

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間： 2007～2009

課題番号：19791035

研究課題名（和文）変異型MMP2による骨破壊機序の研究

研究課題名（英文） Mechanisms of osteolysis associated with MMP2 mutation

研究代表者

福士 純一 (FUKUSHI JUN-ICHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40444806

研究成果の概要（和文）：Matrix Metalloproteinase2（MMP2）遺伝子の変異は、全身性の骨が溶解する疾患・骨溶解症（Winchester 症候群）の原因となる。この疾患が、MT1-MMP 遺伝子欠損マウスの表現形ときわめて類似することに注目し、変異型 MMP2 と MT1-MMP との相互作用について解析を行った。また、変異型 MMP2 を過剰発現させたマウスを作成することで、ヒトの疾患との比較を試みた。

研究成果の概要（英文）：Loss-of-function mutation in Matrix Metalloproteinase2（MMP2）gene results in a rare disorder multicentric osteolysis（Winchester's syndrome）. Because the phenotype of Winchester's syndrome is similar to that of MT1-MMP null mice, we sought to examine the molecular interaction between mutated MMP2 and MT1-MMP. For in vivo study, we planned to make a transgenic mouse model by overexpressing mutated MMP2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	900000		900000
2008 年度	1400000	420000	1820000
2009 年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3200000	690000	3890000

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：関節病学

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、全身性の関節炎そして成長障害を来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 (leucin/proline; L/P) を同定した。両親はいとこ婚でありヘテロの患者ではホモの変異alleleであった。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示唆された。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(64KDa)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。

2. 研究の目的

Winchester症候群におけるMMP-2の不活性型変異の報告 (Martignetti et al, Nat Genet 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、不活性変異型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。そこで本研究ではMT1-MMP遺伝子欠損マウスの表現型との相同性に注目しながら、

(1) 変異型MMP-2とMT1-MMPおよびTIMP-2との相互作用について *in vitro* にて解析を行い、さらに

(2) 変異型MMP-2トランスジェニックマウスを作成し、上記3分子の *in vivo* における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

(1) 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、そこに別のMT1-MMPが作用することで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。そこで始めに、LP変異型MMP-2がMT1-MMP/TIMP-2と三量体を形成するか否か、それぞれの発現ベクターを用いてHEK293細胞に強制発現させ、免疫沈降法にて検討する。また、ゼラチンカラムを用いてMMP-2を精製し、MT1-MMP/TIMP-2発現細胞と、¹²⁵IラベルしたMMP-2を用いて細胞膜との結合アッセイを行い、細胞表面からのMMP-2のクリアランスを比較する。

多くのMMP前駆体は他のMMPによって活性化されるが、concanavalin A(Con A)や4-aminophenyl mercuric acetate(APMA)存在下ではautolytic activationによりプロペプチドが切断され、自己活性化する。Con AやAPMAによるMMP-2の自己活性化が、LP変異により変化するのかを、ザイモグラフィにて検討する。

先行研究では、変異型MMP-2の過剰発現により、MT1-MMPによる野生型MMP-2の活性化が低下した。LP変異のためにプロペプチドが切断されず、MT1-MMP/TIMP-2と安定した三量体を形成すれば、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、MT1-MMPによって活性化されるMMP-2、そのMMP-2で活性化されるMMP-9についても、ゼラチンザイモグラフィおよび特異的蛍光基質を用いて活性化状態を調べ、MMP活性化カスケードに及ぼす効果についても解析する。

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。

(2) 変異型MMP-2トランスジェニックマウスの作成及び形態学的解析

ベータアクチンをプロモーターに持つpCAGGSベクターに、変異型MMP-2のcDNAを組み込んだ発現ベクターは作成済みであり、HEK293細胞において機能的に発現することを確認している。このベクターをC57Bl/6マウス受精卵に導入し、変異型MMP-2をユビキタスに発現させ、表現型を解析する。

変異型MMP-2がMT1-MMPに抑制的に働くのであれば、MT1-MMP欠損マウスと同様の表現型を呈する可能性が考えられる。関節炎や骨破壊、骨量減少の有無について、形態・組織病理学的に検討する。具体的には、

a) 頭蓋骨を含めた骨格系の変形の有無、

- b)成長速度の違い、
- c)骨端成長板の形態の変化、
- d)マイクロCTおよびX線をもちいての骨密度、骨質の計測、
- e)TRAP染色を用いた関節滑膜における破骨細胞数の計測、を行いさらに、
- f)film in situ zymographyを用いて、骨および関節における活性型MMPの局在についても検討する。

4. 研究成果

(1)変異型MMP-2とMT1-MMPとの相互作用の解析

ヒトMMP2遺伝子変異による骨溶解症（Winchester症候群）の表現系が、MT1-MMP遺伝子欠損マウスの表現形ときわめて類似することは、変異型MMP2がMT1-MMPの機能を抑制する可能性を示唆する。そこで、MMP2とMT1-MMPの相互作用についての解析を行った。

はじめにHEK 293細胞に、発現ベクターをトランスフェクションすることで、培養上清中にMMP2蛋白が分泌される系を確立した。この系において、ゼラチンカラムを用いて、培養上清よりMMP2を精製・濃縮し、相互作用の解析に使用することが可能となった。

次いで、MMP2前駆体蛋白の特異的精製を行うべく、N末端にFlagタグを付けた発現ベクターの作成を行った。ゼラチンカラムと、Flagタグ親和性カラムを組み合わせることにより、前駆体蛋白を特異的に精製することが可能となった。N末端Flagタグ付きMMP2が、タグ無しMMP2と同様にMT1-MMPと複合体を形成し、活性化をうけることを確認した。この結果を受け、N末端Flagタグ付きMMP2を用いた、トランスジェニックマウスの作成を開始した。詳細は次項(2)において記載する。

さらに変異型MMP2とMT1-MMPとの相互作用として、MT1-MMPが細胞膜上に発現したRANKLを切断する効果に注目し、検討をおこなった。HisタグをつけたRANKLの発現ベクターを作成し、HEK293細胞上にMT1-MMPとともに強制発現させることで、培養上清中に可溶性RANKLが放出される実験系を構築した。しかしながら、変異型MMP2の存在下に可溶性RANKLの放出量の変化はなく、MT1-MMPによるRANKLのsheddingへの阻害効果は認めなかった。

(2)変異型MMP-2トランスジェニックマウスの作成

N末端Flagタグ付き変異型MMP2の、in vitroでの検討を行った後に、トランスジェニック(Tg)マウスの作成を行った。発現ベクターには、CMVプロモーターを利用したpCAGGSベクターをベースとした発現カセットを用い、ユビキタスに発現する系を予定した。C57Bl/6マウス卵200個にマイクロインジェクションを行い、2匹のTgマウスを得た。表現形の解析を

すべく繁殖を行ったが、Tgマウスは繁殖能力がなく、系統を維持することが困難であったため、精子の凍結保存を行った。

不妊マウスの問題を解決するため、コンディショナルトランスジェニック (conditional Tg) が可能な発現ベクターを用いてTgマウスを作成することを計画している。発現ベクターにpCALNL5を用いることで、Creリコンビナーゼの存在下においてのみ変異型MMP2を組織に過剰発現することが可能となる。I型およびII型コラーゲンのプロモーターを持つCre発現マウス(Coll1-CreあるいはCol2-Creマウス)と交配されることで、骨あるいは関節軟骨において特異的に変異型MMP2を発現する動物実験モデルを構築し、骨破壊機序の解明を行う予定である。

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 (FUKUSHI JUN-ICHI)

九州大学・大学病院・助教

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：