

脳腫瘍に対するヒストン脱アセチル化阻害剤と 細胞死シグナルによる新規治療法の開発

永 根 基 雄 清 水 早 紀 塩 川 芳 昭
渡 邊 卓¹ 藤 岡 保 範²

杏林大学医学部脳神経外科

¹ 杏林大学医学部臨床検査医学

² 杏林大学医学部病理学

研究成果のまとめ

脳腫瘍の代表的疾患である悪性神経膠腫 (glioma) は近年の画期的な医療の進歩にも拘らず未だ治癒率は低く、新規治療の開発が必須である。ヒストンのアセチル化の制御は DNA クロマチン構造の変化を介した遺伝子転写の調節機構として注目されており、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が様々な癌細胞で増殖抑制、分化誘導、アポトーシス誘導などの効果を持つことが最近確認され、癌治療の有効な新規分子標的剤として臨床試験を含め積極的に研究が進められている。TNF family に属する細胞死因子 TRAIL は、細胞表面に発現し細胞内ドメインに death domain (DD) をもつ特異的な受容体 DR4, DR5 と結合し、急速に腫瘍細胞に特異的にアポトーシスを誘導する。内因性の death factor である TRAIL は、腫瘍細胞に選択的に細胞死を誘導する機能から新規癌治療薬として期待されているが、glioma においては耐性を示す腫瘍もあり、その効果増強が望まれている。ともに腫瘍細胞に特異的な細胞死を誘導しうる HDAC 阻害剤と TRAIL による death receptor を介するアポトーシス誘導療法の併用により、相乗的治療効果が得られることが期待され、その効果並びに分子機序につき検討した。

研究成果

1. ヒト glioma 細胞の HDAC 阻害剤への感受性

まず最初に、HDAC 阻害剤である SAHA, Trichostatin A (TSA), SBHA がヒト glioma 細胞に対し細胞傷害効果を持つか否かを検討した。12 種類のヒト glioma 細胞株

を連続希釈系列で調整した各 HDAC 阻害剤の存在下で 72 時間培養後、細胞の生存度を MTT アッセイにて計測した。SAHA 及び TSA 治療は容量依存性に細胞傷害性を発揮し、IC₅₀ 値は SAHA で約 3-10 μ M, TSA で 0.2-0.5 μ M であった。一方、SBHA は、この濃度ではほとんど細胞傷害性が認められなかった。従って、HDAC 阻害剤はヒト glioma 細胞に対して細胞傷害活性を有すると考えられたが、阻害剤による相違も明らかとなった。

2. HDAC 阻害剤と TRAIL 或は抗 DR5 モノクローナル抗体併用療法による相乗的細胞傷害効果

次に HDAC 阻害剤と TRAIL による death signal 活性化による併用治療効果につき検討した。ヒト glioma 細胞株に対し、sublethal な濃度の SAHA, sTRAIL 或は完全ヒト型抗 DR5 モノクローナル抗体 (mAb) E11 (協和発酵キリン株式会社より無償で供与) を単独、或は併用で治療し、48 時間後に MTT アッセイにて細胞傷害度を計測した。SAHA + sTRAIL 併用により、9/12 (75%) の細胞株で相乗的殺細胞効果が認められた。また、SAHA + E11 併用によっても、E11 単独への感受性が極めて高い T98G と SF188 を除いた 10 細胞株のうち 8 株で有意に相乗的効果が認められた (図 1)。この細胞傷害効果が DR5 を介する death signal 活性化による apoptosis 亢進によるものであることを検証するため、SAHA + E11 併用療法を汎 caspase 阻害剤である z-Asp-CH₂-DCB の存在下で施行したところ、ほぼ basal level の細胞傷害度まで抑制され、本併用療法の効果は caspase 活性化により生じることが示唆された。

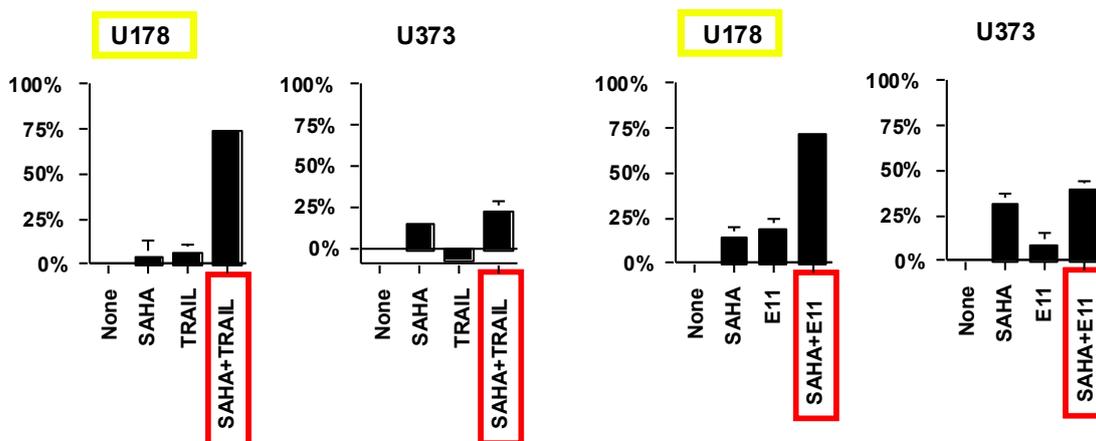


図1. Combination Treatment with SAHA and TRAIL Enhances Cytotoxicity in Human Glioma Cells

3. HDAC 阻害剤と TRAIL 経路活性化による相乗効果の分子機序

SAHA + TRAIL 療法により apoptosis が活性化されたことから、SAHA による TRAIL 経路の感受性化効果があることが予想され、次に、apoptosis 経路の各分子の発現レベルに SAHA が影響を及ぼしている可能性を Western blot 法を用いて検討した。SAHA + sTRAIL 或は E11 併用療法で相乗的細胞傷害効果がみられた U87, T98, LN229, U251, LNZ308 の各 glioma 細胞株を用いて、SAHA の治療の有無により、apoptosis 関連分子などの発現量の変化につき Western blot を行い比較した。まず、SAHA の治療により、各細胞株にて Histone H3 のアセチル化の亢進が検出され、HDAC の阻害効果が認められた。一方、他の HDAC 阻害剤である TSA 治療では、使用した濃度では Histone H3 のアセチル化はほとんど認められなかった。この条件下で、最も上流にあたる TRAIL 受容体の DR5, Caspase8, 9, 3 の各重要上流・下流 caspase, DISC に関わる adaptor 分子の FADD, ミトコンドリアを介する apoptosis に関与する Bcl-2 ファミリー分子の Bcl-2, Bak, Bcl-X_L, また、p53, p27, p16 などの細胞周期関連分子のいずれにも、その発現量に有意な変化は認められなかった。

一方、DISC に抑制的に作用する細胞内因性 apoptosis 阻害因子である c-FLIP_L の発現は、c-FLIP_L の発現が極めて少量の T98, SF188 以外のほぼ全ての glioma 細胞株で SAHA 治療により発現が減少した。しかし、ヒストンのアセチル化効果に乏しかった TSA 治療では、この濃度では c-FLIP_L の発現に影響はみられなかった(図2)。

4. ヒト glioma 細胞における c-FLIP_L 発現の TRAIL/ 抗 DR5 抗体治療感受性への関与

ヒストンのアセチル化をもたらす SAHA 治療により、apoptosis の内因性阻害因子である c-FLIP_L の発現抑制がほぼ全ての glioma 細胞株で認められたことから、SAHA + TRAIL 療法の相乗的細胞傷害効果の一因が c-FLIP_L の発現調節にある可能性が考えられ、その検証のため、以下の実験を行った。

まず、この併用療法で相乗効果が認められる glioma 細胞株の U87MG と LNZ308 株に対し、FLIP_L の siRNA を用いて c-FLIP_L の発現抑制を試みた。siRNA により c-FLIP_L の発現が減少することが Western blot にて確認された。次いで FLIP_L に対する siRNA 治療を行うと同時に sTRAIL での治療を行うと、sTRAIL 単独の場合と比較し、U138, U251 を含めた 4 種類のヒト glioma 細胞株での sTRAIL による殺細胞効果は著明に増強した。

次に、c-FLIP_L の発現が僅少である T98 及び LNZ308 細胞株に c-FLIP_L の発現ベクターを遺伝子導入し、得られた c-FLIP_L 高発現サブクローンにおいて SAHA + E11 併用療法を施行したところ、対照の空ベクターを導入したサブクローンでは親株の T98 と同様の感受性を示したのに対し、c-FLIP_L を高発現するクローンでは著明に細胞傷害性の抑制が認められた。

以上により、SAHA による c-FLIP_L の発現抑制が、SAHA + TRAIL 治療による相乗的殺腫瘍細胞効果の一因となっていることが示唆された。

5. SAHA による c-FLIP_L 発現抑制の分子機序

次に SAHA 治療により c-FLIP_L の発現が抑制される機序につき検討した。SAHA は HDAC 阻害剤であり、遺伝子の転写を阻害する作用を持つため、SAHA により c-FLIP_L の mRNA 発現が減少している可能性がまず考えられた。そこで、SAHA 治療の有無により、c-FLIP_L

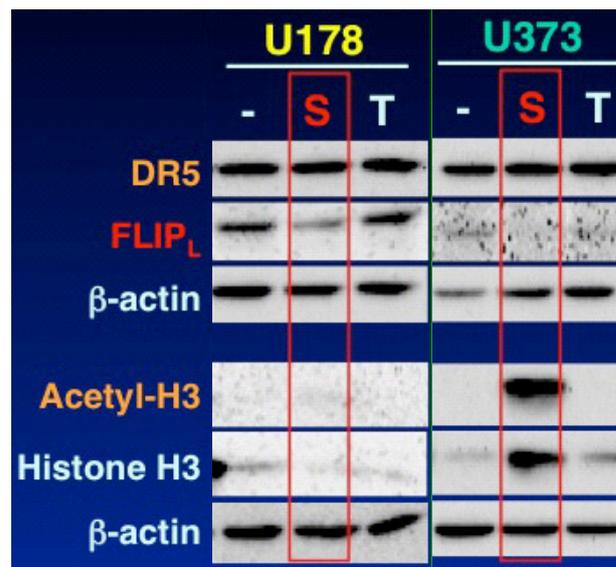


図2. SAHA Treatment Downregulates FLIP_L Expression in Most Human Glioma Cell Lines

mRNA 発現量に違いが生じていないかどうかを、semi-quantitative RT-PCR 法を用いて検証した。今回検討した U87, T98, LN229, LNZ308 の 4 細胞株の中で、LN229 と LNZ308 の 2 細胞株において、明らかな SAHA 治療に伴う c-FLIP_L mRNA 発現低下が認められた。一方、他の 2 細胞株では c-FLIP_L mRNA 発現量に有意な差は認められなかった。

次に、FLIP の発現調節は proteasome を介する蛋白分解の促進によることが報告されていることから、SAHA による proteasome 機構の機能亢進が生じ、その結果、c-FLIP_L 発現レベルの低下が惹起される可能性も考えられる。しかし、U87 及び LNZ308 細胞株では、ともに proteasome 阻害剤である MG132 の存在下で SAHA による c-FLIP_L 発現抑制に変化は認められず、proteasome を介する蛋白分解の亢進が関与する可能性は低いと考えられた。

更に、細胞内転写因子である STAT3 の活性が HDAC 阻害剤により抑制される可能性が報告されていることから、U87, U138, U251, LNZ308 細胞株を用いて、SAHA 治療による STAT3 のリン酸化状態への影響を Western blot 法にて検討した。その結果、U138 と LNZ308 では SAHA 治療により STAT3 の活性化型であるコドン 705 の tyrosine のリン酸化が減少することが明らかになった。

以上より、SAHA による c-FLIP_L 発現抑制作用には、SAHA による c-FLIP_L の転写阻害効果ならびに STAT3 を介した発現制御が関与している可能性が示唆され、今後その詳細を検討することが必要と考えられた。

6. SAHA + 抗 DR5 抗体併用療法による抗腫瘍効果

最後に in vitro で明確に認められた HDAC 阻害剤である SAHA と TRAIL 療法の併用による相乗的細胞傷害効

果が in vivo においても認められるかどうか、ヌードマウスでの担腫瘍モデルを用いて検証した。ヌードマウスの皮下にヒト glioma 細胞株の U87 或は LNZ308 を移植し、皮下腫瘍を形成させた。その後、SAHA 単独、E11 単独、SAHA + E11 併用、vehicle 対照の 4 群に分けて腹腔内投与にて治療を行った。投与した治療容量では、単独治療での治療効果は対照の vehicle 治療とほとんど変わらず、明らかな腫瘍増大抑制効果は認められなかったが、同量の併用治療では、治療後に腫瘍の縮小が認められ、その後も無治療対照群、SAHA 或は E11 単独治療群と比較して明らかに腫瘍増大が遅延する結果が認められた。従って、in vivo においても、本併用療法は抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

結論

以上の結果より、HDAC 阻害剤はヒト glioma 細胞株に対し腫瘍細胞傷害効果を持ち、特に悪性リンパ腫などに対する臨床試験でも既に使用されている SAHA は、ヒストンのアセチル化を阻害し、腫瘍細胞死を誘導する TRAIL 治療と相乗的に細胞傷害効果が増強することが明らかとなった。その効果は、主として SAHA による細胞内の内因性 apoptosis 阻害因子である c-FLIP_L の発現抑制作用と関連があり、SAHA による c-FLIP_L mRNA 発現抑制効果ならびに STAT3 活性化の阻害作用と相関が認められ、その機序の一因となっている可能性が考えられた。更に、in vivo においても、SAHA と TRAIL 治療の相乗的腫瘍増殖抑制効果が認められたことから、本併用療法は、未だ難治性・致命的である悪性神経膠腫に対する新規治療法として期待される。今後、更なる検証を重ね、preclinical な動物実験での検証を計り、臨床試験が行われることを期待したい。

新規ヒト 2 型糖尿病モデル動物 (Sendai Rat) を用いた糖尿病発症の解明

永松 信哉

杏林大学医学部生化学

本研究においては、GFP にて標識したインスリン分泌顆粒が細胞膜と docking そして fusion に至る過程をイメージ出来るシステム、すなわち TIRF (全反射照明蛍光顕微鏡) 解析装置を用いて、インスリン開口放出の分子機構、及び糖尿病モデルラットを用いたインスリン分泌不全部位の同定を試みた。

1. ブドウ糖刺激インスリン分泌の分子機構の解明

ブドウ糖刺激によるインスリン分泌第一相の多くは、もともと形質膜に結合しているインスリン顆粒 (previously docked granules) の fusion によって構成されていて、この fusion の trigger は、膜直下における Ca^{2+} 濃度の変動によってなされているのではないかと、この作業仮説のもと、細胞内 Ca^{2+} 濃度は FURA2 を用いた解析にて、及び膜直下における Ca^{2+} 濃度の経時的変化は FURA-red を用いた TIRF 解析にて行い、並びにそれらの変動とインスリン顆粒の動態を詳細に解析した。その結果、膜直下の Ca^{2+} 濃度の変動が大きい部位において、previously docked granules の fusion が頻繁に起こることが明らかとなった。

2. 糖尿病ラットを用いた解析

国立国際医療センター研究所ヒト型動物開発研究室室長である岡村博士らが開発した新規インスリン分泌低下型糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットにおけるインスリン分泌の動態解析を行った。このラットの 8 週齢、24 週齢、48 週齢のグルコーストレランステスト及びインスリン分泌反応を *in vivo* にて検討したところ、年をとるにつれ、ゆっくりと耐糖能が悪化してきた (図 1)。次に、14 週齢のラ氏島を用いて *perifusion* を施行したところ、SENDAI ラットラ氏島からのインスリン分泌能が第一相、二相ともに低下しており (図 2)、これが原因で耐糖能が悪化したことが予測された。しかしながら、SENDAI ラットはヒト 2 型糖尿病とは異なり、この週齢においても、まだ第一相からのインスリン分泌が観察された。

次に、TIRF システムを用いてインスリン顆粒の動態を観察したところ、SENDAI ラットでは膜結合型インスリン顆粒数が著減していたにも関わらず、軽度ながらの第一相分泌がみられ、従来のヒト 2 型糖尿病モデルラットである GK ラットにおけるインスリン分泌不全機構とは、その分子機構が異なっている可能性があり、今後更なる追求が必要である。

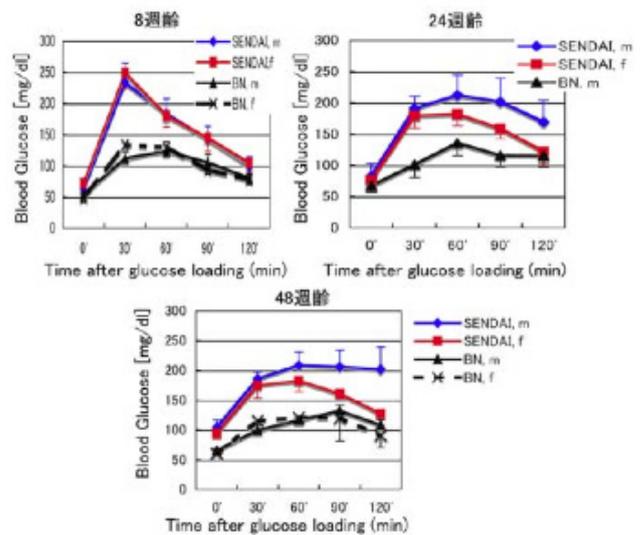


図 1

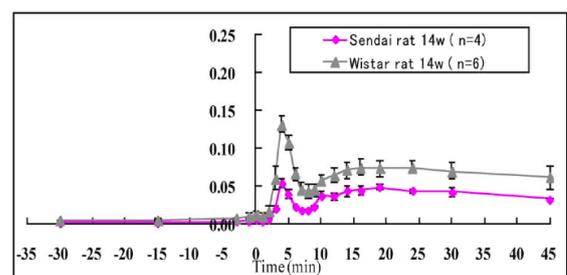


図 2

糖尿病合併症に伴う O-GlcNAc 修飾タンパク質の変化と 糖転移酵素の役割に関する研究

秋 元 義 弘

杏林大学医学部解剖学

糖尿病性合併症の発生機序の一つとして、ヘキソサミン代謝が重要であることが近年明らかになってきた (Diabetes 54: 1615-1625, 2005, Nature 414: 813-820, 2001, 446: 1017-1022, 2007)。高血糖ではヘキソサミン代謝の亢進によって、その代謝経路の最終産物である UDP-GlcNAc が増加し、これを基質として、タンパク質への O-グリコシド結合型 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) の修飾が増加する。O-GlcNAc は核および細胞質内のタンパク質のセリンまたはスレオニン残基に N-アセチルグルコサミンが 1 個だけ結合した糖の修飾であり、タンパク質のリン酸化の制御に関与している。

本研究では、糖尿病合併症に伴う O-GlcNAc 修飾タンパク質の変化と糖転移酵素の役割を調べることを目的に、インスリン非依存性 (2 型) 糖尿病モデル動物の Goto-Kakizaki (GK) ラットを用い、膵臓、網膜、腎臓、神経における糖尿病性合併症に伴う O-GlcNAc 修飾タンパク質の変化を解析し、O-GlcNAc 転移酵素の役割について検討した。さらにインスリン分泌に重要なタンパク質である PDX-1 に注目し、その O-GlcNAc 修飾の変化を解析し、インスリン分泌における O-GlcNAc の役割について検討した。

糖尿病モデル実験動物の組織における糖尿病による O-GlcNAc 化タンパク質の変化

2 型糖尿病モデル GK ラット (15 週齢, 雄) および正常 Wistar ラット (対照) の膵臓、網膜、腎臓、神経組織を用いて、Total tissue homogenate を SDS 電気泳動後、O-GlcNAc に対するマウスモノクローナル抗体 (CTD110.6) を用いて O-GlcNAc の修飾が変化するタンパクを調べた。

その結果、糖尿病 GK ラットの膵臓、坐骨神経、腎臓、網膜では O-GlcNAc 化タンパク質の発現の増加が観察された (図 1)。図 1 に示すように、対照と比較して糖尿病ラットの膵臓では 9 個のバンド、坐骨神経では 6 個のバンド、腎臓では 7 個のバンド、網膜では 5 個のバンドで O-GlcNAc 化タンパク質の増加が観察された。

膵臓ランゲルハンス島における O-GlcNAc 化タンパク質と O-GlcNAc 転移酵素の局在に関する免疫組織化学的検討

糖尿病ラット膵臓のランゲルハンス島では、線維性間質が出現し、線維化した組織像を呈する。免疫組織化学的解析より、O-GlcNAc 化の抗体および O-GlcNAc 転移酵素の抗体に対する反応は、膵臓の外分泌腺とランゲルハンス島のいずれにも観察された。その反応は主に核に局在し、また細胞質にも弱い反応が認められた。正常ラットと比較して糖尿病 GK ラットでは、O-GlcNAc および O-GlcNAc 転移酵素の染色性の増強が観察された。これに対して、インスリン抗体に対する染色性に有意な変化は認められなかった。

糖尿病ラットにおけるホメオドメイン転写因子 (PDX-1) の O-GlcNAc 修飾の上昇

糖尿病ラットにおいて変化の認められた O-GlcNAc 化タンパク質の中で、Immunoblot 法により、インスリン合成に関与するホメオドメイン転写因子である PDX-1 を同定することができた。この PDX-1 は糖尿病ラットにおいて O-GlcNAc 化が顕著に上昇した。このことからタンパク質の O-GlcNAc 化とインスリン分泌とが密接に関係することが示唆された。

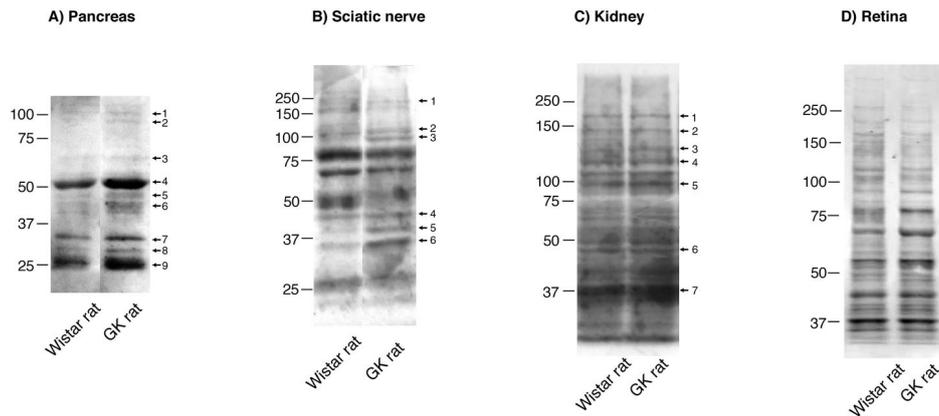


図1 糖尿病モデル動物 (GK ラット, 15 週齢, 雄) の (A) 膵臓, (B) 坐骨神経, (C) 腎臓, (D) 網膜における *O*-GlcNAc 化タンパク質の変化。レーンの右に番号を記したバンドに, 有意な増加が観察された。

O-GlcNAcase の阻害剤を用いた細胞内における *O*-GlcNAc 化の役割の検討

タンパク質の *O*-GlcNAc 化の上昇とインスリン分泌との関係を明らかにするため, 単離ランゲルハンス島を *O*-GlcNAc の修飾をはずす *O*-GlcNAcase の阻害剤, PUGNAc 存在下で培養した。その結果, PUGNAc 存在下ではタンパク質の *O*-GlcNAc 化がさらに上昇し, それに伴いグルコース刺激によるインスリン分泌が減少することが明らかになった (図2)。

O-GlcNAc 酵素の発現を阻害する RNAi による *O*-GlcNAc 転移酵素の役割の検討

O-GlcNAc 転移酵素の発現を阻害する RNAi 法を用いて, インスリン分泌における *O*-GlcNAc 転移酵素の役割について検討した。RNAi 法により MIN6 細胞を siRNA 存在下で培養したところ, *O*-GlcNAc 転移酵素の発現が阻害され, タンパク質の *O*-GlcNAc 化が減少した。またそれに伴いグルコース刺激によるインスリン分泌が減少することが明らかになった。

以上のことより, *O*-GlcNAc 化の異常が, 糖尿病合併症の一つの原因になっていることが明らかとなった。今後, グライコпротеオームによりマーカータンパク質を検索し, さらに *O*-GlcNAc 転移酵素や *O*-GlcNAcase の活性を阻害する阻害剤や RNAi 法を用いた実験により, 糖尿病性合併症の診断, 予防への臨床応用の基礎となるデータを得ることが課題である。

(上記の内容は, *Glycobiology* 17: 127-140, 2007にて発表した。)

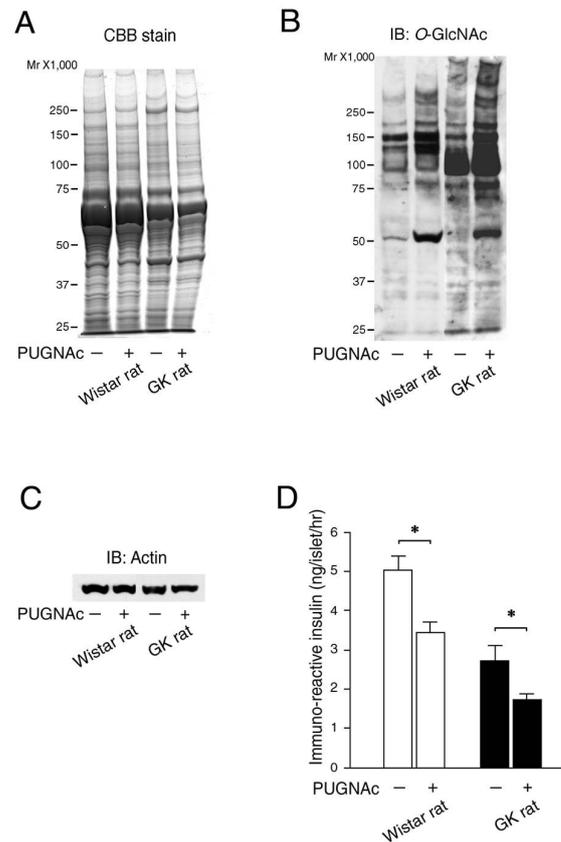


図2 単離ランゲルハンス島を *O*-GlcNAcase 阻害剤 PUGNAc 存在下で培養すると, *O*-GlcNAc のレベルが上昇し, グルコース刺激によるインスリン分泌が減少する。(A) 電気泳動した総タンパク質の CBB 染色像, PUGNAc 処理群と無処理群とではほとんど差が認められない。(B) *O*-GlcNAc のイムノプロット, (C) β -actin のイムノプロット. (D) 培養単離ランゲルハンス島におけるグルコース刺激によるインスリン分泌. データ: means \pm SEM (n=6). (白抜き) Wistar ラット, (黒抜き) GK ラット. *, $p < 0.05$.

胆管癌発癌・進展機構に関する分子生物学的解明 —癌特異的発現蛋白 HMGA1 発現検討を中心に—

阿 部 展 次 杉 山 政 則 跡 見 裕

杏林大学医学部外科学

研究の背景

胚発生に必須の役割を担っている非ヒストン DNA 結合蛋白 High Mobility Group A (HMGA: HMGA1, HMGA2) は、特異な DNA binding domain を有し様々な遺伝子の転写に関与することで細胞の悪性形質転換に深く関与している。我々は、大腸癌、膵癌、悪性膵管内乳頭腫瘍などで HMGA の特異的過剰発現が認められること、その発現レベルは多段階発癌とパラレルな関係にあることを明らかにしてきた¹⁻⁶⁾。また、HMGA1 antisense を発現させる adenoviral vector を用いた研究 (in vitro, in vivo) により、HMGA1 蛋白合成抑制は著明な膵癌細胞増殖抑制効果につながることを証明した⁷⁾。我々の一連の研究結果は、HMGA が様々な臓器・組織における発癌機構に決定的な役割を担っていることを強く示唆するものである。一方、胆管癌は有効な化学療法もない難治性消化器癌の一つであり、その発生・進展に関する分子生物学的機構もほとんど未知である。

研究の目的

多段階発癌過程が強く推察されている肝内結石を背景とした種々の肝内胆管異型性病変 (過形成性病変, 軽度異型性病変, 高度異型性病変, 上皮内癌, 浸潤癌) において HMGA1 の発現を検討し, HMGA1 発現という側面から胆管癌発生・進展の分子生物学的機構の一端を明らかにする。

対象と方法

肝内結石症を背景とした胆管上皮性病変 23 病変を検討対象とした。23 病変の内訳は, 過形成 5 例, 軽度異型性病変 5 例, 高度異型性病変 5 例, 上皮内癌 4 例, 浸

潤癌 4 例。パラフィン包埋切片にて, HMGA1 発現を免疫組織化学的に検討した。ランダムに抽出した領域において, 20% 以上の核濃染が認められたものを陽性とした。

結果

過形成性病変, 軽度異型性病変, 高度異型性病変, 上皮内癌, 浸潤癌 (図 1) における各々の HMGA1 発現陽性率は, 60%, 40%, 80%, 78%, 78% であり, 高度異型性病変から浸潤癌の陽性率 (77%) は, 過形成から軽度異型性病変の陽性率 (30%) に比べ有意 ($p=0.039$) に高率であった。

考察, 結論

高度異型性病変から浸潤癌では, 過形成から軽度異型性病変に比べ高率に HMGA1 が強発現しており, 他の消化器癌と同様, 肝内結石症を背景とした種々の異型性病変においても HMGA1 発現が多段階発癌あるいは癌進展に深く関与している可能性が示唆された。また, 一部の過形成病変においても HMGA1 発現を認めていたことより, 肝内結石症を背景とした上皮では比較的早い段階から malignant transformation が起こりえることも推察された。以上より, HMGA1 発現は肝内結石症での malignant Transformation の獲得時期の指標として重要な役割を持つと考えられる。

参考文献

- 1) Abe N, Watanabe T, Sugiyama M, et al. Determination of high mobility group I(Y) expression level in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker. *Cancer Res* 15:1169-1174, 1999.
- 2) Abe N, Watanabe T, Masaki T, et al. Pancreatic duct cell

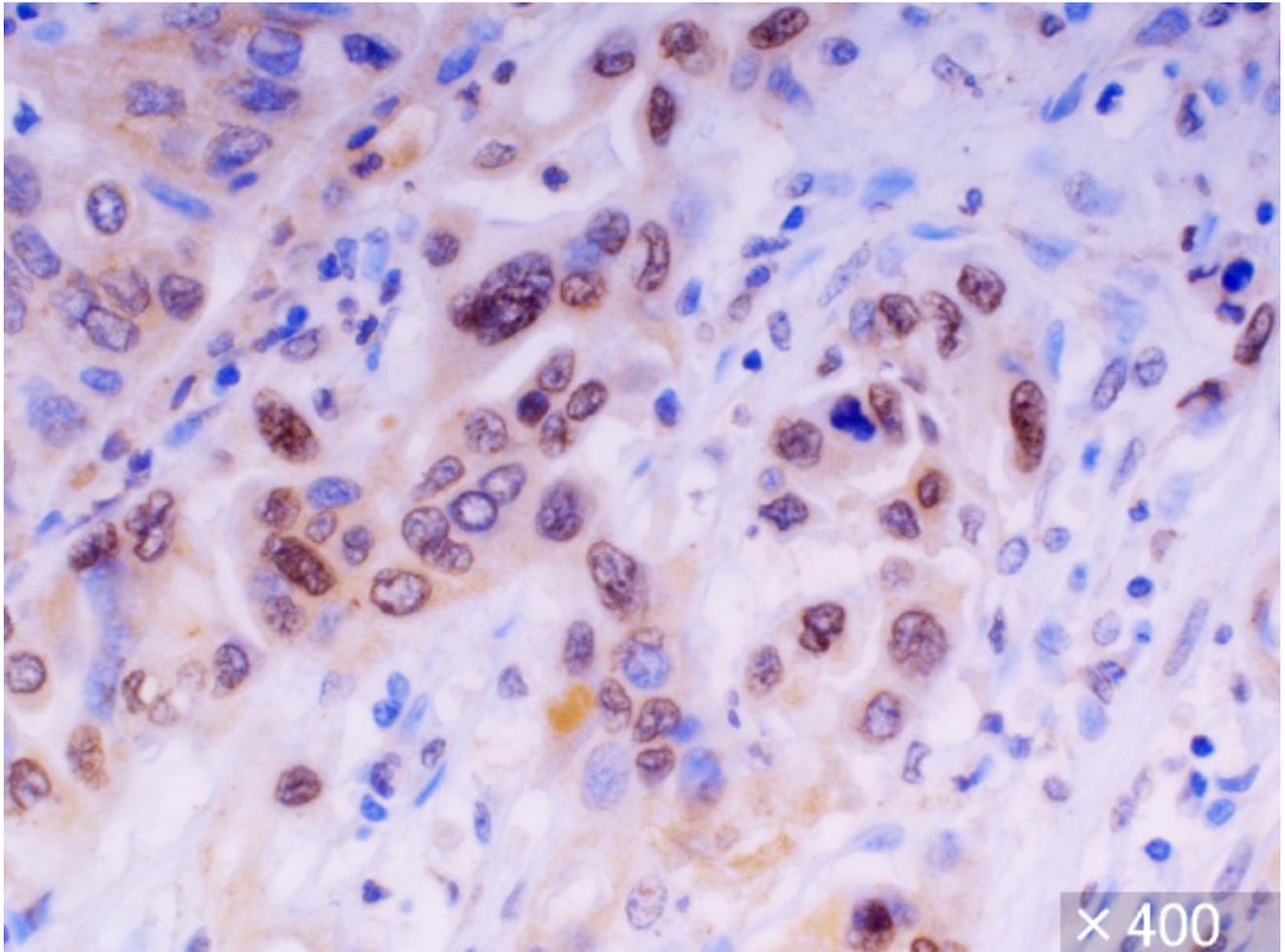


図1. 浸潤癌における HMGA1 発現。腫瘍核において濃染像が認められる。

carcinomas express high levels of high mobility group I(Y) proteins. *Cancer Res* 15:3117-3122, 2000.

- 3) Chiappetta G, Manfioletti G, Pentimalli F, et al. High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases. *Int J Cancer* 15:147-151, 2001.
- 4) Abe N, Watanabe T, Izumisato Y, et al. Diagnostic significance of high mobility group I(Y) protein expression in intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *Pancreas* 25:198-204, 2002.
- 5) Abe N, Watanabe T, Suzuki Y, et al. An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *Br J Cancer* 89:2104-2109, 2003.
- 6) Abe N, Watanabe T, Izumisato Y, et al. High mobility group A1 is expressed in metastatic adenocarcinoma to the liver and intrahepatic cholangiocarcinoma, but not in hepatocellular carcinoma: its potential use in the diagnosis of liver neoplasms. *J Gastroenterol* 38:1144-1149, 2003.
- 7) Trapasso F, Sarti M, Cesari R, et al. Therapy of human pancreatic carcinoma based on suppression of HMGA1 protein synthesis in preclinical models. *Cancer Gene Ther* 11:633-641, 2004.

腎尿細管管腔側プロスタグランジン・シグナル機構を構成する 輸送分子複合体の解明

安 西 尚 彦

杏林大学医学部薬理学

研究目的

プロスタグランジンは腎臓において、血管トーンスの調節、水・電解質輸送の調節、そしてレニン分泌の調節に重要な役割を果たしている。腎臓で最も多く産生されるプロスタグランジンは PGE_2 であり、これは細胞内の合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) により産生され、細胞外に出て、膜表面にあるレセプターに作用し、作用後は再び細胞内に取り込まれ分解される。このようにプロスタグランジンはオートコイドとして局所で作用するが、酵素である COX 活性の調節によって産生量を変化させることでその作用を決定している。プロスタグランジンは構造上カルボン酸を持ち、生理的 pH ではアニオンに分類されるためプロスタグランジンの細胞膜通過には膜トランスporterが必要となる。

腎臓の COX には構成型の COX-1 と、炎症や塩分食・ホルモン刺激に反応する誘導型の COX-2 があり、COX-1 は腎臓内において糸球体や髄質血管、および集合管に広く分布するのに対し COX-2 は主にマクラデンサを含む皮質部 Henle ループの太い上行脚に限局するとされる。これらの COX により産生されたプロスタグランジンは COX-1 存在部位では、SLCO に分類されるユビキタスな発現を示すプロスタグランジントランスporter PGT1 が細胞膜輸送に関与するが、COX-2 の存在する部位では未だその責任分子は同定されていなかった。我々はこれまでに腎臓の有機アニオントランスporter SLC22 ファミリー遺伝子の同定を行ってきたが、最近この COX-2 発現部位に存在し、従来のプロスタグ

ランジントランスporter PGT1 とは構造的に異なる SLC22 に属する、新規腎特異的プロスタグランジントランスporter OAT-PG の同定に成功した (Anzai *et al.*, *J Pharmacol Sci*, 100: 111P, 2006)。

これまでの検討で OAT-PG がプロスタグランジンの中でも PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 を選択的に運ぶこと、またマクラデンサを含む皮質部 Henle ループの太い上行脚から遠位尿細管にかけての管腔側膜に存在することを我々は明らかにした (Anzai *et al.*, *J Pharmacol Sci*, 100: 111P, 2006)。 PGE_2 のレセプターである EP4 が同部位の管腔側膜に存在していることも同時に確認されたことから、我々は OAT-PG が COX-2 により産生された PGE_2 を尿細管中に排出し、管腔側の EP4 に作用して同部位での Na^+ 輸送調節を行うという、腎尿細管管腔側プロスタグランジン・シグナル系の構成因子ではないか、という可能性を見出すに至った。

また我々はこれまでに、腎尿細管管腔側膜に発現する多くの有機溶質トランスporterは、タンパク質間相互作用に関与する PDZ 相互作用により、細胞内の支持タンパク質と結合し、膜状に発現し機能することを報告している (Anzai *et al.*, *J Biol Chem*, 2004; Miyazaki *et al.*, *J Am Soc Nephrol*, 2005; Noshiro *et al.*, *Kidney Int*, 2006)。興味深いことに、OAT-PG はその細胞内 C 末端に T-E-C という PDZ motif を持ち、また EP4 は K-C-I という PDZ motif を持っており、両膜タンパク質が共通の細胞内 PDZ タンパク質により管腔側膜で束ねられ、COX-2 による産生から始まるプロスタグランジンを介したシグナ

ルの効率的な伝達に寄与していることが強く推測された。

そこで我々は本研究でプロスタグランジントランスポーター OAT-PG を中心として, EP4 および COX-2 を束ね, ユニットとしての作用を可能にする細胞内因子の同定を行い, それらの OAT-PG 輸送機能への影響, 膜移行機序の変化を調べることにより, プロスタグランジンの経細胞膜輸送に関わる分子複合体を明らかにすることを目的とする。

研究方法と結果

1. OAT-PG C 末端に対する結合タンパク質の同定

OAT-PG C 末端のアミノ酸配列は T-T-E-C であり, PDZ モチーフに分類される。そこで細胞内 C 末端配列を持つベクトルを作成し, 腎臓 cDNA ライブラリーをプレイとする酵母ツーハイブリッド法を行った。

その結果, 結合タンパク質の候補として 4 つの PDZ ドメインを持つ支持タンパク質である CIPP (channel-inetracting PDZ domain protein) の同定に成功した(未発表)。

2. CIPP との結合における OAT-PG C 末端 PDZ モチーフの役割

この最後の 3 アミノ酸残基の欠損変異体 ($\Delta 3$) と, 2 箇所

T552A,C554A) を作成し, CIPP 全長プレイベクターとの結合性を酵母 Two-hybrid assay を用いて検討した。

その結果図 1 で示されたように, C 末端の 3 種の変異体において, CIPP との結合が失われたことから, OAT-PG と CIPP との結合には CIPP C 末端の PDZ モチーフが重要であることが確認された。

	C terminal	LEU2	GFP
OAT-PG-CTwt	L E T T E C*	+	+
OAT-PG-CTd3	L E T*	-	-
OAT-PG-C554A	L E T T E A*	-	-
OAT-PG-T552A	L E T A E C*	-	-

図 1

考察

OAT-PG の細胞内結合タンパク質 CIPP は 4 つの PDZ ドメインを持つことから, OAT-PG と他のタンパク質 (例えば膜受容体) をつなぐ役割が想定される。今後 EP4 と CIPP の結合を解析する事で, 腎尿細管管腔側プロスタグランジン・シグナル系の構成因子解明の端緒となることが期待される。

インスリン分泌顆粒細胞内トラフィックの可視化解析

今 泉 美 佳

杏林大学医学部生化学

膵β細胞内インスリン顆粒の貯蔵から fusion までの細胞内トラフィックを明らかにする目的で、Variable TIRF(VTIRF) 顕微鏡 (evanescent 場を任意に調節可能な顕微鏡) を開発し、GFP 標識顆粒の時間空間的動態解析を行い、以下の点を明らかにした。

(1) β細胞におけるインスリン顆粒には形質膜上に docking している顆粒 (previously docked granules) のプールと、形質膜から約 500nm 内部に存在する細胞質内顆粒プールの少なくとも 2つの顆粒の貯蔵プールが存在していた。高グルコース刺激による分泌第 1 相は、前者の貯蔵プールからの顆粒の fusion により構成され、一方、分泌第 2 相は後者の貯蔵プールから形質膜へ移動してきた顆粒 (newcomers) の docking/fusion (<50 ms) から構成されていた。さらに細胞質内貯蔵プールから形質膜への移動にはアクチンの関与が示唆された。このように VTIRF 顕微鏡は特に 2 相目のインスリン分泌の解明に非常に有用なシステムである (Proc. SPIE, 2006)。

(2) 分泌第 1 相における顆粒の fusion 部位は Syntaxin1A (Synt1A) の局在と一致したが、第 2 相では Synt1A とは異なる部位で fusion が観察された。Synt1A 欠損マウスから調製した β細胞では第 1 相を担う previously docked granules が激減し、そこからの fusion が見られなかったが、第 2 相での newcomers の fusion は wild type と同様に観察された。Synt1A 欠損 β細胞に Synt1A をアデノウイルスを用いて発現させると、previously docked granules の数が正常値まで回復すると共に、分泌第 1

相が回復した。このように、インスリン分泌第 1 相は Synt1A 依存性であり、第 2 相は Synt1A 非依存性であることから、分泌第 1 相と第 2 相におけるインスリン開口放出は共通のメカニズムではなく、空間的にまた関与する分子が異なる機構であることを明らかにした (図 1) (J. Cell Biol., 2007; Science 2007)。

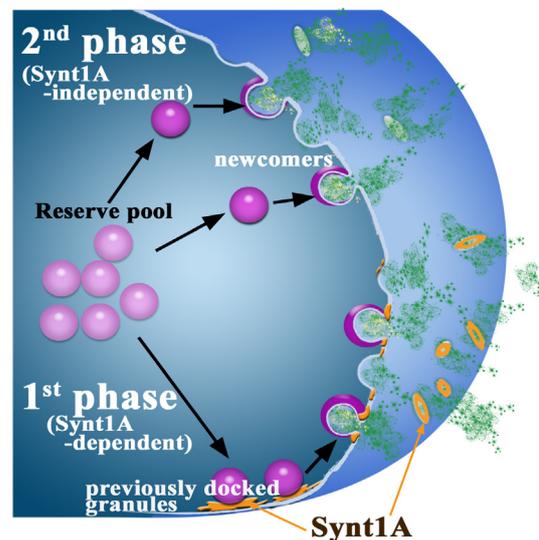


図 1. 分泌第 1 相と第 2 相のインスリン開口放出機構は異なっている (2 相性インスリン開口放出機構のモデル図) 分泌第 1 相ではインスリン顆粒はシンタキシン (Synt1A) クラスタ上にドッキングし、フュージョンする。分泌第 2 相では、分泌顆粒が細胞内部の貯蔵部位より形質膜上へ移動し、Synt1A クラスタとの相互作用なしに形質膜とフュージョンする。

(3) 膵β細胞は膵ラ氏島の中で凝集して存在しており、そのβ細胞同士のコミュニケーションがインスリンの basal 分泌を低下させ、グルコースによって刺激されるインスリン分泌をより増加させることが知られているが、そのメカニズムは不明であった。私達は EphA と ephrinA の両方がβ細胞に発現しており、EphA-ephrinA シグナルがインスリン分泌を促進・抑制の両方向に調節していることを見出した。すなわち、EphA forward シグナルは分泌を抑制し、一方、ephrin-A reverse シグナルは分泌を促進する。高グルコース下では EphA forward シグナルが downregulation されたことから、低グルコース下では EphA forward シグナルが優勢となり分泌は抑制方向に、高グルコース下では ephrin-A reverse シグナルが優勢となり分泌は促進方向に調節されることを明らかにした (Cell, 2007)。

発表論文

- 1) Wakazono, Y., Sakurai, T., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu S., Yamamoto, S., Terakawa, S.: Intracellular dynamics observed by mode switching of microscope with a light incidence to the interface at alternate angles through the ultra high NA objective. Proc. SPIE. 6088: 449-454, 2006.
- 2) Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara T., Nakamichi Y., Okamura T., Akimoto Y., Kawai J., Matsushima S., Kawakami H., Watanabe T., Akagawa K. and Nagamatsu S. : Imaging analysis reveals mechanistic differences between first- and second-phase insulin exocytosis. J. Cell Biol. 177: 695-705, 2007
- 3) Nagamatsu S., Ohara-Imaizumi, M., Cell biology. IP7 debut in insulin release Science. 318:1249-50, 2007.
- 4) Konstantinova, I., Nikolova, G., Ohara-Imaizumi, M, Meda, P., Kucera, T., Zarbalis, K., Wurst, W., Nagamatsu S., Lammert, E.: EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. Cell. 129:359-370, 2007.

Cell Track Prep システムを用いた末梢血循環前立腺癌細胞検査の 臨床応用の可能性

桶 川 隆 嗣

杏林大学医学部泌尿器科学

目的

循環癌細胞 (Circulating Tumor Cells ; CTC) 検出方法を大きく分けると分子生物学的手法と形態学的検出法がある。前者は血液中から mRNA を抽出し癌細胞に特異的発現する遺伝子を増幅する RT-PCR 法やマイクロアレイなどで検出する方法がある。RT-PCR 法では検出した核酸の由来が不確定なこと、癌細胞形態が崩壊し、脱核・変形をしたフラグメントを検出してしまう問題点が指摘されていた。後者は抗 PSA 抗体などを用いた免疫学的手法によりリンパ節、骨髄の微小転移検出に用いられていた。最近、自動的に CTC を検出するシステムが開発された Cell Track Prep システムを用いて CTC と前立腺癌の再発・予後との関係を検討した。

方法・対象

血液 10 mL を採血して、CellSave 検体保存チューブに保存後、コニカルチューブに移し (7.5mL)、セルサーチシステムの機器 CellTracks[®] オートプレップにセットする。CellTracks[®] オートプレップでは、ナノ鉄粒子に上皮細胞接着分子である EpCAM に対する抗体を結合された磁性粒子 (フェロフルード) により血液中の多くの細胞から特異的に上皮細胞を分離・抽出する。分離された上皮細胞に蛍光標識したサイトケラチンモノクローナル抗体を反応させると共に蛍光性の DNA 染色物質 DAPI で細胞の核を染色する。混入した白血球を CTC と識別するために、同様に蛍光標識した CD45 抗体を反応させる。CTC の反応溶液は、セルサーチシステムの機器 CellTracks[®] アナライザー II で解析する。マグネストに組込まれた磁石の発する磁力によりフェロフルードに捉えられた CTC がカートリッジ上面に移動する。DAPI で染色された核とサイトケラチン抗体で蛍光染色された

細胞の形態と CD45 抗体には反応しないことから、検出された細胞が CTC であると同等できる。(図 1)¹⁾

対象は前立腺癌 156 症例 (治療骨転移 80 症例と内分泌療法抵抗性骨転移 76 症例) とした。

結果

未治療骨転移前立腺癌症例における PSA 再燃予測

80 症例の未治療骨転移前立腺癌症例の CTC と再燃の関係を検討した²⁾。治療開始時に血液 7.5mL 中の CTC 数が 5 個以上であった患者の中で治療開始後も 5 個以上であった患者の再燃期間の中央値は 18 ヶ月で、治療開始時より血液 7.5mL 中の CTC 数が 5 個未満だった症例の再燃期間の中央値 (32 ヶ月以上) との間に有意差が認められた。

内分泌療法抵抗性前立腺癌患者の生存予測

内分泌療法抵抗性骨転移前立腺癌 76 症例の CTC と予後との関係を検討した。測定時の血液 7.5mL 中の CTC 数が 5 個以上であった患者の OS の中央値は 13 ヶ月で、CTC 数が 5 個未満だった患者の OS の中央値 (20 ヶ月) との間に有意差が認められた³⁾。測定時に CTC 数が 5 個以上であった症例が治療により CTC 数が 5 個未満になった場合、OS の中央値は 12.2 ヶ月から 45 ヶ月以上と改善し、反対に CTC 数が 5 個未満であったが治療中 5 個以上になった場合は、OS の中央値は 47 ヶ月以上から 24.3 ヶ月と不良であった。(図 2)

考察

未治療骨転移前立腺癌症例において治療開始時さらに治療中も CTC 数が 5 個以上の症例では 5 個未満だった症例と比較して再燃期間が有意に短かった (18 ヶ月 vs 32 ヶ月以上)。治療前の CTC は内分泌治療奏効期間

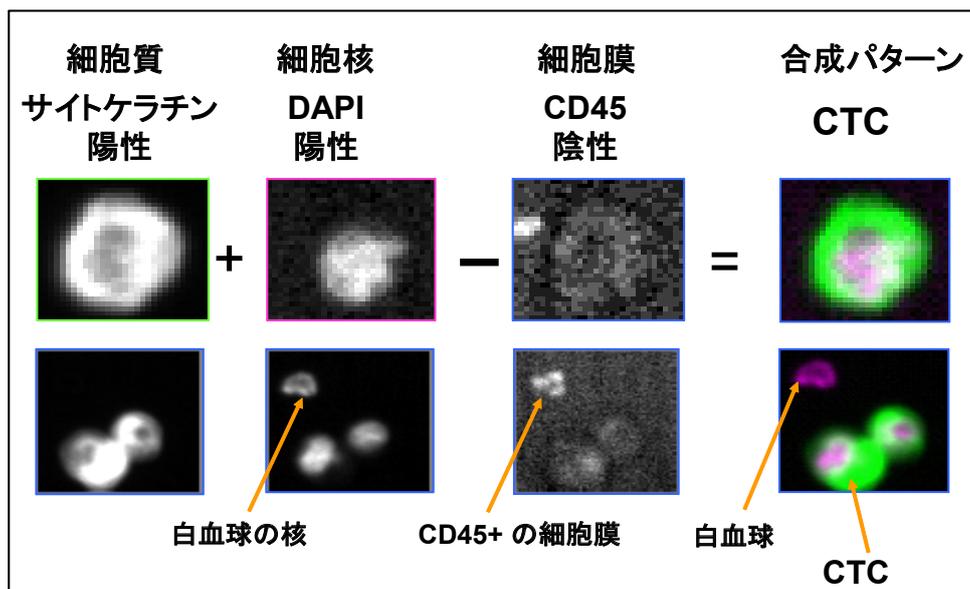


図1 CTC検査の測定

の予測が可能であり早期に治療方針の変更が可能であることが示唆された。

内分泌療法抵抗性骨転移前立腺癌症例において CTC 数が 5 個以上であった患者の OS は 5 個未満だった患者より有意に予後不良であった (13 ヶ月 vs 20 ヶ月)³⁾。また治療経過中に CTC 数が 5 個以上が 5 個未満になった場合、OS の中央値は 12.2 ヶ月から 45 ヶ月以上と改善した。CTC 数が 5 個未満であったが治療中 5 個以上になった場合は、OS の中央値は 47 ヶ月以上から 24.3 ヶ月と不良であった。Scher らは複数国間において、内分泌療法抵抗性骨転移前立腺癌患者を対象に行われた前向き多施設共同臨床試験を行った。内分泌療法抵抗性骨転移と診断されて PSA 高値で ECOG (米国東海岸癌研究会の診断基準) スコアが 0~2 の初回化学療法または救援化学療法及び (または) 併用療法を開始する 276 症例を対象に行われた⁴⁾。治療開始時に血液 7.5mL 中の CTC 数が 5 個以上であった患者の中で治療開始後 2~5 週の時点で 5 個未満に減少した患者の全生存期間の中央値 (20 ヶ月以上) は、5 個以上に留まった患者の中央値 (9.3 ヶ月) よりも有意に長く、治療開始時に血液 7.5mL 中の CTC 数が 5 個未満だった患者の中央値 (20 ヶ月以上) との間に有意な差は認められなかった。診断時の病期、年齢、ECOG スコア、PSA 等を組み入れた多変量分析において、CTC の測定は最も有用性の高い独立した予後予測因子であった。これらの結果より、CTC は内分泌療法抵抗性骨転移患者における全生存期間の有用な予測因子であり、治療開始後も CTC の測定値が高く維持される患者においては、現行の治療法では

効果が得られないことが示唆された。さらに、Scher らは 12 ヶ月以内の癌死を予測する ROC 曲線で治療前の CTC 数は、PSA response より優れた検査法であると報告した。他の施設報告も同様で CTC は内分泌療法抵抗性前立腺癌患者の病態および治療効果を反映し、有効な治療継続と早期に無効な治療変更を示す可能性を示していた⁵⁻¹⁰⁾。

結論

未治療骨転移前立腺癌や内分泌療法抵抗性骨転移前立腺癌で治療開始早期での CTC 数は治療効果を予測するマーカーであることが示唆された。

文献

- 1) Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. Clin Cancer Res (2004) 10:6897-6904.
- 2) Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Immunomagnetic quantification of circulating tumor cells as a prognostic factor of androgen deprivation responsiveness in patients with hormone naive metastatic prostate cancer. J Urol. 2008;180(4):1342-7.
- 3) Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer. J Urol. 2009 Mar;181(3):1091-7.
- 4) Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, Heller G. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. Lancet Oncol. 2009 Mar;10(3):233-9.

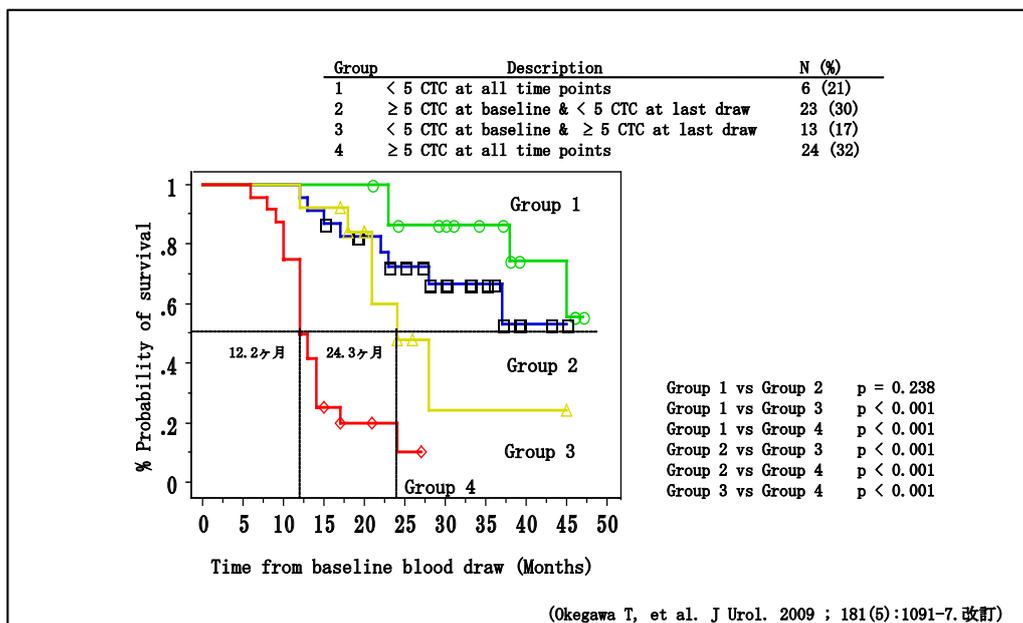


図2 内分泌抵抗性前立腺癌における治療経過でのCTC検査と予後

- 5) Chen Bt, Loberg RD, Neeley CK, et al. Preliminary study of immunomagnetic quantification of circulating tumor cells in patients with advanced disease. *Urology* 2005;65:616-21.
- 6) Moreno JG, Miller MC, Gross S, et al. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2005;65:713-8.
- 7) Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:7053-8.
- 8) Olmos D, Arkenau HT, Ang JE, et al. Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre experience. *Ann Oncol* 2009 ; 20: 27-33.
- 9) de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 1;14(19):6302-9.
- 10) Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, et al. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Can Res* 2007;13:2023-9