

いて転写抑制因子 YB-1 を発現させると、四塩化炭素投与による COL1A2 プロモーターの活性化が有意に抑制されることを明らかにした。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) 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.
- 2) 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.
- 3) Zhang W, Oul J, Inagaki Y, Greenwel P, Ramirez F. Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates TGF $\beta 1$  stimulation of  $\alpha(I)$  collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem* 2000; 275: 39237-39245.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Higashi K, Inagaki Y, Suzuki N, Mitsui S, Mauviel A, Kaneko H and 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* 278: 5156-5162, 2003
- 7) Higashi K, Inagaki Y, Fujimori K, Nakao A, Kaneko H and Nakatsuka I: Interferon- $\gamma$  interferes with transforming growth factor- $\beta$  signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J Biol Chem* 278: 43470-43479, 2003
- 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) Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, ten Dijke P, Gressner AM. *Smad7* prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 125: 178-191, 2003
- 12) 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.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kiyoshi Higashi, **Yutaka Inagaki**, Noriyuki Suzuki, Shinichi Mitsui, Alain Mauviel, Hideo Kaneko and Iwao Nakatsuka: Y-box binding protein YB-1 mediates transcriptional repression of human  $\alpha 2(I)$  collagen gene expression by interferon- $\gamma$ . *J Biol Chem* 278: 5156-5162, 2003
- 2) Fukiko Furukawa, Koichi Matsuzaki, Shigeo Mori, Yoshiya Tahashi, Katsunori Yoshida, Yasushi Sugano, Hideo Yamagata, Masanori Matsushita, Toshihito Seki, **Yutaka Inagaki**, Mikio Nishizawa, Junichi Fujisawa and Kyoichi Inoue: p38 MAPK mediates fibrogenic signal through *Smad3* phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology* 38: 879-889. 2003
- 3) **Yutaka Inagaki**, Tomoyuki Nemoto, Miwa Kushida, Yin Sheng, Kiyoshi Higashi, Kazuo Ikeda, Norifumi Kawada, Fumiaki Shirasaki, Kazuhiko Takehara, Kota Sugiyama, Mitsukiyo Fujii, Hiroshi Yamauchi, Atsuhito Nakao, Benoit de Crombrughe, Tetsu Watanabe and Isao Okazaki: Interferon  $\alpha$  down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 38: 890-899, 2003
- 4) Kiyoshi Higashi, **Yutaka Inagaki**, Ko Fujimori, Atsuhito Nakao, Hideo Kaneko and Iwao Nakatsuka: Interferon- $\gamma$  interferes with transforming growth factor- $\beta$  signaling through direct interaction of YB-1 with *Smad3*. *J Biol Chem* 278: 43470-43479, 2003
- 5) Yutaka Kanamaru, Atsuhito Nakao, Yuichi Tanaka, **Yutaka Inagaki**, Hiroko Ushio, Isao Shirato, Satoshi Horikoshi, Ko Okumura, Hideoki Ogawa and Yasuhiko Tomino: Involvement of p300 in TGF- $\beta$ /*Smad*-pathway-mediated  $\alpha 2(I)$  collagen expression in mouse mesangial cells. *Nephron Exp Nephrol* 95: e36-e42,

2003

- 6) Yutaka Inagaki, Tomoyuki Nemoto, and Atsuhito Nakao: Transcriptional activation of type I collagen gene during hepatic fibrogenesis. In: Extracellular Matrix and the Liver-Approach to Gene Therapy, Okazaki I, Ninomiya Y, Friedman SL and Tanikawa K (Eds), Academic Press, New York, 2003, pp.233-248.

## 2. 学会発表

- 1) 稲垣 豊、池田一雄、渡辺 哲、岡崎 勲: Interferon  $\gamma$ /YB-1 シグナリングによるコラーゲン遺伝子の転写抑制. 第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月 22 日、福岡
- 2) Yutaka Inagaki: Transcriptional regulation of type I collagen gene expression by transforming growth factor- $\beta$  and Smad signaling. 第 35 回日本結合組織学会学術大会 (大高賞受賞記念講演)、2003 年 6 月 7 日、山口

- 3) 稲垣 豊、渡辺 哲、岡崎 勲: アルコール性肝線維症の進展を規定する遺伝的素因. 第 38 回日本アルコール・薬物医学会総会シンポジウム (2) 「アルコール性肝・膵線維化の発生機序: 研究の現況と対策」、2003 年 7 月 4 日、東京
- 4) 稲垣 豊: 肝線維化の可逆性と治療の展望 - 肝硬変は治るのか -. 日本消化器病学会北陸支部第 10 回教育講演会、2003 年 11 月 30 日、金沢
- 5) 稲垣 豊、櫛田美和、渡辺 哲、岡崎 勲: TGF- $\beta$ /Smad シグナリングからみた肝線維症の治療戦略. 第 17 回肝類洞壁細胞研究会、2003 年 12 月 14 日、東京

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

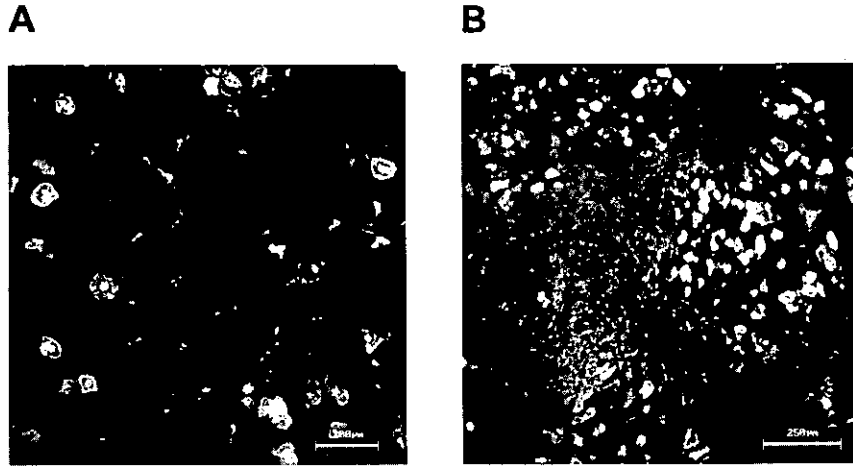


図 1 : COL1A2 エンハンサー・プロモーターによる GFP の発現

COL1A2 の転写開始部位の上流、-17 kb から-15, 5 kb 間のエンハンサーおよび-350 から+54 塩基間のプロモーターによって GFP を強制発現させるアデノウイルスベクター (1x10E9 pfu) を尾静脈から静注し、四塩化炭素投与による傷害肝における発現を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した(A)。対照として、CAG 発現ユニットを用いて同様に傷害肝組織において GFP を発現させた(B)。

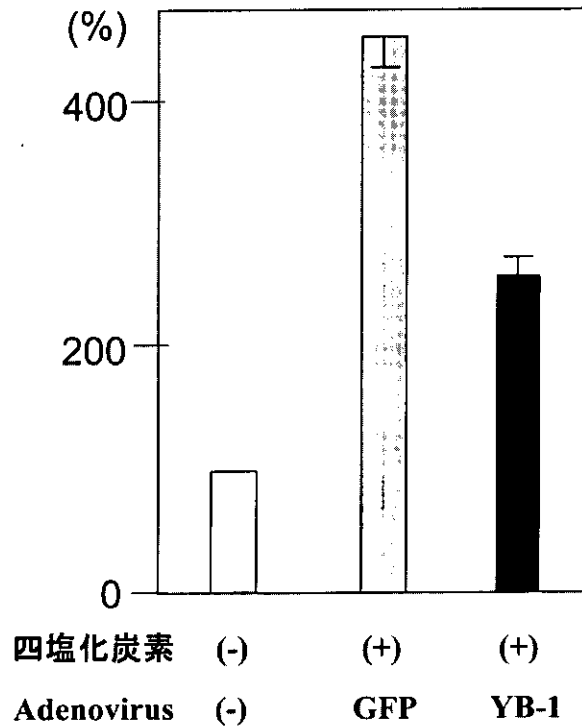


図 2 : YB-1 の組織特異的発現による COL1A2 プロモーター活性の抑制

図 1 と同じ COL1A2 エンハンサー・プロモーターを用いて、四塩化炭素投与傷害肝において GFP あるいは転写抑制因子 YB-1 を強制発現させた場合の COL1A2 プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにより解析した。四塩化炭素未投与の正常肝における COL1A2 プロモーター活性を 100 として相対活性を示している。

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刺激による human α2(I) collagen 遺伝子発現亢進  
における PI3-kinase 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助手  
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 三村佳弘 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-βは線維化を強力に誘導する因子であり、強皮症皮膚線維芽細胞の細胞外マトリックス産生亢進において中心的な役割を果たしている。最近、PI3-kinase 活性を抑制することにより、TGF-β刺激による Smad2 のリン酸化が有意に抑制されることが報告された。今回我々は、TGF-β刺激により Smad3 依存性に発現が亢進するヒトα2(I)コラーゲン遺伝子に注目し、PI3-kinase 活性の抑制が Smad3 のリン酸化に及ぼす影響およびヒトα2(I)コラーゲン遺伝子の発現に及ぼす影響について検討した。正常皮膚線維芽細胞においては、PI3-kinase inhibitor LY294002 は TGF-β刺激によるヒトα2(I)コラーゲンの mRNA の発現亢進を有意に抑制した。LY294002 および PI3-kinase p85 subunit の dominant negative mutant は TGF-β刺激によるヒトα2(I)コラーゲンの転写活性の亢進を有意に抑制し、その作用は Smad3 結合部位を介していた。また、TGF-β刺激による Smad3 のリン酸化は、LY294002 および 2xFYVE の一過性強発現により有意（約 50%）に抑制された。以上の結果から、正常皮膚線維芽細胞において TGF-β刺激による Smad3 の効率的なリン酸化には PI3-kinase 活性および anchor protein として機能する FYVE domain protein が存在することが示された。一方、強皮症皮膚線維芽細胞では、LY294002 あるいは 2xFYVE の一過性強発現によりヒトα2(I)コラーゲン遺伝子の発現は有意に抑制され、Smad3 の恒常的なリン酸化はほぼ完全に抑制された。以上の結果から、強皮症皮膚線維芽細胞における autocrine TGF-β signaling の確立には PI3-kinase 活性が不可欠であることが示された。

#### A. 研究目的

TGF-β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<sup>1</sup>。強皮症皮膚線維芽細胞では、TGF-β type I

receptor および type II receptor の発現が亢進していること<sup>2</sup>、また、抗 TGF-β抗体および TGF-β1 antisense oligonucleotide により type I collagen の発現が抑制されること<sup>3</sup>から、汎発

性強皮症患者の病態において、TGF- $\beta$ が中心的な役割を果たしている可能性が考えられている。

TGF- $\beta$ 刺激は、TGF- $\beta$  type I receptor が細胞内 second messenger である Smad2/3 をリン酸化することにより細胞内へと伝達される。リン酸化された Smad2/3 は Smad4 と結合したのち、核内へと移行し、転写因子として、標的遺伝子の発現を調節する<sup>4</sup>。TGF- $\beta$ 刺激による転写制御が Smad2/3 のどちらに依存するかは、標的遺伝子により異なるが、皮膚線維芽細胞においては、TGF- $\beta$ 刺激によるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の発現亢進は Smad3 依存性で、Smad2 非依存性であることが明らかにされている<sup>5</sup>。

今回我々が注目した PI3 kinase は、phosphatidyl inositol をリン酸化し、phosphatidyl inositol 3' phosphate (PI3P)を産生する作用がある<sup>6,7</sup>。Smad2 の anchor protein である Smad anchor for receptor activation (SARA)は PI3P を介して early endosome に recruit されるため、PI3 kinase 活性の抑制は SARA の mislocalization を誘導し、結果的に TGF- $\beta$ 刺激による Smad2 のリン酸化を抑制する<sup>6,7</sup>。一方、Smad3 に関しては、TGF- $\beta$ 刺激により、SARA 非依存性にリン酸化することは明らかにされているが<sup>8</sup>、PI3 kinase 活性の抑制が TGF- $\beta$ 刺激による Smad3 のリン酸化に与える影響、およびヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の発現亢進に及ぼす影響は検討されていない。

今回我々は、PI3 kinase が TGF- $\beta$ 刺激によるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子発現亢進に与える影響、および PI3 kinase が強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子発現に与える影響を明らかにすることを目的に検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞は、発症2年以内で diffuse type に分類される汎発性強皮症患者の皮膚硬化を伴う前腕伸側より得た。正常皮膚線維芽細胞は、汎発性強皮症患者と年齢および性別が一致した健常人の前腕伸側より得た。これらの検体の採取は被検者の informed consent および施設の承認を得た上で行った。培養線維芽細胞は 10%仔牛血清 (FBS)、2mM L-グルタミンと 50 $\mu$ g/ml ゲンタシン含有 MEM にて 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、95% air にて継代し、継代3代目から6代目の細胞を用いた。

### 2) 免疫プロットティング

#### ① 細胞から抽出した蛋白質を用いる場合

皮膚線維芽細胞を 4 $^{\circ}$ C の phosphate buffered saline (PBS)で洗浄し、1% Triton X-100, 50mM Tris-HCl [pH 7.4], 150mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を含有する lysis buffer にて溶解した。不溶分画は 15 分間 20000G 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、各 10  $\mu$ g の検体を 10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。その後、ニトロセルロース膜を特異的抗体と反応させた。horseradish peroxidase と結合した二次抗体と反応させ enhanced chemiluminescence で発光させ、X-ray フィルムに感光させた。

#### ②培養液中に分泌された蛋白質を用いる場合

6 well plate に線維芽細胞を撒き、10%FBS 含有 MEM 中で confluence まで培養した後、serum free medium 中で 24 時間培養した。その後、新

しい serum free medium に交換し、更に 24 時間培養した後、10~20 $\mu$ l の培養液を用いて、上記と同様に免疫ブロット法を行った。Loading する培養液の量は細胞数により補正した。

### 3) RNA 抽出とノーザンブロットニング

Total RNA は Isogen (ニッポンジーン) を用いて抽出した。2  $\mu$ g の total RNA を 1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写した。メンブレンは UV-crosslink し、 $\alpha$ 2(I) collagen, GAPDH に対する DNA probe と反応させ、X-ray フィルムに感光させた。

### 4) プラスミド

-772 COL1A2/CAT construct はヒト  $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子 promoter の-772 から+58 領域に chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter 遺伝子を結合させて作成した。その他の deletion mutation construct は過去の報告と同様の方法を用いて作成した<sup>9</sup>。Smad3 binding site の部位特異的変異の導入は QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて行った<sup>10</sup>。Plasmid は全て CsCl にて 2 回精製した後、transient transfection assay に用いた。

### 5) DNA transfection および chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay

皮膚線維芽細胞を直径 100mm dish に  $1 \times 10^5$  個播種し、48 時間後 FuGENE<sup>TM</sup>6 を用いて、各種 plasmid を transfection した。細胞は 48 時間培養し、その後 reporter lysis buffer (Promega) にて溶解した。不溶分画は 2 分間 20000G 遠心にて除去した。CAT 活性を測定し、 $\beta$ ガラクトシダーゼ活性で補正した。

### 6) DNA affinity precipitation

Smad3 binding site である CAGA motif を 3 個持つ 3 x CAGA oligo (5'-TCGAGAGCCAGACAAGGAGCCAGACAAGGAGCCAGACACTCGAG)および CAGA motif の mutation を 3 個持つ 3 x CAGA-M oligo (5'-TCGAGAGCTACATAAAAAGCTACATATTTAGCTACATACTCGA)を合成し、5'端を biotin で標識した。培養皮膚線維芽細胞から蛋白を抽出し、500  $\mu$ g(1mg/ml)の蛋白抽出液と 5 $\mu$ g の poly(dI-dC)を 4 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた後、500 pmol の二本鎖 oligo(3 x CAGA および 3 x CAGA-M)と 4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。その後、65  $\mu$ l の streptavidin-agarose を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。Protein-DNA-streptavidin-agarose 複合体を lysis buffer で 3 回洗浄し、sample buffer を加えて 3 分間煮沸した後、遠心して得られた上清を、10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写し、抗 Smad2/3 抗体と反応させた。

### 7) mRNA stability の検討

$\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子 mRNA の stability は、Northern blotting により得られた結果を片対数グラフに blot し、得られた傾き m から以下の公式を用いて算出した。半減期 ( $t_{1/2}$ ) =  $0.693/k$  ( $k=-2.3m$ )

### 8) 統計学的検討

平均値の比較には Mann-Whitney test を用いた。p<0.05 を有意とした。

## C. 研究結果

1) LY294002 が正常皮膚線維芽細胞のヒト  $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子発現に及ぼす影響

まず初めに、正常皮膚線維芽細胞を用いて、TGF- $\beta$ 刺激下および非刺激下において、PI3 kinase の特異的 inhibitor である LY294002 が type I collagen 蛋白の発現に及ぼす影響について検討した。図 1 に示すように、LY294002 は無刺激下、および TGF- $\beta$ 刺激下において、正常皮膚線維芽細胞の type I collagen 蛋白の発現を用量依存性に抑制した。図 2 に同じ条件下での、Northern blotting 法の結果を示す。無刺激下、および TGF- $\beta$ 刺激下において、LY294002 はヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の mRNA の発現量を用量依存性に抑制した。

2) LY294002 が正常皮膚線維芽細胞におけるヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の mRNA stability に及ぼす影響

次に、転写阻害剤である actinomycin D を用いて、LY294002 が正常皮膚線維芽細胞におけるヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の mRNA stability に与える影響を検討した(図 3)。無刺激下では、LY294002 は用量依存性にヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の mRNA stability を低下させた。TGF- $\beta$ 刺激下では TGF- $\beta$ 非刺激下と比較して、ヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の mRNA stability は有意に上昇したが、TGF- $\beta$ 刺激下においても LY294002 は用量依存性にヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の mRNA stability を低下させた。

3) PI3 kinase 活性の抑制が正常皮膚線維芽細胞におけるヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

次に、LY294002 が正常皮膚線維芽細胞におけるヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の転写活性に与える影響を検討した(図 4)。無刺激下では、LY294002 はヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の転写

活性に有意な影響を及ぼさなかった。一方、TGF- $\beta$ 刺激下では、LY294002 はヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の転写活性を用量依存性に有意に抑制した。PI3 kinase p85 subunit の dominant negative mutant (DN p85) およびヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の promoter の deletion を用いて、更に検討した(図 5)。DN p85 の一過性強発現は、無刺激下では、ヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の promoter 活性に有意な影響を及ぼさなかったが、TGF- $\beta$ 刺激下ではヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の転写活性を有意に抑制した。この抑制効果は、-353 deletion mutant, -264 deletion mutant では、ほぼ同程度に認められたが、-181 deletion mutant では完全に消失した。-264~-181 領域には Smad3 binding site があることから、次に、Smad binding site の site directed mutation, -353m を用いて検討した。-353m では TGF- $\beta$ 刺激下における DN p85 による転写抑制効果は完全に消失した。以上より、TGF- $\beta$ 刺激下における、DN p85 の転写抑制効果は Smad3 を介していることが示された。

4) LY294002 が正常皮膚線維芽細胞における Smad3 のリン酸化および DNA 結合能に及ぼす影響

次に、LY294002 が正常皮膚線維芽細胞における Smad3 のリン酸化に与える影響を検討した。図 6 は LY294002 にて 1 時間処理したのち、2ng/ml の TGF- $\beta$ で刺激し、更に 1 時間後の Smad3 のリン酸化を示している。30 $\mu$ M の LY294002 により、TGF- $\beta$ 刺激による Smad3 のリン酸化は約 50%抑制された。同様の条件下にて、3xCAGA を probe として用いて、DNA affinity precipitation を行った。図 7 に示すように、LY294002 は Smad3 の 3xCAGA への結合



能を約 50%抑制した。以上の結果より、PI3 kinase 活性の抑制は、Smad3 のリン酸化を抑制することによって、TGF- $\beta$ 刺激によるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写亢進を抑制していると考えられた。

5) 2xFYVE の一過性強発現が正常皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性および Smad3 のリン酸化に及ぼす影響

PI3 kinase 活性の抑制により Smad3 のリン酸化が抑制される機序として、Smad3 の anchor protein の mislocalization が関与している可能性について検討するため、Hrs 蛋白の PI3P 結合部位である FYVE domain を 2 つ持つ 2xFYVE を一過性強発現させ、ヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性および Smad3 のリン酸化がどのように変化するかを検討した。図 8 に示すように 2xFYVE の一過性強発現により、正常皮膚線維芽細胞における TGF- $\beta$ 刺激によるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性の亢進は有意に抑制された。一方、2xFYVE の抑制効果は-353m では完全に消失した。また、2xFYVE の一過性強発現により、TGF- $\beta$ 刺激による Smad3 のリン酸化も有意に抑制された (図 9)。以上の結果より、Smad3 には anchor protein が存在しており、PI3 kinase 活性の抑制は anchor protein の mislocalization を誘導することによって TGF- $\beta$ 刺激による Smad3 のリン酸化を抑制していると考えられた。

6) LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞における type I collagen 蛋白およびヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の mRNA の発現量に及ぼす影響

次に、強皮症皮膚線維芽細胞を用いて同様の

実験を行った。LY294002 は、強皮症皮膚線維芽細胞の type I collagen 蛋白の発現、およびヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の mRNA の発現を用量依存性に抑制した (図 10, 11)。

7) LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の mRNA stability に及ぼす影響

転写阻害剤である actinomycin D を用いて、LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の mRNA stability に与える影響を検討した (図 12)。強皮症皮膚線維芽細胞のヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の mRNA stability は正常皮膚線維芽細胞と比較して有意に上昇していた。LY294002 は強皮症皮膚線維芽細胞においても用量依存性にヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の mRNA stability を低下させた。

8) PI3 kinase 活性の抑制が強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性に与える影響を検討した (図 13)。強皮症皮膚線維芽細胞のヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性は正常皮膚線維芽細胞と比較して有意に亢進していた。LY294002 は強皮症皮膚線維芽細胞においてもヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性を用量依存性に有意に抑制した。また、DN p85 の一過性強発現によっても、強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性は有意に抑制された (図 14)。

9) LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞における

Smad3 のリン酸化および DNA 結合能に及ぼす影響

まず初めに、正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞で Smad3 のリン酸化の程度 (図 15) および Smad3 の DNA 結合能 (図 16) について比較した。強皮症皮膚線維芽細胞では、無刺激下において Smad3 の恒常的なリン酸化を認め、また Smad3 は DNA と恒常的に結合していた。TGF- $\beta$ 刺激後 1 時間では、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞はほぼ同程度の Smad3 の強いリン酸化と Smad3 と DNA の強い結合を認めた。次に、LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞における Smad3 のリン酸化 (図 17) および Smad3 の DNA 結合能 (図 18) に及ぼす影響について検討した。強皮症皮膚線維芽細胞における Smad3 の恒常的なリン酸化および Smad3 と DNA の結合能の亢進は 30 $\mu$ M の LY294002 にて 24 時間処理することにより、ほぼ完全に抑制された。

10) 2xFYVE の一過性強発現が強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性および Smad3 のリン酸化に及ぼす影響

2xFYVE を一過性強発現させ、強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性の亢進および Smad3 の恒常的なリン酸化に anchor protein が不可欠であるか否かについて検討した。図 19 に示すように 2xFYVE の一過性強発現により、強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性の亢進は有意に抑制された。また、2xFYVE の一過性強発現により、TGF- $\beta$ 刺激による Smad3 のリン酸化も有意に抑制された (図 20)。以上の結果から、強皮症皮膚線維芽細胞においても、

PI3 kinase 活性の抑制は anchor protein の mislocalization を誘導することによって Smad3 の恒常的なリン酸化を抑制し、ヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性を抑制している可能性が示された。

#### D. 考案

今回の検討により、

- ① 正常皮膚線維芽細胞において、PI3 kinase 活性の抑制は、無刺激下では mRNA stability を低下させることにより、ヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の発現を抑制する
- ② 正常皮膚線維芽細胞において、PI3 kinase 活性の抑制は、TGF- $\beta$ 刺激下では、転写活性および mRNA stability を低下させることによりヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の発現を抑制する。
- ③ Smad3 に特異的な anchor protein が存在し、PI3 kinase 活性の抑制はその anchor protein の mislocalization を誘導することによって TGF- $\beta$ 刺激による Smad3 のリン酸化を抑制している
- ④ 強皮症皮膚線維芽細胞において、PI3 kinase 活性の抑制は、転写活性および mRNA stability を低下させることによりヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の発現を抑制する。
- ⑤ 強皮症皮膚線維芽細胞においては、anchor protein の mislocalization は Smad3 の恒常的なリン酸化を完全に抑制することが明らかとなった。特筆すべきは、正常皮膚線維芽細胞では PI3 kinase 活性を抑制することによって TGF- $\beta$ 刺激による Smad3 のリン酸化が約 50%抑制されるのに対し、強皮症皮膚線維芽細胞における Smad3 の恒常的な弱いリン酸化は PI3 kinase 活性を抑制することによってほぼ完全に抑制されたことである。この事実

は、効率的な TGF- $\beta$  signaling の活性化には anchor protein の存在が不可欠であり、強皮症皮膚線維芽細胞で認められるような Smad3 の弱いリン酸化は anchor protein 存在下で TGF- $\beta$  signaling が効率的に活性化されたときにのみ認められることを示唆している。この事実は、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞における TGF- $\beta$  signaling の活性化のレベルの違いが、今後汎発性強皮症の治療戦略を立てる際に鍵となる可能性を示していると考えられた。

## E. 結論

本研究により PI3 kinase 活性が TGF- $\beta$  signaling に及ぼす影響が明らかとなった。PI3 kinase 活性を抑制することにより強皮症皮膚線維芽細胞における TGF- $\beta$  signaling の恒常的な活性化を完全に抑制できたことから、PI3 kinase が汎発性強皮症の治療の標的となりうる可能性が示され、今後更なる研究が期待される。

## F. 文献

1. Wahl, S. M. 1994. Transforming growth factor  $\beta$ : the good, the bad, and the ugly. *J. Exp. Med.* 180:1587.
2. Kawakami, T., H. Ihn, W. Xu, E. Smith, 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.
3. 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.

4. Derynck, R., Y. Zhang, and X. H. Feng. 1998. Smads: Transcriptional activators of TGF- $\beta$  responses. *Cell* 95:737.
5. Chen, S., W. Yuan, Y. Mori, A. Levenson, M. Trojanowska, and J. Varga. 1999. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF- $\beta$ : involvement of Smad3. *J. Invest. Dermatol.* 112:49.
6. Tsukazaki, T., T. A. Chiang, A. F. Davison, L. Attisano, and J. L. Wrana. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF- $\beta$  receptor. *Cell* 95:779.
7. Itoh, F., N. Divecha, L. Brocks, L. Oomen, H. Janssen, J. Calafat, S. Itoh, and P. ten Dijke. 2002. The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF- $\beta$ /Smad signalling. *Genes to Cells* 7:321.
8. Goto, D., H. Nakajima, Y. Mori, K. Kurasawa, N. Kitamura, and I. Iwamoto. 2001. Interaction between Smad anchor for receptor activation and Smad3 is not essential for TGF- $\beta$ /Smad3 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281:1100.
9. Ihn, H., K. Ohnishi, T. Tamaki, E. C. LeRoy, and M. Trojanowska. 1996. Transcriptional regulation of the human  $\alpha 2(I)$  collagen gene. Combined action of upstream stimulatory and inhibitory cis-acting elements. *J. Biol. Chem.* 271:26717.
10. Poncelet, A. C., and H. W. Schnaper. 2001. 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.*, 276:6983.

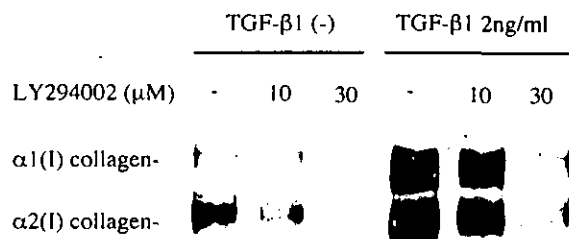


図 1. LY294002 が正常皮膚線維芽細胞の type I collagen 蛋白の発現に及ぼす影響

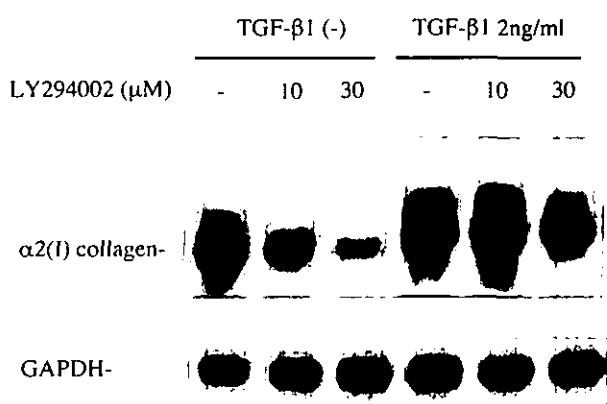


図 2. LY294002 が正常皮膚線維芽細胞のヒトα2(I) collagen 遺伝子 mRNA の発現に及ぼす影響

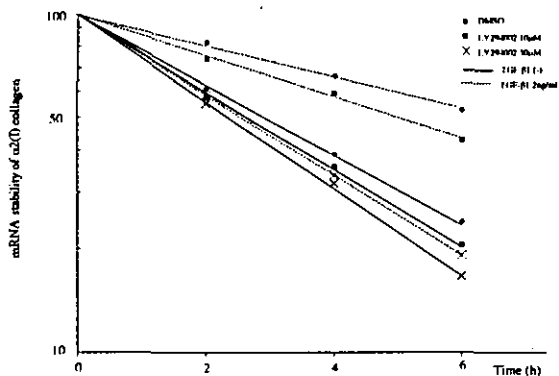


図 3. LY294002 が正常皮膚線維芽細胞のヒトα2(I) collagen 遺伝子の mRNA stability に及ぼす影響

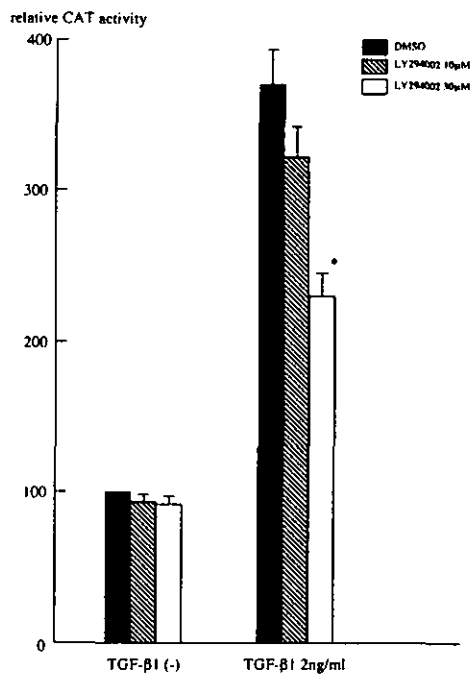


図 4. LY294002 が正常皮膚線維芽細胞のヒトα2(I) collagen 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

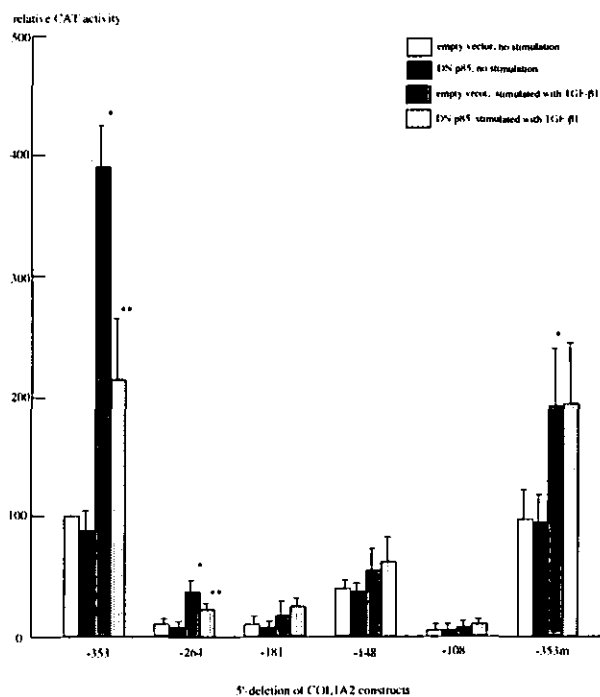


図 5. dominant negative mutant p85 の一過性強発現が正常皮膚線維芽細胞のヒトα2(I) collagen 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

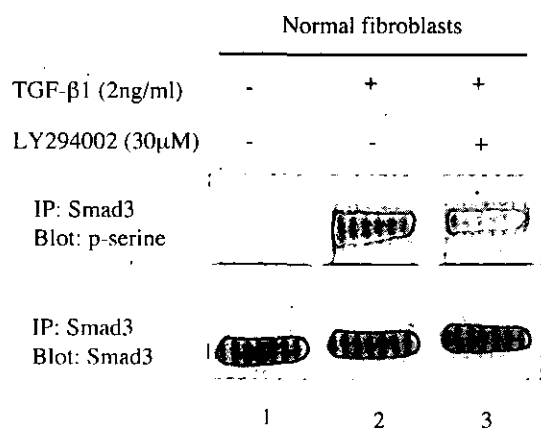


図 6. LY294002 が正常皮膚線維芽細胞における Smad3 のリン酸化に及ぼす影響

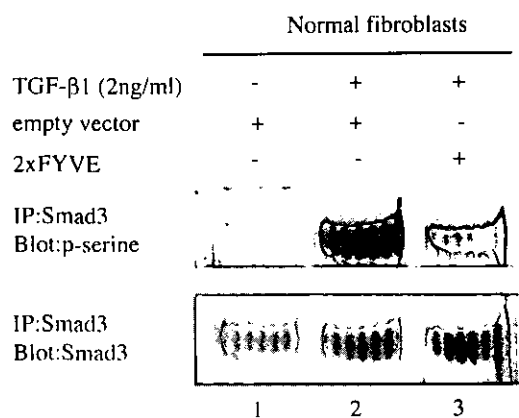


図 9. 2xFYVE の一過性強発現が正常皮膚線維芽細胞における Smad3 のリン酸化に及ぼす影響

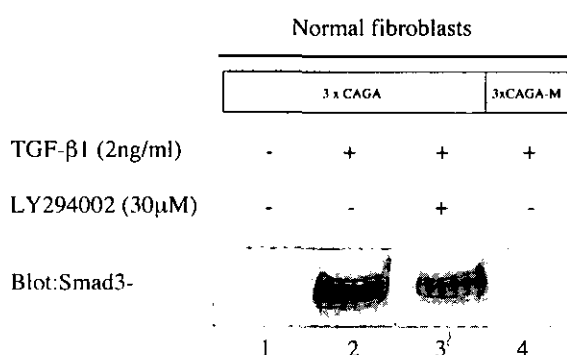


図 7. LY294002 が正常皮膚線維芽細胞における Smad3 の DNA 結合能に及ぼす影響

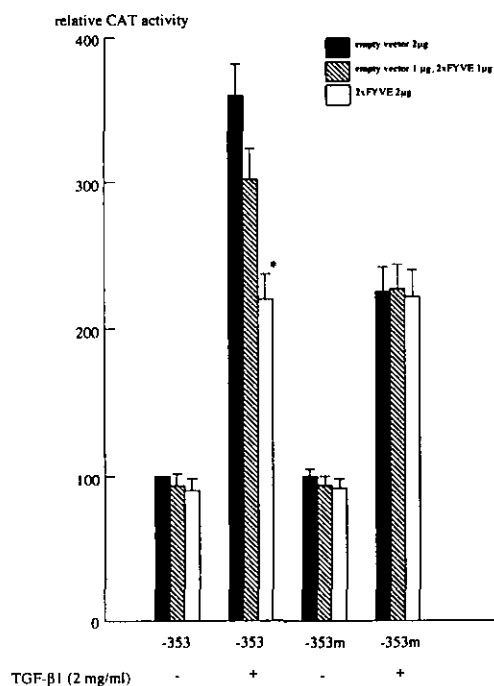


図 8. 2xFYVE の一過性強発現が正常皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

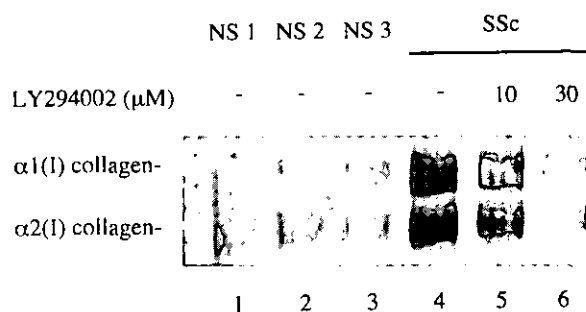


図 10. LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞の type I collagen 蛋白の発現に及ぼす影響

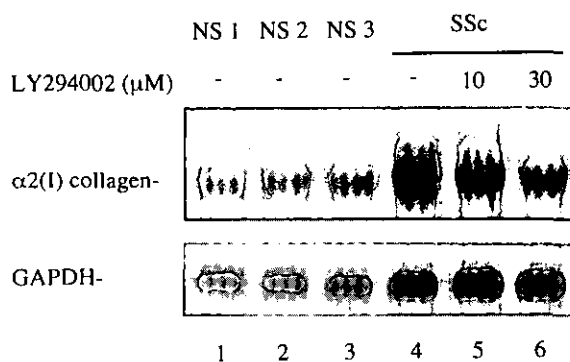


図 11. LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞のヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子 mRNA の発現に及ぼす影響

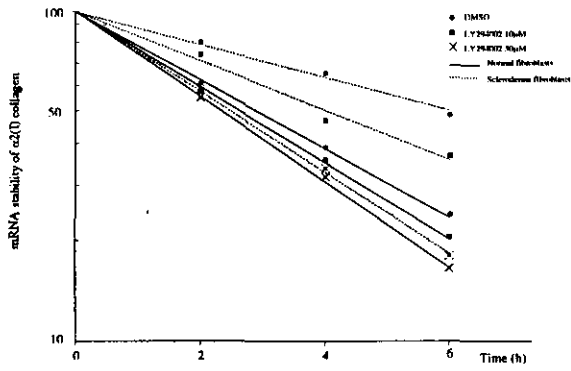


図 12. LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞のヒト $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の mRNA stability に及ぼす影響

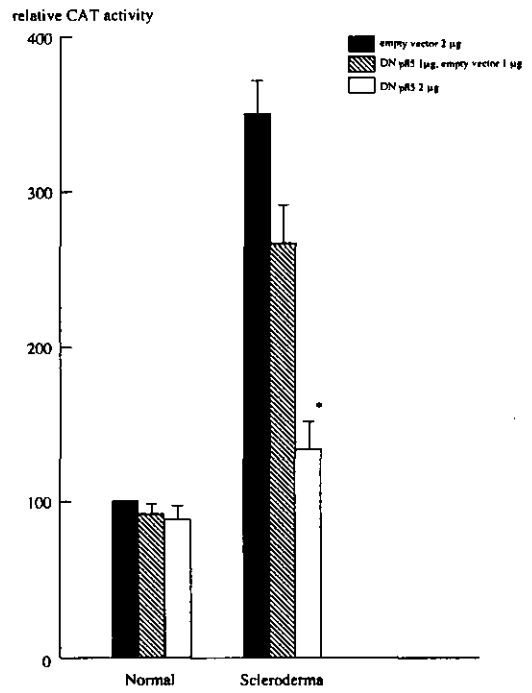


図 14. dominant negative mutant p85 の一過性強発現が強皮症皮膚線維芽細胞のヒト $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

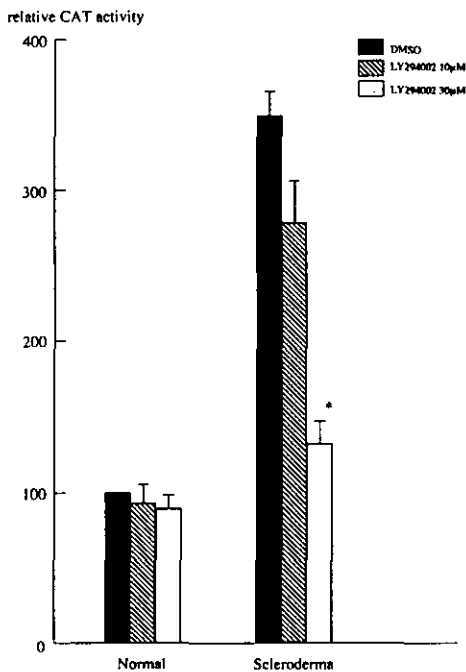


図 13. LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞のヒト $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

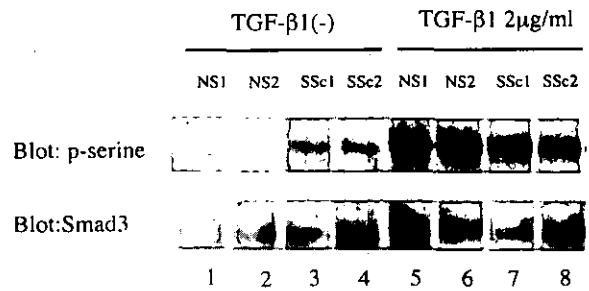


図 15. 正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞における Smad3 のリン酸化の比較

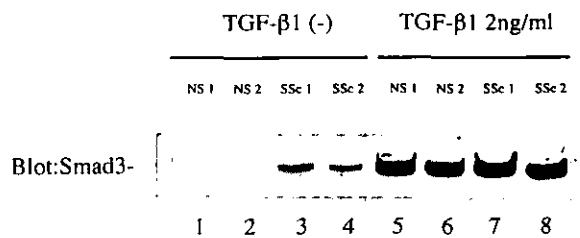


図 16. 正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞における Smad3 の DNA 結合能の比較

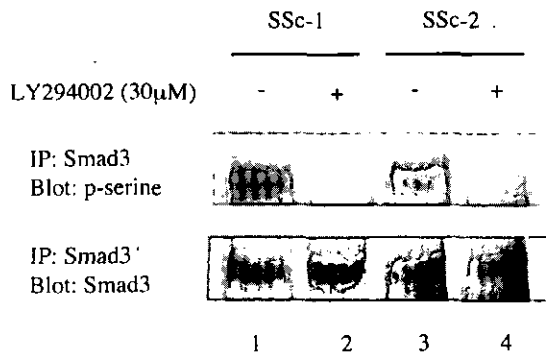


図 17. LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞における Smad3 のリン酸化に及ぼす影響

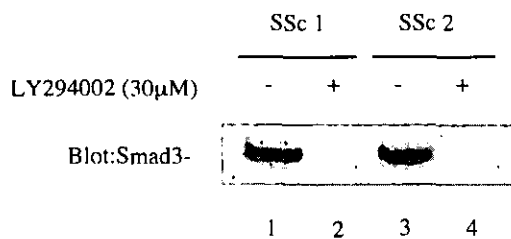


図 18. LY294002 が強皮症皮膚線維芽細胞における Smad3 の DNA 結合能に及ぼす影響

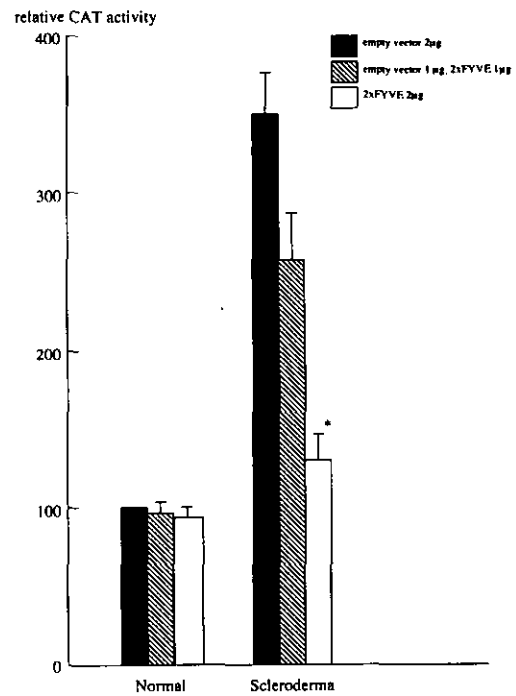


図 19. 2xFYVE の一過性強発現が強皮症皮膚線維芽細胞におけるヒト $\alpha$ 2(I) collagen 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

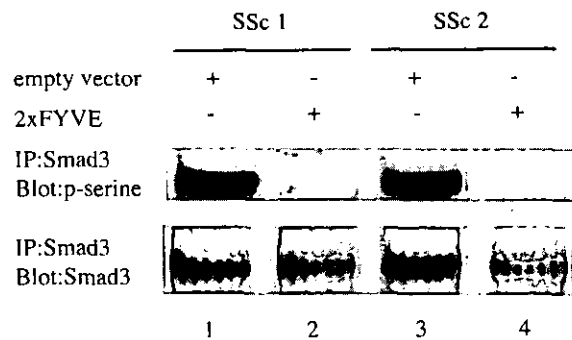


図 20. 2xFYVE の一過性強発現が強皮症皮膚線維芽細胞における Smad3 のリン酸化に及ぼす影響

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

Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ による I 型コラーゲン  
遺伝子転写制御における p38 mitogen-activated protein  
kinase (MAPK)の関与について

分担研究者 尹 浩信 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学講師  
協力者 山根謙一 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学助手  
協力者 玉置邦彦 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

TGF- $\beta$ は I 型コラーゲン遺伝子発現を転写レベルで発現させる。正常ヒト皮膚線維芽細胞において、TGF- $\beta$ による I 型コラーゲン蛋白、mRNA 発現亢進は p38 MAPK 阻害剤で抑制された。また TGF- $\beta$ は p38 MAPK のリン酸化を亢進し、キナーゼ活性を亢進した。さらに TGF- $\beta$ による  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子転写活性の亢進は dominant negative p38 MAPK の発現により阻害され、汎発性強皮症などの皮膚線維化における p38 MAPK の関与が示唆された。

A. はじめに

汎発性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は皮膚および内蔵諸臓器の線維化が病変の主体であり TGF- $\beta$ の関与が示唆されている<sup>1,2)</sup>。TGF- $\beta$ はコラーゲンなどの細胞外マトリックス産生を強力に促進することが知られ、線維化においては中心的な役割を果たすと考えられている。TGF- $\beta$ による I 型コラーゲン遺伝子制御は主に転写レベルで行われていることが知られ、ヒト  $\alpha 2(I)$  collagen 遺伝子プロモーター領域に結合する転写因子 Sp1、Smad を介して I 型コラーゲン遺伝子転写制御を行ってい

ると考えられている。すなわち TGF- $\beta$ が TGF- $\beta$  受容体に結合するとその下流にある Smad2/3 がリン酸化され、核内に移行し Sp1、Smad4、co-activator である p300/CBP と complex を形成して I 型コラーゲン遺伝子の転写が亢進することが知られている。また種々の細胞において TGF- $\beta$ が p38 MAP キナーゼを活性化することが報告されているが、I 型コラーゲン遺伝子発現亢進による p38MAPK の関与については明らかではない。

p38 MAPK は種々の炎症性サイトカインやストレスによって活性化される情報伝達経路で、



4種類の p38 MAPK が存在し、皮膚線維芽細胞では p38 MAPK $\alpha$ と $\beta$ が発現していることが確認されている。

今回我々は、TGF- $\beta$ による I 型コラーゲン遺伝子転写制御における p38 MAPK の関与について検討を行なった。

## B. 材料と方法

**免疫プロット法および Northern blot 法** 正常ヒト皮膚線維芽細胞を 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. 結果と考察

まず I 型コラーゲン蛋白の発現を免疫プロット法にて検討した。ERK の特異的阻害剤 PD と p38MAPK 特異的阻害剤 SB202190 と SB203580 の TGF- $\beta$ による I 型コラーゲン蛋白発現促進作用における影響を検討した。Basal level は各種阻害剤の添加によって変化しなかったが、SB202190 と SB203580 は TGF- $\beta$ による I 型コラーゲン蛋白発現促進作用を量依存性に阻害した (図 1)。

次に Northern blot 法にてヒト a2(I) collagen 遺伝子発現を検討した。p38MAPK 特異的阻害剤は TGF- $\beta$ による I 型コラーゲン遺伝子発現促進作用を阻害した (図 2)。

ヒト皮膚線維芽細胞において TGF- $\beta$ 刺激によって p38MAPK が活性化するか検討した。TGF- $\beta$ 刺激によって p38MAPK がリン酸化されることが示され、TGF- $\beta$ 刺激 30 分後にその peak が見られた (図 3)。

in vitro kinase assay にて TGF- $\beta$ 刺激による p38MAPK の活性化について検討した。TGF- $\beta$ 刺激によって p38MAPK が活性化されることが示され、TGF- $\beta$ 刺激 30 分後にその peak が見られ、またその活性化は p38MAPK 特異的阻害剤によって抑制された (図 4)。

コラーゲン遺伝子転写活性を CAT assay にて検討した。p38MAPK 特異的阻害剤 SB202190 および SB203580 は TGF- $\beta$ による I 型コラーゲン遺伝子転写活性促進作用を量依存性に阻害した (図 5)。

さらに dominant negative ERK、dominant negative p38 MAPK $\alpha$ 、dominant negative p38 MAPK $\beta$ を一過性に強発現し、I 型コラーゲン

遺伝子転写活性に対する影響を検討した。dominant negative ERK の過剰発現にて TGF- $\beta$  による I 型コラーゲン遺伝子転写活性促進作用変化しなかったが、dominant negative p38 MAPK $\alpha$ 、dominant negative p38 MAPK $\beta$  の強発現にて TGF- $\beta$  による I 型コラーゲン遺伝子転写活性促進作用は量依存性に阻害された (図 6)。これらの結果は TGF- $\beta$  による I 型コラーゲン遺伝子発現促進作用に p38MAPK が関与することを強く示唆すると考えた。

TGF- $\beta$  による I 型コラーゲン遺伝子発現促進作用において Smad3 が主要な役割を果たしているため、p38MAPK の Smad3 に対する影響を検討した。TGF- $\beta$  刺激によって Smad3 は C-terminal 領域のセリン残基がリン酸化することにより活性化することが知られているが、P38MAPK 特異的阻害剤の添加によって Smad3 のセリンリン酸化は変化しなかった (図 7)。また TGF- $\beta$  刺激によって Smad3 は活性化して co-activator である p300/CBP と会合することが知られている。免疫沈降法にて Smad3 と p300/CBP の interaction を検討した。TGF- $\beta$  刺激によって Smad3 と p300/CBP が会合し、P38MAPK 特異的阻害剤の添加によって抑制された (図 8)。

皮膚線維芽細胞において TGF- $\beta$  は p38 MAPK を活性化し、p38 MAPK は Smad3 と p300/CBP の会合を促進することによって、TGF- $\beta$  による I 型コラーゲン遺伝子発現を促進することが示された。以上の結果より、p38MAPK は汎発性強皮症などの線維化において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## D. 文献

1. Ihn H. 2002. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- $\beta$  and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 14: 681-685,
2. Ihn H. 2002. The role of TGF- $\beta$  signaling in the pathogenesis of fibrosis in scleroderma. *Arch Immunol Ther Exp* 50: 325-331.

## E. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表  
なし。

## F. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

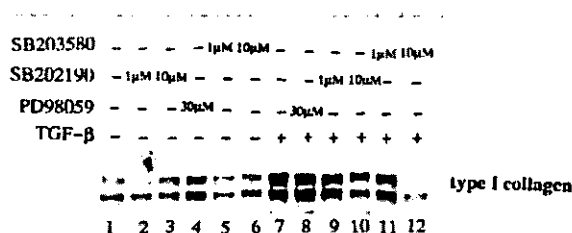


図 1. Basal level は各種阻害剤の添加によって変化しなかったが、SB202190 と SB203580 は TGF- $\beta$  による I 型コラーゲン蛋白発現促進作用を量依存性に阻害した。

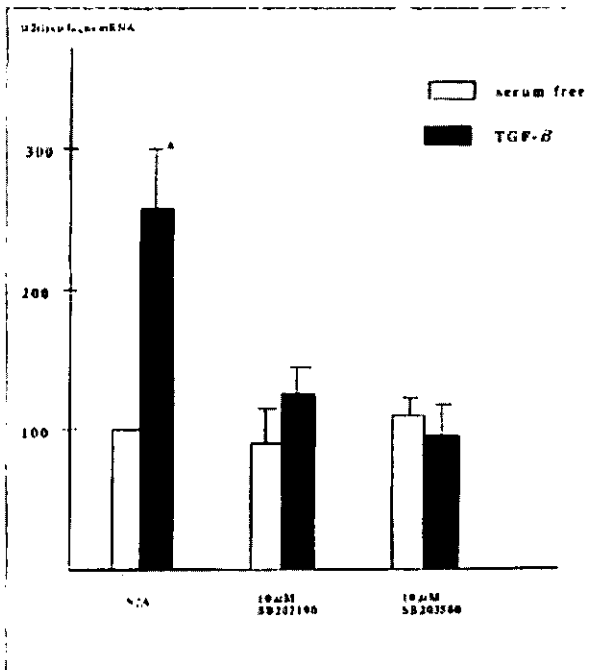


図 2. p38MAPK 特異的阻害剤は TGF-β による I 型コラーゲン遺伝子発現促進作用を阻害した。

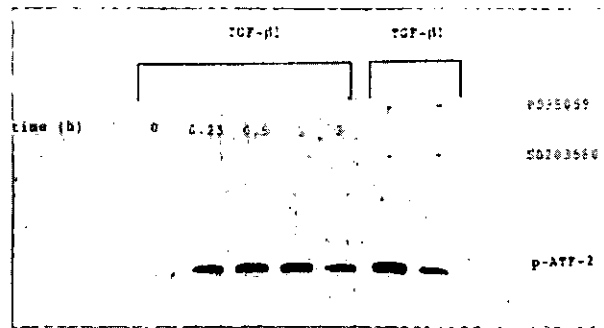


図 4. TGF-β 刺激によって p38MAPK が活性化されることが示され、TGF-β 刺激 30 分後にその peak が見られ、またその活性化は p38MAPK 特異的阻害剤によって抑制された。

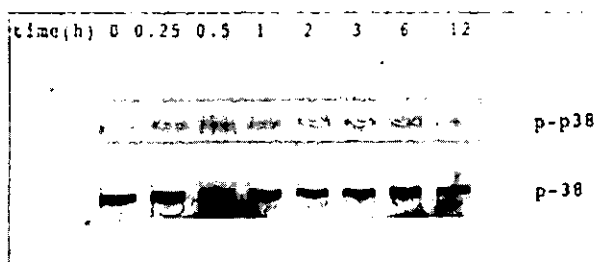


図 3. TGF-β 刺激によって p38MAPK がリン酸化されることが示され、TGF-β 刺激 30 分後にその peak が見られた。

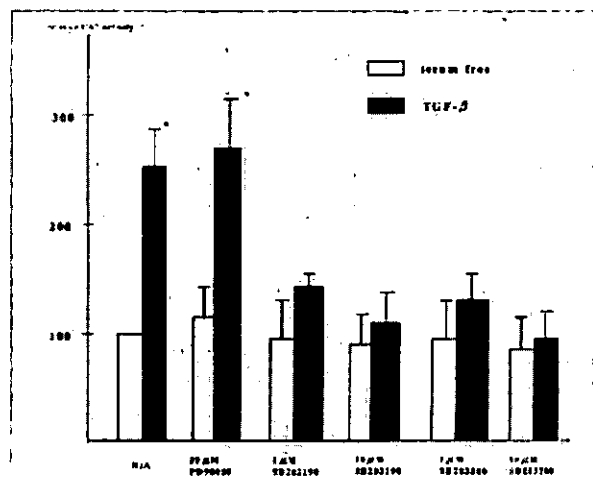


図 5. p38MAPK 特異的阻害剤 SB202190 および SB203580 は TGF-β による I 型コラーゲン遺伝子転写活性促進作用を量依存性に阻害した。

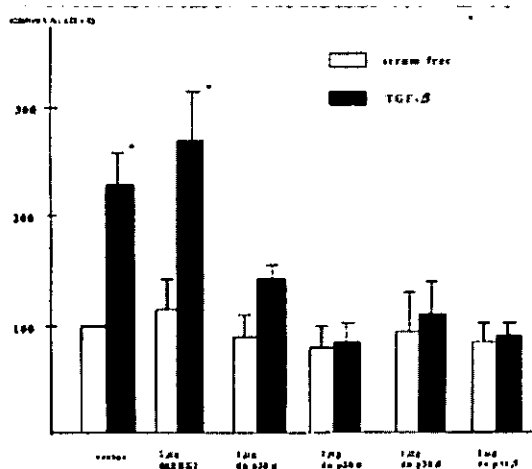


図 6. dominant negative p38 MAPK $\alpha$ , dominant negative p38 MAPK $\beta$ の強発現にてTGF- $\beta$ によるI型コラーゲン遺伝子転写活性促進作用は量依存性に阻害された。

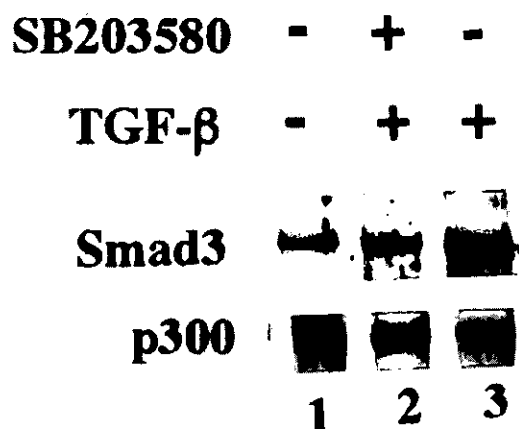


図 8. TGF- $\beta$ 刺激によってSmad3とp300/CBPが会合し、P38MAPK特異的阻害剤の添加によって抑制された。

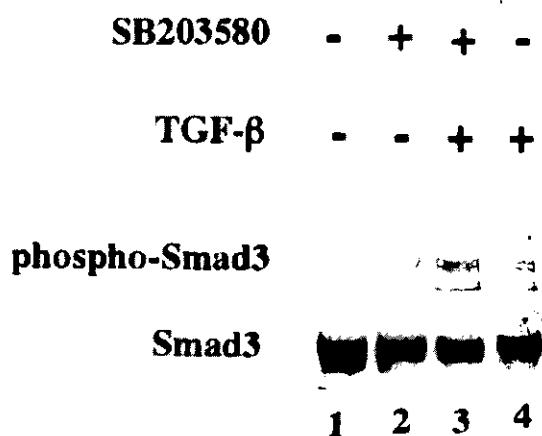


図 7. P38MAPK特異的阻害剤の添加によってSmad3のセリンリン酸化は変化しなかった。