

平成21年度自治医科大学大学院医学研究科 研究奨励賞研究成果報告

間葉系幹細胞の腫瘍集積メカニズムの解明および新規癌治療法の開発

人間生物学系専攻3年 内堀 亮介

【目的】

間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) は腫瘍に集積する性質を有するため、腫瘍局所に治療用遺伝子を送達するための細胞性担体としての利用が期待されている。MSC を癌治療に利用する際には、治療遺伝子を搭載した MSC の腫瘍への遊走・集積一連の過程が順調に進行するかどうか治療の成否を決定する大きな要因となる。MSC が腫瘍に集積する分子機構として、TNF- α 刺激により MSC の血管内皮への接着性が亢進していることを見出した。そこで、腫瘍局所における TNF- α の発現を誘導することにより MSC の腫瘍集積性を高められると考え、血管破壊剤 (DMXAA: 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid) の作用に着目した。DMXAA は腫瘍血管を破壊する効果を持つ低分子化合物であるが、腫瘍局所における TNF- α の産生を誘導することが明らかになっている。本研究では、DMXAA の投与により MSC の腫瘍集積性が増強されるかどうか検証した。

【方法および結果】

In vitro において DMXAA の作用を解析したが、MSC の生存や遊走活性、あるいは腫瘍細胞の増殖への影響は認められなかった。担癌マウスに DMXAA を腹腔内投与すると、腫瘍組織の TNF- α 産生が認められた。しかし、肝臓、脾臓、血清などさまざまな組織でも TNF- α の上昇が認められ、DMXAA は全身性に作用していた。DMXAA を投与した担癌マウスの左心室腔内からルシフェラーゼ発現 MSC を投与して、生体イメージング装置で MSC の腫瘍集積を経時的に評価した。DMXAA 非投与群では腫瘍部位の発光が日数の経過とともに増加し、

MSC の集積が認められた。DMXAA 投与群では腫瘍部位での発光だけでなく、さまざま部位において強い発光が認められた。

【考察】

本研究では、DMXAA の投与により TNF- α が全身性に増加してしまい、腫瘍以外の組織への非特異的な集積が認められるなど、逆に腫瘍集積性が低下してしまった。これらの結果から、TNF- α による MSC の活性化は腫瘍局所で生じていると推察される。今後の課題は、腫瘍局所の TNF- α 産生を特異的に増加させる薬剤の探索やシステムの構築である。

新しい分子イメージング手法を用いた心筋収縮に関わるシグナル伝達の研究

地域医療学系専攻3年 木村まり子

目的

Integrin-linked kinase (ILK) -Akt/PKB シグナル伝達経路は、細胞骨格の形成や細胞の生存に深く関わっており、心肥大や心筋症といった心疾患や腫瘍との関連が報告されている。その経路の上流には ILK, Parvins, PINCH からなるタンパク質三者複合体が存在し、心筋収縮においては、ILK と β -parvin の結合が重要と考えられている。

細胞内シグナル伝達は、タンパク質分子間相互作用やタンパク質のリン酸化などを介して行われている。近年、光のプローブを機能的に分割して再統合させることにより、タンパク質分子間相互作用を可視化する新たなイメージング手法が開発され、ハイスループットアッセイなどへの応用が期待されている。

本研究では、発光や蛍光プローブを機能的に分割して再統合するイメージング手法を用いて、ILK, β -parvin, Akt1 のタンパク質分子間相互作用を可視定量することでその相互作用

の特性を観察するとともに、ILK-Akt シグナル伝達経路における β -parvin の役割を明らかにし、心筋収縮に関わる調節因子としての可能性を探っていく。

方法

目的とするタンパク質に蛍光や発光プローブの断片を付け、タンパク質分子間相互作用の存在によって2つのプローブ断片を再統合させるという分子イメージング法 (complementary method) を構築する。ILK, β -parvin, PINCH1, Akt1の各タンパク質分子間相互作用を上述の complementary method で確認し、ホタルルシフェラーゼの発光プローブを用いた系で、目的とするタンパク質分子間相互作用がシグナル刺激を加えた様々な条件下でどのように変化するかを、ホタルルシフェラーゼの発光量を指標に定量する。さらに siRNA を用いて β -parvin をノックダウンし、ILK-Akt/PKB シグナル伝達経路の下流にある HIF-1 α や VEGF の発現量の変化を観察する。

結果

分割型発光プローブを用いて、生細胞におけるタンパク質分子間相互作用を可視化するという分子イメージング手法を構築し、 β -parvin と Akt1 の新たなタンパク質分子間相互作用を発見した。増殖因子刺激により、 β -parvin と Akt1 のタンパク質分子間相互作用による発光量が増加した。培養心筋細胞において β -parvin をノックダウンすると、下流にある転写因子 HIF-1 α の安定化と VEGF 発現増加を認めた。この β -parvin のノックダウンによる HIF-1 α と VEGF の発現変化は、ILK の存在下で起こることを確認した。

結論

β -parvin は、ILK-Akt/PKB シグナル伝達経路において抑制的に働くと考えられ、心筋収縮に関わる調節因子となる可能性があることが示唆された。

第VIII因子遺伝子正常化による血友病A遺伝子細胞療法の基礎検討

地域医療学専攻4年 柏倉 裕志

1. 背景・目的

血友病は難治性の出血性疾患であり、欠乏する凝固因子製剤を輸注する補充療法が主体である。補充療法における様々な問題を解決し、患者のQOLを向上させ根本的治療へとつながる治療法として遺伝子治療が期待されている。導入遺伝子による挿入変異の問題を回避する治療法として、本研究では、血友病Aに対する遺伝子正常化自己細胞療法を目標とし、血友病Aの原因である第VIII因子 (FVIII) 遺伝子の異常 (変異) を正常化させ、正常化細胞の移植により血友病A遺伝子細胞移植療法が確立できるかを検討した。

2. 方法

遺伝子を正常化させる遺伝子の正常化は、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を選択し、野生型 MSC での FVIII 発現細胞への分化誘導と発現の確認、マウスへの移植が可能かを検討した。遺伝子異常の正常化は、相同組み換えと Cre-loxP システムによって正常化する *ex vivo* 法で検討した。

3. 結果・考察

FVIII 遺伝子ターゲティングベクターを *FVIII-KO/MSC* へ導入し、薬剤セレクションを行ったところ、薬剤耐性コロニーが得られ、PCR によるスクリーニング陽性の遺伝子組換え体コロニーがいくつか得られた。しかし、サザンブロットによる陽性シングルコロニーは得られなかったため、相同組換え効率の上昇などを含めた更なる検討が必要である。野生型 MSC を VEGF 存在下で培養することにより、VWF と FVIII が発現する血管内皮細胞様の細胞へ分化することが確認され、正常な MSC での FVIII 発現による治療の可能性が示唆された。EGFP を遺伝子導入した野生型 MSC を肝障害マウスへ腸管脈静脈経路で細胞移植を検討したところ、GFP 陽性の肝実質細胞や血管内皮細胞が数ヶ月にわたり肝臓に検出された。さらに、野生型 MSC を *FVIII-KO* マウスへ移植すると、血漿中

FVIII活性の上昇が確認された。MSCはFVIIIを発現する肝細胞や血管内皮細胞へ分化可能であり、野生型(正常な)MSCの移植によりFVIIIが上昇したことから、血友病Aに対する遺伝子正常化細胞療法の可能性が示唆された。

ポリアミンによる、ヒトリンパ球 LFA-1発現抑制メカニズムの解明

地域医療系専攻4年 加納 良彦

我々は、癌患者で増加するポリアミンが末梢血単核球の炎症性サイトカインの産生抑制や、lymphokine activated killer (LAK) 活性の抑制に関わっていることを報告し、ポリアミンが Leukocyte function associated antigen 1 (LFA-1) の発現を選択的に抑制し、細胞接着能などの機能をも抑制することを発見した。このポリアミンによる LFA-1発現抑制のメカニズムに関して、ポリアミンの合成にメチルドナーである S-adenosylmethionine (SAM) が関わっていることに着目し、Jurkat 細胞をポリアミン合成阻害薬 DFMO とともに培養して細胞内ポリアミン濃度を低下させた細胞と、それに細胞外からポリアミンの一つであるスペルミンを加えて培養した細胞を用いて、LFA-1の発現の差を FACS フローサイトメトリーにて、LFA-1遺伝子プロモーターのメチル化パターンの差をバイサルファイトシークエンスにて検討した。DFMOを加えてポリアミン合成を阻害した Jurkat 細胞では CD11a の発現が増強し ($111.38 \pm 3.94\% p < 0.0001$)、この細胞にスペルミンを添加して培養したところ、CD11a の発現は低下 ($94.87\% \pm 3.93\% p = 0.0002$) した。DFMO で処理した細胞を SAM の脱炭酸化酵素阻害剤である MGBG を含む培養液で培養したところ、CD11a の発現が抑制された ($94.87 \pm 5.49\% p = 0.0068$)。さらに、培養液に SAM を添加した細胞では CD11a の発現は DFMO で処理した細胞より低下した ($p = 0.0001$)。DFMO を加えた培養液で培養した Jurkat 細胞の Dnmt 活性は、培養液のみで培養した細胞に比べ低下 ($p = 0.0291$) し、DFMO とスペルミンを混じた

培養液で培養した細胞の Dnmt 活性は DFMO のみを加えた細胞に比べ、明らかに高くなった ($p = 0.0012$)。ITGAL のプロモーター領域のメチル化パターンを比較検討したところ、転写開始領域より 1120bs と 1189bp に存在する CpG において、スペルミンの添加によってメチル化が 20% 以上増加することがわかった。スペルミンによる LFA-1発現の抑制が、癌患者において LAK 活性などの細胞性免疫機能を低下させるメカニズムの一つであり、その機序のひとつとしてポリアミンによる ITGAL プロモーター領域のメチル化が関わっている可能性が示唆された。

キーワード: ポリアミン, LFA-1, メチル化, S-adenosylmethionine

ランニングタイトル: ポリアミンによる、ヒトリンパ球 LFA-1発現抑制メカニズムの解明

間葉系幹細胞の免疫抑制能に関する研究

～移植片対宿主病の治療への応用に向けて～

地域医療学系専攻4年 多々良礼音

1. 背景

造血幹細胞移植における致死の合併症として、移植片対宿主病が知られている。治療には各種免疫抑制剤が用いられるが、治療抵抗症例に対する標準的治療法は確立していない。最近注目されているのが、細胞療法である間葉系幹細胞 (MSC) の投与である。ヨーロッパにおける phase II study では、奏効率は 70% にのぼり、長期完全寛解例も報告されている。しかしその一方で、MSC による免疫抑制能のメカニズムについては、現在も諸説入り乱れており確立していない。そこで、MSC の免疫抑制メカニズムの解明を目的として、Th17, Treg 分化に及ぼす MSC の影響について検討した。

2. 方法

B6マウス脾細胞より純化した CD4陽性 T 細胞、あるいはナイーブ CD4細胞を CFSE で標識した後、MSC 非共培養群と共培養群の 2 群に分け、Th17, および Treg 分化誘導条件下で、4日間培養した。MSC 共培養群では、免疫抑

制候補因子の阻害薬や中和抗体を添加した。各分化誘導後、IL-17、および Foxp3の発現をフローサイトメトリーで解析し、それぞれ Th17 分化、及び Treg 分化の程度を評価した。

3. 結果

マウス MSC は Th17 分化を強力に抑制した。一方、Treg 分化については分化に大きな作用を認めなかった。マウス MSC による Th17 分化抑制は、トランスウェルを用いた実験から、MSC の産生する液性因子が重要であると考えられた。マウス MSC は、Th17 分化関連サイトカインの IL-21 や IL-23 の濃度に影響を与えなかった。また、マウス MSC の免疫抑制因子である NO も、Th17 分化抑制においては産生されていなかった。一方、PGE₂ とトリプトファン分解酵素の IDO は、その特異的阻害薬を添加した実験から、マウス MSC による Th17 分化抑制能の一部を担っており、さらに両分子は additive に作用していた。しかし、両因子を阻害してもマウス MSC による Th17 分化抑制は完全には解除されなかった。

4. 考察

マウス MSC の Th17 分化抑制においては、PGE₂ と IDO が重要である事が明らかとなった。これは、マウス MSC による Th1 分化抑制とは異なったメカニズムであり、MSC は、異なった CD4 サブセットに対し、それぞれ異なったメカニズムで作用する事が示唆された。さらに、PGE₂ が Th17 分化を促進するという過去の報告と矛盾しており、今後は PGE₂ 受容体や下流のシグナルを解析する必要がある。さらに、両因子以外にも重要な因子があると推察され、今後はこの未知の阻害因子の同定を試みたい。

グレリンによるインスリン分泌制御と膵β細胞シグナル伝達機構の解明

人間生物学系専攻4年
BOLDBAATAR DAMDINDORJ

1. 目的

成長ホルモン (GH) 分泌促進因子受容体の内因性リガンドとして胃から発見されたグレリ

ンは、その発見以来、主として GH 分泌や摂食亢進作用に関する研究が国内外で精力的に展開されている。一方で、グレリンおよびグレリン受容体の膵臓における発現報告や血中グレリン濃度と2型糖尿病に関する大規模な臨床疫学研究、さらにグレリン受容体拮抗薬やグレリン中和抗体、グレリン遺伝子欠損マウスを用いた解析結果から、膵島内因性グレリンが生理的にグルコース刺激によるインスリン分泌を抑制していることが明らかになった。一方、生体においては glucagon-like peptide-1 (GLP-1) を含む種々の消化管ホルモンがグルコース誘発インスリン分泌を促進することが知られている。本研究では、グレリンの生理的役割をさらに明らかにするため GLP-1 によるインスリン分泌促進作用に対するグレリンの効果を検討した。

2. 方法

ラットからコラゲナーゼ法により膵島を分離し、膵島インスリン分泌と膵島 cAMP 産生量を ELISA 法にて測定した。また、β細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) を fura-2 蛍光画像解析法により測定した。さらに、一晚絶食したラットにグルコースを腹腔内投与し、血糖値と血中インスリン濃度変化を測定した。

3. 結果

GLP-1 はラット分離膵島におけるグルコース誘発 cAMP 産生および膵島インスリン分泌を促進し、外来性グレリン投与はこれら GLP-1 作用を抑制した。グレリンはまた、8.3mM グルコース存在下での GLP-1 刺激による β細胞内 [Ca²⁺]_i 増加作用を濃度依存的に抑制した。一方、グレリン受容体拮抗薬により膵島内因性グレリンの作用を阻害すると、GLP-1 刺激による膵島 cAMP 産生および膵島インスリン分泌作用が増強した。ラットに GLP-1 とグレリン受容体拮抗薬を各々単独作用の無い低用量で併用投与すると、グルコース負荷試験時のインスリン分泌が増大し血糖上昇が抑制された。

4. 考察

グレリンは、グルコース刺激のみならず GLP-1 によるインスリン分泌促進作用に対しても抑制作用を示し、その機序の一つとして β細胞内 cAMP 産生の抑制が明らかになった。GLP-1 とグレリン受容体拮抗薬の各々低用量で

の併用は、副作用を軽減させた新たな糖尿病治療法となる可能性を提示した。