

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590922

研究課題名 (和文) 血管新生とリンパ管新生におけるテトラスパニンの機能解析

研究課題名 (英文) Role of tetraspanins in angiogenesis and lymphangiogenesis

研究代表者

高橋 良 (TAKAHASHI RYO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10546865

研究成果の概要 (和文)：我々は今までにインテグリンのパートナーであるテトラスパニン (CD9, CD151) について急性肺傷害や COPD における機能解析をしてきた。本研究では癌の増殖や転移に重要な血管新生とリンパ管新生について検討を加えた。その結果 CD151 だけでなく CD9 も血管新生に関わること、CD9 はリンパ管新生にも関与することを見出した。テトラスパニンは癌の進展における役割が報告されてきたが、腫瘍微小環境におけるテトラスパニンの機能解明は、癌と血管・リンパ管における TM4 を標的とした治療応用につながる。

研究成果の概要 (英文)：We previously reported that tetraspanins are involved in the progression of inflammation and COPD through regulating cell activation. Here, we found that CD151 is involved in angiogenesis, and that CD9 is involved not only in angiogenesis, but also lymphangiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：テトラスパニン、肺癌、血管新生、リンパ管新生、CD9、CD151

1. 研究開始当初の背景

リンパ管は多くの器官内の組織間隙から組織液を吸収する毛細リンパ管網とリンパ液を排導する集合リンパ管より構成されている。リンパ管は組織液、リンパ球などの免疫担当細胞、漏出したタンパク質、小腸で吸収された脂肪を血管へ送るなどの働きをしている。さらに癌細胞は様々なリンパ管新生促

進物質を分泌して新生リンパ管を誘導し、癌のリンパ節転移を促進するとされる。リンパ節転移は stage 分類に含まれ、腫瘍の進展におけるリンパ管新生の重要性は十分に認識されている。血管新生については多くのことが研究され、血管新生をターゲットとした治療薬の開発が進んでいるにも関わらず、リンパ管新生や癌のリンパ行性転移については

詳しい機序がほとんど解明されていない。

Tetraspanins(以下 TM4)は CD9, CD81, CD82, CD151 などを含む細胞膜 4 回貫通蛋白でヒトでは 32 種類が報告されている。この蛋白ファミリーの特徴として integrin やその他の膜蛋白と複合体を形成することにより接着、遊走、癌転移やシグナル伝達など様々な機能に影響を与える。は癌の進展や転移に関与し、その発現が予後に相関する。ところが TM4 は組織に広く発現しているにもかかわらず、宿主側における役割は全く解析されていない。そこで本研究では癌の進展に重要な血管新生とリンパ管新生について TM4 の機能解析を行う。

2. 研究の目的

本研究目的は TM4 の血管新生とリンパ管新生における役割を解明することである。

- (1) 臨床検体 (肺癌とリンパ節) における TM4 の発現
- (2) ヒト皮膚リンパ管内皮: HDLEC における機能解析とメカニズムの解明
- (3) 血行性およびリンパ行性転移における TM4 の関与

3. 研究の方法

- (1) 肺癌の臨床検体 (tissue array) を使用し、癌組織内血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞におけ TM4 の発現を解析
- (2) siRNA により CD9 を knockdown して HDLEC の機能を検討する。
- (3) CD9 KO mice と CD151 KO mice に癌細胞 (B16F10, LLC) を移植して TM4 の in vivo における血管新生とリンパ管新生の影響を解析する。

4. 研究成果

- (1) Tissue Array を用いた解析により様々な癌腫瘍内において血管やリンパ管内皮細胞に CD9/CD151 の発現を確認した。

(2) ヒト皮膚リンパ管内皮細胞における機能解析を行った。siRNA transfection により CD9 の発現低下をはかり (図 1A)、形態形成や遊走能低下だけでなく増殖能の低下を認めた (図 1B-D)。

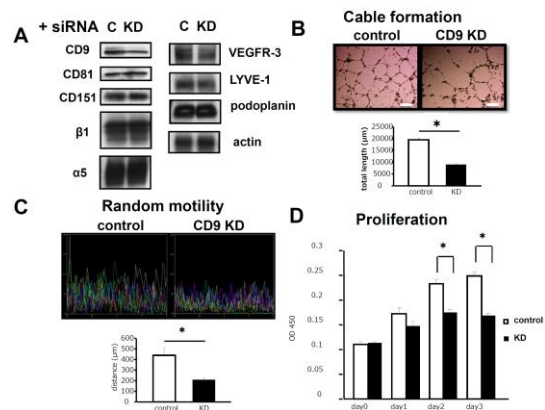


図 1 (A) HDLEC を CD9 siRNA または random RNA でトランスフェクションし、蛋白レベルを確認した。(B, C) トランスフェクションした細胞を用いて形態形成や遊走能を比較した。(D) 増殖能を比較した ★, $p < 0.05$ vs コントロール。

さらに血管新生についても同様に HUVECs を用いてヒト皮膚リンパ管内皮細胞における機能解析を行った。siRNA transfection により CD9 の発現低下をはかり、形態形成や遊走能低下を認めた (データ未掲載)。

(3) さらに CD151 KO マウスを用いて血行性転移における TM4 の関与を検討したところ、KO マウスにおける血行性転移の低下を見出した。(図 2)。

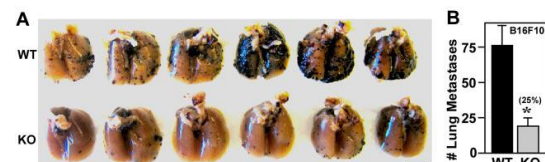


図 2 (A) 野生型マウス WT と CD151 KO マウスを用いて肺転移モデル (血行性転移) を比較した。(B) 転移形成コロニーを比較した。★,

$p < 0.05$ vs コントロール。

さらに我々はリンパ行性転移における TM4 の関与を検討した。CD9 KO マウスは、野生型マウスに比べて肺癌細胞 (LLC) のリンパ行性転移が低下しており、その機序としてリンパ管新生の低下によるものであることを解明した。

結語

従来テトラスパニン(4)は癌の進展における役割が報告されてきたが、今回の腫瘍微小環境におけるテトラスパニンの機能解明は、今後癌と血管・リンパ管における TM4 を標的とした治療応用に結びつくと考えられる。

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 6 件)

1. Takeda Y et al. Diminished metastasis in Tetraspanin CD151 Knockout mice. *Blood*. 14;118(2):464-72. 2011 査読有

2. 立花 功 分子オーガナイザ CD9 と CD81 ダブルノックアウトマウスにおける肺気腫と骨量減少. *呼吸* 29:194-210, 2010. 査読無

3. 立花 功、鈴木真優美、武田吉人他 マクロファージの活性化における CD9 (tetraspanin) の役割. *臨床免疫・アレルギー科* 53:214-220, 2010. 査読無

4. 武田吉人、鈴木真優美、立花 功. COPD におけるテトラスパニンの役割. *The Lung perspective* 18:291-298, 2010. 査読無

5. Suzuki M, Tachibana I, Takeda Y et al. Tetraspanin CD9 negatively regulates lipopolysaccharide-induced macrophage activation and lung inflammation. *J Immunol* 182:6485-6493, 2009. 査読有

6. 武田吉人 COPD モデルとしてのテトラスパニン CD9/CD81 ダブルノックアウトマウスの解析. *International Review of Asthma & COPD* 11:31-36, 2009. 査読無

[学会発表] (計 6 件)

1. 武田 吉人 Tetraspanin CD9 link VEGFR-3 and integrins in physiological and pathological lymphangiogenesis. 日本癌学会 2011年9月28日 名古屋

2. 武田 吉人 Tetraspanin CD9 functions as “linkers” of VEGFR-3 signaling in the regulation of physiological and pathological lymphangiogenesis. FASEB Summer Research Conference, 招待講演 2011.7.20

3. 武田 吉人 Tetraspanin CD9 link VEGFR-3 and integrins in physiological and pathological lymphangiogenesis. 日本癌学会 2010年9月23日 大阪

4. 武田 吉人 Tetraspanin CD9 functions as “linkers” of VEGFR-3 signaling in the regulation of physiological and pathological lymphangiogenesis. 第4回 Tetraspanins Meeting 2010年9月10日 London

5. 立花 功 肺がんと肺の炎症における分子オーガナイザ CD9 と CD81 の役割. 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 12 日 横浜

6. 立花 功 肺の炎症と気腫化におけるテトラスパニン CD9/CD81 の役割. 第 82 回日本生化学会 2009 年 10 月 21 日 神戸

[その他]

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/im-ed3/www/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 良 (TAKAHASHI RYO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10546865

(H21 から研究分担者、H22 から研究代表者として参画)

川瀬 一郎 (KAWASE ICHIRO)

大阪大学・医学系研究科・前教授

研究者番号：10161324

(H21 まで研究代表者として参画)

(2) 研究分担者

武田 吉人 (TAKEDA YOSHITO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40452388

立花 功 (TACHIBANA ISAO)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60324761