

## 論文の内容の要旨

論文題目 CD44 を介した細胞機能制御における膜型マトリックス  
メタロプロテアーゼ・ヘモペキシン様ドメインの関与

氏名 末永 直子

### 序

癌細胞による細胞外基質（ECM）の分解は癌細胞の組織中での移動を可能にし、浸潤・転移を促進する。マトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）は ECM 分解に関するメタロプロテアーゼファミリーの総称であり、その構造から 13 種類の可溶性 MMPs と 6 種類の膜型 MMPs（MT-MMPs）に分類される。中でも MT1-MMP は多くの癌種で発現が亢進し、その発現が浸潤・転移能とよく相関することから、癌の進展に重要な分子と考えられている。MT1-MMP は ECM 分子を直接分解するだけでなく、基底膜の主成分である Ⅰ型コラーゲンの分解酵素である MMP-2 を活性化することから、MMPs 活性化カスケードの上位分子として広範な ECM 分解を誘起すると考えられている。MT1-MMP はシグナルペプチド、プロペプチド、触媒（CAT）ドメイン、ヒンジ、ヘモペキシン様（HPX）ドメイン、膜貫通・細胞質ドメインから構成され、中でも HPX ドメインは MMP ファミリーに特徴的な構造であることから、酵素機能制御に重要なドメインであると考えられている。近年、MMPs は ECM 分子にとどまらず細胞膜タンパク質の切断に関わることも明らかとなっている。例えば、細胞接着分子 CD44 が挙げられる。CD44 もまた高転移性の悪性癌組織での発現が高く、癌患者の血清から検出される CD44 切断断片が病態の悪性度とよく相関することが知られている。MT1-MMP

は、CD44 の切断を介して癌細胞の運動を亢進させることから、唯一機能的に同定されている CD44 切断酵素である。また、MT1-MMP は細胞運動に際して運動先進部に局在し、この分子集積が HPX ドメインと CD44 との結合に依存することも知られている。

本研究では、MT1-MMP の HPX ドメインが CD44 を介した細胞機能制御においてどのような役割を有するか検討すると共に、さらに MT1-MMP と相同なドメイン構造を有する他の MT-MMPs と CD44 との関係について明らかにすることを試みた。また HPX ドメインの強制発現が MT1-MMP と CD44 との結合、CD44 切断を競合阻害することにより、HPX ドメインが CD44 を介した細胞機能を制御する可能性についても言及する。

## 方法および結果

### 1. HPX ドメインは MT1-MMP の CD44 への結合、切断に重要なドメインである。

CD44 と結合能を有するドメインを検討するため、恒常的に CD44 を発現するヒト線維肉腫 HT1080 細胞に FLAG エピトープを付加した MT1-MMP (MT1-F)、CAT ドメインを欠失した変異体 (MT1HPX-F)、HPX ドメインを欠失した変異体 (MT1CAT-F) を遺伝子導入した。抗 FLAG 抗体による免疫沈降において、MT1-F、MT1HPX-F は CD44 を共沈したが、MT1CAT-F は共沈しなかった。次に MT1-MMP の CD44 切断における HPX ドメインの必要性を検討した。MT1-MMP、CD44 共に発現の認められないヒト乳癌 ZR-75-1 細胞に、MT1-F ならびに欠損変異体を CD44 と共に遺伝子導入し、培養上清に切り出される CD44 の検出を行った。CD44 を単独で発現すると 70 kDa 断片のみを検出し、MT1-F と共発現すると MT1-MMP 依存的に 50 kDa、37 kDa 断片を検出した。一方、欠損変異体と CD44 との共発現では MT1-MMP 非依存的な 70 kDa 断片のみを検出した。これらの結果より、HPX ドメインを介した結合がその酵素活性・機能の発現に必要であると推測された。

### 2. CD44 との相互作用は MT-MMPs に広く保存された機構である。

現在までに MT-MMPs は 6 種類が同定されているが、HPX ドメインのアミノ酸配列は MT-MMPs 分子間でよく保存されていることから、MT1-MMP 以外の MT-MMPs も CD44 と相互作用する可能性が考えられる。一方、CD44 切断能は MT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMP、MT5-MMP に認められたが、MT4-MMP、MT6-MMP には認められなかった。また MT1-MMP の基質特異性は CAT ドメインの切断活性と HPX ドメインの基質認識性の協調した結果であったことから、MT-MMPs の CD44 を介した機能制御の解明

は、CAT ドメイン、HPX ドメインに分けて詳細に解析する必要性が考えられた。

そこで各 MT-MMPs の CAT ドメインの CD44 切断活性、HPX ドメインの CD44 への結合能をそれぞれ独立に解析するために、MT1-MMP の CAT ドメインを他の MT-MMPs の CAT ドメインと置換したキメラ変異体、および MT1-MMP の HPX ドメインを他の MT-MMPs の HPX ドメインに置換したキメラ変異体を作製した。

HPX 置換キメラ変異体の CD44 への結合能を HT1080 細胞にて評価したところ、細胞表面での発現が認められたすべての HPX 置換キメラ変異体が CD44 を共沈した。これら分子は細胞表面では CD44 と共局在し、運動先端部に濃縮した。また HPX 置換キメラ変異体は、CD44 切断活性を持つ MT1-MMP 由来の CAT ドメインを有することから、各 MT-MMPs の HPX ドメインの CD44 結合能に依存して CD44 を切断することが期待される。そこで HPX キメラ変異体の CD44 切断能を ZR-75-1 細胞にて検討した。免疫沈降法で CD44 を共沈したすべての変異体と CD44 との共発現により、MT-MMPs 非依存的な 70 kDa 断片が消失し、MT1-MMP による切断時と同様に 50 kDa、37 kDa 断片を検出した。一方、CAT 置換キメラ変異体は MT1-MMP 由来の HPX ドメインを有することから、CD44 への結合により CAT ドメインの活性発現の支持が保証された状態で各 MT-MMPs の CAT ドメインの CD44 切断活性を評価できる。CD44 との結合を確認した上で CAT 置換キメラ変異体の CD44 切断能を検討したところ、MT1-MMP、MT3-MMP の CAT ドメインを有するキメラ変異体が強い CD44 切断能を示し、MT2-MMP および MT5-MMP の CAT ドメインを有するキメラ変異体が弱い切断能を示した。これらの結果より、CD44 の切断活性は MT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMP、MT5-MMP の CAT ドメインに存在し、CD44 との結合能は MT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMP、MT5-MMP、MT6-MMP の HPX ドメインに存在することが明らかとなった。また、両ドメインが協調することにより細胞レベルでの野生型 MT-MMPs の CD44 切断が可能になると考えられた。

### 3.MT1HPX の強制発現は MT-MMPs の機能を競合阻害する。

HPX ドメインを介した結合が MT1-MMP による CD44 の切断活性に必須であれば、MT1HPX の強制発現は MT1-MMP の CD44 への結合、切断を競合的に阻害する可能性がある。そこで、MT1HPX の強制発現が MT1-F の CD44 への結合を競合阻害するか HT1080 細胞にて検討した。MT1-F に共沈する CD44 量は、MT1HPX の強制発現によりその発現量に依存して減少した。また ZR-75-1 細胞において、MT1-F により切断さ

れる CD44 は MT1HPX-F の発現量に依存して ,50 kDa ,37 kDa 断片が減少し ,MT1-MMP 非依存的な 70 kDa 断片が増加した . しながら , MT1CAT-F の強制発現では上記の現象は認められなかった . これらの結果より , HPX ドメインを介した CD44 への結合は MT1-MMP による CD44 切断に必須であることが確認された . また HPX ドメインのアミノ酸配列上の高い保存性から , CD44 への結合は MT-MMPs 間では類似した様式をとることが考えられる . そこで , MT1HPX の強制発現が HPX 置換キメラ変異体の CD44 切断能を競合阻害するか検討した . 各 HPX 置換キメラ変異体により切断される 37 kDa , 50 kDa 断片は MT1HPX-M ( c-Myc エピトープを付加 ) の強制発現により全て消失し , MT-MMPs 非依存的な 70 kDa 断片のみを検出した . この結果より , MT1HPX の過剰発現が他の MT-MMPs の HPX ドメインを介した複合体形成をも阻害することが示唆された .

## 考察

本研究により , MT1-MMP が CD44 を切断する際には HPX ドメインを介した結合が必要であることが明らかとなった . MT1-MMP の HPX ドメインはこれまでも様々な分子と相互作用することが報告されており , MT-MMPs を中心とした複合体形成における作用点になると考えられる . また様々な癌種で異なる MT-MMPs の発現パターンが報告されているが , MT1-MMP 以外の分子種については基質 , 局在 , 相互作用する分子等その性質については知見が乏しく , 詳細な解析が求められていた . 本研究において確立したキメラ変異体を用いた系は , MT-MMPs の機能制御においてドメインごとの性質をそれぞれ独立して詳細に検討ができる点で優れており , 今後の MT-MMPs の機能解析における有力な手段になりうる . キメラ変異体を用いた解析の結果 , HPX ドメインを介した CD44 への親和性は , 細胞表面での局在制御にかかわる MT-MMPs に広く保存された性質であることが示された . 一方 , CAT ドメインは CD44 に対する切断活性が分子ごとに異なり , 従って野生型 MT-MMPs の基質特異性は HPX ドメインを介した結合が保証されたもとの , CAT ドメインに依存し決定されていることが明らかとなった . また CD44 との結合様式は MT-MMPs 分子間で機能的に保存されたモチーフを利用していると考えられる . 今後 , MT1HPX は MT-MMPs の広範な機能を競合的に阻害する可能性があることから , 癌治療にも応用できる可能性が期待される .