

業績紹介：遠隔ループ変異がおよぼす構造安定性および活性変調に対する干渉効果

楯 真一

(広島大学理学研究科・A02 公募研究代表者)

論文題目："Coupling effects of distal loops on structural stability and enzymatic activity of Escherichia coli dihydrofolate reductase by deletion mutants"

著者：Yuji Horiuchi, Eiji Ohmae, Shin-ichi Tate, and Kunihiko Gekko

雑誌巻号：Biochim. Biophys. Acta, **1804**, 846-855 (2010)

タンパク質の構造揺らぎと機能との関係を解析するには、タンパク質の構造を大きく変化させずにその揺らぎのみを変化させる試料上の工夫が必要である。私たちの研究グループでは、タンパク質の立体構造形成には大きな寄与をしないと考えられる構造柔軟性を持つループ部の変異が、構造安定性・機能変調に影響を与えるという現象を様々な変異体を使って解析してきた。また、異なるループ部に同時に変異を導入した二重変異体を用いた実験では、2つの変異の影響が、多くの場合は加算的ではなく相互に干渉して非加算的效果をおよぼすことを見いだしている。

ループ変異間での干渉は、遠隔位置にあるアミノ酸残基が機能上や構造安定化の上で、相互に依存し合っていることを示す。ループ部の二重変異が立体構造に大きな摂動を与えないことは、変異によりわずかな CD スペクトル変化しか観測されないことから示される。したがって、遠隔位置にある変異の影響が相互に干渉するには、立体構造の変化ではなく、タンパク質構造に内在する揺らぎの変化が主に関与していると考えられる。この事実から私たちは、ループ変異が、タンパク質構造の揺らぎをかなり選択的に変化させる試料を提供すると考え、揺らぎと機能の関係を解明する対象として利用している。研究プロジェクトではループ変異が実際のどのような揺らぎの変調を誘導するかを NMR による定量的な解析を進めている。同時に、様々なパターンのループ変異体の特性解明も進めており、揺らぎと機能の相関を解析する新たな対象の探索も進めている。今回紹介する論文は、新たなタイプのループ変異体に関する特性についての報告である。

この研究では、*E. coli* 由来のジヒドロ葉酸還元酵素

(DHFR)を対象とし4つのループに対して欠失変異(Δ52, Δ67, Δ121, Δ145)を導入した時の構造安定正・酵素活性パラメーターに対する影響を調べた(図1)。

また、二重欠失変異の影響も解析した。

尿素による変性自由エネルギー変化を1つの欠失変異の場合と二重欠失変異の場合とで比較した結果の一部を示す(図2)。

特に興味深いのは Arg52 に対する欠失変異体である。

尿素変性に対する自由エネルギー変化の大きさから、Δ52 変異体は野生体よりも立体構造が安定になる性質があることが分かる。Δ67 変異が立体構造を不安定化するのに対して、Δ52/Δ67 二重変異体ではΔ52 の構造安定化効果が作用するようΔ67 単独変異体よりも逆に立体構造が安定化するという効果が観測された。

活性に関しては、Δ52 は K_m が2桁ほど野生体よりも悪くなるために酵素活性として野生体よりも低下するが、興味深いことに k_{cat} は、野生型の約3倍に向上している。Δ67 変異体では K_m の低下は顕著ではないが、 k_{cat} は野生体の約半分になる。Δ52/Δ67 二重欠損変異体の酵素活性は、Δ67 変異体より低下するが、その低下の程度は非加算的である。特に興味深いことに、二重変異体の k_{cat} はΔ67 変異体よりも向上するが、Δ52 変異体の 1/3 程度の値にしかならない。2つの変異が酵素反応過程で相互干渉していることが分かる。

この一連のデータからも異なるループ変異の様々な相互干渉が観測されるが、それがどのように揺らぎの変調と関連するかが興味深い。今後順次解析を進める。

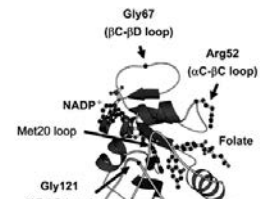


図1：DHFR の立体構造と変異点

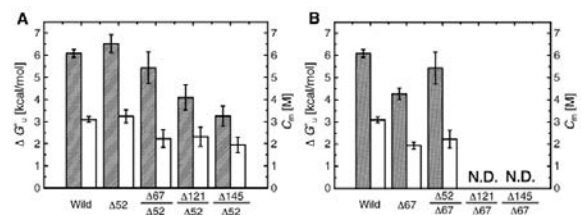


図2：欠失変異体の変性自由エネルギー変化の比較

業績紹介：ハイブリッドリポソームのアポトーシス誘導による胃がん治療

上岡龍一

(崇城大学応用生命科学・A03計画研究代表者)

論文題目："Therapeutic effects of hybrid liposomes on gastric carcinoma involve apoptosis "

著者：Hideaki Ichihara, Yusuke Matsuoka, Yoko Matsumoto, and Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Anticancer Res., 30, 2011–2016 (2010)

筆者らが創製したハイブリッドリポソーム (HL) は [1]、従来の制がん剤なしに HL のみで種々のヒトがん細胞に対し増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導することが明らかになっている [2]。in vivo において、担がんマウスを用いた治療実験から延命効果が得られ [3]、正常動物を用いた安全性試験で副作用が無いことが確認されている [4]。生命倫理委員会承認後の悪性リンパ腫患者に対する臨床試験において、高い安全性および延命効果が得られている [5]。

本研究では、in vitro におけるコトナラット胃がん (CoRa 622 G6) 細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムと in vivo における胃がんの腹膜播種マウスモデルに対する HL の治療効果を検討した。以下に結果を示す。

①HL は、直径約 100 nm の均一なベシクルであることが観察された。動的光散乱法からは、1 ヶ月以上安定であることが明らかとなった。すなわち、HL は細胞内皮系への取り込みが回避可能な膜直径であり、長期間安定で、臨床応用における保存に有用であることが明確となった。

②in vitro における胃がん細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムの解析から、アポトーシスシグナルとして最も重要なカスパーズ-3, -8, -9 を活性化していることが明らかとなった。また、ミトコンドリアの関与を検討した結果、HL 処理した CoRa 622 G6 細胞でミトコンドリアの膜電位の低下が観察されたことから、アポトーシス誘導にミトコンドリアが関与していることも明らかにした。HL の制がんメカニズムは、HL が CoRa 622 G6 細胞膜に融合・蓄積後、ミトコンドリアおよびカスパーズ-3, -8, -9 を経由するアポトーシス誘導である可能性を明らかにした。

③ヌードマウスに CoRa 622 G6 細胞を腹膜移植し、胃がん腹膜播種モデルマウスを作成後、HL の制がん効果およびアポトーシス誘導について検討した。HL

投与群 (Dose 136 mg/kg および 203 mg/kg) では、未治療群と比べ、腫瘍結節数および腹水量に顕著な減少がみられ、高い治療効果を示した (図 1)。また、未治療群に対する HL 投与群の延命率は、Dose 136 mg/kg では 135%以上 ($p<0.05$)、Dose 203 mg/kg では 145%以上 ($p<0.01$) であり、高い延命効果が得られた。次に、アポトーシス誘導について検証するため、腫瘍採取後、TUNEL 染色した腫瘍組織切片を観察した。その結果、HL 投与群 (Dose 136 mg/kg および 203 mg/kg) において、アポトーシス誘導に伴う DNA 断片化が明らかになった。すなわち、HL が、胃がん腹膜播種モデルマウスに対して、アポトーシス誘導による顕著な治療効果および延命効果を示すことを明確にした。

以上のように、胃がんの腹膜播種に関して、HL のみによる副作用のない顕著な治療効果が動物レベルで確認されたことから、臨床応用が期待できる。

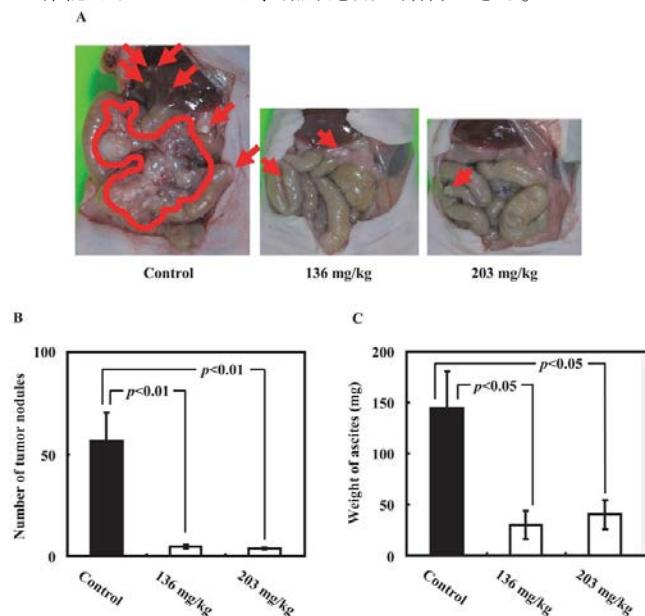


図 1. 胃がん腹膜播種モデルマウスに対する HL の治療効果

A: 腹腔内写真、B: 腫瘍数、C: 腹水量
HL 治療群は未治療のコントロール群と比較して、腫瘍数および腹水が、顕著に減少した。

参考文献

- [1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988). [2] Y. Matsumoto et al., *Int. J. Cancer*, **115**, 377-382 (2005). [3] R. Ueoka et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262-1263 (2000). [4] H. Nagami et al., *Int. J. Pharm.*, **315**, 167-172 (2006). [5] H. Ichihara et al., *Anticancer Res.*, **28**, 1187-1196 (2008).

業績紹介：ハイブリッドリポソームの白血病細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムへの脂質ラフトの関与

上岡龍一

(崇城大生物生命・A03 計画研究代表者)

論文題目："Clustering of lipid rafts in plasma membranes by hybrid liposomes for leukemia cells along with apoptosis"

著者：Yuji Komizu, Sayuri Nakata, Koichi Goto, Yoko Matsumoto, and Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Chem. Lett., **39**, 1291–1293 (2010).

ハイブリッドリポソーム (HL) は、種々の培養がん細胞に対して、細胞レベルおよび動物レベルでがん細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを示した。患者様へのインフォームド・コンセントを経て、生命倫理委員会承認後の臨床応用では、副作用が無く、リンパ腫の縮小効果を得ている。

ヒト白血病 (HL-60) 細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムに関し、Fas (デスレセプター) およびミトコンドリアを經由して、核にアポトーシスシグナルが伝わり細胞死を誘導することが分かっている。しかし、細胞膜構造変化についての影響は分かっていた。

一方、脂質ラフトは、コレステロール、スフィンゴ脂質、ガングリオシド (GM₁) を多く含み、細胞膜上で脂質ドメインを形成している。近年、ラフトは、細胞膜上でシグナル伝達のプラットフォームとして働き、膜の構築そのものが機能をもつことが示唆されている。特に、アポトーシス誘導シグナル分子とラフトとの関わり合いが注目を集めている。

本研究では、リン脂質 (DMPC) および PEG 系界面活性剤 C₁₂(EO)₂₃ からなるハイブリッドリポソーム (HL-23) を用い、ハイブリッドリポソームのヒト白血病 (HL-60) 細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムへのラフトの関与について *in vitro* で検討した。

ハイブリッドリポソームは、HL-60 細胞に対して、アポトーシスを誘導することが明らかになった (図 1)。次に、ハイブリッドリポソーム細胞膜への融合・蓄積を蛍光脂質含有ハイブリッドリポソーム (HL/NBDPC) を用い検討した。HL/NBDPC は、短時間で HL-60 細胞膜に集積することが分かった (図 2)。

脂質ラフトに多く存在する GM₁ を蛍光標識コレラトキシン B (赤) で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、未処理の白血病細胞は、均一な膜構造を示した (図 3, Control)。一方、HL-23 を処理した白血病細胞では、膜構造が大きく偏り、脂質ドメイン (GM₁) のクラスター形成が観察された (図 3, Treatment)。

以上の結果より、ハイブリッドリポソームは、白血病細胞に対して、細胞膜上で脂質ラフトのクラスターを形成し、アポトーシスシグナル伝達を活性化させることが初めて明らかになった。現在、詳細な脂質ラフトのシグナル伝達機構について検討している。

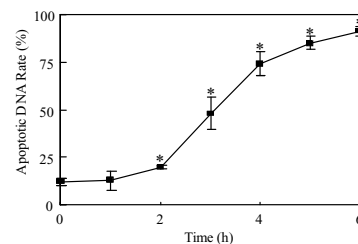


図1 HL-23の白血病 (HL-60) 細胞に対するアポトーシス誘導

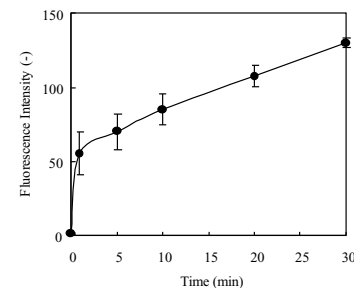


図2 蛍光脂質含有HL-23の白血病 (HL-60) 細胞に対する短時間での融合・蓄積

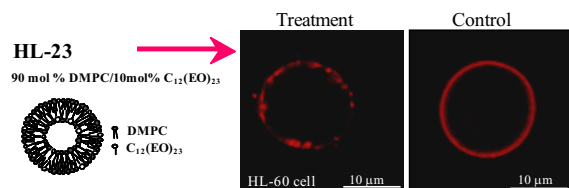


図3 HL-23の白血病 (HL-60) 細胞膜における脂質ラフトのクラスター形成
処理時間：10 min

業績紹介：蛍光脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト肺がん細胞に対する

特異的蓄積と制がん効果

上岡龍一

(崇城大学応用生命科学・A03計画研究代表者)

松下 琢

(崇城大学応用生命科学・A03公募研究代表者)

論文題目："ハイブリッドリポソームの肺がん細胞への特異的蓄積と制がん効果"

著者：行原真美子, 古水雄志, 田上修, 松下琢, 松本陽子, 上岡龍一

雑誌巻号：薬学雑誌, **130**, 1581-1587 (2010)

ハイブリッドリポソーム (HL) は、リン脂質と界面活性剤を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで容易に得られる生体適合性の医用素材であり[1]、これまでに、*in vitro*において種々の培養がん細胞に対する制がん効果および制がんメカニズムが明らかになっている[2]。また、*in vivo*において、担がんモデル動物に対する治療効果および正常動物に対する安全性が確認されており、さらに、生命倫理委員会の承認後、臨床応用において副作用がなく、固形リンパ腫瘍の顕著な縮小効果が得られている[3]。

本研究では、肺がんの約85%を占め、抗がん剤が効き難いと言われている非小細胞がん (NSCLC) に焦点を合わせ、リン脂質 (DMPC) と PEG 系界面活性剤 [C₁₂(EO)₂₃] からなる HL-23 および HL に蛍光脂質 (NBDPC) を組み込んだ蛍光脂質含有 HL (HL-23/NBDPC) の肺がん細胞に対する融合・蓄積、増殖抑制効果およびアポトーシス誘導について検討した。以下に結果を示す。

(1) HL-23/NBDPC を種々の肺がん細胞 (A549, H460, H23, H520) および正常肺細胞 (WI-38, NHLF, HMVEC-L) に添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて3時間観察した。肺がん細胞には HL-23/NBDPC の強い蛍光が観察されたが、正常肺細胞には極めて弱い蛍光しか観察されず (図)、HL-23/NBDPC が肺がん細胞に選択的に融合・蓄積することが明らかとなった。

(2) 肺がん細胞および正常肺細胞の膜流動性を蛍光偏光解消法により測定した結果、肺がん細胞の膜流動性は正常肺細胞よりも高いことが明らかになり、

HL-23/NBDPC の肺がん細胞への蓄積は、細胞膜の流動性が関与している可能性が高いと考えられる。

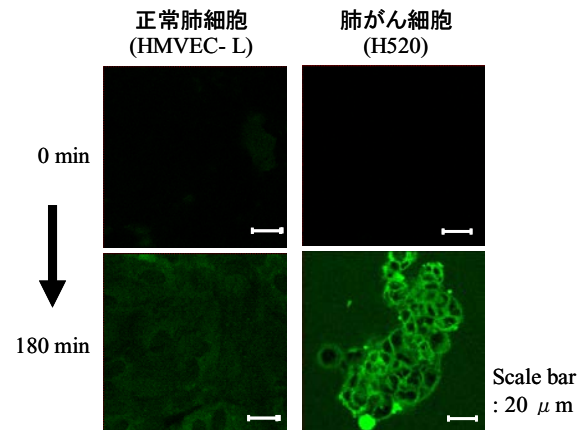


図. HL-23/NBDPCの肺がん細胞への特異的融合・蓄積

(3) HL-23 の種々の肺がん細胞に対する IC₅₀ 値を WST-1 assay により検討した結果、DMPC 単一リポソームの IC₅₀ 値の約 1/2 であった。種類の異なる肺がん細胞に対し、HL-23 が DMPC 単一リポソームより顕著に高い増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

(4) HL-23 が各種肺がん細胞に対して誘導する細胞死について、Annexin-V binding assay を用いて検討した結果、7~11 時間後に Annexin-V-Fluorescein の緑色蛍光のみが観察され、初期のアポトーシス誘導が明らかとなった。また、TUNEL assay の結果、HL-23 処理 48 時間後に、すべての細胞において TUNEL 陽性を示す緑色蛍光が観察され、DNA の断片化が確認された。以上の結果より、HL-23 は肺がん細胞に対しアポトーシスを誘導することが初めて明らかとなった。

以上のように、HL-23 は非小細胞がんに対し選択的に融合・蓄積し、アポトーシスを誘導することにより顕著に大きな増殖抑制効果を示すことが明らかになった。今後、肺がんの新しい治療薬として期待される。

参考文献

- [1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988). [2] Y. Matsumoto et al., *Int. J. Cancer*, **115**, 377-382 (2005). [3] H. Ichihara et al., *Anticancer Res.*, **28**, 1187-1196 (2008).

業績紹介 : 22-oxa-dihydroxyvitamin D3 の胆管細胞癌に対する有効性についての検討

岡田誠治

(熊本大学エイズ研・A03 公募研究代表者)

論文題目 : "22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D3 efficiently inhibits tumor growth in inoculated mice and primary histoculture of Cholangiocarcinoma"

著者 : Wunchana Seubwai, Chaisiri Wongkham, Anucha Puapairoj, Seiji Okada, and Sopit Wongkham

雑誌巻号 : *Cancer* **116** (23), 5535-5543 (2010)

胆管細胞癌 (Cholangiocarcinoma ; CCA) は、胆管上皮から生じる悪性腫瘍である。CCA は初期診断が困難であり、発見時には多くは進行癌で手術不能であり、化学療法も有効なものはないことから、予後不良の疾患である。タイ東北部は、肝吸虫の持続感染を起因とする CCA の好発地域であり、大きな社会問題となっている。

Vitamin D3 は、カルシウムのホメオスタシスに必須のビタミンであるが、活性化型 Vitamin D3 は、乳癌や大腸癌などにおいてその細胞増殖を制御していることが知られている。Vitamin D3 は、高カルシウム血症を起こすため、臨床応用は限られていたが、最近、高カルシウム血症が生じにくい誘導体 22-oxa-dihydroxyvitamin D3 (22-Oxa-D3) が市販された。本研究では、CCA 細胞株をマウスに移植したマウスモデル系と CCA の初代培養系を用いて 22-Oxa-D3 の CCA に対する有効性を検討した。

MTT 法により CCA 細胞株 (M213, M214) が 22-Oxa-D3 添加により細胞増殖が抑制されることが判明した。FACS を用いた解析では、細胞周期の停止が認められ、Western blot 法により p21 の増加と Cyclin D1 の減少が認められた。そこで、高度免疫不全マウス (NOJ マウス) [1] に CCA 細胞株を移植した CCA マウスモデルに 22-Oxa-D3 (15 µg/kg/day) を 17 日間腹腔内投与し、その in vivo における有効性を検討した。その結果、M213, M214 いずれを移植したマウスにおいても腫瘍の縮小が認められた。また、血清中カルシウムの増加などの副作用は認められなかった。移植した腫瘍の免疫組織染色及び Western blot 法解析では、22-Oxa-D3 投与群において Vitamin D 受容体増加、p21

増加と Cyclin D1, PNCA の減少が認められた。そこで、CCA の初代組織培養系を樹立し、22-Oxa-D3 を添加したところ、TUNEL 法によりアポトーシス細胞の増加が認められた。

以上の結果より、22-Oxa-D3 が胆管細胞癌の有効な治療薬となり得ることが示唆された。この結果を受けて、コンケン大学において 22-Oxa-D3 の臨床試験が開始されている。

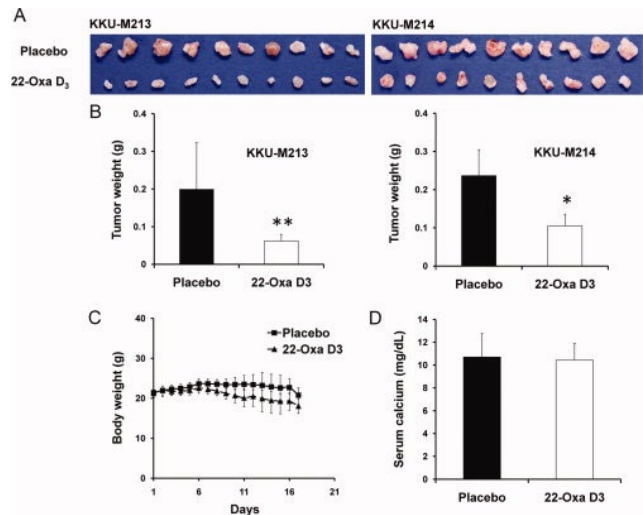


図 1 . CCA 細胞株移植マウスモデルにおける 22-Oxa-D3 の有効性. A.B. 22-Oxa-D3 投与により M213, M214 いずれにおいても腫瘍増殖抑制が認められた。また、体重減少(C)や血清中カルシウムの増加(D)などの副作用は認められなかった。

参考文献

[1] S. Okada et al., *Int. J. Hematol.* **88**, 476-482 (2008).

本研究は、タイ国 Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (RGJ) と日本学生支援機構 (JASSO) の支援により、Wunchana Seubwai 氏 (コンケン大学医学部医学博士課程学生) が、熊本大学に一年間滞在して行った研究をまとめたものである。