博 士 学 位 論 文

氏 名（本 籍）	佐 藤 学 道 （ 東 京 都 ）
学 位 の 種 類	博　 士 （ 工 学 ）
学 位 記 番 号	博 乙 第 １ ２ ０ 号
学位授与年月日	令和　３年　３月　３１日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項
学 位 論 文 題 目	非 三 重 ら せ ん 状 の VI 型 コ ラ ー ゲ ン α1 鎖， NTH α1(VI)， の 研 究 Studies of type VI collagen α1 chain in non-triple helical form, NTH α1(VI)

論 文 審 査 委 員	主 査	今 村 保 忠 教 授
	副 査	小 山 文 隆 教 授
	〃	南 雲 紳 史 教 授
	〃	林 利 彦 教 授
	〃	大 和 雅 之 教 授

工 学 院 大 学 大 学 院

非三重らせん状の VI 型コラーゲン α1 鎖,
NTH α1(VI), の研究

Studies of type VI collagen α1 chain in non-triple helical form, NTH α1(VI)

日本化薬株式会社
医薬研究所　創薬グループ
主幹研究員　　佐藤　学道

略語

2-ME	2-mercaptoetahnol　2-メルカプトエタノール
ABA	*Agaricus bisporus* agglutinin　マッシュルーム凝集素
AU	arbitrary unit　任意単位
BSA	bovine serum albumin　ウシ血清アルブミン
CBB	coomassie brilliant blue　クーマシーブリリアントブルー
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium　ダルベッコ改変イーグル培地
ECM	extracellular matrix　細胞外マトリクス
FBS	fetal bovine serum　ウシ胎児血清
Gal	β-galactose　ベータガラクトース
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase　グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine　N-アセチル-D-グルコサミン
GLUT1	glucose transporter 1　グルコーストランスポーター1
HIF	hypoxia inducible factor　低酸素誘導因子
HMC	human mesangial cell　ヒトメサンギウム細胞
HPLC	high performance liquid chromatography　高速液体クロマトグラフィー
HRP	horseradish peroxidase　ホースラディッシュペルオキシダーゼ
ICI	immune checkpoint inhibitor　免疫チェックポイント阻害剤
IHC	immunohistochemistry　免疫組織化学染色
IP	immunoprecipitation　免疫沈降
IB	immunoblot　イムノブロット
KD	knockdown　ノックダウン
KO	knockout　ノックアウト
JCRB	JCRB cell bank　JCRB 細胞バンク
LCA	*Lens culinaris* agglutinin　レンズマメ凝集素
LP	lectin precipitation　レクチン沈降
MMP	matrix metalloproteinase　マトリクスメタロプロテアーゼ
mTORC1	mechanistic target of rapamycin complex 1　ラパマイシン物理的標的複合体 1
MW	molecular weight　分子量
NeuAc	sialic acid　シアル酸
NG2	neuron-glial antigen 2　神経-グリア抗原 2
NT	no treatment　無処理
NTH	non-triple helical　非三重らせん状
PBS	phosphate buffered saline　リン酸緩衝生理食塩水
PD-1	programmed cell death 1　プログラム細胞死 1

PD-L1	programmed cell death ligand 1　プログラム細胞死リガンド 1
PVDF	polyvinylidene difluoride　ポリフッ化ビニリデン
pVHL	von Hipel-Lindou protein　フォンヒッペル-リンドウタンパク質
RCA120	*Ricinus communis* agglutinin I　トウゴマ凝集素 I
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640　RPMI1640
RT-qPCR	reverse transcription quantitative PCR　定量的逆転写 PCR
siRNA	small interfering RNA　低分子干渉 RNA
TBS	Tris buffered saline with Tween 20　トリス緩衝生理食塩水
TBS-T	Tris buffered saline with Tween 20　ツイーン 20 含有トリス緩衝生理食塩水
TME	tumor microenvironment　がん微小環境
VEGF	vascular endothelial growth factor　血管内皮増殖因子
vWA	von Willebrand factor A　フォンヴィレブランド因子 A
WGA	wheat germ agglutinin　コムギ胚芽凝集素

目次

略語
第１章　序論 …… 1
第２章　非三重らせん状の VI 型コラーゲン α1 鎖は *COL6A1* の既存とは異なる遺伝子産物である …… 5
第１節　序文 …… 5
第２節　実験材料と方法 …… 5
第１項　抗体とレクチン …… 5
第２項　細胞培養 …… 6
第３項　抗体結合樹脂の作製 …… 6
第４項　抗体#141 結合樹脂を用いた 140K の精製 …… 6
第５項　ヒト VI 型コラーゲンの抽出とドットブロッティングによる解析 …… 7
第６項　140K のアミノ酸配列解析 …… 7
第７項　哺乳類発現ベクターの作製及びそれらベクターの 293FT 細胞における一過性発現 …… 8
第８項　免疫またはレクチン沈降 …… 8
第９項　ウェスタンブロッティングとクーマシーブリリアントブルー（CBB）染色 … 8
第３節　結果 …… 9
第１項　抗体#141 の 140K に対する親和性は NTH α1(IV)より高い …… 9
第２項　140K の VI 型コラーゲン α 鎖ポリペプチドとしての同定 …… 9
第３項　抗体#141 のコンフォメーション依存的な VI 型コラーゲン α1 鎖の認識 …… 10
第４項　NTH α1(VI)の糖鎖のキャラクタリゼイション …… 11
第４節　考察 …… 11
第３章　非三重らせん状の VI 型コラーゲン α1 鎖、NTH α1(VI)、の癌細胞増殖への関与 … 14
第１節　序文 …… 14
第２節　実験材料と方法 …… 14
第１項　抗体と VI 型コラーゲン …… 14
第２項　低分子干渉 RNA（siRNA） …… 15
第３項　TaqMan プローブ …… 15
第４項　細胞株及び細胞培養 …… 15
第５項　siRNA のトランスフェクション及び細胞増殖アッセイ …… 15
第６項　メチレンブルー染色 …… 16
第７項　細胞増殖アッセイの為のコンディションメディウム …… 16
第８項　アセトン沈殿による< 10 kDa 画分の濃縮 …… 16
第９項　細胞抽出液の調製 …… 16
第１０項　ウェスタンブロッティングと CBB 染色 …… 16

第１１項　RNA 抽出及び cDNA 合成 …… 17
第１２項　定量的逆転写 PCR（RT-qPCR） …… 17
第１３項　統計解析 …… 18
第３節　結果 …… 18
第１項　S2-VP10 細胞による NTH α1(VI)の発現：COL6A1 サイレンシングは細胞増殖と NTH α1(VI)発現を低下させる …… 18
第２項　増殖促進の為の NTH α1(VI)断片化の必要性 …… 19
第４節　考察 …… 19
第４章　総合討論 …… 22

謝辞 …… 25

引用文献 …… 26

図表 …… 33

第１章　序論

国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer）のリポート GLOBOCAN2018 では、2018 年には約 1810 万人が新たにがんに罹患し，がんが原因で約 960 万が死亡すると報告している(1)。また、国立がん研究センターの最新がん統計によると、2017 年に新たに診断されたがん（全国がん登録）は 977,393 例であり、2018 年にがんで 373,584 人が死亡したと報告している（https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html）。さらに、2019 年の厚生労働省の人口動態統計では、死亡原因の第一位が悪性新生物（がん）であり、日本国民の約 3.7 人に一人ががんで死亡していることがわかる。

Hanahan と Weinberg の Hallmarks of Cancer: The Next Generation によると、がんは 8 つの特徴（core and emerging hallmarks）及び 2 つの性質（enabling characteristics）を持つと報告している(2)。これら 8 つの特徴と 2 つのがんの性質とは、1) 増殖シグナルの維持、2) 増殖抑制の回避、3) 免疫による攻撃からの回避、4) 無制限な複製能力による不死化、5) がんによる炎症の促進、6) 浸潤及び転移の活性化、7) 血管新生の誘導、8) ゲノム不安定性と変異、9) 細胞死耐性、10) 細胞内エネルギー機構の脱制御である。これらの特徴や性質はがんに特有のものであることから、これらの特徴や性質を標的として抗がん剤が開発されている。例えば、1) 増殖シグナルの維持では、上皮増殖因子受容体に対するチロシンキナーゼ阻害剤（ゲフィチニブ、エルロチニブやオシメルチニブ）、3) 免疫による攻撃からの回避では、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）である抗 PD-1 抗体（ニボルマブやペンブロリズマブ）及び抗 PD-L1 抗体（アテゾリズマブ，アベルマブやデュルバルマブ）が挙げられる。

近年、がんゲノム医療が注目を集めている。がんゲノム医療では、がん特有の遺伝子変異（例えば、受容体チロシンキナーゼの活性化型変異）が存在するかを、遺伝子パネル検査によって明らかにし、得られた結果をもとに適切な治療薬を患者さんに提供する。すなわち、効果が高く且つ副作用が低い薬剤が患者さんに提供されることとなる（このような試みをプレシジョンメディシンと呼ぶ)。がんゲノム医療やプレシジョンメディシンに対する期待は高いが、すべての患者さんに薬剤が提供されることではないことが課題として挙げられる。例えば、Zehir らの報告では、10000 人を対象にした臨床試験において、薬剤がマッチした患者さんは 37%であり、63%の患者さんには薬剤がマッチしなかったとのことであった(3)。一方、ニボルマブやペンブロリズマブ等の ICI は効果が長期間持続することから、これらの薬剤に対する期待も高い。しかしながら、ICI が著効を示すことが知られているメラノーマにおいても、ニボルマブやペンブロリズマブの P3 試験では、1 年後の生存率は 72.1%(4)及び 74.1%(5)であり、ICI が効果を示さない患者さんが存在することがわかる。以上をまとめると、がん医療の進歩によりプレシジョンメディシンや ICI が登場したにも関わらず、恩恵を受けることができない患者さんが存在することから、更なるがん治療薬の開発が必要であると考える。

従来の抗がん剤は、がん細胞を標的細胞としていたが，血管新生阻害剤や ICI のようにがん細胞ではなく宿主由来の細胞を標的とした薬剤によっても、薬効を発揮できることが明らかとなっ

ている。そこで、近年、がん微小環境（TME）が創薬標的として注目を集めている。TME には、さまざまな細胞種や分子が関与しているが(6, 7)、我々は、その中の細胞外マトリクス（ECM）成分であるコラーゲン、特に IV 型コラーゲンに注目して研究を行ってきた。

IV 型コラーゲンは、上皮下、血管の管腔外表面及び脂肪細胞と筋肉細胞の周囲に見られる基底膜の成分である(8–11)。ユビキタスに存在する主要な IV 型コラーゲン分子は、2 分子の α1 鎖（α1(IV)）と 1 分子の α2 鎖（α2(IV)）からなる三重らせん構造を形成する。なお、α1(IV)鎖と α2(IV)鎖は、それぞれ COL4A1 と COL4A2 によってコードされている(9, 12–14)。また、IV 型コラーゲン分子は、基底膜のネットワーク構造を構成している（7–10）。具体的には、2 つの NC1 ドメインが二量体を形成し、この分子が 7S 領域で結合して四量体となり、分子間ジスルフィド結合によって架橋される(15–20)。Pöschle らは、*Col4a1* 及び *Col4a2* ダブルノックアウト（KO）マウスは E10.5–E11.5 で死亡し、死亡の原因は基底膜の発達阻害であると報告している(21)。ヒトにおいて、*COL4A1* 変異は脳性麻痺、てんかん及び精神発達の遅延を引き起こす I 型孔脳症の原因であることが知られている。脳の奇形の一種である I 型孔脳症は大脳半球に嚢胞や液胞として存在する。さらに、I 型孔脳症が胎児期の脳梗塞及び出血の原因である可能性がある(22)。すなわち、IV 型コラーゲン及び α1(IV)鎖が基底膜形成や血管成熟の両方に重要であることがわかる。

一方、非三重らせん状の IV 型コラーゲン α1 鎖及び α2 鎖が存在するとの報告もある。Takahashi らは、ヒト胎児肺線維芽細胞株 TIG-1 を血清非存在下で培養すると、非還元条件下で 500 kDa の三重らせん構造の IV 型コラーゲンが観察されるのに対し、血清存在下では 500 kDa のバンドに加えて、JK132 で認識される 180 kDa のバンド（NR180）が存在することを報告している。さらに、Takahashi らは、アミノ酸配列解析により NR180 由来ペプチドのアミノ酸配列が α1(IV)鎖と一致することを確認している(23)。すなわち、NR180 は非三重らせん状の α1(IV)鎖であると考えられる。また、Takahashi らは、TIG-1 細胞のコンディションメディウムには非三重らせん状の α2(IV)鎖も存在すること及び非三重らせん状の α1(IV)鎖と非三重らせん状の α2(IV)鎖は、NC1 ドメインを介した相互作用をしないことを明らかにしている(23)。

Yoshikawa らは、ヒトメサンギウム細胞（HMC）は、アスコルビン酸存在下では IV 型コラーゲンを生成するが、アスコルビン酸非存在下では非三重らせん状の α1(IV)鎖及び α2(IV)鎖を生成することを報告している。さらに、上記アスコルビン酸依存的な IV 型コラーゲンと非三重らせん状 α1(IV)鎖や α2(IV)鎖生成のスイッチングは、他のヒト培養細胞株でも普遍的に観察される現象であることも報告している(24)。すなわち、IV 型コラーゲンと非三重らせん状 α1(IV)鎖や α2(IV)鎖の生成機構は異なる可能性が考えられる。また、彼らは、非三重らせん状の α1(IV)鎖中の 4-hydroxyproline 含量は、IV 型コラーゲン由来の α1 鎖と比較して低下していることも報告している（非三重らせん状 α1(IV)鎖では 14%、IV 型コラーゲン由来 α1(IV)鎖では 67%）(24)。したがって、非三重らせん状 α1(IV)鎖は IV 型コラーゲン由来の α1(IV)鎖とは化学的に異なる分子であると考えられる。

Kajimura らは、HMC のコンディションメディウムを用いて、非三重らせん状 α1(IV)鎖及び α2(IV)鎖はレクチンであるマッシュルーム凝集素（ABA）で認識される糖鎖を有するが、ABA は IV 型コラーゲン由来の α1(IV)鎖及び α2(IV)鎖は認識しないことを報告している。さらに、彼らは、ABA

で認識される非三重らせん状 α1(IV)鎖及び α2(IV)鎖は、HMC のみならず他のヒト細胞株においても観察されること及びヒト胎盤にも ABA 陽性の非三重らせん状 α1(IV)鎖及び α2(IV)鎖が存在することを報告した(25)。すなわち、非三重らせん状 α1(IV)鎖及び α2(IV)鎖は、非三重らせん状構造で細胞から分泌され、生体内の組織に存在すると考えられる。さらに、非三重らせん状 α1(IV)鎖が tissue inhibitor of metalloproteinase 様の活性を示すことも報告している(25)。

Sugiyama らは、非三重らせん状 α1(IV)鎖（non-triple helical α1(IV) chain、以下、NTH α1(IV)）を特異的に認識する抗体を用いて、NTH α1(IV)のウサギの組織内分布を精査した。その結果、NTH α1(IV)は血管、筋内膜、腎臓及び神経の基底膜に存在が認められたが、上皮の基底膜では検出されなかったと報告している。さらに、彼らは、ウサギ血管新生モデルにおいて、IV 型コラーゲンの発現が認められない血管内皮細胞の neovascular tip 領域において、NTH α1(IV)の発現が観察されたと報告している(26)。

我々は、いくつかのヒト癌細胞株のコンディションメディウムにおいて NTH α1(IV)の発現が認められることを確認している。上記の先行研究及び自験の結果から、我々は、NTH α1(IV)はがん血管新生及び増殖に重要であると考えた。そこで、NTH α1(IV)の研究を行う為に、NTH α1(IV)を抗原としてマウスモノクローナル抗体を作製した。その結果、NTH α1(IV)を特異的に認識するいくつかの抗体を得た(27)。得られた抗体の一つである抗体#141 は、予備的な結果ではあるが、ヌードマウス皮下移植モデルにおいて癌細胞の増殖を抑制することが確認された。しかしながら、NTH α1(IV)の生物学的機能や抗体#141 の作用機序は不明であった。そこで、我々は、抗体#141 の作用機序研究を実施した。その結果、第 2 章で示すように、抗体#141 は NTH α1(IV)に加えて、140 kDa のタンパク質（以下、140K）を認識することが判明した。

本研究では、抗体#141 が認識する 140K が、NTH α1(IV)の生理学的機能や作用機序解明に重要であると仮説を立て、その仮説を検証する形で実施された。実施した内容は、140K の同定及びその生物学的作用の解明についてである。

140K の同定は、抗体#141 を用いてアフィニティー精製した 140K のアミノ酸配列分析を行うことで実施した。上述のように、抗体#141 は NTH α1(IV)を抗原として作製されたマウスモノクローナル抗体であることから(27)、我々は、140K は NTH α1(IV)のバリアントであると予想していた。しかしながら、アミノ酸配列分析の結果から、140K は *COL6A1* がコードする VI 型コラーゲン α1 鎖由来の新たな非三重らせん状コラーゲンポリペプチド NTH α1(VI)であることが明らかとなった。さらに、我々は、NTH α1(VI)の糖鎖修飾についても各種レクチンを用いて解析した。詳細については第 2 章に記載する。

VI 型コラーゲンは結合組織のマイクロフィブリルの成分であり(28–30)、*COL6A1*、*COL6A2* 及び *COL6A3* によってコードされる α1、α2 及び α3 鎖で構成されている(31–33)。ベツレムミオパチーやウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーなどの遺伝性疾患は、これらの遺伝子の変異に起因することも報告されている(34–39)。さらに、*Col6a1* KO マウスは、ベツレムミオパチー様の症状を呈することが報告されている(29, 40–41)。Grumati らは、*Col6a1* KO マウスでは、mitophagy（ミトコンドリアの恒常性に必要なミトコンドリアを特異的に分解するオートファジー）(42)の異常によりミトコンドリアの代謝回転が低下しミトコンドリアの機能不全を誘発すること及びこのミト

