

リンパ管内皮細胞が産生するラミニン421は 悪性黒色腫の遊走を促進する

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

リンパ節転移の有無は、悪性黒色腫の重要な予後因子のひとつであるが、リンパ行性転移のメカニズムの解析は血行性転移に比べ、遅れをとってきた。しかし最近、リンパ管内皮細胞のマーカー分子の発見や単離・培養技術の向上などにより、リンパ節転移のメカニズムが癌組織におけるリンパ管新生という観点から解析されるようになってきた。その結果、癌細胞の産生するリンパ管新生因子として、VEGF-CやVEGF-Dなどが見出された。またCXCR4やCCR7などのケモカインに対する受容体を発現した癌細胞がリンパ節への高転移性を示すことなども報告されてきている。本研究では、リンパ管内皮細胞の産生する液性因子が悪性黒色腫細胞に対してどのような影響を及ぼすのか、特に、悪性黒色腫細胞の増殖・遊走能に及ぼす影響について調べた。

【材料と方法】

1. 細胞株：ヒト悪性黒色腫細胞株 (A375M, C8161, GAK, G361, MeWo) およびヒト新生児真皮由来リンパ管内皮細胞 (LEC) を用いた。
2. LEC培養上清の作製：FBSを含まないEGM2-MV2培地でLECを24時間培養し、その培養上清 (LEC-CM) を回収した。
3. 細胞増殖能の測定：水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩であるWST-8を用いたアッセイで細胞増殖能を評価した。
4. 細胞遊走能の測定：細胞遊走能は、トランスウエル・チャンバーを用いたケモタキシスアッセイで評価した。
5. 熱処理、限外濾過：LEC-CMの熱処理は、56℃、あるいは90℃で5分間行った。また、マイクロポアフィルターを用いて分子量を指標にLEC-CMを分画した。
6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)：細胞から抽出した全RNAをもとに逆転写反応を行い、cDNAを得た。このcDNAを鋳型にして標的遺伝子特異的なプライマーペアを用いてPCRを行った。
7. ウェスタンブロッティング法：LEC-CMをSDS-PAGEで展開し、PVDF膜に転写した。標的蛋白に特異的な一次抗体、続いてペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させた。ペルオキシダーゼを化学発光試薬を用いて検出した。
8. 免疫沈降：抗ラミニン1抗体をプロテインAセファロースに結合させた。この複合体をLEC-CMと混合させた後、遠心によってプロテインAセファロース-抗ラミニン1抗体に結合する蛋白を分離した。
9. フローサイトメトリー：悪性黒色腫細胞表面におけるインテグリンとCD151の発現を、それぞれを特異的に認識する一次抗体と蛍光色素FITC標識二次抗体を用いてフローサイトメトリーにより解析した。
10. インテグリンの機能阻害：インテグリンの機能を阻害するために抗インテグリン $\alpha 3$

抗体 (SM-T1) あるいは抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体 (GoH3) で悪性黒色腫細胞をケモタキシアッセイの前30分からアッセイ終了まで処理した。

11. CD151の発現抑制: CD151の発現を抑制するためにCD151に対するsiRNAを悪性黒色腫細胞にリポフェクション法で導入した。siRNAによるCD151の発現抑制は、抗CD151抗体を用いたウェスタンブロット法で確認した。

【結果および考察】

本研究では、悪性黒色腫細胞とLECとの相互作用、特にLECが悪性黒色腫細胞の増殖・遊走性に及ぼす影響について検討した。まず、LEC-CMは5系の悪性黒色腫細胞の増殖性には影響を及ぼさなかったが、それらに対してケモタキシスを誘導することが明らかとなった。このことは、LEC-CMには悪性黒色腫細胞に対してケモタキシス活性をもつ因子が含まれていることを示している。LECによって分泌されケモタキシス活性を有する因子としてケモカインの報告がある。しかし、本研究で見出されたLEC-CMのケモタキシス活性は、分子量100 kDa以上の粗分画に認められ、低分子量 (8から14 kDa) であるケモカイン・ファミリーに属するものではないと考えられた。

LECが分泌する100 kDa以上の分子としてラミニン、ナイドジェンなどの細胞外マトリックス構成成分が報告されている。細胞外マトリックス成分は様々な種類の癌細胞に対してケモタキシスを誘導することが知られている。そこで細胞外マトリックス成分であるラミニン、ナイドジェンに着目してLEC-CMに含まれるケモタキシス活性について検討を進めた。ラミニンとコラーゲンを架橋する役割をもつナイドジェンは、LEC-CM中に存在することがウェスタンブロット法によって確認されたが、LEC-CMからナイドジェンを除去しても、C8161細胞に対するケモタキシス活性は減少することにはなかった。このことから、ナイドジェンはケモタキシス活性の本体ではないと判断し、引き続きLEC-CM中のラミニンの存在とそのケモタキシス活性について調べた。RT-PCRおよびウェスタンブロット解析の結果から、LECは $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ のラミニン鎖を発現していることが明らかとなった。ラミニン $\gamma 1$ 鎖上のエピトープを認識する抗ラミニン-1抗体を用いた免疫沈降によってLEC-CMからラミニン $\gamma 1$ 鎖からなる複合体を除いた。この抗ラミニン-1抗体処理LEC-CMは、悪性黒色腫細胞に対するケモタキシス活性が失われていた。また、抗ラミニン-1抗体での免疫沈降物をウェスタンブロット解析したところ、 $\gamma 1$ 鎖は $\alpha 4$ および $\beta 2$ 鎖と複合体を形成していることがわかった。このことから、LEC-CMに含まれるラミニン $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ (ラミニン421) の三量体が悪性黒色腫の遊走を刺激していると考えられた。

ラミニンに対して悪性黒色腫細胞が遊走しているのであれば、悪性黒色腫細胞はラミニンを認識する接着因子を発現しているはずである。ラミニン $\alpha 4$ 鎖を認識する接着因子にインテグリン $\alpha 6\beta 1$ および $\alpha 3\beta 1$ が知られている。そこで、これらのインテグリンの発現をフローサイトメーターで解析したところ、用いた悪性黒色腫細胞すべてにこれらインテグリンの発現が認められた。ラミニン結合性インテグリンと複合体 tetraspanin-enriched microdomain を形成し、ラミニンを介した細胞運動性を調節する因子にCD151がある。悪性黒色腫細胞株C8161およびMeWoのCD151の発現をsiRNAを利用して抑制し、LEC-CMに対するケモタキシスを調べたところ、これらの細胞のケモタキシスは有意に低下した。以上の結果から、悪性黒色腫細胞はラミニン結合性インテグリンを介してLEC-CM中にあるラミニンに対してケモタキシスを示すと考えられた。

【結語】

ヒト新生児真皮由来リンパ管内皮細胞の培養上清 (LEC-CM) に含まれる悪性黒色腫細胞遊走刺激因子について検討した。その結果、LEC-CMに含まれるラミニン421が悪性黒色腫細胞のケモタキシスを刺激していることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査 教授 山本有平
副査 教授 安田和則
副査 准教授 濱田淳一

学位論文題名

リンパ管内皮細胞が産生するラミニン421は 悪性黒色腫の遊走を促進する

リンパ節転移の有無は、悪性黒色腫の重要な予後因子のひとつであるが、リンパ行性転移のメカニズムの解析は血行性転移に比べ、遅れをとってきた。しかし最近、リンパ管内皮細胞 (LEC) のマーカー分子の発見や単離・培養技術の向上などにより、リンパ節転移のメカニズムが癌組織におけるリンパ管新生という観点から解析されるようになってきた。その結果、癌細胞の産生するリンパ管新生因子として、VEGF-CやVEGF-Dなどが見出された。また CXCR4 や CCR7 などのケモカインに対する受容体を発現した癌細胞がリンパ節への高転移性を示すことなども報告されてきている。本研究では、LEC の産生する液性因子が悪性黒色腫細胞に対してどのような影響を及ぼすのか、特に、悪性黒色腫細胞の増殖・遊走能に及ぼす影響について調べた。

