

Ⅱ 分担研究報告

1. 超音波造影剤作成に向けた分子標的性向上に向けた研究 -----	85
分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授	
協力研究者 朝倉 正 東京慈恵会医科大学 講師	
協力研究者 青木勝彦 東京慈恵会医科大学 助教	
2. 細胞内在性 RNA アプタマーの標的 RNA 結合タンパク質の同定 -----	91
及び相互作用の機能解析	
分担研究者 松藤千弥 東京慈恵会医科大学 教授	
流動研究員 堀谷 学 財団法人医療機器センター・東京慈恵会医科大学	
3. 超音波内視鏡下穿刺吸引細胞・組織診(EUS-FNA)の有用性と -----	96
採取組織の CD147 の発現に関する研究	
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 講師	
4. 消化管腫瘍における CD147 発現の臨床的意義 -----	98
分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師	
5. 子宮頸部腫瘍における CD147 発現解析 -----	100
分担研究者 山田恭輔 東京慈恵会医科大学 講師	
協力研究者 上田 和 東京慈恵会医科大学 助教	
6. 新規界面活性剤の安全性・毒性の検討動物実験のための -----	102
マウス CD147 認識抗体の作製	
分担研究者 日下部守昭 財団法人動物繁殖研究所 主席研究員	
7. <i>In vitro</i> 3次元微小腫瘍モデルの作製に関する研究 -----	106
分担研究者 相澤 守 明治大学理工学部 准教授	
8. 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 -----	112
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 准教授	
協力研究者 永妻啓介 東京慈恵会医科大学 大学院	
協力研究者 Filip Braet シドニー大学 准教授	
9. 新規界面活性剤を用いたナノバブルの調製および -----	118
抗 CD147 抗体標識微小気泡の超音波分子イメージング	
分担研究者 阿部正彦 東京理科大学理工学部 教授	
分担研究者 酒井秀樹 東京理科大学理工学部 准教授	
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 -----	125
研究者 伊藤貴司 アロカ(株)研究所 主幹研究員	
射谷和徳 アロカ(株)研究所 主任研究員	
赤羽睦弘 アロカ(株)研究所 研究員	
11. 第2世代超音波造影剤ソナゾイドの特性 -----	131
分担研究者 宮本幸夫 東京慈恵会医科大学 准教授	
分担研究者 射谷和徳 アロカ(株)研究所 主任研究者	
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 西岡真紀子 東京慈恵会医科大学 講師	
協力研究者 中田典生 東京慈恵会医科大学 講師	

1. 超音波造影剤作成に向けた分子標的性向上に向けた研究

分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授

協力研究者 朝倉 正 東京慈恵会医科大学 講師

協力研究者 青木勝彦 東京慈恵会医科大学 助教

本年度はマウス抗ヒトCD147モノクロン抗体に代わりより分子親和性の高い安定なCD147アプタマー開発を主実験の1つとし、その中から有望な塩基配列が獲得できる可能性が示された。また超音波造影に向けた抗CD147抗体のバブルへの標識の可能性を証明するために、抗体に代え蛍光タンパク質を標識して、バブルを可視化しバブルへの組み込み効率などを確認できた。また抗CD147抗体標識バブルの細胞表面の標的分子であるCD147分子への特異的な集積性を調べる目的で、抗CD147抗体標識リポソームを作製して、培養細胞への集積性と抗癌剤内封による分子標的の特異的抗腫瘍効果発現を調べ、抗CD147抗体標識リポソームは短時間の薬剤接触実験にも関わらずCD147発現腫瘍細胞に特異的に集積し、包含抗癌剤の抗腫瘍効果はCD147発現腫瘍細胞で特異的に高く今後の開発に向けた方向性が確認できた。

実験1.

CD147 認識 RNA アプタマーの作成

A. 研究目的

CD147 の検出感度を向上させるために、Mab12C3 抗体よりも高親和性の RNA アプタマーを作成する。

B. 研究方法

1. RNA プールの作成

60 塩基のランダム配列の両端に特異的なプライマー配列を有する、3 種類の DNA プールを用意した。それぞれの DNA プールを鋳型として、in vitro 転写キット（DuraScribe T7 Transcription Kit, EPICENTRE Biotechnologies）を用いて RNA ライブラリーを合成した。ここで合成される RNA はピリミジン塩基の 2'水酸基がフッ素に置換された修飾型 RNA であり、RNase に対して抵抗性を示す。

2. アプタマーの選別

5×10^{14} 分子の RNA を初期プールとして、CD147 に結合するアプタマーの選別を行った。選別に使用したタンパク質は昨年度に作成した CD147 の細胞外ドメインとウサギ IgG の Fc 領域とのキメラタンパク質（His タグ付き）である。このキメラタンパク質を

Protein G Sepharose レジンおよび TALON レジンに結合させ、RNA プールの中から CD147 と結合するものを B/F 分離により選別した。また、キメラタンパク質を HRV C3 プロテアーゼで消化した後に CD147 の細胞外ドメインを精製し、それを NHS-activated Sepharose レジンに共有結合させたものも同様の選別に用いた。B/F 分離によって選別された RNA は逆転写され、それを鋳型とした PCR によって増幅される。増幅された DNA は in vitro 転写反応の鋳型となり、次世代の RNA プールが合成される。この RNA プールから再度 CD147 と結合するものを B/F 分離により選別した。このようなサイクルを 9 回繰り返した。選別に使用するレジンはサイクルごとに切り替えた。また、Fc 領域やレジンに対して結合する RNA 分子を排除するため、各サイクルでの CD147 を用いた選別の前に、Fc 領域のみをレジンに結合させたものでネガティブ選別を行った。

3. アプタマーのクローニング

9 サイクル後に CD147 を固定したレジンに結合していた RNA を逆転写し、それを鋳型として PCR を行った。増幅した DNA 断片を TA クローニングにてプラスミドに挿入し、大腸菌へ形質転換した。シングルコロニーからプラスミドを回収し、個々の

クローンに対して塩基配列を解読した。

C. 研究結果

9 サイクル目のポジティブ選択 (CD147 固定化レジン) とネガティブ選択 (Fc 固定化レジン) 由来の RNA を逆転写し、PCR を用いてそれぞれの増幅効率の違いを検討した。3 種類の DNA プールのうち、1 種類でポジティブ選択とネガティブ選択との間に PCR 増幅サイクル数の優位な差を認めた。(図 1)

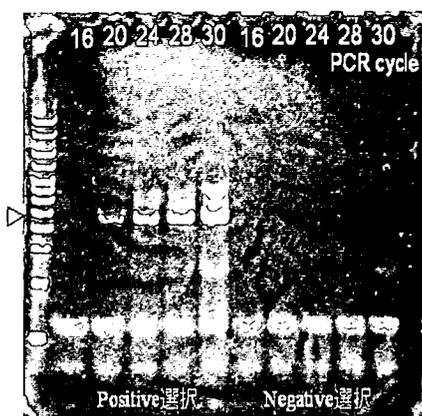


図1. レジンに結合したRNAに対するRT-PCR

ポジティブ選択ではPCRによるDNAの増幅が観察されるが、ネガティブ選択では増幅が見られない。

ポジティブ選択で増幅された DNA 断片をクローニングし、187 個のクローンについて塩基配列を解読した。ClustalW にて系統樹を作成したところ、13 のファミリーに分類できた。(図 2)

