

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成12年度 博士課程進学

氏名 井上 敬一

指導教官名 小野寺 節

### 論文題目

Analyses of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2-deficient mouse  
(Matrix metalloproteinase(MMP)-2 欠損マウスの表現型解析)

Matrix metalloproteinase(MMP)は、20種類以上の遺伝子ファミリーからなる金属イオン依存性の細胞外マトリクス分解酵素であり、多くの生物種で同定されている。これまでの精力的な研究により、MMPによるタンパク質分解は、形態形成や損傷治癒、がんの転移・浸潤、リウマチなどの生理学的・病理学的に重要な生物学現象への関与が示唆されている。それゆえ、分子細胞レベルでMMPの機能を明らかにすることは、生命現象のさらなる理解に繋がるだけでなく、治療薬の開発にも貢献しうるものである。

MMP-2は1972年、リウマチ患者の滑液から初めてその存在が見い出された。コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなど、細胞外マトリクスの構成タンパク質を分解する。前駆体として細胞から分泌されたMMP-2は、細胞膜上でMembrane type1(MT1)-MMPにより活性化され、活性化MMP-2はTIMP-2(tissue inhibitor of metalloproteinases 2)によってその酵素活性を制御されることが*in vitro*の実験から明らかにされている。また、MMP-2の酵素活性は癌細胞の悪性度と比例することが報告され、抗癌剤開発の面からも大きな注目が注がれている。しかし一方で、MMP-2を欠損する変異マウスを作製した論文では、顕著な表現型を示さないとしており、生体内でのMMP-2の機能は不明の点が多い。近年脳の状態進行にMMPsが深く関わる可能性が示唆され、脳におけるMMPsの

機能解明が待たれている。そこで本研究では、MMP 遺伝子ファミリーのひとつである MMP-2 の脳病態時の機能を探ることを当初の目的として研究を開始した。

第1章 様々な脳における疾患において、MMP 群の発現上昇が近年報告されている。その中でも脳硬塞や脳出血患者において、MMP-2 が上昇していることが複数のグループから報告されている。脳病態進行時における MMP-2 の機能を検討するため、私は頭部凍結損傷モデルを用いて、損傷後の MMP-2 の動態をザイモグラフィにて解析した。その結果、MMP-2 は損傷後その活性が一過性に上昇し、6時間後にピークに達し、その後減少して行くことが明らかとなった。そこで、MMP-2 遺伝子欠損マウスに凍結損傷を施すことで、MMP-2 欠損による脳損傷への効果を検討した。その結果、MMP-2 欠損マウスでは、損傷30分、6時間、1日後のいずれの時点においても野生型マウスに比して有為にその損傷領域が軽度であった。これらの成績は、一見すると MMP-2 が脳の凍結損傷を亢進させることを示唆しているように見受けられた。しかし、本実験を行う過程において、私は MMP-2 欠損マウスの頭蓋骨に硬化と変形を見出した。この骨異常が本実験条件下における凍結損傷の差異を部分的に説明しうる。そこで以降、MMP-2 の骨形態形成における役割を解明するため、骨組織における異常の解析を行った。

第2章 これまでの様々な研究から、骨組織における MMP 群の発現は、骨芽細胞、破骨細胞の両細胞において確認されてきた。破骨細胞における MMP が骨基質の分解に関わっていることは容易に想像出来るが、骨芽細胞における MMP については *in vitro* の実験から、破骨細胞が石灰化骨を分解する前に、石灰化骨を覆う未石灰化骨を骨芽細胞由来の MMP 群が分解する（破骨細胞は未石灰化骨を分解出来ない）という仮説が立てられているに過ぎなかった。また近年 MMP-2 の遺伝子変異がヒトの遺伝性骨溶解症を引き起こすことが示唆され、MMP-2 と骨代謝の関連性が注目されている。これらのことを考慮に入れ、MMP-2 欠損マウスの骨組織における異常の解析を行った。摘出した頭蓋骨を比較したところ、縫合線の長さや個々の骨の大きさ等に違いが見られ、全体に横幅が広いことが明白となった。また全体に骨硬化の傾向が認められたため、骨密度を計測し定量化した。老齢マウス（1年齢前後）では MMP-2 欠損マウス

で明らかに骨密度の上昇が見られたが、5週齢のマウスでは逆に骨密度は減少していた。同時に下顎骨も測定したところ、下顎骨では週齢に関係なく MMP-2 欠損マウスで骨密度は有為に減少していた。頭蓋骨の変化はマウスの顔の外観にも影響を及ぼしており、MMP-2 欠損マウスでは短顔傾向が見られた。一方、興味深いことに、老齢マウスの全身の骨密度を計測したところ、MMP-2 欠損マウスは有為に骨密度の低下が観察された。このことは体重・体長における減少にも影響を及ぼしていると考えられる。7週齢マウスでも同様に全身性の骨密度低下が認められた。以上の結果から、MMP-2 欠損マウスは老齢の頭蓋冠では骨密度の上昇を示すが、それ以外の骨では骨密度の減少を示すことが明らかになった。

次に組織学的実験により、MMP-2 欠損マウスにおける骨の異常を検討した。4週齢と35週齢または60週齢のマウスを用いて、手部、足部、頭蓋冠の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。MMP-2 欠損マウスの手指の骨においては4週齢、60週齢ともに皮質骨の薄化が見られたが、60週齢の方がその程度が顕著であった。しかし、手根骨においては60週齢においても違いは見られなかった。同様の傾向は足部の骨でも見られた。一方、頭蓋冠では4週齢ではその厚さに違いは見られなかったが、35週齢では MMP-2 欠損マウスでは骨厚が野生型に比べ極端に増加していた。これらの結果から、老齢頭蓋冠における骨密度の上昇は骨量増加によるものであり、その他の骨における骨密度減少は皮質骨量の減少によるものであることが明らかになった。抗 MMP-2 抗体を用いて、MMP-2 蛋白質の骨組織における局在を調べた。その結果、大腿骨では MMP-2 は大きく分けて、2種類の局在が見られた。ひとつは、成長板の増殖軟骨層から石灰化軟骨層まで存在するものであり、軟骨基質にび漫性に存在した。もうひとつは海綿骨や皮質骨において存在するものであり、骨芽細胞周辺と骨細胞周辺に強く存在していた。一方、頭蓋冠においては縫合部の骨芽細胞に強く存在し、大腿骨と違い骨細胞周辺には全く存在しなかった。これらの結果は、MMP-2 の局在の差異が MMP-2 欠損マウスにおける頭蓋冠と体幹骨の表現型の差異の基礎であることを示唆している。

さらに MMP-2 欠損マウスの骨組織における異常の細胞・形態レベルでどのような異常が起こっているのかを比較するために骨形態計測解析を行った。7週齢と55週齢のマウスの頸骨海綿骨、大腿骨皮質骨、頭蓋冠前頭骨のそれぞれ非脱灰切片を作製し定量した。その結果、頸骨海綿骨では週齢に関係なく、

骨量、骨芽細胞の石灰化能・石灰化領域、破骨細胞の吸収能等、どのパラメータにも異常は見られなかった。大腿骨骨幹部皮質骨では55週齢のマウスにのみ、著しい骨量の低下と、骨内膜での骨形成上昇と骨吸収上昇、骨外膜での骨形成の低下が見られた。このことは皮質骨に骨細胞周辺に存在する MMP-2 の欠損により、骨量低下が起こっていることを示唆するものと考えられる。一方、頭蓋冠前頭骨における解析では、55週齢でのみ著しい骨量増加が見られ、骨芽細胞の石灰化能・石灰化領域ともに有為に上昇していた。さらに頭蓋冠由来の骨芽細胞を単離・培養し、その石灰化能を比較したところ、MMP-2 欠損マウス由来の骨芽細胞で、著しい石灰化の亢進が見られた。以上の成績から頭蓋冠では MMP-2 欠損により、骨芽細胞の機能亢進が生じると考えられる。

今回の研究の結果は、MMP-2 は頭蓋冠では骨芽細胞の増殖およびミネラル沈着能を抑制しており、その他の骨では骨細胞による骨量調節に関係していると考えられる。また、同時に頭蓋骨では、骨芽細胞由来 MMP-2 が骨吸収に先んじて起こる未石灰化骨の除去に関与している可能性も考えられる。頭蓋骨以外の骨において、MMP-2 は骨細胞周辺に存在し、MMP-2 欠損マウスでは荷重骨である下顎骨や体幹骨では骨量の低下を示すことから、骨細胞を介した骨量の調節に関わっていることを強く示唆する。骨に力学的負荷がかかると、骨細胞は骨細胞に沿って存在する骨細管を流れる体液の流動を感知して、骨量の調節に関与すると考えられている (Shear stress 仮説)。MMP-2 は骨細管の管径を、周りに存在するコラーゲン等を分解することで調節しているのではないかと考えられる。また頭蓋冠において、MMP-2 は何らかの基質分子を分解することで骨量を減少させていると考えられる。その中で FGFR1 は有力な候補である。in vitro の実験で MMP-2 が FGFR1 を分解しているという報告があること、また FGFR1 の活性型変異で起こる疾患である頭蓋縫合癒合症患者や、ヒト疾患と同じ FGFR1 変異を持った遺伝子組み換えマウスでは、MMP-2 欠損マウスと全く同様の頭蓋冠の異常を示す。MMP-2 欠損マウス頭蓋冠での異常は MMP-2 と FGFR1 の関連性を強く示唆している。本研究は MMP-2 と骨代謝の関係を直接的に示した初めての研究である。また MMP による骨細胞の骨量調節や骨芽細胞の石灰化能調節を初めて示唆した。単一分子がその局在により対極的役割を果すことを示した例は多くはなく、興味深い点である。MMP-2 欠損マウスは、骨粗鬆症や骨溶解症、頭蓋縫合癒合症などの骨疾患を研究していく上で、優れたモデル動物に成りうるものである。