

4001893

内因性抗細菌ペプチドPR-39の生物学的意義

(08044228)



平成8年度一平成9年度 科学研究費補助金 (国際学術研究)

研究成果報告書

平成10年2月

研究代表者 高後 裕

旭川医科大学医学部教授

研究組織

- 研究代表者 : 高後 裕 旭川医大・医学部・教授
- 研究分担者 : 小野 稔 旭川医大・医学部・講師
- 研究分担者 : Richard Gallo ハーバード大学・医学部・講師
- 研究分担者 : 横田 欽一 旭川医大・医学部・講師
- 研究分担者 : 蘆田 知史 旭川医大・医学部・助手
- 研究分担者 : 藤本 佳範 旭川医大・医学部・助手

(研究協力者 : 田辺 裕貴)

研究経費

平成8年度	1,600千円
平成9年度	1,600千円
計	3,200千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Akinori Matsumoto, Minoru Ono, Yoshinori Fujimoro, Richard Gallo, Merton Bernfield and Yutaka Kohgo. Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int. J. Cancer*, 74, 482-491, 1997.
2. 藤本佳範, 小野稔, 大竹孝明, 生田克哉, 斉藤浩之, 大平基之, 高後裕. syndecan-1およびその発現誘導因子PR-39の遺伝子導入による肝癌細胞の転移・浸潤能低下について. *Biotherapy*, 11, 969-972, 1997
3. 藤本佳範, 高後裕. 肝癌細胞の再発・転移におけるsyndecan-1の発現低下のついて—syndecan-1およびその発現誘導因子PR-39の遺伝子導入による再発・転移阻止を目的とした遺伝子治療の試み—. *消化器癌の発生と進展*, 9, 61-64, 1997

(2) 口頭発表

1. Richard Gallo. Functions of Syndecans and Synducin. 国際学術交流第1会学術講演会 (旭川) . 8月, 1996
2. 大竹孝明, 藤本佳範, 松本昭範, 斉藤浩之, 大平基之, 小野 稔, 高後 裕. Syndecanの発現誘導因子であるSynducin遺伝子の導入による肝癌細胞株の形態変化について. 日本癌学会総会, 10月, 1996
3. 松本昭範, 小野 稔, 藤本佳範, 大竹孝明, 斎藤浩之, 大平基之, 高後 裕. 原発性肝細胞癌におけるSyndecan-1の発現低下—特に転移との関連について—. 日本癌学会総会, 10月, 1996
4. Yoshinori Fujimoto. Alteration of invasive phenotype by PR-39 transfection on human hepatoma cells. 国際学術交流第2会学術講演会 (Boston) . 11月, 1996
5. 藤本佳範, 小野 稔, 大竹孝明, 松本昭範, 斉藤浩之, 大平基之, 高後 裕. syndecan-1およびその発現誘導因子PR-39の遺伝子導入による肝癌細胞の転移・浸潤能低下について—PR-39のbystander効果による癌転移治療の可能性—. がん転移研究会, 4月, 1997
6. Ohtake T, Fujimoto Y, Matsumoto A, Ohhira M, Ono M, Kohgo Y. PR-39, a proline-rich antimicrobial peptide, suppresses invasive phenotype and actin structure on human hepatoma cells. AACR, Washington DC, USA, 1997
7. Fujimoto Y, Ono M, Ohtake T, Matsumoto A, Ohhira M, Kohgo Y. Syndecan-1 cDNA transfection confers invasive phenotype on human hepatoma cells. AACR, Washington DC, USA, 1997
8. Yoshinori Fujimoto. Promotion of stomach ulcer healing by PR-39. 国際学術交流第3会学術講演会 (Boston) . 8月, 1997
9. Hiroki Tanabe. Syndecan-1 expression in stomach ulcers. 国際学術交流第3会学術講演会 (Boston) . 11月, 1996
10. 藤本佳範, 小野 稔, 大竹孝明, 松本昭範, 生田克哉, 斉藤浩之, 大平基之, 高後 裕. 肝細胞癌の再発・転移におけるsyndecan-1の発現低下について—syndecan-1およびその発現誘導因子PR-39の遺伝子導入による再発・転移阻止を目的とした遺伝子治療の試み—. 消化器癌発生学会, 9月, 1997
11. 大竹孝明, 藤本佳範, 斉藤浩之, 生田克哉, 田中浩二, 大平基之, 小野 稔, 高後 裕. syndecan-1発現誘導因子PR-39の遺伝子導入による肝癌細胞の形態の変化と浸潤能抑制について. 日本癌学会総会, 10月, 1997
12. 藤本佳範, 小野 稔, 高後 裕. 内因性proline-rich polypeptide PR-39の生物学的性状と肝細胞浸潤の制御. 浜名湖シンポジウム, 12月, 1997
13. Richard Gallo. Novel systems of cell signaling by syndecans and synducins. 国際学術交流第4会学術講演会 (旭川) . 2月, 1998

(3) 出版物

1. 高後 裕, 藤本佳範, 小野 稔. Syndecan-1の発現低下と転移. 肝胆膵, 国際医書出版, 2月, 1997

はじめに

共同研究者である小野稔とハーバード大学医学部のGallo博士は、ブタのskin wound fluidより、白血球が産生している内因性の殺菌ペプチドPR-39を分離精製し報告した。このPR-39は単に殺菌物質としてのみならず、創傷が治癒する際に重要な働きをもつ heparansulfate proteoglycan (HSPG)の一種であるsyndecanをmRNAおよび蛋白レベルで誘導することが明らかとなった。また、我々はこのsyndecanが肝臓において転移抑制の役割を担っていることを明らかにしていた。これらの研究が契機となり今回、我々とGallo博士との共同研究が始まった。

文部省国際学術研究補助金を用いた4回におよぶ日本と米国での学術講演および共同研究（第1回1996年8月，旭川；第2回1996年11月，ボストン；第3回1997年8月，ボストン；第4回1998年2月，旭川）により以下のことが明らかとなった。

1. 内因性抗菌ペプチドPR-39のN末端から15のアミノ酸のオリゴペプチドを用いて、ウサギを免疫し、PR-39に対するポリクローナル抗体を作成した。
2. この抗体を用いてヒト白血球の蛋白を免疫沈降するとPR-39の大きさに相当する約5kDaのところにバンドが見られた。しかし、ブタPR-39のヒトでの類似蛋白および遺伝子はまだ発見できていない。
3. PR-39はproline richな部位にras signalingに重要であるSos蛋白が持つGrb2のSrc homology 3 (SH3) domainへの結合motifを5回繰り返し有しており、SH3 domainに結合するという可能性が示唆された。そこでScr遺伝子のSH3 domainの蛋白をrecombinantで作成し、PR-39のオリゴペプチドを加え、PR-39に対する抗体で免疫沈降するとSH3 domainの蛋白が共沈し、逆にSH3 domainに対する抗体で免疫沈降するとPR-39が共沈してきた。以上のことより、PR-39はSH3 domainに結合すると考えられる。
4. PR-39遺伝子を肝臓細胞株に導入するとSyndecan-1の発現誘導とともに、細胞形態や浸潤能・細胞運動能に変化が起きた。この変化は、Dr Galloにより発表されたPR-39のSH3 domainへの結合能が関与していると考えられる。
5. PR-39遺伝子導入肝臓細胞はPR-39蛋白を培養液中に分泌した。
6. PR-39遺伝子をNIH3T3細胞のras transformantに導入するとやはり細胞形態の変化が認められ、また増殖能が著しく低下した。
7. syndecan-4の肝臓癌における関与が示唆された。
8. syndecan-1の発現低下は大腸癌の早期から認められた。
9. PR-39はラットにおける酢酸実験潰瘍の修復を増幅した。
10. ヒト胃潰瘍の修復過程におけるsyndecan-1の発現の変化をin situ hybridizationにて検討した。
11. PR-39は哺乳動物の細胞内にも入り込み、細胞膜内側、細胞質、核膜などに存在する。

さらに具体的な研究成果としてすでに公表された論文・著書にて以下報告する。