

分であり、2本の $\alpha 1(I)$ 鎖と1本の $\alpha 2(I)$ 鎖によって構成される。 $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ コラーゲンともにTGF β によって発現が亢進する。Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) 遺伝子ではTGF β -Smadによって産生が増加する。これらのことから、線維化病変においてTGF β は重要な役割を果たしていると考えられている。

TGF β 情報伝達系についても近年明らかにされてきている。TGF β は細胞膜上に存在するII型TGF β 受容体に結合すると、I型TGF β 受容体とヘテロ4量体を形成する(1)。II型TGF β 受容体のkinase domainは恒常的に活性化されておりTGF β が結合するとI型受容体のGS domainをリン酸化し、I型TGF β 受容体のserine/threonine kinaseが活性化される。その結果細胞質内に存在するSmad2あるいはSmad3はリン酸化され、Smad4とともに核内に移行して標的遺伝子の転写を調節する。また、I型TGF β 受容体はTGF β -activated kinase-1 (TAK-1)を介してp38, JNKなどのMAPキナーゼfamilyを活性化する。TGF β -Smad情報伝達系によって、抑制型SmadであるSmad7の発現が誘導される。Smad7はI型受容体と結合して、I型TGF β 受容体-Smad2/3複合体形成を阻害することによりTGF β -Smad情報伝達系を抑制するいわばNegative Feedback Loopを形成する。

TNF α は炎症性サイトカインであり、関節リウマチ、変形性関節症などの慢性炎症性疾患の病因に関与している(2)。TNF α は26kDの不活性型から17kDの活性型となって3量体を形成し、55kDのI型TNF α 受容体と75kD

のII型TNF α 受容体と結合する。主にI型TNF α 受容体が細胞内にシグナルを伝え、NF κ BやAP-1などの転写因子の作用を介して生理的機能を発揮する。

TGF β に対してTNF α が阻害作用を呈する現象がこれまで多数報告されているが、TNF α がどのようにTGF β 情報伝達系を阻害しているかはこれまで明らかにされていない。TGF β は細胞外マトリックスであるI型コラーゲンやエラスチン産生を促進するが、TNF α はこの作用を阻害する(3-5)。TGF β に対するTNF α の阻害作用の機構を明らかにすることは創傷治癒過程、線維化疾患をはじめとする病態の解明に有用であると考えられている。最近、TNF α はNF κ Bの活性化を介して抑制型SmadであるSmad7発現を促進することによって、I型受容体によるSmad2/3のリン酸化、核内移行を阻害することが報告されている(6)。しかし、このTNF α によるSmad7発現調節は細胞特異性があり、マウス胎生線維芽細胞ではTNF α によるSmad7発現が上昇するが、ヒト胎生腎HEK293細胞やヘパトーマHepG2細胞ではむしろ発現を抑制すると報告されている。またTNF α によって活性化されたAP-1がSmadの標的遺伝子上での作用を阻害するとの報告がある(7)一方、これまで報告されたTNF α の阻害作用の機序は細胞特異的あるいは標的遺伝子特異的であり、TGF β 情報伝達系に対するTNF α の阻害作用の普遍的な機序は未だ明らかにされていない。

皮膚線維芽細胞を用いてTGF β による細胞内シグナル伝達や遺伝子発現調節へのTNF α の影響を検討し、その阻害作用の機構を明ら

かにすることで、創傷治癒過程や線維化疾患における TGF β 、TNF α の役割についての理解を深めるために本研究を行った。さらに線維化疾患の1つである汎発性強皮症皮膚線維芽細胞を用いて、TNF α の効果を検討した。本研究により、TNF α はプロテアーゼの活性化による II 型 TGF β 受容体分解による発現抑制を介して TGF β に対する阻害作用を呈する可能性が示唆された。

B. 研究方法

1) 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、 $\alpha 2(I)$ コラーゲン、TIMP-1、TGF β 受容体、GAPDH プローブとハイブリダイズし検出した。

2) DNA transfection および luciferase assays

皮膚線維芽細胞を 100mm dish に播種し、FuGene 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。

3) クロスリンク免疫沈降法

Confluent となった皮膚線維芽細胞を ¹²⁵I でラベルした TGF β とともに、氷上で 3 時間ゆっくり振盪した。クロスリンカー disuccinimityl suberate を加え、氷上で 15 分間振盪した。PBS で 3 回洗浄し、lysis buffer 500 μ l にて溶解した。Sample を抗 II 型 TGF β 受容体抗体 10 μ l と氷上で 1 時間反応させ、Protein G beads 50 μ l を加えて 30 分間混和した。3 回洗浄を行った後にビーズにサンプルバッファーを 50 μ l 加えて 3 分間ボイルし、7% SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。ゲルを乾燥させた後、X-ray フィルムと反応させた。

C. 研究結果

1) 皮膚線維芽細胞において TGF β による細胞内シグナル伝達と遺伝子発現調節を TNF α は阻害する

はじめに皮膚線維芽細胞における TGF β による細胞内シグナル伝達と遺伝子発現調節の TNF α による影響を検討した。まず、TGF β によって発現が促進される $\alpha 2(I)$ collagen と TIMP-1 遺伝子発現に対する TNF α の影響を調べるため Northern Blotting を行った。TGF β による $\alpha 2(I)$ collagen と TIMP-1 遺伝子発現誘導を TNF α は濃度依存的に抑制した(図 1)。次に TGF β によって活性化される細胞内シグナル伝達分子である Smad3 や p38, JNK1 のリン酸化への TNF α の影響を調べるため Western Blotting を行った。TGF β による Smad3 や p38, JNK1 のリン酸化を TNF α

は濃度依存的に抑制した (図 2)。これらの結果より、皮膚線維芽細胞において TGF β による細胞内シグナル伝達と遺伝子発現調節を TNF α は阻害すると考えられた。

2) 皮膚線維芽細胞において TNF α は Smad7 の発現を誘導せず、II 型 TGF β 受容体の発現を抑制する

まず皮膚線維芽細胞における TGF β 受容体発現に対する TNF α の影響を Western Blotting にて検討した。TNF α は濃度依存的・時間依存的に II 型 TGF β 受容体の発現を抑制した (図 3)。細胞表面上にある II 型 TGF β 受容体発現量に対する TNF α の影響を調べるためアフィニティクロスリンク免疫沈降法にて検討した。TNF α は濃度依存的に ¹²⁵I-TGF β と結合する II 型 TGF β 受容体発現を抑制した (図 4)。Smad7 は TGF β の標的遺伝子として同定され、その機能として、TGF β の細胞内シグナル伝達を阻害することが報告されている (6,7) が、TNF α による Smad7 の発現調節には細胞特異性があるとされている。皮膚線維芽細胞において TNF α による Smad7 の誘導の有無について Western Blotting で検討した。TGF β 刺激 3 時間後に Smad7 の発現が誘導されたが、TNF α 刺激にて Smad7 の発現は変化しなかった (図 5)。そこで II 型 TGF β 受容体遺伝子発現量に対する TNF α の影響を Northern Blotting にて検討した。皮膚線維芽細胞を TNF α で刺激しても II 型 TGF β 受容体遺伝子発現量は変化しなかった (図 6)。さらに II 型 TGF β 受容体遺伝子転写活性

に対する TNF α の影響を Luciferase Assay にて検討した。皮膚線維芽細胞において II 型 TGF β 受容体遺伝子転写活性に対する TNF α の影響はみられなかった (図 7)。以上より、皮膚線維芽細胞において TNF α は II 型 TGF β 受容体発現量を抑制するが、II 型 TGF β 受容体遺伝子発現量・遺伝子転写活性への影響は見られなかった。また TNF α は Smad7, I 型 TGF β 受容体発現量への影響を認めなかった。

3) 皮膚線維芽細胞における TGF β に対する TNF α の阻害作用は II 型 TGF β 受容体過剰発現によって補正される

TGF β に対する TNF α の阻害作用は Smad7誘導によらず、II 型 TGF β 受容体発現抑制によると考えられた。この仮説を検証するため、II 型 TGF β 受容体を過剰発現した際の TNF α の阻害作用を Northern Blotting で検討した。Mock を過剰発現させた細胞では TGF β に対する TNF α の阻害作用を認めたが、II 型 TGF β 受容体を過剰発現させた細胞では TNF α の阻害作用の減弱がみられた (図 8)。これらの結果から TGF β に対する TNF α の阻害作用は、II 型 TGF β 受容体の発現の抑制によるためと考えられた。

4) TNF α はプロテアーゼによる蛋白質分解を介して II 型 TGF β 受容体の発現を抑制する

TNF α による II 型 TGF β 受容体の発現抑制機構を検討するため、まず細胞内シグナル伝達を抑制する種々の薬剤を用いた。MEK 阻害剤である PD98059, I κ B α リン酸化阻害剤で

ある BAY11-7082 を用いて TNF α の II 型 TGF β 受容体発現抑制に対する影響を Western Blotting にて検討した。PD98059, BAY11-7082 は TNF α による II 型 TGF β 受容体発現抑制を阻害しなかった (図 9)。この結果から TNF α によって誘導される MEK/ERK や NF κ B といった細胞内シグナル伝達経路は II 型 TGF β 受容体発現抑制に関与しないことが示唆された。次に種々のプロテアーゼ阻害剤が TNF α による II 型 TGF β 受容体発現抑制に影響を与えるか Western Blotting にて検討した。Calpain や Cathepsin B, L 阻害剤である ALLN は TNF α による II 型 TGF β 受容体発現抑制を阻害した (図 9)。しかし Matrix metalloprotease 阻害剤である EDTA, Serine protease 阻害剤である PMSF, Ubiquitin/Proteasome 阻害剤である MG132 はいずれも TNF α による II 型 TGF β 受容体発現抑制を阻害しなかった。以上の結果から TNF α による II 型 TGF β 受容体発現抑制はプロテアーゼによる蛋白質分解を介する可能性が示唆された。

5) 強皮症皮膚線維芽細胞における TNF α の効果

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疾患である。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, TIMP-1 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 (8)。最近我々は正常皮膚線維芽細胞と比較して強皮症皮膚線維芽細胞において TGF β 受容体発現が増加しており, α 2(I) collagen 産生過剰と相関していることを報告している (9-11)。正常皮膚線維芽細胞において TNF α は II 型 TGF β 受容体発現を抑制することから, 強皮症皮膚線維芽細胞における TNF α の影響を Western Blotting, Northern Blotting にて検討した。強皮症線維芽細胞においても TNF α は TGF β 受容体発現を抑制した (図 10)。さらに Northern Blotting でも TNF α は α 2(I) collagen, TIMP-1 の発現を抑制した (図 10)。これらの結果から, 強皮症皮膚線維芽細胞において, TNF α は II 型 TGF β 受容体発現抑制を介して α 2(I) collagen, TIMP-1 の発現を抑制する可能性が示唆された。

D. 考按

TGF β による細胞内シグナル伝達・遺伝子発現調節に対する TNF α の阻害作用はこれまでいくつか報告されてきている (3-5)。本研究は皮膚線維芽細胞において TGF β に対する TNF α の阻害作用は, II 型 TGF β 受容体発現抑制を介していることを明らかにした。II 型 TGF β 受容体蛋白発現量は TNF α によって抑制されるが, II 型 TGF β 受容体遺伝子発現量, 遺伝子転写活性は抑制されなかった。また, II 型 TGF β 受容体を過剰発現させると, TGF β に対する TNF α の阻害作用は減弱した。本研究では, TNF α が II 型 TGF β 受容体発現を抑制することを見出し, さらにその抑制がプロ

テアーゼを介する可能性が示唆された。

TGF β は細胞膜表面にある受容体と結合してその生理的機能を発揮する。TGF β 受容体発現調節は創傷治癒、癌や線維化病変の進展に重要な役割を果たしていることが知られている。例えば、いくつかの癌では TGF β 受容体発現が減弱しており、そのために TGF β による細胞増殖抑制を受けなくなっている。癌における TGF β 受容体発現減少の機構としては、メチル化による転写レベルの抑制や遺伝子突然変異が知られている。一方、線維化疾患として知られている汎発性強皮症は皮膚および内臓諸臓器に線維化を来とし、その結果皮膚および内臓諸臓器に硬化が認められる。その病因はいまだ明らかとなっていないが、皮膚では I 型コラーゲンを主とする細胞外マトリックスが沈着し、本症の病態を形成している (8)。現在まで強皮症患者の皮膚より得られた線維芽細胞を用いて研究が進められ、強皮症皮膚線維芽細胞は正常の皮膚線維芽細胞と比較して I 型コラーゲンをはじめとする各種コラーゲン、ファイブロネクチンなどの細胞外マトリックスを過剰に産生することが知られている。特に強皮症患者皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン産生異常はコラーゲン遺伝子の転写活性が亢進しているためであることが明らかとなっている。

