

## メタロプロテアーゼによる組織内微小環境因子代謝の作用 機構解明と制御

Functional analyses and regulation of the metabolism of tissue  
microenvironmental factors by metalloproteinases

岡田 保典 (OKADA YASUNORI)

慶應義塾大学・医学部・教授



### 研究の概要

MMP (matrix metalloproteinase) と ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) による組織内微小環境因子代謝機構解明と制御により、悪性腫瘍や非腫瘍性疾患に対する新規診断・治療法開発を目指して、多種類の MMP 分子精製法確立、創傷治癒での MMP 作用解析、ADAM28 の増殖・転移での役割解析と測定法開発、変形性関節症関節軟骨の破壊と再生機構の解明を行った。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：MMP、ADAM、ノックアウトマウス、浸潤、転移、変形性関節症、ヒアルロン酸、創傷治癒

### 1. 研究開始当初の背景

生体内における多彩な細胞機能は、細胞膜表面や細胞間に存在する細胞外マトリックスとそれに結合する生理活性物質（増殖因子、サイトカイン、ケモカインなど）からなる組織内微小環境によって厳密に規定されている。悪性腫瘍や炎症などの多くの疾患においては、組織内微小環境因子代謝異常を介して組織の増殖・破壊・改築が進行することから、腫瘍や非腫瘍性疾患における組織内微小環境因子代謝機構解明や制御は現代医学研究における重要な研究課題である。MMP (matrix metalloproteinase) と ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 分子は組織内微小環境因子代謝に関わっていることが研究代表者らの研究によって明らかとなっていった。これらのメタロプロテアーゼは生体内における細胞の増殖・接着・運動・浸潤などの生理的および病的な機能を規定し、その作用機構解明に基づく制御が種々の疾患の新規診断・治療法開発につながると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、MMP と ADAM 遺伝子ファミリーのうち、特に MMP-7、MMP-13、ADAMTS4、ADAM28 の各分子を中心にして、悪性腫瘍と非腫瘍性疾患での組織内微小環境因子代謝機構の解析・制御とそれらを標的とした診断・治療法開発の基礎研究を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1). 関節リウマチ滑膜細胞や腫瘍細胞株の培養液を材料として、カラムクロマトグラフィーで潜在型 MMP を精製した。また、肺線維症肺組織や肺胞洗浄液での MMP-7 を測定した。

(2). MMP-9, 13 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、皮膚創傷モデルを作製して炎症期、増殖期、リモデリング期の創傷を詳細に解析した。

(3). ADAM28 結合分子を酵母 two-hybrid system を用いてスクリーニングし、結合能、分解能、接着能を生化学的に解析した。また、ADAM28 に対する特異的モノクローナル抗体を用いて ELISA を作製し、ヒト肺癌患者血清での濃度を測定した。

(4). 変形性関節症関節軟骨細胞を培養し、高分子ヒアルロン酸の作用、ADAM12 と RECK の発現、増殖能、運動能を検討した。

### 4. これまでの成果

(1). 多種類の潜在型 MMP を効率よく精製できる方法を確立し、標準的な MMP 分子精製法として報告した。また、潜在型 MMP-7 と CD151 との相互作用による潜在型 MMP-7 の活性化を肺線維症肺組織において示した。

(2). MMP-9 KO マウスと MMP-13 KO マウスおよびこれらの両遺伝子を欠損させた KO マウスを用いて創傷治癒モデルを作製し、いずれのマウスでも創傷治癒が遅延することを明らかにし、欠損した表皮細胞の上皮化には MMP-9 と MMP-13 の両方

が必須であり、MMP-13 は肉芽組織での血管新生およびリモデリング期において潜在型 TGF- $\beta$  の活性化を通して筋線維芽細胞の増殖・分化に必要であることを証明した。

(3). ADAM28 は肺癌と乳癌で癌細胞特異的に高発現し、増殖因子代謝を通して癌細胞増殖に重要な役割を果たすことを報告してきた。また、ADAM28 結合分子として P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を同定し、ADAM28 は PSGL-1/P-selectin を介した細胞の血管内皮細胞への接着・遊走機能を亢進することを証明した。さらに、ADAM28 を肺癌患者血清中で測定できる ELISA 系の開発に成功し、本アッセイ法を用いて、血中 ADAM28 レベルが非小細胞性肺癌患者の病期、転移、再発のマーカーになることを示し、本アッセイが早期肺癌の診断に有効であることを示した。

(4). 変形性関節症関節軟骨のアグリカン分解には ADAMTS4 が中心的な役割を果たすことを示し、高分子ヒアルロン酸が ADAMTS4 の遺伝子発現を抑制する薬剤として有力なことを見出した。また、変形性関節症軟骨では、ADAM12 と RECK が特異的に高発現し、ADAM12 は IGFBP-5 を分解することにより IGF-I の作用を亢進させ、RECK は軟骨細胞の増殖促進と運動抑制に作用し、いずれも関節軟骨の再生を表すクローニングに関与することを証明した。

#### 5. 今後の計画

(1). MMP-13 KO マウスでのマウス前立腺癌細胞とメラノーマ細胞移植・転移モデルにおいて、肺間質や皮下組織での MMP-13 による組織内微小環境因子代謝の違いをケモカインや免疫反応の観点から詳細に解析し、そのメカニズムの解明を試みる。

(2). ADAM28 相互作用候補分子に関して、ADAM28 との結合能、分解能、相互作用による細胞・組織レベルでの作用を解析する。

(3). ADAM28 KO マウスの開発を進め、得られた KO マウスの表現型を病理学的に検討し、肺腺癌モデルと腹膜炎モデルを作製して、発癌・進展と炎症細胞浸潤における ADAM28 の作用を検討する。

(4). ADAMTS4 相互作用候補分子が得られた時点で、結合能と分解能、ADAMTS4 の活性の阻害・亢進の有無を検討し、候補分子の変形性関節症軟骨での発現を検討する。

(5). 変形性関節症関節軟骨のクローニングを *in vitro* で再現するアッセイ系において軟骨細胞の増殖と運動能に対する増殖因子代謝を検討し、軟骨組織再生における組織内微小環境因子代謝の意義を明らかにする。

#### 6. これまでの発表論文等

(1) Kimura T., Okada A., Yatabe T., Okubo M., Toyama Y., Noda M. and Okada Y.: RECK is up-regulated and involved in chondrocyte cloning in human

osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 2010, in press.

(2) Fujishima S., Shiomi T., Yamashita S., Yogo Y., Nakano Y., Inoue T., Nakamura M., Tasaka S., Hasegawa N., Aikawa N., Ishizaka A. and Okada Y.: Production and activation of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin-1) in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2010, in press.

(3) Yatabe T., Mochizuki S., Takizawa M., Chijiwa M., Okada A., Kimura T., Fujita Y., Matsumoto H., Toyama Y. and Okada Y.: Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 68:1051-1058, 2009.

(4) Mochizuki S. and Okada Y.: ADAM28 as a target for human cancers. *Curr. Pharm. Des.* 15:2349-2358, 2009.

(5) Hattori N., Mochizuki S., Kishi K., Nakajima T., Takaishi H., D'Armiento J. and Okada Y.: MMP-13 plays a role in migration, angiogenesis and contraction in mouse skin wound healing. *Am. J. Pathol.* 175:533-546, 2009.

(6) Okada A., Mochizuki S., Yatabe T., Kimura T., Shiomi T., Fujita Y., Matsumoto H., Sehara-Fujisawa A., Iwamoto Y. and Okada Y.: ADAM12 ( $\text{M}\epsilon\lambda\tau\text{p}\text{v}\alpha$ ) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor-binding protein-5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 58: 778-789, 2008.

(7) Imai, K. and Okada Y.: Purification of matrix metalloproteinases by column chromatography. *Nat Protoc.* 3:1111-1124, 2008.

(8) Mochizuki S. and Okada Y.: ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 98:621-628, 2007.

(9) Shimoda M., Hashimoto G., Mochizuki S., Ikeda E., Nagai N., Ishida S. and Okada Y.: Binding of ADAM28 to P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances P-selectin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 282: 25864-25874, 2007.

(10) 岡田保典:「組織内活性化制御機構解明に基づく血清 MMP-3 測定法の開発」にて、平成 22 年度文部科学大臣表彰 科学技術賞 (開発部門) 受賞

ホームページ等

<http://keio-okada-lab.jp/>