Research Seminar

癌転移と接着分子

癌転移と接着分子

済木 育夫*

Summary

癌の転移形成過程は癌細胞相互あるいは癌細胞と宿主の細胞（特に血管内皮細胞，免疫系細胞や血小板など）あるいは細胞外マトリックスなどの種々の生体成分との間の複雑な反応カスケードから成り立っており，これらの相互作用は癌細胞の転移形質の発現に重要な役割を果たしていると考えられる。最近，多くの細胞接着に関与する分子およびその受容体が明らかにされつつあり，その制御ならびに分子機構が注目されている。従来，細胞外マトリックスを構成する接着分子としてフィブロネクチンおよびラミニンなどが癌の転移と深く関係していることが示唆されてきた。私共は癌の転移とその形成過程における細胞接着分子およびその分子との相互作用に着目し，いくつかの接着ポリペプチド（特にフィブロネクチン由来の細胞認識配列 RGD 関連ペプチド）を用いて癌細胞の機能（接着性・運動性・浸潤能など）を制御することにより，癌転移の抑止とその機序を解明しようとする試みを行ってきた。本研究はさらに癌転移の防止あるいは治療に有効な薬剤開発の手がかりを与えるものと思われる。

はじめに

癌細胞の転移性は，その自律的な増殖とともに悪性度を特徴づける指標であり，診断および治療法が進んだ今日でも克服することができない臨床上の大きな課題である。癌転移の実験モデルが確立されて以来¹⁾，この現象を細胞レベルで研究することが可能となり，さらに近年では癌転移の複雑な機序が分子レベルで解明されつつある。

本稿では，癌転移を決定する種々の因子のうち癌細胞と細胞外マトリックスとの接着相互作用および癌細胞の接着機能を制御することにより癌転移の阻止を試みようとする最近の知見について紹介する。

癌転移の機序

癌の転移は癌細胞の原発巣からの離脱と周辺組織への浸潤から転移組織での増殖に至る複雑な過程を経て成立している(図1)。また，これらの過程は癌細胞側と宿主側の因子に影響される。前者において，原発巣は絶えざる遺伝子変化に伴い，増殖能，薬剤感受性，免疫原性，形態などの異なった細胞形質を示す不均一な細胞集団から構成されており，高/低転移能²⁾，周辺組織への浸潤能³⁾，ある種の転移性癌細胞からの自己増殖因子の産生⁴⁾など，種々の要因が挙げられる。

一方，宿主側の要因としては，血中内での物理的あるいは解剖学的条件，免疫担当細胞による防御機構，血管内皮細胞および血小板との接着相互作用，さらに転移周辺組織からの増殖因

*Ikuko SAIKI：北海道大学免疫科学研究所

図1. 癌の転移形成過程

子の影響⁵⁾などが考えられる。

このように、癌転移は遺伝子変化により転移に好都合な細胞形質と臓器・組織選択性を獲得し、さらに宿主の淘汰圧から逃れ、首尾よくこれらの過程を突破した少数の癌細胞によって形成され得るのである。

細胞接着分子

癌転移形成の一連の動きの中で、癌細胞は宿主の正常細胞や癌細胞同士、あるいは細胞外マトリックスを含む種々の生体成分に影響され、癌細胞の転移形質の発現と調節が決定されているものと考えられる。最近、正常あるいは癌細胞を問わず細胞接着現象やその接着分子について分子レベルで解明されつつあり、構造上の類似性からカドヘリン⁶⁾、免疫グロブリン⁷⁾、インテグリン⁷⁾⁸⁾およびセレクチン⁷⁾⁹⁾・ファミリーが明らかとなってきた。これらは主として膜貫通型タンパク質で接着を通じ細胞内への情報伝達を介して基本的な細胞活動（接着・運動・移動・増殖・分化など）の調節に寄与していると考えられる。

癌細胞同士あるいは癌細胞-正常細胞間の接

着は細胞表面に発現されている細胞間接着分子が介在しており、カドヘリン分子群、免疫グロブリン群あるいはセレクチン分子群などが知られている。一方、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンなどの糖タンパク質やヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸などのプロテオグリカンを含む細胞外マトリックスと癌細胞の接着はインテグリン分子群を含む細胞表面上の接着分子などが関与している。癌の転移における細胞-細胞あるいは細胞-細胞外マトリックスに関わると思われる接着相互作用を図2に示す。

これら接着分子は細胞同士の分子識別、細胞機能調節あるいは細かな網目構造を形成するなど、癌転移と密接に関わっている。

細胞外マトリックスと癌転移

従来、フィブロネクチンやラミニンなどの細胞外マトリックス分子が癌の転移に深く関与していることが指摘されてきた。細胞が腫瘍ウイルスや化学発癌剤などにより悪性転換すると、細胞外マトリックス分子、特にフィブロネクチンの合成や細胞外への蓄積が減少すること¹⁰⁾、さらに最近になってインテグリン分子 ($\alpha_5\beta_1$ レ

細胞間の接着

癌細胞の内皮細胞あるいは細胞外マトリックスへの接着

図2. 癌転移における細胞-細胞あるいは細胞-細胞外マトリックスの接着相互作用

セプター)の発現量の減少やフィブロネクチンへの接着性の低下も示された¹¹⁾。フィブロネクチンやラミニンは癌細胞の接着、移動能を促進すること¹²⁾、転移性癌細胞では膜上のラミニンレセプターの発現が高いこと¹³⁾、ラミニンであらかじめ培養した癌細胞は基底膜を構成するコラーゲン分解酵素を誘導し、さらに肺への転移能が著明に増加すること¹⁴⁾などが報告されている。

フィブロネクチン(図3)あるいはラミニン分子はドメイン構造をもち分子内に多くの機能を分散させている。生化学的あるいは遺伝子工学的手法により構造が明らかにされるとともに複数の細胞接着部位の存在とそれに対するレセプターも多数発見されてきた。細胞結合ドメイン内のRGD配列が細胞認識部位であり¹⁵⁾、多

くの細胞接着関連分子にも存在・機能し、その細胞受容体が $\alpha_5\beta_1$ インテグリンレセプターであることが同定された¹⁶⁾。最近RGD配列以外にIII CS (type III homology connecting segment) 領域内にCS1ペプチドおよびCS5ペプチドが存在し、メラノーマ細胞、Tリンパ腫細胞さらにBリンパ芽球などが選択的にこの領域を認識することも明らかにされた¹⁷⁾。この部位を認識する $\alpha_5\beta_1$ レセプターはサイトカインで活性化された血管内皮細胞上のVCAM-1とも結合する¹⁸⁾。さらに、33KDaヘパリン結合フラグメント内に細胞接着配列としてペプチドIおよびIIも見出されている¹⁹⁾。 α 、 β 鎖からなるインテグリンレセプターは細胞外マトリックスのみならず細胞間の接着においても重要な働きを持ち、その認識機構が α 、 β 鎖による接着特異性に加えて糖鎖部分により複雑に調節されていることが示され²⁰⁾、転移過程における癌細胞の接着・遊離の制御に関与していることも予想される。

一方、基底膜に固有の接着分子であるラミニンは、十字架様の構造を持ち、その分子内のA鎖上にRGD配列を有しているが、これとは別にB鎖上のYIGSR配列²¹⁾などが細胞接着ペプチドとして同定されている。現在これらを認識するレセプターの解析も進められている。

細胞接着制御による癌転移抑制の試み

細胞接着分子と細胞との接着相互作用が明らかにされるとともにその機能を制御しようとする試みとして、近年、細胞接着ペプチドを癌の

図3. フィブロネクチンの構造と細胞接着部位

転移抑制に応用することが可能となってきた。Yamada ら²²⁾はフィブロネクチンの接着シグナルとしてのGRGDS ペプチドが、Martin ら²³⁾はラミニンの接着ペプチドCDPGYIGSR やPDSGR がメラノーマ細胞 B16-F10 の肺への実験的転移を抑制することを示した。我々は RGD 配列を繰返し単位に持つ poly (RGD) およびその関連ポリペプチド類を用いて癌転移の抑止とその機序の解析を試みておりその一部を紹介する^{24)~31)}。

マウスの実験的および自然肺転移モデルを用いた合成ポリペプチドの転移抑制効果は表 1 A および B に示した。3 種のマウス転移性癌細胞 B16-BL 6 メラノーマ、ルイス肺癌およびコロン26結腸癌およびヒト A375M メラノーマ細胞による実験的肺転移を poly (RGD) は有意に抑制し、さらに治療実験モデルである自然肺転移

系においても同様に著明な転移抑制効果を示した(図 4)。しかし RGD 配列をもたないランダム poly (R, G, D) では全く抑制効果が認められない。Poly (RGD) による癌転移抑制機序に

図 4. 合成ポリペプチド, poly (RGD) によるマウスメラノーマ (B16-BL 6) の肺転移の抑制
A: 対照群
B: poly (RGD) 投与群
黒点は腫瘍

表 1 A. 実験的肺転移に及ぼす合成ポリペプチドの効果

腫 瘍	ポリペプチド	用量 (μ g/マウス)	肺転移結節数 平均 $\pm$ SD (範囲)	P
B16-BL6 メラノーマ	PBS	—	152 $\pm$ 21(120~176)	
	poly (RGD)	500	38 $\pm$ 5(33~46)	<0.001
	poly (R, G, D)	500	109 $\pm$ 7(107~116)	
	RGD	3000	31 $\pm$ 40(2~88)	<0.001
ルイス肺癌 (3LL)	PBS	—	123 $\pm$ 22(98~158)	
	poly (RGD)	500	191 $\pm$ 56(117~262)	
	poly (R, G, D)	500	51 $\pm$ 18(23~65)	<0.001
	poly (R, G, D)	500	141 $\pm$ 29(111~176)	
コロン26 結腸癌	PBS	—	201 $\pm$ 26(174~232)	
	poly (RGD)	500	81 $\pm$ 26(46~112)	<0.001
	poly (R, G, D)	500	204 $\pm$ 32(169~250)	

種々の癌細胞をポリペプチドとともにマウスの尾静脈内より注射した後、14日目に肺の転移結節数を計測した。

表 1 B. B16-BL6メラノーマの自然肺転移に及ぼす合成ポリペプチドの効果

	ポリペプチド	投与時期	用 量 (μ g/マウス)	肺転移結節数 平均 $\pm$ SD (範囲)	P
実験 I	PBS		—	69 $\pm$ 15(45~84)	
	poly (RGD)	on day 7, 9, 11	100 $\times$ 7	18 $\pm$ 9(6~21)	<0.001
	poly (R, G, D)	13, 15, 17, 19	100 $\times$ 7	51 $\pm$ 9(36~60)	
	RGD		100 $\times$ 7	72 $\pm$ 27(57~117)	
実験 II	PBS	on day 22, 24, 26	—	106 $\pm$ 23(73~122)	
	poly (RGD)	28, 30, 32, 34	100 $\times$ 7	41 $\pm$ 19(26~73)	<0.005

マウスの足趾に B16-BL6 メラノーマ (5×10^5 /マウス) を皮下移植した後、種々の投与時期に 100 μ g のポリペプチドを尾静脈内に投与した。原発巣(腫瘍)は移植後21日目に外科的に切除し、さらに2週間後に肺の転移結節数を計測した。

表 2. 合成ポリペプチド poly (RGD) の生物活性

合成ポリペプチド poly(RGD) の生物活性	
癌転移抑制効果	
実験的肺転移 (マウス癌細胞)	: ↓
(ヒト癌細胞)	: ↓
自然肺転移	: ↓
癌細胞の浸潤	: ↓
(基底膜再構成基質を用いた)	
癌細胞の運動性 (接触走化性)	: ↓
癌細胞の接着	
・細胞外マトリックスに対する	: ↓
(フィブロネクチン)	
・血管内皮細胞に対する	: -
・癌細胞同士	: -
細胞外マトリックスの酵素的分解	
ヘパラーゼ活性	: -
タイプIVコラーゲナーゼ活性	: -
血小板凝集	
癌細胞による	: ↓
ADP, コラーゲン, トロンビン刺激による	: ↓
腫瘍血管新生 (マウス)	: ↓
血管内皮細胞の遊走性	: ↓
免疫系細胞に及ぼす効果	
NK細胞・マクロファージ活性化	: -
癌細胞の分裂・増殖	: -

↓: 抑制効果, -: 影響なし

については表 2 に要約した。特に, ① 癌細胞 B16-BL 6 メラノーマの肺へのアレスト (捕捉・着床) を有意に抑制する。② 血管内皮細胞への着床に関わる癌細胞誘導性の血小板凝集を阻害すること——すなわち活性化血小板上の IIb/IIIa レセプターへのフィブリノーゲン分子等の結合を RGD 配列依存的に阻害する。③ 基底膜再構成基質を用いた癌細胞基底膜浸潤を抑制する (表 3)。④ 癌細胞の移動能 (接触走化性) や癌細胞への血管内皮細胞の移動 (すなわち微小血管新生) を阻害する。⑤ poly (RGD) の血中の半減期は GRGDS ペプチドに比べ約 6 倍に遅延している。

このように, poly (RGD) は癌転移形成の複雑な過程において主として癌細胞膜上のレセプターとそのリガンドとの接着相互作用を抑制し, 癌細胞の機能を制御するものと考えられる。

そのほか, 環状 RGD ペプチド, 組換え型フィ

表 3. 癌細胞浸潤に及ぼす合成ポリペプチドの効果

ポリペプチド	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	浸潤した癌細胞数 平均 $\pm$ SD	P
PBS	—	136 $\pm$ 19	
poly(RGD)	20	172 $\pm$ 34	
	200	106 $\pm$ 14	
	500	58 $\pm$ 17	<0.001
poly(R, G, D)	500	108 $\pm$ 16	
RGD	500	113 $\pm$ 25	

B16-BL6 メラノーマ (2×10^5) は, トランスウェルチャンパーの上層に加えた。フィルターは上部表面をマトリジェル ($5 \mu\text{g}$) で, 下部表面はフィブロネクチン ($5 \mu\text{g}$) で各々コートした。実験開始後 6 時間目にフィルター下部表面へ移行した癌細胞の数を計測した。

プロネクチン・フラグメントあるいは (GRGDS)₄ や GRGDS (GRGES)₂ GRGDS ポリマーを用いて癌の転移および浸潤抑制の試みも行われている。一方, ICAM-1 分子発現がメラノーマ細胞の進展・転移³²⁾と, LFA-1 分子 (β_2 インテグリン) の発現がある種のリンパ腫の肝転移形成や線維芽細胞の単層への浸潤能と高い相関を示す³³⁾ことが報告された。化学発癌物質 MNNG により誘発したヒトの悪性転換細胞は $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_1\beta_1$ インテグリンの発現と浸潤能が併行して増加したが, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ の発現には影響がみられず, $\alpha_v\beta_3$ の発現はむしろ著しく低下していることが示された³⁴⁾。最近, Hemler ら³⁵⁾は VLA-2 cDNA を移入したヒト横紋筋腫 (RD) は α_2 インテグリンの発現とコラーゲンやラミニンに対する接着性の上昇に加えて, ヌードマウスを用いた実験的および自然転移を著しく増大することを報告している。また, ヒトグリオーマ細胞の転移能の上昇は NCAM 蛋白の発現消失と関係していること³⁶⁾や種々のヒト肉腫細胞における E-カドヘリンの発現の低下や消失はその脱分化および浸潤能の上昇を引起すこと³⁷⁾なども見出されてきている。この様にそれらの発現調節機構の解明も癌転移の制御に寄与するかもしれない。細胞接着機構における基礎的研究の進展とともに, 細胞機能 (接着など) を制御する物質を用いた新しい癌治療への応用が期待されるものと思われる。

文 献

- 1) Fidler, I. J. : Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature (New Biol.)*, 242 : 148-149, 1973.
- 2) Poste, G. , Tzeng, J. , Doll, J. , et al. : Evolution of tumor cell heterogeneity during progressive growth of individual lung metastases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , 79 : 6574-6578, 1982.
- 3) Nakajima, M. , Welch, D. R. , Belloni, P. N. , et al. : Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res.* , 47 : 4869-4876, 1987.
- 4) Chadwick, D. E. , Lagrade, A. E. : Coincidental acquisition of growth autonomy and metastatic potential during the malignant transformation of factor-dependent CCL39 lung fibroblasts. *J. Natl. Cancer Inst.* , 80 : 318-325, 1988.
- 5) Nicolson, G. L. , Dulski, K. M. : Organ specificity of metastatic tumor colonization is related to organ-selective growth properties of malignant cell. *Int. J. Cancer*, 38 : 289-294, 1986.
- 6) 竹市雅俊 : 組織構築の分子的基础—細胞識別におけるカドヘリンの役割—生化学, 59 : 1-9, 1987.
- 7) Springer, T. A. : Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346 : 425-434, 1990.
- 8) Hynes, R. O. : Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell*, 48 : 549-554, 1987.
- 9) Springer, T. A. and Lasky, L. A. : Sticky sugars for selectins. *Nature*, 349 : 196-197, 1991.
- 10) Yamada, K. M. and Olden, K. : Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, 275 : 179-184, 1978.
- 11) Plantefaber, L. C. and Hynes, R. O. : Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell*, 56 : 281-290, 1989.
- 12) McCarthy, J. B. , Furcht, L. T. : Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells *in vitro*. *J. Cell Biol.* , 98 : 1474-1480, 1984.
- 13) Wewer, U. M. , Liotta, L. A. , Jaye, M. et al. : Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , 83 : 7137-7141, 1986.
- 14) Terranova, V. P. , Williams, J. E. , Liotta, L. A. , et al. : Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin. *Science*, 226 : 982-985, 1984.
- 15) Pierschbacher, M. D. , Ruoslahti, E. : Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309 : 30-33, 1984.
- 16) Pytela, R. , Pierschbacher, M. D. , Ruoslahti, E. : Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell*, 40 : 191-198, 1985.
- 17) Humphries, M. J. , Komoriya, A. , Akiyama, S. K. , et al. : Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type-specific adhesion. *J. Biol. Chem.* 262 : 6686-6892, 1987.
- 18) Elices, M. J. , Osborn, L. , Takada, Y. , et al. : *Cell*, 60 : 577-584, 1990.
- 19) McCarthy, J. B. , Skubitz, A. P. N. , Zhao, Q. , et al. : RGD-independent cell adhesion to the carboxy-terminal heparin-binding fragment of fibronectin involves heparin-dependant and independent activities. *J. Cell Biol.* , 110 : 777-787, 1990.
- 20) Akiyama, S. K. , Yamada, S. S. and Yamada, K. M. : Analysis of the role of glycosylation of the human fibronectin receptor. *J. Biol. Chem.* , 264 : 18011-18018, 1989.
- 21) Graf, J. , Iwamoto, Y. , Sasaki, M. , et al. : Identification of an amino acid sequence in Laminin mediating cell attachment, chemotaxis, and receptor binding. *Cell*, 48 : 989-996, 1987.
- 22) Humphries, M. J. , Olden, K. , Yamada, K. M. : A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science*, 233 : 467-470, 1986.
- 23) Iwamoto, Y. , Robey, F. A. , Graf, J. , et al. : YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science*, 238 : 1132-1134, 1987.
- 24) Saiki, I. , Iida, J. , Azuma, I. , et al. : Biological activities of synthetic polypeptides containing a repetitive core sequence (Arg-Gly-Asp) of cell adhesion molecules. *Int. J. Biol. Macromol.* , 11(2) : 23-25, 1989.
- 25) Saiki, I. , Murata, J. , Iida, et al. : The inhibition of murine lung metastasis by synthetic polypeptide, poly (Arg-Gly-Asp) and poly (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) with a core sequence of cell adhesion molecules. *Br. J. Cancer*, 59 : 194-197, 1989.
- 26) Murata, J. , Saiki, I. , Iida, J. , et al. : Inhibition

- of tumor cell adhesion by anti-metastatic polypeptide containing a repetitive Arg-Gly-Asp sequence. *Int. J. Biol. Macromol.*, 11(4): 226-232, 1989.
- 27) Saiki, I., Iida, J., Murata, J., et al.: The inhibition of the metastases of murine malignant melanoma by synthetic polymeric peptides containing core sequences of cell-adhesive molecules. *Cancer Res.*, 49: 3815-3822, 1989.
 - 28) Murata, J., Saiki, I., Azuma, I., et al.: Inhibitory effect of a synthetic polypeptide, poly (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), on the metastatic formation of malignant tumor cells. *Int. J. Biol. Macromol.*, 11(4): 97-99, 1989.
 - 29) Saiki, I., Murata, J., Iida, J., et al.: Antimetastatic effects of synthetic polypeptides containing repeated structures on the cell adhesive Arg-Gly-Asp (RGD) and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) sequences. *Br. J. Cancer*, 60: 722-728, 1989.
 - 30) Saiki, I., Murata, J., Makabe, T., et al.: Inhibition of tumor angiogenesis by synthetic cell-adhesive polypeptide derived from fibronectin, poly (RGD). *Jpn. J. Cancer Res.*, 81: 668-675, 1990.
 - 31) Saiki, I., Murata, J., Matsuno, K., et al.: Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric RGD peptide, poly (RGD) and its related analogues. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81: 660-667, 1990.
 - 32) Johnson, J. P., Stade, B. G., Holzmann, B., et al.: *De novo* expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 641-644, 1989.
 - 33) Roossien, F. F., de Kuiper, P. E., de Rijk, D., et al.: Invasive and metastatic capacity of revertants of LFA-1-deficient mutant T-cell hybridomas. *Cancer Res.*, 50: 3509-3513, 1990.
 - 34) Dedhar, S. and Saulnier, R.: Alteration in integrin receptor expression on chemically transformed human cells: specific enhancement of laminin and collagen receptor complexes. *J. Cell Biol.*, 110: 481-489, 1990.
 - 35) Chan, B. M. C., Matsuura, N., Takada, Y., et al.: *In vitro* and *in vivo* consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science*, 251: 600-602, 1991.
 - 36) Anderson, A. M., Moran, N., Gaardsvoll, H., et al.: Characterization of NCAM expression and function in BT 4 C and BT 4 Cn glioma cells. *Int. J. Cancer*, 47: 124-129, 1991.
 - 37) Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., et al.: E-cadherin-mediated cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.*, 113: 173-185, 1991.