

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間： 2007～2008
 課題番号：19390084
 研究課題名（和文）
 膜型マトリックスメタロプロテアーゼによる組織破壊機構の解析
 研究課題名（英文）
 Study on mechanism of tissue degradation by membrane-type matrix metalloproteinase
 研究代表者
 佐藤 博（SATO HIROSHI ）
 金沢大学・がん研究所・教授
 研究者番号：00115239

研究成果の概要：

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) の機能は、潜在型MMP-2の活性化と基質切断の2つに大別できる。人工的なMMP-2受容体MSP-TIMP-2を考案してMMP-2活性化機構の解明とMMP-2活性化の生理的意義を明らかにした。また、MT1-MMPの新規基質を同定し、がん浸潤・転移に果たす役割を解明した。さらにMT1-MMPの細胞接着斑における機能を解析し、細胞運動などに果たす役割を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：MT1-MMP、組織破壊、MMP-2、GDF-15、細胞接着斑、ERK、細胞運動、分子標的

1. 研究開始当初の背景

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) としてはこれまでに23種類が同定され、そのうち6種類は膜型である。申請者らは1994年に最初の膜型MMP (Membrane-Type MMP-1, MT1-MMP) を胎盤cDNAライブラリーよりクローニングし (Sato, et al., Nature, 370, 61-65, 1994)、がんの浸潤・転移のみならず管腔形成など組

織形態形成過程においても重要な役割を果たすことを見出した。MT1-MMPは当時がん転移に最も重要とされたIV型コラゲナーゼであるMMP-2の活性化因子として同定されたが、その後MT1-MMP自身のコラーゲンなどの細胞外マトリックス (Extracellular Matrix, ECM) 分解活性もまた組織リモデリング、細胞浸潤・炎

症性疾患に伴う組織破壊に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかしながら MT1-MMP を中心とする膜型 MMP の基質および制御分子については未解明の点がきわめて多い。

2. 研究の目的

(1) MT1-MMP の新規基質の探索

MT1-MMP を中心とする膜型 MMP はがん浸潤以外にも炎症性疾患、創傷治癒など組織破壊を伴う病態に深く関与するがそれらの病態における基質特異性、機能などについては未だ不明の点が多い。これまでの発現クローニング法を進展させ、新規基質・制御分子を探索することにより膜型 MMP の病理・生理機能を解明する。

(2) シグナル伝達制御機構の解析

ECM は組織の構造維持のみならず高次機能を制御するダイナミックな機能を有している。細胞—ECM における MT1-MMP の機能を分子レベルで解析し、MT1-MMP による細胞—ECM の相互作用の制御機構を明らかにすることにより、各種病態における MT1-MMP および関連分子の機能を解明する。

(3) MMP-2 活性化機構・生理的意義の解析 MT1-MMP の機能は自身による ECM および関連分子の分解と MMP-2 活性化に大別されるが、MMP-2 活性化機構・意義については未だ不明の点が多い。先に提唱した活性化モデルの検証とその生理的意義を解明する。

以上の結果を総合して、MT1-MMP のがん浸潤・転移をはじめとする組織破壊を伴う疾患における機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) MT1-MMP の新規基質の探索

ヒト胎盤 cDNA ライブラリーを MT1-MMP プラスミドと 293T 細胞にトランスフェクションし、MT1-MMP 活性を MMP-2 活性化能で測定することにより MT1-MMP と相互作用する分子のスクリーニングを行った。

(2) シグナル伝達制御機構の解析

これまでに MT1-MMP は細胞接着斑において ECM を分解することにより細胞—ECM

相互作用により生じるシグナルを制御することを見出し、MT1-MMP の細胞接着斑における重要性を報告した。今回は MT1-MMP の Dominant Negative 体である Pex に Focal Adhesion Kinase の細胞質領域 FAT を結合させることにより Pex を細胞接着斑にターゲットし、細胞接着斑における MT1-MMP の機能解析を行った。

(3) MMP-2 活性化機構・生理的意義の解析

我々は先に MT1-MMP による潜在型 MMP-2 活性化には MMP 阻害因子である TIMP-2 が MT1-MMP と結合した MT1-MMP/TIMP-2 複合体が MMP-2 の受容体とし機能するというモデルを発表した。本モデルにおける MMP-2 活性化と他の基質の切断という MT1-MMP の基質選択性を検証する。また、本モデルに従い、MMP-2 活性化を促進すると予想される人工的な MMP-2 受容体として II 型膜タンパク MSP と TIMP-2 とのキメラタンパク (MSP-T2) を作成した。本分子を用いて、MMP-2 活性化における受容体の実態・機能、および MMP-2 活性化のがん転移における役割を解析した。

4. 研究成果

(1) MT1-MMP の新規基質の探索

改良発現クローニング法により新規基質として Transforming Growth Factor β ファミリーメンバーである Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) を同定した。そして、リコンビナント MT1-MMP と GDF15 を用いて MT1-MMP は GDF15 の N-252/M253 間を切断することにより GDF15 を不活性化することを明らかにした。また GDF15 はがん細胞にがん抑制遺伝子 p53, p21 の発現を誘導することによりその増殖を抑制することを見出した。その結果、MT1-MMP は GDF15 を切断することにより GDF15 による p53, p21 の発現誘導を抑制し、GDF15 による細胞増殖阻害を解除することを明らかにした。すなわち MT1-MMP による GDF15 の切断は GDF15 のがん細胞増殖抑制活性を不活性化することが示された。

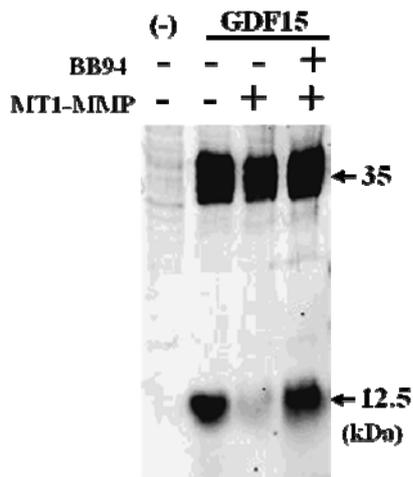


図 1 : GDF15 と MT1-MMP を 293T 細胞に発現させると GDF15 の切断が起こる。

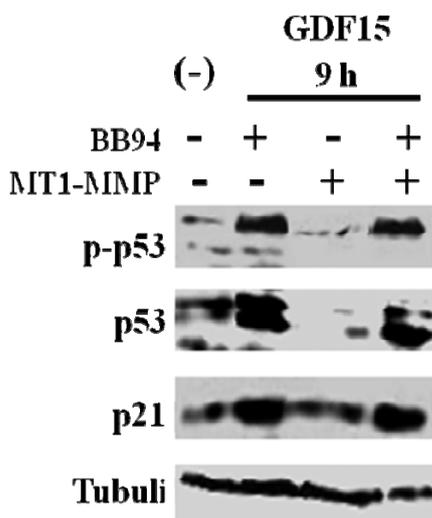


図 2 : GDF15 は p53 および p21 の発現を誘導するが MT1-MMP による GDF15 の切断は GDF15 を不活性化し p53 および p21 の発現誘導を抑制することにより細胞増殖阻害を解除する。

(2) シグナル伝達制御機構の解析

MT1-MMP は細胞接着斑における ECM の分解により細胞—ECM 間の相互作用を調節し、シグナル伝達を制御することにより、細胞増殖・運動をコントロールしている。

MT1-MMP の阻害因子である Pex を FAK の細胞質ドメインと融合させることにより Pex を細胞接着斑にターゲットすることに成功した。細胞接着斑にターゲットされた Pex は効率よく MT1-MMP による細胞接着斑における ECM 分解を阻害し、がん細胞の増殖・

運動を制御することに成功した。細胞接着斑における MT1-MMP の機能・重要性を直接的に証明した重要な知見である。

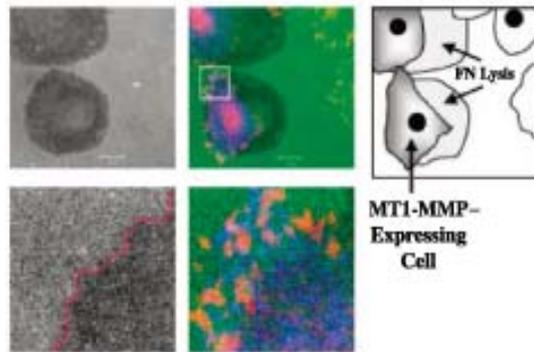


図 3 : MT1-MMP は細胞運動の先進部に局在し、ECM を分解しつつ細胞は進む。免疫染色では細胞接着斑と MT1-MMP の共局在を示している。

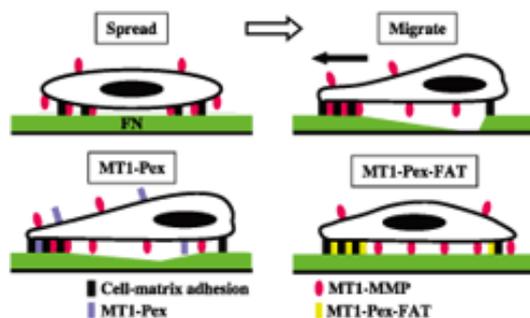


図 4 : FAT ドメインにより Pex を細胞接着斑にターゲットし細胞運動を抑制する。

(3) MMP-2 活性化機構・生理的意義の解析

MT1-MMP による潜在型 MMP-2 活性化には MMP 阻害因子である TIMP-2 が MT1-MMP と結合した MT1-MMP/TIMP-2 複合体が MMP-2 の受容体として機能するというモデルを発表した。従って本モデルでは MT1-MMP は MMP-2 活性化と基質切断は同時に行うことができないとされる。本研究では、TIMP-2 濃度を厳格に制御することにより本モデルを実証した。また、本研究で開発した MSP-T2 は極めて低レベルの MT1-MMP でも効率よく MMP-2 の活性化を行うことが可能であった。MSP-T2 を MT1-MMP 発現レベルの低い U87 細胞に発現させると MMP-2 の活性化が起こると同時に発育鶏卵におけるがん転移を著しく亢進した。この結果は

MMP-2 の活性化はがんの浸潤・転移を亢進することを強く示唆している。

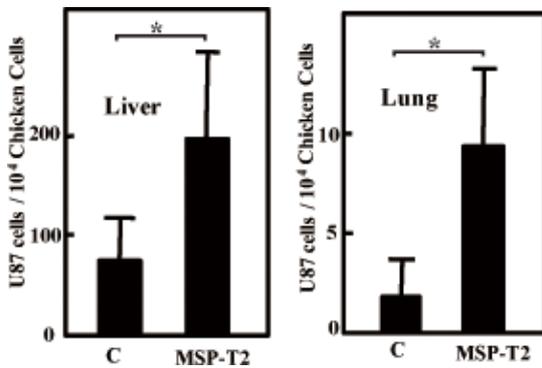


図 5: MSP-T2 を発現する U87 細胞は発育鶏卵胎児の肝臓、肺への転移を促進する。

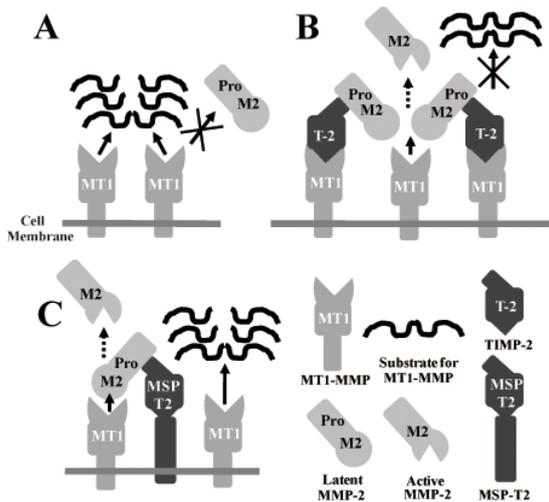


図 6: A, MT1-MMP のみを発現する細胞では基質の切断のみが起こり、MMP-2 活性化は起こらない。B, MT1-MMP/TIMP-2 両者が発現する細胞では MMP-2 活性化のみが起こる。C, MT1-MMP/MSP-T2 両者が発現する細胞では基質切断と MMP-2 活性化の両者が効率よく起こる。

以上の結果より、MT1-MMP の多機能性、すなわち潜在型 MMP-2 の活性化、コラーゲンなどの ECM 成分の分解、GDF-15 などの低分子生理活性物質の切断などが総合してがん細胞の悪性化、その他の病態の増悪に深く関与することが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件) (全て査読有)

1. Itatsu K, Sasaki M, Yamaguchi J, Ohira S, Ishikawa A, Ikeda H, Sato Y, Harada K, Zen Y, Sato H, Ohta T, Nagino M, Nimura Y, Nakanuma Y.: Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor-alpha. *Am. J. Pathol.*, 174, 829-841, 2009.

2. Gantulga D, Baljinnyam Tuvshintugs B, Endo Y, Takino T, Sato H, Murakami S, Yoshioka K. The scaffold protein c-Jun NH2-terminal kinase-associated leucine zipper protein regulates cell migration through interaction with the G protein Ga13. *J. Biochemistry*, 144, 693-700, 2008.

3. Nishida Y, Miyamori H, Thompson E.W., Takino T, Endo Y., Sato H.: Activation of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 By Membrane-type 1-MMP Through An Artificial Receptor For ProMMP-2 Generates Active MMP-2. *Cancer Res.*, 68, 9096-9104, 2008.

4. Itatsu K, Sasaki M, Harada K, Yamaguchi J, Ikeda H, Sato Y, Ohta T, Sato H, Nagino M, Nimura Y, Nakanuma Y.: Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear translocation of nuclear factor-kappaB are involved in upregulation of matrix metalloproteinase-9 by tumour necrosis factor-alpha. *Liver Int.* 29, 291-298, 2008.

5. Kato M., Hossain K., Iida M., Sato H., Uemura N., Goto Y.: Arsenic enhances matrix metalloproteinase-14 expression in fibroblasts. *J Toxicol Environ Health A*, 71, 1053-1055, 2008.

6. Takino T, Saeki H., Miyamori H., Kudo T., Sato H.: Inhibition of Membrane-Type Matrix Metalloproteinase at Cell-Matrix Adhesions. *Cancer Res.*, 67, 11621-11629, 2007.

7. Abd El-Aziz SH., Endo Y., Miyamaori H., Takino T., Sato H.: Cleavage of growth differentiation factor 15 (GDF15) by membrane type 1-matrix metalloproteinase abrogates GDF15-mediated suppression of tumor cell growth. *Cancer Sci.*, 98, 1330-1335, 2007.

8. Yana, I., Sagara H., Takaki S., Takatsu K., Nakamura K., Nakao K., Katsuki M., Taniguchi S., Aoki T., Sato H., Weiss

S.J., Seiki M.: Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. *J. Cell Sci.*, 120, 1607-1614, 2007.

9. Bayarsaikhan B., Takino T., Gantulga D., Sato H., Ito T. Yoshioka K.: Regulation of N-cadherin-based cell-cell interaction by JSAP1 scaffold in PC12h cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353, 357-362, 2007.

10. Kudo T., Takino T., Miyamori H., Thompson E.W., Sato H.: Substrate choice of membrane-type matrix metalloproteinase-1 is dictated by tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 levels. *Cancer Sci.*, 98, 563-568, 2007.

[学会発表] (計 12 件)

1. 第 66 回 日本癌学会総会 佐藤 博、遠藤 良夫、滝野 隆久「MT1-MMPによるGDF15切断の生理的意義の解析」平成 19 年 10 月 4 日 (横浜)

2. 第 66 回 日本癌学会総会 滝野 隆久、佐藤 博 「MT1-MMP阻害変異体の細胞接着斑への標的は腫瘍細胞の浸潤抑制を増強する」平成 19 年 10 月 4 日 (横浜)

3. 第 66 回 日本癌学会総会 内原 嘉仁、滝野 隆久、佐藤 博 「TIMP-2 キメラタンパクによるMT1-MMPを介したMMP-2 活性化の促進」平成 19 年 10 月 4 日 (横浜)

4. 第 66 回 日本癌学会総会 柘植 尚志、滝野 隆久、佐藤 博「細胞接着斑におけるMT1-MMPの役割」平成 19 年 10 月 4 日 (横浜)

5. 第 16 回日本がん転移学会総会 佐藤博、宮森久志、滝野隆久「グルコシルチコイド受容体を介したMT1-MMP遺伝子発現抑制」日本がん転移学会総会 平成 19 年 7 月 9 日 (富山)

6. 第 16 回日本がん転移学会総会 宮森久志、滝野 隆久、佐藤 博 「人工的なMMP-2受容体を介したMT1-MMPによるMMP-2 活性化」日本がん転移学会総会 平成 19 年 7 月 9 日 (富山)

7. 第 80 回 日本生化学会大会 滝野 隆久、佐藤 博 「細胞接着斑におけるMT1-MMPの役割」、平成 19 年 12 月 6 日 (横浜)

8. 第 17 回日本がん転移学会総会 西田 有希、滝野 隆久、佐藤 博「MT1-MMPによるMMP-2 活性化は転移を増強する」(優秀演題賞) 日本がん転移学会総会 平成 20 年 7 月 24 日 (鹿児島)

9. 第 17 回 日本がん転移学会 滝野 隆久、小澤 晃正、西田 有希、佐藤 博 「MT1-MMPによる浸潤性増殖誘導」、平成 20 年 7 月 24 日 (鹿児島)

10. 第 17 回 日本がん転移学会 小澤 晃正、滝野 隆久、西田 有希、佐藤 博 「MT1-MMPによる細胞外マトリックス再構築誘導」、平成 20 年 7 月 25 日 (鹿児島)

11. 第 67 回 日本癌学会総会 滝野 隆久、佐藤 博 「MT1-MMPはFAKとERKを介して細胞増殖と浸潤を増強する」平成 20 年 10 月 29 日 (横浜)

12. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 シンポジウム (マトリックスメタロプロテアーゼの新規機能: オーガナイザー; 宮崎香、佐藤博) 佐藤博、滝野隆久「MT1-MMP活性制御機構の解析」平成 20 年 12 月 10 日 (神戸)

[図書] (計 1 件)

佐藤 博 「がん転移研究の実験手法」254-257 頁、金芳堂 2008 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 博 (SATO HIROSHI)
金沢大学・がん研究所・教授
研究者番号: 00115239

(2) 研究分担者

滝野 隆久 (TAKINO TAKAHISA)
金沢大学・がん研究所・准教授
研究者番号: 40322119