

氏名（本籍） ^{いた} ^{がき} ^{けい} ^{すけ} 板 垣 圭 祐（千葉県）
学位の種類 博士（薬科学）
学位記番号 乙第48号
学位授与の日付 2021年3月18日
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
学位論文題目 **Study on a membrane receptor mediating de-adhesive effect of the cryptic site FNIII14 within fibronectin molecule and its pathophysiological roles**
(フィブロネクチン分子内の機能部位 FNIII14 の反接着作用を媒介する膜受容体とその病態生理学的役割に関する研究)

論文審査委員 (主査) 教授 樋上 賀一
教授 秋本 和憲 教授 内海 文彰
准教授 早田 匡芳 教授 斎藤 顕宜

論文内容の要旨

固形組織を構成する細胞の増殖、分化、生/死などの機能発現は、接着分子インテグリンを介した細胞外マトリックス (ECM) への接着により調節されている。接着性の細胞は足場である ECM への接着を喪失すると細胞死が誘導され、これを足場依存性の細胞死アノイクスと呼ぶ。機能性 ECM タンパクであるフィブロネクチン (FN) 分子内には $\beta 1$ インテグリンを不活性化する機能部位 FNIII14 が存在し、この部位がマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの ECM 分解酵素による限定分解を介して表出することが報告されている。この機能配列を含む FNIII14 ペプチドは $\beta 1$ インテグリンの活性化を阻害することで様々な細胞機能に影響を及ぼすことが報告されている。

本研究ではまず、FNIII14 の反接着作用を媒介する受容体として同定された細胞質タンパクであるタンパク質翻訳伸長因子 eukaryotic elongation factor 1A (eEF1A) が細胞膜上にも存在し、アノイクスを誘導することを示す (第1項)。次に、FNIII14 と細胞膜上の eEF1A の相互作用に

よって引き起こされる反接着作用が病態生理学的にどのような役割を果たすのか、がん細胞の移動及び浸潤に着目して解析する（第2項）。

1. FNIII14 の反接着作用によるアノイクスの誘導と作用を媒介する受容体の実態究明

1.1. FNIII14 の反接着作用によるアノイクスの誘導

アノイクスとは、細胞が接着基質から脱着することで基質からの生存シグナルを喪失し、アポトーシスが起る現象のことで、組織の過形成を初めとする恒常性の破綻を未然に防ぐ重要な機構である。FNIII14 が正常細胞であるマウス線維芽細胞株 NIH3T3 のアノイクスに与える影響を評価したところ、血清非存在下での培養により誘導されたアノイクスが FNIII14 ペプチド存在下では増強された。また、増強されたアノイクスはインテグリン活性化抗体や FNIII14 機能阻害抗体（抗 FNIII14 抗体）の添加により、アノイクス誘導前と同程度まで回復した。これらのことは、FNIII14 による反接着作用がアノイクスを誘導していることを示唆している。

1.2. FNIII14 受容体の同定

NIH3T3 を用いてビオチン標識 FNIII14 によるアフィニティーラベルを行った結果、50-kDa の FNIII14 結合性膜タンパク質 p50 が検出された。FNIII14 応答性がないマウス大腸がん細胞株 Colon26M3.1 では p50 の発現はみられないことから、p50 が FNIII14 の作用を媒介する受容体であると推測された。この p50 が精製され、その内部アミノ酸配列が解析された結果、細胞質内因子であるタンパク質翻訳伸長因子 eEF1A と一致した。

1.3. 細胞膜上における eEF1A の発現

細胞膜受容体と考えていた p50 が細胞質タンパクである eEF1A と同定されたことから、eEF1A が細胞膜上にも存在する可能性を検討した。まず、FNIII14 応答性のあるヒト線維肉腫様細胞株 WI38VA13 を用いて抗 EF1A 抗体によるフローサイトメトリーを行った結果、eEF1A の細胞膜上での存在が示唆された。次に、蛍光免疫染色により eEF1A の細胞局在を観察した結果、細胞膜に沿って eEF1A の局在が認められた。更に、細胞膜上のタンパクをプロナーゼによって分解すると、アフィニティーラベルによる p50、フローサイトメトリーによる eEF1A の細胞膜上での検出は共に消失した。これらの結果から、細胞質で機能すると考えられている eEF1A の一部が細胞膜上にも存在（以降、膜型 eEF1A）する可能性が示唆された。

1.4. 膜型 eEF1A のインテグリンを介した細胞機能制御への関与

eEF1A を過剰発現させた WI38VA13 細胞を用いて FNIII14 応答性を観察した結果、 β 1 インテグリン活性化抑制作用及び反接着作用は共に上昇し、同時にアフィニティーラベルによる p50

も増加した。一方、eEF1A siRNA で eEF1A をノックダウンした場合は、 $\beta 1$ インテグリン活性化抑制作用及び反接着作用が低下し、同時に p50 も低下した。以上の結果から、膜型 eEF1A が FNIII14 の作用を媒介する膜受容体としてアノイキスを含むインテグリンを介した細胞機能制御に関与することが示唆された。

