

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590306

研究課題名（和文） 細胞外微小環境変化と細胞運動誘導

研究課題名（英文） Cell migration induced by alternation of extracellular matrix microenvironment

研究代表者 滝野 隆久 (TAKINO TAKAHISA)

金沢大学・がん研究所・准教授

研究者番号：40322119

研究成果の概要（和文）：

ヒト扁平上皮癌細胞のコラーゲンゲル培養において、MT1-MMP活性を合成阻害剤やsiRNAを用いたknockdownにより阻害すると細胞増殖が顕著に抑制された。この際、FAKとERKの活性化が抑制されていた。また、MT1-MMP阻害はインテグリン $\alpha\beta 3$ を介したc-Srcの活性化も抑制することも見出した。c-Srcのエフェクター分子を検索したところ、コラーゲンゲル内においてMT1-MMPはPaxillinを介してERK活性化と細胞増殖を誘導することを証明した。MT1-MMPはコラーゲンゲル内において細胞外環境の変化を誘導し、c-Srcの活性化を惹起し、Paxillinを介してERK活性化と細胞増殖を誘導すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is essential for tumor invasion and growth. We show here that MT1-MMP induces extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation in cancer cells cultured in collagen gel, which is indispensable for their proliferation. Inhibition of MT1-MMP by MMP inhibitor or small interfering RNA suppressed activation of focal adhesion kinase (FAK) and ERK in MT1-MMP-expressing cancer cells, which resulted in up-regulation of p21^{WAF1} and suppression of cell growth in collagen gel. Cell proliferation was also abrogated by the inhibitor against ERK pathway without affecting FAK phosphorylation. MT1-MMP and integrin $\alpha_v\beta_3$ were shown to be involved in c-Src activation, which induced FAK and ERK activation in collagen gel. These MT1-MMP-mediated signal transductions were paxillin dependent, as knockdown of paxillin reduced cell growth and ERK activation, and co-expression of MT1-MMP with paxillin induced ERK activation. The results suggest that MT1-MMP contributes to proliferation of cancer cells in the extracellular matrix by activating ERK through c-Src and paxillin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

がん細胞浸潤は細胞外マトリックス (ECM) 分解と方向性を持った細胞運動誘導が協調的に制御され、かつ運動誘導シグナルの連続性が維持されて初めて成立する。

細胞の ECM への接着はインテグリンの集積を導き、続いて focal adhesion kinase (FAK) の凝集とその自己リン酸化を誘導する。FAK は種々の情報伝達分子群の細胞接着斑への凝集を誘導し、extracellular

signal-regulated kinase (ERK) や c-Jun N-terminal kinase (JNK) などの mitogen-activated protein kinase (MAPK) や phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) 経路を活性化する足場 (FAK scaffold) として機能する。従って、細胞接着斑は細胞運動時の物理的な足として、また細胞運動を誘導する情報伝達経路活性化の足場としても機能している。細胞の ECM 受容体であるインテグリンと FAK を介したシグナルは、細胞骨格系と細胞接着斑の代謝回転を制御することで細胞運動を誘導する。研究代表者は FAK から p130^{Cas}/Crk あるいは JSAP1 を経由して JNK を活性化する経路が、細胞接着斑の代謝回転と細胞運動に重要であることを示してきた。

また、ECM 分解酵素による細胞外微小環境の変化は、細胞運動誘導シグナルを正に制御する。特に研究代表者らが同定した膜型マトリックスメタロプロテアーゼ Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) は、ECM 分解カスケードを活性化するだけではなく、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にも関与していることから、MT1-MMP は細胞外微小環境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であると着想するに至った。

2. 研究の目的

1) MT1-MMP による細胞運動誘導機構

細胞の ECM への接着は、インテグリンを介して MAPK、PI-3K、Rho ファミリーを活性化し、細胞運動極性の形成と維持をする。したがって MT1-MMP による細胞局所での ECM 分解はインテグリンを介した情報伝達経路に影響し、細胞運動の極性形成と維持に関与していると推測された。研究代表者は MT1-MMP を同定し、MT1-MMP が癌の浸潤・転移に重要な役割を果たしていることを報告してきた。また、MT1-MMP による I 型コラーゲン分解が持続的な ERK 活性化を亢進し、この持続的な ERK 活性化が MT1-MMP の活性発現を増強するフィードバック機構の存在や、MT1-MMP が細胞接着斑の代謝回転と細胞運動に重要であることも報告してきた。本研究では MT1-MMP の ECM 分解による細胞外微小環境変化誘導が、細胞接着斑の代謝回転と細胞運動・誘導シグナルの連続性を維持する機構の解明を行った。また、細胞運動の重要な制御因子である FAK/Src が MT1-MMP の細胞表面での発現を制御していることから、FAK/Src から JNK 活性化に関連する分子 (p130^{Cas}、Crk、JSAP1) の MT1-MMP

の活性発現と細胞運動連続性の維持における役割も検討した。

2) MT1-MMP による細胞外微小環境変化誘導と浸潤性増殖

MT1-MMP は腫瘍細胞の 3 次元コラーゲンゲル内への浸潤と増殖に必要である。また、3 次元コラーゲンゲルの弾性が幹細胞などの分化を調節しており、3 次元コラーゲンゲルの弾性調節に MT1-MMP の関与が示唆されている。すなわち MT1-MMP は局所的な ECM 分解による弾性(細胞外微小環境)変化誘導とそれを感知する細胞システムを制御し、3 次元 ECM 中での細胞運動・増殖・分化を制御していると推測された。本研究では MT1-MMP と細胞接着斑に標的した MT1-MMP (MT1-FAT) を恒常的に発現する腎上皮細胞を樹立し、3 次元 ECM 内での生存シグナル、管腔形成と浸潤性増殖における MT1-MMP の役割の解析と浸潤誘導シグナルの連続性維持機構をインテグリン/FAK を介した情報伝達経路を中心に解析を試みた。

3. 研究の方法

1) MT1-MMP による細胞運動誘導機構

研究代表者は MT1-MMP による I 型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フィードバック機構が細胞運動誘導に重要であること、MT1-MMP 発現によるフィブロネクチン分解がインテグリンの凝集、FAK のリン酸化、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を報告してきた。細胞接着斑の代謝回転は細胞運動極性形成に必須であることから、MT1-MMP と MT1-MMP の阻害変異体に FAK の細胞接着斑標的ドメインを付与し、細胞接着斑の代謝回転における効果を検討した。細胞接着斑に標的した MT1-MMP (MT1-FAT) と MT1-MMP 阻害変異体 (MT1-Pex-FAT) は共に細胞接着斑に局在した。MT1-Pex-FAT は、細胞接着斑でフィブロネクチンの分解を抑制し、細胞運動と 3 次元 ECM 中への浸潤を非常に効率良く抑制した。本研究では、MT1-MMP による局所的 ECM 分解に起因する細胞接着斑の不安定化が、インテグリンを介した情報伝達経路と細胞運動極性形成・維持に及ぼす影響を検討した。具体的には細胞に MT1-MMP および MT1-FAT を遺伝子導入あるいは腫瘍細胞の MT1-MMP を siRNA を用いて knockdown し、I 型コラーゲンとフィブロネクチン分解と FAK、Paxillin、p130^{Cas}、CrkII のリン酸化

の関係を各種抗リン酸化抗体を用いた免疫沈降法および immunoblotting にて解析した。また、Akt の PH ドメインに GFP を融合したキメラ蛋白(GFP-Akt-PH)で PIP₃ の動態、抗 Paxillin、Vincullin、Tubulin 抗体を用いた免疫染色法にて細胞極性形成に対する MT1-MMP 作用の解析を試みた。

2) MT1-MMP による細胞外微小環境変化誘導と浸潤性増殖

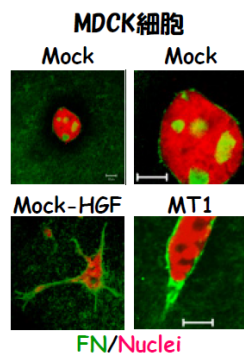
MT1-MMP は腫瘍細胞の 3 次元コラーゲンゲル内への浸潤性増殖に必要である。研究代表者等は 3 次元コラーゲンゲルで培養したイヌ腎上皮細胞(MDCK)が HGF 刺激で誘導される管腔形成に MT1-MMP を必要とすることを報告した。本研究では、3 次元コラーゲンゲル培養を用いて管腔形成と細胞増殖における MT1-MMP 局在、コラーゲンゲル弾性(細胞外微小環境)変化の意義を解析した。

