

学位論文題名

フィブロネクチン由来の組換えペプチドによる
癌転移の抑制とその作用機序に関する研究

学位論文内容の要旨

癌の転移は種々の複雑な反応カスケードから成り立っている。このメカニズムが分子レベルで研究が進むにつれて、多くの細胞接着分子が接着という現象を通して癌転移に関与しており、その機能・調節が転移成立に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。これらの細胞接着分子は、本来は細胞の発生、分化、増殖、炎症、創傷治癒、血液凝固などの生命現象の調節、維持を司る分子である。その接着様式も蛋白質-蛋白質間、蛋白質-糖鎖間、あるいは糖鎖-糖鎖間と多種多様であることが明らかにされてきた。癌細胞は転移の各段階で癌細胞-癌細胞間、癌細胞-正常細胞(血管内皮細胞、血小板、免疫担当細胞など)間あるいは癌細胞-細胞外マトリックス(Extracellular matrix, ECM)構成蛋白質間に関わる接着分子の基質特異性や親和性あるいは量的な違いを巧みに使い分けながら遠隔臓器へ転移すると考えられる。

一方、接着分子を介した細胞の接着相互作用の機能を細胞接着性ペプチドによって調節、制御することにより、癌の転移・浸潤を抑制しようとする試みが以前からなされている。特に、フィブロネクチン分子中のGRGDS配列やラミニン分子の接着配列CDPGYIGSR(インテグリン分子群に属さない67kDaラミニンレセプターが認識する)を用いた研究が数多く行われている。本研究では図1に示す様なフィブロネクチン中に存在する細胞接着ドメイン(C-274)とヘパリン結合ドメイン(H-271)を融合させたキメラペプチド(CH-271)を用いて異なる機能性ドメインを融合させることにより、癌転移の抑制効果に及ぼす影響について検討を行った。また、このような接着ペプチドを用いた癌転移の治療(Anti-adhesion therapy)の応用の可能性を探るために、抗癌剤との併用効果とその作用機序についても検討した。

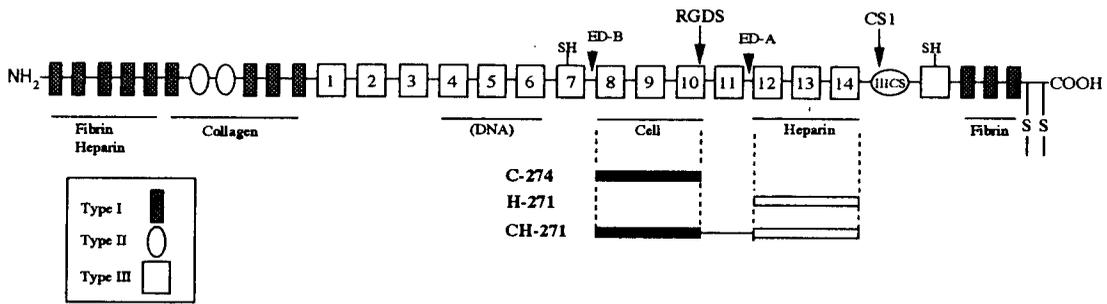


図1. フィブロネクチンの構造と組換えペプチド

細胞結合ドメインペプチド(C-274) : Pro1239-Asp1512, 3つのタイプIIIホモロジーユニットを含む。
 ヘパリン結合ドメインペプチド(H-271) : Aja1690-Thr1960。
 キメラペプチド(CH-271) : Pro1239-Ser1515-(Met)-H-271。

1. CH-271はフィブロネクチンと同様に細胞の移動、伸展および接着斑(Focal contact)の形成を誘導したが、C-274あるいはH-271ではこれらの誘導は観察されなかった。CH-271は細胞膜表面上のインテグリンおよびヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンによって、細胞接着ドメインおよびヘパリン結合ドメインをそれぞれ認識されていることが以下の実験より明らかとなった。(1) RGDSペプチド、抗 $\alpha 5$ あるいは $\alpha 3$ 抗体および抗 $\beta 1$ 抗体がCH-271によって誘導される癌細胞の移動を阻害した。(2) 癌細胞をheparatinase Iで前処理することにより培養初期段階での一時的な細胞移動の阻害が観察された。(3) CH-271のヘパリン結合ドメイン中の第13番目のタイプIIIモジュールを欠損させることにより、接着斑の形成を伴う細胞伸展および細胞移動の誘導が著しく減少あるいは失活することが示唆された。

また、CH-271のヘパリン結合ドメイン内の第13番目のタイプIIIモジュールが特に活性発現に重要な働きを持つことが示唆された。

2. CH-271はマウスメラノーマB16-BL6細胞の肺転移およびマウスリンパ腫L5178Y-ML25細胞の肝転移をC-274、H-271あるいは未処置群と比較して、有意な抑制および治療効果と延命効果を示した。また、CH-271の転移抑制効果の機序の1つとして、免疫機能低下マウスを用いたL5178Y-ML25細胞の肝転移実験においても転移抑制効果を示したことから、免疫系の細胞を介したものではなく、むしろL5178Y-ML25細胞の肝臓への着床の阻害によることが示された。

3. CH-271は癌細胞のフィブロネクチンおよびラミニン基質への接着を濃度依存的に阻害した。C-274はRGDS依存的に癌細胞のフィブロネクチンへの接着のみ抑制し、一方、H-271はラミニンへの接着のみを抑制した。同様にしてCH-271はフィブロネクチンおよびラミニンとの相互作用を介した癌細胞の移動・浸潤を濃度依存的に抑制した。

なお、本実験に用いた組換えペプチドは、癌細胞に対して直接的な増殖抑制活性および毒性は示さなかった。

4. L5178Y-ML25リンパ腫細胞由来の培養上清により、炎症部位で見られるような血管内皮細胞の活性化を引き起こし、癌細胞の血管内皮細胞への接着能を亢進させた。また、活性化内皮細胞に対するL5178Y-ML25細胞の接着能の亢進は、抗IL-1 β 抗体、抗ELAM-1抗体およびELAM-1のリガンドの一つであるシアリルLeX糖鎖の添加により濃度依存的に阻害された。以上の結果から、活性化内皮細胞への癌細胞の接着の増強は、癌細胞由来のIL-1 β により内皮細胞が活性化され、それに伴って内皮細胞上に発現が誘導されたELAM-1分子を介して引き起こされていることが示唆された。このような活性化内皮細胞への癌細胞の接着はCH-271およびH-271によって抑制されたが、C-274では抑制されなかった。

5. CH-271と抗癌剤との併用投与は、マウスメラノーマB16-BL6細胞の肺転移および、マウスリンパ腫L5178Y-ML25細胞の肝転移をそれぞれ単独投与群と比較して、より効果的に抑制した。L5178Y-ML25細胞を移植した担癌マウスに対して、CH-271と抗癌剤との併用投与は、各単独投与群と比較して有意な延命効果を示した。癌転移に対するCH-271および抗癌剤による癌転移抑制効果は併用投与により増強した。その作用機序は、CH-271は癌細胞のマトリジェルへの接着・浸潤の阻害、抗癌剤は直接的な癌細胞の増殖抑制に基づくことが示唆された。

以上のことから、フィブロネクチン由来の2つの機能性ドメインを融合したキメラペプチド(CH-271)は、その立体構造が元来のフィブロネクチン分子とは異なっている可能性があるにも関わらず、癌細胞表面上のインテグリン・レセプターおよびグリコサミノグリカンによって、CH-271中の細胞接着ドメインおよびヘパリン結合ドメインをそれぞれ認識され、細胞の機能発現を誘導しうるということが明かとなった。このことが、各ドメイン単独による癌転移抑制に比べ、より強い癌転移の抑制効果を示した要因の1つであるかも知れない。また、癌細胞の接着や運動を阻害するCH-271とは異なり、主として癌細胞の増殖抑制に働く抗癌剤との併用投与は、より効果的な癌転移抑制効果を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 菊 池 九 二 三

副 査 教 授 濟 木 育 夫

(富山医科薬科大学 和漢薬研究所)

学 位 論 文 題 名

フィブロネクチン由来の組換えペプチドによる 癌転移の抑制とその作用機序に関する研究

癌の転移は種々の複雑な反応カスケードから成り立っている。このメカニズムが分子レベルで研究が進むにつれて、多くの細胞接着分子が接着という現象を通して癌転移に関与しており、その機能・調節が転移成立に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。

