

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 5月 31日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651222

研究課題名（和文）血清中の細胞接着・増殖制御因子の同定と新規基礎培地の開発

研究課題名（英文） Identification of cell adhesion molecules and growth factors in the serum &amp; the development of new culture medium

研究代表者

中村 隆範 (NAKAMURA TAKANORI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：70183887

研究成果の概要（和文）：我々は本研究によって、FBSをはじめとする各種動物血清中の血球細胞接着・増殖阻害因子の同定や増殖力価の評価を行い、以下のような結果を得た。

1. 各種ほ乳動物の非働化血清に浮遊血球系細胞に対する接着阻害活性があり、主な接着阻害因子が、補体成分 C4bp、H 因子及びリポ蛋白質 LDL/VLDL であることが分かった。血清タンパクの中で C4bp、H 因子や LDL/VLDL は優先的に培養フラスコ・シャーレの疎水性表面を覆い、浮遊血球細胞が非特異的に接着しないよう阻害しているものと推測された。
2. 血清中の血球細胞増殖阻害因子の同定を進め、その一つが IgM であり、LDL を加熱（血清の非働化条件 56℃、30 分）して生じる酸化 LDL にも強い細胞毒性を見出した。一方、IgG には顕著な阻害活性は見いだせなかった。
3. T 細胞株の中で Jurkat は LDL 要求性が強く、一方、Molt-4 は LDL 要求性が低く、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸 (ITS) のみでも増殖することが分かった。また、Jurkat の完全な増殖には増殖因子や脂質以外の低分子成分が必要なことも分かった。Jurkat の増殖を指標に、IgM を除去して LDL 量をコントロールできれば FBS に匹敵する代替培地の開発が可能となることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：By this research, we performed identification of the blood cell cell adherence and the inhibitory growth factors in various animal sera including FBS, and evaluation of proliferation potential value, and obtained the following results.

1. The inactivation serum of various mammals has adhesion inhibitory activity over a floating blood cell system cell, and it turned out that the main adhesion prevention factors are complement C4bp, H factor, and lipoprotein LDL/VLDL. C4bp, and H factor and LDL/VLDL covered the hydrophobic surface of the cultivation flask laboratory dish preferentially in serum protein, and what is checked so that a floating blood cell cell may not paste up nonspecific was conjectured.
2. Identification of the blood cell cell-growth inhibition factor in serum was advanced, and one of them is IgM and it found out cytotoxicity strong also against the oxidization LDL which heats LDL (56 °C of inactivation conditions of serum, 30 minutes), and arises. On the other hand, inhibitory activity remarkable in IgG was not able to be found out.
3. LDL demand nature of Jurkat was strong in the T-lymph cell stock, and on the other hand, Molt-4 had low LDL demand nature and it turned out an insulin, transferrin, and that only selenious acid (ITS) is increased.

Moreover, perfect multiplication of Jurkat found low molecular components other than a growth factor or lipid also for the required thing.

If IgM is removed for multiplication of Jurkat against an index and the amount of LDL(s) can be controlled, it is possible that development of the alternative culture medium which

is equal to FBS is attained.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物活性物質の探索

キーワード：血清、細胞増殖、無血清培地、LDL

#### 1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、レクチンに分類される**ガレクチンファミリー**、中でも **galectin-9** の構造特性と生理活性（T細胞の遊走、接着、アポトーシスなど）の相関を明らかにしてきた（**N.Matsushita, T.Nakamura, et al.:** J Biol Chem, 275:8355-60 (2000), **M.Sato, T.Nakamura, et al.:** Glycobiology, 12:191-97 (2002)）。また、別種の **galectin-8** から強い好中球接着誘導作用と活性酸素産生誘導作用を見出し、好中球の細胞応答がインテグリン  $\alpha M$  と結合することから開始することを明らかにした（**N.Nishi, T.Nakamura, et al.:** Glycobiology, 13:755-63 (2003)）。さらに、各種血球系培養細胞の接着誘導についても、好中球と同様にインテグリンファミリーが関与することを明らかにした（**L.-H.Lu, T.Nakamura, et al.:** J Biochem, 141:157-72 (2007), **H.Yamamoto, T.Nakamura, et al.:** J Biochem, 143:311-24 (2008)）。