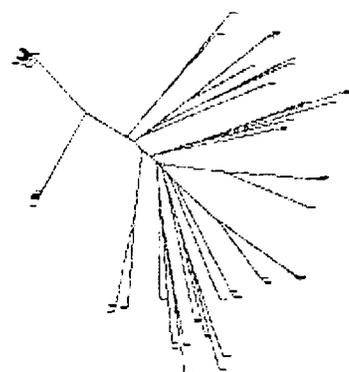


図2. ポジティブ選択によって得られたクローンの系統樹

187個のクローンは13のファミリーに分類された。

D. 考察

今年度の研究では、CD147 結合レジンと親和性のある RNA 集団から多数のクローンを取得することができた。現在、これらのクローンから合成した RNA と CD147 タンパク質との直接的な結合を、BIACORE を用いて解析しているが、既に解析が終了した 5 つのクローンについては CD147 との結合は観察されなかった。今後は残りのクローンについて解析を

行なっていく。CD147 タンパク質に対するアプタマーが得られた後は、そのアプタマーが癌細胞表面の CD147 を認識可能かどうか、さらなる解析を行なっていく必要がある。今回使用した CD147 タンパク質には成熟した糖鎖が付加されていないため、本研究から得られるアプタマーが細胞表面の CD147 を認識できないことも考えられる。そのような場合は成熟型の糖鎖を持つ CD147 を発現する細胞に対してアプタマーの取得を試みる必要があるだろう。

今年度の研究から、リコンビナントタンパク質に対するアプタマー取得に関する実験系の基盤が整備された。それにより、CD147 以外の分子を標的としたラベル化造影剤の開発への道が開けたという点で、本研究の結果は重要である。本研究は東京大学・医科学研究所・基礎医科学部門・遺伝子動態分野の中村義一教授と大内将司助教との共同研究により行われた。

E. 結論

リコンビナントタンパク質に対するアプタマー取得に関する実験系の基盤が整備され、CD147 固定化レジンに親和性を有する RNA 集団がクローニングされた。CD147 に対するアプタマーがこの集団内に含まれる可能性は高いと考えられる。今後は細胞表面に発現する成熟糖鎖結合型の CD147 に対するアプタマーの更なる検索を行なう必要がある。また、CD147 以外の標的タンパク質に対するアプタマーの取得も視野に入れる必要があると考えられる。

実験 2.

A. 研究目的

抗 CD147 抗体のバブルへの標識の可能性を証明するために、抗体に代え蛍光タンパク質を標識して、バブルを可視化することで確認する。なお本研究は東京理科大、アロカ研究所チームへの協力実験であり C の一部、D、E、F の各項はそちらに記す。

B. 研究方法

1. 材料

Distearyl phosphatidylethanolamine-polyethylenglycol (DSPE-PEG)-maleimide (MW: 5kD)、DSPE-PEG-NHS (MW: 3kD) は日本油脂から

購入した。GFP (recombinant His-tag-GFP)、抗CD147抗体 (Mab12C3, aCD147ab) は当研究室で調製した。

2. 蛍光タンパク質および抗体標識リン脂質の作製

(1) DSPE-PEG-GFP:

DSPE-PEG-maleimide 1 mg と GFP 1 mg を 300 μ l 0.1M KPB (pH 6.5) で室温、一昼夜反応させる。反応後、ゲルろ過 (Sephadex G-100) で DSPE-PEG-GFP と未反応の GFP を分取する。DSPE-PEG-GFP は void volume 直後に溶出され、その後 GFP が溶出される。

(2) DSPE-PEG-Keima-Red:

1 mg DSPE-PEG-NHS と 1 mg Keima-Red を 300 μ l 0.1M KPB (pH 8.0) で室温、一昼夜反応させる。反応後、ゲルろ過 (Sephadex G-100) で DSPE-PEG-Keima-Red と未反応の Keima-Red を分取する。DSPE-PEG-Keima-Red は void volume 直後に溶出され、その後 Keima-Red が溶出される。

(3) DSPE-PEG-aCD147ab:

1 mg DSPE-PEG-NHS と 1 mg aCD147ab を 300 μ l 0.1M KPB (pH 8.0) で室温、一昼夜反応させる。反応後、ゲルろ過 (Sephacryl S-300HR) で DSPE-PEG-aCD147ab と未反応の aCD147ab を分取する。DSPE-PEG-aCD147ab は void volume に、未反応の aCD147ab は void volume 直後に溶出される。

3. シクロアミロースバブルへの蛍光タンパク質および抗体の標識

30%グリセリン水溶液に、0.08mM シクロアミロース修飾界面活性剤、0.004mM 蛍光タンパク質または抗体標識リン脂質を混合し、内包ガス：六フッ化硫黄(SF₆)にてバブルを発生させる。

C. 研究結果

1. GFP 標識バブル

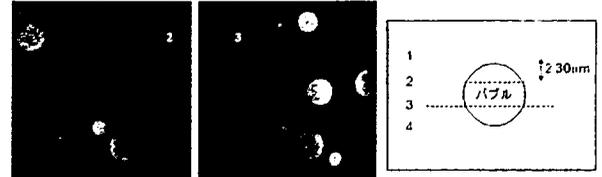
DSPE-PEG-GFP をバブルに標識し、共焦点レーザー顕微鏡で励起波長 475nm、蛍光波長 505nm で観察すると、バブルの像(図1)が認められたが、この蛍光は GFP 非標識バブルでも観察された。蛍光波長スペクトルを調べると、励起光がバブルにより散乱し、その波長が 550nm 以上にまで及んでいることが判明した(図2)。そこで、励起波長と蛍光波長の

差の著しく蛍光波長領域に散乱光の影響のない Keima-Red を用いて検討した。

2. Keima-Red 標識バブル

DSPE-PEG-Keima-Red をバブルに標識し、共焦点レーザー顕微鏡で励起波長 440nm、蛍光波長 620nm で観察すると、図3のように各断面でリング状のバブルの像が認められ、バブルにタンパク質を標識できることが確認された。

混合バブル:シクロアミロース+ DSPE-PEG-GFP



単独バブル:シクロアミロース

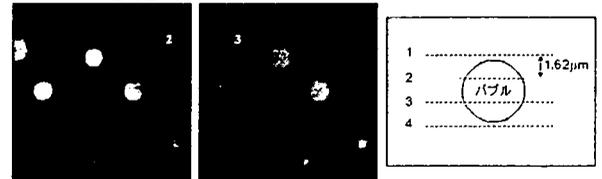
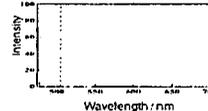
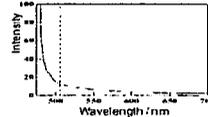


図1: GFP標識バブルの共焦点レーザー顕微鏡観察像(励起波長:475nm, 蛍光波長:505nm)。DSPE-PEG-GFP有無条件下でバブルを調製し観察。

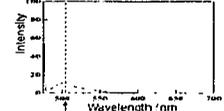
<シクロアミロース修飾界面活性剤水溶液>
(バブル調製前)



<シクロアミロース界面活性剤バブル>
(蛍光蛋白修飾リン脂質は含まれていない)



<蛍光標識蛋白修飾リン脂質のみ>
(GFP-PEG-DSPE)



<混合バブル>
(蛍光蛋白修飾リン脂質含む)

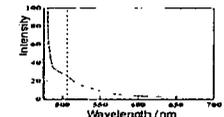


図2: 475nm励起光によるバブルの蛍光スペクトル。DSPE-PEG-GFP有無条件下でバブルを調製し、475nm励起光照射による蛍光波長を観察

混合バブル:シクロアミロース+ DSPE-PEG-Keima-Red

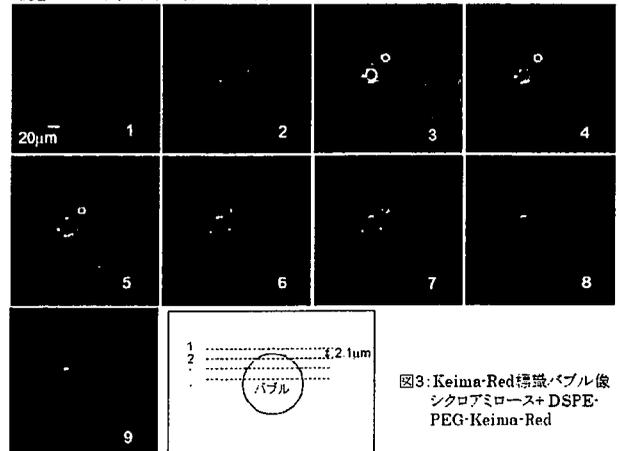


図3: Keima-Red標識バブル像シクロアミロース+ DSPE-PEG-Keima-Red

実験 3.

A. 研究目的

抗CD147抗体標識バブルの細胞表面CD147分子への特異的集積性を調べる目的で、抗CD147抗体の有効性確認のため、抗CD147抗体標識リポソームを作製して、培養細胞への集積性と抗癌剤内封による標的分子特異的抗腫瘍効果発現を調べた。

B. 研究方法

1. 材料

中空リポソーム製剤コートソーム EL-A-01、*DSPE-PEG-maleimide (MW: 5kD)、*DSPE-PEG-NHS (MW: 3kD)は日本油脂 (株) から購入した。タグ付き組換え Green fluorescent protein (recombinant His-tag-GFP)、抗 CD147 抗体 (Mab12C3, aCD147ab) は当研究室で作製した。

*DSPE-PEG: distearyl phosphatidylethanolamine polyethylenglycol

2. 蛍光色素および抗体標識リポソームの作製

(1) DSPE-PEG-GFP:

DSPE-PEG-maleimide 1mg と GFP 1mg を 300 μ l 0.1M KPB (pH6.5) で室温、一昼夜反応させる。

(2) DSPE-PEG-aCD147ab:

同様に 1.0mg DSPE-PEG-NHS と 1mg aCD147ab を 300 μ l 0.1M KPB (pH8.0) で室温、一昼夜反応させる。

(3) Immunoliposome (aCD147ab-GFP-liposome):

10mg コートソームを 720 μ l メタノールで溶解し、DSPE-PEG-GFP と DSPE-PEG-aCD147ab 各 40 μ l を混合する。室温で 30 分静置後、遠心 (15,000rpm, 30min) によりコートソーム非結合の DSPE-PEG-GFP、DSPE-PEG-aCD147ab および未反応の GFP、aCD147ab を除去(上清)する。沈殿を 1ml 滅菌 PBS で 2 回洗浄する。沈殿を 200 μ l 滅菌 PBS で懸濁する。

(4) 抗癌剤封入 immunoliposome (aCD147ab-liposome/GSH-DXR) の調製

上記(3)で得られた immunoliposome に我々の研究室で開発した極めて抗癌効果の強いグルタチオン

結合アドリマイシン (GSH-DXR) を添加し室温で 30 分静置後、コートソーム内に封入されなかった GSH-を遠心 (15,000rpm, 30min) により除去 (上清)する。沈殿を 1ml 滅菌 PBS で 2 回洗浄する。沈殿を 200 μ l 滅菌 PBS で懸濁する。

3. 細胞

ヒト扁平上皮がん細胞A431、ヒト子宮内膜癌細胞 Ishikawa、ヒト前立腺がん細胞PC3と CD147siRNA 発現抑制細胞 (PC3/KD) を用いた。培養は通常のものであった。

C. 研究結果

1. A431, Ishikawa, PC3 および PC3/KD 細胞における CD147 発現

各細胞における CD147 発現を aCD147ab で、蛍光顕微鏡観察および細胞抽出液の SDS-PAGE と Western blot により確認した (図 1)。A431, Ishikawa および PC3 細胞ではいずれも CD147 の発現が確認されたが、PC3/KD 細胞では CD147 発現が消失していた (図 1)。

2. CD147 発現細胞への aCD147ab-liposome の特異的集積

A431 細胞に aCD147ab-GFP-liposome を 30 分暴露後、GFP 蛍光を顕微鏡観察すると、図 2 のように細胞への aCD147ab-GFP-liposome の集積が観察された。aCD147ab-GFP-liposome 添加時に過剰の aCD147ab の同時添加は、aCD147ab-GFP-liposome の蛍光を消失させた (図 2)。また、aCD147ab を持たない GFP-liposome 処理では GFP 蛍光は認められないことから、aCD147ab を介した liposome の CD147 を介し特異的な細胞集積が観察された。次いで CD147 発現の PC3 細胞に aCD147ab-GFP-liposome を添加すると、GFP 蛍光の集積が観察されたが、CD147 を発現抑制した PC3/KD 細胞に aCD147ab-GFP-liposome を添加しても GFP 蛍光は観察されず、aCD147ab-GFP-liposome が CD147 を標的として集積したことが確認された (図 2)。

3. GSH-DXR 内封 aCD147ab-liposome

(aCD147ab-liposome/GSH-DXR) の A431, Ishikawa, PC3 および PC3/KD 細胞に対する殺細胞効果

各細胞に aCD147ab-liposome/GSH-DXR を 4 時間暴露し、9 6 時間後の生細胞率を MTT 法により求め、死細胞率を算出すると、特異性の無い正常マウス (Mo) IgG-liposome/GSH-DXR に比べ A431, Ishikawa, PC3 細胞は有意な殺細胞効果を示したが、PC3/KD 細胞では有意な殺細胞効果は観察されず、CD147 発現細胞への殺細胞効果の特異性が認められた (表 1、図 3)。

D. 考察

正常組織における CD147 の発現が極めて少ないのに比べ、多くのがん細胞で CD147 の高発現が報告されている。本実験では aCD147ab-liposome を用いることによる CD147 分子標的治療の有効性について検討した。aCD147ab-liposome の CD147 発現細胞への集積が過剰の aCD147ab により競合的に抑制されること、CD147 発現抑制細胞 PC3/KD への集積が観察されないことから、aCD147ab-liposome が CD147 発現細胞への特異的な集積が明らかになった。さらに、aCD147ab-liposome/GSH-DXR を用いた抗腫瘍効果判定実験から、CD147 発現細胞への特異的殺細胞効果が認められた。これらのことは、aCD147ab 標識バブルにも CD147 発現細胞への特異的効果が期待され、診断と治療の両面において有用となることが示唆された。

本実験で用いた GSH-DXR は多剤耐性克服の目的で開発した薬剤で、DXR 単剤よりも非常に強い殺細胞効果を示すことから、標的治療において低濃度で効果を発揮できる薬剤としてバブル内封薬剤としての有効性が期待される。

E. 結論

1. aCD147ab-liposome は CD147 発現細胞にのみ特異的に集積した。
2. GSH-DXR 内封 aCD147ab-liposome に CD147 発現細胞に特異的な殺細胞効果が観察された。これらの結果から、aCD147ab-liposome を用いた分子標的治療への有効性が期待された。また、aCD147ab 標識バブルの有用性が期待される基礎的データとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Eda H, Aoki K, Fujii K, Ohkawa K.; FGF-2 signaling induces downregulation of TAZ protein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *BBRC* 366;471-75,2008
- 2) Asakura T, Sasagawa A, Takeuchi H, Shibata S, Marushima H, Mamori S, Ohkawa K.: Conformational change in the active center region of GST P1-1 due to binding of a synthetic conjugate of DXR with GSH, enhanced JNK-mediated apoptosis *Apoptosis* DOI 10.1007 2007.
- 3) Mamori T, Asakura T, Ohkawa K., Tajiri H: Survivin expression in early hepatocellular carcinoma and post-treatment with anti-cancer drug under hypoxic culture *World J Gastroenterol* 13(40): 1306-11,2007
- 4) Mamori S, Nagatsuma K, Matsuura T, Ohkawa K., Hano H, Fukunaga M, Matsushima M, Masui Y, Fushiya N, Onoda H, Searashi Y, Takagi I, Tagiri H.: Useful detection of CD147 (EMMPRIN) for pathological diagnosis of early hepatocellular carcinoma in needle biopsy samples. *World J Gastroenterol.* 13(21): 2913-7, 2007.

