

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592938

研究課題名(和文) 自然免疫分子カセリシジンの腫瘍抑制効果に対するmiRNA制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of miRNA regulatory systems of antitumor effects by human cathelicidin.

研究代表者

奥村 一彦 (OKUMURA, Kazuhiko)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：60194510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：(1)カセリシジンがMMP-9の酵素活性を阻害して癌細胞の浸潤と転移を抑制することを示した。また、MMP-9の制御を行っているmiRNAとしてmiR-4327を同定した。以上の結果から、カセリシジンはmiR-4327を介してMMP-9の発現を抑制していることが示された。

(2) 血管新生におけるLL-37ペプチドの効果を検討した結果、LL-37は血管形成を制御する機能を有していた。成熟血管ではLL-37が、血管内皮細胞の管腔形成を濃度依存的に抑制しmiR-3188の発現亢進がみられた。一方、新生血管ではLL-37が管腔形成を促進し、miR-582-5pの発現亢進がみられた。

研究成果の概要(英文)：(1) hCAP18/LL-37 is the only antimicrobial peptide of the cathelicidins family identified from human. We reported Cathelicidin inhibits the enzymatic activity of MMP-9, thereby repressing tumor cell invasion and metastasis. In addition, miRNA microarrays were used to identify MMP-9-regulated miRNA, miR-4327. In conclusion, Cathelicidin regulates MMP-9 expression via miR-4327.

(2) We examined the effect of LL-37 peptide in angiogenesis. In angiostatic condition, LL-37 peptide inhibited the tube formation of HMVECs in dose dependently. By contrast, in proangiogenic condition, LL-37 peptide induced a 2.6-fold increase in tube formation compared with control. Additionally, miRNA microarrays were used to identify LL-37-regulated miRNA. In angiostatic condition, LL-37 could induce expression of miR-3188 and in proangiogenic condition, LL-37 could induce expression of miR-582-5p. In conclusion, LL-37 has angiostatic and proangiogenic activity in vascular endothelial cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：カセリシジン 自然免疫 抗腫瘍効果 抗菌ペプチド LL-37 hCAP18

1. 研究開始当初の背景

昆虫からヒトに至る多くの生物には、生体内に微生物が侵入した際に、最初のバリアーとして皮膚、粘膜上で微生物を排除する非特異的免疫機構、すなわち先天性免疫と称される自然免疫 (innate immunity) を有している。この自然免疫に関与する抗菌ペプチドは、現在500以上にのぼり共通して陽電荷を保持し、細菌や真菌さらにウイルスに殺菌効果を有している。哺乳類では、これら抗菌ペプチドが好中球やマクロファージ等の免疫細胞、表皮、粘膜組織から豊富に産生分泌されている。抗菌ペプチドは、デیفエンシンとカセリシジンの2つのファミリーに大別され、微生物の細胞膜を破壊することにより効果を発揮する。そこで、抗菌ペプチドの非特異的な微生物の殺菌効果を期待して、感染症治療薬として応用することを目的に研究が進められてきた。ヒトのカセリシジンとして唯一認められる hCAP 18/LL-37は細菌内毒素のリポ多糖 (LPS) との結合による中和作用があることから、現在使用されている抗菌薬と大きく異なる部分でとして知られている。これは、現状の抗菌薬が細菌毒素に対して無効であることと対照的である。また、hCAP18/LL-37の病原性微生物に対する選択的殺菌効果は、耐性菌や日和見感染を誘導しないため、極めて生体に優しい感染症治療薬として期待される。次に、抗菌ペプチドを応用した癌治療薬としての有効性については、古くは α -デیفエンシンに始まるが、2004年に我々が、ヒトのカセリシジン hCAP18/LL-37のC末端に存在する抗菌活性領域から合成した27残基ペプチドを用いた抗腫瘍効果の報告が最初である。その後、牛の乳汁中に存在するラクトフェリンの合成誘導体ペプチド ラクトフェリンで、我々と同様に抗腫瘍効果が報告されている (Eliassen et al. 2006)。しかし、抗菌ペプチドの癌細胞を含めた哺乳動物細胞に対する作用機序や、癌細胞特異的な殺細胞効果の詳細なメカニズム

については不明な点が多い。そこで、ヒトカセリシジン遺伝子導入癌細胞を用いて、癌細胞特異的アポトーシスの誘導機構を解析した。その結果、健常細胞と同様に抗菌ペプチドによる殺細胞効果が消失し、カセリシジン遺伝子導入癌細胞がLL-37ペプチドに抵抗性を示す結果が得られた。このことから、hCAP18/LL-37は癌抑制遺伝子様の機能を有していることが示された。また、同時に本細胞が恒常的に産生分泌するhCAP18/LL-37は微生物に対する殺菌効果を十分有しており、その生物学的活性が維持されていることから、自己産生抗菌ペプチドによる感染症予防への応用が期待される。

2. 研究の目的

感染防御の最前線を担う上皮細胞や好中球をはじめとする免疫細胞は、自然免疫機構において感染症や癌の発症を抑制しうることが明らかとなってきた。そこで、カセリシジン・ファミリーで唯一ヒトに認められる hCAP18/LL-37 の腫瘍抑制機構の解析を行い、自然免疫分子を応用した癌治療の治療的基盤の確立を目的とする。検討事項は以下の2点である。

- (1) hCAP18/LL-37 遺伝子強制発現ヒト口腔扁平上皮癌細胞による上皮間葉移行関連因子を介した腫瘍抑制機構を明らかにする。
- (2) hCAP18/LL-37 による癌細胞と間質細胞の自然免疫制御系 miRNA の探索とその制御機構の解析を行う。

3. 研究の方法

hCAP18 合成ペプチドの作製: ヒト CAP18 は、30 残基のシグナルペプチドに続いて 140 個のアミノ酸残基から構成されており、抗菌活性を示す部分は C 末端側の 37 残基から作製したペプチド (LL-37) と、活性ドメインから N 末端から 5 つ、C 末端から 5 つのアミノ酸残基を削った 27 残基からなるペプチド (hCAP18: hCAP18₁₀₉₋₁₃₅) を各々合成して使用

した (図 1)。

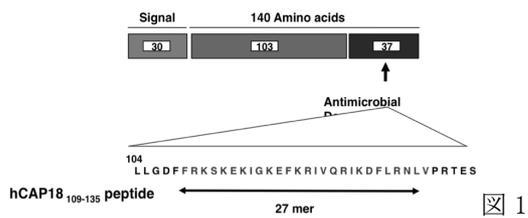


図 1

CAMP 遺伝子導入: ヒト健常上皮細胞 HaCaT に活性化ビタミン D₃により hCAP18/LL-37 の発現を誘導した³⁾。健常上皮細胞 HaCaT から得られたカセリシジン (CAMP) 遺伝子を pcDNA3.2/V5-DEST ゲイトウェイ・ベクター (Invitrogen) に組み込んだ。本ベクターを電気穿孔法で高浸潤性ヒト舌扁平上皮癌細胞 SAS-H1 に導入し、G418 抗菌薬処理により hCAP18/LL-37 高発現安定細胞株 (CAMP/SAS-H1) を作製した。

LL-37 ペプチドによる血管形成能の評価: 正常皮膚微小血管内皮細胞 HMVEC 細胞 (CC-2543) を用いた。血管形成能は、マトリゲル管腔形成アッセイを用いて評価した。

miRNA プロファイリング: 各細胞から miRNA を抽出し、マイクロアレイ解析 (Agilent Tec.) を行った。

miRNA 配列データベースによる機能検索: miRNA の発現量に差がみられたものについて、オンライン上で探索可能なデータベースである、DIANA, EIMMo, Rep Tar, miRDB, microRNA.org, miRBase, Magia, MicroCosm Targets, TargetScanHuman 6.2, を用いて機能の探索を行った。

