

接着分子シグナルを利用した皮膚老化防止の新戦略

群馬大学 生体調節研究所

的 崎 尚

SHPS-1 is a transmembrane protein whose extracellular region interacts with CD47 and whose cytoplasmic region undergoes tyrosine phosphorylation and thereby binds the protein tyrosine phosphatase SHP-2. Formation of this complex is implicated in regulation of cell migration by an unknown mechanism. A CD47-Fc fusion protein or antibodies to SHPS-1 inhibited migration of human melanoma cells or of CHO cells overexpressing SHPS-1. Overexpression of wild-type SHPS-1 promoted CHO cell migration, whereas expression of the SHPS-1-4F mutant, which lacks the phosphorylation sites required for SHP-2 binding, had no effect. Antibodies to SHPS-1 failed to inhibit migration of CHO cells expressing SHPS-1-4F. SHPS-1 ligands induced the dephosphorylation of SHPS-1 and dissociation of SHP-2. Antibodies to SHPS-1 also enhanced Rho activity and induced both formation of stress fibers and adoption of a less polarized morphology in melanoma cells. Our results suggest that engagement of SHPS-1 by CD47 prevents the positive regulation of cell migration by this protein. The CD47-SHPS-1 system and SHP-2 might thus contribute to the inhibition of cell migration by cell-cell contact.

1. 緒 言

皮膚は、年齢変化が最も顕著に認められる組織の1つである。皮膚老化のバイオロジーを研究することは、生命科学における老化の基本メカニズムを明らかにする上においても、また皮膚の老化を防止あるいは遅延させて美容に役立つ薬剤の開発を行う面においても、極めて意義深い成果をもたらすと考えられる。私共は、これまで蛋白質チロシンリン酸化を介した細胞内シグナル伝達系の役割を中心として、細胞の増殖と接着の制御機構につき研究を継続している。特に、私共は、SH2ドメインを有しているチロシンホスファターゼ SHP-2 が、増殖因子刺激による Ras 低分子量 G 蛋白質の活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにした¹⁾。また、SHP-2 の脱リン酸化基質蛋白質として、イムノグロブリンファミリーに属する受容体型の蛋白質 SHPS-1²⁾ およびドッキング蛋白質 Gab-1 を見い出しており、SHPS-1/SHP-2 系や Gab-1/SHP-2 系が細胞接着装置であるインテグリン系やカドヘリン系と相互作用して、Rho 低分子量 G 蛋白質の活性化を介して細胞運動をも制御することを示した。即ち、SHP-2 は、増殖因子と細胞接着の両方のシグナル経路の下流に位置し、2つの異なる低分子量 G 蛋白質 Ras と Rho を制御する多機能なシグナル分子であることを明らかにした。私共は、最近、SHPS-1 がその細胞外領域の生理的なリガンドである受容体型の分

子 CD47 と相互作用することにより新しい細胞間シグナル伝達系 (CD47-SHPS-1 系) を形成していることを明らかにしつつある³⁾。

SHPS-1 は、その細胞外領域に3個の免疫グロブリン様構造をもち、さらにリン酸化を受ける複数のチロシン残基を細胞内領域にもつ蛋白質である。一方、CD47 は、細胞接着分子であるインテグリンに関連する分子として同定され、組織普遍的に発現する5回細胞膜貫通型の蛋白質である。CD47 は、その細胞外領域に1個の免疫グロブリン様構造をもち、これが SHPS-1 の N 末端側の免疫グロブリン様構造に結合する。

SHPS-1 と CD47 は相互作用することにより双方向性にシグナルを伝えると考えている。そこで本研究では、将来皮膚の再生や老化の防止につながる手法や薬剤の開発の端緒を得ることを目的として、細胞接着や細胞運動の制御における CD47-SHPS-1 系による機能を分子レベルでさらに詳細に検討しようと試みた。

2. 実 験

2. 1 細胞、抗体および融合蛋白質

細胞として、ヒト悪性黒色腫細胞 WM239a と CHO 細胞を用いた。CHO 細胞には外来性にヒトまたはラット SHPS-1 遺伝子を導入し、安定発現株とした。抗体は、抗ヒト SHPS-1 抗体 (SE12C3) および抗ラット SHPS-1 抗体 (2F34, 9F10) を用いた。さらに、CD47 の細胞外領域と Ig-Fc との融合タンパク質 (CD47-Fc) を分泌する CHO 細胞株を樹立し、この細胞培養上清より CD47-Fc を回収し Protein-A を用い精製して、これを SHPS-1 リガンドとして用いた。

2. 2 SHPS-1 および CD47 の発現の検討

悪性黒色腫細胞および CHO 細胞での SHPS-1、CD47 の



A new strategy for protection of skin senescence by utilizing adhesion molecules

Takashi Matozaki

Biosignal Research Center, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University

発現は、Flowcytometry またはウェスタンブロッティング法で検討を行った。

2. 3 細胞運動の測定

細胞運動の測定には、Transwell apparatus (Corning 社) を用い、既報⁴⁾ に基づき行った。また同様に Wound healing assay 法によっても検討を行った。

2. 4 SHPS-1 リガンド処理による細胞形態への影響

蛍光免疫染色法で細胞形態の観察を行った。

2. 5 シグナル分子のチロシンリン酸化の検討

各種分子のチロシンリン酸化を免疫沈降法と抗チロシンリン酸化抗体を用いて検討した。

2. 6 Rho 活性の測定

GST 融合 Rhotekin を用いて活性化 Rho を沈降させ、Rho の活性化状態の検討を行った。

3. 結 果

3. 1 細胞運動に対する SHPS-1 リガンドの効果

CD47-SHPS-1 系による細胞運動の制御機構を詳細に解析するために、SHPS-1 を発現する種々の培養細胞の運動能を解析できるシステムを構築した (図 1)。特に、ヒト悪性黒色腫細胞に SHPS-1 を発現することを確認し、これをモデル細胞として用い、この系における CD47 と SHPS-1 の相互作用による細胞運動への影響を検討した。悪性黒色腫細胞に SHPS-1 抗体あるいは CD47-Fc を作用させると、細胞運動の抑制が観察された (図 2、3)。この効果は、2 次抗

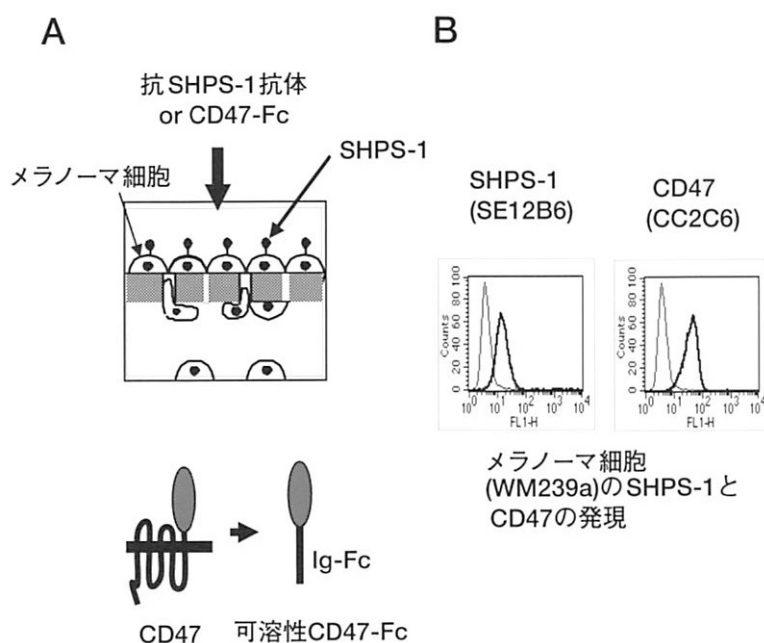


図 1 A 細胞運動測定系の概念図
B ヒト悪性黒色腫細胞上での CD47, SHPS-1 の発現

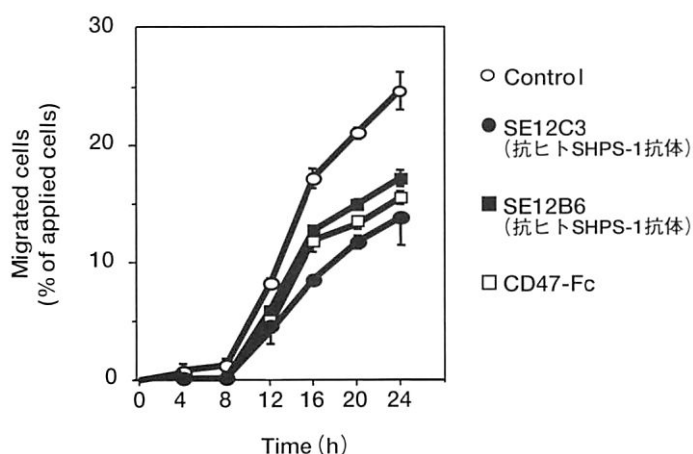


図 2 細胞運動に対する SHPS-1 リガンドの効果

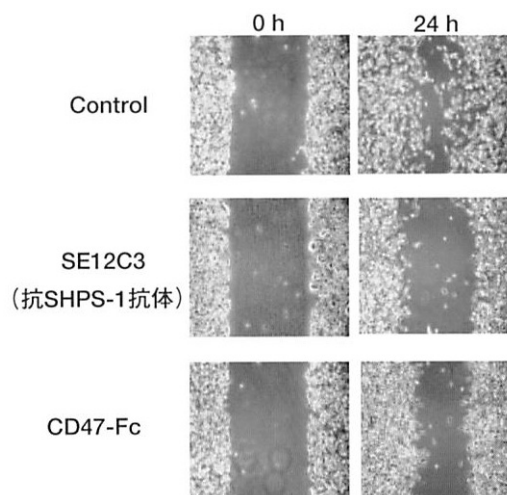


図 3 SHPS-1 リガンドによる細胞運動抑制

体の添加によりさらに増強された。すなわち、SHPS-1 抗体あるいは CD47-Fc による細胞運動の抑制は、細胞表面上の SHPS-1 の ligation によるものと考えられた。

SHPS-1 抗体あるいは CD47-Fc による細胞運動の抑制は、SHPS-1 を外来性に発現させた CHO 細胞においても認められ、この効果は SHP-2 を結合しないタイプの変異型 SHPS-1 発現 CHO 細胞では観察されなかった (図 4)。

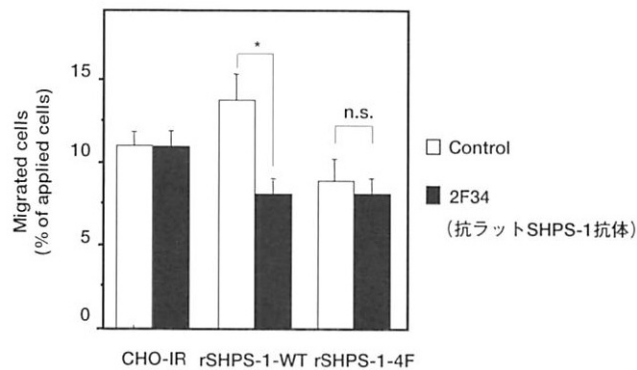


図4 細胞運動抑制に対する SHPS-1 細胞内領域チロシンリン酸化部の役割
SHPS-1 4F (リン酸化をうけるチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体) では SHPS-1 リガンドによる細胞運動抑制効を認めない。

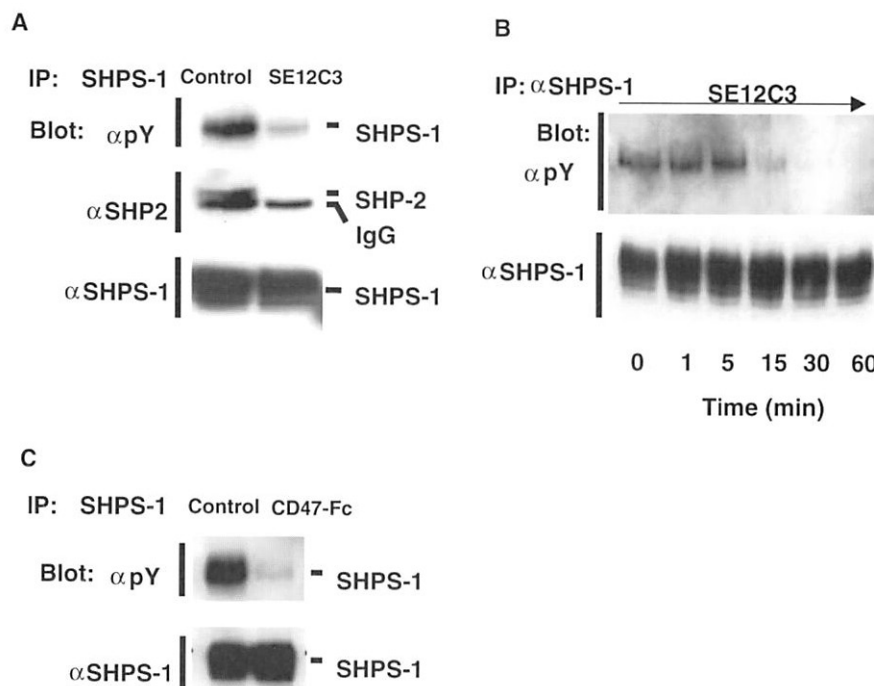


図5 SHPS-1 リガンド処理による SHPS-1 リン酸化への影響
A : SHPS-1 抗体処理により SHPS-1 は脱チロシンリン酸化され、SHP-2 との結合も解除される。
B : この効は 15 分後より著明となり、60 分後も持続する。
C : 可溶性 CD47 処理によっても脱リン酸化が認められる。

3. 3 細胞形態に対する SHPS-1 リガンドの効果

ヒト悪性黒色腫細胞を抗 SHPS-1 抗体処理することにより、紡錘形を示す悪性黒色腫細胞が多角化し、アクチンストレスファイバーの増強を認めた (図 6)。Vinculin、Paxillin といった接着斑関連蛋白質には著明な変化を認めなかった。

3. 4 SHPS-1 リガンド処理による Rho 活性への影響

アクチンストレスファイバーの増強を認めたため、細胞骨格系の制御に関与する Rho 活性への影響を検討したところ、抗 SHPS-1 抗体処理により Rho 活性の上昇を認めた。また Rho のエフェクターである p160ROCK の阻害剤 Y-27632 処理により、SHPS-1 リガンドによる細胞運動抑制の部分的な解除を認めた (図 7)。

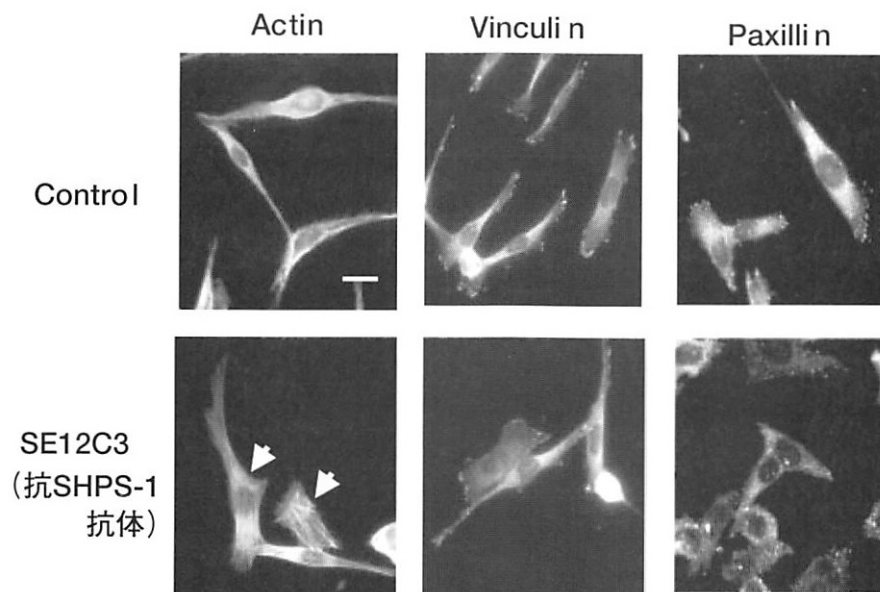


図 6 SHPS-1 リガンドによるアクチン及び細胞形態の変化
SHPS-1 抗体処理により悪性黒色腫細胞は、多角化し、アクチンストレスファイバーの増強を認める。

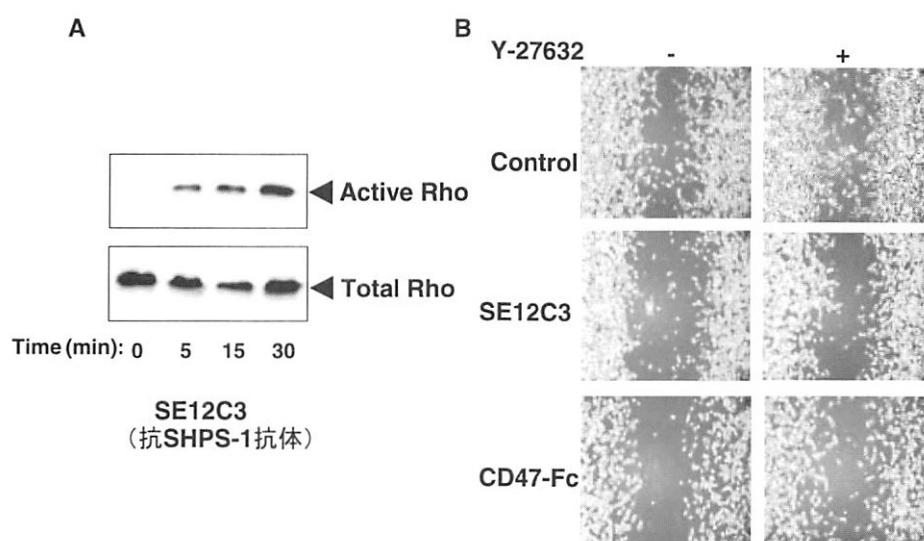


図 7 SHPS-1 リガンドによる Rho 活性への影響
A : SHPS-1 抗体処理 5 分後より、Rho の活性化を認めた。
B : ROCK 阻害剤 (Y-27632) 処理により、SHPS-1 リガンドによる細胞運動抑制が部分的に解除された。

4. 考 察

本研究では CD47-SHPS-1 系が、普遍的な細胞運動の負の制御に関与していることを明らかにした⁵⁾。

CD47-SHPS-1 系はこれらの分子を各々発現する細胞同士との接触により双方向性に細胞運動を抑制すると想定され、CD47-SHPS-1 系が接触阻害の分子機構に関わっている可能性が高い (図 8)。この結果から、例えば CD47-SHPS-1 系のがんにおける異常が、浸潤・転移の分子機構に関与する可能性が考えられる。皮膚においては、メラノサイト以外にケラチノサイトにも SHPS-1 の発現が観察される。CD47 は、かなり普遍的に発現しており、CD47-SHPS-1 系が皮膚を構成する細胞群の増殖、接着、運動の制御に重要な役割を果たしていることが想定される。最近、T 細胞上の CD47 が、樹状細胞上の SHPS-1 と相互作用することにより互いの細胞機能を負に調節することも報告されている⁶⁾。皮膚のランゲルハンス細胞には SHPS-1 の高い発現があることから、CD47-SHPS-1 系が皮膚の免疫系においても重要である可能性が高い。今後、これらの点につき詳細な検討を行う予定である。

(参考文献)

- 1) Noguchi T, Matozaki T, Horita K, et al.: Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. *Mol Cell Biol.* 14: 6674-6682, 1994.
- 2) Fujioka Y, Matozaki T, Noguchi T, et al.: A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol.* 16: 6887-6899, 1996.
- 3) Yamao T, Noguchi T, Takeuchi O, et al.: Negative

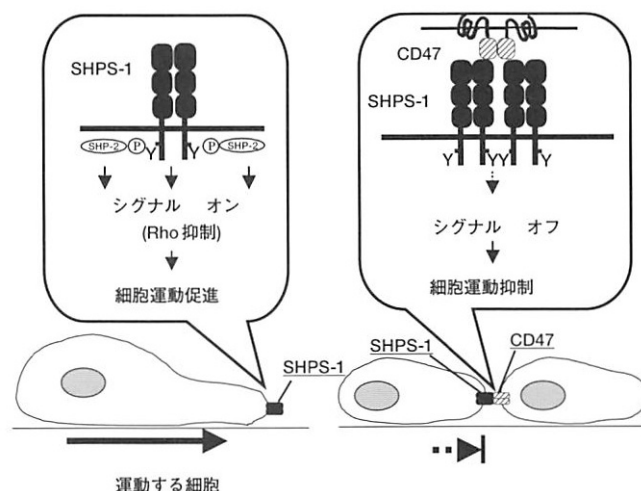


図 8 CD47-SHPS-1 系による細胞運動抑制機構のモデル

regulation of platelet clearance and of the macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1. *J Biol Chem* 277: 39833-39839, 2002.

- 4) Longo N, Yanez-Mo M, Mittelbrunn M, et al.: Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood.* 98: 3717-3726, 2001.
- 5) Motegi S, Okazawa H, Ohnishi H, et al.: Role of the CD47-SHPS-1 System in Regulation of Cell Migration. *EMBO J.* 22: 2634-2644, 2003
- 6) Latour S, Tanaka H, Demeure C, et al.: Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein- α : down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol.* 167: 2547-2554, 2001.