

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth
神経系に発現する膜型マトリックスメタロプロテアーゼの解析

指導教官 清木元治教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 10 年 4 月 入学
医学博士課程
病因・病理学専攻
早下裕美

【背景】

中枢・末梢神経系の発生過程において、その特徴的な構造を作るためには、細胞とその周辺の細胞外基質 (ECM) との相互作用が重要であることが知られている。神経発生と神経系の発達において、細胞外基質と細胞表面に局在してそれを分解する分子は重要な役割をになっている。例えば神経芽細胞・神経膠細胞の分化・細胞の移動・成長や軸索のガイダンスなどである。さらに分化過程において、ECM と細胞膜表面の分子の相互作用は選択的なシナプス形成の過程に関与すると考えられている。神経の発生において基底膜成分の ECM が特に関与すると考えられるが、それぞれの分子の正確な役割は明らかではない。これまでにラミニンが神経細胞の移動と軸索伸長を促進することと、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどのプロテオグリカンは軸索伸長に抑制的に働くことが明らかにされている。

MMP(マトリックスメタロプロテアーゼ)は活性中心に Zn^{2+} を保持するエンドペプチダーゼであり、ほとんどの ECM 成分の分解を担っている。これまでに哺乳類では 21 種類がクローニングされ、そのドメイン構造より可溶型 MMP と膜型 MMP に分類される。膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMP) はそのファミリーとして MT1-MMP~MT6-MMP までが報告されている。可溶型 MMP が ECM 分解を組織の広い範囲で行うのに対し、MT-MMP は膜に局在していることから、細胞の増殖や移動、浸潤時に際して近接部位での ECM の分解において働いている。例えばもっとも研究の進んでいる MT1-MMP では悪性腫瘍の浸潤時、血管新生中の内皮細胞、胎児発生段階の間質細胞、骨組織、

創傷治癒の過程で発現しており、周辺の基質分解に関与していることが知られている。

MT5-MMP は MT-MMPs の中でも脳に限局的に発現している点で特異的である。また MT5-MMP がコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとヘパラン硫酸プロテオグリカン分解するが、ラミニンは分解しないという点は注目に値する。最近の研究で MT5-MMP がラットの神経系に主に発現することが示された。このことから MT5-MMP は神経系の働きと機能維持に特異的な役割を担っていることが示唆されたが、その詳細な解析はされていない。

今回、マウス発生段階における MT5-MMP の発現を免疫組織染色と *in situ* hybridization により調べた。MT5-MMP が胎児・成体ともに神経細胞特異的に発現していることを見出した。さらに *in vitro* での分化誘導系と後根神経節の初代分散培養を用いることによって神経細胞の軸索伸長にどのように関与するかについて研究を行った。

【結果】MT5-MMP が成体マウスにおいて発現している器官を明らかにするために、様々な組織のノザンブロットを行った。この結果、脳に特異的に発現していること、腎臓に弱い発現があることがわかった。さらに脳の発生段階においてどの時点からこの発現が開始するのか調べるために、胎生 14.5 日目～16.5 日までの全脳と、胎生 17.5 日～生後 30 日目までの大脳・小脳それぞれの RNA を抽出し、同様にノザンブロットを行った。この結果、大脳皮質形成期である胎生 14.5～生後まで MT5-MMP RNA の発現は増加し、それ以降減少した。これと対照的に、小脳での MT5 の発現は生後～2 週間までの小脳の形成時期に増加し、成体になってもその発現レベルは強いままであった。一方、大脳における MT5-MMP の発現量は生後では減少した。

ノザンブロットで MT5-MMP が脳に発現していることが明らかになったので、脳のどの部位で発現しているかを確認するために *in situ* hybridization、免疫組織染色を行った。胎生 15.5 日のマウス胎児で免疫組織染色を行ったところ、神経組織である脳・後根神経節・脊髄に発現を認めた。生後 14 日目の仔の全脳で同様に免疫組織染色を行ったところ嗅球から rostral tract にかけてと、海馬の歯状回、小脳のプルキンエ細胞と顆粒細胞に強い発現があった。生後 60 日の全脳で同様に免疫組織染色と *in situ* hybridization を行ったところ、生後 14 日と同様に小脳と海馬、嗅球に強い発現があった。免疫組織染色と *in situ* hybridization では同様の結果が得られた。また、小脳における MT5-MMP の発現は、Neurofilament と局在が同じであったが、グリア細胞マーカーである GFAP とは局在パターンを異にしていた。さらに成体の後根神経節でも MT5-MMP の発現が確認された。

MT5-MMP の免疫組織染色により小脳に強い発現があることから、小脳の発生段階における MT5-MMP の役割を明らかにするために、DQTM-gelatin を用いた *in situ* zymography による酵素活性の確認を行った。DQTM-gelatin はクエンチング基質であり、プロテアーゼによりゼラチンが分解されると蛍光を発することによりゼラチン分解活性を

観察出来る。生後 1 日目、9 日目、90 日目のマウスより小脳を単離し、凍結切片を作成、in situ zymography を行ったところ、小脳の migrating external cell layer にゼラチン分解活性を認めた。隣接切片の HE 染色と比較したところ、生後 90 日のマウス小脳ではプルキンエ細胞と顆粒細胞に強い分解活性があった。このゼラチン分解活性は MMP 阻害剤である BB-94 で抑制され、セリンプロテアーゼ阻害剤 (pefabloc) では抑制されなかった。これらの細胞は MT5-MMP を発現していることから本酵素のゼラチン分解への関与が推定された。

In vitro における神経細胞分化誘導系としてよく用いられている embryonic carcinoma P19 細胞が神経細胞に誘導をした時に MT1-MMP~MT5-MMP の発現がどのように変化するかを見た。P19 はレチノイン酸処理によりグリア細胞と神経細胞様に分化する。MT5-MMP が神経細胞のみに発現しているかどうかを見るために、分化誘導した P19 をさらに DNA 合成阻害剤である Ara-C で処理してグリア細胞を除き、神経細胞を多く含む分画を得た。それぞれから RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR により MT-MMPs と Neurofilament, GFAP の発現量の増減を見た。この結果、MT5-MMP は RA 処理により増加し、Ara-C 処理によってもその発現量は変化しなかった。一方、MT5-MMP と同様に脳に発現が見られる MT1-MMP は RA 処理により発現が増加したが、Ara-C 処理により発現が減少した。MT3-MMP は発現レベルは低いながら MT5-MMP と同様に Ara-C 処理による発現の減少は見られなかった。MT2-MMP, MT4-MMP は RA 処理、Ara-C 処理によって影響は受けなかった。

In vitro における分化誘導系で MT5-MMP は神経細胞に特異的に発現が上昇していることが示されたので、軸索伸長における MT5-MMP の役割を調べるために、マウス後根神経節のラミニン上での初代分散培養を行った。初代培養細胞においても、MT5-MMP の発現は Neurofilament を発現している細胞に観察され、特に細胞体と軸索、さらに成長円錐の先端に局在していることが確認された。これまでに HSPG や CSPG などのプロテオグリカンは軸索伸長に阻害的に働くとされているが、これらのプロテオグリカンを MT5-MMP のリコンビナント蛋白で処理するとラミニンを基質とした時と同じ程度まで軸索伸長は回復した。また、この効果は MMP 阻害剤である BB-94 の添加により抑制された。このことから MT5-MMP は軸索の伸長に阻害的に働くプロテオグリカンを分解することで軸索の伸長を促進する可能性が示唆された。

【結論】本研究により神経特異的に発現する MT5-MMP が、どのような発生段階で脳組織のどの細胞に発現しているかがタンパク質レベル、mRNA レベルで明らかになった。成体で MT5-MMP の強い発現が見られた部位は神経の可塑性があるとされる領域であり、MT5-MMP が可塑性の形成に何らかの関与をしている可能性も考えられる。また、小脳の発生においては移動中の顆粒細胞層に MT5-MMP が局在し、その同じ細胞層にゼラチン分解活性が確認されたことから、MT5-MMP が何らかの細胞外基質を切断して顆粒細

胞の移動を容易にしている可能性も考えられる。これまでに MT5-MMP は免疫組織染色によりラットの脳で発現していることと、その発生段階で大脳皮質と小脳のプルキンエ細胞と顆粒細胞層に発現していることが報告されていたが、その発現細胞が神経細胞に特異的であるのか、グリア細胞によるものであるか明らかではなかった。今回、P19 を用いた *in vitro* 分化誘導系で neurofilament, MT5-MMP, GFAP mRNA の発現量を解析したところ、MT5-MMP の発現は神経細胞に特異的なものであることが示された。マウス後根神経節の分散初代培養において neurofilament と MT5-MMP の免疫染色を行ったことにより MT5-MMP は neurofilament を発現している神経細胞に発現し、その発現は細胞体、軸索と成長円錐の先端に見られることが明らかになった。MT5-MMP の基質としては現在までに pro-MMP2, ヘパラン硫酸プロテオグリカン, コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどが報告されているが、軸索伸長阻害効果をもつとされているプロテオグリカンの基質上で培養を行ったところ、その阻害効果は MT5-MMP の添加により消失し、MT5-MMP がプロテオグリカンを切断することにより軸索伸長を促進する可能性が示唆された。MMP-2 はニワトリの後根神経節分散初代培養で MT5-MMP と同様に軸索と成長円錐の先端に発現することが報告されており、MT5-MMP が MMP-2 の活性化を行い、協同的に軸索伸長の際に働いている可能性もある。本研究は、これまでその発現部位と神経細胞における生理的役割が明らかでなかった MT5-MMP が神経細胞特異的に発現し、神経の軸索伸長を制御し、さらには神経のネットワーク形成に関与している可能性を明らかにした。