

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440033

研究課題名(和文) 生体内機能分子の作用機序を応用した高特異性MMPインヒビターの開発

研究課題名(英文) Design of highly selective MMP inhibitors by coupling selective peptide inhibitors with physiological MMP-binding proteins

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・教授

研究者番号：10275076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) MMP-2に対し、高い阻害選択性を持つ10残基ペプチドインヒビターAPP-IPのアミノ酸配列を改変し、MMP-7、MMP-9およびMMP-14のそれぞれに対する選択性を高めたペプチドインヒビターを開発した。(2) さらに、MMP-9に対する選択性を高めたAPP-IP改変体と、MMP-9およびMMP-2の非触媒領域に対し親和性を持つTIMP-1とを組み合わせることで、MMP-9とMMP-2に対して、高い選択性を持ち、かつ強力なインヒビタータンパク質の設計に成功した。(3) がん細胞表面でMMP-7により、特異的に切断され、細胞凝集誘導に関わるタンパク質がHAI-1であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：(1) We developed peptide inhibitors with enhanced selectivity toward MMP-7, MMP-9 and MMP-14, respectively, by modifying the amino acid sequence of APP-IP, an MMP-2-selective decapeptide inhibitor. (2) We further designed a highly selective and strong protein inhibitor against MMP-9 and MMP-2 by combining the variant of APP-IP with enhanced MMP-9 selectivity and TIMP-1, which binds specifically to the non-catalytic domains of MMP-9 and MMP-2. (3) We identified hepatocyte growth factor activator inhibitor type I (HAI-1), a type I membrane protein, as a specific substrate of MMP-7 on cancer cell surface, and found that the extracellular domain of HAI-1 released by the MMP-7-catalyzed cleavage acts as a cell-adhesion protein.

研究分野：構造生物化学

キーワード：matrix metalloproteinase selective inhibitor APP-IP MMP-7 MMP-9 TIMP-1 HAI-1 細胞間接着

1. 研究開始当初の背景

悪性がんが高発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は、がんの浸潤性増殖や転移を支えることから、がん治療の分子標的として期待された。しかし、従来の MMP 阻害剤はいずれも特異性が低く、生体内に 20 種類以上存在する MMPs のうち、標的外の MMPs を阻害することで重篤な副作用を引き起こした。

私達は -アミロイド前駆体蛋白質 (APP) の細胞外領域に MMP-2 活性を阻害する活性が存在することを見出し、その領域を同定したところ、アミノ酸 10 残基からなる APP 分子内の一領域がインヒビターを形成することを見出した。この 10 残基ペプチドインヒビター (APP-IP と命名) は種々の MMPs のうち、がん治療の標的 MMPs の一つに分類される MMP-2 に対し、高い選択性を示した。また、APP-IP と MMP-2 触媒ドメインから成る複合体の結晶構造解析により、その阻害様式を調べた結果、APP-IP がどのようなメカニズムで MMP-2 選択性を発揮するのかが明らかになっていた。さらに、MMP-2 の非触媒領域と結合性を持つ TIMP-2 と APP-IP を融合することにより、高い特異性を持ち、かつ強力な MMP-2 インヒビタータンパク質 ($K_i = 0.7 \text{ pM}$) を創出することに成功した。

一方、MMP-7 は大腸がんの肝転移に深く関わることから、がん治療の標的 MMP に分類されるが、私達は、この MMP-7 が大腸がん細胞の細胞膜上に存在するコレステロール硫酸に結合すると、その基質特異性が変化するとともに、がん細胞の凝集誘導を介してその転移能を顕著に増強することを見出してきた。また、MMP-7 分子内のコレステロール硫酸結合部位、およびコレステロール硫酸による MMP-7 機能変換の分子メカニズムの解析を進める中で、MMP-7 と基質タンパク質の双方がコレステロール硫酸を介して細胞膜表層に濃縮されることで、特定の基質タンパク質の分解反応のみが著しく促進されることを見出した。このよ

うに個々の MMP の基質認識部位の構造は酷似しているものの、生体内では各 MMPs が、それぞれ他の分子と相互作用しつつ、特異性を発揮すると考えられた。

2. 研究の目的

前述の背景から、本研究では MMP-2 選択的インヒビターペプチドである APP-IP を改変することにより、MMP-2 以外の標的 MMP に対する阻害選択性を高めるとともに、これら改変 APP-IP を、それぞれの MMP が選択的に相互作用する生体内分子と組み合わせることで、標的 MMPs に対する高特異性インヒビターを創出することを目的とした。

一方、MMP-7 によるユニークながん転移促進機構を分子レベルで解明する目的で、がん細胞表層において MMP-7 に切断され、細胞凝集の誘導に關与するタンパク質の同定を試みた。

3. 研究の方法

これまでの成果から、APP-IP と MMP-2 間どの部位での相互作用が、選択性に寄与するのかが明らかになっていた。そこで、APP-IP を構成する 10 アミノ酸残基のうち、選択性に寄与する部位のアミノ酸残基を 20 種類のアミノ酸を網羅するようにランダムに変換し、その中から MMP-2 以外のがん関連 MMPs に対する親和性が上昇するアミノ酸残基を選別した。この操作を順次繰り返し、高い選択性を持つペプチドインヒビターを得ることを考えた。すなわち、酵素 (MMP) 側の基質認識部位 (=インヒビターペプチドが結合する部位) の立体構造に沿ってパズルのピースを一つずつ選択するようにインヒビター側のアミノ酸残基を選択し、そのピースの適合度を、親和性測定で調べつつ、インヒビターペプチドを目的 MMP に適合するように試験管内で進化させた。

具体的には、まず、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) に APP-IP のアミノ酸配

列を付加した融合タンパク質の発現ベクターを構築した。次に、APP-IP の酵素選択性に関与する部分のアミノ酸残基に相当する塩基配列にランダム変異を導入したプライマー（変異を入れようとするアミノ酸のコドン）を NNK とする。すなわち、4 種の塩基 ATGC を混合したもの(N)と 2 種の塩基 TG の混合物(K)を用いることで、20 種類のアミノ酸を網羅することができる)を設計し、上記 APP-IP-GST 融合タンパク質の発現ベクターを鋳型とした PCR 法により、APP-IP 部分の目的のアミノ酸残基の位置に 20 種類のアミノ酸を網羅する置換が導入された GST 融合タンパク質の発現ベクターを得た。これを大腸菌に導入後、得られるコロニーのそれぞれについて、融合タンパク質の発現誘導 SDS-PAGE リガンドプロット法による融合タンパク質の MMP 結合性の検出を行った。リガンドプロットのプローブとしては目的 MMP の触媒ドメインをビオチン標識したものを用い、アビジン酵素コンジュゲートを用いた既存の方法にてプローブと各融合タンパク質の結合量を測定した。

得られた融合タンパク質のうち、そのプローブ結合性(目的 MMP の触媒ドメインとの親和性)が変異導入前の融合タンパク質と比較して上昇しているクローンでは、アミノ酸置換によりインヒビターの活性が上昇したことを示唆する。これらのクローンの塩基配列を調べ、親和性上昇の原因となるアミノ酸置換を同定した。一つの部位のアミノ酸残基が決まれば、次の部位に同様の方法で変異を導入し、逐次選別した(図 1)。

4. 研究成果

(1) 上述の方法を用いて APP-IP のアミノ酸配列の改変を行った結果、MMP-7 と MMP-9 に対する選択性を高めたペプチドインヒビターを得た(図 1)。また、MMP-14 に対する阻害活性を高めたペプチドの創出にも成功し

た。

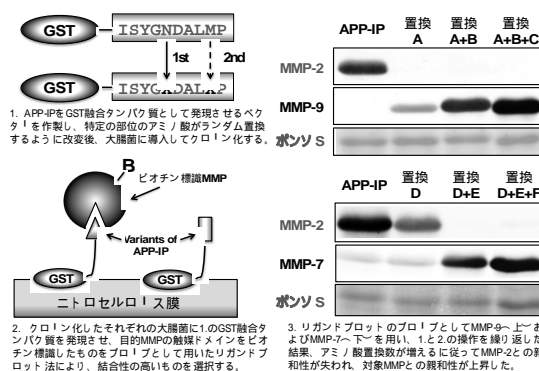


図 1 APP-IP のアミノ酸置換による MMP 選択性の変換

(2) 背景の項で述べたように、私達は APP-IP と TIMP-2 を融合することにより、MMP-2 に対して高い特異性を持つインヒビタータンパク質 APP-IP-TIMP-2 の創出に成功している。一方、TIMP-1 の C 末端部分は MMP-9 の非触媒ドメインと特異的に結合することが報告されており、MMP-9 に対する選択性を高めた改変 APP-IP を TIMP-1 と融合することで、MMP-9 に対する特異性がさらに高まるのではないかと考えた。そこで、この融合タンパク質を作製し、各種 MMPs に対する阻害活性を調べたところ、MMP-9 活性を強力に阻害する ($K_i = 2.0 \text{ pM}$) ことを見出した。しかし、過去の報告とは異なり、TIMP-1 が MMP-2 の非触媒領域とも親和性を持つことが判明し、この融合タンパク質は MMP-2 に対しても強い阻害活性を示した ($K_i = 3.2 \text{ nM}$)。現在、この融合タンパク質の TIMP-1 部分を改変することにより、MMP-9 選択性を高めたインヒビターの分子設計を試みている。また、MMP-7 に関してはこの酵素の二量体形成を利用したインヒビターの作製に成功した。

一方、MMP-14 に関しては、この MMP と親和性を持つことが報告されている MT1-AF7p というペプチドや CD44 のコアタンパク質との親和性が確認できず、融合タンパク質の作製に至らなかった。

(3) がん細胞表面において MMP-7 によって切断されるタンパク質を同定する目的で、がん細胞表面のタンパク質をビオチン標識した後、MMP-7 処理を行い、培養液中に切出されたタンパク質を調べた結果、45 kDa のビオチン標識

断片が、MMP-7処理後に特異的に細胞外へ放出されることを見出した。この45 kDa 標識断片を固定化アビジンカラムで回収し、SDS-PAGEで分離後、トリプシン消化 LC-MS/MS解析を行った結果、この断片が Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1)の細胞外領域に由来することを同定した。また、HAI-1の細胞外領域をリコンビナントタンパク質として調製し、その細胞凝集誘導活性を調べた結果、ある処理を施したがん細胞に対して細胞凝集誘導活性を持つことが明らかになった。

さらに、細胞凝集誘導活性を持つHAI-1分子内の最小構造単位を明らかにする目的で、HAI-1の持つ各ドメインを欠損させた種々のバリエーションを作製し、それらの細胞凝集誘導活性を調べた。HAI-1の細胞外領域には多くの分子内ジスルフィド結合(S-S結合)が含まれるため、各バリエーションはヒト細胞(HEK293細胞)に強制発現・分泌させ、その培養上清から精製した。その結果、調製可能であった全てのHAI-1バリエーションにおいて細胞凝集誘導活性が確認された。興味深いことに、HAI-1のアミノ酸配列中、141-249に相当する部分を欠くバリエーションはいずれも分泌されなかったことから、この領域がHAI-1の細胞外への輸送に重要であることが示唆されるとともに、細胞凝集誘導活性にも重要である可能性が考えられた。そこで、分子内ジスルフィド結合を含まないHAI-1(141-249)を大腸菌の菌体内に封入体として発現させた後、リフォールディングにより調製し、活性を調べた結果、この領域が細胞凝集誘導活性を持つことが明らかになった。本成果はHAI-1を分子標的としたがん転移抑制剤開発に繋がるものと考えられる。

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)

Yusuke Kakei, Chiaki Yamazaki, Masashi Suzuki, Ayako Nakamura, Akiko Sato, Yosuke Ishida, Rie Kikuchi, Shouichi Higashi, Yumiko Kokudo, Takahiro Ishii,

Kazuo Soeno, and Yukihisa Shimada: Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *Plant J.* 査読有 **84**, 827-837, 2015

Hiroki Sato, Shouichi Higashi, and Kaoru Miyazaki: Amino-terminal fragments of laminin γ 2 chain stimulate migration of metastatic breast cancer cells by interacting with CD44. *Clin. Exp. Metastasis* 査読有 **32**, 405-415, 2015

Kazuhiro Yamamoto, Kaoru Miyazaki, and Shouichi Higashi: Pericellular proteolysis by matrix metalloproteinase-7 is differentially modulated by cholesterol sulfate, sulfatide, and cardiolipin. *FEBS J.* 査読有 **281**, 3346-3356, 2014

Jun Oyanagi, Nako Kojima, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Keiji Kikuchi, Katsuya Sakai, Kunio Matsumoto, and Kaoru Miyazaki: Inhibition of transforming growth factor- β signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. *Exp. Cell Res.* 査読有 **326**, 267-279, 2014

Eriko Komiya, Hiroki Sato, Naoko Watanabe, Marii Ise, Shouichi Higashi, Yohei Miyagi, and Kaoru Miyazaki: Angiomodulin, a marker of cancer vasculature, is upregulated by vascular endothelial growth factor and increases vascular permeability as a ligand of integrin α v β 3. *Cancer Med.* 査読有 **3**, 537-549, 2014

Go Kamoshida, Takashi Ogawa, Jun Oyanagi, Hiroki Sato, Eriko Komiya, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki, and Tsutomu Tsuji: Modulation of matrix metalloproteinase-9 secretion from tumor-associated macrophage-like cells by proteolytically processed laminin-332 (laminin-5). *Clin. Exp. Metastasis* 査読有 **31**, 285-291, 2014

Hiroki Sato, Jun Oyanagi, Eriko Komiya, Takashi Ogawa, Shouichi Higashi, and Kaoru Miyazaki: Amino-terminal fragments of laminin γ 2 chain retract vascular endothelial cells and increase vascular permeability. *Cancer Sci.* 査読有 **105**, 168-175, 2014

[学会発表](計17件)

近藤 優希、東 昌市 : 癌転移を支える MMP-7に対し、高い阻害選択性を持つインヒビターペプチドの開発。BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会)(神戸)、2P1075、2015年12月1-4日

