

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12900

研究課題名(和文) MMP-7による大腸がんの肝転移促進機構解明とその肝再生医療への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism of MMP-7-enhanced liver metastasis of colon cancer, and its application for liver regenerative medicine

研究代表者

東 昌市 (Higashi, Shouichi)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・教授

研究者番号：10275076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1)がん細胞表層に結合したMMP-7の基質タンパク質として、I型膜タンパク質であるHAI-1を同定した。MMP-7はHAI-1を細胞膜近傍の部位で切断し、その細胞外領域を可溶性HAI-1(sHAI-1)として遊離させることが判明した。
(2)MMP-7の作用により遊離したsHAI-1は細胞凝集を誘導する活性を持っていた。また、HAI-1細胞外領域の141-249に相当するアミノ酸配列部分が細胞凝集誘導活性に重要であった。
(3) sHAI-1が細胞凝集誘導活性を発揮するためには、MMP-7のプロテアーゼ活性によりHAI-1以外の膜タンパク質の切断修飾が必須であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：(1) We found that hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1), a membrane-bound Kunitz-type serine protease inhibitor, is an MMP-7 substrate; MMP-7 cleaves HAI-1 at the membrane-proximal region, and releases the extracellular region as soluble HAI-1(sHAI-1).
(2) The released sHAI-1, but not the membrane-bound HAI-1, has an ability to induce cancer cell aggregation, and the HAI-1 region corresponding to amino acids 141-249 is essential for the cell aggregation-inducing activity.
(3) A cell-surface cholesterol sulfate-independent proteolytic action of MMP-7 is critical for the sHAI-1-mediated induction of cell aggregation, whereas cholesterol sulfate is needed for the MMP-7-catalyzed generation of sHAI-1.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：MMP-7 HAI-1 がん転移 細胞間接着 細胞凝集 コレステロール硫酸 細胞表層プロテオリシス

1. 研究開始当初の背景

私達はこれまで、がん組織における細胞外タンパク質分解に関する研究を幅広く行ってきた。その中で、大腸がん細胞の表層に結合したマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-7の活性により、細胞凝集が誘導され、大腸がんの肝転移が顕著に促進されることを見出した。また、MMP-7が、がん細胞表層に存在するコレステロール硫酸と特異的に結合し、特定の細胞表層タンパク質を切断することで、細胞間接着を高めることを明らかにしてきた。

一方、国内外のがん転移研究において、がん転移は増殖の速いがん細胞に転移能力があるのではなく、がん組織内にごく少数存在し、自己複製とがん細胞産生の両方の能力を持つがん幹細胞が転移先臓器に生着することではじめてがん転移が成立するという見方が高まってきた。

以上の背景から、MMP-7ががん幹細胞の増殖・維持あるいは生着を促進し、がん転移を促進する可能性が高いと考えた。また、がん幹細胞の生着を促進するのであれば、類似の特性を持つ正常幹細胞の生着も促進するのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、MMP-7により誘導される細胞凝集から、がん転移促進に至る一連の分子機序の解明を試みる目的で、まず、MMP-7によって切り出されるがん細胞表層タンパク質の同定を試みた。

次にこのタンパク質がどのような機序で細胞間接着を誘導するのかを明らかにするため、細胞間接着活性部位の同定と、その受容体の同定を試みた。これらを明らかにし、がんの転移抑制剤の開発に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

MMP-7が、がん細胞表層に存在するコレステロール硫酸と特異的に結合し、特定の細胞表層タンパク質を切断することで、細胞間接着を誘導することが明らかになっている。

そこで、まずMMP-7により切断され、細胞凝集誘導に関わる細胞表層タンパク質の同定を試みた。具体的な方法としては、がん細胞の表層タンパク質をビオチン化試薬で標識した後、細胞表層のコレステロール硫酸をメチルβ-シクロデキストリン処理により除去した細胞と除去しない細胞を調製した。これらをMMP-7処理し、細胞培養液中に遊離するビオチン標識タンパク質断片を調べた結果、コレステロール硫酸存在下でのみMMP-7によって遊離される断片を発見し、これを、質量分析機を用いて同定したところ、I型膜タンパク質であるhepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1)であることが判

明した。

MMP-7によるHAI-1切断が実際に細胞凝集誘導に関与するか否かを調べる目的で、HAI-1タンパク質の発現をshRNAにより抑制した細胞株や、HAI-1分子内のMMP-7切断部位にアミノ酸置換を導入し、MMP-7切断耐性にしたHAI-1を強制発現させた細胞株を作製して検討した。

HAI-1の細胞外領域は種々のドメインから構築されるが、HAI-1分子内のドメインを欠損させた種々のリコンビナントタンパク質を作製し、細胞凝集活性に重要なドメインの同定を試みた。また、HAI-1細胞外領域の受容体を同定する目的で、細胞凝集活性に重要なHAI-1の分子内ドメインを固定化したアフィニティーカラムを作製し、細胞膜画分から受容体の精製を試みた。

4. 研究成果

今回、プロテオミクス的手法を用いることにより、がん細胞表層のコレステロール硫酸に結合したMMP-7によって切断される細胞表層タンパク質がHAI-1であることをつき止めた。また、MMP-7によって切り出されたHAI-1の細胞外領域(soluble HAI-1, sHAI-1)が細胞間接着活性を持つが、切断される前のHAI-1にはその活性がないことを明らかにした。さらに、細胞間接着活性を担うHAI-1分子内の領域が141-249に相当するアミノ酸配列部分に存在することを明らかにした(図)。興味深いことに、sHAI-1が細胞間接着を引き起こすためには、コレステロール硫酸と結合していないMMP-7が細胞表層に作用することが必須であることも判明した。

