

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007-2008  
 課題番号： 19590084  
 研究課題名 (和文) がんの浸潤・転移の素過程におけるインテグリン-マトリックス相互作用の解析  
 研究課題名 (英文) The integrin-matrix interaction in the metastasis and invasion processes of cancer  
 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

研究成果の概要：悪性度の高い肝がんや胃がんを高発現する細胞接着分子 3 1 インテグリンのがんの浸潤・転移における役割について解析した。このインテグリンと組織マトリックスに含まれるラミニンの相互作用により細胞運動や浸潤能が高まり、またマトリックス分解酵素の産生が亢進し、これらが相乗的に作用し、がんの浸潤・転移に対し促進的に働くことが推察された。この過程を制御することによりがん転移の予防に資するものと考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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，細胞運動，インテグリン，がん，浸潤・転移，細胞外マトリックス

## 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。その中で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 3 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ものであり、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 3 インテグリンの発現と胃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 3 1 インテグリンの発現が相関することが見出された。そ

ここで私達は「 $\alpha 3$  インテグリンの発現が高いがん細胞がなぜ浸潤・転移しやすいか？」という問題を解決しようと研究を行った。その結果、この接着分子の発現の高い胃がん細胞が腹膜中皮細胞および基底膜に対して接着性が高く、腹膜播種を起こしやすくする原因の一つであることを明らかにした。本研究では、さらに (1) がん細胞の組織浸潤における接着分子の役割、(2) 接着分子からのシグナルによるがん細胞でのマトリックス分解酵素産生の調節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「がん細胞ではどうして  $\alpha 3$  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する。

## 2. 研究の目的

本研究では、がん細胞と宿主組織との相互作用により大きく影響を受ける浸潤・転移のプロセスの素過程における  $\alpha 3$  インテグリンの役割およびその発現調節機構の解明を目的として研究を進める。具体的には、以下のような課題について検討する。

がん細胞の腹膜組織への浸潤能の評価系の確立と  $\alpha 3$  インテグリンの役割の解明：腹膜中皮細胞の単層培養系を用いた疑似腹膜による *in vitro* の細胞浸潤能評価系を確立し、これを活用し  $\alpha 3$  インテグリンを含む細胞接着分子およびそれらのリガンド（特にラミニン・ファミリー分子）との相互作用が細胞の運動および浸潤に与える影響を精査する。

がん細胞の  $\alpha 3$  インテグリン依存的接着によるマトリックス分解酵素の産生：がん細胞が腹膜中皮細胞の産生するマトリックスあるいはその構成成分であるラミニン 5 に接着することにより、マトリックス分解酵素の産生がどのように影響を受けるか調べる。特に、基底膜を分解するマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)-2 および MMP-9 などの IV 型コラゲナーゼに注目して調べる。

がん細胞における  $\alpha 3$  インテグリン発現の制御：申請者らのこれまでの研究で  $\alpha 3$  インテグリンの転写には、本遺伝子の 5' 非翻訳領域に存在する Ets 転写因子結合コンセンサス配列が重要であることが分かって

いるので、この領域に結合する因子の探索を進める。Ets 結合コンセンサス配列をタンデムに連結した DNA 断片を固定化した担体を調製し、がん細胞由来の核抽出液からこのアフィニティー担体に結合する分子を単離した後、ウエスタンブロット法等により解析し、この分子の同定を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 疑似腹膜によるがん細胞の浸潤能の *in vitro* 評価系の確立

ポイデン・チャンバーを用いた疑似腹膜による *in vitro* の浸潤能を評価した。まず、チャンバーの上室と下室を隔てる PET 膜を基底膜成分を含むマトリゲルでコートし、次いでその表面にマウス腹膜より単離した中皮細胞を単層培養した。下室に線維芽細胞 (HT-1080 細胞) 由来の細胞走化性因子を、上室には胃がん細胞株 (MKN1, GT3TKB, NUGC-4) をそれぞれ添加し、培養を続け一定時間後に下室に浸潤する細胞を染色後、顕微鏡下で計測した (図 1)。

また、界面活性剤 1% Nonidet P-40/2M urea 処理により中皮細胞を除去した疑似基底膜も調製した。

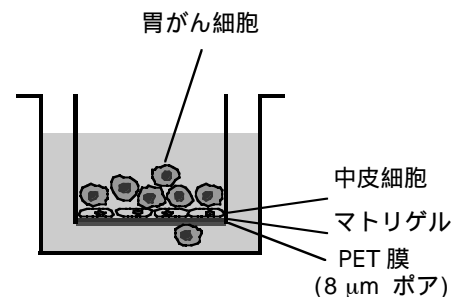


図 1 ポイデンチャンバーを用いた疑似腹膜の調製

### (2) 胃がん細胞の浸潤過程におけるインテグリンとリガンドの相互作用の解析

上記 (1) で確立した浸潤能評価系を利用したがん細胞の運動能、浸潤能の評価に際し、抗  $\alpha 3$  インテグリン抗体などの各種抗接着分子抗体を共存させ、その阻害効果を比較検討した。同時に、 $\alpha 3$  インテグリンを発現していない肝がん細胞株 HepG2 に対し cDNA トランスフェクションにより  $\alpha 3$  インテグリンを強制的に発現させた細胞を樹立し、その浸潤能についても検討を

加えた。

(3) インテグリンとリガンドの相互作用によるマトリックス分解酵素産生の誘導

3 1 インテグリンとラミニンとの相互作用によりマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) の一つである MMP-9 の産生および放出が影響されるかザイモグラフィおよび ELISA 法により解析した。

(4) がん細胞におけるインテグリン  $\alpha 3$  サブユニットの発現制御

3 1 インテグリンの発現の律速である  $\alpha 3$  サブユニットの発現に関わる転写開始点上流約 140 bp の Ets 転写因子結合配列に結合する因子をアフィニティークロマトグラフィにより精製した。このタンパク質の同定をウエスタンブロット法により試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 肝細胞がんが高発現する  $\alpha 3$  インテグリンと細胞の運動性・浸潤性との関連

$\alpha 3$  インテグリン陰性の肝がん HepG2 細胞に cDNA 導入法により  $\alpha 3$  インテグリンを強制発現させ、細胞外マトリックスへの接着性、運動性、浸潤性などの変化を解析し下記の結果を得た。

$\alpha 3$  インテグリン強制発現株の作成： $\alpha 3A$  鎖および  $\alpha 3B$  鎖の cDNA をリポフェクション法により HepG2 細胞に導入し、安定発現株 (HepG2-3A および HepG2-3B) を樹立した。フローサイトメトリー法および免疫沈降法により、両細胞で同程度の  $\alpha 3$  鎖の発現が認められ、いずれも  $\alpha 1$  鎖と会合していることが確認された。

マトリックスに対する接着：ラミニン 5，フィブロネクチン (FN)，あるいはマトリゲル (MG) をコートしたプレートに対する接着実験を行ったところ、HepG2-3A および HepG2-3B は親株に比べ、ラミニン 5 への接着率が高く、抗  $\alpha 3$  抗体の添加により抑制された。MG および FN に対する接着は 3 者間で有意差が認められなかった。

ラミニン 5 をコートしたプレートでの細胞運動性：単層培養した細胞に対し scratch wound 法により運動性を評価した。その結果、ラミニン 5 をコートしたプレートでは HepG2-3A および HepG2-3B がコントロール細胞 (HepG2-M) に比べ運動性が高いことが示された。

ボイデンチャンバー法による細胞浸潤実

験：チャンバーの上室と下室を仕切る膜をラミニン 5 を含むマトリゲルでコートした場合に、HepG2-3A および HepG2-3B はコントロール細胞に比べ、下室への移動細胞数が多く、これは抗  $\alpha 3$  抗体により抑制された (図 2)。

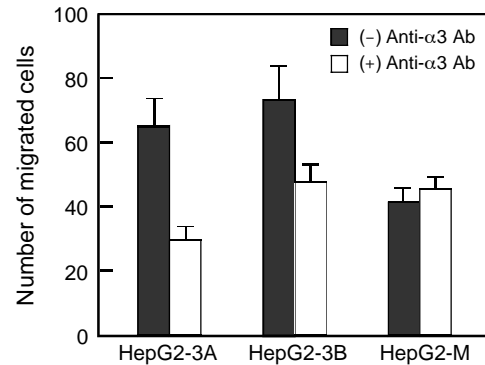


図 2 ボイデンチャンバーによる細胞浸潤能の評価

以上の結果より、肝細胞がんでの  $\alpha 3$  インテグリンの発現の上昇が、浸潤・転移能を高める一因となることが推測された。

(2) 胃がんの腹膜播種性転移における  $\alpha 3$  インテグリンと細胞の運動性・浸潤性およびマトリックス分解酵素産生との関連

$\alpha 3$  インテグリンを介した胃がん細胞の腹膜中皮マトリックスあるいはその主要成分であるラミニン 5 との相互作用により細胞の挙動がどのように変化するか解析し下記の結果を得た。

腹膜中皮細胞の産生するマトリックスの調製：マウス腹膜および横隔膜に緩和なトリプシン処理することにより腹膜中皮細胞を単離し、単層になるまで培養した。次いで界面活性剤 / 尿素処理により中皮細胞産生マトリックスを調製した。

マトリックスに対する細胞接着： $\alpha 3$  種類の胃がん細胞株 (MKN1, GT3TKB, NUGC-4) を用い、中皮細胞産生マトリックスに対する接着を評価したところ、いずれの細胞においても  $\alpha 3$  インテグリン依存的な強い接着が認められた。

ボイデンチャンバー法による細胞浸潤実験：チャンバーの上室と下室を仕切る膜を中皮細胞産生マトリックスまたはラミニン

5を含むマトリゲルでコートしたところ、マトリゲル単独の場合に比べ、MKN1細胞の浸潤能が亢進し、これは抗 $\alpha 3$ インテグリン抗体により抑制された。

マトリックス分解酵素の産生誘導：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の産生が増強されることがゼラチンゼイモグラフィーによって示された。この増強効果は、加えたラミニン5の濃度依存的であった(図3)。

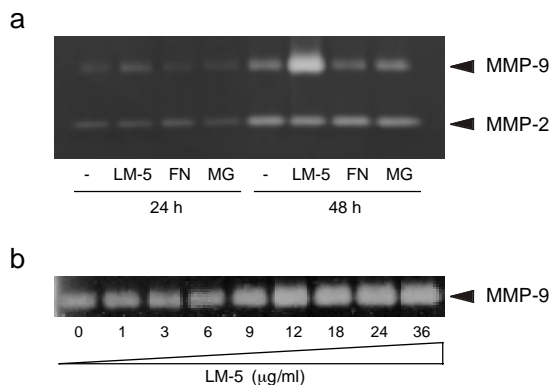


図3 ゼラチンゼイモグラフィーによるMMPの検出

以上の結果より、胃がん細胞に高発現する $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンと腹膜中皮マトリックス構成成分であるラミニン5の相互作用が胃がんの腹膜転移に対し促進的に働くことが推測された(図4)。

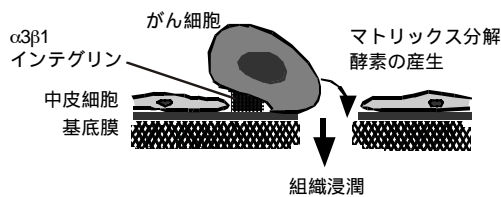


図4  $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンを介した細胞接着と浸潤

(3) インテグリン $\alpha 3$ サブユニット発現に関わる転写因子

がん細胞におけるインテグリン $\alpha 3$ サブユニットの発現には転写開始点上流約140bpのEts転写因子結合配列が重要であることがわかっていたので、この配列を複数連結

させたDNA断片をセファロースに結合させた不溶性担体を調製し、MKN1細胞由来の核抽出液よりアフィニティークロマトグラフィーにより結合タンパク質を単離した。野生型と変異型のDNA担体に対する結合性の差より分子量約50kDaのEtsファミリータンパク質が $\alpha 3$ サブユニットの発現に関する転写因子である可能性が考えられた。

#### 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3件)

- 1) Saito N, Hamada JI, Furukawa H, Tsutsumida A, Oyama A, Funayama E, Saito A, Tsuji T, Tada M, Moriuchi T, Yamamoto Y. Laminin-421 produced by lymphatic endothelial cells induces chemotaxis for human melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 22 in press (2009) 査読有
- 2) Oku T, Kaneko Y, Murofushi K, Seyama Y, Toyoshima S, Tsuji T. Phorbol ester-dependent phosphorylation regulates the association of p57/coronin-1 with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 283: 28918-28925 (2008) 査読有
- 3) Mizuno H, Ogura M, Saito Y, Sekine W, Sano R, Gotou T, Oku T, Itoh S, Katabami K, Tsuji T. Changes in adhesive and migratory characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) cells induced by expression of  $\alpha 3 \beta 1$  integrin. *Biochim Biophys Acta* 1780: 564-570 (2008) 査読有

[学会発表](計5件)

- 1) 島田賢太郎, 奥輝明, 辻勉. 腹膜への $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン依存的胃がん細胞の接着に対するTNF- $\alpha$ の効果. 日本薬学会第129年会 2009年3月27日 京都
- 2) 後藤敏江, 水野博己, 奥輝明, 伊藤佐生, 辻勉. 肝がん細胞株HepG2のインテグリン発現とTNF- $\alpha$ による細胞死. 日本薬学会第129年会 2009年3月27日 京都
- 3) 辻勉. がんの浸潤・転移と $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン-マトリックス相互作用. 第52回日本薬学会関東支部大会シンポジウム「分子標的創薬研究の最前線-細胞接着システムを標的として-」2008年10月4日, 東京理科大学薬学部

- 4) 関根わか菜, 齋藤雄太, 伊藤佐生智, 奥 輝明, 辻 勉. 胃がん細胞の細胞浸潤とラミニン5との相互作用によるMMPとTIMPの発現変化. 日本薬学会第128年会 2008年3月27日 横浜
- 5) 関根わか菜, 奥 輝明, 伊藤佐生智, 辻 勉. 胃がん細胞の  $\alpha 3 \beta 1$  インテグリンとラミニンの相互作用によるマトリックスメタロプロテナーゼの産生誘導と細胞浸潤. 第51回日本薬学会関東支部大会 2007年10月6日 東京

[その他]

<http://polaris.hoshi.ac.jp/openresearch/index.html>

## 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

伊藤 佐生智 (ITO SAOTOMO)  
星薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 70308013  
奥 輝明 (OKU TERUAKI)  
星薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 20409361

### (3) 研究協力者

齋藤 雄太 (SAITO YUTA)  
星薬科大学・大学院生  
水野 博己 (MIZUNO HIROMI)  
星薬科大学・大学院生  
関根 わか菜 (SEKINE WAKANA)  
星薬科大学・大学院生  
後藤 敏江 (GOTOU TOSHIE)  
星薬科大学・大学院生  
島田 賢太郎 (SHIMADA KENTARO)  
星薬科大学・大学院生  
鴨志田 剛 (KAMOSHIDA GO)  
星薬科大学・大学院生