

201108016B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

歯周病治療薬と歯槽骨再生方法の開発

(H22-政策創薬-一般-008)

平成22年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者

江口 傑徳 (平成22年4月～平成23年7月)

渡辺 研 (平成23年8月～平成24年3月)

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

歯周病治療薬と歯槽骨再生方法の開発

(H22-政策創薬一般-008)

平成22年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者

江口 傑徳 (平成22年4月～平成23年7月)

渡辺 研 (平成23年8月～平成24年3月)

平成24(2012)年 5月

総合研究報告書

目 次

総合研究報告	
歯周病治療薬と歯槽骨再生方法の開発	----- 1
江口 傑徳・渡辺 研	
第一部 細胞内 MMP3 の機能解析	----- 2
第二部 歯槽骨再生方法の開発：OstemiR（オステミア）の同定	----- 17
研究成果の刊行に関する一覧表	----- 26
研究成果の刊行物・別刷	----- 28

総合研究報告書

総合研究報告書

歯周病治療薬と歯槽骨再生方法の開発

研究代表者 江口 傑徳

（平成 22 年 4 月 1 日～平成 23 年 7 月 31 日）

渡辺 研

（平成 23 年 8 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日）

独立行政法人 国立長寿医療研究センター 研究所

研究要旨

歯槽骨吸収は、主として細菌感染と生体免疫の相互作用によって生じ、多くの中高齢者の QOL を低下させており、現在種々の再生医療が試みられている。

細胞外で他のタンパク質の活性調整を行う酵素である MMP3 は、細胞内では転写因子として CTGF/CCN2 を発現誘導する等の機能が知られてきた (Eguchi and Kubota, 2008)。本研究では、細胞内 MMP3 についてのさらなる解析を行った。MMP3 のノックダウンは軟骨細胞株の増殖あるいは接着を抑制することが MTT アッセイにより明らかになった。CMV プロモーター制御下の MMP3 cDNA を一過性に 293 細胞に遺伝子導入し、マイクロアレイで発現変動を明らかにし、共通上流転写因子および分子パスウェイを解析した結果、細胞内 MMP3 は、(1) 基本転写、転写調節、RNA 代謝、クロマチンの構成と修飾、細胞増殖等の生体イベント、(2) HSF による HSP の転写調節等、リン酸化シグナル及び転写因子機能、(3) ヒストン及びタンパク質のメチル化およびアセチル化パスウェイ、(4) 創傷治癒、UV 応答、分化多能性、(5) 関節リウマチ、変形性関節症、前立腺癌、白血病等の病態イベント、のそれぞれに関与することが予測された。マイクロアレイで顕著な発現変動が検出された Hsp70 mRNA について、リアルタイム PCR を行った結果、細胞内 MMP3 及びその PEXDメインは、HP1 と協調して Hsp70 mRNA の発現を誘導することが確認された。以上の結果より、細胞内 MMP3 は、複数の転写因子との相互作用し細胞内イベントを調節することによって、そのポジティブな作用としては創傷治癒及び分化多能性を調節し、また各種疾患の病態にも関与することが予測された。miRNA は、21-25 nt の一本鎖 RNA であり、その機能として特定の mRNA からタンパク質への翻訳の抑制、mRNA の分解誘導および転写調節が知られてきた。さらに最近、エクソゾームの中に miRNA が存在することが分かってきた。これまでに骨細胞分化のマーカー、転写因子、増殖因子が報告されてきたが、それらを制御する miRNA についての情報は少ない。本研究では、半網羅的な miRNA アレイ解析を援用することによって、骨細胞形成過程における miRNA 発現変動パターンを明らかにし、特徴的な発現変動を示す miRNA を抽出し、骨細胞分化関連因子との関わりを探った。結果として、骨関連因子、細胞の幹性、エピジェネティクス関連因子を制御することが予測される miRNA が骨細胞分化過程で発現変動することが明らかとなり、それらの miRNA を *ostemiR* (オステミア) と命名した。本研究で同定した *OstemiR* および *anti-ostemiR* は、生理的な骨代謝の理解に有用であると同時に、歯周病と骨粗鬆症の診断および治療のために有用な新しい指標およびツールとして有力である。

緒言

本研究の目的は、有効な歯周病治療薬開発及び歯槽骨再生方法の開発である。歯科の臨床において、歯槽骨の吸収は機能回復を困難にする最も大きなファクターの1つである。歯槽骨吸収は、加齢や歯周病によって生じ、特に中高年の咬合・咀嚼機能の低下を招き、老年期の摂食・嚥下機能低下の原因となっている。歯槽骨が極度に吸収すると、高齢者の義歯（いわゆる入れ歯）が不安定となり、「口の中で入れ歯が泳ぐ」とか「食事の時には入れ歯を外す」という老人も少なくない。旨いものを食べたときの「ああ、生きててよかった」という実感も損なわれることになる。歯槽骨吸収は、口腔インプラント治療をも困難にし、高齢者の栄養摂取、QOL、認知症などにとって大きなマイナス要因となっている。特に、水平性骨吸収に対する現在の唯一の治療法であるディストラクション骨誘導術は、高度の専門技術を必要とし、生体侵襲性も高いため、適用範囲が非常に狭い。近年の再生医療の発展をもってしても、水平性骨吸収に対する歯槽骨の再生については決定的なものがない。

第一部：細胞内 MMP3 の機能解析

細胞外で他のタンパク質の活性調整を行う酵素である MMP3 は、細胞内では転写因子として CTGF/CCN2 を発現誘導、アポトーシスの誘導、 α シヌクレインの分解等の機能が知られてきた (Eguchi and Kubota, 2008; Kwan and Schilze, 2004)。MMP3 の細胞外での機能は、タンパク質分解酵素として、他のタンパク質を切断することによって、ECM の代謝、レセプターおよび成長因子の活性調整が主たる機能である。しかし MMP3 の細胞内での機能についての情報は少ない。

転写因子 MMP3 のターゲットとして唯一明らかとなっている CTGF/CCN2 は、軟骨、骨、その他結合組織の発生、再生、創傷治癒にポジティブに働く一方で、繊維化、乳癌、乳癌の骨転移に関わる (Perbal and Takigawa, 2005; Kubota and Takigawa, 2011)。

本研究では、細胞内で MMP3 の全長、C 末端側の PEX ドメイン、及び酵素活性ドメイン (Catalytic domain, Cat.) を発現させた後、マイクロアレイにより網羅的に mRNA 発現変動を明らかにし、それをもとに共通上流転写因子検索及びパスウェイ解析を行う

ことにより、細胞内 MMP3 が関わる細胞イベント、生体イベント、病態イベントについて予測した。

方法

1. 細胞培養：ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 を 5%血清および L アラニル L グルタミン含有 DMEM 中で培養し、遺伝子発現解析に供した。HCS-2/8 細胞は、10%血清および L グルタミン含有 DMEM を用い培養した。
2. プラスミド DNA： p3Flag-MMP3(sp)-myc, p3Flag-Cat/MMP3-myc, p3Flag-PEX/MMP3-myc, pcDNA3/HP1G-3HA, pcDNA3.1/3xHA を用いた (Eguchi and Kubota, 2008, MCB)。HP1A, MLL5, CNOT4 の cDNA は、Gateway エントリークローンを製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー分野 (nite NBRC) より供与を受け、pcDNA/V5-His ベクターへと TOPO 酵素反応 (Invitrogen) によって組み替え、pcDNA/HP1A, pcDNA/MLL5, pcDNA/CNOT4 と命名した。分泌シグナルを含む MMP3 の cDNA は、pBK-CMV/MMP3 (Eguchi and Kubota, 2008) から pcDNA 上に制限酵素を用いて組み替えられ、pcDNA/spMMP3-GFP と命名された。
3. 遺伝子導入：導入試薬として FuGENE-HD, リポフェクタミン LTX 及びマルチフェクタムを用いた。
4. 細胞画分の調製：細胞の培養上清を取り、適量のプロテアーゼインヒビターカクテルを添加後、12000xg で細胞の Debris を遠心分離し、その上清を Sup とした。ライセートの調製は、CellLytic M (Sigma) を用い、不溶画分に 1xSDS サンプルバッファーを加え SDS-PAGE に用いた。核抽出液は、Nuclear extraction reagents (Thermo Scientific) を使用し調製した。核抽出後の不溶画分を Benzonase 処理し、クロマチン画分とした。さらなる不溶画分に 1xSDS サンプルバッファーを加え不溶画分とした。
5. SDS-PAGE およびウェスタンブロット：SDS-PAGE およびウェスタンブロットは通法に従い実施した。
6. トータル RNA の調製：遺伝子導入後 24 時間のトータル RNA を RNeasy および QiaCube (Qiagen) を用いて調製した。
7. マイクロアレイ：マイクロアレイは、Agilent

Technology社のHuman Gene 1.0 ST Arrayを用いた。コントロールと比較して2の1.5乗以上差異のあるデータを抽出した。

8. 共通上流転写因子検索, 分子パスウェイ解析: マイクロアレイで明らかにしたデータについて、キーモルネット(医薬分子設計研究所)を用い、共通上流転写因子検索およびパスウェイ解析を行った (Sato H et al, 2005, Curr Drug Discov echnol). 遺伝子発現量の比較データを、論文情報をもとにして、重み付けを加味して作成されたパスウェイマップに適用し、共通上流転写因子サーチ、シグナル伝達相互関係サーチを行った。分子パスウェイ、生体イベント、病態イベント、疾患、オントロジーの観点からスコア化とランキングを行った。
9. 逆転写と定量リアルタイムPCR: cDNA合成及び SybrGreenによるリアルタイムPCRは、通法に従い行った(タカラバイオ)(Eguchi et al, 2008, MCB). リアルタイムPCRにおいて、Slope $-3.0 \sim -4.0$ を採用し、融解曲線分析でシングルピークの得られたものをデータに用いた。

(倫理面の配慮)

当該研究課題では、ヒトならびにヒト組織由来試料ならびに実験動物を使用していない。

結果

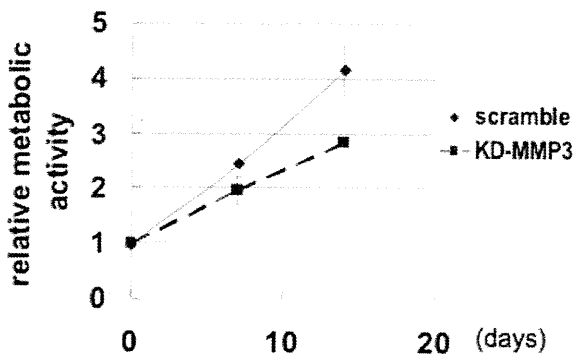


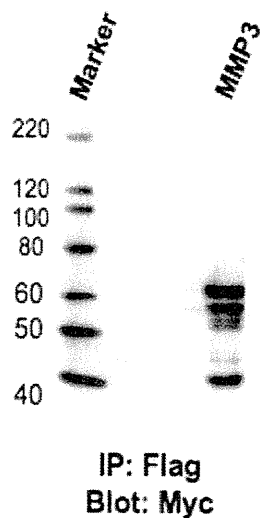
図1. MMP3 を標的とする shRNA およびスクランブル配列をレトロウイルスで発現させ、ノックダウンした。細胞の代謝は、ウイルス感染の一週間および二週間後に MTT アッセイにより定量した。

1. MMP3 ノックダウンが細胞増殖と接着に与える影響:

細胞増殖あるいは接着に MMP3 が与える影響を知るために、MMP3 mRNA のノックダウン及び MTT アッセイを行った。MMP3 のノックダウンによって HCS-2/8 細胞の増殖が抑制された(図1)。このことから MMP3 は細胞増殖促進活性または細胞接着促進活性を持っていることが示唆された。

2. 細胞内 MMP3 の断片化:

シグナルペプチドを含まない MMP3 の cDNA を 293 細胞で発現させ、Flag 抗体で免疫沈降の後、myc 抗



体でウェスタンブロットを行った。その結果、3種類のメジャーなバンドと

図2. 細胞内全長 MMP3 の発現およびその活性化。全長 MMP3 を細胞内で強制発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降後、MYC タグ抗体でウェスタンブロットを行った。

数種類のマイナーなバンドが検出された(図2)。メジャーなバンドは、その分子量から全長 MMP3 および活性型 MMP3 であることが推測された。マイナーなバンドは修飾産物か、断片化過程の中間産物であると推察された。また N 末端の Flagx3 タグで免疫沈降し、C 末端の myc タグでウェスタンを行い、これらのバンドを得たため、活性型 MMP3 は全長 MMP3 と結合しているか、同じタンパク質複合体中にあることが示唆された。

3. 細胞内 MMP3 およびドメインの可溶性:

MMP3 全長および各ドメインを、COS7 細胞内で発現させ、2日間培養後、タンパク質を回収し、ウェスタンブロットを行った。その結果、いずれのタンパク質も可溶画分で検出された(図3)。MMP3 と PEX は不溶

性画分でも検出されたが、Catドメインは検出されなかった。PEXドメインは、全長MMP3よりも多く不溶画分で検出された。Catドメインは可溶画分でわずかに検出された。これらの結果から、PEXドメインはクロマチンに局在化するか、アグリソームを形成するか、その両方であることが示唆された。これに対し、Catドメインと全長ドメインは、可溶性となる傾向があり、自らも速やかに分解されることが示唆され、その可溶化と分解はMMP3の持つ酵素活性によるものと推察された。

4. MMP3の細胞内局在： 分泌シグナルを保持したMMP3のC末端にGFPを融合したタンパク質を発現するプラスミドを構築し、293細胞に遺伝し導入後、その局在を調べた。その結果、約100kDaのMMP3-GFPが、ライセートおよび培養上清にて検出された(図4A)。核抽出液、ベンゾナーゼ画分、不溶画分についてウェスタンブロットを行ったところ、ベンゾナーゼ画分および核抽出液中でMMP3-GFPが検出され、不溶画分では検出されなかった(図4B)。

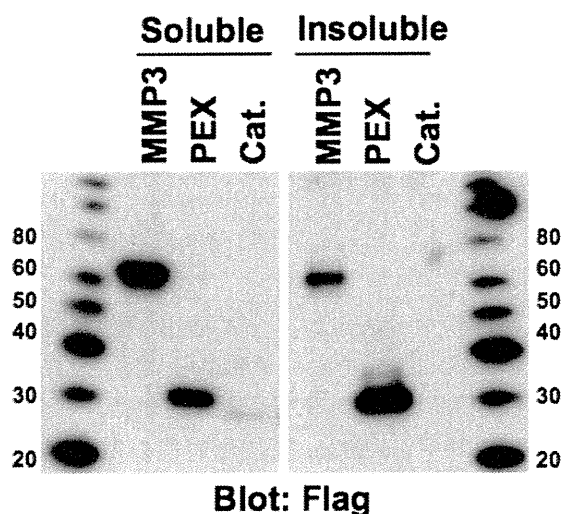


図3. MMP3および各ドメインの細胞内可溶性. MMP3全長および各ドメインを、COS7細胞内で発現させ、2日間培養後、タンパク質を回収し、ウェスタンブロットを行った。いずれのタンパク質も可溶画分で検出された。MMP3とPEXは不溶性画分でも検出されたが、Catドメインは検出されなかった。PEXドメインは、全長MMP3よりも多く不溶画分で検出された。Catドメインは可溶画分でわずかに検出された。

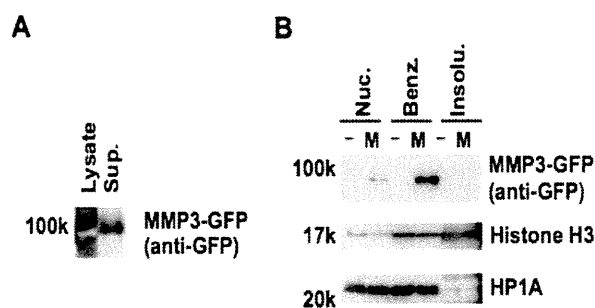


図4. 分泌シグナルを保持したMMP3はGFP接続され293細胞で発現させられた。A, 抗GFP抗体による全長MMP3-GFPの検出。B, MMP3-GFPは、各抽出液およびベンゾナーゼによるクロマチンタンパク質の溶出によって検出された。M, MMP3-GFP発現; -, ノントランスフェクション。

各画分について、HP1AおよびヒストンH3のウェスタンブロットを行った結果、HP1Aは、核抽出液およびベンゾナーゼ画分に、ヒストンH3はベンゾナーゼ画分および不溶画分に主として検出された。これらの結果から、まず、ベンゾナーゼ画分はHP1およびヒストンH3を含むクロマチン画分であり、さらにHP1Aは含まずヒストンH3を含む不溶性ヌクレオソーム画分があることが明らかとなった。さらにMMP3-GFPはクロマチン画分に主として局在することが明らかとなった。

5. 細胞内MMP3が細胞内遺伝子発現パターンに与える影響： 293細胞にシグナルペプチドを含まない全長MMP3、酵素活性ドメイン(Cat)、及びPEXドメインを発現するプラスミドおよびコントロールプラスミドをそれぞれトランスフェクションし、遺伝子発現に与える影響をマイクロアレイを用いて調べた。全長MMP3では129の遺伝子、Catドメインでは197の遺伝子、PEXドメインでは207の遺伝子が発現上昇した(図S1)。また全長MMP3では226の遺伝子(、Catドメインでは410の遺伝子、PEXドメインでは374の遺伝子が発現低下した(図S2)。PEXで誘導され、Catで誘導されなかった133のmRNAのうち、60が既知で73が未知であった。Catで誘導され、PEXで誘導されなかった123のmRNAうち、39が既知で84が未知であった。全長MMP3のみで誘導

された 59 の mRNA のうち 29 が既知で 30 が未知であっ

た. 全長 MMP3 とコントロールの遺伝子発現変動を比較したスキャタープロット解析の結果を示す(図 5). 全長 MMP3 で発現上昇し, PEX および Cat で上昇しなかった遺伝子(表 S1), PEX で発現上昇し Cat でしなかった遺伝子(表 S2), その逆(表 S3)をそれぞれリスト化した. 数値は2の乗数で表した.

6. 細胞内 MMP3 に関連する転写機構の抽出:

マイクロアレイのデータをキーモルネットに適用し, MMP3 および各ドメインにより発現変動する遺伝子の共通上流転写因子解析を行った. その結果, 細胞内 MMP3 発現によって, 一つの遺伝子は複数の転写因子により発現調節され, 一つの転写因子が複数のターゲットを転写調節するマップが作成された(図6). 発現変動した Hsp70, Hsp40, Hsp26/aBcrystallin の共通上流転写因子検索によって Hsf1 が抽出され, MMP3 は Hsf1 と共通の転写調節機構を持つか Hsf1 と相互作用することが示唆された. ま

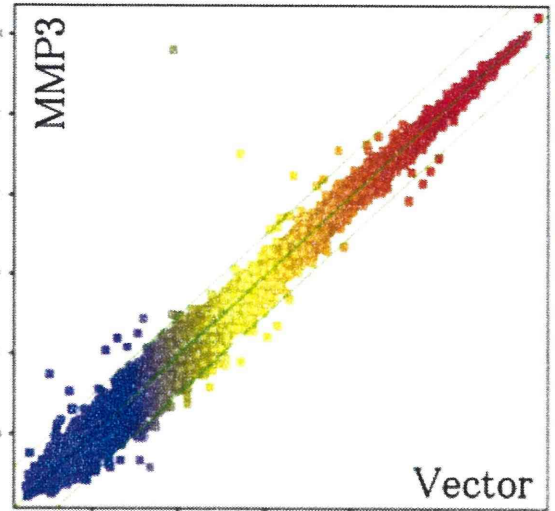


図 5. スキャタープロット解析. MMP3 cDNA をトランスフェクション後の mRNA を用いてマイクロアレイを行った.

た c-Myc の上流で, hnRNPk および NONO が発現上昇し, c-Myc の下流で Hsp70 が発現上昇したため, 細胞内 MMP3 は c-Myc と共通の調節機構をも

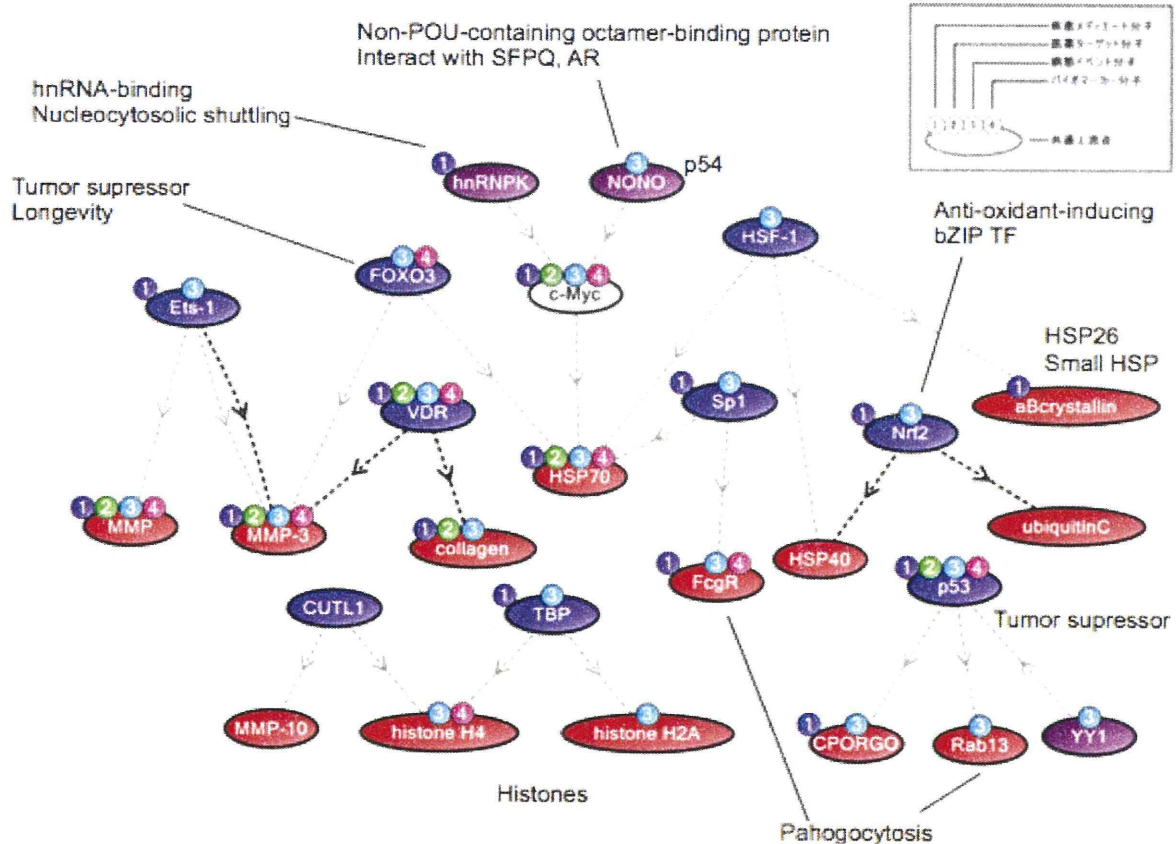


図 6. 細胞内 MMP3 で発現上昇した分子 (赤) と, その共通上流転写因子 (青) 検索の結果.

つか、相互作用することが示唆された。さらにヒストン H4 とヒストン H2A の上流で TBP が予測され、MMP3 は TBP と相互作用することが示唆された。また p53 の下流因子 CPORGO および Rab13 が発現上昇し、p53 の上流の YY1 も発現上昇したため、細胞内 MMP3 は p53 と同様の機能を持つか相互作用することが示唆された。さらに、Hsp40 と品質管理ユビキチンリガーゼである ubiquitinC が発現上昇し、その上流で Nrf2 が予測されたため、MMP3 は直接 Hsp40, ubiquitinC の発現を調節するか Nrf2 と相互作用することが示唆された。

7. 細胞内 PEX ドメインに関連する転写機構の抽出:

PEX についても同様の転写調節マップが作成された(図7)。MMP3 と IL-10R の発現の上流で VDR が予測された。また MMP ファミリーと L セレクチンの上流で Ets-1 が予測された。さらに細胞内 PEX は、Sp1 のシグナルと関わり L-selectin, Hsp70, eIF4G, FcgR を制御することが予測された。また c-Myc の上流で NONO が、下流で Hsp70 および L11 が発現上昇したため細胞内 PEX は c-Myc と相互作用するか類似の機能を持つことが示唆された。

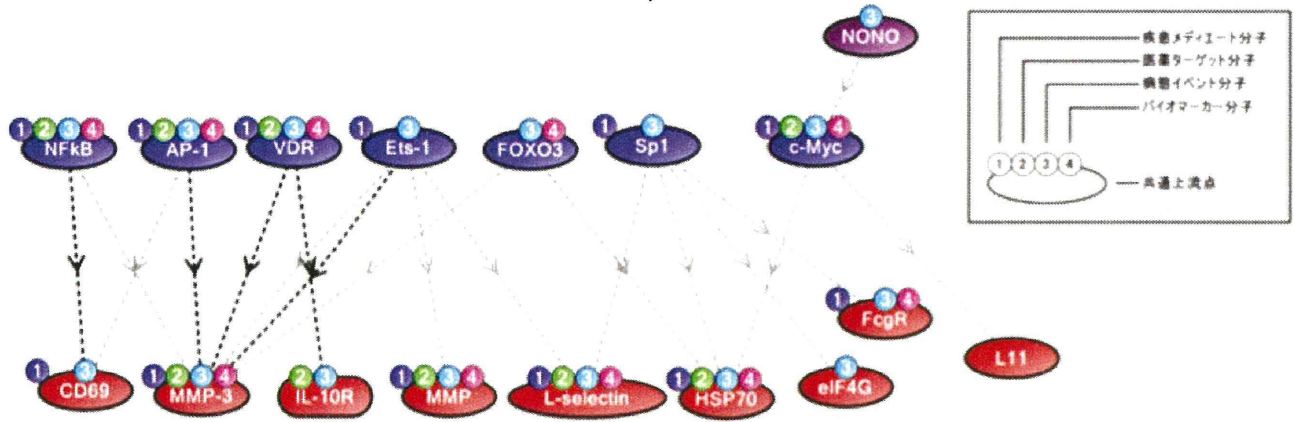


図7. 細胞内 PEX で発現上昇した分子 (赤) と、その共通上流転写因子 (青) 検索の結果。

8. 細胞内 Cat ドメインに関連する転写機構の抽出:

Cat ドメイン発現について、転写マップを作成したところ、c-Myc の上流で NONO, hnRNPK, hnRNPC1/C2, E/EBPe が発現上昇し、c-Myc の下流で L11, NPM1 が発現変動した(図8)。これらの結

果は、細胞内 Cat 発現は、c-Myc のシグナルに関与することを示すと同時に、数種類の hnRNPK の発現変動および関与は、Cat ドメインが、RNA のスプライシング、核内外輸送、mRNA, lincRNA, miRNA の機能調節に関わることを示している。さらに、C/EBPa の下流因子 Hb, defensin, ADH, C/EBPe が発現上昇したため、細胞内 Cat 発現は、C/EBPa および C/EBPe のシグナルに関与することが明らかとなり、脂肪細胞分化への深い関与が示唆された。

9. 相互作用検索、共通上流検索によるパスウェイ、関連疾患、関連生体現象の解析(全長 MMP3)

次に発現変動した遺伝子をコードする分子の相互作用マップが作成された(データ略)。さらに、相互関係検索と共通上流転写因子検索のそれぞれについて、関与の深いパスウェイ、疾患、生体現象がそれぞれ解析された(表1-10)。

それらの結果、MMP3 は (1)VHL シグナル, STAT, HIF, HAT, BRCA, Nucleophosmin, SIBRING シグナル, Myc, Smad, Ets-1/2, C/EBP のパスウェイに関わり(表4), (2) 関節リウマチ, 白血病, 前立腺癌, 肝炎, 肺気腫, 変形性関節症, 骨肉腫等の病態

に関与し(表5, 6), (3) UV 応答, 創傷治癒, 分化多能性, 癌, ウイルス感染, X 染色体不活性化, 転移にかかわると解析された(表7, 8)。MMP3 発現では、特徴として、炎症, 低酸素, 癌に関連するパスウェイおよびそれらに関与する Nucleophosmin, SIBRING などのシグナル伝達が上位にランクした。

10. 相互作用検索, 共通上流検索によるパスウェイ, 関連疾患, 関連生体现象の解析 (PEX)

PEXドメイン発現では, (1) Nucleophosmin シグナル, HAT シグナル, MMP シグナル伝達, VDR による発現調節, IL-10 シグナル, microRNA による発現調節, MAPK シグナル伝達への関与, (2) 関節リウマチ, 各種癌, 肝炎への関与, (3) 転移, 体細胞超変異, 癌の典座, 上皮間葉移行, 血栓, 層化上皮形成, 癌

白血病, 骨髄異形成症候群, 関節リウマチ, 黒色種, 多発性骨髄炎等の疾患への関与が解析され, (3) 癌, 細胞周期, 造血, 創傷修復, 血液脳関門, 癌の化学療法, 記憶の再固定, 脂肪細胞生成, メカニカルシグナル伝達が解析された(表 S5, 6). すなわち, Catドメイン発現では, C/EBP, CDK インヒビターなど, 発現に関与するパスウェイが上位にランクし, 癌との関わり, 造血幹細胞や骨形成に関与する RUNX に

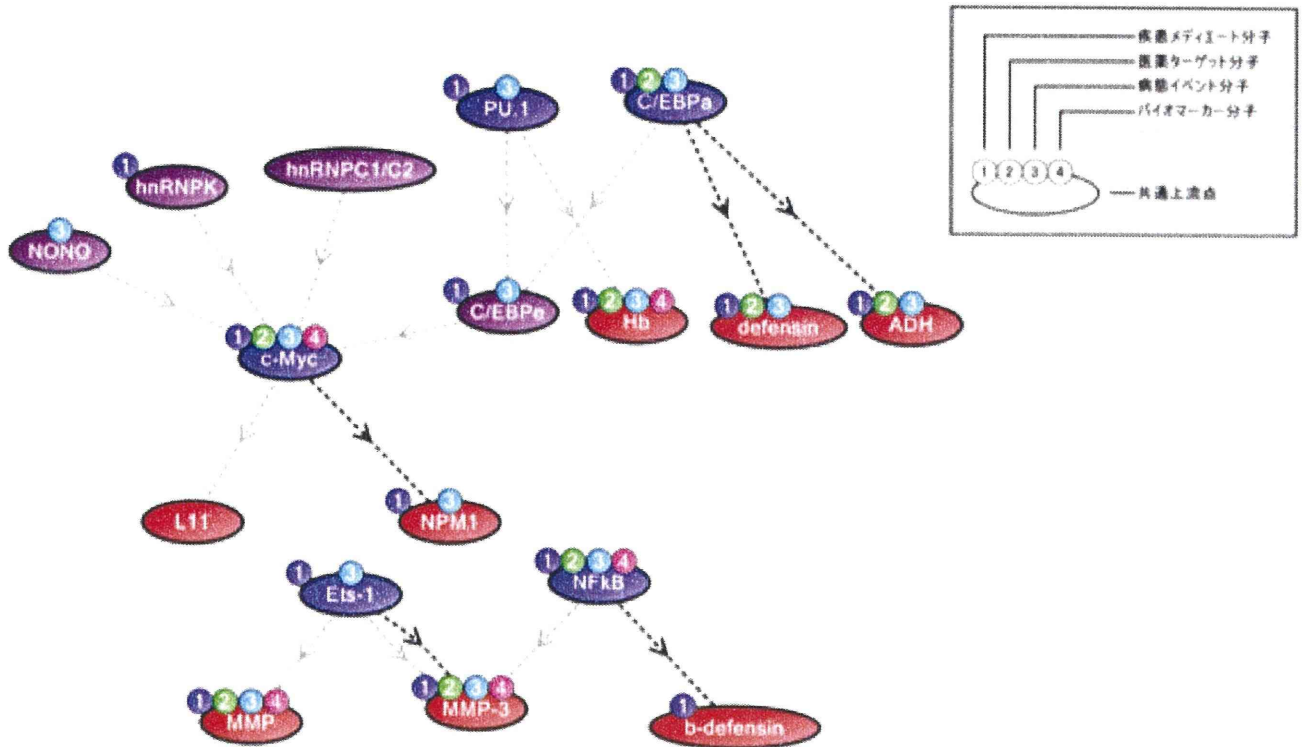


図 8, 細胞内 Cat で発現上昇した分子 (赤) と, その共通上流転写因子 (青) 検索の結果.

性悪液質, 免疫システム, 創傷修復, UV 応答への関与が解析された(表 S3, 4). PEXドメイン発現では, 癌化に関するパスウェイが特徴的に上位にランクし, また無機質の恒常性維持に関与する VDR による発現調節や, 面系関連細胞の分化に関与する IL-10 シグナルが上位にランクした.

11. 相互作用検索, 共通上流検索によるパスウェイ, 関連疾患, 関連生体现象の解析 (Cat)

次に Catドメイン発現によっては, (1)

Nucleophosmin シグナル, C/EBP, CDK 阻害シグナル, RB/E2F, microRNA による発現調節 (免疫), Runx による発現調節, IRF, SIBLING が解析され, (2) マントル細胞リンパ腫, 頭頸部癌, リンパ腫,

による発現調節がランクインし, 造血系への関与がうかがわれた.

12. 始点終点検索によるパスウェイ, 関連疾患, 関連生体现象の解析 (全長 MMP3)

さらに始点終点検索の結果, (1) GR による発現調節, MMP シグナル伝達, NFκB による発現調節, IRF による発現調節, SMAD による発現調節, MAPK シグナル伝達 への関与が, (2) 関節リウマチ, サルコイドーシス, 多発性骨髄腫, アテローム性動脈硬化症, 胃がん, 多発性硬化症などの疾患への関与が, (3) 免疫システム, 血管新生, 転移, 癌, 創傷修復, 血小板機能等の生体现象への深い関与が解析された(表 S7). 特徴として, GR を介して関節リウマチに, また

NFκB を介して癌関連の生体現象に関与していることがうかがえた。

12. 細胞内 MMP3, PEX, HP1G, HP1A による Hsp70 の発現制御: マイクロアレイによって顕著な発現変動のあった HspA6 についてリアルタイム PCR による確認を行った。その結果, HspA6 は, MMP3 および PEX によって発現誘導され, Cat ドメインでは誘導されず, マイクロアレイと類似の結果を得た(図9)。さらに, PEX ドメインは, HP1A および HP1G との共発現によって協調的に HspA6 の発現を誘導した。

13. 細胞内 MMP3 とそのドメインによ TNAP および CTGF/CCN2 の発現制御: マイクロアレイで発現変動が確認された TNAP についてリアルタイム PCR をしたところ, MMP3, PEX, Cat のいずれで

も発現が低下しており, マイクロアレイと同様の結果を得た(図10)。この結果は, マイクロアレイのデータがリアルタイム PCR でも再現できることと同時に, MMP3 による TNAP の抑制が示された。

これまでに HCS-2/8 細胞において MMP3 の転写下流因子であることが知られている CTGF/CCN2 の発現は, 今回 293 細胞の実験では MMP3 により発現変化がなかった。リアルタイム PCR による解析の結果, PEX ドメインおよび Cat ドメインにより CTGF 遺伝子の発現が 1.4 倍程度上昇することが明らかとなった(図 5)。

考察

HSPA6/HSP70B' を含む HSP70 ファミリーは, ストレスに応答して生体防御に働く (Noonan E et al, 2008, Exp Cell Res)。その機構の本体は分子シャペ

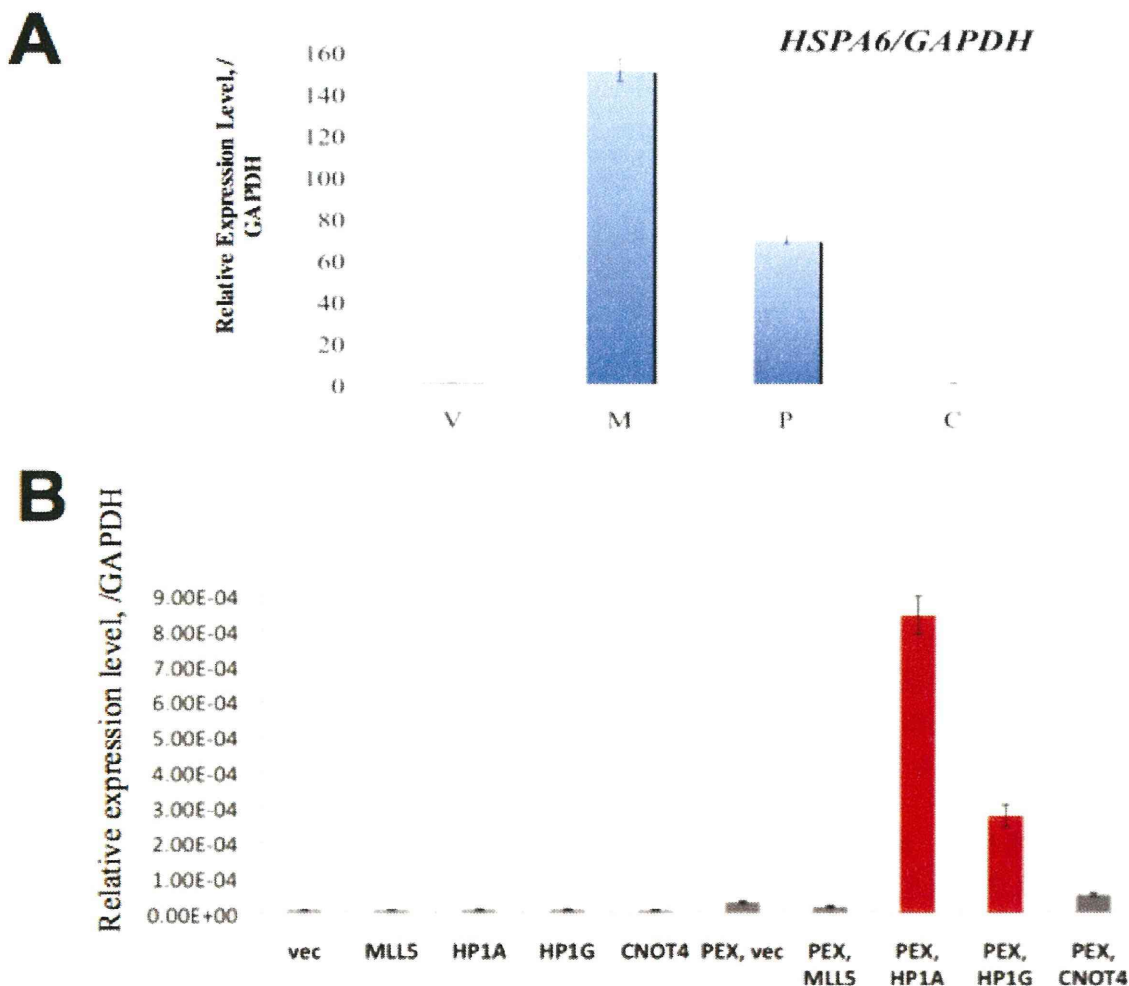


図9. A, 細胞内 MMP3 および PEX ドメインによる HspA6 の発現誘導. 293 に一過性トランスフェク

ロンであり、タンパク質の折り畳み、輸送、分解の各イベントにおいて主体的に関与する。このような分子シャペロン機能だけでなく、HSPファミリーは、細胞外に放出されて、まるでサイトカインや危機伝令者(アラーム、アラミン)としても働く(Calderwood SK et al, 2007, FEBS Lett)。さらにHSPは、そのC末端の配列がファミリー間で異なり、そのC末端ペプチドが、細胞表面で抗原提示のような形で提示され、抗原提示細胞からT細胞へと情報が受け渡され、その後炎症がコントロールされるというモデルが示されている(van Eden W et al, 2005, Nature Rev Immunol)。このように多彩で複雑な機能で知られるHSPであるが、HSPA6/HSPB'についての報告は少ない。

HSPA6/HSP70B'はマウスやラットなどのげっ歯類には存在せず、人類などの霊長類にしかない(Noonan EJ et al, 2008, Cell Stress Chaperones)。このことはHSPA6/HSPB'を他の数多くのHSP70ファミリーと区別する。すなわちHSPA6/HSP70B'は、進化の過程で霊長類に備わった遺伝子であり、その機能は霊長類に特有の生活様式や生命現象と関係していると言えよう。生体の生理機能研究、病気の研究、遺伝子の研究にげっ歯類は多用されてきたが、勿論、ヒトにおける全ての現象がげっ歯類をはじめとするモデル生物を使って説明できるわけではない。免疫や再生、病気のメカニズムはヒトでの現象とモデル生物とでは異なることが珍しくない。従って、HSPA6に纏わる研究は、今後もヒトにおける免疫、再生、病気の研究をする上でのランドマークとして貴重である。

今回の研究で、HP1はPEXドメインによるHSPA6誘導を補助的に強調することが明らかになった。PEXドメインにはHP1 Boxと呼ばれるHP1結合配列が存在するため、そこを介してHP1とMMP3のPEXドメインは結合するのだろう。PEXドメインを含むMMP3には6箇所の塩基性アミノ酸クラスター、つまりリジンとアルギニンに富む領域(K/R-rich)が存在し、それらは核移行シグナルとして機能しうることが以前に示されている(Eguchi T et al, MCB, 2008)。そのようなK/R-richな領域は、一般にDNA結合配列としても機能しうる。HP1は、ヒストンH3K9メチル化を認識しそこに結合し、HP1のポリマー化によってヘテロクロマチン形成することが、ヘテロクロマチンプロテインという名の所以であるが、その後の研究で、ユ

ークロマチンにも存在することや、転写因子としての機能、さらにはRNAへの結合までもが示されている。MMP3もまたDNA結合因子であるため、どうやらMMP3-HP1複合体は、RNAおよびDNAに結合し、メチル化ヒストンにも作用しうるエピゲノム制御複合体のようだ。HP1の別の顔としては、免疫寛容の鍵因子であることが指摘されている(El Gazzar M et al, 2008, J Biol Chem)。従って、DNAやRNAと結合するHP1の挙動とエピジェネティックな発現制御の関わりは大変興味深い。

HSPA6はHSPの一種であるにも関わらず、熱でさほど誘導されない点、他のHSPファミリーと比較して特別である。我々の実験でもヒートショックによってHSPA6は2倍程度にしか誘導されなかった(データ省略)。別の側面として、UV応答のイベントが細胞内MMP3と関与するという今回の結果は、今回我々が示したMMP3によるHSPの誘導と繋がりがあ(表7,8; 図1)。なぜなら、HSPはUVというストレスに応答して発現する分子だからだ。UVに代表される光と、皮膚などの老化、代謝、若返りの関係は、今後も重要な研究課題である。UVなどの光によりHSPを誘導し、疾患の予防や治療に応用するのも今後の課題である。

ところで、マイクロアレイのデータに基づく、共通上流検索と相互作用サーチによって、細胞内MMP3が関節リウマチと深い関係にあることが示唆された(表5,6)。血中MMP3は、関節リウマチのマーカーとして臨床で用いられている。MMP3と関節リウマチに関する論文数自体が多いため、キーモルネット解析では、上位にヒットし、ハイスコアを示したと考えるのが妥当だろう。しかし、気をつけてデータを解釈しなければならない。MMP3が創傷治癒や関節保護に働くとの報告も多く、その機序は不明である。細胞内MMP3が、組織再生因子CCN2を誘導するという事実は、疾患におけるMMP3のポジティブな作用を示唆している(Eguchi T et al, MCB, 2008)。関節リウマチの患者で、高度の歯周病および歯槽骨吸収を呈す患者がおり、関節リウマチと歯周病の繋がりは、しばしば指摘されてきた。今回得られたパスウェイなどのデータを基に、さらに深く探求することで、関節リウマチの病態を解明する。

細胞内MMP3に関わる病態イベントとしてはその他に、創傷治癒、分化多能性が上位にランクされた

(表 7,8)。CCN2/CTGF は、細胞内 MMP3 により転写調節を受ける因子であると同時に、皮膚や骨の再生を促進することが知られる。従って、細胞内 MMP3 が CCN2/CTGF 発現誘導を介して組織再生に働くという、以前に我々が提唱した仮説をキーマルネットは補強した(Eguchi T et al, MCB, 2008)。今回は、キーマルネットによる細胞内 MMP3 が分化多能性と関与するというデータと同時に、Myc および HIF による発現調節が関係するとのデータも得た(図 3,4,5; 表 2,4)。Myc, HIF, HP1 などの転写因子の働きによって細胞内 MMP3 は転写調節に関与し、分化多能性や創傷治癒、組織再生に関わるのだろう。

細胞内 MMP3 が関わる生体イベントとして明らかになったのは、ほとんど転写調節、RNA 代謝、クロマチンの構築と構成にかかわることであった(表 9, 10)。このことは、細胞内 MMP3 が細胞質および核内で様々な転写制御因子、シグナル伝達物質、クロマチン因子と相互作用することを意味している。以前に我々が行った研究で、細胞内 MMP3 相互作用因子(NuMAPs)を質量分析装置を応用した LC-MS/MS によって網羅的に同定しており、その実験によって、HP1A, HP1G, MLL5, CNOT4 などのエピジェネティクス因子が同定された(Eguchi T et al, MCB, 2008)。さらに今回の実験では、MMP3 の PEX ドメインと HP1A および HP1G が協調的に遺伝子発現制御することが明確になった(図1)。以前及び今回に示した HP1 と MMP3 の PEX を介した相互作用は、HP1 の結合ターゲットであるメチル化されたヒストンおよびその先のクロマチン動態に影響を及ぼすだろう(図 1)(Eguchi T et al, MCB, 2008)。実際に、細胞内 MMP3 によって、ヒストンメチル化およびアルギニンメチル化のパスウェイが変動もしたのだから、細胞内 MMP3 はヒストン修飾と密接に関わることが分かる(表 3)。

細胞内 MMP3 の臨床との関わり

本研究の結果から、細胞内 MMP の発現は、多くの転写経路、シグナル経路に関わることが明らかとなった。その中には、硬組織のマーカーである SIBLING ファミリーやコラーゲンの誘導、細胞多能性を誘導する c-Myc, がん抑制遺伝子 p53, 抗菌ペプチドであるディフェンシンといった経路が予測され、直接応用するに際し、ポジティブな作用が期待でき

る。一方で、タンパク質のアグリゲーションと Hsf1, Hsp の誘導といった特徴、種々の癌関連シグナルへの関与の予測は、CMV プロモーター制御下での協力的な発現によりもたらされたことも推察され、従って、強すぎないプロモーターの利用や薬剤制御のプロモーターによる発現量調節などにより、より有効で副作用の少ない応用が期待できる。また、癌化、形質転換、多能性獲得が強い関連を持った事象であるためであるとも推察されるが、安易な臨床応用への警告でもあり、本研究結果を十分に踏まえた応用方法が期待される。

さらに。本研究では、細胞内 MMP3 が、関節リウマチや癌に関わると解析され、これまでの多くの報告と一致することから、本研究の変動遺伝子リスト、転写マップ、シグナルマップ、関連パスウェイ解析、関連疾患解析、関連生体現象解析は、MMP が関与する種々の疾患の機序解明および MMP3 分子の医療応用に役立つものである。さらに細胞内 MMP3 によって誘導された c-Myc の上流因子である hnRNPK ファミリーは、RNA の機能に関わる分子であるが、今後その機能の解明が待たれる。

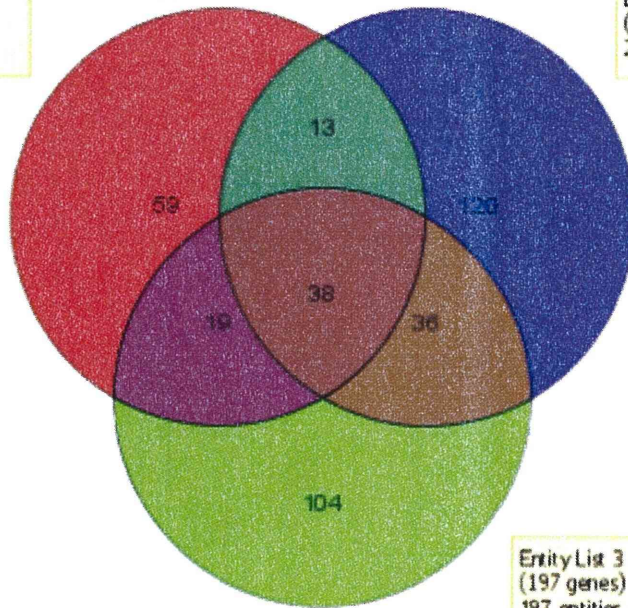
謝辞： マイクロアレイ及びデータ解析の支援について、バイオマトリックス研究所に感謝を表す。キーマルネットを用いた共通上流転写因子検索及びパスウェイ解析は、医薬分子設計研究所に委託し、谷口理恵の有益な示唆に感謝を表す。

Sp-

Entity List 1 : (1-1-c) x 1.5
(129 genes)
129 entities

PEX

Entity List 2 : (1-2-c) x 1.5
(207 genes)
207 entities



Entity List 3 : (1-3-c) x 1.5
(197 genes)
197 entities

Cat

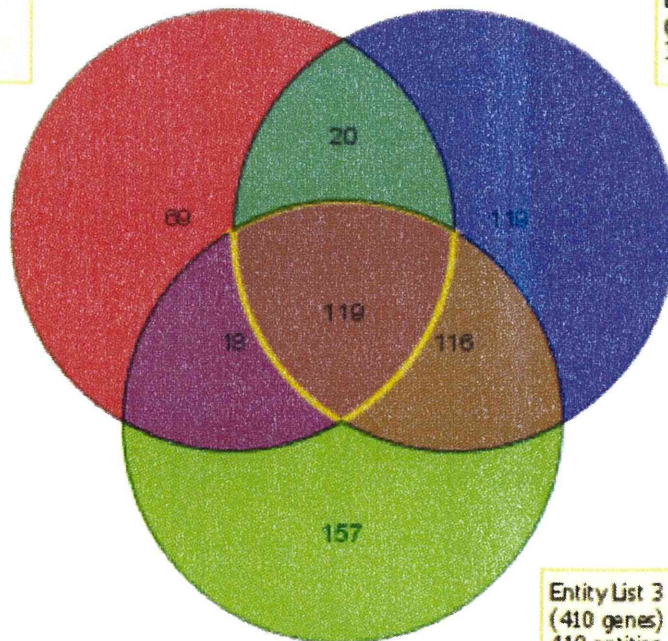
- ☒ S1
- ☒ S2

Sp-

Entity List 1 : (1-1-d) x 0.67
(226 genes)
226 entities

PEX

Entity List 2 : (1-2-d) x 0.67
(374 genes)
374 entities



Entity List 3 : (1-3-d) x 0.67
(410 genes)
410 entities

Cat

**Upregulated genes by SP- ,
but not by PEX nor Cat**

SP-	PEX	Cat	
1.9	1.3	1.1	RNU5B
1.6	0.9	0.9	SERHL2
1.6	1.2	1.0	SNRPN SNORD116-21 SNORD116
1.6	1.2	1.1	LOC728220
1.6	1.0	1.1	MMP10
1.5	1.1	1.0	SNORD38A
1.5	1.1	1.1	REP15
1.5	1.2	1.1	CCDC102B
1.5	1.2	1.2	IMMP1L

表 S1.

**Upregulated genes by PEX,
but not by Cat**

SP-	PEX	Cat	
12.6	9.1	1.0	HSPA6
1.1	1.6	1.1	P2RY12
1.2	1.6	1.2	PCDHB15
1.1	1.6	1.3	SSX9
1.2	1.6	1.4	LRFN2
1.3	1.6	1.4	C9orf31
1.3	1.5	1.2	ZNF285B
1.1	1.5	1.3	CTSG
1.2	1.5	1.2	LYZL6

表 S2.

**Upregulated genes by PEX,
but not by Cat**

SP-	PEX	Cat	
12.6	9.1	1.0	HSPA6
1.1	1.6	1.1	P2RY12
1.2	1.6	1.2	PCDHB15
1.1	1.6	1.3	SSX9
1.2	1.6	1.4	LRFN2
1.3	1.6	1.4	C9orf31
1.3	1.5	1.2	ZNF285B
1.1	1.5	1.3	CTSG
1.2	1.5	1.2	LYZL6

表 S3.

表1. 細胞内MMP3で発現変動した分子の共通上流転写因子が関わるパスウェイ	score(v
1 Nrfによる発現調節 (Transcriptional regulation by Nrf	14.354
2 VDRによる発現調節 (Transcriptional regulation by VDR	12.325
3 Ets-1/2による発現調節 (Transcriptional regulation by Ets-1/2	6.088
表2. 細胞内MMP3で発現変動した分子の共通上流転写因子が関わる分子パスウェイ	score(v
1 Nucleophosminシグナル伝達 (Nucleophosmin signaling pathway	22.180
2 SIBLINGシグナル伝達 (SIBLING signaling pathway	20.467
3 Mycによる発現調節 (Transcriptional regulation by Myc	19.766
4 SMADによる発現調節 (Transcriptional regulation by SMAD	18.966
5 Ets-1/2による発現調節 (Transcriptional regulation by Ets-1/2	18.182
6 C/EBPによる発現調節 (Transcriptional regulation by C/EBP	16.566
7 DAPKシグナル伝達 (DAPK signaling pathway	16.056
8 WT1による発現調節 (Transcriptional regulation by WT1	15.502
9 IL-33シグナル伝達 (IL-33 signaling pathway	14.708
10 VDRによる発現調節 (Transcriptional regulation by VDR	14.667
11 progesterone receptorによる発現調節 (Transcriptional regulation by pro	14.472
12 MAPKシグナル伝達 (MAPK signaling pathway	14.303
13 p38シグナル伝達 (p38 signaling pathway	13.993
14 POU domain factorによる発現調節 (Transcriptional regulation by POU d	13.759
15 Nrfによる発現調節 (Transcriptional regulation by Nrf	13.324
表3. 細胞内MMP3で発現変動したパスウェイ	score(v
1 MMPシグナル伝達 (MMP signaling pathway	16.566
2 Histone methylation	11.723
3 IRFによる発現調節 (Transcriptional regulation by IRF	11.101
4 MRFによる発現調節 (Transcriptional regulation by MRF	10.817
5 TG2シグナル伝達 (TG2 signaling pathway	10.188
6 arginine methylation (Arginine methylation	8.974
7 HATシグナル伝達 (HAT signaling pathway	8.159
8 ERKシグナル伝達 (ERK signaling pathway	7.951
9 Mycによる発現調節 (Transcriptional regulation by Myc	7.366
10 IL-33シグナル伝達 (IL-33 signaling pathway	7.231
表4. 細胞内MMP3で発現変動した分子パスウェイ	score(v
1 VHLシグナル伝達 (VHL signaling pathway	59.534
2 STATによる発現調節 (Transcriptional regulation by STAT	42.296
3 HIFによる発現調節 (Transcriptional regulation by HIF	40.711
4 HATシグナル伝達 (HAT signaling pathway	35.973
5 BRCAシグナル伝達 (BRCA signaling pathway	35.606
6 BLIMP-1による発現調節 (Transcriptional regulation by BLIMP-1	33.877
7 AP-1による発現調節 (Transcriptional regulation by AP-1	33.348
8 MAPKシグナル伝達 (MAPK signaling pathway	32.334
9 SMADによる発現調節 (Transcriptional regulation by SMAD	31.894
10 Mycによる発現調節 (Transcriptional regulation by Myc	28.913
11 C/EBPによる発現調節 (Transcriptional regulation by C/EBP	28.136
12 Nucleophosminシグナル伝達 (Nucleophosmin signaling pathway	27.456

表 5. 細胞内MMP3で動いた遺伝子の共通上流転写因子が関わる疾患	score(v)
1 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis)	27.186
2 前立腺癌 (Prostate Cancer)	18.006
3 肺気腫 (Emphysema)	14.788
4 変形性関節症 (Osteoarthritis)	14.273
5 バーキットリンパ腫 (Burkitt's Lymphoma)	13.45
6 肺癌 (Lung Cancer)	12.617
7 頭頸部癌 (Head and Neck Cancer)	11.914
表 6. 細胞内MMP3で動いた分子パスウェイと関係する疾患	score(v)
1 成人T細胞リンパ腫/白血病 (Adult T Cell Lymphoma/Leukemia)	21.129
2 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis)	20.574
3 肝炎 (Hepatitis)	18.228
4 慢性骨髄性白血病 (Chronic Myelogenous Leukemia)	16.917
5 骨肉腫 (Osteosarcoma)	15.716
6 小細胞肺癌 (Small Cell Lung Cancer)	15.470
7 マントル細胞リンパ腫 (Mantle-cell Lymphoma)	15.206
8 頭頸部癌 (Head and Neck Cancer)	14.830
9 ウイルス性肝炎 (Viral Hepatitis)	14.548
10 大腸癌 (Colorectal Cancer)	13.952
表 7. 細胞内MMP3で動いた遺伝子の共通上流転写因子が関わる病態イベント	score(v)
1 創傷修復 (Wound Repair)	19.050
2 UV応答 (UV Response)	18.006
3 分化多能性 (Pluripotency)	17.054
4 X染色体不活性化 (X-chromosome Inactivation)	14.273
5 ヘモグロビン制御 (Hemoglobin Regulation)	13.811
6 転移 (Metastasis)	12.246
7 上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition)	11.637
8 自己免疫 (Autoimmune)	9.02
9 癌 (Cancer)	8.546
表 8. 細胞内MMP3で動いた分子パスウェイと関係する病態イベント	score(v)
1 UV応答 (UV Response)	31.066
2 分化多能性 (Pluripotency)	24.302
3 癌 (Cancer)	23.999
4 ウイルス感染 (Viral Infection)	16.134
5 転移 (Metastasis)	16.003
6 タイトジャンクション (Tight Junction)	15.746
7 上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition)	15.035
8 X染色体不活性化 (X-chromosome Inactivation)	14.525
9 低酸素症 (Hypoxia)	14.259
10 脂肪細胞生成 (Adipogenesis)	13.674

表 5. 細胞内MMP3で動いた遺伝子の共通上流転写因子に関わる疾患	score(v)
1 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis)	27.186
2 前立腺癌 (Prostate Cancer)	18.006
3 肺気腫 (Emphysema)	14.788
4 変形性関節症 (Osteoarthritis)	14.273
5 バーキットリンパ腫 (Burkitt's Lymphoma)	13.45
6 肺癌 (Lung Cancer)	12.617
7 頭頸部癌 (Head and Neck Cancer)	11.914

表 6. 細胞内MMP3で動いた分子パスウェイと関係する疾患	score(v)
1 成人T細胞リンパ腫/白血病 (Adult T Cell Lymphoma/Leukemia)	21.129
2 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis)	20.574
3 肝炎 (Hepatitis)	18.228
4 慢性骨髄性白血病 (Chronic Myelogenous Leukemia)	16.917
5 骨肉腫 (Osteosarcoma)	15.716
6 小細胞肺癌 (Small Cell Lung Cancer)	15.470
7 マントル細胞リンパ腫 (Mantle-cell Lymphoma)	15.206
8 頭頸部癌 (Head and Neck Cancer)	14.830
9 ウイルス性肝炎 (Viral Hepatitis)	14.548
10 大腸癌 (Colorectal Cancer)	13.952

表 7. 細胞内MMP3で動いた遺伝子の共通上流転写因子に関わる病態イベント	score(v)
1 創傷修復 (Wound Repair)	19.050
2 UV応答 (UV Response)	18.006
3 分化多能性 (Pluripotency)	17.054
4 X染色体不活性化 (X-chromosome Inactivation)	14.273
5 ヘモグロビン制御 (Hemoglobin Regulation)	13.811
6 転移 (Metastasis)	12.246
7 上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition)	11.637
8 自己免疫 (Autoimmune)	9.02
9 癌 (Cancer)	8.546

表 8. 細胞内MMP3で動いた分子パスウェイと関係する病態イベント	score(v)
1 UV応答 (UV Response)	31.066
2 分化多能性 (Pluripotency)	24.302
3 癌 (Cancer)	23.999
4 ウイルス感染 (Viral Infection)	16.134
5 転移 (Metastasis)	16.003
6 タイトジャンクション (Tight Junction)	15.746
7 上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition)	15.035
8 X染色体不活性化 (X-chromosome Inactivation)	14.525
9 低酸素症 (Hypoxia)	14.259
10 脂肪細胞生成 (Adipogenesis)	13.674

表9. 細胞内MMP3で動いた遺伝子の共通上流転写因子が関わる生体イベント	score(v)
1 転写(RNAポリメラーゼIIプロモータ	21.118
2 RNA代謝 (RNA metabolic process	17.592
3 転写調節(RNAポリメラーゼIIプロモータ	17.365
4 転写 (transcription	12.993
5 DNA依存性転写調節 (regulation of transcription, DNA-dependent	11.951
6 細胞増殖調節 (regulation of cell proliferation	11.785
7 細胞増殖 (cell proliferation	11.3
8 細胞増殖制御(-	11.186
9 造血 (hemopoiesis	9.638

表10. 細胞内MMP3で動いた分子パスウェイと関係する生体イベント	score(v)
1 転写(RNAポリメラーゼIIプロモータ	40.423
2 転写 (transcription	39.897
3 転写調節(RNAポリメラーゼIIプロモータ	38.348
4 転写調節 (regulation of transcription	36.528
5 DNA依存性転写調節 (regulation of transcription, DNA-dependent	35.794
6 RNA代謝 (RNA metabolic process	34.965
7 染色体構築 (chromosome organization	34.330
8 クロマチン構成 (chromatin organization	33.210
9 クロマチン修飾 (chromatin modification	26.567
10 タンパク代謝 (cellular protein metabolic process	24.711
11 転写制御(+	24.661
12 細胞増殖 (cell proliferation	23.466