

全身性強皮症皮膚線維芽細胞における TGFβ受容体の 発現量についての解析

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 久保正英 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

全身性強皮症ではその線維化の病態形成において各種サイトカイン、特に TGFβの関与が強く考えられている。今回、我々は全身性強皮症において TGFβ受容体の皮膚組織内における発現を in situ hybridization 法および免疫染色法にて検討したところ、全身性強皮症の皮膚線維芽細胞において健常人よりも I 型受容体及び II 型受容体の双方の発現が免疫染色法においても、in situ hybridization 法においても上昇しており、さらにこれら受容体陽性の線維芽細胞の数も全身性強皮症において増加していることが認められた。以上より、両受容体の増加により、TGFβの信号伝達が亢進していることが全身性強皮症の線維化の進展に関与している可能性が示された。

A.研究目的

全身性強皮症(Systemic sclerosis: SSc)は皮膚及び内臓諸臓器の硬化を主徴とする疾患であり、その硬化の本体は線維化であると考えられている¹。組織の線維化にはさまざまなサイトカインの関与の可能性が注目され、なかでも TGFβはそのなかでも中心的な役割を

果たしているのではないかと特に注目されている²。

TGFβの受容体は現在まで 3 種の受容体が報告されており³、このうち I 型受容体及び II 型受容体の 2 種が TGFβの信号伝達に関与していると考えられている³。細胞膜上で、TGFβは II 型受容体にまず結合し、その複合体が I 型受

容体と結合し、II型受容体がI型受容体のGSドメインをリン酸化することからTGFβの信号伝達が始まることが既に知られている³。

全身性強皮症由来の培養線維芽細胞では健康人由来の培養線維芽細胞と比較して、I型受容体とII型受容体の発現が上昇していることが報告されているが⁴、全身性強皮症皮膚組織内におけるこれら受容体の発現の増減は報告されていない。

今回の検討ではI型受容体及びII型受容体の発現の増減を検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

当科を受診し、皮膚生検を行ったSSc5例(全例女性)および健康人5例(女性3例、男性2例)を用いた。詳細を表1に示す。SScの患者は全例アメリカリウマチ協会(ARA)の診断基準案⁵を満たしており、レイノー症状を示していた。3例はlcSSc⁶で、2例はdcSSc⁶でうち1例に多発性筋炎の合併が認められた。皮膚生検は全例前腕伸側より行い、ホルマリンにて固定し、パラフィンにて包埋した。ヘマトキシリンエオジン染色にて組織学的に膠原線維の膨化増生が認められ、真皮表皮境界部が平滑化し、皮膚硬化は脂肪織にまで、及んでいた。

2) 免疫染色

一次抗体は抗TGFβ I型受容体及びII型受容体ともにSanta Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)から購入した。染色はベクター社(Burlingame, CA)のElite ABCキットを用いた。5μm厚にて薄切したパラフィン切片をキシレンアルコール系列により立つ脱パラフィン化したのち、0.3%過酸化水素水15分間にて内因性のペルオキシダーゼを消費し、1.5%ヤギ血清にてブロックした後に1.5%ヤギ血清にて希釈したビオチン化抗ウサギ抗体にて30分反応させた後、ABC試薬にて30分反応させ、DAB器質および過酸化水素水により発色させた。発色後にヘマトキシリンにて核染色を行い、アルコールキシレン系列により脱水し、マリノールにより封入した。

3) In situ hybridization 法⁷

5μm厚にて薄切したパラフィン切片をキシレンアルコール系列により立つ脱パラフィン化したのち、0.2規定の塩酸にて15分前処置し、30分37℃にて1.5μg/mlのproteinase Kにて消化した。その後、4%paraformaldehydeにて30分再固定し、その後15分2mg/mlのグリシンにて2回処理した後、ハイブリダイゼーションを行った。

TGFβ I 型受容体のプローブは Dr. ten Dijke (Ludwig Institute, Uppsala, Sweden) より供与された 2300 塩基のフラグメントを, TGFβ II 型受容体のプローブは Dr. Weinberg (Whitehead Institute for Biochemical Research, Cambridge, CA) より供与された 4000 塩基のフラグメントをそれぞれ SPT18 プラスミドに挿入したものをを用い, DIG-RNA ラベリングキット (Roche Molecular Biochemicals Cambridge, CA) を用いて Digoxigenin-11UTP にてラベルした。プローブはそれぞれ最終濃度 1μg/ml にて使用した。ハイブリダイゼーションのバッファーは 50% フォルムアミド, 10% Dextran Sulfate, 1x Denhart's solution, 100 μg/ml tRNA, 5x SSC, 0.25% sodium dodecylsulfate, 1mM EDTA, 50mM NaH₂PO₄ にて 18 時間 45°C の条件にてハイブリダイゼーションを行った。余剰のプローブは 2.5 μg/ml の RnaseA にて分解し, 2x SSC にて 1 回, 0.2x SSC にて 2 回それぞれ 50°C にて洗浄し, DIG 核酸検出キット (Roche) にて発色させた。

4) 評価

免疫染色及び in situ hybridization 法の結果の判定は陽性細胞の見られないから強陽性の 3+ までの 4 段階で行い, 陽性細胞は 200 倍視野における概数を記録した。

C. 研究結果

- 1) sense プローブを用いた SSc 皮膚をおよび健康人皮膚における in situ hybridization sense プローブを用いた SSc 皮膚および健康人皮膚においては表皮における基底層の色素沈着以外には発色および染色は認められなかった。このことから, この方法のバックグラウンドが非常に少ないことが確認された。
- 2) 健康人皮膚における antisense プローブを用いた in situ hybridization 結果を表 2 に記す。TGFβ I 型受容体 mRNA および II 型受容体 mRNA とともに脂腺・毛胞に発現が強く認められ, 表皮および血管上皮に中等度に認められ, 真皮の紡錘形の細胞にわずかな発色が認められた。
- 3) SSc 皮膚における antisense プローブを用いた in situ hybridization 結果を表 2 に記す。TGFβ I 型受容体 mRNA および II 型受容体 mRNA とともに SSc 皮膚においても脂腺・毛胞に発現していた。また, 健康人皮膚と異なり, TGFβ I 型受容体 mRNA および II 型受容体 mRNA とともに膠原線維束間の紡錘形の細胞に強く発現が認められた。表皮および血管上皮に中等度に認められ, 真皮の紡錘形の細胞にわずかな発色が認められた。

4) 健常人皮膚における抗 TGFβ I 型受容体抗体および抗 TGFβ II 型受容体抗体による免疫染色結果を表 2 に記す。TGFβ I 型受容体蛋白および II 型受容体蛋白の発現は脂腺・毛胞に発現が強く認められ、表皮および血管上皮に中等度に認められ、真皮の膠原線維間の紡錘形の細胞にわずかな発色が認められた。全体として、in situ hybridization とほぼ同様の結果が得られた。

5) SSc 皮膚における抗 TGFβ I 型受容体抗体および抗 TGFβ II 型受容体抗体による免疫染色結果を表 2 に記す。SSc 皮膚においても健常人皮膚と同様に TGFβ I 型受容体蛋白および II 型受容体蛋白の発現は毛胞および脂腺に強く認められ、表皮と血管上皮に中等度に認められた。膠原線維束間の紡錘形の陽性細胞数は健常人皮膚に比較して増加していた。しかしながら、紡錘形の陽性細胞における in situ hybridization 法で認められた染色強度の差異は免疫染色では認められなかった。

D. 考案

TGFβ は現在 SSc を含むさまざまな線維化疾患において中心的な役割を果たしていると考えられている²。TGFβ は主にヒト線維芽細胞に対して細胞外マトリックスの産生を刺激し、過

剰な沈着を引き起こすと考えられている⁸。

TGFβ は type I, III, VI, VII および X のコラーゲンおよび fibronectin やプロテオグリカンの産生を亢進させ⁸、さらには蛋白分解酵素の低下や蛋白分解酵素の減少や蛋白分解酵素阻害物質の濃度を上昇させることにより、マトリックスの変性を阻害すると考えられている⁸。

一方、サイトカインの反応にはリガンドの発現量のみならず、受容体の発現量も反応性に関与していると考えられており、創傷治癒および種々の線維化疾患の病態形成に TGFβ I 型受容体および II 型受容体が関与する可能性があると考えられる。線維化の局所では免疫細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞から TGFβ が分泌され、線維芽細胞による autocrine によって長期間 TGFβ が分泌されつづける可能性が考えられている^{9,10}。

この検討において SSc 皮膚において、健常人皮膚と比較して TGFβ I 型受容体および II 型受容体がともに著明に上昇していることを示した。培養細胞ではこれら受容体の mRNA の発現の増加がコラーゲンの mRNA の発現の上昇に結びつくという報告⁴もあり、これら受容体の発現の亢進が組織内においてもコラーゲンの発現量の上昇に結びついている可能性があると考えられる。

E. 結論

TGF β I 型受容体および II 型受容体の発現の亢進が全身性強皮症の患者皮膚において認められ、TGF β の autocrine 刺激が全身性強皮症において皮膚の線維化の病因として考えられる。

F. 文献

1. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *New Engl J Med* 1994; 331: 1286-92.
2. LeRoy EC, Smith EA, Kahaleh MB, Trojanowska M, Silver RM. A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis; is transforming growth factor β the answer? *Arthritis Rheum* 1989; 32: 817-25.
3. Wrana JL, Atissano L, Weiser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994; 370: 341-7.
4. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy EC, Trojanowska M. Increased expression of TGF- β receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF- β signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 47-51.
5. American Rheumatism Association: Subcommittee for scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
6. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, Rowell N, Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-5.
7. 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* 1995; 105: 280-4.

8. Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
9. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6020-4.
10. Van Obberghen-Schilling E, Roche NS, Flanders KC, Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem* 1988; 263:7741-6.

表1 本検討でもちいた強皮症患者と健常人のまとめ

	年齢	性別	診断	抗核抗体	罹病期間
症例1	61	女	lcSSc	抗核小体抗体	5年
症例2	55	女	dcSSc	Topo-I	3年
症例3	15	女	dcSSc	Topo-I	3年
症例4	54	女	lcSSc+PM	斑紋型抗核抗体, SS-A	2年
症例5	56	女	lcSSc	抗セントロメア抗体	5年
健常人1	43	男			
健常人2	30	男			
健常人3	20	女			
健常人4	22	女			
健常人5	45	女			

lcSSc; limited cutaneous systemic sclerosis; dcSSc diffuse cutaneous systemic sclerosis; PM; 多発性筋炎; Topo-I; 抗トポイソメラーゼI抗体; SS-A; 抗SS-A抗体

表2 SSc皮膚と健常人皮膚におけるin situ hybridizationおよび免疫染色の結果

	<i>In situ</i> hybridization						免疫染色			
	I型受容体			II型受容体			I型受容体		II型受容体	
	表皮細胞	線維芽細胞	No.	表皮細胞	線維芽細胞	No.	表皮細胞	線維芽細胞	表皮細胞	線維芽細胞
症例1	+	+	10-20	++	+	10-20	++	++	++	+++
症例2	++	++	10-20	++	++	>30	++	+++	++	+++
症例3	++	+	5-10	++	++	>30	+++	+	++	++
症例4	+	++	1-5	++	++	>30	+++	++	+++	+++
症例5	+++	++	>30	++	++	>30	-	-	++	++
健常人1	++	+	0-1	++	+	1-5	++	++	++	+
健常人2	++	-	0	+	-	0	++	+	++	+
健常人3	+	-	0	+	-	0	++	-	++	-
健常人4	++	+	0-1	++	+	1-5	++	++	+	-
健常人5	++	-	0	++	+	0-1	+	-	+	-

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

ヒト皮膚細胞における EGF によるファイブロネクチン
発現制御のメカニズム

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 三村佳弘 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
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

過去の報告により、強皮症患者由来皮膚線維芽細胞ではファイブロネクチンが過剰に産生されており、正常細胞でも TGF-beta により誘導されること、EGF は線維芽細胞における TGF-beta 受容体の発現を亢進させることが知られている。今回我々は正常皮膚線維芽細胞において EGF は post transcriptional level において PKC-delta を介しファイブロネクチン制御に関わっていることを明らかにした。

