

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20168

研究課題名(和文) Beta-2 Glycoprotein Iの腫瘍血管新生抑制効果の検討

研究課題名(英文) The inhibitory effect of Beta-2 Glycoprotein on tumor angiogenesis.

研究代表者

中川 久子(Nakagawa, Hisako)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任助教

研究者番号：60615342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：B2GPIおよびnicked B2GPIは血管内皮細胞の増殖や遊走を阻害する効果を有し、またB2GPIでのみ細胞増殖と浸潤を阻害した。B2GPI添加により乳がんの細胞骨格が変化したことから、EGF-EGFR相互作用と後に続くシグナル伝達、上皮間葉系移行(EMT)への影響を検討した。EGFによるEGFRのリン酸化および核内移行、EMTのマーカーであるslug+snailとvimentinのタンパク質量は、それぞれ既報のとおり、EGFの添加により亢進したが、B2GPIの存在下では認められなかった。以上のことから、B2GPIは腫瘍細胞並びに血管内皮細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the significance and functional role of B2GPI in angiogenesis and cancer invasion/metastasis, VE-cadherin endocytosis assay was performed in the presence or absence of intact or nicked B2GPI using HUVECs. We found that B2GPI and nicked B2GPI inhibit VE-cadherin endocytosis and cell permeability. The proliferation of tumor cells was inhibited and F-actin polymerization was suppressed by only intact form B2GPI. In addition, B2GPI suppressed the EGF-EGFR interaction, such as EGFR2 phosphorylation and nuclear translocation. In general, Epithelial-Mesenchymal Transformation (EMT), as it is associated with cell proliferation, differentiation and migration, is induced by growth factor. We investigated that the influence of B2GPI for EMT. The mRNA expression levels and protein levels of EMT related transcription factors Slug, Snail and Vimentin were down-regulated after B2GPI treatment. These data suggest that B2GPI is a critical novel regulator for angiogenesis and tumorigenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Beta 2 Glycoprotein 乳がん 腫瘍転移 EGF

1. 研究開始当初の背景

乳癌は、若年層からの罹患率と死亡率が他の癌には見られない程高く、その制圧が強く求められている。多くの浸潤性乳管癌や悪性の高い非浸潤性乳管癌に EGFR-GEP100Arf6 経路が存在する事が報告され、近年、同経路が VEGFR2 の下流にも存在する事が明らかにされた。この経路が乳がんの転移抑制治療ターゲットになるものと予想された。

B2GPI は妊娠合併症や動脈血栓症を呈する自己免疫疾患である抗リン脂質抗体症候群の主要な抗原として広く知られている。B2GPI の詳細な生理機能は未だ明らかにされていないが、申請者はこれまでに B2GPI の分解産物である B2GPI, nicked B2GPI が強い血管新生抑制効果を有することを報告した。近年この nicked B2GPI の作用は VEGFR2 を介して Cell cycle の抑制に働き、血管内皮細胞の増殖や遊走を阻害する事が明らかになっている。また申請者は nicked B2GPI が plasminogen の分解産物であり、腫瘍血管新生抑制効果を有する Angiostatin と結合し、互いの血管新生抑制能の抑制しあう事を報告している。

2. 研究の目的

B2GPI には腫瘍血管内皮細胞や腫瘍転移に対する抑制効果を有するものと予想される。腫瘍血管内皮細胞および腫瘍細胞における B2GPI の作用を検討し、新たな癌転移抑制薬の開発に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Cells

ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC は EGM-2 で、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468LN は DMEM with 10% FCS で 37 度 5% CO₂ 下で培養した。

(2) Protein

nicked B2GPI の精製は以下のように行った。affigel 10 (Bio-Rad) 2ml を cold PBS で 3 回洗浄し(8000rpm, 1分, 4℃)、PBS に懸濁後 spin カラムよりゲルを取り出し遠心を行った。ローテータ - を用いて二時間、4℃ 下でヒト血漿由来 plasmin (calbiochem) 400µg を Affigel 10 に固定し、二時間後遠心により gel を回収する(8000rpm, 1分, 4℃)。Gel を 3 回 cold PBS で洗浄し、再び PBS に懸濁した後エッペンチューブに移し、B2GPI (Yamasa) を 1mg 加えて 37℃ 下 overnight で浸透を行った。

(3) HUVEC VE-cadherin endocytosis

カバーガラスボトムチャンバースライド上で培養した HUVECs は VE-カドヘリン抗体と反応させた後、洗浄する。VEGF-A および B2GPI を添加後、1 時間後に固定透過処理を行い、蛍光標識した二次抗体を反応させ、蛍光顕微鏡でエンドサイトーシスの程度を比較した。

(4) Tumor cell migration assay

細胞は DMEM (-) を用いて 1x10⁵ cells/ml に分散し、1well に 50ul ずつ分注した。さらに B2GPI および nicked B2GPI を添加した。24 時間、48 時間、72 時間、96 時間培養後、MTT Assay にて測定した。データはグラフ化し、統計的解析には t 検定を使用した。

(5) Tumor cell invasion assay

intact B2GPI および nicked B2GPI が MDA-MB-468LN 細胞の浸潤に与える影響について BD Matrigel invasion Chamber を用いて試験した。8 時間 37℃ 5% CO₂ 下で静置し、ディフクイック (シスメックス) を用いて Matrigel および 8µm ポアを通過しメンブレン下面に達した MDA-MB-468LN 細胞を染色し計測した。

(6) Western Blot

MDA-MB-468LN 細胞は EGF 添加後 0、15、60 分後の cell lysate を調整し、WB にてタンパク量を比較した。WB に使用した一次抗体は EGFR、EGFR pY1068、β-catenin、Vimentin、Slug+Snail、β-actin を用い、二次抗体は anti-Rabbit IgG HRP を用いて、検出した。バンドは Image J を用いて解析した。

(7) 免疫染色

EGF、β2GPI を添加反応後 4% パラホルムアルデヒドで固定、0.5% Triton X-100 で透過処理を行い、一次抗体に WB で使用した抗体と同じものを使用した。二次抗体は anti Rabbit IgG alexa fluor 488 または alexa fluor 594 を使用した。画像は Olympus Fv10i を用いて取得し、Image J にて蛍光強度を比較した。

4. 研究成果

(1) B2GPI および nicked B2GPI は VEGF による VE カドヘリンエンドサイトーシスと細胞間透過性の誘導を抑制する

はじめに、腫瘍形成・転移に重要な VEGF-A による血管内皮細胞の透過性と VE カドヘリンエンドサイトーシスの亢進に対する B2GPI および nicked B2GPI の作用を解析した。その結果 B2GPI および nicked B2GPI は VEGF-A 存在下で血管内皮細胞の増殖や遊走を阻害する効果を示し、特に nicked B2GPI は細胞間の透過性と VE カドヘリンエンドサイトーシスを強く抑制した。

(2) β2GPI は腫瘍細胞の増殖および細胞遊走を抑制する

MDA-MB-468LN 細胞は B2GPI 添加群で生存率が低下傾向にあり、濃度上昇に伴い、有意に細胞数の減少が認められた。また Wound Healing Assay においても同様の傾向が認められ、24 時間後の EGF 群と EGF+B2GPI 100µg/ml 添加群の比較では EGF+B2GPI 添加群で有意に細胞遊走の抑制が認められた。増殖

試験中 B2GPI を添加した乳がん細胞では、細胞の形態変化が観察されたため、F-actin を染色し比較した。その結果 F-actin 量の低下を認め、B2GPI による細胞骨格形成阻害効果を確認した。

intact form の B2GPI は腫瘍血管内皮細胞よりも腫瘍細胞そのものの増殖に効果を有することが明らかになった。このことより以降の試験では、乳がん細胞に対する影響を検討することとした。

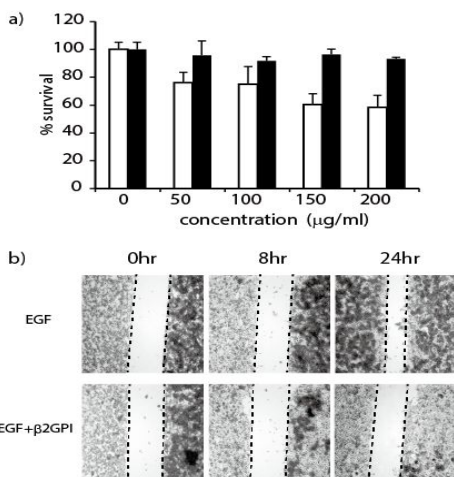


Fig.1 細胞生存率および Wound Healing
a) 細胞生存率(EGF+β2GPI、 EGF)
b) Wound Healing

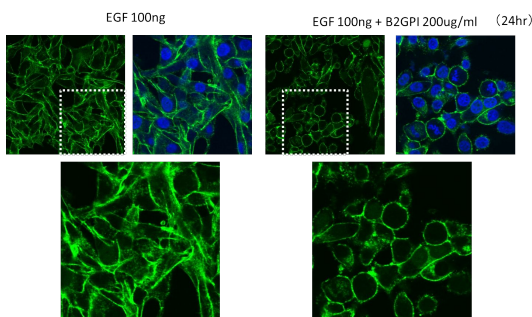


Figure.2 B2GPI による F-actin 重合および細胞骨格変化

(2) B2GPI は EGF-EGFR 経路を阻害し、後に続くシグナル伝達を抑制した

次に B2GPI は EGF による細胞間透過性亢進にどのように影響するのか検討を行った。EGF 添加下の細胞では、細胞間接着及び細胞間透過性が亢進したが B2GPI の濃度依存的に EGF の効果を抑制した。また EGF による EGFR のリン酸化の抑制、並びにリン酸化 EGFR の核内移行を有意に抑制した。Arf-6 の下流の遺伝子の発現は、B2GPI の濃度依存的に発現の低下を認めた(Fig.3)。一方、これらの効果は EGF あるいは EGFR と B2GPI の結合によるものかどうか証明できなかった。

(3) B2GPI は EGF による乳がん細胞の EMT 誘

導を阻害する

がん細胞はいくつかの成長因子によって上皮間葉転換(EMT)が誘導される。本研究においても細胞骨格の変化から、EGF によって EMT 誘導されている可能性が考えられた。そのため EMT のマーカーとして知られる slug、snail、vimentin についてタンパク質量を WB で比較定量した結果、EGF 添加群に比べ、

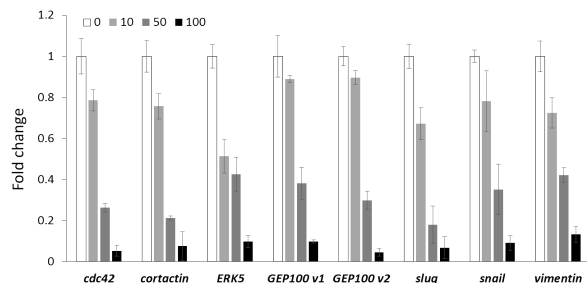
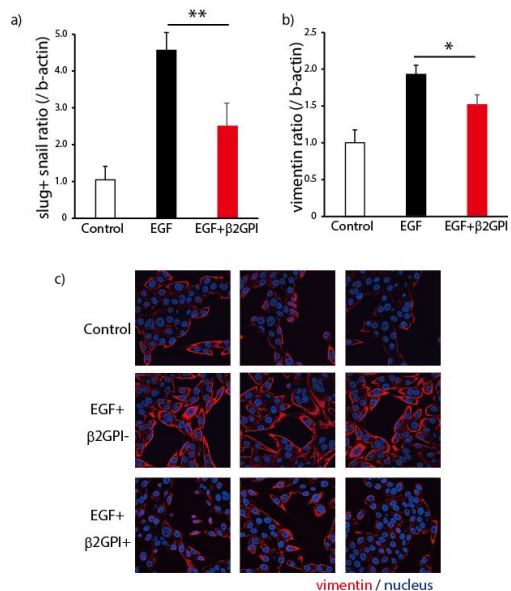


Figure.3 EGFR 下流の遺伝子発現

B2GPI 添加群で有意な減少を認めた ($p < 0.01$, $p < 0.05$) (Fig.4a)。また vimentin を免疫染色した結果、EGF 添加群では細胞の集合の外側細胞において vimentin の高い発現を確認した。一方 EGF と B2GPI を添加した群では、EGF を添加していないコントロールと同程度の発現であった。このことから B2GPI は EGF-EGFR を阻害することで後に続く接着や

透過、EMT に関する多くのシグナルを抑制することが明らかとなり、以上のことから



B2GPI には血管新生抑制と腫瘍形成・転移の抑制に効果を有する可能性が示唆された。

Figure.4 EMT マーカーへの影響

- a) slug+snail のタンパク質量比
- b) vimentin のタンパク質量比
- c) vimentin の局在の比較

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中川 久子 (NAKAGAWA, Hisako)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・
特任助教
研究者番号：60615342