

論文の内容の要旨

論文題目 癌の進展における膜型マトリクスメタロプロテアーゼ 1(MT1-MMP)の役割に関する研究

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 11 年 4 月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

谷脇 香

多細胞生物の形態形成・組織構築の維持に、細胞と細胞外マトリクス(以下 ECM)の相互作用は重要な役割を果たしていると考えられている。ECM はコラーゲン、プロテオグリカン、糖蛋白質などの高分子から構成されており、細胞の足場として機能するだけでなく、細胞表面の受容体を介して様々なシグナルを細胞内へと伝達することが知られている。このため細胞と ECM は非常に密接な関係にあり、細胞による ECM 産生とその分解は細胞の周辺環境を改変し、細胞の運動・増殖・分化・死といった機能を制御する。また ECM は増殖因子・サイトカインを結合しており、ECM 分解によりこれらの可溶性因子が放出されることによっても細胞の機能が制御される。このように ECM 分解は生体にとって非常に重要な現象であり、これにはマトリクスメタロプロテアーゼ(以下 MMP)が重要な役割を担うと考えられている。

MMP は活性中心に亜鉛イオンが結合する一群のエンドペプチダーゼであり、今日まで 20 数種が見出されている。発現様式およびその構造上の違いから、分泌型と膜結合型に大別され、一般に、N 末端よりシグナルペプチド、プロペプチド、触媒ドメイン、ヒンジドメイン、ヘモペキシン様ドメインを持つ。膜結合型はさらに C 末端に膜貫通型ドメインと細胞内ドメインを付加された構造を示す。MMP は、ECM 分解能により乳腺の発達や骨形成といった形態形成、創傷治癒などにおける組織構築やその維持のみならず、関節炎、動脈硬化症、癌の進展といった様々な病的状態にも関与すると考えられている。

癌の進展は原発巣からの癌細胞の離脱とそれに続く周囲組織への浸潤、脈管内への侵入と侵出、遠隔臓器での生着と増殖という複数の過程より構成される。これらの各過程に共通する ECM 分解への MMP の関与が示唆されている。

癌細胞が浸潤する際には、上皮細胞層と間質を隔てる基底膜を分解し、つぎに間質中の主要な ECM である I 型コラーゲンを分解する過程が観察される。膜型マトリクスメタロプロテアーゼ 1 (以下 MT1-MMP)は、それ自身 I、II、III 型コラーゲン、フィブロネクチン、

ラミニン等を含む広範な ECM 成分を分解するだけでなく、基底膜中の IV 型コラーゲン分解酵素である MMP-2 や、I、II、III 型コラーゲンを基質とする MMP-13 を細胞膜表面で活性化する機能を持つ MMP である。このため、MT1-MMP は癌の進展における ECM 分解の中心的な役割を担う酵素と考えられている。また、MT1-MMP は接着分子 CD44 と結合して限定分解することにより、細胞-細胞外基質間の接着性を修飾し細胞移動を促進する可能性も報告されている。さらに最近、MT1-MMP が癌細胞の増殖に関与する可能性も報告され、癌細胞の増殖、浸潤、転移を調節する中心的役割を担う可能性が示唆されている。

MMP-2 は基底膜特有の ECM 成分である IV 型コラーゲンに対して特異的な分解活性を持つことから、癌細胞が浸潤する初期過程において鍵を握る酵素と考えられている。MT1-MMP は癌細胞表面における MMP-2 の主要な活性化因子であることから、MT1-MMP/MMP-2 基質分解系が癌の浸潤に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、この分解系が癌の進展にどのような寄与をしているのか未だ生体内で明らかにされていない。

そこで本研究では MT1-MMP/MMP-2 基質分解系の癌の進展における重要性を *MT1-MMP* 欠失癌細胞と *MMP-2* 欠失マウス双方を用い、検討することを試みた。

MT1-MMP 欠失マウスは骨格に異常が生じる表現型を示し、生後 1 ヶ月以内で死亡することが二つのグループより報告されている。当研究室においても独自に *MT1-MMP* 欠失マウスを作製し、同様の表現型を得ている。しかし、マウスの寿命が短いためにこのマウスを用いて癌の進展時における MT1-MMP の機能について検討することは困難である。そこで本研究では、*MT1-MMP* 欠失マウス大腸より上皮細胞株を樹立し、これを癌化させて移植実験に使用した。マウス大腸上皮細胞は *in vitro* 培養で細胞がアポトーシスを起こすため樹立が困難であった。これを回避するために *MT1-MMP*・*p53* 欠失マウス胎児より細胞株を樹立し、*v-src* を導入して目的の癌細胞株樹立に成功した。さらにこの細胞にテトラサイクリンまたはその誘導体のドキシサイクリンによって遺伝子発現を誘導できる *MT1-MMP* を導入した細胞を作製した。解析には導入した *MT1-MMP* の発現量が野生型と同程度のクローンを用いた。

まず、*MT1-MMP* revertant 細胞(以下 MT1 rev.細胞)が発現する MT1-MMP が基質分解能を有するか否かを検討した。MT1 rev.細胞、mock 細胞はともに検出可能なレベルの MMP-2 を発現しないため、外来性 MMP-2 を添加してその活性化能をゼラチンゼイモグラフィにより検討した。この結果、MT1-MMP 発現依存的に MMP-2 の活性化がみられた。一方、発現させた MT1-MMP の細胞膜表面への局在の有無をゼラチン分解アッセイ、および細胞免疫染色にて検討した。あらかじめ蛍光標識したゼラチンをコートしたチャンバースライド上に細胞を播種し、接着面におけるゼラチンの分解像を観察した。この結果、MT1-MMP 発現依存的にゼラチンの分解像がみられ、その分解野に存在する細胞膜表面で MT1-MMP の局在が確認された。以上の結果より、MT1 rev.細胞において MT1-MMP は細

胞膜表面に発現し、酵素活性を持つことが示された。

次に MT1 rev.細胞、mock 細胞を C57BL/6J マウス背部皮下に移植し腫瘍増殖を継続的に測定したところ、MT1-MMP 発現依存的に腫瘍増殖能が増大した。この結果は MT1-MMP が腫瘍細胞の増殖に関与している可能性を示唆している。

MMP-2 がこの MT1-MMP 依存性な腫瘍増殖能に関与するか否かを検討するため、MT1 rev.細胞と mock 細胞を同系統の *MMP-2* 欠失マウス背部皮下に移植した。その結果、MT1 rev.細胞の増殖は、*MT1-MMP* 誘導条件下においても野生型マウス皮下移植時と比較して、有意に低下した。次にこの実験系における腫瘍細胞増殖の低下が、二次的な MMP-2 の供給により回復するか否かを検討した。このため MMP-2 を恒常的に発現している MT1 rev.細胞(MT1 rev./MMP-2)を作製した。MT1 rev./MMP-2 細胞を *MMP-2* 欠失マウス背部皮下に移植し、さきの MT1 rev.細胞移植時の結果と比較した。この結果、*MMP-2* 欠失マウスにおいて MT1-MMP と MMP-2 双方を発現させた場合の腫瘍体積は MT1-MMP のみを発現させた場合に比較して有意に増大し、MT1-MMP を発現させた細胞を野生型マウスに移植した場合の腫瘍体積とほぼ同程度にまで回復する結果を得た。以上の結果は、皮下における MT1 rev.細胞の増殖には MT1-MMP と MMP-2 が協調して関与することを示唆している。また、野生型マウス間質由来の MMP-2 を MT1 rev.細胞が利用した可能性が高く、間質の関与が重要であることも示唆された。今後は MMP-2 が如何にして腫瘍細胞増殖に関与するのか、それに関わる分子機序についてさらに検討する予定である。

MT1-MMP が腫瘍細胞の増殖に関与する可能性は複数のグループから報告されているが、MMP-2 の関与は少ないものと考えられていた。本研究により、MT1-MMP・MMP-2 の 2 分子による協調作用により腫瘍細胞の増殖を増大する機序の存在することが解明された。この知見は癌治療法開発の一端につながるものと期待される。