

図 1. Western blotting。皮膚線維芽細胞（NHFB）および HaCaT, HeLa, HepG2 における I 型コラーゲン発現量

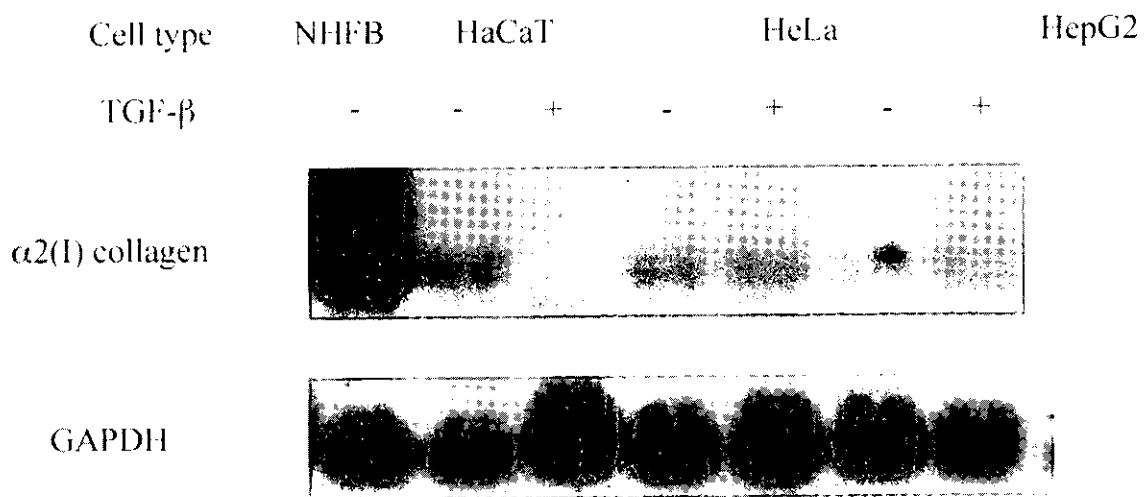
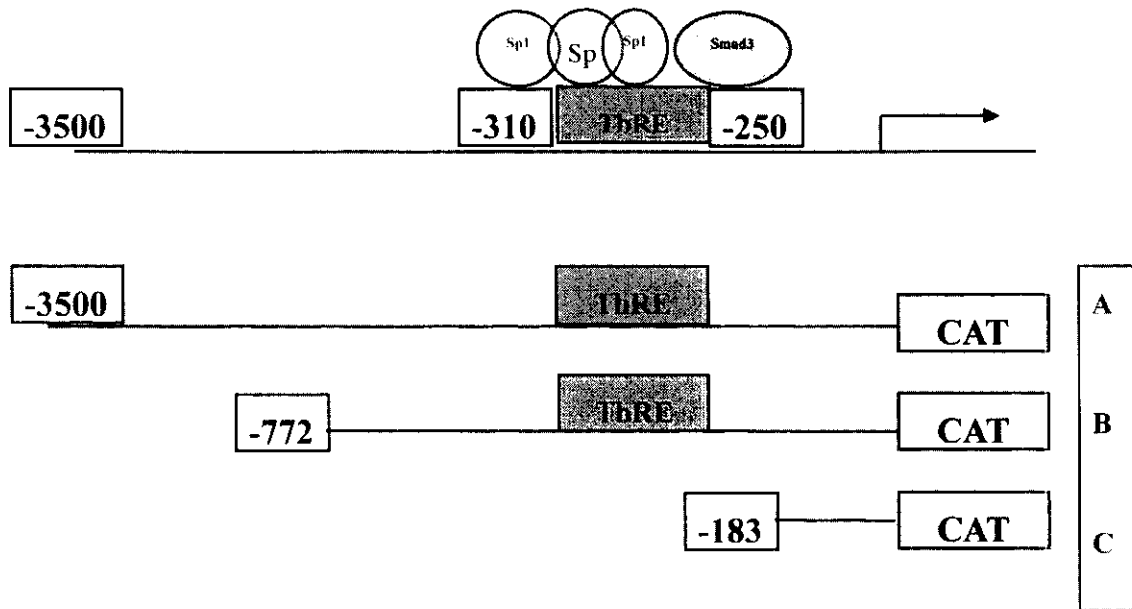
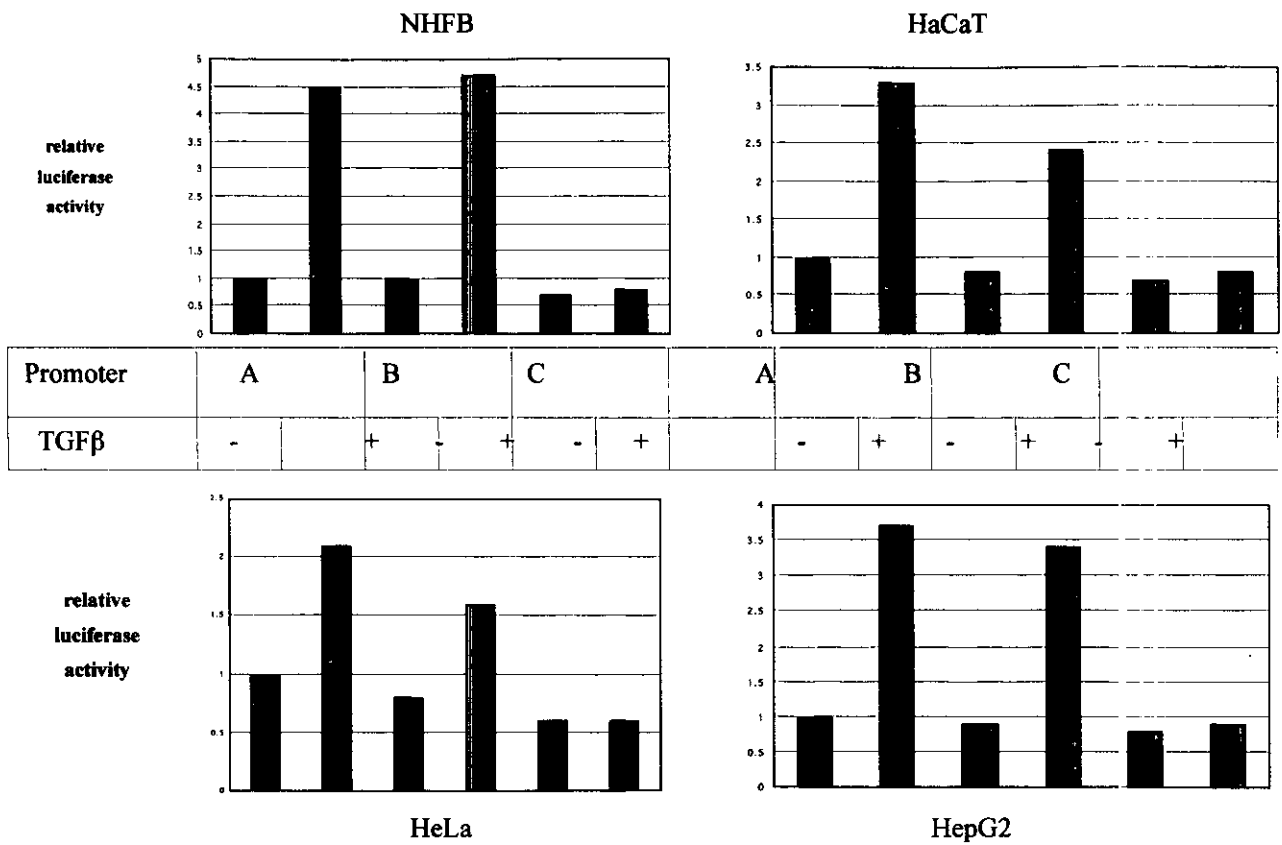


図 2. Northern blotting。皮膚線維芽細胞（NHFB）および HaCaT, HeLa, HepG2 における  $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子発現量



### 3A



### 3 B

図3 CAT assay。皮膚線維芽細胞 (NHFB) および HaCaT, HeLa, HepG2 における $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子転写活性

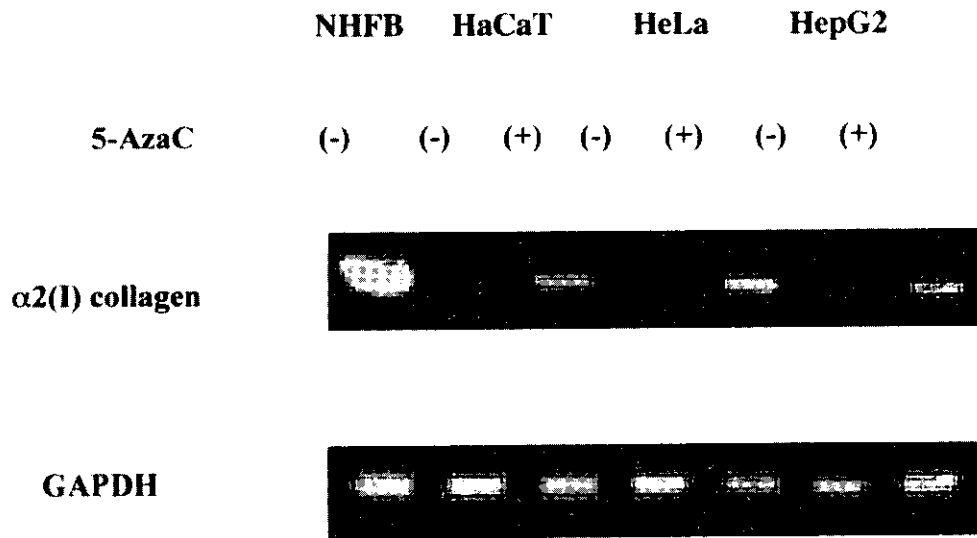


図4 RT-PCR。HaCaT, HeLa, HepG2 における 5-AdC による $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子 reactivation

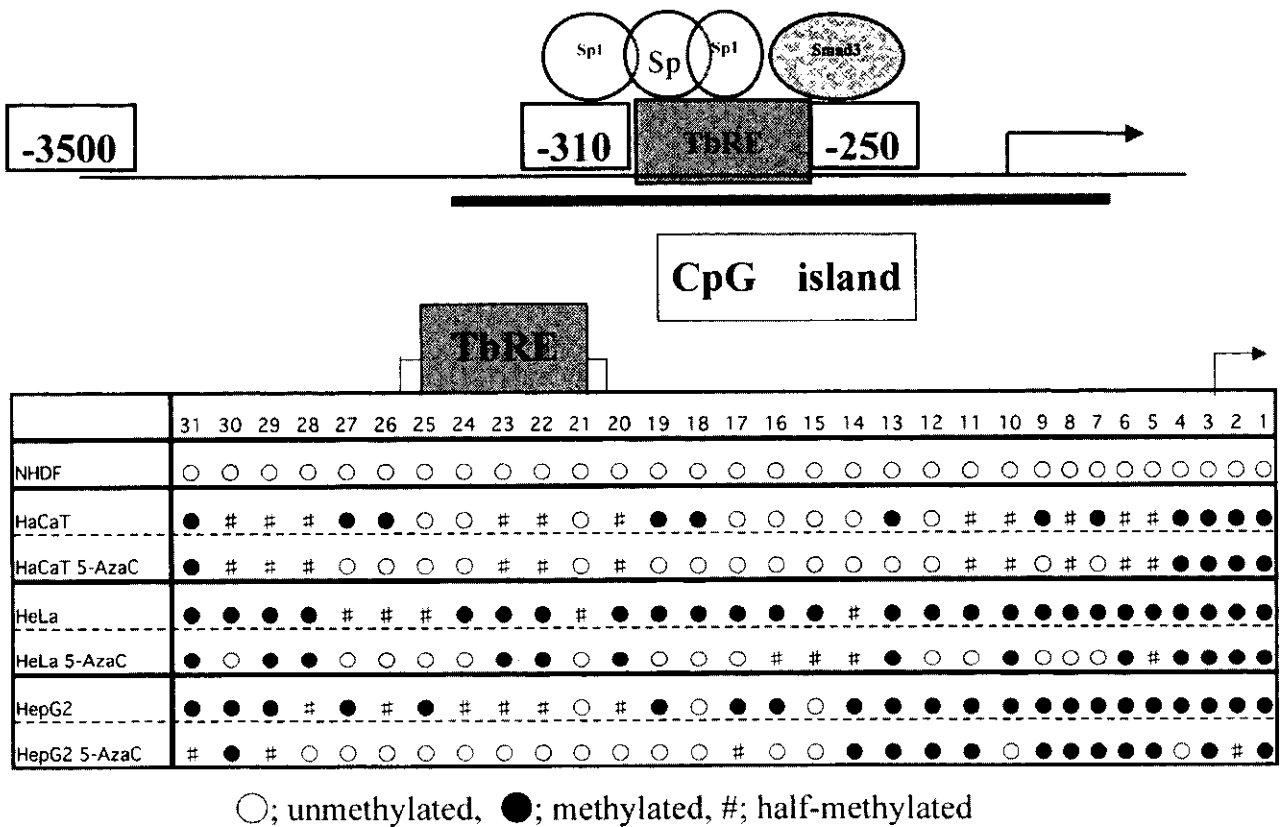


図5 Bisulfite sequence。皮膚線維芽細胞 (NHFB) および HaCaT, HeLa, HepG2 における $\alpha 2(I)$  collagen プロモーター領域のメチル化状態

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 群馬大学医学部皮膚科教授  
協力者 大西一徳 群馬大学医学部皮膚科講師

### 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。我々は、SSc患者由来培養皮膚線維芽細胞における転写活性の亢進の機序を、I型コラーゲンを構成するCOL1A2遺伝子プロモーター領域をin vivo フットプリント法を用いて検討し、正常人とSSc患者由来線維芽細胞との間に、転写活性抑制因子が作用すると考えられる同プロモーターの-170 bp近傍に明かな違いがあることを示した。本研究では、この違いが正常人及び強皮症患者の同プロモーターの塩基配列の違いによるものではないことを明らかにするとともに、ゲルシフトアッセイで-170 bp近傍に特異的に結合する因子を含め、両者の間に相違のあることを示し、詳細はなお明らかではないが、同プロモーターの-170 bp近傍を介して作用する抑制因子の減弱がSScにおける転写活性亢進をきたす一因と考えた。

### A. 研究目的

COL1A2遺伝子プロモーターの転写活性の調節は、CATアッセイを用いた検討から、basalな転写活性の維持にはGC box及びCAT boxが関与し、転写活性の亢進には-119 ~ -133 bpに存在するTCCTCCが、転写活性の抑制には-155 ~ -173 bpに存在するTCCCCCが関与することが明らかとなった<sup>1</sup>。SSc患者皮膚由来線維芽細胞においては、I型コラーゲン遺伝子の転写レベルでの亢進が認められるが、その異常がCOL1A2遺伝子プロモーターのどのような調節障害によるものかはなお明らかでない。我々は、通常の

DNase I フットプリント法に比し、より生体内でのDNA-蛋白（転写因子）の結合やDNAの状態を反映するin vivo フットプリント法で、正常人とSSc患者由来培養皮膚線維芽細胞を用いCOL1A2遺伝子プロモーターを解析し、転写活性を抑制する因子が結合すると思われる-170 bp近傍に両者の間に相違があることをみいだした<sup>2</sup>。

今回我々は、in vivo フットプリント法における相違が、正常人とSSc患者の同プロモーターの塩基配列の異常によるものかどうかを明らかにし、更に同プロモーターに結合する因子に相

違があるかを検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象

対象とした SSc 患者は 14 例（女性 12 例、男性 2 例）で、年齢は  $56.4 \pm 15.6$  歳であった。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性が 8 例、抗セントロメア抗体陽性が 5 例、抗核抗体陰性が 1 例であった。対照した正常人は 9 例で、全例女性で年齢は  $30.9 \pm 9.8$  歳であった。

### 2) 核抽出物

52 歳、女性及び 24 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 24 歳、女性の前腕及び 21 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 ~ 4 代のものを直径 15 cm の plastic dish に培養し、ほぼコンフルエントに達した時点で核抽出物を作成し<sup>3</sup>、蛋白量を測定した。

### 3) DNA シーケンシング

EDTA を添加して採血した全血より、COL1A2 プロモーター上のプライマー TGCAGAGCACTCCGACGTGT (-350 ~ -331)、ACCTCCAACCTTAGCCGAAACCT (+39 ~ +18) を用い、PCR 法でフラグメント DNA を作成した。アガロース電気泳動後フラグメント DNA を精製した後、pBS EcoRV CIP に挿入し、JM109 をコンピテントセルとしてトランスフォーメーション後、LB プレートで培養し白色コロニーを

得た。前記プライマーを用いて PCR 法で、フラグメント DNA が挿入されていることが確認できたコロニーよりミニプレップでプラスミド DNA を単離した。T3 プライマーを用いた Dye Termination 法でシーケンス反応を行い、シーケンサ (ABI PRISM310、Perkin Elmer) で解析した。

### 4) ゲルシフトアッセイ

COL1A2 プロモーター上の -285 ~ -147 をビオチン標識したプライマーを用い、PCR 法でプローブ作成し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で精製した。同様に競合に用いた同部位の二本鎖 DNA は非標識プローブを用いて作成した。また、競合に用いた 24 bp 二本鎖 DNA (-176 ~ -153) は合成オリゴヌクレオチドをアニーリングして作成した。電気泳動は 5 % の非変性ポリアクリルアミドゲル、0.5×トリスほう酸緩衝液 (TBE)、プローブ (DNA として 0.12  $\mu$ g)、核抽出物 (蛋白量 15  $\mu$ g) を用い施行した<sup>4</sup>。電気泳動後 DNA をセミドライプロッターを用いて、メンブレイン (Hybond-N+, Amersham) に転写し、streptABComplex (Dako) を反応後、ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham) で検出した。さらに特異的結合の確認のために、抗 Sp1 抗体、抗 Sp3 抗体 (Santa Cruz) を用いた。

## C. 研究結果

### 1) COL1A2 遺伝子プロモーターの塩基配列

対象した正常人 9 例、SSc 患者 14 例で、異常な塩基配列は検出されなかった。

### 2) ゲルシフトアッセイ

用いたプローブが長いため、正常人及び SSc

患者核抽出物で多数のバンドが検出された(図1)。そのほとんどは非標識プローブの添加による競合で消失し、特異的と考えられた。一方24 bpのオリゴヌクレオチドの競合で、一番速く泳動するバンドが消失し特異的と考えられた(黒い矢印)。正常人及びSSc患者それぞれ2例の間には大きな差異は認められなかったが、正常人とSSc患者との比較では、24 bpのオリゴヌクレオチドで競合されるバンドが、SSc患者に比し正常人で濃かった。さらにこのバンドの次に速く泳動されるバンドにも、両者の間に差異を認めた(白い矢印)。

これまでの報告では、COL1A2遺伝子プロモーターの本研究で検討されている部位にSp1、Sp3が結合するとされているので、さらに特異抗体を用いた検討を加えた(図2)。抗Sp1抗体、抗Sp3抗体の添加で、それぞれ異なる特異的バンドが消失したが(黒い矢印)、両抗体の添加は24 bpのオリゴヌクレオチドで競合される特異的DNA-蛋白結合にに変化を与えなかった。

#### D. 考案

先ず今回の検討から、SScにおけるCOL1A2遺伝子の転写レベルでの亢進は、少なくとも同プロモーターの-330 ~ +38間の塩基配列の異常によるものではなく、我々が*in vivo* フットプリント法でみいだした-170 bp近傍の正常人とSScの間の差異も、DNAと何らかの因子の結合の差異を反映するものと考えられた。

今回のゲルシフトアッセイの結果から、抑制因子が作用するとされる-170 bp近傍に何らかの因子が特異的に結合することが確認できた。しかしながら、この因子は、これまでの報告より

予想されたSp1及びSp3とは異なる因子であることが、特異的抗体を用いた検討から示唆された。さらにゲルシフトアッセイの結果からは、核抽出物中の同因子は、SScに比べ正常人に多いことが示された。これらのことから、SScではCOL1A2遺伝子プロモーターの転写活性を抑制する、-170 bp近傍に結合する因子が正常人に比べ少ないために、転写活性が亢進していることも考えられる。

つい最近、COL1A2遺伝子プロモーターにおけるインターフェロンの転写活性抑制刺激を、-161 ~ -150に結合するYB-1が伝達することが報告された<sup>5</sup>。我々が今回検討した因子がYB-1と同一因子かどうかはなお不明であるが、我々が競合に用いた24 bpのオリゴヌクレオチドが-176 ~ -153を含み、ほとんどYB-1が結合する部位に一致しており、興味もたれる。

さらに今回のゲルシフトアッセイの結果から、-170 bp近傍に結合する因子以外にも正常人とSScの核抽出物中に相違があることが示唆されたが、その詳細は不明である。

#### E. 結論

SSc患者皮膚由来線維芽細胞で、COL1A2遺伝子転写活性が亢進している一因として、同遺伝子の転写活性を抑制する、-170 bp近傍に結合する因子が正常人に比べSScで少ないことが考えられた。

#### F. 文献

1. Ihn H, Ohnishi K, Tamaki T, LeRoy EC, Trojanowska M: Transcriptional regulation of the human  $\alpha 2(I)$  collagen promoter. J Biol Chem

- 1996;271:26717-23.
2. 石川治、大西一徳: 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. 厚生科学研究強皮症調査研究班平成 13 年度報告書. pp41-44. 2001.
  3. Andrews NC and Faller DV: A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acid Res* 1991;11:2499-501.
  4. Ihn H, Ohnishi K, Tamaki T, LeRoy EC, Trojanowska M: Transcriptional regulation of the human  $\alpha 2(I)$  collagen promoter. *J Biol Chem* 1996;271:26717-23.
  5. Higashi K, Inagaki Y, Suzuki N, Mitsui S, Mauviel A, Kaneko H, Nakatsuka I: Y-box binding protein YB-1 mediates transcriptional repression of human  $\alpha 2(I)$  collagen gene expression by interferon- $\gamma$ . *J Biol Chem* 2003; in press

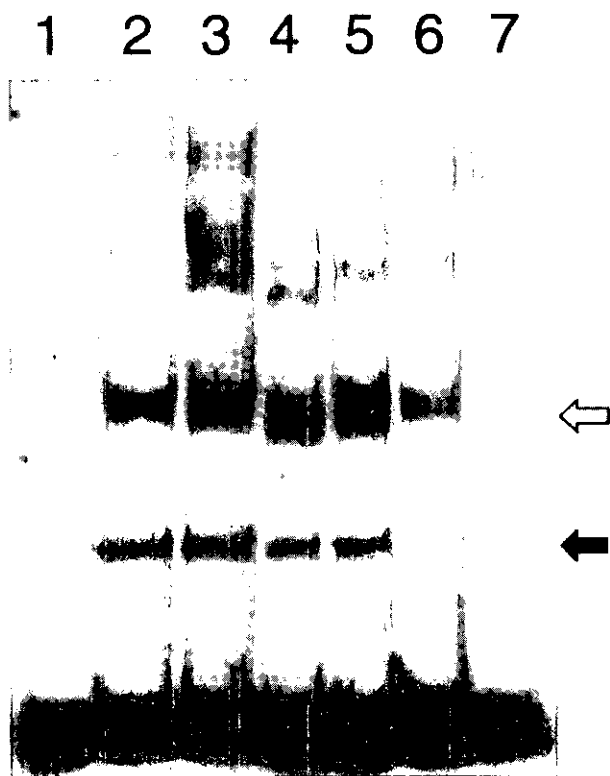


図 1: ゲルシフトアッセイによる-170 bp 近傍に結合する蛋白の検出、および正常人と SSc 患者由来培養皮膚線維芽細胞の核抽出物による差異。レーン 1、核抽出物なし; レーン 2 - 3、異なる正常人由来核抽出物; レーン 4 - 5、異なる SSc 患者由来核抽出物; レーン 6、正常人由来核抽出物と 24 bp オリゴヌクレオチド(-176 ~ -153)による競合; レーン 7、正常人由来核抽出物と非標識プローブによる競合。黒い矢印は-170 bp 近傍に結合する特異的反応を示す。白い矢印は正常人と SSc 患者由来核抽出物間の差異が認められる部位を示す。

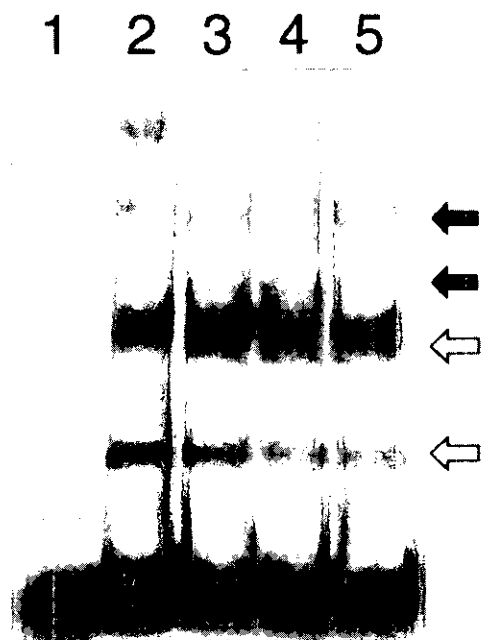


図 2: 抗 Sp1 抗体と抗 Sp3 抗体を用いた、特異的反応の検出。レーン 1、核抽出物なし; レーン 2、正常人由来核抽出物; レーン 3 - 5、SSc 患者由来核抽出物; レーン 4、抗 Sp1 抗体による阻害; レーン 5、抗 Sp3 抗体による阻害。黒い矢印は抗体による特異的阻害を示す。白い矢印は正常人と SSc 患者由来核抽出物間の差異が認められる部位を示す。



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

IL-4 による皮膚線維芽細胞における TIMP-2 の  
発現亢進の機序の検討

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 玉置邦彦 東京大学医学部皮膚科学講座教授

研究要旨

Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) is a potent inhibitor of activated matrix metalloproteinases such as gelatinase and collagenase, and thus helps to control extracellular matrix metabolism and deposition by connective tissue cells. We examined the responsiveness of the expression of TIMP-2 to various cytokines in dermal fibroblasts and studied the regulatory and signaling mechanisms of the response. TIMP-2 protein and mRNA expression was induced by interleukin-4 (IL-4) in a dose- and time-dependent manner, but not by transforming growth factor- $\beta$ , oncostatin M, or interleukin-6. IL-4 induction of TIMP-2 expression was dependent upon transcription. The p38 MAP kinase inhibitors SB202190 or SB203580 suppressed IL-4-induced TIMP-2 expression, suggesting the involvement of p38 MAP kinase in the signaling of IL-4 leading to TIMP-2 expression. Immunoblotting analysis using a specific antibody against phosphorylated p38 MAP kinase (Thr180/ Tyr182) showed that IL-4 induced phosphorylation of p38 MAP kinase in human dermal fibroblasts. Furthermore, p38 MAP kinase assay showed that IL-4 induces p38 MAPK activation in human dermal fibroblasts. The expression of the dominant-negative mutant p38 MAPK represses the IL-4 induced TIMP-2 expression in human dermal fibroblasts. Thus, IL-4 can potentially alter the dermal matrix metabolism by regulating TIMP-2.

## 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、TIMP-2 遺伝子の発現亢進も知られている。今回皮膚線維芽細胞において TIMP-2 発現亢進を引き起こすサイトカインを同定し、その作用機序を検討したので報告する。

## B. 研究方法

**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、上清を得た。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、一次抗体と反応後二次抗体と反応させ、chemiluminescent 法にて検出した。また RNA を抽出後ナイロン膜に転写し、TIMP-2、GAPDH プローブとハイブリダイズし検出した。

**DNA transfection** 皮膚線維芽細胞を播種し、FuGene を用いて dominant negative ERK2, dominant negative p38 $\alpha$ , dominant negative p38 $\beta$  をトランスフェクションした。

**In vitro kinase assay** IL-4 存在下あるいは非存在下の皮膚線維芽細胞から得た細胞抽出液 (200 $\mu$ g) を phospho-p38MAPK 抗体と overnight 反応させ、ATP 存在下での ATF-2 fusion protein のリン酸化を phospho-ATF-2 抗体を用いて解析した。

## C. 研究結果と考案

### 皮膚線維芽細胞における TIMP-2 の発現を IL-4 は促進する

種々のサイトカイン刺激における皮膚線維芽細胞の TIMP-2 発現を ELISA 法にて検討した。図 1 に示すように、IL-4 は皮膚線維芽細胞における TIMP-2 蛋白質発現を促進したが (6 倍程度)、その他のサイトカインは TIMP-2 蛋白質発現に変化を与えなかった。

