

平成13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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

新しい白血球の機能制御手法を適用したガン細胞の浸潤・転移抑制方法の開発研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
研究者 鈴木 和博

分担研究者

山本 一夫 東京大学大学院 新領域創成科学研究科
西川 清広 日本化薬株式会社 創薬本部新薬創成部門

【要旨】

白血球の運動を制御するコフィリンの脱リン酸化シグナルにホスホリパーゼ C が関与すること、コフィリンのリン酸化酵素 LIM キナーゼは、刺激に応答して細胞膜領域に移行することを見いだした。またNK細胞の抑制性受容体 Ly49A および Ly49G2 に結合するペプチドの合成に成功した。さらに、アミノペプチダーゼNがガン細胞の転移に関与すること、bestatin がその酵素活性を阻害し、転移を抑制することを明らかにした。

1. 研究目的

現在死因の三分の一はガンであり、長年首位の座を占め続けている。そして、その半数以上に転移があるとされる。「転移を征するものはガンを征する」と言われるゆえんであり、有効な転移抑制手法の開発は焦眉の課題となっている。しかし、「ガンの転移」は多くの生物学的事象の結果生ずる極めて複雑な現象であるため、「発ガン機構」の研究に比べ遅れていると言わざるを得ない。最近の数年間にメタロプロテアーゼ阻害剤が有効である可能性が大きくなり、製薬各社が競って開発し現在5品目が臨床試験にかけられているが、具体的に認可されたものはまだない。また、血管新生阻害剤による転移予防効果も期待されるが、やはり臨床試験の段階である。

一方、「白血球」とは、血液細胞のうち赤血球と血小板以外の細胞群の総称である。ガン細胞の浸潤・転移は、白血球とは研究面でも臨床面でも密接な関係がある。すなわち、①転移は活発な細胞運動の結果であり、正常な状態で同様な運動活性をもつのは白血球だけである、②転移の際、メタロプロテアーゼが、ガン細胞の転移巣を形成するのに深く関与している、③血流に入ったガン細胞は、多くの場合ナチュラルキラー (NK) 細胞の攻撃を受け死滅するが、それを生き延びたものが血管外へ浸潤・転移する。申請者らはこれまでに白血球の細胞骨格系制御蛋白コフィリンについて、基礎的な研究を重ねてきた。アクチン細胞骨格は、直接細胞運動に関わる細胞内システムであり、その制御手法の開発はガン細胞の転移の制御に直接役立つ可能性がある。また、昨年度まで本研究費の補助金型予算を受けて、白血球機能を制御するペプチドをファージディスプレイライブラリを用いて探索し、食細胞やナチュラルキラー (NK) 細胞に対して機能調節活性のあるペプチドを複数得るに至っている。本研究はそれらの成果をシーズとして、ガン転移抑制薬の開発を行っている企業と共同で応用しようとするものである。具体的には、①ガン細胞の運動活性を抑制する、②メタロプロテアーゼを阻害する、③NK 細胞のガン細胞 killing 能を亢進する、④血管新生を阻害する、などの面から研究を展開し、ガン治療に役立つ医薬の開発に資する知見を得ることを目的とする。

最近、今後のガン治療創薬の戦略として tumor dormancy therapy (ガン細胞の休眠療法) の有効性が多くの専門家から提唱されているが、本研究はまさにそのような戦略の研究である。また、方法論としては、分子レベルでの知見をベースに、応用拡大していく方向性をもった研究であり、分子細胞生物学分野にも学術的に

貢献できる成果を得たい。

本プロジェクト初年度の平成 13 年度は、(1)白血球の運動を直接担うアクチン細胞骨格について、その主要な調節因子であるコフィリンのリン酸化・脱リン酸化に着目し、制御のシグナル伝達機構を検討し、(2)抑制性 NK 細胞レセプターの認識を阻害するペプチドの探索を行い、さらに、(3)ヒトメラノーマ細胞 A375M に APaseN の遺伝子を導入し、過剰発現させた APaseN によるマトリックス分解能、接着能、浸潤能および転移能などの変化を調べ、APaseN の転移および浸潤における細胞機能を検討した。

2. 研究方法

1) U937 細胞の機能発現、コフィリン動態に対するホスホリパーゼ C 阻害剤の効果

ヒト単球系培養細胞 U937 を TNF- α (200 ng/ml) およびビタミン D₃ (200 nM) 存在下で 3 日間培養し、マクロファージ様に誘導した。その細胞に、ホスホリパーゼ C 阻害剤である U73122 を加え、30 分 37°C でインキュベートした後、HBSS で洗浄してから実験に使用した。なお、対照試薬としてホスホリパーゼ C 阻害活性を持たない構造類似体 U73343 を使用した。活性化剤としては、*in vitro* で使える最も生理的な刺激剤であるオプソニン化ザイモザン (OZ) を使用した。活性酸素産生の測定は DCF-DA を利用した蛍光法と、シトクロム C の還元を利用した比色による定量法を併用した。コフィリンのリン酸化は、細胞を ³²Pi と 1 時間インキュベートした後、上記のように U73122 処理してから、OZ 刺激し、モノクローナル抗コフィリン抗体を用いた免疫沈降—SDS-PAGE 法により分析した。また、コフィリンの細胞内動態変化は、U73122 処理した細胞を OZ で刺激後、ホルマリン固定し、メタノール処理後、間接蛍光抗体法により蛍光染色して、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡により観察した。ホスホリパーゼ C 活性は、IP₃ 測定キット (Amersham) を用いて、OZ 刺激後の細胞内 IP₃ を定量する事により行った。

2) U937 細胞内の LIM キナーゼの分布変化の観察

上記のように分化させた U937 細胞を、OZ で刺激したのちホルマリンで固定した。次いで、0.4% Triton X-100 で処理した後、牛胎児血清とロバ IgG でブロッキングを行ってから、一次抗体として LIM キナーゼの PDZ ドメインに対する特異的なウサギ抗体 (アフィニティー精製済み、東北大学理学部、水野健作教授から供与)、二次抗体として蛍光標識ロバ抗ウサギ抗体 (Chemicon) を用いて間接蛍光抗体染色を行い、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡により観察した。

3) 可溶型マウス NK 細胞受容体 Ly49A の作成

マウス NK 細胞レセプター Ly49A をコードする cDNA をもとに、細胞外領域とその C 末端側にビオチン化配列をつないだ遺伝子を作成し、これを発現ベクター pET-3C に組み込んだ。これを大腸菌 BL21 (DE3) にトランスフォームし、IPTG 存在下で発現誘導を行った。この組換え体の可溶型 Ly49A (sLy49A) は封入体として回収されたため、グアニジンで可溶化後、さまざまな条件で透析しリフォールディングを行い、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過を組み合わせ精製した。同様にして、可溶型 Ly49G2 の作成も行った。

4) マウス NK 細胞受容体 Ly49A に結合するファージクローンのパイオパニング

sLy49A をストレプトアビジンアガロースビーズに固相化し、これに結合するファージクローンをパニングを用いてスクリーニングした。結合したファージの回収は、0.2M Glycine/HCl, pH2.2, 1 mg/ml BSA を用いた。Phage Peptide Library は 7mer のランダムペプチドの両端にシステインを含むペプチドライブラリーを提示したもの (Ph.D. -C7C, New England Biolab) を用いた。

5) 環状ペプチドの合成

ペプチドは Fmoc 法を用いて化学合成し、切り出し、脱保護基、HPLC による精製を行いリニアなペプチドを得た。次に、希薄水溶液中で室温、一週間攪拌を行い、酸化され環状となったペプチドを再度 HPLC により分離精製した。精製標品は、MALDI-TOF MS により確認した。

6) 環状ペプチドによる Ly49A-H-2Dd 結合阻害実験

H-2Dd を強制発現させた C1498 細胞にビオチン化標識 sLy49A を加えインキュベートし、洗浄後その結合量を

アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンの発色により調べた。定量的結合は表面プラズモン共鳴を利用した BIAcore を用いて解析を行った。センサーチップにアビジン-ビオチンを介して Ly49A を固定化後、種々の濃度の各ペプチド存在下で H-2Dd を流し、その RU の変化をモニターすることに経時的に Ly49 と H-2Dd との結合を測定した。

7) APaseN 発現ベクターの導入

APaseN の全長 cDNA を含む哺乳動物発現ベクター pZipSV(x)neoCD13 およびコントロールベクター pZipSV(x)neo を電ポレーション法により A375M ヒトメラノーマ細胞に導入し、1 mg/mL の G-418 存在下で耐性細胞を選択した。遺伝子導入細胞は 10% FBS、1 mg/mL G-418 を含む RPMI1640 培地で維持し、遺伝子導入細胞のクローニングは限界希釈法によって行った。

8) APase 活性の測定

APase 活性は、Ala-MCA を基質とし、酵素反応によって遊離される 7-amino-4-methylcoumarin (MCA) の蛍光強度を測定して定量した。0.1 mM の Ala-MCA と細胞 (5×10^3) を混合し、96 穴マイクロプレート中で 37°C で反応させた。30 分ごとに検体を採取し 0°C に冷却して反応を停止させ、上清を 90°C で 1 分間加熱し、MCA による蛍光を Baxter Fluorescence Concentration Analyzer によって定量した。

9) 癌細胞の浸潤能の測定

癌細胞の浸潤能を Transwell chamber を用いて測定した。ポリビニルピロリドンフリーポリカーボネートフィルター (pore size 8 μ m) の下層面を 5 μ g のフィブロネクチンで、さらに上層面を 5 μ g の基底膜マトリゲルでコートし室温で乾燥させた。 1×10^6 /mL の細胞浮遊液 100 μ L を chamber の上層に加え、37°C で 8 時間培養した。フィルターをメタノールで固定した後ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色し、フィルターの上層から下層表面に浸潤した癌細胞数を、顕微鏡下 100 倍でフィルター当たり 5 視野計測した。

10) タイプIVコラーゲン分解活性の測定

[³H] 標識タイプIVコラーゲン (3×10^5 cpm/1.6 μ g/mL) を風乾してコートした 6 穴培養プレートに、 5×10^5 /mL の細胞を加え 24 時間培養した後、上清を回収した。100 μ L の 50% トリクロロ酢酸を加え、遠心上清中の分解したコラーゲンの放射活性を測定した。

11) 細胞接着活性の測定

5 μ g の基底膜マトリゲルをコートした 96 穴マイクロプレートに癌細胞浮遊液 2×10^4 /0.05 mL を加え、37°C で 60 分間培養した後、PBS で 4 回洗浄して非付着性の細胞を除去した。付着性細胞を MTT 法を用いて吸光度で測定した。

12) APaseN の精製と酵素反応速度の測定

ヒト線維肉腫細胞 HT-1080 を低張処理し、遠心により回収した細胞膜画分から、1% NP-40 を含む緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, protease inhibitor) で抽出したタンパク上清に抗 CD13 抗体を加え、protein G-sepharose beads を用いて APaseN/CD13 を精製した。pH 11.3 で beads から溶出し、pH 7.5 にした後、APaseN の酵素阻害実験を行った。酵素液に種々の濃度の bestatin を加え 30 分間氷上で放置後、各濃度の Leu-MCA を添加し、分解速度を測定した。分解速度は、基質である Leu-MCA 添加後 90 秒間の蛍光強度の変化とした。

13) 肺転移抑制実験

DBA/2 マウス♂ (Crj) に 2×10^5 個のマウス肺扁平上皮癌細胞 KLN205 を尾静脈より移植し、翌日から bestatin 7 mg/kg (n=9) および 35 mg/kg (n=8) を連日経口投与し、27 日目に剖検して肺重量を測定した。

3. 研究成果

1) 分化型 U937 細胞の活性酸素産生

マクロファージ様に分化させた U937 細胞は、OZ 刺激すると活性酸素を産生することが DCF を用いた蛍光法、シトクロム C の還元法で確認された。その活性酸素産生は、いずれの手法を使った場合でも、ホスホリパ

ーゼ C 阻害剤 U73122 により 2 μ M で約 70%、4 μ M で約 90%阻害されたが、阻害活性のない対照試薬 U73343 では全く阻害されなかった。したがって、OZ 刺激による活性酸素産生の経路には、ホスホリパーゼ C が関与していることが示唆された。

2) コフィリンのリン酸化状態

標記について、³²P を用いた免疫沈降法で調べた結果、OZ 刺激により 15 分後には約 50%の脱リン酸化が認められた。その刺激依存性脱リン酸化反応は 4 μ M の U73122 で阻害されたが、U73343 では、まったく阻害されなかった。したがって、OZ によるコフィリンの脱リン酸化反応にもホスホリパーゼ C が関与していることが示唆された。

3) コフィリンの細胞内分布変化

アクチン・PIP2 結合蛋白であるコフィリンは、刺激を受ける前は細胞質に分散して存在しているが、OZ 刺激を受けると、5 分以内に細胞膜領域に移行した。とくに、貪食胞を形成したり活性酸素を産生している変形した細胞膜近傍に顕著に集積していた。そのコフィリンの局所的集積は、さらに時間が経つと減少し、20 分後にはほとんど観察されなかった。このようにコフィリンは、細胞内で必要に応じて可逆的に移行して役割を果たす可動性蛋白であるが、4 μ M の U73122 により、その移行は顕著に阻害された。また、その阻害は同濃度の U73343 では観察されなかった。この結果から、コフィリンの細胞内分布変化にもホスホリパーゼ C が関与していることが示唆された。

4) ホスホリパーゼ C 活性の測定とハービマイシンの効果

以上の結果より、OZ 刺激による細胞内情報伝達経路にホスホリパーゼ C が深く関与することが示唆されたので、実際にその活性を直接測定する実験を IP3 をレセプターアッセイで定量して行った。その結果、OZ 刺激により、細胞内 IP3 は上昇するが、その上昇は U73122 で阻害され、U73343 では阻害されなかった。したがって、上記の活性酸素産生、コフィリンの脱リン酸化および細胞内分布変化は、ホスホリパーゼ C を介したものであることが強く示唆された。さらに、興味深いことにチロシンキナーゼ阻害剤のハービマイシンでも、この IP3 産生は阻害されたことから、このホスホリパーゼ C の活性制御に関して、上流に src タイプのチロシンキナーゼが関与していることが示唆された。

5) LIM キナーゼの細胞内分布変化

コフィリンはリン酸化されるとアクチン結合活性を失う。したがって、リン酸化・脱リン酸化の機構はコフィリンを介した、細胞骨格制御機構の理解に欠かせない。最近、コフィリンをリン酸化するキナーゼは LIM キナーゼであることが明らかにされた。そこで、LIM キナーゼの発見者である現東北大の水野健作教授より LIM キナーゼ 1 特異的な抗体の供与を受け、LIM キナーゼの細胞内分布を検討した。その結果、LIM キナーゼは刺激を受ける前は細胞質に分散しているが、刺激を受けると経時的に細胞膜領域に強く移行し、30 分で最大に移行しているのが観察された。この LIM キナーゼの移行は基質であるコフィリンに比べると、やや遅くまた 30 分後も膜近傍に留まっていた。LIM キナーゼはリン酸化することによりコフィリンの活性を抑えると考えられるので、膜近傍において脱リン酸化状態で役割を果たしたコフィリンは、やはり膜近傍に濃縮してきた LIM キナーゼによりリン酸化を受け、過剰な活性は抑えられた状態に戻るものと想像される。

6) 可溶型マウス NK 細胞レセプター-Ly49A、Ly49G2 の作成

マウス NK 細胞レセプター-Ly49 に結合し MHC 分子の認識を阻害するペプチドを検索するために、可溶型のマウス NK 細胞受容体 Ly49A および Ly49G2 をそれぞれ数 mg 作成した。精製標品は数種類の抗 Ly49A、G2 と交叉すること、またリガンドである H-2Dd との結合活性を示すことから、正しい構造を保持していると考えられた。

7) マウス NK 細胞受容体 Ly49A に結合するファージクローンのバイオパニング

sLy49A をストレプトアビジンアガロースビーズに固相化し、これに結合するファージクローンをパニングに用いてスクリーニングした。パニングを 4 回繰り返した結果、ファージの回収は 2 回目に 0.2%、3、4 回目で 0.45、0.5%であり、2 回でも十分に効率よく選別されていることが判った。得られたクローンから 36 個のクローンをランダムに拾い、その塩基配列の決定を行ったところ、Ly49A に結合活性を有する 8 種のクローンが得られ

た。これらはアミノ酸配列の相同性から2つに分類され、CXFXLPWLC という共通配列を持つ C1 (CLFNLPWLC), C19 (CLFDLPWLC), C21 (CMFNLPWLC)、並びに CXFXLPWLC という共通配列を持つ C2 (CSFTWLPWC), C8 (CPFKHLWPC), C11 (CPFQYLPWC), C14 (CPFQFLWPC), C26 (CPFSFLWPC) であった。これらをそれぞれ Type I, II と分類した。

8) Ly49G2 との結合性の検討

Ly49A のリガンドである H2-Dd は、同時に同じファミリーの NK 細胞レセプター-Ly49G2 のリガンドであることも知られている。そこで、これらのファージクローンと Ly49G2 との結合性を検討するため、Ly49A と同様の方法に従って可溶性 Ly49G2 を作成し結合実験を行った。その結果、type I ペプチドは Ly49G2 には一切結合しなかったが、type II ペプチドには Ly49G2 に結合するもの (C2, C14, C26) と結合しないもの (C8, C11) の2種類が存在した。これらをそれぞれ Type II', II と分類した。

9) 環状ペプチドによる Ly49A-H-2Dd 結合阻害実験

合成した各環状ペプチドが Ly49A と H-2Dd の結合を阻害するか否かの検討を行った。H-2Dd を強制発現させた C1498 細胞と sLy49A の結合に各種ペプチドを加えたところ、100 μ M の濃度において C1 ペプチドは 32%、C11 ペプチドは 83% の結合阻害をした。また表面プラズモン共鳴を用いた BIAcore による解析では、3種のペプチドはいずれも濃度依存的に Ly49A に結合し、その強さは Type I, Type II' > Type II の順であった。さらに、可溶性の H-2Dd を作成して、Ly49A に対する結合を BIAcore を用いて解析を行った。固定化した Ly49A に対して可溶性 H-2Dd が $K_d = 1.6 \sim 3.0 \times 10^{-7} M$ で結合したが、それぞれのペプチドは Type I > Type II' >> Type II のに可溶性 H-2Dd の結合を阻害した。

10) 癌転移における aminopeptidaseN の機能

癌の浸潤・転移における APaseN の機能を明らかにするために、APaseN 遺伝子を癌細胞に導入し、その細胞機能を元の細胞およびベクターのみを導入した細胞と比較した。

① APaseN 遺伝子導入細胞の樹立

APaseN の cDNA 発現ベクター pZipSV(x)neoCD13 およびコントロールベクター pZipSV(x)neo を転移性メラノーマ細胞 A375M に導入した。1 mg/mL の G-418 存在下で選択培養した後、クローニングを行った。細胞表面に発現した APaseN を FITC 結合抗 CD13 モノクローナル抗体 WM-15 (Silenus) によって 4°C で 30 分間染色し、FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) で蛍光測定したところ、遺伝子導入していない元の細胞の APaseN 発現は弱かったが、APaseN 遺伝子を導入した細胞では強い APaseN の発現が観察された。pZipSV(x)neo を導入した細胞では APaseN の発現量に変動はみられなかった。これらの細胞の APase 活性を、Ala-MCA を基質とし、遊離される MCA の蛍光量で測定した。Ala-MCA の加水分解活性は APaseN 遺伝子導入細胞では増加していた。

② APaseN 導入細胞の浸潤および転移活性の増大

各細胞を Transwell chamber の上層に加え、マトリゲル/フィブロネクチンでコートしたフィルター上で 8 時間培養し、浸潤した細胞数を計測して APaseN 遺伝子導入細胞の浸潤能を調べた。APaseN 遺伝子導入細胞の浸潤能は、対照とした細胞と比較して有意に高かった。マトリゲルを用いず、フィルターの下層をフィブロネクチンでコートした場合には有意な差は見られず、APaseN 遺伝子導入による浸潤能の増強は運動能の変化によるものではないことがわかった。

さらに、APaseN 遺伝子導入細胞の転移能を調べた。2 \times 10⁵ 個の各細胞をヌードマウスの尾静脈より移植し、51 日後の肺転移結節数を数えた。APaseN 遺伝子を導入した癌細胞では、元の癌細胞およびコントロールベクターを導入した癌細胞と比較して有意な肺転移結節数の増加がみられた。各細胞の増殖速度を調べたところ有意な差はなく、この転移能の増大は APaseN による浸潤能の増大によるものと考えられた。

③ 細胞外マトリックスの分解と接着能の亢進

APaseN 遺伝子を導入した癌細胞の浸潤・転移能の増大の原因として、APaseN による細胞外マトリックスの分解促進を想定し、マトリックス成分であるタイプIVコラーゲンの分解について検討した。 [³H] 標識タイプIVコラーゲンをコートしたプレートに各細胞を加えて 24 時間培養し、遊離した放射活性を測定した。APaseN 遺伝子導入細胞は、対照細胞に比べて強いコラーゲン分解能を示した。また、細胞外マトリックスである基底膜マ

トリゲルに対する接着能を測定したところ、APaseN 遺伝子導入細胞ではマトリゲルに対する接着性が高まっていた。

11) APaseN 阻害剤 bestatin による癌転移抑制作用

このように、APaseN は癌細胞の浸潤・転移を促進する機能を持つことが明らかとなったことから、APaseN に対する特異的な阻害剤は浸潤や転移を抑制するものと考えられる。そこで、APase 阻害剤であり白血病治療薬として用いられている bestatin について、精製 APaseN に対する阻害活性を確認した上で、癌の転移抑制作用を検討した。

①精製 APaseN に対する bestatin の酵素阻害活性

HT-1080 細胞の膜分画から抗 CD13 抗体を用いて酵素の精製を試み、bestatin の酵素阻害活性を測定した。種々の濃度のベストアチン存在下での Leu-MCA の分解速度を求め、Dixon plot を行った結果、bestatin は APaseN に対して拮抗阻害することが阻害係数 K_i は $1.39 \mu\text{M}$ であった。

②転移抑制作用

bestatin が APaseN 阻害活性を示す濃度は臨床投与において到達可能な濃度であることから、APaseN 活性の高い癌細胞の浸潤や転移の亢進を bestatin が抑制し、臨床効果が得られる可能性が示された。そこで、マウス肺扁平上皮癌 KLN205 細胞の実験転移モデルをにおいて、bestatin 投与による転移抑制作用を検討した。bestatin 35 mg/kg を連日経口投与することによって、肺転移による肺重量の増加を有意に抑制した ($P < 0.05$)。これまで、bestatin は主に免疫活性化作用によって抗腫瘍効果を示すと考えられていたが、APaseN 阻害に基づくと考えられる癌の転移抑制作用を有することが示された。

4. 考察

白血球系食細胞である分化型 U937 細胞を用いて、機能発現に必要なアクチン細胞骨格系について、その制御機構を検討した。その結果、コフィリンのリン酸化・脱リン酸化が極めて重要な役割をしていることが明らかになった。脱リン酸化のシグナルにはホスホリパーゼ C が関与すること、リン酸化酵素 LIM キナーゼがある程度挙動を共にして細胞内分布を変えることが明らかになった。細胞の運動や粒子状物質の貪食など、細胞膜が大きく変形する際には、その直下でアクチン細胞骨格系が大きく remodeling を受けて中心的役割を果たすが、そのアクチンを制御する蛋白コフィリンは激しく脱リン酸化・リン酸化の可逆的制御を繰り返しているに違いない。細胞の局所においてさえ、同時に逆向きの反応が活発に起こっていると理解すべきであろう。

マウス NK 細胞レセプター Ly49A 並びに Ly49G2 の可溶型を大腸菌によって発現させこれらをビーズに固相化することにより、ランダムペプチドを提示したファージライブラリーから NK レセプターと結合するクローンの単離を試みた。組換えレセプターが大量に調製できたことから、非特異的吸着を抑えてパニングを効率よく行うことが可能になり、NK 細胞レセプター Ly49A に結合するファージのスクリーニングに成功した。マウス NK レセプター Ly49A に結合するクローンは 8 クローンが得られたが、これらのクローンがコードする環状ペプチドはそのアミノ酸配列から CFXFLPWLC (Type I), CFXFLPWC という 2 種類に大別された。また、前者の配列を持つペプチドは同じリガンド (H-2Dd) を共有するレセプター Ly49G2 には結合せず、後者は Ly49G2 にも結合するもの (Type II') としないもの (Type II) のさらに 2 種類が存在した。

次のステップとして、これらファージクローンの違いが各ファージ表面に提示されているペプチドの違いによることを明らかにするために、合成ペプチドを作成しその検証を行った。Ly49A と H-2Dd の結合における環状ペプチドによる阻害効果を 3 つの実験系において調べたところ、いずれも同様の結果を示し Type I > Type II' >> Type II の順に強い阻害能を示した。しかし、これらペプチドの IC50 は μM オーダーであることから、*in vivo* におけるガン転移抑制を導くにはより結合能の強いペプチドの探索が必要であろう。

転移性メラノーマ細胞 A375M に APaseN 遺伝子を導入して強制発現させることによって、癌細胞の浸潤能とタイプ IV コラーゲンの分解およびマトリゲルへの接着の活性増強が認められ、その結果肺転移能も高まっていた。APaseN 遺伝子導入によって、細胞増殖や運動能には変化は認められず、APaseN は浸潤・転移に特異的な

促進因子と考えられた。そこで、APase 阻害剤である bestatin について、まず APaseN の阻害活性を確認し ($K_i = 1.39 \mu\text{M}$)、次いで転移抑制作用を検討したところ、マウス肺扁平上皮癌 KLM205 細胞の転移形成を有意に抑制した。

APaseN は N 末端残基がプロリンやピログルタミン酸以外のオリゴペプチドの N 末端残基を除去する活性を有していることから、細胞外マトリックスの直接分解の他に、プラスミンやタイプIVコラーゲナーゼによる細胞外マトリックスの分解を促進する可能性や他のプロテアーゼの活性化を行うことが考えられる。一方、APaseN は酵素として働く他に、接着分子として機能する可能性も考えられる。実際、phage display 法によって、腫瘍新生血管に対して結合するペプチド配列 NGR (Asn-Gly-Arg) が報告されているが、この配列は APaseN に結合することが明らかとなった。NGR はフィブロネクチン中に見出される配列であり、APaseN が接着分子として機能することが予想される。今回の実験では、APaseN 高発現細胞のフィブロネクチンに対する接着能には変化がなかったが、マトリゲルに対する接着の亢進が認められたことから、マトリゲル中に APaseN と接着する成分があるものと考えられ、この相互作用が癌細胞の浸潤・転移を促進していることが考えられる。

APaseN は単球やマクロファージあるいは血管内皮細胞などの比較的運動性の高い正常細胞にも発現しており、癌細胞の浸潤・転移だけでなく、正常な細胞においても細胞外マトリックスの分解や浸潤において重要な役割を持つものと考えられる。例えば、血管内皮細胞が血管形成する場合に APaseN が機能していることも考えられる。今後、癌治療において、浸潤・転移の抑制とともに、血管新生の阻害も重要な治療戦略であることから、APaseN の細胞機能をさらに解明し、APaseN 阻害剤による癌転移や血管新生の抑制法の開発を試みたい。

5. まとめ

ヒト白血球系食細胞であるマクロファージ様分化型 U937 細胞を用いて、運動・諸機能発現に必須のアクチン細胞骨格系の制御機構を検討した。その結果、アクチン・PIP2 結合蛋白コフィリンのリン酸化・脱リン酸化が極めて重要な役割をしていることが明らかになった。脱リン酸化への細胞内情報伝達にはホスホリパーゼCが、チロシンキナーゼの下流で機能すること、およびコフィリンリン酸化酵素 LIM キナーゼ1が細胞膜領域に移行することが明らかになった。一方、今回、マウス NK レセプターLy49A および Ly49G2 に結合するペプチドの主に *in vitro* における解析を行った。化学合成した9アミノ酸の環状ペプチドは分子量約1,300であるが、いずれもリガンド認識を阻害することができた。来年度は、結合能の高いペプチドを再度スクリーニングすること、および誘導体化、多量体化によるより効果のある物質の探索が必要と思われる。一方、合成ペプチドの生物学的効果、すなわ NK 細胞傷害活性に及ぼす効果を *in vitro* 並びに *in vivo* において検証する必要がある。

これらの NK 細胞傷害活性に対する効果と結合実験との相関等を *in vitro* において比較解析するとともに、*in vivo* における投与、生体内分布、代謝、排泄も考慮した効果的な誘導体の検討を行う必要がある。さらに、APaseN 遺伝子を導入した細胞では、タイプIVコラーゲンの分解能、基底膜マトリゲルへの接着能、浸潤能が亢進し、*in vivo* では転移能が亢進していた。これらのことから、APaseN は細胞外基質の分解や接着に関与し、細胞の浸潤・転移を促進する因子であることが明らかとなった。臨床において白血病治療薬として用いられている bestatin は、APaseN の酵素活性を阻害し、癌細胞の転移を抑制した。

6. 研究発表

1. Matsui, S., Matsumoto, S., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Watanabe, H., Ohashi, K., Mizuno, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., and Suzuki, K.: LIM Kinase Modulates Opsonized Zymosan-triggered Activation of Macrophage-like U937 Cells. Possible Involvement of Phosphorylation of Cofilin and Reorganization of Actin Cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 277, 544-549 (2002)
2. Matsui, S., Adachi, R., Kusui, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Hayakawa, T., Suzuki, K.: U73122 inhibits the dephosphorylation and translocation of cofilin in activated macrophage-like U937

- cells. *Cell. Signalling* 13,17-22 (2001)
3. N. Matsumoto, M. Mitsuki, K. Tajima, W. M. Yokoyama, K. Yamamoto.: The functional binding site for the c-type lectin-like NK cell receptor Ly49A spans three domains of its MHC class I ligand. *J. Exp. Med.* 193, 147-157 (2001)
 4. N. Matsumoto, M. Mitsuki, K. Tajima, W. M. Yokoyama, K. Yamamoto.: The c-type lectin-like NK cell receptor Ly49A recognizes surface of MHC class I ligand composed of three domains. *Int. Immunol.* 13(5) 615-623 (2001)
 5. N. Matsumoto, W. M. Yokoyama, S. Kojima, K. Yamamoto.: The NK cell MHC class I receptor Ly49A detects mutations on H-2Dd inside and outside of the peptide binding groove. *J. Immunol.* 166, 4422-4428 (2001)
 6. R. Tozawa, S. Ishibashi, J. Osuga, K. Yamamoto, H. Yagyu, K. Ohashi, Y. Tamura, N. Yahagi, Y. Iizuka, H. Okazaki, K. Harada, T. Gotoda, H. Shimano, S. Kimura, R. Nagai, N. Yamada.: Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the major receptor subunit: Obligate requirement of HL-1 for the stable expression of oligomeric receptor. *J. Biol. Chem.* 276 12624-12628 (2001)
 7. N. Matsumoto, M. Mitsuki, K. Tajima, W. M. Yokoyama, K. Yamamoto.: Identification of the functional recognition site on MHC class I for a NK cell lectin-like receptor. *Activating and inhibitory Immunoglobulin-like receptor* M. D. Cooper, T. Takai, J. V. Ravetch Eds. pp215-223 Springer-Verlag, Tokyo (2001)
 8. K. Yamamoto, T. Tsuji, T. Osawa.: Affinity chromatography of oligosaccharides and glycopeptides with immobilized lectins. *Protein Protocols Handbook*, 2nd Edition Ed. Walker, J. M. pp917-931 (2002)
 9. K. Sekine, H. Fujii, F. Abe, K. Nishikawa : Augmentation of death ligand-induced apoptosis by aminopeptidase inhibitors in human solid tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 94, 485-91(2001)
 10. 岡田峯明、小笠原亜子佳、関根啓子、瀬野千恵子、西川清広 : 抗エストロゲン剤 Toremifene Citrate の血管新生抑制作用および転移抑制作用. *癌と化学療法* 28, 1099-1104(2001)
 11. T. Onda, Y. Hashimoto, M. Nagai, H. Kuramochi, S. Saito, H. Yamazaki, Y. Toya, I. Sakai, C. J. Homcy, K. Nishikawa, Y. Ishikawa: Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 47785-47793(2001)

平成13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1分野
先端的創薬技術の開発に関する研究

平成14年9月10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