

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32660  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23590090  
 研究課題名（和文） テネイシン由来のインテグリン活性化ペプチドによる細胞の悪性化とその分子機構  
 研究課題名（英文） Molecular mechanism for malignant cell transformation induced by a peptide derived from tenascin C through integrin activation  
  
 研究代表者 深井 文雄 (Fukai Fumio)  
 東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・教授  
 研究者番号：90124487

研究成果の概要（和文）：テネイシンCは悪性腫瘍組織に高発現するがその腫瘍との関連は明らかでない。本研究により、テネイシンCはその分子内のTNIIIA2機能部位のインテグリン活性化作用を介して細胞の細胞死に対する抵抗性や過剰な増殖能を獲得すると共に、発がんプロモーション作用を発現する可能性が示された。以上の知見は、テネイシンCを高発現する悪性腫瘍の新たな治療標的として、TNIIIA2機能部位が重要であることを示すものである。

研究成果の概要（英文）：Following results were obtained by the present study: 1) Peptide TNIIIA2 derived from tenascin-C (TNC) has the ability to induce potentiated and sustained activation in beta1-integrins, 2) TNIIIA2 is capable of inducing hyperstimulation of cell survival and proliferation through activation of integrins, 3) TNIIIA2 may serve as a tumor promotor. These results provide important basis for understanding of the role of TNC in tumor initiation and promotion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	4,300,000	1,290,000	5,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：細胞生物学

## 1. 研究開始当初の背景

テネイシン C は悪性腫瘍組織中に高発現することが知られているが、その腫瘍形成に置ける役割の詳細は不明である。一方、我々はテネイシン C 分子由来のペプチド TNIIIA2 が、 $\beta 1$  インテグリン活性化に基づいて、細胞接着を促進・誘導することを見出した。

## 2. 研究の目的

悪性腫瘍組織に高発現するテネイシン C の腫瘍形成に置ける役割を、テネイシン C 由来のインテグリン活性化ペプチドの作用に関連して究明する。具体的には以下の4つの項目について検討する。

① アノイキス抵抗性獲得機構解明：血清飢餓下で発生するNIH3T3のアノイキスを TNIIIA2 が強く阻害する分子機構解明。

② PDGF 依存性増殖促進の分子機構解明：TNIIIA2 がPDGF 依存性細胞増殖を過度に促進する細胞内シグナル伝達経路を解明する。一方、TNIIIA2 は細胞膜syndecan-4 を介してraft/caveolaeに依存してβ1 インテグリン活性化を維持することが明らかになっているが、TNIIIA2 によるPDGF 受容体活性化もraft/caveolae 依存性があるかどうか、syndecan-4 とβ1 インテグリンとPDGF 受容体のraft/caveolae 内での物理的集合化が必要かどうかを明らかにする。

③ Focus 形成誘導機構：TNIIIA2 による NIH3T3 のfocus 形成誘導がヒト線維芽細胞あるいは上皮細胞でも観察されるかどうかを、ヒト正常線維芽細胞、正常上皮細胞を用いて検討する。更に、TNIIIA2 のこの作用にβ1 インテグリンの活性化が関与することを証明し、その下流のシグナル経路を明らかにする。

④ 上皮-間葉転換作用：「上皮-間葉転換」はがん腫の浸潤・転移能の獲得に必須の過程と考えられている。一方、神経膠芽腫は極めて悪性度が高く、最近 10 年間治癒率の向上が達成されていない難治性悪性腫瘍である。そこで、ヒト神経膠芽腫細胞を用いて TNIIIA2 に上皮-間葉転換作用があるかどうか解析する。

### 3. 研究の方法

細胞の生存、増殖に対する作用をWSTアッセイ法に基づいた *in vitro* の相棒培養系により解析する。また、TNIIIA2 のプロモーション活性をBhas42アッセイ法により検討する。また、シグナル伝達経路については、各種シグナル分子あるいはその活性化状態を認

識する抗体を用いたイムノブロットにより解析する。

### 4. 研究成果

上記の検討を行い以下の結果を得た。項目ごとに得られた成果を列記する。

① 細胞死抵抗性獲得機構：TNIIIA2は NIH3T3の脱着性細胞死アノイキスを強く阻害するが、この作用がβ1インテグリンの活性化に起因することを証明した(図1)。

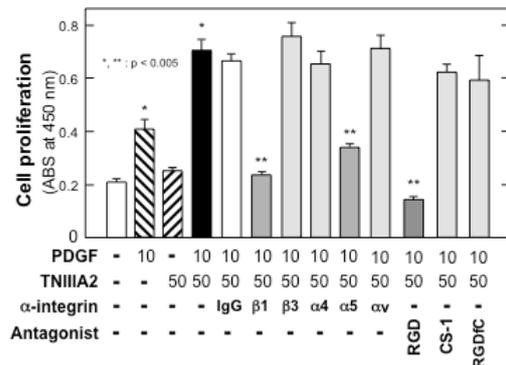


図 1. NIH3T3 細胞の生存/増殖におよぼす TNIIIA2 作用. TNIIIA2 作用はインテグリンα5β1の機能阻害によって消失した。

またこのアノイキス抑制には、主要な細胞生存シグナル分子であるAktの活性化とアポトーシス抑制性タンパク質Bcl-2の発現上昇が関与することが明らかになった。

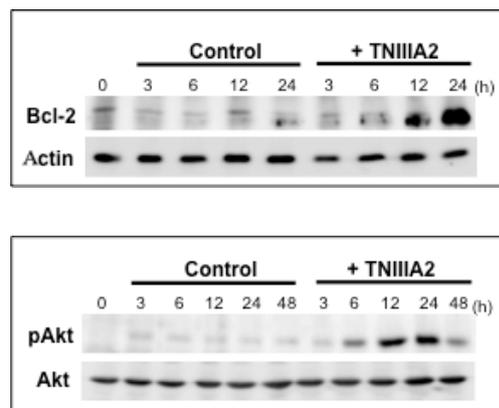
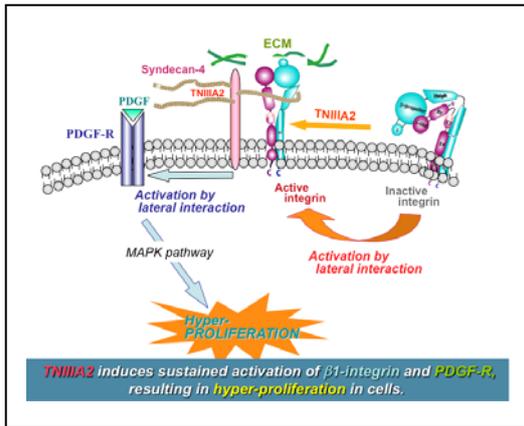


図 2. TNIIIA2によるAkt活性化とBcl-2発現誘導.

② PDGF依存性増殖促進の分子機構：

TNIIIA2は、PDGF受容体とその下流シグナル経路の持続的活性化により、細胞増殖を過度に刺激することが示された。この活性化は、TNIIIA2がPDGF受容体とβ1インテグリンの細胞膜raft/caveola内への集積と巨大複合体形成の誘導に基づき、結果として過剰な活性化シグナルを発生したのではないかと推測された（下図参照）。



③ Focus形成誘導機構：TNIIIA2の発がんプロモーター活性の有無をin vitro試験系により解析した。Balb3T3にv-Ha-rasを導入した細胞株Bhas42を用いた試験により、テネインCに弱く、TNIIIA2では明らかな発がんプロモーション活性が検出された。本結果は、悪性腫瘍部位で高発現するテネインCの発がんへの直接的関与を示した初めての結果である。

④ 上皮-間葉転換作用：神経膠芽腫は高い増殖能と浸潤能に基づいて治癒率が極めて低い難治性悪性腫瘍で、テネインCのみならずPDGF受容体が高発現している。ヒト神経膠芽腫細胞T98Gは通常の培養下に細胞間接着により敷石状形態をとるが、TNIIIA2添加培養により完全に分散し、線維芽細胞用の形態に変化した。

細胞分散能

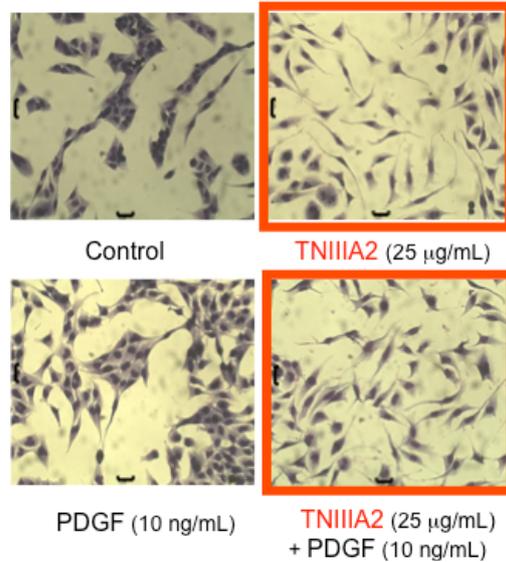


図 3. TNIIIA2 は T98G の敷石状接着を破壊し、細胞を分散させる。

⑤ 神経膠芽腫に対する作用：上記④の結果に基づき、T98GのPDGF依存性の増殖、移動に対するTNIIIA2の作用を観察した結果、TNIIIA2はT98Gの増殖、移動をインテグリン活性化に起因して、過度に増強することが明らかとなった。

