

# メラノーマ癌細胞転移における Osteopontin と TypeI コラーゲンの協調作用

## 学位論文内容の要旨

生命を脅かす癌細胞の重要な性質のひとつである転移は、細胞の癌化と共に克服すべき重要な課題となっている。癌細胞の転移は、癌細胞の細胞外マトリックスとの接着、基底膜蛋白質の分解、血管外遊走、転移巣の形成など、多くの過程を経て成立する。マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)に属する MMP-2 および MMP-9(gelatinaseA,B または TypeIV collagenase と呼ぶ)は、基底膜の主要構成蛋白質である TypeIV コラーゲンや、フィブロネクチン、ラミニン、TypeI コラーゲン、プロテオグリカンといった細胞外マトリックス成分を分解することから、癌細胞の転移において最も重要な酵素のひとつであると考えられている。また、近年では、細胞外基質の分解だけでなく、MMPs による癌細胞増殖、血管新生、細胞遊走なども報告され、癌細胞の転移に密接に関与すると考えられている。

オステオポンチン(OPN)は、酸性のリン酸化糖蛋白質で、細胞の形質転換に伴い発現誘導される分泌性の物質として同定された。OPN は分子内に保存されたアルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)配列を介して  $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ 、 $\alpha 8 \beta 1$  など種々のインテグリン分子と結合することが明らかとされている。これまでに、これらの受容体との結合を介して、細胞接着、遊走、細胞の活性化を引き起こすことが示されている。また、OPN は RGD 非依存的に、 $\alpha 9 \beta 1$ 、 $\alpha 4 \beta 1$  などのインテグリン分子や、CD44 と結合し、細胞接着、遊走、Th1/Th2 バランスなどの制御を行うことが明らかとされている。OPN は癌細胞転移においても重要な役割を果たすと考えられており、その機能が MMPs のそれと重複する部分があることから、両者の関係に興味を持たれる。

本研究では、癌細胞の転移能における OPN と MMPs(MMP-2 と MMP-9)の関係について、転移能が低く、静脈内投与によってのみ低い転移能(いわゆる実験転移能)を示す B16-F1 細胞、高い実験転移能にくわえ、皮下接種にても遠隔臓器に転移する(自然転移能)B16-BL6 細胞を用いて検討した。これらの細胞株における OPN、MMP-2、MMP-9

の発現および $\alpha v \beta 3$ の細胞膜上発現について、TypeI コラーゲンの存在下および非存在下で比較検討した。さらに、OPN および RGD を欠失した OPN 変異体を発現する組み換えアデノウイルスを作製し、OPN の発現誘導による MMP-2、MMP-9 の発現変化および転移能の変化について検討した。

B16-BL6 および B16-F1 細胞の OPN の産生能を検討すると、転移能の高い B16-BL6 細胞で高い発現が認められた。さらに、B16-F1 細胞では上清中に MMP-9 の活性のみ認められたが、転移能の高い B16-BL6 細胞では MMP-9 にくわえ、MMP-2 の活性が認められた。このように、転移能の高い B16-BL6 細胞では OPN、MMPs いずれも高い産生を示した。TypeI コラーゲン存在下における、OPN および MMPs の産生能変化を検討すると、B16-BL6 細胞では、OPN、MMPs の産生増強が認められた。一方、B16-F1 細胞では、TypeI コラーゲンにより MMPs の産生増強が認められた。従って、癌細胞は転移の過程で生じる TypeI コラーゲンとの相互作用により、転移に深く関与する因子の産生を増強させると考えられた。アデノウイルスベクターを用いて B16-F1 細胞に OPN の発現を強く誘導すると、MMP-2 および MMP-9 の発現増強が認められた。同時に B16-F1 細胞の転移能は増強し、実験転移能が有意に増強しただけでなく、自然転移能が新たに獲得された。このように OPN は、MMPs の産生亢進を介して、癌細胞の転移を促進すると考えられた。興味深いことに、OPN のこの作用は、TypeI コラーゲンの存在下にのみ認められた。さらに、RGD 欠失変異体を用いた検討から、OPN の作用には RGD ドメインが重要であることが明らかとなった。さらに、癌細胞の活発な増殖により、増殖局所における pH が酸性に傾斜することが明らかにされている。B16-BL6 および B16-F1 細胞を酸性条件下(pH6.1)で培養すると、いずれの細胞においても OPN の産生増強が認められた。以上から、OPN は癌細胞が活発に増殖する局所において、酸性条件によりその産生が亢進し、細胞外マトリックスの主要構成蛋白質である TypeI コラーゲンと協調して、RGD 依存的に MMPs の発現を誘導し、癌細胞の転移を引き起こすことが明らかとなった。

B16-F1 細胞の転移における OPN の機能が、RGD を介したものであったことから、OPN の RGD ドメインに対する最も主要な受容体である $\alpha v \beta 3$ の発現を、FACS により解析した。B16-F1 細胞上には B16-BL6 細胞と異なり、TypeI コラーゲン存在下においても、 $\beta 3$  インテグリンの発現はほとんど認められず、機能的な $\alpha v \beta 3$ 受容体を発現していないと考えられた。このように、B16-F1 細胞の転移能増強における OPN 役割として、RGD 依存的かつ $\alpha v \beta 3$ 非依存的な経路が新たに明らかになった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

## メラノーマ癌細胞転移における Osteopontin と TypeI コラーゲンの協調作用

この学位論文では、メラノーマ細胞の転移における Osteopontin(OPN)と細胞外マトリックス分解酵素(MMP-2 および MMP-9)の関連に着目し、同一のメラノーマ細胞株(B16細胞)に由来し、転移能の異なる2種類のマウスメラノーマ細胞株、B16-BL6 および B16-F1細胞を用いて両者の関連について解析した。B16-F1細胞は転移能が低く、静脈内投与によってのみ低い転移能(いわゆる実験的転移能)を示す。一方、B16-BL6細胞は高い実験的転移能にくわえ、皮下接種にても遠隔臓器に転移するという自然転移能を有する。両細胞株における OPN と MMP-2 および MMP-9 の発現能を、通常培養条件下で比較検討した結果、B16-F1細胞に比べて、転移能の高い B16-BL6細胞でいずれも高い発現を示した。癌細胞の転移過程において、細胞が癌細胞塊から遊離し、血管内へ遊走するステップは、重要な過程のひとつであると考えられる。このような *in vivo* の状況下においては、細胞は、周囲に存在し、主として TypeI コラーゲンから構成される細胞外マトリックスと活発に相互作用し、また、癌細胞自身の活発な増殖により酸性に傾斜した pH 条件下に存在することが予想される。B16-BL6 および B16-F1細胞を TypeI コラーゲン存在下および酸性条件下(pH6.0)で培養し、OPN、MMP-2、MMP-9 の発現変化を検討した。TypeI コラーゲンの存在により、B16-BL6細胞では OPN および MMP の強い産生増強が、B16-F1細胞においては、MMP の産生増強が認められた。一方、酸性条件下では、いずれの細胞においても OPN の強い産生増強が認められた。次に、腫瘍細胞が分泌する OPN の機能を探る目的で OPN および RGD ドメインを欠失した OPN を発現する組み換えアデノウイルスベクターを作製し、転移能および OPN 産生能の低い B16-F1細胞に遺伝子導入した。その結果、MMP-2、-9 の発現増強にくわえ、実験的転移能、自然転移能の増強が認められ

た。この効果は、正常の OPN 導入時にのみ認められ、RGD 欠失 OPN では認められなかったことから、RGD 依存的な作用であると考えられた。B16-F1 細胞上の OPN 受容体を解析したところ、RGD ドメインの主要な受容体と考えられる  $\beta 3$  インテグリンの発現が、B16-BL6 細胞と異なり、ほとんど認められないことが明らかとなった。以上から、メラノーマ細胞の転移における Osteopontin(OPN)の作用機構として、次の特徴を有する経路が存在することを明らかにした。1)細胞外マトリックス分解酵素(MMP-2 および MMP-9)の発現誘導を介し転移を促進する。2)TypeI コラーゲンと協調して転移を促進する。3)OPN の RGD ドメインが重要である。4)OPN は細胞膜上の  $\alpha v \beta 3$  以外の受容体に結合する。

この学位論文の公開発表に対して、まず副査の小林教授から、B16-F1 細胞にアデノウイルスベクターを用いて外来性に OPN 発現を導入することにより認められる MMP-2、-9 の発現増強のメカニズムについて、具体的に直接的な相互作用が認められるのかについて、また、MMP と OPN 両分子の発現増強に関して生体では OPN と MMP-2 および MMP-9 のいずれが上位に位置すると考えられるのかについて質問がなされた。次に、副査の小野江教授からは、TypeI コラーゲンの受容体は何か、抗体等を用いてその作用を阻害した場合、OPN の作用も消失するかについて、また、複数存在する OPN 受容体の中で、最も高い親和性で OPN に結合するものは何か、さらに、 $\beta 3$  インテグリンを発現する B16-BL6 細胞に対する OPN の作用が、B16-F1 細胞同様に  $\beta 3$  インテグリン非依存的なのかどうかについて質問があった。最後に主査の上出教授から、今回見いだされた MMP-2、-9 発現誘導を介する OPN の作用が、他の癌細胞にも共通にあてはまるかどうかについて、どのような考えを持っているか質問がなされた。これらの質問に対し、申請者は日本語や英語の理解に多少の問題があったが、自らの実験データや文献を引用しつつ、概ね妥当な答弁をなし得た。

この論文は、OPN が癌細胞の転移を促進させる機序として、TypeI コラーゲンを必要とする経路が存在することを初めて明らかにした。今後、TypeI コラーゲンと OPN の協調作用の詳細が分子レベルで明らかになれば、癌細胞転移の制御法として新たな可能性が生まれるものと期待される。

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。