

学内グラント 終了時報告書

平成20-21年度 学内グラント報告書

ペプチド結合リポソームを用いた、エボラウイルスに対する CTL誘導型ワクチンの開発

研究代表者 松井 政則(埼玉医科大学 医学部 微生物学)

研究分担者 禾 泰壽¹⁾, 山岸 敏之²⁾, 赤塚 俊隆³⁾, 内田 哲也⁴⁾

緒言

エボラウイルスは、フィロウイルス科に属するRNAウイルスで、ヒトを含む霊長類に重篤な新興感染症であるエボラ出血熱を引き起こす。その致死率は時に90%を超え、最も危険なウイルスである¹⁾。1976年にスーダンとザイールで大流行して以来、中央・西アフリカで散発的に流行を繰り返しているが、米国においても1989年にサル検疫施設で発生し大問題となった。致死量が極めて少量で、血液や体液を介してヒトからヒトへ感染するため極めて脅威であり、Biosafety level 4 (BSL4) の封じ込めが必要である。自然宿主はコウモリの可能性が示唆されている²⁾が、まだ特定されていない。我が国ではまだ発症例はないが、ペットのサルの輸入や旅行者の増加に伴い、日本に侵入する危険性は高まっており、一類感染症に指定されている。また、米国政府は、エボラウイルスをバイオテロに利用しうるカテゴリーAの生物兵器と位置づけている。しかしながら、効果的な予防・治療法は存在しない。以上の状況から、地球規模で、エボラウイルスに対するワクチンの開発は急務である。

エボラ出血熱の患者では、激しいリンパ球のアポトーシスがみられ、免疫機構がうまく働かない。しかし、生き延びたわずかの感染者では、ウイルス特異的細胞傷害性T細胞(CTL)やウイルスに対する抗体が存在する³⁾。従って、エボラウイルス感染においても、一般的なウイルス感染症と同様に、体液性免疫及び細胞性免疫が有効にウイルスを排除すると考えられる。事実、マウスにウイルス中和抗体⁴⁾やウイルス特異的CTL⁵⁾を導入することによって、エボラウイルスへの

抵抗性が示された。一方、サルを用いた実験では、細胞性免疫は有効にウイルスを排除した^{6,8)}が、中和抗体はウイルスをコントロールできなかった⁹⁾。従って、CTLを中心とした細胞性免疫がエボラウイルスの排除に重要である可能性が高く、CTL誘導型ワクチンの開発が必要であると思われる。しかし、エボラ出血熱における細胞性免疫の研究はほとんど行われておらず、そのCTLエピトープはわずか3つしかわかっていない¹⁰⁾。

エボラウイルスを扱うにはBSL4の封じ込めが必要であり、それが研究上の大きな障害である。我々は、組換えウイルスとMHCクラスIトランスジェニックマウスを用いることで、BSL3やBSL4実験施設が必要とされる危険なウイルスに対しても、BSL2実験室でCTLのエピトープを同定できる方法を開発した。さらに、エピトープに相当する短いペプチドをリポソーム表面に結合させてマウスに免疫することで、極めて強力にペプチド特異的CTLを誘導できることを示した¹¹⁾。我々は、これらの方法を使って、BSL3の封じ込めが必要な、重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルス^{12,13)}、及びH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス¹⁴⁾のHLA-A2拘束性CTLエピトープを多数同定した。そして、同定したエピトープを結合したペプチド結合リポソームを作製し、HLA-A2トランスジェニックマウスに免疫して、ウイルス特異的CTLの誘導を詳細に検討した^{12,14)}。現在、我々は、これらのデータを基にして、新型インフルエンザに対する新しいワクチンの開発・実用化をめざした研究を続けている(特許2件出願中)。

本研究では、同様の方法を用いて、エボラウイルスに対するCTLエピトープを多数同定し、そのエピトープを利用してペプチド結合リポソームを作製・解析して、エボラ出血熱に対するワクチン開発のための基礎

1) 埼玉医科大学 医学部 分子生物学
2) 埼玉医科大学 医学部 解剖学
3) 埼玉医科大学 医学部 微生物学
4) 国立感染症研究所

データを得ることを目的とした。

材料と方法

1) HLA-A 2 トランスジェニックマウス

マウスMHCクラスIと $\beta 2$ -マイクログロブリン($\beta 2$ -m)をノックアウトしたマウスに、ヒトMHCクラスIの一つであるHLA-A*0201(HLA-A2)とヒト $\beta 2$ -m遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(HHDマウス)¹⁵⁾を使用した。HHDマウスは、仏・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

2) コンピューターによるCTLエピトープの予測

エボラウイルス(ザイール型)を構成する7つのタンパク質(NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, L)のアミノ酸配列において、HLA-A2結合ペプチドモチーフに従い、2種類のコンピュータープログラム、「BIMAS」と「SYFPEITHI」で、9個のアミノ酸からなる94種類のCTLエピトープを予測した。これらのエピトープに相当するペプチドは、オペロン社により人工合成された。

3) HLA-A 2分子への結合アフィニティの測定

それぞれのペプチドのHLA-A2分子に対する結合アフィニティを、HLA-A2遺伝子を導入・発現させたTAP欠損細胞株、RMA-S-HHDを使ったpeptide binding assayで測定した。RMA-S-HHD細胞にさまざまな濃度のペプチドを加え、どの程度安定したHLA-A2分子が検出できるかを、抗HLA-A2モノクローナル抗体で染色しフローサイトメトリーで測定して、結合アフィニティを測定した。

4) 合成ペプチドによるIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の誘導

ナイーブなHHDマウスの脾細胞を調整し、予測したエピトープに相当する合成ペプチドでパルスした。その細胞を、別のHHDマウスの尾静脈に細胞移入して免疫した。免疫7日後に、脾細胞を調整し、各々のペプチドで抗原刺激した。その後、細胞表面をFITC-抗CD8抗体、細胞内部をPE-抗IFN- γ 抗体で染め、それぞれのエピトープに特異的に反応するIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞数を、フローサイトメトリーで測定した。

5) ペプチド結合リポソームによるCTLの誘導

IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を誘導したペプチドを、リポソーム表面に結合させてペプチド結合リポソームを作製し、CpGと混ぜてHHDマウスの皮下に免疫した。そして、免疫7日後に、以下の方法により、インフルエンザウイルス特異的CTLが誘導できるかどうかを検討した。

a) 細胞内サイトカイン陽性CTLの測定

免疫7日後に、マウス脾細胞を各々のペプチドで抗原刺激した。その後、細胞表面をFITC-抗CD8抗体、細胞内部をPE-抗IFN- γ 抗体で染め、それぞれ

のエピトープに特異的に反応するIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞数を、フローサイトメトリーで測定した。

b) in vivo CTL assay

ナイーブなマウスの脾臓から、ペプチドでパルスした脾細胞とパルスしていない脾細胞を調整して、それぞれを異なる濃度のCFSEで染色した。その2つの細胞群を同数混ぜて、ペプチド結合リポソームで免疫したマウスに尾静脈から細胞移入し、ペプチドでパルスした脾細胞が特異的にどのくらい溶解されるかをフローサイトメトリーで測定した。(倫理面への配慮)

マウスは、埼玉医大・実験動物管理運営規定に基づき飼育され、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

結果

1) CTLエピトープの予測

エボラウイルス(ザイール株)を構成する7つのタンパク質(NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, L)のアミノ酸配列から、HLA-A2拘束性エピトープの可能性が高い、9個のアミノ酸からなるペプチド配列を、2種類のエピトープ予測プログラム(BIMAS & SYFPEITHI)を用いて予測した。NPから13種類、VP35から10種類、VP40から4種類、GPから10種類、VP30から3種類、VP24から9種類、Lから45種類(計94種類)予測し、その合成ペプチドを作製した。

2) HLA-A 2分子への結合アフィニティの測定

予測したペプチドのHLA-A2分子への結合アフィニティを、RMA-S-HHD細胞を使って測定したところ、ほとんどのペプチドで高い結合アフィニティを示し、予測が良好であることがわかった。その中でも、極めて結合アフィニティが高い(BL50<100 μ M)ペプチドが25種類存在した。

3) 予測したエピトープによるIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の誘導

ナイーブなHHDマウスから脾細胞を取り出して、94種類の予測エピトープに相当するペプチドでパルスし、別のHHDマウスの静脈に移入して免疫した。免疫したマウスの脾細胞を調整して、各々のペプチドでin vitroで抗原刺激し、フローサイトメトリーで細胞内IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の誘導を測定した。その結果、94種類のうち24種類のペプチド(NP, 3種類; VP35, 1種類; VP40, 0種類; GP, 4種類; VP30, 3種類; VP24, 1種類; L, 12種類)が、ペプチド特異的にIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を誘導した。これらの細胞は、ペプチド特異的に活性化されたCTLと相同であると考えられるため、これらのペプチドは、エボラウイルス由来のCTLエピトープであると推定される。

4) ペプチド結合リポソームによるIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の誘導

24種類のエボラウイルス由来ペプチドが、特異

的にCTLを活性化したため、これらのペプチドをリポソームに結合させて、24種類のペプチド結合リポソームを作製した。そして、それらをCpGと共に、HHDマウスの皮下 (footpad) に免疫した。その後、ペプチド特異的に誘導されるIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の数を測定した。その結果、14種類のペプチド結合リポソーム (Lip-NP-6, -NP-7, -VP40-2, -GP-3, -GP-4, -GP-7, -GP-10, -VP30-2, -L-10, -L-12, -L-19, -L-22, -L-29, -L-39) で、有意にペプチド特異的IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞が誘導された (Fig. 1)。特に、NP-6, VP30-2, L-10, L-12, L-19, L-29を結合させたリポソームは強い誘導能を示した (Fig. 1)。

5) ペプチド結合リポソームによるCTL killing 活性の誘導
次に、IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を強く誘導した6種類

のペプチド結合リポソーム (Lip-NP-6, -VP30-2, -L-10, -L-12, -L-19, -L-29) について、マウス *in vivo* におけるCTL killing 活性を調べた。その結果、やはり、6つのペプチド結合リポソームで極めて良好にペプチド特異的なkilling 活性がみられた (Fig. 2)。また、IFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を特に強く誘導した3つのペプチド結合リポソーム (Lip-L-12, -L-19, -L-29) は、killing 活性の誘導も強いことが示された (Fig. 2)。

考察

エボラウイルスを構成するタンパク質から、24種類のCTLエпитープが同定された。これらのエピトープとリポソームの結合物は、効率よくペプチド特異的にIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞を誘導し強いkilling 活性を示

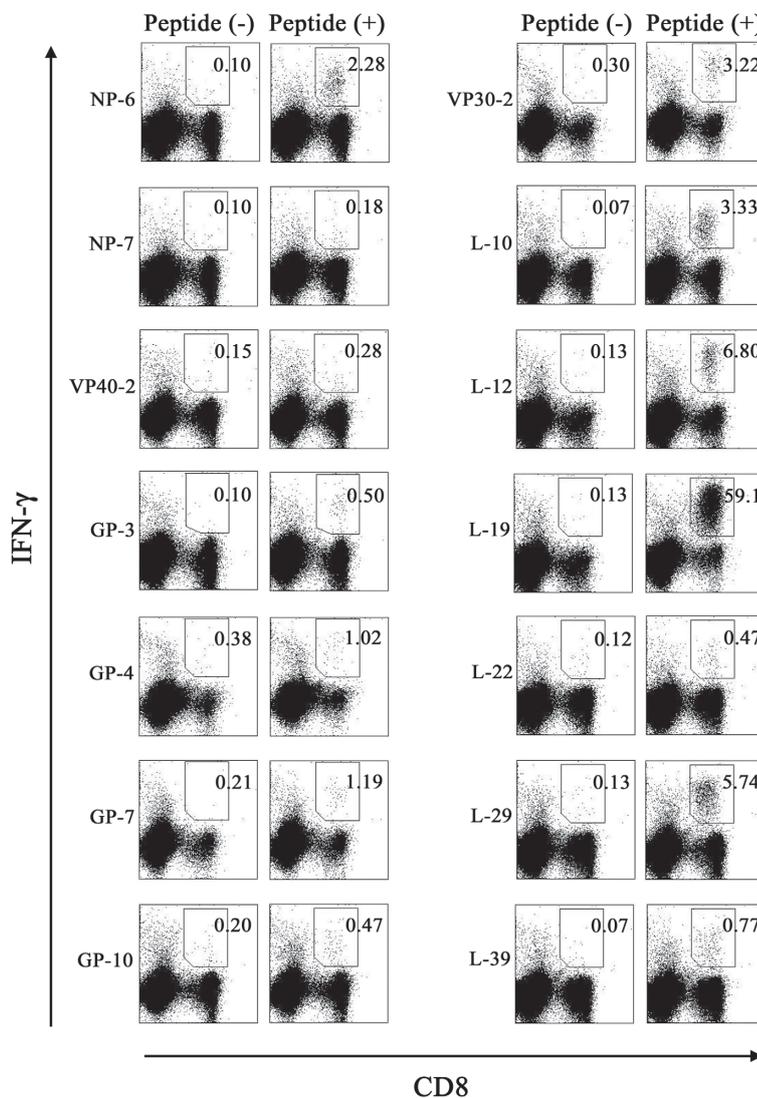


Fig. 1. Intracellular IFN- γ staining of CD8⁺T cells specific for peptides derived from Ebola virus in mice immunized with surface-linked liposomal peptides. HHD mice were immunized once with either Lip-NP-6, -NP-7, -VP40-2, -GP-3, -GP-4, -GP-7, -GP-10, -VP30-2, -L-10, -L-12, -L-19, -L-22, -L-29, or -L-39 together with CpG. After one week, spleen cells were prepared and stimulated with (+) or without (-) a relevant peptide for 5 h. Cells were then stained for their surface expression of CD8 (x axis) and their intracellular expression of IFN- γ (y axis). The numbers shown indicate the percentages of intracellular IFN- γ ⁺ cells within CD8⁺T cells.

した. 特に3つのペプチド結合リポソーム, Lip-L-12, -L-19, -L-29は, 極めて強い活性を示した. 従って, これらは, エボラウイルスに対して, 効果の高いワクチンになりうる可能性が示唆された. エボラウイルスには, 病原性の異なる4種(ザイール, スーダン, アイボリーコーストおよびレ斯顿)が存在する. 本研究では, もっとも致死率の高いザイールエボラウイルスのアミノ酸配列をもとに, CTLエピトープを同定したが, L-29は, 4種類のエボラウイルスに共通のエピトープであった. 従って, Lip-L-29は, どのエボラウイルスに対しても, 防御効果を示すことが予想される. 本研究では, 実際にエボラウイルスを使ったウイルス実験を行わなかった. しかし, 現在, 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンターとの共同研究を開始しており, その共同研究の一環として, 今後, カナダのBSL4施設でエボラウイルスを扱ったウイルスチャレンジ実験を行い, ペプチド結合リポソームのワクチン効果を検討する予定である.

引用文献

- 1) Khan AS, Tshioko FK, Heymann DL, Guenno BL, Nabeth P, Kerstiens B, et al. The reemergence of Ebola hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 1999;179:S76-86.
- 2) Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 2005;438:575-6.
- 3) Zampieri CA, Sullivan NJ, Nabel GJ. Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. *Nat Immunol* 2007;8:1159-64.
- 4) Wilson JA, Hevey M, Bakken R, Guest S, Bray M, Schmaljohn AL, et al. Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* 2000;287:1664-6.
- 5) Wilson JA, Hart MK. Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J Virol* 2001;75:2660-4.
- 6) Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang Z, Nabel GJ. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 2000;408:605-9.
- 7) Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, Xu L, Yang Z, Roederer M, et al. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature* 2003;424:681-4.
- 8) Bukreyev A, Rollin PE, Tate MK, Yang L, Zaki SR, Shieh W-J, et al. Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J Virol*

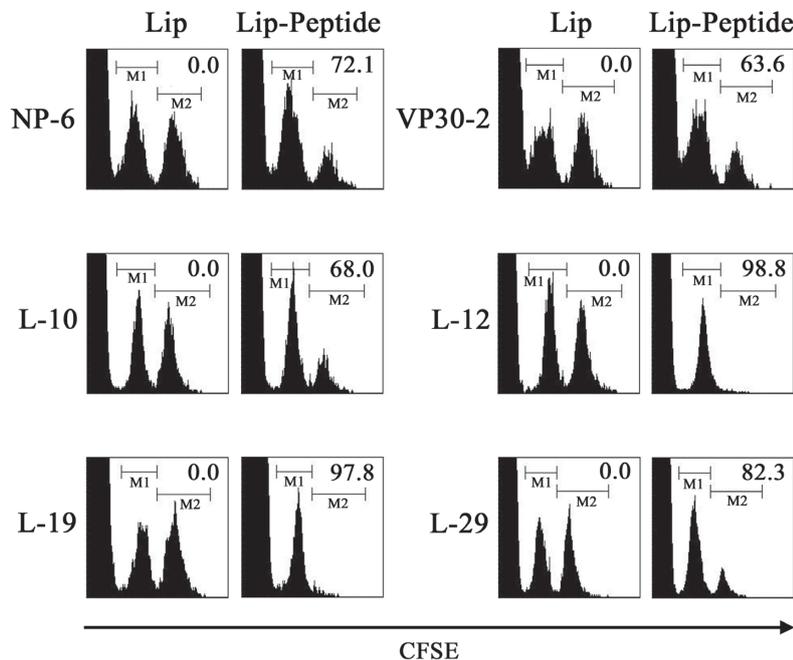


Fig. 2. CTL killing activities specific for peptides derived from Ebola virus in mice immunized with surface-linked liposomal peptides. HHD mice were immunized once with either each liposomal peptide (Lip-peptide) or liposomes alone (Lip) together with CpG. One week later, an equal number of a relevant peptide (NP-6, VP30-2, L-10, L-12, L-19 or L-29)-pulsed CFSE^{high} targets (M2) and unpulsed CFSE^{low} targets (M1) were transferred into the immunized mice by i.v. injection. After 12 h, CFSE-labeled cells were recovered from spleens of recipient mice and analyzed by flow cytometry. The numbers indicate the percentages of specific lysis.

- 2007;81:6379-88.
- 9) Oswald WB, Geisbert TW, Davis KJ, Geisbert JB, Sullivan NJ, Jahrling PB, et al. Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys. *PLoS Pathog* 2007;3:63-6.
 - 10) Sundar K, Agnieszka Boesen A, Coico R. Computational prediction and identification of HLA-A2.1-specific Ebola virus CTL epitopes. *Virology* 2007;360:257-63.
 - 11) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, et al. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8⁺T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177:2324-30.
 - 12) Ohno S, Kohyama S, Taneichi M, Moriya O, Hayashi H, Oda H, et al. Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice. *Vaccine* 2009;27:3912-20.
 - 13) Kohyama S, Ohno S, Suda T, Taneichi M, Yokoyama S, Mori M, et al. Efficient induction of cytotoxic T lymphocytes specific for severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from a non-structural polyprotein 1a. *Antiviral Res* 2009;84:168-77.
 - 14) Matsui M, Kohyama S, Suda T, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, et al. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1494-9.
 - 15) Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Pérarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185:2043-51.
 - carcinoma. *Mol Immunol* 2009;46:1654-62.
 - 3) Ohno S, Kohyama S, Taneichi M, Moriya O, Hayashi H, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Akatsuka T, Uchida T, Matsui M. Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice. *Vaccine* 2009;27:3912-20.
 - 4) Kohyama S, Ohno S, Suda T, Taneichi M, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, Hayashi H, Uchida T, Matsui M. Efficient induction of cytotoxic T lymphocytes specific for severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from a non-structural polyprotein 1a. *Antiviral Res* 2009;84:168-77.
 - 5) Nakano T, Inoue I, Shinozaki S, Matsui M, Akatsuka T, Takahashi S, Tanaka K, Akita M, Seo M, Hokari S, Katayama S, Komoda T. A possible role of lysophospholipids produced by calcium-independent phospholipase A2 in membrane-raft budding and fission. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes* 2009;1788:2222-8.
 - 6) Takagi A, Matsui M, Ohno S, Duan H, Moriya O, Kobayashi N, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Highly efficient anti-viral CD8⁺T cell induction by peptides coupled to the surface of liposomes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1383-92.
 - 7) Matsui M, Kohyama S, Suda T, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1494-9.
 - 8) Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, Nishimura Y. Identification of SARS-CoV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitope by using a new muramyl dipeptide-derivative adjuvant. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23:165-77.
 - 9) Morishima N, Mizoguchi I, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Shimizu M, Matsui M, Mizoguchi J, Yoshimoto T. A pivotal role for interleukin-27 in CD8⁺T cell functions and generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:1-10.

研究成果リスト

論文

- 1) 松井政則, 高山俊輔, 内田哲也. 特集 I : 感染症に対するワクチンの開発とその免疫理論— SARSワクチンの開発. *臨床免疫・アレルギー科* 2008;50:511-7.
- 2) Hu P, Hu H-D, Chen M, Peng M-L, Tang L, Tang K-F, Matsui M, Belladonna ML, Yoshimoto T, Zhang D-Z, Xiang R, Ren H. Expression of Interlukins-23 and 27 leads to successful gene therapy of hepatocellular

学会発表

- 1) 高山俊輔, 大野悟, 磯田明宏, 守屋修, 林秀徳, 岩倉洋一郎, 善本隆之, 赤塚俊隆, 松井政則.

- IL-12/IL-17 axisによる, ウイルス感染防御における増強機構の解析, 第128回日本薬学会, 平成20年3月, 横浜.
- 2) 大野悟史, 高山俊輔, 守屋修, 種市麻衣子, 小田洋, 林秀徳, 赤塚俊隆, 内田哲也, 松井政則. SARSウイルス特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) に対するエピトープの決定とペプチド結合リポソームによるCTLの誘導, 第128回日本薬学会, 平成20年3月, 横浜.
 - 3) Duan H, Yoshimura Y, Kobayashi N, Takagi A, Matsui M, Ohno S, Sugiyama K, Morisseau C, Hammock BD, Akatsuka T. Analysis of the topology of the microsomal epoxide hydrolase on the cell surface with monoclonal antibodies with different epitope specificities, ASPET Meeting, 平成20年4月, San Diego.
 - 4) Takagi A, Matsui M, Moriya O, Kobayashi N, Akatsuka T, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T. Highly efficient anti-viral CD8⁺ effector and memory T cell induction without T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes, Fronteers in Immunology Conference, 平成20年9月, Newport Beach, USA.
 - 5) 高木徹, 松井政則, 守屋修, 赤塚俊隆, 小林信春, 種市麻衣子, 内田哲也. ペプチド表面結合リポソームはCD4ヘルプなしに抗ウイルスCD8⁺メモリーT細胞を誘導する, 第56回日本ウイルス学会, 平成20年10月, 岡山.
 - 6) 高木徹, 松井政則, 赤塚俊隆, 種市麻衣子, 内田哲也. ペプチド表面結合リポソームによる抗ウイルスCD8⁺T細胞反応の効率的な誘導, 第12回日本ワクチン学会, 平成20年11月, 熊本.
 - 7) Takagi A, Matsui M, Moriya O, Kobayashi N, Oda H, Mori M, Yamamura H, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Memory CD8 T cell induction without CD4 T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes, The 15th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses, 平成20年10月, San Antonio, Texas, USA.
 - 8) Takagi A, Ohno S, Moriya O, Matsui M, Akatsuka T, Taneichi M, Uchida T. Memory CD8⁺ T cell induction without CD4⁺ T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes, 第38回日本免疫学会, 平成20年12月, 京都.
 - 9) Shinozaki R, Nakano T, Inoue I, Matsui M, Akatsuka T, Tanaka K, Akita M, Hokari S, Katayama S, Komoda T. Phospholipase A₂ may promote membrane-raft budding and fission, 第81回日本生化学会, 平成20年12月, 神戸.
 - 10) 高山俊輔, 須田達也, 種市麻衣子, 赤塚俊隆, 内田哲也, 松井政則. SARSコロナウイルスのpolyprotein 1a由来HLA-A*0201拘束性CTLエピトープの同定と, そのペプチドを結合したりポソームによる細胞傷害性T細胞の誘導, 第13回日本ワクチン学会, 平成21年9月, 札幌.
 - 11) Kohyama S, Suda T, Taneichi T, Uchida T, Matsui M. Efficient induction of SARS coronavirus-specific CTLs by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from nucleocapsid and a non-structural polyprotein 1a, 第39回日本免疫学会, 平成21年12月, 大阪.
 - 12) Chen Y-Zh, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, Nishimura Y. Identification of HLA-A24-restricted CTL epitopes of SARS-CoV protein, 第39回日本免疫学会, 平成21年12月, 大阪.

