

シンポジウム 1 「新規マクロライド誘導体EM703の生物評価」

肺線維芽細胞におけるEM703のTGF- β シグナル伝達抑制

吾妻安良太¹⁾ 李 英姫¹⁾ 松田久仁子¹⁾ 青山昭徳¹⁾ 阿部信二¹⁾
 白杵二郎¹⁾ 工藤翔二¹⁾ 砂塚敏明²⁾ 大村 智²⁾

はじめに

昨年、われわれはマウスプレオマイシン肺線維症モデルにおいてEM703は早期の炎症期 (inflammatory process) のBAL液中炎症細胞の浸潤および後期の線維化期 (fibrotic process) の線維症を抑制することを本研究会で報告し、また*in vitro*において、EM703はTGF- β による肺線維芽細胞増殖・可溶性コラーゲン産生を抑制することを報告した。TGF- β の線維芽細胞内シグナル伝達はSmadタンパク質によりTGF- β による様々な生物学的反応を引き起こすことが知られている¹⁾。また、プレオマイシン肺線維症動物モデルにおいてsmad3は肺線維症形成に重要な役割を果たしていることが報告されている^{2, 3)}。今回、われわれはEM703のSmad3の発現に及ぼす作用について*in vitro*, *in vivo*にて検討した。

方法

In vitro :

細胞培養 :

マウス肺線維芽細胞株MLg2908 (ATCC ; CCL-206) を用いて検討した。実験Groupは①コントロール, ②TGF- β alone, ③TGF- β + pre-EM703, ④TGF- β + syn-EM703, ⑤TGF- β + post-EM703に設定した。TGF- β の最終濃度は5 ng/ml, EM703の最終濃度は5 μ g/mlにて検討した。細胞の培養は37°C, 5% CO₂下にて行った。各Groupの細胞をRPMI 1640 + 10% FCSにより2 \times 10⁴/mlに調製し、24ウェルTissue Culture Plateに分注し、48時間培養した。Group③にEM703を添加し、24時間培養後、Group④にEM703を添加し、Group②③④⑤の細胞をTGF- β にて曝露した。さらに24時間培養後、

Group⑤にEM703を添加して24時間培養した。各Groupの細胞を回収し、RT-PCR方法によるSmad 3 mRNA発現検討に供した。

In vivo :

7週令、ICR雄マウスを用い、プレオマイシン (BLM : Nippon Kayaku ; Tokyo, Japan) は100mg/kg, 0.3ml/mouse経尾静脈より1回投与し、EM703は75mg/kg, 0.3ml/mouse 1日1回連日経口投与した。実験スケジュール : 生食投与群 (N), BLM単独投与群 (B), BLMとEM703投与群 (B/E703) を設定した (n = 3)。Day 0にBLMを経尾静脈より1回投与した。Day-3からday6までEM703を1日1回連日強制経口投与した。生食投与群とBLM単独投与群では5%アラビアゴム懸濁液 (0.3ml/mouse) を1日1回連日強制経口投与した。各群ともBLM投与後7日目にエーテル麻酔下にてsacrificeし、肺を取り出してRT-PCR方法によるSmad 3 mRNA発現検討に供した。

RT-PCR :

*In vitro*実験により回収した細胞と*in vivo*実験により取り出した肺組織を用い、ISOGEN (Nippon GENE ; Tokyo, Japan) にてTotal RNAを抽出し、RT-PCR法^{4, 5)}にてSmad 3 mRNA発現について検討した。cDNA増幅に用いたprimerは以下の通りである^{6, 7)}。

Smad3:sense 5'-CTGGCTACCTGAGTGAAGATG
 GAGA-3',
 antisense 5'-AAAGACCTCCCCTCCGATGT
 AGTAG-3'
 G6PD:sense 5'-TAGGAATTCATCATCATGGGTGC

¹⁾ 日本医科大学第四内科, ²⁾ 北里大学北里生命科学研究所

Fig. 1. EM703 Effects of TGF- β on Smad3 expression in MLg2908. TGF- β : 5 ng/ml, EM703 : 5 mg/ml.

Lane 1: control; Lane 2: TGF- β alone; Lane 3: TGF- β + pre-EM703; Lane 4: TGF- β + syn-EM703; Lane 5: TGF- β + post-EM703.

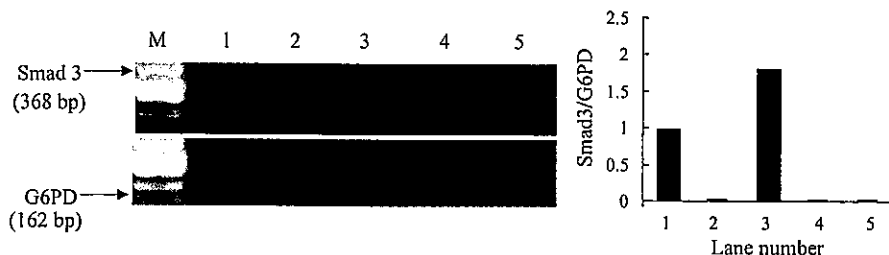
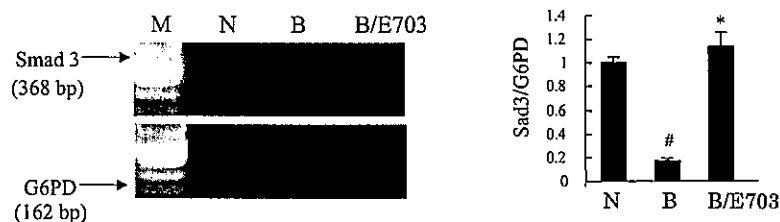


Fig. 2. Effects of EM703 on expression of Smad3 mRNA in lung tissue on day 7 after bleomycin injection in ICR mice. # $p < 0.01$, Significantly different from NS-treated group; * $p < 0.01$, Significantly different from bleomycin alone-treated group, Values are means and bars are SD ($n = 3$). N: NS-treated group; B: bleomycin-alone-treated group; B/E703: bleomycin plus EM703-treated group.



ATCG-3'
antisense 5'-TAGAAGCTTGTGTTTGC GGATG
TCAGCCACTGT-3'

PCR産物は2%アガロースゲルにて100V, 20分電気泳動後, ethidium bromideにて発色しAdobe Photoshop 6.0を用いてintensityの比較検討を行った。

統計: Stat Mate III software (ATMS DIGITALS Medical Station, Tokyo, Japan)を用い, 一元配置分散分析を行い, Newman-Keuls testにて評価した。

結果

In vitro :

MLg2908のSmad3のmRNA発現はTGF- β 添加より完全に消失した(Lane 2)が, EM703の前添加(Lane 3)より完全に回復された。EM703の同時添

加(Lane 4)と後添加(Lane 5)では回復されなかった(Fig. 1)。

In vivo :

BLM投与後7日目の肺組織のSmad3のmRNA発現はBLM投与により著明に減少したが(Lane 2), EM703の併用投与より回復された(Lane 3)(Fig. 2)。

考察

肺損傷の修復とリモデリングの過程において, 線維芽細胞は重要な役割を果たしている⁸⁾。TGF- β は肺線維芽細胞に作用し, その増殖を促進させ, 肺急性炎症後に生じる肺のリモデリングに深く関係のある増殖因子として注目されている⁹⁾。昨年の本研究会で, われわれは*in vitro*において, TGF- β によるマウス肺線維芽細胞の増殖増強, 可溶性

コラーゲン産生増強はEM703により抑制されるが、従来のEM-Aでは抑制されないことを確認し、報告した。

TGF- β の線維芽細胞内シグナル伝達はSmadタンパク質によりTGF- β による様々な生物学的反応を引き起こすことが知られている¹⁾。BLM肺線維症の進展にSmad3は重要な役割を果たしている^{2,3)}。今回われわれの結果は*in vitro*の肺線維芽細胞においてSmad3 mRNA発現はTGF- β 添加により完全に消失し、*in vivo*の検討ではBLM投与により著明に減少し、文献²⁾の結果と一致している。ところが、Smad3 mRNA発現はいずれもEM703により完全に回復した。肺線維芽細胞において、Smad3はネガティブフィードバックループにてTGF- β のシグナル伝達の役割を果たしていると報告されている²⁾。今回の研究結果より、EM703はSmad3のネガティブフィードバックループ形成を抑制することにより、TGF- β のシグナル伝達を抑制する役割を果たし、マウスBLM肺線維症モデルにおいて、肺線維症進展を抑制する可能性が示唆された。

参考文献

- 1) HELDIN C. H., MIYAZONO K. & PETER TEN DUKE P. : TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD protein. *Nature* 390 : 465~471, 1997
- 2) ZHAO Y. & GEVERD D. A. : Regulation of Smad3 expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis : a negative feedback loop of TGF-beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 294 (2) : 319~323, 2002
- 3) ZHAO J., SHI W., WANG Y. L., *et al.* : Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282 (3) : L585~593, 2002
- 4) LI Y., AZUMA A., TAKAHASHI S., USUKI J., *et al.* : Fourteen-Membered Ring Macrolides Inhibit Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Messenger RNA Induction and Leukocyte Migration Role in Preventing Lung Injury and Fibrosis in Bleomycin-Challenged Mice. *CHEST* 122:2137~2145, 2002
- 5) TAKAHASHI S., FOSSATI L., IWAMOTO M., *et al.* : Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice. *J. Clin. Invest.* 97 : 1597~1604, 1996
- 6) SATOH M., SUGINO H. & YOSHIDA T. : Activin promotes astrocytic differentiation of a multipotent neural stem cell line and an astrocyte progenitor cell line from murine central nervous system. *Neurosci. Lett* 284 : 143~146, 2000
- 7) BOEHM T., SPILLANTINI M. G., SOFRONIEW M. V., *et al.* : Developmentally regulated and tissue specific expression of mRNAs encoding the two alternative forms of the LIM domain oncogene rhombotin : evidence for thymus expression. *Oncogene* 6 : 695~703, 1991
- 8) SELMAN M. & PARDO A. : The epithelial/fibroblast pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 29 (3) : S93~S97, 2003
- 9) WESTERGREN-THORSSON G., HERNNAS J., SARNSTRAND B., *et al.* : Altered expression of small proteoglycans, collagen and transforming growth factor- β 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *J. Clin. Invest.* 92 : 632~637, 1993