

氏 名 (本籍)	大 西 啓 祐
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1 5 5 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 (博 士 課 程) 外 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Matrix Protein Degradation in Human Pulmonary Emphysema. (マトリクスメタロプロテアーゼによる肺気腫肺の細胞外基質の分解について)
	(主 査)
論 文 審 査 委 員	教 授 里 見 進 教 授 佐 々 木 英 忠 教 授 貫 和 敏 博

論文内容要旨

研究目的

肺気腫症の発症要因として、現在はプロテアーゼ・抗プロテアーゼ不均衡説が諸研究家の注目するところとなっている。しかしそのメカニズムについても未だ十分解明されているとはいえない。プロテアーゼ・抗プロテアーゼ不均衡説は、1960年代に α_1 -アンチトリプシン欠損症と肺気腫症との関連性が発見され、またほぼ同時期にラットの気管内にパバインを注入し実験的に肺気腫症を作り出すことに成功して以来、臍エラスターゼ、ヒト好中球エラスターゼ、内因性のエラスターゼを活性化させることにより、肺気腫症のモデルが作られたことからプロテアーゼの中心的なものはエラスターゼと考えられるようになっていた。

肺の細胞外基質の約50%はコラーゲンが占めるものの、従来コラゲナーゼ単独では肺気腫症の変化の誘起は困難とされていたが、1992年にD'Arminento等により、ヒトコラゲナーゼ(matrix metalloproteinase (MMP)-1)をハプトグロビンのプロモーターに連結し発現させたtransgenic mouseにヒト肺気腫症に類似した気腔の拡大を観察したことから、ヒト肺気腫症にも内因性のコラゲナーゼの作用が疑われた。

これらのことより、肺気腫患者における胸腔鏡下肺部分切除術(TVRS)時の標本を用いてヒト肺気腫症におけるmatrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-9, membrane type matrix metalloproteinase (MT1-MMP), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1, TIMP-2および好中球エラスターゼ、 α_1 -アンチトリプシンについての研究を行った。

研究結果

MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2につきmRNAレベルでは肺気腫組織、非肺気腫組織の双方に存在が確認されたものの、免疫組織学的に検索した結果では、MMP-1, MMP-8, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2は肺気腫組織、非肺気腫組織ともに染色性が低く、明らかな差異は認められなかった。しかし、MMP-2, MT1-MMPは主に肺胞上皮細胞、線維芽細胞、肺胞マクロファージに存在し、肺気腫組織においてより強い染色性が認められた。

肺胞壁をホモジェナイズした上清中の顆粒球エラスターゼ量は、肺気腫組織中には 355.1 ± 59.1 ng/g proteinに対し、非肺気腫組織中には 246.7 ± 57.7 ng/g proteinであった。また、 α_1 -アンチトリプシン量は 4.0 ± 0.7 mg/g proteinの肺気腫組織に対し、非肺気腫組織では 1.7 mg/g

proteinであったが2群間に有意差はみとめなかった。

I型コラーゲン分解活性は肺気腫組織において $11.0 \pm 3.0 \times 10^{-7}$ IU/g/72h に対し非肺気腫組織では $3.5 \pm 1.4 \times 10^{-7}$ IU/g/72h と肺気腫組織に有意の上昇が認められ肺気腫の成因にコラーゲナーゼの関与が示唆された。

MMP-2, MMP-9の活性はgelatin zymographyにより解析した。その結果ゲラチン分解能はMMP-2: 肺気腫 0.66 ± 0.09 に対し, 非肺気腫では 0.31 ± 0.04 と有意に上昇しており ($p < 0.01$), 活性型のMMP-2の量も肺気腫に多く認められた。MMP-2の活性化には, 膜型のマトリクスメタロプロテアーゼ (MT1-MMP) の関与が報告されており, 本研究でもウェスタンブロット法によりその発現量の増加が確認された。MMP-2とMT1-MMPにはI型コラーゲンの分解能を有するという報告も在り, コラーゲナーゼ群のMMP-1, MMP-8はEIAによる定量でも肺気腫, 非肺気腫組織間に差はなく, 免疫組織染色においてほとんど認めないことから肺気腫におけるコラーゲナーゼ活性の上昇はむしろMMP-2およびMT1-MMPの関与が強く示唆された。またelastin zymographyによりMMP-2にはエラスチン分解能も有していることが判明した。

以上のことから, MMP-2には肺の細胞外基質であるコラーゲンとエラスチンの双方の分解能が在り, これを活性化するMT1-MMPの過剰発現が肺胞の破壊に強く関与しているものと考えられた。

研究の意義・独創的な点

本研究は, ヒト肺気腫においてMMP-2によるコラーゲンとエラスチンの分解能のin vivoで証明したものであり, これに関する報告は未だない。肺胞の破壊に関与するプロテアーゼを明らかにすることができればその障害をすることにより病態の進展を押さえることにつながるであろう。本研究では複雑なプロテアーゼのカスケードの1部を明らかにしたものとする。

審査結果の要旨

近年肺気腫症による死亡者数は増加傾向にあり、特に欧米においては死亡原因の上位にあがるようになり、我が国においても同様の傾向がある。肺気腫症の発症要因として、現在はプロテアーゼ・抗プロテアーゼ不均衡説が諸研究家の注目するところとなっているが、そのメカニズムについても未だ充分解明されているとはいえない。従来考えられてきた、プロテアーゼの中心的なものは好中球エラスターゼであったが、本研究では、新鮮な肺気腫のサンプルと正常肺のコントロールとを対比させ、細胞外基質の代謝に注目し詳細なプロテアーゼと抗プロテアーゼの検討を行っている。

はじめに、MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2 につき mRNA レベルでの存在の確認後、免疫組織学的にも検索している。その結果 MMP-1, MMP-8, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 は肺気腫組織、非肺気腫組織ともに染色性が低く、明らかな差異がなく、MMP-2, MT1-MMP は主に肺胞上皮細胞、線維芽細胞、肺胞マクロファージに存在し、肺気腫組織においてより強い染色性を示し、気腫性変化の形成に MMP-2 および MT1-MMP の関与を示唆している。

ついで、MMP-2 に注目し、SDS-PAGE やゲラチンザイモグラフィーを用い気腫性変化をきたした周囲の肺内におけるコラゲナーゼ活性、ゲラチナーゼ活性の上昇していることを証明し、それに加え、エラスチンサイモグラフィーにより MMP-2 によるエラスチン分解活性の上昇からヒト肺気腫の形成と MMP-2 との関連を示した。また、生体内における MMP-2 の活性化機構に関与すると考えられている MT1-MMP との関連も考察しており肺気腫の成因に MMP-2 の関与の可能性がきわめて高いことを指摘している。

さらに、エンザイムイムノアッセイ法を用いて、MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 の定量を行い、免疫組織学的検索、酵素活性の結果の裏付けをおこなっている。従来考えられてきたエラスターゼ- α 1-アンチトリプシンの不均衡は認めておらず、MMP-2, MT1-MMP の関与の信憑性を高めている。

本研究は、ヒト肺気腫において MMP-2 によるコラーゲンとエラスチンの分解能の上昇をはじめて証明し、肺内の細胞外基質の代謝における複雑なプロテアーゼのカスケードの1部を明らかにしたものでこれに関する報告は未だなく、今後の肺気腫の成因論に大きく影響し得る研究であり、学位に値するものとする。