

表1 強皮症患者における血清IL-12高値検出群と未検出群間の臨床像および検査所見の比較検討

Variables	Patients with detectable IL-12 (n=9)	Patients without detectable IL-12 (n=26)	P
anti-Topoisomerase -I	44 % (4)	44 % (4)	NS
anti-Centromere	40 % (11)	19.2 % (5)	NS
anti-U1RNP	22% (2)	15.4 % (4)	NS
ANA	22 % (2)	92.3 % (24)	NS
CRP elevation	100 % (9)	26.9 % (7)	NS
ESR elevation	56 % (5)	30.8 % (24)	NS
Characteristics			
Sex (male:female)	2:7	5:21	NS
Age (years)	62.4	56.0	NS
Duration of disease (years)	8.1	6.6	NS
Raynaud's phenomenon	100 % (9)	92.3 % (24)	NS
Pitting scars/ulcers	78.0 % (7)	23.0 % (6)	0.003
Short sublingal frenulum	56.0 % (5)	57.6 % (15)	NS
Contracture of phalanges	22.0 % (2)	11.5 % (3)	NS
Pigmentation	44.0 % (4)	69.2 % (18)	NS
Telangiectasia	56.0 % (5)	30.8 % (8)	NS
Calcinosis	0 % (0)	3.8 % (1)	NS
Organ involvement (%)			
Esophagus	88.9 % (8)	57.6 % (15)	NS
Lung	66.7% (6)	53.8% (14)	NS
Decreased %DLco	30.0% (3)	15.4 % (4)	NS
Decreased %VC	44.4% (4)	11.5 % (3)	NS
Heart	11.1 % (1)	11.5 % (3)	NS
Kidney	0 % (0)	3.8 % (1)	NS
Joint	78.7 % (7)	57.6 % (15)	NS
Muscle	11.1 % (1)	15.4 % (4)	NS

強皮症患者における血清IL-12高値検出群 (n=9) と未検出群間 (n=26) の臨床所見および検査所見を比較した。血清IL-12検出SSc患者群の指尖部潰瘍瘻痕に有意に高い陽性率を認めた (p<0.003)。

ならびに bFGF (FGF2) レベルを測定したところ、いずれのレベルも健常者コントロールおよびSLE群と有意差を認めなかった。

考 案

我々はこれまで、抗核抗体発現と強皮症の臨床病態との関連について調べてきた²⁾。加えて、今回、さらに強皮症の患者の一部 (26%) において血清 IL-12 値が検出可能な高いレベルを示すことを報告した。活性化T細胞により発現されるCD40 L分子が、主にマクロファージなどのCD40陽性細胞にシグナルを伝えることから IL-12 産生が誘導される³⁾。さらに産生された IL-12はTナイーブ細胞に作用し、IFN γ やIL-2を産生するようになるTh1系への分化をシフトさせることが知られており、とくに細胞性免疫が主病態と考えられる慢性関節リウマチにおいて

も血清レベルが高いことが報告されている⁴⁾。

強皮症患者のTh1/Th2バランスについては議論の多いところであり、従来の報告でも、Th2系優位な免疫系の制御も報告されているが、Th1系サイトカインの関与も指摘されている⁵⁾⁶⁾。極く最近、SatoらはSSc患者名の血清IL-12を測定した結果、我々と同様にSSc患者の中に血清IL-12が高いレベルを示す患者群が存在すること、さらに健常者血清と比較しても、有意に高いレベルを示すことを報告している⁷⁾。また、末梢血単核細胞(PBMC)によるIL-12産生能もSSc患者において有意に高値を呈したことから、高い血清レベルを示すIL-12の産生細胞は、PBMC中の単球であることが示唆されている。さらに我々は、現時点ではまだ症例数が少ないものの、SSc初診症例の生検皮膚において他の炎症性サイトカインmRNAに加えて、IL-12mRNAが発現していることを報告した。これら皮膚局所と血清中のIL-12がSScの

表2 強皮症患者皮膚局所におけるサイトカインmRNA発現の検出 (RT-PCR法)

Cytokine Primers	Normal donor #1	SSc #1	Cytokine Primers	Normal donor #1	SSc #1
GAPDH	+	+	GAPDH	+	+
IL-4	-	-	TNF α	-	-
IFN γ	-	-	IL-1 β	+	-
IL-2	-	-	GM-CSF	-	-
IL-5	-	-	IL-6	-	++
IL-13	-	-	IL-8	-	+
IL-12	-	+	TGF β	+	++
IL-10	-	-	(Total)		

病態に及ぼす生物学的作用については、今後の研究の課題のひとつであると考えられる。

SSc患者の一部にみられる高い血清レベルのIL-12の強皮症病態に対する生物学的意味は何であるのか？今回の検討により我々は、血清IL-12値が検出可能な高いレベルを示すSSc患者群の臨床像の特徴として、指尖部潰瘍瘻痕の陽性率が統計上有意に高いことを見出した。また、SSc患者皮膚生検組織のRT-PCR法を用いたサイトカインmRNA発現解析により、局所においても、IL-12が産生されている可能性を明らかにした。

IL-12が、TGF β などの血管新生作用を有するサイトカイン環境を抑制的に制御している可能性がすでに指摘されていることから⁹⁾、指尖部潰瘍形成後の組織修復/再生段階における血管新生機能不全状態の表現としての陥凹型瘻痕が形成されやすいのかもしれない。一方、慢性関節リウマチでは、血清IL-12レベルが疾患活動性に相関することが報告されているが、dcSScおよびlcSScそれぞれの強皮症病型間には統計上の有意な差は認めなかった。

また最近、強皮症の動物モデルのひとつであるtight-skinマウスにIL-12をコードしたプラスミドを投与することで、皮膚のコラーゲン蓄積を抑えることができ、IL-12の強皮症病態に対する治療効果を期待する報告もあり¹⁰⁾、血清IL-12が生体側の補正機能の表現である可能性も考えられる。

線維芽細胞増殖因子 (FGF) は十数個の遺伝子からなり、さらにスプライシングを含むアイソタイプを加えると多数の分子群からなるファミリーを形成する。またそのレセプター (FGFR) も4つの遺伝子群からなり、FGFR1からFGFR4を含むスーパー Igファミ

リーを形成している。FGFファミリーとFGFRファミリーはそれぞれ交差して結合し得る。組み合わせにより結合親和力が異なるために、巧妙かつ特異的に線維芽細胞様細胞の増殖に作用し、発生・分化や病態形成時に多様性をもたらしていると考えられる。今回、強皮症患者血清の塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の血清レベルに関して追試するとともに、FGFとFGFRそれぞれのファミリー分子相関について皮膚局所における発現を調べた。その結果、SSc患者生検皮膚局所にFGF1、FGF 5、およびFGFR1の各mRNAの発現が認められた。しかしながら、血清中のTGF β ならびにbFGF (FGF2) いずれのレベルも健常者コントロールおよびSLE群と有意差を認めなかった。強皮症患者の皮膚局所のFGF/FGFRファミリー分子の発現に異常な偏りが存在するの否かについて、現在、さらに対象患者数を増やして検討を進めている。

文 献

- 1) Kikuchi K, Kadono T, Ihn H, Sato S, Igarashi A, Nakagawa H, Tamaki K, Takehara K. Growth regulation in scleroderma fibrosis: increased response to transforming growth factor- β 1. *J Invest Dermatol* 1995; **105**:128-32.
- 2) 野上玲子, 前川嘉洋. 当教室における汎発性強皮症の自己抗体の検討. *西日皮膚* 1986; **48**: 1082-1087.
- 3) Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immu

nity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; **13**: 251-76.

- 4) Kim W U, Min S Y, Cho ML, Youn J, Min J K, Lee SH, Park S H, Park S H, Cho C S, and Kim H Y. : The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* 2000; **119**: 175-81 .
- 5) Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, Pupilli C, Pizzolo G, Maggi E, Romagnani S. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol* 1997; **151**:1751-8.
- 6) Majumdar S, Li D, Ansari T, Pantelidis P, Black CM, Gizycki M, du Bois RM, Jeffery PK. Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies. *Eur Respir J* 1999;**14**:251-7.
- 7) Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, Nagaoka T, Hamaguchi Y, Nishijima C, Komatsu K, Hirata A, Takehara K: Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2000; **27**: 2838-42.
- 8) Wilkinson KA, Aung H, Wu M, Toossi Z: Modulation of transforming growth factor beta-1 gene expression by interleukin-12. *Scand. J. Immunol.* 2000; **52**:271-7.
- 9) Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G: Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 1996; **87**: 3877-82.
- 10) Tsuji-Yamada J, Nakazawa M, Takahashi K, Iijima K, Hattori S, Okuda K, Minami M, Ikezawa Z, Sakaki T : Effect of IL-12 encoding plasmid administration on tight-skin mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; **280**: 707-12.

強皮症患者血清に認識されるRNAポリメラーゼIII上の 主要なエピトープの解析

班 員：桑名正隆（慶應義塾大学 先端医科学）

Major Autoantigenic Epitopes on RNA Polymerase III Recognized by Sera from Patients with Systemic Sclerosis

Masataka KUWANA

Institute for Advanced Medical Research, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Summary

Autoantibody reactive with RNA polymerase I/III (RNAP I/III) is specific to systemic sclerosis (SSc) and is associated with a unique subset of diffuse cutaneous SSc having rapidly progressive skin thickening and a high frequency of renal crisis. The clinical usefulness of anti-RNAP I/III antibodies is widely accepted, but a practical assay to detect anti-RNAP I/III antibodies has not been established yet. We previously found that the major antigenic epitopes recognized by anti-RNAP I/III antibodies in SSc sera are located within the largest subunit (RPC155) and the 62-kDa polypeptide (RPC62) of RNAP III by immunoblots using affinity-purified RNAP I/II/III as an antigen source. To further determine the major epitopes on RPC155 and RPC62, four different portions of RPC155 and an entire open reading frame of RPC62 were expressed as recombinant proteins in a bacterial expression system and were used as antigens for immunoblots. Four RPC155 recombinant fragments were recognized by 11 SSc sera with anti-RNAP I/III antibodies in various combinations, but all anti-RNAP I/III-positive sera reacted with RPC155-C, corresponding to amino acid residues 732-1166 of the entire 1391 amino acids of RPC155. RPC155-C was not recognized by 10 SSc sera without anti-RNAP I/III antibodies or 6 healthy sera. A recombinant RPC62 was recognized by 6 (56%) of 11 anti-RNAP I/III-positive sera, but not by SSc sera without anti-RNAP I/III antibodies or healthy sera. In summary, our results indicate that recombinant RPC155-C contains the epitope commonly recognized by anti-RNAP I/III antibodies in SSc sera and is a candidate antigen used in solid-phase assays for detection of anti-RNAP I/III antibodies.

はじめに

強皮症患者血清中にはトポイソメラーゼ I やセントロメア/キネトコアなど重要な生物活性を持つ核蛋白に対する自己抗体が高頻度に検出される¹⁾。これら自己抗体は強皮症に特異的であることから、その診断に用いられている。また、抗トポイソメラーゼ I 抗体は肺線維症を伴う diffuse 型、抗セントロメア抗体は内臓病変が少ない limited 型と関連することから、これら自己抗体の検出は病型分類や予後の予測に有用である^{1, 2)}。

我々は 1993 年に複数の RNA ポリメラーゼ (RNAP) を同時に認識する自己抗体が強皮症患者に特異的に検出されることを報告した³⁾。RNAP は RNA の転写を触媒する酵素であり、RNAPI はリボソーム RNA、RNAPII は mRNA、RNAPIII は tRNA などの低分子 RNA をそれぞれ転写する。強皮症患者血清中には RNAPI と RNAPIII を同時に認識する抗体 (抗 RNAPI/III 抗体) が検出され、そのうち一部は RNAPII とも反応する。抗 RNAPI/III 抗体は強皮症に特異性がきわめて高く、これまで強皮症患者以外での報告はない。抗 RNAPI/III 抗体は急速に皮膚硬化が進行する diffuse 型に高頻度に検出され、強皮症腎を高率に併発し、予後の悪い病型と関連する³⁾。我々の成績は、その後欧米の施設での追試で確認されている^{4, 5)}。日本人強皮症患者における抗 RNAPI/III 抗体の陽性頻度は約 5% と少ないが、欧米白人強皮症患者での頻度は 20% を越える。この頻度は抗トポイソメラーゼ I 抗体の陽性頻度に匹敵し、抗セントロメア抗体に比べて高率である⁶⁾。近年、抗 RNAPI/III 抗体が検出された強皮症患者では、強皮症腎を早期に発見するための血圧自己測定を徹底させることが勧められている。強皮症腎を併発した際には、早期に ACE 阻害薬による治療を開始することで、生命予後の著明な改善が得られている。したがって、抗 RNAPI/III 抗体は強皮症の診断、病型分類、治療方針に決定に際してきわめて有用な自己抗体である。しかし、現時点では大量のアイソトープと培養細胞を用いる煩雑な免疫沈降法が抗 RNAPI/III 抗体を検出する唯一の方法である。そのため、一般検査室での抗 RNAPI/III 抗体の検出は困難であり、臨床的に有用なマーカーであるにもかかわらず、普及していない。したがって、抗 RNAPI/III 抗体の簡便な検出法の開発が急務である。

抗 RNAPI/III 抗体は従来自己抗体を検出するために行われてきた二重免疫拡散法や crude な抗原を用いた免疫プロット法では検出できない。RNAPI、III はいずれも 10 個以上のサブユニットから構成される複合体であり、細胞内における個々のサブユニッ

トの分子数も少ない。したがって、培養細胞からの大量の RNAPI/III 抗原の精製は困難である。しかしながら、抗 RNAPI/III 抗体により高頻度に認識されるエピトープを含むサブユニットが同定されれば、そのサブユニットを分子生物学的手法を用いて大量に発現させ、酵素免疫測定法 (ELISA) などの solid-phase assay の抗原として利用できる可能性がある。昨年度の本研究班での研究成果により、強皮症患者血清中の抗 RNAPI/III 抗体は RNAPIII の 155-kDa と 62-kDa のサブユニット (RPC155、RPC62) を高頻度に認識することが明らかにされた⁷⁾。そこで、今年度はこれら 2 つのサブユニットをリコンビナント蛋白として大腸菌で発現させ、強皮症患者血清中の抗 RNAPI/III 抗体により高頻度に認識されるエピトープ領域を解析することを目的とした。

材料と方法

対象 免疫沈降法で抗 RNAPI/III 抗体陽性が確認されている強皮症患者 11 例、同抗体陰性強皮症患者 10 例、健康人 6 例の血清を対象とした。強皮症患者は全例がアメリカリウマチ学会による分類予備基準⁸⁾ を満足していた。

免疫沈降法 ³⁵S メチオニンで標識した HeLa 細胞の可溶性細胞抽出物を抗原とした免疫沈降法を行った。抗 RNAPI/III 抗体は RNAPI の高分子サブユニット (190-kDa 蛋白と 126-kDa 蛋白) と RNAPIII の高分子サブユニット (155-kDa 蛋白と 138-kDa 蛋白) の沈降により同定した³⁾。

RPC155、RPC62 をコードする cDNA の分離

Genebank に登録されている RPC155 と RPC62 の cDNA の塩基配列^{9) 10)} をもとに特異的なプライマーを合成した。ヒト白血病細胞株 K562 から poly A⁺ の mRNA をマグネティックビーズ結合 oligo (dt)₂₅ (宝酒造, 東京) を用いて分離し、AMV の reverse transcriptase により一本鎖 cDNA へと変換し、さらにこれをテンプレートとして RPC62 の全 open reading frame (ORF) をコードする cDNA を増幅した。RPC155 の ORF は、それぞれ 30bp 以上を重複する 4 つの断片として、random hexamer により逆転写した一本鎖 cDNA をテンプレートとした PCR により増幅した。得られた DNA は pGEM-T ベクター (Promega, Madison, WI) にサブクローニングし、T7 および SP6 プライマーを用いて塩基配列を決定し、既知の塩基配列と比較した。

RPC155 と RPC62 のリコンビナント蛋白の発現

RPC155およびRPC62をコードするcDNAを蛋白発現ベクターpMAL-c2(New England Biolabs, Beverly, MA)のMalE遺伝子の下流にサブクローニングした。0.3 mM IPTGの添加により、RNAPサブユニットのリコンビナントポリペプチドをmaltose-binding protein (MBP)との融合蛋白として発現させた。

RPC62、RPC155 と反応する自己抗体の検出

RPC62およびRPC155のリコンビナント断片と反応する自己抗体は免疫ブロット法により検出した。リコンビナント抗原を発現した大腸菌の可溶成分を10%ポリアクリルアミド-SDSゲル電気泳動で分画し、ニトロセルロース膜に電気的に転写した。血清は250倍に希釈し、MBPの発現を誘導した大腸菌の可溶成分と反応させて大腸菌成分とMBPと反応する抗体を除去した。ニトロセルロース膜は血清、アルカリフォスファターゼ結合抗ヒトIgG抗体と順次反応させた。リコンビナント蛋白に結合した抗体はNBT/BCIPを基質とした呈色反応により検出した。

結果と考察

RPC62 リコンビナント蛋白に対する反応性

k562細胞株由来のcDNAから特異的プライマーを用いたPCRによりRPC62の全ORFをコードするcDNAの増幅を試みた。その結果、約1.7kbと1.6kbの二つのDNAが得られた。塩基配列を決定したところ、1.7kbのDNAは従来報告されていたRPC62の全ORFを含む1684bpのDNAの配列と一致した。一方、1.6kbのDNAはRPC62のアミノ酸残基62-99に相当する113bpが欠失しており、RPC62のalternative splicingの産物と考えられ、RPC62-delと名付けた。

RPC62-delでは、113bpの部分欠失の直後がframe shiftのため終止コドンとなっており、塩基配列から予想されるアミノ酸はRPC62の533個に比べてわずか62個であった。RT-PCRによる解析では、K562以外の腫瘍細胞株HeLa、HepG2、skme123でもRPC62とRPC62-delの両方のmRNAの発現を認めた。一方、各種ヒト組織ではRPC62のmRNAは腫瘍細胞株と同程度発現していたがRPC62-delのmRNAの発現はきわめて低かった。したがって、RPC62-delは腫瘍細胞で発現が亢進していたが、現時点ではその生理的活性は不明である。

RPC62とRPC62-delのcDNAをpMal-c2にサブクローニングし、MBPとの融合蛋白として発現させた。塩基配列からの予測通り、RPC62では約100 kDa、RPC62-delでは約50 kDa (MBPの分子量は43 kDa)の融合蛋白が発現された。RPC62融合蛋白に対する反応性は、抗RNAPI/III抗体陽性強皮症11例中6例(56%)で検出された(表1)。抗RNAPI/III抗体陰性強皮症10例、健常人6例の血清ではRPC62融合蛋白との反応性を認めなかった。一方、RPC62-del融合蛋白に対する反応性は、抗RNAPI/III抗体の有無にかかわらず強皮症、健常人血清で検出されなかった。

RPC155 リコンビナント蛋白に対する反応性

RPC155の全ORFを含むcDNAは4.2kb以上あり、そのために通常のRT-PCR法での増幅は困難であった。そこで、RPC155の全ORFを、少なくとも30bpはオーバーラップしてコードする4つのcDNA断片として増幅した。すなわち、1391個のアミノ酸で構成されるRPC155を、アミノ酸残基1-374番目(RPC155-A)、365-751番目(RPC155-B)、732-1166番目(RPC155-C)、1092-1391番目(RPC155-D)をそれぞれコードする4

Table 1. Reactivities to recombinant RNAP III fragments in SSc patients with or without anti-RNAP I/III antibodies and healthy individuals

Recombinant RNAP III fragment	SSc anti-RNAP I/III(+) (n = 11)	SSc anti-RNAP I/III(-) (n = 10)	Healthy individuals (n = 6)
RPC155-A	2(18%)	1 (10%)	0
RPC155-B2	1 (9%)	0	0
RPC155-C	11 (100%)	0	0
RPC155-D	3 (27%)	0	0
RPC62	6 (55%)	0	0

つの cDNA 断片として増幅した。得られた cDNA 断片は pGEM-T にサブクローニングし、塩基配列を決定し、既知の RPC155 の塩基配列と比較した。RPC155-A、-B、-C、-D のいずれも既知の配列と高度の相同性を有していたが、それぞれ 1 個または 2 個の塩基の相違を認めた。複数のコロニーの DNA からは同一の塩基配列が検出されたことから、PCR によるエラーよりも RPC155 遺伝子に存在する遺伝子多型性 (SNP) と考えられた。

RPC155-A、-B、-C、-D をそれぞれ pMAL-c2 にサブクローニングし、MBP との融合蛋白として発現させた。RPC155-A、-C、-D ではインサートの塩基配列および融合蛋白の分子量から、それぞれの部分をコードする融合蛋白の発現が確認された。しかし、RPC155-B の cDNA をサブクローニングした大腸菌のコロニーからはいずれも異なる RPC155 の塩基配列が検出された。いずれの塩基配列中にも塩基の欠失、挿入、変異を認め、その結果 RPC155-B の全長が発現されていなかった。そのため、最も長く original のアミノ酸配列を発現するクローンを RPC155-B2 (アミノ酸残基 365-451) と名付け、その後の解析に用いた (図 1)。RPC155 の 509-519 番目のアミノ酸配列は大腸菌からヒトのまで種を越えて広く保存されており、転写活性中心部分と考えられている⁹⁾。そのため、この活性中心部分を含むリコンビナント蛋白の発現が大腸菌に対して毒性に働き、これらの遺伝子の変異をもったクローンが選択された可能性が高い。

RPC155 をコードする 4 つのリコンビナント蛋白に対する抗 RNAPI/III 抗体陽性強皮症 11 例、抗 RNAPI/III 抗体陰性強皮症 10 例、健常人 6 例の血清の反応

性を免疫ブロットで調べた。表 1 に示すように、RPC155-A、-B2、-C、-D はそれぞれ 2 例 (18%)、1 例 (9%)、11 例 (100%)、3 例 (27%) の抗 RNAPI/III 抗体陽性血清により認識され、RPC155 分子上には自己抗体と反応する複数のエピトープが存在することが示された。特に、RPC155-C は抗 RNAPI/III 抗体が陽性の全例により認識され、抗 RNAPI/III 抗体陰性強皮症および健常人の血清には認識されなかった。したがって、抗 RNAPI/III 抗体陽性血清により共通して認識されるエピトープは RPC155-C に存在することが明らかとなった。RPC155-C には RNAPIII に特異的な領域や RNAPII とアミノ酸配列の相同性が高い領域が含まれており⁹⁾、今後の詳細なエピトープ部分の解析により強皮症における RNAP に対する自己抗体産生のメカニズムが解明される可能性がある。

抗 RNAPI/III 抗体を検出する ELISA への応用

元来、抗 RNAPI/III 抗体は免疫沈降法により同定された自己抗体であり³⁾、患者血清中の抗体は native な RNAP 分子と結合する。近年、膠原病患者血清中の自己抗体の多くは、native な分子上の conformational なエピトープと反応することが示されている¹¹⁾。したがって、大腸菌で発現させたリコンビナント蛋白は生体内の分子とは高次構造が異なるために、自己抗体との反応性が低い可能性がある。しかし、本研究により強皮症患者血清中の抗 RNAPI/III 抗体のうち少なくとも一部は大腸菌で発現させたサブユニットとも反応することが明らかとなった。したがって、大腸菌で発現させたリコンビナントのサブユニットでも抗 RNAPI/III 抗体を検出するアッセイの抗原として用いることができる可能性が

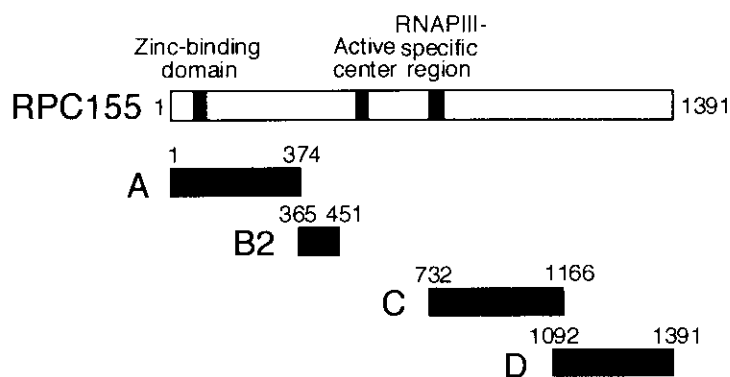


Figure 1. Recombinant RPC155 fragments used in this study. Four different portions of RPC155, including RPC155-A, B2, C, and D, were expressed as recombinant fusion proteins in bacteria, and used for immunoblotting.

考えられた。

今回の成績では、強皮症血清中の抗RNAPI/III抗体の多くがRPC155-Cと反応したことから、RPC155-Cが抗RNAPI/IIIを検出するELISAの抗原の候補の一つと考えられた。RPC155-Cは少なくとも今回検討した11例の抗RNAPI/III抗体陽性血清のすべてと反応し、対照として用いた抗RNAPI/III抗体陰性血清とは反応しなかった。したがって、感度、特異性ともに100%であり、抗RNAPI/III抗体の検出のために適した抗原と考えられる。ただし、現時点では検討した症例数が少ないため、さらに症例数を増やす必要がある。また、RPC155-Cは大腸菌で発現させるとdegradationしやすい。そのため、今後は主要なエピトープ部分を含むより小さい断片の作成または有核細胞での発現を検討すべきと思われる。

文 献

- 1) Okano Y: Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 1996; **22**: 709-35
- 2) Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M: Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; **37**: 75-83
- 3) Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M: Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993; **91**: 1399-404
- 4) Okano Y, Steen VD, Medsger TA Jr: Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1993; **119**: 1005-13
- 5) Harvey GR, Rands AL, McHugh NJ: Anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis (SSc). *Clin Exp Immunol* 1996; **105**: 468-74
- 6) Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Tojo T, Medsger TA Jr: Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1994; **37**: 902-6
- 7) Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Medsger TA Jr, Wright TM: Autoantibodies to RNA polymerases recognize multiple subunits and demonstrate cross-reactivity with RNA polymerase complexes. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 275-84
- 8) Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr, Altman RD, D'Angelo WA, Fries JF, et al: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; **23**: 581-90
- 9) Sepehri S, Hernandez N: The largest subunit of human RNA polymerase III is closely related to the largest subunit of yeast and Trypanosome RNA polymerase III. *Genome Res* 1997; **7**: 1006-19
- 10) Wang Z, Roeder RG: Three human RNA polymerase III-specific subunits from a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev* 1997; **11**: 1315-26
- 11) Kuwana M, Kaburaki J, Medsger TA Jr, Wright TM: An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 1179-88

GC box 結合因子と Smad タンパクによるコラーゲン 遺伝子の細胞種特異的転写調節機構

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）

Interaction Between GC Box Binding Factors and Smad Proteins Modulates Cell Lineage-specific Collagen Gene Transcription

Yutaka INAGAKI and Atsuhito NAKAO*

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

Summary

Systemic sclerosis, which is characterized by accelerated deposition of collagen in various organs, seldom involves liver. While activated hepatic stellate cells (HSC) are the main producers of type I collagen, parenchymal hepatocytes produce little, if any, of this protein during hepatic fibrogenesis. We have previously reported that a ubiquitous *trans*-activator Sp1 and interacting unknown factor(s) bind to the -313 to -255 sequence of $\alpha 2(I)$ collagen gene (COL1A2) and play essential roles for basal and TGF- β -stimulated transcription in skin fibroblasts and activated HSC. Recently Smad3 has been shown to bind to the region, and its interaction with Sp1 has been implicated in mediating TGF- β -elicited COL1A2 stimulation. The present study demonstrates the predominant binding of Sp3, rather than Sp1, to the -313 to -255 sequence in parenchymal hepatocytes. In these cells, this region did not exhibit strong enhancer activity or mediate the effect of TGF- β on COL1A2 transcription. Transfection of activated HSC with an Sp3 expression plasmid abolished the COL1A2 response to TGF- β , whereas overexpression of Sp1 in hepatocytes increased basal COL1A2 transcription and conferred TGF- β responsiveness. Functional interactions between Sp1 and Smad3, but not between Sp3 and Smad3, were demonstrated by co-transfection experiments. Altogether, the results indicate that cell lineage-specific interactions between GC box binding factors and Smad protein(s) may account, at least in part, for differential COL1A2 transcription and TGF- β responsiveness in activated HSC and parenchymal hepatocytes.

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するが、肝の線維化を伴うことは稀である。肝においては、星細胞がコラーゲンの主要産生細胞と考えられているのに対して、肝実質細胞の関与は専ら否定的である¹⁾。TGF- β はコラーゲン発現の主要促進因子であり、近年そ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²⁾。

これまで本研究者は、I型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖をコードする $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子(COL1A2)のプロモーター上に、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であることを示してきた^{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る³⁾。最近になって後者にSmad3の結合が示され^{5, 6)}、Smad3とSp1とのinteractionがTGF- β の作用を伝達する上で必要かつ必須と考えられている⁷⁾。

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転写の細胞種特異的調節機構について解析を行った。

材料と方法

細胞培養 コラゲナーゼ還流法により得られたラット初代培養肝細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)を添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用いて、また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活性化星細胞株は、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の存在下で培養した。

ゲルシフトアッセイおよびウェスタンブロッティング コラーゲン産生性の活性化星細胞株と、非産生性の初代培養肝細胞からそれぞれ核タンパクを抽出し、COL1A2プロモーター上のTbREに結合する転写因子について、ゲルシフトアッセイにより解析した。また、特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、核タンパク抽出液中の転写因子の量を半定量的に解析した。

トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッ

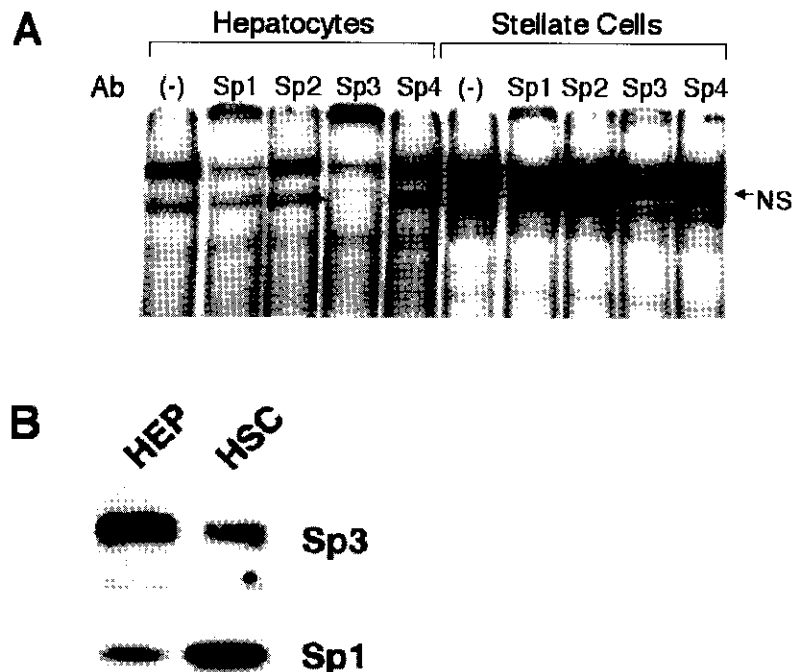


Fig. 1. Gel mobility shift assays and Western blot analyses of the GC box binding nuclear factors. A; Nuclear extracts prepared from primary culture of hepatocytes and activated stellate cells were incubated with the COL1A2 promoter sequence containing GC boxes. Antibodies against Sp1, Sp2, Sp3 or Sp4 were used for interference assays. The arrowheads indicate the complexes most effectively affected by the addition of anti-Sp1 or anti-Sp3 antibodies. NS, non-specific band. B; Nuclear proteins prepared from freshly isolated hepatocytes (HEP) and stellate cells (HSC) were immunoblotted with anti-Sp1 or anti-Sp3 antibodies.

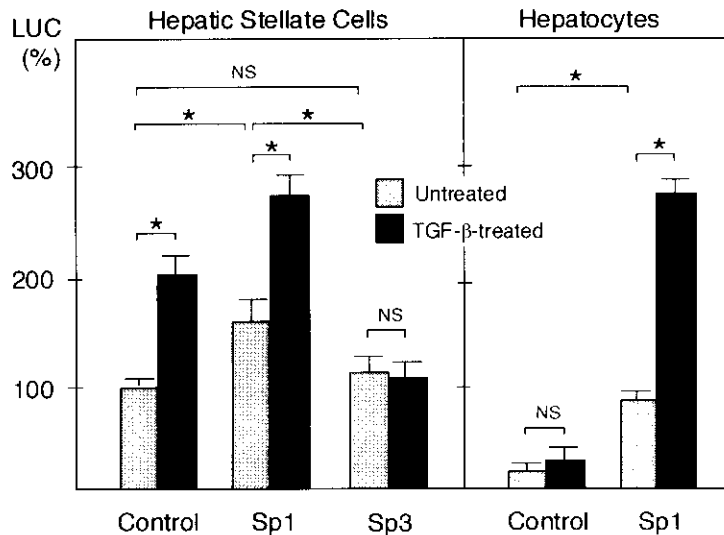


Fig. 2. Effects of overexpression of Sp1 or Sp3 protein on COL1A2 transcription. Activated stellate cells and primary culture of hepatocytes were transfected with the -378COL1A2/LUC construct together with a control empty vector or expression plasmids encoding either Sp1 or Sp3, then untreated or treated with TGF- β . The values are mean \pm SD obtained from five independent tests and expressed relative to the activity in untreated stellate cells co-transfected with the control expression vector. The asterisk means that the values are significantly different between the groups. NS, not significant.

セイ 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ルシフェラーゼ遺伝子に連結した癒合遺伝子(-378COL1A2/LUC)をレポーターとし、Sp1ならびにSp3のGC box結合因子とSmad3の各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発現プラスミドをトランスフェクションして、COL1A2の基礎転写やTGF- β に対する反応性に与える影響について検討した。トランスフェクション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105秒間のショックを行った。PBSで3回洗浄した後に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は、デュアルルシフェラーゼ・アッセイシステム (Promega)を用いて行った。

結果と考察

活性化星細胞ならびに初代培養肝細胞から核タンパクを抽出してGC boxをプローブとするゲルシフトアッセイを行うと、少なくとも下方のバンドは両細胞種間で異なる泳動度を示した (Fig. 1A)。特異的抗体を用いてantibody interference assayを行うと、活性化星細胞においては専らSp1がGC boxに結合しているのに対して、肝実質細胞ではSp3の結合

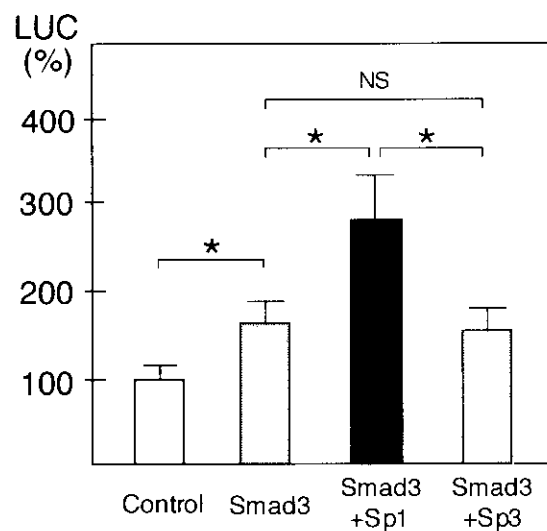


Fig. 3. Functional interaction between Sp1/Sp3 transcription factors and Smad3. Activated stellate cells were transfected with the -378COL1A2/LUC construct together with a control empty vector or a Smad3 expression plasmid. In some cases, either Sp1 or Sp3 expression plasmid was co-transfected together with a Smad3 expression vector. The values are mean \pm SD obtained from five independent tests and expressed relative to the activity in cells transfected with the -378COL1A2/LUC construct together with an empty expression vector. The asterisk means that the values are significantly different between the groups. NS, not significant.

が優位に認められた (Fig. 1A). 両細胞の核内に存在する Sp1 と Sp3 のタンパク量をより定量的に解析するために, 特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングを行うと, 星細胞の核内にはより多くの Sp1 が, 肝実質細胞にはより多くの Sp3 が存在していた (Fig. 1B).

活性化星細胞に Sp1 発現プラスミドをトランスフェクションすると基礎転写が増加し, TGF- β に対する反応性も保持されていたのに対して, Sp3 を過剰発現すると TGF- β による転写促進が阻害された (Fig. 2). 一方, 初代培養肝細胞に Sp1 を過剰発現させると, 基礎転写の増加とともに TGF- β に対する反応性を獲得した (Fig. 2). 星細胞に Sp1 と Smad3 発現プラスミドを同時に過剰発現させると, COL1A2 転写は相乗的に増加したが, Sp3 と Smad3 を同時にトランスフェクションしても同様の相乗効果はみられなかった (Fig. 3).

結 論

コラーゲン産生性の活性化星細胞と非産生性の肝実質細胞を比較することにより, コラーゲン遺伝子の細胞種特異的転写調節には遺伝子プロモーター領域に結合する Sp1 と Sp3 との量的バランス, さらにはこれら GC box 結合因子と Smad3 との相互作用が重要なはたらきを演じている可能性が示された.

文 献

- 1) Friedman SL: Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Seminars Liver Dis* 1990; **10**: 20-29
- 2) 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
- 3) Inagaki Y, Truter S, Ramirez F: Transforming growth factor- β stimulates α 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 α 2(I) collagen to transforming factor- β 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) Chen S-J, Yuan W, Lo S, Trojanowska M, Varga J: Interaction of Smad3 with a proximal Smad-binding element of the human α 2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF- β . *J Cell Physiol* 2000; **183**: 381-392

7) Zhang W, Oul J, Inagaki Y, Greenwel P, Ramirez F: Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor β 1 stimulation of α 2(I) collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem* 2000; **275**: 39237-39245

汎発性強皮症皮膚線維芽細胞のコラーゲン遺伝子 発現異常における TGF- β の関与について

班 員：尹 浩信（東京大学医学部皮膚科）

共同研究者：山根謙一、久保正英、玉置邦彦（東京大学医学部皮膚科）

Blockade of Endogenous Transforming Growth Factor β Signaling Prevents Up-Regulated Collagen Synthesis in Scleroderma Fibroblasts

Hironobu IHN, Kenichi YAMANE, Masahide KUBO, Kunihiro TAMAKI

Department of Dermatology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Summary

To elucidate the role of transforming growth factor β (TGF- β) in the increased expression of the collagen gene in systemic sclerosis (SSc) fibroblasts, we determined the production of TGF- β 1 levels, the expression of the TGF- β type I and type II receptor proteins, and the expression of messenger RNA and transcriptional activity of α 2(I) collagen gene in SSc fibroblasts. SSc fibroblasts expressed increased levels of TGF- β type I and type II receptors, but secreted amounts of TGF- β similar to those secreted by normal fibroblasts. The blockade of TGF- β signaling with anti-TGF- β antibodies or a TGF- β 1 antisense oligonucleotide abolished the increased mRNA expression, as well as the up-regulated transcriptional activity of the human- α 2 (I) collagen gene in SSc fibroblasts. These results suggest that TGF- β plays a crucial role in the pathogenesis of SSc and raise the possibility of a therapeutic approach with anti-TGF- β antibodies or a TGF- β 1 antisense oligonucleotide.

はじめに

汎発性強皮症は皮膚および内臓諸臓器における硬化性変化を主徴とし、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの過剰な沈着がその原因と考えられている。汎発性強皮症皮膚線維芽細胞が過剰に細胞外マトリックスを産生する機序は明らかではないが、TGF β の関与の可能性が以前から示唆されている。本研究はこの仮説を確認するために行った。まず正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞におけるTGF β の産生量、TGF β 受容体の発現量を検討した。さらに、TGF β 中和抗体あるいはTGF β 1アンチセンスオリゴを用いてTGF β 情報伝達経路の遮断によるコラーゲン遺伝子発現および転写活性に対する影響を観察したので報告する。

材料と方法

免疫プロット法およびNorthern blot 法 皮膚線維芽細胞をconfluentまで培養し、24時間無血清の状態にし、従来の方法で細胞抽出液を得た。4/20ポリアクリルアミドゲルにて泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体と反応後抗ウサギIgG抗体と反応させ、chemiluminescent法にて検出した。またtotal RNAを抽出後ナイロン膜に転写し、ヒト α 2(I) collagen、GAPDHプローブとハイブリダイズし検出した。

DNA transfection および chloramphenicol acetyltransferase assays (CAT アッセイ) 皮膚線維芽細胞を100mm dishに播種し、リン酸カルシウム法にてコラーゲンプロモーター/CAT遺伝子をトランスフェクションした。細胞は48時間培養し、その後凍結融解にて破碎した。不溶分画は10分間、2000G遠心にて除去した。Bio-Rad蛋白質濃度測定試薬を用いて上清の蛋白質量を測定し、butyryl-Coenzyme Aと ^{14}C chloramphenicolとともに90分間反応させた。ブチル化したchloramphenicolは無機溶媒にて抽出し、シンチレーションにて定量化した。

結果と考察

強皮症皮膚線維芽細胞の産生するTGF β およびTGF β 受容体について

まず強皮症皮膚線維芽細胞あるいは正常皮膚線維芽細胞の培養液中に産生するTGF β を測定した。表1に示すように、強皮症皮膚線維芽細胞あるいは正常皮膚線維芽細胞の産生する総TGF β 量、活性型TGF

表1. 強皮症線維芽細胞および正常線維芽細胞が産生するTGF β

	Active	Total
	TGF β 1, ng/ml	TGF β 1, ng/ml
Systemic sclerosis fibroblasts	0.073 \pm 0.021	0.381 \pm 0.031
Normal fibroblasts	0.062 \pm 0.031	0.435 \pm 0.082

Values are mean \pm SEM

β に有意な差はなかった。

しかしながら、図1に示すように強皮症皮膚線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞と比較し、I型およびII型TGF β 受容体発現が亢進していた(I型 2.3倍、II型 2.6倍)。

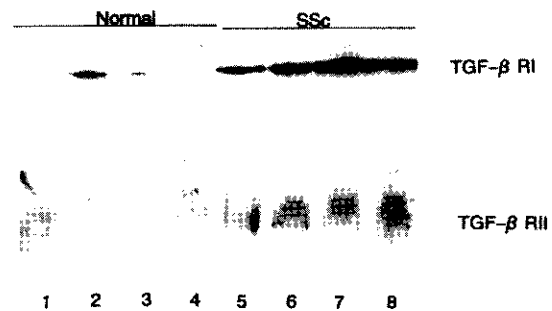


図1. 強皮症線維芽細胞 (SSc) および正常線維芽細胞 (Normal) におけるI型およびII型TGF β 受容体発現量

TGF β 中和抗体のコラーゲン遺伝子発現に及ぼす影響

強皮症皮膚線維芽細胞のコラーゲン遺伝子発現異常におけるTGF β の関与について調べるために、TGF β 中和抗体を用いて線維芽細胞から産生されるTGF β の情報伝達を阻害し、ヒト α 2(I)コラーゲン遺伝子発現量を検討した。図2に示すように強皮症線維芽細胞では α 2(I)コラーゲン遺伝子発現量は亢進していた。TGF β 中和抗体を投与した場合、正常皮膚線維芽細胞ではコラーゲン遺伝子発現量は10%程度しか低下しなかったが、強皮症線維芽細胞では著明な α 2(I)コラーゲン遺伝子発現量の低下を認めた。

以前の検討で強皮症線維芽細胞ではコラーゲン遺伝子転写活性が亢進していたため、ヒト α 2(I)コラーゲン遺伝子転写活性に対するTGF β 中和抗体の及ぼす影響について検討した。図3に示すようにTGF β 中和抗体を投与した場合、正常皮膚線維芽細胞ではコラーゲン遺伝子転写活性は15%程度しか低下しなかったが、強皮症線維芽細胞では著明な α 2(I)コラーゲン遺伝子転写活性の低下を認めた。

正常線維芽細胞ではコラーゲン遺伝子発現量はほとんど低下しなかったが、強皮症線維芽細胞では著明な $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子発現量の低下を認めた。

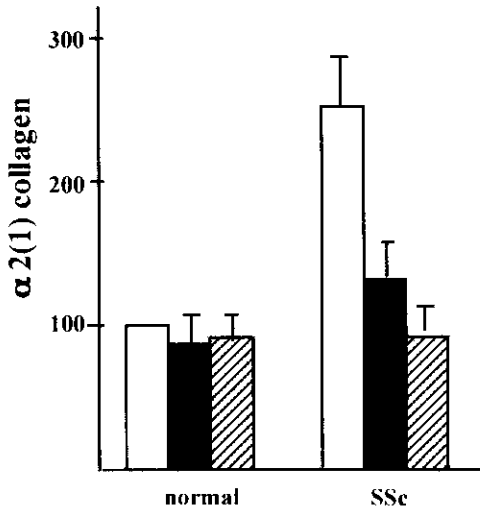


図2. ヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子発現量

□ serum free, ■ 2 μ g/ml anti-TGF β -Ab, ▨ 10 μ g/ml anti-TGF β -Ab

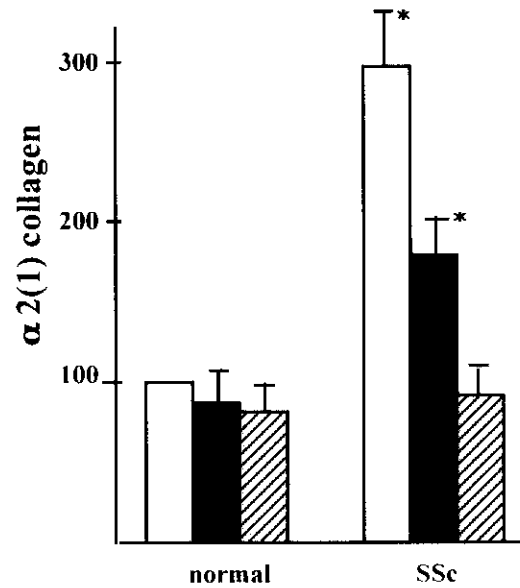


図4. TGF $\beta 1$ アンチセンスオリゴ存在下のコラーゲン遺伝子発現量

□ serum free, ■ 2 μ M antisense -TGF $\beta 1$, ▨ 10 μ M antisense -TGF $\beta 1$

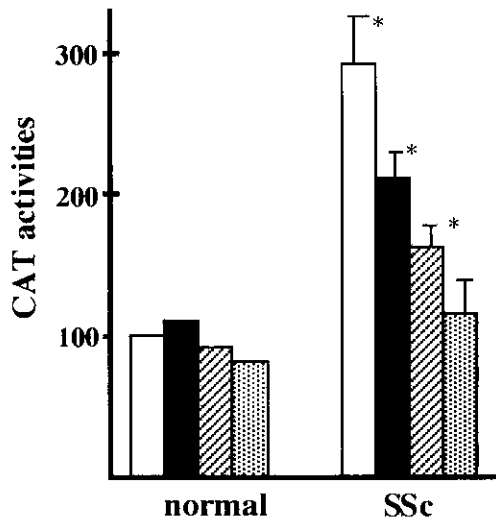


図3. TGF β 中和抗体存在下のコラーゲン遺伝子転写活性

□ serum free, ■ 2 μ g/ml anti-TGF β -Ab, ▨ 5 μ g/ml anti-TGF β -Ab, ▩ 10 μ g/ml anti-TGF β -Ab

センスオリゴではこのような変化は認められなかった。さらに $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子転写活性についても検討した。図5に示すように、正常皮膚線維芽細胞ではコラーゲン遺伝子転写活性はほとんど低下しなかったが、強皮症線維芽細胞では著明な $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子転写活性の低下を認めた。

以上の結果は、強皮症皮膚線維芽細胞のコラーゲン遺伝子発現異常には autocrine TGF β が関与することを示唆し、また TGF β 中和抗体あるいは TGF $\beta 1$ アンチセンスオリゴの汎発性強皮症に対する治療への応用の可能性を示唆するものと考えられた。

TGF $\beta 1$ アンチセンスオリゴのコラーゲン遺伝子発現に及ぼす影響

TGF $\beta 1$ の転写を特異的に阻害することが知られている TGF $\beta 1$ アンチセンスオリゴ (GAGGGCGGCA TGGGGAGG) を用いてさらに検討した。TGF $\beta 1$ アンチセンスオリゴを投与した場合、図4に示すように

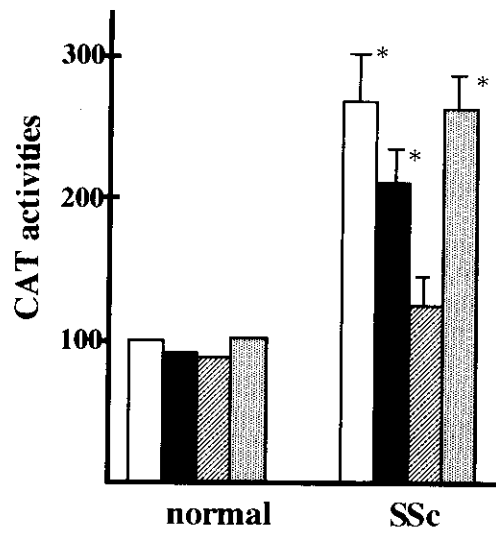


図5. TGF β 1 アンチセンスオリゴ存在下のコラーゲン遺伝子転写活性

serum free,
 2μM antisense TGFβ1,
 10μM antisense TGFβ1,
 10μM sense TGF β1,

全身性強皮症患者皮膚線維芽細胞のタイプ・コラーゲン $\alpha 2$ (COL1A2) プロモーターの in vivoフットプリント法を用いた解析

班 員：石川 治 (群馬大学 皮膚科)
共同研究者：大西一徳 (群馬大学 皮膚科)

In vivo Footprinting Analysis on the Human $\alpha 2(I)$ Collagen (COL1A2) Gene Promoter of Dermal Fibroblasts Derived from Patients with Systemic Sclerosis

Osamu ISHIKAWA^a and Kazunori OHNISHI

Department of Dermatology, Gunma University School of Medicine

Summary

It is well recognized that dermal fibroblasts of systemic sclerosis (SSc) produce type I collagen more than normal dermal fibroblasts and that the increased production of type I collagen results from the transcriptional activation. We examined the difference of DNA-proteins (transcription factors) interactions in COL1A2 gene promoter between dermal fibroblasts of patients with SSc and normal controls using in vivo foot printing analysis. Some DNA-proteins interactions were observed in and near the promoter regions that were detected with DNase I footprinting analysis. The most striking difference was observed in the region (-155 bp to -173 bp), which was identified to bind an inhibitor of the promoter. The pattern of in vivo foot printing in the region of SSc resembled to that of naked DNA and was different from that of control. These results may indicate that the increased transcriptional activity in SSc is due to the lack of inhibition of the promoter region from -155 bp to -173 bp.

はじめに

全身性強皮症 (SSc) は皮膚及び内臓諸臓器の線維化を主徴とする疾患である。SSc 患者皮膚由来培養線維芽細胞では、 α 型コラーゲンの合成が正常人皮膚由来培養線維芽細胞に比し亢進し、その異常はコラーゲン遺伝子の転写レベルでの亢進であることが知られている。一方、近年 α 型コラーゲンを構成する COL1A2 遺伝子のプロモーター領域の解析が進み、種々の転写因子や TGF- responsive element をはじめとする幾つかの増殖因子の作用部位に関する報告がなされている。しかしながら SSc で認められる COL1A2 遺伝子の転写活性の亢進が、プロモーター領域のどのような変化で生じているかはなお明かではない。そこで我々は、正常人皮膚由来培養線維芽細胞を対照として、SSc 患者皮膚由来培養線維芽細胞を用い、通常の核抽出物と DNase \cdot を用いたフットプリント法と比べ、より生体内に近い形で DNA と蛋白 (転写因子) の結合状態を解析できる dimethyl sulfate (DMS) を用いた *in vivo* フットプリント法で COL1A2 遺伝子のプロモーター領域の解析を行った。

材料と方法

1. 皮膚線維芽細胞

5 2 歳、女性及び 2 4 歳、女性のアメリカリウマチ学会の SSc 診断基準を満たす患者の前腕皮膚より通常の explant culture 法で初代培養を行い、10% 牛胎児血清添加 MEM 培地で培養して得られた線維芽細胞を用いた。臨床的に両患者ともに前腕部の明らかな皮膚硬化を認めた。正常皮膚線維芽細胞は 2 4 歳、女性の前腕及び 2 1 歳、男性の大腿皮膚より同様の方法で得られた線維芽細胞を用いた。全ての線維芽細胞は、継代 3 代のものを直径 1.5 cm の plastic dish に培養し、ほぼコンフルエントに達した時点で実験に供した。

2. *in vivo* フットプリント法 (詳細は文献 1 参照)

線維芽細胞より genomic DNA を抽出し、この裸の DNA に DMS を最終濃度 0.1%、2 分間処理したものを *in vivo* フットプリント法全体の対照とした。一方、SSc 及び正常人皮膚由来培養線維芽細胞を DMS で最終濃度 0.1%、2 分間処理後に genomic DNA を抽出した。これらの DNA をピペリジン処理後、ligation-mediated PCR を行った後、6-FAM 標識したプライマーを用いて Vent polymerase で伸長し、得られた 6-FAM 標識 DNA のフラグメントを genetic analyzer

(ABI PRISM 310) で解析した。今回使用した 2 組の 3 個のプライマーと annealing に用いた温度を以下に示す。

- 1-1 GACTCCTGTGTGCGAGAGC (60°C)
- 1-2 ACCTCCAACCTAGCCGAAACCT (58°C)
- 1-3 ACCTCCAACCTAGCCGAAACCTCCTGC (60°C)
- 2-1 CAGCCACAGCTGGGAGGAGCCTG (60°C)
- 2-2 GAGAGGAGGGAGCGAATGGG (62°C)
- 2-3 GAGAGGAGGGAGCGAATGGGGACGTG (66°C)

結果

裸の DNA に DMS を作用させて得られたフラグメント (対照) と SSc 及び正常人皮膚由来培養線維芽細胞に DMS を作用させて得られたフラグメントのパターンの例を重ねて示す (図 1、2)。それぞれのフラグメントのピークの位置はほとんど重なっていた。しかしながら、矢印で示した部位では、対照に比べ SSc 及び正常人皮膚由来培養線維芽細胞より得られたピークの高さに大きな差が認められた。一方ほとんどの部位で、SSc と正常人皮膚由来培養線維芽細胞より得られたピークの高さに大きな差は認められなかったが、プロモーターの -170bp 付近では、両者の間にはっきりした違いが認められた (図 3)。即ち、この部分では SSc 皮膚由来培養線維芽細胞より得られたピークのパターンは対照と類似し、正常人皮膚由来培養線維芽細胞より得られたピークのパターンとは明らかに異なっていた。またこの結果は SSc 及び正常人皮膚由来培養線維芽細胞それぞれ 2 例より得られたパターンに共通するものであった。

考案

これまでに報告された COL1A2 遺伝子のプロモーター領域に存在する転写因子が結合する motif や、結合すると報告された転写因子及び我々が報告した DNase \cdot を用いた通常のフットプリントで、培養線維芽細胞由来の核抽出物が結合する部位 (四角形) (図 4) と、今回の *in vivo* フットプリント法での検討で明らかとなったパターンに違いの認められる部位 (矢印) をまとめて示す。これらの矢印で示した部位のうち、正常人と SSc 患者の間に大きな違いを認めた部位を大きい矢印で示す。ほとんどの矢印は DNase \cdot を用いたフットプリント法で何らかの核抽出物が結合する部分か (四角形)、その近傍に認められている。図の四角形内に存在する motif については、mutation を導入することで、線維芽細胞を用いた transient transfection による CAT assay で、

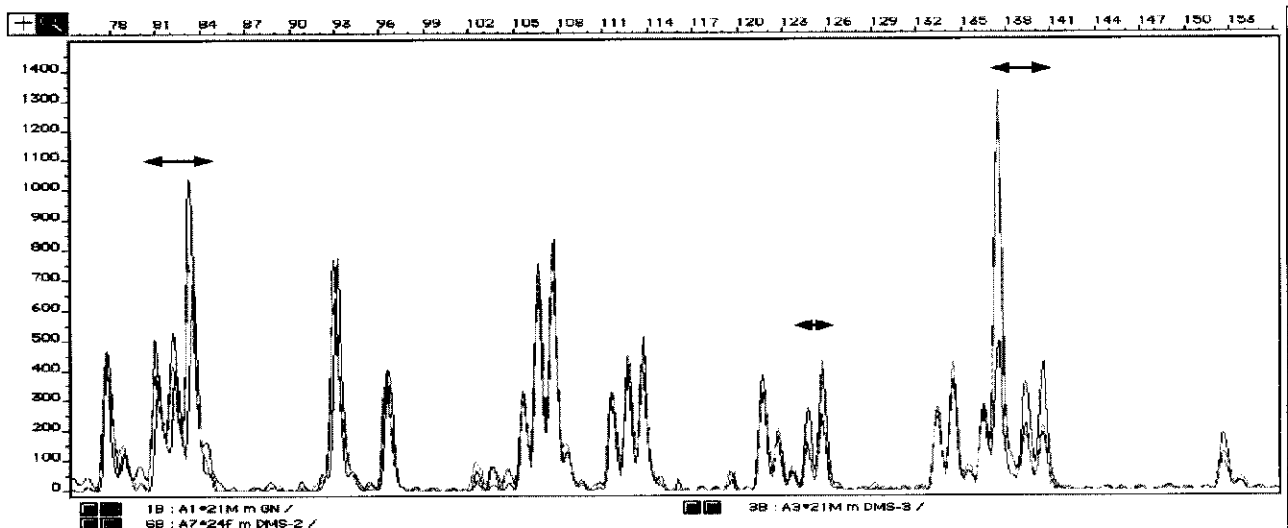


図1. -10 bp ~ -90bp付近の in vivo フットプリント。対照、正常人、SSc患者を重ねて示してある。

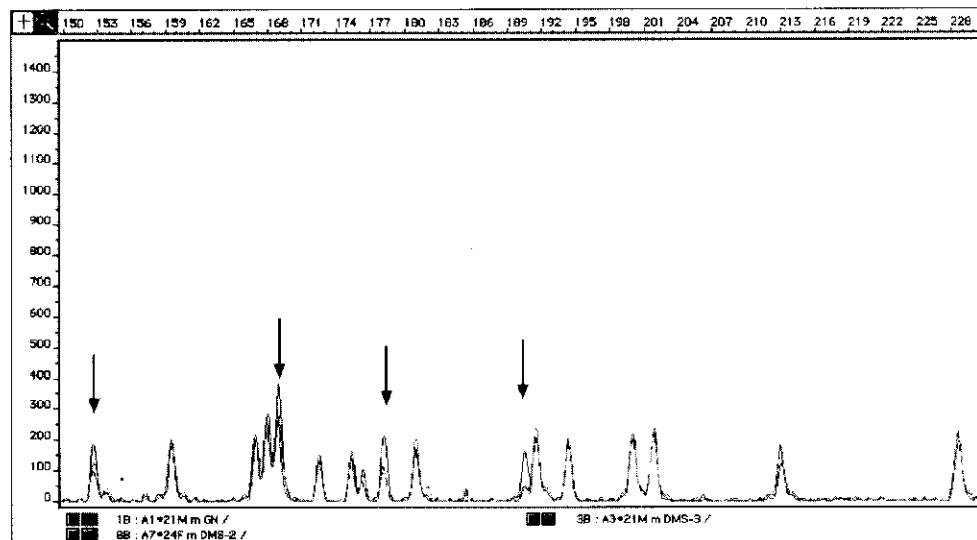


図2. -90 bp ~ -165bp付近の in vivo フットプリント。対照、正常人、SSc患者を重ねて示してある。

COL1A2遺伝子の転写活性に与える影響が判明している。このうちGC box及びCAT boxはbasalな転写活性の維持に必要で、-119~-133 bpに存在するTCCTCCは転写活性を亢進させ、-155~-173 bpに存在するTCCCCCは転写活性を抑制することが明らかとなっている。今回の結果では、正常人とSSc患者との間で明らかな差異の認められた部位が、-155~-173 bpの何らかの転写活性を抑制する因子が結合する部位に認められ、そのパターンが対象とした裸のDNAとSSc患者とが類似し正常人とは異なっていたことは、正常人でこの部位に結合する抑制因子が

SSc患者では結合していないために、COL1A2遺伝子転写活性が正常人に比し亢進している可能性も考えられる。今後さらに例数を増やすとともに、肥厚性癩痕やケロイドなど、強皮症以外の線維化をきたす疾患についても検討を加えたい。

文献

- 1) Mueller PR, Wold, Garrity PA: Ligation-mediated PCR for genomic sequencing and footprinting. Current protocols in molecular biology, unit 15.5. 1992

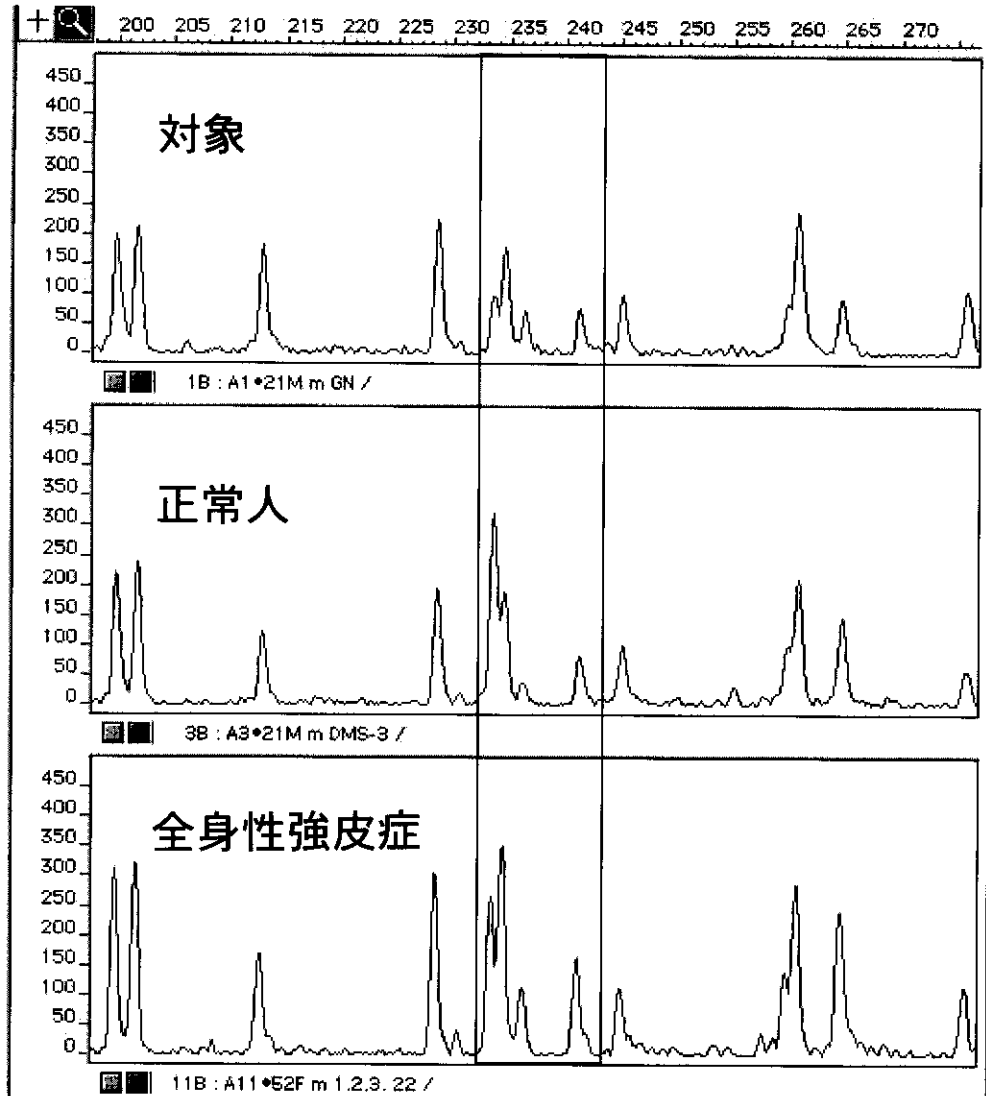


図3. -140 bp ~ -210 bp付近の *in vivo* フットプリント。線で区切った部分で正常人とSSc患者の間に違いを認める。

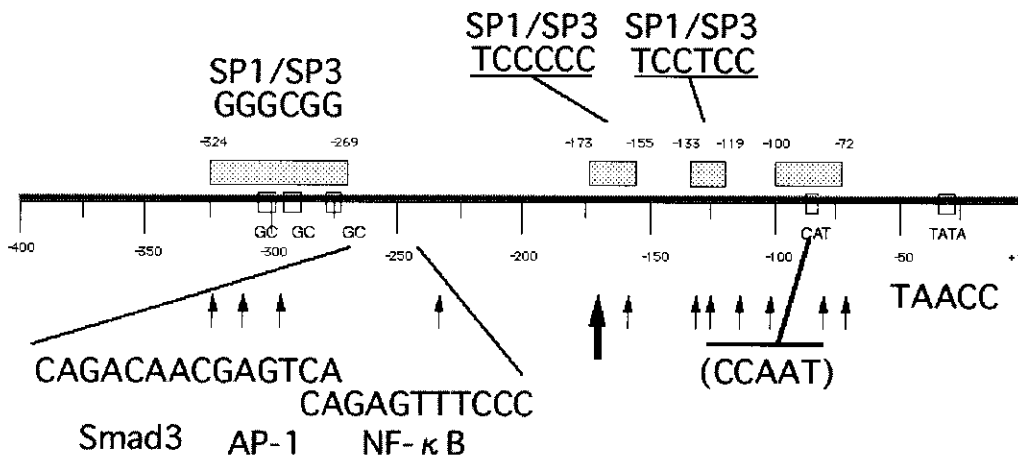


図4. COL1A2遺伝子プロモーターの模式図。ドット印の四角はDNase・フットプリント法で線維芽細胞由来の核抽出物と結合が認められた部位。矢印は今回の *in vivo* フットプリント法による検討で、裸のDNAと差異を認めた部位。大きい矢印は正常人とSSc患者の間に差異を認めた部位。