

## 論文の内容の要旨

論文題目 Study on the role of cytoplasmic tail of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in cancer cell invasion

和訳 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1の細胞質ドメインの機能解析

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 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 上北尚正

### 【背景】

マトリックスメタロプロテアーゼ(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2種類のサブグループに分類され、これまでにヒトでは20種類が単離されている。可溶型 MMPs は、細胞外に放出されて組織内の広範な細胞外基質(extra cellular matrix, ECM)分解に関与しているのに対し、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局所的なECMの分解を担うことが示唆されている。このことからMT1-MMPは、細胞の運動、増殖、形態変化をECM分解面から制御していると考えられている。MT-MMPsは、現在6種類(MT1, MT2, MT3, MT4, MT5, MT6-MMP)が単離されており、膜貫通ドメインと短い細胞質ドメインを介して膜表面に存在する膜貫通型(MT1, MT2, MT3, MT5)とGlycosylphosphatidylinositol(GPI)を介して膜表面に存在するGPI型(MT4, MT6)の2種類に分類されている。

これらMT-MMPsの中でもMT1-MMPは、特に研究の進んでいる分子である。MT1-MMPは、I, II, III型コラーゲン、ラミニン1, 5、フィブロネクチン、フィブリン、プロテオグリカン等のECMを分解する活性を持つのみでなく、細胞膜表面において可溶型MMPであるMMP-2やMMP-13を活性化する機能をも有している。また、MT1-MMP遺伝子欠損マウスは骨格系に異常をきたし、潜在型MMP-2の活性化が抑制されている。またMT1-MMPは、その発現と癌の浸潤・転移とに相関があることが示されている。MT1-MMPは正常組織において、主として間質系細胞で発現する一方、癌組織においては、その進展とともに癌

細胞と周辺の間質細胞で MT1-MMP の発現が亢進することが明らかとなっている。さらに、MT1-MMP の発現が癌細胞の浸潤・転移能を増大することも癌細胞を用いた実験系によって示されている。これらの知見から、MT1-MMP は癌細胞の浸潤・転移に重要な役割を担っていると考えられている。

細胞が浸潤する際には、プロテアーゼや細胞接着因子を含む細胞膜表面に存在する多くの分子が機能している。この過程において MT1-MMP は、ECM の分解のみならず、細胞運動にも重要な役割を担っていることが示唆されており、細胞が運動する際、その運動方向の先端部及び、接着部位に局在することが示されている。しかしながら、その部位における MT1-MMP の活性制御機構や、役割についてはいまだ明らかにはなっていない。

細胞膜表面の MT1-MMP は、いくつかの異なる機構によって活性が制御されている。潜在型 MT1-MMP はプロプロテインコンバーターゼ(PCs)に認識される Arg-Arg-Lys-Arg<sup>111</sup> 部位をプロペプチド配列の末端に有しており、MT1-MMP のプロペプチド配列は細胞内において PCs により切断され、活性型として細胞膜表面に存在すると考えられている。活性型 MT1-MMP は、内因性の阻害分子である Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-2, TIMP-3, TIMP-4 によって阻害され活性が制御されることが明らかとなっており、その中でも TIMP-2 は MT1-MMP の主要な阻害剤であることが知られている。一方で TIMP-2 は、MT1-MMP の活性部位に結合することにより、潜在型 MMP-2 と結合して 3 量体を形成し、別の活性型 MT1-MMP によりプロペプチド配列を切断して潜在型 MMP-2 を活性化する機構に関与するとの報告がなされている。また活性型 MT1-MMP は、MMP-2 や MT1-MMP 自身により触媒ドメインが切断され、細胞膜表面に 43 kDa の不活性型分子として存在し活性が制御されることも示唆されており、その分子が潜在型 MMP-2 の活性化を阻害する可能性も報告されている。

