

	いしだ たかし
氏 名	石田卓士
学 位	博士(医学)
学位記番号	新大博(医)第1701号
学位授与の日付	平成19年1月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Matrix Metalloproteinase-1 Activation via Plasmin Generated on Alveolar Epithelial Cell Surfaces (肺胞上皮細胞表面のプラスミン産生によるマトリックスメタロプロテアーゼ-1の活性化について)
論文審査委員	主査 教授 林 純一 副査 教授 下條文武 副査 教授 鈴木榮一

博士論文の要旨

プラスミンは、線維素溶解だけでなく、組織の修復やリモデリングに関連し、TGF- β などのサイトカインの放出や活性化にも関与するセリンプロテアーゼです。さらに、他のプロテアーゼの活性化にも関与する可能性が考えられています。一方、マトリックスメタロプロテアーゼ（以下MMP）は、癌の転移や血管新生、慢性関節リウマチの関節破壊などで過剰発現し、病態の進行に関与すると考えられ、注目されています。呼吸器疾患でも、肺気腫の進展や気管支喘息での気道粘膜下マトリックスの増加、基底膜肥厚などに関連し、リモデリングを伴う炎症の病態に深く関わっています。MMPは、間質コラーゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロムライシンの大きく3つに分類され、このうち強固な3重鎖の線維型コラーゲンを切断できるMMPは、間質コラーゲナーゼに限られます。産生細胞や一部アミノ酸配列の違いから、MMP-1およびMMP-8に分類される間質コラーゲナーゼは、いずれもtype I, II, IIIコラーゲンの特異的なアミノ酸配列を認識して分解し、細胞外マトリックスの改変の際に、引き金を引く役割を果たすと考えられます。MMP-1は、主にfibroblastより産生され、特にtype Iコラーゲンを分解し、肺線維症での線維化の過程を防ぐ一因となると考えられています。MMPは、生体にその過剰産生を制御する機構が備わっており、非活性化型のproMMPとして産生され、セリンプロテアーゼや水銀化合物などにより分解・活性化される特徴をもつことも明らかにされてきました。すなわち、転写の段階で様々なサイトカインにより制御されていることに加え、潜在型前駆体のプロペプチド部分を切断、分解して、活性化酵素に変換する物質として、トリプシン、水銀化合物などが知られており、それらの影響下に制御されています。さらに、末梢組織中に存在するTIMPによる抑制を受けることにもなります。MMP産生は、様々な呼吸器疾患の病態に関与していますが、その活性化の過程は必須であるものの、その因子について検討した報告はほとんどありません。今回、私たちはプラスミンがMMP-1の主な活性化因子であると仮定し、肺胞上皮細胞であるA-549 cellでのプラスミン産生によってMMP-1が活性化されることを明らかにするため、A-549 cellにプラスミノゲンとproMMP-1とtype Iコラーゲンを加えて一晩培養した後、type-1コラーゲンの分解を培養細胞の上清でSDS-PAGEにより確認することを試みました。

材料と方法：proMMP-1およびのプラスミノゲンの存在下でtype-1 collagenと反応させ、その分解産物をbandとしてSDS-PAGEにより確認しました。また、私たちはA-549 cell由来のプラスミン産生がIL-1で促進されることを確かめており、IL-1も添加して行いました。他のセリンプロテアーゼとしてトリプシン、水銀化合物などとも反応させ、比較しました。迅速コラゲナーゼ測定キットを用い、MMP-1の活性化能の定量化も試みました。

結果：まず、プラスミンの濃度を変えて、私たちが用いたproMMP-1が活性化されるか否かを確かめ、プラスミンの存在でコラーゲンのdegradationを誘導したことが確認できました。A-549 cellにproMMP-1, プラスミノゲン, IL-1を加えたものでは、type-I collagenの分解産物が認められ、A-549の存在下で、かつプラスミノゲン、IL-1が添加された時に最も強くMMP-1が活性化されました。また、IL-1のない条件では、活性は弱く、A-549のない条件ではプラスミノゲンがプラスミンへと活性化されておらず、また、MMP-1活性も誘導されないことがわかりました。市販の迅速コラゲナーゼ測定キットを用いた方法で、コラゲナーゼ活性の定量化を試みたところ、A-549 cellとプラスミノゲンの存在下で、コントロールに比して明らかに強いMMP-1のコラゲナーゼ活性が誘導されていることが確かめられました。以上より、肺胞上皮細胞のプラスミン産生によりproMMP-1はMMP-1へと活性化されることがわかり、肺線維症などの線維化を来す肺疾患での組織のリモデリングに深く関わっている可能性が示唆されました。

(論文審査の要旨)

Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)は、type I collagenを分解するため、肺線維症での線維化を防ぐ一因となると考えられている。本研究は、肺胞上皮細胞表面での plasmin 産生が、肺における MMP-1 の主な活性化因子であるか否かを明らかにすることを目的とし、肺胞上皮細胞に plasminogen と proMMP-1 と type I collagen を加えて培養し、type I collagen の分解産物と MMP-1 の活性化能を測定した。肺胞上皮細胞の存在下で、かつ plasminogen が添加された時に最も強く MMP-1 が活性化され、type I collagen の分解産物が確認された。肺胞上皮細胞のない条件では、plasmin も MMP-1 も活性化されなかった。以上、本研究は、肺胞上皮細胞表面の plasmin 産生により proMMP-1 が MMP-1 へと活性化されることが、線維化を来す肺疾患における組織のリモデリングに深く関わっている可能性を示した点に、学位論文としての価値を認める。