

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 (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，収束超音波利用で治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。

このプロジェクトと同時に進められた研究から 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くの細胞に少量発現するものの，癌細胞表面に特に高発現していることが判明，これを利用した超音波イメージングのみならず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。今年度は血管内皮への取り込みが低く血液滞留時間を長くすることができる高分子ミセルを利用した。GSH-DXR を内封したミセルは，ヒト類表皮癌細胞 A431，ヒト子宮内膜癌細胞 Ishikawa そしてヒト卵巣癌細胞 A2780 に対して非常に強い抗腫瘍効果を示した。そこでより効率の良い標的療法のために高分子ミセルへの抗 CD147

抗体 (aCD147ab) 標識薬剤の調整中である。また抗癌性物質として注目されている 3-ブロモビルビン酸 (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から 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殺細胞効果を発揮することが判明し，3-BrPA の殺細胞効果は低酸素環境下で増強が観察され，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。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化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。化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たい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侵潤能を中心に生化学的に解析している。EXM 耐性細胞 (Ish/EXM) は，EMT の Key 分子の E-Cadherin (Gene symbol: CDH1) の発現が完全に消失した。CDH1 の転写抑制因子分子群 Snail/2, Twist, ZEB1/2, E12/E47 のうち，Ish/EXM では ZEB1 の高発現が確認され，ZEB1 は感受性親細胞に対しても EXM 処理により速やかに発現亢進し，CDH1 発現を抑制することが判明した。

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、あるいは一部の悪性腫瘍病変でのユビキチン化蛋白質蓄積は病態への多彩な修飾が考えられる。そこで、すでに確立した生体内ユビキチン化蛋白質の精製・同定法からヒト近位尿管由来培養細胞 HK-2 に対する半致死性のカドミウム (Cd) 曝露は、難溶性ユビキチン化タンパク質の増加とりわけ転写因子 STAT6 の難溶化 (正常分子の減少) をもたらすことが判明している。そこで Cd 投与量に対応した腎皮質病変を呈する Cd 腎障害モデルマウスを作成し、腎組織中のタンパク質を分析したところ、投与量に対応した難溶性ユビキチン化タンパク質の増加と転写因子 STAT6 の性状変化が見出された。これらは培養細胞での知見を裏付けるものであり、固体レベルにおいても『細胞内タンパク質の構造的損傷』が腎細胞毒性の発現に関与すると考えられる。

III. その他

厚生労働科研・政策創薬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。本プロジェクトのアルブミン、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。本研究での我々の分担は、高分化型ヒト肝臓由来細胞株 FLC-4 (米国特許#5,804,441 保有)、FLC7-CS (完全無血清培地馴化株) 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 (FG) などの血漿蛋白の大量産生法とその精製法を開発することである。従来 HAS、FG は原料が献血者血漿由来のため惹起する未知の感染物質等の混入の危険性がない製剤開発が必要である。今年度は FG 産生に焦点をしぼり、その産生をみると FLC7-CS の従来の平板細胞が 2 $\mu\text{g}/\text{ml}/4\text{days}$ と 3 次元培養条件にもまして最高の産生量を示した。

「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、ユビキチン化蛋白質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、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) Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, Agata T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 2010; 465 (7296): 346-9.
- 2) Saito R, Ishii Y, Ito R, Nagatsuma K, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Nomoto H, Ohkawa K, Mano H, Aizawa M, Hano H, Yanaga K, Matsuura T. Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney. *Artif Organs* 2011; 35(1): 80-3.
- 3) Suzuki N, Yachiguchi K, Hayakawa K, Omori K, Takada K, Tabata JM, Kitamura K, Endo M, Wada S, Srivastav AK, Chowdhury VS, Oshima Y, Hattori A. Effects of inorganic mercury on osteoclasts and osteoblasts of the goldfish scales *in vitro*. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 2011;

56(1): 47-51.

III. 学会発表

- 1) 高田耕司, 福田隆浩, 青木勝彦, 加藤尚志, 大川 清. カドミウムの継続投与によるマウス腎臓のタンパク質の性状変化. 第 83 回日本生化学会大会. 神戸, 12 月.
- 2) 和田あづみ, 金井孝夫, 大川 清, 都築政起. *Phodopus campbelli* 由来近交系に発見された胃癌発症例. 第 108 回関西実験動物研究会. 京都, 12 月.
- 3) 青木勝彦, 飯田泰志, 山田恭輔, 高田耕司, 朝倉 正, 大川 清. 解糖系阻害剤 3-プロモビルピンの取り込みにおける MCT1-EMMPRIN 複合体の役割. 第 83 回日本生化学会大会. 神戸, 12 月.
- 4) 日下部守昭, 大川 清, 井上 循, 橋本尚詞. 近赤外蛍光標識抗テネイシン C 抗体を用いた腫瘍の生体イメージング. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 9 月.
- 5) 朝倉 正, 飯田泰志, 青木勝彦, 大川 清. Epoxomicin 耐性細胞における E-cadherin 発現消失はヒストンアセチル化による ZEB1 発現調節を介している. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 9 月.
- 6) 古市達哉, 大川 清, 池川志郎. 糖ヌクレオチド輸送体 SLC35D1 の機能不全は, マウスとヒトにおいて重度の骨格形成異常を引き起こす. 第 127 回成医会総会. 東京, 10 月.
- 7) 和田あづみ, 大川 清, 都築政起. *Phodopus campbelli* の黒色被毛突然変異体における attractin 遺伝子塩基配列. 日本遺伝学会第 82 回大会. 札幌, 9 月.
- 8) 古市達哉, 榊屋啓志, 村上智彦, 鈴木智広, 今泉和則, 大川 清, 若菜茂晴, 池川志郎. ENU ミュータジェネシスによる新規 II 型コラーゲン遺伝子 (Col2a1) 変異マウスの同定. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 帯広, 9 月.
- 9) Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Ohkawa K, Hashimoto H, Nagano T. Development of novel NIR fluorescent dyes based on rhodamine and their application for *in vivo* tumor imaging. World Molecular Imaging Congress 2010. Kyoto, Sept.
- 10) 小出裕一郎, 浦野泰照, 花岡健二郎, 寺井琢也, 日下部守昭, 大川 清, 橋本尚詞, 長野哲雄. ローダミンを母核とした新規近赤外蛍光色素の開発と *in vivo* イメージングへの応用. 第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム. 松島, 7 月.
- 11) 江田 誉, 青木勝彦, 吉松俊紀, 吉松俊一, 大川 清, 丸毛啓史. Bortezomib はプロテアソーム活性非依存的に FGF-2 の骨芽細胞分化抑制効果を阻害し骨分化を促す. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会. 東京, 7 月.
- 12) 和田あづみ, 大川 清, 都築政起. *Phodopus campbelli* から育成された新規近交系の遺伝学的基礎特性. 第 57 回日本実験動物学会総会. 京都, 5 月.

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る生理活性アミンである。細胞内ポリアミンは主に核酸と結合して存在し, 複製や遺伝子発現に必須の役割を果たすとともに, アポトーシス, オートファジー, イオンチャネルの制御にも関与する。ポリアミンは, アミノ酸を材料とする生合成と細胞外からの取り込みによって供給されるが, その両方がアンチザイム (AZ) と呼ばれるタンパク質によって負に調節される。AZ の発現には翻訳フレームシフトという特異な機構が必要であり, その効率率は細胞内ポリアミン濃度に応じて増大する。すなわち, AZ の翻訳フレームシフトは, 細胞内ポリアミンのフィードバック調節におけるポリアミンセンサーとして機能する。AZ は広く真核生物に保存され, 哺乳動物には AZ1-3 の 3 種類が存在する。さらに AZ にはアンチザイムインヒビター (Azin) という結合タンパク質が存在し, 細胞内ポリアミンを正に調節している。われわれは, これらポリアミン調節タンパク質の機能を解明し, 複雑な調節系の存在意義を明らかにするとともに, それらを利用した研究および診断ツールの開発をめざしている。

I. ポリアミン過剰摂取に対する AZ1 の防御作用

ポリアミンは正常な細胞機能に必須であり, 年齢とともにその細胞内含量が低下することから, 老化を防ぐ健康食品としての応用が試みられている。一方, ポリアミンの過剰状態は生体にとって有害であることが知られている。われわれは, これまでにノックアウトマウスを用いて, AZ1 欠損によるポリアミンの過剰が個体発生や造血系の分化の障害を引き起こすことを明らかにしてきた。今回は, AZ1 がマウス成体においてポリアミン過剰摂取に対する安全装置としての役割を果たしているかを調べる目的で飼育実験を行った。AZ1 欠損マウスおよび野生型マウスに高ポリアミン含有食 (通常食の 25 倍量) を 1 年間摂食させ, 個体, 組織の変化を解析した。その結果, 両群間の体重や寿命などに差はみられなかったが, AZ1 欠損マウスにのみ肝腫瘍の発生を