

19990579

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策事業）

強皮症調査研究 平成11年度研究報告書

平成12年 4 月

主任研究者 新海 法

厚生省保健医療局エイズ疾病対策課

Annual Report of the ministry of Health and Welfare
Scleroderma Research Committee
Japan, 1999

Chairman: Hiroshi Shinkai, M.D.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策事業）

強皮症調査研究班

平成 11 年度研究報告書

平成 12 年 4 月

主任研究者 新海 宏

厚生省保健医療局エイズ疾病対策課

平成11年度強皮症研究者名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	しんかい ひろし 新海 宏	千葉大学医学部皮膚科	教 授
分担研究者	いわもと いつお 岩本 逸夫	千葉大学医学部第二内科	助教授
	いしかわ おさむ 石川 治	群馬大学医学部皮膚科	教 授
	いながき ゆたか 稲垣 豊	国立金沢病院 内科	医 師
	いん ひろのぶ 尹 浩信	東京大学医学皮膚科	助 手
	かたやま いちろう 片山 一郎	長崎大学医学部皮膚科	教 授
	くわな まさたか 桑名 正隆	慶応義塾大学医学部先端医科学 研究所細胞情報研究部 内科学	助 手
	にしおか きよし 西岡 清	東京医科歯科大学皮膚科	教 授
	はた りゅういちろう 畑 隆一郎	東京医科歯科大学難治疾患研究所・ 成人疾患部門	助教授
	まえかわ よしひろ 前川 嘉洋	国立熊本病院皮膚科	医 長
(疫 学)	もり みつる 森 満	札幌医科大学公衆衛生学	教 授
(事務局) 経理事務 連絡担当者	エンドウ ヒデハル 遠藤 秀治	千葉大学医学部皮膚科 〒260-0856 千葉市中央区亥鼻1-8-1 TEL 043-222-7171 FAX 043-226-2128	

【目次】

総括研究報告	1
分担研究報告	7
コラーゲン遺伝子転写を制御する Smad タンパクの解析	9
稲垣 豊 (国立金沢病院 内科・臨床研究部)	
中尾篤人 (順天堂大学 アトピー疾患研究センター)	
T細胞レセプター刺激による TGF- β 刺激伝達系の修飾	13
岩本逸夫、真村瑞子、後藤大輔、倉沢和宏、中尾篤人	
(千葉大学第2内科)	
汎発性強皮症皮膚線維芽細胞における転写因子 Sp1 および Sp3 の発現, DNA	19
結合性についての検討	
尹 浩信、玉置邦彦 (東京大学 皮膚科)	
ヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写制御における転写因子 Sp1 および Sp3 の機能	23
について	
尹 浩信、玉置邦彦 (東京大学 皮膚科)	
全身性強皮症患者における遺伝子的背景	27
畑 隆一郎、赤井 潤、木村 彰方 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所	
成人疾患研究部門)、石川 治 (群馬大学 医学部 皮膚科)、桑名 正隆	
(慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所 細胞情報部門)、新海 滋 (千葉	
大学 医学部 皮膚科)	
強皮症血清に認識される RNA ポリメラーゼ I/III のサブユニットの同定	33
桑名正隆 (慶應義塾大学 先端医科学)	
全身性強皮症患者およびシェーグレン症候群患者のマイクロキメリズム	39
石川 治、遠藤雪恵、根岸 泉 (群馬大学 皮膚科)	
抗セントロメア抗体陽性例の HLA class II 遺伝子解析 - 全身性強皮症、原	45
発性胆汁性肝硬変症を中心に - 強皮症の臨床像と自己抗体の関与	
石川 治、秋元幸子、安部正敏 (群馬大学 皮膚科) 高木 均 (群馬大学	
第一内科)	
強皮症の臨床像と自己抗体の関与	51
前川嘉洋 (国立熊本病院 皮膚科)	
P38MAPK 特異的阻害剤 (SB203580) によるマウス強皮症モデルの治療効果	55
の検討	
片山一郎、浜崎洋一郎、Bae Sang Jae (長崎大学 皮膚科)、	
遠藤秀治、新海 滋 (千葉大学 皮膚科)、	
山本俊行、西岡 清 (東京医科歯科大学 皮膚科)	
ヒト培養線維芽細胞の extracellular matrix 遺伝子発現におけるプレオマイ	63
シンの効果の検討	
西岡 清、山本俊幸 (東京医科歯科大学・皮膚科)	
平成 11 年度事業報告	67
研究成果の刊行一覧	71

総括研究報告

総括研究報告

主任研究者 新海 滂 千葉大学教授

強皮症の病因・病態はいまだ不明な点が多く、有効な治療法も開発されていない。病因・病態の新たな発見から治療法の糸口が開かれる可能性があることから、これまで当研究班で見いだしてきた知見をもとに、臨床像と特異的自己抗体の関連、特異的自己抗体の簡便な検査方法の開発さらに本症の病態と関連する細胞外マトリックス沈着と硬化性変化は、臓器線維症の主成分であるコラーゲン線維の沈着の複合因子の作用結果と考えられか、患者線維芽細胞の細胞内情報伝達機構を含め、コラーゲン転写調節機構の解明から治療の開発は可能かを検討することを目的に組織した。初年度の研究成果は、自己抗体の簡易検出方法の開発が可能となったこと、特定の自己抗体を有する本症のコラーゲン遺伝子に特定のマイクロサテライトが存在すること、コラーゲン遺伝子の発現に核たんぱく質 Sp1、Sp3 が関連すること、細胞内シグナル伝達物質として Smad2、3 および 4 が関連することが明らかになった。

A. 研究目的

強皮症の病因はいまだ不明であるが、強皮症の特徴である硬化病変の形成には fibrogenic cytokine を介して細胞外マトリックスの遺伝子発現に影響を与えることが次第に明らかとなった。硬化病変の主体であるコラーゲンは fibrogenic cytokine である TGF- β により制御されているが、本分子は免疫抑制性サイトカインでもある。強皮症は免疫異常を伴い、全身臓器の線維症と捉えられが、肝臓の線維化は認められないのが通常である。臓器の違いによる線維化過程を検討するため、TGF- β を介した細胞内のシグナル伝達物質が注目されるようになり、TGF- β の細胞内シグナル伝達物質として、Smad と呼ばれる一連のタンパク質の役割が重要との認識から、初代培養皮膚線維芽細胞 CF37 とラット線維肝から樹立された星細胞株 CFSC-2G に、シグナル伝達型の Smad2、3、4 ならびにシグナル抑制型の Smad7 の各発現プラスミドを co-transfection し、COL1A2 転写に与える影響について検討した。本症が免疫学的異常をとまうことから T 細胞の活性化を誘導する T 細胞レセプター (TCR) 刺激伝導系と TGF- β 刺激伝導系の相互作用を TGF- β 伝達分子である Smad のリン酸化、会合に対する効果について検討した。

遺伝的背景をもとに多因子により発症することが考えられ、マトリックス沈着の主体であるコラーゲンは強皮症皮膚線維芽細胞で I 型コラーゲン遺伝子の発現が亢進している。このことからコラーゲン遺伝子の I 型コラーゲン α 2 鎖の転写制御領域のマイクロサテライトを強皮症線維芽細胞と各

種自己抗体との関連性を検討した。強皮症皮膚線維芽細胞は I 型コラーゲン遺伝子の発現が亢進し、TGF- β に対する反応性を示さないことから、I 型コラーゲン遺伝子の転写制御における転写因子を検討し、転写因子 Sp1 および Sp3 が重要であることが判明したので、I 型コラーゲン遺伝子の転写制御における転写因子 Sp1 および Sp3 の機能および Sp1 結合阻害剤が治療の一助になるかを検討した。本症で検出される自己抗体腫と臨床像は相関することが知られているが、自己抗体の検出には種々の制約があり簡単に検査が出来ない。このため各施設で簡単に自己抗体検出方法を検出できる方法の開発が望まれているので、今回、RNA ポリメラーゼ (RNAP) I/III に対する自己抗体をリコンビナント蛋白を用いた簡便な検出法を開発した。本症では有効な治療法がないので、本研究班でプレオマイシンをマウスの皮下に投与することにより、強皮症類似の硬化病変を作成できることを見だし、本モデルマウスを用いて、各種治療法の検討を行った。

B. 研究方法

強皮症関連自己抗体の簡易検出法の開発：RNA ポリメラーゼ (RNAP) I/III に対す抗体検出のために特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により RNAP サブユニットをコードする cDNA を分離し、リコンビナント蛋白として発現させた。

自己抗体と強皮症タイプの頻度：Barnett のタイプと自己抗体（抗 DNA 抗体 6 例、抗トポイソメラーゼ I 抗体 12 例、抗 RNP 抗体 3 例、抗セントロメア抗体 3 例）の相関を見た。

TGF- β の細胞内シグナル伝達物質としての smad の機能：初代培養皮膚線維芽細胞 CF37 とラット線維肝から樹立された星細胞株 CFSC-2G に各発現プラスミドを co-transfection し、COL1A2 転写に与える影響について検討した。免疫能に与える smad の機能を見るために健常人末梢血 T 細胞および Jurkat 細胞を TGF- β あるいは anti-CD3 mAb により刺激し、Smad2 のリン酸化は抗リン酸化 Smad2 抗体を用い検出した。Smad2 と Smad4 の会合の検出は抗 Smad2 抗体で免疫沈降後、抗 Smad4 抗体にて検出した。Smad2 の核内移行は抗 Smad2 抗体で細胞を染色、解析した。多因子としての遺伝子背景の検討：患者からインフォームドコンセントのもとに血液を得、遺伝子の解析を行った。I 型コラーゲンを構成する $\alpha 2$ 鎖 (Col1A2) 遺伝子上流および第一イントロンに存在する 2 塩基反復配列およびこれらを含むシフェラーゼレポーター遺伝子コンストラクトの発現活性は既報の方法で行った。

ヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写制御における転写因子 Sp1 および Sp3 の機能と発現：各 Sp 発現するプラスミドを SL2 細胞に導入。CAT assay により機能解析を行った。Sp1 および Sp3 の発現量は免疫ブロットおよび northern blot 法で測定。結合能の測定は DNA mobility shift assay 法を用いた。

各種治療法の検討：モデルマウスを用いて解析した。

C. 研究成果

強皮症関連自己抗体の簡易検出法の開発：RNAP サブユニットをコードする cDNA から得たリコンビナント蛋白は RNAPIII のサブユニットである RPC155 と RPC62 に対する抗体は 100%、93% で検出され、これらサブユニットが抗 RNAPI/III 抗体により高頻度に認識される主要なエピトープを含んでいた。抗 RNAPI/III 抗体陽性強皮症 20 例中 16 例 (80%) は RPC62 を発現するリコンビナント蛋白と反応し、RPC62 融合蛋白単独では特異性は高いが検出感度が 80% と低かった。

自己抗体と強皮症タイプの頻度：病型と抗体の出現頻度の差には有意差がなく、抗 scl-70 抗体とタイプ 3 の関連が示唆された。

TGF- β の細胞内シグナル伝達物質としての smad の機能：CFSC-2G における COL1A2 転写は CF37 の約 10 倍に亢進していたが、外来的に投与された TGF- β に対する反応性はむしろ低下していた。CF37 に Smad2、3 および 4 を co-transfection すると、COL1A2 転写はそれぞれ 2.7 倍、

30.6 倍、1.4 倍に増強したが、CFSC-2G に Smad3 を co-transfection しても 2.4 倍の増加を示すのみであった。また、Smad7 を CF37 に co-transfection すると、TGF- β による転写促進効果が 13.8 倍から 3.3 倍に抑制されたのに対して、CFSC-2G ではこの転写抑制効果はみられなかった。TGF- β 刺激は末梢血 T 細胞 および Jurkat 細胞の Smad2 をリン酸化し、Smad2 と Smad4 の会合を誘導した。一方、TCR 刺激は Smad2 をリン酸化したが、Smad2/4 の会合は誘導しなかった。さらに、TGF- β は Smad2 の核内移行を誘導したが、TCR 刺激は誘導しなかった。また、MEK inhibitor は TCR による Smad2 リン酸化を抑制したが、TGF- β による Smad2 リン酸化には影響を与えなかった。

多因子としての遺伝子背景の検討：I 型コラーゲンを構成する $\alpha 2$ 鎖 (COL1A2) 遺伝子の転写制御領域には転写開始点上流 1.4 キロ塩基と下流 1.4 キロ塩基 (第一イントロン) に 2 つの 2 塩基反復配列が存在し、これらは個人により多型性

