

論 文 要 旨

CD147-targeting siRNA inhibits cell-matrix adhesion of human malignant melanoma cells by phosphorylating focal adhesion kinase

〔CD147-targeting siRNA は focal adhesion kinase のリン酸化により
ヒト悪性黒色腫細胞の細胞接着を阻害する〕

西 馬 場 理 恵

【序論および目的】

CD147/basigin は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖蛋白で種々の正常臓器に分布している。悪性黒色腫細胞を含む悪性腫瘍細胞の表面で発現が増強しており、腫瘍の増殖、matrix metalloproteinases (MMP) の産生を介する浸潤、転移、血管新生に重要な役割を果たしている。細胞が浸潤・移動するには、腫瘍細胞の周囲の基質へ接着することが必要不可欠で、その際に接着分子であるインテグリンが重要である。インテグリンの細胞内ドメインはアクチン細胞骨格やシグナル伝達物質と相互に作用していて、動的に細胞の運動・形態を調節している。Focal adhesion kinase (FAK) はインテグリンシグナルの軸となるもので、細胞の分化、運動、生存をコントロールしており、そのリン酸化は細胞接着により調節されている。FAK にはリン酸化をうけるいくつかのチロシン基があり、397 番目のチロシン基 (pY397) の自己リン酸化は主要なもののひとつである。

本論文では、CD147 を高く発現する悪性黒色腫の細胞株 A375 を用い、CD147 がインテグリンシグナルリングと関連して細胞と細胞外器質の接着に関与しているかどうかを検討した。

【材料および方法】

悪性黒色腫の cell line である A375 細胞を用いて実験を行った。CD147 をターゲットにした siRNA を A375 に transfection し、RT-PCR とウェスタンブロット法を用いて、CD147 がノックダウンされているかを確認した。細胞外基質 (フィブロネクチン、コラーゲン I、コラーゲン IV、ラミニン、フィブリノーゲン、BSA) でコートされたプレートを用いて細胞接着を評価した。コラーゲン I でコートされたチャンバースライドに細胞を一時間培養し、固定して、CD147・インテグリン・アクチンの局在を共焦点顕微鏡で観察した。コラーゲン I でコートされたディッシュに細胞を一時間培養し、蛋白を回収して FAK のリン酸化をウェスタンブロット法で調べた。

【結 果】

1. CD147 ノックダウン細胞では、コラーゲン I とコラーゲン IV への接着が抑止された。フィブロネクチン、ラミニン、フィブリノーゲンでは有意差が認められなかった。
2. 細胞表面に確認されていたインテグリンは、CD147 ノックダウン細胞では細胞質内に斑状に観察された。細胞の形態も円形から偽足を伴う多角形へ変化していた。
3. CD147 ノックダウン細胞は FAK の発現は変化がなかったが、リン酸化 FAK (pFAK) は増加していた。

【結論及び考察】

これまで我々は、悪性黒色腫の細胞において、CD147 が MMP の産生、浸潤、移動、転移に重要な役割をしていることを示してきた。腫瘍細胞の浸潤や移動にはいくつかのステップが必要である。まず細胞先端の細胞膜が突出し、周囲の細胞外基質へ接着し、それに引き続き細胞の後側は牽引され細胞外基質から細胞が離れる、このステップが次々と起こることにより細胞が移動・浸潤していく。今回の研究で CD147 のノックダウンによって細胞の接着が抑制され、CD147 が腫瘍浸潤に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

FAK はインテグリンシグナルの重要なメディエーターで、インテグリンを介して細胞外基質 (ECM) との連絡があり、アクチンフィラメントのような細胞骨格とも相互作用する。FAK のリン酸化部位で最も主要なアミノ酸は Y397 であり、細胞移動のほか細胞周期の調節、アポトーシスの抑制など生物学的に重要である。今回の実験で、悪性黒色腫細胞の CD147 をノックダウンすると、FAK のリン酸化がおり、インテグリンの分布や形態が変わり、コラーゲン I とコラーゲン IV への接着が落ちることがわかった。細胞表面に確認されていたインテグリンは、CD147 ノックダウン細胞では細胞質内に斑状に観察され、細胞の形態も円形から偽足を伴う多角形へ変化していた。この結果から、CD147 はインテグリン $\beta 1$ と相互作用し、細胞構造にも影響していることがわかる。現在までの報告には、今回の結果と逆で、CD147 ノックダウン細胞で FAK のリン酸化が落ちているものもある。また、偽足を伴う多角形の細胞は一般的に動的な細胞とされるが、今回の実験では浸潤性が低いと報告されている、CD147 ノックダウン細胞で観察された。これらの違いは、今回の実験ではコラーゲンコートをしたプレートを用いているため起こった可能性が考えられる。

今回、CD147 は FAK のリン酸化によって悪性黒色腫細胞の細胞外基質への接着に関与して細胞の転移に影響していることを明らかにしたが、細胞移動は接着と分離が動的に起こるという複雑な過程であり、かつ FAK のリン酸化、浸潤、接着、細胞形態との関係は複雑なものであるためさらなる研究が必要と思われる。

(Journal of Dermatology 2012 ; 39: 63-67 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 206 号	学位申請者	西馬場 理恵
審査委員	主査	中川 昌之	学位
	副査	小澤 政之	副査
	副査	橋口 照人	副査
			博士 (医学)
			夏越 祥次
			池田 龍二

CD147-targeting siRNA inhibits cell-matrix adhesion of human malignant melanoma cells by phosphorylating focal adhesion kinase

(CD147-targeting siRNA は focal adhesion kinase のリン酸化によりヒト悪性黒色腫細胞の細胞接着を阻害する)

CD147/basigin は発生と分化にあずかる分子の同定を目的として embryonal carcinoma 細胞 (F9) からクローニングされた分子で、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、種々の正常臓器に分布している。CD147 ノックアウトマウスでは着床障害、精子形成不全、雌性不妊、嗅覚障害、空間・位置記憶の障害、視力障害などを認める。また、CD147 は悪性黒色腫細胞を含む悪性腫瘍細胞の表面で発現が増強しており、腫瘍の増殖、matrix metalloproteinases (MMPs) の産生を介する浸潤、転移、血管新生に重要な役割を果たしている。一方、CD147 は integrin $\beta 1$ と interaction しているとの報告がある。インテグリンは細胞外基質との接着に重要な分子の一つであり、細胞外基質との接着は細胞の移動・浸潤に必要不可欠である。細胞が細胞外基質の上を移動する際にはアクチン骨格の remodeling が生じ、細胞の形態や運動性が変化していく。Focal adhesion kinase (FAK) はインテグリンによる細胞内シグナルに非常に必要な役割を果たす非受容体型チロシンキナーゼで、接着により FAK のリン酸化が起こる。FAK にはリン酸化をうけるいくつかのチロシン基があり、397 番目のチロシン基 (Y397) の自己リン酸化 (pY397) は主要なもののひとつである。FAK は移動細胞先進部の細胞接着斑複合体の集積などを制御する一方で、移動細胞後縁部における細胞接着の解除も調節することにより、細胞移動を動的に制御している。本論文では、CD147 を強く発現する悪性黒色腫の細胞株 A375 を用い、CD147 がインテグリンシグナリングと関連して細胞と細胞外基質の接着に関与しているかどうかを研究した。その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. CD147 ノックダウン細胞では、コラーゲン I とコラーゲン IV への接着が抑止された。フィブロネクチン、ラミニン、フィブリノーゲンでは有意差が認められなかった。
2. 細胞表面に確認されていた integrin $\beta 1$ は、CD147 ノックダウン細胞では細胞質内に斑状に観察された。細胞の形態も円形から偽足を伴う多角形へ変化していた。
3. CD147 ノックダウン細胞は FAK の発現に変化はなかったが、Y397 のリン酸化 FAK (pFAK) は増加していた。

CD147 はメラノーマ細胞自身と周囲の線維芽細胞からの MMP 産生誘導により癌の浸潤を促進するが、本研究により、同時にインテグリン $\beta 1$ を介した FAK へのシグナル伝達により細胞骨格と接着能の調節を行い、浸潤を促進していることが明らかにされた。本研究では、臨床的に問題となる腫瘍細胞の転移・浸潤に対する CD147 の役割の一つを明らかにしている点で非常に興味深い。よって学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 206 号		学位申請者	西馬場 理恵
審査委員	主査	中川 昌之	学位	博士 (医学)
	副査	小澤 政之	副査	夏越 祥次
	副査	橋口 照人	副査	池田 龍二

主査および副査の5名は、平成24年9月10日、学位申請者 西馬場 理恵 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) メラノサイトからできる悪性黒色腫は、何系の腫瘍に分類されるか。

(回答) 神経系に分類される。

質問2) 上皮系の腫瘍と神経系の腫瘍で CD147 の働きに差があるか。

(回答) CD147 はさまざまな臓器に発現しており、糖鎖によっても働きが異なる。上皮系の腫瘍と神経系の腫瘍で CD147 の働きに差があるかどうかについては検討していないが、上皮系・神経系に関らず、腫瘍細胞では invasion、metastasis に関与しているとの報告が多い。

質問3) 正常細胞で CD147 は分化のどの段階に関係しているのか。また、正常細胞で CD147 の発現が増える場合、減る場合などに特徴があるのか。

(回答) 正常皮膚では基底層から上層にいくにつれ分化していく。正常皮膚では表皮基底層では CD147 は発現しているが、上層になると発現していない。分化していく段階で発現が減っていくと考えられる。

質問4) CD147 ノックダウン細胞では細胞表面のインテグリン $\beta 1$ が減少している状態で、ラミニン・フィブリノーゲンなどへの接着は維持されているということか。

(回答) 今回の結果からは CD147 はラミニン・フィブリノーゲンとの接着には関わっていないと考えられる。CD147 と colocalize することが報告されているのはインテグリン $\beta 1$ のみのため、今回はそれ以外のインテグリンについては検討していない。

質問5) CD147 ノックダウン細胞とコントロール細胞で形態学的に差があったが、機序はどのようなものか。

(回答) FAK がアクチンなど細胞骨格の調節に関与している。CD147 が FAK に影響することにより細胞形態に差が出たと思われる。

質問6) 転移がある腫瘍では CD147 が発現し、転移がないものは CD147 は発現しないというように、CD147 発現はかなりはっきり差が出るものなのか。

(回答) 統計学的にも有意差があり、転移とかなり強い相関があると考えられる。

質問7) ノックアウトマウスのフェノタイプは、ヘテロマウスでも現れるのか。

(回答) 報告はホモマウスであり、ヘテロマウスについては今回も検討はしていない。

質問8) Confocal microscopy で CD147 はどこに発現しているのか。

(回答) 細胞膜に発現している。

質問9) インテグリン $\beta 1$ と CD147 の局在はどうなっているのか。

(回答) Colocalize している。

質問10) CD147 とインテグリン $\beta 1$ の colocalize は、悪性腫瘍で特徴的なことか。

(回答) 悪性腫瘍でない細胞でも CD147 とインテグリン $\beta 1$ の colocalize の報告がある。

質問11) CD147 ノックダウン細胞での増殖のスピードはどうか。

(回答) 増殖スピードは落ちる。

質問12) 実際に実験している際に、細胞がはがれやすい・はがれにくいなどの差はあったか。

(回答) 実験をする中でははがれやすさに差を感じることはなかった。

質問 13) CD147 ノックダウン細胞での FAK のリン酸化の機序はどのようなものか。

(回答) FAK のリン酸化の機序については今回は検討していない。

質問 14) CD147 ノックダウンで増殖能が低下するようだが、ERK や PI3K などの関与はあるか。

(回答) FAK の下流に多くのシグナルがあるため関与している可能性はあるが、今回は検討していない。

質問 15) FAK のリン酸化部位は他にもいくつかあるが、今回のリン酸化部位以外のものに差はなかったか。

(回答) 他の部位についても実験を行ったが、はっきりした差は認められなかった。

質問 16) CD147 を抑えるような薬の開発、薬剤の報告などはあるか。

(回答) マウスモデルで CD147 抗体を使って実験し、肺癌や頭頸部癌に効果があったとの報告がある。

質問 17) コラーゲン I は骨の細胞外マトリックスなので、骨転移や骨に対する影響はないのか。

(回答) 骨転移・骨に対する影響は今回は検討していない。

質問 18) Fig 3 は細胞をまいて何時間後に観察しているのか。

(回答) 一時間後に観察している。

質問 19) Fig 3 ではかなり形態に差があるが、通常の培養をしている際に形態に差はあったか。

(回答) 通常の培養時には形態の差は認めなかった。Fig 3 ではコラーゲン I でコートしたカバーガラスを使用しており、その影響が考えられた。

質問 20) CD147 ノックダウンで悪性黒色腫の migration、invasion、metastasis はどうなるのか。

(回答) Invasion、migration、metastasis については以前論文を出しており、ノックダウン細胞で invasion、migration、metastasis が落ちることがわかっている。

質問 21) A375 を選んだ理由は何か。

(回答) 以前より当研究室で使用しており、CD147 が強く発現していることを確認していたため使用した。

質問 22) Adhesion assay の結果でノックダウン細胞は接着がおちているが、この結果から遊走能が落ちているといえるか。

(回答) Migration は接着と接着解除が交互に行われることが必要であり、adhesion の結果だけで migration についての評価は出来ない。

質問 23) 接着能が落ちると拡散しやすくなり転移しやすくなるのか。

(回答) 転移する際は一度接着が落ち、遊走してから、さらにまたどこかで接着しなければ転移しないと考えられ、CD147 ノックダウンではこのサイクルがうまく働かず、invasion、metastasis が落ちるのではないかと考えられる。

質問 24) A375 の接着に関与する蛋白は、コラーゲン I とコラーゲン IV か。

(回答) 今回の adhesion assay の結果からはコラーゲン I とコラーゲン IV と考えられる。

質問 25) Adhesion assay でノックダウンにより 2~3 割しか adhesion は落ちていないが、この差で migration に差が出てくるのか。もっとほかに重要な接着蛋白があるのか。CD147 以外の接着のメカニズムがあるのか。

(回答) 今回は検討していないため、今後検討が必要である。

質問 26) 薬剤などで FAK のリン酸化を阻害した場合、接着性は戻るのか。

(回答) その可能性は考えられるが、今回は検討していないため、今後検討が必要である。

質問 27) 細胞の遊走の方向など極性を決めるものは何かあるのか。

(回答) 酸素濃度、pH 等が考えられる。

質問 28) Fig 3b に関して CD147 がインテグリン $\beta 1$ の細胞内の局在をコントロールする機序はあるのか。

(回答) Monocarboxylate transporters (MCTs) の膜への発現に関して、CD147 はシャペロンとしての働きがあることがわかっており、同様の機序が考えられる。

質問 29) 通常の培養で接着性に差がなかったとのことだが、ヒトロネクチンに接着するのではないか。血清でコートして adhesion assay などは行わなかったか。

(回答) 今回は行っていないため、今後検討が必要である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。