以上、腫瘍部位で高発現するテネインCは、TNIIIA2機能を介して細胞死に対する抵抗性や過剰増殖能など悪性形質獲得に寄与する可能性が明らかになった。実際TNIIIA2は、テネインCとPDGF受容体を高発現する神経膠芽腫細胞のPDGF依存性の増殖や移動を過度に促進し、更にTNIIIA2は単独で神経膠芽腫細胞の細胞間接着を分散する等、悪性転換に深く関与している可能性が示された。TNIIIA2機能部位は、神経膠芽腫を始めとする悪性腫瘍の悪性を阻止する良い標的になるのではないかと期待される。

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 5 件)

1. Hayashi R., Miura, S., Saito Y., Osada S., Iyoda, T., Fukai, F., and Kodama H. The cell adhesion and proliferation activities of a peptide derived from human tenascin-C are dependent on two Ile residues. *Bioorg. Med Chem* 20: 4608-4613, 2012 査読有り
2. Matsunaga T, Fukai F., Kameda T, Shide K, Shimoda H, Torii E, Kamiunten A, Sekine M, Yamamoto S, Hidaka T, Kubuki Y, Yokokura S, Uemura M, Matsuoka A, Waki F, Matsumoto K, Kanaji N, Ishii T, Imataki O, Dobashi H, Bandoh S, Shimoda K. *Ann Hamatol* 91(10): 1633-1643, 2012 査読有り
3. Itagaki, K., Naito, T., Iwakiri, R., Haga, M., Miura S., Saito Y., Owaki, T., Kamiya, S., Iyoda, T., Yajima, H., Iwashita, S., Ejiri, S., and Fukai, F. Eukaryotic translation elongation factor 1A induces anoikis by triggering cell detachment. *J Biol Chem* 287 : 16037-16046 ,2012 査読有り
4. Matsunaga T, Imataki O, Torii E, Kameda T, Shide K, Shimoda H, Kamiunten A, Sekine M, Taniguchi Y, Yamamoto S, Hidaka T, Katayose K, Kubuki Y, Dobashi H, Bandoh S, Ohnishi H, Fukai F., Shimoda K. Elevated HIF-1 $\alpha$  expression of acute myelogenous leukemia stem cells in the endosteal hypoxic zone may be a cause of minimal residual disease in bone marrow after chemotherapy. *Leukemia Res* 36: 122-124, 2012 査読有り
5. Iyoda, T., and Fukai, F. Modulation of tumor cell survival, proliferation, and differentiation by the peptide derived from tenascin-C. *Int. J Cell Biol.* 2012: Article ID 647594, 10 pages, 2012 査読有り

[学会発表] (主なもののみ 5 件)

1. 藤田元道、藤澤達也、伊豫田拓也、深井文雄、テネイシンC分子由来のインテグリン活性化ペプチドによる神経膠芽腫細胞のPDGF依存性増殖、移動能の過剰増強、日本薬学会第132年会(北海道大学、札幌(横浜)、2012年3月29日～3月29日

2. 藤田元道、藤澤達也、伊豫田拓也、深井文雄、テネイシンC分子由来のインテグリン活性化ペプチドによる神経膠芽腫細胞のPDGF依存性増殖、移動能の過剰増強、第2回テネイシンフォーラム(東京理科大学・森戸記念館)、2012年11月10日
3. 深井文雄、細胞接着分子を標的とした新しい治療薬の開発、第23回新薬創製談話会(熱海)、2012年9月11日
4. 大塚一樹、藤澤達也、伊豫田拓也、深井文雄、テネイシンC由来のペプチドTNIIIA2はPDGF依存性の細胞増殖を過度に促進する、第1回テネイシンフォーラム(三重大学医学部)、2011年11月5日～11月5日
5. Fumio Fukai, Cell regulation by cryptic functional sites in fibronectin and tenascin-C molecules 10th Osteoponchin meeting 特別講演(北海道大学医学部、札幌)、2011年6月19日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深井 文雄 (Fukai Fumio)

東京理科大学。薬学部・生命創薬科学科・教授

研究者番号：90124487

(2) 研究分担者

伊豫田 拓也 (Iyoda Takuya)

東京理科大学。薬学部・生命創薬科学科・助教

研究者番号：80465715

(3) 連携研究者

なし