

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) マクロファージ由来タンパク質 AIM によるがん細胞の除去機構を利用した
肝細胞がん治療法の開発
(英語) Development of a novel HCC treatment based on anti-HCC effect
of macrophage-derived protein AIM

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科 准教授 新井郷子
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Associate Professor,
Satoko Arai

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 肝細胞がんを標的とした AIM の細胞表面蓄積誘導によるがん治療系の構築
開発課題名： (英語) Establishment of a novel HCC treatment by induction of efficient
cell surface accumulation of AIM

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科 准教授 新井郷子
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Associate Professor,
Satoko Arai

II. 成果の概要（総括研究報告）

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) は、組織マクロファージが特異的に産生する分子量約 45 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 µg/ml に保たれている。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、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。そこで本課題では、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ために以下の項目に取り組んだ。

【1】 HCC を標的とした AIM の細胞表面蓄積誘導によるがん治療系の構築 (HCC 細胞移植モデル)

AIM の HCC 細胞表面上への蓄積の特異性と集積効率を高め、AIM による効率的ながん細胞除去を促進することを目標とし、人為的に特異的抗原を発現させた HCC 細胞株を AIM 欠損マウスの肝臓に移植する一方で、その特異的抗原に対する抗体の認識部位 (Fab) と AIM を fusion したタンパク質を作製し、投与することで HCC 細胞表面上に特異的に蓄積させ、細胞死誘導の検討を行うことを目的とし、H28 年度は特異的抗原ヒト CD2 (hCD2) を発現する Hepa1.6 細胞安定株の構築や、AIM と抗体の fusion タンパク質の構築および精製を完成させた。

【2】 HCC を標的とした AIM の細胞表面蓄積誘導によるがん治療系の構築 (HCC 特異的に集積するタンパク質 X を利用した系)

本項目も【1】と同様、AIM のがん細胞表面蓄積の効率を高める系の構築が目的であるが、より自然な状態における HCC をターゲットにした AIM の集積を試みた。すなわち、我々は、高脂肪食長期間負荷による脂肪肝由来あるいはジエチルニトロソアミン (DEN) 投与による HCC を有する肝臓において、AIM の有無にかかわらず、がん部特異的に抗原非特異的にタンパク質 X が集積していることを見出した。本項目では、このタンパク質 X が抗原非特異的に HCC 上に集積する現象を利用し、タンパク質 X と AIM を fusion したタンパク質を作製し、脂肪肝由来 HCC を有する AIM 欠損マウスに投与し、細胞表面への蓄積および細胞死の誘導を検討することを目的とした。H28 年度は、HCC におけるタンパク質 X の集積に必要な受容体と認識部位を明らかにした。また、AIM とタンパク質 X の融合タンパク質の構築、大量精製を行い、HCC を有する AIM^{-/-}マウスに対する投与を行い、HCC への効率的な集積を確認することが出来た。

【引用文献】

- 1) Maehara N. et al. Circulating AIM prevents obesity-associated hepatocellular carcinoma through complement activation. Cell Rep. 9:61-74, 2014

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is a secretory protein of about 40 kDa, whose function is conserved between human and mouse. In liver, AIM is produced by Kupffer cells, and the serum concentration is maintained at around 5 µg/ml through association with IgM-pentamer, which provides the stability in blood. In 2014, we reported that AIM was incorporated into normal hepatocytes and suppress the accumulation of triacylglycerol when mice were fed with a high fat diet, while AIM was accumulated on the surface of cancer cells, which induced cell death by activating complement cascades, thereby preventing hepatocellular carcinoma (HCC)¹⁾. In this study, we work on following specific aims to establish the basis for a novel therapy for HCC by employing this anti-HCC effect of AIM.

[1] Construction of a novel treatment of HCC by induction of efficient cell surface accumulation of AIM (A model with HCC cell transplantation)

In this section, we designed an artificial mouse HCC model to see whether an increase of the specificity and the efficiency of AIM accumulation onto HCC cells can enhance their elimination, by transplanting HCC cells which express a specific molecule targetted by AIM. In the fiscal year of 2016, we established the Hepa1.6 cells (mouse HCC cell line) with stable expression of human CD2, which is used to be a target of AIM. We have also constructed the protein that the antigen-recognition site (Fab domain) of the antibody against human CD2 is fused with AIM in order that the fusion protein can specifically accumulates on the surface of Hepa1.6 expressing hCD2. We administrated the fusion protein to the AIM KO mice harboring the transplanted Hepa1.6-hCD2 cells in the liver, and could detect the accumulation of AIM-fusion protein on those cells.

[2] Construction of a novel treatment of HCC by induction of efficient cell surface accumulation of AIM (A model utilizing Protein X which physiologically accumulates on HCC)

It is desirable that a mouse model which can enhance accumulation of AIM on the physiologically-induced HCC (not transplanted HCC) is created. We have discovered that Protein X accumulated on HCC, which were induced by either long-term high fat diet feeding or diethylnitrosamine (DEN), regardless of the presence or absence of AIM. In this section, we utilize this phenomenon to achieve enhanced accumulation of AIM on HCC. In the fiscal year of 2016, we determined the receptor of Protein X which is expressed in the HCC region, and defined the binding site of Protein X. Based on these findings, we constructed a fusion protein of AIM and the binding domain of Protein X, in order that the fusion protein can capably bind to the receptor expressed in the HCC region. By administrating the fusion protein intravenously to AIM KO mice harboring DEN-induced HCC, the AIM-fusion protein was efficiently and specifically accumulated onto the HCC region.

[Reference]

- 1) Maehara N. e al. Circulating AIM prevents obesity-associated hepatocellular carcinoma through complement activation. Cell Rep. 9:61-74, 2014

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 4 件）

1. Sugisawa R, Hiramoto E, Matsuoka S, Iwai S, Takai R, Yamazaki T, Mori N, Okada Y, Takeda N, Yamamura KI, Arai T, Arai S, Miyazaki T. Impact of feline AIM on the susceptibility of cats to renal disease. *Scientific Reports*. 2016, 6, 35251.
2. 新井郷子, 宮崎徹. AIM の多様な機能とバイオマーカーとしての可能性. *生体の科学*. 2016, 67, 424-425.
3. Ozawa T, Maehara N, Kai T, Arai S, Miyazaki T. Dietary fructose-induced hepatocellular carcinoma development manifested in mice lacking apoptosis inhibitor of macrophage (AIM). *Genes to Cells*. 2016, 21, 1320-1332.
4. Yamazaki T, Sugisawa R, Hiramoto E, Takai R, Matsumoto A, Senda Y, Nakashima K, Nelson P S, Lucas J M, Morgan A, Li Z, Yamamura KI, Arai S, Miyazaki T. A proteolytic modification of AIM promotes its renal excretion. *Scientific Reports*. 2016, 6, 38762.
5. Matsumoto A, Taniguchi K, Takeda N, Yamamura KI, Arai S, Miyazaki T. Inflammatory and anti-inflammatory states of adipose tissue in transgenic mice bearing a single TCR. *International Immunology*. 2017, 29: 21-30.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 生物学的ゴミの除去メカニズムによる新しい疾患治療パラダイム, 口頭, 宮崎徹, 東京大学生命科学シンポジウム, 2016/4/9, 国内.
2. 生体内の異物除去を誘導するタンパク質 AIM による、様々な現代病の統一的な理解と新しい治療戦略, 口頭, 宮崎徹, 第 7 回北海道動脈硬化フォーラム, 2016/4/27, 国内.
3. 尿中排泄に伴う AIM の修飾とその機能的変化, 口頭, 山崎智子, 新井郷子, 宮崎徹, 第 59 回日本腎臓学会学術総会, 2016/6/17 国内.
4. A role for circulating AIM protein in the pathogenesis of autoimmune type 1 diabetes, 口頭, 松元彩香, 新井郷子, 宮崎徹, International Congress of Immunology 2016, 2016/8/23 国外.
5. Dedefferentiation of renal tubular epithelial cells to phagocytes to ameliorate acute kidney injury through scavenging necrotic cell debris deposited with apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) protein, ポスター, 新井郷子, 山崎智子, 宮崎徹, Cell Symposia -100 Years of Phagocytes-, 2016/9/20, 国外.
6. 血中タンパク質 AIM による生体内異物除去機構にもとづく新しい疾患治療パラダイム, 口頭, 宮崎徹, Vascular Biology Innovation に関する研究助成 第 11 回研究発表会, 2016/8/20, 国内.
7. 血中タンパク質 AIM による生体内異物除去機構をもちいた新しい疾患治療パラダイム, 口頭, 宮崎徹, Infection and Immunity symposium, 2016/9/30, 国内.
8. 糖尿病合併症治療薬の開発と期待, 口頭, 宮崎徹, 第 31 回日本糖尿病合併症学会・第 22 回日本糖尿病眼学会/合同シンポジウム, 2016/10/8, 国内.

9. 血中タンパク質 AIM による生体内異物除去機構を基盤とした腎臓・代謝疾患の新しい治療パラダイム, 口頭, 宮崎徹, 第 23 回新世紀・静岡糖尿病研究会, 2016/11/11, 国内.
10. 血中タンパク質 AIM による生体内異物・不要物除去機構をもちいた新しい疾患治療パラダイム, 口頭, 宮崎徹, 日本薬学会九州支部主催講演会, 2016/11/12, 国内.
11. A novel defense system against multiple diseases via biological garbage clearance mediated by apoptosis inhibitor of macrophage (AIM), 口頭, 宮崎徹, Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammolgy (MPCTU) 第 3 回シンポジウム, 2016/11/29, 国外.
12. 血中における AIM の切断とその機能的変化, ポスター, 山崎智子, 新井郷子, 宮崎徹, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1 国内.
13. 高フルクトース食に起因する生活習慣病における AIM の影響の解析, ポスター, 小澤崇之, 新井郷子, 宮崎徹, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1 国内.
14. ヒト AIM の疾患治療応用に向けた最適化, ポスター, 中村恵子, 新新井郷子, 宮崎徹, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1 国内.
15. 血中 AIM 活性化ファクターの開発とその疾患治療応用, ポスター, 平本絵美莉, 松岡茂, 山崎智子, 新井郷子, 宮崎徹, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1 国内.
16. 血中タンパク質 AIM による異物除去機構を介した新しい疾患制御パラダイム, 口頭, 新井郷子, 宮崎徹, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/3 国内.
17. Recruitment of T cells in the development of anti-inflammatory environment in adipose tissue is abrogated in transgenic mice bearing single T-cell receptor of T lymphocytes accumulating in obese adipose tissue, 口頭, 松元彩香, 新井郷子, 宮崎徹, 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016/12/7 国内.
18. 血中タンパク質による急性腎障害の治癒メカニズムとその臨床応用の可能性, 口頭, 新井郷子, 第 43 回関東腎研究会, 2017/1/25, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし