

氏 名 (本 籍) 川 崎 誠 康 (大阪府)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 6 1 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Effect of His-Gly-Lys motif derived from domain 5 of high molecular weight
kininogen on suppression of cancer metastasis both *in vitro* and *in vivo*
(高分子キニノーゲン・ドメイン5由来 ヒスチジン-グリシン-リジン-モ
チーフの癌転移抑制効果)

審 査 委 員 主 査 教 授 岡 部 英 俊

副 査 教 授 岡 村 富 夫

副 査 教 授 堀 江 稔

論文内容要旨

*整理番号	463	(ふりがな) 氏名	かわさき まさやす 川崎 誠康
学位論文題目	Effect of His-Gly-Lys motif derived from domain 5 of high molecular weight kininogen on suppression of cancer metastasis both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (高分子キニノーゲン・ドメイン5由来 ヒスチジン-グリシン-リジンモチーフの癌転移抑制効果)		
[目的]			
<p>高分子キニノーゲンは肝臓で産生される分子量 12 万の一本鎖ポリペプチド構造のタンパク質である。近年その6つの生理ドメインのマッピングが行なわれ、ドメイン4のブラジキニン以外に、ドメイン2・3がシステインプロテアーゼ阻害酵素である事や、血液凝固の内因系の補酵素として働く時、ドメイン6が第11因子やプレカリクレインと結合する部位である事などが解明され、多機能タンパク質としての性質が明らかとなった。中でもドメイン5 (D5_H) は、血小板凝集抑制、リンパ球の血管内皮への接着阻害、癌細胞の細胞外マトリックス (ECM) への接着・浸潤阻害、血管新生阻害など様々な細胞機能に関与することが報告されている。本研究はこの D5_H における癌細胞の接着・浸潤阻害機能と血管新生阻害機能を癌の抑制に応用するべく、それぞれの阻害活性における中心的なアミノ酸配列 (モチーフ) 及びその作用機序を明らかにする事を目的とした。</p>			
[方法]			
<p>1. <i>in vitro</i>での癌細胞接着・浸潤阻害における D5_Hの活性中心配列の検討 ヒト乳癌株化細胞を用いて ECM の一つであるビトロネクチンに対する接着能やビトロネクチンをケモアトラクタントとした際のマトリゲルへの浸潤能を検討した。D5_Hのアミノ酸配列を分割する形で合成したペプチド (D5_H由来ペプチド) 共存下での各機能の阻害率を求め、阻害活性を示したペプチドに共通する配列より活性の中心配列であるモチーフを同定した。</p> <p>2. マウス実験的肺転移モデルにおけるモチーフの阻害効果の検討 マウス尾静脈より悪性黒色腫細胞を注入し肺転移を形成する系において、<i>in vitro</i>で阻害活性を示したモチーフを含むペプチドを同時投与し、転移抑制効果を検討した。</p> <p>3. 細胞接着・浸潤阻害に関与する癌細胞膜の D5_Hレセプターの検出 乳癌細胞膜をビオチン化したのち膜タンパク質を可溶化し、これに D5_Hを結合させた。そのうち D5_Hの細胞接着・浸潤におけるモチーフ部分と特異的に結合するタンパク質のみを同じ配列を持つペプチド溶液を高濃度加える事で解離させ、電気泳動して検出した。</p> <p>4. 血管新生阻害作用における活性中心部位の同定 ヒト静脈血管内皮細胞 (HUVEC) をマトリゲル上で培養し管腔形成させるアッセイにおいて、D5_H由来ペプチド共存下での形成阻害を指標として、血管新生阻害作用における D5_Hの活性中心配列を検討した。</p>			
[結果]			
<p>1. 癌細胞の接着・浸潤を阻害したペプチドは、いずれもヒスチジン-グリシン-リジン (HGK) という共通のアミノ酸配列を有し、そのうちリジンをアルギニンに置き換えたペプチド (HGR) 及びタンパク質 (D5_HK487R) は阻害活性が消失した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. *印の欄には記入しないこと。

2. HGK ペプチドを投与した群の肺転移総数は著しく減少した (阻害率 95%)。一方 HGR ペプチドを投与した群は阻害率 27% と効果の減弱が顕著であった。
3. 分子量 95kDa のタンパク質が特異的に検出された。
4. HUVEC の管腔形成は HGK モチーフによらず、その C 末端側に位置する配列 HKNKGGK を有するペプチドによって阻害された。

[考察]

D5_Hにおける癌細胞の接着・浸潤阻害モチーフがHGKであるという事が、*in vitro*・*in vivo*において示された。またその効果はアミノ酸の持つチャージ依存性でなく、配列依存的であるという事がリジンと同じ塩基性のアルギニンに変換すると失活した事より明らかとなった。この作用機序の仮説としてD5_Hが細胞表面の接着レセプターにモチーフ部分を中心として結合する事で阻害する為と考えた。当初そのレセプターはインテグリン等のビトロネクチンレセプターと予測されたが、今回得られたバンドはモノマーであり分子量も異なるゆえ該当せず、新しいタンパク質である可能性が出て来た。現時点ではD5_Hは自身のHGKの部位を中心に95kDaの細胞膜レセプターに結合し、そこからのシグナルがインテグリン等の接着系のレセプターからのシグナル伝達を細胞内でブロックする事で細胞活動が抑制されると考えている。一方HGKモチーフの血管新生阻害における効果も検討したが、その活性中心はHGK部分の更にC末端側の領域に存在すると推定された。このHGKモチーフを認識する95kDaレセプターや血管新生阻害に関与するレセプターを同定し、それらを介した癌転移抑制機構を明らかにする事が出来れば、新しい癌抑制系が確立されると考えられる。

[結論]

1. 癌細胞の接着・浸潤を阻害する D5_H 中の最小機能配列は HGK であった。
2. *in vivo* においても HGK モチーフによる癌転移抑制効果が示された。
3. HGK モチーフによる接着・浸潤阻害作用には、95kDa の細胞表面レセプターが関与していると考えられた。
4. 血管新生阻害活性中心は HGK モチーフではなく、それに続く C 末端側の領域に存在すると推定された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	463	氏名	川崎 誠康
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、ヒト高分子キニノーゲンドメイン5の株化癌細胞に対する細胞接着・浸潤阻害機能を解析したものであり、以下の結果を得ている。</p>			
<ol style="list-style-type: none">1. ドメイン5を構成するアミノ酸配列の中から8残基のペプチド (GHGKHKNK) を合成した。このペプチドは癌細胞接着と浸潤の双方を阻害した。2. 阻害活性の中心部位は、ヒスチジン・グリシン・リジン (HGK) の3残基のアミノ酸配列であり、両阻害活性発現の最小単位 (モチーフ) を見いだした。3. 8残基のペプチドは、マウスを用いた肺転移モデルにおいても転移阻害効果があり、またこのモチーフが結合する受容体が癌細胞膜に存在した。4. 8残基のペプチドのC末端側に血管新生を阻害する活性があることも見いだした。			
<p>これらの結果は癌細胞接着・浸潤阻害や血管新生阻害に関わる生体内物質由来のペプチドを新たに同定したものである。これは癌転移の治療に道を拓くものと考えられ、博士 (医学) の学位を授与するに値するものと考えられる。</p>			
(平成16年2月13日)			