

[別紙 1]

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) による EMMPRIN
(Extracellular matrix metalloproteinase inducer) の切断

指導教官 清木 元治 教授

東京大学大学院医学系研究科

医学博士課程

病因・病理学専攻

平成 14 年 4 月 入学

江川長靖

癌は多段階の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異により発生し、脱分化・自律性増殖能、血管新生誘導能、浸潤・転移能をいった悪性形質を獲得し進展する疾患である。その中でも、浸潤・転移能は癌の悪性を規定し、患者の生命予後を決定する重要な因子である。癌の浸潤・転移機構は、①原発巣からの離脱と細胞外基質 (Extracellular Matrix, ECM) の分解を伴う組織内への浸潤、②脈管系への進入・侵出、③二次臓器への生着と増殖と行ったような段階を経て成立する。癌細胞は、組織内において周囲を ECM に囲まれていることから、癌細胞の局所での増殖に続く周囲組織への浸潤に加えて、脈管内への侵入と侵出、遠隔臓器での生着と増殖といった複数の局面において、癌細胞による ECM の再構築—周辺環境の制御—は重要な役割を果たすと考えられる。

この ECM を主な基質とする一群の酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) がある。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。MMP はコラーゲンやエラスチン、ラミニン、フィブロネクチンなどほとんどの ECM 成分に対して幅広い分解活性をもつ。多数の報告が、癌細胞による MMP の活性亢進が ECM を分解し癌細胞周辺の環境を改変することにより、癌の悪性化に関わる増殖・浸潤・転移能を促進させる可能性を示唆している。また、現在までに作製されている MMP 欠失マウス、あるいは MMP を過剰発現させた改変マウスにおいても MMP が癌の進展に寄与することを示唆する結果が得られている。このような結果は、癌の進展の際に MMP による ECM 分解が重要な役割を果

していることを示している。

Membrane-type-1 MMP (MT1-MMP)はヒト線維肉腫細胞の細胞表面で MMP-2 を活性化する因子として同定され、MMP の基本ドメインに加えて C 末端側に細胞膜貫通部位をもつ膜型 MMP として報告された。MT1-MMP は、それ自体が直接広範な ECM 成分を分解することに加えて、基底膜の構成成分であるIV型コラーゲンの分解酵素である MMP-2 や MMP-13 を細胞表面上で活性化する。これらのことを通して、MT1-MMP は細胞周囲の微小環境の制御を行い、癌細胞の増殖や浸潤・転移に関与していると考えられている。一方、近年 MT1-MMP は、直接の ECM 分解に加えて細胞膜表面上で様々な機能分子と複合体を形成し、細胞表面の機能分子の制御を通して癌の浸潤・転移に深く関与する報告が多数ある。MT1-MMP は接着因子である CD44 と結合することにより運動先端部に局在し、CD44 を限定分解することにより細胞移動を促進することが報告されている。加えて、MT1-MMP は運動先端部にて $\alpha v \beta 3$ インテグリンと結合、限定分解を加えることにより、*low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP; CD91)を限定分解することにより LRP1 による MMP-2 の細胞内取り込みを抑制していることが報告されている。このように、MT1-MMP は、直接の ECM 分解に加えて細胞膜表面上で様々な機能分子の機能制御因子として細胞の機能に深く関与し、癌の浸潤・転移に深く関わる可能性を有する。したがって、MT1-MMP の生理的な基質となりうる膜蛋白質の同定は、癌の悪性化機構の理解に貢献すると考えられる。

EMMPRIN (Extracellular matrix metalloproteinase inducer) は2つの免疫グロブリン様ドメインを持つ一回膜貫通型糖蛋白質である。EMMPRIN は腫瘍細胞の細胞膜上に発現し近隣の間質細胞を刺激し MMP-1 の発現を誘導する分子として同定された。EMMPRIN は多くの癌組織において高い発現が認められており、MMP-1 に加え、MMP-2、-3、-9、MT1-MMP、MT2-MMP の産生を誘導することが報告されている。今までの報告によると、EMMPRIN は癌細胞の培養上清中にタンパク質分解酵素による *shedding* によって放出され、MMP 誘導因子として機能することが知られている。この、*shedding* は亜鉛のキレーターで抑制されることから、MMP を含むメタロプロテアーゼが関与していることが考えられる。しかし、EMMPRIN の *shedding* における、生理的な責任酵素、その切断部位については未知の部分が多い。EMMPRIN の蛋白質分解酵素による *shedding* は、可溶性の EMMPRIN を産生することに加えて、EMMPRIN の膜上での機能制御、EMMPRIN のターンオーバーにも重要な役割をしていると考えられている。そこで、今研究において我々は EMMPRIN のタンパク質分解酵素による *shedding* について詳細な検討を行ったので報告する。

はじめに、線維肉腫細胞株 HT1080、類上皮腫細胞株 A431 および胃癌細胞株 TMK-1 の 3 種類の癌細胞株を用いて、EMMPRIN の発現および培養上清中への shedding を査定した。この際、MMP の発現および活性を促進することが知られている PMA (100nM) を加え、その影響を確認した。HT1080 および A431 細胞においては、培養上精中に完全長の EMMPRIN に加えて、分子量の小さな 22kDa の EMMPRIN 断片が検出された。以前の報告にあるような 50kDa 程度の EMMPRIN 断片は検出されなかった。この 22kDa の EMMPRIN 断片の shedding は PMA 刺激によって増強され、MMP の合成阻害剤である MMI270 によって完全に抑制された。

次に、この 22kDa EMMPRIN 断片の shedding における責任酵素の同定を試みた。まず、生体内における MMP の阻害分子である TIMP-1 および TIMP-2 の EMMPRIN の shedding に与える影響を検討したところ、22kDa EMMPRIN 断片の shedding は TIMP-2 によって抑制されるが、TIMP-1 によっては抑制されないことが示された。この結果より 22kDa EMMPRIN 断片の shedding には MT-MMPs が関与している可能性が示唆された。続いて、22kDa EMMPRIN 断片の shedding に MT-MMPs の与える影響を検討したところ、MT1-MMP および MT2-MMP 共発現で培養上清中に断片が shedding された。一方、他の MT-MMP の共発現では EMMPRIN の shedding は誘導されなかった。次に、内在性の MT1-MMP および MT2-MMP が 22kDa EMMPRIN 断片の shedding に与える影響を MT1-MMP、MT2-MMP に対する siRNA を用いて評価した。その結果、MT1-MMP の発現低下によって 22kDa EMMPRIN 断片の shedding が顕著に抑制され、MT2-MMP の発現低下によってもわずかに抑制された。これらの結果より、MT1-MMP が 22kDa EMMPRIN 断片の shedding に関して主要な責任酵素であることが示された。

次に、22kDa EMMPRIN 断片の C 末端を質量分析装置を用いて解析したところ Asn⁹⁸であった。加えて in vitro において MT1-MMP が EMMPRIN を Asn⁹⁸-Ile において切断することを示した。MT1-MMP による EMMPRIN 切断部位 (Asn⁹⁸-Ile) は、EMMPRIN の二つある免疫グロブリン様ドメインのリンカー部位にあり、22kDa EMMPRIN 断片は N 端側の免疫グロブリン様ドメインを含む。この部位は MMP 産生誘導能に必須であることから、shedding された 22kDa EMMPRIN 断片が MMP 誘導活性を保持しているのか検討したところ、正常線維芽細胞に対して MMP-2 産生誘導能を持つことが示され、EMMPRIN は MT1-MMP によって、MMP 誘導活性をもつ機能ドメインが shedding されることが明らかとなった。また、A431 細胞を用いた免疫染色の結果、MT1-MMP と EMMPRIN は lamellipodia において共局在することが明らかとなり、そのような浸潤先端部位で MT1-MMP による EMMPRIN の shedding が重要である可能性が示唆された。

以上の結果から、細胞による EMMPRIN の shedding の責任酵素として初めて

MT1-MMP を同定した。EMMPRIN は MT1-MMP によって Asn⁹⁸-Ile で切断され、22kDa の EMMPRIN 断片を遊離する。この 22kDa の EMMPRIN 断片は MMP 誘導活性を持つことが示された。EMMPRIN は MT1-MMP による shedding によって MMP 誘導活性や細胞間相互作用に重要である N 端の Ig ドメインを遊離することが示された。このことは、可溶性の MMP 誘導因子を MT1-MMP 依存的に培養上清中に産生することに加えて、細胞表面の機能的な EMMPRIN を減少させることとなり、EMMPRIN の機能を負に制御する可能性も考えられる。このように、MT1-MMP はそれ自身の ECM 分解や MMP-2 活性化に加えて、EMMPRIN の shedding を介して MT1-MMP が癌組織において MMP の産生の制御を行っている可能性が示されたことは、MT1-MMP の浸潤・転移における多彩な機能を理解するうえで重要な所見であると考えられる。