

Adachi-Akahane S (Toho Univ), Suda N. Detection of L-type calcium channel activity in human normal parathyroid cells. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl): S173]

- 20) Morimoto S, Kawai M, Kusakari Y, O-Uchi J, Komukai K, Hongo K, Takeda T¹⁾, Asahi M¹⁾, Otsu K¹⁾(Osaka Univ), Sasaki H, Kurihara S. Properties of Ca²⁺ handling in sarcoplasmic reticulum of saponin-treated SERCA2a transgenic mouse myocardium. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl): S208]

V. その他

- 1) 大槻啓男. トロポニン発見四十周年記念国際シンポジウム. 生体の科学 2006; 57(2): 153-5.
- 2) 大内 仁. 研究の抱負: 研究課題: 心筋細胞 α_1 アドレナリン受容体サブタイプ特異的な細胞内情報伝達機構の解明 (Determination of intracellular signal transduction pathways after the subtype-specific α_1 -adrenoceptor stimulations in mammalian cardiomyocytes). 財団法人循環器学研究振興財団 平成17年度応募研究論文集・事業報告書 2006: 140-1.
- 3) 栗原 敏. サルコリピンによる心筋筋小胞体 Ca²⁺ 取り込みの分子調節機構 (平成16年度~平成18年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) 研究成果報告書. 2007.

生化学講座第1

教授: 大川 清 がんの生化学, 病態生化学
 助教授: 高田 耕司 分子細胞生物学, 病態生化学

講師: 朝倉 正 がんの生化学, 病態生化学

研究概要

I. がんの生化学

(1) 2005年度より始まった厚生労働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, 治療学的研究が多くなされた。CD147 は EMMPRIN ともいわれ早期より転移・浸潤を示す癌の表面マーカーとして確認出来た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 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 metalloproteinase (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が報告されている。我々はこの CD147 の悪性腫瘍細胞での性格を利用し, 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することを計画した。また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開発もする予定である。本年度は分子描出に適した新規超音波造影剤開発, 腫瘍モデルでのバブル超音波描出の検討, バブルの CD147 認識抗体 MAb12C3 標識法の改良, バブル高感度検出技術開発 (FMCW 法), 収束超音波治療技術の開発のため

- 1) 微小腫瘍における標的分子 CD147 蛋白発現と臨床有用性の確認
- 2) 超音波評価用腫瘍モデル (三次元培養癌浸潤モデルと担癌動物モデル) の確立
- 3) 新規界面活性剤を用いた超音波造影剤 (バブル) の創成とラベル化
- 4) FMCW 法利用バブル新規高感度検出技術の開発を進めた。

その結果

- 1) 超音波誘導針生検早期極微小肝癌 (平均腫瘍径 14.5 mm) や超音波内視鏡下針生検組織を始め婦人科, 消化器早期癌でも CD147 は高発現し診断に有用だった。

2) 三次元マウス培養肝臓癌浸潤モデルへのヒト癌細胞注入でCD147陽性癌細胞を検出した。またIRDye800WC標識MAb12C3の*iv*投与は40分後既に担癌マウスヒト腫瘍径0.8cmを抽出した。抗癌剤結合MAb12C3も標的の特異抗癌効果を発揮した。これらの結果から超音波造影剤(MAb12C3標識バブル)集積性、抽出検討が*in vitro*, *in vivo*で可能となった。

3) 生体にやさしく生分解性に優れた新規超音波造影剤シクロアミロース界面活性剤とタウリン誘導ジェミニ型陰イオン界面活性剤でバブル調整(0.06-1 μ m)に成功し充分な供給も可能である。分子標的性付与は独自に検討中で、標的性向上のアプタマー作成準備も整った。

4) バブル振動と組織非線形効果解析各シミュレーターを開発し、エコーの非線形特性利用でのバブル振動で生ずる第2高調波(ハーモニック)と組織の高調波を識別する技術開発を行い、従来比2倍以上の高い検出感度と、空間分解能1mm以下の高解像度が得られた。

分子構造からみるとCD147は2つのイムノグロブリンドメインを有する膜貫通型の糖蛋白質である。多くの種類の細胞に少量発現しているが、特に癌細胞の細胞表面に高発現していることが知られている。CD147は癌の浸潤や転移を促進する分子であり、その分子機構は、癌細胞の周囲に存在する間質細胞に作用することでMMPの分泌(活性化)を誘導することと考えられている。これまでに、癌細胞におけるCD147の過剰発現とその生物学的意義について研究が行われているが、癌細胞でCD147の発現を抑制した場合の細胞応答については知見が少ない。そこで我々は前立腺癌細胞株PC-3にCD147をノックダウンするためのshRNA発現ベクターを導入しCD147の発現が抑制された5種類のshRNA安定発現株を取得した。これらのCD147ノックダウン(KD)細胞を用いて、多くの抗癌活性物質の効果を検討しているがある種の物質に対してこれらKD細胞はCD147を発現しているPC-3細胞よりも抵抗性を示した。本物質の細胞内移入にCD147が重要な役割を果たしていることが示唆されその分子機構について解析を行っている。ついでCD147分子が腫瘍細胞表面に強発現していることを利用した癌細胞膜表面高発現糖タンパク質CD147を標的とした癌化学療法が検討された。抗CD147単クローン抗体(MAb12C3)とドキシソルピシン(DXR)との複合体(MAb12C3-DXR複合体)がヒト類表皮癌細胞A431、ヒト前立腺癌細胞PC-3およびヒト子宮内膜

癌Ishikawaに対しての短時間暴露でも強い抗腫瘍効果を示した。また、CD147KD細胞ではその特異性の消失がみられ、MAb12C3-DXR複合体がCD147を標的とした抗腫瘍効果を示すことが確認された。

(2) プロテアソーム阻害剤PS341は抗癌剤として利用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の阻害剤に耐性細胞を誘導する。我々はA431に加え新たに子宮内膜癌1、乳癌1、神経芽細胞腫1、線維肉腫1の計4株のエポキシミン耐性株を作成し、耐性獲得の機序、克服について研究している。

(3) GSH結合アドリアマイシンの研究

GSH結合アドリアマイシンは強力な抗癌効果を発揮することが示され、その標的分子がGST π であることも判明した。共立薬大との共同研究から本薬剤投与時のプロテオーム解析がなされ幾つかの興味あるデータが示され現在解析を共同ですすめている。

II. 生体内ユビキチン化蛋白質の生物学的研究

(1) 神経変性疾患、脳虚血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推定されている。そこで、生体内ユビキチン化蛋白質を網羅的に精製・同定するための方法を確立した。昨年度に続き本年度は細胞質内に不溶化するユビキチン化蛋白質の性格づけに着手したが、その手法確立のための基礎データをとることとなった。細胞質不溶化画分としてのNPCマウス脳のユビキチンタンパク質複合体は、8M尿素よりも2%SDSでより多く可溶化された。SDS可溶化画分からSDSを除くための実用的な方法を構築するため、シクロアミロース等の試薬を検討した結果、タンパク質を失わずに大部分のSDSが排除可能となった。この方法を用いてもユビキチン抗体によるイムノアフィニティークロマトグラフィーは脳内ユビキチン化タンパク質の大規模精製において十分機能し、難溶性ユビキチンタンパク質複合体の新たな単離法が確立された。一方急性毒性を示す濃度のカドミウム(70 μ M)は近位尿管細胞を傷害し、細胞死に先行して難溶性ユビキチン含有複合体が顕著に増加する。蛍光抗体法でも細胞質全体に多数点在するユビキチン含有凝集体として見出されたがカドミウムで出現する凝集体はアグリソームに至らなかった。これは急性毒性に起因する細胞急死時の一般的結果なのか、重金属によるアグリソーム形成不全なのか現在検討中である。

(2) 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 γ のコリプレッサーとしても機能することが知られている。TAZ タンパク質の発現調節機構については不明である。骨芽細胞分化の重要な調節因子である FGF2 が化骨過程においてマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 内の TAZ 蛋白質量をプロテアソーム, ERK, JNK, P38 に対する各々の阻害剤に興味ある反応を示し, FGF2 の骨芽細胞に対する複雑な作用機序が明らかとなってきた。

「点検・評価」

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, 臨床利用が間近に迫っている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僅かではあるが新しい可能性が見られた。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化骨において実証可能となりつつあり興味が尽きない。転移の初期マーカー CD147 は以前我々が確立したマウス単クローン抗体認識抗原であり, 厚生労働省科学研究を中心に, 診断治療への新たな手段を提供可能となり, 今後臨床応用を視野に入れたバイオリ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 of 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結果, 生化学 1, 2 両講座教員への多大な負担をかけたが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) Minami J, Takada K, Aoki K, Shimada Y, Okawa Y, Usui N, Ohkawa K. Purification and characterization of C-terminal truncated forms of

histone H2A in monocytic THP-1 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 171-80.

- 2) Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto N, Masaki T, Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, Matsuura T. Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. *Artif Organs* 2007; 31: 148-51.

III. 学会発表

- 1) Fujigasaki J, Yagishita S, Iwabuchi K, Fujigasaki H, Takada K. Proteasome inhibitor induces formation of ubiquitin/SUMO positive intranuclear inclusions in neuronal cells. 第 47 回神経病理学会総会学術研究会. 岡山, 5 月. [*Neuropathology* 2006; 26: A40]
- 2) Shimada Y, Takada K, Aoki T, Iwamuro S, Asakura T, Ohkawa K. Development of a novel method for purifying SDS-solubilized ubiquitin-protein conjugates. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June. [Abstracts 2006: 472]
- 3) Takada K, Aoki K, Iwamuro S, Eda H, Aoki K, Ohkawa K. Immunocytochemical characterization of polyubiquitin conjugates formed by cadmium exposure. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June. [Abstracts 2006: 487]
- 4) 間森 聡, 朝倉 正, 大川 清, 松平 浩, 伊藤周二, 瀬嵐康之, 竹上慎一郎, 中島尚登, 高木一郎, 田尻久雄. 培養肝癌細胞における抗癌剤短時間曝露の有効性. 第 43 回日本肝癌研究会. 東京, 6 月.
- 5) 石橋由朗, 小村伸朗, 鈴木 裕, 中田浩二, 羽生義信, 柏木秀幸, 川崎成郎, 大川 清, 浦島充佳, 矢永勝彦. DNA チップとベアリング解析法による食道癌の分子生物学的分類と新しい予後規定因子の検討. 第 61 回日本消化器外科学会. 横浜, 7 月.
- 6) 丸島秀樹, 松島知和, 大川 清. ^{13}C -呼吸試験を用いた *in vitro* 細胞毒性試験の開発. 第 48 回日本平滑筋学会総会. 岡山, 7 月.
- 7) 朝倉 正, 青木勝彦, 間森 聡, 丸島秀樹, 大川 清. 癌細胞膜表面高発現糖タンパク質 CD147 を標的とした化学療法法の検討. 第 65 回日本癌学会総会. 横浜, 9 月. [日本癌学会 65 回総会記事 2006: 477]

- 8) 上田 和, 山田恭輔, 浦島充佳, 青木勝彦, 鷹橋浩幸, 岡本愛光, 安田 允, 大川 清, 田中忠雄. 子宮体癌における CD147 の発現と臨床病理学的検討. 第 65 回日本癌学会総会. 横浜, 9 月. [日本癌学会 65 回総会記事 2006: 356]
- 9) 青木勝彦, 上田 和, 間森 聡, 丸島秀樹, 山田恭輔, 朝倉 正, 大川 清. 癌浸潤マーカータンパク質 CD147 を標的とするモノクローナル抗体 MAb12C3 の機能解析. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」. 名古屋, 12 月. [Abstracts of Late Submission 2006: 31]
- 10) 江田 誉, 青木勝彦, 高田耕司, 丸毛啓史, 大川 清, 藤井克之. FGF2 は骨芽細胞様細胞内の TAZ タンパク質量を減少させる. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」. 名古屋, 12 月. [Abstracts of Late Submission 2006: 456]
- 11) 松浦知和, 大川 清. ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発. 平成 17 年度厚生労働省科学研究費研究成果等普及啓発事業萌芽の先端医療技術推進研. ナノメディシン研究成果発表会. 東京, 2 月.
- 12) 高田耕司. カドミウム曝露に伴い蓄積するユビキチン化タンパク質の性状解析. 北陸大学学術フロンティア・サテライトミーティング—食品汚染金属の毒性とその防御の分子メカニズム. 仙台, 2 月. [講演要旨集 2007: 23-4]

V. その他

- 1) 大川 清. ストレス誘導性アポトーシスとグルタチオン S-トランスフェラーゼの役割 (II). 平成 17 年度ビタミン B 研究委員会報告書 2006: 25.
- 2) 大川 清. ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発: 平成 17 年度総括研究報告書 厚生労働科学研究費補助金萌芽の先端医療技術推進研究事業. 2006.
- 3) 高田耕司. カドミウムによる細胞障害の分子機構: ユビキチン修飾を指標としたタンパク質異常化の解明. 中間評価のための資料集 2006: 477-86

生化学講座第 2

教授: 大川 清 癌の生化学, 病態生化学
 教授: 松藤 千弥 生化学, 分子生物学

研究概要

I. 翻訳フレームシフトの分子機構

当講座では, 酵母から哺乳動物にいたる真核細胞に広く保存されているポリアミン調節タンパク質, アンチザイム (AZ) の発現調節と生理的役割に焦点を当てて研究を行っている。哺乳動物の AZ は AZ1, AZ2, AZ3 からなるファミリーを形成し, いずれもポリアミンで促進される +1 翻訳フレームシフトがその発現に必要なである。

1. AZ シュードノット RNA 結合タンパク質の探索

AZ1 と AZ2 の mRNA には翻訳フレームシフトの促進配列としてはたらくシュードノット構造が存在する。ここに特異的に結合し, フレームシフト促進機構に関与する RNA 結合タンパク質を, UV クロソリング法で探索した。昨年度候補にあがった複数のタンパク質は, 変異体を用いた検討において十分な特異性が証明されず, 目的とするタンパク質ではないと結論した。一方, 変異体解析において, シュードノットの 5' 側ステムの下半分を形成しない変異体に特異的に結合する 34 kDa のタンパク質をヒト由来 293F 細胞の抽出液中に検出した。シフト部位に到達したリボソームにより 5' 側ステムの下半分が融解した構造に本タンパク質が結合し, フレームシフトを制御するという仮説を立て, フレームシフトに対する効果を検討している。また, 担体に固定した変異体シュードノット RNA を用いて, 細胞抽出液の 34 kDa のタンパク質をアフィニティー精製することに成功し, 質量分析装置を用いたペプチド・マス・フィンガープリント法による同定を試みている。

2. 大腸菌における哺乳動物アンチザイムフレームシフト信号の解析

AZ1 のフレームシフト信号配列は, 大腸菌内で, シフト部位周辺の塩基配列に依存して 3' 側へのリボソームホッピングによる -8 や -5 翻訳フレームシフトを引き起こすことを報告した。この現象の分子機構を MALDI-TOF 質量分析を用いて解析するため, グルタチオン S-トランスフェラーゼ遺伝子と C 末端に His タグを付けたプロテイン A 遺伝子の間