

平成15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

目 次

課題番号

KH11001

ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の
開発研究

川西 徹 …… 1

KH11002

ゲノム創薬を支援する高感度分析・解析技術の開発・応用に関
する研究

今井一洋 …… 11

KH11003

疾患モデル動物の開発および保存のための高度発生工学技術の
確立

小倉淳郎 …… 19

KH11004

トランスジェニックラットの作成とその公共利用のための胚バ
ンクの検討

小林英司 …… 25

KH11005

癌細胞の標的化を可能にするベクターの開発；単クローン抗体
からペプチドへの展開

石坂幸人 …… 32

KH11006

遺伝子改変動物をもちいたGタンパク質共役型受容体の機能解
析

田上昭人 …… 37

KH11007

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

鈴木和博 …… 53

KH11008

多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関す
る研究

切替照雄 …… 65

KH12079

超機能性核酸類縁体（BNA）を用いたアンチセンス医薬品の開
発とその実践的応用

今西 武 …… 78

KH12084

コンディショナルノックインによる受容体機能変換マウス作成
と情報伝達機構の解析

笹岡俊邦 …… 82

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

研究要旨 白血球の細胞運動にはコフィリンが PI3 キナーゼの下流でリン酸化/脱リン酸化反応を介して必須の役割を果たしていることを明らかにする一方、NK 細胞の殺ガン細胞活性を亢進させるペプチドを自作ライブラリーから開発した。さらに、アミノペプチダーゼ N は、血管内皮細胞の管腔形成、運動、接着を制御して、血管新生に深く関与することを明らかにした。

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

A. 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ェージディスプレイライブラリーを用いて探索し、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)アクチン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、白血球の走化性運動に関わる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、その組織発現特異性、発現抑制した場合の血管内皮細胞の機能変化を検討した。

B. 研究方法

- (1) ケモタキシスアッセイ

HL-60 細胞を 1.25% DMSO 及び G-CSF (25 ng/ml) 存在化に 6 日間培養し好中球様に分化させた。分化後の細胞を HBSS で洗い、RPMI1640 (phenol red 不含) に懸濁させた。96 穴プレートに 10ng/ml IL-8 走化性因子を 380 μ l ずつ入れ、ケモタキシスチャンパーにセットして、2 μ m の pore size のポリカーボネイトフィルターを挟んで、上室に細胞の懸濁液を 260 μ l (細胞数 1~2x10⁶) ずつ well に注いだ。37°C で 90 分間インキュベーション後、PBS で 5, 6 回洗い、上室に残った細胞を除いた。フィルターをとらずに 2000rpm で 10 分間遠心した後、フィルターをメタノールで固定し、ギムザ染色した。一方、96 well plate は上清 200 μ l を除去し遊走した細胞を顕微鏡観察した。細胞数定量のため Cell Titer-Glo (Promega) を 100 μ l/well 加え、2 分間 shake、室温で 10 分間インキュベーションを行い、ケミルミネッセンスをプレートリーダー (ARVO. SX) で測定した。

(2) IL-8 刺激による F-actin 変動の解析

分化誘導させた HL-60 細胞を 800rpm で 10 分間遠心し HBSS で洗浄した。50 万個の細胞を培地 360 μ l に懸濁させ、37°C で 10 分間 preincubation し、40 μ l の 100ng/ml IL-8 (final 10 ng/ml) を加え、0, 15, 30 秒、1, 5, 10 分間インキュベーションした。氷冷した 4% paraformaldehyde 400 μ l を加え、反応を止めた。氷水で 5 分間氷冷した。その後、室温で 30 分間インキュベーションし上清を捨て、氷冷しておいた PBS (—) を 1ml 加え 1200 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上清を捨て 200 μ l の Lyso PC (final 5mg/ml) 含有の Alexa-Phalloidin (final 300U) に懸濁し、室温で 30 分間ゆっくり混ぜながらインキュベーションした。その後、1ml の PBS を加え、1200rpm で 10 分間遠心した。PBS に懸濁し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察し、フローサイトメータにて蛍光強度を測定した。

(3) コフィリン siRNA のトランスフェクション

コフィリン siRNA は B-Bridge International, Inc. にデザイン、合成・精製を依頼した。siRNA のトランスフェクションは文献を参考にしてトランスフェクション試薬を選び、スクリーニングした。siFECTOR と TransIT-TKO reagent を用いて、まず 24well plate の小スケールから始めた。TransIT-TKO reagent の方が導入効率が良かったので、TransIT-TKO reagent を使用することにし、siRNA の濃度を 40 nM に決定した。分化誘導後 3 日目の HL-60 細胞を遠心し (800rpm, 10min, 4°C)、1380 万個/6.6ml に懸濁させた。この細胞液を 75cm² のフラスコに移し、TransIT-TKO Reagent/siRNA mixture (下記) を加え、37°C、48 時間培養した。コフィリン siRNA とコントロール siRNA は Universal buffer で希釈し、Final 40nM で使用した。

TransIT-TKO Reagent/siRNA mixture の作製

Opti-MEM1.3ml を tube に入れ、ここに TransIT-TKO Reagent を 79.2 μ l 加え vortex で混和した。室温で 15 分間インキュベートした。次に、コントロール siRNA またはコフィリン siRNA を加え (final 40 nM)、pipetting で混和し、室温で 15 分間インキュベーションした。

これを TransIT-TKO Reagent/siRNA mixture とした。

(4) F-actin とリン酸化コフィリンの細胞内分布の変動

分化誘導させた HL-60 細胞を 800rpm で 10 分間遠心し HBSS で洗浄した。100 万個の細胞を培地 900 μ l に懸濁させ、37°C で 10 分間 preincubation し、100 μ l の 100ng/ml IL-8 (final 10 ng/ml) を加え、0, 30, 秒 2 分間インキュベーションした。氷冷した 4% paraformaldehyde を加え、反応を止めた。氷水で 5 分間氷冷した。その後、室温で 30 分間インキュベーションし上清を捨て、氷冷しておいた PBS を 1ml 加え 1200 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上清を捨て 200 μ l の Lyso PC (final 5mg/ml) 含有の Alexa-Phalloidin (final 300U) に懸濁し、室温で 30 分間ゆっくり混和しながらインキュベーションした。その後 PBS で 3 回洗浄した。半分に分け抗リン酸化コフィリン抗体あるいは抗コフィリン抗体で 30 分間インキュベーションした。その後 PBS で 3 回洗浄した。それぞれ Alexa Flour568 標識抗ラビット抗体および Alexa Flour568 標識抗マウス抗体で染色し、PBS で 3 回洗浄した。染色した細胞を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

(5) マウスNK細胞受容体Ly49Aに結合するフェージクロンのバイオパニング

可溶性マウスNK細胞レセプターLy49Aをストレプトアビジンアガロースビーズに固相化し、これに結合するフェージクロンをパニングを用いてスクリーニングした。結合したフェージの回収は、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環状ペプチドを提示したもの (Ph. D. -C7C, New England Biolab) を用いた。

(6) 新規ペプチドライブラリーの作成

NK細胞の細胞傷害活性を増強するペプチドがいくつか単離できたが、より結合能の強いペプチドの探索を目指して新たなペプチドライブラリーを構築した。3種類に分類される阻害ペプチドには共通のアミノ酸配列が存在することから、共通配列を保存し他をランダムなアミノ酸で置換したペプチドライブラリーの作成を試みた。ランダムな塩基配列を含む鋳型のDNAをもとにPCRを行い、Eag I とAcc65I処理後、同制限酵素で切断したベクターM13KEに組み込んだ。Ly49Aとの結合力を高めるた

めに両末端にランダムな3アミノ酸を伸長させたライブラリーも同様の方法にて作成を行った。両ライブラリーはエレクトロポレーション法により大腸菌にトランスフェクトし、プラークを算定した。それぞれのライブラリー数は 3×10^3 pfu、および 5×10^5 pfuであった。ライブラリーからのLy49A結合性ファージクローンの選別は、前回と同様の方法によって行った。

(7) 環状ペプチドを用いたLy49A-H-2Dd結合阻害実験

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。これを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。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

エフェクターとして、B10. D2マウス由来のLy49A, Ly49G2二重陽性、Ly49A陽性、Ly49G2陽性、Ly49A及びLy49G2陰性NK細胞をそれぞれ分離・調製し、H-2Ddを強制発現させたC1498細胞を標的細胞として細胞傷害性試験を行った。Ly49A結合性ペプチドを結合させたNK細胞と ^{51}Cr を取り込ませた標的細胞は、E/T (effector:target)比、10 : 1で、5% CO_2 、 37°C 、4時間反応させた。反応後、標的細胞から放出された ^{51}Cr の放射活性を測定した。

(9) ヒトNKレセプターCD94/NKG2A, CによるHLA-E上認識領域の同定

CD94/NKG2A, Cが認識するHLA-E上の領域を同定するために、各種HLA-E変異体を作製し、ヒトCD94/NKG2A, C発現細胞との結合解析を行った。アラニン点変異を導入は、その側鎖が分子表面に露出した残基を $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ 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を鋳型とした二段階PCR法により導入した。変異を導入したHLA-Eの細胞外領域をコードするcDNAを、C末端側にビオチンリガーゼ認識配列を付加したpET3Cbioベクターに組み込み、大腸菌BL21 (DE3) pLysS発現誘導し封入体を得た。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でリフォル

ディングし、イオン交換クロマトグラフィーによる精製の後、ビオチン化を行い、更にゲルろ過クロマトグラフィーによる再精製を行った。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, C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。

(10) HLA-E認識の相違を規定するNKG2上アミノ酸残基の同定

HLA-E認識の違いを規定するNKG2A, C上残基を明らかにするため、NKG2Aと異なるNKG2Cの残基をNKG2Aに導入したNKG2A変異体発現細胞株を樹立した。

変異を導入した残基は、NKG2A上の

163, 189, 197, 225残基目およびloop3 (167-170残基)である。これらの変異体をコードするcDNAを二段階PCR法により作成し、発現ベクターpHbApr-1-neoに導入後C1498細胞にて恒常的発現株をクローン化した。これらの変異体発現細胞に対し、各種HLA-E変異体との結合を解析した。

(11) HLA-E重鎖結合ペプチドのCD94/NKG2による認識に及ぼす影響

D69, H155の2残基はそれぞれ $\alpha 1$, $\alpha 2$ 領域上面のヘリックス中央にあり、HLA-E重鎖が結合するペプチドの4残基目を挟んでいる。そこで、ペプチドの4残基目を各種アミノ酸に変えたHLA-E複合体と、CD94/NKG2A, Cとの結合を解析した。種々の4残基目の異なる9mer合成ペプチド20種類を調製し、それぞれ組換え体HLA-Eをin vitroでリフォルディングさせる際に共存させ結合させた。これらの可溶性HLA-EとCD94/NKG2A, C、並びにこれらの変異体との結合を調べた。

(12) 癌細胞及び血管内皮細胞における APase の発現

癌細胞株及びヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の計 24 種の細胞から ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を調製した。各細胞の total RNA 及び胎盤由来 RNA から、primer Oligo dT 及び SuperScript III RT(ともに invitrogen)を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型とし、アディポサイト由来ロイシン特異的 APase (A-LAP)、胎盤由来ロイシン特異的 APase (P-LAP)、ピューロマイシン感受性 APase (PSA)、及び APaseN に対する特異的 primer と Ex Taq (宝酒造)を用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物を 1.5%アガロースゲル電気泳動することにより、各細胞における目的遺伝子の発現を検出した。

(13) HUVEC への siRNA の導入

A-LAP 及び APaseN に対する siRNA の設計と合成は QIAGEN によって行った。また、遺伝子発現に影響を及ぼさない Non-silencing control siRNA を対照として用いた。

Oligofectamine (最終濃度 0.35%) と siRNA を混合し、室温で 15 分間静置した。HUVEC の培地を

HuMedia EG2 (クラボウ) から Opti MEM I(invitrogen)に置換し、siRNA を添加して 4 時間処理した。細胞を Opti MEM I で 1 回洗浄した後、HuMedia EG2 培地で培養した。

(14) siRNA による目的遺伝子の発現阻害の確認 mRNA の発現の定量は real time PCR 法で行った。A-LAP では SYBR Green を、APaseN では Taqman probe (ともに Applied Biosystems) を用いた。また、Phycoerythrin (PE) ラベルした抗 APaseN 抗体 (BD PharMingen) と細胞を 4°C、30 分間混合し、FACScan で蛍光測定することにより、細胞表面の APaseN のタンパクを検出した。

(15) 増殖抑制試験

siRNA を導入した HUVEC 4000 個/well を 96 穴プレートにまき、HuMedia EG2 培地で培養した。1、2、3 日後に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。

(16) ケモタキシス試験

24 穴プレート transwell chamber (Corning costar) の 5 μ m pore フィルター裏面に 4 μ g のファイブロネクチンをコートし、クリーンベンチ内で風乾させた。チャンパー内に、siRNA を導入した HUVEC を 2x10⁴ 個まき、4 時間培養した。フィルター裏面へ遊走した細胞をディフ・クイック染色キット (国際試薬) を用いて染色し、顕微鏡下において任意の 5 視野における細胞数を数えた。

(17) 細胞運動試験

siRNA を導入した HUVEC が 24 穴プレート内で confluent になった状態で、1~10 μ L 用のピペットチップ先端で、well 中央に一直線に傷をつけた。12 時間培養後、細胞をギムザ染色し、顕微鏡下でデジタルカメラ撮影し、傷付け後の細胞運動を観察した。

(18) 管腔形成試験

24 穴プレートにマトリゲルをコートした上に、siRNA を導入した HUVEC を 3x10⁴ 個まき、5 時間培養した。細胞を顕微鏡下で 4 視野デジタルカメラ撮影し、プリントアウトした画像上で、形成された管腔構造の全長を計測した。

(19) HUVEC と各種接着因子との接着試験

マトリゲル、ラミニン、ファイブロネクチン Type I コラゲン、Type IV コラゲンの 5 種類の接着因子でコートした 96 穴プレートに、siRNA を導入した HUVEC を 2x10⁴ 個まき、15 分間培養した。各 well を PBS(-)で洗浄した後、接着している細胞をピコグリーン (Molecular Probes) で染色し、蛍光量を測定した。

(倫理面への配慮)

国立医薬品食品衛生研究所ではヒト由来実験材料の取り扱いに関する倫理委員会 (外部委員が参加) および実験動物の取り扱いに関する委員会が組織され、成文化された規定がある。本研究では、

ヒトの細胞は全て細胞バンク登録されている樹立細胞株を使用したもので、それらの規定には抵触せず、倫理上の問題はない。また、策定された三省ゲノム指針においても、樹立細胞株については委員会審査を必要としないことになっている。

in vivoにおけるNK細胞傷害活性の増強を調べるために、マウスを用いた動物実験を行った。動物実験は「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守するとともに、PETを用いたリアルタイムによる観察の手法を採用し、実験に供するマウスを最小限にするよう配慮した。アミノペプチダーゼNの研究に用いた細胞株及び胎盤由来RNAはいずれも市販されているものであり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

(1) 好中球様 HL-60 細胞の IL-8 刺激によるリン酸化コフィリンの経時変化

これまでに好中球様に分化させた HL-60 細胞での走化性を検討した実績から 10 ng/ml IL-8 の時が最も走化性が促進されたので、この濃度を用いて以下の実験を行った。HL-60 細胞を好中球様に分化させると IL-8 に対して走化性がみられ、IL-8 の受容体である CXCR1 が発現することがわかった。走化性は細胞運動であるので、細胞骨格の構築に重要な役割を果たしているコフィリンの IL-8 刺激における経時変化について検討した。好中球様に分化させた HL-60 細胞を 1、5、10 分間 IL-8 で刺激をし、細胞を可溶化して SDS-PAGE のサンプルを調製した。ウェスタンブロッティングの分析から、無刺激時のリン酸化コフィリンのレベルを 100 として、IL-8 刺激による経時変化を解析した。その結果、IL-8 刺激後 1 分でコフィリンは刺激前に比べ脱リン酸化された。IL-8 刺激後 5 分にはリン酸化のレベルが回復し、その後リン酸化コフィリンは増加した。実験は 3 回行い、再現性が得られた。

休止状態の細胞ではコフィリンはリン酸化の割合が多く、刺激を受けると脱リン酸化されることと一致した。コフィリンは IL-8 刺激で直ちに脱リン酸化され、再リン酸化されることが走化性において重要であることが示唆された。

(2) 好中球様 HL-60 細胞の IL-8 刺激による F-actin の変動

好中球様に分化させた HL-60 細胞は IL-8 に対して走化性がみられた。HL-60 細胞が走化性運動している時の F-actin の変動を解析した結果、IL-8 刺激後 15 秒で F-actin レベルが上昇し、その後の F-actin のレベルは減少した。IL-8 刺激による細胞内の F-actin の経時変化においては刺激前では細胞膜の方に弱く染まっていたが、IL-8 刺激後 15 秒でラメリポディア、フィロポディア形成が見

られ、強い F-actin の集積が観察された。IL-8 刺激後 1 分では、F-actin の集積は弱くなり、刺激後 5 分では蛍光は弱くなっていた。IL-8 刺激により一過性に F-actin が形成され、leading edge (運動先端)でのラメリポディア、フィロポディア形成を促進したと考えられる。

(3) 好中球様 HL-60 細胞の IL-8 刺激に対する S3-R ペプチドの影響

これまでにコフィリンのリン酸化部位 (3 番目のセリン) を含む 16 アミノ酸からなる配列と膜透過性配列ペネトラチンからなる S3 ペプチドを用いた系において、T 細胞の LIMK1 のリン酸化活性を抑制することと、走化性を抑制することが報告されている。そこで、好中球様に分化させた HL-60 細胞の走化性における S3 ペプチドの効果を検討した。しかし、コントロールペプチド (コフィリンのリン酸化部位の含む配列の N 末と C 末を逆にした配列と膜透過性配列からなる合成ペプチド) を用いても、走化性や活性酸素産生に影響が見られた。更には STAT3 とペネトラチンの合成ペプチドでも同様であったことから、おそらく、ペプチドの膜透過性配列が影響を及ぼしたと考えられた。そこで、膜透過性配列をアルギニン 8 残基の配列に変え、S3-R ペプチドとして使用した。S3-R ペプチドは N 末にコフィリンのリン酸化部位 (3 番目のセリン) を含む 16 アミノ酸と 8 モルのアルギニンからなる合成ペプチドである。アルギニンが 8 残基付加することにより細胞傷害性が少なく、また従来考えられているエンドサイトーシスとは異なる機序で細胞内に取り込まれるとされる。

好中球様に分化させた HL-60 細胞を遠心し、洗浄してから、S3-R ペプチドまたはコントロールペプチドで室温、30 分間インキュベーションして細胞を調製した。そして IL-8 に対する走化性における S3-R ペプチドの濃度による影響を調べた。コントロールに比べ S3-R ペプチドは濃度依存的に走化性を促進し、50 μ g/ml の濃度で最大となった。実験は繰り返し行い、再現性があった。また、S3-R ペプチドによる IL-8 刺激のコフィリンのリン酸化についても検討した。上記の方法で細胞を調製し、30 秒、1、5、10 分間 IL-8 刺激し、細胞を可溶化して SDS-PAGE のサンプルを作成した。ウェスタンブロットングの分析から、S3-R ペプチドは IL-8 刺激後すぐの早いコフィリンの脱リン酸化には効果を示さなかったが、その後起こる再リン酸化を抑制した。実験は 3 回行い、再現性が得られた。なお、IL-8 刺激時の F-actin 形成における S3-R ペプチドの影響も検討したが、顕著な効果は見られなかった。

(4) 好中球様 HL-60 細胞の siRNA の効果

siRNA は small interfering RNAs の略で、二本

鎖 RNA (dsRNA) が RNase III ファミリーに属する Dicer により、3' 末端側に 2 塩基のオーバーハングをもつ 21 塩基の siRNA にプロセッシングされ、次いで RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる siRNA-蛋白質複合体に取り込まれ、配列特異的に mRNA を分解する現象である。RNA interference (RNAi) は線虫を含め、昆虫、植物、菌類などの様々な生物種間で保存されている現象であることが示唆されている。ここでは、コフィリンの遺伝子の発現を抑制することにより走化性への影響を検討した。コフィリンの siRNA 配列の解析、合成は B-Bridge 社に依頼し、有力候補の 5 種類の配列の siRNA 混合物を用いた。コントロール siRNA としては GC 含有率 52 % のもの (NNACTCTATCTGCACGCTGAC) を用いた。ウェスタンブロットングの結果から、コフィリン siRNA を導入した細胞はコントロールに比べ、約 55% までコフィリンの発現を減少した。また、コフィリン siRNA を導入した細胞の IL-8 に対する走化性を検討したところ、走化性は顕著に抑制された。実験は 5 回行い、高度に再現性があった。

コフィリンの発現を減少させたことにより走化性を抑制したことから、コフィリンは走化性に必須のタンパクであることが示唆された。

(5) F-actin とリン酸化コフィリンの細胞内局在の検討

これまでの実験から好中球様に分化させた HL-60 細胞における走化性にコフィリンが関与し、また、そのリン酸化/脱リン酸化の挙動も走化性に関与している事が示唆された。そこで、コフィリンはアクチン結合タンパクであることから、IL-8 刺激におけるリン酸化コフィリンと F-actin の細胞内分布について検討した。無刺激状態では F-actin は細胞内に均一に分布しているが、IL-8 刺激後 30 秒では F-actin は細胞膜近傍で集積している様子が観察された。IL-8 刺激後 2 分ではそれほど強い F-actin の集積は観察されなかった。これは F-actin のフローサイトメータによる定量的結果と一致した。また、リン酸化コフィリンは無刺激状態の細胞では細胞内に分散しているのに対し、IL-8 刺激後 30 秒で細胞膜直下に局在し F-actin と共局在していた。IL-8 刺激後 2 分では共局在は見られなかった。休止状態では細胞の形態は円形であるのに対し、IL-8 刺激により変形して分極した細胞が多く観察された。

同様の方法で、コフィリン siRNA を導入した細胞での F-actin とリン酸化コフィリンの細胞内局在についても検討した。無刺激状態でのリン酸化コフィリンは、コントロールに比べコフィリン siRNA を導入した細胞では IL-8 刺激後 30 秒での F-actin とリン酸化コフィリンの共局在は見られなかった。実験は 2 回行い、同じ結果となった。

コフィリン siRNA を導入した細胞では F-actin とリン酸化コフィリンの共局在が観察されなかったことと走化性を抑制したことから、F-actin とリン酸化コフィリンの共局在が走化性に関して重要であることが示唆された。コフィリンの発現を抑制したことで、コフィリンの機能が十分に果たされなかったと考えられる。また、細胞膜直下でリン酸化コフィリンのレベルが上昇し、F-actin の形成を亢進するように作用している可能性がある。

(6) PI3K 阻害剤による走化性の影響

これまでに様々な細胞種で PI3K が走化性において影響を及ぼしていることが報告されている。この白血球の実験系での PI3K の関与を検討するため、PI3K 阻害剤である wortmannin と LY294002 を用いて走化性の実験を行った。wortmannin はよく保存された p110 サブユニットの Lys802 残基に選択的に結合して PI3K の活性を阻害する。wortmannin は μM の高濃度ではミオシン軽鎖キナーゼや PI4 キナーゼに対しても阻害を示すので低濃度(10 nM 以下)で使用した。LY294002 は触媒サブユニットへの ATP 結合を競合阻害することにより PI3K の活性を阻害する。wortmannin および LY294002 は濃度を幾つかとり好中球様に分化させた HL-60 細胞の IL-8 に対する走化性への影響を検討した。結果は、両試薬とも濃度依存的に有意に走化性を抑制し、10nM wortmannin、10 μM LY294002 でその効果は最大となった。リン酸化コフィリンの経時変化に対する効果も検討した。走化性の実験で最も効果のあった濃度の PI3K 阻害剤 10nM wortmannin と 10 μM LY294002 で細胞を 37°C で 30 分間インキュベーションし IL-8 で刺激し SDS-PAGE のサンプルとして調製した。ウェスタンブロッティングの結果、wortmannin・LY294002 は IL-8 刺激直後のコフィリンの脱リン酸化及びそれに続く再リン酸化の両方を抑制した。

以上の結果より PI3K がコフィリンのリン酸化酵素である LIMK と脱リン酸化酵素である slingshot のシグナルの上流に位置していることが示唆された。

(7) 新たなLy49A結合性ペプチドの探索

Ly49A結合性ファージクローンの発現しているペプチドのアミノ酸配列のうち、C1 (Type I), C11 (Type II), C26 (Type II')を選び、これら環状ペプチドをを化学合成した。これらのペプチド共存下において、Ly49AとH-2Ddの結合が阻害されるか否かの検討を行った。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(CXFXLPWLC), Type II'(CXFXXLPWC)>Type II(CXFXLPWC)の順であった。また、Type II'ペプチドは可溶性マウスNK細胞抑制性レセプターLy49G2にも結合し、NK細胞の細胞傷害活性を増強

した。しかし、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った。これら3種類の阻害ペプチドには共通のアミノ酸配列が存在することから、共通配列を保存し他をランダムなアミノ酸で置換したペプチドライブラリー、およびLy49Aとの結合力を高めるために両末端にランダムな3アミノ酸を伸長させたライブラリーを作成し、それぞれスクリーニングを行った。前者から新たに3つのクローンMI-1 (CIFGLPWLC), MI-2 (CLFGLPWLC), MI-3 (CYFNLPWLC)が、後者から4つのクローンMC102 (QQGCLFNLPWLC DKV), MC116 (QQTCLFNLPWLCNNS), MC103 (ERHCLFNLPWLC SMP), MC109 (EROCLFNLPWLC EQD)が、それぞれ単離された。うちMI-2がこれらの中で最も強い活性を示し、既知のC1ペプチドに比べ3倍強い阻害効果を示した。

(8) Ly49結合性ペプチドによるNK細胞傷害活性の増強

3つのLy49A結合性ペプチドによるLy49AとH-2Ddとの結合阻害がNK細胞傷害活性に影響するか否かの検討を行うため、 ^{51}Cr リリースアッセイを行った。この実験ではエフェクターとして、B10.D2マウス由来のLy49A, Ly49G2二重陽性、Ly49A陽性、Ly49G2陽性、Ly49A, Ly49G2陰性NK細胞をそれぞれ調製し、標的細胞としてH-2Ddを強制発現させたC1498細胞を用いた。各々のLy49A結合性ペプチドを加えると、Ly49A陽性NK細胞傷害活性は濃度依存的に増強した。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、Ly49G2陽性NK細胞傷害活性も増強した。以前のin vitroにおける結合実験において、Type IペプチドはLy49G2には一切結合しなかったが、にはLy49G2に結合するType II'ペプチド(C2, C14, C26)と結合しないType IIペプチド(C8, C11)の2種類を明らかにしていた。今回の結果は、Type II'ペプチドがLy49G2に直接結合して、その活性を阻害していることを示唆しており、細胞傷害活性の増強は、Ly49AとLy49G2の両者を介していることが明確になった。

(9) 可溶性HLA-Eアラニン点変異体とCD94/NKG2A, C発現細胞の結合解析

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 $\beta 2$ 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ペクトロメトリーにより確認した。HLA-Eの $\alpha 1/\alpha 2$ 領域に存在するR65, Q72, R75, R79, D162, E166のHLA-E重鎖アラニン変異体およびペプチド(野生型: VMAPRTVLL)の4残基目をLys (pP4K)にしたHLA-Eにおいて、CD94/NKG2A, Cへの結合が低下

した。これらの結果から、CD94/NKG2A, Cは共にHLA-E上面部の $\alpha 1/\alpha 2$ 領域（ペプチドを含む領域）を認識していることが明らかになった。予期していなかったことに、HLA-E重鎖上のD69, H155へのアラニン変異導入はCD94/NKG2Aへの結合を低下させたが、CD94/NKG2Cへの結合には大きな影響を与えなかった。これらの結果はCD94/NKG2A, CはHLA-Eのほぼ同じ領域に結合するものの、結合に関与する残基は一部異なることを示唆している。(10) HLA-E認識の相違を規定するNKG2上アミノ酸残基の同定

NKG2A上のM163, M189, E197, I225をそれぞれNKG2C型に置換したNKG2A単変異体の野生型HLA-Eへの結合は大きくは変化しなかった。また、loop3のNKG2A単変異体を除く上記4つのNKG2A単変異体は、野生型CD94/NKG2Aと同じHLA-E変異体の結合パターンを示した。この結果から、HLA-E認識の違いを規定するNKG2A, C上残基はloop3にあることが予想された。しかし、loop3の置換により野生型HLA-Eの結合能が著しく低下した。そこで、loop3と他の残基の同時置換によって、HLA-Eへの結合が回復する可能性を考え、loop3に加えてさらに別の残基もNKG2C型に置換したNKG2A二重変異体を作製し、HLA-Eとの結合解析を行なった。NKG2A二重変異体とHLA-E変異体との結合解析の結果、すべてのNKG2A二重変異体において野生型CD94/NKG2Cと同様のHLA-E変異体に対する結合パターンを示した。これらの結果から、CD94/NKG2A, CによるHLA-E認識の違いは、NKG2上のloop3単独あるいはloop3と他残基との同時置換によって引き起こされていることが明らかになった。

(11) HLA-E重鎖結合ペプチドのCD94/NKG2による認識に及ぼす影響

ペプチド4残基目をLys, Met, Argにした場合、HLA-EはCD94/NKG2A, Cに対しての結合が著しく低下したが、His, Trpにした場合には増加した。特にHisに置換したHLA-EはCD94/NKG2Cへの結合が顕著に増加したことから、HLA-Eに結合するペプチド次第ではCD94/NKG2Cに選択的に結合する可能性が示唆された。

(12) 癌細胞株及び血管内皮細胞における APase の発現

各細胞における4種のAPaseの発現をRT-PCRで検討した。結果を図1に示した。APaseNは、HUVECにおいて最も強く発現しており、癌細胞株での発現も4/23株と一部に認められるのみであった。また、A-LAPについても細胞による発現の強弱が認められ、HUVECで最も強く発現していた。それに対し、P-LAPやPSAはすべての癌細胞において発現が検出され、血管内皮細胞に対する発現特異性は低かった。

(13) A-LAP及びAPaseNに対するsiRNAによる遺伝子発現阻害

HUVECでの発現が高かったA-LAPとAPaseNについて、それぞれのsiRNAを合成してHUVECに導入し、血管新生に関わる機能に変化がおきるか検討を行うこととした。まず、siRNAによる遺伝子発現の抑制効果について確認試験を行った。Oligofectamineを用いて導入したsiRNAの濃度に依存してmRNA量は低減した。10 nMのsiRNA濃度でのmRNA量をreal-time PCRで定量すると、A-LAPでは約90%、APaseNでは約75%の阻害が確認された。いずれのsiRNAもGAPDHの発現には影響を及ぼさなかった。

さらに、HUVECの細胞表面のAPaseNタンパクを抗APaseN抗体で染色し、FACSで発現量を調べた。その結果、APaseNに対するsiRNA 10 nMの導入により、約50%のAPaseNタンパクの発現抑制が認められた。

(14) A-LAPに対するsiRNA導入のHUVECに及ぼす作用

A-LAPに対するsiRNAの導入によってHUVECの増殖は変わらず、Oligofectamine処理のみの群、Non-silencing siRNA導入群の細胞増殖と差はなかった。また、ケモタキسسアッセイによる細胞遊走、傷付けによる細胞運動もsiRNA導入によって影響されなかった。

(15) APaseNに対するsiRNA導入のHUVECに及ぼす作用

① APaseNがHUVECの細胞増殖に及ぼす作用
APaseNに対するsiRNAの導入による遺伝子発現阻害によって、HUVECの増殖は弱く抑制された。その程度は導入siRNAの濃度に依存し、10 nMのsiRNAでは、Oligofectamine処理群やNon-silencing siRNA導入群と比較して約20%の細胞増殖阻害であった。

② APaseNがHUVECの管腔形成に及ぼす作用
APaseNに対するsiRNA導入によって、マトリゲル上に形成されるHUVECの管腔構造が影響されるか検討した。マトリゲル上にHUVEC細胞をまき、5時間培養すると、細胞間の接着による網目状管腔構造を形成する。これに対し、APaseNに対するsiRNAを10 nM導入したHUVECでは、管腔形成の程度は明らかに少なかった。この管腔構造の長さを比較したところ、APaseNに対するsiRNA導入群では、Non-silencing siRNA導入群と比較し約50%の有意な阻害が認められた。

③ APaseNがHUVECの運動に及ぼす作用
APaseNに対するsiRNAによるHUVECの運動に及ぼす影響について検討した。confluentな培養状態のHUVECに傷をつけた直後、及び12時間後の状態を観察した。対照のOligofectamine処理のみの群及びNon-silencing siRNA導入群では、傷つけ12時間後には細胞運動により間隙が狭まった。これらに対し、APaseNのsiRNA導入群の細胞においては、明瞭な運動の阻害が観察された。

次に、ケモタキシスに及ぼす影響について検討した。ファイブロネクチンをコートした 5 μ m pore のフィルターの transwell chamber で HUVEC を 4 時間培養すると、多数の細胞がフィルター裏面に遊走した。これに対し、APaseN に対する siRNA を導入した HUVEC では、明瞭に遊走細胞数が減少した。遊走細胞数を計測すると、10 nM の APaseN に対する siRNA 導入による阻害は、Non-silencing siRNA 群に対して約 75%であった(P<0.001)。

④ APaseN が HUVEC の接着に及ぼす作用
さらに、APaseN と各種接着因子との接着に及ぼす siRNA の影響を検討した。その結果、マトリゲル、ラミニン、ファイibroネクチン、Type I コラゲン、Type IV コラゲンの 5 種類の接着因子に対し、Non-silencing siRNA 導入 HUVEC は、15 分間の培養でほぼ 100%接着した。それに対し、siRNA による APaseN 発現阻害によって HUVEC のマトリゲルに対する接着は有意に減少した。単一分子の接着因子としては、ファイibroネクチン、Type I コラゲン、Type IV コラゲンに対する接着が有意に抑制され、最も阻害された Type IV コラゲンに対する接着阻害は 14.0%であった(P<0.001)。

D. 考察

好中球コフィリンの結果を簡条書きすると次のようになる。

(1) 好中球様 HL-60 細胞は IL-8 (10 ng/ml) に対して顕著な走化性運動を示すが、その条件下でコフィリンのリン酸化の変動をみたところ、IL-8 刺激後 30 秒でコフィリンは脱リン酸化され、その後再リン酸化された。

(2) コフィリンのリン酸化阻害剤である S3-R ペプチドで前処理することにより、細胞の走化性は促進された。また、S3-R ペプチドはリン酸化コフィリンが脱リン酸化されたあとの再リン酸化を抑制した。

(4) コフィリン siRNA をトランスフェクトした細胞のコフィリンはコントロールに比べ約 55%に減少し、走化性は顕著に抑制された。IL-8 刺激後 30 秒のコントロール細胞では細胞膜近傍で F-actin とリン酸化コフィリンの共局在が見られたが、コフィリン siRNA を導入した細胞ではほとんど見られなかった。

(5) PI3 キナーゼ阻害剤の Wortmannin、LY294002 は濃度依存的に走化性を抑制した。また、リン酸化コフィリンの変動においては初期の脱リン酸化および後期の再リン酸化の両方を抑制した。

以上の結果より好中球の走化性は活性型コフィリンの存在に依存することが強く示唆された。コフィリンは細胞膜直下でリン酸化と脱リン酸化状態を繰り返し、アクチンの重合・脱重合を促進させ、細胞運動に重要な役割を果たしていると考えられる。

ヒト T 細胞株 Jurkat 細胞において S3 ペプチドは LIMK のリン酸化活性を抑制し、走化性とアクチンの再構築を抑制したと報告されている。しかし、本研究においては好中球様に分化させた HL-60 細胞では S3 ペプチドで走化性や活性酸素産生に影響を及ぼし、さらにペネトラチン配列をもつ STAT3 ペプチドでも同様の効果が見られた。ペプチドの膜透過性配列ペネトラチンが走化性や活性酸素産生に影響を及ぼしたと考えられる。走化性、活性酸素産生はアクチン細胞骨格により制御されている。好中球ではペネトラチンが膜に対して直接的な運動亢進作用をもっている可能性が考えられる。

S3-R ペプチドはアルギニンが 8 モル付加している。このようなペプチドの細胞への移行はきわめて速く、数分で細胞膜を透過し核へと至るといふ。アルギニン残基の数には至適値があり、6-8 個の時間が効率的に膜を透過することができると思われる。S3-R ペプチドは IL-8 によるコフィリンの再リン酸化を抑制し走化性を促進した。これは LIMK 活性の抑制によって非リン酸化型のコフィリンが増加したと考えられる。また、コフィリンを活性にすることにより走化性が亢進したと考えられる。ところが、IL-8 による F-actin の初期変動をフローサイトメータで解析した結果、変化が見られなかった。さらに顕微鏡で観察したが、コントロールでも S3-R ペプチドにおいても多くのラメリポディアも観察され、コントロールと S3-R ペプチドの差は得られなかった。

F-actin に結合し、その動態を制御しているタンパクはコフィリン以外にも多く存在している。F-actin 重合を促進させるタンパクはプロフィリン、Arp2/3(actin-related protein 2 and 3) 複合体、WASp/Scar などである。細胞が刺激を受けると PIP₂ が豊富に存在する膜付近において特異的に Cdc42 が活性化され、WASp/Scar を活性化する。WASp/Scar の C 末で Arp2/3 複合体と結合し活性化させる。Arp2/3 複合体はアクチン重合の最初の段階で活性化され重合核生成を起こす。また、F-actin に Arp2/3 複合体が結合すると Arp2/3 複合体が分岐点となり、新たな方向に F-actin が形成される。重合核生成が起こり F-actin となると、F-actin に極性が生じ、barbed end で重合が起こり F-actin が伸長する。barbed end にはゲルゾリンが結合し、重合を促進させる。F-actin は細胞表面に向かって伸展する。また、プロフィリンはコフィリンと競合しており、ADP-アクチンと結合して ATP-アクチンにし、重合を促進させる。

一方、脱重合を促進する因子に Aip1(Actin-interacting factor 1)、デストリン、サイモシンβ4 などがある。サイモシンβ4 は定常状態においてプロフィリンと結合していない ADP-アクチンと結合し、重合を抑制している。しかし、サイモ

シンβ4 はプロフィリンよりも結合力が弱いので細胞が刺激を受けるとアクチンはプロフィリンと結合し、重合を促進する。AIP1 は酵母で同定されたタンパクで、特異的にコフィリンが誘導したアクチン動態を増大させる。AIP1 単独だとアクチン動態に何も効果を示さないが、コフィリン存在下だとコフィリンが結合したフィラメントの末端に結合して、断片化を促進している。このように細胞内では様々な因子がアクチン細胞骨格の動態を制御している。

今回の研究でコフィリンの siRNA が運動活性を強く抑制できるツールとなることが明らかになった。今後、コフィリンが他のアクチン制御蛋白群とどのように co-operate しているかを究明すること、運動制御活性分子をどのように転移性ガン細胞に送達するか、が課題である。

マウスNK細胞抑制性レセプターLy49A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、これと特異的に結合するファージをランダムペプチドを提示したファージライブラリーの中から単離した。幸運なことに、これらLy49A結合性ペプチドは、分子量1,300程度と低分子ながら、いずれもリガンドとの結合を阻害する活性を有していた。マウスNKレセプターLy49Aに結合するクローンはそのアミノ酸配列からCXFXLPWLC (Type I), CXFXLPWC (Type II)という2種類に大別された。また、Type I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。昨年の懸案であった、より強い結合能を持つペプチドの探索を目指し、新たに2つの異なるライブラリーを作成し、同様にスクリーニングを行った。これら2種類のライブラリーの中から新たな候補が単離でき、またその活性もより強力なものが見つかった。これらの新しく見つかったペプチドに関しては、細胞障害活性の阻害効果について検討はまだであるが、当初単離した3種類のペプチドに関して、細胞傷害活性に及ぼす効果、またin vivoにおける効果について、詳細な検討を行った。3種類のうち1種類は、同じリガンドを共有するLy49G2に結合することも示唆されていた。しかし、Ly49G2に結合するからと言って、Ly49G2と結合を阻害するとは限らず、またLy49G2からの抑制性シグナルを解除できるとは限らない。そこで、今回新たにLy49G2のみを発現しLy49Aを持たないNK細胞を調製し、この細胞単独に対する効果を調べた。期待通り、Type II' ペプチドは、Ly49AばかりでなくLy49G2を介する抑制シグナルも解除することができ、以前観察していたType II' ペプチドがより効果が強い理由が理解できた。in vivoの実験に関する結果については触れなかったが、PETを用い経時的に肺クリアランス能を1mg/回、1回投

与、癌細胞と同時投与し2時間経時変化を観察し、NK細胞の腫瘍細胞に対する傷害活性増強効果を測定した。個体差や手技的な難しさから予備的な観察に留まったが、対照に比べて有効性が認められ、転移抑制効果も期待できる結果であった。

ヒトNK細胞レセプターCD94/NKG2Aに関して、当初マウスNK細胞レセプターLy49Aと同様のアプローチを行っていた。さまざまな条件を模索し、NKG2Aに結合するペプチドは単離できたものの、CD94/NKG2AとHLA-Eの結合を抑制するものは見つからなかった。CD94/NKG2はLy49Aとは異なり、同じリガンドを認識するものの、抑制性レセプターであるCD94/NKG2AとCD94/NKG2Cが存在することから、これら両者の認識の違いを明らかにし、その違いに対して特異的に機能するペプチドの探索を試みよう方針を変更した。まず始めに、HLA-Eのさまざまな変異体を作成し、CD94/NKG2Aとの結合を調べ、HLA-EのHLA-Eの $\alpha 1/\alpha 2$ 領域の上面に存在することから、このHLA-E $\alpha 1/\alpha 2$ 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。次にHLA-Eに結合するCD94/NKG2A,C上の領域を、同様に変異を導入することにより明らかにした。特に抑制性レセプターであるCD94/NKG2Aと活性化レセプターであるCD94/NKG2CにおけるHLA-E認識の違いを規定するアミノ酸残基の同定を行なったところ、主にNKG2上のloop3のアミノ酸残基が大きく寄与していることが明らかになった。興味深いことに、loop3は抑制性のNKG2ではSIIS、活性化型ではASILというアミノ酸配列が保存されている。このNKG2上loop3は抑制性、あるいは活性化CD94/NKG2を特徴付けるのに重要な部位であると考えられた。このloop3との相互作用が予測されるHLA-E上の残基は、変異体を用いた結合実験ならびにモデリングから、HLA-E重鎖の溝に結合したペプチドの4残基目(P4)であると考えられた。そこで最後に、P4を種々のアミノ酸で置換したペプチドの効果を検討したところ、P4(His)ペプチドをHLA-E上に提示することにより、CD94/NKG2Cに対する結合を選択的かつ顕著に増強することがわかった。この結果はCD94/NKG2Cを選択的に活性化するペプチドをHLA-E上に提示させることにより、CD94/NKG2Cを介したNK細胞の活性化が誘導できることを示唆しており、Ly49Aとは全く異なる新たな発想により、NK細胞傷害活性を調節し癌転移を抑制するアプローチを導くことができた。

我々はこれまでに、APaseNに結合し、その酵素活性を阻害するbestatin及びその誘導体が血管新生を阻害することを示した。その研究の中で、血管新生阻害活性の強いbestatin誘導体が細胞表面APaseNのみならず、細胞内に存在する他のAPaseの活性も強く阻害することを見出した。そこで、A-LAP、P-LAP、PSA及びAPaseNの4種

について血管内皮細胞である HUVEC における発現を検討し、培養癌細胞と比較した。P-LAP と PSA の発現は全ての癌細胞で認められ、HUVEC における発現もそれらと大差なかった。一方、A-LAP 及び APaseN は種々の癌細胞と比較して HUVEC で最も強く発現していた。特に、APaseN が発現している癌細胞は少なく、HUVEC における発現亢進は際立っていた。これらの結果から、血管新生には A-LAP 及び APaseN が関与すると考えられた。A-LAP は Angiotensin II を基質とすること、Angiotensin II は血管新生に重要な役割を果たす VEGF の発現を調節することが知られている。そこで、A-LAP の発現を siRNA を用いて阻害したが、HUVEC の増殖及び運動能には影響が見られず、A-LAP は血管内皮細胞自身の運動には直接影響を及ぼさないと考えられた。

一方、APaseN の発現を siRNA で抑制した場合には種々の変化が認められた。HUVEC の増殖は siRNA の濃度依存的に抑制され、APaseN は血管内皮細胞の増殖に関与していることが示めされた。また、HUVEC のマトリゲル上での血管腔状構造の形成も抑制された。抗 APaseN 抗体 (MY7) 処理も HUVEC のマトリゲル上での管腔形成を抑制することが報告されており、今回の我々の結果と対応するものである。

マトリゲル上で管腔構造を形成するためには、HUVEC がマトリゲル上に接着し、さらに管腔構造を形成するように運動していく必要がある。そこで、まず APaseN が HUVEC の運動能に及ぼす影響について siRNA を用いて検討した。APaseN 発現阻害により、シャーレ上における傷付け後の水平運動、及び transwell chamber 内のケモタキシスが抑制された。これらの評価系はマトリゲル上での細胞運動を直接的に反映するものではないが、APaseN が HUVEC の細胞運動に関与していることが明らかとなった。

さらに、APaseN 発現阻害による管腔形成の阻害には、APaseN を介した細胞接着が関与していると考え、HUVEC の各種接着因子との接着を検討した。APaseN 発現阻害により、Type IV コラゲンとの接着が最も強く抑制された。マトリゲルには Type IV コラゲンが含まれており (ラミニン、エンタクチン、ヘパリン硫酸プロテオグリカン等も含む)、APaseN とマトリゲルとの接着にはこの接着因子が重要と考えられた。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 に結合することが知られている。この NGR はファイブネクチンや Type IV コラゲン中に見出される配列である。このことと今回我々が示した結果から、APaseN が酵素として働く他に、接着分子としても機能することが示唆される。

以上のように、4 種の APase の中で、細胞表面

APase である APaseN が血管新生に関与することを明らかにした。さらに、血管新生において、APaseN は細胞運動に関わり、また接着因子としても機能していることを示した。我々はこれまでに APaseN に結合する bestatin やその類縁体が血管新生を抑制することを報告したが、その作用は本研究で明らかにした APaseN の血管内皮細胞の運動や接着を阻害することによるものと考えられる。血管新生に関わる APaseN を標的分子とし、癌血管新生を阻害する新たな癌治療薬の創生が期待される。

E. 結論

好中球の走化性は活性型コフィリンの存在に依存することが強く示唆された。コフィリンは細胞膜直下でリン酸化と脱リン酸化状態を繰り返し、アクチンの重合・脱重合を促進させ、細胞運動に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、NK 細胞関連の研究では、マウス NK 細胞レセプター-Ly49A に直接結合し、リガンドとの結合を抑制するペプチドの探索、またそのペプチドを用いることにより実際に NK 細胞傷害活性を増強し、癌細胞に対する細胞傷害作用を導くことができた。また、ヒト NK 細胞レセプター-CD94/NKG2A, C に関する研究からは、そのリガンドである HLA-E に提示されるペプチドを変えることにより両レセプターから入力するシグナルのバランスを変え、NK 細胞を活性化へ導き、癌細胞傷害活性を導くという新たな手法を示すことができた。また、APaseN 関連の研究結果を箇条書きにまとめると、以下のようになる。(1) APaseN 及び A-LAP は、種々の癌細胞と比較して血管内皮細胞 HUVEC において強く発現していた。(2) P-LAP 及び PSA はすべての癌細胞で発現しており、HUVEC 特異的ではなかった。(3) siRNA による A-LAP 発現阻害は、HUVEC の細胞増殖や運動に影響を及ぼさなかった。(4) APaseN の発現阻害により、HUVEC のマトリゲル上における管腔形成が抑制された。これは、血管内皮細胞の運動能及び接着能が抑制されたためと考えられた。APaseN の機能を抑制することによって癌血管新生を阻害する新しい癌治療薬が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe, H., Adachi, R., Hirayama, A., Kasahara, T., and Suzuki, K.: Triphenyltin enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 Cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 26-31 (2003)
- 2) Watanabe, H., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama,

A., Kasahara, T., and Suzuki, K.: Bisphenol A significantly enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells *Int. Immunopharmacol.* **3**, 1601-1608 (2003)

3) 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* **75**, 1238-1243 (2003)

4) Chen, S.H., Stins, M.F., Huang, S.H., Chen, Y.H., Kwon-Chung, K.J., Chang, Y., Kim, K.S., Suzuki, K., and Jong, A.Y.: Cryptococcus neoformans induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J. Med. Microbiol.* **52**, 961-970 (2003)

5) Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Suzuki, K., Yamamoto, Y., and Hayakawa, T.: Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-Plastin in Activation of Superoxide-Generating NADPH Oxidase. *J. Biochem.* **134**, 827-834 (2003)

6) Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K., and Yamamoto, K.: Two HLA-E Mutants Segregate the Inhibitory NK Receptor CD94/NKG2A and the Activating Receptor CD94/NKG2C, Both of Which Bind the Top of HLA-E. *Euro. J. Immunol.* **34**, 81-90 (2004)

7) Tajima, K., Matsumoto, N., Ohmori, K., Wada, H., Ito, M., Suzuki, K., and Yamamoto, K.: Augmentation of NK cell-mediated cytotoxicity to tumor cells by inhibitory NK cell receptor blockers. *Int. Immunol.* **16**, 385-393 (2004)

8) Kusui, K., Sasaki, H., Adachi, R., Matsui, S., Yamamoto, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., and Suzuki, K.: Ribosomal protein S18 identified as a cofilin-binding protein by using phage display library *Mol. Cell. Biochem.* (2004) in press

9) M. Mitsuki, N. Matsumoto, K. Yamamoto.: A species-specific determinant on b2-microglobulin required for Ly49A recognition of its MHC class I ligand. *Int. Immunol.*, **16**, 197-204 (2004)

10) 山本一夫: 細胞内輸送・選別における糖鎖認識プロセス *生化学*76(3) in press (2004)

11) 松崎靖司, 西川清広: 薬剤性肝障害の治療: 治療の実際と EBM に基づく UDCA の効果. *日本消化器病学会雑誌* **100** 659-666 (2003)

12) T. Nagahata, M. Onda, H. Emi, H., Nagai, K. Tsumagari, T. Fujimoto, A. Hirano, T. Sato, K. Nishikawa *et al.*: *Cancer Science* **95**, 218-225 (2004)

13) H. Morohashi, F. Abe, K. Saiga, E. Toyoda, K. Nishikawa: NK95806, a newly synthesized microtubule-disrupting agent, suppresses collagen-induced arthritis in mice. *Int. Immunopharmacol.* **4**

(2004) in press

14) T. Usui, H. Watanabe, H. Nakayama, Y. Tada, N. Kanoh, M. Kondoh, T. Asao, K. Takio, H. Watanabe, K. Nishikawa, T. Kitahara, H. Osada: The anti-cancer natural product pironetin selectively targets Lys352 of α -tubulin. *Chemistry and Biology* **11** (2004) in press

2. 学会発表

1) 安達玲子、武内恒成、鈴木和博: マクロファージの反応性に対するコフィリンアンチセンスの効果 第4回 Pharmac-Hematology シンポジウム 2003年6月 (東京)

2) Hirayama, A., Adachi, R., Mizuno, K., Kasahara, T., Suzuki, K.: Cofilin/LIM-kinase modulates chemotaxis of phagocytes. The 76th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Oct. (2003)

3) Watanabe, H., Adachi, R., Hirayama, A., Kasahara, T., Suzuki, K.; Effects of endocrine disruptors on gene expression during differentiation of leukocytes. The 33rd Annual Meeting of Japan Immunology Society Dec. (2003)

4) 山本一夫、豊本雅靖、神谷由紀子、山口芳樹、加藤晃一 Cargo receptorによる sorting メカニズムの解析 第24回日本糖質学会年会(2003年) 要旨集 p71

5) 神谷由紀子、山口芳樹、松尾一郎、伊藤幸成、豊本雅靖、松本直樹、山本一夫、加藤晃一 VIP36 リガンド糖鎖の結合様式の解析 第24回日本糖質学会年会(2003年) 要旨集 p117

6) 辻知奈、松本直樹、田嶋恭子、三ツ木元章、山本一夫 マウスNK細胞レセプターLy49Dによる H-2Ddの認識機構の解析 日本免疫学会総会・学術集会記録(2003年) 要旨集 p141

7) 田嶋恭子、松本直樹、山本一夫 NK細胞抑制性レセプターLy49Aに対する高親和性ブロッカーの探索 日本免疫学会総会・学術集会記録(2003年) 要旨集 p141

8) 伊藤昌之、松本直樹、山本一夫 MHCクラスI 認識におけるLy49, CD8間の機能的競合の解析 日本免疫学会総会・学術集会記録(2003年) 要旨集 p142

9) 斉藤直俊、松本直樹、山本一夫 Killer cell lectin-like receptor G1リガンドを発現する細胞株の同定 日本免疫学会総会・学術集会記録(2003年) 要旨集 p143

10) 和田はるか、松本直樹、山本一夫 NK細胞抑制性レセプターCD94/NKG2A, 活性化レセプターCD94/NKG2Cが認識するHLA-E上領域の同定 日本免疫学会総会・学術集会記録(2003年) 要旨集 p144

11) 神谷由紀子、山口芳樹、松尾一郎、伊藤幸成、

豊本雅靖、松本直樹、山本一夫、加藤晃一 VIP36
による標的糖タンパク質認識機構 第26回日本分
子生物学会(2003年) 講演要旨集 p365

12) Satoru Koganei, Naoki Matsumoto, Kazuo
Yamamoto Cloning and expression of mouse KLRH1,
a lectin-like inhibitory receptor of natural
killer cells. 第76回日本生化学会大会(2003年)
発表抄録集 p872

13) Haruka Wada, Naoki Matsumoto, Kazuo
Yamamoto Two HLA-E mutants discriminate
between the inhibitory NK receptor CD94/NKG2A
and the activating receptor CD94/NKG2C, both of
which bind the top of HLA-E. 第76回日本生
化学会大会(2003年) 発表抄録集 p873

14) Masayasu Toyomoto, Naoki Matsumoto, Kazuo
Yamamoto Analysis of sorting mechanism in
cargo receptors. 第76回日本生化学会大会(2003
年) 発表抄録集 p957

15) 山本一夫 糖鎖を介した細胞内における蛋白
質の品質管理と蛋白質医薬品への応用 第6回富
山医療薬学研究会(富山、2004年1月)

16) 山本一夫 細胞内小胞輸送にかかわる糖鎖
第7回理研シンポジウム「生体分子の化学」(和
光、2003年12月) 要旨集 p8

17) M. Onda, T. Nagahata, K. Nishikawa, M. Emi:
Novel molecular prognostic markers for breast
cancer: Analysis with 25K cDNA microarray. 94th
American Association for Cancer Research (2003)

18) T. Nagahata, M. Onda, T. Sato, K. Tsumagari,
H. Nagai, F. Kasumi, S. Yokoyama, K. Nishikawa,
T. Tsunoda, M. Emi: Novel genetic markers for
prediction of postoperative prognosis in
estrogen receptor-negative breast cancer. 26th
San Antonio Breast Cancer Symposium (2003)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 国際特許出願

1) カーゴレセプターの遺伝子改変による糖鎖
ライブラリー (PCT/JP03/01718)

平成15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16年9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