コンドリア機能障害により骨格筋細胞死が誘導されミオパチー様表現型を呈することを示した。さらに、Grumati らは、オートファジーを活性化する低タンパク質食または mTORC1 阻害剤ラパマイシンがミオパチーをレスキューすることも報告している(40)。また、VI 型コラーゲンは、インテグリン(43–46)及び Neuron-glial Antigen 2(NG2)/コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(43, 47–49)を介して Akt や phosphatidylinositol-3 kinase を活性化すること及び上皮間葉転換にも関与することが報告されている(30, 43, 50–52)。すなわち、VI 型コラーゲンは結合組織としての機能のみならず多様な生物学的機能を有することがわかる。

VI 型コラーゲンはある種の癌細胞でも発現していることが報告されている(30)。また、You らは、マウスの脳に移植した B16F10 細胞の増殖は、野生型マウスと比較して *Col6a1* KO マウスでは抑制されると報告している(53)。さらに、VI 型コラーゲンは HT1080 や他の癌細胞株のアポトーシスを阻害すること(54, 55)、癌細胞のシスプラチン耐性を増強すること(56)及び *in vivo* での癌細胞の増殖を促進することが報告されている(50)。すなわち、VI 型コラーゲンは、癌細胞の増殖、アポトーシス、薬剤耐性に関わっていることがわかる。

以上の VI 型コラーゲンに関する先行研究から、NTH α1(VI)もなんらかの生物学的機能を有することが考えられた。また、上述の NTH α1(IV)先行研究から、NTH α1(VI)の翻訳後修飾が VI 型コラーゲンとは異なることが予想された(24, 25)。一方、IV 型コラーゲン由来の生理活性物質として、matricryptin あるいは matrikine として知られるコラーゲン由来のフラグメントが存在する（以下、matricryptin）(57)。さらに、COL6A3 の切断産物である endotrophin が悪性腫瘍の進行を促進すること(52)及び癌患者の血清中では健常人と比較して COL6A1 及び COL6A3 由来のペプチド量が上昇していることが報告されている(58)。すなわち、NTH α1(VI)に加えて NTH α1(VI)由来ペプチドも生物学的機能を有する可能性が考えられた。NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドについての機能については、第 3 章で詳細を述べる。

本研究では、抗体#141 が認識する 140K の同定を目的として行い、その結果、新たな非三重らせん状コラーゲンポリペプチドである NTH α1(VI)の発見につながった。また、NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドの機能解析の結果、NTH α1(VI)由来ペプチドが癌細胞増殖に重要であることが明らかとなった。すなわち、本研究結果は新たながん治療薬開発に貢献できると考える。

第２章　非三重らせん状の VI 型コラーゲン α1 鎖は *COL6A1* の既存とは異なる遺伝子産物である

第１節　序文

非三重らせん状のIV型コラーゲンα1鎖の存在がHMC(23)、ヒト胎盤(25)及びウサギ組織において報告されており(26)、我々はそれをNTH α1(IV)と名付けた(26, 27)。Yoshikawaらは、培養したHMCはアスコルビン酸除去下でNTH α1(IV)を分泌すること及びNTH α1(IV)の4-hydroxyproline含量はIV型コラーゲンやIV型コラーゲン由来のα1(IV)鎖より低下していることを報告している(24)。さらに、NTH α1(IV)はABAで認識される糖鎖を有するが，ABAはIV型コラーゲン由来のα1(IV)鎖を認識しないことが報告されている(25)。すなわち、NTH α1(IV)は、IV型コラーゲン由来のα1(IV)鎖とは異なる糖鎖を有することから、NTH α1(IV)の生物学的機能のみならずその生合成や分泌制御もIV型コラーゲン由来のα1(IV)鎖やIV型コラーゲンと異なることが示唆される。

NTH α1(IV)のNC1ドメインは、matrix metalloproteinase-9（MMP-9）に対してtissue inhibitor of metalloproteinase様の活性を示すことが報告されている(25)。また、Sugiyamaらは、ウサギ血管新生モデルにおいて、IV型コラーゲンが検出されないneovascular tipにNTH α1(IV)の発現が認められることを報告している(26)。すなわち、NTH α1(IV)は、血管新生や血管系のダイナミクスに関連する生物学的機能を有することが示唆される。

腫瘍細胞は腫瘍形成や腫瘍増殖の為に、正常組織とは異なる ECM や微小環境を作り出すと考えられている。例えば、IV 型コラーゲン由来のフラグメントは腫瘍増殖や血管新生に関与することが知られている(59)。 我々は、NTH α1(IV)発現が、いくつかの癌細胞株のコンディションメディウム中に観察されることを見出している(Morita, M. 投稿準備中)。以上の知見から、NTH α1(IV)は腫瘍の血管新生に関与していることが示唆されるが、NTH α1(IV)の生物学的役割や作用機序については不明であった。

我々は、腫瘍形成における NTH α1(IV)関与の可能性を精査する為に、NTH α1(IV)を抗原として抗 NTH α1(IV)抗体の作製を試みた。その結果、我々は、IV 型コラーゲンに含まれる α1(IV)鎖と反応しない、いくつかの抗 NTH α1(IV)モノクローナル抗体を得た(27)。これらの抗体のキャラクタリゼイションの過程で、そのうちの 1 つである抗体#141 が、NTH α1(IV)に加えて 140 kDa のタンパク質である 140K を認識することを見出した。上述のように、抗体#141 は NTH α1(IV)を抗原として得られたモノクローナル抗体であることから、我々は 140K が NTH α1(IV)の新たなバリアントであり、その同定は NTH α1(IV)の機能解析に重要であると考えた。

そこで、我々は、抗体#141 を用いて 140K をアフィニティー精製し、その精製 140K をアミノ酸配列分析に供することで 140K の同定を行った。また、140K の糖鎖についても各種レクチンを用いて解析を行った。以下に、詳細を記す。

第２節　実験材料と方法

第１項　抗体とレクチン

マウス抗 NTH α1(IV)モノクローナル抗体#141 は我々の研究所（日本化薬、東京、日本）で作製

された(27)。マウス抗 α1(IV)鎖モノクローナル抗体である JK132 は、精製ヒト IV 型コラーゲンを抗原として作製された(60)。ウサギ抗 COL6A1 ポリクローナル抗体（N term）は Abgent（サンディエゴ、CA、米国）から購入した。ホースラディッシュペルオキシダーゼラベルヒツジ抗マウス及びロバ抗ウサギ IgG 抗体は GE ヘルスケア（リトルチャルフォント、英国）から購入した。

本研究で使用したビオチンラベルレクチンは、レンズマメ凝集素（LCA）、トウゴマ凝集素 I（RCA120）及びコムギ胚芽凝集素（WGA）である。また、上記レクチンを結合したアガロースも使用した。なお、これらのレクチンは J-オイルミルズ（東京、日本）から購入した。

第２項　細胞培養

ヒト胎児腎臓細胞株 293FT（サーモフィッシャーサイエンティフィック、ウォルサム、MA、米国）は、1 mM のピルビン酸ナトリウム（サーモフィッシャーサイエンティフィック）、非必須アミノ酸溶液（サーモフィッシャーサイエンティフィック）と 10%のウシ胎児血清（FBS；Tissue Culture Biologicals、トゥーレアリ、CA）を含むダルベッコ改変イーグル（DMEM） high glucose 培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック）で培養した。東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター（宮城、日本）から購入したヒト乳癌細胞株 MCF-7 とヒト食道癌細胞株 TE8、American Type Culture Collection（マナサス、VA、米国）から購入したヒト中皮腫細胞株 MSTO-211H、ヒト肺癌細胞株 NCI-H226 とヒト肺癌細胞株 NCI-H460 及び JCRB 細胞バンク（JCRB、東京、日本）から購入したヒト線維肉腫細胞株 HT1080、ヒト肝癌細胞株 HLF とヒト肺癌細胞株 Lu65A は、10%の FBS を含有する Roswell Park Memorial Institute 1640（RPMI1640）培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック）で培養した。ヒト胎児肺線維芽細胞株 TIG-1 細胞は JCRB から購入し、10%の FBS を含む DMEM 培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック）で培養した。すべての細胞株は 37℃、5% CO_2 雰囲気下で培養した。

第３項　抗体結合樹脂の作製

抗体#141 または JK132 を結合した樹脂は、以下の通りに調製した。2 mg の抗体#141 または JK132 を 1 mL の Protein G Sepharose 4 Fast Flow（GE ヘルスケア）に添加し、各々の樹脂を穏やかに振とうしながら 1 時間、4℃でインキュベートした。樹脂は 0.2 M の triethanolamine-HCl（pH 8.2）で平衡化した。その後、抗体をクロスリンクする為に、穏やかに振とうしながら 50 mM の dimethyl pimelimidate 中で、室温で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、樹脂を 0.2 M の ethanolamine-HCl（pH 8.2）で平衡化した。未反応のアミノ基をブロックする為に、穏やかに振とうしながら室温でさらに 1 時間インキュベートした。ブロッキング後、樹脂をリン酸緩衝食塩水（PBS, pH 7.4）で洗浄及び平衡化した。

第４項　抗体#141 結合樹脂を用いた 140K の精製

すべての精製手順は 4℃で実施した。140K は HLF 細胞のコンディションメディウムから以下の通りに精製した。140K を吸着する為に、1500 mL のコンディションメディウムを 6 mL の抗体#141 結合樹脂と混合した。吸着後、樹脂を PBS で洗浄し、140K を含む吸着したポリペプチ

ドを 0.1 M の glycine-HCl（pH 2.8）で溶出した。140K を含有する画分を回収し、Amicon Ultra-15（メルクミリポア、ビレリカ、MA、米国）で濃縮した。濃縮各分は、PBS で透析した。

第５項　ヒト VI 型コラーゲンの抽出とドットブロッティングによる解析

既報に則り、ヒト皮膚線維芽細胞（HF18）の長期（31 日）培養によって形成される真皮様構造を VI 型コラーゲン調製の出発物質として使用した(61)。なお、すべての精製操作は 4℃で実施した。具体的には、真皮様構造の凍結乾燥材料（1.10 g）を、5 mM の EDTA、100 μM の *N*-ethylmaleimide 及び 100 μM の phenylmethylsulfonyl fluoride のプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 5 mL の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)-1 M NaCl 溶液と混合し一晩懸濁した。その後、10,000 × *g* で 30 分間遠心することにより、上清を回収した。なお、回収した上清のタンパク質濃度は、0.1 mg/mL と見積もられた。クーマシーブリリアントブルー（CBB）染色による分析から、VI 型、I 型と V 型コラーゲンは、Amicon Ultra-0.5（メルクミリポア）で 10 倍濃縮後に検出できることが明らかとなった。

ドットブロッティングは、以下の通りに実施した。VI 型コラーゲン含有サンプルを、0.02%の 2-mercaptoethanol（2-ME）含有あるいは不含（それぞれ、加熱及び還元条件と加熱及び非還元条件として図 5A で表わされる）で 90℃、10 分間、加熱した。また、2-ME 含有あるいは不含の非加熱サンプルも調製した。VI 型コラーゲンを含むサンプルは、トリス緩衝生理食塩水（TBS、25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl）で希釈し、フィルトレーションマニホールドシステムである MilliBlot システム（メルクミリポア）を用いて、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）メンブレン（イモビロン-P、メルクミリポア）上にブロッティングした。メンブレンは TBS で 1 回洗浄後、1/4 に希釈したブロックエース（DS ファーマバイオケミカル、大阪、日本）にてブロッキングした。その後、メンブレンを抗体#141 でインキュベーションした。インキュベーション後、ツイーン 20 含有トリス緩衝生理食塩水（TBS-T、20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20）で洗浄した。結合した抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼが付加された抗マウス IgG 抗体で検出し、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate（メルクミリポア）を用いてイメージアナライザー（ImageQuant LAS4000、GE ヘルスケア）で視覚化された。

第６項　140K のアミノ酸配列解析

140K のアミノ酸配列解析は、以下の通りに APRO サイエンス（徳島、日本）で実施された。すなわち、精製した 140K に等量の 2-ME 含有 2X 濃縮サンプルバッファー（125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 10% 2-ME, 4% SDS）を添加し混合し、95℃、5 分間加熱した。その後、7.5% の SDS-PAGE ゲルにロードし電気泳動を行った。電気泳動後、140K のバンドはゲルから切り出され、そのゲルをプロテアーゼ Lys-C（富士フィルム和光純薬工業、大阪、日本）処理（35℃、20 時間）に供した。消化後のペプチドは Aliance HPLC 2695 Separations Module System（Waters、ミルフォード、MA）にインジェクトし、Symmetry C_{18} column（100 Å, 3.5 μm, 1.0 × 150 mm, Waters）を使用して分離した。なお、分離相は、A：0.10%トリフルオロ酢酸-2%アセトニトリル及び B：0.09%トリフルオロ酢酸-90%アセトニトリル。グラジエントコンディションは、0%の分離相を 6 分間、0%から 10%の分離相 B を 5 分間、10%から 50%の分離相 B を 75 分間、50%から 100%の分離相 B

を 5 分間、100%の分離相 B を 5 分間で流速は 1 mL/min.である。分離されたペプチドは Procise 494 HT Protein Sequencing System （サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて、製造元の取扱説明書に則り回収及び解析した。なお、ペプチドは 210 nm の UV 波長で検出し、参照波長は 280 nm とした。

第７項　哺乳類細胞発現ベクターの作製及びそれらベクターの 293FT 細胞における一過性発現

COL4A1 と *COL6A1* コード領域を、表 1 に示すプライマーを用いて HLF 由来の cDNA をテンプレートとして、PCR によって増幅した。その後、各コード領域を pENTR ベクター（サーモフィッシャーサイエンティフィック）にサブクローニングした。哺乳類細胞での発現の為に、*COL4A1* または *COL6A1* コード領域を、製造元の取扱説明書に則り GATEWAY テクノロジー（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて、pcDNA3.2/V5-DEST ベクター（サーモフィッシャーサイエンティフィック）へ移動した。

一過性発現の為に、製造元の取扱説明書に則り Lipofectamine 2000（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて、哺乳類発現ベクターを 293FT 細胞へトランスフェクトした。トランスフェクション後、293FT 細胞を 37℃、5% CO_2 雰囲気下で 3 日間培養した。その後、コンディションメディウムをウェスタンブロッティング解析に供した。

第８項　免疫またはレクチン沈降

免疫またはレクチン沈降は、既報の方法に若干の修正を加え実施した(27)。具体的には、10 μL の抗体結合樹脂またはレクチン結合アガロースを、1 mL のコンディションメディウムに添加し、4℃で 1 時間インキュベートした。その後、抗体結合樹脂あるいはレクチン結合アガロースを、洗浄バッファー（50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1% Triton X-100）で洗浄した。洗浄後、吸着したタンパク質あるいは糖鎖を、2-ME を含む 2X 濃縮サンプルバッファーを用いて、95℃、5 分間で溶出し、ウェスタンブロッティングに供した。

第９項　ウェスタンブロッティングとクーマシーブリリアントブルー（CBB）染色

ウェスタンブロッティングは、既報に若干の修正を加え実施した(27)。具体的には、等量の 2-ME 含有 2X 濃縮サンプルバッファーをサンプルに添加し、 95℃、5 分間加熱した。なお、非還元条件下では、2-ME 不含の 2X 濃縮サンプルバッファーを用いた。熱変性したサンプルは、7.5%の SDS-PAGE ゲルあるいは 5–20%の SuperSep Ace プレキャストゲル（富士フィルム和光純薬工業）にロードし電気泳動を実施した。なお、Precision Plus Protein Dual Color Standards（バイオラッド、ハーキュリーズ、CA、米国）を分子量マーカーとして使用した。電気泳動後、ゲル中のタンパク質を PVDF メンブレンに転写した。その後、メンブレンを 5%スキムミルク（BD バイオサイエンス、フランクリンレイク、NJ、米国）含有 TBS-T でブロッキングした。ブロッキング後、メンブレンを抗体またはビオチンラベルレクチンでインキュベートし反応した。なお、すべての一次抗体は、5%スキムミルク含有 TBS-T で 1 μg/mL に希釈し使用した。また、すべてのビオチンラベル

レクチンは、TBS-T で 0.1 μg/mL に希釈し使用した。反応後、TBS-T でメンブレンを洗浄し、結合した抗体はホースラディッシュペルオキシダーゼラベルの抗マウスまたは抗ウサギ IgG 抗体で検出した。なお、ビオチンラベルレクチンをプローブとして使用した場合、ホースラディッシュペルオキシダーゼラベルストレプトアビジン（GE ヘルスケア）を検出の為に使用した。メンブレンは Hyperfilm ECL（GE ヘルスケア）上で、ECL（GE ヘルスケア）または ECL Prime（GE ヘルスケア）を用いて現像した。いくつかの実験では、我々は、異なる抗体で検出する為にメンブレンを再利用した。メンブレンを再利用する為に、抗体またはレクチンをストリッピングバッファー（62.5 mM Tris-HCl, pH 6.5, 100 mM 2-ME, 2% SDS）で 55℃、30 分間、インキュベートすることで剥離した。その後、既報に記載の通りにリプローブ後、ウェスタンブロッティングに供した(62)。

