



Resistance of B16 melanoma cells to CD47-induced negative regulation of motility as a result of aberrant N-glycosylation of SHPS-1

小倉，武司

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3042

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003042>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 140 】

氏 名・(本 籍) 小倉 武司 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1600号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

Resistance of B16 melanoma cells to CD47-induced
negative regulation of motility as a result of aberrant
N-glycosylation of SHPS-1
(B16 メラノーマ細胞における SHPS-1 の N-結合型
糖鎖付加の異常により生じる CD47 による細胞運動
の負の調節に対する抵抗性)

審 査 委 員

主査 教 授 片岡 徹

教 授 錦織 千佳子

教 授 久野 高義

<目的・背景>

細胞表面の接着因子は細胞増殖、分化、運動などの様々な生理現象に関与しており、その分子機構の破綻は癌や炎症、神経変性等の病態に関与していることが知られている。我々は以前に神経や血球系に豊富な SHPS-1(SHP substrate-1)という分子を同定しているが、同分子は細胞内部分に 2 つの ITIM モチーフをもち、リン酸化依存性に SHP-1 または 2 と結合することが知られている。また細胞外部分には、3 つの免疫グロブリン様部分があり、その N 末端の IgV 部分が、リガンドである CD47 と結合することが知られている。CD47 と SHPS-1 はその結合により、細胞間情報伝達システムを形成していると考えられており、現在までに、マクロファージによる赤血球の食食、マクロファージの多核化、T 細胞の活性化、好中球の遊走などに関わることが報告されている。SHPS-1 は細胞増殖因子を負に調節し、また我々の作製した SHPS-1 の細胞内部分の大半を欠失した変異マウスによる解析では、インテグリンを介した細胞骨格の再構築や細胞運動の調節に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、ある種の癌細胞で SHPS-1 の発現が減少しており、また SHPS-1 の強制発現により癌細胞の接着非依存性増殖能や転移能が抑制される等の報告があり、SHPS-1 と癌化との関連が示唆されるが、CD47-SHPS-1 系が癌化形質獲得にどのような関与をするのかについては未だ不明な点が多い。

今回我々は、CD47 と SHPS-1 の結合が細胞の悪性形質転換に果たす役割を検討するため、同一の遺伝的背景を持ち、内因性に SHPS-1 を発現する非癌性メラノサイト Melan-a および高転移性マウスマラノーマ細胞 B16F10 を用いて、CD47 の結合親和性について比較検討し、その機能、役割について解析を行った。

<方法>

分泌型の融合タンパク質として可溶性 SHPS-1 リガンド (CD47-Fc) を CHO 細胞に分泌させ、これを精製した。この CD47-Fc を用いて、各細胞の SHPS-1 との結合親和性や細胞運動に与える効果などについて検討した。

<結果>

ウエスタンプロット法にて Melan-a と B16F10 の SHPS-1 分子の発現量はほぼ同程度であったが、後者の SHPS-1 分子は前者と比較して電気的な泳動度の低下

が認められた。次に小胞体ストレスを与える tunicamycin や 1-deoxymannojirimycin および脱糖化酵素である N-glycosidase F によって処理したことろ、両細胞間の SHPS-1 分子の電気的な泳動度の差異は消失した。また終末に mannose 残基をもつ糖鎖に高い親和性を持つ GNlectin に対する親和性をみると、成熟型 SHPS-1 分子で B16F10 が Melan-a に比べ低下しており、両細胞の成熟型 SHPS-1 分子に N-糖鎖構造の違いがあることが示唆された。

次に、フローサイトメトリーにて両細胞間の SHPS-1 の発現量をみると、ほぼ同程度であったが、CD47-Fc との結合親和性は B16F10 で、Melan-a に比べて著明に低下していた。次にこれを *in vitro* の結合実験でみても、Melan-a に比べ B16F10 細胞で著明に低下していたが、tunicamycin や 1-deoxymannojirimycin にて処理することによりこの差異は消失した。よってこのことは（少なくとも一部は）両細胞間の SHPS-1 の糖化状態の違いに起因すると考えられた。

次に SHPS-1 と CD47 の結合が細胞運動に与える効果について Boyden chamber 法を用いて検討した。Melan-a では CD47-Fc 存在下において、細胞運動の約 20% の低下を認めた。また、human-Fc に対する抗体を加え CD47-Fc を cross-link したところさらに 10% の低下を認めた。しかし B16F10 ではこのような現象は認められなかった。さらに SHPS-1 の細胞外部分を認識するモノクローナル抗体を用いて、同様の実験を行ったところ Melan-a で約 22%、B16F10 で約 25% の細胞運動の低下を認めた。また、このモノクローナル抗体を cross-link したところ、両細胞ともさらに 5% の低下を認めた。これらのことから、CD47-SHPS-1 系は細胞運動を負に調節していることが示唆された。

次に CD47-Fc 存在下で両細胞を 6 時間 culture したところ Melan-a では SHPS-1 の発現量の減少を認めたが、B16F10 では認められなかった。次に野生型マウス CD47 を強発現する細胞 (CHO-Ras-CD47) と両細胞を 5 時間 coculture したことろ、コントロールの細胞(CHO-Ras)と coculture したときと比べて Melan-a では SHPS-1 の発現量が著明に低下し、CD47 に対する抗体の存在下ではこの現象は、ほぼ完全に抑制された。これに対し B16F10 細胞ではこの現象がほとんど起こらなかった。これらのことから、SHPS-1 と CD47 との結合によって SHPS-1 の発現量が減少することが示唆された。

CHO 細胞に野生型 SHPS-1(WT)、および 4 つの細胞内チロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型 SHPS-1(4F)を強発現させた細胞系を樹立した。Flow cytometry にて、WT および 4F の SHPS-1 の発現量および CD47-Fc との結合親和性を見たところ、ともに同程度であった。また CHO-Ras-CD47 細胞と coculture すると、4F でも WT と同程度 SHPS-1 の発現量低下が生じた。以上からこの現象に SHPS-1 のチロシンリン酸化状態は関与しないことがわかった。また、この現象は chloroquine や NH4Cl で抑制されず、MG132 では抑制されたことから、proteasome での分解が関与していることが示唆された。

最後に CD47-SHPS-1 系が FAK のリン酸化に与える影響を調べた。

CHO-Ras-CD47 と coculture した CHO-SHPS-1(WT)では、SHPS-1 の発現量と共にこれと結合する SHP-2 の量も減少していた。

次に、CHO-K1、CHO-SHPS-1(WT)、CHO-SHPS-1(4F)の各細胞に、一過性に HA tag で標識された FAK を発現させた細胞を、CHO-Ras-CD47 と coculture し、FAK の単位蛋白量当たりのリン酸化レベルをみた。CHO-K1 では、CHO-Ras-CD47 と coculture しても、コントロールと差は無かった。WT では、コントロールでは CHO-K1 よりも減弱しており、CHO-Ras-CD47 との coculture によって同レベルまで回復した。また 4F では、コントロールでも CHO-K1 より亢進しており、CHO-Ras-CD47 と coculture しても変化はなかった。このことから、SHPS-1 にリクルートされた SHP-2 が FAK を脱リン酸化すること、また SHP-2 をリクルートできない 4F は、dominant negative に機能していることが示唆された。

<考察>

本研究では B16F10 マウスマラノーマ細胞で、非癌性メラノサイト Melan-a と比べ、著明に可溶性 SHPS-1 リガンド(CD47-Fc)との結合親和性が低下していることが示された。さらに CD47-Fc は Melan-a の細胞運動を抑制することから、B16F10 は CD47 による細胞運動の抑制機構に抵抗性を持つことが示唆される。また両細胞に発現する SHPS-1 に、電気的な泳動度と GNA レクチンに対する親和性の違いが存在し、さらに、tunicamycin や N-glycan の生成を阻害する 1-deoxymannojirimycin で処理すると、両細胞間の電気的泳動度や CD47-Fc との結合親和性の差異が消失することから、B16F10 の SHPS-1 は、N 結合型糖鎖付加反応の異常のため CD47-Fc との結合親和性が減弱していることが示された。

SHPS-1 のガラクトース付加状態の違いによって、リガンドの結合親和性に組織特異性が生じることや、B16F10 を含む浸潤性の強いマウスマラノーマ細胞で、SHPS-1 にガラクトースを付加する酵素である β 1,4-galactosyltransferase の活性が上昇しているとの報告もあり、B16F10 では SHPS-1 の過剰なガラクトース付加のため、CD47-Fc に対する結合親和性が減弱している可能性がある。

今回我々は、CD47-Fc が Melan-a の細胞運動を抑制するが、B16F10 にはこの効果がないこと、また両細胞の SHPS-1 を同程度認識できる、SHPS-1 に対する抗体によって、両細胞とも同程度細胞運動が抑制されることを示した。ケラチノサイトには CD47 が豊富に発現している(未発表データ)ことから、SHPS-1 を発現するメラノサイトでは、ケラチノサイトの発現する CD47 によってその運動性が抑制されている、という重要な機構があることが示唆され、CD47 との結合親和性が低下しているメラノーマ細胞では、このケラチノサイトによる抑制機構が働くこと、浸潤性や転移性という悪性形質の獲得が促進されていることが示唆された。

以前より FAK の脱リン酸化が癌細胞の転移や浸潤に必要であること、SHP-2 は FAK を脱リン酸化すること、また SHPS-1 と SHP-2 の結合が細胞運動に重要であることなどが報告されている。今回 SHPS-1 と CD47 との結合によって SHPS-1 の proteasome における分解が亢進し SHPS-1 の発現量と SHPS-1 に結合する SHP-2 の量の低下が生じることがわかった。また野生型 SHPS-1 を発現する細胞では FAK のリン酸化が減弱しており、CD47 との結合によってこれが回復すること、かつ変異型 SHPS-1 を発現する細胞では CD47 との結合にかかわらず FAK のリン酸化は亢進することが明らかになった。これらのことから、CD47 による細胞運動の抑制の分子メカニズムとして、SHPS-1 の発現低下によって SHP-2 による FAK の脱リン酸化が減弱し、結果として FAK のリン酸化レベルが上昇することによって細胞運動が減弱すると考えられた。

<結論>

B16F10 メラノーマ細胞では、SHPS-1 の N 結合型糖鎖の異常によって CD47 に対する結合親和性の低下をきたしており、この細胞間情報伝達システムにおける機能異常が高転移性や高浸潤性といった悪性形質の獲得に寄与している。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1601 号	氏名	小倉 武司
論文題目	<p>Resistance of B16 melanoma cells to CD47-induced negative regulation of motility as a result of aberrant N-glycosylation of SHPS-1 (B16メラノーマ細胞におけるSHPS-1のN-結合型糖鎖付加の異常により生じるCD47による細胞運動の負の調節に対する抵抗性)</p>		
審査委員	主査 片岡 徹 副査 鈴木 千佳子 副査 久野高義		
審査終了日	平成 16 年 3 月 12 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

SHPS-1 (SHP substrate-1)は神経や血球に豊富な細胞膜貫通性の糖タンパク質で、細胞外部分に3つの免疫グロブリン様部分があり、そのN末端のIgV部分が、リガンドであるCD47と結合することが知られている。CD47とSHPS-1はその結合により、細胞間情報伝達システムを形成していると考えられており、現在までに、マクロファージによる赤血球の貪食、マクロファージの多核化、T細胞の活性化、好中球の遊走などに関わることが報告されている。ある種の癌細胞でSHPS-1の発現が減少しており、またSHPS-1の強制発現により癌細胞の接着非依存性増殖能や転移能が抑制される等の報告があり、癌化との関連が示唆されるが、CD47-SHPS-1系が癌化形質獲得にどのような関与をするのかについては未だ不明な点が多い。本研究ではCD47とSHPS-1の結合が細胞の悪性形質転換に果たす役割を検討することとした。

本研究者は、同一の遺伝的背景を持ち、内因性にSHPS-1を発現する非癌性メラノサイト Melan-a および高転移性マウスマラノーマ細胞 B16F10 を用いて、CD47の結合親和性について比較検討し、その機能、役割について解析を行った。

先ず分泌型の可溶性 SHPS-1 リガンド (CD47-Fc) を精製し、これを用いて各細胞の SHPS-1 との結合親和性や細胞運動に与える効果などについて検討した。B16F10 細胞では、Melan-a と比べ、著明に CD47-Fc との結合親和性が低下していた。さらに CD47-Fc は Melan-a の細胞運動を抑制することから、B16F10 は CD47 による細胞運動の抑制機構に抵抗性を持つことが示唆された。また両細胞に発現する SHPS-1 に、電気泳動度と GNA レクチンに対する親和性の違いが存在し、さらに、tunicamycin や 1-deoxymannojirimycin で処理すると、両細胞間の電気泳動度や CD47-Fc との結合親和性の差異が消失することから、B16F10 の SHPS-1 は、N結合型糖鎖付加反応の異常のため CD47-Fc との結合親和性が減弱していることが示された。SHPS-1 のガラクトース付加状態の違いによって、リガンドの結合親和性に組織特異性が生じることや、B16F10 を含む浸潤性の強いマウスマラノーマ細胞で、SHPS-1 にガラクトースを付加する酵素である β 1,4-galactosyltransferase の活性が上昇しているとの報告もあり、B16F10 では SHPS-1 の過剰なガラクトース付加のため、CD47-Fc に対する結

合親和性が減弱している可能性が考えられた。

CD47-Fc は Melan-a の細胞運動を抑制したが、B16F10 には効果がなかった。また、両細胞の SHPS-1 を同程度認識できる抗体によって、両細胞とも同程度に細胞運動が抑制された。ケラチノサイトには CD47 が豊富に発現している(未発表データ)ことから、SHPS-1 を発現するメラノサイトでは、ケラチノサイトの発現する CD47 によってその運動性が抑制されている、という重要な機構があることが示唆され、CD47 との結合親和性が低下しているメラノーマ細胞では、この抑制機構が働くはず、浸潤性や転移性という悪性形質の獲得が促進されている可能性が示唆された。

以前より FAK の脱リン酸化が癌細胞の転移や浸潤に必要であること、SHP-2 は FAK を脱リン酸化すること、また SHPS-1 と SHP-2 の結合が細胞運動に重要であることなどが報告されていた。今回 SHPS-1 と CD47 との結合によって SHPS-1 の proteasome における分解が亢進し SHPS-1 の発現量と SHPS-1 に結合する SHP-2 の量の低下が生じることがわかった。また野生型 SHPS-1 を発現する細胞では FAK のリン酸化が減弱しており、CD47 との結合によってこれが回復すること、かつ変異型 SHPS-1 を発現する細胞では CD47 との結合にかかわらず FAK のリン酸化が亢進することが明らかになった。これらのことから、CD47 による細胞運動の抑制の分子メカニズムとして、SHPS-1 の発現量低下によって SHP-2 による FAK の脱リン酸化が減弱し、結果として FAK のリン酸化レベルが上昇することによって細胞運動が減弱すると考えられた。

本研究は、細胞接着因子 SHPS-1 について、そのメラノーマ細胞における糖鎖付加の異常に起因する機能の変化が細胞運動性の変化を引き起こすメカニズムを研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつた SHPS-1 がメラノーマ細胞の悪性形質獲得に関わる分子機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。