

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430119

研究課題名(和文)がん浸潤マーカー・ラミニン 2によるがん幹細胞機能の調節

研究課題名(英文)Roles of tumor invasion marker laminin gamma2 chain in tumor progression and cancer stem cell functions

研究代表者

宮崎 香(MIYAZAKI, KAORU)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：70112068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん浸潤マーカーであるラミニン 2鎖(Lm 2)のがんの悪性増殖における役割を調べた。1) Lm 2鎖の最N末端ドメインV(dV)が血管内皮の透過性やがん細胞の血管内皮下への浸潤を促進した。2) dV断片は転移性乳がん細胞のCD44分子に結合することによって、がん細胞の移動を促進した。しかし、がん幹細胞機能への関与は明確でなかった。3) dV断片に対する新規モノクローナル抗体を用いた分析から、培養ヒトがん細胞やがん組織においてdVを含む低分子量の断片が多量に産生され、がん患者血中でも検出されること、また本抗体が肺がん組織の免疫染色において浸潤性がん細胞を高感度で検出できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated functions of the tumor invasion marker laminin gamma2 chain (Lmg2) in tumor progression. 1. The most N-terminal, domain V (dV) of Lmg2 promoted vascular permeability and tumor cell invasion into endothelial cell layer. 2. The dV protein stimulated migration of metastatic breast cancer cells by binding the cancer stem cell marker CD44. However, it was not clear whether dV supports the stem cell function. 3. Novel antibodies recognizing dV were prepared. Analyses with these antibodies revealed that small proteolytic fragments containing dV were highly produced in various cultured human cancer cell lines, cancer tissues and sera of cancer patients. Immunohistochemistry showed that one of dV antibodies detects invasive lung cancer cells at high sensitivity. These results suggest that dV fragments are produced in cancer tissues and contribute to tumor invasion. The dV antibodies seem useful for pathological analysis and diagnosis of human cancers.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん微小環境 浸潤・転移 がん幹細胞 ラミニン CD44 細胞接着 細胞外マトリックス 免疫染色

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス (ECM) はがんの悪性増殖を支える重要な微小環境因子である。ECM 分子の中でも、特に基底膜の主成分であるラミニンや IV 型コラーゲンの発現変化はがん細胞が上皮内に留まるか、あるいは浸潤がんに移行するかどうかを決定する。基底膜が減弱あるいは消失すると、がん細胞は間質因子の影響を受けて上皮-間葉移行 (EMT) と呼ばれる形態変化を示しながら間質へと浸潤する。一方、近年、がん細胞集団の中のがん細胞を再生産する幹細胞様のがん細胞、すなわちがん幹細胞 (cancer stem cells または cancer-initiating cells) が存在することが明らかになり、注目されている。がん幹細胞は増殖速度が低いために通常の抗がん剤に対する抵抗性が高く、がん治療後の再発の重要な原因になっていると考えられている。このため、がん幹細胞を標的とする新規抗がん剤の開発や、がん幹細胞を維持させる環境因子 (niche) の解明が急務となっている。最近、EMT を起こしたがん細胞とがん幹細胞には、抗がん剤抵抗性、低増殖性、マーカータンパク質発現などにおいて共通性があることが報告されている (Cell 133:704, 2008)。

これまで私たちは一貫して、がんの増殖・浸潤・転移に関与する細胞外分子の解析を進めてきた。過去、大腸がん細胞が分泌する新規のマトリックスメタロプロテアーゼ

(MMP) としてマトリライシン (MMP-7)

