

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590391
 研究課題名 (和文) 成熟型切断と分泌型産生による接着分子 SgIGSF/TSLC1 の機能制御
 研究課題名 (英文) Regulation of the function of adhesion molecule SgIGSF/TSLC1 by shedding and splicing
 研究代表者
 伊藤 彰彦 (ITO AKIHIKO)
 東京大学・医科学研究所・准教授
 研究者番号：80273647

研究成果の概要：

SgIGSF (spermatogenic immunoglobulin superfamily) / TSLC1 (tumor suppressor in lung cancer-1) は、免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する細胞膜1回貫通型の接着分子で、様々な細胞に発現しており、精子形成やシナプス形成など種々の機能を有するが、本分子の機能制御の仕組みについてはよくわかっていない。本研究課題では、SgIGSF/TSLC1 の発現制御機構として転写調節 (splicing による分泌型分子の産生) と転写後調節 (shedding による細胞外ドメイン断片の産生) が存在することを明らかにした。加えて、分泌型分子は細胞外に放出された後、神経突起上に発現する膜貫通型分子と trans-ホモフィリックに結合することにより、神経突起の伸長方向の制御に関わることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

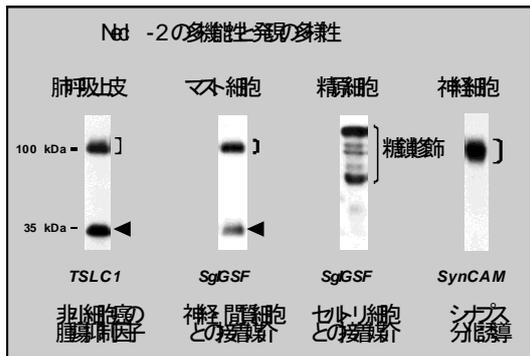
キーワード：病理学、発生・分化、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

SgIGSF (spermatogenic immunoglobulin superfamily) / TSLC1 (tumor suppressor in lung cancer-1) は、免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する細胞膜1回貫通型の接着分子である。5年ほど前に別々の研究者が異なる分野において単離し、種々の機能を報告した。構造上はネクチンと類似し (Nec12)、精子形成に必須で (SgIGSF)、神

経シナプス形成誘導能 (SynCAM) や肺癌抑制機能 (TSLC1) がある。本研究代表者はマスト細胞の接着分子として単離し、線維芽細胞や神経との接着を媒介することでマスト細胞の生存や活性化に寄与することを見出した。このように SgIGSF/TSLC1 は多機能性接着分子であるが、その分子機序は全く不明であった。

一方 SgIGSF/TSLC1 は、分子構造上、細胞



外ドメインに3個の免疫グロブリン様ループを有する分子量約100 kDaの接着分子で、スプライシングバリエーションとして分子量55 kDaの分泌型アイソフォームが存在する。NIH3T3細胞は内在性にSgIGSF/TSLC1を発現していないが、SgIGSF/TSLC1の全長cDNAを遺伝子導入しSgIGSF/TSLC1のC末抗体でウェスタンブロットすると、100 kDaの他に35 kDaと15 kDaにバンドが検出される(上図参照)が、このバンドの由来は不明であった。

2. 研究の目的

本研究においては、まず(1) SgIGSF/TSLC1全長cDNA遺伝子導入・発現実験によって35 kDa分子が成熟型SgIGSF/TSLC1 mRNAに由来する蛋白であることを明らかにし、次いで(2)質量分析により35 kDa分子が成熟型分子の切断産物であることの同定を試みる。更に(3)成熟型切断によって放出される細胞外断片とスプライシング・アイソフォーム分泌型分子を培養上清中に検出し、両分子が成熟型分子によって媒介される細胞接着にどのような作用を有するのかを決定する。

3. 研究の方法

(1) 35 kDa分子の由来及び発現分布 ①細胞レベル：内在性にSgIGSF/TSLC1を発現しない細胞(例えばNIH/3T3線維芽細胞、或いは転写因子MITF変異マウス由来培養マスト細胞)にSgIGSF/TSLC1やMITFの全長cDNAを遺伝子導入する。②個体レベル：SgIGSF/TSLC1全長cDNAを用いて作成したトランスジェニックマウスから各種臓器を摘出し、又骨髄より培養マスト細胞を樹立する。③細胞・組織から蛋白を抽出し、抗SgIGSF/TSLC1細胞内領域認識抗体及び細胞外領域認識抗体にてウェスタン法を行う。(2) 35 kDa分子産生機構として成熟型sheddingの可能性 ①35 kDa分子がSgIGSF/TSLC1膜貫通型分子(約100 kDa)のsheddingによって細胞膜側に残った分子であるならば、細胞外領域の断片は培養上清中に放出されるはずであり、その大きさは約65 kDaと予想される。②セミコンフルエントな

培養細胞を無血清培地で一晚放置し、培養上清を回収・濃縮する。SgIGSF/TSLC1細胞外領域認識抗体を用いたウェスタン法により細胞外断片の検出を試みる。

(3) 質量分析による35 kDa分子の同定 ①35 kDa分子を高発現する細胞から蛋白を抽出し、SgIGSF/TSLC1細胞内領域認識抗体により35 kDa分子を免疫沈降する。SDS-PAGEに展開し、バンドをゲルから切り出し、質量分析に供する。②質量分析によりそのsheddingの位置が決定する。③SgIGSF/TSLC1全長cDNAにおいてshedding部位或いはその近傍に点変異を導入する。

(4) スプライシング・アイソフォーム分泌型分子の検出 ①SgIGSF/TSLC1にはICAM等の免疫グロブリンスーパーファミリー接着分子と同様にスプライシング・アイソフォームとして分泌型分子が存在する。②(2)-(2)と同様の手順によりSgIGSF/TSLC1分泌型分子の検出を試みる。

(5) SgIGSF/TSLC1の神経突起伸長に対する影響の解析 ①神経細胞の3次元培養：新生仔マウスの上頸神経節(交感神経)及び後根神経節(知覚神経)から神経細胞のsingle cell suspensionを得て、神経成長因子を含むコラーゲンゲル内に移植する。神経突起が移植部を中心に放射状に伸長することを確認する。②SgIGSF/TSLC1分泌型分子濃度勾配の作成：SgIGSF/TSLC1分泌型分子を恒常的に発現・分泌する細胞垂株を得て、コラーゲン内に移植する。移植部位を中心にSgIGSF/TSLC1分泌型分子の濃度勾配が出来ていることをゲルのパラフィン切片免疫染色で確認する。③SgIGSF/TSLC1分泌型分子濃度勾配と神経突起伸長との関係：(a)の神経細胞、(b)の垂株、及びその親株の3者を三角形の頂点の位置にコラーゲン内に移植する。神経突起が(b)の垂株の方向を指すようにカーブして伸長すると期待される。ゲルのパラフィン切片免疫染色により、SgIGSF/TSLC1分泌型分子が伸長する神経突起上のSgIGSF/TSLC1膜貫通型分子と結合していることを示す。

4. 研究成果

(1) ①35 kDaと15 kDaのバンドはN末認識抗体では検出されなかった。②SgIGSF/TSLC1全長cDNAを遺伝子導入したNIH3T3細胞の無血清培養上清をN末認識抗体でウェスタンブロットすると75 kDaと60 kDaにバンド検出した。③この75 kDa分子はN型及びO型糖鎖切断酵素処理によって、それぞれ65, 55 kDaまで分子量が減少した。④一方、60 kDaのバンドはN型糖鎖切断酵素処理で50 kDaに移動したが、O型糖鎖切断酵素処理では移動しなかった。この結果は分泌型アイソフォームの場合と同じであった。

(2) SgIGSF/TSLC1は細胞外領域の傍膜貫通領

域に13個スレオニンが連続する部分があり、この部位で高度にO型糖鎖修飾を受けていると考えられている。今回の結果から、SgIGSF/TSLC1はスレオニン繰り返し配列のすぐN末側とC末側の2か所でsheddingを受けていると考えられた。Sheddingの結果細胞外に放出されるN末側断片は2種類あり、両者はO型糖鎖修飾の有無の点で構造的に異なり、小さい方の分子は分泌型アイソフォームとほぼ相同の構造を有すると考えられた。

(3) マウス上頸神経節細胞をI型コラーゲン内で神経成長因子の存在下に培養すると、神経突起は移植部位を中心に放射状に伸長した。培養開始後2日目にSgIGSF/TSLC1分泌型分子を恒常的に分泌するトランスフェクタントとその元の細胞を神経の近傍で対称的な位置に移植した所、6日目には神経突起の伸長がトランスフェクタントの方向へ曲がっているのが観察された。この3次元培養系を免疫組織化学的に検討すると、SgIGSF/TSLC1分泌型分子はトランスフェクタントの周囲に濃度勾配を成して分布し、その一部は神経突起表面に発現するSgIGSF/TSLC1膜貫通型分子と結合していた。以上の結果より、SgIGSF/TSLC1分泌型分子は神経突起細胞膜に発現するSgIGSF/TSLC1膜貫通型分子と結合することで神経突起伸長に対するアトラクティブなガイダンス能を持つものと考えられた。

なお、SgIGSF/TSLC1は別名にSynCAM、Nec1-2、RA175、IGSF4等があったが、混乱を避けるため最近CADM1 (Cell adhesion molecule-1)という名称に統一された。

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17件)

- ①Hagiyama M, Ichiyangi N, Kimura KB, Murakami Y, Ito A: Expression of a soluble isoform of cell adhesion molecule 1 in the brain and its involvement in directional neurite Outgrowth. **Am J Pathol**, 174:2278-2289, 2009.
- ②Omori Y, Nakayama F, Li D, Kanemitsu K, Semba S, Ito A, and Yokozaki H: Alternative lengthening of telomeres frequently occurs in mismatch repair system-deficient gastric carcinoma. **Cancer Sci**, 100:413-418, 2008.
- ③Koma Y, Furuno T, Hagiyama M, Hamaguchi K, Nakanishi M, Masuda M, Hirota S, Yokozaki H, and Ito A: CADM1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions. **Gastroenterology**, 134:1544-1554, 2008.
- ④Ito A, Hagiyama M, Mimura T, Matsumoto M, Wakayama T, Iseki S, Yokozaki H, and Okada M: Expression of cell adhesion molecule 1 in malignant pleural mesothelioma as a cause of efficient adhesion and growth on mesothelium. **Lab Invest**, 88:504-514, 2008.
- ⑤Overmeer RM, Snijders PJF, Claassen-Kramer D, Berkhof J, Helmerhorst TJM, Heideman DAM, Wilting SM, Ito A, Murakami Y, Meijer CJLM and Steenbergen RDM: Association of dense CADM1 promoter methylation and reduced protein expression in high-grade ICN and cervical SCC. **J Pathol**, 215:388-397, 2008.
- ⑥Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, Semba S, Ito A, and Yokozaki H: Sail-associated epithelial to mesenchymal transition promotes esophageal squamous cell carcinoma motility and progression. **J Pathol**, 215:330-339, 2008.
- ⑦Kobayashi S, Ito A, Okuzaki D, Onda H, Yabuta N, Nagamori I, Suzuki K, Hashimoto H, and Nojima H: Expression Profiling of PBMC-based Diagnostic Gene Markers Isolated from Vasculitis Patients. **DNA Res**, 15:253-265, 2008.
- ⑧Hollins F, Kaur D, Yang W, Cruse G, Saunders R, Sutcliffe A, Berger P, Ito A, Brightling CE, and Bradding P: Human airway smooth muscle promotes human lung mast cell survival, proliferation, and constitutive activation: co-operative roles for stem cell factor, IL-6 and cell adhesion molecule-1. **J Immunol**, 181:2772-2780, 2008.
- ⑨Ito A, Hagiyama M, and Oonuma J: Nerve-mast cell and smooth muscle-mast cell interaction mediated by cell adhesion molecule-1, CADM1. **J Smooth Muscle Res**, 44:83-93, 2008.
- ⑩Ito A, Nishikawa Y, Ohnuma K, Ohnuma I, Koma Y, Sato A, Enomoto K, Tsujimura T, and Yokozaki H: SgIGSF is a novel biliary-epithelial cell adhesion molecule mediating duct/ductule development. **Hepatology**, 45:684-694, 2007.
- ⑪Mimura T, Ito A, Sakuma T, Ohbayashi C, Yoshimura M, Tsubota N, Okita Y, and Okada M: Novel marker D2-40, combined with calretinin, CEA and TTF-1: An

