

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570118

研究課題名（和文） 個々の MMP 活性を選択的に制御する高特異性インヒビターの開発

研究課題名（英文） Development of highly selective inhibitors against individual MMPs

研究代表者

東 昌市（HIGASHI SHOUICHI）

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号：10275076

研究成果の概要（和文）：（1）結晶構造解析により、10 残基ペプチドインヒビターAPP-IP の MMP-2 選択的活性阻害様式を明らかにした。（2）MMPs に対する生理的インヒビターTIMP-2 と APP-IP とを組み合わせることで、MMP-2 に対し、強力かつ高い特異性を持つインヒビターの設計に成功した。（3）コレステロール硫酸による MMP-7 基質特異性変換機構を解明し、このメカニズムを応用した MMP-7 選択的阻害剤開発の手掛かりを得た。

研究成果の概要（英文）：(1) We determined the crystal structure of the catalytic domain of MMP-2 in complex with decapeptide inhibitor APP-IP, and clarified its mode of the MMP-2-selective inhibition. (2) We designed a highly selective and strong inhibitor against MMP-2 by combining the MMP-2-selective peptide inhibitor APP-IP and physiological MMPs inhibitor TIMP-2. (3) We clarified the mechanism of the cholesterol sulfate-mediated alteration of the substrate preference of MMP-7; clarification of the mechanism provides the clue to develop MMP-7-selective inhibitors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：分子認識及び相互作用

1. 研究開始当初の背景

悪性のがん組織では、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）が高発現し、がん細胞の浸潤・転移に寄与している。しかしながら、ヒトで見出されている 24 種の MMPs の全てが、がんの浸潤・転移を促進するのではなく、特

異性の低い阻害剤によって標的以外の MMPs が阻害されると、がんの転移を助長する可能性や、副作用が現れることが示唆されていた。事実、研究開始当初までに開発された多くの MMPs インヒビターはいずれも特異性が低く、臨床試験の過程で、がんの抗転移剤としての

効果が明確ではない場合や、確認された様々な副作用が原因となり、がん治療薬としての利用に至っていなかった。したがって、標的 MMPs に対し、高い特異性を持つインヒビターの開発が重要であると考えた。

ところで、MMPs の一つである MMP-2 は、がんの浸潤・転移に対し促進的に作用することが示唆されており、がん治療の良好なターゲット分子であるが、私達は、 β -アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が MMP-2 に高い選択性を持つインヒビター領域を持ち、その領域が APP 分子内の ISYGNALMP 配列 (APP-IP と命名) に局在することを見出していた。

一方、MMP-7 は特に大腸がんにおいて高頻度で発現しており、その発現量と大腸がんの悪性度が高い相関を示すことが知られていた。私達は、MMP-7 が大腸がん細胞の細胞表層に結合し、特定の細胞膜タンパク質を切断することで、細胞間接着能を高めることを見出していた。この細胞間接着能の獲得により、大腸がん細胞の肝臓への転移能が顕著に増強されることが判明している。さらに、細胞表層のコレステロール硫酸 (CS) が MMP-7 の特異的な結合分子であることを同定し、この脂質との相互作用が上記細胞膜タンパク質の切断に必須であることを明らかにしていた。また、CS との結合に重要な MMP-7 分子内のアミノ酸残基を同定したところ、これらの残基が触媒活性部位とは反対側に位置することが明らかになり、CS がアロステリック効果により MMP-7 の活性部位に作用することを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では、がんの増殖および浸潤・転移に促進的に寄与する MMP-2 および MMP-7 の活性を特異的に抑制する阻害剤を、それぞれ、APP-IP および CS との選択的相互作用を基に

開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌を用いた組換えタンパク質の発現とリフォールディング法を組み合わせ、MMP-2 の触媒ドメインを作製した後、化学合成した APP-IP と複合体を形成させた。この複合体を結晶化後、X 線結晶解析を行い、その立体構造を解明することにより、APP-IP の MMP-2 選択的活性阻害様式を明らかにした。

(2) APP-IP のアミノ酸配列を TIMP-2 の NH₂ 末端側に付加した融合タンパク質を設計し、その cDNA を動物細胞発現用のベクターに導入後、ヒト繊維芽肉腫 HT1080 細胞にトランスフェクトした。この融合タンパク質の安定発現株の conditioned medium から各種クロマトグラフィーを用いて融合タンパク質を精製した。

合成ペプチド基質を用いた MMPs 活性測定系により、各種 MMPs 活性に及ぼす融合タンパク質の阻害効果を調べた。また、培養細胞系の MMP-2 活性に及ぼす融合タンパク質の効果を調べた。

(3) CS による MMP-7 機能変換機構を調べる目的で、種々の濃度の CS 存在下において、MMP-7 と各種基質タンパク質をインキュベートした。その後、SDS-PAGE あるいは基質タンパク質に対する抗体を用いた Western blotting 法で解析することにより、基質タンパク質の分解速度を調べた。また、各基質タンパク質と CS との親和性を、共沈法を用いて調べた。さらに、細胞表層に CS を介して結合した MMP-7 が細胞培養液中あるいは培養プラスチックプレートにコートした基質タンパク質を分解できるか否かについて調べた。

4. 研究成果

(1) APP-IP と MMP-2 触媒ドメインとの複合体の結晶構造解析を行うことにより、この二分子間の結合様式を明らかにした。その結果、APP-IP はその NH₂ 末端から COOH 末端へ方向が基質ペプチドとは逆向きになるように MMP-2 の基質結合クレフトに結合し、APP-IP の Asp⁶ のカルボキシル基が MMP-2 活性中心の Zn²⁺ に配位結合していた。また、APP-IP の Ala⁷-Pro¹⁰ と Tyr³-Ile¹ 部分がそれぞれ、MMP-2 基質結合クレフト内の S2-S5 および、S1'-S3' 部位と相互作用しており、これらの広域にわたる相互作用が高い MMP-2 選択性に深く関与することが予想された。すなわち、基質結合クレフト内の活性中心近傍の構造は MMPs 間で酷似しているものの、このクレフト全体の構造はそれぞれの MMP 間で異なるため、クレフト全体と相互作用する APP-IP が酵素選択性を発揮できるのではないかと推察した。これに対し、従来型阻害剤は低分子であるが故に酵素と多くの相互作用を持つことができず、全ての MMPs に共通する触媒部位の亜鉛イオンを中心に相互作用することが、選択性が得られない要因となると考えられた (図 1)。この酵素阻害様式の解明は個々の MMP に対して高い特異性を持つ阻害剤の設計・開発に重要な手がかりを与えるものとする。

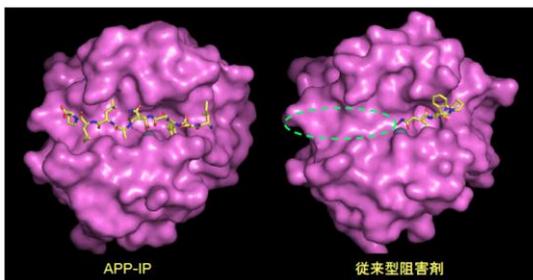


図1. 高選択性インヒビターペプチドAPP-IPと従来型阻害剤とのMMP結合様式の比較。APP-IP-MMP-2複合体の結晶構造(左)との比較から、従来型阻害剤では点線で囲んだ部分において酵素との相互作用がないことが、低い選択性の原因となることが予想された。

(2) 本研究では APP-IP が MMP-2 に対して高い選択性を持つことに着目し、さらに特異性の高いインヒビター分子の設計を試みた。

私達の以前の研究より、生体内の MMP インヒビタータンパク質である TIMP-2 の主鎖の NH₂ 末端 α-アミノ基を修飾すると、MMP インヒビター活性が完全に失われるのに対し、MMP-2 の非触媒ドメインに対する結合能は保持されることが分かっていた。そこで、今回、TIMP-2 の NH₂ 末端に APP-IP のアミノ酸配列を付加したところ、TIMP-2 が持っていた他の MMPs に対する阻害活性は失われたのに対し、MMP-2 に対しては強力な阻害活性を持つ分子となることが判明した (図 2)。

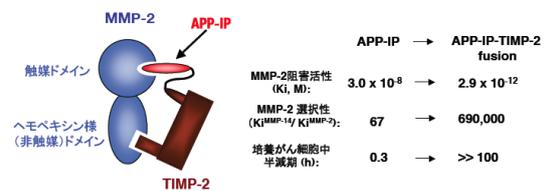


図2. APP-IP-TIMP-2によるMMP-2阻害の様式図およびAPP-IPとの活性比較

この融合タンパク質 APP-IP-TIMP-2 は MMP-2 の合成基質水解活性を非常に低い阻害定数 (K_i=2.9 pM) で阻害するほか、MMP-2 を分泌するがん細胞の移動やこの細胞による IV 型コラーゲンの分解を抑制することが判明した。がん細胞が基底膜を破壊して浸潤・転移する際に基底膜の主成分である IV 型コラーゲンの分解が重要になるが、APP-IP-TIMP-2 はこの浸潤過程を抑制するのに有効な薬剤と成り得る可能性がある。一方、近年 MMP-2 が血小板凝集を促進することが明らかになりつつあることから、今回設計した融合タンパク質は血栓症の予防薬として開発することも可能かも知れない。

(3) プロテアーゼを細胞膜表層に局在させることは、細胞膜タンパク質の分解やプロセッシングを効率化するだけでなく、近傍の細胞外タンパク質を限定的に分解する上でも極めて有効である。上述のように私達は、MMP-7 が、がん細胞膜表層の CS に結合し、特異的膜タンパク質を切断することで、がん細胞

胞の転移能を増強することを見出してきた。本研究では、CS との相互作用が MMP-7 の細胞外マトリックスタンパク質分解活性に及ぼす効果について調べた。その結果、MMP-7 単独では基底膜構成成分の一つである laminin-332 を殆ど分解しないのに対し、CS 存在下ではその分解が著しく促進されることを見出した。反対に、MMP-7 によるカゼインの分解は CS の存在下、顕著に阻害された。一方、MMP-7 による fibronectin の分解は、低濃度の CS 存在下では部分的に阻害されたものの、高濃度の CS 存在下では有意に促進されることが判明し、CS によって MMP-7 の基質特異性が変化することが示唆された。さらに、この基質特異性変化のメカニズムについて調べたところ、CS 存在下で MMP-7 による分解が促進される基質タンパク質は全て CS に対し親和性を持つことが明らかになった。したがって、CS は MMP-7 とその基質タンパク質の両方に結合することで、これらを架橋し、酵素反応を促進することが予想された。これに対し、CS が MMP-7 側のみに結合すると、その基質認識部位が影響を受け、酵素反応における K_m 値が増大することで反応速度が低下することが明らかになった。一方、CS を介して細胞膜に結合した MMP-7 は溶液中およびプラスチックプレートにコートした laminin-332 や fibronectin を分解することが判明し、これら細胞接着タンパク質の分解に伴ったがん細胞の脱着が観察された。以上の結果から、細胞表層の CS に結合した MMP-7 は近傍の CS と親和性を持つ細胞接着タンパク質を選択的に分解しつつ、がん細胞の移動を促進する可能性が考えられた。

上述の結果は、また、CS 結合性タンパク質と MMP インヒビターを組み合わせることにより、CS に結合した MMP-7 を標的とする高選択性インヒビター開発の可能性を与えるもの

と考える。

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 6 件)

- ① Jun Tsunozumi, Shouichi Higashi, and Kaoru Miyazaki (2009): Matrilysin Cleaves C-type Lectin Domain Family 3 Member A (CLEC3A) on Tumor Cell Surface and Modulates its Cell Adhesion Activity. *J. Cell Biochem.* 査読有 **106**, 693-70
- ② Kazuhiro Yamamoto, Kaoru Miyazaki, and Shouichi Higashi (2010): Cholesterol Sulfate Alters Substrate Preference of Matrix Metalloproteinase-7 and Promotes Degradations of Pericellular Laminin-332 and Fibronectin. *J. Biol. Chem.* 査読有 **285**, 28862-28873
- ③ Taizo Mori, Kota Ono, Yoshinobu Kariya, Takashi Ogawa, Shouichi Higashi, and Kaoru Miyazaki (2010): Laminin-3B11, a Novel Vascular-type Laminin Capable of Inducing Prominent Lamellipodial Protrusions in Microvascular Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 査読有 **285**, 35068-35078
- ④ Taizo Mori, Yoshinobu Kariya, Eriko Komiya, Shouichi Higashi, Yohei Miyagi, Kiyotoshi Sekiguchi, and Kaoru Miyazaki (2011): Downregulation of a newly identified laminin, laminin-3B11, in vascular basement membranes of invasive human breast cancers. *Cancer Sci.* 査読有 **102**, 1095-1100
- ⑤ Hiroshi Hashimoto, Tomoka Takeuchi, Kyoko Komatsu, Kaoru Miyazaki, Mamoru Sato, and Shouichi Higashi (2011): Structural Basis for Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)-selective Inhibitory Action of β -Amyloid Precursor Protein-derived Inhibitor. *J. Biol. Chem.* 査読有 **286**, 33236-33243
- ⑥ Eriko Komiya, Momoko Furuya, Naoko Watanabe, Yohei Miyagi, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki (2012): Elevated expression of angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) in tumor stroma and its roles in fibroblast activation. *Cancer Sci.* 査読有 **103**, 691-699

[学会発表] (計 17 件)

- ① Eriko Komiya, Marii Ise, Yuichiro Sato, Shouich Higashi and Kaoru Miyazaki : Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (Irp1/TAF) synergistically modulates tumor cell adhesion with laminin-332(laminin-5). Yokosuka Science Festa 2009 8th Pan-pacific connective Tissue Societies Symposium. Yokosuka Japan, Jun. 4-7, 2009
- ② 古宮栄利子、東昌市、宮崎香 : IGFBP-rP1/TAF とラミニン 332 のがん細胞に対する協調的な促進作用。第 68 回日本癌学会学術集会 (横浜)、P0891、2009 年 10 月 1-3 日
- ③ 寺田翔、迫田明子、東昌市、宮崎香 : マトリプターゼ (MT-SP1) による CTGF (IGFBP-rP2) の切断と腫瘍増殖促進作用。第 82 回日本生化学会大会 (神戸)、3T4a-10、2009 年 10 月 21-24 日。
- ④ 廣瀬智一、東昌市、宮崎香 : マトリックスメタプロテアーゼ-2 (MMP-2) に対し、高い特異性を持つインヒビタータンパク質の設計。第 82 回日本生化学会大会 (神戸)、3T4a-15、2009 年 10 月 21-24 日。
- ⑤ 東昌市、宮崎香 : MMP-2 に対し、高い特異性と阻害活性をもつインヒビタータンパク質の分子設計。第 69 回日本癌学会学術集会 (大阪)、0-347、2010 年 9 月 22-24 日。
- ⑥ 森泰三、東昌市、関口清俊、宮城洋平、宮崎香 : 血管基底膜に存在する新規ラミニン分子 3B11 の性質と腫瘍血管における発現抑制。第 69 回日本癌学会学術集会 (大阪)、P-0078、2010 年 9 月 22-24 日。
- ⑦ 伊勢まりい、古宮栄利子、古谷桃子、東昌市、宮崎香 : IGF 結合タンパク質様分子 IGFBP-rP1 の乳がん組織血管での発現誘導。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)、4P-0945、2010 年 12 月 7-10 日。
- ⑧ 古谷桃子、古宮栄利子、東昌市、宮崎香 : IGF 結合タンパク質様分子 (IGFBP-rP1) の腫瘍増殖抑制における間質との相互作用。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)、4P-0930 (4T4-8)、2010 年 12 月 7-10 日。
- ⑨ 小松恭子、東昌市、宮崎香 : 細胞表層のコレステロール硫酸を介した MMP-7 前駆体 (proMMP-7) 活性化機構の解析。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)、2P-0257、2010 年 12 月 7-10 日。
- ⑩ 東昌市、山本和博、宮崎香 : コレステロール硫酸との相互作用に伴う MMP-7 の基質特異性変化と細胞近傍タンパク質の選択的分解促進機構。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)、2P-0256、2010 年 12 月 7-10 日。
- ⑪ 佐藤拓輝、小柳潤、藤田幸、東昌市、宮崎香 : がん浸潤マーカー「ラミニン γ 2 鎖」と血管内皮細胞の相互作用。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)、2P-0252、2010 年 12 月 7-10 日。
- ⑫ Jun Oyanagi, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki : Epithelial-mesenchymal transition (EMT) stimulates tumor cells to produce invadopodia-like protrusions in collagen matrix, suppressing cell growth. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting (Orlando, FL), No. 3360, April 2-6, 2011
- ⑬ 竹内友香、橋本博、宮崎香、佐藤衛、東昌市 : MMP-2 と APP 由来インヒビターペプチドとの複合体の結晶構造解析。第 16 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (大阪)、演題番号 41、2011 年 8 月 26-27 日。
- ⑭ 竹内友香、橋本博、宮崎香、佐藤衛、東昌市 : APP 由来インヒビターペプチドによる MMP-2 選択的阻害機構の解明。第 84 回日本生化学会大会 (京都)、2P-0257、2011 年 9 月 21-24 日。
- ⑮ 小柳潤、佐藤拓輝、東昌市、宮崎香 : 上皮-間葉変換はコラーゲンゲル中で Invadopodia 様の突起形成を促進する一方で細胞増殖を抑制する。第 70 回日本癌学会学術集会 (名古屋)、J-1101、2011 年 10 月 3-5 日。
- ⑯ 古宮栄利子、東昌市、宮崎香 : 腫瘍由来接着因子 IGFBP-rP1/TAF はヒト繊維芽細胞の増殖とフィブロネクチン産生を促進する。第 70 回日本癌学会学術集会 (名古屋)、J-2076、2011 年 10 月 3-5 日。
- ⑰ 佐藤拓輝、小柳潤、東昌市、宮崎香 : がん浸潤マーカー・ラミニン γ 2 鎖は、がん細胞の血管内皮単層下への浸潤を促進する。第 70 回日本癌学会学術集会 (名古屋)、J-2077、2011 年 10 月 3-5 日。

[産業財産権]

○出願状況 (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 : 公立大学法人横浜市立大学
 種類 : PCT 国際出願
 番号 : PCT/JP 2009/ 067320

出願年月日：2009年10月5日
国内外の別：外国

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yokohama-cu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 昌市 (HIGASHI SHOUICHI)
横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学
研究科・准教授

研究者番号：10275076

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：