(Cancer Res 50:7758, 1990) や新規 MMP 阻害分子 APP (Nature 362:839, 1993) などを見いだした。また、胃がん細胞が産生する新規細胞接着性運動促進因子 (ラドシン) を見いだした (PNAS 90:11767, 1993)。後にこの分子は上皮基底膜の重要な細胞接着分子である新規ラミニンであることが判明し、ラミニン 5、さらに最近ラミニン 332 (Lm332) と改名された (Matrix Biol. 24:326, 2005)。私たちを含めた多数の研究により、Lm332 ががんの浸潤性増殖に関与する重要な分子であることが明らかになっている (Cancer Sci. 97:91, 2006)。Lm332 は  $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$  鎖の巨大 3 量体分子 (450 k Da) である。私たちは初めて Lm332 の組み換えタンパク質の発現に成功し、その構造と作用機構を明らかにしてきた (J Biochem 132:607, 2002)。特に  $\gamma 2$  鎖短腕が限定切断されると、Lm332 の細胞接着活性が低下し、細胞運動活性が上昇することが明らかになった (MBC 18:1621, 2007)。一方、がん細胞が間質内に浸潤するとき、 $\alpha 3$  鎖と  $\beta 3$  鎖の発現が低下し、 $\gamma 2$  鎖が単独で過剰発現することを明らかにした (Cancer Res. 59:5596, 1999)。これまでに、がん浸潤先進部位での  $\gamma 2$  鎖の高発現は殆ど全ての種類のがんで報告されており、Lm  $\gamma 2$  鎖は典型的ながん浸潤マーカーとして認識されている。しかし、がんの悪性増殖における Lm  $\gamma 2$  の意義は全く不明であった。

最近、Lm  $\gamma 2$  を強制発現したがん細胞がヌードマウス体内で高い浸潤能を示すこと (Int J Cancer 127:2031, 2010)、Lm  $\gamma 2$  が EMT に伴って誘導され、この EMT がん細胞はコラーゲンゲル内で分裂能を失って浸潤する (低増殖高浸潤) こと (PLoS ONE 7:e53209, 2012)、などを明らかにした。さらに最近、Lm  $\gamma 2$  が、がん幹細胞機能の発現に重要と考えられている CD44 に結合することが示唆された。これらのことから、がん浸潤組織で高発現する Lm  $\gamma 2$  ががん幹細胞の機能維持にも関与している可能性が高い。本研究はこの可能性に注目しながら、がんの浸潤転移における Lm  $\gamma 2$  の役割を明確にすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

多種のヒトがん組織の浸潤先進部位ではラミニン 332 の構成鎖の一つであるラミニン  $\gamma 2$  鎖 (Lm  $\gamma 2$ ) が単独で過剰に発現する。しかし、このがん浸潤マーカー Lm  $\gamma 2$  の病理的意義は明確でない。最近の私たちの結果から、Lm  $\gamma 2$  鎖の N 末端断片が重要であること、また予備的な検討においてそれが、がん幹細胞マーカーである CD44 と相互作用すること、などが示唆された。これらのことは、がん浸潤部位で高発現する Lm  $\gamma 2$  ががん幹細胞を支える niche の成分として機能する可能性を示唆する。本研究では、特に Lm  $\gamma 2$  と CD44 の相互作用に注目しながら、がんの悪性進展における Lm  $\gamma 2$  の病理的役割を明らかにする。このために、Lm  $\gamma 2$  のがん組織における発現分布とその機能、Lm  $\gamma 2$  と CD44 との相互作用、Lm  $\gamma 2$  のがん幹細胞機能 (浮遊増殖能、抗がん剤耐性など) への関与、などを明らかにする。

## 3. 研究の方法

がん浸潤部位で高発現する Lm  $\gamma 2$  の機能を、がん幹細胞機能との関係に注目しながら、明らかにする。このために、主として以下の研究を行う。1) Lm  $\gamma 2$  とその N 末端断片の天然あるいは組換えタンパク質を調製し、種々のがん細胞への作用を明らかにする。2) Lm  $\gamma 2$  と CD44 の相互作用、および互いの結合部位を、細胞あるいは精製タンパク質を用いた実験によって明確にする。3) 種々の CD44 発現がん細胞において Lm  $\gamma 2$  ががん幹細胞機能 (浮遊増殖能、基質接着能、抗がん剤耐性など) に影響するかどうか、また、それが CD44 との相互作用によるものかどうかを明らかにする。4) Lm  $\gamma 2$  の CD44 結合部位に対する抗体を作製し、種々のヒトがん組織やがん細胞における Lm  $\gamma 2$  活性断片の発現と作用を明らかにする。

## 4. 研究成果

### 1) Lm $\gamma 2$ ・N 末端断片の生物活性

Lm  $\gamma 2$  鎖の短腕領域には N 末端側からドメイン V、IV、III が存在する。この部分は

プロテアーゼによる限定切断を受け、N 末端断片を遊離する。代表的な切断ではドメイン V (dV) と IV (dIV) からなる N 末端断片 (Lm $\gamma$ 2pf) が遊離される。この Lm $\gamma$ 2pf および dV などの組換えタンパク質を調製し、それらの培養細胞に対する生理活性を調べた。その結果 Lm $\gamma$ 2pf および dV が血管内皮細胞の収縮、ひいては血管内皮の透過性を促進した。このような作用によって、特に dV 断片はがん細胞の血管内皮下への浸潤を強く促進した。dV の血管透過性促進作用はヌードマウスを用いた *in vivo* の実験でも確認された。

## 2) Lm $\gamma$ 2 と CD44 の相互作用

Lm $\gamma$ 2 と CD44 との相互作用を解析し、以下の成果が得られた。(1) Lm $\gamma$ 2 は良性乳がん細胞 MCF-7 に比べて転移性乳がん細胞 MDA-MB-231 に高度に結合した。MDA-MB-231 細胞の表面に存在する Lm $\gamma$ 2 受容体の分析から、がん幹細胞マーカーである CD44 分子が Lm $\gamma$ 2 受容体として同定された。MDA-MB-231 細胞の全 CD44 含量は MCF-7 細胞に比べてはるかに高いことが判明した。(2) Lm $\gamma$ 2 の CD44 結合部位は最 N 末領域であるドメイン V (dV) の EGF 様リピート 2/3 と同定された。当初 Lm $\gamma$ 2 が結合する CD44 はヘパラン硫酸鎖をもつ CD44v3 と想定されたが、精製タンパク質を用いた分析において糖鎖をもたない標準型 (CD44s) にも結合した。(3) Lm $\gamma$ 2 の MDA-MB-231 細胞への結合は CD44 の細胞内領域のリン酸化を促進し、細胞移動を促進した。この作用は CD44 中和抗体や RNAi 処理によって阻害された。以上の結果から、Lm $\gamma$ 2 の浸潤促進活性は CD44 を介すること、すなわち 2 種のがん細胞マーカーである Lm $\gamma$ 2 と CD44 が相互作用し、生体内でのがん細胞の浸潤転移を促進する可能性が強く示唆された。

## 3) Lm $\gamma$ 2 とがん幹細胞機能との関係

上記のように Lm $\gamma$ 2pf および dV 断片ががん細胞の CD44 分子に結合し、がん細胞の細胞移動を促進することが明らかになった。CD44 はがん幹細胞マーカー分子であることから Lm $\gamma$ 2・N 末端断片の CD44 への結合ががん幹細胞機能に影響する可能性が考えられる。この可能性を調べる目的で、Lm $\gamma$ 2pf および dV 断片が MDA-MB-231 細胞の薬剤耐性に影響するかどうかを調べたが明確な効果は認められなかった。さらに、MDA-MB-231 の浮遊増殖性に対する効果も調べたが効果は明確でなかった。このような単純な実験系において結果はネガティブであったが、上記のように良性の乳がん細胞 MCF-7 に比べて、CD44 の発現量が高く、かつ浸潤性が高い MDA-MB-231 乳がん細胞に dV 断片が高度に結合した。さらに、CD44 発現量とがん細胞の悪性度が相関するとの報告がいくつか存在する。これらのことから、他の多様な因子が存在する生体内環境において Lm $\gamma$ 2・N 末端断片ががん幹細胞機能に

影響する可能性は否定できない。

## 4) Lm $\gamma$ 2 の dV 断片 (CD44 結合部位) に対するモノクローナル抗体の作成

Lm $\gamma$ 2 の N 末領域を認識する抗体が市販されていないことから、以下のようにマウスモノクローナル抗体を自作した。(1) Lm $\gamma$ 2 ドメイン V (dV) および IV (dIV) からなる  $\gamma$ 2pf (45kDa) を抗原としてマウスを免疫し、dV および dIV を認識する多数の抗体クローンを樹立した。それらの中から、免疫ブロッティングや免疫染色が可能な抗体を選別した。さらに 2 個の抗体クローンを選別、数 ng/ml レベルの  $\gamma$ 2 鎖 N 末端断片を検出できる Sandwich ELISA 系を樹立した。(2) 上記抗体を用いて Lm $\gamma$ 2 の N 末端断片の解析を行った結果、多くの培養がん細胞では  $\gamma$ 2 鎖はプロテアーゼにより切断され、 $\gamma$ 2pf とドメイン V 断片が多量に分泌されることが明らかになった。一方、ヒト肺がん組織ではドメイン III の C 末端部分で切断されて生じた 70-80kDa の  $\gamma$ 2 短腕断片や dV 断片が主に検出された。以上から、CD44 分子に結合する dV 断片が生体内でも産生されることが明らかになった。(3) 作成した Sandwich ELISA 系ががん患者血清中の  $\gamma$ 2 鎖 N 末端断片を検出できることが分かった。

## 5) ヒト肺がん組織における Lm $\gamma$ 2・dV 断片の分布

CD44 に結合する Lm $\gamma$ 2・dV 断片のヒトがん組織における分布を新規 dV 抗体 (クローン P2H) を用いた免疫染色法で調べた。同時に、過去に私たちが作製した 3 種の Lm332 抗体を用いて、Lm332 構成鎖の発現分布も調べた。その一つである D4B5 抗体は  $\gamma$ 2pf より C 末端側のドメイン III を認識する抗体で広く世界で使用されている。免疫染色の結果、D4B5 に比べて、P2H 抗体が浸潤性がん細胞および周囲の間質組織を強く染色した。特に悪性度の高いがんほど、がん細胞質が強く染色された。これらのことから、P2H 抗体で検出される、dV を含む N 末端側プロテアーゼ断片が、D4B5 で検出される C 末端側断片よりもがん組織中でより安定に存在し、がん細胞の浸潤能に寄与することが推測された。他の抗体を用いた結果から、浸潤性がん細胞では  $\gamma$ 2 鎖に加えて  $\beta$ 3 鎖が、また、がん間質では  $\gamma$ 2 鎖に加え  $\alpha$ 3 鎖が過剰に発現することが明らかになった。一方、dV 断片に対する高感度のサンドイッチ ELISA 系を作成し、肺がん患者血清を分析した結果、特にステージ III 以上の肺がん患者血清中で  $\gamma$ 2dV 断片が有意に増加した。以上から、初めて作製された  $\gamma$ 2dV 抗体が肺がん組織の病理診断に有効であるだけでなく、がんの血清診断への応用性が考えられた。

## 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 7 件)

1. Sato, H, Oyanagi, J., Komiya, E., Ogawa, T, Higashi, S., Miyazaki, K. Amino-terminal fragments of laminin  $\gamma 2$  chain stimulate migration of metastatic breast cancer cells by interacting with CD44. Clin. Exp. Metastasis, 32: 405-415. 2015, doi: 10.1007/s10585-015-9705-6.
2. Sato, H, Oyanagi, J., Komiya, E., Ogawa, T, Higashi, S., Miyazaki, K. Amino-terminal fragments of laminin  $\gamma 2$  chain retract vascular endothelial cells and increase vascular permeability. Cancer Sci., 105:168-175, 2014, doi: 10.1111/cas.12323.
3. 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.
4. Komiya, E, Sato, H., Ise, I., Yanagawa, T., Watanabe, N., Higashi, S., Miyazaki, K. Angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) is a molecular marker of vascular endothelial cells activated by VEGF in human breast cancers. Cancer Med. 3:537-49, 2014 doi: 10.1002/cam4.216.
5. Oyanagi, J., Kojima, N., Sato, H., Higashi, S., Kikuchi, K., Sakai, K., Matsumoto, K., Miyazaki, K. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$  signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. Exp. Cell Res. 326:267-279, 2014, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.009.
6. Sato, H, Oyanagi, J., Komiya, E., Ogawa, T, Higashi, S., Miyazaki, K. Amino-terminal fragments of laminin  $\gamma 2$  chain stimulate migration of metastatic breast cancer cells by interacting with CD44. Clin. Exp. Metastasis, 32: 405-415. 2015, doi: 10.1007/s10585-015-9705-6.
7. Miyazaki, K., Oyanagi, J., Sugino, A., Sato, H., Yokose, T., Nakayama, H., Miyagi, Y. Highly sensitive detection of invasive lung cancer cells by novel antibody against amino-terminal domain of laminin  $\gamma 2$  chain. Cancer Sci., 2016 Dec;107(12):1909-1918.

[学会発表] (計 7 件)

1. Miyazaki, K., Jun Oyanagi, J., Higashi, S., Kikuchi, K., Sakai, K., Matsumoto, K. Three-dimensional collagen gel co-culture model as a tool to investigate tumor invasion: roles of HGF and TGF- $\beta$ . 第 73 回日本癌

学会総会 2014 年 9 月 25-27 日 (横浜)

2. Sato, H., Miyazaki, K. Laminin gamma2 Chain Interacts with CD44 and Stimulates Migration of Metastatic Breast Cancer Cells. 第 23 回日本がん転移学会総会 2014 年 7 月 10-11 日 (金沢)
3. 宮崎香. がん微小環境における細胞外マトリックス分子の変動と意義。第 33 回日本ヒト細胞学会 8 月 22-23 日、2015 (宮崎)
4. Miyazaki, K., Sato, H., Higashi, S. N-terminal fragments of laminin  $\gamma 2$  chain stimulate migration of metastatic breast cancer cells by interacting with CD44. 第 74 回日本癌学会総会 J-1146, 2015 年 10 月 8-10 日 (名古屋)
5. Kanayama, T., Koizume, S., Miyagi, E., Hirahara, F., Miyazaki, K., Miyagi, Y. CD69 induced in CCC cells cultured under serum starvation and hypoxia activates cell surface integrin. 第 74 回日本癌学会総会 P-2258, 2015 年 10 月 8-10 日 (名古屋)
6. Miyazaki, K., Oyanagi, J., Sato, H., Miyagi, Y. Production of N-terminal active fragments of laminin  $\gamma 2$  chain by cultured human cancer cells and in lung cancer tissues. 第 75 回日本癌学会総会 J-3097, 2016 年 10 月 6-8 日 (横浜)
7. Miyazaki, K. Tumor invasion marker laminin  $\gamma 2$  chain - highly sensitive detection of invasive lung cancer cells by novel antibody recognizing its N-terminal fragment. BIT's 10<sup>th</sup> Annual World Cancer Congress, May 19-21, 2017. Barcelona, Spain.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 香 (MIYAZAKI Kaoru)  
神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター  
臨床研究所・特任研究員/横浜市立大学・  
名誉教授  
研究者番号：70112068

(2) 連携研究者

宮城 洋平 (MIYAGI Yohei)  
神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター  
臨床研究所・総括部長  
研究者番号：00254194

(3) 連携研究者

東 昌市 (HIGASHI Shouichi)  
横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学  
研究科・教授  
研究者番号：10275076