

細胞増殖因子および接着分子による 皮膚硬化制御に関する分子生物学的研究

獨協医科大学 皮膚科

山 蔭 明 生

Purposes: We investigated how to control skin sclerosis and softness. Systemic scleroderma is a model for sclerotic or aging skin. We indicated that TGF- β , PDGF-AA and PDGF α receptor interaction might play an important role in skin sclerosis. Recently, it has been clear that many of the proteoglycans behave as modulators of growth factors binding in scleroderma and normal fibroblasts. We examine the role of proteoglycans for binding to growth factors on scleroderma fibroblasts in this paper. The hyaluronate receptor (CD44) molecule is a multifunctional cell surface protein involved in T cell activation, monocyte cytokine release, fibroblast locomotion, and lymphocyte binding to high endothelial venules. There is protein kinase C-like kinase domain in intracellular portion of CD44, and intra-molecular serine/threonine residue may be phosphorylated to mediate signal transduction. Materials and methods: Effects of heparitinase digestion on TGF- β and bFGF binding to their receptors were studied in vitro using ligand binding assay, ^3H -thymidine uptake and affinity level in scleroderma and control fibroblasts. To study the roles of CD44 molecules play in systemic sclerosis (SSc), we measured expression and phosphorylation of CD44 in lymphocytes and fibroblasts from SSc patients and healthy controls, using immunoprecipitation method with ^{32}P and anti-CD44 antibody. Results: TGF- β binds to 200-300kD betaglycan (type III receptor of TGF- β , type I and II receptor in scleroderma fibroblasts more than in control fibroblasts. After heparitinase digestion betaglycan is degraded to 110kD core protein of betaglycan and TGF- β does not bind to type I nor II receptor. bFGF binds to 130kD receptor in scleroderma fibroblasts more than in control fibroblasts. After digestion bFGF bind to no receptor. CD44 was expressed and phosphorylated on many lymphocytes and fibroblasts. Furthermore, lymphocytes from SSc patients contained more CD44 or more phosphorylated than cells from healthy control. Immunohistochemically, CD44 was expressed on the cells. Conclusions: Obtained data suggest that heparan sulfate proteoglycans are growth factor receptors and affect storage, release and protection against degradation of growth factors. It was suggested that multifunctionality of TGF- β express through heparan sulfate proteoglycans. In the pathogenesis of SSc, CD44 may play an important role in control of cell locomotion, cell adhesion, cell proliferation, and synthesis of extracellular matrix component.

1 緒 言

皮膚の柔らかさ・硬さは主に真皮結合組織、すなわち膠原繊維・弾力繊維・ムコ多糖等の量的および質的狀態を反映していると考えられる^{1), 2)}。臨床的に皮膚硬化を来す強皮症や軟化を示すエーラス=ダンロス症候群などの疾患で皮膚結合組織代謝異常が認められ、これらの病態は種々の増殖因子や接着分子の作用によって制御されている^{3) - 8)}。そこで我々は、汎発性強皮症患者と健康人の皮膚を比較対照して検討することで、増殖因子や接着分子の産生およびそれらのレセプター

発現さらにはシグナル伝達機構などの働きを解明し、線維化を様々な段階で抑制することを目指した。すなわち transforming growth factor- β (TGF- β) や basic fibroblast growth factor (bFGF) のレセプターであるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割や CD44 の作用を検討して、*in vitro* で皮膚線維芽細胞の作用をコントロールすることにより、皮膚の柔軟性保持ひいては皮膚老化抑制の方法を探った。

2 実 験

2.1 材 料

汎発性強皮症患者前腕伸側硬化部皮膚および健康人対照の同部非硬化皮膚より生検により採取し培養した真皮線維芽細胞、患者および健康人から分離したリンパ球浮遊液及び培養線維芽細胞培養上清を用いて以下の実験を行なった。



Molecular biological study on the control of skin sclerosis by growth factors and adhesion molecule

Akio Yamakage

Department of Dermatology,
Dokkyo University School of Medicine

2.2 ^3H -TdR uptake

1 ng/mL TGF- β および 1 ng/mL basic FGF を加え、heparitinase 添加群と無添加群で培養線維芽細胞の増殖活性を ^3H -TdR の uptake を測定することにより、検討した^{4), 9)}。

2.3 receptor binding assay

リガンドとレセプターの結合を receptor binding assay により測定し、レセプター数と親和性を算定した¹⁰⁾。

2.4 immunoprecipitation 法

すでにコラーゲン・ムコ多糖産生を促進することが知られている TGF- β 、basic FGF のレセプター発現と、リガンドとレセプターの結合様式に与えるヘパラン硫酸プロテオグリカンの影響をヘパリチナーゼによりレセプターとしてのヘパラン硫酸プロテオグリカンを切断することで検討した。

さらに、TGF- β 、FGF などの成長因子が細胞表面上のプロテオグリカンを含むレセプターにどれだけ結合するかを receptor binding assay およびアフィニティラベルにより測定した。

細胞膜表面に存在する接着分子 CD44 はヒアルロン酸・コラーゲン・ヘパラン硫酸・ヘパリンをリガンドとして、リン酸化シグナルを発信しリンパ球の増殖、活性化を促進するので、汎発性鞏皮症患者より分離したリンパ球浮遊液中にヒアルロン酸を加え、 ^{32}P ラベル後抗 CD44 モノクローナル抗体を用いた Immunoprecipitation 法により CD44 を分離し、SDS-PAGE 後 autoradiography を施行し、tyrosine kinase のリン酸化を指標としてリン酸化シグナルを測定した¹¹⁾。

3 結果

3.1 培養線維芽細胞の増殖活性

健常人由来線維芽細胞では TGF- β 添加群では無添加群に比して増殖活性は低下する傾向があり、heparitinase 消化によりさらに低下する傾向

を認めた。一方、PSS では TGF- β 添加群と無添加群とで増殖活性は不変で、heparitinase 消化により上昇する傾向を認めた (図 1)。

健常人由来線維芽細胞では basic FGF 添加群では無添加群に比して増殖活性は 2 倍以上上昇する傾向があり、heparitinase 消化では不変。一方、PSS では basic FGF 添加群では無添加群に比して増殖活性は 2 倍に上昇する傾向があり、heparitinase 消化により低下する傾向を認めた (図 2)。

3.2 heparitinase 消化による receptor binding

heparitinase 消化前後の TGF- β receptor 数は健常人でも PSS でもやや減少し、親和性はやや増加した (図 3)。

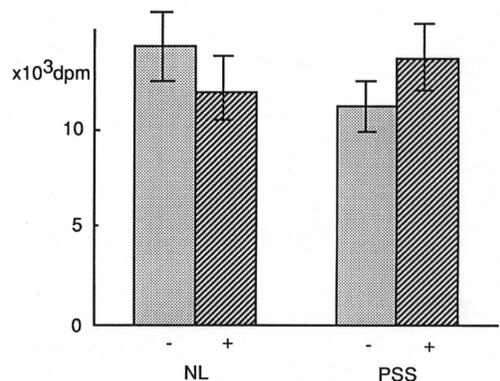


図 1 健常人由来および PSS 由来培養線維芽細胞における heparitinase 消化 (+) および未消化 (-) 条件下での TGF- β 添加による増殖活性

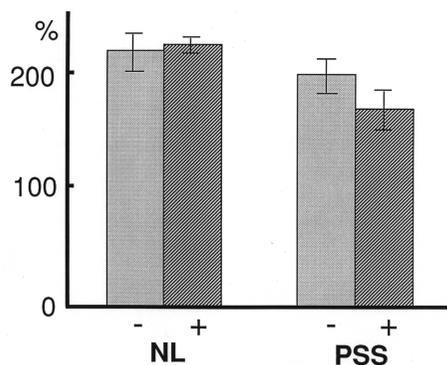


図 2 heparitinase 消化 (+) および未消化 (-) 条件下での bFGF 添加による増殖活性

heparitinase 消化前後の basic FGF receptor 数は健常人でも PSS でもやや増加し、親和性もやや増加した (図4)。

3.3 heparitinase 消化による TGF-β および bFGF binding site の変動

heparitinase 消化により、heparan sulfate proteoglycan (betaglycan、TGF-β receptor type III、MW 300Kd 前後) に結合していた ¹²⁵I-TGF-β は、GAG 鎖が消化されて残った、TGF-β 結合部位を有する core protein (MW 100 ~ 130Kd) に結合して存在するようになった。また type I (MW ¹²⁵I-TGF-β monomer との結合体として

65Kd) および type II (MW 同 95Kd) の TGF-β receptor に結合していた ¹²⁵I-TGF-β は、そのまま残った (図5)。

heparitinase 消化により、heparan sulfate proteoglycan の proteoglycan 部分に結合していた ¹²⁵-basic FGF は、結合部位を失ったため、結合し得なくなった (図6)。

3.4 ヒアルロン酸添加培養による CD 44 のリン酸化

汎発性鞏皮症より分離した末梢血リンパ球では、健常人に比してヒアルロン酸添加培養群で CD44 のリン酸化をより強く認めた (図7)。

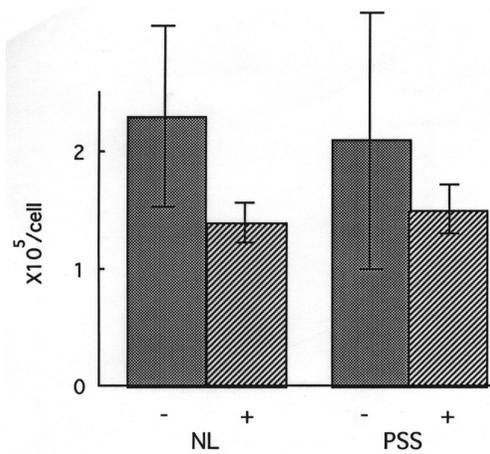


図3 heparitinase 消化前後の TGF-β receptor 数

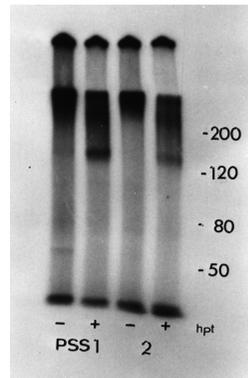


図5 heparitinase 消化による TGF-β binding site の変動

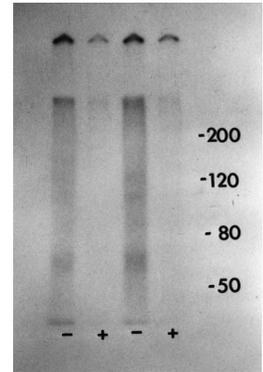


図6 heparitinase 消化による bFGF binding site の変動

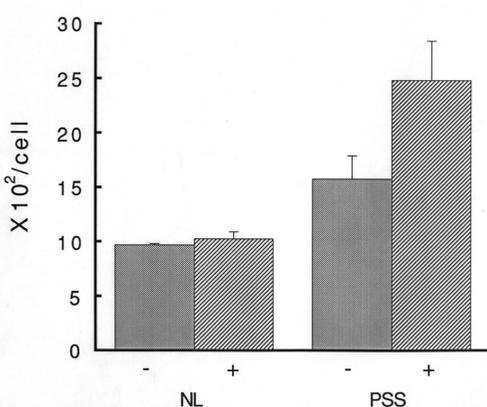


図4 heparitinase 消化前後の basic FGF receptor 数



図7 汎発性鞏皮症より分離した末梢血リンパ球では、健常人に比してヒアルロン酸添加培養群で CD44 のリン酸化をより強く認めた

4 考察

近年、種々のコア蛋白とグリコサミノグリカン (GAG) 側鎖からなるプロテオグリカンの構造と機能が明かになりつつある。例えば、コア蛋白と GAG 鎖の種類によって軟骨のアグリカン、線維芽細胞のバーシカン、結合組織のデコリン、基底膜のパールカンなどが知られている。アグリカンやバーシカンはヒアルロン酸と結合してマトリ

ックスを構築し、デコリンは I 型コラーゲンや TGF- β に結合する。

ベータグリカンはヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸に富む GAG 鎖をもち、分子量 300Kd (非還元下 \sim 600Kd) 前後のプロテオグリカンで、TGF- β タイプ III レセプターとも呼ばれ、100 \sim 130Kd のコア蛋白部分に TGF- β 結合部位を有する (図 8)。ベータグリカンそのものにはシグナル伝達機能は認められていないが、TGF- β を貯

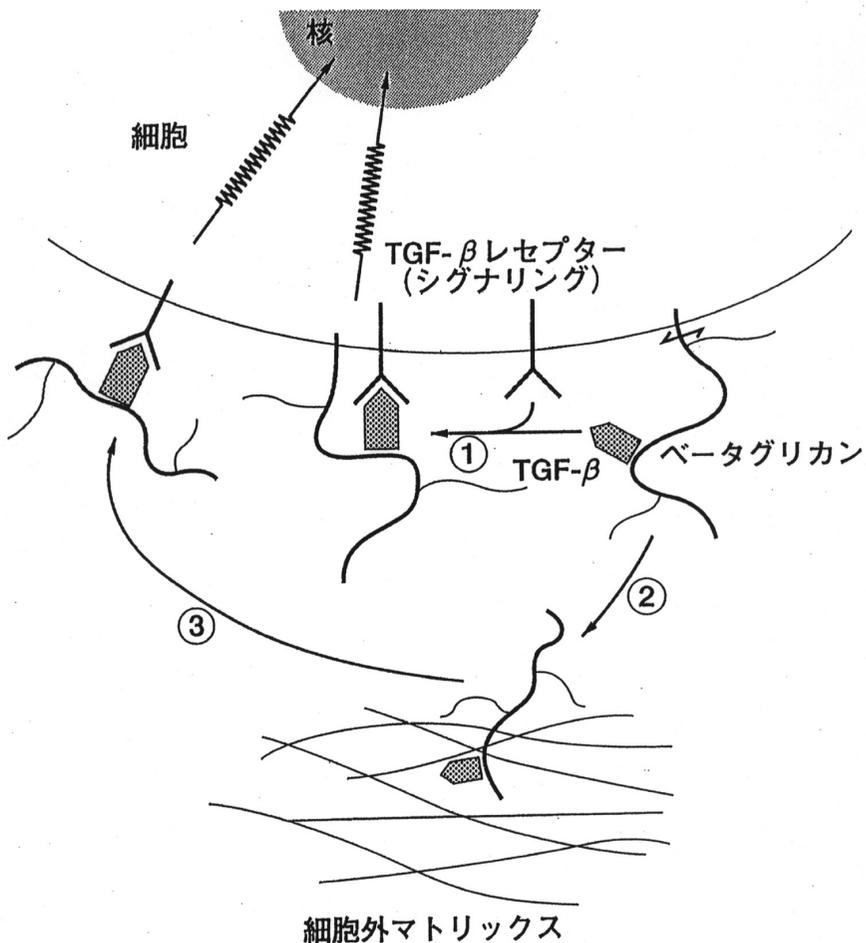


図8 ベータグリカンの仮想的機能 (山口佑: 実験医学 10: 1859, 1992 より)

①ベータグリカンは TGF- β をシグナリングレセプター (タイプ I あるいはタイプ II レセプター) に提示する。ベータグリカンの存在により、シグナリングレセプターへの TGF- β の結合が促進される。②ベータグリカンの一部は遊離型となり、TGF- β を細胞外マトリックスに貯蔵する。③遊離のベータグリカンがレセプターに TGF- β を提示する可能性。

蔵ないし保存する働きやタイプ I およびタイプ II レセプターへの TGF- β の提示ないし結合促進作用などが知られている^{12) - 16)}。

今回の実験で、PSS 患者前腕伸側硬化部皮膚由来および健常人対照の同部非硬化皮膚由来真皮培養線維芽細胞に対する TGF- β の作用およびプロテオグリカンの役割がより明かになった。

basic FGF は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンあるいはフリーの可溶性ヘパリンないしヘパリン様分子に結合し、ある種の構造変化を遂げた状態でのみ高親和性レセプターに結合し得る(図 9)^{17) - 26)}。PSS 線維芽細胞においても健常人対照線維芽細胞においてもヘパリチナーゼ無添加

では bFGF と結合し得、ヘパリチナーゼ消化により結合できなくなる点で、線維芽細胞の性状に相違はなかった。

リンパ球及び線維芽細胞表面 CD44 は、ヒアルロン酸と結合し、protein kinase C 類似の kinase のリン酸化および CD44 分子内 serine/threonine 残基のリン酸化を来たすことによりシグナルを発信し、細胞の接着機能・増殖能・結合織成分合成などを制御している可能性がある(図 10)^{27) - 29)}。特に汎発性鞏皮症では CD44 を介してリンパ球及び線維芽細胞の誘導、増殖、ムコ多糖・コラーゲン合成の亢進などが行なわれていることが示唆された。

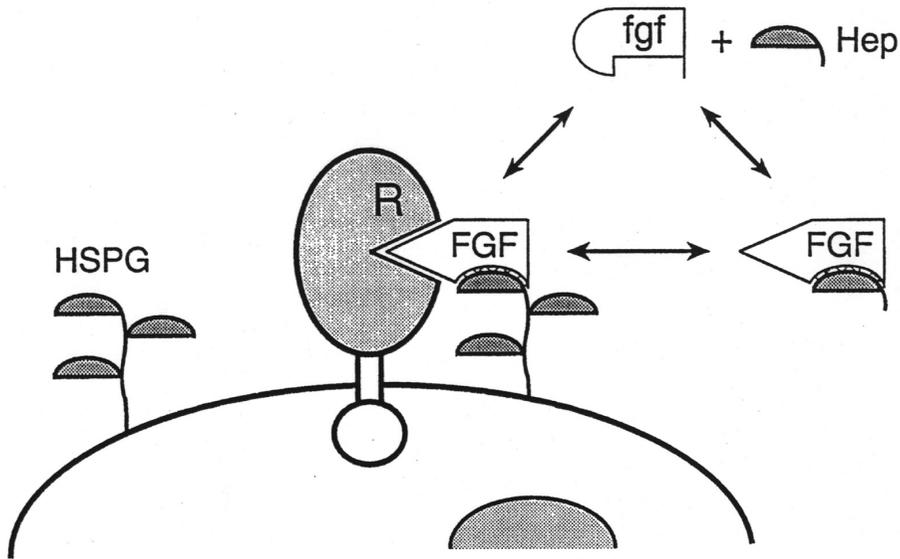


図 9 An Induced-Fit Model for Heparin-Dependent High Affinity Receptor Binding of bFGF (Yayon A et al:Cell 64:841,1991 より)

bFGF can bind to its high affinity receptor only when bound to either cell surface HSPGs or to free, soluble heparin or heparin-like molecules. Both free and cell surface immobilized heparin-like molecules can interchangeably confer a stable, receptor-compatible conformational change upon bFGF. Hep, heparin; R, receptor.

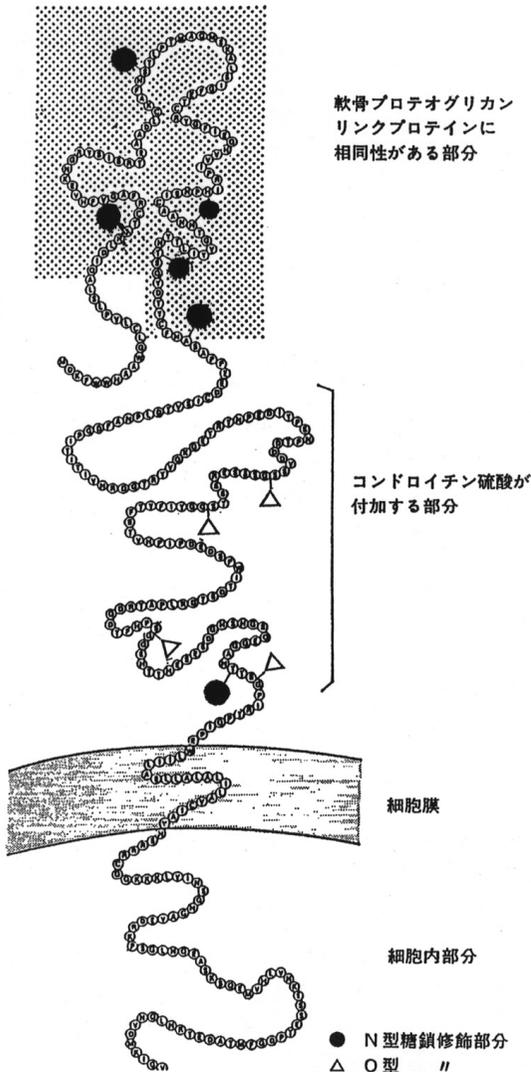


図10 CD44分子の構造(反町典子ら: 実験医学 12:2190,1994より)

N末端側に軟骨プロテオグリカンのコアプテインあるいはリンクプロテインに相同性のあるドメインが存在し、この部分でヒアルロン酸に結合すると考えられている。細胞膜直上部にコンドロイチン硫酸が付加する部分がある。

文献

1) Ishikawa H, Saito Y, Yamakage A, Kitabatake M: Scleroderma-inducing glycosaminoglycan in the urine of patients with systemic scleroderma.

Dermatologica 156: 193-204, 1978

2) Kitabatake M, Ishikawa H, Uchiyama Y: Significant increase of urinary low-sulfated heparan-sulfate-related protein in patients with severe systemic scleroderma. *Dermatologica* 174: 166-172, 1987

3) LeRoy EC, Smith EA, Kahaleh MB, Trojanowska M, Silver RM: A strategy for scleroderma (systemic sclerosis): is transforming growth factor beta the answer? *Arthritis Rheum* 32:817-825, 1989

4) Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M: Selective upregulation of PDGF α receptors by TGF- β in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med* 175:1227-1234, 1992

5) Ishikawa O, Yamakage A, LeRoy EC, Trojanowska M: Persistent effect of TGF- β $_1$ on extracellular matrix gene expression in human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 232-238, 1990

6) Trojanowska M, Wu L, LeRoy EC: Elevated expression of c-myc protooncogene in scleroderma fibroblasts. *Oncogene* 3: 477-481, 1988

7) Kikuchi K, Yamakage A, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M: Differential modulation of bFGF receptors by TGF- β in adult skin, scleroderma skin, and newborn foreskin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 99: 201-205, 1992

8) Bowen-Pope DF, Ross R: Platelet derived growth factor. *J Biol Chem* 257: 5161-5171, 1982

9) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970

10) Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 660-672, 1949

11) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory

- Press, New York, 18:26-46, 1989
- 12) Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Crombrugge B: Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 105: 1039-1045, 1987
 - 13) Obberghen-Schilling EV, Roshe NS, Flanders KC, Sporn MB, Roberts AB: Transforming growth factor β 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem* 263: 7741-7746, 1988
 - 14) Ruoslahti E, Yamaguchi Y: Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64: 867-869, 1991
 - 15) Massague J: Subunit structure of a high-affinity receptor for type β -transforming growth factor. Evidence for a disulfide-linked glycosylated receptor complex. *J Biol Chem* 260: 7059-7066, 1985
 - 16) 山口祐 : TGF- β の作用と細胞外マトリックス. *実験医学* 10:1859,1992
 - 17) Burgess WH, Maciag T: The heparin-binding (fibroblast growth factor) family of proteins. *Ann Rev Biochem* 58: 575-606, 1989
 - 18) Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J: Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-linking with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J* 9: 2685-2692, 1990
 - 19) Rafkin DB, Moscatelli D: Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 109: 1-6, 1989
 - 20) Moscatelli D: High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Physiol* 131: 123-130, 1987
 - 21) Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsbrun M: Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2292-2296, 1987
 - 22) Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L: Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J Cell Physiol* 5: 15-26, 1987
 - 23) Moscatelli D: Metabolism of receptor bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 107: 753-759, 1988
 - 24) Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM: Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64: 841-848, 1991
 - 25) Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB: Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252: 1705-1708, 1991
 - 26) Kan M, Wang F, Xu J, Crabb JW, Hou J, McKeehan WL: An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science* 259: 1918-1921, 1993
 - 27) Pasquale EB, Singer SJ: Identification of a developmentally regulated proteintyrosine kinase by using anti-phosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5449-5453, 1989
 - 28) 反町典子、宮坂昌之 : リガンド結合による CD44 分子の機能的調節とその生理的意義. *実験医学* 12: 2190,1994
 - 29) Hynes BF, Talen MJ, Hale LP & Denning SM: CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunology Today* 10:423-428, 1989