［別紙 1］

論文の内容の要旨

論文題目　癌細胞の浸潤・転移に関与する膜型マトリックスメタロプロテアーゼの機能解析に関する研究

指導教官　清木元治教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 10 年 4 月　転入学
医学博士課程
病因・病理学専攻
梶田昌裕

【背景】

癌細胞の浸潤・転移機構は、(I) 原発巣からの離脱と細胞外基質(extracellular matrix, ECM)の分解、(II) 脈管系(血管、リンパ管)への侵入、(III) 脈管系からの侵出、(IV) 転移組織への生着と増殖の 4 段階に分けて考えられている。癌細胞は、脈管系で運搬されるとき以外は周囲を ECM に囲まれており、増殖や浸潤過程では周辺の ECM 分解を必要とする。その ECM 分解に中心的役割を担っているのがマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)である。MMPs は、酵素活性中心に Zn^{2+}を保持するプロテアーゼであり、可溶型 MMPs と膜結合型 MMPs (MT-MMPs)の二種類のサブグループに分類され、これまでにヒトでは 18 種類が単離されている。可溶型 MMPs は、細胞外に放出されて広範な ECM 分解に関与するのに対し、MT-MMPs は、細胞膜上に局在することから、細胞の増殖や運動に伴う膜近傍の ECM 分解を担っていると考えられる。この MT-MMPs はこれまでに、5 種類(MT1, MT2, MT3, MT4, MT5-MMP)が単離されている。その中で MT1-MMP は、I 型コラーゲンを直接分解する活性を持つだけでなく、基底膜の主成分である IV 型コラーゲンの分解酵素である MMP-2 を活性化することで、ECM 分解を制御していることが知られている。癌組織では、MT1-MMP の高発現に伴って潜在型 MMP-2 の活性化が観察され、浸潤・転移とも相関する。他の MT2, MT3, MT5-MMP も、*in vitro* 実験系で潜在型 MMP-2 活性化能を有していることが報告されているが、それらの癌組織での発現と潜在型 MMP-2 の活性化とは必ずしも相関してない。本研究では、MT-MMPs の機能と、癌との関連を明らかにする研究の一部として、遺伝子が報告されているにも拘わらず、タンパク質レベルの研究が行われていない MT4-MMP の解析と、癌細胞に高発現する MT1-MMP が細胞接着分子と関連して細胞の運動をどの様に制御されるのかに着目し

て研究を行った。

【結果】

[1] Puenteらにより単離されたヒトhMT4-MMP遺伝子(Puente型)は、MT-MMPsに共通したドメイン構造を持つが、アミノ酸配列の相同性は低い。特に、触媒ドメインに関しては、他のMT-MMPs間では約80-90%の相同性があるのに対し、MT4-MMPでは40%程度である。このことからhMT4-MMPは、他のMT-MMPsとは異なる機能を有していると考えられる。しかし、Puente型cDNAは、これまでに報告されたMMPsに共通するシグナルペプチド配列がコードされていないことから、報告されたcDNAが機能的な遺伝子であるのか疑問であった。そこで本研究では、MT4-MMP遺伝子を再検討することにした。まず、シグナルペプチド配列に相当する部分を欠く遺伝子が、マウスにおいても発現しているのかを調べる目的で、hMT4-MMP遺伝子(Puente型)をプローブとして、マウスcDNAライブラリーをスクリーニングし、mMT4-MMP遺伝子を単離した。このmMT4-MMP遺伝子はシグナルペプチド配列をコードしていることから、ヒトでもマウス遺伝子に相当する転写産物が存在する可能性が示された。そこで、hMT4-MMP遺伝子の5'末端を、5'RACE (rapid amplification of cDNA ends)法により単離したところ、マウス遺伝子に対応する断片と、Puenteらが単離した遺伝子(Puente型)に対応する配列の２種のcDNAが単離された。マウス遺伝子に対応する5'領域の断片と、Puente型cDNAから完全なｃDNAを再構築し(完全長型)、COS-1細胞株に導入したところ、完全長型からは67kDaと71kDaのタンパク質が翻訳産物として検出されたが、Puente型cDNAはタンパク質として翻訳されなかった。hMT4-MMPゲノム遺伝子を解析したところ、Puente型は第二エクソンの上流に、イントロン配列を持つ転写産物に由来することが明らかになった。ヒトおよびマウスMT4-MMP mRNAの発現は、MT1-MMPが広範な組織で発現しているのに対して、白血球細胞及び、脳において高い発現が観察された。特に大脳における発現を発生段階で検討してみると、胚の大脳の分化に伴い発現が増加したことから、MT4-MMPは大脳の形成過程に何らか関与していることが考えられた。以上、本研究により初めて、完全なタンパク質をコードするMT4-MMP遺伝子を単離することに成功した。このことはこれまで解析が困難であったMT4-MMPの生理機能の解析に大きく貢献するものと考えられた。

[2] CD44は、ヒアルロン酸等のECM成分をリガントとし、細胞内ではERM (ezrin/radixin/moesin)やankyrinを介してアクチン骨格と結合する細胞-ECM間接着分子として機能している。またCD44は、広範な細胞で発現しており、細胞の運動をはじめとする様々な細胞機能に関与すると報告されている。特に、アイソフォームであるCD44v6は癌転移を促進することから、CD44は癌細胞の悪性形質発現にも関与していると考えら

れているが、その詳細は明らかにはなっていない。

一方で、CD44 は細胞表面からプロテアーゼによるプロセシングを受けて遊離することが知られている。この様な CD44 のプロセシングは生体内でも起こっており、癌患者では健常者に比べて多量の遊離型 CD44(sCD44)が血清中に検出されている。この CD44 のプロセシングに関与するプロテアーゼとして、これまでにセリンプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼが報告されているが、詳細は全く明らかとなっていない。そこで、CD44 のプロセシングへの MT-MMPs の関与を検討する目的で、CD44H を恒常的に発現し、細胞外に遊離しているヒト膵臓癌 MIA PaCa-2 細胞を用いて、各種プロテアーゼ阻害剤効果を検討した。その結果、CD44 はセリンプロテアーゼによる 90kD と、メタロプロテアーゼによる 70kDa の 2 種類にプロセシングされることが示された。70kDa のプロセシングは内因性 MMP 阻害因子である TIMP-1 では抑制されず、TIMP-2 により抑制された。この TIMP-2 依存的な効果は、MT-MMPs (MT4-MMP を除く)に特徴的であることから、70kDa のプロセシングに MT-MMPs が関与していることが示唆された。そこで次に、CD44H と MT-MMP をヒト乳癌 ZR-75-1 細胞株に共発現させ、培養上清に遊離してくる sCD44 を調べると、CD44H は MT1-MMP および MT3-MMP によりプロセシングされ、70kDa の sCD44 を産生することが示された。上述した MIA PaCa-2 細胞では、MT1, MT2-MMP を発現しているが、MT3, MT4, MT5-MMP の発現は低いことから、CD44 は MIA PaCa-2 細胞では、主に MT1-MMP によりプロセシングされていることが示唆された。

これまでに CD44 は細胞運動の制御に関与することが示唆されている。そこで、MT1-MMP による CD44H のプロセシングが ZR-75-1 細胞の運動性におよぼす影響を、金コロイド法を用いて検討した。CD44H や MT1-MMP をそれぞれ単独で発現させても細胞の運動性に変化はなかったが、両者を共発現させた細胞では約 2 倍程度の運動性亢進が観察された。この運動性の亢進は、MMP 阻害剤である BB-94 により抑制された。また、細胞の運動に際して、MT1-MMP と CD44H は、共に細胞先進部に局在していることが免疫染色で観察された。以上の結果から、細胞は、先進部で MT1-MMP により CD44H をプロセシングすることで、運動性を亢進している可能性が示唆された。

そこで次に、MT1-MMP による CD44H のプロセシング部位を決める目的で、CD44 の細胞外ドメイン (rCD44HS)を大腸菌により調整し、リコンビナント MT1-MMP (rMT1CAT)と反応させ、生じた反応産物の N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、rCD44HS は rMT1CAT により、162Arg-163Thr, 186Arg -187Ser, 192Gly-193Tyr の 3 カ所で切断されていることが明らかとなった。また、3 カ所の切断部位を含む、158Lys-197Thr のアミノ酸配列を欠損した変異型 CD44H (CD44HM)は、ZR-75-1 細胞で MT1-MMP と共発現させても切断されなかったことから、CD44H は MT1-MMP により 162Arg-163Thr, 186Arg -187Ser, 192Gly-193Tyr のいずれかあるいは全てでプロセシングされることが示唆された。そこで、CD44HM が細胞運動性におよぼす影響を金

コロイド法を用いて検討した。CD44H と比較して、CD44HM を MT1-MMP と共発現させても ZR-75-1 細胞の運動性が亢進することはなかった。さらに、CD44HM の発現は、CD44H と MT1-MMP の共発現によって亢進した細胞運動を抑制することが観察された。また、CD44H を恒常的に遊離し、運動性も亢進している MIA PaCa-2 細胞に、CD44HM を発現させてもその運動性を抑制した。一方、MIA PaCa-2 細胞ではセリンプロテアーゼによる CD44H のプロセシングが生じている。しかし、セリンプロテアーゼ阻害剤(トリプシン・インヒビター)は、運動性を阻害しなかったことから、セリンプロテアーゼによるプロセシングは細胞運動には影響を与えないことが明らかとなった。以上より、CD44H の MT1-MMP による特異的なプロセシングが細胞運動を亢進させることが明らかとなった。

【結論】

[1] 報告されている 5 種類の MT-MMPs の中で MT4-MMP は全く解析されていなかった。MT4-MMP 遺伝子の転写産物を再検討した結果、従来報告されていた cDNA が不完全な転写産物に由来することを明らかにし、新たに MT4-MMP タンパク質を発現しうる完全な遺伝子を始めて同定した。このことにより、MT4-MMP の生化学的及び、細胞生物学的な解析が可能となった。

[2] 本研究によって、MT1-MMP が CD44 のプロセシングを行っていることが示された。さらに MT1-MMP によってプロセッシングされない変異体（CD44HM）を用いることにより、MT1-MMP による CD44 のプロセシングが、細胞の運動性を制御していることを明らかにした。これまで、MT1-MMP は細胞膜近傍の ECM を分解をすることで、細胞の運動や癌細胞の浸潤に関与していると考えられてきたが、それに加えて、細胞接着因子 CD44 をプロセシングし、細胞運動性を制御していることが示された。

細胞が運動する際には、低分子量 GTP 結合タンパク質(Rho, Rac, Cdc42)を介した、細胞骨格の再編が起こり、その結果として、(I) 細胞先進部での浸潤突起の形成、(II) 浸潤突起の ECM への接着、(III) 前進、(IV) 細胞後進部の脱接着と収縮が起こる。さらにそれらと連動して、細胞接着因子やプロテアーゼが時間的・空間的に制御されていると考えられる。インテグリンが細胞先進部で ECM に接着し、後進部では脱接着が起こり、リサイクルされているのに対して、CD44 は ECM へ接着した後、プロセシングされることで脱接着の過程が制御されることが明らかとなった。MT1-MMP は細胞運動に際して、先進部で CD44 と局在を共にして ECM 分解に関与し、一方で、CD44 のプロセシングに関わる主要な酵素であると考えられた。本研究は、これまで浸潤・転移への関与の分子機構がほとんど明らかになっていなかった CD44 について、MT1-MMP との関連で細胞運動を制御する新たな接点を明らかにした。