4. 研究成果

(1) カセリシジン (CAMP) 遺伝子強制発現ヒト口腔扁平上皮癌細胞の腫瘍抑制機構

①カセリシジン遺伝子導入による基底膜分解酵素MMP-9発現の抑制

カセリシジン遺伝子を発現していない口腔扁平上皮癌細胞 (Mock/SAS-H1 癌細胞) では、hCAP18ペプチドにより殺細胞効果がみられた

が、カセリシジン遺伝子を強制発現させた口腔扁平上皮癌細胞 (CAMP/SAS-H1 癌細胞) では、その効果は無効であった。また、CAMP/SAS-H1 癌細胞の細胞遊走性と細胞浸潤性は Mock/SAS-H1 細胞に比べ有意に低下していた。また、癌細胞が産生する基質分解酵素 (MMPs) の産生状況を検討したところ、CAMP/SAS-H1 癌細胞は MMP-9 産生が消失するとともに、MMP-2 産生も低下していたが、一方、Mock/SAS-H1 細胞は MMP-9 と MMP-2 産生を認めた。これは、CAMP/SAS-H1 癌細胞では MMPs 阻害因子 TIMP1 と TIMP3 の mRNA の発現亢進により、MMPs の発現が抑制されたことを示した。

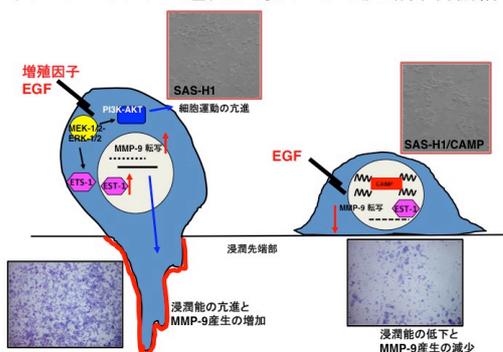
② 上皮間葉移行を介した LL-37 ペプチドによる細胞遊走制御

健常上皮細胞 HaCaT とカセリシジン遺伝子を強制発現させた口腔扁平上皮癌細胞 (CAMP/SAS-H1 癌細胞) で LL-37 ペプチドによる細胞遊走制御について検討した。LL-37 ペプチド (0 - 1 μg / ml) で処理すると、健常上皮細胞 HaCaT では、濃度依存性に細胞遊走が促進された。一方、CAMP/SAS-H1 癌細胞ではペプチド濃度依存的に細胞遊走が抑制された。そこで、ペプチド処理による上皮間葉移行に関連する分子種の mRNA 発現を検討した。その結果、健常上皮細胞 HaCaT では、ペプチド濃度依存性に上皮系マーカー: β-catenin 発現が増強したが、CAMP/SAS-H1 癌細胞では発現が低下した。また、健常上皮細胞 HaCaT では、間葉系マーカー: fibronectin, vimentin の発現が、ペプチド濃度依存性に増強したが、CAMP/SAS-H1 癌細胞では発現が低下した。以上の結果から、カセリシジン遺伝子導入により、癌細胞が間葉系細胞に移行するのを阻止した結果、LL-37 ペプチドによる細胞遊走が抑制されたことを示した。

③ カセリシジン遺伝子による上皮成長因子 (EGF) による基底膜浸潤能の抑制機構
カセリシジン遺伝子導入癌細胞 (CAMP/SAS-H1 癌細胞) の基底膜浸潤性の変化を解析するた

めに、EGF (0, 1, 10, 100 ng / ml) 刺激による浸潤性の検討を行った。その結果、Mock/SAS-H1細胞はEGF濃度依存性にMMP-9 mRNA発現および基底膜浸潤性が亢進したが、CAMP/SAS-H1癌細胞では、EGF刺激を与えてもMMP-9 mRNA発現誘導はなく、基底膜浸潤性も一様に低下していた。また、カセリシジン遺伝子導入によりMMP-9 mRNA発現に関与する転写因子Ets-1の恒常的発現増強が観察されたことから、Ets-1を介したMMP/TIMPバランスの制御を受けることが示唆された (図2)。

図2:カセリシジン遺伝子導入による腫瘍抑制機構

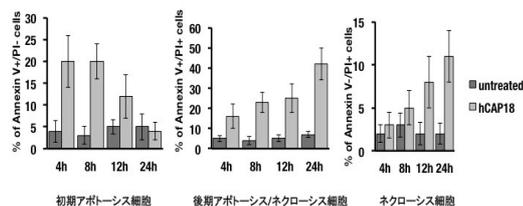


④ hCAP18 ペプチドによる細胞膜穴形成を介した抗腫瘍効果の解析

健常上皮細胞 HaCaT と口腔扁平上皮癌細胞 SAS-H1 を hCAP18 ペプチドで処理した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を検討した。また、その際の死細胞の検討を行った。その結果、口腔扁平上皮癌細胞 SAS-H1 では、ペプチドにより小胞体からの Ca^{2+} 放出と共に、 Ca^{2+} 濃度が一過性に上昇し、その直後から約 80% の細胞で細胞膜穴形成が生じ、短時間で初期アポトーシスを誘導した。一方、健常上皮細胞 HaCaT では、hCAP18 ペプチドにより Ca^{2+} 放出がみられ、 Ca^{2+} 濃度が上昇とオシレーションが観察されたが、細胞穴形成はわずか 20% の細胞で生じるのみで、細胞死には至らなかった。以上のことから、hCAP18 ペプチドによる抗腫瘍効果は癌細胞膜穴形成を介して、短時間で初期アポトーシスを誘導する効果があることが示され

た (図3)。

図3: hCAP18ペプチドは、癌細胞に短時間で初期アポトーシスを誘導する。



(2) hCAP18/LL-37 による癌細胞と間質細胞の自然免疫制御系miRNA の探索とその制御機構の解析

① カセリシジン遺伝子を強制発現させた口腔扁平上皮癌細胞 (CAMP/SAS-H1 癌細胞) で特異的に誘導されるmiRNA と機能探索

CAMP/SAS-H1癌細胞で、EGFと同様の増殖因子であるTGF- β 1刺激で浸潤性の変化をみたところ、マイクロアレイ解析結果から、hsa-mir-4327が刺激前と比較し142倍の発現亢進がみられた。CAMP/SAS-H1癌細胞での定量PCRでもhsa-mir-4327が、TGF- β 1刺激で発現亢進した。データベース解析から、ADAM9 (MMP-9) を陰性制御する機能を保持していることが示された。今後、CAMP/SAS-H1癌細胞にhsa-mir-4327阻害剤を導入し、MMP9発現が回復しTGF- β 1刺激により浸潤性の亢進がみられことを確認する予定である。

② LL-37ペプチドによる血管形成制御機構の解析

癌巣を取り巻く間質細胞で主となる血管内皮細胞へのLL-37ペプチドの作用を検討した。血管内皮細胞の影響をみるため、マトリゲル内に侵入したHMVEC細胞から形成される管腔の増減により血管形成能を評価した。その結果、通常マトリゲルを用いた系では、LL-37ペプチドで管腔形成能の抑制が観察された (図4)。一方、成長因子低減マトリゲルを用いた系では、LL-37ペプチドにより管腔形成能の促進がみられた (図5)。また、管腔形成能と平行して細胞遊走能が変化したが、細胞増

殖性については両者の系で影響がみられなかった。すなわち、健常者のLL-37血清濃度である $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ を境界として濃度がこれ以下であれば血管形成を促進し、一方、これ以上の高濃度では血管形成を抑制する働きを有することが示された。以上のことから、抗菌ペプチドLL-37は、血管形成の促進と抑制の両者の機能を担う抗菌ペプチドであることが示唆された。

図4: マトリゲルを用いたLL-37ペプチドによる管腔形成抑制効果の観察

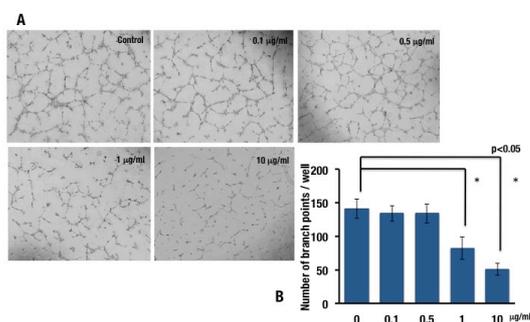
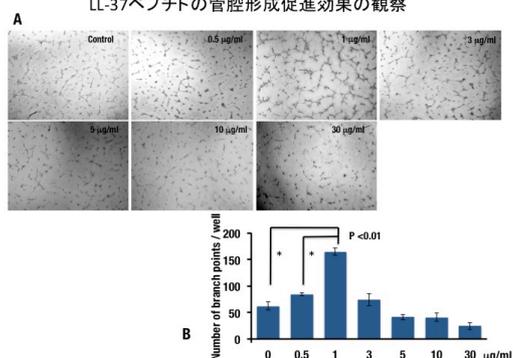


図5: 成長因子低減マトリゲルを用いたLL-37ペプチドの管腔形成促進効果の観察



③ LL-37ペプチドによる血管形成制御を担うmiRNA分子の探索

HMVECsをLL-37(0, 0.5, 1.0, 10.0 microgram/ml)で処理した際の、マイクロアレイ解析を行った結果、LL-37: $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ で血管新生のスイッチが入り、has-mir-3188の急激な発現上昇がみられ、さらにLL-37: $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ で血管新生の促進がピークとなり、has-mir-582-5pの急激な発現上昇をみた。その後、LL-37 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ で血管形成がほぼ抑制され、has-mir-3188の急激な発現上昇をみ

た。このことから、has-mir-3188は血管新生の陰性制御に働くことが示唆され、has-mir-582-5pの発現上昇はこの陰性制御を解除している可能性が示唆された。今後、これらmiRNA分子に対する阻害剤を細胞へ導入し検証実験を行う必要がある。

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 4 件)

- ① Kuroda K, Fukuda T, Okumura K, Yoneyama H, Isogai H, Savage PB, Isogai E. Ceragenin CSA-13 induces cell cycle arrest and antiproliferative effects in wild-type and p53 null mutant HCT116 colon cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 査読有、24, 2013, 826-834, DOI: 10.1097/CAD.0b013e3283634dd0
- ② Nishimura J, Saito T, Yoneyama H, Bai L L, Okumura K, Isogai E. Biofilmformation by streptococcus mutans and related bacteria. *Advances in Microbiology*, 査読有、2, 2012, 208-215, DOI: 10.4236/aim.2012.23025
- ③ Kuroda K, Fukuda T, Yoneyama H, Katayama M, Isogai H, Okumura K, Isogai E. Anti-proliferative effect of an analogue of the LL-37 peptide in the colon cancer derived cell line HCT116 p53+/+ and p53-/-, *Oncology Reports*, 査読有、28, 2012, 829-834, DOI: 10.3892/or.2012.1876
- ④ 磯貝恵美子、秋葉敬斎、岡 翔太、堀 初弘、磯貝 浩、小林美智代、奥村一彦、マダニデフェンシンの中腸由来細菌に対する抗菌活性、*無菌生物*、査読有、41巻、2011、113-116、

[学会発表] (計 6 件)

- ① Okumura, K., Sawada, N., Isogai, E., Shibata, T. Isogai, H.: 624
Cathelicidin is a regulator of invasion in oral squamous-cell carcinoma. The 2nd Meeting of the International Association of Dental Research-Asia Pacific Region (IADR-APR), 平成25年8月21～23日、Thailand, Bangkok, Plaza Athenee,
- ② 奥村一彦、柴田考典、抗菌ペプチド hCAP18の細胞膜穴形成を介した細胞死、第58回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2013年10月11～13日、福岡県、福岡国際会議場、マリンメッセ
- ③ Okumura, K., Isogai, E., Shibata, T., Isogai, H. Cathelicidin negatively regulates Matrix Metalloproteinase-9 expression in human tumor cell lines. 第87回日本細菌学会総会、平成26年3月26～28日、東京都、タワーホール船堀 (江戸川区総合区民ホール)
- ④ 磯貝浩、磯貝恵美子、黒田健吾、奥村一彦、大腸菌に発現させた抗菌タンパクとその活性第87回日本細菌学会総会、平成26年3月26～28日、東京都、タワーホール船堀 (江戸川区総合区民ホール)
- ⑤ 奥村一彦、平 博彦、柴田考典、抗菌ペプチド遺伝子導入扁平上皮癌細胞の基底膜浸潤抑制、第57回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2012年10月19日～2012年10月21日、神奈川県、パシフィコ横浜 会議センター
- ⑥ Kobayashi-Sakamoto M., Isogai E, Hirose K, Okumura K., Holen I, Chiba I. Thrombin induces osteopontin production via phosphatidylinositol

3-kinase pathway in human microvascular endothelial cells. 10th World Congress on Inflammation, 2011年7月25-29日、Palais des Congres, Paris, France

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 一彦 (OKUMIRA, Kazuhiko)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号：60194510

(2) 研究分担者

小林 美智代 (KOBAYASHI, Michiyo)
北海道大学・理学部・特任助教
研究者番号：80316265

(3) 連携研究者

なし