

## 生 化 学 講 座

教授：大川 清	がんの生化学，病態生化学
准教授：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

### 教育・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，治療学的研究がなされた。CD147 は EMM-PRIN とはいわれ早期より転移・浸潤を示す癌の表面マーカー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 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。腫瘍モデルでのバブル超音波分子描出の検討，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) の確立と応用
- 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) 早期癌が疑われる婦人科，消化器早期癌，GIST 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モデルへの標識バブル投与で超音波造影剤 (MAb12C3 標識バブル) の特異的集積性，抽出が可能となった。

- 3) 分子標的性付与は独自に検討中で，SELEX 法とヒトリコンビナント CD147 を用いたスクリーニングで標的性向上のアプタマー作成をすすめている。
- 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 1 mm 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 1 回膜貫通型の糖蛋白質であり，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 の発現抑制 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の検討から細胞内物質移入に 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。また，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も検討された。抗 CD147 抗体 (MAb12C3) で標識した liposome によるターゲット療法の有効性を検討するため，抗がん剤として我々が開発した GSH-DXR を内封した MAb12C3 標識 liposome を用いた。CD147 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，MAb12C3 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 MAb12C3 標識 liposome による特異的な抗腫瘍効果が示された。

(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 5 株のエポキシシミン耐性株を作成し，浸潤能などの性格・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 $\pi$  であることも判明した。GST P1 活性を阻害することによりアポトーシスを誘導する GSH-DXR は，JNK 活性化を介してミトコンドリア経路 (ミトコンドリアから細胞質への cytochrome c 放出，caspase-9 活性化) のアポトーシスを誘導した。この JNK 活性調節に GST P1 の JNK への結合および GST P1 活性が深く関わっており，GSH-DXR は GST P1 の活性

中心の構造変化をもたらすことで JNK 活性化を強く誘導することを明らかにした。

## 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。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・細胞死の関係をニューマンピック病 C 型 (NPC) モデルマウス 9 週齢の脳 ( $n=15$ ) と 70  $\mu\text{M}$ , 15 時間カドミウム (Cd) 曝露ヒト近位尿管 HK-2 細胞を実験系として解析した。2% SDS で可溶化される難溶性ユビキチン化タンパク質を抗体アフィニティー精製し、変性タンパク質の再生を組み合わせる独自の手法で、アミノ酸配列解析から K48 型ポリユビキチン鎖の脳内での存在が実証された。一方、尿管細胞からは、転写因子 STAT6 が同定され、Cd 障害に伴う STAT6 の Cd 毒性との関連を解析中である。

## III. その他

(1) 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が知られている。TAZ は間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に関与し、FGF-2 刺激による細胞内 TAZ タンパク質の減少により骨芽細胞様細胞の石灰化が抑制されること、また細胞の増殖が促進されることを明らかにした。この FGF-2 の作用は可逆的であり、FGF-2 を除くことで骨芽細胞の性質が回復した。さらに、TAZ タンパク質の減少が SAPK/JNK 経路の阻害により抑制されることを明らかにした。以上の結果は TAZ タンパク質の発現量が骨芽細胞の増殖と分化に関与していることを示唆している。また、TAZ は間葉系細胞の脂肪分化を調節している事実から臨床における FGF-2 の投与時期に大きな示唆を与える結果となった。現在は化骨の制御調節機構を中心に脂肪細胞の形成についても研究をすすめている。

(2) アルツハイマー病患者脳で観察される老人斑の主成分であるアミロイド  $\beta$  がもたらす新たな発症メカニズムとして、毒性アルデヒドのミトコンドリアも含む代謝障害を報告している。また、晩期発症型アルツハイマー病モデルマウスの開発を行った。

## 「点検・評価」

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、ユビキチン化蛋白質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、厚生労働省科研究を中心、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。従来からの生化学講義 (分子から生命へ) の 1/3 で少人数演習形式を実施した結果、生化学、分子生物学講座教員への多大な負担をかけたが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) Ueda K, Yamada K, Urashima M, Ishibashi Y, Shirai M, Nikaido T, Takahashi H, Okamoto A, Saito M, Yasuda M, Ohkawa K, Tanaka T. Association of extracellular matrix metalloproteinase inducer in endometrial carcinoma with patient outcomes and clinicopathogenesis using monoclonal antibody 12C3. *Oncol Rep* 2007; 17(4): 731-5.
- 2) Mamori S, Nagatsuma K, Matsuura T, Ohkawa K, Hano H, Fukunaga M, Matsushima M, Masui Y, Fushiya N, Onoda H, Searashi Y, Takagi I, Tagiri H. Useful detection of CD147 (EMMPRIN) for pathological diagnosis of early hepatocellular carcinoma in needle biopsy samples. *World J Gastroenterol* 2007; 13(21): 2913-7.