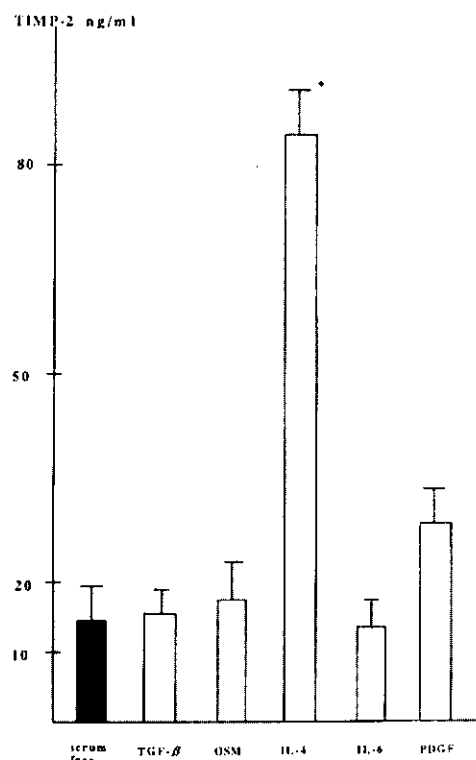


図 1. ELISA 法にて検討した TIMP-2 蛋白質発現量。

さらに免疫ブロット法にて IL-4 は皮膚線維芽細胞における TIMP-2 蛋白質発現を量依存性に (図 2a)、時間依存性に (図 2b) 促進した。

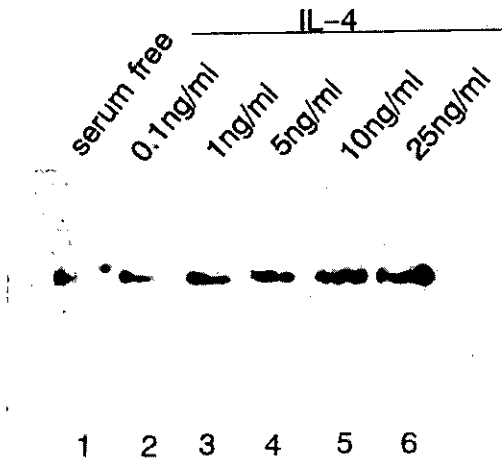


図 2a.免疫プロット法にて検討した TIMP-2 蛋白質発現量. IL-4 は皮膚線維芽細胞における TIMP-2 蛋白質発現を量依存性に促進した.

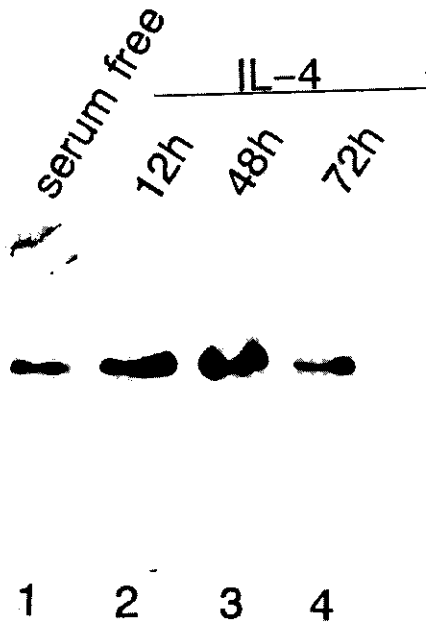


図 2b.免疫プロット法にて検討した TIMP-2 蛋白質発現量. IL-4 は皮膚線維芽細胞における TIMP-2 蛋白質発現を時間依存性に促進した.

次に TIMP-2 mRNA 発現を検討するため Northern blot 法を行った. IL-4 は TIMP-2 mRNA 発現を促進し (図 3), またその作用は actinomycin D にて抑制されたため転写レベルで制御されると考えられた.

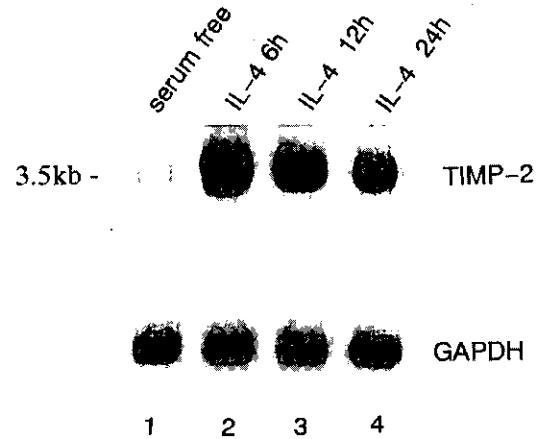


図 3. TIMP-2 mRNA 発現を検討するため Northern blot 法を行った. IL-4 は TIMP-2 mRNA 発現を促進した.

#### IL-4 による TIMP-2 発現亢進に p38 MAPK が関与する

IL-4 による TIMP-2 発現促進の機序をさらに検討するため, 情報伝達経路の阻害剤を用いて各情報伝達経路の関与について検討した. 図 4 に示すように IL-4 による TIMP-2 発現促進は p38 MAPK 阻害剤 SB202190 および SB203580 によって阻害され, ERK 阻害剤 PD98059 にて変化しなかった.

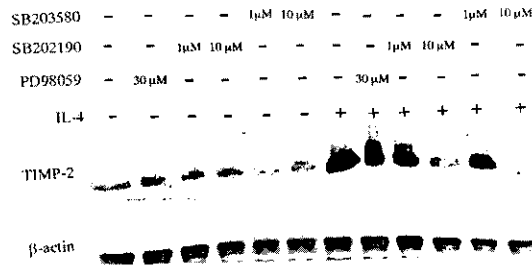


図 4. IL-4 による TIMP-2 発現促進は p38 MAPK 阻害剤 SB202190 および SB203580 によって阻害された。

この結果は IL-4 による TIMP-2 発現促進に p38 MAPK が関与する可能性を示唆するものであった。そこで実際皮膚線維芽細胞において IL-4 刺激にて p38 MAPK が活性化するか検討した。

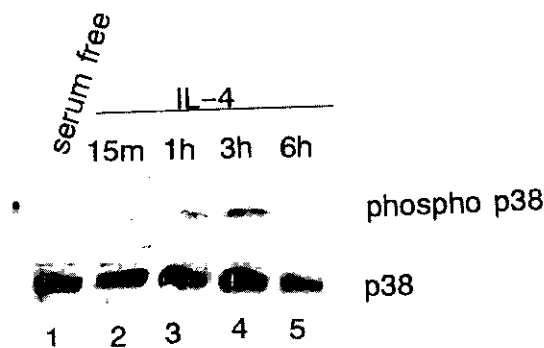


図 5a. 皮膚線維芽細胞において IL-4 は p38 MAPK をリン酸化する。

図 5a に示すように、皮膚線維芽細胞において IL-4 刺激は p38 MAPK をリン酸化し、またこの活性は *in vitro* kinase assay にて確認された(図 5b)。

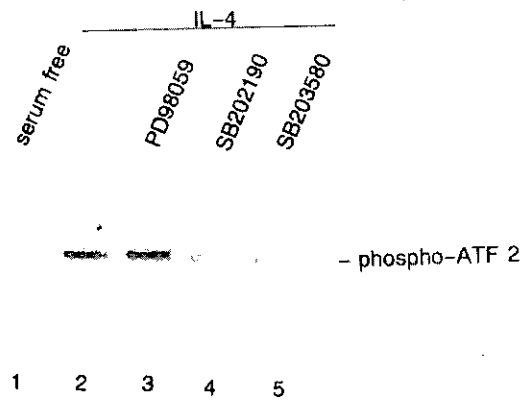


図 5b. 皮膚線維芽細胞において IL-4 刺激は p38 MAPK の活性を亢進する。

さらに IL-4 による TIMP-2 発現促進に p38 MAPK が関与することを dominant negative p38 MAPK を用いて検討した。

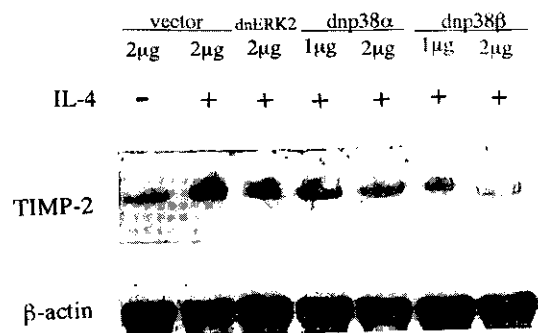


図 6. IL-4 による TIMP-2 発現促進は dominant negative p38 MAPK によって阻害された。

図 6 に示すように dominant negative ERK2 の過剰発現によって IL-4 による TIMP-2 発現促進は抑制されず、dominant negative p38 MAPK $\alpha$ あるいは p38 MAPK $\beta$ の過剰発現によって IL-4 による TIMP-2 発現促進は抑制された。この結果は IL-4 による TIMP-2 発現促進に p38 MAPK が関与することを強く示唆し、汎発性強皮症をはじめとする皮膚の線維化に IL-4 および p38 MAPK の関与を示唆するものと考えられた。今後汎発性強皮症の病因における IL-4 および p38 MAPK の関与について検討を深める予定である。

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

汎発性強皮症皮膚線維芽細胞におけるインテグリン  $\alpha v \beta 5$  の発現  
レベルとその意義についての検討

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

Integrin  $\alpha v \beta 5$  receptor functions in the endocytosis and degradation of matrix-bound vitronectin by human skin fibroblasts. Matrix-bound vitronectin has the potential to stabilize the active form of plasminogen activator inhibitor type 1, leading to the inhibition of plasmin-dependent pericellular proteolytic cascade. Previous studies suggest that interstitial fibroblasts control deposit level of matrix-bound vitronectin through integrin  $\alpha v \beta 5$  and subsequently organize ECM remodeling by regulating pericellular proteolysis. In the present report, we compared expression levels of integrin  $\alpha v \beta 5$  receptor on dermal fibroblasts between scleroderma and healthy controls. We demonstrated that integrin  $\alpha v \beta 5$  expression is upregulated on scleroderma fibroblasts and increased expression of integrin  $\alpha v$  and  $\beta 5$  subunits is controlled at transcriptional level. In immunohistochemical analyses, integrin  $\alpha v$  and  $\beta 5$  subunits were strongly stained on scleroderma fibroblasts. Moreover, transient overexpression of integrin  $\alpha v \beta 5$  on normal dermal fibroblasts induced increased promoter activity of human  $\alpha 2(I)$  collagen gene. These results strengthen the concept that vitronectin-dependent inhibition of pericellular proteolytic cascade contributes to the pathogenesis of fibrotic disorders and suggest the possibility that the upregulated expression of integrin  $\alpha v \beta 5$  serves to the phenotypical alteration of lesional fibroblasts in scleroderma.

## A. 研究目的

インテグリンは、細胞間および細胞-細胞外マトリックス間の接着過程において重要な役割を果たす分子であり、近年の研究により、細胞の増殖や分化、形態形成、組織修復など広範な現象において重要な機能を担うことが分かってきている。強皮症皮膚線維芽細胞においても、これまでにインテグリンの発現量の異常について多くの報告があるが、これらの過去の報告では、type I collagen 受容体であるインテグリン  $\alpha 1\beta 1$  および  $\alpha 2\beta 1$  の発現量の異常にのみ焦点が当てられてきた。

正常皮膚線維芽細胞において、インテグリン  $\alpha 1\beta 1$  は、type I collagen 遺伝子の発現抑制に関与し、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  は collagenase の発現亢進に関与していることが知られている。強皮症皮膚線維芽細胞ではこれらのコラーゲン受容体の発現が減少しており、その結果、type I collagen metabolism の negative feedback 機構が破綻していると考えられている。しかしながら、強皮症皮膚線維芽細胞において、integrin  $\alpha 1\beta 1$  と  $\alpha 2\beta 1$  の発現量の異常はないとした報告もあり、コラーゲン受容体の発現量については未だ一定した見解は未だ得られていない。

今回我々が注目した、インテグリン  $\alpha v\beta 5$  は細胞外マトリックス中のビトロネクチンを ligand としており、創傷治癒の過程で、表皮細胞の遊走に重要な役割を果たしていると考えられている。インテグリン  $\alpha v\beta 5$  は線維芽細胞にも発現しており、線維芽細胞はインテグリン  $\alpha v\beta 5$  を介した endocytosis により細胞外マトリックス中の vitronectin を分解することが知られている。また、細胞外マトリックス中の vitronectin は plasminogen activator inhibitor-type 1 をはじめ、幾つかの protease

inhibitor と結合し、その活性を調節する機能をもっていると報告されている。以上より、線維芽細胞に発現しているインテグリン  $\alpha v\beta 5$  は、細胞外マトリックス中の vitronectin の分解を制御する事により、各種 protease inhibitor の活性をも制御し、細胞周囲の proteolytic cascade を調節している可能性が考えられている。しかしながら、線維化を主徴とする疾患において、インテグリン  $\alpha v\beta 5$  の発現異常に関する報告はこれまでない。

そこで、今回我々は強皮症皮膚線維芽細胞におけるインテグリン  $\alpha v\beta 5$  の発現レベルとその意義について検討した。

## B. 研究結果

正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞における integrin  $\alpha v\beta 5$  の発現量

正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞の integrin  $\beta 5$  subunit の発現量について、whole cell lysate を用いた immunoblotting にて検討した。図 1 に示すように、 $\beta$ -actin にて補正したところ、強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞と比較して、integrin  $\beta 5$  subunit の発現が約 3 倍に亢進していた。次に、細胞表面での integrin  $\alpha v\beta 5$  receptor の発現量を検討するため、細胞表面に発現している蛋白を biotin でラベルし、integrin  $\beta 5$  subunit に対する抗体を用いて免疫沈降法を行った。図 2 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 integrin  $\alpha v\beta 5$  receptor の発現量が著明に亢進していた。

正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞の integrin  $\beta 5$  subunit 遺伝子の発現量

次に、integrin  $\beta 5$  subunit 遺伝子の発現量について、Northern blot 法を用いて検討した。

図3に示すように、GAPDHで補正すると、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、integrin  $\beta 5$  subunit遺伝子の発現量は約3倍に亢進していた。次に、強皮症皮膚線維芽細胞におけるintegrin  $\beta 5$  subunit遺伝子の発現亢進が転写レベルの亢進なのか、message stabilityによるものなのかを検討するため、アクチノマシンDを加える直前、加えて4時間後、8時間後のintegrin  $\beta 5$  subunit遺伝子の発現量をNorthern blottingにて検討した。図4に示すように、integrin  $\beta 5$  subunit遺伝子発現量の半減期は、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞との間で有意差は認められなかった。このことから、強皮症皮膚線維芽細胞におけるintegrin  $\beta 5$  subunitの発現量の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。

#### 正常皮膚と強皮症患者皮膚におけるintegrin $\beta 5$ subunitの発現量

強皮症患者の皮膚と正常人の皮膚において、免疫組織染色を用いて、integrin  $\beta 5$  subunitの発現量について検討した。表1に結果のまとめを示す。強皮症患者の皮膚では正常対照群の皮膚と比較して、線維芽細胞および膠原線維間にintegrin  $\beta 5$  subunitの強い発現を認めた。

#### インテグリン $\alpha v\beta 5$ 発現亢進がコラーゲン遺伝子発現に及ぼす影響

integrin  $\alpha v\beta 5$  receptorの発現量亢進が、線維芽細胞の細胞外マトリックス産生に及ぼす影響を調べるため、正常皮膚線維芽細胞にintegrin  $\beta 5$  subunitを一過性に強発現させ、CAT assayを用いてhuman  $\alpha 2(I)$  collagen promoter活性を調べた。図5に示すように、

integrin  $\alpha v\beta 5$  receptorを強発現させた群では、vectorのみを強発現させた群に比べ、promoter活性が約1.4倍と有意に亢進していた。以上より、integrin  $\alpha v\beta 5$  receptorの発現亢進がコラーゲン遺伝子の発現亢進に関与している可能性が示唆された。

#### C. 考案

今回の検討により、in vivoおよびin vitroにおいて強皮症皮膚線維芽細胞のインテグリン  $\alpha v\beta 5$  の発現量が亢進していることが示された。この結果は、強皮症皮膚においてproteolytic cascadeの何らかの異常が細胞外マトリックスの沈着に関与している可能性を示唆していると考えられた。また、インテグリン  $\alpha v\beta 5$  を正常皮膚線維芽細胞に一過性強発現させることによりコラーゲン遺伝子の転写活性の亢進が認められたことから、インテグリン  $\alpha v\beta 5$  の発現量の亢進は強皮症皮膚線維芽細胞のphenotypeの変化にも関与している可能性が示された。

表 1

Results of immunohistochemical staining

Subjects	Age/Sex	Disease duration, years	Epidermis	Blood vessel	Smooth muscle	Follicle	Sweat gland	Fibroblasts	Between collagen bundle
Patients									
1	57/F	1	+	+++	+++	+	+	+++	+++
2	61/F	0.5	+	+++	+++	+	+	+++	+++
3	31/F	1	+	+++	+++	+	+	+++	+++
4	32/F	1	+	+++	+++	+	+	+++	+++
5	27/F	1	+	+++	+++	+	+	+++	+++
Controls									
1	57/F		+	+++	+++	+	+	-	-
2	61/F		+	+++	+++	+	+	-	-
3	31/F		+	+++	+++	+	+	-	-
4	32/F		+	+++	+++	+	+	-	-
5	27/F		+	+++	+++	+	+	-	-

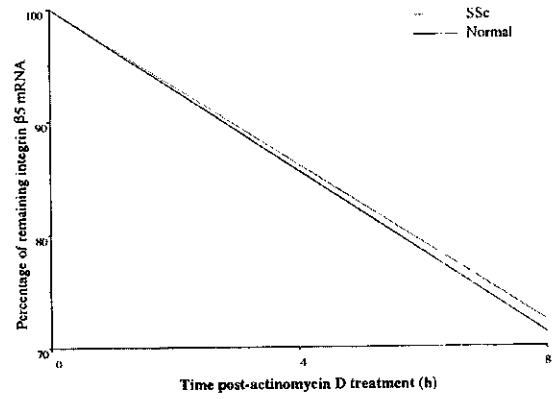


图 4

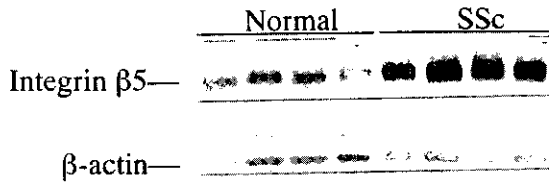


图 1

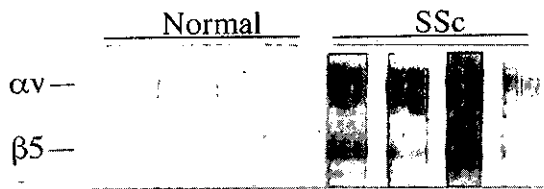


图 2

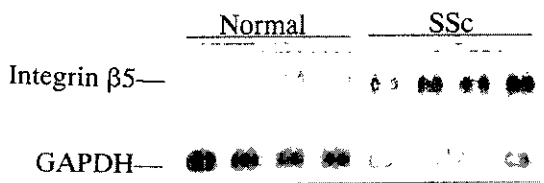


图 3

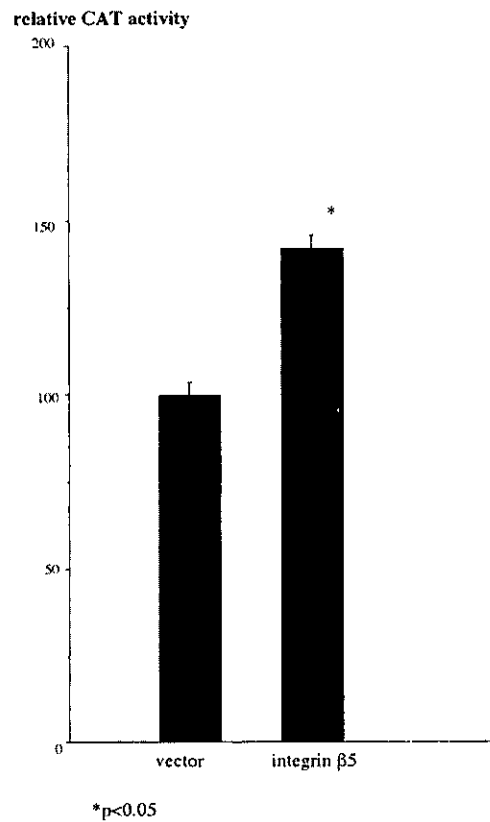


图 5



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

**TGF- $\beta$ / Smad 抑制因子の炎症・線維化組織特異的発現による  
臓器線維症の治療戦略**

研究協力者 稲垣 豊 東海大学医学部地域保健学部門助教授  
協力者 池田一雄 大阪市立大学大学院医学研究科器官構築形態学講師  
協力者 岡崎 勲 東海大学医学部地域保健学部門教授  
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

**研究要旨**

TGF- $\beta$ / Smad シグナルに対する抑制因子を炎症・線維化組織において特異的に発現させるための基礎的検討として、 $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子 (COL1A2) 上流のエンハンサー・プロモーターを用いて GFP を発現させるアデノウイルスベクターを作製して、皮膚線維芽細胞に感染させた。非刺激時の皮膚線維芽細胞では、COL1A2 エンハンサー・プロモーターによる GFP の発現はほとんど観察されなかったが、TGF- $\beta$ 刺激により陽性細胞数・蛍光強度ともに増加した。一方、対照として用いた CAG/GFP アデノウイルスベクターの感染では、TGF- $\beta$ 刺激・非刺激のいずれにおいても GFP の強い発現が観察され、両者で差異はみられなかった。これらの結果は、コラーゲン発現が亢進した炎症・線維化組織において特異的に抑制因子を発現させ、ひいては強皮症をはじめとする臓器線維症の分子制御を試みる上で、重要な知見をもたらすと考えられた。

**A. 研究目的**

強皮症は、全身の諸臓器にコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの異常沈着をきたす原因不明の疾患である。コラーゲンは、細胞外マトリックスの主要成分として、組織・臓器形態の保持のみならず組織修復や創傷治癒においても重要なはたらきを演じているが、その産生調節機構が破綻をきたすと過剰なコラーゲンの沈着をもたらし、皮膚・肺・腎・肝・脾など諸臓器の線維化を引き起

こす。なかでも、I型コラーゲンは線維化組織において増加した全コラーゲンの約50%を占める最多の構成成分である。2本の $\alpha 1$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖から構成され、それぞれ $\alpha 1(I)$ コラーゲン遺伝子(COL1A1)、 $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子(COL1A2)という異なる遺伝子によりコードされている。TGF- $\beta$ はCOL1A2転写を促進する最も重要な液性因子として知られ<sup>1</sup>、近年その細胞内シグナル伝達物質として Smad と呼ばれる一群のタ

ンパク質が同定された<sup>2</sup>。

今回、炎症組織・線維化組織において特異的に TGF- $\beta$ /Smad シグナルに対する抑制因子を発現させ、臓器線維症に対する治療法を確立するための基礎的検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 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% CO<sub>2</sub>の存在下で培養した。

### 2) アデノウイルスベクター

COL1A2 の転写開始部位の上流、-17 kb から-15,5 kb 間のエンハンサー配列を同遺伝子の-350 から+54 塩基間のプロモーターに接続し、これらによって GFP を発現させるアデノウイルスベクター (17.0COL/GFP) を作製した。また、陽性コントロールとして、CAG 発現ユニットを用いて GFP を強制発現させるアデノウイルスベクター (CAG/GFP) を作製した。

### 3) アデノウイルス感染実験

5% FBS 存在下で CF37 細胞にアデノウイルスを 1 時間感染させた後培地を取り除き、PBS で細胞を洗浄後、0.1% FBS を含む培地で置換した。一部の細胞は、2ng/ml の TGF- $\beta$  で 48 時間刺激し、非刺激細胞と比較した。

### 4) GFP 蛍光観察

アデノウイルス感染細胞における GFP の蛍光を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

## C. 研究結果

COL1A2 エンハンサー・プロモーターにより転写制御を受ける GFP (17.0COL/GFP) の発現は、非刺激時における陽性細胞は全細胞の数%未満にすぎず、蛍光強度も弱かった (図 1A)。これに対して、アデノウイルス感染後の同細胞を TGF- $\beta$  で刺激すると、陽性細胞は約 15% に増加し、蛍光強度も増強した (図 1B)。

一方、対照として用いた CAG/GFP アデノウイルスベクターの感染では、TGF- $\beta$  刺激・非刺激のいずれにおいても約 70% の細胞において GFP の強い発現が観察されたが、TGF- $\beta$  添加の有無でその発現強度に差はみられなかった (図 2A および B)。

## D. 考案

コラーゲンの産生はサイトカインをはじめとする血中の生理物質により複雑な調節を受けており、なかでも TGF- $\beta$  は COL1A2 転写を促進する最も重要な液性因子である。皮膚線維芽細胞を用いた研究により、転写開始部位の上流-313 塩基から-255 塩基間が TGF- $\beta$  による同遺伝子転写の促進を伝達する重要な領域であり、著者らはこの領域を TGF- $\beta$ -responsive element (TbRE) と命名した<sup>3</sup>。TbRE は GC box と Smad 結合配列とによって構成される。このうち前者には Sp1 が<sup>3,4</sup>、後者には Smad3/Smad4 が結合し<sup>5</sup>、TGF- $\beta$  は両者のタンパク間相互作用を介して COL1A2 転写を促進することが判明した<sup>5</sup>。実際、TGF- $\beta$  で刺激した皮膚線維芽細胞から核タンパクを抽出してゲルシフトアッセイを

行くと、非刺激細胞と比較して TbRE に結合する Sp1 と Smad3 の増加が確認された<sup>3</sup>。Sp1 と Smad タンパクによる COL1A2 転写の促進は、皮膚線維芽細胞のみならず肝星細胞<sup>6</sup>や腎メサンジウム細胞<sup>7</sup>においても同様に証明されており、各臓器に共通したコラーゲン発現の調節機序と考えられる。したがって、TGF- $\beta$ /Smad シグナルに対する抑制因子の発現は、過剰のコラーゲン産生を抑制し、ひいては強皮症をはじめとする臓器線維症の治療を考える上でも重要と考えられる。

TGF- $\beta$ /Smad シグナル伝達からみた臓器線維症治療の試みとしては、これまでに変異型<sup>8</sup>あるいは可溶性<sup>9</sup>TGF- $\beta$ 受容体を用いた肝線維症の治療や、抑制型 Smad7 を用いたブレオマイシン誘発肺線維症の発症抑制が報告されている<sup>10</sup>。しかしながら、これらの遺伝子治療は TGF- $\beta$ シグナル全般をブロックしコラーゲン遺伝子に特異的ではないため、細胞増殖や免疫系をはじめとする他の多くの TGF- $\beta$ 反応遺伝子にも影響を与え、実際の臨床応用にあたっては生体に対する悪影響・副作用が懸念される。とりわけ、TGF- $\beta$ シグナル系の遮断は常に発癌の危険性を孕んでいるだけに、慎重な配慮が必要である<sup>10</sup>。

本研究は、COL1A2 上流のエンハンサー・プロモーターを用いることで、コラーゲン発現が亢進している炎症・線維化組織において特異的に抑制因子を発現させ、コラーゲン遺伝子転写を抑制しようとする試みである。本研究で用いた COL1A2 の -17 kb から -15.5 kb 間は、トランスジェニックマウスを用いた解析により、胎児発生過程における組織特

異的発現に重要なエンハンサー配列であることが示されている<sup>11</sup>。我々も四塩化炭素投与による肝線維化過程において、このエンハンサー領域を含む COL1A2 プロモーターの活性化が細胞種特異的に起こることを明らかにした<sup>12</sup>。したがって、このエンハンサー領域を用いることで、他組織への影響が軽減されることが期待される。この点は、サイトメガロウイルスプロモーターを用いたこれまでの遺伝子治療では顧みられなかった配慮であり、副作用を軽減する上で重要である。

## E. 結 論

コラーゲン発現が亢進した炎症組織・線維化組織においてのみ TGF- $\beta$ /Smad に対する抑制因子を発現させるための基礎的研究を行ったところ、COL1A2 エンハンサー・プロモーターによる GFP の発現は TGF- $\beta$ 刺激下の線維芽細胞において増強された。この結果は、強皮症をはじめとする臓器線維症の分子制御を考える上で重要な知見をもたらすと考えられた。

## F. 文 献

1. Roberts AB, Heine VI, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor- $\beta$ . Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann NY Acad Sci* 1990; 580: 225-232.
2. Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P: TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus via Smad proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471.

3. Inagaki Y, Truter S, Ramirez F. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates  $\alpha 2(I)$  collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *J Biol Chem* 1994; 269: 14828-14834.
4. Greenwel P, Inagaki Y, Hu W, Walsh M, Ramirez F. Sp1 is required for the early response of  $\alpha 2(I)$  collagen to transforming growth factor- $\beta 1$ . *J Biol Chem* 1997; 272: 19738-19745.
5. Zhang W, Oul J, Inagaki Y, Greenwel P, Ramirez F. Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates TGF $\beta 1$  stimulation of  $\alpha 2(I)$  collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem* 2000; 275: 39237-39245.
6. Inagaki Y, Nemoto T, Nakao A, ten Dijke P, Kobayashi K, Takehara K, Greenwel P. Interaction between GC box binding factors and Smad proteins modulates cell lineage-specific  $\alpha 2(I)$  collagen gene transcription. *J Biol Chem* 2001; 276: 16573-16579.
7. Poncelet A-C, Schnaper HW. Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor- $\beta 1$ -induced  $\alpha 2(I)$  collagen expression in human glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 6983-6992.
8. Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type  $\beta$  transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2345-2349.
9. George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bissell DM. *In vivo* inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor  $\beta$  type II receptor: A potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12719-12724.
10. Nakao A, Fujii M, Matsumura R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, Iwamoto I. Transient gene transfer and expression of *Smad7* prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 1999; 104: 5-11.
11. De Val S, Ponticos M, Antoniv TT, Wells DJ, Abraham D, Partridge T, Bou-Gharios G. Identification of the key regions within the mouse pro- $\alpha 2(I)$  collagen gene far-upstream enhancer. *J Biol Chem* 2002; 277: 9286-9292.
12. Inagaki Y, Truter S, Bou-Gharios G, Garrett L-A, de Crombrughe B, Nemoto T, Greenwel P. Activation of pro $\alpha 2(I)$  collagen promoter during hepatic fibrogenesis in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 606-611.