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

眼内血管新生病の遺伝子解析と抗血管新生治療に対する 個別化医療の確立

研究代表者 森 圭介(埼玉医科大学 医学部 眼科学)

研究分担者 栗田 卓也¹⁾, 樺沢 昌²⁾, 田北 博保²⁾,
大崎 昌孝¹⁾, 米谷 新²⁾

緒言

加齢黄斑変性(AMD)は欧米の失明原因の第一位を占めており、本邦でも急激に増加し現在失明原因の第四位に位置し、今後もさらに増加するとされている疾患である。AMDは生活習慣病で高齢者に発症するため、本邦における生活習慣の欧米化や高齢化社会の形成に伴い増加する。現在マスメディアでも多く取り上げられるようになり、社会問題になりつつある疾患である。AMDでは脈絡膜新生血管を介して黄斑部網膜が破壊されることで、黄斑部機能は著しく低下し、非可逆性の視力低下に至る。糖尿病網膜症とならび、眼内血管新生を介する病理変化で失明に陥る疾患で、眼内血管新生病と総称されるが、その重篤性や罹患患者の多さから、眼内血管新生を征することは眼底疾患を征することと評されている。実際、眼内血管新生は1990年代より世界中の眼科・視覚領域の研究者の中心的トピックスとなっており、また、これら多くの研究者の研鑽により光線力学療法(PDT)や抗VEGF療法などの新しい治療法が開発され、現在多くの患者に福音を与えつつある。

現在PDTや抗VEGF抗体を使った抗血管新生療法は現実のものとなっており、その有効性も臨床的に証明されている。一方、AMDでは、眼内新生血管が生じている時には既に網膜に対する非可逆性の障害が生じてしまっていることが多い。従って、究極の治療法は、これらの病態の原因遺伝子を突き止め、将来的に発症のリスクを予測すると共に、発症リスクの高い患者に対し、原因遺伝子をコントロールする治療法と言える。AMDの疾患感受性遺伝子については、様々な候補遺伝子との関連が検討されてきたが、最近特に米

国のCaucasianを対照とした研究において大きな進展が見られた。具体的には、DNAアレイによる網羅的遺伝子多型の解析により、補体活性化第二経路の制御因子の1つである1番染色体上の補体H因子(CFH)のアミノ酸置換を行うSNP(Y402H)とCaucasianでのAMDの発症との強い関連が示された。これに加え、最近セリンプロテアーゼ遺伝子の1つ(HTRA1)がAMDの二番目の原因遺伝子として報告された。一方、日本人のAMDのphenotypeはCaucasianのそれと異なることが指摘されており、特にCFH Y402Hに関しては、欧米の報告と全く異なる結果が本邦の複数のグループから報告されている。このため、日本人特有の疾患感受性遺伝子を検索することは極めて有用な情報をもたらすことが期待される。

疾患感受性遺伝子についての研究のもう一つの大きな課題として、各種の治療法との関連を検討すること、つまり個別化医療(personalized medicineもしくはindividualized medicine)が挙げられる。個別化医療は、各医療分野で注目され、現在最も活発な研究がなされているトピックスのうちのひとつである。個別化医療とは、患者個人の持つ分子・遺伝情報をもとに、治療効果を最大化しかつ副作用を最小化する治療計画を立案・実行することと定義されている。メディアでも、オーダーメイド医療、もしくはテーラーメイド医療という名称で数多く取り上げられている。ちなみにオーダーメイドは「和製英語である」こと、テーラーメイドは「特権階級意識を感じさせる」との理由から嫌われて、最近ではpersonalized またはindividualizedが使われることが多い。個別化医療の代表的な適応として癌の化学療法があるが、近年眼科領域でもこれに関連する研究データが出てきている。

以上のような経緯・背景のもと、本研究においては、日本人AMDにおけるPhenotypeとGenotypeの特徴を

1) 埼玉医科大学 医学部 内分泌 糖尿病内科
2) 埼玉医科大学 医学部 眼科学

明らかにするとともに, PDT, 抗 VEGF 抗体の抗血管新生療法に関する個別化医療を確立するため, AMD において, 治療効果と各遺伝子の SNP との関連を検討した。

方法

本研究は, 埼玉医科大学倫理委員会の承認の下, 文書によるインフォームドコンセントが得られた埼玉医科大学病院眼科受診者を対象とした。Case 408 名, Control 142 名より末梢血を採取しゲノム DNA を精製して解析に用いた。AMD の病態としては, 滲出型 AMD, ポリープ状脈絡膜血管症 (PCV), 萎縮型 AMD の 3 型に分類した。コントロール群とした AMD 非罹患患者は, AMD の他, 他の網膜・脈絡膜疾患を有さない, 罹患群とマッチする年齢層の人を対象とした。個人を特定する情報は埼玉医科大学病院眼科において管理し, RI 部門においてはサンプルと個人情報を切り離して解析を行った。SNP 解析は, 塩基の違いにより発色する蛍光色素が異なるようにデザインされたプローブによる PCR 解析, TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ (Applied Biosystems 社) を用いて行った。調査した遺伝子および SNP は, complement factor H (CFH) 遺伝子の四つの SNP (rs800292, rs1061170, rs1410996, rs2274700), high-temperature requirement factor A1 (HTRA1) 遺伝子の rs11200638, vascular endothelial growth factor 遺伝子の三つの SNP

(rs699947, rs1570360, rs2010963), および pigment epithelium-derived factor (PEDF) 遺伝子の四つの SNP (rs12150053, rs12948385, rs9913583, rs1136287) とした。

結果

408 名の AMD 患者のうち, 373 名 (91.4%) が滲出型 AMD であり, 残りの 35 名 (8.6%) が萎縮型 AMD であった。滲出型 AMD のうち, 219 名は典型的な滲出型 AMD (58.7%), 154 名 (8%) が PCV であった。すべての AMD, 典型的な滲出型 AMD, PCV, 萎縮型 AMD は, コントロールに比べ有意高齢であった ($p < 0.001$)。また, 男性の有病率は, すべての AMD, 典型的な滲出型 AMD, PCV, 萎縮型 AMD の順で, 76.7, 73.1, 79.2, 88.6% で, それぞれコントロールよりも大幅に高かった ($p < 0.0001$)。

調査した SNP のうち, 発症と有意な関連のあったものは, CFH の rs800292, rs1410996, rs2274700, HTRA1 rs11200638 であった。これらの 4 つの SNP を組み合わせた場合, 最も低い発症リスクを持つ SNP の組み合わせと, 最も高い発症リスクを持つ SNP の組み合わせとを比べると約 70 倍相当のリスク差があった (図 1)。また, PDT に対する治療効果に関しては, HTRA1 rs11200638 が最も高い予測効果をもたらす genetic biomarker であることが明らかとなった (図 2)。

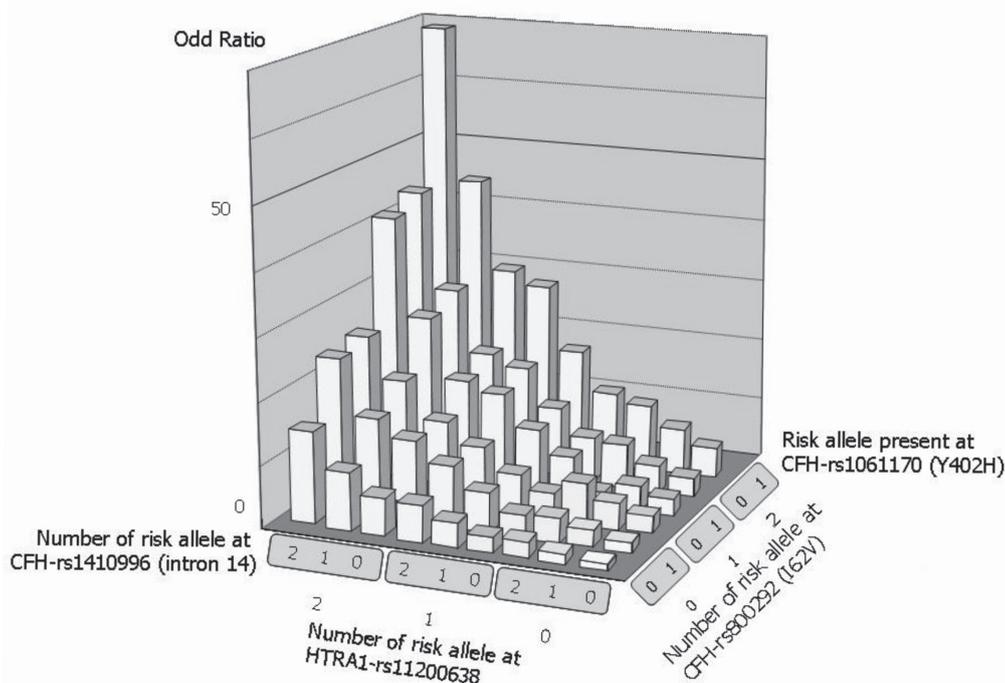


図 1. Joint effects among CFH-rs800292, -rs1061170, -rs1410996 and HTRA1 genotypes for the risk of AMD development. from Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Takita H, Kabasawa S, Kawasaki I, Ohkubo T, Kurihara S, Iizuka H, Miyashita Y, Katayama S, Awata T, Yoneya S, Inoue S. Phenotype and genotype characteristics of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology* 2010;117:928-38.

考按

結果で示したこれらの遺伝子情報がどのように臨床にかかわってくるかが、当然一番問題となるところである。これら遺伝子解析の臨床的な目的は二つあり、ひとつは病態の理解ひいては治療法の開発であり、もうひとつは個々の症例におけるリスク管理であろう。まず、病態の理解だが、例えばAMDにおいてCFH Y402HのCアレルの数が多いほどAMDに罹患しやすいことは上述したが、この場合、402番目のアミノ酸がヒスチジンに置き換わることで、CFH蛋白としての機能が劣化する。CFHは補体系の代替経路の抑制機能を担っており、CFHの機能が劣化することは、代替経路を介して補体系が容易に活性化する環境が成立していると考えられる。この他の事実として、C2, C3, CFBなどの他の補体系分子の遺伝子多型がAMD発症と関連していることが報告されており、遺伝子多型の研究により、補体系を介した炎症がAMD発症に重要な役割を果たしていることはほぼ間違いのない事実として認識されるようになった。また、日本人を代表とするアジア人種では、HTRA1/ARMS2が特に重要であるが、その機能解析ではまだ議論があり、今後の研究に注目したい。加えて、狭義AMDとPCVのサブタイプ解析においては、エラスチン遺伝子におけるハプロタイプ解析でPCVと狭義AMDの間に差がある

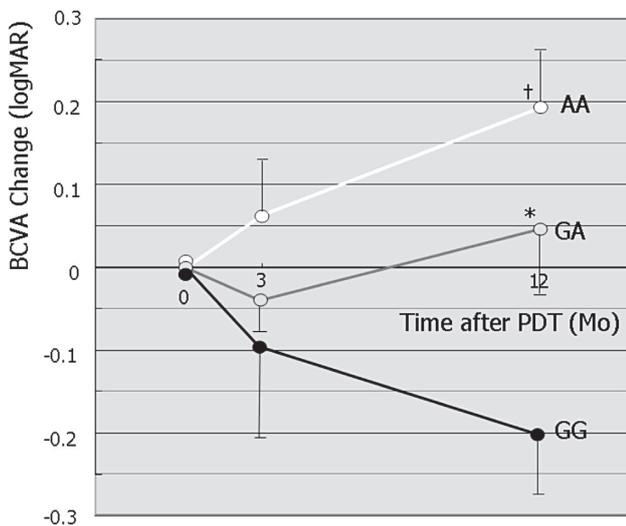


図 2. Mean logMAR vision change from baseline by patients with the HTRA1 genotype (open circle: AA, gray circle: GA, solid circle: GG) over the follow-up period. Improvement in BCVA among the HTRA1 genotypes was significantly different 12 months after PDT (* wild-type homozygous (GG) vs heterozygous (GA): $p=2.97 \times 10^{-2}$, wild-type homozygous (GG) vs risk allele homozygous (AA): $p=7.00 \times 10^{-4}$, Bonferroni multiple comparison correction). Bar, SE.

From Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, et al. *Ophthalmology* 2010 (in press).

と報告されている。このことはエラスチンがAMDとPCVの病態を形成する上で、一役担っている可能性を示唆するものである。

もうひとつの目的である個々の症例におけるリスク管理だが、一般に、1) 予防、2) 診断利用、3) 治療効果の予測、4) 治療における副作用の予測、の4つとされている。予防に関しては、集団検診や希望者における遺伝子検査で各疾患になりやすい人を見つけ、疾患になりにくいような生活習慣を指導したり、早期発見に努めるよう定期受診を勧めたりすることができる。今回の自験例550名における遺伝子解析では、いくつかの遺伝子多型を組み合わせると、リスクの高い人はそうでない人に比べて、70倍のオーダーでAMDに罹患しやすくなるという結果が出ている。このようなハイリスク群は当然予防的指導が必要と考えられる。特に日本人AMDの場合、ドルーゼンのような前駆病変を必ずしも伴うとは限らないので、現在までの検査法では発症リスクを読むのには限界がある。従って、予防医学的にもぜひとも遺伝子検査法の確立が待たれる。

診断利用としては、病気の確定診断やその性格を調べるのに利用されている。AMDを代表とする眼科疾患の場合、他の内科的疾患に比べ、診断は比較的容易でかつ正確にできるため、遺伝子検査の補助はあまり必要ないが、重症度の予測には遺伝子解析が有用である。日本人AMD (PCVを含む) では、HTRA1-rs11200638のリスクアレルを多く持つ人ほど病変サイズが巨大化しやすく、また、特にPCVではARMS2 A69Sのリスクアレルを多く持つ人ほど大量出血による硝子体出血を来しやすいと報告されている。

治療効果の予測に関しては、欧米を中心にいくつかのデータが報告されている。米国と英国の住民における光線力学療法 (PDT) 治療効果との関連はCFH Y402HとARMS2 A69Sで示されたが、フィンランドの住民からの報告では関連がないと報告されている。また、抗VEGF療法に関してもCFH Y402HとARMS2 A69Sの関連が米国から報告されている。残念ながら、現時点ではこのように報告によって意見が分かれており、統一された見解はないが、少なくとも今回のデータは日本人における初めてのものであり、AMDの病型や治療予後は人種間、特にCaucasianとAsianでは異なることが指摘されていることから、独自の重要性を持つものと解釈される。このように、本邦独自の個別化医療に関する指標を確立することが近々の重要な課題であろう。

おわりに

現在、例えば流行性角結膜炎の診断に抗原抗体反応を応用したクロマトグラフィを実際の臨床現場で使用するように、またぶどう膜炎の診療でHLAのタイピングをするように、AMD診療で遺伝子検査を行う

ようになる日もそう遠くはないと研究代表者は期待している。しかしながら、日本人を含むアジア人のAMDは、遺伝子型・表現型ともに欧米人のそれとはかなり異なるため、欧米主導型のデータを鵜呑みにすることはできない。そのため、日本人眼科医による日本人AMD患者のための遺伝型・表現型の関連データを出し続けること、しかもできるだけ多くの症例で、きちんとしたもの、可能なら多施設でまとめることが必須であり、またわれわれ日本人眼科医の責務であると研究代表者は考える。

研究成果リスト

論文

1. 上山数弘, 森圭介, 米谷新. 光線力学療法でのポリープ状脈絡膜血管症の異常血管網の変化. 臨床眼科 2009;63:511-4.
2. Tsuchihashi T, Mori K, Peyman G, Shimada Y, Yoneya S. Photodynamic effects on retinal oxygen saturation, blood flow, and electrophysiological function in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina*. 2009;29:1450-6.
3. 森圭介. 加齢黄斑変性のリスク遺伝子と個別化医療の可能性. 眼科 2009;51:1647-52.
4. Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Takita H, Kabasawa S, Kawasaki I, Ohkubo T, Kurihara S, Iizuka H, Miyashita Y, Katayama S, Awata T, Yoneya S, Inoue S. Phenotype and genotype characteristics of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology* 2010;117:928-38.
5. 土橋尊志, 森圭介, 米谷新. 視力良好な滲出型加齢黄斑変性に対する光線力学的療法の治療成績. 日眼会誌 2010;114:7-13.
6. 土橋尊志, 森圭介, 上山数弘, 大和史, 米谷新. 滲出型加齢黄斑変性に対する光線力学療法の長期成績. 臨眼 2010;64:531-5.
7. Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Takita H, Kueyama K, Okazaki Y, Inoue S, Awata T, Katayama S, Yoneya S. Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2010 (in press).

学会発表

1. 田北博保, 森圭介, 樺澤昌, 土橋尊志, 上山数弘, 飯塚裕幸, 粟田卓也, 堀江公仁子, 井上聡, 米谷新. 日本人加齢性黄斑変性症 (AMD) とポリープ状脈絡膜血管症 (PCV) の発症関連遺伝子と眼底病変の関連. 第112回日本眼科学会総会. 2008.04. パシフィコ

横浜.

2. 樺澤昌, 森圭介, 川崎いづみ, 大崎昌孝, 飯塚裕幸, 粟田卓也, 米谷新. 加齢黄斑変性とポリープ状脈絡膜血管症の生活環境因子との関連. 第112回日本眼科学会総会. 2008.04. パシフィコ横浜.
3. 土橋尊志, 森圭介, 樺澤昌, 田北博保, 上山数弘, 堀江公仁子, 井上聡, 飯塚裕幸, 粟田卓也, 米谷新. 加齢黄斑変性に対する光線力学療法の治療効果に関する遺伝因子. 第112回日本眼科学会総会. 2008.04. パシフィコ横浜.
4. Hiroyasu Takita, Keisuke Mori, Sho Kabasawa, Takashi Tutihashi, Kazuhiro Ueyama, Hiroyuki Iizuka, Takuya Awata, Kuniko Horie, Satoshi Inoue, Peter L. Gehlbach, Shin Yoneya. CFH and HTRA1 Gene Polymorphisms Correlate With Age-related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy but not Heterogeneity in Their Clinical Characteristics in a Native Japanese Population. 2008 ARVO Annual Meeting .2008.4. (Fort Lauderdale, Florida).
5. S. Kabasawa, K. Mori, K. Ueyama, H. Omata, S. Yoneya. Age and Cigarette Smoking, But Not Gender, Moderately Influence the Risk of AMD and PCV in a Japanese Population. 2008 ARVO Annual Meeting .2008.4. (Fort Lauderdale, Florida).
6. 森圭介, 米谷新. 加齢黄斑変性における遺伝子多型と個別化医療. 第10回 JAPAN Macula Club. 8/23/2008, 蒲都市.
7. 樺澤昌, 森圭介, 上山数弘, 大崎昌孝, 飯塚裕幸, 粟田卓也, 米谷新. 血中脂肪酸分画を含む生活環境因子の加齢黄斑変性発症への関与. 第47回日本網膜硝子体学会・第25回日本眼循環学会合同学会. 2008.11. 国立京都国際会館.
8. 田北博保, 森圭介, 樺澤昌, 土橋尊志, 上山数弘, 飯塚裕幸, 粟田卓也, 堀江公仁子, 井上聡, 米谷新. 日本人加齢黄斑変性におけるフルオレセイン蛍光造影の分類と発症関連遺伝子の関連. 第113回日本眼科学会総会. 2009.04. 東京国際フォーラム.
9. 森圭介, 堀江公仁子, 樺澤昌, 土橋尊志, 田北博保, 今井大介, 粟田卓也, 井上聡, 米谷新. 日本人加齢黄斑変性の表現型・遺伝子型の特徴. 第63回日本臨床眼科学会. 2009.10. 博多. 福岡国際会議場・福岡サンパレス・マリンメッセ福岡.
10. 大野京子, 森圭介, 石田晋, 相原一, 雑賀司珠也. インストラクションコース. Bench to bedside. 基礎研究を敬遠していませんか? 第63回日本臨床眼科学会. 2009.10. 博多.
11. 今井大介, 森圭介, 米谷新. 加齢黄斑変性への bevacizumab の治療効果と遺伝子多型 AMD. 第48回日本網膜硝子体学会総会・第26回日本眼循環学

会・第15回日本糖尿病眼学会総会 .2009.12. 名古屋国際会議場.

12. 森圭介, 大谷篤史, 飯島裕幸, 高橋寛二, 安川力, 尾花明, 松本容子. インストラクションコース13. 加齢黄斑変性の治療戦略. 第33回日本眼科手術学会総会. 2010.1.22-24. 東京国際フォーラム.
13. 森圭介. 特別講演. 加齢黄斑変性と光線力学的療法の過去・現在・未来. 第11回山梨網膜研究会. 山梨古名屋ホテル. 2010/3/4.
14. Mori K. Distinguished Invited Lecture. Antiangiogenic protein delivery mediated by viral

vectors. In BIT's Annual International Congress of Antibodies. March 24-26, 2010. Beijing, China.

特許出願

本学整理番号

: 埼玉特21-019

出願番号

: 特願2009-298772

出願日

: 平成21年12月28日

出願人

: 井上聡, 井上公仁子, 森圭介, 米谷新

発明の名称

: 加齢黄斑変性症易罹患性の判定マーカー並びに判定方法及び判定キット.

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

筋組織内でおこる異所性骨化メカニズムの解明と その治療法・予防法の開発

研究代表者 福田 亨(埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター)

研究分担者 片桐 岳信¹⁾, 穉田 真澄²⁾, 織田 弘美³⁾, 加藤 仁⁴⁾

緒言

骨は運動・支持器官としての機能の他, カルシウムの貯蔵組織として胎生期から種々のサイトカインやホルモンにより時間的・空間的に厳密に制御され, 一生涯にわたり恒常性が保たれる。一方, 通常の骨格形成とは別に, 本来は骨組織が形成されない部位に病的な骨形成が起こる現象として, 臨床的に筋組織内での異所性骨化が広く知られている。異所性骨化の誘発因子として, 過度のリハビリテーションや打撲, 脊髄損傷, 頭部外傷などが知られ, 人工透析や人工股関節置換術後にも異所性骨化が起こる。また, 遺伝性の難病として, 筋組織内で異所性骨化が起こる進行性骨化性線維異形成症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; FOP)が知られている¹⁾。異所性骨化の進行は関節の可動域制限を伴うため, 著しい患者のQuality of Life (QOL)の低下を引き起こす。このため, 異所性骨化の分子メカニズムを解明し, それに基づく新しい治療法や予防法を確立することが求められている。

骨誘導因子(Bone Morphogenetic Protein; BMP)は骨基質中に含まれるサイトカインで, 筋組織内に移植すると異所性骨化を誘導することから, 異所性骨化の発症に深く関わることを示唆される。BMPは, 培養細胞を用いた実験系でも骨芽細胞への分化誘導能を示す。我々は, 筋サテライト細胞由来の筋芽細胞(C2C12細胞)が, BMPシグナルによって筋細胞から骨芽細胞へと分化することを発見した²⁾。また, 我々は世界で初めて血清から活性型BMPを単離することに成功し, BMPが全身性の骨形成因子である可能性を示した³⁾。このようにBMPやその活性調節因子は, 全身性の生理的骨形成や病的骨形成に重要な役割を担うと予想さ

れているが, その標的細胞などを含めた異所性骨化の発症機序は未だ明らかでない。

Wntは350~380個のアミノ酸からなる分泌性糖タンパクで23~24個のCys残基が分子内の共通した位置に保存されている^{4,5)}。細胞外に分泌されたWntは細胞表面上に存在する7回膜貫通型受容体であり10種類報告されているfrizzled (Frz)と1回膜貫通型の共役受容体であるlow-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5/6に結合する。Wntシグナル伝達経路には β -catenin/T-cell factor (TCF)を介してWnt標的遺伝子の発現を制御するWnt/ β -catenin経路(Canonical経路), 細胞骨格系の制御に参与する細胞内平面極性(planar cell polarity:PCP)経路が知られている。Wntリガンドのうち少なくともWnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8およびWnt8bがWnt/ β -catenin経路を活性化することが知られている。この経路の活性は細胞質に存在する β -cateninの量によって決定される。通常, 細胞質内の β -cateninの量はAxin, adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), casein kinase 1 α (CK1 α)の4つを含む複合体によって制御されるプロテアソーム依存性のタンパク質分解によって低いレベルに抑えられている。Frz/LRP複合体にWntが結合することにより惹起されるシグナルにより, その下流に存在するdishevelled (Dvl)はリン酸化され, 協働するAxinを介してGSK-3 β の活性を阻害する。 β -cateninはGSK-3 β によってリン酸化されるとユビキチン化され, 26Sプロテアソームにて分解される。従ってGSK-3 β の活性阻害は細胞質内の β -cateninの集積につながる。リン酸化を免れた β -cateninは核内へと移行し, 転写因子TCFと複合体を形成し, CREB binding protein (CBP)などの他の転写因子とも相互作用して標的とする遺伝子の転写を制御する⁴⁾。Wntシグナルは骨芽細胞の分化にも深く関わっており, 体内の骨量調節に重要なシグナル伝達経路である⁵⁾。培養

1) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター
2) 埼玉医科大学 中央研究施設 形態部門
3) 埼玉医科大学 整形外科 脊椎外科
4) 埼玉医科大学 医学部 医学科

細胞を用いた種々の実験から、Wntが骨芽細胞を成熟した骨芽細胞へと分化を促すことが示されており、また未分化間葉細胞から骨芽細胞への分化にWntが必要とされる可能性が示されている。近年Wntシグナル伝達経路の異常と骨の疾患について明らかにされつつある。まずFzの共役受容体であるLRP5の遺伝子異常が骨密度の異常な低下や上昇に結びついていることが報告され^{6,7)}、またこの共役受容体の変異が若年性に骨粗鬆症を発症し、骨量の減少に起因する骨折や骨の変形を特徴とする骨粗鬆症-偽神経膠腫症候群 (osteoporosis-pseudoglioma syndrome:OPPG)の原因となることが報告されている⁶⁾。

近年、BMPシグナルとWntシグナルの相互作用の存在が示唆されているが、詳細については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、異所性骨化の発症メカニズムの一端を解明するため、骨芽細胞分化におけるBMPとWntの相互作用の解明を試みた。

材料・方法

実験にはマウス筋芽細胞由来C2C12細胞を用いた。15%FBSおよびPenicillin-Streptomycinを添加したDMEM培地を用い、37℃、5%CO₂下で培養を行った。各リガンド処理を行ったC2C12細胞の骨芽細胞分化は骨芽細胞の特異的分化マーカーとして知られるalkali phosphatase (ALP)の酵素活性およびOsteonectin、I型コラーゲンおよびOsteocalcin遺伝子の発現を指標に判定した。測定は各リガンド処理後3日目に行った。各シグナル系の活性化はIdWT4F-luc (BMP) およびSuperTOPflash (Wnt) を用いたLuciferase assayにより検討を行った。Luc活性の測定は各リガンド処理後1日目に行った。

結果および考察

Canonical WntリガンドとBMPは骨芽細胞分化を相乗的に誘導する

C2C12細胞を各WntリガンドとBMP-4で処理し、

ALP活性を測定したところCanonical WntリガンドであるWnt1およびWnt3aがBMPと相乗的に骨芽細胞分化を誘導した(図1, A)。一方、non-canonical WntリガンドであるWnt5aおよびWnt11ではこのような効果は認められなかった。また、Wnt3aは濃度依存的にALP活性を上昇させることが明らかとなった(図1, B)。さらに、BMP-6もBMP-4同様にWnt3aと骨芽細胞分化を相乗的に誘導することが観察された(図1, C)。これらの結果からCanonical WntがBMPと相乗的に骨芽細胞分化を誘導することが示唆された。

WntとBMPは骨芽細胞分化の初期分化を誘導する

WntとBMPによる骨芽細胞分化誘導を詳細に検討するため、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を検討したところ、BMP単独処理群と比較しWnt+BMP処理で骨芽細胞分化の初期マーカーであるI型コラーゲンおよびOsteonectin遺伝子の発現が有意に上昇していることが観察された(図2)。しかしながら、後期分化マーカーであるOsteocalcin遺伝子の発現に変化は認められなかった。以上の結果からWntとBMPは骨芽細胞分化の初期分化を誘導することが示された。

WntとBMPによる骨芽細胞分化誘導はβ-catenin系を介さない

両リガンドによる骨芽細胞分化誘導メカニズムを明らかにするため、WntがBMPシグナルを活性化するか否かをLuciferase assayにより検討した。その結果、WntはBMPのreporterであるIdWT4Fを活性化しなかった(図3, A)。さらに、WntはBMPの細胞内シグナル伝達分子であるSmad1/5/8のリン酸化にも影響を与えなかった(図3, B)。同様にBMPがWntシグナルを活性化するか検討を行ったところ、BMPによるWntシグナルの活性化は観察されなかった(図3, C)。この現象を詳細に検討するため、Wntシグナルの細胞内シグナル伝達分子であるβ-cateninおよび恒常的活性化型β-cateninをBMP-4と共にC2C12細胞で過剰発現させたところ、Wnt+BMPで見られるようなALPの相乗的な活性化は観察されなかった(図4)。一方、Wnt

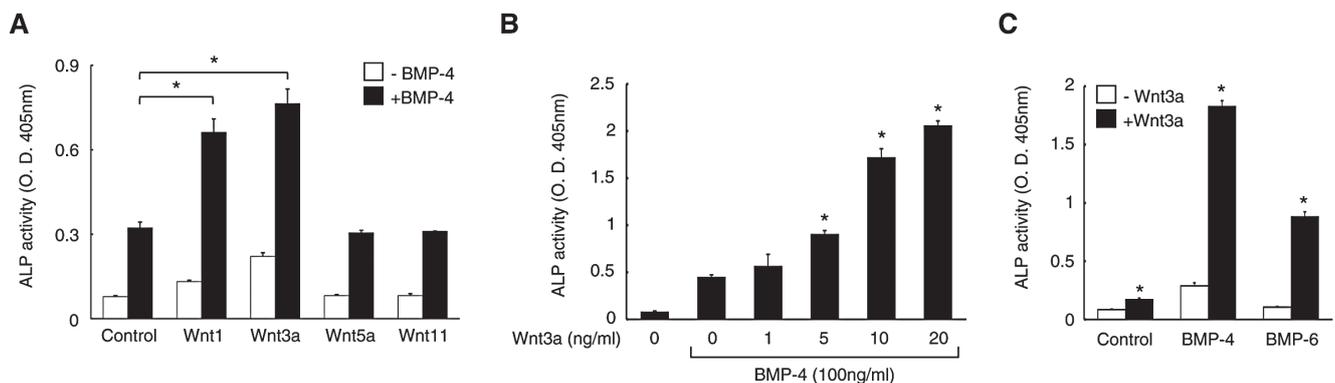


図1. WntとBMPによる骨芽細胞分化誘導。

およびBMPと共にGSK3 β を過剰発現させたところ、ALPの相乗的な活性化は有意に抑制された。

本研究により、BMPとWntは骨芽細胞分化の初期段階を相乗的に誘導することが明らかとなった。さらに、この相乗的誘導はGSK3 β には依存するが、 β -cateninには依存しない系を介することが示唆された。今後さらにWntとBMPの相乗効果メカニズムを解析することで、異所性骨化発症メカニズムの解明に貢献できるものと期待される。

研究成果リスト

論文

- 1) Fukuda T, Kanomata K, Nojima J, Kokabu S, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Komori T, Maruki Y, Matsuoka M, Miyazono K, Nakayama K, Nanba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Haga N, Furuya H, Katagiri T. A unique mutation of ALK2, G356D, found in a patient with fibrodysplasia ossificans progressiva is a moderately activated BMP type I receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;377:905-9.
- 2) Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro H, Okazaki Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;368:267-72.
- 3) Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, Nojima J, Nakamura A, Kamizono J, Noguchi Y, Iwakiri K, Kondo T, Kurose J, Endo K, Awakura T, Fukushima J,

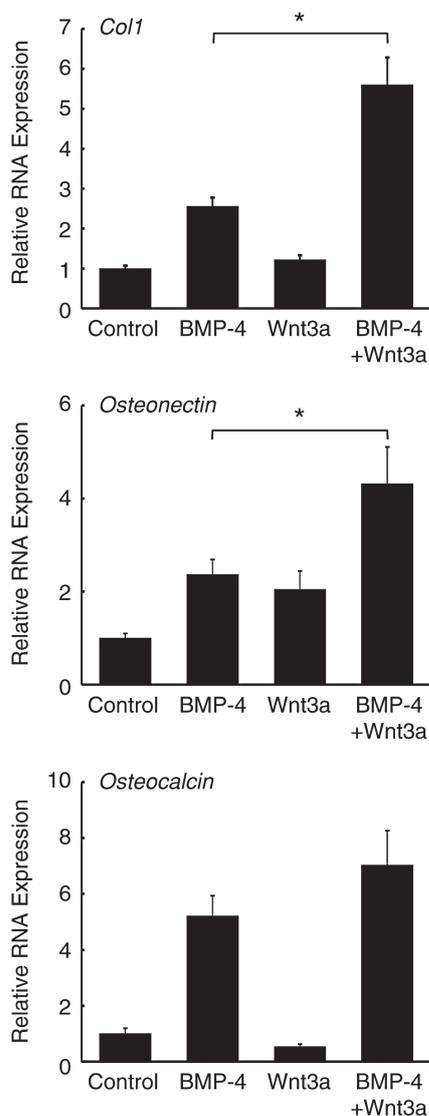


図2. 骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現確認。

Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Haga N, Furuya H, Katagiri T. A unique mutation of ALK2, G356D, found in a patient with fibrodysplasia ossificans progressiva is a moderately activated BMP type I receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;377:905-9.

- 2) Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro H, Okazaki Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;368:267-72.
- 3) Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, Nojima J, Nakamura A, Kamizono J, Noguchi Y, Iwakiri K, Kondo T, Kurose J, Endo K, Awakura T, Fukushima J,

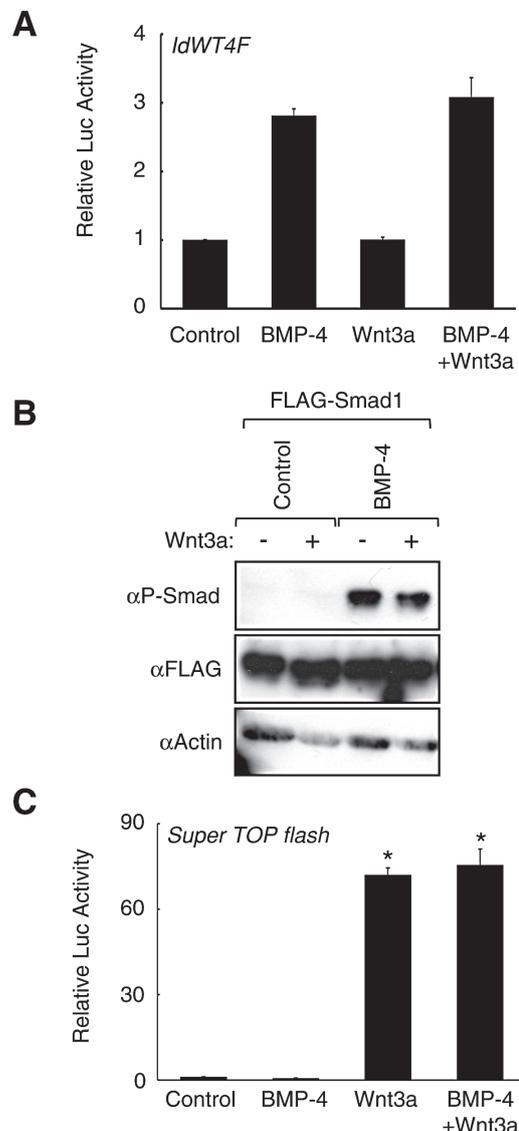


図3. WntとBMPは互いのシグナル系を活性化しない。

Nakashima Y, Chiyonobu T, Kawara A, Nishida Y, Wada I, Akita M, Komori T, Nakayama K, Nanba A, Maruki Y, Yoda T, Tomoda H, Yu PB, Shore EM, Kaplan FS, Miyazono K, Matsuoka M, Ikebuchi K, Ohtake A, Oda H, Jimi E, Owan I, Okazaki Y, Katagiri T. Constitutively activated ALK2 and increased SMAD1/5 cooperatively induce bone morphogenetic protein signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J. Biol. Chem.* 2009;284:7149-56.

- 4) Kanomata K, Kokabu S, Nojima J, Fukuda T, Katagiri T. DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. *Genes Cells* 2009;14:695-702.
- 5) Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, Tanabe M, Takezawa S, Takada I, Yamaoka I, Yonezawa M, Kondo T, Furutani Y, Yagi H, Yoshinaga S, Masuda T, Fukuda T, Yamamoto Y, Ebihara K, Li DY, Matsuoka R, Takeuchi JK, Matsumoto T, Kato S. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009;106:9280-5.
- 6) Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, Yagi K, Yatsuka-Kanesaki Y, Suda T, Fukuda T, Katagiri T, Kondoh Y, Amemiya T, Tashiro H, Okazaki Y. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett.* 2009;583:2263-8.
- 7) Kokabu S, Nojima J, Kanomata K, Ohte S, Yoda T, Fukuda T, Katagiri T. Protein Phosphatase Magnesium-Dependent 1A-Mediated Inhibition

of BMP Signaling is Independent of Smad Dephosphorylation. *J. Bone Miner. Res.* 2009; in press.

学会発表

- 1) Nojima J, Kanomata K, Fukuda T, Nakamura A, Tsukui T, Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T, Katagiri T: Dual Roles of Smad Proteins in the Conversion from Myoblasts to Osteoblastic Cells by BMPs. 30th ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) annual meeting September 12-16, 2008, Montreal, Canada.
- 2) 野島淳也, 鹿又一洋, 福田亨, 中村厚, 古株彰一郎, 岡崎康司, 依田哲也, 片桐岳信: BMPはSmad4-E4F1を介して筋分化を抑制する. 第15回BMP研究会2008年10月28日大阪.
- 3) 古株彰一郎, 野島淳也, 福田亨, 鹿又一洋, 依田哲也, 片桐岳信: R-SmadのホスファターゼPPM1AによるBMP活性の抑制はSmadの脱リン酸化に依存しない分解を介す. 第15回BMP研究会2008年10月28日大阪.
- 4) 野島淳也, 鹿又一洋, 福田亨, 中村厚, 古株彰一郎, 依田哲也, 片桐岳信: BMPシグナルは核内のSmad4とE4F1の相互作用によって筋分化を抑制する. 第26回日本骨代謝学会学術集会2008年10月30日大阪.
- 5) 鹿又一洋, 福田亨, 野島淳也, 中村厚, 古株彰一郎, 片桐岳信: BMP補助受容体DRAGONはBMPによる骨芽細胞分化を抑制する. 第26回日本骨代謝学会学術集会2008年10月30日大阪.
- 6) 古株彰一郎, 野島淳也, 福田亨, 鹿又一洋, 依田哲也, 片桐岳信: SmadのホスファターゼPPM1AはSmadの脱リン酸化ではなく分解を促進してBMPシグ

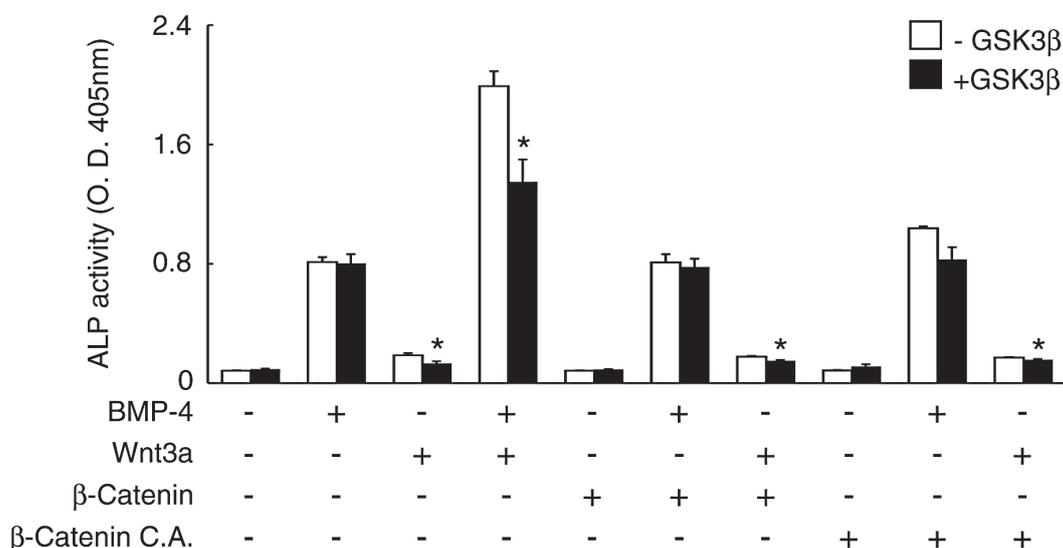


図4. WntとBMPはβ-catenin非依存的な系で骨芽細胞分化を誘導する。

- ナルを抑制する. 第26回日本骨代謝学会学術集会 2008年10月30日 大阪.
- 7) 古株彰一郎, 野島淳也, 福田亨, 中村厚, 鹿又一洋, 依田哲也, 片桐岳信: R-Smadのホスファターゼ PPM1AによるBMPの活性抑制には脱リン酸化に依存しないSmadの分解が重要である. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008)2008年12月11日 兵庫.
- 8) 野島淳也, 鹿又一洋, 福田亨, 中村厚, 古株彰一郎, 岡崎康司, 依田哲也, 片桐岳信: BMPシグナルはSmad4-E4F1を介して筋分化を制御する. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008)2008年12月12日 兵庫.
- 9) Kokabu S, Nojima J, Kanomata, Yoda T, Fukuda T, Katagiri T: Protein phosphatase magnesium-dependent 1A inhibits BMP signaling by stimulating Smad degradation independent of dephosphorylation at the carboxyl termini. 2nd Joint Meeting International Bone & Mineral Society and Australian & New Zealand Bone & Mineral Society March 22, 2009, Sydney, Australia.
- 10) Katagiri T, Kanomata K, Kokabu S, Nojima J, Fukuda T: DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. 2nd Joint Meeting International Bone & Mineral Society and Australian & New Zealand Bone & Mineral Society March 24, 2009, Sydney, Australia.
- 11) 古株彰一郎, 大手聡, 野島淳也, 依田哲也, 福田亨, 片桐岳信: Smad C末端のホスファターゼPPM1AとSCP1はリンカー領域のMAPKリン酸化部位を介してBMPシグナルを抑制する. 第27回日本骨代謝学会学術集会 2009年7月25日 大阪.
- 12) 福田亨, 古株彰一郎, 大手聡, 片桐岳信: Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)で同定されたALK2変異体の解析. 第27回日本骨代謝学会学術集会 2009年7月25日 大阪.
- 13) 古株彰一郎, 大手聡, 福田亨, 片桐岳信: Smad1のリン酸化・脱リン酸化による骨芽細胞分化誘導の制御. 第16回BMP研究会(2009年7月27日, 大阪).
- 14) 福田亨, 古株彰一郎, 大手聡, 片桐岳信: Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)で新たに同定されたALK2変異体の解析. 第16回BMP研究会 2009年7月27日 大阪.
- 15) 福田亨, 古株彰一郎, 大手聡, 片桐岳信: WntとBMPリガンドによる相乗的な骨芽細胞の誘導機構. 第32s回BMP日本分子生物学会年会 2009年12月12日 横浜.

参考文献

- 1) Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, et al. Constitutively activated ALK2 and increased SMAD1/5 cooperatively induce bone morphogenetic protein signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem* 2009;284:7149-56.
- 2) Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994;127:1755-66.
- 3) Kodaira K, Imada M, Goto M, et al. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:1224-31.
- 4) Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002;296:1644-6.
- 5) Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004;341:19-39.
- 6) Gong Y, Slee RB, Fukai N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001;107:513-23.
- 7) Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;346:1513-21.

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

肺癌における予後マーカーとしての EZH2 発現と ゲノム解析による予後・転移規定因子同定

研究代表者 小山 信之 (埼玉医科大学 国際医療センター 呼吸器内科)

緒言

Polycomb 遺伝子群 (PcG) はクロマチン構造を変化させ、遺伝子の発現を抑制する遺伝子の一群であり、PcGに属する複数の蛋白質によって複合体, Polycomb repressor complex (PRC) を形成して機能を発揮する. Enhancer of zeste homolog (EZH2) は PRC2 の構成分子であり、ヒストン H3 の Lysine 9 と 27 に対するメチル化を促進し、さまざまな遺伝子発現を抑制することがわかっている¹⁾. EZH2 に関する研究は発生学、幹細胞および癌増殖経路に関する分野において盛んであり、EZH2 は幹細胞の pluripotency において重要であることがわかっているが、最近 EZH2 の過剰発現が前立腺癌等の転移に関与している可能性があることが報告された²⁾. しかしながらこれまでに肺癌を対象とした EZH2 に関する解析の報告はなく、肺癌の臨床病理学的特徴や生物学的特性、分子病態と EZH2 の関係は不明である.

これまでに我々は20種類の肺癌(一部は悪性中皮腫)細胞株における EZH2 mRNA の発現を realtime PCR を用いて解析し、50%以上の細胞株で正常ヒト肺組織に比して発現が2倍以上亢進していることを確認した (Fig 1). さらに EZH2 mRNA の発現亢進がみられている細胞株に対して抗 EZH2 抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、EZH2 蛋白の著しい発現が認められていた. 多くの肺癌細胞株において、EZH2 が mRNA、蛋白レベルともに発現亢進していることが確認されたことから、EZH2 が肺癌の病態に対して影響を及ぼしている可能性が示唆された. これら肺癌細胞株での実験結果をもとに、臨床検体を用いての EZH2 発現に関する研究を計画し、すでに埼玉医科大学倫理委員会にて審査を受けて承認済みである. そこで患者同意を得て非小細胞肺癌切除検体に対して免疫組織化学を用いた EZH2 発現解析を行い、EZH2 発現と臨床病理学的特徴との関係を調査して EZH2 が非小細胞肺癌における予後をはじめとした臨床的なマ-

ーカーになりうるかについて検討をおこなった.

方法

EZH2 mRNA 発現解析; 20種類の肺癌(一部は悪性胸膜中皮腫)細胞株から total RNA を抽出し、realtime PCR を用いて EZH2 mRNA 発現レベルを解析した. コントロールとして正常ヒト肺組織 total RNA を用い、細胞株/正常ヒト肺組織の発現比にて細胞株における EZH2 mRNA 発現レベルの評価を行った.

免疫組織化学; 84例のI期非小細胞肺癌症例 (Table 1) の外科切除標本から薄切切片を作製した後、抗ヒトマウス EZH2 モノクローナル抗体を一次抗体として用いた免疫染色を行った (Fig 2). 過去の報告をもとに EZH2 蛋白発現レベルを半定量的に解析して、発現レベル別に3群 (非発現群 29例; 0%, 低発現群 33例; <50%, 高発現群 22例; >50%) に分類し、各群における生存期間、年齢、性別、組織型、組織分化度、病期、腫瘍径を比較した³⁾ (Table 2).

結果

EZH2 mRNA 発現解析; 20種類の細胞株中11種類の細胞株において有意な発現亢進 (発現比 2.0 以上) が見られた (2.0-6.9). 一方4種類の細胞株では相対的に発現低下が見られた (0.3-0.7). これらから肺癌細胞株における EZH2 mRNA 発現亢進は比較的高頻度で認められるということが新たに判明した (Fig 1).

免疫組織化学; 免疫組織化学による EZH2 発現解析と臨床病理学的特徴との比較から生存期間と病期が EZH2 発現と有意な相関を示し、3群比較において EZH2 非発現群で有意に生存期間延長が見られた. さらに EZH2 低発現群と高発現群をあわせた EZH2 発現群と EZH2 非発現群との2群比較においても、EZH2 非発現群は有意に生存期間延長を認めた (Fig 3). 一方生存期間に関与する因子の解析では、EZH2 発現と病期のみが生存期間と有意な相関を示した (Table 3).

Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析で

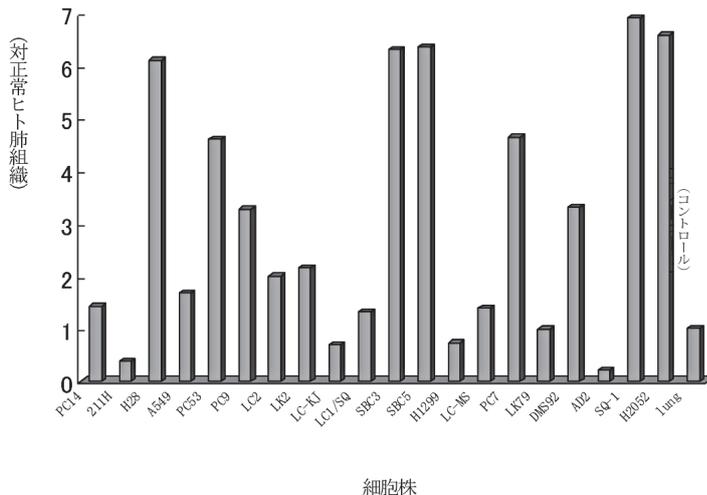


Fig1. 肺癌細胞株におけるEZH2 mRNA発現. 肺癌細胞株とヒト肺におけるEZH2 mRNA発現をEZH2発現値/GAPDH発現値にて測定し, 肺癌細胞株とヒト肺との比により過剰発現の有無を解析した.

