

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 23日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659075

研究課題名（和文）ヒト内因性 HSP90 の無菌性炎症惹起誘発機構

研究課題名（英文）patho-physiologic role of HSP90 in the aseptic inflammatory process.

研究代表者

佐藤 昇志 (SATO NORIYUKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50158937

研究成果の概要（和文）：

感染症における LPS など外因性リガンドによるマクロファージや樹状細胞等、自然免疫の活性化機構は相当部分明らかにされた。しかし、内因性リガンドによる炎症惹起や自然免疫活性化機構はまだ不明の部分が大部分である。

本研究はマクロファージや樹状細胞上の extracellular HSP90 受容体遺伝子を同定し、無菌性炎症の惹起機序や自然免疫から獲得免疫活性化へのあらたな分子機構を解明するものである。

その結果、現在までにいくつもの候補遺伝子がとられた。現在、それらの炎症惹起における分子病理学的役割りを決定している。

研究成果の概要（英文）：

This study was intended to analyze patho-physiologic role of heat shock protein 90 (HSP90) in the aseptic inflammatory process. Specifically we tried to identify HSP90 receptor molecule that is considered to be expressed on inflammatory cells such as macrophages and dendritic cells. We successfully obtained such candidate molecules, and it may be possible to regulate the pathologic inflammatory process involving with these molecule.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理

1. 研究開始当初の背景

学術的背景

我々は熱ショック蛋白質（heat shock proteins, HSP）と抗原ペプチドや蛋白質との複合体を製作し、マウスに免疫することで、

抗原ペプチド特異的細胞障害性 T 細胞を活性化できること、また様々な HSP のなかでとりわけ HSP90 が最もそのような活性が高いことを示してきた (J. Immunol, in press, 2009, J. Immunol., 179, 1803, 2007, J. Biol.

Chem., 282, 26956, 2007, Eur. J. Immunol 37:1730, 2007)。この効果は CFA (完全フロイドアジュバント) の効果にも匹敵する。

その際、抗原提示細胞 APC である樹状細胞は受容体依存性エンドサイトーシスにより extracellular に HSP90-ペプチド複合体を取り込み、その後結合ペプチドを MHC クラス I 経路に提示する。しかしこれまでのところヒト樹状細胞上に発現していると考えられる HSP90 特異的な受容体は同定されていない。本研究はヒトの樹状細胞上に発現していると予想される HSP90 レセプターの cDNA クローニングを行い、外来性抗原である HSP-ペプチド複合体がいかに APC を活性化し、樹状細胞のなかでいかにクラス I の経路に入り、プロセッシングを受け CD8T 細胞に HSP90 結合抗原ペプチドを提示できるのかを解明しようとするものである。

2. 研究の目的

何を明らかにしようとするのか

以上のような学術的背景をもとに本研究では、期間内に以下の2点を明らかにする。

(ア) ヒト APC 上に発現している HSP90 受容体の遺伝子クローニングを目的とする。発現クローニングおよびクロスリンカーを用いた生化学的方法を駆使し、受容体の同定、構造解析、機能解析を行う。

(イ) HSP90 受容体の分子病理学的、病態病理学的解析を行う。特に本研究の新しい知見にもとづいた無菌性炎症の惹起機構が T 細胞ワクチンの応用に新たな基盤を形成するはずである。

3. 研究の方法

平成 22 年度

(1) ビオチン化ヒト HSP90 の作製と樹状細胞上に発現する HSP90 レセプターの cDNA クローニング

①精製ヒト HSP90 を用いてビオチン化 Hsp90 を作成する。

②HSP90 を結合し取り込むことが証明されている、GM-CSF によって誘導されたヒト末梢血単球由来の樹状細胞より cDNA ライブラリーを調整し、これを COS-7 細胞に一過性発現させる。これらの細胞にビオチン化 HSP90 を添加し、セルソーターにより HSP90 結合細胞をソーティングする。数回のソーティング操作後プラスミド DNA を回収し、cDNA を得て、遺伝子を同定する。

