

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791386

研究課題名(和文)骨・関節表現型におよぼすMMP2変異の影響の解明

研究課題名(英文)The effects of mutated MMP2 on bone and joint

研究代表者

福土 純一 (Fukushi, Jun-ichi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40444806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトMMP2遺伝子変異は、多関節の関節破壊と骨粗鬆症を呈する多中心性骨溶解症を生じる。ムチランス型の関節リウマチに類似した病態が、プロテアーゼの不活性型変異で生じることは興味深い。その分子機序については、全く明らかとなっていない。関節炎および骨吸収を生じる新たな病態機序の解明は、関節リウマチや骨粗鬆症の新たな治療法の開発へつながる可能性があり、臨床的にも極めて重要な課題である。骨溶解症の動物モデルの作成を行うべく、特殊な条件の下で変異型MMP2が発現する遺伝子改変マウスを作成し、安定的に繁殖させた。生体内のさまざまな組織に変異型MMP2を発現させ、その機能を解析することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Mutations in MMP2 gene results in unique skeletal phenotype called osteolysis, which is characterized by multiple joint distraction and severe osteoporosis. The pathology of joint damages in osteolysis mimics rheumatoid synovitis, however, the underlining molecular mechanism how inactivated mutation in MMP2 results in osteolysis is largely unknown. In this study, we tried to develop an animal model for osteolysis. We have made a conditional transgenic mouse carrying an mutated MMP2 gene, which can be over-expressed under specific condition. This mouse would be useful for understanding the roles of MMP2 during the development of osteolysis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨溶解症 骨破壊 MMP2

1. 研究開始当初の背景

主にI型コラーゲンと石灰化した骨基質よりなる骨においては、多様な蛋白分解酵素が協調して働き、骨吸収と骨形成のバランスが保たれている。骨成長および再構築(リモデリング)の過程においては、さまざまなmatrix metalloproteinase (MMP) が関与するが、なかでも膜型MMPであるMT1-MMPは特に重要であり、その遺伝子欠損マウスは骨粗鬆症と全身性の関節炎を来たすことが知られている(Holmbeck et al, Cell 1999)。

このマウスと極めて類似した表現型を呈するヒトの疾患として、多中心性骨溶解症の一型であるWinchester症候群が知られる。Winchester症候群は、手足より始まり全身の関節に広がる骨破壊と骨粗鬆症を特徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患であるが、MT1-MMPには異常はなく、MMP-2の不活性型変異が原因とされている(OMIM120360)。興味深いことにMMP-2遺伝子欠損マウスにおいては骨格系の異常はほとんどなく、ヒトMMP-2の不活性型変異と、マウスMT1-MMPの欠損が相同な表現型となる機序は明らかではない。我々はWinchester症候群の家系で遺伝子診断を行い、MMP-2のプロドメイン領域に新規ミスセンス変異(leucine/proline; L/P)を同定した。血清を用いてゼラチンザイモグラフィを行うと、患者血清においては活性型MMP-2が検出されず、不活性型変異であることが判明した。

2. 研究の目的

MMP-2は前駆体(68KDa)として産生されると、細胞膜上でMT1-MMPによりプロペプチドが切断されて部分活性型(64KDa)となり、さらに自己切断によって完全活性型(62KDa)となる。野生型およびL/P変異型MMP-2の発現ベクターを作成し、MT1-MMPと共にHEK293細胞で発現させゼラチンザイモグラフィを行うと、変異型MMP-2では部分活性化に伴う溶解窓(64

KDa)を認めず、不活性型変異だと判明した。野生型MMP-2由来の64KDaのバンドは、変異型MMP-2の過剰な共発現にて消失することから、変異型MMP-2がMT1-MMPの機能を抑制する可能性が示唆された。

