

平成22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

バソヒビン-2の腫瘍血管新生における役割の 解明, および治療への応用

地域医療学系専攻3年 高橋 詳史

1. 目的・背景

Vasohibin (VASH) は、2004年に東北大学加齢医学研究所佐藤靖史教授らのグループによって新たに発見された血管新生抑制因子であり、血管内皮細胞で血管新生の negative feedback regulator として働くことが報告されている。その後のゲノムデータベース検索により、アミノ酸配列52.5%の相同性を有する homologue が発見され、VASH2と命名された。VASH2の機能についてはいまだ不明な点が多く、殊に腫瘍血管新生との関連性に関する報告はない。そこで本研究では、VASH2の腫瘍血管新生における役割を明らかとすることを目的とし、癌治療への応用へ向けた基礎研究を行った。

2. 方法

1) 癌細胞株における VASH2発現の有無を定量的 PCR 法により調査した。2) VASH2を標的としたショートヘアピン型 RNA 発現ベクターを作製し、ヒト卵巣癌細胞株 (SKOV-3, DISS) に遺伝子導入して VASH2抑制細胞株を樹立し、腫瘍増殖や腹膜播種などに関してコントロール株と比較した。3) VASH2発現ベクターを作製し、内因性 VASH2が発現していないマウス腫瘍細胞株 (EL-4, MLTC-1) へ遺伝子導入して VASH2発現細胞株を樹立し、同様にコントロール株と比較した。4) マウス血管内皮細胞株 (MS-1) を用いて、VASH2による内皮細胞増殖能・遊走能への影響を検討した。

3. 結果

1) ヒト卵巣癌, 子宮頸癌, 子宮体癌細胞株では、28株中26株に VASH2の発現を認めた。2) VASH2抑制細胞株はコントロール株と比較して、皮下腫瘍血管新生, 腫瘍増殖, 腹膜播種が抑制された。3) VASH2発現細胞株はコ

ントロール株と比較して、皮下腫瘍血管新生, 腫瘍増殖が促進された。4) VASH2は血管内皮細胞の増殖能へは影響を与えなかったが、遊走能を有意に促進した。

4. 結論

以上から、VASH2は新規の腫瘍血管新生促進因子であることが明らかとなった。婦人科癌細胞株は高率に VASH2を発現していることから、VASH2を標的とした分子標的治療の可能性が示唆された。

膵β細胞電位依存性K⁺チャネルの糖代謝・ チャネルリン酸化による新規制御機構

地域医療学系専攻3年 吉田 昌史

1. 目的

膵β細胞グルコース (G) 刺激インスリン分泌時の膜電位変化は、主に ATP 感受性 K⁺ チャネル (KATP) を介して調節されていると考えられており、その主な調節因子は ATP/ADP 比である。しかし、生理的血中 G 濃度維持中は細胞内 ATP/ADP 比はほぼ一定に保たれ、KATP も常にほぼ一定の割合で閉じている。今回我々は KATP 以外でインスリン分泌を調節している機構を電位依存性 K⁺ チャネル (Kv-C) が担っているかどうかを検討した。

2. 方法

ラット膵β細胞を単離培養し、Nystatin 法、Whole-cell clamp 法 (W法) を用いて Kv-C 電流を観察した。Kv2.1発現細胞 (HEK293細胞) にも同様に観察した。

3. 結果

β細胞に対してW法を用い①細胞外 G 2.8 mM (細胞内 5 mM MgATP) 適用時, ②細胞外 G 0 mM 適用時, ③細胞内 0 mM MgATP 適用時, ④細胞外 FCCP (電子伝達系ブロッカー) 適用時, ⑤細胞外 G 11.2 mM および細胞内 5

mM AMPPNP（非加水分解性 ATP）適用にて Kv-C 電流は増加した。Kv2.1-C 発現 HEK293 細胞において細胞内へ10mM MgATP を適用した場合は Kv-C 電流は変化しなかったが、細胞内 0 mM MgATP 適用時には電流は増加した。 β 細胞にて細胞内へ10U/ml のアルカリフォスファターゼを適用すると、Kv-C 電流は膜電位 -40mV から -20mV の範囲で有意に増加した。次に β 細胞にて細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加（1 μM ）させると Kv-C 電流の増加が観察された。100 μM トルブタミド存在下で、細胞内 Ca^{2+} 濃度増加により静止膜電位は $-20.2 \pm 1.4\text{mV}$ （1nM Ca^{2+} , n=8）から $-33.2 \pm 1.8\text{mV}$ （1 μM , n=5）へ過分極した（ $P < 0.001$ ）。Kv2.1発現細胞においても同様な結果を得た。

4. 考察

胼 β 細胞の Kv チャネルは代謝依存性に調節され、その主な調節因子は MgATP である。この作用にはチャネルリン酸化機構の関与も示唆された。細胞内 Ca^{2+} 濃度増加により同様の Kv-C 活性の変化がもたらされることから、グルコース刺激時の β 細胞内 Ca^{2+} 濃度増加により Kv-C が活性化され、過剰なインスリン分泌きたさないように制御していると考えられた。

