

博士論文（要約）

論文題目 がん浸潤におけるCD44を介した
MT1-MMPの機能制御メカニズムの解明

氏 名 鈴木 隆

【背景】

がんの浸潤は、がん細胞が細胞外マトリックス (ECM) との接着と脱離を繰り返し、運動性を高めることで生じる。この過程では、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が重要な役割を果たす。中でも、膜貫通型 MMP である MT1-MMP は、がん細胞の浸潤先端に局在し、I 型コラーゲン等の ECM や接着分子を分解することで、がんの浸潤を促進する。

MT1-MMP は、細胞外に酵素 (CAT) ドメインとヘモペクシン様 (HPX) ドメインを有し、細胞膜上にて、ヒアルロン酸 (HA) をリガンドとする接着分子 CD44 と HPX ドメインを介して会合する。この相互作用により、MT1-MMP は CD44 を介して間接的にアクチン骨格と連結し、浸潤先端へリクルートされると考えられている (Fig. 1A)。また、MT1-MMP は CD44 の細胞外領域を切断する活性を有しており、浸潤先端にて CD44 を介した HA との接着を解除し、細胞の運動性を高める役割を果たす (Fig. 1B)。

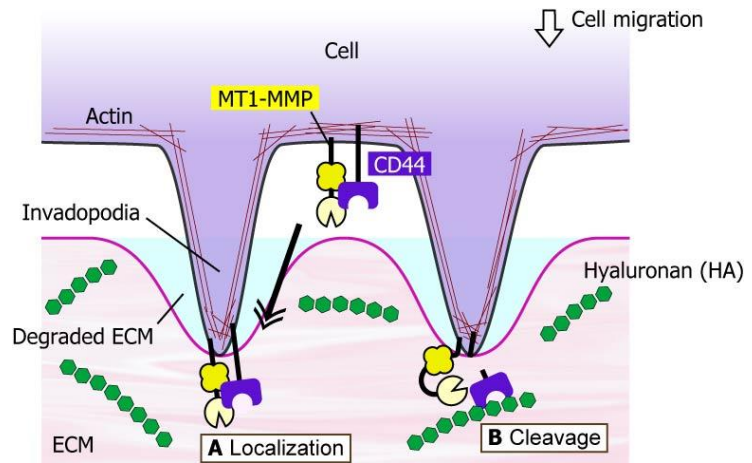


Fig. 1 CD44 との結合を介した MT1-MMP の機能

MT1-MMP は HPX を介して CD44 と会合することにより、浸潤先端へ局在化する (A)。また、MT1-MMP は CD44 を切断することで、細胞接着を解除する役割を果たす (B)。

このように、がん浸潤の過程にて MT1-MMP は、CD44 との相互作用を介して浸潤先端へ局在化する一方、CD44 を切断する活性を有しており、この相反する機能をどのように達成しているか不明であった。そこで本研究では、MT1-MMP と CD44 の相互作用様式を明らかにすることにより、がん浸潤において MT1-MMP の機能が CD44 によってどのように制御されるか解明することを目的とした。

【結果】

1. MT1-MMP と CD44 の相互作用における HABD の構造依存性

これまでの研究より、CD44 の HA 結合ドメイン (HABD) は、HA 低親和性の O-state と、HA 高親和性の PD-state の間の構造平衡にあり、HA 非結合下では O-state に (Fig. 2A)、HA 結合下では PD-state に (Fig. 2B)、それぞれ平衡が偏ることが判明している。また、このような構造平衡が細胞のローリングに重要な役割を果たすことも明らかにしている。MT1-MMP と CD44 の結合において HABD の構造依存性が存在するか否か調べるため、MT1-MMP の HPX ドメイン (以下 HPX) と HABD を調製し、等温滴定カロリメトリー (ITC) 法による相互作用解析を行った。その結果、HPX と野生型 HABD の解離定数は $13 \mu\text{M}$ と算出された (Fig. 2C)。次に、HABD の構造を HA 高親和性の PD-state に固定した変異体を用いて同様の解析を行ったところ、解離定数は $153 \mu\text{M}$ と野生型の 10 倍以上に増大した (Fig. 2D)。HA 非結合下にて野生型 HABD は主に O-state にあることから (Fig. 2A)、HPX は PD-state よりも O-state を強く認識することが明らかとなった。

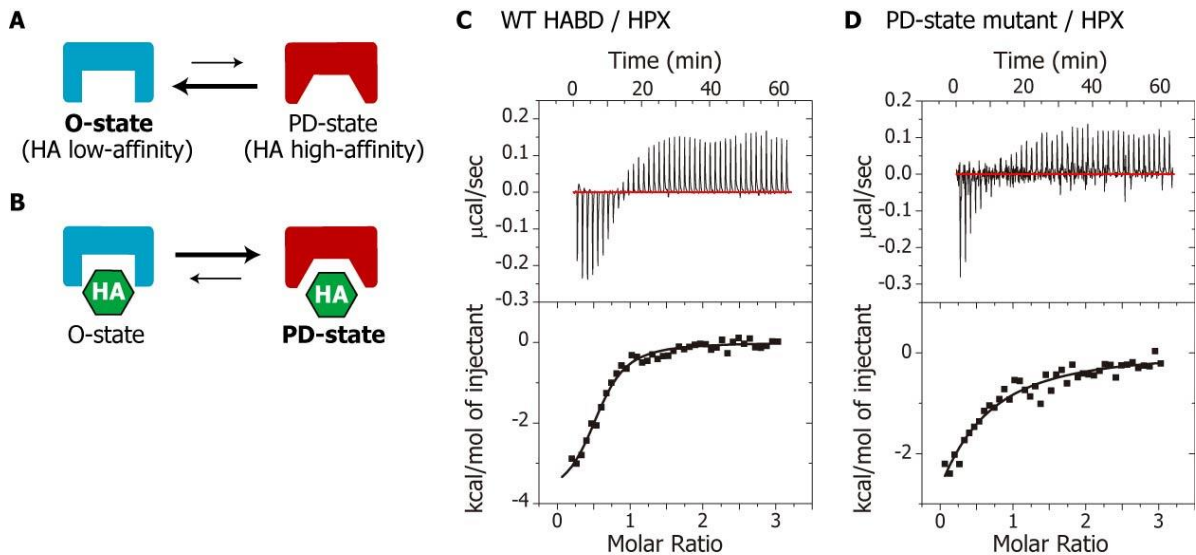
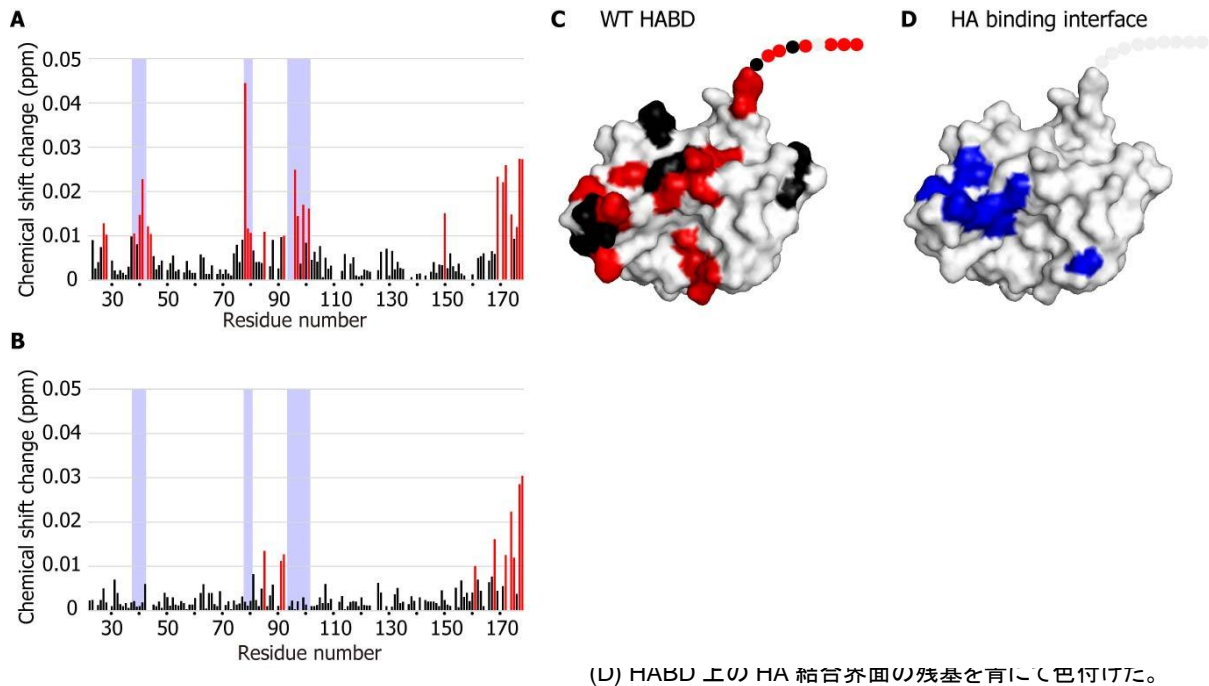


Fig. 2 HABD の構造依存的な MT1-MMP の結合
 (A-B) HA 非存在下 (A) および HA 存在下 (B) における HABD の 2 状態平衡。
 (C-D) 濃度 150 μM の野生型 (WT) HABD (C)、および濃度 152 μM の PD-state 変異体 (D) に対して HPX を滴定したときの、ITC データ (上) および等温滴定曲線 (下)。Single-site model を用いたフィッティング曲線を実線にて示した。

2. CD44 HABD と MT1-MMP HPX の相互作用の構造生物学的解析

MT1-MMP が O-state にある CD44 を認識する構造メカニズムを解明するため、NMR 解析を行った。まず、均一 ^2H , ^{15}N 標識野生型 HABD に対し非標識 HPX を滴定し、HABD の NMR スペクトルの変化を調べた。その結果、HPX の滴定に伴って一部のシグナルにおいて強度減少を伴う化学シフト変化が観測された (Fig. 3A)。これらの残基を HABD の構造上にマッピングすると、分子表面に連続的に分布し、HPX との相互作用の形成に重要な役割を果たすことが示唆された (Fig. 3C)。さらに、これまでに判明している HA 結合界面と比較したところ、大半の領域が重複することが判明した (Fig. 3D)。これより HABD は、HPX および HA を共通の領域を介して認識することが示唆された。次に、野生型 HABD に対し、鎖長 12 mer の HA を 2 等量添加した条件にて、同様の HPX 滴定実験を行ったところ、HA 結合界面を中心に、HPX の滴定に伴う化学シフト変化は顕著に抑制された (Fig. 3B)。これより、HA 結合下では HPX と HABD の相互作用が抑制されることが明らかとなった。この結果は、HABD 上の HPX 結合界面と HA 結合界面が重複するため、HA 存在下では HPX と HABD の相互作用が競合的に阻害されることを示している。



(D) HABD 上の HA 結合界面の残基を青にて色付けた。

3. MT1-MMP による CD44 切断における HABD の構造平衡の意義

次に、CD44 の構造依存的な MT1-MMP の相互作用が、CD44 の切断に与える影響を調べた。これまでに、CD44 は MT1-MMP による切断を受け、約 37 kDa の可溶性 CD44 (sCD44) を生成することが報告されている。そこで、ヒト胎児腎細胞 HEK 293T に対し、MT1-MMP と CD44 を一過的に共発現させ、培地中に放出された sCD44 を WB により検出した。まず、野生型 CD44 と MT1-MMP を共発現させた細胞では、MT1-MMP を共発現させない条件と比較し、sCD44 由来のバンド強度が顕著に増大した (Fig. 4)。これより、MT1-MMP によって CD44 の切断が生じていることが確認された。次に、CD44 の構造を O-state あるいは PD-state に固定した変異体を用いて同様の解析を行った。その結果、いずれの変異体でも野生型と比較し、sCD44 由来のバンド強度が減弱した (Fig. 4)。よって、MT1-MMP による CD44 の切断には、CD44 が O-state と PD-state の 2 状態を形成することが重要であることが明らかとなった。O-state 変異体において切断が抑制された原因として、MT1-MMP との親和性は強いものの、形成される複合体は切断に不利な配向であるためと考えられる。また、PD-state 変異体では切断可能な配向をとることは可能であるものの、MT1-MMP との親和性が低く、細胞膜上で両者の近接が抑制されるためと考えた。

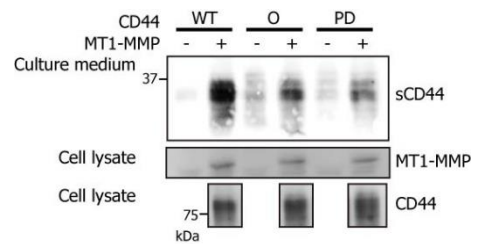


Fig. 4 MT1-MMP による CD44 の切断における HABD の構造依存性

細胞上に、野生型 CD44 (WT)、O-state 変異体 (O)、および PD-state 変異体 (PD) を MT1-MMP と共発現させ、培地中の sCD44 を抗 CD44 抗体にて検出した。また、細胞上に発現した MT1-MMP を抗 FLAG-tag 抗体にて、CD44 を抗 CD44 抗体にて検出した。

【考察】

以上の結果に基づき、CD44 を介した MT1-MMP の浸潤先端への局在化と、MT1-MMP による CD44 の切断という 2 つの機能が両立するメカニズムについて考察した。細胞膜上に発現した MT1-MMP と CD44 が形成する複合体において、CD44 は HPX に対して高親和性の O-state と低親和性の PD-state の 2 状態平衡にあり、O-state との複合体では切断が抑制されている (Fig. 5A)。HA 非存在下における CD44 の平衡は、HPX に対して高親和性の O-state に偏っており、この複合体では MT1-MMP による切断が抑制されているため、複合体を保持したまま細胞内のアクチン骨格の再構成により浸潤先端へリクルートされる (Fig. 5A)。

一方、細胞接着が亢進する浸潤先端では、MT1-MMP と CD44 の複合体は HA を含む ECM に近接する (Fig. 5B)。このとき、構造平衡により HPX に対して低親和性の PD-state へ移行すると、CD44 は HA と結合する。CD44 の HABD 上の HA 結合面は、MT1-MMP 結合面と共通しているため、CD44 に HA が結合すると、切断に不利な配向の複合体を形成できなくなる。その結果、MT1-MMP は CD44 を切断可能な配向をとることができるようになり、CD44 を切断し HA との接着を解除する (Fig. 5B)。以上の機構により、MT1-MMP による CD44 の切断は時空間的に制御され、CD44 を介した浸潤先端への局在化との両立を達成していると考えた。

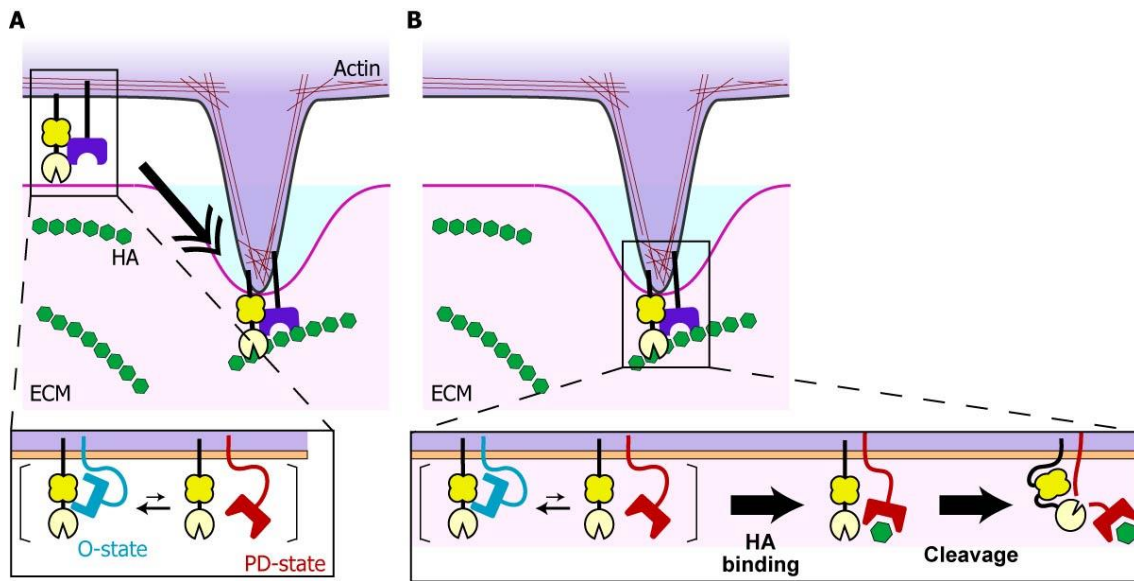


Fig. 5 CD44 の 2 状態平衡を介した MT1-MMP の機能制御モデル

(A) 細胞膜上に発現した MT1-MMP は、HPX を介して CD44 と複合体を形成する。HA 非存在下では、CD44 の平衡は HPX 高親和性の O-state に偏っており、複合体を保持したまま、MT1-MMP を浸潤先端へリクルートする。
(B) 浸潤先端では、HA を含む ECM と近接する。CD44 が、構造平衡によって HPX 低親和性の PD-state へ移行すると、HPX と結合面が共通する HA が結合し、HPX との再結合が阻害される。その結果、切断抑制的な状態が解除され、MT1-MMP による CD44 の切断が誘起される。