

学位論文題名

乳癌の転移におけるADAM-15 /
integrinの相互作用の機能解析

学位論文内容の要旨

【背景】

転移は複数の過程を経て成立するが、その中でも浸潤能は転移の成立にとって重要な因子である。これには、プロテアーゼの働きが必須であるが、integrinをはじめとする細胞接着分子がその制御に関与していることが報告されている。

ADAM (a disintegrin and metalloprotease) は細胞膜貫通型の糖蛋白であり、metalloprotease、disintegrin(d.d.)、cystein-rich、EGF-like、cytoplasmic domain から構成されている。このうち metalloprotease domain がプロテアーゼとして機能するのみならず、その d.d.を介して integrin と相互作用する。ADAM ファミリーの1つである human ADAM-15 は、d.d.内に RGD 配列を有し、これを介して $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha IIb\beta 3$ integrin と、また RGD 配列非依存的に $\alpha 9\beta 1$ インテグリンと結合する。この ADAM-15 と integrin との相互作用は、細胞間接着や血管新生に働くことが示唆されている。また乳癌においては、ADAM-15 が細胞増殖に促進的に働くことや、転移巣で ADAM-15 の発現が亢進していることなどが報告されている。一方、 $\alpha v\beta 3$ integrin は、癌細胞の細胞浸潤や遊走に重要な役割を果たしていることが報告されている。 $\alpha 9\beta 1$ integrin は、vascular endothelial growth factor(VEGF)-A と結合し、血管新生に働くことや、VEGF-C、-D と結合することで、リンパ管新生に働き、リンパ管転移を促進させると考えられている。しかし、乳癌細胞の転移において、ADAM-15 と integrin の相互作用がどのような機能を有するかは不明である。そこで、本研究では、乳癌転移における ADAM-15 と integrin の相互作用の機能を解析することを目的とした。

【方法と結果】

ヒト ADAM-15 d.d.の GST 融合タンパク質をマウスに免疫し、モノクローナル抗体(8F7)を樹立した。8F7 はヒト ADAM-15 d.d.リコンビナントタンパク質または d.d.内の RGD 配列を RAA 配列に置換したリコンビナントタンパク質(d.d.-RAA リコンビナントタンパク質)と、ヒト $\alpha 9$ またはヒト $\beta 3$ integrin を過剰発現させた CHO 細胞($\alpha 9$ /CHO、 $\beta 3$ /CHO)の細胞接着を有意に抑制した。また、ADAM-15 を過剰発現させた CHO 細胞(ADAM-15/CHO)と、 $\alpha 9$ /CHO または $\beta 3$ /CHO の細胞間接着を有意に抑制した。以上より、細胞間において ADAM-15 と integrin が相互作用していることが示唆された。次に ADAM-15、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 9\beta 1$ integrin を発現するヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 luc D3H2LN(D3H2LN)または MDA-MB-468LN(468LN)を用いて、以降の実験をおこなった。まず、乳癌細胞に発現する integrin が、ADAM-15 と相互作用するかどうかを確認するために、ADAM-15/CHO と D3H2LN または 468LN を用いた細胞間接着試験をおこ

なった。8F7、 $\alpha\text{v}\beta 3$ 及び $\alpha 9\beta 1$ integrin に対する抗体を添加することにより、細胞間接着が有意に抑制された。したがって、乳癌細胞においても、ADAM-15 と integrin が細胞間で相互作用することが示唆された。

そこで、細胞増殖における、ADAM-15/ integrin の相互作用の機能を検討した。ADAM-15 に対する siRNA もしくは 8F7 で処理した D3H2LN を、0.5% FCS 存在下で 72 時間培養し、その増殖能を比較した。その結果、ADAM-15 のノックダウンにより細胞増殖は抑制されたが、8F7 添加では細胞増殖の抑制はみられなかった。

次に、マトリゲルインベージョンチャンバーを用いて、D3H2LN と 468LN における細胞浸潤試験をおこなった。8F7、 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、 $\alpha 9\beta 1$ integrin に対する抗体により細胞浸潤は有意に抑制された。細胞浸潤には、プロテアーゼ活性と細胞の運動性が重要であることから、プロテアーゼ活性における ADAM-15 d.d. の関与を検討するために、8F7 の存在下で培養した D3H2LN の培養上清を用いたゼラチンザイモグラフィにより MMP-9 の分泌量を検討した。8F7 を添加しても、培養上清中への MMP-9 の分泌量は変化しなかった。また、ADAM-15/CHO の細胞溶解タンパク質と DQ ゼラチンを用いたプロテアーゼアッセイにより ADAM-15 のプロテアーゼ活性の調節に d.d. が関与するかどうかを検討した。8F7 を添加しても、ADAM-15 のプロテアーゼ活性は変化しなかった。更に、細胞運動能における ADAM-15 と integrin の機能を検討するために、細胞遊走試験を行なったところ、8F7、 $\alpha\text{v}\beta 3$ 及び $\alpha 9\beta 1$ integrin に対する抗体を添加することにより、細胞遊走は有意に抑制された。そこで、ADAM-15 と $\alpha\text{v}\beta 3$ 及び $\alpha 9\beta 1$ integrin の相互作用を介した浸潤のメカニズムを追求するために、Akt と Erk の関与を検討した。Akt と Erk はそれぞれ PI3K、MEK1/2 の下流分子であるため、PI3K または MEK1/2 の阻害剤を添加したところ、細胞浸潤が有意に抑制された。そこで、細胞間での ADAM-15 と integrin の相互作用が Akt と Erk を活性化するかどうかをウェスタンブロットにより検討した。ADAM-15/CHO と D3H2LN の細胞間接着により、Akt のリン酸化が亢進した。一方で、Erk のリン酸化には、差がなかった。更に、これらの Akt のリン酸化は、d.d. リコンビナントタンパク質や $\alpha\text{v}\beta 3$ 及び $\alpha 9\beta 1$ integrin に対する抗体を添加することにより、抑制された。

