



がん細胞転移を抑制する新たな細胞接着制御メカニズムを解明

研究成果のポイント

- ・ 細胞接着レセプター $\alpha 4$ インテグリンのスプライシングバリエント $\alpha 4B$ を同定した。
- ・ $\alpha 4$ インテグリン発現組織に $\alpha 4B$ も発現し、ともに炎症組織で高発現していた。
- ・ $\alpha 4B$ 自身の $\alpha 4$ インテグリンの細胞外マトリックス成分への結合は部分的であるが、 $\alpha 4$ インテグリンと共発現すると $\alpha 4$ インテグリンの細胞外マトリックス成分への結合を阻害した。
- ・ $\alpha 4B$ は $\alpha 4$ インテグリンの関与が知られるメラノーマがん細胞転移を抑制した。
- ・ $\alpha 4$ インテグリンと $\alpha 4B$ の相互作用の解明から新規抗がん剤開発が期待される。

研究成果の概要

細胞接着レセプター、インテグリンは種々の細胞外マトリックスとの細胞接着反応に関わる代表的な細胞膜貫通タンパク質ファミリーとして知られています。インテグリンの機能異常は、がんや炎症性疾患等、多くの疾患の発症や増悪化に関与することから医薬標的としても注目されている分子群です。

今回、私たちは、 $\alpha 4$ インテグリンのスプライシングバリエント $\alpha 4B$ を発見しました。 $\alpha 4B$ は $\alpha 4$ インテグリンの内因性インヒビターとして働き、 $\alpha 4$ インテグリンの細胞接着反応や $\alpha 4$ インテグリンの関与するがん細胞転移を抑制することがわかりました。 $\alpha 4$ インテグリンと $\alpha 4B$ の相互作用の詳細を理解することにより、インテグリン機能を人為的に操作できれば、がんの新しい薬の開発に繋がります。

本研究は生物学分野で権威ある雑誌「The Journal of Biological Chemistry」の Papers in press で 4 月 22 日に公表されました。

論文発表の概要

研究論文名 : The novel $\alpha 4B$ murine $\alpha 4$ integrin splicing variant inhibits $\alpha 4$ -dependent cell adhesion (新規マウス $\alpha 4$ インテグリンのスプライシングバリエント $\alpha 4B$ は $\alpha 4$ インテグリン依存的細胞接着を抑制する)

著者 : 紅露ひとみ, 今重之, 松本尚樹, 宮下友恵, 角地彩花, 安次富 大, 齋藤浩大, 中鶴拓也, 硯澄仁, 室本竜太, 松田 正 (北海道大学大学院薬学研究院)

公表雑誌 : The Journal of Biological Chemistry (<http://www.jbc.org/>)

公表日 : 米国東部時間 2014 年 4 月 22 日 Papers in press に公表

研究成果の概要

(背景)

細胞接着レセプターであるインテグリンは、 α 鎖と β 鎖の2つのポリペプチド鎖から成る細胞膜貫通型タンパク質ファミリーを形成し、リガンドである細胞外マトリックス成分や細胞表面成分と結合することにより、細胞接着反応を担っています。インテグリンによる細胞接着反応は、胚発生や生体の恒常性維持には不可欠であり、創傷治癒や炎症応答、白血球遊走、がん転移など種々の病態形成やその進展に深く関わっています。インテグリン分子は、大きな細胞外領域と膜貫通領域、短い細胞内領域から成っており、細胞外領域はリガンドとの結合に必須ですが、細胞内領域も細胞接着反応において重要な役割を担っています(図1)。インテグリン分子は、リガンド結合による構造変化で低親和性から高親和性レセプターへの活性化が起ります。なかでも $\alpha 4$ インテグリンは、種々の白血球や腫瘍細胞表面に発現しており、フィブロネクチンRGDモチーフや血管接着分子VCAM-1、フィブロネクチンのCS1領域、血液凝固因子として知られるフォン・ヴィレブランド因子、オステオポンチンなどをリガンドとし、それらとの結合を介して細胞接着反応を担っています。また、 $\alpha 4$ インテグリンは、自己免疫疾患やがん転移への関与が知られており、マウスの自己免疫疾患やがん転移モデルで $\alpha 4$ インテグリンに対する特異的抗体による阻害効果も報告されています。

私たちは、本研究においてマウス $\alpha 4$ インテグリンの新規スプライシングバリエント $\alpha 4B$ を同定し、 $\alpha 4B$ が $\alpha 4$ インテグリンの機能やがん転移においてどのように働くかを検討しました。

(実験手法)

マウスメラノーマがん細胞株B16細胞cDNAより新規 $\alpha 4$ インテグリンのスプライシングバリエント $\alpha 4B$ を遺伝子クローニングし、配列決定を行いました。 $\alpha 4B$ 特異的なプライマーや抗体を作成し、それらを用いて $\alpha 4B$ と野生型 $\alpha 4$ インテグリンの種々の正常組織や炎症組織での発現の比較を行い解析しました。さらに $\alpha 4B$ 、野生型 $\alpha 4$ インテグリン単独及び両者を発現する細胞株を樹立し、それら細胞株の細胞外マトリックス成分(フィブロネクチン RGD モチーフや血管接着分子 VCAM-1、フィブロネクチンの CS1 領域、血液凝固因子として知られるフォン・ヴィレブランド因子、オステオポンチンなど)への細胞接着反応や細胞内シグナル伝達系への影響を解析しました。また、 $\alpha 4B$ 細胞内領域欠損変異体を構築し、 $\alpha 4B$ 細胞内領域欠損変異体の $\alpha 4B$ 、野生型 $\alpha 4$ インテグリンによる細胞外マトリックス成分への細胞接着反応に対する影響を解析しました。最後に $\alpha 4B$ の生体内での役割を調べるために、 $\alpha 4$ インテグリンの関与が知られているマウスメラノーマ B16 がん細胞転移モデルを用いて検討しました。B16細胞には内在性の $\alpha 4B$ および野生型 $\alpha 4$ インテグリンが発現しており、siRNAにより内在性 $\alpha 4B$ 発現を特異的に低下させてがん細胞転移能への影響を検討しました。

(研究成果)

マウスメラノーマがん細胞株B16細胞cDNAより新規 $\alpha 4$ インテグリンのスプライシングバリエント $\alpha 4B$ を同定しました(Genebank accession number: AB850880)。 $\alpha 4B$ は、野生型 $\alpha 4$ インテグリンと同一の細胞外領域と膜貫通領域を有しながら、細胞内領域は野生型 $\alpha 4$ インテグリンとは異なるわずか4アミノ酸KVILから成ることがわかりました。野生型 $\alpha 4$ インテグリンと $\alpha 4B$ のmRNA発現は、ともに脾臓やリンパ節など免疫系組織に認められ、野生型 $\alpha 4$ インテグリン発現細胞に $\alpha 4B$ も発現していることが示唆されました。また興味深いことに、両者のmRNAは炎症組織において高発現していることもわかりました。 $\alpha 4B$ 、野生型 $\alpha 4$ インテグリン単独及び両者を発現する細胞株を樹立し、それら細胞株の細胞外マトリックス成分(フィブロネクチン RGD モチーフや VCAM-1、フィブロネ

クチンの CS1 領域, ヴォン・ヴィレブランド因子, オステオポンチンなど)への細胞接着反応を解析すると, 野生型 $\alpha 4$ インテグリン発現細胞が VCAM-1, フィブロネクチンの CS1 領域, ヴォン・ヴィレブランド因子に結合するのに比べ, $\alpha 4B$ 発現細胞は VCAM-1 への結合しか観察されませんでした。さらに両者を発現した細胞株では, 野生型 $\alpha 4$ インテグリンによる細胞外マトリックス成分への結合が阻害されました。インテグリン活性化による細胞内シグナル伝達分子群の活性化を解析したところ, VCAM-1 による野生型 $\alpha 4$ インテグリン依存性の細胞内シグナルの活性化も $\alpha 4B$ 発現により阻害されることがわかりました。これらの結果は, $\alpha 4B$ が野生型 $\alpha 4$ インテグリンの働きを制御する内因性インビターである可能性を示唆しています。さらに, $\alpha 4B$ 細胞内領域欠損変異体では野生型 $\alpha 4$ インテグリンによる細胞外マトリックス成分への細胞接着反応阻害効果が観察されないことから, $\alpha 4B$ 細胞内領域が $\alpha 4B$ の機能に関与していることもわかりました。実際に $\alpha 4B$ の野生型 $\alpha 4$ インテグリン抑制効果がどのような生理的意義をもっているか, マウスメラノーマ B16 がん細胞肺転移モデルにおいて siRNA により内因性 $\alpha 4B$ 発現を低下させた B16 がん細胞を用いて検討したところ, $\alpha 4B$ 発現低下 B16 細胞ではコントロール B16 細胞に比べて有為に肺転移の亢進が観察されました。すなわち, $\alpha 4B$ は生体においてがん転移を抑制する分子であることがわかりました(図 2)。

(今後への期待)

本研究で同定された $\alpha 4B$ と野生型 $\alpha 4$ インテグリンとの機能的相互作用のさらなる解析は, がんの患者さんのための新しい薬の開発を行う際の新たな手掛かりとなると考えられます。

お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院薬学研究院 准教授 今 重之(こん しげゆき)

TEL: 011-706-3920 FAX: 011-706-4990 E-mail: kon@pharm.hokudai.ac.jp

所属・職・氏名：北海道大学大学院薬学研究院 教授 松田 正(まつだ ただし)

TEL: 011-706-3243 FAX: 011-706-4990 E-mail: tmatsuda@pharm.hokudai.ac.jp

ホームページ: <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/eisei/index.html>

【参考図】

図1 インテグリンレセプター蛋白ファミリーとその働き

インテグリンレセプターは多種の α 鎖, β 鎖からなるヘテロダイマーから成り, その組み合わせにより様々な細胞外マトリックス成分と結合することで細胞間接着, 細胞増殖や種々の細胞内シグナル伝達経路の活性化に関与しています

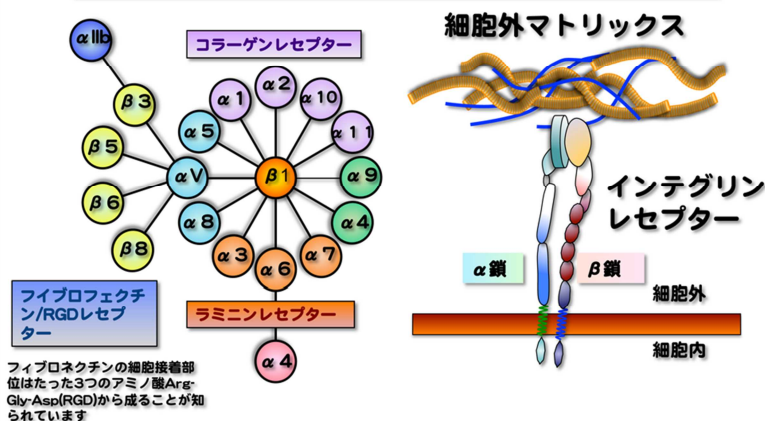
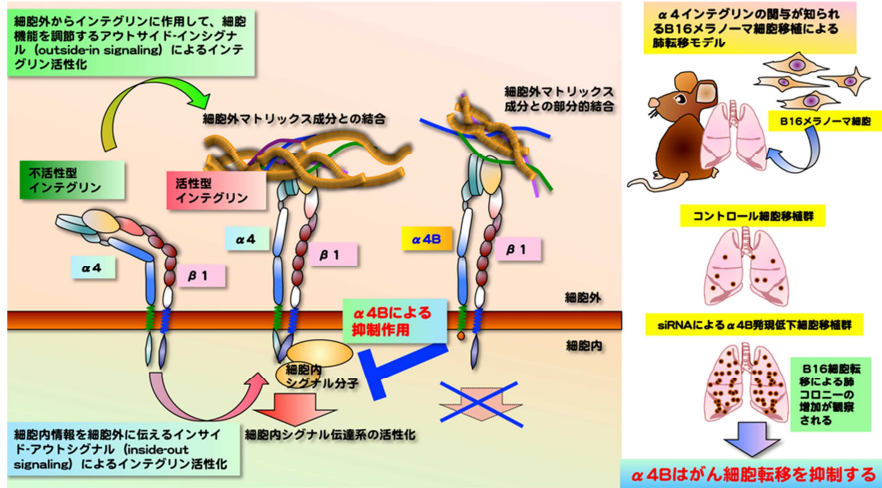


図2 内因性 $\alpha 4$ インテグリンインヒビター $\alpha 4B$ によるがん転移抑制作用



【用語解説】

siRNA

特殊な二本鎖構造をした短い RNA。適切な塩基配列のものを選択して用いると、特定の RNA の機能を抑制することができ、これを用いてさまざまな遺伝子の機能を解析できる。