

# ウマの腱組織における腫瘍壊死因子 (TNF) $\alpha$ の 機能に関する研究

## 学位論文内容の要旨

本研究は、ウマ腱細胞を用いて腱炎の発症から組織修復に至る一連の過程での腫瘍壊死因子(TNF) $\alpha$ の機能を詳細に検討したものである。

浅指屈筋腱炎は、ウマの運動器障害の一つで、我が国の競走馬の 1,100-1,200 頭が本障害に罹患している。本障害は発症すると完治が困難である上に炎症経過後に生ずる瘢痕が腱組織を脆弱化させ、トレーニング再開の際に腱炎を再発させる要因ともなっている。TNF $\alpha$ は、結合組織疾患において組織変性、アポトーシスや細胞増殖などの病態進行に深く関わっているが、腱炎発生から瘢痕形成に至る一連の治癒過程での TNF $\alpha$ に関する情報不足は、効果的な予防および治療法の確立を妨げている。腱における TNF $\alpha$ の機能解明することは、腱組織の動態、特に炎症による組織変性の進行を理解し、腱炎の進行をくい止め、早期治療を行う上で有効な手段を提供する。本論文では、ウマ腱細胞を用いた炎症性サイトカインの一つである TNF $\alpha$ に焦点を当て、以下の総合的研究を行った。

すなわち、第 1 章ではウマの浅指屈筋腱における正常腱、炎症腱および瘢痕形成腱を観察し、TNF $\alpha$ の発現と TNF-R1 を介する細胞内シグナル伝達因子の分布を明らかにした。第 2 章では、ウマ損傷腱組織でアポトーシスが TNF-R1 を介する機構によって誘導されていることを解明した。さらに、第 3 章では培養ウマ腱細胞を用い TNF $\alpha$ 添加による腱細胞の応答性を明らかにした。

### 第 1 章 ウマの正常腱、炎症腱および瘢痕形成腱組織における腫瘍壊死因子(TNF) $\alpha$ と TNF-receptor1(TNF-R1)の発現

炎症性サイトカインの発現と動態を、ウマ浅指屈筋正常腱、炎症腱そして瘢痕形成腱と比較した。さらに、TNF $\alpha$ の発現と TNF-R1 を介する細胞内シグナル伝達因子の分布を明らかにした。TNF $\alpha$ を含む 4 種類の炎症性サイトカインを免疫組織化学的に検索したところ、いずれの炎症性サイトカインも正常腱では検出されなかったのに対し、炎症腱では 4 種類すべてのサイトカインに対して高い割合で腱細胞が陽性を示した。次に生存とアポトーシスという全く相反する作用を細胞に誘導する TNF $\alpha$ に注目し TNF-R1、TNF receptor-associated factor-2 (TRAF-2)、caspase-3 の動態を形態学的、生化学的に検索した。その結果、ウマの浅指屈筋正常腱、炎症腱および瘢痕形成腱のいずれも TNF $\alpha$  mRNA お

よびタンパク質の持続的な発現を認めた一方で、TNF-R1、TRAF-2 および caspase-3 は炎症腱でのみ強い発現を示した。これらは正常および癒痕形成腱ではきわめて微弱であった。さらに、活性型 caspase-3 は炎症腱でのみ検出された。本研究によりウマ腱細胞にも TNF $\alpha$ による TNF-R1 を介したシグナル伝達経路の存在することが明らかとなった。

## 第2章 ウマ腱炎における細胞死関連因子の発現

炎症腱組織中におけるアポトーシスの有無を検索し、そのメカニズムを考察した。TUNEL 法、caspase-3、ssDNA 免疫染色によって、正常腱ではアポトーシス細胞が検出されなかったのに対し、炎症腱では多数の陽性細胞が認められた。さらに活性型 caspase-3 が炎症腱のみから検出されたことより、腱細胞のアポトーシスが caspase 依存性経路を介することが示された。

本結果より、炎症時のウマ腱細胞に、アポトーシスの出現することが示された。腱細胞のアポトーシス亢進は、腱細胞数の大幅な減少をもたらし、腱組織におけるコラーゲンの合成能と分解能の低下に関連することから、腱の機能的破綻を意味する。炎症時における腱細胞のアポトーシス亢進は、腱組織の脆弱化、腱炎の再発、治癒遅延の危険因子と考えられた。

## 第3章 培養ウマ腱細胞における TNF $\alpha$ の意義

TNF $\alpha$ 刺激と TNF 受容体および細胞内シグナル伝達因子との関連性を明らかにするため、5 種類のシグナル伝達因子、すなわち、TNF-R1、TNF-R2、TRAF-2、NF- $\kappa$ B そして caspase-3 に注目し、これら因子の培養腱細胞における動態を検索した。その結果、TNF $\alpha$  の腱細胞に対する生物活性は濃度依存性であることが明らかとなった。すなわち、TNF $\alpha$  の添加量が中濃度では細胞数の増加傾向を、高濃度では細胞数の減少傾向を、低濃度では細胞数の維持傾向を示した。TNF 受容体の存在は培養液中の TNF $\alpha$ 存在の有無によって大きく変化した。成長培地に TNF $\alpha$ を 10 ng/ml 添加した TNF $\alpha$ 処理細胞 (Tt 細胞) は、抗 TNF-R1 抗体に対して免疫染色で強い陽性反応を示したが、正常細胞における反応は明らかに Tt 細胞より弱かった。一方、抗 TNF-R2 抗体に対しては正常細胞も Tt 細胞も強い陽性反応を示した。正常細胞における 2 種類の TNF 受容体の分布を比較すると、TNF-R2 が R1 より広範囲であった。さらに、TRAF2、NF- $\kappa$ B および caspase-3 も Tt 細胞では正常細胞と比較して強い反応が現れるようになった。以上のことより、培養腱細胞の増殖性は TNF $\alpha$ の濃度に依存すること、そしてそれは TNF-R2 から TNF-R1 への ligand passing に起因すること、さらに TNF-R1、TNF-R2、TRAF-2、NF- $\kappa$ B および caspase-3 は、腱細胞の動態を反映することが明らかとなった。

本研究により、TNF $\alpha$ に対する腱細胞の細胞応答の詳細が明らかとなり、TNF 受容体を介した細胞内シグナル伝達機構を明らかにすることができた。腱細胞の細胞動態に関する知見と本研究によって明らかにしたウマ腱細胞における TNF 受容体を介した細胞内シグナル伝達機構の特性を応用することで、腱炎の発症予防と治癒促進が可能であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 昆 泰 寛  
副 査 教 授 桑 原 幹 典  
副 査 教 授 梅 村 孝 司  
副 査 助 教 授 奥 村 正 裕

学 位 論 文 題 名

## ウマの腱組織における腫瘍壊死因子 (TNF) $\alpha$ の 機能に関する研究

本研究はウマの腱組織を用いて、腱炎の発症から組織修復に至る一連の過程での腫瘍壊死因子(TNF) $\alpha$ の機能を検討したものである。

第 1 章では、炎症性サイトカインの発現と動態を、ウマ浅指屈筋正常腱、炎症腱ならびに癒痕形成腱で比較した。4 種類の炎症性サイトカインを免疫組織化学的に検索したところ、いずれの炎症性サイトカインも正常腱では検出されなかったのに対し、炎症腱ではすべてのサイトカインに対して高い割合で腱細胞が陽性を示した。次に、TNF $\alpha$ 、TNF-receptor 1 (TNF-R1)、TNF receptor-associated factor-2 (TRAF-2)、caspase-3 の動態を形態学的、生化学的に検索した結果、正常腱、炎症腱および癒痕形成腱のいずれも TNF $\alpha$ の持続的な発現を認めた。一方、TNF-R1、TRAF2 および caspase-3 は炎症腱でのみ強い発現を示した。さらに、活性型 caspase-3 は炎症腱でのみ検出された。本研究によりウマ腱細胞にも TNF $\alpha$ による TNF-R1 を介したシグナル伝達経路の存在することが明らかとなった。

第 2 章では、ウマ炎症腱組織におけるアポトーシスの有無を検索し、その発現機構を検討した。その結果、炎症腱細胞でのアポトーシスは caspase 依存性に誘導されることが明らかとなった。また、腱細胞のアポトーシス亢進がコラーゲン合成能・分解能を低下させ腱機能を破綻させていることから、アポトーシスは腱炎の再発・治癒遅延の危険因子である可能性が示された。

第 3 章では、ウマ培養腱細胞を用い TNF $\alpha$ 刺激とシグナル伝達因子 [TNF-R1、TNF-R2、TRAF2、nuclear factor (NF)- $\kappa$ B、caspase-3] との関連を検討した。その結果、腱細胞に対する TNF $\alpha$ の生物活性は濃度依存性であることが明らかとなった。すなわち、TNF $\alpha$ の添加量が中濃度では細胞数の増加傾向を、高濃度ではその減少傾向を、低濃度ではその維持傾向を示した。TNF 受容体発現は培養液中の TNF $\alpha$ 量によって大きく変化した。すなわち、TNF $\alpha$ 感作細胞(Tt 細胞)は、TNF-R1 を強く発現したが、正常細胞のそれは弱かった。一方、TNF-R2 は正常細胞も Tt 細胞も強い発現を示した。正常細胞における 2 種類の TNF 受容体の細胞内分布を比較すると TNF-R2 が R1 より広範囲であった。さらに、TRAF2、NF- $\kappa$ B および caspase-3

も Tt 細胞では正常細胞に比較して強く発現していた。以上のことより、培養腱細胞の増殖性は TNF $\alpha$ の濃度に依存すること、それは TNF-R2 から TNF-R1 への ligand passing に起因すること、さらに TNF-R1、TNF-R2、TRAF2、NF- $\kappa$ B および caspase-3 は、腱細胞の動態を反映することが明らかとなった。

本研究は、ウマ腱細胞と TNF $\alpha$ との直接の相関関係を明らかにしたものであり、TNF $\alpha$ のコントロールが腱炎治療においてきわめて重要であることを提示した優れた研究内容であると評価できる。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者保坂善真氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。