

対象研究テーマ：ケモカインを分子標的とした治療法の開発

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：nicked β 2-Glycoprotein I の腫瘍転移抑制薬への応用

研究代表者：北海道大学遺伝子病制御研究所 特任教授 宮崎忠昭

研究成果の概要：

β 2-Glycoprotein I (β 2GPI)は、主に凝固線溶系における制御因子として解析されてきた。この分子は plasmin 産生が亢進している状態下では nicked form として存在する。我々はこれまでに β 2GPI および nicked β 2GPI が血管新生抑制物質であることを報告した。本研究では VEGFR2 の下流に存在し、腫瘍転移に重要な細胞内シグナル伝達経路 GEP100-Arf6-AMAP1 に対する β 2GPI、nicked β 2GPI の制御能を評価し、腫瘍転移抑制分子としての機能を解析した。あわせて、これら分子の腫瘍細胞に対する直接的な作用を調べた。その結果、 β 2GPI および nicked β 2GPI は VEGF-A 存在下で血管内皮細胞の増殖や遊走を阻害する効果を有し、特に nicked β 2GPI は細胞間の透過性と VE カドヘリンエンドサイトーシスを強く抑制した。また、腫瘍細胞への直接的作用を検討した結果、 β 2GPI のみが細胞増殖と浸潤を阻害した。これらの結果から、 β 2GPI は抗血管新生作用および抗腫瘍増殖・転移効果を併せ持つことが示された。

研究分野：分子生物学

キーワード：血管新生、 β 2GPI

1. 研究開始当初の背景

腫瘍転移と血管の機能は密接に関係しており、高転移性を示す腫瘍の血管内皮細胞では低転移細胞に比べ細胞増殖因子や低酸素誘導因子などが高発現しており、血管新生能が高い事が明らかにされた。また癌の転移浸潤に関わる細胞内 GEP100-Arf6-AMAP1 シグナル経路が VEGFR2 の下流に存在し、この活性化により VE-cadherin の細胞内輸送や細胞透過性等が亢進することが示された。

我々はこれまでに β 2GPI とその plasmin 切断産物である nicked β 2GPI が血管新生抑制作用を有し、nicked β 2GPI が plasminogen の自己分解産物である angiostatinKring1-4,5 (AS4.5)と結合し、AS4.5 の血管内皮細胞の遊走増殖阻害効果や管腔形成抑制効果を制御する事を報告した (Nakagawa H., et al. Blood, 2009, Vol. 114, No. 12, pp. 2553-2559)。これらの β 2GPI および nicked β 2GPI の作用は腫瘍血管内皮細胞においても示されるものと考えられ、血栓症の病態形成に関与するのみならず腫瘍転移に関わる血管新生を制御する機能を有することが想定された。

2. 研究の目的

本研究では β 2GPI および nicked β 2GPI の

VEGF-A 存在下での血管新生制御作用を解析し、腫瘍転移における役割を明らかにするため血管内皮細胞間の透過性や細胞間接着に対する制御機能を調べる。また、腫瘍細胞への直接的な作用を検討し、血管新生を阻害する新規制癌剤としての応用の可能性を評価する事を目的とした。

3. 研究の方法

腫瘍転移に重要な VEGF-A による血管内皮細胞の透過性と VE カドヘリンエンドサイトーシスの亢進に対する β 2GPI および nicked β 2GPI の影響を検討した。 β 2GPI と腫瘍細胞との直接作用を検討する為、A549細胞、Hep3B細胞、MDA MB 453S 細胞、MDA MB 468LN 細胞を用いて、MTT 法による細胞増殖実験および細胞浸潤に対する作用を解析した。 β 2GPI 添加群のみ細胞形態が異なっていたため phalloidin 染色により解析した。

4. 研究成果

β 2GPI および nicked β 2GPI が VEGF-A 存在下で血管内皮細胞の増殖、遊走を有意に阻害する事を確認した。腫瘍転移には血管内皮細胞間の透過性の程度が関わるため、 β 2GPI および nicked β 2GPI による細胞間の透過性

に対する制御効果を検討した。これまでに、細胞間の接着は VEGF の存在下で Arf6 により抑制され、細胞間の透過性が亢進する事が報告されている。我々の実験の結果、 β 2GPI を添加することにより、FITC-dextran の細胞間透過は抑制された ($p < 0.05$)。nicked β 2GPI の添加は、より強く細胞透過性を抑制した ($p < 0.01$)。さらに VE カドヘリンエンドサイトーシスへの影響を検討した結果、 β 2GPI 添加群 ($p < 0.05$)、および nicked β 2GPI 添加群 ($p < 0.01$) においてエンドサイトーシスが有意に抑制された。これらの β 2GPI と nicked β 2GPI の作用は VEGF 非存在下では認められなかった。

これまでに β 2GPI による腫瘍細胞の増殖・浸潤制御作用は明らかになっていない。本研究では β 2GPI の腫瘍細胞に対するこれらの直接的な作用を検討する為、腫瘍細胞増殖実験および浸潤実験を行った。その結果、 β 2GPI および nicked β 2GPI は腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制した。しかし、血管内皮細胞に対する作用結果と異なり、nicked β 2GPI は腫瘍細胞の増殖・浸潤に抑制的に働くがその効果は弱く、逆に β 2GPI は強い抑制効果を示した。また、増殖実験において細胞の形態を鏡下で確認した所、 β 2GPI を添加した細胞では接着形態がコントロール細胞と異なっていた。従って β 2GPI が細胞骨格に何らかの影響を与えることが考えられたため、phalloidin 染色により F-アクチンの重合を調べた。その結果、腫瘍細胞増殖実験の結果と同様に、nicked β 2GPI 添加群はコントロール群と同程度の F-アクチンの重合を認めたが、 β 2GPI 添加群では、有意に F-アクチンの重合を阻害した。これらの結果から、 β 2GPI および nicked β 2GPI は異なる作用機序によって腫瘍転移に抑制的に働くことが示唆された。今後、 β 2GPI と nicked β 2GPI の血管内皮細胞および腫瘍細胞に対する作用点とその制御機構について詳細なメカニズムを明らかにする。

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 2 件)

1) Daisuke Fujikura, Masatoshi Ito, Satoko Chiba, Tanenobu Harada, Frank Perez, John C Rees, Toshimitsu Uede, Tadaaki Miyazaki: CLIPR-59 regulates TNF- α -induced apoptosis by controlling ubiquitination of RIP1. *Cell Death and Disease* (2012) 3, e264

2) Yasuko Nakagawa, Hiroshi Kataoka, Takashi Kurita, Hisako Nakagawa,

Shinsuke Yasuda, Tetsuya Horita, Tatsuya Atsumi, Takao Koike: Impaired expression of Act1 mRNA in B cells of patients with Sjögren's syndrome.

Japanese Journal of Clinical Immunology 01/2012; 35(1):75-80.

[学会発表] (計 3 件)

1) 中川 久子、保田 晋助、藤枝 雄一郎、堀田 哲也、渥美 達也、小池 隆夫: β 2-Glycoprotein I 379T/-フレームシフト変異と抗 β 2GPI 抗体の関連性 第 56 回日本リウマチ学会総会 2012

2) Yoichiro Fujioka, Masumi Tsuda, Tomoe Hattori, Junko Sasaki, Takehiro Sasaki, Tadaaki Miyazaki, Yusuke Ohba: The Ras-PI3K Signaling Pathway is Involved in the Uptake of Exogenous Factors into Cells 第 35 回日本分子生物学会年会 2012

3) 宮崎 忠昭: 腫瘍転移抑制薬開発を目指した TNF ファミリー分子及び beta2-glycoprotein I の機能解明 金沢大学がん進展制御研究所・北海道大学遺伝子病制御研究所ジョイントシンポジウム 2012

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北海道大学遺伝子病制御研究所・特任教授
宮崎忠昭

(2) 研究分担者

北海道大学遺伝子病制御研究所・
博士研究員 中川久子

(3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史