

機関番号：37111

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590415

研究課題名 (和文) 癌浸潤促進因子 EMMPRIN の多機能性メカニズムの解析

研究課題名 (英文) Analysis of mechanisms involved in multifunction of tumor invasion factor emmprin

研究代表者 鍋島 一樹 (NABESHIMA KAZUKI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40189189

研究成果の概要 (和文)：癌浸潤促進因子 emmprin の多機能性メカニズムの解析を目的として、BS3 crosslinker によって細胞膜上の分子間に複合体を形成させ、emmprin と複合体を形成する分子を質量分析器にて解析した。BS3 処理群の複合体にのみ認められた 130 分子から、分子量や局在、機能を参考に約 10 程度の分子に絞り込み、現在これらの分子の emmprin との複合体形成能と MMP 誘導活性について確認作業中である。

研究成果の概要 (英文)：To analyze the mechanisms that are responsible for multifunction of emmprin, a tumor invasion-promoting factor, we induced crosslink among cell surface molecules by using a crosslinker BS3. The molecules, which had been crosslinked to emmprin, were analyzed by means of mass spectrometer. Up to now, the analysis has narrowed down to about 10 candidate molecules. Their abilities to complex with emmprin and stimulate fibroblasts to produce MMPs are now under investigation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、マトリックス・メタロプロテアーゼ、浸潤、転移

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに「がん細胞」の浸潤機構、とくに細胞接着調節を解した運動能の制御と、MMPを介した細胞外基質の改変による細胞移動の制御について研究し、病理組織標本上で観察している癌細胞の小集団としての移動・浸潤様式 (cohort migration) においても、細胞表面での matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 活性化を阻害することにより細胞浸潤を抑制できること

を報告した (Cancer Res, 60: 3364, 2000)。このMMP-2 (gelatinase A)は多くの癌で悪性度と相関し、予後不良因子となることが報告されている。しかし、合成インヒビターによるMMP活性の抑制を介した腫瘍浸潤・転移抑制の試み (臨床治験) は、生理的役割を担った正常組織でのMMP活性も抑制するために、関節痛などの副作用が強く、有効な臨床的効果をあげることなくそのほとんどが中止となった。そこで癌組織における過剰なMMP産

生を抑制するというオプションを考えて取り組んできた。これまでに、癌組織におけるMMPの主たる産生細胞は、癌細胞ではなく、間質の線維芽細胞であることが *in situ* hybridizationを用いた研究で明らかにされてきた。つまり、癌細胞が周囲の線維芽細胞を刺激してMMPの産生を促進する機構の存在を示唆している。その癌細胞に発現するMMP産生因子の代表がemmprinであり、周囲の間質線維芽細胞に作用して、線維芽細胞からのMMP-1, 2, 3等の産生を誘導する。これまでにその発現が悪性腫瘍で亢進し、腫瘍の悪性化の程度と相関するという研究結果が、我々のもの (Int J Cancer 55:19, 1993; Int J Cancer, 88:21, 2000; J Pathol 202: 341-351, 2004) を含めて多く報告されている。Emmprinは免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに属する糖タンパクで、2つのIgドメインを有する。その第一Igドメインが活性部位であることを、emmprinの発見者であるタフツ大学の故Biswas教授との共同研究で既に明らかにしている (Cancer Res, 55: 434, 1995)。このemmprinを介したMMP産生亢進は癌のみならず肉腫系でも存在することも明らかにした (Anticancer Res 26: 1359, 2006; Int J Cancer 120: 761, 2007)。近年、emmprinはMMPの産生促進のみならず、VEGFの発現増強を介して腫瘍の血管新生を促進し (Tang et al., Cancer Res 65: 3193, 2005)、ヒアルロン酸産生促進を介して細胞増殖を刺激すること (Marieb et al., Cancer Res 64: 1229, 2004)、がん細胞の薬剤耐性にも関与すること (Misra et al., J Biol Chem 278: 25285, 2003) が報告され、抗腫瘍療法のターゲットとしてさらに注目されている。我々は既にemmprinの活性ドメインの部分ペプチドによって、emmprinによるMMP-2産生亢進を抑制できることを報告した (J Pathol 202: 341, 2004; Int J Cancer 120: 761, 2007)。しかし近年さらにemmprinは腫瘍浸潤のみならず、免疫系 (T細胞の抗原による活性化)、生殖能、網膜神経細胞などの神経系の発達などにも重要な役割を果たしていることがわかった。従って、その多機能性のメカニズムの解析と、それを通して「がん細胞」の浸潤に関与した分子機構の選択的阻害による、浸潤・転移の抑制が求められている。Emmprinの多機能性に関与する機構はこれまでの研究結果より、細胞膜上で形成される複合体の種類 (どの分子との複合体が形成されるか) と考えている。

2. 研究の目的

Emmprinは癌細胞に発現し、周囲の間質線維芽細胞に作用してMMP-1, 2, 3等のmatrix metalloproteinases (MMP)の産生を誘導する。これまでにその発現は悪性腫瘍で亢進し、腫瘍の悪性化の程度と相関することが明らかになっている。さらに近年、emmprinはMMPの産生促進のみならず、VEGFの発現増強を介して腫瘍の血管新生を促進し、ヒアルロン酸産生促進を介して細胞増殖を刺激すること、がん細胞の薬剤耐性にも関与することが報告され、抗腫瘍療法のターゲットとしてさらに注目されている。しかし同時に免疫系 (T細胞の抗原による活性化)、生殖能、網膜神経細胞などの神経系の発達などにも重要な役割を果たしていることがわかった。従って、その多機能性のメカニズムの解析と、それを通して「がん細胞」の浸潤に関与した分子機構の選択的阻害による、浸潤・転移の抑制が求められている。本研究では、特にemmprinと複合体を形成する蛋白の解析を通してこの多機能性メカニズムの解析を目的としている。

3. 研究の方法

FLAG-tagged full sized emmprin 発現細胞 (胃癌細胞株 TMK-1 および類上皮肉腫細胞株 FU-EPS-1 細胞を用いてすでに作成済み) に cross-linker (BS3) を作用させて emmprin 膜蛋白複合体を形成させ、lysis buffer にて可溶化後に、FLAG affinity chromatography を用いて複合体を精製する。SDS-PAGE にて得られた各複合体バンドを質量分析器にて解析して (東大医科学研究所越川直彦博士に依頼)、emmprin と複合体を形成する候補蛋白を得る。複合体の可溶化条件の設定が key point となるが、lysis buffer は RIPA (1% tritonX-100, 1% デオキシコール酸, 0.1% SDS), 1% triton X-100, 1%CHAPS, 1% Brij 98, in 25mM Tris-HCl pH 7.4+150 mM NaCl+1 mM CaCl₂ にて検討する。

4. 研究成果

(1) FLAG-tagged full sized emmprin 発現細胞 (胃癌細胞株 TMK-1 および類上皮肉腫細胞株 FU-EPS-1 細胞) に cross-linker (BS3) を作用させて emmprin 膜蛋白複合体を形成させ、lysis buffer にて可溶化実験を行い、複合体の可溶化条件の設定を行った。以下の lysis buffer [RIPA (1% tritonX-100, 1% デオキシコール酸, 0.1% SDS), 1% triton X-100, 1%CHAPS, 1% Brij 98, in 25mM Tris-HCl pH 7.4+150 mM NaCl+1 mM CaCl₂] を用いて検討し、1%CHAPS を含む lysis buffer (1%CHAPS in 25mM Tris-HCl pH 7.4+150 mM NaCl+1 mM CaCl₂) にて良好な複合体を得た。

(2) emp#2ペプチド (emmprinの細胞外第1ドメイン由来の部分ペプチド) はcoculture実験において、emmprinによる線維芽細胞からのMMP-2合成、分泌促進作用を阻害し、予備実験の結果より、この阻害作用は腫瘍細胞膜上でのemmprinとemmprin結合分子による複合体形成を阻害するためと考えられた。そこで、emp#2ペプチドが結合することによって、emmprinとの複合体形成を抑制されたemmprin結合分子を同定するために、emp#2ペプチドに光架橋ペプチドを導入し、さらにbiotin標識化した。このペプチド複合体の可溶性も1%CHAPSを含むlysis bufferにて良好であった。この実験では紫外線の波長が重要で、365nmの紫外線が最適ということがわかったので、その波長の紫外線照射器にて4℃、1時間の照射にて光架橋を誘導し、複合体をimmunoblottingにて検出した (peptide内のbiotinをstreptoavidinと反応させて検出)。しかし、内在性のbiotin結合分子が存在し、それをdetectすることはできたが、光架橋を介してemmprinとcross linkされた新たな分子をdetectすることはできなかった。

(3) FLAG-tagged full sized emmprin発現細胞 (胃癌細胞株TMK-1および類上皮肉腫細胞株FU-EPS-1細胞) と線維芽細胞をcocultureし (腫瘍細胞のemmprinにて線維芽細胞を刺激する条件下)、cross-linker (BS3)を作用させてemmprin膜蛋白複合体を形成させ、1%CHAPSを含むlysis buffer (1%CHAPS in 25mM Tris-HCl pH 7.4+150 mM NaCl+1 mM CaCl₂)にて抽出した。この抽出複合体をWestern blottingにて確認すると、BS3処理群でのみ元来ある30-54kのbroadなemmprinバンドは減少し、76k付近のバンドが得られた。抗FLAG抗体では (モノクローナルもポリクローナルも) 認識されなかったが、このバンドは3種類のemmprin抗体で認識できるので、FLAG認識部位が複合体内部に向いて、抗体との反応性を欠いたものと判断し、このバンドとBS3非処理サンプルの同部位を切り出し、質量分析器にて解析した (東大医科学研究所 越川直彦博士、尾山大明博士に依頼)。

(4) 質量分析の結果、BS3処理後の複合体 (+) サンプルからは431分子断片が、BS3無処理サンプルからは787分子断片が得られ、emmprin (basigin/CD147) は前者のみに含まれていた。両サンプル間で278分子が共通に認められ、130分子が複合体 (+) サンプルのみに認められた。コンタミの可能性も考えられる表皮関連分子、分析上確からしさの低い分子、核内分子 (transcription factors など) を除外し、さらに分子量にてスクリーニングを行い、約10程度の分子に絞り込まれた。現在これらの分子のemmprinとの複合

体形成について確認作業中である。

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2件)

① Koga K, Aoki M, Sameshima T, Hamasaki M, Egawa N, Seiki M, Toole BP, Suzumiya J, Nabeshima K. Synthetic emmprin peptides inhibit tumor cell-fibroblast interaction-stimulated upregulation of MMP-2 and tumor cell invasion. Int J Oncol, accepted. (査読有り)

② Kawakami T, Sameshima T, Hojo H, Koga K, Nakahara Y, Toole BP, Suzumiya J, Okada Y, Iwasaki A, Nabeshima K. Synthetic emmprin peptides with chitobiose substitution stimulate MMP-2 production by fibroblasts. BMC Cancer, under revision. (査読有り)

[学会発表] (計1件)

① Aoki M, Nabeshima K et al. Emmprin is released as glycolalyceal bodies. 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium. June 4-7, 2009 (Shonan Village Center)

[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

鍋島 一樹 (NABESHIMA KAZUKI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：40189189

(2) 研究分担者

濱崎 慎 (HAMASAKI MAKOTO)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：90412600

青木 光希子 (AOKI MIKIKO)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：80469379

(3) 連携研究者

越川 直彦 (KOSHIKAWA NAOHIKO)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：70334282