

平成21年 6月 4日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590304  
 研究課題名（和文）腫瘍細胞の転移と血管新生阻害およびアポトーシスを誘導するペプチドに関する研究  
 研究課題名（英文）A study of high weight molecular kininogen domain 5 derived peptide: Inhibition of metastasis and vascularization, and induction of apoptosis  
 研究代表者  
 大久保 岩男（OHKUBO IWAO）  
 滋賀医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：80152073

研究成果の概要：ヒト血液凝固内因系・高分子キニノーゲンの分解産物であるドメイン5（D5<sub>H</sub>）の持つ細胞の接着阻害，走化阻害，浸潤阻害とその阻害活性機構，内皮細胞管腔形成阻害，アポトーシス誘導活性を検討した。(1)細胞の種類と誘因タンパク質（細胞外基質タンパク質）の種類にかかわらず，D5<sub>H</sub>およびD5<sub>H</sub>由来ペプチドによる細胞の接着阻害，走化阻害，浸潤阻害が見られた。(2)阻害活性を発揮するD5<sub>H</sub>の領域に結合する細胞膜面分を同定した。(3)内皮細胞管腔形成阻害活性を持つと思われる領域を同定した。(4)アポトーシス誘導活性は細胞接着阻害実験後の細胞において認められなかった。(5)抗体を用いた細胞染色法によるERK1/2とAktのリン酸化の割合の変化は，細胞接着阻害実験後の細胞では見られなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞の走化（伸展）・浸潤，ひいては転移の阻害をする物質を見だし，およびその阻害機構を明らかにすること，さらに阻害物質が臨床治療に応用できれば，癌治療に関わる基礎の研究者や臨床の医師に大きく貢献すると思われる。しかしながら，阻害物質が明らかとなったとしても，その物質が生体に副作用として多大な悪影響を与える場合も多い。そこで，私どもは悪影響を極力排除する目的でヒト生体内物質を用いることとした。実際には，血液凝固の内因系の補助因子として存在する高分子キニノーゲンの誘導体を用いて研究を進めてきた。ヒトの高分子キニノーゲンは血液凝固や線溶系のセリンタイプのプロ

テアーゼである活性型第XII因子，プラスミンにより分解されることが知られているが，これらの酵素により高分子キニノーゲンからブラジキニンばかりでなく，ドメイン5（D5<sub>H</sub>，分子量約12,000で，Histidine-X-Glycineという繰り返し配列よりなり，Hisが多いことからhistidine-rich regionとも呼ばれている）も遊離される。私どもは，このD5<sub>H</sub>が骨肉腫細胞株一つであるMG-63細胞の細胞接着，伸展，浸潤を阻害することおよびその阻害活性発現にD5<sub>H</sub>のC末端側の15残基のアミノ酸が関与していることを報告し（Kamiyama *et al.* *BBRC*, 2001），さらにこの15残基の中に，His-Gly-Lys-motif（HGK-motif）が存在し，この3残基が最も重要な配列であることを明

らかにし報告した (Kawasaki *et al.* *J Biol. Chem.* 2003)。また、このmotifを含むペプチドはメラノーマ株であるB16-F10細胞の肺への転移阻害を *in vivo*でも示した。

## 2. 研究の目的

(1) 他の癌細胞株や正常の組織細胞でのこれらの阻害機能が未だ明らかになっていないこと、阻害を仲介する膜タンパク質が同定されていないこと (予備実験では、D5<sub>H</sub>に結合する分子量約 95,000 のインテグリンβ<sub>3</sub>とは別のタンパク質の存在を乳癌細胞株で確認している。)、さらには細胞内へ如何なる情報伝達が、この膜タンパク質を介して送られるのか、その情報伝達のどの段階が阻害または活性化 (リン酸化や脱リン酸化) されるのかなどが不明であることからまずこれらを解析する。

(2) 上記 15 残基の中に管腔形成 (腫瘍細胞のための栄養血管の形成をみるとされる実験) を阻害することも見いだした。この管腔形成に関与する腫瘍細胞の膜タンパク質も未だ不明であり、腫瘍の細胞接着、伸展、浸潤の阻害に関わる膜タンパク質と同様に解析する。

(3) D5<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列の中に、アポトーシスを誘導する配列が存在することも、最近推定されているので、D5<sub>H</sub>分子上のいかなるアミノ酸配列がアポトーシスを誘導するかを明らかにし、その細胞内でのアポトーシスの発症機序も明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) HGK-motif による種々の腫瘍細胞の走化活性 (haptotaxis) およびマトリゲルを用いた浸潤活性 (haptoinvasion) の阻害機能の解析:

モデル腫瘍細胞としてヒト乳癌由来の細胞株である MAD-MB231 やマウスメラノーマ B16、ヒト骨肉腫株化細胞 MG-63 などを用い、また細胞外マトリックスとして、ビトロネクチン (VN)、コラーゲン・タイプ I (ColI) および Zn-α2-glycoprotein (ZAG) を用い、上記双方の活性を阻害する D5<sub>H</sub>領域由来の 15 残基のペプチド (H479KHGHGKHKNK493)、15 残基を分割したペプチド (K480HGHGKHKNK487)、(H488KNKGKKN495)、(G484HGHGKHKNK491) を合成し、限られた範囲の腫瘍の走化活性および浸潤活性阻害に効果があるのか否か、その普遍性を明らかにする。

(2) 接着・走化性・浸潤活性の阻害機能に関わる膜タンパク質の単離:

HGK-motif を認識する細胞膜表面上の受容体を同定することで、細胞内へのシグナル伝達系を明らかにすることができる。D5<sub>H</sub> や 15 残基の D5<sub>H</sub> 由来ペプチドを結合させた樹脂と細胞可溶性膜画分を混和させ、D5<sub>H</sub> 由来ペ

プチド中の HGK-motif を含まないペプチド (H488KNKGKKN495) で洗い、HGK-motif を含むペプチド (G484HGHGKHKNK491) で特異的に溶出されるタンパク質を回収し、そのアミノ酸配列の解析から目的のタンパク質を同定する。

(3) 血管新生阻害活性中心の同定:

腫瘍細胞が増殖・転移するためには栄養血管形成が必須である。D5<sub>H</sub> に、血管新生阻害活性が存在することがヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた実験から明らかになっているので、今回は新たに、ヒトの末梢血管より得られた HMVEC (normal human microvascular endothelial cell) を加えて実験を行う。その際、D5<sub>H</sub> 由来ペプチドを用いて血管管腔形成阻害実験を行い活性中心を絞りこんでいく。motif が存在すれば、それを提唱する。

(4) アポトーシス誘導活性中心の同定:

D5<sub>H</sub> を構成するアミノ酸配列を 10 残基程度に分け、それらのペプチドを合成する。合成ペプチドを腫瘍細胞に添加し、アポトーシス誘導の有無を FITC 標識アネキシン V 法およびカスパーゼ 3 法などで解析し、アポトーシス誘導活性中心の同定を行う。

(5) 接着・走化性・浸潤の阻害および血管新生阻害による情報伝達機構の変化の解析:

阻害活性ペプチドを腫瘍細胞に作用させ、細胞内情報伝達に関与すると考えられているタンパク質 (MAPK, Akt など) を中心とした物質の量的変化を抗体 (Akt 抗体, ERK1/2 抗体, リン酸化 Akt, リン酸化 ERK1/2 抗体など) を用いて、HGK-motif 結合タンパク質とがどのようにこの情報伝達に関わっているかを明らかにする。さらに、リン酸化に焦点を絞った抗体を用いて、リン酸化という視点からも細胞内情報伝達機構を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 種々の腫瘍細胞の走化性・浸潤の阻害機能の解析:

ヒト乳ガン株化細胞 MDA-MB-231 でみられた、HGK-motif によるビトロネクチン (VN) に対する (VN/MDA-MB-231) 細胞の接着・走化性・浸潤の阻害が、MG-63 の I 型コラーゲン (ColI) に対する (ColI/MG-63) 細胞の接着・走化性・浸潤でも同様に見られた。ColI/MG-63 の結果では、VN/MDA-MB-231 細胞 (*JBC* 2003 参照) と異なり、HGK-motif を C 末端にもつペプチド (K479-K486) の接着阻害活性は見られなかった (図 1 参照)。また、HGK-motif を持つペプチドのマトリゲル浸潤阻害活性は ColI/MG-63 では 25% であったのに対し VN/MDA-MB-231 では 50% であった。

HGK-motif のペプチド中での位置や誘因物質として用いた細胞外マトリックスと細胞の組み合わせにより阻害活性の値に差が見られるものの、これらの結果と我々の以前の報告 (BBRC 2001, JBC2003) から、HGK-motif の阻害活性は、細胞外基質や細胞の種類を選ばず発揮されることが明らかとなった。

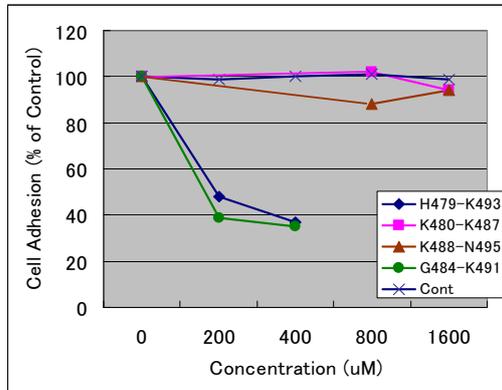


図1 細胞接着阻害実験 (ColI/MG-63)

(2) 走化性・浸潤活性の阻害機能に関わる膜タンパク質の単離：

D5<sub>H</sub>-Sepharose に結合したタンパク質を HGK-motif を含まないペプチドで洗浄し、HGK-配列を含むペプチドを流し、特異的に溶出されたタンパク質として  $\alpha$ -アクチニン 4 を検出した。 $\alpha$ -アクチニン 4 は細胞内の F-アクチン結合タンパク質であり、アクチンを調節することで細胞の移動に関与し、転移性の乳がんやリンパ節に転移した大腸癌で高発現していることが報告されている。そこで、D5<sub>H</sub> や D5<sub>H</sub> 由来ペプチドが細胞内に取り込まれ細胞内のアクチニン 4 に結合し阻害作用を示すのかを検討した。組換えタンパク質 GST-D5<sub>H</sub> を用いた細胞接着阻害実験後の細胞を抗 GST 抗体や抗 D5H 抗体で染色したところ、一部に非特異的に染色される細胞が見られたため、完全を期すため現在再実験を行っている。

(3) 血管新生阻害活性中心の同定

HUVEC をマトリゲル上で GST- D5<sub>H</sub> や D5<sub>H</sub> 由来ペプチド存在下、16 時間培養した。D5<sub>H</sub> (アミノ酸 94 残基) で見られたマトリゲル上での血管新生阻害は、D5<sub>H</sub> 由来ペプチド (15~8 残基) にしても阻害の傾向は見られた。その活性中心は、細胞の接着・走化性・マトリゲル浸潤を阻害する 15 アミノ酸残基の HGK-motif を含むペプチドの後方に存在している可能性が出てきた。そこで、HGK-motif 直後のペプチドを鋳型にしてオーバーラップするように数種類のペプチドを作製した。その結果、HUVEC のマトリゲル上での管腔形成阻害は、一番 C 末端に近いペプチドで阻害される傾向が見られた。

同様の実験を、HMVEC を用いて行ったところ、HUVEC と同様の傾向が見られた。

以上の結果より、ヒト高分子キニノーゲン・D5<sub>H</sub> の C 末端側のアミノ酸残基に内皮細胞の管腔形成阻害活性がある可能性が高くなった。

(4) アポトーシス誘導活性中心の同定：

アポトーシス誘導能について、細胞接着阻害実験後の MG-63 細胞を用いて検討した。アポトーシスが起これ細胞内にあるホスファチジルセリンが細胞膜表に出現した状態を検出するアネキシン V 法では、GST- D5<sub>H</sub> や D5<sub>H</sub> 由来ペプチド存在下と非存在下で有意な差は見られなかった。不活化しているカスパーゼ 7 や 3 がアポトーシスにより活性化されるという初期のアポトーシスの状態を見るために細胞を可溶化後、カスパーゼ 7 と 3 の基質を加え、目的のカスパーゼの酵素活性を測定したが、安定した結果が得られなかった。コラーゲン I 型やマトリゲル上での臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) のアポトーシス (16h と 24h) も検討したが、結果は MG-63 細胞と同様であった。In vitro のアポトーシス実験系では pH の影響が大きいことが報告されており、D5<sub>H</sub> は His-rich protein と呼ばれ、プラスチャージのアミノ酸が多いことから新たなアッセイ系を検討している。

(5) 接着・走化性・浸潤の阻害および血管新生阻害による情報伝達機構の変化の解析：

シグナル伝達系についても細胞接着阻害実験後の MG-63 細胞を用いて検討した。インテグリンや成長因子受容体の下流にある Akt と ERK1/2 のリン酸化を中心に、細胞を蛍光抗体染色法で解析した。Akt と ERK1/2 共にリン酸化されている割合は、D5<sub>H</sub> 由来ペプチド存在下、非存在下で大きな差は認められなかった。アクチニン 4 との関係から、アクチン線維形成に関係する ARP2/3 についても調べる必要があり、さらに実験を進めているところである。

## 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)

- Ohno S, Toyoda F, Zankov DP, Yoshida H, Makiyama T, Tsuji K, Honda T, Obayashi K, Ueyama H, Shimizu W, Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H, Kita T, Horie M  
“Novel KCNE3 mutation reduces repolarizing potassium current and associated with long QT syndrome” *Hum. Mutat.*, 30 (4) : 557-563 (2009) 査読有

り

- ② Takeuchi K, Sakaue T, Yamamoto Y, Nishi K, Ohkubo I, "Shedding of gACE from residual body membrane of rat sperm", *Leg. Med. (Tokyo)*, 11, S309-S310 (2009) 査読有り
- ③ Morita Y, Araki H, Sugimoto T, Takeuchi K, Yamane T, Maeda T, Yamamoto Y, Nishi K, Asano M, Shirahama-Noda K, Nishimura M, Uzu T, Hara-Nishimura I, Koya D, Kashiwagi A, Ohkubo I, "Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells ", *FEBS Lett.*, 581, 1417-1424 (2007) 査読有り
- ④ Takeuchi K, Araki H, Sakaue T, Yamamoto Y, Fujiwara M, Nishi K, Ohkubo I, "Porcine germinal angiotensin I-converting enzyme: Isolation and characterization and molecular cloning ", *Comp. Biochem. Physiol. part B*, 146, 215-226 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tunetoshi Hato, Toshinaga Maeda, Susumu Uchiyama, Daisuke Nou, Keisuke Takeuchi, Osamu Ogikubo, Iwao Ohkubo and Takanobu Otsuka, Identification of actinin-4 as a binding protein for domain 5 of high molecular weight kininogen on MG-63", The 23<sup>rd</sup> Annual Research Meeting of the Japanese Orthopaedic Association, 2008 年 10 月 24 日, 国立京都国際会館
- ② 山根拓也, 渡辺一史, 杉本直之, 蜂須麗, 竹内圭介, 前田利長, 大久保岩男 「ヒトキニノーゲン domain5 由来ペプチドによる MG-63 細胞における遺伝子発現変化」 BMB2007, 2007 年 12 月 14 日, パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大久保 岩男 (OHKUBO IWAO)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80152073

### (2) 研究分担者

上山 久雄 (UEYAMA HISAO)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30127013  
前田 利長 (MAEDA TOSHINAGA)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20250342  
竹内 圭介 (TAKEUCHI KEISUKE)

滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40432306

### (3) 連携研究者