

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590092

研究課題名(和文) インテグリン依存的ながん細胞の腹膜への接着・浸潤とサイトカインによる修飾

研究課題名(英文) Modulation by cytokines of integrin-dependent cancer cell adhesion/invasion to peritoneum

研究代表者

辻 勉 (TSUJI, Tsutomu)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00143503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：がんの腹膜転移の初期過程では、がん細胞の腹膜への接着が重要なステップとなる。本研究においては、腹膜の中皮細胞培養系を用いた腹膜モデルに対する細胞接着および浸潤について解析した。TNF- α やIL-1などのサイトカインにより、がん細胞および中皮細胞からのマトリックス分解酵素(MMP)の分泌が増強されるとともに、インテグリン依存的な細胞接着および浸潤が亢進し、がんの腹膜転移において炎症性サイトカインが重要な因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The adhesion of cancer cells to peritoneum is an important step in the initial process of peritoneal metastasis of cancer. In this study, we investigated adhesion and invasion of cancer cells by using monolayer culture of peritoneal mesothelial cells. Treatments of cancer cells and mesothelial cells with tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) or interleukin-1 (IL-1) promoted integrin-dependent cell adhesion and invasion in association with increased secretion of matrix-degrading proteinases, indicating that these inflammatory cytokines play crucial roles in peritoneal metastasis of cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、生物系薬学

キーワード：細胞接着 がん浸潤 インテグリン 細胞外マトリックス サイトカイン 腹膜播種転移

1. 研究開始当初の背景

がんは死亡原因の第一位を占める疾病であり、その浸潤性および転移性は患者の予後を決定する重要な因子となっている。がん細胞に発現する細胞接着分子は、がん細胞と標的器官との接着および組織浸潤において極めて重要な役割を演じると考えられている。細胞接着分子ファミリーを形成するインテグリンは、細胞間および細胞-マトリックス間の相互作用を媒介している。このうち $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン (VLA-3) は、悪性形質転換細胞で増量する細胞膜糖タンパク質として申請者らにより精製、cDNA クローニングされた分子であり、がん細胞の異常なふるまいと密接な関係があることが予想されていた。その後、胃がんの臨床試料についての研究より $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンの発現とがん細胞の浸潤能および腹膜への転移能との間に高い相関性があることが報告された。また、肝がん、メラノーマ、脳腫瘍などでもがんの悪性度と $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンの発現が相関することが見出された。そこで私達は、「 $\alpha 3$ インテグリンの発現の高いがん細胞がなぜ腹膜転移しやすいか？」という問題を解決しようと研究を行ってきた。その結果、この細胞接着分子の発現の高い胃がん細胞が腹膜に対して接着性が高く、腹膜播種を起こしやすい原因の一つであることを明らかにした。本研究では、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン依存的な接着亢進と腹膜播種転移巣形成の関係およびその分子機序を明らかにするため、(1) 腹膜中皮細胞の形態変化(収縮)による中皮下基底膜の露出および組織浸潤のための間隙の提供、(2) がん細胞の接着亢進およびマトリックス分解酵素産生、(3) インテグリン-マトリックス相互作用のサイトカインによる修飾という個々の過程に焦点を当て研究を進める。また、もう一つの重要課題である「がん細胞ではなぜ $\alpha 3$ インテグリンの発現が高くなるのか？」という点についても解析する。そして、このような機序を制御することにより、がんの浸潤・転移を抑制する方策を探索したいと考えた。

2. 研究の目的

胃がん細胞に発現する接着分子 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンは、その発現量と浸潤・転移能などのがんの悪性挙動とに相関があることが臨床データで示されている。申請者らのこれまで研究から、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンの媒介するがん細胞の腹膜への接着が播種転移巣形成の初期過程で重要であることが明らかになった。このような背景を踏まえ、本研究では、(1) 腹膜中皮細胞の形態変化による中皮下基底膜の露出および組織浸潤のための間隙の提供、(2) がん細胞の接着亢進およびマトリックス分解酵素産生、(3) インテグリン-マトリックス相互作用のサイトカインによる修飾等の素過程の解析を通して $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンを介する細胞接着・浸潤が播種性

