

氏 名	三 木 貴 雄
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3137 号
学位授与の日付	平 成 19 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	The Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs (RECK) Interacts with Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) and CD13/Aminopeptidase N (APN), and Modulates their Endocytic Pathways (RECK は MT1-MMP 及び CD13/アミノペプチダーゼ N と作用し、それらのエンドサイトーシス経路を調節する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 松 田 道 行 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 武 藤 誠

論 文 内 容 の 要 旨

活性化型 *ras* がん遺伝子は、マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) を含む種々のプロテアーゼの発現誘導により、がんの悪性化を促進することが知られている。*RECK* 遺伝子は、活性化型 *ras* がん遺伝子を導入することにより形質転換したマウス線維芽細胞の、悪性形質の一部を正常復帰させる活性を有する遺伝子として単離された。その後の研究により、*RECK* は MMP ファミリーのメンバーである MMP-9、MMP-2、MT1-MMP の活性を負に制御することが示された。*RECK* ノックアウト・マウスは、MMP の異常活性化が原因と考えられる繊維性コラーゲンの著しい減少や血管形成の異常を示し、胎生 10.5 日で死に至る。一方、*RECK* と既知の MMP 制御因子 (すべて分泌型) との構造を比較すると、膜に GPI アンカーされている点で際だった差がある。よって *RECK* には、MMP に対し固有の空間的制御機構が存在すると考えられるが、詳細なメカニズム等、不明な点は多い。そのため、本研究では *RECK* の標的の一つである MT1-MMP に対する制御機構の詳細な解析、さらに、新規な制御因子の同定・解析を目的とした。

野生型 *RECK* を過剰発現させたヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を用いて、免疫沈降法、精製タンパク質を用いた阻害実験、ショ糖密度勾配遠心法、ゼラチン・ザイモグラム法により、*RECK* による MT1-MMP の制御機構を調べた。その結果：

- 1) *RECK* と MT1-MMP が免疫沈降法により共沈降すること
- 2) 精製 *RECK* は精製 MT1-MMP の活性を拮抗阻害すること
- 3) GPI アンカー型の *RECK* はショ糖密度勾配遠心法によりラフト画分へ回収されるが、*RECK* の発現に伴って、MT1-MMP もラフト画分に集積すること
- 4) 脂質ラフトの構成成分であるコレステロールを除去する薬剤 MBCD で細胞を処理すると、*RECK* の MT1-MMP を抑制する機能が失われること

等が観察された。これらの結果は、*RECK* が MT1-MMP の脂質ラフトへの局在を増加させ、その活性を制御することを示唆している。

そこで次に、*RECK* が他の標的タンパク質についても脂質ラフトへの局在を増加させるという可能性を以下の方法で検討した。すなわち、*RECK* またはコントロール・ベクターを導入した HT1080 細胞のラフト画分を回収し、SDS-PAGE により分離後、銀染色により可視化した。その結果、*RECK* 発現細胞に特異的に出現するバンドが検出され、これを質量分析法により同定した結果、癌の浸潤、転移、血管新生を促進する膜結合型プロテアーゼとして知られる CD13/aminopeptidase N であることが判明した。MT1-MMP と同様の手法で *RECK* による CD13 の制御機構を検討し、以下の知見を得た：

- 1) 免疫沈降法により *RECK* と CD13 は共沈降する
- 2) 精製 *RECK* は精製 CD13 のペプチダーゼ活性を拮抗阻害する
- 3) *RECK* を過剰発現した HT1080 細胞では、CD13 の活性が減少している

4) MBCD で細胞を処理すると、RECK による CD13 抑制効果が減少する

これらの結果から、CD13 は RECK により制御される新たな標的タンパク質であることが示唆された。

MT1-MMP、CD13 は、共に膜結合型タンパク質のため、エンドサイトーシスによる制御が活性調節に深く関わると思われる。そこで、GPI アンカー型タンパク質である RECK との結合はこの機構にどのような影響を及ぼすのかをさらに検証した。生細胞表面の RECK、MT1-MMP、CD13 を抗体で標識し、輸送経路を追跡したところ、RECK、MT1-MMP、CD13 が同一のエンドソームへ輸送されることが判明した。RECK 非存在下では、MT1-MMP のエンドサイトーシスは、クラスリンないしカベオリン依存的であるが、RECK 存在下では、これらとは異なる経路が選択され、エンドサイトーシスされる MT1-MMP や CD13 の量の増加と、分解の促進が見られた。以上の結果より、RECK がエンドサイトーシスおよび分解の促進を介して膜結合型プロテアーゼを負に制御することが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者らは、多くのがんで発現低下している膜結合型MMP制御因子RECKの作用機構に洞察を加える目的で研究を行い、以下のような知見を得た。

- 1) 先ず、RECK が MT1-MMP と複合体形成することを確認した。次に、内在性 RECK の発現が低いヒト線維肉腫由来細胞株 (HT1080) に RECK を強制発現させると、脂質ラフト画分中の MT1-MMP 量が増加すること、この効果は、コレステロール除去作用を持つ methyl- β -cyclodextrin で細胞を処理することによって消失することを見出した。
- 2) RECK 依存的に脂質ラフト画分に局在するタンパク質を見出し、マスマスペクトル分析を行った結果、CD13 (別名アミノペプチダーゼ N) であることが判明した。RECK は CD13 と複合体を形成し、その活性を阻害することも示された。
- 3) MT1-MMP と CD13 のエンドサイトーシスは、RECK 非存在下では、主にクラスリンまたはカベオリン依存的な経路で起こるが、RECK 発現細胞では、これらとは異なる経路で起こり、分解速度も高まることを見出した。

以上の研究は、RECK の細胞レベルでの機能解明に貢献し、分子腫瘍学の発展に寄与する所が大きい。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 5 月 8 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。