

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300351

研究課題名(和文) がんの悪性進展に伴う細胞接着システムの破たんの分子機構

研究課題名(英文) Disorder of cell adhesion system in tumor progression

研究代表者

宮崎 香 (MIYAZAKI, KAORU)

横浜市立大学・付置研究所・その他

研究者番号：70112068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,000,000円、(間接経費) 5,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞はその悪性進展に伴い、接着性を低下させる一方で、浸潤能を獲得する。本研究では、このような過程におけるがん細胞と細胞接着分子の相互作用を調べた。主要な成果として、以下の結果を得た。良性腫瘍ではがん細胞はラミニン332などの基底膜分子に接着し、限局する。しかし、浸潤部位ではこのラミニンのサブユニットの一つであるラミニン 2(Lm 2)を過剰に発現する。本研究ではLm 2が上皮間葉変換(EMT)に伴って発現すること、Lm 2は血管内皮細胞に作用して血管透過性を亢進させる一方で、がん細胞に対してはがん幹細胞マーカー分子であるCD44に直接結合し、がん細胞の移動を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Non-invasive tumor cells are fixed on basement membranes (BMs) by stably binding to cell adhesion proteins such as laminin-332 (Lm332). However, they start to invade the BMs and then stroma during tumor progression. In this study, we investigated the mechanism of tumor invasion, mainly focusing on the interaction of tumor cells with cell adhesion proteins. Major results are as follows. Laminin gamma2 (Lm-g2), a subunit of Lm332, is often overexpressed in invasive human cancers and hence regarded as a tumor invasion marker. We found that (1) Lm-g2 is induced in association with epithelial-mesenchymal transition of tumor cells, and (2) amino-terminal fragments of Lm-g2 directly interacts with the cancer stem cell marker CD44 in metastatic cancer cells, leading to the stimulation of their migration. These results suggest the cooperation of the two important tumor markers for cancer progression. We also found that Lm-g2 acts on vascular endothelial cells, increasing vascular permeability.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん浸潤 細胞接着分子 ラミニン332 ラミニン 2 上皮間葉変換(EMT) CD44 がん幹細胞 腫瘍血管

1. 研究開始当初の背景

初期上皮がんは腫瘍基底膜のラミニンに接着し、一定の細胞極性を保ちながら限局して増殖する。がんの悪性進展が進行すると、基底膜は消失し、がん細胞は間質へ浸潤する。間質浸潤に伴ってがん細胞は細胞極性を失い、線維芽細胞様形態をとる現象、すなわち上皮-間葉移行 (EMT) を呈する。EMT 細胞は細胞接着性が低下し、運動性を獲得すると考えられている。さらに悪性進展が進行した末期がん患者ではしばしば腹水がんになり、がん細胞は腹水に分散して浮遊した状態で増殖し、広範な播種を引き起こす。しかし、このようながんの悪性進展に伴う細胞接着性の異常化のメカニズムや、それとがん浸潤との関係については明確でない。

私たちはこれまで、がんの浸潤・転移に関与する細胞外分子、特にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、基底膜型細胞接着分子ラミニン 332 (Lm332)、および腫瘍血管に高発現する低分子量細胞接着分子 angiomodulin (AGM)/IGFBP7 などの機能解析を進めてきた。Lm332 は良性腫瘍においては腫瘍基底膜に存在するが、浸潤先進部位では Lm332 が消失し、そのサブユニットの一つであるラミニン γ 2 (Lm γ 2) 鎖が過剰に発現することが分かっている。本研究では、特にがん細胞とこのような細胞接着分子との相互作用に注目しながら、がんの浸潤機構の解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞が悪性化に伴って細胞接着性を失う機構を、細胞接着分子、細胞表面受容体、細胞内シグナル伝達分子、細胞骨格分子等の異常の観点から解明するとともに、それとがんの悪性増殖との関係、さらにはそれを抑制することによるがんの増殖制御の可能性を明らかにすることを目標とした。細胞接着分子としては多くのがん組織で発現する Lm332 および Lm γ 2、また腫瘍血管で特異的に発現する angiomodulin (AGM) の作用に注目した。

3. 研究の方法

浸潤性がん細胞の特徴である上皮-間葉移行 (EMT) を実験的に誘導したがん細胞を用いて、接着性、運動性、浮遊増殖性、in vitro および in vivo の浸潤能などの変化とそのメカニズムを、主として培養ヒトがん細胞を用いて行った。細胞接着分子の機能解析は既に樹立している種々の強制発現細胞、およびそこから精製した組換えタンパク質を用いた。これらの分子の発現解析は、学内倫理委員会の承認を得て神奈川県立がんセンターから提供された多様なヒトがん組織検体と自作のモノクローナル抗体を用いて行った。がんの浸潤機能の解析において一般に使用される培養細胞モデルは生体内でのそれとは大きく異なることから、コラーゲンゲルを用い

る新たな 3 次元浸潤モデルを構築した。

4. 研究成果

(1) ラミニン 332 (Lm332) の作用
がんの基底膜浸潤において、Lm332 の γ 2 鎖の限定分解により Lm332 のマトリックス (ECM) 形成能が消失し、その結果がん細胞の Lm332 への接着能の低下と、運動能の亢進が起こることが明らかになった。すなわち、Lm332 のプロテアーゼによる限定切断が、がん細胞の腫瘍基底膜への浸潤を可能にすると考えられる。一方、基底膜を通過し、間質内に浸潤したがん細胞は上皮-間葉移行 (EMT) を起こすことが知られている。本研究では 3 種の上皮性がん細胞に TGF- β で EMT を誘導し、ECM 分子の変化や細胞形質の変化を調べた。EMT を誘導したがん細胞は、接着分子 Lm511 の構成鎖である Lm α 5 鎖が減少する半面、Lm γ 2 鎖、Lm α 4 鎖、フィブロネクチンの産生が大きく促進された。また、EMT 誘導がん細胞は間質型接着分子であるフィブロネクチンや I 型コラーゲンに対する接着性が大きく上昇した。これらの結果から、EMT の誘導によって上皮性 Lm の発現が減少する半面、間質型接着分子の産生やそれに対する接着能が上昇し、間質内浸潤を可能にすることが分かった。

(2) ラミニン γ 2 (Lm γ 2) の作用

上記のように、Lm γ 2 はがんの浸潤先進部位で高発現すること、また Lm γ 2 の強制発現によって膀胱がん細胞の in vivo での浸潤性増殖が亢進することなどを既に報告した。本研究では、Lm γ 2 が血管内皮細胞の収縮を促進し、血管内皮下へのがん細胞の浸潤と in vitro および in vivo での血管透過性を上昇させることを明らかにした。これらの結果は、Lm γ 2 が paracrine 的に血管内皮細胞に作用し、がん細胞の転移や血管新生に関与する可能性を示唆する。一方 autocrine 的作用としては、Lm γ 2 が悪性がん細胞で発現する CD44 に直接結合し、がん細胞の移動を促進することを初めて明らかにした。この結果から、Lm γ 2 ががん幹細胞の重要なマーカー分子である CD44 と協調的にがんの浸潤性増殖やがん幹細胞の機能維持に関与することが考えられる。

(3) Angiomodulin (AGM) の作用

私たちは以前膀胱がん細胞が分泌する細胞接着分子として angiomodulin (AGM)/IGFBP-rP1/IGFBP7 を見だし、AGM が各種ヒトがん組織の血管で高発現することを報告している。今回新たに、AGM はがん細胞周囲の線維芽細胞、特に筋線維芽細胞でも発現することが明らかになった。乳がん組織では、AGM の線維芽細胞での発現ががんの悪性度と相関することを明らかにした。さらに、AGM の誘導因子として線維芽細胞では TGF- β 、血管内皮では VEGF が同定された。AGM は線維芽細胞

の増殖やフィブロネクチンの産生を促進することによって、腫瘍間質の形成に役立つと考えられた。一方、AGMは血管内皮細胞のインテグリン $\alpha v \beta 3$ に結合し、その細胞接着を促進することが初めて明らかになった。精製AGMタンパク質はin vivoで血管の透過性を促進した。以上の結果から、AGMはがん細胞周囲の血管や線維芽細胞で発現し、それらの構造や機能を変えることによってがんの悪性進展に寄与すると推測される。

