

論文の内容の要旨

論文題目 β -ガラクトシダーゼを利用した MT4-MMP/MMP-17 in vivo 発現の
効率的追跡システムを持つ遺伝子変換マウスの作製及びその解析

指導教員 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

力丸晃子

多細胞生物の組織の骨格は主に細胞及び細胞外基質(extracellular matrix; ECM)により構築されており、発生段階における組織構築、あるいは成熟固体における組織リモデリングの際にはこれらの ECM の再構成が必要である。マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)は活性中心に Zn^{2+} を有する ECM 分解酵素であり、この組織再構成において重要な役割を担っている。一方、MMP は、癌細胞の浸潤・転移の過程、関節炎、動脈硬化、神経疾患などのさまざまな病的な組織の再構成にも関与していることが知られており、治療上の標的分子として重要視されている。

膜型 MMP(MT-MMP)は現在のところ、6 種類(MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP, MT6-MMP)同定されている。それぞれ組織分布が異なるなどの特徴を有しているが、MT1-MMP 以外については、具体的な機能については不明な点が多い。

膜型 MMP4(membrane-type 4 matrix metalloproteinase, MT4-MMP/MMP-17)は、1996 年、Puenteらによりヒト乳がん細胞株から単離された膜型プロテアーゼとして報告された。当時、報告された cDNA はシグナルペプチド配列をコードしていない不完全長 cDNA だったが、1999 年、当研究室で、5'RACE(rapid amplification of cDNA ends)法を用いてシグナルペプチド配列を含む完全長 cDNA を単離することに成功し、これにより生化学的あるいは生理的機能の解析が可能となった。MT4-MMP は他の MT-MMP とは異なった性質をいくつか有していることが報告されている。まず、膜結合様式に関して、MT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMP、そして MT5-MMP が膜貫通領域と短い細胞質尾部を持つ I 型膜貫通型の膜タンパク質であるのに対し、MT4-MMP と MT6-MMP は glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) アンカー型の膜タンパク質である。

MT1-MMP の細胞内領域は細胞膜表面上から細胞内への取り込みの制御に関与していることが示唆されており、また、GPI アンカー型膜タンパク質は I 型膜タンパク質とは異なる局在制御を受ける可能性がある。また、アミノ酸配列の相同性に関して、MT4-MMP は、MT6-MMP 以外の MT-MMP とのアミノ酸配列の相同性は低く、触媒ドメインのみの組み換えタンパク質を用いた生化学的解析で他の MT-MMP で確認されている主要な細胞間基質である I 型コラーゲンなどの ECM 分解活性が認められないことが示されている。さらに、MT6-MMP 以外の MT-MMP 共通の特徴である潜在型 MMP-2 の活性化能も MT4-MMP の場合には見解が分かれている。これまでの報告では、MT4-MMP は a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs (ADAMTS)4 の活性化や TNF- α converting enzyme (TACE)様活性を示して pro-tumor necrosis factor- α (pro-TNF- α) のシェディングに関与することが生化学的解析により示唆されている。以上の理由から MT4-MMP は他の I 型膜結合性 MT-MMP とは異なる特徴を有している可能性が考えられる。

GPI アンカー型 MT-MMP の内で、ヒト *MT6-MMP* は白血球細胞に発現が限局しているのに対し、ヒト *MT4-MMP* は脳、卵巣、精巣、大腸など様々な臓器で mRNA の発現が報告されている。*MT4-MMP* の生体内における遺伝子発現量は、他の *MT-MMP* と比較して少ないため、組織中における発現細胞の同定は困難であった。

このことから、当研究では、*MT4-MMP* を同定し、生体レベルでの *MT4-MMP* の発現をモニターできるツールの確立を目指して *MT4-MMP* 遺伝子座に *NLS-LacZ* 遺伝子を挿入し、*MT4-MMP* プロモーター制御下に *LacZ* 遺伝子を発現させる遺伝子変換マウスを作製し、*NLS-LacZ* の発現を利用して組織中における *MT4-MMP* 遺伝子発現の分布及び発現細胞の同定を行うことを試みた。また、発現細胞における *MT4-MMP* 欠損の影響を調べることを目的とした。

本研究では、まず、*MT4-MMP* ゲノムの一部を β -ガラクトシダーゼ (*LacZ*) 遺伝子に置き換え、*MT4-MMP* プロモーター制御下で *LacZ* 遺伝子が発現するように設計した遺伝子変換マウスを作製した。ホモ接合型の *MT4-MMP* 欠失マウスはメンデルの法則に従って正常に生まれ、その成長速度、寿命、そして生殖能は野生型マウスと相違は見られず、分化・発生の過程では *MT4-MMP* の有無による違いは見られなかった。

しかしながら、作製した遺伝子変換マウスは、これまで限られが情報しかなかった *MT4-MMP* の細胞における発現を明らかにする貴重なマウスである。そこで、はじめに、野生型マウスにおける *MT4-MMP* の mRNA の組織発現量を定量 RCP で測定し、*MT4-MMP* の mRNA が睾丸を除いてホモ接合型マウスの *LacZ* の mRNA 発現量と相関していること、またその結果から、*MT4-MMP* の mRNA が発現する主要な組織は脳、肺、脾臓、腸管そして子宮であることがわかった。続いて、*MT4-MMP* 発現細胞は各組織における *LacZ* 活性を利用して *LacZ* 染色により *MT4-MMP* 発現細胞を同定することを試みた。

脳ではまず、IP-Western 法によって脳組織での *MT4-MMP* タンパク質の存在を確認した。野生型及びヘテロ接合体の脳組織では *MT4-MMP* のタンパク質が検出されたが、ホモ接合体においてはその発現が欠失していた。そして、*LacZ* の染色は運動野、感覚野、視覚野などの大

脳皮質、海馬、前嗅球核、嗅結節、線状体、黒質で強く確認されたことから、神経細胞出の発現が推測された。さらに LacZ 染色と抗ニューロフィラメント抗体による共染色や LacZ 染色で染色された細胞層を解析することにより、MT4-MMP は大脳において錐体細胞や顆粒細胞などの神経細胞で発現していることが同定された。

肺と子宮の LacZ 染色はそれぞれの平滑筋細胞層が強く染色され、MT4-MMP が平滑筋細胞で発現していることが推察された。子宮で LacZ 染色と抗 α -SMA 抗体により共染色を行ったところ、LacZ 染色された領域と α -SMA で染色された領域が一致した。また、腸管や血管の平滑筋においても平滑筋層が染色された。さらに、大脳組織など一部の組織を除いて MT4-MMP と α -SMA の mRNA の発現量が相関している。よって、MT4-MMP が平滑筋細胞で発現していることが示された。

肺の LacZ 染色像から、肺では MT4-MMP が平滑筋細胞のほか、組織マクロファージで発現していることが推察された。肺胞より回収した肺胞マクロファージが LacZ 染色とマクロファージ特異的抗体である F4/80 の染色で重染色され、脾臓においては平滑筋細胞がある細動脈に加え、マクロファージが存在している赤脾髄で LacZ の染色が見られた。さらに、腹腔から回収した腹腔マクロファージでも、肺胞マクロファージと同様に LacZ 染色と F4/80 による免疫染色の共染色により MT4-MMP が発現していることが示された。この肺胞マクロファージを利用してマクロファージの機能に MT4-MMP の欠失が影響を及ぼすかについて検討を行った。はじめに、蛍光ラテックスビーズを用いて腹腔マクロファージの貪食能を測定したが、MT4-MMP 欠損マクロファージの貪食能は野生型マクロファージの貪食能と違いはなかった。次に、LPS によって刺激を与えたところ、LPS 刺激後 8 時間で野生型マクロファージでの MT4-MMP 及び MT4-MMP 欠損マクロファージの LacZ それぞれの mRNA 発現量が一時的に発現が低下した。しかし、LPS 刺激によりマクロファージで産生され、放出される Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) の転写、放出には MT4-MMP の欠失の影響は見られなかった。また、炎症部位へのマクロファージ浸潤能への MT4-MMP の寄与を検討するために TPA 誘導耳炎症反応を行ったが、炎症部位に流入したマクロファージの数は MT4-MMP 欠失による変化は見られなかった。

以上の結果から、本研究では、作製した MT4-MMP 遺伝子変換マウスを利用して、MT4-MMP の発現細胞、神経細胞、平滑筋細胞及びマクロファージを同定することができた。マクロファージの機能についてさらに検討を加えたが、MT4-MMP の欠失によりマクロファージの貪食能、TNF- α の放出及び炎症部位への浸潤等の機能には影響を与えないことがわかった。しかし、本研究で作製した遺伝子変換マウスは、MT4-MMP の生体内における発現や生物学的機能について検討する上で重要なツールであり、このマウスを利用して病態モデルマウスと掛け合わせるなど、今後の MT4-MMP の機能解析に有用なマウスであると考えられる。