

Ⅲ. 学会発表

- 1) 松尾知明¹⁾, 須藤正道, 山田 深¹⁾, 大島 博¹⁾, 栗原 敏, 向井千秋¹⁾(¹⁾宇宙航空研究開発機構). 長期宇宙滞在中の心機能低下を予防する運動療法に関する研究(予備実験). 第128回成医会総会. 東京, 10月.
- 2) 栗原 敏. (シンポジウム4) 健康・スポーツ科学領域における人対象の調査・研究の倫理的問題. 第66回日本体力医学会大会. 下関, 9月. [体力科学 2012; 61(1): 26]
- 3) Kobirumaki F, Terui T, Mizuno A¹⁾, Kagemoto T¹⁾, Shimozawa T (RIKEN), Ishiwata S¹⁾(¹⁾Waseda University), Kurihara S, Fukuda N. Real-time measurement of sarcomere length in the rodent heart by using α -actinin-GFP. 第49回日本生物物理学会年会. 姫路, 9月. [生物物理 2011; 51(Suppl. 1): S124]
- 4) Shintani S¹⁾, Yamane M¹⁾, Oyama K¹⁾, Kurihara S, Ishiwata S¹⁾(¹⁾Waseda University). Unraveling the role of autonomous regulation in heartbeat: Analysis of self-oscillatory properties of rat neonatal cardiomyocytes. 第49回日本生物物理学会年会. 姫路, 9月. [生物物理 2011; 51(Suppl. 1): S125]
- 5) Hongo K, Morimoto S, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Kurihara S. Direct renin inhibition improved cardiac remodeling and survival in mouse model of dilated cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Session 2011. Orlando, Nov. [Circulation 2011; 124(21): A10950]
- 6) 雨宮えりか, 宮坂玄樹, 横田俊介, 草刈洋一郎, 井上天宏, 浦島 崇, 栗原 敏. 線維化心筋における興奮収縮連関の生理学的特性. 第128回成医会総会. 東京, 10月.

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. 厚生労働科研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 (EMMPRIN) は早期転移・浸潤の癌表面マーカー糖蛋白質で本学産婦人科・山田恭輔, 生化学・大川 清, 病理学現仙台社会保険病院・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 認識抗原であり(Am J Clin Phathol 1995; 103: 288-94), CD147は癌微小環境の構築に寄与する糖タンパク質である。その機能はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性化や血管新生因子の誘導, モノカルボン酸トランスポーター (MCT) の細胞膜への輸送など多岐に及ぶ機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, 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CD147発現腫瘍に集積させ, 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でモニターしている。高分子ミセルはリポソームに比し血管内皮への取り込みが低く血液滞留時間を非常に長くすることができるので, 抗CD147抗体(aCD147ab)で標識しGSH-DXRを内封した本高分子ミセルのターゲティング療法の有効性を検討した。aCD147abの高発現しているヒト類表皮癌細胞A431およびヒト子宮癌細胞Ishikawaに, aCD147ab標識liposomeがCD147を特異的にターゲットにして集積することが確認された。さらに, GSH-DXRを内封したaCD147ab標識liposomeによる特異的な抗腫瘍効果が示された。

MCT1細胞膜発現への効果からCD147の分子シャペロンとしての機能をみるため共免疫沈降法を用いてCD147と相互作用するタンパク質の検索を行った。その結果, 既に知られているMMP1, MCT1, MCT4, PDLIM7の他に, 新規なものとし

てMMP3, 炭酸脱水素酵素 (CA9とCA12) が同定された。CD147を介するモノカルボン酸トランスポーター (MCT1, 4) の発現誘導の研究は, 上皮性卵巣腫瘍で本邦では欧米に比較し高発頻度で治療抵抗性の卵巣明細胞癌 (CCC) の性格解析を進めた。MCT1, 4は低酸素癌微小環境で培養したCCC培養株HAC2で高発現し, HIF下流遺伝子発現として証明された。この低酸素下では他の卵巣癌細胞株に比較し, グリコーゲン蓄積が著しく亢進し, その原因はグリコーゲン合成系の機能亢進によることが生化学的に証明された。治療効果に対するこれらの影響を検討中である。

2. プロテアソーム阻害剤PS341 (ボルテゾミブ) は抗癌剤として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これら薬剤に対し耐性細胞を容易に誘導する。我々はプロテアソーム阻害剤の一つのエポキシミシン (EXM) 耐性株5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, 克服について本細胞株の一つ, Ishikawa株のプロテアソーム阻害剤耐性細胞の浸潤能を中心に生化学的に解析している。子宮がん細胞IshikawaにおけるE-Cadherinの発現は, プロテアソーム阻害剤Epoxyomicin (EXM) に対して耐性を獲得することでmiR200 familyの発現を低下させZEB1発現を誘導しE-Cadherin発現消失を促した。このことは, 耐性を獲得した細胞にmiRNAを導入することで, ZEB1の発現が抑制されE-Cadherinの発現が回復したことから明らかである。

3. 通常, 細胞のエネルギー産生はミトコンドリアにおける酸化リン酸化によって行われているが, がん細胞ではその大部分を解糖系に依存していることが知られている。近年, この正常細胞とがん細胞のエネルギー生産系の違いを標的とした抗癌剤の開発が注目されており, 3-プロモピルビン酸 (3-BrPA) はそのひとつである。我々は3-BrPAがモノカルボン酸トランスポーター (MCT1) 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。今回, 我々は20種類の癌細胞株に対して3-BrPAの殺細胞効果を検討した。それらの中から3-BrPAに対して感受性が高い細胞株と抵抗性を示す細胞株を選び出し, MCT1の発現量をウエスタンブロッティングで比較したところ, 3-BrPA感受性の細胞株ではMCT1の発現量が高いことが明らかになった。これらの感受性株でMCT1をノックダウンすると3-BrPAに対して抵抗性を示すことから, 3-BrPAの

細胞内取り込みに対するMCT1の重要性を示すことが出来た。一方, 3-BrPA抵抗性を示す乳癌細胞株MDA-MB-231ではMCT1がほとんど発現していない。そこで, この細胞株でのMCT1遺伝子発現の抑制がエピジェネティックな効果によるものであると仮定し, 実験を行ったところ, DNAメチル化阻害剤 (5-aza-2'-deoxycytidine) と副腎皮質ステロイド (dexamethasone) を同時に処理することでMCT1のmRNA発現量が顕著に増加することが明らかになった。この結果から, 3-BrPA抵抗性を示す細胞株でのMCT1の発現抑制はDNAのメチル化によるものである可能性が示唆された。

II. 生体内ユビキチン化蛋白質の生物学的研究

2011年度は以下3課題の研究を実施した。(1) ポリユビキチン鎖定量による有害化学物質の毒性評価。(2) ヒト肝臓由来高分化型細胞株を用いた血漿タンパク産生の検討。(3) マウスの絶望行動の発現に関する脱ユビキチン化酵素USP46の生化学的研究。

(1) では化学物質のリスク評価に資する新たな指標を確立する目的で近位尿管上皮HK-2, 神経芽細胞腫Neuro2A, 繊維芽細胞NIH/3T3の各細胞を半致死濃度の塩化カドミウム, メチル水銀, パラコートに曝露し細胞内ポリユビキチン鎖を定量した。その結果, カドミウムでは全細胞で顕著なポリユビキチン鎖量の増加が観察され, 毒性マーカーとしての有用性が示唆された。(2) では安全な血漿タンパク製剤の開発を目的としてFLC-4およびFLC-7細胞を用いた検討を進め, アルブミンまたはフィブリノーゲンの産生に資する培養条件を確立した。(3) ではUSP46遺伝子の変異により絶望行動を失ったCSマウスを用いて脳組織の脱ユビキチン化活性を測定したところ, 海馬と嗅球において野生型よりも同活性が低下していることを見出した。

また, エピソーマルベクター系を用いた哺乳類細胞でのUSP46タンパク質発現系を作成し, 野性型と変異型の両方についてHeLa細胞内での安定的な過剰発現を確認した。

「点検・評価」

本年度は従来のprojectsに加え厚生科研政策創薬総合研究事業での3次元ラジアルフローバイオリ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の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ー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。転移の初期マーカーCD147から始まった癌細胞と微小環境適応性獲得の研究は卵巣明細胞癌の治療抵抗性の解析、組織発生まで遡り研究の広がりをみせた。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、創薬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。しかし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年生の一部に係わっている。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て5年程が過ぎ多大な教員の負担はあるものの、充分それに見合う教育効果が得られて来たと考えている。生化学・分子生物学両講座の密接な連帯のもと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) Marushima H, Shibata S, Asakura T, Matsuura T, Maehashi H, Ishii Y, Eda H, Aoki K, Iida Y, Morikawa T, Ohkawa K. Three dimensional culture promotes reconstitution of the tumor specific hypoxic microenvironment under TGF β stimulation. *Int J Oncol* 2011; 39(5) : 1327-36.
- 2) Iida Y, Aoki K, Asakura T, Ueda K, Yanaiharu N, Takakura S, Yamada K, Okamoto A, Tanaka T, Ohkawa K. Hypoxia promotes glycogen synthesis and accumulation in human ovarian clear cell carcinoma. *Int J Oncol* 2012; 40(6) : 2122-30. Epub 2012 Mar 19.
- 3) Conlon JM, Mechkarska M, Ahmed E, Leprince J, Vaudry H, King JD, Takada K. Purification and properties of antimicrobial peptides from skin secretions of the Eritrea clawed frog *Xenopus clivii* (Pipidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2011; 153(3) : 350-4.
- 4) Shimada Y, Kobayashi H, Kawagoe S, Aoki K, Kaneshiro E, Shimizu H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Endoplasmic reticulum stress induces autophagy through activation of p38 MAPK in fibroblasts from Pompe disease patients carrying c.546G>T mutation. *Mol Genet Metab* 2011; 104(4) : 566-73.
- 5) Mechkarska M, Eman A, Coquet L, Jerome L, Jouenne T, Vaudry H, King JD, Takada K, Conlon JM. Genome duplications within the Xenopodinae do not increase the multiplicity of antimicrobial peptides in *Silurana paratropicalis* and *Xenopus andrei* skin secretions. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2011; 6(2) : 206-12.

III. 学会発表

- 1) 朝倉 正, 飯田泰志, 青木勝彦, 大川 清. Epoxomicin 耐性細胞における Proteasome 活性低下が miR200 family の発現低下に伴い ZEB1 発現を誘導し E-cadherin 発現消失を促す (Decrease in proteasome activity in epoxomicin-resistant cells caused suppression of E-cadherin by miR200 and ZEB1). 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋, 10月. [日癌会総会記 2011; 70回 : 120]
- 2) 高田耕司, 青木勝彦, 山田宙史¹⁾, 岩室祥一¹⁾(¹東邦大), 大川 清. 細胞内ポリユビキチン鎖の定量による化学物質の毒性発現機序の検討. 第84回日本生化学会大会. 京都, 9月.
- 3) 松本倫典, 松浦知和, 大川 清, 高田耕司. ヒト肝臓由来の高分化型細胞株 FLC-4, FLC-7 を用いた血漿タンパク質の効率的産生. 第84回日本生化学会大会. 京都, 9月.
- 4) 青木勝彦, 宮野千草, 山田宙史, 梅村翔也, 岩室祥一, 大川 清, 海老原史樹文, 高田耕司. 絶望行動を制御する脱ユビキチン化酵素 USP46 の解析. 日本動物学会第64回関東支部大会. 船橋, 3月.