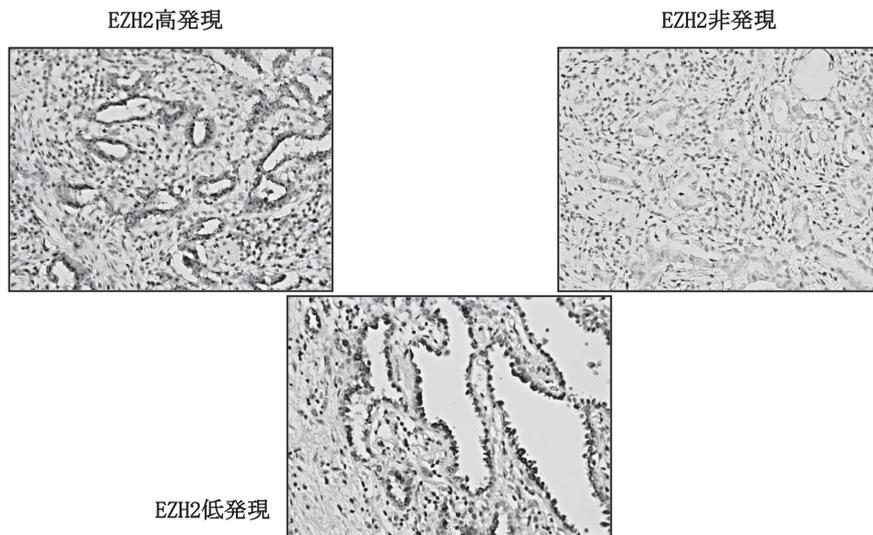


Fig2. 免疫組織化学を用いた非小細胞肺癌におけるEZH2発現. 免疫組織化学を用いて非小細胞肺癌切除標本におけるEZH2蛋白発現を解析し, 3群(発現細胞数が視野内において10%未満の場合EZH2非発現群, 10-50%未満の場合EZH2低発現群, 50%以上の場合EZH2高発現群)に分類した.

Table1. 解析症例の臨床病理学的特徴

年齢 (平均) :	64.2 ± 11.0歳
性別 :	男性: 54例 女性: 30例
病期 :	IA: 58例 IB: 26例
組織型 :	腺癌: 55例 扁平上皮癌: 27 大細胞癌: 2
生存期間 (平均) :	2206.5日間

Table2. EZH2発現と臨床病理学的特徴との関係

	年齢 (歳; 平均)	性別 (男: 女)	病期 (IA: IB)	組織型 (腺癌: 非腺癌)	組織分化度 (高分化: 非高分化)	生存期間 (日)
EZH2 非発現 (29)	63.9 ± 11.5	15:14	24:5	20:9	18:11	2484.9
EZH2 低発現 (33)	63.6 ± 11.3	23:10	21:12	21:12	17:16	2015.3
EZH2 高発現 (22)	65.3 ± 10.4	16: 6 <i>P</i> < 0.05	13:9	14:8	13:9	1854.7 <i>P</i> < 0.01

は、EZH2発現と病期が生存期間と有意な相関を示し、特にEZH2は5.46と最高値を示した (Table 4)。さらにPearsonの相関係数では、病期、性別、組織型は各々相関を示したが、EZH2発現は他の因子との相関が見られず、単独で危険因子となることが判明した (Table 5)。

考察

肺癌は様々な治療法の開発にも関わらず年間死亡者数が世界で130万人以上、日本でも6万人以上と全癌種中最多である。そのために新たな治療法や早期に診断、最適な治療を可能にするマーカー等の新たな診断法の開発が最も望まれている癌であるが、いまだ途上段階であり十分とはいえない。本研究では根治的外科

治療を行ったI期非小細胞肺癌症例において、EZH2発現が予後予測因子となることが示唆された。I期非小細胞肺癌術後に予後を規定するのは主に再発の有無と考えられ、今後EZH2発現がみられた症例では積極的な術後化学療法を行うことにより、再発予防、生存期間延長に結びつく可能性がある。現在のエビデンス、ガイドラインではI期非小細胞肺癌に対する術後化学療法は、IB期肺腺癌に対する経口化学療法剤(テガフル・ウラシル)のみで、IA期に対しては術後化学療法の有効性は証明されていない⁴⁾。今後EZH2発現の有無による術後化学療法施行に関する臨床試験を行うことにより、EZH2発現による肺癌個別化医療の確立が可能か否か検証可能と考えられる。

要約

EZH2はI期非小細胞肺癌の有効な予後予測因子となる可能性が示唆された。今後臨床応用に向けて研究を進めることで、肺癌に対する個別化医療の進展に寄与することが期待される。

引用文献

- 1) Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C,

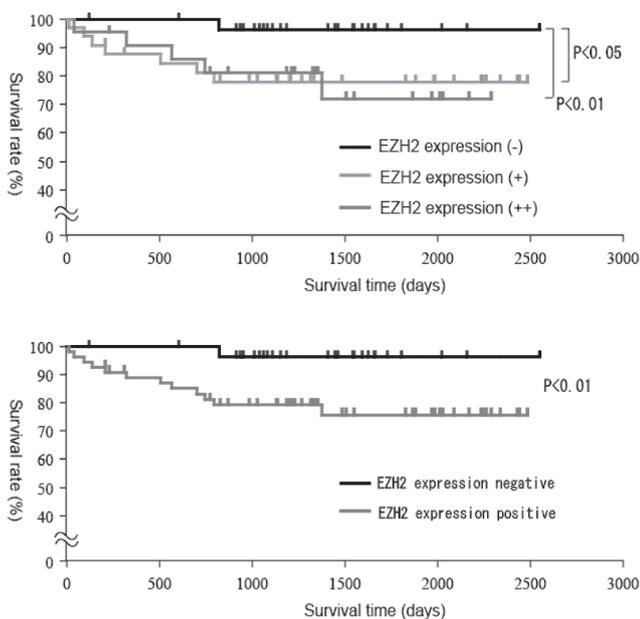


Fig3. EZH2発現レベルによるKaplan-Meier生存曲線。EZH2発現により分類した3群の生存率をKaplan-Meier生存曲線を用いて解析した。EZH2非発現群は有意に生存期間延長を示した。

Table3. EZH2発現以外の因子と生存期間との関係

因子	平均生存期間 (日)	P値
年齢 (≥64歳 : 64歳<)	2007.4 : 2361.4	P=0.103
性別 (男性 : 女性)	2037.5 : 2340.8	P=0.269
病期 (IA : IB)	2390.6 : 1694.9	P<0.001
組織型 (腺癌 : 非腺癌)	2274.7 : 1978.8	P=0.299
組織分化度 (高分化 : 非高分化)	2269.0 : 2047.6	P=0.358
EZH2発現 (非発現 : 発現)	2484.9 : 2007.6	P=0.026

Table4. Cox比例ハザードモデル

	危険度	95% 信頼区間下限	95% 信頼区間
EZH2発現	5.465852872	1.68877163	43.37511346
年齢	1.885126093	0.54353425	6.538135159
性別	1.194031688	0.21282008	5.663969895
組織型	0.977495994	0.25249957	3.029796256
組織分化度	0.802995326	0.21282008	3.029796256
病期	4.51150519	1.26444786	16.09689071

Table5. Pearsonの相関係数

	EZH2発現	年齢	性別	組織型	組織分化度	病期
EZH2発現		NS	NS	NS	NS	NS
年齢	NS		NS	NS	NS	NS
性別	NS	NS		P<0.01	NS	P<0.001
組織型	NS	NS	P<0.01		NS	P<0.01
組織分化度	NS	NS	NS	NS		NS
病期	NS	NS	P<0.001	P<0.01	NS	

- Lebersorger A, et al. Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at S. cerevisiae telomeres. *EMBO J* 1997;16:3219-32.
- 2) Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002;419:624-9.
 - 3) Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H, et al. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci* 2006;97:484-91.
 - 4) Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 2004;350:1713-21.
- 細胞肺癌予後との関係, 第48回日本呼吸器学会学術講演会
- 2) Huqun, Jialing Zhang, Nobuyuki Koyama, Yoshiya Goto, Hiroyuki Nitanda, Yoshihiko Shimizu, Koichi Kaneko, Minoru Kanazawa, Kunihiko Kobayashi, Koichi Hagiwara. Enhancer of zeste 2 (EZH2) as a prognostic marker of non-small cell lung cancer, 第67回日本癌学会学術総会
 - 3) Huqun, Jialing Zhang, Nobuyuki Koyama, Yoshiya Goto, Hiroyuki Nitanda, Yoshihiko Shimizu, Koichi Kaneko, Minoru Kanazawa, Kunihiko Kobayashi, Koichi Hagiwara. Enhancer of zeste 2 (EZH2) as a prognostic marker of non-small cell lung cancer, 第49回日本肺癌学会総会
 - 4) Nobuyuki Koyama, Huqun, Jialing Zhang, Yoshiya Goto, Hiroyuki Nitanda, Yoshihiko Shimizu, Koichi Kaneko, Minoru Kanazawa, Kunihiko Kobayashi, Koichi Hagiwara. Enhancer zeste homolog (EZH) 2 expression reduces the survival of the patients with non-small cell lung cancer, 100th American Association for Cancer Research

研究成果リスト

学会発表

- 1) 呼群, 張嘉玲, 小山信之, 後藤義也, 二反田博之, 清水禎彦, 金子公一, 金澤實, 小林国彦, 萩原弘一. Enhancer of zeste homolog (EZH2) 発現とI期非小

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

慢性腎臓病患者の予後改善に関する基礎及び臨床的研究

研究代表者 竹中 恒夫(埼玉医科大学 医学部 腎臓内科)

研究分担者 井上 勉¹⁾, 加藤 信孝¹⁾, 高根 裕史¹⁾, 宮崎 孝²⁾

緒言

21世紀に入り、人口の高齢化、肥満や糖尿病の増加に伴い、心疾患や脳血管障害に加え、終末臓器である慢性腎臓病の患者数が急増してきている。幸いなことに慢性腎臓病が進行し末期腎不全となっても、腎機能を代替する透析療法があり生命は保たれるが、多額の医療費が必要となる。日本透析医学会の統計によれば、わが国の透析患者数は25万人を超え、年間の医療費は1兆5000万円に及び、社会的な問題となっている。また、慢性腎臓病の患者が動脈硬化症に基づく心血管病を合併しやすいことも周知の事実である。しかし、上記の金額は血液浄化に必要な費用だけであって、透析患者や保存期の慢性腎臓病患者が心筋梗塞や脳血管障害等を併発した際の医療費は含まれていない。欧米を中心とした先進国でも人口の高齢化や肥満の増加は進んでいる。最近、WHOが危機感を憶えたためか、慢性腎臓病は心血管病のリスクであり、タンパク尿でさえも心筋梗塞の既往を同程度の心血管死に対するリスクであるという勧告を示したのは記憶に新しい。また、WHOは肥満や糖尿病の急増を受けて、以前より問題とされてきた低栄養に伴う疾患よりも過栄養に基づく疾患を重要視するようにパラダイムシフトを行った。特に日本人を含めたアジア人は欧米人と比べて、平均して糸球体濾過率が低く慢性腎臓病に罹患しやすい傾向がある。どのような治療が腎障害の進行をより効果的に遅延させ、腎疾患患者の心血管病の発症を予防するかを明らかにすることは倫理的のみならず医療経済的にも重要な問題である。

腎臓は水、電解質代謝だけでなくホルモンを分泌し生体の恒常性に寄与している。腎臓由来のホルモンとしては、レニンやエリスロポイエチンに加え、クロトが考えられている。クロトは最近同定された腎の遠位尿細管と脳の脈絡叢、副甲状腺に発現している

蛋白である。クロトは特に尿細管に強く発現しており、Transient receptor potential V5を活性化しカルシウム代謝に関与するとともに、Fibroblast growth factor-23 (FGF23) 受容体の形成を促しリン代謝にも関与している。クロトは細胞を一回貫通する130 kdの蛋白であるが、細胞内ドメインは10アミノ酸と短く、また細胞外ドメインは弱いベータ・グルコシダーゼ活性を持っており、また、膜直上付近で切断され分泌される。最近はこの分泌されたクロトはホルモンとして作用し、superoxide dismutaseやカタラーゼといった活性酸素を分解する酵素を誘導することが示唆されている。また、クロトは内皮細胞の延命し、一酸化窒素等の産生を亢進させる。予想されるように腎臓でのクロトの発現は慢性腎疾患患者で低下している。また、クロトを過剰発現した動物では腎障害の進行が遅延することが判明している。動脈硬化の治療として脂質異常を正常化することは勿論であるが、一酸化窒素系の活性化等により酸化ストレスを軽減することも慢性腎臓病に頻繁に認められる大血管障害を抑制するためには肝要であろう。クロトの遺伝子を挿入突然変異により破壊したマウスは、動脈硬化や骨粗鬆症などの老化徴候を示す。クロト機能の温存は腎障害の治療のみならず、老化の予防につながるものと思われる。

方法

クロトの精製と結合実験：ヒト α クロト1のcDNA (OriGene Technologies) をCHO細胞 (TET-ON CHO-K1 Cell Line) でTrans IT-CHO Transfection Reagentを用いて過剰発現させる。培養上清中に出てきた分泌型のクロト蛋白をQ-Sepharose FF, ConA-Sepharose 4B, DEAE-Sepharose FFを順次使用して単離抽出した。この蛋白を用いてクロトの組織結合実験を行った。

クロトの発現の調節因子：クロト発現の生理的な調節因子を解明するため、腎機能正常な動物(ウイスターラット, 雄, 8週令)を用いて、FGF23 (10 micro-g/Kg),

1) 埼玉医科大学 医学部 腎臓内科

2) 埼玉医科大学 地域医学・医療センター

ビタミンD (1 micro-g/Kg), parathyroid hormone (PTH, 10 micro-g/Kg) を投与して3時間後に過剰の麻酔薬を使用して屠殺し, 腎臓でのクロト発現への影響を観察した. 本来, 培養細胞を使用した実験を考慮したが, クロトをstableに発現している細胞株がなく *in vivo* の研究を行った. クロトの蛋白レベルをウエスタンブロットでモノクロナル抗体を用いて検出し, β アクチンで補正した値を用いた.

病態モデルでのクロト: 片腎臓を摘出した脳卒中易発症性自然高血圧ラットに高塩食を负荷する高血圧性腎硬化症のモデルを用いて, 一群にはビタミンDを投与し (30 ng/Kg, 浸透圧ポンプを使用), 他群をコントロールとして溶媒のみを12週間投与し, 2群間で腎でのクロト, 血管内皮機能 (アセチルコリンによる降圧の程度), 腎機能, 腎組織等を検討した.

結果

1 Lの培養上清液から約1 μ gのクロトの抽出が可能であった. 合成したクロトの腎組織への結合反応は良好で, 特に内皮細胞に結合することが判明した.

腎機能正常のウイスターラットを用いた検討では PTH (約3倍), FGF23 (約10倍) とビタミンD (約4倍) の投与は腎臓でのクロト発現を3時間で増加させた (図1). また, PTHは同時点で測定した FGF23 (312 \pm 23 vs 170 \pm 15 pg/ml, $p < 0.05$) を増加させたが, ビタミンDは変化を与えなかった (210 \pm 20 pg/ml). よって, PTHによるクロトの亢進作用は FGF23 に依存する

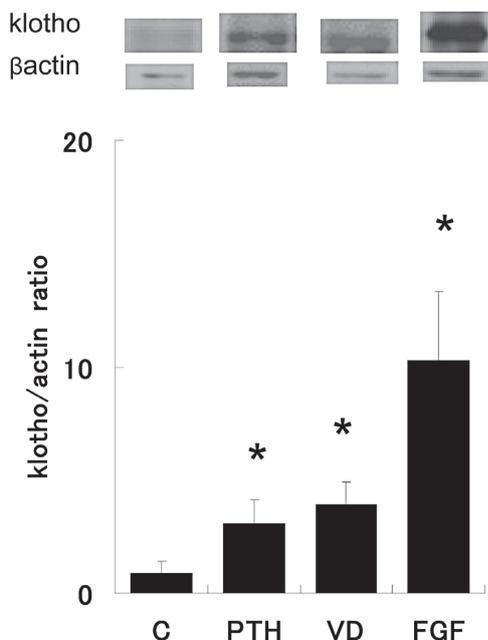


図1. Effects of fibroblast growth factor-23 (FGF23), parathyroid hormone (PTH) and vitamin D (VD) on renal klotho expression. * indicates significant difference from the control.

と思われるが, ビタミンDは FGF23 とは独立にクロト発現に正の影響を与えられたと考えられた. なお, これらのシグナル伝達経路については現在も解析中である.

病態モデルである自然高血圧発症ラットを用いた検討では, ビタミンD投与群に比べてコントロール群でクロト発現は障害されていた (図2). コントロール群に比べてビタミンD群では蛋白尿やクレアチニンクリアランスには変化なかったが, ビタミンD群で腎繊維化は抑制され, 8-epi-prostaglandin F2 α の排泄も半減した. アセチルコリンに対する反応もビタミンD群で改善が認められた (表1).

考案

分泌型クロト蛋白は合成可能であったが, 当初考えていたよりも分離が困難であることが判明し, RIAに用いるには収量が不十分であった. クロトは非常に凝集しやすく, このために困難があると考えられ, 今後臨床応用を考慮した際に PEG化等の改善を要する点と考えられた. 大量にクロトを合成し, 測定や慢性実験に使用する予定であったが, 今回は量的にも困難であり, 組織染色にのみ使用した.

FGF23は遠位尿細管に存在する膜型クロトと共に FGF受容体に結合して, シグナル伝達を行い, 近位尿細管のリン再吸収を阻害してリン利尿を起こすとされている. 今回の検討でも, FGF23投与によりリン排泄の増加を認めた. しかし, FGF23自体のクロト発現に対する影響は未だ検討されていない. また, 遠位尿細管から近位尿細管へのシグナル伝達物質については不明である. 黒尾らは分泌型クロトの投与がリン利尿をきたすことを示した. このことから, FGF23と結合したクロトが, 細胞膜上で分離され近位尿細管へのシグナルとして働く可能性が考えられている. 今回の

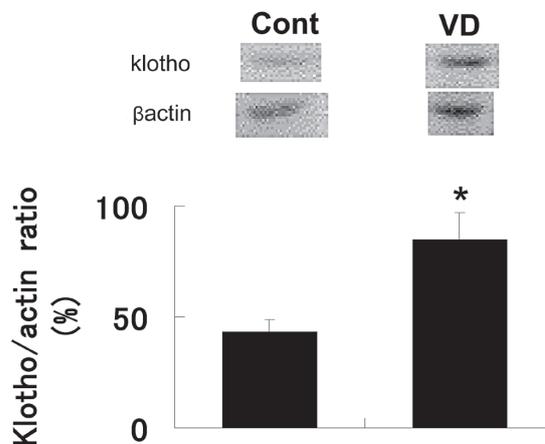


図2. Long-term effects of vitamin D (VD) on renal klotho expression in uni-nephrectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats. * indicates significant difference from the control.

検討でFGF23が膜型クロト発現を増加させる点は、近位尿細管へのシグナル伝達に必要なクロトを供給するという観点から考えると上記の仮説を支持するものと思われる。しかし、合成したクロト蛋白が近位尿細管に結合する所見は得られておらず、今後さらに検討を重ねる必要がある。

今回の検討での新しい発見はビタミンDがクロトを温存する効果があることであろう。正常腎機能の動物では活性型ビタミンD投与3時間後には膜型クロト発現が増加していた。ビタミンDは慢性腎臓病患者でその活性化に障害があることが知られている。そのため、慢性腎臓病では活性型ビタミンDの低下が早期から認められ、その補充が生命予後を改善する可能性が示唆されている。クロトを過剰発現させると生命予後を改善し、腎障害も遅延させることが知られている。ビタミンDは骨だけでなく細胞増殖の調整など多岐にわたる生理活性を有している。今回の検討からは、ビタミンDがクロト発現を介して慢性腎臓病患者の予後改善に寄与している可能性が示唆された。

分泌型のクロトは、superoxide dismutaseを活性化したり、幹細胞を温存するなどのクロトの抗加齢効果に関与していると考えられている。今回の検討でも、酸化ストレスの指標である8-epi-prostaglandin F2 α の産生がクロトを温存することで低下した。慢性腎臓病患者では高リン血症が一つの予後規定因子とされている。腎障害により低下したクロト発現が高リン血症を来し、同時に酸化ストレスを亢進させ動脈硬化

の進展を寛容していることが考えられる。大阪大学のグループは培養血管内皮細胞を用いてクロトがeNOSの発現を増すことを示した。今回の検討で、我々はクロトが内皮細胞に結合することを示した。また、eNOSについては解析中であるが、アセチルコリンに投与による降圧反応がクロトを温存した群で増加していた。これらの所見から、分泌型クロトが内皮細胞に働き、一酸化窒素の産生を亢進させ、アセチルコリンによる内皮依存性血管拡張に伴う降圧を増強したものと考えられた。

研究成果リスト

論文

- Takashi MIYAZAKI, Tsuneo TAKENAKA, Tsutomu INOUE, Makiko SATO, Yuka EIKI, Makoto NODERA, Mayuko HANYU, Yoichi OHNO, Satomi SHIBAZAKI and Hiromichi SUZUKI Zinc Deficiency may Accelerate Aging by Inhibiting Klotho mRNA Expression. Trace Nutrients Research 2009;26:74-8.
- Tsuneo Takenaka, Hitoshi Hoshi, Nobutaka Kato, Kazuyuki Kobayashi, Hiroshi Takane, Junko Shoda, Hiromichi Suzuki Cardio-ankle vascular index to screen cardiovascular diseases in patients with end-stage renal diseases J Atheroscler Thromb. 2008;15:339-44.
- 竹中恒夫, 佐藤貴彦, 井上勉, 渡辺裕輔, 菅野義彦, 大野洋一, 鈴木洋通 腎老化におけるklothoの役割を知る Journal of Angiotensin Research 2009;6(4):263-7.

学会報告

- Tsuneo Takenaka, Tsutomu Inoue, Yoichi Ohno, Takashi Miyazaki, Hiromichi Suzuki. Dual actions of fibroblast growth factor-23 on renal klotho expression 第42回アメリカ腎臓学会(サンディエゴ)にて口演
- Tsuneo Takenaka, Tsutomu Inoue, Hirokazu Okada, Takashi Miyazaki, Hiromichi Suzuki. Decreased klotho expression in early aldosterone-induced hypertension 第42回アメリカ腎臓学会(サンディエゴ)にて口演

特許出願

発明の名称；カルシミメティクスを有効成分として含むklothoまたはFGF23に関連する疾患の予防または治療薬

出願人名義；学校法人 埼玉医科大学／キリンファーマ株式会社

発明者；竹中恒夫

出願番号；特願2008-229880

表 1. Comparison between groups

	Control	Vitamin D
Body Weight (g)	365 \pm 15	360 \pm 16
Systolic blood pressure (mmHg)	224 \pm 7	218 \pm 8
Creatinine clearance (ml/min)	1.6 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2
Albuminuria (mg/gCr)	148 \pm 20	122 \pm 15
8-epi-prostaglandin F2 α excretion (ng/day)	15 \pm 2	8 \pm 1 *
Response to Ach (Changes in mean blood pressure (%))		
Ach 0.3 micro-g	-8 \pm 3	-11 \pm 4
Ach 1 micro-g	-15 \pm 6	-38 \pm 11 *
Ach 3 micro-g	-43 \pm 14	-50 \pm 13

* indicates significant difference between groups.

