

膜型セリンプロテアーゼMT-SP1によるCDCP1切断を介した 癌細胞の足場非依存性能の解析

澤山忠司 上北尚正

令和元年9月

防衛大学校理工学研究報告 第57巻 第1号 別刷

膜型セリンプロテアーゼ MT-SP1 による CDCP1 切断を介した 癌細胞の足場非依存性能の解析

澤山 忠司* 上北 尚正**

(平成 31 年 3 月 7 日受付：令和元年 6 月 4 日受理)

Analysis of the Anchorage-Independence of Cancer Cells
through CDCP1 Cleavage by Membrane-Type Serine Protease 1 (MT-SP1)

By Tadashi Sawayama* and Takamasa Uekita**

CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is an important molecule for regulating anchorage-independence involved in cancer metastasis. Recently, it was reported that the synthetic substrate of CDCP1 is cleaved by Membrane-type serine protease 1(MT-SP1), however it is not clear that this cleavage is involved in anchorage-independence. In this study, we investigated the effect of CDCP1 cleavage by MT-SP1 on anchorage-independence in cancer cells by soft agar assay using MT-SP1 siRNA and uncleaved CDCP1 mutant (2RKAAres-F). As a result, cleavage of CDCP1 was inhibited in both experiments, and then the anchorage independence was suppressed. Therefore, it is suggested that the cleavage of CDCP1 by MT-SP1 is involved in the regulation of anchorage independence in cancer cells.

Keywords: CDCP1, MT-SP1, Anchorage independent growth, Metastasis

1. 緒言

癌の悪性度を左右する要因の一つに癌転移がある。また、癌転移に必要な機能として、細胞が浮遊した状態でも生存することができる足場非依存性能がある。CUB domain-containing 1 (CDCP1)は、癌細胞の浮遊培養時に Src family kinase (SFK)の Src homology 2 ドメインに結合するリン酸化タンパク質として同定された¹⁾。siRNA 法による CDCP1 の発現抑制は、癌細胞の浮遊培養時の細胞死を引き起こすことから、CDCP1 は、足場非依存性能に関与する重要な因子であることが明らかとなっている²⁾。さらに、CDCP1 が癌細胞の運動能や浸潤能に関与することが報告されたことから³⁾、CDCP1 は、癌の浸潤・転移の鍵となる因子であることが示唆されている。

*防衛大学校 理工学研究科後期課程 (第16期)

**防衛大学校 応用科学群 応用化学科 准教授

CDCP1 は、836 個のアミノ酸で構成された I 型膜貫通タンパク質であり、N 末端側から細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインで構成されている。細胞外ドメインには、Complement sub-components C1s/C1r, Urchin embryonic growth factor および Bone morphogenic protein 1 の3種類のタンパク質のアミノ酸配列と相同性が見られる CUB ドメインが三つ存在する。膜貫通ドメインは、細胞膜に存在する部位であり、CDCP1 を膜に局在させる。細胞内ドメインには、SFK の Src homology 3 ドメインが結合するプロリンリッチ配列や SFK によってリン酸化される 734 番目と 762 番目のチロシン残基が存在する⁴⁾。また、細胞外ドメインには N 型糖鎖修飾部位であるアスパラギン残基が 14 個存在しており、CDCP1 タンパク質の分子質量は、理論上 90 kDa であるが、糖鎖修飾によって実際は 135 kDa の位置に SDS-PAGE 後のウ

ェスタンブロット (WB)で検出されることが分かっている³⁾。

CDCP1 による足場非依存性能の制御に関する研究は、細胞内ドメインを介したシグナル伝達の研究で進展している。癌細胞が浮遊すると、CDCP1 細胞内ドメインに活性型 SFK が結合する。その後、アポトーシス関連因子である Protein kinase C δ (PKC δ)が、CDCP1 の細胞内ドメインに結合することにより、細胞膜近傍で SFK—CDCP1—PKC δ 複合体が形成され、下流にシグナルを伝えることが報告されている¹⁾。一方、CDCP1 細胞外ドメインに関する研究報告は少なく、CDCP1 細胞外ドメインの切断が、Akt キナーゼ依存的なアポトーシスの阻害による癌細胞の生存や初期の転移巣形成を促進に関与することや⁶⁾、膜結合型セリンプロテアーゼ Membrane-type serine protease 1(MT-SP1)が、CDCP1 細胞外ドメインの 368 番目のアルギニン残基と 369 番目のリシン残基間を切断することが組換えタンパク質によって示されているだけである⁷⁾。

MT-SP1 は、別名 Matriptase および ST14 と呼ばれ、855 個のアミノ酸で構成された分子質量 80~90 kDa の II 型の膜結合型セリンプロテアーゼである⁸⁾。MT-SP1 mRNA は、消化管、前立腺、腎臓、肺、胸腺、脾臓、皮膚などの組織に発現が確認されている⁹⁾。これまで、生化学的に urokinase-type plasminogen activator (UPA)や hepatocyte growth factor (HGF)の切断に関与することが示されている¹⁰⁻¹²⁾。一方で MT-SP1 は、癌においても発現が確認されており、乳癌や卵巣癌においてその高発現は予後不良と相関していることが報告されている^{13,14)}。しかしながら、この MT-SP1 を介した CDCP1 の切断が、足場非依存性能に関与するかは明らかとなっていない。

よって、本研究では、MT-SP1 による切断を受けない CDCP1 変異体と Matriptase (MT-SP1) siRNA を用い、MT-SP1 による CDCP1 の切断が、癌細胞の足場非依存性能に与える影響について検討をおこなった。

2. 実験方法

2.1 実験材料

2.1.1 プラスミド

MT-SP1 による CDCP1 を切断するアミノ酸配列部位(R368, K369)をアラニン (A368, A369)に置換した CDCP1 変異体である 2RKAAres-F は、既存の CDCP1res-F を鋳型として KOD-Plus Mutagenesis Kit (Toyobo)による PCR によって作製し、塩基配列を

DNA シークエンサーで確認した。C 末端に FLAG 標識した CDCP1 変異体(CDCP1res-F)、細胞外ドメイン欠失変異体(Δ ECD-F) および C 末端に HA 標識した CDCP1 変異体(CDCP1res-HA)は、既存のものを使用した¹⁵⁾。全てのプラスミドには CDCP1 siRNA 標的配列にサイレント変異を入れた rescue 配列(表 1)が存在している³⁾。

	97								120
CDCP1	GCT	CTG	CCA	CGA	GAA	AGC	AAC	ATT	
	A	L	P	R	E	S	N	I	a.a.
rescue	GCT	<u>TTA</u>	CCA	<u>AGG</u>	GAA	<u>TCC</u>	AAI	ATC	

表 1 CDCP1 に挿入された rescue 配列
CDCP1 siRNAによって抑制されないサイレント変異(rescue)の入ったDNA配列の部位には、下線が引かれている。97; 97番目の塩基, 120; 120番目の塩基, a.a.; アミノ酸配列

Table.1 Rescue sequence inserted in CDCP1
The site of the DNA sequence containing the silent mutation (rescue) not suppressed by CDCP1 siRNA is underlined. 97; 97th base, 120; 120th base, a.a.; amino acid sequence

2.1.2 抗体

goat-anti-CDCP1 抗体 (Cat#ab1377)は、abcam から購入した。mouse-anti-matriptase 抗体 (Cat#sc-365482), rabbit-anti-HA (Cat#sc-43911)および anti-goat-IgG HRP 抗体 (Cat#sc-2354)は、Santa Cruz Biotechnology から購入した。anti-tubulin 抗体 (Cat#T5168)は、Sigma-Aldrich から購入した。anti-mouse-IgG HRP 抗体 (Cat#NA931V)は、GE Healthcare から購入した。Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG(H+L)抗体 (Cat# A11010) および Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG(H+L)抗体 (Cat# A11001)は、Life Technologies から購入した。

2.2 トランスフェクション

ヒト肺癌細胞株 A549 は、10% ウシ胎仔血清 (Sigma-Aldrich)および1% Penicillin / Streptomycin 混合溶液 (nacalai tesque)を添加した RPMI 1640 培地 (Sigma-Aldrich)中で培養した。Matriptase (MT-SP1) siRNA (Cat# sc-43911, Santa Cruz Biotechnology)をトランスフェクションする際は、90 mm 培養ディッシュに細胞を 1.0×10^6 個播種し、12 時間後に Lipofectamine 2000 試薬 (Invitrogen)の取り扱い方法に従って処理し、48 時間後に PLC 細胞溶解液 (10 mM Tris-HCl, pH7.5, 5 mM EGTA, 150

mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate [Na₂VO₄], 100 µg/mL leupeptin)に細胞を溶解させた。内在性 CDCP1 の発現を抑制させた細胞 (A549 miCDCP1)は、当研究室で作製したものを使用し、継代培養には 10 µg/mL の blasticidin (Invitrogen) を添加した。また、A549miCDCP1 細胞に 2RKAAres-F を恒常的に発現する細胞には、800 µg/mL の G418 sulfate (Calbiochem)を添加した。

2.3 ウェスタンブロット (WB)

細胞溶解液を 4℃、20,630×g で 15 分間遠心分離し、上清を細胞ライセートとして回収した。タンパク質濃度は、BCA protein assay kit (Bio-Rad)を使用して測定した。次に、得られた細胞ライセートを 10% SDS-PAGE によって分離したのち、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を Blocking One 溶液 (nacalai tesque) で室温 1 時間ブロッキングした後、5% Blocking One/TBS-T 溶液に、任意の濃度に希釈した 1 次抗体を加えて室温 1 時間振とうした。その後、TBS-T で 3 回洗浄したのち、1 次抗体同様に 2 次抗体を加え、30 分間振とうした。最後に、Western Lightning 試薬 (PerkinElmer)に 2 分間浸し、myECL Imager (Thermo Fisher Scientific)で、2 次抗体による発光バンドを検出した。

2.4 足場非依存性能の検討 (Soft agar assay)

0.5%の Ultra-Pure Agarose (Invitrogen)を含んだ RPMI1640 培地を 6 well ディッシュに入れ、室温冷却して basal agar とし、2RKAAres-F プラスミドまたは Matriptase (MT-SP1) siRNA (Santa Cruz Biotechnology)をトランスフェクションして 24 時間後の細胞を 6×10³個、0.33%の agarose になる様に調製した RPMI1640 培地に混合し、basal agar の上に播種した。その後、CO₂インキュベーター (37℃, 5% CO₂)で培養した。30 日後に形成された細胞塊(コロニー)を CCD カメラで撮影し、その中の直径 0.5 mm のコロニーの数を測定して足場非依存性能を比較した。

2.5 細胞免疫染色

90 mm の浮遊培養ディッシュに、A549 細胞株 1×10⁵ 個を加えて CO₂ インキュベーター (37℃, 5%)で一晩培養し、Lipofectamin 2000 試薬 (Thermo Fisher Scientific)を用いて CDCP1res-HA プラスミド (0.6 µg)を細胞に導入した。18 時間後に、4% Paraformaldehyde で細胞を 10 分間固定し、PBS で洗浄後、0.25 % Triton X-100 で 10 分間膜透過処理をおこなった。Blocking One 溶液でブロッキングした後、anti-HA 抗体 (1:300)と anti-matriptase 抗体

(1:150)の溶液に 1 時間浸した。次に、Alexa Fluor 標識の 2 次抗体 (1:800)に 30 分間浸した後、遠心分離により浮遊細胞を回収した。50 µL の SlowFade Gold 褪色防止用封入剤 (Thermo Fisher Scientific)を回収した細胞に入れ、その溶液をスライドガラスに 5 µL 滴下して 12 mm カバーガラスを上からかぶせた。染色細胞の観察と画像取得は、オールインワン共焦点顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (OLYMPUS)を用いた。

2.6 生存曲線の解析およびアミノ酸配列のホモロジー検索

CDCP1 および MT-SP1 の mRNA 発現による予後不良との相関を示す生存曲線の解析には、PROG gene V2 (<http://genomics.jefferson.edu/proggene/>) データベースを使用した。

CDCP1 と MT-SP1 に存在する CUB ドメイン間のアミノ酸配列のホモロジー検索には、Clustal Omega EMBL EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)データベースを使用した。

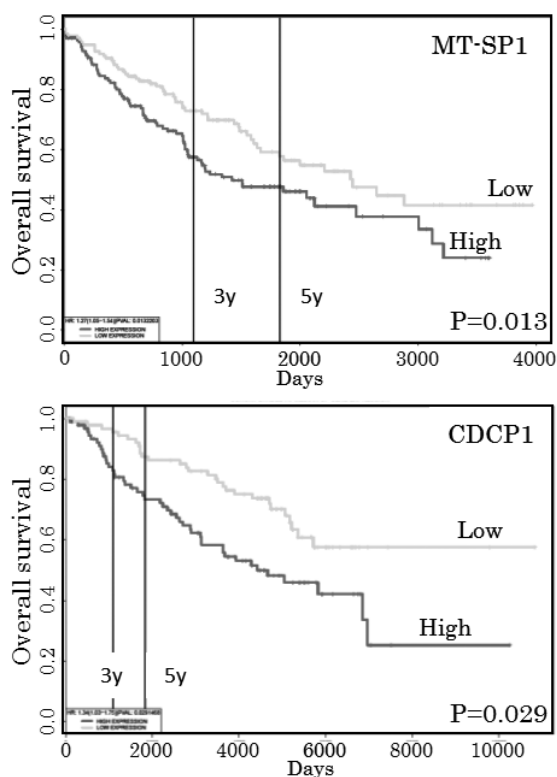


図1 肺癌症例における MT-SP1 および CDCP1 発現の臨床的影響 3y: 3年目, 5y: 5年目
Fig.1 Clinical impact of MT-SP1 and CDCP1 expression in lung cancer cases 3y: 3rd year, 5y: 5th year

3. 結果

CDCP1 は、生化学的な試験管内実験において MT-SP1 によりその細胞外ドメインが切断されることが報告されている⁷⁾。しかし、癌細胞の足場非依存性

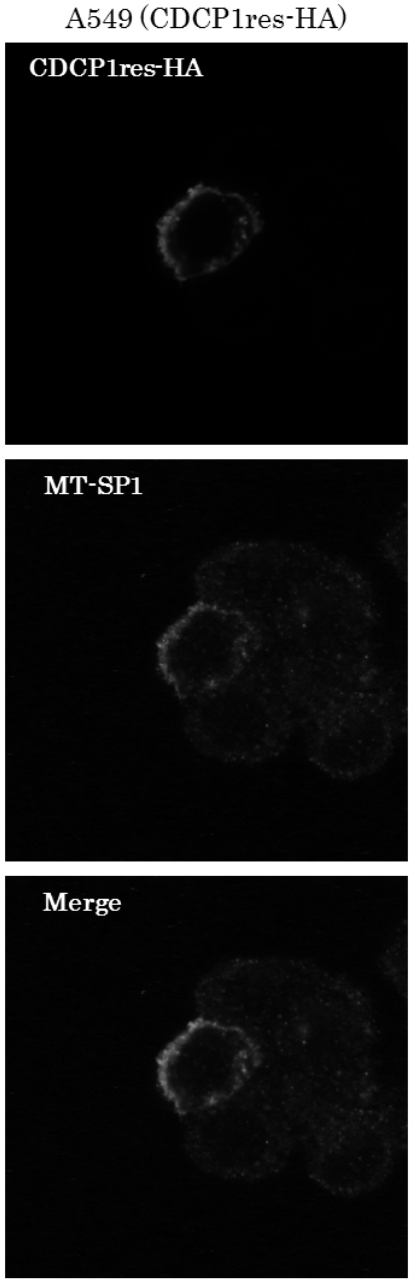


図2 MT-SP1およびCDCP1res-HAの細胞局在
Fig.2 Localization of MT-SP1 and CDCP1 in A549 lung cancer cells expressed CDCP1res-HA

能に関与するかは分かっていなかった。そこでまず、足場非依存性能が予後不良と相関することから、PROG gene V2 データベースにより、転移を起こしやすい癌腫である肺癌における CDCP1 および MT-SP1 の mRNA 発現と生命予後との関連を調べた。すると、CDCP1 および MT-SP1 mRNA の高発現は、共に予後不良になることが示された(図 1)。この結果から、CDCP1 と MT-SP1 が足場非依存性能に関与している可能性が示された。

次に、癌細胞における CDCP1 と MT-SP1 の関係性を調べるため、A549 細胞株に CDCP1res-HA を発現させて浮遊培養し、細胞免疫染色によって CDCP1 と MT-SP1 の細胞局在を観察した(図 2)。その結果、内在性 MT-SP1 は、細胞膜と細胞質の両方で均等に観察されたが、CDCP1res-HA を発現させた細胞では、細胞膜上で CDCP1res-HA と MT-SP1 の共局在の増加が見られた。よって、MT-SP1 と CDCP1 が、細胞膜上で同じ領域に局在することが示唆された。

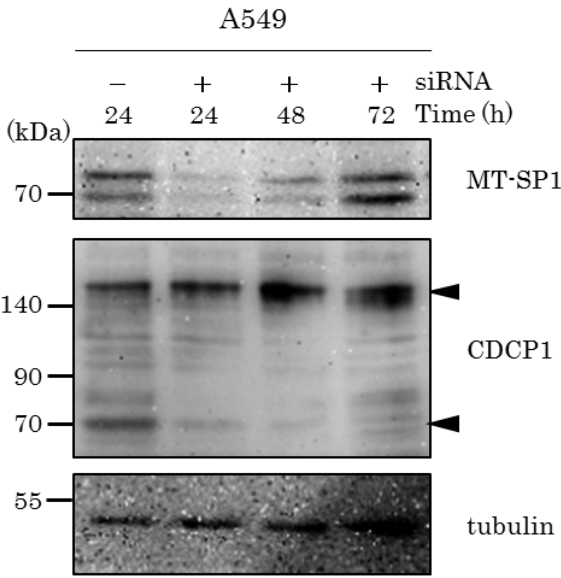


図3 siRNAによるMT-SP1発現の抑制を介したCDCP1切断の検討 MT-SP1およびCDCP1抗体を用いたWBの結果。細胞の総タンパク質量は tubulin抗体を用いたWBで示した。黒三角は CDCP1および切断されたCDCP1を示す。

Fig.3 Investigation of CDCP1 cleavage via MT-SP1 expression suppressed by siRNA
Results of WB using MT-SP1 and CDCP1 antibodies. The total protein content of the cells is shown by WB using a tubulin antibody. Black triangles indicate CDCP1 and cleaved CDCP1.

そこで、MT-SP1 による CDCP1 切断の可能性を検討するため、まず CDCP1 切断に対する Matriptase (MT-SP1) siRNA の効果について検討した。MT-SP1 の発現は、siRNA 処理後、24 時間、48 時間、72 時間の時点では、24 時間で抑制が最大となり、48 時間後から 72 時間後と MT-SP1 の発現が回復していくことが分かった(図 3 : MT-SP1)。この時、CDCP1 の切断による 70 kDa のバンドは、24 時間後から 72 時間後まで抑制されていた(図 3 : CDCP1)。この他に 2 回実験をおこなったが同様の結果が得られた。この結果から、癌細胞での CDCP1 切断に関与する酵素が MT-SP1 であることが示唆された。

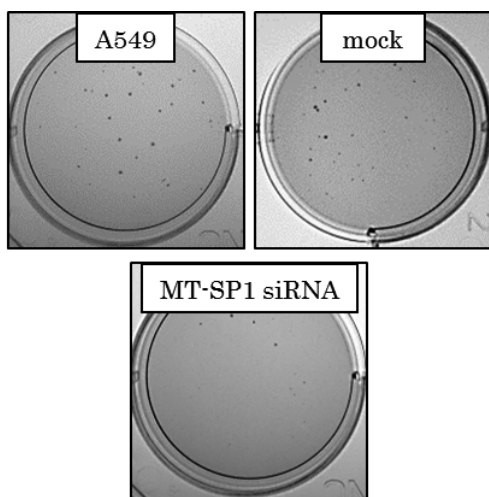


図4 siRNAによるMT-SP1発現の抑制を介した soft agar assay A549 : A549細胞株, mock : Lipofectamine 2000 処理のみ, MT-SP1 siRNA : Matriptase (MT-SP1) siRNA処理
Fig.4 Soft agar assay of CDCP1 cleavage via MT-SP1 expression suppressed by siRNA A549 : A549 cell-line, mock : Treatment of Lipofectamine 2000 only, MT-SP1 siRNA : Treatment of Matriptase (MT-SP1) siRNA

次に、この Matriptase (MT-SP1) siRNA 処理による足場非依存性能の検討を soft-agar assay を用いておこなった(図 4)。Soft agar assay は、足場非依存性能を調べる指標の一つであり、細胞塊(コロニー)の数が多いほど、その能力が高いこと示している。野生型である A549 細胞株の細胞コロニー数は、 35.0 ± 3.6 個となり、この値を基準とすると、Matriptase

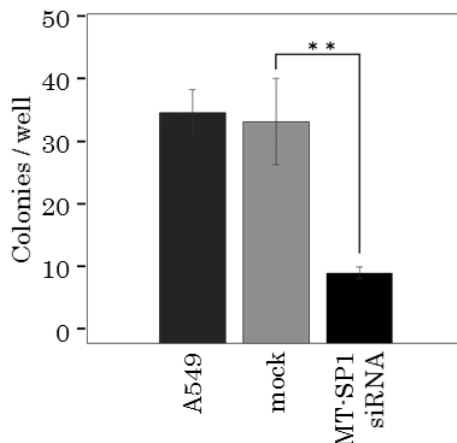


図5 MT-SP1 siRNA処理した細胞のSoft agar assayによる細胞コロニー数のグラフ A549 : A549細胞株, mock : Lipofectamine 2000処理のみ, MT-SP1 siRNA : Matriptase (MT-SP1) siRNA処理** P<0.01

Fig.5 A graph of the number of cell colonies in Soft agar assay by MT-SP1 siRNA treated cells A549 : A549 cell-line, mock : Treatment of Lipofectamine 2000 only, MT-SP1 siRNA : Treatment of Matriptase (MT-SP1) siRNA ** P<0.01

(MT-SP1) siRNA 処理した細胞のコロニー数は、 10.7 ± 0.9 個と抑制されていた(図 5)。この結果から、MT-SP1 が癌細胞の足場非依存性能に関与する可能性が示された。また、Lipofectamine 2000 試薬のみを処理した mock 細胞では、コロニー数が 33.7 ± 6.5 個と A549 細胞株のコロニー数と変化がなく、Lipofectamine 2000 試薬による毒性は見られなかった。

最後に、CDCP1 細胞外ドメインの切断が足場非依存性能に必要であるかを検討した。CDCP1 の切断を阻害する変異体(2RKAres-F)を作製し(図 6A)、内在性 CDCP1 発現を抑制した A549miCDCP1 細胞に発現させると、トランスフェクション後 24 時間では、CDCP1 および切断阻害変異体に 135 kDa のバンドが見られたが、トランスフェクション後 36 時間では、CDCP1 において 135 kDa と切断された 70 kDa のバンドが観察されたが、切断阻害変異体では、135 kDa のみで 70 kDa のバンドが観察されななかった(図 6B)。よって、CDCP1 切断阻害変異体では、CDCP1 の切断が抑制されていることが示された。この変異体

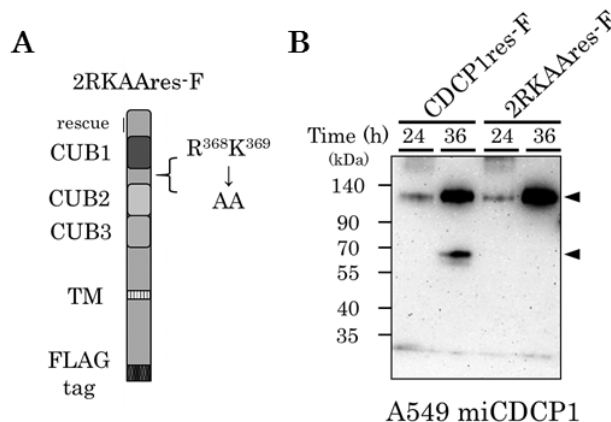


図6 MT-SP1による切断を受けないCDCP1変異体の発現

A. MT-SP1による切断を受けないCDCP1変異体(2RKAAres-F)の模式図 アルギニン残基(R³⁶⁸)とリジン残基(K³⁶⁹)をアラニン残基(A)に変換した。rescue: siRNA標的配列DNAのサイレント変異部位。³ CUB1-3: CUB1-3ドメイン, TM: 膜貫通ドメイン, FLAG tag: FLAG標識 **B.** CDCP1変異体発現によるウェスタンブロット A549 miCDCP1: CDCP1発現を抑制したA549肺癌細胞株, 黒三角: CDCP1発現バンドの位置

Fig.6 Expression of CDCP1 mutant not cleaved by MT-SP1

A. Schematic illustration of CDCP1 mutant (2RKAAres-F) not cleaved by MT-SP1. Arginine residue (R368) and lysine residue (K369) were converted to alanine residue (A). Rescue: silent mutation site of siRNA target sequence DNA.³ CUB 1-3: CUB 1-3 domain, TM: transmembrane domain, FLAG tag: FLAG label **B.** Western blot with CDCP1 mutant. A549 miCDCP1: A549 lung cancer cell line which suppressed CDCP1 expression, black triangle: position of CDCP1 expression band

を用いて、癌細胞のCDCP1切断が足場非依存性能に与える影響を検討した(図7)。野生株のA549細胞株では、細胞コロニー数が 34.7 ± 9.0 個であり、この値を基準とすると、CDCP1発現を抑制したA549 miCDCP1細胞ではコロニー数が 8.3 ± 1.3 個と抑制されていた。また、A549 miCDCP1細胞にCDCP1を発現にさせると、コロニー数は 34.3 ± 3.1 個となりA549細胞株と同等まで回復していた。しかし、CDCP1切断抑制変異体の発現では、コロニー数が 10.3 ± 6.1 個と回復しなかった。細胞外ドメインを欠失させCDCP1の切断が起こらない別の変異体である Δ ECD-Fでも、CDCP1切断抑制変異体と同様にコロニー数は 6.3 ± 0.9 個と回復しなかった。この結果は、CDCP1による足場非依存性能に、CDCP1細胞外ドメインの切断が必要であることを示唆している。

4. 考察

CDCP1は、癌細胞の浮遊培養時にリン酸化が亢進するタンパク質として発見され、その細胞内ドメイン

を介したシグナル伝達を介して癌の浸潤・転移を制御することが知られている⁴⁾。一方のMT-SP1は、CDCP1の細胞外ドメインの切断に関与する可能性が示されていたが、生化学的検討だけで細胞生物学的知見はなく、癌細胞で実際にCDCP1を切断し、機能制御に関与するかは未解明であった。

MT-SP1は膜結合型セリンプロテアーゼであり、細胞膜近傍に存在するタンパク質を切断すると考えられてきた。これまで、組換えタンパク質による切断実験から、MT-SP1はアルギニン残基とリジン残基の間で切断することが示唆されていたが⁷⁾、細胞生物学的知見は少なかった。本研究において、CDCP1とMT-SP1が細胞膜上で共局在することが示された(図2)。つまり、MT-SP1とCDCP1が細胞膜上の同一領域に存在することを示唆している。また、siRNAによるMT-SP1の発現抑制は、CDCP1の切断を抑制することが示された(図3)。これら結果は、CDCP1の切断にMT-SP1が関与する可能性を示している。組換えタンパク質を用いた場合、MT-SP1はアルギニン残基とリジン残基

の結合を切断する。CDCP1 の細胞外ドメインには368番目と369番目にアルギニン-リジンの配列があることから、MT-SP1 がこの部位を切断する可能性は高い。よって、MT-SP1 が細胞膜上で CDCP1 の細胞外ドメインを切断することを示唆している。MT-SP1 は、発がんや癌細胞の浸潤・転移能に広く関与することが知られている¹⁶⁾。癌組織は、糖代謝によって産出される乳酸やグルコース代謝における二酸化炭素の亢進により、正常組織と比較して酸性に傾いていることが報告されており¹⁷⁾、MT-SP1 は、酸性条件下において活

性化されることが示唆されている¹⁸⁾。また、MT-SP1 による HGF 前駆体の切断は、過剰な HGF 活性を誘発し、癌を発生させ、UPA 前駆体の切断は、癌の浸潤に関与することが報告されている^{19, 20)}。一方の CDCP1 は、癌細胞の足場非依存性能や細胞運動能、浸潤能に関与していることが報告されていることから⁴⁾、MT-SP1 が CDCP1 を切断することは、癌における CDCP1 の機能の一つである足場非依存性能の制御する上で重要であることが示唆される。また、MT-SP1 による CDCP1 の切断が一部であることから(図 3, 6)、この一部の切断が癌細胞の足場非依存性能の制御に十分であることが示唆される。

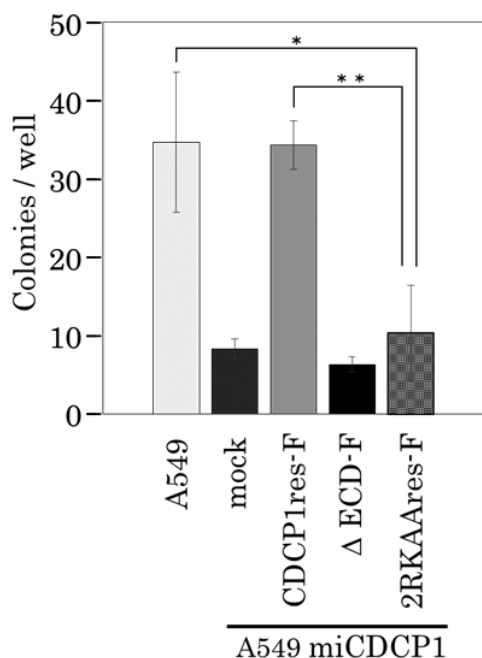


図7 切断を受けないCDCP1変異体によるSoft agar assayの細胞コロニー数のグラフ
A549: A549細胞株, mock: pcDNA3.1発現プラスミドのみ, CDCP1res-F: FLAG標識付CDCP1発現細胞, ΔECD-F: CDCP1細胞外ドメイン欠失変異体発現細胞, 2RKAres-F: 切断を受けないCDCP1変異体発現細胞 * P<0.05, ** P<0.01

Fig.7 A graph of the number of cell colonies in Soft agar assay by uncleaved CDCP1 mutant A549: A549 cell-line, mock: pcDNA3.1 plasmid only cell, CDCP1res-F: FLAG-tagged CDCP1 expressing cell, ΔECD-F: CDCP1 extracellular domain deleted mutant expressing cell, 2RKAres-F: CDCP1 mutant expressing cell not undergoing cleavage * P<0.05, ** P<0.01

Matriptase (MT-SP1) siRNA 処理による MT-SP1 発現抑制を介した CDCP1 の切断抑制や CDCP1 の切断抑制変異体を用いた soft agar assay では、A549 細胞株と比較して、細胞コロニー数の抑制が観察された(図 5, 7)。よって、MT-SP1 による CDCP1 細胞外ドメインの一部の切断が、足場非依存性能に関与することが考えられた。これまでに、CDCP1 の細胞外ドメインの切断を介した機能制御として、同種 2 量体形成を伴った細胞運動能の制御が報告されている²¹⁾。CDCP1 は、タンパク質-タンパク質間結合に関与する CUB ドメインを三つ持っており、N 末端側の CUB1 ドメインが切断されることにより、細胞外に放出されることが分かっている²²⁾。よって、同種 2 量体形成には、それ以外の CUB2 および CUB3 ドメインが関与していると考えられている。また、MT-SP1 には、CDCP1 と同様に細胞外ドメインに CUB ドメインが二つ存在することが報告されている²³⁾。これら知見から、MT-SP1 と CDCP1 はお互いの CUB ドメインを介して結合し、その後 MT-SP1 が、CDCP1 の細胞外ドメインを切断して CUB1 ドメインを放出することにより、CDCP1 が CUB2 あるいは CUB3 ドメインを介して同種 2 量体形成を促進し、この同種 2 量体形成が足場非依存性能にも関与する可能性が考えられる。

MT-SP1 と CDCP1 に存在する CUB ドメイン間のアミノ酸配列のホモロジー検索では、14.06~18.75% となり、相同性は低かったが、両方の CUB ドメインには、共通したアミノ酸配列の W-X-X-X-V-P が存在することを発見した。しかし、様々な構造配列のデータベースによって、このアミノ酸配列に対するモチーフ検索をしたが、機能配列としては存在していなかった。この配列が MT-SP1 と CDCP1 の結合部位として機能する可能性の検討については、今後の課題である。

近年、CDCP1 抗体による CDCP1 切断の阻害が、

細胞内 CDCP1 シグナルを抑制することが報告された²⁴⁾。また、CDCP1 細胞外ドメインの切断は、癌細胞の SFK 活性化に関与することも示された²⁵⁾。細胞内 CDCP1 シグナルは、CDCP1 と SFK および PKC δ の複合体を介したシグナルであり、足場非依存性能¹⁾や細胞運動能を制御することが知られている²¹⁾。つまり、CDCP1 細胞外ドメインの切断が、細胞内 CDCP1 シグナルの制御を介した癌の浸潤・転移に重要であることが示唆されていた。しかし、癌細胞においてどのような酵素が、癌細胞の機能に重要であるかは明らかにになっていなかった。本研究において、Matritase (MT-SP1) siRNA による CDCP1 切断の抑制や CDCP1 の切断抑制変異体を介した CDCP1 の切断抑制により足場非依存性能が抑制されることが観察された (図 5, 7)。よって、MT-SP1 が CDCP1 の切断酵素の一つであることが示され、MT-SP1 による CDCP1 の切断が、細胞内 CDCP1 シグナルの制御に関与している可能性が示された。

MT-SP1 による CDCP1 切断を介した、同種 2 量体形成の可能性と細胞内シグナルの制御との関連については、さらなる検討が必要である。

5. 結語

本研究により、癌細胞において MT-SP1 が、CDCP1 を細胞膜上で切断する酵素であることが示された。また、MT-SP1 による CDCP1 細胞外ドメインの切断は、癌細胞の足場非依存性能を制御する上で重要であることが示唆された。

これら知見から、MT-SP1 を標的とした機能阻害や CDCP1 切断部位をマスクする抗体などが、今後の CDCP1 を介した癌転移の抑制に有用であると考えられる。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP 15K06890 の助成を受けて実施した。

参考文献

- 1) T. Uekita, L. Jia, M. Narisawa-Saito, J. Yokota, T. Kiyono, and R. Sakai “CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma”, *Mol. Cell. Biol.* 27[21] (2007), pp. 7649-7660.
- 2) T. Uekita, S. Fujii, Y. Miyazawa, A. Hashiguchi, H. Abe, M. Sakamoto and R. Sakai “Suppression of autophagy by CUB domain-containing protein 1 signaling is essential for anchorage-independent survival of lung cancer cells”, *Cancer Sci.* 104[7] (2013), pp. 865-870.
- 3) Y. Miyazawa, T. Uekita, N. Hiraoka, S. Fujii, T. Kosuge, Y. Kanai, Y. Nojima and R. Sakai “CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation”, *Cancer Res.* 70[12] (2010), pp. 5136-5146.
- 4) T. Uekita and R. Sakai “Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis”, *Cancer Sci.* 102[11] (2011), pp. 1943-1948.
- 5) A. Wortmann, Y. He, E. I. Deryugina, J.P. Quigley and J. D. Hooper “The cell surface glycoprotein CDCP1 in cancer—insights, opportunities, and challenges”, *IUBMB Life.* 61[7] (2009), pp. 723-730.
- 6) B. Casar, Y. He, M. Ionomou, J. D. Hooper, J. P. Quigley and E. I. Deryugina “Blocking of CDCP1 cleavage in vivo prevents Akt-dependent survival and inhibits metastatic colonization through PARP1-mediated apoptosis of cancer cells”, *Oncogene.* 31[35] (2012), pp. 3924-3938.
- 7) A. S. Bhatt, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C. S. Craik and M. M. Moasser “Adhesion signaling by a novel mitotic substrate of src kinases”, *Oncogene.* 24[34] (2005), pp. 5333-5343.
- 8) Y. E. Shi, J. Torri, L. Yieh, A. Wellstein, M. E. Lippman and R. B. Dickson “Identification and Characterization of a Novel Matrix-degrading Protease from Hormone-dependent Human Breast Cancer Cells” *Cancer Res.* 53[6] (1993), pp. 1409-1415.
- 9) J. D. Hooper, J. A. Clements, J.P. Quigley and T. M. Antails, “Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzyme”, *J. Biol. Chem.* 276[2] (2001), pp. 857-860.
- 10) S. Satomi, Y. Yamazaki, S. Tsuzuki, Y. Hitomi, T. Iwanaga and T. Fushiki “A role for

- membrane-type serine protease (MT-SP1) in intestinal epithelial turnover”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287[4] (2001), pp. 995-1002.
- 11) T. Takeuchi, J. L. Harris, W. Huang, K. W. Yan, S. R. Coughlin and C. S. Craik “Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates”, *J. Biol. Chem.* 275[34] (2000), pp. 26333-26342.
 - 12) S. L. Lee, R. B. Dickson and C. L. Lin “Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease”, *J. Biol. Chem.* 275[47] (2000), pp. 35720-35725.
 - 13) S. Kim, J. W. Yang, C. Kim and M. G. Kim “Impact of suppression of tumorigenicity 14 (ST14)/serine protease 14 (Press14) expression analysis on the prognosis and management of estrogen receptor negative breast cancer” *Oncotarget.* 7[23] (2016), pp. 34643-34663.
 - 14) A. L. Welm, J. B. Sneddon, C. Taylor, D. S. Nuyten, M. J. van de Vijver, B. H. Hasegawa and J. M. Bishop “The macrophage-stimulating protein pathway promotes metastasis in a mouse model for breast cancer and predicts poor prognosis in humans”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104[18] (2007), pp. 7570-7575.
 - 15) T. Sawayama and T. Uekita “The extracellular CUB domain of CDCP1 is involved in cell-cell contact and regulates collective cell migration in BxPC3 cells”, *Memoirs of the NDA.* 58[1] (2018), pp. 11-20.
 - 16) T. M. Antalis, M. S. Buzza, K. M. Hodge, J. D. Hooper and S. Netzel-Arnett “The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment”, *Biochem. J.* 428[3] (2010), pp. 325-346.
 - 17) L. E. Gerweck and K. Seetharaman “Cellular pH Gradient in Tumor versus Normal Tissue: Potential Exploitation for the Treatment of Cancer”, *Cancer Res.* 56[6] (1996), pp. 1194-1198.
 - 18) I. C. Tseng, H. Xu, F. P. Chou, G. Li, A. P. Vazzano, J. P. Kao, M. D. Johnson and C. Y. Lin “Matriptase Activation, an Early Cellular Response to Acidosis”, *J. Biol. Chem.* 285[5] (2010), pp. 3261-3270.
 - 19) R. Szabo, A. L. Rasmussen, A. B. Moyer, P. Kosa, J. M. Schafer, A. A. Molinolo, J. S. Gutkind and T. H. Bugge “c-MET-induced epithelial carcinogenesis is initiated by the serine protease matriptase”, *Oncogene* 30[17] (2011), pp. 2003-2016.
 - 20) K. List, R. Szabo, A. Molinolo, V. Sriuranpong, V. Redeye, T. Murdock, B. Burke, B. S. Nielsen, J. S. Gutkind and T. H. Bugge “Deregulated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation”, *Genes Dev.* 19[16] (2005), pp. 1934-1950.
 - 21) H. J. Wright, J. Arulmoli, M. Motazed, L. J. Nelson, F. S. Heinemann, L. A. Flanagan and O. V. Razorenova “CDCP1 cleavage is necessary for homodimerization-induced migration of triple-negative breast cancer” *Oncogene.* 35[36] (2016), pp. 4762-4772.
 - 22) L. Yang, S. M. Dutta, D. A. Troyer, J. B. Lin, R. A. Lance, J. O. Nyalwidhe, R. R. Drake and O. J. Semmes “Dysregulated expression of cell surface glycoprotein CDCP1 in prostate cancer” *Oncotarget.* 6[41] (2015), pp. 43743-43758.
 - 23) C. Y. Lin, J. Anders, M. Johnson, Q. A. Sang and R. B. Dickson “Molecular Cloning of cDNA for Matriptase, a Matrix-degrading Serine Protease with Trypsin-like Activity” *J. Biol. Chem.* 274[26] (1999), pp. 18231-18236
 - 24) B. Casar, I. Rimann, H. Kato, S. J. Shattil, J. P. Quigley and E. I. Deryugina “In vivo cleaved CDCP1 promotes early tumor dissemination via complexing with activated β 1 integrin and induction of FAK/PI3K/Akt motility signaling” *Oncogene* 33[2] (2014), pp. 255-268
 - 25) Y. He, A. Wortmann, L. J. Burke, J. C. Reid, M. N. Adams, I. Abdul-Jabbar, J. P. Quigley, R. Leduc, D. Kirchhofer and J. D. Hooper “Proteolysis-induced N-terminal ectodomain shedding of the integral membrane glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is accompanied by tyrosine

phosphorylation of its C-terminal domain and recruitment of Src and PKCdelta” J. Biol. Chem. 285[34] (2010), pp. 26162-26173