(Polymorphism) を示すマイクロサテライトであった。強皮症患者遺伝子には {13,6,8}-12 の組み合わせをホモに持つ例が存在したが、対照には存在しなかった。この反復配列の組み合わせを含むコンストラクトを線維芽細胞にトランスフェクトすると最大の転写促進活性を示した。

ヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写制御における転写因子 Sp1 および Sp3 の機能と発現：ヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の 3 つの GC-box を含むプロモーター領域に結合する核たんぱく質は Sp1 および Sp3 であることが判明し、Sp1 および Sp3 の機能はヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写に活性化因子として関与し、強皮症皮膚線維芽細胞と正常線維芽細胞では Sp1、Sp3 遺伝子の発現に有意な差はなく、TGF- β 、oncostatin M 刺激にても変化しなかった。その結合能においても有意差はないが、Sp1 結合阻害剤である mithramycin に対して強皮症皮膚線維芽細胞はコラーゲン遺伝子の発現が低下した。

E. 結論

強皮症患者の I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の転写制御領域転写開始点上流 1.4 キロ塩基と下流 1.4 キロ塩基 (第一イントロン) に 2 つの 2 塩基反復配列 {13,6,8}-12 の組み合わせをホモに持つ例があり、この組み合わせは強皮症男性患者で、トポイソメラーゼ抗体を有することが判明し、正常人、女性例には見いだすことが出来なかった。強皮症

のリスクファクターとして、この組み合わせが考えられた。コラーゲン転写因子の Sp1 結合阻害剤である mithramycin は強皮症の線維芽細胞のコラーゲン遺伝子発現を抑制することから、治療への応用が示唆された。さらに細胞内シグナル物質である p38MAPK のシグナル伝達を特異的に抑制する薬剤 SB203580 の応用、コラーゲン遺伝子発現抑制サイトカイン IFN- γ の治療への応用も示唆された。

分担研究報告

コラーゲン遺伝子転写を制御する Smadタンパクの解析

班 員：稲垣 豊（国立金沢病院 内科・臨床研究部）
共同研究者：中尾篤人（順天堂大学 アトピー疾患研究センター）

Role of Smad Proteins in Collagen Gene Transcription

Yutaka INAGAKI and Atsuhito NAKAO*

Department of Internal Medicine and Clinical Research Institute, National Kanazawa Hospital,
Kanazawa, and *Allergy Research Center, Juntendo Medical University, Tokyo, Japan.

Summary

Increased production of type I collagen is a common hallmark of various fibrotic diseases such as systemic sclerosis and liver cirrhosis. TGF- β is considered to be the key factor to accelerate excessive collagen production during the fibrogenic process. We have previously identified the upstream sequence that is important for basal and TGF- β -stimulated transcription of α 2(I) collagen gene (COL1A2). The TGF- β -responsive element (TbRE) of COL1A2 consists of two neighboring regions. We have shown that one of them is a binding site of a ubiquitous transactivator Sp1, whereas it is disclosed recently that Smad 3, a mediator of intracellular TGF- β signaling, can bind to the other region.

Using cell transfection experiments, we have shown that over-expression of Sp1 stimulates COL1A2 transcription in primary culture of skin fibroblasts. In addition, co-transfection of Smad3 further increased the promoter activity in the cells, indicating a functional interaction between Sp1 and Smad3. On the other hand, activated hepatic stellate cells, in which COL1A2 transcription level was ten times higher than in primary culture of skin fibroblasts, less responded to exogenous TGF- β or Smad3 over-expression. The inhibitory effect of Smad7 on COL1A2 transcription observed in primary culture of skin fibroblasts was not detected in activated stellate cells. It is therefore indicated that endogenous TGF- β signaling pathway is activated in those stellate cells, which may accounts, at least in part, for accelerated production of type I collagen in the cells.

はじめに

強皮症は、コラーゲンの産生過剰と異常蓄積に基づく全身諸臓器の線維化を特徴とし、TGF- β はその主要促進因子と考えられている。

近年、TGF- β の細胞内シグナル伝達物質として、Smadと呼ばれる一連のタンパクが同定された¹⁾。TGF- β は細胞膜上に存在する特異的受容体に結合してこれをリン酸化させ、リン酸化された受容体が今度はSmad2およびSmad3と呼ばれる細胞内伝達物質をリン酸化させる。これらリン酸化Smad2あるいはSmad3がSmad4とheterodimerを形成した後に核内へと移行して、特定のプロモーター領域に直接的・間接的に結合して、遺伝子転写を調節すると考えられている。一方で、Smad7はTGF- β 受容体によるSmad2あるいはSmad3のリン酸化を抑制し、TGF- β のシグナル伝達をブロックする抑制型Smadとして知られている²⁾。

これまで我々は、1型コラーゲンの α 2鎖をコードする α 2(I)コラーゲン遺伝子(COL1A2)プロモーター上に、皮膚線維芽細胞や肝の星細胞においてTGF- β の転写促進作用を伝達するTGF- β -responsive element (TbRE)を同定し、転写因子Sp1がそのkey factorであることを示した^{3,4)}。TbREは、Sp1が結合するGC boxとその14塩基下流に存在する未知の核タンパクの結合領域とにより構成され³⁾、最近になって後者にSmad3の結合が示された⁵⁾。

コラーゲン発現の調節機構を明らかにし、ひいては強皮症の病態解明と治療法開発の一助となることを目的に、COL1A2の転写制御におけるSmadタンパクの意義について解析を行った。

材料と方法

細胞培養 初代培養皮膚線維芽細胞CF37は、10%胎児ウシ血清(FBS)添加ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用いて、四塩化炭素投与により作成されたラット線維肝から樹立された星細胞株CFSC-2Gは、上記培地に非必須アミノ酸を添加した培地を用いて、37°C、5% CO₂の存在下で60 mmプラスチック培養皿上に培養した。

プラスミド COL1A2の転写開始部位の上流-378塩基から+58塩基にわたる領域をホタル・ルシフェラーゼ遺伝子に連結したキメラ遺伝子(-378COL1A2/LUC)をreporterとし、シグナル伝達型のSmad2、3、4ならびにシグナル抑制型のSmad7の各cDNA、さらにはSp1、c-Junならびに

Fosの各転写因子cDNAをサイトメガロウイルスのプロモーターを用いて発現させるプラスミドをco-transfectionした。また、内部標準プラスミドとして、サイトメガロウイルスプロモーターを用いて発現させるウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を用いた。

Transfection 細胞をトリプシン処理後、約 1.0×10^5 個/mlの密度で24時間培養し、-378COL1A2/LUCと各Smad発現プラスミド、さらには内部標準プラスミドをco-transfectionした。Transfectionはリン酸カルシウム共沈法を用いて行い、5時間培養した後に15%グリセロール添加DMEMを加えて、90秒間のショックを行った。PBSで3回洗浄した後、0.1% FBS添加DMEM 2.5 mlを加え、さらに48時間培養した。

ルシフェラーゼアッセイ ルシフェラーゼアッセイは、デユアルルシフェラーゼ・アッセイシステム(Promega)を用いて、細胞抽出液中のホタルならびにウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を各45秒間ルミノメーターを用いて測定した。

結果と考察

内部標準プラスミドの転写活性で補正すると、CFSC-2GにおけるCOL1A2転写はCF37の約10倍に亢進していたが、外来的に投与されたTGF- β に対する反応性はむしろ低下しており(Fig. 1)、CFSC-2Gにおいては内因性のTGF- β シグナル伝達系が既に活性化されている可能性が示された。

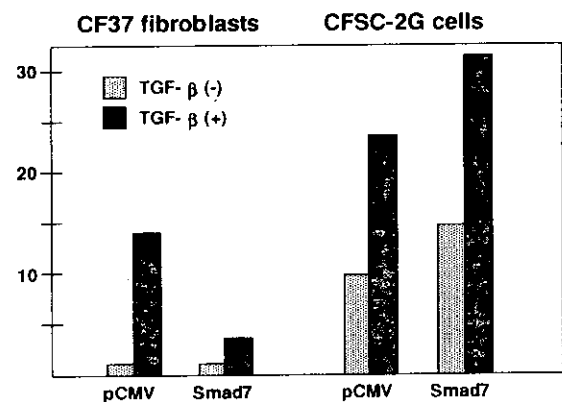


Figure 1. Effects of Smad7 expression on TGF- β -stimulated COL1A2 transcription.

The -378COL1A2/LUC reporter construct was transfected together with a control vector (pCMV5) or a cytomegalovirus (CMV) promoter-driven Smad7 expression plasmid into primary culture of skin fibroblasts (CF37) or activated stellate cells (CFSC-2G) untreated or treated with TGF- β .

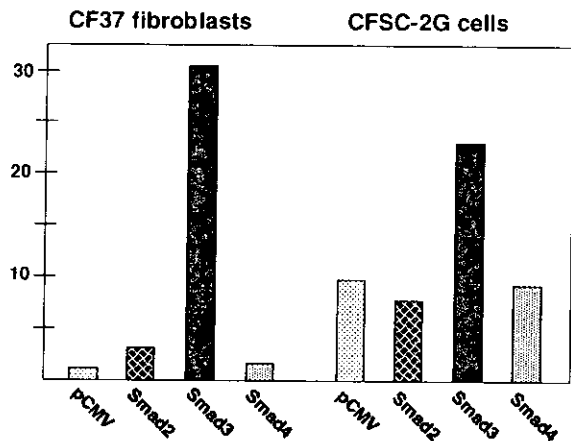


Figure 2. Effects of Smad2, Smad3 and Smad4 expression on COL1A2 transcription. CF37 or CFSC-2G cells were transfected with the -378COL1A2/LUC reporter construct together with pCMV5 or CMV promoter-driven Smad2, Smad3 or Smad4 expression plasmid.

次に、CF37にSmad2、3および4をco-transfectionすると、COL1A2転写はそれぞれ対照の2.7倍、30.6倍、1.4倍に増強し、皮膚線維芽細胞におけるCOL1A2転写にはSmad3が重要な役割を果たしていると考えられた (Fig. 2)。CFSC-2GにおいてもSmad3のco-transfectionが最も転写活性を増加させたが、その増加は2.4倍にとどまり (Fig. 2)、リガンド刺激のみならずSmad3の過剰発現に対する反応性も低下していた。

また、Smad7をco-transfectionすると、CF37におけるTGF- β の転写促進効果が13.8倍から3.3倍に抑制されたのに対して、CFSC-2Gではこの転写抑制効果はみられなかった (Fig. 1)。

次いで、CF37におけるCOL1A2転写に対するSmad3と各転写因子 (Sp1、c-JunならびにFos)との相互作用を検討すると、Sp1の発現により4倍の増加を示した転写活性がSmad3のco-transfectionにより20倍以上へとさらに増加を示したのに対して、c-JunやFosを発現させた際のCOL1A2転写活性は低下もしくは不変で、Smad3のco-transfectionによる増強効果もみられなかった (Fig. 3)。TGF- β によるCOL1A2の転写促進作用領域として、我々が同定したThREの他に、その最下流に位置するAP1結合領域の関与も報告された⁴⁾が、今回のSmad3とのco-transfection実験結果からもc-JunやFosの関与は否定的であった。

結 論

1) 皮膚線維芽細胞におけるCOL1A2転写には、

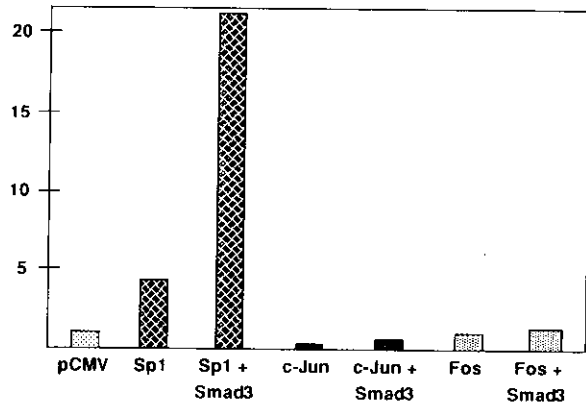


Figure 3. Co-transfection of Smad3 and nuclear factor expression plasmid. CF37 cells were transfected with the -378COL1A2/LUC reporter construct together with one of the nuclear factor expression plasmids (Sp1, c-Jun or Fos) plus/minus Smad3 expression plasmid.

