

# 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1による 細胞接着因子 CD44 のプロセッシングを介した 腫瘍細胞運動性の検討

植 田 純 子

東京慈恵会医科大学整形外科学講座

(受付 平成 15 年 12 月 15 日)

## THE IMPORTANCE OF THE PROCESSING OF CD44 BY MEMBRANE-TYPE 1 MATRIX METALLOPROTEINASE IN TUMOR CELL MIGRATION

Junko UEDA

*Department of Orthopedic Surgery, The Jikei University School of Medicine*

Tumor cell migration is a multiple step process that involves concerted action of adhesion molecules and proteases outside the cells. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is believed a key enzyme in this process, and a cell surface hyaluronan receptor CD44 is reported to be one of the substrates of this enzyme. Here many migrative tumor cells are shown to express CD44 and MT1-MMP. Highly migrative fibrosarcoma cell line HT1080 endogenously expressed these two molecules. The migration of HT1080 cells was inhibited by a synthetic MMP inhibitor BB94, specific downregulation of MT1-MMP, and by expressing mutants of MT1-MMP or CD44, which interrupts the association between them. And the processing of CD44 was partially inhibited. These results address the possibility that the processing of CD44 by MT1-MMP plays a crucial role in CD44-mediated tumor cell migration in HT1080 cells.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2004; 119: 165-75)

Key words: cell migration, MT1-MMP, CD44

### I. 緒 言

マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinases; MMPs) は亜鉛イオンを活性部位に持つ金属酵素の一群である。現在哺乳動物においては 23 種類の MMPs が同定されており、相互によく保存されたドメイン構造を持ち遺伝子ファミリーを形成している<sup>1)2)</sup>。これらの酵素はそれぞれに基質特異性を持ち<sup>1)2)</sup> また異なる遺伝子発現の制御下に置かれているものの<sup>3)</sup>、全体でほとんどすべての細胞外基質 (Extracellular

Matrix: ECM) 構成成分に対する分解活性を持ち、多様な ECM に対応できるといわれている。近年の研究によりその基質は ECM のみならず、成長因子、サイトカイン、各種受容体、細胞接着因子にまで及ぶことが明らかとなった。MMPs は細胞外環境において、これらを分解、あるいは切断することによりその生理活性を制御している可能性が示唆されている<sup>2)4)5)6)</sup>。また MMPs の活性はその内因性特異的インヒビターである TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) によって制御されている。腫瘍細胞はしばしば複数の

MMPsを過剰発現し、このことは腫瘍の浸潤、転移に重要な役割を果たすと考えられている<sup>27)8)</sup>。MMPsはその構造から2つのサブグループに分類される。細胞から分泌される分泌型のMMPsと細胞膜に結合する膜型MMPs (Membrane type-MMPs: MT-MMPs)である。分泌型MMPsは細胞より分泌されて産生細胞より比較的離れた部位でその活性を発現できるため細胞外の広範なECM分解に関与する。MT-MMPsは現在までに6種類同定されており、その構造上の特徴はC末端側の1型の膜貫通ドメイン、あるいはGlycosylphosphatidylinositol (GPI)により産生細胞の細胞膜に結合していることである<sup>4)</sup>。このようにして細胞膜表面に局在することによって、細胞の増殖や運動に伴う細胞周辺部に局限したECM分解を担当すると考えられる。

腫瘍細胞において発現が認められるMT-MMPsのうちでも、最初に同定されたMT1-MMPは種々の癌組織に発現が亢進していることからその悪性化に寄与する因子として最も有力視され、研究が進められてきた<sup>9)-12)</sup>。MT1-MMPは幅広い基質特異性を保持していることがわかっており、基質となるECMとして現在までにI, II, III型のコラーゲン、ファイブロンectin、ラミニン1と5、ビトロネクチン、アグリカン等が同定されている<sup>13)-20)</sup>。また、潜在型酵素として細胞より分泌されたproMMP-2<sup>21)</sup>、proMMP-13<sup>22)</sup>の活性中心をマスクしているプロペプチドを切断除去することによってそれらを活性化させるという働きも持っている。またそれ以外にもCD44<sup>23)</sup>、ラミニン-5の $\gamma$ 2鎖<sup>20)</sup>、インテグリン $\alpha$ V鎖<sup>14)</sup>、組織トランスグルタミナーゼ (tissue transglutaminase: tTG)<sup>25)</sup>の切断酵素としても働き、その結果として細胞運動を変化させることが報告されている。また細胞表面においてMT1-MMPによってサイトカインの不活性化が起こることも報告された<sup>6)</sup>。このようにMT1-MMPは多彩な機能を有する分子であり、またその発現が高浸潤性の腫瘍で亢進していることから推測されるように、これまでにMT1-MMPを強制発現させることにより*in vitro*における細胞の浸潤能が亢進すること<sup>10)</sup>、また実験的転移をも促進することが報告されている<sup>26)</sup>。われわれはMT1-MMPの発現のみ

を単独で抑制したところ、他のMMPの発現下でもその腫瘍細胞の運動能や浸潤能を著しく阻害したことからMT1-MMPが浸潤性腫瘍に対する治療の重要なターゲットとなりうる可能性について報告した<sup>27)</sup>。またそのMT1-MMPの標的となる分子の1つとして梶田らは先に述べたCD44を報告した<sup>23)</sup>。糖タンパク質CD44は多彩な機能を持つ細胞接着因子であり、リンパ球のホーミング、Tリンパ球の活性化、創傷治癒、血管新生、腫瘍の浸潤転移などの生理的あるいは病的状態に関与すると言われている<sup>28)-30)</sup>。CD44は単一の分子ではなく、その翻訳後修飾やスプライシングバリエーションによって様々な構造のアイソフォームが存在する<sup>28)</sup>。そのうちで最も豊富に存在するのはまったくバリエーションを含まないCD44でありstandard hematopoietic CD44 (CD44H)と呼ばれている。CD44はそのN端のglobular domainにおいてヒアルロン酸、I型コラーゲン、ファイブロンectinなどのECM分子と結合するが、この結合を通じて細胞はECMに接着すると同時にさまざまな生理刺激を受けることが報告されている<sup>28)</sup>。CD44は細胞表面でプロセッシングを受けることが知られており<sup>28)30)31)</sup>、そのプロセッシング産物(可溶性CD44)は細胞培養上清中<sup>23)30)31)</sup>、関節液中<sup>32)</sup>、また血清中<sup>33)34)</sup>に検出される。森、梶田らは過去にMT1-MMPがCD44と会合し、それをプロセッシングすることを報告した<sup>23)35)</sup>。興味深いことにCD44H、およびMT1-MMPの発現レベルの低い細胞にそれぞれを単独で発現させても運動の亢進はみられないが、両者を同時に発現させるとCD44Hのプロセッシングを伴って細胞運動が亢進したのである<sup>23)</sup>。

本研究では、このMT1-MMPを介したCD44のプロセッシングが実際の腫瘍細胞においてその運動装置として機能しているのかを検証することを目的とした。

## II. 方 法

### 1. 細胞培養

Human pancreas carcinoma (MIA Paca-2), breast carcinoma (ZR75-1) (MDA-MB-231) (MCF7), malignant melanoma (A375), glioblastoma (U251), bladder carcinoma (T24)

(KK47), cervix carcinoma (Hela), prostate carcinoma (LNCAP), osteosarcoma (MG63) は ATCC (American Type Culture Collection) から購入し, 10% FBS と Kanamycin を含む Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) medium (Life Technologies) で培養した. Epidermoid carcinoma (A431), pancreas carcinoma (Panc1), gastric carcinoma (TMK-1) は ATCC から購入し, 10% FBS と Kanamycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies) で培養した. Fibrosarcoma (HT1080) は, 10% FBS と Penicillin, streptomycin を含む DMEM (Life Technologies) で培養した. 培養は 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で行った.

細胞への遺伝子導入は 6 well の培養皿に 1×10<sup>5</sup> cells/well の濃度で細胞を撒き, それぞれのウェルに 2 μg の DNA を FuGENE6 (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland) を用いて production manual により行った.

## 2. RT-PCR 法

各種細胞株の 3.0 μg total RNA から random primer (0.3 μg) と Superscript II (Gibco BRL) を用いて一本鎖 cDNA (RTproduct) を合成した. MicroSpin™column S-200 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて random primer を取り除いた後, 1 μl の RT product を鋳型として Takara DNA thermal cycler MP (Takara Co.) を用いて 30 サイクルの PCR を行った. (GAPDH に関しては 20 サイクル) 用いたプライマーは以下のとおりである.

CD44 (forward primer: 5'-AGACATCTACCCCAGCAAC-3', reverse primer: 5'-CGTTGAGTCCACTTGGCTTTC-3'); MT1-MMP (forward primer 5'-GCTTGCAAGTAA-CAGGCAA-3', reverse primer: 5'-AAATTC-TCCGTGTCCATCCA-3'); GAPDH (forward primer: 5'-AAGGCTGAGAACGGGAAGCTT-GTCATCAAT-3', reverse primer: 5'-TTC-CCGTCTAGCTCAGGGATGACCTTG CCC-3').

## 3. 発現プラスミド

CD44H をコードする cDNA は MIA Paca-2

細胞より抽出した RNA から reverse transcript PCR (RT-PCR) を用いて単離し, mammalian expression vector, pSG5 (Stratagene) にサブクローニングした. その遺伝子配列は accession no. M24915 と等しいことを確認した. MT1-MMP によって切断されると推測される Lys 158 から Thr 197 までの配列を欠失した変異体 CD44HM にさらに N 末に FLAG-tag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-AspLys) を付加した CD44HM-F は PCR 法により作成した. ヒト MT1-MMP の cDNA (accession no. D26512) を pSG5 にサブクローニングした. 酵素活性ドメイン (ΔTyr<sup>112</sup>-Pro<sup>312</sup>) を欠失しさらに N 末に FLAG-tag を付加した変異体 MT1-PEXF も PCR 法により作成した. (Sequence data are available from GenBank/EMBL/DDBJ under indicated accession nos.)

## 4. 抗体と阻害剤

ウサギ抗 CD44 ポリクローナル抗体 (C1-1) はヒト CD44 の stem 領域の 8 アミノ酸をウサギに免疫して作成した (サワデー). マウス抗 FLAGM2 抗体は Sigma Chemical Co., Ltd. (MO, U.S.A.) より購入した. マウス抗アクチン抗体は Chemicon International より購入した. マウス抗ヒト MT1-MMP 抗体でヘモペキシン様ドメイン (222-1D8) を認識するものは第一ファインケミカル社の岩田博士に供与していただいた.

MMP 阻害薬 BB94 (Talbot and Brown, 1996) は British Biotech の Peter Brown 博士の好意により供与していただいた.

## 5. RNA interference (RNAi)

21~23 ヌクレオチドの 2 本鎖 RNA は 3' 末端に UU のついた互いに相補的な 1 本鎖 RNA をアニーリングさせることによって得た.

### MT1-MMP

AUGCAGAAGUUUUACGGCUUGUU  
CAAGCCGUAAAACUUCUGCAUUU,

コントロールとして, ヒト MT1-MMP の遺伝子配列と相同性がないことを確認した EGFP の RNA を用いた.

GCACCAUCUUCUUCAAGGACGUU  
CGUCCUUGAAGAAGAUGGUGCUU,

細胞への遺伝子導入は OLIGOFECTAMINE

(Invitrogen)を用いてメーカーのプロトコールに従って行った。トランスフェクションを行う16時間前に細胞を $1 \times 10^5$  cells/wellで6 wellのculture plate (Corning)に播いた。その後無血清培地中でOLIGOFECTAMINEを用いて1ウェル当たり $30 \mu\text{l}$ のdsRNA溶液( $20 \mu\text{M}$ )をトランスフェクションし6時間後に血清入りの培地に変えて反応を停止させた。細胞は24~48時間後に実験に用いた。

### 6. ウェスタンブロッティング

細胞を6 wellのculture plateで培養し遺伝子導入し、48時間後に細胞と培養上清をそれぞれ回収した。細胞はPBSで1回洗浄した後 $200 \mu\text{l}$ のSDS-PAGEローディングバッファーで溶解し回収した。培養上清は3,000 rpmで5分間遠心して細胞を除いた後15,000 rpmで30分間遠心して不溶物を取り除いた。最終濃度が10%になるようにトリクロロ酢酸(TCA)を加えTCA沈殿によりたんぱく質を濃縮し、 $40 \mu\text{l}$ のローディングバッファーに溶解した。これらを15分煮沸したものをSDS-PAGEのサンプルとした。SDS-PAGEは7.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて泳動し、サンプルを分離した。ゲル中のタンパクはPVDF膜(Millipore)に転写し、メンブレンはブロッキング溶液(5% fat-free dry milk, PBS-T: PBS, 0.05% Tween 20)で1時間ブロッキングした後ブロッキング溶液に1次抗体を加えた溶液で室温で2時間以上反応させた。その後メンブレンをPBS-Tで2回洗浄後、ブロッキング溶液にHRP標識2次抗体を加えた溶液で室温で1時間反応させた。その後PBS-Tで3回洗浄し、ECL+plus Western Blotting Detection System (Amersham)またはWestern Lightning (Perkin Elmer)を用いてバンドを検出した。

### 7. 金コロイド法による細胞運動アッセイ (Phagokinetic track motility assay)

Phagokinetic track motility assayはAlbrecht-Buehlerらの方法に従った。最終濃度10.6 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1.27 mM  $\text{AuCl}_4\text{H}$ を混ぜ、弱い火力で加熱した。沸騰後、0.1% formaldehyde 1.8 mlを加え、金コロイド溶液を調整した。この金コロイド溶液を1%BSAであらかじめコーティングしたカバーガラスにのせ1時間静置した。培養

液で2回洗浄した後、培養液中で一晩放置した。細胞は $3 \times 10^3$  cells/wellの濃度で金コロイドをコーティングしたカバーガラス上に播き $37^\circ\text{C}$ で24時間培養した。24時間後にカバーガラスを3% paraformaldehydeで固定しマウントし、CCDカメラで観察した。得られた画像はNIH image softwareで解析し、細胞が移動した領域を測定した。それぞれの細胞種あたり30個の細胞についてその移動領域を測定し平均した。

## III. 結 果

我々はMT1-MMPが細胞運動、浸潤に重要な役割を果たしていることを報告した<sup>27)</sup>。またその基質のひとつとして梶田らはCD44が挙げられることを報告した<sup>23)</sup>。そこで15種類の腫瘍細胞株を選び、それらの細胞のMT1-MMPとCD44のmRNAの発現量をRT-PCR法を用いてスクリーニングした(Fig. 1)。CD44の検出に用いたプライマーはすべてのバリエーションを含んだCD44を増幅できるように設計した。ここで選んだ腫瘍細胞のうち、MG63, ZR75-1, LNCAPを除くすべての細胞は程度の差はあるもののCD44Hまたはそのバリエーション体を発現していた。腫瘍細胞はCD44のバリエーション体を高頻度に発現し<sup>28)36)</sup>、その発現は腫瘍の浸潤能と相関するという過去の報告があるが<sup>36)37)</sup>、ここでスクリーニングした腫瘍細胞のうちでバリエーションの発現が確認できたものはA431とTMK-1の2種類の細胞のみであった。次に同様にMT1-MMPのmRNAの発現をスクリーニングした。HT1080, A375, A431, U251, MDA-MB-231, T24においてはMT1-MMPが高発現しており、その他の細胞ではその発現はごく弱いか、あるいは確認されなかった。次にこの15種類の細胞を用いてウェスタンブロット法によって、CD44, MT1-MMPの発現をたんぱく質レベルで検証した(Fig. 1)。腫瘍細胞の由来臓器とこれらのたんぱく質の発現量には明らかな相関は認められなかった。

梶田らはMT1-MMPによるCD44のプロセッシングは細胞運動の亢進を伴うものであるということを報告している。そこで金コロイド法による細胞運動能アッセイを用いてこれらの腫瘍細胞の運動能を評価した。それぞれの細胞をCD44の基質

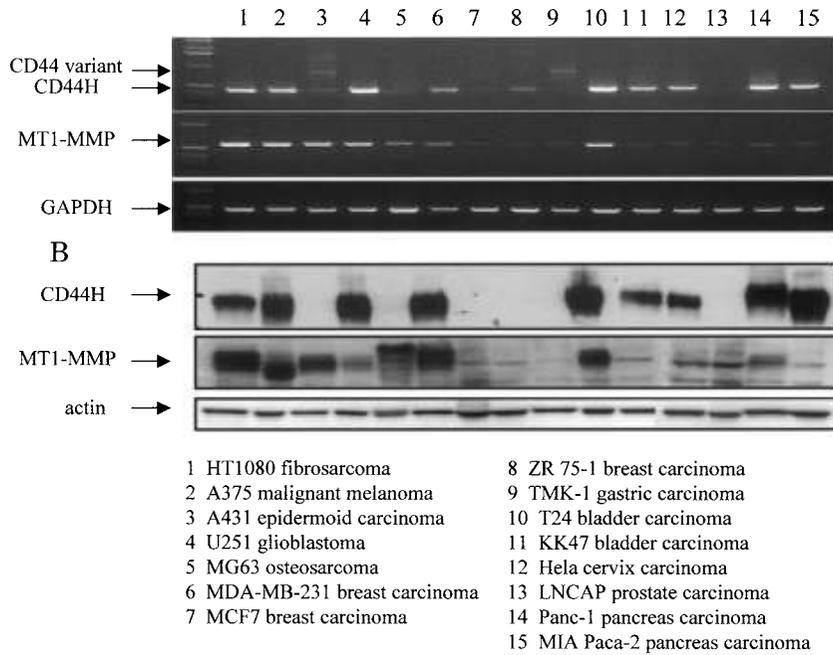


Fig 1. Expression of CD44H and MT1-MMP in different human tumor cell lines  
 A: Total RNA of each human tumor cell line listed by 1-15 was extracted and analysed by RT-PCR using specific primers to CD44, MT1-MMP, and GAPDH.  
 B: Each cell was lysed and the expression of CD44H, MT1-MMP, and Actin were analysed by Westernblotting using an anti-CD44 pAb, anti-MT1-MMP mAb or antiactin antibody.

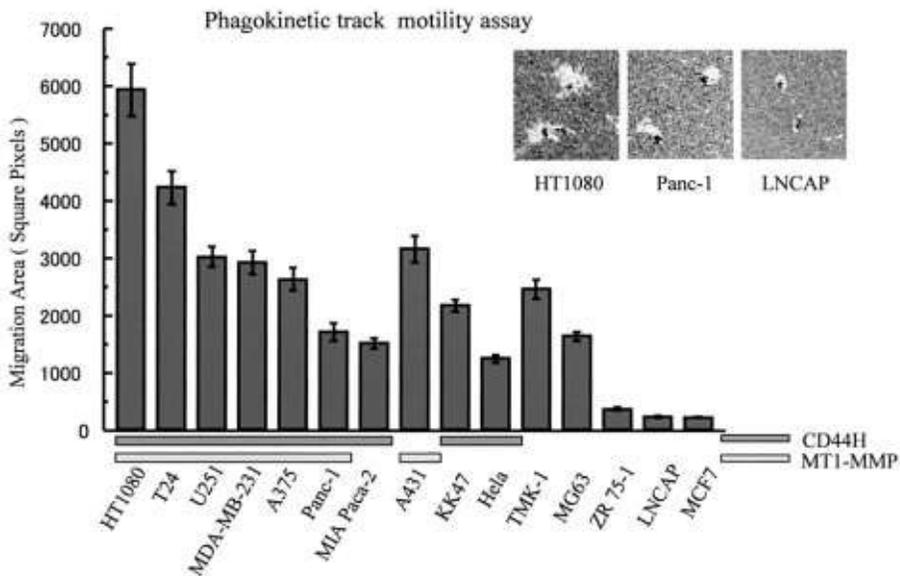


Fig 2. Tumor cell motility and the expression of CD44H and MT1-MMP  
 The motility of each human tumor cell was analysed by a phagokinetic track assay with colloidal gold-coated coverslips. The migration area of the cell was visualized under bright field illumination after 24 hrs, and was calculated using NIH image software. The average of random 30 cells  $\pm$  SEM is plotted. Three typical cells which showed high, moderate and slight migration were shown.

であるヒアルロン酸でコートしたカバーガラス上に撒き、24時間運動させたのちにそれを固定し、個々の細胞の移動した面積を計測しグラフに示した (Fig. 2) . グラフの最下段に CD44H, MT1-MMP のたんぱく質レベルでの発現の有無を示した. CD44H, MT1-MMP のどちらの発現も確認されなかった3種類の細胞 (ZR75-1, LNCAP, MCF7) はほとんど運動性を認めなかった. それに対し HT1080, T24, U251, MDA-MB-231, A375 など両者の発現している細胞においては比較的运动能が高い傾向が確認された.

次に培養液中に放出された CD44 のプロセシング産物 (可溶性 CD44H) を検出する目的で, CD44, MT1-MMP 両者を発現している細胞の培養液を濃縮し, CD44 の抗体を用いてウェスタンブロット法を行った (Fig. 3). 培養液中に放出された可溶性 CD44H は 90~95 kDa, 70 kDa の2つのバンドとして確認された. これらのうち 70 kDa のバンドは MMP 阻害剤 BB94 によって完全に消失したことから, メタロプロテアーゼによるプロセシングを受けて放出されたものであると推測された.

森らは CD44 と MT1-MMP との会合は MT1-MMP のヘモペキシン領域によって行われることを過去に報告した<sup>35)</sup>. ヘモペキシン領域は MT1-MMP の基質認識に重要であるとされる領域でありその領域の生物学的意義については現在様々な研究が行われている. そこで MT1-MMP の基質切断に必要な酵素活性領域を欠失し, このヘモペキシン領域を残した変異体 (MT1PEX-F) を作成した. この変異体 MT1PEX-F は MT1-MMP と

CD44 との会合を競合的に阻害することが過去に報告されている<sup>35)</sup>. また CD44 はその stem 領域において MT1-MMP によってプロセシングされることが報告されており<sup>23)</sup>, その領域 Lys158-Thr197 を欠失した変異体 (CD44HM-F) も作成した. これらの変異体の構造を Fig. 4 に示した. この2種類の変異体と MMP 阻害剤 BB94, MT1-MMP を特異的に阻害する RNA interference (RNAi)<sup>27)</sup> を用いて細胞運動能アッセイを先の実験で, CD44, MT1-MMP をともに高発現しその運動能も高いことを確認したヒト線維肉腫細胞株 HT1080 で行った (Fig. 4). 金コロイド法を用いた運動能アッセイでは, MMP 阻害剤 BB94, MT1-MMP の発現を特異的に阻害する RNAi を用いたところ, HT1080 細胞の運動能はコントロールの細胞と比較して 30~40% 減少した. MT1-MMP と CD44 との会合を阻害する MT1PEX-F, CD44 のプロセシングされると推測される配列を欠いた CD44HM-F を細胞に遺伝子導入することによっても同様の運動能抑制効果であった.

MT1-MMP の RNAi は CD44 の 70 kDa のプロセシングを一部阻害することが過去に報告された<sup>27)</sup>. しかし BB94 による阻害効果 (Fig. 3) と比較してその程度は完全ではない. そこで先の実験で用いた2種類の変異体の CD44 のプロセシングに与える影響を検討した. MT1PEX-F は RNAi と同程度までそのプロセシングを阻害した (Fig. 5). この結果から CD44 のプロセシングには MT1-MMP のみならず複数のメタロプロテアーゼが関与し, そのうちの一部を MT1-MMP が

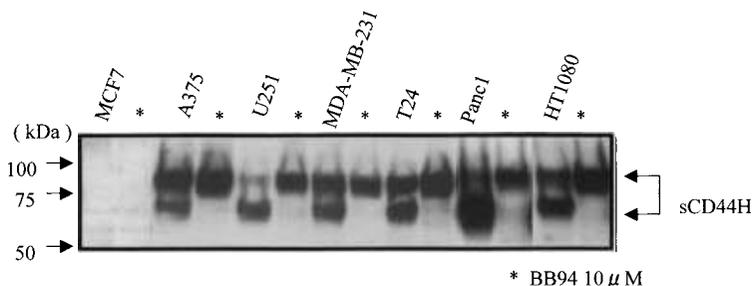


Fig 3. The processing of CD44H in tumor cells expressing CD44 and MT1-MMP.

