# 平成 21 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 | 研究統括。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 | 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 の新規機能検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っ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 21 年度は下記の成果をあげた。

1) 別府班は、マクロファージや単球表面のタンパク質ヌクレオリンに、バクテリアのエンドトキシン(菌体内毒素)の成分であるリポポリサッカライド(LPS)が結合すること、そしてこの結合の結果、細胞がTumor Necrosis Factor-α (TNFα)を産生することを見出し、細胞表面ヌクレオリンが炎症性サイトカインの産生に関与していること、そしてこの結合の制御によりサイトカイン産生を調節し得る可能性を示した。

2) 田野中班は、不全心では GST 発現量が変化しているとの昨年度の知見を踏まえてその機序の解析を進めた。その結果、肥大心ではミトコンドリアの酸素消費能が増大するものの、それがエネルギー産生能の上昇に直結しないこと、酸素消費能の増大は電子伝達系複合体 I の活性上昇による可能性があること示した。そして、複合体 I の活性上昇が ROS 産生を増大させ、心肥大促進を招くのではないかと推論した。

3) 大野班は、マウスモデルで血管炎を発症する *Candida* 可溶性多糖画分を、NMR により物理化学的に解析し、また、βグルカン受容体 dectin-1 のリコンビナント体を用いて活性解析した。その結果、大麦βグルカン BBG は酵母βグルカンとは異なり 1,3-β-D-グルカンであることを明らかにした。また、dectin-2 を用いて *Candida* 細胞上の糖鎖構造を解析した。さらに、dectin-1、-2 の siRNA 導入細胞を用いて結果を確認した。

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誘導タンパク EMMPRIN と同一細胞内に存在するタンパク質 cyclophilin B、およびそれらの活性を促進するプロテオグリカン syndecan-1 との相互作用を検討し、EMMPRIN と syndecan-1 は細胞膜で複合体を形成していること、その結合部位は EMMPRIN の EM9 配列であること、cyclophilin B は細胞質に存在することを明らかとした。
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)に対する乳がん細胞の耐性機構の一つとして、がん細胞の多剤耐性と密接な関係にあり、種々のグルクロン酸抱合体を細胞外に排出する細胞膜の薬物トランスポーターによる可能性を検討した。その結果、細胞内 TAM 代謝物の細胞外への排出に ABC トランスポーターや MDR1、MRP1、などのトランスポーターが関与していることが示唆された。
6) 新槇班は、がん細胞や血管内皮細胞などに特徴的な細胞表面分子 syndecan に選択的に結合するリガンドとしてラミニン由来ペプチドを付与し、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、各種疾患治療のための遺伝子医薬の開発に向けた取り組みを継続し、siRNA 内封ペプチド修飾リポソームの調製及び細胞内導入、AG73 修飾 PEG リポソームの標的指向性の解析等を実施した。

まとめ：本研究プロジェクトは平成 21 年度で 4 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、最終年度の次年度では、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、細胞質で見出されたタンパク質ヌクレオリンは、クロマチンの凝縮と脱凝縮、リボソームの生合成に関わり、また、核―細胞質間のシャトルタンパク質として、rRNA の核外輸送等に関わるタンパク質であることが知られている。さらに近年、ヌクレオリンは各種の細胞表面にも存在することが確認され、LDL、ラミニン、ミッドカイン、ラクトフェリン等の生理活性物質の細胞内への取り込みや、parainfluenza virus type 3, HIV, coxsackie B virus 等のウィルスや、Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 等の細菌類に感染する際の動物細胞側のレセプターとして働くことが報告されている多機能タンパク質である。

筆者らは、マクロファージや単球、脳内ミクログリアなどの貪食細胞表面のヌクレオリンが、アポトーシス初期の死につつある細胞を認識し貪食除去するレセプターとして機能していることを見出した。これを契機として、細胞表面のヌクレオリン分子の多様な未知機能を解明し、それらの機能を人為的に制御することによって生活習慣病の治療、とりわけ細胞死やタンパク質変性、情報伝達系の変化等に起因する疾病の治療、さらには予防等に利用できないかと考えている。

これまでの本プロジェクトにおいて、初年度（平成 18 年度）は、マクロファージ細胞表面におけるヌクレオリンの存在様式および結合様式を検討し、ヌクレオリンはその RBD ドメインを介してマクロファージ細胞表面の何らかのタンパク性分子（足場タンパク質）に結合していること、また、細胞表面ヌクレオリンの各ドメインのうち、アポトーシス細胞の認識（結合）に関わる領域は KOKVEGTEPT 配列を含む領域であることを明らかにした。２年目（平成 19 年度）は、ヌクレオリンが細胞質や核内では、DNA や RNA などの陰性荷電を帯びた核酸分子に結合していること、また、マクロファージ細胞表面では、陰性荷電を帯びた初期アポトーシス細胞表面の糖鎖クラスターに結合することから、ヌクレオリンは酸化ストレス等により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認識除去するスカベンジャーレセプター（scavenger receptor: SR）としての機能を有する可能性を考え、検討し、実際、スカベンジャーレセプター活性を有することを見出した。さらに、3 年目の平成 20 年度は、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ことを示し、また、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初期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ことを示した。さらに、3）ミクログリア細胞表面ヌクレオリンは、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βアミロイドタンパク質（Aβ）を結合し貪食除去する機能を有していることを見出した。

4 年目の平成 21 年度は、まず第１に、平成 20 年度の結果を受けてミクログリア細胞表面ヌクレオリンの Aβ除去機能の人為的制御のための調査を行うこととした。

第２に、細胞表面ヌクレオリンがある種の細菌に対する感染レセプターであることから、さらに他の細菌の感染レセプターとなっているかを調査した。

第３に、胃がんのリスクファクターとされるヘリコバクターピロリ菌が胃がんを引き起こす過程

においてヌクレオリンの関与があるか否かを検討した。

２．研究結果の概要

**（１）ミクログリア細胞表面ヌクレオリンによるＡβ除去に関する研究（その 2）**

細胞表面ヌクレオリン分子の機能制御、特に「Ａβ除去機能の増強」を念頭に、ヌクレオリンに対する核酸アプタマーや他の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た。

１）ヌクレオリン核酸アプタマーの影響。

ヌクレオリンに対する核酸アプタマーであるAGRO（別名:AS1411)はミクログリアによるＡβの結合・取り込みを部分的（約25%）に阻害し、ミクログリアによるＡβの結合・取り込みにミクログリア表面のヌクレオリンが部分的に（25%程度）関与していると考えられた。この結合・取り込み阻害率は、抗ヌクレオリン抗体による阻害率よりやや高かった。

２）細胞接着タンパク質（フィブロネクチンなど）の影響。

フィブロネクチンをコートした培養フラスコにミクログリア細胞を生育させ、Ａβ結合・取り込み機能を調べたところ、フィブロネクチンコーティングの影響は認められなかった。

３）$Ca^{2+}$イオノフォアの影響。

$Ca^{2+}$イオノフォアA23187を培養ミクログリアに添加し、Ａβ結合・取り込み機能への影響を見たところ、特に影響は認められなかった。

以上の実験結果により、ヌクレオリンのＡβ結合・取り込み機能には細胞接着や$Ca^{2+}$シグナルは関与していないと考えられた。

また、細胞表面ヌクレオリン分子の機能抑制には、核酸アプタマー AGRO（AS1411）が有用であり、この核酸アプタマーを用いれば、ヌクレオリンが関与する細胞表面での現象（作用）は概ね抑制できると思われた。

**（２）細菌感染におけるヌクレオリンの関与の検討**

先に述べたようにヌクレオリンは、Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 等のいくつかの細菌の感染レセプターとして働いているとの報告があることから、さらに他の細菌感染のレセプターにもなっている可能性があると考え、バクテリアのエンドトキシン（菌体内毒素）として様々な生理作用を有することが知られているグラム陰性菌の細胞壁外膜構成成分であるリポポリサッカライド（LPS）について、1) ヌクレオリンのリガンドとなるものがあるかどうか、リコンビナントのヌクレオリンと各種 LPS の結合実験により調べた。さらに、2)ヌクレオリンとの結合性が認められた LPS について、 LPS と細胞（THP-1 単球）の結合、および LPS による細胞生理作用の発現に、細胞表面のヌクレオリンが関与しているかどうか検討することとした。

１）ヌクレオリンと LPS の結合性の検討

ヌクレオリンに LPS との結合性があるかどうかを調べるために、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、各種の細菌由来 LPS との結合性を Surface Plasmon resonance 法(SPR 法)により検討した。LPS として、*Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enterica (enteritidis), Salmonella enterica (typhimurium), Escherichia coli (O55), Escherichia coli (O111), Serratia marcescens* 由来の LPS を用いた。rNUC284 をセンサーチップに固定化し、上記の LPS との結合性を観察した。その結果、いくつかの細菌由来の LPS と rNUC284 に結合性がみられた。結合性は強い順に、*Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enterica (enteritidis), Escherichia coli (O55), Escherichia coli (O111)*由来の LPS で結合性がみられた。一方、

*Salmonella enterica (typhimurium), Serratia marcescens* 由来の LPS とは結合性がみられなかった。

次に、ヌクレオリンと LPS の結合部位を検討した。まず、ヌクレオリン側の結合部位を検討するために rNUC305 もしくは rNUC446 と *Pseudomonas aeruginosa* 由来の LPS の結合性を SPR 法で検討したところ、rNUC305 では結合性がみられたが、rNUC446 では結合性はみられなかった。この結果より、ヌクレオリンの 284 番目から 446 番目のアミノ酸配列付近に LPS との結合部位がある可能性が推測された。

さらに、LPS 側の結合部位を検討した。LPS は糖鎖構造と脂質構造より構成される。そこで、*Escherichia coli (O55), Escherichia coli (O111)*由来 LPS の糖鎖部位と rNUC284 との結合性を検討した。その結果、SPR 法のプロファイルより、LPS 全体の場合と比較して解離が速い傾向がみられたが、結合性が確認された。一方、lipid A monophosphoryl (*Salmonella enterica serotype minnesota Re mutant* 由来)と rNUC284 にも強い結合性がみられたことから、ヌクレオリンと LPS の結合には LPS の糖鎖部位、脂質部位共に関与していることが示唆された。

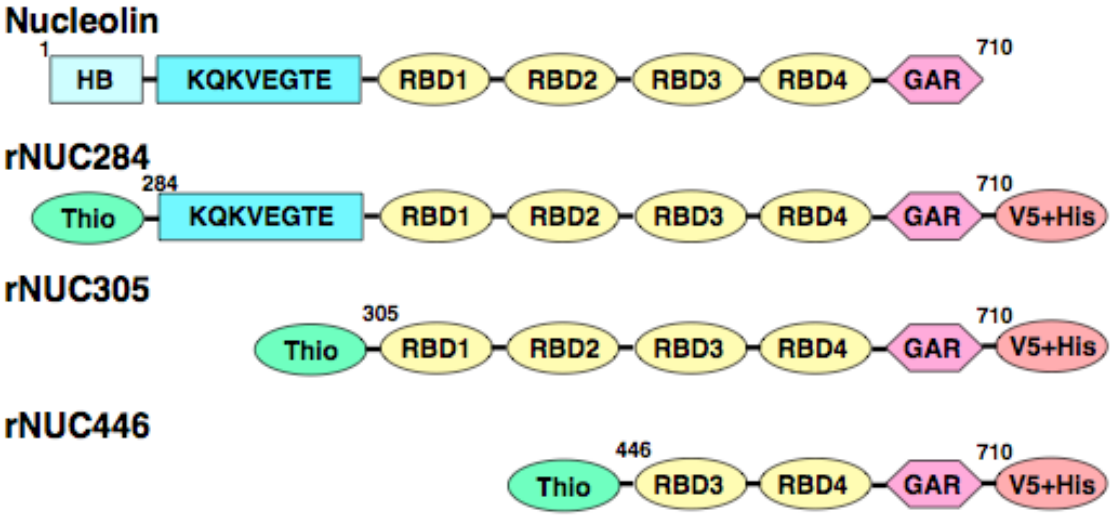


**図１　LPS との結合実験に用いたヌクレオリンの各種リコンビナント体**

２）　LPS と細胞の結合および生理作用発現におけるヌクレオリンの関与

上記の結果より、いくつかの細菌由来 LPS についてヌクレオリンとの結合性が確認されたため、実際に細胞において、LPS がヌクレオリンのリガンドとなっているかどうか検討した。

ヒト単球系の THP-1 細胞、マウス腹腔細胞（常在性マクロファージ）及びチオグリコレートにより誘導したマウス腹腔細胞（TG 誘導性マクロファージ）を用いて、細胞表面ヌクレオリンが細胞と LPS の結合に関与しているかどうか検討した。LPS として、*E. coli (O55)* 由来の LPS を用いた。ヌクレオリンのアプタマーとして知られる AGRO を用いた阻害実験により検討したところ、THP-1 細胞では、AGRO 処理により結合全量の約 14%が阻害された。マクロファージマーカーの一つである CD11b 陽性の常在性マクロファージでも約 35%の阻害がみられ、同じく CD11b 陽性の TG 誘導性マクロファージでは約 33.8%が阻害された。また、ヌクレオリンの全配列 cDNA をトランスフェクトし、細胞表面にヌクレオリンを発現させたヒト胚腎性細胞 HEK293 細胞（NUC 発現細胞）では、LPS の結合が約 13%増加し、この増加は AGRO により阻害された。これらの結果から、マクロファージ細胞表面のヌクレオリンは LPS の細胞への結合に関与していると考えら

れた。

LPS は細胞に様々な生理作用を及ぼすことが知られている。その内のひとつである炎症性サイトカイン Tumor Necrosis Factor-α(TNFα)の産生に、ヌクレオリンが関与しているかどうか検討した。まず、THP-1 細胞を用いて、LPS による TNFα の産生を検討した結果、LPS 処理濃度依存的な TNFα の産生が認められた。そこで、anti-rNUC 抗体を用いて阻害実験（THP-1 細胞表面のヌクレオリンのブロック）を行ったところ、anti-rNUC 処理をした細胞では TNFα の産生量が約 53%阻害された。また、LPS 処理による TG 誘導性マクロファージからの TNFα の産生も anti-rNUC 抗体処理により約 22.5%阻害された。これらの結果から、単球・マクロファージ表面のヌクレオリンは LPS による TNFα 産生の細胞表面レセプターとして機能していると考えられた（図 2)。

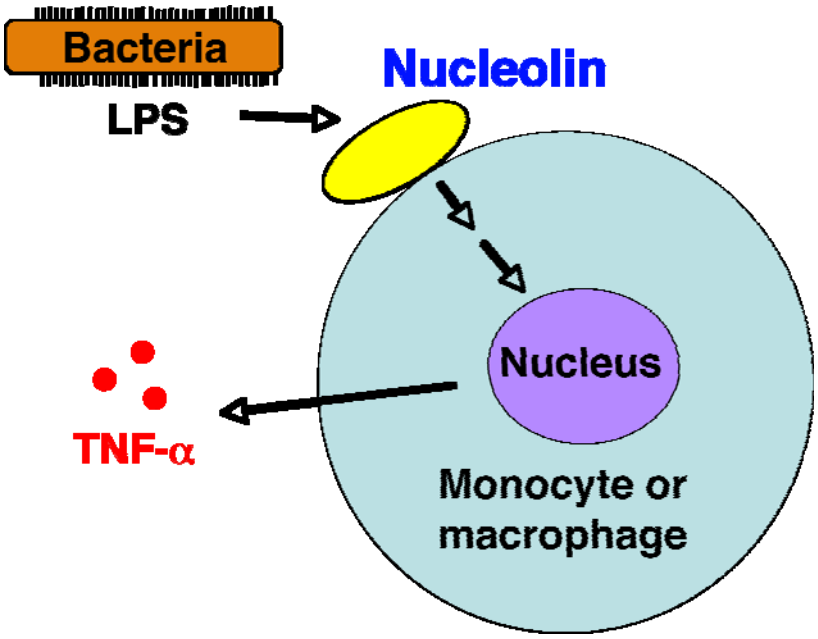


**図２　LPS による TNFα 産生における単球・マクロファージ細胞表面ヌクレオリンの関与**

**（３）ヘリコバクターピロリ菌による胃がん発生に於けるヌクレオリンの関与の検討**

細菌感染の中でも、胃がんの発生に関与しているといわれるヘリコバクターピロリ菌（以下、ピロリ菌）による胃がん発症に於けるヌクレオリンの関与の可能性について検討した。

ピロリ菌はヒトの胃に生息するグラム陰性螺旋桿菌であるが、世界人口の半数以上が感染しており、その感染により胃がん発生リスクは 10 倍高まるといわれている。ピロリ菌による胃がんの発がんプロセスとして、①胃に於けるピロリ菌感染　②ピロリ菌からの発がん促進因子（Tipα：TNFα-inducing protein）の分泌、が重要とされており、これにより胃粘膜細胞で TNFα 遺伝子の発現が誘導され、その結果、胃粘膜細胞のがん化が促進されると考えられていた。しかしながら、発がん促進因子といわれる Tipα がどのようにして TNFα 遺伝子の発現を誘導するのかは不明であった。このメカニズムを明らかにするため、Tipα と相互作用するタンパク質の存在が想定され、種々検討を重ねた結果、ヌクレオリンが Tipα と結合していることが判明した。さらに検討を重ねた結果、Tipα は胃粘膜細胞の表面に存在するヌクレオリンに結合することによって、細胞内に取り込まれ、TNFα 遺伝子の発現を誘導することが示唆された。

本研究により、ヘリコバクターピロリ菌による胃がん発生において、胃粘膜細胞表面のヌクレオ

リンはピロリ菌由来のタンパク質と結合して、胃粘膜細胞のがん化に関わっていることが明らかとなった。

３． 研究評価および今後の研究計画

（１）研究評価

本研究テーマは、多機能性タンパク質として知られていたヌクレオリンの新たな機能を見つけ出し、生活習慣病の治療等への応用を意識した研究を展開することを旨としているが、本プロジェクト初年度の平成 18 年度は「ヌクレオリンの細胞表面での存在様式」という基本的な情報を得るための研究を実施し、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を明らかにした。平成 19 年度は、動脈硬化発症に関連深いマクロファージ表面スカベンジャーレセプターとしてヌクレオリンが働いている可能性について検討し、実際その機能を有していること、動脈硬化等の予防や治療に利用できる可能性があることを示唆した。平成 20 年度には、脳ミクログリア表面のヌクレオリンにＡβ1-42 を除去する機能があることを示し、アルツハイマー病の予防や治療に利用できる可能性を示した。今回、平成 21 年度の検討では、平成 20 年度の検討を継続すると共に、マクロファージや単球表面のヌクレオリンは LPS のレセプターとして機能していることが示され、LPS により引き起こされる敗血症等の予防や治療の分子標的として利用できる可能性が示唆された。さらには、ヘリコバクターピロリ菌による胃がん発生においてヌクレオリンが関与していることが明らかになり、ヌクレオリンの新たな側面が見出された。以上の経過から、ヌクレオリンは各種の生活習慣病の治療や予防の標的分子となり得る可能性が増しており、本研究は概ね当初の狙い通りに順調に進行しているといえる。

（２）今後の研究計画

本研究プロジェクトは、来年度（平成 22 年度）で最終年度を迎えるが、来年度の本研究は、多機能性タンパク質ヌクレオリンの未知のリガンド（結合タンパク質や相互作用するタンパク質）をシステマティックに探索することを目的として、yeast two-hybrid 法によりヌクレオリンと結合するタンパク質を探索することとする。この研究は、当初研究予定にはなかったものであるが、これまでの研究結果を踏まえ、より発展的な取り組みとして計画した。

４． 研究成果の発表

原著論文

(1) Watanabe, T., Hirano, K., Takahashi, A., Yamaguchi, K., Beppu, M., Fujiki, H., and Suganuma, M.
Nucleolin on the cell surface as a new molecular target for gastric cancer treatment
*Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 796-803 (2010)

(2) Watanabe, T., Tsuge, H., Imagawa, T., Kise, D., Hirano, K., Beppu, M., Takahashi, A., Yamaguchi, K., Fujiki, H., and Suganuma, M.
Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor-α inducing protein: a carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*
*J. Cancer Res. Clin. Oncol.,* 136, 911-921 (2010)

国際学会発表

(1) Suganuma, M., Watanabe, T., Kise, D., Tsuge, H., Yamaguchi, K., Takahashi, A.,

Beppu, M., Hirano, K., Fujiki, H.
Nucleolin as a new specific binding protein of Tipα, a carcinogenic factor released from *H. pylori.*
100st Annual Meeting of American Association of Cancer Research
2009/4, Denver, USA

国内学会発表

(1) 三木雄一，小山大雅，菅原　翔，平野和也，別府正敏
細胞表面 nucleolin の lipopolysaccharide に対する結合性及び炎症性サイトカイン産生への関与
第 10 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム，2009 年 6 月，東京

(2) 小池正哲，中村卓史，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 53 回日本薬学会関東支部大会，2009 年 10 月，埼玉

(3) 関　貴之，松本達也，平野和也，三木雄一，別府正敏
ヌクレオリンと結合性を示す生体内タンパク質の探索
第 53 回日本薬学会関東支部大会，2009 年 10 月，埼玉

(4) T. Watanabe, H. Tsuge, K. Hirano, M. Beppu, H. Sumimoto, A. Takahashi, H. Fujiki, and M. Suganuma
Tipα, *H pylori*-carcinogenic factor, enters gastric cancer cells via a new membrane trafficking mechanism with cell surface nucleolin
第 32 回日本分子生物学会年会，2009 年 12 月，横浜

(5) 関　貴之，松本達也，平野和也，三木雄一，別府正敏
多機能性タンパク質ヌクレオリンの新規リガンドの探索及び解析
日本薬学会　第 130 年会，2010 年 3 月，岡山

(6) 小池正哲，中村卓史，平野和也，根岸洋一，新槇幸彦，別府正敏
ミクログリア表面ヌクレオリンによるベータアミロイドの除去
日本薬学会　第 130 年会，2010 年 3 月，岡山

# 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

平成 20 年度の研究成果で、肝臓あるいは腎臓だけでなく心筋組織でも薬物代謝酵素の一種のグルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）が発現していることを示すことができた。加えて、心筋梗塞後不全心では、GST の心筋組織含量およびその細胞内局在が変動する可能性を示した。心不全を発症する過程では、心筋リモデリングと呼ばれる生存心筋の再構築が起こる。この心筋リモデリングの指標の一つに心肥大がある。成熟した（分化した）心筋細胞は、分裂増殖を行わないので、心臓への負荷が増大すると、心筋組織は心筋細胞を肥大させることにより、増大した負荷に打ち勝つための心機能上昇を行う。今までの概念では、肥大した心筋組織は圧負荷の上昇に反応し、単に心筋細胞のサイズ（容積）が拡大した状態と理解されるとの理解であった。

心筋細胞で、ミトコンドリアは心筋細胞容積の約 35% を占めるとされ、心筋細胞の肥大は量的なミトコンドリアの増大を伴うと考えられる。ミトコンドリアはエネルギー産生の中心となるオルガネラである。このエネルギー産生は解糖系/TCA 回路/電子伝達系からなり、いわゆる酸化的リン酸化反応を介して ADP を ATP へと再生産している。このミトコンドリアでの酸化・

還元反応でエネルギーを産生していると言っても過言ではない。ミトコンドリアの酸化・還元反応は、エネルギー産生だけでなく、細胞内の酸化・還元平衡にも関与しており、ミトコンドリアは細胞内環境を制御するオルガネラとして重要な役割を演じている。不全心では、心筋細胞内は酸化的な状態のあると推測されており、この病的な状態へのミトコンドリアの関与を今までの研究で示してきた。しかしながら、リモデリングで重要とされる心筋細胞肥大そのものがミトコンドリアの電子伝達系にどの様な影響を及ぼすのか、つまり心肥大の過程でのミトコンドリアからの酸化的なシグナルの有無およびそのシグナルが電子伝達系のどの部位から発せられるのかについては不明のままである。そこで、平成 21 年度の研究では、リモデリングに重要な役割を演じる心筋肥大がミトコンドリアの機能に与える作用を明らかにし、不全心での GST 変動の機序の解析を進めることとした。

心筋梗塞後心不全では心筋肥大だけでなく、炎症性反応亢進による好中球およびマクロファージの活性化など様々な要因が平衡して進行するため、その解析が難しいものとなる。そこで、本研究では圧負荷による肥大心モデルを用いて、梗塞巣のない単純な心肥大モデルでの解析を行うこととした。実験は Wistar 系雄性ラットの腹部大動脈を狭窄することにより圧負荷肥大心を作成した。この腹部大動脈狭窄により、術後 4 週目以降、心体重比は正常動物のそれの約 140% となり、肥大心が形成された。このときの心収縮期圧は、180 mmHg 以上に上昇しており、腹部大動脈狭窄により誘発された心肥大が心臓の後負荷上昇により誘発されたと考えられた（圧負荷肥大心）。なお、予備実験で、本モデルでは肥大心が形成されるものの、心ポンプ機能は低下することなく、少なくとも術後 6 ヶ月は心機能が正常動物のそれと同様に維持されることを確認しており、単純な心肥大を解析するのに適切な実験系と言える。

圧負荷肥大心での心筋組織中のミトコンドリア酸素消費能を skinned bundle 法を用いて直接評価した。その結果、心筋組織のミトコンドリア酸素消費能は心筋肥大に伴い上昇した。作用させる基質により、電子伝達系を構成する複合体の活性を測定した。つまり、グルタミン酸を基質とすることで電子伝達系複合体 I の活性が、コハク酸により複合体 II が、アスコルビン酸により複合体 III/IV (cytochrome *c* を含む) 活性を測定した。その結果、肥大心筋ミトコンドリアでは複合体 I の活性が上昇する一方で、それ以外の複合体の酸素消費活性は正常心筋ミトコンドリアのそれと同様の値となった。これらの結果から、肥大心筋のミトコンドリア酸素消費能の上昇は、電子伝達系複合体 I の活性上昇に起因することが示された。ミトコンドリア酸素消費能の上昇は、このオルガネラのエネルギー産生能上昇に帰結すると推測し、心筋組織の高エネルギーリン酸含量を測定した。しかしながら、心筋組織の ATP 含量は減少する傾向にあり、ミトコンドリア酸素消費能の上昇が同エネルギー産生能の上昇には関与していないことが示された。ミトコンドリア電子伝達系の活性上昇は、この酵素系の酸化還元能のうち、還元当量（電子）の増大を意味するものである。複合体 I 以外の酵素複合体活性が変化していないので、複合体 I での電子が蓄積され、その増加分がミトコンドリアから漏出、すなわち活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）として細胞質側へ漏出すると仮定した。そこで、肥大心筋ミトコンドリアの ROS 産生能を測定したところ、ROS 産生活性の上昇が認められた。このミトコンドリアから漏出した電子による ROS 産生が細胞内の情報伝達におよぼす効果について検討した。心筋組織では細胞内の酸化・還元状態の影響を受け易い情報伝達系として protein kinase C (PKC) 経路が考えられている。そこで、PKC ファミリーの中で心筋細胞内で様々な生理活性発現に関与することが知られている PKCε について検討した。その結果、ミトコンドリア ROS

産生能上昇に伴い、PKCε がミトコンドリアに集積することを見出した。

3. 研究評価及び今後の研究計画

前年度の研究により、不全心では GST の発現量に変化のあることが示された。そこで、本年度はこの不全心で GST 発現を変動させる要因について解析することを主なテーマとして研究が進められた。上述したように心不全は、心筋梗塞などの基礎疾患から心筋リモデリングと呼ばれる病態生理学的条件下での適応の破綻を経て発症する。この心筋リモデリングの中で心肥大は中心的な役割を演じると考えられている。心不全は様々な条件が重複しており、その中での解析を一度に行うことは技術的に難しいため、単純な肥大心筋を実験モデルとして、その解析を進めることにした。本研究では、この心肥大に圧負荷寝台モデルを採用した。その結果、圧負荷肥大心ではミトコンドリアの酸素消費能が増大するものの、この酸素消費量の増大がエネルギー産生能の上昇に直結しないことを新たに発見した。このミトコンドリア酸素消費能上昇が、電子伝達系のどの様な変化により誘発されたのかを解析したところ、複合体 I の活性上昇に起因する可能性を示すことが出来た。さらに、この複合体 I の活性上昇は、ROS 産生を増大させることを示した。このミトコンドリアの電子伝達系複合体 I からの ROS 産生増大は、細胞内の酸化・還元平衡の変化を介した PKC の細胞内局在を変化させることにより心筋肥大を促進させると考えられた。

PKC は様々な細胞内タンパク質をリン酸化することにより、その機能（酵素活性）を制御している。不全心での変動にリモデリングが進行する過程での心肥大が PKC の細胞内局在を変化させ、GST の不全心での発現とその細胞内局在の変化に寄与する可能性がある。さらに、肥大心筋ミトコンドリアによる細胞内酸化･還元平衡の変動がヌクレオリンの心筋細胞への作用を変化させる可能性も考えられる。そこで、今後の研究では、ミトコンドリアからの電子漏出による細胞内環境の変化が GST あるいはヌクレオリンの機能にどの様な影響を及ぼすか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

Daicho T, Daisho Y, Kojima S, Takano S, Tejima Y, Marunouchi T, Takagi N, Takeo S, Tanonaka K.

Alterations in dystrophin-related glycoproteins in development of right ventricular failure in rats.

J Pharmacol Sci. 2009,111:405-415.

Daicho T, Yagi T, Takano S, Marunouchi T, Abe Y, Ohara M, Takeo S, Tanonaka K.

