炎症過程における好中球ゲラチナーゼ(matrix metalloproteinase-9)の発現調節

長岡 功・廣田聡子*

mini review

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Expression of neutrophil metalloproteinase-9 (gelatinase) under inflammatory conditions

Matrix metalloproteinase(MMP)-9 plays an important role in neutrophil extravasation and migration by its ability to degrade the major components of basement membrane. To evaluate the expression of neutrophil MMP-9(gelatinase) under inflammatory conditions, we examined the levels of MMP-9 and its mRNA in neutrophils from glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs. MMP-9 level in peritoneal neutrophils was essentially the same as that in blood neutrophils, although peritoneal neutrophils were assumed to have extracellularly released MMP-9 from the granules during infiltration into the peritoneal cavity. Interestingly, MMP-9 mRNA was expressed more abundantly in peritoneal neutrophils than in blood neutrophils. Moreover, actinomycin D-or cycloheximide-treatment significantly suppressed the MMP-9 levels in blood and peritoneal neutrophils. In addition, when blood neutrophils from non-injected animals were stimulated with 10^{-7} M N-formyl-Met Leu-Phe, $10 \mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide, 10 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate, 10^{-8} M IL-8 or 100 U/ml tumor necrosis factor- α , expression of MMP-9 mRNA was markedly increased. The present observations indicate that MMP-9 gene is transcribed, and MMP-9 protein is synthesized in neutrophils during inflammation. Moreover, the transcription of MMP-9 gene can be upregulated in neutrophils by stimulation with inflammatory mediators, even after neutrophils have been matured.

Rec. 9/16/1999, Acc. 10/12/1999, pp 31~37

Isao Nagaoka・Satoko Hirota*

key words : *gelatinase, matrix metalloproteinase, neutrophil, inflammation, expression*

好中球の顆粒内には、マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinases, MMPs)が存在し、細胞外マトリックスの分解を介して好中球の血管外浸潤や好中球による組織障害に深く関わっている(表1)¹⁾。好中球のMMPsのなかで、コラゲナーゼ(75-kDa neutrophil collagenase,

MMP-8)が主にI-III型のコラーゲンを分解するのに対して、ゲラチナーゼ(92-kDa gelatinase, MMP-9)は基底膜のIV型コラーゲンやエラスチン、フィブロネクチン、ラミニンなどの細胞外基質蛋白質を幅広く分解することによって、好中球の血管外浸潤により重要な働きをされると考えられている^{2~4)}。好中球MMP-9は、骨髄における好中球の分化・成熟過程の中期～後期(骨髄球、後骨髄球)に生成され、その後、成熟好中球の顆粒内に蓄えられて存在する^{5~9)}。このことから、MMP-9の

* Department of Biochemistry, Juntendo University, School of Medicine 順天堂大学医学部生化学第二
Offprint requests to : Isao Nagaoka, Department of Biochemistry Juntendo University School of Medicine, 2-1-1, Hongo Bunkyo-ku Tokyo, 113-8421 Japan

表 1 白血球に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ

種 類	細 胞	基 質
Interstitial collagenase (MMP-1)	Mononuclear phagocytes Eosinophils	Collagen I, II, III, VII, X, gelatin, proteoglycan
Neutrophil collagenase (MMP-8)	Neutrophils, eosinophils	Collagen I, II, III, VII, X, gelatin, proteoglycan
72-kDa gelatinase (MMP-2)	Mononuclear phagocytes	Gelatin, collagen IV, V, elastin, fibronectin, laminin
92-kDa gelatinase (MMP-9)	Neutrophils Mononuclear phagocytes	Gelatin, collagen IV, V, elastin, fibronectin, laminin
Stromelysin-1, -2, -3 (MMP-3, -10, -11)	Mononuclear phagocytes	Collagen IV, V, fibronectin, laminin, proteoglycan
Matrilysin (MMP-7)	Monocytes	Elastin, collagen IV, fibronectin, laminin, proteoglycan
Metalloelastase (MMP-12)	Macrophages	Elastin, fibronectin, laminin, collagen IV, proteoglycan

文献¹⁾より改変

図 1 グリコーゲン腹腔炎症モデルにおける好中球 MMP-9 の変化
未処理の動物およびグリコーゲン投与動物から血液好中球、腹腔細胞(マク
ロファージ, 好中球)および腹腔上清を調製し, 細胞の場合 4×10^3 個, 上清の場合
 4×10^3 細胞相当をゲラチンを含むポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後
に, ザイモグラムを作成して MMP-9 の発現を検討した²⁵⁾. 上にザイモグラム
が, 下にその結果を Master Scan で定量した結果を示す. 92 kDa の分子は好
中球 MMP-9 を示し, 220 kDa の分子はその二量体を示す²⁶⁾. また, 75 kDa と
63 kDa の分子は MMP-9 の自己分解産物と考えられる²⁷⁾. 発現量は血液好中
球, 腹腔細胞あるいは腹腔上清どうしの間で比較した. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

図 2 腹腔炎症モデルにおける好中球 MMP-9 の mRNA の変化
未処理の動物およびグリコーゲン投与動物の血液好中球および腹腔細胞 (マクロファージ, 好中球) から total cellular RNA を調製し, それをアガロース電気泳動後, ナイロンメンブランに転写し, digoxigenin で標識した MMP-9 およびアクチンの cDNA プローブとハイブリダイズして mRNA の発現を検討した. 上は, ノザンプロットのオートラジオグラムを示し, 2.8 kb と 2.2 kb のバンドは, MMP-9 とアクチンの mRNA をそれぞれ表す. 下は, これらの結果を Master Scan で定量した結果を示す. 発現量は血液好中球あるいは腹腔細胞どうしの間で比較した. N.D.; not detected. **** $p < 0.001$

作用発現は, 遺伝子の転写レベルよりも顆粒の放出反応によって調節されると考えられてきた⁴⁾. しかし, 筆者らは最近, モルモットのグリコーゲン誘発腹腔炎症モデルを用いて好中球 MMP-9 の発現が転写レベルや翻訳レベルにおいても調節されていることを明らかにした.

そこで, 本稿ではそれらの知見に基づいて, 炎症過程における好中球 MMP-9 の発現調節について論じる.

腹腔炎症における好中球 MMP-9 の発現の変化

腹腔炎症モデルは, モルモットの腹腔にグリ

コーゲンを投与して作成し, グリコーゲン投与後, 約 15 時間で血液および腹腔滲出液を採取した. 血液からは比重遠心法によって好中球を分離し, 腹腔滲出液からは遠心によって腹腔滲出好中球と上清を回収した. また, 未処理の動物からも, 同様の操作によって血液好中球, 腹腔マクロファージ, 腹腔上清を回収し, MMP-9 の活性をゲラチンゼイモグラフィを用いて検討した (図 1). その結果, 未処理の動物において血液好中球は明らかな MMP-9 活性を示したが, 腹腔マクロファージと腹腔上清では, 血液好中球の 20% 程度しか活性を認めなかった. 一方, グリコーゲン投与動物では,

図3 好中球のMMP-9発現に及ぼすシクロヘキシミドとアクチノマイシンDの影響
 蛋白合成阻害剤のシクロヘキシミド(10 mg/kg)あるいはRNA合成阻害剤のアクチノマイシンD(500 μ g/kg)をグリコーゲン誘発腹腔炎症モデルに前投与して、MMP-9発現に及ぼすそれらの効果を検討した。図1と同様に、血液および腹腔好中球を 4×10^3 個、あるいは腹腔上清を 4×10^3 細胞相当電気泳動して得られたザイモグラムを上を示す。また、下には、その結果をMaster Scanで定量した結果を示す。発現量は血液好中球、腹腔好中球あるいは腹腔上清どうしの間で比較した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$

好中球の腹腔内浸潤に伴って腹腔上清に好中球MMP-9の増加が認められた。さらに、腹腔滲出好中球は、浸潤過程でゲラチナーゼを細胞外に放出しているにもかかわらず、血液好中球と同等のMMP-9活性を示すことがわかった。また、炎症動物の血液好中球は、未処理動物の好中球よりもMMP-9活性が少し高い傾向を示した。これらの結果から、炎症過程において好中球のMMP-9が新たに生合成されている可能性が考えられた。

そこで、そのことを確かめるために、まず、MMP-9のmRNA発現について調べた(図2)。その結果、未処理動物の血液好中球と腹腔マクロファージでは、MMP-9のmRNA発現は認められなかったが、グリコーゲン炎症動物では、血液好中球においてMMP-9のmRNA発現が認められ、さらに、その発現が腹腔滲出好中球におい

て増加していることがわかった。

さらに、蛋白質合成阻害剤およびRNA合成阻害剤のMMP-9活性に及ぼす影響を検討した(図3)。その結果、蛋白合成阻害剤のシクロヘキシミドあるいはRNA合成阻害剤のアクチノマイシンDを前投与することによって、グリコーゲン炎症における血液好中球と腹腔滲出好中球のMMP-9活性が、コントロールの約50%まで減少することがわかった。一方、腹腔上清のゲラチナーゼ活性はこれらの処理によってほとんど影響されなかった。

これらの結果から、グリコーゲン腹腔炎症の血液好中球と腹腔滲出好中球ではRNA合成と蛋白合成を介して、MMP-9が新たに生成されることがわかった。一方、腹腔上清のゲラチナーゼは、RNA合成と蛋白合成に依存しないことから、お

図 4 MMP-9 の mRNA 発現に及ぼす好中球刺激の影響

MMP-9 の mRNA 発現に及ぼす好中球の刺激効果を検討するために、未処理のモルモットから調製した血液好中球 (2×10^6 cells/ml) を 10% fetal calf serum を含む RPMI-1640 培地中で 10^{-7} M fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe), $10 \mu\text{g/ml}$ LPS (リポ多糖), 10 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), 10^{-8} M IL-8, 100 U/ml TNF- α と 37°C , 18 時間培養した後に, RNA を分離し, MMP-9 mRNA の発現をノザンプロット法で解析した. 上は, ノザンプロットのオートラジオグラムを示し, 下は, これらの結果を Master Scan で定量した結果を示す. 発現量は刺激物質を加えないもの (None), 加えたもの (fMLP, LPS, PMA, IL-8, TNF- α) の間で比較した. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$

そらく好中球の顆粒内に蓄えられていたものが, 好中球の浸潤に伴って細胞外に放出されたものと考えられた.

好中球刺激による MMP-9 mRNA 発現の変化

さらに, MMP-9 の mRNA 発現に及ぼす好中球の刺激効果について検討した. そのために, 未処理動物の血液好中球を種々の物質で刺激した後に, MMP-9 の mRNA 発現をノザンプロット法で検討した. その結果, 好中球を fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe), LPS (リポ多糖), PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) で刺激すると MMP-9 mRNA が 3~5 倍増加することがわかった. さらに, IL-8 や TNF- α のようなケモカインやサイトカインで刺激しても MMP-9 mRNA が約 3 倍増加した. これらの結果から, 好

中球は骨髓で成熟し, 血流中に出た後にも, 刺激を受けると MMP-9 遺伝子の転写が起り, mRNA が新たに合成されることがわかった.

おわりに

単球・マクロファージ, 線維芽細胞, リンパ球, 粘膜ケラチノサイトなどの細胞において, MMP-9 の発現が, 炎症性サイトカイン, ケモカイン, LPS などの刺激によって転写レベルあるいは翻訳レベルで調節されることが知られている^{10~14)}. しかし, 好中球の場合, MMP-9 の mRNA が, 骨髓における好中球の分化・成熟過程の限られた時期に発現し, 成熟好中球でほとんど認められないことから, MMP-9 の作用発現は, 遺伝子の転写レベルよりも顆粒の放出反応によって調節されと考えられてきた^{4~9)}.

炎症過程において、種々のサイトカイン、ケモカインが生成され、好中球機能に影響することから¹⁵⁾、筆者らは、炎症刺激によって好中球のMMP-9発現も変化するのではないかと考え、グリコーゲン誘発腹腔炎症モデルを用いて、好中球のMMP-9について検討した。その結果、炎症の際、好中球においてMMP-9遺伝子の転写が亢進して、MMP-9が新たに合成されることを見出した。さらに、成熟好中球を *in vitro* で炎症性の物質で刺激するとMMP-9の遺伝子が転写されることを明らかにした。ヒトおよびマウスでは、MMP-9遺伝子がすでに単離され、それらの転写にはNF- κ BやAP-1のような転写因子が関与することが報告されている¹⁶⁾。NF- κ BはLPSやTNF- α のシグナル伝達系に関与し^{17,18)}、一方、AP-1はPMA, IL-8, fMLPなどのプロテインキナーゼCの活性化を介したシグナル伝達系に関与することが示されている^{19~21)}。筆者らの実験でもこれらの物質によってMMP-9のmRNAが増加したことから、モルモットのMMP-9遺伝子の転写にもNF- κ BやAP-1のような転写因子が関与している可能性が考えられる。

MMPsの酵素活性は生体内でメタロプロテアーゼ組織インヒビター(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)のような内因性の阻害物質によって調節されている^{1~4)}。そして、TIMPsの転写には、MMPsと共通の転写因子が関与することが知られている¹⁶⁾。実際、筆者らの炎症モデルにおいても、MMP-9を特異的に阻害するTIMP-1のmRNA発現が腹腔好中球において増加していることを見出した(未発表データ)。したがって、MMP-9とTIMP-1の発現は、炎症過程において協調的に調節されている可能性がある。

最近、MMPsに対する特異的な阻害剤が開発され、それらの効果が検討されている²²⁾。そして、MMP-9阻害剤のGM 6001がTリンパ球のMMP-9活性と遊走能を阻害することが明らかにされた²³⁾。また線維芽細胞を用いた実験において、NF- κ Bを阻害するI- κ Bを遺伝子導入するとMMP-9の発現が抑制されることが見出され

た²⁴⁾。将来、MMP-9の阻害剤を投与したり、あるいはI- κ Bを導入したりして、好中球のMMP-9の発現を酵素活性レベルあるいは遺伝子の転写レベルで調節することによって、炎症の際にみられる好中球の過度の浸潤と、それに伴う組織障害を調節できるようになることが期待される。

文 献

- 1) Owen CA, Campbell EJ : The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol* 65 : 137-150, 1999.
- 2) Matrisian LM : Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6 : 121-125, 1990.
- 3) Woessner JF, Jr : Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5 : 2145-2154, 1991.
- 4) Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA : Matrix metalloproteinases : a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4 : 197-250, 1993.
- 5) Borregaard N, Sehested M, Nielsen BS, Sengeløv H, Kjeldsen L : Biosynthesis of granule protein in normal human bone marrow cell. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood* 85 : 812-817, 1995.
- 6) Borregaard N, Cowland JB : Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89 : 3503-3521, 1997.
- 7) Gullberg U, Andersson E, Garwicz D, Lindmark A, Olsson I : Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins : insight into neutrophil granule development. *Eur J Haematol* 58 : 137-153, 1997.
- 8) Nagaoka I, Tsutsumi-Ishii Y, Yomogida S, Yamashita T : Isolation of cDNA encoding guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa(CAP11) and evaluation of CAP11 mRNA expression during neutrophil maturation. *J Biol Chem* 272 : 22742-22750, 1997.
- 9) Nagaoka I, Hirata M, Sugimoto K, Tsutsumi-Ishii Y, Someya A, Saionji K, Igari J : Evaluation of the expression of human CAP 18 gene during neutrophil maturation in the bone marrow. *J Leukoc Biol* 64 : 845-852, 1998.
- 10) Sarén P, Welgus HG, Kovanen PT : TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 157 : 4159-4165, 1996.
- 11) Zhang Y, McCluskey K, Fujii K, Wahl LM : Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TGF- α , granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 β through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 161 : 3071-3076, 1998.
- 12) Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ, Rees RC : Cytokine and chemokine regulation of proM-

- MP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 158 : 2327-2333, 1997.
- 13) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI : SV 40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264 : 17213-17221, 1989.
 - 14) Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Pierson M, Whitelock JM, Birkedal-Hansen H : Interleukin-1 β and transforming growth factor- α /epidermal growth factor induce expression of Mr 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem* 268 : 19143-19151, 1993.
 - 15) Shijo H, Iwabuchi K, Hosoda S, Watanabe H, Nagaoka I, Sakakibara N : Evaluation of neutrophil functions after experimental abdominal surgical trauma. *Inflamm Res* 47 : 67-74, 1998.
 - 16) Borden P, Heller RA : Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7 : 159-178, 1997.
 - 17) Darnay BG, Aggarwal BB : Early events in TNF signaling : a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol* 61 : 559-566, 1997.
 - 18) Kopp EB, Medzhitov R : The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11 : 13-18, 1999.
 - 19) Snyderman R, Uhing RJ : Chemoattractant stimulus-response coupling. In *Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates*. (Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R eds) 2nd ed. Raven Press, New York, 1992, p 421-439.
 - 20) Pedruzzi E, Hakim J, Giroud JP, Perianin A : Analysis of choline and phosphorylcholine content in human neutrophils stimulated by f-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate : contribution of phospholipase D and C. *Cell Signal* 10 : 481-489, 1998.
 - 21) Atta-ur-Rahman, Harvey K, Siddiqui RA : Interleukin-8 : an autocrine inflammatory mediator. *Curr Pharm Des* 5 : 241-253, 1999.
 - 22) Guedez L, Lim MS, Stetler-Stevenson WG : The role of metalloproteinases and their inhibitors in hematological disorders. *Crit Rev Oncog* 7 : 205-225, 1996.
 - 23) Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D : Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 156 : 1-4, 1996.
 - 24) Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC : Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines : an absolute requirement for transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett* 435 : 29-34, 1998.
 - 25) Yasumitsu H, Miyazaki K, Umenishi F, Koshikawa N, Umeda M : Comparison of extracellular matrix-degrading activities between 64-kDa and 90-kDa gelatinases purified in inhibitor-free forms from human schwannoma cells. *J Biochem(Tokyo)* 111 : 74-80, 1992.
 - 26) Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N : Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 268 : 10425-10432, 1993.
 - 27) Ferry G, Lonchampt M, Pennel L, de Nanteuil G, Canet E, Tucker GC : Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Lett* 402 : 111-115, 1997.