

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation
and morphostatic maintenance of skeletal muscle
骨格筋組織の形態形成及び組織恒常性維持における膜型
マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) の機能解析
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 15 年 4 月入学
医学博士課程
病因・病理学専攻
大竹 洋平

骨格筋組織はヒト成人体重の約 30%を占める組織であり、個体の運動あるいは呼吸など生命活動の根幹において重要な機能を司る組織である。本研究においては骨格筋組織の形態形成及び組織恒常性維持において、膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) が重要であることを明らかとした。新規解明点として以下に示す 2 点を報告する。

1. 骨格筋の幹細胞である筋芽細胞から収縮能を持つ筋管細胞が形成される過程において MMP 活性が時期特異的に必要であること。同活性に MT1-MMP が関わること。
2. 個体レベルでの MT1-MMP の欠損が骨格筋組織において組織異常を誘起す

ること。

これらの事象に関わる分子である MT1-MMP は、細胞膜表面に存在する亜鉛イオン要求性のタンパク質分解酵素である。同分子はマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) と呼称される分子群に属しており、同分子群の主要な分解基質は細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) であることが知られている。ECM は多細胞生物の組織構築において細胞外成分として必須であり、複数種類の分子からなる高分子複合体である。本来生体内においてほぼ全ての細胞種が ECM に依存した細胞接着機構を用いており、細胞は *in vitro* 培養条件下においても ECM 分子を産生しそれらを培養皿上に分子複合体として沈着させ細胞接着に利用している。この様に細胞接着の基質となることは ECM 全般に共通した機能であるが、その構成成分は細胞や組織の状態に対応して様々に変化することが知られている。これは個々の ECM 分子が運動、形態変化、あるいは分化といった細胞機能をそれぞれ調製する働きを持つことと関連している。従って、既存分子を分解してこうした ECM 構成分子の変化を促すことが MMP の生理機能の一つであると考えられる。

上記 1 において述べた MT1-MMP の機能はこうした背景と関連していると考えられ、具体的には以下の知見が本研究において確認された。培養筋芽細胞株を用いた骨格筋分化培養系において、分化誘導後の細胞動態は (1) 細胞増殖 (2) 細胞の極性化と伸長 (3) 細胞融合による筋管細胞の形成といった 3 段階を経て進行した。増殖期、伸長期、融合期としたそれら各段階においては、

増殖及び分化マーカー分子の特異的発現パターンが認められた。MMP 阻害剤である BB94 を培養系に添加すると筋管細胞の形成が明瞭に阻害されたが、この阻害作用は同阻害剤を伸長期に添加した場合にのみ時期特異的に認められた。伸長期において発現上昇する MMP を探索すると、MT1-MMP 及び MMP-2 が確認された。特に MT1-MMP に注目し、その発現を RNA 干渉法により特異的に阻害すると、阻害剤添加と同様に筋管細胞の形成阻害が認められた。以上より、MT1-MMP の筋管細胞形成における必要性を結論した。

さらに付加的には筋分化培養系における MMP の分解基質の同定を試みた。前述の様に「分化に付随した ECM 成分の変化に MMP が関わる」という可能性から、文献的に筋分化に伴って減少する報告のある ECM としてフィブロネクチンに注目した。フィブロネクチンは生体内に普遍的に存在する ECM 分子であり、Integrin α 5 β 1 のリガンドとして間葉系細胞の接着に関わる分子である。伸長期において各種 MMP 阻害処理を行った培養群より細胞溶解液を調製し、特異抗体によるウエスタンブロット法にて検討したところ、確かに MMP 依存的にフィブロネクチンの分解が起こっていることが認められた。興味深いことには、筋管細胞形成がより阻害された処理群においてフィブロネクチン分解もより阻害されていることが明らかとなった。この相関関係からフィブロネクチンが MMP 下流で筋分化を制御する重要な役割を持つことが示唆された。

また MMP 阻害時に筋管細胞形成が抑制される機構に関して解析を進めたところ、これまでに報告の少ない特殊な阻害機構であることが明らかとなった。筋分化機構に関する一般的理解は、細胞系譜を単独で決定し得る強力な転写因子であるマスタージーンが存在し、同分子が以降の分化における全ての事象を

一元的に支配するといったものである。著名な分子として myoD を挙げれば、同分子の強制発現は線維芽細胞を筋芽細胞へと形質転換させ、最終的に分化特異的収縮タンパクの発現と筋管細胞への形態変化を誘導する。それに対して MMP 阻害時の細胞動態に注目すれば、分化特異的収縮タンパクの発現には変化が無く、筋管細胞への形態変化のみが抑制された。こうした形態分化特異的な阻害様式は文献的に ECM の糖鎖合成を阻害した場合と同等であった。従って、形態分化においてはマスターゲーンによる制御に加えて適切な ECM 環境が形成されることが必要であると考えられた。これまで関連研究分野の主要な報告がマスターゲーンもしくはその周辺分子に関するものであったことから、遺伝子発現変化としての分化と形態変化としての分化を区別すること無く筋分化研究が進んで来た経緯がある。本研究はそれらが独立して個々に特異的な制御を受けることを明瞭に示しており、関連研究分野において基礎的ではあるが重要な理解を確立するものと考えられる。

また上記2において述べた事象に関しても骨格筋組織における ECM の機能に基づいた理解が可能であると考えられる。生体内の成熟骨格筋組織においては、特に基底膜と呼称される超微細的な膜構造を持った ECM が筋線維に接して取り囲んでおり、筋線維の細胞接着の足場として利用されている。この基底膜の機能異常に基づく疾患として筋ジストロフィーがあるが、MT1-MMP 遺伝子欠損マウスにおいて認められた変化は筋線維の自然再生が認められるという点において同疾患に類似していた。

筋ジストロフィーの機序は、細胞接着の減弱により収縮という物理的ストレ

スに筋線維が耐えられなくなり壊死が起きるといったものであり、従って前述の基底膜の機能異常ばかりではなく、細胞接着分子の機能異常や細胞内骨格分子の機能異常もまた同様に病因となる。本研究においては、こうした細胞内外を結ぶ分子間相互作用に対して MT1-MMP が関与する可能性を考え、これを評価することとした。文献検索を行った結果、関連分子の中では細胞外基質であるラミニン-2 および細胞接着分子である α -dystroglycan が生体内において限定分解を受けているとの報告があり、かつこれらの分解における責任酵素は未同定であった。そこで MT1-MMP 欠損マウスの骨格筋より組織抽出液を調製し、各分子の分解状況を特異抗体によるウエスタンブロット法により評価すると、ラミニン-2 において MT1-MMP 依存的な分解を確認することが出来た。一方で α -dystroglycan の分解様式には差異が認められなかったため、以降はラミニン-2 に注目し詳細な解析を行うこととした。

ラミニン-2 はヘテロ 3 量体として構成される ECM 分子であるが、他の ECM 分子との相互作用部位および細胞膜上の細胞接着分子との相互作用部位の両者を併せ持ったサブユニットである α 鎖が、同分子において機能的に重要であると考えられている。そこで α 鎖のそれぞれ異なった部位を抗原として複数種類の抗血清を調製し、これらを用いて解析を行うことで分解部位を推定することを可能とした。遺伝子欠損マウスよりの組織抽出試料と合わせ、精製ラミニン-2 を組み替え MT1-MMP により生化学的に切断した試料を用いて評価を行うと、これらの試料における MT1-MMP 依存的切断部位は質的に同等であり、その切断箇所は α 鎖のアミノ末端に存在するドメイン VI の直近部位であると推定された。ドメイン VI は前述した他の ECM 分子との相互作用を担うドメインであり、か

つ同ドメインのみをスプライシング突然変異により部分欠損するマウス系統には筋ジストロフィーが発症することから、同ドメインの機能的重要性は文献的に明らかである。本研究においては MT1-MMP によるラミニン-2 の切断が、機能ドメイン周辺の分子構造を改変しうるものであることを示し、同機構の破綻が同酵素欠損状況下における組織異常に関連する可能性を考えた。

本研究により得られた知見を俯瞰すれば、「MT1-MMP は細胞が細胞外環境に随意化させるための手段である」と理解可能である。ECM 組成により規定される細胞外環境は細胞機能に影響を及ぼす機能単位であり、細胞は MT1-MMP を介してその組成を改変し特定の状況下における至適化を行っている。本研究では骨格筋組織を解析対象としたが、MT1-MMP の発現は他の多くの組織においても認められることから、この概念は一般化可能であろうと推定される。分化に伴った ECM 更新は一般的に認知される事象であることから、同分子が他組織での細胞分化に影響を及ぼす可能性も十分に想定される。また、ラミニン-2 との関係においては組織特異的な酵素基質関係を評価したが、こうした組織特異的 ECM 分子と MMP の関係性に関してはこれまでほぼ解析されておらず、関連研究分野における今後の課題である。以上より、本研究が MT1-MMP の分子研究ではなく、MT1-MMP を介した細胞と細胞外環境との相互作用に関する研究であることを各位にご理解頂きたい。