

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462301

研究課題名(和文) MMP2/MT1-MMP機能不全に伴う骨破壊機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of bone/joint destruction by impaired MMP2/MT1-MMP

研究代表者

福士 純一 (Fukushi, Jun-ichi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：40444806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：MMP2遺伝子の不活性型ミスセンス変異は、ヒトにおいて多関節の関節破壊と骨粗鬆症を呈する骨溶解症(Winchester症候群)を生じる。MT1-MMP遺伝子変異によっても骨溶解症が生じることから、変異型MMP2がMT1-MMPの機能を抑制することが想定される。入手可能なMMP2遺伝子欠損マウスに、骨特異的に変異型MMP-2を発現させることを計画した。予備実験として、HEK293細胞に変異型MMP-2、TIMP2およびMP1-MMPを強制発現させ、MT1-MMPの基質の代謝検討を行った。変異型MMP-2を発現させることで、MT1-MMPの基質分解が抑制されることを確認した。

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. To evaluate the possible function of mutated pro-MMP2 present in the tissue, we made expression constructs containing wild type MMP2, mutated MMP2, and wild type MT1-MMP. When co-transfected with MT1-MMP into HEK293 cells, wild type pro-MMP2 was cleaved to form an intermediate form. In contrast, when mutated MMP2 was transfected, only pro-MMP2 was visualized, indicating that mutated pro-MMP2 is resistant to the cleavage by MT1-MMP. When mutated MMP2 was co-transfected with wild type MMP2 and MT1-MMP into 293 cells, activated wild type MMP2 was decreased dose-dependently. This suggests that mutated MMP-2 may inhibit the activity of MT1-MMP.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨溶解症 骨破壊 MMP-2

## 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(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。

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、入手可能なMMP2遺伝子欠損マウスに、骨特異的に変異型MMP-2を発現させることを計画した。加えて、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とを計画した。

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の実験系を計画した。

### (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分子を発現していないHEK293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。

#### (2) 変異型MMP-2発現マウスの作成

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、MMP-2遺伝子欠損マウスにおいて、骨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。I型コラーゲンをプロモーターとした変異型MMP-2の発現ベクターを作成し、MMP-2遺伝子欠損マウスに過剰発現させることで、骨特異的に変異型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)に受託を依頼する。

#### 4. 研究成果

動物実験の予備実験として、HEK293細胞に変異型MMP-2、TIMP-2および、MT1-MMPを強制発現させ、MT1-MMPの基質であるI型コラーゲンやRANKL、特異的な蛍光基質を用いてその活性変化の検討を行った。変異型MMP-2を発現させることで、MT1-MMPによる、正常

MMP-2の分解が抑制されることを確認した。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。

動物実験においては、I型コラーゲンプロモーターの下流に変異型MMP-2をもつ発現ベクターを作成した。In vitroでは十分な発現レベルを確認できなかったため、遺伝子欠損マウスへの強制発現を行うまでの条件を、十分に確立できなかった。

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
福士 純一 (FUKUSHI, Jun-ichi)

九州大学・大学院医学研究院・准教授  
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：

(4)研究協力者  
( )