

報告書

平成17年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

先天性心奇形発生機序の解明：
心内膜床形成にかかわる因子の網羅的な解析

受賞者 山岸 敏之（埼玉医科大学解剖学教室）

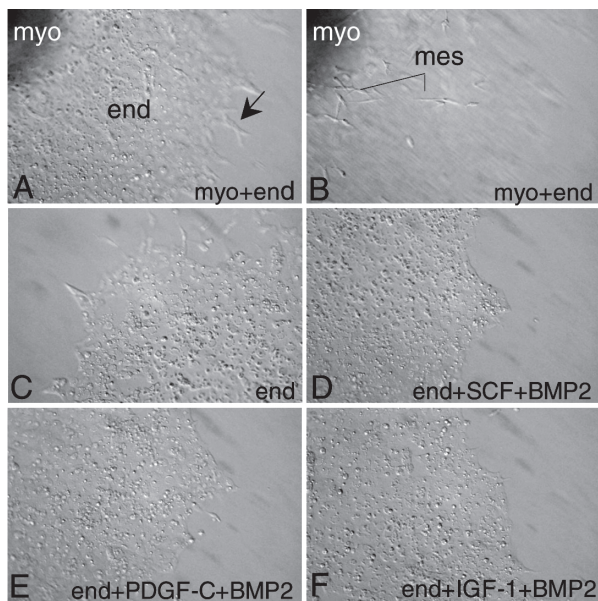
共同研究者 奥田 晶彦*

心内膜床は初期胚心臓に生じる弁や中隔の原基で、房室管と流出路の心内皮細胞が間葉細胞に転換して形成される。心内膜床の形成異常は先天性心疾患の原因の一つになる。この心内膜床形成で起こる内皮-間葉形質転換は、心筋から分泌される未知のシグナル因子と心内皮細胞から分泌されるTGF- β (Transforming growth factor- β ：形質転換成長因子- β)によって制御されていることが示されている。私たちは心筋細胞からのシグナルの一つがTGF- β ファミリーに属するBMP2 (Bone morphogenetic protein 2: 骨形成因子2)であり、心内皮細胞の形質転換のときにTGF- β 3と協調的に作用することをはじめて明らかにした。またこの実験から、BMP2とTGF- β 3の作用経路とは異なる経路が存在する可能性が明らかになった。そこで房室管領域に発現する遺伝子を調べることで、この経路を明らかにすることを計画した。本研究の目的は、胚心臓の各領域に発現する遺伝子を網羅的に解析することで房室管領域特異的な遺伝子群を同定し、これらの情報をもとに心内膜床形成にかかわる因子を生物検定により明らかにすることである。

9.5~10.5dpc (days of post-coitus)のマウス胚750匹の心臓を微小外科手術により、心室、房室管、心房の各領域に切り分けた。これらの領域からDNAマイクロアレイに必要なmRNAを精製し、プローブを合成した。そしてDNAチップ (Affymetrix社)を用いて心臓の各領域に発現する遺伝子の網羅的な解析を行った。心室、房室管、心房の各領域での遺伝子発現量を比較したところ、房室管領域に多く発現する遺伝子約400個が明らかになった。これらの遺伝子のなかには、私たちがこれまでに機能を明らかにしてきたTGF- β やBMP、転写因子であるtbx遺伝子群も含まれていた。上皮細胞の形質転換には、様々な成長因子や転写因子

がかかわっていることが明らかにされつつある。このことから房室管に発現する遺伝子の中でも、まず最初に成長因子と転写因子に注目し解析することにした。成長因子については、心内膜床形成への関与が明らかでないSCF (stem cell factor, c-kit ligand), PDGF-C (platelet derived growth factor-C), IGF-1 (insulin like growth factor-1)についてその機能を調べることにした。機能解析は、マウス胚では微小外科手術が困難であり生物検定が難しいこと、これまでの技術や知識の蓄積が豊富であることからニワトリ胚心臓をつかった器官培養系でおこなった。この検定は次のように行なう。ニワトリ胚心臓の心内膜床形成領域を切り出し、コラーゲンゲル上で培養する。このとき心筋細胞とともに心内皮細胞を培養すると、心内皮細胞は形質転換しコラーゲンゲル内に侵入する (図A, B)。一方、心内皮細胞だけを培養した場合には心内皮細胞の形質転換はおこらない (図C)。このようにコラーゲンゲル内への心内皮細胞の侵入の有無により、形質転換能が判定できる。そこで心内皮細胞だけを培養し、培養液中にSCF, PDGF-C, IGF-1をそれぞれ投与した。しかしながら、心内皮細胞の遊走や形質転換はみられなかった。次にこれらの成長因子が心筋細胞からの液性因子として作用しているBMP2と協調しているかどうかを確かめるため、BMP2とともに投与し心内皮細胞の形態変化を観察した。しかしこのときも心内皮細胞の遊走やコラーゲンゲル内への進入は観察できなかった (図D, E, F)。これらの因子についてはさらに別の成長因子との関係を検討中である。一方、心内膜床領域に発現する転写因子についてはホメオボックスタイプの転写因子に注目した。ホメオボックス遺伝子は、発生過程で生物の形づくりにかかわる転写因子群である。これらの遺伝子産物を心内皮細胞で発現させるため全長クローニングを行い、これまでに2つのホ

*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



図．心内皮細胞に対するSCF, PDGF-C, IGF-1の形質転換実験(48時間培養)．A：コラーゲンゲル上での心筋細胞(myocardium; myo)と心内皮細胞(endothelial cell; end)の共培養．心内皮細胞の遊走(矢印)がみられる．B：Aの実験のコラーゲンゲル内部の様子．心内皮細胞から形質転換した間葉(mesenchymal cell; mes)がある．C：心内皮細胞だけを培養した場合．心内皮細胞の遊走やゲル内への間葉細胞の浸潤はみられない．D：SCFとBMP2を同時に投与したとき．E：PDGF-CとBMP2を同時に投与したとき．F：IGF-1とBMP2を同時に投与したとき．D, E, Fでは心内皮細胞だけを培養したときと同じような形態を示した．

メオボックス遺伝子のクローニングを完了した．今後これらの遺伝子を発現ベクターに組み込み生物検定を行なう予定である．

学会発表

Yamagishi T, Nakajima Y, Nishimatsu S, Nohno T, Ando K, Sakabe M, Nakamura H. Expression patterns of *tbx* genes during chick atrial development. Experimental biology. April 1-5, 2006. San Francisco.

報告書

平成17年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

樹状細胞を用いたTヘルパーI型, II型免疫応答制御療法の為の
基礎的研究

受賞者 植村 靖史(埼玉医科大学免疫学教室)

共同研究者 劉 天懿¹⁾, 鈴木 元晴²⁾, 成田 弥生³⁾高木 理恵¹⁾, 大山 秀樹¹⁾, 涌井 昌俊¹⁾菊地 博達³⁾, 石原 理²⁾, 松下 祥¹⁾

緒言

近年, 全身性強皮症 (J. Exp. Med. 182:1163-8. 1995.), 1型糖尿病 (Nature 391:177-81. 1998.), SLE (Lupus 7:565-8. 1998.), 関節リウマチ (Arthritis Rheum. 44:1127-38. 2001.)などの自己免疫疾患の患者群において, NKT細胞の減少あるいは機能不全が報告され, これらの疾患の病因, 病態に深く関与していることが示唆されている.

NKT細胞は, その活性化を通してTh2応答を促進し, 臓器特異的自己免疫疾患の防止に寄与するとの報告があるが (J. Exp. Med. 194: 1801-11. 2001. Nat. Med. 7: 1052-56. 2004.), その一方で樹状細胞 (DC) のIL-12産生を誘導することにより1型ヘルパーT (Th1) 応答を促進し, 腫瘍拒絶あるいは感染防御にも貢献するという報告もある (J. Exp. Med. 9: 1503-17. 2005.). これらの矛盾する観察は, 機能的に異なるNKTサブセットが存在し, それぞれが異なる免疫応答を誘導することを示唆するものである.

実際, ヒトNKT細胞には, $CD4^{+}$, および $CD4^{-}CD8\beta^{-}$ (double negative: DN) の2つの主要なサブセットが存在するが, これらのサイトカイン産生性やケモカイン受容体の発現パターンの違いだけでは以上の現象を説明するに至っていない. 最近, このNKT細胞が免疫制御の中心的役割を果たしている樹状細胞 (dendritic cells: DCs) と相互作用することでDCの成熟を誘導し, 免疫応答性を制御することが明らかとなった. しかし, 機能的に異なるこれらのNKTサブセットがDCに付与する機能的修飾, およびこれに関

連する分子機構については明らかにされていない. これらの機序を解明することで, 自己免疫疾患の病因・病態の解明に貢献するとともに, 特定のNKTサブセットを用いて機能的修飾を付与したDC, あるいはサブセットに発現する特有の分子をターゲットとした自己免疫応答制御法の開発に資することができる.

本研究課題では, ヒトNKTサブセットとDCとの相互作用により, 異なるNKTサブセットがDCに付与する機能的修飾をDCの産生する液性因子, Th分化誘導性の観点から明らかにした. また, NKTサブセットとDCとの相互作用によって誘導される免疫寛容誘導活性を, 自己免疫疾患関連Th細胞クローンの応答性 (増殖応答性) を評価することで明らかにし, NKTサブセットとDCの相互作用を応用した自己免疫応答制御の可能性を*in vitro*で評価した.

材料と方法

ヒトV α 24インバリエントNKT細胞株の樹立と精製

健康人ボランティアの同意を得た上で採血を行い, 分離した末梢血単核球 (PBMC) よりCD14陽性単球を磁気分離した. これをIL-4 (100 U/ml), およびGM-CSF (50 ng/ml) 存在下, 5日間培養することでヒト単球由来DCを誘導した. 一方, PBMCよりTCRV α 24陽性細胞を磁気分離し, 抗原として α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) をパルスしたDCを抗原提示細胞 (APC) とし, 7-9日おきに複数回刺激することにより, α -GalCer特異的ヒトV α 24インバリエントNKT細胞株を樹立した. さらに, V α 24 $^{+}$ 6B11 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD8 β^{-} , およびV α 24 $^{+}$ 6B11 $^{+}$ CD4 $^{-}$ CD8 β^{-} の各サブセットを, 高速自動セルソーターを用いて精製した.

1) 埼玉医科大学免疫学教室, 2) 埼玉医科大学産婦人科学教室
3) 埼玉医科大学麻酔学教室

NKTサブセットがDCにおけるサイトカイン産生および表面分子の発現に及ぼす影響の評価

α -GalCerをパルスしたDCとNKTサブセットを共培養し、24時間後の上清中のIL-12p70, 48時間後のIL-12p40, およびIL-6をELISA法により定量した。一方、共培養開始24時間後のDCにおけるHLA-DR, CD40, CD80, CD83, およびCD86分子の発現を解析することでDCの成熟状態を評価した(フローサイトメトリー)。

NKTサブセットがDCを介してTh分化に及ぼす影響の評価

α -GalCerをパルスしたDCとNKTサブセットを共培養することでDCの成熟を誘導した。24時間培養後、これらのDCとHLA-DRの異なるアロナイーブTh細胞を共培養することによりMLRを誘導した。MLRにより誘導される増殖応答性は、 ^3H -thymidineの取り込みを測定することで評価した。一方、MLRによって増殖・分化したTh細胞のケモカイン受容体(CCR4, CXCR3), サイトカイン産生性(IFN- γ , IL-4, IL-5, およびIL-13)の発現を評価することでTh分化を決定した(ELISA法, フローサイトメトリー)。

DCのIL-12産生に重要なCD4サブセットの液性因子の決定

α -GalCerをパルスしたDCとNKTサブセットを共培養する際に、NKTサブセットが産生するサイトカイン(IFN- γ , IL-4, 10, 13)に対する中和抗体を用いて、これらに関連するシグナルを阻止した際のIL-12産生を指標に重要な候補の液性因子を決定した。

GAD65自己反応性Thクローンに対するDCの免疫寛容誘導活性の評価

HLA-DR53陽性ドナー由来のDCとNKTサブセットを共培養した。24時間培養後、このDCに65kDaグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65) p111-131ペプチドをパルスし、これと1型糖尿病患者より樹立されたHLA-DR53拘束性GAD65p111-131反応性Th細胞クローンを共培養した(J. Immunol. 170: 947-60. 2003.)。Th細胞クローンにおける増殖応答の抑制は、 ^3H -thymidine取り込みを測定することで評価した。また、Th細胞クローンをCFSEにてラベルしてDCと共培養4日後の分裂抑制の程度をフローサイトメトリーにより解析した。以上の結果からDCを介した自己反応性Th応答制御の有効性を評価した。

結果

NKT細胞株の樹立とNKTサブセットの精製分離

健康人末梢血単核球よりTCRV α 24陽性細胞を α -GalCer刺激することにより、V α 24インバリアントNKT細胞株を樹立した。さらにV α 24⁺6B11⁺CD4⁺CD8 β ⁻, およびV α 24⁺6B11⁺CD4⁻CD8 β ⁻の各サブセットを、高速自動セルソーターを用いて精製

した。それぞれのNKTサブセットは、TCRV α 24陽性、V β 11陽性(図1)であり、CD1d拘束性に α -GalCerを認識し、増殖応答を示すとともに多量のIFN- γ とIL-4を産生した(data not shown)。

CD4サブセットはDCのIL-6とIL-12産生を誘導する

CD4サブセットと共培養されたDCは、NKT:DC比および α -GalCer濃度依存性にIL-12p40, IL-12p70, およびIL-6を産生した(図2 a-c)。また健康人ドナー(5人)由来のCD4サブセットは、その活性化を通してDCにIL-6およびIL-12産生を誘導した(図2 d, e)。

NKTサブセットはDCの成熟を誘導する

CD4およびDNサブセットは、ともにその活性化を通してDCにおけるHLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86分子の発現上昇を誘導した(図3)。CD4とDNの間には差異は認められなかった。また、サブセットを蛋白合成阻害剤であるemetineで処理した場合には、 α -GalCer存在する場合だけにDCの成熟が誘導された(data not shown)。

NKTサブセットはDCを介して異なるTh分化を誘導する

CD4およびDNサブセットは、ともにその活性化を通してDCの成熟を誘導し、アロMLR誘導活性を上昇させた(図4 a)。CD4サブセットにより成熟したDCは、CCR4/CXCR3比Low, Th1/2サイトカイン比HighのTh1分化を誘導した。一方、DNサブセットにより成熟したDCは、CCR4/CXCR3比High, Th1/2サイトカイン比LowのTh2分化を誘導した(図4 b-d)。これらの効果は、emetineによって処理されたNKTサブセットを用いた場合では消失した。さらにDCと共培養したDN/CD4サブセットの比を人工的に変化させた場合では、DN/CD4比に依存してCCR4/CXCR3比が上昇し、IL-4陽性細胞数/IFN- γ 陽性細胞数の増加が認められた(図5 a, b)。同様の条件でDCにおけるIL-6およびIL-12産生を評価したところ、DN/CD4比が増加するに従って、これらのサイトカイン産生は減少した(図5 e)。サブセット間の細胞傷害性の違いは認められなかった(図5 c, d)。

NKTサブセットはともにCD40Lを発現するがDCの異なるIL-12産生性を誘導する

CD40L分子は活性化T細胞に発現し、DC上のCD40分子をligationすることでDCにおけるIL-12産生を誘導することが知られている。NKTサブセットを図6 aに示す条件で刺激した場合のCD40L分子の発現は、サブセット間で差異を認めなかった。CD4サブセットと α -GalCer-DCの共培養系では、CD40L阻害抗体により、DCにおけるIL-12産生阻害が観察された(図6 b)。一方、抗CD3抗体刺激のDNサブセットとDCの共培養系では、DCにおけるIL-12産生が誘導される為(図6 c)、これにCD40L阻害抗体を加えて評価したところIL-12産生の抑制が認められ、DNサブセッ

トのCD40L分子は機能的に完全であることが明らかとなった(図6d). また, この条件にさらに α -GalCerを加えて評価したところ, CD4サブセットは α -GalCer濃度依存性にDCのIL-12産生を促進し, DNサブセットはこれを抑制した(図6e).

CD4サブセット由来のTh2サイトカインはDCにおけるIL-12産生に相互依存的に作用する

CD4サブセットは, IL-4, IL-13等のTh2サイトカインを大量に産生することが知られている. NKTサブセットの産生するIFN- γ , IL-4, IL-13はDCにおけるIL-12産生を促進し, さらにこれらのNKTサイトカインの相互作用により, さらに促進された(図7a-e). また, CD4サブセット由来のIL-10は抑制的に作用した(図7c).

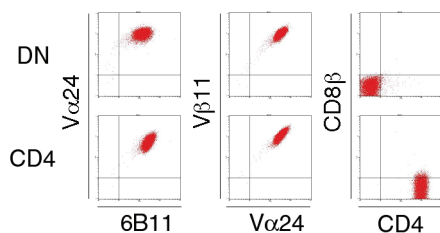


図 1. NKTサブセットの樹立.

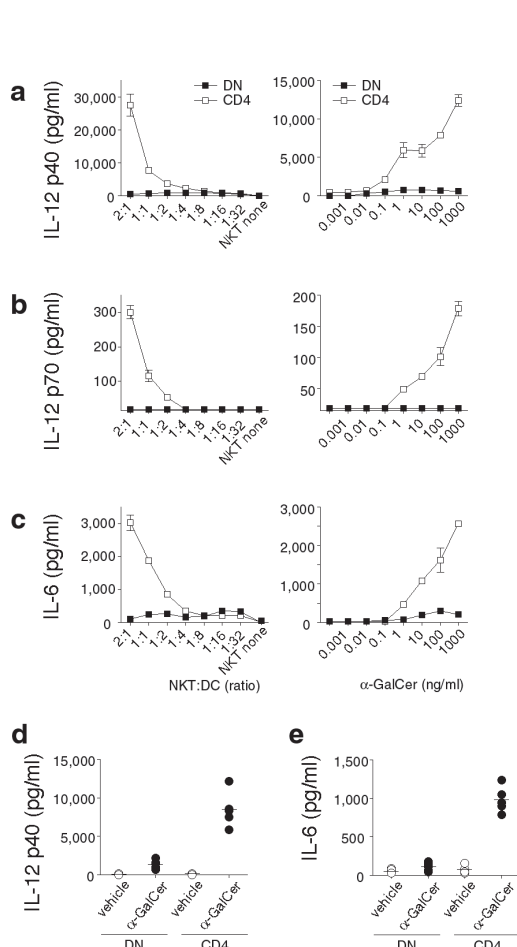


図 2. NKTサブセット-DC 共培養系におけるDCのサイトカイン産生.

以上よりCD4サブセットの産生するTh2サイトカインはDCにおけるIL-12p70産生を促進することが明らかとなった.

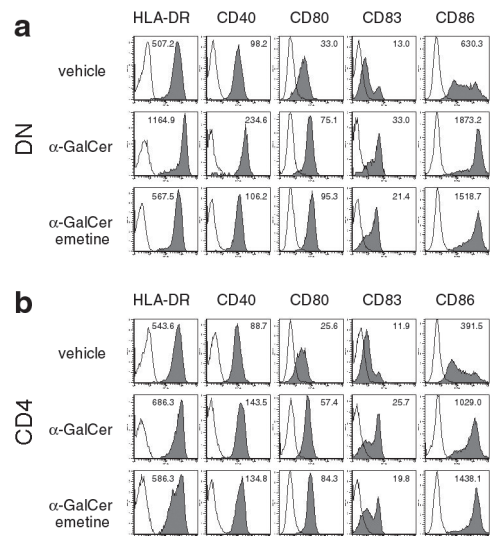


図 3. NKTサブセットと-DC 共培養系におけるDCの成熟状態.

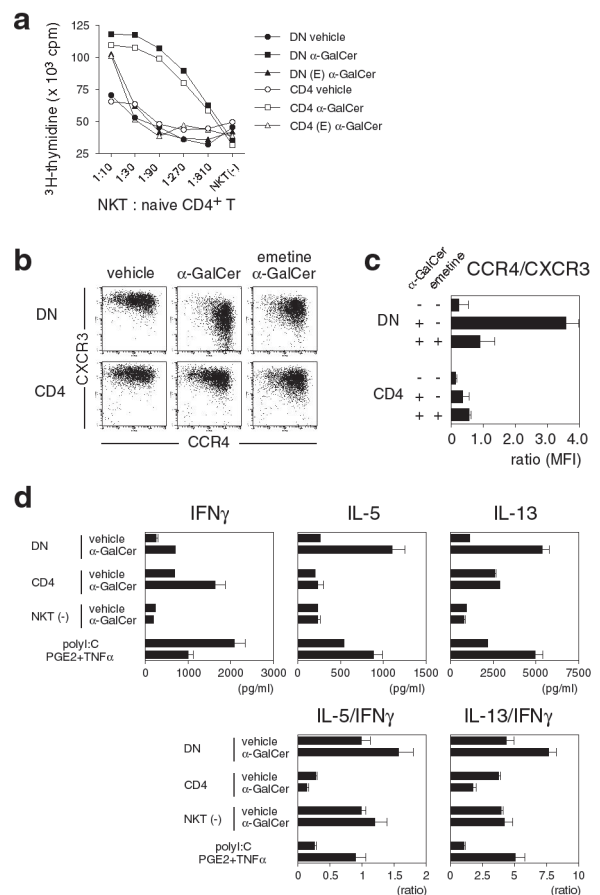


図 4. アロMLR誘導活性とTh分化誘導性. a. アロMLR誘導活性の評価. b-c. 分化Th細胞におけるケモカイン受容体(CXCR3, CCR4)発現. d. 分化Th細胞におけるサイトカイン産生(CD3/28刺激24h).

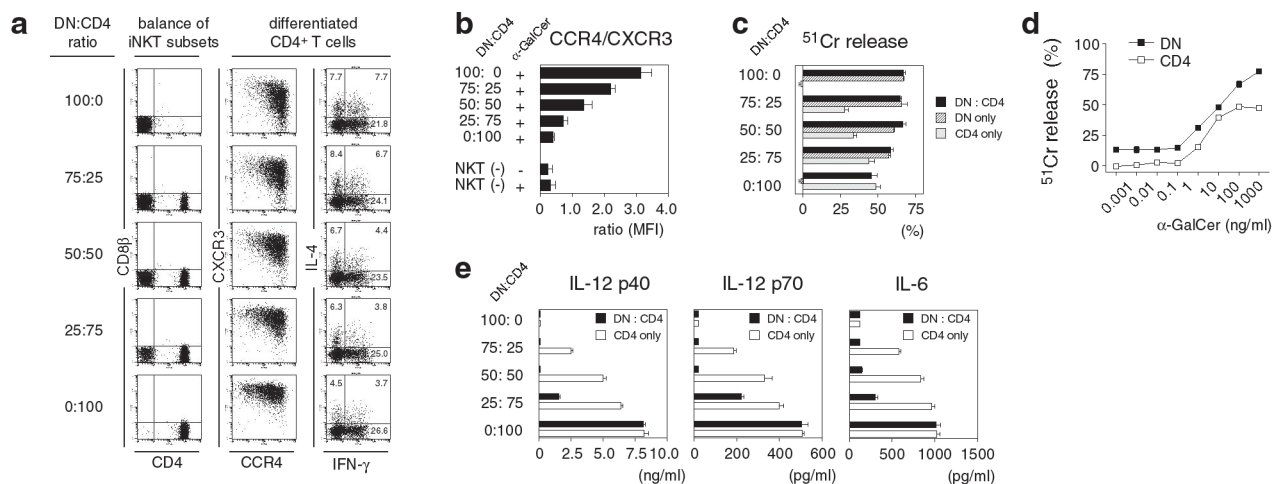


図 5. NKTサブセットのバランスがDCを介してTh分化に及ぼす影響の解析. a-b. NKTサブセットのバランスと分化Th細胞におけるCXCR3, CCR4, 細胞内IL-4, 細胞内IFN- γ . c, d. DCに対する細胞傷害性 (^{51}Cr release assay). e. DCにおけるIL-12, IL-6産生.

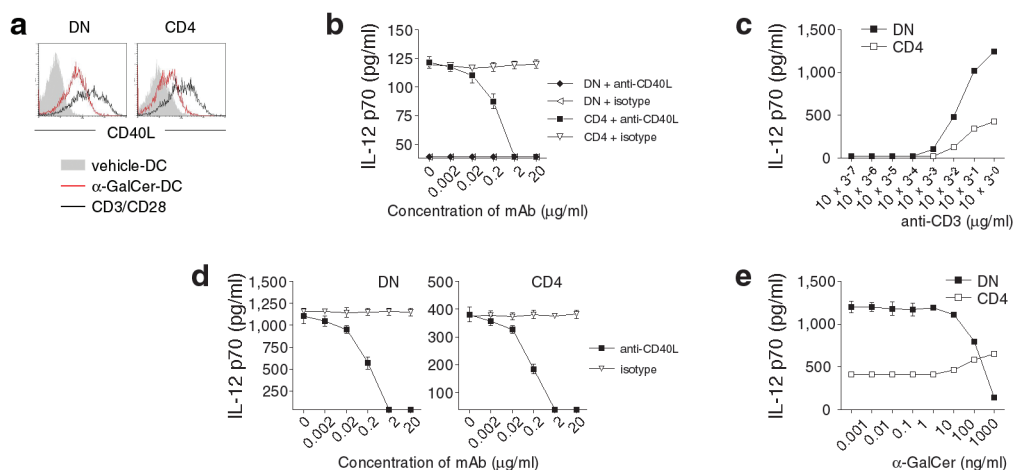


図 6. NKTサブセットのCD40L機能. a. 各サブセットにおけるCD40L分子の発現. b. NKT-DC共培養系にCD40L阻害抗体を添加した際のDCにおけるIL-12p70産生. c. CD3刺激したNKTサブセットとDCを共培養した際のDCにおけるIL-12p70産生. d. c.にCD40L阻害抗体を添加した際のDCにおけるIL-12p70産生. e. c.に α -GalCerを添加した際のDCにおけるIL-12p70産生.

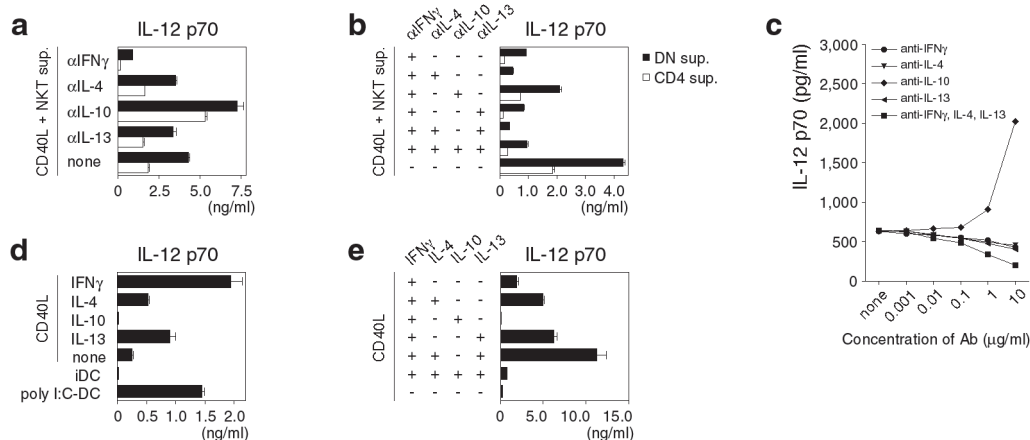


図 7. NKTサブセットの液性因子がDCのIL-12p70産生に及ぼす影響の評価. a. CD40L発現L細胞株とDCの共培養系に、CD3刺激したNKTサブセットの24時間後の培養上清を添加し、さらに各サイトカインに対する中和抗体を加えた際のDCにおけるIL-12p70産生. b. CD40L発現L細胞株とDCの共培養系に、各サイトカインを加えた際のDCにおけるIL-12p70産生. c. DCとCD4サブセットの共培養系に各サイトカインに対する中和抗体を加えた際のDCにおけるIL-12p70産生.

NKTサブセットはDCを介して自己反応性Th細胞の応答を抑制する

α -GalCerにより活性化を受けたDNおよびCD4サブセットと共培養したDCは、各doseのGAD65ペプチドに対して、T細胞クローンSA32.5およびMK20.2の増殖応答を抑制した(図8a). これらのクローンの増殖抑制は分裂が抑制されることに起因することが明らかとなった(図8b,c). 以上の観察は、DNおよびCD4サブセットが、その活性化を通してDCの寛容性分化を誘導することにより、自己反応性Th細胞の分裂・増殖を抑制することを示唆するものである。

考 察

最近、NKT細胞が認識する自己糖脂質抗原および微生物由来の糖脂質抗原が同定され、NKT細胞の有する生物活性が明らかになりつつある(Science 306: 1786-89, 2004. Nature 434: 520-5. 2005. Nature 434: 525-9. 2005.). これまでの研究の多くは、糖脂質抗原のアナログを用いることにより、NKT細胞の産生するサイトカインバランスを制御する方法に主眼が置かれてきた(Nature 413: 531-34. 2001. Arthritis Rheum. 50: 305. 2004.). これに対して本研究は、NKT細胞の応答性を制御するのではなく、機能的に異なるNKTサブセットを精製分離し、これをアジュバントとして応用することで免疫制御の中心的役割を果たすDCの機能を修飾し、これを免疫応答制御に応用しようとするものである。

本研究により、DNサブセットの活性化を通して成

熟したDCが、ナイーブTh細胞のTh2分化を優位に誘導し、CD4サブセットの活性化を通して成熟したDCは、IL-12p70を産生することでTh1分化を誘導することを明らかにした(日本免疫学会2005, 口頭発表). しかし、DCに対してIL-12産生を誘導するCD40L (CD154) 分子の発現レベルは、NKTサブセット間で差異が認められないことから、CD40L以外の何らかの分子がIL-12産生に大きく貢献していることが予想される。

我々は以前の研究で、APC上のHLA-DRを抗体でクロスリンクすると、APCからのIL-12産生が促進されることを見出ししている(J. Immunol. 166: 2202-8. 2001.). CD1d分子はDCの細胞表面でHLAクラスII分子と近接して存在する為(EMBO J. 21: 1650-60, 2002.), CD1d拘束性に活性化されたCD4サブセットのCD4分子がオリゴマー形成することで、DCのHLAクラスII分子と安定な結合をし、これをクロスリンクする(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6444-8. 1995. Immunol. Today 19: 455-61. 1998. Nat. Immunol. 3: 727-32. 2002.). これに伴ってDCにおけるHLAクラスII依存性のシグナルが積極的に誘導されることでIL-12産生が促進される。一方、CD4分子をもたないDNサブセットは、同様のシグナルが活性化しない為、IL-12産生が誘導されないことが予想される。すでにこの仮説の検証がスタートしているが、本研究によりCD4分子のオリゴマー形成がDCにおけるIL-12産生に重要な役割を果たすことが明らかになれば、CD4オリゴマー形成を抑制あるいは促進する為の新薬開発などの発展性を秘めている。

我々が解析に用いたDCは末梢血より分離した単

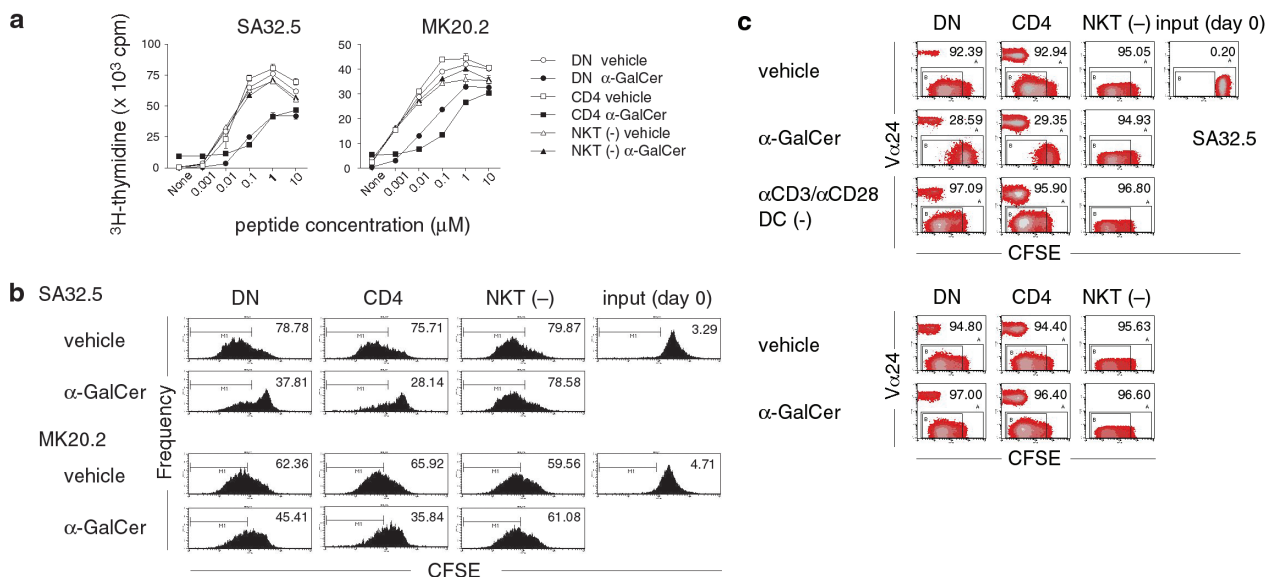


図8. NKTサブセットがDCを介して自己反応性Th応答に及ぼす影響の評価。a. DNおよびCD4サブセットと共培養したDCをAPCとし、これに1型糖尿病の自己抗原として知られるGAD65ペプチドを添加し、これと共培養したGAD65自己反応性T細胞クローンの増殖応答性。これらのクローンは、異なる1型糖尿病患者より樹立され、HLA-DR53拘束性にGAD65ペプチドを認識する。b. CFSEでこれらのThクローンを標識して4日後の分裂の程度を示す。

球から *in vitro* で誘導することが可能であり, 自己の NKT サブセットと DC を生体外で作用させ, 機能的修飾を付与した DC を生体内に移入することで, リスクのない免疫制御効果が期待できる. したがってヒトを対象とした実用性の高い免疫制御療法の可能性を秘め

ている. 本研究の成果は, 自己免疫疾患のみではなく, アレルギー性疾患, 感染症, 癌, あるいは移植医療における拒絶反応の制御など, 多方面への応用が期待される.

報告書

平成17年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

悪性リンパ腫における新規予後因子nm23の発現動態の検討

受賞者 新津 望(埼玉医科大学血液内科)

1. はじめに

nm23 遺伝子は、癌の転移に関係する遺伝子変化を見いだす中で differential hybridization 法を用いて1988年 Steegらによって発見された¹⁾。マウスメラノーマ細胞株において、低転移性株で発現が高く、高転移性株において逆にその発現が低下している遺伝子として単離され、最初のがん移抑制遺伝子として報告された。その後この遺伝子産物は nucleoside diphosphate kinase (NDPK) 活性を有し、増殖促進、分化抑制、転写調節、*c-myc* 転写活性 (PuF)、ショウジョウバエの形態形成 (*awd* 遺伝子)、接着分子、G 蛋白調節および微小管機能調節などの機能があることが判明した(図1)。埼玉がんセンターの角ら²⁾は、マウスの分化抵抗性骨髄性白血病細胞 (M1 細胞) の培養上清中から分化誘導抑制因子 (inhibitory factor; I-factor) を検出し、M1 細胞の分化能を制御する重要な因子として精製し、それが nm23 蛋白と同一のものであることを見出した。nm23 の主な生化学的機能は NDPK 活性であり、NDPK は生理的条件下では ATP を磷酸基供与体としてリボおよびデオキシリボ体 NDP から対応する NTP を生成し、それらは核酸の構成要素として、多糖類/磷脂質の前駆体の活性化因子として、さらに蛋白合成、微小管合成やシグナル伝達系における調節因子として広汎な生体反応に利用される。また、nm23 遺伝子は高等動物細胞のみならず原核細胞に至るまで広く生物界に分布しているハウスキーピング遺伝子であり、現在までにヒトでは8つの nm23 アイソフォーム (nm23-H1, nm23-H2, DR-nm23, nm23-H4, nm23-H5, nm23-H6, nm23-H7 および nm23-H8) が報告されている。しかし未だ nm23-H1, -H2 以外の遺伝子産物は本来の機能は明らかになっていない。nm23-H1 と nm23-H2 は第17染色体 (17q21) に位置し、88% の相同性を有する。これら2つのアイソフォームは5つのエクソンと4つのイントロンによって構成され、それぞれが同一染色体上でタンデムに配列している。近年、いろいろな癌に

おいて免疫組織染色による nm23 の発現と予後との検討が行われている。悪性黒色腫、乳癌、胃癌などでは、nm23 の発現と患者の生存率との間に有意な逆相関を認めたが、一方神経芽細胞腫、大腸癌、膵癌では病期進行とともにむしろ発現が増強し予後不良となることが報告されている。我々は、血清 nm23-H1 の ELISA 法による測定系を作成し³⁻⁵⁾、非ホジキンリンパ腫 (NHL) および急性骨髄性白血病の予後因子となることを見いだした。今回は、血清、細胞表面、細胞質内 nm23-H1 と NHL との関係を検討し、予後との関係、および細胞内局在などを中心に検討した。

2. 血清 nm23-H1 と予後との関係

血清 nm23-H1 は、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、末梢 T 細胞性リンパ腫 (PTCL) および成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATLL) で正常対照 (3.89 ± 4.06 ng/mL) より有意に高値を示した。DLBCL および PTCL について生存率、progression-free survival (PFS) を検討したが、nm23-H1 が 80 ng/mL 以上の症例で 80 ng/mL 未満の症例に比し、有意に予後不良であった。また、現在非ホジキンリンパ腫の予後予測因子として広く使われている国際予後因子 (IPI) の4つのリスク群に分け検討したが、生存率、PFS 共にすべてのリスク

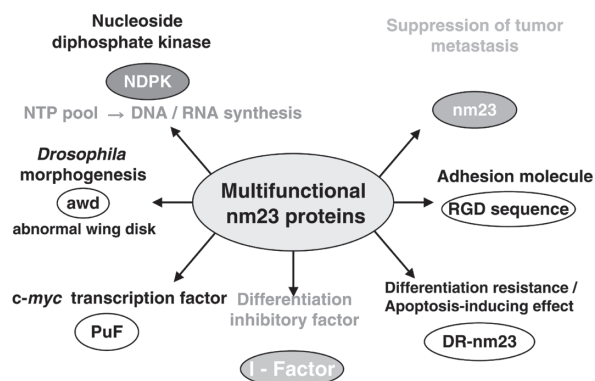


図1. nm23 遺伝子の多彩な機能。

群でnm23-H1 高値群は予後不良であった(図2). このように血清 nm23-H1が, 非ホジキンリンパ腫において新しい優れた予後不良因子となることを報告してきた³⁻⁵⁾. 血清 nm23-H1の長所としては, 1) nm23-H1は比較的安定な蛋白であるため, その血清レベルを容易に測定できる, 2) 少量の血清で短時間に測定可能であるため, 治療開始前に結果を得ることが出来る, 一方短所としては, 1) 溶血検体では測定値が高くなる可能性がある, 2) H1以外のnm23の予後因子としての関与は今のところ不明である, などが挙げられる.

3. 細胞表面 nm23-H1

nm23の大部分は細胞質に存在し, 少数が細胞核, ミトコンドリア, 細胞膜にも結合している. 血清 nm23-H1はリンパ腫細胞が直接産生しているかどうかは不明であるが, リンパ腫の予後を反映している事より病態に関与していると考えられる. そのため, 次にリンパ腫細胞表面のnm23-H1蛋白の臨床的意義を検討するためにフローサイトメトリー法により測定し, 血清中 nm23-H1との関係, 予後などについて検討した⁶⁾. 108例中28例(25.9%)に20%以上の細胞表面 nm23-H1 蛋白の発現を認め, 特にPTCL($26.9 \pm 21.02\%$; $p < 0.01$), extranodal NK/T cell lymphoma($46.04 \pm 37.77\%$; $p < 0.001$)で高い発現を認めた(表1). 細胞表面 nm23-H1 発現と血清 nm23-H1との間に有意な相関を認めた($r = 0.531$, $p < 0.0001$)⁶⁾が, 細胞表面 nm23-H1と血清 LDH, 血清 sIL-2Rの間には相関を認めなかった. また, 細胞表面 nm23-H1 発現レベルが高い症例では低い症例に比し生存率, PFSが有意に低率であった. 次に細胞表面 nm23-H1と血清 nm23-H1の組み合わせによる生存率を検討した. 細胞表面と血清 nm23-H1 共に低値 (Group A: $n = 64$), 細胞表面あるいは血清 nm23-H1のどちらかが高値 (Group B: $n = 11$), 細胞表面と血清 nm23-H1 共に高値 (Group

C: $n = 6$)の3群に分けて検討した. Group A, B, およびCの生存率はそれぞれ78.6, 49.7, 0%であり, Group Cが有意に予後不良であった($p = 0.0001$). 以上より, 細胞表面 nm23-H1も血清 nm23-H1 同様 NHLの治療戦略を考える上で, 有用な予後因子となりうる可能性が示唆された. しかし, nm23 蛋白が細胞表面に発現する分子学的機序は未だ不明である. nm23にはインテグリンファミリーが認識するRGDシーケンスが認められており, nm23は接着リガンドとしての機能とともにサイトカイン様に分泌されて機能する可能性が示唆されている. また, 血清と細胞表面 nm23-H1が相関していることより, 一部は細胞表面のnm23-H1が血清に認められている可能性が示唆された. また, 細胞表面に発現しているnm23-H1が, 全長なのか一部分なのか, またもし部分的ならどの部分が残っているのかが大変興味深く, 今後の検討の余地があると考えられる. また, 臨床的所見と細胞表面 nm23-H1との検討では, 血清中 nm23-H1の結果と同様に病期と相関していることにより, 細胞表面 nm23-H1もリンパ腫の進展に関与している可能性が示唆された. また, 完全寛解となった症例では低発現であり, 治療の反応性にも関与していると考えられた.

4. 免疫組織染色による細胞質内nm23-H1 発現の検討

上記のように血清および細胞表面 nm23-H1がNHLの予後因子となることが示唆されたが, 未だ悪性リンパ腫における血中nm23-H1蛋白の機能については不明な点が多い. そのため, 悪性リンパ腫細胞におけるnm23-H1蛋白発現とその細胞内局在を明らかにし, 悪性リンパ腫におけるnm23-H1の機能を解析する必要がある. 最近その機能解析の一貫として, PTCL例の病理組織標本を使いnm23-H1の免疫組織化学的検索を行い^{7, 8)}, 予後および血清 nm23との関係を検討したため, 以下にその概略を述べる. 反

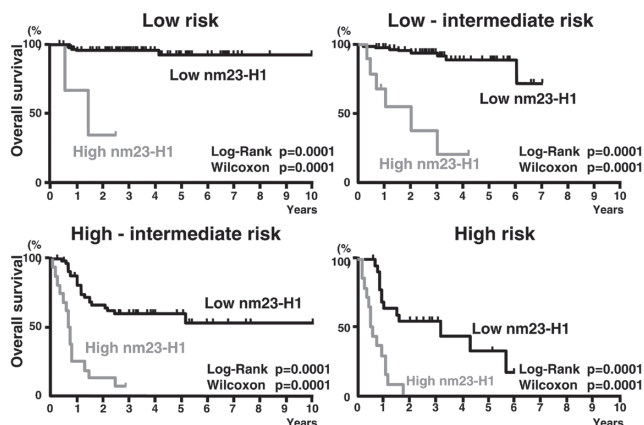


図2. びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫における国際予後分類別の血清 nm23-H1の生存曲線.