A. 研究目的

汎発性強皮症の病因の1つとして線維化がある。線維化は主にI型コラーゲンやファイブロネクチンなどの細胞外マトリクスの増加が原因であると考えられている。また正常細胞においても線維化に深い関わりを持つとされる TGF-beta によりファイブロネクチンが誘導されることが知られている。

EGF は多くの生理的作用を有するサイトカインであるが、皮膚線維芽細胞における TGF-beta 受容体の発現を亢進させることが知られている。強皮症患者由来線維芽細胞では TGF-beta 受容体の過剰発現していることが報

告されており、EGF も強皮症の病態の形成に関与している可能性がある。

今回、我々は EGF によるファイブロネクチン発現制御のメカニズムを、正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

1) 試薬

Calphostin C は全ての isozyme の PKC の阻害剤、Rottlerin は PKC-delta の特異的な阻害剤として使用した。また、PKC-delta をより特異的に阻害する方法として、dominant negative form (DN) の PKC-delta も使用した。

2) 免疫プロット法

培養細胞の上清をポリアクリルアミドゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗ファイブロネクチン抗体および抗 PKC-delta 抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて発色させた。

3) ノーザンプロット法

guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法を用いて抽出した RNA を 1%アガロースゲルに泳動し、ナイロン膜に転写した。膜を cDNA プローブと反応させ、フィルムに露光した。

4) luciferase assay 法

subconfluent の状態の線維芽細胞に、FuGENE6 (Roche) を用いて transient transfection を行った。pSV- beta- galactosidase vector を用いて、導入効率を補正した。

5) 免疫蛍光法

スライドガラス状の線維芽細胞と、抗 PKC-delta 抗体と反応させ、フルオセイン標識 2 次抗体を用いて発色させた。

C. 研究結果

正常皮膚線維芽細胞のファイブロネクチン蛋白量、遺伝子発現量は EGF によって亢進する

図 1, 2 に示すように正常皮膚線維芽細胞はファイブロネクチン受容体蛋白量、遺伝子発現量は EGF によって量依存的、時間依存的に亢進していた。

図 1. 正常線維芽細胞におけるファイブロネクチン蛋白量、遺伝子発現量の量依存性

図 2. 正常線維芽細胞におけるファイブロネクチン蛋白量、遺伝子発現量の時間依存性

EGF によるファイブロネクチン発現亢進の機序について

図 3 に示すように EGF によるファイブロネクチン発現亢進は Actinomycin D 及び cycloheximide 添加下でも抑制されなかった。さらにファイブロネクチン遺伝子の message stability を検討したが、EGF の添加によって stability は亢進した (図 4)。またファイブロネクチンプロモータ活性は EGF 刺激によって変化しなかった (図 5)。これらのことから正常皮膚線維芽細胞における EGF によるファイブロネクチン亢進は転写後レベルでの調節の異常である可能性が示唆された。

PKC-delta シグナル伝達経路は EGF によるファイブロネクチン遺伝子発現亢進に参与する

次に EGF によるファイブロネクチン遺伝子発現亢進に参与するシグナル伝達経路について検討した。図 6 に示すように Calphostin C 及び Rottlerin は EGF によるファイブロネクチン蛋白量、遺伝子発現亢進をともに抑制した。さらに優性抑制型 dominant negative PKC-delta (DN PKC-delta), を用いて EGF によるファイブロネクチン蛋白発現量への影響を検討した。図 7 に示すように DN PKC-delta は EGF によるファイブロネクチン蛋白発現量亢進を抑制した。

正常皮膚線維芽細胞において EGF により PKC-delta シグナル伝達経路が活性化する

正常皮膚線維芽細胞において EGF による PKC-delta 伝達経路が実際に活性化されているか検討した。図 8A に示すように、EGF は

PKC-delta 蛋白発現量を亢進させた。さらに図 8B に示すように PKC-delta は EGF 刺激により膜分画で強い発現を認めた。

Rottlerin は EGF によるファイブロネクチン遺伝子安定化作用を減少させる。次に、Rottlerin の EGF によるファイブロネクチン遺伝子安定化作用に対する影響を Actinomycin D 添加後の遺伝子安定性を測定することにより検討した。図 4 に示すように Rottlerin 存在下におけるファイブロネクチン遺伝子は無刺激下の細胞とほぼ同じ割合で時間経過に従って分解された。

D. 考案

今回の検討により、EGF は PKC-delta を介し、post-transcriptional level でファイブロネクチン発現を制御することが明らかとなった。PKC-delta は TGF-beta/Smad signaling pathway にも関わっているとの報告もあり、線維化のメカニズムでの重要性が示唆された。

E. 結論

正常皮膚線維芽細胞を用いて EGF によるファイブロネクチン発現を制御のメカニズムを明らかにした。今後、強皮症患者由来の細胞を用いるなどさらなる検討が必要と考えられる。

F. 文献

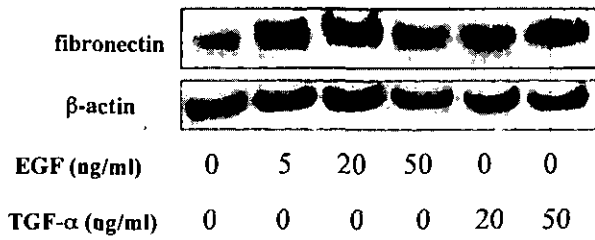
1. Eckes B, Mauch C, Huppe G, Krieg T: Differential regulation of transcription and transcript stability of pro-alpha 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. *Biochem J.* 315: 549-54, 1996
2. Ignatz RA, Endo T, Massague J: Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 262: 6443-6, 1987
3. Yamane K, Ihn H, Tamaki K: Epidermal growth factor up-regulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in human dermal fibroblasts by phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway: Resistance to epidermal growth factor stimulation in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 48: 1652-66, 2003.

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 H16 年度強皮症研究会議

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

A



B

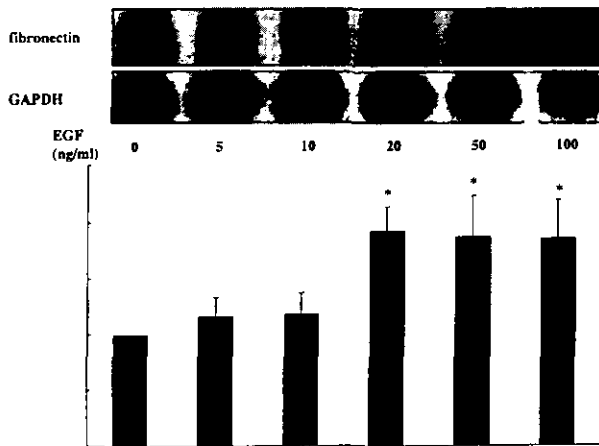
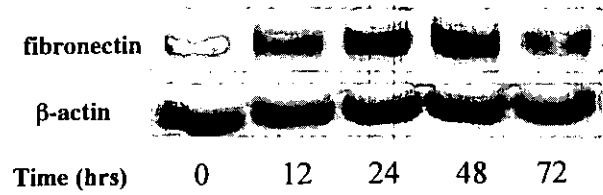


図1：正常線維芽細胞におけるファイブロネクチン蛋白量，遺伝子発現量の量依存性 (A) 蛋白発現量 (B) 遺伝子発現量

A



B

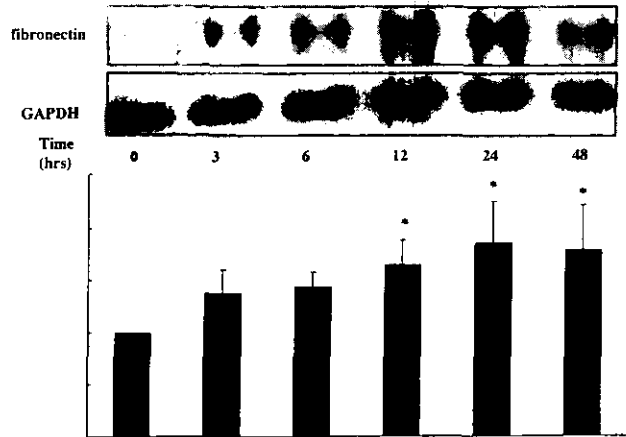


図2：正常線維芽細胞におけるファイブロネクチン蛋白量，遺伝子発現量の時間依存性 (A) 蛋白発現量 (B) 遺伝子発現量

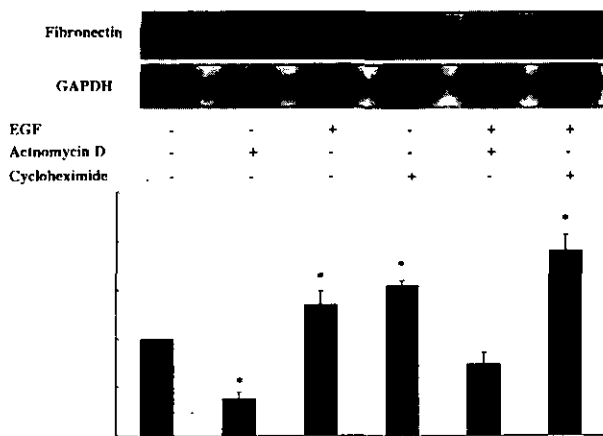


図3：EGFによるファイブロネクチン遺伝子発現量亢進における Actinomycin D, Cycloheximide の影響

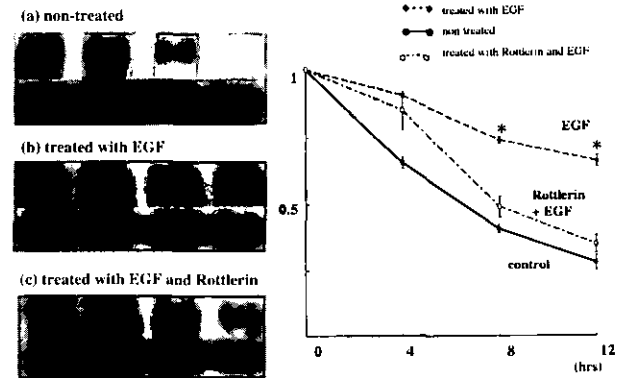


図4：EGFはファイブロネクチン message stability を亢進させるが、その作用は Rotlerin により減少する。

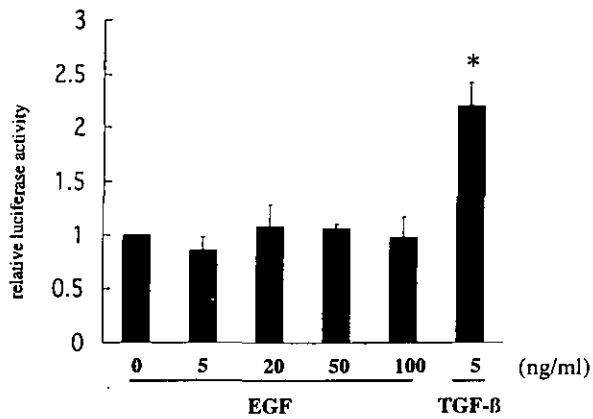


図5：EGF はファイブロネクチンプロモータ活性に影響しない。

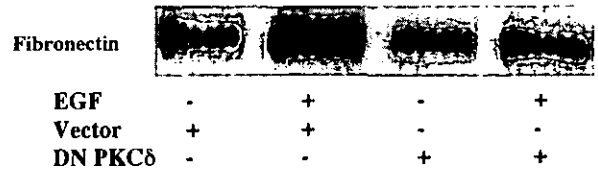


図7：DN-PKC-delta は EGF によるファイブロネクチン遺伝子発現亢進を抑制する。

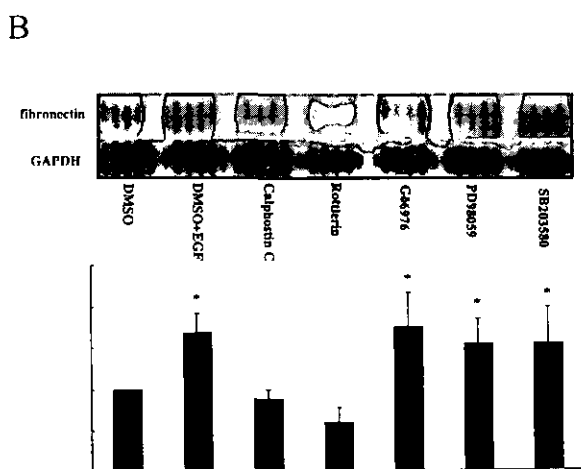
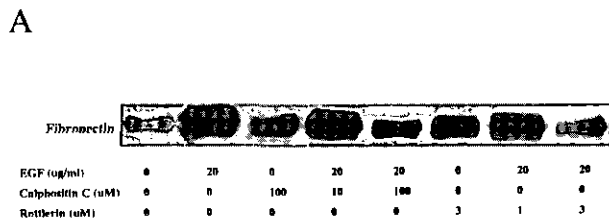


図6：Calphostin C 及び Rottlerin は EGF によるファイブロネクチン遺伝子発現亢進を抑制する。
(A) 蛋白発現量 (B) 遺伝子発現量

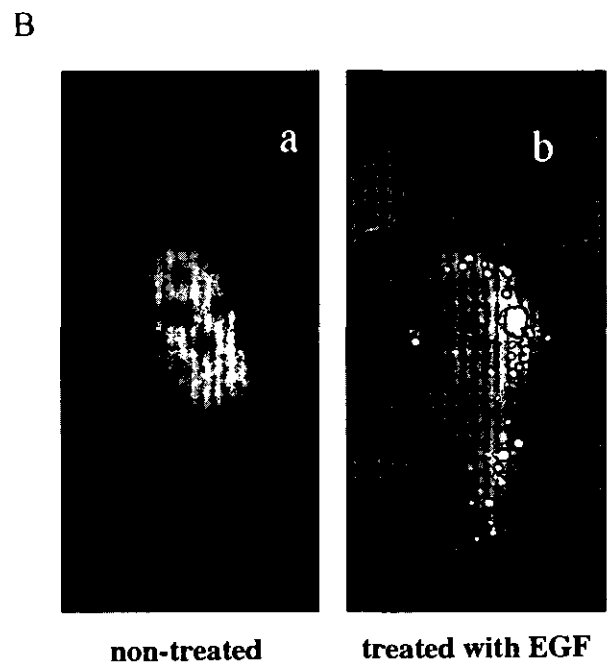
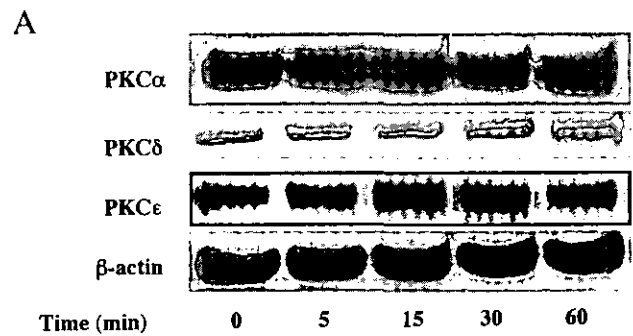


図8：正常皮膚線維芽細胞において EGF により PKC-delta シグナル伝達経路が活性化する。
(A) 蛋白発現量 (B) 細胞内分布

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

皮膚線維芽細胞における EGF による II 型 TGF- β
受容体発現亢進の機序について

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 浅野善英 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
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

線維化病変において TGF- β 受容体発現の亢進が細胞外マトリックス産生亢進に関与していることが報告されている。今回我々は TGF- β 受容体発現を亢進させるサイトカインとその機序について検討した。正常皮膚線維芽細胞において EGF は II 型 TGF- β 受容体遺伝子発現量、蛋白量を増加させた。EGF による II 型 TGF- β 受容体遺伝子発現亢進は Actinomycin D により抑制されたが、cycloheximide にて抑制されなかった。II 型 TGF- β 受容体遺伝子の message stability は、EGF 添加の有無によって差はなかった。また p38MAPK 阻害剤である SB203580 は、EGF による II 型 TGF- β 受容体遺伝子発現亢進を抑制した。II 型 TGF- β 受容体 promoter luciferase construct を用いた II 型 TGF- β 受容体遺伝子転写活性は EGF によって亢進した。EGF による II 型 TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進は SB203580 によって抑制された。EGF による II 型 TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進は dominant negative p38 α あるいは dominant negative p38 β によって抑制された。以上の結果から正常皮膚線維芽細胞において、EGF は p38MAPK の系を介して II 型 TGF- β 受容体発現を亢進することが示唆された。また汎発性強皮症では II 型 TGF- β 受容体の発現が亢進していることを我々は報告したが、正常皮膚線維芽細胞でみられた EGF による II 型 TGF- β 受容体発現亢進が、強皮症皮膚線維芽細胞で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では p38MAPK の系をはじめとする EGF によって惹起されるシグナル伝達経路の異常の存在が示唆された。

A. はじめに

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。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。最近, 我々は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 TGF- β 受容体の発現が亢進していることを見出し, 正常皮膚線維芽細胞に TGF- β 受容体を一過性に強発現させるとコラーゲン遺伝子転写活性が亢進することを示した。さらに強皮症患者皮膚線維芽細胞における TGF- β 中和抗体あるいは TGF- β 1 アンチセンスオリゴを用いて TGF- β 情報伝達経路の遮断によるコラーゲン遺伝子発現および転写活性が抑制されることを報告している。今回, 正常皮膚線維芽細胞において EGF による II 型 TGF- β 受容体発現亢進の機序について検討するとともに, EGF による強皮症皮膚線維芽細胞の II 型 TGF- β 受容体発現量への影響を検討した。

B. 材料と方法

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 poly A (+) RNA を抽出後ナイロン膜に転写し, II 型 TGF- β 受容体, GAPDH プロブとハイブリダイズし検出した。

DNA transfection および luciferase assays 皮膚線維芽細胞を 100mm dish に播種し, リン酸カルシウム法にて 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。

C. 結果と考察

正常皮膚線維芽細胞の II 型 TGF β 受容体蛋白質量, 遺伝子発現量は EGF によって亢進する

図 1, 2 に示すように正常皮膚線維芽細胞は II 型 TGF- β 受容体蛋白質量, 遺伝子発現量は EGF によって量依存的, 時間依存的に亢進していた。

EGF による II 型 TGF β 受容体発現亢進の機序について

図 3 に示すように EGF による II 型 TGF- β 受容体遺伝子発現亢進を Actinomycin D は抑制し

たが、cycloheximideは抑制しなかった。II型 TGF- β 受容体遺伝子の message stability を検討したが、EGFの添加の有無によって半減期に差はなかった。このことから正常皮膚線維芽細胞におけるEGFによるTGF- β 受容体発現量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。

p38MAPKシグナル伝達経路はEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子発現亢進に関与する

次にEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子発現亢進に関与するシグナル伝達経路について検討した。図4に示すようにp38MAPK阻害剤であるSB203580は、EGFによるII型TGF- β 受容体蛋白量発現亢進をともに抑制した。

正常皮膚線維芽細胞においてEGFによりp38MAPKシグナル伝達経路が活性化する

正常皮膚線維芽細胞においてEGFによるp38MAPKシグナル伝達経路が実際に活性化されているか検討した。図5に示すように、p38MAPK phosphorylationをEGF刺激によって認めた。またp38MAPKのkinase assayにおいて、基質であるATF-2のphosphorylationを認めた。

正常皮膚線維芽細胞においてEGFによりII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性が亢進する

さらにEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性への影響を検討した。図6に示すように、正常皮膚線維芽細胞ではII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性が亢進した。

正常皮膚線維芽細胞においてEGFはp38MAPKシグナル伝達経路を介してII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性を亢進する

次に、EGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進がp38MAPKシグナル伝達経路を介するかを検討した。図7に示すようにSB203580はEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進を抑制した。p38MAPKの優性抑制型 dominant negative p38MAPK α (DN p38 α), dominant negative p38MAPK β (DN p38 β)を用いてEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進への影響を検討した。図8に示すようにDN p38 α , DN p38 β はEGFによるII型TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進を抑制した。

以上の結果より、正常皮膚線維芽細胞においてEGFはp38MAPKシグナル伝達経路を介してII型TGF- β 受容体遺伝子発現量、蛋白量を上昇させることが示された。また、強皮症皮膚線維芽細胞においてEGFによるII型TGF- β 受容体蛋白量の上昇がみられず、p38MAPKをはじめとした、EGFによって惹起されるシグナル伝達経路の異常が示唆された。

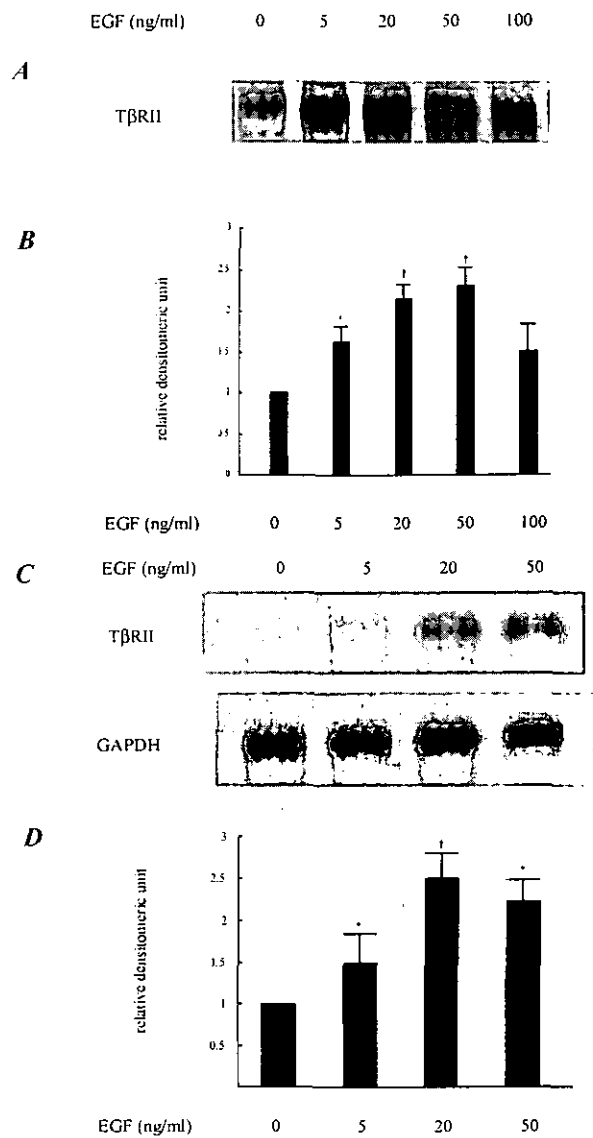


図1. 正常線維芽細胞におけるII型TGF-β受容体蛋白量、遺伝子発現量の量依存性

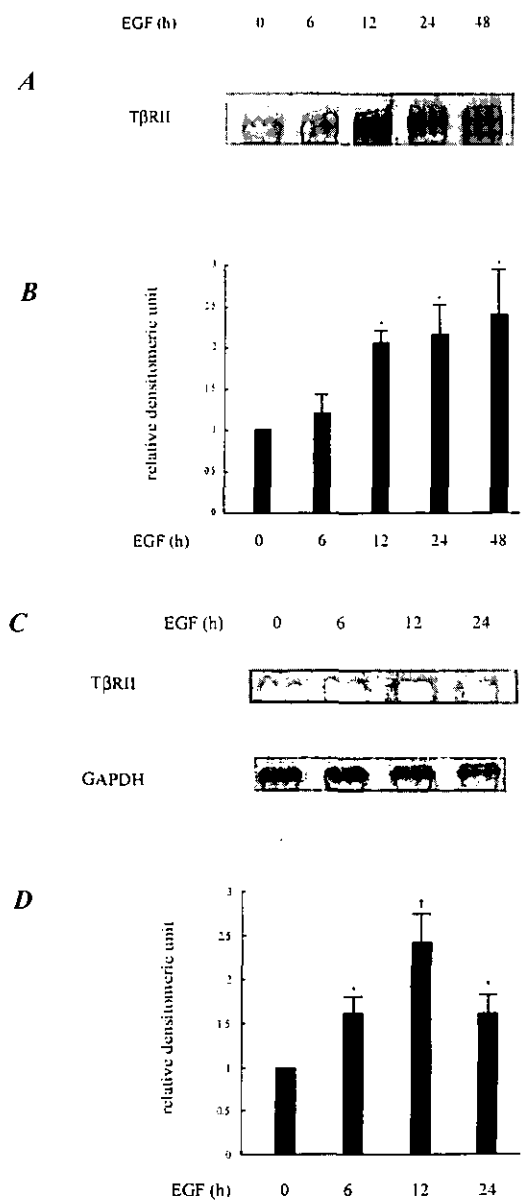


図2. 正常線維芽細胞におけるII型TGF-β受容体蛋白量、遺伝子発現量の時間依存性

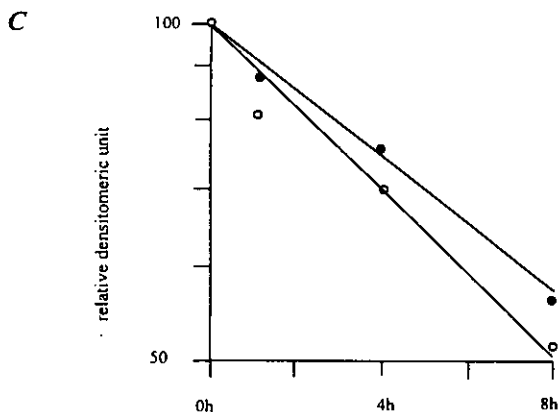
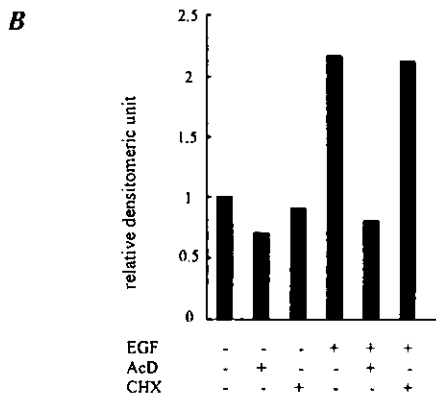
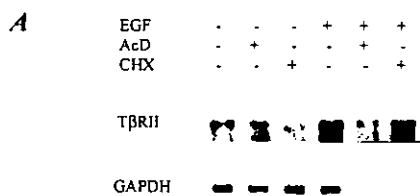


図3. EGF による II 型 TGF- β 受容体遺伝子発現量亢進における Actinomycin D, Cycloheximide の影響

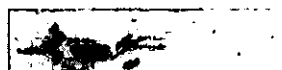
EGF 20ng/ml	-	+	+	+	+	+
SB203580 (μ M)	-	-	10	20	-	-
PD98059 (μ M)	-	-	-	-	10	30



図4. SB203580 は EGF による II 型 TGF- β 受容体発現亢進を抑制する

EGF (min) - 15 30 60 180

phospho-p38



p38



EGF (min) - 15 30 60 180 15 15
SB203580 (μ M) - - - - - 20 -
PD98059 (μ M) - - - - - - 30

phospho-ATF-2



図5. 正常皮膚線維芽細胞において EGF により p38MAPK シグナル伝達経路が活性化される

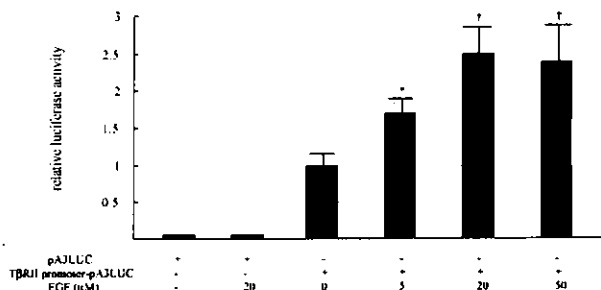


図6. EGF による II 型 TGF- β 受容体遺伝子転写活性亢進

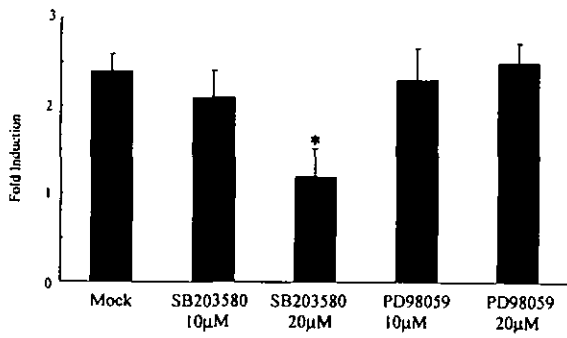


図7. EGFによるII型TGF-β受容体遺伝子転写活性亢進はSB203580によって抑制される

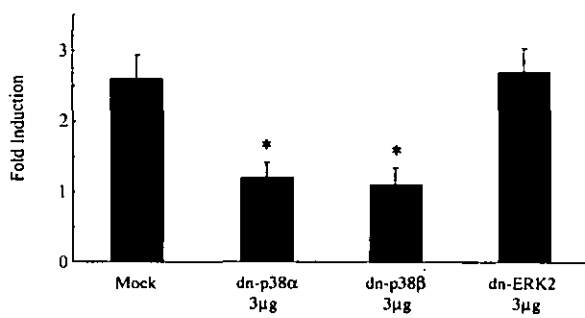


図8. DN p38αとDN p38βによるII型TGF-β受容体遺伝子転写活性への影響

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

Protein kinase C による皮膚線維芽細胞における
I 型コラーゲン遺伝子の転写制御

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 神人正寿 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
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

過去の報告により、protein kinase-C (PKC) の阻害によりコラーゲン発現が大きく抑制されることが知られている。今回我々は正常皮膚線維芽細胞において alpha2(I)コラーゲン遺伝子の転写活性は PKC-alpha および -delta により制御されていることを明らかにした。さらに、強皮症患者由来の皮膚線維芽細胞では PKC-delta の発現が増強しており、これを阻害することにより、TGF-beta/Smad signaling も抑制された。以上より、PKC-delta 抑制は効率的にコラーゲン発現を抑え、汎発性強皮症の治療に応用できる可能性が示された。

A. 研究目的

汎発性強皮症の病因として、主に線維化、免疫異常、血管障害などのファクターが挙げられている。このうち、線維化は主に I 型コラーゲンの転写レベルでの増加が原因で、この増加には TGF-beta1 が誘導するシグナル、特に Smad の系が関与していると考えられている。

このコラーゲン転写の面からの汎発性強皮症の治療へのアプローチが試みられているが、

その流れとしては大きく分けて 2 種類あると思われる。一つは、強皮症ではコラーゲン遺伝子の転写亢進の原因として autocrine TGF-beta signaling の存在が知られており¹、これを阻害することで線維芽細胞からのコラーゲン遺伝子の転写を正常に近づける、という戦略である。

もう一つの戦略として、正常の線維芽細胞におけるコラーゲン転写のメカニズムを解析し、根本からコラーゲン転写を阻害するとい

うアプローチも存在する。2001年、Jimenezらは、PKC-deltaの特異的な阻害剤であるRottlerinを添加することにより、I型およびIII型コラーゲン発現が強く抑制される、と報告している²。通常のコラーゲン遺伝子の転写にPKC-deltaが関与していると推察されるが、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。今回、我々はalpha2(I)コラーゲン遺伝子の転写制御におけるPKCの関与を、正常人および汎発性強皮症患者由来の皮膚線維芽細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

1) 対象

diffuse cutaneous typeの強皮症患者3名の前腕由来の皮膚線維芽細胞および正常人3名由来の皮膚線維芽細胞を使用した。

2) 試薬

Calphostin Cは全ての isozyme のPKCの阻害剤、Gö6976はPKC-alphaの特異的な阻害剤、またRottlerinはPKC-deltaの特異的な阻害剤として使用した。また、PKCの各 isozymeをより特異的に阻害する方法として、dominant negative form (DN)のPKC-alpha, およびPKC-deltaも使用した。

3) 免疫プロット法

培養細胞の上清をポリアクリルアミドゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗 type I collagen 抗体、抗 Ets1 抗体、抗 Fli1 抗体、抗 PKC-alpha 抗体、抗 PKC-delta 抗体および抗 Smad2/3 抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて発色させた。

4) ノーザンプロット法

guanidinium thiocyanate-phenol- chloroform法を用いて抽出したRNAを1%アガロースゲルに泳動し、ナイロン膜に転写した。膜をcDNAプローブと反応させ、フィルムに露光した。

5) chloramphenicol acetyltransferase (CAT)法

subconfluent の状態の線維芽細胞に、FuGENE6 (Roche) を用いてtransient transfectionを行った。pSV-beta-galactosidase vector を用いて、導入効率を補正した。細胞抽出液にbutyl-CoA と [¹⁴C]-chloramphenicol を加え、Butylated chloramphenicol を抽出し、液体シンチレーションにてカウントした。

C. 研究結果

1) 正常皮膚線維芽細胞での PKC によるコラーゲン発現調節

免疫プロット法、ノーザン・プロット法およびchloramphenicol acetyltransferase法にて正常皮膚線維芽細胞におけるalpha2(I)コラーゲン発現はCalphostin, Rottlerin, Gö6976により抑制されることが示された(図1a-c)。よって、正常線維芽細胞でのコラーゲンの発現は少なくともPKC-alpha及びPKC-deltaという2つのシグナルによって制御されていると考えられた。

2) PKCによるalpha2(I)コラーゲン遺伝子の調節メカニズムの検討

alpha2(I)collagenプロモーター遺伝子の deletion constructを用いたCAT法によりPKCのresponsive elementを検討した。その結果、PKC-alphaのinhibitorは、-148から-108base pairの領域に作用していると考えられた(図

2a)。この領域にはSp1/3 binding siteが存在する。この Sp1/3 binding site の substitution mutation construct では PKC-alphaのinhibitorに対する反応性が消失した。他の領域のsubstitution mutationでは反応性に影響はみられなかった(図2b)。PKC-alphaはこの領域のSp1/3 binding site に作用すると考えられた。

同様に PKC-delta の inhibitor の responsive elementを検討した。PKC-delta のinhibitorは-353から-186base pairの領域に作用していると思われたが(図2c)、この領域にはSmad binding siteやSp1あるいはEts familyの binding sitesなどが存在する。

Smad binding site の substitution mutation construct を用いても inhibitor に対する反応性に変化はみられなかったが、Sp1/3 binding site や Ets binding site の substitution mutation では反応性が低下した。また、これら両者の substitution mutation では反応性が完全に消失した(図2d)。PKC-delta は Sp1/3 binding site および Ets binding site に作用していると考えられた。

3) PKC inhibitor の作用に関する転写因子の検討

まずPKC inhibitorの作用におけるSp1/3の関与を検討するため、Sp1あるいはSp3強発現がコラーゲン蛋白発現に及ぼす影響を免疫プロット法にて検討した。Sp1強発現でコラーゲンの量に変化はみられなかったが、Rottlerin, G66976によるcollagen発現抑制はSp1強発現によって回復した(図3a)。一方Sp3にはこの

ような作用はみられなかった。Rottlerin, G66976ともSp1の働きを抑えることで作用を発揮していることが示唆された。

次に、PKC-delta と Ets family の関係について検討した。Ets family のうち、Ets1 はコラーゲン転写活性を増やす働き、Flil は減らす働きがあるとされているが、Rottlerin を用いてPKC-delta を阻害することにより Ets1 の量が減少し、Flil の量が増加することでコラーゲンの転写が減少する可能性があると考えられた(図3b)。

4) 強皮症患者由来皮膚線維芽細胞での PKC によるコラーゲン発現調節

免疫プロット法、ノーザン・プロット法および CAT 法にて強皮症皮膚線維芽細胞における alpha2(I)コラーゲン発現は Calphostin, Rottlerin により抑制されるが、G66976 添加には反応しないことが示された(図4a-c)。強皮症線維芽細胞でのコラーゲンの発現は PKC-delta により制御されていると考えられた。

5) 正常及び強皮症皮膚線維芽細胞における PKC 発現量の比較

正常及び強皮症皮膚線維芽細胞における PKC発現量を免疫プロット法を用いて比較した。強皮症皮膚線維芽細胞では正常に比べ PKC-alpha の量に変化はなかったが、PKC-deltaの量が増加していた(図5a)。正常線維芽細胞をTGF-beta刺激によりやはり PKC-deltaの量は増加したがPKC-alphaの量は変化しなかった(図5b)。強皮症における PKC-deltaの増加はTGF-betaの作用によるものである可能性が示唆された。