

## 19. マクロファージ由来蛋白質 AIM による肝がん治療法の開発

新井 郷子

東京大学 大学院医学系研究科 疾患生命工学センター

Key words : AIM, HCC (hepatocellular carcinoma)

### 緒言

日本における死因の第一位はがんであり、また世界的にも患者は増加する一方であるため、国内外問わず、がんの発生メカニズムの解明や抗がん作用をもつ化合物の探索等、がん研究は盛んにおこなわれている。その上で外科的治療や化学療法は一定の効果を生み出し、また近年注目されている分子標的薬等のより特異的で安全性の高いがん治療薬が生み出されつつある。しかしながら、現代的生活がもたらす食生活の変化や多大な生活・環境ストレス、環境汚染等によってがんのリスクは増加する一方であり、今後はより身体的負担の少なく、安全で画期的な治療・予防法の開発が望まれる。本課題では、我々の生体が本来持つ抗がん作用に着目し、それを利用した新しいがん治療・予防の系を確立することを目標とする。実現すればより副作用が少ない治療として、患者の QOL を高める治療が可能となる。本課題において生体が本来持つ抗がん作用として注目する分子 AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) は、組織マクロファージが特異的に産生する分子量約 50 kDa の分泌型タンパク質であり、ヒト・マウスにおいて同様の性質が確認されている。肝臓では通常時からクッパー細胞による強い産生が観察され、血中では五量体 IgM に結合して安定化することで血中濃度は約  $5 \mu\text{g/ml}$  に保たれている<sup>1-4)</sup>。AIM は通常、肝細胞内に取り込まれ、中性脂肪の蓄積を抑制するはたらきをもつが、がんにおいては、最近の我々の研究により、AIM は肝細胞がん (Hepatocellular carcinoma: HCC) の細胞表面に蓄積し、それが補体系の活性化を促すことでがん細胞へ細胞死を誘導することで、がん細胞の速やかな除去に貢献していることが見出された<sup>5)</sup>。本課題では、この AIM のもつ「がん細胞除去機構」を用いて新しいがん治療法を確立することを目標とした。AIM による抗がん作用は本来生体に備わっている機能であるが、この機能に何らかの破綻がある場合や、また機能が十分に及ばない場合にがんが発達するものと考えられる。そのため、AIM の機能を用いてより効率的にがんを抑制する方法として、AIM をより効果的に HCC へ集積させる方法の確立を目指した。AIM はすでに生体内に存在する分子であり、また AIM の「がん細胞除去機構」はがん特異的に発揮され、正常細胞には傷害を与えないものであるため、安全性は非常に高く、身体への負担は小さい。これを既存のがん治療と併用し、効果的に利用することで、AIM によるがん治療は大きな医療の進歩をもたらすものと考えられる。

### 方法

#### 1. HCC 保有マウスにおける肝臓組織の探索

AIM 欠損マウスに約 1 年間高脂肪食を負荷するとほぼ 100% の割合で HCC が発生する<sup>5)</sup>。そのマウスにおいて、肝臓を採取、凍結ブロックを作製し、様々なタンパク質について、免疫組織化学染色を行った。

#### 2. IgG1 の Fc 領域と AIM を融合させたタンパク質 (AIM-Fc 融合タンパク質) の精製

AIM-Fc 融合タンパク質発現ベクターを図 1 のように設計した。発現ベクターは HEK293T 細胞にトランスフェクションし、3 日間培養した。その後、培養上清について、抗マウス AIM 抗体カラムを用いて精製を行った。

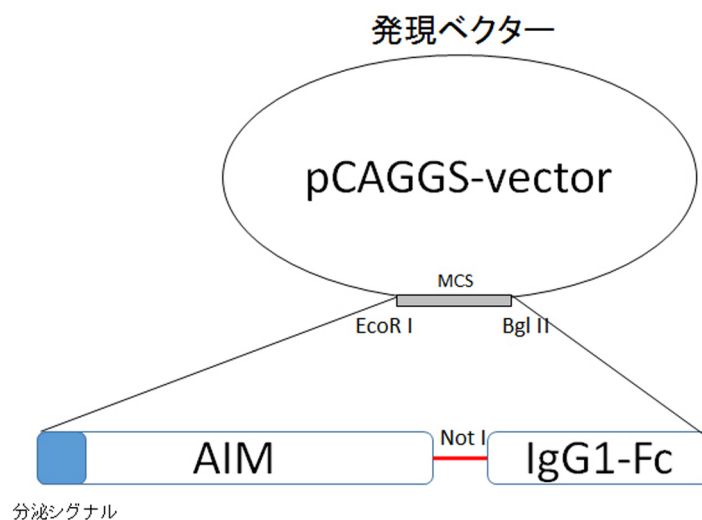
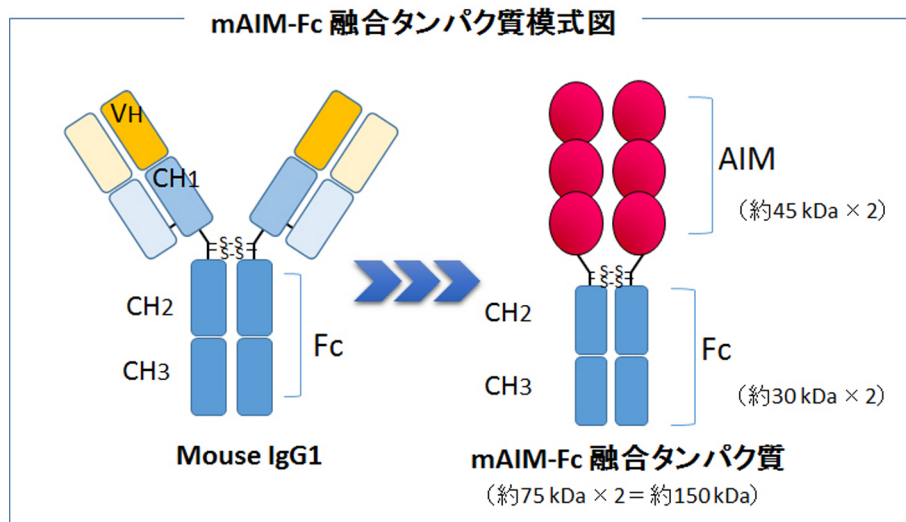


図1. AIM-Fc 融合タンパク質

マウス AIM とマウス IgG1 の Fc 領域 (CH2、CH3) の融合タンパク質の模式図および発現ベクターの設計図。IgG は通常ヒンジ領域のシステイン残基により 2 量体を形成するが、この融合タンパク質においてもヒンジ領域を含めているため、図のような 2 量体を形成する。また、AIM の N 末端にある分泌シグナルにより、培養上清中に分泌される。

### 3. マウスへのタンパク質投与

HCC を保有するマウスとして、高脂肪食を約 1 年間負荷した *AIM* 欠損マウス、あるいはジエチルニトロソアミン (DEN) を投与した *AIM* 欠損マウスを用いた。投与は AIM-Fc 融合タンパク質あるいは AIM タンパク質について、眼窩静脈叢より静脈投与を行った。

## 結 果

### 1. HCC における IgG の集積の発見と、それを利用したがん部位への AIM 集積方法の考案

AIM をより効率的に HCC に集積させるため、HCC に特異的に発現あるいは集積する分子の探索を行ったところ、HCC 部位に IgG が集積していることを発見した (図 2)。

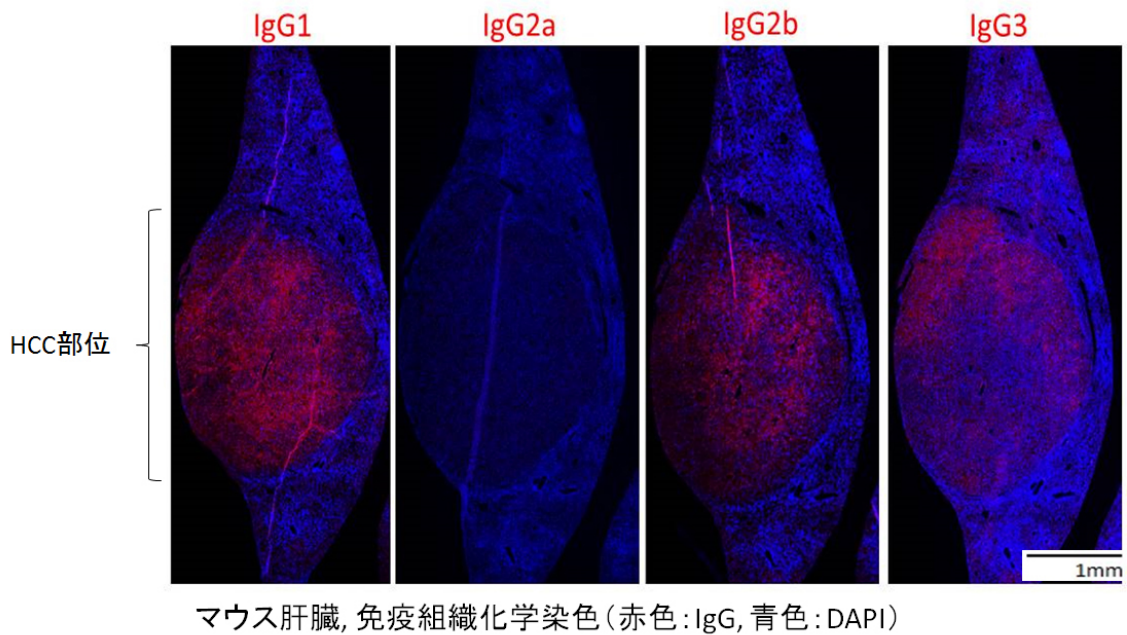


図2. マウス HCC における IgG の集積

高脂肪食を1年間付加させることでHCCを誘導したAIM欠損マウスの肝臓を用いて、マウスIgGの各サブクラスに対する免疫組織化学染色を行った。HCC部位において、IgG2a以外のすべてのサブクラスのIgGの集積が確認された。

マウスIgGにはIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3の4つのサブクラスがあるが、IgG2aを除くすべてのサブクラスのIgGが集積していることなどから、HCCに集積するIgGは、HCCにおいて発現する特異的抗原を認識して集積しているのではなく、抗原認識を介さず、抗原非特異的に集積していると考えられた。そこで我々は、このHCCに集積するIgGを用いてAIMをHCCに効率的に集積させることによるがん細胞除去モデルを考案した。IgGは抗体の抗原認識部位ではなく、定常部位（Fc領域）を介してHCCに集積していることが考えられたが、抗体のFc領域を認識するFc受容体には様々な種類が存在する。探索を行ったところ、そのなかでもHCCにおいてはFcRnを介してIgGが集積していることが示された（図3）。

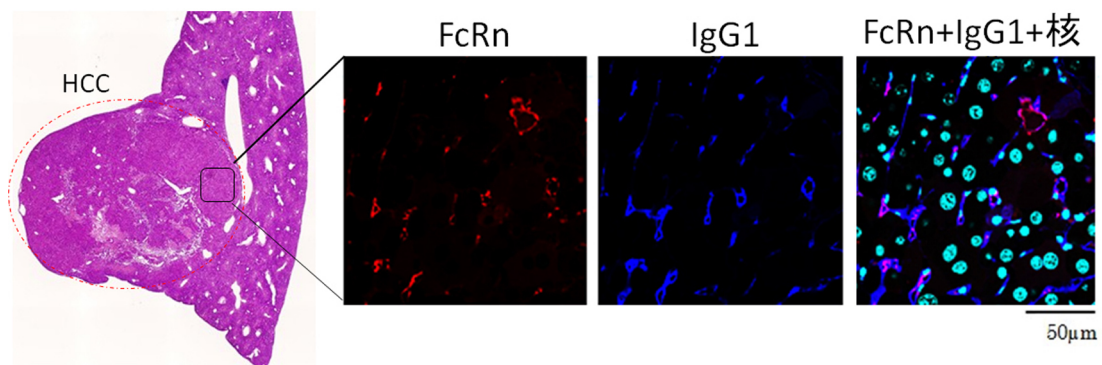


図3. HCCにおけるFcRnを介したIgGの集積

HCCを保有するマウス肝臓組織において、IgG1およびFcRnに対する免疫化学組織染色を行った。HCC部位においてFcRnとIgG1の共局在が観察され、IgG1がFc領域を介してFcRnに結合することでHCCに集積していることが示唆された。

そこで、我々は IgG1 の Fc 領域と AIM を融合させたタンパク質 (AIM-Fc) を構築し、それを投与することで、Fc 領域を介して AIM が HCC に効率的に集積する系を考案した (図 1)。

## 2. AIM-Fc タンパク質の精製とマウスへの投与

AIM-Fc タンパク質の発現ベクター (図 1) を構築し、HEK293T 細胞に強制発現させることで、AIM-Fc タンパク質の発現を確認したところ、細胞の培養上清中に目的のタンパク質が分泌されていることを確認した。そこで培養上清を大量に調製し、抗 AIM 抗体カラムを用いて、AIM-Fc タンパク質の精製を行った (図 4)。

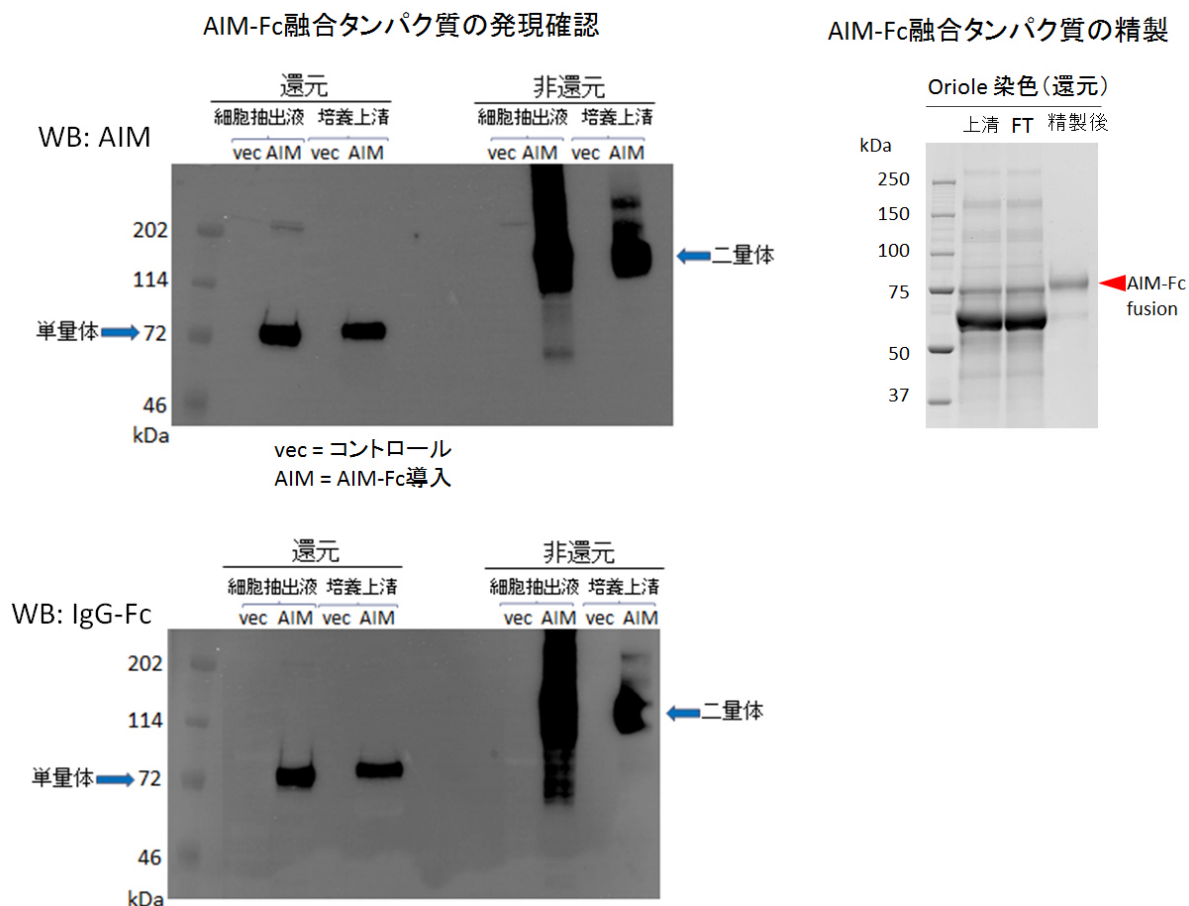


図 4. AIM-Fc 融合タンパク質の発現と精製

HEK293T 細胞に AIM-Fc 発現ベクター (図中に AIM と表示) およびコントロールとしてベクターのみ (vec と表示) をトランスフェクションし、細胞抽出液および培養上清についてタンパク質の発現を抗 AIM 抗体 (左上) および抗 IgG-Fc 抗体 (左下) を用いてウェスタンブロッティングによって確認した。還元、非還元状態で確認を行い、目的のタンパク質が得られていることを確認した。その後、培養上清について抗 AIM 抗体カラムを用いて AIM-Fc タンパク質の精製をおこなった。上清およびフロースルー (FT)、溶出液 (精製後) について還元条件下で SDS 電気泳動後、オリオール染色をおこなったところ、目的の AIM-Fc タンパク質の精製が確認された。

次に、AIM-Fc タンパク質を HCC を保有する AIM 欠損マウスに静脈投与し、HCC 部位への集積の確認を行った。AIM-Fc タンパク質およびコントロールとして通常の AIM タンパク質を等モル量になるようにそれぞれ 200  $\mu$ g、60  $\mu$ g をマウスへ投与し、投与 4 時間後の肝臓において AIM-Fc あるいは AIM タンパク質の集積を確認した。その結

果、AIM-Fc タンパク質は HCC 部位特異的に集積し、非がん部の肝臓組織には集積しないことが確認された。さらに、AIM そのものを投与した場合よりも、AIM-Fc タンパク質を投与したほうがより効率的に HCC 部位へ集積可能なことが明らかになった (図 5)。

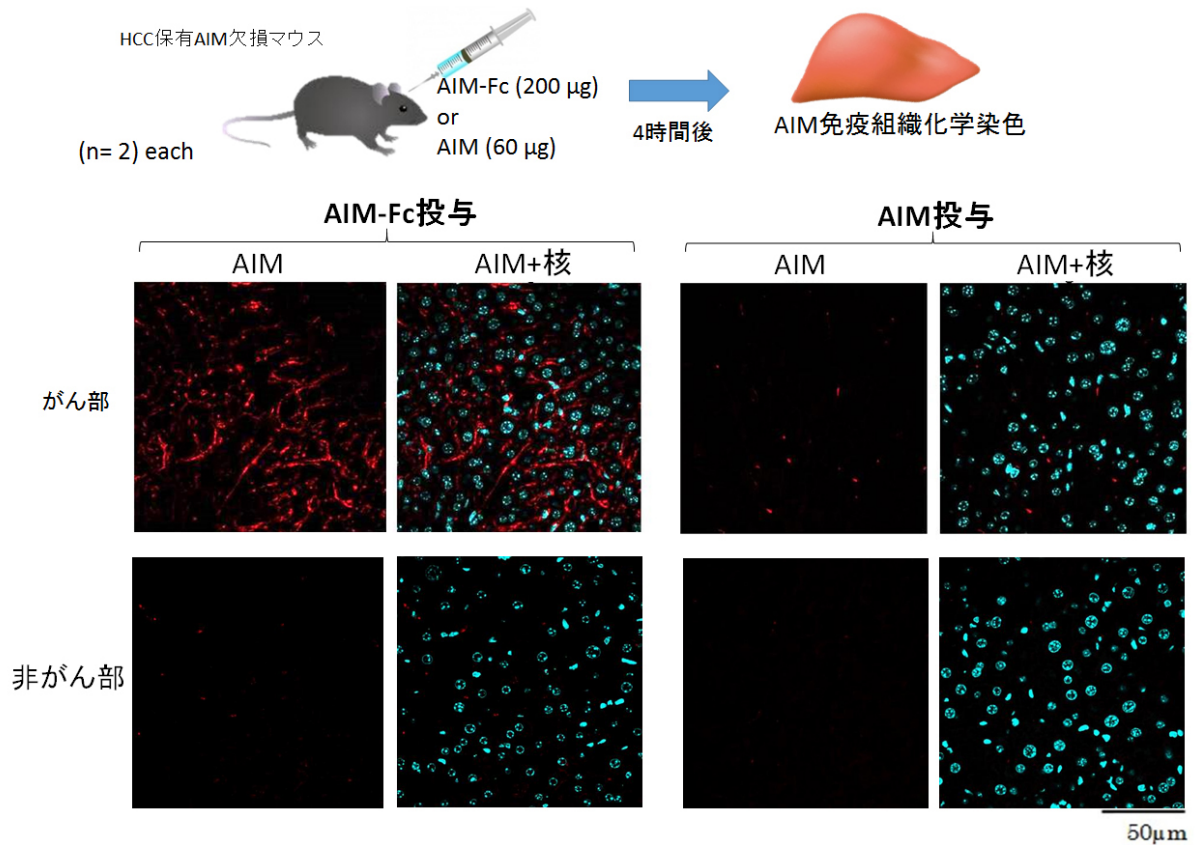


図 5. AIM-Fc 融合タンパク質の HCC 部位への集積

AIM-Fc および AIM を等モルになるように HCC を保有する AIM 欠損マウスに静脈投与し、4 時間後に肝臓を摘出、それぞれのタンパク質の HCC における集積を免疫組織化学染色により解析した。AIM-Fc 融合タンパク質は AIM よりも効率よく HCC に集積した。

## 考 察

本研究では、HCC 部位に IgG が抗原認識を介さず、Fc 領域を介して集積していることを明らかにした。また、この現象を利用して、AIM-Fc 融合タンパク質を構築することで、AIM をより効率的に HCC 部位へ集積させることが可能になった。今後は、この系を用いて、実際に HCC の縮小あるいは予防について検討を行い、AIM のがん細胞除去機能を用いたがん治療・予防法の確立を目指したい。

## 文 献

- 1) Miyazaki T, Hirokami Y, Matsuhashi N, Takatsuka H, Naito M. Miyazaki. in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily. *J Exp Med.* 1999;189(2):413-22. PMID: 9892623.
- 2) Arai S, Maehara N, Iwamura Y, Honda S, Nakashima K, Kai T, Ogishi M, Morita K, Kurokawa J, Mori M, Motoi Y, Miyake K, Matsuhashi N, Yamamura K, Ohara O, Shibuya A, Wakeland EK, Li QZ, Miyazaki T. Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells. *Cell Rep.* 2013;3(4):1187-98. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.006.
- 3) Kai T, Yamazaki T, Arai S, Miyazaki T. Stabilization and augmentation of circulating AIM in mice by synthesized IgM-Fc. *PLoS One.* 2014;9(5):e97037. doi: 10.1371/journal.pone.0097037.

- 4) Yamazaki T, Mori M, Arai S, Tateishi R, Abe M, Ban M, Nishijima A, Maeda M, Asano T, Kai T, Izumino K, Takahashi J, Aoyama K, Harada S, Takebayashi T, Gunji T, Ohnishi S, Seto S, Yoshida Y, Hiasa Y, Koike K, Yamamura K, Inoue K, Miyazaki T. Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans. *PLoS One*. 2014;9(10):e109123. doi: 10.1371/journal.pone.0109123.
- 5) Maehara N, Arai S, Mori M, Iwamura Y, Kurokawa J, Kai T, Kusunoki S, Taniguchi K, Ikeda K, Ohara O, Yamamura K, Miyazaki T. Circulating AIM prevents hepatocellular carcinoma through complement activation. *Cell Rep*. 2014;9(1):61-74. doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.058.