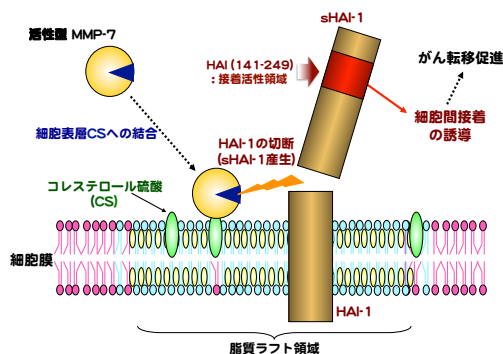


図 MMP-7による細胞間接着誘導とがん転移促進の分子メカニズム

これらの成果から、sHAI-1ががん転移抑制のための新規標的分子と成り得ることが示唆された。

一方、がん細胞表層のsHAI-1受容体の同定については、界面活性剤を用いて細胞膜画分を可溶化すると、sHAI-1と受容体との親和性が顕著に低下すること等が障害となり、未だ同定に至っていない。しかし、MMP-7によるがん転移促進に至る分子機序の全容解明には本受容体の同定が必須であるため、

今後、その同定を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Ishikawa T, Kimura Y, Hirano H, Higashi S: Matrix metalloproteinase-7 induces homotypic tumor cell aggregation via proteolytic cleavage of the membrane-bound Kunitz-type inhibitor HAI-1. *J Biol Chem*. 2017 Dec 15; 292(50): 20769-20784. DOI: 10.1074/jbc.M117.796789.
2. Kamoshida G, Tansho-Nagakawa S, Kikuchi-Ueda T, Nakano R, Hikosaka K, Nishida S, Ubagai T, Higashi S, Ono Y.: A novel bacterial transport mechanism of *Acinetobacter baumannii* via activated human neutrophils through interleukin-8. *J Leukoc Biol*. 2016 Dec; 100(6): 1405-1412. DOI: 10.1189/jlb.4AB0116-023RR.

[学会発表] (計 10 件)

1. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市 : 細胞接着因子としての可溶性 HAI-1 の機能解析。第 90 回日本生化学会大会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会, ConBio2017) (神戸)、4LT26-03(3P-0917) 2017 年 12 月 6-9 日
2. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市 : MMP-7 により切断・放出された可溶性 HAI-1 のがん細胞表層との相互作用の解析。第 22 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (大阪)、演題番号 1、2017 年 8 月 11-12 日
3. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市 : HAI-1 の切断修飾を介した MMP-7 によるがん転移能増強機構の解析。第 26 回日本がん転移学会 (大阪)、演題番号 P05-1、2017 年 7 月 27-28 日
4. Tomohiro Ishikawa, Yayoi Kimura, Hisashi Hirano, Shouichi Higashi: MMP-7-catalyzed processing of HAI-1 induces cancer cell aggregation and promotes cancer metastasis. The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop, Shizuoka, Oct. 17th-21st, 2016
5. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市 : 培養がん細胞において MMP-7 がセリンプロテアーゼ様活性を促進する機構の解析。第 89 回日本生化学会大会 (仙台)、2P-295、2016 年 9 月 25-27 日
6. 佐々木 祐太、東 昌市 : MMP-9 に対し高い選択性を持つペプチドインヒビターの分子設計。第 89 回日本生化学会大会 (仙台)、1P-269、2016 年 9 月 25-27 日
7. 近藤 優希、東 昌市 : MMP-2 選択的インヒビターペプチド APP-IP のアミノ酸改変による新規 MMP-2 インヒビターの開発。第 89 回日本生化学会大会 (仙台)、

- 1T06-02、1P-275、2016 年 9 月 25-27 日
8. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市 : 可溶性 HAI-1 による細胞間接着機構の解析。第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (大阪)、演題番号 9、2016 年 8 月 5-6 日
9. 佐々木 祐太、東 昌市 : MMP-9 に対して高い阻害活性と選択性を併せ持つペプチドインヒビターの開発。第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (大阪)、演題番号 19、2016 年 8 月 5-6 日
10. 近藤 優希、東 昌市 : MMP-2 選択的インヒビターペプチド APP-IP のアミノ酸改変による新規 MMP-2 インヒビターの開発。第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (大阪)、演題番号 20、2016 年 8 月 5-6 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 改変型 APP-IP, 改変型 APP-IP と TIMP-1 との融合タンパク質, 及び MMP-9 の阻害剤
発明者: 東 昌市
権利者: 公立大学法人横浜市立大学
種類: 特許
番号: 特願 2017-254802
出願年月日: 2017 年 12 月 28 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: β -アミロイド前駆体蛋白質由来マトリックスメタロプロテアーゼ 2 インヒビターペプチドと組織メタロプロテアーゼ阻害物質との融合タンパク質
発明者: 東 昌市
権利者: オリエンタル酵母工業株式会社
種類: 特許
番号: 特許第 5651474 号、US8802627、EP2341138B1
取得年月日: 国内: 2014 年 11 月 21 日
 米国: 2014 年 8 月 12 日
 欧州: 2017 年 11 月 22 日
国内外の別: 国内、米国および欧州

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
東 昌市 (HIGASHI SHOICHI)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号: 10275076

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者

木村 弥生 (KIMURA YAYOI)

横浜市立大学・先端医科学研究センター・准教授

研究者番号：80391936

(4)研究協力者 ()