

学 位 論 文 題 名

A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes

(MMP-1 promoter における単一塩基多型と羊膜細胞中の MMP-1 発現ならびに早産期前期破水発症との関連)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

間質性コラーゲンは、羊膜に伸展性の緊張を与え、この分解が卵膜破綻・破水の原因の一つと考えられる。-1607 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter における guanine(G)の挿入は核内で Ets binding site (5'-GGAA/T-3) を創り、プロモーター活性を増強させる。本研究では、遺伝子型 1G/2G もしくは 2G/2G の羊膜細胞が 1G/1G のそれよりも、プロモーター活性が強く、その結果として MMP-1 の遺伝子発現を増強させることから、この polymorphism と早産期前期破水 (PPROM: Preterm premature rupture of the fetal membrane)発症との関連を明らかにすることを目的とした。

研究材料と方法

コラゲナーゼ A を用いて、正常正期産単胎妊娠の羊膜から間質細胞 (mesenchymal cell) を抽出し、これを使用した。

pGL3 vector に挿入した-4372 bp (1G) あるいは -4373 bp (2G) MMP-1 promoter fragment から成る plasmid と pCMV- β -galactosidase plasmid をそれぞれ A2058 melanoma cell、wish cell (羊膜上皮細胞)、mesenchymal cell 及び human cervical smooth muscle cell (hCSMC) にトランスフェクトし、24 時間後の Relative luciferase units (RLU) を測定した。

Mesenchymal cell を 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) もしくは 50ng/ml phorbol myristoyl acetate (PMA) で 24 時間培養後、核内タンパクを抽出し、Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) に使用した。

遺伝子型の異なった mesenchymal cell (1G/1G, 1G/2G, 2G/2G) を 2% DMSO もしくは 50ng/ml PMA で 24 時間培養後、total RNA を抽出しノーザンブロットングに使用した。また total RNA を逆転写し、Quantitative real-time PCR に使用した。Mesenchymal cell を同様の方法で刺激し、24 あるいは 48 時間後の上澄みを用いて、MMP-1 タンパク をウェスタンブロットング、ELISA 法で分析した。

本研究の新生児 DNA サンプルは、母親のインフォームドコンセントの得られた African American から抽出した。Control は早産既往のない単胎正期産、PPROM は単胎早産を対象とした。MMP-1 遺伝子型の分析は Genescan によって PCR product の全長(148 あるいは 149bp)を計る方法と、Reverse primer に 2 つの mismatch を設けて 1G amplicon のみが制限酵素 Xmn I で分解される方法を用いた。

結果

羊膜抽出細胞は、vimentin で 95% 以上陽性で、cytokeratin-18 では陰性であった。

トランスフェクションした結果は、どの宿主細胞においても、2G allele の方が 1G allele よりも強い promoter activity を示した。

EMSA では、DMSO 処理した核内タンパクと 1G もしくは 2G probe との結合親和性には違いはなかった。しかし、PMA 処理した核内タンパクでは、1G probe と比較して 2G probe でより強い結合親和性を示した。またこの核内タンパクの 2G probe への結合親和性は、³²P でラベルしてない 2G probe によって完全に抑制されたが、AP-1 probe では抑制されなかった。これは PMA 処理した核内タンパクと 2G allele との結合が特異的であることを示唆する。また consensus Ets binding probe は high mobility complex を抑制したが、mutant Ets binding probe は抑制しなかった。従って、このタンパク-DNA 複合体を形成する核内タンパクは Ets transcription factor family の 1 つであると予想される。Ets family の Ets-1/Ets-2 及び Elk-1 antibody を用いてこのタンパク-DNA 複合体が supershift するか試みたが、何れの antibody もそれを示さなかった。以上の結果から、この核内タンパク-DNA 複合体を形成するタンパクはそれ以外の Ets family と考えられる。

Quantitative real-time PCR では、1G/2G もしくは 2G/2G の mesenchymal cell の方が 1G/1G のそれよりも、PMA によって多くの MMP-1 mRNA を誘導した (1G/1G: 24.2 ± 9.2 (mean \pm S.E. N=4), 1G/2G もしくは 2G/2G: 365.5 ± 153.5 (N=11), $p < 0.01$)。ノーザンブロットングでは、Quantitative real-time PCR の結果同様、PMA による MMP-1 mRNA 発現量は、2G allele をもった細胞のほうが 1G/1G のそれよりも顕著であった。また splicing がおこる前段階の RNA, nascent transcripts, も測定した。その結果 mesenchymal cell では、MMP-1 nascent transcripts は MMP-1 mRNA 同様、2G allele を持った細胞の方が 1G/1G のそれより高値を示した (1G/1G: 23.9 ± 12.6 (N=4), 1G/2G もしくは 2G/2G: 215.0 ± 69.5 (N=6), $p < 0.05$)。PMA 刺激による MMP-1 タンパク産生は 2G allele を持った細胞のほうが 1G/1G のそれよりも多いことが、ウェスタンブロットング、ELISA 法 ($p < 0.01$) で確認された。

新生児 -1607 MMP-1 promoter の遺伝子型を PPROM 群 (N=75) と Control 群 (N=235) で比較検討した。PPROM 群の 1G/2G もしくは 2G/2G 遺伝子型の新生児の発現頻度は 88.0% で Control 群の 76.2% より高かった ($p = 0.028$; odds ratio 2.29, 95 % confidence interval: 1.09 - 4.82)。

考察

Amnion mesenchymal cell を使って *in vitro* で、-1607 MMP-1 promoter polymorphism が MMP-1 の遺伝子発現を強めることをはじめて証明した。

臨床的には、少なくとも 2G allele を 1 つ持つ胎児は 1G/1G 遺伝子型の胎児より PPROM となる危険性が高いことを解明しえた。MMP-1 promoter の胎児遺伝子型と PPROM が強い相関関係になかった理由として他の遺伝子や環境因子が関係しているためと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 水 上 尚 典

学 位 論 文 題 名

A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes

(MMP-1 promoter における単一塩基多型と羊膜細胞中の MMP-1 発現ならびに早産期前期破水発症との関連)

-1607 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter における guanine(G)の挿入は核内で Ets binding site (5'-GGAA/T-3') を創り、プロモーター活性を増強させる。遺伝子型 1G/2G もしくは 2G/2G の羊膜細胞が 1G/1G のそれよりも、プロモーター活性が強く、MMP-1 の遺伝子発現を増強させることから、この polymorphism と早産期前期破水 (PPROM)発症との関連を明らかにすることを目的とした。

コラゲナーゼ A を用いて、正常正期産単胎妊娠の羊膜から mesenchymal cell を抽出し、2% DMSO もしくは 50ng/ml PMA で 24 時間培養後、核内タンパクを抽出し、Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)に使用した。遺伝子型の異なった mesenchymal cell (1G/1G, 1G/2G, 2G/2G) を同様に培養後、total RNA を抽出しノーザンブロッティングに、あるいは逆転写し Quantitative real-time PCR に使用した。細胞を同様の方法で刺激し、24 あるいは 48 時間後の培養上澄みを用いて、MMP-1 タンパク をウェスタンブロッティング、ELISA 法で分析した。

MMP-1 遺伝子型の分析は、Genescan によって PCR product の全長(148 あるいは 149bp)を計る方法と、Reverse primer に 2 つの mismatch を設けて 1G amplicon のみが制限酵素 *Xmn I* で分解される方法を用いた。

トランスフェクションした結果、どの宿主細胞においても、2G allele の方が 1G allele よりも強い promoter activity を示した。

EMSA では、DMSO 処理した核内タンパクと 1G もしくは 2G probe との結合親和性には違いはなかった。しかし、PMA 処理した核内タンパクでは、1G probe と比較して 2G probe でより強い結合親和性を示した。またこの核内タンパクの 2G probe への結合親和性は、³²P でラベルしてない 2G probe によって完全に抑制されたが、AP-1 probe では抑制されなかった。これは PMA 処理した核内タンパクと 2G allele との結合が特異的で

あることを示唆する。また consensus Ets binding probe は high mobility complex を抑制したが、mutant Ets binding probe は抑制しなかった。従って、このタンパク-DNA 複合体を形成する核内タンパクは Ets transcription factor family の 1 つであると予想される。

Quantitative real-time PCR で、1G/2G もしくは 2G/2G の羊膜細胞(mesenchymal cell)の方が 1G/1G のそれよりも、PMA によって多くの MMP-1 mRNA を誘導した。(1G/1G: 24.2 ± 9.2 (mean \pm S.E. N=4)、1G/2G もしくは 2G/2G: 365.5 ± 153.5 (N=11)、 $p < 0.01$)。ノーザンブロットィングでも、PMA による MMP-1 mRNA 発現量は、2G allele をもった細胞が 1G/1G よりも顕著であった。MMP-1 nascent transcripts は MMP-1 mRNA 同様、2G allele を持った細胞の方が 1G/1G のそれより高値を示した(1G/1G: 23.9 ± 12.6 (N=4)、1G/2G もしくは 2G/2G: 215.0 ± 69.5 (N=6)、 $p < 0.05$)。PMA 刺激による MMP-1 タンパク産生は 2G allele を持った細胞が 1G/1G よりも多いことが、ウェスタンブロットィング、ELISA 法 ($p < 0.01$) で確認された。

新生児 -1607 MMP-1 promoter の遺伝子型を PPROM 群 (N=75) と Control 群 (N=235) で比較検討した。PPROM 群の 1G/2G もしくは 2G/2G 遺伝子型の新生児の発現頻度は 88.0% で Control 群の 76.2% より高かった ($p = 0.028$; odds ratio 2.29, 95 % confidence interval: 1.09 - 4.82)。

羊膜の mesenchymal cell を使って、-1607 MMP-1 promoter polymorphism が MMP-1 の遺伝子発現を強めることをはじめて証明した。臨床的にも、2G allele を持つ胎児は 1G/1G 遺伝子型の胎児より PPROM となる危険性が高いことを解明しえた。

公開発表に際し、副査の石橋教授から、臨床成績で 2G を有する 2 種の遺伝子型を合体して検討した理由、Gel shift で 2G オリゴヌクレオチドプローブに結合するタンパクについて、Gel shift での高分子シグナルの由来について、2G allele をもった新生児頻度の PPROM における有意性について、遺伝子型 1G/2G が 2G/2G よりも MMP-1 mRNA およびタンパク発現量を高値に示した理由などについて質問があった。副査の水上教授からは、生体内での MMP-1 プロモーターの活性を上昇させる物質について、炎症性サイトカインが核内タンパクと Ets binding site の結合を刺激することの証明について、子宮頸管のコラーゲンの分解と前期破水との関係について質問があった。最後に主査の吉木教授から、MMP-1 プロモーター遺伝子多型と他疾患との関連について、PPROM と他の MMP あるいは TIMP との関連について質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象症例の解析結果、最新の文献情報、これまでの自身の研究経験をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、本研究の成果と申請者の研鑽を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。