

59 (Suppl. 1) : 129]

- 11) Fukuda N. Nonlinear properties of cardiac sarcomeres: novel insights into the physiology of the heart. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 25]
- 12) Hongo K, Morimoto S, O-Uchi J, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Morimoto S (Kyushu University), Ohtsuki I, Takeda N, Kurihara S. Renin-angiotensin system plays an important role in the pathogenesis of DCM in mouse. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 24]
- 13) Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. Endothelin-1 potentiates L-type Ca current by activating CaMKII in rat ventricular myocytes. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 126]

## 生 化 学 講 座

教授：大川 清	がんの生化学，病態医化学
准教授：高田 耕司	分子細胞生物学，病態生化学
准教授：朝倉 正	がんの生化学，病態医化学

### 教育・研究概要

#### I. がんの生化学

1. 厚生労働科科学研究の一環として癌表面転移・浸潤マーカー抗原 CD147 の生物学，治療学的研究がなされた。CD147 は EMMPRIN とはいわれ早期より転移・浸潤を示す癌の表面マーカー糖蛋白質であり産婦人科山田恭輔，生化学大川 清，国立病院機構千葉東病院臨床センター城 謙輔により樹立されたマウス単クローン抗体 (MAb12C3) 産生 hybridoma 認識抗原である (Am J Clin Pathol, 1995; 103; 288-94)。その後，本抗原の主機能が転移・浸潤における matrix metalloprotease (MMP) の inducer としての機能であり特に MMP2 に対しては強い誘導能を示すことを報告している。我々は CD147 を癌標的分子とし，新規開発高安全性の CD147 高親和性物質標識超音波造影剤 (マイクロ・ナノバブル以下バブルと略) を集積させ，臨床で汎用の超音波診断法で高悪性度微小癌を超早期に画像化診断し，同時に抗癌剤等包含標識バブルを微小癌に集積，収束超音波利用で加療する技術の動物実験モデルを作製中である。本研究でのマイクロ・ナノバブルの生体内動態は NEDO 研究で開発した蛍光イメージングをモニターとして利用している。

同時に進められた分子の性格付けの研究から CD147 分子は 2 つのイムノグロブリンドメインを有する 1 回膜貫通型の糖蛋白質で多種類の細胞に少量発現するが，癌細胞表面に特に高発現していることが判明，これを利用した癌細胞膜表面高発現 CD147 分子を標的とした癌化学療法の有効性を検討し，CD147 イムノリポソーム封入 GSH-DXR が強い標的抗腫瘍効果を示すことが判明した。また CD147 の発現抑制 [CD147 ノックダウン (KD)] 細胞を用いた抗癌活性物質効果のスクリーニングから細胞内物質移入への CD147 の役割が示唆され，抗癌性物質として注目されている 3-プロモビルビン酸 (3-BrPA) が嫌氣的代謝の亢進した癌細胞に対してのみ選択的殺細胞効果を発揮する機構の解析へと発展し 3-BrPA が CD147-MCT1 モノカルボン酸トランスポーター複合体を介して前立腺癌細胞株

PC3に取り込まれ、殺細胞効果を発揮することを明らかにしてきた。さらに3-BrPAの殺細胞効果を低酸素環境下で検討したところ、その増強が観察された。また、CD147とMCT1のタンパク質発現量は上昇していた。一般的に低酸素環境下の癌細胞は抗癌剤に耐性であるが、3-BrPAはそのような癌細胞に対しても有効である可能性がある。

一方NEDOプロジェクト研究では「標的認識ユニットの開発、抗テネニン抗体、抗TN-C誘導因子(TIF)各抗体の腫瘍標的認識能の評価と抗体の安定大量産生への試み」を分担テーマとして研究を遂行した。我々が標的分子として選択したヒト癌胎児性間質蛋白質TN-Cは細胞の移動や増殖にかかわる分子であり転移性格を示す高悪性度癌細胞と周囲の間質細胞には高発現する。そこで転移能が強い高悪性癌の非侵襲的な早期診断・治療を見据えTN-C分子の標的認識ユニット要素の標的分子としての有用性について検討した。まず、本研究の遂行上必須のTN-C発現ヒト癌細胞株の検索と分子発現環境の検討を行い、数種のヒト癌培養株で平板培養に比較して生体内組織を一部再現可能なスフェロイド培養と高密度大量培養に適したラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を用いた三次元立体培養での高発現がヒト腫瘍ヌードマウス移植組織と同様に*in vitro*培養系でも確認できた。このことは*in vitro*培養系を用いても細胞環境に注意を払う事で生体内環境での分子挙動を再現可能で、この結果、生体内でのイメージングにむけた標的分子としてのTN-Cの有用性が十分裏付けられた。ついで、蛍光色素標識修飾操作の抗ヒトTN-C抗体への安定性の影響について検討し、抗体力価は数%~数10%低下する抗体も認めた。同時に予後調査の確立した臨床腫瘍標本での検討からTN-C発現と腫瘍悪性度の高い相関関係を再確認出来た。ついで標的認識ユニットとして選択された有望な抗体を用い市販の近赤外蛍光色素並びに研究組織内研究開発で得られた新規近赤外蛍光色素を用い近赤外蛍光標識抗体を作製し、ヒト腫瘍移植動物への生体内投与で経時集積性と特異性(インビボイメージング)をマトリックス細胞研究所、東京大学大学院薬学系研究科(長野哲雄教授)と共同で比較評価し標的認識ユニットとしての有効性を確認した。また有用抗体の大量産生に向け、精製に影響する培地添加牛胎児血清の影響を排除し、精製の簡略化、迅速化に必須の無血清培地馴化抗ヒトTN-C抗体産生ハイブリドーマ2系統を樹立した。1系統は免疫ラット脾細胞/マウスミエローマのハイブリドーマ、もう1系統は免疫

BDF1マウス脾細胞/マウスミエローマ由来のハイブリドーマである。この二株はともに融合パートナーの種の問題から常法のプリスタン注射BALB/cマウスには可移植性が無く、大量抗体産生には特別な飼育環境が必要な免疫不全マウスへの移植による抗体産生のみが可能で、しかもいずれも腹水化が極めて困難な系統であった。本樹立細胞株を用い、高密度大量培養に適したRFBを用いた培養とBDCELLLine CL-1000フラスコを用いた2種類の培養システムでハイブリドーマ大量培養法を確立できた。これらの培養システムを用いて1回の培養でハイブリドーマ移植マウスの腹水中抗体IgG量とほぼ同程度の10~20mgの機能の十分な抗体IgGを得ることが可能で、標的認識ユニットとしての抗ヒトTN-C抗体の大量供給に目処をつけた。

2. プロテアソーム阻害剤PS341は抗癌剤として利用されその効果が期待されているがペプチド性プロテアソーム阻害剤の多くは耐性細胞を容易に誘導する。我々は5株のプロテアソーム阻害剤の一つのエボキシミシン耐性株を作成し、MMP分子群を介する浸潤能などの性格・プロテアソーム活性と耐性獲得の機序、克服について興味ある知見を得て報告している。今年度は本細胞株の内、子宮内膜癌Ishikawaのプロテアソーム阻害剤耐性細胞の浸潤能を中心に解析した。本細胞はIshikawa株をプロテアソーム阻害剤エボキシミシン(EXM)で長期暴露して得られたものでEXM耐性細胞(Ish/EXM)の特徴は、EMTの指標となるE-Cadherin(遺伝子:CDH1)の発現が消失した。CDH1の転写抑制因子とされているSnail, Slug, Twist, ZEB1/2のうち、Ish/EXMではZEB1によることがsiRNAを用いた実験により判明した。

間葉系幹細胞が骨芽細胞や脂肪細胞へ分化する過程での重要な調節因子TAZはRUNX2のコアクチベーターでありPPAR $\gamma$ のコリプレッサーとしても機能することを当講座で報告してきた。FGF-2を介したTAZタンパク質の発現量調節が骨芽細胞の増殖と分化に深く関与していることもまた明らかにしてきた。上述してきたプロテアソーム阻害剤PS-341(ボルテゾミブ)は多発性骨髄腫の有望な治療薬だが、その制癌作用以外に、転写因子のRunx2を活性化して骨分化を誘導することが報告されている。このボルテゾミブによる骨分化誘導の分子機構の詳細については不明点が多い。そこでこれまでに、Runx2のコアクチベーターとして機能するTAZが、FGF-2で刺激された骨芽細胞様細胞MC3T3-E1で減少することを報告しているの

FGF-2 処理による TAZ の減少に対するボルテゾミブの影響を解析したところ、ボルテゾミブはプロテアソーム阻害剤として働く濃度以下で TAZ の減少を抑制し、MC3T3-E1 の分化を誘導することが明らかになった。この結果は多発性骨髄腫の患者にボルテゾミブを投与した際に見られる骨量増加のメカニズムを説明できるとともに病的骨折の治療に役立つ可能性を示唆している。

## II. 生体内ユビキチン化蛋白質の生物学的研究

神経変性疾患、脳虚血・再還流や重金属中毒などの細胞ストレス負荷後の変化や一部の悪性腫瘍の病変部位ではユビキチン化蛋白質が蓄積し病態への関与が考えられる。そこで、生体内ユビキチン化蛋白質の精製・同定法を確立した。今年度は本法で難溶性ユビキチン化タンパク質の増加・蓄積と細胞障害・細胞死の関係をカドミウム (Cd) 曝露ヒト近位尿細管 HK-2 培養細胞を用いて解析した。その結果ヒト近位尿細管由来 HK-2 細胞に対する半致死性のカドミウム曝露は、難溶性ユビキチン化タンパク質の増加及び転写因子 STAT6 の難溶化 (正常分子の減少) をもたらす。その機序と意義を探索したところ、STAT6 そのものがカドミウム毒性の軽減に関与すること及び同分子内の特定の Cys 残基 (Cys384 等) の酸化的修飾が難溶化の原因となることが明らかとなった。この重金属の毒性発現には、細胞内タンパク質の構造変化とそれに伴う機能低下が関るものと推定される。

## III. その他

厚生労働科研・政策創業総合研究事業ではラジアルフローバイオリアクターを用いた血漿蛋白・ウイルス粒子の産生系の確立を研究した。本プロジェクトではアルブミン、フィブリノーゲンなどの血漿蛋白製剤をヒト細胞で大量に生産する技術の開発は、ウイルス感染の回避、医療費軽減のために急務である。また、C 型肝炎や E 型肝炎ウイルスなどのウイルス粒子高産生細胞系はワクチン開発にとって有用性が高い。本研究では、高分化型ヒト肝臓由来細胞株の三次元培養系を用いて、ヒト血漿蛋白および肝炎ウイルス粒子の大量産生技術を確立するとともに、目的蛋白、抗原の精製法を確立する。本研究は、高分化型ヒト肝臓由来細胞株 FLC-4 (米国特許 # 5,804,441 保有) をラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) 等の高密度大量細胞培養装置で培養することにより、ヒトアルブミン (HSA)、フィブリノーゲン (Fib) などの血漿蛋白、C 型肝炎ウ

イルス (HCV) と E 型肝炎ウイルス (HEV) 粒子の大量産生法を開発することである。HSA、Fib は広く臨床で利用されているが、原料を献血者の血漿としていることから、未知の感染物質等の混入の危険性がない遺伝子組み換え製剤の開発が必要である。日本で必要な HSA 量は年間約 100 トンと膨大である。HCV、HEV に対するワクチンは確立されていない。またウイルス粒子を調製できれば高い抗原性が期待でき、共同研究者の研究室では、精製ウイルス粒子をマウスに免疫することで、感染中和活性を持った特異的抗体の誘導を報告している。本年度は三次元培養系での培養条件の最適化と産生蛋白質ウイルスを同定した。

### 「点検・評価」

本年度は従来の projects に加え厚生科研政策創業総合研究事業での 3 次元ラジアルフローバイオリアクターを利用したヒトアルブミン、フィブリノーゲンの安全大量産生法を開発をスタートさせアルブミン、フィブリノーゲンの高産生系の確保ができた。また本年度も昨年度につづき多剤耐性をクリアできる臨床利用可能な薬剤の性質を確立するための作用機序の検討が重点的に行われ、臨床応用の可能性が充分手応えとして得られた。また、臨床利用が始まったプロテアソーム阻害剤に対する耐性細胞をいち早く樹立し、その細胞性格の解析から治療上の注意を喚起する研究を続けてきた。一方、ユビキチン化蛋白の解析も新しいコンセプトのもと開始され成果が出てきた。化骨、骨吸収破壊過程の多くの切り口で関与が予想されるユビキチン-プロテアソーム系がどのような役割をもって化骨にかかわるか具体例が成果となり興味が尽きない。転移の初期マーカー CD147 に加え、TN-C の解析は、厚生労働省科研と NEDO からの支援を受けた研究を中心に、早期癌の診断治療への新たな手段を提供可能となる。また今後臨床応用を視野に入れたバイオリアクターを用いた腫瘍モデルによる *in vitro* 研究を基に新しい診断法・補助診断への可能性など従来創業の立場からも臨床応用へ導く過程でギャップが大きく問題視されている分野へつなげて行く予定であり、今年度はこの方面の研究が多くの研究者によって進められた。昨年度と比較しほとんど進展のない研究もあり、次年度の一層の努力が必要と思われる。教育面では、主に、2 年生そして 3 年生の一部にかかわっている。従来の生化学講義 (分子から生命へ) の 1/3 で少人数演習形式を実施した多大な教員の負担はあるものの、それに見合う教育効果が得られた

ことを期待したい。両講座とも新しい教育手法の試み、実習を含め多くの時間をこれに傾注した。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Janer A, Werner A, Takahashi-Fujigasaki J, Daret A, Fujigasaki H, Takada K, Duyckaerts C, Brice A, Dejean A, Sittler A. SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7. *Hum Mol Genet* 2010; 19(1): 181-95.
- 2) Eda H, Aoki K, Kato S, Okawa Y, Takada K, Tanaka T, Marumo K, Ohkawa K. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits FGF-2-induced reduction of TAZ levels in osteoblast-like cells. *Eur J Haematol* 2010; 85(1): 68-75.
- 3) Matsudaira H, Asakura T, Aoki K, Searashi Y, Matsuura T, Nakajima H, Tajiri H, Ohkawa K. Target chemotherapy of anti-CD147 antibody-labeled liposome encapsulated GSH-DXR conjugate on CD147 highly expressed carcinoma cells. *Int J Oncol* 2010; 36(1): 77-83.
- 4) Shibata S, Marushima H, Asakura T, Matsuura T, Eda H, Aoki K, Matsudaira H, Ueda K, Ohkawa K. Three-dimensional culture using a radial flow bioreactor induces matrix metalloprotease 7-mediated EMT-like process in tumor cells via TGFbeta1/Smad pathway. *Int J Oncol* 2009; 34(5): 1433-48.
- 5) 射谷和徳<sup>1)</sup>, 今野剛人<sup>1)</sup>(<sup>1</sup>アロカ), 土屋好司<sup>2)</sup>, 阿部正彦<sup>2)</sup>(<sup>2</sup>東京理科大学), 松浦知和, 大川 清. 超音波イメージング技術ーラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの診断技術ー. 超音波 TECHNO 2009; 21(5-6): 94-8.

### III. 学会発表

- 1) 江田 誉, 青木勝彦, 加藤壮紀, 吉松俊紀, 吉松俊一, 大川 清, 丸毛啓史. FGF-2 存在下でのプロテアソーム阻害剤 bortezomib による骨芽細胞分化促進機構. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会. 横浜, 11 月. [日整会誌 2009; 83(8): S1262]
- 2) 大川 清, 青木勝彦. 解糖系阻害剤 3-ブロモピルビン酸の細胞内取り込みにおける乳酸トランスポーターの役割. 第 418 回ビタミン B 研究協議会. 京都, 11 月.
- 3) 高田耕司, 青木勝彦, 加藤尚志, 砂原幸一, 岩室祥一, 大川 清. STAT6 のチオール酸化を介したカドミウムの腎細胞毒性の発現 (Cadmium-induced renal cytotoxicity by thiol oxidation of STAT6). 第 82 回

日本生化学会大会. 神戸, 10 月.

- 4) 大川 清, 松浦知和, 朝倉 正, 阿部正彦, 土屋好司, 江田 誉, 青木勝彦, 丸島秀樹, 射谷和徳. CD147 を分子標的としたマイクロバブル超音波造影剤の開発 (Preparation of an ultrasound contrast of CD147 target immunomicrobubble). 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.
- 5) 青木勝彦, 上田 和, 朝倉 正, 江田 誉, 大川 清. 解糖系阻害剤 3-ブロモピルビン酸の抗癌作用に対する MCT1-CD147 複合体の役割 (Role of MCT1-CD147 complex in the anti-tumor effect of glycolytic inhibitor, 3-bromopyruvate). 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.
- 6) 江田 誉, 青木勝彦, 大友博之, 大川 清. プロテアソーム阻害剤 (エボキシオミシン) は FGF-2 存在下で骨芽細胞分化を刺激する. 第 9 回日本抗加齢医学会総会. 東京, 5 月.
- 7) 成相孝一, 和田あづみ, 青木正隆, 木村靖男, 杉村由紀子, 飯塚きよみ, 角田正紀, 石野田康広, 中谷武夫, 竹淵礼子, 大竹行夫, 住吉伸夫, 馬橋康雄, 松村明, 南井孝介, 清水光行, 大川 清. 小型げっ歯類における簡便な気管挿管法. 第 126 回成医学会総会. 東京, 10 月.
- 8) 中田典生, 宮本幸夫, 伊藤貴司, 射谷和徳, 今野剛人, 土屋好司, 酒井秀樹, 阿部正彦, 相澤 守, 松浦知和, 田尻久雄, 松藤千弥, 大川 清. がんイメージングの新たな展開ラベル化ナノバブルを用いた超音波によるがん超早期診断システムの研究開発 (Advances in cancer imaging ultra-early cancer diagnosis using labeled nano-bubble contrast ultrasonography). 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.
- 9) 朝倉 正, 丸島秀樹, 松平 浩, 青木勝彦, 江田 誉, 大川 清. Proteasome inhibitor, epoxomicin 耐性細胞における E-cadherin 発現消失を介した転移能の獲得 (Acquirement of motility via E-cadherin suppression in proteasome inhibitor, epoxomicin-resistant cells.). 第 68 回日本癌学会総会. 横浜, 10 月. [日癌学会総会記 2009; 68 回: 430]
- 10) Shimada Y, Fukuda T, Ohashi T, Sunahara K, Ohkawa K, Takada K. Purification and identification of SDS-solubilized ubiquitin-conjugates accumulated in brains of Niemann-Pick C disease mouse. 第 32 回日本神経科学大会. 名古屋, 9 月.
- 11) 和田あづみ, 大川 清, 都築政起. Phodopus campbelli の黒眼黄色被毛突然変異体における tyrosinase-related protein1 遺伝子塩基配列. 日本遺伝学会第 81 回大会. 松本, 9 月.
- 12) 大川 清. (テーマ: 分子イメージングーがんイメージング・マイクロドージング・創薬ー) 分子標的認識



性超音波造影剤の試作と応用にむけて、第23回ゲノム創薬フォーラム談話会、東京、9月。

- 13) 成相孝一, 神谷直樹, 安田 允, 田中忠夫, 大川 清. 光線力学療法 (PDT) を応用した卵巣退行の誘導、第27回日本ヒト細胞学会、東京、8月。
- 14) 江田 誉, 丸毛啓史, 大川 清. Bortezomib は FGF-2 による TAZ 減少を抑制し骨芽細胞分化を刺激する。第27回日本骨代謝学会学術集会、大阪、7月。
- 15) 間森 聡, 丸島秀樹, 永妻啓介, 田中 賢, 滝川真吾, 瀬嵐康之, 田尻久雄, 松浦知和, 酒井はるか, 大川 清. 肝細胞におけるグルコーストランスポーター (GLUT) 発現の変容 - 3次元環流培養系を用いた検討 -。第45回日本肝臓学会総会、神戸、6月。
- 16) 江田 誉, 青木勝彦, 大友博之, 大川 清. JNK 阻害剤は FGF-2 存在下で骨芽細胞分化を刺激する。第9回日本抗加齢医学会総会、東京、5月。
- 17) 和田あづみ, 大川 清, 都築政起. Phodopus 属ハムスターに存在する2つの淡色被毛突然変異。第56回日本実験動物学会総会、大宮、5月。

#### IV. 著 書

- 1) 高田耕司. 第I部: 分子細胞生物学 7. 蛋白質の成熟・分解・異常. 花岡炳雄, 永倉俊和編. 臨床分子細胞生物学. 東京: メディカルレビュー社, 2009. p.103-17.

## 分 子 生 物 学 講 座

教 授: 松藤 千弥 生化学・分子生物学  
講 師: 小黒 明広 分子生物学  
講 師: 村井 法之 生化学・分子生物学

### 教育・研究概要

ポリアミン (プトレッシン, スペルミジン, スペルミン) は、あらゆる細胞に含まれ、細胞増殖に必須の生理活性分子である。ポリアミンは RNA や DNA に結合し、それらの安定化や機能制御にはたらくとともに、アポトーシスや NMDA レセプターなどの制御にも関与している。細胞内ポリアミン濃度の調節において中心的な役割を果たすのは、アンチザイム (AZ) と呼ばれるタンパク質である。AZ は翻訳フレームシフトによって発現誘導され、ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の分解促進と、細胞外からのポリアミンの取込みを阻害することにより、ポリアミン濃度をフィードバック調節する。AZ は広く真核生物に保存され、哺乳動物には3種のファミリー (AZ1, 2, 3) が存在する。当講座では、ポリアミン調節システムの分子機構と存在意義を明らかにすることを目標として、研究を進めている。

### I. AZ1 の個体レベルでの生理機能

#### 1. AZ1 欠損マウスにおける造血障害

我々は昨年度までに、AZ1 欠損マウスの部分胎生致死の原因の一つとして、胎仔肝における高濃度のポリアミンが、コロニーアッセイで赤芽球系前駆細胞に相当する burst-forming unit-erythroid (BFU-e) を減少させ、貧血を引き起こすことを見出した。BFU-e が減少する原因として、大動脈生殖原基中腎 aorta-gonad-mesonephros (AGM) で発生した造血幹細胞の胎仔肝へ移行障害、または赤芽球系前駆細胞より早期の造血系細胞の分化障害の可能性が考えられたため、本年度はこれらに着目して解析を行った。AZ1 欠損胎仔肝細胞の fluorescence-activated cell sorting (FACS) 解析において、造血幹細胞および早期前駆細胞の表面マーカーを発現している細胞群は野生型に比べてやや増加しており、造血幹細胞の胎仔肝への移行には問題ないことが示された。また胎仔肝由来造血細胞のコロニーアッセイでは、赤血球系と骨髄球系の共通の前駆細胞に相当する mixed コロニーが減少し、さらに骨髄系のコロニーも減少していた。以上の結果から、