

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19109004

研究課題名（和文）メタロプロテアーゼによる組織内微小環境因子代謝の作用機構解明と制御

研究課題名（英文）Functional analyses and regulation of the metabolism of tissue microenvironmental factors by metalloproteinases

研究代表者

岡田 保典（OKADA YASUNORI）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00115221

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：MMP、ADAM、ノックアウトマウス、浸潤、転移、変形性関節症、ヒアルロン酸、創傷治癒

1. 研究計画の概要

本研究課題では、MMP（matrix metalloproteinase）とADAM（a disintegrin and metalloproteinase）遺伝子ファミリーメンバーのうち、特にMMP-7、MMP-13、ADAMTS4、ADAM28の各分子を中心にして、以下の4研究項目について研究している。

（研究1）MMPとADAMの相互作用分子探索とADAM28遺伝子欠損（KO）マウスの開発

（研究2）癌の生物像を規定する組織内微小環境因子代謝機構の解析

（研究3）組織の破壊・増殖・改築を伴う非腫瘍性疾患での組織内微小環境因子代謝機構の解析

（研究4）MMPとADAMを標的とした診断・治療法開発の基礎的研究

2. 研究の進捗状況

（研究1）MMPとADAMの相互作用分子探索とADAM28遺伝子KOマウスの開発：多種類の潜在型MMPを効率よく精製できる方法確立し、標準的なMMP精製法として報告した。潜在型MMP-7とCD151との相互作用による潜在型MMP-7の活性化を肺線維症肺組織において示した。ADAM28結合分子としてP-selectin glycoprotein ligand-1（PSGL-1）を同定し、ADAM28はPSGL-1/P-selectinを介した好中球の血管内皮細胞への接着・遊走機能を亢進し、炎症細胞の浸潤促進作用を有することを証明した。ADAM28遺伝子KOマウス

の作製については、複数の相同組み換え陽性クローンを得て、今後マウス初期胚に注入し、KOマウスの作製を予定している。

（研究2）癌の生物像を規定する組織内微小環境因子代謝機構の解析：マウスの前立腺癌細胞とメラノーマ細胞をMMP-13 KOマウスの皮下組織や尾静脈内注入した結果、前立腺癌細胞では癌細胞生着率が極めて低値であるのに対し、メラノーマ細胞では肺転移が逆に亢進することが明らかとなり、組織内微小環境因子代謝の違いによる可能性が示唆された。ADAM28は、VWF（von Willebrand factor）を分解することで、VWF誘導性癌細胞アポトーシスの回避、癌細胞の生存亢進により転移を促進する可能性を示した。

（研究3）組織の破壊・増殖・改築を伴う非腫瘍性疾患での組織内微小環境因子代謝機構の解析：MMP-9 KOマウスとMMP-13 KOマウスおよびこれらの両遺伝子を欠損させたKOマウスを用いて創傷治癒モデルを作製し、いずれのマウスでも創傷治癒が遅延することを明らかにし、欠損した表皮細胞の上皮化にはMMP-9とMMP-13の両方が必須であり、MMP-13は肉芽組織での血管新生およびリモデリング期において潜在型TGF-βの活性化を通して筋線維芽細胞の増殖・分化に必須であることを証明した。変形性関節症関節軟骨では、ADAM12が特異的に高発現することを示すと同時に、ADAM12がIGFBP-5を分解することによりIGF-Iの作用を亢進させ、関節軟骨細胞増殖に必須であることを証明した。

(研究4). MMP と ADAM を標的とした診断・治療法開発の基礎的研究：血中 MMP-3 が滑膜細胞に由来し、人工膝関節置換術により血中レベルが低下することを実証した。ADAM28 を肺癌患者血清中で測定できる ELISA 系の開発に成功し、本アッセイ法を用いて、血中 ADAM28 レベルが非小細胞性肺癌患者の病期、転移、再発のマーカーになり、本アッセイが早期肺癌の診断に有効であることを示した。変形性関節症の関節軟骨アグリカンの分解には ADAMTS4 が中心的な役割を果たすことを示し、高分子ヒアルロン酸が ADAMTS4 の遺伝子発現を抑制する薬剤として有力なことを見出した。また、カルシウムペントサンが ADAMTS4 の活性を直接阻害することを初めて証明した。

3. 現在までの達成度

本研究課題の当初研究目的の達成度は、「おおむね順調に進展している。」と自己評価している。

ヒト癌細胞で高発現する ADAM28 に関して、yeast two-hybrid system を用いて相互作用する複数の候補分子を特定しており、これまでに既に報告した分子を含めて、ADAM28 に関する生理的および病的状態での役割をかなり解明できたと考えている。一部の ADAM28 相互作用分子に関しては、さらなる研究により本研究課題の終了までに当初の目的を遂行できると確信している。癌間質細胞で発現する MMP-13 の機能を MMP-13 KO マウスを用いて解析したデータがかなり集積しており、癌の組織内微小環境の違いが癌細胞の生物像を規定している点で興味深い。ヒト乳癌と肺癌では ADAM28 が癌細胞特異的に発現することや癌細胞の増殖・転移での作用機構や診断への応用を世界に先駆けて報告してきた点で十分な進展があり、高く評価できると考えている。また、創傷治癒における MMP-9/MMP-13 の役割を明らかにできた点も評価できる。変形性関節症の研究プロジェクトでは、ADAM12 が軟骨細胞で特異的に高発現することを見出すとともに、軟骨組織の不完全な再生過程に重要な役割を果たしていることを示すことができ、関節軟骨の再生医療への応用に基礎的なデータを与えている。研究代表者は関節リウマチ患者血清中における MMP-3 測定法を開発・実用化してきたが、本研究では血中 MMP-3 が滑膜細胞に由来することを示すとともに、そのレベルは人工膝関節置換術後に低下することを実証し、一連の蓄積したデータから平成 22 年度文部科学大臣表彰 科学技術賞を受けた。本研究では、ADAM28 に対する ELISA 系の早期肺癌診断への応用、MMP-9 や MMP-13 の補充ないし発現誘導因子による創傷治癒促進療法、ADAMTS4 の遺伝子発現抑

制や阻害剤として働く高分子ヒアルロン酸やカルシウムペントサンの軟骨底保護剤への応用など、診断・治療法開発につながる可能性のある基礎データを得ている。

4. 今後の研究の推進方策

本研究では、ADAM28 KO マウスの開発などの研究項目でやや遅延を認めるものの、その解決法の見通しは立っており、研究計画の大きな変更や研究遂行上での問題はない。本研究課題の終了までに当初の目的を遂行できると考えられ、新たに見出した疾患の診断・治療法開発につながる可能性のある研究に関しては、それらの実用化を目指して研究を推進する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 41 件)

Hattori N., Mochizuki S., Kishi K., Nakajima T., Takaiishi H., D'Armiento J. and Okada Y.: MMP-13 plays a role in migration, angiogenesis and contraction in mouse skin wound healing. *Am. J. Pathol.* 175:533-546, 2009.

Imai, K. and Okada Y.: Purification of matrix metalloproteinases by column chromatography. *Nat Protoc.* 3: 1111-1124, 2008.

Shimoda M., Hashimoto G., Mochizuki S., Ikedo E., Nagai N., Ishida S. and Okada Y.: Binding of ADAM28 to P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances P-selectin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 282: 25864-25874, 2007.

〔学会発表〕(計 18 件)

Okada Y.: ADAMs in tumor growth and progression. In Gordon Research Conference on MMPs. Invited speaker. August 30-September 4, 2009. Les Diablerets, Switzerland.

〔図書〕(計 2 件)

Okada Y.: Proteinases and matrix degradation. In Kelley's Textbook of Rheumatology. Ed. by Firestein G. S., Budd R. C., Harris E. D., Jr., McInnes I. B., Ruddy S. and Sergent J. S. 8th edition, Elsevier Saunders. Philadelphia. pp115-134, 2009.

〔その他〕

平成 22 年度文部科学大臣表彰 科学技術賞 (開発部門) 受賞 (平成 22 年 4 月 13 日)

ホームページ : <http://keio-okada-lab.jp/>