

Dou X, Ponticos M, Black C, Bernabeu C, Jackman JK, Findell PR, Connolly MK. Dysregulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma: overexpression of endoglin in cutaneous scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1857-1865

5. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, Simonneau G, Galie N, Loyd JE, Humbert M, Nichols WC, Morrell NW, Berg J, Manes A, McGaughran J, Pauciulo M, Wheeler L. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 2001;345:325-334

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

藤本 学、尹 浩信、玉置邦彦、佐藤伸一、竹原和彦 全身性強皮症患者血清中の可溶性エンドグリン値の検討 日本皮膚科学会東京地方会
2003年12月、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

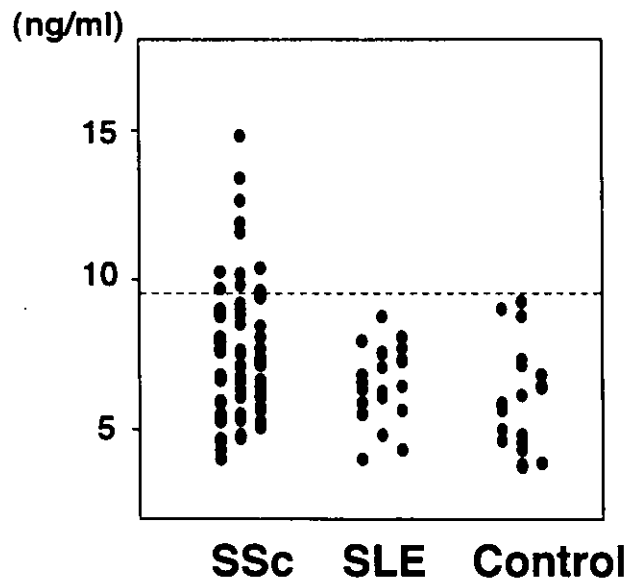


図1 全身性強皮症、全身性エリテマトーデス、健常人における血清中の可溶性エンドグリン値。破線は健常人の平均+2SD（カットオフ値）を示す。

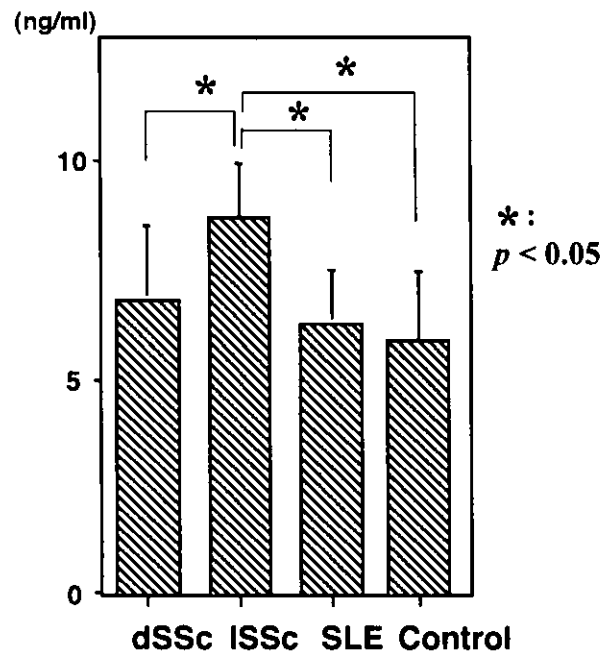


図2： 全身性強皮症の病型別の血清中の可溶性エンドグリン値。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

皮膚線維化における CTGF の役割

分担研究者	佐藤伸一	金沢大学院医学系研究科皮膚科学助教授
協力者	中條園子	金沢大学院医学系研究科皮膚科学医員
協力者	金原拓郎	金沢大学院医学系研究科皮膚科学医員
協力者	白崎文朗	金沢大学院医学系研究科皮膚科学助手
協力者	川原 繁	国立金沢病院皮膚科医長
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
主任研究者	竹原和彦	金沢大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究主旨

コラーゲン合成を促進する代表的なサイトカインとして、transforming growth factor-beta(TGF- β)が知られているが、近年 connective tissue growth factor(CTGF)も線維化に関与する因子として注目されている。今回我々は、新生マウスの皮下に TGF- β 、CTGF を注入して線維化を誘導する実験モデルを作製し、I 型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖をコードする pro $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写活性を測定した。TGF- β のみの注入で転写活性は 4 日目をピークに低下したが、TGF- β 3 日間注入後 CTGF を 4 日間注入すると転写活性は 5 日目以降も高値を示した。皮膚線維化の機序として、TGF- β が皮膚線維化を誘導し CTGF が線維化を維持することが示唆された。また、この線維化の機序に肥満細胞、マクロファージが関与していると考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症は、皮膚や肺、心、腎、消化管などに広範な線維化や血管障害をきたす結合織疾患のひとつである。線維化はコラーゲンをはじめとする細胞外基質が異常蓄積した状態である。強皮症における線維化の機序は未だ不明であるが、これまで様々な研究がなされ、血管内皮細胞、血小板、浸潤細胞などから分泌されるサイトカインが、線維芽細胞を増殖させ、細胞外基質の産生を亢進させることにより線維化が生じると

考えられている¹。

TGF- β は、繊維芽細胞に作用してコラーゲン合成を促進することから、強皮症の発症に関わる重要な細胞増殖因子としてこれまで注目されてきた²。さらに近年では、TGF- β の下流でその作用を仲介することから CTGF も線維化に関与する因子として注目されている。

CTGF は、TGF- β の刺激により選択的に線維芽細胞から分泌され、線維芽細胞の増殖とコラーゲンの産生を亢進させる因子と考えられている

^{3,4}。全身性強皮症において、皮膚硬化部に組織学的硬化と関連した CTGF mRNA の発現がみられる⁵ことや、患者血清中の CTGF 濃度が疾患の重症度に相関して上昇している⁶ことが報告されている。

以前、我々は、新生マウスの皮下に TGF- β 、CTGF を注入して線維化を誘導する実験モデルの確立を試みた。TGF- β のみを注入すると、4日目に肉芽が誘導されるが、8日目にはこの肉芽は消失する^{7,8}。しかし、TGF- β を3日間注入し、次に CTGF を4日間注入すると線維化が形成された。また、CTGFのみを注入しても線維化はみられなかった。これより、CTGFはTGF- β により誘導された線維化を維持すると考えられた。

今回我々は、この CTGF による線維化の維持に、コラーゲン遺伝子の転写レベルが関与しているかどうか、また、浸潤細胞が関与しているかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 使用したマウス

I型コラーゲンは、細胞外基質の主要成分であり、2本の $\alpha 1$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖によって構成される。そのI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子として螢の蛍光色素であるルシフェラーゼ遺伝子を結合させた融合遺伝子と、同じプロモーター領域に大腸菌の Lac Z 遺伝子を結合させた融合遺伝子を2種類組み込んだマウスを使用した。つまり、このマウス組織のルシフェラーゼ活性を測定することにより組織中のI型コラーゲンの転写活性を測定することができ、また、LacZ染色陽性細胞はI型コラーゲン遺伝子を発現している線維芽細胞である

と同定できる。

2) 皮膚線維化モデルマウスの作製

予備実験によりあらかじめ至適用量を決定した上で、TGF- β 、CTGFをPBSに溶解して最終濃度が各々40、20ng/ μ lになるように調整し、新生マウスの項背部に連日20 μ l、すなわちTGF- β 800ng、CTGF 400ngを皮下投与した。TGF- β 、CTGF各々3、7日間の単独投与と、TGF- β を3日間投与した後CTGFを4日間投与する連続投与を行った。また、PBSをコントロールとした。最終投与から24時間以内に組織を採取した。

3) コラーゲン量の測定

10 μ の切片を脱パラし、脱パラした切片の肉芽組織の部分をチューブに入れ、0.1%Fast Greenと0.1%Sirius red F3BAの染色液を加え反応させた。Fast Greenは非コラーゲン組織、Sirius red F3BAはコラーゲン組織に吸着する。反応液に0.1N NaOH:メタノール(1:1)を加え染みでてきた抽出液の上清の吸光度を540nmと605nmで測定し、コラーゲン量を計算した。

4) real-time PCR

凍結標本切片の肉芽組織の部分よりRNAを抽出し、DNAの合成を行った。ABI Prism 7000 Sequence Detector System (PE Applied Biosystems, Foster city, CA)を用いて、real-time PCRを行った。マウスのI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(COL1A2)のプライマーとして5'-CAA CCC AGC GAA GAA CTC ATA-3'(forward)、5'-GCC ACC ATT GAT AGT CTC TCC TAA C-3'(reverse)、プローブとして5'-CGC CCA GGC CAA GCA TGT C-3'を使用した。コントロール遺伝子としてGAPDHを用い、 $\Delta \Delta$ CT法により発現量比を算定した。

5)ルシフェラーゼ活性測定

肉芽組織を乳鉢ですりつぶした後細胞融解液で15分間溶かし、10000rpmで1分間遠心した。上清20 μ lに発光基質液100 μ lを添加しルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は1mgあたりの値で比較した。

6)X-gal染色

凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで5分間固定しPBSで10分間 \times 2回洗浄した。4mMフェロシアンカリウム、4mM フェリシアンカリウム、2mM 塩化マグネシウム、1mg/mlX-galで37 $^{\circ}$ C、48時間染色した。その後エオジンでカウンター染色し、PBSで10分間 \times 2回洗浄し封入した。

7)組織染色

パラフィン切片を用いて、肥満細胞とマクロファージについて染色を行った。肥満細胞はトルイジンブルー染色、マクロファージは抗マウスマクロファージ抗体(F4/80, clone A3-1, ACM, UK)を用いた免疫染色を行った。

C. 研究結果

1)コラーゲン量

Sirius redF3BAを用いて測定した肉芽組織中のコラーゲン量は、TGF- β 単独投与では、4日目に最も増加し8日目には減少した。TGF- β 、CTGF連続投与では、8日目に著明にコラーゲン量が増加していた(図1)。これらの結果は、組織学的所見とほぼ一致した。

また、real-timePCRで測定した肉芽組織中のCOL1A2 mRNA発現量は、TGF- β 単独投与では4日目に最も増加し、8日目には減少した。それに対し、TGF- β /CTGF連続投与では、8日目にCOL1A2 mRNA発現量は増加していた(図2)。

これより、CTGFはTGF- β により誘導されたコラーゲン産生をin vivoで亢進することが示された。

2)コラーゲン遺伝子の転写活性

2、4、6、8日目に肉芽組織を採取しルシフェラーゼ活性を経時的に測定すると、TGF- β 単独投与では4日目にピークを示した。単独投与では、8日目にほぼ0となったのに対し、TGF- β /CTGF連続投与では、ルシフェラーゼ活性は8日目にも高値を維持した(図3)。すなわち、I型コラーゲン遺伝子の転写活性は、CTGFの投与により維持されたと考えられた。

肉芽組織の凍結切片を用いてX-gal染色によるLacZの検出を行い、陽性細胞数を400倍の視野で計測した。TGF- β 3日間投与群に比べ、TGF- β /CTGF連続投与群のX-gal陽性細胞数は有意に高値を示した(図4)。すなわち、CTGFによる線維化には、コラーゲン遺伝子が転写されている線維芽細胞の増加が関与していると考えられた。

3)浸潤細胞数の計測

トルイジンブルー染色にて肥満細胞数を計測すると、TGF- β 3日間投与群で有意に肥満細胞数が増加していた。8日目の肥満細胞数はTGF- β 群がほぼ0になったのに対し、TGF- β /CTGF連続投与群では増加していた(図5)。

F4/80抗体を用いた免疫染色にてマクロファージ数を計測したところ、TGF- β /CTGF連続投与群でマクロファージ数は有意に増加していた(図6)。

これより、肥満細胞やマクロファージの増加は、CTGFによる線維化に何らかの関連があると考えられた。

D. 考察

以前、我々は、TGF- β 単独投与により一過性の肉芽組織が誘導され、TGF- β にひき続き CTGF を投与すると肉芽組織は消失せずに線維化組織が形成されることを組織学的に示した。

今回の検討では、以前我々が作製した皮膚線維化モデルマウスにおける、TGF- β や CTGF 単独投与と TGF- β /CTGF 連続投与のコラーゲン量や COL1A2 の mRNA 発現量は組織学的所見と一致するものであった。つまり、TGF- β は、コラーゲン産生を一過性に誘導する作用があり、CTGF は誘導する作用は少ないが、誘導されたコラーゲン産生を亢進させる作用があると考えられた。

COL1A2 の転写活性は、TGF- β 単独投与では 4 日目をピークに低下し、8 日目にはほぼ 0 となるのに対し、TGF- β /CTGF 連続投与では高値が維持された。さらに、連続投与の 8 日目では COL1A2 遺伝子を発現する線維芽細胞数の増加を認め、CTGF は線維芽細胞数の増加により COL1A2 の転写活性を維持し、コラーゲン産生を亢進させると考えられた。

以上より、TGF- β が線維化を誘導し、CTGF が線維化を維持すると考えられたが、この線維化の機序をさらに検討するために浸潤細胞についての検討を行った。

これまで、肥満細胞やマクロファージが線維化組織で増加していることが報告されていること^{9,10} から、我々は組織染色によりこれらの細胞の検討を行った。TGF- β /CTGF 連続投与で、肥満細胞、マクロファージともに増加しており、CTGF による線維化の維持に関与していると考えられた。これらの細胞は様々なサイトカインやケモカイン

を放出することから、今後はこの皮膚線維化モデルにおいて、サイトカインやケモカインについてもさらに検討する必要があると思われた。

E. 結論

以上、皮膚線維化モデルマウスにおける実験結果より、我々は図 7 に示す強皮症における二段階線維化仮説を考えた。TGF- β は線維化を誘導し CTGF の産生を刺激する。正常部では、CTGF や炎症細胞は消失し線維化も消失するが、強皮症の皮膚硬化部では、CTGF の産生が増加し、線維芽細胞の増加、コラーゲン産生の促進により線維化は維持され、その過程に肥満細胞やマクロファージが関与していると考えられた。

F. 文献

1. Jimenez SA, Htraya E, Varga J.: Pathogenesis of scleroderma. *Collagen. Rheum Dis Clin North Am* 22:647-74, 1996
2. LeRoy EC, Smith EA, Kahaleh MB, Trojanowska M, Silver RM: A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. *Is transforming growth factor beta the answer? Arthritis Rheum* 32:817-25, 1989
3. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR: Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4:637-45, 1993
4. Takehara K: Growth regulation of skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 24 Suppl 1: S70-7, 2000
5. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn

H, Grotendorst GR, Takehara K: Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 105:280-4, 1995

6. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K: Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 27:149-54, 2000

7. Shinozaki M, Kawara S, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takehara K: Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by transforming growth factor beta—simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 240:292-7, 1997

8. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, et al: Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 181:153-9, 1999

9. Isikawa O, Ishikawa H: Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 19: 1202-6, 1992

10. Nishioka K, Kobayashi Y, katayama I, Takijiri C: Mast cell numbers in diffuse scleroderma. *Arch Dermatol* 123:205-8, 1987

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 102 回日本皮膚科学会総会

第 31 回日本臨床免疫学総会

H 知的財産の出願・登録状況

なし

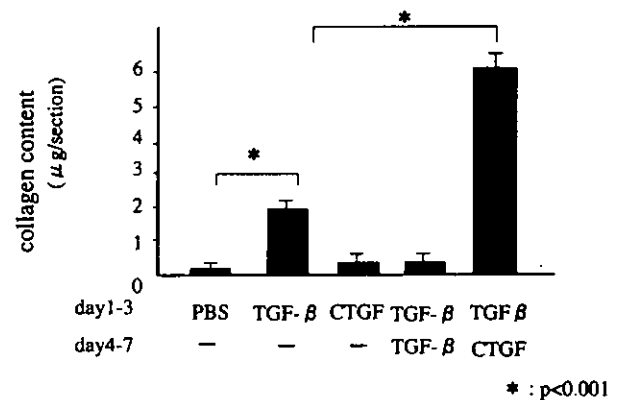


図 1 : TGF-β、CTGF 皮下注後のコラーゲン量の変化

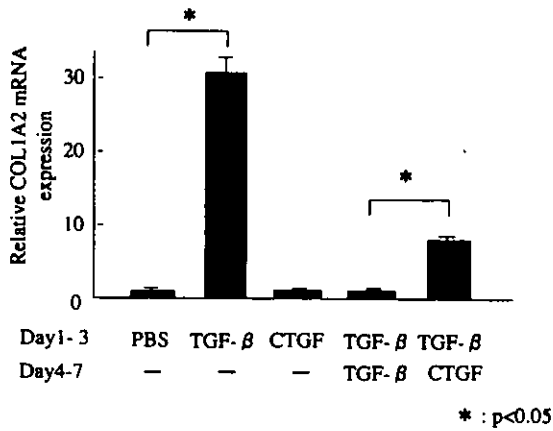


図2：TGF-β、CTGF皮下注後のコラーゲン mRNA 発現量

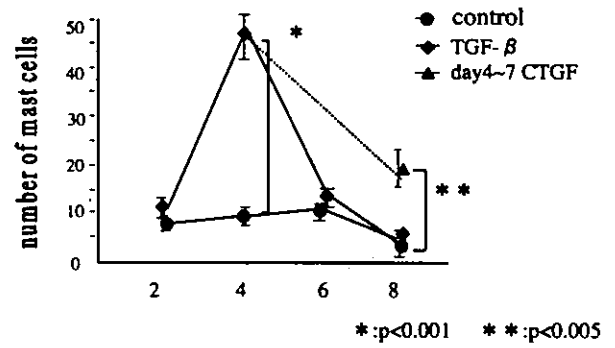


図5：TGF-β、CTGF皮下注後の肥満細胞数の変動

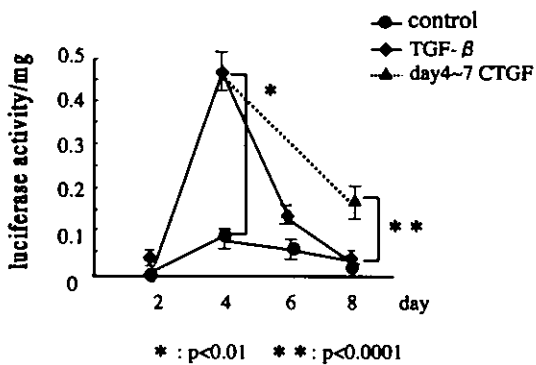


図3：TGF-β、CTGF皮下注後のルシフェラーゼ活性の変動

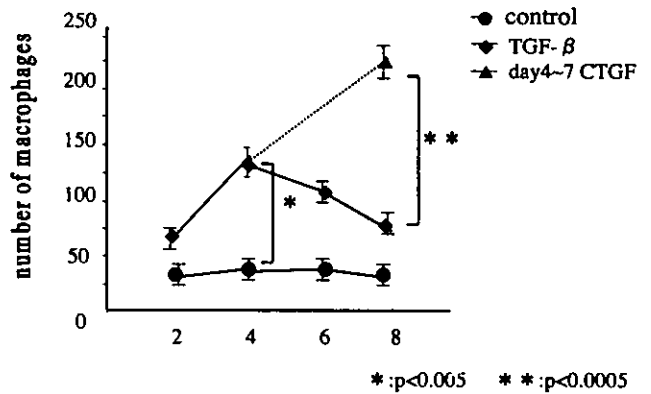


図6：TGF-β、CTGF皮下注後のマクロファージ数の変動

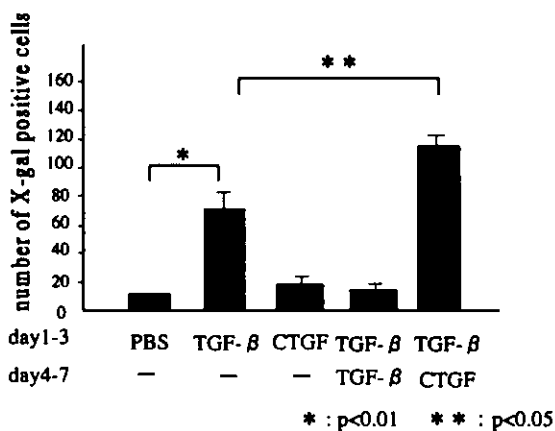


図4：TGF-β、CTGF皮下注後のX-gal陽性線維芽細胞数

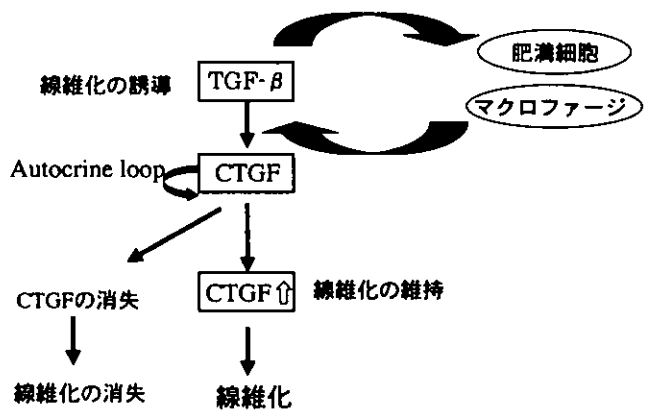


図7：皮膚線維化の機序

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

TGF- β Inhibitor による分化・増殖調節機構の検討

分担研究者	宮園浩平	東京大学大学院医学系研究科分子病理学教授
協力者	近藤美幾	財団法人癌研究会生化学部研究員
協力者	羽生亜紀	財団法人癌研究会生化学部研究補助員
協力者	斉藤正夫	東京大学大学院医学系研究科分子病理学助手
協力者	宮澤恵二	東京大学大学院医学系研究科分子病理学助教授
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

研究内容

TGF- β は細胞の増殖や分化、さらには線維化、血管新生等に深く関与しているが、詳細な分子機構は不明である。本研究ではこれらの機構を解明するために、TGF- β のI型受容体に特異的な阻害物質（SB431542）を用いて、TGF- β による増殖調節や転写活性化、更には Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation (EMT) に対して検討を行ったところ、SB431542 はそれぞれの機能を抑制した。よってこれらの現象には TGF- β のI型受容体からのシグナル伝達が重要であることが示された。

A. 研究目的

TGF- β の作用は、細胞増殖の抑制、分化、線維化、細胞外マトリックスの産生、アポトーシス誘導など多岐にわたり、そのシグナルは細胞表面のセリン・スレオニンキナーゼ型受容体から、Smadとよばれるタンパク質に伝達される。活性化された Smad は核内に移行して、自ら DNA に結合、あるいは種々の転写因子と相互作用することにより標的遺伝子の転写を調節する¹⁾。近年 TGF- β のI型受容体に特異的な阻害物質である SB431542 が同定された^{2,3,4)}。本研究で我々は、TGF- β による細胞増殖、アポ

トーシス、EMT に対して本剤の効果を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

COS-7 細胞, Mv1Lu 細胞: 10% FBS (ウシ胎児血清, JRH BIOSCIENCE)、100 U/ml の Penicillin (Gibco)、100 μ g/ml の Streptomycin (Gibco) 4.5 g/l glucose を含む培養液 (Sigma)
HS72 細胞: 5% FBS、.50 μ M の 2-Mercaptoethanol (Gibco)、2 mM の L-Glutamine (Gibco)、1 mM の Sodium pyruvate (Gibco)、10 mM の HEPES (Gibco)、100 U/ml の Penicillin (Gibco)、

100 µg/ml の Streptomycin (Gibco) を含む RPMI-1640 培養液 (Sigma)

NMuMG 細胞: 10%の FBS、10 µg/ml insulin 100 U/ml の Penicillin (Gibco)、100 µg/ml の Streptomycin (Gibco)、4.5 g/l glucose DMEM 培養液 (Sigma)

いずれも 37 °C、5% CO₂の条件下で培養した。

2) 増殖因子

TGF (Transforming Growth Factor) -β (R&D 社)

BMP (Bone Morphogenetic Protein) -4 (R&D 社)

アクチビン (味の素株式会社から供与)

3) 抗体

マウスモノクローナル抗体 anti-FLAG (M2) (SIGMA)

ラットモノクローナル抗体 anti-HA High Affinity (3F10) (Roche)

Myc 抗体 (Clone9E10)

抗 phospho-Smad2 抗体 (Cell-Signaling)

抗 phospho-Smad1/5/8 抗体 (Cell-Signaling)

Anti-mouse Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody

(Amersham Pharmacia Biotech)

Anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody

(Amersham Pharmacia Biotech)

4) 阻害剤

SB431542 は文献(3)に従って作成したものを
用いた。

5) 免疫沈降法

細胞を Lysis buffer (150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、1% NP-40、1.5% aprotinin、1 mM PMSF) で溶解し、タンパク質を回収した。回収したタンパク質は、Protein Assay (Bio-Rad) でタンパク量を定量し、FLAG 抗体にて 4°C で 2 時間、その後に protein G Sepharose beads にて 1 時間インキュベートした。Lysis buffer で 2 回 wash し、Sample buffer にて溶解後、98 °C 5 分間煮沸して調整した。これらのサンプルを 8.5%にて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離後、Fluoro Trans W Membrane (Pall) ヘセミドライ法にて転写した。メンブレンを Blocking buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、5% Skim milk、0.05% Tween20) にて 30 分間室温でインキュベーションした後、抗 Myc 抗体、抗 phospho-Smad1/5/8 抗体、又は抗 phospho-Smad2 抗体と 4 °C にてオーバーナイトでインキュベートした。その後 2 次抗体として、HRP-conjugated 抗ラット抗体、又は HRP-conjugated 抗ウサギ抗体にて室温で 1 時間インキュベートした。検出には、Enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Pharmacia Biotech) を使用した。

6) Cross-linking Immunoprecipitation

TGF-βは chloramine T 法でヨード化した⁵⁾。COS-7 細胞に TGF-β II 型受容体、恒常活性型 TGF-βI 型受容体と、不活性型 TGF-βI 型受容体の mutant を FUGENE6 (Roche) でトランスフェクションした。24 時間後、ヨード化した

TGF- β を含む 0.9mM CaCl₂, 0.49mM MgCl₂, 1mg/ml の BSA を含む PBS で氷上で3時間インキュベートし、0.27mM DDS(Pierce Chemical Co.) を含む buffer で 15 分間 TGF- β と receptor を架橋した。細胞を 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH7.4), 1 mM EDTA , 10% glycerol, 0.3 mM PMSF を含む buffer で wash し、Lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA , 1% Triton-X 100, 1% sodium deoxycholate, 1.5% aprotinin, 1 mM PMSF) で 60 分 lysis し、FLAG, HA 抗体と 4℃ で一晩、protein-A Sepharose(Amersham Biosciences,) beads で 1 時間インキュベートした。Lysis buffer で 2 回 wash し、Sample buffer にて溶解後、8.5%にて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離後、gel を乾燥させ、BAS 2500(Fuji Photo Film Tokyo)で解析した。

7) Luciferase assay

R42 細胞に FUGENE 6 を用いて必要なプラスミドを各 well に遺伝子導入し、Dual luciferase kit(Promega) を用いてルミノメーターで測定した。また、ルシフェラーゼの活性は sea-pansy luciferase で補正した。

8)細胞増殖

・³H-Tymidine の取り込み

Mv1Lu 細胞を 24 well plate に 1.0 x10⁵ 個/well の細胞密度で duplicate で播種し、TGF- β を希釈して各 well に添加した。48 時間培養後、[methyl-³H]チミジン溶液(Amersham Pharmacia Biotech)を 0.3 μ Ci/well を加えた。

2 時間培養後、洗浄し氷上にて 5%トリクロロ酢酸を 500 μ l ずつ加え、20 分静置した。その後、上清を除き、200 μ l の 1M NaOH を加えて 37℃で 60 分インキュベートし、その後 220 μ l の 1M HCl を加えた。各 well からシンチレーションバイアルに移し、3ml のシンチレーターを加え Beckman LS 6500 で測定した。

・細胞数測定

Mv1Lu 細胞、R42 細胞を 12 well plate に 1.25 x10⁴ 個/well の細胞密度で duplicate で播種し、TGF- β を 1 ng/ml、又は BMP-4 を 50 ng/ml を添加後、37 °C、5% CO₂ の条件下で 48 時間インキュベートした。その後、コールターカウンターにより細胞数を計測した。

9)細胞染色

細胞を 0.75 x10⁵ 個/well で播種し、24 時間後に細胞を 4% ホルマリンで固定し、tetramethylrhodamine B isocyanate (TRITC)-conjugated phalloidin (Sigma- Aldrich) で染色した。

10)Wounding assay

細胞を 6-well plate に 3x10⁵ 個/well で播種し、12 時間後に 100 pM の TGF- β で刺激し、同時に tip で傷をつけた。24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1) 恒常活性型 I 型受容体による Smad のリン酸化 (Fig 1)

COS-7 細胞に恒常的活性型 TGF- β I 型受容体、BMP I 型受容体を過剰発現すると Smad2,

Smad1/5 のリン酸化を認めたが、SB431542 を加えると Smad2 のリン酸化は抑制したが Smad1/5 のリン酸化は抑制しなかった。また、恒常的活性型 TGF- β I 型受容体による Smad3 のリン酸化と Smad3/4 のヘテロダイマー形成も阻害した。

2) 細胞内の Smad2 のリン酸化 (Fig 2)

C2C12 細胞に TGF- β を刺激すると、Smad2 のリン酸化を認めた。さらに SB431542 によりリン酸化が抑制された。

3) Smad と TGF- β I 型受容体との結合 (Fig 3)

SB431542 がどの段階で抑制効果を示すかを Cross linking IP 法にて検討した。I 型受容体によって Smad がリン酸化、活性化されると I 型受容体からすぐに離解するため、Smad と受容体の結合は検出できない (lane 1)。しかし、不活性型 I 型受容体を発現すると、receptor から遊離できないため、結合したままの状態になり、band として検出される (lane 3)。さらに、不活性型 I 型受容体をリン酸化できない type2 の mutant を発現させると、SB431542 の有無にかかわらず Smad は receptor に結合できない (lane 5, 6)。また、type I receptor と、Smad との結合は SB431542 の有無にかかわらず、変化がなかった (lane 4)。以上のことから、SB431542 は II 型受容体ではなく、I 型受容体だけに作用し、Smad のリン酸化を抑制しているということが示された。

4) レポーターアッセイ (Fig 4)

TGF- β , BMP のそれぞれの刺激に対して活性を示す p3TP, 3GC2-Luc に対する SB431542 の効果を検討した。R42 細胞に TGF- β , BMP の恒常活性型受容体を発現させたところ、TGF- β の恒常活性型受容体で p3TP-Luc の活性の上昇を認めるが SB431542 でこれを抑制した。一方 BMP の恒常活性型 receptor では、3GC2-Luc 活性の上昇は SB431542 で抑制されなかった。

5) 細胞増殖 (Fig 5)

TGF- β による増殖機構について Mv1Lu 細胞を用いて検討した。(A) TGF- β によりチミジンの取り込みが抑制されたが、SB431542 はこれを解除した。尚、MG63 細胞では TGF- β により増殖が促進することが知られているが SB431542 により増殖が抑制された⁸⁾。(B) 細胞数測定にても前記と同様の結果を得た。さらに、TGF- β の無刺激状態でも SB431542 により細胞の増殖を認めた。これは、TGF- β の I 型受容体を持たない R42 細胞では認められなかった。(C)。よって、Mv1Lu 細胞では TGF- β がオートクリンに作用することにより細胞増殖に影響を与えることが明らかとなった。

6) アポトーシスの抑制 (Fig 6)

HS72 細胞ではアクチビンによりアポトーシスがおこることが知られている。SB431542 に対する効果を検討したところ、アポトーシスが抑制された。また、BMP では抑制されなかった。

7) Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation (EMT) (Fig 7, 8) TGF- β で EMT が起こることが報告されている NMuMG 細胞を用いて、Phalloidin の染色、Wounding assay を施行した。TGF- β により、stress fiber の形成、紡錘様形態を認め(Fig 7)、さらには運動能が亢進したが、SB431542 によりこれらを抑制した(Fig 8)。

D. 今回の考察

TGF- β による線維化、血管新生、マトリックス産生の亢進や、癌化については以前から多数の報告がある。その中で TGF- β シグナルを抑制することにより起こる現象を例に挙げると、可溶性の dominant negative 型 TGF- β II 型受容体を発現させたマウスでは、癌の転移が著明に抑制される⁶⁾。また、抑制型 Smad である Smad7 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入すると、内在性の Smad7 が抑制され、TGF- β によるコラーゲン産生が増強することが知られている⁷⁾。今回の我々の研究により、SB431542 は TGF- β I 型受容体からの Smad のリン酸化を特異的に抑制していることが再確認された(Fig 9)。そして、Smad pathway の抑制が、TGF- β が起こす様々な現象を抑制することも判明した。これらのことから、今後癌や膠原病をはじめとした様々な疾患への臨床応用が期待される。現段階では *in vitro* の実験のみであるが、今後 *in vivo* での効果を検討することにより、さらなる発展が期待される。

E. 結論

SB431542 は TGF- β の I 型受容体に特異的な阻害物質であり、Smad pathway を抑制することにより、細胞増殖、アポトーシス、EMT が抑制された。よって、強皮症をはじめとする様々な疾患の今後の治療に大きく貢献できる可能性が示唆された。

F. 文献

- 1) 鈴木裕之、宮園浩平：実験医学 2003, Vol.21(2): 184-189
- 2) James F.Callahan et al: J.Med.Chem. 2002, Vol.45: 999-1001
- 3) N. J. Laping et al: Mol.Pharmacol. 2002, Vol.62: 58-64
- 4) Gareth J. Inman et al: Mol.Pharmacol. 2002, Vol.62: 65-74
- 5) Frolik CA et al: J.Biol.Chem.1984, Vol.259: 10995-11000
- 6) Muraoka, R.S.et al.: J.Clin.Invest. 2002, Vol 109: 1551-1559
- 7) Chen SJ et al: J.Cell.physiol.2000, Vol.183: 381-392
- 8) Matsuyama et al: Cancer Res. 2003, Vol.63: 7791-7798

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuyama, S., Kondo, M., Saitoh, M., Shimizu, K., Aburatani, H., Mishima, H.K., Imamura, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2003) SB-431542 and Gleevec inhibit TGF- β -induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 63 (22), 7791-7798.
2. Watabe, T., Nishihara, A., Mishima, K., Yamashita, J., Shimizu, K., Miyazawa, K., Nishikawa, S., and Miyazono, K. (2003) TGF- β receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Biol.* 163(6), 1303-1311.
3. Koinuma, D., Shinozaki, M., Komuro, A., Goto, K., Saitoh, M., Hanyu, A., Ebina, M., Nukiwa, T., Miyazawa, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2003) Arkadia amplifies TGF- β superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J.* 22 (24), 6458-6470.
4. Kondo, M., Suzuki, H., Takehara, K., Miyazono, K., and Kato, M. (2004) Transforming growth factor- β signaling is differentially inhibited by Smad2D450E and Smad3D407E. *Cancer Sci.* 95, 12-17.
5. Kahata, K., Hayashi, M., Asaka, M., Hellman, U., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S., Imamura, T., and Miyazono, K. (2004) Regulation of transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein signaling by transcriptional co-activator GCN5. *Genes Cells*, in press.
6. Takeda, M., Mizuide, M., Oka, M., Watabe, T., Inoue, H., Suzuki, H., Fujita, T., Imamura, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2004) Interaction with Smad4 is indispensable for suppression of BMP signaling by c-Ski. *Mol. Biol. Cell* in press.
7. Maeda, S., Hayashi, M., Komiya, S., Imamura, T., and Miyazono, K. (2004) Endogenous TGF- β signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J.* in press.

2. 学会発表

American Association for Cancer Research

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

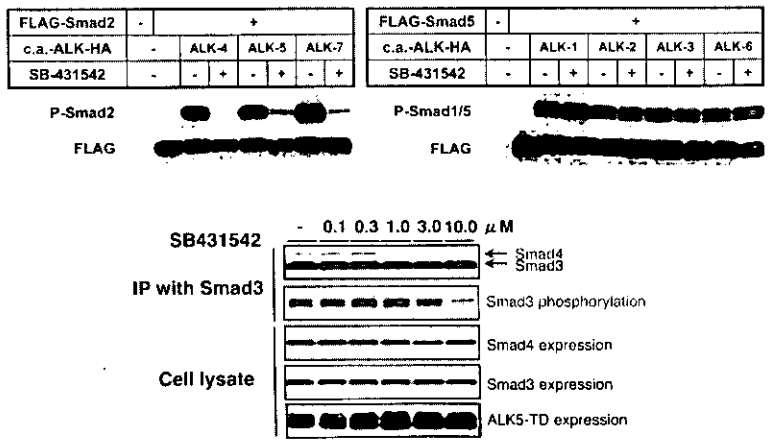


Fig. 1 恒常的活性型TGF- β , BMP I型受容体によるSmadのリン酸化とSB431542の効果。

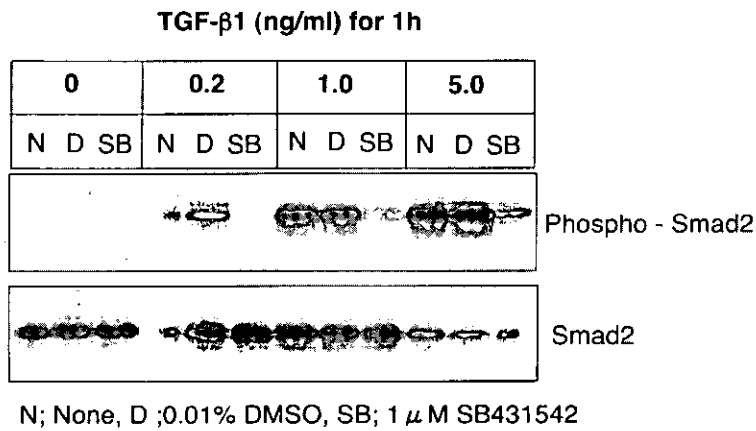


Fig. 2 TGF- β 刺激によるSmad2のリン酸化とSB431542の効果。

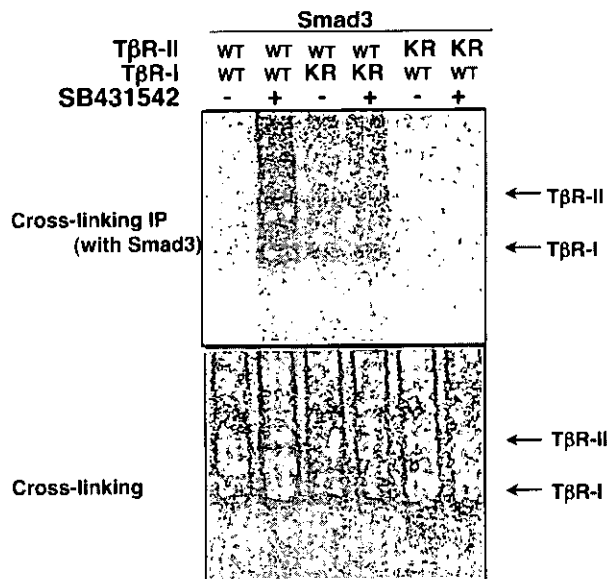


Fig. 3 I型、II型受容体に対するSB431542の効果。左をlane 1とした。

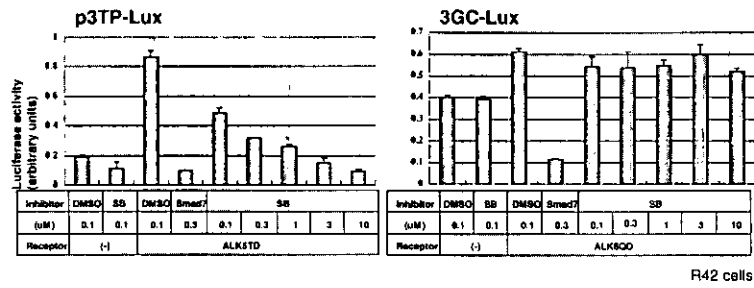


Fig. 4 SB431542によるTGF-β, BMPの転写活性への効果。

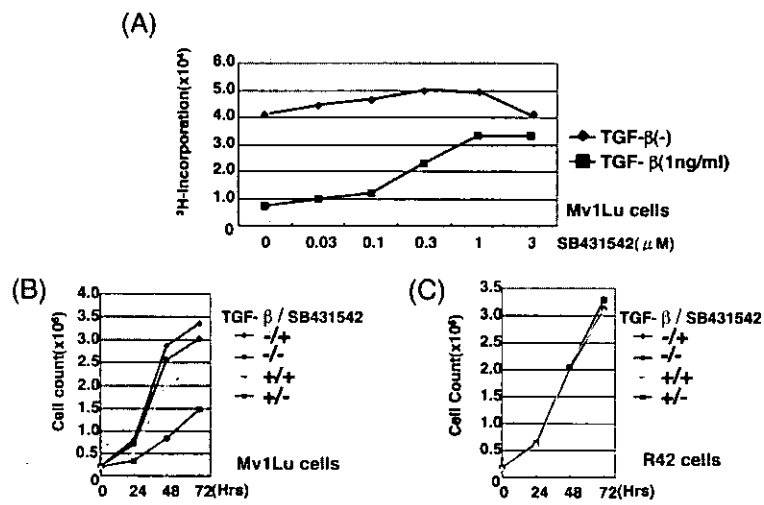


Fig. 5 Mv1Lu 細胞でのTGF-βによる増殖抑制とSB431542の効果。

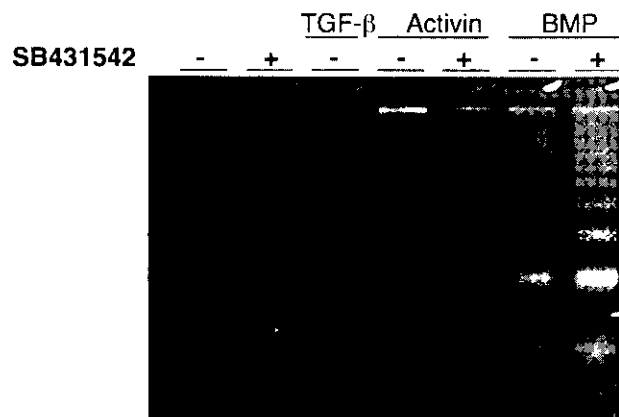


Fig. 6 HS72 細胞でのAアクチビンによるアポトーシスとSB431542の効果。

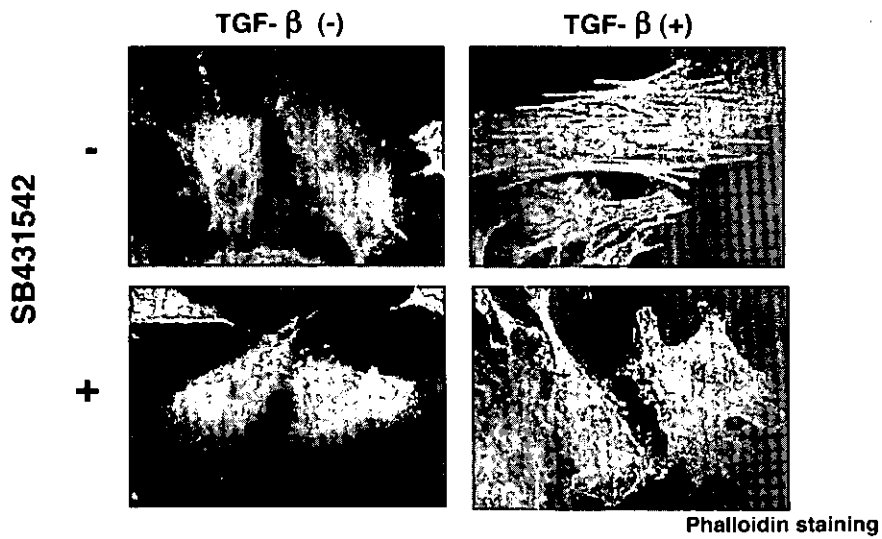


Fig. 7 NMuMG 細胞におけるTGF-βで誘導されるEMTとSB431542の効果。

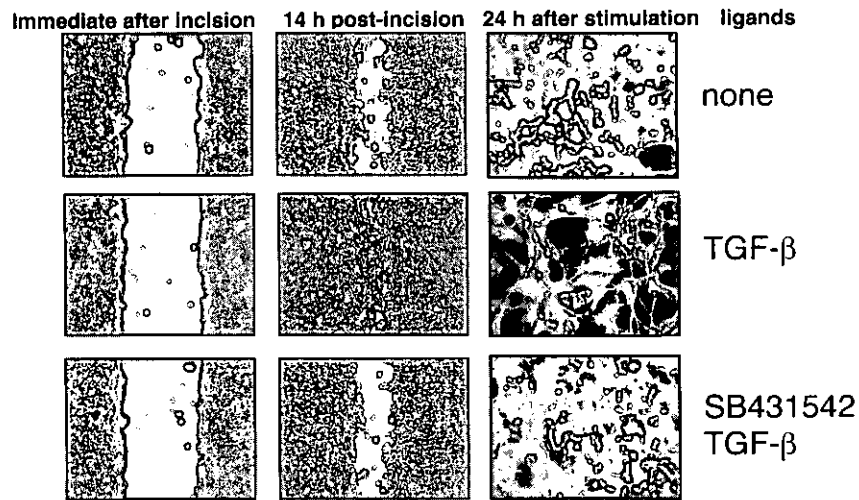


Fig. 8 NMuMG 細胞におけるTGF-βでの細胞運動能とSB431542の効果。

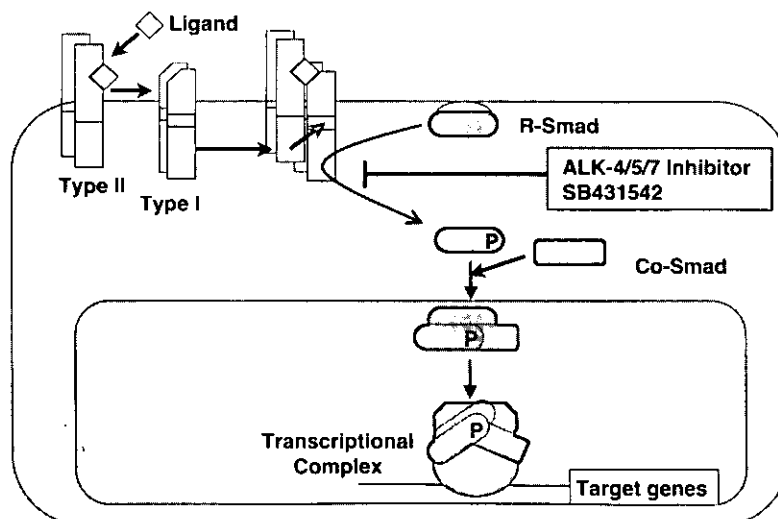


Fig. 9 SB431542の作用機序。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

TGF- β /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 東海大学医学部基盤診療学系助教授
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 東海大学医学部基盤診療学系教授
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- β /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のみ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) 上流の組織特異的エンハンサー・プロモーターを用いて GFP あるいは抑制因子 YB-1 を発現させるアデノウイルスベクターを作製した。これらのベクターをマウスの尾静脈より静注すると、対照として CAG 発現ユニットを用いた場合には正常肝ならびに四塩化炭素投与後の傷害肝のいずれにおいても肝実質細胞と非実質細胞に GFP の強い発現がみられた。これに対して、COL1A2 エンハンサー・プロモーターによる GFP の発現は正常肝では全く観察されず、四塩化炭素投与後の傷害肝においては主として壊死巣周囲の星細胞にその発現が認められた。この系を用いて、COL1A2 エンハンサー・プロモーターにより転写抑制因子 YB-1 を発現させたところ、四塩化炭素投与後の COL1A2 プロモーター活性の上昇が抑制され、臓器線維症の治療に有用となる可能性が示唆された。

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- β はCOL1A2の転写を促進する最も重要な液性因子であり、近年その細胞内シグナル伝達物質として Smad と総称される一群のタンパク質が同定された。

したがって、TGF- β /Smad シグナル伝達系に対する拮抗阻害は臓器線維症の治療に有用と

考えられるが、実際の臨床応用にあたっては線維化組織のみで抑制因子を発現させて正常組織への影響をいかに最小限にとどめるかが肝要である。今回、COL1A2 上流の組織特異的エンハンサー・プロモーターを用いて TGF- β /Smad シグナルに拮抗する転写抑制因子 YB-1 を強制発現させ、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) アデノウイルスベクター

COL1A2 の転写開始部位の上流-17.0 kb から -15.5 kb に存在する組織特異的エンハンサー配列を同遺伝子の-350 から+54 塩基間の最小プロモーターに接続し、これらにより Green fluorescence protein (GFP)あるいは YB-1 を発現させるアデノウイルスベクター (COL/GFP ならびに COL/YB-1)を構築した。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 あるいは YB-1 を強制発現させるアデノウイルスベクター (CAG/GFP ならびに CAG/YB-1) を作製した。

2) アデノウイルス感染実験

上記のアデノウイルスベクター、 1×10^9 pfu を、未処置あるいは四塩化炭素投与直後の COL1A2 プロモーター/ルシフェラーゼ・トランスジェニックマウスの尾静脈より静注した。ウイルス静注 72 時間後にマウスを犠牲死させて、肝における GFP の局在を共焦点レーザー顕微鏡で、YB-1 発現による COL1A2 プロモーター活性化の抑制をルシフェラーゼアッセイにより解析し、COL1A2 エンハンサー・プロモーターを用いた場合と CAG 発現ユニット

を用いた場合とで比較検討した。

3) 免疫蛍光染色

肝組織における活性化星細胞の同定は、抗平滑筋アクチン抗体を用いた免疫蛍光染色により行い、共焦点レーザー顕微鏡下に GFP との共発現を解析した。

C. 研究結果

CAG 発現ユニットによる GFP の発現は、正常肝組織・四塩化炭素投与後肝組織のいずれにおいても、肝実質細胞ならびに非実質細胞に強く認められた。これに対して、COL1A2 エンハンサー・プロモーターによる GFP 発現は正常肝組織では全く認められず、四塩化炭素投与 72 時間後に主として壊死巣周囲の非実質細胞にその発現が認められた (図 1)。これらの GFP 陽性細胞の少なくとも一部は平滑筋アクチン染色が陽性であり、活性化星細胞と考えられた。

この COL1A2 エンハンサー・プロモーターの系を用いて YB-1 を強制発現させると、四塩化炭素投与後にみられる COL1A2 プロモーターの活性化が有意に抑制された (図 2)。

なおこの際、心筋・肺・腎・皮膚などの他臓器において GFP の発現はみられず、YB-1 の強制発現によっても組織学的に著変を認めなかった。

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- β 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- β 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- β -responsive element (TbRE)と命名した¹⁾。また、TbREにはSp1とSmad3/Smad4が結合すること²⁾、TGF- β 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も明らかにした³⁾。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⁴⁾や腎メサンジウム細胞⁵⁾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- β /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。転写調節因子YB-1によるCOL1A2転写の抑制は、本研究協力者らによりつい最近その作用機序が明らかにされた。YB-1はCOL1A2転写に抑制的にはたらくIFN γ の細胞内伝達物質のひとつとして、IFN γ 刺激を受けた皮膚線維芽細胞において細胞質から核内へと移行する⁶⁾。TbREの約100塩基下流に存在するIFN γ -response element (IgRE)に結合してCOL1A2の基礎転写を抑制する⁶⁾とともに、TbREに結合するSmad3とp300 coactivatorとのタンパク間相互作用を阻害することで、TGF- β によるCOL1A2転写の促進に対しても拮抗的にはたらく⁷⁾。

TGF- β /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⁸⁾あるいは可溶型⁹⁾TGF- β 受容体を用いた肝

線維症の治療や、抑制型Smad7を用いたプレオマイシン誘発肺線維症¹⁰⁾ならびに胆管結核による肝線維症¹¹⁾の進展抑制が報告されている。しかしながら、これらの遺伝子治療はTGF- β 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- β 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- β 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。

本研究は、COL1A2上流の組織特異的エンハンサー・プロモーター¹²⁾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り、実際この系を用いてYB-1を発現させると四塩化炭素投与後のCOL1A2プロモーターの活性化が有意に抑制された。しかもこの際、他臓器にはGFPの発現は認められず、組織学的にも著変を認めなかった。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、この点はCAG発現ユニットや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る。

E. 結 論

COL1A2の組織特異的エンハンサーを用いることで、TGF- β /Smadシグナルに対する拮抗抑制因子を炎症・線維化組織において特異的に発現させることが可能となった。この系を用