そのプロモーター上のThREに結合するSp1とSmad3とのinteractionが重要と考えられ、c-JunやFosの関与は否定的であった。

2) 内因性コラーゲン発現が亢進した活性化星細胞においては、リガンド刺激やSmad3の過剰発現に対する反応性が低下しており、内因性のTGF- β シグナル系が既に活性化状態にある可能性が示された。また、Smad7による転写抑制からの脱制御もみられ、これが同細胞において過剰のコラーゲン発現を引き起こす一因と考えられた。

文 献

- 1) Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P: TGF- β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 1997; 16: 5353-62.
- 2) Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian J, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin N-E, Heldin C-H, ten Dijke P: Identification of Smad7, a TGF- β -Inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* 1997; 389: 631-5.
- 3) Inagaki Y, Truter S, Ramirez F: Transforming growth factor- β stimulates $\alpha 2(I)$ collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1 binding site. *J Biol Chem* 1994; 269: 14828-34.
- 4) Greenwel P, Inagaki Y, Hu W, Walsh M, Ramirez F: Sp1 is required for the early response of $\alpha 2(I)$ collagen to transforming factor- $\beta 1$. *J Biol Chem* 1997; 272: 19738-45.

- 5) Chen S, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M, Varga J: Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF- β : involvement of Smad 3. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 49-57.
- 6) Chung K-Y, Agarwal A, Uitto J, Mauviel A: An AP1 binding sequence is essential for regulation of the human α 2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1996; 271: 3272-8.

T細胞レセプター刺激による TGF- β 刺激伝達系の修飾

班員：岩本逸夫（千葉大学第2内科）

共同研究者：真村瑞子、後藤大輔、倉沢和宏、中尾篤人（千葉大学第2内科）

Ligation of the T Cell Receptor Phosphorylates Smad2 and Modulates Transforming Growth Factor Signaling in T Lymphocytes

Itsuo IWAMOTO, Mizuko MAMURA, Daisuke GOTO, Kazuhiro KURASAWA,
and Atsuhito NAKAO

Department of Internal Medicine II, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan

Summary

T cells and transforming growth factor- β (TGF- β) play important roles in the development of systemic sclerosis. However, it remains unknown whether there exists crosswalk between T cell receptor (TCR)-mediated signals and TGF- β signals in T cells. Here, we showed that not only TGF- β but also TCR ligation phosphorylated Smad2 in primary T cells and the Jurkat T cell line. We further demonstrated that TGF- β -induced the interaction between Smad2 and Smad4 and translocation of Smad2 into the nucleus in the Jurkat T cell line. In contrast, ligation of TCR failed to induce Smad2/4 interaction and nuclear translocation of Smad2. In addition, PD98059, a MEK inhibitor, suppressed TCR-mediated but not TGF- β -mediated Smad2 phosphorylation in Jurkat T cell line. These findings indicated that TCR ligation activates mitogen-activated protein (MAP) kinase cascades to phosphorylate Smad2, which fails to interact with Smad4, suggesting that TCR-mediated signals inhibits TGF- β signaling pathways by blocking Smad2/4 interaction. This also suggests that activated T cells could be resistant to TGF- β mediated inhibitory signals and could be involved in the development of fibrotic lesions in systemic sclerosis where TGF- β is abundant.

はじめに

強皮症発症においてT細胞は重要な役割を果たしている^{1,2)}。強皮症T細胞は線維化病変部に浸潤し、活性化され、サイトカインを分泌し、病変形成に関与している。実際、線維化病変部には主として活性化されたT細胞が浸潤しており、そのT細胞レセプター(TCR)は限定されている。さらに、我々は強皮症患者の末梢血、皮膚、および肺病変においてT細胞由来サイトカインであるInterleukin-17の産生が亢進していることを報告してきた³⁾。したがって、強皮症病変部には抗原で活性化されたT細胞が存在し、その病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

Transforming growth factor- β (TGF- β)は強皮症発症に重要な役割を果たしているサイトカインである⁴⁾。TGF- β は線維芽細胞を増殖させ、そのコラーゲン合成を増強させる⁵⁾。さらに、TGF- β 産生亢進が強皮症患者の線維化病変部で報告されている⁶⁾。一方、TGF- β はT細胞活性化には抑制的に働くことが知られている。したがって、強皮症の病態形成におけるT細胞の役割を評価するうえで、T細胞活性化に対するTGF- β の効果を理解することは重要である。しかし、T細胞においてTCRよりの活性化シグナルとTGF- β レセプターからの抑制シグナルの2つのシグナル間の関係は不明である。近年、TGF- β のシグナル伝達系が明らかにされてきた⁷⁾。TGF- β がTGF- β レセプターに結合することにより、TGF- β レセプターは活性化し、Smad2あるいはSmad3をリン酸化する。さらに、リン酸化Smad2/3はSmad4と会合、複合体を形成し、Smad2/3-Smad4複合体が核内に移行し、DNAと結合することにより、TGF- β シグナルが伝わる。したがって、本研究は、T細胞の活性化を誘導するTCR刺激がTGF- β のシグナル伝達系を修飾しているか否かを明らかにするために、Smad2のリン酸化、Smad2のSmad4との会合、Smad2/4複合体の核内移行について検討した。

材料および方法

細胞 ヒトT細胞は末梢血よりFicoll-Hypaqueで単核球を分離した後、抗CD3抗体結合マイクロビーズとMACS (Miltenyi Biotech GmbH)を用い精製分離し、実験に用いた。純度は99%以上であった。また、ヒトT細胞腫瘍細胞株であるJurkat細胞を一部実験に用いた。

培養およびT細胞刺激 ヒトT細胞およびJurkat

細胞は10%牛胎仔血清を含むRPMI1640培地で培養された。これら細胞はTGF- β (1-10 ng/ml) (R&D)により、あるいはanti-CD3 mAb (OKT3: 100 mg/ml) (Ortho Biotech)と抗マウスIgG抗体(10mg/ml)のcross-linkによるTCR刺激により刺激された。一部の実験においては、MEK inhibitorであるPD98059 (New England Biolab)または抗TGF- β 抗体(50 mg/ml) (R&D)の存在下でT細胞は刺激された。

RT-PCR T細胞におけるSmadの存在はspecific primerを用いたRT-PCR法で行った。すなわち、total RNAをIsogen (Nippon Gene)を用い分離し、1st cDNA Synthesis kit (Boehringer Mannheim)を用い、cDNAを合成し、以下のprimerを用いて、PCR増幅し(94°C 1.5分、59°C 1分、72°C 1分; 30サイクル)、PCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動をおこない検出した。Smad2 (5'-AGTATGGACACAGGCTCTCC-3' and 3'-GTCTTATGGCTTCCGCTCTG-5'), Smad3 (5'-TCCCCAGCACATAATAACTT-3' and 3'-TAAAAACAGGTCAGAGGGT-5'), Smad4 (5'-ATCTGAGTCTAATGCTACCAGC-3' and 3'-TTGTGGAACGACCTAACTT-5') and HPRT (5'-TTCTTTGCTGACCTGCTG-3' and 3'-TTTCTACCAGTTCCAGCG-5')。

ウエスタンブロット Smad2、Smad4の蛋白レベルでの検出は抗Smad2、Smad4抗体(Transduction Laboratories)を用いた。リン酸化Smad2の検出はTGF- β によりリン酸化されるSmad2に対するポリクローナル抗体⁷⁾を用いた。Smad2とSmad4の会合は抗Smad2抗体で免疫沈降をおこない、抗Smad4抗体にて検出した。

Smad2の核内移行 Smad2タンパクの核内移行は刺激T細胞をアセトン固定し、抗Smad2抗体とFITC結合2次抗体にて細胞を染色し、cofocal顕微鏡で解析した。

結果

T細胞におけるSmad2、3、4 mRNAの発現

Smad2、3、4がmRNAレベルでT細胞に発現しているかRT-PCR法を用い検討した。Smad2、3、4 mRNAはヒト末梢血T細胞およびJurkat細胞で検出された(Fig. 1)。なお、CD4およびCD8陽性細胞ともSmad2、3、4 mRNAを発現していた。

TGF- β 刺激によるSmad2のリン酸化

TGF- β によりSmad2のリン酸化が誘導される

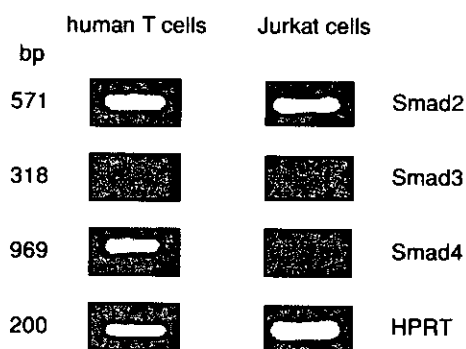


Fig. 1. Expression of Smad2, 3 and 4 mRNA in T cells. Total RNA was extracted from human peripheral T cells and Jurkat T cell line. cDNA of Smad2, 3 and 4 mRNA and HPRT as an internal control were amplified by PCR. The PCR products were visualized by electrophoresis on 1.5% agarose gel. The data are representative of three experiments.

か抗リン酸化 Smad2 抗体を用い検討した。リン酸化 Smad2 はヒト末梢血 T 細胞および Jurkat 細胞において TGF- β (10 ng/ml) 刺激後 15-30 分に認められた (Fig. 2)。

TCR 刺激による Smad2 リン酸化

TCR 刺激が Smad2 をリン酸化するか否かをヒト末梢血 T 細胞および Jurkat 細胞にて検討した。ヒト

末梢血 T 細胞では抗 CD3 抗体刺激により、リン酸化 Smad2 が刺激後 5 分より認められ、15-30 分において最大となった (Fig. 3)。この Smad2 のリン酸化が活性化 T 細胞により産生された TGF- β により引き起こされる可能性を検討するために、抗 TGF- β 抗体存在下での TGF- β および TCR 刺激による T 細胞 Smad2 のリン酸化を検討した。抗 TGF- β 抗体は TGF- β による Smad2 のリン酸化は抑制したが、TCR 刺激によるリン酸化は抑制しなかった (Fig. 4)。なお、同様の Smad2 のリン酸化は Jurkat 細胞でも認められた。したがって、TCR からの刺激は TGF- β のシグナル伝達分子として同定された Smad2 をリン酸化することが明らかになった⁸⁾。

TCR 刺激による Smad2 リン酸化に対する MEK inhibitor の効果

さらに、TCR による Smad2 リン酸化が TCR 刺激によって活性化するいかなる刺激伝達系によって引き起こされるか検討した。我々は TCR 刺激により活性化される MEK/MAP kinase 系が Smad2 のリン酸化に関与しているか明らかにするために MEK inhibitor である PD98059 の TCR 刺激による Smad2 リン酸化に対する効果を検討した。TGF- β による Smad2 のリン酸化は PD98059 により影響を受けなかったが、TCR 刺激による Smad2 リン酸化は抑制された (Fig. 5)。したがって、TCR 刺激は MEK/MAP kinase 系を介して Smad2 をリン酸化することが明らかになった⁸⁾。

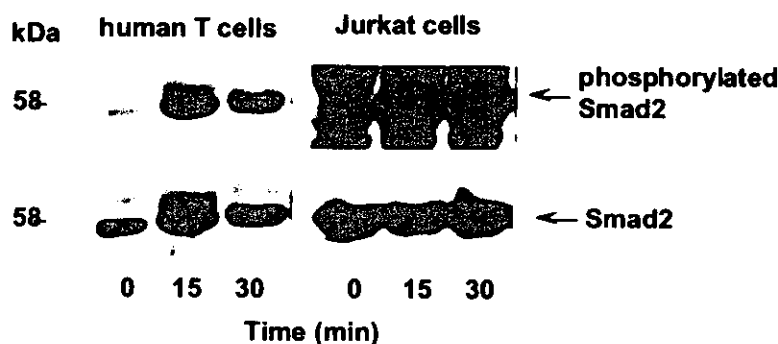


Fig. 2. Phosphorylation of Smad2 by TGF- β in T lymphocytes. Human peripheral T cells and Jurkat T cell line (1×10^6 /ml) were stimulated with TGF- β 1 (10 ng/ml) at 37°C for indicated time. Cell lysates were immunoblotted with anti-phosphorylated Smad2 antibody (upper panel) or anti-Smad2 antibody (lower panel). The position of phosphorylated and nonphosphorylated Smad2 at approximately 60 kDa is shown by the arrows. The data are representative of three experiments.

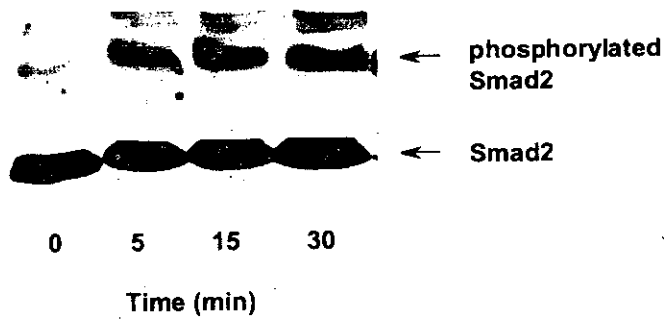


Fig. 3. Phosphorylation of Smad2 by TCR ligation in T lymphocytes. Human peripheral T cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$) were stimulated with anti-CD3 mAb at 37°C for the indicated time and cell lysates were immunoblotted with anti-phosphorylated Smad2 antibody (upper panel) or anti-Smad2 antibody (lower panel). The data are representative of three experiments.

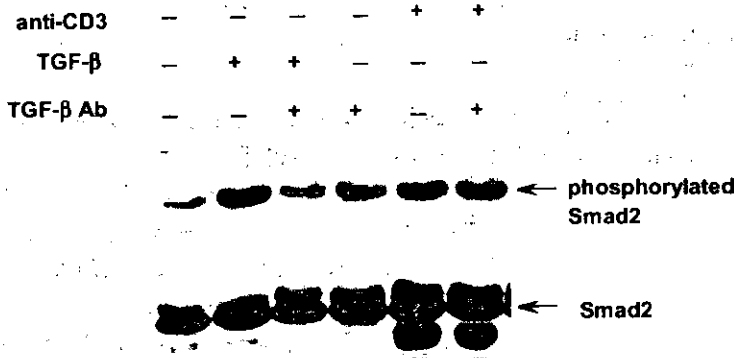


Fig. 4. Effect of neutralizing antibody against TGF- β on phosphorylation of Smad2 by TCR ligation. Human peripheral T cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$) were stimulated with anti-CD3 mAb in the presence or absence of neutralizing antibody against TGF- β ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) at 37°C for 20 min and cell lysates were immunoblotted with anti-phosphorylated Smad2 antibody (upper panel) or anti-Smad2 antibody (lower panel). The data are representative of three experiments.

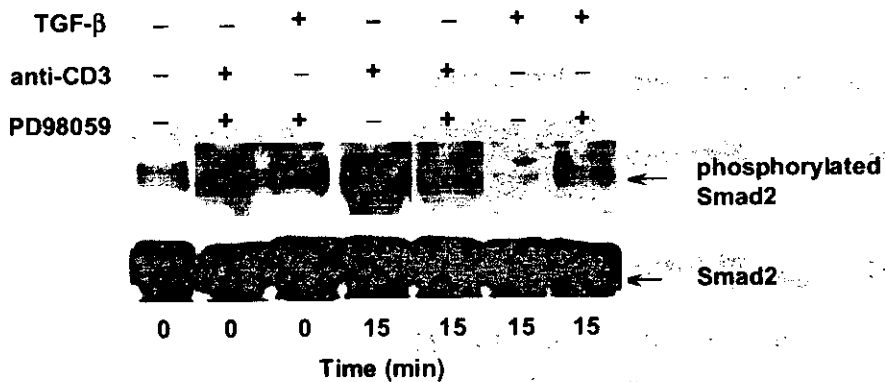


Fig. 5. Effect of MEK inhibitor on phosphorylation of Smad2 by TCR ligation. Jurkat T cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$) were stimulated with anti-CD3 mAb or TGF- β ($10 \text{ ng}/\text{ml}$) for the indicated time in the presence or absence of PD98059 (20 mM) and cell lysates were immunoblotted with anti-phosphorylated Smad2 antibody (upper panel) or anti-Smad2 antibody (lower panel). The data are representative of three experiments.

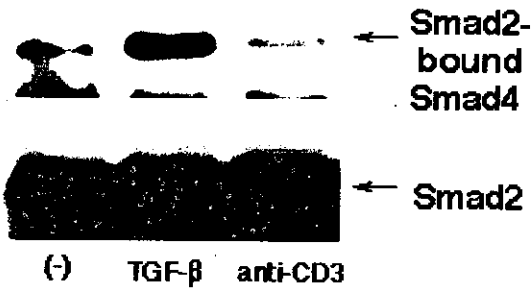


Fig. 6. Effect of TCR ligation on Smad 2-4 interaction. Jurkat T cells (1×10^6 /ml) were stimulated with anti-CD3 mAb or TGF- β at 37°C for 60 min. Cell lysates were then immunoprecipitated with anti-Smad2 antibody followed by immunoblotting with anti-Smad4 antibody. Equal expression of Smad2 was confirmed by immunoblotting with anti-Smad2 antibody (lower panel). The data are representative of three experiments.

TCR刺激によるSmad2/Smad4の会合および核内移行

TCR刺激により誘導されたリン酸化Smad2が、TGF- β によるリン酸化と同様にSmad4と会合、核内に移行し、シグナルを伝えるか検討した。まず、Smad2とSmad4の会合がTCR刺激により誘導されるかJurkat細胞を用い検討した。このために刺激細胞より作成したcell lysateを抗Smad2抗体で免疫沈降し、抗Smad4抗体で検出した。Smad2/4の会合はTGF- β 刺激により認められたが、TCR刺激によっては認められなかった (Fig. 6)。次にTCR刺激によりSmad2の核内移行が引き起こされるか検討した。TGF- β 刺激はSmad2の核内移行を引き起こしたが、TCR刺激は核内移行を惹起しなかった (Fig. 7)。さらに、TCR刺激とTGF- β 刺激を同時におこなった場合にはSmad2のリン酸化は認められるが、Smad2/4の会合は認められなかった。したがって、TCR刺激はSmad2をリン酸化するが、そのリン酸化Smad2はSmad4と会合できないため、シグナルは伝えず、逆にTGF- β 刺激伝達系を抑制するように働くことが明らかになった。

考案

本研究はT細胞においてTCR刺激はTGF- β シグナル伝達分子であるSmad2をリン酸化することを明らかにした。このTCR刺激によるSmad2のリン酸化はMEK/MAPKを介して起こることを示した。しかし、TCR刺激によるリン酸化Smad2は、TGF-

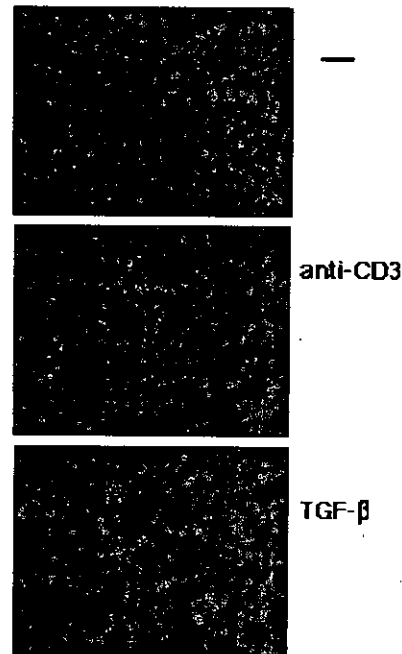


Fig. 7. Effect of TCR ligation on nuclear translocation of Smad 2. Jurkat T cells (1×10^6 /ml) were stimulated with anti-CD3 mAb or TGF- β (10 ng/ml) at 37°C for 60 min. Cells were fixed with ice-cold acetone, stained with anti-Smad2 antibody and FITC conjugated anti-rabbit IgG antibody and analyzed with confocal microscopy. The data are representative of three experiments.

β の場合と異なり、Smad4とは会合できないためシグナルは伝えず、逆にTGF- β によるシグナル伝達を抑制するように働くことを明らかにした。

近年、TGF- β シグナルと他の刺激伝導系のcross-talkが次第に明らかにされてきた。Caestecker等はHepatocyte growth factorおよびepidermal growth factorがMEK/MAPK系を介し、Smad2をリン酸化することを報告している⁹⁾。また、TGF- β シグナルを抑制するSmad7の発現をIFN- γ が誘導することも報告されている¹⁰⁾。本研究はT細胞ではTCR刺激がMAP kinase系を介してSmad2をリン酸化することを見だし、TCRシグナル伝達系が直接TGF- β シグナル伝達系とcross-talkしていることを明らかにした。

さらに、本研究はTCR刺激によりリン酸化されたSmad2はSmad4と会合できずシグナルを伝えることができず、むしろ、TGF- β シグナルを抑制するように働く可能性を明らかにした。Kretschmar等は、oncogenic RasはMAPK系を介しSmad2をリン酸化するが、そのリン酸化部位は、TGF- β によりリン酸化されるC末端のセリンと異なりlinker部のセ

リンであることを示した¹¹⁾。さらに彼らは oncogenic Ras によりリン酸化された Smad2 は、核内移行ができず、TGF- β の作用を抑制することを明らかにした。本実験で用いた抗リン酸化 Smad2 抗体は TGF- β によりリン酸化される C 末端のセリンのリン酸化部位を認識する抗体であるが⁷⁾、TCR 刺激により linker 部のリン酸化が起こり、Smad2/4 の会合がおこらず、TGF- β シグナル伝達系を抑制している可能性がある。なお、TCR 刺激によりリン酸化された Smad2 の他の役割は今後の検討課題であろう。

TCR 刺激が TGF- β 刺激伝達系を抑制することは、TGF- β の T 細胞に対する効果が免疫抑制であることより、TCR 刺激により活性化した T 細胞は TGF- β の抑制効果を受け難くなると予想される。実際、活性化 T 細胞を TGF- β 存在下で培養しても、その増殖反応は抑制されないことを我々は見いだしている。したがって、TGF- β 産生が亢進している線維化病変部においても活性化 T 細胞の機能は抑制されずに T 細胞はサイトカイン分泌などにより強皮症病変の形成に関与している可能性が示された。

以上、T 細胞において TCR 刺激は MEK/MAP kinase 系を介して Smad2 をリン酸化するが、そのリン酸化 Smad2 は Smad4 と会合できず、TGF- β シグナルを抑制するように働く。このことは抗原刺激が T 細胞を TGF- β による抑制を受けにくくし、活性化 T 細胞が強皮症病変形成に関与する可能性を示唆する。

文 献

- 1) Silver RM. Systemic sclerosis. In: Frank MM, Austen KF, Claman HN, Unanue ER, editors. *Samter's Immunologic diseases*. Boston: Little, Brown; 1995. p805-822.
- 2) White B. Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin in Rheumatol* 1995; 7: 541-555.
- 3) Kurasawa K, Hirose K, Sano H, et al: Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* (in press).
- 4) Roberts AB, Roberts AB, Sporn MB, et al: Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4167-4171.
- 5) Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, et al: Co-localization of transforming growth factor β 2 with α 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1990; 86: 917-922.
- 6) Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P: TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471.
- 7) Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, et al: TGF- β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 1997; 6: 5353-5362.
- 8) Mamura M, Nakao A, Goto D, et al: Ligation of the T cell receptor complex results in phosphorylation of Smad2 in T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 268: 124-127.
- 9) de Caestecker MP, Parks WT, Frank CJ, et al: Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev*. 1998; 12: 1587-1592.
- 10) Ulloa L, Doody J, Massague J, et al: Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signalling by the interferon- γ /STAT pathway. *Nature*. 1999; 397: 710-713.
- 11) Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, et al: A mechanism of repression of TGF β /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev*. 1999; 13: 804-816.

汎発性強皮症皮膚線維芽細胞における転写因子 Sp1 および Sp3 の発現, DNA 結合性についての検討

研究協力者： 尹 浩信 (東京大学 皮膚科)

共同研究者： 玉置邦彦 (東京大学 皮膚科)

Expression Levels and DNA binding Activities of Sp1 and Sp3 in Scleroderma Fibroblasts

Hironobu IHN, Kunihiko TAMAKI

Department of Dermatology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Summary

In this study, we investigated the potential roles of transcription factor Sp1 and Sp3 in the increased expression of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene in scleroderma fibroblasts. Scleroderma fibroblasts showed basal $\alpha 2(I)$ collagen gene mRNA levels about three times higher than those of normal fibroblasts. TGF- β or oncostatin M increased human $\alpha 2(I)$ collagen mRNA expression in normal dermal fibroblasts, but these cytokines failed to increase $\alpha 2(I)$ collagen mRNA levels in SSc fibroblasts. There were no significant differences in the expression levels of Sp1 or Sp3 between scleroderma and normal fibroblasts. However, increased Sp1 phosphorylation was detected in scleroderma fibroblasts compared with normal fibroblasts. Mithramycin, a specific inhibitor of Sp1 binding, abolished the increased expression of the $\alpha 2(I)$ collagen gene in scleroderma fibroblasts in a dose-dependent manner. These results demonstrated the involvement of Sp1 in the up-regulation of the $\alpha 2(I)$ collagen gene in scleroderma fibroblasts.