

研究区分	一般共同研究
研究課題	標的 MMPs の活性を特異的に制御する機能性分子の開発
研究代表者	所属・職名・氏名 横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科・准教授・東昌市
受入担当教員	職名・氏名 教授・佐藤博
【研究目的】	悪性がんの組織内で高発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は、がん細胞の浸潤性増殖および転移を支えることから、がん治療の有望な標的分子である。しかし、従来型 MMP 阻害剤は特異性が低く、臨床試験の過程で様々な副作用を示したため、それらを抗がん剤として開発することに成功していない。そこで本共同研究では、個々の MMP の酵素活性あるいはそれらの一機能の特異的に阻害するインヒビターを創出することにより、副作用の極めて少ないがん治療薬の開発へ繋げることを目指した。
【研究内容・成果】	<p>今回、β-アミロイド前駆体タンパク質 (APP) に由来する 10 残基ペプチドインヒビター (APP-IP と命名) が MMP-2 に対し、高い選択性を持つこと、および MMP-2 選択性に関与する APP-IP のアミノ酸残基が私達のこれまでの研究で明らかになっていることを利用して、APP-IP を改変し、MMP-7 および MMP-9 のそれぞれに対して選択性を持つペプチドインヒビターの開発を試みた。APP-IP の改変方法としては、選択性に関与するアミノ酸残基を一つずつ 20 種のアミノ酸を網羅するようにランダム変異を導入し、標的 MMP との親和性獲得を指標に選別を行った。選別の方法としては、APP-IP 改変体を大腸菌の外膜タンパク質との融合分子として、大腸菌表層にディスプレイさせる方法、および APP-IP 改変体を GST 融合タンパク質として菌体内に発現させ、各クローンの溶解物について標的 MMP をリガンドとしたリガンドブロッティング法を用いて親和性を調べる方法を比較した。その結果、リガンドブロッティングを用いる方法が変異導入後の親和性上昇を検出するのに有効であることが判明した。この方法により MMP-9 に対する親和性を獲得したペプチド 2 種、MMP-7 に対する親和性ペプチド 1 種を得た。今後これらのペプチドと各 MMP に対して親和性を持つ生体内物質を組み合わせ、より特異性の高いインヒビターを開発する予定である。</p> <p>一方、私達は、がん細胞表層のコレステロール硫酸に MMP-7 が結合すると、近傍にある膜タンパク質を切断し、がん細胞の転移能を顕著に上昇させることを見出してきたが、MMP-7 によって切断される膜タンパク質は未同定であった。今回、がん細胞の表層タンパク質をビオチン標識した後、MMP-7 処理を行い、培養液中に切り出されてくるビオチン標識されたタンパク質断片を精製した。これらをトリプシン消化→質量分析を行うことにより、いくつかの膜タンパク質が MMP-7 の基質となっていることを明らかにした。今後、これらの細胞表層タンパク質の中でがん細胞の転移能上昇に関与するタンパク質の同定を試みる予定である。</p>
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Shouichi Higashi</u>, Tomokazu Hirose, Tomoka Takeuchi, and Kaoru Miyazaki (2013) Molecular design of a highly selective and strong protein inhibitor against matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). <i>J. Biol. Chem.</i> 288, 9066-9076 2. Hiroki Sato, Jun Oyanagi, Eriko Komiya, Takashi Ogawa, <u>Shouichi Higashi</u>, and Kaoru Miyazaki (2014) Amino-terminal fragments of laminin γ2 chain retract vascular endothelial cells and increase vascular permeability. <i>Cancer Sci.</i> 105, 168-175 3. Go Kamoshida, Takashi Ogawa, Jun Oyanagi, Hiroki Sato, Eriko Komiya, <u>Shouichi Higashi</u>, Kaoru Miyazaki, and Tsutomu Tsuji (2014) Modulation of matrix metalloproteinase-9 secretion from tumor-associated macrophage-like cells by proteolytically processed laminin-332 (laminin-5). <i>Clin. Exp. Metastasis</i> 31, 285-291 4. Eriko Komiya, Hiroki Sato, Naoko Watanabe, Marii Ise, <u>Shouichi Higashi</u>, Yohei Miyagi, and Kaoru Miyazaki (2014) Angiomodulin, a marker of cancer vasculature, is upregulated by vascular endothelial growth factor and increases vascular permeability as a ligand of integrin αvβ3. <i>Cancer Med.</i> in press <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 佐野 未奈、東 昌市：極めて特異性の高い MMP-2 インヒビタータンパク質の分子設計とその in vitro がん細胞浸潤に及ぼす効果の解析。第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (大阪)、演題番号 23、2013 年 8 月 16-17 日 <u>Young Investigators Award</u> を受賞 2. 佐野 未奈、小柳 潤、宮崎 香、東 昌市：3 次元浸潤モデル系を用いた MMP-2 特異的インヒビターのがん細胞浸潤抑制効果の解析。第 86 回日本生化学会大会 (横浜)、演題番号 1T10p-10 および 2P-396、2013 年 9 月 11-13 日 3. 鴨志田 剛、小川 崇、小柳 潤、佐藤 拓輝、古宮 栄利子、東 昌市、宮崎 香、斧 康雄、辻 勉：細胞外マトリックスタンパク質ラミニン-332 による単球からのマトリックスプロテイナーゼ-9 産生調節。第 86 回日本生化学会大会 (横浜)、演題番号 1T11p-12 および 1P-178、2013 年 9 月 11-13 日 4. 佐藤拓輝、東昌市、宮崎香：ラミニンγ2鎖による血管透過性亢進は、N末端部EGF様リピートのヘパリン結合部に依存する。第72回日本癌学会学術総会 (横浜)、P-1184、2013年10月3-5日 <p>【その他特筆事項】</p> <p>研究室学生を受賞があり、横浜市立大学 HP で紹介して頂きました。 佐野 未奈、第 18 回日本病態プロテアーゼ学会 Young Investigators Award http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/131002.html</p>