

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430123

研究課題名(和文) ラミニン 5鎖による癌細胞の基底膜浸潤メカニズムの解明

研究課題名(英文) The roles of laminin alpha5 in tumor invasion

研究代表者

吉川 大和 (KIKKAWA, YAMATO)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20274227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラミニン 5鎖は 1鎖および 1鎖とヘテロ三量体を形成し、ラミニン-511として成体基底膜の主要な構成分子として存在している。ラミニン-511は、正常細胞を秩序よく基底膜へ接着させ組織を安定化させている。一方、癌細胞の基底膜浸潤では足場として利用されるが、そのメカニズムは十分に解明されていない。本研究では、ラミニン-511とその細胞接着に着目し、癌細胞による基底膜形成阻害、癌細胞の基底膜への接着および運動メカニズムにアプローチした。その結果、ラミニン-511の不足は基底膜形成を抑制すること、ラミニン-511への細胞接着を弱めながら細胞運動を促進する細胞内シグナルが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells stably anchor to basement membrane, whereas malignant tumors pass through it to achieve metastasis. Of basement membrane components, laminin-511 (alpha5, beta1, gamma1; LM-511) is a major isoform in many adult tissues. Several studies have shown that LM-511 promotes not only cell adhesion but also tumor cell migration. Thus, LM-511 can be viewed like two distinct molecules in normal vs. tumor cells. In this study, we focused on 1) the assembly of basement membrane containing LM-511 in tumor microenvironments and 2) the migration of tumor cells adhering to LM-511. The amino acid sequences active for endothelial cell tube formation were identified using synthetic peptides-derived from laminin alpha5 N-terminus. Our results also showed that endogenous LM-511 promotes the formation of cyst structure accompanying with basement membrane. Moreover, we found that the inside-out signal is involved in the transition from static to migratory cell behaviors on LM-511.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ラミニン 基底膜 細胞外マトリックス 癌 細胞接着 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

癌細胞と基底膜の相互作用についての研究は、基底膜の代替する物質としてマウス肉腫由来のマトリゲルが使用されてきた。しかしながら、このマトリゲルはラミニンにおいて成体組織で見られる基底膜と大きく異なっている。ラミニンは α 、 β 、 γ の3つの鎖からなるヘテロ三量体の蛋白質であり、細胞接着といった主な機能は α 鎖によって担われている。マトリゲルに含まれるラミニン-111は $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 鎖によって構成されているが、細胞接着の中心である $\alpha 1$ 鎖は胎児期を中心に発現するため、癌細胞がラミニン-111と相互作用することはまれである。このため、マトリゲル基底膜浸潤モデルは、必ずしも成体の基底膜浸潤を反映するものではなかった。実際に癌が生じる成体組織の基底膜では、ラミニン $\alpha 5$ 鎖を含むラミニン-511が主なラミニンであることが明らかになっている。しかしながら、ラミニン $\alpha 5$ 鎖が癌細胞の基底膜浸潤に関与する可能性が高いにもかかわらず、十分にアプローチされていなかった。

ラミニンの正常なヘテロ三量体は、自己会合し、基底膜の形成に関与していることが知られている。これまでに癌細胞が *in vitro* において、ラミニン $\alpha 5$ 鎖が単量体として分泌され、プロテアーゼの分解を受けやすいことを見出した。これらのことから、過剰な単量体ラミニン $\alpha 5$ 鎖が自己会合を介した基底膜形成を破綻させ、癌細胞が浸潤しやすい基底膜の綻びを生じさせている可能性が想定された(図1A)。また、ラミニン $\alpha 5$ 鎖と相互作用する受容体として、インテグリン、ディストログリカン、ルテランなどが知られている。なかでもルテランは、ラミニン $\alpha 5$ 鎖の特異的な受容体である。ルテランとインテグリンはラミニン $\alpha 5$ 鎖の同じLGドメインへ競合的に結合する(図1B; Kikkawa et al., J Biol Chem, 2007)。また、癌細胞におけるルテランの発現上昇を見出してきた(Kikkawa et al., Exp Cell Res, 2008)。さらに、ルテランのラミニン $\alpha 5$ 鎖に対する結合は細胞脱着に働き、癌細胞の運動を促進することを明らかにしてきた(図1C; Kikkawa et al., J Biol Chem, 2013)。これらの結果から、ルテランの発現上昇は細胞脱着を促進し、ラミニン $\alpha 5$ 鎖を含む基底膜へ向かって浸潤する方向性のある細胞運動を促進する可能性が示されていた。

