

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07047

研究課題名（和文）細胞膜タンパク質HAI-1の切断を介した新規細胞間接着とがん転移促進機構の解明

研究課題名（英文）Studies on mechanism of inter cellular adhesion induced by cleavage of cancer cell surface HAI-1 protein and following enhancement of cancer metastasis.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：悪性のがん組織内で高発現しているMMP-7はがん細胞表面のセリンプロテアーゼインヒビターHAI-1を切断し、がん細胞の細胞凝集を誘導しつつ、その転移能を増強することが明らかになってきたが、そのメカニズムの詳細は不明であった。本研究において、HAI-1の標的酵素の一つであるマトリプターゼの細胞凝集誘導への寄与を明らかにするとともに、MMP-7により細胞表面で切断を受けたHAI-1がエンドソーム内の弱酸性環境下で活性型マトリプターゼから遊離し、その活性が回復することが示唆された。さらに、マトリプターゼ活性とMMP-7活性はそれぞれ異なる経路で協調的に細胞凝集を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MMP-7を含むいくつかのMMPsはがん組織内で高発現しており、がんの増殖や転移を支えることから、MMPsの活性阻害剤は、従来の薬剤に代わるものとしてその開発が期待された。しかし、これまでに開発されたMMPs阻害剤は、個々のMMPに対する選択性が低く、副作用が原因となってがん治療薬としての利用に至っていない。私たちが見出したMMP-7によるがん転移促進機構の全容解明は、そのユニークな機序を応用した副作用の少ない抗がん剤開発に繋がる可能性があり、学術および社会的意義を持つと考える。

研究成果の概要（英文）：We previously found that matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) induces homotypic adhesion of cancer cells by cleaving cell surface HAI-1 protein, a membrane-bound serine protease inhibitor. However, the detailed molecular mechanism remained to be clarified. In the present study, we revealed that matriptase, one of the proteases susceptible for HAI-1 inhibition, contributes to the induction of the cancer cell aggregation. We also found that endocytosis of the cleaved HAI-1 led to enhance of membrane-bound matriptase activity and induction of the cell aggregation: dissociation of the cleaved inhibitor from active site of matriptase under mildly acidic conditions in the endosome probably causes exertion of the protease activity. It is likely that activities of MMP-7 and matriptase synergistically induce the cell aggregation via independent pathways. Further studies are needed to clarify these pathways.

研究分野：生化学

キーワード：HAI-1 MMP-7 マトリプターゼ がん転移 細胞間接着 コレステロール硫酸 エンドサイトーシス CRISPR-Cas9

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MMP-7は種々のがん組織で高発現しているマトリックスメタロプロテアーゼの一種であり、その発現はがん悪性度と高い相関を示す。私達はMMP-7により、がん転移が促進される機序として以下のことを明らかにしてきた。まず、がん細胞により生合成され、分泌・活性化されたMMP-7が、がん細胞の細胞膜成分として存在するコレステロール硫酸と結合する。次にコレステロール硫酸と結合したMMP-7が近傍の細胞表面タンパク質であるHAI-1(hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1)を切断することで、細胞凝集を惹起する。当初、細胞外へ放出されたHAI-1の細胞外領域が細胞間接着を誘導することが示唆されていたが、本研究の開始直後、このHAI-1細胞外領域単独でのがん細胞凝集誘導能は極めて弱く、補助的寄与しか持たないことが判明した。一方、MMP-7が誘導する細胞凝集メカニズムにセリンプロテアーゼ活性が介在することが示唆された。

2. 研究の目的

MMP-7が誘導するがん細胞凝集機構の詳細を明らかにすることを目的とした。特に細胞膜表面のセリンプロテアーゼ活性が介在することが示唆されてきたため、このセリンプロテアーゼを同定するとともに、HAI-1切断からセリンプロテアーゼ活性の発現に至るメカニズムの解明、この経路において細胞間接着を担う因子の同定などを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

まず、MMP-7誘導性のがん細胞凝集に及ぼす種々のセリンプロテアーゼインヒビターの効果を調べ、候補に上がったセリンプロテアーゼについてRNA干渉やCrispr-CAS9システムを用いて遺伝子を欠損させたがん細胞株を用いて検証を行なった。その結果同定されたセリンプロテアーゼであるマトリプターゼについては、細胞内輸送機構や活性発現機構が明らかになっていなかったため、マトリプターゼやHAI-1の種々の改変体を用いて解析を行なった。また、切断を受けたHAI-1のエンドサイトーシス経路の特定には各種エンドサイトーシスインヒビターを用い、これらのがん細胞凝集に及ぼす効果を調べた。MMP-7が誘導するがん細胞凝集において細胞間接着を担う因子の同定については、既知の細胞間接着分子を中心として主に遺伝子欠損がん細胞株を樹立しつつ解析を行なった。

4. 研究成果

MMP-7が誘導する細胞凝集メカニズムにおいてMMP-7の下流で作用すると考えられるプロテアーゼの候補としてHAI-1の標的酵素の一つであるマトリプターゼを想定し、Crispr-Cas9を用いてマトリプターゼ遺伝子を欠損させた大腸がん細胞株(Colo201)やマトリプターゼに対するshRNAを安定発現する細胞株を樹立した。これらの細胞に、MMP-7を作用させたところ、野生型Colo201細胞と比較して細胞凝集が有意に遅延することが判明した。一方、マトリプターゼのセリンプロテアーゼドメインを調製し、野生型およびマトリプターゼ欠損Colo201細胞に作用させたところ、いずれの細胞株も同等に凝集することが判明した。これらの結果から、MMP-7とマトリプターゼがそれぞれ異なる細胞表面基質を切断し、協調的に細胞凝集を誘導する可能性が考えられた。事実、MMP-7とマトリプターゼのセリンプロテアーゼドメインを同時に野生型Colo201細胞に作用させると、短時間で強い凝集が誘導された。

ところで、マトリプターゼ前駆体は生合成された後、HAI-1とともに細胞外へ輸送され、細胞外で自己活性化、あるいは他のプロテアーゼにより活性化されることが示唆されていた。そこで、マトリプターゼ前駆体とHAI-1のそれぞれの細胞外領域をHEK293細胞に共発現させたところ、殆ど細胞外へ輸送されないことが判明した。一方、HAI-1細胞外領域を修飾し、インヒビター活性を高めるとともに、マトリプターゼ前駆体のセリンプロテアーゼドメインに活性型コンフォメーションを誘導する分子を設計し、これをマトリプターゼ前駆体の細胞外領域とともにHEK293細胞に共発現させると、細胞外への輸送が飛躍的に増強されることを見出した。これらの結果から、HAI-1の存在下、何らかの要因でセリンプロテアーゼドメイン内に活性型コ

ンフォーメーションが誘導されたマトリプターゼ前駆体、あるいは切断を受けて活性型に変換されたマトリプターゼが選択的に細胞表層へ輸送される可能性が示された。

上記の成果を踏まえ、次にMMP-7によるHAI-1の切断後、細胞内でどのようにマトリプターゼの活性発現に至るかについて研究を行なった。まず、*in vitro*においてマトリプターゼとHAI-1のインヒビター領域との親和性を測定した結果、弱酸性条件下 (pH 6.0) では中性条件下 (pH 7.5) と比較してその阻害定数が約10倍となることが判明し、インヒビターとプロテアーゼが部分分解する可能性が考えられた。細胞内においてエンドソーム等の小胞内部では弱酸性になることが知られているため、次に、エンドサイトーシスインヒビターがマトリプターゼ活性とMMP-7誘導性細胞凝集に及ぼす効果を調べたところ、ダイナミンインヒビターの一つであるDyngoが細胞膜画分のマトリプターゼ活性を低下させるとともに細胞凝集を顕著に抑制することが判明し、エンドサイトーシス後のHAI-1断片の解離がマトリプターゼ活性の発現に重要であることが示唆された。

最後に、細胞間接着を担う因子の同定については、ごく最近、解析を始めたばかりであるが、クローディン分子群のうちいくつかの遺伝子欠損に伴い、がん細胞にMMP-7誘導性の細胞凝集と類似の凝集形態が見られたことから、MMP-7あるいはマトリプターゼ活性の発現からクローディン機能欠損に至るメカニズムの解明を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五十畑 萌、東 昌市
2. 発表標題 MMP-7が誘導するがん細胞凝集機構における膜型セリンプロテアーゼ活性発現機序の解析。
3. 学会等名 第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田 小春、東 昌市
2. 発表標題 マトリプターゼ前駆体の細胞外輸送には触媒ドメインにおける活性型コンフォメーションの誘導が重要である。
3. 学会等名 第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東 昌市
2. 発表標題 がん悪性進展に関するMMPsを分子標的とした高特異性阻害剤の開発。
3. 学会等名 第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田 小春、東 昌市
2. 発表標題 マトリプターゼ前駆体の細胞外輸送にはその触媒ドメイン内における活性型コンフォメーションの誘導が重要である。
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五十畑 萌、東 昌市
2. 発表標題 弱酸性条件下でのマトリプターゼ活性発現とそのMMP-7誘導性がん細胞凝集機構における意義。
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富永 明里、東 昌市
2. 発表標題 MMP-7が誘導するがん細胞凝集機構におけるエンドサイトーシスおよび細胞内シグナルの寄与
3. 学会等名 第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 空野 弘樹、常住 淳、東 昌市
2. 発表標題 MMP-7が誘導するがん細胞凝集に及ぼす化合物スラミンの阻害効果
3. 学会等名 第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永 明里、東 昌市
2. 発表標題 MMP-7が誘導するがん細胞凝集機構におけるエンドサイトーシスの寄与
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永 明里、常住 淳、東 昌市
2. 発表標題 MMP-7が誘導するがん細胞凝集機構におけるマトリプターゼ活性の寄与。
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 空野 弘樹、常住 淳、東 昌市
2. 発表標題 化合物スラミンはMMP-7が誘導するがん細胞の細胞凝集を阻害する。
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuhiro Yamamoto, Moe Isohata, Shouichi Higashi	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 316
3. 書名 Proteases and Cancer: Methods and Protocols	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------