Winchester症候群におけるMMP-2の不活性型変異の報告(Martignetti et al, Nat Gen et 2001)により、骨・関節組織におけるMMP-2の重要性が示されたが、その病態機序については全く解明が進んでいない。MMP-2遺伝子欠損マウスには明らかな骨格系の異常がないことから、不活性型変異MMP-2すなわちプロペプチドの部分切断を受けないMMP-2の存在が、骨・関節の恒常性を阻害していると考えられる。先行研究において、変異型MMP-2を全身に過剰発現するマウスを作成したところ、生殖能力がなく解析が不能であった。そこで本研究では、骨および関節軟骨に特異的に変異型MMP-2を発現するマウスを作成して表現型を検討するとともに、in vitroおよびex vivoにおける変異型MMP-2とMT1-MMPおよびTIMP-2との相互作用について検討する。これらの過程を通じて変異型MMP-2による骨・関節破壊の分子機序を明らかにすることが本研究の目的であり、骨溶解症のみならず、将来の関節リウマチや骨粗鬆症の新たな治療法開発への端緒として期待されるものである。

3. 研究の方法

変異型MMP2が骨吸収・関節破壊をもたらす機序について、in vitroおよびin vivoの実験系を用いて検討した。

(1) 変異型MMP-2トランスジェニックマウスの作成

先行研究において、ベータアクチンをプロモーターに持つpCAGGSベクターを用いて変異型MMP-2のトランスジェニック(Tg)マウスを作成したところ、生殖能力を持たない表現形となった。そこで本研究では、組織特異的に変異型MMP-2を過剰発現させることを計画する。LoxP配列を

持つpCALNL5ベクターに変異型MMP-2を組み込んだTgマウスを作成し、Col1-CreおよびCol2-Creマウスと交配させることで、それぞれ骨および関節軟骨に特異的に変異型MMP-2を過剰発現させることが可能となる。マウス作成は、ユニテック(株)に受託を依頼した。

(2) 変異型 MMP-2 と MT1-MMP との相互作用の解析

MMP-2はプロペプチド領域を介して細胞膜上のMT1-MMP/TIMP-2と三量体を形成した後プロペプチドの切断を受け、部分活性型(64kDa)となり三量体から遊離する。LP変異のためにプロペプチドが切断されない場合は、MT1-MMPは変異型MMP-2に占拠され、その機能が抑制されると考えられる。これを検証するため、MMP-2、MT1-MMPおよびTIMP-2の3分子を発現しているHT1080線維肉腫細胞に変異型MMP-2を強制発現させ、MT1-MMP特異的な蛍光基質を用いてMT1-MMP活性を検討する。また、骨芽細胞上の膜型RANKLはMT1-MMPの生理的な基質であることから、変異型MMP-2がMT1-MMPのRANKL切断を抑制するか否かを、同様に検討する。以上の研究より、MMP-2の不活性型変異が、MT1-MMPの機能に及ぼす影響を明らかにする。

4 . 研究成果

先行研究においてpCAGGSベクターを用い、全組織に変異型MMP2を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作成したところ、生殖能力を持たない表現型を呈したため、本研究では組織特異的にトランスジーンを過剰発現させることを計画した。LoxP配列をもつpCALNL5ベクターに変異型MMP2を組み込むと、Cre非存在下ではネオマイシン遺伝子が発現するが、Cre存在下では変異型MMP2が発現する。この発現カセットを用いて作成したTgマウ

スを安定的に繁殖させることに成功した。

In vitroの解析においては、MT1-MMPによる膜型RANKLのsheddingにおよぼす影響を検討したが、変異型MMP2によってRANKLのsheddingが抑制されることは観察されなかった。また、蛍光基質を用いたMT1-MMPの活性評価は、蛍光強度が低く、変異型MMP2による阻害効果を検証できなかった。

今後は、作成したTgマウスを組織特異的にCreを発現するマウスと交配することで、変異型MMP2が組織に及ぼす影響をin vivoで検討する予定である。

5 . 主な発表論文等

(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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織 (1) 研究代表者

()
福士 純一

研究者番号：40444806

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：