原 著

TIMP-1 および TIMP-2 は破骨細胞形成を促進する

祖父江尊範^{*1} 大口雅代^{*1} 田中繁寿^{*1}小出雅則^{*1} 石原裕一^{*1} 山下京子^{*2}早川祐久^{*1} 早川太郎^{*2} 野口俊英^{*1}^{*1}愛知学院大学歯学部歯周病学講座^{*2}愛知学院大学歯学部生化学講座

(受付日: 2005 年 9 月 27 日 受理日: 2005 年 11 月 9 日)

Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2)
Stimulate Osteoclast DifferentiationTakanori Sobue^{*1}, Masayo Oguchi^{*1}, Shigehisa Tanaka^{*1},Masanori Koide^{*1}, Yuichi Ishihara^{*1}, Kyoko Yamashita^{*2},Hirohisa Hayakawa^{*1}, Taro Hayakawa^{*2} and Toshihide Noguchi^{*1}^{*1}Departments of Periodontology, ^{*2}Biochemistry, Aichi-Gakuin University, School of Dentistry

(Received : September 27, 2005 Accepted : November 9, 2005)

Abstract : Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2, originally known as intrinsic inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs), are now known as constitutive components in serum and have potent cell growth-promoting activity. In this study, we examined the effects of TIMPs in FCS on osteoclast-like (OCL) cell formation in mouse bone marrow culture. The OCL cell formation is totally dependent on the presence of PGE₂ or 1 α 25 (OH)₂D₃ or IL-1 α . The effects of these factors were, however, not completely but greatly suppressed by deleting TIMP-1 and TIMP-2 from FCS in culture. But the suppression was almost fully recovered by the readdition of the same amount of recombinant (r) TIMPs which were detected in 10% FCS. As low molecular weight MMP inhibitors could not substitute rTIMPs for the recovery, TIMP activity on the OCL cell formation seemed to be independent from their MMP inhibitory activity. These results strongly suggest a secondary but potent stimulating activity of TIMPs on OCL cell formation. In conclusion, TIMPs in serum play an important role in osteoclastogenesis in mouse bone marrow culture. Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 47 : 297–307, 2005.

Key words : tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2), osteoclasts, bone marrow culture

連絡先: 祖父江尊範

〒 464-8651 愛知県名古屋市中千種区末盛通 2-11 愛知学院大学歯学部歯周病学講座

Takanori Sobue

Aichi-Gakuin University, School of Dentistry, Department of Periodontology

2-11 Suemori-dori Chikusa-ku Nagoya 464-8651 Japan

E-mail Sobue@dpc.aichi-gakuin.ac.jp

要旨：Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) は Matrix metalloproteinases (MMPs) に共通の内因性インヒビターであり、細胞外マトリックス成分の分解を調節している。しかし TIMPs が、MMPs インヒビターとしての機能とは独立して、広範囲の細胞に対し増殖活性を有することが明らかになっている。本研究では、TIMPs が PGE₂ などの破骨細胞形成促進因子共存下におけるマウス骨髄細胞培養系において、破骨細胞の形成を促進することを明らかにした。すなわち、培養液中に加えられる FCS より TIMP-1 および TIMP-2 を除くことにより破骨細胞形成が有意に抑制された。しかしリコンビナント TIMP-1 および TIMP-2 を添加することにより破骨細胞形成は有意に回復した。さらに、抗 TIMP-1 および TIMP-2 抗体を加えたところ、破骨細胞形成が有意に抑制された。また、TIMPs の破骨細胞形成促進活性の作用機構を明らかにするため、メタロプロテアーゼインヒビターや合成 MMP インヒビターをリコンビナント TIMPs の代りに添加したが、破骨細胞形成の促進は認められなかった。本研究により、TIMP-1 および TIMP-2 は破骨細胞形成を MMPs 阻害作用とは異なる別の作用機構により促進していることが明らかとなった。

キーワード：tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2)、破骨細胞、骨髄細胞培養

緒 言

間質コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ A、ゼラチナーゼ B およびストロムライシン-1 に代表されるマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases : MMPs) はコラーゲン、ゼラチンおよびプロテオグリカンなどの、細胞外マトリックス成分 (extracellular matrix : ECM) を分解することにより、歯周病¹⁾や関節リウマチ²⁾などにおける炎症の進展や、癌における浸潤・転移³⁾に深く関与していることが知られている。さらに破骨細胞における骨吸収の場においても、MMPs や cysteine proteases などのタンパク質分解酵素が骨基質成分の分解に関与しており、破骨細胞自身がゼラチナーゼ B (MMP-9)⁴⁾ や cathepsin K⁵⁾ を産生していることが明らかとなっている。MMPs は線維芽細胞をはじめ、種々の正常細胞や癌細胞などが産生・分泌しており、現在までにサブファミリーまで数えると 28 種類、ヒトに限定すると 24 種類が報告されている⁶⁻¹¹⁾。

一方、MMPs に共通の内因性阻害剤として tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) の存在が知られており、これも現在までにヒトで TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 および TIMP-4 の 4 種類が報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。TIMPs も MMPs と同様に、種々の正常細胞や癌細胞などが産生・分泌することが知られている。これら TIMPs が MMPs の活性を阻害することにより、ECM や骨基質成分の分解を調節しているものと推察されている。TIMPs の MMPs 阻害機構は活性型 MMPs と 1 : 1 で結合して複合体を形成すること以外に TIMP-1 がプロゼラチナーゼ B と、TIMP-2 がプロ間質コラゲナーゼおよびプロゼラチナーゼ A と複合体を形成して、それらプロ酵素から活性型酵素への自己活性化を抑制することであ

る。

TIMPs のその他の機能として、TIMP-2 が膜型 MMPs の一つである MT 1-MMP によるプロゼラチナーゼ A の細胞表面での活性化に不可欠であることから、TIMP-2 はプロゼラチナーゼ A を細胞表面に局在させる錨のような役割を果たしていると考えられている¹⁵⁾。

しかし最近、TIMPs が上記の MMPs 活性の阻害作用の他に、様々な機能を有することが明らかとなってきた。これらの作用は広義の増殖因子活性と呼ぶもので、EPA (erythroid-potentiating activity)、細胞増殖活性、ESA (embryogenesis-stimulating activity)、血管内皮細胞増殖抑制活性、STP (steroidogenesis-stimulating protein)、生存因子、子宮内膜症タンパク質 II (ENDO-II) などである¹⁰⁾。特に Hayakawa らはヒト TIMP-1 および TIMP-2 が広範囲の細胞に対して強い増殖活性を示すことを明らかにしており、さらに、これらの活性は MMPs 阻害活性とは独立したものであることを示している^{16,17)}。またニワトリ胎仔線維芽細胞が産生する TIMP-3、ChIMP-3 (chicken inhibitor of metalloproteinases) にも線維芽細胞の増殖促進活性が見い出されており¹⁸⁾、これらの事実は、細胞増殖活性が TIMPs に共通の機能であることを示唆している。また、TIMP-1 および TIMP-2 はヒト血清やウシ胎児血清 (fetal calf serum : FCS) 中の常在成分であり^{17,19,20)}、FCS の細胞増殖作用はこれら TIMP-1 および TIMP-2 に大きく依存していることが明らかにされている^{16,17)}。すなわち、両 TIMP は血清中の強力な細胞増殖因子であると言える。ところでこれまで、成熟破骨細胞の形成には、細胞間接触を媒介する破骨細胞分化因子 (RANKL) の骨芽細胞/間質細胞表面への発現²¹⁾と液性因子であるマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) の分泌²²⁾が深く係っていることが明らかにされ

ている。本研究によって、この破骨細胞の成熟過程に、新しい細胞増殖因子である TIMP-1 および TIMP-2 が関与しているという興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 材 料

1) 抗 TIMP-1 および抗 TIMP-2 モノクローナル抗体結合プレートの調製

抗 TIMP-1 モノクローナル抗体 (クローン 7-23 G 9 の IgG; 第一ファインケミカル) もしくは抗 TIMP-2 モノクローナル抗体 (クローン 68-6 H 4 の IgG; 第一ファインケミカル) の溶液をマイクロプレートウェル (NUNC, Denmark) へ入れ、4°C にて 24 時間静置後、脱イオン水にて素早く 2 回洗浄した。ついで、抗 TIMP-1 モノクローナル抗体結合プレートへは 1% BSA, 10 mM EDTA, 0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) を加え、4°C にて 48 時間ブロッキングした。そして、脱イオン水にて 3 回洗浄後、凍結乾燥した。抗 TIMP-2 モノクローナル抗体結合プレートへは 1% BSA, 30 mM EDTA, 0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、4°C にてブロッキングし、測定時に脱イオン水にて 3 回洗浄後使用した。

2) TIMP(-)FCS の調製

マウス骨髄細胞培養に用いるウシ胎児血清 (FCS) に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 は抗 TIMP-1 モノクローナル抗体および抗 TIMP-2 モノクローナル抗体アフィニティカラム²⁰⁾にて除去し、サンドイッチ酵素免疫測定法 (EIA) 法にて TIMP-1 および TIMP-2 の除去を確認後、TIMP (-)FCS として用いた。

3) 実験動物

実験動物として ddY マウス (6 週齢の雌) を用いた。なお本研究は愛知学院大学歯学部実験動物指針に従って行った。

4) 培地

培地は 10% FCS, ペニシリン G カリウム (100 U/ml) およびストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含む α -MEM を用いた。

5) 破骨細胞形成促進因子

破骨細胞形成促進因子としてプロスタグランディン E₂ (PGE₂) (SIGMA, USA), ヒトリコンビンアントインターロイキン 1 α (hrIL-1 α) (R & D Systems, USA) および活性型ビタミン D₃ (カルシトリオール,

1 α 25 (OH)₂D₃) (和光純薬) を用いた。

6) 統計学的解析

実験結果は全て平均 + S.E. で表示した。統計処理は Student の *t* 検定を用いて評価した。

2. 実験方法

1) TIMPs 量の定量

培地に加える FCS 中の TIMP-1 量および TIMP-2 量の定量, および TIMP(-)FCS 調整時の TIMP-1 および TIMP-2 の除去の確認に用いた。TIMP-1 量は, Kodama らのサンドイッチ EIA に従って測定した²³⁾。すなわち, 被検液とペルオキシダーゼ標識抗 TIMP-1 モノクローナル抗体 (クローン 7-6 C 1 の Fab'; 第一ファインケミカル) を反応させた。ついで, その反応液を, 異なるエピトープを標識する抗 TIMP-1 モノクローナル抗体 (クローン 7-23 G 9 の IgG, 第一ファインケミカル) を結合させたマイクロプレートウェルへ移し, 室温にて 30 分間静置反応させた。その後, 抗原抗体反応液をアスピレーターにて吸引除去し, 0.1% Tween 20, 0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) にて素早く 3 回洗浄した。ついで, 0.5 mg/ml o-フェニレンジアミン, 0.02% 過酸化水素水を含む 0.15 M クエン酸ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 4.9) を加え, 室温にて 15 分間静置反応させた。その後, 2 N 硫酸 (最終濃度 1 N) を加え酵素反応を停止し, マイクロプレートリーダー (東ソー-MPR-A 4 型) を用いて, 波長 492 nm における吸光度を測定した。TIMP-2 量は, Fujimoto らのサンドイッチ EIA に従って測定した²⁰⁾。すなわち, 被検液とペルオキシダーゼ標識抗 TIMP-2 モノクローナル抗体 (クローン 67-4 H 11 の IgG; 第一ファインケミカル) を反応させた。ついで, その反応液を, 異なるエピトープを標識する抗 TIMP-2 モノクローナル抗体 (クローン 68-6 H 4 の IgG) を結合させたマイクロプレートウェルへ移し, 室温にて 60 分間静置反応させた。その後, 抗原抗体反応液をアスピレーターにて吸引除去し, 0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) にて素早く 3 回洗浄した。ついで, 2 mg/ml o-フェニレンジアミン, 0.02% 過酸化水素水を含む 0.15 M クエン酸ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 4.9) を加え, 室温にて 20 分間静置反応させた。その後, TIMP-1 量測定と同様に硫酸を加え酵素反応を停止し, マイクロプレートリーダーを用いて, 波長 492 nm における吸光度を測定した。

2) マウス骨髄細胞培養

骨髄細胞は 6 週齢の ddY マウスから常法に従って無菌的に採取した²⁴⁾。次に骨髄細胞を通常の FCS

[TIMP(+)]FCS] または抗 TIMP-1 モノクローナル抗体および抗 TIMP-2 モノクローナル抗体アフィニティーカラムにて TIMP-1 および TIMP-2 を除去した FCS [TIMP(-)]FCS] を 10% 添加した α -MEM 培地にて、 1×10^6 cells/well に調製した。24 ウェルマイクロタイタープレート (CORNING, USA) を用い、各ウェルに骨髓細胞および各種試験試薬を加え、5% CO_2 存在下 37°C で 3 日目ごとに培地交換をしながら 6-8 日間培養した。培養終了後、10% ホルマリンを含むリン酸緩衝化生理食塩水 (以下 PBS と略す) で細胞を 10 分間固定した。続いてエタノール・アセトン (1:1) で 1 分間、後固定した。乾燥後、50 mM の酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase; TRAP) 反応液を入れた。室温にて 10-15 分間放置後、水洗、乾燥させ光学顕微鏡下で観察した。通常 3 核以上の核を有する TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞として計測した。この実験系にて TIMP-1 および TIMP-2 が破骨細胞形成にどのような影響を及ぼすか、1) FCS 中に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 の影響、2) TIMP(-)FCS 条件下におけるリコンビナントウシ TIMP-1 およびリコンビナントヒト TIMP-2 の影響、3) TIMP(+)]FCS 条件下における抗 TIMP-1 抗体および抗 TIMP-2 抗体の影響、および 4) TIMP(+)]FCS 条件下におけるメタロプロテアーゼ阻害剤 (BE 16627 B, 萬有製薬) および合成 MMP 阻害剤 (R 94138, 三共) の影響について実験を行った。

3) RT-PCR 法

マウス骨髓細胞を 10% FCS 添加した α -MEM にて 6 日間培養した後、PBS にて洗浄し非付着細胞を除去し、付着細胞を骨髓間質細胞として用いた。その骨髓間質細胞に各々の実験条件に合うように刺激物を添加し 6 時間培養し、細胞を回収した。mRNA の抽出には QuickPrep[®] Micro mRNA Purification kit (アマシャムバイオサイエンス) を用いた。得られた mRNA は通法にて逆転写酵素反応を行ない、cDNA を合成した。合成された cDNA は PCR 法にて denaturation 94°C , 1 分, annealing 60°C , 1 分, polymerization 72°C , 30 秒の条件下で増幅した。反応終了後、PCR 産物は ethidium bromide 含有 1.5% agarose gels にて電気泳動を行い検出した。この実験系を用いて RANKL, OPG および M-CSF の mRNA 発現における TIMP および PGE_2 の影響を検討した。増幅に用いたプライマーおよびサイクル数を以下に示す。

RANKL sense, 5'-GGTCGGGCAATTATGAA-

TT-3';

RANKL antisense, 5'-GGGAATTACAAAGTG-CACCAG-3';

OPG sense, 5'-TGGAGATCGAATTCTGCT-TG-3';

OPG antisense, 5'-TCAAGTGCTTGAGGGCA-TAC-3';

M-CSF sense, 5'-AGTGAGGGATTTTGTACC-CAGGAAGCAAA-3';

M-CSF antisense, 5'-CTATACTGGCAGTTCC-ACCTGTCTGT-3';

β -actin sense, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3';

β -actin antisense, 5'-CTCTTTGATGTCACGC-ACGATTTC-3'

サイクル数: RANKL 25 cycles, OPG 30 cycles, M-CSF 25 cycles, β -actin 17 cycles

結 果

1. FCS 中に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 量

本実験の培養系で用いる FCS 中に含まれる TIMP-1 量および TIMP-2 量を測定したところ TIMP-1 は 105 ng/ml, TIMP-2 は 107 ng/ml 含まれていることが分った。またロットの異なる FCS についても測定してみたところ、TIMP-1 および TIMP-2 量に違いのあることが明らかとなった (データは示していない)。

2. 破骨細胞形成における TIMP-1 および TIMP-2 の影響

1) FCS 中に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 は破骨細胞形成を促進する

通常の FCS [TIMP(+)]FCS] を用いた培養系に破骨細胞形成促進因子である PGE_2 を加えることにより破骨細胞形成は促進された (図 1, レーン 1 と 2)。また、TIMP-1 および TIMP-2 を除去した FCS [TIMP(-)]FCS] を用いた培養系においても、 PGE_2 を添加することにより破骨細胞形成は認められたが (図 1, レーン 3 と 4)、TIMP(+)]FCS に PGE_2 を加えた群と比較するとその破骨細胞形成は有意に抑制された (図 1, レーン 2 と 4)。しかし、この TIMP (-)FCS に PGE_2 を加えた群に、通常の FCS [TIMP(+)]FCS] に含まれる量と同量のリコンビナント TIMP-1 およびリコンビナント TIMP-2 を添加することにより、TIMP(+)]FCS に PGE_2 を加えた群と同程度まで破骨細胞形成が回復した (図 1, レー

図1 破骨細胞形成における PGE₂ および FCS に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 の影響

骨髄細胞を TIMP(+)FCS もしくは TIMP(-)FCS を 10% 含む α -MEM にて PGE₂ 刺激下で 6 日間培養した時の TRAP 陽性多核細胞数 (PGE₂: 10^{-6} M, rTIMP-1: 10 ng/ml, rTIMP-2: 10 ng/ml, * $p < 0.01$)

図3 破骨細胞形成における抗 TIMP-1 抗体および抗 TIMP-2 抗体の影響

骨髄細胞を TIMP(+)FCS および抗 TIMP-1 抗体および抗 TIMP-2 抗体を含む α -MEM にて PGE₂ 刺激下で 6 日間培養した時の TRAP 陽性多核細胞数 (PGE₂: 10^{-6} M, mouse IgG: 0.5 mg/ml, * $p < 0.01$)

ン 4 と 5)。また PGE₂ の代りに他の破骨細胞形成促進因子である IL-1 α や 1 α 25 (OH)₂D₃ を添加しても、同様の結果が得られた (図 2)。さらに、破骨細胞形成に対する TIMP-1 および TIMP-2 の影響をより明確にするため以下の実験を行った。

2) 抗 TIMP-1 および抗 TIMP-2 抗体により破骨細胞形成は抑制される

TIMP(+)FCS に PGE₂ を加えた群に、抗 TIMP-1 および抗 TIMP-2 抗体を添加すると、その

図2 破骨細胞形成における IL-1 α または 1 α 25 (OH)₂D₃ および FCS に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 の影響

a: 骨髄細胞を TIMP(+)FCS もしくは TIMP(-)FCS を 10% 含む α -MEM にて IL-1 α 刺激した時の TRAP 陽性多核細胞数。

b: 骨髄細胞を TIMP(+)FCS もしくは TIMP(-)FCS を 10% 含む α -MEM にて 1 α 25 (OH)₂D₃ 刺激した時の TRAP 陽性多核細胞数 (IL-1 α : 10 ng/ml, 1 α 25 (OH)₂D₃: 10^{-8} M, rTIMP-1: 10 ng/ml, rTIMP-2: 10 ng/ml, * $p < 0.01$)

破骨細胞形成は有意に抑制された。そしてそれぞれを 0.5 mg/ml 以上添加したとき、TIMP(-)FCS に PGE₂ を加えた群と同レベルまで破骨細胞形成が抑制された (図 3)。以上の結果より破骨細胞形成に、FCS 中に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 が促進的に関与していることが明らかとなったが、この TIMPs の破骨細胞形成促進活性が MMPs の阻害を介する作用であるかどうかを明らかにするため、以下の実験を行った。

図4 破骨細胞形成におけるメタロプロテアーゼ阻害剤の影響

骨髓細胞を TIMP(-)FCS およびメタロプロテアーゼおよび合成 MMP 阻害剤を含む α -MEM にて PGE₂ 刺激下で 6 日間培養した時の TRAP 陽性多核細胞数 (PGE₂: 10^{-6} M, †: 10% TIMP(+)FCS に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 の和と等モル濃度)

3) 各種メタロプロテアーゼインヒビターは破骨細胞形成を促進しない

TIMP(-)FCS を用い PGE₂ を加えた群に、メタロプロテアーゼ阻害剤である BE 16627 B, および合成 MMP 阻害剤である R 94138 をそれぞれ濃度を変えて添加したが、破骨細胞形成に有意な差は認められなかった (図 4)。

図5 RANKL, OPG および M-CSF mRNA 発現における TIMP-1 および TIMP-2 の影響

骨髓間質細胞を TIMP(+)FCS, TIMP(-)FCS および PGE₂ にて刺激し、6 時間培養後細胞を回収し RT-PCR 法にて RANKL, OPG および M-CSF mRNA 発現を確認した。

4) TIMP-1 および TIMP-2 は RANKL, OPG および M-CSF mRNA 発現に関与しない

骨芽細胞/間質細胞より発現し、破骨細胞形成に重要な役割を担っていると考えられる RANKL, OPG および M-CSF の mRNA 発現に TIMP-1, TIMP-2 および PGE₂ がどのように作用するのか骨髓間質細胞を用いて RT-PCR 法にて検討した。その結果、PGE₂ にて刺激した群では、刺激していない群と比較して RANKL mRNA 発現が増強した。しかし TIMP(+)FCS を用いた群と TIMP(-)FCS を用いた群では RANKL mRNA 発現に差は認められなかった。すなわち TIMP-1 および TIMP-2 は RANKL mRNA 発現に影響を及ぼさない事が明らかとなった。また OPG および M-CSF mRNA 発現には TIMP-1, TIMP-2 および PGE₂ による影響は認められなかった (図 5)。

考 察

MMPs に共通の内因性インヒビターである TIMPs には、現在 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 および TIMP-4 の 4 種類の存在が明らかにされている。それら TIMPs の一義的な機能は活性型 MMPs と 1:1 で結合し、複合体を形成し酵素活性を阻害することで

あるが、それとは別に TIMP-1 はプロゼラチナーゼ B と TIMP-2 はプロ間質コラゲラーゼおよびプロゼラチナーゼ A と複合体を形成し、プロ MMPs から活性型 MMPs への自己活性化を阻害する作用も持っている。これら MMPs/TIMPs のバランスが局所の ECM の統合性の維持に重要と思われる。MMPs/TIMPs のバランスが崩れることにより、ECM の異常な分解や、反対に蓄積が生じ、病的な状態に移行する。前者の例として、癌の浸潤・転移、炎症の進展があり、後者の例として、種々の臓器にみられる線維症がある^{1,26-31)}。しかし最近になって、MMPs/TIMPs はそれら病態に係わるだけでなく、広く様々な生命現象に係わっていることが明らかになっている。例を挙げれば、排卵から始まり、胎生期の成長や分化、血管新生、分娩、骨の成長と改造、さらに唾液腺、歯胚などの器官形成や生理的な組織の退縮などに MMPs/TIMPs が深く関与している^{8,31,32)}。他方、上述した TIMPs の MMPs インヒビターとしての機能とは独立して、TIMP-1、TIMP-2 および TIMP-3 が広義の細胞増殖因子と呼ぶような様々な機能をもつことが明らかにされている¹⁴⁾。また、TIMP-1 および TIMP-2 はヒト血清や FCS 中の常在成分であり、FCS 中での細胞の増殖はこれら TIMPs に大きく依存していることが明らかにされている¹⁷⁾。本研究において、我々は *in vitro* における骨髄細胞を用いた破骨細胞の形成に対し、FCS 中の TIMPs がどのように作用するか検討した。

本研究ではデータは示していないが、ロットの異なる 14 種類の FCS 中の TIMP-1 および TIMP-2 量をサンドイッチ EIA 法にて計測したところ、TIMP-1 は 64 ± 28 ng/ml、TIMP-2 は 160 ± 47 ng/ml (平均 $\pm$ S.D.) 含まれていることが分かった。これはすでに Kodama らや Hayakawa らが報告しているのと同様に (TIMP-1 が 213 ± 79 ng/ml、TIMP-2 が 131 ± 66 ng/ml) 多量の TIMPs が FCS 中に含まれていることを示している^{16,17)}。またこれら 14 種類の FCS を用い、マウス骨髄細胞培養系で破骨細胞形成能について検討した。本研究では、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い、3 核以上の核を有する TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞として計測したが、マウス骨髄細胞培養系における TRAP 陽性多核細胞が破骨細胞としての特徴を兼ね備えていることは Takahashi らによって確認されている³³⁾。また Ueda らの報告ではマウス骨髄細胞培養系で形成された TRAP 陽性多核細胞が、象牙片上に吸収窩を形成したこと、さらにカルシトニンにより形成が完全に阻害されたことなどから考慮して、この多核細胞が破

骨細胞としての機能を備えていることは間違いないと思われる³⁴⁾。そこで、ロットの異なる FCS を用い破骨細胞形成能について検討したところ、FCS のロットにより TRAP 陽性多核細胞すなわち破骨細胞形成能に違いがあることが明らかとなった。しかし検討した 14 種類の FCS に含まれる TIMP-1 量および TIMP-2 量と破骨細胞形成能には相関は認められなかった。この結果は、検討した FCS が 14 種類と少なかったため、相関が認められなかったのか、もしくは FCS に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 以外の増殖因子などによる破骨細胞形成能への影響が大きかったものと推測される。そこで本実験では、検討したロットの異なる 14 種類の FCS 中で、TIMP-1 を 105 ng/ml、TIMP-2 を 107 ng/ml と比較的 TIMP-1 および TIMP-2 を多く含み、破骨細胞形成能の優れたロットの FCS を用い、さらに検討を行なうこととした。FCS 中の TIMP-1 および TIMP-2 が破骨細胞形成能に影響を及ぼすのであれば、FCS 中より TIMP-1 および TIMP-2 を除去することにより破骨細胞形成能に何らかの影響が現れると考え検討した。すなわち FCS 中より TIMP-1 および TIMP-2 を抗 TIMP-1 および抗 TIMP-2 モノクローナル抗体を固定したアフィニティーカラムにて除去した、いわゆる TIMP(-)FCS を調製し、マウス骨髄細胞培養系にて破骨細胞形成能を TIMP(+)FCS 群と TIMP(-)FCS 群について比較検討した。その結果、これまでの報告と同様に PGE_2 などの破骨細胞形成促進因子の添加無しには破骨細胞形成は認められなかった³³⁾。すなわち TIMP(+)FCS もしくは TIMP(-)FCS のみでは破骨細胞形成は認められず、 PGE_2 などの破骨細胞形成促進因子の添加により、破骨細胞形成は認められた。またそれら破骨細胞形成促進因子の存在下で TIMP(+)FCS 群と TIMP(-)FCS 群を比較すると TIMP(-)FCS 群では TIMP(+)FCS 群より有意に破骨細胞形成能は抑制されていた。また、通常の FCS すなわち TIMP(+)FCS 中に含まれる TIMP-1 および TIMP-2 量と同量のリコンビナント TIMP-1 および TIMP-2 を TIMP(-)FCS 群に添加することにより破骨細胞形成能がほぼ完全に回復した。さらにリコンビナント TIMP-1 または TIMP-2 のいずれか片方を添加しても破骨細胞形成能は回復することより、本実験系では TIMP-1 および TIMP-2 いずれも破骨細胞形成を促進する作用を有していると考えられる。

これまでの研究により、破骨細胞形成促進因子として $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、IL-1 α 、 PGE_2 、PTH などが挙げられている^{33,35-37)}。本研究では破骨細胞形成促進因

図6 破骨細胞形成におけるTIMPsの作用機構に関する作業仮説

子として、ホルモンの一種である $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、炎症系サイトカインである $\text{IL-1}\alpha$ もしくは PGE_2 を用い、TIMP-1およびTIMP-2の破骨細胞形成能への影響を検討したが、いずれを用いても、同様の結果となった。このことは、骨のリモデリング時の骨吸収や炎症時の骨吸収、すなわち生体の正常、異常に関係なくTIMP-1およびTIMP-2が破骨細胞形成に促進的に関与しているものと考えられる。また、これら破骨細胞形成促進因子の存在なしでは、TIMP-1およびTIMP-2の存在に係わりなく破骨細胞が形成されないことより、両TIMPは副次的に破骨細胞形成を促進していると考えられる。また破骨細胞形成促進因子存在下で、TIMP(-)FCS群にメタロプロテアーゼ阻害剤もしくは合成MMP阻害剤を添加しても破骨細胞形成能を促進しなかった結果より、TIMP-1およびTIMP-2は、両TIMPのMMPインヒビターとしての作用とは別の作用機構により破骨細胞の形成を促進するものと考えられる。この作用機構はHayakawaらが報告しているような細胞に対する成長因子様の作用によるものかもしれない³⁸⁾。このことは今回用いたメタロプロテアーゼ阻害剤である

BE 16627 Bが細胞に対し増殖活性を有しないことから考察される³⁹⁾。緒言でも述べたように癌における浸潤・転移にMMPsが関与しており、近年それら浸潤・転移に係わるMMPsの阻害剤の基礎研究が活発に行われているが、これらMMPs阻害剤は阻害活性のみを示し、細胞に対し増殖活性を示さないことが必須だと思われる。今回用いたBE 16627 BおよびR 94138は両者とも破骨細胞形成に関しても促進作用を示さないことが明らかとなった。

ところで、破骨細胞が間質コラゲナーゼ(MMP-1)^{40,41)}、ゼラチナーゼB(MMP-9)^{4,41-43)}およびMT1-MMP⁴⁴⁾をmRNAおよびタンパク両レベルで発現することが報告されているが、TIMP-1の発現に関しては、タンパクレベルでの発現があるという報告(ただし、 IL-1 刺激下)⁴¹⁾と発現しないという報告⁴³⁾があり、一致した見解は得られていない。我々が別の研究にてNorthern blottingで調べた限りでは、発現しているものの痕跡程度であるという結果を得ている。これに対して、生体内では破骨細胞に接触して存在していることが知られている骨芽細胞/間質細胞やMC 3 T 3-E 1細胞(マウス頭蓋骨由来骨芽細胞

胞)では強い発現がみられた⁴⁵⁾。これらの結果は、*in vivo*においては、骨芽細胞/間質細胞が主として産生した TIMPs が隣接する破骨細胞前駆細胞の分化を刺激している可能性を強く示唆している (図 6)。

これまで破骨細胞の形成には、骨芽細胞/間質細胞と破骨前駆細胞の細胞間接触を媒介する破骨細胞分化因子 (RANKL)²¹⁾の骨芽細胞/間質細胞表面への発現と、この RANKL に結合して破骨細胞形成を抑制する破骨細胞形成抑制因子 (OPG)^{21,46,47)}や液性因子であるマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)²²⁾を骨芽細胞/間質細胞が発現・分泌することが知られている。

本研究によりマウス骨髄細胞培養系において、TIMP-1 および TIMP-2 が破骨細胞形成を促進することを明らかにしたが、この機構に関して、2つの可能性が考えられる。すなわち1つは、両 TIMPs が直接破骨細胞前駆細胞に作用して、その破骨細胞への分化を促進するという可能性である。もう1つは、両 TIMPs がオートクリン機構で骨芽細胞/間質細胞に作用し、RANKL や M-CSF の発現を介して間接的に破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を促進する可能性である (図 6)。我々は、最初、後者の可能性を考え、マウス骨髄間質細胞を用い、TIMP-1 および TIMP-2 にて刺激し RT-PCR 法を用いて RANKL, OPG および M-CSF mRNA 発現を検討したが、RANKL, OPG および M-CSF mRNA 発現にはコントロールと比較して変化が認められなかった。今回はマウス骨髄間質細胞を用いて検討したが、今後、別の骨芽細胞や間質細胞を用いて両 TIMPs が RANKL, OPG および M-CSF mRNA 発現に関与するか否か検討する予定である。また前者の可能性についても検討を続けていく予定である。両 TIMPs が破骨細胞前駆細胞に作用し破骨細胞への分化を促進するののであれば、受容体を介した作用が考えられる。我々はこれまでに、種は異なるがウサギより採取した純度 95% 以上の破骨細胞においてその細胞膜画分に TIMP-2 が結合するということを報告している⁴⁵⁾。また、予備実験ではあるが、同じくウサギ由来の破骨細胞の細胞膜上に蛍光体を標識した TIMP-2 が結合する結果も得ている。これらの結果は少なくとも TIMP-2 が破骨細胞前駆細胞へ作用し破骨細胞の分化を促進する可能性を含んでいると考えられる。しかし TIMP-1 に関しては、同様の研究を行っておらず今後検討する予定である。

緒言ですでに TIMPs が広義の細胞成長因子と呼びうる種々な機能を有することを紹介したが、本研究により破骨細胞形成に対し TIMP-1 および TIMP-2 が

促進作用を示すこと、さらにその作用機構が MMP 阻害活性とは異なる別の作用機構によることが明らかになった。この両 TIMPs の破骨細胞形成促進活性は、TIMPs の広義の細胞成長因子としての機能にさらに新しく加えられるものと考えられる。しかし TIMP-3 および TIMP-4 が破骨細胞形成に対し同様の作用を示すかどうかについては不明であり、今後検討する必要があると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際し材料をご提供頂きました第一ファインケミカル株式会社に、心より感謝いたします。

文 献

- 1) Hayakawa T, Yamashita K, Ohwaki K, Sawa M, Noguchi T, Iwata K, Hayakawa T : Collagenase activity and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) content in human whole saliva from clinically healthy and periodontal disease subjects. J periodontal Res, 29 : 305-308, 1994.
- 2) Vincenti M P, Clark IM, Brinckerhoff CE : Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. Easier said than done? Arthritis Rheum, 37 : 1115-1126, 1994.
- 3) 島田剛敏, 岡田保典 : MMP と腫瘍形成, 転移. 実験医学, 16(増刊) : 2100-2105, 1998.
- 4) Tezuka K, Nemoto K, Tezuka Y, Sato T, Ikeda Y, Kobori M, Kawashima H, Eguchi H, Hakeda Y, Kumegawa M : Identification of matrix metalloproteinases 9 in rabbit osteoclasts. J Biol Chem, 269 : 15006-15009, 1994.
- 5) Kakudo S, Mano H, Shiokawa M, Mori Y, Kumegawa M, Hakeda Y : Concanavalin A directly stimulates bone-resorbing activity of osteoclasts and their gene expression of cathepsin K/OC-2. Biochem Biophys Res Commun, 234 : 600-604, 1997.
- 6) Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I, Pennington CJ, Bourgoin P, Edwards DR, Yong VW : Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. Brain, 126 : 2738-2749, 2003.
- 7) Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC : Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. J Biol Chem, 276 : 10134-

- 10144, 2001.
- 8) Visse R, Nagase H : Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases : structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92 : 827-839, 2003.
 - 9) Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C : Matrix metalloproteinases in cancer : from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.* 48 : 411-424, 2004.
 - 10) 岡田明子, 清水元治 : マトリックスメタロプロテアーゼと癌の浸潤・転移. *蛋白質核酸酵素*, 42 : 2386-2392, 1997.
 - 11) Hayakawa T : Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in the development and diseases of oral tissues. *Dentistry in Japan*, 34 : 167-177, 1998.
 - 12) Edwards DR, Beaudry PP, Laing TD, Kowal V, Leco KJ, Leco PA, Lim MS : The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodeling and cell growth. *Int J Obes*, 20 : Suppl. 3, S 9-S 15, 1996.
 - 13) Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, Apte SS : A review of tissue inhibitors of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect of primary tumor growth. *Biochem Cell Biol*, 74 : 853-862, 1996.
 - 14) 早川太郎 : TIMP の細胞増殖因子活性. *蛋白質核酸酵素*, 42 : 2277-2283, 1997.
 - 15) Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI : Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinases. *J Biol Chem*, 270 : 5331-5338, 1995.
 - 16) Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchiyama E, Iwata K : Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for wide range of cells. *FEBS Lett*, 298 : 29-32, 1992.
 - 17) Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A : Cell Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*, 107 : 2373-2379, 1994.
 - 18) Yang TT, Hawkes SP : Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts : *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 : 10676-10680, 1992.
 - 19) Kodama S, Yamashita K, Kishi J, Iwata K, Hayakawa T : A sandwich enzyme immunoassay for collagenase inhibitor using monoclonal antibodies. *Matrix*, 9 : 1-6, 1989.
 - 20) Fujimoto N, Zhang J, Iwata K, Shinya T, Okada Y, Hayakawa T : A one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta*, 220 : 31-45, 1993.
 - 21) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 : 3597-3602, 1998.
 - 22) Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, Kurokawa T, Suda T : Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest*, 91 : 257-263, 1993.
 - 23) Kodama S, Iwata K, Iwata H, Yamashita K, Hayakawa T : Rapid one step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases. An application for rheumatoid arthritis serum and plasma. *J Immunol Methods*, 127 : 103-108, 1990.
 - 24) Suda T, Takahashi N, Martin TJ : Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev*, 13 : 66-80, 1992.
 - 25) Tezuka K, Sato T, Kamioka H, Nijweide P J, Tanaka K, Matsuo T, Ohta M, Kurihara N, Hakeda Y, Kumegawa M : Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 186 : 911-917, 1992.
 - 26) 早川祐久 : 健康者および歯周病患者の唾液中のコラゲナーゼと TIMP-1 に関する研究. *愛院大歯誌*, 30 : 61-70, 1992.
 - 27) 中田和彦 : ヒト歯髓細胞のコラゲナーゼと TIMP-1 産生に対するサイトカインの影響. *愛院大歯誌*, 30 : 151-169, 1992.
 - 28) 澤 政樹 : 炎症性サイトカインがヒト歯肉線維芽細胞の間質コラゲナーゼおよび TIMP-1 の産生に及ぼす影響. *愛院大歯誌*, 31 : 133-150, 1993.
 - 29) 宮下朋久 : 歯肉炎および歯周炎患者の歯肉溝滲出液中の TIMP-1 量, コラゲナーゼおよびゼラチナーゼ活性に関する研究. *愛院大歯誌*, 32 : 1-11, 1994.
 - 30) 吉田 勉 : ヒト歯根膜細胞の MMPs と TIMPs の産生に対するインターロイキン-1 の影響. *愛院大歯誌*, 33 : 1-17, 1995.
 - 31) Frisch SM, Werb Z : Molecular biology of collagen degradation. in *Collagen*, Vol. IV, Molecular Biology. Florida, CRC Press, Boca Raton, 85,

- 1989.
- 32) 早川太郎, 山下京子: 軟骨マトリックスとその代謝 MMPs と TIMPs の基礎. THE BONE, 8 : 59-73, 1994.
- 33) Takahashi N, Yamada H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A, Suda T : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*, 122 : 1373-1382, 1988.
- 34) Ueda N, Nishihara T, Ishihara Y, Amano K, Kuroyanagi T, Noguchi T : Role of prostaglandin in the formation of osteoclasts induced by capsular-like polysaccharide antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y 4. *Oral microbial immunol*, 10 : 69-75, 1995.
- 35) Akatsu T, Takahashi N, Udagawa N, Imamura K, Yamaguchi A, Sato K, Nagata N, Suda T : Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice in vitro. *J Bone Miner Res*, 6 : 183-189, 1991.
- 36) Akatsu T, Takahashi N, Debari K, Morita I, Murota S, Nagata N, Takatani O, Suda T : Prostaglandins promote osteoclastlike cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J Bone Miner Res*, 4 : 29-35, 1989.
- 37) Akatsu T, Takahashi N, Udagawa N, Sato K, Nagata N, Moseley JM, Martin TJ, Suda T : Parathyroid hormone (PTH) -related protein is a potent stimulator of osteoclast-like multinucleated cell formation to the same extent as PTH in mouse marrow cultures. *Endocrinology*, 125 : 20-27, 1989.
- 38) Hayakawa T : Tissue inhibitor of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity. *Cell Struct Func*, 19 : 109-114, 1994.
- 39) Naito K, Kanbayashi N, Nakajima S, Murai T, Arakawa K, Nishimur S, Okuyama A : Inhibition of growth of human tumor cells in nude mice by a metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer*, 58 : 730-735, 1994.
- 40) Okamura T, Shimokawa H, Takagi Y, Ono H, Sasaki S : Detection of collagenase mRNA in odontoclasts of bovine root-resorbing tissue by in situ hybridization. *Calcif Tissue Int*, 52 : 325-330, 1993.
- 41) Hill PA, Murphy G, Docherty AJP, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, Meikle MC : The Effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci*, 107 : 3055-3064, 1994.
- 42) Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason, K. : High expression of 92-kDa type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol*, 124 : 1091-1102, 1994.
- 43) Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M : Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase=gelatinase B) in osteoclasts : implications for bone resorption. *Lab Invest*, 72 : 311-322, 1995.
- 44) Sato T, del Carmen Ovejero M, Hou P, Heegaard A-M, Kumegawa M, Foged N T, Delaisse J-M : Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT 1-MMP in osteoclasts. *J Cell Sci*, 110 : 589-596, 1997.
- 45) Sobue T, Hakeda Y, Kobayashi Y, Hayakawa H, Yamashita K, Aoki T, Kumegawa M, Noguchi T, Hayakawa T : Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 16 : 2205-2214, 2001.
- 46) Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K : Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 234 : 137-142, 1997.
- 47) Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K : Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem*, 273 : 5117-5125, 1998.