

論文の内容の要旨

論文題目 肝臓がん抑制能を持つ AIM タンパク質を用いた
新規の癌治療法開発のための基礎的検討

氏名 楠 俊輔

現在、肝臓がんは悪性新生物の中での死因の第2位であり、予後不良疾患であるために罹患率に対する死亡率が非常に高い疾患である。また、原発性肝臓がんの内、約80%が肝細胞がん(Hepatocellular Carcinoma: HCC)である。そのような中で、ウイルス感染のない非ウイルス性の慢性肝疾患から引き起こされる肝臓がんが増加傾向にあり、メタボリックシンドロームや肥満による非アルコール性脂肪性疾患(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: NAFLD)は近年急速に問題となってきた現代的疾患である。近年の研究によって、内臓脂肪の蓄積による肥満が慢性炎症を惹起し、それがインスリン抵抗性を誘導することによって、糖尿病や動脈硬化、さらに脂肪肝から進行する脂肪肝性肝炎(Non-Alcoholic SteatoHepatitis: NASH)や肝細胞がん等の様々な疾患を連続的に発症・増悪することが明らかになってきた。肥満や糖尿病などのメタボリックシンドローム患者はさらなる増加傾向にあることから、肝臓がんに対する治療薬の開発に期待が持たれている。

このような中で、マクロファージが特異的に産生・分泌し血中に存在するタンパク質 AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage)が、肝臓がんの抑制機能を持つことが当研究室において示された。肥満した AIM 欠損マウスでは脂肪肝が亢進するのみならず、全例で HCC を発症するが、AIM を有する野生型マウスではほとんど HCC を発症しない。すなわち、AIM は脂肪肝に伴う HCC 発症を強く抑制することが分かった。この AIM タンパク質による HCC 抑制メカニズムは、がん細胞表面上へ集積した AIM が周囲に存在している補体系の活性化を促進し、がん細胞に膜侵襲複合体を形成させることで壊死を引き起こし、マクロファージによる貪食作用でがん細胞を除去するというものである。

AIM タンパク質はがん細胞表面上に集積することで抗がん作用を発揮することが明らかとなっているが、AIM は血中で IgM と結合すること、また AIM は脂肪細胞や肝細胞に取り込まれることで、脂肪分解の促進に寄与することなど様々な機能を持つことが分かっているため、AIM タンパク質をただ投与するのではなく、より効率的にがん細胞表面上に集積させる方法を開発することが AIM をがん治療薬として用いるために必要であると考えた。

そこで、AIM タンパク質をがん細胞表面上に集積させる方法を模索した際、高脂肪食を負荷することで肝臓がんを発症させたマウスの肝臓組織を用いて、抗マウス IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、IgG1, IgG2b, IgG3のシグナルががん部位細胞表面上に特異的に検出され、その中でも特に IgG1が強く検出されたことから、マウスの肝臓がんの細胞表面上には IgG が集積していることが見出された。次に、この IgG はどのようにして細胞表面上に集積しているのかを調べるために、まずはその集積している部位を調べたところ、類洞

血管内皮細胞のマーカーである CD31の局在と一致したことから、この IgG は肝臓の類洞血管内皮細胞に集積していることが示唆された。

肝臓の類洞血管内皮細胞は IgG の Fc 領域を認識して結合する Fc Receptor (Fc 受容体) が存在し、血中の IgG を認識して細胞内に取り込むことや、免疫複合体の除去を担うことが分かっている。このことから、肝臓がん部位の類洞周辺における IgG の集積は Fc 受容体を介したものではないかと考えた。そこで、マウスの Fc 受容体であり、がん部位において最も多く集積していることが示唆された IgG1との結合能を持つものとして知られている FcγR2B, FcγR3, FcRn 受容体が HCC において発現しているかどうかを定量的 PCR (qPCR)によって調べたところ、3種類すべての Fc 受容体が発現していることが分かった。さらに、現在入手可能で免疫染色に使用することができる FcγR2B と FcRn に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、肝臓がん部位に存在するかどうか、また IgG1と共局在しているかどうかを検討した。その結果、FcγR2B と FcRn が類洞と思われる部位に存在し、IgG1と共局在していることが分かった。この2種の Fc 受容体のうち、FcRn は類洞血管内皮細胞において、IgG と同時に血中タンパク質などをエンドサイトーシスによって細胞内に取り込み、トランスサイトーシスによって Disse 腔側に放出するか、不要であればタンパク質の分解経路に持って行く、または、再利用が可能であれば IgG らと共に血中に再放出するという機能を持つことが分かっている。これより、正常な細胞では FcRn と結合した IgG は集積せずに、細胞内に取り込まれたり血中に再放出されたりするが、がん化した細胞ではエンドサイトーシス機能が低下することで IgG が FcRn と結合したまま細胞表面上に集積するのではないかと考えられる。以上のことから、肝臓がんの類洞血管内皮細胞表面上における IgG の集積に最も関与しているのは FcRn 受容体ではないかと考えた。

また、肝臓がん部位における IgG の集積は、細胞ががん化したことによって産生されるがん特異的分子を抗原として認識した IgG の集積である可能性がある。この可能性を検討するために、コントロールマウス IgG に Alexa Fluor 647を付加して標識し、この標識した IgG を肝臓がん発症マウスに投与した。IgG を肝臓がん部位に集積させることができれば、がん特異的分子を抗原として認識した集積ではなく、Fc 受容体による IgG の Fc 領域を認識した抗原非特異的な結合の結果の集積であることが示唆される。結果として、標識した Alexa Fluor 647のシグナルすなわち投与したコントロール IgG が、がん部位に集積している様子が観察されたことから、肝臓がんの類洞血管内皮細胞における IgG の集積は、がん特異的分子を抗原として認識したものではなく、Fc 受容体が IgG の Fc 領域を認識した抗原非特異的な結合の結果、集積したものであるということが示された。これらの結果より、AIM タンパク質に IgG の Fc 領域を付加した融合タンパク質を作製すれば、がん細胞表面上に効率よく集積させることができ、AIM を肝臓がんの治療薬として特化させることができるのではないかと考えた。

そこで、最もがん部位に集積していると思われる IgG1 の Fc 領域を AIM に融合させた AIM/IgG1-Fc 融合タンパク質(AIM-Fc)を発現するプラスミドを作製した。次に、AIM-Fc

プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションして培養し、培養後の培養上清と細胞抽出液を回収して抗 AIM 抗体によるウエスタンブロッティングを行ったところ、AIM-Fc が正しく発現し、培養上清中に分泌されることが確認された。次に、AIM-Fc の精製を抗 AIM 抗体カラムを用いて行った。さらに、通常の AIM タンパク質は血中において IgM の 5 量体と結合して安定化することが分かっていることから、AIM-Fc 融合タンパク質の AIM の構造や性質に変化が起きていないかどうかを調べるために、精製した AIM-Fc を用いて IgM5 量体との結合性を検討したところ、AIM タンパク質と同様に結合することが分かった。以上の結果から、作製した AIM-Fc 融合タンパク質は AIM と同様に IgM5 量体との結合性を持ち、生体内で AIM と同様の動態を示すことが期待されたため、この AIM-Fc を用いて肝臓がんの治療効果を検討する実験を行った。

まずは AIM-Fc を投与することで肝臓がん部位に集積させることができるかどうかを、AIM-Fc を静脈投与した肝臓切片を用いた AIM 抗体による免疫組織染色で調べたところ、がん化した肝臓の類洞部位に AIM のシグナルが得られたことから、AIM-Fc を肝臓がん部位に集積させることができた。さらに通常の AIM との集積効率を比較したところ、AIM-Fc の集積は AIM を静脈投与したときよりも効率的であり、がん部位に特異的な集積であることが分かった。AIM-Fc を肝臓がん部位に集積させることができると分かったため、次に、AIM が持つ抗がん作用を発揮することができるかどうかを検討した。肝臓がんを発症した AIMKO マウスに対して、AIM-Fc 200 μ g を毎日投与することを 5 日間連続で行った肝臓組織切片を用いて免疫組織染色で観察したところ、補体系の C3 の活性化が AIM-Fc の集積部位において見られ、マクロファージのマーカーである F4/80 が陽性の細胞ががん部位に多く浸潤していることが観察された。また、AIM-Fc と F4/80 が死細胞を囲み、死細胞を貪食していると思われる様子も DAB 染色結果より観察された。これらのことから、AIM-Fc を継続的に投与したことにより、AIM-Fc が集積した部位において AIM が持つ抗がん作用が発揮されたことが示唆された。

さらに、AIM-Fc のがん予防効果を検討するために、DEN を生後 2 週間のときに投与したことによって肝臓がんを発症させた AIMKO マウスを用いて実験を行った。このマウスを、肝臓がん初期の状態にある DEN 投与後 4 ヶ月のときに、AIM-Fc を 1 日に 200 μ g 投与することを 5 日間連続で行い、この操作を 2 度行った。その後、肝臓がんが悪化して腫瘍が肥大化する DEN 投与 8 ヶ月のときにマウスの肝臓を観察したところ、AIM-Fc 投与群のマウスの 2 匹のうち 1 匹において完全に肝臓がんが抑制された様子が観察された。この結果から、AIM-Fc を肝臓がんの初期段階で投与することができれば、肝臓がんの進行を抑制できる可能性があることが示唆された。しかし匹数が 2 匹であるため、今後投与するマウスの数を増やして検討する必要がある。

本研究の結果から、AIM-Fc 融合タンパク質は通常の AIM タンパク質よりも肝臓のがん化した類洞血管内皮細胞の表面上に効率的に高濃度集積させることができた。さらにそれに伴って、集積した AIM-Fc の周辺において補体の活性化や、マクロファージの浸潤・

貪食作用の発揮が示唆されたことから、本研究によって開発された AIM-Fe 融合タンパク質は新規の肝臓がん治療法として期待でき、今後の肝臓がんの治療法に新たな知見をもたらすことが期待される。