

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ(MT-MMP)発現細胞による細胞外基質の分解

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9307

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMP) 発現細胞による 細胞外基質の分解

金沢大学がん研究所腫瘍分子科学研究部門細胞機能統御研究分野 (主任: 清木元治教授)

芝 原 一 繁

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane-type matrix metalloproteinase, MT-MMP) は高頻度にヒト癌組織に発現し 72kDa-IV型コラゲナーゼ (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) の活性化因子として癌の浸潤・転移に重要な役割を果たすとされている。本研究では細胞培養系を用いて MT-MMP 発現細胞による細胞外基質分解, 細胞浸潤の機構を解析した。これまでに知られている3種類の MT-MMP (MT-1-MMP, MT-2-MMP, MT-3-MMP) 発現細胞株を樹立化しそれらのコラーゲン分解・浸潤能を検討したところ MT-1-MMP 発現細胞は強い分解活性を示したが他の発現細胞は弱い活性しか示さなかった。MT-1-MMP 発現細胞によるコラーゲン分解は MMP 特異的阻害剤である BB94 により完全に抑制された。一方これらの細胞による合成ペプチド基質およびゼラチン分解活性を検討したところコラーゲン分解活性とよい相関関係を示した。また MT-1-MMP の膜貫通領域の機能を検討するためにこの領域を欠質した変異体 Δ MT-1-MMP 発現細胞を樹立化し MT-1-MMP 発現細胞と比較したところ Δ MT-1-MMP 発現細胞は著しく弱いコラーゲンおよびゼラチン分解活性しか示さなかったが合成ペプチド基質に対しては MT-1-MMP 発現細胞に近い活性を有していた。したがって MT-1-MMP によるコラーゲン, ゼラチンなどの高分子基質の分解には MT-1-MMP が膜貫通構造を介して細胞膜上の特定の領域に局在する必要があることが示唆された。また MT-1-MMP によるゼラチン分解は MMP 阻害因子 (tissue inhibitor of metalloproteinases-2, TIMP-2) によって抑制されたが TIMP-1 では阻害されなかったことから, MT-1-MMP によって活性化された MMP-2 よりむしろ MT-1-MMP 自身の酵素活性がこの分解に関与することが示唆された。

Key words membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP), collagen gel, type I gelatin, fluorescent peptide substrate

癌細胞が周辺組織へ浸潤し, 転移が成立するためには複雑なステップをクリアしなければならない¹⁾。とりわけ細胞外マトリックス (extracellular matrix) の一形態である基底膜の破壊が不可欠である。基底膜はIV型コラーゲンを骨格構造とし, ラミニン, ヘパラン硫酸, プロテオグリカンなどから構成される。したがって癌細胞が周辺組織に浸潤, 転移する過程においてこのIV型コラーゲンの分解が重要である^{2)~4)}。

このIV型コラーゲンの分解を担うのがマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) の中のIV型コラゲナーゼである。IV型コラゲナーゼにはゼラチナーゼA (72kDa-IV型コラゲナーゼ/MMP-2) とゼラチナーゼB (92kDa-IV型コラゲナーゼ/MMP-9) の2種類が知られているが, なかでも特に MMP-2 が癌の浸潤・転移に重要な役割を果たすと考えられている⁵⁾⁶⁾。他の全ての MMP と同様に MMP-2 は酵素活性を持たない潜在型酵素として細胞より分泌され, 癌細胞表面に局在する膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane type-MMP, MT-MMP) によって活性化される⁷⁾。

現在までに機能的な MT-MMP として3種類の遺伝子 (MT-1, 2, 3-MMP) がクローニングされており^{8)~10)}, それらのアミノ酸配列は相互に約50%の相同性を有している。この酵素は他の分泌型 MMP には存在しない細胞膜貫通領域をカルボキシ末端部に持ち, この領域を介して細胞膜表面に局在する¹¹⁾。

MT-MMP は MMP 阻害因子 (tissue inhibitor of metalloproteinases-2, TIMP-2) を介して MMP-2 と結合し3量体を形成することにより効率よく MMP-2 を活性化する¹²⁾¹³⁾。また MT-MMP は癌細胞の浸潤性偽足 (invadopodia) に局在し細胞浸潤のための細胞外基質分解に関与する¹⁴⁾。

本研究では3種類の MT-MMP の細胞外基質分解能および浸潤能を比較検討し, さらに MT-MMP の細胞膜貫通領域の機能をその欠失変異体を用いて検討した。

対象および方法

I. 細胞培養

1. 使用細胞とその培養条件

平成10年3月31日受付, 平成10年4月22日受理

Abbreviations: BES, N, N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid; BSA, bovine serum albumin; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; MMP, matrix metalloproteinases; MT-MMP, membrane-type matrix metalloproteinase; PBS, phosphate-buffered saline; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; TBS, Tris-buffered saline

使用した細胞はヒト胃癌由来細胞 KKLS, イヌ腎上皮細胞 MDCKである。細胞は10%牛胎仔血清 (fetal calf serum, FCS, Hyclone, Utah, USA), 0.2mg/ml カナマイシン (和光, 大阪: 以下特に記載の無い場合は当社の製品を用いた) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (日水, 東京) にて37°C, 5% CO₂存在下で培養した。

II. 培養細胞における MT-MMP の発現

1. MT-MMP発現ベクターの構築

発現ベクターは pCEP4 (Invitrogen, De Schelp, Netherlands) を用いた。このベクターは、ヒトサイトメガロウイルスの強力なプロモーターを有し、Epstein-Barr ウイルスの複製開始点、その複製調節因子である EBNA-1 をもち核内の染色体外での複製が可能であり、持続高発現細胞株を得るのに適している。また、この発現ベクターにはハイグロマイシン耐性遺伝子が含まれており、ハイグロマイシンを含む選択培地にて遺伝子導入細胞を選択することが可能である (図1A)。このベクターに、図1Bに示す切断部位で切り出される MT-1, 2, 3-MMPcDNA をそ

のマルチクローニングサイトに組み込み発現プラスミドとした (図1B)。細胞膜貫通領域を欠失した△MT-1-MMP発現プラスミドは MT-1-MMPcDNA の536番目のアラニンをストップコドンに置換することによって作製した。

2. プラスミドの大量調整

II-1. で得られたプラスミドで形質転換された大腸菌 XL1-Blue 株を 2xYT 培地 [トリプトン (半井, 京都) 16g, 酵母エキス (半井) 10g, 塩化ナトリウム (NaCl) 5g, アンピシリン (和光, 大阪) 50 µg/l, pH7.6] 250ml にて 37°C, 12時間培養した。培養終了後、遠心にて集菌し、沈殿を [50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNase (Sigma, St. Louis, USA), pH8.0] 10ml で懸濁した。懸濁液にアルカリ溶液 [200mM 水酸化ナトリウム (NaOH), 1% SDS] 10ml を加えて室温で5分間放置して菌を溶解した。この混合液に3M 酢酸カリウム, pH 5.5 を10ml 加え、10分氷冷して液を中性化し、遠心して沈殿を除去した後、上清に10mg/ml RNase を150 µl 加え、37°C, 30分間 RNA を消化した後、QIAGEN-tip P 500 (QIAGEN, Chatsworth, USA) カラムに重層した。プラスミドDNAが吸着したカラムを1M NaCl, 50mM 3-N-モルホリノ-プロパンスルホン酸, 15% エタノール, pH7.0 にて2回洗浄後、1.25M NaCl, 50mM Tris-HCl, 15% エタノール, pH8.5 にてプラスミドDNA を溶出した。プラスミドDNA 溶出液に等量のイソプロパノールを加えて良く混和し、3,000rpm, 30分遠心してプラスミドを沈殿させた。プラスミドの沈殿を Tris EDTA (TE) 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) で1mg/ml の濃度に溶解した。

3. 培養細胞への遺伝子導入

培養細胞 (KKLS 細胞, MDCK 細胞) を 35mm プラスチックディッシュ (FALCON, New Jersey, USA) に約 1.0×10^5 個/ml の濃度で5% FCS 加 DMEM 2ml にて 37°C, 24時間培養後、Chenら¹⁵⁾ のリン酸カルシウム法変法にて遺伝子導入を行った¹⁶⁾。即ち、プラスミドDNA 2.0 µg を 0.25M 塩化カルシウム (CaCl₂) 100 µl に混和し、その混合液に2倍濃度 N, N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノ-エタンスルホン酸 [N, N-bis (2-hydroxyethyl)-2-amino-ethanesulfonic acid, BES] 緩衝液 (280mM NaCl, 50mM BES, 2.8mM リン酸水素二ナトリウム, pH7.9) 100 µl を加え、室温で20分間、次に37°C室温で10分間静置した後、上記培養細胞に加え CO₂ 濃度3% の条件下にて 37°C, 24時間培養した。培養後、ハンクス液 (Hanks balanced salt solution) にて2回洗浄し、5% FCS 加 DMEM 2ml で 37°C で培養した。

4. 持続高発現細胞株の樹立

遺伝子導入後72時間後に培養液をハイグロマイシン B (和光) 200 µg/ml を含む選択培地に変え、約2週間培養することにより遺伝子導入細胞を得た。MT-1-MMP 遺伝子の発現、酵素活性を以下の方法で確認した。

5. ゼラチンザイモグラフィ

培養細胞を 35mm プラスチックディッシュ (FALCON) に約 1.0×10^5 個/ml の濃度で5% FCS 加 DMEM 2ml にて 37°C, 24時間培養し、その後培養液を除去し、ハンクス液にて2回洗浄し、無血清 DMEM, もしくは10% FCS 加 DMEM を1ml 加え、24時間培養後の培養上清を試料とした。試料を試料溶解液 [50mM Tris-HCl, pH6.5, 10% グリセロール, 2% SDS, 0.1% プロモフェノールブルー (bromophenol blue, BPB)] と等量混和し、37°C で30分加温した後、0.1% ゼラチンを含む10% ポリ

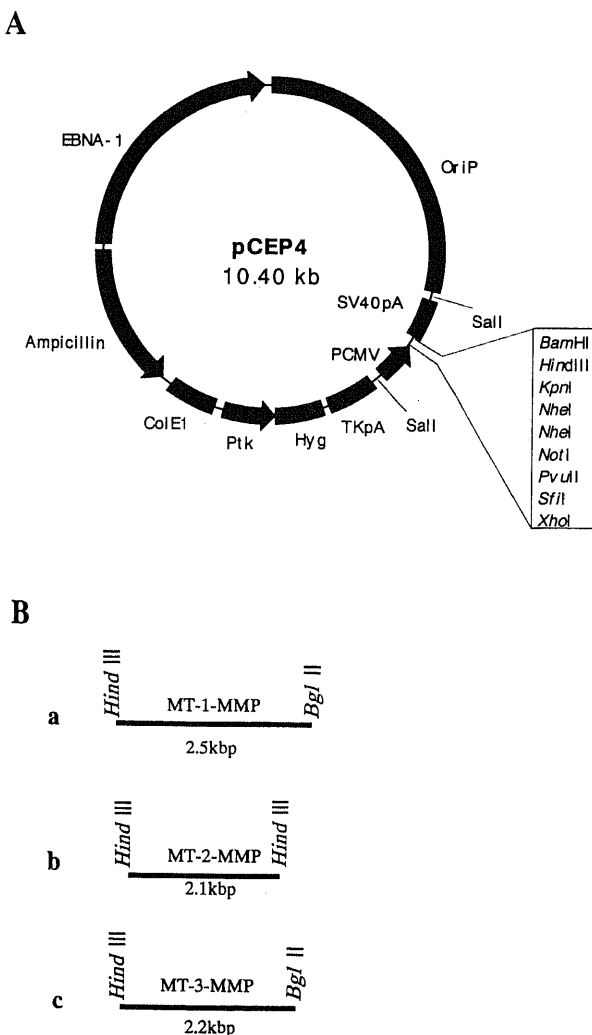


Fig. 1. Construction of expression vectors. (A) pCEP4 vector. (B) MT-MMP cDNA. MT-1-MMP cDNA (a), MT-2-MMP cDNA (b), MT-3-MMP cDNA (c) fragments were inserted into the multiple cloning site at the indicated restriction sites.

アクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った。泳動終了後、ゲルを2.5%トライトンX100にて30分間室温で2回洗浄し、その後ゼラチナーゼ反応液 [50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 0.02%アジ化ナトリウム (NaN₃)] にて37°C, 24時間反応させた。反応後、ゲルを染色液 [30%メタノール, 10%酢酸, 0.3%コームスブリリアントブルー-G-250 (Sigma Chemical, St. Louis, USA)] にて室温で5時間染色し、30%メタノール, 10%酢酸にて脱色して観察した。

III. 遺伝子導入細胞におけるMT-MMPの発現

1. 細胞溶解液の調整

II-4.で得られた細胞を冷却したPBSで2回洗浄した後、ラバーポリスマンにて回収し、細胞懸濁液を4°C, 1000rpm, 5分間遠心して細胞を集め、細胞溶解液 [50mM Tris-HCl, pH7.4, 5mM EDTA, 50mM NaCl, 2.25mM Dithiothreitol, 0.02%アジ化ナトリウム (NaN₃), 0.5%ノニデット (Nonidet P-40), 5μg/mlフッ化フェニルメチルスルホニル (phenylmethylsulfonyl fluoride) とともにDounce型ホモジナイザー (WHEATON, MILLVILLE, USA) にて細胞を破碎した。細胞溶解液を4°C, 10,000rpm, 30分間遠心し、不溶物を除去した。

2. ウェスタンブロット法

III-1.で得たタンパク量として20μgを含む細胞溶解液をII-5.の試料溶解液で溶解し、SDS-PAGEを行った。泳動後のゲルをハイボンド-ECLフィルター (Amersham, Buckinghamshire, UK) に転写し、トリス緩衝化生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) 加3%牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) にて室温で1時間ブロッキングした。続いて、フィルターを抗MT-MMP抗体を5μg/ml含むTBS-3%BSAにて室温で12時間反応させた。反応後、フィルターをリン酸緩衝化生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS)-3%スキムミルク (Gibco, Detroit, USA) で洗浄して西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase) 結合抗IgG (Cappel, West Chester, USA) 5μg/mlを含むPBS-3%スキムミルクで室温にて1時間反応させた。フィルターをPBS-3%スキムミルクで洗浄した後、ECL ウェスタンブロット検知液 (Amersham) で反応させ、1分間感光フィルムへ露光した。

IV. 培養細胞におけるコラーゲンゲルへの浸潤能の評価

1. コラーゲンゲルの作成

7容のセルマトリックス タイプI-A (新田ゼラチン, 大阪), 2容のNaHCO₃を含まない5xDMEM, 1容のコラーゲン・ゲル再構成用緩衝溶液 [2.2% NaHCO₃, 200mM HEPES, 0.05N NaOH] を水中でよく混和し、12穴マイクロプレート (イワキガラス, 千葉) に1ウェルあたり1ml分注し、37°C, 30分間加温することによりゲル化させた。

2. 細胞培養法

KKLS細胞においては、IV-1.で作成したコラーゲンゲル上に1.0×10⁴/ml個に調整した細胞懸濁液を1ml重層し、37°C, 5%CO₂存在下で1週間培養を続けた。この間培養液は2-3日に1回交換した。

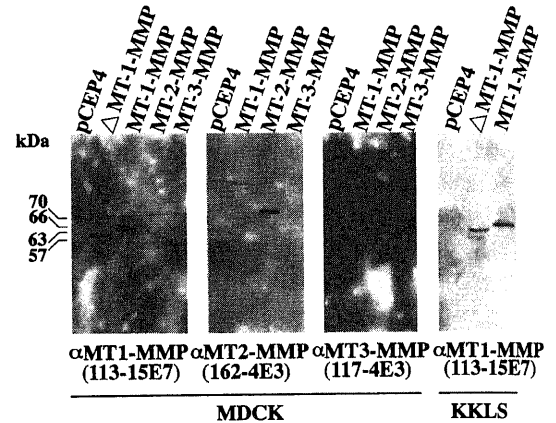
MDCK細胞においては、1ウェルあたり5.0×10⁴個の細胞をIV-1.で作成したコラーゲンゲル1mlに懸濁し、37°C, 30分間加温しゲル化させた後、培養液を1ml重層し、同様に37°C, 5%CO₂存在下で1週間培養を続けた。培養1週間後にコロニーの発育形態を倒立顕微鏡 (オリンパス, 東京) にて観察し、マイクロメーター (オリンパス) にて長径および短径を計測し、

その積をもってコロニーの大きさとした。なお、MMP阻害剤のBB94は寿製薬 (株) より分与された。

3. 細胞の固定および染色

培養液を除去し、このゲルを10%リン酸緩衝ホルマリンに

A



B

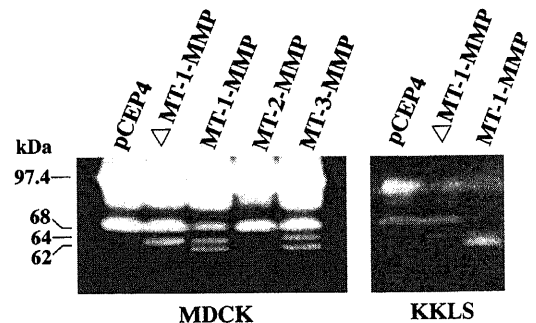


Fig. 2. Detection of MT-MMP gene product and its effect on pro-gelatinase A activation. (A) Western blotting. Cell lysates were prepared from MDCK cells transfected with vector plasmid (lane, pCEP4), expression plasmid for Δ MT-1-MMP, MT-1-MMP, MT-2-MMP and MT-3-MMP (lanes; Δ MT-1-MMP, MT-1-MMP, MT-2-MMP and MT-3-MMP, respectively) (panel, MDCK) and KKLS cells transfected with vector plasmid (lane, pCEP4), expression plasmid for Δ MT-1-MMP and MT-1-MMP (lanes, Δ MT-1-MMP and MT-1-MMP, respectively) (panel, KKLS) and then were analyzed by Western blotting as described in "Materials and Methods". (B) Gelatin zymography. MDCK cells transfected with vector plasmid (lane, pCEP4), expression plasmid for Δ MT-1-MMP, MT-1-MMP, MT-2-MMP and MT-3-MMP (lanes; Δ MT-1-MMP, MT-1-MMP, MT-2-MMP and MT-3-MMP, respectively) were cultured in DMEM containing 10% fetal calf serum (panel, MDCK). KKLS cells transfected with vector plasmid (lane, pCEP4), expression plasmid for Δ MT-1-MMP and MT-1-MMP (lanes, Δ MT-1-MMP and MT-1-MMP, respectively) were cultured in serum free DMEM for 12h (panel, KKLS). Conditioned medium (15μl) was mixed with SDS electrophoresis sample buffer and separated in a 10% polyacrylamide gel containing 1 mg/ml gelatin. After incubation for gelatin digestion, the gel was stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 as described "Materials and Methods".

て固定後、通常の方法でパラフィン包埋し、HE染色を行った。

V. 培養細胞における細胞外基質の分解能の評価

1. 合成ペプチド基質の分解能

MMP酵素活性は基質としてMca-Pro-Leu-Gly-Leu-Gly-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (Peptido Inst., 大阪) を用いて測定した。この基質はMMPによって切断されることにより蛍光を発する。MDCK細胞を35mmプラスチックディッシュ (FALCON) に約 1.0×10^5 個/mlの濃度で5% FCS加 DMEM 2mlにて37℃, 24時間培養し、その後培養液を除去し、カルシウムを含むトリス緩衝化生理食塩水 (20mM Tris, pH7.5, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, TNC) にて2回洗浄し、ディッシュ1枚あたり合成基質 $1 \mu\text{M}$ を含むTNC 500 μl 中37℃で培養後、0.1M酢酸ナトリウム (pH 4.0) 2.5mlで酵素反応を停止させた。ペプチドの分解によって現れる蛍光を分光蛍光光度計 (日立, 東京) を用いて、励起波長328nm, 検出波長393nmにてその蛍光強度を測定した。

2. ゼラチン分解能

MDCK細胞を35mmプラスチックディッシュ (FALCON) に約 1.0×10^5 個/mlの濃度で5% FCS加 DMEM 2mlにて37℃, 24時間培養した。その後培養液を除去し、TNCにて2回洗浄し、ディッシュ1枚あたりゼラチン $20 \mu\text{g}$ を含むTNC 200 μl 中37℃で1,6時間培養した。培養上清をウルトラフリーC3, CL

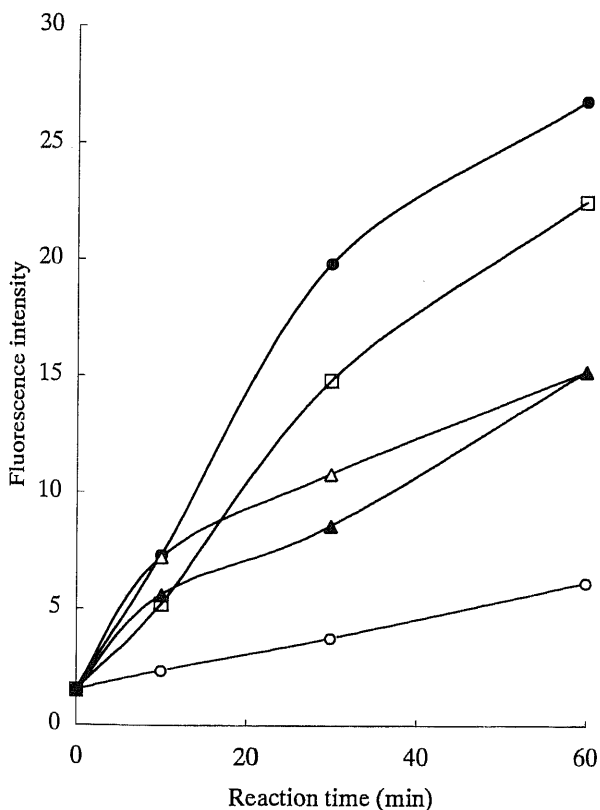


Fig. 3. Degradation of fluorescent peptide substrate. Fluorescent peptide substrate ($1 \mu\text{M}$) were incubated with cells transfected with vector plasmid, expression plasmid for MT1-MMP, MT2-MMP, MT-3-MMP and Δ MT-1-MMP in TNC buffer at 37℃ and the fluorescence intensity of reaction products was measured by fluorescence spectrophotometer. ○; pCEP4, ●; MT-1-MMP, △; MT-2-MMP, ▲; MT-3-MMP, □; Δ MT-1-MMP.

(MILLIPORE, 東京) にて4℃, 9,000rpmで30分遠心することにより濃縮した。濃縮液をII-5.の試料溶解液 $20 \mu\text{l}$ で溶解しSDS-PAGEを行った後II-5.の染色液で30分間染色・脱色した。

3. TIMPによるゼラチン分解の阻害

MT-1-MMP発現細胞を用いてTIMP-1, -2によるゼラチン分解の阻害を検討した。即ちV-2.においてディッシュ1枚あたりTNC 200 μl , ゼラチン $20 \mu\text{g}$ にリコンビナントTIMP-1, TIMP-2をそれぞれ $1 \mu\text{g}$ 添加し37℃, 5% CO₂存在下で6時間培養した後に同様にSDS-PAGEを行った。なおリコンビナントTIMP-1, TIMP-2は富士薬品工業 (株) 岩田和士博士より分与された。

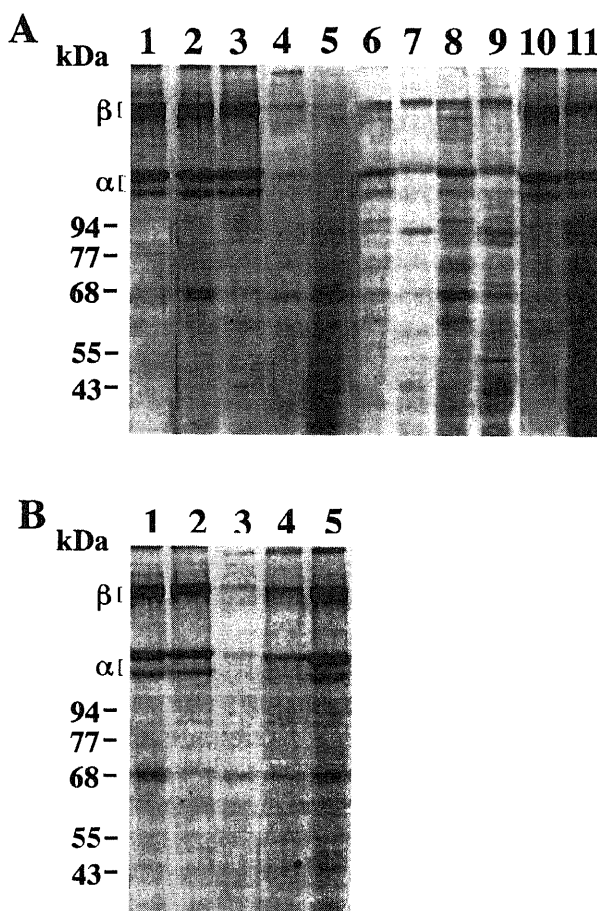


Fig. 4. Degradation of type I gelatin. (A) Type I gelatin ($20 \mu\text{g}$) was incubated with cells transfected with vector alone for 1h and 6h (lane 2 and 3) with expression vectors for MT-1-MMP (lanes 4 and 5), MT-2-MMP (lanes 6 and 7), MT-3-MMP (lanes 8 and 9) and Δ MT-1-MMP (lanes 10 and 11). Supernatants from each culture were concentrated and subjected to SDS-PAGE with type 1 gelatin ($20 \mu\text{g}$) as a control (lane 1). (B) Type I gelatin ($20 \mu\text{g}$) was incubated with cells transfected with vector alone for 6h (lane 2) and expression vector for MT-1-MMP (lane 3). Type 1 gelatin was incubated with cells transfected with MT-1-MMP expression vector in the presence of $1 \times 10^{-5} \text{M}$ recombinant TIMP-1 and TIMP-2 (lanes 4 and 5). Supernatants from each culture were concentrated and subjected to SDS-PAGE with $20 \mu\text{g}$ type 1 gelatin as a control (lane 1).

成 績

I. MT-MMP および Δ MT-1-MMP 遺伝子導入細胞の蛋白の発現および酵素活性

1. ウエスタンブロット法

III-1. で得られた試料を MT-1-MMP, MT-2-MMP, MT-3-MMP に対する単クローン抗体, 113-15E7, 162-4E3, 117-4E3 を用いてそれぞれウエスタンブロッティングを行った. 113-15E7 では, MT-1-MMP と Δ MT-1-MMP のみがそれぞれ 63kDa, 57kDa のバンドとして検出された. 162-4E3 では MT-2-MMP のみが 70kDa のバンドが, 117-4E3 では MT-3-MMP のみが 66kDa のバンドとして検出された. pCEP4 導入細胞はどの抗体とも反応しなかった (図 2A).

2. ゼラチンゼイモグラフィー

ゼラチンゼイモグラフィーは酵素活性をポリアクリルアミドゲル電気泳動後のゲル中でのゼラチン分解能により検出する方法であり, 潜在型 MMP-2 は 68kDa, 活性化中間体は 64kDa, 活性化型は 62kDa のバンドとして現れる. KKLS 細胞は内因性の MMP-2 を発現しているが MDCK 細胞は発現していない. したがって KKLS 細胞では MT-MMP による内因性 MMP-2 活性化の能力を測定するために FCS を含有しない DMEM を使用した. 一方, MDCK 細胞では潜在型 MMP-2 を含有する FCS を含む DMEM にて実験を施行した. MT-1, 2, 3-MMP 発現細胞で MMP-2 の活性化能を比較検討すると, MT-1-MMP, MT-3-MMP 発現細胞では MMP-2 の活性化が認められたのに対して MT-2-MMP 発現細胞では活性化型 MMP-2 は検出されなかった. Δ MT-1-MMP 発現細胞では 64kDa の MMP-2 活性化中間体と Δ MT-1-MMP 自身のゼラチン分解活性による 57kDa のバンドが検出された (図 2B).

II. MT-MMP および Δ MT-1-MMP 発現細胞による細胞外基質の分解

1. 合成ペプチド基質の分解能

MT-MMP および Δ MT-1-MMP 発現細胞における MMP 酵素活性を合成ペプチド基質の分解能により評価した. pCEP4 発現細胞はほとんどの合成ペプチド基質を分解しないのに対して, MT-1-MMP 発現細胞は高い分解能を示した. MT-2, 3-MMP 発現細胞では MT-1-MMP 発現細胞の 1/2 程度の分解能を示した. また, Δ MT-1-MMP 発現細胞は MT-1-MMP 発現細胞と同程度の高い分解能を示した. (図 3).

2. ゼラチン分解能

MT-MMP および Δ MT-1-MMP 発現細胞における MMP 酵素活性をゼラチン分解能により検討した. pCEP4 を導入したコントロール細胞では全く分解は認められなかったのに対して MT-1-MMP 発現細胞は 1 時間後にゼラチンの α バンドが消失し始め, 6 時間後には完全に消失するという強いゼラチン分解能を示した. MT-2, 3-MMP 発現細胞では 6 時間後によく α バンドが消失し, MT-1-MMP 発現細胞に比して弱いゼラチン分解活性を呈した. Δ MT-1-MMP 発現細胞は MT-2, 3-MMP 発現細胞と同程度の弱いゼラチン分解活性を示した (図 4A). MT-1-MMP 発現細胞によるゼラチン分解は MMP 阻害物質である TIMP-1 では有意に阻害されなかったが, TIMP-2 では完全に阻害された (図 4B).

III. MT-MMP-1 の発現細胞の浸潤能

1. コラーゲンゲルへの浸潤

KKLS 細胞をコラーゲンゲル上で培養すると, pCEP4 導入コントロール細胞および Δ MT-1-MMP 発現細胞では細胞がゲル上で単層に整然と増殖した. 一方, MT-1-MMP 発現細胞では細胞がコラーゲンゲル中に浸潤し, 浸潤部分ではコラーゲンゲ

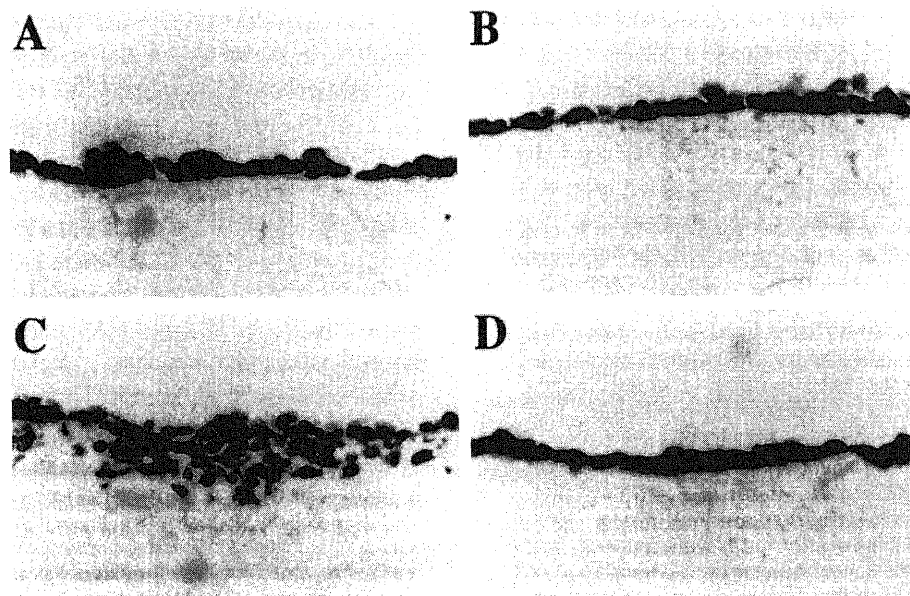


Fig. 5. Cell invasion into collagen gel. KKLS cells transfected with expression plasmid for MT-1-MMP and its deletion mutant Δ MT-1-MMP were cultured on type I collagen gel for 7 days in the presence or absence of MMP inhibitor BB94, and then the gel was fixed and stained with HE. (A) pCEP4, (B) Δ MT-1-MMP, (C) MT-1-MMP, (D) MT-1-MMP+ BB94 (1×10^{-6} M).

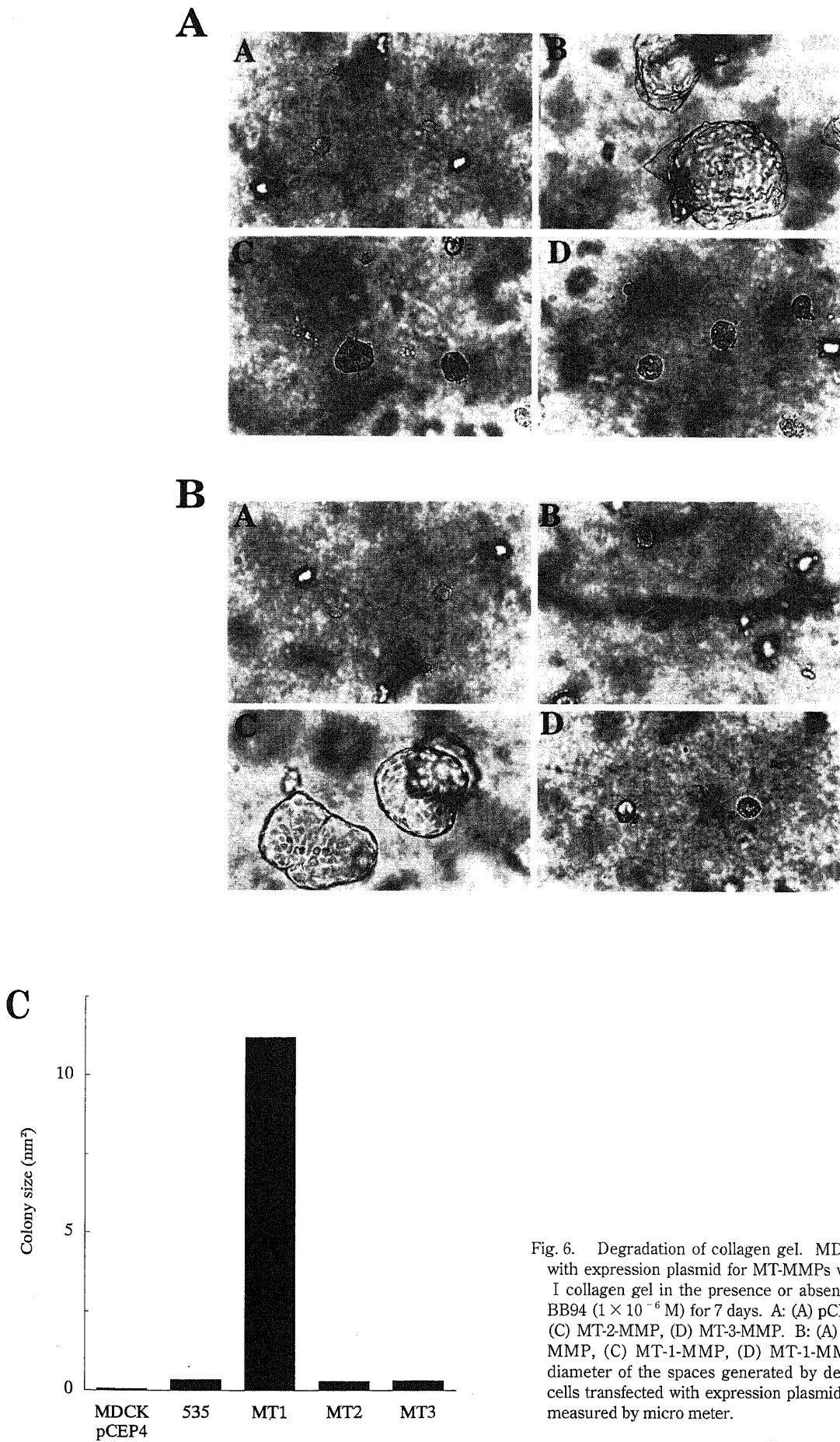


Fig. 6. Degradation of collagen gel. MDCK cells transfected with expression plasmid for MT-MMPs were cultured in type I collagen gel in the presence or absence of MMP inhibitor BB94 (1×10^{-6} M) for 7 days. A: (A) pCEP4, (B) MT-1-MMP, (C) MT-2-MMP, (D) MT-3-MMP. B: (A) pCEP4, (B) Δ MT-1-MMP, (C) MT-1-MMP, (D) MT-1-MMP+BB94. (C) The diameter of the spaces generated by degradation by MDCK cells transfected with expression plasmids for MT-MMPs was measured by micro meter.

ルが著しく分解されているのが観察された。この浸潤はMMP特異的インヒビターであるBB94で完全に阻害された(図5)。

2. コラーゲンゲル中での空泡形成

MDCK細胞をコラーゲンゲル中で培養すると、pCEP4導入コントロール細胞は細胞塊を形成して増殖した。一方、MT-1-MMP発現MDCK細胞はコラーゲンゲル中に空泡を形成し細胞はその内面にほぼ単層に増殖した。MT-2, 3-MMP発現細胞、 Δ MT-1-MMP発現細胞はpCEP4導入コントロール細胞と同様の細胞塊を形成して増殖した(図6A, B)。このコラーゲンゲル中で増殖した細胞をホルマリン固定後H-E染色を施すと、MT-1-MMP発現細胞では細胞がゲルを分解し、空泡を形成しその裏打ちをするように増殖している様子が観察された。pCEP4導入コントロール細胞ではコラーゲンゲル分解に伴う空泡形成は見られず、MT-2, 3-MMP発現細胞、 Δ MT-1-MMP発現細胞ではわずかに小さな空泡形成のみであった(図6C)。またこの空泡形成はMMPの特異的インヒビターであるBB94で完全に阻害された。

考 察

MT-1-MMPはヒト癌組織におけるMMP-2活性化因子として同定され、癌浸潤・転移のキーエンザイムとして注目されている⁷⁾。MT-1-MMPはMMP-2活性化能に加えて自らもコラーゲンなどの細胞外基質を分解する¹⁷⁾。分泌型MMPに対して、MT-MMPはカルボキシ末端部に細胞膜貫通領域を有し、この領域を介して細胞膜表面に局在することによりさらに効率的に細胞浸潤のための細胞外基質の分解を行うと考えられる。

現在までに膜型MMPとして構造のみならずアミノ酸配列まで酷似した3種類のMT-MMPが知られているが癌組織における発現頻度としてはMT-1-MMPが最も高い^{18)~21)}。

本研究においては、3種類のMT-MMP発現細胞による細胞外基質の分解、発現細胞の浸潤に関する機能の比較検討を試みた。その結果、合成ペプチド基質、ゼラチンの分解能、細胞浸潤能共にMT-1-MMP発現細胞がもっとも高かった。さらに詳しくその機能を解析するために、細胞膜貫通領域に着目し同領域を欠失した変異体である Δ MT-1-MMP発現細胞株を樹立し、その機能を解析した。その結果MT-1-MMP、 Δ MT-1-MMPの遺伝子を恒常的に発現させた細胞は共にコントロール細胞に比して著しく高い合成ペプチド基質分解活性を示した。しかし、高いゼラチン分解活性、コラーゲンゲルへの浸潤活性はMT-1-MMP発現細胞にのみ認められ Δ MT-1-MMP発現細胞ではこれらの活性は著しく低値であった。このことはMT-1-MMP発現細胞がゼラチンのような高分子基質を分解し細胞浸潤をひきおこすにはMT-1-MMPが細胞膜表面に発現することが必要であることを示唆している。

Nakaharaら¹⁴⁾によるとMT-1-MMP発現細胞が細胞外基質に浸潤する時にはMT-1-MMPは浸潤性偽足に局在し浸潤方向に向かって細胞外基質を分解すると報告している。さらにMT-1-MMPの細胞膜貫通領域の完全なシーケンスが浸潤性偽足への局在に必要であると提案している。 Δ MT-1-MMP発現細胞が低分子の合成ペプチド基質の分解は行っても高分子のゼラチンを分解できなかったことからMT-1-MMPが高分子細胞外基質を分解できるような立体構造をとるためには浸潤性偽足への局在が必要なのかもしれない。

MT-1-MMP発現細胞によるゼラチン分解はTIMP-2によって阻害されたがTIMP-1は無効であった。TIMP-1, TIMP-2はMMP-2を含むほとんどのMMPに対して同様の強い阻害活性を示す。しかしMT-1-MMPは数少ない例外としてTIMP-2によってのみその酵素活性が阻害されTIMP-1は無効である¹⁶⁾。したがって本研究におけるMT-1-MMP発現MDCK細胞によるゼラチン分解活性はMT-1-MMPによって活性化されたMMP-2によるのではなくMT-1-MMP自身のゼラチン分解活性によることが強く示唆された。このことは内因性MMP-2を産生しないMDCK細胞がMT-1-MMP発現によりコラーゲンゲルを分解するという結果と矛盾しない。

一方、MT-2-MMP, MT-3-MMP発現細胞の浸潤活性はMT-1-MMPに比して著しく低かったがこれは両MT-MMPの弱い酵素活性によるものと推定された。

従来、癌細胞は表面のMT-1-MMPによってMMP-2を活性化し活性化されたMMP-2の細胞外基質分解活性により浸潤すると考えられていたが本研究ではMT-1-MMP自身の分解活性も重要な役割を果たすことが始めて示された。

結 論

ヒト胃癌細胞KKLS細胞およびイヌ腎上皮細胞MDCK細胞にMT-1-MMPおよび Δ MT-1-MMPの遺伝子を導入し、細胞外基質の分解能および細胞の浸潤能を検討し、以下の結論を得た。

1. MT-1-MMP, MT-3-MMP発現細胞ではMMP-2の活性化型の産生を、 Δ MT-1-MMP発現細胞では活性化中間体の産生を認めた。MT-2-MMP発現細胞ではいずれの産生も認められなかった。
 2. KKLS細胞のコラーゲンゲルを用いた浸潤測定において、MT-1-MMP発現細胞のみが著明な浸潤能を示した。この浸潤はMMP特異的阻害剤BB94によって阻害された。
 3. MDCK細胞をコラーゲンゲル中で3次元培養するとMT-1-MMP発現細胞はコラーゲンゲルを分解し空泡を形成しながらその内面で増殖した。MT-2-MMP, MT-3-MMP, Δ MT-1-MMP発現細胞はコラーゲンゲルを分解せずに細胞塊を形成して増殖した。
 4. 合成ペプチド基質の分解はMT-1-MMP, Δ MT-1-MMP発現細胞で高く、MT-2-MMP, MT-3-MMP発現細胞では低かったが、高いゼラチン分解活性はMT-1-MMP発現細胞でのみ認められた。
 5. MT-2-MMP, MT-3-MMP発現細胞では細胞外基質の分解能、浸潤能ともに低かった。
- 以上の結果からMT-1-MMPは細胞膜上に発現しMMP-2を活性化しまたそれ自身により細胞外基質を分解し浸潤することが明らかとなった。またこの浸潤には細胞膜貫通領域が重要な役割をはたすことが示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師清木元治教授に深甚なる謝意を表します。また、本教室での研究の志に多大な御協力と御鞭撻を賜りました金沢大学医学部第一外科学講座渡辺洋宇教授に深く感謝いたします。さらに終始直接の御指導を賜りました佐藤博助教授をはじめ金沢大学がん研究所腫瘍分子科学研究部門細胞機能統御研究分野教室各位に深謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第56回日本癌学会総会(1997年, 京都)において発表した。

文 献

- 1) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336, 1991
- 2) Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C. Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 24: 209-18, 1993
- 3) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9: 541-573, 1993.
- 4) Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB* 5: 2145-2154, 1991.
- 5) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GL. SV-40 transformed human lung fibroblasts secretes a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophage. *J Biol Chem* 264: 17213-17221, 1989.
- 6) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA, Goldberg GL. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen *J Biol Chem* 263: 6579-6587, 1988.
- 7) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370: 61-65, 1994.
- 8) Will H, Hinzmann B. cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem* 231: 602-608, 1995.
- 9) Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem* 270: 23013-23020, 1995.
- 10) Tanaka M, Sato H, Takino T, Iwata K, Inoue M, Seiki M. Isolation of a mouse MT2-MMP gene from a lung cDNA library and identification of its product. *FEBS Lett* 402: 219-222, 1997.
- 11) Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *J Biol Chem* 270: 801-805, 1995.
- 12) Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GL. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase - Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270: 5331-5338, 1995.
- 13) Ward RV, Atkinson SJ, Reynolds JJ, Murphy G. Cell surface-mediated activation of progelatinase A: demonstration of the involvement of the C-terminal domain of progelatinase A in cell surface binding and activation of progelatinase A by primary fibroblasts. *Biochem J* 304: 263-269, 1995.
- 14) Nakahara H, Howard L, Thompson EW, Sato H, Seiki M, Yeh Y, Chen WT. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7959-7964, 1997.
- 15) Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7: 2745-2752, 1987.
- 16) Kinoshita T, Sato H, Takino T, Itoh M, Akizawa T, Seiki M. Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 56: 2535-2538, 1996.
- 17) Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272: 2446-2451, 1997.
- 18) Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 55: 3263-3266, 1995.
- 19) Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M. Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 64: 355-359, 1995.
- 20) Yoshizaki T, Sato H, Maruyama Y, Muroso S, Furukawa M, Park CS, Seiki M. Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma. *Cancer* 79: 139-144, 1997.
- 21) Ueno H, Nakamura H, Inoue M, Imai K, Noguchi M, Sato H, Seiki M, Okada Y. Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 57: 2055-2060, 1997.

Degradation of Extracellular Matrix by Cell Lines Expressing MT-MMP Kazushige Shibahara, Department of Molecular Virology and Oncology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-0934 — J. Juzen Med Soc., 107, 184 — 192 (1998)

Key words membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP), collagen gel, type I gelatin, fluorescent peptide substrate

Abstract

Membrane-type matrix metalloproteinase is frequently expressed in human tumor tissue and is thought to play an important role in tumor invasion and metastasis as an activator of 72kDa-type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2, MMP-2). In this study, we analyzed the mechanism of extracellular substrate degradation and cellular invasion using an *in vitro* cell culture system. Degradation and invasion into collagen gel was investigated with cell lines expressing the 3 MT-MMPs so far known (MT-1-MMP, MT-2-MMP, MT-3-MMP). Cells expressing MT-1-MMP showed high activity while the other 2 cell lines expressed only faint activity. Degradation of collagen gel by cells expressing MT-1-MMP was interfered with by the MMP specific inhibitor BB94. Degradation activity of these cellines against synthetic peptide substrate and gelatin correlated well with collagen gel degradation activity. To analyze the function of the carboxy terminal transmembrane domain of MT-1-MMP, a mutant MT-1-MMP truncated at the transmembrane domain (Δ MT-1-MMP) was stably expressed. Cells expressing Δ MT-1-MMP showed weak collagen gel and gelatin degradation activity, but they digested synthetic peptide substrate with comparable efficiency to cells expressing normal MT-1-MMP expressing cells. This suggests that the degradation of high molecular weight substrate by MT-1-MMP on the cell surface requires specific localization of MT-1-MMP mediated by the transmembrane domain. The fact that tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 interfered with gelatin degradation by cells expressing MT-1-MMP, while TIMP-1 did not suggests that degradation of gelatin is mediated by MT-1-MMP itself, rather than MMP-2 activated by MT-1-MMP.