

論文の内容の要旨

論文題目 マクロファージにおける膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1 (MT1-MMP)の浸潤およびエネルギー産生制御機構の解析

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14年4月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

坂本 毅治

単球・マクロファージは炎症反応において非常に重要な役割を果たしている自然免疫系の細胞である。血流中から炎症部位に到達するために、単球・マクロファージは細胞外基質(ECM)のバリアを分解すると同時に、炎症部位近傍での低酸素環境下で運動に必要なエネルギーを産生しなければならない。ECMの分解にはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が重要な役割を果たしていることが研究されており、一方単球・マクロファージは運動のためのエネルギー産生に低酸素応答性転写因子Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)によって制御される嫌氣的解糖系を通常酸素分圧下でも利用していることがそれぞれ研究されている。しかし、この二つの局面がマクロファージが浸潤する際にどのように協調的に制御されているかはほとんど明らかになっていない。本研究では、マクロファージにおいて浸潤装置として知られている膜型プロテアーゼであるMT1-MMPが嫌氣的解糖系を介してATP産生を促進することを新たに見いだした。

まず、マウスを用いた炎症反応実験により、MT1-MMP欠損マウスでは野生型マウスに比べて炎症部位へのマクロファージの浸潤が低下していることが明らかとなった。マウス骨髄細胞由来のマクロファージを用いた実験により、MT1-MMP欠損マクロファージがプロテアーゼ活性が必要な再構成基底膜(マトリゲル)への浸潤能だけでなく、プロテアーゼ活性を必要としないケモカインMCP-1に対する運動能(ケモタキシス)にも異常を呈することが明らかとなった。さらなる解析の結果、

MT1-MMP欠損マクロファージの運動能低下の原因は、解糖系関連遺伝子の発現低下によるATP産生の低下であることが分かった。嫌氣的解糖系関連遺伝子の発現は転写因子HIF-1によって制御される。HIF-1はタンパク量による調節と転写共役因子との結合活性でその機能が制御されているので、MT1-MMP欠損マクロファージの核タンパク中のHIF-1のタンパク量およびHIF-1に結合している転写共役因子p300/CBPを測定した。その結果、HIF-1のタンパク量には異常がなく、p300/CBP結合量に低下がみられた。また、p300/CBPと結合するHIF-1 α のC末端転写活性ドメイン(CAD)の転写活性をHEK293細胞を用いたレポーターアッセイで解析したところ、MT1-MMPの細胞内領域(CP)依存的にCADの転写活性が上昇することが明らかとなった。CADの転写活性を抑制する因子としてfactor inhibiting HIF-1 (FIH-1)が知られているので、RNAiによりHEK293細胞のFIH-1の発現量を低下させたところ、MT1-MMPによるCADの活性化が見られなくなり、またMT1-MMP欠損マクロファージのFIH-1発現量をRNAiで低下させたところATP量が野生型と変わらなくなった。このことから、MT1-MMPによるHIF-1の活性化はFIH-1を介したものであることが明らかとなった。さらにpull-downアッセイによる解析の結果、MT1-MMPのCPがFIH-1と*in vitro*で直接結合し、レポーターアッセイでCADを活性化しないCP14 R/A変異体はFIH-1と結合しなかったことから、MT1-MMPのCPとFIH-1が結合することがHIF-1の活性化に必要である事が明らかとなった。続いてMT1-MMPによるFIH-1抑制のメカニズムを解明するため、Yeast-two-hybrid法および免疫沈降法を用いてFIH-1の新規結合因子のスクリーニングを行った。その結果、FIH-1の新規結合因子としてAPBA3/Mint3を同定した。Pull-downアッセイによりAPBA3のN末端領域がFIH-1と結合してFIH-1とHIF-1 α CADとの結合を競合的に阻害する事、またレポーターアッセイによりAPBA3がFIH-1存在下でHIF-1 α CADの転写活性を上昇させることが明らかとなり、APBA3がFIH-1の阻害因子であることが明らかとなった。そこでAPBA3をその機能に基づいてinhibitor of FIH-1 (iFIH)と呼ぶ事を提唱した。RNAiを用いた実験により、iFIHはMT1-MMPによるHIF-1 α CADの活性化およびマクロファージでのATP産生の促進に必須であることがわかり、またiFIHとMT1-MMPが協調的にHIF-1 α CADの活性化をするにはiFIHが膜画分に局在することが重要な事が明らかとなった。さらに免疫沈降実験の結果から、MT1-MMPがCP依存的にFIH-1とiFIHの複合体形成を促進することが明らかとなり、MT1-MMPによるHIF-1の活性化のメカニズムが明らかとなった。また、免疫細胞染色法による解析の結果、MT1-MMP欠損マクロファージではFIH-1は細胞質に一樣に存在したが、野生型マクロファージではFIH-1は核近傍に濃縮し、iFIHと共局在することが明らかとなり、この結果は免疫沈降での結果と合致するものであった。

以上の結果から、MT1-MMPというひとつの分子がECM分解と運動のためのエネルギー産生を協調的に制御することで浸潤という細胞機能を効率よく制御していることが明らかとなった。本研究ではMT1-MMPが細胞内領域依存的にFIH-1-iFIHの結合を促進することを明らかにしたが、この過程がどのように時空間的に制御されているか、他の分子との関係性も含めて今後解析を進める必要がある。また、MT1-MMPによるHIF-1 α の活性化がマクロファージのエネルギー産生の亢進以外

のどういった生命現象に結びつくかについても研究を進める必要がある。本研究により、少なくともマクロファージにおいては MT1-MMP が浸潤装置としてだけでなくエネルギー産生のスイッチとして使用されていることが新たに明らかとなった。MT1-MMP はマクロファージが関わるような炎症性疾患において新たな治療標的になるかもしれない。