摂食の生理的調節因子としての視床下部室傍核 nesfatin-1 の役割

人間生物学系専攻3年
セテバザル ウドワル

1. 目的

Nesfatin-1は近年発見された満腹ペプチドであり、室傍核（PVN）に発現している。PVNは摂食調節だけでなく、サーカディアンリズムを作り出す重要な神経核である。肥満におけるサーカディアンリズムの乱れが近年示唆されており、新しい学術・研究領域として注目されている。PVNにおける内因性 Nesfatin-1のサーカディアンリズムとその生理的意義は未解明である。本研究の目的は摂食調節における PVN Nesfatin-1の生理的役割、特にサーカディアンリズムとの関連、過食、肥満における病態生理

学的意義を明らかにすることである。

2. 材料と方法

1) Nesfatin-1のサーカディアンリズムと摂食パターンの関係

Wistar ラットおよび過食・肥満病態モデルである Zucker fatty ラットの摂食パターンおよび PVN における Nesfatin-1 mRNA レベルを調べた。

2) 摂食調節における PVN Nesfatin-1の役割の解明

明期、暗期における内因性 PVN Nesfatin-1を shRNA または中和抗体にてブロックし、摂食量を調べた。

3. 結果

1) Wistar ラットでは暗期の21:00と比較し、明期の09:00では PVN Nesfatin-1 mRNA レベルが3倍に増加していた。しかしこの変化は明期に過食を示す Zucker fatty ラットでは消失していた。

2) Nesfatin-1mRNA レベルが高くなる明期に抗 Nesfatin-1 IgG により内因性 Nesfatin-1をブロックすると明期での摂食量が増加した。

3) PVN における内因性 Nesfatin-1を Nesfatin-1 shRNA でノックダウンすると24時間の摂食量の増加およびオキシトシン mRNA の減少が見られた。

4. 考察

これらの結果から PVN Nesfatin-1 mRNA の発現にはサーカディアンリズムが存在し、このリズムは摂食パターンと逆相関すること、および、肥満病態の Zucker fatty ラットではこの Nesfatin-1発現リズムが消失していることが明らかになった。現在 PVN Nesfatin-1 mRNA の発現リズムが摂食リズムを作り出すという仮説を立て研究を継続している。さらに内因性 PVN Nesfatin-1が PVN オキシトシンを介して生理的な摂食調節することも明らかになった。

E3ユビキチンリガーゼ c-Cbl による造血幹細胞制御メカニズムの解析

地域医療学系専攻4年 上原 英輔

c-Cbl は、活性化されたチロシンキナーゼをユビキチン化し、プロテアソームで分解するユビキチン連結酵素 (ubiquitin E3 ligase) として働き、チロシンキナーゼの negative regulator として作用する。最近、血液腫瘍において c-Cbl の点突然変異が相次いで報告され、未分化造血細胞における c-Cbl の役割が注目されている。一方、c-Cbl はその C 端側に PI-3K p85 subunit やアダプタータンパク質 CrkL と結合するチロシン残基が存在するため、細胞骨格制御において何らかの機能を有することが予測された。

本研究で、c-Cbl 欠損未分化造血細胞においてケモカインに対する遊走性障害と骨髓微小環境への homing 能障害が認められ、細胞骨格制御シグナルに重要な Rho-GTPase family の一つである Rac の活性が減弱していることを見出した。これらの障害は、恒常的活性型 Rac 変異を導入することにより回復した。さらに、遊走性障害と homing 能障害は c-Cbl 遺伝子導入で回復したが、これらの障害は c-Cbl チロシン残基の Tyr700 と Try774 を変異させた c-Cbl 遺伝子では回復しなかったことから、c-Cbl チロシン残基の Tyr700 と Try774 を介するシグナルにより調整されていることを明らかにした。

本研究より、(1) 骨髓細胞と骨髓微小環境は Rac を介して c-Cbl により制御されている、

(2) Rac 活性化には c-Cbl の Tyr700 および Tyr774 残基が必要である、ことが明らかにされた。本研究で明らかになった c-Cbl Tyr700/Tyr774-Rac 経路が血液細胞の細胞運動に重要であるという知見は、血液細胞の骨髓生着に関する分子学的メカニズムの一端を解明した有意義な研究成果と考えられる。

移植片対宿主病における Stat3 の役割に関する発生工学的手法を用いた検討

地域医療学系専攻4年 松 春子

1. 背景

同種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 (GVHD) が知られている。今回、サイトカインがその効果を発現する過程で様々な免疫担当細胞において分化や生存、細胞死を調節する重要な転写因子であることが知られている Stat3 に注目し、急性 GVHD と Stat3 の関連について多面的に解析した。

2. 方法

GVHD の発症には移植片に混在するドナー T 細胞が重要であるため、T 細胞特異的 Stat3 コンディショナルノックアウト (Stat3KO) マウスを作成し、マウス GVHD モデルにおいて移植片の Stat3 をノックアウトするとどのような影響が及ぼされるかを解析した。移植後に

(1) GVHD clinical score, (2) 生存率, (3) 生着率の解析と (4) 病理学的観察を行い、T 細胞特異的に Stat3 をノックアウトすると GVHD が減弱するか否かを検証した。続いて、ドナー由来のリンパ球を用いて (5) CD4 と CD8 の絶対数, (6) T 細胞のサブセット, (7) 移植後の脾細胞から T 細胞を回収し増殖に差があるかを thymidine incorporation assay で解析, (8) 血清中サイトカインおよび T 細胞のサイトカイン産生能を解析した。さらに、リンパ球混合反応 (Mixed lymphocyte reaction, MLR) を行い、細胞増殖やサイトカイン産生能を解析した。

3. 結果

Stat3KO マウスの CD4 陽性 T 細胞を移植すると、皮膚と肝臓の GVHD が減弱し、GVHD clinical score の改善を認め、生存期間が延長した。移植後のマウスの CD4 陽性 T 細胞を用いた MLR では、Stat3KO で T 細胞増殖能が低下しており、上清のサイトカイン産生を ELISA で比較すると、Stat3KO で IFN- γ 産生能が低下していた。また、移植前のマウス CD4 陽性 T 細胞を用いた MLR でも、Stat3KO で T 細胞増殖能が低下していた。MLR でのアポトーシスを調べると、全体的に細胞数が減少してお

り、アポトーシスではなく細胞増殖能自体の差がMLRの差の原因であることが示唆された。更に、MLRの細胞を用いて、細胞増殖に重要とされる分子の発現をリアルタイムPCR法で確認すると、Stat3KOでc-Myc, survivin, Cdc25aの発現量が有意に低下していた。

4. 考察

T細胞特異的なStat3コンディショナルノックアウトマウスを用いたGVHDモデルで、ドナーT細胞のStat3を欠損させるとGVHDが減弱することが明らかとなった。Stat3をin vivoで抑制する低分子化合物はすでに知られていることから、将来的には人への応用も可能と考えられる。しかしながら、患者にStat3阻害剤を直接投与することは、これまでの報告から個体の免疫応答の増強を惹起し、かえってGVHDが増悪する可能性もあると考えられる。移植片のT細胞のみでStat3を選択的に減弱させるような治療法の構築が今後の検討課題である。

研究課題：関節リウマチの難治病態におけるIL-33/ST2Lシステムの役割

地域医療学系専攻4年 松山 泰

1 目的

Interleukin (IL-) 33はST2Lを受容体とした炎症性サイトカインであり、関節リウマチ(RA)のモデルマウスにおいては、関節炎の増悪因子として作用し、阻害抗体や可溶性デコイ受容体を投与することで関節炎は改善する。本研究ではRA患者の検体を用いてIL-33の測定を行い、臨床所見との関連を検証し、とくに難治病態における意義を明らかにすることを目的とした。

2 研究方法

RA患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞(fibroblast-like synoviocytes: FLS)と末梢血単核球とを用い、IL-33の発現、放出を誘導するメカニズムを検証した。ヒトIL-33を測定するenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を確立し、RA患者血清、関節液IL-33濃度を測定した。診療録をもとに疾患活

動性、治療反応性などとの関連を検証した。

3 研究成績

FLSにおけるIL-33の発現はIL-1 β によって強く誘導され、tumor necrosis factor (TNF) α による相乗効果も認められた。末梢血単核球を抗CD3/CD28抗体を用いて刺激したが、IL-33の発現は認められなかった。

血清IL-33濃度は、感染症患者、健常人と比較して、関節液IL-33濃度は変形性関節症患者と比較して、RA患者で有意に高値であった。また、血清IL-33濃度はRAの疾患活動性と正の相関を示した。関節液と血清とを同日に採取し得た症例においては、関節液IL-33濃度が有意に高値を示した。抗TNF治療に抵抗性を示す難治例では治療後においても血清および関節液IL-33濃度の持続的な高値を認めた。

4 考察と結論

RA患者血清および関節液のIL-33濃度が、疾患活動性に相関し、抗TNF治療無効例において持続的に上昇することを示した。血清と関節液とのIL-33濃度の違いや、FLSと末梢血単核球におけるIL-33の発現を比較すると、IL-33が主に罹患関節のFLSより産生されることが考えられた。FLSにおけるIL-33の発現はIL-1 β , TNF α によって誘導され、前者がより強い関連をもつことが示唆された。IL-33/ST2LシステムがRAの疾患活動性や抗TNF治療への抵抗性に影響を与えることが示唆された。