- 3) Asakura T, Sasagawa A, Takeuchi H, Shibata S, Marushima H, Mamori S, Ohkawa K. Conformational change in the active center region of GST P1-1, due to binding of a synthetic conjugate of DXR with GSH, enhanced JNK-mediated apoptosis. *Apoptosis* 2007; 12(7) : 1269-80.
- 4) Mamori S, Asakura T, Ohkawa K, Tajiri H. Survivin expression in early hepatocellular carcinoma and post-treatment with anti-cancer drug under hypoxic condition. *World J Gastroenterol* 2007; 13(40) : 5306-11.

### III. 学会発表

- 1) 射谷和徳, 伊藤貴司, 今野剛人, 大川 清, 松浦知和, 阿部正彦, 酒井秀樹, 土屋好司. 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. 第46回日本生体医工学学会大会. 仙台, 4月.
- 2) 今野剛人, 伊藤貴司, 射谷和徳, 大川 清, 松浦知和, 阿部正彦, 酒井秀樹, 土屋好司, 坪根和幸. 超音波分子イメージング用ナノプローブの開発—ナノバブルの生成. 第80回日本超音波医学会. 鹿児島, 5月.
- 3) 和田あづみ, 大川 清, 都築政起. Phodopus属ハムスターに発見された行動異常を伴う淡色突然変異. 第54回日本実験動物学会総会. 東京, 5月.
- 4) 間森 聡, 朝倉 正, 大川 清, 松平 浩, 伊藤周二, 瀬嵐康之, 上竹慎一郎, 松浦知和, 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暴露の有効性の検討. 第43回日本肝癌研究会. 東京, 6月.
- 5) 大川 清. 新しい三次元培養法の確立とその応用. 第42回日本婦人科腫瘍学会学術集会. 東京, 6月.
- 6) 中田典生, 宮本幸夫, 西岡真樹子, 今野剛人, 射谷和徳, 伊藤貴司, 土屋好司, 酒井秀樹, 阿部正彦, 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. 第2回日本分子イメージング学会総会. 福井, 6月.
- 7) Tsuchiya K, Fujiwara K, Konno T, Itani K, Ito T, Matsuura T, Ohkawa K, Tsubone K, Sakai H, Abe M. Preparation of micro/nano bubbles for ultrasound contrast agents. *American Chemical Society 234th National Meeting & Exposition*. Boston, Aug.
- 8) 土屋好司, 藤原和慶, 今野剛人, 射谷和徳, 伊藤貴司, 松浦知和, 大川 清, 坪根和幸, 酒井秀樹, 阿部正彦. 超音波診断用造影剤として利用可能な微小気泡の開発 (Preparation of micro/nano bubbles for ultrasound contrast agents). 色材協会創立80周年記念会議. 東京, 9月.
- 9) Shimada Y, Takada K, Fukuda T, Ohkawa K. Characterization of ubiquitin and polyubiquitin conjugates in brains of Niemann-Pick C disease mouse (ニーマンピック病C型マウス脳におけるユビキチン及びユビキチン化タンパク質の性状解析). *The 30th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society*. Yokohama, Sept. [神経化学 2007; 46(2) : 488]
- 10) 土屋好司, 藤原和慶, 今野剛人, 射谷和徳, 伊藤貴司, 松浦知和, 大川 清, 坪根和幸, 酒井秀樹, 阿部正彦. 超音波診断用造影剤の開発に向けたマイクロ/ナノバブルの調整. 第60回コロイドおよび界面化学討論. 松本, 9月.
- 11) Konno T, Itani K, Itoh T, Tsuchiya K, Abe M, Sakai H, Matsuura T, Ohkawa K. Approach for early cancer diagnosis using targeted ultrasound contrast agents. *The Academy of Molecular Imaging and the Society for Molecular Imaging: Molecular Imaging Joint Conference*. Rhode Island, Sept.
- 12) 間森 聡, 高木一郎, 大川 清. CD147は早期肝癌のターゲティングマーカーとなり得るか? 3次元腫瘍浸潤モデルと肝生検よりの検討. 第11回日本肝臓学会大会 (JDDW 2007). 神戸, 10月.
- 13) Ueda K, Yamada K, Aoki K, Takahashi H, Urashima M, Okamoto A, Yasuda M, Ohkawa K, Tanaka T. Study of CD147 expression in endometrial carcinoma and cervical carcinoma: Correlation with clinicopathogenesis (子宮悪性腫瘍におけるCD147発現と臨床病理学的検討). 第66回日本癌学会総会. 横浜, 10月. [日癌学会総会記 2007 : 66 : 568]
- 14) 朝倉 正, 間森 聡, 青木勝彦, 松平 浩, 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の見直し. 第66回日本癌学会総会. 横浜, 10月.
- 15) 湯川豊一, 高田耕司, 嶋田洋太, 田尻久雄, 大川 清. 上皮細胞の酸化ストレス応答: 蛋白質の酸化修飾とユビキチン依存性分解系との関係. 第124回成医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2007; 122(6) : 240-1]
- 16) 江田 誉, 青木勝彦, 大川 清, 丸毛啓史. Fibroblast growth factor (FGF)-2の骨芽細胞に対する影響の検討. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 浜松, 10月.
- 17) 大川 清, 松浦知和, 土屋好司, 射谷和徳, 伊藤貴司. 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. 総合科学技術会議 科学技術連携施策群 第2回ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会 ナノバイオテクノロジーが拓くイノベーションの世界. 東京, 12月.
- 18) 朝倉 正, 間森 聡, 青木勝彦, 松平 浩, 大川 清.

