

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No

課題番号

20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄		1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治		14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久		18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里		25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄		33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸		38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドーシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎		46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹		53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男		60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子		68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘		80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武		88
951A	21102	移植免疫寛容とミクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光		92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三		98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎		111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子		118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満		126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆		134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン (IFN) の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功		144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一		149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子 (OCIF) とそのリガンドである破骨細胞分化因子 (ODF) の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之		160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世		167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人		178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症 (NC) マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美		183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明		193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行		200

20000967A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発

所 属 国立国際医療センター研究所 血液疾患研究部
研究者 湯 尾 明

分担研究者

三共株式会社 創薬化学研究所 小泉 誠

要 旨

CREB アンチセンスオリゴの白血病細胞に対する作用機序の形態面などからの検討、テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムによるBcl-2蛋白減少による自食現象を伴う細胞死の誘導、造血因子で誘導されるアポトーシスの細胞内分子機序の解明を行った。

1. 研究目的

造血障害性疾患の大部分の病因は造血細胞自身の内在的異常に由来しており、血液疾患の中でもきわめて難治性である。その具体的な病因は、血液細胞自身の根本的な遺伝子の異常や、血球などから産生されるサイトカイン、造血因子の異常、その受容体や細胞内刺激伝達機構の異常などさまざまなものが想定され、そのごく一部は分子レベルで解明されつつあるが、多くの未解決の課題が残っている。このような難治性の疾患の病因の解明と新しい治療法の開発のためには、ヒト血液細胞の増殖、分化、アポトーシス等に関わる細胞間ならびに細胞内情報伝達機構を十分に基礎検討した上で、造血障害における分子病態の解明とその分子を標的とした特異的な治療法の開発に着手することが重要である。

本研究においては、このような観点から正常血液細胞の細胞動態を分子レベルで解明しつつ、造血障害性疾患などの血液疾患の、病因、病態の解明、診断法、治療法の開発に向けて、ヒトの系に絞って研究を進めることにより、基礎的な病因、病態に根ざし、しかも臨床応用につながりやすい成果を得ることを目指す。近年、血液細胞の増殖、分化、アポトーシスに関わる造血因子、サイトカインなどの細胞間の連絡を司るメディエーターや細胞内の情報伝達に関わる細胞内分子が次々と同定されているが、その相互作用や細胞生物学的意義が不明のものも多い。これらの分子の役割をヒトの血液細胞を用いて解明すると同時に、アンチセンスなどのオリゴヌクレオチドやその他の遺伝子導入の系を用いた血液疾患の病因や病態の解明、診断法や治療法の開発を推進することはきわめて重要であり、本研究の主な目的、課題である。具体的には、それぞれの分子のアンチセンスや dominant negative、dominant positive 変異体、特異的阻害剤（オリゴヌクレオチド、ペプチド）等を用いた阻害実験等を行う。また、これらの分子（もしくはその変異体）の遺伝子をヒトの血液細胞に効率的に遺伝子導入できるレトロウイルスの実験系や誘導的な遺伝子発現系を用いて、新しい造血障害性疾患の治療法を開発する所までを目標としたい。

本年度は、昨年度に引き続きCREBという転写因子の細胞内での役割を、そのアンチセンスオリゴの系を用いて検討したので報告する。また、本年度は新たに、テトラサイクリンによる遺伝子発現調節システムを用いたbc1-2全長遺伝子の誘導発現系を駆使して、そのセンス配列とアンチセンス配列のヒト血液細胞に対する効果を検討し、Bc1-2蛋白の従来知られている作用からは説明しがたい予想外の結果を得たので報告する。また、ヒト血液細胞株におけるある種の造血因子によるアポトーシスの独自の系とその細胞内情報伝達機構に関する興味ある知見も得たので合わせて紹介する。

2. 研究方法

①昨年までの研究により、ヒトCREB cDNA塩基配列を基にデザインした20量体のアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド(AS-ODN)の数種類において比較的強い白血病細胞増殖抑制活性が認められた。そこで、今年度はその際に観察される細胞の形態変化などに関して詳細に検討した。なお、実験に用いたホスホロチオエート型修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロアミダイト法にてDNA/RNA自動合成機で合成し、逆相高速液体クロマトグラフィーにて精製した。

②ヒト血液細胞株は、造血因子に非依存的に増殖する骨髓芽球細胞株HL-60と単芽球細胞株U937を用いた。特に、HL-60細胞はアンチセンスの実験系においてきわめて有用であることが明らかになっているので、今年度は遺伝子誘導発現系の実験の対象細胞の一つとしても用いた。U937細胞は造血因子GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)で誘導されるアポトーシスという独自の系の検討のために用いた。

③細胞の増殖もしくはその抑制は生細胞数の算定により評価した。アポトーシスの同定に関しては、サイトスピン標本のギムザ染色やヘキスト33342を用いた核染色により形態面から評価する方法、電子顕微鏡により微細形態を観察する方法、FACSを用いた細胞周期解析におけるsug1フラクションの定量、アガロース電気泳動によるDNA断片化(DNAラダーの形成)の検出、などの手法を用いた。

④蛋白の免疫沈降は、プロテインAセファロースビーズを用いた沈降法により行い、イムノブロットリングは、可溶化した蛋白をレムリのサンプルバッファーで固定して、SDS-PAGEにて電気泳動、展開した後にニトロセルロース膜またはPVDF膜に転写し、特異的抗体を結合させた後にアルカリホスファターゼ法により発色させた。一部の実験においては、ケミルミネッセンス法により発色させた。

⑤カスパーゼ活性の測定は、カスパーゼ3、カスパーゼ1、カスパーゼ8、カスパーゼ7に関してそれぞれの特異的基質(DEVD-AMC、YVAD-AMC、IETD-AMC、AMC-VDQVDGW [K-DNP])を用いて、蛍光分光光度計により測定した。活性型(分断型)カスパーゼ蛋白の検出はイムノブロットリングによった。

⑥bc1-2遺伝子是大阪大学医学部辻本教授より供与を受けた。テトラサイクリン誘導発現系に関わる遺伝子、bc1-2遺伝子などのHL-60細胞などへの遺伝子導入は、エレクトロポレーション法を用い、抗生剤選択はネオマイシンとハイグロマイシンを用いた。

⑦ミトコンドリア膜電位は、ローダミン123を指標としてFACSを用いて測定した。

3. 研究成果

①CREB遺伝子に対するAS-ODNで、HL-60細胞増殖抑制活性を有することがこれまでの研究で明らかになっているHS-13を選びHL-60細胞での形態変化などを検討した。その結果、アンチセンス処理した細胞においては、著明な核の断片化と分裂期(M期)の形態異常が認められたが、DNAの断片化は認められずアポトーシスとは異なる細胞死を来していることが明らかになった。また、細胞周期の解析からは、著明なSub G1領域の増加と著明なG1期の減少をとまなうものの、S期は保たれG2/Mもほぼ正常範囲内であった。すなわち、G1アレストでもG2/Mアレストでもなく、M期からG1期に戻れずに細胞死を来たしてSub G1領域に行ってしまう状況と考えられた。このような細胞死はきわめて特異であり、その細胞内分子機序の検討が今後の重要課題であると考えられた。また、今回、増殖抑制活性が認められるHS-13内の部分配列に活性があるか否かを調べるために、下記のような配列のものを合成した。即ち、HS-13とHS-17の共通配列であるHS-48にoligoTを付加したものや、HS-13の3'側配列にoligoTを付加したものである。これらのものは細胞増殖抑制活性がなかったことから、単にリン酸基の負電荷の効果によって活性発現しているのではないことがわかった。

②テトラサイクリン遺伝子誘導発現系(Tet Onの系)を用いてヒト骨髓系血液細胞株HL-60におけるbcl-2遺伝子の役割について検討した。Bcl-2全長遺伝子のセンス配列とアンチセンス配列の両方を用いて実験を行った。まず、センス配列の発現においてはBcl-2蛋白の量が増加すること、逆にアンチセンス配列の発現においてはBcl-2蛋白の量が減少することを確認した(Figure 1)。次に、センス配列の発現ではHL-60細胞の細胞死が抑制されること、アンチセンス配列の発現では細胞死が促進されることを確認し、Bcl-2蛋白の抗細胞死作用を今回の実験系で明らかにした(Figure 1)。次にbcl-2アンチセンス遺伝子の発現によってBcl-2蛋白が減少した細胞での細胞死がアポトーシスであるかどうかを確認するために、形態観察やDNA断片化(ラダー形成)の同定を行ったが、核の凝縮やDNAラダーと言ったアポトーシス特有の所見は見出されず、予想外の結果となった。光顕レベルで確認できた細胞内の空胞は、電顕でも確認された。さらに、電顕においても核の凝縮、ミトコンドリアの変化などは観察できなかった。また、ミトコンドリアに関しては、電位変化が認められないことも確認した。また、今回観察された細胞死はカスパーゼ阻害剤(z-VAD)では抑制されず、カスパーゼとは異なる細胞内機序を介した細胞死であると考えられた。

③ヒト単芽球細胞株U937に、GM-CSFを添加したところ、時間依存的に(培養4日までの間に)アポトーシスを誘導することを確認した。そのようなGM-CSFによるアポトーシスはTNFによるアポトーシスと相乗的に作用しあい、両者を添加したU937細胞は著明な細胞死に陥った(Figure 2)。TNFにみならずGM-CSFもU937細胞においてカスパーゼ3様の活性を誘導したが、両者を添加するとさらに強いカスパーゼ3様の活性が誘導された。ところが、TNFではカスパーゼ3の活性型蛋白が誘導されるのに対してGM-CSFでは誘導されず、両者存在してもTNF単独と同等の効果であった。したがって、GM-CSF単独で誘導されTNFとGM-CSFの両者で相乗的に誘導されるカスパーゼ3様の活性はカスパーゼ3そのものでは無いことが示された。さらに、カスパーゼ3の阻害剤(DEVD-CHO)やカスパーゼ全般の阻害剤(zVAD)は、TNFによる細胞死を抑制したがGM-CSFによる細胞死には影響を与えなかった。カスパーゼ3以外のカスパーゼの検討

では、カスパーゼ8の関与が示唆されたが、カスパーゼ7は活性の面からも活性型蛋白の面からも関与していないと考えられた。

4. 考 察

我々の合成したCREBに対するホスホロチオエート型の20量体のアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドは、HL-60細胞に対して特有の作用を発揮した。すなわち、形態上は核の分断化と凝集を来すが、DNAの電気泳動上はラダーを認めず、これまでにあまり提唱されていない形式の細胞死であると考えられた。また、細胞周期の解析からはM期の異常によりM期からG1期に戻れずSubG1に流れてしまう状態と考えられたが、これもG1アレストやG2/Mアレストとは異なる独特の細胞死と言える。一方、アンチセンスの作用機序に関しては、昨年度までの研究により(CREB蛋白の減少を伴う)いわゆるアンチセンス効果ではないこと、しかし、特定の短い塩基配列のみによるアプタメリック効果ではなくハイブリダイゼーション依存的な作用であるらしいことなどが示されてきた。その一つの可能性として、CREBに対する3種類の有効なアンチセンスに相当する塩基配列を有しており、CREBそのものとは異なる分子(蛋白、mRNA)も考えられる。我々は現在そのような配列を探索して、CREB遺伝子の3'側とAlu配列がつながった遺伝子の存在を確認している。さらに、そのような遺伝子のmRNAが今回有効であったアンチセンスにより著明に減少する(センス配列は無効)ことも予備的な実験で確認している。今後はこのような機序の可能性に関してさらに検討してゆきたい。

今回、テトラサイクリン誘導発現系(TetOnの系)を用いてヒト骨髓系血液細胞株HL-60におけるbcl-2遺伝子の役割について検討したところ、センス配列の発現ではHL-60細胞の細胞死が抑制されること、アンチセンス配列の発現では細胞死が促進されることを見出し、Bcl-2蛋白の抗細胞死作用をあらためて確認することができた。しかし、bcl-2アンチセンス遺伝子の発現によってBcl-2蛋白が減少した細胞での細胞死においては、核の凝縮やDNAラダーと言ったアポトーシス特有の所見は見出されず、予想外の結果となった。むしろ、細胞内に空胞が多数確認され、いわゆる自食(autophagy)という現象と考えられた。ミトコンドリアは形態上も機能上も著変なく、カスパーゼの関与も否定的で、アポトーシスとは細胞内シグナル伝達の面からも大きく異なる細胞死と考えられた。このような細胞死はアポトーシスではないばかりか、典型的なネクローシスとも明らかに異なり、近年注目されている第3の形式のプログラムされた細胞死と考えられる。また、Bcl-2蛋白の増減によってミトコンドリアには大きな変化はなく、ミトコンドリア以外(ライソゾームなど)でのBcl-2の役割を示唆する所見を得たが、その詳細は不明であった。

その他、今年度の研究においては、本来は血液細胞の生存を助けるはずの造血因子GM-CSFによるヒト単芽球細胞株U937のアポトーシスを明らかにした。このGM-CSFによる特有のアポトーシスは、古典的なTNFによるアポトーシスと相乗的に作用し合い、カスパーゼ3阻害剤の影響を受けず、カスパーゼ3そのものではないカスパーゼ3様の活性を伴い、きわめて興味深い細胞内機序を介しているものと考えられた。生理的な意味は不明であるが、ヒト血球のアポトーシスを考える上できわめて重要な実験系であると考えられた。

今年度の研究においては、従来から研究を続けてきたCREB過剰発現によるアポトーシスとCREBアンチセンスオリゴによる独自のアポトーシスではない細胞死に加えて、Bcl-2蛋白減少による自食を伴うアポトーシスではない細胞死とカスパーゼ3様の機序を介する造血因子によるユニークなアポトーシスという2種類の興味深いヒト血液細胞死の様式を明らかにすることができた。これらの合計4種類の我々独自の細胞死の機序を比較しながらさらに詳細な検討を加えることにより、細胞死の基礎的な分子機序に迫るのみならず、血液細胞死に異

常を来している造血障害性の血液疾患や造血器悪性腫瘍の病因、病態の解明や治療法の開発に直接関わる研究成果を得ることができるものと期待される。

5. 結 論

今年度は、従来より行ってきたCREBアンチセンスオリゴのヒト白血病細胞に対する作用機序を形態面などから検討し、アポトーシス、ネクローシス、G1アレスト、G2/Mアレストのいずれとも異なる特異な性質を明らかにした。また、本年度は新たに、テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムを用いて、ある種のヒト白血病細胞のBcl-2蛋白を減少させ、その結果アポトーシスではなく自食現象を伴う細胞死が誘導されることを発見した。さらに、本年度は、造血因子GM-CSFで誘導されるヒト単芽球細胞株のアポトーシスと言う興味深い現象を見出し、その細胞内分子機序の解明を主にカスパーゼという観点から行った。

6. 研究発表

Okuma E, Saeki K, Shimura M, Ishizaka Y, Yasugi E, Yuo A: Induction of apoptosis in human hematopoietic U937 cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: possible existence of caspase 3-like pathway. *Leukemia* 14:612-619,2000.

Shimura M, Osawa Y, Yuo A, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y: Oxidative stress as a necessary factor in room temperature-induced apoptosis of HL-60 cells. *J Leukoc Biol* 68:87-96,2000.

Yasugi E, Kumagai T, Nishikawa Y, Okuma E, Saeki K, Oshima M, Susin SA, Kroemer G, Yuo A: Involvement of apoptosis-inducing factor during dolichyl monophosphate-induced apoptosis in U937 cells. *FEBS lett* 480:197-200,2000.

Saeki K, Yuo A, Abe I, Seki T, Noguchi H, Isemura M: Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. *Biol Pharm Bull* 23:1391-1394,2000.

Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G, Takaku F: Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL-60 cells. *Cell Death Diff* 7:1263-1269,2000.

Hagiwara S, Yagisawa M, Iki S, Mimura T, Urabe A, Miwa A, Togawa A, Higashihara M, Takaku F, Yuo A: Tyrosine phosphorylation of proteins in primary human myeloid leukemic cells stimulated by macrophage colony-stimulating factor: analysis by disease types and comparison with normal human hematopoietic cells. *Int J Hematol* 73:100-107,2001.

Saeki K, Yuo A, Koizumi M, Fujiwara K, Kaneko M, Takaku F, Yazaki Y: CREB antisense oligonucleotides induce non-apoptotic cell death in proliferating leukemia cells, but not normal hematopoietic cells, by a bizarre non-antisense mechanism. *Leukemia* 15:238-245,2001.

Yuo A: Differentiation, apoptosis and function of human immature and mature myeloid cells:

intracellular signaling mechanism. Int J Hematol in press 2001.

湯尾 明：2. 好中球。I. 血液細胞の単離法・培養法。臨床血液実験操作法。血液腫瘍科 40(suppl.):10-16,2000.

湯尾 明：ヒト単球の細胞内シグナル伝達機構。臨床免疫 33:448-464,2000.

湯尾 明：アポトーシスのシグナル伝達。血液フロンティア 10:1383-1494,2000.

湯尾 明：ヒト骨髓系血球の分化とシグナル伝達。生化学、印刷中

湯尾 明：顆粒球、他。医学大辞典。伊藤正男、井村裕夫、高久史麿編。医学書院、東京、印刷中.

湯尾 明：ランダム運動。免疫学辞典第2版。大沢利昭他編。東京化学同人、東京、印刷中.

湯尾 明：白血球増加症。B：白血球系疾患。第3章：疾患編。第3巻：血液・造血器疾患。看護のための最新医学講座。日野原重明、井村裕夫監修。中山書店、東京、印刷中.

湯尾 明：白血球減少症。B：白血球系疾患。第3章：疾患編。第3巻：血液・造血器疾患。看護のための最新医学講座。日野原重明、井村裕夫監修。中山書店、東京、印刷中.

湯尾 明：白血球機能異常症。B：白血球系疾患。第3章：疾患編。第3巻：血液・造血器疾患。看護のための最新医学講座。日野原重明、井村裕夫監修。中山書店、東京、印刷中.

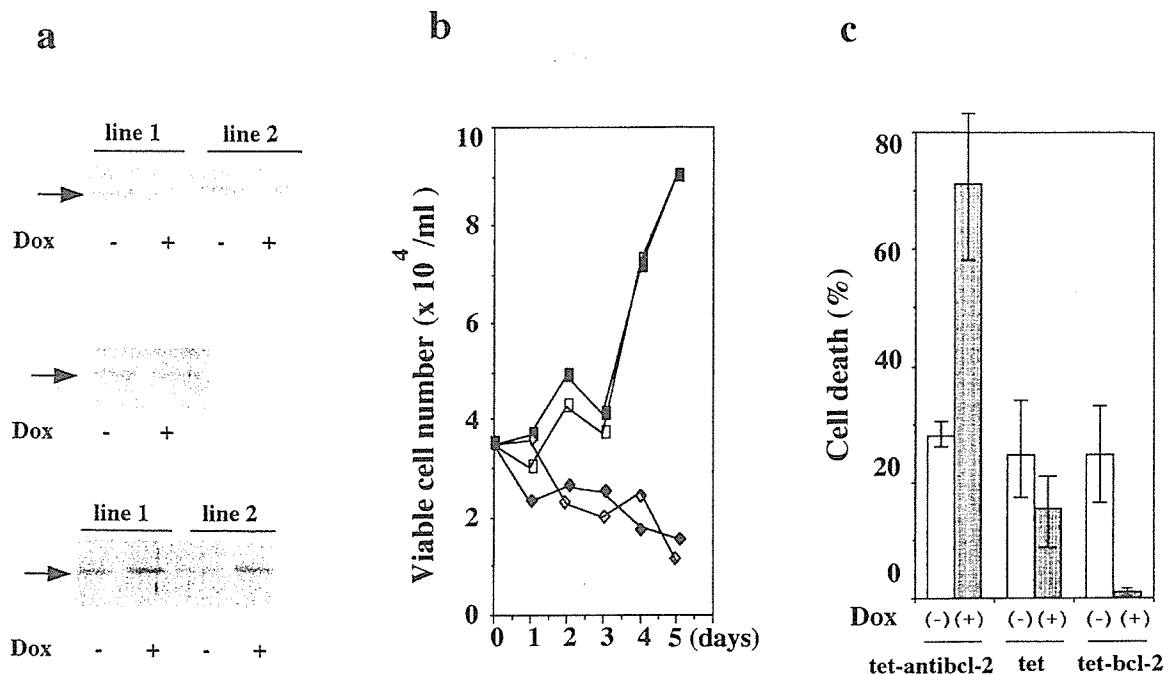


Figure 1 Bcl-2 knockdown by its full-length antisense message induction. (a) The two bcl-2-antisense-message-inducible lines of HL60/tet-antibcl-2 (upper), the parental HL60/tet (middle) and the two bcl-2-sense-message-inducible sublines of HL60/tet-bcl-2 (bottom) were cultured with or without 2 μ g/ml doxycycline as indicated. After 5 days, cell lysate was prepared from the equivalent number of viable cells and Western blotting was performed. (b) The growth curve of the two lines of HL60/tet-antibcl-2 after doxycycline treatment. (closed square: line-1 doxycycline (-), closed diamond: line-1 doxycycline (+), open square: line-2 doxycycline (-), open diamond: line-2 doxycycline (+)). (c) The percentages of dead cell numbers in HL60/tet-antibcl-2 line 1, HL60/tet and HL60/tet-bcl-2 line 1 at day 5 were shown. Similar results were obtained from line 2 (data not shown). Results from the three independent experiments were shown

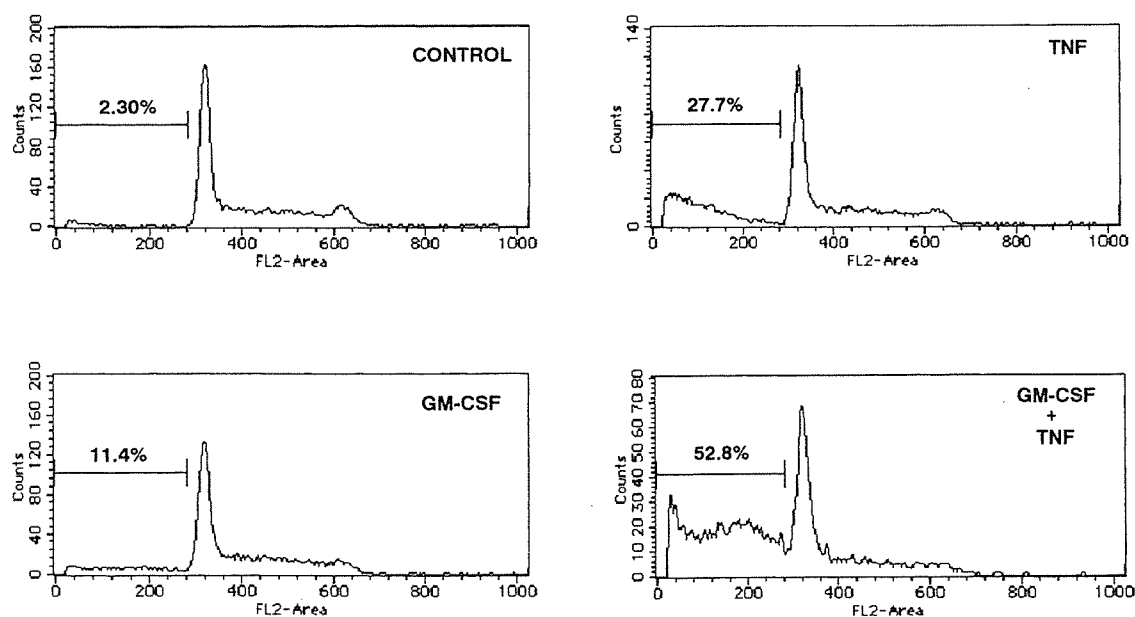


Figure 2 Combined effects of GM-CSF and TNF on U937 cells. U937 cells were cultivated with or without 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml TNF or combination of both for 2 days (48 h), and then subjected to FACS analysis to quantify the population in the sub-G1 region.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社