

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21121007

研究課題名(和文)細胞動態における分子構造の遷移と機能発動

研究課題名(英文) Analysis of the conformational transitions and functional modifications in membrane proteins

研究代表者

早坂 晴子 (Hayasaka, Haruko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70379246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 86,500,000円、(間接経費) 25,950,000円

研究成果の概要(和文)：癌の進展、転移には、癌細胞自身の特性に加えて癌細胞をとりまく微小環境が重要である。最近、癌細胞自身あるいは転移先組織に発現する接着分子やケモカインが癌細胞の遠隔転移に關与する可能性が示唆されている。接着分子CD44は特定の癌細胞に発現し、ヒアルロン酸に結合することで癌転移に關与する可能性がある。一方ケモカインは間質細胞、血管内皮細胞、神経細胞など種々の細胞から産生され、特定のケモカインが特定の受容体に結合することで細胞応答性が調節される。本研究により、リガンドで誘導されるCD44の一過的構造変化、ケモカイン受容体の細胞膜での一過的局在変化が、各分子機能に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In various cancer cells, the expression of adhesion molecules and chemokine receptor shows a positive correlation with the metastatic potential, suggesting a possible involvement of those molecules in cancer metastasis. CD44 plays a role in cell adhesion by binding to its ligand hyaluronate. Chemokines are critical regulators of cell migration in the context of effective and appropriate immune responses, inflammation, angiogenesis and tumor progression. In this research project, we found that the transition of CD44 molecular structure by ligand binding is possibly involved in the CD44-mediated tumor progression. We also found that the dynamics of chemokine receptor localization on the plasma membrane are important for their function in cell migration.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：ケモカイン 細胞運動 接着分子

### 1. 研究開始当初の背景

免疫細胞の生体内移動、癌細胞の原発巣から転移巣への転移には特定の臓器・組織に発現する接着分子およびケモカインが重要な役割を果たす。これまでに国内外での研究から、接着分子、ケモカイン受容体の細胞膜上での局在変化や構造変化が生体内における細胞動態調節に重要であることが示唆されてきた。これらの変化は一過的、過渡的であると予想されるが、立体構造平衡が生体内の細胞動態調節に果たす具体的な役割については不明であった。

### 2. 研究の目的

これまでの接着分子 CD44 の分子構造学的研究から、CD44 分子はプロテアーゼ感受性高い不安定な分子構造とより安定な構造との平衡状態で存在し、この不安定で可逆的な平衡状態が癌細胞の細胞運動と浸潤性を調節する可能性が考えられた。一方、ケモカイン受容体についても、異なるケモカインレセプター間の相互作用によりリガンド感受性が一過的に調節されることを明らかにし、この調節は受容体発現変化を伴わないことから、細胞膜上での分子修飾、多量体化、局在変化などの分子構造変化で制御される可能性が考えられた。そこで本研究課題では、接着分子およびケモカイン受容体による細胞動態調節機構を細胞レベルおよび生体レベルで解析し、細胞膜タンパク質の立体構造平衡と分子機能の相関を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) リガンド結合型、非結合型に立体構造がシフトした CD44 点突然変異体を用いて、CD44 分子の構造遷移が機能的に重要である可能性を検証した。これらの変異体を癌細胞に発現させ、マウス移植実験により造腫瘍性、転移能を比較した。

(2) ケモカイン受容体 CXCR4 シグナルによる CCR7 受容体感受性亢進の生物学的意義とメカニズムを解析した。CXCR4 結合分子である CXCL12 と HIV-gp120 を用いて、生体内における CCR7 依存的細胞移動が調節される可能性を検討した。また CXCR4、CCR7 分子の細胞内での局在変化を解析するため、これらの受容体と蛍光タンパク質の融合分子を細胞に発現させ、ケモカイン刺激下における受容体局在の細胞ライブイメージング解析をおこなった。

### 4. 研究成果

(1) 活性化型 CD44 点突然変異体、不活性化型点突然変異体および野生型遺伝子発現プラスミドをそれぞれ導入した各細胞株を樹立し、免疫不全マウス個体に移植し、in vivo における造腫瘍性、転移能を解析した。乳癌細胞株 MCF7 に遺伝子導入した細胞株について解析したところ、最も高い造腫瘍性を示したのは野生型 CD44 遺伝子導入株であり、次に

活性化型あるいは不活性化型 CD44 点突然変異体、続いて mock 細胞の順番となる傾向がみられた。転移については、どの細胞株も細胞移植後 2 週間の時点における転移率は 1/7 程度であったため、十分なサンプル数を得られず有意な差を見出すことができなかった。以上の結果から、さらに詳細な解析が必要ではあるが、CD44 構造の準安定状態は一部の癌細胞における造腫瘍能調節に関与する可能性が示唆された。

(2) 本研究で私たちは CXCR4 と CCR7 の協働作用がヒト乳癌細胞の浸潤活性および転移能を調節すること、またヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) エンベロープタンパク質 gp120 が CXCR4 を介してヒト末梢血 CD4 T 細胞の CCR7 依存的細胞遊走を亢進させることを明らかにした。この知見はケモカイン受容体協働作用が定常状態での免疫細胞の組織への移動、癌細胞のリンパ節転移、HIV-1 の感染病態など多方面での細胞動態調節に関与する可能性を示唆する。

次に私たちはヒト CD4 T 細胞株を用いて、CXCR4/CCR7 協働作用の分子メカニズムについて解析した。ヒト乳癌細胞膜における両ケモカイン受容体局在解析から CXCR4 シグナルの有無に関わらず、両受容体はラッフル膜に集積して存在した (図 1)。CXCR4 シグナル誘導条件下では、CCR7/CXCR4 集積ラッフル膜の形成が促進さ

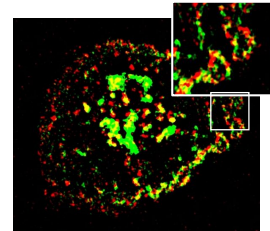
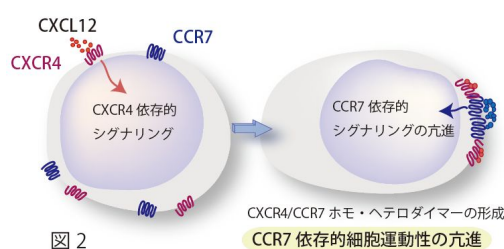


図 1 ラッフル膜における CXCR4 (赤)/CCR7 (緑) の共局在 (超解像顕微鏡にて撮影)

れ、ラッフル膜部位での CCR7 リガンド集積と CCR7 の細胞質への取込みが亢進した。これらの結果から、CXCR4 シグナルにより CCR7/CXCR4 集積ラッフル膜形成亢進が誘導され、ラッフル膜における CCR7 リガンド結合と CCR7 シグナリングが亢進することにより、CCR7 反応性が亢進する可能性が考えられた。一方、CXCR4 シグナルが CCR7 ホモオリゴマーや CCR7/CXCR4 ヘテロオリゴマー形成に影響を及ぼす可能性を検討したところ、CXCR4 シグナル誘導により局所的な CCR7/CCR7 ホモダイマーおよび CCR7/CXCR4 ヘテロダイマー形成が促進されることが明らかになった。また CCR7/CCR7 ホモオリゴマーおよび CCR7/CXCR4 ヘテロオリゴマー形成阻害活性をもつ CCR7 膜領域由来ペプチドが CCR7 依存的な細胞遊走活性を阻害することから、CCR7/CCR7 ホモオリゴマーおよび CCR7/CXCR4 ヘテロオリゴマー形成が CCR7 活性に重要である事が示唆さ

れた。さらに私たちは CXCR4 の遺伝子ノックダウンにより CCR7 の細胞膜での発現が低下する事から、CCR7/CXCR4 ヘテロオリゴマー形成は CCR7 発現安定性にも重要であるという知見を得た。以上の結果から、CXCR4 リガンドで誘導される CCR7 反応性亢進のメカニズムとして、図 2 で示す作用機序が考えられた。すなわち CXCR4 シグナルの誘導により細胞膜上の CCR7 ホモダイマーおよび CCR7/CXCR4 ヘテロダイマーが形成され、ラフリング膜部位での局所的集積が誘導される。の結果、細胞膜局所における CCR7 発現が安定化され、これに伴って CCR7 リガンド結合能が上昇する。の結果、CCR7 リガンド誘導性細胞遊走が亢進する、という一連の経路が考えられた。



## 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 8 件)

- Umemoto, E., Takeda, A., Jin, S., Luo, Z., Nakahogi, N., Hayasaka, H., Lee, CM., Tanaka, T., and Miyasaka, M. Dynamic changes in endothelial cell adhesion molecule nepmucin/CD300LG expression under physiological and pathological conditions. *PLoS ONE*, 8:e83681. (2013)
- Ding, Q., Cai, G-Q., Hu, M., Yang, Y., Zheng, A., Tang, Q., Gladson, CL., Hayasaka, H., Wu, H., You, Z., Southern, BD., Grove, LM., Rahaman, SO., Fang, H., and Oلمان, MA. FAK-related nonkinase is a multifunctional negative regulator of pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 182: 1572-1584. (2013)
- Bai, Z., Cai, L., Umemoto, E., Takeda, A., Tohya, K., Komai, Y., Veeraveedu, PT., Hata, E., Sugiura, Y., Kubo, A., Suematsu, M., Hayasaka, H., Okudaira, S., Aoki, J., Tanaka T., Albers, HMG, Ovaa, H., and Miyasaka, M. Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis. *J. Immunol.*, 190: 2036-2048. (2013)
- Umemoto, E., Otani, K Ikeno, T., Verjan Garcia N, Hayasaka, H., Bai, Z., Jang MH., Tanaka T., Ueda, K., and Miyasaka, M. Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling. (2012) *J. Immunol.*, 189: 191-199.
- Umemoto, E., Hayasaka, H., Bai, Z., Cai, L., Yonekura, S., Peng, X., Takeda, A., Tohya, K., Miyasaka, M. Novel regulators of lymphocyte trafficking across high endothelial venules. *Crit. Rev. Immunol.*, 31: 147-169. (2011)
- Hayasaka, H., Taniguchi, K., Fukai, S. and Miyasaka, M. Neogenesis and development of the high endothelial venules that mediate lymphocyte trafficking. *Cancer Sci.*, 101: 2302-2308. (2010)
- Ogino, S., Nishida, N., Umemoto, R., Suzuki, M., Takeda, M., Terasawa, H., Kitayama, J., Matsumoto, M., Hayasaka, H., Miyasaka, M., and Shimada, I. Two-state conformations in the hyaluronan-binding domain regulate CD44 adhesiveness under flow condition. *Structure*, 18: 649-656. (2010)
- Bai, Z., Hayasaka, H. (co-first authors), Kobayashi, M, Li, W, Guo, Z, Jang, MH, Kondo, A, Choi, BI, Iwakura, Y, and Miyasaka, M. CXCL12 promotes CCR7-dependent naïve T cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Immunol.*, 182: 1287-1295. (2009)

〔学会発表〕(計5件)

1. Haruko Hayasaka, Daichi Kobayashi,  
Masayuki Miyasaka. Chemokine receptor  
oligomerization: a potential mechanism for  
regulating lymphocyte and cancer cell  
migration (2013年10月29日 第51  
回日本生物物理学会シンポジウム:京都  
国際会議場)
2. The HIV-1 gp120/CXCR4 interaction  
promotes CCR7-dependent CD4 T cell  
trafficking into lymph nodes. Hayasaka H,  
Yoshimura H, Kobayashi D, Nakayama EE,  
Shioda T, Bai Z, Miyasaka M (2012)  
Keystone Symposia. Poster発表:
3. 白血球、癌細胞の生体内動態調節とケモ  
カイン協働作用 早坂 晴子(2011年7  
月21日 新学術領域研究「過渡的複合  
体」公開シンポジウム:東京大学薬学部  
講堂)
4. The effects of HIV-1 gp120 on CCR7  
ligand-induced human CD4 T cell  
trafficking. Hayasaka H, Yoshimura H,  
Nakayama EE, Shioda T, Bai Z, Miyasaka  
M (2010) 第14回 国際免疫学会 口頭  
発表:
5. 早坂 晴子、吉村 洋美、白 忠彬、宮  
坂 昌之:ケモカインレセプターの準安  
定状態と細胞動態 (2010年6月16日 第  
10回日本蛋白質科学会年会 企画ワー  
クショップ:札幌コンベンションセンタ  
ー)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂 晴子 (HAYASAKA, Haruko)  
大阪大学 医学系研究科 助教  
研究者番号: 70379246

(2) 研究分担者

白 忠彬 (BAI, Zongbin)  
大阪大学 免疫学フロンティア研究セン  
ター 特任助教  
研究者番号: 10512840

(3) 連携研究者

宮坂 昌之 (MIYASAKA, Masayuki)  
大阪大学 医学系研究科 教授  
研究者番号: 50064613