

20020842

厚生労働科学研究研究費補助金
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

遺伝子治療製剤の供給基盤整備と 遺伝子医療への応用に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉 田 純

平成15 (2003) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
遺伝子治療製剤の供給基盤整備と遺伝子医療への応用に関する研究	1
吉田 純	
II. 分担研究報告	
1. 免疫学的検討に関する研究	9
高橋利忠	
2. シグナル伝達機構の解明に関する研究	12
妹尾久雄	
3. バイオインフォマティクスによるゲノム情報の解析と医療への応用	18
小林 猛	
4. アポトーシスに関する研究	20
田沼靖一	
5. 皮膚癌に対する遺伝子治療の開発に関する研究	22
斎田俊明	
6. 遺伝子治療製剤の開発に関する研究	28
水野正明	
7. 人工染色体に関する研究	31
舩本 寛	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別冊	39

I. 総括研究報告

研究要旨

本研究は名古屋大学医学部附属病院に設置され、すでに稼働している我が国初の遺伝子治療用製剤調製施設（遺伝子治療製剤調製室）を中心に総合的な遺伝子医療システムを構築し、我が国における遺伝子治療臨床研究を強力に推進してきた。本年度は①汎用性の高い凍結乾燥製剤の大量調製法を確立し、調製施設を整備した。②純国産技術で開発された我が国最初の悪性グリオーマに対する遺伝子治療臨床研究を、5症例で実施し、うち2症例で有効性が確認できた。③人工染色体、単鎖抗体、インターロイキン8の細胞内シグナル、ハイブリッドベクターを用いた遺伝子導入法の改良等新しい遺伝子治療開発のための基盤研究を進めた。④ヒトβ型インターフェロン遺伝子治療を悪性黒色腫に適応拡大できる準備が整った。

分担研究者

高橋利忠 愛知県がんセンター研究所所長
妹尾久雄 名古屋大学環境医学研究所教授
小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科教授
田沼靖一 東京理科大学薬学部教授
斎田俊明 信州大学医学部教授
水野正明 名古屋大学大学院医学系研究科
助教授
舛本 寛 名古屋大学大学院理学研究科講師

A. 研究目的

本研究は、名古屋大学医学部附属病院に設置され、すでに稼働している我が国初の遺伝子治療用製剤調製施設（遺伝子治療製剤調製室）を中心に総合的な遺伝子医療システムを構築し、我が国における遺伝子治療臨床研究を強力に推進しようとするものである。この目的を実現するため、以下の3つの課題を押し進めてきた。【課題1】遺伝子治療製剤の供給基盤整備及び凍結乾燥製剤の開発と実用化、【課題2】遺伝子治療を推進するために必要な基盤研究、【課題3】遺伝子医療への応用である。

遺伝子治療臨床研究を実施するための具体的なモデルを提唱することは、今後の先端医療開発にとって大きな意味合いを持つ。また、同時に欧米に比べ、遅れている当該分野を早く社会に定着することになる。これは既存の治療では完治できない疾患に罹患した患者に対しては大きな希望につながるものと考えられる。

B. 研究方法

【課題1】遺伝子治療製剤の供給基盤整備及び凍結乾燥製剤の開発と実用化

①製剤の供給基盤整備：名古屋大学の遺伝子治療製剤調製室を中心にクリニカルグレードのプラスミドDNAや遺伝子治療用リポソーム製剤を十分に供給できる体制作りを目指した。一方で、前記の遺伝子治療製剤調製室で調製された遺伝子治療製

剤（遺伝子包埋リポソーム製剤）を実際に臨床研究で使用し、その安全性及び有効性を評価した。さらに、遺伝子治療製剤を他施設に十分供給できるよう大量調製法の確立と大量調製施設の設置を計画した。

②凍結乾燥製剤の開発と実用化：遺伝子治療製剤を「医薬品」として一般診療で用いるためには、製剤の剤形や安定性は極めて重要な課題になる。そこで本研究では、従来液剤として開発されたヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤の剤形変更を検討し、中長期保存型の凍結剤及び凍結乾燥剤の開発を目指した。

【課題2】基盤研究

①インターフェロン（IFN）遺伝子で誘導されるアポトーシスのシグナル伝達機構を明らかにするための検討を行った。IFN mRNAと感受性の相関性の有無を定量型RT-PCR法で、IFNの細胞内シグナル伝達を司るJak-Stat系関連蛋白のリン酸化をウェスタンブロット法で、DNA断片化を引き起こすエンドヌクレアーゼの同定を免疫蛍光染色でそれぞれ行った。また、グリオーマ細胞株を用い、細胞内カルシウムの上昇によるインターロイキン-8（IL-8）の発現変化と、その発現に与えるサイクロスポリンA（CsA）の効果を検討した。

②ヒト人工染色体形成に関わる因子について検討した。

③変異型EGFR受容体に対する単鎖抗体（3C10）の臨床応用を目指すため、担癌マウス（脳内及び皮下）での集積状況をシンチグラフィで検討した。

④免疫疾患や癌に対する新しい治療法の開発において、抗原ペプチドとMHCの結合様式の解明は非常に重要である。そこで知能情報処理的な解析で結合ペプチドを予測する手法の構築を試みた。

⑤悪性黒色腫に対する免疫療法を開発するため、角層を剥離した表皮に悪性黒色腫抗原ペプチドTRP-2、gp100を塗布することによって感作リンパ球を誘導できるか否かを検討した。また、DNAチップ法を用いて新規ヒト悪性黒色腫抗原の同定を試

みた。

【課題3】遺伝子医療への応用

本研究で開発された遺伝子治療製剤を使用して悪性グリオーマに対するヒトβ型インターフェロン遺伝子治療を実施し、その安全性及び有効性を評価した。また、悪性グリオーマ以外の癌腫（悪性黒色腫、腎細胞癌等）での適応を検討した。

（倫理面への配慮）

臨床研究の対象となる患者に対するインフォームド・コンセント（IC）や人権擁護上の配慮については名古屋大学倫理委員会及び遺伝子治療臨床研究審査委員会ですら十分審議された。また、進行中の遺伝子治療臨床研究は国の審査後、承認されたプロジェクトである。一方、動物実験等に関しては実験ごとに名古屋大学 DNA 組換え実験安全委員会ですら承認を受けている。

C. 研究結果及び考察

【課題1】遺伝子治療製剤の供給基盤整備及び凍結乾燥製剤の開発と実用化

当初開発したヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤の剤形は液剤であり、その有効期間は1ヶ月と短く、多施設共同研究を展開するには実用性に難点があった。そのため、本研究では剤形変更を検討し、中長期保存型の凍結剤及び凍結乾燥剤の開発に成功した。また、これを他施設に十分供給できるよう大量調製法の確立と大量調製施設の設置を行った。具体的には、大量調製法の作業手順書を作成した。また、名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室に凍結乾燥機を設置し、凍結乾燥工程のプログラミングを行った。その結果、1回の作業で最高600ピアル程度の調製が可能となった。これにより多施設共同研究を遂行するための製剤供給準備がほぼ完了した。

【課題2】基盤研究

①インターフェロン（IFN）遺伝子で誘導されるアポトーシスのシグナル伝達機構を明らかにするための検討を行った。その結果、IFN 遺伝子が誘導する細胞死のメカニズムには、(1) 脳腫瘍細胞の IFN に対する感受性は、細胞内で産生される IFN の mRNA の量に比例する。(2) IFN が受容体を介して細胞内にシグナルを伝達する経路のひとつである Jak-Stat 経路でのリン酸化が延長・増強される。(3) (1)と(2)の状況が細胞に備わった上で、リポソームが細胞膜と相互作用することで最終的には DNase γ が活性化される。以上、3つのメカニズムのあることがわかった。次にフォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの添加により細胞内カルシウムを上昇させると IL-8 の発現は著明に増加し、その増加は CsA により有意に抑制された。細胞内カルシウムの上昇による IL-8 発現促進には、

転写因子 NF-κB (nuclear factor-kappa B) の活性化が最も重要な役割を果たしていることがゲルシフトアッセイやリポータージーンアッセイにより示された。CsA は IκBα (inhibitor of NF-κB α) の分解を抑制することにより NF-κB の活性化を抑制することも明らかとなった。グリオーマ細胞において IL-8 は血管新生・細胞増殖の促進に関与することが知られている。従って、CsA は細胞内カルシウムの上昇による IL-8 発現促進を抑制することにより、グリオーマ治療に対する補助療法としての可能性が示唆された。

②CENP-B タンパク結合配列に2塩基だけ置換を導入した変異型配列では人工染色体を形成せず、CENP-B の結合がアルフォイド DNA 上へのセントロメア構造形成に必要であることがわかった。また、人工染色体前駆体へ挿入した遺伝子からの強い転写活性は、人工染色体形成に阻害的な影響を与えた。

③^{99m}Tc 標識した 3C10 mAb は、皮下移植モデルだけでなく、脳内移植モデルにおいても高い集積率を示した。

④MHC 分子のエピトープ解析はペプチド医薬の開発につながるため重要であるが、特に MHC クラス II 分子では実験的なエピトープ同定がむずかしい。これを打開する方法として、隠れマルコフモデル (HMM) を適応し、入力として対象ペプチドの長さを固定しなくても解析できる、簡易かつ高精度な結合推定モデル (S-HMM) を構築した。

⑤角層を剥離した表皮に悪性黒色腫抗原ペプチド TRP-2、gp100 を塗布することで感作リンパ球を誘導できることがわかった。また DNA チップ法によって新規ヒト悪性黒色腫抗原 FABP7 を同定した。

【課題3】遺伝子医療への応用

本研究で開発された遺伝子治療製剤を使用して悪性グリオーマに対するヒトβ型インターフェロン遺伝子治療を5例の患者で実施し、その安全性及び有効性を評価した。その結果、製剤が直接的に関連する有害事象は認められなかった。また、治療後3ヶ月目での時点では、2例が PR (Partial Response)、2例が SD (Stable Disease)、1例は判定不能と判定された。うち、2例は1年半にわたり、再燃あるいは再発を見なかった。一方、悪性グリオーマ以外の癌腫（悪性黒色腫、腎細胞癌等）への適応拡大を進めた結果、悪性黒色腫については国に対し実施計画申請を行った。

D. 評価

1) 達成度について

本研究の目的である遺伝子治療製剤の供給基盤整備については、他施設にも十分供給できる体制が確立できた。また、遺伝子医療への応用では、悪性グリオーマ患者5名に対して臨床研究を実施し、名古屋大学で調製した遺伝子治療製剤の安全

性と有効性が確認できた。また、新たな展開として悪性黒色腫に適応拡大できる目処が立ちつつある（現在、国での審査中）。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

大学等で独自に開発し、自らの施設で調製した遺伝子治療製剤を使用した臨床研究が実施できたことは、先端医療開発のひとつの方向性を打ち出せたと言える。使用した遺伝子治療製剤は正電荷多重膜リポソームであり、このシステムを用いた遺伝子治療としては世界で最初のトライアルとなったことから、国際的意義は高い。さらにこれまで有効な治療法がなかった再発・再燃の悪性グリオーマ患者に対し、一定の有効性を示せたことは社会に大きなインパクトを与えた。

3) 今後の展望について

今後は本研究で確立した遺伝子治療製剤供給体制を利用して、さまざまな疾患を対象に遺伝子治療臨床研究を多施設共同体制の下で実施し、先端医療開発を促進したい。また、産業界との連携を深め、医療経済の活性化に役立てたい。

E. 結論

1) 汎用性の高い凍結乾燥型遺伝子治療製剤の開発に成功し、その製剤を大量調製するシステムを確立した。

2) 純国産技術で開発した我が国最初の遺伝子治療製剤を用いて臨床研究を実施した。悪性グリオーマ患者5名で実施した結果、2例でPRが得られた。安全性には問題はなかった。

3) 新しい遺伝子治療開発のための基盤研究が進んだ。

4) ヒト β 型インターフェロン遺伝子治療を悪性黒色腫に適応拡大できる目処が立った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuhara H, Yamamoto N, Hayashi Y, Fukui T, Nishikawa M, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. Improvement of transduction efficiency of recombinant adenovirus vector conjugated with cationic liposome for human oral squamous cell carcinoma cell line. *Oral Oncol*, in press.
2. Nakanishi H, Mizutani Y, Kawauchi A, Ukimura O, Shiraishi T, Hatano M, Mizuno M, Yoshida J, Miki T. Significant antitumoral activity of cationic liposomes containing human interferon- β gene against human renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*, in press
3. Yoshida J, Mizuno M, Nakahara N and Colosi P. Antitumor effect of an experimental intracranial human glioma by adeno-associated virus vector containing the human interferon- β gene. *Jpn J Cancer Res*, 93: 223-228, 2002
4. Ogawa H, Kobayashi T, Yokoyama I, Nagatani N, Mizuno M, Yoshida J, Kadomatsu K, Muramatsu H, Nakao A, Muramatsu T. Reduction of α -galactosyl xenoantigen by expression of endo- β -galactosidase C in pig endothelial cells. *Xeno-transplantation* 9: 290-296, 2002.
5. Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J. Cationic liposomes conjugation to recombinant adenoviral vectors containing herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment reduces viral antigenicity and maintains antitumor activity in mouse subcutaneous glioma model. *Cancer Gene Ther*, 9: 825-829, 2002
6. Kato M, Nagaya T, Fujieda M, Saito K, Yoshida J, Seo H: Expression of PPAR \cdot and its ligand-dependent growth inhibition in human brain tumor cell lines. *Japanese Journal of Cancer Research*, 93(6): 660-666, 2002.
7. Sakano S, Hasegawa Y, Murata Y, Ito T, Genda E, Iwata H, Ishiguro N, Seo H: Inhibitory effect of \cdot FGF on endochondral heterotopic ossification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 680-685, 2002.
8. Shibata A, Nagaya T, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Seo H: Inhibition of NF- κ B activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 73: 237-243, 2002.
9. Wakabayashi K, Kambe F, Nagaya T, Kato M, Saito K, Yoshida J, Seo H: Effect of PPAR \cdot ligand on TNF α -dependent expression of EGF receptor in human glioma cell line. *Environmental Medicine*, 45, 33-35, 2002.
10. Murakami R, Kambe F, Mitsuyama H, Okumura K, Miwata S, Yamamoto R, Seo H: Effect of epidermal growth factor and cyclosporin A on interleukin-8 gene expression in human aortic smooth muscle cells. *Environmental Medicine*, 45, 48-51, 2002.
11. Mitsuyama H, Kambe F, Murakami R, Ishiguro N, Seo H: Analysis of interleukin-8 gene promoter function in human osteoblast-like cells: regulation by Ca²⁺-signaling and Cyclosporin A. *Environmental Medicine*, 45, 52-54, 2002.
12. H. Noguchi, et al.: Hidden Markov

- model-based prediction of antigenic peptides that interact with MHC class II molecules. *J. Biosci. Bioeng.*, 94(3), 264-270 (2002)
13. D. Shiokawa, T. Kobayashi, and S. Tanuma (2002) Involvement of DNase γ in apoptosis associated with myogenic differentiation of C2C12 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 31031-31037
 14. D. Shiokawa, and S. Tanuma (2001) Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase γ during apoptosis. *Biochemistry.* 40, 143-152
 15. T. Kojima, A. Yoshimori, A. Hayakawa, C. A. Del Carpio, and S. Tanuma (2000) Design of an Apoptosis-Inducing short peptide using the system for macromolecular interaction assessment MIAx. *Genome Informatics* 11, 432-433
 16. D. Shiokawa, M. Tanaka, T. Kimura, K. Hashizume, R. Takasawa, H. Ohyama, K. Fujita, T. Yamada, and S. Tanuma (2000) Characterization of two DNase γ -specific monoclonal antibodies and the in situ detection of DNase γ in the nuclei of apoptotic rat thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 343-349
 17. Oguchi M, Sagara J, Matsumoto K, Saida T, Taniguchi S: Expression of lamins depends on epidermal differentiation and transformation. *Br J Dermatol*, 147: 853-858, 2002
 18. Kaneko M, Takeoka M, Oguchi M, Koganehira Y, Murata H, Ehara T, Tozuka M, Saida T, Taniguchi S: Calponin h1 suppresses tumorigenicity of src-induced transformed 3Y1 cells in association with decrease in vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Jpn J Cancer Res* 93:935-943, 2002
 19. Saida T, Oguchi S, Miyazaki A: Dermoscopic findings in pigmented lesions of glabrous skin. ed. by Malvehy J & Puig S: *Principles of Dermoscopy*, CEGE, Barcelona, 2002, pp243-256
 20. Saida T, Oguchi S, Miyazaki A: Dermoscopy for acral pigmented skin lesions. *Clin Dermatol* 20:279-285, 2002
 21. Oguchi S, Kaneko M, Uhara H, Saida T: Docetaxel induced durable response in advanced extramammary Paget's disease: A case report. *J Dermatol* 29: 33-37, 2002
 22. Nobayashi M, Mizuno M, Kageshita T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J: Repeated cationic multilamellar liposome-mediated gene transfer enhanced transcription efficiency against murine melanoma cell lines. *J Dermatol Sci* 29: 206-213, 2002
 23. Uhara H, Saida T, Watanabe T, Takizawa Y: Lymphangiitis of the foot: Lymphatic drainage of the sole. *J Am Acad Dermatol* 47:502-504, 2002
 24. Hayashi K, Ohkubo S, Watanabe T, Yamazaki Y, Horiuchi N, Saida T: Malignant melanoma on the sole showing prominent neural differentiation. *Int J Dermatol* 41: 247-249, 2002
 25. Wakamatsu K, Kageshita T, Furue M, Hatta Y, Kiyohara Y, Nakayama J, Ono T, Saida T, Takata T, Tsuchida T, Uhara H, Yamamoto A, Yamazaki N, Naito A, Ito S: Evaluation of 5-S-cysteinyl-dopa as a marker of melanoma progression: 10 years' experience. *Melanoma Res* 12: 245-253, 2002
 26. Koganehira Y, Takeoka M, Ehara T, Sasaki K, Murata H, Saida T, Taniguchi S: Reduced expression of actin-binding proteins, h-caldesmon and calponin h1, in the vascular muscle inside melanoma lesions: An adverse prognostic factor of malignant melanoma. *Br J Dermatol* 148: 2003 (in press)
 27. Ryuke Y, Mizuno M, Natsume A, Suzuki O, Nobayashi M, Kageshita T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J: Growth inhibition of subcutaneous mouse melanoma and induction of natural killer cells by liposome-mediated interferon- β gene therapy. *Melanoma Res* 13: 2003 (in press)
 28. Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, Sera F, Binder M, Cerroni L, De Rosan G, Ferrara G, Hofmann-Wellenhop R, Landthaler M, Menzies SW, Pehamberger H, Piccolo D, Rabinowitz HS, Schiffner R, Staibano S, Stolz W, Bartenjev I, Blum A, Braun R, Cabo H, Carli P, De Giorgi Y, Fleming MG, Grichnik JM, Grin CM, Halpern AC, Johr R, Katz B, Kenet RO, Kittler H, Kreuzsch J, Malvehy J, Mazzocchetti G, Oliviero M, Ozdemir F, Peris K, Perotti R, Perusquia A, Pizzichetta MA, Puig S, Rao B, Rubegni P, Saida T, Scalvenzi M, Seidenari S, Stanganelli I, Tanaka M, Westerhoff K, Wolf IH, Braun-Falco O, Kerl H, Nishikawa T, Wolff K, Kopf AW: Dermoscopy of pigmented skin lesions: Results of a consensus meeting via the internet. *J Am Acad Dermatol* 48: 2003 (in press)

29. 齋田俊明：メラノーマか否かそれが問題だ。清水 宏編：皮膚疾患のとりえ方、文光堂、東京、2002、pp192-204
30. 齋田俊明：小色素斑をみたら。小野友道編、発疹から病気がみえる、文光堂、東京、2002、pp164-169
31. 齋田俊明：色素異常症。亀山正邦他編、今日の診断指針第5版、医学書院、東京、2002、pp74-76
32. 齋田俊明：有棘細胞癌。玉置邦彦他編、最新皮膚科学大系 12 巻、中山書店、東京、2002、pp66-81
33. 野呂佐知子、山本明史、山崎直也、町田秀樹、山崎自子、宇原 久、齋田俊明：悪性黒色腫の新 AJCC 病期分類と現行 UICC 分類の比較検討：本邦 342 例に関する解析。Skin Cancer 17:38-43, 2002
34. 石原和之、齋田俊明、山本明史：悪性黒色腫の新 TNM 分類と解説ならびに新病期による統計（1992~1996 年）。Skin Cancer 17:113-118, 2002
35. 久保仁美、齋田俊明：黒い腫瘍の鑑別診断。診断と治療 90:1628-1633, 2002
36. 林 宏一、齋田俊明：皮膚癌。総合臨床 51:2635-2640, 2002
37. 齋田俊明：悪性黒色腫と関連疾患、玉置邦彦他編、最新皮膚科学大系 11 巻、中山書店、東京、2002、pp226-253
38. 齋田俊明：悪性黒色腫（メラノーマ）、植木宏明他編、皮膚科専門医テキスト改訂第2版、南江堂、東京、2002、pp665-673
39. 石原和之、齋田俊明、山本明史：悪性黒色腫の統計（1992~1996 年）。Skin Cancer 17: 7-15, 2002
40. 宇原 久、齋田俊明：抗がん剤適正使用のガイドライン(案)：皮膚がん。癌と化学療法 29: 1074-1080, 2002
41. 齋田俊明、塩原哲夫、宮地良樹、渡辺晋一(共編)：今日の皮膚疾患治療指針第3版、医学書院、東京、2002(総頁 789 頁)
42. 齋田俊明：黒色腫瘍を生じる皮膚疾患、ダーモスコピー、悪性黒色腫。宮地良樹他編、皮膚疾患実践ガイド、文光堂、東京、2002、pp32-33, pp75-78, pp604-607
43. 齋田俊明、真鍋俊明、上出良一、三原一郎、竹内紋子(共著)：メラノーマの病理組織診断：症例検討から学ぶ診断のポイント。文光堂、東京、2002(総頁 158 頁)
44. 齋田俊明、瀧川雅浩、山本明史、土田哲也、宇原 久(編集)：皮膚悪性腫瘍取扱い規約第1版。金原出版、東京、2002(総頁 205 頁)
45. 齋田俊明、小口真司、宮寄 敦：ダーモスコピー：色素性皮膚病変の革新的診断法。Visual Dermatol 1: 76-87, 2002
46. 齋田俊明、小口真司、宮寄 敦、田中 勝：Consensus Net Meeting on Dermoscopy 2000。臨床皮膚 56(増)：90-96, 2002
47. 齋田俊明：皮膚癌。山口 徹他編、今日の治療指針 2003 年版、医学書院、東京、2003、pp809-811
48. 齋田俊明：悪性黒色腫、日本臨床腫瘍研究会編、臨床腫瘍学第3版、癌と化学療法社、東京、2003(印刷中)
49. M. Suzuki, Y. Mizutani-Koseki, Y. Fujimura, H. Miyagishima, T. Kaneko, Y. Takada, T. Akasaka, H. Tanzawa, Y. Takihara, M. Nakano, H. Masumoto, M. Vidal, K. Isono and H. Koseki: Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. Development, 129, 4171-4183 (2002)
50. J. Ohzeki, M. Nakano, T. Okada and H. Masumoto: CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. J. Cell Biol. 159, 765-775 (2002)
51. 舛本 寛、中野めぐみ、大関淳一郎：セントロメアの構造と機能。実験医学, 20, 1550-1556 (2002)
52. 舛本 寛：哺乳類人工染色体。日本生化学会編：バイオサイエンスの世紀、15、生命工学、23-32 (2002)

2. 学会発表

- 高須 俊太郎、吉川和宏、村松秀樹、林 毅志、河田陽一、中原紀元、若林俊彦、水野正明、宮石 理、樋口徹也、織内 昇、遠藤啓吾、上田龍三、佐賀信介、高橋利忠、吉田 純、高橋利忠：^{99m}Tc を標識した Type III mutant EGFR を特異的に認識する 3C10 抗体によるヌードマウス脳内移植モデルでの画像化。第6回基盤的癌免疫研究会総会 2002. 7. 17 久留米
- 高須 俊太郎、吉川 和宏、中原 紀元、若林 俊彦、水野 正明、宮石 理、樋口 徹也、織内 昇、遠藤 啓吾、上田 龍三、佐賀 信介、吉田 純、高橋 利忠：type III mutant EGFR を特異的に認識する ^{99m}Tc 標識 3C10 モノクロナル抗体によるヌードマウス脳内移植モデルでの画像診断。第 61 回日本癌学会総会 2002. 10. 1 東京
- 村松 秀樹、吉川 和宏、林 毅志、高須 俊太郎、河田 陽一、小崎 健一、新美 岳、前田 浩義、佐藤 滋樹、佐賀 信介、高橋 利忠、上田 龍三：抗 CD25 単鎖抗体の作製。第 61 回日本

- 癌学会総会 2002. 10. 2 東京
4. 高須 俊太郎、吉川和宏、中屋敷典久、中原紀元、藤井正純、若林俊彦、水野正明、宮石理、織内 昇、樋口徹也、遠藤啓吾、佐賀信介、高橋利忠、吉田 純 : Type III mutant EGFR を特異的に認識する 3C10 抗体によるヌードマウス脳内移植モデルでの targeting. 第 61 回日本脳神経外科学会総会 2003. 10. 3 松本
 5. 村上隆一郎、神部福司、奥村健二、妹尾久雄 : 血管平滑筋細胞において cyclosporin A (CsA) は転写因子 AP-1 の活性化を介して IL-8 産生を促進する. 第 75 回日本内分泌学会, 2002. 6. (大阪)
 6. 光山浩人、黒河内 和俊、神部福司、石黒直樹、妹尾久雄 : TNF α は NF- κ B を介して骨芽細胞間シグナル伝達を増加させる. 第 75 回日本内分泌学会, 2002. 6. (大阪)
 7. 星野 伸、高岸芳子、神部福司、妹尾久雄、村田善晴 : マウス脳における甲状腺ホルモン応答性遺伝子 ZAKI-4 がコードする蛋白の局在 : カルシニューリン (Cn) の局在との比較. 第 75 回日本内分泌学会, 2002. 6. (大阪)
 8. 日比八束、長屋 敬、今井常夫、船橋啓臣、妹尾久雄 : 各種甲状腺腫瘍における Pax-8-PPAR \cdot 融合癌遺伝子の発現の検討. 第 75 回日本内分泌学会, 2002. 6. (大阪)
 9. Cao X, Kambe F, Sarkar D, Ohmori S, Seo H: Involvement of cyclosporin A (CsA)- and rapamycin-sensitive pathway for the thyroid hormone-mediated induction of ZAKI-4 \cdot expression. 84th Annual Meeting of the Endocrine Society, San-Francisco, USA, 2002.
 10. 若林健一、神部福司、長屋敬、齋藤清、吉田純、妹尾久雄 : ヒトグリオーマ細胞におけるカルシウムシグナリングによるサイトカイン発現調節 : 免疫抑制剤の作用. 第 61 回日本脳神経外科学会総会 2002. 10. (松本)
 11. R. Kato, et al. : Hidden Markov Model-Based Prediction of Antigenic Peptides that Interact with MHC Class II Molecules, YABEC 2002, Nov. 10-12, Taiwan (2002)
 12. 加藤竜司ら : 隠れマルコフモデルを用いた MHC class II 分子と相互作用するペプチドの予測, CBI 学会 (於 : 東京), (2002)
 13. Saida T: Workshop on Dermoscopy: Pigmented lesions of palms and soles. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France, 2002. 7
 14. Uhara H, Saida T, Watanabe T, Takizawa Y: Lymphangitis of the foot demonstrating lymphatic drainage pathways from the sole. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France, 2002. 7
 15. Koganehira Y, Takeoka M, Ehara T, Sasaki K, Murata H, Saida T, Taniguchi S: Prognostic significance of reduced expression of actin-binding proteins calponin-h1 and h-caldesmon in the vessels of primary melanoma. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France, 2002. 7
 16. Kawachi S, Kidoh K, Koga H, Hama H, Oguchi S, Minemura K, Saida T: A case report of Carney complex: The complex of myxomas spotty pigmentation, endocrine overactivity, and schwannomas. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France, 2002. 7
 17. Oguchi M, Sagara J, Matsumoto K, Saida T, Taniguchi S: Expression level of lamins depends on the epidermal differentiation and transformation. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France, 2002. 7
 18. Yamazaki Y, Miyazaki A, Kubo H, Kawachi S, Saida T, Ota Y, Oguchi S, Ishihara Y, Horigome R, Miyashita T, Nakai K, Takizawa M, Murase S: Teledermatology conference among five hospitals using a videophone network. 3rd European Symposium on Teledermatology, Graz, Austria, 2002. 1
 19. 斎田俊明 : 色素性病変をどう診るか、第 18 回日本臨床皮膚科医学会臨床学術大会 (シンポジウム)、仙台、2002. 4
 20. 久保仁美、松本和彦、斎田俊明、影下登志郎、水野正明、吉田 純 : ヒト β 型インターフェロンによる悪性黒色腫の遺伝子治療開発のための基礎実験 (続報)、第 101 回日本皮膚科学会総会、熊本、2002. 6
 21. 山崎自子、小口真司、松本和彦、斎田俊明、太田由子、石原八州司、堀米玲子、中井桂司、滝沢正臣、村瀬澄夫 : テレビ電話を用いた多施設間遠隔皮膚科カンファランス、第 101 回日本皮膚科学会総会、熊本、2002. 6
 22. 古賀弘志、河内繁雄、斎田俊明、徳田隆彦 : Remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema (RS 3 PE) 症候群の 1 例、第 101 回日本皮膚科学会総会、熊本、2002. 6.
 23. 宮寄 敦、小口真司、斎田俊明 : 掌蹠の色素細胞母斑の dermoscopy 所見における fibrillar/filamentous pattern の成因について : 解剖学および病理組織学的検討、第 101 回日本皮膚科学会総会、熊本、2002. 6
 24. 尾藤利憲、渡辺衣里、市橋正光、神保孝一、金子史男、斎田俊明、大塚藤男、石川 治、

- 瀬戸山充、神崎 保：全国8大学皮膚科の共同による皮膚癌の発症因子と予防因子の症例対照研究、第18回日本皮膚悪性腫瘍学会、米子、2002.6
25. 林 宏一、斎田俊明：内眼角部皮膚悪性腫瘍切除後の再建、第18回日本皮膚悪性腫瘍学会、米子、2002.6
 26. 関 詩穂、島田 茜、新倉冬子、金児みわ子、小口真司、宇原 久、河内繁雄、斎田俊明、福沢正男：合併症のため放射線療法を選択した上眼瞼メルケル細胞癌の2例、第18回日本皮膚悪性腫瘍学会、米子、2002.
 27. 小口美抄枝、相良淳二、松本和彦、斎田俊明、谷口俊一郎：皮膚表皮性腫瘍におけるラミンの発現および局在の検討、第27回日本研究皮膚科学会、京都、2002.8
 28. 金児みわ子、小口美抄枝、小金平容子、村田浩、斎田俊明、谷口俊一郎：カルボニン h1 (CNh1) の src-形質転換線維芽細胞 SR-3Y1 における血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現低下と関連した造腫瘍性の抑制、第27回日本研究皮膚科学会、京都、2002.8
 29. 斎田俊明：皮膚悪性腫瘍の診断・治療の新展開、第40回日本癌治療学会総会 (ワークショップ)、東京、2002.9
 30. 宇原 久：皮膚悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節生検の試み、第40回日本癌治療学会総会、東京、2002.9
 31. 斎田俊明：悪性黒色腫の基礎的研究と診断・治療の新展開、第53回日本皮膚科学会中部支部学術大会 (シンポジウム)、岐阜市、2002.9
 32. 古賀弘志、宇原 久、斎田俊明、松沢正浩、御子柴 甫：血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy: TMA) を伴う高血圧性腎クリーゼを発症した全身性強皮症の1例、第53回日本皮膚科学会中部支部学術大会、岐阜市、2002.9
 33. 金児みわ子、小口美抄枝、小金平容子、村田浩、江原孝史、斎田俊明、江原孝史、竹岡みち子、谷口俊一郎：カルボニン h1 (CNh1) の src-形質転換線維芽細胞 SR-3Y1 における血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現低下と関連した造腫瘍性の抑制、第61回日本癌学会総会、東京、2002.10
 34. 関 詩穂、小口美抄枝、斎田俊明、小口真司：日本人における後天性色素細胞母斑の数と分布：メラノーマ患者と非メラノーマ患者の比較、第61回日本癌学会総会、東京、2002.10
 35. 関 新、相良淳二、増本純也、横山太郎、小金平容子、小口美抄枝、斎田俊明、谷口俊一郎：メラノーマにおけるアポトーシス関連分子 ASC の発現低下と ASC 遺伝子のメチル化について、第61回日本癌学会総会、東京、2002.10
 36. 木藤健治、島田 茜、関 詩穂、金児みわ子、宇原 久、斎田俊明、樋口 誠：腎炎を合併した relapsing polychondritis の一例、第66回日本皮膚科学会東部支部学術大会、つくば市、2002.10
 37. 墨矢咲子、宮寄 敦、木庭幸子、村田 浩、塩原順子、斎田俊明：悪性線維性組織球症 (MFH) の1例、第66回日本皮膚科学会東部支部学術大会、つくば市、2002.10
 38. 後藤康文、鈴木ゆり子、猪爪隆史、斎田俊明、河上 裕：DNA チップを用いた悪性黒色腫抗原 FABP7 の同定、第32回日本免疫学会総会、東京、2002.12
 40. Yoshida J. Basic and Clinical Studies of Cancer Gene Therapy in Central Nervous System. The International Symposium on Drug Delivery to the Central Nervous System: Bridging the Gap between Fundamental and Applied Science (ISDDC). (2003 Jan. 29-31, Tokyo)
 41. 水野正明、斉藤 清、吉田 純 神経皮膚症候群に対する分子治療の可能性 厚生労働省 班研究 (平成14年12月20日、福岡)
 42. 吉田 純 ベクター・コアバンクにおけるリポソームの位置づけ 文部科学省 科学技術振興調整費 知的基盤整備推進シンポジウム (平成14年11月15,16日、つくば)
 43. 水野正明、吉田 純 メラノーマの遺伝子治療の新しい展開 第40回日本癌治療学会総会 (平成14年10月16-18日、東京)
 44. 水野正明、斉藤竜太、波多野 学、吉田 純 悪性グリオーマに対するヒトβ型インターフェロン遺伝子治療の新しい展開 第61回日本癌学会 (平成14年10月1-3日、東京)
 45. 水野正明、斉藤竜太、波多野 学、吉田 純 悪性グリオーマに対するヒトβ型インターフェロン遺伝子治療の新しい展開 第61回日本脳神経外科学会総会 (平成14年10月2-4日、松本)
 46. Yoshida J, Mizuno M, Kajita Y, Fujii M, Wakabayashi T. Human beta-interferon gene therapy for malignant glioma: clinical trials. The Japan Society of Gene Therapy's 8th Annual Meeting. (2002, July 18-20, Tokyo).
 47. Mizuno M, Saito R, Hatano M, Yoshida J. Interferon-β gene therapy for human glioma cells by heat-inducible adeno-associated virus vectors and low-temperature hyperthermia
 48. The American Society of Gene Therapy's 5th Annual Meeting. (2002, June 5-9, Boston,

- USA).
49. 中野めぐみ、鈴木伸卓、大関淳一郎、舛本寛：
De novo assembly, inactivation and re-assembly of centromere chromatin of Human Artificial Chromosomes. 国際イネゲノムワークショップ2002、つくば、2002年2月7日
 50. 舛本寛：ヒト染色体セントロメアの新規形成とクロマチン再構成. 第55回日本細胞生物学会大会、2002年5月21日
 51. 舛本寛：ヒト染色体セントロメア構造形成とダイナミクス. 第75回日本生化学会大会、京都、2002年10月14日
 52. H. Masumoto: Centromere chromatin assembly on human artificial chromosomes. CREST Int. Symp. "Structure and Function of Plant Centromere", 倉敷、2002年11月15日
 53. 舛本寛、中野めぐみ、大関淳一郎、岡本康秀：
アルフォイドDNAに依存したセントロメア構造形成と不活性化の機構. 第25回日本分子生物学会年会、2002年12月12日
 54. 大関淳一郎、中野めぐみ、岡田晃明、舛本寛：
CENP-B box 配列は新規セントロメア構造形成に必須であるが、十分ではない. 第25回日本分子生物学会年会、2002年12月13-14日
 55. 中島大、大西涼子、金田安史、舛本寛：アルフォイド配列外クロマチンの新規セントロメア構造形成への影響. 同上
 56. H. Masumoto: Essential Sequences for Centromere Assembly Assessed by the Human Artificial Chromosome Assay. Australia-Japan Symposium on Biomedical Sciences: Melbourne, Australia, February 23-24, 2003
7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
- | | |
|-----------------------|----|
| 凍結乾燥製剤の調製法 | 1件 |
| 特願平 2002-258305 (出願中) | |

II. 分担研究報告

研究要旨

悪性神経膠腫の一部には III 型の変異 EGF レセプター (Type III mutant epidermal growth factor receptor (EGFR)) の発現が認められ、正常細胞には発現されていないため、腫瘍細胞の標的分子として適していると考えられる。これまでに Type III mutant EGFR を特異的に認識する、3C10 モノクローナル抗体 (mAb) の作製に成功しているが、今回、本抗体の臨床応用の可能性を検討することを目的として、Type III mutant EGFR を強発現する悪性神経膠腫細胞株を皮下または脳内に移植し、腫瘍を形成したヌードマウスを対象として、^{99m}Tc 標識した 3C10 mAb の体内動態を検討した。その結果、皮下移植モデルだけでなく、脳内移植モデルにおいても高い集積が観察された。また、シンチグラフィにおいても、脳内移植腫瘍に特異的に標識抗体の集積する画像が得られた。

A. 研究目的

Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子は、ヒト第 7 染色体上にあり、いくつかのがん腫で増幅、過剰発現が認められるが、悪性神経膠芽腫では、約 40 から 60% に過剰発現が認められると報告されている。本腫瘍では増幅とともに、3 種類に分類される EGFR 遺伝子の欠失変異の発現が認められ、その 90% が Type III (EGFRvIII) と分類される変異で、801 塩基の遺伝子の欠失に伴ってドメインの一部が欠失するとともに、再構成部位には 1 個の新しいアミノ酸、グリシンが発現するという特徴的な構造を示す。

EGFRvIII は、悪性神経膠芽腫の約 20% で発現が認められる（さらに、肺がん、乳がん、子宮がん、前立腺がんでも発現が報告されているが、確認はされていない）。一方、正常細胞では発現が認められていないため、腫瘍特異的な分子標的療法の良いターゲットとなりえる。

これまでに、EGFRvIII を特異的に認識する 3C10 マウスモノクローナル抗体 (mAb) (IgG1) を作製し、さらにこの抗体の臨床応用を目指し、組み換え型抗体として単鎖抗体 (scFv) の作製に成功している。本年度では、マウス抗体としての臨床応用の可能性を検討するため、EGFRvIII を発現する腫瘍株を皮下のみならず脳内に移植したヌードマウスを用いて、^{99m}Tc 標識 3C10 mAb の体内動態を検討した。

B. 研究方法

1. 標的細胞における EGFRvIII の発現と 3C10 mAb の反応性の検討

ヒト悪性神経膠腫細胞株で、野生型 EGFR を発現している U87MG 株、および U87MG に EGFRvIII の cDNA を導入した U87MG-ΔEGFR 株に対して、3C10 mAb、続いて FITC 標識抗マウス IgG 抗体を反応させ、FACS により EGFRvIII の発現を評価した。コントロールとして腎がんの細胞表面抗原と反応する RCS-1 mAb を用いた。

2. 標的細胞の腫瘍形成と生体内での EGFRvIII 発現の検討

U87MG-ΔEGFR および U87MG をヌードマウスの右大脳半球に移植し、それぞれ 2 週後、6 週後に腫瘍の大きさと EGFRvIII 発現を検討した。組織は、10%ホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、HE 染色を行って観察した。また、凍結切片を用いた免疫染色も行って観察した。

3. ^{99m}Tc 標識 3C10 mAb の標的細胞に対する反応性の検討

3C10 および RCS-1 mAb に ^{99m}Tc を標識し、標的細胞との反応性を調べた。標識した抗体を標的細胞 (2×10^6) と反応させ、上清と細胞に分離し、それぞれの放射線量を測定した。

4. ヌードマウス皮下移植モデルおよび脳内移植モデルでの 3C10 mAb の体内動態の検討

U87MG-ΔEGFR または U87MG を用いて、皮下または脳内に腫瘍を形成させたヌードマウスに、0.37 MBq ($1 \mu\text{g}$) の ^{99m}Tc 標識 3C10 または RCS1 mAb を静脈内投与し、24 時間後に腫瘍および各臓器の放射線量を測定した。

5. ヌードマウス脳内移植腫瘍の ^{99m}Tc 標識 3C10 mAb による画像化の検討

ヌードマウス脳内移植モデルに、^{99m}Tc 標識 3C10 mAb を 11.1 MBq ずつ静脈内投与し、3、6、24 時間後のシンチグラフィを撮像した。（ガンマカメラ、PRISM300、Picker 社を使用）

C. 研究結果

1. 標的細胞における EGFRvIII の発現と 3C10 mAb の反応性

3C10 mAb は、U87MG-ΔEGFR に対してのみ反応性が認められ、U87MG には反応しなかった。本結果により、3C10 mAb の U87MG-ΔEGFR に発現している EGFRvIII 抗原に対する反応性が確認できた。

2. 標的細胞の腫瘍形成と生体内での EGFRvIII 発現

U87MG. ΔEGFR の増殖は極めて早く、U87MG が同等の大きさの腫瘍を形成するのに約3倍の日数を要した(平均14日対42日)。また、3C10 mAbを用いた免疫染色により、U87MG. ΔEGFR の腫瘍でのEGFRvIII発現を確認した。

3. ^{99m}Tc 標識 3C10 mAb の標的細胞に対する反応性

U87MG. ΔEGFR に対しては、^{99m}Tc 標識 3C10 mAb の41%が細胞に結合したが、コントロールのRCS-1 mAbでは、1%未満しか結合が認められなかった。U87MG に対しては、3C10 mAb、RCS-1 mAb ともに細胞への結合は1%未満だった。

4. ノードマウス皮下移植モデルおよび脳内移植モデルでの3C10 mAbの体内動態

各臓器 1g あたりに集積した投与放射線量の比較により、投与抗体の体内分布および腫瘍への集積性を検討した。また、腫瘍：血液比および正常組織：血液比を算出し、抗体の反応の特異性を検討した。

U87MG. ΔEGFR 皮下移植モデルに3C10 mAbを投与した場合は、腫瘍：血液比は、 10.30 ± 0.90 と高い値を示した。他の正常組織では、組織：血液比が1を超える組織はなく、また、U87MG 皮下移植モデルに3C10 mAbを投与した場合は 0.50 ± 0.26 、U87MG. ΔEGFR 皮下移植モデルにRCS-1 mAbを投与した場合は 0.97 ± 0.01 と、腫瘍：血液比は1未満であった。

U87MG. ΔEGFR 脳内移植モデルに3C10 mAbを投与した場合、正常脳における組織：血液比は 0.06 ± 0.02 と非常に低い値であったが、腫瘍：血液比は 4.01 ± 0.84 を示し、腫瘍への明らかな集積性を示した。また、U87MG 脳内移植モデルに3C10 mAbを投与した場合は 0.43 ± 0.13 、U87MG. ΔEGFR 脳内移植モデルにコントロールのRCS-1 mAbを投与した場合は 0.72 ± 0.32 と、腫瘍：血液比は、いずれも1未満で、腫瘍の局在に関わらず、3C10 mAbの標的細胞への特異的な集積が観察された。

5. ノードマウス脳内移植腫瘍の^{99m}Tc 標識 3C10 mAb による画像化

U87MG. ΔEGFR 脳内移植モデルでは、3時間後より脳内移植片への集積が認められ、時間とともに腫瘍への集積が増強した。24時間後では、他臓器への集積が減少し、腫瘍への集積が際立つ画像が得られた。

D. 考察

EGFRvIIIは、悪性神経膠芽腫をはじめいくつかのがん腫に発現し、正常細胞には発現が認められないため、分子標的療法の良いターゲットとして期待されている。3C10 mAbは、EGFRvIIIを発現する細胞を皮下あるいは脳内に移植した腫瘍に対し、腫瘍：血液比が各々10、4と強い集積性が観察され、脳内にあつては、腫瘍：正常脳組織の比でおおよそ67と極めて強い腫瘍特異的な集積が観察された。

他の研究グループでも、EGFRvIIIを特異的に認識

するモノクローナル抗体を作成し、同様にマウスでの体内動態を検討しているが、何れも腫瘍：血液比で1前後の値であり、腫瘍への集積性の点では当グループの3C10 mAbが優れていると考えられた。しかし、既にこれらの抗体を用いた臨床研究が他研究グループより開始されており、治療効果を示唆する成績も報告されている。

3C10 mAbは、他の抗体と比較して、明らかに優れた腫瘍への集積を示し、腫瘍の画像化も可能であった。これらの結果から、3C10 mAbの臨床応用が期待される。しかしながら、本研究はマウス抗体を用いての実験成績であり、その免疫原性を低下させるため、ヒト・マウスキメラ抗体の作成等の準備を開始している。

E. 結論

ノードマウス皮下移植モデルおよび脳内移植モデルにおいて、^{99m}Tc 標識 3C10 mAbの生体内での体内動態を検討したが、U87MG. ΔEGFR 移植腫瘍への特異的な集積が認められた。また、シンチグラフィにおいて、腫瘍への集積が認められる画像を得ることができた。3C10 mAbのキメラ抗体化による、悪性神経膠芽腫の診断、治療への応用が期待される。

F. 研究発表

1. 学会発表

・高須 俊太郎、吉川和宏、村松秀樹、林 毅志、河田陽一、中原紀元、若林俊彦、水野正明、宮石 理、樋口徹也、織内 昇、遠藤啓吾、上田龍三、佐賀信介、高橋利忠、吉田 純、高橋利忠：^{99m}Tcを標識したType III mutant EGFRを特異的に認識する3C10抗体によるノードマウス脳内移植モデルでの画像化。第6回基盤的癌免疫研究会総会 2002. 7. 17 久留米

・高須 俊太郎、吉川 和宏、中原 紀元、若林 俊彦、水野 正明、宮石 理、樋口 徹也、織内 昇、遠藤 啓吾、上田 龍三、佐賀 信介、吉田 純、高橋 利忠：type III mutant EGFRを特異的に認識する^{99m}Tc 標識 3C10 モノクローナル抗体によるノードマウス脳内移植モデルでの画像診断。第61回日本癌学会総会 2002. 10. 1 東京

・村松 秀樹、吉川 和宏、林 毅志、高須 俊太郎、河田 陽一、小崎 健一、新美 岳、前田 浩義、佐藤 滋樹、佐賀 信介、高橋 利忠、上田 龍三：抗CD25単鎖抗体の作製。第61回日本癌学会総会 2002. 10. 2 東京

・高須 俊太郎、吉川和宏、中屋敷典久、中原紀元、藤井正純、若林俊彦、水野正明、宮石 理、織内 昇、樋口徹也、遠藤啓吾、佐賀信介、高橋利忠、吉田 純：Type III mutant EGFRを特異的に認識する

3C10 抗体によるヌードマウス脳内移植モデルでの
targeting。第 61 回日本脳神経外科学会総会 2003.
10. 3 松本

研究要旨

悪性脳腫瘍は手術療法、化学療法、放射線療法などを併用しても、その予後は極めて不良であり、有効な治療法が望まれている。一方、脳腫瘍の進展・虚血の際に細胞内カルシウムの上昇が関与している報告がみられる。本研究では、グリオーマ細胞株を用い、細胞内カルシウムの上昇によるインターロイキン-8 (IL-8) の発現変化と、その発現に与えるサイクロスポリン A (CsA) の効果を検討した。フォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの添加により細胞内カルシウムを上昇させると IL-8 の発現は著明に増加し、その増加は CsA により有意に抑制された。細胞内カルシウムの上昇による IL-8 発現促進には、転写因子 NF- κ B (nuclear factor-kappa B) の活性化が最も重要な役割を果たしていることがゲルシフトアッセイやリポータージーンアッセイにより示された。CsA は I κ B α (inhibitor of NF- κ B α) の分解を抑制することにより NF- κ B の活性化を抑制することも明らかとなった。グリオーマ細胞において IL-8 は血管新生・細胞増殖の促進に関与することが知られている。従って、CsA は細胞内カルシウムの上昇による IL-8 発現促進を抑制することにより、グリオーマ治療に対する補助療法としての可能性が示唆された。

A. 研究目的

脳腫瘍の進展にカルシウム・シグナリングが関与する報告がみられる。グリオーマ細胞においてフォルボールエステルなどの投与により細胞内カルシウム・シグナリングを活性化すると、VEGF (vascular endothelial growth factor) の産生増加や MMP (matrix metalloproteinase) の発現増加が生じ、血管新生および細胞浸潤の促進が認められるとするものである。このカルシウム・シグナリング系の賦活は各種インターロイキンの発現にも関与することが知られている。例えばインターロイキン 8 (IL-8) は、白血球においてフォルボールエステルやカルシウムイオノフォアによるカルシウム上昇刺激により著明な産生亢進を生じ、炎症反応に関与することが知られている。さらに近年の研究では種々の腫瘍細胞においても IL-8 の産生が認められ、細胞増殖・血管新生・細胞浸潤などの作用があることが明らかにされつつある。またこうした IL-8 による腫瘍細胞進展に関する作用には、VEGF や MMP との関連を指摘する報告も多い。このような背景から IL-8 を含めたサイトカインを標的とした治療は、腫瘍治療の補助療法としてその可能性が模索されている。

一方サイクロスポリン A (CsA) は、免疫抑制剤として IL-2 の他種々のサイトカイン産生を抑制することが知られ、臓器移植医療において既に臨床応用されている。近年、CsA が脳梗塞・脊髄損傷に対して神経保護効果を示すことが報告され、またグリオーマにおいては apoptosis 誘導を促す報告がみられるなど、神経系疾患に与える影響が注目されている薬剤である。CsA のサイトカイン発現の抑制機序として、細胞内カルシウムの上昇により活性化される蛋白脱リン酸化酵素、カルシニューリンの抑制が知られている。

これまで脳腫瘍における細胞内カルシウムの上昇による IL-8 発現についての詳細な報告は少ない。今回我々は、グリオーマ細胞株を用いて細胞内カルシウム

上昇刺激による IL-8 遺伝子の発現変化を検討し、その変化に与える CsA の効果ならびに作用機序について検討した。

B. 研究方法

U251MG グリオーマ細胞株を用い、フォルボールエステル PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, 50nM) およびカルシウムイオノフォア (A23187, 1 μ M) を添加して細胞内カルシウムの上昇させた。

PMA/A23187 添加 6 時間後に細胞を採取し、IL-8 mRNA の発現変化を Northern blot 法により検討した。また培養液中の IL-8 を ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) 法にて測定した。CsA の IL-8 発現に及ぼす影響の検討では、PMA/A23187 添加 1 時間前に CsA (1 μ M) を加えた。

細胞内カルシウムの上昇による IL-8 遺伝子の発現促進機序を検討するため、IL-8 promoter (-1460~+44bp) とその deletion mutant の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。更に、-133~-60bp 領域に存在する NF- κ B site および AP-1 site の mutant をそれぞれ作成した。これら luciferase reporter gene の発現変化を検討することにより、細胞内カルシウムの上昇に依存するプロモーター部位を検討した。なお、導入効率をモニターするため、同時に β -galactosidase 発現プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクション後 12 時間して PMA/A23187 添加し、24 時間後に細胞を採取して luciferase 活性および β -galactosidase 活性を測定した。

転写因子 NF- κ B および AP-1 の活性化の検討については、PMA/A23187 添加 2 時間後に核内蛋白を抽出し、gel-shift assay を用いて解析した。

NF- κ B 活性化の上流にある I κ B α のカルシウム刺激による経時的変化は、Western blot 法にて解析した。

なお CsA の IL-8 発現に及ぼす影響の検討では、いずれの実験においても PMA/A23187 添加 1 時間前に CsA (1 μ M) を加えた。

結果は、Northern blot・ELISA・Luciferase reporter assay においては triplicate での実験結果を mean \pm SD で示した。

C. 結果

1. 細胞内カルシウムの上昇による IL-8

発現の促進

PMA/A23187 により IL-8 mRNA は著しく増加し、この増加は CsA の添加により有意に抑制された (図 1)。

この IL-8 mRNA の変化に呼応し、培養液中 IL-8 も PMA/A23187 により著増し、CsA の添加は、この増加を有意に抑制した (図 2)。

2. 細胞内カルシウムの上昇にตอบสนองする

IL-8 遺伝子プロモーター領域の同定

IL-8 遺伝子のプロモーター領域 -1460 ~ +44bp (転写開始起点を 1 とする) を用いた Luciferase reporter assay により、この領域に細胞内カルシウム上昇に対する応答性配列の存在が認められた (図 3)。また PMA/A23187 により上昇するプロモーター活性は、CsA により抑制された。この領域の各種の 5' -deletion mutant を作成し、更に細胞内カルシウム上昇・CsA に対する応答性配列の局在を検討すると、-60 ~ +44 bp の deletion mutant では、PMA/A23187 に対するにตอบสนองするプロモーター活性がほぼ完全に消失し、-133 ~ +44 には応答性が保たれていた (図 3)。従って、PMA/A23187 および CsA にตอบสนองする配列が -133 ~ -60 領域にあることが示された。

この IL-8 遺伝子の -133 ~ -60 bp プロモーター領域には、NF- κ B および AP-1 の結合配列が各々 1ヶ所存在することがモチーフ検索により想定された。そこで、NF- κ B 或いは AP-1 結合配列に変異を導入にし、PMA/A23187 に対する応答性を検討した (図 4)。何れの mutant においても細胞内カルシウム上昇刺激および CsA に対する応答性は、-133 deletion mutant に比較して著明に低下をみることから、NF- κ B および AP-1 結合配列が共に、PMA/A23187 および CsA の応答に必要な *cis*-acting element であることが示唆された。

3. 細胞内カルシウムの上昇にตอบสนองする

転写因子 NF- κ B の同定

NF- κ B および AP-1 の活性化が細胞内カルシウム上昇刺激による IL-8 遺伝子の発現促進に呼応して認められるか否かを gel-shift assay により検討した。AP-1 は、U251MG においては恒常的に活性化され、PMA/A23187 および CsA による変化は認められなかった (図 5)。しかしながら、NF- κ B は PMA/A23187 により活性化され CsA によりその活性化の低下が認められた (図 6)。以上の結果、PMA/A23187 および CsA にตอบสนองする *trans*-acting element は NF- κ B であることが強く示唆された。NF- κ B の各種サブユニットに対する抗体

を用いた supershift analysis から PMA/A23187 により活性化される NF- κ B に p65 subunit が含まれることが示された (図 6)。

4. 細胞内カルシウムの上昇による I κ B α の分解の亢進

p65 は、細胞質内 I κ B α と結合して存在し、NF- κ B 活性化刺激により、リン酸化、ユビキチン化を経てプロテアソームにより分解される。そこで PMA/A23187 添加後の I κ B α 分解の経時的変化を Western blot 法により検討した (図 7)。PMA/A23187 投与後 30 分より I κ B α の減少が認められ、60 分後には完全に消失し、細胞内カルシウムの上昇が I κ B α の分解を促進することが示された。これに対し、CsA は PMA/A23187 による I κ B α の分解促進を抑制した。

D. 考察

今回の実験により、細胞内カルシウムの上昇により IL-8 の発現が著明に増加し、この増加が CsA により抑制されることが、グリオーマ細胞において初めて示された。

細胞内カルシウムの上昇による IL-8 の発現促進には、p65 サブユニットを含む NF- κ B の活性化が必須であることが、reporter gene assay と gel-shift assay により示された。NF- κ B の活性化は、細胞質に存在する I κ B α の分解に起因し、CsA は I κ B α の分解を抑制することにより NF- κ B の活性化を抑制することが示された。

NF- κ B の恒常的活性化は各種の腫瘍において増悪因子として報告されている。グリオーマにおいても NF- κ B の活性化が腫瘍の進展や予後不良の指標となるという報告が認められる。従って、NF- κ B 活性化の制御は、新たな治療の可能性を示唆する。

今回の研究では、細胞内カルシウムによる NF- κ B の活性化を CsA が I κ B α の分解を抑制することで制御していることが示された。

CsA が I κ B α の分解を抑制する機序に関しては、更に検討が必要と考えられる。CsA がカルシニューリン阻害剤であることを踏まえると、細胞内カルシウムの上昇によりカルシニューリンが活性化され、この活性化が何らかの形で I κ B α の分解促進をもたらしている可能性が示唆される。カルシニューリンが蛋白脱リン酸化酵素であること、I κ B α の分解には I κ B kinase によるリン酸化が必須であることを考えると、カルシニューリンの活性化が I κ B kinase の活性化をもたらしている可能性が示唆される。

E. 結論

グリオーマ細胞 U251MG において、細胞内カルシウムの上昇により誘導される IL-8 遺伝子発現は CsA により抑制された。細胞内カルシウムの上昇は、NF- κ B を活性化することで IL-8 の発現を促進し、CsA は I κ B α の分解を抑制することで NF- κ B の活性化を抑制することを示した。

IL-8は血管新生・細胞増殖を促進することが知られ、グリオーマにおけるIL-8の発現促進は腫瘍の増悪因子と考えられる。従って、細胞内カルシウムの上昇によるIL-8の発現誘導を抑制するCsAは、抗腫瘍治療における補助療法としての可能性が示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato M, Nagaya T, Fujieda M, Saito K, Yoshida J, Seo H: Expression of PPAR γ and its ligand-dependent growth inhibition in human brain tumor cell lines. Japanese Journal of Cancer Research, 93(6): 660-666, 2002.
2. Sakano S, Hasegawa Y, Murata Y, Ito T, Genda E, Iwata H, Ishiguro N, Seo H: Inhibitory effect of FGF on endochondral heterotopic ossification. Biochemical and Biophysical Research Communications., 293, 680-685, 2002.
3. Shibata A, Nagaya T, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Seo H: Inhibition of NF- κ B activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. Breast Cancer Research and Treatment, 73: 237-243, 2002.
4. Wakabayashi K, Kambe F, Nagaya T, Kato M, Saito K, Yoshida J, Seo H: Effect of PPAR γ ligand on TNF α -dependent expression of EGF receptor in human glioma cell line. Environmental Medicine, 45, 33-35, 2002.
5. Murakami R, Kambe F, Mitsuyama H, Okumura K, Miwata S, Yamamoto R, Seo H: Effect of epidermal growth factor and cyclosporin a on interleukin-8 gene expression in human aortic smooth muscle cells. Environmental Medicine, 45, 48-51, 2002.
6. Mitsuyama H, Kambe F, Murakami R, Ishiguro N, Seo H: Analysis of interleukin-8 gene promoter function in human osteoblast-like cells: regulation by Ca²⁺-signaling and Cyclosporin A. Environmental Medicine, 45, 52-54, 2002.

