

論文の内容の要旨

論文題目 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1 (MT1-MMP)ヘモペキシン様ドメインによる腫瘍抑制

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 13 年 4 月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

野中孝浩

癌細胞の浸潤・転移機構は(1)原発巣からの離脱と細胞外基質(Extracellular matrix ; ECM)の分解、(2)脈管系(血管、リンパ管)への侵入、(3)脈管系からの侵出、(4)二次臓器への生着と二次増殖の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に囲まれていることから、増殖や浸潤過程では周辺のECM分解を必要とする。そのECM分解で中心的役割を担っていると考えられているのが、マトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix metalloproteinases ; MMPs)である。実際に、腫瘍組織内で多種のMMPsが過剰発現し、ECMの分解や蛋白質の機能調節をすることで細胞の増殖、浸潤・転移に関与することが数多く報告されている。

しかしながら、MMPs 活性全体を広範に抑制する合成低分子 MMP 阻害剤(MMPI)を用いた最近の臨床試験では、必ずしも良好な抗腫瘍効果が得られなかった。その原因としては、MMPs が正常組織を含む多くの細胞で発現しているために関節や骨格筋に副作用が生じること、また、酵素の種類や酵素を分泌する細胞によって抗腫瘍効果を含む多種多様な機能を担っていることが考えられる。MMPs を標的とすることで、がんに対する著明な治療効果を引き出すためには、制御すべき MMP に関する正確かつ詳細な情報に基づいた選択性の高い阻害法が待たれている。

MMPs はその構造的特徴から、細胞から分泌される 13 種類の分泌型 MMPs と、細胞膜に結合する 6 種類の膜型 MMPs (Membrane type-MMPs ; MT-MMPs) の 2 つに分類される。分泌型 MMPs は産生細胞より比較的離れた部位でその活性を発現できるために、広範囲の ECM 分解に関与する。一方、MT-MMPs は C 末端側で I 型膜貫通ドメイン、あるいは Glycosylphosphatidylinositol(GPI)により細胞膜表面に局在することによって、細胞周辺部に限局した ECM 分解に関与する。細胞の増殖や運動、浸潤には、基質の広範な破壊よりも、局所的な分解が必要であると考えられる。そのため、がんの進展を効果的に抑制するためには、分泌型 MMPs よりも MT-MMPs を標的とすることの方が妥当であると考えられる。

6 種類の MT-MMPs の中でも膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1(MT1-MMP)は、多くの癌細胞で発現が亢進し、その発現が浸潤・転移能とよく相関する。また、MT1-MMP は細胞の運動や浸潤能にかかわる多彩な機能を有する分子であることが知られている。例えば MT1-MMP の機能として、I、II、III型コラーゲン、フィブロネクチンなどの ECM 分子を直接分解することが知られている。それだけでなく MT1-MMP は、基底膜の主成分である IV 型コラーゲンの分解酵素として働く proMMP-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。その他、CD44 やインテグリン α_v 、組織トランスグルタミナーゼ、ラミニン 5 γ 2 鎖の切断酵素としても働き、その結果として細胞の運動能を変化させることや、MT1-MMP が細胞表面においてサイトカインを不活性化することも報告されている。

実際に、MT1-MMP を癌細胞に過剰発現させることにより *in vitro* における細胞浸潤能、および *in vivo* における腫瘍増殖能や実験的転移能が亢進すること、逆に RNAi により MT1-MMP を発現を抑制すると他の MMP の発現下でも運動能や浸潤能が著しく阻害されることが報告されている。以上の知見から、MT1-MMP はがんの悪性化に寄与する因子と考えられ、浸潤性がんの治療に対して MT1-MMP が重要な標的になり得ると考えられている。しかしながら従来の MMPi の中には MT1-MMP に対して特異的な阻害剤は存在せず、MT1-MMP ががん治療の分子標的として適当かつ十分であるか否かに関する確たる情報は未だ得られていない。

MT1-MMP は N 末端側からシグナルペプチド、プロドメイン、触媒ドメイン、ヒンジ、へ

モペキシン様ドメイン(HPX ドメイン)、膜貫通・細胞内ドメインの 5 つの基本ドメインから構成されている。MT1-MMP の蛋白質分解活性自体は触媒ドメインによって担われているが、その局在や基質選択性の決定には、MMP ファミリーに特徴的な構造であり、多くの蛋白質と相互作用するためのインターフェース機能を有するヘモペキシン様(HPX)ドメインや細胞内ドメインが重要な役割を果たすことが知られている。当研究室においても、MMP-2 を活性化する際に MT1-MMP は、HPXドメインを介してホモオリゴマーを形成することでMMP-2を効率よく活性化することを報告している。その際、触媒ドメインを欠失させた変異体(HPX(1))を癌細胞に強制発現させると、オリゴマー形成を阻害し、*in vitro*における proMMP-2 の活性化および再構成基底膜マトリジェルへの浸潤能を抑制した。そこで我々は本研究により、癌細胞に HPX(1)を発現させることが効果的ながん治療となり得るか否かをヌードマウスを用いて検討した。

