

TNF α 変換酵素の過剰発現が炎症・線維化病態に 及ぼす影響について

学位論文内容の要旨

【背景と目的】TNF α 変換酵素 (TACE) は ADAM ファミリーに属する I 型膜蛋白で、免疫や発生・分化に関わる多様な膜型蛋白を細胞膜から切断し、可溶型蛋白に変換する酵素である。TACE は prodomain を含む約 120kDa の非活性型として産生された後、furin により prodomain の切断を受けることによって約 100kDa の活性型となり、細胞膜表面に運ばれ基質と接触し、酵素としての機能を発揮する。実験的に関節炎モデルや LPS 投与による急性肺障害モデル、ブレオマイシン誘導皮膚硬化モデルなどで TACE 阻害薬の有効性が認められることや、ヒトでは発症早期強皮症患者の末梢血単球における TACE の発現亢進と治療による発現低下が報告されていることから、TACE の過剰発現または活性化の亢進が関節リウマチや強皮症などにおける炎症・線維化病態に関わっている可能性が示唆される。本研究では、TACE の炎症性疾患や線維化病態への関与を明らかにするために、TACE を全身臓器で過剰発現する TACE 遺伝子導入マウス (TACE-Tg) を作製し、解析を行った。

【材料と方法】マウス由来の全長 TACE cDNA の 3' 側に FLAG タグを付加したコンストラクトを β -actin プロモーターにより全身発現させた TACE-Tg を作製した。対照には同週齢の野生型マウス (WT) を用いた。マウスの各臓器または培養細胞における TACE, I 型コラーゲン, α SMA の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。蛋白発現の評価として、抗 TACE 抗体と抗 FLAG 抗体を用いて western blotting を行った。TACE 活性はキットを用いて測定した。TACE-Tg および WT の背部皮膚から初代線維芽細胞を培養し、PMA, LPS, ブレオマイシン, lysophosphatidic acid で刺激し、TACE 活性型への変化を western blotting で調べた。PMA (0.08 μ g/100 μ l PBS) を TACE-Tg および WT の背部皮下 2 か所に投与し、1 日後と 7 日後に犠牲死させ、投与部位の皮膚の一方から組織標本を作製し、もう一方から RNA 抽出または蛋白抽出を行った。皮膚 HE 標本について、投与部位とその中心から 1 cm 離れた周囲の正常部位で真皮厚を計測した。TACE-Tg および WT の培養線維芽細胞を PMA 刺激した後にリアルタイム RT-PCR 法で I 型コラーゲンおよび α SMA 発現の変化を測定した。

【結果】6 週齢の TACE-Tg の各臓器における TACE mRNA の発現は WT よりも高く、導入遺伝子由来蛋白の発現が TACE-Tg の全身臓器で確認された。導入遺伝子由来 TACE 蛋白は主として約 120kDa の非活性型として検出された。6 週齢の TACE-Tg の全身組織を WT と比較したが、明らかな組織学的違いは認められなかった。導入遺伝子由来の TACE が活性を持つことを確認するため、TACE-Tg の皮膚と筋肉の組織抽出液に furin を反応させたところ、無刺激時に TACE 活性は TACE-Tg と WT で同程度であったが、TACE-Tg では furin 濃度依存的に活性型に変換され、それに伴い酵素活性も有意に上昇した。Furin に代わる生体内に投与可能な刺激物質を探索するため、培養線維芽細胞を各種物質で刺激したところ、PMA が最も強く TACE を活性型に変換した。PMA の個体レベルでの作用を調べるため、PMA をマウスに皮下投与した。PMA 投与後の皮膚では、1 日目の TACE-Tg において TACE が活性型に

変換されていることが確認された。7日目には活性型 TACE の量は投与前のレベルに戻っていた。PMA 投与後 1 日目の皮膚では、皮下組織に強い好中球浸潤が見られたものの、炎症細胞の種類や浸潤の程度には TACE-Tg と WT では明らかな差は認めなかった。PMA 投与後 7 日目では真皮が肥厚し、皮下組織には瘢痕状の線維化が誘導された。PMA 投与周辺の正常部位の真皮厚に対する PMA 投与部の真皮厚の比を計測したところ、TACE-Tg では WT に比べて有意に高い値であった。同様に 7 日目の皮膚における I 型コラーゲンと α SMA の発現を TACE-Tg と WT で比較したところ、統計学的な有意差は認められなかったものの TACE-Tg で高い傾向を示した。皮膚線維芽細胞における TACE の量的な差が TACE-Tg と WT の組織学的変化の差を生じさせたことを裏付けるために、初代培養線維芽細胞を PMA 20 nM および 1300 nM で刺激し、I 型コラーゲン、 α SMA の mRNA 発現を検討した。その結果、I 型コラーゲンについては TACE-Tg 由来線維芽細胞において PMA の濃度依存的に発現が亢進し、1300nM では無刺激と比較して有意差を認めた。このことから、皮膚線維芽細胞の TACE の過剰な発現と活性化が I 型コラーゲン発現に促進的に働くことが示唆された。

【考察】TACE-Tg は強皮症あるいは関節炎モデルになることが期待されたが、作製した TACE-Tg は無刺激時には固有の表現型を示さなかった。無刺激状態では導入遺伝子由来の TACE はほとんどが非活性型として組織中に存在しており、酵素活性も WT と同等であった。このことが、TACE-Tg と WT に明らかな表現型の差が表れなかった原因と考えられた。Furin に代わる生体に投与可能な TACE 活性化刺激を検討したところ、PMA が最も効率良く TACE を活性型に変換することが分かった。PMA をマウスに皮下投与したところ、1 日目の TACE 活性化に引き続いて 7 日目には皮膚線維化が誘導された。これまでに PMA 刺激を皮膚線維化誘導物質として用いたモデルはなく、本研究で初めて単回の PMA 投与で皮膚線維化を誘導できること、また、この系において TACE が線維化に促進的に関与することを示した。PMA 皮下投与による TACE-Tg と WT の皮膚線維化の程度の違いは線維芽細胞における TACE の量的な差とそれによる基質切断の差から生じたと考えられた。具体的にどのような TACE 基質が関わっているかは現段階では不明であるが、線維化病態に関わる TACE 基質を介したシグナル経路の候補のひとつとして、EGF レセプターリガンドが TACE-Tg で過剰となり、線維芽細胞の増殖あるいは I 型コラーゲン発現に影響した可能性が考えられる。複数の EGF レセプターリガンドが TACE で切断されることが知られており、切断された EGF レセプターリガンドが線維芽細胞上に発現する EGF レセプターに autocrine, paracrine に作用し、細胞外マトリックスの産生や増殖が促進される可能性が考えられる。具体的にどのような EGF レセプターリガンドが関与するかを今後さらに検討したい。

【結論】TACE を全身臓器で過剰発現する TACE-Tg を作製した。通常の飼育環境下では導入遺伝子由来の TACE が活性化されないため、TACE-Tg 固有の表現型が観察されなかったが、PMA 刺激により TACE 活性化が誘導され、新たな皮膚線維化モデルを作製できた。このモデルを用いることにより、皮膚線維芽細胞における TACE の過剰な発現と活性化が皮膚の線維化に対して促進的に作用することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 西 村 正 治

副 査 教 授 笠 原 正 典

学 位 論 文 題 名

TNF α 変換酵素の過剰発現が炎症・線維化病態に 及ぼす影響について

TNF α 変換酵素 (TACE) は ADAM ファミリーに属する I 型膜蛋白で、免疫や発生・分化に関わる多様な膜型蛋白を細胞膜から切断し、可溶型蛋白に変換する酵素である。ヒトでは発症早期強皮症患者の末梢血単球における TACE の発現亢進と治療による発現低下が報告されているが、病態における TACE の役割は不明な点が多い。

本研究では、TACE の炎症性疾患や線維化病態への関与を明らかにすることを目的とした。研究には、マウス由来の全長 TACE cDNA の 3' 側に FLAG タグを付加したコンストラクトを β -actin プロモーターにより全身発現させた TACE-Tg を作製し、対照には同週齢の野生型マウス (WT) を用い解析を行った。6 週齢の TACE-Tg の各臓器における TACE mRNA の発現は WT よりも高く、導入遺伝子由来蛋白の発現が TACE-Tg の全身臓器で確認された。導入遺伝子由来 TACE 蛋白は主として非活性型として検出され、このことが TACE-Tg と WT に明らかな表現型の差が表れなかった原因と考えられた。

導入遺伝子由来の TACE が活性を持つことを確認するため、TACE-Tg の皮膚と筋肉の組織抽出液に furin を反応させたところ、TACE-Tg では furin 濃度依存的に活性型に変換され、それに伴い酵素活性も有意に上昇した。Furin に代わる生体内に投与可能な刺激物質として PMA に着目し、PMA (0.08 μ g/100 μ l PBS) を TACE-Tg および WT の背部皮下 2 か所に投与し、1 日後と 7 日後に犠牲死させ、投与部位の皮膚の一方から組織標本を作製し、もう一方から RNA 抽出または蛋白抽出を行った。皮膚 HE 標本について、投与部位とその中心から 1 cm 離れた周囲の正常部位で真皮厚を計測した。PMA 投与後の皮膚では、1 日目の TACE-Tg において TACE が活性型に変換されていることが確認された。7 日目には活性型 TACE の量は投与前のレベルに戻っていた。PMA 投与後 1 日目の皮膚では、皮下組織に強い好中球浸潤が見られたものの、炎症細胞の種類や浸潤の程度には TACE-Tg と WT では明らかな差は認めなかった。PMA 投与後 7 日目では真皮が肥厚し、皮下組織には瘢痕状の線維化が誘導された。PMA 投与周辺の正常部位の真皮厚に対する PMA 投与部の真皮厚の比を計測したところ、TACE-Tg では WT に比べて有意に高い値であった。

同様に 7 日目の皮膚における I 型コラーゲンと α SMA の発現を TACE-Tg と WT で比較したところ、統計学的な有意差は認められなかったものの TACE-Tg で高い傾向を示した。皮膚線維芽細胞における TACE の量的な差が TACE-Tg と WT の組織学的変化の差を生じさせたことを裏付けるために、初代培養線維芽細胞を PMA 20 nM および 1300 nM で刺激し、I 型コラ

ーゲン、 α SMA の mRNA 発現を検討した。その結果、I 型コラーゲンについては TACE-Tg 由来線維芽細胞において PMA の濃度依存的に発現が亢進し、1300nM では無刺激と比較して有意差を認めた。このことから、皮膚線維芽細胞の TACE の過剰な発現と活性化が I 型コラーゲン発現に促進的に働くことが示唆された。本研究で初めて単回の PMA 投与で皮膚線維化を誘導できること、また、この系において TACE が線維化に促進的に関与することを示した。PMA 皮下投与による TACE-Tg と WT の皮膚線維化の程度の違いは線維芽細胞における TACE の量的な差とそれによる基質切断の差から生じたと考えられた。線維化病態に関わる TACE 基質を介したシグナル経路の候補の一つとして、EGF レセプターリガンドが TACE-Tg で過剰となり、線維芽細胞の増殖あるいは I 型コラーゲン発現に影響した可能性が考えられる。複数の EGF レセプターリガンドが TACE で切断されることが知られており、切断された EGF レセプターリガンドが線維芽細胞上に発現する EGF レセプターに autocrine、paracrine に作用し、細胞外マトリックスの産生や増殖が促進される可能性が考えられる。以上から、本研究により皮膚線維芽細胞における TACE の過剰な発現と活性化が皮膚の線維化に対して促進的に作用することが明らかとなった。

質疑応答では、副査の笠原正典教授より、PMA 投与局所での TACE 活性、組織切片上の線維化の測定法、PMA 投与部での TACE 基質の変化、ヒト強皮症患者の皮膚における TACE 活性について、副査の西村正治教授からは、TACE-Tg とヒト強皮症の線維化病態との類似点・相違点、PMA 投与部での線維化の範囲、肺で TACE を多く発現している細胞がなにかの質問があった。主査の小池隆夫教授からは、ヒト強皮症の単球でみられた TACE の高発現と TACE-Tg を用いて示した TACE の向線維化作用のつながりをどう考えるか、炎症・線維化病態において TACE 阻害を行うことの展望についてどう考えるかについて質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

この論文は、TACE の誘導型高発現モデルを新規に作製し、線維化促進作用を In vivo および In vitro で解析したことが高く評価され、今後の TACE 基質の病態における役割の解析や TACE をターゲットとした治療応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。