2. FNIII14 と膜型 eEF1A の相互作用によるがん細胞の移動及び浸潤の制御

細胞膜に発現した eEF1A (膜型 eEF1A) と接着基質である FN 分子から表出した FNIII14 の相互作用による $\beta 1$ インテグリンの不活性化は、インテグリンを介した ECM への接着によって支配される他の細胞機能にも関与している可能性がある。

がんの転移は原発巣から離脱した細胞が足場である ECM 上を移動・浸潤し、近傍の血管やリンパ管内へと入り込むことで達成される。ECM 上での細胞移動は、接着分子インテグリンの活性調節により足場との接着及び反接着が絶えず繰り返されることで制御されると考えられていることから、FNIII14 と膜型 eEF1A の相互作用ががん細胞の移動及び浸潤に関与する可能性について解析を行った。

2.1. FNIII14 のがん細胞の移動・浸潤への関与

反接着機能部位 FNIII14 が実際ががん細胞の移動・浸潤の制御に関与しているかどうかを確認するために、抗 FNIII14 抗体存在下でがん細胞の移動及び浸潤を観察した。その結果、高い移動・浸潤能を持つヒト悪性黒色腫細胞株 Mum2B の FN 基質上の細胞移動並びに FN を含むマトリゲルへの浸潤は、抗 FNIII14 抗体によって強く抑制された。

前述したように、FNIII14 は MMP などの ECM 分解酵素による限定分解を介して表出することが報告されている。Mum2B 細胞は高い MMP-9 産生能を有していることが確認されたことから、細胞が産生した MMP により FN 分子内から FNIII14 が表出し、細胞の移動・浸潤を制御している可能性が考えられた。そこで、MMP-2/9 阻害剤存在下での Mum2B 細胞の移動及び浸潤を観察したところ、抗 FNIII14 抗体と同様に両者とも強く抑制された。また、Mum2B 細胞と同様に高い MMP-9 産生が確認された高転移性マウス乳がん細胞株 4T1 の活発な移動・浸潤も抗 FNIII14 抗体及び MMP-2/9 阻害剤によって抑制された。以上の結果から、これらががん細胞の活発な移動・浸潤は、細胞が産生する MMP による FN 分子からの FNIII14 の表出に依存していることが示唆された。

2.2. 膜型 eEF1A のがん細胞の移動・浸潤への関与

反接着機能部位 FNIII14 は膜型 eEF1A との結合を介して反接着作用を示す。そこで、膜型 eEF1A の発現調節が Mum2B 細胞の移動・浸潤に与える影響について解析した。その結果、eEF1A

siRNA を用いて膜型 eEF1A の発現を低下させた細胞では、移動及び浸潤が抑制され、eEF1A 発現プラスミドを用いて膜型 eEF1A の発現を上昇させた細胞では逆に移動及び浸潤が促進された。更に、膜型 eEF1A 過剰発現株に抗 FNIII14 抗体あるいは MMP-2/9 阻害剤を作用させたところ、過剰発現に伴う浸潤細胞数の増加が抑制された。以上の結果から、細胞が産生した MMP が足場の FN を分解することで反接着機能を持つ FNIII14 部位が表出し、この FNIII14 が膜型 eEF1A を介してインテグリンを不活性化することでがん細胞の移動・浸潤を促進している可能性が示唆された。

2.3. FNIII14 を標的としたがんの転移抑制

前項までの試験結果より、少なくとも本試験で使用した高浸潤/高転移性のがん細胞の *in vitro* における移動及び浸潤は抗 FNIII14 抗体によって強く抑制されることが明らかになった。すなわち、抗 FNIII14 抗体は転移抑制薬としての可能性を秘めている。そこで、高浸潤性のヒト悪性黒色腫細胞株 Mum2B をヌードマウスの足跡部に移植した転移モデルを作製し、抗 FNIII14 抗体による転移抑制効果を検討した。本実験ではマウス組織（肺及び腸骨下リンパ節）からゲノム DNA を抽出し、Mum2B 由来のヒト特異的遺伝子 human protein tyrosine phosphatase receptor type C (human PTPRC) が検出されるかどうかで転移を評価した。その結果、Control IgG 投与群では肺及び腸骨下リンパ節から hPTPRC が検出され、これら組織への転移が確認された。それに対し抗 FNIII14 抗体投与群では、いずれの組織においても hPTPRC は検出されず転移が抑制されていることが確認された。抗 FNIII14 抗体による転移抑制効果は、高転移性のマウス乳がん細胞株 4T1 をマウスの足跡部に移植した肺転移モデルにおいても示された。

本研究より、高浸潤/高転移能を有する Mum2B 細胞及び 4T1 細胞は自らが産生した MMP により FN 基質から FNIII14 部位を表出させ、それが膜型 eEF1A と相互作用し、局所的にインテグリンを不活性化させることで細胞の特定部位の接着を減弱させ、高い移動及び浸潤能を獲得している事が示唆された。更に、*in vivo* 実験の結果からがんの転移に FNIII14 が関与し、その機能を阻害することで転移が抑制できることが明らかになったことから、FNIII14 と膜型 eEF1A ががん転移抑制薬の新たな標的となり得る可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

我々の身体の組織／臓器を構成する細胞の殆どは、細胞外マトリックス (ECM) に接着した状態で存在している。細胞の ECM への接着は、主に接着受容体ファミリー分子インテグリンによって媒介されているが、インテグリンを介したこの接着によって、固

形組織が形成されその形態が保持されるばかりでなく、それぞれの組織を構成する細胞の基本的な機能発現に積極的に関与している。このように、固形組織を構成する細胞の機能は、インテグリンを介した接着によって厳密に制御されていることから、細胞機能の「足場依存性制御」と呼ばれ、腫瘍化していない正常細胞に特徴的な性質とされている。インテグリンは α 鎖と β 鎖の2つのサブユニットから構成されるヘテロ二量体で、現在までに24種類のインテグリン分子種が見出されている。代表的なECMタンパク質であるコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等への細胞接着は、主に $\beta 1$ インテグリンサブファミリー分子によって媒介されており、細胞の生存/増殖、分化、遺伝子発現、更には運動等の調節において必須の役割を果たしている。 $\beta 1$ インテグリンにはECMへの接着性をもつ“活性型”コンフォメーションに加えて、接着性を消失した“不活性型”コンフォメーションが存在し、この活性化状態の変化が細胞機能調節において重要な関与をしていると考えられている。しかしながら、インテグリンの活性化/不活性化の制御機構については殆ど明らかにされていないのが現状である。

Fukai等の研究グループは、代表的なECMタンパク質で組織内に広く分布するフィブロネクチン分子内には隠された機能性配列(YTIYVIAL)が存在し、これを含むペプチドFNIII14には $\beta 1$ インテグリンを不活性化作用があることを見出した。このFNIII14は、matrix metalloproteinase (MMP)を始めとする炎症性プロテアーゼによるフィブロネクチンの限定分解によって表出し、 $\beta 1$ インテグリン不活性化に伴う細胞接着抑制(反接着作用)を介して、細胞機能に多大な影響を及ぼすことが明らかにされている。本研究では、フィブロネクチン分子内に見出された機能部位FNIII14が反接着作用を発現する分子機構を明らかにすると共に、FNIII14の反接着作用がどのような生理的あるいは病態現象に関与するかを解析したものであり、以下に示す極めて重要な知見が得られている。

第2章では、FNIII14による接着抑制の正常細胞に対する作用が解析された。その結果、非悪性線維芽細胞NIH3T3にペプチドFNIII14を作用させたところ、正常細胞に特有の性質である“接着喪失性細胞死(アノイキス)”が誘導されること、またFNIII14のこの作用発現は膜受容体によって媒介されていることが明らかにされた。更に、この膜受容体を分離同定した結果、驚いたことに、ペプチド伸長因子として翻訳過程に係わる細胞内タンパク質eukaryotic elongation factor 1A (eEF1A)がFNIII14の反接着作用を媒介する受容体として機能しているとの極めて新規性の高い知見を得ている。

第3章では、FNIII14とeEF1Aの相互作用による $\beta 1$ インテグリン不活性化とそれによる細胞の接着抑制の病態過程への関与について解析されている。がんの悪性形質を特徴づける重要な性質であるがんの浸潤/転移は、がん細胞の高い運動/移動能によって説明できるとされている。細胞がECM上で移動するには、細胞先端での $\beta 1$ インテグリン接着のみならず、細胞後端における接着解離が必須である。そこで、FNIII14-eEF1A相互作用による反接着作用発現が、がん細胞の移動/浸潤能に及ぼす作用をメラノーマ及び乳がん細胞株を用いて解析された。その結果、高浸潤/転移性の両細胞株の*in vitro*

における移動／浸潤は、MMP-9による接着基質フィブロネクチンからの FNIII14 表出、並びに細胞側の eEF1A 膜発現量に依存することが明らかとなった。更に、これらの細胞株をマウスに移植して作製した腫瘍モデルを用いた *in vivo* 実験系により、これらのがん細胞の浸潤／転移が FNIII14 に対する機能阻害抗体の投与によって抑制できることが示された。

このように本研究によって、フィブロネクチン分子内に存在する隠された機能部位 FNIII14 が、① $\beta 1$ インテグリン不活性化による反接着作用に基づいて“接着喪失性細胞死”を誘導すること、並びに②がん細胞の移動能亢進に基づいてがんの浸潤／転移に関与することが明らかになった。これらの知見は、 $\beta 1$ インテグリンを介した細胞接着による細胞機能調節系を統一的に理解する上で極めて重要な基礎を提供している。更に、がん浸潤／転移モデルを使った *in vivo* 実験の結果は、がんの最も重要な悪性形質の一つである浸潤／転移に FNIII14-eEF1A 相互作用による反接着作用発現が関与していることを示しており、今後の抗浸潤・転移薬を開発する上でも有用な情報を提供するものである。

以上、本論文は博士（薬科学）の学位論文として十分に価値あるものと認められる。副査の先生方からも相応の評価を頂いていることを申し添える。