

THE HEPATIC SINUSOIDAL ENDOTHELIAL LINING
AND COLORECTAL LIVER METASTASES

Filip Braet¹, Keissuke Nagatsuma², Masaya Saito³, Lilian Soon¹, Eddie Wisse⁴,
and Tomokazu Matsuura⁴

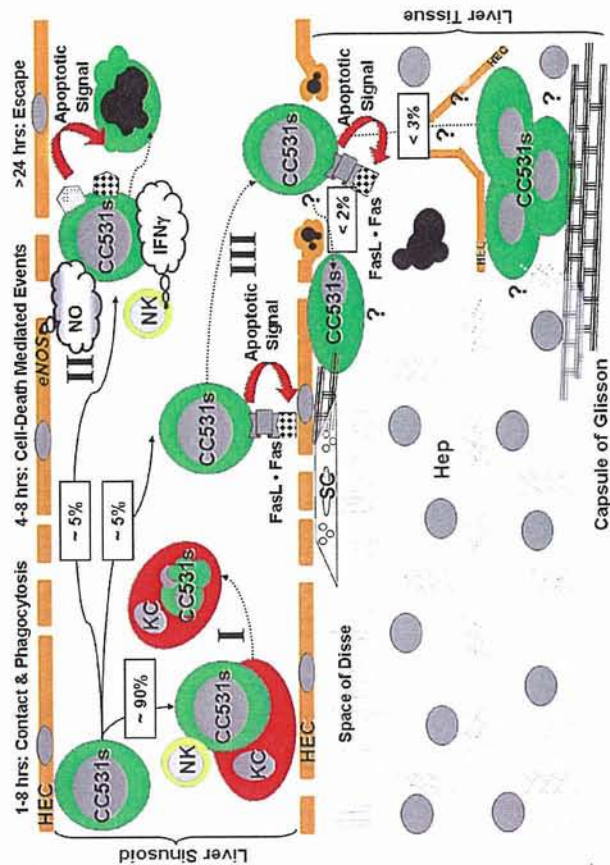
¹Australian Key Centre for Microscopy and Microanalysis (AKCMM), Electron Microscopy Unit,
The University of Sydney, NSW 2006, Australia; ²Department of Pathology, The Jikei University
School of Medicine, Tokyo, Japan; ³Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of
Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan; ⁴Department of
Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

Key words: Apoptosis, Australia, Endothelial Cells, Hepatic Metastasis, Colorectal Cancer,
CC531, Caps, Interferon Gamma, Kupffer Cells, Natural Killer Cells, Nitric Oxide, Macrophages,
Phagocytosis, Plugging, Pit Cells, Stellate Cells, X-Ray Micro-Computed Tomography.

Correspondence to: a/Prof Filip Braet, Australian Key Centre for Microscopy and Microanalysis,
Electron Microscope Unit, Madsen Building F09, University of Sydney, Sydney, NSW 2006,
Australia. Tel: + 61 2 9351 7619. Fax: + 61 2 9351 7682. E-mail: filip.braet@emtu.usyd.edu.au



Will be submitted on 15
November to World
Journal of
Gastroenterology





N A N O

Grant Possibilities in Japan?

1. Reconstructing and Modelling **Colorectal Liver Metastasis** Pathways (Filip has text proposal ready)

Or

2. **Transendothelial Transport Mechanisms** In Hepatic Endothelial Cells of the Immortomouse

Or

3. Tomo can forward me your full record (CV) to see the possibility to go for a mutual **grant under the NHMRC?**



N A N O



How can you help me?

- HCC tissue for X-ray Tomographic Investigation?
- My grant proposal to submit under Japanese Research Foundation?
- Possibilities to repeat visit next year around same time – in order to follow data, and prepare manuscripts?

To do Filip for Tomo:

Old Immortomouse data Siegfried Hofmans



Filip Braet
A/Professor & Deputy Director

Madsen Building F09
Ph: 61 2 9351 7619 Fax: 61 2 9351 7682
E-mail: filip.braet@emu.usyd.edu.au

Monday, 6 November 2006

Master Research Project Opportunity

X-Ray Micro-Computed Imaging of Bioreactor Liver Tissue

A research project is available for one student to undertake research studies leading to a Master in Applied Sciences (Microscopy & Microanalysis) at the University of Sydney in the Australian Key Centre for Microscopy and Microanalysis (www.emu.usyd.edu.au) in collaboration with Jikei University (Tokyo, Japan). The student will be based at the Electron Microscope Unit of Sydney University and work closely with A/Prof. Braet, - and with Dr. Matsuura at the Department of Laboratory Medicine in Tokyo.

In previous studies we successfully imaged liver tissue and its associated vasculature via soft X-ray micro-computed imaging (1,2). In this research project proposal we aim to image, reconstruct and model artificial liver tissue grown in a bioreactor (for more information, see 3) via X-ray micro-computed tomography. This study will lead to a peer-reviewed Journal publication and might open PhD possibilities from 2008 onwards.

1. Ananda S, Marsden V, Vekemans K, Korkmaz E, Tsafnat N, Soon L, Jones A, Braet F. The visualization of hepatic vasculature by X-ray micro computed tomography. *J Electron Microscop* 2006; 55:151-155.
2. Braet F, Nagatsuma K, Saito M, Soon L, Wisse E, Matsuura T. The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver cancer metastases. *World J Gastroentero* 2007: In Press.
3. Saito M, Matsuura T, Masaki T, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, Iwahori T, Suzuki T, Braet F. Reconstruction of liver organoid using a bioreactor. *World J Gastroentero* 2006; 12:1881-1888.

Further Information:

A/Prof. Filip Braet (Deputy Director)
Phone: + 61 2 9351 7619
Email: filip.braet@emu.usyd.edu.au
Australian Key Centre for Microscopy & Microanalysis
Madsen Building, F09, Room 8a and 8b
The University of Sydney
NSW 2006, Australia



関連会議

会議	日 時	場 所	参加グループ	主 題
1	平成 18 年 4 月 4 日	東京理科大	理科大・アロカ	超音波式バブル発生方法
2	平成 18 年 4 月 25 日	慈恵大	慈恵大・アロカ	18 年度研究開発の進め方
3	平成 18 年 5 月 16 日	東京理科大	理科大・アロカ	超音波式バブル発生方法
4	平成 18 年 7 月 4 日	慈恵大	慈恵大・理科大・アロカ	日本分子イメージング学会報告 ／バブル発生状況報告
5	平成 18 年 7 月 25 日	東京理科大	理科大・アロカ	バブル発生実験報告
6	平成 18 年 8 月 22 日	東京理科大	理科大・アロカ	バブル内包ガスの検討
7	平成 18 年 9 月 19 日	東京理科大	理科大・アロカ	分子イメージング学会報告
8	平成 18 年 10 月 3 日	慈恵大	慈恵大・理科大・アロカ	バブル抗体標識方法の進め方
9	平成 18 年 10 月 24 日	東京理科大	理科大・アロカ	FF-TEM によるバブル観察
10	平成 18 年 11 月 2 日	アロカ	慈恵大・Dr.Braet・アロカ	バブルが血管から組織へ放出 される条件
11	平成 18 年 11 月 7 日	慈恵大	慈恵大・Dr.Braet・ 理科大・アロカ	Dr.Braet 講演会“肝臓研究に 貢献する画像技術方法他”
12	平成 18 年 11 月 9 日	東京理科大	慈恵大・Dr.Braet・ 理科大	マイクロ・ナノバブルの電子 顕微鏡観察
13	平成 18 年 11 月 28 日	東京理科大	理科大・アロカ	ナノバブルの調製と物性
14	平成 18 年 12 月 27 日	東京理科大	理科大・アロカ	多孔質方式バブル発生方法
15	平成 19 年 1 月 16 日	東京理科大	理科大・アロカ	多孔質方式ナノバブル生成
16	平成 19 年 1 月 27 日	慈恵大	慈恵大・理科大・ アロカ・日下部	新規造影剤ソナゾイド基礎特性 安全性試験
17	平成 19 年 2 月 22 日	東京理科大	理科大・アロカ	バブルの安定性評価結果
18	平成 19 年 3 月 24 日	芝パーク ホテル	慈恵・理科大・アロカ その他	平成 18 年度報告会及び 平成 19 年度計画

第2回大川班研究報告会
「超音波分子イメージング研究会」

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（萌芽の先端医療技術推進研究事業）（ナノメディシン分野）
研究課題：ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発（H17-ナノ-013）

主任研究者 大川 清

日時：平成19年3月24日土曜日 午後2時-8時

場所：芝パークホテル・別館2階・ローズルーム（電話：03-3433-4141）

I. 発表会（発表者・座長：敬称略）14:00-17:30

1. あいさつ（大川清）

2. CD147の臨床的意義とその捕捉

- ① 針生検で採取した肝臓癌におけるCD147の染色と臨床的意義（間森聡、朝倉正、大川清）
- ② 婦人科癌でのCD147の発現と臨床的意義（上田和、山田恭輔）
- ③ GISTにおけるCD147の発現と臨床的意義（石橋由朗）
- ④ 超音波内視鏡針生検で採取した腫瘍におけるCD147の発現（今津博雄、田尻久雄）
- ⑤ 3次元培養癌転移モデルとCD147（相澤守、永妻啓介、松浦知和）
- ⑥ 担癌マウスモデルでのMAI2C3の集積（友添祐介、大川清）

3. 超音波造影剤としての新規マイクロ・ナノバブルの創生とその特性

- ① 新規界面活性剤を用いたマイクロ・ナノバブルの創生（土屋好司、酒井秀樹、阿部正彦）
- ② 新規界面活性剤のマウスにおける安全性・毒性の検討（日下部守昭）
- ③ 蛋白結合リン脂質の作成（朝倉正、大川清）

4. 超音波によるマイクロ・ナノバブルの画像化

- ① ソナゾイドによる超音波検査の実際と音響特性（宮本幸夫、中田典生、西岡真紀子）
- ② マイクロ・ナノバブル検出のための高感度画像化技術の開発（今野剛人、射谷和徳、伊藤貴司）
 - 1) バブル画像化技術の現状（射谷和徳）
 - 2) 高感度画像化技術の開発（今野剛人）
 - ・バブル音響特性の測定
 - ・非線形効果（組織・バブル）シミュレーターの開発
 - ・パルス圧縮法による感度検討
 - ・動物実験用画像化装置の試作
 - 3) 平成19年度研究目標（射谷和徳）

教育講演 「アプタマー」 司会 生化学講座第2 松藤千弥 17:05-17:50

講演者 株式会社リボミック 宮川 伸 先生

II. 平成19年度に向けての連絡（松浦知和）

III. 懇親会：場所：ローズルーム隣のアイビー 18:00-20:00

—各自で研究内容の確認、共同研究など話し合うため—

- * 発表時間は、東京理科大学 25 分、アロカ（株） 25 分、その他は質疑を含め 15 分をお願いいたします。
- * 教育講演の講演時間は 45 分間です。
- * ご発表は Power Point で、USB メモリーを持参されるか、またはご自身のパソコンをお願いいたします。