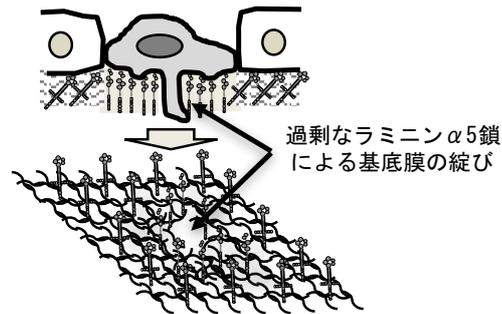
2. 研究の目的

基底膜は細胞外マトリックスからなる非常に薄い膜状の構造体であり、細胞を秩序よく接着させ組織を安定化させている。癌細胞はこの特殊な基底膜を破綻させて、細胞増殖や浸潤・転移に適した細胞外環境として利用するようになる。これまでマトリックスメタプロテアーゼによる基底膜の分解が注目されてきたが、これ以外にも癌細胞が過剰に分泌する基底膜分子が基底膜形成を破綻さ

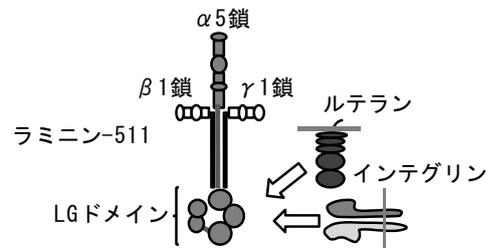
せている可能性が高い。また癌細胞も、破綻した基底膜へ向かって浸潤するために方向性のある細胞運動を亢進していると考えられる。本研究では、基底膜の主要分子であるラミニン $\alpha 5$ 鎖とその受容体ルテランに着目し、癌細胞による基底膜浸潤のメカニズムの解明および解明に向けた新しいツールの作製を目指した。

図1 研究開始当初の背景

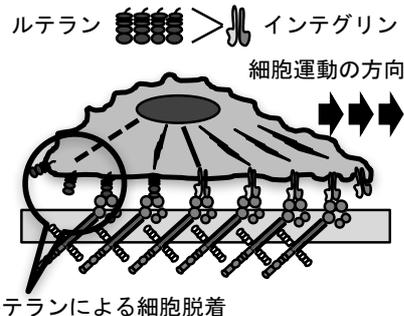
A. 癌細胞による基底膜形成の破綻



B. 受容体の競合的な結合



C. 癌化によるルテランの発現上昇および細胞脱着による細胞運動の促進



3. 研究の方法

(1) 三次元培養による Cyst 形成の誘導

イヌ尿細管上皮由来の MDCK 細胞をマトリゲル中で培養し、基底膜様構造を伴った cyst を形成させた。Cyst は、ゲルの中でパラホルムアルデヒド固定し、蛍光免疫染色を行った。また、Cyst 形成前の細胞と形成後の細胞から RNA を精製し、real time PCR に用いた。さらに、培養液中に組換えラミニン-511 および肝細胞増殖因子(HGF)を添加し、Cyst の形態およびラミニンの発現を定量化した。

(2) ラミニン $\alpha 5$ 鎖 N 末端の組換え蛋白質および合成ペプチドの作製

ラミニン $\alpha 5$ 鎖 N 末端は、short arm と呼

ばれ LN-LEa-L4a-LEb-L4b-LEc の 6 つのドメインからなっている。これに Fc タグを融合して、組み換えタンパク質を作製した。さらに C 末側からドメイン欠損させた組み換えタンパク質を作製し、細胞接着アッセイに用いて、機能ドメインの探索を行った。さらに機能ドメインのアミノ酸配列を網羅するように、12-15 残基のペプチドを合成した。ペプチドは Fmoc 固相合成法によって合成し、マスペクトロメトリーにより正しく合成されていることを確認した。

(3) 血管内皮細胞によるチューブ形成

ヒト臍帯由来の血管内皮細胞は、マトリゲル上で培養すると血管用のチューブを形成する。この培養系に、ラミニン $\alpha 5$ 鎖 N 末由来の合成ペプチドを添加し、チューブ形成に対する効果を Image J を用いて定量化した。

(4) 細胞接着アッセイ

ラミニン-511 を始めとする細胞外マトリックスおよび合成ペプチドを 96well プレートに吸着させ、BSA でブロッキングの後に細胞を播種した。そして、CO₂ インキュベーターで 1 時間静置し、接着した細胞をギムザ染色により染色した。そして顕微鏡下で接着した細胞をカウントし、定量化した。細胞接着の阻害実験では、播種するときに阻害抗体を添加した。

(5) 細胞運動アッセイ

ラミニン-511 をガラスボトムディッシュに吸着させ、BSA でブロッキングの後に細胞を播種した。抗体および生理活性物質は、細胞接着後に添加した。細胞運動の測定は、キーエンス BZ-8000 顕微鏡および TOKAIHIT の顕微鏡用培養装置を用いて細胞の動画を撮影し、ImageJ を用いて細胞運動を定量化した。

(6) ファージ抗体の単離

ファージ抗体ライブラリを用いて、組み換えルテランに対するバイオパニングを行い、特異的に結合するファージクローンを単離した。単離したファージ抗体を用いて結合阻害実験および細胞運動阻害実験を行った。

4. 研究成果

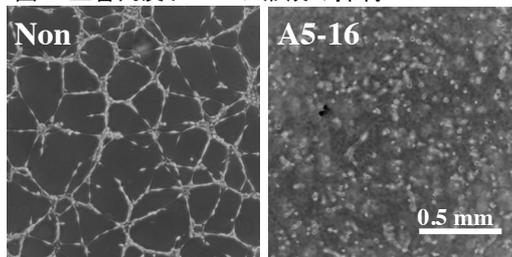
(1) $\alpha 5$ 鎖を含むラミニンによる基底膜形成

三次元培養法による上皮様組織形成を促し、培養系でより成体の基底膜に近い構造の作成を試みた。その結果、上皮様組織が形成されるにつれて、ラミニン $\alpha 5$ 鎖を含む成体の基底膜に近い構造体が形成されることを見出した。さらに、この三次元培養法による上皮様組織形成の過程に、 $\alpha 5$ 鎖を含む組換えラミニン-511 を添加すると基底膜の形成が促されると明らかとなった。このことは、ラミニン-511 が不足すると基底膜形成が破綻する可能性を示した。また、ラミニン-511 の受容体であるルテランは、プロテアーゼに

よって切断され細胞表面から放出される。この放出されたルテランは、ラミニン-511 に対する結合能を保持しており、細胞とラミニン-511 の相互作用を妨げていることが明らかとなった。放出されたルテランがラミニン-511 に結合することで、基底膜形成を抑制または破綻させることを示唆した。さらに、MDCK 細胞を肝細胞増殖因子 (HGF) で刺激したところ、ラミニン $\alpha 5$ 鎖の発現が有意に減少し、基底膜様構造が見られなくなった。このことは、ラミニン-511 が不足すると基底膜形成が破綻する可能性を示した。

ラミニン-511 の $\alpha 5$ 鎖 N 末端にある細胞接着および自己会合に関与するアミノ酸配列の同定を試みた。その結果、LN ドメインのアミノ酸配列に基づいたペプチド A5-16: LENGEIVVSLVNGR が、血管内皮細胞の接着に関与し、さらに *in vitro* において血管内皮細胞による管腔形成を抑制した(図 2)。管腔形成の抑制はラミニン-511 による自己会合の阻害を示唆した。

図 2 血管内皮チューブ形成の抑制

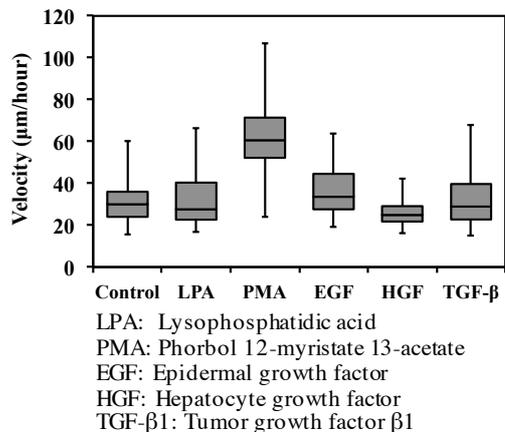


(2) ラミニン-511 に接着した細胞の運動を促進する走化性因子の探索および運動促進シグナルの解明

細胞運動を促進するとされる発癌物質および生理活性物質を用い、ラミニン-511 に接着した細胞の運動を評価した。その結果、発癌プロモーターであるホルボール-12-ミリスタート-13-アセタート (PMA) がラミニン-511 に接着したヒト肺癌細胞 A549 の運動を促進した(図 3)。さらに、PMA 刺激による A549 細胞の丸い形態への変化は、PMA によりラミニン-511 に対する細胞の接着が減少することによると明らかになった。PMA による癌細胞の運動促進により、細胞運動に関与する癌細胞の受容体やその細胞内のシグナル伝達にアプローチすることが可能になった。阻害抗体を用いて受容体を検討した結果、PMA 刺激を与えた A549 細胞のラミニン-511 に対する接着と運動の変化は、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ とルテランを介していると明らかになった。また、シグナル伝達を阻害する化合物を用いて、ラミニン-511 の PMA 刺激を与えた細胞運動を制御するシグナル伝達分子を検討したところ、Rho の下流を制御する Rho キナーゼ (ROCK) を阻害したとき、細胞運動が減少した。また、PMA 刺激後の ROCK 阻害剤の効果は、細胞の形態をコントロールの伸展した形態にまで変化した。これらのことから、PMA 刺激

を与えたときのラミニン-511 に接着した A549 細胞の運動は、Rho/ROCK 経路を介していることが明らかになった。

図3 細胞運動を促進する走化性因子の探索



(3) ルテランに対するファージ抗体の作製とその評価

ルテランの機能を解析する新しいツールとして、ルテランに対するファージ抗体の作製を行った。まず、肝細胞癌患者の末梢血由来の抗体ファージライブラリを構築し、ルテランに対する特異的な抗体の単離・解析を試みた。構築したライブラリは 10^8 以上の多様性を確保した。そして構築したライブラリを用いて、ルテランに対してバイオパンニングを行ったところ、抗原に対する濃縮が観察された。そしてクローン化後の ELISA による結合解析の結果、ルテランに高い特異性を持つクローンを単離した。そして、ルテランとラミニン $\alpha 5$ 鎖の結合アッセイにファージ抗体を加えて、結合を阻害するクローンがあることを見いだした。これまでの研究から、ルテランがラミニン $\alpha 5$ 鎖上での癌細胞の運動を促進することが明らかになっている。ルテランに対するファージ抗体は、その機能解明だけでなく、癌の転移・浸潤を抑制するような分子標的薬の作製に役立つものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① [Kikkawa Y](#), Sugawara Y, Harashima N, Fujii S, Ikari K, Kumai J, Katagiri F, Hozumi K, [Nomizu M](#). Identification of laminin alpha5 short arm peptides active for endothelial cell attachment and tube formation. *J Pept Sci*, in press (2017) doi: 10.1002/psc.2987. 査読あり
- ② Enomoto-Okawa Y, Maeda Y, Harashima N, Sugawara Y, Katagiri F, Hozumi K, Hui KM, [Nomizu M](#), Ito Y, [Kikkawa Y](#). An anti-human lutheran glycoprotein phage antibody inhibits cell migration on laminin-511: epitope mapping of the antibody. *PLoS One*. 12, e0167860 (2017) doi: 10.1371/journal.pone.0167860. 査読あり
- ③ [Kikkawa Y](#), Harashima N, Ikari K, Fujii S, Katagiri F, Hozumi K, [Nomizu M](#). Down-regulation of cell adhesion via rho-associated protein kinase (ROCK) pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. *Exp Cell Res*, 344, 76-85 (2016) doi: 10.1016/j.yexcr.2016.04.002. 査読あり
- ④ Yamada H, Mori S, Miyakawa T, Morikawa R, Katagiri F, Hozumi K, [Kikkawa Y](#), [Nomizu M](#), Takasu M. Structural study of cell attachment peptide derived from laminin by molecular dynamics simulation. *PLoS One*, 11, e0149474 (2016) doi: 10.1371/journal.pone.0149474. 査読あり
- ⑤ Sato T, Iwasaki Y, [Kikkawa Y](#), Fukagawa M. An efficacy of intensive vitamin D delivery to neointimal hyperplasia in recurrent vascular access stenosis. *J Vasc Access*, 17, 72-77 (2016) doi: 10.5301/jva.5000469. 査読あり
- ⑥ Muguruma K, Yakushiji F, Kawamata R, Akiyama D, Arima R, Shirasaka T, [Kikkawa Y](#), Taguchi A, Takayama K, Fukuhara T, Watabe T, Ito Y, Hayashi Y. Novel hybrid compound of a plinabulin prodrug with an IgG binding peptide for generating a tumor selective noncovalent-type antibody-drug conjugate. *Bioconjug Chem*, 27, 1606-1613 (2016) doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00149. 査読あり
- ⑦ Kumai J, Hozumi K, Yamada Y, Katagiri F, [Kikkawa Y](#), [Nomizu M](#). Effect of spacer length and type on the biological activity of peptide-polysaccharide matrices. *Biopolymers*, 106, 512-520 (2016) doi: 10.1002/bip.22785. 査読あり
- ⑧ Hozumi K, Nakamura K, Hori H, Miyagi M, Nagao R, Takasaki K, Katagiri F, [Kikkawa Y](#), [Nomizu M](#). Mixed Fibronectin-Derived Peptides Conjugated to a Chitosan Matrix Effectively Promotes Biological Activities through Integrins, alpha4beta1, alpha5beta1, alphavbeta3, and Syndecan. *Biores Open Access*. 5, 356-366 (2016) doi: 10.1089/biores.2016.0037. 査読あり
- ⑨ Fujimori C, Kumai J, Nakamura K, Gu Y, Katagiri F, Hozumi K, [Kikkawa Y](#), [Nomizu M](#).

- M. Biological activity of peptide-conjugated polyion complex matrices consisting of alginate and chitosan. *Biopolymers*, in press (2016) doi: 10.1002/bip.22983. 査読あり
- ⑩ Hozumi K, Fujimori C, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. Suppression of cell adhesion through specific integrin crosstalk on mixed peptide-polysaccharide matrices. *Biomaterials*. 37: 73-81 (2015) doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.005. 査読有り
- ⑪ 吉川大和、がん細胞の接着および運動における基底膜分子ラミニン-511 とその受容体 Lu/B-CAM の役割、*生化学* 87, 609-611 (2015)
URL: <https://seikagaku.jbsoc.or.jp/10.14952/SEIKAGAKU.2015.870609/data/index.pdf>. 査読あり
- ⑫ Katagiri F, Hara T, Yamada Y, Urushibata S, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M. Biological activities of the homologous loop regions in the laminin alpha chain LG modules. *Biochemistry*. 53: 3699-3708 (2014) doi: 10.1021/bi5003822. 査読有り
- ⑬ Katagiri F, Takagi M, Nakamura M, Tanaka Y, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M. Screening of integrin-binding peptides in a laminin peptide library derived from the mouse laminin beta chain short arm regions. *Arch Biochem Biophys*. 550-551: 33-41 (2014) doi: 10.1016/j.abb.2014.04.008. 査読有り
- ⑭ Kikkawa Y, Miwa T, Tanimizu N, Kadoya Y, Ogawa T, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Soluble Lutheran/basal cell adhesion molecule is detectable in plasma of hepatocellular carcinoma patients and modulates cellular interaction with laminin-511 in vitro. *Exp Cell Res*. 328: 197-206 (2014) doi: 10.1016/j.yexcr.2014.07.012. 査読有り
- [学会発表] (計 68 件)
- ① 吉川大和、保住建太郎、片桐文彦、野水基義、基底膜の機能解明からバイオマテリアルの創製へ、第 48 回日本結合組織学会学術大会、2016 年 6 月 24-25 日於ける長崎
- ② 原島望、碓和樹、藤井翔悟、片桐文彦、保住建太郎、野水基義、吉川大和、ROCK 経路を介したラミニン-511 に対する細胞接着の抑制と細胞運動の促進、第 48 回日本結合組織学会学術大会、2016 年 6 月 24-25 日於ける長崎
- ③ 吉川大和、細胞-基質間における基底膜分子ラミニン-511 とその受容体ルテランの役割、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016 年 6 月 15-17 日於ける京都
- ④ Kikkawa Y, Harashima N, Ikari K, Fujii S, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M. Down-regulation of cell adhesion via rho-associated protein kinase (ROCK) pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting, 2016 年 11 月 13-16 日於ける St. Petersburg (USA)
- ⑤ Sugawara Y, Harashima N, Fujii S, Ikari K, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Kikkawa Y. Identification of laminin $\alpha 5$ short arm peptides active for endothelial cell attachment and tube formation. 2016 Annual Meeting the American Society for Cell Biology, 2016 年 12 月 3-7 日於ける San Francisco (USA)
- ⑥ Harashima N, Sugawara Y, Ikari K, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Kikkawa Y. The involvement of Lu/B-CAM spectrin binding motif in cell migration on LM-511. 2016 Annual Meeting the American Society for Cell Biology, 2016 年 12 月 3-7 日於ける San Francisco (USA)
- ⑦ 藤井翔吾、碓和樹、片桐文彦、保住建太郎、野水基義、吉川大和、ラミニン-511 に対する細胞接着の抑制と細胞運動の促進、第 47 回日本結合組織学会学術大会、2015 年 5 月 15-16 日、コクヨホール、東京
- ⑧ Kikkawa Y, Harashima N, Ikari K, Fujii S, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M. Tumor cell migration on laminin-511 is promoted through the receptor binding reduced with PMA. 9th International Conference on Proteoglycans and 10th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 23-27 Aug, 2015, Ewha Womans University, Seoul, Korea
- ⑨ 原島望、藤井翔悟、碓和樹、片桐文彦、保住建太郎、野水基義、吉川大和、ラミニン-511 上における癌細胞の運動促進メカニズム、第三回 MatriCell フォーラム、2015 年 9 月 12-13 日、三重大学、津
- ⑩ Fujii S, Harashima N, Ikari K, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Kikkawa Y. Identification of active sequences in N-terminal region of laminin $\alpha 5$ involving endothelial cell attachment. 2015 Annual Meeting the American Society for Cell Biology, 12-16 Dec, 2015, San Diego Convention Center, San Diego (USA)
- ⑪ 吉川大和、榎元友里恵、小川貴穂、片桐文彦、保住建太郎、Hui Kam Man、野水基義、伊東祐二、ラミニン $\alpha 5$ 鎖受容体ルテラン (Lu/B-CAM) に対するファージ抗体の作製

とその評価、第46回日本結合組織学会学術大会 第61回マトリックス研究会大会合同学術集会、2014年6月6-7日、ウインク愛知、名古屋市

- ⑫ 吉川大和、榎元友里恵、小川貴穂、片桐文彦、保住建太郎、Hui Kam Man、野水基義、伊東祐二、肝細胞癌由来 scFv フォージ抗体ライブラリを用いたルテラン特異的抗体の単離、第21回肝細胞研究会、2014年6月27-28日、東京医科歯科大学、東京
- ⑬ Kikkawa, Y, Miwa, T, Tanimizu, N, Kadoya, Y, Ogawa, T, Katagiri, F, Hozumi, K, Nomizu, M, Mizuguchi, T, Hirata, K, Mitaka, T. Soluble Lutheran glycoprotein/basal cell adhesion molecule is detectable in plasma of hepatocellular carcinoma patients and modulates cellular interaction with laminin-511 in vitro. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2014, 12-15 Oct. 2014, Marriott Key center, Cleveland (USA)
- ⑭ Kikkawa, Y, Enomoto, Y, Ikari, K, Katagiri, F, Hozumi, K, Nomizu, M, Ito, Y. An anti-human Lutheran phage antibody isolated from hepatocellular carcinoma phage library inhibits cell migration on laminin-511. The 2014 ascb/ifcb meeting, 6-10 Dec. 2014, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia (USA)

〔図書〕(計1件)

- ① Kikkawa Y and Nishimune H. Laminin beta 2. Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition. in press (2016) 査読あり

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：抗癌剤
発明者：吉川大和、福原武志、野水基義、伊東祐二
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-230926
出願年月日：平成 27 年 11 月 26 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等
東京薬科大学 薬学部 病態生化学
<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/byotaiseika/>
吉川大和-研究者-researchmap
<http://researchmap.jp/yamatokikkawa/>

吉川大和-研究者-researchgate
https://www.researchgate.net/profile/Yamato_Kikkawa

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 大和 (KIKKAWA, Yamato)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：20274227

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

野水 基義 (NOMIZU, Motoyoshi)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00311522

(4) 研究協力者

該当なし