一方、接着分子を介した細胞の接着相互作用の機能を細胞接着性ペプチドによって調節、制御することにより、癌の転移・浸潤を抑制しようとする試みが以前からなされている。特に、フィブロネクチン分子中の GRGDS 配列やラミニン分子の接着配列 CDPGYIGSR (インテグリン分子群に属さない67kDaラミニンレセプターが認識する) を用いた研究が数多くなされている。本研究ではフィブロネクチン中に存在する細胞接着ドメイン(C-274)とヘパリン結合ドメイン(H-271)を融合させたキメラペプチド(CH-271)を用いて異なる機能性ドメインを融合させることにより、癌転移の抑制効果に及ぼす影響について検討を行った。また、このような接着ペプチドを用いた癌転移の治療 (Anti-adhesion therapy)の応用の可能性を探るために、抗癌剤との併用効果とその作用機序についても検討した。

1. CH-271はフィブロネクチンと同様に細胞の移動、伸展および接着斑(Focal contact)の形成を誘導したが、C-274あるいはH-271ではこれらの誘導は観察されなかった。CH-271は細胞膜表面上のインテグリンおよびヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンによって、細胞接着ドメインおよびヘパリン結合ドメインをそれぞれ認識されていることが以下の実験より明らかとなった。(1) RGDSペプチド、抗 α_3 あるいは α_3 抗体および抗 β_1 抗体がCH-271によって誘導される癌細胞の移動を阻害した。(2) 癌細胞をheparitinase Iで前処理することにより培養初期段階での一時的な細胞移動の阻害が観察された。(3) CH-271のヘパリン結合ドメイン中の第13番目のタイプIIIモジュールを欠損させることにより、著しく接着斑の形成を伴う細胞伸展および細胞移動の誘導が減少あるいは失活した。ことから、示唆された。
2. CH-271はマウスメラノーマB16-BL6細胞の肺転移およびマウスリンパ腫L5178Y-ML25細胞の肝転移をC-274、H-271あるいは未処置群と比較して、有意な抑制および治療効果と延命効果を示した。また、CH-271の転移抑制効果の機序の1つとして、L5178Y-ML25細胞の肺および肝臓への着床の阻害によることが示された。
3. CH-271は癌細胞のフィブロネクチンおよびラミニン基質への接着を濃度依存的に阻害した。C-274はRGDS依存的に癌細胞のフィブロネクチンへの接着のみ抑制し、一方、H-271はラミニンへの接着のみを抑制した。同様にしてCH-271はフィブロネクチンおよびラミニンとの相互作用を介した癌細胞の

移動・浸潤を濃度依存的に抑制した。

4. L5178Y-ML25細胞由来の培養上清により、炎症部位で見られるような血管内皮細胞の活性化を引き起こし、癌細胞の血管内皮細胞への接着能を亢進させた。活性化による内皮細胞への癌細胞の接着の増強は、癌細胞由来のIL-1 β により活性化された内皮細胞上に発現が誘導されたELAM-1分子を介して引き起こされていることが示唆された。このような活性化内皮細胞への癌細胞の接着はCH-271およびH-271によって抑制されたが、C-274では抑制されなかった。
5. CH-271と抗癌剤との併用投与は、マウスメラノーマB16-BL6細胞の肺転移および、マウスリンパ腫L5178Y-ML25細胞の肝転移をそれぞれ単独投与群と比較して、より効果的に転移を抑制した。

以上のことから、フィブロネクチン由来の2つの機能性ドメインを融合したキメラペプチド(CH-271)はその立体構造が元来のフィブロネクチン分子とは異なっている可能性があるにも関わらず、癌細胞表面上のインテグリン・レセプターおよびグリコサミノグリカンによって、CH-271中の細胞結合ドメインおよびヘパリン結合ドメインをそれぞれ認識され、細胞の機能発現を誘導しうることが明らかとなった。このことが、各ドメイン単独による癌転移抑制に比べ、より強い癌転移の抑制効果を示した要因の1つであるかも知れない。また、癌細胞の癌細胞の接着や運動を阻害するCH-271とは異なり、主として癌細胞の増殖抑制に働く抗癌剤との併用投与は、より効果的な癌転移抑制効果を示した。