学内グラント 終了時報告書

平成20-21年度 学内グラント報告書

がん治療法確立へむけたがん幹細胞と胚性幹細胞に共通する 腫瘍性維持の分子機構解明

研究代表者 西本 正純(埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター)

研究分担者 山岸 敏之*

緒言

発がんの分子機構としてこれまで、遺伝子の変異あるいは染色体の再編成といった塩基配列の変異に基づく遺伝情報の異常が主たる要因と考えられてきた。しかし現在、塩基配列の変異に基づかぬ、即ちエピジェネティックな理由により、本来発現すべきではない遺伝子の発現上昇が見られたり、逆に発現すべきものの発現が減少したりすることが、発がんの要因になり得るのではないかという可能性が考えられ始めている¹⁾。この点を支持する最も代表的な例として、胎児胚盤胞の内部細胞塊から株化した胚性幹細胞(ES細胞)を挙げることが出来る。この細胞株は塩基配列には全く変異が認められない。即ちこの細胞株より例えばマウスであれば正常な個体を生じる事が出来るにもかかわらず、この細胞株をSCIDマウスの皮下に移植した場合テラトーマが生じることより、この細胞そのものは腫瘍性を持っていることが知られている²⁾。この腫瘍性には、転写因子Oct4(Oct3, Oct3/4とも呼ばれる)の強い関与が示唆されている³⁾。Oct4は本来、多能性を持つ内部細胞塊あるいはそれに由来するES細胞や胚性外胚葉の細胞に発現は局限しており^{4,5)}、これら細胞の多能性維持に必須な遺伝子であることが知られている。即ちOct4を欠失させたこれら細胞では、自己複製能を失い幹細胞として機能しえなくなり、結果分化することが既に示されている^{7,8)}。しかし近年、このOct4が、ある種の体細胞がんで発現していること^{9,10)}、不死化した細胞にOct4を強制発現させることで、トランスフォーメーションが認められたこと¹¹⁾、トランスジェニックマウスを用いた系で異所的にOct4を発現させることで、皮膚の異形成が認められたこと³⁾等より、Oct4と腫瘍性の強い相関が示されることとなった。

*埼玉医科大学 医学部 解剖学

一方腫瘍を考える上で、近年cancer stem cell(がん幹細胞)の存在が注目されつつある¹²⁾。即ち腫瘍組織の中には、ごく少数のがん幹細胞が存在しており、この細胞が自律的に自己複製し増殖するとともに、非対称分裂の過程で分裂能の低下した細胞を生じ、結果これら2種類の細胞集団から腫瘍組織が形成されることが、腫瘍形成の機構と考えられるようになった。従ってこのがん幹細胞を同定し、これを取り除くことががん治療の上で極めて重要であると考えられている。がん幹細胞は、その名の通り「幹細胞」であり、他の正常な「幹細胞」との類似性、即ち自己複製能があり、従ってこの自己複製能を規定している分子機構には共通な部分が有るのではないかと考えられている。事実これまで、Bmi1¹³⁾、 β -catenine¹⁴⁾といった遺伝子が自己複製能を規定する上での重要な候補として知られているが、しかしいずれの場合もがん幹細胞では、これら遺伝子に変異が生じ、タンパク質が恒常的に活性化される、あるいは機能低下することでがん幹細胞としての性質を獲得することが示されている。このことは上で述べたOct4の場合とは大きく異なっている。即ちOct4の場合、野生型タンパク質の異所的な発現ががん化の要因であり、即ちOct4の機能そのものには異常が認められていない。このようにOct4による腫瘍性維持と言う観点から見ると、がん幹細胞とES細胞の極めて高い類似性を見いだすことも可能であると考えられる。事実、ES細胞によるテラトーマ形成では、ES細胞自身はOct4に依存しながら自己複製し、その一方で非対称分裂に伴い分化した細胞を生じさせることにより腫瘍形成がなされており、まさにES細胞そのものが、Oct4に依存しながら、がん幹細胞として機能しているとも考えられる。一方、Oct4の発現が認められる体細胞がんでは、その発現が組織幹細胞に由来した細胞に局限していることが知られている。以上のことより、Oct4によるES細胞とある種のがん幹細胞

胞での自己複製と腫瘍性維持における重要性は示されたと考えられるが、それでは、これら二つの現象はそもそも分離できるか、即ちOct4の下流遺伝子の内(1)自己複製に関与(2)腫瘍形成に関与の2つのグループに分離出来るか否かはこれまで明らかとされていなかった。さらに、転写因子であるOct4が、いかなる遺伝子の発現を制御することで自己複製能あるいは腫瘍形成能をES細胞に付与しているのかが不明である。そこで私は、Oct4の変異体を野生型Oct4の代わりにES細胞に導入することで、自己複製能と腫瘍形成能にいかなる影響を及ぼすかを検討することとした。その結果ある種のOct4変異体を導入した場合、腫瘍形成能と自己複製能を分離することに成功し、またその腫瘍形成能の付与には、Oct4の下流遺伝子として私が同定した¹⁵⁾転写補助因子UTF1が¹⁶⁾重要な寄与をしている可能性を見出したので、ここに報告する。

材料と方法

ES細胞 (ZHBTc 4株) の培養

Tet-off系によりOct4の発現が制御可能なZHBTc4株の培養は丹羽らの方法による⁸⁾。なおこの細胞株はOct4の遺伝子座にZeocinおよびBlasticidin耐性遺伝子が挿入してあり、通常の培養では、これら薬剤を含む培地にて培養している。

レスキュー実験

丹羽らにより開発された方法による¹⁷⁾。簡単に述べると、Oct4の変異体 (Oct4とOct6のキメラタンパク質) をコードするcDNAにIRESの配列をはさみ puromycin 耐性遺伝子を繋ぎ、これら遺伝子をCAGプロモーターのコントロール下におくようにプラスミドを設計する。変異体の構造は図2参照。なお黒部分がOct6に由来し、白部分がOct4に由来している。このOct4変異体を発現させるプラスミドをZHBTc4株に電気穿孔法により導入するとともに、tetracyclinを添加し内在性のOct4の遺伝子発現を消失させる。その後 puromycin 存在下で培養し、未分化性を維持した細胞のコロニーの産生状況により、Oct4変異体のレスキュー効果を評価する(図1)。なお一部キメラタンパク質によりレスキューされた細胞は、継代培養し、RNAの解析に用いる。また下記のUTF1の過剰発現の実験に用いる。

UTF 1 の過剰発現

CAGプロモーター下にUTF1のcDNAならびにIRESをはさむようにHistidinol耐性遺伝子を置いたプラスミドを作製する。またコントロールプラスミドとして上記プラスミドからUTF1のcDNAを除いたプラスミドを作製する。Oct4の変異体によりレスキューされた細胞に、上記2種類のどちらかを導入し、Histidinol耐性コロニーを得た後、継代培養する。

テラトーマ形成実験

ヌードマウス (BALB/cA-nu/nu 株)を2週間、10 ug/mlの tetracyclin を含む水にて飲料水として与え全処理した後、Oct4変異体によりレスキューされた細胞に、コントロールプラスミドあるいはUTF1過剰発現プラスミドを導入した細胞を接種し、10 ug/mlの tetracyclin を含む水にて飲料水として与えながら、一ヶ月生育させテラトーマ形成について観察する。なおコントロールとしてZHBTc4株を接種し、tetracyclin 未処理で飼育しテラトーマ形成を観察する。

RNase protection assay

方法は既報による¹⁵⁾。プローブの設計はcDNAの翻訳開始コドンATGのAを+1として；UTF1, +226 to +544; FGF4, +2588 to 2784; Sox2, +480 to 905; Rex1, +75 to 351; β -actin, +903 to 1023を検出するように設計した。

結果と考察

レスキュー可能なOct-4とOct-6キメラタンパク質

Oct4はPOUドメインを持つ転写因子のファミリーに属している。これらファミリーに属し、かつES細胞で発現することが知られているものとして、Oct-1とOct-6の2つが知られている。しかし、これら2つの転写因子いずれにおいても、Oct4の機能を代償することは不可能であることは丹羽らの報告によりすでに知られている¹⁷⁾。しかしなぜ同じPOUドメインに属する転写因子にもかかわらず、Oct4のみがES細胞の自己複製能および腫瘍性を維持することが可能なのか、すなわちそのOct4のどのタンパク質領域が、ES細胞の性質維持に必須であるのかを同定することにより、その過程で自己複製能と腫瘍性の分離が可能になるのではないかと考え、Oct4とレスキューできないOct6とのキメラタンパク質を tetracyclin 処理したZHBTc4に

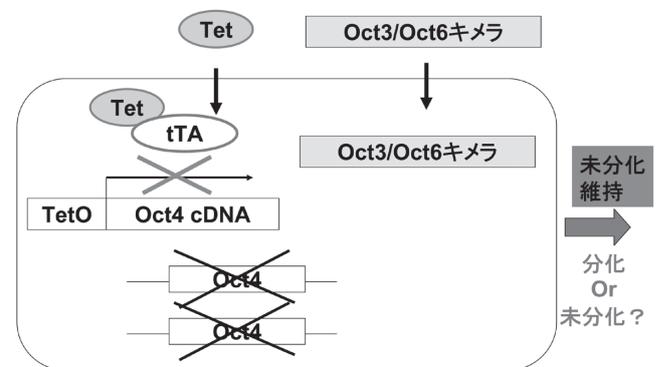


図 1. レスキュー実験の概要。ZHBTc4株にTetracyclin 処理を開始し内在性Oct4の発現を消失させると同時に、キメラタンパク質発現プラスミドを導入し、puromycinによる薬剤選択の後、コロニーの形成をもってレスキューされたと判定する。

導入することで、レスキュー実験を行うこととした。その結果図2に示すようなキメラにおいてレスキュー可能であることが確認された。すなわち、POUドメインのうち、linker portionと呼ばれる部分と、POU-specificドメインの中の22番目のスレオニンの両方が必須であることが明らかとなった。

レスキューされた細胞でのOct-4の下流遺伝子 UTF 1 の発現レベル

なおこのレスキュー実験では自己複製能が可能であるか否かを判定することしかできないので、レスキューされた細胞におけるOct-4の下流遺伝子として報告された遺伝子についてその発現を確認した。その結果FGF4, Sox2, Rex1といった遺伝子ではその発現レベルで、いずれのキメラタンパク質でレスキューされた細胞において変化は見られなかった。しかし同じOct-4の下流遺伝子として同定されたUTF1では、ある種のキメラタンパク質 (Mt K22T) によりレスキューされた細胞において、顕著な発現の低下が認められた(図2)。

UTF 1 の発現量に依存したES細胞の腫瘍性の違い

以上の結果より、ある種のOct-4とOct-6のキメラでレスキューされた細胞では、同じOct-4の下流遺伝子として知られているもののなかで、少なくともUTF1において発現の減少が認められた。しかしUTF1以外の未知なるOct-4の下流遺伝子も同様に発現が低下し

ている可能性も考えられるため、ここでUTF1のみに焦点を合わせることを目的として、Mt K22Tのキメラでレスキューされた細胞に再度UTF1を強制発現させることとした。なおここでコントロールプラスミドを導入した細胞も用意し、UTF1の発現量およびUTF1の下流に位置する遺伝子のみが異なる2種類の細胞株を樹立することとした。このことはもしこれら2種類の細胞間で細胞の性質に差が生じたならば、それはUTF1の発現量の差に起因すると考えられることによる。そこでこれら2種類の細胞株について、特に腫瘍性について検討を加えるために、teratoma assayを行った。その結果、図3に示すように、UTF1の発現が減少しているコントロールプラスミドを導入した細胞では、ほとんど腫瘍の形成が認められなかったのに対し、UTF1を再度強制発現させた細胞では、正常なES細胞と同程度の腫瘍形成を認めた。

結論

ES細胞は、多能性を持つことならびに無限の増殖能を持つことから、今後再生医療において有効な材料になることが期待されている。しかしES細胞には腫瘍形成能という性質があり、再生医療実現化の上でひとつの大きな障害となっている。すなわち、もし移植に必要な組織に分化させた細胞の中に、分化しきれずに腫瘍性を維持したままの細胞が混入していたならば、移植後の腫瘍形成が生ずることが予測されるからである。したがってES細胞の腫瘍性維持の分子機

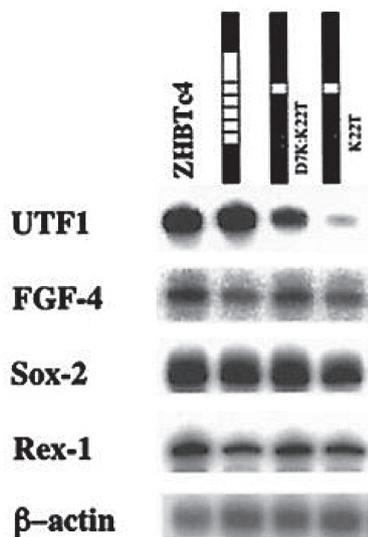


図2. 様々なキメラタンパク質によりレスキューされた細胞でのOct-4の下流遺伝子の発現。キメラタンパク質によりレスキューされた細胞において、Oct-4により発現が制御されていることが知られている遺伝子について、RNase protection assayにより発現レベルを確認した。

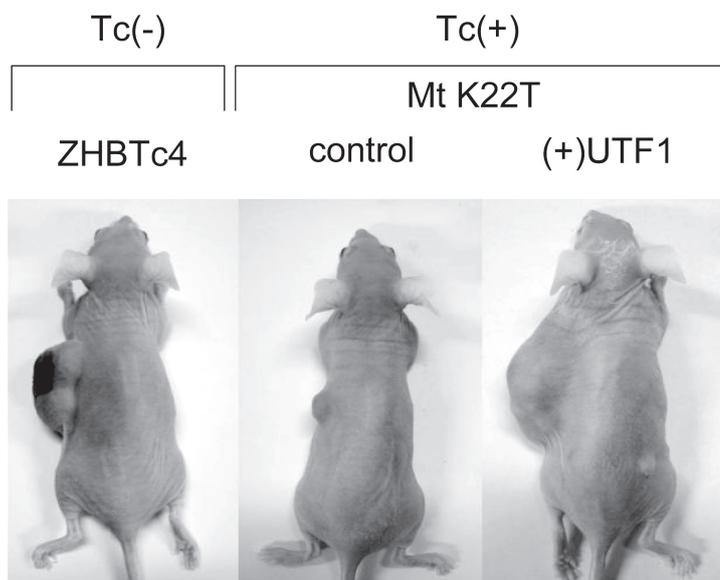


図3. UTF1の発現レベルの差によるteratoma形成能について。Mt K22Tキメラタンパク質に、コントロールプラスミドあるいはUTF1強制発現プラスミドを導入した細胞を、tetracyclineを飲料水として飲ませたヌードマウスに接種し、その腫瘍形成能の差について調べた。なおZHBTc4株をES細胞のteratoma形成能のポジティブコントロールとした。

構解明は、ES細胞を利用した再生医療実現化には欠かせぬテーマだと考えられる。そのような中私は今回の研究において、ES細胞の持つ自己複製能と腫瘍性という2つの固有の性質を分離することに成功した。さらにその腫瘍性維持にはUTF1遺伝子が重要な寄与をしていることを示すようなデータを得た。このことは今後のES細胞を利用した再生医療の実現への一歩になると期待している。今後はUTF1ノックアウトES細胞を樹立することで、ES細胞の腫瘍形成能とUTF1の関連について直接的な証拠が得られればと考えている。

参考文献

- 1) Jones, P.A. and Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genetics* 2002;3:415-28.
- 2) Freed, C.R. Will embryonic stem cells be a useful source of dopamine neurons for transplant into patients with Parkinson's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;99:1755-7.
- 3) Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C., and Jaenisch, R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005;121:465-77.
- 4) Scoler, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 1990;344:435-9.
- 5) Rosner, M.H., Vignano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. A POU-domain transcriptional factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 1990;345:686-92.
- 6) Okamoto, K., Okazawa, A., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 1990;60:461-72.
- 7) Nichols, J., Zebnic, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. Cell formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor. *Cell* 1998;95:379-91.
- 8) Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 2000;24:372-6.
- 9) Jin, T., Branch, D.R., Zhang, X., Qi, S., Youngson, B., and Goss, P.E. Examination of POU homeobox gene expression in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 1999;81:104-12.
- 10) Wang, P., Branch, D.R., Bali, M., Schultz, G.A., Goss, P.E. The POU homeodomain protein Oct3 as a potential transcriptional activator for fibroblast growth factor-4 in human breast cancer. *Biochemical J.* 2003;375:199-205.
- 11) Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y., and Pikarsky, E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 2003;4:361-70.
- 12) Skinner, M. Stem cells: Insights into breast cancer heterogeneity. *Nature Review Cancer* 10:163
- 13) Lessard, J. and Sauvageau, G. Bmi1 determines the proliferative capacity of normal and leukemic stem cells. *Nature* 2003;423:255-60.
- 14) Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., Van den Born, M. et al. Crypt stem cells as the cells-of origin of intestinal cancer. *Nature* 2009;457:608-11.
- 15) Nishimoto M. Fukushima A. Okuda A. Muramatsu M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Molecular & Cellular Biology.* 1999;19:5453-65.
- 16) Okuda A. Fukushima A. Nishimoto M. Orimo A. Yamagishi T. Nabeshima Y. et al. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO Journal.* 1998;17:2019-32.
- 17) Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, A., and Miyazaki, J-I. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU-domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22:1526-36.

研究成果リスト

論文

1. Miyagi S. Masui S. Niwa H. Saito T. Shimazaki T. Okano H. Nishimoto M. Muramatsu M. Iwama A. Okuda A. Consequence of the loss of Sox2 in the developing brain of the mouse. *FEBS Letters.* 2008;582(18):2811-5.
2. Matsui H, Sakabe M, Sakata H, Yanagawa N, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. Induction of initial heart α -actin, smooth muscle α -actin, in chick pregastrula epiblast: the role of hypoblast and fibroblast growth factor-8. *Dev Growth Differ* 2008;50:143-57.
3. Sakabe M, Sakata H, Matsui H, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. ROCK1 expression is regulated by TGF β 3 and ALK2 during valvuloseptal endocardial cushion formation. *Anat Rec* 2008;291:845-57.

4. Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E, Hasegawa K, Kawase E, Yamagishi T, Shimizu Y, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:13781-6.
5. Zhang J, Nomura J, Maruyama M, Nishimoto M, Muramatsu M, Okuda A. Identification of an ES cell pluripotent state-specific DUSP6 enhancer. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 2009;378(2):319-23.
6. Nomura J, Maruyama M, Katano M, Kato H, Zhang J, Masui S, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Okuda A. Differential requirement for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. *Stem Cells*. 2009;27(5):1066-76.

総説

1. Roles of TGFbeta and BMP during valvulo-septal endocardial cushion formation. Yamagishi T, Ando K, Nakamura H. *Anat Sci Int*. 2009;84(3):77-87.

学会発表

1. Expression pattern of sox9 gene during chick heart development. Yamagishi T, Nakajima Y, Ando K, Sakabe M, Nakamura H Society for Developmental Biology 67th Annual Meeting July 28, 2008, Philadelphia.
2. Inhibition of Nodal signaling affects epiblast cell movement in the pre-streak chick blastoderm. Yanagawa N, Sakata H, Yamagishi T, Nakajima Y Society for Developmental Biology 68th Annual Meeting July 23, 2009, San Francisco.
3. Tenascin C regulates recruitment of smooth muscle cells during coronary arterial development. Ando K, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y 49th American Society for Cell Biology Annual Meeting December 8, 2009, San Diego.
4. UTF1は胎児の成長速度に関与している 西本正純, 山岸敏之, 野村淳, 丸山昌良, 鍋島曜子, 鍋島陽一, 奥田晶彦 第31回日本分子生物学会 2008年12月9日-12日 神戸市.
5. ES細胞と神経幹細胞における nucleostemin の役割 丸山昌良, 野村淳, 升井伸治, 西本正純, 奥田晶彦 第31回日本分子生物学会 2008年12月9日-12日 神戸市.
6. マウスおよびヒトES細胞におけるDUSP6遺伝子の未分化状態特異的な発現をサポートする発現調節領域の同定 張佳星, 野村淳, 丸山昌良, 西本正純, 奥田晶彦 第31回日本分子生物学会 2008年12月9日-12日 神戸市.
7. 心内膜床形成過程でおこる上皮-間葉形質転換でのsox9の役割 山岸敏之, 中島裕司, 安藤克己, 米山克美, 中村裕昭 第114回 解剖学会全国学術総会 2009年3月30日.
8. 心内膜床形成でのsox9の役割: 心臓弁・中隔原基形成の分子機構 山岸敏之, 柳川成章, 寺迫優美, 中村裕昭, 中島裕司 第85回日本解剖学会近畿支部学術集会 2009年11月28日.
9. UTF1は胎盤の成長に寄与している 西本正純, 片野幸, 山岸敏之, 菱田友昭, 野村淳, 丸山昌良, 鍋島曜子, 鍋島陽一, 加藤英政, 奥田晶彦 第32回日本分子生物学会 2009年12月9日-12日 横浜市.
10. マウスES細胞におけるp53活性制御因子としてのNucleosteminの役割 片野幸, 野村淳, 西本正純, 加藤英政, 奥田晶彦 第32回日本分子生物学会 2009年12月9日-12日 横浜市.
11. Myc/Max複合体はES細胞のviability維持に必須である 菱田友昭, 野崎友里子, 加藤英政, 西本正純, 奥田晶彦 第32回日本分子生物学会 2009年12月9日-12日 横浜市.
12. 全体換気システムに局所排気システムを接続したホルムアルデヒド低減化対策 高橋真樹子, 安部みき子, 山岸敏之, 仲谷和記, 岡出朋子, 小川登紀子, 小西博之, 桐生寿美子, 木山博資, 中島裕司 第115回 解剖学会全国学術総会 2010年3月28日.

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

メタボリックシンドローム診断のための腹囲測定法の標準化 —光3D計測装置の開発—

研究代表者 秦 朝子(埼玉医科大学 保健医療学部 看護学科)
研究分担者 林 静子¹⁾, 吉澤 徹²⁾, 若山 俊隆²⁾, 奥村 高広²⁾,
富田 幸江¹⁾, 天野 雅美¹⁾, 辻 美隆¹⁾

1. 緒言

メタボリックシンドロームは、インスリン抵抗性、動脈硬化惹起性リポ蛋白異常、血圧高値を個人に合併する心血管病易発症状態であり、世界的にも心血管病の予防対策として重要視されている。メタボリックシンドロームの診断基準については、World Health Organization (WHO) やNational Cholesterol Education Program (NCEP) の基準とは別に、日本においても2005年に発表されている(日本内科学会雑誌;94(4):188-203)。メタボリックシンドロームの病態の中でも主要な項目として内臓脂肪蓄積が挙げられており、内臓脂肪蓄積の指標としてWHO基準ではBMIやウエスト/ヒップ比、NCEP基準ではウエスト周囲径が用いられている。日本では、可能な限りCTスキャンなどにより腹腔内脂肪量測定を行うことが望ましいとしながらも、できるだけ簡便でかつ病態を反映し保健指導に用いることができるウエスト周囲径(腹囲)が採用された。腹囲はメタボリックシンドロームの診断基準の必須項目として位置づけられ、2008年度より開始となった特定健診においても、巻尺を使用した腹囲の計測が主要な検査項目として実施されている。

しかし、日本のメタボリックシンドローム診断基準では、腹囲の測定について「立位・軽呼吸時・臍レベルで測定する」とされており、さらに「脂肪蓄積が著明で臍が下方に偏位している場合は肋骨下縁と前上腸骨棘の midpoint の高さで測定する」ともつけ加えられている。つまり、腹部の形状によっては臍高腹囲が内臓脂肪蓄積を反映しない可能性が考えられ、測定部位の選択は測定者の判断に任せられているといえる。また、巻尺

で計測するという方法は、一見簡便なようであるが、測定者間差がみられたり、故意に腹部をへこませることが可能であるという問題点が指摘されている(臨床病理 2007;55(12):1097-102)。さらに、測定を受ける被験者としても、腹囲測定に対して抵抗を感じやすいことや、腹部の露出が不可欠であり羞恥心を伴うことも指摘されている。このような測定者、被験者双方の問題点を解消するために、腹部の露出や測定者との接触が少なく、正確な腹囲を簡便に計測できる方法確立することは、メタボリックシンドローム対策を進める上で重要な課題であると考えられる。

研究分担者らはこれまで、MEMSミラーを用いた「3D-MEMSスキャナ(Proc.SPIE 2007;67620B:1-6)」の開発や、光セクション法を応用した「下肢の形状計測装置(埼玉医科大学看護学科紀要 2007;1(1):61-4)」の製作を行ってきた。今回は、メタボリックシンドローム診断に必要な腹囲測定法の標準化を目指し、従来の巻尺による接触方式ではなく、接触による対象者の不快感や羞恥心に配慮した非接触方式の、短時間でより正確な光3D腹囲計測装置の開発を目標とした。

2. メタボリックシンドローム診断のための腹部評価法 ～周囲長、断面積および容積の導出～

光三次元測定技術を用いれば、被験者の腹部の周囲長、断面積および容積を容易に測定することができる。その測定手法には光セクション法や格子パターン投影法などが提案されているが、これらの方法を用いた測定装置は、極めて高価で家庭に1台設置できるとはとても言えないのが現状である。このような現状をブレークスルーするために、我々のグループは安価で非侵襲にかつだれでも簡易に測定できる手法の開発に主眼をおいて研究開発を行ってきた。今回の研

1) 埼玉医科大学 保健医療学部 看護学科

2) 埼玉医科大学 保健医療学部 医用生体工学科

究によって、特許出願の可能性が生じたことにより、本報告書では詳しい測定原理の掲載を控えさせていただいている。測定法の原理は学内グラント終了後報告で詳しく掲載する予定である。

我々が提案する手法を使用すれば、図1における腹部中央の点 O からの長さを $r(\theta)$ とすると、任意の角度 θ における腹部表面の座標 x と y は、

$$x = r(\theta) \cos \theta \quad (1)$$

$$y = r(\theta) \sin \theta \quad (2)$$

と表すことができ、図1のように表示できる。このとき、点 O は測定装置の座標系の中心点としている。腹部の周囲長 L と腹部の断面積 S は、

$$L = \int_0^{2\pi} r(\theta) d\theta \quad (3)$$

$$S = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} r(\theta)^2 d\theta \quad (4)$$

と表すことができる。さらに、図1の z 軸方向にも断面積を微小幅 dz で積分すると、腹部の体積 V は、

$$V = \frac{1}{2} \int_{z_1}^{z_2} \int_0^{2\pi} r(\theta, z)^2 d\theta dz \quad (5)$$

と表すことができる。

3. 基礎実験, 実験結果とその考察

基礎実験を行うために、図2に示したダミー人形(トルソ女子(小) 55cm, 世界堂)の腹部を測定した。特許出願を検討しているため、基礎実験光学系の掲

載は控えさせていただいている。式(1)および(2)を用いて計算すると、図3の座標を取得できる。この図から腹部の形状が容易に推定できる。式(3)および(4)より腹囲の長さとその断面積は、 $L=49.8$ cmおよび $S=199.7$ cm²と計算された。

一方で、巻尺を用いてダミー人形の腹部の周囲長を測定した。5名の測定者が5回測定したときの平均値は $L=48.9 \pm 0.4$ cmであった。基礎実験の光学系では、誤差が積分されたことから、巻尺測定との差が出たと考えられるが、本計測法の有効性は確認できた。

4. 実応用に向けた腹部測定, 実験結果とその考察

上記の基礎実験を踏まえて、実応用に向けた光学系を作製した。作製した光学系は、特許出願の関係からこちらも終了時報告書では示すことを控えさせていただいている。本測定法によって推定された腹部の断面形状を図4(灰色の実線)に示す。測定対象は3章と同様のダミー人形を用いた。式(3)および(4)より腹部の周囲長 $L=48.9$ cm, 断面積 $S=195.8$ cm²となった。

3章で測定した断面図(黒色の実線)と照らし合わせてみると実応用に向けた光学系で測定した腹部の方が一回り小さくなった。これは、実応用の光学系で実施した結果に誤差が生じたのではなく、むしろ基礎実験の光学系の方が、誤差量が大きくなってしまったことを示している。測定過程で誤差量が積分されてしまったことが主な原因と考えられる。このことは、腹囲長を巻尺で測定した結果からも理解できる。一方で、形状に関して言えば、サンプリングの問題から基礎実験光学系で得られた黒色の実線の結果のほうが実

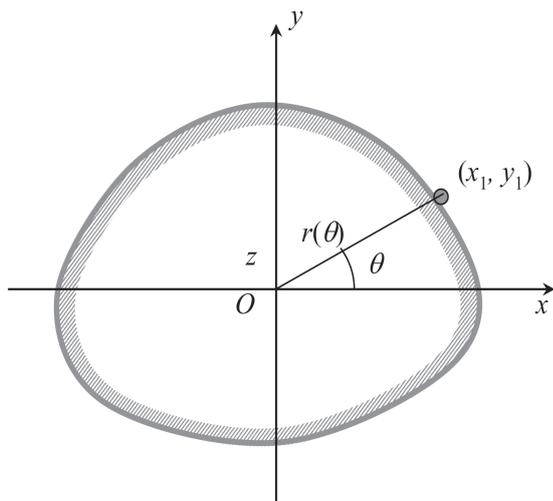


図1. 解析されたデータ。



図2. 被写体(トルソ像)。

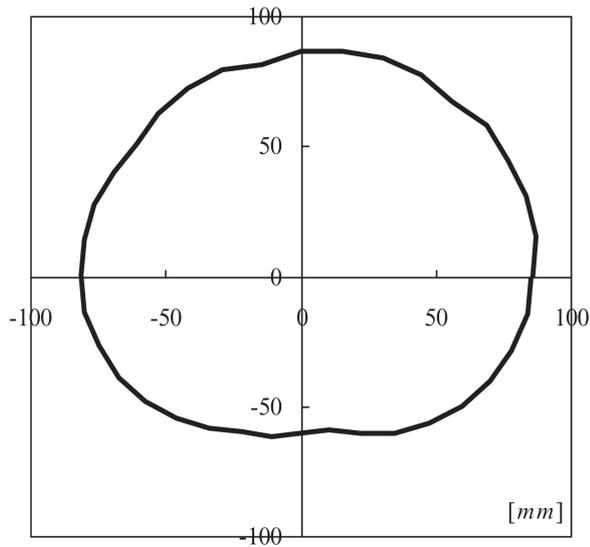


図3. ダミー人形の腹部の断面形状.

際の形状をより反映していると考えられる.

5. 結言

今回、メタボリックシンドローム診断に必要な腹部の新しい評価法となるように光三次元計測技術を用いた腹部の周囲長、断面積および体積の測定法を提案し、ダミー人形を用いて腹部の周囲長と断面積の測定を行った。基礎実験および実応用に向けた光学系をそれぞれ構築した。現状は、未だ測定装置の自動化にまでは至っておらず、光学定盤で実験している段階である。自動化と装置化が達成されれば、本研究で提案された測定装置は、臨床応用にも十分対応できると期待している。

今後は、誤差要因を突き止めて、誤差を抑えられる

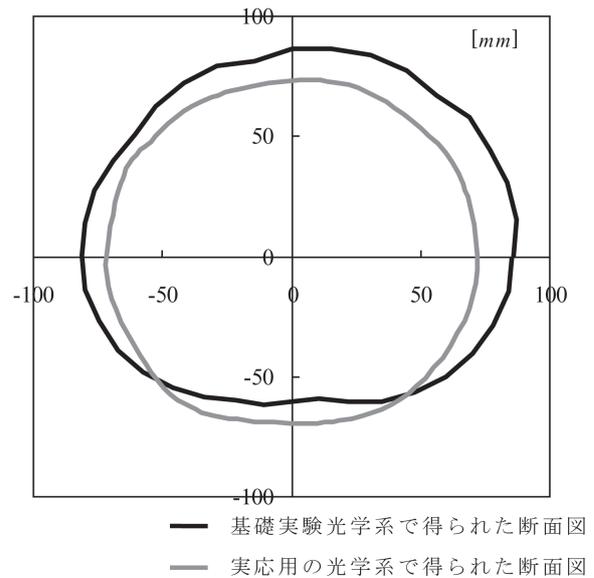


図4. ダミー人形の腹部断面形状の比較.

ように装置化を進めていく。さらに腹部の周囲長、断面積だけでなく、体積情報も同時に取得できる装置にした上で、人体のデータも測定していく予定である。

謝辞

実験光学系の作製およびデータ収集に際しご尽力いただきました、医用生体工学科オプトメカトロニクス実験室の坂本祐希さん(4年生)に深く感謝申し上げます。

研究成果リスト

現時点での論文、学会発表はないが、測定原理を特許出願する予定である。

学内グラント 終了時報告書

平成21年度 学内グラント報告書

神経芽腫マウスモデルを用いた自然免疫細胞による 腫瘍死細胞除去と免疫応答の検討

研究代表者 井上 成一郎

(埼玉医科大学 総合医療センター 肝胆膵・小児外科)

緒言

悪性腫瘍は自己から発生するにもかかわらず、その異常に起因する種々の抗原を発現するため本来は免疫機構によって拒絶されると考えられている。しかし臨床症状を発症する悪性腫瘍は、自己の免疫による拒絶機構を“すり抜けて”増殖し続ける。また近年、外科手術、抗癌化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療の効果により、神経芽腫を中心とした小児固形腫瘍領域で患者の生存期間が延長したが、いまだに治療中に腫瘍増殖が加速して治療の効果を上回り最終的に死亡に至る症例は後を絶たない。悪性腫瘍における免疫機構と腫瘍増殖の関係の詳細な解明は、悪性腫瘍に対する有効な根治法の開発に不可欠である。小児外科領域で頻度の高い固形腫瘍である進行神経芽腫においても、新たな治療の試みとして腫瘍細胞に対する宿主の免疫反応を誘導する免疫療法の確立が試みられている。中でも腫瘍抗原を用いて自己の樹状細胞(Dendritic cell: DC)の抗原提示を誘導するいわゆる腫瘍ワクチン療法は、臨床試験や動物を用いた実験でも報告されているが¹⁻³⁾、広く臨床に普及するまでの効果は得られていない。

腫瘍免疫における基礎的研究を中心に、悪性腫瘍に対する免疫応答にはDCやMacrophageなど自然免疫系の貪食細胞が深く関与していることが明らかにされるようになってきた。ある抗原に対して、免疫反応が抑制され拒絶されない状態を免疫寛容と呼ぶ。近年悪性腫瘍の増殖に関しても近年悪性腫瘍に対する免疫応答回避の機構のひとつとして悪性腫瘍組織に対する免疫寛容を誘導する機構の存在が提唱されている。DCは腫瘍抗原を取り込んで抗原提示することで腫瘍細胞に対する細胞障害性T細胞(Cytotoxic T Lymphocyte: CTL)を誘導するが、一方で免疫寛容を誘導するDCも存在する⁴⁾。さらに腫瘍組織に浸潤

したMacrophageである腫瘍関連Macrophage (TAM: Tumor Associated Macrophage)が悪性腫瘍の増殖に関与することが明らかになってきた⁵⁾。悪性腫瘍は一部細胞死をきたし排除処理されながら宿主の腫瘍排除機構を逸脱して増殖を繰り返すことから、DC、TAMなどの貪食細胞による死細胞処理と腫瘍に対する免疫反応誘導との関連が推定される。また貪食細胞が抗原細胞を貪食した結果起こる免疫事象は、貪食細胞に貪食される抗原を持つ細胞の状態(たとえば死細胞がapoptosisによるものか、necrosisによるものか)が大きく関与している可能性がある⁶⁾。G Kroemerらは各種抗癌化学療法剤を用いて細胞死を誘導した腫瘍細胞を用いてマウスにワクチンを行うと、抗癌剤の種類により抗腫瘍免疫反応が誘導される場合と反応が誘導できない場合があることを示した⁷⁾。抗癌剤の作用機序により誘導される細胞死に差異があり、結果として引き起こされる免疫反応に差異が生じることが示唆された⁷⁾。現在主流となっている集学的治療で使用される抗悪性腫瘍薬の中には腫瘍免疫反応上有利なものと同利なものがある可能性を強く示唆している。

小児進行神経芽腫において各種治療により細胞死が誘導された際に貪食細胞に腫瘍細胞が貪食され処理された結果起こる免疫反応は図1のような可能性(仮説)が考えられる。特に治療に使用される抗悪性腫瘍薬が引き起こす腫瘍細胞の細胞死が免疫反応を誘導するのか、免疫寛容を誘導するのかを検討することは、よりqualityの高い新しい集学的治療のプロトコールを作成することに大きく貢献できる。さらに抗癌剤、放射線治療などの腫瘍細胞死を誘導する治療においてその死細胞処理の結果起こる免疫反応のメカニズムを解析することで新しい抗癌免疫療法の開発に役立つと考えられる。

本研究ではマウス神経芽腫モデルを確立した。In vitroでの神経芽腫細胞死誘導法を確立し、in vivo, in

in vitro 両面から神経芽腫モデルでの免疫応答を解明することを目指した。

材料と方法

・マウス神経芽腫細胞株

マウス由来神経芽細胞腫細胞株 Neuro-2a (ATCC™/住商ファーマインターナショナル) を、10%FBS (ATCC™), 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO™) を添加した Minimum Essential Medium Eagle (ATCC™) 中で 37.0℃・5% CO₂ 下で培養した。培養 dish に接着した Neuro-2a 細胞は PBS で洗浄したのち Trypsin (0.25%) -EDTA (1 mmol) (和光純薬) を添加し 5 分後に 10%FCS を含む培地で反応を停止し、細胞懸濁液とした。

・実験動物

8～12 週齢雌 A/J mouse (日本 SLC) を埼玉医科大学総合医療センター研究部動物実験施設において固形飼料および水を自由に摂取できる状況下で飼育管理を行い実験に使用した。

・薬剤

Doxiorubicin hydrochloride (Sigma-Aldrich) は蒸留水で溶解して 10 mg/ml 溶液として凍結保存した。Bafilomycin A1 (和光純薬) は DMSO (Sigma) で 100 μmol/l として保存した。Cisplatin (シスプラチン注) [マルコ]^R (ヤクルト) は遮光下に 4℃ 保存。Vincristine (オンコビン注射用^R) は滅菌蒸留水で 1 mg/ml に溶解し保存した。各薬剤とも凍結保存または 4℃ で保存の上、適宜 Neuro-2a 培養用培地を用いて適切な濃度に希釈し培養系培地に添加した。

・Cell surviving detection

Neuro-2a 培養系において、各種濃度の Doxorubicin, Bafilomycin A1, Cisplatin, Vincristine を添加し、1

～3 日間 37.0℃・5% CO₂ 下で培養した際の Neuro-2a 細胞の生存率を細胞毒性測定用試薬 Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて測定した。2X10⁵/ml の Neuro-2a 細胞懸濁液を 90 μl/well ずつ 96well plate に播種し、37.0℃・5% CO₂ 下で 24 時間培養後、各種薬剤を目的の最終濃度の 10 倍になるように細胞培地で希釈し 10 μl/well ずつ添加した。Doxiorubicin は 24 時間、Bafilomycin A1 は 48 時間、Cisplatin, Vincristine は 72 時間同条件で培養した後、Cell Counting Kit-8 溶液を 10 μl/well ずつ添加、37.0℃・5% CO₂ 下で約 1 時間の呈色反応を行い、450 nm の吸光度を測定した。各種薬剤を加えなかった well での細胞生存率を 100% として、各濃度での細胞生存率を測定した。

・FACS による Apoptosis 解析

24 時間 37.0℃・5% CO₂ 下で培養した Neuro-2a 細胞培養系に Doxorubicin (final conc.:5 μM), Bafilomycin A1 (final conc.:0.1 μM), Cisplatin (final conc.:50 μg/ml), Vincristine (final conc.:0.1 μg/ml), を添加した。さらに 37.0℃・5%CO₂ 下で培養 (Doxiorubicin (24 hr), Bafilomycin A1 (24 hr), Cisplatin (72 hr), Vincristine (72 hr)) した後、全細胞を回収した。BioVision Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit を用いて AnnexinV, および PI で染色したのち FACS を用いて AnnexinV 染色陽性細胞の有無を評価し、各種薬剤で Neuro-2a に Apoptosis が誘導されていることを確認した。

・神経芽腫死細胞を用いたワクチン効果

上記実験と同様に 24 時間 37.0℃・5% CO₂ 下で培養しに Doxorubicin (final conc.:5 μM) を添加し、さらに 24 時間培養を継続して Apoptosis を誘導した Neuro-2a 細胞を 1X10⁶ cells/100 μl の PBS 懸濁液と

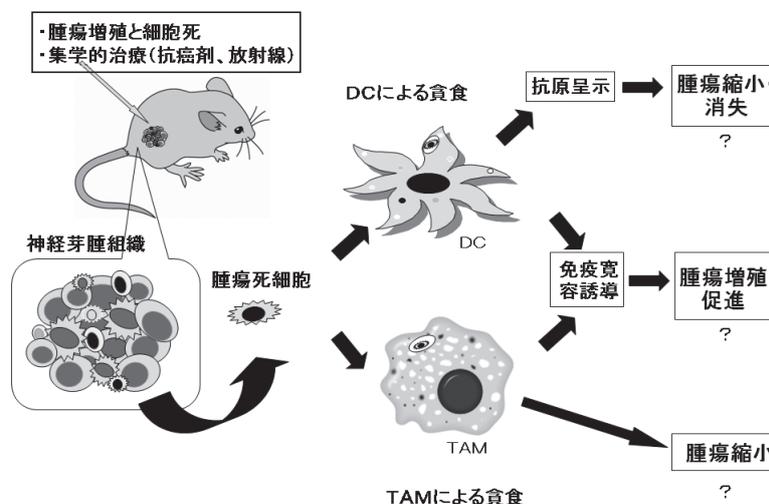


図 1. 腫瘍死細胞の貪食を介した免疫反応(仮説).

し、全身麻酔下のマウスの両下肢 foot pad に接種した。対照群は細胞を含まないPBS溶液 100 μ l をマウスの両下肢 foot pad に接種した。1回目の接種から7日目に同様にApoptosis誘導した細胞を接種した。さらに7日後に薬剤処理を行っていないNeuro-2a細胞を 1×10^6 cells マウス背部皮下に接種し (図2) マウスの生存期間を対照群と比較した。

結果

マウス神経芽腫細胞 Neuro-2a は、各種抗悪性腫瘍薬により、濃度依存性に細胞死が誘導された (図3)。

Doxorubicin で24時間、Bafilomycin で48時間、CDDP およびVincristine では72時間の細胞培養下での薬剤作用により腫瘍細胞死が誘導された。この結果をもとに培養細胞に投与するそれぞれの薬剤濃度および培養時間を決定した。

各種薬剤を培養系に添加し培養を継続し、Annexin V染色を行ってFACSを用いて解析すると、Neuro-2a細胞の細胞死誘導過程でAnnexin V陽性PI陽性細胞の出現が確認され、本法によるNeuro-2a細胞の細胞死においてApoptosisが誘導されていることが確認された (図4)。

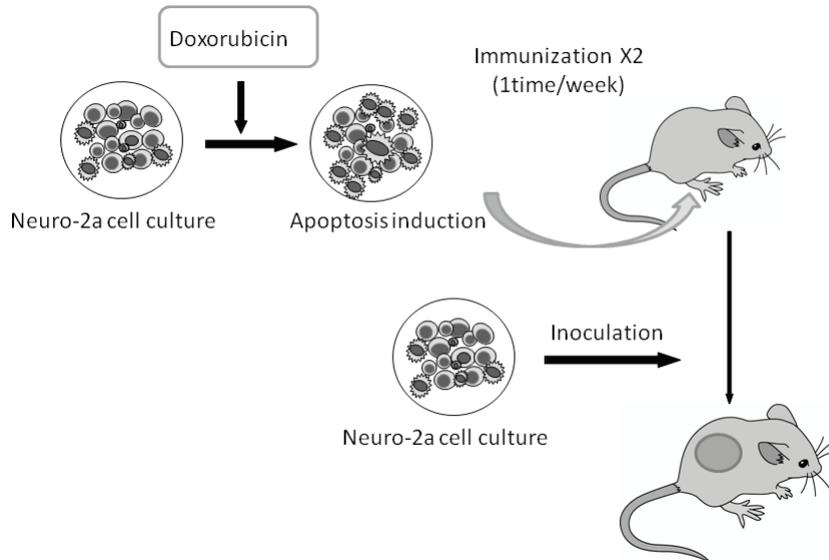


図2. Immunization実験プロトコール。

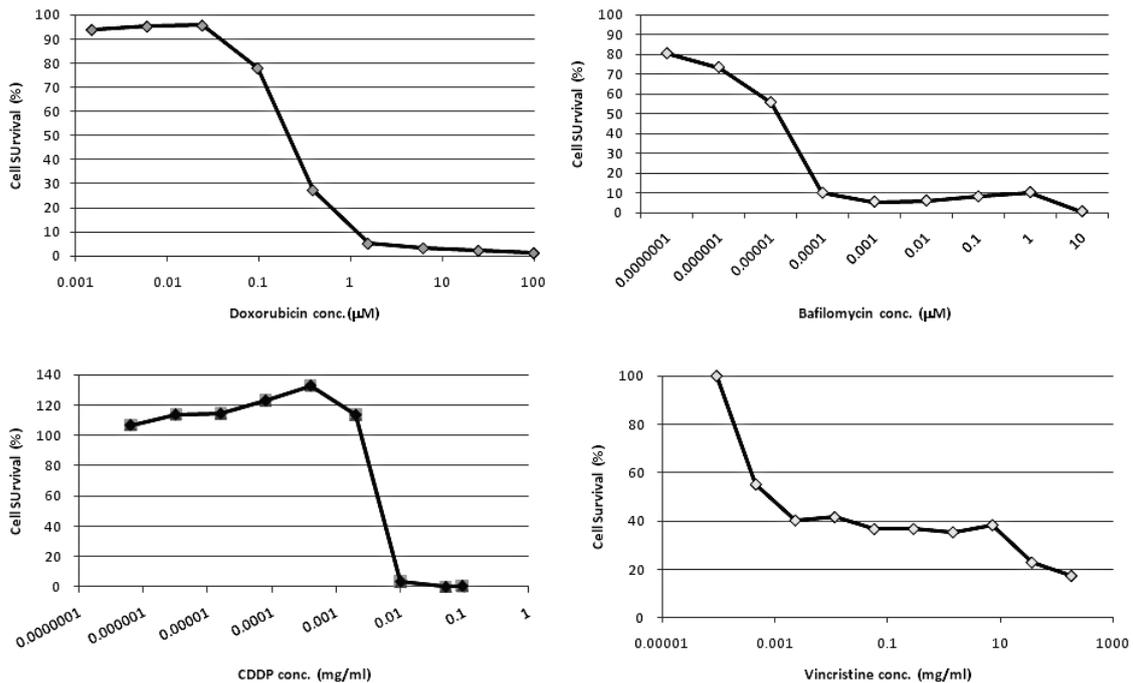


図3. 各種薬剤添加後のNeuro-2a培養細胞生存率。

Doxiorubicinを用いて*Ex. vivo*でApoptosisを誘導したNeuro-2a細胞を用いてマウスに免疫した後、マウス背部に 1×10^6 cellsの薬剤処理していないNeuro-2a細胞を接種すると、表1に示したように、対照群としてPBSを投与したマウス群と比較してマウスの生存期間が延長する傾向が認められた。

考察および研究成果

小児進行神経芽腫は高度な集学的治療の発達により生存期間延長が得られるようになったものの、現在も長期にわたる治療の後に再発・進展を繰り返し結果的に幼い命を奪われるケースは今も後を絶たない。加えて集学的治療の発達の結果として問題となる治療後後遺症や二次発がんの問題など、解決に向けて努力すべき問題は山積している。患児の免疫反応を惹起して抗がん効果を得る免疫治療はより安全で患児の負担を軽減し得る新しい治療法として期待されるが、即臨床に応用するに値する確実な効果に関しては、まだまだ十分とは言えない。現状を考慮すると、がんに対する免疫療法の開発は、従来の集学的治療にとって代わる新しい治療法としての開発を目指すことはもちろんのこ

と、従来の集学的治療との相乗効果を期待して、より安全で高い効果が得られる併用治療としての位置づけのもと研究開発を進めることも重要と考え、本研究を立案した。

マウス実験系を用いて、神経芽腫に対する免疫反応を評価し、抗がん免疫療法を開発するための実験系を確立した。さらに担がん宿主にはなく、培養がん細胞に*Ex. vivo*で薬剤を投与することでApoptosisを誘導することに成功した。さらにこの確立した実験系のもと、免疫反応を惹起する細胞死を誘導する可能性が示されているDoxorubicinを用いてApoptosisを誘導した細胞を用いたワクチン療法が何らかの免疫系の機序を介して、担がんマウスの生命予後を改善する可能性が示された。さらに今後はマウスの生存期間延長をもたらす免疫機序をDendritic cellとMacrophageという自然免疫の中核を担う2種の細胞に注目して解明していく。また、担がんマウスの生存延長のみならず、*in vivo*で形成した腫瘍の縮小・消失が得られるあたらしい治療法としてのApoptosis細胞投与法の開発を目指して行く予定である。

2009年7月本学着任直後に本グラントに応募し、採用して頂いたことにより早期に本学での研究を開始することが可能となった。単年度研究としての採用となったため、今回はスタートアップとしての現時点までの研究成果報告ではあり、現時点で論文、学会発表、特許出願等の研究成果はないが、今後も研究を継続しさらに発展させていく予定である。幼くして重大な疾患に罹患してしまった患児達のために少しでも貢献できる様、そして臨床治療に貢献できる様、さらなる研究の継続を目指していきたい。

謝辞

本研究開始および施行にあたり多大なご協力を頂きました総合医療センター研究部の皆様に感謝いたします。特に、細胞培養・維持並びに培養細胞実験、FACS解析実験の施行における技術的協力を頂きました共同利用研究施設担当 瀬戸山由美子様、研究施設における細胞培養を中心とした実験開始の環境整備にご協力いただきましたRI研究施設 潮田陽一様、松岡菊美様、実験動物の管理・飼育並びに動物実験に際して

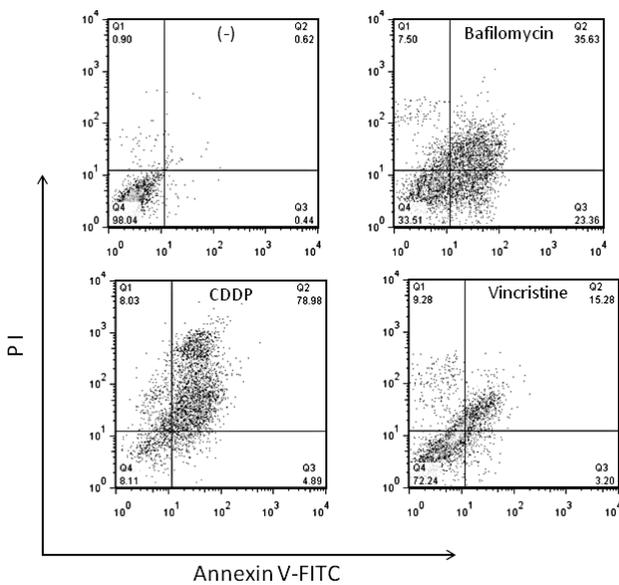


図4. 各種抗腫瘍薬によるNeuro-2a cellのApoptosis誘導.

表1. Dox.処理した細胞を用いた免疫効果(マウス生存期間)

Group	N	Survival (days)				Mean±S.D. (days)
Immunized with Doxorubicin Treated Cells	4	15	33	34	35	29.3±9.54
Control (PBS)	4	19	21	23	40	25.8±9.64

動物の麻酔管理において御協力頂いた動物実験施設
小山直基様, 龍前真也様に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, et al. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 2001; 61(23):8513.
- 2) Ohashi K, Kobayashi G, Fang S, et al. Surgical excision combined with autologous whole tumor cell vaccination is an effective therapy for murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2006;41(8):1361.
- 3) Shilyansky J, Jacobs P, Doffek K, Sugg SL. Induction of cytolytic T lymphocytes against pediatric solid tumors in vitro using autologous dendritic cells pulsed with necrotic primary tumor. *J Pediatr Surg* 2007;42(1):54.
- 4) Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685.
- 5) Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 2007;117(5):1155.
- 6) Miyake Y, Asano K, Kaise H, Uemura M, Nakayama M, Tanaka M. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest* 2007;117(8):2268.
- 7) Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13(1):54.

学内グラント 終了時報告書

平成21年度 学内グラント報告書

ホジキンリンパ腫における転写因子 NF-κB分子の細胞質—核内振動の役割

研究代表者 豊住 康夫 (埼玉医科大学 総合医療センター 病理部)

研究分担者 田丸 淳一¹⁾, 東 守洋¹⁾, 木崎 昌弘²⁾

【緒言】

NF-κBは炎症, 細胞増殖, アポトーシスなど生命のさまざまな機能を担う転写因子であり, その異常は悪性腫瘍, とりわけリンパ球系細胞においてその腫瘍化をひきおこす. NF-κB阻害剤はリンパ球系腫瘍の分子標的治療薬として注目されている¹⁾. ホジキンリンパ腫はB細胞由来の悪性腫瘍であり²⁾, ホジキンリンパ腫において知られている遺伝子異常のほとんどはNF-κBの異常活性化に帰結される³⁻⁵⁾ (図1). これらの細胞内シグナルは他のリンパ球系悪性腫瘍とも共通しており何がホジキンリンパ腫を特徴付けるもっとも重要な異常なのかは未だ解明されていない. またNF-κBは約300種の分子発現を調節しており, このなかには細胞の増殖をひきおこすシグナルとアポトーシスを誘導するシグナルという相反した機能も有する⁶⁾. この多面的な機能がいかに調節されているかも明らかとなっていない. NF-κBの活性は, おもにその抑制因子であるIκBにより調節されている⁷⁾. IκBはIKKによりリン酸化され, リン酸化されたIκBはユビキチン—プロテアソーム系で分解される. この結果, NF-κBは核へ移行しDNAと結合可能となる. IκBはまた, NF-κBにより転写調節されている. すなわちIκBはNF-κBのネガティブフィードバック経路として働く⁸⁾. このためNF-κB-IκB複合体は図2のように細胞質—核内移動を繰り返す“oscillation”(振動)という現象がみられることが明らかになってきた⁹⁾. 近年, この現象はシステム生物学的研究によるシミュレーションを含めて詳細に検討され, oscillationのパターンの違いにより転写される遺伝子群に違いがあることが示されてきた. 本研究ではホジキンリンパ腫におけるNF-κBシグナル伝達機構の重要性について検討するため, シグナル

経路構成分子の発現と活性化について検討し, さらにNF-κBのoscillationについて検討することを目的とした.

【材料と方法】

①ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-κBシグナル伝達経路構成分子の発現

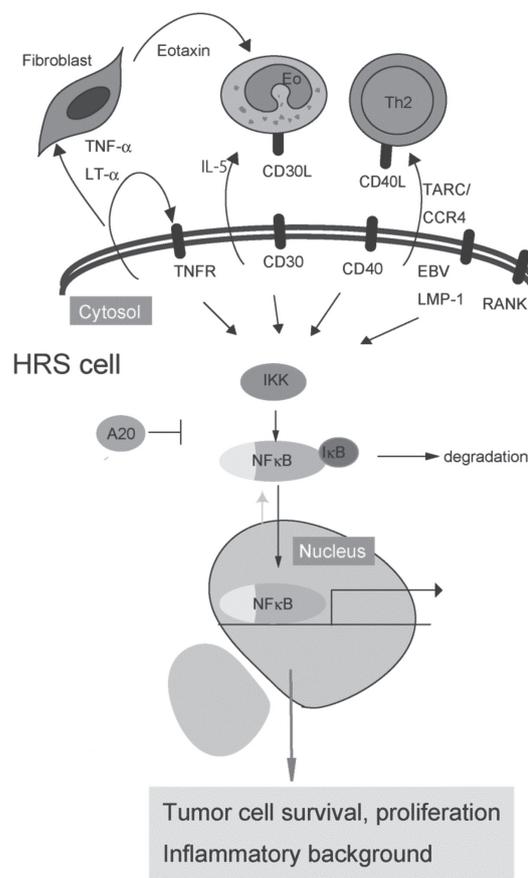


図1. ホジキンリンパ腫とNF-κBシグナリング. 種々のシグナルがNF-κB活性化に帰結する.

1) 埼玉医科大学 総合医療センター 病理部
2) 埼玉医科大学 総合医療センター 血液内科

ホジキンリンパ腫培養細胞株4種(HDLM-2, L540, KM-H2, L428細胞)と対照として4種の非ホジキンリンパ腫細胞株を用いWestern Blotで検討した。用いた抗体はI κ B α , p65, phospho-p65, c-Rel, p105, hMAML-1, hMAML-2, hMAML-3. それぞれ培養細胞をLaemli's bufferでタンパク抽出後, 30 ugをアプライしSDS-PAGE, PVDF膜に転写後行った。

②ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kBの細胞内局在の検討1

c-Relに対する抗体を用い, 各種培養細胞株のセルブロックを作成し, 免疫染色で検討した。

③ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kBの細胞内局在の検討2

ホジキンリンパ腫培養細胞株からのタンパクを核画分, 細胞質画分にわけWestern blotで検討した。

④ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kB活性の検討

NF-kB binding siteの合成オリゴDNAをprobeとし, electromobility shift assay (EMSA)でNF-kBの活性状態を検討した。

【結果】

①ホジキンリンパ腫培養細胞株4種のうちHDLM-2, KM-H2, L428にはI κ B α の発現が見られなかった。その他のNF-kBシグナル経路構成分子(p65, phospho-p65, c-Rel, p105, hMAML-1, hMAML-2, hMAML-3)はいずれも発現が見られた。

②ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kBの細胞内局在の検討1

c-Relに対する抗体を用い, 各種培養細胞株のセル

ブロックを作成し, 免疫染色で検討した(図2)。いずれの細胞株でもWestern blotと同様, c-Relの発現がみられたが, 細胞内局在としては細胞質内, 核細胞質内, 核内の3種のパターンが見出された。また細胞株間によりその局在パターンに差がみられた。現在定量的な解析を試みている。

③ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kBの細胞内局在の検討2

ホジキンリンパ腫培養細胞株からのタンパクを核画分, 細胞質画分にわけWestern blotで検討した。対象となるHeLa細胞ではTNF- α 刺激で経時的にNF-kB核移行がみられたが, ホジキンリンパ腫細胞株KM-H2では恒常的に核に存在していた(図3)。

④ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kB活性の検討

対象となるHeLa細胞ではTNF- α 刺激で経時的にNF-kB活性化がみられたが, ホジキンリンパ腫細胞株KM-H2では恒常的に活性化していた。またKM-H2ではc-Rel抗体でsupershiftがみられ, DNA結合NF-kB複合体にはc-Relが存在することが見出された(図4)。

【考察】

ホジキンリンパ腫細胞株でNF-kBシグナル伝達経路の発現, 細胞内局在, 活性化を検出可能となり, 今後のホジキンリンパ腫におけるNF-kBシグナル経路の役割について解析しうる準備ができたことは意義深い成果と考えられる。本研究は単年度研究として許可を受けたため, 現時点での研究成果をもって終了時報告とするが, 現在ホジキンリンパ腫におけるNF-kB活性化

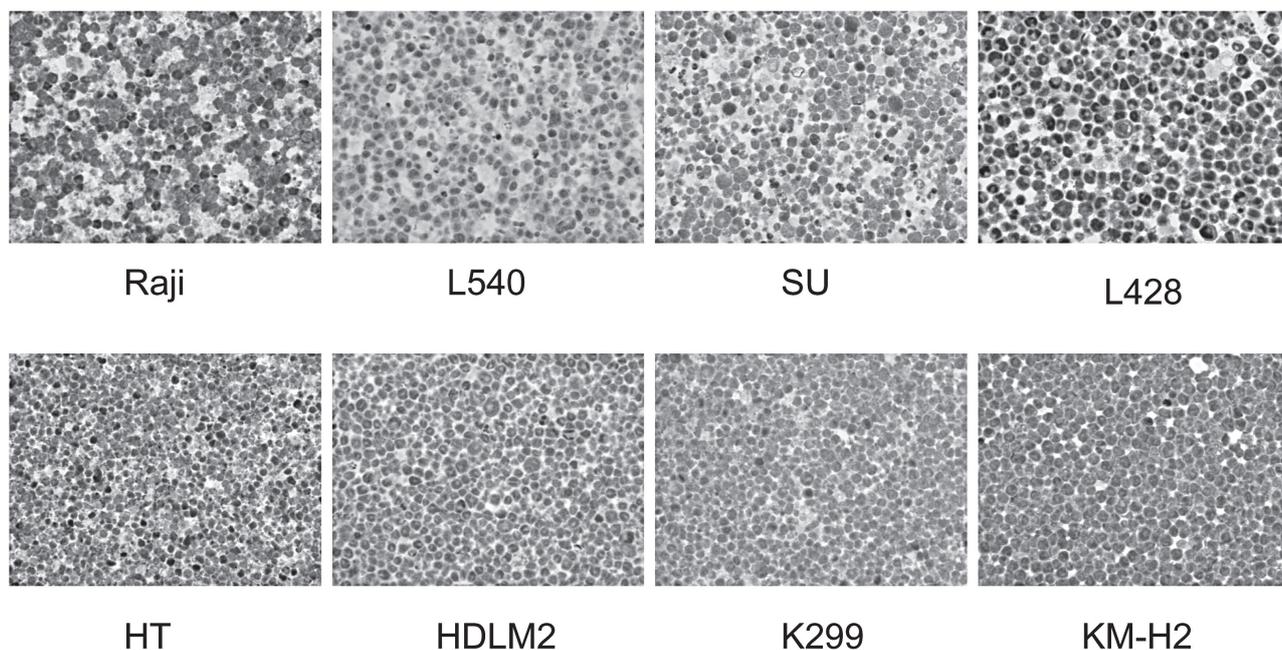


図2. 各種リンパ腫培養細胞株におけるc-Relの発現. セルブロック作成後, 免疫染色を行った。

機構について、その調節分子の関わりと細胞質-核内 oscillation を研究中であるため、これらの成果を含めて改めて終了後報告で説明したい。現時点での論文、学会発表、特許出願などはない。

【文献】

- 1) Pavan A, Spina M, Canzonieri V, Sansonno S, Toffoli G, De Re V. Recent prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma indicate NF-kappaB pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:2048-58.
- 2) 田丸淳一 木崎昌弘編. WHO 分類第4版による白血病・リンパ系腫瘍の病態学: 中外医学社; 2009.
- 3) Felberbaum RS. The molecular mechanisms of classic Hodgkin's lymphoma. *Yale J Biol Med*. 2005;78:203-10.
- 4) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, et al. Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2008;111:5118-29.
- 5) Mathas S, Johrens K, Joos S, et al. Elevated

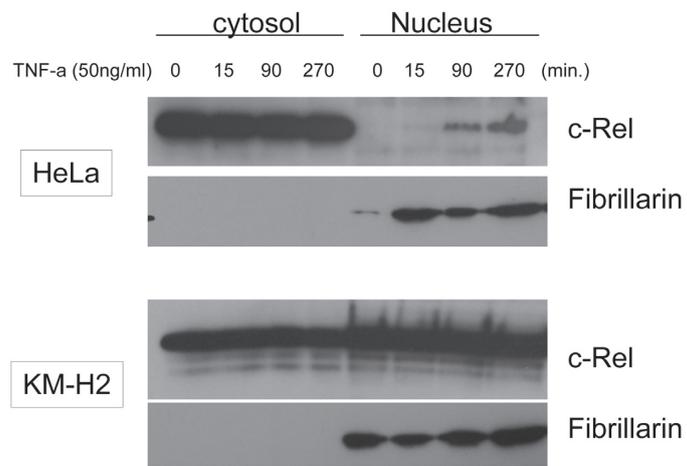


図3. HeLa細胞, KM-H2細胞におけるTNF- α 刺激後のc-Rel核内移行. TNF- α で刺激後, 図に示したタイムポイントで核, 細胞質画分にわけてタンパクを回収し, c-Rel抗体でプロットした. HeLa細胞では時間依存性に核内c-Relタンパクが増加しているが, KM-H2細胞では恒常的に核内c-Relタンパクがみられる. Fibrillarlinは核画分マーカー.

NF- κ B gel shift assay

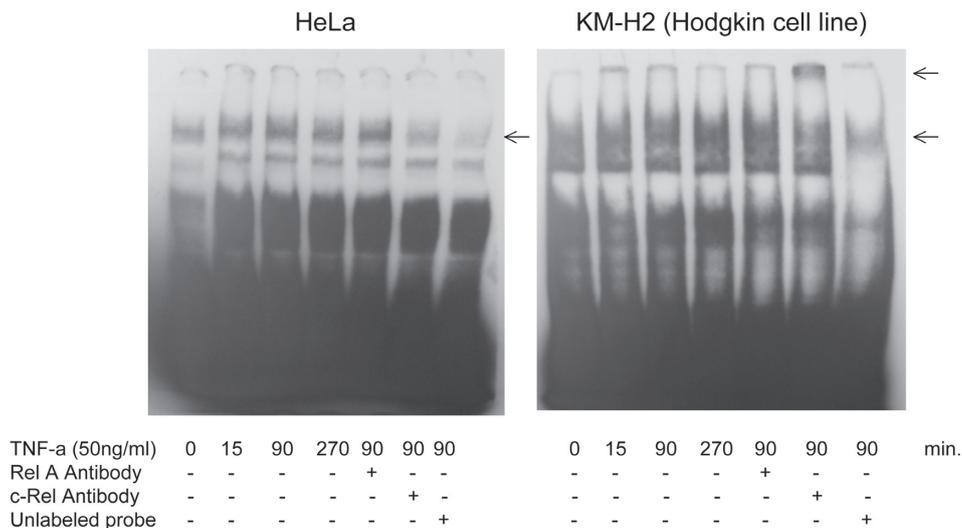


図4. NF- κ B electromobility shift assay. HeLaではTNF- α 刺激下でNF- κ B活性化がみられるが, KM-H2では刺激の有無に関わらず, NF- κ Bが活性化している. KM-H2ではc-Rel抗体をインキュベーションすることにより supershift bandがみられる.

- NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 2005;106:4287-93.
- 6) Zheng B, Georgakis GV, Li Y, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 in Hodgkin disease cell lines is independent of inhibitor of nuclear factor-kappaB mutations or activation of the CD30, CD40, and RANK receptors. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3207-15.
- 7) Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature*. 1990;344:678-82.
- 8) Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006;2006:re13.
- 9) Nelson DE, Ihekwaba AE, Elliott M, et al. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*. 2004;306:704-8.

学内グラント 終了時報告書

平成21年度 学内グラント報告書

Cold shock protein ファミリー dbpA の悪性リンパ腫の病態発生における役割

研究代表者 東 守洋 (埼玉医科大学 総合医療センター 病理部)

研究分担者 田丸 淳一¹⁾, 得平 道英²⁾, 川野 竜太郎³⁾

緒言

悪性リンパ腫は本邦において増加の一途をたどる悪性腫瘍のひとつである。われわれは以前より、悪性リンパ腫の診断ならびに研究・治療を行ってきた。

一方、ヒト Cold shock protein ファミリーは dbpA, YB-1, dbpC の3つが知られており、その中央に大腸菌で保存されている Cold shock domain とよばれる機能ドメインを有するのが特徴である (図1)。ヒトにおいて YB-1 が MDR 遺伝子の転写制御を行うことから、癌の薬剤耐性の観点から主に解析が進んでいる。しかしながら dbpA の機能はほとんどわかっていないのが実情である。そこで dbpA の機能を探る上でも、悪性リンパ腫の発生機序および病態の理解において、きわめて有用であると考えられる。

材料と方法

症例: 正常リンパ組織はヒト扁桃を用い、悪性リンパ腫症例は埼玉医科大学総合医療センター病理部に提出された検体を用いた。本解析に際し、当院倫理委員

会に承認されている (埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会 No.246)。

免疫組織染色: dbpA に対する免疫染色を行い、10% 以上の腫瘍細胞に陽性であった症例を陽性とした。

培養細胞: ヒト悪性リンパ腫由来培養株細胞株 (HDLM-2, L428, L540, KM-H2, SU-DHL-1, Karpas 299, Raji, HT, Jurkat) は 10% FBS (GIBCO 社) と 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO 社) を添加した RPMI 培地 (GIBCO 社) 中にて、37°C, 5% CO₂ 下において培養した (なお培養細胞に関する実験は東京大学大学院新領域創成科学研究科渡邊俊樹教授との共同研究である)。また遺伝子導入に際しては、BTX 社 ECM600 を用いて行った。

抗体: ヒト dbpA に対する抗体は、ヒト dbpA の C 末端 14 アミノ酸 (TENPAPPTQSSAE) をウサギに免疫し樹立した。

ベクター: pIRES-AcGFP (Clontech 社) を BamHI で切断し、平滑末端化したのち、pcDNA3.1-dbpA (順天堂大学医学部病理・腫瘍学 樋野興夫教授より供与) の dbpA のコート領域を挿入し、発現ベクターとした。配列はシークエンサーにて確認した。

結果

ヒト dbpA に対する抗体を用い、正常リンパ組織での組織発現を検討した。その結果、活性化リンパ球の指標とされる CD30 の発現パターンと dbpA の発現パターンが類似していることを見出した (図2)。次に当院の悪性リンパ腫症例、約 500 例を用いて dbpA の発現解析を行い、WHO 分類 (第3版) に則った亜型別の発現頻度を検討した。その結果、CD30 陽性の悪性リンパ腫である Hodgkin リンパ腫ならびに未分化大細胞リンパ腫において高い頻度で発現していることを見出した。Hodgkin リンパ腫: 44/69 (64%), 未分化大細胞リンパ腫: 5/12 (42%) であった。一方、もっとも

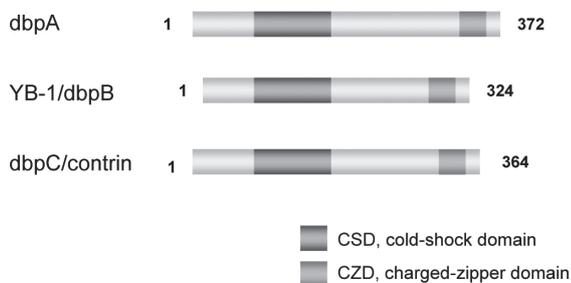


図1. Cold shock domain ファミリーの遺伝子の構造図。

1) 埼玉医科大学 総合医療センター 病理部
 2) 埼玉医科大学 総合医療センター 血液内科
 3) 埼玉医科大学 総合医療センター 歯科口腔外科

多いリンパ腫の疾患単位であるびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫DLBCLでは36/225 (16%)で、CD30陽性のリンパ腫に比べて低率であった。

DLBCLにおいてdbpAの発現と予後との検索から、その発現が予後不良因子となることを新たに見出した。現時点でdbpAの発現におけるDLBCLの亜型別(GCB:(Germinal center B-cell)型やnon-GCB型など)、EBV感染やBCL6, p53, BCL2などとのマーカーの相関は見出されていない。

dbpAの発現を種々の悪性リンパ腫細胞株でスクリーニングした結果、多くのリンパ腫細胞に発現がみられるが、HDLM-2, L428細胞株においてdbpAの発現がみられないことを見出した(図3)。次にこれらの細胞に安定的にdbpAを発現する細胞株を樹立した(図4)。

考察

本研究では主に、ヒトリンパ系組織、悪性リンパ腫症例ならびにヒトリンパ腫細胞株を用いてdbpAの機

能解析を行った。その結果、dbpAがCD30陽性の種々のリンパ腫において高率に発現することを見出し、CD30を介したシグナル伝達経路へのdbpAの関与が示唆された。こうしたことからHodgkinリンパ腫を中心としたCD30陽性におけるdbpAの関わりを介してリンパ腫発生機構に重要な役割を有していることを見いだせたことは意義深い。今後はさらに遺伝子発現の網羅的解析を通じて、dbpAの発現に伴う遺伝子発現のプロファイリングを行う。

一方でDLBCLは悪性リンパ腫の中で最も多い亜型であり、その病因ならびに病態においてヘテロな疾患群である。われわれは、DLBCLにおいてdbpAの発現がその予後との相関することを見出した。DLBCLにおけるdbpAの発現の意義を今後は疾患モデルの作製などを通じて行う予定である。

本研究の推進はリンパ腫、とりわけHodgkinリンパ腫を含めたCD30陽性のリンパ系腫瘍の病態の解明ならびに分子標的を用いた治療戦略の新しい道を切り開くものと期待される。

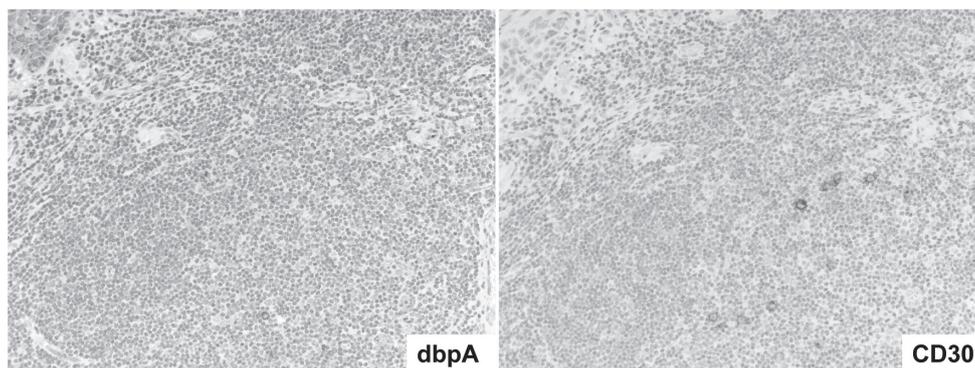


図2. ヒト扁桃組織におけるdbpAとCD30の免疫染色の結果。濾胞内および濾胞間領域、一部濾胞内に散在性に陽性細胞が観察され、両者の分布の類似が認められた。またdbpAは血管の一部にも陽性像を認めた。

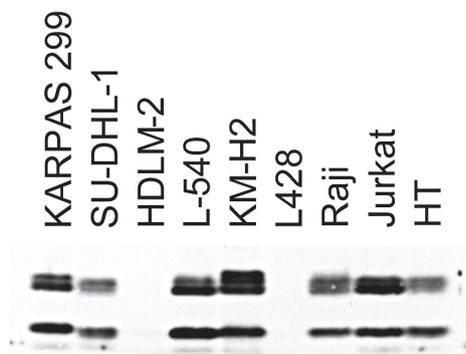


図3. 悪性リンパ腫細胞株におけるdbpAのタンパク発現の結果。HDLM-2ならびにL428ではdbpAの発現が認められなかった。

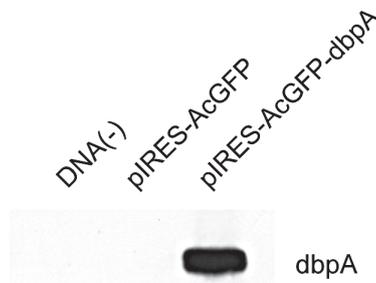


図4. dbpA発現安定細胞株の図。① DNAなし、② pIRES-AcGFP、③ pIRES-AcGFP-dbpA。

参考文献

- The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. *Bioessays*. 2003 Jul;25(7):691-8.
- The up-regulation of Y-box binding proteins (DNA binding protein A and Y-box binding protein-1) as prognostic markers of hepatocellular carcinoma. Yasen M, Kajino K, Kano S, et al. *Clin Cancer Res*. 2005 · Oct 15;11(20):7354-61.
- Clinicopathologic characteristics and treatment outcome of the addition of rituximab to chemotherapy for CD5-positive in comparison with CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. Niitsu N, Okamoto M, Tamaru II, et al. *Ann Oncol*. 2010 Mar 26.
- Co-existence of acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia and Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoproliferative disorder in a patient with rheumatoid arthritis: a case report. Tokuhira M, Hanzawa K, Watanabe R, et al. *J Hematol Oncol*. 2009 Jun 30;2:27.
- Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients. Asano N, Yamamoto K, Tamaru J, et al. *Blood*. 2009 Mar 19;113(12):2629-36.
- Pathology of malignant lymphoma Tamaru J, Kawano R, Momose S. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 2009 Jun;112(6):465-73. Review. Japanese.

研究成果リスト

英語論文

- CD44 expression during tumor progression of follicular lymphoma. Higashi M, Sugaya Y, Soeta S, et al. *Oncol Rep*. 2009 Nov;22(5):1135-40.
- Human Mena associates with Rac1 small GTPase in glioblastoma cell lines. Higashi M, Ishikawa C, Yu J, et al. *PLoS One*. 2009;4(3)

学内グラント 終了時報告書

平成21年度 学内グラント報告書

リンパ球運命決定におけるアダプタータンパク SIT の役割の解析

研究代表者 塚越 由香 (埼玉医科大学 保健医療学部 健康医療科学科)

研究分担者 加門 正義*

緒言

T細胞やB細胞の表面には、抗原分子を認識して細胞内にシグナルを伝えるT細胞レセプター (T cell receptor: TCR) が存在する¹⁾。シグナルは、細胞膜から細胞質を経て核へと伝達され、増殖、分化、アポトーシスなど実に様々な細胞応答を誘導し、その結果様々な細胞の運命が決定される^{2,5)}。この違いはシグナルの強度、持続時間、補助シグナルの有無により決定されると考えられている^{6,10)}。

例えば、胸腺では、未熟なT細胞がTCRと自己ペプチドの親和性の違いにより、分化成熟していく^{4,6,9)}。骨髄から胸腺に遊走してきた未熟T細胞は、最初はCD4, CD8いずれも発現していないDN (ダブルネガティブ) 細胞であるが、その後CD4, CD8どちらも発現しているDP (ダブルポジティブ) 細胞へと分化し、正の選択、負の選択の対象になる。これらの選択はTCRと、胸腺上皮上に提示された自己major histocompatibility complex (MHC) 及び自己ペプチド断片の複合体との親和性を指標に行われる。つまり、TCRが親和性の強いリガンド (MHC + 自己ペプチド) と出会った場合は負の選択によりアポトーシスを引き起こし細胞は死滅する。また、親和性が弱い場合は正の選択によりデフォルト死を回避して生き残る²⁾。このような選択機構を通り抜けて生き残った細胞のみCD4, CD8SP (シングルポジティブ) 細胞へと分化し、末梢へ遊走する事ができるようになる。したがって、TCRからのシグナルをpositive もしくは、negativeに制御しているしくみを明らかにする事は、T細胞の運命を理解する上で非常に重要である。

近年、レセプターからのシグナル伝達は、非常に複雑なネットワークを形成し、調節されていることが明らかになってきた。そこには、シグナルを受け取るレセプターと、シグナルを伝えるリン酸化酵素、司令塔の役割を担う膜型アダプター分子の3つが中心とな

り、核内の遺伝子発現を制御する転写因子を動かしていると考えられている。レセプターからのシグナルにおいてアダプター分子は、様々なシグナル伝達分子群と結合し、シグナル伝達の顕著な効率化、及び経路の分岐等に重要な役割を果たす分子である¹⁰⁾。そこで我々は、シグナルネットワークを形成するメンバーの一つであるSHP-2 interacting transmembrane adaptor protein (SIT) が胸腺細胞に強く発現されていることに着目して研究を進めた。SITは膜型のアダプター分子であり、シグナルの負の制御への関与が推測されているが、機能はまだほとんどわかっていない¹¹⁻¹⁴⁾。SITは短い(22アミノ酸残基)細胞外部と長い細胞質部を持ち、ホモダイマーを形成するタンパク分子で¹⁵⁾、C-terminal src kinase (Csk), growth factor receptor binding protein 2 (Grb2), SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) 等を結合し、nuclear factor of activated T cells (NF-AT) 活性を抑制することが明らかにされている。SHP2結合部位に変異を入れても、抑制機能は損なわれないのでどのような機構で抑制作用が発現するかは明らかでないが、SITノックアウトマウスにおいてT細胞の正の選択が弱まり、負の選択へシフトすることからTCRを介したシグナルを何らかの形で抑制していることが報告されている。一方で、TCRからのシグナル伝達を正に制御することが知られているLAT (linker of activation in T cells) は、SIT同様膜型アダプター分子の一つで構造的にもSITとよく似ている。TCRの抗原刺激で活性化されたZAP-70によりリン酸化されるとphospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1), grb2-related adaptor downstream of src (Gads), Grb2等と会合し、MAPK経路、Ca²⁺動員のシグナル伝達に必須であることが示されており、解析が進んでいる分子である^{16,21)}。そこで、LATはSITの鏡面分子としての役割を持ち、LATは正、SITは負にTCRシグナル伝達を制御しているのではないかと仮説を立て、SITがTCRを介したシグナル伝達における役割をLAT機能と比較しながら解析を行った。

*埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 発生、分化、再生部門

材料と方法

1) 動物

C57BL/6 (B6) マウスは日本CLEAより購入した。

2) 抗体

FITC 標識抗 TCR β 抗体 (H57-597), FITC 標識抗 CD25 抗体 (7D4), PE 標識抗 B220 抗体, PE 標識抗 CD44 抗体 (IM-7), PE-Cy5 標識 streptavidin, PE-Cy7 標識 streptavidin は BD Biosciences より購入した。FITC 標識抗 CD8 抗体, FITC 標識抗 B220 抗体は BioLegend より購入した。PE 標識抗 CD4 抗体, PE 標識抗 TCR β 抗体 (H57-597) は Beckman Coulter (Miami, FL, USA) より購入した。FITC 標識抗 CD4 抗体は eBioscience より購入した。Biotin 標識 BSIT-1 ~ 5, 同標識抗 CD4 抗体 (MT4), 同標識抗 CD8 抗体, Alexa Flour 647 標識 BSIT-1 は我々の研究室で調整した。

HRP 標識抗マウス IgG 抗体, 抗 CD3 抗体 (2C11), 抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) は同研究室で調整した。

3) フローサイトメーター

胸腺細胞, 脾臓細胞をそれぞれ $1 \sim 10 \times 10^5$ 個の細胞に抗体を加えて水中で 30 分反応させ, 氷冷した staining buffer (0.5% BSA, 0.02% sodium azide 含有 HBSS) で二回洗浄した。染色の際, 抗体と Fc γ receptor との非特異的結合を防ぐために, ラット抗マウス Fc γ receptor (2.4G2) を加えた。染色した細胞は, FACSCalibur また FACSaria (Becton Dickinson) を用いて解析を行った。

4) リン酸化の検出

24 穴培養プレートに $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗 CD3 抗体 (2C11) を一晚, 4°C でコートさせ, 5×10^6 個/well に調製した細胞を加えた。1200 rpm で 3 分遠心し, 細胞を抗体に密着させた。その後 37°C で 5 分間反応させ, $5 \times \text{TNE}$ buffer を加え, 反応を止めると同時に細胞を溶解した。その後, 遠心分離にて可溶性の上清を分取し, 免疫沈降用の抗体を加え, protein G ビーズを用いて免疫沈降させた。SDS-PAGE と Western blotting は定法によって行った。

結果

1) 脾細胞における SIT 発現

BSIT-1 を用いて B6 マウス脾細胞における SIT 発現をフローサイトメーターにて解析した。成獣 B6 マウスより脾臓を摘出し T 細胞 (TCR β +), B 細胞 (B220 +) について SIT 発現を解析した所, T 細胞では高発現していることがわかった (図 1)。B 細胞においても認められたがかすかだった。

2) T 細胞の各分化段階における SIT 発現

末梢の T 細胞で SIT が発現していることがわ

かったため, 次に T 細胞の各分化段階における SIT の発現を調べた。T 細胞が分化・成熟する場所として知られている胸腺より細胞を摘出し, CD4, CD8 に対する抗体で DN 細胞, DP 細胞, CD4SP 細胞, CD8SP 細胞に染め分け, 各分画における SIT の発現をフローサイトメーターで解析した (図 2)。その結果全ての分画で SIT の発現は見られたが, DN 細胞では低く, DP 細胞で最大となり, SP 細胞になると低下するということがわかった。特に SP 細胞では CD4SP 細胞での SIT 発現は SD8SP の SIT 発現より高かった。

さらに, TCR 遺伝子の再構成のシグナルは DN 細胞の時期に入るので DN 細胞について, CD25 と CD44 に対する抗体で DN1 ~ 4 に染め分け詳しく解析した²⁾ (図 3)。その結果, DN1 ではほとんど発現は見られないが, DN2 になると, かすかに発現し始めた。TCR β 鎖の遺伝子再構成が行われ, T 細胞分化のチェックポイントとなる β 選択のシグナルが入る DN3 で高くなり, TCR α 鎖の遺伝子再構成が行われる DN4 でさらに高くなった。さらに, DN4 の次のステージである DP 細胞と比較すると, T 細胞のクローン選択に非常に重要な正の選択, 負の選択のシグナルが入る DP で SIT 発現は最大となるということが明らかになった。

3) 胸腺における T 細胞の最終分化に伴う SIT 発現

T 細胞分化において, DP 細胞の時期に正の選択により自己ペプチドと MHC の複合体と弱く反応するクローンが選ばれ CD4 もしくは CD8SP 細胞へ分化する細胞の運命が決定されると, 髄質へと遊走

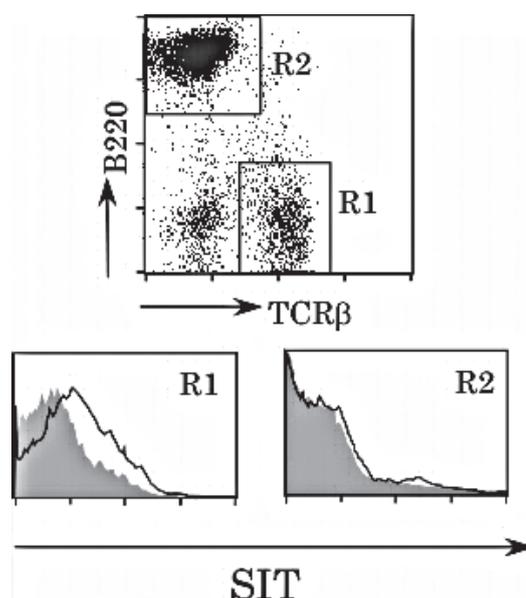


図 1.

し髄質の抗原提示細胞により異所的に発現し, 提示された自己ペプチドと強く反応するクローンを除く負の選択が行われる. この2つのチェックポイントを通過するとCD4/8どちらか一方の発現が抑えられ残りの一方を発現するSP細胞へと分化する. そこで, 正の選択により運命決定がなされた後のT細胞の最終分化にともなうSITの発現量の変化をフローサイトメーターにて解析した(図4). B6マウスから胸腺を摘出し, CD4とCD8に対する抗体で染め分け, 正の選択が終了したばかりの細胞から, 最終分化を終えた細胞まで細かくゲートをかけ, SITの発現の推移を解析した. 図4より, CD4への分化が決定した細胞について, 正の選択を終えたばかりのまだCD8を高く発現している細胞でSITの発現は高く, その後最終分化を受けCD8の発現がほとんどなくなるとSITの発現は低くなることがわかった. CD8への分

化が決定した細胞についても同様に, 正の選択を受けた直後ではSIT発現は高く, CD4の発現が低下するとSIT発現も低下することがわかった. このことから, SIT発現はT細胞の最終分化にともなって低下することがわかった.

4) TCR刺激に伴うSITリン酸化

SIT発現がTCR刺激に伴って増加したため, TCR刺激に伴うSITのリン酸化をWestern blottingにて確認した. B6マウスより胸腺を摘出し抗CD3抗体(2C11)で刺激後, BSIT-2でSIT分子を免疫沈降しSDS-PAGEで展開しWestern blottingにて抗リン酸化チロシン抗体(4G10)を用いてSITのリン酸化を検出したところ, 同様に処理したLATはリン酸化されている一方で, SITは刺激前から強くリン酸化された状態で存在し刺激に応じた新たなリン酸化は検出されなかった(図5).

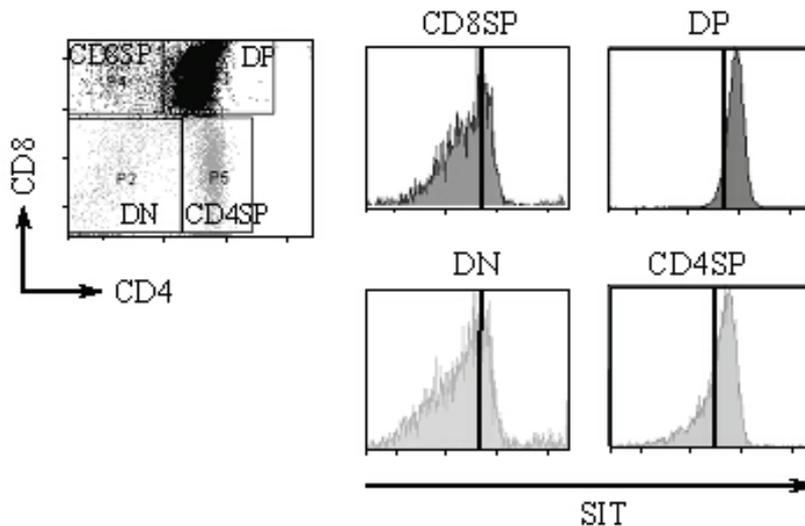


図2.

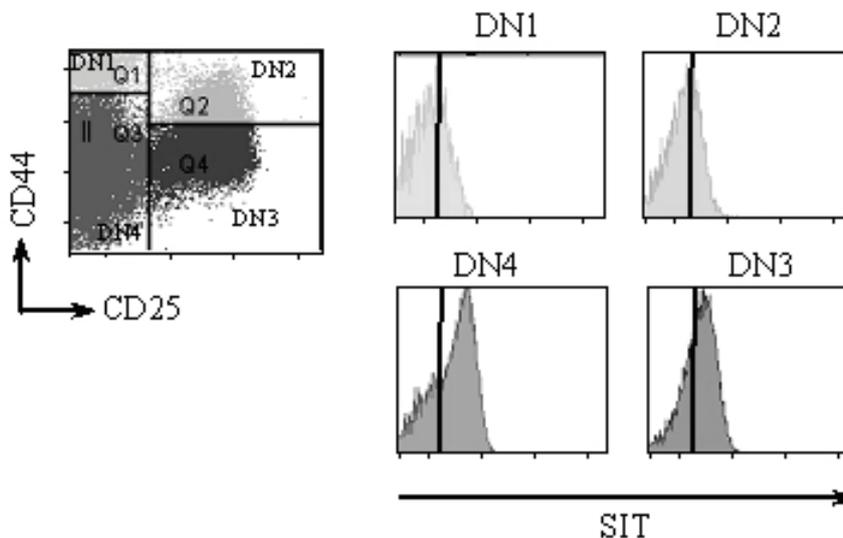


図3.

考察

T細胞は抗原提示分子であるmajor histocompatibility complex (MHC) 分子上に提示された抗原をCD4やCD8のような補助レセプターと共にTCRを介して認識する。TCRを介したシグナル伝達はそのシグナルの伝わり方により、増殖、分化、アポトーシス、サイトカイン産生等、全く異なった細胞の運命が決定される。近年、SIT同様、膜型のアダプター分子であるLATがTCRを介したシグナル伝達において中心的な役割を担う分子として注目されている。LATはT細胞の分化に必要な不可欠であることが示されており、TCRがMHC上に提示された自己ペプチドを認識する際にZAP-70によりリン酸化され、SLP-76やPLC- γ , Gads, Grb2など様々なシグナル伝達分子を結合することでシグナル伝達の効率化に寄与している^{19,20)}。

SITはTCRを介したシグナル伝達を負に制御するという点で、LATと異なっている。腫瘍細胞を用いた

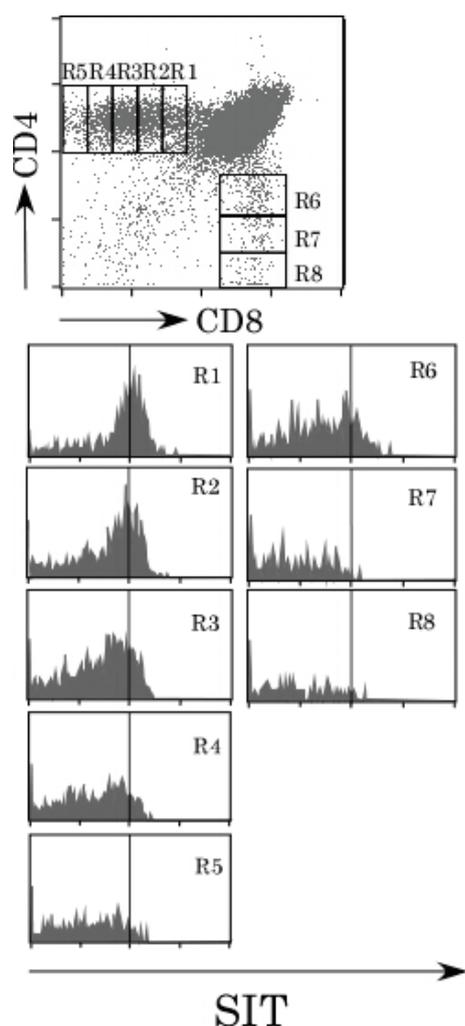


図4.

実験でSITを過剰発現させるとNF-ATの活性が低下することや、SITノックアウトマウスにおいて正の選択から負の選択にシフトする傾向が見られることからTCRを介したシグナル伝達を負に制御すること考えられるが、詳しい制御のメカニズムは明らかになっていない^{11,13)}。

そこで、本研究ではリンパ球におけるSITの発現を解析した結果、SITは主にT細胞に発現していることがわかった。T細胞の分化段階におけるSITの発現を解析した所、TCR β 鎖の遺伝子再構成が行われ β 選択のシグナルが入るDN3、TCR α 鎖の再構成が行われるDN4と分化が進むにつれて高くなり、T細胞のクローン選択に重要な正、負の選択のシグナルが入るDP細胞でSITの発現は最大になった。TCR(CD3)に刺激を入れてもSITのリン酸化に差異が見られなかったことから、SITは構成的にリン酸化を受けた状態で存在し、 β 選択や正、負のシグナルが入った時に他のシグナル伝達分子を会合することでシグナル伝達を行う場所を作出したり、TRIM (TCR-interacting molecule) と協調することでシグナルの強さや長さを調節しているのではないかと考えている^{22,23)}。SITがT細胞分化のどの段階で機能しているのかを解決するためには、ある段階で分化が止まっているような遺伝子改変マウス (RAG2 (-/-) マウスやTCR α 鎖 (-/-) マウス) や正もしくは負の選択のみ起こるようなTCRトランスジェニックマウスを用いてSITの発現やリン酸化、会合する分子について解析をしていく必要があると考えられる。

本研究より、SITがT細胞のクローン選択の時期に相関して発現していることが明らかになった。細胞の

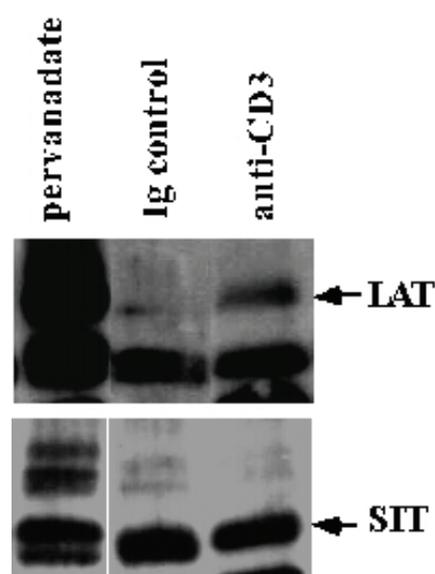


図5.

外から刺激を加えてもSITのリン酸化に優位な差は見られなかったことから、構成的にリン酸化を受けることで、遺伝子再構成に関係するシグナルや抗原レセプターのシグナルを制御することに関わっているのではないかと考えている。詳しい制御のメカニズムは解明しきれなかったが、複雑なシグナルネットワークの一つを構成する分子としてのSITについて知見を増やすことができた。残された疑問を明らかにするため、今後の解析が期待される。

参考文献

- 1) Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-81.
- 2) Kronenberg M, Gorman J, Haars R, Malissen M, Kraig E, Philips L, Delovitch T, Suci-Foca N, Hood LE. Rearrangement and transcription of the b-chain genes of the T-cell antigen receptor in different types of murine lymphocytes. *Nature* 1985;313:647-53.
- 3) Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996;14:259-74.
- 4) Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:139-76.
- 5) Yasutomo K, Doyle C, Miele L, Fuchs C, Germain RN. The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature* 2000;404:506-10.
- 6) Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Guinter TI, Yamashita Y, Sharrow SO, Singer A. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+T cells. *Immunity* 2000;13:59-71.
- 7) Wilkinson B, Kaye J. Requirement for sustained MAPK signaling in both CD4 and CD8 lineage commitment: a threshold model. *Cell Immunol* 2001;211:86-95.
- 8) van der Merwe PA, Davis SJ. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 2003;21:659-84
- 9) Liu X, Bosselut R. Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nat Immunol* 2004;5:280-8.
- 10) Horejsi V, Zang W, Schraven B. Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:603-16.
- 11) Marie-Cardine A, Kirchgessner H, Bruyns E, Shevchenko A, Mann M, Autschbach F, Ratnoffsky S, Meuer S, Schraven B. SHP2-interacting transmembrane adaptor protein (SIT), a novel disulfide-linked dimer regulating human T cell activation. *J Exp Med* 1999;189:1181-94.
- 12) Pfrepper KI, Marie-Cardine A, Simeoni L, Kuramitsu Y, Leo A, Spicka J, Hilgert I, Scherer J, Schraven B. Structural and functional dissection of the cytoplasmic domain of the transmembrane adaptor protein SIT (SHP2-interacting transmembrane adaptor protein). *Eur J Immunol* 2001;31:1825-36.
- 13) Simeoni L, Posevitz V, Kölsch U, Meinert I, Bruyns E, Pfeffer K, Reinhold D, Schraven B. The transmembrane adapter protein SIT regulates thymic development and peripheral T-cell functions. *Mol Cell Biol* 2005;25:7557-68
- 14) Posevitz V, Arndt B, Krieger T, Warnecke N, Schraven B, Simeoni L. Regulation of T cell homeostasis by the transmembrane adaptor protein SIT. *J Immunol* 2008;180:1634-42.
- 15) Hübener C, Mincheva A, Lichter P, Schraven B, Bruyns E. Complete sequence, genomic organization, and chromosomal localization of the human gene encoding the SHP2-interacting transmembrane adaptor protein (SIT). *Immunogenetics* 2001;53:337-41.
- 16) Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 1998;92:83-92.
- 17) Finco TS, Kadlecsek T, Zhang W, Samelson LE, Weiss A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 1998;9:617-26.
- 18) Zhang W, Irvin BJ, Tribble RP, Abraham RT, Samelson LE. Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line. *Int Immunol* 1999;11:943-50.
- 19) Zeyda M, Staffler G, Horejsi V, Waldhausl W, Stulnig TM. LAT displacement from lipid rafts as a molecular mechanism for the inhibition of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 2002;277:28418-23.
- 20) Sommers CL, Park CS, Lee J, Feng C, Fuller CL, Grinberg A, Hildebrand JA, Lacaná E, Menon RK, Shores EW, Samelson LE, Love PE. A LAT mutation that inhibits T cell development yet induces lymphoproliferation. *Science* 2002;296:2040-3.
- 21) Aguado E, Richelme S, Nuñez-Cruz S, Miazek A, Mura AM, Richelme M, Guo XJ, Sainty D, He HT, Malissen B, Malissen M. Induction of T helper type

2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. Science 2002;296:2036-40.

- 22) Bruyns E, Marie-Cardine A, Kirchgessner H, Sagolla K, Shevchenko A, Mann M, Autschbach F, Bensussan A, Meuer S, Schraven B. T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-z complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. J Exp Med 1998;188:561-75.
- 23) Koelsch U, Schraven B, Simeoni L. SIT and TRIM determine T cell fate in the thymus. J Immunol 2008;181:5930-9.

研究成果

論文発表

- 1) Shimizu N, Tsukagoshi Y, Eshima K,

Iizuka M, Shinohara N. Developmental change in the expression of SHP2-interacting Transmembrane Protein(SIT) on the cells of T lineage. Kitasato Med J. 2010 (in press).

- 2) Tsukagoshi Y, Shimizu N, Matsuno Y, Katagiri H, Eshima K, Ito K, Iizuka M, Shinohara N. Production of monoclonal antibodies to a short extracellular portion of SHP2-interacting transmembrane adaptor protein by DNA immunization. Kitasato Med J. 2009;39:44-51.

学会発表

- 1) Tsukagoshi Y, Iizuka M, Eshima K, Shinohara N. Requirement of SHP-2 interacting transmembrane adaptor protein(SIT) to induce T and B cell development. 第39回日本免疫学会学術集会. 平成21年12月. 大阪.