

◎総説

コラーゲン分解系と疾患

越智浩二, 原田英雄, Chowdhury RIAZ, 山下晴弘, 一村光子,
田中淳太郎, 妹尾敏伸, 松本秀次

岡山大学臨床検査医学

水島孝明

岡山大学第2内科

横田 聡, 光延文裕, 谷崎勝朗

岡山大学三朝分院

要旨：組織のコラーゲン沈着にはコラーゲン合成系と分解系の不均衡によって生ずる。従来、主としてコラーゲン合成系が注目されていたが、最近の研究の進歩により、コラーゲン分解系が重要な役割を演ずることが明らかになってきた。コラーゲンの分解系には細胞内と細胞外の二つの経路が存在する。それぞれ collagenolytic cathepsin および matrix metalloproteinases (MMP) がコラーゲン分解能を有する重要な酵素である。その調節因子については細胞外の経路についての解明が進んでいる。MMP の遺伝子の発現にはサイトカインや成長因子が関与し、IL-1 や TNF- α は強力な誘導因子である。一旦、遺伝子が発現すれば、MMP は合成され、細胞外に不活性型 (latent form) で分泌される。不活性型の MMP が活性化する過程には plasminogen activator inhibitor や tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) などの阻害因子が存在し、MMP 活性を調節する。TIMP の遺伝子の発現にもサイトカインや成長因子が関与する。MMP が TIMP を上回るような病態では組織破壊が、逆に TIMP が MMP を上回るような病態では線維化が生ずる。コラーゲン分解能の障害が線維化の維持や不可逆性に関与することが推察される。

索引用語：線維化, コラーゲン, TIMP, MMP

Key words : Fibrosis, Collagen, TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase), MMP (matrix metalloproteinase)

はじめに

臓器の線維化は良性疾患においても、非可逆的な機能の廃絶をもたらすことが知られている。線維化をきたす疾患は肝硬変、肺線維症、慢性膵炎など多数あるが、線維化に対する根本的な治療がいまだ確立されておらず、その発生機序に基づいた治療法の開発が望まれるところである。厚生省

難治性膵疾患調査研究班では、この点に注目し、膵の線維化のメカニズムを明らかにし、その根本的な治療法の確立をめざし、“膵の線維化”を研究班の重点研究の一つに挙げている。筆者らの一人は研究班の“膵線維化に関する小委員会”の委員長に推挙され、小委員会の委員と現在研究を進めている。

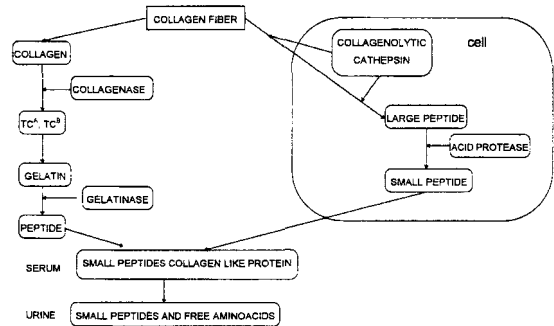
以前、線維化の発生機序についてまとめる機会

があり、総説として本研究報告書の前身である環境病態研報告に掲載した¹⁾。当時はコラーゲンの合成系が注目されていたが、その後の研究の進歩により、最近コラーゲンの分解系に関する新しい研究報告が相次いでいる。その結果、肝や肺の線維化では臓器の線維化が進むにつれて、コラーゲンの合成能は低下するが、同時にコラーゲンの分解能も低下することが判明してきた^{2), 3)}。コラーゲン分解能の障害が線維化の維持や不可逆性に重要な役割を演ずる可能性が示唆されている。そこで、本稿ではコラーゲンの分解系に焦点を合わせ、分解系の新しい知見および疾患との関係について概説する。

コラーゲンの分解系

コラーゲンを分解する経路としては細胞外の経路と細胞内の経路がある (figure 1)。細胞外の経路ではコラーゲンは depolymerase により proteoglycan などの matrix component がはずれる。その後 collagenase により TC^A と TC^B に分解される。その後、変性を受け、gelatin となる。gelatin は gelatinase により peptide に分解される。細胞内の経路は collagenolytic cathepsin が細胞周囲 (pericellular space) に分泌され、酸性の環境下でコラーゲンが分解される。分解されたコラーゲンはペプチドになり、貪食作用によって細胞内に取り込まれ、collagenolytic cathepsin や非特異的酸性蛋白分解酵素によりさらに小さなペプチドにまで分解される。このようにコラーゲンの分解には細胞内と細胞外の二つの経路があるが、二つの経路と病態との関連性についてはいまだ明らかにされていない。しかしながら、それぞれの系での分解酵素である collagenase や collagenolytic cathepsin, および collagenase inhibitor などと病態との関係は次第に明らかにされつつある。

Fig. 1. コラーゲン分解経路



collagenolytic cathepsin

collagenolytic cathepsin はコラーゲンの細胞内分解経路における重要な酵素である。酸性の環境下で高い酵素活性を有する collagenolytic cathepsin は collagen の分解には二つの働きがあるとされる。一つは細胞周囲に分泌され、コラーゲンを分解し、もう一つは lysosome 酵素として、phagocytose されたコラーゲン fragment を分解する役割である。酸性の環境下でコラーゲンの N 末端非ラセン部に作用し 3 本の短縮 α 鎖に解離した後、アミノ酸まで分解される。collagenolytic cathepsin には酵素学的特性の異なる cathepsin B, L, N, S が存在する⁴⁾。

Yamada ら⁵⁾ は、rat にエタノールを 7 週間投与し、脾組織中の collagenolytic cathepsin 活性が増加することを報告している。ヒトの肝臓での検討⁶⁾では肝臓の hydroxyproline が増加するにつれて、collagenolytic cathepsin 活性が増加するが、collagenolytic cathepsin/肝 hydroxyproline 含量の比でみると、慢性肝炎では正常であるのに対し、肝硬変では増加していることが報告されている。耳鼻科領域では慢性炎症よりも急性の粘膜損傷に collagenolytic cathepsin が関与するとの報告⁷⁾がある。

MMP (matrix metalloproteinase)

matrix metalloproteinase (MMP) は細胞外の collagen を分解する酵素で、主に結合組織または結合組織に存在する細胞より合成、分泌され

る。MMP は Table 1⁸⁾ に示すように多くの種類が存在することが明らかになっている⁹⁾。分解する基質によって、interstitial collagenase, gelatinase (type IV collagenase), stromelysin に三つに大別される¹⁰⁾。interstitial collagenase は間質コラーゲンである type I, II, III コラーゲンを分解する。gelatinase は基底膜コラーゲンである type IV コラーゲンや間質コラーゲンの変性物質 (gelatin) を分解する。stromelysin はプロテオグリカン, ラミニン, フィブロネクチン, IV型コラーゲンなど種々の細胞外マトリックスを分解する。これらの MMP family に共通する特徴としては、① collagen 分解能を有する、②亜鉛イオンを内部に有しており、chelating agent によってその酵素活性が阻害される、③活性のない latent form で分泌され、その活性化には蛋白分解酵素活性を必要とする、④ tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) により、その活性が調節されるなどが挙げられる。

組織の collagen 量は MMP の発現や活性を調節することにより、調節されている。すなわち、MMP が TIMP を上回る場合には組織破壊が起こり、逆に TIMP が MMP を上回る場合には collagen の沈着をきたす。このことが実験的、あるいは臨床的に確認されている疾患としては以下のものが挙げられる。MMP が TIMP を上回るものとしては、慢性関節リウマチ^{11, 12)}、変形性関節症¹²⁾、外傷性関節炎¹²⁾、腫瘍細胞の浸潤・転移^{13, 14)}、血管新生¹⁵⁾、血管炎¹⁵⁾、などがある。一方、TIMP が MMP を上回るものとしては、肺線維症^{16, 17)}、過敏性肺臓炎¹⁷⁾、肝硬変^{2, 18, 19)}、動脈硬化^{15, 20)}、強皮症¹⁵⁾ などがある。

MMP の調節機序としては、① MMP の遺伝子レベルでの調節、② latent form の MMP の活性化による調節がある^{2, 10)}。遺伝子レベルでの産生の調節には多くのサイトカインや成長因子が関与することが明らかになってきた。IL-1 β ^{21, 22)}、TNF- α ^{23, 24)}、lymphotoxin (LT)²⁵⁾、PDGF、EGF、FGF、phorbol ester による増加^{9, 26)}、retinoic acid や corticosteroid による抑制²⁷⁾ が報告されている。TGF- β は MMP の種

類によってその発現に対する作用は異なる。すなわち、74kDa type IV collagenase (MMP-2) の発現は亢進させるが、stromelysin や interstitial collagenase (MMP-1) の発現は抑制する^{28, 29)}。これらの関与する因子のうち、IL-1 β 、TNF- α はもっとも強力な MMP 誘導因子であり、結合組織の病的破壊に関与するとされる³⁰⁾。

MMP の mRNA が一旦発現すると、MMP は translate され、proenzyme として分泌される。不活性型 MMP の活性化にはいくつかの調節機構がある。内因性の MMP の活性化物質の一つとして plasmin がある。plasmin は前駆物質である plasminogen に plasminogen activator が作用して生ずるが、MMP を分泌する細胞で合成される plasminogen activator inhibitor によって調節を受ける^{31, 32)}。plasmin は procollagenase や prostromelysin に作用し、活性化型 collagenase や stromelysin を生ずる。stromelysin は procollagenase の強い活性化作用を有する³²⁾。その他、肥満細胞トリプターゼ³³⁾ や白血球エラスターゼ、カテプシン G³⁴⁾ などとも MMP の活性発現に関与する。活性化された MMP の活性を阻害する内因性物質としては、血液中の $\alpha 2$ -macroglobulin³⁵⁾、組織中の TIMP が存在する。TIMP は不活性型および活性型 MMP と 1 : 1 で結合し、その活性を調節する。TIMP による調節機構は TIMP の項に譲る。

Table 1. Matrix metalloproteinase family

MMP No.	Trivial Name	KD	Source	Substrate
1	Interstitial collagenase	55	Connective tissue cells	Collagen I, II, X, gelatin, proteoglycan
8	Neutrophil collagenase	75	Neutrophils	Collagens, gelatin, proteoglycans
3	Stromelysin-1	57	Connective tissue cells, macrophages	Proteoglycan, cross-link regions of collagens II, IV, IX, collagens X, XI, procollagens, fibronectin laminin, gelatin, collagenase, gelatinase B
10	Stromelysin-2	57	Macrophages	As stromelysin-1 but much lower activity
2	Gelatinase A	72	Most cell types	Denatured collagens; collagens IV, V, VII, X, and XI
9	Gelatinase B	95	Monocytes, connective tissue, tumor cell	As gelatinase A
7	Pump (matrilysin)	28	Immature monocytes, mesangial, tumor cells (not fully defined)	As stromelysins, elastin
11	Stromelysin-3	51	Stromal cells of tumors	Unknown
12	metallo-elastase	57	Macrophage (mouse)	Elastin, fibronectin

Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)

TIMP は滑膜細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞より産生され、MMP に対する阻害作用を有する物質である。従来、分子量 29kD 糖鎖蛋白を TIMP と呼んでいたが、その後の研究により、分子量 23kD の非糖鎖蛋白の MMP 阻害作用を有する inhibitor が発見された³⁶⁾。新しく発見されたものを TIMP-2 と命名し、従来の TIMP は TIMP-1 と呼ぶことになった。この TIMP-2 は活性化 collagenase 阻害作用と同時に、proenzyme が活性化される過程に対する阻害作用を有する³⁷⁾。TIMP-2 は TIMP-1 と産生細胞はほぼ同じであるが、量的には TIMP-1 のほうが多い⁸⁾。

TIMP の mRNA の発現には MMP と同様に、サイトカインや成長因子などが関与する。b-FGF, EGF, TGF- β ²⁸⁾, retinoid²⁷⁾, IL-6³⁰⁾ は促進するが、corticosteroid は抑制する²⁷⁾。一方、MMP の強力な誘導因子である IL-1 β や TNF- α については、その効果は条件や用いる細

胞によって異なるとされる^{15, 38)}。

最後に

コラーゲン分解系は組織の線維化や破壊に重要な役割を果たしている。しかし、病態との関係ではいまだ不明な点が多く、今後解明されるべき課題も多数存在する。以上、最近注目されているコラーゲン分解系およびその発現因子、調節因子について概説した。

文 献

1. 妹尾敏伸, 原田英雄, 越智浩二, 田中淳太郎, 松本秀次, 石橋忠明, 武田正彦, 三宅啓文: 細胞間マトリックスの構成成分と線維化。岡山大学環境病態研報告 30: 76-82, 1989.
2. Arthur MJP: The role of matrix degradation in liver fibrosis. "Molecular and cell biology of liver fibrogenesis" ed by Gressner AM, Ramadori G, 1992, p213-227, Kluwe Academic Publishers.
3. Selman M, Montano M, Ramos C, chapela R, Gonzákez G, Vadillo F: Lung collagen metabolism and the clinical course of hypersensitivity pneumonitis. Chest 94: 347-353, 1988.
4. Maciewicz RA, Etherington DJ: A comparison of four cathepsins (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. Biochem J 256: 431-440, 1988.
5. Yamada M, Murawaki Y, Hirayama C: Effects of ethanol Feeding on collagen synthesizing and degrading enzymes in rat pancreas. Biochemical Pharmacology 36: 3361-3364, 1987.
6. Murawaki Y, Hirayama C: Hepatic in collagenolytic patients with chronic liver disease. Clinica Chimica Acta 108: 121-128, 1980.
7. Hamaguchi Y, Sakakura K, Majima Y, Sakakura Y: Cathepsin B-like thiol proteases and collagenolytic proteases in middle

- ear effusion from acute and chronic otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol* 104 : 119-124, 1987.
8. Murphy G, Docherty AJP : The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir cell Mol Biol* 7 : 120-125, 1992.
 9. Matrisian LM : Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trend Genet* 6 : 121-125, 1990.
 10. Murphy G, Hebray RM, Hughes CE, Fosgang AJ, Hardingham TE : Role of regulation of metalloproteinases in connective tissue turnover. *Biochem Soc Trans* 18 : 812-815, 1990.
 11. Hayakawa T, Yamashita K, Kodama S, Iwata H, Iwata K : Tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase activity in synovial fluid of human rheumatoid arthritis. *Biomedical Research* 12 : 169-173, 1991.
 12. 小宮靖弘 : ヒト関節滑膜における tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) および stromelysin の免疫組織化学的局在。日関外誌 XI : 59-70, 1992.
 13. Khokha R, Denhardt DT : Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases : A review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion Metastasis* 9 : 391-405, 1989.
 14. 岡田保典 : マトリックスメタロプロテイナーゼの活性調節。実験医学 10 : 256-262, 1992.
 15. 神宮政男 : 血管内皮細胞の TIMP。炎症 11 : 529-537, 1991.
 16. Pardo A, Selman M, Ramirez R, Ramos C, Montano M, Stricklin G, Raghu G : Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lung. *Chest* 102 : 1085-1089, 1992.
 17. Montano M, Ramos C, Gonzales G : Lung collagenase inhibitors and spontaneous and latent collagenase activity in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 96 : 1115-1119, 1989.
 18. Iredale JP, Murphy G, Hemberry RM : Human hepatic lipocytes synthesis tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Clin Invest* 90 : 282-287, 1992.
 19. 岡崎 勲, 荒井正夫, 和田則仁, 丸山勝也 : 肝線維化過程におけるコラーゲナーゼ, コラーゲナーゼインヒビターの遺伝子発現の動態。日本臨床 51 : 428-434, 1993.
 20. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, et al : Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 8154-8158, 1991.
 21. Murphy G, Reynolds JJ, Werb Z : Biosynthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases by human fibroblasts in tissue culture. Stimulation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and interleukin 1 in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 260 : 3079-3083, 1985.
 22. Dayer JMB, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA : Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest* 77 : 645-648, 1986.
 23. Dayer JM, Beutler B, Cerami A : Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 162 : 2163-2168, 1985.
 24. Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M : Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor-alpha. *Nature* 337 : 661-663, 1989.
 25. Unemori EN, Hibbs MS, Amento EP :

- Constitutive expression of a 92 - kd gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal fibroblasts by inflammatory cytokines. *J Clin Invest* 88 : 1656 - 1662, 1991.
26. Murphy G, Docherty AJP, Hembry RM, Reynolds JJ : Metalloproteinase and tissue damage. *Br J Rheumatol* 30 [Suppl 1] 25 - 31, 1991.
27. Clark SD, Kobayashi DK, Welgus HG : Regulation of the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase by retinoids and glucocorticoids in human fibroblasts. *J Clin Invest* 80 : 1280 - 1288, 1987.
28. Edwards DR, Murphy G, Reynold JJ, Whitham SE, Docherty AJ : Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBOJ* 6 : 1899 - 1904, 1987.
29. Overall CM, Wrana JL, Sodek J : Independent regulation of collagenase, 72 - kDa progelatinase and metalloproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 264 : 1860 - 1869, 1989.
30. Lotz M, Guerne PA : Interleukin - 6 induces of tissue inhibitor of metalloproteinases - 1 / erythroid potentiating activity (TIMP - 1 / EPA). *J Biol Chem* 266 : 2017 - 2020, 1991.
31. Reich R, Thompson EW, Iwamoto Y, Martin GR, Deason JR, Fuller GC, Miskin R : *Cancer Res* 48 : 3307 - 3312, 1988.
32. He C, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI : Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 2632 - 2636, 1989.
33. Gruber BL, Marchee MJ, Suzuki K, Schwartz LB, Okada Y, Nagase H, Ramamurthy NS : Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J Clin Invest* 84 : 1657 - 1662, 1989.
34. Okada Y, Nakanishi I : Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 ('gelatinase') by human neutrophil elastase and cathepsin G. *FEBS Lett.* 249 : 353 - 356, 1989.
35. Enghild JJ, Salvesen G, Brew K, Nagase H : Interaction of human rheumatoid synovial collagenase (matrix metalloproteinase 1) and stromelysin (matrix metalloproteinase 3) with human alpha - 2 - macroglobulin and chicken ovomucoid. *J Biol Chem* 264 : 8779 - 8785, 1989.
36. Boone TC, Johnson MJ, De Clerck YA, Langley KE : cDNA cloning and expression of a metalloproteinase and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 218 : 66 - 69, 1990.
37. De Clerck YA, Yean TD, Lu HS, Ting J, Langley KE : Inhibition of autolytic activation of interstitial procollagenase by recombinant metalloproteinase inhibitor MI/TIMP - 2. *J Biol Chem* 266 : 3893 - 3899, 1991.

Collagen degradation and in the pathogenesis of diseases

Koji OCHI, Hideo HARADA,
Riaz CHOWDHURY, Haruhiro YAMASHITA,
Mitsuko ICHIMURA, Juntaro TANAKA,
Toshinobu SENO, Shuji MATSUMOTO,
Takaaki MIZUSHIMA*, Satoshi YOKOTA**,
Fumihito MITSUNOBU**,
Yoshiro TANIZAKI**

Department of Laboratory Medicine,
Okayama University Medical School Second
Department of Internal Medicine, Okayama
University Medical School*
Misasa Medical Branch, Okayama University
Medical School**

Fibrosis is the result of net accumulation of collagen in the organ. This may occur as a consequence of alterations in the synthesis of collagen, their degradation, or both. Recent

investigations revealed that a decrease in collagen degradation plays a crucial role in fibrogenesis. Two pathways exist in collagen degradation : extracellular and intracellular. Each pathway has an important enzyme ; that is, matrix metalloproteinases (MMP) and collagenolytic cathepsin, respectively. Collagenolytic activity is regulated at several levels. Expression of MMP and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP), which act as inhibitors of MMP, is regulated independently by a number of cytokines and growth factors. MMP, which is synthesized in the cell, is secreted in a latent form. Activation of the latent MMP is controlled by TIMP and plasminogen activator inhibitor. TIMP also inhibits activated MMP which can degrade connective tissue matrices including collagens. In the condition where TIMP is predominant over MMP, activity of collagen breakdown is reduced, and consequently collagen deposition occurs.