

KAKEN

2006

24

ノックアウトマウスを用いた ADAMTS-1 の 卵巣機能における役割の解析

(課題番号 16590305)

平成16年度－17年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 久野 耕嗣

金沢大学がん研究所 助教授

金沢大学附属図書館



0700-03196-0

はしがき

器官形成、がん浸潤転移、創傷治癒など、組織の再構築が起こる際には、細胞外マトリックスタンパクの分解と合成が起こる。これまで細胞外マトリックス分解性プロテアーゼについてはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を中心にその研究が行われてきた。筆者は、1997年に、新しいタイプの細胞外マトリックス局在性プロテアーゼである ADAMTS-1 を世界に先駆けて同定した(Kuno K et al., *JBC*, 1997)。ADAMTS-1 は、マウス結腸がん colon 26 の悪液質誘導性株の腫瘍で高発現する遺伝子として同定したものであるが、従来の ADAM とは異なり、トロンボスポンジン(TSP)タイプ 1 モチーフを持つ分泌型の新しいタイプの ADAM 型メタロプロテアーゼであったので、筆者は、ADAM のサブファミリーとして、ADAMTS (ADAM with TSP type I motifs) と命名した。現在、同様のドメイン構造を持つ 19 の遺伝子群が ADAMTS ファミリーと呼ばれている。ADAMTS ファミリーにはアグリカネース (ADAMTS-4、5)等が含まれ、細胞外マトリックス分子の代謝に関わるプロテアーゼ群として、関節炎、がん浸潤転移をはじめとする様々な疾患とのかかわりが注目されている。

これまで筆者は、ADAMTS-1 が細胞外マトリックス中の硫酸化グリコサミノグリカンへ結合する活性型メタロプロテアーゼであり、この性質に一致して、ADAMTS-1 がプロテオグリカンに対する分解活性を有することを明らかにしてきた。このことから ADAMTS-1 がプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス分子の分解を通して、器官形成に関わる可能性が推定される。また筆者らは、生体における ADAMTS-1 の機能を明らかにするために、ADAMTS-1 欠損マウス (ADAMTS-1(-/-)) の解析を行ってきた。その結果、ADAMTS-1(-/-)マウスでは腎杯の拡張など、顕著な腎臓での病変が認められ、ヒト腎盂尿管移行部閉塞症と類似した表現型を示すことを見出し、ADAMTS-1 が腎盂尿管移行部組織の構築に必須なメタロプロテアーゼであることを明らかにしてきた。

筆者らはまた、ADAMTS-1(-/-)雌マウスは強い不妊傾向を示すことを見出し、ADAMTS-1 が雌生殖機能にも重要であることを明らかにしてきた。今回、ADAMTS-1(-/-)雌マウスの不妊の原因を明らかにするため、同マウスの排卵過程、卵胞生育過程における異常を詳しく調べ、ADAMTS-1 の卵巣機能における役割を調べた。また ADAMTS-1 は血管新生抑制因子でもあること

から、ADAMTS-1 が腫瘍血管新生を抑制することによって、抗腫瘍、抗転移作用を発揮する可能性が推定された。そこで、ADAMTS-1 の腫瘍増殖、転移への作用についても検討を行った。

平成 18 年 3 月

研究代表者

金沢大学がん研究所助教授

久野 耕嗣

研究組織

研究代表者： 久野 耕嗣 (金沢大学がん研究所)

交付決定額 (配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	1,800千円	0千円	1,800千円
平成17年度	1,700千円	0千円	1,700千円
総計	3,500千円	0千円	3,500千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Shozu M, Minami N, Yokoyama H, Inoue M, Kurihara H, Matsushima K, Kuno K : ADAMTS-1 is involved in follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J. Mol. Endocrinol.* 35, 343-355 (2005).

2. Kuno K, Bannai K., Hakozaiki M., Matsushima K., Hirose K.: The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental metastatic potential. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 319, 1327-1333 (2004).

(2) 学会発表等

1. 生水真紀夫、南紀子、横山仁、井上正樹、栗原裕基、松島綱治、○久野耕嗣

(○発表者) : 「ADAMTS-1 の卵胞成熟、排卵過程への関与」日本分子生物学会年会、2004年12月神戸ポートアイランド (神戸)

2. 久野耕嗣. 「ADAMTS-1 の生体における機能」 特定領域研究公開シンポジウム：細胞－細胞外マトリックスインターフェイスにおける MMP/ADAM の機能. 2004年8月 慶応大学 (東京)

3. 生水真紀夫、南紀子、横山仁、井上正樹、栗原裕基、松島綱治、○久野耕嗣 (○発表者) 「ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスにおける異形成卵胞の形成」第 28 回日本分子生物学会年会ワークショップ、2005 年 12 月福岡

(3) 出版物

1. Kuno K. (2004) ADAMTS-1. In Handbook of Proteolytic Enzymes (Second Edition) (Barrett A.J., Rawlings N.D., and Woessner J. F., eds.), London, Academic Press pp735-737.

研究成果の概要

1) ADAMTS-1 の卵巣機能における役割

1a) ADAMTS-1 は排卵過程に必要なものである。

妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)/ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン(hCG)投与による過排卵条件下で排卵数を測定した場合、ADAMTS-1(-/-)雌マウスでは、コントロールマウスと比較して、排卵数が約 1/8 に低下していた。次に同じく過排卵条件下で、hCG 投与 15 時間後の卵巣組織を調べた結果、ADAMTS-1(-/-)マウスの卵巣では、成熟した卵胞のうち、排卵が起こらない卵胞の割合が、コントロールマウスと比較して顕著に増加していることがわかった。このことから、ADAMTS-1 が排卵過程に重要な役割を果たしていることが示唆された。この時、ADAMTS-1(-/-)雌マウスでは、卵胞壁の菲薄化が起こらない非破裂卵胞が認められることから、ADAMTS-1 は排卵時に、卵胞壁の線維性コラーゲンの分解系を促進する役割を担っていると考えられる(Shozu et al., JME, 2005)。

1b) ADAMTS-1 は卵胞生育過程のうち、前胞状卵胞期の卵胞構造の維持に関与する

まず、ゴナドトロピン投与による過排卵条件下の ADAMTS-1(-/-)マウスの卵巣では、成熟卵胞数がコントロールマウスの 3分の1 に減少していることから、同マウスでは卵胞生育過程に異常があることが示唆された。次に、ADAMTS-1(-/-)マウスで、卵胞生育過程のどの段階に異常があるか調べた。その結果、ADAMTS-1(-/-)マウスの卵巣では PMSG 刺激、未刺激にかかわらず、タイプ 5b (前胞状卵胞後期) およびタイプ 6 (胞状卵胞) の卵胞数が、コントロールマウスと比較して有意に減少していた。このことから同マウスでは卵胞発育過程のうち、タイプ 4 または 5a の卵胞から次の発育ステージへ進む過程が抑制されていることがわかった。また ADAMTS-1(-/-)マウスでは、卵子の断片化と顆粒膜細胞層のアポトーシスに特徴づけられる通常の卵胞閉鎖経路も、ゴナドトロピン刺激の有無にかかわらず抑制されていた。これらの生理的な卵胞に代わって、ADAMTS-1(-/-)マウスの卵巣では、その卵子はタイプ 4 卵胞のものに相当しているが、顆粒膜細胞層が多層化せず消失ないし扁平化を示す異形成 (閉鎖) 卵胞が、ゴナドトロピン刺激の有無にかかわらず多数認められた。これらの結果から ADAMTS-1(-/-)マウスでは前胞状卵胞期から

異形成卵胞を形成する経路が存在するために、正常な卵胞生育経路を経て成熟する卵胞数が減少するものと考えられ、また ADAMTS-1 は前胞状卵胞期の卵胞構造の維持に重要であることが示唆された。(Shozu et al., JME, 2005)

1c) ADAMTS-1 は卵巣髄質血管網の構築に必要である。

ADAMTS-1 の卵巣血管網の構築における役割を明らかにするために、ADAMTS-1(-/-)マウスにおける血管形成の異常について調べた。卵巣の髄質は、大小様々なサイズの血管に富む組織であるが、ADAMTS-1(-/-)マウスでは、髄質部の占める領域がコントロールマウスと比較して、顕著に狭くなっていることがわかった。また PMSG 刺激後の卵巣髄質部では、直径 50 μ m 以上のサイズの大きな血管網が形成され、卵巣髄質部の大部分を占めているが、ADAMTS-1(-/-)マウスの卵巣髄質部においては、サイズの大きな血管が占める領域が、コントロールマウスと比較して、顕著に減少していることがわかった。これらの結果から、ADAMTS1 は卵巣髄質部血管網の形成に対して、促進的に働いていることが示唆された。(Shozu et al., JME, 2005)

2) ADAMTS-1 の腫瘍増殖、転移への作用

2a) 全長 ADAMTS-1 は腫瘍増殖促進作用を示す

ルイス肺がん(LLC)細胞および CHO 細胞で全長 ADAMTS-1 を高発現する安定形質導入株を樹立し、マウス皮下に移植して腫瘍増殖への効果を調べたところ、ADAMTS-1 の高発現株では、コントロール群と比較して腫瘍増殖の促進が認められた。一方 ADAMTS-1 のうち TSP タイプ I モチーフを含む C 末端側領域のみを高発現する CHO 細胞株を皮下移植した場合、逆に腫瘍増殖が抑制されることがわかった。このことから、全長 ADAMTS-1 は腫瘍増殖を促進するが、C 末端側領域は競合的に働いて阻害的に作用する可能性が示唆された。(Kuno et al., BBRC, 2004)

2b) ADAMTS-1 の C 末端側領域は、実験的肺転移を抑制する

ADAMTS-1 の実験的肺転移への作用を CHO での ADAMTS-1 高発現株を用いて調べた。ADAMTS-1 またはその C 末端側領域の高発現株をマウス尾静脈に移植した場合、コントロール群と比較して肺転移結節数が顕著に減少した。これらから ADAMTS-1 は、実験的肺転移を抑制する作用を有しており、その

抑制作用は ADAMTS-1 の C 末端側領域によって担われていることがわかった。また ADAMTS-1 およびその C 末端側領域の高発現株が形成する肺転移結節では、コントロール群と比較して腫瘍血管密度が有意に減少していた。このことから ADAMTS-1 は、肺転移部位での腫瘍血管新生を阻害することによって、実験的肺転移を抑制すると考えられた。(Kuno et al., BBRC, 2004)

(今後の展望)

今回の ADAMTS-1(-/-)マウスの解析から、ADAMTS-1 が排卵過程に必要であり、さらに ADAMTS-1 は前胞状卵胞期の卵胞構造の維持を通じて、卵胞生育過程にも重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた。最近の生殖補助技術の進歩により男性不妊や女性不妊の多くが治療可能になってきているが、その一方で卵巣性障害に起因する難治性排卵障害患者の診断・治療が未解決のままとなっている。今回の研究は、ADAMTS-1 が卵胞機能に深く関わっていること、したがってその機能異常がヒトでの排卵障害・卵胞発育異常を示す卵巣性不妊の原因の一つとなっている可能性があることを示している。今後、ADAMTS-1 ノックアウトマウスの解析をさらに進めることにより、難治性排卵障害の実験モデルとしての意義を明らかにしていくことが期待される。また家族性の腎盂尿管移行部閉塞症で ADAMTS-1 遺伝子異常の症例があるかについても検討が必要である。また今回、ADAMTS-1 遺伝子を導入した CHO 細胞の肺転移が、コントロールと比較して顕著に抑制されることを見出したが、今後 ADAMTS-1 のがんの抗転移剤としての応用が期待される。