Alterations in pharmacological action of the right ventricle of monocrotaline- induced pulmonary hypertensive rats.

Biol Pharm Bull. 2009,32:1378-1384.

国内学会発表

阿部洋平、丸ノ内徹郎、高木教夫、平塚 明、田野中浩一

肥大心筋でのミトコンドリア機能の変化

日本薬学会第 130 年会　2010 年 3 月、岡山

# 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

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。CAWSには1,3-β-D-グルカン以外にも、αマンナンが多く含まれることが明らかになり、細胞受容体や免疫細胞の反応性を解析する段階にある。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、２１年度はNMR解析結果から推測された真菌多糖の構造と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（CLR）タンパクやβグルカン認識タンパクの反応性の解析、及びC型レクチン受容体発現細胞及び欠損細胞の多糖反応性の解析を中心に行なうこととした。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型レクチンとβグルカン認識タンパクに焦点を絞り、その結合特異性および受容体機能をタンパク分子あるいは細胞レベルで解析することにした。以下に項目ごとの研究目標を示す。

(1) NMR及び結合タンパクプローブによる真菌細胞壁多糖の構造解析

NMRにより得られた糖鎖構造解析結果とC型レクチンやβグルカン認識タンパクの反応特異性との相関により糖鎖構造解析応用への可能性について検討する。

(2) C型レクチン受容体結合特異性の検討とその応用

多糖受容体に関連したCLR（dectin-1,-2など）の遺伝子クローニングの結果に基づき、可溶型受容体タンパクの作製分取、可溶型受容体タンパクの多糖結合性の解析を経て、病態診断ツールとしての受容体タンパクプローブの可能性を検討する。

(3) C型レクチン受容体発現及び欠損細胞による受容体機能の解析

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（リンパ球系、単球系等）への遺伝子導入により発現細胞あるいは欠損細胞を作製し、炎症性サイトカイン産生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

(1) NMR及び結合タンパクプローブによる真菌細胞壁多糖の構造解析

昨年度までの解析で、*Candida*細胞壁多糖は培養条件の違いによりマンナン組成が異なり、マウスモデルにおいて血管炎を発症する*Candida*可溶性多糖画分（CAWS）はβグルカン部分やαマンナンを含みこれらの多糖成分が発症に重要である可能性が示されている。一方βグルカン構造多様性と発症の関連性は不明である。*Candida*などの酵母真菌由来のβグルカンは、担子菌などのβグルカンと異なる1,6-分岐構造を持ち、βグルカン受容体への結合性にも差がある可能性も示唆されている。そこでβグルカン受容体タンパクプローブを作成し、これまで得られているβグルカンのNMR構造解析と

結合活性との相関性を検討し、各βグルカン構造解析への受容体タンパクプローブの応用を目的とした。構造既知の担子菌βグルカンSPGと酵母βグルカン、及び構造未知の大麦βグルカンBBGを試料に用いた。BBGの構造については、NMRにより解析した。BBGは酵母βグルカンやSPGとは異なり、1,4-β-D-グルコピラノシル結合をも含む1,3-β-D-グルカンであることが明らかとなった。βグルカン受容体タンパクの一つである、dectin-1の可溶性タンパクプローブを作成し、様々な構造のβグルカンとの結合性を比較した。その結果、BBGは真菌βグルカンSPGよりも高い反応性を示した。一方、dectin-1以外のβグルカン受容体タンパクとして無脊椎動物のβグルカン認識タンパクについても発現系を作成し、βグルカン結合性を検討した。鱗翅目3種*Bombyx mori*（Bm）、*Pieris rapae*（Pr）、*Ploidis interpunctella*（Pi）、の幼虫よりRNAを抽出し、RT-PCRよりBGRP cDNAを得た。βグルカン認識タンパク（BGRP）を大腸菌或いは293T細胞を用いて発現させ、様々な構造の1,3-β-D-グルカンへの結合活性をELISAにより測定した。各BGRPの反応性を酵母βグルカン、無分岐1,3-β-D-グルカン、担子菌βグルカンのSPGで比較すると、Bm-BGRP及びPi-BGRPはSPGに結合性が高く、Pr-BGRPは酵母βグルカンに高い反応性を示した。構造解析との結果から、dectin-1、Bm-BGRP、Pr-BGRPタンパクプローブへの反応性を比較することで、簡易的にβグルカン構造の分岐構造を推測できる可能性が示された。

(2) C型レクチン受容体結合特異性の検討とその応用

昨年度、C型レクチン受容体に属するdectin-2が*Candida*細胞に結合する結果が得られた。そこで、dectin-2の*Candida*細胞上のリガンド構造を解析する目的で、様々な培養条件で得られた*Candida albicans*への結合活性を比較した。27℃に比べ、37℃培養で得られた*Candida*菌体へのdectin-2結合性が高いことが明らかとなり、37℃培養でαマンナンの含量が増加することとの関連性が示唆された。そこで、同様にαマンナンからなるCAWSを菌体結合前にdectin-2と混合し、菌体結合性を比較したところCAWS前処置したdectin-2は*Candida*菌体への結合が完全に抑制された。

CAWSのαマンナンは1,2-、 1,3-、或いは1,6-マンノピラノシル結合を含むことが明らかになっている。dectin-2の菌体結合がどのマンナン構造に依存しているかを検討する目的で、exoα-1,2-マンノシダーゼで処理したところ、dectin-2の結合性が著しく低下した。以上より、CAWSのα-1,2-マンノース残基はdectin-2 に親和性を有することが明らかとなった。dectin-2の認識糖鎖構造の解明により、*Candida* αマンナンの検出ツールとしてdectin-2分子を応用できるものと考えられる。

(3) C型レクチン受容体発現及び欠損細胞による受容体機能の解析

*Candida* 菌体や CAWS にはβグルカンやαマンナンが存在し、それぞれ C 型レクチンファミリーに属するdectin-1及びdectin-2がその認識に関係することが示唆されている。しかし、dectin-1 及び dectin-2 は、単球、マクロファージ、樹状細胞などに同時に発現しており、*Candida* 細胞壁糖鎖の認識及び細胞活性化において、各々の dectin 分子がどの様に関わっているか明確ではない。そこで、dectin-1 及び dectin-2 各々に特異的

な siRNA を導入し、発現制御を行った状態で細胞機能を比較することにした。ヒト末梢血単核球(hPBMC)の dectin-1 及び dectin-2 の発現は、GM-CSF 処理で高まり、*Candida* 菌体刺激によって TNFα産生が促進された。hPBMC に予め各 siRNA を導入し、GM-CSF 処理したところ、導入した siRNA に依存して、dectin-1 或いは dectin-2 の発現が有意に低下した。*Candida* 菌による TNFα産生は dectin-1 或いは dectin-2 の siRNA 導入細胞において有意に低下し、dectin-1 と dectin-2 両者の siRNA 導入により更に低下する傾向が認められた。受容体発現及び siRNA 遺伝子導入に関しては別府班及び新槇班の指導のもと得られた成果である。以上より、dectin-2 のみならず dectin-1 も *Candida* 菌体に対する炎症応答において重要な役割を演じていることが明らかとなった。

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）に対する自然免疫系受容体分子の結合活性を明確にし、受容体タンパク分子の結合性による血管炎危険因子の検出への応用を目指して、まずはβグルカン部分に注目した。βグルカン受容体タンパク dectin-1或いは無脊椎動物由来のBGRPの発現系を新たに調製できた。各タンパク分子と分岐構造などが異なるβグルカンとの結合活性をELISA法により比較し、dectin-1や各種BGRPの結合特異性が明らかとなった。*Candida*βグルカンの検出において、dectin-1、Bm-BGRP、及びPr-BGRPを併用することで分岐構造の特定が簡易的に行えることが明らかとなった。既存のβグルカンの検出法では酵母に特有の分岐構造の有無を検出できなかったが、これらの受容体タンパク類の利用により、簡便で特異性の高い検出が可能になった。今後、危険因子としての*Candida*多糖の検出に応用できるか更に検討する。

CAWS の主成分である *Candida* αマンナンに対して、認識受容体が不明であったが、CLR タンパク分子の発現を通じて dectin-2 の関与が明らかとなった。dectin-2 結合糖鎖構造の解析では多様なαマンノピラノシル結合の中でα1,2-残基の重要性が示唆され、CAWS のβマンノース残基の消失と血管炎発症との関連性からも矛盾の無い結果が得られた。dectin-2 の糖鎖結合活性は $Ca^{2+}$依存的であり、α1,2-マンノピラノシル残基のクラスター形成が高いアビディティをもたらす可能性がある。α1,2-マンノースオリゴ糖鎖による予防法開発への進展も期待される。また、昨年度、障壁となっていたリンパ球系、単球系細胞への遺伝子導入に関しても新槇班の協力により解決した。siRNA 導入による標的遺伝子発現のノックダウンが可能になり、ヒト単球において dectin-1 及び dectin-2 の発現制御条件を確立することができた。*C. albicans* 菌体に対する炎症性サイトカイン産生が dectin-1 及び dectin-2 の発現低下に伴い有意に減少したことから、dectin-1 のみならず dectin-2 も *Candida* 菌体認識と炎症応答に関与することが示された。これらの細胞発現制御系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 への反応特性をマウス動物モデルにおいても解析する予定である。

以上、２１年度は真菌誘発性炎症病変解析に応用可能な糖鎖認識受容体分子の獲得および細胞レベルでの受容体発現制御などの解析条件を確立出来た。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検出、細胞の活性制御を通じて発症機序解

析へ展開する予定である。

4. 研究成果の発表

原著論文

(1) Tada, R., Ikeda, F., Aoki, K., Yoshikawa, M., Kato, Y., Adachi, Y., Tanioka, A., Ishibashi, K., Tsubaki, K., Ohno, N.
Barley-derived beta-D-glucan induces immunostimulation via a dectin-1-mediated pathway.
Immunol. Lett., 123(2), 144-148 (2009).

国際学会発表

(1) Miura, N. N., Komai, M., Adachi, Y., Kameoka, Y., Suzuki, K., Ohno N.
Interleukin-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice.
The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05, Tokyo, Japan

(2) Takano, Y., Arai, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Suzuki, K., Ohno, N.
Studies on immunotoxicity of water soluble polysaccharide complex fraction from culture supernatant of *Candida* spp.
The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05, Tokyo, Japan

(3) Takano, Y., Kouchi, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Hanzawa, H., Aizawa, Y., Suzuki, K., Ohno, N.
Interleukin-10 gene transfer inhibits the induction of CAWS vasculitis in mouse.
The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05, Tokyo, Japan

(4) Hirata, N. Ishibashi, K., Hata, S., Usui, T., Yoshioka, J., Adachi, Y., Miura, N. N., Suzuki, K., Ohta, S., Nakazawa, K., Ohno, N.
The model of aortitis-induced heart failure in DBA/2 mice developed by fugal PAMPs, CAWS, water-soluble polymer complex obtained from *Candida albicans*.
The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05, Tokyo, Japan

(5) Ikeda, F., Adachi, Y., Ishibashi, K., Miura, N. N., Saijo, S., Iwakura,Y., Ohno,N.
Dectin-1-mediated innate immune response to *Candida albicans* cultured in various conditions.
The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05, Tokyo, Japan

(6) Aoki, K., Adachi, Y., Hirabayashi, J., Yamaguchi, A., Ishibashi, K., Miura, N. N., Saijo, S., Iwakura, Y., Ohno, N.
Complement receptors modulate macrophage activation in response to particulate Candida ß-glucan.
The 17th Congress of The International Society for Human and Animal

Mycology: ISHAM2009, 2009/05, Tokyo, Japan

(7) Sakuraba, D., Kato, Y., Adachi, Y., Ishibashi, K., Miura, N. N., Ohno, N.
Comparative study of receptor functions of dectin-1 in rat, mouse and human.
The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05, Tokyo, Japan

(8) Adachi, Y., Ikeda, F., Ishibashi, K., Miura, N. N., Saijo, S., Iwakura, Y., Ohno, N.
Recognition of *Candida* cell wall polysaccharides by C-type lectins on macrophages.
15th European Carbohydrate Symposium, 2009/07, Vienna, Austria

(9) Ohno, N., Miura, N. N., Ishibashi, K., Adachi, Y., Hirata, N.
A Murine Model of Coronary Arteritis Induced by Fungal PAMPs, CAWS, for Drug Development.
EDDP2010 Int. Conference on Early Disease Detection and Prevention, 2010/02, Munich, Germany

国内学会発表

(1) 三浦典子，高野雄介，安達禎之，塙　晴雄，相澤義房，鈴木和男，大野尚仁
ＣＡＷＳ血管炎に対するＩＬ－１０遺伝子治療の効果
第 74 回日本インターフェロンサイトカイン学会・学術集会， 2009 年　6 月，　京都

(2) Sakuraba, D. Adachi, Y., Ishibashi, K., Miura, N. N., Ohno, N.
Binding activity of human Dectin-2 to *Candida albicans* is dependent on the *Candida*-culture temperature.
第 39 回日本免疫学会総会・学術集会， 2009 年　12 月，　大阪

(3) Adachi, Y., Ishibashi, K., Miura, N. N., Saijo, S., Iwakura, Y., Ohno, N.
Specificity of C-type lectins on macrophages for recognition of *Candida* cell wall polysaccharides.
第 39 回日本免疫学会総会・学術集会， 2009 年　12 月，　大阪

(4) 安達禎之，石橋健一，三浦典子，安達禎之，大野尚仁
Recognition of *Candida* cell wall polysaccharides by C-type lectins and the role for immune response.
第 83 回日本細菌学会総会， 2010 年　3 月，横浜

(5) 三浦典子，高野雄介，安達禎之，大野尚仁
CAWS 血管炎マウスへの IL－10 遺伝子導入の影響
日本薬学会　130 年会, 2010 年　3 月，岡山

(6) 石井雅樹，安達禎之，石橋健一，三浦典子，大野尚仁
鱗翅目(1→3)-β-D-グルカン結合タンパクの分子クローニングとβグルカン結合性の解析
日本薬学会　130 年会, 2010 年　3 月，岡山

# 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

原発巣より離脱したガン細胞は，ガン転移促進酵素である matrix metalloproteinases (MMPs)の産生促進や細胞移動活性の増強により悪性度および転移能が高進している．また，高転移性の微小ガン細胞において，その転移活性と相関性がもっとも高いガン遺伝子として extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)(別名：CD147，basigin)が同定された．EMMPRIN は細胞外に 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り，MMPs の産生誘導を介した細胞外マトリックス(ECM)の分解促進に起因してガン細胞の浸潤・転移を惹起する．当教室では EMMPRIN ループ I 領域内の EM1 配列(42-57 アミノ酸)が MMP 産生促進に寄与する活性部位であること，またガン細胞から分泌された膜型と同一の分子量をもつ EMMPRIN がガン細胞の移動活性を促進することを明らかにした.一方，EMMPRIN とその結合分子の一つであり細胞膜上に局在する cyclophilin B が T リンパ球の遊走活性促進に寄与すること，両分子によるこの活性発現には細胞膜結合型プロテオグリカンである syndecan-1 のヘパラン硫酸鎖が促進的に関与することが示唆されている．しかしながら，ガン細胞の移動活性調節における膜上での EMMPRIN, cyclophilin B および syndecan-1 の相互作用とその役割については全く不明である．

本年度は,ガン細胞膜上での EMMPRIN 機能発現の分子機構を明らかにするために,EMMPRIN と相互作用する機能分子について cyclophilin B および syndecan-1 に着目しヒト子宮頸部扁平上皮ガン細胞 SKG-II を含む 5 種のガン細胞を用いて検討する.さらに，細胞膜上での複合体形成に関わる EMMPRIN の機能部位についても検討を加える．

## 2. 研究成果の概要

### (1)　SKG-II 細胞における EMMPRIN，cyclophilin B および syndecan-1 の発現

EMMPRIN によるガン細胞移動活性調節を明らかにするために,SKG-II 細胞において EMMPRIN と細胞移動調節に関与する候補分子として cyclophilin B および syndecan-1 の発現を検討した.その結果,SKG-II 細胞において 53 kDa の EMMPRIN が恒常的に発現しており,同様に 24 kDa の cyclophilin B および 89 kDa の syndecan-1 も検出された（Fig. 1）．また，超遠心分離法により細胞画分を調製して 3 者の細胞内局在を検討したところ，EMMPRIN および syndecan-1 は主に細胞膜画分に，cyclophilin B は細胞質画分に存在することが判明した(Fig. 2)．EMMPRIN は T 細胞の膜上において cyclophilin B の結合分子として遊走活性調節に関与することから，SKG-II 細胞の膜上における EMMPRIN と cyclophilin B，さらに EMMPRIN と syndecan-1 との相互作用を検討した．Fig. 3 に示したように，EMMPRIN 抗体(EM6-pAb）による免疫沈降により cyclophilin B は検出されなかったが(パネル A，レ

ーン 2)，syndecan-1 が共沈降することが判明した(パネル B，レーン 2).

これらの結果より，SKG-II 細胞は細胞膜上に EMMPRIN および syndecan-1 を，また細胞質内に cyclophilin B を恒常的に発現していることが判明した．さらに，膜上において EMMPRIN が syndecan-1 と複合体を形成していることが初めて明らかとなった．

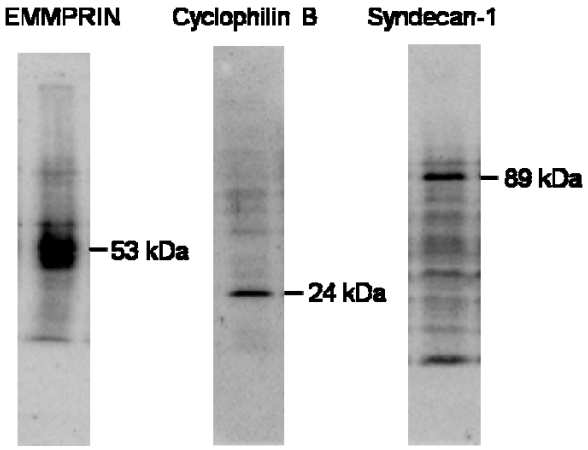


**Fig. 1 Expression of EMMPRIN, cyclophilin B, and syndecan-1 in SKG-II cells**
Preconfluent SKG-II cells were cultured for 24h in 0.2% (w/v) LAH/DMEM, and then harvested cell lysate was subject to Western blotting for EMMPRIN, cyclophilin B, and syndecan-1.

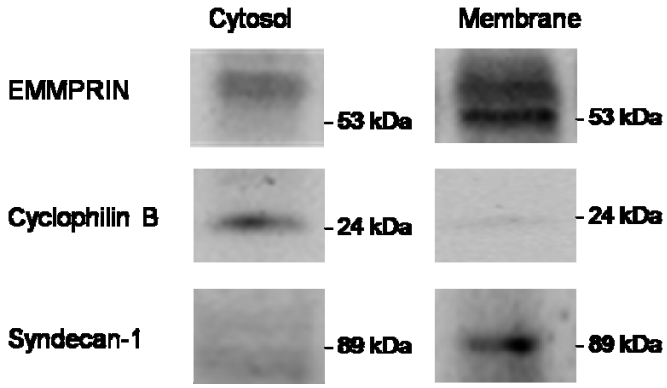


**Fig. 2 A stepwise centrifugation analysis for the cellular distribution of EMMPRIN, cyclophilin B, and syndecan-1 in SKG-II cells**
Cell lysate as shown in Fig. 1 was fractionated to cytosol and membrane fractions by a stepwise centrifugation method, and then both fractions were subjected to Western blotting for EMMPRIN, cyclophilin B, and syndecan-1.

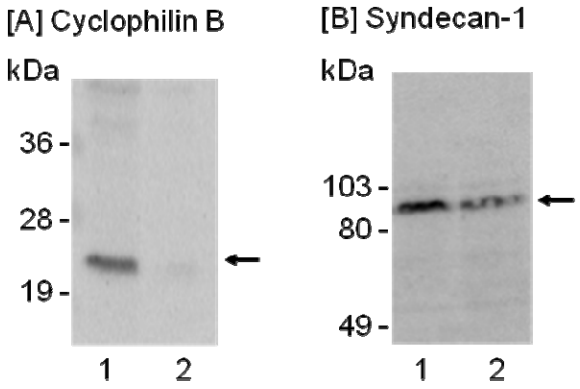


**Fig. 3 Co-immunoprecipitation of syndecan-1, but not cyclophilin B, with EMMPRIN in SKG-II cells**

Cell lysate as shown in Fig. 1 was subjected to immunoprecipitation using an EMMPRIN antibody (EM6-pAb), and then precipitates were subjected to Western blotting for cyclophilin B [A] and syndecan-1 [B]. Lanes 1 and 2, SKG-II-cell lysate and immunoprecipitate, respectively.

**(2)　種々のガン細胞の細胞膜上における EMMPRIN と syndecan-1 との共局在性**

SKG-II 細胞において，EMMPRIN が細胞膜上で syndecan-1 と複合体を形成することが判明したことから，両者の相互作用がガン細胞に普遍的な現象であるか否かを SKG-II 細胞を含む 5 種類のヒトガン細胞株を用いて蛍光二重染色法により解析した．Fig. 4 に示したように，SKG-II，MCF-7，HT1080，MeWo および U251 細胞において EMMPRIN のみならず syndecan-1 が恒常的に発現していることが判明した．また，両分子の蛍光シグナルが細胞表層において共局在することが明らかとなった．すなわち，細胞膜上での EMMPRIN および syndecan-1 の複合体形成は，種々のガン細胞において共通の現象であると示唆された．

**(3)　EMMPRIN と syndecan-1 との複合体形成の分子機構**

EMMPRIN が syndecan-1 とガン細胞膜上において複合体を形成することが明らかとなったことから，複合体形成に寄与する EMMPRIN の機能部位についてその合成ペプチドを用いた競合的免疫沈降法にて検討した．すなわち，これまでに同定した MMP 産生誘導の機能部位である EMMPRIN ループ I の EM1 配列を含む EMMPRIN 合成ペプチドによる EMMPRIN と syndecan-1 との複合体形成阻害を検討した．その結果，EMMPRIN と syndecan-1 の相互作用に対し外因性の EM1 ペプチドは影響を及ぼさなかったが，EM9 ペプチドは濃度依存的にこの結合を阻害することが判明した(Fig. 5A)．なお，これら免疫沈降実験において検出される EMMPRIN 量は全く変化しないことが明らかとなった(Fig. 5B)．すなわち，EMMPRIN の EM9 配列が syndecan-1 との複合体形成における機能部位であると示唆された．

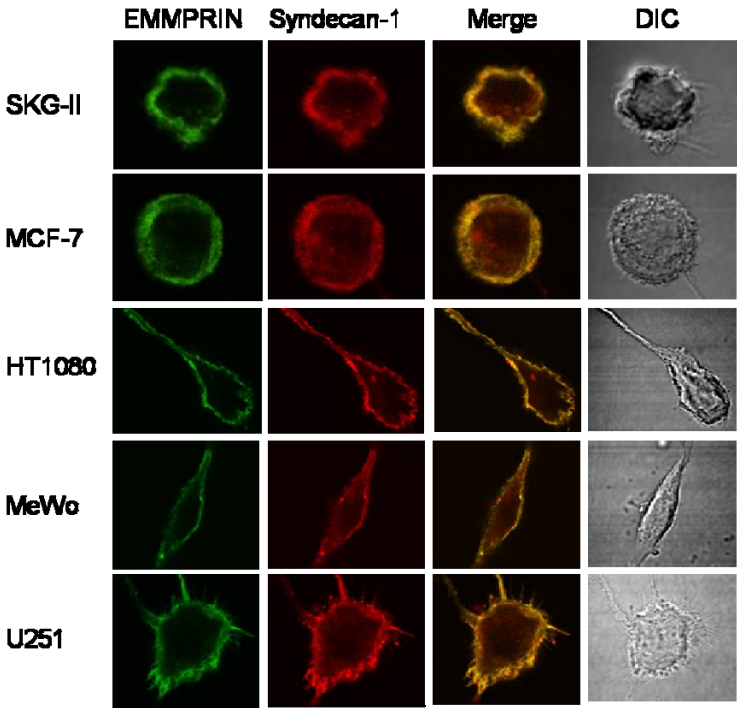


**Fig. 4 Co-localization of EMMPRIN and syndecan-1 on the tumor cell surface**

Tumor cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde/PBS(-), and then subjected to immunostaining for EMMPRIN (green) and syndecan-1 (red). Co-localization of EMMPRIN and syndecan-1 was detectable at yellow signals (Merge) on the cell surface. DIC: Differential interference contrast. SKG-II, human uterine cervical carcinoma cells; MCF-7, human breast adenocarcinoma cells; HT-1080, human fibrosarcoma cells; MeWo, human melanoma cells; and U251, human glioma cells. Magnification, ×1,000.

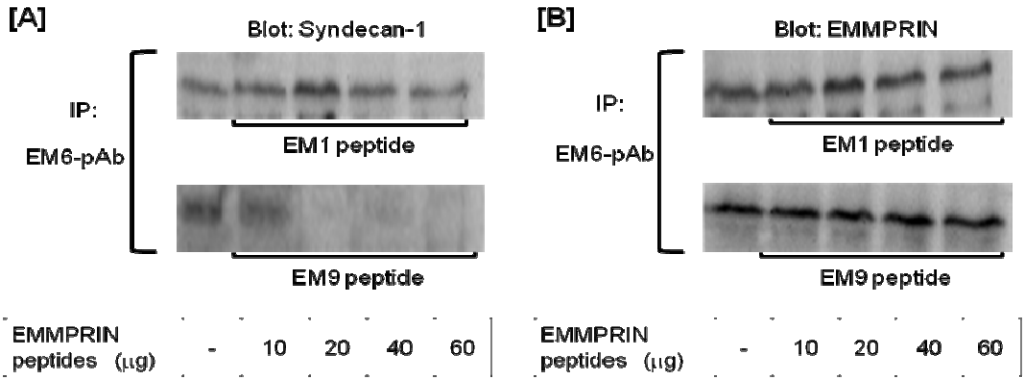


**Fig. 5 EM9, but not EM1 peptide, interferes with the complex formation of EMMPRIN and syndecan-1 *in vitro***

Cell lysate as shown in Fig. 1 was subjected to immunoprecipitation (IP) using EMMPRIN antibody (EM6-pAb) in the presence or absence of EMMPRIN peptide (EM1 or EM9) (10-60 μg). After immunoprecipitation, Western blotting for syndecan-1 [A] and EMMPRIN [B] was performed.

**(4)　EMMPRIN-syndecan-1 複合体形成阻害によるガン細胞の移動活性促進**

EMMPRIN によるガン細胞移動活性調節における EMMPRIN-syndecan-1 複合体の役割を明らかにするために，その形成に寄与する EMMPRIN の EM9 に対する抗体(EM9-pAb)を用いて細胞移動活性を検討した．その結果，SKG-II 細胞の移動活性は EM9-pAb により濃度依存的に促進することが明らかとなった(Fig. 6). しかしながら，EMMPRIN に対する他の抗体(EM1-pAb および EM6-pAb)はその細胞移動活性には影響しないことが判明した(Fig. 6).

したがって，SKG-II 細胞における EM9 配列への抗体結合は細胞移動活性を促進することが初めて明らかとなった．すなわち，細胞膜上での EMMPRIN-syndecan-1 複合体は，ガン細胞の移動活性を抑制的に調節することが示唆された．

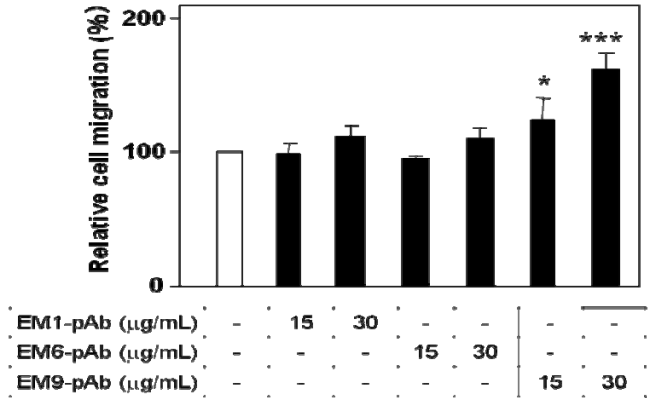


**Fig. 6 Effects of EMMPRIN antibodies on SKG-II cell migration**

Confluent SKG-II cells (2 x $10^6$ cells/mL) in 35-mm dishes were scratched with a pipet tip and then treated for 14 h with EM1-pAb, EM6-pAb, and EM9-pAb (15-30 □g/mL, respectively). Cell migration distance (□m) was measured, and then relative cell migration was expressed by taking untreated cells as 100%. Data are indicated as mean ± SD of three individual areas. * and ***, significantly different from untreated cells ($p<0.05$ and 0.001, respectively).

3. 研究評価及び今後の研究計画

ガン細胞膜上において EMMPRIN はその EM9 配列を介して syndecan-1 と結合することで複合体を形成し，ガン細胞の移動活性を抑制的に調節することを初めて見出した．すなわち，本研究成果は，ガン細胞の移動活性調節機構における新規調節および実行分子として EMMPRIN と相互作用する syndecan-1 を同定し，ガン細胞膜上でのヘテロ分子間相互作用による新たなガン転移調節機構の存在を提唱するものである．さらに,これら知見は今後のガン治療戦略において EMMPRIN のみならず syndecan-1 をも分子標的とした新規ガン浸潤・転移阻害薬の開発に繋がるものと期待される．

本年度の研究計画の一つであるガン細胞への EMMPRIN siRNA の導入については本プロジェクトにおける新槇班との連携の下，さらに適性条件の検討等を含め継続検討中であるが，ガン細胞膜上での EMMPRIN/syndecan-1 複合体形成機構の発見およ

び EMMPRIN 機能解析に有用な合成ペプチドおよび抗体の開発などを考慮し，目標を達成することができたと考えられる．

今後は，ガン細胞膜上での EMMPRIN/シンデカン-1 の複合体形成とガン細胞移動活性との関連性を明らかにするために，ガン細胞における EMMPRIN およびシンデカン-1 siRNA による両分子のノックダウン，および特異的な抗体による分子機能阻害による細胞移動活性調節を検討する予定である．さらに，その移動活性調節に寄与する EMMPRIN/シンデカン-1 依存的な細胞シグナルについても基礎的検討を行うこととする．

4．研究成果の発表

原著論文

(1) Sato, T., Ota, T., Watanabe, M., Imada, K., Nomizu, M., and Ito, A.
Identification of an active site of EMMPRIN for the augmentation of matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in a co-culture of human uterine cervical carcinoma cells and fibroblasts.
*Gynecol. Oncol,.* **114**, 337-342 (2009)

国際学会発表

(1) Hashimoto, K., Sato, T., Imada, K., Nomizu, M., and Ito, A.
Suppression of EMMPRIN-mediated tumor cell migration by syndecan-1
8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium/41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research/56th Annual Meeting of the Japan Matrix Club, 2009/6, Yokosuka, Japan

(2) Sato, T., Ishii, M., Imada, K., and Ito, A.
Involvement of lipid raft-associated signaling in EMMPRIN gene expression and secretion
8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium/41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research/56th Annual Meeting of the Japan Matrix Club, 2009/6, Yokosuka, Japan

(3) Imada, K., Sato, T., Visse, R., Nagase, H., and Ito, A.
Pathophysiological roles of interstitial procollagenase/proMMP-1 localized on the cell surface in the tumor cell invasion and metastasis
Sixth General Meeting of the International Proteolysis Society, 2009/10, Gold Coast, Australia

(4) Umeda, Y., Imada, K., Sato, T., Shiono, T., Nagase, H., and Ito, A.
Involvement of sugar chains of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)/CD147 in the interaction with interstitial procollagenase/proMMP-1
Sixth General Meeting of the International Proteolysis Society, 2009/10, Gold Coast, Australia

(5) Hashimoto, K., Sato, T., Imada, K., Nomizu, M., and Ito, A

Negative regulation of tumor cell migration by EMMPRIN-syndecan-1 interaction on tumor cell surface
Sixth General Meeting of the International Proteolysis Society, 2009/10, Gold Coast, Australia

(6) Sato, T., Hashimoto, K., Imada, K., Nomizu, M., and Ito, A.
Heparan sulfate-dependent interaction of Syndecan-1 with EMMPRIN on the cell surface suppresses tumor cell migration: Identification of the binding site of EMMPRIN to Syndecan-1 heparan sulfate
The 49th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2009/12, San Diego, USA

国内学会発表

(1) 今田啓介，澤田賢志，佐藤　隆，澤地恭昇，小坂泰一，山本謙吾，伊東　晃
滑膜細胞表層に発現するガン転移促進因子 extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)/CD147 の関節リウマチにおける機能
第 63 回西東京内分泌代謝研究会，2009/7，東京

(2) 佐藤　隆，今田啓介，伊東　晃
癌のマトリックスターンオーバーと EMMPRIN
第 14 回日本病態プロテアーゼ学会，2009/8，大阪

(3) 今田啓介，澤田賢志，佐藤　隆，澤地恭昇，小坂泰一，山本謙吾，伊東　晃
ガン転移促進因子 extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)/CD147 は関節リウマチ特異的な MMP 産生増強因子である
第 14 回日本病態プロテアーゼ学会，2009/8，大阪

(4) 橋本　圭，佐藤　隆，今田啓介，野水基義，伊東　晃
ガン細胞膜上での EMMPRIN と Syndecan-1 の相互作用は細胞移動活性を抑制的に調節する
第 53 回日本薬学会関東支部大会，2009/11，埼玉

# 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。

これまでに我々は、*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。さらに 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 を乳癌細胞中で発現させると、TAM および *trans*-4-HO-TAM の抱合代謝が促進され、TAM の細胞増殖抑制効果の減弱が起ることも明らかにしている。

既に、平成２０年度本研究において、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行い、実際の患者の血漿および尿中から代謝物として TAM $N^+$-glucuronide を同定し、TAM の主代謝物の一つであることを初めて明らかにした。このことからグルクロン酸抱合による TAM 代謝と、その成績体である TAM $N^+$-glucuronide の動態を明らかにすることが必要であると考えられる。そこで本年度研究では、様々な薬物排泄機構の中でも癌細胞の多剤耐性と密接な関係にあり、種々のグルクロン酸抱合体を輸送することが知られている ABC トランスポーターに着目し UGT1A4 発現乳癌細胞における TAM $N^+$-glucuronide の細胞外排泄への ABC トランスポーターの関与の有無を明らかにすることを目的とした。

2.研究成果の概要

1）ヒト乳癌細胞における TAM $N^+$-glucuronide の細胞外排泄機構

ヒト乳癌由来細胞 MCF-7 にヒト UGT1A4 を安定発現させた MCF-7-UGT1A4 細胞を用いて、TAM $N^+$-glucuronide の細胞外輸送に及ぼす各種トランスポーター阻害剤の影響を検討した。すなわち、MCF-7-UGT1A4 を TAM を含有した培地で培養して細胞内に TAM $N^+$-glucuronide を生成させ、その後各種トランスポーターの阻害剤を培地に添加し、細胞外に排泄された TAM $N^+$-glucuronide の量を定量した。その結果、orthovanadate（ABC トランスポーター汎用阻害剤）、cyclosporin A（MDR1 および MRPs 阻害剤）、verapamil（MDR1 および MRPs 阻害剤）または probenecid（MRPs 阻害剤）の共存により、TAM $N^+$-glucuronide の細胞外への排泄が対照群と比較して有意に阻害されていた。一方、genistein（BCRP 阻害剤）の共存下では対照群と比較して有意な差は認められなかった（Table 1）。

**Table 1. The effects of inhibitors on TAM $N^+$-glucuronide efflux in MCF-7-UGT1A4 cells**

| Inhibitor | Target transporter | Inhibitory effect |
|---|---|---|
| Orthovanadate | ABC transporters | + |
| Cyclosporin A | MDR1 (P-gp), MRPs | + |
| Verapamil | MDR1 (P-gp), MRPs | + |
| Probenecid | MRPs | + |
| Genistein | BCRP | − |

これらのことから、TAM $N^+$-glucuronide は ABC トランスポーターにより輸送されていることが示唆された。そこでさらに分子種を推定するために、ヒト MDR1、MRP1 または MRP2 を発現した昆虫細胞 membrane を用いて、ATPase アッセイを行い、TAM $N^+$-glucuronide がこれらのトランスポーターの基質となり得るかについて検討した。その結果、ヒト MRP1 発現 membrane でのみ ATPase 活性が認められ、TAM $N^+$-glucuronide が MRP1 の基質となり得ることが明らかになった（Fig .1）。

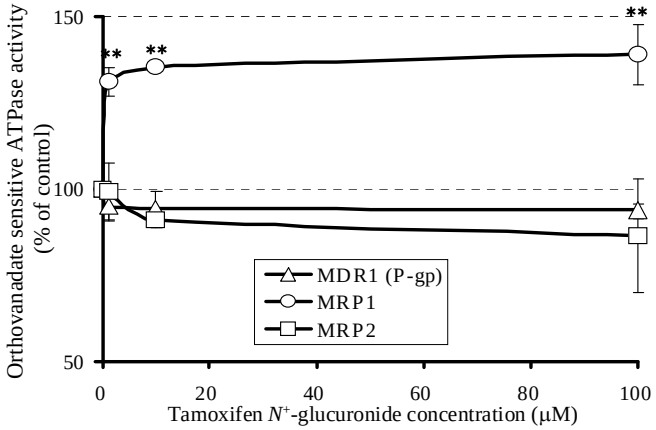


**Fig. 1. Effect of TAM $N^+$-glucuronide on orthovanadate sensitive ATPase activity in membrane fractions isolated from an insect cell (Sf9) system expressing human MDR1 (△), human MRP1 (○), or human MRP2 (□).**

The data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test. **: significantly different from control at P < 0.01, respectively.

以上のことから、TAM $N^+$-glucuronide の細胞外輸送には MRP1 が関与していることが強く示唆され、UGT1A4 による TAM の N-グルクロン酸抱合と、それに引き続く MRP1 による TAM $N^+$-glucuronide の細胞外排泄が TAM 耐性化を増強する可能性が示唆された。

3. 研究評価及び今後の研究計画

a)研究評価

既に上述したように、MCF-7-UGT1A4 細胞において UGT1A4 が発現することにより、TAM が TAM $N^+$-glucuronide へと代謝され、細胞内 TAM 濃度が減少することが TAM 耐性化の一要因となり得ることが示されている。一方、既に我々はこの TAM $N^+$-glucuronide はエストロゲン受容体に対して TAM と同程度の親和性を保持しており、また TAM に比して弱いものの抗エストロゲン作用を有していることも明らかにしている。そのため、TAM $N^+$-glucuronide 生成は TAM の薬効を増強する可能性も考えられてきた。しかしながら、本研究でその関与が示唆された MRP1 が癌細胞中で UGT1A4 と共に発現した場合には、TAM $N^+$-glucuronide の細胞外への排泄が促進されることで、TAM 耐性化に対して UGT1A4 と相加的あるいは相乗的な働きを示すことが示唆された。すなわち、UGT1A4 による TAM のグルクロン酸抱合と、それに引き続く MRP1 による TAM $N^+$-glucuronide の細胞外排泄により、細胞内 TAM 濃度が低下することが耐性化を増強する可能性も考えられた。

b)今後の研究計画

本年度研究において明らかになった、TAM の代謝および排泄が実際の乳癌治療における TAM 耐性化機構となり得るかについては現段階では不明である、したがって、今後はヒト乳癌組織における UGT やトランスポーター発現についての検討が必要である。そこで、今後はヒトの乳癌患者から外科的に切除された乳癌組織およびその周辺の正常組織を用いて組織中の UGT 分子種の発現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) Ohnuma, T., Matsumoto, T., Komatsu, T., Nishiyama, T., Ogura, K., Iwata H., Hiratsuka, A. Role of phase 2 drug-metabolizing enzymes modulated by extracts from 78 herbal medicines in detoxification of electrophiles and lung cancer chemotherapy. J. Trad. Med., in press.

b)学会発表

(1)Nishimura, K., Ogura, K., Nishiyama, T., Ohnuma, T., and Hiratsuka, A., Transport of tamoxifen $N^+$-glucuronide, a metabolite potentially responsible for acquired TAM resistance, in human breast cancer cells.
日本薬物動態学会第 24 回年会、2009 年 11 月、京都

(2)小倉健一郎、西村香里、大沼友和、西山貴仁、平塚　明
乳癌治療薬 Tamoxifen の乳癌細胞におけるグルクロン酸抱合と抱合体排泄機構
日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山

(3)阿部陽平、丸ノ内徹郎、高木教夫、平塚　明、田野中浩一
肥大心筋でのミトコンドリア機能の変化
日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山

# 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 20 年度研究において、AG73 修飾 PEG リポソームによる遺伝子導入効果が、超音波技術との併用により、増強することを明らかとしている。この結果を踏まえ、平成２１年度共同研究計画では、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）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 導入システムの構築を試み、最終的にがんや循環器疾患治療に有用な siRNA 医薬品開発分野への応用の可能性について検証する。

2. 研究成果の概要

1) siRNA 内封ペプチド修飾リポソームの調製

今年度は、siRNA を内封したペプチド修飾リポソームの調製法と siRNA 導入効果の検討を行った。はじめに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 時間乾燥させ、lipid film を調製した。調製した lipid film に HEPES buffer (10 mM; pH 7.4) で溶解した polyethylene(PEI)、または、 poly-*l* -lysine (PLL)と、等量の siRNA を混合

し vortex することで静電的に相互作用させた siRNA・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 5 分間超音波処理してリポソームを微粒子化し、さらに polyethyleneglycol(PEG)の末端に AG73 ペプチドを総脂質量の 5 mol%で修飾したペプチド修飾リポソームを作製した。粒子径をダイナミック光散乱光度計 DLS にて測定したところ、120 nm 付近の均一な微粒子が調製できていることが分かった。

2) siRNA内封ペプチド修飾リポソームの細胞内導入

調製された siRNA 内封ペプチド修飾リポソームの細胞内送達とそれに伴う遺伝子発現の抑制効果が認められるかを明らかとするため、Luciferase 安定発現 B16 メラノーマ細胞株に Luciferase 遺伝子発現を抑制可能な siRNA(siGL3)を封入したペプチド修飾リポソームに作用させた後に、24 時間後の Luciferase 活性を指標に siRNA の導入効率を評価した。また、コントロールには、siGL3 のランダム配列を持つ siCont を用いた。その結果、siRNA のリポソームへの内封に PEI を用いた場合、AG73 ペプチド修飾を介した遺伝子発現の抑制傾向が認められた。これに対し、PLL では、ほとんど遺伝子発現の抑制効果は、確認できなかった。以上のことから、AG73 修飾 PEG リポソームの siRNA の細胞内送達ツールとしての可能性が示された。今後は、siRNA 封入に他のポリカチオンを用いることや、ペプチド修飾率を変えるなどして siRNA の導入効率の向上を図る必要性があると考えられる。

3）AG73 修飾 PEG リポソームの血管新生部位への標的指向性の解析

AG73 修飾 PEG リポソームの血管新生部位への選択的送達が可能か否かについて検討した。血管新生を簡便に観察できるモデル動物として、麻酔した ICR マウスの背部に colon26 細胞株（マウス大腸ガン細胞由来）を注入したアクリルチャンバーを挿入後、切開部位を縫合した Dorsal air sac（DAS）モデルマウスを作製した。 7 日後のマウスに蛍光色素 DiI でラベルした AG73 修飾 PEG リポソームを尾静脈投与し、数時間後、麻酔下のマウスより背部の皮膚が付着したチャンバーを摘出した。そのチャンバー直下の皮膚の新生血管を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、ジグザグ状に蛇行した新生血管に蛍光修飾した AG73 修飾 PEG リポソームの集積性傾向が確認された。以上のことから、AG73 修飾 PEG リポソームが新生血管を標的化する DDS キャリアとして有用であることが示唆された。

3. 研究評価及び今後の研究計画

AG73 修飾 PEG リポソームに低分子核酸医薬として期待されている siRNA が内封可能であること。実際に siRNA 内封 AG73 修飾 PEG リポソームを用いることで、がん細胞内への siRNA 送達と、それに引き続く標的遺伝子の発現抑制が可能となることが示された。また、DAS モデルマウスを用いた実験から、AG73 修飾 PEG リポソームの新生血管への標的指向性も示されたことから、AG73 修飾 PEG リポソームを利用した siRNA の細胞内導入法は，がんや循環器疾患治療法の開発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「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 導入システムの構築」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のみならず siRNA 医薬開発への応用に繋がるものと予想される。

平成 22 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核酸

導入システムの構築とその有用性を評価するために、担がんモデルや下肢虚血マウスを作製し、ラミニン由来ペプチド修飾リポソームによる標的組織選択的な核酸（プラスミドDNA）導入システムを構築する。さらに治療用遺伝子の組織内導入を試みることで、本リポソームの有用性を明らかにする。目標達成のために以下の項目について検討し、担がんモデルマウスや下肢虚血モデルマウスにおける核酸（プラスミド DNA）導入と治療効果の有無を調べる予定である。また、治療効果を増強するために超音波エネルギーの併用も試みる。

(1) 治療用遺伝子内封ペプチド修飾リポソームの調製

ペプチド修飾リポソームにプラスミドDNA（治療用遺伝子－抗血管新生または、血管新生遺伝子）を内封する。調製されたリポソームの表面にラミニン由来ペプチドを修飾する。また、調製時に、蛍光（DiI）修飾脂質を用いる。

(2) 担がんモデルマウスにおける核酸（プラスミドDNA）導入と治療効果の解析

担がんモデルマウスを作製し、プラスミドDNA内封ペプチド修飾リポソームを投与し、ルシフェラーゼ発現を指標に腫瘍部位での遺伝子発現効率を解析する。さらに抗血管新生遺伝子をコードしたプラスミドDNAを内封したリポソームを用いて、抗血管新生効果による抗腫瘍効果の有無を生化学的・組織学的に明らかにする。

(3) 下肢虚血モデルマウスにおける核酸（プラスミドDNA）導入と治療効果の解析

下肢虚血マウスを作製し、プラスミド DNA 内封ペプチド修飾リポソームを投与し、ルシフェラーゼ発現を指標に虚血部位での遺伝子発現効率を解析する。さらに血管新生遺伝子をコードしたプラスミド bFGF を内封したリポソームを用いて、血管新生効果の有無を生化学的・組織学的に明らかにする。

4. 研究成果の発表

原著論文

(1) Negishi, Y., Omata, D., Iijima, H., Takabayashi, Y., Suzuki, K., Endo, Y., Suzuki, R., Maruyama, K., Nomizu, M., Aramaki, Y.
Enhanced laminin-derived peptide AG73-mediated liposomal gene transfer by bubble liposomes and ultrasound.
Mol Pharm ., 7, 217-226 (2010)

総説・著書等

(1) Negishi, Y., Sekine, S., Endo, Y., Nishijima, N., Suzuki, R., Maruyama, K., and Aramaki, Y.
Intravenous Delivery of pDNA and siRNA into Muscle with Bubble Liposomes and Ultrasound.
*9th ISTU,* American Institute of Physics, 1215, 299-302 (2009)

国際学会発表

(1) Negishi, Y., Sekine, S., Endo, Y., Nishijima, N., Suzuki, R., Maruyama, K., Aramaki, Y.
Intravenous Delivery of pDNA and siRNA into Muscle with Bubble Liposomes and Ultrasound.

9th International Symposium of Therapeutic Ultrasound, 2009/9, Aix-en-Provence, France

国内学会発表

(1) 根岸洋一、松尾慶子、遠藤葉子、鈴木健太郎、高木教夫、鈴木亮、丸山一雄、新槇幸彦
超音波技術を利用した下肢虚血モデルへの bFGF/SDF-1 遺伝子導入効果の解析
日本薬剤学会第 24 年会，2009 年 5 月，静岡

(2) 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
超音波技術を利用した AG73 修飾リポソームによる遺伝子導入効果の解析
第 25 回日本 DDS 学会，2009 年 7 月，東京

(3) 西島信明、根岸洋一、関根祥子、遠藤葉子、鈴木亮、丸山一雄、新槇幸彦
バブルリポソームを利用した筋組織への経静脈的超音波遺伝子導入システムの構築
第 25 回日本 DDS 学会，2009 年 7 月，東京

(4) 小俣大樹、根岸洋一、村上孝、野水基義、新槇幸彦
ラミニン由来 AG73 ペプチド修飾リポソームによる siRNA 導入効率の評価
日本薬学会第 130 年会，2010 年 3 月，岡山

(5) 濱野展人、根岸洋一、遠藤葉子、鈴木亮、丸山一雄、野水基義、Choijamts Batsuren、江本精、新槇幸彦
AG73 ペプチド修飾バブルリポソームを用いた新生血管を標的化する新規超音波造影剤の開発
日本薬学会第 130 年会，2010 年 3 月，岡山

(6) 根岸洋一
バブルリポソームと超音波技術を融合した筋組織への遺伝子導入システムの開発
日本薬学会第 130 年会，2010 年 3 月，岡山

(7) 根岸洋一
筋組織への超音波遺伝子デリバリーシステムによる疾患治療への応用
第3回超音波分子診断治療研究会，2010年3月，福岡