佐々木 祐太、東 昌市 : MMP-14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。BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会)

会・合同大会(神戸) 4T18L-12、3P1089、2015年12月1-4日
石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市 : MMP-7による切断を受けた後、細胞間接着の誘導に關与するHAI-1分子内領域の同定。BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会(神戸) 3T18p-12、3P1059、2015年12月1-4日
佐々木 祐太、東 昌市 : MT1-MMPに対して高い阻害活性・選択性を併せ持つペプチドインヒビターの開発。第20回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(名古屋)、演題番号25、2015年8月21-22日 Young Investigators Award 受賞
近藤 優希、東 昌市 : 癌の浸潤、転移を支えるMMP-7に対し、高い選択性を持つインヒビターペプチドの開発。第20回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(名古屋)、演題番号11、2015年8月21-22日 Young Investigators Award 受賞
石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市 : 可溶性HAI-1の細胞間接着活性部位の同定。第20回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(名古屋)、演題番号10、2015年8月21-22日
得津 奏子、菅原 経継、井野 洋子、倉田 洋一、木村 弥生、東 昌市、平野 久 : ヒト26Sプロテアソームサブユニットのリン酸化修飾状態の解析。第65回日本電気泳動学会総会・シンポジウム(横浜)、P-8、2014年10月24-25日 優秀ポスター賞受賞
石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市 : がん細胞表層に結合したMMP-7によって切断され、細胞凝集を惹起するタンパク質の同定。第87回日本生化学会大会(京都)、2T15a-12、2P-399、2014年10月15-18日 若手優秀発表賞受賞
佐野 未奈、東 昌市 : 高特異性MMP-2インヒビターのがん細胞浸潤抑制効果と血管新生に及ぼす効果。第87回日本生化学会大会(京都)、2P-396、2014年10月15-18日
石川 智弘、東 昌市 : MMP-7により切断修飾を受ける細胞表層タンパク質の同定。第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(大阪)、演題番号9、2014年8月8-9日 Young Investigators Award 受賞
佐野 未奈、東 昌市 : がん細胞浸潤および血管内皮細胞増殖に及ぼす高特異性MMP-2インヒビターの効果。第36回日本血栓止血学会(大阪)、演題番号0-112、P-032、2014年5月29-31日 優秀ポスター発表賞受賞
佐藤 拓輝、東 昌市 : がん浸潤マーカー・ラミニン2鎖の血管内皮下浸潤活性とその機構。第36回日本血栓止血学会(大阪)、演題番号0-113、P-033、2014年5月29-31日

佐野 未奈、東 昌市 : 極めて特異性の高いMMP-2インヒビタータンパク質の分子設計とそのin vitroがん細胞浸潤に及ぼす効果の解析。第18回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(大阪)、演題番号23、2013年8月16-17日 Young Investigators Award 受賞
佐野 未奈、小柳 潤、宮崎 香、東 昌市 : 3次元浸潤モデル系を用いたMMP-2特異的インヒビターのがん細胞浸潤抑制効果の解析。第86回日本生化学会大会(横浜) 演題番号 1T10p-10 および 2P-396、2013年9月11-13日
鴨志田 剛、小川 崇、小柳 潤、佐藤 拓輝、古宮 栄利子、東 昌市、宮崎 香、斧康雄、辻 勉 : 細胞外マトリックスタンパク質ラミニン-332による単球からのマトリックスプロテイナーゼ-9産生調節。第86回日本生化学会大会(横浜) 演題番号 1T11p-12 および 1P-178、2013年9月11-13日
佐藤拓輝、東 昌市、宮崎 香 : ラミニン2鎖による血管透過性亢進は、N末端部EGF様リピートのヘパリン結合部に依存する。第72回日本癌学会学術総会(横浜)、P-1184、2013年10月3-5日
小柳 潤、東 昌市、菊地 慶司、酒井 克也、松本 邦夫、宮崎 香 : TGF- β 阻害剤はin vitroにおいて線維芽細胞のHGF産生の亢進を介してがん細胞の浸潤を促進する。第72回日本癌学会学術総会(横浜)、P-1184、2013年10月3-5日

〔図書〕(計1件)

東 昌市 : アミロイド前駆体タンパク質分子内に見出されたMMP-2インヒビター領域の選択性発現機構とその応用。Mechanism of MMP-2-selective inhibitory action of β -amyloid precursor protein-derived inhibitor and its application to design specific inhibitors against individual MMPs. 日本血栓止血学会誌第26巻第6号 P647-657, 2015年12月

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

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

取得年月日：国内：2014 年 11 月 21 日

米国：2014 年 8 月 12 日

国内外の別：国内および米国

〔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・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

佐藤 衛 (SATO MAMORU)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：60170784

橋本 博 (HASHIMOTO HIROSHI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：40336590