



Transforming growth factor- β enhances connective tissue growth factor expression in L6 rat skeletal myotubes

前田, 伸也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3063

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003063>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	前田 伸也
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3063 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 31 日

【 学位論文題目 】

Transforming growth factor- β enhances connective tissue growth factor expression in L6 rat skeletal myotubes(TGF- β は L6 ラット骨格筋管細胞における CTGF の発現を増強させる)

審 査 委 員

主 査	教 授	熊谷 俊一
	教 授	西尾 久英
	教 授	伊藤 光宏

(論文博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Transforming growth factor- β enhances connective tissue growth factor expression in L6 rat skeletal myotubes

TGF- β は L6 ラット骨格筋管細胞における CTGF の発現を増強させる

(指導教員：神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻苅田典夫准教授)

前田 伸也

はじめに

肝臓、腎臓、皮膚や肺など様々な臓器や組織において、TGF- β は線維化に関して重要な役割を果たしていると考えられている。TGF- β 1 は線維芽細胞に細胞外マトリックスの産生を促進し、創傷治癒過程の重要な点を制御すると考えられている。TGF- β は線維芽細胞に細胞外マトリックスの産生を増大させ、マトリックス・メタプロテアーゼの合成を抑制し、臓器の線維化を促進するとされている。肝臓では毒素やウイルス感染により TGF- β の産生が増強され、細胞外マトリックスの過剰な産生が起こる。

骨格筋では TGF- β 1 は Duchenne/Becker 型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、炎症性筋障害において発現していることが報告されている。TGF- β 1 は筋疾患の線維化の病因に関与していると考えられている。

CTGF は TGF- β によって生産が促進される因子であるが、近年線維芽細胞の増殖、移動、接着や細胞外マトリックスの産生の促進に働いている事がわかってきた。1991 年に Bradham らによってヒト内皮細胞により分泌された成長因子は Connective tissue growth factor(CTGF)と名付けられた。CTGF は ctgf/cyr61/nov (CCN)ファミリーの一員で腎臓、心臓、胎盤、肺、肝臓、膵臓など様々なヒトの臓器で発現していた。CTGF はトロロンビン、VEGF、デキサメタゾンなどでも産生が促進されるが、おもに TGF- β により産生が促進される。試験管内で CTGF は線維芽細胞、内皮細胞、血管平滑筋細胞、神経細胞などで発現していることが示されていた。

方法

この研究で私たちは L6 ラット骨格筋管細胞において TGF- β が CTGF の発現を増強するかどうか mRNA レベルと蛋白レベルで調べた。10%FBS を加えた DMEM の中で L6 ラット骨格筋管細胞を培養した。筋管細胞に分化させた上で、異なった濃度の TGF- β を含んだ DMEM の中で増殖させた。Northern blot 分析により L6 骨格筋管細胞において TGF- β 1 が CTGF の mRNA の発現を増強するか調べた。また、Western blot 分析により L6 骨格筋管細胞において、TGF- β 1 が CTGF の蛋白の発現を増強するか調べた。

結果

Northern blot 分析

5ng/ml の TGF- β 1 の刺激により 3 から 48 時間後の間で CTGF mRNA の発現の増強が認められた。6 時間後にピークが認められた。CTGF mRNA の発現の増強は 0.1 から 10 ng/ml の範囲において量依存性に認められた。5-10 ng/ml の刺激において CTGF の発現は最も増強された。

Western blot 分析

5ng/ml の TGF- β 1 の刺激により 3 から 48 時間後の間の CTGF 蛋白の発現の増強が認められた。12 時間後にピークが認められた。CTGF 蛋白の発現の増強は 0.1 から 10 ng/ml の範囲において量依存性に認められた。

考察

TGF- β は線維芽細胞を増殖させ、コラーゲン合成を増加させるので、過剰なコラーゲン合成から組織構造の変化をもたらす、ついには組織の再生を障害することがあると考えられている。TGF- β 1 はラット筋芽細胞においてコラーゲンやフィブロネクチンの合成を促進すると報告されている。試験管内において TGF- β 1 は筋由来の蛋白の発現を抑制し、線維化に関連する蛋白を誘導する。生体内で TGF- β は骨格筋の線維化のカスケードの誘因となり、筋由来の細胞が線維性の細胞へと分化するよう誘導する。TGF- β 1 は骨格筋における線維化の病因に関与していると考えられる。

線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、血管平滑筋細胞、神経細胞などにおいて TGF- β は CTGF の発現を促進する。心筋の線維芽細胞と筋細胞において TGF- β は CTGF の発現を促進する。筋疾患においては、TGF- β の発現の増大した状態で CTGF が発現していると報告はあるものの、十分に研究されていない。Obreo らは L6 骨格筋芽細胞において TGF- β が CTGF の発現を増大させ、コラーゲン合成と集積を増加させることを報告している。この研究で、わたしたちは L6 ラット骨格筋管細胞において TGF- β 1 が CTGF の産生を促進する事を mRNA レベルと蛋白レベルで示した。それゆえ、TGF- β は筋組織の中で CTGF の発現を促進し、骨格筋の線維化の中で役割を担っていると考えられた。

CTGF は胚形成、着床、創傷治癒などの正常な生理的過程において、役割を担っているものと思われる。肝硬変、糖尿病性腎症、肺線維症、血管の動脈硬化など線維増殖性疾患において、CTGF の過剰生産が臓器の線維化や瘢痕化を促進していると報告されている。

腎臓の糸球体硬化症や尿細管間質の線維化において CTGF の発現が増加しており、線維化の進行の程度や重さと CTGF の発現の程度が相関していた。骨格筋においても、CTGF の発現は TGF- β により増大し、細胞外マトリックスを増加させ線維化を促進するのかもしれない。この仮説は TGF- β と CTGF が骨格筋の線維化に決定的な役割をはたしているかもしれないことを示唆する。

様々な臓器で TGF- β を抑制することが線維化に効果があったことが報告されている。皮膚筋炎の患者において TGF- β 1 の抑制が筋肉の細胞構造の改善と筋膜の炎症と結合

組織の増殖の減少に関与していたことが報告されている。TGF- β を抑制することは線維化を抑制し、炎症性筋疾患を改善させるかもしれない。さらに骨格筋において TGF- β 1 によって誘導される CTGF の役割をあきらかにする研究を行い、筋疾患と線維化をより理解することが重要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2057 号	氏 名	前田 伸也
論文題目 Title of Dissertation	TGF- β は L6 ラット骨格筋管細胞における CTGF の発現を増強させる Transforming growth factor- β enhances connective tissue growth factor expression in L6 rat skeletal myotubes		
審査委員 Examiner	主 査 熊谷 俊一 Chief Examiner 副 査 伊藤 光宏 Vice-examiner 副 査 西尾 久英 Vice-examiner		
審査終了日	平成 21 年 3 月 18 日		

（要旨は1, 000字～2, 000字程度）

TGF- β は線維芽細胞に細胞外マトリックスの産生を増大させ、マトリックス・メタロプロテアーゼの合成を抑制し、創傷治癒過程の重要な点を制御すると考えられている。肝臓、腎臓、皮膚や肺など様々な臓器や組織において、TGF- β は臓器の線維化を促進する。肝臓では毒素やウイルス感染により TGF- β の産生が増強され、細胞外マトリックスの過剰な産生が起こる。一方、先天性筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、炎症性筋疾患においても、TGF- β は骨格筋に発現し、筋線維化への関与が示唆されている。

Connective tissue growth factor (CTGF) は TGF- β により産生促進される因子であるが、近年線維芽細胞の増殖、移動、接着や細胞外マトリックスの産生の促進に働いている事がわかってきた。CTGF は *ctgf/cyr61/nov* (CCN) ファミリーに属し、腎臓、心臓、胎盤、肺、肝臓、脾臓など様々なヒトの臓器で発現している。また CTGF は線維芽細胞、内皮細胞、血管平滑筋細胞、神経細胞などでも発現し、トロニン、VEGF、TGF- β により産生が促進される。

本研究者は筋疾患の線維化における CTGF の役割を解明することを目的として、L6 ラット骨格筋管細胞を用いて、TGF- β が CTGF の発現を増強するかどうかを調べた。10%FBS を加えた DMEM の中で L6 ラット骨格筋芽細胞を培養し、筋管

細胞に分化させた上で、異なった濃度の TGF- β を加え、DMEM の中で増殖させた。

Nothern blot 分析により L6 骨格筋管細胞において TGF- β 1 が CTGF の mRNA の発現を増強するか調べた。また、Western blot 分析により L6 骨格筋管細胞において、TGF- β 1 が CTGF の蛋白の発現を増強するか調べた。

Nothern blot 分析では、5ng/ml の TGF- β 1 の刺激により 3 から 48 時間後の間で CTGF mRNA の発現を認め、6 時間後にピークが認められた。CTGF mRNA の発現は 0.1 から 10 ng/ml の範囲において量依存性に認められ、5-10 ng/ml で最も増強された。CTGF 蛋白の発現を Western blot で解析したところ、5ng/ml の TGF- β 1 の刺激により、12 時間後にピークをピークとする 3 から 48 時間後の間の産生が認められた。TGF- β 1 による CTGF 蛋白産生は、0.1 から 10 ng/ml の範囲において量依存性に認められた。

TGF- β は線維芽細胞を増殖させ、コラーゲン合成を増加させるので、過剰なコラーゲン合成から組織構造の変化をもたらす、ついには組織の再生を障害することがあると考えられている。一方、ラット筋芽細胞においても TGF- β 1 はコラーゲンやフィブロネクチンの合成を促進し、試験管内においては TGF- β 1 は筋由来の蛋白の発現を抑制し、線維化に関連する蛋白を誘導する。生体内で

TGF- β は骨格筋の線維化カスケードの誘因となり、筋由来の細胞が線維性の細胞へと分化するよう誘導する。筋疾患においては、TGF- β 発現が増強した状態で CTGF が発現していると報告はあるものの、十分には研究されていない。この研究で、わたしたちは L6 ラット骨格筋管細胞において TGF- β 1 が CTGF の産生を促進する事を mRNA レベルと蛋白レベルで示した。それゆえ、TGF- β は筋組織の中で CTGF の発現を促進し、骨格筋の線維化の中で役割を担っていると考えられた。様々な筋疾患においても、TGF- β は CTGF 発現を誘導し細胞外マトリックスを増加させ骨格筋の線維化を促進すると考えられ、TGF- β と CTGF が骨格筋の線維化に決定的な役割をはたしているかもしれないことを示唆する。

本研究は炎症性筋疾患における CTGF について、その病態的意義を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった骨格筋の線維化について、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。