プロテアーゼと血管レモデリング

葛谷 雅文

Key words : 細胞外マトリックス蛋白, 血管新生, 動脈硬化, マトリックス・メタロプロテアーゼ

(日老医誌 2001; 38: 113—116)

はじめに

細胞外マトリックス蛋白は細胞接着に関与しているのみならず, 特異的受容体であるインテグリンを介して, アポトーシス, 細胞増殖, 遊走, 分化, プロテアーゼ産生など様々な細胞機能に関与していることが知られている¹⁾. 血管生物学分野においても, マトリックス蛋白により多くの現象がレギュレートされている.

血管構成細胞の機能を検索する上で, 培養を使用した実験系が広く使われている. その際, マトリックス蛋白との相互関係を検索したり, 細胞の遊走, 増殖を検討する場合, 単に培養皿やメンブランをマトリックス蛋白でコーティングし, その上での細胞を培養する場合が多い. しかしながら, 生体内では単にマトリックス蛋白上で細胞が増殖, 接着, 遊走したりする2次元的环境よりは, むしろ周囲をマトリックス蛋白で取り囲まれた3次元的环境で細胞が種々の行動をとることの方がはるかに多いと思われる. 例をあげると, 新生血管ができる過程において, 既存の血管の内腔側にある内皮細胞が基底膜, 血管外マトリックスを溶かしながら angiogenic factor の存在部位まで遊走して行くが, その遊走過程では内皮細胞周囲をマトリックス蛋白で取り囲まれた3次元環境にいる. 一方動脈硬化進展過程においては, 平滑筋細胞の中膜より内膜への遊走は重要な役割を担っているが, この平滑筋細胞の遊走過程においても, 平滑筋細胞の内膜への遊走は単にマトリックス蛋白の表面を移動するのではなく, マトリックスの内部を3次元的に浸潤し移動して行く. 従って, このような過程を培養系で表わすには, 2次元培養で細胞の behavior を検討するより, 細胞周囲をマトリックス蛋白で囲まれたような3次元的环境で検討する必要がある.

マトリックス・メタロプロテアーゼ

血管レモデリングの過程では血管組織に多量に存在する細胞外マトリックス蛋白を溶解することが不可欠である. このマトリックス蛋白溶解には中性環境下でマトリックスの構成蛋白質を加水分解する亜鉛含有の蛋白分解酵素群であるマトリックス・メタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) が重要な役割を果たしている. 表1に示すように現在までに多くの MMP family が報告されている. MMP の多くは様々な細胞で不活性型前駆体として産生され, プラスミン, トリプシンといった種々の内因性セリンプロテアーゼや活性化された別の MMP により, プロペプチド部分が切断され活性化される (図1). 最近, 膜型の MMP (MT-MMP) がクローニングされ, Pro-MMP-2 を活性化することが注目されている²⁾. さらに, 生体内には MMP の内因性阻害物質である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) が存在し MMP の働きを制御している (図1).

血管平滑筋細胞の浸潤モデル

上記のごとく, 動脈硬化進展過程でおこる平滑筋細胞の内膜側への移動は, 単なるマトリックス蛋白表面上を遊走するのではなく, むしろマトリックスの内部を「浸潤」し移動して行く. 我々はこの平滑筋細胞の浸潤過程

図1 MMP 活性化機構

表1 MMP family

名称	MMP 番号	基質
1) コラゲナーゼ群		
組織コラゲナーゼ	MMP-1	コラーゲン I, II, III, X
好中球コラゲナーゼ	MMP-8	コラーゲン I, II, III
コラゲナーゼ 3	MMP-13	コラーゲン I
2) ゼラチナーゼ群		
ゼラチナーゼ A	MMP-2	変性コラーゲン, コラーゲン IV, V, VII, XI, ラミニン, フィブロネクチン, エラスチン
ゼラチナーゼ B	MMP-9	変性コラーゲン, コラーゲン III, IV, V, エラスチン
3) ストロムライシン		
ストロムライシン 1	MMP-3	変性コラーゲン, コラーゲン III, IV, VII, IX, ラミニン, フィブロネクチン, プロテオグリカン
ストロムライシン 2	MMP-10	変性コラーゲン, コラーゲン III, IV, V, IX, フィブロネクチン, プロテオグリカン
ストロムライシン 3	MMP-11	変性コラーゲン, ラミニン, フィブロネクチン, プロテオグリカン
4) その他		
マトリライシン		変性コラーゲン, ラミニン, フィブロネクチン, エラスチン, プロテオグリカン, コラーゲン IV
メタロエラスターゼ		エラスチン
5) 細胞膜型 MMP 群		
MT1-MMP	MMP-14	変性コラーゲン, コラーゲン I, II, III, ラミニン, フィブロネクチン, プロテオグリカン
MT2-MMP	MMP-15	フィブロネクチン, テネイシン, アグリカン, パールカン
MT3-MMP	MMP-16	変性コラーゲン, コラーゲン III, フィブロネクチン

を定量化する *in vitro* のモデル (invasion assay) を作成し, この浸潤過程におけるプロテアーゼ, さらに特定のインテグリンの重要性を検討した³⁾.

平滑筋細胞の遊走 (migration) は, Transwell (5μm pore size) の inner chamber に collagen type I を thin-coating し, 上室に平滑筋細胞を加え, 下室に PDGF などの遊走因子を加えて培養し, 遊走因子に引き寄せられ membrane 下面に遊走してきた細胞を定量する方法がよく使用される. 我々は, inner chamber membrane 上に中和した collagen type I を加え, membrane 表面上でゲルを作成し invasion assay の系を作成した (図 2).

この migration assay と invasion assay を使用し, 平滑筋細胞の移動に与える様々な因子を検討した. 表 2 にまとめを示す. 種々の MMP 阻害剤 (KB-R8301, TIMP-1, TIMP-2, peptide 74) は平滑筋細胞の migration にはなんら影響を与えなかったが, 平滑筋細胞がコラーゲンを貫通する必要がある invasion において MMP 阻害剤は抑制作用を示した. $\alpha\text{v}\beta 3$ インテグリン抗体は平滑筋細胞の migration には影響せず, invasion のみ抑制効果を示した. 同様に $\alpha\text{v}\beta 3$ インテグリンのリガンドである RGD を含むペプチドは migration には影響を与えず, invasion のみ抑制した. 以上より, 平滑筋細胞がコラーゲンを溶かしながら移動 (浸潤) するには MMP が必須なこと, さらに平滑筋細胞 $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin とコラーゲン分子内の RGD site との interaction が重要な役割を果たすことが明らかとなった³⁾.

内皮細胞のコラーゲン・ゲル内 3 次元培養

血管内皮細胞のコラーゲン・ゲルを使用した 3 次元培養は血管新生の *in vitro* のモデルとしてよく使用されている. このモデルにおいては血管新生誘導物質の存在下で, 内皮細胞は隣接する内皮細胞同志が接着し, 毛細血管様のチューブを形成することが知られる. この 3 次元モデルでは 2 次元培養に比較し, 内皮細胞の増殖が抑制され, 内皮細胞は血管新生誘導物質により分化に導かれる.

ウシ胎児大動脈由来の内皮細胞をコラーゲン・ゲル内に埋没させ, 10% 血清存在下で 3 次元培養すると 3~4 日後に 80% 以上の細胞はゲル内で球形の形態を呈する. 核染色により, そのような細胞の核では fragmentation が起こっており, さらに DNA の ladder formation を認めることより, アポトーシスを起こしているものと思われる⁴⁾⁵⁾. なお, この内皮細胞はコラーゲンを thin-coating したディッシュ上での 2 次元培養では特別な成長因子非存在下でも血清が存在すれば正常に増殖し, アポトーシスを起こすことはない.

一方, 血清と basic fibroblast growth factor (FGF) や phorbol myristate acetate (PMA) などの血管新生誘導物質の存在下で 3 次元培養すると, 内皮細胞はゲル内で伸展し近接の細胞どうしが結合して毛細血管様のチューブを形成し, アポトーシスの誘導は阻害される. FGF, PMA 存在下で vitronectin 受容体である $\alpha\text{v}\beta 3$ インテグ

図2 平滑筋細胞の migration assay と invasion assay

表2 MMP 阻害剤, RGD peptide, インテグリン抗体の平滑筋細胞遊走, 浸潤に関する影響

	migration	invasion
KB-R8301	-	++
TIMP-1	-	+
TIMP-2	-	++
peptide 74	-	++
RGD peptide	-	++
$\alpha v \beta 3$ 抗体	-	+

-': 影響なし
 +': 中等度の抑制
 ++': 強度の抑制

表3 内皮細胞の3次元培養下でのアポトーシスの誘導

	angiogenic factor	
	(-)	(+)
(-)	apoptosis(+)	apoptosis(-)
$\alpha v \beta 3$ 抗体	apoptosis(+)	apoptosis(+)
MMP 阻害剤	apoptosis(-)	apoptosis(-)
$\alpha v \beta 3$ 抗体+MMP 阻害剤	apoptosis(-)	apoptosis(-)

リンの中和抗体を添加すると、チューブ形成は著しく抑制され、アポトーシスが誘導される。興味あることに、FGFやPMA非存在下で、MMP阻害剤を加えると、内皮細胞のコラーゲン・ゲル内でのアポトーシスは抑制される。さらにMMP阻害剤存在下では $\alpha v \beta 3$ インテグリン中和抗体によってもアポトーシスは誘導されない。表3に結果をまとめた。これらの結果より、少なくともコラーゲン・ゲル内でのチューブ形成のみならず、アポトーシスの回避に $\alpha v \beta 3$ インテグリンが必須であること。MMP阻害剤によりangiogenic factor非存在下でも、さらに $\alpha v \beta 3$ インテグリン中和抗体存在下でもアポトーシスがおこらないことより、内皮細胞自らが産生するMMPがアポトーシス誘導に関与しており、MMPにより内皮細胞のコラーゲン分子と反応するインテグリンが、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンにスイッチすることが示唆される。

3次元培養下でのコラーゲン分子の

プロテアーゼによる断列化

上記の2種類の実験から、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンがコラー

ゲン・ゲル内の3次元培養下では重要な働きをしていることが明らかとなった。しかし、native collagen type Iには $\alpha v \beta 3$ integrinのリガンドとなるRGD siteはtriple helix内に埋没しており、表出していない。しかし、コラーゲン分子が何らかの変性を受けるとそのtriple helix構造が壊れ、RGD siteが表出することが報告されている(図3)⁶⁾。従って、3次元培養下の平滑筋細胞や内皮細胞の周囲のコラーゲン分子は何らかの変性を受けている可能性がある。MMP阻害剤を3次元培養下に投与することにより、平滑筋細胞のコラーゲン・ゲルへの浸潤が押さえられること、さらには内皮細胞のコラーゲン・ゲル内でのアポトーシスが抑制されることより、上記の3次元培養の系では平滑筋細胞や内皮細胞が自ら産生するMMPにより、周囲のコラーゲン分子を変性させ、RGD siteを表出させている可能性が高いと思われる。

また $\alpha v \beta 3$ integrinの中和抗体、またはRGD peptideにより、平滑筋細胞の浸潤が抑制されたり、内皮細胞のアポトーシスが誘導されたりする事実は、変成されたコラーゲン分子と細胞との相互関係を維持するには細胞膜上に存在する $\alpha v \beta 3$ integrinが極めて重要な役割を果たしていることを意味している。

すなわち、コラーゲンに周囲を囲まれた3次元の環境下では平滑筋細胞も内皮細胞も自ら産生するMMPにより周囲のコラーゲン分子が変性を受け、コラーゲン分子上にRGD siteが現われ、細胞膜に存在する $\alpha v \beta 3$ inte-

図3 コラーゲンの変性と RGD site の表出

図4 細胞の細胞外マトリックス蛋白への浸潤

grin と反応することにより、浸潤が進んだり、アポトーシスが抑制され血管新生が進行するものと思われる (図4)。

まとめ

内皮細胞においても平滑筋細胞においても単なるコラーゲン分子上で増殖したり、遊走したりする機構とコラーゲン内での3次元的な環境下で分化して新生血管を形成したり、浸潤する機構は大きくことなることは明らかである。血管のリモデリング過程では血管構成細胞由来のMMPによる周囲のマトリックス蛋白の溶解変成が必須である。上記の実験では系をシンプルにするためコラーゲン・タイプIを使用した。実際の血管組織には

様々な細胞外マトリックス蛋白が存在しており、さらに複雑な機構が存在するものと思われる。

文 献

- 1) Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science 1995; 268: 233—239.
- 2) Sato H, Takino T, Ikada Y, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature 1994; 370: 61—65.
- 3) Kanda S, Kuzuya M, Ramos MA, Koike T, Yoshino K, Ikeda S, et al.: Matrix metalloproteinase and $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through the type I collagen lattice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 998—1005.
- 4) Satake S, Kuzuya M, Ramos MA, Kanda S, Iguchi A: Angiogenesis stimuli are essential for survival of vascular endothelial cells in the three-dimensional collagen lattice. Biochem Biophys Res Commun 1998; 244: 642—646.
- 5) Kuzuya M, Satake S, Ramos MA, Kanda S, Koike T, Yoshino K, Ikeda S, et al.: Induction of apoptotic cell death in vascular endothelial cells cultured in three-dimensional collagen lattice. Exp Cell Res 1999; 248: 498—508.
- 6) Davis G: Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: $\alpha\text{v}\beta 3$ binds to denatured collagen type I through RGD sites. Biochem Biophys Res Commun 1992; 182: 1025—1031.