

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成9年度博士課程 進学

氏名 森 英俊

指導教官 東條 英昭

論文題目 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP)の細胞膜局在の
制御機構に関する研究

細胞運動および形態変化はアクチン細胞骨格系の再構築によって達成される。また一方で、細胞が組織の中を運動する時には、細胞外基質 (ECM) に接着し分解することが必要である。即ち、細胞運動と ECM への接着・分解の制御は連動して行われなくてはならない。細胞外基質への接着と分解は、細胞の運動先進部から後進部にかけて、様々な分子の局在と活性が時間的・空間的に制御されることによって遂行される。インテグリンを初めとする細胞接着分子は、ECM をリガンドとして結合する一方で、細胞内においてはシグナル分子やアクチン骨格系と会合している。従って、これらの接着分子は ECM からのシグナルを細胞内へ伝えると同時に、細胞運動を制御するシグナルによってその局在・活性が制御される。

細胞表面で働く細胞外基質分解酵素として膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMP) がある。現在までに 6 種類知られている酵素の中で、MT1-MMP はそれ自身がコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどを直接分解するだけでなく、基底膜基質の主成分である IV 型コラーゲンを分解する MMP2 (ゼラチナーゼ A) を細胞膜上で活性化する。癌組織における MT1-MMP による MMP2 の活性化と癌の浸潤度が相関すること、癌細胞株に MT1-MMP を強発現させると浸潤能および転移能が増加することから、MT1-MMP は癌細胞浸潤の重要な分子であると考えられている。MT1-MMP は血管内皮細胞でも発現しており、血管新生に必須の酵素であることが報告されている。また、イヌの腎上皮由来細胞株 MDCK がコラーゲングル内で HGF 依存的に管腔を形成す

るときにも MT1-MMP の活性が必須である。このような状況での MT1-MMP の働きは、接着分子やアクチン骨格系と連動して制御されていると考えられるが、それを可能にする分子の実体は全く解っていないのが現状である。この MT1-MMP の局在制御機構を解明することは癌の浸潤・転移を理解する上で重要な課題である。そこで、本研究では MT1-MMP の細胞膜上での局在制御機構を解析する目的で、第一章では MT1-MMP とアクチン骨格との関係について、MT1-MMP とアクチンの会合を規定するドメインの解析を試みた。第二章では MT1-MMP とアクチンの会合を仲介する分子が CD44 であることを明らかにし、CD44 による MT1-MMP の局在制御機構の解析を試みた。

第一章 アクチン骨格と MT1-MMP の会合を規定するドメインの解析

細胞運動に関係する接着分子が細胞内ではアクチンと結合することによって、細胞運動と連動した制御を受けるのと同様に、MT1-MMP も細胞骨格と連動した制御を受けている可能性が考えられる。その結果として、MT1-MMP が細胞運動の先端部へと集結すれば、浸潤方向の ECM 分解に都合がよい。そこで、MT1-MMP の局在がアクチン骨格系の変化によって影響を受けるのかを調べるため、アクチンを脱重合させることで知られているサイトカラシン D (以下 CyD) でアクチン骨格系を変化させた。その結果、細胞膜上の MT1-MMP の局在が変化し、脱重合したアクチンの凝集像と局在が一致することから、両者が類似した局在を示すことが確認された。アクチンと結合することが知られている CD44 も細胞表面の局在とアクチン束の染色像が良く一致し、CyD 処理した細胞では細胞内の凝集アクチンと一致した細胞表面の分布の変化を示した。MT-MMP の中で MT4-MMP は細胞膜貫通構造を持たず、GPI-anchor 型で細胞表面に局在する。MT4-MMP を強発現させた細胞を CyD 処理してもその影響を受けず、アクチン凝集部への移動も観察されず、MT4-MMP はアクチン骨格には結合していないと考えられた。以上のことから、MT1-MMP の細胞膜表面での局在が CD44 と同様に細胞内のアクチン骨格と連結して制御されていることが明らかとなった。

次に、MT1-MMP がどのドメインを介してアクチン骨格系とリンクしているかを MT1-MMP の変異体を用いて検討した。膜貫通・細胞質ドメインを欠失し、代わりに MT4-MMP の GPI-anchor によって細胞表面に存在する変異体の MT1-MMP は、CyD 処理によるアクチン凝集と挙動を共にした。このことから MT1-MMP と細胞内にあるアクチンとの関係は細胞外ドメインを介して間接的に行われると考えられた。実際に細胞外ドメインであるヘモペキシンドメインを欠失した変異体はアクチンとの局在が一致せず、CyD 処理した細胞上に分散して存在した。しかし、もう一つの細胞外ドメインである触媒ドメインを欠失した変異体は野生型 MT1-MMP と同様の局在を示した。

以上のことから、MT1-MMP と細胞内のアクチンとの連携はヘモペキシンドメインを介して行われると考えられ、MT1-MMP はヘモペキシンドメインを介して、アクチン骨格系と会合している細胞表面因子と結合し、このことによって間接的に細胞内アクチンと連携していると結論された。

第二章 CD44 による MT1-MMP の局在制御機構の解析

アクチンとの共存を示すためにポジティブコントロールとして用いた CD44 は、ヒアルロン酸、オステオポンチン、セルグリシン、フィブロネクチン、I 型コラーゲンなどをリガンドとし、細胞内では ERM およびアンキリンとの結合を介してアクチンと会合する。また、CD44 は様々な癌細胞で発現しており、細胞の運動能や浸潤・転移能を亢進させることが知られている。インテグリンも細胞内裏打ち構造としてアクチン束と会合しているが、MT1-MMP の局在はインテグリンが存在する接着斑の部位よりはむしろ CD44 と一致した。実験に用いた CHO-K1 細胞は CD44 を恒常的に発現していることから、CD44 が MT1-MMP を細胞内アクチン骨格系にリンクさせる分子として機能している可能性が考えられた。

CD44 と MT1-MMP のヘモペキシンドメインが結合するか否かを解析するために可溶性のヘモペキシンドメインを CHO-K1 細胞に発現させて、CD44 依存的に細胞表面に保持されるかどうかを調べた。その結果、ヘモペキシンドメインは CHO-K1 細胞の表面に結合し、CD44 の発現の増加に伴い細胞膜表面への結合量も増加した。一方、可溶性の触媒ドメインは CD44 の発現の有無に関わらず細胞表面への結合は認められなかった。次に、リコンビナントの可溶性ヘモペキシンドメイン、可溶性触媒ドメインと可溶性 CD44 との結合をライガンドブロッキングにより解析した。その結果、可溶性ヘモペキシンドメインと可溶性 CD44 の結合したが、可溶性触媒ドメインとの結合は認められなかった。さらに、CD44 のヒアルロン酸結合ドメインと膜結合部位の間の領域に相当するリコンビナントタンパク質 (CD44^{stem}) とリコンビナントの可溶性 MT1-MMP の変異体 (MT1EAAΔt, MT1PEX, MT1CAT)、MT4-MMP のヘモペキシンドメインとの直接の結合を BIACORE (分子間の結合、解離により生じる微量な質量変化をリアルタイムにモニターする装置であり、得られたデータから反応速度論の解析を行える) を用いて解析した。その結果、MT1-MMP のヘモペキシンドメインを分子内に有する変異体 MT1EAAΔt, MT1PEX と CD44^{stem} の結合が認められ、その解離常数 (K_d 値) はそれぞれ 624nM、82nM であった。しかし、MT1CAT と MT4PEX の結合は認められなかった。このことから MT1-MMP はヘモペキシンドメインを介して CD44 に直接結合することが示された。

MT1-MMP とアクチンとの会合が CD44 との会合に依存しているとすれば、それは CD44 の細胞内ドメインの機能に依存するはずである。そこで、CD44 の細胞質ドメインに存在するアクチンと会合するためのドメインを欠失した変異体 CD44-dE を作成し、CHO-K1 細胞に発現させ、CyD 処理による細胞膜上での CD44-dE の局在変化を観察した。CyD 処理によってアクチンは細胞内で凝集するが、CD44-dE は細胞膜上で局在がほとんど変化しなかった。また、MT1-MMP と CD44-dE を CHO-K1 細胞に共発現させた場合も、細胞上の CD44-dE と類似して、MT1-MMP もほとんど局在が変化せず、アクチンの凝集部位への局在変化は認められなかった。このことから、MT1-MMP とアクチン骨格との関係には CD44 の細胞質ドメインが必須であることが示された。

MT1-MMP が CD44 を介してアクチン骨格と会合しているならば、細胞運動の際のアクチン骨格

の再編成に伴って両分子の局在も変化するはずである。そこで HT1080 細胞に MT1-MMP の変異体を発現させ PMA 刺激による細胞の運動性を誘導した場合の MT1-MMP 変異体と内在性 CD44 の細胞膜上での局在変化を比較検討した。その結果、MT1-MMP はヘモペキシンドメイン依存的に CD44 と局在が一致し、細胞辺縁部、葉状仮足への局在変化が観察された。また、この実験を MDCK 細胞で行っても同様の結果を得ることができた。これらの結果から、MT1-MMP はヘモペキシンドメイン依存的に CD44 と結合し、アクチン骨格の再編成に伴う細胞膜上の CD44 の局在変化と挙動が一致することが示された。

本研究によって MT1-MMP の細胞膜上の局在が CD44 によって制御されていることが明らかとなり、癌細胞の浸潤を含めた細胞の組織内移動の際に、その運動先進部に MT1-MMP を局在化させ、ECM 分解に利用するメカニズムが明らかとなった。さらに、本研究の結果からプロテアーゼとアクチン骨格との結合を可能にする分子との連携を断つことが、従来のプロテアーゼ阻害剤に加えて、新たな浸潤制御の戦略になりうることを示している。