(4) がん細胞の接着性消失機構

浮遊性ヒト大腸がん細胞 Colo201 を特定のチロシンキナーゼ阻害剤で処理すると短時間で細胞は上皮様の接着形態を回復することが明らかになった。そこでこの阻害剤を用いて Colo201 細胞の浮遊化の機構を調べた。Colo201 細胞の再接着誘導にはタンパク質合成は必要なく、またインテグリンなどの細胞接着装置も保持していることが判明した。接着関連細胞内シグナルの変化を調べた結果、阻害剤処理によってパキシリンのチロシンリン酸化が大きく亢進することから、この分子のリン酸化レベルが細胞接着を決定していると考えられた。すなわち、未確認のチロシンキナーゼの異常な活性化によってパキシリンのチロシンリン酸化が抑制された結果、Colo201 細胞は浮遊性を獲得したものと考えられる。

(5) 三次元がん浸潤モデル

生体により近いがん浸潤モデルとして、膵がん細胞 Panc-1 あるいは肺がん細胞 A549 と正常線維芽細胞の三次元コラーゲンゲル共培養系を構築し、がん浸潤を調節する因子を調べた。これらのがん細胞は単独では殆どゲル内に浸潤しないが、線維芽細胞との共培養では著しく浸潤した。線維芽細胞が産生する浸潤促進因子として肝細胞増殖因子 (HGF) を同定した。TGF- β は単独培養ではがん細胞の浸潤を促進したが、意外なことに共培養下では、TGF- β 阻害剤が、がん細胞が産生する TGF- β の HGF 産生抑制作用を阻止することによって、がん浸潤を強く促進した。この結果は、がん細胞の間質内への浸潤に HGF や TGF- β の作用が重要であること、また TGF- β 阻害剤の抗がん剤としての臨床応用において、逆にがんの悪性化が生じる可能性を示唆する。本研究で構築したがん浸潤モデルは、がんの浸潤機構の解析や阻害剤の探索に極めて有効と考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

① Mori, T., Kariya, Y., Komiya, T., Higashi, S., Miyagi, Y., Sekiguchi, K., Miyazaki, K. Downregulation of a newly identified laminin, laminin-3B11, in vascular basement membranes of invasive human breast cancers. *Cancer Sci.*, 査読有 102: 1095-1100, 2011, doi 10.1111/

j.1349-7006. 2011.01892.x.

② Hashimoto, H., Takeuchi, T., Komatsu, K., Miyazaki, K., Sato, M., Higashi, S. Structural basis for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)-selective inhibitory action of beta-amyloid precursor protein-derived inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 査読有 286: 33236-33243, 2011. doi 10.1074/jbc.M111-264176.

③ Komiya, E., Furuya, M., Watanabe, N., Miyagi, Y., Higashi, S., Miyazaki, K. Elevated expression of angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) in tumor stroma and its roles in fibroblast activation. *Cancer Sci.*, 査読有 103: 691-699, 2012. doi 10.1111/j.1349-7006. 2012. 02203.x.

④ Kariya Y, Sato H, Katou N, Kariya Y, Miyazaki K. Polymerized laminin-332 matrix supports rapid and tight adhesion of keratinocytes, suppressing cell migration PLoS ONE, 査読有 7, e35546, 2012. doi 10.1371/journal.pone. 0035546.

⑤ Ngora N, Galli UM, Miyazaki, K., Zöller M. Membrane-bound and exosomal metastasis-associated C4.4A promotes migration by associating with the $\alpha_6\beta_4$ integrin and MT1-MMP. *Neoplasia*. 査読有 14: 95-107, 2012. doi 10.1593/neo.111450

⑥ Oyanagi, J., Ogawa, T., Sato, H., Higashi, S., Miyazaki, K. Epithelial-mesenchymal transition stimulates human cancer cells to extend microtubule-based invasive protrusions and suppresses cell growth in collagen gel. *PLoS ONE*, 査読有 7 (12), e53209, 2012. doi: 10.1371

⑦ Higashi, S., Hirose, T., Takeuchi, T., Miyazaki, K. Molecular design of a highly selective and strong protein inhibitor against matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). *J. Biol. Chem.*, 査読有 288: 9066-9076, 2013, doi: 10.1074 /jbc.M112.441758..

⑧ 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.* 査読有 105: 168-175, 2014, DOI: 10.1111/cas.12323.

⑨ 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* 査読有 31: 285-291, 2014. doi: 10.1007/s10585-013-9627-0..

