

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井上 敬一

がんやリウマチの患者の病変組織で、細胞外マトリクスを分解する酵素である Matrix Metalloproteinase(MMP)-2 の発現が高まっていることは良く知られている。そのため、がん治療薬としていくつかの MMP 阻害剤が開発され、これまでに実際の患者で試されてきた。しかし、当初の期待とは裏腹に、予期していなかった副作用が強いことから、MMP 阻害剤のほとんどは現在開発中止となっている。これらはひとえに MMP-2 の生体内での機能が今だ充分理解されていないためであり、臨床的な観点から MMP-2 の生体内での機能を詳しく解明することは極めて重要な課題であると言える。しかし、数年前に作製された MMP-2 遺伝子欠損マウスに関して、これまでのところ重篤な表現型は報告されていない。

そこで、本研究においては MMP-2 の新たな機能を明らかにするため、MMP-2 欠損マウスを詳細に解析した。具体的には、1) 脳の病態時における MMP-2 の機能の検討、及び 2) MMP-2 欠損マウスの骨組織における形態異常の解析を行った。

第 1 章において、まず脳虚血や脳出血の実験モデルである頭部凍結損傷を野生型マウスに施し、傷害後の MMP-2 の挙動を調べた。その結果、MMP-2 は傷害後数時間でその発現が上昇することが明かとなった。さらに MMP-2 欠損マウスに傷害を施すことで、MMP-2 の効果を検討した。MMP-2 欠損マウスは野生型に比べ、その傷害の程度が軽度であったが、本実験を行う過程において、MMP-2 欠損マウスにおいて頭蓋骨の硬化と変形を見出した。そこで第 2 章では、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 章において、MMP-2 欠損マウスの骨組織における異常を詳細に解析した。MMP-2 欠損マウスは体長が短く、特徴的な顔付きをしており、その頭蓋骨は硬化していた。2重エネルギー X 線吸収法により、5~7週齢と約1年齢のマウスの体躯および頭蓋骨、下顎骨の骨密度を計測したところ、5~7週齢ではすべての骨組織において骨密度の低下が見られたのに対し、約1年齢の頭蓋骨でのみ骨密度の上昇が見られた。このことは個々の骨組織の由来により、骨密度の違いが現われている訳ではないことを示している。さらに指の基節骨と頭部の頭頂骨の脱灰切片を作製し、MMP-2 欠損マウスの骨組織における形態異常を調べた。その結果、基節骨では骨髄を取り囲む皮質骨部においてその薄化が見られ、逆に頭頂骨においてはその骨厚が増大していた。近年、特定の

家系の連鎖解析から、MMP-2 の欠損変異が遺伝性の骨粗鬆症として知られるヒトの多中心性骨溶解症を引き起こすことが報告されている。MMP-2 欠損マウスは低体長、特徴的な顔付き・頭蓋骨、全身性の骨密度低下、長骨皮質骨部の薄化を示しており、これらの表現型はヒト骨溶解症の症状と類似している。以上から MMP-2 欠損マウスはヒト骨溶解症の優れた動物モデルであると言える。

次に MMP-2 欠損マウスでどのような細胞レベルの異常が起こっているのかを調べるために骨形態計測と免疫組織化学を行い検討した。骨組織は骨芽細胞による骨造成と破骨細胞による骨吸収によりその形態が維持されている。骨形態計測は骨形態や骨芽細胞による骨形成能、破骨細胞による骨吸収能等を定量的に調べる方法である。7週齢と55週齢のマウスの頸骨海綿骨、大腿骨皮質骨、頭蓋骨前頭骨を用いて、それぞれの部位における骨形態計測を行った。海綿骨と皮質骨を構成する骨芽細胞、破骨細胞はそれぞれ同じ由来である。頸骨海綿骨の骨形態計測の結果、体幹骨の骨芽細胞・破骨細胞の機能は、7週齢、55週齢ともに正常であることがわかった。しかし一方、大腿骨皮質骨の骨形態計測の結果から、55週齢において、皮質骨量の著しい低下と、骨内膜側の骨形成・骨吸収の亢進、ならびに外骨膜側の骨形成の低下が明かとなった。頸骨海綿骨と大腿骨皮質骨の形態計測の結果から、体幹骨において皮質骨に多く存在し、骨形成・骨吸収を制御していると考えられている骨細胞の異常により、骨形成・吸収の不均衡が起こり、皮質骨の骨量の低下に繋がっていると考えられる。一方、頭蓋骨前頭骨の骨形態計測の結果から、頭蓋骨では55週齢 MMP-2 欠損マウスにおいて、著しい骨芽細胞の機能亢進が起こっており、それにより骨量の増大が起こると考えられる。このことから MMP-2 は頭蓋骨では骨芽細胞の増殖・分化に関係していると考えられる。またさらに抗 MMP-2 抗体を用いた免疫組織化学を行った結果、MMP-2 は体幹骨においては骨芽細胞と骨細胞に存在し、頭蓋骨においては骨芽細胞に存在することが明かとなった。骨形態計測と免疫組織化学の結果、体幹骨においては MMP-2 は骨細胞に主に存在し、骨量制御に関わっており、一方、頭蓋骨においては骨芽細胞に存在し、骨形成に抑制的に働いていることが示唆される。実際、頭蓋骨由来骨芽細胞を培養し、その石灰化能を比較すると、MMP-2 欠損マウス由来骨芽細胞では石灰化能の亢進が見られた。

本研究は体幹骨と頭蓋骨の骨形成維持機構の独立性を示唆し、かつ MMP-2 欠損マウスは骨溶解症の優れた動物モデルと成り得ることを示している。また、MMP-2 が単一分子で双方向性の機能を持つことも示している点でも極めてユニークである。さらに、本研究は骨細胞の機能不全による骨異常を示す初めてのマウスであり、これまでほとんど解析されて来なかった骨細胞の機能を分子レベルで解きあかす先駆けと成り得る研究であるといえよう。

したがって、審査員一同は、当論文内容が農学博士の資格を有するとの結論に達した。