CBB 染色は、Rapid Stain CBB キット（ナカライテスク、京都、日本）を用いて、製造元の取扱説明書に従って実施した。

第３節　結果

第１項　抗体#141 の 140K に対する親和性は NTH α1(IV)より高い

抗体#141 のキャラクタリゼイションの過程で、抗体#141 は加熱及び非還元条件下で、NTH α1(IV)に加えて 140K を認識することが、いくつかの癌細胞株のコンディションメディウム（ヒト肝癌細胞株 HLF、ヒト食道癌細胞株 TE8 及びヒト肺癌細胞株 NCI-H226）で確認された（図 1A）。140K は加熱及び非還元条件下で観察されることから、IV 型コラーゲンとは異なりジスルフィド結合による三重らせん構造を形成しないことを示す。図 1A は、JK132 が NTH α1(IV)（180 kDa）に加えて、135 kDa 及び 160 kDa の 2 つのバンドを認識したことも示している。Iwata らは、180 kDa の α1(IV)鎖に加えて、α1(IV)鎖の短いバリアントである 160 kDa の存在を報告しているが、135 kDa（以下、135K）のバンドの報告はない(63)。また、135K は大きさにおいて 140K とわずかに異なる。このことは、140K と 135K が NTH α1(IV)の未知のバリアントであることを示唆する。

次に、我々は免疫沈降実験を行った。その結果、抗体#141 は 140K を沈降できるが 135K はできず、JK132 は 135K を沈降できるが 140K はできないことが明らかとなった（図 1B）。さらに、図 1B に示すように、抗体#141 は、NTH α1(IV)より 140K を沈降する量が多かった。すなわち、抗体#141 の 140K への反応性は、NTH α1(IV)に対する反応性より高いと考えられる。既報では、JK132 はヒト α1(IV)鎖の 1165 から 1179 の領域を含むアミノ酸配列を認識すると報告されている(23, 63)。さらに、抗体#141 は、NTH α1(IV)を抗原として用いて我々の研究室で作製された(27)。以上の知見から、我々は、140K と 135K は NTH α1(IV)の新しいバリアントであり、抗体#141 と JK132 の 140K への親和性の違いは、2 つの抗体の認識配列の違いに起因していると考えた。

第２項　140K の VI 型コラーゲン α1 鎖ポリペプチドとしての同定

次に我々は 140K の同定を試みた。なお、140K は HLF 細胞培養のコンディションメディウムから精製した。CBB 染色により、精製した 140K には、140K が主たるポリペプチドとして含まれていること及び 140K より小さいポリペプチドがそれより少ない量含むことが確認された（図 2A）。

次に、抗体#141 の精製 140K に対する反応性を確認した。図 2B に示すように、抗体#141 は、精製 140K を認識することが確認された。140K の純度はアミノ酸分析に十分であると考えられたが、エドマン分解による 140K の N 末端アミノ酸配列の同定はできなかった。N 末端アミノ酸配列分析ができなかった理由は、N 末端アミノ酸の翻訳後修飾（例えば、N 末端のピログルタミン酸形成）と推測された。

140K の N 末端アミノ酸配列の分析ができなかった為、我々は、140K を Lys-C 消化し、消化によって生成した内部ペプチドに対して N 末端アミノ酸配列分析を行うこととした。具体的には、消化して得られたペプチドを逆相 HPLC により分離し、図 3 に示すフラクション 30、40、47 及び 58 のペプチドをアミノ酸配列分析に供した。表 2 に同定されたペプチド配列を示す。フラクション 40 以外のすべてのペプチドが COL6A1（RefSeq RefSeq accession number: NP_001839.2）と同定された。なお、フラクション 58 からは COL6A1 由来の二つのペプチド配列が同定された。また、理由は不明だが、フラクション 40 のアミノ酸配列は同定できなかった。分析されたすべてのペプチドが COL6A1 の配列と同定された。上述のように、140K を NTH α1(IV)の未知のバリアントであると予想していたが、アミノ酸再列分析の結果から、140K は *COL6A1* がコードする VI 型コラーゲン α1 鎖（α1(VI)）ポリペプチドである可能性が考えられた。

抗体#141 は、NTH α1(IV)を抗原として得られた抗体である(27)。しかしながら、アミノ酸配列分析は 140K が COL6A1 に由来することを示した。我々は、アミノ酸配列分析の結果を確認する為に、293FT 細胞に COL4A1 または COL6A1 発現ベクターをトランスフェクトし、抗体#141 が COL6A1 を認識するか検討した。なお、JK132 は COL4A1 の 1165 から 1179（KGEPGLPGRGFPGFPT）を認識すること(60, 63)及びこの配列が COL6A1 に含まれないことから、ネガティブコントロールとして使用した。その結果、抗体#141 は加熱及び還元条件下で、COL4A1 及び COL6A1 を認識するのに対し、JK132 は COL4A1 のみを認識し COL6A1 は認識しないことが確認された（図 4）。この結果は、140K が分子量において α1(VI)鎖のポリペプチドであること裏付ける。

第３項　抗体#141 のコンフォメーション依存的な VI 型コラーゲン α1 鎖の認識

上述のように、抗体#141は、α1(VI)鎖の非ジスルフィド結合ポリペプチドを認識する（図1A及び2B）。この抗体のα1(VI)鎖に対する反応性は、VI型コラーゲンのコンフォメーションに依存していることが考えられる。そこで、我々は、熱変性させたVI型コラーゲン分子が、抗体#141により認識されるかドットブロット解析により確認した。図5Aは、抗体#141が熱変性後の還元及び非還元条件下のα1(VI)鎖を認識したことを示す。抗体#141の非加熱及び非還元条件下におけるネイティブ構造のα1(VI)鎖に対する反応は、無視できるほど小さかった。さらに、抗体#141は非加熱及び還元条件下のα1(VI)鎖をほとんど認識しなかった。さらに、加熱及び還元条件下において、我々が用いたVI型コラーゲンには、三重らせん構造由来のα1(VI)鎖と一致する140 kDaポリペプチドを主としたバンドを含有し、且つ、180 kDaのα1(IV)鎖及びNTH α1(IV)の明確なバンドが認められなかったことを確認している（図5B）。すなわち、我々が用いたVI型コラーゲンには、抗体#141反応性抗原としてα1(VI)鎖だけを含むと考えられた。以上の結果から、抗体#141はコンフォメーション依存的にα1(VI)鎖を認識すると考えられた。また、図1Aに示すように、抗体

#141は非還元条件下で140Kを認識する。以上の結果から、140Kは*COL6A1*によってコードされる新たな非三重らせん状のポリペプチドであると考えられ、我々はそれをNTH α1(VI)と命名した。上述のように、NTH α1(VI)は非還元条件下で検出されたことから、NTH α1(VI)はα2 (VI)鎖またはα3(VI)鎖とジスルフィド結合は形成していないと考えられた。

第４項　NTH α1(VI）の糖鎖のキャラクタリゼイション

NTH α1(VI)の糖鎖修飾のキャラクタライズを行う為に、我々は、いくつかのレクチンのNTH α1(VI)に対する反応性を検討した。その結果、LCAがHT1080及びLu65A細胞由来のNTH α1(VI)を沈降すること、RCA120はHT1080から回収したNTH α1(VI)と反応するがLu65A由来のNTH α1(VI)とは反応しないこと及びWGAはどちらのNTH α1(VI)も沈降しないことが明らかになった（図6A)。これら3つのレクチンは、異なる糖鎖を認識することが報告されている。すなわち、1) LCAはN型結合型糖鎖のコアフコースを認識する(64, 65)（なお、コアフコースとは、N型糖鎖の共通5糖母核（コア）の還元末端に付加されたフコースを指す(66)）、2) RCA120は非還元末端のβ-galactose（Gal）を認識する(67)、3) WGAは非還元末端のN-アセチル-D-グルコサミン（GlcNAc）とそのオリゴマー（例えば*N,N′* diacetyl-chitobiose）及び非還元末端のシアル酸（NeuAc）を認識する(68–70)。以上をまとめると、NTH α1(VI)の糖鎖の共通の特徴は、コアフコース構造を有すること及び非還元末端にはGlcNAcとNeuAcが存在しないことが挙げられる。次に、我々はヒトVI型コラーゲンに対するレクチン反応性を検討した。図6Bは、LCA、RCA120及びWGAが加熱及び還元条件下でヒトVI型コラーゲンを認識することを示す。Fujiwaraらは、VI型コラーゲンはコアフコースを有するN型結合糖鎖及びGalあるいはNeuAcを非還元末端に有するが、GlcNAcは有しないと報告した(71)。この報告は、図6Bに示す我々の結果と一致する。これに対し、図6Aは、WGA反応性からNTH α1 (VI)は非還元末端にNeuAcを有さないことを示す。すなわち、NTH α1(VI)に付加される糖鎖は三重らせん構造のα1(VI)鎖とは異なることを示唆する。

第４節　考察

我々は、NTH α1 (VI)がいくつかの癌細胞株のコンディションメディウムに存在すること（図1A）及びNTH α1(VI)が*COL6A1*の新しい遺伝子産物であることを明らかにした（表2と図4)。一方、NTH α1 (VI)とは異なる非三重らせん状のコラーゲンポリペプチドであるNTH α1(IV)の存在も報告されている(23–27)。NTH α1(IV)は、*COL4A1*のIV型コラーゲンα1鎖とは異なる遺伝子産物で非ジスルフィド結合構造を示す(23)。さらに、JK132のエピトープは三重らせん構造で隠れる為、NTH α1(IV)はJK132によって特異的に認識される(23)。このことは、NTH α1(IV)の高次構造がIV型コラーゲンのα1(IV)鎖とは異なることを示す。同様に、我々は、抗体#141が非三重らせん状のα1(VI)鎖のみを認識することを示した（図5)。我々の結果は、JK132のNTH α1(IV)に対する反応性と類似している。すなわち、NTH α1(VI)のコンフォメーションは、VI型コラーゲンのα1(VI)鎖と異なると考えられる。

我々は、抗体#141がNTH α1(IV)及びNTH α1(VI)を認識することを明らかにした（図1)。両ポリペプチドに対する抗体#141の認識機構を明らかにする為に、我々は、抗体#141の認識配列を精査

した。その結果、抗体#141は、COL4A1の1055から1064及びCOL6A1の254から286アミノ酸の領域を認識すること及び抗体#141は両分子に共通のエピトープ（PxxGxPGLRG）を認識することを明らかにしている(72)。すなわち、抗体#141のNTH α1(IV) 及びNTH α1(VI)に対する反応性は、COL4A1とCOL6A1に存在する共通の認識配列に起因すると考えられる。さらに、COL4A1やCOL6A1に存在する抗体#141認識配列の大部分はコラーゲン領域に存在することから、三重らせん構造を形成すると抗体#141の認識配列が隠れると考えられる。そのため、抗体#141は三重らせん構造のIV型コラーゲンやVI型コラーゲンを認識できないと考えられる。すなわち、抗体#141の非三重らせん状コラーゲンポリペプチド、NTH α1(IV) やNTH α1(VI)、に対する特異的な認識は、その認識配列に起因すると考えられる。また、図1Bで示されるように、抗体#141のNTH α1(VI)に対する親和性は、NTH α1(IV)より高いことが推測された。抗体#141の、COL6A1中の#141認識配列に対する親和性は、COL4A1中の#141認識配列に対する親和性より高いことを我々は確認している(72)。すなわち、抗体#141のNTH α1(VI)に対する親和性の高さもその認識配列に起因すると考えられる。

NTH α1(VI)はVI型コラーゲンと同様にコアフコース構造を有するが、NTH α1(VI)の糖鎖は非還元末端にNeuAcを含まない（図6）。N型結合糖鎖は小胞体からゴルジ体で生合成され、共通5糖母核を持ち、さまざまな酵素により共通5糖母核上に複数の糖鎖が形成される(73–77)。一方、NeuAcはシアル酸転移酵素の作用によって非還元末端へ転移される。基質に対する酵素特異性はシアル酸転移酵素間でさまざまであることが知られている(76, 77)。NTH α1(VI)は非三重らせん状の構造であることから（図5）、NTH α1(VI)とVI型コラーゲンの非還元末端の差異はシアル転移酵素のNTH α1(VI)に対する親和性に起因していることが示唆される。しかし、NTH α1(VI)に付加される糖鎖構造は完全には決定されていない。更なる研究が必要であると考える。

VI 型コラーゲンは三重らせんとして生合成される(31–33)。また、VI 型コラーゲンの適切なフォールディングには α3(VI)鎖が重要な役割を担う。α3(VI)鎖がない場合、α1(VI)鎖及び α2(VI)鎖は非会合ポリペプチドとして細胞内にとどまり分解されると論じられてきた(78)。いくつかの癌細胞株のコンディションメディウム中に NTH α1(VI)発現認められることから（図 1A）、α3(VI)鎖が NTH α1(VI)生合成に重要か否かの疑問を引き起こす。NTH α1(VI)の糖鎖修飾は、VI 型コラーゲンとは異なると考えられる結果を我々は得ている (図 6)。すなわち、NTH α1(VI)は VI 型コラーゲンの α1(VI)鎖とは異なるメカニズムにより生合成及び分泌されていると推測されることから、α3(VI)鎖が NTH α1(VI)生合成に必要ではない可能性が考えられる。

VI型コラーゲンが腫瘍形成、例えば癌細胞増殖(53, 54)やアポトーシス(55)に関与していることが報告されており、VI型コラーゲンの作用機序はβ1インテグリンまたはNG2/コンドロイチン硫酸プロテオグリカンとの相互作用を介している(46, 79, 80)。上述のように、NTH α1(VI)発現はいくつかの癌細胞株で観察される（図1A）。このことは、NTH α1 (VI)が腫瘍形成に関与していることを示唆する。また、NTH α1(VI)の高次構造と糖鎖修飾は、VI型コラーゲンとは異なると考えられる（図5及び6）。タンパク質の高次構造（例えば、I型コラーゲンフィブリルや多量体化フィブロネクチン）及び糖鎖修飾（例えば、筋ジストロフィーによる糖鎖付加の欠損）は、生物学的機能に影響を与える(81, 82)。すなわち、NTH α1(VI)の作用機序と生物学的機能がVI型コラーゲン

とは異なることが示唆される。

Park らは、COL6A3 の切断産物である endotrophin(83)が乳癌の増殖、転移、上皮間葉転換及び腫瘍血管形成を促進すると報告している(52)。NTH α1(VI)は *COL6A1* によってコードされること及び endotrophin のアミノ酸配列は COL6A1 には保存されていないことから、NTH α1(VI)の作用機序は endotrophin とも異なると考えられる。

我々は、140K が *COL6A1* がコードする新規な非三重らせん状コラーゲン分子 NTH α1 (VI)であることを明らかにした。また、NTH α1(VI)発現がいくつかのヒト癌細胞株のコンディションメディウムで観察されたことから、NTH α1(VI)が腫瘍形成に関与していることを示唆する。一方、レクチン反応性から、NTH α1(VI)の糖鎖が VI 型コラーゲン由来の α1(VI)鎖とは異なることを示した。このことは、NTH α1(VI)の生合成機構、作用機序及び生物学的機能が VI 型コラーゲンの α1 鎖や VI 型コラーゲンとは異なることが示唆される。すなわち、NTH α1(VI)が新たな創薬標的分子となり得る可能性が考えられる。しかしながら、NTH α1(VI)の生物学的機能については不明であった。そこで、NTH α1(VI)の機能解析を実施した。次章において NTH α1(VI)の機能解析の結果について述べる。

第３章　非三重らせん状の VI 型コラーゲン α1 鎖、NTH α1(IV)、の癌細胞増殖への関与

第１節　序文

宿主細胞から分泌される VI 型コラーゲンは、癌細胞の増殖に影響を及ぼすことが報告されている(30, 50, 53)。また、定量的逆転写 PCR（RT-qPCR）解析により、*COL6A1* mRNA の高発現が星状細胞腫で認められていることが報告されている(84)。RT-qPCR と免疫組織化学（IHC）解析により、*COL6A1* mRNA 及び COL6A1 の過剰発現が非小細胞肺癌細胞で報告されている(85)。IHC 解析により、COL6A1 発現が隣接正常組織より去勢抵抗性前立腺癌で高いことも明らかとなっている(86)。さらに、遺伝子発現プロファイル解析により、*COL6A1* mRNA 発現が淡明細胞型腎細胞癌の予後不良因子であること(87)及びプロテオミクス解析から、COL6A1 発現が神経膠芽腫患者の予後不良と関連することが報告されている(88)。同様に、COL6A1 発現により子宮頸癌患者の予後を予測できることも報告されている(89)。このように、VI 型コラーゲン及び COL6A1 が癌細胞増殖にとって重要な役割を担っている可能性が考えられる。

Zhu らは、COL6A1 ノックダウン（KD）がヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の増殖を阻害すること及び COL6A1 過剰発現によりヒト前立腺癌細胞株 LNCaP の増殖が促進され、その作用は JAK-STAT 経路を介していることを報告している(86)。Owusu-Ansah らも、COL6A1 は高転移性のヒト膵臓癌細胞株 BxPC-M8 の遊走と浸潤に関与していることを報告している(90)。また、第 2 章において、*COL6A1* によってコードされる非三重らせん状 α1(VI)鎖である NTH α1(VI)の発現が、いくつかの癌細胞株のコンディションメデイウム中に認められることを示した(91)。すなわち、VI 型コラーゲンの α1(VI)鎖ではなく NTH α1(VI)が、癌細胞の増殖、遊走及び浸潤に直接関与している可能性が考えられた。

Matricryptin と呼ばれる生物学的活性を有する ECM タンパク質由来のフラグメントが知られている(57)。Arresten、canstatin 及び tumstatin は、それぞれ IV 型コラーゲン α1、α2 及び α3 鎖の NC1 ドメインに由来する matricryptin であり、抗血管新生及び抗腫瘍活性を有する(92, 93)。また、COL6A3 の切断産物である endotrophin は、悪性腫瘍の進行を促進することが報告されている(52)。

以上の知見から、NTH α1(VI)あるいは NTH α1(VI)由来ペプチドが癌細胞の増殖、遊走、浸潤に関与していることが示唆された。そこで、NTH α1(VI)または NTH α1(VI)由来のペプチドが癌細胞増殖に関与するかを検証する為に、多くの MMP を恒常的に発現する高転移性ヒト膵臓癌細胞株 S2-VP10 細胞 (94)を用いて検証実験を行った。以下に、その詳細を記す。

第２節　実験材料と方法

第１項　抗体と VI 型コラーゲン

COL4A1、NTH α1(IV)、COL6A1 及び NTH α1(VI)を認識するマウスモノクローナル抗体（抗体 #141）は当研究所（日本化薬）で作製した(27, 72, 91)。ウサギ抗 COL6A1 ポリクローナル抗体は Novus Biologicals（リトルトン、CO、米国）から購入した。ウサギ抗 COL6A1 ポリクローナル抗体（N term）及びマウス抗 COL6A2 モノクローナル抗体は Abgent から購入した。マウス抗 HSP90 モノクローナル抗体は BD バイオサイエンスから購入した。ホースラディッシュペルオキシダー

ゼラベルヒツジ抗マウス及びロバ抗ウサギ IgG 抗体は、GE ヘルスケアから購入した。ヒト VI 型コラーゲンは BD バイオサイエンスから購入した。

第２項　低分子干渉 RNA（siRNA）

コントロール及び COL6A1 siRNA はサーモフィッシャーサイエンティフィックから購入した。表 3 にコントロール siRNA を除くすべての siRNA 配列を示す。

第３項　TaqMan プローブ

COL4A1、*COL6A1*及びグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（*GAPDH*）TaqManプローブはサーモフィッシャーサイエンティフィックから購入した。

第４項　細胞株及び細胞培養

ヒト乳癌細胞株MDA-MB-436(95)は、American Type Culture Collectionから購入し、10% FBS（Tissue Culture Biologicals）を含有したRPMI-1640培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック）で培養した。ヒト膵臓癌細胞株S2-VP10は、東北大学加齢医学研究所医用資源センターから購入し、10% FBSを含有したDMEM培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック）で培養した。両細胞株は、37℃、5% CO_2雰囲気下で培養した。なお、我々は両細胞株がマイコプラズマ陰性であることを確認している。

第５項　siRNA のトランスフェクション及び細胞増殖アッセイ

細胞（1x10^4/well）を12ウェルプレートに播種し、37℃、5% CO_2雰囲気下で培養した。一晩培養後、細胞にsiRNAを製造元の取扱説明書に従って、Lipofectamine RNAiMAX （サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いてトランスフェクションした。具体的には、10 pmolesのsiRNAを含む100 μLのOptiMEM（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を2 μLのLipofectamine RNAiMAXを含む100 μLのOptiMEMと混合し、混合物を室温で20分間インキュベートした。インキュベーション後、混合物を細胞に添加し、37℃、5% CO_2雰囲気下で培養した。3時間後、培養液を新鮮な培養液に交換した。その後、VI型コラーゲン、1 mLのコンディションメディウムまたは1 mLの10%FBS含有DMEMを細胞に添加した後、37℃、5% CO_2雰囲気下でさらに72時間培養し、細胞増殖アッセイに供した。また、いくつかの実験では細胞培養終了後、siRNAで処理したコンディションメディウムを回収し、第7項「細胞増殖アッセイの為のコンディションメディウム」に記載の通り、Amicon Ultra -4またはUltra-15遠心フィルターユニット（分子量カットオフ、10 kDa、メルクミリポア）を用いて分画した。分画した画分のレスキュー活性を細胞増殖アッセイにより評価した。

なお、細胞増殖を評価する為に、我々は次項「メチレンブルー染色」に示すメチレンブルー染色の評価から相対増殖（対コントロール（%））を算出した。

第６項　メチレンブルー染色

我々は、細胞増殖を既報に若干変更を加えたメチレンブルー染色で評価した(96, 97)。具体的には、培養後の細胞の培地をウェルから除去しプレートを室温で乾燥させた。その後、各ウェルに500 μLのメタノールを加え、細胞を固定する為にプレートを2分間室温で静置した。次に、ウェルからメタノールを除去しプレートを室温で乾燥させた。500 μLの0.05%メチレンブルー溶液を各ウェルに加え、室温で30分間インキュベートした。その後、メチレンブルー溶液を除去し、プレートを蒸留水で3回洗浄した。洗浄後、メチレンブルーを溶解する為に、各ウェルに1 mLの3%塩酸溶液を添加した。その後、SoftMAX Pro Software version 6.4.2（モレキュラーデバイス、サンノゼ、CA、米国）を搭載したSpectraMAX M3プレートリーダー（モレキュラーデバイス）を用い660 nmの吸光度を測定した。すべての細胞増殖アッセイはtriplicateで実施され、siRNA処理、化合物処理及びレスキュー実験は少なくとも3回繰り返した。データは平均±SDとして表した。

第７項　細胞増殖アッセイの為のコンディションメディウム

S2 -VP10細胞（2 x 10^5/well）を6ウェルプレートに播種し、37℃、5% CO_2雰囲気下で2日間培養した。培養後に得られたコンディションメディウムは、COL6A1 KDによる細胞増殖阻害作用のレスキュー効果を評価する為に使用された。いくつかの実験において、コンディションメディウムは製造元の取扱説明書に従いAmicon Ultra -4またはUltra-15 Centrifugal Filter Unitsを用いて分画した。具体的には、コンディションメディウムを、フィルターユニット中で5,000 × *g*で25分間、4℃で遠心分離し、10 kDaを超える分子を含む画分（> 10 kDa画分）及び10 kDa未満の画分（< 10 kDa画分）を別々に回収した。その後、画分を0.45 μmのPVDFメンブレンフィルター（メルクミリポア）でろ過した。なお、1容量の> 10 kDa画分に対して9容量のDMEM及び9容量の< 10 kDa画分に対して1容量のFBSを添加した。各画分は細胞増殖アッセイに供した。

第８項　アセトン沈澱による< 10 kDa 画分の濃縮

タンパク質をアセトン沈澱により濃縮した。具体的には、1容量の< 10 kDa画分に対して9容量の氷冷アセトンを添加し、混合液を-20℃で2時間以上インキュベートした。その後、混合液は15,000 × *g*、4℃で10分間遠心し沈殿を得た。得られた沈殿をSDS-PAGEに供した。

第９項　細胞抽出液の調製

細胞をPBSにより3回洗浄後回収した。細胞に溶解バッファーを添加し、氷上で30分間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を20,000 × *g*、4℃で15分間遠心し、上清を回収した。回収した上清を細胞抽出液として使用した。タンパク質濃度は、製造元の取扱説明書に従ってBCA Protein Assay Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック）により測定し、10 μgの細胞抽出液をウェスタンブロッティングに供した。

第１０項　ウェスタンブロッティングと CBB 染色

ウェスタンブロッティングは、既報に準じて実施された(27, 91)。具体的には、各細胞抽出液あ

るいはコンディションメディウムに等量の2-ME含有2X濃縮サンプルバッファーを添加し、95℃、5分間加熱した。なお、非還元条件下では2-ME不含の2X濃縮サンプルバッファーを用いた。加熱後、サンプル溶液を7.5%のSDS-PAGEゲル、5–20%のSuperSep Aceプレキャストゲル（富士フィルム和光純薬工業）あるいは15–20%のSuperSep Aceプレキャストゲル（富士フィルム和光純薬工業）にロードし電気泳動した。なお、Precision Plus Protein Dual Color Standards（バイオラッド）を分子量マーカーとして使用した。電気泳動後、ゲル中のタンパク質をPVDFメンブレン（メルクミリポア）に転写し、5%スキムミルク（BDバイオサイエンス）含有TBS-Tでブロッキングした。その後、メンブレンは一次抗体と反応させた。なお、抗COL6A1 (N-term)と抗COL6A2抗体以外のすべての一次抗体は、5%スキムミルク含有TBS-Tで1 μg/mLに希釈し使用した。抗COL6A1 (N-term)及び抗COL6A2抗体はCan Get Signal®（TOYOBO、大阪、日本）を用いて1 μg/mLに希釈し使用した。反応後、TBS-Tでメンブレンを洗浄し、結合した抗体はホースラディッシュペルオキシダーゼラベルの抗マウスまたは抗ウサギIgG抗体（GEヘルスケア）で検出した。また、メンブレンはHyperfilm ECL（GEヘルスケア）上で、ECL（GEヘルスケア）またはECL Prime（GEヘルスケア）を用いて現像した。いくつの実験では、我々は異なる抗体で検出する為に同じメンブレンを使用した。メンブレンを再利用する為に、抗体をストリッピングバッファーで55℃、30分間でインキュベートすることで剥離し、既報に記載の通りにリプローブ後、ウェスタンブロッティングに供した(62)。

CBB染色は、製造元の取扱説明書に従ってRapid Stain CBB Kit（ナカライテスク）を用いて行った。

第１１項　RNA抽出及びcDNA合成

RNAは製造元の取扱説明書に従って、RNeasy Mini Kit（キアゲン、ヒルデン、ドイツ）を用いて抽出及び精製した。

cDNA は、精製 RNA 及び SuperScript III（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて以下の通りに合成された。具体的には、500 ng の RNA を、1 μL の 50 μM oligo d(T)20（サーモフィッシャーサイエンティフィック）及び 1 μL の 10 mM dNTP Mix（サーモフィッシャーサイエンティフィック）と混合した。 混合液は、13 μL になるように滅菌蒸留水を添加し、65℃で 5 分間加熱した。熱変性後、混合液を 4°C で 1 分間インキュベートした。次に、4 μL の 5X First-Strand Buffer（サーモフィッシャーサイエンティフィック）、 1 μL の 0.1 M dithiothreitol（サーモフィッシャーサイエンティフィック）、 1 μL の RNaseOUT （サーモフィッシャーサイエンティフィック）及び 1 μL の SuperScript III を混合液に添加した。cDNA 合成の為に、混合液を 50℃、30 分間インキュベートし、その後、75℃で 15 分間熱変性した。得られた cDNA を RT-qPCR のテンプレートとした。

第１２項　定量的逆転写PCR（RT-qPCR）

mRNA発現は、製造元の取扱説明書に従いRotor Gene Q （キアゲン）を用いてRT-qPCRにより測定した。具体的には、10 μLの2X TaqMan Gene Expression Master Mix（サーモフィッシャーサ

イエンティフィック）、 1 μL TaqMan probe（サーモフィッシャーサイエンティフィック）、1 μL cDNA及び8 μL dH_2Oを含む反応液を調製し、RT-qPCRに供した。RT-qPCRのサイクリング条件は次の通り。95℃、10分間の初期変性、95℃で15秒間の変性、60℃で1分間のアニーリングと伸長、サイクル数は40。反応後、標的遺伝子の相対的なΔCq（ΔΔCq）は*GAPDH* mRNAを内在性コントロールとして用い算出した(98)。また、*COL6A2* mRNAの発現レベルは*COL6A1* mRNAの発現量と比較した。すべてのRT-qPCR実験はduplicateで実施し、各RT-qPCR実験は少なくとも3回繰り返した。データは平均±SDとして表した。

第１３項　統計解析

すべての統計解析は、Exsus version 8.1.0 software（株式会社CACクロア、東京、日本）を使用し実施した。データは平均±SDとして表した。なお、4群間の統計的差異を決定する為にDunnetの多重比較テストを使用した。また、Studentのt-テストは2群間の統計的差異を決定する為に使用した。$P < 0.05$を統計的に有意と見なした。

第３節　結果

第１項　S2-VP10 細胞による NTH α1(VI)発現：COL6A1 サイレンシングは細胞増殖と NTH α1(VI)発現を低下させる

図7A及び7Bに示すように、S2-VP10細胞はNTH α1(VI)を発現するが, COL6A2の発現はわずかしか認められなかった。また、加熱及び非還元条件下でスメアバンドが観察された（図7A）。COL6A1にはシステイン残基が含まれていることから(33)、スメアバンドは分子内ジスルフィド結合の違いから生じたことが示唆された。次に、mRNAレベルでの発現を確認した。S2-VP10細胞における*COL6A2* mRNAの発現レベルは*COL6A1* mRNA発現レベルの22.3±0.7％であった（図7C）。予備検討の過程で、我々は、MDA-MB-436細胞がCOL6A1とCOL6A2を発現していることを見出した（データ示さず）。そこで、我々は、*COL6A2* mRNA /*COL6A1* mRNAの比率をMDA-MB-436 細胞で確認することとした。その結果、MDA-MB-436細胞の*COL6A2* mRNA発現レベルは*COL6A1* mRNA発現と同等（90.5±13.6％）であることが確認された（図7D）。VI型コラーゲンはα1、α2及びα3鎖で構成されており、三重らせん構造のVI型コラーゲンを形成するには、各鎖を等量必要とすることから(28, 30)、S2-VP10細胞では主要な*COL6A1*遺伝子産物はVI型コラーゲンではなく、NTH α1(VI)であると考えられた。

我々はCOL6A1 KDの及ぼす影響について検討する為に、COL6A1 siRNAによるCOL6A1発現抑制効果を検討した。図8Aに示すとおりに、各COL6A1 siRNAによりCOL6A1発現の抑制が確認された。コントロールsiRNAをトランスフェクトした場合及びしない場合の代表的なS2-VP10細胞の増殖曲線を図8Bに示す。図8Bに示されるように、コントロールsiRNAトランスフェクションがS2-VP10細胞の増殖に影響を与えないことが確認された。次に、我々は既報どおりに(86)、COL6A1 KDがS2-VP10細胞増殖を阻害するか検討した。その結果、COL6A1 KDによりS2-VP10細胞の増殖が阻害されることが確認された（図8C）。

第２項　増殖促進の為の NTH α1(VI)断片化の必要性

COL6A1 KD によるS2 -VP10細胞の増殖抑制は、*COL6A1*遺伝子産物（VI型コラーゲン、NTH α1(VI)及びNTH α1(VI)由来のペプチド）が細胞増殖に関与することを示唆する。すなわち、VI型コラーゲンがS2-VP10細胞の増殖に関与しているのであれば、VI型コラーゲンを添加することでCOL6A1 KDによる細胞増殖抑制作用をレスキューできると考えられる。そこで、VI型コラーゲンのレスキュー活性を検討した。図9Aに示す通り、VI型コラーゲンによるレスキュー活性は認められなかった。

図7Aに示されるように、S2-VP10のコンディションメディウムにはNTH α1(VI)が含まれていること及び図7Cに示されるように*COL6A1* mRNAと*COL6A2* mRNAの比率から、S2-VP10細胞ではNTH α1(VI)が*COL6A1*の主要な遺伝子産物であると考えられた。NTH α1(VI)あるいはNTH α1(VI)由来ペプチドがS2-VP10細胞の増殖に関与するのであれば、S2-VP10細胞のコンディションメディウムはレスキュー活性を示すと考えられる。そこで、コンディションメディウムのレスキュー活性を、10% FBS含有DMEM培地をネガティブコントロールとして検討した。その結果、コンディションメディウムがレスキュー活性を示すことが明らかとなった（図9B及び9C）。次に、NTH α1(VI)あるいはそのペプチドのどちらがレスキュー活性を示すか検討するため、コンディションメディウムを分子量により分画し、各画分のレスキュー効果を検討した。図9C–9Eに示すように、< 10 kDaの画分は非分画のコンディションメディウムと同様の強さのレスキュー活性が認められたが、NTH α1(VI)を含む> 10 kDaの画分にはレスキュー活性は認められなかった。このことは、増殖促進にはNTH α1(VI)の断片化が必要であることを示す。次に、< 10 kDa画分の活性成分がNTH α1(VI)由来であることを確認する為に、COL6A1 KD細胞の< 10 kDa画分のレスキュー活性を評価した。評価の結果、コントロールsiRNA処理細胞の< 10 kDa画分がレスキュー活性を示すことが確認された（図10A及び10B）。一方で、COL6A1 KD細胞の< 10 kDa画分は、レスキュー活性が減弱することが確認された（図10C）。すなわち、< 10 kDa画分の活性成分はNTH α1(VI)由来であると考えられた。なお、COL6A1 KD細胞の< 10 kDa画分におけるわずかなレスキュー活性の残存は、KD処理前に存在していたNTH α1(VI)から生成された少量の活性断片に起因すると考えられた。また、我々は、NTH α1(VI)が> 10 kDaの画分のみで検出されること及び< 10 kDaの画分ではNTH α1(VI)は検出されず（図10D）、< 10 kDaの画分には分子量で10 kDa未満のペプチドが含まれていることを確認している（図4E）。なお、抗体#141は上記10 kDa未満のペプチドを認識しないことも確認している（データ示さず）。

以上の結果から、NTH α1(VI)の10 kDa未満のフラグメントへの断片化が癌細胞の増殖促進に関与すると考えられた。

第 4 節　考察

我々は、10 kDa未満のペプチド、おそらくNTH α1(VI)断片化由来、がS2-VP10細胞の増殖に関与していることを示した（図7–10）。COL6A1の高発現は、ある種の腫瘍で観察されており(84–86)、また、その発現が予後不良と関連しているとの報告もある(87–89)。Zhuらは、COL6A1の過剰発現が前立腺癌LNCaP細胞の増殖を促進すること及びCOL6A1発現が去勢抵抗性前立腺癌の患

者でより高いことを示した(86)。さらに、膵臓癌を含むいくつかの癌において、血清中のCOL6A1断片が増加していることが明らかとなっている(58)。このことは、本研究のNTH α1(VI)由来のペプチド断片が腫瘍の増殖に関与していることを示唆する。最近、Chen らは、COL6A1 KDがヒト大動脈血管平滑筋細胞の増殖と遊走を抑制することを報告した(99)。すなわち、本研究のペプチドが血管の発達にも関与する可能性も考えられる。

コラーゲン由来のmatricryptins（endostatin、arresten、canstatin及びtumstatin）は抗血管新生および抗腫瘍活性を有する(92, 93)。すなわち、NTH α1(VI)断片化由来ペプチドは新たなmatricryptinである可能性が考えられる。また、Hamanoらは、*in vivo*においてtumstatinがMMP-9 proteolysisによって生成されることを報告している(100)。一方で、S2 -VP10細胞は、恒常的に多くのMMP（MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-10及びMMP-14）を発現すること及び高転移性の表現型を示すことが知られている(94)。Willumsenらは、ある種の癌において、MMPにより生成されるCOL6A1断片の血清中レベルが上昇していることを報告している(58)。すなわち、本研究のペプチドが、1種あるいは複数のこれらのプロテアーゼによって生成されることが示唆される。

我々の結果は、ペプチドの増殖促進メカニズムが VI 型コラーゲンと異なることを示唆する（図9A）。既報で示されたように、arresten、canstatin 及び tumstatin は抗血管新生および抗腫瘍活性を示す。これらの matricryptin の配列は非コラーゲン性の NC1 ドメインにある。また、これらの matricryptin の生物学的活性はインテグリンを介していることも報告されている(92, 93)。加えて、COL6A3 の切断産物である endotrophin は C5 Kunitz 様ドメインを有し transforming growth factor β シグナル経路を介し、悪性腫瘍の進行を促進する(52)。以上の知見は、コラーゲンの非コラーゲン領域が生物学的機能を有すること及びこれらの活性は特定の受容体を介して媒介されることを示す。COL6A1 は、3 つのフォンヴィレブランド因子 A（vWA）module を有する（N 末端に 1 つ及び C 末端に 2 つ）ことが報告されている(30, 32, 43)。また、Whittaker と Hynes は、COL6A1 を含むコラーゲンタンパク質の vWA module が他の ECM スタンパク質やおそらく細胞とのタンパク質-タンパク質相互作用に関与する可能性を指摘している (101)。すなわち、vWA module が本研究のペプチド断片の活性に重要である可能性が考えられる。

我々は, S2-VP10 細胞において *COL6A2* mRNA 及びそのタンパク質発現が低いことを示した（図7A 及び 7B）。これは、COL6A1 と COL6A2 間の量比が異なることを示す。 Merl-Pham らも、ヒト肺線維芽細胞の ECM において COL6A1 と COL6A2 間の量比に異常が認められることを報告した。彼らは、量比異常の原因の一つは NTH α1(VI)の存在であると結論づけている(102)。彼らの報告と我々の結果は、本報告のペプチドの起源が NTH α1(VI)であることを強く示唆する。ただし、ペプチドの起源が VI 型コラーゲン由来であるという可能性は完全には排除されない。ペプチドの起源を明らかにする為には、ペプチド配列を同定することが必須であると考える。また、MMPs やその他のプロテアーゼはペプチド切断のコンセンサス配列を有することから、ペプチド配列はペプチド生成についての情報を提供する可能性があると我々は考える。

結論として、本研究において、i）10 kDa 未満のペプチドがヒト膵癌細胞株 S2-VP10 の増殖に関与していること、ii）ペプチドは NTH α1(VI)の断片化由来であること及び iii) その作用機序は VI

型コラーゲンとは異なることが示された。

第 4 章　総合討論

本研究では、抗体#141 が認識する 140K の同定を行うことで、新規な非三重らせん状コラーゲンポリペプチドである NTH α1(VI)を見出し、さらに、NTH α1(VI)由来ペプチドが癌細胞株に対して増殖促進作用を有することを明らかにした。NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドは、新たな診断マーカーや創薬標的として有用である可能性が考えられるが、上記展開を図る為に解決すべき課題として、1) NTH α1(VI)由来ペプチドの配列決定、2) NTH α1(VI)由来ペプチドの作用機序解明、3) NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドの産生機構の解明、4) 臨床検体での NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドの発現確認及び測定系の開発が挙げられる。

1)については、本研究で示したように、我々は、NTH α1(VI)由来ペプチドの分子量が 10 kDa 未満であることは確認している。しかしながら、NTH α1(VI)由来ペプチドの配列決定には至っていない。第 3 章では、VI 型コラーゲンの vWA module が NTH α1(VI)由来ペプチドの機能に重要である可能性を指摘した。予備検討の結果から、抗体#141 は NTH α1(VI)由来ペプチドを認識しないことを我々は確認している（データ示さず）。また、抗体#141 が COL6A1 のアミノ酸配列 254–263（N 末の vWA module とコラーゲン領域の境界に位置する）を認識することを、我々は報告している(72)。すなわち、C 末側の vWA module が NTH α1(VI)由来ペプチドの機能に重要である可能性が考えられる。この可能性を検証する為には、NTH α1(VI)由来ペプチドの同定が必須である。我々は、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法による NTH α1(VI)由来ペプチドの同定を実施したが、未だそのアミノ酸配列同定には至っていない。今後の医療への応用を検討する為には、NTH α1(VI)由来ペプチドのアミノ酸配列同定が喫緊の課題であると考える。

第 2 章で示したように、NTH α1(VI)の糖鎖修飾は VI 型コラーゲン α1 鎖とは異なることを明らかにしている。さらに、第 3 章において、VI 型コラーゲンは COL6A1 KD による増殖抑制活性をレスキューしないことから、NTH α1(VI)由来ペプチドの作用機序が VI 型コラーゲンとは異なる可能性を示した。Grumati らは、*Col6a1* KO のミオパチー様の表現型が、低タンパク質ダイエットやラパマイシンによりレスキューできることを報告している(40)。我々は、S2-VP10 細胞における COL6A1 KD による細胞増殖抑制作用が、ラパマイシンによりレスキューされないことも確認している（データ示さず）。以上のことから、NTH α1(VI)由来ペプチドは、VI 型コラーゲンとは異なり mitophagy や mTORC1 経路には作用しないと考えられる。また、作用機序解明には、NTH α1(VI)由来ペプチドの受容体の同定が必要であると考える。VI 型コラーゲンは、インテグリン(43–46)や NG2/コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(43, 47–49)と相互作用することが知られている。上述のように、NTH α1(VI)由来ペプチドの作用機序は VI 型コラーゲンとは異なると考えられることから、NTH α1(VI)由来ペプチドの受容体は、これらインテグリンや NG2/コンドロイチン硫酸プロテオグリカンとは異なると推定される。我々は、JK132 と抗体#141 で免疫沈降されるタンパク質をプロテオミクス解析により比較することで、抗体#141 特異的に免疫沈降されるタンパク質 GP96 を同定している。GP96 は、小胞体に局在するシャペロンタンパク質であるが(103, 104)、細胞外にも存在することが知られている(105)。Tramentozzi らは、GP96-IgG 複合体がヒト臍帯静脈内皮細胞に対して増殖促進及び血管新生活性を示すことを報告している(106)。GP96-IgG 複合体が、

NTH α1(VI)由来ペプチドの増殖促進作用に関与する可能性が考えられるが、NTH α1(VI)由来ペプチドと GP96 が相互作用するかは未確認である。NTH α1(VI)由来ペプチドの作用機序を解明するには、検討すべき項目であると考える。

Yoshikawa らは、NTH α1(IV)は IV 型コラーゲン由来の α1(IV)鎖と比較して、4-hydroxyproline 含量が低下していることを報告している(24)。コラーゲンは三重らせん構造を安定化する為にプロリン残基のヒドロキシル化を必要とすることが報告されており、このプロリン残基のヒドロキシル化は主に prolyl 4-hydroxylase によって触媒される(107–109)。Prolyl 4-hydroxylase は、プロリン残基のヒドロキシル化を触媒する為に Fe^{2+}、2-オキソグルタル酸、O_2 及びアスコルビン酸を必要とする(107)。実際に、アスコルビン酸除去下で NTH α1(IV)産生が上昇することを Yoshikawa らと Kajimura らが報告している(24, 25)。したがって、NTH α1(VI)も 4-hydroxyproline 含量が低下していること及び NTH α1(VI)産生にアスコルビン酸や O_2 等が関与している可能性が考えられる。注目すべきことに、がんは低酸素環境に置かれていることが知られている(110)。すなわち、NTH α1(VI)及び NTH α1(VI)由来ペプチドの産生が低酸素下で上昇する可能性が考えられる。産生機構を解明することで、NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドの生理的役割に対する理解が深まると考えられることから、産生機構の解明も今後解決すべき重要な課題の一つであると考える。

淡明細胞型腎細胞癌の多くはフォンヒッペル-リンドウタンパク質（pVHL）が欠失していることが知られている。pVHL は、低酸素応答に重要な転写因子である Hypoxia inducible factor（HIF）α サブユニットの分解を担う E3 ligase である。すなわち、pVHL 欠失により VEGF-A や GLUT1 等の低酸素応答遺伝子産物の過剰発現が引き起こされる為、淡明細胞型腎細胞癌は高い血管新生能や解糖系優位の表現型を示す(111)。さらに、Wan らは、*COL6A1* mRNA 発現量や COL6A1 発現量が淡明細胞型腎細胞癌の予後不良と相関すること及び COL6A1 過剰発現により *VHL*-/-の 7860 細胞の増殖が *in vivo* xenograft モデルで増加したことを報告している(87)。以上のことから、NTH α1(VI)由来ペプチドが淡明細胞型腎細胞癌の増殖に関与している可能性や、NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドの産生が低酸素環境や HIF 発現量と相関している可能性が考えられる。第 2 章及び第 3 章に示したように、ヒト肝癌細胞株 HLF、ヒト食道癌細胞株 TE8、ヒト肺癌細胞株 NCI-H226 及びヒト膵臓癌細胞株 S2-VP10 において NTH α1(VI)の発現が観察されている。また、*COL6A1* mRNA や COL6A1 タンパク質の高発現は、星状細胞腫(84)、非小細胞肺癌細胞(85)、去勢抵抗性前立腺癌(86)、神経膠芽腫(88)及び子宮頸癌(89)でも報告されている。すなわち、上記癌種においても、HIF 依存的メカニズムにより NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドの発現が誘導されている可能性が考えられ、このような幅広い癌種において、NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドが診断マーカーや新規薬剤標的分子となることが期待される。しかしながら、臨床検体における NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドの発現検討は未実施である。また、臨床応用を図る為には、臨床検体での発現確認のみならず、臨床現場で使用可能な簡便且つ高感度に NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドを測定できる ELISA 等のキットの開発が必要不可欠である。臨床検体での発現確認のみならず測定系開発も今後の課題の一つであると考える。

本研究の結果から、NTH α1(VI)や NTH α1(VI)由来ペプチドが、新たな診断薬や医薬品の標的分子と成り得る可能性が見いだされた。しかしながら、診断薬や医薬品への応用展開を図る為に

は、上述の 1) NTH α1(VI)由来ペプチドの配列決定、2)作用機序解明、3)産生機構の解明、4) 臨床検体での発現確認及び測定系の開発が必要である。今後、共同研究も視野に入れて、上記課題の解決ができればと考えている。

本研究では、新規非三重らせん状コラーゲンポリペプチド NTH α1(VI)の同定及び NTH α1(VI)由来ペプチドが癌細胞への増殖促進作用を持つことを明らかにした。今後、NTH α1(VI)の研究が進展し、医療への貢献が果たされれば望外の喜びである。また、本研究から、非三重らせん状コラーゲンポリペプチドが、IV 型コラーゲン α1(IV)鎖や α2(IV)鎖以外にも存在することが明らかとなった。NTH α1(VI)以外にも非三重らせん状コラーゲンポリペプチドが存在する可能性がある。非三重らせん状コラーゲンポリペプチド研究の今後の発展にも期待したい。

謝辞

本研究の遂行及び本論文の作成にあたり的確なアドバイス及び親切な指導をして頂いた、工学院大学　先進工学部　生命科学科　生体機能化学研究室の今村保忠教授に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行上で研究環境を整えて頂くとともに適切な助言及び丁寧な指導をして頂いた、日本化薬株式会社　医薬研究所の森田誠チーム長に感謝申し上げます。ならびに、研究に関する的確なアドバイスやクリティカルな指摘及び論文を向上させるための的確な助言をしていただいた瀋陽薬科大学　武谷イノベーションカレッジ　中国-日本医学及び製薬科学研究所の林利彦教授に感謝申し上げます。

工学院大学　先進工学部　生命科学科　生体機能化学研究室の鷹野涼修士には貴重なデータを提供していただき心より感謝申し上げます。日本化薬　医薬研究所の雑賀寛博士、戸村有宏研究員及び徳中一寛研究員には、終始貴重なアドバイスをいただき、心より感謝申し上げます。また、日本化薬　医薬研究所の相島貴研究員、喜々津彩研究員及び髙原直子研究員には、研究遂行にあたり技術的なサポートをしていただき感謝申し上げます。

最後に、本研究を温かく見守ってくださった日本化薬　医薬研究所の研究員の方々に感謝します。

参考文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin. 68: 394–424, 2018.

2. Hanahan D and Weinberg Robert A: Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144: 646–674, 2011.

3. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al.: Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. Nat. Med. 23: 703–713, 2017.

4. Robert C, Long GV, Brady B, et al.: Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. N. Engl. J. Med. 372: 320–330, 2015.

5. Robert C, Schachter J, Long GV, et al.: Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. N. Engl. J. Med. 372: 2521–2532, 2015.

6. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, et al.: Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. Cell Commun Signal 18: 59, 2020.

7. Brassart-Pasco S, Brezillon S, Brassart B, Ramont L, Oudart JB and Monboisse JC: Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. Front. Oncol. 10: 397, 2020.

8. Konomi H, Hayashi T, Nakayasu K and Arima M: Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. Am. J. Pathol. 116: 417–426, 1984.

9. Pihlajaniemi T, Tryggvason K, Myers JC, et al.: cDNA clones coding for the pro-α1(IV) chain of human type IV procollagen reveal an unusual homology of amino acid sequences in two halves of the carboxyl-terminal domain. J. Biol. Chem. 260: 7681–7687, 1985.

10. Sado Y, Kagawa M, Naito I, et al.: Organization and Expression of Basement Membrane Collagen IV Genes and Their Roles in Human Disorders. J. Biochem. 123: 767–776, 1998.

11. Hasegawa H, Naito I, Nakano K, et al.: The distributions of type IV collagen α chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages. Arch. Histol. Cytol. 70: 255–265, 2007.

12. Brazel D, Pollner R, Oberbäumer I and Kühn K: Human basement membrane collagen (type IV). Eur. J. Biochem. 172: 35–42, 1988.

13. Pöschl E, Pollner R and Kühn K: The genes for the α1(IV) and α2(IV) chains of human basement membrane collagen type IV are arranged head-to-head and separated by a bidirectional promoter of unique structure. EMBO J. 7: 2687–2695, 1988.

14. Kühn K: Basement membrane (type IV) collagen. Matrix Biol. 14: 439–445, 1995.

15. Timpl R, Wiedemann H, Van Delden V, Furthmayr H and Kühn K: A Network Model for the Organization of Type IV Collagen Molecules in Basement Membranes. Eur. J. Biochem. 120: 203–211,

1981.
16. Bächinger HP, Fessler LI and Fessler JH: Mouse procollagen IV. Characterization and supramolecular association. J. Biol. Chem. 257: 9796–9803, 1982.
17. Oberbäumer I, Wiedemann H, Timpl R and Kühn K: Shape and assembly of type IV procollagen obtained from cell culture. EMBO J. 1: 805–810, 1982.
18. Yurchenco PD and Furthmayr H: Self-assembly of basement membrane collagen. Biochemistry 23: 1839–1850, 1984.
19. Yurchenco PD and Ruben GC: Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. J. Cell Biol. 105: 2559–2568, 1987.
20. Yurchenco PD and Patton BL: Developmental and Pathogenic Mechanisms of Basement Membrane Assembly. Curr. Pharm. Des. 15: 1277–1294, 2009.
21. Pöschle E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y and Mayer U: Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. Development 131: 1619–1628, 2004.
22. Kuo DS, Labelle-Dumais C and Gould DB: COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. Hum. Mol. Genet. 21: R97–R110, 2012.
23. Takahashi S, Yoshikawa K, Sasaki T, et al.: Serum-dependent Secretion of Nondisulfide-bonded and Unfolded Type IV Collagen α Chains by Cultured Fetal Lung Fibroblasts. Connective tissue 31: 161–168, 1999.
24. Yoshikawa K, Takahashi S, Imamura Y, Sado Y and Hayashi T: Secretion of Non-Helical Collagenous Pblypeptides of α1(IV) and α2(IV) Chains upon Depletion of Ascorbate by Cultured Human Cells. J. Biochem. 129: 929–936, 2001.
25. Kajimura D, Takahashi S, Yoshikawa K, et al.: Non-helical type IV collagen polypeptides in human placenta. Biochem. Biophys. Res. Commun. 314: 11–16, 2004.
26. Sugiyama H, Tokunaka K, Hayashi T, Imamura Y, Morita M and Yamato M: Non-Triple Helical Form of Type IV Collagen α1 Chain. Heliyon 1: e00051, 2015.
27. Morita M, Sugihara H, Tokunaka K, et al.: Preparation and partial characterization of monoclonal antibodies specific for the nascent non-triple helical form of the type IV collagen alpha 1 chain. Biochemistry and Biophysics Reports 9: 128–132, 2017.
28. Allamand V, Brinas L, Richard P, Stojkovic T, Quijano-Roy S and Bonne G: ColVI myopathies: where do we stand, where do we go? Skeletal muscle 1: 30, 2011.
29. Bernardi P and Bonaldo P: Mitochondrial dysfunction and defective autophagy in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5: a011387, 2013.
30. Chen P, Cescon M and Bonaldo P: Collagen VI in cancer and its biological mechanisms. Trends Mol. Med. 19: 410–417, 2013.
31. Trüeb B and Winterhalter KH: Type VI collagen is composed of a 200 kd subunit and two 140 kd

subunits. EMBO J. 5: 2815–2819, 1986.
32. Chu M-L, Mann K, Deutzmann R, et al.: Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones. Eur. J. Biochem. 168: 309–317, 1987.
33. Weil D, Mattei MG, Passage E, et al.: Cloning and chromosomal localization of human genes encoding the three chains of type VI collagen. Am. J. Hum. Genet. 42: 435–445, 1988.
34. Jobsis GJ, Keizers H, Vreijling JP, et al.: Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. Nat. Genet. 14: 113–115, 1996.
35. Pan T-C, Zhang R-Z, Pericak-Vance MA, et al.: Missense mutation in a von Willebrand factor type a domain of the α3(VI) collagen gene (*COL6A3*) in a family with Bethlem myopathy. Hum. Mol. Genet. 7: 807–812, 1998.
36. Camacho Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ, et al.: Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 7516–7521, 2001.
37. Higuchi I, Shiraishi T, Hashiguchi T, et al.: Frameshift mutation in the collagen VI gene causes Ullrich's disease. Ann. Neurol. 50: 261–265, 2001.
38. Demir E, Sabatelli P, Allamand V, et al.: Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. Am. J. Hum. Genet. 70: 1446–1458, 2002.
39. Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, et al.: Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. Neurology 62: 620–623, 2004.
40. Grumati P, Coletto L, Sabatelli P, et al.: Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. Nat. Med. 16: 1313–1320, 2010.
41. Chrisam M, Pirozzi M, Castagnaro S, et al.: Reactivation of autophagy by spermidine ameliorates the myopathic defects of collagen VI-null mice. Autophagy 11: 2142–2152, 2015.
42. Yoshii SR and Mizushima N: Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy. Biochim. Biophys. Acta 1853: 2797–2801, 2015.
43. Cescon M, Gattazzo F, Chen P and Bonaldo P: Collagen VI at a glance. J. Cell Sci. 128: 3525–3531, 2015.
44. Doane KJ, Yang G and Birk DE: Corneal cell-matrix interactions: type VI collagen promotes adhesion and spreading of corneal fibroblasts. Exp. Cell Res. 200: 490–499, 1992.
45. Pfaff M, Aumailley M, Specks U, Knolle J, Zerwes HG and Timpl R: Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. Exp. Cell Res. 206: 167–176, 1993.
46. Tulla M, Pentikainen OT, Viitasalo T, et al.: Selective binding of collagen subtypes by integrin α_1I, α_2I, and α_{10}I domains. J. Biol. Chem. 276: 48206–48212, 2001.
47. Marcelino J and McDevitt CA: Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. Biochim. Biophys. Acta 1249: 180–188, 1995.
48. Doane KJ, Howell SJ and Birk DE: Identification and functional characterization of two type VI collagen receptors, $\alpha_3\beta_1$ integrin and NG2, during avian corneal stromal development. Invest. Ophthalmol.

