

## MMP-13/collagenase-3の動脈硬化プラークにおける役割

出口 順夫<sup>1,2</sup> 相川 眞範<sup>2</sup> 宮田 哲郎<sup>1</sup> Peter Libby<sup>2</sup>

**要 旨**：線維性コラーゲンは間質の主成分としてプラークを安定させている。matrix metalloproteinase (MMP)-13は線維性コラーゲンを分解しうるが、MMP-13欠損マウスに高コレステロール食を負荷しプラーク内のコラーゲン量と構造とを測定したところ、コラーゲンの量は増加し線維の構造が均一化した。MMP-13活性は動脈硬化性プラークのコラーゲン量と構造とを調節し、プラークの安定性に寄与している。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 327-331)

Key words: matrix metalloproteinase (MMP)-13, collagenase, collagen, atheromatous plaque

### はじめに

間質コラーゲンは中膜・外膜の間質の主成分として動脈の強度を規定するが、動脈硬化プラーク内の間質も主として間質コラーゲン(特にtype 1 コラーゲンなど線維性コラーゲン)が占めており、プラークの安定性を規定していると考えられている。線維性コラーゲンは、立体的に構築されており分解が困難であり、collagenaseといわれる一部のタンパク分解酵素群によって分解される。私たちは動脈硬化との関係が深いmatrix metalloproteinase (MMP)のなかでもcollagenase活性を有するMMP-collagenase (MMP-1/collagenase-1, MMP-8/collagenase-2, MMP-13/collagenase-3)に注目し、これらがプラーク内のコラーゲン量を調節していると示してきた<sup>1,2)</sup>。

本稿では、中でもMMP-13にターゲットを当て、MMP-13が動脈硬化プラークの量と同時に構造にも影響を与え、プラークの安定性に関与していることを詳述する。

### 間質コラーゲンとタンパク分解酵素

間質コラーゲンは、細胞間隙の主成分であり、各臓器で支持組織として強度を規定していると考えられている。血管壁では1型, 3型, 5型コラーゲンが多く、

また内弾性板には4型コラーゲンがある。このうち1型は60~70%を占め、3型と合わせると90%以上を占める。1型, 3型は線維性コラーゲンであり、コラーゲン小線維がtriple helix構造を形成し、さらにその小線維が何重にも束を作って線維構造をとっている。線維性コラーゲンを分解することは困難であり、限られたタンパク酵素でしか分解できないことが知られていて、それらをcollagenaseと総称する<sup>3,4)</sup>。動脈硬化にはタンパク分解酵素の関与が示されているが、その代表的なものはMMPである。そのうち、collagenase活性を有するのはMMP-1, MMP-8, MMP-13で、さらに最近ではMMP-14も活性を有することが示された。MMP-9やMMP-12はgelatinaseであり、ある程度分解された後のコラーゲンを分解することが可能な酵素である。その他、cathepsin Kもcollagenase活性を持っており、最近では動脈硬化プラークにcathepsin Kが発現しているという報告もある<sup>5)</sup>。

### MMP-collagenaseと動脈硬化プラーク

AikawaとLibbyは、MMPのうちcollagenase活性を有するMMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-14をMMP collagenaseと称している。彼らはMMP-collagenaseは1型コラーゲンを分解することによって動脈硬化プラークの強度に関与し、プラーク破綻の重要な要因になると提唱してきた<sup>6)</sup>。実際、ヒトの動脈硬化プラークの解析

<sup>1</sup>東京大学血管外科

<sup>2</sup>ハーバード大学医学部ブリガムアンドウィメンズ病院

2007年4月4日受理

から、破綻を起こすプラークはマクロファージなど炎症細胞が集簇していることやコラーゲンが相対的に減少していることはコンセンサスを得ており、一方、MMP-collagenaseもマクロファージなど炎症細胞によって産生され、破綻しやすいとされる炎症細胞が豊富なプラークに強発現していることより、間接的ではあるがMMP-collagenaseがプラーク破綻に関与していることが強く示唆されている。

一方、MMP-1, MMP-8, MMP-13は共通のコラーゲン切断部位を有しており $\alpha$ 鎖のGly<sup>775</sup>とIle/Leu<sup>776</sup>の間を切断しコラーゲンを分解する(MMP-14の切断部位は不明である)。したがって、Ile/Leu<sup>776</sup>からPro<sup>776</sup>にポイントミューテーションを起こすと、MMP-collagenaseがコラーゲンを切断できなくなる<sup>7)</sup>。このようにプロコラーゲン $\alpha$ 鎖のIle/Leu<sup>776</sup>をPro<sup>776</sup>に遺伝子操作をしたマウスを用いると、MMP-collagenaseが動脈硬化プラーク内のコラーゲンも切断できなくなるため、MMP-collagenaseが動脈硬化プラークのコラーゲン代謝にどの程度関与しているかを知ることができる。その結果、MMP-collagenaseはプラークの量(サイズ)自体にはあまり関与しないが、プラークのコラーゲン量に影響することが証明され、MMP-collagenaseが動脈硬化プラークのコラーゲン代謝に関与し、コラーゲン量を規定していることが示された<sup>1)</sup>。

### MMP-13と動脈硬化プラーク

しかし、プラーク内のコラーゲン量を規定しているというだけで、MMP-collagenaseがプラークの安定性に関与しているかどうかは分からない。本当に安定したプラークであるか否かを確認するためには、実際に力学的負荷をかけてみなければ分からないが、現実的には非常に困難である。動脈硬化プラークの骨格が間質コラーゲンである以上、コラーゲン量以外でプラークの力学的安定性に関与するものとしてはコラーゲン構造の変化が考えられる。また、構造の変化は、コラーゲンを分解する過程やプラークのremodelingの際に起こり、MMP-collagenaseがコラーゲン構造変化を起こすことによりプラークの安定性に影響を与えていることは十分に予想される。

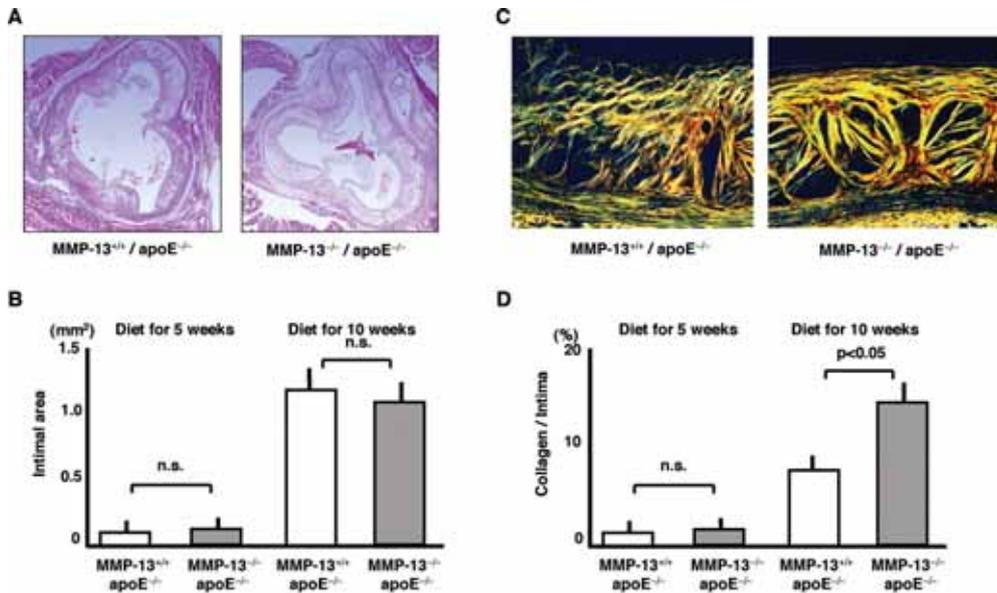
マウスではMMP-1が欠損しており、代わりにMcol (murine collagenase like) AとBが存在していることが知られているが、これらは胎生期に重要で、生まれた

後にはほとんど発現されない。したがって、ヒトなどで発現しているMMP-1の機能はMMP-13とMMP-8とが肩代わりしていると考えられている。今回は、MMP-13欠損マウスを用いて、MMP-collagenaseの一つであるMMP-13がコラーゲン量および構造に影響しているかどうかを検討した。MMP-13欠損マウスはInada, Kraneらによって作成された<sup>8)</sup>。実際はExon 5の欠落で機能欠損であるが、MMP-13タンパク量の発現も低下していることが確認され、事実上MMP-13欠損状態のマウスである。

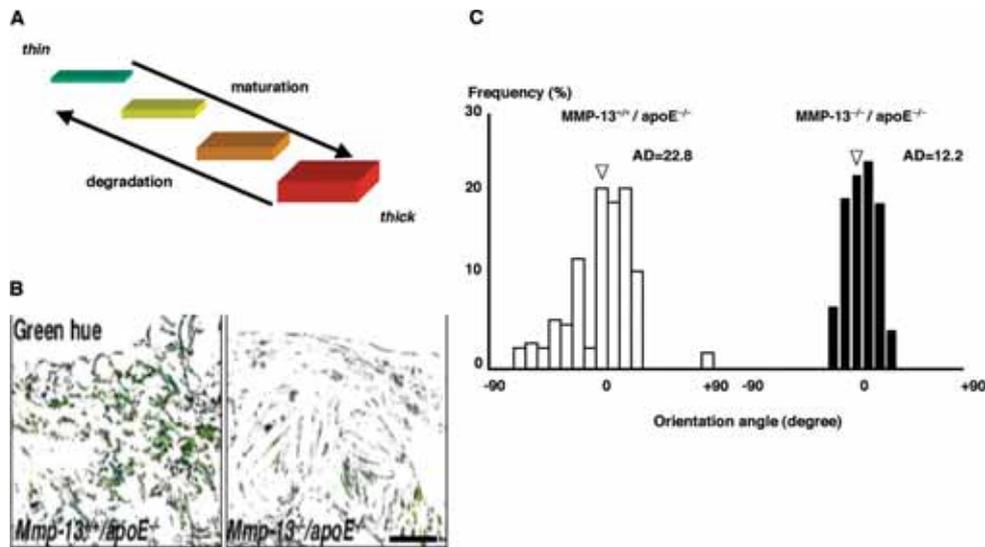
われわれは、動脈硬化を起こすapoE欠損マウスにバッククロスしたMMP-13正常発現(MMP-13<sup>+/+</sup>)、MMP-13非発現(MMP-13<sup>-/-</sup>)マウスを作成し生後1カ月のオスに高コレステロール食を負荷し、大動脈弁レベルでのプラークを評価した。われわれの高コレステロール食の負荷により、apoE欠損マウスは8週間ほどで十分なサイズのプラークが形成されているため、高コレステロール食負荷は5週間と10週間とした。すると、プラークのサイズは、高コレステロール5週間、10週間負荷とで差がなかった(Fig. 1A, 1B)。プラーク内の間質コラーゲン量をpicrosirius red染色で評価すると、高コレステロール10週間負荷に伴い、MMP-13<sup>-/-</sup>群でコラーゲン量が増加していた(Fig. 1C, 1D)。このことは、MMP-13が動脈硬化プラークの発達(サイズ)にはあまり関与していないが、プラーク内のコラーゲン量代謝に関与していることを意味している。

コラーゲン量は、産生する平滑筋細胞と分解するマクロファージ細胞により調節されているが、MMP-13によってこれらの細胞のプラーク内での変化がコラーゲン量に影響を与えているか否かを調べると、免疫染色による細胞の占める面積での評価ではあるが、プラーク内の平滑筋細胞とマクロファージ細胞の数は両群で差を認めなかった<sup>9)</sup>。

picrosirius redで染色した標本を高性能偏光顕微鏡で観察すると、色によってコラーゲン線維が識別される<sup>10)</sup>(Fig. 2A)。MMP-13<sup>+/+</sup>のプラークでは、緑の色調のコラーゲンが多くなっており、線維がより細いことが分かった(Fig. 2B)。さらに高性能偏光顕微鏡でコラーゲンの線維の方向まで2次元に観察することが可能となった。動脈内腔面を輪切りに切った標本を用い、内腔面に対し接線方向を0度としてプラーク内のコラーゲンの線維方向を2次元にコンピュータで測定し



**Figure 1** The role of MMP-collagenase in forming the atherosclerotic plaque.  
 A: Representative view of atheroma by HE stain in MMP-13<sup>+/+</sup> / apoE<sup>-/-</sup> (left) or MMP-13<sup>-/-</sup> / apoE<sup>-/-</sup> (right) mice fed with atherogenic diet for 10 weeks.  
 B: Quantitative analysis of intimal area in MMP-13<sup>+/+</sup> / apoE<sup>-/-</sup> or MMP-13<sup>-/-</sup> / apoE<sup>-/-</sup> mice. Mice were fed with atherogenic diet for 5 or 10 weeks. Note the similar extent of plaque formation between two groups.  
 C: Representative view of interstitial collagen accumulation in MMP-13<sup>+/+</sup> / apoE<sup>-/-</sup> (left) or MMP-13<sup>-/-</sup> / apoE<sup>-/-</sup> (right) mice fed with atherogenic diet for 10 weeks.  
 D: Quantitative analysis of collagen area ratio in the atheroma in MMP-13<sup>+/+</sup> / apoE<sup>-/-</sup> or MMP-13<sup>-/-</sup> / apoE<sup>-/-</sup> mice. Mice were fed with atherogenic diet for 5 or 10 weeks.  
 Bars represent mean ± SEM.



**Figure 2** Optical analyses revealed thinner and less aligned periluminal collagen fibers.  
 A: Scheme of the relation between the color and thickness of the collagen fibers. The color of the collagen fibers stained with picrosirius red and viewed with polarized light is determined by fiber thickness.  
 B: Images show the distribution of green collagen, representing thin fibers.  
 C: Representative examples of collagen fiber orientation. MMP-13<sup>-/-</sup> / apoE<sup>-/-</sup> mice have more aligned collagen fiber in the intima than MMP-13<sup>+/+</sup> / apoE<sup>-/-</sup> mice.

た。するとFig. 2CのようにMMP-13<sup>+/+</sup>のプラークのコラーゲン線維のほうがより接線に対しばらつきがあることが分かった。すなわち、MMP-13<sup>-/-</sup>のプラークはより太く、内腔に対する接線に沿ってより均一の方向性があるコラーゲンを有していることが分かった。

結論として、MMP-13活性は、マウスの動脈硬化性プラークのコラーゲン量と質を調節していることを示しており、プラークの安定性に寄与していると考えられた。

近年、マウスモデルを用いて、破綻プラークを示す論文が出てきているが、われわれの実験系では、コントロール群であるMMP-13<sup>+/+</sup>/apoE<sup>-/-</sup>に高コレステロール食を長期(1年以上)負荷してもプラーク破綻のマウスを認めなかった。ただ、もし、プラーク破綻がマウスで起こるならこれ以上のモデルはなく、今後検討が必要と考えられた。

### 今後の問題点

2007年3月、*New England Journal of Medicine*において、drug eluting stentが従来のstentに比べ必ずしも経皮的冠動脈インターベンション(percutaneous coronary intervention: PCI)が遠隔期の生存率や心筋梗塞発症率を改善していない、と報告された。すなわち、このことは、冠動脈狭窄病変の対処と再狭窄予防だけでは不十分であり、急性冠症候群の原因となる不安定化プラークに対する抜本的な治療法の確立が必要であることを意味している。近年、不安定プラークは複数存在するという認識から、局所のみでのプラーク管理から冠動脈全体の管理へ移行すべきという意見が強くなっている<sup>11)</sup>。また、不安定プラークも従来はプラーク破綻(破裂)としてのみ認識されてきたが、プラークエロージョンも少なくないことが明らかになっており、両者に病態生理上どのような差異があるのかを明らかにしていかなければならない。

われわれは、冠動脈全体の管理が重要であるという認識から、冠動脈全体の不安定性を画像化できないかと考えている。具体的には、マクロファージが鉄を貪食する性質を利用して鉄を含んだマクロファージをMR等で感知する方法を開発中である。また、MMPが特定のペプチド配列を切断する性質を利用し、近赤外線プローブを用いてMMP活性を検出する方法を開発している<sup>12)</sup>。ただし、この方法では、成功しているのは発現

量の多いMMP-9のみである。いずれも小動物レベルで体外からの検知に成功しているのみで、臨床応用には多くの問題が残っている。しかし、将来的には、動脈硬化プラークを全体として把握し管理していくことが可能になると考えられる。

### 文 献

- 1) Fukumoto Y, Deguchi JO, Libby P et al: Genetically determined resistance to collagenase action augments interstitial collagen accumulation in atherosclerotic plaques. *Circulation*, 2004, **110**: 1953–1959.
- 2) Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E et al: Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*, 1999, **99**: 2503–2509.
- 3) Rekhter MD: Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res*, 1999, **41**: 376–384.
- 4) Lee RT, Libby P: The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 1859–1867.
- 5) Sukhova GK, Shi GP, Simon DI et al: Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1998, **102**: 576–583.
- 6) Aikawa M, Libby P: The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol*, 2004, **13**: 125–138.
- 7) Liu X, Wu H, Byrne M et al: A targeted mutation at the known collagenase cleavage site in mouse type I collagen impairs tissue remodeling. *J Cell Biol*, 1995, **130**: 227–237.
- 8) Inada M, Wang Y, Byrne MH et al: Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**: 17192–17197.
- 9) Deguchi JO, Aikawa E, Libby P et al: Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation*, 2005, **112**: 2708–2715.
- 10) Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR et al: Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*, 1994, **89**: 397–410.
- 11) Libby P, Theroux P: Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 2005, **111**: 3481–3488.
- 12) Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH et al: Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages *in vivo*. *Circulation*, 2006, **114**: 55–62.

## MMP-13 Contributes Collagen Structure and Catabolism in the Mouse Atheroma Plaque

Juno Deguchi,<sup>1,2</sup> Masanori Aikawa,<sup>2</sup> Tetsuro Miyata,<sup>1</sup> and Peter Libby<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vascular Surgery, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Cardiovascular Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Massachusetts, USA

---

**Key words:** matrix metalloproteinase (MMP)-13, collagenase, collagen, atheromatous plaque

Interstitial collagen strengthens the arteries and is supposed to play a crucial role in forming atherosclerotic plaques. Degradation of the interstitial collagen may result in rupture in the atherosclerotic plaque. Collagenases of matrix metalloproteinase (MMPs), including MMP-1/collagenase-1, MMP-8/collagenase-2 and MMP-13/collagenase-3, can digest collagen structure and contribute to collagen catabolism in atherosclerotic plaques. We demonstrated that MMP-collagenases is linked with the development and structure of atherosclerotic plaques, by using mice with mutation at the collagenase common cleavage site resulting in resistant to MMP-collagenase. In order to specify the role of MMP-collagenase in the structure of the atherosclerotic plaque, we utilized apolipoprotein E-deficient mice lacking MMP-13 or expressing mild-type MMP-13. While both groups revealed similar plaque size at the aortic root, the plaques of MMP-13<sup>-/-</sup> mice contained significantly more interstitial collagen than those of MMP-13<sup>+/+</sup> mice. Furthermore, quantitative optical analyses revealed thinner and less aligned periluminal collagen fibers within the plaques of MMP-13 mice versus those from MMP-13 mice. The data support the hypothesis of MMP-13, vital role in regulating and organizing collagen for atherosclerotic plaques. Development of the system is under way for visualizing MMP activities, with focus on MMP-collagenase. (J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 327–331)