Cells ( $3 \times 10^5$ ) were cultured for 24~48 hrs in serum free medium in the presence or absence of BB94 ( $10 \mu\text{M}$ ). Conditioned medium were subjected to Western blot analysis using an anti-CD44 pAb. Soluble CD44H (sCD44H) was detected as two major bands.

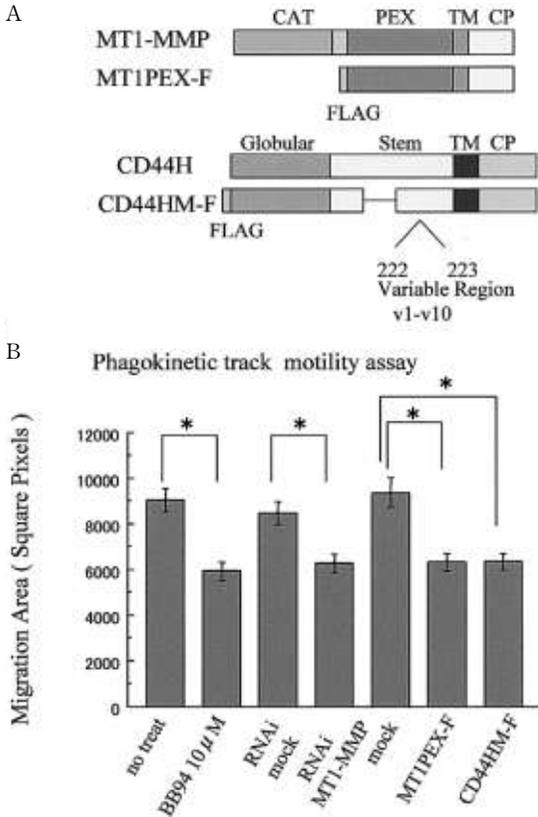


Fig 4. The effect of BB94, RNAi to MT1-MMP, MT1PEX-F, CD44HM-F on the migration property of HT1080 cells.

A: Constructions of the mutants MT1PEX-F; MT1-MMP lacking the catalytic domain with a FLAG tag at the N terminus. CD44HM-F; deletion mutant of CD44 ( deleted between Lys158 and Thr197) with a FLAG tag at the N terminus.

B: HT1080 cells were transfected with dsRNA/MT1-MMP (RNAi MT1-MMP), dsRNA/EGFP (RNAi mock), expression plasmids for MT1PEX-F, CD44HM-F or control vector alone (mock). The migration area was analyzed as described. \* $p < 0.01$  by Student's *t*-test.

担っている可能性が示唆された。またCD44HM-Fはこの70 kDaのプロセッシングを阻害する効果を示さなかった(Fig. 5)。CD44HM-Fにはメタロプロテアーゼと会合し、CD44のプロセッシングを競合する働きはないものと推測されるが、プロセッシングを受けないことから運動を妨げる強固な細胞接着因子として働いていることが推測された。

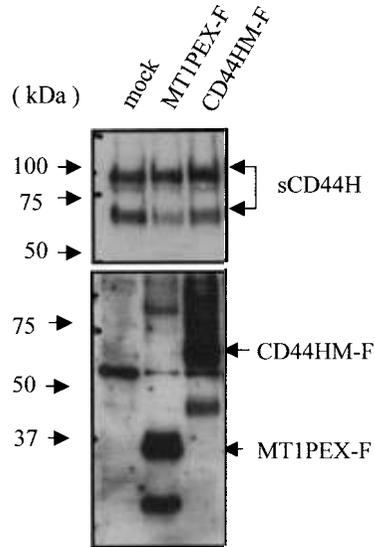


Fig 5. The effect of MT1PEX-F or CD44HM-F on the processing of CD44H in HT1080 cells. HT1080 cells were transfected with expression plasmids for MT1PEX-F, CD44HM-F or control vector alone (mock). After 24 hr, cells were cultured for an additional 24 hr in serum free medium. Conditioned medium (top) and the cell lysates (bottom) were separately subjected to Western blot analysis using an anti-CD44 pAb or an anti-FLAG mAb, respectively.

#### IV. 考 察

本研究の結果から運動性の高い腫瘍細胞は、CD44とMT1-MMPを発現する傾向にあること、それらの細胞においてはメタロプロテアーゼによるCD44のプロセッシングが行われていること、またヒト線維肉腫細胞HT1080においてはCD44のプロセッシングの一部をMT1-MMPが担っており、そのプロセッシングは細胞運動能の亢進を伴うものであることが示された。CD44は梶田らが新たに報告したMT1-MMPの基質であり<sup>23)</sup>、MT1-MMPと同様に浸潤性の腫瘍細胞でその発現がしばしば亢進している分子である<sup>28)36)38)</sup>。CD44は細胞表面のleading edgeと呼ばれる運動先進部に局在し、ヒアルロン酸の主要な受容体として機能している<sup>28)</sup>。そしてヒアルロン酸に富んだ基質に対する細胞の初期のゆるい接着を担っていると推測される<sup>35)39)</sup>。細胞運動に際して、その運動先進部は細胞膜の構造を急速にま

たダイナミックに変化させることが知られており、CD44を通じて得られる柔軟な接着は細胞運動に必要な最初の接着に適していると思われる。その後、それらのゆるい接着はインテグリンによる強固な接着へと置換され、運動に必要な牽引力を発生させる<sup>40)</sup>。そのため、MT1-MMPはCD44と運動先進部で局在をともにし、時にそれをプロセシングすることによって、その初期の接着を制御していると推測される<sup>4)35)</sup>。

過去の報告<sup>23)31)</sup>からCD44をプロセシングする活性を持つ酵素はMT1-MMPのみではないということは明らかであるが、これまでに実際に同定された酵素はMT1-MMPだけである。しかしPanc-1, U251などの決してMT1-MMPの発現が高いとはいえない細胞においてCD44の70 kDaのプロセシングが優位に行われていることから、これらの細胞においてはMT1-MMP以外のプロテアーゼもそのプロセシングを担っている可能性が示唆される。HT1080細胞においてもMT1-MMPを抑制してもまだ70 kDaのプロセシングが行われているということから、この細胞はMT1-MMP以外の違う切断酵素をも発現していることが示された。その一方でBB94はほぼ完全にこのプロセシングを阻害し、その切断酵素はメタロプロテアーゼ群に含まれるものであることは確実といえる。

プロセシング部位を欠いた変異体 (CD44HM) を用いた実験により、ヒアルロン酸基質上のHT1080細胞の運動はCD44のプロセシングを必要とすることが示された。CD44のプロセシングという観点からみるとMT1-MMPの関与はごく一部にすぎないにもかかわらず、MT1-MMPの発現抑制はその運動性を顕著に阻害した。この結果はCD44をプロセシングする酵素は複数存在する中でも、MT1-MMPによるプロセシングは他の酵素によるプロセシングと比較してその運動に貢献する割合が大きいことを示唆している。CD44のプロセシングはそれが起こっている場所によって細胞運動に様々な影響すると考えられる。MT1-MMP以外の切断酵素の局在はそれらがいまだ同定されていないことから明らかではないが、少なくともMT1-MMPは細胞の運動先進部に存在し<sup>35)41)42)</sup>、そこでCD44と共局在しそのプ

ロセシングを担うと考えられている。

MT1-MMPによるCD44のプロセシングを介した細胞運動亢進のシステムはヒト線維肉腫細胞株HT1080においてその高い運動性の一部を担うシステムとして機能していることが示された。また運動性の高い他の様々な種類の腫瘍細胞においてもこの両者の発現が高率に認められたことから、細胞の腫瘍化の過程で両者の発現が亢進するようになった細胞ではその運動性が増強される可能性が考えられた。

近年、がん患者血清中、あるいは組織液中に検出される可溶性CD44が腫瘍の増殖や浸潤などの様々な病的状態を反映したものであるという報告が散見される<sup>43)-45)</sup>。しかし、その一方で否定的な報告もなされ<sup>46)-48)</sup>、可溶性CD44の発現と様々な癌の病態を関連づけようとする臨床研究は明確な結論を得られていない。これはCD44のプロセシングを担う酵素が複数存在し、既存のELISA法ではこれら複数の酵素によってプロセシングを受けた個々の産物を区別して検出することが不可能であったためと推測される。MT1-MMPによってプロセシングされた可溶性CD44のみを特異的に検出することで、腫瘍細胞の運動能、ひいては癌の進行過程とどのように相関しているのか等について、これまでに得られた基礎研究をいかにして臨床応用していくのか検討中である。

本研究に際してご指導いただいた東京大学医科学研究所 腫瘍細胞社会学分野 清木元治教授に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4.
- 2) Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-74.
- 3) Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 657-72.
- 4) Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 624-32.
- 5) McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metal-

- loproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 534-40.
- 6) Overall CM, McQuibban GA, Clark-Lewis I. Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics. *Biol Chem* 2002; 383: 1059-66.
  - 7) Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today* 2001; 6: 478-82.
  - 8) Stetler-Stevenson WG, Yu AE. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 143-52.
  - 9) Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *Apmis* 1999; 107: 137-43.
  - 10) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells [see comments]. *Nature* 1994; 370: 61-5.
  - 11) Okada Y. Tumor cell-matrix interaction: pericellular matrix degradation and metastasis. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000; 84: 33-42.
  - 12) Hernandez-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 131-8.
  - 13) Pei D, Weiss SJ. Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* 1996; 271: 9135-40.
  - 14) d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, et al. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 1997; 250: 751-7.
  - 15) Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997; 272: 2446-51.
  - 16) Buttner FH, Hughes CE, Margerie D, Lichte A, Tschesche H, Caterson B, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1mut at the 'aggrecanase' and the MMP sites: characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan. *Biochem J* 1998; 333: 159-65.
  - 17) Fosang AJ, Last K, Fujii Y, Seiki M, Okada Y. Membrane-type 1 MMP (MMP-14) cleaves at three sites in the aggrecan interglobular domain. *FEBS Lett* 1998; 430: 186-90.
  - 18) Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95: 365-77.
  - 19) Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 2000; 149: 1309-23.
  - 20) Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol* 2000; 148: 615-24.
  - 21) Atkinson SJ, Crabbe T, Cowell S, Ward RV, Butler MJ, Sato H, et al. Intermolecular autolytic cleavage can contribute to the activation of progelatinase A by cell membranes. *J Biol Chem* 1995; 270: 30479-85.
  - 22) Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996; 271: 17124-31.
  - 23) Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001; 153: 893-904.
  - 24) Ratnikov BI, Rozanov DV, Postnova TI, Baciug PG, Zhang H, DiScipio RG, et al. An alternative processing of integrin alpha(v) subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 7377-85.
  - 25) Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metallo-

- proteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem* 2001; 276: 18415-22.
- 26) Tsunazuka Y, Kinoh H, Takino T, Watanabe Y, Okada Y, Shinagawa A, et al. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. *Cancer Res* 1996; 56: 5678-83.
  - 27) Ueda J, Kajita M, Suenaga N, Fujii K, Seiki M. Sequence-specific silencing of MT1-MMP expression suppresses tumor cell migration and invasion: importance of MT1-MMP as a therapeutic target for invasive tumors. *Oncogene* 2003; 22: 8716-22.
  - 28) Naot D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 241-319.
  - 29) Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem* 2001; 276: 36770-8.
  - 30) Goebeler M, Kaufmann D, Brocker EB, Klein CE. Migration of highly aggressive melanoma cells on hyaluronic acid is associated with functional changes, increased turnover and shedding of CD44 receptors. *J Cell Sci* 1996; 109: 1957-64.
  - 31) Okamoto I, Kawano Y, Tsuiki H, Sasaki J, Nakao M, Matsumoto M, et al. CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene* 1999; 18: 1435-46.
  - 32) Haynes BF, Liao HX, Patton KL. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells* 1991; 3: 347-50.
  - 33) Haberhauer G, Kittl EM, Skoumal M, Hubl W, Wagner E, Bayer PM, et al. Increased serum levels of soluble CD44-isoform v5 in rheumatic diseases are restricted to seropositive rheumatoid arthritis. *Acta Med Austriaca* 1997; 24: 23-5.
  - 34) Kittl EM, Ruckser R, Selleny S, Samek V, Hofmann J, Huber K, et al. Evaluation of soluble CD44 splice variant v5 in the diagnosis and follow-up in breast cancer patients. *Exp Clin Immunogenet* 1997; 14: 264-72.
  - 35) Mori H, Tomari T, Koshikawa N, Kajita M, Itoh Y, Sato H, et al. CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *EMBO J* 2002; 21: 3949-59.
  - 36) Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zollar M, Haussman I, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
  - 37) Rudzki Z, Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol* 1997; 50: 57-71.
  - 38) Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 1998; 51: 191-200.
  - 39) Okamoto I, Kawano Y, Matsumoto M, Suga M, Kaibuchi K, Ando M, et al. Regulated CD44 cleavage under the control of protein kinase C, calcium influx, and the Rho family of small G proteins. *J Biol Chem* 1999; 274: 25525-34.
  - 40) Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells—over and over and over again. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E97-100.
  - 41) Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, et al. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 2001; 20: 4782-93.
  - 42) Sato T, del Carmen Ovejero M, Hou P, Heegaard AM, Kumegawa M, Foged NT, et al. Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J Cell Sci* 1997; 110: 589-96.
  - 43) Guo YJ, Liu G, Wang X, Jin D, Wu M, Ma J, et al. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 422-6.
  - 44) Masson D, Denis MG, Denis M, Blanchard D, Lorient MJ, Cassagnau E, et al. Soluble CD44: quantification and molecular repartition in plasma of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 80: 1995-2000.
  - 45) Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prog-

- nostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology* 1999 ; 56 : 232-8.
- 46) Okamoto I, Tsuiki H, Kenyon LC, Godwin AK, Emlet DR, Holgado-Madruga M, et al. Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors. *Am J Pathol* 2002 ; 160 : 441-7.
- 47) Sheen-Chen SM, Chen WJ, Eng HL, Sheen CC, Chou FF, Cheng YF. Evaluation of the prognostic value of serum soluble CD 44 in patients with breast cancer. *Cancer Invest* 1999 ; 17 : 581-5.
- 48) Van Hal NL, Van Dongen GA, Ten Brink CB, Heider KH, Rech-Weichselbraun, Snow GB, et al. Evaluation of soluble CD44v6 as a potential serum marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 3534-41.