

Study of function of ADAMTS-1 in bone metabolism

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-09-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kuno, Koji メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00055483

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN

2003

62

金沢大学

ノックアウトマウスを用いた ADAMTS-1 の 骨代謝における役割の解析

(研究課題番号：14570182)

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成 16 年 3 月

研究代表者 久野 耕嗣

(金沢大学附属図書館 所・助教授)

金沢大学附属図書館



0400-05033-1

金沢大学
附属図書館

はしがき

ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) は、ヘビ毒メタロプロテアーゼとディスインテグリンと相同性を示す遺伝子群の総称である。ADAM は複数のドメインから成る膜蛋白質で、接着因子としての機能や、さまざまな膜蛋白質のプロセッシングを行う膜結合型プロテアーゼとしての機能が明らかにされ、広く炎症反応や組織発生等に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。一方私は、典型的な膜型 ADAM とは異なり、分泌型で3つのトロンボスポンジン(TSP)タイプ1モチーフを持つ、新しいタイプの ADAM ファミリー遺伝子を世界に先駆けて同定し、その構造的な特徴から、ADAMTS-1 (ADAM with TSP type I motifs -1) と命名した(Kuno et al., *J. Biol. Chem.*, 1997)。その後、私は ADAMTS-1 が細胞外マトリックス結合性の活性型メタロプロテアーゼであることを確立している(Kuno K. et al., *J. Biol. Chem.*, 1998)(Kuno et al., *J. Biol. Chem.*, 1999)。他方、ADAMTS-1 と同様なドメイン構造を持つタンパクをコードする遺伝子群が他のグループ等から報告され、現在これらの遺伝子群は、ADAMTS ファミリーと呼ばれている。ADAMTS ファミリーは、現在、20 のメンバーからなる比較的大きな遺伝子ファミリーであることがわかっている。このうち、ADAMTS-2,-3,-14 は、procollagen N-proteinase 活性を有していて、プロコラーゲンのプロセッシングに関わっており、特に ADAMTS-2 は、古くからヒツジの皮膚脆弱症として知られていた dermatosparaxis の原因遺伝子であることが明らかにされた。また ADAMTS-4,-5 は aggrecanase であり、関節炎における軟骨組織破壊との関わりが明らかにされつつある。さらに、最近 ADAMTS-13 は、von Willebrand factor の切断酵素であり、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の原因遺伝子であることが示されている。このように、ADAMTS ファミリーのメンバーは、主として細胞外マトリックス分子の代謝を制御することにより組織構築に関わっており、その発現が異常になった場合には、種々の疾患の原因となる、大変重要なプロテアーゼファミリーであると考えられる。我々も、ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスがヒト腎盂尿管移行部閉塞症とよく似た表現型を示すことを明らかにし、また ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスの解析を通じて、ADAMTS-1 が、腎盂尿管移行部や副腎髄質組織の構築、雌生殖器の機能に必須な多機能なメタロプロテアーゼであることを明らかにしてきている。

我々は、ADAMTS-1 が、硫酸化グリコサミノグリカン結合性のメタロプ

ロテアーゼである性質とよく一致して、軟骨プロテオグリカンであるアグリカンを切断する活性を有することを明らかにしてきた(Kuno K. et al. FEBS letters, 2000)。ADAMTS-1 は、アグリカンを切断し、約100kDaを初めとする複数のアグリカン・コア蛋白断片を生成するが、このうち約100kDaコア蛋白断片の場合、そのアミノ酸配列から決定された切断部位は、アグリカンのコンドロイチン硫酸鎖結合領域の E(1872)-L(1873)部位であった。慢性関節炎リウマチや変形性関節症の関節炎患者の関節滑液中やインターロイキン1で刺激した軟骨組織培養の上清には、IGD およびコンドロイチン硫酸鎖結合領域の gap 領域における5箇所の切断部位で切断されたアグリカン断片が検出されることが報告されている。ADAMTS-1 切断部位はこれらアグリカンの *in vivo* 切断部位の一つに対応することから、ADAMTS-1 がアグリカンの turnover や関節炎における軟骨組織破壊に関わる可能性が考えられる。

本研究では、ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスでコラーゲン誘導性関節炎を誘発し、野生型マウスと比較して関節軟骨破壊の軽減が見られるかどうかを調べることにより、関節炎誘発時の関節軟骨破壊における ADAMTS-1 の役割を調べることを目的としている。この目的のため ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスをコラーゲン誘導性関節炎に感受性を示す DBA/1 マウスと戻し交配を10世代行い、現在実験に必要な繁殖を行っている段階である。そこで今回は、本研究と平行して進めていた複数のプロジェクト、1) ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスの表現型と腎盂尿管移行部閉塞症との類似点、2) ADAMTS-1 の卵巣機能への関与、3) ADAMTS-1 の腫瘍増殖に及ぼす効果、4) 線虫 *C. elegans* の ADAMTS ファミリー遺伝子、*adt-1* の雄尾部感覚器官 ray 形態形成における関与、について、それぞれ研究成果をまとめた。

平成16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14年度	1900千円	0千円	1900千円
平成15年度	1600千円	0千円	1600千円
総計	3500千円	0千円	3500千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Kuno K., Baba C., Asaka A., Matsushima C., Matsushima K., Hosono R.: *C. elegans* ADAMTS family gene, *adt-1* is necessary for morphogenesis of the male tail copulatory organs. *J. Biol. Chem.*, 277, 12228-12236. (2002).
2. Yokoyama H, Wada T, Kobayashi K, Kuno K, Kurihara H, Shindo T, Matsushima K. A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-1 null mutant mice develop renal lesions mimicking obstructive nephropathy. *Nephrol. Dial Transplant* 17, suppl 9, 39-41. (2002).
3. Kuno K., Bannai K., Hakozaki M., Matsushima K., Hirose K.: The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental metastatic potential. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, in press.

(2) 口頭発表

1. 浅香敦子、細野隆次、久野耕嗣 「*C. elegans* ADAMTS ファミリー遺伝子 *adt-1* は *hyp 7* 細胞で発現し ray 形態形成に関与する」日本分子生物学会、2002年12月パシフィコ横浜
2. 久野耕嗣 (招待講演) Roles of ADAMTS-1 in the functions of ureteropelvic junction and ovary, and its effects on tumor growth and metastasis, 第76回日本生化学会大会シンポジウム、2003年10月パシフィコ横浜

(3) 出版物

1. Kuno K.: ADAMTS-1. in Handbook of Proteolytic Enzymes (Second edition) (Barrett, A.J. and Rawlings, N.D. eds.) Academic Press, in press.

2. 久野 耕嗣 「ADAMファミリー」「アグリカネース」
分子生物学、免疫学キーワード辞典 (永田和宏、宮坂昌之、宮坂信之、山本
一彦共編) 医学書院

主な研究成果の概略

1) ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスを用いた、ADAMTS-1 の生体における役割の解析

1-a) ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスは腎盂尿管移行部閉塞症に酷似した表現型を示す。

我々は ADAMTS-1 の生体における機能を明らかにするため ADAMTS1 遺伝子欠損マウスを作製してその解析を行ってきた。ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスでは、主な表現型として腎臓に顕著な変化が見られ、腎杯の拡張と腎髄質乳頭部の萎縮が観察される。この ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスにおける腎杯の拡張は、生後1週目ではわずかであるが、生後4週目では顕著な拡張が認められることから、生後、尿量の増加とともに進行するものと考えられた。また腎盂造影を行った場合、ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスにおいては、拡張した腎杯が描出されて典型的な水腎症の像が認められ、また造影剤静注後30分では腎杯部分における尿の貯流が観察された。この結果から、ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスでは腎盂尿管移行部において部分的な閉塞状態が生じており、これが原因で腎杯の拡張が引き起こされると考えられた。またこれらの解剖学的な変化と対応して、ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスでは、尿量の増加 (2.37ml, n=4 (ADAMTS-1^{-/-}), vs 1.61 ml, n=8 (ADAMTS-1^{+/+})) と、尿比重の低下 (1.054, n=4 (ADAMTS-1^{-/-}), vs 1.081, n=8 (ADAMTS-1^{+/+})) が認められた。ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスで観察された腎臓に関するこれらの表現型は、ヒトでの腎盂尿管移行部閉塞症のものとよく類似していることから、ADAMTS-1 が腎盂尿管移行部閉塞症の原因遺伝子のひとつである可能性も考えられる。また電子顕微鏡による解析では、ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスの腎盂尿管接合部で、腎盂上皮下の線維層において過剰な線維性コラーゲンの産生が観察され、また平滑筋層においても、過剰な線維性コラーゲンが平滑筋細胞間に入りこんだ箇所が認められた。この結果から、ADAMTS-1 が腎盂上皮下の線維層における線維性コラーゲン等の細胞外マトリックス分子の産生制御を介して、腎盂尿管移行部の組織構築に重要な役割をはたしていることが示唆された。

1-b) ADAMTS-1 の雌性生殖器機能への関与

ADAMTS-1 遺伝子欠損雌マウスは、交尾後 13%しか出産せず、出産した場合でも産子数が極めて少ないなど、強い不妊傾向を示すことから、ADAMTS-1 が雌性生殖器の機能に密接に関わっていると考えられる。また他のグループにより、排卵前卵胞の顆粒膜細胞層で ADAMTS-1 mRNA の発現が誘導されるという報告がある。今回、卵巣全体の機能における ADAMTS-1 の役割を評価するため、hCG、PMSG 投与による過排卵条件下での排卵数を調べた。その結果 ADAMTS-1 遺伝子欠損雌マウスの過排卵条件下での排卵数は、ヘテロ雌マウスの場合と比較して、約 7 分の 1 程度まで減少していた。このことから、ADAMTS-1 遺伝子欠損雌マウスでは、卵巣全体の機能がかなり低下しており、ADAMTS-1 は卵巣機能に必須であることが示唆された。現在、ADAMTS-1 が、卵巣機能のうち、卵胞成熟過程、排卵過程のどの過程に関与しているかについてさらに研究を進めている。

2) ADAMTS-1 の腫瘍増殖に及ぼす効果

ADAMTS-1 はプロテオグリカンを分解するプロテアーゼである一方、血管新生抑制因子でもあることから、ADAMTS-1 の腫瘍増殖、転移への効果について調べている。まず Lewis Lung carcinoma (LLC) で 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を調べたところ、全長 ADAMTS-1 の LLC 高発現株では、コントロール群と比較して腫瘍サイズの増加と移植後 21 日目の腫瘍重量の増加が認められた。また同様に ADAMTS-1 を高発現する Chinese hamster ovary (CHO) 細胞株を用いた場合も同様に、腫瘍増殖促進作用が認められた。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、結果的に ADAMTS-1 は腫瘍増殖に関して 2 つの相反する作用を有することがわかった。これらの結果から、ADAMTS-1 が発現する腫瘍では、ADAMTS-1 がその増殖能に影響を及ぼす可能性が強く示唆された。

3) 線虫 *C. elegans* の ADAMTS-1 ホモログ遺伝子、*adt-1* は雄尾部の感覚器官の形態形成に必須である。

線虫 *C. elegans* は多細胞生物の発生および神経を遺伝学的に解析するモデル生物である。*C. elegans* の器官形成、形態形成における ADAMTS ファミリーの役割を明らかにする目的で、データベースの検索から *C. elegans* での ADAMTS-1 ホモログ遺伝子、*adt-1*(*adamts* in *C. elegans*)を同定し、同遺伝子の破壊実験を行なった。トランスポゾン Tc1 を用いた遺伝子破壊法により、*adt-1* 遺伝子のうちメタロプロテアーゼドメインをコードする第 7-9 エクソンを欠失した変異株を分離し、その表現型を解析した結果、*adt-1* 遺伝子変異株では、雄尾部の形態形成に異常があることがわかった。*C. elegans* の雄の尾部は、雌雄同体との配偶行動のために特殊化した構造をしており、配偶行動に必要な 9 対の ray と呼ばれる感覚器官を持っている。ray は 2 つの異なったタイプの neuron と structural cell および hypodermal cell から構成される細長い円柱状の感覚器官で、wild type では 9 対の ray が尾部の体側より fan に沿って放射状に伸びた構造をしている。一方、*adt-1* 遺伝子変異株では、ray 6 が異常に太い形態に変化しており、他の ray についても bending などの形態異常が観察された。また *adt-1* 遺伝子変異株では mating efficiency が wild type と比較して約 10 分の 1 に低下しており、さらに雄の配偶行動の諸過程のうち turning 行動等に異常がみられた。このことから *adt-1* 遺伝子変異株では ray の形態変化が原因で、感覚器官である ray の雌雄同体を認識する能力が低下していると考えられた。ray の伸長は、L4 期の非常に短い期間に起るため、*C. elegans* の外骨格である cuticle 中の、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの急速なリモデリングが伴う過程である。*adt-1* 遺伝子プロモーター制御下の GFP レポーターを用いた発現部位の解析では、雄尾部の ray 全体で GFP の発現が確認されることから、ray を構成する hypodermal cell より産生された ADT-1 が cuticle 層の ECM のリモデリングを調節することにより、ray の伸長過程を制御していると考えられる。