

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 太田 大地

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」

【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、 $\alpha\beta3$ 及び $\alpha9\beta1$ 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シ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、 $\alpha\beta3$ 、 $\alpha9\beta1$ 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、 $\alpha\beta3$ 及び $\alpha9\beta1$ 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 $\alpha\beta3$ 及び $\alpha9\beta1$ 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 $\alpha\beta3$ 及び $\alpha9\beta1$ 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。