審査の結果の要旨

氏名　神人正寿

本研究は、anti-adhesive molecule の一つと目される細胞外マトリックス蛋白である Tenascin-C(TN-C)の様々な皮膚疾患における発現亢進が transforming growth factor (TGF)-βによりもたらされている可能性に着目し、皮膚線維芽細胞における TGF-βによる tenascin-C 産生促進作用の機序について検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 胎児の背部皮膚由来の線維芽細胞を用いて、免疫ブロッティングおよびノーザンブロッティングにより TGF-βが TN-C 蛋白および mRNA 発現を誘導することを確認した。さらに TGF-β刺激下あるいは無刺激下における mRNA の stability を比較したところ、半減期に有意差は認められなかった。TGF-β刺激によって TN-C mRNA が増加する一方で mRNA の半減期が増加しないことより、TGF-βによる TN-C mRNA の発現亢進は転写レベルで調節されていることが示唆された。
2. chloramphenicol acetyltransferase assay を用いた TN-C 遺伝子 promoter 領域の 5'-deletion の解析により、同遺伝子 promoter の-133～-29bp 領域に TGF-βに対する responsive element が存在すると考えられた。また、この領域に存在する CAGA motif に対する Smad2/3 の結合能が TGF-β刺激で増強することを DNA affinity precipitation assay を用いて確認した。
3. Smad3、Smad4、加えて Ets1 および Sp1 の強発現により無刺激下においても TN-C 蛋白発現およびプロモーター活性の亢進がみられ、また TGF-βの蛋白誘導作用およびプロモーター活性化作用は増強した。さらに、CAGA motif およびこの領域の Ets binding site および Sp1/3 binding site の substitution mutation では TGF-βの作用が抑制されたのに加え、免疫沈降法では TGF-β刺激により Smad3・Sp1・Ets1 間の interaction が誘導された。以上より、これら 3 つの転写因子は TGF-β刺激により複合体を形成することで TN-C 遺伝子の転写活性を調節している可能性があると考えられた。
4. wild type CBP あるいは p300 強発現下では TN-C プロモーター活性に対する TGF-βの作用は増強するが、逆にこれらの dominant negative mutant の強発現

により TGF-βの作用は抑制された。よって、両者もまた TGF-βによる TN-C の発現増強に関与すると考えられた。

以上、本論文はTGF-βによるTN-C遺伝子転写活性亢進にはSmad3とEts1、Sp1、CBP/p300 間の interaction が必要であることを明らかにした。本研究はこれまで解析が進んでいなかった TN-C のサイトカインレギュレーションについて包括的な検討を加えており、そ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。