

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790373

研究課題名（和文）  $\alpha 6\beta 4$  インテグリンによる悪性形質発現機序の解明研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanism of tumor progression induced by an  $\alpha 6\beta 4$  integrin研究代表者 苅谷 慶喜 (KARIYA YOSHINOBU)  
福島県立医科大学医学部・講師

研究者番号：00458217

研究成果の概要（和文）：本研究では、 $\beta 4$  インテグリン上 N 型糖鎖の役割を調べるために、野生型および N 型糖鎖欠損  $\beta 4$  インテグリン発現ケラチノサイトを樹立した。それら細胞のラミニン 332 上での細胞接着および細胞運動能を調べた結果、 $\beta 4$  インテグリン上 N 型糖鎖はそれら細胞機能の発現に重要であることが明らかとなった。また、 $\beta 4$  インテグリンは N 型糖鎖を介して、EGFR やガレクチン 3 と超分子複合体を形成し、それによって細胞内シグナルや細胞機能を増強していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the role of N-glycosylation on  $\beta 4$  integrin, we established the keratinocytes re-expressing wild-type or N-glycosylation-defective  $\beta 4$  integrin in  $\beta 4$  integrin null keratinocytes. The analysis using the keratinocytes indicated that N-glycosylation plays important roles for integrin-mediated cell adhesion and migration. In addition, we found that  $\beta 4$  integrin forms supramolecular complex with EGFR through cross-linking with galectin-3-mediated N-glycans, thereby promoting cellular signaling and the following cellular function.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	772,744	360,000	1,132,744
2012 年度	1,827,256	420,000	2,247,256
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード： $\beta 4$  インテグリン、癌、糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

$\alpha 6\beta 4$  インテグリンは膜貫通型の細胞表面受容体であり、そのリガンドとして細胞外マトリックスであるラミニン 332 (旧名ラミニン 5) が知られている。両者の結合はヘミデスモソームと呼ばれる皮膚の接着構造形成に重要である。そのため、 $\alpha 6\beta 4$  インテグリンは接着構造の単なる構

成因子と捉えられてきた。しかしながら近年、皮膚癌や乳癌を初めとする様々な癌における過剰発現と患者の予後不良との相関性が多数報告され、癌の浸潤・転移への関与が考えられるようになった。ごく最近、その概念は *in vitro* 浸潤アッセイやマウスモデルにより実証された。すなわち  $\alpha 6\beta 4$  インテグリンは接着構造体としての

静的役割のみならず、癌の形成、浸潤・転移という動的役割も果たしている。 $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンは PI3K や ERK などのシグナルを活性化して細胞運動や増殖を促進するが、そのメカニズムについては不明な点が多い。そうしたメカニズムの理解は、 $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンによる癌の浸潤・転移に対する阻害薬の開発に必要不可欠である。

申請者は本研究以前に、ラミニン332が誘導する細胞運動にそのN型糖鎖が影響することを明らかにした (Kariya, Y., et al., 2008, *J. Biol. Chem.*)。さらに、 $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンが細胞外ドメインのN型糖鎖を介してEGFR、ラミニン332と超分子複合体を形成し、細胞運動促進シグナルを誘導することを明らかにした (Kariya, Y., et al., 2010, *J. Biol. Chem.*)。これらの結果から、 $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンの細胞運動促進シグナルはEGFR やラミニン332とのN型糖鎖を介した相互作用に影響されることが予想された。このことは、それら糖鎖の相互作用による癌の浸潤・転移機構が存在する可能性を想起させた。しかしながら、それまで $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンの糖鎖と癌に関する直接的な報告はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は細胞運動に関与する $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンが、どのように癌の浸潤・転移を促進するのか、その分子メカニズムを糖鎖に着目して明らかにするとともに、それら知見による癌治療薬開発の研究基盤を確立することが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) $\beta 4$ インテグリン機能へのN型糖鎖の影響に関する実験方法：

$\beta 4$  インテグリンの5ヶ所のN型糖鎖付加部位をPCRによる変異導入法によりAsnからGlnに置換し、N型糖鎖を付加できない $\beta 4$  インテグリンのレトロウイルス発現ベクターを作製した。このベクターあるいは野生型 $\beta 4$  インテグリン発現ベクターを、ヒト $\beta 4$  インテグリン欠損ケラチノサイトに導入した発現細胞を樹立した。樹立した細胞における $\beta 4$  の細胞表面発現量をFACSにより解析した。また、免疫沈降を用いた解析により、 $\alpha 6$  と $\beta 4$  インテグリンサブユニットによるダイマー形成についても調べた。それら細胞のラミニン332 上での接着能を接着アッセイにより解析した。運動能についてはタイムラプス顕微鏡を用いて解析をおこなった。更に両細胞における $\beta 4$  インテグリンのラフトにおける局在をシヨ糖密度勾配遠心法を

用いて調べた。両細胞の細胞シグナルの違いを調べるために、ERK や Akt の抗体およびそれらのリン酸化型を認識する抗体を用いたウェスタンブロットをおこなった。 $\beta 4$  インテグリンのクラスターリング能の違いによる影響を調べるために、 $\beta 4$  インテグリンの抗体を用いた $\beta 4$  の強制クラスターリング (クロスリンク) 実験をおこなった。 $\beta 4$  インテグリンの糖鎖によるEGFR 上糖鎖への影響を調べるため、野生型および糖鎖欠損型 $\beta 4$  発現細胞におけるEGFRの糖鎖を異なる糖鎖を認識するいくつかのレクチンを用いた、レクチンブロットをおこなった。さらに、EGFR 抗体を用いた共免疫沈降実験を両細胞の細胞抽出液に対しておこない、ガレクチン3と $\alpha 6 \beta 4$  インテグリン、EGFRの複合体形成能について調べた。

- (2) 癌における $\beta 4$  インテグリン上N型糖鎖解析：購入したヒト皮膚扁平上皮癌の組織切片を脱パラフィン化した後、蛍光ラベルしたレクチンや抗 $\beta 4$  インテグリン抗体で蛍光免疫染色をおこなった。また、異なる糖鎖を認識するいくつかのレクチンを用いた、レクチンブロットによりRasによる癌化前後のケラチノサイトに発現する $\beta 4$  インテグリンの糖鎖構造の解析をおこなった。

## 4. 研究成果

当該研究の主な成果としては、主に下記の二つが挙げられる。

- (1)  $\beta 4$  インテグリン機能へのN型糖鎖の影響：細胞運動や接着など $\beta 4$  インテグリンの機能におけるN型糖鎖の寄与を調べるために、 $\beta 4$  インテグリンの5ヶ所のN型糖鎖付加部位をPCRによる変異導入法によりAsnからGlnに置換し、N型糖鎖を付加できない $\beta 4$  インテグリン発現ベクターを作製した (図1)。

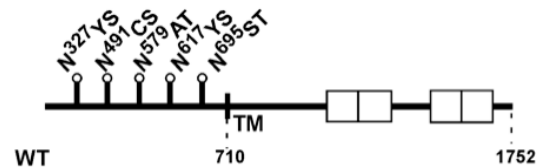


図1. 野生型 $\beta 4$ インテグリンにおけるN型糖鎖付加予測部位(Asn-X-Ser/Thr)。数字はアミノ酸配列の番号。白いboxはフィブロネクチンIII型リピートを表す。TM:transmembrane。N型糖鎖欠損 $\beta 4$ インテグリンは327, 491, 579, 617, 695番目のAsnをGlnに置換したものである。

N型糖鎖欠損および野生型 $\beta 4$  インテグリン発現ベクターをヒト $\beta 4$  インテグリン欠損ケラチノサイトに導入し、それら

発現細胞を樹立した。N型糖鎖欠損β4インテグリン発現ケラチノサイトは野生型発現のものに比べ、細胞伸展や接着、運動促進活性がいずれも低下した(図2)。

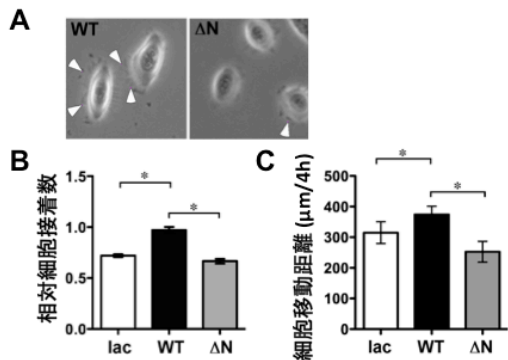


図2. N型糖鎖欠損によるβ4インテグリン依存的細胞機能への影響 (A)野生型(WT)およびN型糖鎖欠損(ΔN)β4インテグリン発現ケラチノサイトのラミニン332上での細胞伸展の様子。矢頭はラメリポディアを示す。(B)各細胞のラミニン332への細胞接着数の比較。lac:β4インテグリンnullケラチノサイト。(C)各細胞のラミニン332上での細胞運動能の比較。\*, p<0.001

N型糖鎖欠損β4インテグリン発現ケラチノサイトの細胞機能低下の原因を調べるために、β4インテグリンあるいはEGFRに対する抗体による免疫沈降、β4インテグリンのクラスター解析、リピッドラフトにおける局在、細胞内シグナル分子の解析をおこなった。その結果、N型糖鎖欠損β4インテグリン発現ケラチノサイトの細胞機能の低下はN型糖鎖を介したβ4とEGFR、ガレクチン3との超分子複合体形成の減少によるものであった。本結果は、N型糖鎖を介した超分子複合体がβ4インテグリン分子の機能に影響を与えるという全く新しい概念を提示するものである(図3)。

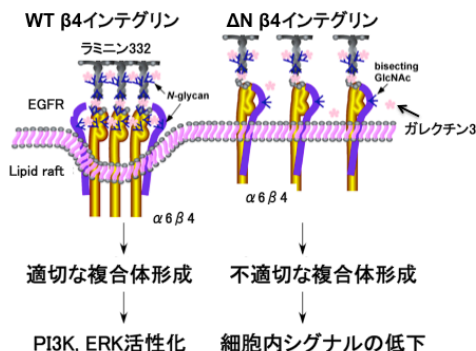


図3. β4インテグリン上N型糖鎖の細胞機能への影響のモデル図。通常状態(WT)ではガレクチン3を介したN型糖鎖のクロスリンクにより、β4インテグリンはEGFRやラミニン332と結合する。糖鎖による結合は適度な相互作用をもたらす。効率的なインテグリンのクラスターリング、細胞内シグナルを引き起こす。一方、糖鎖がない場合(ΔN)、そうした相互作用が失われるため、効果的なインテグリンクラスターリングや細胞内シグナルが抑制される。

(2) 癌におけるβ4インテグリン上N型糖鎖: ヒト皮膚癌の組織切片に対し、特異的なN型糖鎖構造を認識するいくつかのレクチンおよび抗β4インテグリン抗体で免疫染色をおこなった。その結果、特定の糖鎖構造が癌組織において高発現しており、そのシグナルはβ4インテグリンと共局在していた。また、レクチンプロット解析において、Rasにより癌化させたケラチノサイトのβ4インテグリンは正常ケラチノサイト由来のものに比べ、上記で同定した糖鎖構造の増加が認められた。これらの結果から、癌組織においてβ4インテグリン上には特定の糖鎖構造の増加がみられると考えられた。

上記(1),(2)を総合的に考えると、癌化に伴い増加するβ4インテグリン上の癌特異的糖鎖が超分子複合体形成を促すことで癌の浸潤・転移や増殖を促進している可能性が考えられる。このことはタンパク質だけではなく糖鎖をターゲットにした、これまでにないタイプの薬剤が癌治療薬として有効である可能性を示唆している。

## 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)

- Jianguo Gu, Tomoya Isaji, Qingsong Xu, Yoshinobu Kariya, Wei Gu, Tomohiko Fukuda, Yuguang Du: Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconj. J.* (査読あり) 29(8-9), 599-607, 2012. doi: 10.1007/s10719-012-9386-1.
- Yoshinobu Kariya\*, Jianguo Gu: N-glycosylation of beta4 integrin controls the adhesion and motility of keratinocytes. *PLoS One* (査読あり) 6(11), e27084, 2011. (\*corresponding author) doi:10.1371/journal.pone.0027084.

[学会発表] (計 4件)

- 苅谷慶喜、顧建国、ラミニン332上の Bisecting GlcNAc糖鎖はガレクチン3依存的ケラチノサイトの運動を抑制する、第44回日本結合組織学会学術大会、第59回マトリックス研究会合同学術集会(東京)、2012年6月8日(大高賞受賞記念講演)
- 苅谷慶喜、顧建国: β4インテグリンの機能発現におけるN-結合型糖鎖の役割、

第 84 回日本生化学会大会（京都）、2011 年 9 月 22-23 日（口頭発表およびポスター）

- (3) Yoshinobu Kariya, Jianguo Gu: N-glycosylation of beta4 integrin controls the adhesion and motility of keratinocytes. The 31<sup>st</sup> Naito conference. Gene Expression and Regulation II: Metabolites, Stress Response, Microdomains, and beyond. (Sapporo), September 14, 2011,
- (4) 苧谷慶喜、顧建国：β4 インテグリンの機能発現における N-結合型糖鎖の役割、第 43 回日本結合組織学会学術大会・第 58 回マトリックス研究会大会合同学術集会（大分）、2011 年 6 月 10 日（口頭発表）

〔図書〕（計 1 件）

- (1) Yoshinobu Kariya\*, Yukiko Kariya and Jianguo Gu: Nova Science Publishers, Inc., Laminin-332 and Integrins: Signaling Platform for Cell Adhesion and Migration and its Regulation by N-glycosylation. Laminins: Structure, Biological Activity and Role in Disease. (2013) p29-51(総ページ数 23 ページ)  
(\*corresponding author)

〔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

苧谷 慶喜 (KARIYA YOSHINOBU)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00458217

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：