

氏名(本籍)	奥野貴史(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第432号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	Interleukin-1 $\beta$ and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Induce Chemokine and Matrix Metalloproteinase Gene Expression in Human Colonic Subepithelial Myofibroblasts (ヒト大腸筋線維芽細胞における炎症性サイトカインによるケモカインおよびマトリックスメタロプロテナーゼの遺伝子発現誘導について)
	審査委員 主査 教授 小笠原 一 誠 副査 教授 瀬戸 昭 副査 教授 三ツ浪 健 一

## 論文内容要旨

### 【目的】

炎症性腸疾患、特にクローン病では、組織の線維化による狭窄がしばしば臨床上の問題となるが、炎症反応による組織の破壊と修復反応が繰り返される結果と考えられ、炎症の制御が線維化を防ぐ重要な課題である。これまで間葉系細胞は、組織の線維化に重要な役割を果たしていると言われてきたが、詳細は明らかではない。最近の見解で、大腸粘膜の基底直下には筋線維芽細胞が密に存在し、この細胞群をヒト正常大腸粘膜から単離、培養する方法をMahidaraらが明らかにした。多くの組織において、炎症反応は細胞外基質の代謝と密接な関係がある。そこで、炎症反応の進展と細胞外基質の代謝に筋線維芽細胞が果たす役割を明らかにするために、炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 刺激による、筋線維芽細胞からの細胞外基質の産生誘導、および炎症の進展に重要なケモカインの産生誘導組織の再構築に重要なマトリックスメタロプロテナーゼ(以下MMP)の産生誘導について検討した。

### 【方法】

1) 筋線維芽細胞はinformed consentを得た上で手術材料よりMahidaraの方法に従い単離した。2) 細胞をIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ 、各種成長因子で刺激し、そのDNA合成能を [ $^3$ H] thymidine取り込み試験でまた細胞外基質の分泌能をウエスタンブロット法で検討した。3) 細胞をIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ で刺激した後、IL-8, MCP-1, MMP-1, MMP-2の蛋白発現をELISA法、mRNAの発現をノーザンブロット法で検討した。4) MMP-2の活性をZymography法で検討した。5) 転写因子NF- $\kappa$ B, NF-IL6の活性化をEMSA法で検討した。6) NF- $\kappa$ Bの阻害剤TPCK, PDTCの効果をノーザンブロット法で検討した。

### 【結果】

1) 免疫染色、電子顕微鏡の観察により、単離した細胞が筋線維芽細胞であると同定した。2) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ はDNA合成能は促進させず、PDGF, b-FGF, IGF-1が促進させた。また、非刺激下の細胞からI型およびIV型コラーゲンの産生が認められた。3) 非刺激下の細胞からIL-8, MCP-1, MMP-1の産生は僅かであったが、MMP-2は大量に産生された。IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ はこの細胞のIL-8, MCP-1, MMP-1の産生を濃度および時間依存性に増強させたが、MMP-2の産生は微増であり活性にも差はなかった。また、細胞外基質の産生にも影響はなかった。4) これらのIL-1 $\beta$ ,

TNF- $\alpha$ の効果は、mRNA発現のレベルでも確認された。5) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ によりNF- $\kappa$ Bの活性化が誘導された。6) NF- $\kappa$ Bの阻害剤PDTC, TPCKの添加はIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ の刺激によるIL-8 mRNA, MCP-1 mRNAの発現を抑制したが、MMP-1 mRNAの発現には影響はなかった。

#### 【考 察】

炎症性腸疾患のような慢性炎症下では、筋線維芽細胞は著しく増殖し、細胞外基質の過剰な産生を誘導し、組織の改変にいたらせる。筋線維芽細胞の増殖はIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ よりはむしろ、PDGF, bFGFにより誘導される。また、筋線維芽細胞は非刺激下で細胞外基質を活発に産生する一方で、MMPsの分泌を通してその分解にも寄与している。MMP-1は主に線維性コラーゲンなどを分解し、MMP-2は主に基底膜を構成するIV型コラーゲンを分解する。細胞は非刺激化で少量のMMP-1と大量のMMP-2を産生する。しかし炎症性サイトカインの刺激下では、MMP-1の産生は著しく増強され、MMP-2の分泌は微増に留まる。つまり、筋線維芽細胞は細胞外基質と基底膜の恒常性の維持に働いているが、炎症刺激が加わるとMMP-1の分泌を通して線維性コラーゲンを分解し、組織の改変に寄与することが示唆される。またケモカインは好中球などの免疫担当細胞の遊走や、内皮への接着を惹起し、活性化させる因子だが、炎症性サイトカインの刺激により、筋線維芽細胞からのその分泌は増強しており、炎症の進展と持続に重要な役割を果たしている。また筋線維芽細胞でのIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ の刺激によるケモカイン誘導はNF- $\kappa$ Bの活性化を伴っているが、MMP-1誘導にはNF- $\kappa$ Bは関与しなかった。実際、NF- $\kappa$ B阻害剤TPCK, PDTCはIL-8, MCP-1mRNAの発現には関与しなかった。筋線維芽細胞のケモカインとMMPsの分泌は異なったシグナル伝達経路にて制御されていることが示され、筋線維芽細胞は炎症の場における分解と修復のバランスを巧みに制御している可能性が示唆された。

#### 【結 語】

筋線維芽細胞におけるケモカインおよびMMPsの分泌が炎症性サイトカインの制御下にあることを示した。大腸の炎症における炎症性サイトカインの重要性について様々な報告はあるが、細胞間の反応の詳細なメカニズムはいまだ明らかではない。炎症における進展と持続、一方の修復における細胞外基質の分解と合成、このバランスの維持に筋線維芽細胞が寄与している可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

炎症性腸疾患の病因については未だに不明な点が多い。本研究では炎症の場におけるケモカイン、MMP産生誘導について、大腸筋線維芽細胞が炎症性サイトカインの制御下にその役割の一端を担っていることを明らかにした。すなわち、正常大腸組織から単離した筋線維芽細胞から1) 細胞外基質は恒常的に産生される、2) IL-8, MCP-1, MMP-1の分泌は恒常的には僅かだが、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ の刺激にてその濃度依存性に増強される、3) MMP-2は恒常的に分泌されIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ の刺激でその分泌はやや増強されるが、その活性については未刺激の状態と変化がない、4) ケモカインとMMPはその遺伝子発現の機序が異なることが示された。このように筋線維芽細胞が大腸局所での炎症の進展と持続、及び組織の改変に寄与している可能性を示した点で博士(医学)の学位論文に値するものである。