optimal set of immunodiagnostic markers for pleural mesothelioma. **Cancer**, 109:933-938, 2007.

- ⑬ Ito A, Hagiwara M, Oonuma J, Murakami Y, Yokozaki H, and Takaki M: Involvement of the SgIGSF/Necl-2 adhesion molecule in degranulation of mesenteric mast cells. **J Neuroimmunol**, 184:209-213, 2007.
- ⑭ Ohba Y, Kanao Y, Morita N, Fujii E, Hohrai M, Takatsuji M, Hirose H, Miura D, Watari A, Yutsudo M, Zhao H, Yabuta N, Ito A, Kita Y, and Nojima H: Oleamide derivatives suppress the spontaneous metastasis by inhibiting connexin 26. **Int J Cancer**, 121:2801-2808, 2007.
- ⑮ Wakayama T, Sai Y, Ito A, Kato Y, Kurobo M, Murakami Y, Nakashima E, Tsuji A, Kitamura Y, and Iseki S: Heterophilic binding of the adhesion molecules poliovirus receptor and immunoglobulin superfamily 4A in the interaction between mouse spermatogenic and Sertoli cells. **Biol Reprod**, 76:1081-1090, 2007.
- ⑯ Takaoka Y, Ohta M, Ito A, Takamatsu K, Sugano A, Funakoshi K, Takaoka N, Sato N, Yokozaki H, Arizono N, Goto S, and Maeda E: Electroacupuncture suppresses myostatin gene expression: cell proliferative reaction in mouse skeletal muscle. **Physiol Genomics**, 30:101-110, 2007.
- ⑰ Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, Fujimori A, Okuzaki D, Zhao H, Ikawa M, Okabe M, and Nojima H: Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. **J Biol Chem**, 282:19259-19271, 2007.
- ⑱ Saito-Katsuragi M, Asada H, Niizeki H, Katoh F, Masuzawa M, Tsutsumi M, Kuniyasu H, Ito A, Nojima H, and Miyagawa S: A role for connexin 26 in metastasis of human melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. **Cancer**, 110:1162-1172, 2007.

[学会発表] (計5件)

- ①伊藤彰彦「フェムト秒レーザーによる神経-マスト細胞間接着力の測定」日本病理学会、2009.5.3、京都
- ②伊藤彰彦「フェムト秒レーザーを用いた新規細胞間接着力測定法」日本分子生物学会、2008.12.9、神戸
- ③伊藤彰彦「フェムト秒レーザーを用いた神

経-マスト細胞間接着力の測定：CADM1 接着分子の関与」日本アレルギー学会、2008.11.27、東京

- ④伊藤彰彦「CADM1 promotes nerve-pancreatic islet cell interaction and contributes to hormonal function of islet cell tumors」日本癌学会、2008.10.28、名古屋
- ⑤伊藤彰彦「膵島細胞腫瘍における接着分子 CADM1 の発現：ホルモン機能性との相関」日本病理学会、2008.5.15、金沢

[図書] (計1件)

- ①Ito A, and Hagiwara M: CADM1: a new mast-cell adhesion molecule that mediates interaction with fibroblasts, nerves, and smooth muscles in **Mast Cells: Roles, Interactions and Disorders** (eds, Jonas F. Jung and Luca T. Scholz), Nova Science Publishers, Hauppauge, pp.215-230, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 彰彦 (ITO AKIHIKO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：80273647

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし