

## 造血幹細胞ニッチにおける MMP-9 の役割

服部 浩一, 田代 良彦

生体骨髄内の造血幹細胞の至適微小環境（ニッチ）への定着と離脱の分子制御機構は、造血系細胞の分化、動員そして増殖等の細胞動態と密接な関連性を有していることが明らかとなってきている。近年、こうした骨髄及び骨髄由来細胞の動態において、接着分子や細胞増殖因子の細胞外ドメイン分泌を制御するマトリックスメタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9) の重要性が示唆された。筆者らは、最近の研究で、骨髄中の造血幹細胞ニッチの構成分子と幹細胞動態との相互作用が、生体内の主にセリンプロテアーゼに属する血液線維素溶解系（線溶系）因子による潜在型酵素 ProMMP から活性型 MMP への変換を中心に構成されていることを明らかにした。本稿では、これらの研究成果を中心に、MMP-9 活性化の生体内造血における意義について概説する。

### はじめに

近年の研究で、骨髄中の造血幹細胞はニッチと呼ばれる至適微小環境に存在し、各種生体因子の作用による成熟分化、すなわち未分化性の喪失過程を通じてニッチを離脱し、骨髄内の細胞外マトリックス中の移動を経て、骨髄由来細胞として、末梢血中へと移動していくことが明らかとなりつつある。こうした細胞外微小環境中の細胞移動において重要視されているのが、コラーゲンやラミニン等の細胞外マトリックス構成分子群を基質とするマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) をはじめとする生体内のタンパク質分解酵素群である。また MMP は様々なサイトカイン及びその受容体、接着分子の細胞外ドメイン分泌（プロセッシング）を促進することにより、造血系の各種細胞の分化・増殖にも関与していることが判明している。幹細胞の未分化性を維持するシステムの解明は、未だ幹細胞生物学上の主要命題とされているが、こうした造血幹細胞の移

動と分化の連動性が示唆されたことで、細胞運動の阻害が細胞分化の抑制—未分化性の維持機構として機能する可能性も提起された。本稿では筆者らの最近の研究成果を中心に、当該分野の最新の知見について概説する。

### 1. MMP による接着分子のプロセッシングと造血幹細胞の動態

骨髄内の造血支持組織は静脈洞系の発達した血管系と網状の間質構造により構成されている。静脈洞で仕切られた造血実質は骨髄間質（ストローマ）細胞とこれらを支持する細胞外マトリックスと共に造血至適微小環境（ニッチ）を形成している。ストローマ細胞は様々な造血因子を含むサイトカイン、ケモカインを産生するばかりでなく、これらの受容体、さらに多種の接着分子を発現している。近年こうした微小環境構成因子群の動態が、MMP あるいはその近縁ファミリーである a disintegrin and metalloproteinases (ADAMs) や a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motif (ADAMTS) という金属要求性タンパク質分解酵素群によって制御されていることが明らかとなってきている。これらの酵素群は、マトリックス構築タンパク質の直接的な基質分解のみならず、多くのサイトカインとこれらの受容体、接着分子、さらには Notch, Delta/Jagged 等の分化制御分子に至る膜型から可溶性へのプロセッシング—細胞膜貫通型糖タンパク質の細胞外ドメインからの

切断・遊離の過程を担っている。つまり最終的にこれら生体因子のシグナル伝達からその生物活性自体を制御する機能を有している。

造血幹細胞、正確に記載するならば造血組織再構築能を有する細胞群に発現する接着分子の中で、ニッチの構造タンパク質として重要視されているヒアルロン酸をリガンドとする CD44 は、造血幹細胞分画での発現が報告されており、イスラエルのワイツマン研究所の Lapidot らは、CD44 が造血幹細胞とニッチとの間で、ホーミングあるいは lodgement のプロセスを制御する主要な因子であることを抗 CD44 抗体を使用した実験で明らかにしている<sup>1)</sup>。近年の研究で、この CD44 は  $\gamma$  セクレターゼ以外に、膜型あるいは可溶性の MMP によって、そのプロセシングが制御されていることが示唆されている。つまりこのことは、MMP の活性化による接着分子の切断が、造血幹細胞のニッチからの離脱を促進する可能性を示唆している。また同様に造血幹細胞に発現するとされる very late antigen-4 (VLA-4) とそのリガンドである vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1) との相互作用については、これまで抗 VLA-4 抗体あるいは抗 VCAM-1 抗体、最近では VLA-4 阻害剤のマウス生体への投与が、いずれも造血幹細胞、前駆細胞の動員を促進することから、長年、造血幹細胞動態の重要な制御機構の一つとして注目されてきた<sup>2,3)</sup>。近年、VCAM-1 がやはり MMP によってプロセシングを制御されていることが示唆されており<sup>4)</sup>、これらの事象は、いずれも接着分子を介した造血幹細胞とニッチ間との結合が、MMP によって制御されていることを直接的に示唆していると言えよう。

## 2. 造血幹細胞の動態制御における MMP-9 の機能解析

幹細胞を含む造血系細胞の分化増殖あるいは動員の制御因子としては、これまでに顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) や Kit リガンド (stem cell factor: SCF) をはじめとする造血因子の他、CXCL12 (stromal cell-derived factor-1: SDF-1)、インターロイキン-8 (IL-8) 等のケモカイン、vascular endothelial growth factor (VEGF) や placenta growth factor (PlGF) 等の血管新生因子が知られている。筆者らはこれまでの研究で、CXCL12 や VEGF、PlGF を産生するアデノウイルスベクターを投与し、マウス生体中で各種因子を強制発現させる実験を行ったところ、マウス末梢血中に各種因子の血中濃度依存性に有意な数の造血幹細胞、前駆細胞が動員されたことを報告した<sup>5-7)</sup>。この時、筆者らは、G-CSF を加えたこれら各種因子による骨髓ニッチからの造血幹細胞の動員過程において、骨髓ストローマを中心に血管基底膜等を構成する IV 型コラーゲンを基質とする MMP-9 が活性化されることを見出した (図 1A)<sup>8)</sup>。MMP-9 は以前より、各種のがん転移の促進因子としても

注目されており、生体内の血行性の細胞移動には必須の因子と考えられている。筆者らは、カリフォルニア大学サンフランシスコ校の Werb らとの共同研究による MMP-9 遺伝子欠損マウス (MMP-9<sup>-/-</sup>) の解析において、放射線あるいは抗がん剤による傷害後の骨髓細胞・組織の再生は野生型 (MMP-9<sup>+/+</sup>) では、骨髓中での局所的な MMP-9 活性化部位の移行と共に、骨芽細胞領域から始まり、速やかに血管領域へと移動していくのに対し、MMP-9<sup>-/-</sup> の骨髓細胞の再生は細胞周期特異的抗がん剤 5-フルオロウラシル (5-FU) 250 mg/kg 投与後 10 日以降になっても骨芽細胞領域に留まり、骨髓組織再生遅延が生じることを見出し、生体内 MMP-9 の活性化が、幹細胞を含む造血系細胞の骨髓内外の動態に関与すること、さらに造血幹細胞ニッチが、骨内膜近傍—骨芽細胞領域に存在することを示唆した (図 1B)<sup>8,9)</sup>。造血幹細胞ニッチの所在については近年、先述のごとく骨芽細胞領域に加えて、骨髓血管内皮近傍に存在する可能性が指摘されているが、両者の間には酸素やカルシウム濃度に相違があり、静止期の造血幹細胞は前者に多いことが推測され、両者間 (ニッチ間) には、ある種の機能分担が存在するとの見方が有力となってきている。筆者らはその後の研究で、MMP-9 の活性化が、造血因子 Kit リガンドのプロセシングを促進し、造血幹細胞の分化増殖及び動員、あるいは再生といった一連の動態の起点として機能しているとする生体内造血機構の一端を明らかにした。

## 3. 血液線維素溶解系の亢進と造血幹細胞動態との連関

生体内造血機構における重要性が確認された MMP の活性化機構の解明も、ここ数年、急速に進んできている。生体内で MMP は、まずその前駆体、潜在型酵素 ProMMP として産生され、MMP として機能する際には、そのプロペプチド部分の酵素的切断による活性化—ProMMP から MMP への変換が必須のプロセスとなることが明らかとなっている。また各種 MMP は、多段階的に相互の活性化に関与することが解明されてきており、特に MT1-MMP (MMP-14) や MT2-MMP (MMP-15) 等の膜型 MMP は MMP 活性化カスケードの上流に位置することから、多くの分泌型 MMP の活性化を制御する可能性を有していることが示唆されている<sup>10)</sup>。

近年、生体外の実験系において、代表的な血液線維素溶解系 (線溶系) 因子プラスミンが ProMMP から MMP への変換過程を制御していることが報告された。プラスミンはその前駆体であるプラスミノゲン (Plg) から、ウロキナーゼ型 Plg アクチベータ (uPA) や組織型 PA による活性化を経て生成される。筆者らは、こうした知見を基礎として、デンマークのコペンハーゲン大学の Dano らとの共同研究により、Plg 遺伝子欠損マウス (Plg<sup>-/-</sup>) とそ

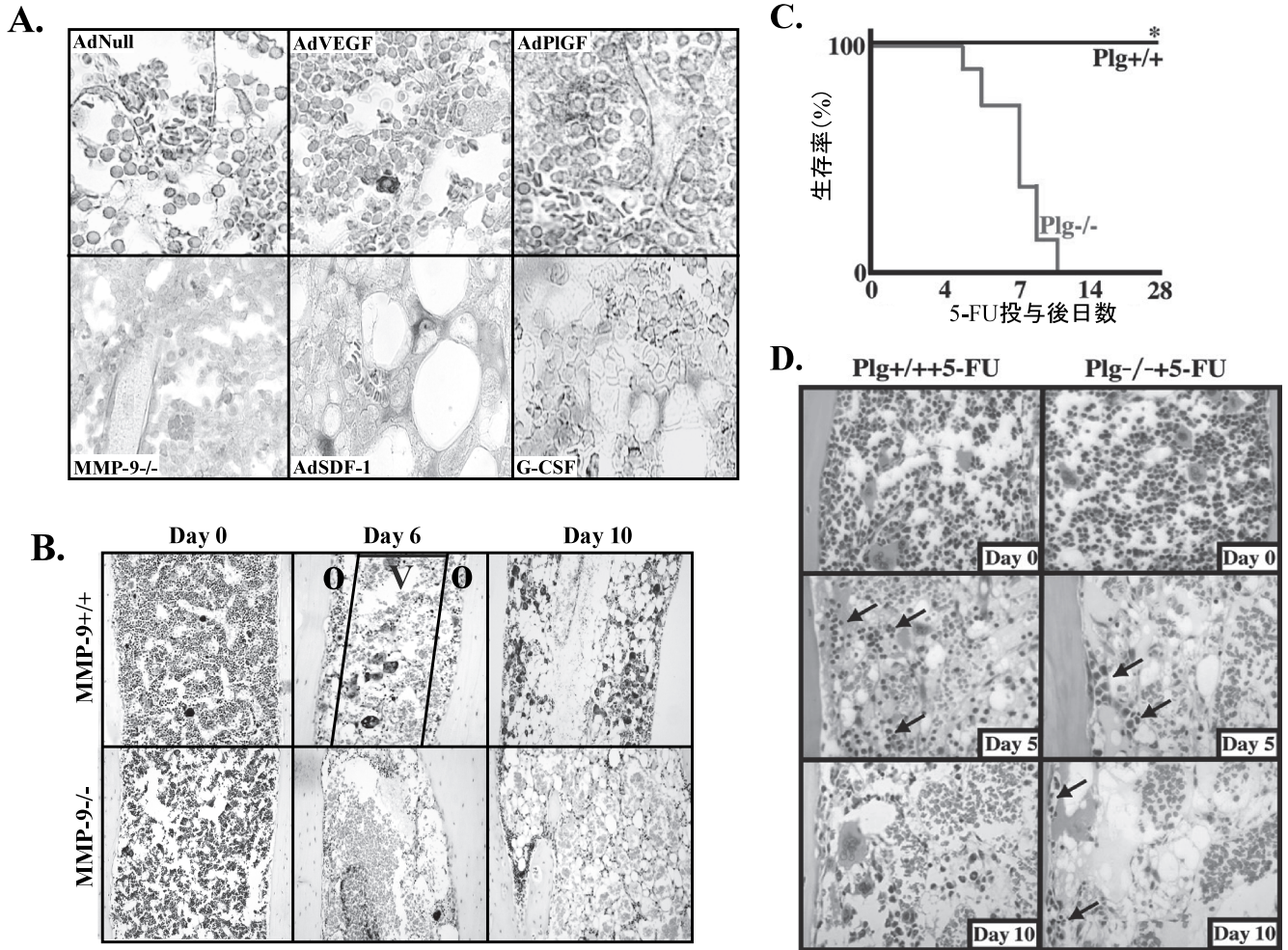


図1 骨髄細胞の再生・分化増殖と各種プロテアーゼ活性との関連性

(A) 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), 血管内皮増殖因子 (VEGF), 胎盤成長因子 (PIGF) の各種造血幹細胞動員, 分化促進因子をアデノウイルスベクター (AdSDF-1, AdVEGF, AdPIGF) 投与によってマウス生体中で強制発現させた際, 骨髄組織に対しマトリックスメタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9) の免疫組織染色を施行した。ベクターのみ (Ad-Null) を投与した対照群, MMP-9 遺伝子欠損マウス MMP-9<sup>-/-</sup> の骨髄と比較すると明らかにこれらの因子の発現により, MMP-9 の活性が増強されていることが解る。(B) 抗がん剤 5-フルオロウラシル (FU) 250 mg/kg 投与後の骨髄組織再生の所見を MMP-9<sup>-/-</sup> とその野生型 (MMP-9<sup>+/+</sup>) とで比較した。骨髄の再生は骨組織の近傍の O (骨芽細胞領域) 付近から始まっており, 造血幹細胞ニッチが O 領域に存在することが示唆される。また MMP-9<sup>-/-</sup> の骨髄では O (骨芽細胞領域) から V (血管領域) への細胞の再生増殖が MMP-9<sup>+/+</sup> と比較して遅延していることから, 骨髄組織再生における MMP-9 活性の重要性が示唆される。(C) 5-FU 投与後のプラスミノゲン (Plg) 遺伝子欠損マウス (Plg<sup>-/-</sup>) と Plg<sup>+/+</sup> の生存率の比較。5-FU 投与後, Plg<sup>+/+</sup> では全てのマウスが生じたのに対し, Plg<sup>-/-</sup> では 2 週間以内に全てのマウスが死亡した。(D) 5-FU 投与後の Plg<sup>+/+</sup> と Plg<sup>-/-</sup> の骨髄組織再生状況の比較。Plg<sup>-/-</sup> では Plg<sup>+/+</sup> と比較して骨髄組織再生が明らかに遅延しており, 骨髄細胞の分化障害も認められる。(文献 7), (8) 及び (11) より一部改変)

の野生型 (Plg<sup>+/+</sup>) を使用し, 抗がん剤 5-FU による骨髄傷害後の骨髄細胞・組織の再生過程について精査した。5-FU 250 mg/kg 投与後, SPF 環境下では全ての Plg<sup>+/+</sup> が生じたのに対して, Plg<sup>-/-</sup> は 2 週間以内に全てのマウスが死亡した (図 1C)。この時, Plg<sup>-/-</sup> では末梢血中の白血球数, 骨髄細胞数の回復が認められず, 骨髄組織所見でも骨芽細胞領域にのみ僅かの細胞が認められるのみで, 細胞表面マーカーの解析を通じて, 骨髄細胞の成熟分化と骨髄組織再生とが共に著しく障害されていること

が判明した (図 1D)。また 5-FU 投与後の骨髄組織再生過程において Plg<sup>+/+</sup> で認められた MMP-2, MMP-9 の活性化と血中の Kit リガンド濃度の上昇が, Plg<sup>-/-</sup> ではいずれも抑制されていること, Plg<sup>-/-</sup> の骨髄細胞は, Plg<sup>+/+</sup> と比較して S 期への細胞周期移行が有意に遅延していることは, やはり Plg の欠如に伴う MMP の活性化と造血因子の産生分泌障害が, 骨髄細胞の分化増殖の不全を誘導していることを示唆していると言えよう<sup>(11)</sup>。

筆者らは, こうした実験結果を基礎として, 抗血栓治療

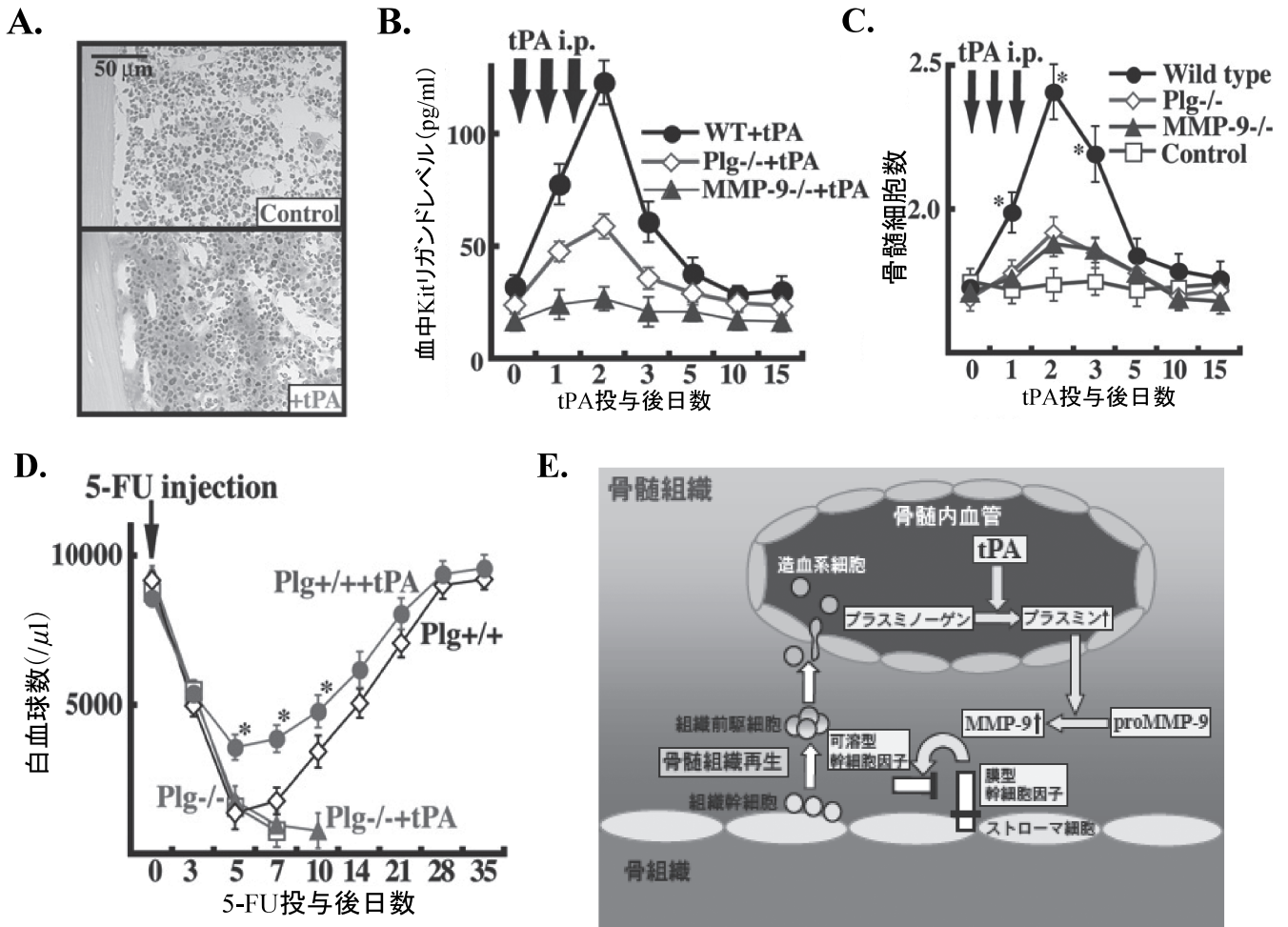


図2 骨髄組織・細胞の再生における線維素溶解系因子群の役割

(A) 組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA) 10 mg/kg 投与開始3日後のマウス骨髄組織における MMP-9 免疫特殊染色所見. bovine serum albumin-phosphate buffered saline (BSA-PBS) を投与した対照群と比較して tPA の投与は、骨髄中の MMP-9 の活性化を誘導している。(B) マウス各群に tPA を連日 10 mg/kg 3日間投与した際の造血因子 Kit リガンド (stem cell factor: 幹細胞因子) の血中濃度の推移. 野生型では、MMP-9<sup>-/-</sup>、Plg<sup>-/-</sup>と比較して tPA 投与により有意な血中 Kit リガンド濃度の上昇が認められる。(C) この時の骨髄細胞数の変化. 野生型では、MMP-9<sup>-/-</sup>、Plg<sup>-/-</sup>と比較して tPA 投与により有意な骨髄細胞数の増加が認められる。(D) tPA 投与による 5-FU 250 mg/kg 投与後の白血球減少期間への影響. 野生型では Plg<sup>-/-</sup>と比較して、白血球減少期間が有意に短縮しており、tPA の投与が、骨髄組織再生を介して抗がん剤投与後の白血球減少の緩和に有効であることを示唆している。(E) 線維素溶解系の骨髄組織再生機構における役割. tPA によるプラスミンの生成は、MMP の活性化、幹細胞因子の分泌促進を介して、骨髄組織の再生に寄与しているものと考えられる。(文献 11) より一部改変)

薬として臨床普及が進んでいる tPA 10 mg/kg を3日間、Plg<sup>+/+</sup>に投与することにより、骨髄中の MMP の活性化と Kit リガンドの産生増加を誘導し、骨髄細胞増殖を促進することに成功した (図 2A-C). また、こうした tPA による細胞分化、増殖促進効果は Plg<sup>-/-</sup>、MMP-9<sup>-/-</sup>及び Kit リガンド遺伝子欠損マウス (Sl/Sl<sup>d</sup>) では認められなかったことから、線維素系の亢進は MMP の活性化とサイトカイン、造血因子のプロセッシングを介して、これらの上流から造血幹細胞動態を制御しているものと考えられた。さらに tPA の投与は、5-FU 投与後の白血球減少期間を短縮し、骨髄細胞数の回復を促進した (図 2D). こうした実

験結果は tPA 等による線維素系酵素群の活性化が、骨髄組織再生の促進に機能していること、また特に再生医療分野における臨床応用の可能性を示唆したものと言えよう (図 2E). 筆者らはこれまでのところ、マウスに対する tPA のこの投与量では、出血等の副作用は一切認めていないが、仮に臨床応用を勧める上でも、こうした薬剤の安全かつ有効な投与量の設定には、今後も慎重な検討を続ける必要がある。

#### 4. 血液線維素溶解系の虚血壊死組織再生における意義

筆者らは、以前にマウス生体中の大腿動静脈を結紮する

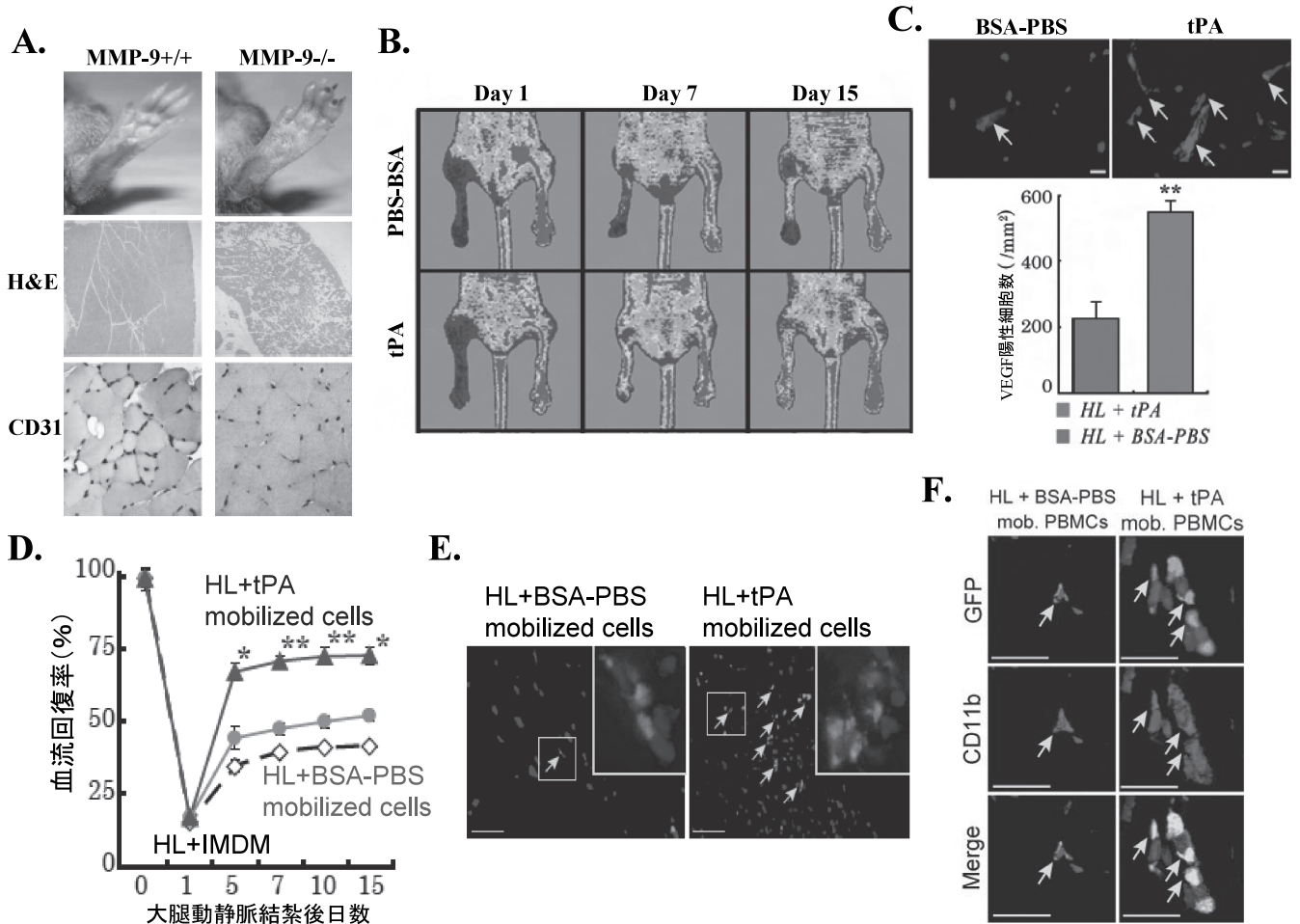


図3 生体内組織再生における骨髄由来細胞動員の有用性

(A) 野生型及び MMP-9<sup>-/-</sup>の大股動静脈を結紮し、その末梢に虚血性壊死を誘導したマウス虚血肢モデルの作製 15 日後の肉眼所見と腓腹筋組織所見。MMP-9<sup>-/-</sup>では、筋肉組織再生にも明らかな遅延が生じていることが解る。(B) tPA10 mg/kg あるいは BSA-PBS 投与後のマウス虚血肢モデルの超音波ドップラーによる経時的な血流回復状況の比較。対照群と比較して tPA 投与により有意な血流回復が得られていることが解る。(C) tPA あるいは BSA-PBS 投与後のマウス虚血肢モデルの腓腹筋組織中の VEGF 染色の結果。tPA 投与群では、筋組織中の VEGF 陽性細胞の有意な増加が認められた。(D) tPA あるいは BSA-PBS を 3 日間にわたり投与した green fluorescent protein (GFP) 陽性マウスからその間末梢血を 400  $\mu$ l ずつ採取し、この末梢血単核球の正常野生型虚血肢モデルへの移植を施行した後、これらのマウスの超音波ドップラーによる経時的な血流回復状況。tPA によって動員された末梢血単核球の移植は、対照群と比較して、有意な血流回復を示した。(E) マウス虚血肢モデル作製 15 日後の腓腹筋組織における GFP 陽性細胞の集簇状況の比較。tPA によって動員された末梢血単核球は対照群と比較して、有意に虚血組織に多く集簇する傾向がある。(F) このときの CD11b との二重染色の結果。集簇している GFP 陽性細胞の中で、CD11b 陽性細胞が有意に増加していることが判明した。このことは骨髄由来の造血系細胞が、虚血組織に集簇することにより、筋組織の再生を促進している可能性を示唆している。(文献 12)、13) より一部改変)

ことにより、その末梢の血管支配領域に形成された虚血壊死組織の再生が、MMP-9 の活性化と Kit リガンドの分泌促進に伴う、骨髄由来の VEGFR1 陽性 CXCR4 陽性細胞 (ヘマンジオサイト) の虚血壊死組織中への動員と、これらによる血管新生因子アンジオポイエチン-2 の産生により制御されることを報告した (図 3A)<sup>12)</sup>。ヘマンジオサイトは、VEGF や CXCL12 の濃度上昇により末梢血中への動員が促進されることが判明しており、筆者らは生体内の虚血壊死組織からの血管新生・組織再生過程においては、骨髄由来のヘマンジオサイトがいわば HUB の役割を担っ

て、組織構築細胞の構成に関与し、血管新生・組織再生の至適組織微小環境となる「虚血 (血管新生) ニッチ」の形成に至ることを示唆している。

最近になって筆者らは、tPA のマウス生体への投与が MMP-9 の活性化を介して、造血幹細胞に由来する各種の骨髄由来細胞の末梢血及び組織中への動員を促進すること、またこれらの骨髄由来細胞に VEGF 等の血管新生因子を組織内供給する作用が存在することを明らかにした<sup>13)</sup>。また先述のマウス大股動静脈結紮による「虚血肢モデル (hind limb モデル)」の作製後、経時的に腓腹筋の病

理組織変化や超音波ドップラーによる血流回復の推移等を tPA の投与群とその対照群とで比較したところ、tPA の投与が有意に血流回復、組織再生を促進することを確認した (図 3B)。さらにこの時、tPA 投与群では、末梢に形成された虚血壊死組織中に、対照群を有意に上回る数の骨髄由来の CD11b 陽性細胞が動員されること、さらにこれらの細胞には血管新生因子 VEGF の産生能が存在することも明らかとなっており、tPA 投与群と対照群との間で、血中 VEGF の濃度上昇にも有意差が生じることが解った (図 3 C-F)。これらの実験結果は、tPA が MMP の活性化を介して、骨髄内での造血幹細胞の分化増殖、また骨髄由来の血管新生因子供給能を有する細胞群の組織中への動員、加えてこれらの細胞を構成因子とした「虚血ニッチ」の形成を促進することを示している。一連の研究成果は、生体内の線溶系が、骨髄由来細胞動員を介し組織再生を制御している可能性、造血幹細胞の動態と血管新生・組織再生機構との関連性を示唆していると言えよう。

#### おわりに

これまで血液凝固系に相対する生体内の恒常性維持機構として捉えられてきた線溶系の機能解析は、線溶系因子群と造血あるいは組織再生機構との関連性が示唆されたことによって新局面を迎えつつある。今後は、こうした研究成果を基礎とした凝固・線溶系活性の制御による造血ないしは組織再生への影響の解明を軸に、全く新しい再生医療へのアプローチが考案されることが期待される。

#### 文 献

- 1) Avigdor, A., Goichberg, P., Shvitiel, S., Dar, A., Peled, A., Samira, S., Kollet, O., Hershkoviz, R., Alon, R., Hardan, I., Ben-Hur, H., Naor, D., Nagler, A., & Lapidot, T. (2004) *Blood*, 103, 2981-2989.
- 2) Papayannopoulou, T. (2000) *Semin. Hematol.*, 37, 11-18.
- 3) Papayannopoulou, T., Priestly, G.V., & Nakamoto, B. (1998) *Blood*, 91, 2231-2239.
- 4) Kikuta, T., Shimazaki, C., Ashihara, E., Sudo, Y., Hirai, H., Sumikuma, T., Yamagata, N., Inada, T., Fujita, N., Kina, T., & Nakagawa, M. (2000) *Exp. Hematol.*, 28, 311-317.
- 5) Hattori, K., Heissig, B., Tashiro, K., Honjo, T., Tateno, M., Shieh, J.H., Hackett, N.R., Quitarino, M.S., Crystal, R.G., Rafii, S., & Moore, M.A. (2001) *Blood*, 97, 3354-3360.
- 6) Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Lyden, D., Hackett, N., Tateno, M., Hicklin, D., Witte, L., Rudge, J., Crystal, R.G., Moore, M.A.S., & Rafii, S. (2001) *J. Exp. Med.*, 93, 1005-1014.
- 7) Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Bohlen, P., Witte, L., Hendriks, J., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Moore, M.A., Werb, Z., Lyden, D., & Rafii, S. (2002) *Nat. Med.*, 8, 841-849.
- 8) Hattori, K., Heissig, B., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A., Werb, Z., & Rafii, S. (2002) *Cell*, 109, 625-637.
- 9) Heissig, B., Rafii, S., Akiyama, H., Ohki, Y., Sato, Y., Rafael, T., Zhu, Z., Hicklin, D.J., Okumura, K., Ogawa, H., Werb, Z., & Hattori, K. (2005) *J. Exp. Med.*, 202, 739-750.
- 10) Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., & Chakraborti, T. (2003) *Mol. Cell. Biochem.*, 253, 269-285.
- 11) Heissig, B., Lund, L.R., Akiyama, H., Ohki, M., Morita, Y., Romer, J., Nakauchi, H., Okumura, K., Ogawa, H., Werb, Z., Danø, K., & Hattori, K. (2007) *Cell Stem Cell*, 1, 658-670.
- 12) Jin, D.K., Shido, K., Kopp, H.G., Petit, I., Shmelkov, S.V., Young, L.M., Hooper, A., Amano, H., Avicilla, S.T., Heissig, B., Hattori, K., Zhang, F., Hicklin, D.J., Wu, Y., Zhu, Z., Dunn, A., Salari, H., Werb, Z., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Lyden, D., & Rafii, S. (2006) *Nat. Med.*, 12, 557-567.
- 13) Ohki, M., Ohki, Y., Ishihara, M., Nishida, C., Tashiro, Y., Akiyama, H., Komiyama, H., Lund, L.R., Nitta, A., Yamada, K., Zhu, Z., Ogawa, H., Yagita, H., Okumura, K., Nakauchi, H., Werb, Z., Heissig, B., & Hattori, K. (2010) *Blood*, 115, 4302-4312.