

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014056

研究課題名（和文） がん細胞の動態を制御する間質因子

研究課題名（英文） Stromal factors regulating tumor cell motility

研究代表者

宮坂 昌之 (MIYASAKA MASAYUKI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50064613

研究成果の概要（和文）：癌組織間質に由来する CD44 結合性分子として低分子量ヒアルロン酸、低分子量コンドロイチン硫酸 E を同定し、これらの分子が癌細胞自身が産生する分解酵素によって癌細胞周囲に産生され、膜上の CD44 を介して癌細胞の浸潤を亢進させるというオートクリン、パラクリン作用機構が明らかになった。また、癌細胞の運動性を制御する分子として複数のケモカインが協調的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have identified tumor stroma-derived molecules that upregulate tumor cell motility via cell surface CD44; they include low-molecular-weight hyaluronic acid and chondroitin sulfate E. They are produced by the enzymes produced by tumor cells and act on the tumor cells in an autocrine/paracrine manner. We also found that a number of the stroma-derived molecules bind chemokines and that certain combinations of chemokines modulate tumor cell motility, implying that certain stroma-derived molecules and chemokines upregulate tumor cell motility synergistically.

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	20,900,000	0	20,900,000
2006年度	20,400,000	0	20,400,000
2007年度	20,400,000	0	20,400,000
2008年度	19,300,000	0	19,300,000
2009年度	19,300,000	0	19,300,000
総計	100,300,000	0	100,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：癌、糖鎖、バイオテクノロジー、免疫学、転移、細胞外基質、接着分子

1. 研究開始当初の背景

(1) われわれは独自に、癌細胞転移関連分子

L-selectin, CD44 の新規リガンドとして種々のプロテオグリカンと同定し、特に CS の中の特定の

糖鎖構造が selectin, CD44 との結合に重要であることを初めて明らかにし、また、間質の主要構成成分であるヒアルロン酸 (HA) の分解産物が癌細胞の運動性、浸潤性に大きな影響を与えることを明らかにした。

(2) 過硫酸化 CS が癌細胞や内皮細胞の運動性に影響を与えるケカインと結合してその機能を修飾することを明らかにした。

(3) これらのことから、腫瘍の間質側に腫瘍細胞の運動性、浸潤性を規定する重要な因子群が存在することが明らかになりつつあった。

しかし、これらの間質由来分子の分解産物がどのようにして産生されるのか、その生化学的機構は不明であった。また、ヒアルロン酸以外のグリコサミングリカン鎖、たとえば過硫酸化 CS は、CD44 のみならず特定のケカイン群にも結合するが、これらの分子あるいはその分解産物が腫瘍細胞の浸潤性を修飾するのかについても不明であった。この他に、そもそもこれらの分子が腫瘍間質に存在するのかについては、特異的抗体が存在しなかったために不明であった。CD44 については、膜貫通型分子であるにも関わらずリガンド結合により CD44 の細胞外部分が一定部分で切断されて細胞外に放出される (shedding) が、その分子機構は不明であり、どのような構造的変換がもたらされるのかについては全く情報が無かった。

2. 研究の目的

癌の浸潤、転移、なかでも転移のプロセスを規定する微小環境においてどのような間質因子が癌細胞の転移制御に関わるかを明らかにすることを試みる。特に、

(1) 癌細胞転移関連分子 CD44 を刺激する癌細胞からの産物 (低分子量 HA) によるマトリックスの浸潤促進の分子機構の詳細を明らかにす

ることを試みる。また、CD44 と低分子量 HA の結合の構造的要求性を明らかにする。

(2) 癌細胞のメタスタシスの重要性について明らかにすることを試みる。

(3) 癌細胞転移関連分子である L-selectin, CD44 に結合する過硫酸化 CS の局在や癌細胞動態への関与を明らかにするために特異的モノクローナル抗体の作成を試みる。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞が産生する低分子量 HA の産生機構を生化学的に検討するとともに、種々の低分子量 HA 標品の CD44 shedding 誘導能、運動能誘導能をウェスタンブロットイングおよび浸潤アッセイなどを用いて解析する。また、東大薬学研究所の嶋田一夫教授との共同研究で NMR を用いて CD44-低分子量 HA の結合における構造的要求性を明らかにする。

(2) ケカインの結合アッセイは BIACore、メタスタシスはトランスウェルアッセイを用いる。

(3) モノクローナル抗体の作成は通常法およびファージディスプレイ法による。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌細胞株 MIAPaCa-2 では自らが産生するヒアルロンターゼにより間質の HA を分解して低分子量 HA を作り、低分子量 HA は癌細胞自身に働いてその浸潤性を増加させることが明らかになった (J.Biol.Chem. 281:5861, 2006)。また、腫瘍間質から生成される低分子量 chondroitin sulfate E (CSE)にも低分子量 HA と同様な作用があり、特に 3 kD のものは CD44 に特異的に結合して強い CD44 shedding を誘導する (図 1) とともに癌細胞の浸潤能を上昇させることが明らかになった (Cancer Res. 68:7191, 2008)。

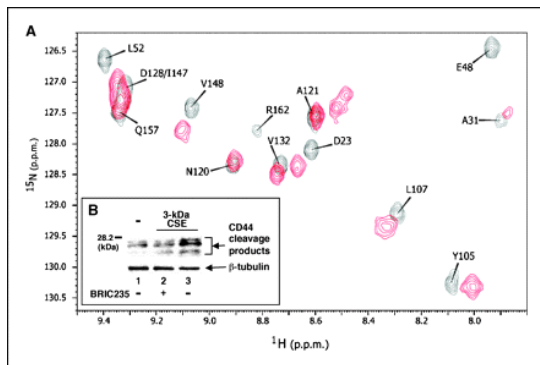


図 1 : CSE の CD44 への結合と shedding 誘導能

また、骨肉腫細胞の肝転移結節形成においても CSE が促進的に働くことが明らかになった (Glycobiol. 19:735, 2009)。すなわち、腫瘍細胞は CD44 を介してその間質とダイナミックな相互作用をしながら自らの浸潤性を上昇させる機構をもつことが明らかになった。

また、嶋田一夫博士との共同で CD44 の HA 結合ドメインに存在する機能的部分リンクモジュール (LM) と HA との結合様式を解析したところ、LM のみならず LM 両端の付加配列も HA と結合するとともに、HA 結合によって付加配列全体および隣接する C 末端部分 (アミノ酸残基 153~169) に大きな構造変化が起こることが明らかになった (J.Biol.Chem. 281:40089, 2006)。さらに、さらに最近の解析から CD44 は HA 低親和性の ordered conformation と HA 高親和性の disordered conformation の平衡状態にあり、Y161A 変異体は disordered conformation のみを保持するとともにタンパク分解酵素により細胞外部分が切断されやすいことがわかった (投稿中)。

(2) 癌間質に存在するケモカイン結合物質を探索した結果、CSE の他に、collagen type IV, fibronectin, laminin-1 などが CCL21、CXCL13 などの特定のケモカインに結合することが明らかになった (図 2 : J.Immunol. 179:4376, 2007)。

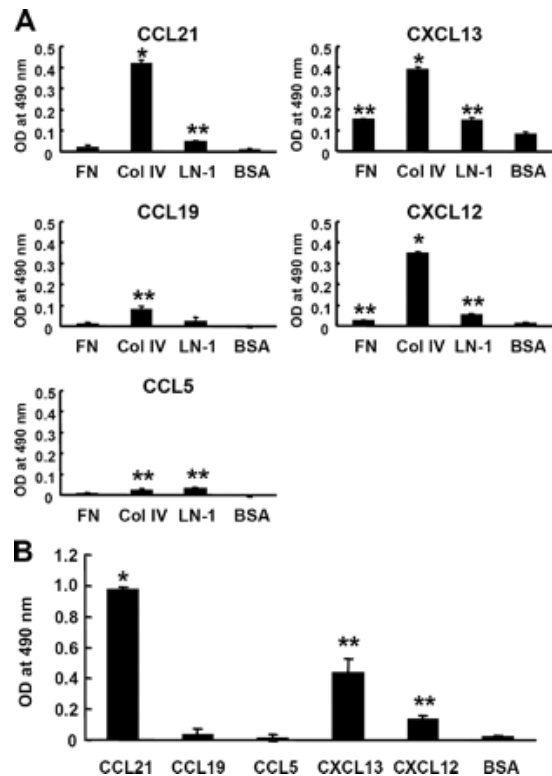


図 2 : 種々のケモカインの間質構成成分への結合

CCL21 はリンパ管内皮細胞により分泌され、癌細胞のリンパ節転移への関与が報告されていることから、癌細胞のケモキシスへの関与を検討したところ、リンパ球の場合と同様に (J.Immunol. 182:1287, 2009)、CCL21 単独のケモキシス誘導性は弱いですが、別のケモカインである CXCL12 と共同的に働いて癌細胞のケモキシスを亢進させるという結果が得られた (投稿準備中)。これは、癌間質や所属リンパ節で産生される複数のケモカインが共同的に働いて転移を誘導することを示唆する知見であり、きわめて興味深い。

(3) 癌間質から産生される低分子量 HA、CS に対する特異的モノクローナル抗体の産生を通常法、ファージライブラリー法を用いて試みたが、特異的に反応する抗体を得ることはできなかった。しかし、ランダの van Kuppevelt らが CSE に特異的に反応する抗体を得たために共同研究としてこの抗体を得て組織学的検討を行ったところ、図 3 に示すように種々の腺癌組織で

は CSE の発現が亢進していることが確認された (Cancer Res. 68:7191, 2008)。

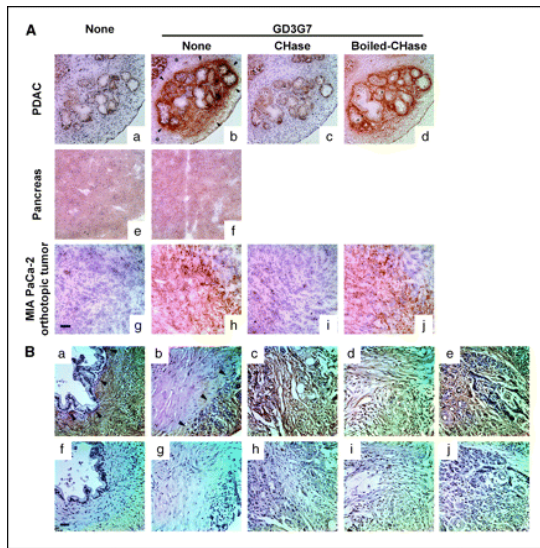


図 3：膵癌組織における CSE の発現

(4) 癌幹細胞の転移能について検討するために大腸癌細胞株 LoVo と悪性中皮腫株 7 種において side population 解析を進めたが、幹細胞としての性格をもつ細胞は同定できなかった。ただ、この過程で悪性中皮腫細胞ではケモキネシスリセプター CCR10 が発現し、CCR10 リガンドに反応してケモキシスを示したが、良性中皮細胞ではこのようなことは見られなかった。

(5) 血管内皮細胞に特異的に発現する接着分子を探索する中から新規のものとして nepmucin を同定した (J.Exp.Med. 203:1603, 2006)。この分子は癌組織および癌の所属リンパ節で癌の進展とともに発現が低下する。本分子は免疫細胞の血管外移動に関与することから、その発現低下は癌免疫能の低下につながることを考えられ、興味深い。

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 19 件)

①*Ebisuno, Y., *Katagiri, K., Katakai, T., Ueda,

Y., Nemoto, T., Inada, H., Nabekura, J., Okada, T., Kannagi, R., Tanaka, T., Miyasaka, M., Hogg, N. & Kinashi, T. (*equal contribution): Rap1 controls lymphocyte adhesion cascades and interstitial migration within lymph nodes in a RAPL-dependent and independent manner. *Blood*, 115:804-814, 2010, 査読有

②Tanaka, T., Moriwaki, K., Murata, S. & Miyasaka, M.: A LIM domain-containing adaptor, leupaxin, localizes in focal adhesion and suppresses the integrin-induced tyrosine phosphorylation of paxillin. *Cancer Sci.*, 101:363-368, 2010, 査読有

③Matsumoto, M., Miyasaka, M. & Hirata, T.: P-selectin glycoprotein ligand-1 negatively regulates T-cell immune responses. *J. Immunol.*, 183:7204-7211, 2009, 査読有

④Basappa, Murugan, S., Sugahara, K.N., Lee, C.M., ten Dam, G.B., van Kuppevelt, T.H., Miyasaka, M., Yamada, S. & Sugahara, K.: Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells. *Glycobiology*, 19:735-742, 2009, 査読有.

⑤*Bai, Z., *Hayasaka, H., Kobayashi, M., Li, W., Guo, Z., Jang, M.H., Kondo, A., Choi, B., Iwakura, Y. & Miyasaka, M. (*equal contribution): CXCL12 promotes CCR7-dependent naïve T-cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Immunol.*, 182:1287-1295, 2009, 査読有.

⑥Jin, S., Umemoto, E., Tanaka, T., Shimomura, Y., Tohya, K., Kunizawa, K., Yang, B.-G., Jang, M.H., Hirata, T. & Miyasaka, M.: Nepmucin/CLM-9, an Ig domain-containing sialomucin in vascular endothelial cells, promotes lymphocyte transendothelial migration in vitro. *FEBS Lett.*, 582:3018-3024, 2008, 査読有.

⑦*Nakasaki, T., *Tanaka, T., Okudaira, S., Hirosawa, M., Umemoto, E., Otani, K., Jin, S., Bai, Z., Hayasaka, H., Fukui, Y., Aozasa, K., Fujita, N., Tsuruo, T., Ozono, K., Aoki, J. & Miyasaka, M. (*equal contribution): Involvement of a lysophosphatidic-acid generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *Am. J. Pathol.*, 173:1566-1576, 2008, 査読有.

⑧Matsumoto, M., Shigeta, A., Miyasaka, M. &

- Hirata, T.: CD43 plays both antiadhesive and proadhesive roles in neutrophil rolling in a context-dependent manner. *J. Immunol.*, 181:3628-3635, 2008, 査読有.
- ⑨ Sugahara, K.N., Hirata, T., Tanaka, T., Ogino, S., Takeda, M., Terasawa, H., Shimada, I., Tamura, J., Ten Dam, G.B., Van Kuppevelt, T.H. & Miyasaka, M.: Chondroitin sulfate E fragments enhance CD44 cleavage and CD44-dependent motility in tumor cells. *Cancer Res.*, 68:7191-7199, 2008, 査読有.
- ⑩ Furukawa, Y., Umemoto, E., Jang, M.H., Tohya, K., Miyasaka, M. & Hirata, T.: Identification of novel isoforms of mouse L-selectin with different carboxy-terminal tails. *J. Biol. Chem.*, 283:12112-12119, 2008, 査読有.
- ⑪ Yang, B.-G., Tanaka, T., Jang, M.H., Bai, Z., Hayasaka, H. & Miyasaka, M.: Binding of lymphoid chemokines to collagen IV that accumulates in the basal lamina of high endothelial venules; its implication in lymphocyte trafficking. *J. Immunol.*, 179:4376-4382, 2007, 査読有.
- ⑫ *Matsutani, T., *Tanaka, T., Tohya, K., Otani, K., Jang, M.H., Umemoto, E., Taniguchi, K., Hayasaka, H., Ueda, K. & Miyasaka, M. (*equal contribution): Plasmacytoid dendritic cells employ multiple cell adhesion molecules sequentially to interact with high endothelial venule cells - Molecular basis of their trafficking to lymph nodes. *Int. Immunol.*, 19:1031-1037, 2007, 査読有.
- ⑬ Matsumoto, M., Shigeta, A., Furukawa, Y., Tanaka, T., Miyasaka, M. & Hirata, T.: CD43 collaborates with P-selectin glycoprotein ligand-1 to mediate E-selectin-dependent T cell migration into inflamed skin. *J. Immunol.*, 178:2499-2506, 2007, 査読有.
- ⑭ Takeda, M., Ogino, S., Umemoto, R., Sakakura, M., Kajiwara, M., Sugahara, K.N., Miyasaka, M., Terasawa, H. & Shimada, I.: Ligand-induced structural changes of the CD44 hyaluronan-binding domain revealed by NMR. *J. Biol. Chem.*, 281:40089-40095, 2006, 査読有.
- ⑮ Umemoto, E., Tanaka, T., Kanda, H., Jin, S., Tohya, K., Otani, K., Matsutani, T., Matsumoto, M., Ebisuno, Y., Jang, M.H., Fukuda, M., Hirata, T. & Miyasaka, M.: Nepmucin, a novel HEV sialomucin, mediates L-selectin-dependent lymphocyte rolling and promotes lymphocyte adhesion under flow. *J. Exp. Med.*, 203:1603-1614, 2006, 査読有.
- ⑯ Sugahara, K.N., Hirata, T., Hayasaka, H., Stern, R., Murai, T. & Miyasaka, M.: Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments. *J. Biol. Chem.*, 281:5861-5868, 2006, 査読有.
- ⑰ Nakai, K., Tanaka, T., Murai, T., Ohguro, N., Tano, Y. & Miyasaka, M.: Invasive human pancreatic carcinoma cells adhere to endothelial tri-cellular corners and increase endothelial permeability. *Cancer Sci.*, 96:766-773, 2005, 査読有.
- ⑱ *Kanemitsu, N., *Ebisuno, Y., *Tanaka, T., Otani, K., Hayasaka, H., Kaisho, T., Akira, S., Katagiri, K., Kinashi, T., Fujita, N., Tsuruo, T. & Miyasaka, M. (*equal contribution): CXCL13 is an arrest chemokine for B cells in high endothelial venules. *Blood*, 106:2613-2618, 2005, 査読有.
- ⑲ Tanaka, T., Bai, Z., Srinoulprasert, Y., Yang, B.-G., Hayasaka, H. & Miyasaka, M.: Review: Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci.*, 96:317-322, 2005, 査読有.
- [学会発表] (計 14 件)
- ① Suzuki, M., et al. CD44-mediated cell rolling regulated by two-state conformational equilibrium of the hyaluronan-binding domain. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Dec. 2-4, 2009. Osaka.
- ② Matsumoto, M., et al. Characterization of CXCR4⁺ cells with prominent membrane blebbing in a human colon adenocarcinoma cell line LoVo. The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct. 1-3, 2009. Yokohama.
- ③ Kubota, H., et al. Attempts to identify the cell population directly involved in invasion/metastasis in human malignant mesothelioma. The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct. 1-3, 2009. Yokohama.
- ④ Sugahara, K., et al. The E-type structure of chondroitin/dermatan sulfate on tumor cell surfaces is involved in lung and liver metastases. 6th International Conference

on Preteoglycan. Sep. 13-17, 2009.
Aix-les-Bains, France.

- ⑤ 菅原一幸、他. マウス癌細胞株の肺および肝臓への転移にはコンドロイチン硫酸 E 様構造が関与する. 第 29 回日本糖質学会年会. 2009.9.9-11. 岐阜.
- ⑥ 早坂晴子、他. 乳癌細胞における CXCL12 と CCR7 リガンド協働作用の解析. 第 18 回日本がん転移学会学術集会・総会. 2009.7.23-24. 旭川.
- ⑦ Miyasaka, M., et al. The role of CD44-ECM interactions in tumor invasion. Yokosuka Science Festa 2009. June 4-7, 2009. Yokosuka
- ⑧ 岩本由希、他. 癌細胞における CXCL12 及び CCL19/CCL21 の協働作用の検討. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008.12.9-12. 神戸.
- ⑨ 宮坂昌之. 癌細胞の動態を制御する間質因子. 招待講演. 第 49 回日本肺癌学会総会. 2008.11.13-14. 福岡
- ⑩ Nishiyama, M., et al. Characterization of SP and non-SP in a human colon adenocarcinoma cell line LoVo. The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 10.28-30, 2008. Nagoya.
- ⑪ Umemoto, E., et al. A novel endothelial cell adhesion molecule, nepmucin: Its absence of expression in immunologically privileged sites and tumor tissues. The U.S.- Japan Cooperative Cancer Research Program Workshop 2008. 3/19-21, 2008. Kyoto.
- ⑫ Jin, S., et al. Nepmucin that shows homophilic binding plays a role in lymphocyte transmigration across vascular endothelial cells. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 11.20-22, 2007. Tokyo.
- ⑬ Umemoto, E., et al. A novel endothelial cell adhesion molecule, nepmucin: Its absence of expression in immunologically privileged sites and tumor tissues. Invited lecture. The 6th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research. 10.6-7, 2007. Toya.
- ⑭ 早坂晴子、他. 癌細胞のケモタキシスにおけるケモカイン協働作用の解析. 第

16 回日本がん転移学会学術集会.
2007.7.9-10. 富山.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 低分子コンドロイチン硫酸を含む医薬

発明者: 宮坂 昌之、前田 浩、村松 信、
松本 太郎

権利者: 大正製薬株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2005-150820

出願年月日: 平成 17 年 5 月 24 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮坂 昌之 (MIYASAKA MASAYUKI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 50064613

(2)研究分担者

早坂 晴子 (HAYASAKA HARUKO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 70379246

梅本 英司 (UMEMOTO EIJI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 90452440

張 明浩 (JANG MYOUNG-HO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・

特任准教授 (常勤)

研究者番号: 70420453

白 忠彬 (BAI ZHONGBIN)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・

特任研究員

研究者番号: 10512840

ベルハンガルシア ノエル

(VERJAN-GARCIA NOEL)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・

特任研究員

研究者番号: 90533216

平田 多佳子 (HIRATA TAKAKO)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号: 00346199

田中 稔之 (TANAKA TOSHIYUKI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号: 30217054

(3)連携研究者

なし