それ以外の MT1-MMP の細胞膜表面における活性制御の機構として、MT1-MMP の細胞内への取り込み機構や MT1-MMP の段階的な分解による活性制御機構などが考えられる。近年、MT1-MMP に結合する TIMP-2 が細胞内に取り込まれ分解されるという報告がなされ、MT1-MMP が細胞内に取り込まれる可能性の高いことが推測された。

本研究では、MT1-MMP の膜表面からの取り込みを検証する観点から細胞内ドメインに着目し、細胞質ドメインによる MT1-MMP の取り込みの有無について検証をおこなった。さらに、MT1-MMP の細胞質ドメイン変異体を作製し、同分子の細胞質ドメインの細胞機能への関与の可能性を細胞生物学的手法を用いて検証した。

## 【方法と結果】

MT1-MMP の細胞内への取り込みを調べるため、MT1-MMP の触媒ドメインの N 末端に FLAG-tag を付けた同分子を CHO-K1 細胞に発現させ、<sup>125</sup>I 標識した FLAG 抗体を用いて MT1-MMP の細胞内への取り込みを検証した。その結果、MT1-MMP が 30 分で約 40% 細胞内に取り込まれることを確認した。また、MT1-MMP がどのドメイン依存的に細胞内に

取り込まれるかを検証するために、MT1-MMP の各ドメイン欠失体を作製し、同様に細胞内への取り込みを検討したところ、MT1-MMP の細胞質ドメイン欠失体は細胞内への取り込みが抑制されることを見出した。以上の結果から、MT1-MMP は細胞質ドメイン依存的に細胞内に取り込まれることが示唆された。また、MT1-MMP 細胞質ドメイン内の欠失及び、点変異体をもちいた細胞内への取り込み実験の結果から、細胞質ドメインの Leu-Leu-Tyr<sup>573</sup> 領域によって MT1-MMP が細胞内に取り込まれることが示唆された。

次に、MT1-MMP の細胞内への取り込みに関与する分子を同定することを試みた。膜型タンパク質の輸送にはクラスリン被覆小胞が関与することが知られている。特に、膜型タンパク質の細胞内への取り込みには、クラスリン被覆小胞の被覆成分として同定された Adaptor protein-2 (AP-2) が重要な役割を担っている。AP-2 は、 $\alpha$ ,  $\beta 2$ ,  $\mu 2$ ,  $\sigma 2$  鎖からなるヘテロ 4 量体から構成されている。 $\alpha$  鎖は細胞質から形質膜への AP-2 の移行及び、クラスリン被覆小胞の形成制御に関与し、 $\beta 2$  鎖はクラスリンとの結合に関与する。 $\mu 2$  鎖は膜型タンパク質の細胞質領域に存在するチロシン領域 (YXX $\Phi$ ) やジロイシン領域 (D/EXXXLL) と結合し、その領域を持つ膜型タンパク質をクラスリン被覆小胞に組み込んで選択的な細胞内取り込みを引き起こす。 $\sigma 2$  鎖に関しては明らかな機能はまだ分かっていない。これらの知見をもとに、 $\mu 2$  鎖と MT1-MMP の細胞質ドメインとの結合の有無を Yeast two-hybrid 法により検証したところ、MT1-MMP の細胞質ドメインは  $\mu 2$  鎖と結合することが明らかとなった。また、MT1-MMP の細胞質ドメインの Leu-Leu-Tyr<sup>573</sup> 点変異体では  $\mu 2$  鎖と結合しなかったことから、 $\mu 2$  鎖は MT1-MMP の細胞質ドメインの Leu-Leu-Tyr<sup>573</sup> 領域を認識している可能性が示唆された。さらに、クラスリン被覆小胞と MT1-MMP との局在を免疫染色で観察したところ、両者の局在が細胞先進部近傍の小胞で一致することを見出した。以上の結果と MT1-MMP が細胞内に取り込まれるという結果から、MT1-MMP は細胞先進部でクラスリン被覆小胞を介して細胞内に取り込まれることが強く示唆された。

次に、この MT1-MMP の細胞内への取り込みとその機能との関係について検証を試みた。MT1-MMP の重要な機能の一つは潜在型 MMP-2 の活性化である。そこで、MT1-MMP の各細胞質ドメイン変異体における潜在型 MMP-2 の活性化能の検討をゼラチンゼイモグラフィを用いておこなった。その結果、どの細胞質ドメイン変異体においても、野生型と比べて潜在型 MMP-2 の活性化には影響が見出されなかった。また、<sup>125</sup>I 標識した FLAG 抗体を用いて細胞表面の MT1-MMP 量を測定した実験から、細胞表面に存在する各細胞質ドメイン変異体の量に変化がないことを見出した。以上の結果から、MT1-MMP の細胞内への取り込みは細胞表面の MT1-MMP 活性には影響を及ぼさないことが示唆された。また、TIMP-2 の取り込みが MT1-MMP の細胞質ドメインに依存している可能性について検証した。細胞質ドメイン欠失体と野生型の各々を発現させた細胞に <sup>125</sup>I 標識した TIMP-2 を結合させ、細胞内への取り込みの検証をおこなった結果、TIMP-2 が MT1-MMP の細胞質ドメイン依存的に細胞内に取り込まれることを見出した。

最後に、細胞運動の制御に MT1-MMP の細胞質ドメインを介した細胞内への取り込みが関与する可能性を検証するため各細胞質ドメイン変異体を発現させた細胞を用いて金コロイド法による細胞運動性の解析をおこなった。金コロイド法は、細胞の金コロイドに対する貪食作用を利用し、細胞が移動した軌跡を測定する方法である。その結果、細胞に取り込まれない変異体では、Mock と同程度の運動性しか見られなかったが、取り込まれる変異体や野生型では、Mock と比較して約 3 倍程度に運動性が亢進することを見出した。また、再構成基底膜を用いた浸潤実験から、細胞の運動性の解析同様に、細胞に取り込まれない変異体では、浸潤能がほとんど見られず、取り込まれる変異体や野生型では、浸潤能が亢進することを見出した。以上の結果から、細胞質ドメインによる MT1-MMP の細胞内への取り込みが細胞の運動性や浸潤能に重要な役割を担っていることが示唆された。

#### 【結論】

本研究によって、MT1-MMP が同分子の細胞質ドメイン、特にその中の Leu-Leu-Tyr<sup>573</sup> 領域依存的に、クラスリン被覆小胞を介して細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。さらに細胞内に取り込まれない MT1-MMP の細胞質ドメイン変異体を用いた細胞運動性の解析（金コロイド法）と再構成基底膜による浸潤実験から、MT1-MMP の細胞内への取り込みが、細胞の運動性及び浸潤能の制御の一端を担っていることを明らかにした。その制御機構の中で、MT1-MMP の細胞質ドメインは、細胞運動及び、癌細胞の浸潤の際の細胞先進部における ECM 分解後の同分子の回収機構に関与する重要なドメインであることが示唆された。本研究は、これまで細胞運動や癌細胞の浸潤・転移の分子機構に関与する MT1-MMP の中で機能がほとんど明らかにならなかった細胞質ドメインの一つの機能を明らかにし、細胞の運動性及び、癌細胞の浸潤・転移機構の解明に新たな局面を提示した。

癌細胞の浸潤過程は、低分子量 GTP 結合タンパク質を介した、細胞骨格の再編と細胞接着因子やプロテアーゼによる時間的・空間的な制御により、(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) ECM 分解による細胞の運動、(IV) 細胞後進部の脱接着と収縮という現象が繰り返し起こることによって成立していると考えられている。

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、本研究により、細胞先進部で MT1-MMP が適切に機能するためには、同分子の細胞内への取り込みと新しく産生された分子への置換が細胞の運動性に必要であり、それが細胞の浸潤能にも関与するという新たな興味深い知見が得られた。