

してコラーゲン合成増加、DPT の減少を引き起こし、コラーゲン線維の硬化性病変を来すことが示唆された。

E. 研究発表

論文発表 刊末に一括表示

学会発表

A specific sequence of C4 domain of laminin α 3 chain supports cell adhesion through syndecans and cooperative involvement of integrin β 1

62nd The society for Investigative Dermatology Meeting May 10, 2001 Washington

Targeted disruption of dermatopontin causes abnormal collagen fibrillogenesis in skin

Meeting May 11, 2001 Washington

皮膚線維芽細胞における EGF による II 型 TGF- β
受容体発現亢進の機序について

分担研究者 尹 浩信 東京大学 皮膚科講師

研究要旨： 汎発性強皮症皮膚線維芽細胞は、正常皮膚線維芽細胞と比較して I 型、II 型 TGF- β 受容体の発現が亢進していることを昨年我々は報告した。今回我々は正常皮膚線維芽細胞を用いて TGF- β 受容体の発現を亢進するサイトカインとそのシグナル伝達経路について検討した。EGF は II 型 TGF- β 受容体遺伝子発現量、蛋白量を増加させた。EGF による II 型 TGF- β 受容体遺伝子発現亢進は Actinomycin D により抑制されたが、cycloheximide にて抑制されなかった。II 型 TGF- β 受容体遺伝子の message stability は、EGF の添加の有無によって差はなかった。また PI3K 阻害剤である、wortmannin, LY294002, Akt 阻害剤である Akt inhibitor は、EGF による II 型 TGF- β 受容体遺伝子発現亢進を抑制した。以上の結果から正常皮膚線維芽細胞において、EGF は PI3K/ Akt の系を介して II 型 TGF- β 受容体発現を亢進することが示された。さらに強皮症皮膚線維芽細胞に EGF を添加して II 型 TGF- β 受容体蛋白発現量を検討した。

A. 研究目的

汎発性強皮症は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による皮膚および内臓諸臓器の線維化を主徴としている。強皮症皮膚線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞と比較して I 型、III 型、VI 型、VII 型 collagen, fibronectin, glycosaminoglycans などの細胞外マトリックスの産生増加、tissue inhibitor of metalloproteinase などの protease inhibitor の産生増加が報告されており、過剰な細胞外マトリックス沈着が汎発性強皮症の病態の主体であると考えられている。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。最近、我々は強皮症皮膚線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞と比較して TGF- β 受容体の発現が亢進していることを見出し、正常皮膚線維芽細胞に TGF- β 受容体を一過性に強発現させるとコラーゲン遺伝子転写活性が亢進することを示した。さらに強皮症患者皮膚線維芽細胞における TGF- β 中和抗体あるいは TGF- β I 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が抑制されることを報告している。今回、正常皮膚線維芽細胞において EGF による II 型 TGF- β 受容体発現亢進の機序について検討するとともに、EGF による強皮症皮膚線維芽細胞の II 型 TGF- β 受容体発現量への影響を検討した。

B. 研究方法

材料と方法

免疫ブロット法および 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 poly A (+) RNA を抽出後ナイロン膜に転写し、II 型 TGF- β 受容体、GAPDH プローブとハイブリダイズし検出した。

DNA transfection および luciferase assays 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 TGF- β 受容体プロモーター/luciferase 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 reporter lysis buffer (promega) にて破碎した。不溶分画は 2 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、luciferase substrate とともに 5 秒間反応させ luminometer にて定量化した。

C. 結果と考察

正常皮膚線維芽細胞の II 型 TGF- β 受容体蛋白量、遺伝子発現量は EGF によって亢進する

正常皮膚線維芽細胞は II 型 TGF- β 受容体蛋白量、遺伝子発現量は EGF によって量依存的、時間依存的に亢進していた。

EGFによるII型TGF- β 受容体発現亢進の機序について

EGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子発現亢進をActinomycin Dは抑制したが、cycloheximideは抑制しなかった。II型TGF- β 受容体遺伝子のmessage stabilityを検討したが、EGFの添加の有無によって半減期に差はなかった。このことから正常皮膚線維芽細胞におけるEGFによるTGF- β 受容体発現量亢進は転写レベルでの調節の異常である可能性が示唆された。

PI3K/ Aktシグナル伝達経路はEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子発現亢進に関与する

EGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子発現亢進に関与するシグナル伝達経路について検討した。PI3K阻害剤であるwortmannin, LY294002, Akt阻害剤であるAkt inhibitorは、EGFによるII型TGF- β 受容体蛋白量、遺伝子発現亢進をともに抑制した。

正常皮膚線維芽細胞においてEGFによりPI3K/ Aktシグナル伝達経路が活性化する

正常皮膚線維芽細胞においてEGFによるPI3K/Aktシグナル伝達経路が実際に活性化されているか検討した。PI3Kの調節subunitであるp85のphosphorylation, PI3Kの下流であるAktのphosphorylationをEGF刺激によって認めた。またAktのkinase assayにおいて、基質であるGSK-3 β のphosphorylationを認めた。

正常皮膚線維芽細胞においてEGFによりII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性が亢進する

EGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性への影響を検討した。正常皮膚線維芽細胞ではII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性が亢進した。

正常皮膚線維芽細胞においてEGFはPI3K/ Aktシグナル伝達経路を介してII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性を亢進する

EGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進がPI3K/ Aktシグナル伝達経路を介するかを検討した。wortmannin, LY294002, Akt inhibitorはEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進を抑制した。PI3Kの調節subunit p85の優性抑制型 dominant negative p85 (DN p85), 触媒subunit p110の恒常活性型 constitutive active p110 (CA p110)を用いてEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進への影響を検討した。DN p85はEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進を抑制し、CA p110はEGFによらずII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性を亢進した。Aktの優性抑制型 dominant negative Akt

(DN Akt)を用いて検討したところ、DN AktはEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進を抑制した。

強皮症皮膚線維芽細胞においてEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子蛋白量亢進を認めない

強皮症皮膚線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞と比してII型TGF- β 受容体蛋白発現亢進していることを我々は報告しているが、強皮症皮膚線維芽細胞にEGFを添加してII型TGF- β 受容体蛋白発現量を検討した。正常皮膚線維芽細胞ではEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子蛋白量は亢進するが、強皮症皮膚線維芽細胞ではもともと亢進しているII型TGF- β 受容体遺伝子蛋白量のさらなる亢進を認めなかった。

以上の結果より、正常皮膚線維芽細胞においてEGFはPI3K/ Aktシグナル伝達経路を介してII型TGF- β 受容体遺伝子発現量、蛋白量を上昇させることが示された。また、強皮症皮膚線維芽細胞においてEGFによるII型TGF- β 受容体蛋白量の上昇がみられず、PI3Kをはじめとした、EGFによって惹起されるシグナル伝達経路の異常が示唆された。

D. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示

全身性強皮症患者皮膚線維芽細胞のタイプIコラーゲン $\alpha 2$ プロモーターの解析

分担研究者 石川 治 群馬大学 皮膚科教授

研究要旨： 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、I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。昨年我々は、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、*in vivo* フットプリント法でCOL1A2遺伝子のプロモーター領域を解析、-170 bp近傍で両者のフットプリントに明らかな差異が認められることを報告した。今回我々は同様の方法でSSc同様に線維化をきたすケロイド由来線維芽細胞について検討を加えるとともに、SSc患者については我々が解析を行っているプロモーター領域の塩基配列の異常の有無についても検討を加えた。その結果、線維化を生じるSScとケロイド由来の線維芽細胞においてもプロモーターの同部位におけるDNAと転写因子の結合状態などに違いがあることが明らかとなり、線維化を来すSScやケロイドでは、COL1A2遺伝子プロモーターの-155～-173 bp近傍が転写活性の亢進に重要と考えられる。さらに線維化をきたす疾患間においても差異が認められたことから、疾患特異的なDNAと転写因子の相互作用が存在する可能性も示唆された。また、例数は少ないもののSSc患者に、今回検討したプロモーター領域に塩基配列の異常を認めなかったことは、SSc患者と正常人の間に認められたフットプリントの差異は、塩基配列の違いによるものではないと考えられる。

A. 研究目的

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、I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I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- β 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、どのプロモーター領域の変化で生じているかはなお明かではない。昨年我々は、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、*in vivo* フットプリント法でCOL1A2遺伝子のプロモーター領域を解析、-170 bp近傍で両者のフットプリントに明らかな差異が認められることを報告した。今回我々は同様の方法でSSc同様に線維化をきたすケロイド由来線維芽細胞について検討を加えるとともに、SSc患者については我々が解析を行っているプロモーター領域の塩基配列の異常の有無についても検討を加えた。

B. 研究方法

材料と方法

皮膚線維芽細胞 52歳、女性及び24歳、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24歳、女性の前腕及び21歳、男性の大腿皮膚より、また57歳、女性の耳朶、70歳、女性の腹部のケロイド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3～4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。

in vivo フットプリント法 線維芽細胞よりgenomic DNAを抽出し、この裸のDNAにdimethyl sulfate (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-carboxyfluorescein (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。
塩基配列の決定 SSc患者2例と正常人ボランティア2例の末梢血液を用いた。COL1A2 プロモーターの-375から+116を増幅するプライマーを用いてPCRで増幅後、型のごとくサブクローニングを行い、genetic analyzer (ABI PRISM™ 310) で解析した。

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、ケロイド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ピークの位置はほとんど重なっていた。COL1A2 プロモーターの -170bp 付近では、検討した3者の間にはっきりした違いが認められた。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。更にケロイド線維芽細胞より得られたピークのパターンはSScや正常人のそれと異なっていた。一方、これら3者の皮膚由来培養線維芽細胞それぞれ2例の間では、得られたピークのパターンは類似していた。なお、検討を加えたSScおよび正常人のCOL1A2 プロモーターの-375から+116の領域の塩基配列は、既に報告されている塩基配列と一致した。

D. 考察

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 I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うち、正常人とSSc患者の間に大きな違いを認めた部位はDNase I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その近傍に認められている。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、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TCCCC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の線維芽細胞

とが類似し、正常人とは異なっていた。このことは、正常人でこの部位に結合する抑制因子がSScの線維芽細胞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。更に今回の検討では、線維化を生じるSScとケロイド由来の線維芽細胞においてもプロモーターの同部位におけるDNAと転写因子の結合状態などに違いがあることが明かとなり、線維化を来すSScやケロイドでは、COL1A2遺伝子プロモーターの-155~-173 bp近傍が転写活性の亢進に重要と考えられる。さらに線維化をきたす疾患間においても差異が認められたことから、疾患特異的なDNAと転写因子の相互作用が存在する可能性も示唆された。また、例数は少ないもののSSc患者に、今回検討したプロモーター領域に塩基配列の異常を認めなかったことは、SSc患者と正常人の間に認められたフットプリントの差異は、塩基配列の違いによるものではなく、DNAと転写因子の相互作用によるものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示
2. 学会発表

In: The cutting edge in scleroderma research and novel treatment strategies. 20th Congress of the international League of Associations of for Rheumatology (ILAR), Edmonton, Canada, 2001

Study of human $\alpha 2$ (I) collagen (COL1A2) gene promoter of dermal fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis using in vivo footprinting analysis. 65th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology, San Francisco, USA, 2001

病診連携での皮膚科医の役割分担とその戦略 —紹介患者の指標と長期管理の問題点— 「強皮症」
第17回日本臨床皮膚科医学会総会 2001.5.19-20
長崎

「強皮症」日本皮膚科学会平成12年度研修講習会
2001.1.7 東京(教育講演)

右半身に多発した斑状強皮症 第24回皮膚管・膠原病研究会 2001.1.25-26 大宮

多発性大腸潰瘍を来した全身性強皮症の1例
第52回日本皮膚科学会中部支部学術大会・総会
2001.11.3-4 京都

正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞におけるコラーゲンマトリックスによるコラーゲン合成制御機構の研究

分担研究者 畑 隆一郎 神奈川歯科大学 口腔生化学教授

研究要旨： 強皮症患者皮膚におけるコラーゲンマトリックスの異常蓄積の原因を明らかにするために、細胞の微小環境を形成するコラーゲンマトリックスによる皮膚線維芽細胞のコラーゲン合成制御について調べた。皮膚線維芽細胞のコラーゲン合成活性はポリスチレン培養皿よりもI型コラーゲン上では促進され、三次元のI型コラーゲンゲル内では逆に阻害を受ける。強皮症患者線維芽細胞のコラーゲン合成は対照の細胞と同様な制御を受けたが、I型コラーゲン上でも、三次元のI型コラーゲンゲル内においても対照の細胞より活性が高かった。コラーゲンマトリックスによるコラーゲン合成制御機構を調べるために、I型コラーゲンの $\alpha 1$ (COL1A1) 鎖、或いは $\alpha 2$ (COL1A2) 鎖遺伝子の転写制御領域にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を結合した各種コンストラクトを作成し、ヒト皮膚線維芽細胞にトランスフェクトした後に上記の条件で培養した。ルシフェラーゼ活性の測定により細胞外マトリックスの立体構造の違いに応答する領域を調べると、COL1A1 遺伝子では、第一イントロンに、COL1A2 鎖遺伝子では上流3.4キロ塩基対に2次元のコラーゲンマトリックスに応答してCOL1A2鎖遺伝子の転写を促進する配列の存在することを示していた。即ち、細胞は細胞外マトリックスの示す位置情報をインテグリンなどのレセプターを介して細胞内に伝達して応答していると考えられる。今後は強皮症患者細胞において細胞外マトリックス受容体の機能、シグナル伝達機構の異常の点から研究することにより、強皮症の病因が明らかにされると考えられる。

A. 研究目的

強皮症 (SSc) は皮膚および多臓器の線維化を主症状とする疾患である。病因は不明であるが硬化組織においてI型コラーゲンの異常蓄積がみられることから、正常およびSSc患者皮膚線維芽細胞を用いてI型コラーゲンの代謝制御機構を解析してきた。その過程で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である遺伝子上流及び第一イントロンに2つの反復配列を見出し、この反復配列の組み合わせにより、COL1A2 遺伝子の転写活性が制御されていること、及び、高い転写促進活性を示す反復配列の組み合わせ (ハプロタイプ) が強皮症に対する感受性に関与していることを報告した。このことは少なくとも一部のSSc患者においては疾患に対する感受性が遺伝的に規定されていることを示している。しかし、これによって説明できる症例は一部であるので、さらにSSc患者皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン遺伝子の他の発現制御機構の異常を探索する目的で、細胞の微小環境を形成する細胞外マトリックスによるI型コラーゲン遺伝子発現のフィードバック制御機構を解析した。

B. 研究方法

材料と方法

1) 細胞と細胞培養条件

強皮症患者及び対照の皮膚より explant 法により線維芽細胞を得、10%のウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM-10) 中で継体培養した。実験の際には、ポリスチレン培養皿の他に、I型コラーゲンを被覆した培養皿 (2次元のコラーゲンマトリックス)、或いはIコラーゲンゲル (3次元のコラーゲンマトリックス、0.08-0.3%) を使い、コラーゲン合成活性測定の際は、活性持続型ビタミンC (Asc2-P) 添加の条件で培養した。また、 $\alpha 1$ (I) 鎖と $\alpha 2$ (I) 鎖の mRNA 量は細胞から既報の方法でRNAを分離後、ノーザンプロット法で定量した。

2) レポーター遺伝子コンストラクトの作成とトランスフェクション

ヒトコラーゲンの $\alpha 1$ (I) 鎖或いは $\alpha 2$ (I) 鎖遺伝子の一部からファージベクター、或いはPCR法により増幅して得た。すべてのコンストラクトは塩基配列の決定により変異がないことを確認した。これらのコンストラクトを正常皮膚線維芽細胞にジーントランスファー或いはFuGene6を用いてトランスフェクトした。ルシフェラーゼ活性はデュアルルシフェラーゼ

アッセイキットを用いて測定した。

C. 結果

1. コラーゲンマトリックスによるコラーゲン合成のフィードバック制御

ヒト皮膚線維芽細胞を2次元のコラーゲンマトリックス上で培養すると、細胞自身のコラーゲン合成活性は、細胞をポリスチレン培養皿に直接播種した場合より若干高い値を示した。一方、細胞を3次元のコラーゲンマトリックス内で培養すると、ゲル濃度(0.08-0.3%)に拘わらず、細胞の増殖とコラーゲン合成活性は阻害された。非コラーゲン性蛋白質の合成もゲル内培養で阻害されたが、その程度は低く、結果として、ゲル内培養では、総蛋白質合成に対するコラーゲンの合成の割合は有意に低下した。2次元のコラーゲン上では細胞はマトリックスに密に接着し、細胞の形態は扁平であった。一方、3次元のコラーゲンゲル内では、細胞は細長い突起を持つ形態を示した。正常細胞においてもSSc患者細胞においても同様な傾向を示したが、いずれの培養条件でもSSc患者由来の細胞で高いコラーゲン合成活性を示した。細胞外マトリックスによるコラーゲン合成の制御機構を明らかにするために、さらに培養条件を変化させて培養後経時的細胞を集め、RNA調製した。ノーザンブロット法により、 $\alpha 1(I)$ 鎖と $\alpha 2(I)$ 鎖mRNAレベルを調べると、2次元のコラーゲンマトリックス上の培養では内部標準として用いたグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のmRNAに対する $\alpha 1(I)$ 鎖と $\alpha 2(I)$ 鎖mRNAのレベルが上昇しており、また、3次元のコラーゲンマトリックス内ではGAPDHのmRNAに対する $\alpha 1(I)$ 鎖と $\alpha 2(I)$ 鎖mRNAレベルが有意に低下していた。

2. ルシフェラーゼレポーター遺伝子コンストラクトのヒト線維芽細胞へのトランスフェクションと発現活性

$\alpha 1(I)$ 鎖遺伝子のプロモーター(転写開始部位を+1としてその上流-500塩基(bp)から第一エキソンの翻訳開始部位の前まで)を含むルシフェラーゼレポーター遺伝子コンストラクト、さらにこれに第一イントロンをプロモーターの上流、或いは下流(in situの遺伝子と同じ配置)、またはルシフェラーゼ遺伝子の下流に正の方向(センスの方向)、或いは逆の方向(アンチセンスの方向)に含むコンストラクト、及び遺伝子上流-2,200bpを含むコンストラクトを作成し、正常線維芽細胞にトランスフェクト後、プラスチック培養皿、2次元のコラーゲン上、或いは3次元のコラーゲンゲル内で培養し、一日後に細胞を集めルシフェラーゼ活性の測定を行った。その結果、2

次元のコラーゲン上では、染色体内の遺伝子と同様に、プロモーターの下流にセンスの方向に第一イントロンを結合したコンストラクトが最大の発現活性を示した。また、3次元のゲル内では、やはり同じコンストラクト、即ちプロモーターの下流に第一イントロンをセンスの方向に結合したコンストラクトの発現活性の抑制が最大であった。この結果 $\alpha 1(I)$ 鎖遺伝子の第一イントロンには細胞の周りに存在するマトリックス(コラーゲン)の立体構造が2次元か、3次元かを認識し、 $\alpha 1(I)$ 鎖遺伝子の転写をフィードバック制御する配列が存在することが示された。

一方、 $\alpha 2(I)$ 鎖遺伝子の場合も同様な実験を行うと、細胞が2次元のコラーゲン上に存在することを認識し応答する配列が遺伝子の上流3.4kbpと0.6kbpの間に存在することが示された。

D. 考察

強皮症患者皮膚における結合組織の代謝異常の原因を明らかにするために、正常、及び強皮症患者皮膚線維芽細胞を用いて、細胞のコラーゲン合成の制御機構を調べた。我々は、コラーゲンマトリックスを用いた培養法により、強皮症患者細胞におけるコラーゲン代謝の異常が、細胞と細胞外マトリックスの相互作用の異常による可能性を示し、さらに、細胞のコラーゲン合成における、フィードバック制御の機構を調べた。

ルシフェラーゼレポーター遺伝子コンストラクトのトランスフェクションの結果より、線維芽細胞はI型コラーゲンの立体構造を認識して、細胞自身のコラーゲン合成を転写レベルで変化させ、応答していることが示された。即ち、細胞は細胞外マトリックスの示す位置情報をインテグリンなどのレセプターを介して細胞内に伝達していると考えられる。今後は強皮症患者細胞における細胞外マトリックス受容体の機能、シグナル伝達機構の異常の点からも研究することにより、強皮症の病因が明らかにされると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示
2. 学会発表

Topological analysis of the human type I collagen $\alpha 2$ chain gene which determines susceptibility to systemic sclerosis.

第54回日本細胞生物学会大会 2001年6月 岐阜

オリゴヌクレオチドを用いたヒト $\alpha 2(I)$ collagen遺伝子転写制御の解析

分担研究者 尹 浩信 東京大学 皮膚科講師

研究要旨： 汎発性強皮症におけるコラーゲン遺伝子発現亢進の機序を明らかにするため、我々はヒト $\alpha 2(I)$ collagen遺伝子プロモーター領域について解析を行い、同遺伝子プロモーター領域に4つの cis-acting elementが存在し、転写因子 Sp1/Sp3が結合することを明らかとした。今回合成オリゴヌクレオチドを用いて各elementに対する Sp1/Sp3結合能、機能について検討した。Sp1/Sp3はGC-boxまたはTCCTCC motifを介して作用し、転写抑制領域（TCCCCC領域）はこれらの領域に対する Sp1/Sp3の結合を阻害し、この作用によって転写抑制領域はヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写制御を行っていると考えられた。強皮症患者細胞において細胞外マトリックス受容体の機能、シグナル伝達機構の異常の点から研究することにより、強皮症の病因が明らかにされると考えられる。

A. 研究目的

汎発性強皮症は皮膚および内蔵諸臓器における硬化性変化を主徴とし、I型コラーゲンは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、I型コラーゲン遺伝子の発現亢進は転写レベルで制御されている。ヒト $\alpha 2(I)$ collagenプロモーターには4つの cis-acting elementが存在し、転写因子 Sp1/Sp3が結合して同遺伝子の転写制御を行っていることを我々は明らかとした。今回合成オリゴヌクレオチドを用いて各elementに対する Sp1/Sp3結合能、機能について検討した。

B. 研究方法

材料と方法

DNA transfection および chloramphenicol acetyltransferase assays (CAT アッセイ) 皮膚線維芽細胞あるいは Drosophila SL2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。

DNA mobility shift assay 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、従来の方法で核抽出液を得た。各cis-elementのオリゴヌクレオチドをend-labelingし、DNA-蛋白質複合

体を5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、解析した。

In vitro transcription 皮膚線維芽細胞から得た核抽出液を用いて-772bpCOL1A2/CATをテンプレートとしてin vitro transcriptionを行い、新生した転写産物を逆転写酵素を用いてcDNAとし、5%ポリアクリルアミドゲル/ureaにて電気泳動し、解析した。

C. 結果と考察

皮膚線維芽細胞における転写因子Sp1/Sp3のヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性に対する作用について皮膚線維芽細胞に転写因子Sp1あるいはSp3を強発現し、ヒト $\alpha 2(I)$ collagen遺伝子転写活性を検討した。従来の報告同様、SV40プロモーターはSp1の強発現によって転写活性が亢進したが、Sp3の強発現によって転写活性に変化はなかった。しかしながら、ヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性は、Sp1あるいはSp3の強発現によって転写活性に変化はなかった。この結果は、ヒト皮膚線維芽細胞を用いたシステムでは、ヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子プロモーターはSp1あるいはSp3によって充足されているため、Sp1あるいはSp3の機能を検討することは不可能であると考えられた。

そのため、Sp1およびSp3活性を持たないDrosophila SL2細胞を用いて、コラーゲン遺伝子転写制御におけるSp1およびSp3の機能について検討した。SL2細胞にSp1、Sp3を強発現させた場合、GC-box deletionによってSp1、Sp3によるコラーゲン遺伝子転写活性は50%程度に減少し、転写領域deletionによってSp1、Sp3によるコラーゲン遺伝子転写活性は変化せず、

TCCTCC領域deletionによってSp1、Sp3によるコラーゲン遺伝子転写活性はほとんど消失した。この結果は、Sp1/Sp3はGC-box、TCCTCC領域の2領域を介してコラーゲン遺伝子転写制御を行なっていることが示され、さらにこのシステムでは転写抑制領域へのSp1/Sp3の結合はコラーゲン遺伝子転写制御を活性化も抑制もしないと考えられた。

Sp1/Sp3の各領域に対する結合の特異性および結合親和性

各 cis-element のオリゴヌクレオチドを用いた DNA mobility shift assay にて各 cis-element に対する Sp1/Sp3 の結合親和性、特異度について検討した。GC-box 領域に対する Sp1/Sp3 の結合親和性は転写抑制領域に対する結合親和性より強いことが示された。

TCCTCC motif 領域に対する Sp1/Sp3 の結合親和性は転写抑制領域に対する結合親和性より強いことが示された。

CBF の結合は CBF 結合領域オリゴヌクレオチドにて阻害されたが、転写抑制領域オリゴヌクレオチドにて阻害されなかった。

転写抑制領域に対する Sp1/Sp3 の結合親和性は Sp1 コンセンサスオリゴヌクレオチドに対する結合親和性より弱いものであった。

以上の検討より、TCCTCC motif の Sp1/Sp3 に対する結合親和性は最も強く、Sp1 コンセンサスオリゴヌクレオチドよりも強いものであった。また転写抑制領域の Sp1/Sp3 に対する結合親和性は最も弱かった。また転写抑制領域は Sp1/Sp3 の GC-box あるいは TCCTCC motif に対する結合を阻害することを示唆した。すなわち、いわゆる "molecular sink" として転写活性化領域に結合する転写因子の結合を阻害する可能性が示唆された。

In vitro transcription による検討

In vitro transcription 法を用いて各オリゴヌクレオチドの存在下でのコラーゲン遺伝子転写活性を観察した。非特異的オリゴヌクレオチドでは in vitro 転写は抑制されなかった。各領域のオリゴヌクレオチドによってコラーゲン遺伝子の in vitro 転写は抑制され、この結果は転写抑制領域はいわゆる "molecular sink" として転写活性化領域に結合する転写因子の結合を阻害することを示唆するものと考えられた。

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転写因子 Sp1/Sp3 あるいは転写抑制が関与する可能性があり、コラーゲン遺伝子転写制御のさらなる検

討は強皮症皮膚線維芽細胞のコラーゲン遺伝子発現異常の機序を明らかにし、汎発性強皮症に対する治療の開発につながるものと考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示

Interferonによるコラーゲン遺伝子の転写抑制機構の解析

分担研究者 稲垣 豊 国立金沢病院 内科医師

研究要旨： コラーゲンの発現は、血中の生体物質により複雑な調節を受けており、その代表的促進因子として、Transforming growth factor- β (TGF- β)が知られている。これまで、Interferon (IFN) γ およびIFN α がコラーゲン発現に対して抑制的にはたらくことが報告されていたが、その作用機序については十分に解明されていなかった。本研究では、初代培養皮膚線維芽細胞を用いて、 $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子(COL1A2)の基礎転写およびTGF- β による転写促進に対するIFN γ とIFN α の抑制効果を、トランスフェクション法により解析した。その結果、IFN γ とIFN α はCOL1A2プロモーター上のTGF- β -responsive elementに結合するSmad3と拮抗してCOL1A2転写を抑制し、その作用はp300依存性であった。また、細胞質内ドメインを欠失させた変異型I型IFN受容体を過剰発現させると、COL1A2基礎転写の有意の増加とともに、IFN α による転写抑制効果が消失し、IFN α の細胞内シグナルがCOL1A2転写を抑制することが明らかになった。

A. 研究目的

強皮症は、コラーゲンの異常蓄積に基づく全身諸臓器の線維化を特徴とする原因不明の疾患である。コラーゲン発現を促進する代表的因子として、Transforming growth factor- β (TGF- β)が知られており、Interferon (IFN) γ およびIFN α がコラーゲン発現に対して抑制的にはたらくことが知られていたが、その作用機序については十分に解明されていなかった。

本研究者はこれまでに、 $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子(COL1A2)プロモーター上にTGF- β による転写促進を伝達するTGF- β -responsive element (TbRE)を同定し、そこに結合する核内転写因子として、Smad3およびSp1の重要性を報告してきた。さらに最近では、Smad3とp300との相互作用もTGF- β による転写促進に重要であることが報告されている。

本研究では、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転写に対して拮抗的にはたらくIFN γ およびIFN α の抑制機序を、分子生物学的解析により明らかにした。

B. 研究方法

材料と方法

細胞培養 初代培養ヒト皮膚線維芽細胞(CF37)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、37°C、5% CO₂の存在下で培養した。

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、レポーター遺伝子として用いた。細胞質内ドメインを欠失させた変異型I型IFN受容体cDNAは、正常ヒト末梢血単核球からRNAを抽出し、特異的プライマーを用いたRT-PCR法により増幅後、発現ベクターにクローニングした。この変異型I型IFN受容体発現プラスミドの他に、Smad3、Sp1、ならびに非活性型p300の各cDNAをサイトメガロウイルスのプロモーター下に発現させる発現プラスミドを用いた。

トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッセイ 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を加え、さらに48時間培養した。この培養液中にIFN γ やIFN α を添加し、COL1A2の基礎転写やTGF- β による転写促進に対して与える影響について検討した。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。

C. 結果と考察

-378COL1A2/LUCをCF37細胞にトランスフェクションした後、TGF- β の非存在下・存在下に培養液中にIFN γ やIFN α を添加すると、いずれも転写活性は有意に低下し、IFN γ とIFN α がCOL1A2の基礎転写やTGF- β による転写促進に対して抑制的にはたらくことが示された。

次に、-378COL1A2/LUCと一緒にSmad3、Sp1、ならびに非活性化型p300の各cDNA発現プラスミドをトランスフェクションし、IFN γ やIFN α 添加の影響について検討した。その結果、IFN γ とIFN α はSmad3によるCOL1A2の転写促進を有意に抑制したが、Sp1による転写促進には影響を与えなかった。一方、CF37細胞に非活性化型p300を過剰発現させると、IFN γ やIFN α によるCOL1A2の転写抑制効果が消失したことから、その抑制作用がp300を介することが明らかになった。

さらに、細胞質内ドメインを欠失させた変異型I型IFN受容体を過剰発現させると、COL1A2基礎転写の有意の増加とともに、IFN α による転写抑制効果が消失した。この結果は、トランスフェクションされた変異型I型IFN受容体がいわゆるdominant negative受容体としてはたらいっていること、またIFN α の細胞内シグナルがCOL1A2転写を抑制することを示している。

D. 結論

初代培養皮膚線維芽細胞を用いて、COL1A2の基礎転写およびTGF- β による転写促進に対するIFN γ とIFN α の抑制効果を、トランスフェクション法により解析した。その結果、IFN γ とIFN α はTbREに結合するSmad3と拮抗してp300にはたらくことでCOL1A2転写を抑制する可能性が示唆された。

この研究成果は、コラーゲン発現の調節機構を理解する上で重要であるとともに、その発現を制御することにより強皮症に対する有効な治療手段の開発にも寄与することが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示
2. 学会発表

Roles of Smad proteins in the regulation of collagen gene transcription in activated stellate cells. International Conference on New Strategies for the Treatment of Liver Fibrosis, 2001. 6. 7, Tokyo, Japan

Molecular basis for antifibrotic effects of interferon α . International Conference on New Strategies for the Treatment of Liver Fibrosis, 2001. 6. 8, Tokyo, Japan

TGF- β /Smad signaling in the regulation of collagen gene transcription in activated stellate cells. European Association for the Study of Liver Diseases, Single Topic Symposium: Liver Fibrosis, From Cell Biology to Clinical Targets, 2001. 10. 12, Florence, Italy

活性化星細胞のコラーゲン遺伝子転写におけるTGF- β /Smadシグナリング異常、第60回日本癌学会総会、2001年9月28日、横浜

1

GC box結合因子とSmadタンパクによるコラーゲン遺伝子の転写調節機構、第74回日本生化学会大会、2001年10月25日、京都

Transforming growth factor- β シグナルにおける Smad3 の機能的意義の解明

分担研究者 森 聖二郎 千葉大学大学院医学研究院細胞治療学講師

研究要旨： Transforming growth factor- β (TGF- β) の血管平滑筋細胞に対する作用としては、増殖抑制、遊走促進、マトリックス産生促進などが知られている。本研究の目的は、Smad3 欠損マウスから大動脈中膜平滑筋細胞を培養する技術を確認し、Smad3 欠損マウス由来細胞と野生型マウス由来細胞との間でTGF- β に対する反応性を比較することにより、Smad3 のTGF- β シグナルに占める機能的意義を明らかにすることである。まず始めに、TGF- β に対する遊走反応をポイデンチャンパー法にて検討した結果、野生型マウス由来細胞と比較して、Smad3 欠損マウス由来細胞の遊走反応が亢進していた。この結果は、Smad3 がTGF- β の細胞遊走シグナル伝達に抑制的に働いている可能性を示唆している。また、TGF- β 刺激された細胞におけるアクチンストレスファイバーの形成を検討すると、野生型マウス由来細胞では、刺激後4時間の時点でほぼ全ての細胞においてアクチンストレスファイバーの出現をみるのに対し、Smad3 欠損マウス由来細胞では、TGF- β 刺激によるアクチンストレスファイバーの形成は認められなかった。この結果は、TGF- β シグナルにおいて、Smad3 がアクチンストレスファイバーの形成に重要な働きをしていることを示唆している。今後、Smad3 の細胞遊走抑制作用とアクチンストレスファイバー形成との関連性についてさらに検討していきたい。

A. 研究目的

粥状動脈硬化病変すなわち粥腫（プラーク）を構成する成分のうち細胞成分を除くと、細胞外マトリックスは脂質とともに量的にも質的にも極めて重要な成分である。特にプラークの破綻あるいは安定化といった観点からは、細胞外マトリックスの量ならびに組成がプラークの強度を一義的に決定していると言える。プラークの細胞外マトリックスを産生している主たる細胞は血管平滑筋細胞である。そしてプラークを構成する内皮細胞や活性化T細胞など様々な細胞が、細胞同士の相互作用あるいは種々のサイトカイン、増殖因子などの分泌を介して、平滑筋細胞に影響を及ぼすことにより、プラークの細胞外マトリックスの量ならびに組成を制御していると考えられる。

培養平滑筋細胞において、transforming growth factor- β (TGF- β) は最も強力なコラーゲン合成刺激作用を有する。実際インビボでも、TGF- β の遺伝子を導入された動脈では、I型コラーゲンの産生蓄積が増加していることが示されている。そこで我々は、TGF- β のプラーク形成における役割を明らかにすることを目的に、Smad3 欠損マウスから大動脈中膜平滑筋細胞を培養する技術を確認し、Smad3 欠損マウス由来細胞と野生型マウス由来細胞との間でTGF- β に対

する反応性を比較することにより、Smad3 のTGF- β シグナルに占める機能的意義を明らかにする研究を開始した。

B. 研究方法

Smad3 欠損マウスは Anita Roberts 博士より供与された。常法にしたがい、C57BL/6 マウスと戻し交配を5代以上行ったマウスを実験に供した。同胞間ヘテロ交配によって得られた10～12週齢の野生型ならびにSmad3 欠損マウスから、麻酔下に大動脈を摘出し、外膜を中膜内膜複合体から分離し、さらに内膜擦過によって内膜組織を除いた中膜切片を作成した。この切片から、培養マウス大動脈由来平滑筋細胞を既報にしたがい採取した。すなわち、中膜切片を約1ミリメートル四方の断片まで細切した後、コラゲナーゼとエラストナーゼ処理を行い、単離細胞を培養フラスコに移し37°Cインキュベーターにて培養した。得られた培養平滑筋細胞の純度検定は、平滑筋細胞特異的分子マーカーである α アクチンに対する抗体を用いた免疫染色法により行った。Smad3 欠損マウス由来培養細胞におけるSmad3 蛋白欠損の確認は、抗Smad2/3抗体を用いたイムノブロット法にて行った。細胞遊走能はポイデンチャンパー法にて、TGF- β 濃度勾配下における細

胞のフィルター上部から下部への移動を観察することにより評価した。アクチンストレスファイバーの形成は、TGF- β 刺激前後で蛍光標識ファロイジンを細胞に添加した後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。なお本研究はヘルシンキ宣言に準じ、千葉大学医学部における倫理委員会、動物実験取り扱い委員会の規定にしたがい遂行した。

C. 研究結果

培養系に移された細胞は90%以上が平滑筋 α アクチン陽性細胞であることが確認された。さらに、Smad3欠損マウス由来の細胞ではSmad3蛋白が発現していないことが免疫ブロット法にて確認された。

これらの細胞を用いて、TGF- β に対する細胞遊走能の評価をおこなった。0から100 ng/mlのTGF- β 濃度域において、野生型マウス由来細胞に比し、Smad3欠損マウス由来細胞では細胞遊走が亢進していた。

TGF- β 刺激された細胞におけるアクチンストレスファイバーの形成を検討すると、野生型マウス由来細胞では、刺激後4時間の時点でほぼ全ての細胞においてアクチンストレスファイバーの出現をみるのに対し、Smad3欠損マウス由来細胞では、TGF- β 刺激によるアクチンストレスファイバーの形成は認められなかった。

D. 考察

TGF- β 刺激に対する平滑筋細胞の遊走現象が、Smad3欠損マウス由来の細胞において野生型マウス由来の細胞に比し増加していたことは極めて興味深い(図2)。この結果は、Smad3がTGF- β の細胞遊走シグナル伝達経路において抑制的に機能している可能性を提示している。ところで、TGF- β シグナル伝達経路においては2種類のMAPK (mitogen-activated protein kinase)、すなわちERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) とp38 MAPKが活性化されることが知られている。そしてp38 MAPKの活性化は、TGF- β 刺激による内皮細胞の透過性亢進ならびにミオシン軽鎖のリン酸化に必須であることが報告されている。我々は以前、PDGF β 受容体を発現させた培養内皮細胞のPDGF濃度勾配下における細胞遊走が、やはりp38 MAPKの活性化に依存していることを報告した。以上の実験事実から、TGF- β 刺激による培養平滑筋細胞の遊走にもp38 MAPKが関与している可能性が推測される。そして、このp38 MAPKの活性化がSmad3に非依存性の現象であるとするれば、p38 MAPKは遊走促進的に機能し、一方、Smad3は遊走抑制的に機能していると解釈することも可能である。この点に関しては、p38 MAPKの特異的抑制薬などを用いたさらなる

検討を要する。

Swiss 3T3細胞を用いた検討によれば、TGF- β シグナル伝達経路において、Smad3の下流でNET1と呼ばれるグアニンヌクレオチド交換因子が活性化され、これにより小型G蛋白であるRhoAが活性化されアクチンストレスファイバーが形成されるとする報告がある。今回、Smad3欠損マウス由来の細胞においては、TGF- β 刺激後のアクチンストレスファイバーの形成が認められなかったことから、培養マウス大動脈由来平滑筋細胞においても、Smad3の下流でNET1からRhoAを介してアクチンストレスファイバーの形成が行われている可能性が示唆される。一般的に、アクチンストレスファイバーの形成は、細胞がマトリックスに強固に固定される際に認められる細胞骨格変化と考えられている。したがって、TGF- β からSmad3を介する細胞遊走抑制シグナルの本体は、このようなRhoAを介する細胞骨格の変化であるのかも知れない。

E. 結論

Smad3欠損マウスから大動脈中膜平滑筋細胞を培養する技術を確立し、Smad3欠損細胞と野生型細胞との間でTGF- β に対する反応性を比較することにより、Smad3のTGF- β シグナルに占める機能的意義を検討した。TGF- β に対する遊走反応は、野生型細胞に比較して、Smad3欠損細胞で亢進していることが判明した。TGF- β シグナルにおいて各種のSmadが重要な働きをしていることが知られており、当然、Smad3欠損細胞は遊走反応が減弱ないし消失していると考えられたため、この結果は予想外であった。近年、TGF- β のシグナル伝達経路においては、SmadとともにMAPKが重要な働きをしている可能性が指摘されている。今回のデータの一つの解釈として、TGF- β の遊走シグナル伝達においては、MAPKは促進的に、Smad3は抑制的に働いていると仮定すると、Smad3欠損細胞で遊走反応が亢進していた理由を説明することができる。今後、各種のMAPK特異的阻害剤を用いた実験により、この点を明らかにしていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルにおける、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の検討

分担研究者 西岡 清 東京医科歯科大学 環境皮膚免疫学教授

研究要旨： 近年いくつかの臓器線維化において MCP-1 の関与が示唆されている。強皮症においても MCP-1 の発現が増強していることが報告されつつある。そこで、ブレオマイシン (BLM) 誘導性皮膚硬化モデルを用いて MCP-1 の発現を検討した。BLM (1mg/ml) を C3H マウスに隔日で 4 週間反復投与し、各週において MCP-1 の発現を蛋白、mRNA レベルで検討した。免疫染色では硬化病変部において浸潤する単核球、線維芽細胞に陽性所見を認めた。病変部組織より total RNA を抽出し、RT-PCR 法での検討では 2-3 週に mRNA の発現のピークを認めた。MCP-1 のレセプターである CCR-2 の発現も硬化の誘導に伴い亢進してみられた。以上より、BLM による皮膚硬化の誘導において MCP-1 は重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年いくつかのケモカインが線維化に関与することが示唆されてきている。Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は C-C chemokine superfamily の一つで、近年 *in vitro* においてラットの肺線維芽細胞からの I 型コラーゲンの遺伝子発現を増強することが報告され、線維化に関与する因子として注目されている。In vivo においても肺線維症や肝の線維化、また肺線維症や腎硬化症の動物モデルにおいても MCP-1 の発現が増強してみられることが報告されている。強皮症においても皮膚病変部、あるいは強皮症由来培養線維芽細胞においても MCP-1 の発現が亢進してみられることが報告されつつある。

ブレオマイシンは頻用される抗癌剤であるが、その副作用としてはヒトにしばしば肺線維症を引き起こすことはよく知られている。これを利用してマウスやラットに実験的にブレオマイシン誘導性の肺線維症を引き起こす動物モデルは既に確立され、広く用いられている。また一方、ブレオマイシン使用中の担癌患者に実際に強皮症様病変が引き起こされた報告もわずかながらみられる。われわれはこれまでに、ブレオマイシンをマウスの皮下に頻回に局所投与することで、ヒトの強皮症と組織学的ならびに生化学的に類似する皮膚硬化を誘導することを報告してきた。

そこで、今年度はブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルにおける、MCP-1 の発現を検討した。

B. 研究方法

C3H マウス（6 週令、雌）の背部に 1mg/ml のブレオマイシン（日本化薬）を 100 μ l ずつ隔日で皮下注を 4 週間くり返し硬化を誘導した。1-4 週の各

週において経時的に皮膚を採取し、病変部皮膚における MCP-1 の発現を酵素抗体法を用いた免疫組織学的検討、および RT-PCR 法を用いて検討した。また、MCP-1 のレセプターである CCR-2 の発現も同様に検討した。抗体は抗 MCP-1 抗体 (R&D Systems)、抗 CCR-2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。

C. 結果と考察

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化病変部における MCP-1 の発現

病変部皮膚における MCP-1 の発現は、ブレオマイシン投与 2 週目頃より、病変部皮膚に浸潤する単核球に強くみられたが、4 週目になると浸潤細胞における発現は減弱し、かわりに線維芽細胞に発現してみられた。

病変部皮膚組織から経時的に total RNA を抽出し、MCP-1、MIP-1 α/β 、RANTES の mRNA の発現を RT-PCR 法でみたが、MCP-1 の mRNA 発現は 2-3 週目で upregulation がみられた。MIP-1 α/β も 3 週目に強く mRNA の発現がみられた。これに対し、RANTES は経過中を通じて mRNA の発現にあまり変化はみられなかった。

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化病変部における CCR-2 の発現

次に、MCP-1 のレセプターである CCR-2 の発現を調べた。ブレオマイシン処理後 2 週目に、浸潤する単核球に強く発現がみられましたが、4 週目には単核球における発現は減弱し、かわって線維芽細胞様細胞にも発現がみられるようになった。

病変部皮膚組織における、CCR-2 の発現を RT-PCR

法でみると、CCR-2のmRNAの発現は2-3週目に増強してみられた。CCR-1のmRNA発現は2週目にわずかにupregulationがみられる程度であとは比較的同程度のレベルであった。

抗CCR-2抗体による抑制効果の検討

そこで、CCR-2の作用を抗体でブロックすることにより、皮膚硬化の誘導が抑制されうるかを検討した。1 mg/mlのブレオマイシンと同時に100 μ g/mlの抗CCR-2抗体を尾静脈より隔日で50 μ l ivし、4週間後に組織学的に評価した。ブレオマイシン単独投与群は膠原線維の膨化、肥厚、均質化といった皮膚硬化の所見が誘導されるが、抗CCR2抗体の同時投与によって部分的に抑制されてみられた。

引き続き、hydroxyproline量の測定やコラーゲンのmRNAの発現などをみる予定である。

D. 結 語

MCP-1/CCR-2を介する経路はブレオマイシンによる皮膚硬化の誘導に重要な役割を果たす可能性が示唆された。MCP-1はコラーゲンを始めとするECMの発現をupregulateするdirectな作用と、病変部局所に遊走された炎症細胞から産生されるメディエーターを介するindirectな作用の両方を介して線維化・硬化を誘導する可能性が考えられた。MIP-1もブレオマイシン誘導性皮膚硬化に関与する可能性が考えられるが、これについては一層の検討が必要と思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示

TNF レセプター p55 欠損 (TNFRp55^{-/-}) マウスにおける皮膚線維化形成機序の解析

分担研究者 片山一朗 長崎大学 皮膚科教授

研究要旨: TNF Rp55^{-/-}マウスにプレオマイシンを皮下投与することで野生型に比べ早期に著しい皮膚硬化を来すことを報告し、さらにTNFRp55を介したシグナルが細胞外マトリックス分解系において重要な役割を担っている可能性を示した。上記現象が *in vitro* でも再現できることを確認し、MMP-1 遺伝子の転写に essential であるとされている JNK/SAPK 及び NF- κ B の活性化を確認した。強皮症の患者血清中の可溶性 TNFRp55 については、皮膚硬化の重症度や内臓病変、皮膚症状、他の検査値との相関は明らかではない。そこで、強皮症患者血清中の可溶性 TNFRp55 を ELISA 法を用いて測定し、発症年齢や Barnett の type、skin score (Modified Rodnan Total Skin Thickness Score: TSS) 等の臨床所見、肺線維症などの内臓病変、各種皮膚症状、および P- \cdot -P などの検査値と可溶性 TNFRp55 の測定値間の相関性について統計的に解析した。その結果、可溶性 TNFRp55 測定値は、Barnett の type \cdot の患者群において正常および type \cdot の患者群に比較して有意な上昇を認め、また skin score (TSS)、P- \cdot -P、血清 β 2 microglobulin、immunoglobulin G の値および手指爪上皮出血と相関を示した。

A. 研究目的

全身諸臓器の線維化を特徴とする強皮症の病態形成にはサイトカインの関与が報告されており、中でも TNF は患者群特異的な遺伝子多型の存在や、患者血清中の TNF 濃度の上昇が病勢に一致することが報告されている。一方、その受容体である TNFR の可溶性フォームは TNF シグナリングに拮抗的に働くことが知られているが、病勢に一致してその血中濃度が上昇することが近年報告されている。このことは生体内での TNF シグナリングの異常が強皮症の病態に関与していることを示唆している。そこで TNFRp55 ノックアウトマウスを用いてプレオマイシンによる皮膚硬化を検討し、強皮症患者血清中の可溶性 TNFRp55 を ELISA 法を用いて測定し、発症年齢や Barnett の type、skin score (Modified Rodnan Total Skin Thickness Score: TSS) 等の臨床所見、肺線維症などの内臓病変、各種皮膚症状、および P- \cdot -P などの検査値と可溶性 TNFRp55 の測定値間の相関性について統計的に解析した。

B. 研究方法

材料と方法

1. TNFRp55 ノックアウトマウス

このマウスは TNFRp55 の膜貫通領域から細胞室内ドメインが欠失しているが、TNFRp75 の発現およびそれからの細胞内へのシグナリングは正常である。外観上健康であり、胸腺やリンパ球の population に異常はない。

2. 培養細胞株

野生型あるいは TNFRp55 ノックアウトマウスの embryonic fibroblast は胎生 14 日目の胎児から樹立した。

3. プレオマイシン誘導性皮膚硬化の作成

TNFRp55 ノックアウトマウス、およびコントロールとしてこのノックアウトマウスの野生型である C57B6 マウスの背部皮膚にプレオマイシン 1mg/ml 溶液を 0.1ml、連日皮内注射した。投与後 12 時間、24 時間、3 日後、5 日後、7 日後、14 日後に皮内注射部の皮膚を採取し、病理学的検討を行うと共に、蛋白および total RNA を抽出した。病理学的検討では真皮の厚さを測定し定量化した。統計的な解析は Mann-Whitney の U 検定を用いた。

4. Western Blotting

皮膚を 0.1M NaCl, 0.01M Tris-HCl (pH 7.6), 1mM EDTA (pH 8.0), 0.02 mg/ml に溶解し、上澄をサンプルに用いた。培養細胞のサンプリングには lysis buffer で溶解した上澄を用いた。

各々のサンプルは 20 μ g をローリー法によって定量し、10% SDS ポリアクリルアミドゲルに分離し、泳動後、PVDF メンブランにトランスファーした。Blotting に用いた抗体は抗 MMP-1 抗体 (SIGMA)、抗 MMP-2 抗体 (富士薬品)、抗 LT- α 抗体 (SIGMA)、抗 JNK/SAPK 抗体、抗リン酸化型 JNK/SAPK 抗体 (NEB)、抗 κ B 抗体 (SantaCruz) を用いた。2 次抗体は HRP-conjugated (Amersham Pharmacia) を用いた。Blot は ECL System を用いて可視化した。抗 actin 抗体 (CHEMICON) をコントロールとして用いた。

5. RT-PCR

マウスに作成した硬化性皮膚病変部の皮膚よりtRNAを抽出、それを鋳型としてprocollagen alpha 1 (I)、MP-2, MMP-9, TNF, LT-alpha, PDGF, beta-actinの特異的プライマーを用いてPCR法でDNAを増幅した。

6. Flow Cytometric Analysis

3~5 × 10⁵ 個の細胞を回収し、PBS-2% FBS で2回洗浄した後、細胞は4℃でFITC conjugated anti-TNFRp55 polyclonal antibodyあるいはisotype control antibodyと20分間反応させた。FBS/PBSで2回洗浄した後、再びFBS/PBSに浮遊させ、CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いてFACSscanを行った。

7. 強皮症患者血清を用いた可溶性TNFRp55 ELISA

強皮症患者24名および健常人コントロール5名から、同意を得て血清を採取した。女性23例、男性1例、患者の平均年齢は57 ± 13歳 (16~78歳)、Barnettの分類ではtype・10人、type・4人、type・10人であった。可溶性TNFRp55はELISAキット(R&D社)を用いて測定した。臨床所見と検査所見について分割表分析・Fisherの直接確率法、Mann-WhitneyのU検定、回帰分析・分散分析により統計的な解析を行い、P値が0.05未満を有意差ありとした。

C. 結果と考察

1. TNFRp55^{-/-}マウスにおけるプレオマイシン誘導性の皮膚線維化形成

TNFRp55ノックアウトマウスはプレオマイシン投与後3日目から野生型には見られない著しい皮膚の肥厚が見られた。さらにその後もTNFRp55ノックアウトマウスではプレオマイシンの投与回数依存的に皮膚肥厚が増強していた。これらのことからTNFRp55ノックアウトマウスではプレオマイシン誘導性の皮膚肥厚が強調されていることが考えられた。

2. TNFRp55ノックアウトマウスにおけるプレオマイシン誘導性線維化病変の解析

プレオマイシン投与後3日目の皮膚をアザンマロリー染色したが、TNFRp55ノックアウトマウスでは野生型に比し、コラーゲンバンドルの著しい肥厚を認めた。TNFRp55ノックアウトマウスではプレオマイシン投与後24時間後から著しいコラーゲンの蓄積が認められた。ヒアルロン酸、デルマトン硫酸ともにTNFRp55ノックアウトマウスでは蓄積傾向は認められなかった。TNFRp55ノックアウトマウスによるプレオマイシン誘導性皮膚肥厚はコラーゲンの蓄積によって生じている可能性が考えられた。

3. Fibrogenic cytokine, procollagen alpha 1,ゼラチナーゼのmRNAのプレオマイシンによる発現誘導

TNFRp55ノックアウトマウスにおけるコラーゲンの蓄積は既に72時間後には生じていることから、72時間以前にTGF-beta, PDGF, IL-4の発現レベルに変化が予想されるが、上記の遺伝子発現に変化が認められなかった。またCOL1A1, MMP-2, MMP-9の遺伝子発現も変化が見られなかった。

4. TNFRp55ノックアウトマウスにおけるプレオマイシン誘導性のMMP-1の発現

TNFRp55ノックアウトマウスではプレオマイシン刺激後、MMP-1の発現が著しく減弱していた。TNFRp55ノックアウトマウスにおけるプレオマイシン誘導性のコラーゲン蓄積はMMP-1の発現の減弱が原因と考えられた。

この現象がin vitroでも再現できるかを確認するために野生型あるいはTNFRp55ノックアウトのembryonic fibroblast (MEF)に対しTNF刺激を行いMMP-1の蛋白レベルの発現を検討した。野生型MEFではTNF刺激time dose-dependentにMMP-1の発現増強が認められるが、TNFRp55ノックアウトMEFでは、TNFによるMMP-1の発現増強は認められなかった。MMP-1遺伝子の発現誘導にはJNK, NF-κBの活性化が転写活性に働くことが知られているため、同じメンブタンを用いてJNKの活性化をそのリン酸化で、NF-κBの活性をIκBの分解という形で検討を行った。野生型ではJNKのリン酸化、IκBの分解を認めるが、TNFRp55ノックアウトでは認められなかった。TNFRp55が欠失したことによるMMP-1の発現誘導の減弱はin vivo, vitro双方で再現可能であり、TNFRp55の下流におけるJNK, NF-κBの活性の欠失が原因と考えられた。

5. プレオマイシン刺激による線維芽細胞TNFRp55発現調節

プレオマイシン刺激による細胞表面のTNFRp55の挙動を確認するために野生型MEFを用いたFACSを行った。

TNFRp55はプレオマイシン刺激によって細胞表面上にup regulationしていた。

6. 強皮症患者血清中の可溶性TNFRp55測定

強皮症の患者血清中の可溶性TNFRp55については、limited typeに比較してdiffuse typeで優位に上昇するという報告はあるが、皮膚硬化の重症度や内臓病変、皮膚症状、他の検査値との相関は明らかではない。そこで、強皮症患者血清中の可溶性TNFRp55をELISA法を用いて測定し、発症年齢やBarnettのtype、

skin score (Modified Rodnan Total Skin Thickness Score: TSS)等の臨床所見、肺線維症などの内臓病変、各種皮膚症状、およびP-・-Pなどの検査値と可溶性TNFRp55の測定値間の相関性について統計的に解析した。その結果、可溶性TNFRp55測定値は、Barnettのtype・(1,270 ± 358 pg/ml)の患者群において正常(776 ± 143 pg/ml)およびtype・(901 ± 324 pg/ml)の患者群に比較して有意な上昇を認め、またskin score (TSS)、P-・-P、血清β 2-microglobulin、immunoglobulin Gの値および手指爪上皮出血とP < 0.05で相関を示した。臨床症状・所見の肺線維症、関節炎、逆流性食道炎、消化器・便通異常、腎硬化症・高血圧症、心病変、レイノー症状、舌小帯の短縮、強脂症、pitting scar、斑状毛細血管拡張、石灰沈着、顔の皮膚硬化、また検査所見としてのLDH、CPK、アルドラーゼ、IgA、IgM、RA、抗核抗体、抗Scl-70抗体、抗セントロメア抗体、抗RNP抗体、可溶性IL-2レセプター、KL-6、%VC、%DLCOについては相関を示さなかった。以上のことは、可溶性TNFRp55が、強皮症の病態に深く関係していることを示唆するとともに、臨床的に強皮症患者の皮膚硬化重症度の指標と成りうる可能性を示唆していると考えられる。

D. 研究発表

論文発表 刊末に一括表示

学会発表

抗リン脂質抗体症候群

Care Net TV メディカルCh(01/01/05)

第99回日本皮膚科学会総会シンポジウム「20世紀皮膚科学の総括」

脂漏性皮膚炎が先行した皮膚筋炎の一例

第24回皮膚脈管・膠原病研究会(01/01/25～01/01/26 於大宮市・大宮ソニックシティーホール)

特別講演：膠原病を疑う皮膚症状

学術講演会〔主催：熊本県医師会、熊本市医師会〕
(01/02/23 於熊本市・熊本市国際交流会館)

第152回大阪皮膚科症例検討会(01/03/08 於大阪市・天王寺都ホテル)

特別講演：抗リン脂質抗体症候群の基礎と臨床
片山一朗（長崎大）

特別講演：きをつけておきたい膠原病の皮膚症状

第4回皮膚疾患治療懇話会(01/07/05 於札幌市・札幌後楽園ホテル)

ヒト HGF 遺伝子導入リボソームを用いた皮膚硬化モデルマウスの治療

分担研究者 西岡 清 東医歯大、環境皮膚免疫学教授

研究要旨： 昨年の班会議で我々はマウスにブレイマイシン(BLM)を投与すると同時にHGF-リボソーム(HGF-liposome)を筋肉に投与することにより皮膚硬化の誘導を抑制することを報告した。今回、BLMを皮下投与によりすでに誘導された皮膚硬化モデルマウスにHGF-liposomeを筋肉内に投与して皮膚硬化を治療が可能か検討した。その結果HGF-liposomeをBLMで誘導した皮膚硬化マウスに投与することにより真皮の肥厚、コラーゲン量ともに減少した。BLM投与7、8週間後のマウスの血清、皮膚、筋肉、肺、肝臓などの臓器抽出物からRT-PCR法、ELISA法を用いて mRNA 蛋白レベルでのHGFを検出したところ血中では大量のHGFが、皮膚では少量のHGFが検出できた。HGF-liposomeを投与することにより皮膚のTGF- β 1蛋白量、mRNA発現量ともに抑制された。以上のことより、HGF-liposomeの筋肉内投与による強皮症の遺伝子治療の可能性が示唆された。

A. 研究目的

ブレオマイシンは、マウスやラットに実験的に肺線維症をひきおこす薬剤として知られている。これまでの研究活動において、ブレオマイシンをマウスに繰り返し局所投与することにより皮膚の硬化を誘導することを見出し、強皮症のモデルマウスとなりうる可能性を報告した。一方、肝細胞増殖因子(HGF)は肺線維症のモデルマウスに投与され、肺の線維化を抑制することが知られている。また一昨年度の班会議でhuman HGFを皮膚硬化モデルマウスの筋肉内に投与することによりモデルマウスの皮膚硬化が抑制されることを報告、さらに昨年度の班会議では、human HGF遺伝子挿入ベクターを組み込んだHVJ-liposomeにより皮膚硬化が抑制されることを報告した。今回、このHGF-HVJ-liposomeをすでにBLMにて誘導された皮膚硬化モデルマウスに投与して強皮症の治療薬として使用できるか検討した。

B. 研究方法

材料及び方法

ブレオマイシン（日本化薬：PBSで100 μ g/mlに調整、BML）をC3Hマウスに0.1mlずつ4週間連日皮下注射し、硬化を誘導した。その後、human HGF DNA (2.2 Kb)をVector plasmidに挿入後、HVJ-liposomeに組み込み5 mg/mouseを皮下に10 mg/mouseを筋肉内に2週間ごと2回投与し、4週間後にPBSを筋肉内に投与した群と比較検討した。BLM最終投与4週間後に、背部皮膚を切除し組織学的に検討した。一部の実験ではホルマリン固定した組織標本において、H & E

染色、トルイジンブルー（pH 7.0）、ギムザ、コンゴレッド染色を各々施行し、硬化病変部における病理学的変化と皮膚の厚さを計測した。また、径6mmのpunch biopsy 皮膚中の皮膚ハイドロキシプロリン量をWoessnerの方法を用いて測定した。さらに、human HGFがmRNA、蛋白レベルで発現しているかを明らかにするため、皮膚、肺、筋肉、腎臓などの臓器の抽出液および血清よりRT-PCR法、ELISA法を用いて測定した。HGFの発現分布を検討するため、抗ヒトHGF抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。さらに、皮膚におけるTGF- β 1の発現レベルを測定するためELISA、RT-PCR法を用いてmRNA、蛋白レベルで定量した。

C. 研究結果

1. HGFのmRNA、蛋白の発現

HGF遺伝子を組み込んだHVJ-liposomeの筋肉内投与によりHGFが皮膚などの臓器及血清中にmRNA、蛋白レベルで発現しているか検討した。HGF-liposome投与後の皮膚、肺、筋肉にHGF-mRNAの発現がみられたが、肝臓には発現が認められなかった。さらにHGFの蛋白レベルでの発現をELISA法で検討した。その結果、皮膚の抽出液からは少量のHGFが認められなかったが、HGF-liposomeの投与群の血清からは大量のHGFが検出された。

2. BLMにより誘導された皮膚硬化に対するHGF-HVJ-liposomeの投与の効果

BLMにより皮膚硬化を誘導したマウスにHGF-HVJ-liposomeを筋肉内に投与した場合の病理組織像では、

対照群のPBSを投与した群と比較し、明らかに皮膚硬化は軽快していた。BLM投与マウスにおける皮膚の厚さを比較検討すると、BLMにより皮膚硬化を誘導したマウスにHGF-liposomeを筋肉内に投与した群では、HGF-liposome非投与群に比較して、明らかに皮膚の肥厚が改善されていた。また、皮膚ハイドロキシプロリン量測定結果でも、HGF-liposomeの投与後4週間後の時点で、対照群のPBSを同期間局注したものと比較してHGF-liposome筋肉内投与群、皮内投与群ともに有意に皮膚ハイドロキシプロリン量が低下した。

3. TGF- β 1の発現の検討

強皮症モデルマウスでの皮膚硬化の誘導においてTGF- β 1が関与していることを報告している。今回のHGFによる皮膚硬化に対する治療効果にTGF- β 1が関与した反応であるかどうかを明らかにするため、liposome投与群、非投与群間で免疫組織化学的手法、ELISA法、RT-PCR法を用いて比較検討した。免疫組織化学的検討で明らかにHGF-liposome非投与群のBLM誘導硬化皮膚に、紡錘形大型円形細胞に強いTGF- β 1の発現が見られたが、HGF-liposome投与群ではTGF- β 1の発現レベルが減弱していた。さらに皮膚におけるTGF- β 1陽性細胞数を検討したが、細胞数に有意差は見られなかったものの、紡錘形大型単核細胞におけるTGF- β 1陽性率は低下していた。一方、皮膚抽出液におけるTGF- β 1量をELISAにより検討した結果、HGF-liposome投与群では、非投与群に比べ有意に減少していた。以上の事よりHGFはTGF- β 1産生細胞率を減少させるのみではなく、マクロファージ、線維芽細胞などにおけるTGF- β 1の産生量を抑制することが示唆された。

D. 考察

BLM投与により誘導した皮膚硬化モデルマウスにおいて、ヒトHGF遺伝子を挿入したベクターを組み込んだHVJ-liposomeを筋肉内投与することにより、すでに誘導された皮膚硬化が改善されることが明らかになった。HGF-liposomeを筋肉内に投与したとき、筋肉、皮膚、肺ではHGFのmRNA発現が認められたが、肝臓では認められなかった。しかし、肝硬変の動物モデルにおいてHGF-liposomeの筋肉内投与が有効であるとする報告6)もあり、肝臓の抽出液中にHGF-mRNAが発現しなかったのは、検索を行った時間が異なっているなどの違いによる可能性もあり再検の必要がある。また、HGF蛋白は、HGF-liposome投与4週間後に微量に検出されたが、血清中には大量のHGFが検出できたこと、免疫組織学的にHGFが皮膚、肺にびまん性に染色されることより、筋肉の細胞より産生されたHGFが血中

を大量に循環して、皮膚、肺などの臓器に至った可能性が示唆された。

HGF投与により皮膚硬化が改善した機序を解析するため皮膚局所のTGF- β 1の発現を解析した。その結果、HGF-liposome投与により、明らかに皮膚局所のTGF- β 1の発現がmRNAレベル、蛋白レベルで抑制されていた。しかし、皮膚局所のTGF- β 1陽性細胞の数はHGF-liposome投与群、非投与群間で差が認められなかった。このことはマクロファージ、線維芽細胞のTGF- β 1産生能が抑制された可能性を示唆する結果である。最近、慢性腎炎モデルマウスでもHGFを投与することにより腎臓における線維化が抑制されること、さらに抑制機序に関してHGFがTGF- β 、PDGFの産生を抑制することが腎炎モデルマウスでも明らかにされている。この報告は我々の結果を支持する報告と考えられる。今後、HGFがTGF- β 1の産生を阻害する機序、TGF- β 1の阻害以外の皮膚硬化抑制機序について引き続き検討を加える予定である。また、今回HGF-liposomeがすでに形成された皮膚硬化病変の治療に有効である可能性が明らかにされたので、今後ヒト強皮症にHGF-liposomeが有効であるか否かを検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示