具体的には、MT1-MMP 発現による細胞生存シグナルへの影響と浸潤性増殖機構をインテグリン/FAK 経路を中心に各種抗リン酸化抗体を用いた immunoblotting および免疫染色法にて解析した。また、MDCK 細胞は 3 次元コラーゲンゲル内で囊胞周囲に IV 型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等からなる基底膜様構造を形成する。MT1-MMP 発現と MT1-FAT 発現による増殖様式の違いと関連した ECM 成分を immunoblotting および免疫染色法にて解析を試みた。

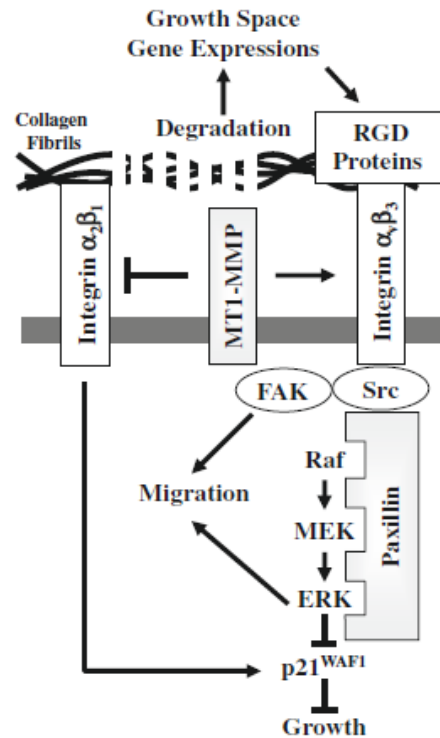
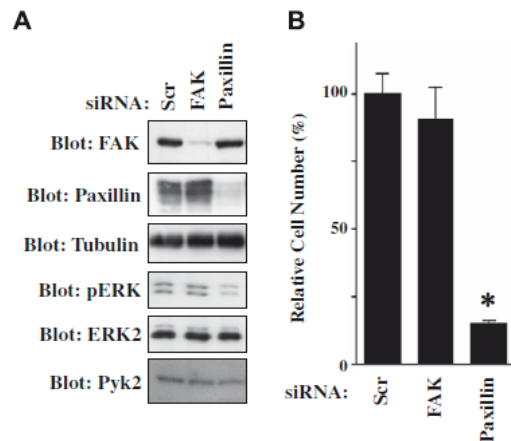
4. 研究成果

3 次元コラーゲン中で MDCK 細胞の肝細胞増殖因子(HGF)による部分的な上皮間葉転換(EMT)の誘導には MT1-MMP が必要であることを報告してきた。MT1-MMP を恒常的に発現させた MDCK 細胞はコラーゲンゲル内で急速に球状増殖するが、細胞塊は依然として基底膜様構造に覆われている。即ち MT1-MMP は I 型コラーゲンの分解による増殖空間の確保と並行して基底膜様構造の代謝回転も行い細胞増殖を誘導していると考えられた。事実、HGF 刺激による部分的 EMT 誘導は、MT1-MMP の活性増強とともに管腔周囲へのフィブロネクチン(FN)の沈着を認めた。

FN やラミニ



ンは細胞増殖、運動、生存に重要な ECM 成分であり、MAPK がその発現制御に関与していると考えられた。ヒト扁平上皮癌細胞のコラーゲンゲル培養において、MT1-MMP 活性を合成阻害剤や siRNA を用いた knockdownn により阻害すると細胞増殖が顕著に抑制された。この際、FAK と ERK の活性化が抑制されていた。また、MT1-MMP 阻害はインテグリン $\alpha\beta_3$ を介した c-Src の活性化も抑制することも見出した。c-Src のエフェクター分子を検索したところ、コラーゲンゲル内において MT1-MMP は Paxillin を介して ERK 活性化と細胞増殖を誘導することを証明した。MT1-MMP はコラーゲンゲル内において細胞外環境の変化を誘導し、c-Src の活性化を惹起し、Paxillin を介して ERK 活性化と細胞増殖を誘導することが判明した(下図)。



がん細胞は EMT 過程において細胞-細胞間接着の低下、運動能と ECM 分解能の増強、そして間質細胞としての ECM 生産能が付与される。TGF- β 刺激などにより EMT が誘導された細胞では FN の産生が亢進されることから、FN は中間径フィラメント Vimentin とともに EMT 誘導のマーカーとして利用されている。しかし、EMT 過程における FN 産生亢進の意義や細胞機能に及ぼす影響については、まだ十分な検討がなされていない。

Ras 変異を有した細胞をデキサメタゾン (DXM) で処理し培地中に FN を添加すると細胞の運動能は低下し、細胞-ECM 間接着と細胞-細胞間接着の増強とともに FN の産生と重合、蓄積が誘導される。即ち、細胞の DXM 処理は FN の産生誘導以外 EMT と相反する細胞現象を導く。この過程において、c-Src と Paxillin が重要であることが報告されている。研究代表者は、Ras 変異に加えて MT1-MMP を高発現しているがん細胞 (HT1080 細胞など) では FN を培地中に加えることなく DXM と MMP 阻害剤処理、あるいは MT1-MMP 発現抑制により FN の重合・蓄積の誘導が認められることを見出した。また、N-カドヘリンを介した細胞間接着の MT1-MMP による制御が FN の重合・蓄積誘導に必要であることが判明した。この FN の重合と蓄積の誘導は細胞運動と浸潤に対して抑制的に作用した。今後は、上皮細胞を用いて EMT 過程において MT1-MMP が FN の重合制御を行う可能性とその詳細な機構について明らかにしていきたい。

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 6 件)

1. Takino, T., Tsuge, H., Ozawa, T., Sato, H. MT1-MMP promotes cell growth and ERK activation through c-Src and paxillin in three-dimensional collagen matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396 (2010), 1042-1047、査読有
2. Sato, H. and Takino, T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. *Cancer Science* 101 (2010), 843-847、査読有
3. Sakr, M., Takino, T., Domoto, T., Nakano, H., Wong, R., Sasaki, M., Nakanuma, Y., Sato, H. GI24 enhances tumor invasiveness by regulating cell surface membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Science*, 101 (2010), 2368-2374、査読有
4. Nishida, Y., Miyamori, H., Thompson, E. W., Takino, T., Endo, Y., Sato, H. Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by membrane type 1 matrix metalloproteinase through an artificial receptor for proMMP-2 generates active MMP-2. *Cancer Research* 68 (2008), 9096-9104、査読有
5. Gantulga, D., Tuvshintugs, B., Endo, Y., Takino, T., Sato, H., Murakami, S., Yoshioka, K. The scaffold protein c-Jun NH₂-terminal kinase-associated leucine zipper protein regulates cell migration through interaction with the G protein G (alpha 13). *Journal of Biochemistry*, 144(2008), 693-700、査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 滝野隆久、堂本貴寛、佐藤博「MT1-MMP は 3 次元コラーゲンゲル内で c-Src1 と Paxillin を介して ERK 活性化と細胞増殖を亢進する」第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場 (大阪府)
2. 滝野隆久、佐藤博「MT1-MMP による浸潤性細胞増殖誘導」第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
3. 滝野隆久、佐藤博「MT1-MMP による浸潤性増殖誘導」第 82 回 日本生化学会大会、2008 年 10 月 22 日、神戸国際会議場 (兵庫県)
4. 滝野隆久、小澤晃正、西田有希、佐藤博「MT1-MMP による浸潤性増殖誘導」第 17 回 日本がん転移学会学術集会、2008 年 7 月 24 日、鹿児島サンロイヤルホテル(鹿児島県)
6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝野 隆久 (TAKINO TAKAHISA)
金沢大学・がん研究所・准教授
研究者番号：40322119

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし