

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Transforming Growth Factor  $\beta$  情報伝達系に対する  
Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  の阻害作用とその機序**

指導教官 玉置邦彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 山根謙一

### 序

Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) は皮膚線維芽細胞において①コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックス産生を強力に促進し, ②コラゲナーゼなどの細胞外マトリックス分解酵素産生を抑制し, ③プロテアーゼ抑制因子合成を促進する。汎発性強皮症をはじめとする線維化疾患において TGF $\beta$  は重要な役割を果たしている。TGF $\beta$  情報伝達系についても近年明らかにされてきており、TGF $\beta$  は細胞膜上に存在する II 型 TGF $\beta$  受容体に結合すると、I 型受容体とヘテロ 4 量体を形成する。II 型受容体の kinase domain は恒常的に活性化されており TGF $\beta$  が結合すると I 型受容体の GS domain をリン酸化し、I 型受容体の serine/threonine kinase が活性化される (5)。その結果細胞質内に存在する Smad2 あるいは Smad3 はリン酸化され、Smad4 とともに核内に移行して標的遺伝子の転写を調節する (6, 7)。また、I 型受容体は TGF $\beta$ -activated kinase 1 (TAK-1) を介して p38, JNK などの MAP キナーゼ family を活性化する。TGF $\beta$ -Smad 情報伝達系によって、抑制型 Smad である Smad7 の発現が誘導される。Smad7 は I 型受容体と結合して、I 型受容体-Smad2/3 複合体形成を阻害することにより TGF $\beta$ -Smad 情報伝達系を抑制するいわば Negative Feedback Loop を形成する。

TNF $\alpha$  は炎症性サイトカインであり、関節リウマチ、変形性関節症などの炎症性疾患の病因に参与している。TNF $\alpha$  は 26kD の不活性型から 17kD の活性型となって 3 量体を形成し、55kD の I 型 TNF $\alpha$  受容体と 75kD の II 型 TNF $\alpha$

受容体と結合する。主に I 型 TNF $\alpha$ 受容体が細胞内にシグナルを伝え、NF $\kappa$ B や AP-1 などの転写因子の作用を介して生理的機能を発揮する。

TGF $\beta$ に対して TNF $\alpha$ が阻害作用を呈する現象がこれまで多数報告されているが、TNF $\alpha$ がどのように TGF $\beta$ 情報伝達系を阻害しているかはこれまで明らかにされていない。TGF $\beta$ は細胞外マトリックスである I 型コラーゲンやエラスチン産生を促進するが、TNF $\alpha$ はこの作用を阻害する。TGF $\beta$ に対する TNF $\alpha$ の阻害作用の機構を明らかにすることは創傷治癒過程、線維化疾患をはじめとする病態の解明に有用であると考えられている。皮膚線維芽細胞を用いて TGF $\beta$ による細胞内シグナル伝達や遺伝子発現調節への TNF $\alpha$ の影響を検討し、その阻害作用の機構を明らかにすることで、創傷治癒過程や線維性疾患における TGF $\beta$ 、TNF $\alpha$ の役割についての理解を深めるために本研究を行った。さらに線維性疾患である汎発性強皮症皮膚線維芽細胞を用いて、TNF $\alpha$ の効果を検討した。

## 結果と考察

皮膚線維芽細胞における TGF $\beta$ によって発現が促進される $\alpha$ 2(I) collagen と TIMP-1 遺伝子発現に対する TNF $\alpha$ の影響を調べるため Northern Blotting を行ったところ、TGF $\beta$ による $\alpha$ 2(I) collagen と TIMP-1 遺伝子発現誘導を TNF $\alpha$ は濃度依存的に抑制した。次に TGF $\beta$ によって活性化される細胞内シグナル伝達分子である Smad3 や p38, JNK1 のリン酸化への TNF $\alpha$ の影響を検討したところ、TGF $\beta$ による Smad3 や p38, JNK1 のリン酸化を TNF $\alpha$ は濃度依存的に抑制した。これらの結果より、皮膚線維芽細胞において TGF $\beta$ による細胞内シグナル伝達と遺伝子発現調節を TNF $\alpha$ は阻害すると考えられた。この阻害作用の機序を検討するため、まず TGF $\beta$ に対する TNF $\alpha$ の阻害作用が Smad7 の誘導を介するか検討したが、皮膚線維芽細胞において TNF $\alpha$ は Smad7 を誘導しなかった。一方 TNF $\alpha$ は II 型 TGF $\beta$ 受容体蛋白発現量を抑制するが、II 型 TGF $\beta$ 受容体遺伝子発現量、遺伝子転写活性は抑制されなかった。また、II 型 TGF $\beta$ 受容体を過剰発現させると、TGF $\beta$ に対する TNF $\alpha$ の阻害作用は補正された。これらの結果から、TGF $\beta$ に対する TNF $\alpha$ の阻害作用の機序として、II 型 TGF $\beta$ 受容体発現抑制が関与することが明らかとなった。TGF $\beta$ 受容体発現抑制機構については長い間不明であったが、本研究では、TNF $\alpha$ による II 型 TGF $\beta$ 受容体発現抑制がプロテアーゼを介

する機構によることを明らかにした。

TGF $\beta$ は細胞膜表面にある受容体と結合してその生理的機能を発揮する。TGF $\beta$ 受容体発現調節は創傷治癒、癌や線維化病変の進展に重要な役割を果たしていることが知られている。例えば、線維性疾患として知られている汎発性強皮症は皮膚および内臓諸臓器に線維化を来し、その結果皮膚および内臓諸臓器に硬化が認められる。その病因はいまだ明らかとなっていないが、皮膚ではI型コラーゲンを主とする細胞外マトリックスが沈着し、本症の病態を形成している。最近、汎発性強皮症ではTGF $\beta$ 受容体発現が亢進しており、TGF $\beta$ による細胞外マトリックス産生作用が増強されている可能性が示唆されている。我々は汎発性強皮症においてTGF $\beta$ 受容体発現が亢進しており、抗TGF $\beta$ 抗体、TGF $\beta$  antisense oligonucleotideでTGF $\beta$ シグナルを阻害すると、亢進していた $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子発現量や遺伝子転写活性が減弱することを明らかにし、汎発性強皮症においてTGF $\beta$ 受容体発現亢進による autocrine TGF $\beta$ が関与していることを報告している。本研究ではTGF $\beta$ に対するTNF $\alpha$ の阻害作用がII型TGF $\beta$ 受容体発現抑制を介していることから、汎発性強皮症皮膚線維芽細胞におけるTNF $\alpha$ の影響を検討したところTNF $\alpha$ は亢進しているII型TGF $\beta$ 受容体発現を抑制し、さらに $\alpha$ 2(I) collagen、TIMP-1 遺伝子の発現亢進も抑制した。

本研究では皮膚線維芽細胞において、TGF $\beta$ によるSmad3, p38, JNKを介した細胞内シグナル伝達や $\alpha$ 2(I) collagen、TIMP-1 遺伝子発現亢進をTNF $\alpha$ は抑制することを示した。また、このTGF $\beta$ に対するTNF $\alpha$ の阻害作用は、プロテアーゼによるII型TGF $\beta$ 受容体分解による発現抑制を介していることが明らかとなった。さらに、汎発性強皮症皮膚線維芽細胞においてもTNF $\alpha$ はII型TGF $\beta$ 受容体発現を抑制することによって、 $\alpha$ 2(I) collagen、TIMP-1 遺伝子発現亢進を阻害することが示された。汎発性強皮症をはじめとした種々の線維化疾患において、TGF $\beta$ 受容体発現調節と細胞外マトリックス産生の関連を今後さらに明らかにすることは、これらの疾患の病態解明、治療法の開発につながることで期待される。

## まとめ

TGF $\beta$ は細胞外マトリックスの産生を促進するが、TNF $\alpha$ はこの働きを抑制する。皮膚線維芽細胞においてTGF $\beta$ はSmad, p38, JNKの情報伝達系を活性

化させ、 $\alpha 2(I)$ collagen、TIMP-1 遺伝子発現を亢進させるが、TNF $\alpha$ は TGF $\beta$ の効果を抑制する。TNF $\alpha$ の阻害作用の機序を検討するため抑制型 Smad である Smad7 の発現を検討したが、皮膚線維芽細胞においてはその上昇を認めなかった。一方 TGF $\beta$ 受容体発現に対する TNF $\alpha$ の影響を検討したところ、I 型 TGF $\beta$ 受容体発現量に変化はなかったが、II 型 TGF $\beta$ 受容体発現量は時間依存的・濃度依存的に減少した。しかし、II 型 TGF $\beta$ 受容体遺伝子発現量に変化はなく、また転写活性にも影響はみられなかった。クロスリンク免疫沈降法により、細胞膜上の II 型 TGF $\beta$ 受容体が減少していることが明らかとなった。さらに皮膚線維芽細胞に一過性に II 型 TGF $\beta$ 受容体を過剰発現させると、TGF $\beta$ に対する TNF $\alpha$ の阻害作用が補正されたことから、TNF $\alpha$ の阻害作用が II 型 TGF $\beta$ 受容体発現量減少によることが示唆された。TNF $\alpha$ による II 型 TGF $\beta$ 受容体発現量減少の機序について検討したところ、TNF $\alpha$ の細胞内情報伝達系である NF $\kappa$ B,MEK/ERK の関与は見出せなかったが、プロテアーゼによる分解を介することが明らかとなった。汎発性強皮症皮膚線維芽細胞において TNF $\alpha$ は II 型 TGF $\beta$ 受容体発現量、 $\alpha 2(I)$ collagen、TIMP-1 遺伝子発現量を抑制した。本研究は皮膚線維芽細胞における TGF $\beta$ 情報伝達系に対する TNF $\alpha$ の阻害作用の機序を明らかにし、汎発性強皮症をはじめとする線維化疾患における TNF $\alpha$ の有用性が示唆された。