

腫瘍分子科学研究部門細胞機能統御研究分野

<研究スタッフ>

教授 佐藤 博

准教授 滝野 隆久、遠藤 良夫、久野 耕嗣

技能補佐員 山岸 小百合

大学院（博士） SAKR MOUSTAFA ABDEL-SAMED

堂本 貴寛、郭 魯泐

（修士） 清水 聡史、藤村 浩司、長尾 亮太

<研究の概要>

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MT1-MMP) は MMP-2 の活性化因子として同定され、その後 MMP-2 活性化以外にも細胞外マトリックス成分であるコラーゲン、ファイブロネクチンの分解、シンデカンなどの膜タンパクのシェディング、KiSS-1 などの低分子リガンドの切断など様々な機能を有し、総合的にがんの悪性化形質に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。MT1-MMP による MMP-2 活性化はほとんど全てのがん組織で確認されるが、活性化の意義・メカニズム・他基質切断との関連などについては不明の点が多かった。我々は人工的な MMP-2 レセプターを開発することにより (Cancer Res., 2008)、MT1-MMP による MMP-2 活性化 vs 他基質切断の調節機構について新規の提案を行った (Cancer Science 総説, 2010)。MMP の中で MT1-MMP の特徴的な活性として、膜タンパクのシェディングが挙げられる。発現クローニング法を用いた MT1-MMP の基質探索により新規膜タンパクを MT1-MMP の基質として同定し、それらのシェディングのがんの増殖・浸潤・転移に果たす役割を検討している。遠藤、久野准教授は独自のプロジェクトを推進中である。

<今年度の研究成果>

1. 発現クローニング法により MT1-MMP の新規基質として機能未知の膜タンパク x x を同定した。x x は肝がん、扁平上皮がんが発現する。x x の発現は発現細胞のファイブロネクチンへの接着を促進し、コラーゲングル内での増殖を負に制御すること、MT1-MMP による同分子のシェディングはコラーゲングル内での増殖を回復することを見出した。他にも複数の膜タンパクを MT1-MMP の新規基質として同定し、切断部位の決定ならびにがんの浸潤・増殖における意義を検討中である。(佐藤)
2. 上皮系細胞のコラーゲングル培養では、増殖抑制とともに FAK と ERK の活性化抑制が認められた。MT1-MMP 発現がん細胞では、コラーゲングル培養中でも FAK

と ERK の活性化が維持されており、MT1-MMP のノックダウンにより FAK と ERK の活性化が抑制された。また、MT1-MMP 発現細胞ではコラーゲンゲル培養においてファイブロネクチン (FN) の産生が亢進しており、MT1-MMP の阻害や FN のノックダウンは細胞死を誘導した。以上の結果から、MT1-MMP は 3 次元 ECM 中で細胞外微小環境の改編に重要な役割を果たし、FAK や ERK 経路を介して細胞増殖、運動、死を制御していると考えられた。(滝野)

3. 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は生体内に存在するアミノ酸類であり、腫瘍組織選択的に細胞内でヘム生合成経路によりプロトポルフィリン IX (PpIX) に代謝され、光感受性物質として活性化される。本年度は、胃癌培養細胞の中でも 5-ALA-PDT に高感受性を示す MKN-45 細胞を用い、親株と比較して、1,000 倍以上の耐性を示す 5-ALA-PDT 高度獲得耐性株の樹立をした。この高度耐性細胞におけるヘム生合成経路の因子群の mRNA 発現を親株と比較したところ、PpIX 濃度を規定すると考えられるタンパクの発現に著名な変化があることを見出した。(遠藤)
4. ADAMTS-1^{-/-}マウスの分娩異常の原因を明らかにするため、同マウスの子宮平滑筋の収縮能に異常があるか調べた。その結果分娩直前の ADAMTS-1^{-/-}マウスから調製した子宮平滑筋 strip では、60mM KCl 刺激および hypotonic shock によって生じる収縮力が 30-40%低下しており、子宮の機能的平滑筋量の低下が示唆された。またオキシトシンによる収縮力を調べた結果、ADAMTS-1^{-/-}マウスでは機能的な平滑筋あたりのオキシトシンへの反応性も有意に低下していることが明らかとなった。(久野)

<今後の研究課題・計画>

1. MT1-MMP による膜タンパクのシェディングの浸潤・転移ならびに増殖における意義を明らかにし、このステップを標的とした制御方法の開発を試みる(佐藤)。
2. 次元コラーゲンゲル細胞培養法を用いて、がん細胞の細胞増殖と浸潤能獲得における MT1-MMP の役割とその作用機序を解析するとともに、細胞運動・浸潤の極性形成とその連続性維持における MT1-MMP の役割とその機構を検討する(滝野)。
3. PpIX 濃度を規定する因子を標的にした 5-ALA-PDT 感受性増強剤の探索とリード化合物候補の探索を継続する。(遠藤)
4. 今後さらに分娩時の生理的な収縮誘導物質である PGE₂, PGF₂・に対する応答性を調べて、ADAMTS-1^{-/-}マウスの分娩前の子宮平滑筋についてその収縮機能を評価するとともに、子宮平滑筋の組織学的変化や ECM 成分の変化について解析を行う。また ADAMTS-1^{-/-}マウスで子宮頸管の熟化に異常があるかについても解析を行い、ADAMTS-1 の分娩過程における役割を明らかにする。(久野)

<原著・研究室主体>

Sato H, Takino T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1(MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. *Cancer Science* (in press).

<原著・共同研究>

Itatsu K, Sasaki M, Yamaguchi J, Ohira S, Ishikawa A, Ikeda H, Sato Y, Harada K, Zen Y, Sato H, Ohta T, Nagino M, Nimura Y, Nakanuma Y.: Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor-alpha. *Am. J. Pathol.*, 174, 829-841, 2009.

Onodera M, Zen Y, Harada K, Sato Y, Ikeda H, Itatsu K, Sato H, Ohta T, Asaka M, Nakanuma Y. Fascin is involved in tumor necrosis factor (TNF)- α -dependent production of MMP9 in cholangiocarcinoma. *Lab. Inv.*, (in press)

<学会発表>

第18回日本がん転移学会総会 堂本 貴寛、滝野隆久、佐藤博「膜型セリンプロテアーゼによる膜型 MMP 活性化機構の解析」(優秀演題賞)平成21年7月(旭川)

第82回 日本生化学会大会 滝野 隆久、佐藤 博 「MT1-MMP による浸潤性増殖誘導」、平成21年10月(神戸)

第68回 日本癌学会学術総会 滝野 隆久、佐藤 博 「MT1-MMP による浸潤性増殖誘導」、平成21年10月(横浜)

遠藤 准教授

発表論文

Yonemura Y, Endou Y, Shinbo M, Sasaki T, Hirano M, Mizumoto A, Matsuda T, Takao N, Ichinose M, Mizuno M, Miura M, Ikeda M, Ikeda S, Nakajima G, Yonemura J, Yuuba T, Masuda S, Kimura H, Matsuki N. Safety and efficacy of bidirectional chemotherapy for treatment of patients with peritoneal dissemination from gastric cancer: Selection for cytoreductive surgery. *J Surg Oncol.* 100(4):311-316, 2009.

安部千秋, 宇都義浩, 遠藤良夫, 新元優也, 中島宏一郎, 佐野圭一郎, 佐々木有紀, 皆巳和賢, 前澤 博, 増永慎一郎, 中田栄司, 堀 均:次世代動物実験系としての腫瘍移植鶏卵の構築と放射線照射による腫瘍成長阻害活性. *放射線生物研究* 44(2):233-241, 2009.

学会発表

1. 宇都義浩, 遠藤良夫, 他 11 名: 腫瘍移植鶏卵を用いた in ovo 放射線増感活性評価系の確立 第 11 回増感シンポジウム(奈良) 2009 年 2 月
2. 新元優也, 遠藤良夫, 他 10 名: 腫瘍移植鶏卵を用いた in ovo 放射線増感活性評価系の確立 日本薬学会第 129 年会(京都)2009 年 3 月
3. 中江 崇, 遠藤良夫, 他 10 名: 腫瘍移植鶏卵モデルによる糖ハイブリッド低酸素細胞放射線増感剤 TX-2244 の腫瘍移行性 日本薬学会第 129 年会(京都)2009 年 3 月
4. 宇都義浩, 遠藤良夫, 他 8 名: 腫瘍移植鶏卵モデルによる糖ハイブリッド放射線増感剤の薬物動態解析 第 15 回癌治療増感研究会 2009 年 6 月(京都)
5. Uto Y, Endo Y, 他 4 名: Pharmacokinetic drug design of sugar-hybrid radiosensitizers using the tumor implant chick embryo model 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月(横浜)
6. Yoshida T, Endo Y, 他 2 名: Increased secretion of cytidine deaminase protein in cancer cells resistant to antitumor 2'-deoxycytidine analogues 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月(横浜)
7. Kano S, Endo Y, 他 3 名: Effect of experimental photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on human gastric cancer cells 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月(横浜)
8. 小倉俊一郎, 遠藤良夫, 他 4 名: アミレブリン酸(ALA)による腹膜播種の診断ならびに治療の基礎検討 第 1 回播種性転移研究会(草津) 2009 年 10 月

久野 准教授

<学会発表> Kuno K., Matsushima K., Shozu M.

「妊娠マウス子宮組織における ADAMTS-1 タンパク発現部位の解析」第 32 回日本分子生物学会年会(2009 年 12 月、横浜)