

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590356

研究課題名(和文)細胞外マトリックス分解と細胞運動の極性形成維持機構

研究課題名(英文) A molecular mechanism that regulates extracellular matrix degradation and cell polarity in migrating cells.

研究代表者

滝野 隆久 (Takino, Takahisa)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：40322119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：MT1-MMPを発現抑制したHT1080細胞とRat1線維芽細胞の共培養では、FN繊維がRat1からHT1080細胞の細胞接着斑に伸展し、N-カドヘリン接着が形成された。また、N-カドヘリン阻害は、MT1-MMPを発現抑制したHT1080細胞におけるFN matrix形成を抑制した。以上の結果から、MT1-MMPは細胞接着斑上における初期のFNの重合を抑制することによりN-カドヘリン接着の安定化とFN matrix形成を阻害し、結果的に腫瘍細胞の細胞運動と増殖を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have shown that membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) regulate fibronectin (FN) assembly by cleaving it, which results in promotion of cell motility and proliferation. FN matrix assembly requires the increased cytoskeletal tension generated by cadherin adhesions. In a co-culture of Rat1 fibroblasts and MT1-MMP-silenced but not control HT1080 cells, FN fibrils extended from Rat1 to cell-matrix adhesions in HT1080 cells, and N-cadherin adhesions were formed between these cells. MT1-MMP knockdown promoted FN matrix assembly and N-cadherin adhesions in HT1080 cells, which was abrogated by double knockdown with either integrin beta1 or FN. Conversely, inhibition of N-cadherin adhesions suppressed FN matrix formation in MT1-MMP-silenced cells. These data demonstrate that FN assembly initiated by MT1-MMP knockdown results in increased N-cadherin adhesions, which are prerequisite for further FN matrix formation.

研究分野：腫瘍医学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

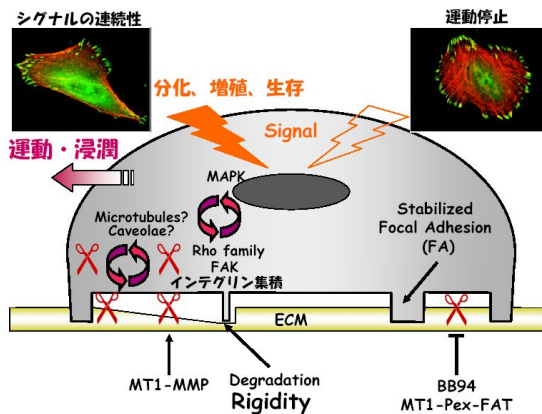
キーワード：細胞運動 浸潤 ECM MMP

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス(ECM)分解と細胞運動の協調的誘導は、がん細胞浸潤・転移の成立に必要である。方向性を有した細胞運動では、運動極性形成とシグナルの連続性が維持されている。がん細胞は ECM 由来の細胞運動誘導シグナルの連続性を確保するという意味でも、ECM 分解酵素を用いて細胞外微小環境を整備している。特に MT1-MMP は、ECM 分解カスケードを活性化するだけでなく CD44 やシンデカン-1 などの細胞接着分子のプロセッシングを行い細胞—ECM 間接着を制御していることから、MT1-MMP は ECM の変化誘導とそれを感知する細胞システムの制御中枢の一つとして機能していると考えられた。研究代表者は、MT1-MMP による細胞接着斑近傍での ECM 分解が focal adhesion kinase (FAK) と extracellular signal-regulated kinase (ERK) 活性化、インテグリン集積を制御して細胞接着斑の代謝回転を促進し、細胞運動を亢進することを見出してきた。また、MT1-MMP が 3 次元 ECM 中において c-Src の活性化と Paxillin を介して ERK 活性化を誘導し、腫瘍細胞の増殖と浸潤を亢進していることも明らかにしてきた。MT1-MMP は、局所的な ECM 分解による微小環境変化とそれを感知する細胞システムを制御することで ECM 分解と細胞運動の連続性と極性維持を制御していると推測された。

2. 研究の目的

1) MT1-MMP による ECM 分解と細胞運動の極性形成維持機構



研究代表者は MT1-MMP によるコラーゲン分解が持続的な ERK 活性化を亢進し、この ERK 活性化の亢進が MT1-MMP の活性発現を増強する正のフィードバック機構が存在することを報告してきた。また、MT1-MMP 発現による ECM 分解がインテグリンの凝集、FAK のリン酸化、c-Src 活性化、ERK 活性化を調節して細胞接着斑の安定性と細胞運動を制御していること、細胞接着斑に標的した MT1-MMP 阻害変異体はフィブロネクチン

(FN)の分解を抑制し、細胞運動と3次元 ECM 中への細胞浸潤を効率良く抑制することも報告してきた。細胞運動・極性形成に必須である細胞接着斑の代謝回転は、細胞内で接着斑構成分子のリン酸化と脱リン酸化、カルパイン等による構成分子の切断により制御されている。研究代表者は MT1-MMP による細胞接着斑における ECM 分解が、物理的にインテグリンの集積を調節して細胞接着斑の安定性を制御するという新しいコンセプトを提唱した。本研究では MT1-MMP による細胞接着斑での ECM 分解とインテグリンを含めた接着分子の制御が、細胞運動・浸潤極性形成の連続性を維持する分子機序の解明を目的とする。

2) PTEN 結合分子による MT1-MMP と細胞運動極性制御機構の解析

細胞の ECM への接着は、インテグリンの集積を起因とした接着斑形成と FAK の凝集・自己リン酸化を誘導する。FAK は MAPK や PI-3K 経路を活性化して細胞増殖、運動、分化、生存を制御している。特に PI-3K/Akt 経路は上皮極性や細胞運動極性の形成に重要であり、がんの増殖や浸潤と密接に関与している。がん抑制遺伝子 PTEN は PI-3K 産物である PIP₃ を脱リン酸化することで PI-3K/Akt 経路を抑制しており、PTEN 遺伝子の欠損は造血器腫瘍、肺癌、前立腺癌などと密接に関与している。また、PTEN は細胞質だけではなく核内でも機能しており、核内 PTEN は正常な細胞分裂や増殖制御に重要であることがわかってきた。近年、アメリカのグループは *Pten* 遺伝子を前立腺上皮特異的に欠損させたマウスにおいて MT1-MMP 蛋白の安定性が PI-3K/Akt 経路依存的に増強され、腫瘍形成が亢進することを報告した。PTEN の酵素活性や蛋白安定性はその C-末端により制御されていることから、PTEN C-末端結合分子が MT1-MMP 活性発現制御にも関与している可能性が考えられた。

3. 研究の方法

1) MT1-MMP による ECM 分解と細胞運動の極性形成維持機構

Cadherin 接着と細胞接着斑の形成には MT1-MMP を含めた多くの共通した分子が関与しており、両者の協調的作用(細胞接着ネットワーク)により細胞極性が形成されていると考えられる。ECM 構成要素の中で唯一 FN だけが細胞表面で細胞によりその重合と集積が行われる。細胞表面で重合された FN は、Integrin と Cadherin 接着による細胞骨格の増強により集積して FN マトリックスを形成する。この FN マトリックス形成の特性を利用し、細胞表面の MT1-MMP による持続的な ECM の再編が、細胞接着ネットワークの

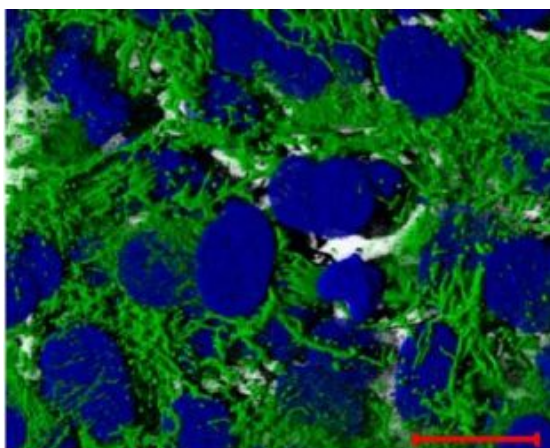
破綻を通して細胞運動と浸潤極性に及ぼす影響を検討した。

2) PTEN 結合分子による MT1-MMP と細胞運動極性制御機構の解析

PTEN の酵素活性は、リン酸化、アセチル化、酸化、単ユビキチン化による細胞質 - 核内移行などにより制御されている。PTEN の C-末端は、酵素活性と蛋白安定性を制御する重要な領域であることが知られている。最近の研究から核内における PTEN は細胞周期、DNA 修復やアポトーシス制御などが抑制的に機能していることが判明した。研究代表者は新たな PTEN の制御因子を同定すべく 3 個の PTEN の C-末端(50 アミノ酸)を直結した Bait を用いて Yeast Two-hybrid 法にて PTEN 結合分子を探索した。得られた 60 クローン解析の結果、GLTSCR2 など既知の PTEN 結合分子の他に転写(8 種類)やユビキチン関連分子(4 種類)等が同定された。これらの分子の中で、PTEN の C-末端との結合が確認され、転写制御、細胞周期制御、DNA 修復やアポトーシス誘導などの機能を有するがん抑制遺伝子であるヒストンアセチル化酵素 Tip60 についての解析を行った。

4. 研究成果

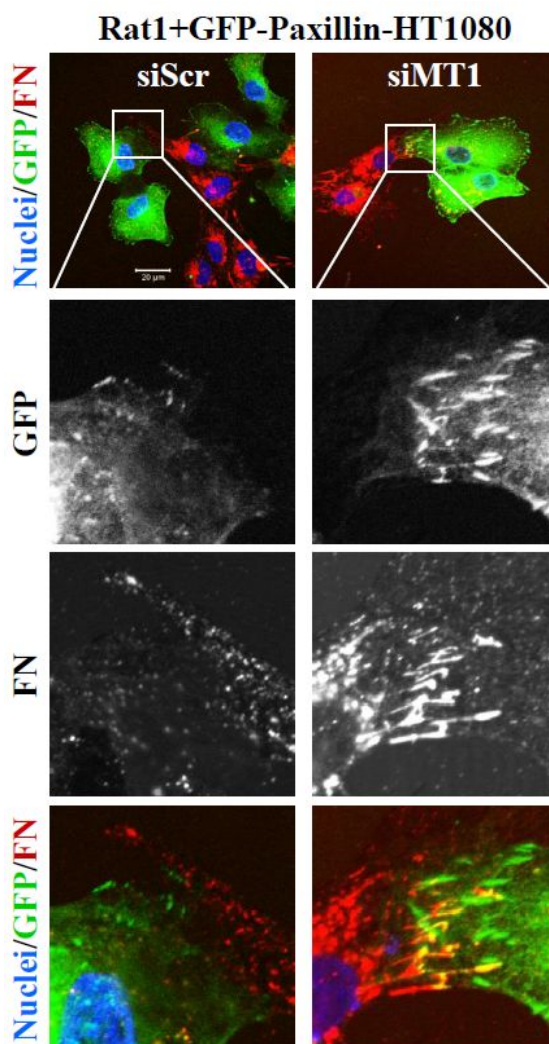
1) MT1-MMP による ECM 分解と細胞運動の極性形成維持機構



DAPI/FN

siRNA を用いて MT1-MMP の発現抑制を行ったヒト線維肉腫 HT1080 細胞では、FN マトリックス形成と N-カドヘリン接着の増強が観察された(上図)。この N-カドヘリン接着の増強は、細胞性 FN の発現とインテグリン 1 鎖に依存的であった。また、N-カドヘリンの発現抑制と中和抗体による細胞処理は、いずれも MT1-MMP 発現を抑制した HT1080 細胞における FN マトリックス形成を抑制した。Rat1 繊維芽細胞では、FN の重合が細胞間接触部位において認められ、MT1-MMP の強制発現により N-カドヘリン

接着形成とともに抑制された。Rat1 と MT1-MMP の発現を抑制した HT1080 細胞を共培養することによっても、細胞間接触部位近傍の細胞接着斑上で 2 つの細胞をブリッジする形で FN の重合が起こることが判明した。この細胞間接触部位における FN の重合に続いて、N-カドヘリン接着形成が認められた。従って、FN マトリックスは、Rat1 と MT1-MMP の発現を抑制した HT1080 細胞の共培養でも形成された。一方、MT1-MMP がアクティブな HT1080 細胞では、Rat1 と接触しても細胞接着斑が細胞間接着部位とは反対側に形成され、FN の重合は起こらなかった(下図)。以上の結果から、MT1-MMP は細胞接着斑上における初期の FN の重合を抑制することにより N-カドヘリン接着の安定化と FN マトリックス形成を阻害し、結果的に腫瘍細胞の細胞運動と増殖を誘導することが示唆された。



2) PTEN 結合分子による MT1-MMP と細胞運動極性制御機構の解析

がん抑制遺伝子 Tip60 は、PTEN と結合することにより、PTEN の安定性と細胞質 - 核内移行を亢進することが判明した。また、

PTEN を欠失し MT1-MMP を発現している培養細胞で Tip60 を siRNA にてノックダウンすると、MT1-MMP の活性発現が増強され、細胞の接着性と浸潤能も亢進した。この詳細な分子機構について解析中である。

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 7 件)

1. Teng L, Nakada M, Furuyama N, Sabit H, Furuta T, Hayashi Y, Takino T, Dong Y, Sato H, Sai Y, Miyamoto KI, Berens ME, Zhao SG, Hamada JI. (2013) Ligand-dependent EphB1 signaling suppresses glioma invasion and correlates with patient survival. 査読有. **Neuro-Oncology**, 15: 1710-1720. doi: 10.1093/neuonc/not128.
2. Takino T, Guo L, Domoto T, Sato H. (2013) MT1-MMP prevents growth inhibition by three dimensional fibronectin matrix. 査読有. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 436: 503-508. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.134.
3. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Sai Y, Tsuji T, Miyamoto KI, Hirao A, Hamada JI. (2013) Integrin $\alpha 3$ is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. 査読有. **British Journal of Cancer**, 108: 2516-2524. doi: 10.1038/bjc.2013.218.
4. Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto K, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. (2013) Aberrant glycogen synthase kinase 3 β is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. 査読有. **PLoS One**, 8: e55289. doi: 10.1371/journal.pone.0055289.
5. Guo L, Takino T, Endo Y, Domoto T, Sato H. (2012) Shedding of kidney injury molecule-1 by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. 査読有. **Journal of Biochemistry**, 152: 425-432. doi: 10.1093/jb/mvs082.
6. Domoto T, Takino T, Guo LY, Sato H. (2012) Cleavage of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 by membrane-type MMP-1 activates matriptase. 査読有. **Cancer Science**, 103: 448-454. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02162.x.
7. Takino T, Nagao R, Manabe R, Domoto T, Sekiguchi K, Sato H. (2011) Membrane-type

1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly to promote cell motility. 査読有. **FEBS Letters**, 585: 3378-3384. doi: 10.1016/j.febslet.2011.09.039.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 滝野隆久、佐藤博「MT1-MMP は 3 次元ファイブロネクチンマトリックス由来の増殖抑制を回避する」第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. 滝野隆久、堂本貴寛、佐藤博「MT1-MMP による細胞接着ネットワークの制御」第 22 回日本がん転移学会学術総会、2013 年 7 月 11 日、ホテルブエナビスタ松本 (長野県)
3. 堂本貴寛、滝野隆久、源利成、佐藤博「HAI - 1 分解を介するセリンプロテアーゼ系の活性化は腫瘍細胞の遊走と浸潤能を亢進する」第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、ロイトン札幌 (北海道)
4. 滝野隆久、堂本貴寛、佐藤博「MT1-MMP による N-カドヘリン接着制御」第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、ロイトン札幌 (北海道)
5. 佐藤博、滝野隆久「MT1-MMP による HAI - 1 切断は細胞運動・浸潤に係るセリンプロテアーゼを活性化する」第 21 回日本がん転移学会学術総会、2012 年 7 月 13 日、オリエンタルホテル広島 (広島県)
6. 滝野隆久、堂本貴寛、佐藤博「MT1-MMP による N-カドヘリン接着の制御」第 21 回日本がん転移学会学術総会、2012 年 7 月 13 日、オリエンタルホテル広島 (広島県)
7. 滝野隆久、堂本貴寛、佐藤博「MT1-MMP によるファイブロネクチン重合制御」第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場 (愛知県)
8. 近野祐里、中田光俊、廣瀬まゆみ、北野綾子、宮下勝吉、藤沢弘範、林裕、滝野隆久、佐藤博、崔吉道、宮本謙一、川上和之、源利成「Glycogen synthase kinase (GSK) 3 は膠芽腫の浸潤を促進する」第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場 (愛知県)
9. 堂本貴寛、滝野隆久、佐藤博「MT1-MMP は HAI - 1 を切断することで Matriptase を活性化する」第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、名古屋国際会議場 (愛知県)

10. 滝野隆久、堂本貴寛、佐藤博「MT1-MMPによるファイブロネクチンの重合と集積抑制」第20回日本がん転移学会学術総会、2011年6月30日、アクトシティ浜松(静岡県)

11. 堂本貴寛、滝野隆久、佐藤博「MT1-MMPによるHAI-1切断を介したセリンプロテアーゼ系の制御」第20回日本がん転移学会学術総会、2011年6月30日、アクトシティ浜松(静岡県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/department/cb/04.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝野 隆久 (TAKINO TAKAHISA)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号: 40322119