

がん細胞および正常表皮細胞が分泌するタンパク質の機能解析と応用

横浜市立大学 木原生物学研究所 宮崎 香

【目的と概要】

動物組織中の細胞の機能は、増殖因子、細胞接着分子、タンパク質分解酵素など、自己および周囲の細胞が分泌する多様なタンパク質分子によって調節されている。また、これらの分泌タンパク質は様々な生理現象や疾病に関与することから、創薬の標的分子、診断マーカー、医療器材など、いろいろな形で医療への応用性が期待されている。私たちはこれまで、がんの転移や増殖に関与する分泌タンパク質の作用を研究してきた。本研究ではその経験を生かして、細胞機能を調節する重要な分泌タンパク質を効果的に分析する技術を開発し、その成果を基礎および応用研究に役立てることを目的とした。これまでの研究成果の概要に加え、がん細胞が分泌するタンパク質の機能解析についても紹介する。

【研究成果の概要と今後の取り組み】

(1) がん細胞および表皮細胞が分泌するタンパク質の解析

共同研究者：安田知永・森山佳谷乃（(財)木原記念横浜生命科学振興財団）、岩松明彦（元・キリンビール(株)）、水谷悟（キリンビール(株)）、宮田智（(株)ファンケル）

培養ヒト細胞が分泌するタンパク質を効果的に調製し、それを二次元電気泳動法と質量分析法によって分離・同定する技術を確立した。特に診断や治療に役立つバイオマーカーの開発を目的として、本研究で確立した方法を用いてヒトがん細胞と正常表皮細胞が分泌するタンパク質を解析した（図1）。正常上皮細胞とがん細胞（乳がん、肺がん、膵がんなど）の比較から、正常あるいはがん細胞が特異的に分泌する106種類のタンパク質を同定した。この中で腫瘍マーカーとして有望な11種類を決定した（ポスター発表）。今後、がん患者の血清などを用いて、がんの診断への応用性を明らかにする予定である。

一方、皮膚表皮細胞の老化に伴って変動する皮膚老化マーカーとして25種類のタンパク質を同定した（特許出願；ポスター発表）。また、アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚ならびにヒトの皮膚のタンパク質の分析から、アトピー性皮膚炎マーカーとして14種類のタンパク質を同定した（特許出願予定）。これらはそれぞれ皮膚の健康状態と老化度の判定や、アトピー性皮膚炎の症状の診断に利用することが可能と思われる。今後それらの実用化に向けての技術開発が必要である。

(2) 細胞接着分子ラミニン5及び6の機能解析と応用

共同研究者：苅谷慶喜・坪田芳明（元・(財)木原記念横浜生命科学振興財団）、石塚保行（(株)エーシーバイオテクノロジーズ）

動物組織は多数の細胞とその間を埋める細胞外マトリックス（extracellular matrix; ECM）とよばれる線維状または網目状の構造体から成り立っている。ラミニンは上皮細胞や血管内皮細胞などを支える薄いシート状の膜（基底膜）を構成する重要なECM成分であり、細胞を基底膜に接着固定させる

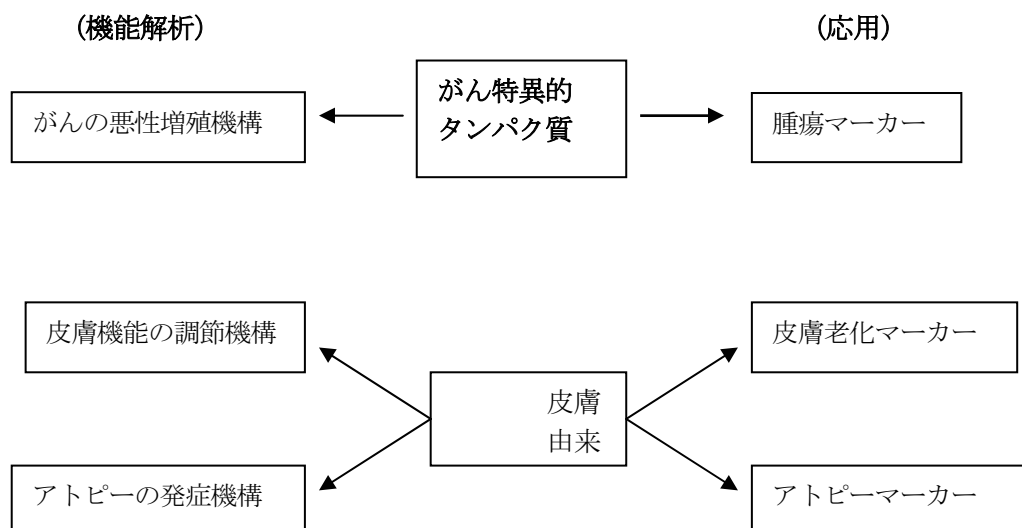


図 1. 分泌タンパク質の機能解析と応用

とともに、それらの細胞の移動、増殖、分化、細胞死などを調節している (図 2)。ラミニンは α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖からなる三量体タンパク質であり、異なる鎖の組み合わせによって 15 種類以上の分子種が存在すると考えられている (図 3)。私たちは過去に、ラミニン 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) が細胞の接着と運動を強く促進する特殊なラミニン分子であることを明らかにした。ラミニンは分子量 50-80 万の巨大な複合タンパク質であるため純粋な形で調製するのが困難であり、それらの機能の解析は非常に遅れている。そこで、本研究ではラミニン 5 および関連分子の効果的な発現系を確立し、それらの機能解析と応用法を確立することを目標とした。

ヒト腎臓由来上皮細胞株 HEK293 細胞にラミニン $\alpha 3A$ または $\alpha 3B$ 鎖、 $\beta 3$ または $\beta 1$ 鎖、および $\gamma 2$ または $\gamma 1$ 鎖の cDNA を導入して、ラミニン 5 と関連分子の発現系を作製した。その結果、ヒト組換え型ラミニン 5 (または 5A)、ラミニン 5B ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$)、ラミニン 6 ($\alpha 3\beta 1\gamma 1$)、およびそれらの変異体を効果的に発現させ、精製する系を確立した (図 3) (特許出願)。本研究ではこれらの系を用いて、これらラミニン分子の生理活性、機能ドメイン、活性調節機構などを調べた。その結果、ラミニン 5/5B/6 はいずれもインテグリン $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ に結合するがその生理活性は互いに異なることが明らかになった (図 2)。ラミニン 5 はラミニン 6 や他の多くのラミニンに比べて高い細胞接着活性と細胞運動活性を示すが、ラミニン 5B はさらに高い細胞運動活性を示した。ラミニン 5 とラミニン 5B は細胞接着に加えて、細胞増殖や神経突起の伸展も促進する。これらの活性から、ラミニン 5/5B を種々の細胞の培養補助剤および培養基材として応用することが可能である (図 4)。一方、変異体を用いた解析から、 $\alpha 3$ 鎖の LG3 ドメインにインテグリン結合部位が存在することを明らかにした。さらに、ラミニン 5 が $\alpha 3$ 鎖の LG ドメイン内、 $\beta 3$ 鎖と $\gamma 2$ 鎖の N 末端部位でそれぞれプロテアーゼの限定分解を受けると、ラミニン 5 の接着活性や運動促進活性が変化すること、これらの末端部位にはラミニン 5 が細胞外マトリックスに組み込まれるのに重要な領域が存在することなどが明らかになった。その他の結果も含め、ラミニン 5 による細胞の接着と移動の調節機構の概要、がんの浸潤・転移におけるラミニン 5 の役割、などを明らかにすることができた。

ラミニン 5 は、現在注目されている再生医療分野への応用が期待できる。骨髄の間葉系幹細胞は骨、

軟骨、脂肪、筋肉などの細胞へ分化する能力をもっており、怪我、変形性関節症、骨粗しょう症などの再生医療への応用が最も期待されている幹細胞の一種である。そこで、ラミニン5の間葉系幹細胞への作用を調べた。その結果、ラミニン5 (5A および 5B) がこの間葉系幹細胞の分化能を維持したままでその増殖を促進することを見出した (特許出願)。このラミニン5の増殖促進活性を、間葉系幹細胞を血清含有培地中あるいは無血清培地中で効率よく増殖させるために利用することができる (図4)。

今後は、組織修復剤など生体内でのラミニン5の応用性も検討する予定である。

(3) がん細胞が分泌するタンパク質の機能解析

がん細胞が分泌する多数の分子の中で、特に卵巣がん細胞で高い発現が見られたアンジオモジュリン (AGM/IGFBP-rP1) に注目してその機能を調べた。AGMは1994年にヒト膀胱がん細胞EJ-1が分泌する細胞接着性の糖蛋白質として私たちが初めて同定した。AGMはIGF結合タンパク質様構造をもち、弱いIGF/insulin結合活性を示すことからIGFBP-rP1とも呼ばれている。これまでに、AGMは*in vitro*で増殖促進活性を示すが、*in vivo*では腫瘍増殖を抑制することが報告されている。本研究において、AGMをヒト大腸がん細胞株DLD-1に強制発現させ、ヌードマウスの腹腔内に移植すると、腫瘍増殖は対照細胞に比べて顕著に抑制された。一方、AGMを多量に発現するEJ-1細胞にsiRNAを導入してAGM遺伝子の発現を抑制すると、腫瘍増殖が著明に亢進することが明らかになった。さらに、AGMがマトリプターゼと呼ばれるセリンプロテアーゼにより限定分解され、そのIGF結合活性が消失することが判明した。これらの結果からAGMが腫瘍抑制因子として機能し、マトリプターゼはその作用を抑制する作用をもつと推測された。今後、これらの結果をがんの治療に役立てることを検討する。

【特許の出願】

- 皮膚基底膜賦活用組成物 (公開番号 2002-338460)
- ラミニン $\alpha 3$ 鎖の改変体 (公開番号 2003-093064)
- 皮膚基底膜賦活用組成物 (公開番号 2003-183121)
- ラミニン-6を含む、細胞接着活性及び/又は細胞運動活性調節用組成物 (公開番号 2003-212791)
- ラミニン 5B (公開番号 WO 2004/108927 A1) (よこはま TLO による出願)
- ラミニン 5 産生促進剤およびインテグリン $\alpha 6\beta 4$ 産生促進剤を含む組成物 (公開番号 2003-226655)
- 表皮の扁平化を予防、防止、改善する皮膚老化防止用組成物 (公開番号 2004-91397)
- I型コラーゲン及び/又はエラスチン産生促進用組成物 (公開番号 2003-083943)
- I型コラーゲン及び/又はエラスチン産生促進用組成物 (PCT 出願)
- ラミニン 5 を利用した間葉系幹細胞の培養技術 (出願番号 2005-240814)
- 皮膚老化マーカーとその利用技術 (出願番号 2005-240820)
- I型コラーゲン産生促進用組成物 (出願番号 2005-283271)
- 異常タンパク質除去用組成物 (出願番号 2005-289491)
- アトピー性皮膚炎マーカーとその利用技術 (出願番号 2005-306498)

【2004年の主な成果】

- (1) **Koshikawa, N., Miyazaki, K., et al.: Proteolytic processing of laminin-5 by MT1-MMP in tissues and its effects on epithelial morphology. FASEB J., 18: 364-366, 2004.**
- (2) Kariya, Y. and Miyazaki, K.: The basement membrane protein laminin-5 acts as a soluble cell motility factor. *Exp. Cell Res.*, 297: 508-520, 2004.
- (3) Kariya, Y., Yasuda, C., Miyazaki, K., et al.: Characterization of laminin-5B (alfa3Bbeta3 gamma 2)

and N-terminal proteolytic fragment of alfa3B chain: Promotion of cellular adhesion, migration and proliferation. J. Biol. Chem., 279: 24774-24784, 2004.

- (4) Ogawa, T., Kariya, Y., Miyazaki, K., et al.: Regulation of Biological Activity of Laminin-5 by Proteolytic Processing of gamma2 Chain., J. Cell. Biochem., 92: 701-714, 2004.
- (5) Jin, X., Miyazaki, K., et al.: Production of Soluble Matritase by Human Cancer Cell lines and Cell Surface Activation of its Zymogen by Trypsin. J. Cell. Biochem., 95:632-647, 2005.
- (6) Tsubota, Y., Yasuda, C., Kariya, Y., Miyazaki, K., et al.: Regulation of biological activity and matrix assembly of laminin-5 by COOH-terminal, LG4-5 domain of alfa3 chain. J. Biol. Chem., 280 : 14370-14377, 2005.
- (7) Paret, C., Miyazaki, K., et al.: Ly6 family member C4.4A binds laminins 1 and 5, associates with galectin-3 and supports cell migration. Int. J. Cancer, in press.
- (8) Hata, D., Miyazaki, K., et al.: Nephrotic syndrome and aberrant expression of laminin isoforms in glomerular basement membranes in an infant with Herlitz junctional epidermolysis bullosa, Pediatrics, in press.
- (9) Hashimoto, J., Miyazaki, K., et al.: Laminin-5 suppresses chondrogenic differentiation of murine teratocarcinoma cell line ATDC5. Exp. Cell. Res., in press.
- (10) Nakashima, Y., Kariya, Y., Yasuda, C., and Miyazaki, K: Regulation of cell adhesion and type VII collagen binding by beta3 chain short arm of laminin-5: effect of its proteolytic cleavage. J. Biochem., in press.

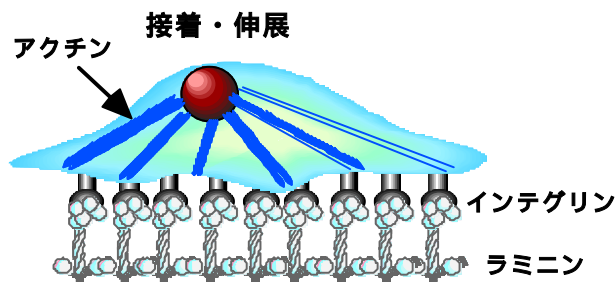


図2 細胞の接着および伸展

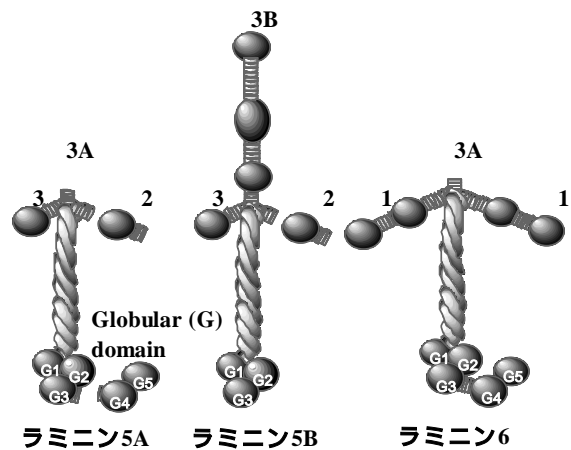


図3 ラミニン5A, 5Bおよび6の構造

細胞培養（特に初代培養や幹細胞培養）

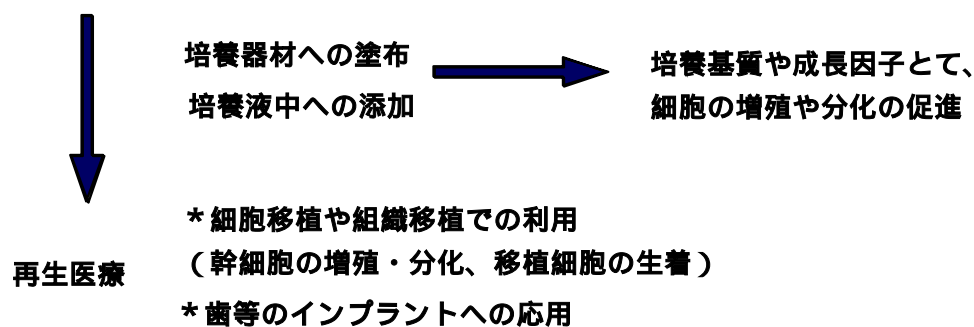


図4. 組み換えラミニン5/6の応用