【考察】

本研究において、細胞間での ADAM-15 と integrin の相互作用が Akt シグナルを活性化することが示唆された。過去の報告で、ADAM-15 は細胞内で Src と相互作用し、Erk1/2 を活性化することが証明されている。しかし、Erk の活性化に ADAM-15 と integrin の相互作用を介した細胞間接着は関与しなかった。Src は PI3K の上流分子であり、Akt の活性化に重要であることが広く知られている。したがって、ADAM-15 d.d. を介する刺激は、Erk シグナルには関与せずに、Src を介して Akt シグナルを活性化させると考えられた。一方で、integrin は細胞外マトリックスと結合することによって、integrin-linked kinase を活性化し、Akt の活性化を誘導することが、多くの論文により報告されている。したがって、ADAM-15 と integrin の両分子の下流シグナルとして Akt シグナル経路が活性化することが予想される。

【結論】

細胞間における ADAM-15/integrin の相互作用は、Akt シグナルを活性化させ、癌細胞の運動性を亢進させることで、細胞浸潤を促進することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐邊	壽孝
副査	准教授	濱田	淳一
副査	准教授	丸尾	聖爾
副査	教授	上出	利光

学位論文題名

乳癌の転移におけるADAM-15 / integrinの相互作用の機能解析

本学位論文は、ADAM15 と integrin の相互作用が、乳癌細胞の浸潤に促進的に機能することを示そうとするものである。

申請者は、ヒト ADAM15 の disintegrin 領域に対するモノクローナル抗体(8F7)を作成し、このものが ADAM15 とその結合相手である特定の integrin との結合を阻害することを示した。このような 8F7 の阻害効果は、この抗体が RGD(Arg-Gly-Asp)配列を認識していることによるのではなかった。次に、ヒト ADAM15 を過剰発現させた CHO 細胞 (ADAM15/CHO) とヒト乳癌細胞株 (D3H2LN) との細胞間接着実験系を用い、ADAM15 は $\alpha 9\beta 1, \alpha v\beta 3$ integrin の両者、もしくはどちらか一方と結合する事を確認した。続いて、乳癌細胞を 8F7 と事前に incubation することにより、乳癌細胞の基質への浸潤活性は有意に阻害されることを見いだした。用いた乳癌細胞はそれ自身が ADAM1, $\alpha 9\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ integrin を発現するが、この実験結果より、申請者は、ADAM15 と integrin との結合が、乳癌細胞の浸潤活性促進に寄与すると結論づけた。一方、同様の抗体添加実験から ADAM15 と integrin との相互作用は、MMP-9 の発現や ADAM15 自身のプロテアーゼ活性には直接には関与しないことも示した。細胞内シグナル伝達への関与に関して研究を進め、ADAM15 と integrin との相互作用は、Akt のリン酸化を上昇させる事を示した。また、ADAM15 に対する siRNA、並びに、8F7 の添加実験から、ADAM15 は細胞増殖に促進的に働くが、このことはその disintegrin 領域には非依存的であることが示唆した。

口頭発表の後、浜田准教授から、1) 細胞間接着について他の実験系を用いて検討したことがあるか、2) 腫瘍細胞と血管内皮細胞の細胞間接着における ADAM15 と integrin の相互作用の関与について、3) 8F7 は ADAM15 と integrin の結合が起きた後でも、それらの結合を引き離す能力をもつか、4) ADAM15 の発現と乳癌細胞の悪性度に関連性があるかどうか質問がなされた。丸尾准教授からは、1) ADAM15 のプロテアーゼ活性を調節するための機序について、2) 浸潤試験において、ADAM15 と integrin をそれぞれ阻害した時に浸潤が抑制される割合が異なる理由について、3) 本実験で、苦労した点について質問がなされ

た。上出教授からは、細胞間接着が浸潤を促進するという現象を、他の実験系を用いてより詳細に確認する必要があると指摘された。また、集団浸潤を起こす腫瘍細胞の種類や、集団浸潤と腫瘍の悪性度の関与について質問がなされた。佐邊は、1) 集団細胞浸潤に関与するといわれる浸潤生カドヘリンが、本研究で用いた乳癌細胞株で発現しているのか、2) 8F7を添加することで、ADAM15が endocytosis により細胞内へ取り込まれるかどうか等を質問した。また、ADAM15と integrin とを介する細胞間接着が、癌細胞の浸潤を促進するとの結論を得るには更に詳細な検討が必要であるとの指摘した。また、学位論文における本文中の表現に関して幾つかの訂正と助言をした。いずれの質問や意見に対して、申請者は、自己の研究結果と文献的考察に基づいて概ね妥当な回答を行った。また、本文の表現に関しても適切に改訂したものを作成した。

本研究は、乳癌細胞集団において、細胞同士の接触における ADAM15 と integrin との相互作用が、癌細胞の運動性を亢進させ浸潤を促進すること、そのことに Akt のリン酸化が関与することを示そうとするものである。この結論を明確に示すためには、さらなる実験が必要がある事は指摘されたが、審査員一同、学位論文に記された成果を意味のあるものと評価し、申請者が博士(医学)の学位を受ける資格を有するものと判定した。