表1. 非Hodgkinリンパ腫における細胞表面 nm23-H1の検討

	No. of patients	Surface nm23-H1 (Mean±SD) %
B-cell neoplasms		
B-cell chronic lymphocytic leukemia	3	9.03 ± 7.70
MALT-type lymphoma	3	3.73 ± 1.87
Mantle-cell lymphoma	5	14.80 ± 5.56
Follicular lymphoma	13	4.79 ± 2.16
Diffuse large B-cell lymphoma	55	15.81 ± 11.96
T- / NK-cell neoplasms		
Peripheral T-cell lymphoma	18	26.90 ± 21.02 *
Anaplastic large-cell lymphoma	2	8.25 ± 0.50
Extranodal NK- / T-cell lymphoma	6	46.4 ± 37.77 ***
Adult T-cell lymphoma / leukemia	3	20.77 ± 15.46
Reactive hyperplasia	7	2.96 ± 1.14

* : $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

応性リンパ節組織におけるnm23-H1発現は、リンパ濾胞の胚中心領域および拡大した濾胞間領域に着色がみられる。胚中心の中心芽細胞、濾胞間領域の大型リンパ球、および髄索の形質細胞にnm23-H1発現がみられ、マントル領域の細胞は陰性であった。次に、T細胞性およびNK細胞性リンパ腫における細胞質内nm23-H1発現を検討した。対象は成人リンパ腫治療研究会に1997年から2002年までの間に連続的に登録された未治療NHL381例で、そのうちT/NK細胞性137例である。男性97例、女子40例、年齢中央値60歳であった。nm23-H1の発現は、免疫組織化学染色により検討した。その結果、137例中55例(36.5%)に陽性であり、病理組織型別の検討ではPTCL-非特定(PTCL-U)38.3%、未分化大細胞リンパ腫(ALCL)50%、血管免疫芽球性T細胞性リンパ腫(AILD)31.8%、NK細胞リンパ腫57.1%、ATLL31.8%に陽性であった。T細胞性リンパ芽球性リンパ腫および皮膚T細胞性リンパ腫では、nm23-H1は全例陰性であった。これからの解析は、PTCL-U,ALCL,AILDの81例(以下PTCLとする)について検討した。年齢、PS、血清LDH値、病期およびIPIと、nm23-H1発現との間に相関を認めなかったが、bulky massを有する症例($p=0.046$)およびB症状を有する症例($p=0.039$)で、有意にnm23-H1発現が高率であった。また、81例中66例(81.5%)が完全寛解(CR)となったが、CRとなった症例のnm23-H1陽性率は33.4%、CRとならなかった症例の陽性率は60%であり、CRとならなかった症例で有意にnm23-H1陽性率が有意に高率であった($p=0.028$)。図3Aに示すように、細胞質内nm23-H1が陽性であった症例の4年生存率は21.9%、陰性であった症例のそれは83.9%と細胞質内nm23-H1が陽性であった症例は、有意に予後不良であった。また無病生存率(DFS)に関する検討では、nm23-H1陽性例の2年DFSは9.6%、陰性例は70%と有意に陽性例の方が予後不良であった(図3B)。次にnm23-H1と細胞障害性蛋白であるTIA-1を組み合わせ検討した。生存率は、nm23-H1+/TIA-1+13.8%、nm23+/TIA-1-50%、nm23-/TIA-1+64.1%、nm23-/TIA-1-100%と両者が陽性の群が、どちらか一方が陽性の群より有意に予後不良であった(図4A)。

DFSも同様にnm23-H1とTIA-1の両者が陽性の群が、どちらか一方が陽性の群より有意に予後不良であった(図4B)。そのため、この2つのマーカーを組み合わせ予後を判定することは、治療戦略を考える上でも有用と考えられた。また、単変量解析では、年齢、PS、病期、IPI、TIA-1、細胞質内nm23-H1が有意な予後因子となり、それらの因子による多変量解析では細胞質内nm23-H1が有意な独立した予後因子となった。

5. 非ホジキンリンパ腫の層別化治療に対するnm23-H1の有用性の検討

今までは初発例を対象に予後因子の検討を行ってきた。本年度は、65歳から79歳までの再発性、難治性び慢性大細胞型B細胞リンパ腫に対して、リツキシマブ併用化学療法を行ない、治療前後で血清nm23-H1値を測定した⁹⁾。治療前血清nm23-H1が高値であった症例で、有意に予後不良であった。また、治療前の血清nm23-H1は、 39.4 ± 41.3 ng/mlと増加していたが、CR例では全例感度以下となった。このため、血清nm23-H1はリツキシマブ併用化学療法に関しても予後因子となる可能性が示唆された。また、CRとなった症例はすみやかに血清nm23-H1値が低下し、CRとならなかった症例では低下を認めなかった。また、再発の予知にも使用できると考えられた。

おわりに

非ホジキンリンパ腫の治療方法は、病理組織型により細分化されてきている。また、同じ組織型の中でも「不均一」な病態を予後が異なることがわかってきた。そのため、予後因子別に治療戦略を決定する必要がある。今回の検討で、血清、細胞表面nm23-H1に加えて、細胞質内nm23-H1もNHLに対する有意な予後因子であることが判明した。免疫染色によるnm23-H1蛋白の検討は比較的簡便に短時間で行うことが出来、またリンパ節のなま検体がなくとも検討できるため、リンパ腫の診断を行うと同時に全症例で検索が可能である。そのため、血清保存やリンパ組織の再生検なども必要がない。しかし、陽性・陰性という定性的な判定

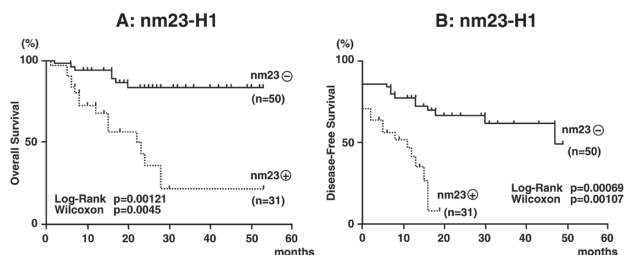


図3. 末梢T細胞性リンパ腫における細胞質内nm23-H1と予後との関係。

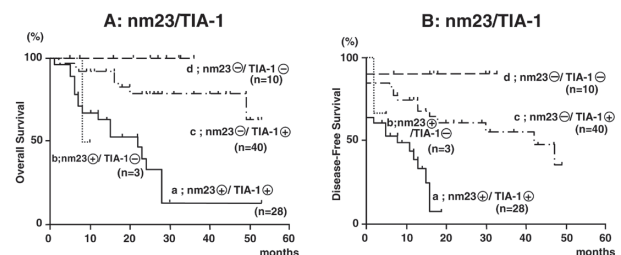


図4. 末梢T細胞性リンパ腫における細胞質内nm23-H1とTIA-1と予後との関係。

しか行えなく、経過を観察することは難しい。よって、血清の採取可能な症例は血清 nm23-H1 を測定し、今後は細胞表面および細胞質内 nm23-H1 を組み合わせることにより、より有用な予後因子を検討すると共に、nm23-H1 のリンパ腫細胞における局在、機能などを検討し、nm23 過剰発現を標的とした新しい治療方法の開発への発展が期待される。

文 献

- 1) Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:200.
- 2) Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, et al. Purification of a factor inhibiting differentiation from conditioned medium of nondifferentiating mouse myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 1988;263:10994.
- 3) Niitsu N, Okabe-Kado J, Nakayama M, et al. Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein and their clinical implications in acute myelogenous leukemia *Blood* 2000;96:1080-6.
- 4) Niitsu N, Okamoto M, Okabe-Kado J, et al. Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor for indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2001;15:832-9.
- 5) Niitsu N, Okabe-Kado J, Okamoto M, et al. Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor in aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001;97:1202-10.
- 6) Niitsu N, Honma Y, Iijima K, et al. Clinical significance of nm23-H1 proteins expressed on cell surface in non-Hodgkin's lymphoma *Leukemia* 2003;17:196-202.
- 7) Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, et al. Expression of nm23-H1 is associated with poor prognosis in peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003;123:621-30.
- 8) Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, et al. Clinical Significance of Intracytoplasmic nm23-H1 Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:2482-90.
- 9) Niitsu N, Kohuri M, Higashihara M, Bessho M. Phase II study of the CPT-11, mitoxantrone and dexamethasone regimen in combination with rituximab in elderly patients with relapsed DLBCL. *Cancer Society* 2006;97:933-7.

報告書

平成17年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

アディポネクチン受容体を介する
アディポネクチンシグナル伝達機構の解明

受賞者 犬飼 浩一 (埼玉医科大学 内科学・内分泌・糖尿病部門)

緒言

脂肪組織は、発現遺伝子の約25%がホルモン、増殖因子などの分泌蛋白であり、このような脂肪組織由来の内分泌因子はアディポサイトカインと呼ばれ、肥満とメタボリックシンドロームを結びつける概念として既に確立された。その中で、アディポネクチンは、脂肪組織において最も多く発現している遺伝子産物として同定された。ほぼすべてのアディポサイトカインが肥満によってその血中濃度が上昇するが、アディポネクチンは肥満、糖尿病、動脈硬化疾患によって低下するという際立った異なる性質を持ち、抗糖尿病、抗動脈硬化作用を持つサイトカインとして注目を集めている。3年前、このアディポネクチン受容体が山内らのグループによって新たにクローニングされ、これによって細胞内情報伝達経路や生理学的役割の解明に大きく前進し、糖尿病や動脈硬化の治療面へ大きな期待が寄せられている。我々は、すでに、このアディポネクチン受容体 (AdipoR1, AdipoR2) の発現調節機構を検討するため、糖尿病モデルマウスや、培養筋肉細胞、脂肪細胞を用いて検討し、インスリンによって負の制御を、アディポネクチンによって正の制御を受けていることを解明した(原著論文1)。

目的

アディポネクチンのシグナル伝達機構は、アディポネクチン受容体がクローニングされたものの、まだ、それ以下のシグナルは全く不明である。現在までのところ、アディポネクチンの標的遺伝子として、AMPキナーゼの活性化、PPAR α の活性化、転写因子NF κ Bの転写抑制などの機能が知られているが、そこに至る経路は全く解明されていない。我々は、本研究において、アディポネクチン受容体直下のシグナル伝達経路の解明を目的とし、以下の2つの手法を用いて実験を行った。1) PMF法 (Peptide-Mass Finger print) を用い

て、アディポネクチンシグナル下流の遺伝子の増減を検討する。2) AMPKの上流に位置し、AMPKをリン酸化する働きのあるLKB1にアディポネクチンがどのような作用を及ぼすか検討する。

方法

1) アディポネクチン受容体 (AdipoR1, AdipoR2) の全長cDNAのクローニング：既に発表されたアディポネクチン受容体の塩基配列をもとに、PCR用5'端と3'端オリゴプライマーを作成し、購入されたmouse embryo cDNAライブラリーより全長アディポネクチン受容体を増幅し、TAクローニングベクターに挿入、DNA sequencerにより、遺伝子配列を確認する。アディポネクチン受容体は、筋肉などのインスリン感受性組織のほか、ubiquitousに存在するAdipoR1と、主に肝臓に発現が見られるAdipoR2の2種類のサブタイプが存在することが知られているが、これらの機能面での相違を明らかにする目的にて、2種類の受容体をクローニングする。2) アディポネクチン受容体発現ウイルスの作成：宝バイオ販売のアデノウイルス作成キット (Code6170) を用いて、アディポネクチン受容体発現ウイルスを作成する。概要としては、pAxCawtitコスミドベクターSwaIサイトにそれぞれのcDNAを挿入し、ヒト尿管細胞由来293細胞を宿主として細胞内における遺伝子相同組み替えにより、CAGプロモーター直下にそれぞれのcDNAを配置したアディポネクチン受容体発現ウイルスを作成する。3) PMF法を用いたアディポネクチン受容体特異的シグナルの解明：作成したアデノウイルスをマウス筋肉初代培養細胞に発現させ、購入した精製アディポネクチンを投与し、アディポネクチン受容体の発現の有無、アディポネクチン添加の有無によって、4種類の2次元電気泳動シートを作成する。アディポネクチン受容体特異的なシグナルによるとと思われるアディポネクチン受容体 (+)、アディポネクチン添加 (+) によってのみ増

幅される特異的遺伝子の同定を試みる。

結 果

1) PMF法を用いて、アディポネクチンシグナル下流の遺伝子の増減を検討したところ、マウス骨格筋において、アディポネクチン添加により約9倍のFerritin Heavy Chain (FHC) 蛋白発現上昇を認め、この上昇は、NF κ Bの阻害薬にて消失すること、並びに、FHC遺伝子の転写はNF κ Bの転写刺激を受けていることから、アディポネクチンは、アディポネクチン受容体を通して、NF κ Bの転写を刺激し、最終的にFHC蛋白量を増幅させる働きがあることが明らかとなった。これにより、アディポネクチンによる骨格筋に対するシグナルは、最終的に酸化ストレス軽減の作用をもたらすことがわかり、現在、池上裕一大学院生が中心となって、詳細につき、さらなる検討をしている。2) まずAMPKの上流に位置し、AMPKをリン酸化する働きのあるLKB1が、アディポネクチンシグナルによって活性化されることを見出した。さらに、LKB1の変異抑制型蛋白を過剰発現させた状況化において、アディポネクチンを作用させると、アディポネクチンによるAMPK活性化が消失することから、アディポネクチンからAMPKに至る過程において、LKB1の活性化が必須であることを今井健太大学院生が証明した(原著論文2)。

結果と考察

アディポネクチンのシグナルは現在までのところ、全く解明されておらず、アディポネクチンの持つ抗動脈硬化作用や抗糖尿病作用のメカニズムについてはほとんどわかっていない。われわれは、2つの実験を

通じて、比較的アディポネクチンシグナルの上流すなわち、AMPKの上流域にLKB1という分子の活性化を介すということ、さらに下流域においては、NF κ Bのリン酸化を介してFHC蛋白量を増幅させる働きがあることが明らかとなった。特にFHCは抗酸化作用を強力に有し、抗動脈硬化作用の中心的な役割を果たしている可能性も強く、現在、さらに詳細な検討を行っている。

その他の共同研究

東北大学研究チームとの共同研究にて、マウスにPPAR γ のアデノウイルスを経静脈的に投与して肝臓に発現させると脂肪肝を引き起こすことがわかり、さらに、そのシグナルが精巣上脂肪組織に、内臓神経を介して情報が伝達され、脂肪肝を起こしにくくしていることがわかった(原著論文3)。

研究発表リスト

- 1) Inukai K, Nakashima Y, Watanabe M, Takata N, Sawa T, Kurihara S, Awata T, Katayama S, Regulation of adiponectin receptor gene expression in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E876-882, 2005.
- 2) Imai K, Inukai K, et al. LKB1, an Upstream AMPK Kinase, Regulates Glucose and Lipid Metabolism in Cultured Liver and Muscle cells. *BBRC* in press.
- 3) Uno K, Katagiri H, Inukai K, et al. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312(5780), 1656-1659, 2006.