

平成21年4月1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770108
 研究課題名（和文）
 癌細胞の浸潤・転移を制御する膜近傍領域でのマトリックスリモデリング
 研究課題名（英文）
 Regulation of tumor invasion and metastasis by matrix remodeling on the cell surface
 研究代表者
 村井 稔幸（MURAI TOSHIYUKI）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：20311756

研究成果の概要：癌細胞の細胞膜近傍領域で起こる細胞外マトリックスのリモデリングを、経時的に測定するための方法を確認した。本研究の成果を応用することにより、癌の浸潤・転移を制御する機構の解明のための道を拓くことに貢献できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素、癌、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌細胞は、腫瘍組織に形成される細胞外マトリックスと相互作用しながら運動性を亢進し、浸潤・転移する。その制御機構には不明な点が多く残されており、癌の進展を防ぐ効果的な手段の開発が望まれている。

(2) これまでに、癌細胞の細胞膜近傍における細胞外マトリックスのリモデリングが、癌細胞の浸潤・転移能において重要な役割を担っていることを見出した。

(3) 特に、細胞外マトリックスの主要構成

分子であるヒアルロン酸が、分解酵素の作用を受けて低分子化することが鍵であり、このようにして生じた低分子量ヒアルロン酸が、癌浸潤促進作用を有することを見出した。

(4) 上述のように、その生物学的重要性が明らかになってきたにもかかわらず、ヒアルロン酸分解酵素は、他の糖鎖分解酵素に比べて、比較的注目されてこなかった。それは、ヒアルロン酸が、生物学活性の低いだけの細胞外マトリックスの成分と考えられており、簡便で高感度なヒアルロン酸分解酵素活性の測定法がなかったためである。

2. 研究の目的

本研究は、上記の 1-(2) および 1-(3) で示したこれまでの独自の知見を基盤にして、癌細胞の細胞膜近傍における細胞外マトリックスリモデリングの制御機構を明らかにするための手段の開発を目標とした。特に、細胞外マトリックスの主要構成分子であるヒアルロン酸のリモデリングに焦点を当て、その分解反応の新規測定法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 独自に癌浸潤促進作用を有することを見出した低分子量ヒアルロン酸に焦点を絞って、次のことをおこなった。

(2) まず、癌組織において、どのようにして低分子量ヒアルロン酸が生じるのかを解明するため、その責任分子・ヒアルロン酸分解酵素を同定し、その触媒機構を解析するため、蛋白質の発現および精製をおこなった。

(3) ヒアルロン酸分解酵素活性の新規測定法のための基質の合成をおこなった。ヒアルロン酸は、枝分かれのない直鎖グリコサミノグリカンであり、D-グルクロン酸 (GlcUA) とN-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) を単位とする2糖繰り返し構造を有する。この単位構造中の官能基に蛍光色素を反応させることを検討した。

(4) ヒアルロン酸に繰り返し含まれるD-グルクロン酸のカルボキシル基に対して、塩酸・1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを反応させ、蛍光色素 Alexa Fluor 488 のヒドラジド誘導体を共有結合させることにより、蛍光ヒアルロン酸を作製した (図1)。

(5) 蛍光ヒアルロン酸に、段階希釈したヒアルロン酸分解酵素ヒアルロニダーゼを反応させたときの蛍光偏光度を、励起波長495 nm、検出波長 519 nm について、蛍光分光光度計により測定した。

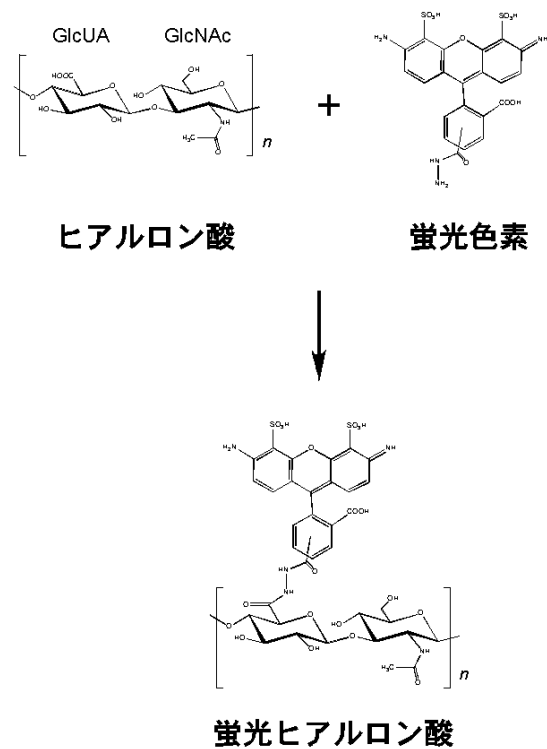


図1. 蛍光ヒアルロン酸の合成

4. 研究成果

(1) 作製した蛍光ヒアルロン酸を基質として、蛍光偏光法により、ヒアルロン酸分解酵素ヒアルロニダーゼの活性を定量的に測定することが出来た (図2)。

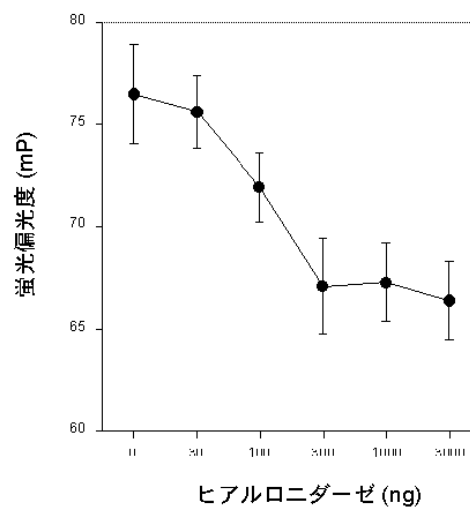
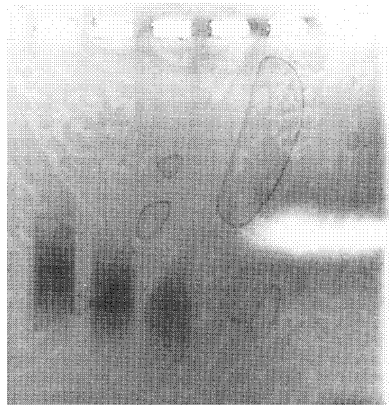


図2. 蛍光偏光度測定

(2) ヒアルロン酸の、ヒアルロニダーゼの分解作用による低分子量化は、電気泳動法により確認することができた。酵素反応後のヒアルロン酸溶液をアガロースゲルに負荷して電気泳動をおこない、ヒアルロン酸を色素染色により可視化した (図3)。



0 30 100 300 1000 3000

ヒアルロニダーゼ (ng)

図3. 電気泳動法によるヒアルロン酸分解の検出

(3) ヒアルロン酸の、ヒアルロニダーゼの分解作用による低分子量化は、高速液体クロマトグラフィによっても確認することが出来た。Alexa Fluor 488 の蛍光を検出することにより、ヒアルロン酸の分解により生じたオリゴ糖を感度よく検出することができた (図4)。また、癌細胞の浸潤促進能を有するサイズのヒアルロン酸分子が生じていることがわかった。

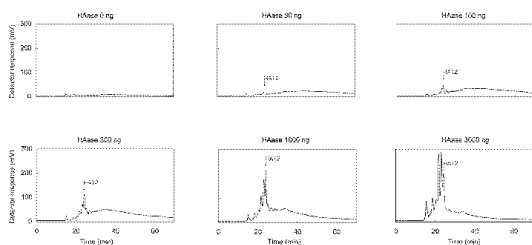


図4. 高速液体クロマトグラフィによるヒアルロン酸分解産物の検出

(4) さらに、上記で確立した蛍光偏光度測定によるヒアルロン酸分解酵素活性測定法が、経時的な連続測定にも適用できることを明らかにした。蛍光ヒアルロン酸を基質として、ヒアルロニダーゼ存在下でインキュベーションしたときの蛍光偏光度を経時的にモニターすることにより、連続測定することができた (図5)。

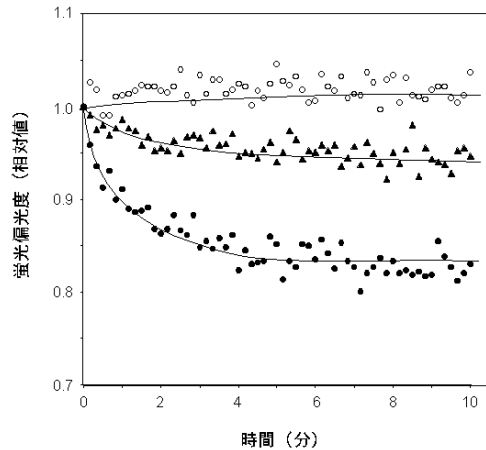


図5. 蛍光偏光度測定によるヒアルロン酸分解の連続測定

(5) 細胞外マトリックスは、癌の浸潤・転移に密接に関与するため活発に研究されているが、そのリモデリング制御機構には不明な点が多い。本研究では、細胞外マトリックスの主要構成分子であるヒアルロン酸に着目し、その分解過程を測定するために、世界に先駆けて、ヒアルロン酸分解酵素の連続的活性測定法を確立した。

(6) 本研究の成果をもとにして、細胞外マトリックスのリモデリングを測定することが可能になり、癌の浸潤・転移を制御する機構の解明のための道を拓くことに貢献できる。

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1件)

Toshiyuki Murai and Hiroto Kawashima.
A simple assay for hyaluronidase activity using fluorescence polarization. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 376, pp. 620-624, 2008.

査読有

[学会発表] (計1件)

Toshiyuki Murai and Hiroto Kawashima.
Tools for analysis of cell adhesion molecules under physiological and pathological conditions. International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science.

平成20年11月8日, 名古屋大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村井 稔幸 (MURAI TOSHIYUKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 20311756

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: