

論文内容の要旨

皮膚線維化過程における CTGF 発現に対する SRF, MRTF 関与の検討

(梁川志保)

(岩手医学会雑誌 67 巻, 1 号 2015 年 4 月掲載 (予定))

I. 研究目的

肺, 腎などの臓器の線維化には筋繊維芽細胞への形質転換や上皮-間葉転換 (EMT) が関与していることが分かっており, TGF- β 刺激がこれらの細胞の形質変化および線維化の重要な起因となる. これに関与しているのがアクチン細胞骨格依存性の転写調節因子 MRTF (Myocardin-related transcription factor) ファミリーであり, TGF- β 刺激に伴うアクチン線維安定化によって単量体アクチンの結合が外れることで活性化され, 転写因子 SRF (Serum response factor) を介して形質転換を起こす. 一方, CCN ファミリーの 1 つである CTGF (CCN2) もまた各臓器の線維化に深く関与していると考えられている因子であり, 細胞増殖, 細胞外マトリックスの産生, 細胞遊走および血管新生を亢進させるなど多岐にわたる作用を持つことが知られる. CTGF 遺伝子の転写調節領域には SRF 認識配列となる CArG 配列が存在しているが, SRF を介した CTGF 発現の制御については未解明な部分が多い.

本研究では, 培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いて TGF β 依存的な CTGF の発現調節における SRF および MRTF ファミリーの関与について検証し, その活性制御の分子メカニズムについて解析を行った. さらに筋線維芽細胞への形質転換における CTGF の役割について解明を試みた.

II. 研究対象ならび方法

培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いた実験系により, TGF- β 刺激に対する CTGF を始めとする線維化関連遺伝子の発現変化および細胞の形質変化を検討した. MRTF や SRF, CTGF などの siRNA による遺伝子発現抑制, 各種シグナル伝達経路の阻害薬を用いたアプローチによって, TGF β 依存的な細胞応答への影響を real-time-PCR 法および Western blotting 法, 免疫染色などの手法により解析した.

III. 研究結果

1. SRF の発現抑制により, TGF- β 24 時間刺激後の CTGF mRNA およびタンパク質発現量が有意に減少した ($p < 0.01$). しかし, MRTF の発現抑制では減少しなかった.
2. MRTF の活性化を引き起こす Jasplakinolide の添加によって, CTGF mRNA 発現量は増加しなかった.
3. p38MAPK の阻害薬 (SB220025) 添加により, 有意に TGF- β 刺激 24 時間後の CTGF mRNA 発現量が減少した ($p < 0.05$). 逆に, p38MAPK 活性化剤 (anisomycin) により有意に CTGF mRNA 発現量が増加した ($p < 0.05$).
4. SRF の co-factor であり, MAP キナーゼ活性制御を受ける ternary complex factor (TCF) の発現抑制により, TGF- β 刺激 24 時間後の CTGF mRNA およびタンパク質発現量が有意に減少した ($p < 0.01$).
5. CTGF を発現抑制することにより, 筋繊維芽細胞への形質転換の指標となる α -SMA 発現量 (TGF- β 刺激 120 時間後) が mRNA およびタンパク質ともに有意に減少した ($p < 0.01$). 免疫染色においても, α -SMA 発現の減少を認めた.

IV. 結 語

ヒト皮膚線維芽細胞において, TGF β 依存的な CTGF 発現誘導には SRF による転写活性化が重要であり, その調節経路として p38MAPK-TCF/ SRF 経路が関与していることを明らかにした. 一方で, 関与が示唆されていた MRTF について, 皮膚線維芽細胞における TGF β による速やかな CTGF 発現誘導には必要ではないことを明らかにした. また, 組織線維化の過程に深く関わる筋繊維芽細胞への形質転換において, CTGF の発現誘導が必須である事を明らかにした. 今回解明した p38MAPK-TCF/SRF による CTGF の発現制御を標的にした CTGF の発現抑制, あるいは CTGF タンパク質に対する機能阻害は皮膚線維化病変に対する治療ターゲットとなり得ると考えられた.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 石田 陽治 教授 (内科学講座：血液腫瘍内科分野)

副査 赤坂 俊英 教授 (皮膚科学講座)

副査 久保田 美子 准教授 (生化学講座：分子医科学分野)

線維化病変を誘発する代表的な因子であるCTGFの発現誘導と筋線維芽細胞への形質転換は、どちらもTGF β という共通のシグナルにより生じる。CTGF遺伝子の転写調節領域には筋線維芽細胞への形質転換に関わる転写因子SRFの認識配列が存在しているが、SRFを介したCTGF発現の制御については未解明な部分が多い。本研究論文は、TGF β 依存的なCTGFの発現調節におけるSRFの関与および筋線維芽細胞への形質転換におけるCTGFの役割に着目し、皮膚線維芽細胞を用いてその制御メカニズムを細胞生物学的に検証した論文である。SRFはp38MAPKおよび転写調節因子TCFの活性化を介してCTGF発現を制御していることを明らかにした。さらにCTGFの発現抑制によって筋線維芽細胞への形質転換を示唆する α -SMA発現が減少した。これは、ヒト皮膚線維芽細胞においてTGF β 依存的なCTGF発現誘導経路としてp38MAPK-TCF/SRF経路が関与していること、および筋線維芽細胞への形質転換においてCTGFの発現誘導が必須である事を明らかにした論文である。

本論文は、p38MAPK-TCF/SRFによるCTGFの発現制御を標的にした、皮膚線維化病変に対する新しい治療法の確立に役立つ有益な試験を示した研究といえる。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

TGF β 依存的なCTGFの発現調節におけるSRFの関与とその活性制御の分子メカニズムについて、および筋線維芽細胞への形質転換におけるCTGFの役割について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。

参考論文

- 1) 有棘細胞癌を併発した陰部硬化性萎縮性苔癬の女性例 (梁川志保 他2名と共著)
臨床皮膚科, 64巻, 7号 (2010) : p501-504.
- 2) インドメタシン外用が奏功した好酸球性膿疱性毛包炎の1例 (梁川志保 他3名と共著)
臨床皮膚科, 65巻, 1号 (2011) : p13-16.
- 3) 丹毒様の皮疹から進展し、急激な転帰をとったanaplastic large cell lymphomaの1例 (梁川志保 他3名と共著)
臨床皮膚科, 67巻, 6号 (2013) : p436-440.
- 4) 眼瞼浮腫から初発した浮腫性硬化症の1例 (梁川志保 他2名と共著)
皮膚科の臨床, 56巻, 3号 (2014) : p467-470.