

## 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 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23701059

研究課題名（和文） ラミニン・ガンマ2鎖短腕のがんの悪性増殖における役割

研究課題名（英文） Roles of laminin g2 chain in tumor growth and invasion.

## 研究代表者

小川 崇 (OGAWA TAKASHI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80405018

## 研究成果の概要（和文）：

間質に浸潤した上皮性のがん細胞はすでにラミニン5を発現していないが、その構成鎖の一つであるgamma2鎖のみを単独で強く発現している。しかし、このgamma2鎖の発現とがんの浸潤性の直接的な関係は明らかではなかった。そこで私は、ヒト膀胱がん細胞EJ-1及びヒト胎児腎由来細胞HEK293にgamma2鎖を単独で強制発現させ、ヌードマウスに移植することによって、gamma2鎖が生体内での浸潤性増殖を促進することを明らかにした。そこで、gamma2鎖単量体の活性部位の探索を行い、主にドメインVに活性部位が存在することを明らかにした。そこで、gamma2鎖ドメインVを認識する抗体の作製を試みた。この作製した抗体がgamma2鎖の活性部位の機能を阻害し、がんの浸潤・転移を抑制できるかどうかを検討中である。

研究成果の概要（英文）：To analyze the effect of Lm g2 chain monomer on tumor growth and invasion *in vivo*, we overexpressed of the g2 chain in the human bladder carcinoma cell line EJ-1 and human embryonic kidney cell line HEK-293. When implanted into nude mice subcutaneously or intraperitoneally, gamma2 overexpressed cells grew faster and produced much larger solid tumors than the control transfectant. These data strongly suggest that the g2 monomer contribute to the invasive growth of tumor cells in stromal tissues. Next, we overexpressed three different  $\gamma 2$  fragments in the HEK-293 and analyzed the active site of the  $\gamma 2$  chain. It was found that domein V of  $\gamma 2$  chain ( $\gamma 2dV$ ) strongly induced the tumor growth. Then, we established monoclonal antibodies against the domain V of human laminin  $\gamma 2$  chain. Further detailed characterization of the antibody is in progress.

## 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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

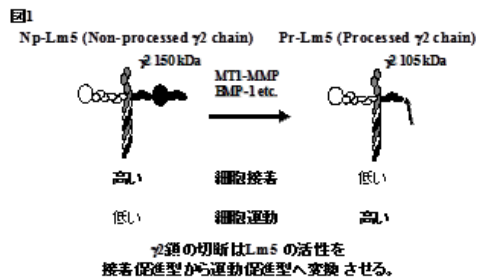
キーワード：がん微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

基底膜に存在する主要な細胞外マトリックスタンパク質であるラミニンは、3つのサブユニット ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) から構成されるヘテロ3

量体タンパク質であり、現在までに15種類のアイズフォームが確認されている。主に皮膚の基底膜に存在しているラミニン5 (Lm5) は  $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$  鎖から構成される。Lm5はインテグ

リンと結合することにより、他の細胞外マトリックス分子に比べて非常に強い細胞接着および細胞運動を誘導する。生体内で、これらの活性は安定な接着装置であるヘミデスモソーム構造の形成による皮膚の構造維持、創傷治癒に寄与している。また、種々のがん組織で Lm5 の高発現が確認されていることから、がんの浸潤転移にも重要であることが示唆されている。私達は、 $\gamma 2$  鎖のプロテアーゼによる切断により Lm5 の活性が接着促進型から運動促進型に変換されることを明らかにした(図 1) (1)。さらに、切断除去される  $\gamma 2$  鎖短腕(N 末端部位)を作製及び精製し生理活性を調べた結果、 $\gamma 2$  鎖短腕のドメイン V が細胞表面受容体のシンデカン-1 と結合することを明らかにした。この結合の結果、Lm5 の主要なレセプターであるインテグリン  $\beta 4$  のチロシン酸化を抑制し、上皮の安定接着構造であるヘミデスモソーム構造の維持に寄与していることを明らかにした(2)。上記の結果から、プロテアーゼによる  $\gamma 2$  鎖短腕の切断除去は Lm5 の活性を接着促進型から運動促進型へ変換させるスイッチのような役割を果たしていることを明らかにした。これらの結果は、 $\gamma 2$  鎖短腕が切断されることにより、本来細胞を接着させるタンパク質である Lm5 が運動促進活性を獲得し、がん細胞等の組織内移動(浸潤)



を促進することを示唆している。また、Lm5 は皮膚基底膜に存在し、皮膚の構造維持に重要な働きをしている。それを裏付けるように、Lm5 の欠損は重篤な表皮剥離性水疱症を引き起こす。しかしながら、Lm5 の基底膜への蓄積様式はまったく明らかになっていない。最近、私は切断型および非切断型 Lm5 発現細胞を用いることによって、2次元培養下および3次元培養下において  $\gamma 2$  鎖短腕が Lm5 の基底膜への蓄積を制御していることを明らかにした(投稿準備中)。このように、 $\gamma 2$  鎖短腕は Lm5 の機能を多方面から修飾していることが明らかになった。一方、Lm5 構成鎖である  $\gamma 2$  鎖は、単量体で胃がんや肺がんなどの浸潤先端部位に発現すること明らかにした(3)。しかし、この  $\gamma 2$  鎖の発現とがん浸潤との直接的な関係は明らかで

はなかった。そこで、 $\gamma 2$  鎖の単独発現とがんの悪性度との関係を明らかにするために、ヒト膀胱がん細胞株 EJ-1 およびヒト胎児腎由来細胞株 HEK-293 に  $\gamma 2$  鎖全長及び  $\gamma 2$  鎖短腕を単独で強制発現させ、ヌードマウスでの造腫瘍性の変化を検討した。その結果、 $\gamma 2$  鎖発現細胞ではいずれも腹腔内での腫瘍形成率、腫瘍体積がともに増大した(図 2) (4)。また形成された腫瘍を病理学的に解析したところ、 $\gamma 2$  鎖発現細胞ではいずれも横隔膜筋層への浸潤が顕著であった。これらの結果は、 $\gamma 2$  鎖短腕が、がんの悪性増殖を促進することを示している。現在、単量体  $\gamma 2$  鎖におけるがんの悪性増殖の作用メカニズムや活性部位を解析し

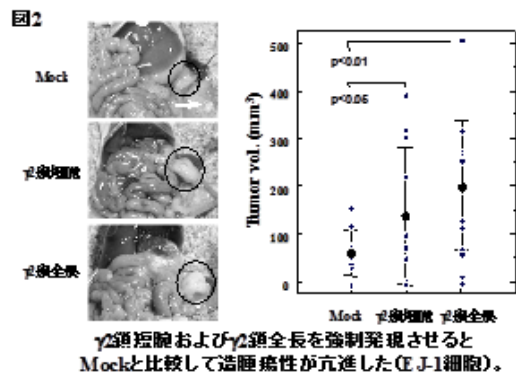


図2  $\gamma 2$ 鎖短腕および  $\gamma 2$ 鎖全長を強制発現させると Mockと比較して造腫瘍性が亢進した(EJ-1細胞)。

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、 $\gamma 2$  鎖の切断が Lm5 の活性を細胞接着型から細胞運動型に変換させることを明らかにしている。そこで、すでに樹立済みの切断型 Lm5 および非切断型 Lm5 強制発現細胞をヌードマウスに移植することにより、Lm5 の切断ががんの悪性増殖に与える影響を *in vivo* レベルで確認する。さらに、Lm5 の基底膜への蓄積機構に  $\gamma 2$  鎖短腕が重要であることが明らかになったので、この Lm5 の蓄積のための相互作用タンパクの同定や蓄積メカニズムを明らかにしたい。

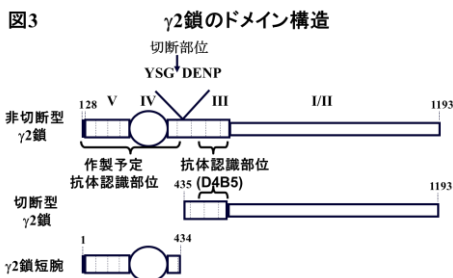
また、これまでががんの間質浸潤先端部において単量体  $\gamma 2$  鎖が高発現し、 $\gamma 2$  鎖単量体が直接がんの造腫瘍性及び浸潤性を亢進することを明らかにしている。そこで、がん細胞の間質への浸潤機構を明らかにするために、がん細胞における上皮特有の Lm5 の発現から  $\gamma 2$  鎖単量体への発現変化がどのような物質や機構によって制御されているかを、がん細胞と正常繊維芽細胞を含む 3次元共培養系を構築し検索する。さらに、 $\gamma 2$  鎖単量体の活性部位の探索を行い、その部位を強制発現させた細胞を用いてがんの浸潤に与える影響を考察する。 $\gamma 2$  鎖の活性部位を明らかにした後、 $\gamma 2$  鎖単量体の活性部位の機能を阻

害する抗体及び化合物の作製を試み、この抗体および化合物が、がんの浸潤・転移を抑制できるかどうかを検討する。

### 3. 研究の方法

1) 浸潤促進活性が確認されている $\gamma 2$ 鎖短腕をアミノ酸レベルで段階的に削除を行うことで活性に必要なアミノ酸残基を同定する。この実験は造腫瘍性や間質浸潤性を指標に研究を行う。また、生理活性に立体構造が重要な場合でも、構造の変化を最小限に止めるためにドメイン中のモチーフ単位での削除を行うことによって、立体構造の変化を最小限に抑えながら活性部位の検討ができると考えている。また、この研究は、2)の阻害抗体作製に向けた基盤研究であり、機能阻害物質を考察する際にも必要であると考え。

2) 1)の結果から $\gamma 2$ 鎖単量体の活性に必要なアミノ酸残基が同定できれば、この部位または $\gamma 2$ 鎖短腕を抗原として抗体を作成し、 $\gamma 2$ 鎖の活性を阻害する抗体のスクリーニングを試みる。この抗体が作製できれば、現在一般的に使われている抗体(D4B5)と抗体認識部位が大きく異なるため、有効に利用可能と考える(図3)。 $\gamma 2$ 鎖はドメインI~Vまであり、その切断はドメインIIIのNH<sub>2</sub>端付近で起こる。現在、一般的に用いられている $\gamma 2$ 鎖抗体は、ほぼドメインIIIのCOOH端付近を認識する。そのため、この抗体は $\gamma 2$ 鎖の切断および非切断を区別することができない。Lm5の切断は機能調節を担っていることから、この抗体が作成できれば、あらゆる組織での $\gamma 2$ 鎖の切断状況を、D4B5との比較染色によって調べることができ、生理機能を知る上で価値があると考えている。そのため、この抗体の作製は2つの意味を持ち、有用であると考えている。



3)  $\gamma 2$ 鎖短腕はがんの悪性増殖を促進することから、がんの浸潤先に存在する間質系のECM成分であるFibronectin (FN)やCollagen I (Col. I)を用いて、 $\gamma 2$ 鎖ががん細胞に与える影

響を調べた。その結果、 $\gamma 2$ 鎖ドメインVがFNやCol. I上での細胞接着や運動を促進する事を明らかにした。そこで、より生体に近い3次元培養のトランズウェルやコラーゲンゲルへのがん細胞の潜り込みを調べ、阻害剤との組み合わせにより、 $\gamma 2$ 鎖単量体の浸潤促進機構の解明を目指す。

4)  $\gamma 2$ 鎖の作用メカニズムを詳細に解析するために、精製した $\gamma 2$ 鎖短腕を添加し、内部シグナルを調べる。現在までに、精製 $\gamma 2$ 鎖の添加によって細胞内の生存シグナルであるAktが活性化されることを明らかにしている。その活性化経路やその他のシグナルを含めて検討を行う。

5) ザイモグラフィを用いて、精製 $\gamma 2$ 鎖の添加によって変動するセリンプロテアーゼ(100 kDaが存在する事を明らかにしている(未同定)。このプロテアーゼの同定を行い、がん浸潤との関係を調べる。また、幅広く浸潤促進メカニズムを探るために、DNAマイクロアレイを用いて $\gamma 2$ 鎖の発現により変動する因子を網羅的に解析する。

6) プロテアーゼによる $\gamma 2$ 鎖の切断はLm5の活性を変換させる。さらに、がん組織や炎症部位等で $\gamma 2$ 鎖切断酵素が高発現していることから、この切断はがんの浸潤に寄与している可能性が考えられる。そこで、すでに樹立してある切断型および非切断型Lm5強制発現細胞をヌードマウスに移植することにより、Lm5の切断ががん浸潤に与える影響をin vivoレベルで証明する。

7) がんの悪性増殖における $\gamma 2$ 鎖単量体の意義を明らかにするために、1)で用いたラミニン $\gamma 2$ 鎖短腕の活性部位を強制発現させたがん細胞のin vivo (ヌードマウス)での機能を解析する。これにより、がんの造腫瘍性や間質浸潤に重要な $\gamma 2$ 鎖の部位の特定が期待できる。

8) また、2)で抗体が作製できれば、この抗体と7)で用いた $\gamma 2$ 鎖発現細胞を用いて、この抗体が造腫瘍性および浸潤性を抑制できるかどうか調べる。これにより $\gamma 2$ 鎖の活性部位の機能を抑制できれば、がんの転移を抑制するといった抗体医療としての展開も考えられる。

9) 2)の抗体を用いて、様々な組織における $\gamma 2$ 鎖の切断状況を免疫染色により明らかにする。正常組織に対する浸潤がん組織や創傷治療時の組織における $\gamma 2$ 鎖の切断の有無が明ら

かになり、生体内における $\gamma 2$ 鎖切断の意義についての考察が可能になる。

10) がんの間質浸潤先端部において単量体 $\gamma 2$ 鎖が強発現していることから、上皮特有のLm5の発現から $\gamma 2$ 鎖単量体への発現変化がどのような物質によって制御されているかを、がん細胞と正常繊維芽細胞を含む3次元共培養モデルを構築し検索する。

11) Lm5が基底膜に蓄積するために、 $\gamma 2$ 鎖短腕が重要であることをすでに明らかにしている。基底膜が脆弱化すると、がんの浸潤が起りやすくなるため、そのメカニズムを知る事は重要である。そこで、 $\gamma 2$ 鎖短腕がどのような分子と結合することが基底膜蓄積に必要なのかを探る。

現在までに申請者は、様々な細胞外マトリックスタンパク質を組換え型タンパク質として作製及び精製を行い、活性部位の同定を行っている。 $\gamma 2$ 鎖によるがん悪性増殖促進の活性部位やその機構を明らかにし、新たに作製する $\gamma 2$ 鎖活性阻害抗体によって $\gamma 2$ 鎖の機能を抑制できれば、がん浸潤を効率的に抑制できる抗体医薬になり得ると考えている。また、様々な実験を計画しているのは、当初の予定どおりに実験が進まなくても、がんにおける $\gamma 2$ 鎖の研究を多方面から行う事で、がんの悪性増殖の抑制に向けた研究が遂行できると考えているからである。

#### 4. 研究成果

がんの浸潤・転移におけるラミニン $\gamma 2$ 鎖の重要性をさらに明確にする結果が得られた。間質に浸潤した上皮性のがん細胞はすでにラミニン5を発現していないが、その構成鎖の一つである $\gamma 2$ 鎖のみを単独で強く発現している。しかし、この $\gamma 2$ 鎖の発現とがんの浸潤性の直接的な関係は明らかではなかった。そこで私は、ヒト膀胱がん細胞EJ-1及びヒト胎児腎由来細胞HEK293に $\gamma 2$ 鎖全長及び $\gamma 2$ 鎖短腕を単独で強制発現させ、ヌードマウスに移植することによって、 $\gamma 2$ 鎖短腕が生体内での浸潤性増殖を促進することを明らかにした。そこで、 $\gamma 2$ 鎖単量体の活性部位の探索を行い、主にドメインVに活性部位が存在することを明らかにした。また、そのメカニズムとして、 $\gamma 2$ 鎖短腕のドメインVが間質系の細胞外マトリックスであるFibronectinやCollagen Iによる細胞の接着や運動を促進することが明らかにした。

そこで、ドメインVを強制発現させた細胞を

樹立し、精製を行い、 $\gamma 2$ 鎖ドメインVを認識する抗体の作製を試みた。この作製した抗体が $\gamma 2$ 鎖の活性部位の機能を阻害し、がんの浸潤・転移を抑制できるかどうかを検討中である。

また、 $\gamma 2$ 鎖が間質系の細胞外マトリックスへの活性を調節していたことから、EMT(Epithelial Mesenchymal Transition)への関与を調べた。その結果、 $\gamma 2$ 鎖の発現に伴って間質系マーカーであるビメンチンの発現が上昇することが明らかになった。つまり、 $\gamma 2$ 鎖はEMTに関与し、その結果としてがん浸潤を促進していることが示唆された。そこで、EMTに至るまでの細胞内シグナル等のメカニズムについて解析を進めている。

また、betaガラクトシド構造を持った糖鎖に特異的に結合するガレクチンがラミニンやインテグリンの糖鎖に結合し機能を修飾するという報告がなされている。実際、ガレクチン-8とインテグリン $\alpha M$ の結合が好中球の接着を誘導することを当研究室が明らかにしている。しかしながら、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。Lamininやその構成鎖である、 $\gamma 2$ 鎖にも糖鎖結合部位が存在する事から、Laminin 5や $\gamma 2$ 鎖の浸潤促進機構や生理活性に糖鎖やガレクチンの与える影響を調べている。現在までに数種のガレクチンとラミニン構成鎖ががん共発現することを明らかにしており、この共発現と機能の関係を解析する。

#### 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3件)

①Oyanagi J, Ogawa T, Sato H, Higashi S, Miyazaki K.(2012) Epithelial mesenchymal transition stimulates human cancer cells to extend microtubule-based invasive protrusions and suppresses cell growth in collagen gel.PLoS One. 2012;7(12):e53209.

②Nonaka Y, Ogawa T, Oomizu S, Nakakita S, Nishi N, Kamitori S, Hirashima M, Nakamura T. (2013) Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the opposite surface of the sugar-binding site. J Biochem. J Biochem. 2013 Feb 21

③Itoh A, Fukata Y, Miyanaka H, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Nishi N. (2013) Optimization of the inter-domain structure of galectin-9 for recombinant production.

〔学会発表〕（計 3 件）

1.

Sato H., Ogawa T., Eriko K., Oyanagi J., Higashi S., and Miyazaki K

Laminin Gamma2 Chain Promotes Invasion of Tumor Cells into Vascular Endothelial Cell Layer  
*In Vitro*

14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society

2012 Sep. オーストラリア ブリスベン

2.

小川 崇、東海林 博樹、野中 康宏、舘野 浩章、平林 淳、西 望、中村 隆範、アフリカツメガエル消化管におけるガレクチンファミリーの発現解析、第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2011 年、9 月、京都

3.

小川 崇、東海林 博樹、野中 康宏、舘野 浩章、平林 淳、西 望、中村 隆範  
「ツメガエル消化管及びヒト大腸がん細胞におけるガレクチン 4 の発現及び機能解析」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月（福岡）

6. 研究組織

（1）研究代表者

小川 崇（OGAWA TAKASHI）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80405018