

## 白血球機能制御を目的とするアンチセンス医薬品の開発と有効性評価に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部  
研究者 安達 玲子

### 要 旨

白血球機能制御を目的として、細胞骨格調節因子コフィリン、情報伝達系因子Hck及びLynのアンチセンスオリゴDNAを作成した。また白血球による活性酸素産生及び食食反応のアッセイ系を構築した。コフィリンアンチセンスによりこれら両反応とも増大したことから、このアンチセンスが白血球機能を亢進させることが示された。

### 1. 研究目的

白血球は異物の排除という生体防御反応に寄与している細胞である。体内に病原体が進入した場合に、食食、活性酸素や種々の酵素の放出などにより殺菌を行っており、白血球機能の低下は重篤な感染症につながる。一方、白血球の機能制御系の破綻や細胞外からの異常な刺激により、障害性因子が不必要に産生・放出された場合には、自己の組織に障害を与えることになる。実際、様々な炎症性疾患や虚血再灌流時の組織障害に白血球が関与していることが知られている。従って、必要に応じて白血球の機能を促進あるいは抑制することができれば、生体にとって有用である。

アンチセンスオリゴDNA法は、特定のタンパク質のmRNAに相補的な配列のオリゴDNAを細胞に導入することにより、その発現を阻害する方法である。タンパク質の機能解析等基礎研究の一手法として多く用いられている他、現在欧米では約30種類のアンチセンス医薬品の臨床試験が実施されている。実際1998年には初のアンチセンスオリゴDNA医薬品が認可・発売された。日本国内でも、大学病院において臨床応用が始まろうとしている状況である。

白血球の機能制御に対しても、アンチセンスオリゴDNA法は有効な手段となり得る。白血球のそれぞれの機能発現にはそれぞれ特定のタンパク質が関与している。また、情報伝達系や転写因子、細胞骨格系のタンパク質の中には、諸機能の全体的なコントロールに関与するものもある。従って、これらのタンパク質に対するアンチセンスオリゴDNAにより白血球の機能を低下あるいは亢進させることは可能である。

本研究は、白血球の機能制御を目的としたアンチセンスオリゴDNAの開発、及びオリゴDNAの効果 を正しく評価するための白血球機能のアッセイ系についての研究を行うものである。

### 2. 研究方法

#### (1) アンチセンスオリゴDNAの作成

アンチセンスの標的として、細胞骨格系因子コフィリン（アクチンフィラメント調節タンパク質）、情報伝達系因子Hck及びLyn（Srcファミリーチロシンキナーゼに属する）を取り上げた。コフィリンについては、効果的な標的配列が未知であったため、mRNA中の10カ所の配列に対するアンチセンスオリゴDNAを合成した。Hck、Lynについては、既に報告されている数種のアンチセンス配列の中から選択してオリゴDNAを合成した。オリゴDNAのタイプは、アンチセンスとして最も頻繁に用いられているホスホロチオエート修飾型、いわゆるSオリゴとした。

アンチセンス活性のアッセイは次のように行った。48穴マイクロプレート上で、マウスマクロファージ由来培養細胞J774.1 ( $1.5 \times 10^4$  cells / 300 $\mu$ l 10%FCS含有RPMI1640) に、オリゴDNAを単独で、あるいは少量の遺伝子導入試薬とともに数日間投与した。その後、ウェスタンブロッティングにより標的タンパク質の発現量減少の度合いを検討した。コントロールオリゴとしては、センス配列及びミスマッチ配列（アンチセンス配列中の数塩基を別の塩基に置換した配列）のオリゴDNAを用いた。

#### (2) 白血球機能アッセイ系の構築

白血球刺激時の活性酸素産生は化学発光を用いて測定した。96穴マイクロプレートで3日間培養し

たJ774.1細胞（約 $4 \times 10^4$  cells）をHBSSバッファーで洗浄後、活性酸素（スーパーオキシド）特異的検出試薬であるDiogenes存在下で刺激剤オプソニン化サイモザン(OZ)を添加し、産生される活性酸素とDiogenesが反応して生じる化学発光を検出・定量した。

異物の貪食反応は、蛍光染色を利用して測定した。8ウェルチャンバー付きスライドグラス上で3日間培養したJ774.1細胞（約 $5 \times 10^4$  cells）を、HBSSバッファーで洗浄、フルオレッセイン標識OZで刺激した後、ホルムアルデヒドで固定し、細胞内のアクチンをCy3標識抗アクチン抗体で染色した。これを共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡で観察し、OZの緑色と染色されたアクチンの赤色が重なって黄色に見えるものを貪食されたサイモザン粒子としてとらえ、明視野像と合わせて、サイモザン粒子を貪食した細胞をカウントした。

### 3. 研究成果

#### (1) コフィリンに対するアンチセンスオリゴDNAの作成

コフィリンは、アクチンフィラメント（F-アクチン）調節因子の一つであり、脱リン酸化状態でアクチンに結合して、F-アクチンの切断・脱重合を起こす。自然界に広く分布し、様々な生物種間でアミノ酸配列がよく保存されていることから、生体にとって重要なタンパク質であると考えられている。これまで筆者らは、ヒト白血球系培養細胞において、刺激に応じてコフィリンが脱リン酸化され、細胞機能発現の場である細胞膜近傍に移行することを見出し、コフィリンが白血球の細胞応答に深く関与していることを示してきた。

本研究で筆者は、マウスマクロファージ由来培養細胞J774.1を用いてコフィリンについて検討し、刺激に応じてコフィリンがリン酸化され細胞膜領域へ移行することを明らかにした。そこで、白血球における重要な細胞骨格系因子としてコフィリンをとりあげ、コフィリンに対するアンチセンスオリゴDNAのスクリーニングを行った。

アンチセンスの標的配列の候補として、コフィリンmRNA中、翻訳開始領域を含むもの・含まないもの合わせて10箇所（20~24mer）を選択した。投与時のオリゴDNAの濃度、遺伝子導入試薬の種類や有無、投与回数、投与日数なども合わせて検討した。その結果、翻訳開始コドンより4塩基上流から20merのSオリゴ $1 \sim 2 \mu\text{M}$ を、少量の遺伝子導入試薬FuGENE6とともに、1日1回、計3日間投与することにより、コフィリンタンパク量を、未処理の細胞の10~30%程度にまで減少させることができた。この時、コントロールオリゴ（センス配列及びミスマッチ配列）の投与も平行して行ったがアンチセンス効果は見られなかった。このようにして、コフィリンに対する効果的なアンチセンスオリゴDNAを作成することができた。

#### (2) Hck、Lynに対するアンチセンスオリゴDNAの作成

Srcファミリーチロシンキナーゼは血球系や神経系の細胞で情報伝達を担っている重要なキナーゼ群であり、これをアンチセンスの次の標的とした。Srcファミリーキナーゼは現在9種類知られており、食細胞ではHck、Lyn、Fgrが多く発現していると考えられている。そこで、J774.1細胞でのこれら3種類のキナーゼの発現をウェスタンブロットティングで検討したところ、Hck、Lynの発現は認められたが、Fgrは検出できず、発現していないか又は発現しているとしても非常に少ないということが明らかとなった。従って、Hck及びLynの2種に絞ってアンチセンスオリゴDNAを作成することとした。これらのアンチセンスについては既に数種類報告があったので、その中から適当なものを選択してオリゴDNAを合成し、J774.1細胞を用いてアッセイを行った。その結果、Hckについては、翻訳開始コドンより6塩基上流からの、Lynについては17塩基上流からの、それぞれ20merのSオリゴを、コフィリンの場合と同様にして1日1回、2日間投与することにより、Hck、Lynのタンパク量を40~60%程度まで減少させることができた。

#### (3) 活性酸素産生のアッセイ系構築

白血球は細胞外からの刺激に応じて活性酸素を産生する。これは生体に侵入した細菌を白血球が殺菌する上で重要な細胞機能である。筆者は産生された活性酸素を化学発光法により検出する系を構築した。細胞の刺激剤としては、オプソニン化サイモザン(OZ)を用いた。これは、不溶性の多糖粒子であるサイモザンの表面に補体成分C3biをコーティングしたもので、生体内に侵入した異物に抗体や補体が結合して貪食されやすくなった（オプソニン化された）状態を模した細胞刺激剤である。OZで白血球を刺激すると、細胞表面のC3bi受容体（ $\beta_2$ インテグリンの一種Mac-1;CD11b/CD18）から細胞内にシグナルが入り、活性酸素が産生される。

本研究では、96穴マイクロプレートで培養したJ774.1細胞を、Diogenes存在下OZで刺激し、産生された活性酸素由来の化学発光を、マイクロプレート対応型発光検出装置で検出した。その結果、再現性よく活性酸素の産生を測定することができた。

#### (4) 食食反応のアッセイ系構築

OZは、水不溶性の粒子状刺激剤なので、白血球による食食反応を実験系で再現することができる。そこで、フルオレッセインで蛍光標識したOZを用いて食食反応の観察を行った。食食され細胞内に取り込まれたOZは、フルオレッセインの緑色と細胞内のアクチンを蛍光染色した赤色が重なって黄色に観察され、食食されていない緑色のOZと区別できる。この蛍光像を、明視野観察での細胞像とも重ね合わせ、OZを食食した細胞と食食していない細胞に分けてカウントした。一視野での細胞数は50個程度とし、1サンプル当たり10視野観察した結果、OZを食食した細胞の全細胞に対する割合を再現性よく算出することができた。

#### (5) 食細胞機能に対するコフィリンアンチセンスの効果

上記(2)、(3)の2種類の細胞機能アッセイ系を用いて、コフィリンに対するアンチセンスオリゴDNAの効果を検討した。96穴マイクロプレートあるいは8ウェルチャンパー付きスライドグラス上で3日間J774.1細胞を培養し、その間1日1回アンチセンスオリゴDNAを投与した。最終投与の翌日、細胞をOZで刺激し、活性酸素産生あるいは食食反応について検討した。その結果、アンチセンス投与によりコフィリンタンパク量を減少させた細胞では、対照細胞（未処理細胞、コントロールオリゴDNA投与細胞）と比較して、活性酸素産生は2~3倍に増大しており、また食食活性を示す細胞の割合は約1.4倍に増大していた。これらの結果から、コフィリンに対するアンチセンスオリゴDNAにより、白血球機能が亢進することが示された。

## 4. 考察・まとめ

### (1) コフィリンアンチセンスオリゴDNAについて

アンチセンスオリゴDNAの標的配列としては、mRNA上の翻訳開始コドンを含む領域がよく使われているが、その他の部分が有効である場合もある。アンチセンスのメカニズムとして、開始コドン領域に相補的なオリゴDNAは、リボソームのmRNAへの結合・アミノ酸への翻訳を阻害すると言われていたが、それ以外に、mRNAの立体構造の変化による安定性の低下等の関与も考えられている。しかし、コフィリンの場合には、結果として翻訳開始コドンを含む領域が標的として有効であった。但し、細胞骨格系因子であるコフィリンは、細胞内での量が比較的多いタンパク質であり、アンチセンス投与後のタンパク量は最低で対照細胞の10%程度と、コフィリンタンパクの発現を完全に阻害することはできなかった。オリゴDNAの投与量をこれ以上増加させると細胞数が非常に少なくなり、細胞機能のアッセイが行えなくなるので、無理にオリゴDNAの投与量を増すことはせず、コフィリンが少量残っている状態でアッセイを行った。

### (2) Hck、LynのアンチセンスオリゴDNAについて

これらのアンチセンスオリゴDNAは、既知のものから選択したこともあり、活性を確認することができた。ただ、タンパク量は半分程度までしか減少しておらず、アンチセンス活性としては若干弱い。これまでの報告例とは使用した細胞種が違う等の理由が考えられるが、今後、添加する量やタイミング等の条件を最適化してより高いアンチセンス効果が見られるような系を作り、これらのアンチセンスオリゴDNAが白血球の機能に与える影響について検討を進める。

### (3) 細胞機能のアッセイ系について

活性酸素の産生については、比色法や蛍光法に比べより感度のよい化学発光法を利用した。これにより、96穴マイクロプレートを用いて、1ウェル当たり $4 \times 10^4$ 程度の比較的少ない細胞数で、産生された活性酸素を定量的に測定することが可能であった。

食食反応については、本研究でのアッセイ法と同様に蛍光標識したOZを用い、食食によりOZを取り込んだ細胞を（付着性細胞の場合は剥離させて懸濁液としてから）フローサイトメーターで検出するという手法がある。しかし、筆者が使用したJ774.1細胞は、非常に付着性が強い細胞であるため、フローサイトメーターは使用せず、蛍光顕微鏡を利用して、食食されたOZとされていないOZを蛍光で区別するという手法を取った。食食した細胞をカウントし、再現性のある結果が得られたことから、この方法は食食反応のアッセイ系として有用であることが示された。

### (4) コフィリンアンチセンスの効果について

筆者らこれまで、培養白血球において、アクチンフィラメント (F-アクチン) 調節因子であるコフィリンと細胞機能が密接に関連していることを示してきた。本研究では、J774.1細胞において、OZ刺激により、コフィリンの細胞膜近傍への集積及びリン酸化 (すなわちF-アクチンの脱重合・切断活性の不活性化) が起きること、同時に細胞膜近傍でのF-アクチン量が増大することを明らかにした。そこで、細胞骨格系から食細胞機能制御へアプローチする方法として、コフィリンアンチセンスが細胞機能に及ぼす影響について検討した。その結果、アンチセンス処理により活性酸素産生・貪食反応とも対照細胞と比較して増大することが示された。

コフィリンアンチセンスとF-アクチンとの関連について検討したところ、アンチセンス処理によってコフィリン量が低下すると細胞内でのF-アクチン量が増加することが確認された。J774.1細胞では、OZ刺激による細胞活性化時にF-アクチン量が増加することから、コフィリンアンチセンスによって引き起こされるF-アクチンの増加が活性酸素産生や貪食反応の増大につながるものと考えられる。最近筆者らは、コフィリンのリン酸化酵素LIMキナーゼの野生型及びドミナントネガティブ型を発現させた培養白血球を用いて、F-アクチンと白血球機能発現との深い関連を示している。また、活性酸素産生酵素NADPH oxidaseは細胞膜及び細胞質に存在する複数の因子が細胞膜上で複合体を形成して活性型となるが、この複合体の形成・維持にF-アクチンが関与して活性酸素産生をサポートしているという報告もある。従って、コフィリンアンチセンスによるF-アクチンの増加が最終的に活性酸素産生の促進につながったと考えられる。また、細胞のダイナミックな運動を伴う貪食反応がコフィリンアンチセンスにより増大したことにも、F-アクチン量の増加が関係しているものと思われる。

#### (5)まとめ

以上、白血球機能制御を目的として、細胞骨格系因子及び情報伝達系因子に対するアンチセンスオリゴDNAを作成した。また、白血球機能の中の活性酸素産生及び貪食反応についてアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて細胞骨格調節タンパク質コフィリンに対するアンチセンスの効果を検討したところ、コフィリン量の低下により活性酸素産生、貪食反応とも増大することが示された。細胞機能を担うそれぞれの因子に対するアンチセンスオリゴDNAにより白血球機能を低下させることは比較的容易にできると考えられるが、反対に、コフィリンアンチセンスは白血球機能亢進のための有用なツールになり得ると考えられる。また、情報伝達系因子のアンチセンスオリゴDNAは白血球機能を抑制することが予想され、この点について今後検討を進める予定である。

## 5. 研究発表

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).

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 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 544-549 (2002).

安達玲子、武内恒成、鈴木和博 「食細胞の反応性に対するコフィリンアンチセンスの効果」 第74回日本生化学会大会 (2001)

松井幸子、松本幸子、安達玲子、大橋一正、水野健作、笠原 忠、鈴木和博 「食細胞の機能発現におけるコフィリン-LIMキナーゼ系の役割」 第74回日本生化学会大会 (2001)

渡辺秀実、安達玲子、楠井 薫、笠原 忠、鈴木和博 「白血球細胞の分化に対する内分泌かく乱化学物質の影響」 第74回日本生化学会大会 (2001)

渡辺秀実、安達玲子、楠井 薫、笠原 忠、鈴木和博 「白血球細胞の分化に対する内分泌攪乱化学物質の影響」 フォーラム2001：衛生薬学・環境トキシコロジー (2001)

安達玲子、武内恒成、鈴木和博 「食細胞の反応性に対するコフィリンアンチセンスの効果」 第55回日本細胞生物学会大会 (2002)

平山明子、松井幸子、松本幸子、笠原 忠、安達玲子、鈴木和博、大橋一正、水野健作 「LIM-キナーゼ1によるマクロファージ様U937細胞の機能修飾について」 第3回Pharmaco-Hematologyシンポジ

ウム (2002)

渡辺秀実、安達玲子、平山明子、笠原 忠、鈴木和博 「白血球分化の遺伝子発現に対する内分泌攪乱化学物質の影響」 第75回日本生化学会大会 (2002)

平山明子、安達玲子、笠原 忠、鈴木和博 「LIM-キナーゼ1によるマクロファージ様U937細胞の機能修飾について」 第32回日本免疫学会総会・学術集会 (2002)

6. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし