

リンパ球のシグナル伝達分子の発現を改変したノックアウトマウスやトランスジェニックマウスでは種々の自己免疫異常やそれに伴う病変がみられることが知られており、リンパ球のシグナル伝達機構の異常が自己免疫疾患の病態に關与する可能性が想定されている。特に B リンパ球では Lyn, CD22, SHP-1, CD72, FcγRIIB などの抑制性分子ないし経路が重要であると考えられている(4)。

われわれは最近、全身性強皮症患者の B 細胞表面の CD19 の発現が増強していることを見出した(5)。また、TSK/+マウスにおいて CD19 の発現が皮膚硬化に影響することを報告した(6)。この知見は、古くから知られている強皮症に高頻度に特異的な自己抗体が出現することに加えて、B 細胞が本症の病態形成に重要な役割をもっていることを示唆している。そこでわれわれは、TSK/+マウスを対象に B リンパ球の抗原受容体を介するシグナル伝達に異常が存在するかどうかを検討した。

## B. 研究方法

### 1) 動物

TSK/+マウスは Jackson Laboratory より購入した。マウスは国立国際医療センター研究所動物飼育室にて特定病原体非存在の環境にて飼育し、8-12 週齢のものを使用した。マウスの飼育および実験にあたっては国立国際医療センター研究所動物管理委員会の承認を得て行った。

### 2) 抗体

使用した抗体は下記の通りである。抗 B220

(RA3-6B2, Beckman Coulter), 抗 CD19 (MB19.1) (7), 抗 CD22 (MB22-1) (8) (Cy34, BD PharMingen), 抗 I-A (M5/114.15.2), 抗リン酸化チロシン (4G10, Upstate Biotechnology, NY; PY99, Santa Cruz Biotechnology), FITC-conjugated 抗 IgM (Southern Biotechnology Associations, Inc.), F(ab')<sub>2</sub> goat 抗 mouse IgM (Cappel, ICN Biomedicals), 抗 Lyn, 抗 Syk, 抗 PLCγ2, 抗-ERK2, 抗 JNK1 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 SHP-1 (Upstate Biotechnology), 抗 Akt, 抗 phospho-Akt (Ser473) (New England Biolabs), 抗 active ERK, 抗 active JNK (Promega)。

### 3) B 細胞の精製, 活性化, 免疫沈降

B 細胞は脾臓からの single cell suspension より、抗 Thy1.2 抗体がコートされた磁気ビーズを用いて T 細胞を除去することにより精製した。B 細胞の精製率はフローサイトメトリーにて 95%以上 (B220 陽性細胞) であった。B 細胞は RPMI1640 培地中で 37°C に加温した後、F(ab')<sub>2</sub> 抗マウス IgM 抗体 (40 μg/ml) で一定時間刺激し、4°C で細胞を遠心、溶解バッファー (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Na orthovanadate, 2 mM EDTA, 50 mM NaF および蛋白分解酵素阻害剤) にて細胞を溶解した。溶解液は SDS-PAGE あるいは免疫沈降に用いた。免疫沈降は、細胞溶解液をマウスないしウサギ IgG およびプロテイン G 結合アガロースビーズで非特異反応を吸収した後、適当な抗体とプロテイン G ビーズを混合し、4~6 時間程度反応させた。ついで、ビーズを溶解バッ

ァーにて4回洗浄し、SDS-PAGE サンプルバッファに溶解した。CD19 の免疫沈降には抗マウス CD19 モノクローナル抗体を Affi-gel (Bio-Rad 社) に結合させたものを使用した。

#### 4) 免疫プロット法

細胞溶解液あるいは沈降させた蛋白は SDS-PAGE により分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜はペルオキシダーゼ標識抗リン酸化チロシン抗体 (4G10: Upstate Biotechnology 社; PY99: Santa Cruz Biotechnology 社) または適当な抗体とペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス/ウサギ IgG 抗体で反応させた。これらのプロットは enhanced chemiluminescence キット (Pierce 社) を用いて発色させた。各レーンの蛋白量が等しいことを確認するため、あるいは結合している別の蛋白を検出するために、プロット後抗体をはがし、適当な抗体で再度プロットを行った。

#### 5) 細胞内カルシウム濃度測定

脾細胞に  $1\mu\text{M}$  の indo-1-AM ester (Molecular Probes) を  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間とりこませた後、FITC 標識抗 B220 抗体と 15 分間反応させた。UV レーザーで励起したときの B220 陽性細胞における蛍光波長の比 (488/407 nm) を Epics Altra flow cytometer (Beckman Coulter) で測定した。測定開始 1 分後に  $\text{F(ab)'}_2$  抗マウス IgM 抗体 (10 または  $40\mu\text{g/ml}$ ) を添加した。結果は 15 秒間の蛍光比の平均を求めることにより表わした。

#### 6) 統計

サンプル間の平均値の差の有意差の検定には Student's *t* test を用いた。

### C. 研究結果

#### 1) TSK/+マウス B 細胞では抗原受容体刺激による細胞内カルシウム濃度反応が過剰に誘導される

TSK/+マウスの B 細胞は、B 細胞そのものには明らかな遺伝子異常がないにもかかわらず、B 細胞の表現型は IgM の発現減少、MHC class II の発現上昇、CD23 の発現上昇などの異常を呈することがわかっている。そこで TSK/+B 細胞において、抗原受容体刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を検討した。図 1 に示すように、TSK/+マウス B 細胞では野生型マウス B 細胞に比べて細胞内カルシウム濃度の上昇が約 50%大きくなっていた。

#### 2) TSK/+マウス B 細胞のシグナル分子のリン酸化

TSK/+マウス B 細胞は抗原受容体刺激に対して過剰反応性であることが示されたため、抗原受容体刺激により誘導される細胞内シグナル分子のリン酸化や活性化について検討した。チロシンキナーゼの Lyn や Syk は野生型と同程度にリン酸化および活性化が誘導された (図 2)。また、カルシウム濃度の調節により直接的な作用のある PLC $\gamma$ 2 や SHIP のリン酸化にも大きな差は認められなかった (図 2)。これは Shc のリン酸化についても同様であった (図 2)。

3) TSK/+マウス B 細胞では CD22 のリン酸化が減弱している

さらに TSK/+マウス B 細胞のカルシウム濃度の異常のメカニズムを検討するために、カルシウム制御に大きくかかわる膜表面分子の CD22 の機能を検討した。CD22 の構成的なリン酸化は TSK/+マウス B 細胞で減弱しており、抗原受容体刺激により誘導されるリン酸化も野生型 B 細胞に比べて著しく減弱していた (図 3)。これにともなって CD22 にリクルートされるチロシンフォスファターゼである SHP-1 の量も低下していた (図 3)。一方 TSK/+B 細胞では CD19 のチロシンリン酸化は野生型 B 細胞に比べ抗原受容体刺激後増加していた (図 3)。なお CD19 および CD22 の発現量には野生型 B 細胞と TSK/+B 細胞で違いは認められなかった。

4) TSK/+マウス B 細胞の下流のシグナルについて

TSK/+マウス B 細胞にみられるこのような CD22 の機能異常が下流のシグナル伝達にどのような影響を及ぼしているかをさらに解析した。抗原受容体刺激に誘導される ERK の活性化は TSK/+B 細胞で上昇しており、一方 JNK や Akt の活性化には有意な差は認められなかった (図 4)

#### D. 考案

本研究では、TSK/+マウスの B 細胞におけるシグナル伝達異常の有無について検討した。TSK/+マウスは自己免疫異常を呈する遺伝子改変マウスとは異なり、リンパ球そのものに

はこれまでに知られている遺伝子異常は存在しないが、血液中や脾臓の B 細胞は表面 IgM の発現低下、MHC class II や CD23 の発現増強という持続的に抗原刺激をうけているような表現型を呈し(6)、これらは CD19 過剰マウス、CD22 欠損マウスなど膜シグナルが構成的に増強しているマウスの B 細胞に共通してみられる所見である。このような所見に一致して、TSK/+マウス B 細胞では抗原受容体刺激に対して細胞内カルシウム濃度上昇や MAP キナーゼである ERK の活性化が野生型マウス B 細胞に比べて 50%程度増強して認められた。このことは TSK/+B 細胞におけるシグナル伝達が質的に変化し、過剰な応答性を示していると考えられる。

われわれの解析において、TSK/+マウス B 細胞は CD22 のチロシンリン酸化が特異的に障害されていた。CD22 は B 細胞に特異的な膜表面糖蛋白であり、細胞内に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) をもち、Lyn により CD22 のチロシン基がリン酸化されるとチロシンフォスファターゼである SHP-1 をリクルートすることができる(9)。この SHP-1 は種々のシグナル分子を脱リン酸化することにより、細胞の活性化を抑制する。すなわち、Lyn/CD22/SHP-1 経路は B 細胞の抗原受容体シグナルを抑制する中心的な経路である。TSK/+マウス B 細胞では、CD22 のリン酸化は抗原受容体刺激の非存在下でも野生型 B 細胞に比べて低下しており、抗原受容体の刺激に誘導されるリン酸化も著明に減弱していた。これに一致して CD22 の抑制性経路の主要なターゲットの一

つである CD19 のチロシンリン酸化は野性型にくらべ増加していた。CD19 は Src family チロシンキナーゼ, Vav, PI3 キナーゼの活性を制御することにより抗原受容体シグナルを増幅するはたらきがある(10)。したがって, TSK/+マウス B 細胞では CD22 抑制性経路が破綻することにより CD19 への抑制が解除され, 刺激への応答性が過剰になっていると推測することができる。この分子メカニズムは, われわれが最近報告した B 細胞上の CD19 の欠損により TSK/+マウスの皮膚の線維化が抑制されるという知見に合致するものである(6)。

CD22 は抗原受容体刺激後 Lyn によってリン酸化されることが示されている。しかしながら, われわれの検討では TSK/+マウスにおける Lyn の活性化は正常であった。CD22 のリガンドはシアル酸であり B 細胞表面上で IgM や CD45 のシアル酸と結合すること (cis 結合) が示されている(11)。TSK/+マウスの B 細胞における CD22 機能の破綻は, 例えば CD22 のリガンドが血中に存在することによって, B 細胞上の CD22 の cis 結合が解除され, 抗原受容体に対する抑制が失われるというモデルを想定することができる。TSK/+マウスにおいては CD22 の遺伝子異常は存在せず, 機能的な異常であると考えられるが, CD22 の遺伝子多型は自己免疫マウスでは報告されており(12), 自己免疫疾患発症の鍵となるシグナル伝達経路であると考えられ, 今後さらなる検討が重要であるとともに, 将来的に治療上のターゲットになりうるものと考えられた。

## E. 結論

TSK/+マウス由来の B 細胞のシグナル伝達異常について解析した。TSK/+マウス B 細胞は抗原受容体刺激に対して過剰な反応性を示し, これは主として CD22 の機能が障害されていることによると考えられた。以上より, B 細胞抑制性シグナル伝達経路の質的な異常が強皮症の病態形成に関与している可能性が示された。

## F. 文献

1. Green, M.C., H.O. Sweet, and L.E. Bunker. 1976. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 82:493-512.
2. Saito, S., K. Kasturi, and C. Bona. 1999. Genetic and immunologic features associated with scleroderma-like syndrome of TSK mice. *Curr Rheumatol Rep* 1:34-37.
3. Kielty, C.M., M. Raghunath, L.D. Siracusa, M.J. Sherratt, R. Peters, C.A. Shuttleworth, and S.A. Jimenez. 1998. The Tight skin mouse: demonstration of mutant fibrillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. *J Cell Biol* 140:1159-1166.
4. Tedder, T.F., S. Sato, J.C. Poe, and M. Fujimoto. 2000. CD19 and CD22 regulate a B lymphocyte signal transduction pathway that contributes to autoimmunity. *Keio J Med* 49:1-13.
5. Sato, S., M. Hasegawa, M. Fujimoto, T.F. Tedder, and K. Takehara. 2000. Quantitative

- genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 165:6635-6643.
6. Saito, E., M. Fujimoto, M. Hasegawa, K. Komura, Y. Hamaguchi, Y. Kaburagi, T. Nagaoka, K. Takehara, T.F. Tedder, and S. Sato. 2002. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the Tight Skin mice. *J. Clin. Invest.* 109:1453-1462.
  7. Sato, S., N. Ono, D.A. Steeber, D.S. Pisetsky, and T.F. Tedder. 1996. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol* 157:4371-4378.
  8. Poe, J.C., M. Fujimoto, P.J. Jansen, A.S. Miller, and T.F. Tedder. 2000. CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. *J Biol Chem* 275:17420-17427.
  9. Sato, S., J.M. Tuscano, M. Inaoki, and T.F. Tedder. 1998. CD22 negatively and positively regulates signal transduction through the B lymphocyte antigen receptor. *Semin Immunol* 10:287-297.
  10. Fujimoto, M., J.C. Poe, M. Hasegawa, and T.F. Tedder. 2001. CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification. *Immunol Res* 22:281-298.
  11. Razi, N., and A. Varki. 1998. Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7469-7474.
  12. Morel, L., C. Mohan, Y. Yu, B.P. Croker, N. Tian, A. Deng, and E.K. Wakeland. 1997. Functional dissection of systemic lupus erythematosus using congenic mouse strains. *J Immunol* 158:6019-6028.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

Fujimoto M, Sato, S. CD22 Inhibitory Regulation is Disrupted in B Cell Antigen Receptor Signaling in the Tight-Skin Mouse. American college of Rheumatology. Annual Scientific Meeting. New Orleans. October, 2002.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

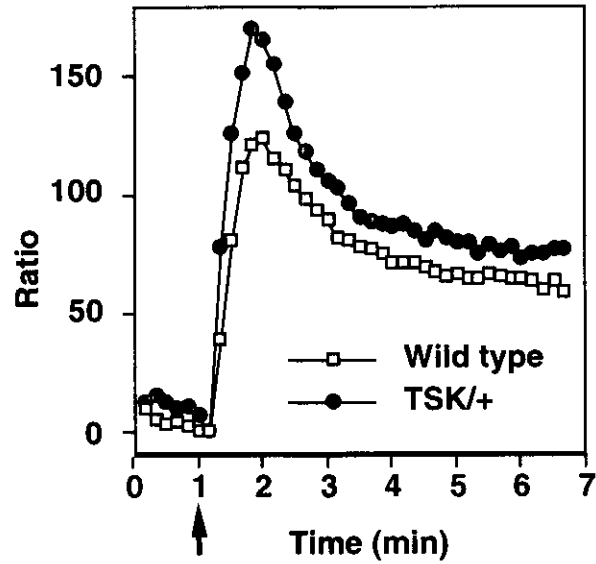


図1：TSK/+マウス B 細胞の抗原受容体刺激に伴う細胞内カルシウム濃度の変化。

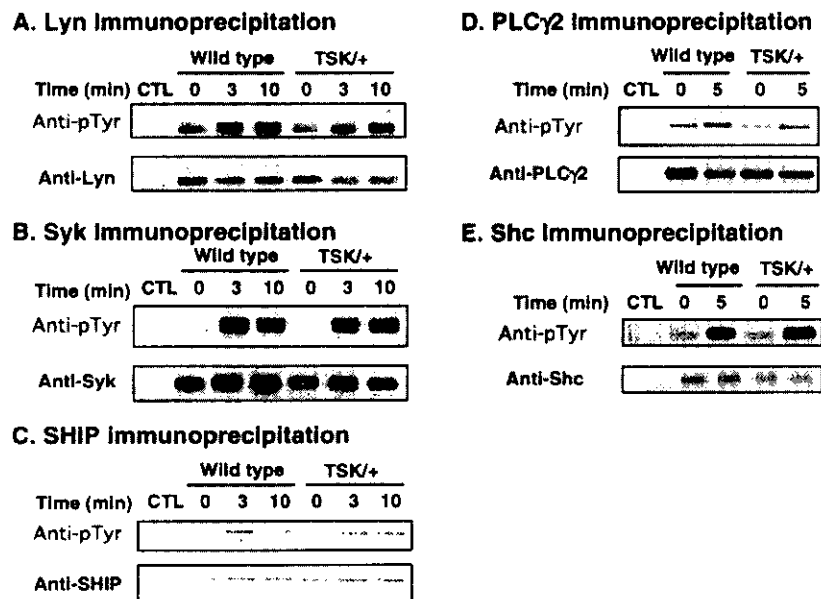
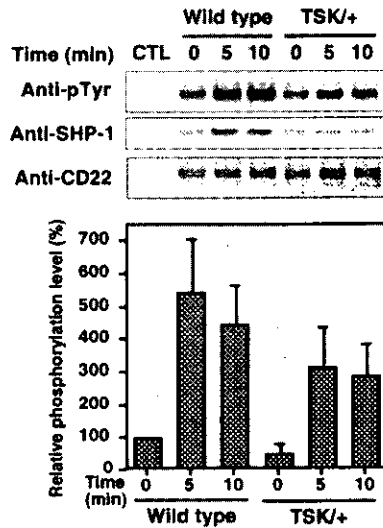


図2：TSK/+マウス B 細胞の抗原受容体刺激による各シグナル分子のチロシンリン酸化。A, Lyn; B, Syk; C, SHIP; D, PLCγ2; E, Shc.

### A. CD22 Immunoprecipitation



### B. CD19 Immunoprecipitation

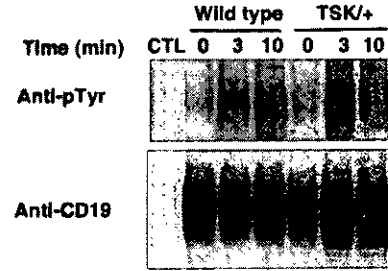
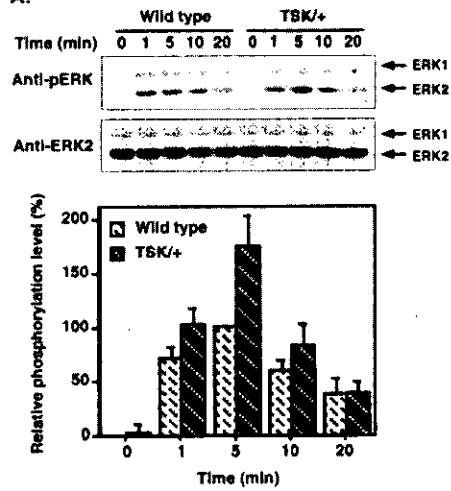
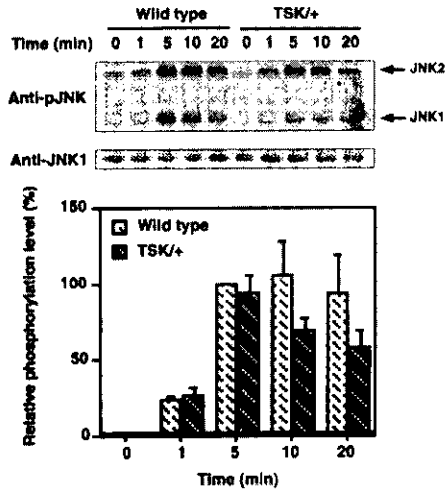


図3：TSK/+マウス B 細胞の抗原受容体刺激による (A) CD22 のチロシンリン酸化と SHP-1 との結合および (B) CD19 のリン酸化。

### A.



### B.



### C.

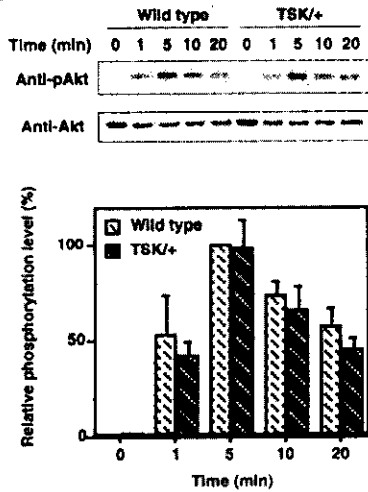


図4：TSK/+マウス B 細胞の抗原受容体刺激による ERK, JNK, Akt の活性化。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

全身性強皮症におけるImmunoglobulin E class switchについての  
検討

研究協力者 大塚 勤 獨協医科大学皮膚科助教授

研究要旨

全身性強皮症において isotype switch の際 looping out する環状 DNA を調べることにより Immunoglobulin E class switching を検討した。direct および sequential switch により生じる S fragments を PCR により増幅し sequencing した。その結果、皮膚組織において正常人 62 例中 4 例に対して全身性強皮症 52 例中 28 例に isotype switching が認められた ( $P < 0.01$ )。以上の結果より全身性強皮症皮膚びょうへん形成において Immunoglobulin E class switching が関与していることが示された。

A. 研究目的

全身性強皮症においてはその fibrosing alveolitis において mast cell (MC) が活性化されていることが報告されている<sup>1</sup>。また、このほかにも MC の関与を示す結果が報告されている<sup>2,3</sup>。さらに、実験的 GVHD や強皮症においても MC の活性化が示されている<sup>4</sup>。一方、immunoglobulin isotype switch は B cell が特異的な抗体を産制することに対して重要な過程である<sup>5</sup>。その際、deletional recombination が起こり特異的な抗体を作る遺伝子の間の部分が切断され、環状の DNA となる<sup>6</sup>。今回は、この環状 DNA を PCR を用いて検出することにより immunoglobulin E の class switch が強皮症皮膚および末梢血細胞で起こっているかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 対象

62 例の正常人（年齢 24-74 歳、平均 55.3 歳）

および全身性強皮症患者 52 例（31-75 歳、平均 52.2 歳）について検討した。全身性強皮症患者においては抗 topoisomerase I 抗体陽性 47 例、抗 centromere 抗体陽性 19 例、発症年齢は平均 40.7 歳（20-73 歳）であった。

2) polymerase chain reaction

被検者の皮膚組織および末梢血から total DNA を抽出し、PCR を施行した。10% DMSO, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 pM primer reaction, and 2.5 U of Taq polymerase を含む 50  $\mu$ l vol の solution を作成し、1  $\mu$ g の template DNA を加えた。最初の PCR は 94  $^{\circ}$ C, 1 min, 65  $^{\circ}$ C, 1 min, 72  $^{\circ}$ C, 5 min を 40 cycles 施行した。その product の一部を用いて二回目の PCR を 94  $^{\circ}$ C, 1 min, 68  $^{\circ}$ C, 1 min, 72  $^{\circ}$ C, 3 min を 40 cycles で行った<sup>7</sup>。それぞれの primer は文献上のものを用いた<sup>7</sup>。

3) TA cloning および sequencing

型のごとく PCR products を用いて TA cloning し、sequencing を行った。



## C. 研究結果

### 1) polymerase chain reactionの結果

nested PCRを施行した結果各種の大きさのDNA断片が得られた。図1にその一部の結果を示す。

### 2) Immunoglobulin E class switchの分布

以上の結果より Immunoglobulin E class switchが起こっている頻度をまとめた(表1)。Direct switchについては、正常人および全身性強皮症の皮膚および血液細胞での分布は有なさを認めなかった。Sequential switchについては全身性強皮症皮膚の出現頻度(23/52)は正常人皮膚(0/62) ( $P<0.01$ )および全身性強皮症血液細胞(2/27) ( $P<0.01$ )と比較して有意に上昇していた。その結果として、of immunoglobulin E classは、全身性強皮症皮膚の出現頻度(28/52)は正常人皮膚(4/62) ( $P<0.01$ )および全身性強皮症血液細胞(3/27) ( $P<0.01$ )と比較して有意に上昇していた。

### 3) Sequencing

得られたPCR productを用いてTA cloningおよびsequencingしたところ、実際にclass switchが起こっていることが確認された。

## D. 考案

全身性強皮症においてはそのfibrosing alveolitisにおいてMCが活性化されていることが報告され<sup>1</sup>、このほかにもMCの関与を示す結果が報告されている<sup>2,3</sup>。これらの報告よりIgE-MC-histaimeが全身性強皮症の病変形成に関与している可能性が指摘されている。

一方、immunoglobulin isotype switchはB cellが特異的な抗体を産制することに対して重要な過程である<sup>5</sup>。B cellがmemory cellまたはplasma cellに分化する際、 $\mu$  heavy chain遺伝子が他のisotypeを発現するように変化し、この過程はIg isotype switchingとして知られて

いる<sup>8</sup>。その際、deletional recombinationが起こり特異的抗体を作る遺伝子の間の部分が切断され、環状のDNAとなる<sup>6</sup>。この環状DNAは、sister chromosome exchangeでは形成されない。これらのことから、今回の検討の結果は、全身性強皮症の皮膚組織においてImmunoglobulin E class switchが特異的に起こっていることを示している。従って、これらのDNA上の変化が全身性強皮症の病変形成に対して深く関わっていることが考えられた。

## E. 結論

全身性強皮症においてはimmunoglobulin E class switchが皮膚組織において起こっており、それが皮膚病変形成に関与している可能性が指摘された。

## F. 文献

1. Chanez P, Lacoste JY, Guillot B *et al*: Mast cells' contribution to the fibrosing alveolitis of the scleroderma lung. *Am Rev Respirat Dis* 147: 1497-502, 1993.
2. Hawkins RA, Claman HN, Clark RA, Steigerwald JC: Increased dermal mast cell populations in progressive systemic sclerosis: a link in chronic fibrosis? *Ann Intern Med* 102: 182-6, 1985.
3. Hebbar M, Lassalle P, Janin A *et al*: E-selectin expression in salivary endothelial cells and sera from patients with systemic sclerosis. Role of resident mast cell-derived tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis Rheum* 38: 406-12, 1995.
4. Claman HN: On scleroderma. Mast cells, endothelial cells, and fibroblasts. *JAMA* 262: 1206-9, 1989.
5. Wang AC, Wilson SK, Hooper JE,

Fudenberg HH, Nisonoff A. Evidence for control of synthesis of the variable regions of heavy chains of immunoglobulin chains G and M by the same gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 66: 337-43, 1970.

6. Honjo T, Kataoka T. Organization of immunoglobulin heavy chain genes and allelic deletion model. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2140-4, 1978.
7. Mills FC, Brooker JS, Camerini-Otero RD: Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription. *Nuc Acid Res* 18: 7305-16, 1990.
8. Pernis B, Forni L, Luzzati AL. Synthesis of multiple immunoglobulin classes by single lymphocytes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 41: 175-83, 1977.
9. Obata, M, Kataoka T, Nakai S, Yamagishi H, Takahashi N, Yamawaki-Kataoka Y, Nikaido T, Shimizu A, Honjo T. Structure of a rearranged  $\gamma 1$  chain gene and its implication to immunoglobulin class-switch mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2437-41, 1981

H. 知的所有権の出願・登録状況  
なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

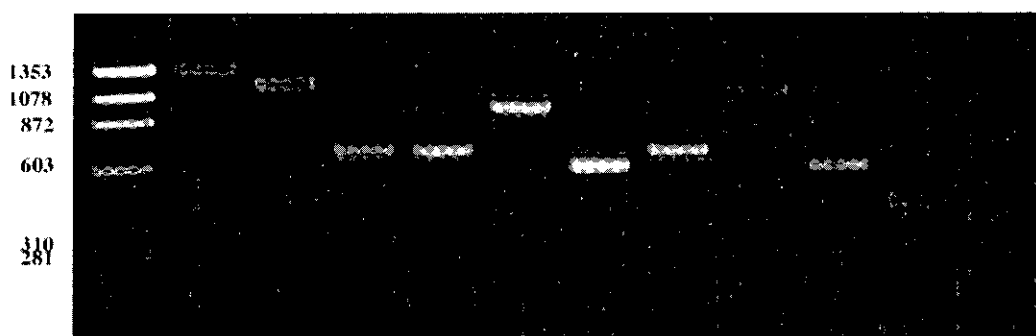
Ohtsuka T, Yamazaki S. The presence of immunoglobulin E class switch in scleroderma skin tissue. Oct. 25-Nov. 2, 2002. 66th annual scientific meeting, New Orleans, USA, American College of Rheumatology.

表1. 正常人および全身性強皮症における $\mu$  から $\epsilon$  への immunoglobulin E class の分布

Subjects	Number	Direct switch	Sequential switch	Total subjects
Normal skin tissue	(62)	4(6.5%)	0(0%)	4(6.5%)
Normal blood cells	(7)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
SSc+ skin tissue	(52)	5(9.6%)	23(44.2%)*	28(53.8%)*
SSc+ blood cells	(27)	1(3.7%)	2(7.4%)	3(11.1%)

+: SSc=systemic sclerosis, \*:  $P < 0.01$  vs normal skin tissue and  $P < 0.01$  vs SSc blood cells.

図1. 2回目のPCRにより得られた各種大きさのproducts



2回目のPCRにより得られたproductsを TA cloning vectorに組み込み、その insertを確認したもの。各種の大きさの断片が認められた。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

強皮症皮膚線維芽細胞における  
Smad7の発現量とその意義

分担研究者	尹 浩信	東京大学医学部皮膚科学講座講師
協力者	浅野善英	東京大学医学部皮膚科学講座大学院生
協力者	山根謙一	東京大学医学部皮膚科学講座大学院生
協力者	玉置邦彦	東京大学医学部皮膚科学講座教授

研究要旨

The principal effect of TGF- $\beta$ 1 on mesenchymal cells is its stimulation of extracellular matrix synthesis. Numerous previous reports indicated the significance of autocrine TGF- $\beta$  loop in the pathogenesis of scleroderma. In this study, we focused on Smad7, an inhibitor of TGF- $\beta$  signaling, to further understand the autocrine TGF- $\beta$  loop in scleroderma. Scleroderma fibroblasts exhibited the up-regulated expression of Smad7 compared with normal fibroblasts in *in vivo* and *in vitro*. The up-regulated Smad7 constitutively made complex with TGF- $\beta$  receptors in scleroderma fibroblasts. Furthermore, the inhibitory effect of Smad7 on the human  $\alpha$ 2(I) collagen promoter activity was completely impaired in scleroderma fibroblasts. These results indicate that the impaired Smad7 inhibitory effect on TGF- $\beta$  signaling might contribute to maintain the autocrine TGF- $\beta$  loop in scleroderma fibroblasts. To our knowledge, this is the first report which indicates the disturbed negative regulation of TGF- $\beta$  signaling in fibrotic disorders.

### A. 研究目的

TGF- $\beta$ は線維芽細胞の細胞外マトリックス産生を強力に誘導するサイトカインである。我々はこれまでに、強皮症皮膚線維芽細胞では TGF- $\beta$  type I receptor および type II receptor の発現が亢進していることにより、autocrine TGF- $\beta$  loop が形成され、この異常が強皮症皮膚線維芽細胞における細胞外マトリックスの過剰発現に関与していることを示してきた。

今回我々が注目した Smad7 は、TGF- $\beta$  signaling の negative regulation において中心的な役割を果たす蛋白である。TGF- $\beta$  刺激は膜蛋白である type I receptor が、細胞内 second messenger 蛋白である Smad2, Smad3 をリン酸化することにより細胞内へと伝達される。Smad7 は TGF- $\beta$  刺激後数時間で発現し、type I receptor に結合し、Smad2, Smad3 が type I receptor によりリン酸化される過程を阻害する。また、Smad7 は Smurf1,2 を TGF- $\beta$  receptor へ recruit し、Smurf1,2 による TGF- $\beta$  type I receptor の分解を誘導すると考えられている。

今回我々は、Smad7 に注目し、強皮症皮膚線維芽細胞における TGF- $\beta$  signaling の negative regulation の異常について明らかにするために検討を加えた。

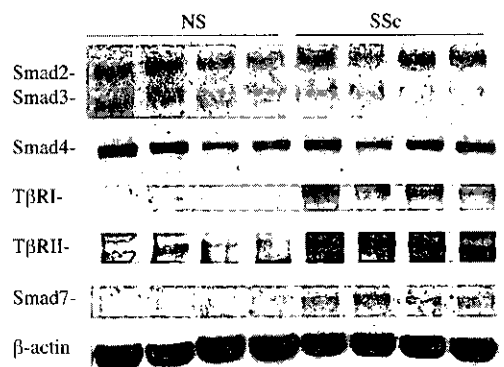
### B. 研究結果と考案

#### 強皮症皮膚線維芽細胞における TGF- $\beta$ receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 の発現レベル

まず、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞において TGF- $\beta$  type I receptor, type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 の発現量を Western blot 法にて比

較した。図1に示すように、強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞に比べて TGF- $\beta$  type I receptor, type II receptor および Smad7 の発現量が亢進していた。一方、Smad2, Smad3, Smad4 の発現量については両者の間に有意な差は認めなかった。

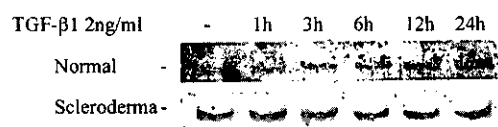
図1



#### TGF- $\beta$ 刺激に対する Smad7 の発現レベルの変化

次に、TGF- $\beta$  刺激による Smad7 の発現量の変化について比較した。正常皮膚線維芽細胞では TGF- $\beta$  刺激により Smad7 の発現量が時間依存性に亢進したが、強皮症皮膚線維芽細胞では TGF- $\beta$  刺激により Smad7 の発現量に変化は認めなかった (図2)。

図2

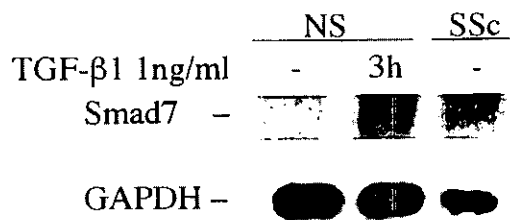


#### 強皮症皮膚線維芽細胞における Smad7 の mRNA の発現レベル

次に、Northern blot 法を用いて Smad7 の

mRNA の発現量について検討した。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、Smad7 の mRNA の発現量が約 3 倍に亢進しており、その発現量は正常皮膚線維芽細胞を TGF- $\beta$ 1 刺激して 3 時間後の Smad7 の mRNA の発現量とほぼ同等であった (図 3)。

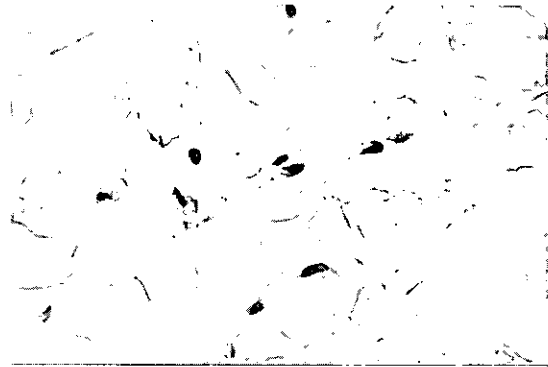
図 3



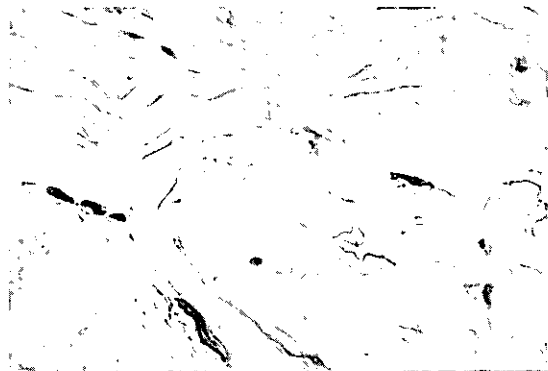
強皮症皮膚における Smad7 の発現レベル次に *in vivo* における Smad7 の発現量について免疫組織染色を用いて検討した。図 4 に示すように、強皮症患者皮膚では正常人皮膚に比べて、線維芽細胞における Smad7 の発現量が亢進していた。

図 4

NS



SSc



### 強皮症皮膚線維芽細胞における Smad7 の細胞内局在

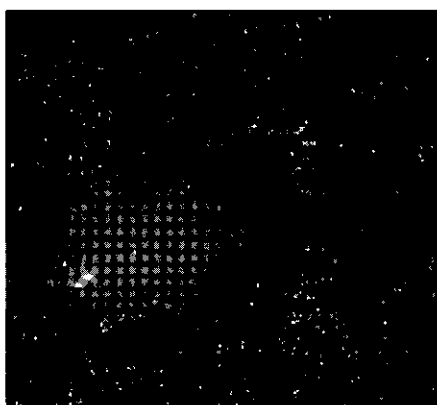
次に蛍光抗体法を用いて、Smad7 の細胞内局在について検討した。図5に無刺激下における染色の結果を示す。強皮症皮膚線維芽細胞では Smad7 は細胞質に dot 状に局在していたが、正常皮膚線維芽細胞では Smad7 の発現量は検出限界以下でその局在を明らかにすることはできなかった。

図5

NS



SSc



強皮症皮膚線維芽細胞において、Smad7 の細胞内局在を更に明らかにするため、TGF- $\beta$  type I receptor および type II receptor との二重染色を行った。図6に示すように、type I receptor、type II receptor とともに細胞質に dot 状に局在しており、その分布は Smad7 の分布と完全に一致した。以上より、強皮症皮膚線維芽細胞では Smad7 が恒常的に TGF- $\beta$  receptor と complex を形成している可能性が示唆された。

☒ 6

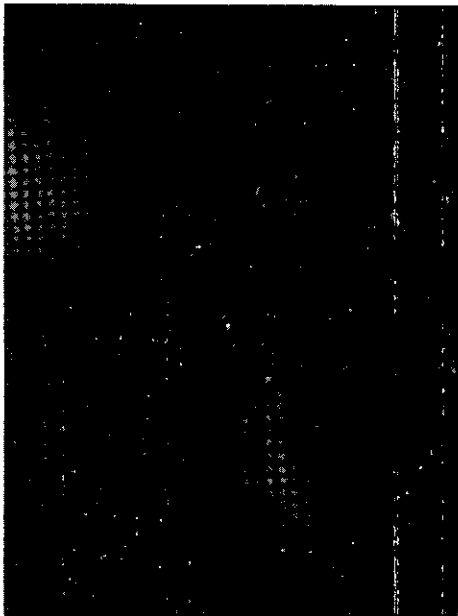
Smad7



overlay



TβRI

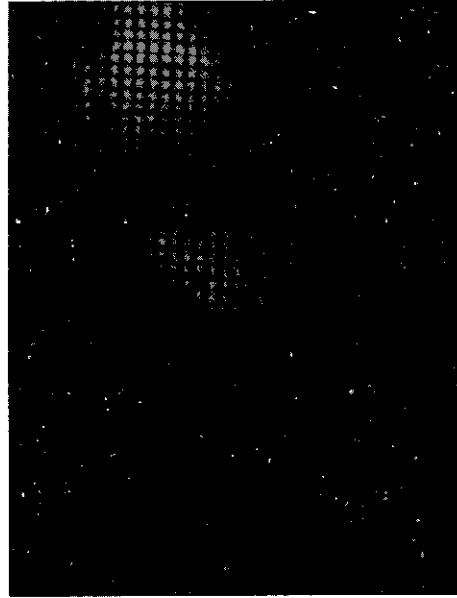




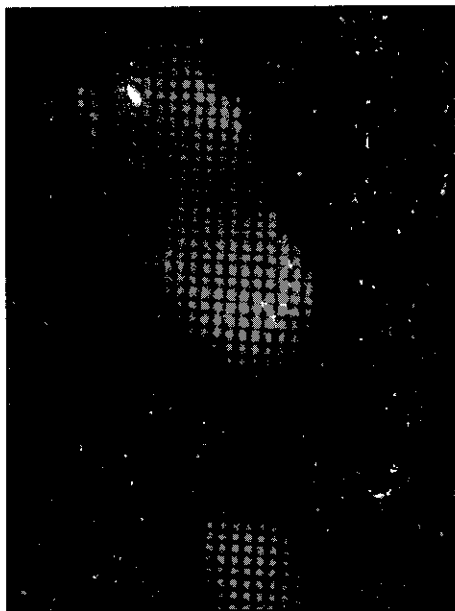
Smad7



Overlay



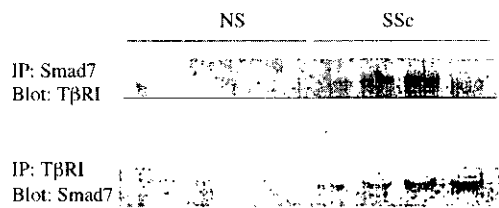
TβRII



強皮症皮膚線維芽細胞における **Smad7 と TGF- $\beta$  type I receptor の interaction**

次に免疫沈降法にて、Smad7 と TGF- $\beta$  type I receptor の結合について検討した (図7)。抗 Smad7 抗体で免疫沈降し、抗 TGF- $\beta$  type I receptor 抗体で検出した場合、および抗 TGF- $\beta$  type I receptor 抗体で免疫沈降し、抗 Smad7 抗体で検出した場合、いずれにおいても、強皮症皮膚線維芽細胞においてのみ、Smad7 と TGF- $\beta$  type I receptor の結合が確認できた。

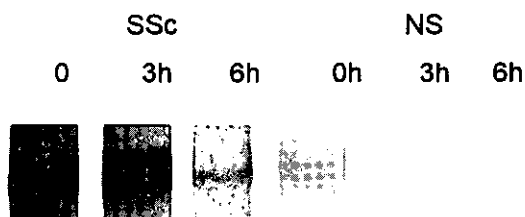
図7



強皮症皮膚線維芽細胞における **TGF- $\beta$  type I receptor の protein stability**

次に、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞における type I receptor の degradation を比較するため s35 を用いた pulse chase 法にて検討した。図8に示すように、強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞に比べて有意に type I receptor の分解が減少していた。

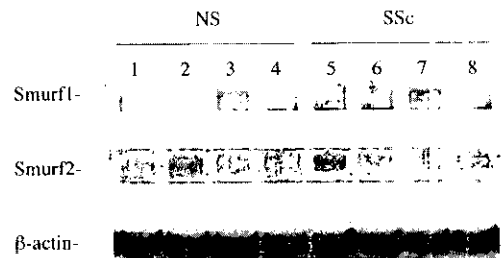
図8



強皮症皮膚線維芽細胞における **Smurf1/2 の発現レベル**

次に Smurf1 および Smurf2 の発現量について比較した。強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞では、Smurf1/2 の発現量に有意差は認められなかった (図9)。

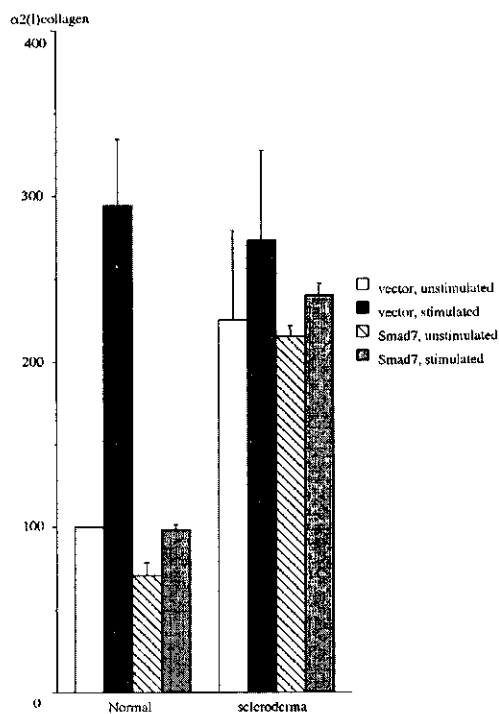
図9



強皮症皮膚線維芽細胞における Smad7 の human  $\alpha 2(I)$  collagen promoter 活性に対する抑制効果

最後に Smad7 を一過性強発現させ、人 $\alpha 2(I)$  collagen promoter 活性に与える影響を検討した (図 10)。正常皮膚線維芽細胞では Smad7 の一過性強発現により TGF- $\beta$  刺激による $\alpha 2(I)$  promoter activity の亢進は完全に抑制された。一方、強皮症皮膚線維芽細胞においては Smad7 の一過性強発現は $\alpha 2(I)$  collagen promoter 活性を抑制しなかった。以上の結果から強皮症皮膚線維芽細胞では Smad7 に対する反応性が低下している可能性が示唆された。

図 10



### C. 結語

今回の検討により、TGF- $\beta$  signaling の negative regulation の異常が強皮症皮膚線維芽細胞における細胞外マトリックス過剰産生に寄与している可能性が示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

皮膚線維芽細胞における TGF $\beta$  情報伝達系に対する  
TNF $\alpha$ の阻害作用とその機序

分担研究者	尹 浩信	東京大学医学部皮膚科学講座講師
協力者	山根謙一	東京大学医学部皮膚科学講座大学院生
協力者	浅野善英	東京大学医学部皮膚科学講座大学院生
協力者	神人正寿	東京大学医学部皮膚科学講座大学院生
協力者	玉置邦彦	東京大学医学部皮膚科学講座教授

### 研究要旨

TGF $\beta$ は細胞外マトリックスの産生を促進するが、TNF $\alpha$ はこの働きを抑制する。皮膚線維芽細胞において TNF $\alpha$ は TGF $\beta$ の効果を抑制する。TNF $\alpha$ の阻害作用の機序を検討するため抑制型 Smad である Smad7 の発現を検討したが、皮膚線維芽細胞においてはその上昇を認めなかった。一方 TGF $\beta$ 受容体発現に対する TNF $\alpha$ の影響を検討したところ、I 型 TGF $\beta$ 受容体発現量に変化はなかったが、II 型 TGF $\beta$ 受容体発現量は時間依存的・濃度依存的に減少した。しかし、II 型 TGF $\beta$ 受容体遺伝子発現量に変化はなく、また転写活性にも影響はみられなかった。さらに皮膚線維芽細胞に一過性に II 型 TGF $\beta$ 受容体を過剰発現させると、TGF $\beta$ に対する TNF $\alpha$ の阻害作用が補正されたことから、TNF $\alpha$ の阻害作用が II 型 TGF $\beta$ 受容体発現量減少によることが示唆された。TNF $\alpha$ による II 型 TGF $\beta$ 受容体発現量減少の機序について検討したところ、TNF $\alpha$ の細胞内情報伝達系である NF $\kappa$ B,MEK/ERK の関与は見出せなかったが、プロテアーゼによる分解を介する可能性が示唆された。汎発性強皮症皮膚線維芽細胞において TNF $\alpha$ は II 型 TGF $\beta$ 受容体発現量、 $\alpha$ 2(I)collagen、TIMP-1 遺伝子発現量を抑制した。本研究は皮膚線維芽細胞における TGF $\beta$ 情報伝達系に対する TNF $\alpha$ の阻害作用の機序を明らかにし、汎発性強皮症をはじめとする線維化疾患の細胞外マトリックス過剰沈着を TNF $\alpha$ が抑制する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

TGF $\beta$ は①コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックス産生を強力に促進し、②コラーゲナーゼなどの細胞外マトリックス分解酵素産

生を抑制し、③プロテアーゼ抑制因子合成を促進する。I 型コラーゲンは、線維化組織において増加した細胞外マトリックスの主要成