

## 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

(1) 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 山本 一夫

(2) 日本化薬株式会社 創薬本部 西川 清広

### 【要旨】

白血球に野生型 LIM キナーゼを強制発現させると活性酸素産生、食食活性が亢進し、細胞内コフィリンのリン酸化の増大および F-アクチンの上昇が起こっていた。NK 細胞の抑制性受容体に結合するペプチドの活性を解析し、アミノ酸配列と殺ガン細胞活性の関係を解明した。Bestatin は、APaseN 阻害だけでなく血管新生阻害作用も有してい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、以前に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。

最近では、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。

本年度は、(1)細胞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り

ン酸化・脱リン酸化に着目し、細胞膜直下の運動制御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って、これらを手がかりにして NK 細胞を介したガン転移抑制手法を検討する一方、(3) 新生血管における APaseN の関与に注目し、APaseN に結合しその酵素活性を阻害する bestatin およびその誘導体の血管新生抑制作用を評価した。

## 2. 研究方法

### (1) U937 細胞への LIM キナーゼベクターの導入

ヒト単球系培養細胞 U937 を TNF- $\alpha$  (200 ng/ml) およびビタミン D<sub>3</sub> (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。誘導 2 日目に、コフィリンリン酸化酵素 LIM キナーゼ 1 を GFP 融合蛋白として発現するベクター (野生型、ドミナントネガティブ型、および対照の empty vector) を、エフェクテン (キアゲン社) を用いて導入した。誘導 3 日目における GFP 発現効率は 20-30% だったので、発現している生細胞をフローサイトメーターで単離・精製した。

### (2) 活性酸素産生の測定

前項で精製した細胞 (生存率は 90% 以上) を化学発光測定用の 96 穴プレートのウェルに入れ (6 x 10<sup>5</sup>/well)、スーパーオキシド特異的な発光試薬 Diogen (National Diagnostics 社) を加えたのち、オプソニン化ザイモザン (OZ) を加えて、37°C でインキュベートし、生ずる化学発光をプレートリーダー (ARVO sx, PerkinElmer 社) で測定した。得られたデータを積分して蓄積活性酸素量を算出した。それとは別に、スーパーオキシド特異的な試薬ニトロブルーテトラゾリウムを用いて、OZ 刺激により細胞上に生ずるホルマザン沈殿を顕微鏡で観察した。

### (3) 食食活性の観察

単離した GFP-LIM キナーゼ発現細胞の食食活性を、ローダミン標識した OZ を用いて、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

### (4) コフィリンのリン酸化状態の定量

単離した GFP-LIM キナーゼ発現細胞を OZ で刺激したのち、SDS 電気泳動、リン酸化コフィリン特異抗体を用いてイムノブロットングを行った。また、同一ブロットにつき、stripping 後、非リン酸化コフィリンに対するモノクローナル抗体 (MAB22) を用いて全コフィリンの検出も行い、コフィリンのリン酸化程度を normalize して比較した。なお、リン酸化特異抗体は、コフィリンのリン酸化体, mimic の N 末ペプチド ((Ac)NH<sub>2</sub>-AS(p)GVAVSDC) を KLH に結合させてウサギに免疫し、調製した。

### (5) 細胞内 F-アクチンの観察および定量

LIM キナーゼ発現ベクター (pUcD2) を導入した U937 細胞を OZ で種々の時間刺激した後、パラホルムアルデヒドで固定してから、細胞内 F-actin を蛍光 (AlexaFluor) 標識ファロイジンで染色した。細胞は、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察するとともに、フローサイトメータで蛍光強度を分析した。

### (6) 可溶性マウスNK細胞レセプターLy49Aの作成とそれに結合するファージクローンのバイオパニング

マウスNK細胞レセプターLy49A並びにLy49G2をコードするcDNAをもとに、細胞外領域とそのN末端側にビオチン化配列をつないだ遺伝子を作成し、可溶性Ly49A (sLy49A) を調製した。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より、これらの可溶性NK細胞レセプターに結合するファージクローンを単離した。

### (7) 環状ペプチドの合成とLy49A-H-2Dd結合阻害実験

Ly49A並びにLy49G2に結合するファージクローンに提示されたペプチドをFmoc法を用いて化学合成した。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、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。

### (8) Ly49A結合性ペプチドによるNK細胞傷害活性の増強

B10. D2マウス由来のLy49A陽性NK細胞の細胞傷害活性を、H-2Ddを強制発現させたC1498細胞を標的細胞として用い測定した。標的細胞は<sup>51</sup>Crを取り込ませ、E/T (effector:target)比、10 : 1で、5% CO<sub>2</sub>、37℃、4時間反応後、標的細胞から放出された<sup>51</sup>Crの放射活性を測定した。

#### (8) ヒトNKレセプターCD94/NKG2A、CD94/NKG2C発現細胞の作製

CD94/NKG2A発現細胞はマウスTリンパ腫細胞C1498にヒトCD94 cDNA、ヒトNKG2A cDNAをトランスフェクトして得た。NKG2Cは細胞内領域、膜貫通領域をNKG2Aのものと置換したNKG2C(rNKG2C) cDNAを作製し、C1498細胞にヒトCD94 cDNAとともにトランスフェクトすることにより得た。

#### (9) 可溶性HLA-Eアラニン点変異体の作製

アラニン点変異を導入する残基は、その側鎖が分子表面に露出したものを $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 領域にわたって幅広く選択した。アラニン点変異はHLA-EをコードするcDNAを鋳型とした2段階PCR法により導入した。また野生型 $\beta 2$ ミクログロブリンも同様にして封入体を得た。アラニン点変異を導入したHLA-E重鎖、 $\beta 2$ ミクログロブリン、重鎖の溝に結合するペプチド(HLA-B7のシグナルペプチド: VMAPRTVLL、化学合成により得た)を合わせてin vitroでリフォールディングし、種々のクロマトグラフィーを組み合わせて再精製を行った。

#### (10) 可溶性HLA-Eアラニン点変異体とCD94/NKG2A、CD94/NKG2C発現細胞の結合解析

可溶性HLA-E並びにアラニン点変異体をPE標識ストレプトアビジンでテトラマー化し、CD94/NKG2A発現細胞への結合をフローサイトメトリーにより解析した。

#### (11) 腫瘍血管におけるAPaseNの発現

ヒト肺癌患者の癌部および非癌部の組織検体が並んだ Tissue Array (SuperBioChips Lab.)を免疫染色し、腫瘍血管におけるAPaseNの発現を検討した。スライドガラス上に固定された標本を0.1 Mクエン酸緩衝液中で95℃ 15 分間マイクロウェーブ処理した後、抗 APaseN 抗体(Neomarkers, 13C03)あるいは抗 factor VIII抗体で処理し、ABC法で発色させた。

#### (12) APaseの酵素活性の測定

ヒトメラノーマ細胞 A2058 にヒト APaseN 遺伝子を導入した細胞 (A2058/CD13) を作製した。その  $10^4$  個/ $100 \mu$  L/well を 96 穴プレートにまき、阻害剤を添加した。合成基質である Ala-MCA を 0.1 mM となるよう加え、添加後 3~13 分の蛍光強度(ex. 450 nm, em. 650 nm)を経時的に測定し、その変化から APaseN の酵素活性を算出した。

また、細胞内の中性 APase 活性を定量するために、 $7.5 \times 10^4$  個のヒト histocytic lymphoma 細胞 U937 に阻害剤を添加し、37℃で 10 分間処理した。合成基質 Ala-Rhodamin (CellProbe)を添加した 5 分後に反応を停止し、FACS で細胞内の蛍光量の測定を行い、細胞あたりの蛍光量に基づいて酵素阻害活性を求めた。

#### (13) 培養血管内皮細胞の管腔形成試験および増殖試験

ヒト皮膚線維芽細胞培養にヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を重層して 11 日間培養し、血管腔形成を観察した(血管新生キット、クラボウ)。70%エタノール固定後、抗 CD31 (PECAM)抗体を用いて免疫染色し、顕微鏡下でデジタルカメラ撮影した。染色された血管の面積等について、血管新生定量ソフト(クラボウ)を用いて画像解析し、管腔形成の程度を定量化した。

また、HUVEC 1600 個/well を 96 穴プレートにまき、HuMedia EG2 培地で培養した。翌日薬剤を添加してさらに 3 日間培養した後、メチレンブルーで細胞を染色し、660 nm の吸光度を測定して HUVEC の細胞増殖を測定した。

#### (14) in vivo 血管新生実験

実体顕微鏡下で F344 ラット 8 週齢♂の角膜固有質にポケットを作製し、VEGF 100 ng 含有のペレットを移植した。7 日目に乳酸リンゲル液を灌流した後、墨汁を投与して血管を染色し、角膜に新生した血管を顕微鏡下で観察した。ペレットに bestatin 3 ng ( $1 \mu$ g/mL)を加え、血管新生抑制作用を評価した。

また、C57BL/6N マウスの側腹部皮下に、100 ng の bFGF を含有した 5 mg/0.5 mL のマトリゲルを移植し、50 mg/kg の bestatin を 7 日間経口投与した。投与終了の翌日にマトリゲルを摘出し、ゲル内のヘモグロビン量を定量して血管新生の指標とした。

#### (15) in vivo 抗腫瘍実験

ヌードマウス Balb/c-nu/nu(Crj) みに  $1 \times 10^6$  個のヒト histocytic lymphoma 細胞 U937 を皮下移植し、腫瘍が約  $5 \times 5$  mm になった時点から薬剤投与を開始した。経時的に腫瘍の長径(L)と短径(W)を計測して腫瘍体積( $LW^2/2$ )を求め、腫瘍増殖曲線を描き、薬剤による増殖抑制効果を評価した。

### 3. 研究成果

#### 1) GFP 融合 LIM キナーゼ発現細胞の単離・精製

マクロファージ様に分化した U937 細胞に GFP 融合 LIM キナーゼを発現させると、発現効率は 20-30%で、発現後死んで分解した細胞の破片も多数見られた。そこで、生きている発現細胞をフローサイトメータで単離・精製した。共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した単離細胞は、ほとんど全ての細胞で蛍光発現しており、トリパンブルー染色の結果、生存率は 90%以上であった。

#### 2) GFP 融合 LIM キナーゼ強制発現細胞の活性酸素産生

前項で単離した細胞につき、OZ 刺激による活性酸素産生を解析した。スーパーオキシド特異的なケミルミネッセンス試薬を用いて測定した結果、野生型 LIM キナーゼを発現している細胞が、もっとも強く活性酸素を生成した。Mock の空ベクターの場合は、それほど強くはないがやはり活性酸素を生成したが、ドミナントネガティブ型 LIM キナーゼを発現した細胞では、活性酸素の産生は強く阻害されていた。

コフィリンは、非リン酸化型がアクチン結合活性のある活性型で、リン酸化されるとその活性を失う。当初白血球の活性化時にコフィリンは脱リン酸化されることを見いだしていたので、この結果はやや意外であった。と同時に、白血球活性化とコフィリンリン酸化状態について、より深い理解に近づけるデータと考えられた。また、好中球とマクロファージの違いにも気をつける必要を感じさせる結果でもあった。詳しくは、この後の「まとめと考察」で述べる。

#### 3) GFP 融合 LIM キナーゼ強制発現細胞の貪食活性

上記のごとく単離した GFP 融合 LIM キナーゼ強制発現細胞の貪食活性を、ローダミン標識した OZ を用いて共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。この場合、細胞は GFP により緑の蛍光に、OZ はローダミンの赤に見える。貪食された OZ は両者の蛍光が混合されて黄色に見える。その結果、野生型の LIM キナーゼ発現細胞では強い貪食が見られたが、ドミナントネガティブ型の LIM キナーゼ発現細胞では、OZ は細胞表面に結合はするものの、貪食はほとんどされていなかった。したがって、ドミナントネガティブ型 LIM キナーゼの発現により、OZ の受容体 (Mac1, CD11b/CD18) に大きな変化はないが、粒子を細胞内に引き込む運動 (貪食) は強く阻害されていることになった。

#### 4) GFP 融合 LIM キナーゼ強制発現細胞内のコフィリンのリン酸化状態

現在のところ、LIM キナーゼの基質はコフィリンのみと考えられている。そこで、LIM キナーゼを強制発現させた場合の細胞内変化としてコフィリンのリン酸化状態を調べた。従来、リン酸化はラジオアイソトープ  $^{32}P$  を用いて観察することが多かったが、今般コフィリンのリン酸化部分ペプチドを免役することにより、リン酸化特異抗体を得ることができたので、それを用いてイムブロットングを行った。正味のリン酸化の定量には、この方法の方が優れていることになる。また、全コフィリンの定量には従来使用してきたモノクローナル抗体 MAB22 が有効なので、両者を使えば、リン酸化の相対的比較ができることになる。その結果、空ベクターの場合を 100 とすると、野生型 LIM キナーゼを発現させた場合は 227、ドミナントネガティブ型 LIM キナーゼを発現させた場合は 47 という数値が得られ、ベクター導入によりコフィリンのリン酸化程度が大きく変化していることが明らかになった。

#### 5) LIM キナーゼ発現細胞を刺激した場合のアクチン動態

以上の結果より LIM キナーゼの発現で細胞内コフィリンのリン酸化状態が変動していることが分かったので、コフィリンの標的蛋白であるアクチンについて、その重合状態を経時的に観察した。すなわち、種々の LIM キナーゼを発現させた U937 細胞を OZ で様々な時間刺激し、反応を止めた後、ファロイジンで重合アクチン (F-actin) を染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡ならびにフローサイトメトリーで解析した。その結果、刺激後いずれの細胞でも刺激後一分で一過性の F-actin レベルの上昇が認められたが、野生型 LIM キナーゼの場合顕著

な上昇であったのに対し、ドミナントネガティブ型 LIM キナーゼの場合、刺激前の F-actin レベルが低い上、刺激による上昇もごくわずかであった。顕微鏡観察の結果と、フローサイトメトリーの結果はよく一致していた。

したがって、LIM キナーゼの強制発現により活性酸素産生や食欲の機能が大きく変化した細胞内のメカニズムとしては、LIM キナーゼ→コフィリン→アクチンとシグナルが流れた結果であることが示唆された。

#### 6) 可溶性マウスNK細胞レセプターLy49Aの作成とそれに結合するファージクローンのバイオパニング

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、可溶性のマウスNK細胞受容体Ly49AおよびLy49G2をそれぞれ数mg作成した。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回繰り返した後、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種のクローンが存在した。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CXFXXLPWC という共通配列を持つC2 (CSFTWLPWC), C8 (CPFHLPWC), C11 (CPFQYLPWC), C14 (CPFQFLPWC), C26 (CPFSFLPWC)であった。これらをそれぞれType I, IIと分類した。これらのファージクローンとLy49Aと同じリガンドに結合する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。

#### 7) 環状ペプチドの合成とLy49A-H-2Dd結合阻害実験

C1 (Type I), C11 (Type II), C26 (Type II')を選び、これらの配列を持つペプチドを化学合成した。これらの合成した各環状ペプチド(100  $\mu$ M)は、H-2Ddを強制発現させたC1498細胞とsLy49Aの結合をC1ペプチドは32%、C11ペプチドは83%の結合阻害をした。C26ペプチドはC11ペプチドと同程度の結合阻害を示した。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のみに可溶性H-2Ddの結合を阻害した。

#### 8) Ly49A結合性ペプチドによるNK細胞傷害活性の増強

51Cr リリースアッセイを用いて細胞障害活性に及ぼすペプチドの影響を調べた。各々のLy49A結合性ペプチドを加えると、NK細胞傷害活性は濃度依存的に増強した。Type IペプチドよりもType II ペプチドの方がより強い増強効果を示した。また、Ly49AとLy49G2とに結合性を示したType II' ペプチドはType IIよりも強い増強効果を示した。

#### 9) ヒトNKレセプターCD94/NKG2A、CD94/NKG2C発現細胞の作製

HLA-Eアラニン点変異体とCD94/NKG2A、CD94/NKG2Cとの結合解析をするため、CD94/NKG2A、CD94/rNKG2C発現細胞の作製を行った。抗CD94抗体、抗NKG2A抗体を用いたフローサイトメトリーおよび免疫沈降の結果、CD94/NKG2A、CD94/rNKG2Cが細胞表面上にジスルフィド結合したヘテロダイマーとして発現していることを確認した。

#### 10) 可溶性HLA-Eアラニン点変異体の作製

CD94/NKG2A、CD94/NKG2CによるHLA-E上認識領域の同定を行うために、可溶性HLA-Eアラニン点変異体の作製を行った。各種可溶性HLA-Eアラニン点変異体は抗HLAクラスI抗体、抗 $\alpha_2$ ミクログロブリン抗体と反応することを確認した。また、重鎖の溝にペプチドが結合していることをマスマスペクトロメトリーにより確認した。

#### 11) 可溶性HLA-Eアラニン点変異体とCD94/NKG2A、CD94/NKG2C発現細胞の結合解析

可溶性HLA-EのCD94/NKG2A、CD94/NKG2C発現細胞への結合をフローサイトメトリーで解析したところ、HLA-Eテトラマー (Wild Type) はCD94/NKG2A発現細胞に結合した。一方でR65A、Q72A、R75A、R79A、D162A、E166AのHLA-E変異体は、CD94/NKG2AならびにCD94/NKG2C発現細胞への結合が低下した。特に、R75Aの変異導入によりCD94/NKG2A、C発現細胞への結合が完全に失われた。しかし、D69A、H155AのHLA-E変異体では、CD94/NKG2A発現

細胞への結合が低下したものの、CD94/NKG2C発現細胞への結合はほとんど低下しなかった。

#### 12) 腫瘍組織内血管における APaseN の発現

腫瘍血管新生における APaseN の関与について検討するため、ヒト肺癌組織中の新生血管での APaseN の発現を免疫染色によって調べた。ヒト肺癌患者の肺癌部位および正常部位の組織を抗 APaseN 抗体で免疫染色するとともに、同じ標本について、血管細胞のマーカーの一つである factor VIII に対する抗体を用いて血管細胞を免疫染色し比較した。55 例のヒト肺癌組織のうち、扁平上皮肺癌では 15 例中 5 例において腫瘍組織内の血管および線維芽細胞で APaseN の発現が認められた。肺癌細胞そのものには APaseN の発現は見られなかった。また、その患者の肺正常部位では、血管を含め APaseN の発現は認められず、腫瘍組織の新生血管特異的に発現していた。他の組織型の肺癌において、腫瘍血管に APaseN の発現がみられたのは類上皮癌の 1/5 例のみで、腺癌 20 例、大細胞癌 5 例、小細胞癌 3 例、その他肺癌 7 例のいずれの症例においても、血管細胞などの間質細胞に APaseN の発現は認められなかった。

#### 13) APaseN 阻害剤 bestatin の血管新生抑制作用

肺扁平上皮癌において腫瘍内の新生血管で APaseN が発現していることから、APaseN が腫瘍血管新生において何らかの機能を担っていると考えると、APaseN 阻害剤が血管新生阻害作用を示す可能性がある。そこで、白血病治療薬として臨床で用いられている APaseN 特異的阻害剤である bestatin の血管新生抑制作用を検討した。

##### ①培養血管細胞の管腔形成に対する抑制作用

まず、ヒト皮膚線維芽細胞に重層培養したヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC の血管腔形成に対する作用を検討した。

11 日間培養後に血管内皮細胞のマーカーである抗 CD31 抗体で HUVEC を免疫染色すると、長い分枝した管腔が明確に形成された。これに対し、bestatin 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を培養に添加することによって血管腔の形成は強く抑制された。種々の濃度の bestatin を作用させ、管腔形成の程度を画像解析ソフトで定量した結果、管腔面積を対照群の 50% に抑制する濃度は 4.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

##### ②ラット角膜モデルにおける血管新生抑制作用

次に、ラットの角膜に 100 ng の VEGF 含有ペレットを埋め込み、誘導される血管新生に対する作用を検討した。

VEGF によって角膜の辺縁からペレットに向かって多数の血管が発生したのに対し、VEGF とともに bestatin 3 ng (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含んだペレットを埋め込んだ場合には、血管新生は 4/5 例においてほとんど見られなかった。

##### ③マウスマトリゲルモデルにおける血管新生抑制作用

さらに、bFGF (100 ng) 含有マトリゲル (5 mg/0.5 mL) をマウスの皮下に移植して誘導される血管新生に対する効果を評価した。対照群ではマトリゲル内への血管浸潤が認められ、ゲル内のヘモグロビン量を定量したところ 122 mg/dL であった。それに対し、移植翌日から bestatin 50 mg/kg を 7 日間連日経口投与した場合には、血管の浸潤はわずかであり、ヘモグロビン量は 4 mg/dL にすぎず、in vivo においても明らかな血管新生抑制作用が認められた。

#### 14) bestatin 誘導体の効果

このように、in vitro および in vivo の評価系において、APaseN 阻害剤 bestatin の血管新生抑制作用が認められた。しかし、bestatin は白血病に対しては有効であるが、固形腫瘍系に対する抗腫瘍作用は十分ではないことがわかっており、この血管新生阻害作用は十分強力とはいえない。そこで、さらに有効な化合物を見出すため、種々の bestatin 誘導体を合成し、活性を評価した。その結果、HUVEC の管腔形成を強く阻害する誘導体として、methyl-bestatin および t-butyl-bestatin を見出した。両化合物の管腔形成に対する  $\text{IC}_{50}$  値は 0.32 と 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で、bestatin に比べそれぞれ 14 倍および 38 倍強かった。しかし、APaseN 阻害作用に関しては、methyl-bestatin は bestatin よりも弱く、t-butyl-bestatin もやや強い程度であった。そこで、細胞内中性 APase に対する作用を検討したところ、両化合物は強い酵素阻害作用を示した。また、HUVEC に対する増殖抑制作用も強かった。これらの結果から、管腔形成に関しては、APaseN のみでなく、細胞内中性 APase も重要であり、それは HUVEC の増殖に関与すると考えられた。エステル誘導体のマウス血漿中での安定性を測定したところ、methyl-bestatin は活性低下したのに対し、t-butyl-bestatin は分解抵抗性であった。そこで、その in vivo 抗腫瘍作用を評価した。ヌードマウスに皮下移植した U937 細胞は 15 日間でほぼ 100 倍に増殖したのに対し、

t-butyl-bestatin の 50 mg/kg を二日おきに 5 回腹腔内投与した場合、腫瘍の増殖はわずかに遅延した。一方、100 mg/kg を三日おきに 2 回投与した場合には強い抗腫瘍効果が認められ、腫瘍増殖は約 10 日間にわたり抑制された。

#### 4. まとめと考察

白血球系食細胞である分化型 U937 細胞と LIM キナーゼ発現ベクターを用いて、以下の結果が得られた。(1) LIM キナーゼの野生型発現細胞は活性酸素産生、OZ 食食活性いずれも亢進していた。(2) ドミナントネガティブ型 LIM キナーゼ発現細胞は、活性酸素産生、食食いずれも低下していた。(3) 細胞内コフィリンは、野生型 LIM キナーゼの発現でリン酸化型が増え、ドミナントネガティブ型 LIM キナーゼでリン酸化型が減少していた。(4) 細胞内アクチンの動態を解析した結果、野生型 LIM キナーゼ発現細胞では OZ 刺激により顕著に F-actin の上昇が見られるのに対し、ドミナントネガティブ型 LIM キナーゼでは F-actin の形成は強く抑制されていた。これらを総合して考えると、野生型 LIM キナーゼを強制発現すると、コフィリンがリン酸化型が増えて、アクチン脱重合活性は抑えられ、F-actin ができやすい環境になって、活性酸素産生や食食などの機能が亢進されると考えられる。また、逆にドミナントネガティブ型 LIM キナーゼを発現させた場合、コフィリンはリン酸化されにくく、活性型のコフィリンは F-actin 形成を阻害する結果、食細胞の機能の抑制につながると考えられる。昨年報告した OZ 刺激による LIM キナーゼの細胞膜への移行と考え合わせて、これらの反応は細胞膜直下で制御されていることが「運動」に重要と思われる。LIM キナーゼの活性を抑制することが、結果として「細胞運動の制御」につながるものが明らかになったのは学術的にも応用的にも興味深い成果と言えよう。

マウスNK細胞抑制性レセプターLy49Aの可溶型を大腸菌によって発現させこれ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を単離することに成功した。得られた8クローンのコードする環状ペプチドは、そのアミノ酸配列からCXFXLPWLC(Type I)、CXFXLPWC 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。さらにファージの提示する環状ペプチドを化学合成し、Ly49AとH-2Ddの結合における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。また、これらのペプチドはNK細胞の細胞傷害活性を増強した。一方、in vivoにおけるLy49A結合性ペプチドの抗腫瘍作用について検証することが必要であり、18F標識したがん細胞をマウスに移植しPET (Positron Emission Tomography)でその動態をモニターする実験系を構築中である。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さらに行う予定である。

マウスと同様にヒトのNK細胞レセプターCD94/NKG2A、CD94/NKG2C発現細胞を作成し、リガンドである可溶性HLA-E並びにその点変異体を作製し、NK細胞レセプターによるHLA-E上認識領域の同定を試みた。その結果、HLA-E<sub>1/2</sub>領域上面がCD94/NKG2A、CD94/NKG2Cの結合サイトであることが示唆された。CD94、HLA-Eそれぞれ単独のX線結晶構造解析によると、CD94上にはF114、L162により構成される疎水性領域、HLA-E上にはI73、V76、重鎖の溝に結合したペプチドの8番目の残基の側鎖によって構成される疎水性領域が存在する。また、CD94上にはD163、E164、D168によって構成される酸性領域が、HLA-E上には、R75、R79、R82によって構成される塩基性領域が存在する。このCD94上の酸性領域とHLA-E上の塩基性領域が静電的に、またCD94およびHLA-E上の疎水性領域同士が疎水的に結合し、CD94はHLA-Eの<sub>1</sub>領域側に結合していると考えられる。一方、D69A、H155AのHLA-E変異体ではCD94/NKG2Aへの結合が低下するものの、CD94/NKG2Cへの結合は低下しなかったことから、CD94/NKG2AとCD94/NKG2CのHLA-E認識には認識領域の微妙な違い(質的な差)があることが今回初めて明らかになった。CD94ダイマーの結晶構造をもとにCD94/NKG2AならびにCD94/NKG2Cの構造モデルを作成すると、HLA-Eとの結合に関与すると考えられるCD94/NKG2表面上にNKG2A、C間でアミノ酸配列の異なるループが存在することから、現在のループがNKG2A、C間のHLA-E認識における相違を規定するかについて検証中である。以上のことから、NKG2Aを標的とした創薬を目指すにあたり、抑制性レセプターであるCD94/NKG2Aと活性化レセプターCD94/NKG2Cとの

特異性を明確にすることが十分可能であると考えられた。

ヒト肺扁平上皮癌組織を抗 APaseN 抗体で染色したところ、腫瘍内の新生血管において APaseN の発現が認められた。正常部位の血管には APaseN の発現は認められず、新生血管特異的な発現であった。phage display 法によって、腫瘍新生血管に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にされた。また、NGR はフィブロネクチン中に見出される配列であり、これらのことは、APaseN 分子が酵素として働く他に、接着分子として機能することを示唆していよう。

この腫瘍血管での APaseN の発現は扁平上皮癌では 5/15 例であったが、他の組織型の肺癌においてはほとんど発現が認められず、新生血管に選択的な発現であるだけでなく、扁平上皮癌と特異的な相互作用が考えられ、興味深い。APaseN 阻害剤である bestatin は白血病に対する治療薬として臨床使用されているが、肺扁平上皮癌に対して有効であるとの報告がなされており、今回示された発現特異性との関係が示唆される。

実際、bestatin は血管内皮細胞の管腔形成やラット角膜モデルおよびマウスマトリゲルモデルで血管新生を明確に抑制した。特異的な APaseN 阻害剤が血管新生阻害を示したことから、血管新生における APaseN の役割が確認され、APaseN は血管新生阻害治療の標的分子と考えられた。しかし、bestatin の固形癌に対する増殖抑制作用は十分とはいえないので、bestatin の誘導体を多数合成して活性評価を行い、血管新生阻害活性の強い t-butyl-bestatin を見出した。本化合物は、bestatin に比べ 38 倍低濃度で HUVEC の管腔形成を抑制し、in vivo においても 100 mg/kg の 2 回投与によって U937 細胞の増殖を著明に抑制した。

しかし、t-butyl-bestatin の APaseN に対する阻害作用は bestatin とほぼ同等で、強い管腔形成抑制作用は APaseN の酵素阻害活性では説明できなかった。t-butyl-bestatin は bestatin に比べ、細胞内中性 APase を 3.5 倍強く阻害し、また、HUVEC の増殖抑制阻害作用も 47 倍強かった。これらのことから、血管新生に関して細胞内中性 APase が関与し、HUVEC の増殖やアポトーシスにかかわる可能性が示唆された。血管新生やアポトーシスに関与する APase としては、APaseN の他に、メチオニン APase、ピューロマイシン非感受性ロイシン特異的 APase、ピューロマイシン感受性 APase などが知られているが、さらにこれら以外の APase が関与する可能性もある。この APase 分子を同定することができれば、新たな腫瘍血管新生阻害剤やアポトーシス誘導剤を見出すことが期待できよう。

## 5. 研究発表

1. Adachi, R., Takeuchi, K., and Suzuki, K.: Antisense Oligonucleotide to Cofilin Enhances Respiratory Burst and Phagocytosis in Opsonized Zymosan-stimulated Mouse Macrophage J774.1 Cells.  
*J. Biol. Chem.* 277, 45566-45571 (2002)
2. Chen, Y.H., Chen, S.H.M., Jong, A., Zhao, Z. Y., Li, W., Suzuki, K., and Huang, S. H.: Enhanced *Escherichia coli* invasion of human brain microvascular endothelial cells is associated with alterations in cytoskeleton induced by nicotine.  
*Cell. Microbiol.* 4, 503-514 (2002)
3. 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)



4. 安達玲子、鈴木和博：食細胞の機能発現と LIM キナーゼ-コフィリンによるアクチン細胞骨格制御（総説）  
生化学 印刷中（2003）
5. Yamamoto K., Tsuji T., Osawa T.: Affinity chromatography of oligosaccharides and glycopeptides with immobilized lectins. *Protein Protocol Handbook*, 2nd Edition Ed. Walker, J. M. pp917-931 (2002)
6. Sakamoto H., Mashima T., Yamamoto K., Tsuruo T.: Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *J. Biol. Chem.* 277, 145770-45775 (2002)
7. Sun Y., Nonobe E., Kobayashi Y., Kuraishi T., Aoki F., Yamamoto K., Sakai S.: Characterization and expression of L-amino acid oxidase of mouse milk. *J. Biol. Chem.* 277, 19080-19086 (2002)
8. Higashi N., Fujioka K., Denda-Nagai K., Hashimoto S., Nagai S., Sato T., Fujita Y., Morikawa A., Tsuji M., Miyata-Takeuchi M., Sano Y., Suzuki N., Yamamoto K., Matsushima K., Irimura T.: The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 277, 20686-20693 (2002)
9. A. Phrutivorapongkul, N. Ruangrunsi, K. Kirtikara, K. Nishikawa, S. Maruyama, T. Watanabe, T. Ishikawa: Studies on the chemical constituents of stem bark of *Millettia Leucantha* Kurz: Isolation of new chalcones with cytotoxic, anti-Herpes simplex virus and anti-inflammatory activities. *Chem. Pharm. Bulletin* 51 187-190 (2003)
10. 藤井秀二、税本敦也、西川清広、山崎哲、亀山周二：BCG Connaught 株のマウス膀胱癌に対する抗腫瘍効果. *Biotherapy* 17 167-173 (2003)
11. 丸山佐起子、黒岩俊介、税本敦也、西川清広：ヒト乳癌細胞に対する Toremifene と Paclitaxel の併用効果. *癌と化学療法* 30 (2003) in press