

アミロイド前駆体タンパク質分子内に見出された MMP-2 インヒビター領域の選択性発現機構とその応用

Mechanism of MMP-2-selective inhibitory action of β -amyloid precursor protein-derived inhibitor and its application to design specific inhibitors against individual MMPs

東 昌市*

Shouichi HIGASHI



東 昌市

略歴

1989年 九州大学理学部生物学科卒業
 1994年 九州大学大学院医学系研究科分子生命科学系専攻博士課程修了
 博士(理学)取得
 1995年 横浜市立大学木原生物学研究所 助手
 2008年 横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科 准教授
 2015年 横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科 教授
 現在に至る

受賞歴

1997年2月 平成8年度 井上研究奨励賞
 1998年9月 平成10年度 日本血栓止血学会学術奨励賞

Key words: MMP-2, APP, TIMP-2, MT1-MMP, cancer metastasis

Points

- ①生体内に20種以上存在するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の全般に広く作用する阻害剤は古くから開発されてきたが、近年、がん治療における標的MMPsと反標的MMPsが分類されるに至り、安全かつ効果的ながん治療薬の開発には標的MMPsに特異的な阻害剤の創出が重要と考えられている。
- ②アミロイド前駆体タンパク質(APP)の分子内に見出されたISYGNALMP配列を持つ10残基ペプチド領域(APP-IP)は、標的MMPsの一つであるMMP-2に対して高い阻害選択性を持っていた。
- ③MMP-2触媒ドメイン・APP-IP複合体の結晶構造解析から、APP-IPを構成する多くのアミノ酸残基がMMP-2基質認識部位との結合に寄与することが判明し、この広域にわたる相互作用が、高いMMP-2選択性に関与することが示唆された。
- ④MMP-2の非触媒ドメインと特異的に相互作用するTIMP-2と、APP-IPとの融合タンパク質APP-IP-TIMP-2($K_i=0.7$ pM)では、APP-IP($K_i=30$ nM)と比較して、MMP-2に対する特異性と阻害活性が飛躍的に高まっていることが判明した。
- ⑤個々のMMPに対する高特異性阻害剤は、がんをはじめとしたMMPsが寄与する様々な病態の解明に役立つとともに、副作用が少なく、かつ効果的な治療薬としての応用が期待される。

*責任者連絡先:

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科
 〒236-0027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸22-2
 Tel: 045-787-2380, Fax: 045-787-2413
 E-mail: shigashi@yokohama-cu.ac.jp

1. はじめに

高等動物の組織において細胞が移動するためには障壁となる細胞外マトリックス(extracellular matrix,

ECM)をいったん破壊する必要がある。ECMは主にコラーゲン、エラスチン、ラミニン、フィブロネクチンなどのタンパク質成分と、ヒアルロン酸やグリコサミノグルカンなどの多糖から構築されているが、発生や創傷治癒、炎症などの生理的あるいは病理的過程では、これらECM成分の分解、除去、再構築が起き、それに細胞の増殖、移動、分化が共役することで、正常組織の構築や維持、再生が可能になる。このECM分解に重要な役割を果たすのがマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)と呼ばれる一群のタンパク質分解酵素である。

悪性のがん組織では、幾つかのMMPsが高発現し、がん細胞の浸潤・転移に寄与することが示されたことから、筆者がこの研究に加わった1995年頃は製薬会社を中心に多くのMMPs阻害剤が開発され、臨床試験が行われつつあった。しかしながら、2000年代に入ると、遺伝子欠損マウスの解析や一遺伝子多型(SNP)解析の結果から、ヒトで見出されている24種のMMPsの全てが、がんの浸潤・転移を促進するのではなく、特異性の低い阻害剤によって標的以外のMMPsが阻害されると、がんの転移を助長する可能性や、副作用が現れることが示唆された。事実、これまでに開発された多くの低分子MMPs阻害剤はいずれも特異性が低く、臨床試験において、がんの転移抑制効果が不明確であったり、様々な副作用が確認された。残念なことに、これらの理由により、がん治療薬としての利用に至ったMMPs阻害剤は1例もないというのが現状である。

期待が大きかっただけに、この「MMPs阻害剤の失敗」の影響は大きく、多くの製薬企業がMMPs研究から撤退し、現在国内のMMPs研究者は非常に少なくなってしまった。しかし、上述のようにMMPsを標的としたがん治療薬開発の失敗の原因が比較的明確であることや、一部のMMPsは依然として良好ながん治療のターゲット分子であること、幾つかのMMPsはがん以外の様々な病態の標的分子と成り得ることなどから、筆者らは個々のMMPsに対し、高い特異性を持つインヒビターの開発が重要であると考え、研究を進めている。本稿ではアミロイド前駆体タンパク質(APP)の分子内に見出されたMMP-2選択的インヒビター領域に関する筆者らの研究を中心に、近年、がん転移のみならず、血小板

凝集の促進因子としても注目されているMMP-2のユニークな活性発現・調節機構と、そのメカニズムを応用した高選択性インヒビターの開発について概説する。

2. 修飾TIMP-2によるMMP-2前駆体の活性化抑制法の発見

筆者がMMPs研究に加わった1990年代半ば頃、アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド β -タンパク質(A β)の前駆体(β -amyloid precursor protein, APP)がMMP-2阻害活性を持つことが見出されていた¹⁾。また、I型の細胞膜貫通タンパク質であるAPPは細胞膜表層に存在する未同定のメタロプロテアーゼ(仮称 α -セクレターゼ)によってA β 領域内で切断を受けると、神経毒性をもつA β を産生することなく分解されることから、当時この膜表在性メタロプロテアーゼの機能不全がアルツハイマー病の発症に関与すると考えられ、その同定が急がれていた。一方で、がん細胞の細胞表層に発現し、MMP-2前駆体(pro-MMP-2)の活性化に関わる膜型MMP(MT1-MMP)が金沢大学がん研究所の佐藤博博士、清水元治博士らのグループによって発見されていた²⁾。そこで、最初に取り組んだテーマは、細胞表層に存在するMT1-MMPあるいはMMP-2がAPPの切断に関わる可能性を調べることであった。残念ながら、A β 領域内でのAPP切断にはA disintegrin and metalloproteinase(ADAM)とよばれる別のクラスのメタロプロテアーゼが主として関わるということが明らかになり、MMPsは主役ではないだろうという結論に至ったが、この研究の過程で幾つか面白い発見があった。その一つが生理的MMPsインヒビタータンパク質であるtissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2)のインヒビター活性部位を化学修飾した分子を用いてMT1-MMPによるpro-MMP-2の活性化を特異的に抑制する方法の発見である。

MT1-MMPが発見された当時、pro-MMP-2の活性化についても精力的な研究がなされ、ユニークかつ複雑なメカニズムが提唱されていた³⁾。そのメカニズムでは、まず、MT1-MMPの酵素活性部位にTIMP-2のN末端に存在するインヒビター部位が結合する。次に、TIMP-2のC末端側にMMP-2の非酵素ドメ

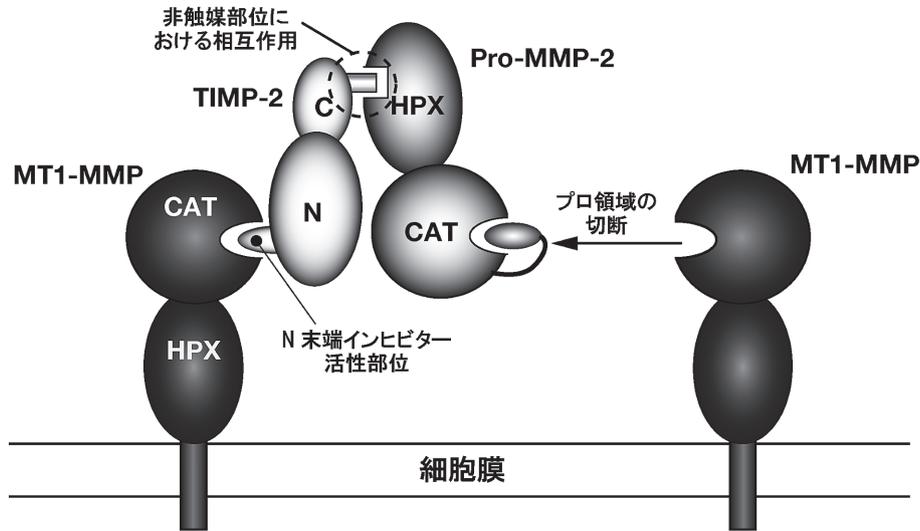


図1 MT1-MMPによる pro-MMP-2 活性化機構
MT1-MMP, TIMP-2 および pro-MMP-2 から成る3分子複合体が形成された後, pro-MMP-2のプロ領域がMT1-MMPに切断され, 活性化される.
CAT: 触媒ドメイン, HPX: ヘモペキシン様ドメイン

インと結合する部位が存在し, この部位を介して pro-MMP-2 が結合すると, 細胞膜上に MT1-MMP・TIMP-2・pro-MMP-2 からなる3分子複合体が形成される. 最後にTIMP-2の結合していない(酵素活性がある)MT1-MMPによって3分子複合体中の pro-MMP-2 が切断を受け活性型酵素に変換されるというものである(図1). したがって, MMPs インヒビターであるTIMP-2は, このメカニズムの中では両面テープの役割を果たし, pro-MMP-2をMT1-MMPが存在する細胞表層へ繋ぎ留めることにより, その活性化反応を促進する. そこで, 筆者はTIMP-2のインヒビター部位のみを破壊し, 両面テープを片面テープへと変換することで, pro-MMP-2の活性化が阻止出来るのではないかと考えた(図2).

この発想に至った頃, 偶然にも筆者が横浜市立大学に赴任する直前に短期留学でお世話になったドイツ・マックスプランク研究所のWolfram Bode博士のグループがTIMP-1とMMP-3との複合体の結晶解析に成功し, TIMP-1の主鎖のN末端Cys¹の α -アミノ基の窒素原子上の非共有電子対がMMPの活性中心亜鉛イオンに配位していることを発見した⁴⁾. そこで, TIMP-2のN末端Cys¹の α -アミノ基をシアン酸イオンを用いてカルバミル化したところ, そのMMPインヒビター活性が完全に消失することを見出した.

また, このインヒビター活性を失ったN末端カルバミル化TIMP-2をコンカナバリンAで刺激したヒト線維肉腫由来HT1080細胞に添加したところ, 内在性MT1-MMPによるpro-MMP2の活性化が阻害されることが明らかになった⁵⁾. これらの結果は上述のMT1-MMPによるpro-MMP2活性化メカニズムの検証にも役立ったが, この修飾TIMP-2がMT1-MMPの酵素活性を阻害することなく, MMP-2の活性化のみを阻害できることから, 培養細胞系において内在性MT1-MMP活性とMMP-2活性を区別する際に有効であった.

3. APPの新規プロセッシングの発見とその責任酵素の同定

細胞表層に存在するMT1-MMPあるいはMMP-2が α -セクレターゼの本体か否かに対する答えは否定的であったが, 研究の過程でこの2つのMMPsのいずれかがAPP細胞外領域の新規切断に関わる可能性が出て来た. すなわち, HT1080細胞の培養上清には α -セクレターゼ切断で放出される105 kDaのAPP断片(soluble APP, sAPP)が検出されたのに対し, この細胞をコンカナバリンAで刺激して内在性のMT1-MMP活性の上昇とMMP-2の活性化を誘導す

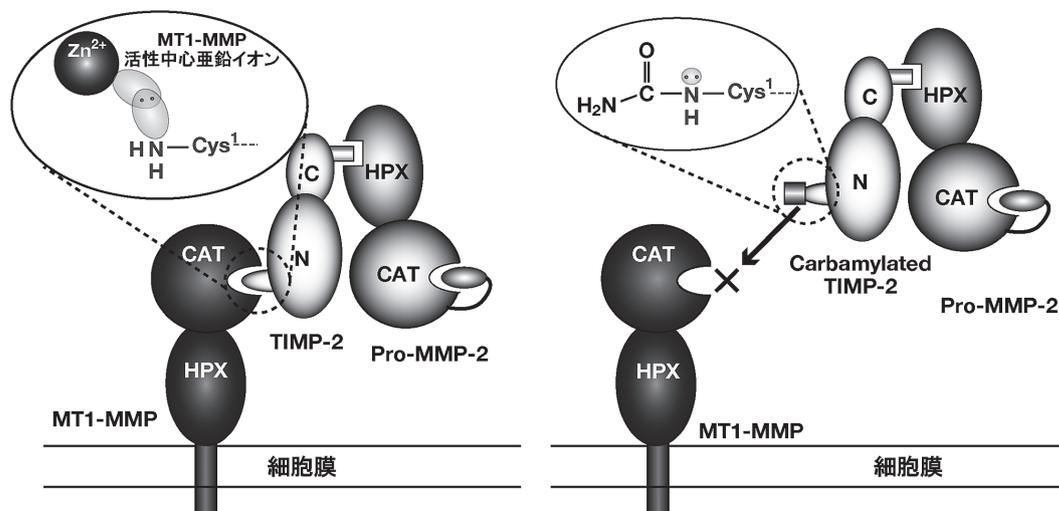


図2 N末端修飾TIMP-2によるpro-MMP-2活性化阻害機構

TIMP-2のN末端Cys¹の主鎖αアミノ基にカルバミル基等の電子吸引基を付加すると、このαアミノ基がMMP活性中心亜鉛イオンに配位結合出来なくなるため、MT1-MMPとTIMP-2との結合が失われる(右図)。一方、TIMP-2とpro-MMP-2との結合はN末端修飾の影響を受けないため、修飾TIMP-2(Carbamylated TIMP-2)の存在下では、pro-MMP-2を細胞表層に濃縮できなくなり、MT1-MMPを介したpro-MMP-2活性化が阻害される。

ると、それに付随して培養上清中に90 kDaの新規APP断片が現れることを見出した。この90 kDaのAPP断片はsAPPのC末端側エピトープを欠いていることから、APPがα-セクレターゼ部位よりもN末端側で切断を受け、sAPPよりも短い細胞外領域が放出されていることが予想された。そこで、この90 kDaのAPP断片をtruncated sAPP(sAPPtrc)と命名した(図3)。興味深いことにsAPPがMMP-2インヒビター活性を持つものに対し、sAPPtrcにはその活性がなかったことから、後のMMP-2インヒビター領域の同定につながった。

一方、sAPPtrcの産生にMT1-MMPあるいはMMP-2が関与する状況証拠はあったものの、その当時はRNA干渉の技術がまだ普及していなかったため、培養細胞系における責任酵素を特定することは意外に困難であった。そこで、筆者らは選択性の低い低分子メタロプロテアーゼ阻害剤、MMPsファミリーを広く阻害するTIMP-2、MMPsファミリーを広く阻害するが、MT1-MMPに対する阻害活性のみが弱いTIMP-1、およびMMP-2の活性化を特異的に阻害するN末端カルバミル化TIMP-2の4種類のインヒビターを用いて調べた結果、低分子MMPs

阻害剤とTIMP-2がsAPPtrcの産生を阻害したのに対し、TIMP-1とN末端カルバミル化TIMP-2は全く阻害しないことが明らかになり、MMP-2ではなくMT1-MMPが責任酵素であることを特定した⁶⁾。

さらに、細胞がMT1-MMP活性を発現している場合にはsAPPtrcがECMに蓄積し、MT1-MMP活性を発現していない場合には、MMP-2インヒビター活性を持つsAPPが蓄積することを見出し、以下のような酵素の調節機構を考案した。すなわち、MT1-MMP密度が低い細胞表面からは主にインヒビター領域を含むsAPPが放出され、この断片が周囲のECMに結合することにより、ECMがMMP-2による分解から保護されるが、MT1-MMPが集積している浸潤先端部位ではインヒビター領域を含まないsAPPtrcが大量に放出され、これがsAPPと置き換わるため、ECMがMMP-2により分解され易くなると考えた。このようなメカニズムによって細胞表層近傍の特異領域に限定されたECMの分解が可能になり、組織内での細胞移動を容易にするのではないかと予想している⁶⁾。この仮説はさらに検証の必要があるが、後述のようにAPP分子内のMMP-2インヒビター領域はMMP-2に対し高い選択性を持つこと

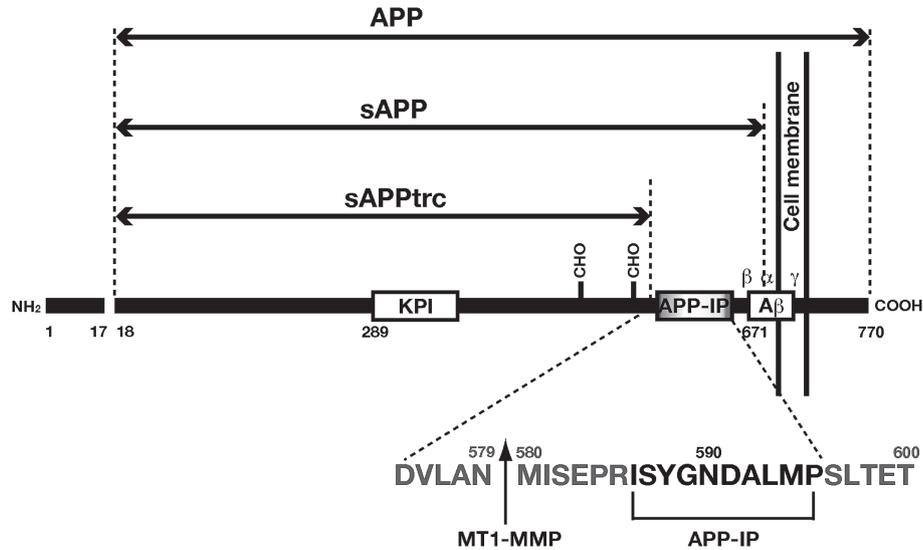


図3 アミロイド前駆体タンパク質(APP)分子内の MMP-2 インヒビター領域(APP-IP)
KPI: Kuniz 型プロテアーゼインヒビター領域, Ab: アミロイドβタンパク質領域
α, β, γ: それぞれ, α-, β-, γ-セクレターゼによる切断部位

から, APP は MT1-MMP/MMP-2 枢軸の特異的な調節分子であることが予想される。

4. APP 分子内 MMP-2 インヒビター領域の同定

MMP-2 インヒビター活性が sAPP には存在し, sAPPtrc には存在しないことを足掛かりに, sAPP の C 末端側領域のアミノ酸配列を含む様々なタンパク質断片や合成ペプチドのインヒビター活性を調べ, その最小単位を同定した結果, APP₇₇₀ の 586–595 番目に相当する ISYGN DALMP 配列がインヒビター領域を形成することを明らかにした(図3)。興味深いことに, このアミノ酸配列を持つ 10 残基ペプチド(APP-derived inhibitory peptide, APP-IP と命名)は sAPP と比較して約 10 倍高い MMP-2 阻害活性を示し, その阻害の IC₅₀ 値は 30 nM であった。また, APP-IP の酵素選択性について調べたところ, APP-IP の MMP-3, MMP-7, MMP-9 および MT1-MMP に対する阻害活性は IC₅₀ 値で比較して MMP-2 阻害活性の 70~1,000 倍弱いことが判明し, APP-IP が高い MMP-2 選択性を持つことが明らかになった⁷⁾。

一方, APP-IP の N 末端側あるいは C 末端側から 1 残基ずつアミノ酸を削ったり, 内部配列のアミノ

酸残基を Ala に置換すると, MMP-2 に対する親和性が顕著に低下することから, 10 アミノ残基残基のほぼ全てが MMP-2 活性部位との相互作用に寄与することが予想された。このことは後に MMP-2 触媒ドメインと APP-IP との複合体の結晶構造解析により証明された。

動物種間で APP のアミノ酸配列を比較すると, APP-IP 配列が哺乳類, 鳥類および魚類に至るまでよく保存されているのに対し, その周辺配列の相同性は低いことがわかる(図4)。したがって, 進化の過程において APP-IP が保存され, その MMP-2 活性制御機構の重要性が示唆された。しかし, APP 遺伝子欠損マウスでは明確な機能異常が見られておらず, その生理的重要性は証明されていない。これは MMP-2 遺伝子欠損マウスにも明確な機能異常がないことに対応するものかも知れないが, 未知の環境下や病理条件下において上記活性制御機構が重要になる可能性は残されている。

5. APP-IP との選択的相互作用に寄与する MMP-2 の構造要素の同定

2000 年代になると, がん治療の標的 MMPs と反標的 MMPs が分類されるとともに⁸⁾, 個々の MMP

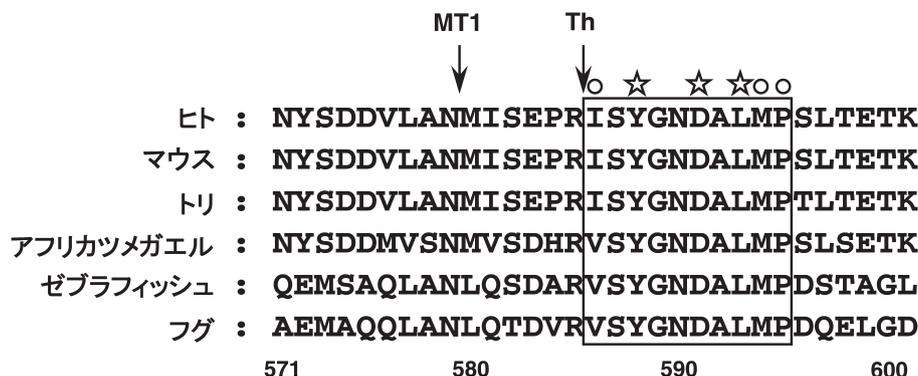


図4 動物種間における APP 分子内 MMP-2 インヒビター領域 (APP-IP) およびその周辺部のアミノ酸配列の比較

ヒト APP 分子内に見出された APP-IP に相当するアミノ酸配列を線で囲んだ。上部の ☆ ($\Delta\Delta G > 10$ kJ/mol) および ○ (10 kJ/mol $> \Delta\Delta G > 5$ kJ/mol) は、APP-IP が MMP-2 活性を阻害する際に、結合エネルギー寄与の大きなアミノ酸残基を示す。MT1 および Th は、それぞれ、ヒト APP が MT1-MMP およびトロンビンで切断される部位を示す。

に特異的なインヒビター開発の重要性が認知され始め、化合物ライブラリーからの探索や従来型低分子インヒビターの修飾、ファージディスプレイ法などを用いて選択的 MMP インヒビターの創出が試みられた。しかし、APP-IP ほど高い選択性をもつインヒビターはなかったことから、筆者らは APP-IP が如何にして選択性を発揮するのかということに興味を持った。

そこで、MMP-2 の触媒ドメインと MMP-7、あるいは MMP-9 の触媒ドメインの各パーツ (アミノ酸配列) を組み合わせて種々の“キメラ MMPs”を作製し、これらの酵素活性に及ぼす APP-IP の阻害活性を調べることで、MMP-2 のどの部位が APP-IP との選択的相互作用に寄与しているのかを明らかにすることを試みた⁹⁾。

ところで、それまでに明らかにされていた種々の MMPs の結晶構造から、各 MMPs の触媒ドメインの主鎖は、同様に折り畳まれており、それらの構造を重ね合わせると α -炭素のトレースはほぼ一致することが分かっていた。事実、この研究で作製したほとんど全てのキメラ MMPs が酵素活性を持っており、異なる MMPs から取り出したパーツを組み合わせても酵素機能に重要な立体構造が保持されていることが分かった。これは各 MMPs の触媒ドメインの構造が互いに酷似していることを反映するとともに、触媒ドメイン (活性部位) を標的とした特異

的インヒビター創出の難しさを反映するのも知れない。

上記キメラ MMPs を用いた解析により、筆者らは APP-IP の酵素選択性に関わる酵素側の構造要因をアミノ酸残基レベルで明らかにしたところ、MMP-7 と MMP-9 が APP-IP との相互作用において異なる部分に障害を持つことを見出した。すなわち、MMP-9 では基質結合クレフトの非プライム側 (基質ペプチドの切断部位の N 末端側と相互作用する酵素側の部位) に存在する Pro⁸⁷ と Gln⁹³ が障害となり、MMP-7 ではプライム側 (基質ペプチドの切断部位の C 末端側と相互作用する部位) の 144-147 に相当する NGDP 配列が障害になっていた。これらの部位は MMP-2 活性中心の亜鉛イオンから比較的遠い位置に存在していたことから、MMPs の基質結合クレフトの構造において、活性中心から遠い部位に各 MMP で個性があることが予想された。

さらに、APP-IP 側のアミノ酸残基を修飾した種々のペプチドと上記キメラ MMPs の相互作用を調べることで、酵素側の 94 番目のアミノ酸が APP-IP 側の Pro¹⁰ と、また、酵素側 144-147 番目の部分が APP-IP の Tyr³ と相互作用することが示唆され、APP-IP の N → C 末端の配向が基質ペプチドとは逆向きになるように酵素側の基質結合クレフトに結合することが予想された。この結合様式も後に MMP-2・APP-IP 複合体の結晶構造解析で証明されたが、恐らく、

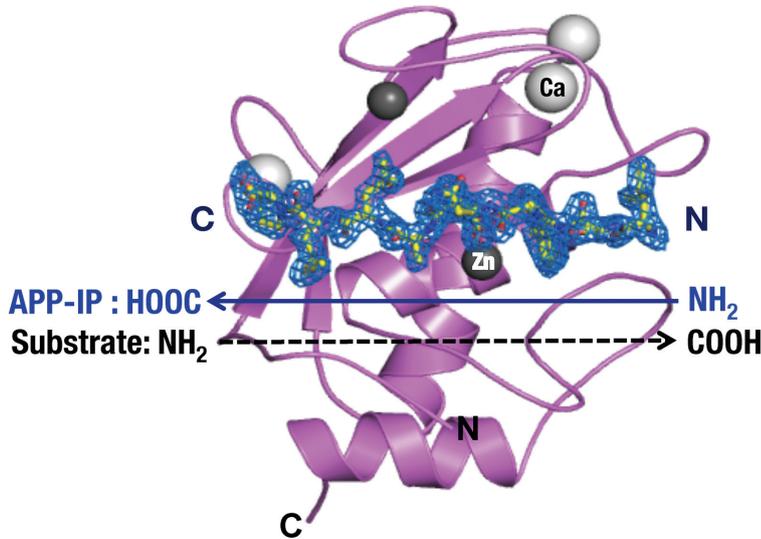


図5 MMP-2触媒ドメイン・APP-IP複合体の結晶構造

MMP-2触媒ドメインを紫色リボン、APP-IPを黄色スティックで表している。青色ケージはAPP-IPの電子密度を示す。灰色および白色の球は、それぞれ、亜鉛イオンおよびカルシウムイオンを示す。APP-IP(青矢印)は基質ペプチド(点線矢印)とはNH₂末端→COOH末端の向きが逆になるようにMMP-2基質認識部位と相互作用している。

逆向きに結合することによりAPP-IP内のペプチド結合が酵素活性中心に呈示されず、加水分解を受けずに基質結合クレフトに留まることが、このペプチドのインヒビター機能を支えていると考えた。

ところで、MMPs前駆体の構造においてN末端側に存在するプロペプチドの一部は基質結合クレフトをマスクし、分子内インヒビターとして機能しているが、この配列部分のN→C末端の配向も基質ペプチドとは逆向きになっている。そこで、活性型MMP-2のN末端に、プロペプチドの代わりにAPP-IP配列を付加したところ、分子内インヒビターとして機能し、MMP-2活性が完全にマスクされることを見出した。これに対し、MMP-2のC末端にAPP-IP配列を付加した場合にはMMP-2活性はマスクされないことから、APP-IPが分子内にあって適切な配向で活性部位に呈示されることが強力な活性阻害に重要であると考えられた⁹⁾。これらの結果は後述のMMP-2に対し、高い選択性を持ち、かつ強力なインヒビタータンパク質APP-IP-TIMP-2の分子設計において重要なヒントとなった。

6. MMP-2・APP-IP複合体の結晶構造解析

上述のキメラMMPsを用いた解析から、APP-IPによるMMP-2選択的阻害機構に対する重要な示唆が得られたものの、これら2分子間の相互作用を詳細に解明するためには酵素-インヒビター複合体の

立体構造解析が必須であった。そこで、MMP-2の触媒ドメインを調製し、APP-IPとの複合体を形成させた後、結晶化およびX線解析を行った¹⁰⁾。

その結果、予想通り、APP-IPはN→C末端の配向が基質ペプチドとは逆向きになるようにMMP-2の基質結合クレフトに結合していることが判明した(図5)。また、APP-IPのAsp⁶側鎖のカルボキシル基がMMP-2活性中心の亜鉛イオンをキレートしていることが明らかになり、APP-IPのAsp⁶→Ala置換によりMMP-2阻害活性が顕著に低下(IC₅₀値が10,000倍に上昇)する過去のデータ⁷⁾と良く一致した。なお、これまで見出された天然のメタロプロテアーゼインヒビターで、カルボキシル基を活性中心亜鉛イオンに配位させるものは見つかっていないことから、APP-IPは新しいタイプのメタロプロテアーゼインヒビターであることが判明した。

また、APP-IPのAla⁷-Pro¹⁰とTyr³-Ile¹部分がそれぞれ、MMP-2基質結合クレフト内のS2-S5および、S1'-S3'部位と相互作用しており、これらの広域にわたる相互作用が高いMMP-2選択性に深く関与することが予想された(図6)。すなわち、基質結合クレフト内の活性中心近傍の構造はMMPs間で酷似しているものの、このクレフト全体の構造はそれぞれのMMPで異なるため、クレフト全体と相互作用するAPP-IPが酵素選択性を発揮できるのではないかと推察した。これに対し、従来型阻害剤は低分子であるが故に酵素と多くの相互作用を持つことができ

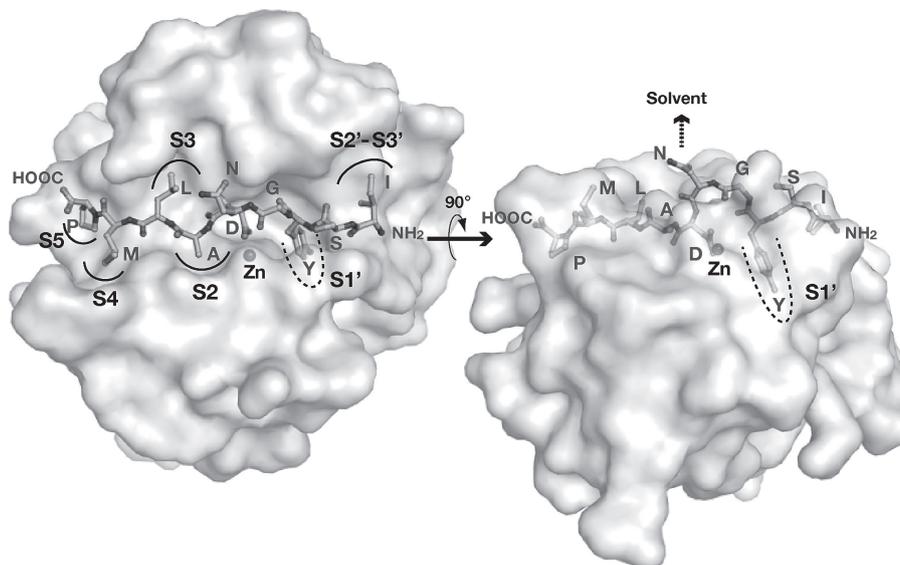


図6 MMP-2の基質認識部位に結合したAPP-IPのコンフォーメーション
MMP-2の表面構造を灰白色の陰影で、APP-IPをスティックで表す。S2-S5およびS1'-S3'は、それぞれ、MMP-2基質認識部位の非プライム側およびプライム側のサブサイトを示す。左は図5と同じ方向、右はAPP-IPのNH₂末端→COOH末端軸のまわりに90°回転させたものであり、上方が溶媒側、下方が酵素分子内部側に相当する。APP-IPのAsp⁶のカルボキシル基が酵素活性中心の亜鉛イオンと、Tyr³のフェノール基が深いS1'ポケットとそれぞれ相互作用している。

ず、全てのMMPsに共通する触媒部位の亜鉛イオンを中心に相互作用することが、選択性が得られない要因になると考えた(図7)。

7. APP-IP-TIMP-2 融合タンパク質の創出

上述のように、TIMP-2の主鎖のN末端α-アミノ基を修飾すると、MMPインヒビター活性が完全に失われるのに対し、MMP-2の非触媒ドメインに対する結合能は保持されることが分かっていた。一方、APP-IP配列をMMP-2分子内に付加し、活性部位に適切に呈示すると、MMP-2活性を強く阻害することが判明した。

これら2つの結果から発想して、TIMP-2とMMP-2非触媒ドメインとの相互作用を利用し、APP-IPをMMP-2の活性部位近傍に呈示させる方法を考案した¹¹⁾。すなわち、TIMP-2のN末端にAPP-IPのアミノ酸配列を付加することで、TIMP-2の持つ低選択性MMPsインヒビター部位を破壊すると同時に、この部位にMMP-2選択的インヒビター配列である

APP-IPを導入し、TIMP-2とMMP-2非触媒ドメイン間の特異的相互作用を利用しつつ、導入したAPP-IP配列部分をMMP-2の活性部位に近づけようというものである(図8)。

TIMP-2のN末端にAPP-IP配列を付加した融合タンパク質(APP-IP-TIMP-2と命名)を作製し、その活性を調べたところ、TIMP-2が持っていた他のMMPsに対する阻害活性は失われていたのに対し、MMP-2に対しては強力な阻害活性(K_i=0.7 pM)を持つことが判明した。また、ペプチドであるAPP-IPは培養がん細胞中で速やかにそのインヒビター活性を失うのに対し(半減期30 min)、融合タンパク質APP-IP-TIMP-2は細胞とともに4日間インキュベートしても全く活性が失われなかった。

