

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770141

研究課題名（和文）

癌細胞による細胞外マトリックスリモデリング受容機構の構造的基盤

研究課題名（英文）

Structural basis for recognition of extracellular matrix remodeling by cancer cells

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（和文）：

細胞外マトリックスのリモデリングは癌細胞の遊走・浸潤を助長し、癌の進行に寄与する。本研究では、細胞外マトリックスのリモデリングを、癌細胞が膜レセプターCD44を介して分子認識し、細胞膜の微細構造変化による制御を受けることを明らかにした。本研究により、癌細胞による細胞外マトリックスリモデリング受容の基盤となる膜構造が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

CD44 is a cell surface receptor for hyaluronan and is implicated in cancer invasion and metastasis. Proteolytic cleavage of CD44 plays a critical role in the migration of cancer cells and is regulated by factors present in the tumor microenvironment, such as hyaluronan oligosaccharides and epidermal growth factor. However, molecular mechanisms underlying the proteolytic cleavage on membranes remain poorly understood. In this study, we demonstrated that cholesterol depletion with methyl- $\beta$ -cyclodextrin, which disintegrates membrane lipid rafts, enhances CD44 shedding mediated by a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10), and that cholesterol depletion disorders CD44 localization to the lipid raft. We also evaluated the effect of long-term cholesterol reduction using a statin agent, and demonstrated that statin enhances CD44 shedding and suppresses cancer cell migration on a hyaluronan-coated substrate. Our results indicate that membrane lipid organization regulates CD44 shedding, and propose a possible molecular mechanism by which cholesterol reduction might be effective for preventing and treating the cancer progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：細胞・組織、シグナル伝達、分子認識

## 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の相互作用を通して浸潤能を獲得し、転移する。特に、細胞外マトリックスのリモデリングはがん細胞の遊走・浸潤を助長し、癌の進行に寄与する。したがって、癌細胞による細胞外マトリックスリモデリングの受容機構の解析は、癌の進行を阻止する手段の開発において鍵となる要素である。

(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、ヒアルロン酸による細胞外マトリックスリモデリングの重要性が明らかになってきたにもかかわらず、それを癌細胞表面で受容する機構は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞外マトリックスのリモデリングを、がん細胞が膜レセプターを介して分子認識し、そして、細胞膜を介して細胞の内へとシグナルを伝達する機構の解明をおこなうことを目的とした。

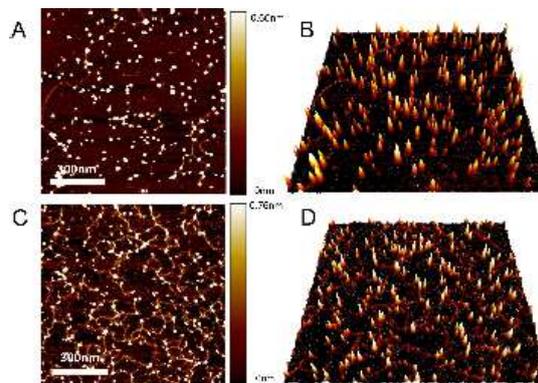
## 3. 研究の方法

癌細胞による細胞外マトリックスリモデリング受容機構について、生化学的解析と高分解能顕微鏡解析などをおこなった。

## 4. 研究成果

(1) 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ついて、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy) 観察により、濃度と分子量により構造を変化させることを見出した。さらに、そのレセプターであるCD44と会合する様を捉えることができた (図1)。

図1. CD44が会合したヒアルロン酸



マトリックス構造の原子間力顕微鏡像

(2) I型細胞膜貫通タンパク質CD44は、細胞外基質の主要構成分子であるヒアルロン酸に対するレセプターとして機能する。特に、CD44の切断・細胞外への放出 (shedding) は、癌細胞の運動能制御において重要な役割を担っており、腫瘍微小環境に存在するヒアルロン酸オリゴ糖 (oligo-HA) や上皮成長因子 (EGF) により亢進されることが、近年の研究によりわかってきた。しかし、膜上でのshedding制御機構は不明であった。

本課題では、CD44が司る細胞接着・細胞運動が、一般に脂質ラフトとして知られている細胞膜マイクロドメインにより制御されることを明らかにした。CD44は、トリトンX-100不溶性の含コレステロール膜マイクロドメイン (脂質ラフト) に存在し、このドメイン構造を破壊する作用のあるメチル-β-シクロデキストリン (MβCD) あるいはフィリピン の添加により、CD44 sheddingが亢進した (図2)。

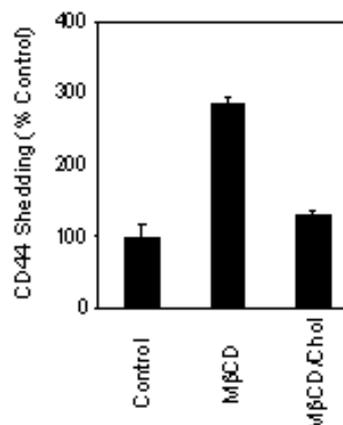


図2.

(3) CD44 sheddingは、膜型メタロプロテアーゼ ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10) の活性に依存的であ

り、ADAM10はトリトンX-100可溶性（非脂質ラフト）画分に存在した。

(4) さらに、大気圧走査型電子顕微鏡 (atmospheric scanning electron microscope, ASEM) を用いた高分解能電子顕微鏡イメージングにより、溶液中における癌細胞表面のCD44の局在変化が観察できた。

(5) また、高コレステロール血症の治療に用いられるスタチン系コレステロール合成阻害剤の投与により、癌細胞のCD44 sheddingが亢進し、ヒアルロン酸基質上でのoligo-HAあるいはEGFによる運動性亢進が阻害されることを明らかにした (図3)。

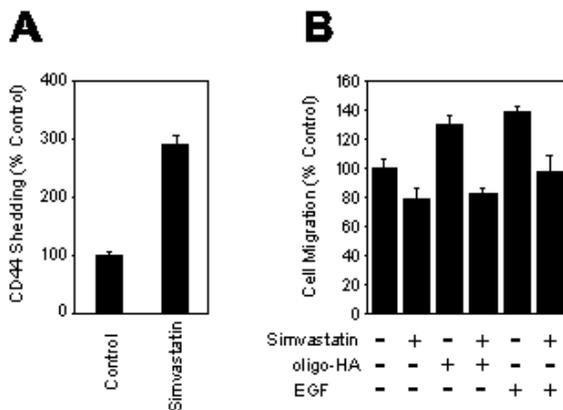


図3.

(6) 本研究により、コレステロール低下によるCD44の膜ドメイン局在とsheddingの操作が、悪性腫瘍の進展に対する予防効果を有することが示唆される。本結果から、癌細胞による細胞外マトリックスリモデリング受容の基盤となる膜構造が明らかになった(図4)。

(7) これは、細胞外マトリックスのリモデリングに焦点を当てた癌浸潤・転移の分子機構の解明を通じて、その予防・治療法の開発に寄与するものである。

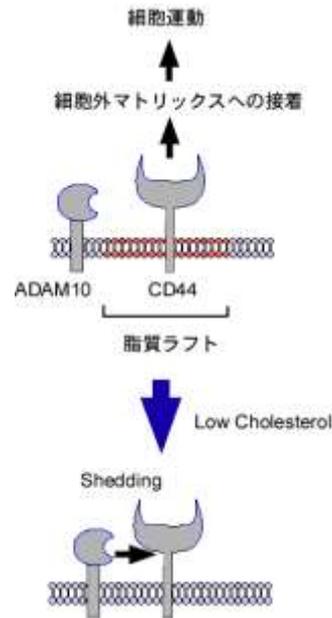


図4.

## 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)

(1) Toshiyuki Murai. The role of lipid rafts in cancer cell adhesion and migration. International Journal of Cell Biology Vol. 2012, art. no. 763283 (2012) 査読有

(2) Toshiyuki Murai, Yuusuke Maruyama, Kazuhiro Mio, Hidetoshi Nishiyama, Mitsuo Suga, and Chikara Sato. Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration. The Journal of Biological Chemistry Vol. 286, No. 3, pp. 1999-2007 (2011) 査読有

(3) Mayumi Hirose, Ryuji Matsumura, Kaori Sato, Toshiyuki Murai, and Hiroto Kawashima. Binding of L-selectin to its vascular and extravascular ligands is differentially regulated by pH. Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 414, No. 2, pp. 437-442 (2011) 査読有

(4) Toshiyuki Murai, Hitomi Hokonohara, Akihiko Takagi, and Tomoji Kawai. Atomic force microscopy imaging of

supramolecular organization of hyaluronan and its receptor CD44. IEEE Transactions on NanoBioscience Vol. 8, No. 4, pp. 294-299 (2009) 査読有

〔学会発表〕(計5件)

(1) Tatsuhiko Ebihara, Toshiyuki Murai, Yuusuke Maruyama, Kazuhiro Mio, Sachie Manaka, Hidetoshi Nishiyama, Mitsuo Suga, and Chikara Sato. Direct ASEM immuno-electron microscopy of cells in solution. World Congress on Advances in Oncology and International Symposium on Molecular Medicine 平成23年10月6日, Hotel Rodos Palace (ギリシャ)

(2) 村井稔幸、丸山雄介、三尾和弘、西山英利、須賀三雄、佐藤主税. 膜マイクロドメインによるがん細胞の接着・運動能の制御機構の解析. 日本生化学会 平成23年9月22日, 国立京都国際会館

(3) 丸山雄介、三尾和弘、村井稔幸、守屋俊夫、川田正晃、西山英利、間中幸絵、須賀三雄、海老原達彦、佐藤主税. 電子線単粒子解析法によるタンパク質複合体のダイナミックな構造変化の観察と液中観察ができる大気圧電子顕微鏡 (ASEM) の展開. 日本生物物理学会 平成23年9月16日, 兵庫県立大学

(4) 佐藤主税、丸山雄介、村井稔幸、西山英利、寺本華奈江、間中幸絵、三尾和弘、須賀三雄. 大気圧電子顕微鏡 ASEM による迅速な水中免疫電顕法. 日本顕微鏡学会 平成23年5月17日, 福岡国際会議場

(5) Toshiyuki Murai and Hiroto Kawashima. Novel Fluorescent probe for measurement of extracellular matrix degradation. International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science. 平成21年11月10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：