

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791378
 研究課題名（和文） 新規分子間相互作用を介したMMPの生理的・病的機能発現機序の解明
 研究課題名（英文） Physiological and Pathological Function of MMP3 by a Novel Molecular Interaction
 研究代表者 江口 傑徳（EGUCHI TAKANORI）
 国立長寿医療センター（研究所）・口腔疾患研究部・室長
 研究者番号：20457229

研究成果の概要（和文）：

マトリックス・メタロ・プロテアーゼ3（MMP3）は細胞外マトリックスや成長因子、そのレセプターを切断することで、組織リモデリング、血管新生、創傷治癒、骨・軟骨リモデリングに関与し、病的にはリウマチのマーカーでもある。そこにきて我々は、MMP3が核移行し、転写因子としてCTGF/CCN2遺伝子の発現を誘導することを見出した。今回、細胞内で発現させたMMP3およびその機能ドメインであるPEXドメインおよびCatalyticドメインを細胞内で発現させその機能を解析した。全長MMP3およびそれらの変異体は細胞死を誘導することなく一部は核移行した。さらにはマイクロアレイによって、細胞内MMP3の特異的な新しいターゲット遺伝子としてHSP70B'を見出した。細胞内MMP3によってHSP70B'が誘導され、細胞がUV、感染、メカニカル・ロードなどのストレスに対して耐性を獲得すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Matrix metalloproteinase -3 (MMP-3) is involved in tissue remodeling, cartilage/bone remodeling, wound repair and angiogenesis, by cleaving extracellular matrices, growth factors or their receptors. Recently we found that MMP3 was translocated to nucleus and induced CTGF/CCN2 gene expression by acting as a transcription factor. In this study, intracellular MMP3 and its functional domains, catalytic and PEX domains, were expressed transiently, then their functions were analyzed. As results, all these proteins entered into the nucleus of COS-7 cells without inducing cell death. MicroArray analysis revealed that intracellular MMP-3 and PEX domain specifically induces HSP70B'/HSPA6 (HSP70B') in 293 cells. HSP70B' have been known to be induced by cellular stress such as UV, infection and mechanical stress then induces cellular tolerance against these stresses. These results indicate that PEX domain and intracellular MMP3 drastically induces cellular protection against stresses through drastic expression of HSP70B'.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,000,000	600,000	2,600,000
21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：細胞内 MMP3・PEX ドメイン・マイクロアレイ・HSP70B' /HSPA6・ストレス耐性

1. 研究開始当初の背景

マトリックス・メタロ・プロテアーゼ (MMP) は、個体発生、組織再生、創傷治癒、血管新生といった生理的な生命現象と、関節炎、線維症、神経変性疾患、癌の浸潤・転移などの病理に関与することが知られてきた。一方で、CTGF/CCN2 (以下 CCN2) は MMPs とよく似た状況で発現し、なおかつ両者の間にはタンパク質同士の相互作用が知られている (Kubota S and Takigawa M, Int Rev Cytol, 2007; Hashimoto G et al, JBC, 2002)。

私達は、分泌タンパク質とされてきた MMP3 が軟骨細胞において核移行し、CCN2 のエンハンサー配列 TRENDIC への結合を介して CCN2 の転写を活性化する、すなわち DNA 結合型転写因子として機能するという極めて珍しいモデルを提唱している。

2. 研究の目的

血管、骨軟骨、免疫系における MMP3 局在変化 (核移行) が CCN2 の転写活性化を介し、生理的および病的血管新生を制御することを明らかにする。これらの機構の異常が組織の繊維化、関節炎、歯周炎、動脈硬化などの血管新生病にどのように関与するかを検証し、その医学的解決策を検討する。

3. 研究の方法

細胞培養、遺伝子導入、蛍光免疫染色
pcDNA3/MMP3-GFP SP+ (pMMP3-GFP), pFlag3Myc/MMP3 SP- (pMMP3 SP-) およびその変異体を作製し用いた。これらを COS7 細胞および 293 細胞にリポフェクション法によって遺伝子導入した。遺伝子導入試薬として、Lipofectamine LTX と Plus reagent あるいは MultiFectam を用いた。293 細胞はコラーゲンコート培養皿にて培養した。蛍光免疫染色は、通法で行った。

遺伝子発現解析

遺伝子発現解析は、遺伝子導入の 18~30 時間後に総 RNA を回収した。RNeasy システムと QIACUBE を用い、途中 DNase 処理を施した。逆転写には、TOYOBO の逆転

写システムを用い、オリゴ dT とランダムプライマーを併用した。リアルタイム PCR 解析には、TaKaRa の SYBR Ex Taq II を用い、リファレンスとして ROX で補正を行った。

マイクロアレイ解析に際しては、逆転写からマイクロアレイまではバイオマトリックス研究所への委託とした。逆転写反応はランダムプライマーを用いて行われた。マイクロアレイには、アジレント社の Human Gene 1.0 ST Array が使われた。

4. 研究成果

細胞内での MMP3 全長、PEX ドメインおよび Cat ドメインの発現

細胞内での MMP3 の機能が不明である上に、その Protease 活性および Protease 活性の役割についても不明である。そこで全長 MMP3、Cat ドメイン、PEX ドメインのそれぞれを COS7 細胞内で発現させ、その局在を観察した。その結果を下に示す。

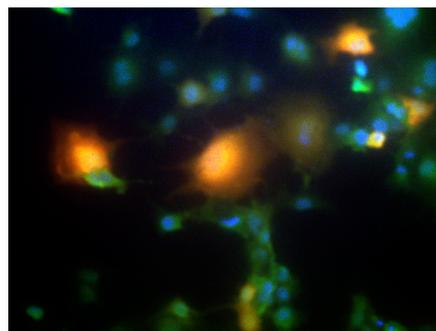


図 1 全長 MMP3 の細胞内発現。赤は N 末端の Flag3 タグの染色、緑は C 末端の Myc タグの染色、青は DNA の DAPI 染色。Flag3 タグを用いることでより信頼性の高い特異的染色が行える。

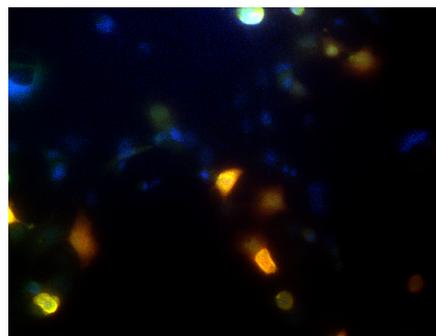


図2 MMP3のプロテアーゼ活性を担うCatドメインの染色像(黄)。N末端(赤)とC末端(緑)の染色が一致し、黄の画像を得た。Catドメインは核周辺あるいは核内に局在したと考えられる。

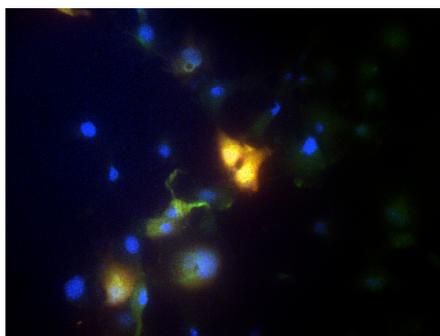


図3 PEXドメインの染色像(黄)。N末端(赤)とC末端(緑)の染色が一致し、黄の画像を得た。核周辺か核内に局在すると考えられる。

以上より、MMP3全長、Catドメイン、PEXドメインのいずれを用いた場合でも、細胞死を誘導せずに安全に細胞内および核内で発現させることができることが分かった。

MMP3の発現によるCCN2/CTGF発現の制御

MMP3遺伝子の発現、あるいはPEXドメインの発現が、他の遺伝子の発現にどのような影響を及ぼすかについて、一過性の遺伝子発現系を用いて検討した。

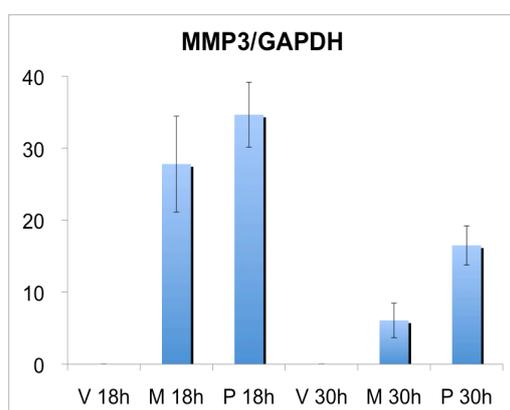


図4 MMP3全長およびPEXドメインの発現(293細胞)。V, vector; M, MMP3; P, PEX domain. 遺伝子導入の18および30時間後にTotal RNAを回収し、遺伝子発現の相対定量を行った。縦軸はGAPDHとの発現量の比。遺伝子導入の30時間後よりも18時間後においてより多い発現量を認めた。

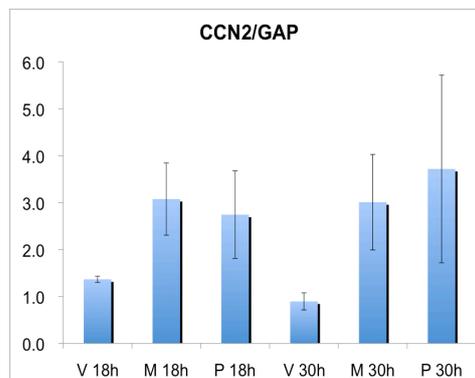


図5 同様の実験系でCCN2/CTGF遺伝子の発現変動を定量した。CCN2/CTGF遺伝子はMMP3およびPEXドメイン導入の18時間後から30時間後にかけて、発現誘導を受けた。

以上のことから、MMP3発現およびPEX発現は、CCN2/CTGFの発現を誘導することが明らかとなった。以前の研究では、軟骨細胞におけるMMP3発現ノックダウンによってCCN2発現が減少することが確認されている。今回の実験は、その裏をとった実験であり、相互補完する形となった。

マイクロアレイでは同様の条件で、28869遺伝子について解析した結果、最も発現変動があった遺伝子はHSP70B' (HSPA6)であった。

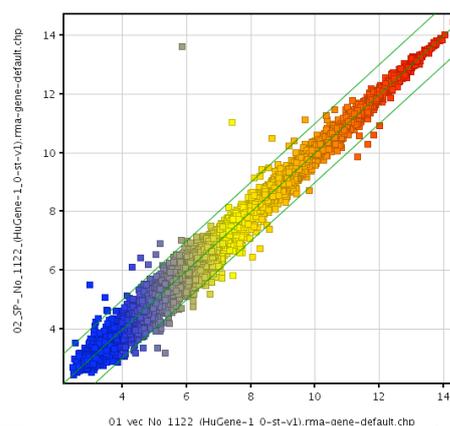


図6 マイクロアレイのスクアター・プロットの図。選択したマイクロアレイおよび数値化のシステムのため、全体的に遺伝子発現の変動の幅が小さいという結果であった。

HSP70B' 遺伝子は細胞にストレス耐性を与える遺伝子であり、コントロールと比較して、細胞内全長MMP3によって12.6倍、PEXドメインによって9.1倍、遺伝子発現が上昇しましたが、Catドメインによっては変化しませんでした。その他の遺伝子の発現変動は、0.36~2.8倍の

範囲内でした。HSP70B' の発現変動を qRT-PCR で解析したところ、細胞内全長 MMP3 によって 150 倍程度その発現が上昇し、PEX ドメインによっては 70 倍程度の上昇を認め、また Cat ドメインによっては変化しませんでした。

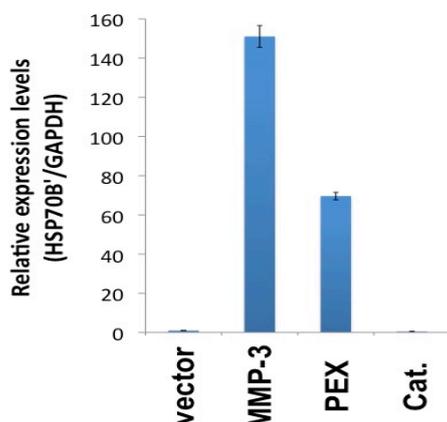


図7 細胞内 MMP-3 および PEX ドメインによって、HSP70B' の発現が劇的に誘導された。

これらの結果から分かることは、細胞内 MMP3 はストレス耐性遺伝子 HSP70B' を特異的に発現誘導することと、その誘導の主体は PEX ドメインであること、Cat ドメインは補助的な役割を果たすことです。

HP1 と MMP3 の相互作用

MMP3 の核内での機能を知る目的で、リコンビナント MMP3 とリコンビナント HP1 ガンマおよび HP1 アルファとのバインディングアッセイを行った。その結果、明確な相互作用は見いだせなかった。

In silico では、PEX ドメイン内に HP1 結合モチーフを見いだしている。したがって、今後は Protease 活性をもつ Cat ドメインを除いた PEX ドメインと HP1 との相互作用をみるのが、タンパク分解という要素を除いて解析できるため、賢明と考える。

D. 考察

今回、細胞内 MMP3 およびその変異体発現が、細胞死を誘導しないことが分かった。他方、シグナルペプチド付きの MMP3-GFP は、細胞死を誘導した。細胞内 MMP3 の一部は核に局在化していることが分かった。

遺伝子発現解析では、293 細胞において細胞内 MMP3 および PEX が CCN2 発現を誘導することが分かった。マイクロアレイによっては同様の結果が得られなかったが、それは実験条件の違いによるものであろう。

マイクロアレイで変動を認めた遺伝子は複数あり、発現抑制を受けた遺伝子もあった。今回の実験では、HSP70B' の変動が他の遺伝子と比べて顕著であった。

E. 結論

もともと軟骨細胞株で見出された核内 MMP3 の特性を知るために、遺伝子導入実験によって 293 細胞内で MMP3 およびその変異体を発現させた結果、それらの一部は核内に認められ、その時、細胞死は認められなかった。核内 MMP3 のターゲット遺伝子の有力候補として HSP70B' が見出された。細胞内 MMP3 は HSP70B' の発現を誘導することで、感染、UV、力学的負荷などの細胞ストレスから細胞を保護するのかもしれない。

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 4 件)

- ① Role of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 in regulation of chondrocyte differentiation. Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Moritani NH, Shimo T, Kondo S, Nishida T, Minagi S, Takigawa M. J Cell Physiol. 222(1) 2010 138-48
- ② Regulation of chondrocytic phenotype by micro RNA 18a: involvement of Ccn2/Ctgf as a major target gene. Ohgawara T, Kubota S, Kawaki H, Kondo S, Eguchi T, Kurio N, Aoyama E, Sasaki A, Takigawa M. FEBS Lett. 2009 Mar 18;583(6):1006-10.
- ③ Posttranscriptional regulation of chicken ccn2 gene expression by nucleophosmin/ B23 during chondrocyte differentiation. Mukudai Y, Kubota S, Kawaki H, Kondo S, Eguchi T, Sumiyoshi K, Ohgawara T, Shimo T, Takigawa M. Mol Cell Biol. 2008 Oct;28(19):6134-47.
- ④ Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M. Mol Cell Biol. 2008 Apr;28(7):2391-413.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 江口傑徳、他：MMP3 はクロマチンに局在し、CCN ファミリー遺伝子を制御する。(第 32 回日本分子生物学会)、2009 年 12 月 9 日、パシフィコ横浜 (横浜)
- ② 江口傑徳：ヒト MMP3 は新規の転写因子

様機能により CTGF/CCN2 遺伝子を制御する。(第 30 回岡山歯学会(奨励論文賞受賞講演)、2009 年 11 月 8 日、岡山大学歯学部)

- ③ 江口傑徳: 軟骨細胞において MMP3 は核移行し CCN2/CTGF の転写活性化因子として働く(第 22 回日本軟骨代謝学会)、2009 年 3 月 7 日、名古屋
- ④ 江口傑徳、小松寿明、杉浦進介、猪俣恵、松下健二: 可溶性セレクトリンによる菌体成分排除 BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008 年 12 月 12 日、神戸
- ⑤ 杉浦進介、江口傑徳、猪俣恵、小松寿明、野口俊英、松下健二: ヒストンアセチル化制御薬による新規炎症性サイトカイン HMGB1 の放出制御 BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、Late Breaking Abstracts, 2008 年 12 月 12 日、神戸
- ⑥ 猪俣恵、江口傑徳、杉浦進介、小松寿明、松下健二: Th1 および Th2 由来サイトカインは STAT の活性化を介して Weibel-Palade Body の構成因子の発現を変化させる BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会) 2008 年 12 月 9 日、神戸
- ⑦ 杉浦進介、江口傑徳、猪俣恵、小松寿明、松下健二: エンドトキシンショック制御を目的とした HMGB1 のアセチル化・放出の制御 第 14 回日本エンドトキシンショック研究会、2008 年 10 月 25 日、仙台
- ⑧ Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Ohgawara T, Uehara J, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M: Novel Transcriptional Regulation of CCN2/CTGF by Nuclear Translocation of MMP3. The 5th Workshop for International CCN Society, October 22nd, 2008, Tronto, Canada

[図書] (計 2 件)

- ① Eguchi T, Satoshi Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Ueharam J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M: Novel Transcriptional Regulation of CCN2/CTGF by Nuclear Translocation of MMP3, in CCN proteins in health and disease: An overview of the Fifth International Workshop on the CCN family of genes (Ed. Bernard Perbal), Springer, 2010.
- ② 杉浦進介、江口傑徳、他: ヒストンアセチル化制御薬を用いた HMGB1 の放出制御. 医学図書出版、2009、118

[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:
取得年月日:
国内外の別:
[その他]

ホームページ等

<http://www.nils.go.jp/department/odr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 傑徳 (EGUCHI TAKANORI)
国立長寿医療センター (研究所)・口腔疾患研究部・室長
研究者番号: 20457229

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: