

骨吸収におけるmatrix metalloproteinase 9（92kDaゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ）－その性質と破骨細胞での局在に関する研究－

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: bone resorption, osteoclast, metalloproteinase, immunolocalization, giant cell tumor 作成者: 仲, 克巳 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8356

骨吸収における matrix metalloproteinase 9 (92k Da ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ)

—その性質と破骨細胞での局在に関する研究—

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

仲 克 巳

(平成3年9月13日受付)

Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9, 92kDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ) は最近その一次構造が決定された MMP 遺伝子ファミリーの新しいメンバーである。本研究では MMP-9 の石灰化骨基質分解への関与を証明する目的で、本酵素の性質と破骨細胞および骨巨細胞腫における免疫組織化学的局在を検討した。ヒト線維肉腫細胞から精製した MMP-9 は、酸可溶性 I 型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖アミノ基末端に存在する非ヘリックス部を特異的に分解する他、酸不溶性 I 型コラーゲンの不溶性重合体を可溶化した。また、III型とV型コラーゲン、I型ゼラチンおよびビトロネクテンも分解された。さらに、MMP-9 は脱灰骨組織中のコラーゲン線維を分解することが電顕的に確かめられた。MMP-9 のゼラチン分解活性は pH7.5-8.0 で最大を示すが、pH5.5-6.0 でも全活性の50-80%保持されていた。また、50mM と 100mM Ca^{++} 存在下でも90%の活性が認められた。フィブリル化した酸可溶性 I 型コラーゲンでは、 $\beta 1$, 2 鎖と $\alpha 2$ 鎖の分解は 100mM まで Ca^{++} 濃度依存性に亢進した。これらのデータは、骨吸収窩における酸性 (pH 4-5) かつ高カルシウム (40-50mM) の特殊な環境下でも MMP-9 が骨基質を分解し得ることを示している。合成ペプチドを抗原として作製したモノクローナル抗体をエリザ法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA 法)、イムノブロット法および免疫染色でスクリーニングし、潜在型 MMP-9 に対する2個の特異抗体 (57-13D8 と 56-2A4) を得た。56-2A4 を用いた免疫組織染色では、MMP-9 は慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 滑膜組織に浸潤した好中球やマクロファージの他、滑膜表層細胞に局在した。RA 関節軟骨・骨組織では、破骨細胞が強陽性に染色された。また、MMP-9 の破骨細胞における局在は正常モルモットおよび抗原誘導型関節炎組織において認められた。骨巨細胞腫では、検討した7症例全例で MMP-9 は巨細胞に局在し、腫瘍組織培養液中には分子量92,000のゼラチン分解活性をもつ潜在型 MMP-9 の存在がイムノブロット法とゼラチンサブストレートゲル法で証明された。さらに、これらの破骨細胞と骨巨細胞腫の巨細胞 (細胞膜) にはビトロネクテンリセプターの存在が免疫組織化学的に観察された。以上の所見から、破骨細胞や骨巨細胞腫で合成・分泌された MMP-9 は石灰化骨基質中の細胞外マトリックスの分解により骨吸収に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

Key words bone resorption, osteoclast, metalloproteinase, immunolocalization, giant cell tumor

骨代謝は骨形成と骨吸収の均衡の上に成り立っている。これらの不均衡により局所の骨溶解をきたす代表的疾患として、慢性関節リウマチ (rheumatoid

arthritis, RA) や原発性および転移性骨腫瘍があげられる。また、全身性疾患として骨粗鬆症が知られている。石灰化骨と未石灰化骨すなわち類骨ではその吸収

Abbreviations: ABC, avidin-biotin peroxidase complex; aBSA, amidated bovine serum albumin; APMA, p-aminophenylmercuric acetate; EDTA, ethylene-diaminetetraacetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; MMP, matrix metalloproteinase; PAGE,

機序は異なると推定されている。類骨の吸収には、骨基質の産生細胞である骨芽細胞そのものが matrix metalloproteinase 1 (MMP-1, コラゲナーゼ) を産生し¹⁾、その作用により類骨中のコラーゲンを分解すると考えられている。一方、石灰化骨の吸収は破骨細胞によってのみ可能で、その吸収は脱灰のプロセスと蛋白分解酵素による骨基質の分解という2段階で進行する²⁰⁾。石灰化した骨基質中へは水分子が入れないことから、脱灰のプロセスは蛋白分解酵素による骨基質の分解に必須である。破骨細胞は石灰化骨に接着後、細胞内で合成した H⁺ をプロトンポンプの作用により細胞直下の骨吸収窩へと放出し脱灰を行なう⁹⁾。従って、骨吸収窩は酸性 (pH4-5) かつ高カルシウム (40-50mM) の特殊な環境²¹⁻²³⁾ からなり、酸性領域で強い活性を示すカテプシン B や L で骨コラーゲンが分解されると考えられている^{23,26)}。実際、カテプシン B と L は骨組織のホモジネート中に存在することが報告されている²⁾。また、石灰化骨基質中には骨芽細胞に由来する潜在型 MMP-1 が局在し⁷⁾、カテプシン B による活性化後に骨コラーゲンを分解する可能性が指摘されている⁸⁾。しかし、破骨細胞はこれまで MMP₉ を産生するという報告は全くなく、MMP-1 以外の MMP₉ が石灰化骨基質の分解に関与するとの報告も認められない。

本研究では、MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ) に対するモノクローナル抗体を作製し、本酵素の RA 関節組織、抗原誘導型関節炎組織および骨巨細胞腫における免疫組織化学的局在を検索するとともに、MMP-9 の骨基質分解能を調べ骨吸収における本酵素の役割について検討した。

材料および方法

I. 潜在型 MMP-9 の精製

潜在型 MMP-9 は五之治⁹⁾の方法に従って精製した。腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor α , TNF α) (100u/ml) で刺激したヒト線維肉腫 (HT1080) 細胞培養液を材料とし、DEAE-セルロース, Green A Dyematrex ゲル, ゼラチンセファロース, 抗 (MMP-1) IgG セファロース, 抗 (TIMP) IgG セファロースの各カラムクロマトグラフィーを用いて潜在型 MMP-9 を単一標品として精製した。

II. 基質特異性の検討

潜在型 MMP-9 を 1.0mM p-aminophenylmersuric

acetate (APMA) 処理 (37°C, 24時間) で活性化し、種々の温度 (27-37°C) でモルモット皮膚由来 I 型ゼラチン, モルモット皮膚由来酸可溶性 I 型コラーゲン, 牛アキレス腱由来酸不溶性 I 型コラーゲン (シグマ社, セントルイス, アメリカ), ヒト胎盤由来 V 型コラーゲンおよびビトロネクチンとインキュベートした。反応後、それらの分解産物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) にて分析した。酸可溶性 I 型コラーゲンは Glimcher ら¹⁰⁾の方法にて精製した。ゼラチンはその I 型コラーゲンを熱変性 (60°C, 30分間) して作製した。また、V 型コラーゲンとビトロネクチンは源 利成博士 (本学がん研究所, 外科) と Dahlback 博士 (ルンド大学, スウェーデン) より恵与された。なお、酸不溶性 I 型コラーゲンは 25% グリセロール/0.35% 酢酸溶液中でホモジナイザーにて懸濁後、中性緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.4/0.15M NaCl/0.02% NaN₃) に透析して用いた。

III. MMP-9 活性に対する Ca²⁺ の影響

1. ゼラチン分解活性の測定

酸可溶性 I 型コラーゲンを Gisslow ら¹¹⁾の方法により ¹⁴C-無水酢酸 (Amersham, 東京) で標識し、熱変性 (60°C, 30分間処理) によりゼラチン化した。これを基質として Harris ら¹²⁾の方法にしたがってゼラチン分解活性をアッセイした。

Ca²⁺ の影響を検討する目的で、活性型 MMP-9 のゼラチン分解活性を種々の濃度 (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500mM) の塩化カルシウム存在下でアッセイした。また、10mM と 50mM 塩化カルシウム存在下で、潜在型 MMP-9 を 1.0mM APMA とインキュベートすることにより活性化を検討した。MMP-9 を溶解した緩衝液から Ca²⁺ を除去するにあたっては Ca²⁺ を含まない緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH7.5/0.15M NaCl/0.02% NaN₃/0.05% Brij35) で平衡化した Sephadex G 10 を充填したスピンカラム¹³⁾で行った。

2. コラーゲン分解活性

酸可溶性 I 型コラーゲンを活性型 MMP-9 と 10, 50, 100mM の塩化カルシウム存在下でインキュベートし、その分解産物を還元状態で SDS-PAGE にて分析した。また、フィブリル形成処理 (35°C, 4時間) した酸可溶性 I 型コラーゲンについても同様な方法で検討した。さらに、酸不溶性 I 型コラーゲンについても

上記と同様な方法で分解活性を調べた。

IV. 脱灰骨の電子顕微鏡的観察

部検により得られた正常腰椎椎体骨 (59才, 女性と 28才, 男性) を細切し, 0.25M アンモニア水30分処理後, 0.5M ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) にて 4°C 48時間脱灰した。次いで緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH7.4/0.15M NaCl/10mM CaCl₂/0.05% Brij35/0.02% NaN₃) で十分洗浄後, MMP-9 (8.6 μg) あるいは緩衝液と 37°C 24時間反応し, グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで二重固定した。試料を脱水, エポン包埋し, 超薄切片を酢酸ウラニールと硝酸鉛および 0.1% リンタングステン酸染色を施し, 電子顕微鏡 H-500 (日立, 東京) にて観察した。

V. 抗 MMP-9 抗体の特異性

潜在型 MMP-9 のアミノ酸配列¹⁴⁾から他の MMP_s と相同性の少ないアミノ基末端部とカルボキシル基末端部に対するペプチドを合成し, それらを抗原としてモノクローナル抗体を作製した (金沢大学医療技術短期大学部 岡田保典助教授と富士薬品工業 岩田和士博士との共同研究)。合成ペプチドを抗原とした ELISA 法で陽性を示したクローンをさらにイムノプロット法と免疫組織染色で再スクリーニングした。

1. イムノプロット法

HT1080 細胞より精製された潜在型 MMP-9 (分子量 92,000) と同細胞培養液を 7.5% ポリアクリルアミドゲルに電気泳動後, 蛋白をニトロセルロース膜に転写した。次いでニトロセルロース膜を MMP-9 に対するモノクローナル抗体とビオチン化抗マウス IgG 抗体と反応させ, アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC 法) で発色した。

2. HT1080 細胞に対する酵素抗体法

ティッシュテック・カルチャー・チェンバー/スライド上で培養した HT1080 細胞を Hembry ら¹⁵⁾の方法に従い 2 μM モネンシンで 3時間処理後, periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定液で 4°C 15~18時間固定した。対照としてモネンシン未処理材料を用いて同様の固定を行なった。細胞は 0.5% Triton X で 5分間処理後, リン酸緩衝溶液で十分洗浄し, 抗 MMP-9 モノクローナル抗体と室温で 1時間反応後, ABC 法で免疫染色した。

3. 潜在型 MMP-9 の活性化と酵素活性に対する阻害試験

潜在型 MMP-9 を 2mM diisopropyl fluorophosphate 処理した抗 MMP-9 モノクローナル抗体 (57-13D8 および 56-2A4) と 37°C で 1時間反応後, 1.0mM

APMA と 37°C, 24時間反応し, ゼラチン分解活性を ¹⁴C-ゼラチンを用いてアッセイした。また, 活性型 MMP-9 を同モノクローナル抗体と 37°C 1時間処理後さらに室温 1時間反応し, ゼラチン分解活性を同様に測定した。

VI. 慢性関節リウマチ関節組織と骨巨細胞腫における MMP-9 の局在

13例の RA 患者より人工関節置換術時に関節滑膜と関節軟骨を採取した。採取した組織を厚さ約 2-3mm に細切して 2 μM モネンシンで 37°C 3時間処理し, PLP 固定液で 4°C 15~18時間固定した。次いで, 骨を含む材料については 0.5M EDTA で 48時間脱灰後, これらをパラフィン包埋した。正常関節組織については, 大腿骨頸部骨折や悪性骨腫瘍に対する人工関節置換術時に得られた材料を同様の方法で処理しパラフィン包埋した。これらのパラフィン切片につき過酸化水素での内因性ペルオキシダーゼのブロック後, 正常ウマ血清で非特異的反応を阻止し, 抗 MMP-9 抗体と 1時間室温で反応させた。次いで, ウマービオチン化抗マウス IgG 抗体と反応させ, ストレプトアビジンと 30分反応させた後, ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) 反応液 (0.05M Tris-HCl, pH8.0/0.03% DAB/1% H₂O₂) で発色させた。これらの試料については, MMP-1, 2, 3 に対する特異抗体^{16), 18)} (金沢大学医療技術短期大学部 岡田保典助教授提供) を用いて同様に免疫染色した。対照として, 正常マウス IgG を用いて同様に免疫染色した。また, モネンシン処理した 7例の骨巨細胞腫組織につき, 同様の方法で MMP-9 と MMP-1, 2, 3 の局在を酵素抗体法で検討した。骨巨細胞腫の一部の材料では試料を未固定のまま Tissue-Tek O. C. T. compound に包埋し凍結切片を作製した。凍結切片につき, マウス抗 MMP-9 IgG と fluorescein isothiocyanate で標識した抗マウス IgG 抗体を用いて蛍光抗体間接法で局在を調べた。さらに骨巨細胞腫組織を 0.2% ラクトアルブミンを含む RPMI-1640 培養液で 24時間培養し, 培養液中の MMP-9 の存在を 57-13D8 と 56-2A4 を用いてイムノプロット法で検討した。また, Hibbs ら¹⁹⁾の方法に従って同培養液を非還元状態でゼラチンサブストレートゲルに電気泳動し, ゼラチン分解パターンを検討した。

VII. アミド化牛血清アルブミン誘導型関節炎の作製

Yamashita ら²⁰⁾の方法に従ってアミド化牛血清アルブミン (amidated bovine serum albumin, aBSA) を抗原として幼若モルモット (ハートレー系, メス, 200~300g) を免疫し, 両側膝関節腔内に aBSA

(0.5mg) を注入して関節炎を誘導した。関節炎誘導 4 日, 1 週, 2 週後の膝関節を矢状断し, $2 \mu\text{M}$ モネンシンで 37°C 3 時間処理した。また, 対照として正常幼若モルモット膝関節を同様に処理した。これらの材料を PLP 固定後, EDTA で脱灰しパラフィン包埋した。パラフィン切片につき上述の方法で MMP-9 の局在を検討した。

VIII. ビトロネクチンレセプターの局在

破骨細胞を含む RA 関節軟骨組織, 正常モルモット及び aBSA 誘導型関節炎膝関節組織および骨巨細胞腫のパラフィン切片につき, ウサギ抗ビトロネクチンレセプター ($\alpha\text{V}\beta 3$) 抗体を用いて上述の酵素抗体法でこの局在を検討した。また, 骨巨細胞腫については凍結切片につき, 蛍光抗体間接法でも局在を調べた。なお, 抗ビトロネクチンレセプター抗体は Vogel 博士

(スクリプト癌研究所, アメリカ) より提供を受けた。

成 績

I. MMP-9 の性質

1. MMP-9 の基質特異性

本酵素の基質特異性については五之治⁹⁾が既に報告している。そこで, 本研究では更に骨に存在する種々の細胞外マトリックスに対する MMP-9 の作用を検討した。

活性型 MMP-9 は酸可溶性 I 型コラーゲンの $\beta 1, 2$ 鎖を特異的に分解し, $\alpha 2$ 鎖も分子量が約 3,000 低分子化することが SDS-PAGE 上観察された。牛アキレス腱由来酸不溶性 I 型コラーゲンでは, $\beta 1, 2$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖の分解の他, α 鎖の架橋により高分子化した不溶性重合体を分解した (図 1 A)。また, MMP-9 は

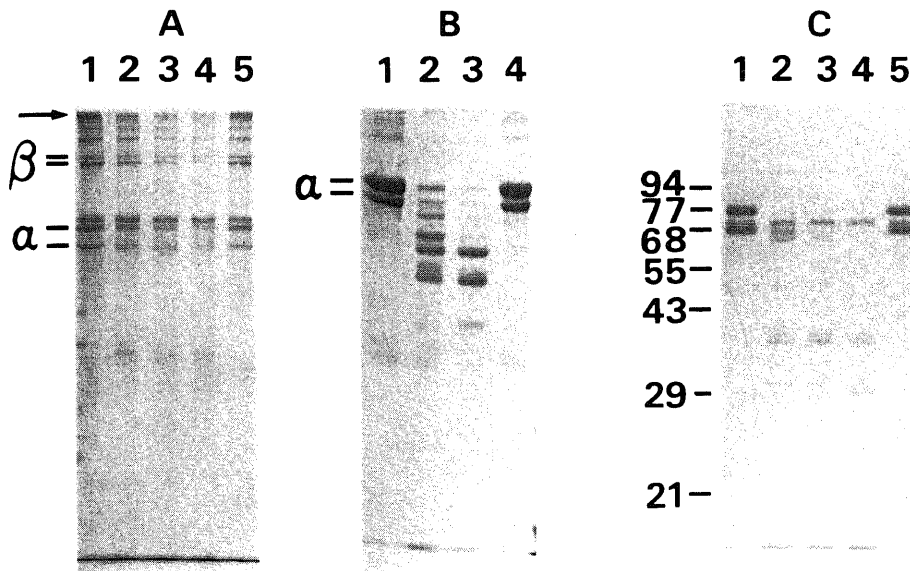


Fig. 1. Digestion of acid insoluble type I collagen, type V collagen and vitronectin with MMP-9. (A) The insoluble collagen ($\sim 200 \mu\text{g}$) was incubated with MMP-9 (860 ng) at 37°C . After terminating the reaction with 10 mM EDTA, the degradation products were analyzed on SDS-PAGE (7.5% total acrylamide) under the reducing conditions. Lanes 1 and 5, the substrate incubated with buffer alone for 0 and 24 hr, respectively. Lanes 2-4, the substrate incubated with MMP-9 for 2, 8 and 24 hr, respectively. Arrow indicates the insoluble polymers. α and β , α and β chains of type I collagen. (B) Type V collagen ($15 \mu\text{g}$) was reacted with MMP-9 (600 ng) at 32°C and the products were run on SDS-PAGE (7.5% total acrylamide) as described in Fig. 1A. Lanes 1 and 4, the substrate incubated with buffer alone for 0 and 24 hr, respectively. Lanes 2 and 3, incubation with MMP-9 for 8 and 24 hr, respectively. α , α chain of type V collagen. (C) Vitronectin ($8 \mu\text{g}$) was incubated with MMP-9 (600 ng) at 37°C and the products were subjected to SDS-PAGE (10% total acrylamide). Lanes 1 and 5, incubation with buffer alone for 0 and 24 hr, respectively. Lanes 2-4, incubation with MMP-9 for 4, 8 and 24 hr, respectively.

V型コラーゲン分解能を有し、 α 、 β 鎖とも分子量92,000-29,000の多数のフラグメントに分解された(図1B)。I型ゼラチンは α 1鎖と α 2鎖が同じ割合で完全に分解された。更に、ビトロネグチンは分子量75,000と68,000の2本のバンドとして泳動されるが、MMP-9はこれらを数本の低分子フラグメントに分解した(図1C)。

2. MMP-9の至適pH

活性型MMP-9を0.2M酢酸ナトリウム/酢酸(pH3.4-5.8)、0.2M MOPS/水酸化ナトリウム(pH5.8-8.3)、0.2M 2-amino-2-methylpropane-1,3-diol/塩酸(pH7.7-9.6)、0.2Mグリシン/水酸化ナトリウム(pH7.9-10.2)の各緩衝液とインキュベートし、種々のpHにおけるゼラチン分解活性を37°C、1時間アッセイすることにより測定した。図2に示すようにpH7.5-8.0で最大の活性を認めた。しかし、pH5.5-6.0でも約50-80%の活性をもち、MMP-9は酸性領域でも十分活性を有することが示された。

3. MMP-9活性に対するCa²⁺の影響

MMP-9のゼラチン分解活性を種々の濃度の塩化カ

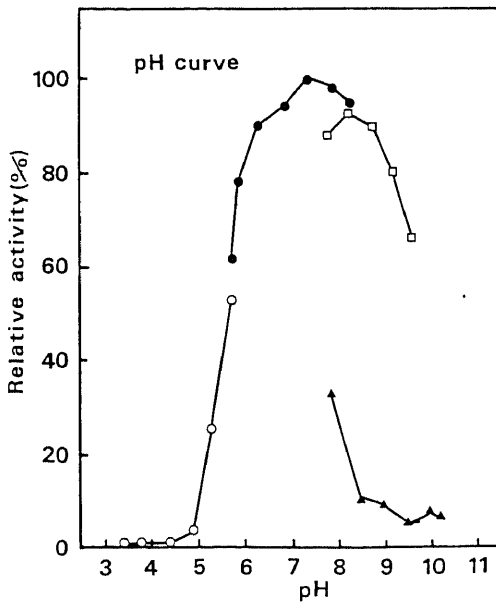


Fig. 2. pH curve of MMP-9. The enzymic activity of MMP-9 was measured against ¹⁴C-gelatin at various pH. The buffers used were 0.2 M sodium acetate (○), Mops (●), 2-amino-2-methylpropane-1, 3-diol/HCl (□) and glycine/NaOH (▲). Activity achieved by the incubation of proMMP-9 with 1.0 mM aminophenylmercuric acetate for 24 hr at 37°C was taken as 100% activity.

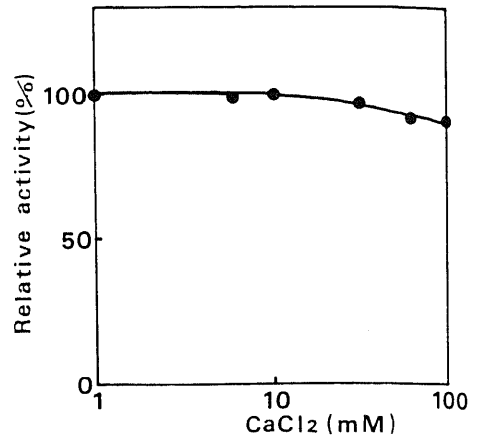


Fig. 3. Effect of Ca²⁺ on the gelatinolytic activity of MMP-9. The enzymic activity of MMP-9 was measured against ¹⁴C-gelatin at various concentrations of Ca²⁺ in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15 M NaCl/0.05% Brij 35/0.02% NaN₃.

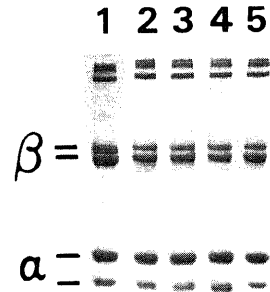


Fig. 4. Influence of Ca²⁺ on the digestion of acid soluble type I collagen with MMP-9. Type I collagen (18 μg) was first incubated at 35°C for 4 hr make fibrils and then incubated with MMP-9 (860 ng) at 37°C for 6 hr in the presence of 10 mM (lane 2), 50 mM (lane 3) and 100 mM CaCl₂ (lane 4). Lanes 1 and 5, incubation with the buffer containing 10 mM CaCl₂ for 0 and 6 hr, respectively.

ルシウム存在下でアッセイにより測定した。結果は図3に示すように、50mMと100mMの濃度においても90%のゼラチン分解活性がみられた。また、APMAによる潜在型MMP-9の活性化は10mMと50mM Ca^{++} 存在下で差異はなかった。酸可溶性I型コラー

ゲンを溶液状態で10、50、100mM塩化カルシウム存在下でMMP-9とインキュベートしても、その分解産物に差異は認められなかった。しかし、フィブリル化した酸可溶性I型コラーゲンを同様の方法でインキュベートすると、 $\beta 1$ 、 2 鎖と $\alpha 2$ 鎖の分解は塩化カル



Fig. 5. Degradation of collagen fibers in demineralized bone. Decalcified bone with 0.5 M EDTA, pH 7.4 was incubated with MMP-9 (8.6 μ g) (A) or buffer alone (B) at 37°C for 24 hr and then fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide. The sections were stained with lead nitrate, uranyl acetate and phosphotungstic acid. Note dissociation of the collagen fibrils and irregular clefts of the fibrils in cross section (arrows) (A). $\times 45,000$.

シウムの濃度依存性に亢進した (図 4). 酸不溶性 I 型コラーゲンに対しては, 塩化カルシウムの影響は明らかではなかった.

4. MMP-9 による骨コラーゲン線維の分解

脱灰骨を MMP-9 で処理後電子顕微鏡的に観察すると, 骨のコラーゲン線維に分解像がみられた. コラーゲン線維は, 縦断面では膨化と横紋の不明瞭化を示し, 長軸に対して斜走する裂隙がしばしば認められた. このようなコラーゲン線維は, 横断面では辺縁部が裂隙形成により虫食い状となっていた (図 5 A). 一方, 緩衝液のみとインキュベートした脱灰骨ではコラーゲン線維の分解像は認められなかった (図 5 B).

II. MMP-9 の局在

1. 抗 MMP-9 モノクローナル抗体の特異性

抗原として使用した合成ペプチドを用いた ELISA 法では, 合計42個のモノクローナル抗体が陽性を示した. これらの抗体をイムノブロット法でさらにスクリーニングした結果, 潜在型 MMP-9 のアミノ基末端

とカルボキシル基末端の各ドメインを特異的に認識するそれぞれ 57-13D8, 56-2A4 の 2 個の抗体が得られた. 図 6 に示すように, これらの抗体は精製した潜在型 MMP-9 (分子量92,000) と反応するのみならず, HT1080 細胞培養液中に存在する多数の蛋白バンドのうち分子量92,000の潜在型 MMP-9 を特異的に認識した.

これらの抗 MMP-9 抗体を用いてスライドガラス上で培養した HT1080 細胞を免疫染色すると, クローン 56-2A4 のみが陽性所見を示した. また, HT1080 細胞を $2 \mu\text{M}$ モネンシンで 3 時間処理後免疫染色すると, その染色性は軽度増強した.

一方, これらの 2 個の抗体は MMP-9 活性や潜在型 MMP-9 の APMA による活性化を阻害しなかった.

2. MMP-9 の免疫組織化学的局在

1) RA および正常関節組織における局在

関節滑膜組織は表層細胞層と表層細胞下層から構成されている. RA 滑膜では表層細胞は過形成となり, 表層細胞下層ではリンパ球, 形質細胞, 好中球やマクロファージの浸潤のほか線維芽細胞や血管の増生が認められた. また, 一部の材料では表層細胞は剝離しフィブリン沈着とともにマクロファージの浸潤を伴う肉芽組織の形成がみられた. クローン 56-2A4 を用いた免疫染色では, MMP-9 は RA 滑膜中に浸潤したマクロファージと好中球のほか, 69% の症例 (9/13 症例) で表層細胞も陽性に染色された (図 7 A). また, RA 関節軟骨・骨組織では少数の軟骨細胞に軽度の染色がみられたのに対し, 軟骨下骨の破骨細胞は強陽性を示した (図 7 B). 一方, これらの破骨細胞は MMP-1, 2, 3 に対する抗体や正常 IgG を用いた免疫染色では陰性であった.

正常滑膜組織では炎症細胞浸潤や表層細胞の過形成はみられず, MMP-9 の局在は観察されなかった. また, 正常関節軟骨細胞も MMP-9 は陰性であり, 軟骨下骨においては破骨細胞は認められず MMP-9 陽性細胞は観察されなかった.

2) 骨巨細胞腫における局在

7 例の骨巨細胞腫につき MMP-9 の局在を検討した. これらの症例のうち 1 例は grade 3 で他は grade 1 の骨巨細胞腫であった. MMP-9 はすべての症例で巨細胞に強く染色された (図 8). 一方, MMP-1, 2, 3 は 2 症例で巨細胞が MMP-1 弱陽性を示したが, 他の症例ではこれら酵素は陰性であった. 骨巨細胞腫培養液を SDS-PAGE すると多数の蛋白バンドが認められたが, 56-2A4 を用いたイムノブロット法で潜在型 MMP-9 に相当する分子量92,000のバンドのみが特異

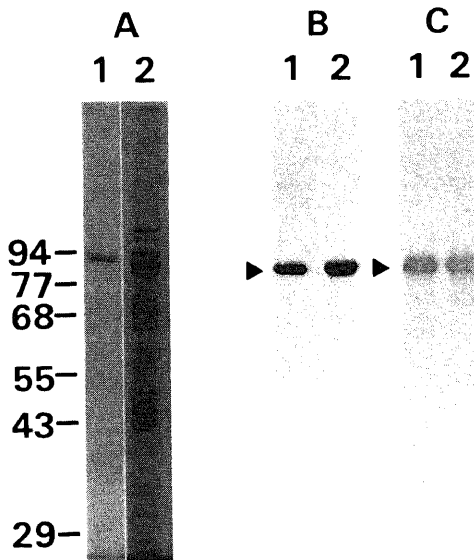


Fig. 6. Immunoblotting for proMMP-9 with monoclonal antibodies. (A) ProMMP-9 (2.15 μg) (lane 1) and concentrated culture medium of HT1080 cells (40 μl) (lane 2) were electrophoresed on a SDS-PAGE (7.5% total acrylamide) under the reducing conditions. (B) ProMMP-9 (lane 1) and the proteins of the culture medium (lane 2) transferred to a nitrocellulose membrane were visualized using a monoclonal antibody, 57-13D8. (C) They were also reacted with a monoclonal antibody, 56-2A4. Arrow head indicates specific recognition of proMMP-9 with the antibodies.

的に認識された (図 9 A)。また、ゼラチンサブストレートゲル上分子量 92,000 のバンドにゼラチン分解活性が証明された (図 9 B)。

3) モルモット抗原誘導型関節炎組織における局在 aBSA の関節腔内注入により著しい関節炎が発生し、関節軟骨は 2 週までにほぼ完全に破壊・消失した。関節炎誘導 1 週と 2 週の方法では、軟骨石灰化層と軟骨下骨に接して多数の破骨細胞の出現が観察された。抗 MMP-9 抗体を用いた免疫組織染色では、MMP-9 はこれら破骨細胞の大部分に局在した。また、幼若モルモットの正常骨組織にみられる破骨細胞にも MMP-9 は陽性に染色された。

III. ビトロネクチンリセプターの局在

ビトロネクチンリセプター ($\alpha V \beta 3$) は、RA 関節組織と正常モルモット及び抗原誘導型関節炎組織に出現した破骨細胞の細胞膜に局在した (図 10 A)。また、骨巨細胞腫の巨細胞細胞膜にも酵素免疫組織化学と蛍光抗体間接法によってその局在が示された (図 10 B)。

考 察

Matrix metalloproteinases (MMPs) は一種の遺伝子

ファミリーで、現在までに少なくとも 10 種類の酵素が報告されている²¹⁾。これらの酵素は、活性中心に Zn^{++} を有し酵素活性には Ca^{++} を必要とすること、潜在型酵素で分泌され細胞外で活性化をうけること、また、これら酵素の共同作用で生体内に存在するほとんど全ての細胞外マトリックス成分が分解されることなどの特徴がある²¹⁾²²⁾。これまで、慢性関節リウマチ、先天性表皮水疱症、創傷治癒、歯周困炎、角膜潰瘍、癌細胞の浸潤・転移、分娩後子宮退縮、骨吸収などの病的小および生理的状态における細胞外マトリックス分解にこれら MMPs が重要な役割を果たすことが報告されている²³⁾。骨吸収に関しては、骨芽細胞の産生した MMP-1 (コラゲナーゼ) の作用によって類骨が吸収されると考えられている¹⁷⁻²⁰⁾。また、石灰化骨基質中には潜在型 MMP-1 が局在することから、破骨細胞による脱灰後に骨基質コラーゲンの分解をきたす可能性が報告されている⁷⁾⁹⁾。しかし、破骨細胞が MMPs を合成・分泌したり、MMP-1 以外の MMPs が骨吸収に関与することの報告はこれまで全くみられない。

本研究は、RA 関節組織中の破骨細胞が MMP-9 を産生することを免疫組織化学的にはじめて示した。免

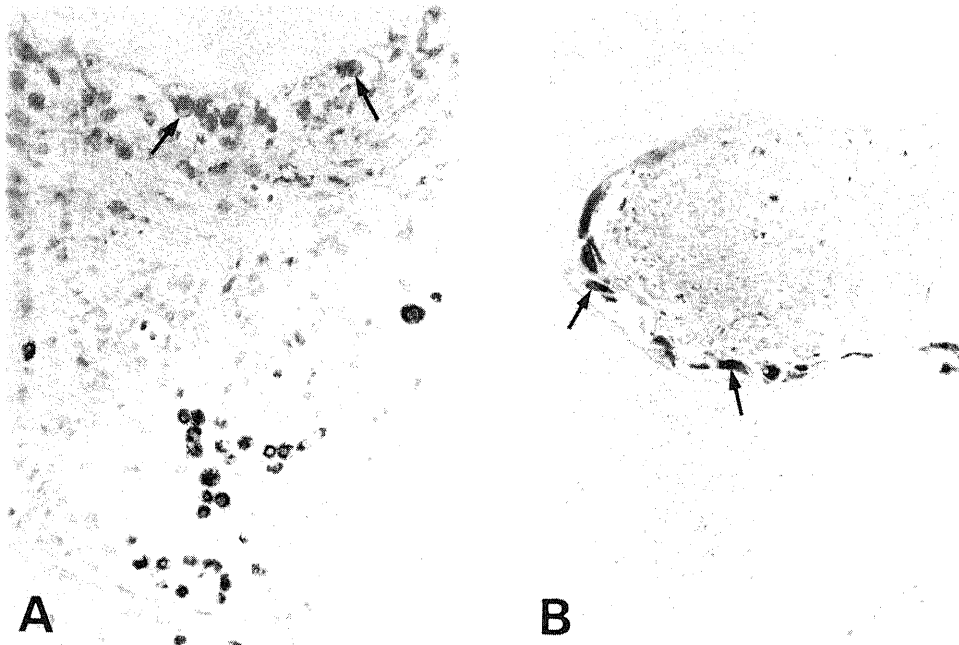


Fig. 7. Immunolocalization of proMMP-9 in rheumatoid joint tissues. Paraffin sections from rheumatoid synovium (A) and bone (B) treated with $2 \mu M$ monensin for 3 hr were stained by streptavidin method using a monoclonal antibody against proMMP-9, 56-2A4. Macrophages infiltrated in the sublining cell layer are intensely labeled and the lining cells weakly stained (arrows) (A). $\times 260$. Osteoclasts attached to the subchondral bone trabecula are also intensely stained (arrows) (B). $\times 130$.

疫染色に用いたモノクローナル抗体 (56-2A4) は、潜在型MMP-9 のカルボキシル基末端ペプチドに対する抗体で、潜在型酵素のみを特異的に認識し活性型MMP-9 とは反応しない抗体である³⁰。また、本抗体は正常および aBSA 誘導型関節炎で発生したモルモットの潜在型 MMP-9 と交差反応することが示された。MMP-9 は基底膜の主要構成成分であるIV型コラーゲンを分解することや高転移性腫瘍細胞株に強く発現されることから、癌細胞の浸潤・転移に重要な役割を果たすと考えられている²⁴⁾²⁵⁾。また、一方でMMP-9 は好中球¹⁹⁾やマクロファージ²⁰⁾のほか、軟骨細胞²⁷⁾やトロフォブラスト²⁸⁾でも産生され、これらの細胞が関与する組織破壊にも作用することが推定されている。実際、本研究においても RA 滑膜組織に浸潤した好中球やマクロファージのほか、RA 滑膜表層細胞や関節軟骨細胞にも MMP-9 の局在が示された。しかし、本研究での免疫染色の所見は、MMP-9 が新たに破骨細胞による石灰化骨の吸収に関与する可能性を示唆している。破骨細胞が MMP-1, 2, 3 に対する特異抗体では染色されないことは、2つ以上の MMP が同時に産生される線維芽細胞²⁹⁾や腫瘍細胞²⁴⁾²⁵⁾に比較し特徴的な所見である。

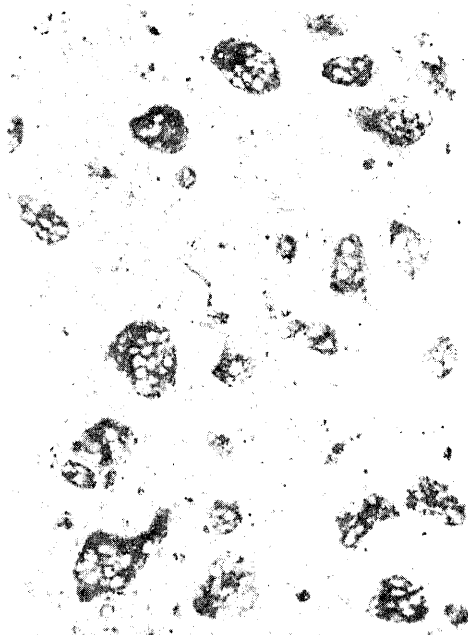


Fig. 8. Immunolocalization of proMMP-9 in giant cell tumor. Paraffin sections from giant cell tumor were stained by streptavidin method using a monoclonal antibody, 56-2A4. Note intense labeling in the giant cells. $\times 260$.

MMP-9 は単にIV型コラーゲンやゼラチンを分解するのみならず、五之治⁹⁾の報告や本研究で示したようにI型、III型、V型コラーゲンおよびビトロネクチンを分解する。骨の主要コラーゲンはI型コラーゲンを微量ながらV型コラーゲンを含むことが生化学的に報告されている³⁰⁾。また、免疫組織化学的にも、これらコラーゲンの局在が知られている³¹⁾。骨のI型コラーゲンは多数の架橋の存在により酸不溶性であり、MMP-1 によっても分解されないとされている²⁹⁾。その分解にはアミノ基やカルボキシル基末端の非ヘリックス部を切断する好中球エラスターゼやカテプシンBおよびLなどの telopeptidase の作用が必要と報告されてきた²³⁾³²⁾。この点で、MMP-9 が酸可溶性I型コラーゲンの $\beta 1, 2$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖を特異的に分解することは興味深い所見である。I型コラーゲンの α 鎖間にはアミノ基末端部の非ヘリックス部に架橋があり、それにより $\beta 1, 1$ 鎖と $\beta 1, 2$ 鎖を形成することが知られている³²⁾。従って、MMP-9 のI型コラーゲンに対

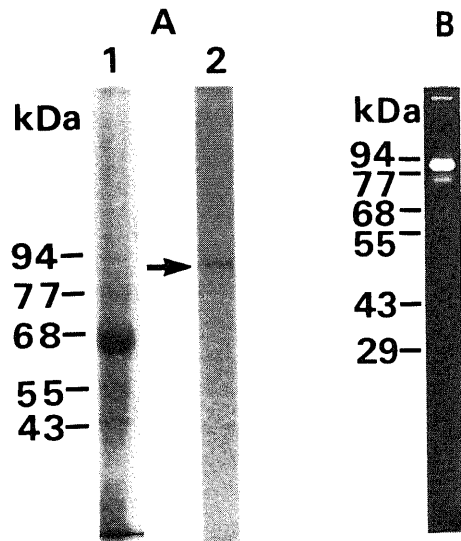


Fig. 9. Production of proMMP-9 by the giant cell tumor. (A) Concentrated culture medium from giant cell tumor ($15 \mu\text{l}$) was run on SDS-PAGE (7.5% total acrylamide) (lane 1). The proteins transferred to a nitrocellulose membrane were visualized with a monoclonal antibody against proMMP-9, 56-2A4 (lane 2). Arrow indicates proMMP-9 recognized by 56-2A4. (B) The culture medium ($50 \mu\text{l}$) was subjected to a gelatin-containing polyacrylamide gel under the nonreducing conditions. The gel was incubated at 37°C for 24 hr after removal of SDS and stained with Coomassie brilliant blue.

する活性は $\alpha 2$ 鎖の非ヘリックス部の分解と考えられ、一種の telopeptidase の作用と解釈される。また、酸不溶性 I 型コラーゲンに対しては、MMP-9 は $\alpha 2$ 鎖のみならずコラーゲン分子が相互に重合した高分子量の不溶性重合体を分解した。さらに、脱灰骨中のコラーゲン線維そのものに対する分解活性が電顕的観察から示された。カテプシン B や L の作用をうけたコラーゲンは体温 (37°C) ではゼラチンに変性し、これらの酵素がもつゼラチン分解活性でさらに低分子のフラグメントに分解されると推定されている³⁹⁾。しかし、これらカテプシンのゼラチン分解活性については詳細な報告はみられない。さらに、石灰化骨中の微量コラーゲンである V 型コラーゲンに対するカテプシン B や L の作用についてはこれまで報告はない。これに対し、MMP-9 はゼラチンに対しては 12,700 μ g/min/mg 蛋白と著しい分解活性があり⁹⁾、V 型コラーゲンに対しても十分な活性がみられた。以上のデータは MMP-9 が骨吸収の局所において活性を示せば、骨基質中の主要細胞外マトリックスを本酵素のみでも十分に分解し得ることを示している。

石灰化骨の吸収は、骨吸収窩と呼ばれる破骨細胞直下の閉鎖腔内でのみ行われる²³⁾。また、破骨細胞は H^+ の分泌により骨を脱灰するため、骨吸収窩は酸性 (pH 4-5) かつ高カルシウム (40-50mM) の特殊な環境となる⁴⁰⁾。システインプロテイナーゼであるカテプシン B³⁹⁾ や L³⁹⁾ は酸性の至適 pH をもち、このような条件下でも骨基質中の I 型コラーゲン分解能を有する。また、これら酵素がもつ酸不溶性 I 型コラーゲン分解能は高カルシウム下で、より強く発揮されることが知られている³⁹⁾。MMP-9 の至適 pH は 7.5-8.0 の中性域にあるが、pH 5.5 の酸性域でもなお 50% の活性が保持されることは注目される。また、 Ca^{++} の影響に関しては少なくともゼラチンや酸可溶性 I 型コラーゲンを基質にした場合には、50mM の高濃度でもほとんど活性低下が認められなかった。むしろ、フィブリル化した酸可溶性 I 型コラーゲンでは 100mM まで濃度依存性に $\alpha 2$ 鎖の分解活性の上昇が認められた。これらの所見は、MMP-9 が骨吸収窩の特殊な環境下においても働き得ることを示しており、破骨細胞で合成・分泌された本酵素が石灰化骨基質の分解に重要な役割を

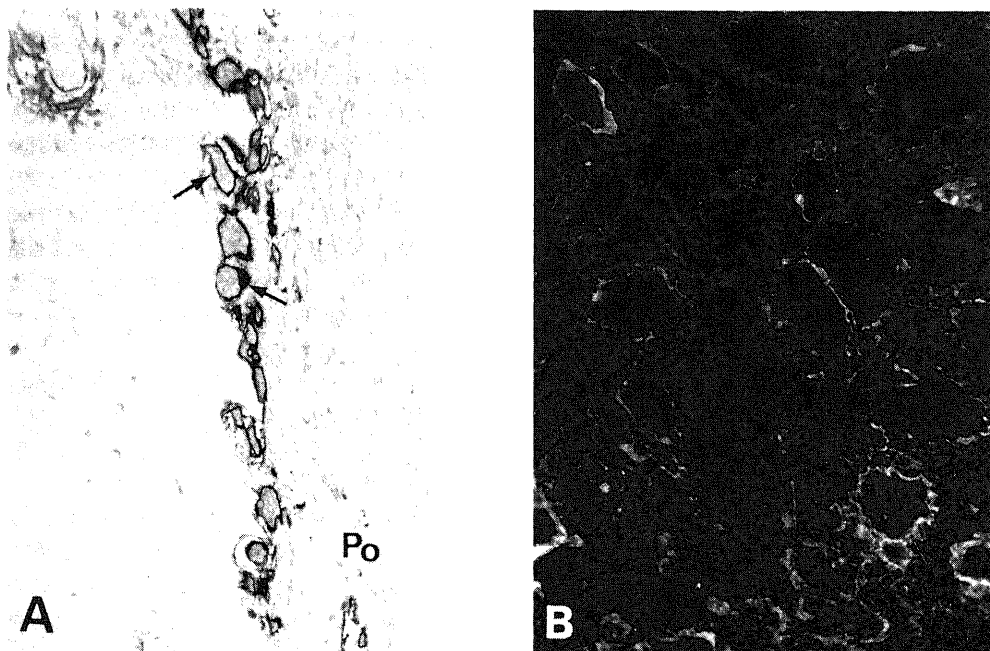


Fig.10 Immunolocalization of vitronectin receptor ($\alpha v \beta 3$) in the osteoclasts and giant cell tumor. (A) Paraffin sections from the tibia of the normal young guinea pig were reacted with the anti-($\alpha v \beta 3$) antibody followed by the streptavidin method. Note intense labeling in the osteoclasts (arrows) attached to the cortex bone. Po, periosteum. $\times 130$. (B) Frozen sections from the giant cell tumor were stained by a fluorescein isothiocyanate immunofluorescent method with anti-($\alpha v \beta 3$) antibody. The giant cells are stained intensely. $\times 215$.

果たす可能性を強く示唆している。

骨巨細胞腫は進行性の骨吸収により骨溶解を示し、臨床上山しばしば病的骨折をきたす腫瘍である。本腫瘍は病理発生上議論はあるが、腫瘍中の巨細胞にはプロトンポンプとビトロネクチンリセプターの局在が知られており^{43,63,7)}、巨細胞はその形態とあいまって破骨細胞類似の細胞と考えられている。このような観点から本腫瘍は破骨細胞腫 (osteoclastoma) とも呼ばれている⁷⁾。本研究では、検討した7例の骨巨細胞腫全てに MMP-9 の免疫組織化学的局在が巨細胞中に観察された。イムノプロット上、その反応蛋白は分子量92,000の潜在型 MMP-9 であり、ゼラチン分解活性をもつことがサブストレートゲルによって証明された。7例中2例では、巨細胞は MMP-1 に対する免疫染色でも弱陽性を示したが、MMP-2 と MMP-3 は陰性であった。骨巨細胞腫における骨吸収は、その細胞特質から腫瘍中の巨細胞によって行われると考えられている。従って、腫瘍中の巨細胞によって合成・分泌された MMP-9 は、カテプシン B や L との共同作用により骨巨細胞腫における骨吸収に関与すると推定される。

破骨細胞の石灰化骨への接着に細胞外マトリックスに対するリセプターであるインテグリンの関与が示唆されている。実際、これまで骨巨細胞腫の巨細胞にビトロネクチンリセプターが免疫組織化学的に証明されている⁷⁾。本研究においても、酵素抗体法と蛍光抗体法により同腫瘍の巨細胞にその局在を認めたほか、RA やモルモット関節炎の破骨細胞にもビトロネクチンリセプターの存在が確かめられた。一方、本リセプターのリガンドとしては Arg-Gly-Asp のアミノ酸配列をもつオステオポンチンとビトロネクチンが考えられており、オステオポンチンは石灰化骨表面に局在すると報告されている³⁸⁾。破骨細胞は局所で骨吸収を終了すると、これらの糖蛋白との接着により近接した骨梁へ移動すると考えられる。従って、破骨細胞の分泌した MMP-9 によって骨吸収窩におけるビトロネクチンが分解されると、破骨細胞は接着を求めてビトロネクチンの存在する骨梁へと移動する可能性が考えられる。このことは、ビトロネクチンの局在を含めて今後検討すべき研究課題と考えられる。

結 論

ヒト線維肉腫細胞から精製した MMP-9 を用いてその性質を調べるとともに、潜在型 MMP-9 の RA 関節組織とモルモット抗原誘導型関節炎組織および骨巨細胞腫における局在をモノクローナル抗体を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. MMP-9 は、酸可溶性 I 型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖アミノ基末端に存在する非ヘリックス部を特異的に分解する他、酸不溶性 I 型コラーゲンの不溶性重合体を可溶化した。また、III型とV型コラーゲン、ゼラチンおよびビトロネクチンも分解された。

2. MMP-9 のゼラチン分解活性は pH5.5-6.0 で全活性の50-80%保持され、100mM Ca^{++} 存在下でも90%の活性が認められた。また、フィブリル化した酸可溶性 I 型コラーゲンでは、 $\beta 1$ 、2 鎖と $\alpha 2$ 鎖の分解は Ca^{++} 濃度依存性に亢進した。

3. EDTA 処理で脱灰した骨組織を MMP-9 とインキュベートすると、骨コラーゲン線維の分解が電顕的に観察された。

4. 合成ペプチドを抗原として作製したモノクローナル抗体を ELISA 法、イムノプロット法および免疫染色でスクリーニングし、潜在型 MMP-9 のアミノ基末端部とカルボキシル基末端部を特異的に認識する抗体 (57-13D8 と 56-2A4) を得た。このうち、56-2A4 は免疫組織染色に使用可能であった。

5. 56-2A4 抗体を用いた免疫組織染色では、MMP-9 は RA 滑膜組織に浸潤した好中球やマクロファージの他、滑膜表層細胞に局在した。また、RA 関節軟骨・骨組織では破骨細胞が強陽性に染色されたが、MMP-1, 2, 3 は破骨細胞中にはみられなかった。また、MMP-9 の破骨細胞における局在は正常モルモットおよび抗原誘導型関節炎組織においても認められた。

6. 7例の骨巨細胞腫では、全ての症例で巨細胞中に MMP-9 の局在が観察された。また、腫瘍組織培養液中に分子量92,000 でゼラチン分解活性をもつ潜在型 MMP-9 の存在がイムノプロット法とゼラチンサブストレートゲル法で確認された。

7. RA と正常モルモットおよび抗原誘導型関節炎の関節組織中に見られた破骨細胞と骨巨細胞腫の巨細胞 (細胞膜) にビトロネクチンリセプターの存在が免疫組織化学的に証明された。

以上のデータは、破骨細胞と骨巨細胞腫によって合成・分泌された MMP-9 が石灰化骨中の細胞外マトリックス分解に重要な役割を果たす可能性を強く示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教授を戴きました金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助教授に心より謝意を表します。更に、本稿の御校閲

を賜りました金沢大学医学部第一病理学中西功夫教授ならびに第一病理学教室教室員の方々に心より感謝致します

文 献

- 1) **Sakamoto, S. & Sakamoto, M.** : Biochemical and immunohistochemical studies on collagenase in resorbing bone in tissue culture. A novel hypothesis for the mechanism of bone resorption. *J. Period Res.*, **17**, 523-526 (1982).
- 2) **Vaes, G.** : Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **231**, 239-271 (1988).
- 3) **Eeckhout, Y., Delaissé, J.-M., Ledent, P. & Vaes, G.** : The proteinases of bone resorption. *In* A. Glanert (ed.), *The Control of Tissue Damage*, 1st ed p297-313, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- 4) **Väänänen, H. K., Karhukorpi, E.-K., Sundquist, K., Wallmark, B., Roininen, I., Hentunen, T., Tuukkanen, J. & Lakkakorpi, P.** : Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J. Cell Biol.*, **111**, 1305-1311 (1990).
- 5) **Silver, I. A., Murrills, R. J. & Etherington, D. J.** : Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.*, **175**, 266-276 (1988).
- 6) **Maciewicz, R. A. & Etherington, D. J.** : A comparison of four cathepsin (B, C, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Biochem. J.*, **256**, 433-440 (1988).
- 7) **Eeckhout, Y., Delaissé, J. M. & Vaes, G.** : Direct extraction and assay of bone tissue collagenase and its relation to parathyroid-hormone-induced bone resorption. *Biochem. J.*, **239**, 793-796 (1986).
- 8) **Eeckhout, T. & Vaes, G.** : Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein and spontaneous activation. *Biochem. J.*, **166**, 21-31 (1977).
- 9) 五之行雄：ヒト線維肉腫 (HT 1080) 細胞由来 matrix metalloproteinase 9 (92kDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ) の性質と活性化機構. 十全医会誌. (印刷中)
- 10) **Glimcher, M. J., Francois, C. J., Richards, L. & Krane, S. M.** : The presence of organic phosphorus in collagens and gelatines. *Biochem. Biophys. Acta*, **93**, 585-602 ((1964).
- 11) **Gisslow, M. T. & McBride, B. C.** : A rapid sensitive collagenase assay. *Anal. Biochem.*, **68**, 70-78 (1975).
- 12) **Harris, E. D. Jr. & Krane, S. M.** : An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochem. Biophys. Acta*, **258**, 566-576 (1972).
- 13) **Okada, Y., Nagase, H. & Harris, E. D. Jr.** : A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14245-14255 (1986).
- 14) **Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmor, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A. & Goldberg, G. I.** : SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa typeIV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17213-17221 (1989).
- 15) **Hembry, R. M., Murphy, G. & Reynolds, J. J.** : Immunolocalization of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in human cells. *J. Cell Sci.*, **73**, 105-119 (1985).
- 16) **Okada, Y., Gonoji, Y., Nakanishi, I., Nagase, H. & Hayakawa, T.** : Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, **59**, 305-312 (1990).
- 17) 岡田保典, 木村颯子, 中西功夫, 岩田和士: 慢性関節リウマチ滑膜細胞由来 matrix metalloproteinase 2 の性質と滑膜組織内局在. 日病会誌 **79**, 285 (1990).
- 18) **Okada, Y., Takeuchi, N., Tomita, K., Nakanishi, I. & Nagase, H.** : Immunolocalization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **48**, 645-653 (1989).
- 19) **Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. & Mainmndi, C. L.** : Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2493-2500 (1985).
- 20) **Yamashita, N., Nakanishi, I. & Okada, Y.** :

- Arthritis induced immunologically with cationic amidated bovine serum albumin in the guinea pig. A morphological and biochemical study on the destruction of articular cartilage. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, **60**, 57-66 (1991).
- 21) Nagase, H., Barrett, A. J. & Woessner, F., Jr.: Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix (Suppl.)*, in press.
- 22) 岡田保典, 中西功夫: Matrix metalloproteinases: その性質と病的組織における役割. 結合組織, 1991 (印刷中)
- 23) Harris, E. D., Jr. & Krane, S. M.: Collagenases. *N. Engl. J. Med.*, **291**, 652-661 (1974).
- 24) Ballin, M., Gomez, D. E., Sinha, C. C. & Thorgeirsson, U. P.: Ras oncogene mediated induction of a 92kDa metalloproteinase; strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 832-838 (1988).
- 25) Yamagata, S., Ito, Tanaka, R. & Shimizu, S.: Gelatinases of metastatic cell lines of murine colonic carcinoma as detected by substrate-gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 158-162 (1988).
- 26) Mainardi, C. L., Hibbs, M. S., Hastly, K. A. & Seyer, J. M.: Purification of a type V collagen degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages. *Collagen Relat. Res.*, **4**, 479-492 (1984).
- 27) Murphy, G., Hembry, R. M., McGarrity, A. M., Reynolds, J. J. & Henderson, B.: Gelatinase (type IV collagenase) Immunolocalization in cells and tissues: use of an anti-serum to rabbits bone gelatinase that identified high and low Mr. forms. *J. Cell Sci.*, **92**, 487-495 (1989).
- 28) Fisher, S. J., Cui, T. Y., Zhang, L., Hartman, K., Grahl, K., Zhang, G. Y., Tarpey, J. & Damsky, C. H.: Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J. Cell Biol.*, **109**, 891-902 (1989).
- 29) Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J. J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanishi, I., Salvesen, G. & Nagase, H.: Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur. J. Biochem.* **194**, 721-730 (1990).
- 30) Miller, E. J.: Recent Information on the Chemistry of the Collagens. *In Proceedings of 2nd International Conference on the Biochemistry and Biology of Mineralized Tissues*, 1st ed p80-93, Ebsco media. Birmingham, Alabama, 1985.
- 31) Ueda, Y. & Nakanishi, I.: Immunohistochemical and biochemical studies on the collagenous proteins of human osteosarcomas. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, **58**, 79-88 (1989).
- 32) Barrett, A. J.: The possible role of neutrophil proteinases in damage to articular cartilage. *Agents Actions*, **8**, 11-18 (1978).
- 33) Etherington, D. J.: The purification of bovine cathepsin B, and its mode of action on bovine collagens. *Biochem. J.*, **137**, 547-557 (1974).
- 34) Kirschke, H., Kambhari, A. A., Bohlley, P. & Barrett, A. J.: Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates. *Biochem. J.*, **201**, 367-372 (1982).
- 35) Etherington, D. J. & Birkedal-hansen, H.: Effect of calcium ions on the degradation of hard tissue and tendon collagens by lysosomal cathepsins (Abstract). *Federation of European Connective Tissue Societies*, 10th Meeting, **203**, 1986.
- 36) Davies, J., Warwick, J., Totty, N., Philp, R., Helfrich, M. & Horton M.: The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *J. Cell Biol.*, **109**, 1817-1826 (1989).
- 37) Zamboni-Zallone, A., Teti, A., Grano, M., Rubinacci, A., Abbadini, M., Gabobi, M. & Marchisio, P. C.: Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a $\beta 3$ integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp. Cell Res.*, **182**, 645-652 (1989).
- 38) Mark, M. P., Prince, C. W., Oosawa, T., Gas, S., Bronckers, A. L. J. J. & Butler, W. T.: Immunohistochemical demonstration of a 44-kDa phosphoprotein in developing rat bones. *J. Histochem. Cytochem.*, **35**, 707-715 (1987).

Matrix Metalloproteinase 9 (92 kDa Gelatinase / Type IV Collagenase) in Bone Resorption. A Study of Its Properties and Immunolocalization in Osteoclast Katsumi Naka, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **100**, 948—961 (1991)

Key words bone resorption, osteoclast, metalloproteinase, immunolocalization, giant cell tumor

Abstract

Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9, 92 kDa gelatinase / Type IV collagenase), the primary structure of which was recently determined, is a new member of the MMP gene family. In the present study, the enzymic properties of MMP-9 and its immunolocalization in osteoclast and giant cell tumors were examined to demonstrate the involvement of MMP-9 in the degradation of extracellular matrix components in mineralized bone. MMP-9 purified from human fibrosarcoma cells specifically cleaved the amino-terminal non-helical region of $\alpha 2(I)$ chain and depolymerized the insoluble polymers of the acid insoluble type I collagen. Collagen types III and V, type I gelatin and vitronectin were also degraded by MMP-9. In addition, electron microscopy demonstrated that MMP-9 digests collagen fibers in demineralized bone. The gelatinolytic activity of the proteinase was optimum at pH 7.5-8.0, but 50-80% of the full activity was retained at pH 5.5-6.0. It was also 90% active against gelatin in the presence of 50 mM and 100mM Ca^{++} . Degradation of $\beta 1,2$ and $\alpha 2$ chains of acid soluble type I collagen which formed collagen fibers was dependent on Ca^{++} concentrations up to 100 mM. These data suggest that MMP-9 is endowed with the ability to degrade extracellular matrix components of the bone even in the acid (pH 4-5) and hypercalcemic (40-50 mM) environment. Monoclonal antibodies raised using synthetic peptides were screened by ELISA, immunoblotting and immunohistochemistry, and two clones (57-13D8 and 56-2A4) specific to the zymogen of MMP-9 (proMMP-9) were obtained. Immunohistochemistry using 56-2A4 showed that in rheumatoid synovium MMP-9 localized in polymorphonuclear leukocytes and macrophages infiltrated the sublining cell layer and the synovial lining cells. In addition, osteoclasts in rheumatoid subchondral bone were intensely labeled. Immunolocalization of MMP-9 in osteoclasts was also observed in normal joint tissues and those of antigen-induced arthritis in the guinea pig. MMP-9 was immunolocalized in the giant cells in all 7 cases of giant cell tumor. Immunoblotting and gelatin zymography demonstrated that giant cell tumors secrete proMMP-9 with Mr 92,000, which is capable of degrading gelatin. Vitronectin receptor was also immunolocalized in the osteoclasts and giant cells in giant cell tumors. These results strongly suggest the possibility that MMP-9 synthesized and secreted by the osteoclasts and giant cell tumors may play an important role in bone resorption by degrading the extracellular matrix components of mineralized bone.