Vis. Sci. 39: 263–275, 1998.
49. Petrini S, Tessa A, Stallcup WB, et al.: Altered expression of the MCSP/NG2 chondroitin sulfate proteoglycan in collagen VI deficiency. Mol. Cell. Neurosci. 30: 408–417, 2005.
50. Iyengar P, Espina V, Williams TW, et al.: Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. J. Clin. Invest. 115: 1163–1176, 2005.
51. Cattaruzza S, Nicolosi PA, Braghetta P, et al.: NG2/CSPG4–collagen type VI interplays putatively involved in the microenvironmental control of tumour engraftment and local expansion. J. Mol. Cell. Biol. 5: 176–193, 2013.
52. Park J and Scherer PE: Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. J. Clin. Invest. 122: 4243–4256, 2012.
53. You WK, Bonaldo P and Stallcup WB: Collagen VI ablation retards brain tumor progression due to deficits in assembly of the vascular basal lamina. Am. J. Pathol. 180: 1145–1158, 2012.
54. Rühl M, Sahin E, Johannsen M, et al.: Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. J. Biol. Chem. 274: 34361–34368, 1999.
55. Howell SJ and Doane KJ: Type VI collagen increases cell survival and prevents anti-$\beta_1$integrin-mediated apoptosis. Exp. Cell Res. 241: 230–241, 1998.
56. Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LBA, et al.: Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. Cancer Cell 3: 377–386, 2003.
57. Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ and Meininger GA: Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. Am. J. Pathol. 156: 1489–1498, 2000.
58. Willumsen N, Bager C and Karsdal MA: Matrix Metalloprotease Generated Fragments of Type VI Collagen Have Serum Biomarker Potential in Cancer – A Proof of Concept Study. Transl. Oncol. 12: 693–698, 2019.
59. Lu P, Weaver VM and Werb Z: The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. J Cell Biol 196: 395–406, 2012.
60. Kino J, Adachi E, Yoshida T, Nakajima K and Hayashi T: Characterization of a Monoclonal Antibody against Human Placenta Type IV Collagen by Immunoelectroblotting, Antibody-Coupled Affinity Chromatography, and Immunohistochemical Localization. J. Biochem. 103: 829–835, 1988.
61. Hazeki N, Yamato M, Imamura Y, et al.: Analysis of matrix protein components of the dermis-like structure formed in a long-term culture of human fibroblasts: type VI collagen is a major component. J Biochem. 123: 587–95, 1998.
62. Kaufmann SH, Ewing CM and Shaper JH: The erasable Western blot. Anal Biochem. 161: 89–95, 1987.
63. Iwata M, Imamura Y, Sasaki T and Hayashi T: Evidence for a short form of α1(IV) as a major

polypeptide in bovine lens capsule. J. Biochem. 117: 1298–1304, 1995.
64. Kornfeld K, Reitman ML and Kornfeld R: The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant. J. Biol. Chem. 256: 6633–6640, 1981.
65. Tateno H, Nakamura-Tsuruta S and Hirabayashi J: Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from Lens culinaris and Pisum sativum using frontal affinity chromatography. Glycobiology 19: 527–536, 2009.
66 Schneider M, Al-Shareffi E and Haltiwanger RS: Biological functions of fucose in mammals. Glycobiology 27: 601–618, 2017.
67. Baenziger JU and Fiete D: Structural determinants of Ricinus communis agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. J. Biol. Chem. 254: 9795–9799, 1979.
68. Wright CS: Refinement of the crystal structure of wheat germ agglutinin isolectin 2 at 1.8Åresolution. J. Mol. Biol. 194: 501–529, 1987.
69. Wright CS: Crystal structure of a wheat germ agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex. Structural basis for cooperative lectin-cell binding. J. Biol. Chem. 267: 14345–14352, 1992.
70. Wright CS and Kellogg GE: Differences in hydropathic properties of ligand binding at four independent sites in wheat germ agglutinin-oligosaccharide crystal complexes. Protein Sci. 5: 1466–1476, 1996.
71. Fujiwara S, Shinkai H and Timpl R: Structure of N-linked Oligosaccharide Chains in the Triple-Helical Domains of Human Type VI and Mouse Type IV Collagen. Matrix 11: 307–312, 1991.
72. Sato T, Takano R, Takahara N, et al.: Identification of a common epitope in the sequences of COL4A1 and COL6A1 recognised by monoclonal antibody #141. J. Biochem. 165: 85–95, 2019.
73. Bieberich E: Synthesis, processing, and function of N-glycans in N-glycoproteins. Advances in neurobiology 9: 47–70, 2014.
74. Schachter H: Complex N-glycans: the story of the “yellow brick road”. Glycoconj. J. 31: 1–5, 2014.
75. Kizuka Y and Taniguchi N: Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer. Biomolecules 6: 25, 2016.
76. Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P and Oriol R: The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. Glycobiology 15: 805–817, 2005.
77. Bhide GP and Colley KJ: Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. Histochem. Cell Biol. 147: 149–174, 2017.
78. Lamandé SR, Sigalas E, Pan T-C, et al.: The Role of the α3(VI) Chain in Collagen VI Assembly: EXPRESSION OF AN α3(VI) CHAIN LACKING N-TERMINAL MODULES N10–N7 RESTORES COLLAGEN VI ASSEMBLY, SECRETION, AND MATRIX DEPOSITION IN AN α3(VI)-DEFICIENT CELL LINE*. J. Biol. Chem. 273: 7423-7430, 1998.
79. Tillet E, Gential B, Garrone R and Stallcup WB: NG2 proteoglycan mediates β_1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. J. Cell. Biochem. 86: 726–736, 2002.

80. Zigrino P, Drescher C and Mauch C: Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of α2β1 integrins. Eur. J. Cell Biol. 80: 68–77, 2001.
81. Hocking DC, Sottile J and Langenbach KJ: Stimulation of Integrin-mediated Cell Contractility by Fibronectin Polymerization. J. Biol. Chem. 275: 10673–10682, 2000.
82. Endo T: Glycobiology of α-dystroglycan and muscular dystrophy. J. Biochem. 157: 1–12, 2015.
83. Aigner T, Hambach L, Soder S, Schlotzer-Schrehardt U and Poschl E: The C5 domain of Col6A3 is cleaved off from the Col6 fibrils immediately after secretion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 290: 743–748, 2002.
84. Fujita A, Sato JR, Festa F, et al.: Identification of *COL6A1* as a differentially expressed gene in human astrocytomas. Genet. Mol. Res. 7: 371–378, 2008.
85. Voiles L, Lewis DE, Han L, et al.: Overexpression of type VI collagen in neoplastic lung tissues. Oncol. Rep. 32: 1897–1904, 2014.
86. Zhu YP, Wan FN, Shen YJ, Wang HK, Zhang GM and Ye DW: Reactive stroma component COL6A1 is upregulated in castration-resistant prostate cancer and promotes tumor growth. Oncotarget 6: 14488–14496, 2015.
87. Wan F, Wang H, Shen Y, et al.: Upregulation of COL6A1 is predictive of poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma patients. Oncotarget 6: 27378–27387, 2015.
88. Turtoi A, Blomme A, Bianchi E, et al.: Accessibilome of human glioblastoma: collagen-VI-alpha-1 is a new target and a marker of poor outcome. J. Proteome Res. 13: 5660–5669, 2014.
89. Hou T, Tong C, Kazobinka G, et al.: Expression of COL6A1 predicts prognosis in cervical cancer patients. Am J Transl Res 8: 2838–2844, 2016.
90. Owusu-Ansah KG, Song G, Chen R, et al.: COL6A1 promotes metastasis and predicts poor prognosis in patients with pancreatic cancer. Int. J. Oncol. 55: 391–404, 2019.
91. Sato T, Takano R, Tokunaka K, et al.: Type VI collagen α1 chain polypeptide in non-triple helical form is an alternative gene product of *COL6A1*. J. Biochem. 164: 173–181, 2018.
92. Monboisse JC, Oudart JB, Ramont L, Brassart-Pasco S and Maquart FX: Matrikines from basement membrane collagens: a new anti-cancer strategy. Biochim. Biophys. Acta 1840: 2589–2598, 2014.
93. Ricard-Blum S and Vallet SD: Matricryptins Network with Matricellular Receptors at the Surface of Endothelial and Tumor Cells. Front. Pharmacol. 7: 11, 2016.
94. Kitamura N, Iwamura T, Taniguchi S, et al.: High collagenolytic activity in spontaneously highly metastatic variants derived from a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) in nude mice. Clin. Exp. Metastasis 18: 561–571, 2000.
95. Cailleau R, Olive M and Cruciger QV: Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. In Vitro 14: 911–915, 1978.
96. Elliott WM and Auersperg N: Comparison of the neutral red and methylene blue assays to study cell growth in culture. Biotech. Histochem. 68: 29–35, 1993.

97. Dror R, Lederman M, Umezawa K, Barak V, Pe'er J and Chowers I: Characterizing the Involvement of the Nuclear Factor-kappa B (NFκB) Transcription Factor in Uveal Melanoma. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51: 1811–1816, 2010.
98. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}$T Method. Methods (San Diego, Calif.) 25: 402–408, 2001.
99. Chen Z, Wu Q, Yan C and Du J: COL6A1 knockdown suppresses cell proliferation and migration in human aortic vascular smooth muscle cells. Exp. Ther. Med. 18: 1977–1984, 2019.
100. Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, et al.: Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV α3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via αVβ3 integrin. Cancer Cell 3: 589–601, 2003.
101. Whittaker CA and Hynes RO: Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. Mol. Biol. Cell 13: 3369–3387, 2002.
102. Merl-Pham J, Basak T, Knüppel L, et al.: Quantitative proteomic profiling of extracellular matrix and site-specific collagen post-translational modifications in an in vitro model of lung fibrosis. Matrix Biology Plus 1: 100005, 2019.
103. Sorger PK and Pelham HR: The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. J. Mol. Biol. 194: 341–344, 1987.
104. Maki RG, Old LJ and Srivastava PK: Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 5658–5662, 1990.
105. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Jr. and Theriault JR: Extracellular heat shock proteins in cell signaling. FEBS Lett. 581: 3689–3694, 2007.
106. Tramentozzi E, Ruli E, Angriman I, et al.: Grp94 in complexes with IgG is a soluble diagnostic marker of gastrointestinal tumors and displays immune-stimulating activity on peripheral blood immune cells. Oncotarget 7: 72923–72940, 2016.
107. Myllyharju J: Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. Matrix Biol. 22: 15–24, 2003.
108. Kivirikko KI and Myllyharju J: Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. Matrix Biol. 16: 357–368, 1998.
109. Holster T, Pakkanen O, Soininen R, et al.: Loss of assembly of the main basement membrane collagen, type IV, but not fibril-forming collagens and embryonic death in collagen prolyl 4-hydroxylase I null mice. J. Biol. Chem. 282: 2512–2519, 2007.
110. Schito L and Rey S: Hypoxia: Turning vessels into vassals of cancer immunotolerance. Cancer Lett. 487: 74–84, 2020.
111. Schodel J, Grampp S, Maher ER, et al.: Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. Eur. Urol. 69: 646–657, 2016.

表 1　本研究で用いたプライマー

Name	Sequence
COL4A1 Fwd	5′-GTCGACGCCACCATGGGGCCCCGGCTCAGCGTCTGGCTGCTG-3′
COL4A1 Rev	5′-GCGGCCGCTTATGTTCTTCTCATACAGACTTGGCAGCG-3′
COL6A1 Fwd	5′-GTCGACGCCACCATGAGGGCGGCCCGTGCTCTGCTGCCCCTG-3′
COL6A1 Rev	5′-GATATCTCTAGCCCAGCGCCACCTTCCTGGAGACTGT-3′

表 2　140K 由来の 4 つのペプチドのアミノ酸配列

Fr.No.	Peptide sequence	Identified protein	Amino acid position
30	VIDRLSRDELVK	COL6A1	641-652
47	GLEQLLVGGS	COL6A1	136-145
58	TAEYDVAYGE	COL6A1	991-1000
58	DVFDFIPGSD	COL6A1	758-767

表 3　本研究で使用した siRNA 配列

Name	Sequence
COL6A1#1 sense	5'-CCUGUUCUUUGUGCUGGACACCUCU-3'
COL6A1#1 antisense	5'-AGAGGUGUCCAGCACAAAGAACAGG-3'
COL6A1#2 sense	5'-GCAUAGACAAGAAGUGUCCAGAUUA-3'
COL6A1#2 antisense	5'-UAAUCUGGACACUUCUUGUCUAUGC-3'
COL6A1#3 sense	5'-GCCGUCGAUGCCAUGGACUUUAUCA-3'
COL6A1#3 antisense	5'-UGAUAAAGUCCAUGGCAUCGACGGC-3'

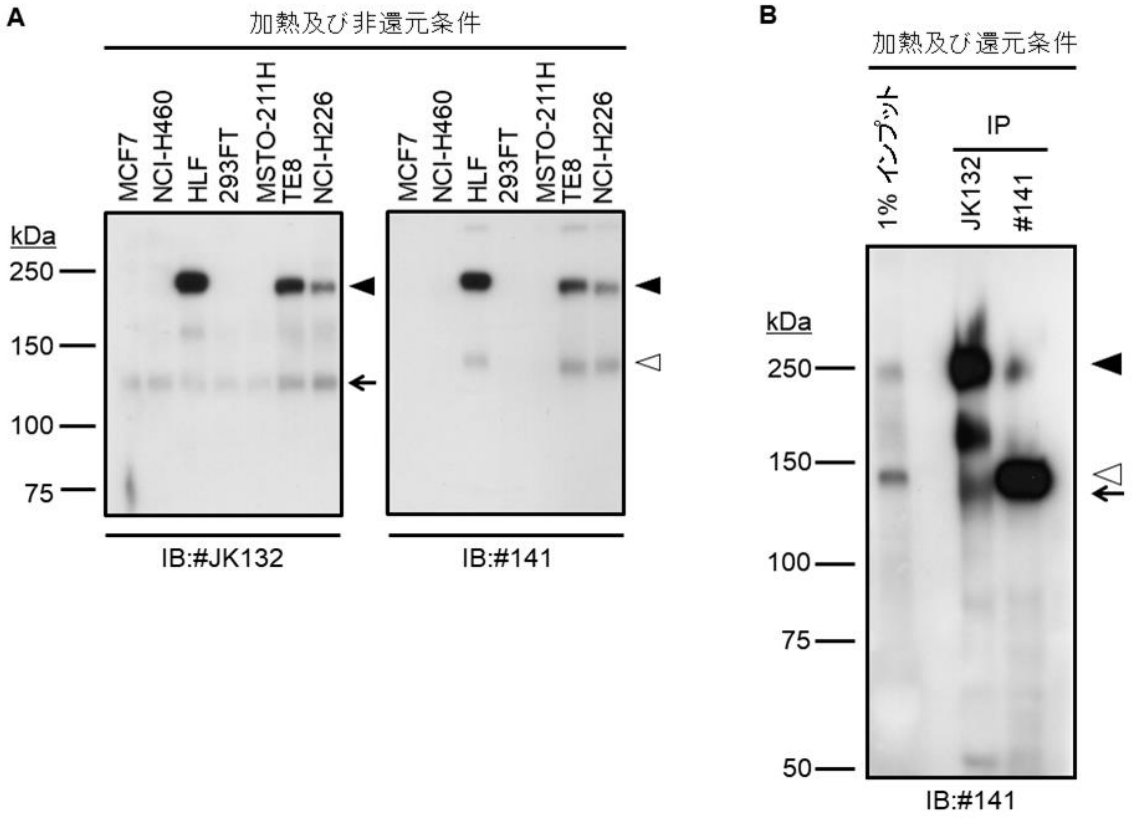

図 1　抗体#141 による 140K の認識

(A) 抗体#141による140K検出の典型的な画像。10 μLの各細胞のコンディションメディウムを等量の2-ME不含の2X濃縮サンプルバッファーと混合し95℃で加熱した（加熱及び非還元条件）。その後、7.5% SDS-PAGEゲルを用いて電気泳動した。電気泳動後、ゲル中のタンパク質をPVDFメンブレンへ転写し、JK132をプローブとして用いウェスタンブロッティングを実施した（IB：JK132）。JK132で検出後、メンブレンからJK132を除去する為に、ストリッピングバッファーを用いてストリッピングした。その後、抗体#141をプローブとして用いウェスタンブロッティングを実施した（IB：#141）。(B) JK132あるいは抗体#141沈降物の典型的な画像。HLF細胞のコンディションメディウム中のタンパク質をJK132あるいは抗体#141結合樹脂を用いて免疫沈降した（図中IP JK132又はIP #141）。沈降物を2-ME含有の2X濃縮サンプルバッファーにより95℃で溶出し、7.5% SDS-PAGEゲルを用いて電気泳動した。電気泳動後、ゲル中のタンパク質をPVDFメンブレンへ転写し、抗体#141（IB：#141）をプローブとして用いてウェスタンブロッティングを実施した。JK132により検出されたNTH α1(IV)、135 kDaのバンド及び抗体#141により検出された140Kをそれぞれ黒矢尻、矢印及び白矢尻で示す。2-ME、2-メルカプトエタノール。IB、イムノブロット。PVDF、ポリフッ化ビニリデン。

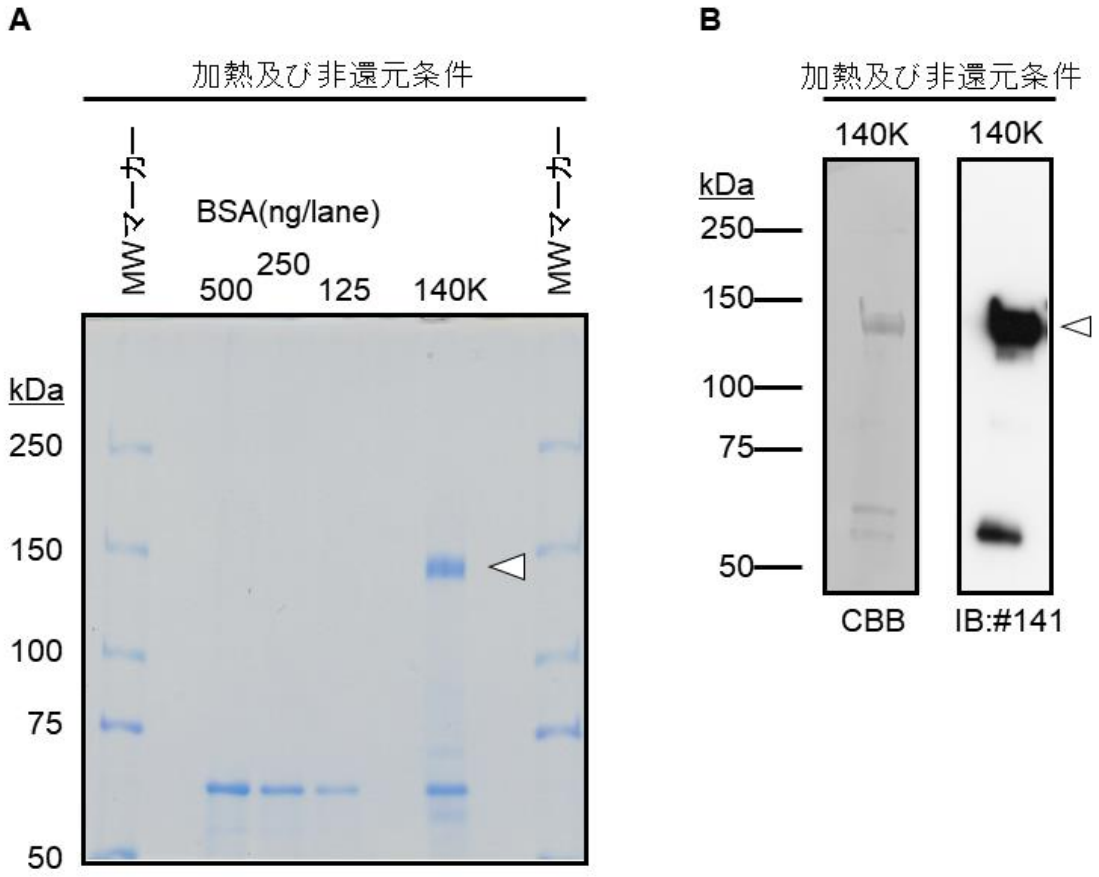

図 2　140K の純度及び精製した 140K に対する抗体#141 反応性の評価

(A) 精製した 140K の典型的な画像。140K は HLF 細胞のコンディションメディウムを用いて精製した。10 μL の精製 140K を等量の 2-ME 不含の 2X 濃縮サンプルバッファーと混合し、95°C で加熱した（加熱及び非還元条件）。その後、7.5% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動し CBB 染色を実施した。なお、140K の量を推定する為に、図に示す量の BSA を同時に電気泳動した。(B) 抗体#141 の精製 140K に対する反応性。10 μL の精製 140K を等量の 2-ME 不含の 2X 濃縮サンプルバッファーと混合し、95°C で加熱した（加熱及び非還元条件）。その後、7.5% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動した。電気泳動後、ゲル中のタンパク質を PVDF メンブレンへ転写し、抗体#141 をプローブとして用いてウェスタンブロッティングを実施した（IB：#141）。抗体#141 検出後、結合した抗体をメンブレンからストリップし CBB 染色を実施した。140K を白矢尻で示す。2-ME、2-メルカプトエタノール。BSA、ウシ血清アルブミン。CBB、クーマシーブリリアントブルー。IB、イムノブロット。PVDF、ポリフッ化ビニリデン。MW、分子量。

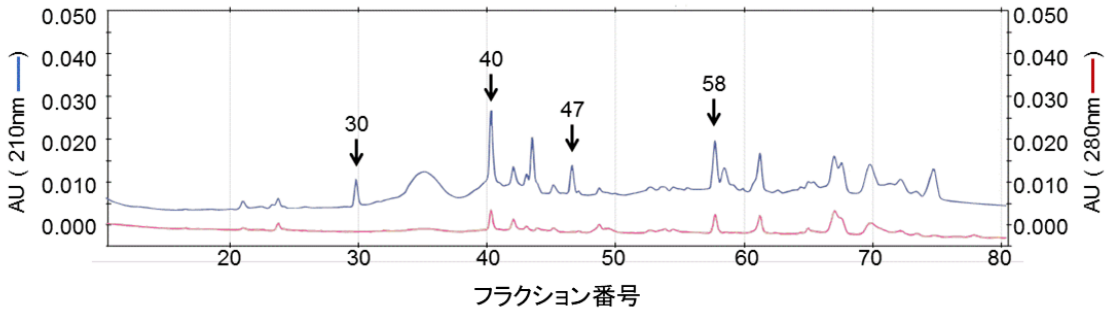

図 3　プロテアーゼ Lys-C 消化した 140K 由来ペプチドの溶出プロファイル

精製した 140K を Lys-C により消化し、ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離した。矢印で示されたフラクションをアミノ酸配列分析に供した。青線：ペプチド検出の為の吸光度 210 nm。赤線：リファレンスとしての吸光度 280 nm。AU：任意単位。

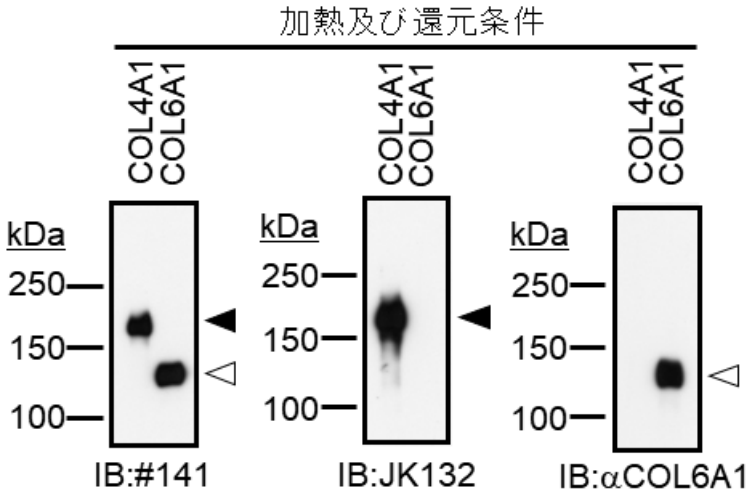

図 4　COL6A1 に対する抗体#141 反応性の解析

製造元の取扱説明書に則り Lipofectamine 2000 を用いて、293FT 細胞へ COL4A1 又は COL6A1 発現ベクターを導入し、そのコンディションメディウムを回収した。10 μL のコンディションメディウムを等量の 2-ME 含有の 2X 濃縮サンプルバッファーと混合し、95℃ で加熱した（加熱及び還元条件）。その後、7.5% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動を実施した。電気泳動後、ゲル中のタンパク質を PVDF メンブレンへ転写しウェスタンブロッティングを実施した。なお、ウェスタンブロッティングは、以下に示す抗体を順次プローブとして用いて実施した。抗体#141（IB : #141）、JK132（IB：JK132）及び抗 COL6A1 ポリクローナル抗体（N-term）（IB：αCOL6A1）。検出後、抗体をストリッピングバッファーによりストリッピングした後、異なる抗体をプローブとして用いウェスタンブロッティングを実施した。COL4A1 と COL6A1 を黒矢尻と白矢尻で示す。2-ME、2-メルカプトエタノール。IB、イムノブロット。PVDF、ポリフッ化ビニリデン。

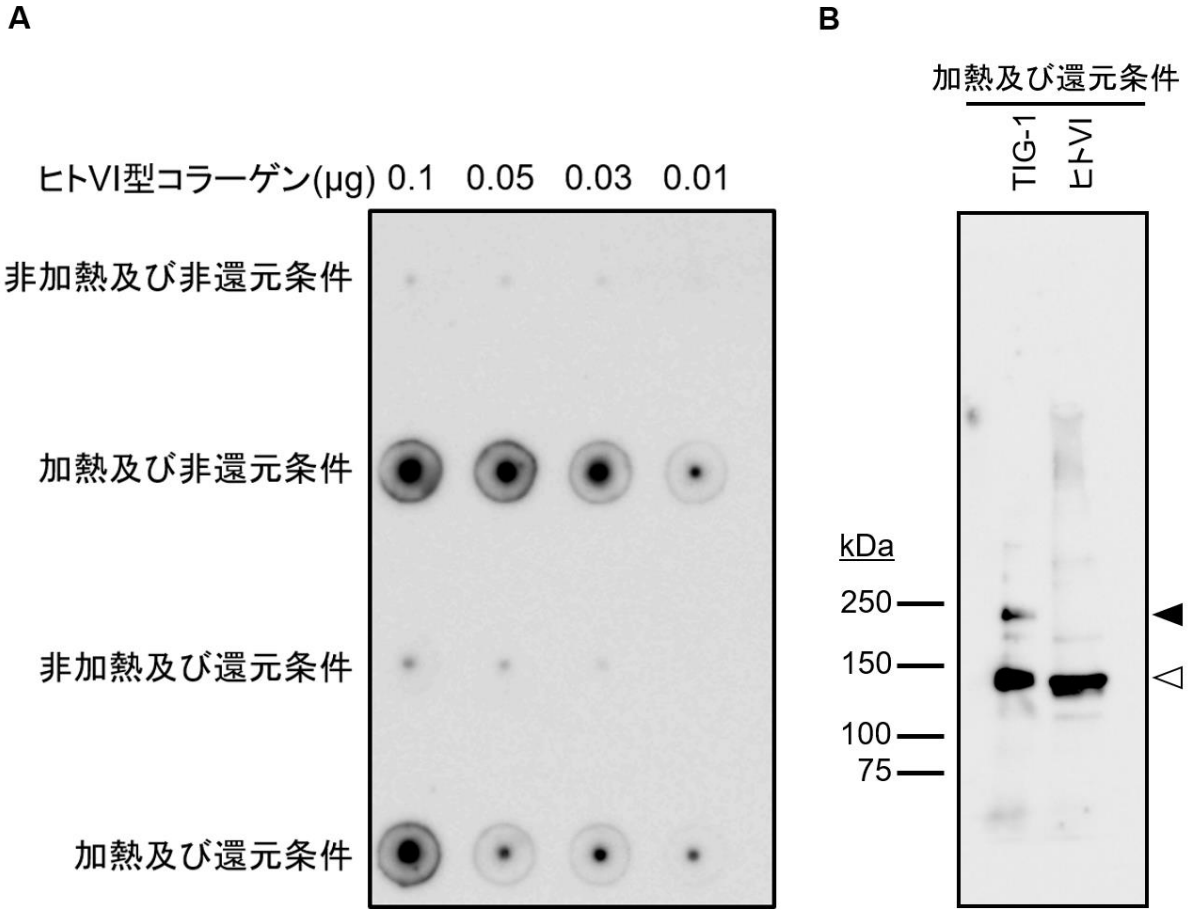

図 5　抗体#141 の特異性の解析

(A) ヒト VI 型コラーゲンに対する抗体#141 の反応性の典型的な画像。0.01 から 0.1 μg の粗精製したヒト VI 型コラーゲンを PVDF メンブレンにブロットし、抗体#141 をプローブとして用いてドットブロッティングを実施した。(B) 加熱及び還元条件下でのヒト α1(VI)鎖に対する抗体#141 の反応性の確認。粗精製した VI 型コラーゲンを用いて、抗体#141 をプローブとしてウェスタンブロッティング実施した。粗精製 VI 型コラーゲンには、抗体#141 反応性の抗原として VI 型コラーゲン由来の α1(VI)鎖のみを含むことがわかる。なお、アスコルビン酸除去培地で培養した TIG-1 細胞のコンディションメディウムを陽性対照として用いた。α1(IV)鎖及び α1(VI)鎖を黒矢尻及び白矢尻で示す。ヒト VI：ヒト VI 型コラーゲン。PVDF、ポリフッ化ビニリデン。

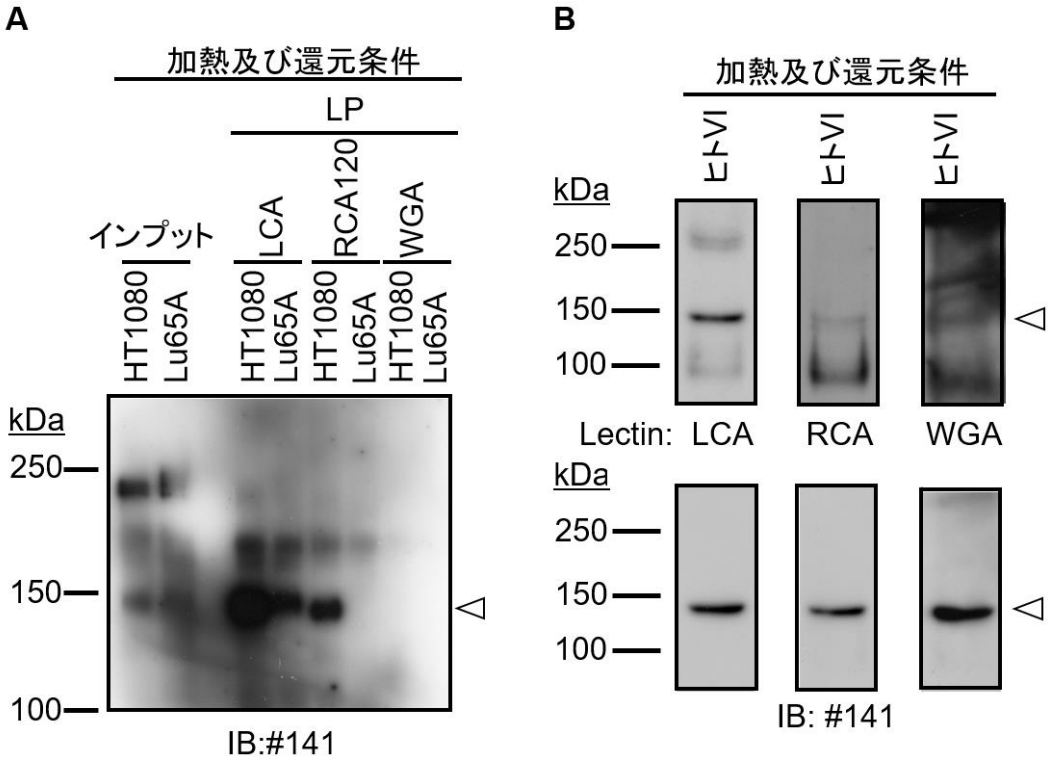

図 6　NTH α1(VI)と VI 型コラーゲンの糖鎖のキャラクタリゼイション

(A) NTH α1(VI)の糖鎖のキャラクタリゼイション。HT1080 及び Lu65A 細胞のコンディションメディウム中の NTH α1(VI)の糖鎖を、各種レクチンにより解析した。具体的には、10 μL の各レクチン結合アガロースを、1 mL の HT1080 あるいは Lu65A 細胞のコンディションメディウムに添加しレクチン沈降を実施した。NTH α1(VI)を含む沈降物は、2-ME 含有の 2X 濃縮サンプルバッファーにより 95℃で溶出し（加熱及び還元条件）、7.5% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動した。電気泳動後、NTH α1(VI)を抗体#141 をプローブとして用いて検出した（IB：#141）。(B) VI 型コラーゲンの糖鎖のキャラクタリゼイション。10 μg の粗精製した VI 型コラーゲンを (A)と同様に加熱及び還元条件下で変性し、5–20% SuperSep Ace プレキャストゲルで電気泳動した。その後、VI 型コラーゲンの糖鎖を、各種レクチンを用いて解析した。解析後、メンブレン上のレクチンをストリッピングバッファーによりストリッピングした後、抗体#141 プローブとして用いウェスタンブロッティングを実施した（IB：#141）。(A)の NTH α1(VI)及び(B)の α1(VI)鎖を白矢尻で示す。LP、レクチン沈降。LCA、レンズマメ凝集素。RCA120、トウゴマ凝集素 I。 WGA、コムギ胚芽凝集素。2-ME、2-メルカプトエタノール。ヒト VI、ヒト VI 型コラーゲン。IB、イムノブロット。

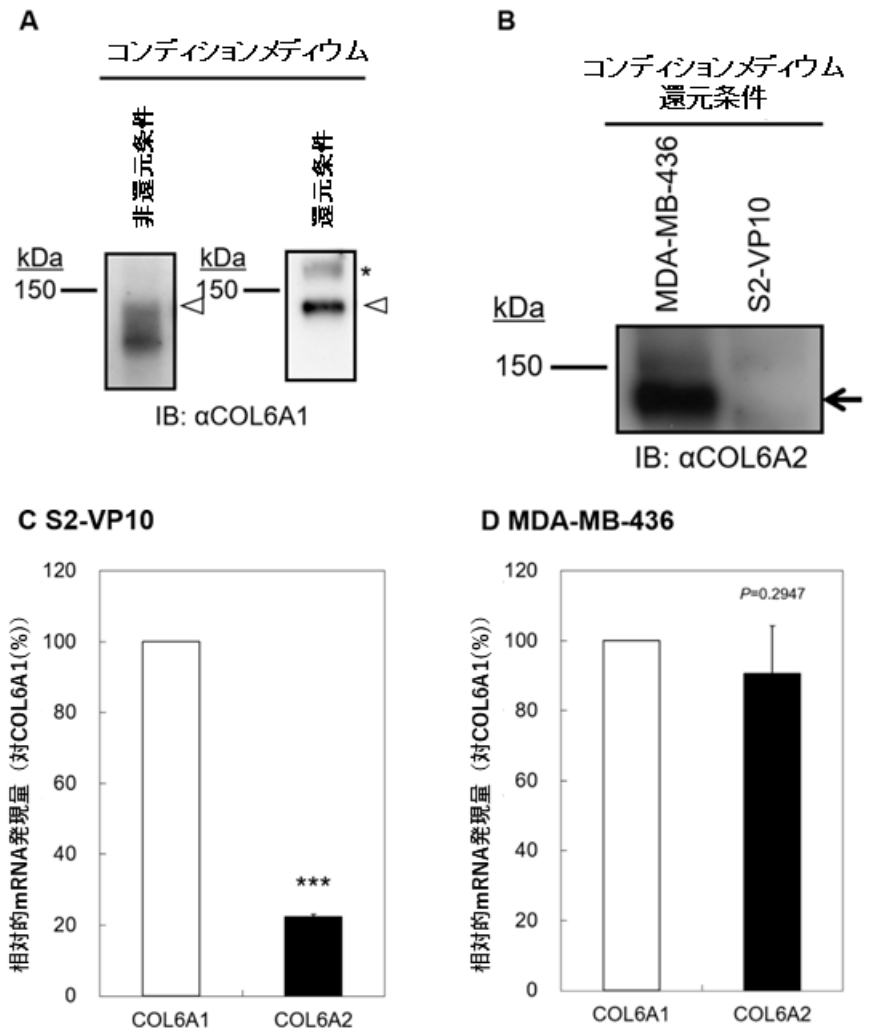

図 7　S2-VP10 細胞における NTH α1(VI)発現

(A) S2-VP10 細胞のコンディションメデイウムにおける NTH α1(VI)発現の典型的な画像。2 日間培養したコンディションメデイウムを加熱及び非還元条件下（非還元条件）又は加熱及び還元条件下（還元条件）で電気泳動を行い、抗 COL6A1 ポリクローナル抗体をプローブとしてウェスタンブロッティングを実施した（IB：αCOL6A1)。NTH α1(VI)及び COL6A1 を白矢尻で示す。*は非特異的バンドを示す。 (B) S2-VP10 及び MDA-MB-436 細胞のコンディションメデイウムにおける COL6A2 発現の典型的な画像。2 日間培養したコンディションメデイウムを加熱及び還元条件下（還元条件）で電気泳動を行い、抗 COL6A2 モノクローナル抗体をプローブとしてウェスタンブロッティングを実施した（IB：αCOL6A2)。COL6A2 のバンドを矢印で示す。(C 及び D) S2-VP10 細胞 (C)及び MDA-MB-436 細胞 (D)における *COL6A1* mRNA 及び *COL6A2* mRNA 発現。72 時間培養した各細胞から RNA を抽出し、定量的逆転写 PCR により *COL6A1* mRNA 及び *COL6A2* mRNA 発現を測定した。データを平均値± SD で表わす（n=3)。***P<0.001、Student の t-テスト、対 *COL6A1* mRNA。IB、イムノブロット。

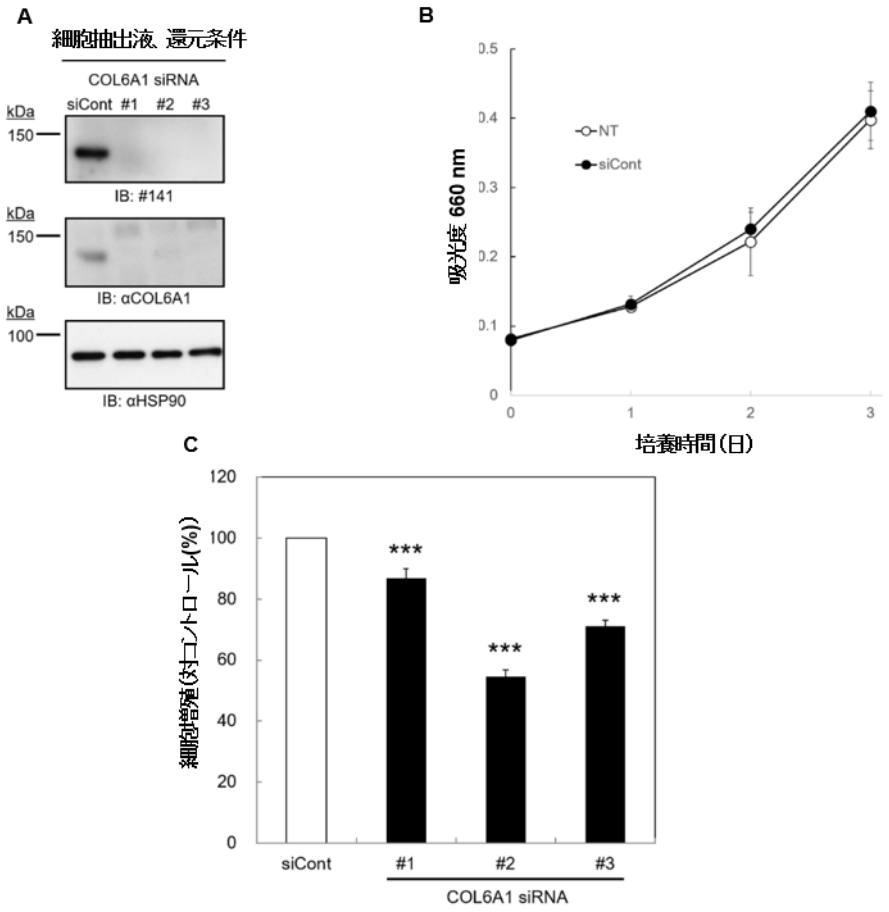

図 8　S2-VP10 細胞の増殖に及ぼす COL6A1 KD の効果

(A) S2-VP10 細胞における COL6A1 KD の典型的な画像。各 siRNA を、製造元の取扱説明書に則り Lipofectamine RNAiMAX を用いて、S2-VP10 細胞にトランスフェクトし細胞抽出液を調製した。得られた細胞抽出液を用いて加熱及び還元条件下（還元条件）で電気泳動を行った後、ウェスタンブロッティングを実施した。なお、ウェスタンブロッティングは、抗体#141 (IB：#141)、抗 COL6A1 ポリクローナル抗体（IB：αCOL6A1）及び抗 HSP90 モノクローナル抗体（IB: αHSP90）を順次プローブとして用い実施した。(B) S2-VP10 細胞の典型的な増殖曲線。コントロール siRNA を、図 8A と同様の手法により S2-VP10 細胞にトランスフェクトし、その後、72 時間培養した。各時間における細胞増殖をメチレンブルー法によって評価した。データを平均値± SD で表わす (n=4)。トランスフェクションなし又はコントロール siRNA をトランスフェクトした場合に、培養 72 時間後に相対的な細胞数は約 3 倍増加したことがわかる。(C) COL6A1 KD の S2-VP10 細胞の増殖に及ぼす影響。各 siRNA を、図 8A と同様の手法により S2-VP10 細胞にトランスフェクトし、その後、72 時間培養した。なお、細胞増殖はメチレンブルー法により評価した。データを平均値 ± SD で表わす（n=3）。 ***P<0.001、Dunnett の多重比較テスト、対 siCont。KD、ノックダウン。IB、イムノブロット。NT、無処理。siCont、コントロール siRNA。

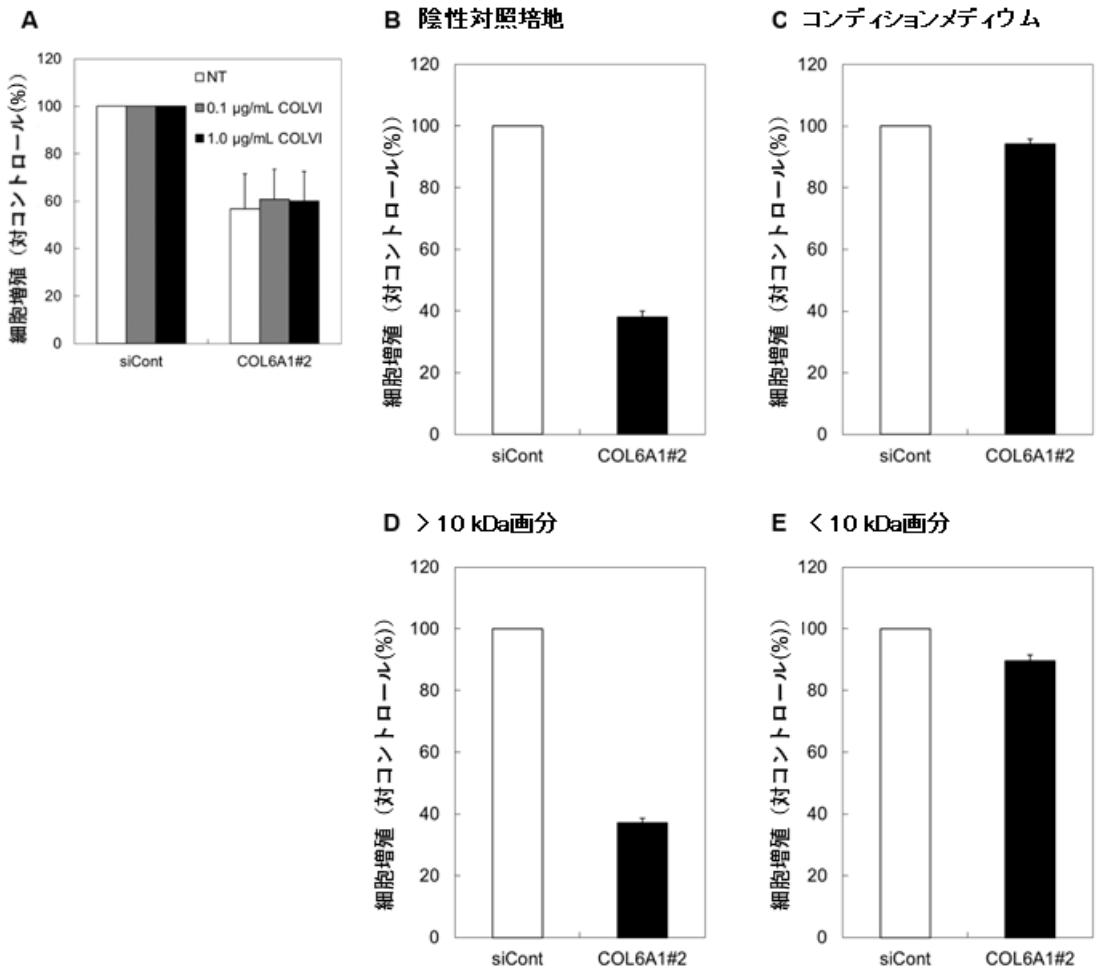

図 9　分子量で分画したコンディションメディウムの S2-VP10 細胞増殖に及ぼす影響
(A) VI 型コラーゲンが S2-VP10 細胞の増殖に及ぼす影響。COL6A1 siRNA#2 のトランスフェクションは図 8A と同様に実施した。siRNA トランスフェクション後の細胞に VI 型コラーゲン（COLVI）を添加し 72 時間培養した。細胞増殖はメチレンブルー法により評価した。データを平均値± SD で表わす（n=3）。(B-E) 分画したコンディションメディウムの S2-VP10 細胞増殖におけるレスキュー活性。COL6A1 siRNA#2 のトランスフェクションは図 8A と同様に実施した。siRNA トランスフェクション後の S2-VP10 細胞に、10% FBS 含有ダルベッコ改変イーグル培地（陰性対照培地）(B)、S2-VP10 細胞由来コンディションメディウム(C)、> 10 kDa 画分(D)及び < 10 kDa 画分(E)を添加し 72 時間培養した。細胞増殖はメチレンブルー染色により評価した。なお、各画分は Amicon Ultra Centrifugal Filter Units を用いて調製した。データを平均値± SD で表わす（n=3）。siCont、コントロール siRNA。COL6A1#2、COL6A1 siRNA#2。

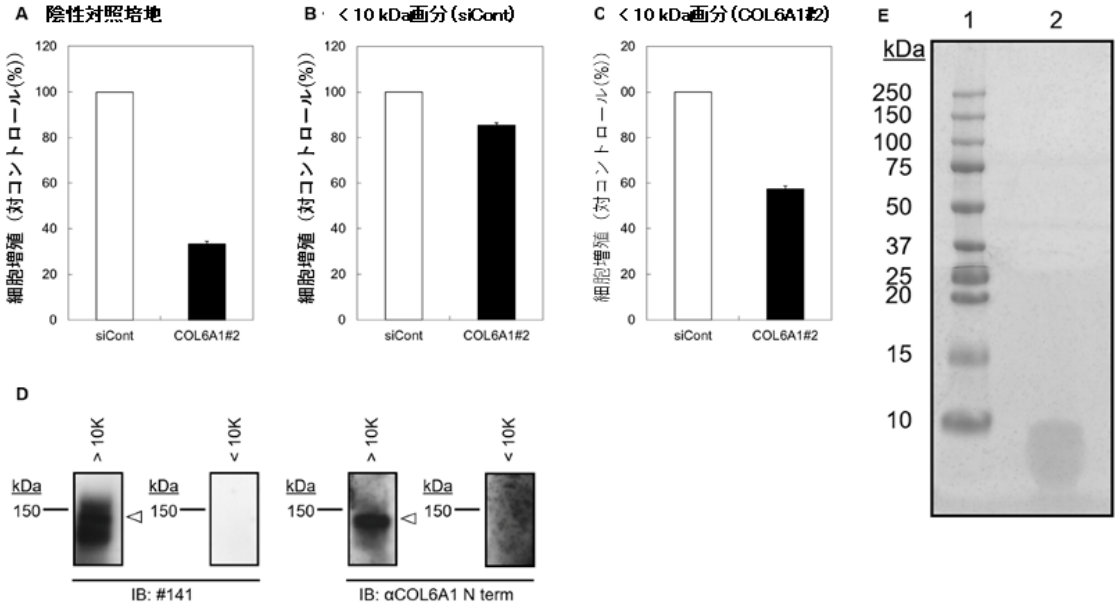

図 10　NTH α1(VI)由来ペプチドのレスキュー活性

(A–C) siRNA 導入コンディションメディウムのレスキュー活性。 COL6A1 siRNA#2 のトランスフェクションは図 8A と同様に実施した。siRNA トランスフェクション後の細胞に、陰性対照培地としての 10% FBS 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (A)、コントロール siRNA 処理した< 10 kDa 画分 (B)及び COL6A1 siRNA#2 処理した< 10 kDa 画分 (C)をそれぞれ添加し、その後、72 時間培養した。細胞増殖はメチレンブルー染色により評価した。データを平均値± SD で表す（n=3）。(D) 各画分の典型的なウェスタンブロッティングの画像。加熱及び還元条件下で電気泳動を行い、抗体#141（IB: #141）あるいは抗 COL6A1 ポリクローナル抗体（N term）（IB: αCOL6A1 N term）をプローブとして用い、> 10 kDa 画分（> 10K）及び< 10 kDa 画分（< 10K）のウェスタンブロッティングを実施した。COL6A1 を白矢尻で示す。(E) < 10 kDa 画分のクーマシーブリリアントブルー染色。アセトン沈殿した< 10 kDa 画分を、加熱及び還元条件下で電気泳動しクーマシーブリリアントブルー染色を実施した。なお、各画分は Amicon Ultra Centrifugal Filter Units を用いて調製した。レーン 1、分子量マーカー。レーン 2、濃縮した < 10 kDa 画分。IB、イムノブロット。siCont、コントロール siRNA。COL6A1#2、COL6A1 siRNA#2。