2. 学会発表

- (1) 射谷和徳、伊藤貴司、今野剛人、大川清、松浦知和、阿部正彦、酒井秀樹、土屋好司。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。第 4 6 回日本生体医工学会大会。仙台、4 月
- (2) 中田典生、宮本幸夫、西岡真樹子、今野剛人、射谷和徳、伊藤貴司、土屋好司、酒井秀樹、阿部正彦、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。第 2 回日本分子イメージング学会総会、福井、6 月
- (3) Konno T, Itani K, Itoh T, Tsuchiya K, Abe M, Sakai H, Matsuura T, Ohkawa K. Approach for early cancer diagnosis using targeted ultrasound contrast agents. The Academy of Molecular Imaging and The Society for Molecular Imaging: Molecular Imaging Joint Conference, 2007, Sept. 8-11 Rhode Island USA

(4) 朝倉正、問森聡、青木勝彦、松平浩、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の検討：(Target chemotherapy of anti-CD147 antibody-liposome encapsulated GSH-DXR conjugate on CD147-expressed carcinoma cells.). 第66回日本癌学会総会. 横浜. 10月.

(5) Ueda K, Yamada K, Aoki K, Takahashi H, Urashima M, Okamoto A, Yasuda M, Ohkawa K, Tanaka T. Study of CD147 expression in endometrial carcinoma and cervical carcinoma: Correlation with clinicopathogenesis. 第66回日本癌学会総会. 横浜. 10月.

(6) 問森聡、高木一郎、大川清. CD147は早期肝癌のターゲティングマーカーになり得るか？ -3次元腫瘍浸潤モデルと肝生検よりの検討- JDDW 2007 2007、10月 東京

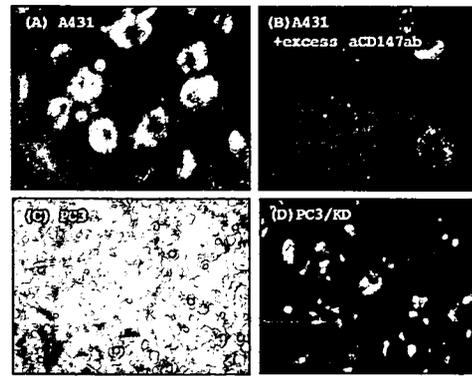


図2. Accumulation of aCD147ab-GFP-liposome in A431 (A), A431 + excess aCD147ab (B), PC3 (C), and PC3/KD (D). The GFP accumulation was observed by fluorescence microscopy. Existence of excess aCD147ab exhibited a competitive inhibition of liposome accumulation (B).

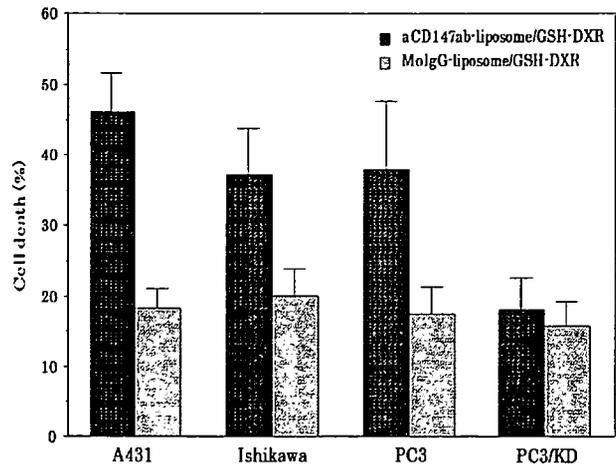


図3. Cytotoxicity of aCD147ab-liposome/GSH-DXR for 4h-exposure against A431, Ishikawa, PC3 and PC3/KD cells.

表1 Cytotoxic effect of GSH-DXR-encapsulated aCD147ab-immunoliposome
Cell death rate (%)

	aCD147ab-liposome/GSH-DXR	MoIgG-liposome/GSH-DXR
A431 cells	46 ± 7%	18 ± 3%
Ishikawa cells	37 ± 8%	20 ± 4%
PC3 cells	38 ± 9%	17 ± 4%
PC3/KD cells	18 ± 4%	16 ± 3%

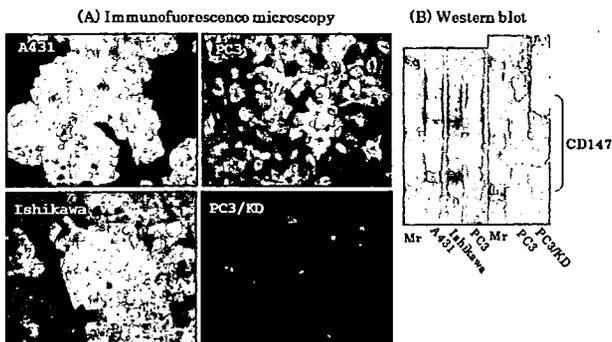


図1. Expression of CD147 in human carcinoma cells (A431, Ishikawa and PC3). (A) Observation by fluorescent microscopy using aCD147ab (Mab12C3) and Alexa488-anti MoIgG as secondary antibody. PC3/KD: CD147-knock down PC3. (B) Western blot analysis of CD147 by aCD147ab (Mab12C3).

2. 細胞内在性 RNA アプタマーの標的 RNA 結合タンパク質の同定及び相互作用の機能解析

分担研究者 松藤千弥 東京慈恵会医科大学 教授

流動研究員 堀谷 学 財団法人医療機器センター・東京慈恵会医科大学

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行うため、ヒト細胞抽出物のシュードノット RNA 結合タンパク質を UV クロスリンク法により解析した。その結果、野生型シュードノット RNA に特異的に結合するタンパク質を検出することはできなかったが、5' 側下部ステムを破壊した変異体に特異的に結合するタンパク質が検出された。RNA を用いたアフィニティー精製とプロテオミクスの手法によりこのタンパク質の同定に成功した。このタンパク質はフレームシフト部位に到達した翻訳中のリボソームにより部分的に融解されたアンチザイム・シュードノットに結合し翻訳フレームシフトを制御する可能性があるため、解析を行った。

A. 研究目的

超音波によるがんの早期診断システムの確立には、適切な標的に対して結合する分子が必要であるが、核酸アプタマーはそのための有益な分子である。核酸アプタマーをがん診断のためのナノ材料として用いるには、適切なタンパク質をアプタマーの標的分子とすることが重要であると共に、その技術の基盤となる核酸とタンパク質の分子間相互作用の理解を深めることが不可欠である。本研究では、細胞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の発現機構である、細胞内ポリアミンにより促進される+1 翻訳フレームシフト現象に着目した。アンチザイムの翻訳フレームシフトは、フレームシフト部位下流に位置するシュードノットと呼ばれる特異な RNA 構造により促進されることがわかっている。しかしながら、その機能は未知であり、本研究においては、このシュードノットが未知の RNA 結合タンパク質に対する細胞内在性の RNA アプタマーとして機能することにより翻訳フレーム