2. 学会発表

1. 村上隆一郎, 神部福司, 奥村健二, 妹尾久雄: 血管平滑筋細胞において cyclosporin A (CsA) は転写因子 AP-1 の活性化を介して IL-8 産生を促進する. 第 75 回日本内分泌学会, 2002. 6. (大阪)
2. 光山浩人, 黒河内 和俊, 神部福司, 石黒直樹, 妹尾久雄: TNF α は NF- κ B を介して骨芽細胞間シグナル伝達を増加させる. 第 75 回日本内分泌学会, 2002. 6. (大阪)
3. 星野 伸, 高岸芳子, 神部福司, 妹尾久雄, 村田

善晴: マウス脳における甲状腺ホルモン応答性遺伝子 ZAKI-4 がコードする蛋白の局在: カルシニューリン (Cn) の局在との比較. 第 75 回日本内分泌学会, 2002. 6. (大阪)

4. 日比八束, 長屋 敬, 今井常夫, 船橋啓臣, 妹尾久雄: 各種甲状腺腫瘍における Pax-8-PPAR γ 融合癌遺伝子の発現の検討. 第 75 回日本内分泌学会, 2002. 6. (大阪)
5. Cao X, Kambe F, Sarkar D, Ohmori S, Seo H: Involvement of cyclosporin A (CsA)- and rapamycin-sensitive pathway for the thyroid hormone-mediated induction of ZAKI-4 expression. 84th Annual Meeting of the Endocrine Society, San-Francisco, USA, 2002.
6. 若林健一, 神部福司, 長屋敬, 齋藤清, 吉田純, 妹尾久雄: ヒトグリオーマ細胞におけるカルシウムシグナリングによるサイトカイン発現調節: 免疫抑制剤の作用. 第 61 回日本脳神経外科学会総会 2002. 10. (松本)

G. 知的所有権の獲得状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

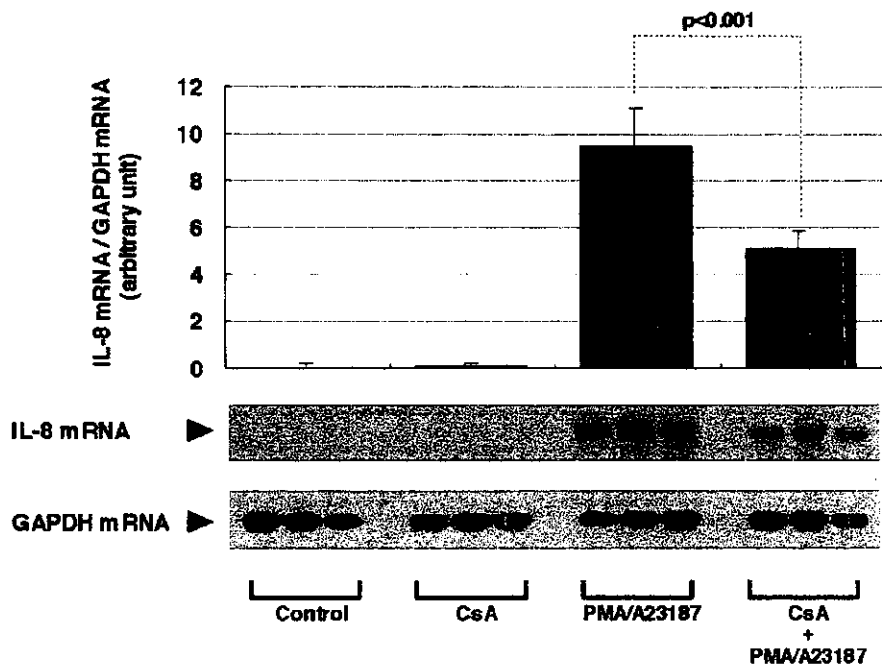


図 1. IL-8 mRNA の変化

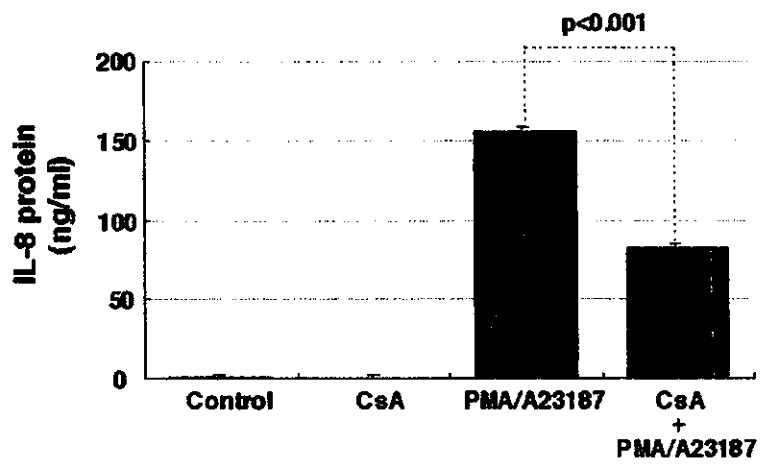


図 2. IL-8 protein の変化

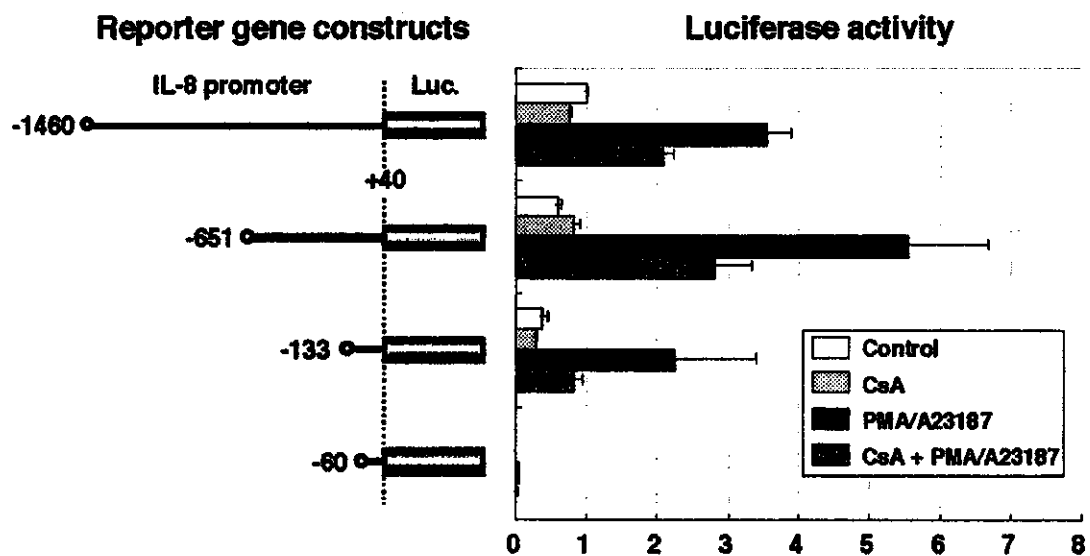


図3. 5'-deletion mutantを用いた Luciferase reporter assayによる IL-8 promoter 活性の応答

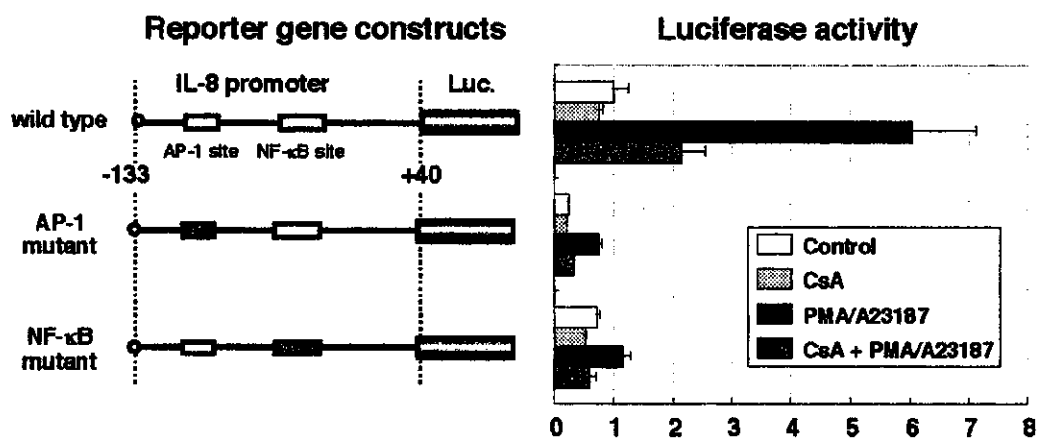


図4. AP-1 mutant および NF-κB mutantを用いた Luciferase reporter assayによる IL-8 promoter 活性の応答