

対象研究テーマ：マトロプロテアーゼを標的とした治療法の開発

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：高特異性 MMP インヒビターの分子設計による制癌剤の開発

研究代表者：横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 准教授 東 昌市

研究成果の概要：

(1) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) に対する生理的インヒビターTIMP-2 と、アミロイド前駆体由来 MMP-2 選択的インヒビターペプチドである APP-IP とを組み合わせることで、MMP-2 に対し、強力かつ高い特異性を持つインヒビターの設計に成功した。(2) コレステロール硫酸による MMP-7 基質特異性変換機構を解明し、このメカニズムを応用した MMP-7 選択的阻害剤開発の手掛かりを得た。

研究分野：構造生物化学

キーワード：分子認識及び相互作用

1. 研究開始当初の背景

悪性のがん組織では、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) が高発現し、がん細胞の浸潤・転移に寄与している。しかしながら、ヒトで見出されている 24 種の MMPs の全てが、がんの浸潤・転移を促進するのではなく、特異性の低い阻害剤によって標的以外の MMPs が阻害されると、がんの転移を助長する可能性や、副作用が現れることが示唆されていた。事実、研究開始当初までに開発された多くの MMPs インヒビターはいずれも特異性が低く、臨床試験の過程で、がんの抗転移剤としての効果が明確ではない場合や、確認された様々な副作用が原因となり、がん治療薬としての利用に至っていなかった。したがって、標的 MMPs に対し、高い特異性を持つインヒビターの開発が重要であると考えた。

MMPs の一つである MMP-2 は、がんの浸潤・転移に対し促進的に作用することが示唆されており、がん治療の良好なターゲット分子であるが、私達は、 β -アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が MMP-2 に高い選択性を持つインヒビター領域を持ち、その領域が APP 分子内の ISYGNALMP 配列 (APP-IP と命名) に局在することを見出した (Higashi and Miyazaki *J. Biol. Chem.* 2003)。また、キメラ MMP-2 改変体を用いた解析 (Higashi and Miyazaki *J. Biol. Chem.* 2008) や 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 (Hashimoto *et al. J. Biol. Chem.* 2011) から、APP-IP による MMP-2 選択的阻害様式を明らかにしてきた。

一方、MMP-7 は特に大腸がんにおいて高頻度で発現しており、その発現量と大腸がんの悪性度が高い相関を示すことが知られていた。私達は、MMP-7 が大腸がん細胞の細胞表層に結合し、特定の細胞膜タンパク質を切断することで、細胞間接着能を高めることを見出していた。この細胞間接着能の獲得により、大腸がん細胞の肝臓への転移能が顕著に増強されることが判明している。さらに、細胞表層のコレステロール硫酸 (CS) が MMP-7 の特異的な結合分子であることを同定し、この脂質との相互作用が上記細胞膜タンパク質の切断に必須であることを明らかにしていた (Yamamoto *et al. J. Biol. Chem.* 2006)。また、CS との結合に重要な MMP-7 分子内のアミノ酸残基を同定したところ、これらの残基が触媒活性部位とは反対側に位置することが明らかになり、CS がアロステリック効果により MMP-7 の活性部位に作用することを明らかにしていた (Higashi *et al. J. Biol. Chem.* 2008)。

2. 研究の目的

本研究では、がんの増殖および浸潤・転移

に促進的に寄与する MMP-2 および MMP-7 の活性を特異的に抑制する阻害剤を、それぞれ、APP-IP および CS との選択的相互作用を基に開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) APP-IP のアミノ酸配列を TIMP-2 の NH₂ 末端側に付加した融合タンパク質を設計し、その cDNA を動物細胞発現用のベクターに導入後、ヒト繊維芽肉腫 HT1080 細胞にトランスフェクトした。この融合タンパク質の安定発現株の conditioned medium から各種クロマトグラフィーを用いて融合タンパク質を精製した。

合成ペプチド基質を用いた MMPs 活性測定系により、各種 MMPs 活性に及ぼす融合タンパク質の阻害効果を調べた。また、培養細胞系の MMP-2 活性に及ぼす融合タンパク質の効果を調べた。

(2) CS による MMP-7 機能変換機構を調べる目的で、種々の濃度の CS 存在下において、MMP-7 と各種基質タンパク質をインキュベートした。その後、SDS-PAGE あるいは基質タンパク質に対する抗体を用いた Western blotting 法で解析することにより、基質タンパク質の分解速度を調べた。また、各基質タンパク質と CS との親和性を、共沈法を用いて調べた。さらに、細胞表層に CS を介して結合した MMP-7 が細胞培養液中あるいは培養プラスチックプレートにコートした基質タンパク質を分解できるか否かについて調べた。

4. 研究成果

(1) APP-IP が MMP-2 に対して高い選択性を持つことに着目し、さらに特異性の高いインヒビター分子の設計を試みた。私達の以前の研究より、生体内の MMP インヒビタータンパク質である TIMP-2 の主鎖の NH₂ 末端 α-アミノ基を修飾すると、MMP インヒビター活性が完全に失われるのに対し、MMP-2 の非触媒ドメインに対する結合能は保持されることが分かっていた。そこで、今回、TIMP-2 の NH₂ 末端に APP-IP のアミノ酸配列を付加したところ、TIMP-2 が持っていた他の MMPs に対する阻害活性は失われたのに対し、MMP-2 に対しては強力な阻害活性を持つ分子となることが判明した (図 1)。この融合タンパク質 APP-IP-TIMP-2 は MMP-2 の合成基質水解活性

を非常に低い阻害定数 ($K_i = 0.68 \text{ pM}$) で阻害するほか、MMP-2 を分泌するがん細胞の移動やこの細胞による IV 型コラーゲンの分解を抑制することが判明した。がん細胞が基底膜を破壊して浸潤・転移する際に基底膜の主成分である IV 型コラーゲンの分解が重要になるが、APP-IP-TIMP-2 はこの浸潤過程を抑制するのに有効な薬剤と成り得る可能性がある。

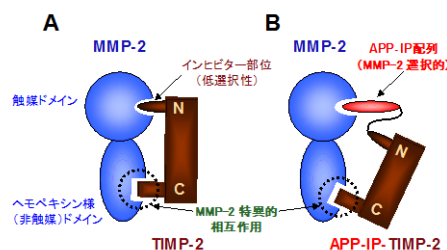


図1. APP-IP-TIMP-2によるMMP-2阻害の模式図
TIMP-2 (A) と APP-IP-TIMP-2 (B) によるMMP-2 阻害様式の比較

(2) プロテアーゼを細胞膜表層に局在させることは、細胞膜タンパク質の分解やプロセッシングを効率化するだけでなく、近傍の細胞外タンパク質を限定的に分解する上でも極めて有効である。上述のように私達は、MMP-7 が、がん細胞膜表層の CS に結合し、特異的膜タンパク質を切断することで、がん細胞の転移能を増強することを見出してきた。本研究では、CS との相互作用が MMP-7 の細胞外マトリックスタンパク質分解活性に及ぼす効果について調べた。その結果、MMP-7 単独では基底膜構成成分の一つである laminin-332 を殆ど分解しないのに対し、CS 存在下ではその分解が著しく促進されることを見出した。反対に、MMP-7 によるカゼインの分解は CS の存在下、顕著に阻害された。一方、MMP-7 による fibronectin の分解は、低濃度の CS 存在下では部分的に阻害されたものの、高濃度の CS 存在下では有意に促進されることが判明し、CS によって MMP-7 の基質特異性が変化することが示唆された。さらに、この基質特異性変化のメカニズムについて調べたところ、CS 存在下で MMP-7 による分解が促進される基質タンパク質は全て CS に対し親和性を持つことが明らかになった。したがって、CS は MMP-7 とその基質タンパク質の両方に結合することで、これらを架橋し、酵素反応を促進することが予想された。これに対し、CS が MMP-7 側のみに結合すると、そ

の基質認識部位が影響を受け、酵素反応における Km 値が増大することで反応速度が低下することが明らかになった。一方、CS を介して細胞膜に結合した MMP-7 は溶液中およびプラスチックプレートにコートした laminin-332 や fibronectin を分解することが判明し、これら細胞接着タンパク質の分解に伴ったがん細胞の脱着が観察された。以上の結果から、細胞表層の CS に結合した MMP-7 は近傍の CS と親和性を持つ細胞接着タンパク質を選択的に分解しつつ、がん細胞の移動を促進する可能性が考えられた。この結果は、CS と MMP-7 との相互作用を標的とする抗転移剤開発の可能性を与えるものとする。

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 3 件)

1. Eriko Komiya, Momoko Furuya, Naoko Watanabe, Yohei Miyagi, Shouichi Higashi, and Kaoru Miyazaki: Elevated expression of angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) in tumor stroma and its roles in fibroblast activation. *Cancer Sci.* **103**, 691-699, 2012

2. Jun Oyanagi, Takashi Ogawa, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, and Kaoru Miyazaki: Epithelial-mesenchymal transition stimulates human cancer cells to extend microtubule-based invasive protrusions and suppresses cell growth in collagen gel. *PLoS One.* **7**, e53209, 2012

3. Shouichi Higashi, Tomokazu Hirose, Tomoka Takeuchi, and Kaoru Miyazaki: Molecular design of a highly selective and strong protein inhibitor against matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). *J. Biol. Chem.* **288**, 9066-9076, 2013

[学会発表] (計 6 件)

1. 竹内友香、宮崎 香、東 昌市: カルシウムイオン結合部位を欠く MMP-7 変体は、がん細胞表層のコレステロール硫酸に強く結合し、MMP-7 が誘導する細胞凝集を抑制する。第 17 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(浜松)、演題番号 2、2012 年 8 月 10-11 日

2. Eriko Komiya, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Yohei Miyagi, Kaoru Miyazaki: Overexpression of Angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) in Tumor Stroma and Vasculature: Differential Regulation and Functions. Brisbane, The 14th International Biennial congress of the Metastasis Research Society(Brisbane、Australia)、No.174 (Abstract p29)、September 2-5, 2012

3. Hiroki Sato, Takashi Ogawa, Eriko Komiya., Jun Oyanagi, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki: Laminin gamma2 chain promotes invasion of tumor cells into vascular endothelial cell layer in vitro. The 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society (Brisbane、Australia)、No.191 (Abstract p29)、September 2-5, 2012、

4. Jun Oyanagi, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki: EMT of tumor cells promotes microtubule-based protrusions in 3D collagen matrix, suppressing cell growth. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Sapporo) , J-1055, September 19-21, 2012

5. Hiroki Sato, Jun Oyanagi, Eriko Komiya, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki: Laminin gamma 2 chain induces transendothelial migration of cancer cells by modulating cytoskeleton of endothelial cells. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Sapporo) , J-3073, September 19-21, 2012

6. 竹内友香、宮崎 香、東 昌市: がん細胞表層に結合した MMP-7 を分子標的とするがん転移抑制剤の開発。第 85 回日本生化学会大会(福岡)、演題番号 3T28-6 および 3P-276、2012 年 12 月 14-16 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横浜市立大学
大学院生命ナノシステム科学研究科
准教授 東 昌市

(2) 研究分担者

横浜市立大学
大学院生命ナノシステム科学研究科
教授 宮崎 香

(3) 本研究所担当者

細胞機能統御・教授 佐藤 博