融合タンパク質設計の際に、この安定性の上昇を狙っていた訳ではなかったが、一般にオリゴペプチドが生体内で分解を受け易いこと、およびAPP-IPはN末端あるいはC末端のアミノ酸残基が1残基削られただけで、顕著に活性が低下することを考慮すると、培養細胞が分泌するMMPs以外のプロテアー

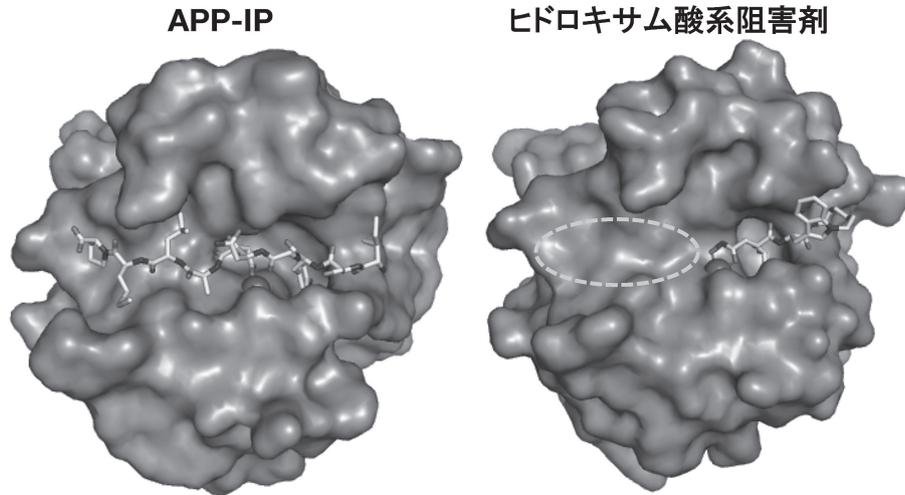


図7 APP-IP とヒドロキサム酸系阻害剤との MMP 結合様式の比較
従来開発されてきたヒドロキサム酸系阻害剤と MMP との相互作用(右)では、点線で
囲んだ部分が分子認識に利用されていないため、選択性が低いと予想された。

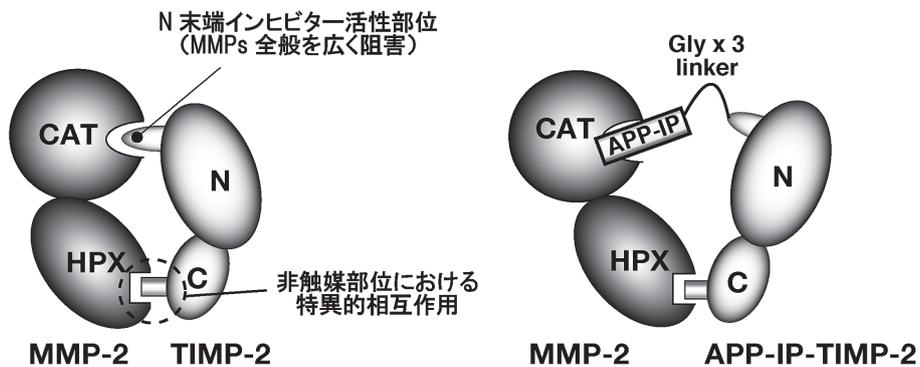


図8 APP-IP-TIMP-2 による MMP-2 阻害様式
TIMP-2(左)と APP-IP-TIMP-2(右)による MMP-2 阻害様式を模式的に表した。
CAT：触媒ドメイン，HPX：ヘモペキシン様(非触媒)ドメイン

ゼ(例えばペプチドを末端から分解するエキソペプチダーゼ類)によって APP-IP が分解を受け易いのに対し、融合タンパク質では TIMP-2 部分の立体障害によりプロテアーゼがアクセスできず、APP-IP 部分が分解から保護されるのではないかと予想した。

APP-IP は MMP-2 に対し、高い選択性を持つインヒビターであったが、その不安定さにより、培養細胞系や *in vivo* での利用が制限されていた。しかし、融合タンパク質にして安定性が飛躍的に上昇したことにより、これらの系での利用が可能となり、生理的および病的条件における MMP-2 の機能を簡便に調べる上で有効なプローブとなることが期待され

る。事実、筆者らは APP-IP-TIMP-2 が MMP-2 を分泌しているがん細胞の移動やこの細胞による IV 型コラーゲンの分解を抑制することを明らかにしている¹¹⁾。

ところで、N 末端修飾 TIMP-2 により MT1-MMP による pro-MMP-2 の活性化が阻害されることを前に述べたが、APP-IP-TIMP-2 もまた N 末端修飾 TIMP-2 であることから、pro-MMP-2 の活性化を阻害する可能性が考えられた。そこで、培養がん細胞を用いてこの融合タンパク質が pro-MMP-2 の活性化におよぼす効果を調べた結果、N 末端カルバミル化 TIMP-2 とほぼ同等に pro-MMP-2 の活性化を阻害すること

が判明した¹¹⁾。したがって、APP-IP-TIMP-2は2つのメカニズム(pro-MMP-2活性化阻害とMMP-2の活性阻害)でMMP-2の活性発現を阻止すると考えられる。しかし、近年pro-MMP-2がpro-MMP-2・TIMP-2・MT1-MMPからなる3分子複合体の形成を介さずに活性化される経路が複数存在することが報告されていることを考慮すると、生体内におけるMMP-2の機能を調べるためにはAPP-IP-TIMP-2が持つ強力なMMP-2活性阻害能がより重要になってくるであろう。

8. 今後の展望

がん細胞が基底膜を破壊して浸潤・転移する際に基底膜の主成分であるIV型コラーゲンの分解が重要になるが、MMP-2はこのIV型コラーゲンに対し、強い分解活性を持つことから、APP-IP-TIMP-2はがんの基底膜浸潤を抑制するのに有効な薬剤と成り得る可能性がある。一方、血小板の活性化に伴って放出されるMMP-2は血小板凝集を促進することが示唆されており、この凝集促進効果はアスピリンによって阻害されないという¹²⁻¹⁴⁾。したがって、今回設計した融合タンパク質は血栓症予防薬として応用することも可能かも知れない。また、血小板ががん細胞と相互作用しつつ、その転移を促進することが最近注目されており¹⁵⁻¹⁷⁾、この過程にMMP-2が介在する可能性も考えられる。さらに、がん血管新生に加え、種々の心臓血管系疾患におけるMMP-2の関与も示唆されており¹⁸⁻²⁰⁾、APP-IPを利用したプローブはこれら病態の解明に役立つ可能性がある。

一方、APP-IPによるMMP-2選択的阻害様式が明らかになったことから、APP-IPのアミノ酸配列の中で、他のMMPsとの相互作用の障害となるアミノ酸残基の置換により、他のMMPに対する選択性を高めたインヒビターペプチドを創出できる可能性が出てきた。事実、筆者らはAPP-IPの改変により、MMP-2以外のいくつかのMMPに対して阻害選択性を高めることに成功している(未発表)。

近年、血液凝固第Xa因子に対する特異的インヒビターが抗血栓剤として臨床応用されたり、インクレチンを不活性化するプロテアーゼDPP-IVのインヒビターが糖尿病治療薬として注目されるなど、過

去に見出されたプロテアーゼが各種疾患治療の標的分子として再注目されている。将来、個々のMMPに対する特異的インヒビターが、がんをはじめとした疾患治療薬として応用されることを期待したい。

謝辞

本稿で紹介した研究のきっかけと支援を与えて頂いた宮崎香先生(横浜市立大学名誉教授)に感謝致します。また、MMP-2・APP-IPの複合体の結晶構造解明は橋本博先生(横浜市立大学准教授・現静岡県立大学教授)ならびに佐藤衛先生(横浜市立大学教授)との共同研究の成果であり、ここに感謝の意を表します。

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Miyazaki K, Hasegawa M, Funahashi K, Umeda M: A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature* **362**: 839-841, 1993.
- 2) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* **370**: 61-65, 1994.
- 3) Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI: Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* **270**: 5331-5338, 1995.
- 4) Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W: Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* **389**: 77-81, 1997.
- 5) Higashi S, Miyazaki K: Reactive site-modified tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits the cell-mediated activation of progelatinase A. *J Biol Chem* **274**: 10497-10504, 1999.
- 6) Higashi S, Miyazaki K: Novel processing of beta-amyloid precursor protein catalyzed by membrane type 1 matrix metalloproteinase releases a fragment lacking the inhibitor domain against gelatinase A. *Biochemistry* **42**: 6514-6526, 2003.
- 7) Higashi S, Miyazaki K: Identification of a region of beta-amyloid precursor protein essential for its gelatinase A inhibitory activity. *J Biol Chem* **278**: 14020-14028, 2003.
- 8) Overall CM, Kleifeld O: Tumour microenvironment—opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and

- anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**: 227–239, 2006.
- 9) Higashi S, Miyazaki K: Identification of amino acid residues of the matrix metalloproteinase-2 essential for its selective inhibition by beta-amyloid precursor protein-derived inhibitor. *J Biol Chem* **283**: 10068–10078, 2008.
 - 10) Hashimoto H, Takeuchi T, Komatsu K, Miyazaki K, Sato M, Higashi S: Structural basis for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)-selective inhibitory action of β -amyloid precursor protein-derived inhibitor. *J Biol Chem* **286**: 33236–33243, 2011.
 - 11) Higashi S, Hirose T, Takeuchi T, Miyazaki K: Molecular design of a highly selective and strong protein inhibitor against matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). *J Biol Chem* **288**: 9066–9076, 2013.
 - 12) Falcinelli E, Giannini S, Boschetti E, Gresele P: Platelets release active matrix metalloproteinase-2 in vivo in humans at a site of vascular injury: lack of inhibition by aspirin. *Br J Haematol* **138**: 221–230, 2007.
 - 13) Choi WS, Jeon OH, Kim HH, Kim DS: MMP-2 regulates human platelet activation by interacting with integrin α IIb β 3. *J Thromb Haemost* **6**: 517–523, 2008.
 - 14) Momi S, Falcinelli E, Giannini S, Ruggeri L, Cecchetti L, Corazzi T, Libert C, Gresele P: Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis in vivo. *J Exp Med* **206**: 2365–2379, 2009.
 - 15) Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H, Ozaki Y: Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* **282**: 25993–26001, 2007.
 - 16) Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, Matsuura N, Hasegawa Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y, Narimatsu H: Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci* **99**: 54–61, 2008.
 - 17) Takagi S, Sato S, Oh-hara T, Takami M, Koike S, Mishima Y, Hatake K, Fujita N: Platelets promote tumor growth and metastasis via direct interaction between Aggrus/podoplanin and CLEC-2. *PLoS ONE* **8**: e73609, 2013.
 - 18) Dean RA, Butler GS, Hamma-Kourbali Y, Delbé J, Brigstock DR, Courty J, Overall CM: Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis. *Mol Cell Biol* **27**: 8454–8465, 2007.
 - 19) Matsumura S, Iwanaga S, Mochizuki S, Okamoto H, Ogawa S, Okada Y: Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest* **115**: 599–609, 2005.
 - 20) Hori Y, Kashimoto T, Yonezawa T, Sano N, Saitoh R, Igarashi S, Chikazawa S, Kanai K, Hoshi F, Itoh N, Higuchi S: Matrix metalloproteinase-2 stimulates collagen-I expression through phosphorylation of focal adhesion kinase in rat cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **303**: C947–953, 2012.