いが予後予測因子の一つとなる可能性も示唆された。以上により、ヒト生体内における TAM 代謝物が幾何異性体別に初めて定量された (Fig. 3)。

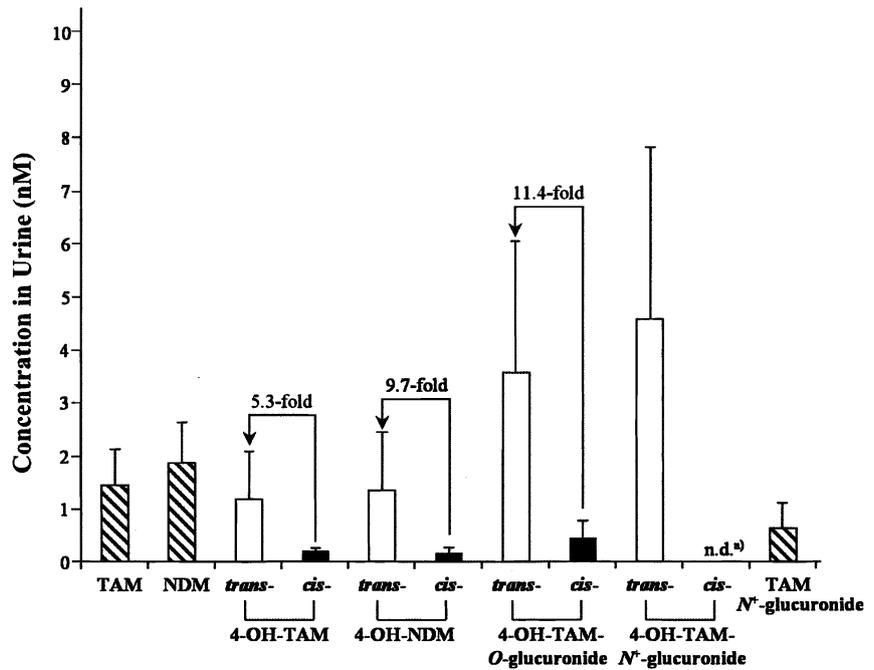


Fig. 2. Mean Concentration of TAM and Its Metabolites in Urine from Patients Administered TAM
n.d.^{a)}, not detectable (less than < 0.01 nM)

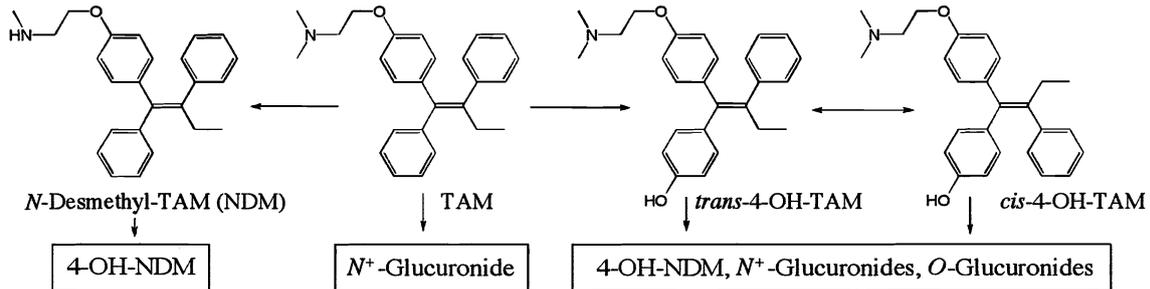


Fig. 3. Proposed Metabolic Pathways of TAM in Human

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、TAM を投与されているヒト尿中および血漿中において TAM の N^+ -グルクロン酸抱合体が実際に生成しているか否かを検討した。さらに、ヒト生体内での TAM の酸化的代謝物およびその抱合体を幾何異性体別に定量し、それぞれの存在量を明らかにした。緒言でも述べたように TAM の酸化的代謝物には幾何異性体が存在し、それぞれの生理活性が異なる。本研究によりヒト生体内では幾何異性体の生じる代謝物は全て *trans*-体優位であることが明らかになった。本研究において、癌再発患者の血漿 4-OH-TAM および 4-OH-NDM のそれぞれの *trans/cis*-比が高いことより、TAM の幾何異性体の存在量比の違いが癌再発と何らかの関連性を持つ可能性も示唆された。

b) 今後の研究計画

乳癌組織中の TAM の酸化的代謝物を幾何異性体ごとに定量することは TAM の薬理効果

の予測因子となりうる可能性も考えられ、再発および TAM 耐性患者を試料供与者とした検討が必要である。本年度研究において、TAM の N^+ -グルクロン酸抱合体が実際の代謝物として存在することが明らかになったので、今後は MCF-7-UGT1A4 細胞における TAM 抱合体排泄機構について検討を行い耐性化との関連性を明らかにする予定である。

4. 研究成果の公表

a) 学術論文発表

- (1) K. Hosoda, Y. Furuta, A. Yokokawa, K. Ogura, A. Hiratsuka, Ishii K, Plasma profiling of intact isoflavone metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometric identification of flavone glycosides daidzin and genistin in human plasma after administration of kinako. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1485-1495 (2008).

b) 学会発表

- (1) 小倉健一郎、高橋健中、大沼友和、西山貴仁、井本 滋、平塚 明
乳癌治療薬 tamoxifen 服用患者からの新規代謝物の同定
日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月、京都
- (2) 田野中浩一、丸ノ内 徹郎、椿原裕太郎、高木教夫、西山貴仁、小倉健一郎、平塚 明
心筋梗塞不全心でのグルタチオン S-トランスフェラーゼの変化
日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月、京都

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

新槇 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 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。

そこで平成 20 年度計画では、AG73 ペプチド修飾リポソームを利用した細胞内への遺伝子導入能の増強を目的とし、超音波エネルギー併用による遺伝子導入促進効果の有無を調べ、最終的に 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としての有用性を検証する。

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と超音波照射併用による遺伝子導入

(1) 超音波併用効果による遺伝子導入効果の増強

Syndecan-2 を高発現した 293T 細胞と血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて、超音波照射 (2 MHz, 1.0 W/cm²) と超音波造影ガス封入リポソームを併用した際の AG73 修飾リポソームの遺伝子発現効率への影響について検討を行った。その結果、AG73 修飾リポソーム

ムで処理した細胞に超音波エネルギーを併用した群では、AG73 修飾リポソーム単独で処理した群と比較し、約 100 倍の高いルシフェラーゼ活性を示した。

(2) 超音波照射強度の影響

次に AG73 修飾リポソームと超音波造影ガス封入リポソーム及び超音波を併用した際の遺伝子導入効率に及ぼす超音波照射強度 ($0.1-1.0 \text{ W/cm}^2$) の影響について検討した。その結果、超音波照射強度 1.0 W/cm^2 において高い遺伝子発現が確認された。また、 1.0 W/cm^2 以上の超音波照射強度において顕著な遺伝子導入効率の差は確認されなかった。

(3) AG73 修飾リポソームに及ぼす超音波造影ガス封入リポソームと超音波併用効果

超音波造影ガス封入リポソームと超音波併用により AG73 修飾リポソームの遺伝子導入効率を増強することが示唆されたので、ペプチド未修飾リポソームにより処理した細胞と比較検討を加えた。その結果、ペプチド未修飾リポソームで処理した細胞に、さらに超音波造影ガス封入リポソームと超音波を併用した群においても、ペプチド未修飾リポソーム単独で処理した群と比較し、約 100 倍の高いルシフェラーゼ活性を示した。また AG73 修飾リポソームで処理後、超音波造影ガス封入リポソームと超音波を併用した群では、ペプチド未修飾リポソームで処理後、超音波造影ガス封入リポソームと超音波を併用した群と比較し、約 50 倍の高いルシフェラーゼ活性を示した。また、いずれの処理群においても顕著な細胞障害性は確認されなかった。

2) 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

超音波造影ガス封入リポソームと超音波照射併用により AG73 修飾リポソームの遺伝子導入効果を増強することを明らかとした。しかしながら、その遺伝子発現促進機構の詳細は不明であり、機構の解明は有用な遺伝子ベクター開発に必要である。一方で、超音波造影ガス封入リポソームと超音波照射併用による遺伝子導入機構はキャビテーションの誘導により生じるマイクロジェット流を駆動力とした物理的作用が重要であると考えられている。そこで、超音波造影ガス封入リポソームと超音波照射併用による AG73 修飾リポソームの遺伝子導入効果増強機構の解明を共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。

まず、蛍光ラベルした AG73 修飾リポソームの細胞内取り込みへのエンドサイトーシスの関与について検討したところ、 4°C 条件下では細胞内へのリポソームの取り込みが減少し、AG73 修飾リポソームはエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれることが確認された。また、 4°C 条件下では、超音波造影ガス封入リポソームと超音波照射併用による AG73 修飾リポソームの遺伝子導入効率の増強が認められなかったことから、AG73 修飾リポソームと超音波造影ガス封入リポソーム及び超音波照射併用による遺伝子導入にエンドサイトーシスが重要な役割を果たしていることが示唆された。

クロロキンは弱塩基性であり、エンドソーム内の酸性化を抑制することでエンドソームを破壊し、リソソームへの移行を回避して細胞質への脱出を助ける作用を有することが知られている。そのためエンドサイトーシスが主な取り込み経路である導入法の場合、クロロキンの存在下での導入時には遺伝子発現が上昇することが報告されている。AG73 修飾リポソームによる遺伝子導入では、クロロキン存在下において遺伝子発現の上昇が確認さ

れたが、AG73 修飾リポソームと超音波造影ガス封入リポソーム及び超音波照射併用による遺伝子導入では、クロロキンの存在による遺伝子発現への顕著な影響は認められなかった。このことから、超音波造影ガス封入リポソームと超音波照射の併用は細胞内へ取り込まれている AG73 修飾リポソームに影響を与え遺伝子発現を促進していることが明らかとなった。

3) 循環器疾患モデル（下肢虚血マウス）における虚血部位への遺伝子導入

正常マウスまたは、作製した下肢虚血マウスに対し、ルシフェラーゼまたは、bFGF(血管新生関連遺伝子)をコードしたプラスミド DNA 投与し、超音波造影ガス封入リポソームと超音波照射の併用による超音波遺伝子導入を試みた。その結果、持続的なルシフェラーゼ発現（2週間）が投与した筋組織において観察された。また、下肢虚血マウスでは、bFGF 発現による血管密度の増加が組織学的解析（CD31 陽性細胞の確認）により明らかとなった。さらにレーザードップラー計により、血流の回復も明らかとなった。これらの結果は、今後の血管新生関連遺伝子を搭載した AG73 修飾リポソームの循環器疾患モデルにおける有用性を検証していく上で重要な基礎的データとなるものと考えられる。

3. 研究評価及び今後の研究計画

AG73 修飾 PEG リポソームによる遺伝子導入は、超音波技術を利用することで、その導入効果を増強することが明らかとなり、超音波造影ガス封入リポソームと超音波照射の併用と超音波照射の併用は細胞内へ取り込まれている AG73 修飾 PEG リポソームに影響を与え遺伝子発現を促進していることが示唆された。今後、超音波技術を融合した本遺伝子導入法は、ガンや循環器疾患の遺伝子治療に有用な一手段となりうると期待される。

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) 修飾リポソームと超音波照射併用による遺伝子導入法の開発」という目標を十分に達成することができた。このことは、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 21 年度計画では、がんや循環器疾患治療を指向した効率的な標的細胞選択的 siRNA 導入システムを構築するために、がん細胞あるいは血管内皮細胞に選択的なラミニン由来ペプチド (AG73, A99 など) で表面修飾したペプチド修飾リポソームによる siRNA 導入法の確立を目的とし、1) siRNA 内封ペプチド修飾リポソームの調製ならびに細胞内導入、2) がんや循環器疾患モデルにおける siRNA 導入について検討していく予定。

4. 研究成果の発表

原著論文

(1) Negishi Y., Endo Y., Fukuyama T., Suzuki R., Takizawa T., Omata D., Maruyama K., Aramaki Y.

Delivery of siRNA into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound.

J. Control. Release., 132(2), 124-130, (2008)

総説・著書等

- (1) Omata, D., Negishi, Y., Endo, Y., Suzuki, R., Suzuki, K., Maruyama, K., Nomizu, M., Aramaki, Y.
AG73-mediated Liposomal Gene Transfection Accelerated by Bubble Liposomes and Ultrasound.
Peptide Science 2008, The Japanese Peptide Society, 73-76, (2009)
- (2) Negishi, Y., Tsunoda, Y., Hamano, N., Endo, Y., Takagi, N., Suzuki, R., Maruyama, K., Batsuren, C., Emoto, M., Nomizu, M., Aramaki, Y.
Ultrasound Imaging and Gene Delivery by AG73-modified Bubble Liposomes.
Peptide Science 2008, The Japanese Peptide Society, 127-130, (2009)

国際学会発表

- (1) Omata, D., Negishi, Y., Endo, Y., Suzuki, R., Suzuki, K., Maruyama, K., Nomizu, M., Aramaki, Y.
Enhancement of AG73-mediated Liposomal Gene Transfection by Bubble Liposomes and Ultrasound.
11th Liposome Research Days Conference, 2008/7, Yokohama, Japan
- (2) Negishi, Y., Endo, Y., Suzuki, R., Maruyama, K., Aramaki, Y.
Delivery of siRNA into the Cytoplasm by Echo-contrast Gas Entrapping Liposomes, “Bubble Liposomes” and Ultrasound in vitro and in vivo
11th Liposome Research Days Conference, 2008/7, Yokohama, Japan
- (3) Matsuo, K., Negishi, Y., Endo, Y., Takagi, N., Suzuki, R., Maruyama, K., Aramaki, Y.
Gene Transfer of bFGF into Skeletal Muscle of Murine Hindlimb Ischemia Model by Echo-contrast Gas Entrapping Liposomes, “Bubble liposomes” and Ultrasound”
11th Liposome Research Days Conference, 2008/7, Yokohama, Japan
- (4) Negishi, Y., Tsunoda, Y., Hamano, N., Endo, Y., Suzuki, R., Maruyama, K., Nomizu, M., Batsuren, C., Emoto, M., Aramaki, Y
Development of AG73-modified Bubble liposomes as a targeted ultrasound imaging gas
The 10th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 2008/12, Tokyo, Japan

国内学会発表

- (1) 松尾慶子、根岸洋一、遠藤葉子、高木教夫、鈴木亮、丸山一雄、新槇幸彦
バブルリポソームと超音波照射を併用した bFGF 遺伝子導入による血管新生療法の試み
日本薬剤学会第 23 年会, 2008 年 5 月, 札幌
- (2) 松尾慶子、根岸洋一、遠藤葉子、高木教夫、鈴木亮、丸山一雄、新槇幸彦
バブルリポソームと超音波照射併用による下肢虚血モデルへの bFGF 遺伝子導入
第 29 回日本炎症・再生医学会, 2008 年 7 月, 東京
- (3) 小俣大樹、根岸洋一、遠藤葉子、鈴木亮、丸山一雄、野水基義、新槇幸彦

バブルリポソームと超音波併用が及ぼすAG73修飾リポソームの遺伝子導入効率への影響について

第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2008年8月, 札幌

- (4) 小俣大樹, 根岸洋一, 遠藤葉子, 鈴木亮, 丸山一雄, 野水基義, 新槇幸彦
AG73 修飾リポソームの遺伝子導入におけるバブルリポソームと超音波の影響
第45回ペプチド討論会, 2008年10月, 東京
- (5) 根岸洋一, 角田由佳, 濱野展人, 遠藤葉子, 高木教夫, 鈴木亮, 丸山一雄,
Chojjamts Batsuren, 江本精, 野水基義, 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
第45回ペプチド討論会, 2008年10月, 東京
- (6) 小俣大樹, 根岸洋一, 遠藤葉子, 鈴木亮, 丸山一雄, 野水基義, 新槇幸彦
AG73 ペプチドを用いた遺伝子導入に及ぼすバブルリポソームと超音波の影響
ファーマ・バイオフィオーラム 2008 第7回, 2008年11月, 東京
- (7) 根岸洋一, 角田由佳, 濱野信人, 遠藤葉子, 鈴木亮, 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の調製とその応用
第7回日本超音波治療研究会, 2008年11月, 東京
- (8) 小俣大樹, 根岸洋一, 遠藤葉子, 鈴木亮, 高木教夫, 丸山一雄, 野水基義, 新槇幸彦
AG73 修飾リポソームの遺伝子導入効率に与えるバブルリポソームと超音波併用の影響
日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都