

【364】

氏 名 (本籍)	やま 山	な 名	けい 慶 (神奈川県)
学 位 の 種 類	博	士 (学	術)
学 位 記 番 号	博	乙 第 2315	号
学位授与年月日	平成 19 年 8 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	腱特異的血管新生抑制因子 ChM1L の機能解析と創薬への応用		
主 査	筑波大学教授	医学博士	戸 村 成 男
副 査	筑波大学教授	博士 (医学)	本 田 靖
副 査	筑波大学准教授	博士 (医学)	石 井 朝 夫
副 査	筑波大学講師	博士 (工学)	奥 脇 暢

論 文 の 内 容 の 要 旨

【目的】

「血管新生」とは体内で新たに血管が作られることである。血管新生には促進物質と抑制物質が関与し、そのバランスが血管新生を調節している。胎児期や成長過程においては血管新生は盛んに起こっているが、成体の場合は排卵や創傷治癒といった特殊な場合でしか認められない。血管系は生命の維持にとって不可欠であり、上記のような血管新生は正常な生体の反応である。一方、異常な血管新生は癌、関節リウマチ、乾癬などの原因・増悪因子であることが明らかにされている。癌が増殖する場合には、栄養の供給路として血管新生が不可欠であることから、血管新生を抑制することにより病態をコントロールする「血管新生阻害療法」に関して、基礎と臨床の両面から非常に活発な研究が進められている。現在、多くの製薬企業が、癌を対象に血管新生抑制薬の開発に取り組んでいるが、癌を克服するにはいたっておらず、新規の血管新生抑制薬が望まれている。Chondromodulin-I (ChM-I) は、無血管組織である軟骨に存在する血管新生抑制因子としてウシ胎児軟骨から精製された分子量約 25kDa の糖タンパク質である。ヒト ChM-I は 334 アミノ酸からなる II 型膜貫通タンパク質がプロセッシングを受けて、C 末端 120 アミノ酸が細胞外に分泌され、軟骨の細胞外マトリックスに蓄積し、軟骨への血管侵入を抑制していると考えられている。我々は ChM-I の血管新生抑制活性に着目し、ChM-I に類似した新規遺伝子が見つければ、癌、関節リウマチなどの難治性疾患に対する治療薬の創薬研究への応用が可能なのではないかと考えた。本研究は、軟骨由来の血管新生抑制因子である ChM-I に相同性を有する新規遺伝子の探索、クローニングとその機能解析を創薬へ応用することを目的として実施した。

【対象と方法】

ChM-I に相同性を有する新規遺伝子の取得を目的として EST データベースを探索した。データベースの検索により得られた新規遺伝子 (ChMIL 遺伝子) の部分配列を基に、rapid amplification of cDNA ends 法により全長 cDNA 配列を決定し、クローニングを実施した。得られた cDNA 配列を利用してゲノムデータベースを検索することにより染色体上の位置を決定した。マウスの各組織および培養細胞における ChMIL

mRNA の発現を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法および real-time PCR 法により解析した。また、マウス肋軟骨組織における ChMIL mRNA およびタンパク質の発現を in situ hybridization 法および免疫染色法により解析した。

培養細胞に組換え ChMIL タンパク質を発現させ、糖鎖構造解析、細胞膜ビオチン化および免疫沈降法による細胞膜貫通型タンパク質であることの確認、さらにマウス組織での ChMIL タンパク質の発現解析を実施した。培養液中への ChMIL タンパク質の分泌を immunoprecipitation 法および immunoblot 法を用いて検討した。培養液中に分泌された ChMIL タンパク質を精製し、アミノ酸配列解析を実施することにより切断部位を決定した。切断部位の解析から、ChMIL のプロセシング酵素は furin ではないかとの仮説をたて、furin 阻害薬、furin 認識配列の変異が ChMIL のプロセシングを阻害するか否かを解析し、また、furin タンパク質による ChMIL タンパク質の切断に関して検討した。Furin が豊富に存在する細胞内小器官であるゴルジ体の ChMIL のプロセシングに対する影響を評価するため、endoplasmic reticulum からゴルジ体への輸送阻害薬の影響を評価し、培養細胞を用いた免疫染色法により、ChMIL と furin の細胞内での局在を検討した。さらに、ChMIL の血管新生抑制活性を評価するため、組換え ChMIL タンパク質を大腸菌で大量発現、精製法を確立し、このタンパク質を用いて ChMIL の血管新生抑制活性および抗腫瘍効果を検討した。

