

審査の結果の要旨

氏名 江川長靖

本研究は癌の浸潤や転移における細胞周囲微小環境の制御に重要な役割を演じていると考えられるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の誘導因子である EMMPRIN の shedding に関して、その責任酵素および切断部位の同定、切断の意義について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 細胞株 HT1080 および A431 細胞において、MMP 依存的に新規の EMMPRIN 断片 (22kDa EMMPRIN 断片) が培養上清中に shedding されることを見出した。また、生体内における MMP の阻害分子である TIMP-1 および TIMP-2 の 22kDa EMMPRIN 断片の 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 には膜型 MMP (MT-MMP) が関与している可能性が示された。
2. EMMPRIN と 6 種の MT-MMP をそれぞれトランスフェクションし 22kDa EMMPRIN 断片の shedding に MT-MMP の与える影響を検討した結果、MT1-MMP および MT2-MMP の共発現時において培養上清中に断片が shedding されることを示した。続いて、MT1-MMP および MT2-MMP に対する siRNA を用いて、内在性の MT1-MMP および MT2-MMP が 22kDa EMMPRIN 断片の shedding に与える影響を検討した結果、MT1-MMP の発現低下によって 22kDa EMMPRIN 断片の shedding が顕著に抑制された。これらの結果より、22kDa EMMPRIN 断片の shedding に関して MT1-MMP が主要な責任酵素であることが同定された。
3. シグナルペプチド直下に FLAG 標識した EMMPRIN を安定発現させ、MT1-MMP の共発現によって shedding された 22kDa EMMPRIN 断片を抗 FLAG 抗体を用いて精製した。この精製された 22kDa EMMPRIN 断片に脱糖鎖処理を加えたところ、22kDa から 10kDa に分子量が変化し、22kDa EMMPRIN 断片のコア蛋白質が 10kDa であることが示された。次に、精製された 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 と予想される切断部位を含むペプチドを反応させ、そのペプチドの質量変化を質量分析装置を用いて解析した結果、MT1-MMP が直接 EMMPRIN を Asn⁹⁸-Ile において切断することが明らかとなった。
4. 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と考えられた。この部位は MMP 産生誘導能に必須

であることから、精製された 22kDa EMMPRIN 断片が MMP 誘導活性を保持しているか検討しところ、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た。したがって、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、可溶性の MMP 誘導因子を産生することが明らかとなった。

以上、本論文は EMMPRIN の shedding に対する解析から、新規の 22kDa EMMPRIN 断片を見出し、その shedding の責任酵素として MT1-MMP を同定した。加えて、その MT1-MMP による切断部位を同定し、shedding された 22kDa EMMPRIN 断片に MMP 誘導能があることを明らかにした。本研究において、MT1-MMP がそれ自身の ECM 分解能や MMP-2 活性化能に加えて、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、癌細胞周囲微小環境の制御における MT1-MMP の多彩な機能を理解するうえで重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。