**ガレクチンファミリー**は  $\beta$  ガラクトシド構造を持つ糖鎖を特異的に認識する動物レクチンで、細胞増殖、アポトーシスや細胞接着・遊走など基本的な生物活性に関わる。また、T細胞分化、炎症反応や癌の発症・転移・進行など免疫系や病態との関連性も深い。一方で、ガレクチンによるアポトーシスや細胞接着誘導実験では、使用している **FBS/血清** に含まれる糖タンパク質による非特異的

な阻害効果も心配された。そこで、我々は無血清培地中で浮遊血球細胞を播き、細胞接着に及ぼすガレクチンの作用を調べた。その結果、無血清下では調べた全ての血球細胞がガレクチンの有無に関わらず培養プレートに接着し、増殖抑制あるいはアポトーシス・ネクローシスを生じることが分かった。つまり、**血清には血球系細胞の非特異的接着を抑制する因子が存在し、これらはアルブミン、IgG など血清中の主要な蛋白質でないことも分かった。**FBS などの血清中に多くの細胞増殖因子が含まれていることは広く知られているが、接着阻害因子やアポトーシス抑制因子については全く注目されていない。

本研究では、血球系細胞の非特異的接着やアポトーシスを抑制する血清蛋白質を同定するとともに、細胞増殖に必須の増殖因子群や逆に増殖を抑制する因子群を同時に同定・プロファイリングして、**FBS** を代替し得る新たな基礎培地の開発を目指す。**平成 23 年度**に接着阻害因子（主な因子は同定済み：投稿準備中）と増殖抑制/促進因子群を同定する。**平成 24 年度**は同定した接着阻害因子や増殖因子群を組み合わせた細胞培養用カクテルの構築を行う。

#### 2. 研究の目的

本研究は、浮遊血球系細胞の増殖を指標に、動物血清に含まれる細胞増殖促進/抑制や細

胞接着の制御に関わるタンパク因子及び脂質を同定・プロファイリングし、100%輸入牛胎児血清(FBS)に頼る現在の細胞培養研究システムの改善を図るものである。そのために、既に同定した接着阻害因子の血球系細胞の細胞接着・増殖・アポトーシスに及ぼす効果を調べ、増殖に必須の新規因子群を動物血清中より同定する。次に、増殖抑制因子にも注目して、その同定と測定系の確立を通じて、FBSを代替しうる安定で安価な細胞培養用カクテル(新規基礎培地)の構築を行う。

### 3. 研究の方法

#### (平成23年度) (1) C4bp、H因子及び

#### LDLの血球細胞接着と増殖・アポトーシスへの効果

血清タンパク質であるC4bp、H因子及びLDLの接着阻害活性を定量的に測定するために、リコンビナントC4bp、H因子、LDL/VLDLを用いて各種血球系細胞:T細胞(Jurkat, Molt-4); B細胞(U937); 単球・マクロファージ(THP-1); 赤芽球(K562)を使って、無血清下における細胞接着数を比較する。また、FBSに含まれる接着阻害因子が浮遊血球系細胞の増殖性にどの程度影響しているか、細胞増殖活性やアポトーシス活性を比較検討する。

#### (2) ブタ血清中の細胞増殖抑制因子の精製

ブタ血清では強い細胞増殖抑制活性が見出されたため、Jurkat、Molt-4細胞の増殖を指標に、ブタ血清を硫酸分画した後、ゲル濾過、各種クロマトグラフィーなどを組み合わせて細胞増殖抑制因子の精製を行い細胞増殖抑制因子の実体を明らかにする

#### (3) FBS、ブタ及びヒト血清中細胞増殖因子群の精製

FBSやブタ及びヒト血清の硫酸60-75%画分からゲル濾過、各種クロマトグラフィーな

どを組み合わせる細胞増殖因子群の精製を行う。増殖因子群が精製できればそのまま精製蛋白質を用い、また増殖因子が精製できない場合も粗精製品を用いて、質量分析計にて細胞増殖因子の実体を明らかにする。我々は既にLDLとインスリン、トランスフェリン、亜セレン酸(ITSと略す)を必須の増殖因子群として同定している。

### 平成24年度以降

#### ・FBS、ヒト血清中の細胞増殖抑制因子の同定と濃度測定

(1) ブタ血清中の増殖抑制因子と同じ精製方法や抑制因子に対する抗体を使ってFBSやヒト血清中の抑制因子を分析する。さらに、そのRIAあるいはELISA法による既製の測定系が使える場合は、FBSのロット毎の増殖抑制因子を測定/比較して、細胞増殖活性(力価)と増殖抑制因子の相関関係を明らかにする。既製測定系がなければ年度内に測定系を自前で開発する。

(2) 我々は思いがけず、ヒト血清が実はFBS以上に血球系の細胞培養に適していることを見出した(研究の斬新性・チャレンジ性の項 下図左)。従って、iPS細胞の増殖・分化による再生医療などに患者自身の自家血が有効に利用できると考えている。自家血の有効性を検証するためにも、ヒト血清中の阻害因子については特にその測定系の確立を急ぐ。

#### ・FBSを代替する低タンパク細胞培養用カクテルの構築(下図右)

(1) 細胞培養用リポタンパク質 LDLの至適濃度を各種血球系細胞:T細胞(Jurkat, Molt-4); B細胞(U937); 単球・マクロファージ(THP-1); 赤芽球(K562)を使って調べる。我々は、LDLが高濃度

(200 $\mu$ g/ml 以上) では毒性を持つが、血清中にはその毒性を中和する成分 (stabilizing factor : SF と仮称) が含まれていることも見出している (実体は不明)。

- (2) LDL 以外の接着阻害因子 (C4bp,H 因子) に細胞増殖の促進活性が見出された場合、細胞培養用カクテルの構成成分に加える。
- (3) 平成 23 年度中に FBS、ヒトあるいはブタ血清から ITS 以外の増殖因子が同定できていれば、増殖因子群と LDL、接着阻害因子を組み合わせたタンパクカクテルを試作して、Jurkat を含む各種血球細胞についてその増殖力価を FBS と比較検討する。
- (4) FBS から増殖因子群を精製して培養用カクテルに加えても価値はあまりない。ブタ血清を材料に精製した増殖因子や安価なりコンビナントタンパクが利用できれば、より安価で高力価の FBS 代替品としての価値が高まることから、将来のコストパフォーマンスについても検討を加える。

・ 引続き精製と活性測定は研究代表者が技術補佐員と分担し、さらに技術補佐員は、接着阻害因子や増殖因子を組み合わせた細胞培養用カクテルの調製を検討する。

・ (平成 24 年度) ・ (1) FBS、ヒト血清中の細胞増殖抑制因子の同定と濃度測定

・ ブタ血清中の増殖抑制因子と同じ精製方法や抑制因子に対する抗体を使って FBS やヒト血清中の抑制因子を分析する。さらに、その RIA あるいは ELISA 法による既製の測定系が使える場合は、FBS のロット毎の増殖抑制因子を測定/比較して、細胞増殖活性 (力価) と増殖抑制因子の相関関係を明らかにする。一方、ヒト血清が FBS 以上に血球系の細胞培養に適していることを見

出しているため、iPS 細胞の増殖・分化による再生医療などに患者自身の自家血が有効に利用できるかどうか、自家血の有効性を検証する基礎実験を行う。

・ (2) FBS を代替する低タンパク細胞培養用カクテルの構築

・ まず、細胞培養用リポタンパク質 LDL の至適濃度について各種血球系細胞を使って調べる。次に、LDL 以外の接着阻害因子 (C4bp,H 因子) に細胞増殖の促進活性が見出された場合、細胞培養用カクテルの構成成分に加える。さらに、平成 23 年度中に FBS、ヒトあるいはブタ血清から ITS 以外の増殖因子が同定できていれば、増殖因子群と LDL、接着阻害因子を組み合わせたタンパクカクテルを試作して、各種血球細胞についてその増殖力価を FBS と比較検討する。

#### 4. 研究成果

本研究において、FBS をはじめとする各種動物血清中の血球細胞接着阻害分子の同定や、増殖力価の評価を行い、以下のような結果を得た。

(1) ウシ、ブタ、ウマ、マウス、ニワトリ、アフリカツメガエルなど、調べたすべての哺乳類、鳥類、両生類の非働化血清に浮遊血球系細胞に対する接着阻害活性があり、主な接着阻害因子が、補体成分 C4bp、H 因子及びリポ蛋白質 LDL/VLDL であることが分かった。一方、血清の主要成分であるアルブミンや IgG には阻害活性はほとんど認められなかった。血清タンパクの中で C4bp、H 因子や LDL/VLDL は優先的に培養フラスコ・シャーレの疎水性表面を覆い、浮遊血球細胞が非特異的に接着しないよう阻害しているものと推測された。

(2) 血清中の増殖阻害因子の同定を進め、その一つが IgM であり、LDL を加熱 (血

清の非働化条件 56°C、30 分) して生じる酸化 LDL にも強い細胞毒性を見出した。

(3) 各種動物血清を硫酸や各種クロマトグラフィーで分画し、高い増殖力価の FBS 中にさえ、細胞の増殖抑制因子が含まれていることや増殖因子群のみを比較的簡便に分離できることを見出した。また、ヒトやブタ血清に FBS 以上の増殖活性が存在することを見出した。しかし、各種動物血清を硫酸沈殿や各種クロマトグラフィーで分画したところ、高い増殖活性をアルブミン画分に見い出せたが、最終的にアルブミンと増殖因子との分離には至らなかった。

(4) T 細胞株の Jurkat は LDL 要求性が強く、一方、Molt-4 は LDL 要求性が低くてインスリン、トランスフェリン、亜セレン酸 (ITS) のみで増殖することが分かった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) Iwaki J, Tateno H, Nishi N, Minamisawa T, Nakamura-Tsuruta S, Itakura Y, Kominami J, Urashima T, Nakamura T, Hirabayashi J. (2011). The Gal $\beta$ -(syn)-gauche configuration is required for galectin-recognition disaccharides. *Biochim Biophys Acta.*, **1810**, 643-651.
- (2) Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nishi N, Tatsuno T, Ishigaki Y, Tomosugi N, Yamashiro C, Hata T, Takegami T, Mogami H, Yamaguchi K, Nakamura T, Otani H, Hatta T, Shoji H. (2012) Expression pattern of Galectin 4 in rat placentation. *Placenta*. **33**:885-7.
- (3) Nonaka Y, Ogawa T, Oomizu S, Nakakita S, Nishi N, Kamitori S, Hirashima M, Nakamura T. (2013) Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the

opposite surface of the sugar-binding site. *J Biochem*. In press.

- (4) Itoh A, Fukata Y, Miyanaka H, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Nishi N. (2013) Optimization of the inter-domain structure of galectin-9 for recombinant production. *Glycobiology*. In press.

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 小川崇, 東海林博樹, 野中康宏, 舘野浩章, 平林淳, 西望, 中村隆範「アフリカツメガエル消化管におけるガレクチンファミリーの発現解析」第84回日本生化学会大会 2011年 9月 (京都)
- (2) 野中康宏, 小川崇, 中北慎一, 神鳥成弘, 西望, 中村隆範「ガレクチンの糖認識ドメインについてのNMRを用いた解析」日本生物物理学会 第3回中国四国支部大会 2011年 5月 (広島)
- (3) 野中康宏, 小川崇, 大水総一, 中北慎一, 神鳥成弘, 西望, 平島光臣, 中村隆範「タンデムリピート型ガレクチン-9のC末側糖認識ドメインの役割について」第84回日本生化学会大会 2011年 9月 (京都)
- (4) 山下賀容子, 中村隆範「T細胞株の増殖に及ぼすLDLや増殖因子の効果について」第84回日本生化学会大会 2011年 9月 (京都)
- (5) 小川崇, 東海林博樹, 野中康宏, 舘野浩章, 平林淳, 西望, 中村隆範「ツメガエル消化管及びヒト大腸がん細胞におけるガレクチン4の発現及び機能解析」第85回日本生化学会大会 2012年 12月 (福岡)
- (6) 野中康宏, 小川崇, 大水総一, 中北慎一, 神鳥成弘, 西望, 平島光臣, 中村隆範「免疫調節蛋白質ガレクチン-9のNMRを用いた解析」第11回四国免疫フォーラム 2012年6月 (高知)
- (7) 野中康宏, 小川崇, 大水総一, 中北慎一, 神鳥成弘, 西望, 平島光臣, 中村隆範「タンデムリピート型ガレクチン-9の二つの

糖結合ドメインについてのNMRを用いた解析」第85回日本生化学会 2012年12月（福岡）  
(8) 山下賀容子、中村隆範「T細胞株の増殖における脂質要求性の違いについて」第85回日本生化学会 2012年12月（福岡）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村隆範 (NAKAMURA TAKANORI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：70183887