

Werner 症候群患者皮膚由来培養線維芽細胞の サイトカイン・細胞成長因子に対する応答性

横浜市立大学医学部
佐々木 哲 雄

Since Werner's syndrome (WS) and progressive systemic sclerosis (PSS) have some similar phenotypic expressions, we performed a comparative study on the responsiveness of those cultured cells to basic fibroblast growth factor (bFGF). Skin fibroblasts were obtained by outgrowth culture of the biopsies from a WS and two PSS patients and used after only one passage in these experiments. The medium used was supplemented with fetal bovine serum in 10% all the time through these cultures. Cell proliferation was stimulated in the presence of bFGF to a similar extent in these three cell cultures (up to 2.5 times of the culture without it). Collagenase production per cell in the presence of bFGF was also increased; the responsiveness of WS cells was lower than that of PSS cells. The significance of this difference in the responsiveness to bFGF remains to be clarified.

1. 緒 言

Werner 症候群 (WS) は常染色体劣性遺伝性疾患で、いわゆる早老性症候群の代表的なものである¹⁾。WS はまれな疾患ではあるが、老化のモデル疾患としてのみならず、その独特の表現型、強皮症様皮膚所見、創傷治癒の遷延など極めて特徴的な所見を有する疾患として注目されている。WS の培養線維芽細胞を用いた研究は少なくないが、増殖因子に対する応答性を検討したものは少ない²⁾。

basic fibroblast growth factor (bFGF) はヘパリンに強い親和性を示す因子 heparin-binding (fibroblast) growth factor (HBGF) ファミリーの一つで、線維芽細胞や血管内皮細胞など多くの細胞に対して増殖促進活性を示す³⁾。

今回は WS 細胞の細胞成長因子に対する応答性

として、bFGF に対する反応性を検討した。その対照細胞として、全身性強皮症 (PSS) 皮膚由来培養線維芽細胞を用いた。PSS は皮膚のみならず肺、食道をはじめ諸臓器の線維化を主徴とし、膠原病あるいは自己免疫疾患に分類されている⁴⁾が、皮膚症状の一部に WS と類似性がみられる⁵⁾ことから、両疾患患者皮膚由来細胞の比較を試みた。

2. 実 験

使用した bFGF はリコンビナントヒト bFGF で、科研製薬から供与を受けた。

対象とした患者は WS1 例 (以下同細胞を WS と記す)、PSS2 例 (同細胞を PSS1、PSS2 と記す) で、皮膚生検もほぼ同時に行い、以後可能な限り同条件で培養した (表1)。すなわち、生検皮膚の一部から型の如く outgrowth culture⁶⁾ を行い、

表1 対象患者と培養細胞

| 患者 | 性 | 生検時年齢 | 診断 | 生検部位 | 生検日 | 細胞 | 継代 |
|-----|---|-------|--------|------|----------|------|----|
| S K | 女 | 52 | Werner | 前腕伸側 | 1991.2.5 | WS | 1回 |
| ME | 女 | 64 | PSS | 前腕伸側 | 1991.2.4 | PSS1 | 1回 |
| I S | 男 | 57 | PSS | 腹部 | 1991.2.4 | PSS2 | 1回 |

表2 細胞蛋白量に対するbFGFの効果*

| 細胞 | bFGF (ng/ml) | | | | | | |
|------|--------------|-----------|-----------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 0.1 | 1 | 10 | 10 ² | 10 ³ | 10 ⁴ |
| WS | 14.8(1)** | 18.5(1.3) | 27.3(1.9) | 31.3(2.1) | 21.2(1.4) | 38.6(2.6) | ND*** |
| PSS1 | 41.8(1) | 49.1(1.2) | 91.8(2.2) | 102.8(2.5) | 78.3(1.0) | 70.7(1.8) | ND |
| PSS2 | 51.1(1) | 38.5(0.8) | 44.8(0.9) | 89.2(1.7) | 113.0(2.2) | 90.0(1.8) | 94.8(1.9) |

* bFGFを0~10⁴ng/ml含有する培養液で6日間(3日後に1回培養液交換)培養後、細胞成分の蛋白量を測定した(μg/well)。
 ** ()内にはそれぞれの細胞系におけるbFGF無添加の値に対する比率を示した。
 *** 旅行せず。

WSとPSS1は3月19日に、PSS2は4月24日にそれぞれ24 well dishに継代した。継代は12-16日(WSは13日、PSS1は12日、PSS2は16日)後の培地交換時にbFGFを最終濃度0.1, 1, 10, 10², 10³, 10⁴(一部の実験)ng/mlとなるように各wellに加えた(day 0)。さらに3日後(day 3)に培地交換とともにday 0と同様にbFGFを添加した。その3日後(day 6)に培地を除去し、細胞蛋白量の測定⁷⁾を行なった。なお、培地はDulbecco's Modified Eagle's Mediumを用い、胎牛血清(FBS)は常に10%で実験を行なった。Day 0, 3, 6に採取した各培養液は-20℃に保存した。培養液中に分泌されたコラゲナーゼの酵素活性はFITCで標識したI型コラーゲンを基質として既報⁸⁾のごとく測定した。

3. 結果

3.1 細胞増殖に対するbFGFの効果

Day 6における細胞蛋白量の測定結果を表2に示した。いずれの細胞系においてもbFGF添加により、その濃度に依存して細胞増殖が促進される傾向がみられた。今回の細胞系では、いずれも最高でもbFGF無添加の場合の2.5倍前後(WSは2.6倍、PSS1は2.5倍、PSS2は2.2倍)であった(表2)。

3.2 コラゲナーゼ産生に対するbFGFの効果

bFGFは培養皮膚線維芽細胞のコラゲナーゼ産生を濃度依存的に増強させた。bFGF添加により培地1ml当たりに分泌されたコラゲナーゼ活性はPSS1 > PSS2 > > WSであった(図1~3)。

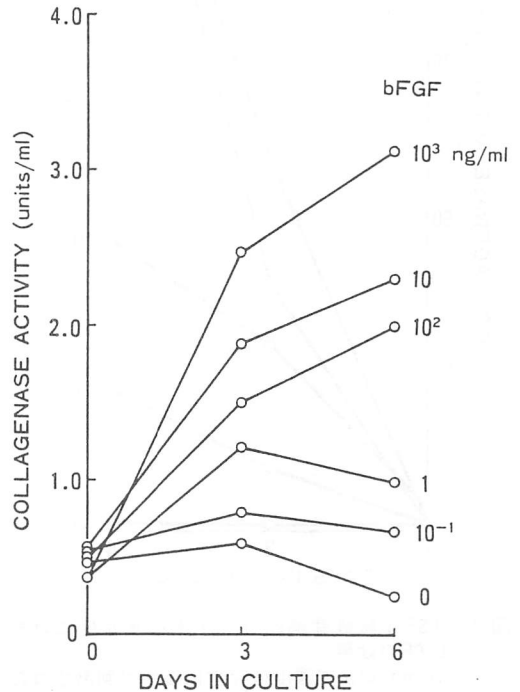


図1 WS線維芽細胞コラゲナーゼ産生に対するbFGFの効果

Day 0, 3, 6における培養液中に分泌されたコラゲナーゼ活性を培養液1ml当たりのunitとして示した(図2, 3も同様)。10ng/mlまで濃度依存性に産生が刺激された。

分泌されたコラゲナーゼ活性を細胞蛋白量当たりで表わしてもその値は、PSS1 > PSS2 > > WSであった(表3)。しかしながら、各細胞系において、細胞蛋白量当たりの分泌されたコラゲナーゼ活性をbFGF無添加の培地の同活性に対する比で示すとPSS1 > > PSS2 > WSとなり、PSS2とWSの差が減少し、PSS1とPSS2の差が拡大した(表3)。

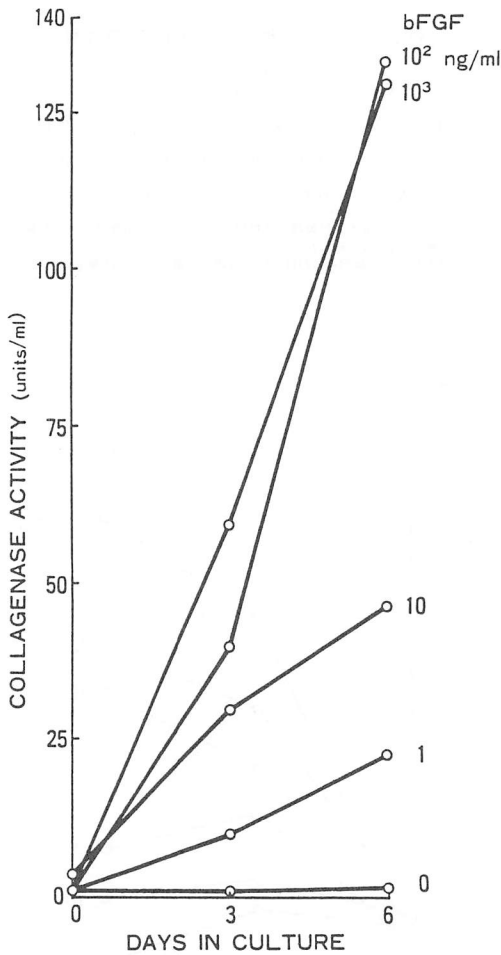


図2 PSS 1 線維芽細胞コラゲナーゼ産生に対するbFGFの効果
10² ng/mlまで濃度依存性に産生が刺激された。

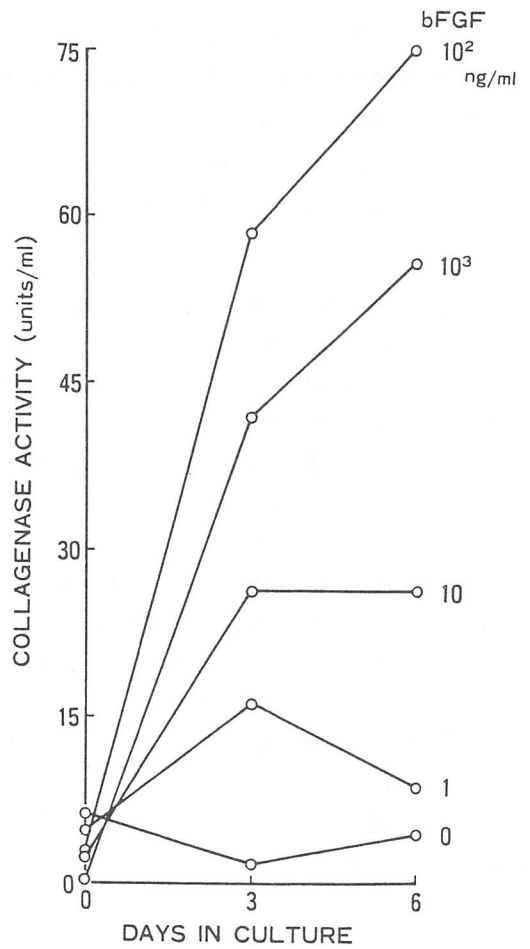


図3 PSS 2 線維芽細胞コラゲナーゼ産生に対するbFGFの効果
10² ng/mlまで濃度依存性に産生が刺激された。

表3 細胞当たりのコラゲナーゼ産生に対するbFGFの効果*

| 細胞 | bFGF (ng/ml) | | | | | |
|------|--------------|------------|------------|-------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 0.1 | 1 | 10 | 10 ² | 10 ³ |
| WS | 17.8(1)** | 36.5(2.1) | 35.9(2.1) | 73.6(4.3) | 94.2(5.5) | 81.2(4.7) |
| PSS1 | 33.0(1) | ND*** | 241.0(7.3) | 450.5(13.7) | 1698(51.5) | 1691(51.2) |
| PSS2 | 87.4(1) | 101.7(1.2) | 187.6(2.2) | 289.9(3.3) | 683.0(7.6) | 617.0(7.1) |

* bFGFを0~10⁴ ng/ml含有する培養液で6日間(3日後に1回培養液交換)培養後、培養液中に分泌されたコラゲナーゼの活性を細胞蛋白量当たりで示した(units/mg protein).

** ()内にはそれぞれ細胞系におけるbFGF無添加の値に対する比率を示した。

*** 施行せず。

4. 考 察

WS 線維芽細胞は血小板由来増殖因子(PDGF)やFGFの増殖刺激に対する応答性は低く(血清を涸渇させた場合)、FBS(20%)の増殖刺激に対しては対照と変わらず十分に応答するという実験結果がすでに報告されている²⁾。今回我々は常に10%FBS存在下で培養を行なった。それがbFGFの細胞増殖刺激活性に対してWSとPSSではほぼ同程度の応答性を示した事実の理由と思われる。1988年平井ら⁹⁾はその低応答性の理由とし

てWS細胞内における蛋白のリン酸化の低下が考えられるとした。1991年河野ら¹⁰⁾はWS細胞の増殖低下はPDGFレセプターの合成低下による可能性を示した。しかしながら、WS線維芽細胞におけるFGFのシグナル伝達に関する詳細な検討の報告はみられていない。

1992年Millisら¹¹⁾は、WS線維芽細胞およびin vitroで継代を重ねたヒト皮膚線維芽細胞においてはmetalloproteinase(コラゲナーゼとstromelysin)の遺伝子発現は亢進し、TIMPの発現は低下しているという成績を発表している。WS線維芽細胞においてはPDGFのコラゲナーゼ産生刺激に対して応答性が低下していることがすでに示されている²⁾が、bFGFのコラゲナーゼ産生に対する効果は我々の知る限りこれまで報告されていない。bFGFのコラゲナーゼ産生刺激効果に対する応答性もWSではPSSに比べて低下していることが今回の実験で示された。しかしながら、対照としたPSS1とPSS2でもその応答性に相当な差がみられたので、その意義は今後なお検討を要するものと思われる。

5. 総括

WSとPSSは皮膚症状など一部の表現型に類似性がみられるため、今回は両疾患患者皮膚由来培養線維芽細胞のbFGFに対する応答性を細胞増殖とコラゲナーゼ産生で比較した。対象はWS(52歳女性)とPSS(64歳女性, 57歳男性)で、同時に生検され、同様に1回継代された培養細胞にリコンビナントヒトbFGFを 10^4 ng/mlまで各種濃度に添加し、3日後、6日後に培養液中に分泌されたコラゲナーゼの活性を、6日後の細胞蛋白量をそれぞれ測定した。培養液中の胎牛血清は常に10%とした。コラゲナーゼ産生はbFGFにより濃度依存的に増強された。6日後の細胞蛋白量はbFGF添加により3種の細胞系でほぼ同程度に増加した(無添加の2.5倍前後)。6日後の細胞蛋白当たりのコラゲナーゼ産生をbFGF無添加の場合

と比較すると、PSS1, PSS2, WSの順にbFGFに対する応答性が強かった。このbFGFに対する応答性の差の意義は今後なお検討を要するものと思われる。

文献

- 1) Epstein, C. J., Martin, G. M., Schultz, A. L., Molsky, A. G. :Werner's syndrome. *Medicine*, 45, 177-201, 1966.
- 2) Bauer, E. A., Silverman, N., Busick, D. F., Kronberger, A., Deuel, T. F. :Diminished response of Werner's syndrome fibroblasts to growth factors PDGF and FGF. *Science*, 234, 1240-1243, 1986.
- 3) Burgess, W. H., Maciag, T. :The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 575-606, 1989.
- 4) 佐々木哲雄 : 病気の生化学(170) 全身性強皮症。代謝, 27, 65-76, 1990.
- 5) 剣持つる代, 佐々木哲雄, 中嶋 弘 : Werner症候群と全身性強皮症との比較研究。横浜医学, 43, 115-119, 1992.
- 6) Sasaki, T., Arai, K., Ono, M., Yamaguchi, T., Furuta, S., Nagai, Y. :Ehlers-Danlos syndrome:a variant characterized by the deficiency of pro α 2 chain of type I procollagen. *Arch Dermatol.*, 123, 76-79, 1987.
- 7) Bradford, M. M. :A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- 8) Nagai, Y., Hori, H., Hattori, S., Sasaki, T. : PMN-derived fibroblast-stimulating factor. In: *Mixed Connective Tissue Disease and Anti-nuclear Antibodies*, 229-234. Ed. R. Kasukawa and G. C. Sharp, Elsevier, Amsterdam, 1987.

- 9) Hirai, M., Amagai, M., Tajima, S., Nishikawa, T., Shimizu, N. :Mitogen-mediated protein phosphorylation in Werner's syndrome fibroblasts. *Cell Struc Func.*, 13, 471-480, 1988.
- 10) 河野幹彦, 森 聖二郎, 神崎哲人, 森崎信尋, 斎藤康, 吉田 尚 : Werner症候群における細胞増殖低下機構—血小板由来成長因子受容体との関連について—. *日老医誌*, 28, 233-234, 1991.
- 11) Millis, A. J. T., Hoyle, M., McCue, H. M., Martini, H. :Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp Cell Res.*, 201, 372-379, 1992.