【結果】

EST データベースを用いて軟骨由来の血管新生抑制因子である ChM-I に類似した新規遺伝子 ChMIL を発見した。cDNA の解析から ChMIL は、ヒト、マウス、ラットで 317 アミノ酸からなる II 型膜貫通タンパク質であり、3 種間のアミノ酸配列を比較するとそれぞれ 95% のアミノ酸が同一であることから、種間で保存された遺伝子であることが明らかになった。ゲノムデータベースを利用した解析により、ChMIL 遺伝子は X 染色体上に存在すること、マウス組織を用いた発現解析の結果から、ChMIL は腱組織および腱細胞で特異的に高発現している遺伝子であることが示された。

タンパク質の性状解析の結果から、ChMIL タンパク質は、N 結合型糖鎖で修飾された II 型の膜貫通タンパク質であることが確認された。また、ChMIL は、II 型膜貫通タンパク質として存在するとともに、プロセシングを受けて細胞外の 81 アミノ酸が分泌されることが判明した。ChMIL 変異体、furin 阻害薬などを用いた検討から ChMIL は、furin によりゴルジ体内でプロセシングを受けた後、分泌されることが示唆された。組換え ChMIL タンパク質は、vascular endothelial cell growth factor (VEGF)、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、hepatocyte growth factor (HGF) および血清で誘導される血管新生をすべて抑制した。一方、線維芽細胞に対しては抑制活性を示さなかった。また、ChMIL は、in vivo で血管新生を抑制し、抗腫瘍活性を示した。

【考察】

本研究において、新規遺伝子 ChMIL を発見しその機能解析から、ChMIL は腱に特異的に高発現する血管新生抑制因子であることが明らかになった。血管新生は促進因子と抑制因子のバランスにより抑制されており、血管新生が起こる場合は、このバランスが崩れて促進因子が抑制因子に対して過剰になっていると考えられる。血管新生促進因子としては、VEGF、FGF などが知られており、そのレセプターや下流シグナルの研究は近年著しい進歩を遂げている。一方、ChMIL の血管新生抑制の機構は不明であるが、おそらく細胞膜上に存在するレセプターを介して血管新生を抑制すると推測される。血管新生抑制因子の創薬への応用を考えた場合、その対象は癌をはじめとする異常な血管新生を伴う疾患となる。2004 年に VEGF に対する抗体が、世界初の血管新生抑制薬としてアメリカ食品医薬品局から承認を受けた。VEGF に対する抗体は癌患者に対して延命効果を示したことから、新たな癌治療の選択肢として非常に期待が高まっているが、一方でこの血管新生抑制薬に関する問題点や薬効の限界も見えてきている。腫瘍では VEGF 以外にも FGF、HGF

などの一群の血管新生促進因子が発現しており、腫瘍の増悪化に伴って発現が増加し、腫瘍の中には VEGF への依存度が低くなるものもあると考えられている。従って、腫瘍に対して血管新生抑制薬を使用する場合には、VEGF を阻害するのみでは不十分であり、理想的には複数の血管新生促進シグナルを抑制する薬物が求められる。本研究で大腸菌発現系を用いて大量発現、精製した組換え ChMIL タンパク質が様々な刺激による血管新生を抑制し、抗腫瘍活性を示したことから、このタンパク質は種々の癌に対して薬効を示す可能性を示唆しており、バイオ医薬品として開発する価値があると考えられる。

【結論】

データベースを利用した相同性検索により chondromodulin-I (ChM-I) に類似した新規遺伝子 ChMIL を見出し、クローニングすることに成功した。機能解析の結果から、ChMIL は腱に特異的に高発現する血管新生抑制因子であると考えられた。さらに、組換え ChMIL タンパク質の精製法を確立し、このタンパク質が VEGF, FGF, HGF などの血管新生促進因子による血管新生を抑制し、抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。将来、このタンパク質は癌や関節リウマチなどの血管新生の異常を伴う難治性疾患の治療薬として開発できる可能性が示唆される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

血管新生は正常な生体の反応である一方、異常な血管新生は癌、関節リウマチ、乾癬などの原因・増悪因子であることが知られている。著者は、chondromodulin-I (ChM-I) に類似した新規遺伝子 ChMIL を見出し、機能解析の結果から、ChMIL は腱に特異的に高発現する血管新生抑制因子であることを明らかにした。本研究は、癌や関節リウマチなど血管新生の異常を伴う難治性疾患に対する血管新生抑制薬の開発に発展する可能性がある時宜を得た研究である。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。