

[別紙 2]

審査結果の要旨

氏名 浅野 善英

本研究は、強皮症皮膚線維芽細胞におけるインテグリン $\alpha v\beta 5$ 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インテグリン $\alpha v\beta 5$ 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インテグリン $\alpha v\beta 5$ 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インテグリン $\alpha v\beta 5$ を強発現する stable transfectants を作成し、インテグリン $\alpha v\beta 5$ 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。最後に、インテグリン $\alpha v\beta 5$ に対する blocking 抗体および $\beta 5$ antisense oligonucleotide が汎発性強皮症の治療に応用できる可能性についても検討を行った。本研究により得られた結果は下記の通りである。

1. 培養強皮症皮膚線維芽細胞では培養正常皮膚線維芽細胞と比較して、インテグリン $\alpha v\beta 5$ の発現量が有意に亢進しており、インテグリン $\alpha v\beta 5$ 依存性にビトロネクチンに対する結合能が有意に亢進していた。免疫組織染色により in vivo で同様の検討を行ったところ、強皮症皮膚では正常皮膚と比較して膠原線維間の紡錘形細胞においてインテグリン $\alpha v\beta 5$ の発現量が著明に亢進しており、同細胞の周囲においてビトロネクチンの過剰な沈着を認めた。ビトロネクチンは plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)と結合することにより PAI-1 を活性型で安定させる作用があることが知られているが、培養強皮症皮膚線維芽細胞ではビトロネクチン依存性に PAI-1 活性が亢進していた。また、この PAI-1 活性の亢進は抗 $\alpha v\beta 5$ 抗体により有意に抑制された。以上の結果より、強皮症皮膚線維芽細胞ではインテグリン $\alpha v\beta 5$ およびビトロネクチン依存性に PAI-1 活性が亢進している可能性が示唆された。活性型 PAI-1 は plasmin 産生を抑制することにより、線維芽細胞から分泌された proMMP-1 および proMMP-13 の活性化を抑制して細胞外マトリックスの沈着を促進する作用があると考えられているため、強皮症皮膚線維芽細胞におけるインテグリン $\alpha v\beta 5$ の発現亢進は汎発性強皮症における細胞外マトリックスの過剰沈着に関与している可能性が示された。

2. 正常皮膚線維芽細胞にインテグリン $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ を一過性強発現させたところ、ヒト $\alpha\text{2(I)}$ コラーゲン遺伝子の転写活性が有意に亢進した。また、この転写活性の亢進はビトロネクチン非依存性であった。以上の結果から、インテグリン $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ の発現亢進は強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha\text{2(I)}$ コラーゲン遺伝子の転写活性の亢進に関与している可能性が示唆された。
3. 正常皮膚線維芽細胞を用いてインテグリン $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ を強発現する stable transfectants ($\beta\text{5 transfectants}$)を作成したところ、同細胞は細胞外マトリックスを過剰産生する myofibroblasts に分化した。 $\beta\text{5 transfectants}$ では Sp1 および Smad3 依存性にヒト $\alpha\text{2(I)}$ コラーゲン遺伝子の転写活性が亢進しており、Smad3 が恒常的にリン酸化していた。また、anti-TGF- β antibody および TGF- $\beta\text{1 antisense oligonucleotide}$ により $\beta\text{5 transfectants}$ におけるヒト $\alpha\text{2(I)}$ コラーゲン遺伝子の転写活性は有意に抑制された。以上の結果から、 $\beta\text{5 transfectants}$ は、autocrine TGF- β1 の刺激により活性化されていることが示された。
4. $\beta\text{5 transfectants}$ では TGF- β1 の mRNA の発現量は正常であったが、培養液中の total TGF- β1 (latent form + active form)の量は有意に減少していた。抗 $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ 抗体で処理することにより、培養液中の total TGF- β1 の量が正常に戻ることから、 $\beta\text{5 transfectants}$ では $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ 依存性に latent TGF- β1 が細胞表面に recruit されている可能性が示された。 $\beta\text{5 transfectants}$ を TGF- $\beta\text{1 antisense oligonucleotide}$ で処理した後、latent TGF- β1 で刺激したところ、ヒト $\alpha\text{2(I)}$ コラーゲン遺伝子の転写活性が有意に亢進したが、抗 $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ 抗体存在下ではこの作用は有意に抑制された。また、 $\beta\text{5 transfectants}$ と TMLC 細胞を共培養すると TMLC 細胞の luciferase 活性は有意に亢進した。以上の結果から、 $\beta\text{5 transfectants}$ では $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ 依存性に latent TGF- β1 が活性化されていることが示された。
5. $\beta\text{5 subunit}$ の細胞内領域の 50 個のアミノ酸を欠失した $\beta\text{5-}\Delta\text{50 subunit}$ を作成し、この $\beta\text{5-}\Delta\text{50 subunit}$ を強発現する stable transfectants ($\beta\text{5-}\Delta\text{50 transfectants}$)を作成した。 $\beta\text{5-}\Delta\text{50 transfectants}$ では、latent TGF- β1 に対する結合能は亢進していたが、ヒト $\alpha\text{2(I)}$ コラーゲン遺伝子の転写活性は正常で、培養液中の total TGF- β1 の量も正常であった。また、TMLC 細胞との共培養実験においても TMLC 細胞の luciferase 活性は正常であった。以上の結果により、インテグリン $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ による latent TGF- β1 の活性化には、 $\beta\text{5 subunit}$ の細胞内領域が必要であることが示された。また、 $\beta\text{5 transfectants}$ を cytochalasin D で処理したところ、ヒト $\alpha\text{2(I)}$ コラー

ゲン遺伝子の転写活性は有意に抑制され、培養液中の total TGF- β 1 の量も正常となった。以上の結果から、 α v β 5 による latent TGF- β 1 の活性化には、 β 5 subunit の細胞内領域と細胞骨格の相互作用が必要であることが示された。

6. 強皮症皮膚線維芽細胞を TMLC 細胞と共培養したところ、TMLC 細胞の luciferase 活性は有意に亢進し、この luciferase 活性の亢進は抗 α v β 5 抗体により有意に抑制された。また、抗 α v β 5 抗体および β 5 antisense oligonucleotide で処理することにより、強皮症皮膚線維芽細胞のヒト α 2(I)コラーゲン遺伝子の転写活性を有意に抑制することができ、Smad3 の恒常的なリン酸化も有意に抑制された。以上の結果から、強皮症皮膚線維芽細胞はインテグリン α v β 5 依存性に latent TGF- β 1 を活性化することによって活性化されている可能性が示された。

以上、本論文はインテグリン α v β 5 が汎発性強皮症の病態において非常に重要な働きをしていると共に、治療の target となりうる蛋白であることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった強皮症皮膚線維芽細胞の活性化の機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。