

寄 附 研 究 部 門

悪性腫瘍に対する新規免疫・遺伝子治療薬開発研究部門

Division of Translational Cancer Research

准 教 授 : 高 橋 淳

Associate Professor : Atsushi Takahashi M.D., Ph.D.

当部門は橋渡し研究 (translational research) として、腫瘍促進因子 FEAT を分子標的とした癌の早期発見と癌予防を目指している。基礎研究として、FEAT の正常組織での機能、正常細胞および癌細胞での発現制御、癌細胞内での機能を解明し、FEAT による癌促進機構の全貌を明らかにしたい。

2013 年は、9 月にエジプト人の外国人訪問研究員 1 名が、2 年間の留学期間を終了し帰国した。10 月からは株式会社新日本医薬より共同研究員が派遣され、中国人と日本人の大学院博士課程の学生 2 名との 3 人態勢で研究に従事した。中国人留学生の日本語が上達してはいるものの、共通言語は英語のみである。英語によるディスカッションを学ぶために、ゲノム病態学分野の大学院生がジャーナルクラブに参加するなど、研究室間の交流が進んでいる。

A. FEAT 検出による癌の早期発見

FEAT は大多数のヒト癌で早期癌や前癌病変の段階から異常に増加している一方で、正常組織では精巣、肝、脳に弱く発現しているのみである。そこで、血液中の FEAT タンパクを定量することで、癌組織からの血液中への流入を感知し、癌化を早期発見したい。

固相酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) により FEAT を定量するために、まず、標準試料としての FEAT タンパクの精製を行った。全長の FEAT タンパクは約 80 kDa あり、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ

(glutathione S-transferase, GST) との融合タンパクとして大腸菌に発現することは困難と考えられた。そこで、ヒスチジン (His) タグと融合した FEAT を大腸菌に発現したところ、不溶性の封入体を形成した。発現誘導に用いる IPTG の濃度、誘導温度、可溶化条件を最適化し、非変性条件で一部可溶性の FEAT を発現させることに成功した。しかし、可溶化した FEAT が Ni²⁺レジンおよび Co²⁺レジンに結合しにくく、十分な収量が得られず、純度も低かった。やむを得ず、BugBuster® Protein Extraction Reagent (Merck Millipore) 不溶の封入体を、塩酸グアニジンによる変性条件で可溶化し、高純度で十分な収量の FEAT タンパクを得た。

今後、2種類の抗ヒトFEAT抗体を用いたサンドイッチ法によりFEATを定量するELISAキットを業者に受託して作製する。さらに、九州大学病院 先端分子・細胞治療科において行われた臨床試験で凍結保存した健常人と癌患者の血漿を測定し、FEATの濃度差を検討する予定である。

B. FEAT を分子標的とする癌予防

a. FEAT ペプチドワクチンによる癌予防

癌精巣抗原であるFEATに対する免疫を、ペプチドワクチンでマウスに誘導し、その副作用を調べた。H-2Kb, H-2Db 適合マウスFEATペプチドを2種類、アジュバントと共にC57BL/6マウスの皮下に2回接種後、B16-F10メラノーマ細胞を皮下注射した。特に2種類のペプチドを混合して接種することにより、腫瘍に炎症反応が誘導された。肺、肝、腎を組織学的に調べた所、ペプチドに起因する異常は認められず、血清中のAST (GOT), ALT (GPT), Creの上昇は認めなかった。FEATペプチドによる免疫反応の誘導は、副作用が少ないことが示唆された。

b. FEAT 阻害剤による癌予防

FEATのメチル基転移酵素活性の基質を見出すために、FEATと共免疫沈降する13個のタンパクのcDNAをクローニングし、GST融合タンパクとして大腸菌に発現し、Glutathione Sepharose 4B レジンをを用いて精製した。

一方で、これらの結合タンパク同士も共免疫沈降することがわかった。さらに、一部のタンパクとFEATとの共免疫沈降は、RNAを介していることも明らかになった。FEATやRNAを含む多数のタンパクの複合体が細胞内に存在することが示唆された。

そこで、今後、精製したHisタグ融合FEATと精製したGST融合タンパクの結合を調べることで、FEATと直接結合するタンパクを見出し、基質の候補とする。その後、酵素反応のアッセイ系を確立し、化合物ライブラリーをスクリーニングして、FEAT阻害剤を見出す予定である。

C. FEAT の正常組織, 細胞での機能

a. FEAT^{+/-}キメラマウスの解析

FEAT^{+/-}マウス胚性幹 (ES) 細胞の胚盤胞期胚への注入により、キメラマウスを得て交配したが、FEAT^{+/-}ヘテロマウスは 2011 年に 1 匹生まれたのみで、2012 年と 2013 年には得ることができなかった。そこで、キメラマウスを解剖し、詳細な組織学的検討を行った。毛色が 70%以上のキメリズムを示したオスの 18 匹中 11 匹に、FEAT^{+/-}ヘテロマウスと同様の、停留睾丸と精子形成不全を認めた。精巣や卵巣には、ライディッヒ細胞腫、顆粒膜-莖膜細胞腫、セルトリ-ライディッヒ細胞腫などのステロイドホルモン分泌腫瘍も見出された。副腎皮質腫瘍とクッシング症候群を思わせる異常な肥満を示したマウスもあった。十分量の FEAT タンパクの発現が、これらのステロイド分泌器官の制御に必要であることが示唆された。

b. FEAT ノックアウト ES 細胞の解析

FEAT^{-/-} (ノックアウト) マウス ES 細胞に胚様体 (embryoid body, EB) を形成させ、レチノイン酸で神経系へ分化誘導した。正常 (FEAT^{+/+}) および FEAT^{+/-}ES 細胞に比べ、神経マーカーの β III-tubulin の発現が低下していた。神経分化を示す突起形成に乏しく、ES 細胞に特徴的な上皮様の形態に留まっていた。ES 細胞の神経系への分化に FEAT が必要であることが示唆された。

D. FEAT 発現の制御機構

FEAT の発現調節機構を明らかにするために、ヒト FEAT 遺伝子のプロモーター領域で駆動されるルシフェラーゼプラスミドを構築し、HeLa 細胞に遺伝子導入して解析した。Ets ファミリータンパクがプロモーター活性を制御することが明らかになった。ゲルシフトアッセイを行い、特異抗体によるスーパーシフトで、プロモーター配列への結合を認めた。さらに、RNA 干渉によりプロモーター活性が低下することを見出した。今後、他の種類の細胞でも同様の機構でプロモーター活性が制御されているか、検討する予定である。

E. FEAT の細胞内機能

FEAT と結合するタンパクの機能は、mRNA からのタンパク合成の制御、ストレス顆粒、細胞骨格制御、繊毛形成、膜輸送、酸化ストレス制御、解糖系など多岐に渡る。RNA 干渉で HeLa 細胞内の FEAT タンパク量を減少する実験から、これらのタンパクが複合体を作っている意義が、次第に明らかになりつつある。

業績目録

原著論文

1. S. Yamaguchi, T. Marumoto, T. Nii, H. Kawano, J. Liao, Y. Nagai, M. Okada, A. Takahashi, H. Inoue, E. Sasaki, H. Fujii, S. Okano, H. Ebise, T. Sato, M. Suyama, H. Okano, Y. Miura, K. Tani. 2014.
Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors.
Cancer Sci. (in press)
2. M. Narusawa, H. Inoue, C. Sakamoto, Y. Matsumura, A. Takahashi, T. Inoue, A. Watanabe, S. Miyamoto, Y. Miura, Y. Hijikata, Y. Tanaka, M. Inoue, K. Takayama, T. Okazaki, M. Hasegawa, Y. Nakanishi, K. Tani. 2014.
TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells.
Cancer Immunol. Res. (in press)

学会発表

1. K. Kobayashi, K. Kawahara, A. Suzuki, K. Tani, A. Takahashi (2013, 10/3).
Functions of FEAT tumor promoter in ES cells. 腫瘍促進因子 FEAT の ES 細胞における機能.
第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜.
2. C. Sakamoto, H. Inoue, M. Narusawa, S. Miyamoto, T. Marumoto, A. Takahashi, M. Inoue, K. Takayama, M. Hasegawa, Y. Nakanishi, T. Tani (2013, 10/3).
Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer. GM-CSF 遺伝子導入癌幹細胞腫瘍ワクチン療法は乳癌の皮下腫瘍及び転移形成を抑制する.
第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜.
3. Y. Li, K. Kobayashi, M.M. Mona, K. Tani, A. Takahashi (2013, 10/4).
Identification of proteins that interact with FEAT tumor promoter.
第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜.
4. M. Narusawa, H. Inoue, C. Sakamoto, Y. Matsumura, A. Takahashi, A. Watanabe, T. Inoue, S. Miyamoto, K. Takayama, M. Inoue, M. Hasegawa, Y. Nakanishi, K. Tani (2013, 12/7-10).
LR7 ligand potentiates GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid

dendritic cells.

The 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans.

5. S. Yamaguchi, T. Marumoto, T. Nii, H. Kawano, J. Liao, Y. Nagai, M.

Okada, A. Takahashi, H. Inoue, E. Sasaki, H. Fujii, S. Okano, Y. Miura, K. Tani (2013, 12/12).

Characterization of dysgerminoma like tumors arisen in the process of generating common marmoset induced pluripotent stem cells.

第3回日本マーモセット研究会大会, 福岡.