

新しいタイプのガン細胞特異的細胞接着因子に関する基礎的研究

A basic study on a novel cell adhesion molecule specific for the tumor cells

研究代表者 東京工業大学生命理工学部生体機構学科助手 高木 淳一

Assistant Profesor, Dept. of Biological Sciences, Faculty of
Biotechnology and Bioscience, Tokyo Institute of Technology.
Junichi TAKAGI

We have previously reported that propolypeptide of von Willebrand factor (pp-vWF) promotes melanoma cell adhesion in a $\beta 1$ integrin-dependent manner. In this report, we identified the α subunit of the cell adhesion receptor for pp-vWF as $\alpha 4$. Human leukemia cell lines that express $\alpha 4\beta 1$ integrin (very late antigen-4, VLA-4), but not cell line which lacks VLA-4, attached well to pp-vWF substrate and these adhesions were completely inhibited by anti- $\alpha 4$ integrin monoclonal antibody HP2/1. Adhesion of mouse melanoma expressing $\alpha 4$ integrin was also inhibited by anti-mouse $\alpha 4$ mAb PS/2. Furthermore, transfection of human $\alpha 4$ cDNA into $\alpha 4^-$ Chinese hamster ovary (CHO) cells resulted in an acquisition of adhesive activity to pp-vWF, indicating that pp-vWF is a ligand for VLA-4 integrin. Using recombinant fragment of pp-vWF, the cell attachment site was shown to be located within amino acid residues 376-455 of pp-vWF. A series of synthetic peptides covering this region were tested for the ability to promote cell attachment and a 15-residue peptide designated T2-15 (DCQDHSFSIVIEVQ, residues numbered 395-409) promoted VLA-4 dependent cell adhesion. The peptide was also capable of inhibiting cell adhesion to pp-vWF, suggesting that this sequence represents the cell attachment site. By affinity chromatography using peptide T2-15-Sepharose, it was found that $\alpha 4\beta 1$ integrin complex from extracts of surface iodinated B16 cells specifically bound to the peptide. These results strongly suggest that pp-vWF is a novel physiological ligand for VLA-4.

研究目的

細胞が生体内でその機能を発揮するためには組織中で適切な足場を確保することが必須であり、その役割を担うのがいわゆる細胞外マトリックス(ECM)である。これまで細胞接着活性を持つ ECM中の蛋白質はフィブロネクチンやビトロネクチン、コラーゲン、ラミニンなど数多く知られているが、最近これらの接着タンパク質は単なる足場を細胞に提供するだけでなく、種々の情報の受け渡しを細胞との間で行い、分化・増殖・発生・

移動など様々な局面で非常に重要な細胞機能制御作用を持っていることが明らかになってきた。本研究は、申請者が最近ユニークな細胞接着活性をもつことを発見したフォンビルブランド因子のプロリペプチド(pp-vWF)という蛋白質について、活性部位の決定やレセプターの同定等を試み、その生理的役割の解明、ひいては細胞接着現象を制御する手段の開発に役立てようとするものである。この蛋白質はある種のガン細胞に特異的な接着活性を持つ非常に特殊な接着タンパク質

であることが申請者の最近の研究でわかった。そしてこのタンパク質に対する細胞側のレセプターがインテグリンファミリーに属する新しいレセプターである可能性を示唆する結果も得ている。このタンパク質の機能ドメインをアミノ酸レベルで同定することができれば、これを基質に組み込むことによってガン細胞特異的な人工マトリックスが得られ、ガン研究の有用な道具となりうる。またそれにとどまらず、合成ペプチドをつかったガン転移の抑制などにも道が開けるかもしれず、きわめて幅広い応用が期待されると考える。本研究では、pp-vWF 分子上の活性部位の同定とレセプターの同定にしばってこのユニークな細胞接着現象の機構を解明していく。

研究経過

本研究ではまず pp-vWF の機能ドメイン（細胞接着部位）をアミノ酸レベルで同定することが何よりも大切であったが、これに関してまず、プロテアーゼ分解によって得たフラグメントを単離・精製してその細胞接着活性を調べ、どの部分に活性が存在するかを予想することを試みた。また pp-vWF に対するモノクローナル抗体を多数もっているのので、これらのうち接着活性を特異的に抑制するクローンを選り出し、そのエピトープを解析することによっても活性部位を予想した。そうやってある程度の領域に活性部位が狭められたので、アミノ酸配列の情報から合成ペプチドを作製し、接着活性に必要な最小のアミノ酸シーケンスを決定した。また pp-vWF の cDNA がすでにクローニングされているので、活性部位を含むと思われる部位を PCR 法により増

幅して大腸菌に組み込み、活性のある組み替えフラグメントを得た。このようにしてえられた細胞接着配列は、RGD 配列やラミニンの YIGSR 配列など、これまでに知られている配列とは全く違うものであった（pp-vWF の全アミノ酸配列中にはこれらの配列は存在しない）。ガン細胞が pp-vWF に接着する際に用いているレセプターを同定するために、 ^{125}I で表面ラベルした細胞の extract を前述のペプチドを固定化したゲルに通して結合する蛋白質を調べた。pp-vWF への接着は Mg^{2+} 要求性であるので溶出には EDTA を用いた。こうして得たレセプターを各種インテグリンに対する抗体との反応性を調べ、その正体を突き止めた。

研究成果

まず pp-vWF の細胞接着部位の決定に関しては、図 1 に示すような組換え蛋白質を作製して接着活性を調べたところ、

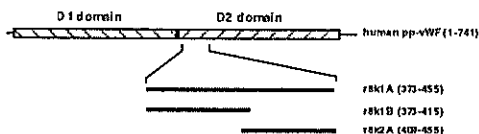


Fig. 1. Schematic diagram of recombinant proteins contained in the central region of human pp-vWF molecule. The top part of the figure shows the structure of the full length pp-vWF subunit composed of two tandem repeats of D-type domains. The locations of amino acid sequences expressed as glutathione-S-transferase fusion proteins are shown in bold/italics. Numbers in the parentheses indicate positions of amino acid residues in human pp-vWF sequence.

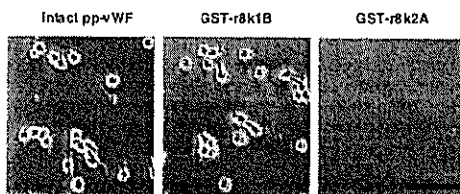


Fig. 2. Attachment and spreading of B16 melanoma cells to N-terminal half of recombinant r8k1a fragment. GST fusion proteins bearing either N-terminal (r8k1B) or C-terminal (r8k2A) half of the cell adhesive R8kDa fragment were tested for their ability to support B16 melanoma adhesion. Bar, 100 μm .

図 2 のように r8k1B と名づけた部分に活性があり、この部位の配列を元につくった合成ペプチド（表 1）の活性を調べ、

Table 1. Synthetic peptides used in this study

Peptide	Amino acid sequence	Location	MW
T1	SFDNRVYTFSGICQYLLARD	376-395	2416.7
T2	LLARDCKDIDHSFISVIETVQC	391-410	2277.6
T3	ETVQCADDRDAVCTRSVTVR	406-425	2224.4
T4	SVTVRLVGLHNSLVKIKIIGA	421-440	2326.5
T5	LKHGAGVAMIDGQDVQIPLLK	436-455	2080.5
T1-8	ESGICQYLL	384-391	930.1
T2-15	DCQDHSFISVIETVQ	395-409	1210.9
T2-10	DCQDHSFISV	395-404	1150.2
BP-5	LRGCTFPPGLFLDFNGSCHPR	662-682	2303.5

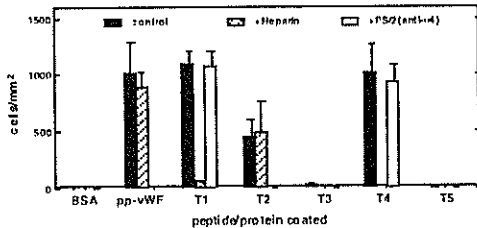


Fig. 3. Properties of cell adhesion activity of synthetic peptides derived from RGD portion of human pp-vWF. Five synthetic peptides were subjected to cell adhesion assay using B16 mouse melanoma in the absence (closed column), or presence of 1:1000 dilution of anti-mouse $\alpha 4$ integrin mAb PS2 (open column) or 100 μ g/ml heparin (hatched column). Note that only the peptide designated T2 shows $\alpha 4$ integrin-dependent, heparin-independent adhesion like intact pp-vWF, while peptides T1 and T4 exhibit $\alpha 4$ integrin-independent, heparin-inhibitable one. Data are mean \pm SE of one of the representative experiments in which triplicate determinations were made.

最終的にわずか 15 残基のペプチドが細胞接着に重要であることがわかった (図 3、4)。またこのペプチドはそれ自体

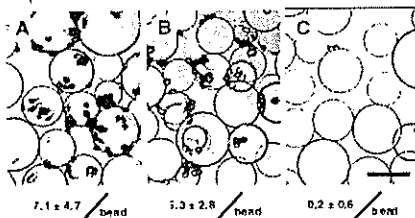


Fig. 4. Attachment of B16 melanoma cells to Sepharose beads carrying peptides derived from RGD fragment. Peptides T2 (A), T2 (100 μ M) (B), and T4 (C) were coupled to 80 μ M activated Sepharose and B16 melanoma cells were allowed to adhere on the beads. Fixed and photographed under microscope. The numbers indicate the photographs show the mean \pm SE of the number of cells adhered per bead by averaging over 100 beads. Bar, 100 μ m.

接着活性を持つだけでなく、pp-vWF に対する細胞接着を阻害する活性も持っていた (図 5)。この配列は DCQDHSFISVIETVQ であり、これは pp-vWF の一次構造上 395-409 残基の部分に相当する。pp-vWF はたがいに相同な 2 回の繰り返し構造 (D ドメイン) からなるが、細胞接着部位は 2 回目の繰り返し構造の N 末端側にあった。この部位は Cys に富む globular なドメインに挟まれ

peptide added

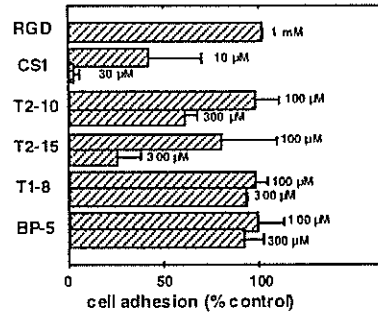


Fig. 5. Inhibition of B16 cell adhesion to pp-vWF by the peptides. Adhesion of B16 mouse melanoma cells to pp-vWF was assessed in the presence of the indicated concentration of peptides. Cells adhered were counted and the adhesion was expressed as percent of the number of cells adhered in the absence of peptide. The data represent mean \pm SE of the three independent experiments in which triplicate determinations were made.

る形で存在し、また二次構造の予測からも分子の表面に露出している可能性が高いことが示唆された。このペプチドを ligand としてアフィニティークロマトグラフィーを行ない、マウスメラノーマである B16 細胞からレセプターを単離・精製した。得られたレセプターはインテグリン特有の、分子量 125/150 万のヘテロダイマーの性質を示し、 $\beta 1$ インテグリンファミリーに属するというそれまでの結果を支持していた。そこで各種 α 鎖に対する抗体との反応性から、これが $\alpha 4$ 鎖であること、すなわち本レセプターが、VLA-4 と呼ばれる、リンパ球の血管への接着の際に重要な働きをする接着レセプターであることが明らかとなった (図 6、7)。

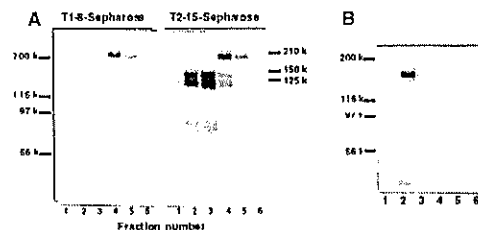


Fig. 6. T2-15 peptide binds $\alpha 4 \beta 1$ integrin complex from B16 cells. A. Affinity chromatography of surface isolated, detergent-treated B16 cells on T2-15 and T1-8-Sepharose. Fractions 1-6 (aggregates) and fractions 7-8 (flow-through) were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions on a 7.5% polyacrylamide gel. The other polypeptides of relative molecular masses of 150 and 125 kDa bound only to T2-15-Sepharose. The positions of molecular mass standards are indicated on the left. B. Immunoblotting analysis of T2-15-Sepharose binding material with monoclonal antibodies. The B16 cell-derived fractions from T2-15-Sepharose were immunoprecipitated with the following antibodies, and analyzed on SDS-PAGE on 7.5% gel. Lane 1, polyclonal antiserum recognizing $\alpha 4 \beta 1$; lane 2, polyclonal antiserum recognizing $\alpha 1$; lane 3, polyclonal antiserum recognizing $\alpha 2$; lane 4, mouse IgG and rabbit IgG (I) (negative control); lane 5, polyclonal antiserum recognizing $\alpha 7 \beta 1$; and lane 6, polyclonal antiserum recognizing $\alpha 5 \beta 1$. The final concentrations were 2 μ g/ml for anti- $\alpha 4 \beta 1$ and 1.20 μ g/ml for others.

今後の課題と発展

前述のように、当初ガン(メラノーマ)細胞特異的な接着因子と思っていた pp-vWF が、免疫系で重要な働きをするレセプターのリガンドであること、すなわちこの蛋白質が生理的にはリンパ球などの炎症性の細胞が障害血管に接着する際の接着分子かもしれないことがわかった。この結果は全く予想外のもので、当初考えていた癌細胞特異的な転移抑制剤の開発は難しくなったが、そのかわりにこんどは炎症性疾患や動脈硬化などの予防・治療に関する研究につながる可能性が出てきた。これまで VLA-4 の生理的なりガンドは VCAM-1 という分子だと考えられてきたが、今後の研究によっては pp-vWF を介する第二の経路の重要性がクローズアップされてくるかもしれない。現在、炎症部位の血管での pp-vWF の動態について非常に興味深い結果が出つつあり、本研究は新たな段階を迎えようとしている。

発表論文リスト

1. J. Takagi, T. Kamata, J. Meredith, W. Puzon-McLaughlin and Y. Takada: Changing ligand specificities of $\alpha v \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins by swapping a short diverse sequence of the β subunit. *J. Biol. Chem.*, **272**, 19794-19800 (1997)
2. T. Isobe, T. Hisaoka, A. Shimizu, M. Okuno, S. Aimoto, Y. Takada, Y. Saito and J. Takagi: Propolypeptide of von Willebrand factor is a novel ligand for VLA-4 integrin. *J. Biol. Chem.*, **272**, 8447-8453 (1997)
3. H. Inuyama, T. Saito, J. Takagi, and Y. Saito: Factor X-dependent thrombin generating activities on a neuroblastoma cell and their disappearance upon differentiation. *J. Cell. Physiol.* in press (1997)
4. J. Takagi, T. Isobe, Y. Takada and Y. Saito: Structural interlock between ligand binding site and stalk like region of $\beta 1$ integrin revealed by a monoclonal antibody recognizing conformation-dependent epitope. *J. Biochem.*, **121**, 914-921 (1997)
5. S. Ueki, J. Takagi, and Y. Saito: Dual functions of transglutaminase in novel cell adhesion. *J. Cell Science*, **109**, 2727-2735 (1996)
6. 高木淳一: インテグリンスーパーファミリー、*生体の科学* **46**: 530-532 (1995)
7. J. Takagi, T. Aoyama, S. Ueki, H. Ohba, Y. Saito and L. Lorand: Identification of factor-XIIIa-reactive glutaminyl residues in the propolypeptide of bovine von Willebrand factor. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 773-777 (1995)
8. J. Takagi, and Y. Saito: Differential role of protein tyrosine phosphorylation/dephosphorylation in affinity modulation of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin in human fibroblasts. *Cell Struct. Funct.*, **20**, 403-413 (1995)