

## 2. 新しいMMP制御因子RECKのがん転移および血管新生における役割

野田 亮\*

細胞外マトリックス(ECM)は、ほ乳動物においては最も豊富なタンパク質性成分であり、発生期には、細胞増殖に応じたりモデリングを繰り返しつつ個体の成長と形態形成をサポートする。ECMリモデリングに関わる中心的な細胞外タンパク質分解酵素群 matrix metalloproteinase(MMP)ファミリーは、腫瘍における浸潤・転移や血管新生においても重要な役割を果たすことが示されている。われわれは、活性化RASによるトランスフォーメーションを抑制する遺伝子を探索する中で、膜結合型MMPインヒビターをコードし、細胞がん化に伴って発現が低下する新規遺伝子RECKを見出した。酵素学的実験、がんにおける強制発現実験およびノックアウトマウス実験の結果は、RECKタンパク質が複数のMMPを阻害し、血管新生とがんの浸潤・転移の抑制に深く関与することを示唆している。

### Roles of the novel MMP regulator RECK in tumor metastasis and angiogenesis

MAKOTO NODA Molecular Oncology, Kyoto University Graduate School of Medicine



\*のだ・まこと：京都大学大学院医学研究科分子腫瘍学教授。昭和56年慶應義塾大学大学院医学研究科修了。昭和60年理化学研究所研究員。平成3年癌研究会癌研究所ウイルス腫瘍部部長。平成6年現職。主研究領域 / 分子腫瘍学，神経生物学。

#### Key words

細胞外マトリックス  
コラーゲン  
がん遺伝子  
血管平滑筋細胞

## 1. 背景

正常細胞とがん細胞を融合させるとしばしば正常なハイブリッド細胞が生ずることが1960年代から知られており、このような観察に基づいて「がん抑制遺伝子」という概念が提唱された<sup>1)</sup>。1980年代前半には、培養マウス線維芽細胞株(NIH3T3)を悪性転換(トランスフォーム)する活性を持つがん細胞由来遺伝子の探索が進められ、変異型 RAS などのがん遺伝子が発見された<sup>2)</sup>。われわれは、1985年頃からこの RAS がん遺伝子の作用機構解明およびがん抑制遺伝子の実体解明を目指して、変異型 RAS 遺伝子で悪性転換した NIH3T3 細胞(DT 株)を正常復帰させる遺伝子の探索を続けてきた。すなわち、正常ヒト線維芽細胞由来の遺伝子ライブラリー(cDNA 発現ライブラリー)を DT 細胞に導入し、形態が扁平となったコロニー(フラット・リパータント)を単離し、ここから正常復帰誘導活性を持った遺伝子クローンを回収するという試みである<sup>3)</sup>。この方法によって得られた4種の遺伝子を解析した結果、2種の細胞内タンパク質[RASファミリーGタンパク質(Krev-1/Rap1A<sup>4)</sup>)およびホメオボックスタンパク質(MSX-2<sup>5)</sup>断片]と2種の細胞外タンパク質分解酵素阻害分子(TFPI-2<sup>6)</sup>、RECK<sup>7)</sup>をコードする遺伝子であることが分かった。本稿では、これらのうち、最近解析の進んだ RECK 遺伝子の性質について概説する。

## 2. RECK 遺伝子および RECK タンパク質の特徴

RECK 遺伝子は NIH3T3 細胞では 4.6 kb の mRNA として発現されているが、悪性転換した DT 細胞ではほとんど発現されていない。同様にヒト線維芽細胞やヒト正常組織では

RECK mRNA の発現が広く認められるが、ヒト線維肉腫由来細胞株 HT1080 はじめ多くのがん由来細胞株では発現が著しく低下している。興味深いことに、NIH3T3 に FOS , MYC , SRC , FMS , FES , MOS などの RAS 以外のがん遺伝子を導入して悪性転換した細胞でも、やはり RECK 遺伝子の発現低下がみられた。すなわち、RECK 遺伝子は細胞悪性化に伴って一般的に発現が低下する遺伝子と考えられる。RAS による発現低下には、RECK 遺伝子の転写開始点直下に存在する Sp1 結合配列が関与する<sup>8)</sup>。これらの知見から、RECK は RAS を含む細胞がん化シグナルの標的として負の制御を受けていること、また、トランスフォームした細胞内で RECK を強制発現させると悪性形質(形態)の抑制がみられることから、RECK の発現低下は悪性転換に必須であることが分かった。

RECK 遺伝子 cDNA の塩基配列から、RECK タンパク質は 971 アミノ酸残基の前駆体として翻訳され、糖およびイノシトールリン脂質(GPI)による修飾を受け、細胞表面に結合して存在するものと考えられたが(図1)、これらの予測は実験的にも確かめられた<sup>7)</sup>。RECK タンパク質は、カルボキシル末端側に3個のセリン・プロテアーゼ(SPI)モチーフを持つ。とくに最初の SPI モチーフ(K1)は、Kazal 型と呼ばれる配列の特徴を持つが、その P1 部位が酸性アミノ酸(アスパラギン酸)であるという点においてユニークである。

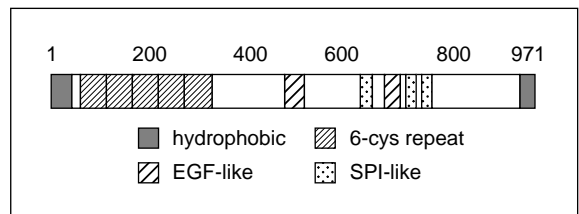


図1 RECK タンパク質の構造

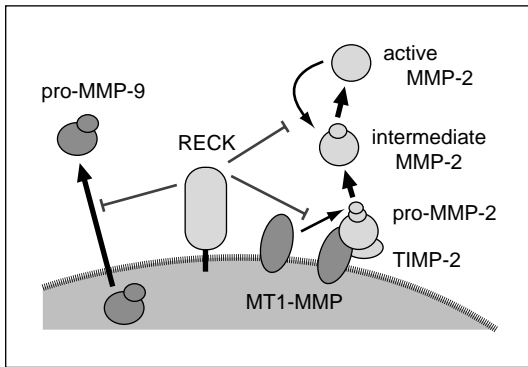


図2 RECK は3つのMMPファミリー分子を制御する

組換え体タンパク質を用いた試験管内実験によって、RECKは、MMP-2、MMP-9、MT1-MMPという3種のマトリックス・メタロプロテイナーゼ(MMP)の活性を阻害することが示された。また、RECKを強制発現させたHT 1080細胞の培養上清中では、pro-MMP-9と活性型MMP-2の量が著しく低下する(図2)。これら3つのMMPについては、いずれもがんの進行に伴って発現が亢進するという事例が報告されている。また、これらのMMPは、コラーゲン分解酵素としてがんの浸潤・転移や腫瘍血管新生に関与することも明らかにされている。RECKは正常細胞の表面にあって、これらのMMPの活性を同時に制御しているものと思われる。したがって、がん遺伝子がRECKの発現を低下させると、これらのMMPが一挙に活性化され、細胞外マトリックス(ECM)タンパク質やその受容体(インテグリン)の発現低下とあいまって細胞基質間接着を弱め、これが悪性形質発現の一翼を担うものと推測される(図3)。

### 3. RECK 遺伝子の生物活性

RECK 遺伝子を強制発現させた HT1080 細胞およびマウス・メラノーマ細胞(B16-B16)

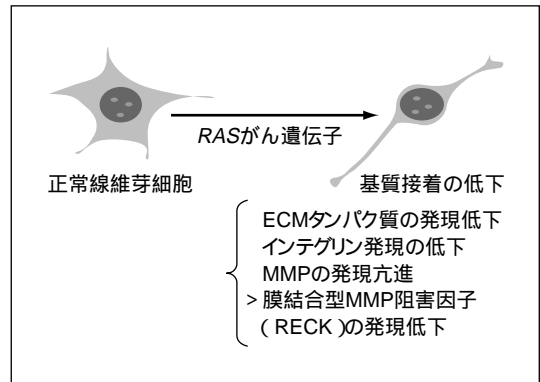


図3 悪性転換における細胞 基質間接着低下のメカニズム

では、浸潤能(マトリゲル浸潤アッセイ)および転移能(尾静脈接種 肺コロニー形成能; 皮下接種 リンパ節転移能)が著しく抑制されることが分かった。また、これらの腫瘍細胞をヌードマウスの皮下に移植した場合、移植部位での増殖は一見順調であるが、宿主動物の生存期間が有意に延びることが観察された。組織化学的解析の結果、コントロール腫瘍では血管分枝がさかんに起こっており、がんの増殖に伴って組織内の血管密度がほぼ一定に保たれるのに対し、RECK発現腫瘍では血管の分枝が起こらず内腔増殖が起こるため、血管密度が著しく低下し、その結果、血管周囲以外の大量の細胞に壊死がみられた。

RECK 遺伝子の生理機能にさらに洞察を加えるために、RECK 遺伝子欠損マウスを作成したところ、ホモ接合体は胎生 10.5 日齢ごろに腹部内出血を伴って死亡することが分かった。この時期の野生型胎児では、RECKは平滑筋細胞において高く発現されている。CD31 抗体による血管内皮細胞の染色像から、変異マウスでは血管発生初期段階(vasculogenesis)は進んでいるが、血管分枝を伴う次の段階(angiogenesis)がうまく進行していない可能性が示唆された。また、変異マウス

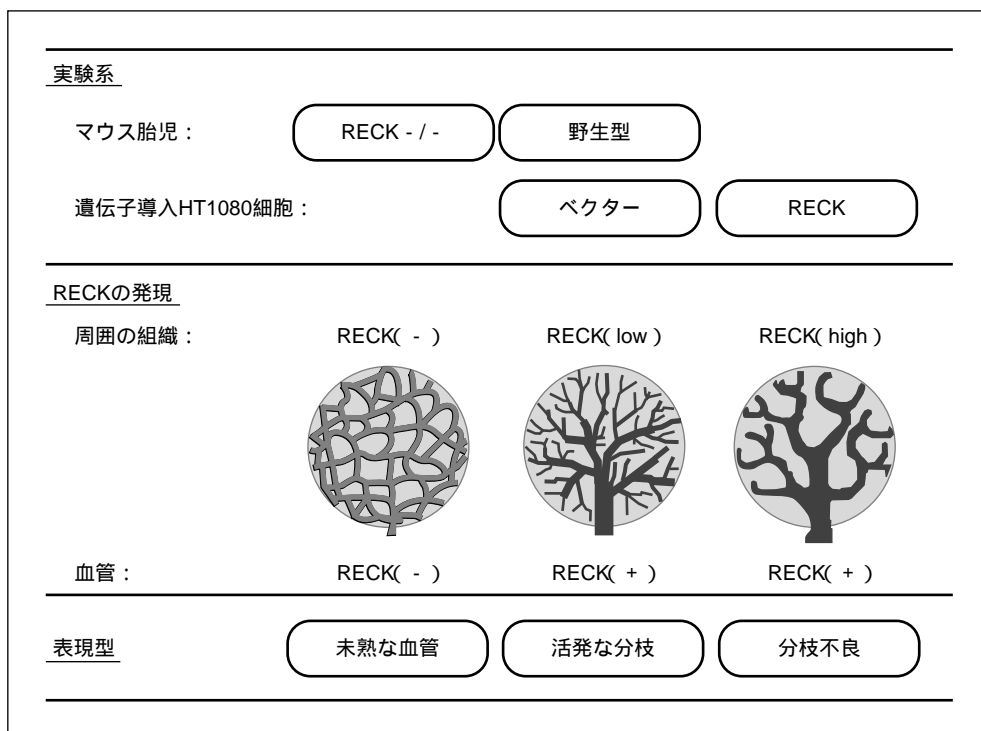


図 4 RECK の発現が血管形成におよぼす影響

では、MMP-2 の活性化が亢進し、繊維状コラーゲンの著しい減少がみられた。これらの観察から、RECK は血管平滑筋周囲の細胞外マトリックスを保護することによって血管を安定化させ血管分枝を可能とするが、血管周囲の組織に過剰の RECK が発現された場合には、分枝はかえって妨げられるものと考えられた ( 図 4 )。

#### 4 . 展望

内在性の MMP 阻害因子としてはすでに TIMP ファミリーが知られているが、これらは分泌性タンパク質であり、欠損マウスでも RECK の場合ほど顕著な表現型は観察されていない<sup>8)</sup>。ヒトがんにおける RECK の役割解明は今後の課題であるが、古元、有井、今村らはすでに、RECK の発現が非がん部に比

べて高い肝がん症例では患者の生存率が有意に高いという知見を得ている<sup>9)</sup>。今日、合成 MMP 阻害剤による新しい概念に基づくがん治療研究が進められているが、副作用等の問題点も指摘されている<sup>10)</sup>。がん発現が落ちる細胞表面タンパク質 RECK は、がん治療への応用という観点からもさまざまな可能性を秘めた大変興味深い分子と言えよう。

#### 謝辞

本研究の一部は文部省科学研究費特定領域研究の助成によって行われた。また、本研究は、高橋智聡、Oh Junseo, Regina M. Sasahara, 近藤俊哉、高橋玲、荒川力、清木元治、糸原重美の各氏の貢献に負うところが大きい。ここに深謝申し上げる。

〔文献〕

- 1) Harris H, Miller OJ, Klein G, *et al.* : Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 1969 ; 223 : 363 - 368.
- 2) Weinberg RA : Oncogenes of spontaneous and chemically induced tumors. *Adv Cancer Res* 1982 ; 36 : 149 - 164.
- 3) Noda M, Kitayama H, Matsuzaki T, *et al.* : Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated ras genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 162 - 166.
- 4) Kitayama H, Sugimoto K, Matsuzaki M, *et al.* : A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 1989 ; 56 : 77 - 84.
- 5) Takahashi C, Akiyama N, Matsuzaki T, *et al.* : Characterization of a human MSX-2 cDNA and its fragment isolated as a transformation suppressor gene against v-Ki-ras oncogene. *Oncogene* 1996 ; 12 : 2237 - 2164.
- 6) Izumi H, Takahashi C, Oh J, *et al.* : Tissue factor pathway inhibitor-2 suppresses the production of active matrix metalloproteinase-2 and is down-regulated in cells harboring activated ras oncogenes. *FEBS Lett* 2000 ; 481 : 31 - 36.
- 7) Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, *et al.* : Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by a novel membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 13221 - 13226.
- 8) Brew K, Dinakarandian D, Nagase H : Tissue inhibitors of metalloproteinases, evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000 ; 1477 : 267 - 283.
- 9) Furumoto K, Arii S, Mori A, *et al.* : RECK gene expression in hepatocellular carcinoma : Correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. *Hepatology* 2001 ; 33 : 189 - 195.
- 10) Hidalgo M, Eckhardt SG : Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001 ; 93 : 178 - 193.

---

## 質 疑 応 答

---

座長(成宮) 野田先生, どうもありがとうございました。新しい制御因子 RECK のがん発生における役割についてお話しいただきました。ただいまのご講演にご質問, ご討論

をお願いいたします。

曾根三郎(徳島大) 一つお聞きしたいのですが, がんが浸潤する過程で MMP-2, MMP-9 が非常に重要ですが, ホスト側細胞から出てくる, たとえば炎症細胞などから産生される MMP-2, MMP-9 も, がんの浸潤で非常に重要な役割を果たしていますね。先生がいわれた RECK 蛋白というのはがん細胞自体が発現してくる MMP-2, MMP-9 だけでなく, 宿主側のほうにも抑制的に働くのでしょうか。

野田 宿主側の細胞が出す MMP も, 結局はがん周囲の ECM を分解することによって, 細胞の通り道を作ったり, そこにトラップされているサイトカインを解放するのではないのでしょうか。もしそうだとすると, 全てのがん細胞に RECK が発現されていれば, その表面でのローカルな ECM の分解は起こり難くなり, 浸潤や血管新生も起こり難くなるのではないかと思います。生理的に RECK が細胞外に放出されるかということ, そのような証拠は今のところ得られておりません。実験的には, 膜にアンカーするドメインを欠失させた可溶性型組換え体 RECK タンパク質も浸潤能を抑制するというデータはありません。

座長 先生が今いわれたあとの点ですが, RECK を recombinant 蛋白として発現して, フリーな分子をたとえば細胞培養に添加したら, RAS の transform 細胞はやはり reversion を起こすのですか。

野田 形態に関してはあまりしっかりやっておりますが, 浸潤 assay に入れた時は効くということはわかっています。

座長 そうしますと, 必ずしも transfection をしなくても, recombinant 蛋白を作ってやって, 外から infusion することによって, 浸潤, 転移が防げるかもしれないということですね。

野田 ただそういう分子というのは, TIMP

---

とか、あるいはすでに MMP inhibitor がいくつかありますので、そういうものよりまさるかどうかということはありません。ですからこの分子に関しては、細胞表面に局在しているということに大きな意味があるだろうというふうに考えているわけです。

**座長** もう一つ伺いたいのですが、今日のお話のように、細胞外基質とがん細胞との関係を改善してやることによって morphologi-

cal には確かにがんの形態が変化し、がん細胞に特徴的な形態が正常細胞に近くなるのですが、そのことがその他のがん細胞の形質をどのくらい変え得るのか、たとえば細胞間接着と細胞外基質間接着はクロストークするというようなこともいわれていますが、

**野田** 細胞間接着については調べておりませんが、今後の重要な課題と考えています。

**座長** どうもありがとうございました。