

ると、内因性 Smad7 蛋白量が増加し、TGF- β 及び BMP による転写活性の低下が認められた。以上のことから、Arkadia は TGF- β のみならず BMP シグナルも増強し、その作用機構の一つとして、抑制型 Smad である Smad7 のユビキチン化、プロテアソーム系での分解の促進が考えられた。Arkadia にはさらにいくつかのタンパク質が標的となって TGF- β シグナルを調節している可能性が高く現在検討を進めている。

D. 考案

Smad7 の作用の調節は TGF- β シグナルの強度に密接に関連してくることから、その作用の調節はきわめて重要である。これまで Smad7 は TGF- β や BMP による刺激、CD40 や interferon- γ の作用、放射線照射やシアーストレスなどでその発現が上昇することが明らかになっている。一方で、Smad7 タンパク質の分解を調節する因子として Smurf1 と Smurf2 の役割が明らかになり、強皮症との関連でも注目されてきた (3)。本研究により、Smad7-TGF- β レセプターの分解が Smurf1 や Smurf2 だけでなく WWP1 や NEDD4-2 などの他の HECT 型 E3 リガーゼによっても促進されることが明らかとなった (図 1)。しかし類似した構造を持つ NEDD4 にはこうした作用は見られず、HECT 型 E3 リガーゼの中でも TGF- β シグナルを調節する因子は限られたもののみであることが示唆された。これらの HECT 型 E3 リガーゼの組織での発現はまちまちであることから、今後どのような病態でこれらの因子の発現が変動するかを調べ

ることはきわめて重要であると考えられた。また新しいタイプの RING finger 型 E3 リガーゼである Arkadia は Smad7 に結合して分解を促進するがレセプターは分解せず、Smurf 類縁因子とは全く逆の作用を持つことが明らかとなった (図 1)。Smurf およびその類縁因子と Arkadia の作用の関わりは TGF- β シグナルの強度がどのように調節されているかを理解するうえできわめて重要であると考えられた。

E. 結論

WWP1 や NEDD4-2 は Smurf1 や Smurf2 と同様、HECT 型 E3 リガーゼである。Smurf1 や Smurf2 だけでなく WWP1 や NEDD4-2 などによっても Smad7-TGF- β レセプターの分解によって TGF- β シグナルが抑制されることが明らかとなった。一方、RING finger 型 E3 リガーゼである Arkadia は Smad7 に結合してその分解を促進し、TGF- β シグナルを増強することが明らかとなった。

F. 文献

1. Miyazono, K., Suzuki, H., and Imamura, T.: Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci.* 94: 230-234, 2003.
2. Monteleone, G., Pallone, F., MacDonald, T.T.: Smad7 in TGF- β -mediated negative regulation of gut inflammation. *Trends Immunol.* 25: 513-517, 2004.

3. Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M., and Tamaki, K.: Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF- β signaling in scleroderma fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 113: 253-264, 2004.
4. Kondo, M., Suzuki, H., Takehara, K., Miyazono, K., and Kato, M.: Transforming growth factor- β signaling is differentially inhibited by Smad2D450E and Smad3D407E. *Cancer Sci.* 95: 12-17, 2004.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeda, M., Mizuide, M., Oka, M., Watabe, T., Inoue, H., Suzuki, H., Fujita, T., Imamura, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K.: Interaction with Smad4 is indispensable for suppression of BMP signaling by c-Ski. *Mol. Biol. Cell* 15: 963-972, 2004.
2. Mochizuki, T., Miyazaki, H., Hara, T., Furuya, T., Imamura, T., Watabe, T., and Miyazono, K.: Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor- β superfamily signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 31568-31574, 2004.
3. Kondo, M., Cubillo, E., Tobiume, K., Fukuda, N., Suzuki, H., Takehara, K., Cano, A., Saitoh, M., and Miyazono, K.: A role for Id in the regulation of TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ.* 11: 1092-1101, 2004.
5. Suzuki, H., Yagi, K., Kondo, M., Kato, M., Miyazono, K., and Miyazawa, K.: c-Ski inhibits the TGF- β signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene* 23: 5068-5076, 2004.
6. Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K.: Negative regulation of transforming growth factor- β (TGF- β) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* 23: 6914-6923, 2004.
7. Kuratomi, G., Komuro, A., Goto, K., Shinozaki, M., Miyazawa, K., Miyazono, K., and Imamura, T.: Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2 (NEDD4-2) negatively regulates transforming growth factor- β (TGF- β) signaling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF- β type I receptor. *Biochem. J.* in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

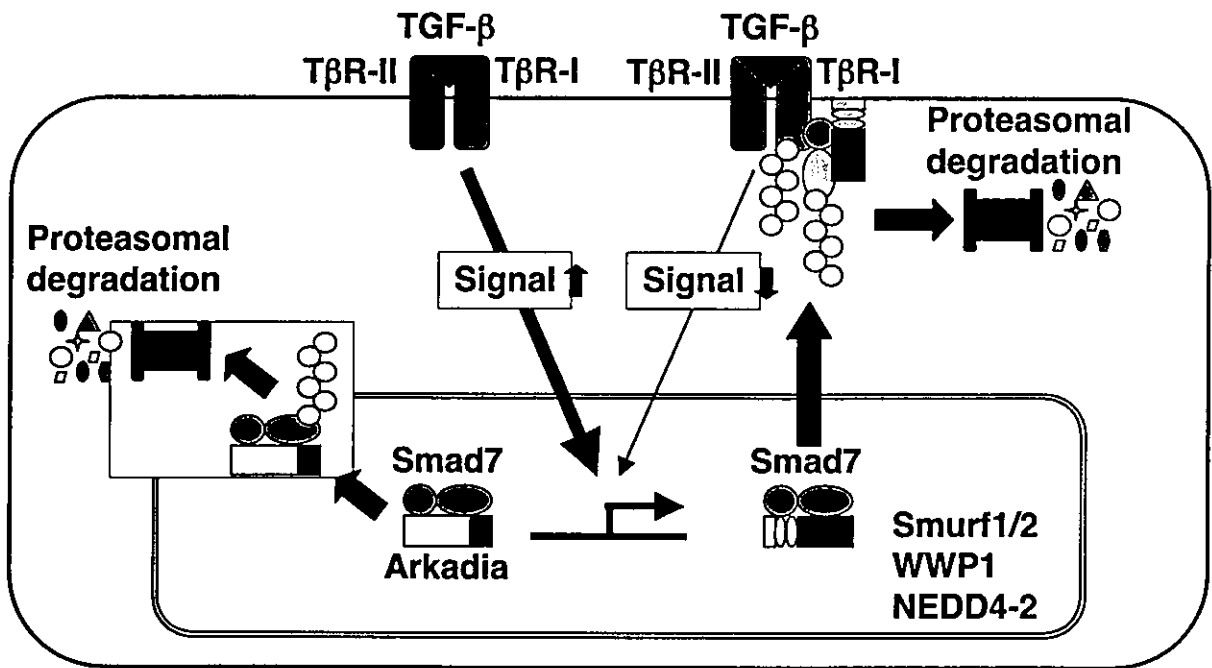


図1 Smad7 の作用の調節による TGF- β シグナルの制御。Smurf1/2、WWP1 や NEDD4-2 は Smad7-TGF- β レセプターの分解によって TGF- β シグナルを抑制する。一方、RING finger 型 E3 リガーゼである Arkadia は Smad7 に結合して分解を促進することから、TGF- β シグナルを増強する。これらの E3 リガーゼの作用によって TGF- β シグナルの強度は調節されている。

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

汎発性強皮症線維芽細胞における Smad3 のリン酸化と Smad3、

Sp1、p300/CBP の相互作用

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

研究要旨

強皮症線維芽細胞では、恒常的に Smad3 がリン酸化しており、Smad3 とその co-activator である p300/CBP、コラーゲン遺伝子発現亢進に関与する転写因子 Sp1 が結合していた。Smad3 の強発現にて強皮症線維芽細胞ではほとんど変化を認めなかった。以上より、強皮症線維芽細胞では autocrine TGF- β signaling によって、Smad3 と p300/CBP、Sp1 が結合し、exogenous TGF- β 刺激に対する反応性が低下していると考えられた。

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- β の関与が示唆されている (1,2)。TGF- β 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- β 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- β が TGF- β 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。

今回我々は、汎発性強皮症患者由来皮膚線維芽細胞における Smad3 のリン酸化と Smad3、Sp1、p300/CBP の interaction、I 型コラーゲン遺伝子転写制御における相互作用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免疫沈降法 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、chemiluminescence 法にて検出した。また各種抗体を用いて従来の方法で免疫沈降を行ない、その後免疫プロット法を行ない、chemiluminescence 法にて検出した。

DNA transfection 皮膚線維芽細胞を播種し、FuGene を用いて Smad2、Smad3、Smad4、Sp1 を単独あるいは同時にトランスフェクションした。

C. 結果と考察

まず正常および強皮症皮膚線維芽細胞における Smad2、Smad3、Smad4 の発現を免疫プロット法にて検討した。正常および強皮症皮

膚線維芽細胞においては Smad2、Smad3、Smad4 の発現に差は認められなかった (図 1)。

次に Smad2、Smad3、Smad4 を一過性に強発現してヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性を CAT assay にて検討した。Smad2 または Smad4 の一過性強発現にてコラーゲン遺伝子転写活性は正常線維芽細胞および強皮症線維芽細胞において変化しなかった。正常線維芽細胞においては Smad3 の一過性強発現にてコラーゲン遺伝子転写活性は有意に亢進した。強皮症線維芽細胞においては Smad3 の一過性強発現にてコラーゲン遺伝子転写活性は軽度亢進したが、その反応は正常線維芽細胞と比較して軽度のものであり、有意な差は見られなかった (図 2)。

通常 Smad3 は TGF- β 刺激によって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ため、Smad3 のセリン残基のリン酸化を免疫沈降法にて検討した。強皮症線維芽細胞では Smad3 のセリン残基のリン酸化が認められたが、正常線維芽細胞においては認められなかった (図 3)。

また TGF- β 刺激による I 型コラーゲン遺伝子転写制御において Smad3 が Sp1 や p300/CBP と complex を形成するため、Sp1 と Smad3 の会合および p300 と Smad3 の会合について検討した。まず Sp1 の発現量を免疫プロット法で検討したが、正常線維芽細胞と強皮症線維芽細胞では Sp1 の発現量に差はなかった (図 4C)。Sp1 と Smad3 の会合について免疫沈降法にて検討したところ強皮症線維芽細胞では恒常的に Sp1 と Smad3 が会合していることが示された (図 4 A&B)。

p300 の発現量は正常線維芽細胞と強皮症線維芽細胞では差はなかったが (図 5 C)、強皮症線維芽細胞では恒常的に p300 と Smad3 が会合していることが示された (図 5 A&B)。

次に Sp1 を一過性に強発現してヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性を CAT assay にて検討した。正常線維芽細胞では Sp1 の一過性強発現によってコラーゲン遺伝子転写活性の basal level は変化しなかったが、TGF- β による反応性は亢進し、TGF- β によるコラーゲン遺伝子転写活性亢進に Sp1 が関与することを示唆した。強皮症線維芽細胞では Sp1 の一過性強発現によってコラーゲン遺伝子転写活性の basal level も TGF- β に対する反応性も有意な変化がなく、強皮症線維芽細胞は exogenous TGF- β 刺激に対する反応性の低下が示唆された (図 6A)。

強皮症線維芽細胞では恒常的に Sp1 と Smad3 が会合していることが示されたため、Sp1 と Smad3 を同時に一過性強発現した場合のコラーゲン遺伝子転写活性について検討した。正常線維芽細胞では Sp1 と Smad3 の一過性強発現にてコラーゲン遺伝子転写活性の basal level が亢進し、さらに TGF- β に対する反応性が強く誘導され、Sp1 と Smad3 のコラーゲン遺伝子転写活性亢進における関与、および TGF- β によるコラーゲン遺伝子転写活性亢進に Sp1 と Smad3 が関与することが示された。強皮症線維芽細胞においては Sp1 と Smad3 の一過性強発現にて basal level には有意な変化がなかったが、TGF- β に対する反応性は、正常線維芽細胞と比較して弱いながら亢進した (図 6B)。この結果より、強皮症

線維芽細胞は exogenous TGF- β 刺激に対する反応性が低下し、この異常には Sp1 と Smad3 の恒常的な会合が関与していると考えられた。

D. 文献

1. Ihn H. 2002. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- β and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 14: 681-685,
2. Ihn H. 2002. The role of TGF- β 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
第789回日本皮膚科学会東京地方会 (研究地方会)
日本研究皮膚科学会第29回年次学術大会

F. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

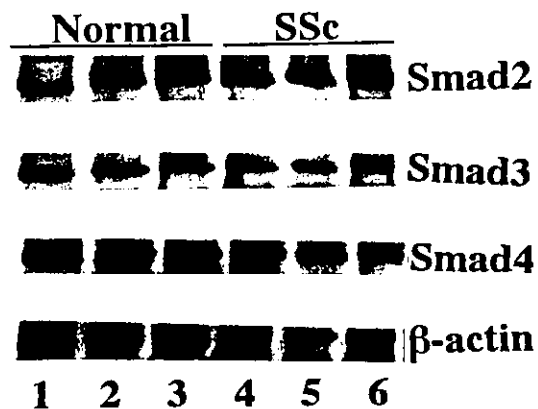
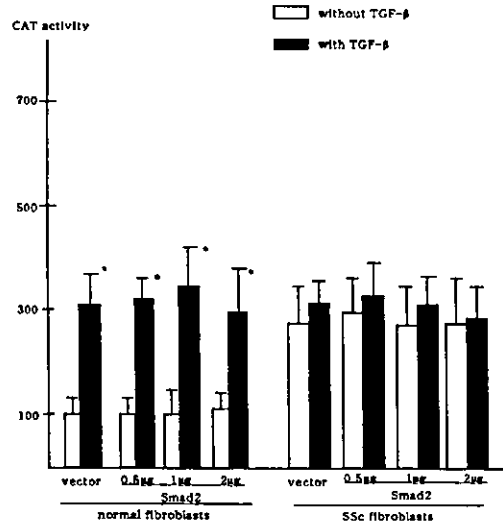
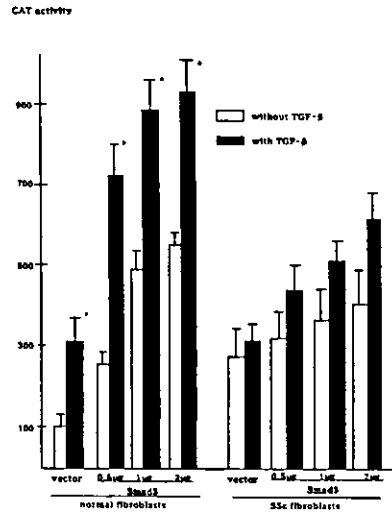


図 1. 正常線維芽細胞および強皮症線維芽細胞における Smad2、Smad3、Smad4 蛋白発現量。

A



B



C

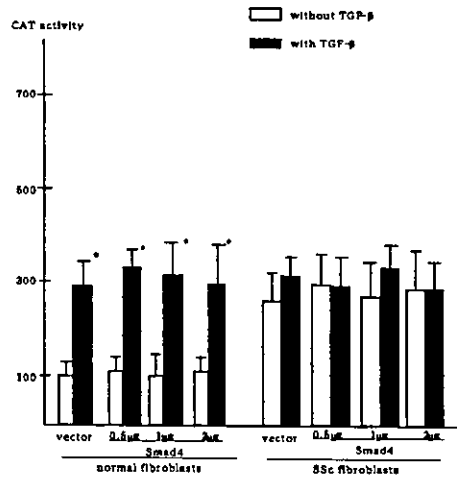


図 2. Smad2、Smad3、Smad4 一過性強発現下のヒトα2(I) collagen 遺伝子転写活性。

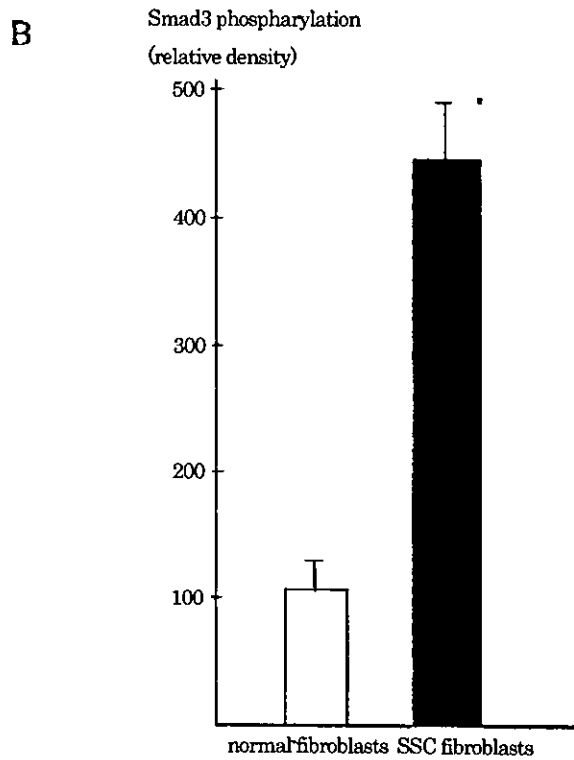
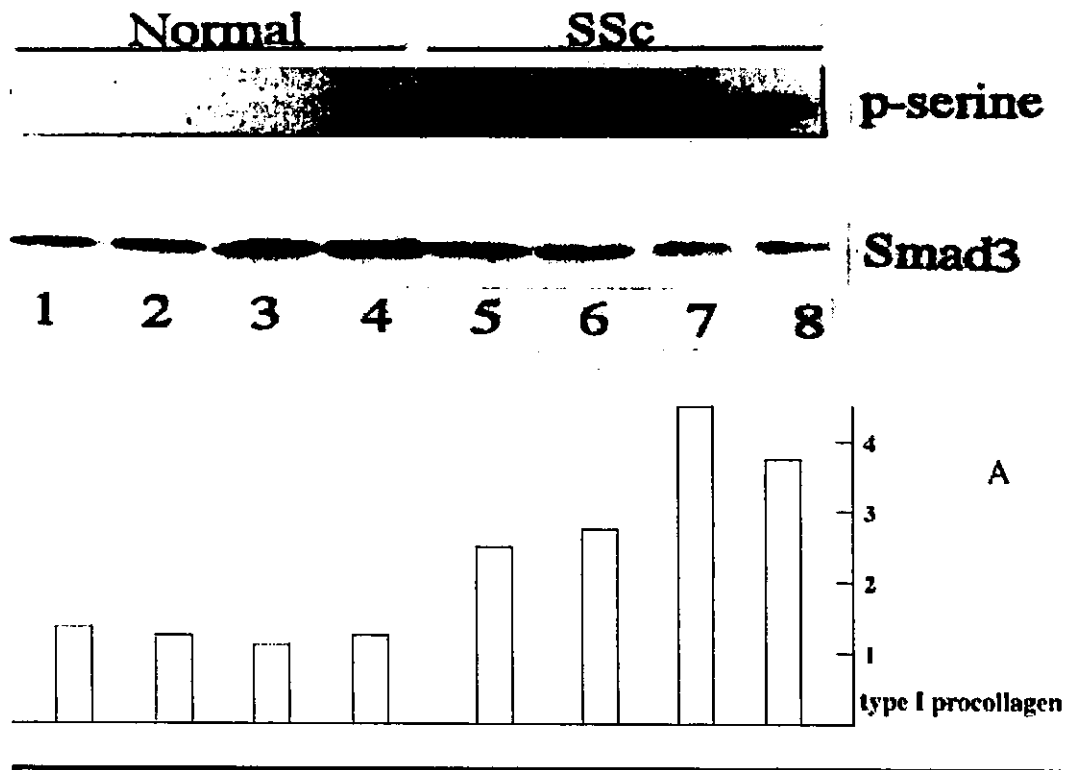
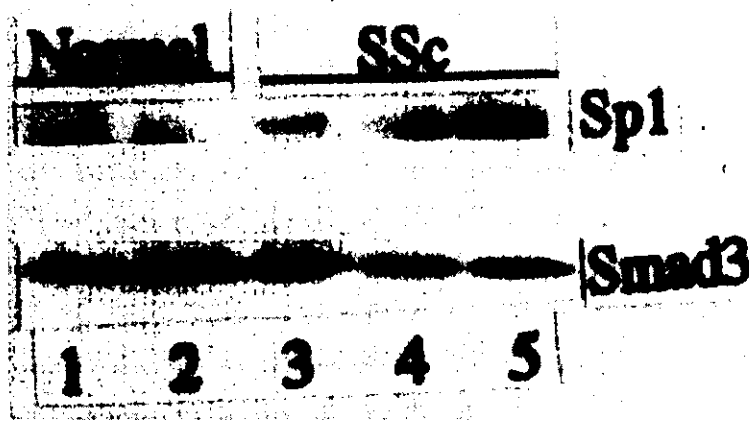
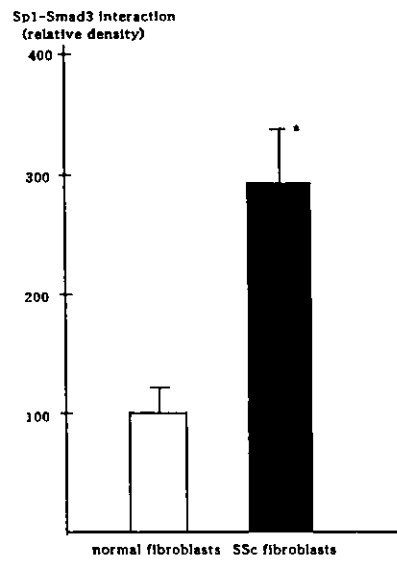


図 3. Smad3 のセリン残基のリン酸化を免疫沈降法にて検討した。強皮症線維芽細胞では Smad3 のセリン残基のリン酸化が認められ I 型コラーゲン蛋白発現量と相関したが、正常線維芽細胞においては Smad3 のセリン残基のリン酸化は認められなかった。

A



B



C

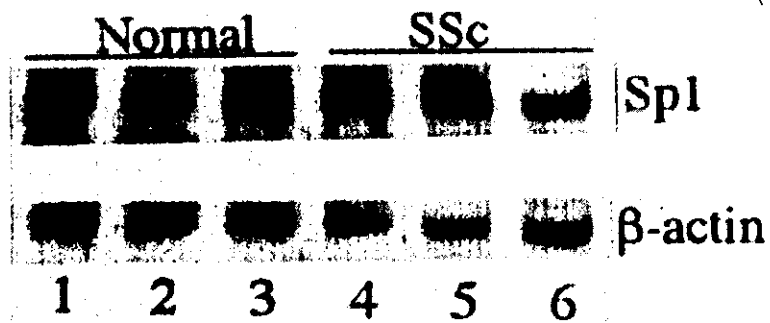


図 4. Sp1 と Smad3 の会合について免疫沈降法にて検討。強皮症線維芽細胞では恒常的に Sp1 と Smad3 が会合していることが示された (A&B)。Sp1 の発現量を免疫プロット法で検討。正常線維芽細胞と強皮症線維芽細胞では Sp1 の発現量に差はなかった (C)。

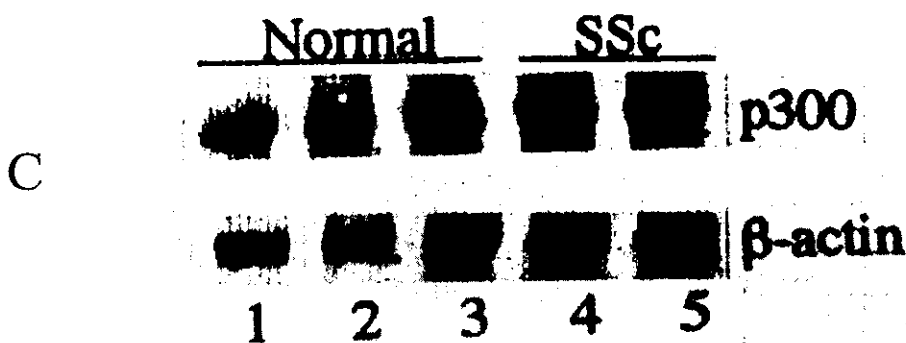
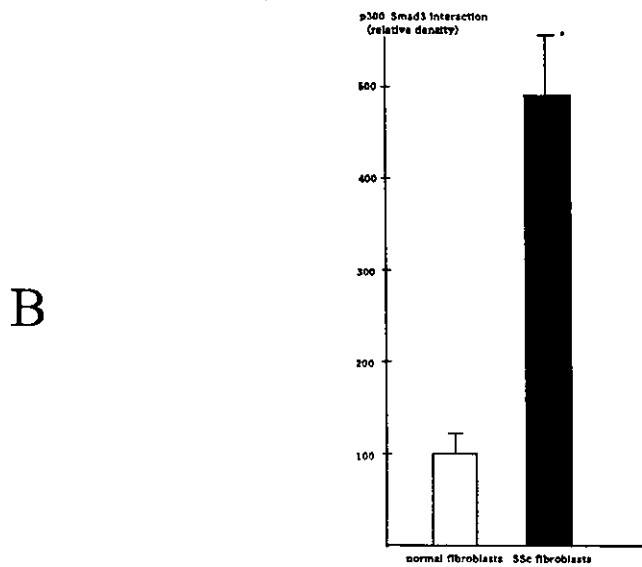
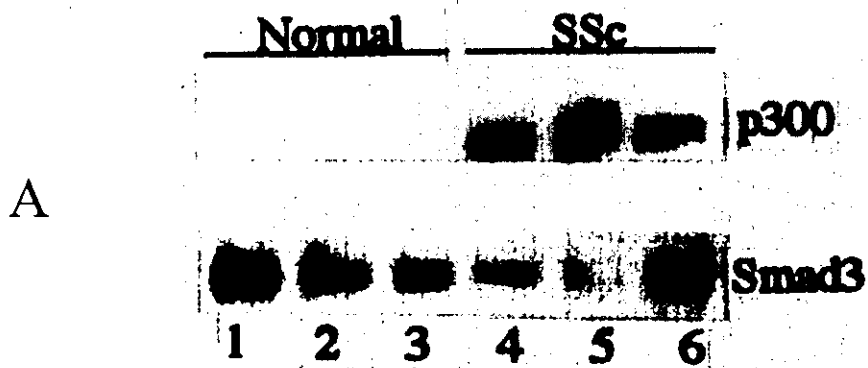


図 5. 強皮症線維芽細胞では恒常的に p300 と Smad3 が会合していることが示された (A&B)。p300 の発現量は正常線維芽細胞と強皮症線維芽細胞では差はなかった (C)。

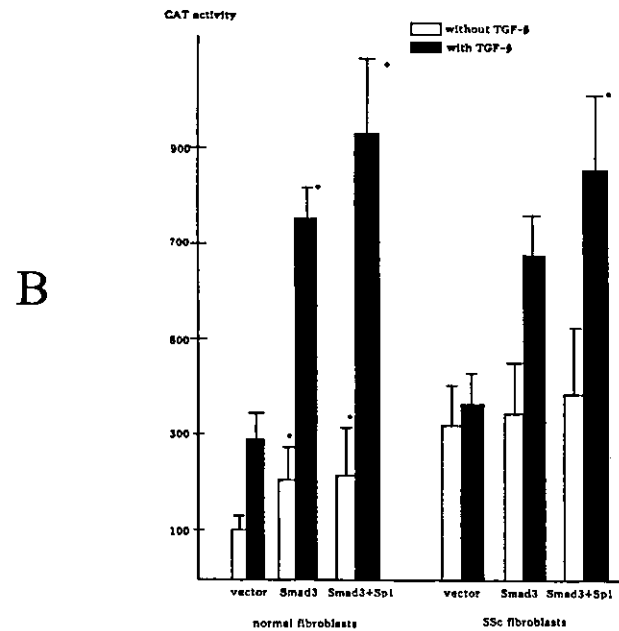
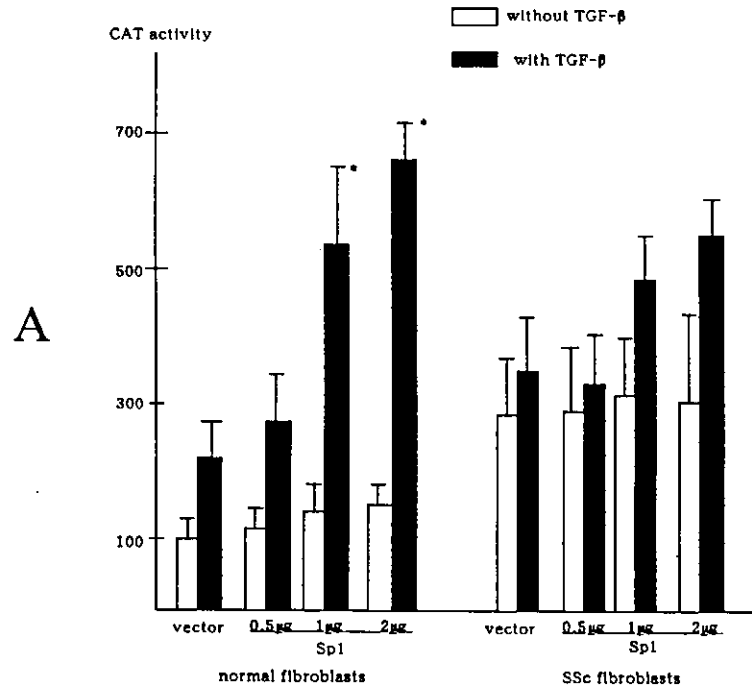


図 6. Sp1 を一過性に強発現してヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性を CAT assay にて検討。正常線維芽細胞では Sp1 の一過性強発現によってコラーゲン遺伝子転写活性の basal level は変化しなかったが、TGF- β による反応性は亢進した。強皮症線維芽細胞では Sp1 の一過性強発現によってコラーゲン遺伝子転写活性の basal level も TGF- β に対する反応性も有意な変化がなかった (A)。Sp1 と Smad3 を同時に一過性強発現した場合のコラーゲン遺伝子転写活性について検討した。正常線維芽細胞では Sp1 と Smad3 の一過性強発現にてコラーゲン遺伝子転写活性の basal level が亢進し、さらに TGF- β に対する反応性が強く誘導された。強皮症線維芽細胞においては Sp1 と Smad3 の一過性強発現にて basal level には有意な変化がなかったが、TGF- β に対する反応性は、正常線維芽細胞と比較して弱いながら亢進した (B)。

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

限局性強皮症病変部および健常部由来培養皮膚線維芽細胞における

Smad2/3 リン酸化と Smad7 および CTGF 発現量の検討

分担研究者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学教授
研究者 橋本姿恵 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学
研究者 安部正敏 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学講師
研究者 横山洋子 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学

研究要旨

限局性強皮症患者の病変部および健常部由来の培養皮膚線維芽細胞 (n=3) に TGF- β_1 10ng/ml を添加し、Western blot 法にて Smad2/3 のリン酸化比と Smad7 および CTGF の発現量を検討した。CTGF は健常部由来細胞において添加 24 時間でピークを迎え 96 時間までに有意に減少したが、病変部由来細胞では高いレベルが維持された。Smad2/3 リン酸化比と Smad7 では両群間に有意な差はみられなかった。限局性強皮症病変部では、CTGF の発現増加が真皮線維化の一因である可能性がある。

A. 研究目的

Transforming Growth Factor (TGF- β) は線維芽細胞に対し細胞外基質産生作用^{1,2)}、細胞増殖抑制作用^{3,4)}やアポトーシス制御作用⁵⁾など多彩な機能を持つことが知られている。TGF- β は、これまで諸臓器の線維化を来たす疾患の病態に関与していることが示唆されており⁶⁾、強皮症においても皮膚硬化のメカニズムとして TGF- β の I 型および II 型受容体の発現亢進^{7,8)}や TGF- β シグナル伝達系 (Smad pathway) の異常^{9,10)}が報告されている。強皮症ではさらに TGF- β により誘導された connective tissue growth factor (CTGF) が、病変部の線維化維持の一因である可能性が示唆されている¹¹⁾。また、限局性強皮症に

においても病変部での CTGF mRNA 発現の亢進¹²⁾、TGF- β 受容体の発現¹³⁾や TGF- β 3 産生の亢進¹⁴⁾が指摘されている。しかし、これまでに限局性強皮症患者の同一個体の病変部（硬化部）と健常部における Smad 伝達系や CTGF の発現について比較検討した報告はない。今回我々は、限局性強皮症の病変部および同一患者健常部由来皮膚線維芽細胞を用いて、TGF- β シグナル伝達系と CTGF 蛋白発現の差異を検討したので報告する。

B. 研究方法

1) Western blot 法

限局性強皮症患者 (n=3) の病変部および健常部から得た皮膚線維芽細胞を 24 時間無血清

培地で培養した後, TGF- β_1 を 10ng/ml 添加した. 1~96 時間培養後に細胞を回収し蛋白を抽出, Western blot 法を用いて蛋白発現量を検討した. ニトロセルロース膜は一次抗体 Smad2/3(E23), phospho-Smad2/3 (p-Smad2/3)(Ser 433/435), Smad7(N-19), CTGF(L-20) (全て Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-actin antibody (SIGMA, St. Louis, MO), 二次抗体 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (ICN Biomedicals, Aurora, OH)で反応させた後, ECL system (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ)を用いて検出した. 検出バンドは NIH Image にて定量した. 症例間の差異が大きかったため, 各サンプルにおける定量結果を TGF- β_1 無添加の健常部を 1 として補正した. 統計処理は unpaired Student's *t* test を行い, $P < 0.05$ を有意とした.

2) 免疫蛍光法

線維芽細胞はカバーガラス上に無血清培地にて 48 時間単層培養し, TGF- β_1 を 10ng/ml 添加培地にてさらに 12 および 24 時間培養した. 3%ホルムアルデヒドにて細胞を固定後, 一次抗体 CTGF(L-20), 二次抗体 Alexa Fluor® 488 rabbit anti-goat IgG (H+L) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)で発色させた.

C. 研究結果

1) Smad2/3 のリン酸化比と Smad7 蛋白発現量

Smad2/3, p-Smad2/3 のバンドを定量しリン酸化比をみた. 健常部では TGF- β_1 添加 1 時間後に有意にリン酸化比は増加していた. しかし,

病変部と健常部では有意差はなかった(図 1, 2). Smad7 蛋白発現量は病変部で TGF- β_1 無添加, および添加 1 時間後で発現の増加傾向があったが, 有意差はなかった(図 3, 4).

