

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 強皮症皮膚線維芽細胞におけるインテグリン α v β 5 発現亢進の意義

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 12 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 浅野善英

汎発性強皮症は、皮膚および肺を始めとした内臓諸臓器における細胞外マトリックスの過剰な沈着を特徴とする疾患である。その病態において中心的な役割を果たしているのは、線維芽細胞の活性化とそれによる細胞外マトリックスの過剰産生である。汎発性強皮症における線維芽細胞の活性化は、自己免疫、微小血管障害、炎症などの様々な外的誘引が複雑に相互作用することによって引き起こされていると考えられている。しかしながら、これらの外的誘引から完全に隔離されている培養系においても強皮症皮膚線維芽細胞は細胞外マトリックスを過剰産生し続けるため、強皮症皮膚線維芽細胞には一度活性化されるとその状態を維持し続ける self-activation の系が存在する可能性が示唆されている。この self-activation の系において重要な役割を果たしていると考えられているサイトカインの 1 つが transforming growth factor- β (TGF- β) である。これまでの研究により、①強皮症皮膚線維芽細胞では TGF- β 受容体の発現量が亢進していること、②正常皮膚線維芽細胞では TGF- β 受容体を一過性強発現することによりヒト α 2(I) collagen 遺伝子の転写活性が有意に亢進し、この効果は抗 TGF- β 抗体によって有意に抑制されること、③強皮症皮膚線維芽細胞ではヒト α 2(I) collagen 遺伝子の転写活性が亢進しているが、抗 TGF- β 抗体および TGF- β 1 antisense oligonucleotide によってその転写活性は有意に抑制されることが示されており、これらの事実から「強皮症皮膚線維芽細胞では TGF- β 受容体の発現量が亢進していることにより autocrine TGF- β loop が形成され、その結果として恒常的に活性化された状態が維持されている」可能性が考えられている。

線維芽細胞を始めとした多くの培養細胞において、TGF- β は latency associated peptide (LAP) および latent TGF- β binding protein-1 (LTBP-1) とからなる 3 つの蛋白質の複合体として分泌されている。LAP と TGF- β の複合体は small latent complex (SLC) と呼ばれ、SLC と LTBP-1 の複合体は large latent complex (LLC) と呼ばれている。LTBP-1 は細胞外マトリックス中の transglutaminase に対する結合能を有するため、LLC は transglutaminase を介して細胞周囲に TGF- β を recruit する機能があると考えられている。一方、SLC はこのままの状態では TGF- β 受容体に結合することができな

いため、SLC が TGF- β としての生物学的な効果を示すためには、LAP が形態的な変化を起こすことにより TGF- β と TGF- β 受容体の結合が可能になること、あるいは TGF- β が LAP から解離することが必要である。SLC のこの性質は、細胞周囲の微小環境において TGF- β の活性化が調節されている可能性を示唆している。

細胞外における SLC の活性化に関与している蛋白質として近年注目を集めているのがインテグリンである。インテグリンは α subunit および β subunit からなる二量体分子で、細胞表面に発現し、主に細胞外マトリックスの受容体として機能している。これまでに 13 種類の α subunit と 8 種類の β subunit が同定されていることが示すように、インテグリンは非常に多様な機能をもつ受容体 superfamily を形成しており、細胞外環境の微小な変化を細胞骨格を介して細胞内へと伝達し、遺伝子発現、細胞分化、細胞周期などを調節している。これらのインテグリンの中で、 αv subunit を含むインテグリン（これまでに $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$ の 5 種類が同定されている）はビトロネクチンおよびフィブロネクチンに代表されるような RGD motif を持つ蛋白質に対する結合能を有している。近年、LAP 中にも RGD motif が含まれており、 αv を含むインテグリンは SLC の受容体として機能していることが明らかとなり、更に $\alpha v\beta 6$ および $\alpha v\beta 8$ に関してはそれぞれ protease 非依存性、protease 依存性に SLC を活性化する機能があることが報告された。特に $\alpha v\beta 6$ については、表皮細胞においてのみ $\beta 6$ を発現しない knockout mouse においてブレオマイシン投与後に肺の線維化が全く生じないことが示され、線維化を特徴とする疾患の病態において非常に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

表 1 (p.3)に過去に報告されている αv を含むインテグリンの特徴をまとめて示した。LAP に対する結合能は全てのインテグリンで認められるが、 $\alpha v\beta 5$ に関しては他のインテグリンと比較して結合能が弱く、 $\alpha v\beta 3$ については LAP と結合できるとする報告と、結合できないとする報告があり、一定した見解は得られていない。 $\alpha v\beta 6$ と $\alpha v\beta 8$ は SLC と結合することにより SLC を活性化することができるが、これらのインテグリンは線維芽細胞には発現していない。一方、線維芽細胞に発現しているインテグリンに関しては、 $\alpha v\beta 1$ は SLC を活性化しないことが報告されているが、 $\alpha v\beta 3$ と $\alpha v\beta 5$ が SLC を活性化するか否かについては未だ検討されていない。以上の過去の報告を踏まえ、線維芽細胞に発現しており、かつ LAP に対する結合性が認められ、SLC の活性化能について未だ検討されていない $\alpha v\beta 5$ に注目して検討を行うこととした。

$\alpha v\beta 5$ はビトロネクチンを主要な ligand とするインテグリンである。ビトロネクチンは分子量 75kD の血漿蛋白で、細胞接着および補体系や凝固系の活性化に関与している。また、ビトロネクチンは血漿中のみでなく、皮膚を含め様々な組織の細胞外マトリックス中に沈着していることが知られている。しかしながら、培養系において、線維芽細胞および表皮細胞はビトロネクチンを産生しないことから、細胞外マトリックス中に沈着しているビトロネクチンの由来はいまだ明らかにされていない。細胞外マトリックス中のビトロネクチンはグリコサミノグリカン、コラーゲン、プラスミノゲン、ウロキナーゼ受容体、plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) など様々な蛋白に結合する。特に PAI-1 に関しては、ビトロネクチンと結合することにより活性型で安定となることが明らかにされている。活性型 PAI-1 はウロキナーゼタイプ plasminogen activator の活性を抑制し、plasminogen から plasmin が産生さ

れるのを抑制する。Plasmin は、主要な collagenase である proMMP-1 や proMMP-13 を細胞外環境において活性化する作用を持っていることから、plasmin-mediated pericellular proteolytic cascade が I 型コラーゲンの分解を制御する上で非常に重要であると考えられている。これらの報告から、細胞外マトリックス中のビトロネクチンは、plasmin 依存性の pericellular proteolytic cascade を介して、細胞外マトリックスの分解あるいは蓄積を制御する蛋白と考えられている。細胞外マトリックス中のビトロネクチンは $\alpha\text{v}\beta 5$ を介して線維芽細胞によって分解される。ヘパリン結合型のビトロネクチンは $\alpha\text{v}\beta 5$ を介した endocytosis により線維芽細胞内に取り込まれ、lysosome により分解されるが、一方、非ヘパリン結合型のビトロネクチンは、endocytosis されずに細胞外マトリックス中に沈着し続ける。従って、線維芽細胞は $\alpha\text{v}\beta 5$ を介して細胞外マトリックス中のビトロネクチンの量を制御し、それにより plasmin 依存性の pericellular proteolytic cascade も制御している可能性が考えられている。

本研究は、強皮症皮膚線維芽細胞における $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現異常が汎発性強皮症の病態に関与している可能性を明らかにするため、まず培養強皮症皮膚線維芽細胞における $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現量、ビトロネクチンへの結合能、PAI-1 活性、および強皮症皮膚における $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現量、ビトロネクチンの沈着量について検討を行った。次に、正常皮膚線維芽細胞を用いて $\alpha\text{v}\beta 5$ を強発現する stable transfectants を作成し、 $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現亢進が強皮症皮膚線維芽細胞の phenotype の変化に及ぼす影響について検討した。本研究により、①強皮症皮膚線維芽細胞においては $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現亢進により、ビトロネクチン依存性に plasmin-mediated pericellular proteolytic cascade が抑制されていること、②強皮症皮膚線維芽細胞における autocrine TGF- β signaling の確立に、 $\alpha\text{v}\beta 5$ 依存性の latent TGF- $\beta 1$ の活性化が関与していること、③抗 $\alpha\text{v}\beta 5$ 抗体および $\beta 5$ subunit antisense oligonucleotide により強皮症皮膚線維芽細胞における恒常的な TGF- β signaling の活性化および $\alpha 2(\text{I})$ collagen 遺伝子の発現亢進を有意に抑制できることが明らかとなった。これらの結果から、 $\alpha\text{v}\beta 5$ は汎発性強皮症の線維化の病態において非常に重要な働きをしており、治療の target となりうる蛋白であることが示された。

表 1. αv を含むインテグリンの特徴

	SLC に対する 結合能	SLC の活性化	線維芽細胞における 発現
$\alpha\text{v}\beta 1$	○	×	○
$\alpha\text{v}\beta 3$	○ or ×	?	○
$\alpha\text{v}\beta 5$	○	?	○
$\alpha\text{v}\beta 6$	○	○	×
$\alpha\text{v}\beta 8$	○	○	×

○認める

×認ない

?検討されていない