③上記により得られた遺伝子を COS-7 細胞に遺伝子導入し、ビオチン化 HSP90 との結合を最終的に確認する。

(2) レセプター媒介性エンドサイトーシスの電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による観察

①レセプター媒介性エンドサイトーシスによる HSP の取り込みの経過につき、まず Alexa488 ラベルした HSP90 を樹状細胞にパルスした後、その動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。

②その time course を把握した上で、次に金コロイド粒子を結合した HSP90 を樹状細胞にパルスした後、電子顕微鏡を用いてレセプター媒介性エンドサイトーシスの経過を経時的に観察する。この金コロイド結合 HSP90 の樹状細胞内での局在を観察する。

平成 23 年度

(3) HSP90 受容体に対する単クローン抗体の作製

上記により HSP90 受容体として同定した遺伝子から、リコンビナント蛋白質を作製し、マウスに免疫し、ハイブリドーマを作製し、抗 HSP90 受容体抗体を樹立する。

(4) エンドサイトーシス後の HSP90-HSP90 受容体の運命の検討

HSP90-ペプチド複合体は受容体依存性エンドサイトーシスにより抗原提示細胞内に取り込まれるが、その際、受容体とリガンドである HSP90-ペプチド複合体の解離と、それに続く受容体と HSP90 の選別輸送が行われるものと考えられる。これが樹状細胞のどの細胞内小器官で行われるのか、検討する。具体的には、GFP 発現ベクターに HSP90 受容体遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを作製し、樹状細胞に発現させる。これにビオチン化 HSP90 を添加することで、GFP-HSP90 受容体-ビオチン化 HSP90 が形成され、エンドサイトーシスに引き続く細胞内でのリガンド・受容体の動態を共焦点レーザー顕微鏡でリアルタイムに観察する。

(5) CTL 応答と炎症性疾患の解明、臨床応用 (癌ワクチン等)

HSP90 受容体が同定された場合、HSP90a 無菌性炎症での役割を炎症の動物モデルで解析する。すなわち同定されたリセプターを介した炎症反応の免疫学的な様々な特徴を決定する。また HSP90 の結合基質抗原の MHC クラス I 分子へのクロス提示能を利用した癌ワクチンへの応用も HSP90 の結合部位を同定し、またこの受容体を利用して可能かどうか決定し、最終的には臨床応用をめざす。

4. 研究成果

感染症における LPS など外因性リガンドによるマクロファージや樹状細胞等、自然免疫の活性化機構は相当部分明らかにされた。しかし、内因性リガンドによる炎症惹起や自然免疫活性化機構はまだ不明の部分が大部分である。我々はこのようないわば無菌性炎症の惹起に

関る内因性リガンドとして組織壊死や細胞死により遊離、放出された extracellular HSP (熱ショック蛋白質) 90が重要な機能を行うことを研究した。

我々はまず、(1) 精製ヒトHSP90を用いてビオチン化Hsp90を作成し、(2) HSP90を結合し取り込むことを証明した。さらにGM-CSFによって誘導されたヒト末梢血単球由来の樹状細胞よりcDNAライブラリーを調整し、これをCOS-7細胞に一過性発現させ、これらの細胞にビオチン化HSP90を添加し、セルソーターによりHSP90結合細胞をソーティングした。数回のソーティング操作後プラスミドDNAを回収し、cDNAを得て、遺伝子を同定した。

その結果、現在までにいくつかの候補遺伝子がとられた。これらには酸化ストレス応答遺伝子の一類などが含まれていた。現在、それらの炎症惹起における分子病理学的役割りを決定している。これらの分子は低酸素反応など、無菌性炎症を含む炎症病態の惹起機構に深く関与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 24 件)

全て査読有り

1. Nishizawa, S., Mori, T., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Tamura, Y., Kamiguchi, K., Takahashi, A., Kanaseki, T., Nakazawa, E., Asanuma, H., Sokolovskaya, A., Morita, R., Yamada, R., Fujii, R., Kondo, T., Hasegawa, T., Hara, I. and Sato, N. Heat shock protein 40 family, DNAJB8 is expressed in renal cancer stem-like cell, controls the tumor-initiating ability and can be a potent target of immunotherapy. *Cancer Res*, in press
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3062
2. Morita, R., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Takahashi, A., Saka, E., Asanuma, H., Suzuki, H., Tamura, H., Nakazawa, E., Ito-Inoda, S., Hashino, S., Hasegawa, T., Tokino, T., Toyota, M., Asaka, M. and Sato, N. DNA methyltransferase 1 is essential for maintenance of human colon cancer stem-like cells. *Am J. Pathol.*, in press.
3. Torigoe, T., Asanuma, H., Nakazawa, E., Tamura, Y., Hirohashi, Y., Yamamoto, E., Kanaseki, T., Hasegawa, T., Sato, N. Establishment of a monoclonal anti-pan HLA class I antibody suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue: Unusually high frequency of down-regulation in breast cancer tissues. *Pathol Int.* 62:303-8, 2012
DOI: 10.1111/j.1440-1827.2012.02789.x
4. Ara, S., Kikuchi, T., Matsumiya, H., Kojima, T., Kubo, T., Ye, R., Sato, A., Kon, S., Honma, T., Asakura, K., Hasegawa, T., Himi, T., Sato, N., Ichimiya, S. Sorting Nexin 5 of a New Diagnostic Marker of Papillary Thyroid Carcinoma Regulates Caspase-2 *Cancer Sci.*, 2012, April, 5, issue
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02296.x
5. Matsuzaki, J., Torigoe, T., Hirohashi, Y., Kamiguchi, K., Tamura, Y., Tsukahara, K., Kubo, T., Takahashi, A., Nakazawa, E., Saka, E., Yasuda, K., Takahashi, S. Sato, N. ECRG4 is a negative regulator of caspase-8-mediated apoptosis in human T-leukemia cells. *Carcinogenesis*, 2012 Mar 27 issue.
DOI: 10.1093/carcin/bgs118
6. Mizuuchi M, Hirohashi Y, Torigoe T, Takafumi K, Yasuda K, Saito T, Sato N. Novel oligomannose liposome-DNA complex DNA vaccination efficiently evokes anti-HPV E6 and E7 CTL responses. *Exp Mol Pathol.* 92:185-190, 2012
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.10.002,
7. Mori T, Nishizawa S, Hirohashi Y, Torigoe T, Tamura Y, Takahashi A, Kochin V, Fujii R, Toru K, Greene MI, Hara I, Sato N. Efficiency of G2/M-related tumor-associated antigen-targeting cancer immunotherapy depends on antigen expression in the cancer stem-like population. *Exp Mol Pathol.* 92:27-32, 2012.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.09.016
8. Nakatsugawa, M., Takahashi, A., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Inoda, S., Asanuma, H., Tamura, Y., Hasegawa, T., Takahashi, H., and Sato, N. SOX2 is expressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumor-initiating potential. *Lab Invest.*, 91:1796-1804, 2011
DOI: 10.1038/labinvest.2011.140.
9. Hirohashi, Y. and Sato, N. Tumor

- associated dendritic cells:
molecular mechanisms to suppress
anti-tumor immunity. *Immunotherapy*,
3:945-947, 2011.
DOI: 10.2217/imt.11.94
10. Tamura Y, Hirohashi Y, Kutomi G,
Nakanishi K, Kamiguchi K, Torigoe T,
Sato N. Tumor-Produced Secreted Form
of Binding of Immunoglobulin Protein
Elicits Antigen-Specific Tumor
Immunity. *J. Immunol.*
186:4325-4330, 2011. Selected paper
in "In this issue" of the Journal
DOI: 10.4049/jimmunol.1004048
 11. Oura, J., Tamura, Y., Kamiguchi, K.,
Kutomi, G., Sahara, H., Torigoe, T.,
Himi, T., and Sato, N. Extracellular
heat shock protein 90 plays a role in
translocating chaperoned antigen from
endosome to proteasome for generating
antigenic peptide to be
cross-presented by dendritic cells.
Int. Immunol., 23:223-237, 2011.
Selected paper in "In this issue" of
the Journal
DOI: 10.1093/intimm/dxq475
 12. Kano, M., Tsukahara, T., Emori, M.,
Murase, M., Torigoe, T., Kawaguchi,
S., Wada, T., Yamashita, T., Sato, N.
Autologous CTL response against
cancer stem-like
cells/cancer-initiating cells of
bone malignant fibrous histiocytoma.
Cancer Sci. 102:1443-1137, 2011.
Selected paper in "In this issue" of
the Journal
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01962.
x
 13. Kameshima, H., Tsuruma, T., Torigoe,
T., Takahashi, A., Hirohashi, Y.,
Tamura, Y., Tsukahara, T., Ichimiya,
S., Kanaseki, T., Iwayama, Y., Sato,
N., Hirata, K. Immunogenic
enhancement and clinical effect by
type-I interferon of anti-apoptotic
protein, survivin-derived peptide
vaccine, in advanced colorectal
cancer patients. *Cancer Sci.*,
102:1181-1187, 2011.
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01918.
x
 14. Nakatsugawa M, Hirohashi Y, Torigoe T,
Inoda S, Kiriya K, Tamura Y, Sato E,
Takahashi H, Sato N. Comparison of
speedy PCR-ssp method and serological
typing of hla-a24 for Japanese cancer
patients. *J Immunoassay Immunochem.*
32:93-102, 2011.
DOI: 10.1080/15321819.2010.543219
 15. Saito, K., Tamura, Y., Kukita, K.,
Kutomi, G., Okuya, K., Asanuma, H.,
Torigoe, T., Hirata, K., Sato, N.
Heat shock protein 90 governs
self-nucleic acid recognition by
Toll-like receptors. *Nature*, in
submission.
 16. Inoda, S., Hirohashi, Y., Torigoe, T.,
Takahashi, A., Morita, R.,
Nakatsugawa, M., Nishizawa, S.,
Tamura, Y., Tsuruma, T., Terui, T.,
Ishitani, K., Hirata, K. and Sato, N.
Cytotoxic T lymphocytes efficiently
recognize human colon cancer
stem-like cells. *Am. J. Pathol.*,
178:1805-1813, 2011.
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.ajp
ath.2011.01.004
 17. Miyazaki A, Kobayashi J, Torigoe T,
Hirohashi Y, Yamamoto T, Yamaguchi A,
Asanuma H, Takahashi A, Michifuri Y,
Nakamori K, Nagai I, Sato N, Hiratsuka
H. Phase I clinical trial of
survivin-derived peptide vaccine
therapy for patients with advanced or
recurrent oral cancer. *Cancer Sci.*,
102:324-329, 2011.
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.
01789.x
 18. Inoda S, Morita R, Hirohashi Y,
Torigoe T, Asanuma H, Nakazawa E,
Nakatsugawa M, Tamura Y, Kamiguchi K,
Tsuruma T, Terui T, Ishitani K,
Hashino S, Wang Q, Greene MI, Hasegawa
T, Hirata K, Asaka M, Sato N. The
feasibility of Cep55/c10orf3 derived
peptide vaccine therapy for
colorectal carcinoma. *Exp. Mol.
Pathol.* 90:55-60, 2011.
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.yex
mp.2010.10.001
 19. Nagashima, T., Ichimiya, S., Kikuchi,
T., Saito, Y., Matsumiya, H., Ara, S.,
Koshiba, S., Zhang, J., Hatate, S.,
Tonooka, A., Kubo, T., Hirose, B.,
Shirasaki, H., Izumi, T., Takami, T.,
Himi, T. and Sato, N. Arachidonate
5-lipoxygenase establishes adaptive
humoral immunity by controlong
primary B cells and their cognate T
cell help. *Am. J. Pathol.*,
171:222-232, 2011.
DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.033
 20. Tanaka, T., Kitamura, H., Torigoe, T.,

- Hirohashi, Y., Masumori, N., Sato, N. and Tsukamoto, T. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 137:789-794, 2011
DOI: 10.1007/s00432-010-0940-6
21. Okuya, K., Tamura, Y., Saito, K., Kutomi, G., Torigoe, T., Hirata, K., Sato, N. Spatiotemporal regulation of heat shock protein 90-chaperoned self-DNA and CpG-oligodeoxynucleotide for type I IFN induction via targeting to static early endosome. *J. Immunol.*, 184:7092-7099, 2010.
DOI: 10.4049/jimmunol.1000490
22. Sato A, Tamura Y, Sato N. Yamashita T, Takada T, Sato M, Osai Y, Okura M, Ono I, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K. Melanoma-targeted chemo-thermo-immuno(CTI)-therapy using N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. *Cancer Sci.* 101:1939-1946, 2010.
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01623.x.
23. Hirohashi, Y., Torigoe, T., Inoda, S., Takahashi, A., Morita, R., Nishizawa, S., Tamura, Y., Suzuki, H., Yoyota, M. Sato, N. Immune response against tumor antigens expressed on human cancer stem-like cells/tumor-initiating cells. *Immunotherapy*, 2:201-211, 2010.
24. Ohno, K., Nishimori, H., Yasoshima, T., Kamiguchi, K., Hata, F., Fukui, R., Okuya, K., Kimura, Y., Denno, R., Kon, S., Uede, T., Sato, N. Hirata, K. Inhibition of osteopontin reduces liver metastasis of human pancreatic cancer xenografts injected into the spleen in a mouse model. *Surg. Today*, 40:347-356, 2010.
DOI: 10.1007/s00595-009-4082-x

[学会発表] (計 12 件)

1. Toshihiko Torigoe, Hirohashi Yoshihiko, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato : Stress Response Genes Expressed in Cancer Stem Cells -potent molecular targets for cancer therapy- The 5th International Congress on

Stress Responses in Biology and Medicine, 2011.8.21-25, Quebec City, Canada.

2. Toshihiko Torigoe, Yoshihiko Hirohashi, Noriyuki Sato : Immune responses against cancer stem cells. 第 69 回日本癌学会学術総会、シンポジウム、大阪、9 月 22 日、2010 年。
3. Noriyuki Sato : Progress of cancer immunotherapy. Immunotherapeutic clinical trial of surviving-based tumor antigens and manipulation of antigenicity enhancement by HSP90. Special Clinical Seminar. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010.
4. Toshihiko Torigoe, Yoshihiko Hirohashi, Satoshi Nishizawa, Akari Takahashi, Hiroko Asanuma, Munehide Nakatsugawa, Kenjiro Kamiguchi, Alisa A. Sokolovskaya, Noriyuki Sato. A novel DNAJ family protein is a cancer initiating cell antigen. -A potent molecular target for cancer immunotherapy- The 8th International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses, June 1-4, 2010, Seorak Mt., Korea

他 8 件

[図書] (計 2 件)

1. Noriyuki Sato, Yoshihiko Hirohashi, Tomohide Tsukahara, Shingo Ichimiya, Yasuaki Tamura and Toshihiko Torigoe : Cancer, Immunology and Photonics Science. Optical Devices and Systems, Biomedical and Green Technologies. 47-52. 2010
2. 守田玲菜、廣橋良彦、鳥越俊彦、佐藤昇志 : がん免疫療法の標的抗原、がん免疫療法 -実用化へのチャレンジ-、シーエムシー出版、p.15-23、2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称 : 改良された糖被覆リポソーム組成物
発明者 : 梶原敏充、柿崎麻希、佐藤昇志 (他 4 名)

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特願 2011-102962

出願年月日 : 2011 年 5 月 2 日

国内外の別 : 国内

他 3 件

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/pathol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 昇志 (SATO NORIYUKI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：50158937