

論文の内容の要旨

論文題目 生体内造血機構における MT1-MMP の機能解析

氏名 西田 知恵美

【背景と目的】

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)活性は、骨髄中の組織幹細胞および前駆細胞の末梢血中への細胞動員や、抗癌剤あるいは放射線照射後の造血組織再生において、その重要性が示唆されている。これまでの研究から、MMP は生体内で潜在酵素 Pro-MMP から血液線維素溶解系(線溶系)因子プラスミンによって活性化されることが報告されると共に、膜部らは生体内線溶系の亢進が MMP-9、MMP-2 の活性化及び造血因子 Kit-ligand (KitL)の膜型から可溶型への変換(プロセッシング)を介して骨髄組織再生を促進することを報告した。さらに、生体内の血管新生過程において血管内皮等に発現が増強することが知られる膜型 MMP (MT1-MMP) が、各種 MMP の活性制御因子として機能していることが示唆されている。現在までに MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-12 等、多くの各種可溶型 MMP の遺伝子欠損マウスが作製、解析されている。これらのマウスは発生や生殖機能にはほとんど変化が見られない。一方、Holmbeck らにより作製された MT1-MMP 遺伝子欠損 (MT1-MMP^{-/-})マウスは頭蓋骨異形成症、関節炎、骨減少症、軟組織の線維化などの症状を呈し、離乳前までに 33%、生後 3 か月以内にほぼすべてのマウスが致死となることが報告されている。

造血幹細胞は成体骨髄内において骨内膜表面の骨芽細胞性ニッチと類洞血管領域の血管性ニッ

チでその細胞周期に応じて維持されているとの仮説が提唱されている。骨芽細胞性ニッチでは造血幹細胞は静止期に留まることでその未熟性を維持し、自己複製に寄与しており、血管性ニッチでは幹細胞の細胞周期移行の開始を経て、造血系細胞への増殖や分化、末梢組織への細胞動員に関与するとの見方がある。また近年、生体内の造血幹細胞の量は骨組織によって構成されるニッチの量により規定されているとの仮説が提示された。MT1-MMP^{-/-} マウスでは骨組織の形成不全が報告されていることから、骨髓内の微小環境の異常により、何らかの造血機能障害を呈している可能性が示唆された。そこで本研究では、MT1-MMP^{-/-} マウスの解析を通じて、MT1-MMPの生体内造血における機能の解明、各種プロテアーゼ活性と造血系細胞の分化成熟機構との相互作用の詳細を明らかにすることを目的とした。

【結果と考察】

東京大学医科学研究所の清木教授の研究室で作製された MT1-MMP^{-/-} マウスは、先に報告されているマウスと同様に著しい骨化障害、血管新生障害を呈し、生後 2 週間ほどで致死となる。そこで、本研究では生後 2 週齢のマウスを用いた。MT1-MMP^{-/-} マウスの末梢血中の細胞数を調べたところ、白血球、赤血球数、血小板の血球三系統における有意な減少が確認された。また、骨髓細胞について造血系細胞の分化状況を解析したところ、野生型と比較して MT1-MMP^{-/-} マウスにおいて血球三系統に分化後の造血前駆細胞数では有意に減少していたのに対し、造血幹細胞レベルの未熟な細胞は顕著な差は見られなかった。つまり MT1-MMP^{-/-} マウスの骨髓では、三系統にコミットする以前の未熟な細胞の段階で、何らかの細胞分化成熟障害が起きていることを示唆された。

そこでより詳細に MT1-MMP^{-/-} マウスの末梢血における B 細胞、T 細胞の分化状況について解析したところ、野生型と比較して MT1-MMP^{-/-} マウスでは成熟細胞分画が著しく減少しており、細胞分化成熟障害が明らかとなった。B 細胞の最終分化については末梢リンパ組織の関与が必要となることから、MT1-MMP^{-/-} マウスの脾臓を精査したところ、脾臓自体の重量、細胞数の著しい減少を認めたほか、その細胞構成を解析したところ、pro-B 細胞分画の細胞の割合が、野生型と比較して MT1-MMP^{-/-} マウスにおいて相対的に増加する傾向にあることが確認された。同様に T 細胞の最終分化に携わる胸腺を精査したところ、胸腺組織の萎縮、細胞数の減少を認めたほか、MT1-MMP^{-/-} マウスでは CD4 および CD8 共陽性分画が減少していること、また CD4、

CD8 単陽性分画がともに増加していた。このことは、MT1-MMP の欠損が末梢組織への細胞の移動においても何らかの障害が生じている可能性を示唆している。

造血細胞の分化増殖は造血幹細胞とニッチとの相互作用により維持されている。そこで MT1-MMP -/- マウスにおける造血不全は造血幹細胞側における MT1-MMP 欠損に起因するものであるか、またはニッチ側に起因するものであるのかを精査した。野生型マウスへの MT1-MMP -/- マウスの骨髄細胞移植では細胞は正常に生着し分化増殖については野生型マウスの骨髄細胞を移植した群と差は見られなかった。また *in vitro* での共培養系によりニッチ側の MT1-MMP を欠損させ正常骨髄細胞を培養すると、分化、増殖が有意に抑制された。このことからニッチにおける MT1-MMP の発現が造血幹細胞の分化、成熟に重要であることが示唆された。

ストローマ細胞から分泌される液性因子もニッチの重要な構成要素であり、造血幹細胞の未分化性の維持や自己複製、各種造血細胞への分化を制御している。そこで、ストローマ細胞から産生される造血因子であり造血細胞の分化成熟に関与する Kit ligand (KitL)、造血細胞の分化成熟及び動員の制御因子であり、B 細胞の分化にも関与する stromal-cell derived factor-1 (SDF-1)、さらに T 細胞や B 細胞の初期分化に関与する Interleukin-7 (IL-7) の血中濃度について解析したところ、いずれも MT1-MMP -/- マウスで有意に減少していることが明らかとなった。これらは遺伝子の転写レベル及びタンパク質への翻訳レベルで調節されると考えられているおり、Heissig らにより骨髄内において KitL の産生は MMP-9 などにより制御されていることや、SDF-1 は各種 MMP により分解されることが報告されている。一方で、IL-7 については MMP による分泌調節機構は報告されておらず、遺伝子発現レベルでの調節機構の存在が示唆されたため、マウス骨髄細胞における各種造血因子の遺伝子発現について解析したところ、いずれも MT1-MMP -/- マウスにおいてその発現が減少していることが明らかとなった。

2009 年に MT1-MMP は自身のタンパク分解活性とは独立して、その細胞内領域で低酸素誘導因子 (HIF-1) 活性阻害物質 FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) と結合しており、MT1-MMP 欠損マクロファージにおいては FIH-1 が細胞内に遊離することにより HIF-1 活性が抑制され、これにより HIF-1 の下流に存在する糖代謝系の発現が抑制されることでマクロファージの活性が低下することが報告された。KitL、SDF-1、IL-7 は低酸素応答性配列を有しており、HIF-1 によりその発現が制御されている。MT1-MMP -/- マウスにおいて造血因子の発現異常が引き起こされるメカニズムを解明するため、ストローマ細胞株 MS-5 を用いて MT1-MMP 遺伝子発現抑制を行ったとこ

ろ、KitL、SDF-1、IL-7 いずれも遺伝子発現およびタンパク産生量が減少した。また、MT1-MMP 遺伝子発現抑制を行った MS-5 細胞 (MT1-MMPKD MS-5)の細胞質および膜分画のタンパク質を調整し、それぞれにおける FIH-1 局在を解析したところ、MT1-MMP KD MS-5 では FIH-1 は細胞内に多く局在することが明らかとなった。さらに、MT1-MMP および FIH-1 遺伝子を同時に発現抑制したところ、KitL、SDF-1、IL-7 のいずれも MT1-MMP 単独の発現抑制群に比較して有意にその遺伝子発現が回復し、MT1-MMP^{-/-}マウスの造血細胞分化障害は、ニッチにおける MT1-MMP 欠損による造血因子の発現低下に起因する可能性が示唆された。さらに、KitL または SDF-1 をマウスに投与した結果、これらを投与したマウスでは末梢血における白血球数、血小板数が有意に増加すること、またその数が野生型と同じレベルまで回復することが明らかとなり、造血細胞における MT1-MMP の発現は分化・増殖には重要ではなく、ニッチにおける MT1-MMP の発現が各種造血因子の産生・分泌に必須である可能性が示唆された。

以上より、本研究で、MT1-MMP^{-/-}マウスは造血因子およびケモカインの発現異常により造血細胞の分化増殖が抑制されていること、また MT1-MMP 欠損による造血因子やケモカイン遺伝子発現異常は、FIH-1 が細胞内へ遊離する結果 HIF-1 活性が阻害されることに起因していることが明らかとなった。さらに、MT1-MMP は骨髄中の造血系細胞の分化成熟、また他種 MMP の活性制御との関連から、骨髄由来細胞の末梢組織への移動に関与する因子であることが示唆された。本研究は MT1-MMP の骨髄造血、細胞分化及び細胞動員制御因子としての重要性を示唆したものであり、これにより生体内造血機構の新たな一面が明らかとなった。

