

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590082

研究課題名(和文) 癌化に伴い過剰発現する細胞膜上分子の分子間相互作用と癌形質への影響

研究課題名(英文) Assessment of the influence of overexpressed-cell surface molecular complexes in cancer characteristics

研究代表者

小谷 典弘 (KOTANI, NORIHIRO)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90342782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞の癌化に依存して特定の細胞膜上分子が過剰発現することについて、これら分子の過剰発現が細胞膜上分子間相互作用(膜貫通タンパク質分子同士が細胞膜上で特異的に会合する現象)にどのような影響を与え、癌細胞の形質や表現型に関与していくかについて検討した。肺癌モデルマウスから採取した肺癌初代培養細胞を題材とし、申請者が開発した分子間相互作用解析法で過剰発現分子と生理的に相互作用する分子の同定および同定した分子会合体の確認と分子会合体発現細胞の作製の2実験を主に実施した。その結果、いくつかの肺癌細胞特異的な分子会合体の組み合わせ候補を同定し、それらの発現細胞の作製ができた。

研究成果の概要(英文)：Many plasma membrane-resident proteins collaborate with other molecules by molecular interactions in a variety of biological events. Herein, we have identified the molecular complexes (heterodimer complexes) expressed specifically in mouse primary lung cancer cells derived from EML4-ALK transgenic mouse as a mouse model of lung cancer. We also focused on the molecular complexes consist of overexpressed-cell surface molecules to assess whether these complexes give rise to cancer progression.

We found the expression of some cell surface molecules was up-regulated, and these overexpressed molecules formed the complexes with several cell surface molecules (alpha and beta integrin etc.). To assess the influence of the complexes, we have developed the cells expressed these candidate overexpressed-cell surface molecular complexes.

研究分野：医歯薬学

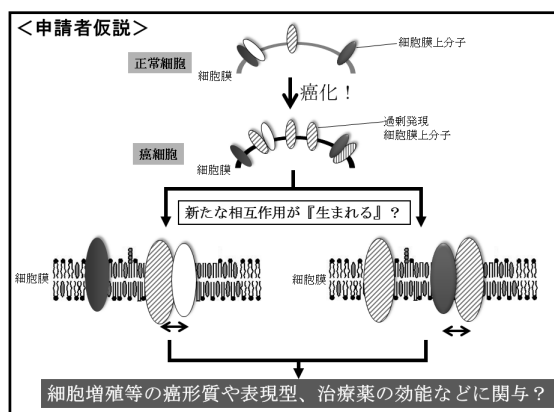
キーワード：膜タンパク質 分子間相互作用 分子会合体

## 1. 研究開始当初の背景

1972年、Singer と Nicolson は動物細胞膜が脂質二重層から成り、その上には各種受容体など細胞機能にとって重要な役割を果たしている細胞膜上分子が多数存在すること、同時にこれら細胞膜上分子は脂質二重層の流動に伴って膜上で常にダイナミックに運動していることを提唱した (Singer, S.J., Nicolson, G.L.: *Science* 175: 720-731(1972))。1990年代に入って細胞膜上分子の運動についての研究が進められるようになり、特定の細胞膜上分子同士が非常に短い一定時間内に膜上で会合する「細胞膜上分子間相互作用」が確認され、細胞内シグナル伝達に極めて重要であることが明らかとなってきた。このような学術的な背景の中、研究代表者らは全く新規で実用的な細胞膜上分子間相互作用解析法の開発に成功した (Kotani N. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2008) 105:7405-9、特許出願済 特願2007-017667)。本法は細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法と呼ばれ、Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) と名付けた反応を利用して行われる。研究代表者らは実際に生化学的可視化法を用いて細胞膜上機能分子の細胞膜上分子間相互作用について解析してきた。本解析法は特別な装置を必要とせず、簡便に生理的条件下において相互作用した細胞膜上分子を生化学的解析により網羅的に同定できるため、今後細胞生物学を中心とした様々な分野の発展に寄与することが見込まれている。

本解析法は現在国内外で用いられている既存法にない特徴 (簡便に生理的条件下において相互作用した細胞膜上分子を生化学的に解析できる) を持っているため、今後生化学や細胞生物学を中心とした様々な分野の発展に寄与できると予想している。これまで

に申請者は EMARS 法を用いて、B 細胞リンパ腫細胞における CD20 抗原の分子間相互作用 (2010-2011 年度 科研費 若手 B 採用) や細胞接着分子インテグリンの分子間相互作用 (Yamashita R, Kotani N. et al. *J Biochem*, 149:347-355 (2011)) などを解析してきた。特に、CD20 抗原の解析においては、CD20 抗原が FGFR3 と相互作用することを見出し、その相互作用が B 細胞リンパ腫治療用抗体医薬の効能に影響している可能性を示唆することができた (2011 年日本生化学会で発表)。一方、CD20 抗原は B 細胞リンパ腫細胞膜上に過剰発現し、細胞増殖などの細胞機能にも関与していることが示唆されている。申請者は研究を進めていく過程で、癌細胞膜上に過剰発現している分子により、正常細胞では起こらない特別な細胞膜上分子間相互作用が惹起され、細胞増殖などの表現型や治療薬の効能などに影響を及ぼしているのではないかと仮説を立てた (下説明図参照)。



## 2. 研究の目的

癌細胞において、細胞膜上分子間相互作用という現象が実際にシグナル経路の制御などに関与しているか、また発癌メカニズムや癌形質・表現型に影響しているかはほとんど分かっていない。従って、本研究では東京大学医学系研究科の間野博行教授らが開発した肺がんモデルマウス (Soda M. et

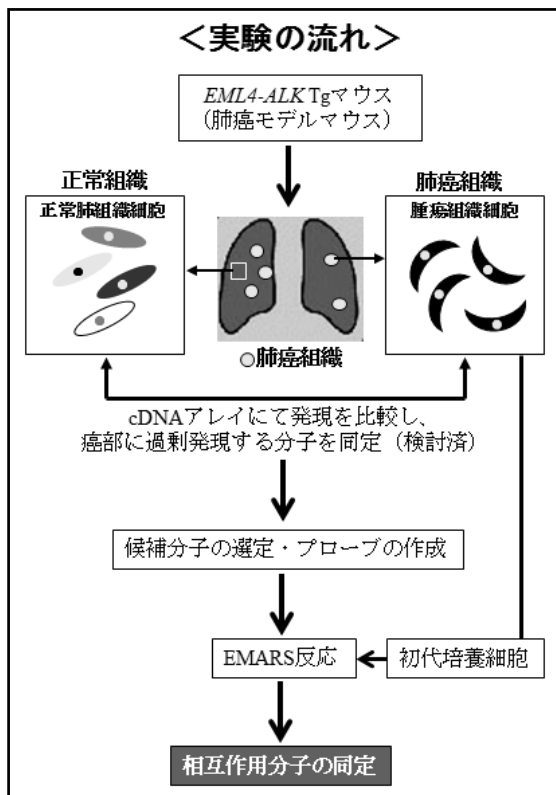
al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:19893-19897 (2008) から採取した肺がん初代培養細胞を用いてこれらの関係について明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

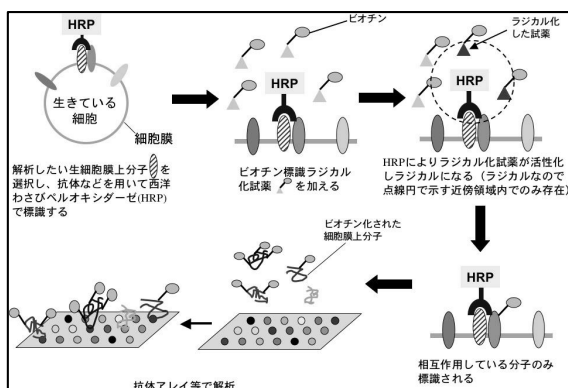
<平成24 - 26年度>

#### 【肺癌初代培養細胞における過剰発現分子と相互作用する分子の同定】

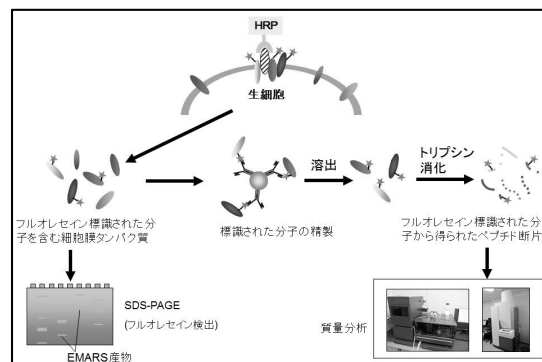
前述の肺がんモデルマウス組織から得た初代培養細胞（申請者所属研究室でほぼ採取・培養法が確立している）を用いて、以下の手順で実験を遂行した。（下説明図<実験の流れ>参照）。



研究代表者らが開発した EMARS 反応については、下図の手順で実験を遂行した。



申請者が所属する研究室では、すでに本モデルマウスの癌部・非癌部肺組織を用いた cDNA アレイ実験を行っており、癌部で非癌部より10倍以上過剰発現している分子を167個同定している。この中から、膜タンパク質で非癌部との発現差が大きいものを検索し、上位に来た分子から順番にモデルマウス肺組織の切片染色により、タンパク質レベルで本当に癌部に発現が高いか確認し、過剰発現の候補分子とした。過剰発現候補分子に対する抗体を入手し、その Fab もしくは還元型抗体を作製し、HRP を標識した (Dojindo 社標識セットを用いる)。標識された相互作用分子は、還元アルキル化し、トリプシン消化によりペプチド化し、C18 カラムを装着した nano-LC により分画した後、LC-MALDI によりショットガン解析した (Jiang S, Kotani N et al. *Proteomics*) (下図参照)。



<平成26 - 27年度>

#### 【分子会合体発現細胞の作製】

次に、これら分子会合体のうち2分子会合体 (heterodimer) について、癌形質との関連の解析および2分子会合体の存在を検出するための2分子会合体認識抗体の作製を行うため、2つの分子の共発現細胞株の作製を行った。HEK293細胞を用いて通常の発現ベクターおよびレンチウイルスベクターによる発現実験を実施した。

#### 4. 研究成果

<平成24 - 26年度>

##### 【肺癌初代培養細胞における過剰発現分子と相互作用する分子の同定】

(1) *EML4-ALK* 肺癌モデルマウスの癌部・非癌部肺組織を用いた cDNA アレイ実験で判明している過剰発現分子のうち、発現が高い順に4つの分子に関して RT-PCR を用いて発現確認を行なった。その結果、*Gjb4*, *Claudin2*, *CHL1*, *MMP13* の4分子に関して明確な過剰発現を認めた。また、各抗体を用いた組織免疫染色実験を行なった結果、少なくとも *CHL1* 及び *Claudin2* の2分子がタンパク質レベルでも過剰発現していることが判明した。

(2) この2分子に関して EMARS プローブを作製するために、各分子に対する抗体を用いて還元型抗体を作製するための検討を行なった。このうち *CHL1* 抗体に関して、還元型抗体にしてもその活性を失わないことが確認できた。そこで、還元型 *CHL1* 抗体の HRP 標識体を作製し、抗体結合能を免疫染色にて確認したところ、活性を有していたので、これを *CHL1* の EMARS プローブとして用いることとした。

(3) 作製した EMARS プローブを肺がん初代培養細胞に処理し、fluorescein 標識 arylazide もしくは fluorescein 標識 tyramide 試薬を用いて EMARS 反応を行った。ウエスタンブロット法により、EMARS 反応がうまく行われているか判定した結果、*CHL1* 分子の相互作用分子が標識されていることが判明した。これら標識された分子を抗体カラムで精製し、LC-MALDI を用いた EMARS 反応標識産物プロテオーム解析法により解析した。その結果、インテグリン等の重要な膜タンパク質分子が *CHL1* と会合していることが示唆された。

<平成26 - 27年度>

##### 【分子会合体発現細胞の作製】

次に、これら2分子会合体 (*CHL1* との会合体) について、癌形質との関連の解析および2分子会合体の存在を検出するための2分子会合体認識抗体の作製を行うため、2つの分子の共発現細胞株の作製を行った。HEK293細胞に通常の発現ベクターにより *CHL1* および同定された分子の共発現を試みたが、どちらか1分子の発現は可能であるものの、効率的に2分子が共発現している細胞を得ることは出来なかった。そこで、レンチウイルスベクターによる発現実験に方針を変更して2分子共発現細胞株の取得を目指した。その結果、レンチウイルス感染後1週間程度は2分子が共発現した細胞が見られたが、培養を継続すると、どちらか1分子の発現が欠失 (原因不明) し、安定的な2分子共発現細胞は得られなかった。その後、2分子会合体のうち、一方はレンチウイルスを用いた発現系、もう一方は通常の発現ベクターによる発現を行った結果、各分子を発現させる順番等を最適化すると、2分子を発現した会合体発現細胞が作製しやすくなり、FACSsort による2分子共発現細胞のセレクションなどと組み合わせさせた結果、3種類の2分子会合体発現細胞を樹立することができた。

#### 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9件)

1: Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N, Honke K. Each GPI-anchored protein species forms a specific lipid raft depending on its GPI attachment signal. (査読有)  
*Glycoconj J.* 32(7):531-40 (2015).

2: Ohkawa Y, Momota H, Kato A, Hashimoto N, Tsuda Y, Kotani N, Honke K, Suzumura A, Furukawa K, Ohmi Y, Natsume A, Wakabayashi T, Furukawa K. Ganglioside GD3 Enhances Invasiveness of Gliomas by Forming a Complex with

- Platelet-derived Growth Factor Receptor and Yes Kinase. (査読有)  
*J Biol Chem.* 290(26):16043-58 (2015).
- 3: Kotani N, Honke K. EMARS (Enzyme-Mediated activation of Radical Sources) Methods for Molecular Interaction Analysis. (査読有)  
*GlycoPOD*, (<http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t234>) (2015).
- 4: Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N, Honke K. Expressed glycosylphosphatidylinositol-anchored horseradish peroxidase identifies co-clustering molecules in individual lipid raft domains. (査読有)  
*PLoS One.* 9(3):e93054 (2014).
- 5: Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N, Honke K. Segregation of lipid rafts revealed by the EMARS method using GPI-anchored HRP fusion proteins. (査読有)  
*Trends Glycosci. Glycotechnol.* 26 (149), 59-69 (2014).
- 6: Hashimoto N, Hamamura K, Kotani N, Furukawa K, Kaneko K, Honke K, Furukawa K. Proteomic analysis of ganglioside-associated membrane molecules: substantial basis for molecular clustering. (査読有)  
*Proteomics.* 12(21):3154-63 (2012).
- 7: Kotani N, Ishiura Y, Yamashita R, Ohnishi T, Honke K. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) associated with the CD20 antigen regulates the rituximab-induced proliferation inhibition in B-cell lymphoma cells. (査読有)  
*J Biol Chem.* 287(44):37109-18 (2012).
- 8: Honke K, Kotani N. Identification of Cell-Surface Molecular Interactions under Living Conditions by Using the Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) Method. (査読有)  
*Sensors*, 12(12), 16037-16045 (2012).
- 9: 本家孝一, 小谷典弘  
「生細胞膜上の分子間相互作用解析試薬「EMARS 試薬 Ar-Flu」の開発」(査読無)  
*バイオインダストリー*, 29(9):37-42 (2012).
- [学会発表](計 5 件)
- 1: Miyagawa-Yamaguchi A, Norihiro Kotani, and Koichi Honke  
Distinction of lipid rafts including different GPI-anchored protein species by the EMARS method  
MPI-RIKEN Symposium in Berlin, (ドイツ・ベルリン) (2016.4.17)
- 2: Kotani N, Ida Y, Shinozaki R, Seo M, Nakano T, Hashizume M, Yamaguchi A, Honke K, Murakoshi T.  
Physiological analysis of lipid raft molecules on mouse brain slices.  
*The 58th Annual meeting of Japanese society for neurochemistry*, Saitama, (2015.9.12).
- 3: Nakano T, Shinozaki R, Ida Y, Kotani N, Hashizume M, Murakoshi T.  
Acute hypoxia increases mitochondrial DNA gene expression and complex I and IV enzyme activity in mouse brain slices.  
*The 58th Annual meeting of Japanese society for neurochemistry*, Saitama, (2015.9.12).
- 4: 山口亜利沙, 小谷典弘, 本家孝一  
「EMARS法は各GPI-アンカータンパク質分子種が固有の脂質ラフトドメインを形成することを明らかにした」  
第 34 回日本糖質学会年会, 東京, (2015.8.1).
- 5: 本家孝一, 山口亜利沙, 小谷典弘  
「GPI-アンカー型 HRP 融合タンパク質がつくる脂質ラフトドメイン」  
シンポジウム, 「46-2S03p 構造の多様性をベースとした糖鎖機能の俯瞰的解説」  
第 86 回日本生化学会大会, 横浜, (2013.9.12).
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
小谷 典弘 (KOTANI NORIHIRO)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90342782
- (2) 連携研究者  
山口 亜利沙 (ARISA YAMAGUCHI)  
高知大学・学振 (PD) 研究員  
研究者番号: 90553157