⑩ Komiya, E, Sato, H., Ise, I., Watanabe, N., Higashi, S., Miyagi, Y., Miyazaki, K. Angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1), a marker of cancer vasculature, is upregulated by vascular endothelial cell growth factor and increases vascular permeability as a ligand of integrin

$\alpha\beta3$. Cancer Med. 査読有 2014, doi: 10.1002/cam4.216

⑪ Oyanagi, J., Kojima, N., Sato, H., Higashi, S., Kikuchi, K., Sakai, K., Matsumoto, K., Miyazaki, K. Inhibition of transforming growth factor- β signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. Exp Cell Res. 査読有 2014, in press. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.009.

⑫ Yamamoto, K., Miyazaki, K., Higashi, S. Pericellular proteolysis by matrix metalloproteinase-7 is differentially modulated by cholesterol sulfate, sulfatide and cardiolipin. FEBS J. 査読有 in press.

[学会発表] (計 23 件)

① Jun Oyanagi, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) stimulates tumor cells to produce invadopodia-like protrusions in collagen matrix, suppressing cell growth. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting Innovation and Collaboration to Progress (Florida in U.S.A.) April 2-6, 2011

② 関根玲子、佐藤拓輝、宮崎香：ヒトがん細胞における細胞接着能消失メカニズムの解析。第 84 回生化学会大会 (京都)。2T10P-15 & 3P-0256、2011 年 9 月 21-24 日。

③ 藤田幸、柳川聡秀、今林司、高橋瑛美、小柳潤、宮崎香：ヒト間葉系幹細胞の増殖と分化に及ぼす各種ラミニン分子の作用。第 84 回生化学会大会 (京都)。2T10P-18 & 3P-0259、2011 年 9 月 21-24 日。

④ 竹内友香、橋本博、宮崎香、佐藤衛、東昌市：APP 由来インヒビターペプチドによる MMP-2 選択的阻害機構の解明。第 84 回生化学会大会 (京都)。4T9P-14 & 4P-0158、2011 年 9 月 21-24 日。

⑤ Jun oyanagi, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki. Epithelial-mesenchymal transition promotes invadopodia-like protrusions in collagen gel., suppressing cell growth. 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋)。Oct. 3-5, 2011.

⑥ Yasumasa Kato, Ryuichiro Hata, Mamoru Tsukuda, Kaoru Miyazaki, Yoji Nagashima. TRPM5 is a transducer of extracellular acidic pH in melanoma cells and contributes lung metastasis. 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋)。Oct. 3-5, 2011.

⑦ Eriko Komiya, Kaoru Miyazaki, Shouichi Higashi. Tumor-derived adhesion factor IGFBP-rP1/TAF promotes growth of human fibroblasts and their fibronectin expression. 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋)。Oct. 3-5, 2011

⑧ Hiroki Sato, Jun Oyanagi, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki. Laminin $\gamma 2$ chain Promotes Invasion of Tumor Cells into Vascular Endothelial Cell Layer In Vitro. 第 70 回日本癌

学会学術総会 (名古屋)。Oct. 3-5, 2011. Oct. 3-5, 2011.

⑨ 宮崎香：血管基底膜に存在する新規ラミニン分子ラミニン 3B11 の発現と性質。第 43 回日本結合組織学会 (別府)。一般口演「ラミニン・基底膜」2011 年 6 月 10-11 日。

⑩ 佐藤拓輝、宮崎香：がん浸潤マーカー・ラミニン $\gamma 2$ 鎖の血管内皮浸潤促進活性とその機構。WS4-1. 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会 (浜松)。2011 年 6 月 30 日-7 月 1 日。

⑪ Chie Yasuda, Nakaba Kayanuma, Minako Takahashi, Shioji Ishiwatari, Kaoru Miyazaki, Shoko Matsukuma. Biomarkers in keratinocyte senescence and skin elasticity. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, May 24-29, 2011.

⑫ Eriko komiya, Hiroki Sato, Yohei Miyagi, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki. Overexpression of Angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) in Tumor Stroma and Vasculature: Differential Regulation and Functions. The 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Association. Brisbane, Australia. Sep 2-5, 2012.

⑬ Hiroki Sato, Takashi Ogawa, Eriko Komiya, Jun Oyanagi, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki. Laminin $\gamma 2$ chain Promotes Invasion of Tumor Cells into Vascular Endothelial Cell Layer In Vitro. The 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Association. Brisbane, Australia. Sep 2-5, 2012.

⑭ Eriko Komiya, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Yohei Miyagi, Kaoru Miyazaki. Overexpression of Angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) in Tumor Stroma and Vasculature: Differential Regulation and Functions. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)。J-3039. Sep. 19-21, 2012.

⑮ Jun Oyanagi, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki. EMT of tumor cells promotes microtubule-based protrusions in 3D collagen matrix, suppressing cell growth. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)。J-1055. Sep. 19-21, 2012.

⑯ Hiroki Sato, Jun Oyanagi, Eriko Komiya, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki. Laminin $\gamma 2$ Chain Induces Transendothelial Migration of Cancer Cells by Modulating Cytoskeleton of Endothelial Cells. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)。J-3073. Sep. 19-21, 2012.

⑰ Kaoru Miyazaki, Eriko Komiya, Hiroki Sato, Yohei Miyagi, Shouichi Higashi. Angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) is overexpressed in tumor vasculature and regulates adhesion of vascular endothelial cells via integrin $\alpha\beta 3$: Possible roles in tumor angiogenesis. AACR Conference at San Diego, USA. "Tumor Invasion and Metastasis" Jan 20-23, 2013

⑱ 宮崎香：基底膜分子ラドシン/ラミニン5/ラミニン332の構造と機能。水疱症研究会特別講演(大分、藤原作平会頭)、2013. 10. 20.

⑲ Hiroki Sato, Shouichi Higashi and Kaoru Miyazaki: Laminin ganma2 Chain Induces Vascular Hyperpermeability through Its Heparin-Binding Site of N-terminal EGF-like Repeat. P-1184. 第72回日本癌学会学術総会(横浜)。Oct. 3-5, 2013.

⑳ Jun Oyanagi, Shouichi Higashi, Keiji Kikuchi, Katsuya Sakai, Kunio Matusmoto, Kaoru Miyazaki: A synthetic inhibitor of TGF- β stimulates tumor cell invasion by enhancing secretion of HGF from fibroblasts *in vitro*. J-3024. 第72回日本癌学会学術総会(横浜)。Oct. 3-5, 2013.

㉑ Eriko Komiya, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Yohei Miyagi, Kaoru Miyazaki: Angiomodulin, a cancer blood vessel marker induced by VEGF, enhances vascular permeability through integrin α -v/ β -3. J-1072. 第72回日本癌学会学術総会(横浜)。Oct. 3-5, 2013.

㉒ 佐藤拓輝、宮崎香：ラミニン γ 2鎖N末端領域に存在するヘパリン結合部位の血管透過性亢進活性。第22回日本がん転移学会学術集会・総会(松本) WS4-1, 2013. 7. 11-12.

㉓ 鴨志田 剛, 佐藤 拓輝, 宮崎 香, 辻 勉: 細胞外マトリックスタンパク質ラミニン-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(松本) p05-2, 2013. 7. 11-12.

〔図書〕(計2件)

① 岡田雅人、宮崎香 編著、「タンパク質実験ノート改訂第4版」(上巻)、羊土社、全215ページ、2011.

② 岡田雅人、三木裕明、宮崎香 編著、「タンパク質実験ノート改訂第4版」(下巻)、羊土社、全222ページ、2011.

〔産業財産権〕

○取得状況(計4件)

① 名称：ラミニン5B。発明者：宮崎香、苅谷慶喜。権利者：横浜 TLO。種類：特許。番号：4798560。取得年月日：2011.08.12。国内外の別：国内。

② 名称：Skin aging marker and technique for use thereof. US 特許認定：. 発明者：Satoshi Miyata, Kaoru Miyazaki, Chie Yasuda, Akihiro Iwamatsu. 権利者：株式会社ファンケル。種類：米国特許。番号：7,972,788。取得年月日：2011.07.05。国内外の別：国外。

③ 名称：ラミニン5を利用した間葉系幹細胞の培養技術。発明者：宮崎香、橋本じゅん子、苅谷慶喜。権利者：横浜市立大学。種類：特許。番号：5001155。取得年月日：

2012.05.25。国内外の別：国内。

④ 名称：ラミニン6B(ラミニン3B11)蛋白質。発明者：宮崎香。権利者：横浜市立大学。種類：特許。番号：5142246。取得年月日：2012.11.30。国内外の別：国内。

〔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)
横浜市立大学木原生物学研究所・教授
(現在 名誉教授)
研究者番号：70112068

(2) 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・准教授
研究者番号：10275076