はじめに、FLAG 標識した 4 種類の HPX(1)変異体を作製し、内在性 MT1-MMP との複合体形成能を検討した。変異体としては、MT1-MMP の触媒ドメイン欠失させた HPX(1)、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインも欠失させた分泌型 HPX(1)(s HPX(1))、HPX ドメイン以下を GPI シグナルに置換した HPX(1)_{gpi}、ヘモペキシン様ドメインを MT4-MMP の HPX ドメインに置換した HPX(4)を用いた。各 HPX(1)変異体に対して FLAG 抗体で免疫沈降を行ったところ、HPX(1)および HPX(1)_{gpi}、すなわち細胞膜に結合した変異体で内在性 MT1-MMP が共沈した。一方、sHPX(1)、HPX(4)では内在性 MT1-MMP の共沈は確認できなかった。

また、細胞生物学的な機能に対する各 HPX(1)変異体の効果を HT1080 細胞を用いて検討した。複合体形成能の結果と一致して、proMMP-2 の活性化、およびマトリジェルへの浸潤に対して、細胞膜に結合した変異体で抑制効果が認められた。また、細胞増殖能に対する影響では、コラーゲンゲル上での二次元培養ではどの HPX(1)変異体でも変化は認められなかった。一方、コラーゲンゲル内での三次元培養およびヌードマウス皮下における増殖は、細胞膜に結合した変異体で抑制効果が認められた。以上の結果から、MT1-MMP の機能に対する HPX(1)による抑制効果は、細胞膜に局在する MT1-MMP の HPX ドメインが必要であることが示された。

次に、癌細胞に対する HPX(1)発現系の効果を調べるために、内在性に MT1-MMP を発現する上皮由来胃癌細胞株 MKN28 細胞および MKN45 細胞を用いた。また、対照として、

MT1-MMP を発現しない上皮由来胃癌細胞株 TMK-1 細胞を用いた。これらの細胞株を用いてマトリジェルへの浸潤能、ヌードマウス皮下における増殖能、ヌードマウスにおける腹膜播種能を検討したところ、MKN28 細胞および MKN45 細胞ではこれらすべてに対して抑制効果が認められた。一方、TMK-1 細胞では HPX(1)によるこれらの腫瘍抑制効果は認められなかった。以上より、HPX(1)は内在性に MT1-MMP を発現する腫瘍に対し選択的に進展を抑える効果があることが分かった。

そこで、より現実に即した治療モデルでの効果を検討するために HPX(1)を発現するアデノウイルスベクター(AdHPX)を構築し、遺伝子治療の可能性をヌードマウスを用いて検討した。最初にHT1080細胞を用いた皮下移植実験で検討したところ、AdHPXを腫瘍組織中に直接投与した場合、用量依存的に癌細胞の増殖が抑制された。次に、胃癌細胞を用い、胃癌進展過程で広く認められる腹膜播種に対する抗腫瘍効果の有無を検討した。MKN28 細胞を用いた場合、AdHPX の投与により腹腔内の腫瘍結節の数は有意に減少した。その際、コントロールウイルスとして AdLacZ 投与した場合には効果は認められなかった。一方、播種された腫瘍によって産生される血性腹水の量も著明に減少し、マウスの生存率も延長した。

HPX(1)遺伝子導入細胞株を用いた実験結果に反して、AdHPX 投与により、MT1-MMP 非発現 TMK-1 細胞の腹腔内における増殖、および腹水の貯留も抑制された。癌細胞に直接 HPX(1)を発現させたときには、腫瘍の増殖、腹水の貯留ともに抑制されなかったことから、TMK-1 細胞に対するの効果は、腹腔内に存在する宿主由来の細胞に AdHPX が感染することで引き起こされたものと考えられた。

以上の結果から、MT1-MMP はがん治療における有望な分子標的となり得ることが示唆された。また、従来のように酵素の触媒ドメインを阻害するという非特異的な阻害形式ではなく、基質認識部位と考えられている HPX ドメインの機能を特異的に阻害することが、新たな MMP 阻害法となる可能性が示唆された。今後、HPX(1)との相互作用により腫瘍抑に関わる標的蛋白質を同定することで、モノクローナル抗体やペプチド、低分子化合物のような、より効果的で現実の治療に即した薬剤の開発も可能になると考えられる。本研究の結果は、近年の MMPi による臨床応用の限界を克服する新たな特異的 MMP 阻害方法として注目される。MT1-MMP を分子標的とした新規抗がん薬の開発という新しい方向性の可能性を示している。