2) CTGF 蛋白発現量

健常部および病変部とも TGF- β_1 添加 12 時間後に発現は有意に増加した(図 5, 6, $P < 0.05$). その後 24 時間まで増加傾向にあった. 6 時間までの検討でも 6 時間まで増加傾向にあり病変部で発現が増強している傾向にあった(data not shown). TGF- β_1 添加 96 時間後までの検討では, 健常部では, 添加 24 時間後に発現量はピークに達し(図 7, 8, $P < 0.05$), 添加 24 時間から 96 時間までは有意に減少した(48 および 96 時間; $P < 0.05$, 72 時間; $P < 0.01$). 一方, 病変部では, 24 時間から 48 時間で減少がみられたものの

($P < 0.05$), 24 時間から 72 時間, 96 時間の変化では統計学的に有意な変化はなかった.

3) 抗 CTGF 抗体をもちいた免疫蛍光法

病変部では無添加の状態においても CTGF は発現があった. TGF- β_1 10ng/ml 添加 12 時間, 24 時間後には両者で発現が増加した(図 9, $\times 100$). CTGF は核周囲に強く染色され, 病変部と非病変部での局在の差異はなかった(図 10, $\times 400$).

D. 考案

線維芽細胞に対する TGF- β の作用は, 細胞外基質産生亢進を誘導させることから, 種々の線維化をきたす疾患で注目されてきた. 近年では, 強皮症病変部や線維化モデルマウスにおいて, TGF- β は病初期に線維化を誘導するものの, その維持には CTGF や basic fibroblast growth factor (bFGF) 等, 細胞成長因子の活性化が必要であることが報告されてきた¹⁵⁻¹⁷. 今回, 病変部および健常部の皮

膚線維芽細胞を同一の限局性強皮症患者から得て TGF- β シグナル伝達系と CTGF の発現を比較検討した。病変部では CTGF の発現が健常部より亢進しており、さらに病変部、健常部ともに TGF- β_1 添加 24 時間までは CTGF の発現が亢進した。添加 48 時間では、病変部、健常部ともに 24 時間と比べ有意に CTGF の発現量は減少したが、48 時間、96 時間において有意な減少があったのは健常部のみであった。従って、限局性強皮症の病変部においても、TGF- β_1 により誘導された CTGF 発現が健常部と比べ高いレベルにあることにより、組織の線維化が維持されている可能性があると考えた。

TGF- β_1 添加前後および病変部、健常部間での CTGF は変化したが、一方、Smad2/3 のリン酸化および抑制系 Smad7 発現量の検討では有意な差異は見出せなかった。強皮症線維芽細胞では、TGF- β のシグナル伝達として Smad 系を介さず、CTGF promoter の活性化をきたすことを報告したのもあり^{18,19)}、今回の検討も同様の機序を示唆している可能性がある。また、病変部線維芽細胞は臨床的・組織学的にも皮膚硬化・線維化が完成していた部より採取しており、TGF- β に対する反応が减弱していたのかもしれない。

E. 結論

限局性強皮症病変部では、健常部と比較し CTGF 発現増加が真皮線維化の一因である可能性を示唆した。

F. 文献

1 Varge J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor- β causes persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and

fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochemistry* 1987; 297: 597-604.

- 2 Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β . *Growth Factors* 1993; 8: 1-9.
- 3 Takehara K, LeRoy EC, Grotendorst GR. TGF- β inhibition of endothelial cell proliferation: Alteration of EGF binding and EGF-induced growth regulatory (competence) gene expression. *Cell* 1987; 49: 415-22.
- 4 Iavaron A, and Massague J. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF- β in cell lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* 1997; 387: 417-20.
- 5 Golstein P, and Wyllie AH. T cell death and transforming growth factor- β 1. *J Exp Med* 2001; 194: 19-21.
- 6 Border WA. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *N Eng J Med* 1994; 10: 1286.
- 7 Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. 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* 2002; 44: 474-80.
- 8 Kubo M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Upregulated expression of transforming growth factor- β receptors in dermal fibroblasts of skin section from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2002;

- 29: 2558-64.
- 9 Dong C, Zhu S, Wang T, *et al.* Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 3908-13.
 - 10 Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibrosis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 1964-78.
 - 11 Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, *et al.* 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.
 - 12 Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, *et al.* Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 1996; **106**: 729-33.
 - 13 Kubo M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Up-regulated expression of transforming growth factor β receptors in dermal fibroblasts in skin sections from patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 2002; **44**: 731-4.
 - 14 Kawakami T, Soma Y, Baba T, *et al.* Immunohistochemical analysis of transforming growth factor β 3 expression in solitary morphea profunda with histological membranocystic changes. *Br J Dermatol* 2002; **146**: 171-3.
 - 15 Shimozaki M, Kawara S, Hayashi N, *et al.* 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* 1997; **237**: 292-7.
 - 16 Mori T, Kawara S, Shimozaki M, *et al.* Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor- β in persistent fibrosis: a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999; **181**: 153-9.
 - 17 Takehara K. Pathogenesis of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003; **30**: 755-9.
 - 18 Holmes A, Abraham DJ, Sa S, *et al.* CTGF and SMADs maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001; **276**: 10594-601.
 - 19 Leask A, Sa S, Holmes A, Shiwen X, Black CM, Abraham DJ. The control of *ccn2* (*ctgf*) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *Mol Pathol* 2001; **54**: 180-3.

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的所有権の出願・登録状況 なし

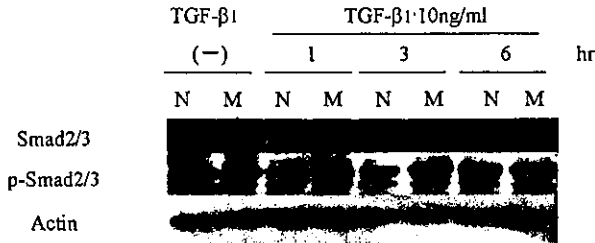


图1 Smad2/3 and p-Smad2/3 expression in fibroblasts from normal or lesional skin of morphea. N: normal skin (unaffected), M: lesional skin (affected), p-Smad2/3: phosphorylated Smad2/3

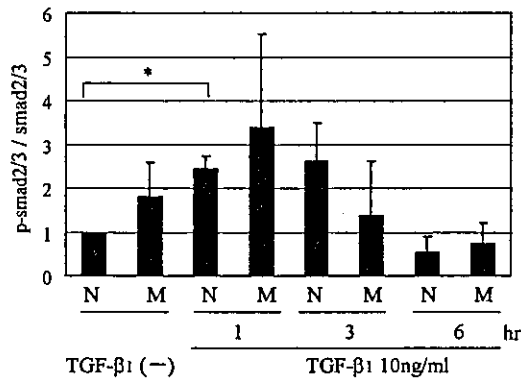


图2 p-Smad2/3 / Smad2/3 ratio in fibroblasts from normal or lesional skin (n=3). N: normal skin (unaffected), M: lesional skin (affected), *P<0.05

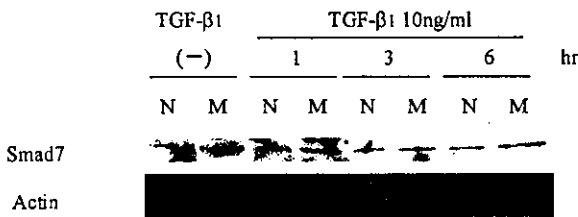


图3 Smad 7 expression in fibroblasts from normal or lesional skin of morphea. N: normal skin (unaffected), M: lesional skin (affected)

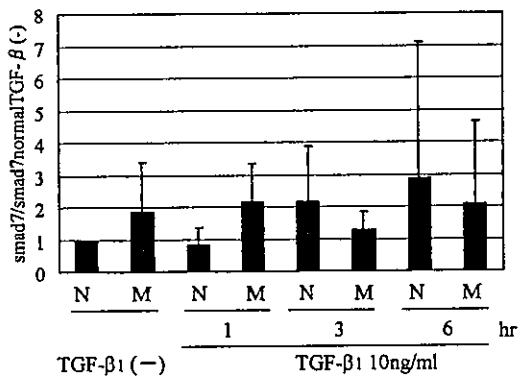


图4 Smad7 expression in fibroblasts from normal or lesional skin (n=3). N: normal skin (unaffected), M: lesional skin (affected)

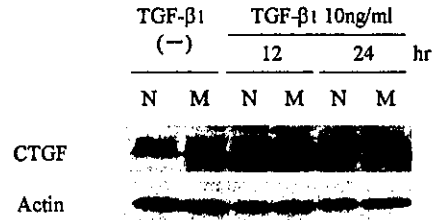


图5 CTGF expression in fibroblasts from normal or lesional skin of morphea. N: normal skin (unaffected), M: lesional skin (affected)

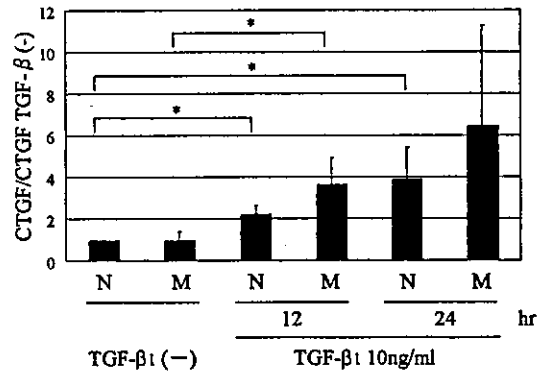


图6 CTGF expression in fibroblasts from normal or lesional skin (n=3). N: normal skin (unaffected), M: lesional skin (affected), *P<0.05

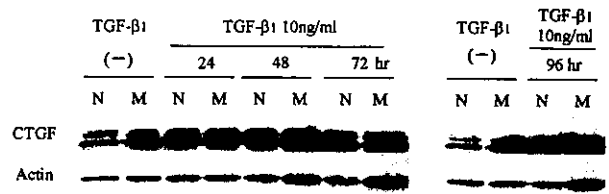


图7 CTGF expression in fibroblasts from normal or lesional skin of morphea. N: normal skin (unaffected), M: lesional skin (affected)

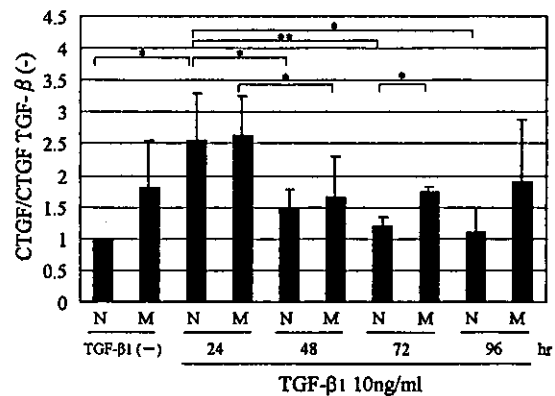
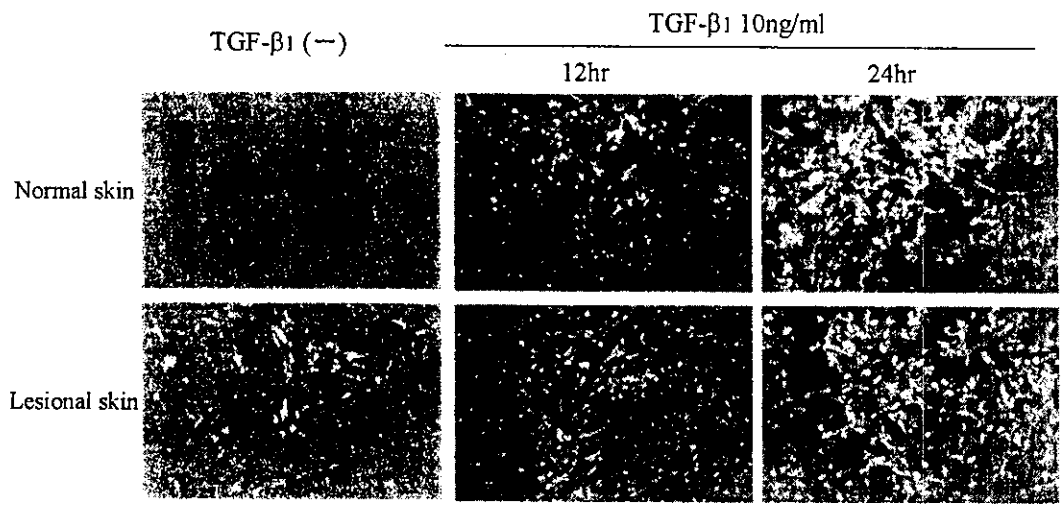
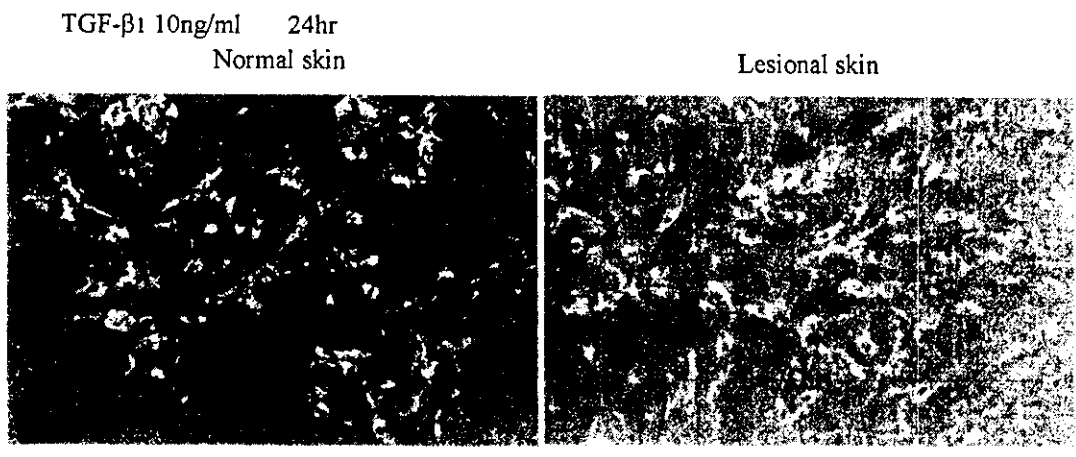


图8 CTGF expression in fibroblasts from normal or lesional skin (n=3). N: normal skin (unaffected), M: lesional skin (affected), *P<0.05, ** P<0.01



☒ 9 CTGF expression in fibroblasts from normal or lesional skin ($\times 100$).



☒ 10 CTGF expression in fibroblasts from normal or lesional skin ($\times 400$).

強皮症線維芽細胞における α smooth muscle actin (SMA) 発現亢進の機序について

分担研究者 尹 浩信 東京大学医学部医学系研究科・医学部皮膚科学講師
協力者 三村佳弘 東京大学医学部医学系研究科皮膚科学大学院生
協力者 玉置邦彦 東京大学医学部医学系研究科・医学部皮膚科学教授

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は α Smooth muscle actin(SMA)を過剰発現するmyofibroblastに分化していることが知られている。今回我々は強皮症皮膚線維芽細胞において α SMAの過剰発現にはFocal Adhesion Kinase (FAK)の恒常的リン酸化が関与していることを明らかにした。さらに、 α SMAの過剰発現及びFAKの恒常的リン酸化はautocrine TGF beta signalingにより維持されている可能性を示した。以上より、FAKのリン酸化およびTGF beta signalingの抑制は α SMAの過剰発現を抑え、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

従来の報告により以下のことが明らかとなっている。(A) 汎発性強皮症患者由来皮膚線維芽細胞は α SMA陽性細胞即ち 1) myofibroblastsとしての性格を持つ。(B) 肺、腎および肝など他臓器の線維化病巣においても α SMA陽性細胞が認められる 2)。(C) α SMA陽性細胞はI型コラーゲンなどの細胞外matrixを過剰産生し、強皮症にお

ける主病因の1つとされる線維化にかかわっている 3)。(D) 正常細胞でもTGF-beta刺激により α SMA発現を誘導することができる。(E) 肺線維芽細胞において、TGF-beta刺激による α SMA発現誘導にはFocal Adhesion Kinaseが関与している 4)。
Focal Adhesion Kinaseは一種のtyrosine kinaseであり、細胞はinterin等を介して細胞外matrixと接着することによりリン酸化される。

今回、我々はalpha SMA発現におけるFAK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 5 名の前腕由来の皮膚線維芽細胞および正常人 5 名由来の皮膚線維芽細胞を使用した。

2) 試薬

PP2 は FAK の阻害剤として使用した。また、FAK のリン酸化能力を持たない kinase deficient mutant FAK 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 alpha SMA 抗体、抗 p-FAK (Tyr397) 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) 免疫蛍光法

スライドガラス上の線維芽細胞と、抗 alpha SMA 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

1) 正常および強皮症皮膚線維芽細胞における alpha SMA 発現量。

免疫プロット法にて cell lysate 中に含まれる alpha SMA を測定した。強皮症線維芽細胞は正常細胞に比べ、約 8 倍程度 alpha SMA の発現が亢進していた (図1)。

2) 正常および強皮症皮膚線維芽細胞におけ

る FAK のリン酸化レベル。

免疫プロット法にて cell lysate 中に含まれる phospho-FAK (Tyr-397) を測定した。強皮症線維芽細胞は正常細胞に比べ、約 1.8 倍程度 alpha SMA の発現が亢進していた (図 2)。

3) TGF beta 刺激下/非刺激下での PP2 による正常および強皮症皮膚線維芽細胞における alpha SMA 発現量の変化。

免疫プロット法にて cell lysate 中に含まれる alpha SMA を測定した。TGF beta 刺激により、正常細胞中の alpha SMA 発現量は有意に亢進したが、強皮症細胞では有意な変化は見られなかった。また、PP2 は強皮症細胞における basal の alpha SMA 発現量を有意に減少させたが、正常細胞では有意な減少を認めなかった。さらに、PP2 は正常細胞における TGF beta による alpha SMA 発現量の亢進作用を阻害した。

次に免疫蛍光法を用いて、PP2 存在下/非存在下での TGF beta による正常および強皮症皮膚線維芽細胞における alpha SMA 発現量の変化を観察した。免疫プロット法とほぼ同様の結果を得た。

4) TGF beta 刺激下/非刺激下での kinase deficient FAK 一過性強発現による正常および強皮症皮膚線維芽細胞における alpha SMA 発現量の変化。

PP2 の代わりに、kinase deficient mutant FAK を一過性に強発現させ、cell lysate 中の alpha SMA 発現量の変化を免疫プロット法にて検討した。

PP2 を用いた場合と同様に、kinase

deficient mutant FAK を一過性に強発現させることにより強皮症細胞における basal の alpha SMA 発現量は有意に減少したが、正常細胞では有意な減少を認めなかった。さらに、正常細胞における TGF beta による alpha SMA 発現量の亢進作用を阻害した。

4) TGF beta antisense oligonucleotide による正常および強皮症皮膚線維芽細胞における alpha SMA 発現量の変化

強皮症細胞における alpha SMA 発現量亢進の機序を調べるために、TGF beta antisense oligonucleotide による正常および強皮症皮膚線維芽細胞における alpha SMA 発現量の変化をしらべた。TGF beta antisense oligonucleotide は有意に強皮症細胞における basal の alpha SMA 発現量を減少させたが、正常細胞では有意な変化を認めなかった。

5) 正常細胞における TGF beta による FAK のリン酸化レベルの変化。

免疫プロット法にて正常細胞の cell lysate 中に含まれる phospho-FAK (Tyr-397)量を測定した。TGF beta 刺激により時間依存性にリン酸化レベルの上昇を認めた。

6) TGF beta antisense oligonucleotide による正常および強皮症皮膚線維芽細胞における FAK リン酸化レベルの変化

強皮症細胞における FAK の恒常的リン酸化亢進の機序を調べるために、TGF beta antisense oligonucleotide による正常および強皮症皮膚線維芽細胞における FAK のリン酸化レベルの変化をしらべた。TGF beta antisense oligonucleotide は有意に強皮症

細胞における basal の p-FAK 量を減少させたが、正常細胞では有意な変化を認めなかった。

7) RGD motif containing peptide による正常および強皮症皮膚線維芽細胞における alpha SMA 発現量の変化

FAK は細胞外 matrix と integrin が接着するとリン酸化される。Integrin の作用を阻害する RGD motif containing peptide による正常および強皮症皮膚線維芽細胞における alpha SMA 発現量の変化を調べた。

RGD motif containing peptide は有意に強皮症細胞における basal の alpha SMA 発現量を減少させたが、正常細胞では有意な変化を認めなかった。

D. 考案

今回の検討により、強皮症線維芽細胞では恒常的にFAKのリン酸化が亢進しており、これを阻害することでalpha SMAの発現を抑えることができることがわかった。強皮症細胞におけるFAKの恒常的リン酸化亢進および alpha SMA発現亢進にはautocrin TGF beta signalingが関与しており、endogenous TGF beta 産生を阻害することにより、これらの発現亢進を抑制できることもわかった。alpha SMA陽性細胞は陰性細胞に比べ、細胞外 matrix産生が多く、線維化に寄与しているといわれている。今回我々が行った検討は将来線維化を抑制する治療に結びつきうる可能性を秘めている。