

## 審査の結果の要旨

氏名 坂本 毅治

本研究は膜型の細胞外基質分解酵素である MT1-MMP がどのようにマクロファージの浸潤に関与しているかを明らかにするため、MT1-MMP 欠損マウスを用いた炎症実験及びマウス骨髄細胞由来マクロファージを用いた浸潤能、運動能の解析を試み、またプロテアーゼ活性に依存しないマクロファージの運動能に MT1-MMP がどのような分子メカニズムで関与しているかについて解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. TPA 誘導耳急性炎症モデルにおいて MT1-MMP 欠損マウスでは野生型マウスに比べて炎症部位へのマクロファージの流入が低下していることを確認した。続いてマクロファージの浸潤能および運動能を解析した結果、MT1-MMP 欠損マクロファージはプロテアーゼ活性の必要な浸潤能だけでなく、プロテアーゼ活性を必要としない運動能も低下していることが明らかとなった。さらなる解析の結果、MT1-MMP 欠損マクロファージは細胞のエネルギー源である ATP 量が低下しており、運動能以外にもラテックスビーズの貪食能、LPS 応答性 TNF- $\alpha$  産生能も低下している事が明らかとなった。
2. 解糖系阻害剤を添加した際の ATP 量の解析、および嫌氣的解糖系最終代謝産物である乳酸の産生量の解析から MT1-MMP 欠損マクロファージは嫌氣的解糖系に機能異常があることが示された。嫌氣的解糖系は転写因子 HIF-1 によって制御されることが知られているので、HIF-1 の標的遺伝子 GLUT-1, PGK-1, VEGF の mRNA 量を定量 PCR で測定したところ、MT1-MMP 欠損マクロファージで各遺伝子の発現低下が見られた。HIF-1 の制御サブユニットである HIF-1  $\alpha$  が MT1-MMP 欠損マクロファージでどのように制御されているかを ELISA 法で解析した結果、野生型と比べて HIF-1  $\alpha$  のタンパク量には差がないが、転写共役因子 p300/CBP との結合が低下していることが明らかとなった。このことから MT1-MMP は HIF-1  $\alpha$  の転写活性に影響を与える事が示唆された。
3. HEK293 細胞を用いて HIF-1  $\alpha$  の転写活性をレポーターアッセイで解析した結果、MT1-MMP の細胞内領域が HIF-1  $\alpha$  の活性化に必要であることが明らかとなった。同様に MT1-MMP によるマクロファージの ATP 産生および運動能の亢進にも細胞内領域が必要であることが示された。続いて MT1-MMP の細胞内領域の欠損変異体およびアラニン置換体を用いてレポーターアッセイを行った結果、細胞内領域の 14 番目のアルギニンをアラニンに置換した R/A 置換体は HIF-1  $\alpha$  を活性化しないことが明らかとなった。さらに、HIF-1  $\alpha$  の転写活性を負に制御する因子である FIH-1 と MT1-MMP との関係を FIH-1 ノックダウン HEK293 細胞を用いてレポーターアッセイで解析した結果、MT1-MMP は FIH-1 依存的に HIF-1  $\alpha$  を活性化していることが明らかとなった。またマクロファージの FIH-1 を RNAi 法でノックダウンした結果、MT1-MMP 欠損マクロファージは野生型マクロファージと

同程度にまで ATP 量が回復した。さらに GST pull-down assay を行った結果、in vitro で MT1-MMP の細胞内領域は FIH-1 と直接結合し、上述の R/A 変異体は FIH-1 と結合しないことから、MT1-MMP の細胞内領域と FIH-1 の相互作用が FIH-1 の抑制に重要であることが示唆された。

4. 続いて MT1-MMP による FIH-1 の抑制メカニズムを解明するために、FIH-1 と相互作用する分子を Yeast-Two-Hybrid 法および HEK293 細胞での免疫沈降法を用いて探索した結果、FIH-1 の新規結合因子として APBA3/Mint-3 を同定した。免疫沈降実験により、APBA3 の N 末端領域 (APBA3NT) が FIH-1 と結合することが明らかとなり、APBA3NT は HIF-1  $\alpha$  と FIH-1 との結合を競合阻害することが pull-down アッセイで明らかとなった。また、レポーターアッセイにより、APBA3 が FIH-1 依存的に HIF-1  $\alpha$  を活性化していること、またこの活性化は APBA3 の N 末端領域だけで十分であることを示した。これらの結果から、その機能に基づき APBA3 を iFIH (inhibitor of FIH-1) と呼ぶ事にした。
5. siRNA を用いて HEK293 細胞の iFIH をノックダウンした状態でレポーターアッセイを行った結果、iFIH のノックダウンは基本の HIF-1  $\alpha$  の活性には影響を及ぼさなかったが、MT1-MMP による HIF-1  $\alpha$  の活性化をキャンセルすることが明らかとなった。また、MT1-MMP と iFIH を低発現の条件でレポーターアッセイを行った結果、MT1-MMP と iFIH は相乗的に HIF-1  $\alpha$  を活性化することが明らかとなった。続いて HEK293 細胞に MT1-MMP または細胞内領域欠損 MT1-MMP (dCP) を発現させて FIH-1 と iFIH との結合を免疫沈降法で解析した結果、MT1-MMP は細胞内領域依存的に FIH-1 と iFIH の結合を促進することが明らかとなった。同様に野生型および MT1-MMP 欠損マクロファージを用いて免疫沈降実験を行った結果、野生型のマクロファージでのみ FIH-1 と iFIH の結合が確認された。免疫蛍光染色法での解析により、MT1-MMP 欠損マクロファージでは FIH-1 は細胞質に一樣に局在していたが、野生型マクロファージでは一部核近傍に濃縮し iFIH と共局在していることが明らかとなった。最後に iFIH を RNAi 法でノックダウンした結果、野生型マクロファージでは著しく ATP 量が低下したのに対し、MT1-MMP 欠損マクロファージでは ATP 量の低下が見られなかったことから、MT1-MMP による ATP 量の亢進には iFIH が関わっていることが明らかとなった。

以上、本論文は MT1-MMP 欠損マウスおよびマウス骨髄由来マクロファージを用いた解析から、マクロファージにおいて膜型プロテアーゼである MT1-MMP が細胞内領域依存的に FIH-1 と本研究で同定した新規結合因子 iFIH との結合を促進することで、HIF-1  $\alpha$  を活化し、嫌氣的解糖系を介した ATP 産生と運動能などの細胞機能を亢進させることが明らかとなった。本研究はマクロファージにおいて細胞外基質の分解とエネルギー産生を MT1-MMP というひとつの膜タンパクが制御することで浸潤という複合的な細胞機能を制御するという新しいコンセプトを提唱し、また癌や炎症性疾患などに関わりの多い転写因子である HIF-1  $\alpha$  の転写活性の新たな制御機構を解明したものであり、学位の授与に値するものと考えられる。