炎症におけるテネイシン発現の多様な調節機構

坂倉 照 好^{*1)}, 日下部守昭^{*2)}

review article

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Manifold mechanism of the regulation of tenascin expression in the inflammation

Tenascin is an extracellular matrix glycoprotein contributing in early organogenesis, tissue remodeling, cancer development, and other diseases. During skin wound healing, tenascin appears transiently in the wound edges of epidermis, hair follicles muscle layer, and in the granulation tissue. By immunohistochemistry, positive staining of tenascin is observed in fibroblasts, myofibroblasts and smooth muscle cells. However, by *in situ* hybridization, mRNA of tenascin is observed even in the epithelial cells besides myofibroblasts and smooth muscle cells. Tenascin expression is up-regulated by various cytokines such as TGF β , bFGF, TNF α , interleukines, angiotensin II, and down-regulated by glucocorticoid. Tenascin is the substrate for matrix metalloproteinases (MMP-1, -3, and -7), cathepsin G, and leucoelastase. The degradation of tenascin occurs when cultured the cells in the presence of IL-1, -2, and -6. These cytokines likely induce tenascin proteinase(s) in the various cells.

Rec. 8/18/1995, pp 377~381

Teruyo Sakakura^{*1)}, Moriaki Kusakabe^{*2)}

key words : tenascin, interleukine, wound healing, TGF β , anti-adhesive molecule

テネイシン¹⁾は、分子量 190 および 250 kDa の細胞外マトリックス糖蛋白質で、組織では通常 6 量体で存在する。ヒトをはじめ、ニワトリ、マウス、ブタなどで cDNA が単離され、また抗体がつくられていろいろな組織での発現が調べられた。その結果、テネイシンは個体発生過程において、また、創傷治癒や組織再生、癌の増殖とか浸潤の過程において一過性に発現することがわかってきた^{2,3)}。

免疫組織化学的にテネイシンが認められるのは、上皮を取り巻いている基底膜周囲の間質で、

産生細胞は一般には線維芽細胞、あるいはそれが分化したものと考えられているが、最近では *in situ* hybridization による詳細な検討により、癌を含む上皮系細胞にも発現していることが明らかになってきた⁴⁾。

いままでに報告されたテネイシンの機能は、細胞接着および脱着、細胞増殖刺激および抑制、細胞移動促進および阻害、形態形成能、赤血球凝集活性、組織境界形成など多岐にわたっているが^{2,3)}、最近ではフィブロネクチンとの干涉により、細胞を組織から離脱させる作用があるという考えが一般に受け入れられている^{5,6)}。

組織体ではすべての細胞が静的に存在しているのではなく、多くのものは動的である。細胞が動き回するには基質に付いたり離れたりしなければならない。フィブロネクチンとテネイシンがそれを微妙に調節すると考えるわけである。これはまた、

^{*1)} Department of Pathology, Mie University School of Medicine 三重大学医学部病理学教室

^{*2)} Laboratory of Experimental Animal Biology, The Institute Physical and Chemical Research 理化学研究所実験動物研究室

Offprint requests to : Teruyo Sakakura, Department of Pathology, Mie University School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu-shi, Mie 514, Japan

表 1 テネイン産現誘導するいろいろな因子

因 子	発現細胞
TGF- β 1	マウス線維芽細胞 ニワトリ線維芽細胞 ラット血管平滑筋細胞 ヒト扁平上皮癌細胞 A431
a-, & b-FGF	マウス線維芽細胞 ヒト神経細胞 ヒト原始神経外胚葉細胞
K-FGF	ヒト原始神経外胚葉細胞
TNF α	ヒト皮膚線維芽細胞 ヒト軟膜線維芽細胞 ヒト肺線維芽細胞 ヒト結膜線維芽細胞
IL-1	ヒト滑膜線維芽細胞 ヒト結膜線維芽細胞
IL-4	ヒト軟膜線維芽細胞 ヒト結膜線維芽細胞
NGF	ラット神経細胞
アンギオテンシンII	ラット血管平滑筋細胞
フォルボールエステル	ヒト原始神経外胚葉細胞

テネインとフィブロンクチンの両分子が細胞に接着することにより、マトリックス分解酵素の発現を誘導させるという最近の報告⁷⁾によって、局所の微妙な分子動態の解明につながっている。

生体内でのテネイン機能研究は、遺伝子発現を実験的にノックアウトしたマウスでの研究がわかりやすいが、残念なことに、テネインノックアウトマウスにはみどころ異常があらわれない⁸⁾。しかしその後、実験的な皮膚創傷とか腎疾患で、炎症反応の過程に異常が起こることを見出している⁹⁾。

テネインの発現は、発生、炎症、腫瘍など組織構築および再構築過程で一過性に認められる。その発現の調節機構を明らかにすることは、テネインの生物機能の解明の近道である。

本稿では創傷治癒過程でのテネイン産現様式、テネイン産生および分解に及ぼすいろいろなサイトカインの影響について、筆者らの実験成績を含め考察を試みる。

創傷治癒過程におけるテネイン産現

マウス背中皮膚に剃刀で傷をつけると、24 時間以内に、創傷腔は線維芽細胞、マクロファージ、

白血球、線維の破片などを含む粗な間質で満たされ、表皮はこの間質のほうへ移動をはじめ、テネインは、創部周囲の表皮下基底膜と毛嚢周囲基底膜および平滑筋層に認められる。48 時間たつと、創傷面は新しく移動してきた表皮細胞に覆われ、その下には炎症細胞、筋線維芽細胞、血管からなる新しい肉芽が形成される。この時期テネインは、肉芽組織の辺縁部と創傷断端部の皮筋層に陽性である。5～7 日目になると、創傷腔は成熟した肉芽組織に満たされ、テネインは強陽性となる。その後、肉芽組織が新しい皮下組織に置き換えられる 7～10 日ごろにはテネイン陽性部位は次第に範囲を狭め、10～14 日後には認められなくなる。

創傷治癒過程であられるテネインの産生細胞としては筋線維芽細胞、平滑筋細胞などであり、その発現誘導因子としていろいろなサイトカイン、増殖因子が考えられる^{10,11)}。

テネインの発現誘導と制御

TGF β は、一般によく知られた細胞外マトリックスの発現誘導因子であり、テネインについてもマウス線維芽細胞で mRNA 発現の誘導因子として最初に証明されたものである¹²⁾。その他、線維芽細胞、平滑筋細胞、神経細胞の培養系で、テネイン蛋白質あるいは mRNA の発現を誘導する物質として、いろいろなものが見つけられている^{13～16)}(表 1)。

発生初期の発育臓器、増殖とか浸潤の激しい癌の間質および肉芽組織などでは、いろいろな細胞の増殖と分化が連続し、いろいろなサイトカイン、ホルモンなど局所的な消長がめまぐるしく起こり、組織の再構築過程がスムーズに進められる。テネインは、この時期一過性にあらわれ、重要な役割を演じていると考えられている。また、ラット血管のテネイン免疫組織化学では、通常、分岐部の中膜が陽性に染色されるが、高血圧ラットでは血管分岐部に限らずいろいろな部分で陽性となる¹⁷⁾。

血管平滑筋細胞の培養では、アンギオテンシン II がテネイン産生を高めるので、なにか物理的

図1 腫瘍形成時におけるテネイシン発現
A: 免疫組織化学, B: *in situ* hybridization
腫瘍と間質の接面周囲に強いテネイシン発現がみられる。

な力に反応してテネイシン発現の引き金が引かれるようである。事実、マウスの妊娠子宮では胎児がおさまっている場所に対応して内輪筋層にテネイシン発現が見られる¹⁸⁾。

ヒト扁平上皮癌A 431細胞は、通常テネイシンを作らない。しかし、ヌードマウスの皮下に注射するとテネイシンをつくりはじめ、腫瘍が大きくなってもつくっている¹⁹⁾。この場合、A 431細胞にテネイシンをつくらせる誘導因子が何であるかはまだ特定されていないが、周囲の間質細胞に接しているところでテネイシン産生細胞が多く認められるので(図1)、おそらく間質細胞から何かの刺激がでているものと思われる。A 431細胞の培養にいろいろなサイトカインを添加した実験で、TGF- β 1がテネイシン産生を起こさせるので、これらは有力な候補である²⁰⁾。

また、サイトカインは、発現するテネイシンの分子を修飾することもある。ラット線維芽細胞とか、swiss 3T3線維芽細胞にTGF β を添加すると、オルタナティブエクソンを含まない小さいテネイシン mRNA の発現が誘導され¹⁴⁾、一方、bFGFは大きい分子のテネイシン mRNA を誘導する¹⁶⁾。ヒト結膜とか軟膜線維芽細胞では、通常小さい分子のテネイシンをつくっているが、IL-1, IL-4, TNF α などが作用すると、大きいテネイ

シンをつくるようになる¹³⁾。

抑制因子として知られているのはグルコルチコイドで、胎仔ラット肺の器官培養¹⁴⁾、マウス線維芽細胞および骨髄のストローマ細胞¹⁵⁾の培養で証明されており、グルコルチコイドとTGF β はテネイシン産生誘導では拮抗している。

このように生体組織内では、テネイシン発現はいろいろな内外因子によって複雑に調節されている。同じような培養線維芽細胞でも由来臓器が違えばテネイシン産生能も違う。いくつか調べられたなかでもっとも多くテネイシンを産生するのは、胎児肺由来の線維芽細胞で、関節腔滑膜、皮膚、および骨髄由来の線維芽細胞がこれにつづき、結膜、軟膜、腎ではほとんど痕跡程度である¹³⁾。

テネイシンの分解

A 375メラノーマ細胞から抽出したテネイシンを、既知のいろいろなマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)およびセリンプロテアーゼと反応させ、その分解を調べた実験が報告されている²¹⁾。その結果、テネイシンはMMP-1, MMP-3, MMP-7, カテプシンGおよび白血球エラスターゼによって分解されるが、MMP-2, MMP-9およびトロンピンには完全に抵抗性を示した。

組織内でのマトリックス分解酵素の発現に、細

A375

DMEM/F12+10%FCS

図2 テネイシン分解におけるインターロイキンの影響

IL-1 α , 1 β および IL-6 は, A375 に作用してテネイシン分解酵素を発現させる。

胞と細胞外マトリックス分子との相互作用が引き金になっているという面白い実験結果が最近報告された⁷⁾。ウサギの滑膜線維芽細胞をテネイシンとフィブロネクチンの混合基質のうえで培養すると、この細胞はコラゲナーゼ、ストロメライシン、92 KDa ゼラチナーゼなどの遺伝子を発現し、活性のある酵素蛋白質を培養液中に分泌する。テネイシン、フィブロネクチンそれぞれ単独ではこの現象は起こらないし、テネイシンとI型コラーゲン、テネイシンとビトロネクチンの組み合わせでも起こらない。

テネイシンとフィブロネクチン両分子と細胞の組み合わせが重要で、細胞移動、組織再構築、細胞浸潤など、形態変化を起こしつつある組織では、これら相互作用がある意味ではでたらめに、偶然に行われているようにみえる。

通常、ヒトメラノーマ細胞A 375 とマウス乳癌細胞 2H6 は、10% FCS DMEM/HamF12 培養条件で、それぞれ 250 kDa と 230 kDa のテネイ

図3 炎症組織におけるテネイシンとサイトカインの相互作用

シンをつくる。ところが、培養液中に IL-1,-2, あるいは-6 を添加することにより、培養液中に分泌されるテネイシンの分子量は、ウエスタンブロッティングでは小さなものが観察され、図2でみられるように、およそ 180 kDa, 140 kDa, 110 kDa の3本のバンドとなる。IL-1の反応は、抗IL-1レセプター抗体および蛋白分解酵素阻害剤(ペファブロック)の添加によって阻害されること、および、IL-1そのものにテネイシン分解活性がないことから、IL-1がこれら細胞にテネイシン分解酵素の産生を誘導したものと考えられる。テネイシン非産生細胞であるA 431では、IL-1はテネイシンをつくらせないが、その分解酵素はつくらせる。

炎症組織におけるテネイシン

免疫組織化学と *in situ* hybridization でテネイシンの分布と発現をみると、大体二つの組織型にわけられる。一つは緻密な間葉系組織で、たとえば砂嚢とか腱がこれに当たる。他の一つは発生初期とか創傷治癒過程など、細胞に動きのある組織である。つまり、物理的な力が生じるところと、再構築中の組織である。炎症反応では組織の修復再構築がおもな変化である。

具体的なテネイシンの役割として、図3に示したように、フィブロネクチンと共同で線維芽細胞と相互作用しながら、細胞にマトリックス分解酵素をつくらせて間質組織をルーズにする一方、細胞を基質から脱着させ、細胞の移動を容易にするが、さらにいろいろなサイトカインによる調節が全体に網をかけているのではないだろうか。

おわりに

炎症反応というダイナミックな組織修復と再構築の過程では、細胞外マトリックスおよびいろいろな因子の機能発現調節が複雑に絡み合っている。たとえば、テネイシン分子の構造と機能は、組織微小環境の調節を受け多様な発現をする。一見でたためにさえ見えるが、そのなかにはきちんとしたルールがあるはずである。免疫組織化学と *in situ* hybridization を組み合わせた、いわば組織におけるテネイシン分子の発現地図づくりの基礎があつてはじめて新しい分子動態の解析が可能になる。

文 献

- 1) Chiquet-Ehrismann, R., Mackie, E. J., Pearson, C. A., Sakakura, T. : Tenascin : An extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47 : 131-139, 1986.
- 2) Erickson, H. P., Bourdon, M. A. : Tenascin : An extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5 : 71-92, 1989.
- 3) Sakakura, T. : Role of tenascin in cancer development. In *Tumor Matrix Biology* (ed. Adany, R.) CRC Press, 1995 p101-129.
- 4) Ishihara, A., Yoshida, T., Tamaki, H., Sakakura, T. : Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin. Cancer Res.* (in press)
- 5) Chiquet-Ehrismann, R. : Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3 : 800-804, 1991.
- 6) Sage, H. E., Bornstein, P. : Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J. Biol. Chem.* 266 : 16831-16841, 1991.
- 7) Tremble, P., Chiquet-Ehrismann, R., Werb, Z. : The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 5 : 439-453, 1994.
- 8) Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T., Aizawa, S. : Mice develop normally without tenascin. *Genes and Devel.* 6 : 1821-1831, 1992.
- 9) Nakao, N., Natori, Y., Sekiguti, M., Kusakabe, M. : Acute glomerulonephritis (AGN) is much severer in tenascin knockout mouse than control. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5 : 815, 1994.
- 10) Murakami, R., Yamaoka, I., Sakakura, T. : Appearance of tenascin in healing skin of the mouse : Possible involvement in seaming of wounded tissues. *Int. J. Dev. Biol.* 33 : 439-444, 1989.
- 11) Mackie, E. J., Halfter, W., Liverani, D. : Induction of tenascin in healing wounds. *J. Cell Biol.* 107 : 2757-2767, 1988.
- 12) Pearson, C. A., Pearson, D., Shibahara, S., Hofsteenge, J., Chiquet-Ehrismann, R. : Tenascin : cDNA cloning and induction by TGF- β . *EMBO J.* 7 : 2977-2981, 1988.
- 13) Rettig, W. J., Erickson, H. P., Albino, A. P., Garin-Chesa, P. : Induction of human tenascin (neuronectin) by growth factors and cytokines : Cell type-specific signals and signalling pathways. *J. Cell Sci.* 107 : 487-497, 1994.
- 14) Zhao, Y., Young, S. L. : TGF- β regulates expression of tenascin alternative-splicing isoforms in fetal rat lung. *Am. J. Physiol.* 268 : L173-180, 1995.
- 15) Ekblom, M., Fassler, R., Tomasini-Johansson, B., Nilsson, K., Ekblom, P. : Downregulation of tenascin expression by glucocorticoids in bone marrow stromal cells and in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 123 : 1037-1045, 1994.
- 16) Tucker, R. P., Hammarback, J. A., Jenrath, F. A., Mackie, E. J., Xu, Y. : Tenascin expression in the mouse : *in situ* localization and induction *in vitro* by bFGF. *J. Cell Sci.* 104 : 69-76, 1993.
- 17) Mackie, E. J., Scott-Burden, T., Hahn, A. W. A., Kern, F., Bernhardt, J. et al. : Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells : Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am. J. Pathol.* 141 : 377-388, 1992.
- 18) Kida, H., Taga, M., Minaguchi, H., Hanazono, M., Ohashi, T. et al. : Expression of tenascin in mouse uterus during early pregnancy. in preparation.
- 19) Hiraiwa, N., Kida, H., Sakakura, T., Kusakabe, M. : Induction of tenascin in cancer cells by interactions with embryonic mesenchyme mediated by diffusible factor. *J. Cell Sci.* 104 : 289-296, 1993.
- 20) Sakai, T., Kawakatsu, H., Ohta, M., Saito, M. : Tenascin induction in tenascin nonproducing carcinoma cell lines *in vivo* and by TGF- β 1 *in vitro*. *J. Cellul. Physiol.* 159 : 561-572, 1994.
- 21) Imai, K., Kusakabe, M., Sakakura, T., Nakanishi, I., Okada, Y. : Susceptibility of tenascin to degradation by matrix metalloproteinases and serine proteinases. *FEBS Lett.* 352 : 216-218, 1994.