

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460382

研究課題名(和文) 膜型マトリックスメタロプロテアーゼによるセリンプロテアーゼ活性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of serine protease activation by membrane-type matrix metalloproteinase

研究代表者

佐藤 博 (Sato, Hiroshi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：00115239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜型マトリックスメタロプロテアーゼ(MT1-MMP)が膜型のセリンプロテアーゼ阻害分子HAI-1(Hepatocyte Growth Factor Inhibitor-1)を切断・不活化することにより膜型のセリンプロテアーゼであるマトリプターゼを活性化し、その結果セリンプロテアーゼ活性化カスケードが始動することによりプロテアーゼ活性が異常に亢進した状態(Protease Storm)を引き起こすことを見出した。プロテアーゼ活性の亢進は上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)を誘導し、がんの悪性化に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Membrane-Type Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) was shown to cleave and inactivate membrane-type serine protease inhibitor HAI-1(Hepatocyte Growth Factor Inhibitor-1), which subsequently induced activation of matriptase. Activated matriptase induced further activation of serine protease cascade, which was named "Protease Storm". Protease storm caused Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in cancer cells. These results indicate that MT1-MMP contributes to malignant transformation of cancer cells by triggering protease activation cascade.

研究分野：腫瘍分子生物学

キーワード：がん転移 マトリックスメタロプロテアーゼ MT1-MMP HAI-1 セリンプロテアーゼ MMP-9

1. 研究開始当初の背景

(1) MT1-MMP の多機能性とがん悪性化:

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)は基底膜分解によるがん浸潤・転移の促進、炎症性疾患などの組織破壊を伴う病態に重要な役割を果たしている。特に申請者らの同定した膜型 MMP (MT1-MMP)は、がん組織での発現レベルが悪性度とよく相関する。しかし、組織破壊に関わる様々なプロテアーゼとの関連については未だ不明の点が多い。

(2) MT1-MMP によるプロテアーゼ活性化:

組織破壊には MMP、セリンプロテアーゼなど多くのプロテアーゼが関与する。一般にプロテアーゼは前駆体(Zymogen)として産生された後、活性化因子(プロテアーゼ)による活性化を受ける。病変部では MMP のみならず、セリンプロテアーゼ系も活性化され、組織破壊に関わっている。膜型セリンプロテアーゼであるマトリプターゼは通常はその阻害因子である HAI-1 (HGF Activator Inhibitor-1)により厳格に制御されているが、がん組織では強く活性を發揮し、がんの悪性化に関与している。しかしそのメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

(1) MT1-MMP とセリンプロテアーゼ等との協調作用による細胞運動・浸潤機構の解析:

MT1-MMP とマトリプターゼ等との協調作用による運動・浸潤・シグナル伝達の制御機構を分子・細胞レベルで明らかにする。

(2) プロテアーゼカスケード活性化機構と生理的意義の解析:

組織破壊を引き起こすプロテアーゼカスケード活性化の分子機構の解析と関連するプロテアーゼ・阻害因子などを同定すると共にその生理・病理的意義を解明する

(3) MT1-MMP の新規機能の解明:

MT1-MMP による他の MMP およびセリンプロテアーゼに対する活性化の可能性を検討する。

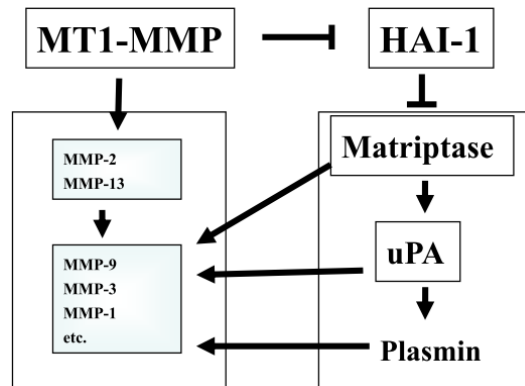
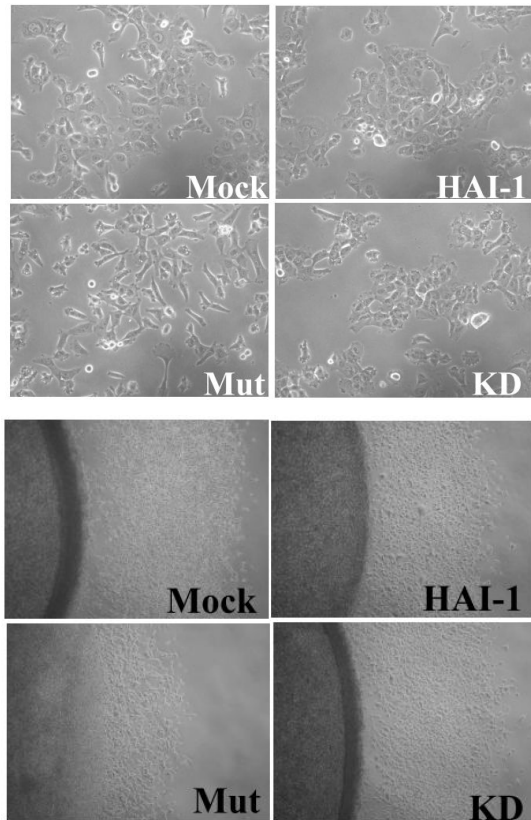
3. 研究の方法

(1) プロテアーゼ及び関連分子を small Interfering RNA (siRNA)にてノックダウンし、細胞増殖、浸潤能への影響を検討する。(2) HAI-1 の各種変異体を作成し、浸潤・転移に対する影響を検討する。MT1-MMP の新規プロテアーゼ活性化系の可能性を改良ゼラチンザイモグラフィー法により検討する。

4. 研究成果

(1) HAI-1 の MT1-MMP により切断を受けない変異体 (Mut) を繊維肉腫由来の HT1080 細胞に発現させたところ、細胞形態が顕著に変化すると共にコラーゲンゲルの分解、浸潤能が著しく低下した。よって、HT1080 細胞においてもセリンプロテアーゼが形態、浸潤能に大きく関わっていることが判明した。

(2) 浸潤・転移に重要な MT1-MMP の発現調節機構を解明する過程で、Tip60 分子が ERK 経



路を介して MT1-MMP 遺伝子の転写制御に関与することを明らかにした。

(3) 金沢大学がん進展制御研究所の大島教授との共同研究によりマウス大腸がん発症過程で MT1-MMP と未同定のセリンプロテアーゼの発現が亢進していることを見出した。

(4) MT1-MMP による新規プロテアーゼ活性化系を検索する過程で、MT1-MMP が長年にわたり不明であった MMP-9 の活性化にも関与することが明らかになった。

以上を総合して、MT1-MMP はプロテアーゼ活性化カスケードをトリガーすることによりがんの浸潤・転移を亢進すると結論した。

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 11 件)

Yoshikawa A, Nakada M, Watanabe T, Hayashi Y, Sabit H, Kato Y, Suzuki S, Ooi A, Sato H, Hamada JI. Progressive adult primary glioblastoma in the medulla oblongata with an unmethylated MGMT promoter and without an IDH mutation: A case report Brain Tumor Pathol. (査読有) 30, 175-179, 2013.

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. Aberrant glycogen synthase kinase 3 β is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. (査読有) PLoS One, 8, 2013.

Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Sai Y, Tsuji T, Miyamoto KI, Hirao A, Hamada JI. Integrin $\alpha 3$ is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. Br J Cancer. (査読有) 108, 2516-2024, 2013.

Abe H, Mochizuki S, Ohara K, Ueno M, Ochiai H, Kitagawa Y, Hino O, Sato H, Okada Y. Src plays a key role in ADAM28 expression in v-src-transformed epithelial cells and human carcinoma cells. Am J Pathol. (査読有) 185, 1667-1678, 2013.

Takino T, Yoshimoto T, Nakada M, Li Z, Domoto T, Kawashiri S, Sato H. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly and N-cadherin adhesion. Biochem Biophys Res Commun. (査読有) 450, 1016-1020, 2014.

Yoshimoto T, Takino T, Li Z, Domoto T, Sato H. Vinculin negatively regulates transcription of MT1-MMP through MEK/ERK pathway. Biochem Biophys Res Commun. (査読有) 455, 251-255, 2014.

Sabit H, Nakada M, Furuta T, Watanabe T, Hayashi Y, Sato H, Kato Y, Hamada J.

Characterizing invading glioma cells based on IDH1-R132H and Ki-67 immunofluorescence. Brain Tumor Pathol. (査読有) 31, 242-246, 2014.

Chikano Y, Domoto T, Furuta T, Sabit H, Kitano-Tamura A, Pyko IV, Takino T, Sai Y, Hayashi Y, Sato H, Miyamoto K, Nakada M, Minamoto T. Glycogen Synthase Kinase 3b Sustains Invasion of Glioblastoma via the Focal Adhesion Kinase, Rac1, and c-Jun N-Terminal Kinase-Mediated Pathway. Molecular Cancer Therapeutics 14, 564-574, 2015.

Oshima H. Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo MM, Oshima M. Suppressing TGF β signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. Cancer Res. (査読有) 75, 766-776, 2015.

Takino T, Nakada M, Li Z, Yoshimoto T, Domoto T, Sato H. Tip60 regulates MT1-MMP transcription and invasion of glioblastoma cells through NF- κ B pathway. Clinical & Experimental Metastasis (査読有), 33, 45-52, 2016. (DOI:10.1007/s10585-015-9756-8)

Nakaoka HJ, Hara T, Yoshino S, Kanamori A, Matsui Y, Sato H, Murakami Y, Seiki M, Sakamoto T. NECAB3 promotes activation of hypoxia-inducible factor-1 during normoxia and enhances tumorigenicity of cancer cells. Sci Rep. (査読有) 印刷中. doi:10.1038/srep22784.

〔学会発表〕(計 14 件)

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 21 回日本がん転移学会総会 (平成 25 年 7 月 11 日 松本)

望月早苗, 阿部任, 尾原健太郎, 落合大樹, 北川雄光, 樋野興夫, 佐藤博, 岡田保典 「Src は ADAM28 の発現に重要な役割を果たす」 第 7 2 回日本癌学会学術総会

(平成25年10月4日 横浜)

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72回日本癌学会学術総会(平成25年10月3日 横浜)

宇都 義浩, 遠藤良夫, 佐藤博

「Akt/Protein Kinase B を標的とした抗転移性低酸素サイトトキシン TX-2137 の開発」第72回日本癌学会学術総会(平成25年10月5日 横浜)

滝野隆久、吉本泰祐、佐藤博

「MT1-MMP による細胞接着斑を介したフィブロネクチンマトリックス形成制御」第73回日本癌学会学術総会(平成26年9月27日 横浜)

芝一休、遠藤良夫、佐藤博、宇都義浩

「TX-2137 をリード化合物とした Akt 選択的抗転移低酸素サイトトキシン TX-2282 の開発」第73回日本癌学会学術総会(平成26年9月27日 横浜)

大島浩子、中山瑞穂、佐藤博、武藤誠、大島正伸「慢性炎症と TGF b シグナル抑制による消化管腫瘍の浸潤誘導」第73回日本癌学会学術総会(平成26年9月25日 横浜)

滝野隆久、佐藤博「MT1-MMP によるフィブロネクチン重合と N-カドヘリン接着の制御」第23回日本がん転移学会学術総会(平成26年7月10日 金沢)

吉本泰祐、滝野隆久、堂本貴寛、川尻秀一、佐藤博「Vinculin は MEK/ERK 経路を介した MT1-MMP の転写を不に制御する」日本がん転移学会学術集会(平成27年7月23日 大阪)

堂本貴寛、滝野隆久、佐藤博、源利成「GSK3 b は FAK-R は c 1 - JNK 経路を介して膠芽腫細胞の浸潤を推進する」日本がん転移学会学術集会(平成27年7月23日 大阪)

大島浩子、中山瑞穂、佐藤博、

武藤誠、大島正伸「炎症反応と TGF b シグナル抑制による大腸がん浸潤誘導」第74回日本癌学会学術総会(平成27年10月8日 名古屋)

堂本貴寛、古田拓也、滝野隆久、佐藤博、中田光俊、源利成「GSK3 b は FAK/JNK 経路を介する MMP s の発現亢進によって膠芽腫細胞の浸潤を推進する」第74回日本癌学会学術総会(平成27年10月9日 名古屋)

吉本泰祐、滝野隆久、堂本貴寛、川尻秀一、佐藤博「Vinculin は MEK/ERK 経路を介した MT1-MMP の転写を不に制御する」第74回日本癌学会学術総会(平成27年10月9日 名古屋)

滝野隆久、中田光俊、堂本貴寛、佐藤博「Tip60 は NF- k B 経路を介して膠芽の MT1-MMP 発現と浸潤を制御する」第74回日本癌学会学術総会(平成27年10月9日 名古屋)

〔図書〕(計 1 件)

佐藤 博

「教えてエコ実験 RETURNS: スケールダウンでコストダウン&効率アップ」

実験医学 Vol.33、2652 - 2656、2015.

〔その他〕

ホームページ等

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 博 (SATO Hiroshi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号: 00115239