

論文の内容の要旨

論文題目 **Rapamycin** 添加による強皮症皮膚線維芽細胞の
 Type I collagen 産生に対する影響について

指導教員 玉置 邦彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 玉城 善史郎

要旨

1) 目的と背景

全身性強皮症(systemic sclerosis: SSc) は、皮膚や肺などの内臓諸臓器の線維化を特徴とする疾患であり、皮膚の線維化の範囲の広い diffuse cutaneous SSc (dcSSc) と皮膚の線維化が四肢末端に限局する limited cutaneous SSc (lcSSc)に分類される。皮膚の線維化を起こす機序の一つとしてコラーゲン分子の代謝異常との関連が示唆されている。

膠原線維の主成分はコラーゲンであり、特に哺乳類においては I 型コラーゲンがその主成分と考えられている。I 型コラーゲンは皮膚においては主として皮膚線維芽細胞で作られていることが知られており、皮膚の線維化に関しては I

型コラーゲン過剰産生、分解能の低下が重要な役割を果たしていると考えられている。皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲンの合成亢進において TGF- β が中心的な役割を果たしていると考えられており、コラーゲンの遺伝子転写活性や蛋白産生を亢進させることが知られている。また、皮膚の線維化の分解において、重要な分子として MMP-1 があり、I 型コラーゲンなどの細胞外基質を分解することで、皮膚の線維化を抑制している。TGF- β などによる線維化の亢進と MMP-1 などによる線維化の抑制がバランスよく働くことで皮膚の線維化が調節されていると考えられている。

全身性強皮症の皮膚の線維化の治療に関して、近年免疫抑制剤が注目がされており、シクロスポリン A や FK506 が線維化抑制に有用であったとの報告も見られているが、副作用として腎障害が高頻度にみられている。

Rapamycin は mTOR (mammalian target of rapamycin) とよばれる蛋白に結合することで、p70S6kinase などの分子の活性化を阻害し、I 型コラーゲンを含めた蛋白合成や細胞の増殖、成長を抑制すると考えられている。近年、rapamycin の線維化抑制作用も注目されるようになり、rapamycin が培養細胞における細胞外基質の産生を抑制するとの報告が多数見られる。Rapamycin は他の免疫抑制剤に比較して腎毒性が非常に低く、海外で既に移植後の免疫抑制剤として活用されており、今後、強皮症患者の皮膚の線維化に対しても有効な薬剤として期待できる。今回、我々は rapamycin のこのような線維化抑制作用について、特に I 型コラーゲンの産生、分解に対する作用やそのメカニズムに関して検討した。

2) 対象及び方法

強皮症皮膚線維芽細胞は、発症2年以内でdiffuse typeに分類される全身性強皮症患者の前腕伸側より得た。これらの検体の採取は東京大学医学部倫理委員会

の規定に基づき、被験者の承認を得た上で行った。正常皮膚線維芽細胞は、健康人の前腕伸側より得た。強皮症あるいは正常皮膚線維芽細胞を用いて、細胞をsubconfluentまで培養した後に実験を行った。細胞生存率測定はTrypan blue染色を用いて行った。強皮症及び正常皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン、MMP-1及びphospho-p70S6kinaseの蛋白量はWestern blotting法を用いて測定した。また、強皮症皮膚線維芽細胞のI型コラーゲンとMMP-1のmRNA発現量測定およびI型コラーゲンのmRNA stabilityの測定にQuantitative Real-Time RT-PCR法を用いた。強皮症皮膚線維芽細胞のI型コラーゲンおよびMMP-1の遺伝子転写活性をluciferase assay法を用いて測定した。統計学的検討はMann-Whitney U testを用いた。危険率 $p < 0.05$ のものを有意とした。

3) 結果と考察

はじめに rapamycin の強皮症皮膚線維芽細胞に対する細胞毒性について検討したところ、今回の 10 nM までの実験の範囲内では細胞毒性はみられなかった。このことは移植後の免疫抑制療法として使用される場合の血中濃度が約 10nM であることから今回の実験で用いた濃度は臨床で使用される範囲内であり、かつ細胞毒性の問題はないと考えられた。

次に 正常皮膚線維芽細胞において、rapamycin 添加により I 型コラーゲンの蛋白量が 0.1nM 以上で有意に低下しており、過去の報告と一致した。

正常皮膚線維芽細胞は TGF- β 刺激により、I型コラーゲン蛋白量の亢進がみられ、強皮症皮膚線維芽細胞に似た特徴を示すことが知られている。今回用いた正常皮膚線維芽細胞においても TGF- β 刺激により、I型コラーゲン蛋白量の亢進がみられた。さらに、TGF- β 刺激を行った正常皮膚線維芽細胞に rapamycin を添加すると I 型コラーゲン蛋白量が 1nM 以上の濃度で有意に低下した。

次に、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞の間での I 型コラーゲンの

蛋白量、mRNA 発現量について検討したところ、蛋白、mRNA レベルでともに亢進しており、過去の報告とほぼ同様の結果がみられた。強皮症皮膚線維芽細胞においても rapamycin 添加により I 型コラーゲンの蛋白量の低下がみられるか検討したところ、0.1nM~10nM と比較的 low 濃度の範囲で I 型コラーゲンの蛋白量の低下がみられることが示された。

次に、rapamycin による I 型コラーゲン蛋白の発現抑制作用がどのような機序で行われているかを検討するために、rapamycin 添加による I 型コラーゲンの mRNA 発現量、遺伝子転写活性、mRNA stability を測定した。その結果、I 型コラーゲンの mRNA の発現量が低下し、mRNA stability の低下も見られたが、遺伝子転写活性には有意な変化はみられなかった。従来よりコラーゲンの発現制御に関しては、mRNA stability が重要な調節因子であることが示されていたが、今回の実験により、強皮症皮膚線維芽細胞において、rapamycin 添加による I 型コラーゲン産生低下に mRNA stability が関与していることが示された。

ヒト肺線維芽細胞において rapamycin が MMP-1 の蛋白、mRNA の発現量を亢進させたという報告もみられるため、強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による supernatant 中の I 型コラーゲン蛋白量低下に MMP-1 が関与しているかどうかについて検討した。強皮症皮膚線維芽細胞において rapamycin 添加により、cell lysate, supernatant とともに MMP-1 の蛋白量の有意な亢進、さらに mRNA 発現量の亢進もみられた。MMP-1 の mRNA 発現量の亢進に関しては MMP-1 遺伝子転写活性の亢進によるものであることも示された。以上のことから、rapamycin は強皮症皮膚線維芽細胞に作用し、MMP-1 の産生亢進、分泌増加を促すことによって、細胞外に分泌された I 型コラーゲンの分解やその過剰沈着を抑制する可能性が示唆された。

皮膚線維芽細胞では他の細胞と同様に I 型コラーゲンの蛋白合成に関しても p70S6kinase のリン酸化が重要であるとの報告がみられるため、強皮症皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン産生過剰に重要な役割を示す TGF- β が p70S6 kinase のリン酸化に関与するかどうかを調べた。その結果、TGF- β 刺激にて p70S6 kinase のリン酸化がおこり、24 時間以上続くことが示された。これにより、強皮症皮膚線維芽細胞において TGF- β による I 型コラーゲンの蛋白発現増加に p70S6 kinase のリン酸化が関与している可能性が示唆された。さらに、強皮症皮膚線維芽細胞に TGF- β 刺激を加えた後に rapamycin 添加した場合、無刺激下の状態よりも p70S6 kinase のリン酸化が抑制された。このことより、強皮症皮膚線維芽細胞における rapamycin 添加による I 型コラーゲンの低下には P70S6kinase のリン酸化の抑制が関与している可能性が考えられた。以上のことより、rapamycin は強皮症皮膚線維芽細胞に働きかけることで、1) I 型コラーゲンの message stability の低下、2) 翻訳抑制による I 型コラーゲン蛋白の産生を低下、さらに 3) MMP-1 蛋白量の亢進を促すことにより、I 型コラーゲンの過剰沈着を抑制していると考えられた。これらから、rapamycin が全身性強皮症の皮膚の線維化を抑制することのできる有効な薬剤になりえると考えられた。

今回、我々の実験では、培養皮膚線維芽細胞において rapamycin が I 型コラーゲン蛋白の産生を抑制し、分解を促進することを示した。今後の臨床応用を考えると、皮膚硬化モデルマウスなどを使った in vivo での rapamycin の線維化抑制作用の検討が必要であると考えられた。全身性強皮症において、皮膚の線維化はしばしば大小関節の可動域の低下を引き起こすことにより、食事や歩行動作などの日常生活に様々な支障をきたす。Rapamycin は他の免疫抑制剤に比較して腎毒性が非常に低いという利点があり、皮膚の線維化を抑制する薬剤

として有望であると考えた。今回は皮膚の線維化に関する検討のみであったが、全身性強皮症では皮膚以外の臓器においても肺線維症や強皮症腎といった線維化をもたらす重篤な症状もみられ、それらに対しても有効である可能性が考えられた。