

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分	一般共同研究	
研究課題	標的 MMPs に対する高特異性阻害剤の分子設計とがん悪性進展抑制法の開発	
研究代表者	所属・職名・氏名	横浜市立大学・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】	<p>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的とした。</p>	
【研究内容・成果】	<p>昨年度に引き続き、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) が高い MMP-2 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、他の MMPs に対して選択性を持つペプチドインヒビターを開発することを試みた。</p> <p>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 との特異性獲得を指標に選別を行った。選別方法は、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 および MMP-2 をリガンドとしたリガンドブロッティング法により親和性を調べる方法を用いた。その結果、MMP-9 と MMP-7 のそれぞれに対する親和性が高まり、反対に MMP-2 との親和性が顕著に低下する APP-IP 改変体が得られた。一方、MT1-MMP は各種 APP-IP 改変体に対する親和性スペクトラムが MMP-2 のそれと類似しており、選択性を顕著に高めることは困難であったが、MMP-2 に対する親和性より MT1-MMP に対する親和性が高い APP-IP 改変体を得られた。また、MMP-9 に対する阻害選択性を高めたペプチドはこれをいくつかの MMP-9 結合性タンパク質と組み合わせることにより、その阻害活性と MMP-9 選択性を飛躍的に高めることに成功した。</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、がん細胞の細胞凝集を誘導するとともに、それら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タンパク質断片をトリプシン消化→質量分析を行うことにより同定したところ、I 型膜タンパク質である HAI-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1) が MMP-7 に切断されることを明らかにした。また、切り出された HAI-1 細胞外領域に細胞凝集誘導活性があることを明らかにし、本タンパク質の切断ががん細胞の転移能上昇に関与することが示唆された。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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 2. 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 3. 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> 3, 537-549 	

4. Jun Oyanagi, Nako Kojima, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Keiji Kikuchi, Katsuya Sakai, Kunio Matsumoto, and Kaoru Miyazaki (2014) Inhibition of transforming growth factor- β signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. *Exp. Cell Res.* **326**, 267-279
5. Kazuhiro Yamamoto, Kaoru Miyazaki, and Shouichi Higashi (2014) Pericellular proteolysis by matrix metalloproteinase-7 is differentially modulated by cholesterol sulfate, sulfatide, and cardiolipin. *FEBS J.* **281**, 3346-3356

【学会発表】

1. 佐野 未奈、東 昌市：がん細胞浸潤および血管内皮細胞増殖に及ぼす高特異性MMP-2 インヒビターの効果。第36回日本血栓止血学会（大阪）、演題番号0-112, P-032、2014年5月29-31日
2. 佐藤 拓輝、東 昌市：がん浸潤マーカー・ラミニン γ 2 鎖の血管内皮下浸潤活性とその機構。第36回日本血栓止血学会（大阪）、演題番号0-113, P-033、2014年5月29-31日
3. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市：MMP-7により切断修飾を受ける細胞表層タンパク質の同定。第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（大阪）、演題番号9、2014年8月8-9日
4. 佐野 未奈、東 昌市：高特異性MMP-2インヒビターのがん細胞浸潤抑制効果と血管新生に及ぼす効果。第87回日本生化学会大会（京都）、2P-396、2014年10月15-18日
5. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市：がん細胞表層に結合したMMP-7によって切断され、細胞凝集を惹起するタンパク質の同定。第87回日本生化学会大会（京都）、2T15a-12、2P-399、2014年10月15-18日
6. 得津奏子、菅原経継、井野洋子、倉田洋一、木村弥生、東 昌市、平野 久：ヒト 26S プロテアソームサブユニットのリン酸化修飾状態の解析。第65回日本電気泳動学会総会・シンポジウム（横浜）、P-8、2014年10月24-25日

【その他特筆事項】

研究室学生の受賞があり、それぞれ、横浜市立大学 HP で紹介して頂きました。

1. 佐野 未奈、第 36 回日本血栓止血学会 優秀ポスター発表賞
<http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/140623.html>
2. 石川 智弘、第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 Young Investigators Award
<http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/140828.html>
3. 石川 智弘、第 87 回日本生化学会大会 若手優秀発表賞
<http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/141215.html>
4. 得津奏子、第 65 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム 優秀ポスター賞
<http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/141212.html>