シフト機構に関わっていると仮定し、ヒト細胞抽出物からアンチザイム・シュードノット RNA に結合するタンパク質の精製及び同定を試みた。

B. 研究方法

UVクロスリンクによるRNA結合タンパク質の検出

ヒト細胞抽出物として、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) 由来である FreeStyle 293F 細胞の細胞溶解液の超遠心上清を用いた。超遠心は 20,000 x g あるいは 100,000 x g で行いそれぞれ、上清を S20 あるいは S100 とした。RNA 結合タンパク質の検出は、主に UV クロスリンク法を用いて評価した。UV クロスリンク法は、以下のように行った。まず、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ あるいは $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ で内部標識した RNA を *in vitro* T7 転写反応により作製し、PAGE による精製後、過剰量の大腸菌 tRNA と共に細胞抽出物と混合し、インキュベーションした後、紫外線照射により架橋反応を行った。続いて、RNアーゼ処理を行った後、反応液を SDS-PAGE により分離し、

放射能標識されたタンパク質を検出した。

RNA 結合タンパク質の精製と同定

RNA 結合タンパク質の精製は、RNA 固相化した磁気ビーズを用いたアフィニティー精製により行った。RNA の固相化は *in vitro* 転写反応により作製した RNA の 5' 末端を ATP γ S とポリヌクレオチドキナーゼを用いてチオール化し、ビオチン-マレイミド・コンジュゲートと反応させ、ストレプトアビジンを架橋した磁気ビーズと混合することによって行った。続いて細胞抽出物と過剰量の *E. coli* tRNA と混合した溶液と固相化 RNA を混合し結合させた。固相化 RNA に結合したタンパク質は 1M NaCl を用いて溶出し、マイクロコンカラム (Millipore) を用いて、脱塩処理を行い、RNA 結合画分とした。RNA 結合画分は、SDS-PAGE により分離し Coomassie Brilliant Blue 染色を行った後、目的とするタンパク質バンドをゲルより切り出し、トリプシンを用いてゲル内消化を行い、ペプチド・マス・フィンガープリンティング (PMF) により配列を同定した。続いて、同定したタンパク質の特異的モノクローナル抗体を用いて、RNA 結合画分のウェスタン・ブロッティングを行い、目的とするタンパク質バンドが検出されることを確認した。

リコンビナントタンパク質を用いた解析

同定したタンパク質の cDNA をヒト脳 cDNA ライブラリー (Invitrogen) より増幅し、ヒスチジンタグ配列が付加されるようにプラスミドベクター pET-28a(+) (Novagen) に導入した。作製したプラスミドを *E. coli* に導入し、リコンビナントタンパク質として過剰発現させ、Ni-NTA カラムおよび陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製タンパク質を用い、ゲルシフトにより RNA 結合性を評価した。また、*in vitro* 翻訳系に

よるヒトアンチザイムの翻訳フレームシフト・アッセイ系に添加し、翻訳フレームシフト効率を測定する実験を行った。

In vitro 翻訳フレームシフト

ヒトアンチザイムの翻訳フレームシフト・アッセイは [³⁵S]-Met 存在下でのウサギ網状赤血球ライセートの *in vitro* 転写/翻訳共役系、あるいは *in vitro* 翻訳系による方法を用いた。プラスミドは、過去に報告されているフレームシフト促進配列をウミシイタケとホタルのルシフェラーゼ ORF で挟んだデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターを用いた。このプラスミドあるいはプラスミドを転写した mRNA から発現するタンパク質は、フレームシフトが起こらない場合はウミシイタケルシフェラーゼが発現し、フレームシフトした場合はウミシイタケルシフェラーゼとホタルルシフェラーゼの融合タンパク質として発現する。

C. 研究結果

まず、ヒト細胞抽出物中 (細胞溶解液の超遠心上清 S20 あるいは S100) にシュードノット RNA 結合タンパク質が存在するか検出する目的で、UV クロスリンクによる解析を行った。この際、RNA プローブの変異体として、翻訳フレームシフト効率が低下するシュードノットの 3' 側ステムを破壊した変異体 (D1 あるいは D2)、3' 側ステム破壊を相補した変異体 (D1/D2) を作製した (図1)。

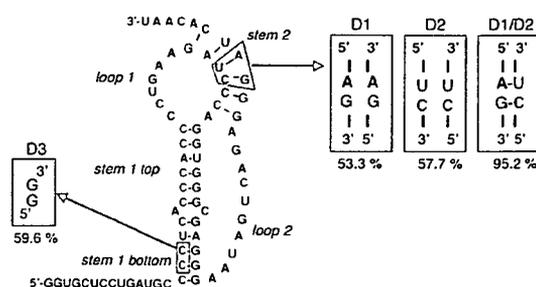


図1. 本研究で用いた RNA プローブ。%はラットアンチザイムの場合での翻訳フレームシフト効率。

その結果、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識した RNA を用いた場合には 50 kD 付近のバンドが強く検出され、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ で標識した RNA を用いた場合には 20 kD 付近の複数のバンドが強く検出された。しかしながら、これらのバンドは野生型 (WT) と D1、D2、D1/D2 の間で大きな差は見られなかった。続いて、メチレンブルーを用いたクロスリンク法で同様の実験を行ったところ、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ で標識した RNA を用いた場合のみ 20 kD 付近のバンドが観察されたが、UV クロスリンク法と同様に野生型と 3' 側ステム変異型の間で差はなかった。

そこで、翻訳フレームシフト効率が低下する別の変異体としてシュードノットの 5' 下部ステムを破壊した変異体 (D3) を作製し (図1)、同様の実験を行ったところ、D3 特異的に検出される 34 kD タンパク質が存在することがわかった (図2)。

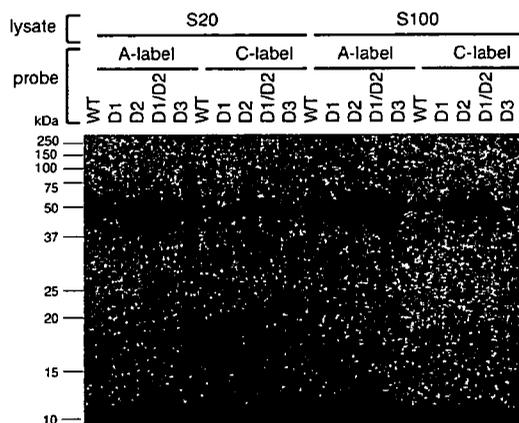


図2. UVクロスリンク法による RNA 結合タンパク質の検出。

このタンパク質を、翻訳中のリボソームにより部分融解されたシュードノットに結合するタンパク質と仮定し、続いて同定を試みた。

まず、野生型シュードノット RNA 及び、D2 変異体、D3 変異体、D2/D3 二重破壊変異体を用い、それぞれ細胞溶解液の超遠心上清 (S20) からアフィニティー精製を行った。RNA 結合画分を SDS-PAGE により分離したところ、34 kD 付近に

D3 特異的なバンドが検出された。このタンパク質は、バンドを切り出した後トリプシンを用いてゲル内消化後抽出し、MALDI/TOFMS により解析を行った。解析データの PMF を行ったところ、有意なタンパク質が同定された ($p < 0.05$)。

続いて、この同定されたタンパク質のモノクローナル抗体 (市販) を用いて、アフィニティー精製した RNA 結合画分のエウスタン・ブロッティングを行った。その結果、D3 変異体の RNA 結合画分のみバンドが検出され (図3)、同定したタンパク質が正しいことを確認すると共に、RNA 構造に対して構造特異性があることが示唆された。

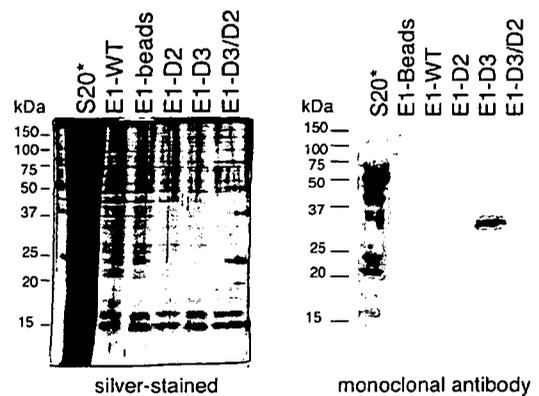


図3. RNA 結合画分 (E1) の SDS-PAGE の銀染色とウエスタンブロッティング。

次に、このタンパク質が翻訳フレームシフトに与える影響を調べるために、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を作製した。作製したタンパク質の RNA 結合性をゲルシフトにより評価したが、過剰の tRNA 存在下において 1 μM のタンパク質を D3 変異体に添加しても、バンドシフトは起こらなかったが、5' 末端 18 塩基を切り詰めた変異体では 500 nM でバンドシフトが観察された。また、*in vitro* 翻訳系に添加し、アンチザイムの翻訳フレームシフト効率を測定した。その結果、125-250 nM 程度添加するとフレームシフト効率が、非添加時に対して 20% 程度上昇する可能性があることがわかったが、この結果については再現性を

確認する必要がある。一方で、500 nM 以上添加すると翻訳効率とともに翻訳フレームシフト効率が減少することがわかったが、フレームシフト促進配列の種類によらないため非特異的な効果と考えられる。

D. 考察

細胞溶解液超遠心上清中に野生型シュードノット RNA の構造特異的に結合するタンパク質を検出することはできなかった。一方で、5' 側下部ステム変異体に特異的に結合するタンパク質が存在した。細胞溶解液超遠心上清の RNA 結合画分のウエスタン・ブロッティングによると、同定したタンパク質は RNA 結合特異性を十分に有していると考えられる。しかしながら、リコンビナントタンパク質を用いた実験においては RNA 結合性が確認できておらず、翻訳フレームシフトへの影響に対する検証が不十分である。

E. 結論

本研究においては野生型アンチザイム・シュードノット RNA に特異的に結合するタンパク質を確認することはできなかったが、アンチザイム・シュードノットの 5' 側下部ステムの変異体に結合するタンパク質を同定した。このタンパク質は、翻訳中のリボソームがフレームシフト部位に到達する際に部分融解されたシュードノット構造に結合する可能性を示唆しており、非常に興味深い結果である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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; 281(7): 3995-4001.

2) 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.

3) Isome M, Lortie MJ, Murakami Y, Parisi E, Matsufuji S, Satriano J. The antiproliferative effects of agmatine correlate with the rate of cellular proliferation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2007 Aug; 293(2): C705-11.

4) Tanaka Y, Osaka T, Hattori A, Murakami Y, Matsufuji T, Matsufuji S, Shinkawa T, Isobe T, Mizutani T. Soluble Liver Antigen/Liver and Pancreas, an Antigen in Autoimmune Hepatitis Patients: Influence on Selenocysteine Synthesis and its Complex with HSP70.

J. Health Sci. 2007; 53(6) 682-691.

2. 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 へアピニ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

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 の探索. 第 8 回日本 RNA 学会年会. 7 月 淡路

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

4) 堀谷学、Howard MT、Atkins JF、村井法之、松藤千弥. 部分融解したアンチザイム・シュードノットを認識する RNA 結合タンパク質. 第 9 回日本 RNA 学会年会. 7 月 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

3. 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

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 講師

研究要旨：当院で超音波内視鏡下穿刺吸引細胞・組織診を行なった32例中29例で細胞もしくは組織採取が可能（90.6%）であり、採取組織の正診率は92.9%、悪性疾患を鑑別する感度・特異度は80%、100%であった。29例中14例で細胞診のみならず組織診が可能であり、CD147の免疫染色を行ったところ、悪性疾患でCD147は細胞膜に良性疾患ではサイトゾルに発現するか程度が弱い傾向がみられた。

A. 目的

超音波内視鏡下穿刺吸引細胞・組織診（EUS-FNA）は、1992年にVillmannらが経消化管的に膵腫瘍を穿刺し、細胞診を行なったことに始まり、欧米では急速に普及した。欧米では、主に癌治療前の細胞組織診断の手法として用いられているが、本邦では保険上の問題、機器の問題等によりEUS-FNAは普及に至っていない。今回、当院におけるEUS-FNAの成績を後向きに検討し、採取した組織のCD147の発現について検討した。

B. 対象と方法

我々は画像診断だけでは確診が得られずEUS-FNAの結果が治療方針を決定し得る疾患・病態をEUS-FNAの絶対適応としている。2005年1月より2007年3月までの期間にEUS-FNAを行なった32例を対象に細胞・組織採取率、良悪性を鑑別する感度・特異度を検討した。また細胞診のみならず組織診が可能な症例にはCD147の免疫染色を行い、その発現について検討した。また、超音波内視鏡にはオリンパス社製GF-UCT240AL5を観測装置にはアロカ社製SSD5000を用い、穿刺針はCook社製ECHOTIP19G、22G、あるいは25G針を用いた。

C. 結果

対象症例32例の内訳は平均年齢58.9±14、男性20例、女性12例であり、最終診断は膵癌6例、肺癌1例、肺癌縦隔リンパ節転移1例、食道癌縦隔リンパ節転移1例、悪性リンパ腫1例、胃GIST5例、胃平滑筋腫5例、

その他の良性疾患12例であった。EUS-FNAによる細胞もしくは組織採取は29例（90.6%）で可能であり、悪性疾患を鑑別する感度・特異度はそれぞれ80%（8/10）、100%（22/22）であった。EUS-FNAに伴う偶発症は認めなかった。29例中14例は細胞診のみならず、組織診が可能であり、CD147の免疫染色を行なった。2例で判定不能であったが、12例でCD147発現の評価が可能であった。Table 1に各疾患のCD147の発現部位を示す。

Table 1: CD147の発現

細胞膜	サイトゾル	陰性	判定不能
肺扁平上皮癌1例	GIST1例	神経鞘腫1例	GIST1例
肺癌1例	平滑筋腫2例	反応性リンパ節1例	平滑筋腫1例
縦隔リンパ節転移2例 (食道癌1例、肺癌1例)			
悪性リンパ腫1例			
膵癌1例			
自己免疫性膵炎1例			
サルコイドーシス1例			

D. 考察

EUS-FNAは高い細胞・組織採取率と、悪性疾患を鑑別するための高い感度、特異度を示し、有用な検査法と思われる。CD147は悪性疾患では細胞膜に発現し、良性疾患ではサイトゾルに発現するか、全く発現しない

傾向があったが、サルコイドーシス、自己免疫性膵炎など自己免疫と関連する疾患では細胞膜に CD147 の発現がみられた。

E. 結論

EUS-FNA は画像診断で確診が得られない疾患の診断法として有用である。EUS-FNA で得られた比較的小さな検体でも CD147 の免疫染色は可能であり、発現部位、程度が臨床度と関連している可能性が示唆された

F. 研究発表

1. 論文発表

今津博雄、田尻久雄．感染性膵壊死、膵膿瘍に対する EUS ガイド下ドレナージ術．胆と膵 27：55－60；2006

2. 学会発表

今津博雄、田尻久雄． EUS-FNA における 25G 穿刺針の有用性－適応拡大の可能性について－ 第73回日本消化器内視鏡学会総会(2007) 東京。

H. 知的財産権の出願状況

なし

4. 消化管腫瘍における CD147 発現の臨床的意義 —食道癌と異形性上皮—

分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師

研究要旨：CD147 を高感度で認識する単クローン抗体(MAb12C3)を用い、臨床摘出標本で食道癌、および食道異形成上皮での CD147 発現を検討した。CD147 発現は、食道癌、食道異形成上皮に認められた。CD147 発現のレベルを比較したところ、Stage III 以上の進行癌では、異形成上皮での CD147 発現が軽度で食道癌での発現に差が見られるものは、予後不良であった。Stage II 以下の食道癌では、両者の発現の差と予後には相関がみられなかった。CD147 を分子ターゲットとして、予後を含む悪性度のリスク評価を行うことが可能となればその臨床的価値は高いと考えられた。

A. 研究目的

平成 17 年度分担研究報告書において我々は、早期食道癌において、CD147 発現が腫瘍の大きさ、深達度に有意な関係が認められていたことを報告した。本研究では、食道癌の前癌病変である食道異形成上皮での CD147 発現を調べ、その臨床的意義を検討する。

B. 研究方法

当院で手術を施行した食道癌症例（101 例）を対象とした。ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製し、食道癌、食道異形成上皮において抗 CD147 抗体（MAb12C3）を用いた免疫組織染色を行い、染色強度パターンを 3 段階（no staining, partial staining, diffuse and strong staining）に分類し検討した。また、染色パターンを数値化（no staining =0, partial staining =1, diffuse and strong staining =2）し、同一症例での数値化した染色パターンの差（食道癌—食道異形成上皮）と予後についての検討を行った。

研究成果

CD147 の発現は、食道癌および食道異形成上皮において認められた。CD147 発現のレベルを比較したところ、Stage III 以上の進行癌では、異形成上皮での CD147 発現が軽度で食道癌での発現強度に差が見られるものは、予後不良であった（図 2）。Stage II 以下の食道癌では、両者の発現の差と予後には相関がみられなかった（図 1）。

C. 考察

我々は、本研究において CD147 発現を指標とした超音波による癌の分子イメージングの対象として早期食道癌の有望性を報告してきた。今回その前癌病変である食道異形成上皮についての CD147 発現について検討した。実際の臨床応用を考えた場合、前癌病変での CD147 発現について検討していくことは必須のものである。今回の検討では、多くの食道異形成上皮においても CD147 発現が認められた。早期食道癌においては、腫瘍の大きさ、深達度と CD147 発現が有意な関係が認められたが、今回の結果より CD147 発現は、悪性度だけでなく、発癌過程についても関連していることが考えられた。CD147 発現のレベルを比較したところ、Stage III 以上の進行癌では、異形成上皮での CD147 発現が軽度で食道癌で高発現となる染色レベルに差が見られるものは、予後不良であった。Stage II 以下の食道癌では、両者の発現の差と予後には相関がみられなかった。つまり、早期癌では、同じ背景粘膜から発生した食道癌、食道異形成上皮の間で CD147 発現にまだ差がみられないが、進行癌になると癌と前癌病変での差が明瞭となり予後と相関する結果が得られた。したがって、今回の結果より CD147 発現は、進行食道癌においても、異形成上皮と比較することにより、悪性度や予後の

指標になりうる可能性が示唆された。さらなる検討を加え本研究によって有望な成果が得られれば、超音波内視鏡を用いることにより食道癌においては、早期癌だけでなく進行癌においても治療方針の決定が容易になる、画期的な臨床応用につながることを期待される。

D. 結論

CD147 発現は、食道癌のみならず食道異形成上皮に認められた。食道癌においては、その診断、治療方針の決定に CD147 が寄与する可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Omura N, Kashiwagi H, Yano F, Tsuboi K, Ishibashi Y, Kawasaki N, Suzuki Y, Mitsumori N, Urashima M, Yanaga K. Prediction of recurrence after laparoscopic fundoplication for erosive reflux esophagitis based on anatomy-function-pathology (AFP) classification. Surg Endosc. 2007; 21 : 427-30.

2) Ueda K, Yamada K, Urashima M, Ishibashi Y, Shirai M, Nikaido T, Takahashi H, Okamoto A, Saito M, Yasuda M, Ohkawa K, Tanaka T. Association of extracellular matrix metalloproteinase inducer in endometrial carcinoma with patient outcomes and clinicopathogenesis using monoclonal antibody 12C3. Oncol Rep. 2007; 17 :731-5.

3) Omura N, Kashiwagi H, Yano F, Tsuboi K, Ishibashi Y, Kawasaki N, Suzuki Y, Matsumoto A, Mitsumori N, Urashima M, Yanaga K. Gastric ulcer after laparoscopic fundoplication for gastroesophageal reflux disease: significance of the eradication of Helicobacter pylori. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech. 2007; 17:193-6

4) Nakayoshi T, Kawasaki N, Suzuki Y, Yasui Y, Nakada K, Ishibashi Y, Hanyu N, Urashima M,

Yanaga K. Epidural administration of morphine facilitates time of appearance of first gastric interdigestive migrating complex in dogs with paralytic ileus after open abdominal surgery. J Gastrointest Surg. 2007; 11:648-54.

H. 知的財産権の出願状況

なし

図 1

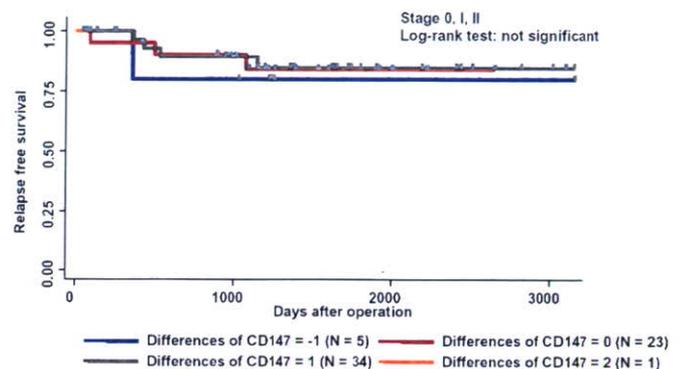
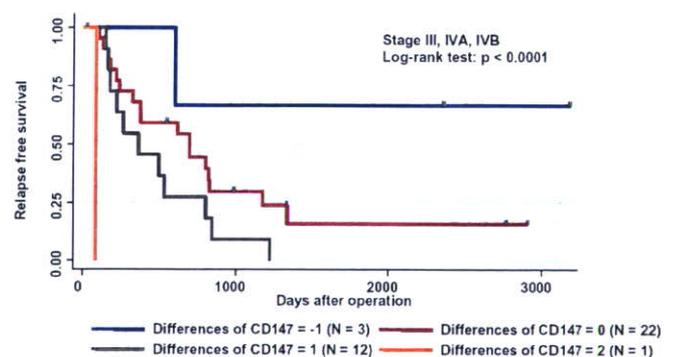


図 2



5. 子宮頸部腫瘍における CD147 発現解析

分担研究者 山田恭輔 東京慈恵会医科大学 講師

協力研究者 上田 和 東京慈恵会医科大学 助教

研究要旨：子宮頸部扁平上皮癌および高度扁平上皮内病変における CD147 の発現を、CD147 を高感度で認識するモノクローナル抗体（MAb12C3）を用いて解析し、臨床病理学的因子や予後との関連性について検討した。子宮頸部腫瘍における CD147 発現は、高率（84.7%）に認められた。その染色強度は統計学的に、SCC 高値例で有意に高く、臨床進行期との相関を認めた。今後、CD147 を分子ターゲットとした子宮悪性腫瘍の診断や治療などへの臨床応用が期待される。

A. 研究目的

CD147 は、matrix metalloproteinase の発現を誘導することにより、癌の浸潤や転移に関与する分子マーカーとして知られている。我々はこれまで、子宮内膜癌における CD147 発現と臨床進行期や組織分化度などの臨床病理学的因子や患者予後との関連について検討し、報告した（Ueda K *et al.*, *Oncol Rep*, 2007）。今回、子宮頸部扁平上皮癌および高度扁平上皮内病変における CD147 発現を解析し、子宮頸癌の発生過程、浸潤・転移における発現の変化および関連性について検討した。

B. 研究方法

当院にて初回治療として外科的手術を施行した子宮頸部腫瘍症例計 72 例（子宮頸部扁平上皮癌 61 例、高度扁平上皮内病変 11 例）を対象とした。ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製し、HE 染色および CD147 認識モノクローナル抗体 MAb12C3 で免疫染色を行い、検討した。

C. 研究結果

CD147 は、正常扁平上皮では基底細胞や旁基底細胞に発現を認めるものの、中・表層細胞には発現を認めなかった。それに対し、子宮頸部腫瘍では 72 例中 61 例（84.7%）の腫瘍細胞表面に発現し、高度扁平上皮内病変の段階より高い発現率を示した。

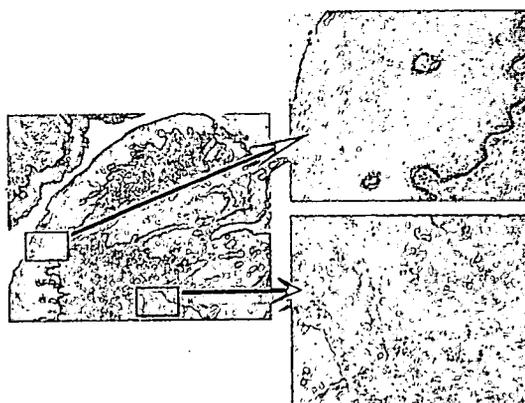


図 1：子宮頸部組織（扁平上皮癌）

統計学的にも、その染色強度は SCC 高値例で有意に高く（ $p=0.01$ ）、臨床進行期との相関を

認めた ($p < 0.01$)。また、リンパ節転移陽性例の転移巣における CD147 発現は、原発巣と同様の発現であった。

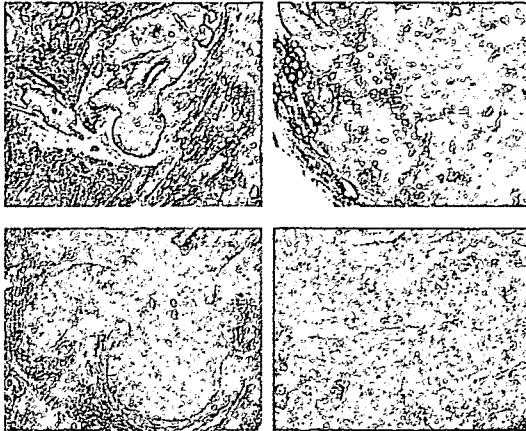


図 2：リンパ節転移陽性例
(左：原発巣 右：転移巣)

D. 考察、E. 結論

子宮頸部腫瘍組織において CD147 が高率に発現していることが明らかになった。その染色強度は臨床進行期との相関を示しており、諸家の報告同様、腫瘍浸潤に関与することが確認された。また、高度扁平上皮内病変組織においても高い発現率を示し、腫瘍の浸潤・転移以外の、子宮頸癌の発生段階におけるメカニズムに関与する因子である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueda K, Yamada K, Urashima M, Ishibashi Y, Shirai M, Nikaido T, Takahashi H, Okamoto A, Saito M,

Yasuda M, Ohkawa K, Tanaka T. Association of extracellular matrix metalloproteinase inducer in endometrial carcinoma with patient outcomes and clinicopathogenesis using monoclonal antibody 12C3. *Oncol Rep*, 17: 731-735, 2007

- 2) Takakura S, Saito M, Ueda K, Motegi M, Takao M, Yamada K, Okamoto A, Niimi S, Sasaki H, Tanaka T, Ochiai K.. Irinotecan hydrochloride (CPT-11) and cisplatin as first-line chemotherapy after initial surgery for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Int Surg*, 92:202-208, 2007

2. 学会発表

- 1) 第 59 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会. 平成 19 年 4 月 14-17 日、京都
- 2) 第 66 回日本癌学会学術総会. 平成 19 年 10 月 3-5 日、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

6. 新規界面活性剤の安全性・毒性の検討 動物実験のためのマウスCD147認識抗体の作製

分担研究者 日下部守昭 財団法人動物繁殖研究所 主席研究員

研究要旨：本研究事業における分担課題として「動物実験系の開発」が主な課題であり、そのため以下の研究を実施した。①動物腫瘍モデルの開発、②バブル材料である界面活性剤の生体への影響、及び③CD147のマウス組織内分布の免疫組織学的解析を行なった。

A. 研究目的

1. 動物腫瘍モデルの開発：癌におけるCD147の発現の強弱は癌の分化度や癌の種類によって様々である。その理由は、癌の浸潤・転移過程においてその周囲の間質細胞との相互作用が大きな影響力を持っており、癌の成長に必要な分子の遺伝子発現に多大な影響を持っていると考えられるからである。そのため、*in vivo*実験系においては、癌の種類とホストの関係が重要であるので、ヒト癌細胞移植系及びマウス腫瘍を用いた腫瘍実験系の開発を目的に基礎的解析を行った。

2. 界面活性剤の生体への影響：マイクロバブル作成の材料として検討されているシクロアミロース修飾界面活性剤と重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の生体への影響を検証することである。

3. CD147のマウス組織内分布の免疫組織学的解析：12C3抗体は、ヒト特異的であるので、ヒト癌を移植したマウスにおけるイメージングは特異的に可能となるが、マウス組織のCD147のイメージングへの影響が不明である。そのため、マウス組織におけるCD147の組織発現を解析し、腫瘍のイメージングにおける周囲組織のCD147のイメージングへの影響を検討した。

B. 研究方法

1.1. ヒト癌細胞の移植による腫瘍動物モデル系の開発：

① 移植に用いるヒト癌細胞株におけるCD147の

発現を、ALEXA488標識抗CD147単抗体12C3を用いた免疫染色によって検討した。

② 性質の違う癌細胞を用いた移植モデル：シスプラチンに対する感受性の違う卵巣癌細胞2008（感受性細胞）およびC13/2008（耐性細胞）を正常ヌードマウスおよびテネイシン欠損ヌードマウスの背部皮下にそれぞれ移植して、固形腫瘍を形成させ、そのテネイシンの発現を免疫組織学的に解析した。

1.2. マウス転移腫性瘍細胞の移植による腫瘍動物モデル系の開発：腫瘍の浸潤・転移などの病態の経過観察ばかりでなく、転移巣などの検出やどのくらいの大きさの腫瘍であれば生体内で検出できるのかを検証できる腫瘍動物モデルの開発が重要である。そのため、マウス乳癌細胞株を背部皮下に移植した。4週後、肺や肝臓に転移した転移腫瘍を病理組織学的に解析した。

2. 界面活性剤の生体への影響：界面活性剤を静脈内に投与し、各種血清生化学検査及び病理組織学検査によって影響を検討した。以下の界面活性剤を用いた。

- ① シクロアミロース修飾界面活性剤
- ② タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤
- ③ SDS水溶液
- ④ シクロアミロース修飾界面活性剤
- ⑤ シクロアミロース修飾界面活性剤(30%グリセリン)