- Target chemotherapy of anti-CD147 antibody-liposome encapsulated GSH-DXR conjugate on CD147-expressed carcinoma cells (CD-147 発現癌細胞に対する GSH-DXR 共役体を内包した抗 CD147 抗体-リポソームによる標的的化学療法). 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月. 日癌会総会記 2007: 66: 530]
- 19) Yukawa T, Takada K, Shimada Y, Tajiri H, Ohkawa K. Cadmium-induced protein modifications: a putative link between thiol oxidation and ubiquitination. 第 80 回日本生化学会大会. 横浜, 12 月. [Abstracts 2007; 780]
- 20) Shimada Y, Takada K, Aoki K, Ohkawa K. Purification of SDS-solubilized ubiquitin-conjugates accumulated in brains of Niemann-Pick C disease mouse. 第 80 回日本生化学会大会. 横浜, 12 月. [Abstracts 2007; 838]
- 21) Takada K, Aoki T, Iwamuro S, Shibasaki T, Ohkawa K. Purification and identification of ubiquitin-protein conjugates formed by cadmium exposure to human kidney HK-2 cells. 第 80 回日本生化学会大会. 横浜, 12 月.
- 22) Tsuji Y, Takada K, Aoki T, Shimada Y, Yukawa T, Aoki K, Iwamuro S (Toho Univ), Kato T (Waseda Univ), Ohkawa K. Cadmium stress affects the properties of STAT-6 in human kidney HK-2 cells. 第 80 回日本生化学会大会. 横浜, 12 月. [Abstracts 2007; 860]
- 23) Itani K, Itoh T, Konno T, Abe M, Sakai H, Tsuchiya K, Ohkawa K, Miyamoto Y, Matsuura T, Kukizaki M. Preparation and detection of nanobubbles: Toward ultrasonic molecular imaging. The 9th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging. Osaka, Dec.
- 24) Takada K, Aoki T, Iwamuro S (Toho Univ), Shibasaki T (Keio Univ), Ohkawa K. Purification and identification of ubiquitin-protein conjugates formed by cadmium exposure to human kidney HK-2 cells. BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会). Yokohama, Dec. [Abstracts 2007; 861]
- 25) 江田 誉, 青木勝彦, 高田耕司, 大川 清. 骨芽細胞様細胞内 TAZ タンパク質の量的減少に関わる FGF シグナル経路の解明. 第 80 回日本生化学会大会. 横浜, 12 月. [講演要旨集 2007; 383]
- 26) 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究 ナノメディシン研究成果発表会. 東京, 2 月.
- 27) 鈴木隆晴, 園田よし子, 多胡めぐみ, 笠原 忠, 朝倉 正, 大川 清. ドキソルビシンおよびグルタチオン修飾ドキソルビシンによるアポトーシスのシグナル伝達メカニズム. 第 128 回日本薬学会年会. 横浜, 3 月.

#### IV. 著 書

- 1) 高田耕司. ExPASy Proteomics tools. 中村保一(かずさ DNA 研), 石川 淳(感染研), 磯合 敦(旭硝子), 平川美夏(京大), 坊農秀雅(理化研)編. バイオデータベースとウェブツールの手とり足とり活用法: 遺伝子の配列・機能解析, タンパク質解析, プロテオミクス, 文献検索, 検索エンジン…etc. 真に役立つサイトを使い倒す! 改訂第 2 版. 東京: 羊土社, 2007. p. 181-7.