汎発性強皮症をはじめとする線維化疾患では TGF β 受容体発現が亢進しており、TGF β による細胞外マトリックス産生作用が増強されている可能性が示唆されている。我々は汎発性強皮症において TGF β 受容体発現が亢進しており、抗 TGF β 抗体、TGF β antisense

oligonucleotide で TGF β シグナルを阻害すると、亢進していた α 2(I) collagen 遺伝子発現量や遺伝子転写活性が減弱することを明らかにし、汎発性強皮症において TGF β 受容体発現亢進による autocrine TGF β が関与していることを報告している (9-11)。本研究では TGF β に対する TNF α の阻害作用が II 型 TGF β 受容体発現抑制を介していることから、汎発性強皮症皮膚線維芽細胞における TNF α の影響を検討した。TNF α は亢進している II 型 TGF β 受容体発現を抑制し、さらに α 2(I) collagen、TIMP-1 遺伝子の発現亢進を阻害した。

E. 結論

本研究により、皮膚線維芽細胞における TGF β に対する TNF α の阻害作用は、プロテアーゼによる II 型 TGF β 受容体分解による発現抑制を介している可能性が示唆された。さらに、汎発性強皮症皮膚線維芽細胞においても TNF α は II 型 TGF β 受容体発現を抑制することによって、 α 2(I) collagen、TIMP-1 遺伝子発現亢進を阻害することが示された。汎発性強皮症をはじめとした種々の線維化疾患において、TGF β 受容体発現調節と細胞外マトリックス産生の関連を今後さらに明らかにすることは、これらの疾患の病態解明、治療法の開発につながることを期待された。

F. 文献

1. Miyazono, K., P. ten Dijke, and C.H. Heldin. 2000. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.* 75:115.
2. Goldring, M. B. 1999. The role of

- cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect. Tissue Res.* 40;1.
3. Solis-Herruzo, J. A., D. A. Brenner, and M. Chojkier. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. 1988. *J. Biol. Chem.* 263;5841.
 4. Kahari, V. M., Y.Q. Chen, M.M. Bashir, J. Rosenbloom, and J. Uitto. 1992. Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity. *J. Biol. Chem.* 267;26134.
 5. Kahari, V. M., Y. Q. Chen, M. W. Su, F. Ramirez, and J. Uitto. 1990. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma suppress the activation of human type I collagen gene expression by transforming growth factor-beta 1. Evidence for two distinct mechanisms of inhibition at the transcriptional and posttranscriptional levels. *J. Clin. Invest.* 86;1489.
 6. Bitzer, M., von G. Gersdorff, D. Liang, A. Dominguez-Rosales, A. A. Beg, M. Rojkind, and E. P. Böttinger. 2000. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev.* 14;187.
 7. Verrecchia, F., M. Pessah, A. Atfi, and A. Mauviel. 2000. Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J. Biol. Chem.* 275;30226.
 8. LeRoy, E.C. Systemic Sclerosis (scleroderma). In: Wyngaarden, J.B., Smith, L.H., Bennett, J.C., editors. Cecil text book of medicine. 19th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 1530-5.
 9. Kawakami, T., H. Ihn, W. Xu, E. Smith, E.C. LeRoy, and M., Trojanowska. 1998. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J. Invest. Dermatol.* 110:47.
 10. Ihn, H., K. Yamane, M. Kubo, and K. Tamaki. 2001. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum.* 44:474.
 11. Yamane, K., H. Ihn, M. Kubo, and K. Tamaki. 2002. Increased transcriptional activities of transforming growth factor beta receptors in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 46:2421.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

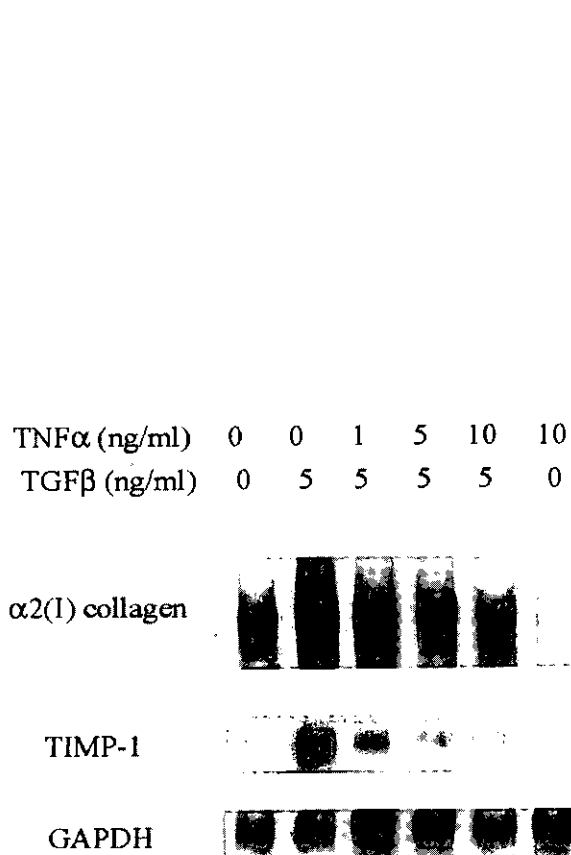


図 1 : Northern blotting による α 2(I) collagen, TIMP-1, GAPDH 遺伝子発現。

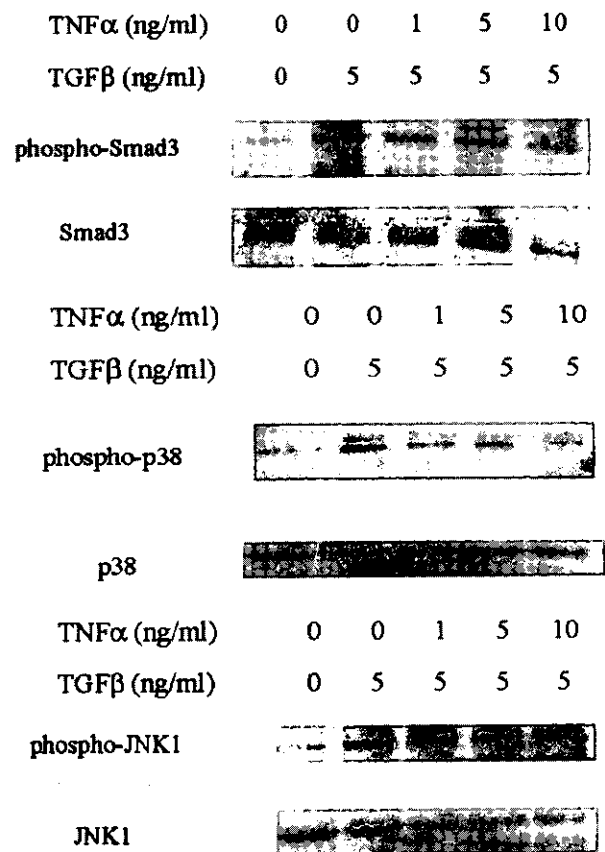


図2: Western blotting, Immunoprecipitation による phospho-smad3, smad3, phospho-p38, p38, phospho-JNK1, JNK1 発現。

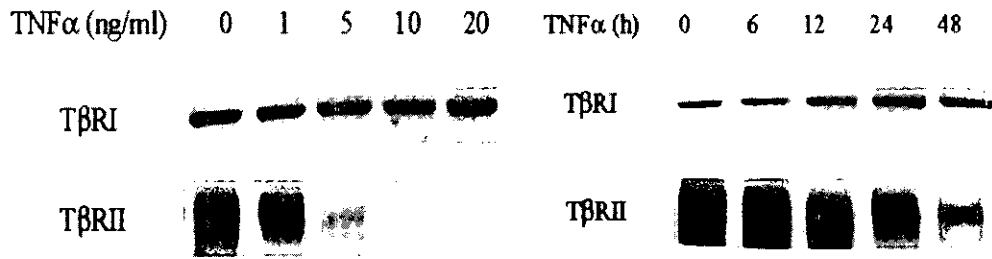


図3: Western blotting. TNF α は II 型 TGF β 受容体の発現を抑制する。

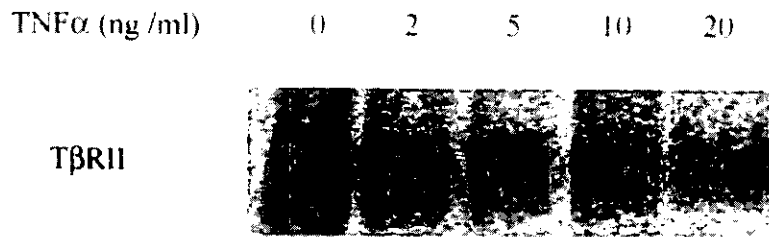


図4:クロスリンク免疫沈降法。TNF α は細胞膜上のII型 TGF β 受容体発現を抑制する。

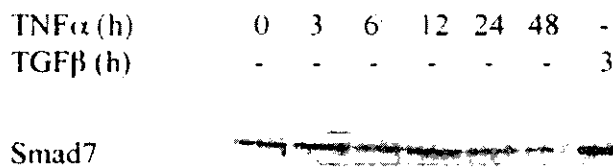


図5: Western blotting. TNF α は Smad7 の発現を誘導しない。

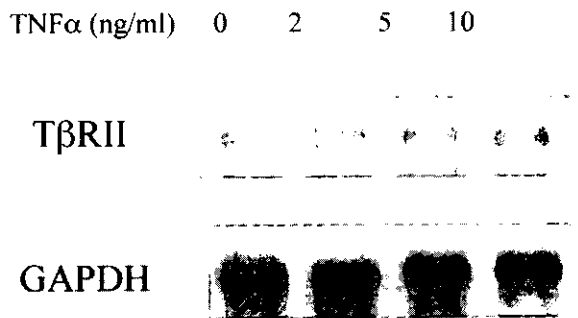


図6: Northern blotting。TNF α はII型TGF β 受容体遺伝子発現に影響しない。

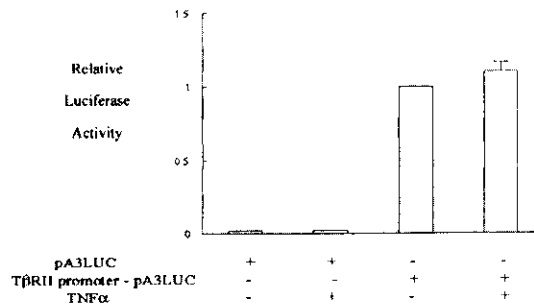


図7: Luciferase Assay。TNF α はII型TGF β 受容体遺伝子転写活性に影響しない。

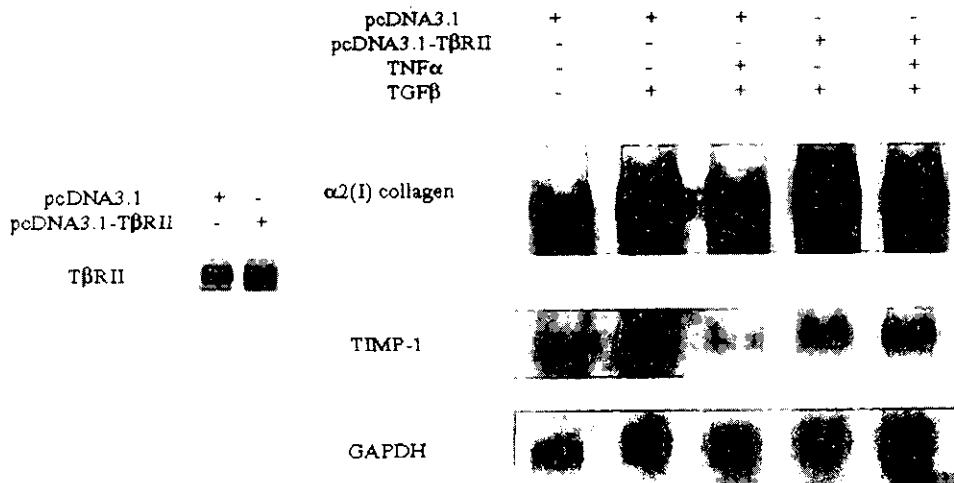


図8: Western blotting、Northern blotting。皮膚線維芽細胞におけるTGF β に対するTNF α の阻害作用はII型TGF β 受容体過剰発現によって弱まる。

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

強皮症におけるアンジオテンシンⅡの線維化におよぼす影響

分担研究者 川口鎮司 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター助手

研究要旨

強皮症にみられる臓器の線維化は、病変局所に存在する線維芽細胞の細胞外マトリックス過剰産生に起因している。アンジオテンシンⅡは、血管収縮因子として機能解析されたペプチドであるが、近年、線維芽細胞の活性化を介して、臓器の線維化に関与していることが報告されている。今回、強皮症患者由来線維芽細胞では、アンジオテンシノーゲンの産生が亢進していた。アンジオテンシンⅡは培養線維芽細胞に作用して、コラーゲンの産生を亢進させた。線維芽細胞の過剰産生するアンジオテンシノーゲンは、強皮症の線維化病変に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

強皮症(SSc)の線維化の機序に、病変局所に存在する線維芽細胞の活性化が関与していることが推定されている。我々の今までの検討では、強皮症由来線維芽細胞は過剰にIL-1 α を産生しており、その作用が強皮症線維芽細胞の異常に関与していることを示してきた^{1,2}。IL-1 α の作用により、線維芽細胞から産生される因子に、アンジオテンシノーゲン(AGN)があり、その代謝産物であるアンジオテンシンⅡ(AgII)は、血管収縮因子として有名である。近年、心筋の線維化、腎間質の線維化にAgIIが重要な働きを担っていることが報告され、血管収縮作用のみでなく、線維芽細胞に対する作用も明らかとなってきた³⁻⁶。SScでは、腎病変の合併時に、血漿レニン活性が高値を呈し、AgII合成過剰が病変の悪化につながると以前より報告されている⁷。また、AgII type 1受容体拮抗薬がSScの線維化に有効である可能性を示唆する報告もみられる⁸。これらの事実より、AgIIのSScの病態への関与が推測さ

れ、今回検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

SSc患者36例（男性：女性＝1：35）、健常人20例（男性：女性＝1：19）を対象とした。強皮症患者は全例、diffuse cutaneous typeに分類され、東京女子医大青山病院に入院となった症例を選択した。

2) 線維芽細胞の培養

SSc患者6例および健常人5例より、皮膚生検を行い、informed consentの結果、explant法により線維芽細胞を培養した。継代培養には10%FBS添加のDMEM培地を用いた。

3) 血清AgII濃度測定

入院後、早朝に空腹時採血を行いすぐに血清分離を行い、-80℃に保存した。その後、SPI-BIO社のキットにて測定した。AgIとの交差反応性は、4%以下であった。

3) reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

無血清培地を用いて培養した線維芽細胞より、RNA ZOLを用いてTotal RNAを抽出した。1 μ gのRNAを逆転写酵素(Superscript II)によりcDNAに転換し、AGNに特異的なプライマーを用いて、PCRを行った。同時に、コントロールとして、 β -actinの増幅をおこなった。それぞれの配列は、

AGN: sense: 5'-ACTACAGCAGAAGGGTATGCGG-3',
antisense: 5'-TTGGAGCAGGTATGAAGGTGGG-3'
 β -actin: sense: 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCC-3',
antisense: 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'

4) 免疫染色法

線維芽細胞を4 chamber slideにて培養し、80% confluentの状態、2% paraformaldehydeにて固定した。AGNに対する抗体は、Santa Cruz社より購入した。1次抗体のコントロールとして免疫されていないヤギのIgGを用いた。2次抗体として、ビオチンラベルした抗ヤギIgG抗体をもちい、Santa Cruz社のABC染色キットにてDAB染色をした。

5) Western blotting

培養線維芽細胞および皮膚組織よりPierce社の細胞内蛋白質抽出キットを用いてcell lysateを作成した。12.5% SDS-PAGEにて電気泳動を行い、PVDF膜に転写した。その後、1次抗体に抗AGN抗体を用い、ABCキットにてhorseradish peroxidaseを付加した。その後、Amersham社のECLキットを用い、発光したシグナルをX-rayフィルムにてとらえた。

6) プロコラーゲン産生

プロコラーゲンタイプIのC-peptideに対する特異的なmonoclonal抗体を用いたタカラ酒

造のELISAキットを利用し、プロコラーゲンタイプIの産生量を測定した。線維芽細胞を24穴のculture plateにて培養し、AgII (1 μ M)、Olmesartan (AgII type I receptor antagonist, 1 μ M)、PD123319 (AgII type II receptor antagonist, 10 μ M)を投与し、72時間後の上清中、コラーゲン濃度を測定した。

C. 研究結果

1) 血清AgII濃度

SSc患者血清中では、38.4 \pm 52.6 pg/mlで、健常人の8.0 \pm 4.0に比較し有意に高値を示した (図1)。

2) 培養線維芽細胞のAGN発現

SSc患者での血中AgII亢進が、皮膚でのAGN産生増加に起因しているかどうかを検討した。図2に示したように、SSc6例では、構成的にAGN mRNAを発現していたが、健常人では、mRNAの発現は認められなかった。さらに、培養線維芽細胞の免疫染色を行ったところ、SSc由来線維芽細胞は、細胞質内にAGNの産生がみられた (図3)。この現象は、SSc6例の線維芽細胞で認められた。正常線維芽細胞ではみられなかった。

本研究で用いたAGNに対する抗体は、AgIIとの交差反応性があり、Western blotting法にて、確認した。図4に示すように、約56kDaの特異バンドがみられ、すでに報告されているAGNの大きさと一致した。このバンドは、生検皮膚からの蛋白質でも認められた。

3) プロコラーゲン産生におよぼすAgIIの影響

AgIIを1 μ M投与したところ、線維芽細胞のコラーゲン産生は、非投与群と比較して有意に亢進させた (図5)。この反応は、SSc、

健常人ともに認められた。さらに、この反応は、AgII type I receptor antagonistにより、完全に抑制されたが、AgII type II receptor antagonistによっては、抑制効果がみられなかった。

D. 考察

SSc由来線維芽細胞は、AGNを過剰に産生していた。近年、組織で産生されるAGNは、レニン、アンジオテンシン変換酵素(ACE)とは異なる組織proteinaseにより、AgIIに変換されることが報告された⁹。以上より、皮膚組織で過剰に産生されたAGNが、組織proteinase (chymase, cathepsin)の作用によりAgIIに変換され、過剰なAgIIの合成が生じている可能性が示唆された。

血清中でAgIIが亢進している患者においてのみではなく、それ以外のSSc患者由来線維芽細胞でも、AGNの産生は亢進していた。AGNの構成的な発現は、SSc線維芽細胞の特徴のひとつと考えられる。一方、皮膚局所での過剰産生が、血清中でのAgII亢進に関与しているかどうかは明らかではない。しかし、血清AgII高値を呈した患者は、全例皮膚硬化の高度な発症早期の症例であった。このことから、血清AgIIは、SScの重症度判定に有用である可能性が示唆された。

AgIIは、皮膚線維芽細胞に作用し、コラーゲンの産生を亢進させることが明らかとなった。この作用は、健常人由来線維芽細胞においてもみられた。特異的なAgII受容体拮抗薬を用いた検討により、AgIIのコラーゲン産生を惹起する作用はtype 1の受容体を介することがわかった。このことは、SSc線維芽細胞上のAgII type 1受容体を制御することで、線維化を抑制できることが推定された。今後、治療の面からもさらなる検討を要する

と考える。

E. 結論

SSc患者で、AgIIの血清での増加とAGNの皮膚線維芽細胞での産生亢進が認められた。培養線維芽細胞を用いた検討では、AgIIがコラーゲン産生を亢進させることが明らかとなった。今後、AgII type 1受容体の拮抗薬のSSc患者への臨床応用も検討すべきであると考えた。

F. 文献

1. Kawaguchi, Y. 1994. IL-1 α gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. Clin. Exp. Immunol. 97:445-450.
2. Kawaguchi, Y., Hara, M., and Wright, T.M. 1999. Endogenous IL-1 α from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. J. Clin. Invest. 103:1253-1260.
3. Kagami, S., Border, W.A., Miller, D.E., and Noble, N.A. 1994. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. J. Clin. Invest. 93:2431-2437.
4. Kawano, H., Do, Y.S., Kawano, Y., Starnes, V., Barr, M., Law, R.E., and Hsueh, W.A. 2000. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. Circulation. 101:1130-1137.
5. Guo, G., Morrissey, J., McCracken, R., Tolley, T., Liapis, H., and Klahr, S. 2001. Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor- α to the development of renal fibrosis. Am. J. Renal Physiol.

280:F777-F785.

6. Pathak, M., Sarkar, S., Vellaichamy E., and Sen, S. 2001. Role of myocytes in myocardial collagen production. *Hypertension* 37:833-840.
7. Steen, V.D., Costantino, J.P., Shapiro, A.P., and Medsger, T.A. Jr. 1990. Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation to availability of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Ann. Intern. Med.* 113:352-357.
8. Dziadzio, M., Denton, C.P., Smith, R., Howell, K., Blann, A., Bowers, E., and Black, C.M. 1999. Losartan therapy for Raynaud's phenomenon and scleroderma. *Arthritis Rheum.* 42:2646-2655.
9. Karlsson, C., Lindell, K., Ottosson, M., Sjostrom, L., Carlsson, B., and Carlsson, LM. 1998. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:3925-3929.

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, Harigai M, Nishimagi E, Kamatani N:

Angiotensin (Ag) II in lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via Ag II type 1 receptor 投稿中

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

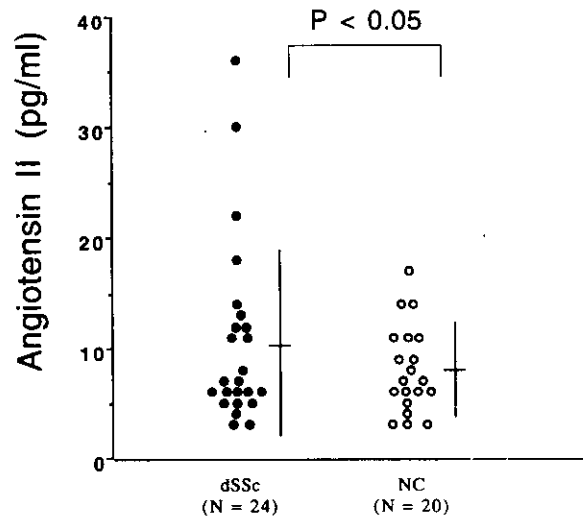


図1. Serum angiotensin II levels in systemic sclerosis (SSc) and normal healthy controls (NC). The concentrations of angiotensin II were determined by a solid-phase immobilized epitope immunoassay.

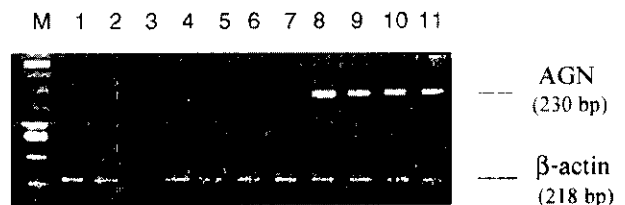


図2. Analyses of gene expressions of angiotensinogen (AGN) in cultured fibroblasts. Total RNA was extracted from cultured fibroblasts of 6 systemic sclerosis (SSc) and 5 healthy controls. One μ g of total RNA from each sample was reverse-transcribed to cDNA, and the aliquots were then subjected to 35 cycles of PCR. Lanes 1-5: normal fibroblasts; lanes 6-11: SSc fibroblasts

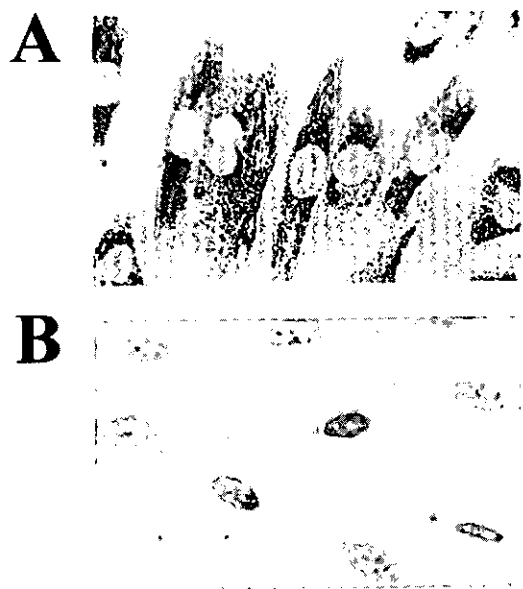


图3. 免疫组织化学染色显示培养的成纤维细胞中血管紧张素原 (AGN) 的表达。

取自 SSc 患者 (A) 和正常健康人 (B) 的成纤维细胞在 4 室培养皿中培养。细胞 (80% 汇合) 用 2% 多聚甲醛在 PBS 中固定，并用抗 AGN 的抗体孵育，然后用生物素标记的抗山羊 IgG 多克隆抗体孵育。最后，细胞在链霉亲和素/过氧化物酶复合物工作液中进行孵育，该复合物使用 DAB 底物进行显色。

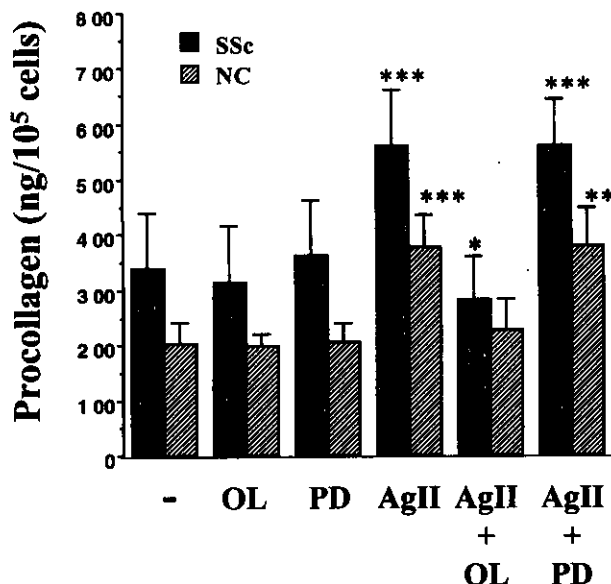


图5. 培养的成纤维细胞在血管紧张素 II 刺激下的原胶原蛋白产生。

取自 6 名系统性硬化症 (SSc) 患者和 5 名健康正常对照 (NC) 的成纤维细胞在 24 孔培养板中培养，培养基为不含血清的培养基，含有血管紧张素 II (AgII, 1 μM)、olmesartan (OL, 1 μM) 作为 AT1R 拮抗剂或 PD123319 (PD, 10 μM) 作为 AT2R 拮抗剂。在培养液上清液中的原胶原蛋白产生通过 ELISA 测定。

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 与无刺激值相比。

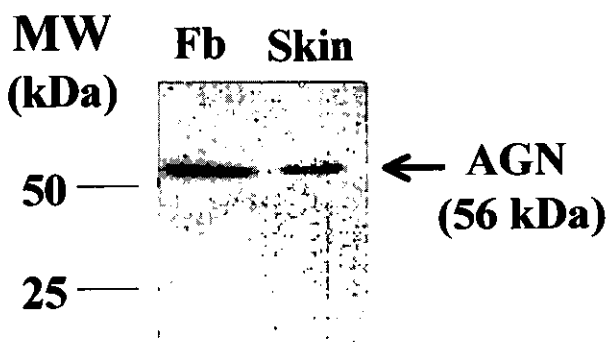


图4. 皮肤和培养的成纤维细胞 (Fb) 中血管紧张素原 (AGN) 的 Western 印迹。

取自 SSc 患者皮肤和活性 SSc 培养的成纤维细胞 (Fb) 的蛋白裂解液在 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳，并转移到 PVDF 膜上。膜用抗人 AGN 抗体进行免疫印迹。

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

DNA メチル化による細胞特異的ヒト $\alpha 2(\text{I})$ collagen 遺伝子発現制御

分担研究者	宮園浩平	東京大学大学院医学部分子病理学講座教授
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	鈴木裕之	東京大学大学院医学部分子病理学講座ポスドク
協力者	近藤美幾	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
協力者	尹 浩信	東京大学医学部皮膚科学講座講師
協力者	玉置邦彦	東京大学医学部皮膚科学講座教授
協力者	加藤光保	筑波大学基礎医学系病理学講座教授

研究要旨

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線維化を主徴とする。沈着している細胞外マトリックスの主要構成蛋白は $\alpha 1(\text{I})$ 、 $\alpha 2(\text{I})$ collagen からなる I 型コラーゲンであり、汎発性強皮症においては転写レベルでの発現調節異常が示唆されている。また $\alpha 2(\text{I})$ collagen は細胞特異的に発現しており、その細胞特異的発現の機序を明らかにすることは汎発性強皮症の病態、治療法の解明に結びつく可能性があるため、正常皮膚線維芽細胞、HaCaT, HeLa, HepG2 を用いて細胞特異的ヒト $\alpha 2(\text{I})$ collagen 遺伝子発現制御機構を検討した。正常皮膚線維芽細胞において $\alpha 2(\text{I})$ collagen 遺伝子、蛋白が検出されたが、HaCaT, HeLa, HepG2 では検出されず、また TGF β による誘導も認められなかった。 $\alpha 2(\text{I})$ collagen 遺伝子転写活性はいずれの細胞においても検出でき、また TGF β responsive element を含む construct においては TGF β によって転写活性が亢進した。HaCaT, HeLa, HepG2 いずれの細胞においても DNA メチル化酵素阻害剤による $\alpha 2(\text{I})$ collagen 遺伝子の reactivation を認めた。Bisulfite sequence によって $\alpha 2(\text{I})$ collagen 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態と $\alpha 2(\text{I})$ collagen 遺伝子発現が逆相関する傾向を認めた。以上より、我々は DNA メチル化によって $\alpha 2(\text{I})$ collagen が細胞特異的に発現していることを明らかにした。

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 (1)。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。

線維化における過剰な細胞外マトリックス沈着の主要な構成成分である I 型コラーゲンは骨, 腱, 皮膚において細胞特異的に発現する蛋白である。また, I 型コラーゲンは線維芽細胞や骨芽細胞に細胞特異的に発現する分化マーカーとして知られている。

細胞特異的遺伝子発現を調節する機序としてプロモーター領域の DNA メチル化を介する場合と細胞特異的転写因子を介する場合がある。I 型コラーゲンの構成成分である $\alpha 2(I)$ collagen の細胞特異的発現を DNA メチル化あるいは細胞特異的転写因子が担うかはこれまでいくつかの報告がされている。Chemical agents や viral transformation によって線維芽細胞の $\alpha 2(I)$ collagen の発現が消失しており, この細胞ではプロモーター領域の DNA メチル化が存在することが報告されている(2)。一方, $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性を表皮角化細胞, 線維芽細胞と比較し, 表皮角化細胞でその活性が消失していることから, 細胞特異的転写因子による調節による可能性を示唆する報告もある(3)。

今回我々は種々の培養細胞を用いて $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子細胞特異的発現の機序に

ついて検討した。

B. 研究方法

1) 免疫プロット法および Northern blot 法

Normal human fibroblast(NHFB;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。7%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, 抗 I 型コラーゲン抗体と反応後, 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, $\alpha 2(I)$ collagen, GAPDH プローブとハイブリダイズし検出した。

2) DNA transfection および luciferase assays

皮膚線維芽細胞を 100mm dish あるいは HaCaT, HeLa, HepG2 細胞を 6-well dish に播種し, FuGene6™ にて $\alpha 2(I)$ collagen 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 passive 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。上清を 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。

3) RT-PCR

各培養細胞から抽出した total RNA から cDNA を合成し, それを鋳型として $\alpha 2(I)$ collagen 特異的プライマーを用いて, PCR 法で DNA を増幅した。

4) Bisulfite sequence

各細胞から抽出した genomic DNA を Bisulfite 処理する。 $\alpha 2(I)$ collagen promoter 特異的プライマーを用いた PCR 産物を TA cloning し, sequence を行う。

C. 研究結果

1) $\alpha 2(I)$ collagen の細胞特異的発現について

I 型コラーゲンの発現を免疫ブロット法にて検討した (図 1)。NHFB では I 型コラーゲンが検出されたが, HaCaT, HeLa, HepG2 では検出されず, また TGF β による誘導も認められなかった。また, $\alpha 2(I)$ collagen の発現を Northern blot 法にて検討した (図 2)。NHFB では $\alpha 2(I)$ collagen が検出されたが, HaCaT, HeLa, HepG2 では検出されず, また TGF β による誘導も認められなかった。

2) $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性について

各 cell line における $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性を CAT assay にて検討した。プロモーター全長を含むもの (A), TGF β responsive element を含む deletion construct (B), TGF β responsive element を含まない deletion construct (C) を使用した (図 3A)。 $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性はいずれの細胞においても検出でき, また TGF β responsive element を含む construct においては TGF β によって転写活性が亢進した (図 3B)。この結果から $\alpha 2(I)$ collagen の細胞特異的発現に細胞特異的転写因子によらない機構の関与が示唆された。

3) $\alpha 2(I)$ collagen の reactivation

DNA メチル化の関与を検討するために DNA メチル化酵素阻害剤である 5-Aza-deoxycytidine (5-AzaC) を用いて $\alpha 2(I)$ collagen の reactivation が起きるか検討した。HaCaT, HeLa, HepG2 を 5-AzaC 存在下あるいは非存在下にて 4 日間培養後抽出した RNA を用いて RT-PCR を施行した (図 4)。HaCaT, HeLa, HepG2 いずれの細胞においても 5-AdC による reactivation を認めた。この結果から $\alpha 2(I)$ collagen の細胞特異的発現にはプロモーター領域の DNA メチル化が関与する可能性が示唆された。

4) $\alpha 2(I)$ collagen プロモーター領域の DNA メチル化状態

$\alpha 2(I)$ collagen プロモーター領域に CpG island があり, DNA メチル化状態を Bisulfite sequence 法にて検討した (図 5)。我々は $\alpha 2(I)$ collagen プロモーター領域の TGF β responsive element と転写開始領域を含む CpG island のメチル化状態を検討したところ, NHFB では全くメチル化が認められなかった。一方, HeLa ではほぼ完全なメチル化を認めた。HaCaT, HepG2 では転写開始点近傍ではメチル化が著明であったが, プロモーター上流ではメチル化の頻度は HeLa と比して減少する傾向があった。また, 5-AzaC 処理を行うと非処理のものに比してメチル化が減少する傾向を認めた。この結果よりプロモーター領域のメチル化状態と $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子発現は逆相関する傾向を認めた。

D. 考按

今回の検討から、 $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子は細胞特異的に発現しており、その遺伝子発現調節には細胞特異的転写因子ではなく、 $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化によって調節されていることが明らかとなった。

DNA メチル化による epigenetic な遺伝子発現制御は細胞特異的発現を調節する場合と癌における異常な遺伝子発現制御を行う場合とが知られている。前者の例としては本研究のような $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子発現制御があり、種々の細胞の特異的性質はその遺伝子発現 profile によって決まるが、その遺伝子発現の多くは DNA メチル化によって制御されていると考えられている(4)。また、後者の例としては種々の癌細胞において細胞周期調節蛋白である p16、p21 や細胞増殖抑制作用をもつ TGF β シグナルの担い手である II 型 TGF β 受容体などのプロモーター領域のメチル化によってその遺伝子発現が消失している例があり、これらの癌抑制作用を持つ分子群の消失が異常な細胞増殖を引き起こす可能性が報告されている。一方、汎発性強皮症患者由来の線維芽細胞は in vivo から in vitro に移しても $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子を過剰に産生し続けることが報告されており (5、6)、このことは in vivo における線維芽細胞周囲の環境、すなわち線維芽細胞周囲にあるサイトカインや細胞成長因子などの異常ではなく、線維芽細胞そのものに異常が存在する可能性が示唆される。そして、線維芽細胞の異常として、本研究で示したような epigenetic な遺伝子発現調節にお

ける異常が、汎発性強皮症の病因に関与するかもしれない。

E. 結論

$\alpha 2(I)$ collagen の細胞特異的発現は DNA メチル化によって制御をうけていることが明らかとなった。SSc における過剰なコラーゲン産生にこのような epigenetic な遺伝子発現調節が関与している可能性もあり、今後同様の視点からの研究が期待される。

F. 文献

1. LeRoy, E.C. Systemic Sclerosis (scleroderma). In: Wyngaarden, J.B., Smith, L.H., Bennett, J.C., editors. Cecil text book of medicine. 19th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 1530-5.
2. Smith, B. D. and Marsilio, E. Methylation of the alpha2(I) collagen gene in chemically transformed rat liver epithelial cells. 1988. *Biochem. J.* 253;269
3. Tamai K et al. Tissue specific expression of the 230-kD bullous pemphigoid antigen gene (BPAG1). 1995. *J. Biol. Chem.* 270;7609
4. Bird, A.P. and Wolffe, A. P. Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. 1999. *Cell.* 99;451.
5. Jelaska, A., M. Arakawa, G. Broketa, J.H. Korn. 1996. Heterogeneity of

collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 39:1338

6. Kirk, T. Z., M.E. Mark, C. C. Chua, B. H. Chua, and M. D. Mayes. 1995. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J. Biol. Chem.* 270:3423

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし