

# 大腸癌局所浸潤と間質反応

## —マトリックスメタロプロティナーゼ (MMP) について—

宮坂 芳明, 石川 徹, 飯野 弥, 藤井 秀樹, 関川 敬義, 松本 由朗

著者らは、癌の局所浸潤の過程において癌細胞と周囲の細胞外マトリックスの相互作用が重要であると考えている。そこで、癌の浸潤性増殖に不可欠であるマトリックスメタロプロティナーゼ (MMP) ファミリー、特にIV型コラーゲン分解酵素である MMP-2, MMP-9 について最近の知見を紹介し、ヒト進行大腸癌を用いておこなった著者らの研究結果についても紹介した。

キーワード：ヒト大腸癌, CD44, Matrix metalloproteinase, 局所浸潤, 炎症細胞

### 1. はじめに

癌の転移が成立するためには、癌細胞の原発巣からの離脱、細胞外マトリックスへの浸潤、脈管系への侵入、標的臓器脈管内皮細胞への接着、脈管系よりの侵出、標的転移臓器での微小転移巣形成および増殖といった多くの過程が必要である。近年、これら癌の転移の各過程における機序に関する研究が盛んである。著者らは癌転移の成立における最初の過程であると考えられる癌細胞の原発巣からの離脱 (浸潤性増殖) の過程において、癌細胞そのものが、周囲の細胞外マトリックスに何らかの作用を及ぼし、また細胞外マトリックスからも癌細胞に何らかの性質の変化を生み出すような機序が働いているのではないかと考えている。上皮性の癌細胞が原発巣より離脱するためには、まず基底膜の破壊が、さらに周囲結合織を分解し浸潤することが必要である。基底膜は、IV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカンなどからなる強固なマトリックスであり、物質透過の障壁となっている。また、基底膜周囲の結合織もI型コラーゲン、エラスチンなどで構築された強固なマトリックスである。これらの細胞外マトリックスを分解する酵素であるマトリックスメタロプロティナーゼ (MMP) は、癌の浸潤性増殖に不可欠であると考えられている。そこで、マトリックスメタロプロティナーゼについて最近の知見を紹介するとともに、これを解明するためにヒト進行大腸癌を対象としておこなった著者らの研究結果についても紹介する。

### 2. マトリックスメタロプロティナーゼファミリー

プロティナーゼは、活性部位の構造の違いにより、マトロプロティナーゼ、セリンプロティナーゼ、システインプロティナーゼ、アスパラギン酸プロティナーゼに分類される。酵素活性が強く、癌浸潤におけるマトリックス分解の中心的役割をなすマトリックスメタロプロティナーゼ<sup>1), 2)</sup>は、活性中心に Zn を持つ金属酵素で、現在15

種類の遺伝子が報告されている (表1) が、遺伝子クローニングの手法の開発とともにますます増えるものと思われる。マトリックスメタロプロティナーゼは、すべて不活性型のプロエンザイムとして細胞外に分泌されシステインスイッチメカニズムによって活性化される<sup>3)</sup>。活性化因子として、プラスミン、トリプシン、カテプシンG、カリクレインなどのセリンプロティナーゼ、SH基修飾薬である Hg 化合物、酸化剤などが知られているが、最近、IV型コラーゲン分解酵素のひとつである MMP-2 の特異的活性化因子として細胞膜結合型マトリックスメタロプロティナーゼ (MT-MMP) の cDNA が、クローニングされ注目されている<sup>4), 5)</sup>。マトリックスメタロプロティナーゼには、さまざまなインヒビターが認められているが、その代表的なものは、TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) である。TIMP は、すべての活性型マトリックスメタロプロティナーゼに結合して不活性化することができる。MMP-9 は、プロエンザイムのまま細胞から放出され TIMP-1 と1対1で会合している。また、MMP-2 も同様に TIMP-2 と会合している。

表1 マトリックスメタロプロティナーゼファミリー

グループ	酵素	kDa	基質
I	MMP-1 (間質コラーゲナーゼ) (I型コラーゲナーゼ)	52, 57	I, II, IIIコラーゲン
	MMP-8 (好中球コラーゲナーゼ)	75	I, II, IIIコラーゲン
	MMP-2 (72kDa IV型コラーゲナーゼ) (72kDa ゼラチナーゼ)	72	IV, V, VIIコラーゲン フィブロネクチン, ゼラチン
II	MMP-9 (92kDa IV型コラーゲナーゼ) (92kDa ゼラチナーゼ)	92	IV, Vコラーゲン ゼラチン
	MMP-3 (ストロメライシン) (トランシン)	57, 60	III, IV, Vコラーゲン ラミニン, フィブロネクチン ゼラチン
	MMP-10 (ストロメライシン-2) (トランシン-2)	53	III, IV, Vコラーゲン フィブロネクチン, ゼラチン
III	MMP-7 (PUMP-1) (マトリン)	28	ゼラチン, フィブロネクチン

### 3. 癌浸潤および転移過程でのマトリックスメタロプロティナーゼの役割

基底膜は、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニニン、プロテオグリカンなどから構成されており、生体内の強固な障壁となっている。癌細胞が浸潤するためには、これらの基底膜の構成成分を分解、破壊する必要がある。特にIV型コラーゲン分解酵素である MMP-2 および MMP-9 が、注目をあつめている。MMP-2 は、Liotta<sup>6)</sup>、Collier ら<sup>7)</sup>によって精製、cDNA のクローニングが成された。不活性型 MMP-2 の発現は、癌細胞に限らず正常線維芽細胞にも認められ、血清中にも恒常的に存在することが知られている。MMP-2 の活性化の機構は不明であったが、清木らによって MMP-2 の活性化因子である MT-MMP の cDNA がクローニングされた<sup>4), 5)</sup>。MT-MMP は、癌細胞表面に存在し、MMP-2 の特異的な活性化因子であるとともに、そのレセプターとしても機能していることが見い出された。おもしろいことに、癌組織における MMP-2 の局在を、免疫組織化学染色と in situ ハイブリダイゼーションで調べると MMP-2 蛋白は癌細胞表面に発現されているのに対して mRNA は癌細胞周囲の線維芽細胞に認められることがある。このことは、癌の局所浸潤と間質反応を考えるうえで非常に興味深い結果となっている。また、MMP-9 は、Wilhelm らによって精製、cDNA のクローニングが成された<sup>8)</sup>。MMP-9 は、マクロファージ、顆粒球および上皮性腫瘍に発現がみられ、ヒトの正常な血清中にも、かなりの量が検出される。マクロファージ、顆粒球などの血液系に由来する細胞は、活性化され血管外に侵出する際に MMP-9 を利用していると考えられている。癌の原発巣および転移巣内のマクロファージは、より高いIV型コラーゲン分解活性を示しており、さらに高転移性腫瘍から得られたマクロファージほど、その活性が高いことも認められた。このことは、マクロファージの生体防御反応を癌細胞が、浸潤・転移のために利用していることを示唆する。著者らが行ったヒト大腸癌の MMP-9 免疫組織化学染色でも同様なことを示唆する結果が得られた<sup>9)</sup>。

### 4. ヒト進行大腸癌の浸潤部における CD44, MMP-9 およびタイプIVコラーゲンの発現

ヒト進行大腸癌20病変を対象とし、CD44, MMP-9 およびタイプIVコラーゲンの免疫組織化学染色を行った。MMP-9 は、癌の浸潤性増殖部周囲の炎症細胞にのみ発現が認められ、癌の膨脹性増殖部周囲間質および癌細胞には発現が認められなかった(図1)。MMP-9 の発現が認められる部位の癌蜂巣の基底膜のタイプIVコラーゲンの染色性は低下し、連続性の欠如が認められ(図2)、MMP-9 による癌蜂巣の基底膜の破壊が示唆された。本来、生体防御の機構のひとつとして癌細胞に攻撃的に働く炎症細胞に MMP-9 が発現され基底膜を破壊していることは、癌細胞がサイトカインなどのメディエーターを介して、これらの炎症細胞の MMP-9

発現をコントロールしている可能性が示唆された。また、CD44は癌細胞、間質の炎症細胞ともに陽性であった。膨脹性増殖部を含め大部分の癌細胞で癌細胞-基底膜間、癌細胞間に CD44 の発現が認められたが、浸潤性増殖部では、癌細胞-基底膜間、癌細胞間ともに CD44 の発現は、ほとんど認められず(図3)癌細胞-基底膜、癌細胞間の接着性が低下し、癌細胞が主病巣より遊離しやすくなっているものと考えられた。このことは、浸潤性増殖部の癌細胞は、膨脹性増殖部の癌細胞とは異なった形質を獲得しているものと考えられた。この様に、癌の浸潤性増殖には、癌細胞と周囲の細胞外マトリックスの相互作用が重要であることが、示唆された。

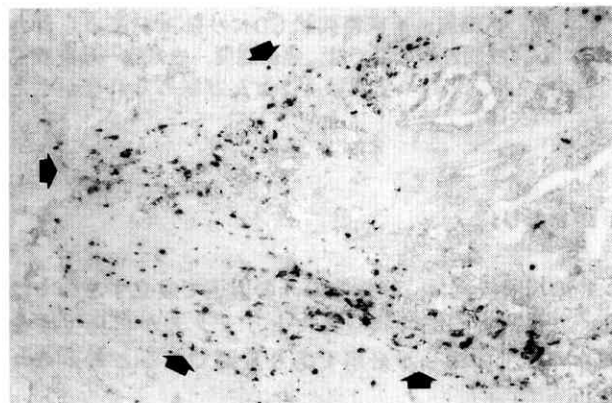


図1 MMP-9 免疫組織化学染色  
癌の浸潤性増殖部では、癌の周囲間質に集簇した炎症細胞に MMP-9 の発現が認められた(矢印)。癌細胞そのものに MMP-9 の発現は認められなかった。



図2 Type IV collagen 免疫組織化学染色  
浸潤性増殖部では、癌蜂巣の基底膜の Type IV collagen の染色性は低下し、連続性の欠如が認められた(矢印)。

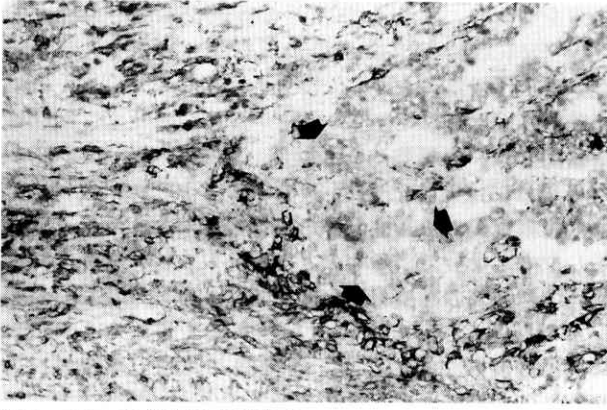


図3 CD44免疫組織化学染色

CD44は癌細胞、間質の炎症細胞ともに陽性であった。膨脹性増殖部を含めて大部分の癌細胞で、癌細胞間、癌細胞—基底膜間にCD44の発現が認められたが、浸潤性増殖部では、癌細胞間、癌細胞—基底膜間ともにCD44の発現は、ほとんど認められなかった(矢印)。

## 5. おわりに

癌の局所浸潤は、癌細胞のみの因子で成立するのではなく、癌病巣周囲の細胞外マトリックスから発生する種々の因子の関与が必須であり重要であると考えられた。

## 引用文献

- 1) Woessner JF JR (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 5: 2145–2154.
- 2) Matrisian LM (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*, 6: 121–125.
- 3) Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys 73 active-site zinc complex in latency and a “cysteine switch” mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 364–368.
- 4) Takino T, Sato H, Yamamoto E, Seiki M (1995) Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene*, 155: 293–298.
- 5) 佐藤 博 (1995) 癌転移にかかわる細胞膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ. *実験医学*, 13: 57–63.
- 6) Salo T, Liotta LA, Tryggvason k (1983) Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem*, 258: 3058–3063.
- 7) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA, Goldberg (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem*, 263: 6579–6587.
- 8) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI (1989) SA 40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem*, 264: 17213–17221.
- 9) 宮坂芳明, 横山 章, 飯野 弥, 藤井秀樹, 関川敬義, 松本由朗 (1996) ヒト進行大腸癌の浸潤部におけるCD44, MMP-9およびTypeIV collagenの発現とその意義. *消化器癌の発生と進展*, 8: 149–154.

## Abstract

### The Role of Stroma in Invasive Region of Human Advanced Colorectal Cancer

Yoshiaki MIYASAKA, Toru ISHIKAWA, Hiroshi IINO,  
Hideki FUJII, Takayoshi SEIKAWA and Yoshiro MATSUMOTO

The process of invasion and metastasis of carcinoma is complex and require a series of sequential steps. First step is the degradation of the extracellular matrix to allow the spreading of the carcinoma cells. We consider that a correlation between carcinoma cell and extracellular matrix is very important for this step. The metalloproteinases play a major role in this step. Recently, MMP-2 and MMP-9/type IV collagenases/gelatinases are remarkable for carcinoma invasion and metastasis. We summarize the matrix metalloprotenase family and report our studies.

The First Department of Surgery