その結果、LEC培養上清 (LEC-CM) は5系の悪性黒色腫細胞の増殖性には影響を及ぼさなかったが、それらに対してケモタキシスを誘導することが明らかとなった。このことは、LEC-CMには悪性黒色腫細胞に対してケモタキシス活性をもつ因子が含まれていることを示している。LECによって分泌されケモタキシス活性を有する因子としてケモカインの報告がある。しかし、本研究で見出されたLEC-CMのケモタキシス活性は、分子量100 kDa以上の粗分画に認められ、低分子量 (8から14 kDa) であるケモカイン・ファミリーに属するものではないと考えられた。

LECが分泌する100 kDa以上の分子としてラミニン、ナイドジェンなどの細胞外マトリックス構成成分が報告されている。細胞外マトリックス成分は様々な種類の癌細胞に対してケモタキシスを誘導することが知られている。そこで細胞外マトリックス成分であるラミニン、ナイドジェンに着目してLEC-CMに含まれるケモタキシス活性について検討を進めた。ラミニンとコラーゲンとを架橋する役割をもつナイドジェンは、LEC-CM中に存在することがウエスタンブロット法によって確認されたが、LEC-CMからナイドジェンを除去しても、C8161細胞に対するケモタキシス活性は減少することはなかった。このことから、ナイドジェンはケモタキシス活性の本体ではないと判断し、引き続きLEC-CM中のラミニンの存在とそのケモタキシス活性について調べた。RT-PCRおよびウエスタンブロット解析の結果から、LECは $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ のラミニン鎖を発現していることが明らかとなった。ラミニン $\gamma 1$ 鎖上のエピトープを認識する抗ラミニン-1抗体を用いた免疫沈降によってLEC-CMからラミニン $\gamma 1$ 鎖からなる複合体を除いた。この抗ラミニン-1抗体処理LEC-CMは、悪性黒色腫細胞に対するケモタキシス活性が失われていた。また、抗ラミニン-1抗体での免疫沈降物をウエスタンブロット解析したところ、 $\gamma 1$ 鎖は $\alpha 4$ および $\beta 2$ 鎖と複合体を形成していることがわかった。このことから、LEC-CMに含まれるラミニン $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ (ラミニン421)

の三量体が悪性黒色腫の遊走を刺激していると考えられた。

ラミニンに対して悪性黒色腫細胞が遊走しているのであれば、悪性黒色腫細胞はラミニンを認識する接着因子を発現しているはずである。ラミニン $\alpha 4$ 鎖を認識する接着因子にインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ および $\alpha 3 \beta 1$ が知られている。そこで、これらのインテグリンの発現をフローサイトメーターで解析したところ、用いた悪性黒色腫細胞すべてにこれらインテグリンの発現が認められた。ラミニン結合性インテグリンと複合体tetraspanin-enriched microdomainを形成し、ラミニンを介した細胞運動性を調節する因子にCD151がある。悪性黒色腫細胞株C8161およびMeWoのCD151の発現をsiRNAを利用して抑制し、LEC-CMに対するケモタキシスを調べたところ、これらの細胞のケモタキシスは有意に低下した。以上の結果から、悪性黒色腫細胞はラミニン結合性インテグリンを介してLEC-CM中にあるラミニンに対してケモタキシスを示すと考えられた。

公開発表にあたり、副査安田和則教授から、1) 新生児真皮由来リンパ管内皮細胞を使用した本研究と、実際の生体系との相同性について、2) 他種のリンパ管内皮細胞を使用した場合に発現が予測される因子について、3) 液性因子の他のスクリーニング方法について、4) 今後の実験計画についての質問があった。次いで副査濱田淳一准教授から、1) ラミニン421の悪性黒色腫への直接作用を示す方法について、2) 悪性黒色腫細胞株による、リンパ管内皮細胞培養上清への遊走能の違いについて、3) ラミニン421は生体のどこに存在しているか、4) 悪性黒色腫の転移においてラミニン421はどこで作用しているか、についての質問があった。次に、主査山本有平教授より、1) 血管内皮細胞に発現するラミニンとの作用の違いについて、2) 臨床応用への展望についての質問とコメントがあった。いずれの質問に対しても申請者は自らの研究内容と文献を引用し、妥当な回答をした。

この論文は、ラミニン421がLECによって産生・分泌され、さらに悪性黒色腫細胞に対してケモタキシス活性を有することを初めて示した点で高く評価され、今後、悪性黒色腫の病態の解明や新たな診断および治療法の開発につながることを期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。