

氏名	高木 聡
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 716 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	がん転移抑制タンパク質 RECK の機能発現に関する研究
論文審査委員	委員長 連携教授 長田 裕之 委員 教授 井上 金治 委員 教授 大西 純一 委員 連携教授 辻本 雅文

## 論文の内容の要旨

### 【研究背景および目的】

がんは 1981 年から現在まで 30 年近くにわたり、国内の死因の第一位を占めており、医療技術が飛躍的に向上した現在においても、その治療がいかに困難なものであるかがうかがい知れる。

では、なぜがん治療は困難を極めるのか。それは、がん細胞が原発巣から他臓器へと浸潤・転移することによる。現在のがん治療は、局所治療である外科療法や放射線療法と、全身治療である化学療法が、がん三大療法として確立されている。しかし、がん細胞が他臓器へと浸潤・転移するために、局所的治療である外科手術や放射線療法の有効性を低下させ、術後のがんが再発することになる。実際に、多くのがんでは原発巣が原因で死亡に至るケースは少なく、転移によるがん再発の影響によるものが大きい。

従って、がん細胞の浸潤・転移を抑制することは局所的治療の大幅な効率上昇とそれに付随した 5 年生存率の飛躍的な向上が見込まれる。さらには、再発率を低下させることにも繋がるため、日夜がん再発の危険に脅かされている患者の生活の質をも改善することが可能になると考えられる。つまり、がん細胞の浸潤・転移メカニズムを詳細に解析し、その段階に関与する分子を同定することは、今後のがん治療において重要な課題であるといえる。

そこで本研究では、がん転移を亢進する酵素 MMP (matrix metalloproteinase) と、近年、単離・同定された MMP 阻害タンパク質 RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal-motifs) に着目した。そして、RECK によるがん転移抑制機構の詳細を明らかにすることで、がん転移抑制剤を開発する際のターゲットとなる分子を提示することを目的とした。

### 【結果】

まず、ヒト線維肉腫細胞 HT1080 に、コントロールベクターおよび野生型 RECK 遺伝子を強制発現させた細胞のクローンを樹立し、コントロール細胞と RECK 過剰発現細胞間の遺伝子発現の差異を、GeneChip を用いて比較した。その結果、ヒトでは 24 種が確認されている MMP ファミリータンパク質のうち、MMP-9 の発現のみが RECK 過剰発現細胞において減少していた。そこで、RECK が MMP-9 の発現を mRNA レベルで抑制する可能性を検討した。まず、RECK 過剰発現細胞とコントロール細胞間の遺伝子

発現の差異を、real-time RT-PCR 法で検出した。その結果、RECK 過剰発現細胞では MMP-9 mRNA 量が 1/10 以下に減少していることが示された。なお、インターナルコントロールとして定量した MMP-2 mRNA 量は、両細胞間で変化が無かった。次に、RECK 特異的な siRNA を用いて、RECK の発現をノックダウンした際の MMP-9 mRNA 量の変化を検出した。その結果、内在性 RECK の発現をノックダウンすることで、MMP-9 mRNA 量が増加することが示された。なお、この時 MMP-2 mRNA 量に変化は無かった。これらのことから、RECK は MMP-9 の発現を mRNA レベルで抑制することが示された。

さらに、MMP-9 プロモータ領域をクローニングし、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイを行うことでその転写活性を測定したところ、RECK 過剰発現細胞では、MMP-9 プロモータの転写活性が抑制されていることが示された。また、種々の変異型 MMP-9 プロモータ領域を作製し、それらの転写活性を測定したところ、NF- $\kappa$ B が結合する  $\kappa$ B site および AP-1 が結合する TRE に変異を導入した際に、RECK による抑制がキャンセルされた。このことから、RECK による MMP-9 プロモータの転写活性の抑制には、 $\kappa$ B site および TRE が重要であることが示された。そこで、MMP-9 プロモータ領域上への NF- $\kappa$ B および AP-1 のリクルートに与える RECK の影響を、クロマチン免疫沈降法を用いて評価した。その結果、RECK 過剰発現細胞では、MMP-9 プロモータ領域上への Fra-1 および c-Jun の結合が減少していることが示された。なお、両細胞の核内における Fra-1 および c-Jun の発現量が同等であることは、ウエスタンブロット法を用いて確認した。Fra-1 および c-Jun が MMP-9 の発現制御に寄与することは、siRNA を用いたノックダウン実験により確認した。これらの結果より、RECK は、MMP-9 プロモータ領域上への Fra-1 および c-Jun の結合を抑制することで、MMP-9 の発現を転写レベルで抑制していることが示唆された。

#### 【考察】

プロテアーゼやグリコシダーゼといった細胞外マトリクスの分解を司る酵素は、その制御バランスの破綻が、がん転移を誘発する原因となっている。本研究の結果より、RECK は、MMP-9 の発現を転写レベルで抑制する新たな分子であることが明らかにされ、がん転移における RECK 発現の重要性が改めて示された。また、RECK が MMP-9 の転写を抑制するメカニズムを詳細に解析することで、Fra-1 と c-Jun が MMP-9 の発現に重要である知見を得た。

これらの結果から本研究は、Fra-1 および c-Jun をターゲットとした分子標的治療薬を開発することで、RECK ミミックな効果、つまりがん転移抑制効果を得ることができると提示することができた。さらに、MMP-9 依存的に転移を進行するようながん細胞に対しては、Fra-1 および c-Jun を標的とした治療戦略を執ることで、がん転移を抑制することのできる可能性を提示することができた。

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 21 年 2 月 18 日(水)に埼玉大学理学部 3 号館で論文発表会を開催した。審査結果の概要は、以下の通りである。

がん治療が困難を極める最大の要因は、がん細胞が他臓器へと転移することにある。高木氏は、がん転移抑制タンパク質 RECK の詳細な機能解析を行うことで、RECK が細胞外マトリクス分解酵素 MMP-9 の発現を mRNA レベルで抑制する新たな分子であることを見出し、RECK の機能ミミックな薬剤が、がん転移抑制剤として有望であることを明らかにした。

学位論文は以下の項目から成っている。

第一章では、序論としてがん治療の現状と問題点が述べられ、がん転移を抑制することの重要性や分子標的治療薬の有用性に関して説明がなされた。また、がん転移亢進タンパク質 MMP と、がん転移抑制タンパク質 RECK に関する既存の知見に触れ、RECK を研究対象とする意義に関して、的確な説明がなされた。

第二章では、RECK による MMP-9 抑制機構に関して論じられた。GeneChip を用いた比較解析を行うことで、RECK 過剰発現に伴う遺伝子発現の変動を検出し、RECK が MMP-9 mRNA 量を減少させる可能性を見出した。リアルタイム RT-PCR 法を用いて mRNA 量を定量したところ、RECK 過剰発現細胞では MMP-9 mRNA 量が減少していることを確認した。さらに、内在性 RECK を発現する細胞に RECK 特異的な siRNA を処理することで、RECK のノックダウンが MMP-9 mRNA 量を増加させることを示した。これらの結果から、RECK は MMP-9 の発現を mRNA レベルで抑制する新たな分子であることが示された。

また、RECK が MMP-9 と直接相互作用する可能性や、RECK が MMP-9 の分泌経路に与える影響についても検討を行い、RECK が MMP-9 を抑制する際にメインの役割を担うのは mRNA レベルでの抑制であることを示した。

さらに、MMP-9 のプロモータ領域をクローニングし、ルシフェラーゼを用いたプロモータアッセイを行うことで、RECK が MMP-9 プロモータの転写活性を抑制することを見出した。また、種々の変異型 MMP-9 プロモータを作製することで、-700 から -400 bp 間に位置する kappa B site および TRE が、RECK による MMP-9 プロモータ活性の抑制に重要であることを示した。さらに、クロマチン免疫沈降法を駆使することで DNA- 転写因子間の結合能を比較し、RECK 過剰発現細胞では TRE に対する c-Jun および Fra-1 の結合が抑制されていることを示した。最後に、c-Jun および Fra-1 のノックダウン実験を行い、MMP-9 の発現に c-Jun および Fra-1 が関与することを示した。

第三章では、総括として RECK の機能ミミックな薬剤を開発するための展望が述べられ、薬剤標的分子としての Fra-1 の有用性が示された。ヒトでは 24 種類が存在する MMP の中でも、特に MMP-9 は高転移能を有する腫瘍組織において高発現していることが知られており、さらに、がん転移の初期過程において必須の現象である血管新生を誘導するトリガーの役割を果たすことが報告されている。すなわち、がん転移における MMP-9 の貢献度は非常に高いものであり、そのような分子である MMP-9 の発現を mRNA レベル

で抑制する RECK は、がん転移抑制タンパク質として非常に重要な役割を担っており、RECK の機能ミミックな薬剤はがん転移抑制剤として有用であることが示された。

また、RECK は MMP-9 の転写を c-Jun および Fra-1 を介して抑制していることが示された。既存の報告より、Fra-1 のノックダウンは、活性型 Ki-ras により形質転換させた細胞を正常形質へと復帰させることが知られている。一方 RECK 遺伝子は、活性型 Ki-ras により形質転換させた NIH3T3 細胞を正常形質へと復帰させる遺伝子として単離された経緯を有しており、RECK による細胞の正常形質復帰作用は、Fra-1 の機能制御によってなされた可能性を強く示唆させる。これらの発見は、Fra-1 もしくは Fra-1 の機能制御に関与する分子の阻害剤を開発することで、RECK ミミックな機能を有するがん転移抑制剤を開発することのできる可能性を示唆していると言える。本研究は Cancer Research 誌に筆頭著者論文として投稿し、受理されている。また、RECK の糖鎖付加に関する論文も、共著者として Cancer Research 誌に報告されている。以上のことから、本審査委員会は高木氏の研究成果は課程博士として十分な内容を有すると判断し、合格とした。