

シンデカン-2を介したがん転移の制御機構の解析

棟 居 聖 一
吉 富 泰 央
小 山 芳 江
成 尾 英 明
岡 山 實

要 旨

マウス・ルイス肺癌から転移能の違いに基づいてクローン化した株細胞は、生体内での一次腫瘍組織形成において全く異なる細胞外マトリックス依存性を示す。即ち、低転移性P29株細胞は、宿主間質誘導能が強く、誘導された間質細胞の形成するフィブロネクチンに富んだ間質型細胞外マトリックス依存的な腫瘍組織形成を示す。それに対して高転移性LM66-H11株細胞は自らが形成する基底膜依存的な腫瘍組織形成を示す。この腫瘍組織形成の違いを反映して培養下において、これらの株細胞はフィブロネクチン基質への接着に際して異なったアクチン細胞骨格形成を示す。これまでに、この接着応答性の違いが細胞表層に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン・シンデカン-2の発現量に依存する現象であること、これらの株細胞の転移能とシンデカン-2発現量との間に逆相関が存在することを明らかにしてきた。

本研究ではシンデカン-2低発現性の高転移性LM66-H11株細胞にシンデカン-2を強制発現させたH11-SN2株細胞を用いて、この逆相関の背後に因果関係のあることを証明した。さらに、このシンデカン-2による転移抑制の機構を明らかにするために、がん転移に際して重要な役割を果たすことが報告されているマトリックスメタロプロテアーゼ（以下、MMPと略）とシンデカン-2との関係について検討した。その結果、MMP-2およびMMP-2活性化関連分子である膜型（以下、MTと略）1-MMP、Tissue inhibitor of metalloproteinase（以下、TIMPと略）-2の転写レベルは、シンデカン-2の発現量の高低に拘わらず、すべての株細胞間で同程度であった。しかし、その活性化はシンデカン-2低発現性・高転移性LM66-H11株細胞においては大きく亢進されているのに対して、シンデカン-2高発現性・低転移性P29およびH11-SN2株細胞においては強く抑制されていることが明らかとなった。さらに、細胞表層からヘパラン硫酸鎖を酵素的に除去したP29株細胞および、LM66-H11株細胞にシンデカン-2タンパク芯のグリコサミノグリカン鎖付加部位のセリン残基をアラニンに変異させた変異体を強制発現させたH11-SN2 GAG株細胞においてはMMP-2の活性化が観察された。以上の結果は、シンデカン-2がMMP-2の活性制御に直接関与していることを強く示唆している。

緒 論

癌転移の過程は、腫瘍細胞の原発巣からの遊離と浸潤、リンパ管や血管といった脈管への侵入、脈管内移動、標的臓器内毛細管の内皮細胞への接着、脈管外への浸出、組織への侵入、定着及び増殖からなると考えられている¹⁻³⁾。このような過程の各段階の機構及びそれに関わる分子の機能を明らかにすることは、がん転移の抑制の方法を考える上で極めて重要なことである。これまでに、腫瘍組織形成の視点から、がん転移を明らかにする様々な研究が行われてきた。本研究室ではこれまで、腫瘍の組織形成において細胞環境を構成する複雑な超分子複合体である細胞外マトリックスの役割に着目して研究を行ってきた。細胞外マトリックスは、主成分としてコラーゲン、糖タンパク質、プロテオグリカンからなる超分子複合体で、大きく2つに分けることができる⁴⁻⁷⁾。1つは、上皮性の細胞が形成する基底膜で、上皮組織と結合組織との境界膜として存在し、その主要構成成分は、Ⅰ型コラーゲン、ラミニン、パールカンである。もう1つは、間質系の細胞によって形成される間質型細胞外マトリックスで、結合組織細胞を取り囲む無定形の構造で、その主要構成成分は、Ⅲ型コラーゲン、フィブロネクチン、パーシカンである。これら細胞外マトリックスは、多細胞体構築に際して、細胞の足場として細胞増殖、分化、移動等の調節に機能し、組織形成に重要な役割を果たしている⁹⁻¹²⁾。腫瘍組織形成という点でも、腫瘍細胞と細胞外マトリックスとの相互作用は、正常細胞の場合と同様に重要な役割を果たしている。しかし自然癌を用いてこの複雑な超分子複合体である細胞外マトリックスと腫瘍組織形成の関係を明らかにすることは困難である。本研究室では、単純化した解析系で腫瘍組織形成に基づくがん転移の機構を明らかにするために、マウス・ルイス肺癌から自然転移能に基づいて転移能の異なる腫瘍細胞がクローン化され、株細胞（低転移性P29、中転移性LM12-3、高転移性LM66-H11株細胞）として樹立された。これらの株細胞を同系マウス（C57/BL）の皮下に移植して作らせた一次腫瘍組織を用いて、細胞外マトリックスを中心に転移能に共軛した組織学的特徴を解析した^{3,7,8)}。その結果、P29およびLM66-H11株細胞が生体内において全く異なる細胞外マトリックス依存的腫瘍形成を示すことが示された。即ち、LM66-H11株細胞は基底膜形成能が高く、腫瘍細胞はそれを足場にした腫瘍組織形成を示す^{14,15)}。それに対してP29株細胞は基底膜形成能をもたず、それに代わって宿主組織に対して強い間質誘導性を示し、誘導された間質細胞の形成するフィブロネクチンに富んだ間質型細胞外マトリックス依存的な組織形成を示した^{3,15,16)}。

上記の組織形成の違いを反映して、両株細胞は、培養下においてフィブロネクチン基質への接着に際して顕著に異なる接着応答性を示す¹⁷⁾。即ち、P29株細胞はフィブロネクチン基質への接着に際してストレスファイバー形成を示すのに対して、LM66-H11株細胞においては、アクチン繊維が細胞辺縁部に局在化する皮質型アクチンの形成を示す。これまでの研究において、これらの応答性の違いは細胞表層のフィブロネクチン受容体の一つ、シンデカン-2の発現

量の違いによること、シンデカン-2発現量と転移能の間に逆相関が存在することを明らかにしてきた。本研究の目的は、シンデカン-2発現量と転移能の間に存在する関係を明らかにし、シンデカン-2の転移における役割を明らかにすることである。

結 果

マウス・ルイス肺癌（3LL）から転移能の異なる株細胞の樹立

自然癌は、ほとんど転移しない腫瘍細胞から、非常に高い転移能を示す腫瘍細胞まで多様な転移活性をもった細胞から成るキメラ組織である。転移能に共軛した腫瘍組織形成を明らかにするため、まず自然癌から転移能の異なる細胞を自然転移能の差に基づいてクローン化し、株細胞として樹立した。本研究では腫瘍細胞としてマウス・ルイス肺癌（3LL）細胞を用い転移能の異なる腫瘍細胞をクローン化し、株細胞として樹立した（表1）^{13,14}。これらの株細胞を用いて以下の実験を行った。

表1 マウス・ルイス肺癌由来の株細胞が示す転移能

株細胞	移植経路	移植細胞数 (x 10 ⁵)	転移動物数		
			実験動物数	平均	範囲
P29	i.v.	1.0	3/7	0.4	0 - 1
LM12-3	i.v.	1.0	7/7	47.9	19 - 92
LM66-H11	i.v.	1.0	7/7	516.2	467 - 744
P29	s.c.	2.0	0/7	0	0
LM12-3	s.c.	2.0	6/7	4.5	0 - 14
LM66-H11	s.c.	2.0	7/7	35.2	23 - 56

i.v.: 静脈移植、s.c.: 皮下移植。

転移能の異なる株細胞の発現するシンデカンファミリー

これまでの研究で、シンデカン発現量の高い低転移性P29株細胞がフィブロネクチンに接着する際にその受容体としてインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ とシンデカン-2とで結合し、協調的に作用した結果、ストレスファイバー形成を誘導することを明らかにすると同時に、高転移性LM66-H11株細胞はシンデカン-2の発現量が閾値以下であるためにインテグリンのみを介した接着の結果、皮質型アクチン形成を示すことを明らかにしてきた¹⁷⁾。そこで、中転移性株細胞を含む、転移能の異なる3つの株細胞を用いて細胞表面でのシンデカンファミリーの発現量をFACSにより解析したところ、中転移性LM12-3株細胞は中程度のシンデカン-2発現量を示した（図1）。この発現はノーザンプロットによるmRNAの発現でも確認された（図示せず）。すなわち、転

移能が高くなるにつれて、シンデカン-2発現量が減少しており、シンデカン-2発現量と転移能との間には逆相関の存在することが明らかとなった。また、他のシンデカンファミリーの発現に有意な差は見られなかった。

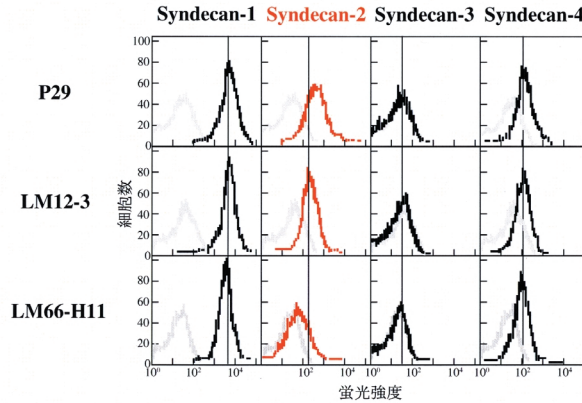


図1 転移能の異なる株細胞におけるシンデカンファミリーの細胞表面発現

低転移性P29株細胞，中転移性LM12-3株細胞，高転移性LM66-H11株細胞の細胞表面シンデカンファミリーの発現を、シンデカン-1，-2，-3および-4各々に特異的な抗体SN1，SN2，SN3およびSN4Abを用いてフローサイトメーターで測定した。これらの結果は、転移能とシンデカン-2の発現の間に逆相関のあることを示した。灰色線は非免疫血清を用いた対照を示す。

シンデカン-2強制発現株細胞の転移能

逆相関を示したシンデカン-2発現量と転移能との関係を明らかにするため、高転移性でシンデカン-2低発現性のLM66-H11株細胞にマウス・シンデカン-2 cDNAを導入し、安定高発現H11-SN2株細胞を樹立した。この細胞のシンデカン-2発現量はFACS分析（図2A）、ノーザンブロット、ヘパリチナーゼ および 消化によって生ずる不飽和糖を認識するF58-3G10抗体によるウエスタンブロット、シンデカン-2タンパク芯に対する抗体を用いたウエスタンブロット（図示せず）で確認した結果、低転移性でシンデカン-2高発現性P29株細胞と同程度の発現量を示した。一方、このシンデカン-2強制発現によって他のシンデカンファミリーの細胞表面発現には影響を及ぼさなかった（図2A）。このようにして樹立したH11-SN2株細胞を用いて実験転移能および自然転移能を解析した。P29，LM66-H11，H11-SN2，ベクターのみを導入したH11-Vec株細胞をマウス尾静脈に注射し、16日後の肺を摘出した（図2B）。P29株細胞注入マウスの肺に殆ど転移結節が認められないのに対して、LM66-H11株細胞注入マウスの肺においては非常に多くの転移結節が観察された。H11-Vec株細胞注入マウスの肺転移結節数はLM66-H11株細胞注入マウスのそれと非常に似ているが、H11-SN2株細胞注入マウスの肺には転移結節は殆ど認められなかった。表2に尾静脈及び皮下移植によって形成された肺転移結節の計測値を示した。また湿重量の結果（図示せず）も、肺転移像と良く一致した。この結果は、LM66-H11株細胞のシンデカン-2発現を人為的に高発現にすることによって、転移能が大きく

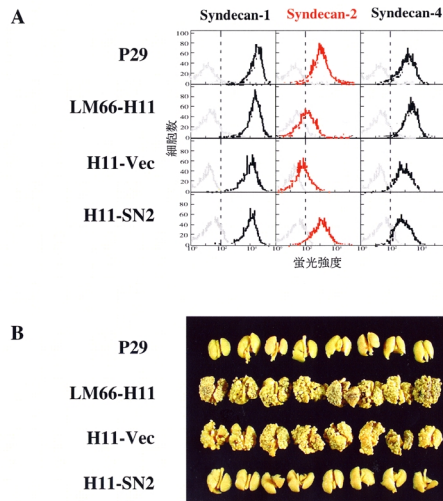


図2 シンデカン-2低発現性の高転移性H11株細胞におけるシンデカン - 2高発現化の転移能への影響
 A: P29株細胞, LM66-H11株細胞, LM66-H11株細胞にベクターのみを導入したH11-Vec株細胞, LM66-H11株細胞にシンデカン - 2cDNAを導入し, 強制発現させたH11-SN2株細胞の細胞表層シンデカンファミリーの発現を, 各シンデカンのタンパク芯に対する特異抗体を用いてフローサイトメーターで測定した. 灰色線は非免疫血清を用いた対照を示す. これらの結果は, シンデカン-2の高発現化は他のシンデカンの発現に影響を及ぼさないことを示している.
 B: 各細胞 (2×10^5 細胞) をそれぞれマウス尾静脈に移植し, 16日後に屠殺して肺を摘出し, プアン・ドゥボスク固定液中で固定した後撮影した.

表2 シンデカン - 2高発現性高転移細胞が示す転移能

株細胞	移植経路	移植細胞数 ($\times 10^5$)	転移動物数		肺転移結節数	
			実験動物数	平均	範囲	
P29	i.v.	2.0	6/8	2.9	0 - 9	
LM66-H11	i.v.	2.0	8/8	977.9	661-1311	
H11-Vec	i.v.	2.0	8/8	688.3	235 - 1405	
H11-SN2	i.v.	2.0	6/8	6.8	0 - 23	
P29	s.c.	2.0	3/8	0.6	0-3	
LM66-H11	s.c.	2.0	7/7	29.7	3 - 69	
H11-Vec	s.c.	2.0	7/7	32.1	4 - 79	
H11-SN2	s.c.	2.0	1/8	0.1	0 - 1	

i.v.: 静脈移植, s.c.: 皮下移植。

抑制されたことを示している. 即ち, シンデカン-2の発現量と転移能との間の逆相関の背後には因果関係が存在することが明らかとなった.

ルイス肺癌細胞の示す転移能とMMP-2の活性化

この転移抑制の機構を明らかにする為の手始めとして腫瘍の転移・浸潤に直接的に関与して

いることが知られているMMPがこの腫瘍系の転移に関わっているかどうかを検討した．先ず腫瘍の転移においてその関与が多く報告されているMMP-2について検討した^{17,18,19)}．MMP-2は不活性の潜在型酵素として分泌され、細胞外マトリックス分解活性を発揮するには活性化の過程を経る．潜在型MMP-2 (72kDa) は細胞外に分泌された後に、MT1-MMPおよびTIMP-2と活性化複合体を形成し、複合体形成に関与していないMT1-MMPにより潜在型MMP-2のプロペプチドのAsn37-Leu38間が加水分解されて中間型MMP-2 (68kDa) になり、その後、自己触媒により活性型MMP-2 (62kDa) となる (図3)²¹⁻²⁶⁾．低転移性P29株細胞の無血清培養上清中には72kDaの潜在型MMP-2バンドが主要バンドとして検出されるのに対して、高転移性LM66-H11株細胞の無血清培養上清中には72kDaの潜在型、68kDaの中間型および62kDaの活性型MMP-2のバンドが検出された (図4)．H11-Vec株細胞の無血清培養上清中からは、LM66-H11株細胞の無血清培養上清中と同様、潜在型、中間型および活性型MMP-2の3本のバンドが検出された．それに対して、シンデカン-2を強制発現させたH11-SN2株細胞由来の無血清培養上清中においてはP29株細胞由来の試料と同様、潜在型MMP-2が主要成分であり、中間型、活性型MMP-2は殆ど検出されなかった．この結果を定量化し、潜在型MMP-2の量に対する中間型および活性型MMP-2の割合を比較した結果、親株のLM66-H11株細胞と比べて、H11-Vec株細胞は同程度の活性化を示したのに対して、シンデカン-2強制発現H11-SN2株細胞の示す活性化は80%の減少を示した (表3)．この結果はシンデカン-2強制発現による転移の抑

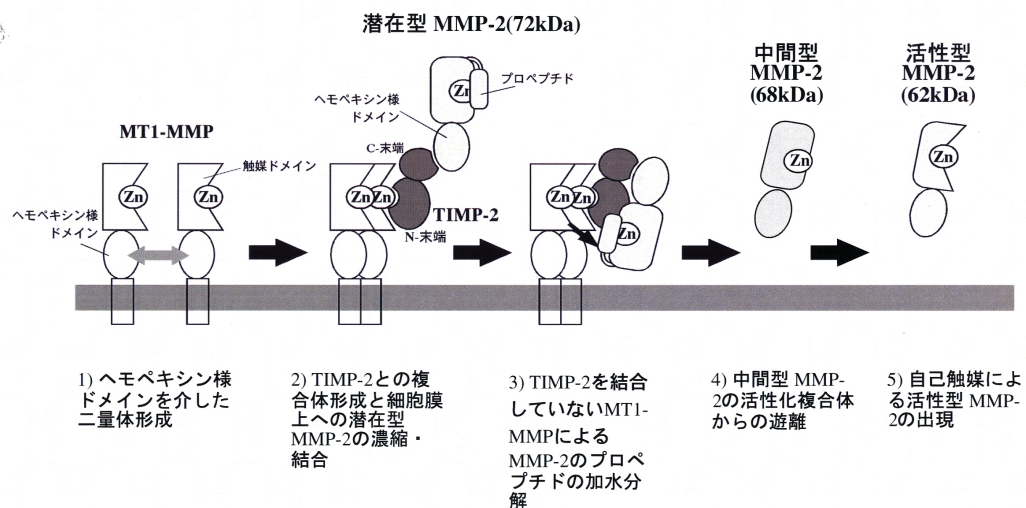


図3 MMP-2の細胞膜表面での活性化機序

MMP-2の細胞膜表面での活性化の機序は1) MT1-MMPのヘモベキシン様ドメインを介した二量体形成に引き続き、2) TIMP-2、潜在型MMP-2が結合し活性化複合体が形成される。3) TIMP-2を結合していないMT1-MMPにより潜在型MMP-2のプロペプチドAsn37-Leu38を加水分解され、4) 中間型MMP-2となり細胞膜から遊離し、5) 自己触媒により活性化型MMP-2になる、という過程を経ると考えられている。(参考文献16より改変)

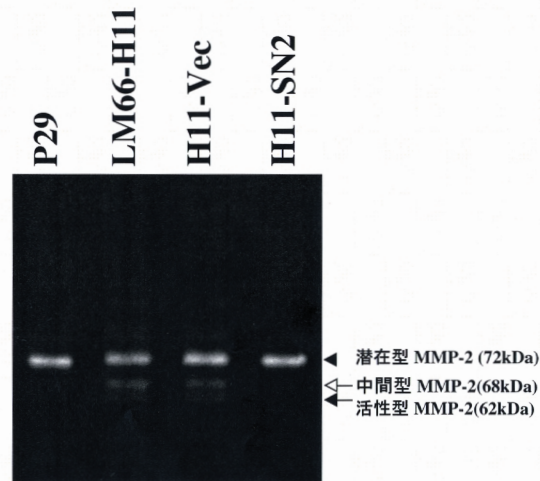


図4 ルイス肺癌細胞の産生するゼラチナーゼとその動態

P29, LM66-H11, H11-VecおよびH11-SN2株細胞より得られた無血清培養上清を、ゼラチンを基質としたザイモグラフィーによりルイス肺癌細胞の産生するMMPの分子種とその動態を検討した結果、すべての株細胞が潜在型MMP-2に相当する分子量を持つ位置(72kDa)に泳動するMMPを産生していた。更には、高転移性LM66-H11およびH11-Vec株細胞の無血清培養上清中には中間型及び活性型MMP-2に相当する位置に泳動するゼラチン分解バンドを検出した。

表3 シンデカン-2強制発現によるMMP-2活性化抑制

株細胞	P29	LM66-H11	H11-Vec	H11-SN2
活性化(%)*	22.1	80.9	93.1	16.5
対 LM66-H11 (%)**	27.3	100	115	20

*活性化 (%)は、Isnardらの方法²⁹⁾に従って計算し、MMP-2活性(%)=中間型バンド+活性型バンド/潜在型バンド×100で計算した。

**LM66-H11細胞に対する各細胞の活性化の割合を示した。

制実験の結果とよい一致を示している。

シンデカン-2発現のMMP-2活性化分子の発現に及ぼす影響

シンデカン-2高発現性株細胞の培養系におけるMMP-2活性化の抑制機構を解析するにあたって、まず、MMP-2活性化に関与する分子群の発現に差異がないかどうかを解析した。ノーザンブロットの結果、MMP-2, MT1-MMPおよびTIMP-2の発現はシンデカン-2の発現の高低に拘わらず4つの株細胞間で有意な違いは見られなかった(図5)。そこで次にシンデカン-2がMMP-2活性化過程へ関与している可能性について検討した。

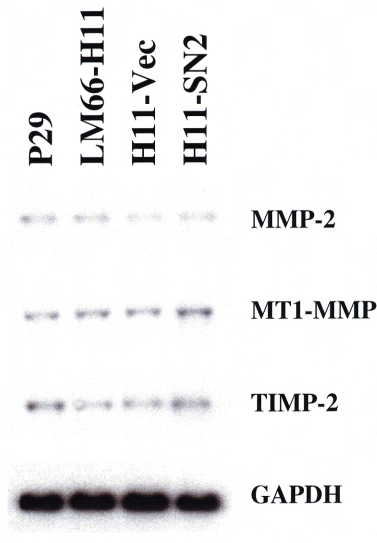


図5 転移能の異なる株細胞におけるMMP-2活性化に関する分子群の発現P29, LM66-H11, H11-VecおよびH11-SN2株細胞から抽出したポリ(A)+RNAを用いてノーザンブロット法によりMMP-2, MT1-MMP, TIMP-2mRNAの発現量を比較した. 細胞で恒常的に発現しているGAPDHの発現を対照として用いた.

MMP-2活性化におけるシンデカン-2ヘパラン硫酸鎖の関与

シンデカンの機能として, その分子の持つヘパラン硫酸鎖を介して増殖因子, あるいは細胞外マトリックス成分に結合し, その結合シグナルを直接あるいは間接的に細胞内に伝達することが明らかにされている²⁸⁻³⁰). これまでの研究から, MMP-2の持つヘモベキシン様ドメインはヘパリン結合性を示すことが報告されている^{13,31,32}). また, MMP-2はヘパリンと結合することによりAsn80-Tyr81の間の自己消化の活性が亢進することも明らかにされている³¹). 従って, 本研究で示したシンデカン-2の高発現によりMMP-2の活性化が抑制される現象にはシンデカン-2ヘパラン硫酸鎖の関与の可能性が考えられた. そこで, シンデカン-2タンパク芯のグリコサミノグリカン鎖付加部位のセリン残基をアラニン残基に変異させた変異体を強制発現させたH11-SN2 GAG株細胞のMMP-2活性化, さらにはヘパリチナーゼにより細胞表層のヘパラン硫酸鎖を除去した場合のMMP-2活性化をゼラチンゼイモグラフィにより検討した. まずP29株細胞をヘパリチナーゼ消化することにより細胞表層からヘパラン硫酸鎖が除去されていることを抗不飽和ヘパラン硫酸抗体F58-10E4を用いたFACS分析により確認した(図6Aa). また, シンデカン-2タンパク芯を認識するSN2Ab抗体を用いたFACS分析により, H11-SN2 GAG細胞膜表層におけるシンデカン-2タンパク芯の発現がP29細胞と同程度であることも確認した(図6Ab). これらの細胞から調製した無血清培養上清を用いたゼラチンゼイモグラフィの結果を図6Bに示した. H11-SN2 GAG株細胞の培養系ではヘパラン硫酸鎖を持つH11-SN2株細胞の培養系と比較して高いMMP-2の活性化が観察され, これらのバンドを定量

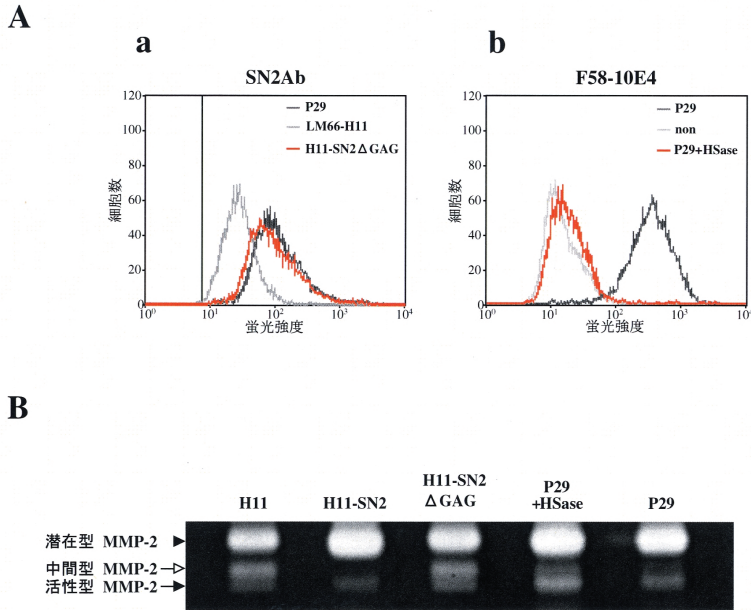


図6 MMP-2活性化における細胞表面ヘパラン硫酸鎖およびシンデカン-2ヘパラン硫酸鎖に対する依存性
A-a: 未処理 (P29) (濃灰色) あるいは0.1U/mlのヘパリチナーゼ で消化 (P29+HSase) したP29細胞 (赤色) を, ヘパラン硫酸鎖を特異的に認識するF58-10E4抗体と反応させ, FITC-標識二次抗体で標識した後, フローサイトメーターで蛍光強度を測定した. 非免疫IgGを一次抗体として用いた結果を対照とした (non) (薄灰色)

A-b: グリコサミノグリカン鎖を持たないシンデカン-2を高発現するH11-SN2 GAG株細胞 (赤線) を, 対照としてP29株細胞 (濃灰色) およびLM66-H11株細胞 (薄灰色) を用い, シンデカン-2タンパク芯を特異的に認識するSN2Ab抗体と反応させ, FITC-標識二次抗体で標識した後, フローサイトメーターで蛍光強度を測定した. 縦実線は非免疫IgGを一次抗体として用いた対照の蛍光強度のピークの位置を示す.

B: LM66-H11株細胞, H11-SN2株細胞, H11-SN2 GAG株細胞, ヘパリチナーゼ処理したP29株細胞 (P29+HSase) および未処理のP29株細胞 (P29) のから得た無血清培養上清を用いてゼラチンザイモグラフィによりMMP-2活性化を解析した.

表4 細胞表面ヘパラン硫酸およびシンデカン-2ヘパラン硫酸側鎖によるMMP-2活性化抑制

株細胞	LM66-H11	H11-SN2	H11-SN2 ΔGAG	P29 +HSase	P29
活性化 (%)	68.2	34.8	65.8	55.3	39.3
対 LM66-H11 (%)*	100	50	96	81.1	57.6
対 P29 (%)**	173.5	88.5	167.4	141	100

*LM66-H11細胞に対する各細胞の活性化の割合、**P29細胞に対する各細胞の活性化の割合を示した。

化した結果、H11-SN2株細胞による活性化の割合は、H11株細胞のそれと比較して50%減少していた。これに対し、H11-SN2 GAG株細胞による活性化はH11株細胞のそれと比較して4%の減少しか示さず、H11株細胞とほぼ同じ程度の活性化を示した(表4)。これはヘパラン硫酸鎖を持たないシンデカン-2を強制発現させてもMMP-2の活性化に対して抑制的には作用し得ないこと、すなわちMMP-2活性化の抑制はシンデカン-2のヘパラン硫酸鎖を介した現象であることを強く示唆している。また、シンデカン-2高発現性のP29株細胞をヘパリチナーゼ 共存下で培養して得た無血清培養上清を用いたザイモグラフィーの結果では酵素を加えないコントロールと比較して有意にMMP-2の活性化が亢進されていた(図6B)。デンシトメトリーによる定量的結果、未処理のP29株細胞と比較してヘパリチナーゼ 消化することによりMMP-2の活性化の割合が41%増加していた(表4)。この結果は先のH11-SN2 GAG株細胞の結果とよい一致を示している。以上の結果は、シンデカン-2が、MMP-2の活性抑制に直接関与していることを強く示唆している。

考 察

本研究室でのこれまでの研究において、マウス・ルイス肺癌から自然転移能の違いに基づいてクローニングした株細胞をもちいて、これらの株細胞が、フィブロネクチン基質への接着に際して全く異なったアクチン細胞骨格形成を示し、この接着応答性の違いは細胞表層に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン・シンデカン-2の発現量の違いに依存していることが明らかにされている^{17,33)}。しかし、シンデカン-2の癌転移への関与の様式および作用の機構についてはいまだに明らかにされていない。そこで、まず、転移能の異なる3つの株細胞を用い、転移能と細胞表層シンデカンの発現量との間に一定の関係が存在するかどうかを解析した。その結果、ルイス肺癌はシンデカンファミリーすべてのファミリーメンバーを発現していたが、そのうちシンデカン-2の発現量と転移能との間に逆相関が存在することが明らかとなった。それ以外のシンデカンは、転移能の高低に関わらず発現レベルに有意な差は観察されなかった。この実験結果に基づき、上記の逆相関の背後に因果関係があるか否かを明らかにするため、シンデカン-2低発現性の高転移性LM66-H11株細胞にシンデカン-2 cDNAを導入し強制発現させた安定高発現株H11-SN2株細胞を用い、転移能を測定したところ、シンデカン-2を高発現させることにより転移が大きく抑制された。つまりルイス肺癌においてはシンデカン-2発現量のみを人為的に変化させることにより転移能を自由にコントロールすることが可能となった。

次に、細胞表層でのシンデカン-2の強制発現が高転移性LM66-H11株細胞の転移を抑制したことから、その機構に興味を持たれた。転移が成立するためには、癌細胞の一次腫瘍からの遊離、血管内侵入、転移先での血管外侵出など、癌細胞が乗り越えなければならない生物構造的障壁が多く存在する。これらの構造的障壁となっている細胞外マトリックスを分解し、癌の悪

性化への関与が明らかにされている分子としてMMPがある。多くのMMPが、がん細胞株あるいは組織切片の解析などからがん転移に関連して報告されている¹⁸⁾。しかしながらどのMMPが癌の浸潤、転移に作用しているかは明らかにされていない。がん転移の過程で脈管への侵入、標的組織での脈管から標的組織への侵入など、基底膜破壊が重要なステップであると考えられてきた。基底膜の主要な構成成分であるⅠ型コラーゲンは基底膜の密な網目構造を形成している。このような理由からこれまでにⅠ型コラーゲン分解活性が癌細胞の悪性度を特徴づける一つの指標であるとして考えられている¹⁹⁾。がん細胞が産生するⅣ型コラーゲン分解酵素としてはMMP-2、MMP-9が主要であり、これらのがん組織での発現や局在が数多く報告されている³⁴⁾。本研究において転移能の異なる細胞で、転移能と一致したMMP-2の著しい活性化が認められた。すなわち、高転移性LM66-H11株細胞において高いMMP-2の活性化を示した。注目すべきはシンデカン-2を強制発現させ、転移を抑制したH11-SN2株細胞ではMMP-2活性化が抑制されていたことである。これはシンデカン-2によりMMP-2活性化が抑制され、その結果として転移が抑制されたことを示唆している。MMP-2の活性化機構は試験管内でMT1-MMPの触媒部位を用いた実験により明らかにされている³⁵⁾。即ち、MT1-MMPが潜在型MMP-2プロペプチドのAsn37とLeu38との間を加水分解し、それによって生じた中間型MMP-2は自己触媒的にAsn80とTyr81の間が加水分解され活性型MMP-2となる。Satoらは膜貫通型のMT1-MMPが細胞膜上で潜在型MMP-2を活性化することを明らかにした²¹⁾。まず、細胞表面に発現したMT1-MMPは阻害分子であるTIMP-2と複合体を形成し、その酵素活性が阻害を受ける。TIMP-2のC-末端ドメインはMMP-2のヘモペキシン様ドメインと親和性があるため、細胞膜表面にMT1-MMP、TIMP-2、MMP-2の3者複合体が形成される。この複合体はMMP-2を膜表面に濃縮するための受容体として機能する³⁶⁾とともに潜在型MMP-2の活性化に必須であり、この複合体構成分子間の相互作用を阻害すると活性化はおこらない。また、MT1-MMPはTIMP-2により酵素活性が阻害されているので潜在型MMP-2を分解し、活性化することができない。このため、TIMP-2を結合していない遊離のMT1-MMPがMMP-2を活性化するというモデルが考えられ、それを支持する結果が多く報告されている²²⁻²⁶⁾。しかし、遊離のMT1-MMPが上記3者複合体の近傍にどのように存在し、それによってMMP-2の活性化がどのように調節されているのかは明らかになっていない。最近、MT1-MMPがヘモペキシン様ドメインを介してホモ二量体を形成することが明らかにされ、そのヘモペキシン様ドメインを欠損するとMMP-2を活性化できないことからホモ二量体形成が、TIMP-2非結合性のMT1-MMPを上記3者複合体の近傍に保つ役割を担っていることが推論されている³⁷⁾。本研究において、転移能の異なるP29、LM66-H11およびシンデカン-2を強制発現したH11-SN2株細胞間で、これらMMP-2の活性化に寄与する分子群の発現量に有意な差は見いだされなかった。そこで本研究では、MMP-2の活性化抑制がシンデカン-2のどのような機能に基づくものかを検討した。シンデカン-2低発現性の高転移性LM66-H11株細胞にグリコサミノグリカン鎖を持たない変異

シンデカン-2を強制発現させてもMMP-2活性化の抑制は観察されず、また、シンデカン-2高発現性の低転移性P29株細胞から細胞表層のヘパラン硫酸鎖を酵素的に除いた培養系においては親細胞と比べMMP-2の有意な活性化の亢進が見られた。この結果はMMP-2活性化抑制にシンデカン-2のヘパラン硫酸鎖が関与していることを強く示唆するものである。MMP-2のヘモペキシン様ドメインはヘパリンに結合性をもつことが示されているが^{23, 31, 32)}、MMP-2は、試験管内で、ヘパリン共存下においてMMP-2の自己触媒的な活性化が8倍高くなることが報告されている³¹⁾。上記の我々の得た結果ではMMP-2活性化の高いのはシンデカン-2の発現の低いLM66-H11株細胞であり、この報告と一見矛盾するが、次に示す“抑制モデル”と“競合モデル”の2つの可能性が考えられる。一つ目の“抑制モデル”は、シンデカン-2のヘパラン硫酸鎖によって直接MMP-2活性化が抑制されているという考えで、Crabbeらは一方で、試験管内におけるヘパリンによるMMP-2の活性化の促進において、高濃度のヘパリン存在下ではMMP-2は活性化されないことも報告している。即ち、その理由として適度なヘパリン(50-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)存在下では潜在型MMP-2と、その活性化分子との間にヘパリンが梁のように入り、お互いをそのヘパリン結合性のヘモペキシン様ドメインによって結合し、活性化する。また、高濃度のヘパリン(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上)存在下では、過剰なヘパリンがこの結合を競合的に阻害する可能性があるとした³¹⁾。これらのことを考え合わせると、細胞膜表層に存在するシンデカン-2のヘパラン硫酸鎖はLM66-H11株細胞よりもP29株細胞で高濃度であるため、MMP-2活性化を抑制したと考えることができる。2つ目の“競合モデル”は、シンデカン-2の

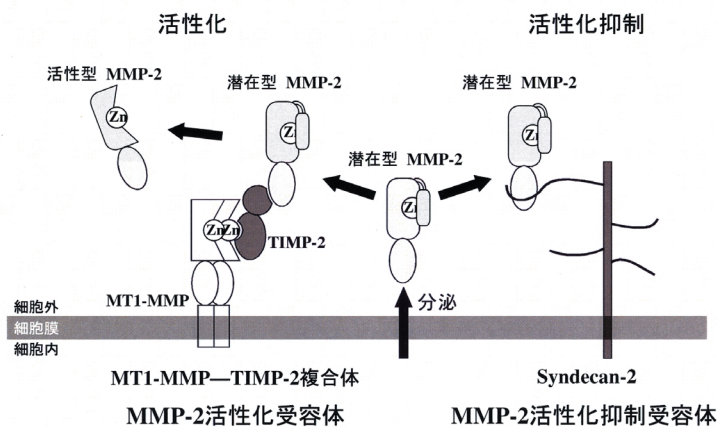


図7 シンデカン-2を介したMMP-2活性化の抑制機構の可能性

細胞から分泌された潜在型MMP-2がMT1-MMP-TIMP-2複合体に結合した結果MT1-MMPにより潜在領域が切断され活性化される。シンデカン-2高発現細胞では分泌された潜在型MMP-2がシンデカン-2のヘパラン硫酸鎖を介して結合することによりMT1-MMP-TIMP複合体への結合を競合した結果、MMP-2の活性化が抑制されたのではないかと考えられる。すなわち、MT1-MMP-TIMP-2複合体がMMP-2の活性化受容体として機能しているのに対してシンデカン-2はMMP-2の活性化抑制受容体として機能している可能性が考えられる。

ヘパラン硫酸鎖がMMP-2の活性化複合体への結合に対して抑制的に働いているという考えである。すなわち、潜在型MMP-2活性化受容体（MT1-MMP-TIMP2二量体）とシンデカン-2のヘパラン硫酸鎖は共にMMP-2のヘモペキシン様ドメインに結合することから、これら二者受容体間で潜在型MMP-2の結合における競合が起こり、MT1-MMPに対する基質濃度が調節されていることが考えられる（図7）。この“競合モデル”では、シンデカン-2が潜在型MMP-2の受容体として機能している必要があるが、最近これを裏付ける結果が得られた。細胞表層のヘパラン硫酸をヘパリチナーゼで消化すると加えた酵素量に応じて潜在型MMP-2が細胞表層から遊離する（図示せず）ことが示された。すなわち、細胞表層のヘパラン硫酸鎖によって潜在型MMP-2が細胞膜上に保持されていることが明らかとなった。このような“競合モデル”の考えが正しいならば、ヘパラン硫酸鎖に結合した潜在型MMP-2はMT1-MMPの基質になり得ないような機構が存在しなければならないが、本研究ではそれを明らかにすることはできなかった。ルイス肺癌細胞に見られたMMP-2活性化におけるシンデカン-2ヘパラン硫酸鎖の特異的機能が、その化学構造に基づくものか、それともシンデカン-2の膜上における局在に基づくものなのかは今後の研究課題である。いずれにしても、MMP-2活性化制御におけるシンデカン-2のヘパラン硫酸鎖の役割については、今後さらに詳しく解析していく必要がある。

参考文献

- 1) Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Folts, C.M. and Shafie, S. (1980) *Nature*, **284**: 67-68
- 2) Nakajima, M., Irimura, T., DiFerrante, N. and Nicolson, G.L. (1983) *Science*, **220**: 611-613
- 3) 岡山實, 草野由理, 小栗佳代子 (1996) *現代化学*, **308**: pp. 51-57, 東京化学同人, 東京
- 4) Hedman, K. and Vaheri, A. (1989) in *Fibronectin* (Mosher, D.F., ed.) pp. 123-134, Academic Press, Inc. New York
- 5) Olsen, B.R., and Nakajima, Y. (1993) in *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins* (Kreis, T. and Vale, R., eds.) pp. 35-36, Oxford University Press, London
- 6) Farquhar, M.G. (1991) in *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd ed., (Hay, E.D., ed.) pp. 365-418, Plenum Press, New York
- 7) 小栗佳代子, 岡山實 (1993) *細胞社会のグリコバイオロジー* (永井克孝, 箱守仙一郎, 木幡陽編) pp. 151-175, 講談社サイエンティフィック, 東京
- 8) 岡山實 (1997) *京都産業大学論集*第28巻, 第4号, 自然科学系列 第6号, pp. 1-95
- 9) Grobstein, C. and Cohen, J. (1965) *Science*, **150**: 626-628
- 10) Bernfield, M. and Banerjee, S. (1978) in *Biology and Biochemistry of Basement Membrane* (Kefalides, N.A., ed.) pp. 137-148, Academic Press, Inc. New York
- 11) Spooner, B.S., Thompson-Lietscher, H.A., Stokes, B. and Basset, K. (1986) in *The Cell Surface in Development and Cancer* (Steinberg, M.S., ed.) pp. 225-260, Plenum Press, New York
- 12) Nakanishi, Y. and Ishii, T. (1989) *BioEssays*, **11**: 163-167

- 13) Nakanishi, H., Takenaga, K., Oguri, K., Yoshida, A. and Okayama, M. (1992) *Virchows, Arch. A*, **420**: 163-170
- 14) Nakanishi, H., Oguri, K., Yoshida, K., Itano, N., Takenaga, K., Kazama, T., Yoshida, A. and Okayama, M. (1992) *Biochem. J.*, **288**: 215-224
- 15) Itano, N., Oguri, K., Nakanishi, H. and Okayama, M. (1993) *J. Biochem.*, **114**: 862-873
- 16) Itano, N., Oguri, K., Nagayasu, Y., Kusano, Y., Nakanishi, H., David, G. and Okayama, M. (1996) *Biochem. J.*, **315**: 925-930
- 17) Munesue, S., Kusano, Y., Oguri, K., Itano, N., Yoshitomi, Y., Nakanishi, H., Yamashina, I. and Okayama, M. (2002) *Biochem. J.*, **363**: 201-209
- 18) Fingleton, B. and Matrisian, L.M. (2001). *Matrix metalloproteinases in cancer* (Clendeninn NJ and Appelt K., ed.) pp. 85-112, Humana Press.
- 19) Liotta, L.A., Thorgeirsson, U.P. and Garbisa, S. (1982) *Cancer Metastasis Rev*, **4**: 277-288
- 20) 伊藤義文. がんの浸潤・転移と細胞運動. 竹縄忠臣 (編) 細胞骨格と細胞運動. シュプリンガー・フェアラーク, 2002
- 21) Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. and Seiki, M. (1994) *Nature*, **370**: 61-65
- 22) Werb, Z. (1997) *Cell*, **91**: pp. 439-442
- 23) Butler, G.S., Butler, M.J., Atkinson, S.J., Will, H., Tamura, T., van Westrum, S.S., Crabbe, T., Clements, J.,
- 24) d'Ortho, M.P., and Murphy, G. (1998) *J Biol Chem.*, **273**: 871-880, 1998.
- 25) Kinoshita, T., Sato, H., Okada, A., Ohuchi, E., Imai, K., Okada, Y. and Seiki, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**: 16098-16103
- 26) Seiki, M. (1999) *APMIS*, **107**: 137-143
- 27) Nagase, H. and Woessner, J.F.Jr. *Matrix metalloproteinases*. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**: 21491-21494
- 28) Isnard, N., Robert, L. and Renard, G. (2003) *Cell Biol. Int.*, **27**: 779-784
- 29) Maccarana, M., Casu, B. and Lindahl U. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**: 23898-23905
- 30) Guimond, S., Maccarana, M., Olwin, B.B., Lindahl, U. and Rapraeger, A.C. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**: 23906-23914
- 31) McKeehan, W.L., Wang, F. and Kan, M. (1998) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **59**: 135-176
- 32) Crabbe, T., Ioannou, C. and Docherty, A.J. (1993) *Eur. J. Biochem.*, **218**: 431-438
- 33) Crabbe, T., O'Connell, J.P., Smith, B.J. and Docherty, A.J. (1994) *Biochemistry*, **33**: 14419-14425
- 34) Kusano, Y., Oguri, K., Nagayasu, Y., Munesue, S., Ishihara, M., Saiki, I., Yonekura, H., Yamamoto, H. and
- 35) Okayama, M. (2000) *Exp. Cell. Res.*, **256**: 434-444
- 36) Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S. and Liotta, L.A. (1993) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 541-573
- 37) Will, H., Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B. and Murphy, G. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**: 17119-17123
- 38) Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A. and Goldberg, G.I. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**: 5331-5338
- 39) Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T. and Seiki, M. (2001) *EMBO J.*, **20**: 4782-4793