転移形成においてどのような役割を担っているかを分子レベルで明らかにし、同時にこれらを抑制する薬物等を探索するための基盤の確立を目的とした。さらに、研究の過程で、宿主の免疫細胞であるマクロファージとがん細胞の相互作用が腫瘍形成及び悪性挙動の発現に重要な影響を与えることが示唆されたので、この点についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞

がん細胞としてヒト胃がん細胞株 MKN1、ヒト腎がん細胞株 SN-12C、ヒト膀胱がん細胞株 EJ-1、ヒト線維芽肉腫細胞株 HT1080 を用いた。単球は、健康人末梢血より Ficoll 密度勾配遠心法で得られた単核球画分から粘着性の細胞を精製した。腹膜中皮細胞は、単離したマウス腹膜をトリプシン処理し精製した。 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン陰性のヒト白血病細胞株 K562 に、ヒト $\alpha 3$ インテグリン cDNA をトランスフェクトし、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン強制発現細胞を樹立した。

(2) 中皮細胞単層培養系に対する接着

がん細胞を蛍光色素 BCECF で標識した後、中皮細胞単層培養系に添加し 37°C で 30-60 分保温し接着させた。その後、非接着細胞を穏やかに洗浄除去し、残った接着細胞を NP-40 を含む緩衝液で溶解し、溶解液の蛍光強度を蛍光分光光度計で測定することにより評価した。

(3) マトリックス分解酵素の活性測定

細胞培養液中のマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) は、ゼラチンザイモグラフィにより測定した。

(4) プロモーター活性の測定

ルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドベクターに $\alpha 3$ インテグリン遺伝子の近位配列を組み込んだ後、MKN1細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性による蛍光を測定することにより評価した。

(5) 腹膜モデルを用いた細胞浸潤測定

Boyden チャンバーを仕切る PET 膜 (8 μm pore) に中皮細胞の単層培養系を作製した。その後、がん細胞の浮遊液を上室に、HT1080 細胞由来の走化性因子を下室に、それぞれ添加し、37°C で 12-24 時間培養を続け、PET 膜を通過した細胞を位相差顕微鏡により観察し細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍壊死因子 (TNF- α) による中皮細胞の形態変化とがん細胞の接着性

マウス腹膜より単離した中皮細胞の単層培養系に TNF- α を作用させ、中皮細胞の形態変化を顕微鏡により観察したところ、中皮細胞の間隙が広がっていることを認めた。一方、胃

がん細胞株MKN1を蛍光色素であるBCECFで標識した後、中皮細胞の単層培養系に対する接着性を調べた。その結果、中皮細胞をTNF- α 処理することにより細胞接着率が上昇し、この接着増強は抗 $\alpha 3$ 及び抗 $\beta 1$ インテグリン抗体の存在下で抑制されることが判明した(図1)。また、 $\alpha 3$ インテグリン陰性の白血病細胞株であるK562にcDNAトランスフェクションにより $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンを強制発現させた細胞を用いて、同様に接着実験を行ったところ、モック細胞に比べ強く接着することがわかった(図2)。これらの結果から、TNF- α 処理によって生じた細胞間隙に蓄積した細胞外マトリックスに対して $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン依存的ながん細胞の接着が増強されるものと考えられた。

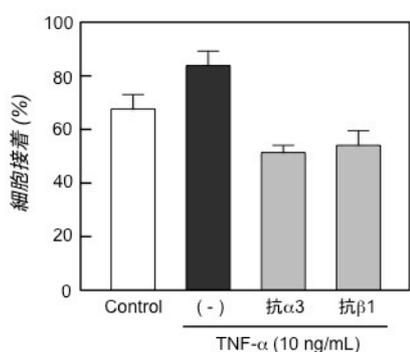


図1 腹膜中皮細胞へのMKN1細胞の接着に及ぼすTNF- α の影響

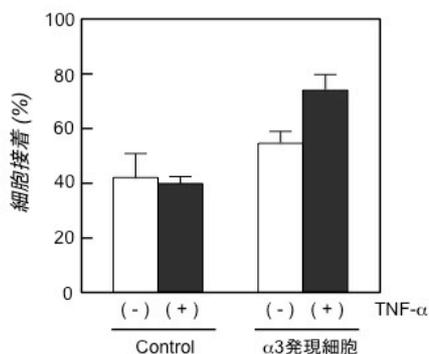


図2 腹膜中皮細胞への $\alpha 3$ インテグリン発現細胞の接着に及ぼすTNF- α の影響

(2) がん細胞からのマトリックス分解酵素産生の誘導

ラミニン等の細胞外マトリックス (ECM) 成分との相互作用による胃がん細胞からのマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP-2及びMMP-9) の産生・分泌変化をゼラチンゼイモグラフィーにより解析した。基底膜の主要成分であり、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンの高親和性リガンドであるラミニン-332 (ラミニン-5) を

コートした培養プレートでMKN1細胞を培養すると、MMP-9分泌量の増加が認められた。一方、MMP-2の分泌量には、ほとんど変化が認められなかった。また、MMP-9産生の増強は、プレートにコートするラミニン-332の濃度依存的であった。これらの結果は、胃がん細胞が腹膜基底膜に含まれるラミニン-332等のECMとの相互作用を介してマトリックス分解酵素産生を亢進し、組織浸潤の促進をもたらすことを示唆している。

(3) 単球との相互作用によるがん細胞の形質変化

単球とがん細胞株の共培養系を用いて、がん細胞を単球とともに5日間培養し、その後のがん細胞のマトリックスメタロプロテナーゼ産生能及び浸潤能を評価した。その結果、MKN1細胞及びHT1080細胞では、共培養によりMMP-9産生能及び疑似基底膜への浸潤が増強することが判明した。SN12C及びEJ-1細胞では、MMP-9産生能の増強は顕著ではなく、また浸潤能の増強も認められなかった。がん細胞の形質変化についてさらに調べたところ、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンやフィブロネクチンの発現も上昇し、これらの相互作用が、がん細胞の浸潤能亢進に寄与している可能性を示した。また、このようながん細胞の形質変化をもたらすメディエーターとしてのTNF- α の重要性が示された。

(4) $\alpha 3$ インテグリン発現への転写因子Ets-1の関与

$\alpha 3$ インテグリン遺伝子上流のプロモーター領域に結合する転写因子について、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法、DNAアフィニティー沈降法を用いて解析したところ、Ets-1転写因子がプロモーター領域に特異的に結合することが判明した。次いで、Ets-1のドミナントネガティブ変異体の導入実験及びEts-1の強制発現実験による $\alpha 3$ インテグリン遺伝子発現変化を解析した。その結果、この転写因子が $\alpha 3$ インテグリン発現制御に深く関与することが示された。

(5) モデル腹膜へのがん細胞の浸潤に対するサイトカインの影響

マウス腹膜中皮細胞単層培養系への胃がん細胞株MKN1の浸潤は、中皮細胞をTNF- α またはIL-1 β で前処理することによって増強されたが、IFN- γ では増強されなかった。また、この浸潤能の増強は、抗 $\alpha 3$ インテグリン抗体により部分的に阻害された。次に、MMP-2及びMMP-9の発現・分泌量についてRT-PCR及びゼラチンゼイモグラフィーにより解析したところ、MKN1細胞及び中皮細胞のいずれの場合にもTNF- α またはIL-1 β 処理により両酵素の発現・分泌量の増加が認められた。一方、IFN- γ 処理では変化が認められなかった。以上の結果より、中皮細胞単層培養系に対するMKN1細胞の浸潤能は、TNF- α やIL-1 β によ

り亢進し、この浸潤過程の一部に $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンが関与していることが示された。また、TNF- α 及びIL-1 β は、がん細胞に対する作用に加え、中皮細胞にも作用しMMPsの分泌を亢進させることが明らかとなり、これらが協調してMKN1細胞の浸潤能を亢進させることが示唆された。

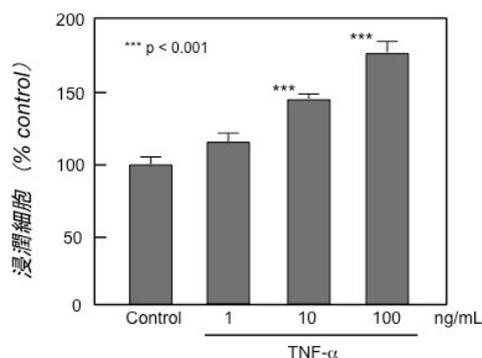


図3 MKN1細胞の浸潤に対するTNF- α の影響

(6) ECMタンパク質による腫瘍関連マクロファージの分化調節

基底膜の主要なECMタンパク質であるラミニン-332の単球分化に対する影響を検討した結果、ラミニン-332は単球からのMMP-9産生能を増強させることが判明した。ラミニン-332は、 $\gamma 2$ 鎖のプロセッシングにより、その機能が変化することが報告されている。そこで、単球分化に及ぼすプロセッシングの影響を検討したところ、 $\gamma 2$ 鎖N末端部分の切断除去により、MMP-9産生能が強化されることが明らかとなった。一方、切断により生成するN末端フラグメントにはMMP-9産生能を抑制する作用があることが示された。以上の結果から、ラミニン-332が単球分化を促進し、また $\gamma 2$ 鎖のタンパク分解プロセッシングにより、その作用が調節されることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

- Itoh S, Kawano K, Takeshita K, Maitani Y, Tsuji T. Development of liposomal nanoconstructs targeting P-selectin (CD62P)-expressing cells by using a sulfated derivative of sialic acid. *Pharm Res* (2014) in press
DOI: 10.1007/s11095-014-1383-6
- Kamoshida G, Ogawa T, Oyanagi J, Sato H, Komiya E, Higashi S, Miyazaki K, Tsuji T. Modulation of matrix metalloproteinase-9 secretion from tumor-associated macrophage-like cells by proteolytically processed laminin-332 (laminin-5). *Clin Exp Metastasis* 31: 285-291 (2014)
DOI: 10.1007/s10585-013-9627-0
- Itoh S, Yokoyama R, Kamoshida G, Fujiwara T, Okada H, Takii T, Tsuji T, Fujii S, Hashizume H, Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) inhibits blood coagulation by binding to prothrombin and factor Xa via their γ -carboxyglutamic acid (Gla) domain. *J Biol Chem* 288: 21569-21580 (2013)
DOI:10.1074/jbc.M113.451419
- Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Sai Y, Tsuji T, Miyamoto KI, Hirao A, Hamada JI. Integrin $\alpha 3$ is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer* 108: 2516-2524 (2013)
DOI:10.1038/bjc.2013.218
- Itoh S, Yamaoka N, Kamoshida G, Takii T, Tsuji T, Hayashi H, Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 8 (SSL8) binds to tenascin C and inhibits tenascin C-fibronectin interaction and cell motility of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 433:127-132 (2013)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.050
- Suzuki J, Hamada E, Shodai T, Kamoshida G, Kudo S, Itoh S, Koike J, Nagata K, Irimura T, Tsuji T. Cytokine secretion from human monocytes potentiated by P-selectin-mediated cell adhesion. *Int Arch Allergy Immunol* 160: 152-160 (2013)
DOI: 10.1159/000339857
- Kamoshida G, Matsuda A, Miura R, Takashima Y, Katsura A, Tsuji T. Potentiation of tumor cell invasion by co-culture with monocytes accompanying enhanced production of matrix metalloproteinase and fibronectin *Clin Exp Metastasis* 30: 289-297 (2013)
DOI: 10.1007/s10585-012-9536-7
- Oku T, Nakano M, Kaneko Y, Ando Y, Kenmotsu H, Itoh S, Tsuiji M, Seyama Y, Toyoshima S, Tsuji T. Constitutive turnover of phosphorylation at Thr-412 of human p57/coronin-1 regulates the interaction with actin. *J Biol Chem* 287: 42910-42920 (2012)
DOI: 10.1074/jbc.M112.349829
- Kamoshida G, Matsuda A, Katabami K, Kato T, Mizuno H, Sekine W, Oku T, Itoh S, Tsuiji M, Hattori Y, Maitani Y, Tsuji T. Involvement of transcription factor Ets-1 in the expression of the $\alpha 3$ integrin subunit gene. *FEBS J* 279: 4535-4546 (2012)
DOI: 10.1111/febs.12040
- Yokoyama R, Itoh S, Kamoshida G, Takii T, Fujii S, Tsuji T, Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 3 binds to toll like receptor 2 extracellular domain and inhibits

cytokine production induced by *S. aureus*, cell wall component or lipopeptides in murine macrophages. *Infect Immun* 80: 2816-2825 (2012)
DOI:10.1128/IAI.00399-12

11. Itoh S, Yokoyama R, Murase C, Takii T, Tsuji T, Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 10 binds to phosphatidylserine and apoptotic cells. *Microbiol Immunol* 56: 363-371 (2012)
DOI: 10.1111/j.1348-0421
12. Kamoshida G, Matsuda A, Sekine W, Mizuno H, Oku T, Itoh S, Irimura T, Tsuji T. Monocyte differentiation induced by co-culture with tumor cells involves RGD-dependent cell adhesion to extracellular matrix. *Cancer Lett* 315: 145-152 (2012)
DOI: 10.1016/j.canlet.2011.09.029

[学会発表] (計 10 件)

1. 鴨志田剛, 小川崇, 佐藤拓揮, 宮崎香, 辻 勉 ラミニン-332による単球の分化とマトリックスメタロプロテイナーゼ-9産生調節 第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会 2013 年 7 月 (松本)
2. 鴨志田剛, 小川崇, 小柳潤, 佐藤拓揮, 古宮栄利子, 東昌市, 宮崎香, 斧康 雄, 辻 勉 細胞外マトリックスラミニン-332による単球の腫瘍関連マクロファージへの分化調節 第 14 回 Pharmacology Hematology シンポジウム 2013 年 6 月 (東京)
3. 鴨志田剛, 松田彩花, 三浦莉紗, 高嶋友理, 桂 有沙, 辻 勉 単球との共培養によるマトリックスメタロプロテイナーゼとフィブロネクチン産生亢進を介したがん細胞浸潤能増強 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 (福岡)
4. 鴨志田剛, 辻 勉 転写因子 Ets-1 による細胞接着分子 $\alpha 3$ インテグリンの発現調節 第 21 回がん転移学会 2012 年 7 月 (広島)
5. 鴨志田剛, 三浦莉紗, 高嶋友理, 鈴木沙由里, 松田彩花, 辻 勉 単球との相互作用によるがん細胞の形質変化～がん細胞浸潤とフィブロネクチンおよび TNF- α の役割～ 第 13 回 Pharmacology Hematology シンポジウム 2012 年 6 月 (東京)
6. Tsuji T, Shimada K, Kenmotsu, H, Sekine, W, Saito, Y, Oku, T, Tsuji, M. Potentiation of gastric carcinoma cell invasion by TNF- α and MMP secretion from peritoneal mesothelial. *Experimental Biology* 2012 2012 年 4 月 (San Diego, 米国)
7. 剣持宏樹, 島田賢太郎, 奥 輝明, 築地 信, 辻 勉 腹膜中皮細胞単層培養系を用いた胃がん細胞の浸潤能の評価と炎症性サイトカインの作用 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 (札幌)

8. 鴨志田剛, 松田彩花, 桂 有沙, 三浦莉紗, 高嶋友理, 辻 勉 細胞外マトリックスタンパク質を介した単球とがん細胞の相互作用における形質変化 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 (京都)
9. 鴨志田剛, 辻 勉 RGD 依存的細胞接着を介した単球の腫瘍馴化マクロファージへの分化とがん細胞接着への影響 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会 2011 年 6 月 (浜松)
10. 鴨志田剛, 松田彩花, 桂 有沙, 三浦莉紗, 高嶋友理, 辻 勉 ヒト末梢血単球とがん細胞の相互作用～細胞外マトリックスタンパク質の働きと癌浸潤～ 第 12 回 Pharmacology Hematology シンポジウム 2011 年 6 月 (富山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 勉 (TSUJI, Tsutomu)
星薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00143503

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

築地 信 (TSUIJI, Makoto)
星薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：90302611

奥 輝明 (OKU, Teruaki)
星薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20409361