II 分担研究報告

1.	癌の浸潤マーカーとしての分子ターゲット CD147 — <i>In vitro</i> , <i>In vivo</i> における Mab12C3 の集積性の検討と親和性など標的性改善への試み —	51
	分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授	
	分担研究者 松藤千弥 東京慈恵会医科大学 教授	
	分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授	
	分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師	
	分担研究者 山田恭輔 東京慈恵会医科大学 講師	
2.	細胞内在性 RNA アプタマーの標的分子としての新規 RNA 結合タンパク質の同定	58
	分担研究者 松藤千弥 東京慈恵会医科大学 生化学講座第2	
	協力研究員 堀谷 学 東京慈恵会医科大学 生化学講座第2	
3.	針生検で採取した肝臓癌における CD147 の染色と臨床的意義	60
	分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授	
	分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授	
	協力研究者 間森 聡 東京慈恵会医科大学 助手	
4.	超音波内視鏡下穿刺吸引細胞・組織診 (EUS-FNA) の有用性と 採取組織の CD147 の発現に関する研究	62
	分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授	
	協力研究者 今津博雄 東京慈恵会医科大学 助手	
5.	消化管腫瘍における CD147 発現の臨床的意義 — 胃 GIST —	64
	分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師	
6.	<i>In vitro</i> 3 次元微小腫瘍モデルの作製に関する研究	66
	分担研究者 相澤 守 明治大学 理工学部 助教授	
7.	超音波造影剤検定のための 3 次元還流培養腫瘍モデルの作成 — 3 次元培養癌転移・浸潤モデルと CD147 —	71
	分担研究者 松浦知和 東京慈恵会医科大学 講師	
	分担研究者 相澤 守 明治大学 理工学部 助教授	
	協力研究者 永妻啓介 東京慈恵会医科大学 大学院	
8.	第 2 世代超音波造影剤ソナゾイドの特性	75
	分担研究者 宮本幸夫 東京慈恵会医科大学 助教授	
	分担研究者 射谷和徳 アロカ (株) 研究所 主任研究員	
	流動研究員 土屋好司 財団法人医療機器センター・東京理科大学	
	協力研究者 中田典生 東京慈恵会医科大学 講師	
	協力研究者 西岡真紀子 東京慈恵会医科大学 助手	
9.	ラベル化造影剤を用いた超音波によるがん超早期診断システムの研究開発	78
	分担研究者 阿部正彦 東京理科大学 教授	
	分担研究者 酒井秀樹 東京理科大学 助教授	
	流動研究員 土屋好司 財団法人医療機器センター・東京理科大学	
10.	超音波分子イメージング装置に関する研究	82
	分担研究者 伊藤貴司 アロカ (株) 研究所 主幹研究員	
	分担研究者 射谷和徳 アロカ (株) 研究所 主任研究員	
	分担研究者 宮坂好一 アロカ (株) 研究所 主任研究員	
	分担研究者 小倉 玄 アロカ (株) 研究所 課員	
	協力研究者 今野剛人 アロカ (株) 研究所 研究員	
11.	分子イメージング用マイクロバブル材料である界面活性剤の生体への影響に関する研究	86
	分担研究者 日下部守昭 (財) 動物繁殖研究所 主席研究員	

1. 癌の浸潤マーカーとしての分子ターゲット CD147

— *In vitro*, *In vivo* における Mab12C3 の集積性の検討と親和性など標的性改善への試み —

分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授

分担研究者 松藤千弥 東京慈恵会医科大学 教授

分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授

分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師

分担研究者 山田恭輔 東京慈恵会医科大学 講師

研究要旨：CD147 (Emmprin) は癌細胞膜表面で高発現する転移浸潤マーカーで正常組織ではほとんど発現がなく、癌の診断・治療の標的分子として期待されている。今年度我々のチームは CD147 アプタマーの開発の準備と従来の CD147 分子認識 Mab12C3 抗体の生体内外での標的性の安定性に関し評価した。承知のように CD147 検出感度の向上には、Mab12C3 より親和性が高い抗体の作成や、抗体の代替技術としてのアプタマーの作成が必須である。特にアプタマーは、通常の単クローン抗体作成のようにマウス内での生物学的な選択による制限が無く、高親和性の分子を *in vitro* で選択可能であるため有用性が高い。しかしアプタマーを作成するためには天然状態（細胞表面上に存在する状態）に近い CD147 タンパク質が、高純度かつ大量に必要である。本年度で CD147 に対するアプタマー作成の準備は全て整ったので、来年度はそれらを用いてアプタマーの作成とその評価を行なう。

研究 I

リコンビナント CD147 の作成

A. 目的

昨年度に作成した発現系を用いて得られた CD147 蛋白質は糖鎖修飾が細胞表面上の本来のものとは異なっており、また一過性発現系のためリコンビナント蛋白質の大量調製が困難であった。そこで今年度はリコンビナント CD147 (CD147-Fc) 発現系の改良を試みた。なお、CD147-Fc とは CD147 の細胞外ドメインとウサギ IgG の Fc 領域との融合蛋白質である。

B. 方法

発現系に使用する宿主細胞の検討

昨年度に作成した発現ベクターをリポフェクション法で絨毛癌細胞株 JEG3 に導入してリコンビナントタンパク質を発現させた。培養上清に分泌された CD147-Fc をプロテイン G ビーズで回収し、その分子量を SDS-PAGE-western blot 法で解析した。

リコンビナント CD147 蛋白質の改良

PCR 法を用いて CD147-Fc の cDNA をテトラサイクリン誘導型発現系の発現ベクター pTRE2hyg に再クローニングした。また PCR で増幅する際にヒスチジンタグの DNA 配列を含むプライマーを使用し、リコンビナント蛋白質のカルボキシル末端にヒスチジンタグを付加した (CD147-FcH)。作成した発現ベクターは 293 Tet-On 細胞にリポフェクション法で導入し、ハイグロマイシン B と G418 で選択することで、CD147-FcH の安定発現株を得た。

リコンビナント FcH の作成

PCR 法を使用して、CD147-FcH の発現ベクターから、CD147 の cDNA 領域を欠失したもの (FcH) の発現ベクターを作成した。この発現ベクターを 293 Tet-On 細胞にリポフェクション法で導入し、ハイグロマイシン B と G418 で選択することで、FcH の安定発現株を得た。

C.結果

1) CD147-Fc 発現ベクターを導入した JEG3 細胞は CD147-Fc 蛋白質を培養上清中に分泌した。しかし得られた蛋白質は 293 細胞使用時と同様に低分子量糖鎖の修飾を受けていた。

2) CD147-Fc にヒスチジンタグを付加した CD147-FcH のテトラサイクリン誘導型安定発現系を作成した。293 Tet-On 細胞に発現ベクターを導入した結果、CD147-FcH は血清存在下において、血清中に含まれる微量のテトラサイクリンに反応して恒常的に分泌された。

3) 培地中に分泌された CD147-FcH は Ni-NTA カラムと Protein A カラムで高純度に精製可能であった(図 1 a)。精製した CD147-FcH は低分子量糖鎖の修飾を受けていた (図 1 b)。CD147-FcH と同様に FcH の安定発現系を作成し、培養上清中から FcH をプロテイン G ビーズで精製できた。

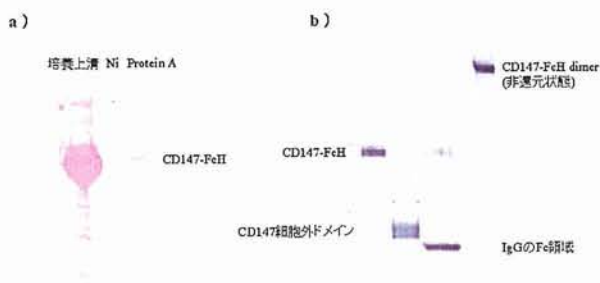


図1. 安定発現細胞から精製されたCD147-FcH

- 培養上清中の CD147-FcH は Ni-NTA カラム (Ni) と Protein A カラム により高純度で精製可能であった。(タンパク染色: ボンソー S)
- 精製した CD147-FcH を HRV C3 protease で消化した。CD147 細胞外ドメインは低分子量の糖鎖修飾を受けていた (約 37 kDa)。非還元条件下では Fc 領域が二量体を形成する。

研究 II

MAb12C3 を用いた分子標的癌診断・治療のモデル実験

A.目的

抗 CD147 抗体 (MAb12C3)、ドキシソルピシン (DXR)、酸化デキストラン架橋抗癌複合体 (MAb12C3-DXR 複合体) の CD147 標的の特異の検討。

B.方法

細胞株

ヒト類表皮癌細胞 A431、ヒト子宮内膜癌細胞 Ishikawa、ヒト前立腺癌細胞 PC3 を用いた。

CD147 ノックダウン (PC3/KD) 細胞の作成

MISSION shRNA Library (Sigma) ベクターをリポフェクション法にて PC-3 と絨毛癌細胞株 JEG3 に導入し CD147 発現抑制細胞を作成した。PC-3 細胞の培養にはコラーゲン I でコートしたディッシュを使用した。5 μ g/ml のピューロマイシンで耐性細胞を選択し、限界希釈法でクローンを得た。CD147 の発現量は蛍光抗体法と細胞抽出液の SDS-PAGE-western blot で解析した。

MAb12C3-DXR 複合体の調製

過ヨウ素酸ナトリウム処理した酸化デキストランに DXR をカップリングさせた後、MAb12C3 を結合させ、ゲルろ過により複合体を調製した。対照としてマウス IgG との複合体 (IgG-DXR) を同様に調製した。

細胞の CD147 発現の検出

Alexa488 標識 MAb12C3 による蛍光抗体法と細胞抽出液による SDS-PAGE-western blot で行った。

抗腫瘍活性の測定

1) 持続暴露

薬剤を段階希釈した培地に細胞を播き、96 時間後に MTT 法により生細胞数を求めた。薬剤無処理細胞に対する薬剤処理細胞の生細胞率で算出した。

2) 短時間暴露

持続暴露で IC80 となる薬剤濃度を添加し各時間 (2h、4h、6h) 暴露後、薬剤を除去し培養を継続し、薬剤添加から 96 時間後に MTT 法により、生細胞率あるいは死細胞率を上述同様に求めた。

C.結果

1) 抗体-DXR 複合体の各細胞における薬剤持続暴露実験による抗腫瘍活性には、MAb12C3-DXR、IgG-DXR、BSA-DXR の間に有意差はなく同程度の効果を示した (図 2 a)。一方、各細胞に対して持続暴露実験から得られた IC80 の薬剤濃度 1.0 μ M で 2、4、6 時間のみ複合体暴露し増殖培地に変更 96 時間

培養した後の生細胞率は対照の IgG-DXR、BSA-DXR に比べ MAb12C3-DXR は強い殺細胞効果を発揮した。各細胞に MAb12C3-DXR、IgG-DXR、BSA-DXR を 4 時間暴露したときの生細胞率は A431 に対して各 54%、90%、89%、Ishikawa に対して 66%、86%、91%、PC3 に対して 62%、90%、93% となり、CD147 を標的とした抗腫瘍活性が示された (図 2 b)。

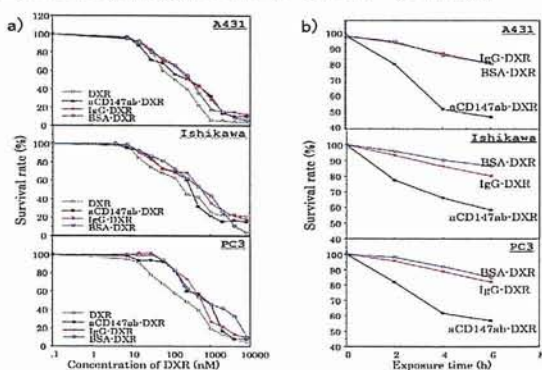


図2. MAb12C3-DXR 複合体の抗腫瘍効果

2) PC3 ならびに PC3/KD の MAb12C3-DXR 薬剤感受性の検討では PC3 と CD147 ノックダウン PC3/KD 細胞とも MAb12C3-DXR、IgG-DXR、BSA-DXR 各薬剤持続暴露による抗腫瘍効果には有意な差がなかった。一方、MAb12C3-DXR および IgG-DXR、BSA-DXR の 4 時間暴露による死細胞の割合をみると、PC3 で各 49%、18%、14% であったのに対して、PC3/KD では 28%、20%、18% となり (図 3)、抗体依存標的性は消失し、MAb12C3-DXR が CD147 分子を標的とした抗腫瘍効果を示していることが確認された。

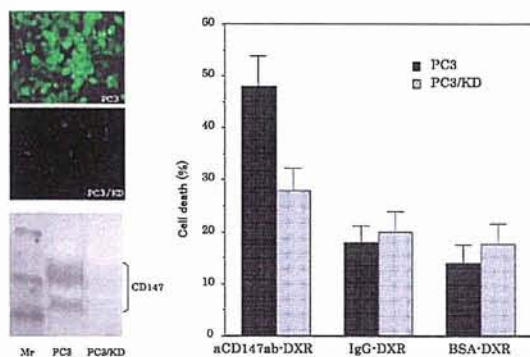


図3. 薬剤4時間暴露後96時間培養後の死細胞率

3) PC3/KD 細胞への MAb12C3-DXR の蓄積を

MAb12C3-DXR の 2 時間暴露後 MAb12C3 に対する蛍光抗体法で観察した。MAb12C3-DXR は CD147 発現の三細胞には集積するが PC3/KD への蓄積はみられなかった (図 4 a)。また、MAb12C3-DXR の CD147 分子標的性を A431、Ishikawa、PC3、PC3/KD 各細胞抽出液を用い SDS-PAGE-western blot 上 MAb12C3-DXR を一次抗体として確認すると CD147 バンドを認識可能 (図 4 b) で、このことは、MAb12C3-DXR が CD147 発現細胞に特異的 (標的) 殺細胞効果発揮したことを示している。

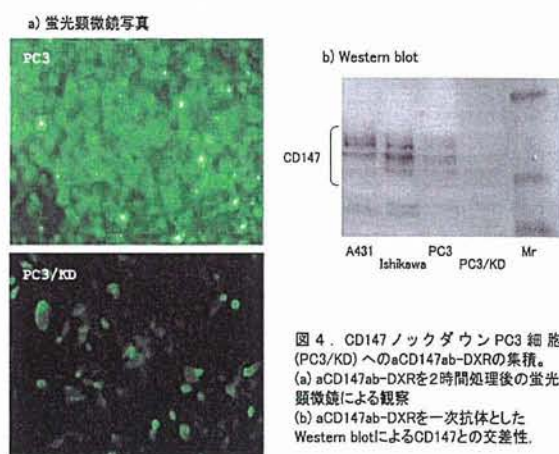


図4. CD147ノックダウンPC3細胞(PC3/KD)へのaCD147ab-DXRの集積。(a) aCD147ab-DXRを2時間処理後の蛍光顕微鏡による観察 (b) aCD147ab-DXRを一次抗体としたWestern blotによるCD147との交差性

研究 III

MAb12C3 抗体のナノバブルへの組み込み予備実験

A.目的

CD147 分子への特異集積リポソームの試作と CD147 高発現 A431 細胞を用いた集積性の検討

B.方法

MAb12C3-、緑色蛍光蛋白質 (GFP)- リン脂質複合体の調製

Phosphatidylethanolamine-Polyethyleneglycol-Maleimide (PE-PEG-MAL) と GFP を 0.1M K-PB (pH6.5) で反応させ、PE-PEG-GFP を調製した。Phosphatidylethanolamine-Polyethyleneglycol-Succinimide (PE-PEG-NHS) と MAb12C3 を 0.1M K-PB (pH8.0) で反応させ、PE-PEG-MAb12C3 を調製した。

MAb12C3 (GFP) 標識リポソームの調製

得られた PE-PEG-GFP および PE-PEG-MAb12C3 を Coatsome (cationic) に添加し、MAb12C3 と GFP の二重標識リポソーム (MAb12C3/GFP-Liposome) を調製した。対照として PE-PEG-GFP を Coatsome に添加した GFP 標識リポソーム (GFP-Liposome) を調製した。リポソームに未標識のリン脂質複合体は PBS で洗浄除去した。

細胞への MAb12C3/GFP-Liposome の集積

A431 細胞培養溶液に MAb12C3/GFP-Liposome を添加 2 時間後に蛍光顕微鏡 (Ex/Em = 475nm/505nm) で MAb12C3/GFP-Liposome の細胞集積を GFP 蛍光で観察する。集積阻止実験として 5mg/ml の MAb12C3IgG と 2 時間前処理後同様 GFP 集積を観察した。

C.結果

MAb12C3/GFP-Liposome の 2 時間暴露は CD147 発現細胞への Liposome の特異結合・蓄積を示した。一方、MAb12C3IgG (5mg/ml) の 2 時間前処理は同 Liposome の集積を強く抑制した (図 5)。この Liposome への抗体や GFP など蛋白質の機能を保持したままの組み込み実験の成功は同方法の改善により今後バブルへの抗体・アプタマーなど標的追跡物質の組み込みに十分な可能性が示された。

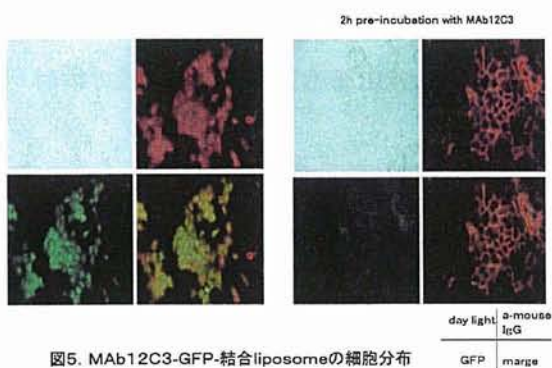


図5. MAb12C3-GFP-結合liposomeの細胞分布

研究 IV

MAb12C3 生体内での安定性

A.目的

担癌ヌードマウスへの MAb12C3 の集積性の検討

B.方法

蛍光標識 MAb12C3 抗体の作成

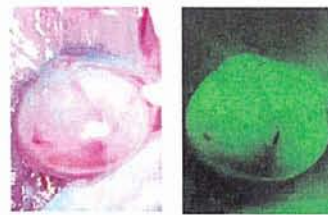
担癌マウス生体に投与された MAb12C3 IgG がマウス移植ヒト腫瘍に到達・集積するかを蛍光標識 MAb12C3 を用い検討した。MAb12C3 ハイブリドーマ移植マウス腹水より精製した抗体 (IgG1) は蛍光色素 Alexa488 あるいは蛍光色素 IRDye 800WC とアミノ基を介し蛍光標識した。

マウス移植腫瘍の作成

Balb/c, nu/nu, ♂マウスにヒト A431 細胞 (5 x 10⁵/head) を皮下または腹腔内に移植し、2 週後使用した。

C.結果

1) 蛍光実体顕微鏡により Alexa488 標識抗体 ip 投与後 12 時間で肝、腎、肺、腫瘍を摘出し、観察すると腫瘍は特異に蛍光発色した (図 6)。この傾向は ip 投与後 2 時間より観察できた。



ip-administration of MAb12C3-Alexa488 to A431-bearing nude mice

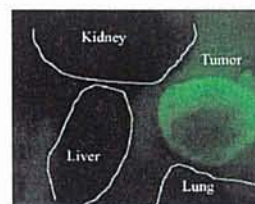


図6. 摘出臓器 (12h後)

2) Odyssey による同一マウスの経時観察が可能な条件で ip あるいは iv 投与された IRDye 800WC 標識 MAb12C3 は 6~9 時間後に腫瘍を強く描出できこの蛍光は 10 日確認できた (図 7)。

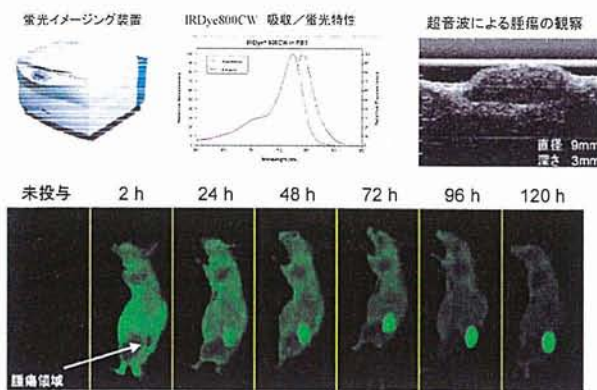


図7. Mab12C3抗体のin vivo 実験 分子捕捉能の確認

D.考察

昨年度に続きリコンビナント CD147 分子獲得のための基礎実験を最優先した。しかし糖鎖の豊富な分子は結局獲得できなかったがアプタマー作成の完全な準備が整った。また Mab12C3 の細胞培養系や生体内での標的機能の安定性が確認できた。

昨年度に使用した 293 細胞と比較すると絨毛癌細胞株 JEG3 には高分子量型糖鎖の CD147 が多量に発現している。そこで宿主細胞を JEG3 に変更することで CD147-Fc の糖鎖修飾が高分子量型に変化することを期待した。しかし、細胞外に分泌された CD147-Fc は低分子量糖鎖修飾型のままであった。また、タンパク質の発現量を低く抑えることが可能なテトラサイクリン誘導型の発現系を用いて糖鎖修飾の改善を試みたが、この発現系においても分泌された CD147-FcH は低分子量糖鎖修飾型であった。これらの結果から、分泌型タンパク質として設計した CD147-Fc(H)は、その性質により、低分子量糖鎖の修飾を受けているものと考えられた。一方、膜貫通領域を持ち細胞膜上に発現する CD147 の大量発現系の作成も試みたが安定発現株は取得できなかった。細胞膜上への大量の CD147 の発現は細胞毒性を惹起すると考えられる。

作成された CD147-FcH は低分子量糖鎖の修飾を受けているが、CD147 細胞外ドメイン領域のペプチド部分は天然のものと同じであるためアプタマー作成の

ための標的分子として使用可能である。しかし CD147-FcH にはウサギ IgG の Fc 領域とヒスチジンタグが付加されている為、アプタマーのスクリーニングにおいてはこの FcH 領域に対する親和性を有するものが選択されてくる可能性が生じる。したがって CD147 に対するアプタマーを作成するには、始めに FcH に親和性を有するアプタマーをライブラリーから除去した後に CD147 に対して親和性を有するアプタマーを選択する必要がある。そこで本年度は FcH の安定発現系も作成した。FcH は培養上清に分泌され、CD147-FcH と同様の方法で精製することができた。

癌に高発現している CD147 (Emmprin) をターゲットにし、バブルによる診断、治療の有効性を検討するための確認・予備実験として、MAB12C3 標識抗癌剤の生体内・細胞集積性・抗腫瘍効果および MAB12C3 標識リポソームの細胞集積性を CD147 高発現細胞ならびに shRNA による CD147 ノックダウン細胞を用いて培養系、マウス移植系で検討した。

MAB12C3-DXR は短時間暴露のみで細胞に特異的に結合し、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ殺細胞効果を発揮したと考えられる。MAB12C3-DXR が CD147 標的の抗体価を保持していることは、短時間での細胞への集積、CD147 ノックダウン細胞への集積のないこと、western blot での一次抗体としての特異性、から明らかであった。培養細胞系では MAB12C3-DXR が非常に有効であるが、動物に投与した場合には、本複合体の一部は血管内皮細胞に非特異的に取り込まれてしまうと考えられるのでリポソーム利用を検討した。リポソームは表面をポリエチレングリコールなどで被覆することで、血管内皮細胞への非特異的取り込みを最小限に抑えることができるので、その有用性が期待される。MAB12C3/GFP-Liposome にも特異的細胞集積性が認められ、ターゲティングへの利用が可能であり抗癌剤封入体の効果が期待される。現在、

我々の開発した非常に強い殺細胞効果を発揮するグルタチオン結合 DXR の MAb12C3-リポソーム封入体を作製し、その標的治療を検討している。一方、バブルは非特異的取り込みを最小限に抑えることができるばかりか、診断にも非常に有効となりうる。我々の調製した PE-PEG-MAb12C3 が抗体価を十分保持しているため、PE-PEG-MAb12C3 を用いて形成したバブルにもその特異的細胞集積性が期待され、現在 MAb12C3/蛍光タンパク質標識バブルの調製を行っている。また抗体は生体内で長期に腫瘍に保持されることが確認でき分子標的治療への CD147 の標的としての有用性が再確認できた。

E. 結論

これらの研究に加えて動物実験に換わる 3 次元培養での in vitro—in vivo 評価実験系確立に向けて取り組みとして CD147 ノックダウン細胞の作成にさらなる細胞種の検討が必要であり、ノックダウン細胞の作成手法も替える必要があると考えられる。すなわち、今年度に行なったプラスミドの導入による安定発現株の取得ではなく、ウイルスベクターを使用した短期間で効率のよいノックダウン細胞作成系を確立すべきである。今年度を使用した MISSION shRNA Library のプラスミドベクターは、パッケージングプラスミドを用いることでレンチウイルスベクターに転用可能であるため、来年度はレンチウイルスを用いた CD147 のノックダウン系の確立を目指す。標的分子 CD147 の分子性格を基にした細胞生物学的活性解析はほとんど知られていないのが現状である。本分子を標的とする診断・治療法の開発には本分子の十分な機能解析が必須であり CD147 の臨床診断面での有用性、CD147 分子の発現と転移促進 MMP 誘導能に関してなど、消化器肝臓内科田尻、外科学石橋、産婦人科山田が中心になって解析を進めているがいくつかの興味ある結果が得られつつあり次年度に期待したい。

G. 研究発表

論文発表

1) Masaki T, Matsuura T, Ohkawa K, Miyamura T, Okazaki I, Watanabe T, Suzuki T. All-*trans* retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBP beta-LIP. *Biochemical J.* 397:345-353, 2006

2) Minami J, Takada K, Aoki K, Shimada Y, Okawa Y, Usui N, Ohkawa K. Purification and characterization of C-terminal truncated forms of histone H2A in monocytic THP-1 cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):171-80, 2007, Epub 2006 Aug 18.

3) Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masak T, Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, Matsuura T.

Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. *Artificial Organ* 31:148-151, 2007

学会発表

1) Takada K, Aoki T, Iwamuro S, Eda H, Aoki K, Ohkawa K. Immunocytochemical characterization of polyubiquitin conjugates formed by cadmium exposure. 第 79 回日本生化学会大会 2006、6 月 東京

2) Shimada Y, Takada K, Aoki T, Iwamuro S, Asakura T, Ohkawa K. Development of a novel method for purifying SDS-solubilized ubiquitin-protein conjugates. 第 79 回日本生化学会大会 2006、6 月 京都

3) 石橋由朗、小村伸朗、鈴木裕、中田浩二、羽生信義、柏木秀幸、川崎成郎、大川清、浦島充佳、矢永勝彦。DNA チップとペアリング解析法による食道癌の分子生物学的分類と新しい予後規定因子の検討。第 61 回日本消化器外科学会、2006、7 月 横浜

4) 丸島秀樹、松浦知和、大川清。 ^{13}C -呼吸試験を用いた in vitro 細胞毒性試験の開発。第 48 回日本平滑筋学会総会 2006、7 月 岡山

- 5)上田和、山田恭輔、浦島充佳、青木勝彦、鷹橋浩幸、岡本愛光、安田允、丸島秀樹、大川清、田中忠夫。子宮体癌における CD147 の発現と臨床病理学的検討。第 65 回日本癌学会総会 2006、9 月 横浜
- 6)朝倉正、青木勝彦、山田恭輔、間森聡、丸島秀樹、大川清。癌細胞膜表面高発現糖タンパク質 CD147 を標的とした化学療法への検討。第 65 回日本癌学会総会 2006、9 月 横浜
- 7)江田誉、青木勝彦、高田耕司、丸毛啓史、大川清。FGF2 は骨芽細胞様細胞内の TAZ タンパク質量を減少させる。日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006、12 月 名古屋
- 8)青木勝彦、上田和、間森聡、丸島秀樹、山田恭輔、朝倉正、大川清。癌浸潤マーカー蛋白質 CD147 を

標的とするモノクローナル抗体 Mab12C3 の機能解析。日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006、12 月 名古屋

9)松浦知和、大川清。ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発。平成 17 年度 厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業萌芽的先端医療技術推進研究。ナノメディシン研究成果発表会、2007、2 月 東京

H.知的所有権の出願・登録状況

1) 射谷和徳・大川清・松浦知和・阿部正彦ほか、特願 2006-333792・画像形成システム・アロカ株式会社

2) 松浦知和、大川清ほか、特願 2006 - 050548 ガス混合装置及びガス混合法

2. 細胞内在性 RNA アプタマーの標的分子としての新規 RNA 結合タンパク質の同定

分担研究者 松藤千弥 東京慈恵会医科大学 生化学講座第2
協力研究員 堀谷 学 東京慈恵会医科大学 生化学講座第2

本研究は、財団法人医療機器センター（外国への日本人研究者派遣事業）の一貫として行われた。
派遣研究者：堀谷 学（東京慈恵会医科大学 協力研究員）
派遣先：アメリカ合衆国ユタ大学人類遺伝学研究所
派遣中の研究指導者：John F. Atkins 教授
派遣期間は、平成17年12月20日から平成18年3月19日までである。
なお、本研究の研究成果の詳細は研究実績報告書として提出済みである。

研究要旨：細胞内在性 RNA アプタマーと仮定されるアンチザイム・シュードノット RNA に結合するタンパク質の同定を目的とし、ヒト細胞抽出物中のタンパク質の RNA 結合性を、UV クロスリンク法等の手法を用いて解析するとともに、翻訳フレームシフトに対する効果を検討した。ヒト細胞抽出物には約 50 kDa、20 kDa のアンチザイム・シュードノット RNA 結合タンパク質が存在することが示唆された。

A. 研究目的

細胞の増殖に必須のポリアミンを負に制御するタンパク質であるアンチザイム（正確にはアンチザイム1）は、細胞内ポリアミン濃度に応答した翻訳フレームシフトによって発現する。細胞内ポリアミン濃度が低い場合は途中のUGAコドンで翻訳が終結するが、細胞内ポリアミン濃度が上昇すると、最初の終止コドンの位置で+1の翻訳フレームシフトが起こり、機能を持った全長のアンチザイム・タンパク質が翻訳される。この翻訳フレームシフトには、UGAコドンの下流にシュードノット構造と呼ばれる特異なRNA構造が形成されることが重要とされているが、その機能は未知である。これまでに、ウサギ網状赤血球の抽出物中にアンチザイム・シュードノット RNA 結合画分が存在することが、ゲル・モビリティ・シフト・アッセイ法により示唆されている（未発表）。本研究では、細胞内在性RNAアプタマーと仮定されるアンチザイム・シュードノットRNAに結合するタンパク質の同定を目的とし、ヒト細胞抽出物中のタンパク質のRNA結合性を、UVクロスリンク法等の手法を用いて解析するとともに、翻訳フレームシフトに対する効果を検討した。

B. 研究方法

細胞抽出物として、ヒト胎児腎細胞（HEK 293）由来のFreeStyle 293F細胞のライセートを超遠心分画した上清を用いた。RNA結合タンパク質の

同定は、主にUVクロスリンク法によった。UVクロスリンク法は、放射能で内部標識したRNAと細胞抽出物を混合し、インキュベーションした後、紫外線照射により架橋させ、RNアーゼでRNAを分解してから、SDS-PAGEにより放射能標識されたタンパク質を検出する方法であり、標識されたRNA結合タンパク質は本来の分子量とほぼ同じ分子量で検出される。また、アンチザイム・シュードノット結合成分を検出する別の方法として、ウサギ網状赤血球ライセートの*in vitro*転写／翻訳システムを用いたアンチザイムの翻訳フレームシフト・アッセイ系にシュードノットRNAを加える実験を行った。

C. 研究結果

UVクロスリンク法により、ヒト細胞抽出物には約50 kDa、20 kDaのアンチザイム・シュードノット RNA 結合タンパク質が観察された。しかしこれらのタンパク質は、変異体を用いた解析からシュードノット形成の有無にかかわらず結合性が保たれており、アンチザイムの翻訳フレームシフト機構との機能的な関連性を示唆するデータは得られなかった。これは、アンチザイム・シュードノットRNAを*in vitro*翻訳系に加える実験において、フレームシフト効率の変化が観測されなかったことから示唆される。メチレン・ブルー・クロスリンク法においては、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識したRNAを用いた場合には、バンドが観察されず、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ で標識したRNAを用いた場合にのみ20 kDa付近

バンドがあらわれた。メチレン・ブルー・クロスリンク法は、二本鎖RNAに結合するタンパク質の検出に有効であるということと、アンチザイム・シュードノットは二本鎖領域にG-C対を豊富に含み、一本鎖領域にアデノシンを多く含むという事実から、この約20 kDaのRNA結合タンパク質はアンチザイム・シュードノットRNAのステム領域に特異的に結合していることが予想される。

また、クロスリンクにより検出されたバンドと、ノースウエスタン・ブロットィング法により検出されたバンドの対応は未確認であるが、ノースウエスタン・ブロットィング法において、50 kDa付近のバンドと、18 kDa付近というクロスリンク法にと似たバンドのパターンが観察されているため、これらのタンパク質をゲルから切り出し、マス・スペクトロメトリーを行うことにより、今後早い段階で、これらのタンパク質の同定が可能であると思われる。

D. 考察

同定されたRNA結合タンパク質は、まだ特異性の検証が不十分であるが、核酸アプタマーとタンパク質との間の相互作用に関する本質的な問題を理解する上で有用であると予想される。また、ポリアミンは細胞の増殖に必須であり、アンチザイムはポリアミンの細胞内濃度の制御に関わるので、本研究の進展は癌の診断・治療に応用される可能性がある。

E. 結論

UVクロスリンク法により、ヒト細胞抽出物には約50 kDa、20 kDaのアンチザイム・シュードノットRNA結合タンパク質が観察され、今後特異性や機能解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

総括報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

論文発表

1) Kosuge M, Takizawa H, Maehashi H, Matsuura T, Matsufuji S. A comprehensive gene expression analysis of human hepatocellular carcinoma cell lines as components of a bioartificial liver using a radial flow bioreactor.

Liver Int. 2007 Feb; 27(1): 101-8.

2) Yamaguchi Y, Takatsuka Y, Matsufuji S, Murakami Y, Kamio Y. Characterization of a counterpart to Mammalian ornithine decarboxylase antizyme in prokaryotes.

J Biol Chem. 2006 Feb 17; 281(7): 3995-4001.

学会発表

1) 堀谷学, 松藤千弥, 原田和雄 GNRA型テトラループ含有RNAへアピンに結合する新規アルギニン・リッチ・ペプチド. 日本ケミカルバイオロジー研究会 5月、東京

2) 堀谷学, Howard MT, Atkins JF, 村井法之, 松藤千弥. 細胞内在性RNAアプタマーの標的分子としてのアンチザイム・シュードノットRNA結合タンパク質の探索. 第8回日本RNA学会年会. 淡路, 7月

3) Horiya S, Howard MT, Atkins JF, Murai N, Matsufuji S. Possible conformational change of the pseudoknot during antizyme frameshifting as detected by a pseudoknot RNA-binding protein. RNA 2006 Izu "Functional RNAs and Regulatory Machinery" Izu, Dec 2006

H. 知的財産権の出願状況

なし

3. 針生検で採取した肝臓癌における CD147 の染色と臨床的意義

分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授

分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授

協力研究者 間森 聡 東京慈恵会医科大学 助手

研究要旨：12C3 (CD147) の早期肝癌診断マーカーとしての有用性を検討した。当院にて診断目的に超音波下穿刺吸引組織診を行なった肝細胞癌症例 22 例に対し 12C3 にて免疫染色を行った。染色強度を 4 段階でスコア化し評価した。結果、染色強度は腫瘍生検と同時に施行された背景肝臓組織と比較し優位に濃染される結果となった。(P<0.01) また 15mm 以下の小径肝癌症例でも優位に濃染され(P<0.05)、12C3 が早期肝癌の診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。また 12C3 マイクロバブルが可能となれば、生検などを施行せず肝癌の早期診断が可能になると考えられた。

A. 目的

現在でも 20mm 以下の小さな早期肝癌は、病理診断で苦慮するケースを認めている。また画像診断上も造影 CT にて Detect できない早期肝癌は臨床現場で多く散見されている。今回、肝癌スクリーニング検査で、腹部超音波のみで肝癌を疑われ、診断目的に施行された吸引腫瘍組織検体を利用し、12C3 の早期診断マーカーとしての有用性を検討した。

B. 対象と方法

超音波診断だけでは確診が得られず診断目的で施行された吸引腫瘍組織検体を利用した。2003 年 1 月より 2005 年 12 月までの期間に東京慈恵会医科大学附属第三病院にて腫瘍生検を行なった 22 例を対象に 12C3 にて免疫染色し患者背景と比較検討した。腫瘍検体は 21G 真島針を用いて採取されたものとした。染色強度を 4 段階でスコア化し評価した。

C. 結果

対象症例 22 例の内訳は平均年齢 68 歳、全例肝炎ウイルス陽性、肝炎例 17 例、肝硬変例 5 例、

高分化癌 15 例、中分化癌 7 例であった。腫瘍部の染色強度は、同時に施行された背景肝臓組織と比較し優位に濃染される結果となった。(P<0.01) また 15mm 以下の小径肝癌症例でも優位に濃染される結果となった。(P<0.05)

Table 1: CD147 の発現 (全 22 例)

4-step scales	Tumor tissues	Non-tumor tissues	P-value
	Number, (%)	Number, (%)	
Very weak (0)	n=1, (4.5%)	n=7, (31.8%)	<0.01
Weak (1)	n=6, (27.3%)	n=6, (27.3%)	
Moderate (2)	n=3, (13.6%)	n=6, (27.3%)	
Strong (3)	n=12, (54.5%)	n=3, (13.6%)	
Total	n=22, (100%)	n=22, (100%)	

また患者背景にて染色強度を比較検討したところ、背景肝機能が低い群 (AST, γ -GTP) にて染色強度が強い傾向が得られた。(P<0.05) しかし、癌の分化度、肝硬変の有無では有意差は認めない結果となった。

D. 考察

腫瘍径 15mm 以下の早期肝癌においても、12C3 が診断マーカーとして有用である可能性が

示唆された。12C3 の病理診断への有用性はもとより、今後 12C3 マイクロバブルが可能となれば、生検などを施行せず肝癌の早期診断が可能になると考えられた。

E. 結論

12C3 は早期肝癌診断マーカーとしての有用性である。

F. 研究発表

1. 論文発表

S.Mamori, Y.Nagatsuma, T.Matsuura, *et al.*

Useful detection of CD147 (EMMPRIN) for pathological diagnosis of early hepatocellular carcinoma (HCC) in needle biopsy samples.

World J Gastroenterol 2007 *in press*

2. 学会発表

DDWJ2007 発表予定

H. 知的財産権の出願状況

なし