

コラーゲンの産生を抑制する Fli-1 は
汎発性強皮症皮膚において減少している

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 久保正英 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 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

転写因子 Fli-1 は培養線維芽細胞においてコラーゲンの生合成を抑制するとされている。In vivo においても Fli-1 とコラーゲンの生合成に逆相関が見られるかを検討した。また、強皮症患者皮膚における Fli-1 の発現量を in vitro および in vivo において調べた。全身性強皮症患者 16 例及び健常人 16 例の皮膚より得られた培養線維芽細胞において Western Blot 法により、Fli-1 の発現を検討した。また、強皮症患者 12 例および健常人 5 例の皮膚組織を用い、Fli1 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。コラーゲンの mRNA の発現を in situ hybridization 法により検討した。強皮症皮膚培養線維芽細胞は健常人皮膚培養線維芽細胞に比較して Fli-1 の発現が減少していた。また、健常人皮膚線維芽細胞ではコラーゲンの mRNA の発現と Fli-1 の免疫染色における発現量に逆相関が認められた。強皮症皮膚線維芽細胞では Fli-1 の発現が低下していた。このことから Fli-1 は in vivo においてコラーゲンの生合成と逆相関を示し、さらに強皮症皮膚線維芽細胞において発現が減少していた。強皮症において Fli-1 の発現減少によりコラーゲン生合成が亢進している可能性があると考えられた。

A. 研究目的

転写因子 Fli1 は Ets1 などとともに Ets family に属する転写因子で(1)、Ets Binding Domain を介して DNA の Ets binding site に結合し、転写調節に関わるとされている(2)。また、Ets family に属する転写因子は、もともと癌遺伝子として発見されたもので(3)、悪性腫瘍における異常発現はよく知られているが、全身性紅斑性狼瘡や関節リウマチなど膠原病でも、Ets family の転写因子の発現

の増加あるいは減少が報告されている(4, 5)。

Fli-1 の発現とコラーゲンの発現の関係においては Collagen のプロモーター領域に Ets Binding site が存在し、in vitro において、Fli-1 を一過性に強く発現させることにより、コラーゲンの転写が抑制されたという報告がある(6)。

今回、In vitro においても Fli-1 の発現とコラーゲンの発現に逆相関がみられるかどうかを検討した。さらに、汎発性強皮症はコ

ラーゲン産生の亢進のモデル疾患として考えられており、汎発性強皮症患者皮膚由来の培養線維芽細胞および汎発性強皮症患者皮膚組織の線維芽細胞ではコラーゲンの産生の増加が既に報告されている(7-10)。今回、汎発性強皮症患者由来の培養線維芽細胞と皮膚組織を用いて、In vitro および In vivo において Fli-1 の発現量を検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

In vitro の検討においてはアメリカリウマチ協会の診断基準案を満たす、汎発性強皮症 16 例由来の培養線維芽細胞および健常人 16 例由来の培養線維芽細胞を用いた。In vivo の検討においては汎発性強皮症 12 例の皮膚組織および健常人 8 例の皮膚組織を用いた。汎発性強皮症はいずれも発症 2 年以内で diffuse type の汎発性強皮症患者の前腕伸側より生検した組織あるいは組織より得られた培養線維芽細胞にて検討し、健常人対照は性および年齢をほぼ一致させた健常人の前腕伸側より生検した組織あるいは組織より得られた培養線維芽細胞を 3 から 5 代継代して用いた。

2) 免疫プロット法

培養細胞の全細胞抽出液をポリアクリ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サンタクルズ社より購入したポリクローナル抗 Fli-1 抗体あるいは抗 Ets-1 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光させ検出した。

3) 免疫染色

一次抗体は免疫プロットと同じポリクローナル抗 Fli-1 抗体を用いた。5 μ m 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させ、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 (ベクター社(Burlingame, CA)) にて 30 分反応させ、DAB 基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。

In situ hybridization 法

5 μ m 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 分前処理し、30 分 37°C にて 1.5 μ g/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。

Type I collagen の RNA プロブは pBluescript プラスミドに挿入した Col1A1 の cDNA 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 sense プロブと antisense プロブをラベルした。プロブはそれぞれ最終濃度 1 μ g/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。発色させた後、ヘマトキシリンまたはメチルグリーンにてカウンターステインを行った。

C. 研究結果

1) 免疫プロット

図 1A に抗 Fli-1 抗体を用いた免疫プロットの結果を示す。汎発性強皮症由来培養線維芽細胞中 16 例中 9 例において正常皮膚由来培養線維芽細胞に比較して減少していた。残りの 7 例において健常人由来のものと汎発性強皮症由来のもので差はなかった。また、図 1B に抗 Ets-1 抗体を用いたウエスタンプロットの主な結果を示す。正常人由来の培養線維芽細胞と汎発性強皮症由来の培養線維芽細胞で差は認められなかった。

2) ウサギ IgG を用いた免疫染色と sense プロローブを用いた in situ hybridization

ウサギ IgG を用いた SSc 皮膚および健常人皮膚における免疫染色で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 (図 2C)。sense プロローブを用いた SSc 皮膚および健常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 (図 2D)。このことから、今回の検討における各方法のバツ

クグラウンドが非常に少ないことが確認された。

3) 健常人の皮膚組織の抗 Fli-1 抗体免疫染色と Col1A1 の in situ hybridization

図 2A と図 2B は連続切片で、A に Fli1 に対する免疫染色を、B にコラーゲンに対する In situ hybridization を示します。A, B 内の X, Y, Z, W の部分の拡大を X, Y, Z, W に示す。Fli-1 が強く発現している X に対応する Y では collagen の発現がほとんどみられず、collagen の発現が強くみられる W に対応する Z では Fli1 の発現はほとんど認められない。

4) SSc 皮膚における抗 Fli-1 抗体の免疫染色

健常人皮膚では認められた Fli-1 の発現 (図 3A) が、汎発性強皮症患者皮膚では認められなかった (図 3B)。さらに真皮における Fli-1 陽性細胞の比率を各検体にて検討したところ、健常人皮膚と比較して汎発性強皮症患者皮膚では線維芽細胞の Fli-1 の陽性比率が低いという結果が得られた (図 3C)。

D. 考案

健常人皮膚においてはコラーゲンの産生・代謝は厳しく制御を受けているが、そのメカニズムはまだよく知られていない。過去の報告で Fli-1 がコラーゲン遺伝子の制御を行っている可能性が報告されている。

健常人由来皮膚培養線維芽細胞に比較して汎発性強皮症患者由来培養線維芽細胞では Fli-1 の発現が減少していたことから、in vitro の正常細胞で Fli-1 を増加させたとき

に Collagen の産生が低下するという過去の報告(6)に一致する結果となった。

また、本研究において、ヒトの *in vivo* における皮膚線維芽細胞の Fli-1 の発現がすべての線維芽細胞に陽性なのではなくて、一部の細胞にのみ陽性であること、また、その比率が線維化疾患モデルである汎発性強皮症において変化していたということは Fli-1 が発現する細胞の比率を変化させることで Collagen の代謝に関与していることが示されたものと考えられる。

健常人皮膚組織において線維芽細胞に Fli-1 の発現が強く認められた部位では Collagen の発現が認められず、線維芽細胞に Collagen の発現が強く認められた部位では Fli-1 の発現が認められなかった。すなわち、Fli-1 の発現と collagen の発現が逆相関を示しており、このことから正常皮膚において Fli-1 の発現調節が Collagen の産生に密接に関与していることが示唆された。

汎発性強皮症患者組織では健常人皮膚組織に比較すると Fli-1 の発現はほぼ認められず、線維芽細胞の Fli-1 陽性細胞の比率は著しく低いことが認められ、汎発性強皮症における Collagen 産生増加に Fli-1 の低下が関与していることが *in vivo* において認められた。以上よりこの研究において Fli-1 の減少が Collagen の産生を上昇させるという仮説が生体内で、しかも疾患モデルである汎発性強皮症において確認されたと考えられる。

E. 結 論

汎発性強皮症において Fli1 の発現の減少

によってコラーゲンの産生が亢進している可能性が考えられた。

F. 文 献

1. Wasyluk, B., J. Hagman, and A. Gutierrez-Hartmann. 1998. Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends. Biochem. Sci.* 23:213.
2. Trojanowska, M. 2000. Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene.* 19:6464.
3. Truong, A. H., and Y. Ben-David. 2000. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene.* 19:6482.
4. Spyropoulos, D. D., P. N. Pharr, K. R. Lavenburg, P. Jackers, T.S. Papas, M. Ogawa, and D. K. Watson. 2000. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 20:5643.
5. Hart, A., F. Melet, P. Grossfeld, K. Chien, C. Jones, A. Tunnacliffe, R. Favier, and A. Bernstein. 2000. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity.* 13:167.

6. Czuwara-Ladykowska, J., F. Shirasaki, P. Jackers, D. K. Watson, and M. Trojanowska. 2001. Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Spl-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 276:20839.
7. Trojanowska, M., E. C. LeRoy, B. Eckes, and T. Krieg. 1998. Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin. *J. Mol. Med.* 76:266.
8. Kahari, V.M. 1993. Activation of dermal connective tissue in scleroderma. *Ann. Med.* 25:511.
9. Fleischmajer, R., S. Gay, W. N. Meigel, and J. S. Perlish 1978. Collagen in the cellular and fibrotic stages of scleroderma. *Arthritis Rheum* 21:418.
10. Ohtsuka, T., N. Koibuchi, H. Sakai, A. Yamakage, and S. Yamazaki. 1999. Quantitative analysis of alpha 1(I) and alpha 1(III) procollagen mRNA expression in systemic sclerosis skin tissue--an in situ hybridization study. *Arch. Dermatol. Res.* 291:575.

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Kubo, J. Czuwara-Ladykowska, O. Moussa, M. Markiewics, E. Smith, R.M. Silver, S. Jablonska, M. Blaszczyk, D.K. Watson, and M.

Trojanowska: Persistent Down-Regulation of Fli1, a Suppressor of Collagen Transcription, in Fibrotic Scleroderma Skin. *Am J Path* 163:571-581, 2004.

2. 学会発表

第 55 回日本皮膚科学会中部支部総会「コラーゲンの産生を抑制する Fli-1 は汎発性強皮症において減少している」

平成 16 年 9 月 12 日

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

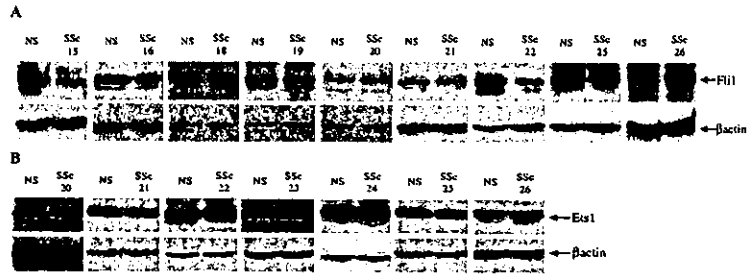


図1：(A)健康人(NS)および汎発性強皮症患者(SSc)の培養線維芽細胞を用いた抗 Fli-1 抗体を用いた免疫ブロット。(B)健康人(NS)および汎発性強皮症患者(SSc)の培養線維芽細胞を用いた抗 Ets-1 抗体を用いた免疫ブロット。

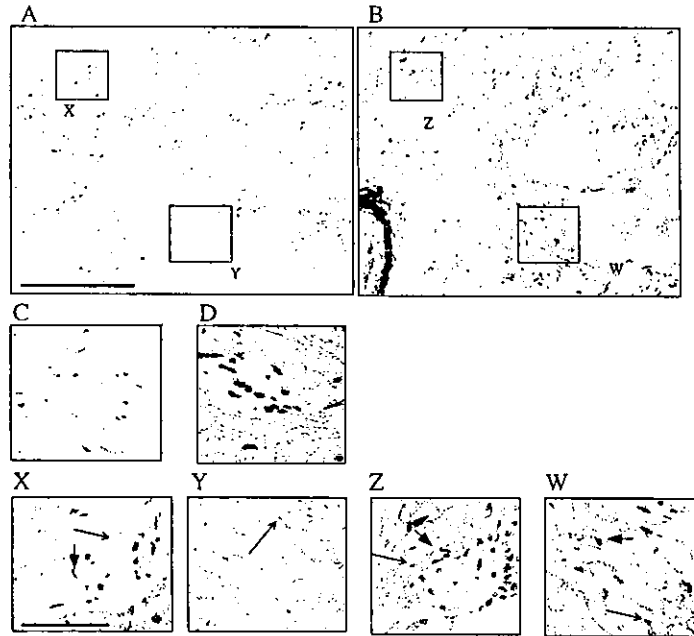


図2：(A) 健康人皮膚の抗 Fli-1 抗体による免疫染色。Scale bar は 200 μ m を示す。(B)(A)の組織の連続切片における Col1A1 のアンチセンスプローブによる *in situ* hybridization。(C)正常皮膚における正常ウサギ IgG を用いた免疫染色。(D)SSc 皮膚における Col1A1 の sense プローブを用いた *in situ* hybridization。(X、Y、Z、W) それぞれ (A) または (B) における標識された部分の拡大。Scale bar は 20 μ m を示す。

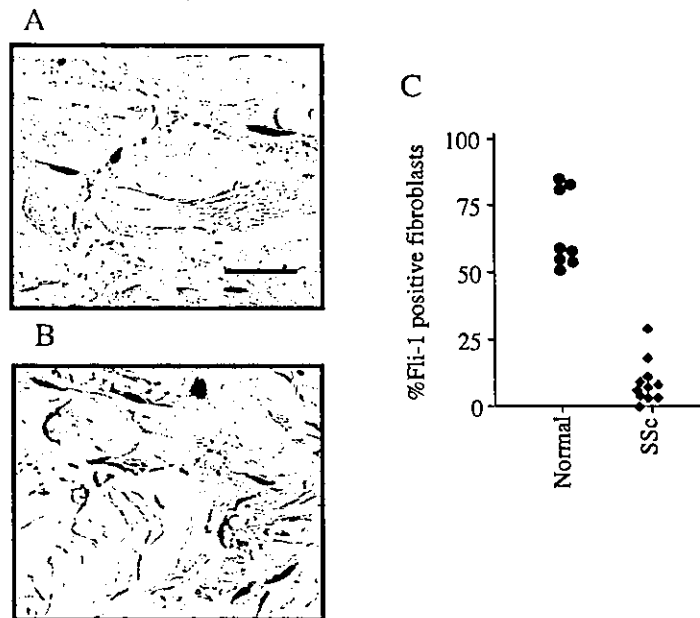


図3：(A) 健康人皮膚における抗 Fli-1 抗体による免疫染色。(B) SSc 皮膚における抗 Fli-1 抗体による免疫染色。(C)健康人皮膚(Normal)および SSc 皮膚における線維芽細胞の抗 Fli-1 抗体における免疫染色による陽性率。Scale bar は 20 μ m を示す。

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

Sphingosine kinase のコラーゲン遺伝子発現に与える影響について

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

協力者 山中正義 群馬大学医学部附属病院皮膚科助手

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

Sphingosine kinase (SPHK)は PDGF, VEGF, TNF α , TGF β などによる刺激により誘導され、種々の細胞内シグナル伝達機構に関与することが明らかになってきている。今回我々は、SPHK のコラーゲン遺伝子発現に与える影響について検討した。Transient transfection 法により Sphingosine kinase-1 (SPHK1)遺伝子を過剰発現させた細胞では I 型コラーゲン遺伝子の転写活性は抑制され、RNAi 法により SPHK1 遺伝子発現を抑制させた細胞では I 型コラーゲン遺伝子の転写活性は増強された。また、SPHK1 遺伝子を過剰発現させた細胞では NF- κ B、c-Jun 活性が亢進しており、SPHK1 はこれらの転写因子を介して I 型コラーゲン遺伝子の転写活性を抑制的に制御していることが示唆された。強皮症皮膚線維芽細胞の SPHK 活性について検討したところ、強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞に較べて SPHK 活性が抑制されていた。以上より、SPHK1 はコラーゲン転写活性を抑制的に制御する因子であり、強皮症患者では SPHK 活性が低下していることがコラーゲンの異常蓄積という強皮症の病態に関与をしている可能性があると考えた。

A. 研究目的

Sphingosine-1-phosphate (S1P) は、以前は sphingosine 代謝における一つの間代謝産物という位置付けであったが、近年になりシグナル伝達物質として重要かつ多彩な作用を有することが明らかとなってきている¹⁻³⁾。S1P は細胞増殖、アポトーシス、細胞分化、細胞骨格・細胞運動調節などにおいて多彩な活性を示し、腫瘍、血管新生、炎症などの病態への関与も報告されている。

細胞内で S1P は、S1P 合成酵素である Sphingosine kinase (SPHK)、分解酵素である sphingosine -1-phosphate phosphatase (SPPase)、sphingosine -1-phosphate lyase (S1PLyase) によりその生成・分解のバランスが制御されている。特に SPHK は platelet-derived growth factor (PDGF), tumor necrosis- α (TNF- α), nerve growth factor (NGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) など様々な成長因子により誘導されることが報告されており、細胞内 S1P 代

謝において中心的役割を果たしていると考えられている¹⁻³⁾。昨年我々は SPHK が transforming growth factor- β (TGF- β)により誘導され、TIMP-1 遺伝子発現を制御していることを報告した⁴⁾ が、細胞外マトリックスの主役であり、強皮症の病態にも深く関与しているコラーゲン遺伝子発現に関する報告は、まだほとんどない⁵⁾。

今回我々は、強皮症由来線維芽細胞の SPHK 活性を検討し、さらに、SPHK の I 型コラーゲン遺伝子の転写活性に与える影響を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞は、diffuse type に分類される全身性强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、全身性强皮症患者と年齢・性別が一致した健常人の前腕伸側より得た。培養線維芽細胞は、10%仔牛血清、2mL グルタミン含有 DMEM 培地にて継代し、継代 3-8 代目の細胞を用いた。

2) sphingosine kinase activity assay

Olivera and Spiegel⁶⁾ の方法に準じた。細胞を洗浄後、assay buffer で抽出。抽出したサンプルに sphingosine (50 μ M) と γ -[³²P]-ATP (10 μ Ci, 1 mM) を加えて 37°C で 30 分間反応させた。標識 SIP を薄層型クロマトグラフィーで分離し、X 線フィルムに露光した。バンドの定量化は PhosphorImager (Molecular Dynamics, Inc.; Sunnyvale, CA) を用いるか、プレートのバンドに一致する部位を scrape してシンチレーションカウンターにて測定した。

3) DNA transfection

皮膚線維芽細胞を 6-well plate に 1×10^5 個撒いて、翌日 lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、各種プラスミドを導入した。

4) Small Interfering RNA (siRNA)

siRNA を用いた hSPHK-1 遺伝子のノックダウンは、the siRNA user guide (<http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/sirna.html>) に準じた。スタートコドンから 70 塩基下流の 5'- GG CAA GGC CTT GCA GCT C-3' ⁷⁾ を作製 (Ambion, Austin, TX) し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて細胞に導入した。

5) CAT assay

Roche 社の CAT-ELISA キットを用いて CAT 活性を測定した。細胞を洗浄後、キット付属の lysis buffer で溶解したものをサンプルとし、プロトコールに準じて ELISA assay を行った。

6) Western blot

サンプルは whole cell lysate を用いた。バッファ - (Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), NaCl (150 mM), 1 % Nonidet P-40, 15 mM NaF, 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 10 μ g / mL aprotinin, 10 μ g / mL leupeptin) にて抽出し、SDS-PAGE で分離。ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体、二次抗体反応させた後、バンドは enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) キットを用いて検出した。抗体は rabbit polyclonal c-Jun, phospho-c-Jun (Cell Signaling Technology Beverly, MA) を用いた。

7) NF- κ B activation

Active Motif 社 (Carlsbad, CA) の Trans-AM kit を用いて、NF- κ B 活性化レベルを測定した。試料となる核抽出液は Active Motif 社 (Carlsbad, CA) の Nuclear Extraction kit を用いて調整した。NF- κ B に特異的な結合配列を含むオリゴヌクレオチドが高密度にコーティングされた 96 well plate に核抽出液を加え室温で 1 時間反応させた後、抗 NF- κ B (p50,p65) 抗体を加え、その後 HRP 標識 IgG

抗体を加えた。発色・発光させ、吸光度 (450nm) を測定した。

B. 研究結果

1) 強皮症患者由来皮膚線維芽細胞では、sphingosine kinase 活性が低下している。

発症2年以内の diffuse type の強皮症患者6名と年齢および性別が一致した健康人6名の前腕伸側より得た皮膚線維芽細胞の sphingosine kinase 活性を測定した。強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞に較べて sphingosine kinase 活性は低い傾向が見られた。また、24時間 TGF- β (5ng/ml) 刺激による sphingosine kinase 活性の亢進も強皮症線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞に比べて抑制されていた。(Fig.1) この結果から、強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞に比べて sphingosine kinase の活性が抑制されているものと考えられた。

2) SPHK1はI型コラーゲン遺伝子の転写活性を抑制する。

正常皮膚線維芽細胞に sphingosine kinase-1 (SPHK1) 遺伝子導入ベクターと Col1A2-CAT ないし Col1A2-luciferase 遺伝子導入ベクターを lipofectamine 2000 試薬を用いて co-transfection し、SPHK1がI型collagen遺伝子の転写活性に与える影響について検討した。sphingosine kinase 遺伝子を発現した細胞では、コントロールに較べてI型collagen遺伝子の転写活性は有意に抑制された。また、24時間 TGF β (2.5 ng/ml) 刺激によるI型collagen遺伝子の転写活性の亢進も有意に抑制された。(Fig.2) 次に、TNF α のI型collagen遺伝子の転写活性に与える影響を検討した。空ベクター

ないし SPHK 1 遺伝子導入ベクター と Col1A2-CAT 遺伝子導入ベクターを正常皮膚線維芽細胞に、co- transfection した後、24時間 serum starvation し、TNF- α を添加し24時間後に細胞を回収した。この条件下ではコントロール細胞では TNF α によるI型collagen遺伝子の転写活性の抑制は見られなかった。この理由としては、従来の報告に較べて⁸⁾、TNF α の作用時間が短かったためと考えられるが、同じ条件下で SPHK 1 遺伝子を発現した細胞では、TNF α によるI型collagen遺伝子の転写活性の抑制が見られた。(Fig.3) 以上の結果より、TNF α によるI型collagen遺伝子の転写活性の抑制に SPHK 1 が関与している可能性が示唆された。

次に、RNAi法を用いて、SPHK1遺伝子発現を抑制した皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン転写活性を検討した。正常皮膚線維芽細胞に scramble および SPHK1の siRNA を lipofectamine 2000 試薬を用いて導入し、翌日細胞をトリプシン処理して回収し、新たに細胞を撒き、翌日 lipofectamine 2000 試薬を用いて Col1A2-CAT 遺伝子導入ベクターを導入した。48時間後に細胞を回収し、CAT assay を行なった。(Fig.4) のように SPHK 遺伝子発現を抑制した皮膚線維芽細胞においては、コントロールに較べて、I型collagen遺伝子の転写活性が増強していた。この結果からも、SPHKがI型collagen遺伝子の転写活性を抑制していることが示唆される。

3) Sphingosine-1-phosphohate lyase (S1P lyase)はI型コラーゲン遺伝子の転写活性を増強する。

次に、S1Pを分解する酵素である S1PLyaseがI型collagen遺伝子の転写活性に与える影響につい

て検討した。S1PLyase 遺伝子を発現した正常皮膚線維芽細胞では、コントロールに較べて有意に I 型 collagen 遺伝子の転写活性が増強していた。(Fig.5) この結果は、SPHK が生成する S1P が I 型 collagen 遺伝子の転写活性を抑制的に制御していることを更に裏付ける結果と考えた。

4) SPHK1 は c-Jun および NF- κ B 活性を亢進する。

c-Jun activity を western blot で検討した。(Fig.6.A)は SPHK1 遺伝子をアデノウイルスベクターを用いて正常皮膚線維芽細胞に導入し過剰発現させたもの、(Fig.6.B) が今回の実験で使用している lipofectamine2000 試薬を用いて SPHK1 遺伝子を発現させた正常皮膚線維芽細胞を用いたものである。いずれの結果からも SPHK1 遺伝子を発現させた正常皮膚線維芽細胞では、コントロールに較べて c-Jun activity が亢進していた。

次に、NF- κ B について検討した。NF- κ B もコラーゲン遺伝子の発現を抑制的に調節する因子の一つであると考えられており、強皮症患者由来の Tcell では NF- κ B の発現が健常人に較べて低下しているとする報告⁹⁾もある。active motif 社の TRANS-AM kit を用いて、NF- κ B activity を測定したところ、SPHK1 遺伝子を発現させた正常皮膚線維芽細胞では、コントロールに較べて NF- κ B activity が亢進していた。(Fig.7) 以上の結果より、SPHK による I 型 collagen 遺伝子の転写活性の制御には、c-Jun, NF- κ B などの転写調節因子が関与している可能性が示唆された。

D. 考案

今回、強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞に較べて SPHK 活性が抑制されていること、

SPHK1 はコラーゲン転写活性を抑制的に制御する因子であることを明らかにし、強皮症患者では SPHK 活性が低下していることが、コラーゲンの異常蓄積という強皮症の病態に関与をしている可能性があるのではないかと考えた。

次に、SPHK1 がいかなる機序でコラーゲン遺伝子転写活性を抑制しているのか解明しなくてはならない。そこで、はじめに着目したのが TNF α 細胞内情報伝達系である。SPHK1 の TNF α 細胞内情報伝達系への関与については、既にいくつかの報告がある。Xia ら¹⁰⁾は、HEK293T cell を用いた検討で、SPHK1 が TRAF2 (TNF receptor-associated factors-2) と結合することを明らかにし、その結合が NF- κ B の活性化を誘導することを示している。また、Pettus ら¹¹⁾は、TNF α が誘導する PGE₂ (prostaglandin E₂) の発現に SPHK1 が必要であることを示している。TNF α がコラーゲン遺伝子発現を抑制的に制御するメカニズムについては、TGF β 細胞内情報伝達系に対する阻害作用を中心に多くの報告^{8,12)}がある。Verrecchia ら¹²⁾は TNF α は JNK を介して TGF- β -Smad 情報伝達系を抑制し、NF- κ B を介して直接コラーゲン遺伝子の転写活性を抑制するのではないかとしている。今回我々は、SPHK1 が c-Jun, NF- κ B を活性化することを示したが、SPHK1 により活性化された c-Jun, NF- κ B がコラーゲン遺伝子発現の抑制にどのように関与しているのかを明らかにするためには更なる検討が必要である。

E. 結論

SPHK はコラーゲン転写活性を抑制的に制御する因子であり、強皮症患者では SPHK 活性が低下していることが、コラーゲンの異常蓄積という強

皮症の病態に関与をしている可能性があるのではないかと考えた。

F. 文献

1. Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S.: Sphingosine kinase, sphingosine -1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1585:193-201.
2. Spiegel S, Milstien S.: Sphingosine -1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003,4:397-407.
3. Stunff HL, Milstien S, Spiegel S.: Generation and Metabolism of Bioactive Sphingosine -1-Phosphate. *J Cell Biochem*. 2004, 92:882-899
4. Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, Pettus B, Hannun YA, Obeid L, Trojanowska M. Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J Biol Chem*. 2004, 279 : 53994-4001
5. Sato M, Markiewicz M, Yamanaka M, Bielawska A, Mao C, Obeid LM, Hannun YA, Trojanowska M. Modulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by endogenous sphingolipid mediators. *J Biol Chem*. 2003, 278 :9276-82.
6. Olivera A, Barlow KD, Spiegel S.: Assaying sphingosine kinase activity. *Methods Enzymol*. 2000, 311:215-23.
7. Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae SS, Stefansson S, Liau G, Hla T. Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation.: *J Biol Chem*. 2002, 277:6667-75.
8. Yamane K, Ihn H, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K. Antagonistic effects of TNF-alpha on TGF-beta signaling through down-regulation of TGF-beta receptor type II in human dermal fibroblasts. *J Immunol*. 2003, 171: 3855-62.
9. Kessel A, Rosner I, Rozenbaum M, Zisman D, Sagiv A, Shmuel Z, Sabo E, Toubi E. Increased CD8+ T cell apoptosis in scleroderma is associated with low levels of NF-kappa B. *J Clin Immunol*. 2004 , 24:30-6.
10. Xia P, Wang L, Moretti PA, Albanese N, Chai F, Pitson SM, D'Andrea RJ, Gamble JR, Vadas MA. Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *J Biol Chem*. 2002, 277 :7996-8003.
11. Pettus BJ, Bielawski J, Porcelli AM, Reames DL, Johnson KR, Morrow J, Chalfant CE, Obeid LM, Hannun YA. The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. *FASEB J*. 2003, 17 :1411-21.
12. Verrecchia F, Mauviel A. TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cell Signal*. 2004 ,16 :873-80.

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

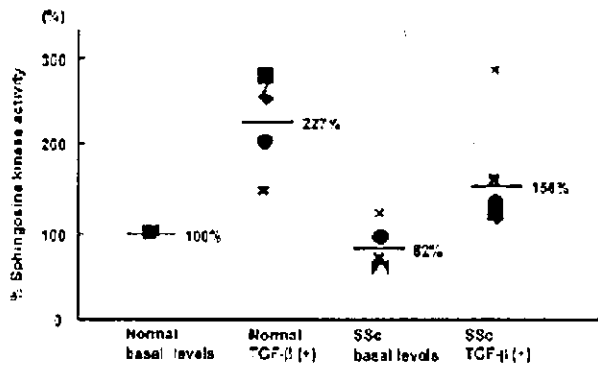


Fig.1 強皮症皮膚線維芽細胞および正常皮膚線維芽細胞の sphingosine kinase 活性

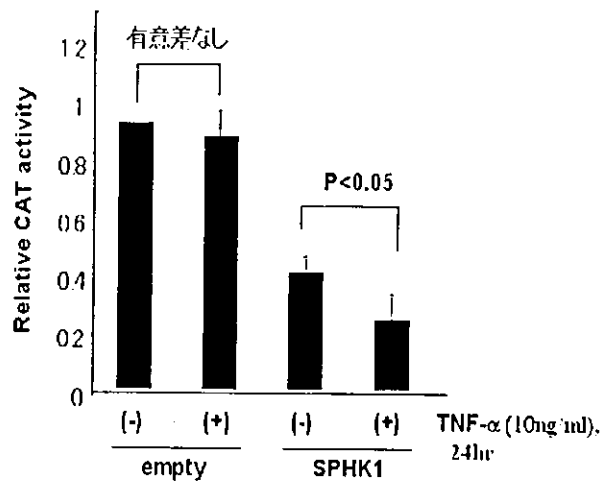


Fig. 3 SPHK1 遺伝子および TNF-α の I 型 collagen 遺伝子の転写活性に与える影響

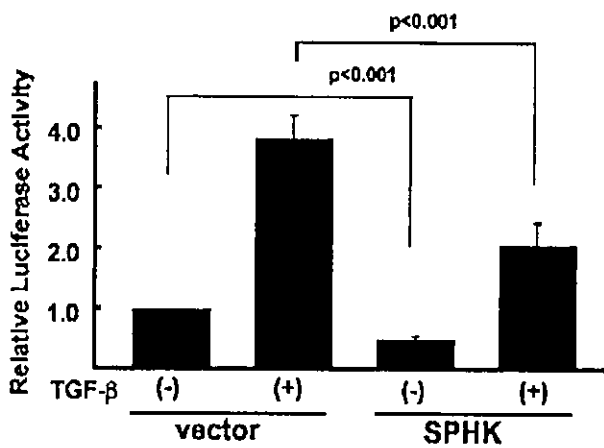


Fig.2 SPHK1 遺伝子および TGF-β の I 型 collagen 遺伝子の転写活性に与える影響

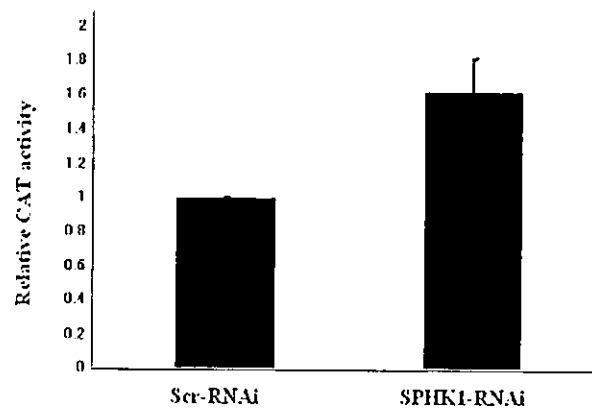


Fig.4 RNAi 法による SPHK1 遺伝子発現抑制の I 型 collagen 遺伝子の転写活性に与える影響

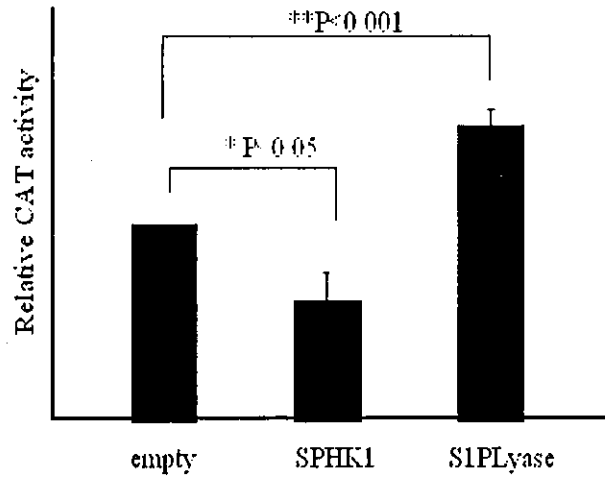


Fig.5 SIP-lyase 遺伝子の I 型 collagen 遺伝子の転写活性に与える影響

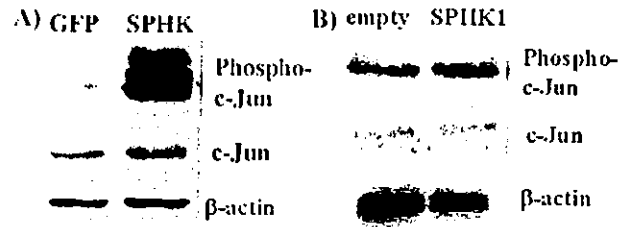


Fig.6 SPHK1 遺伝子の c-Jun 活性に与える影響

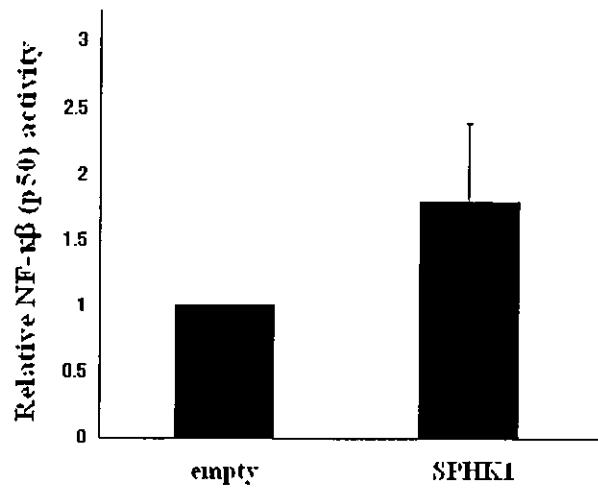


Fig.7 SPHK1 遺伝子の NF-κβ活性に与える影響

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

エストロゲンのI型コラーゲン代謝に及ぼす影響について

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	曲 陸丹	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

近年、閉経後の女性皮膚においてエストロゲンなどのホルモン補充療法が、tissue remodelingにより低下した弾力性が回復するということが報告されている。今回我々はその基礎的研究の一環として、健常な中年女性由来の真皮線維芽細胞を用い、エストロゲンの結合組織代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、 17β -エストラジオールは線維芽細胞のI型コラーゲン産生を増加させる傾向にあり、低濃度域でMMP-1の産生量を有意に減少させた。しかし、TGF- β II型受容体のリン酸化は起こさなかった。以上より、エストラジオールはヒト真皮線維芽細胞由来のMMP-1を介してヒトの真皮リモデリングに関与するが、その機序はTGF- β 1を介さないことが示唆された。

A.研究目的

近年、臨床応用が盛んであるホルモン補充療法において、エストロゲンと皮膚老化との関連が注目されている。エストロゲンはコラーゲン産生を促進するという報告があるが¹⁾⁷⁾、その詳細は未だ不明である。エストロゲンが直接コラーゲン産生を促進するのか、transforming growth factor- β (TGF- β)のような他の因子を介した間接作用であるのかなど、興味を持たれる。更に、真皮のコラーゲン代謝はマトリックスプロテナーゼやそのインヒビターによって調節されているが、エストロゲンがこれらに及ぼす影響を検討した報告は未だ少ない。本研究では、ヒトの真皮リモデリングにおけるエストロゲンの作用について、ヒト真皮線維芽細胞のI型コラーゲン、

matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)産生に及ぼす影響を mRNA および蛋白レベルで検討した。さらに、エストロゲンがヒト真皮線維芽細胞のTGF- β II型受容体を活性化するか否かも検討した。

B.研究方法

1) 細胞培養

正常人女性 (24 歳, 37 歳, 42 歳)由来の皮膚真皮線維芽細胞を Explant culture 法により得、実験に供した。各実験には継代数8代以下の細胞を用いた。

2) RT-PCR 法および ELISA 法

細胞を 10cm のプラスチックディッシュに

播種してサブコンフルントにした後、培養上清中に 17β -エストラジオールを 10^{-12}M ~ 10^{-8}M の濃度で添加した。その6時間後、細胞を回収し、線維芽細胞由来 I 型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1、TGF- β 1 の mRNA の変化を RT-PCR 法で検討した。また、同様の条件下における、培養上清中に存在する蛋白量を ELISA 法で調べた。mRNA 発現量については GAPDH で各々を補正して検討した。

3) Western blot 法

細胞由来の蛋白質を抽出バッファー[150 mM NaCl, 6 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaH_2PO_4 , 2 mM EDTA, 1% NaDOC, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstain A, 1 mM 4-2-aminoethyl benzenesulfony fluoride, 50mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM ammonium molybdate tetrahydrate, (PH 7.0)]を用いて抽出し、ウエスタンブロットを行なった。一次抗体 TGF- β レセプターII [TGF- β RII(C-16/sc-220)],リン酸化 TGF- β レセプターII [p-TGF- β RII(Tyr 336/sc-17006)](Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、二次抗体 horseradish peroxidase (HRT) - conjugated anti-goat IgG (mouse) antibody (sc-2354)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA)、HRT- conjugated anti-rabbit (goat) (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)で反応させた後、ECL system (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ) を用いて検出した。バンドの強さは NIH Image にて定量化した。

C.研究結果

1) 17β -エストラジオール刺激におけるヒト真皮線維芽細胞の I 型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 の mRNA 発現の変化

17β -エストラジオール刺激においては、いずれの濃度でも I 型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 の mRNA の発現に有意差は見られなかった (Fig1)。

2) 17β -エストラジオール刺激におけるヒト真皮線維芽細胞の I 型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 の産生の変化

培養上清中の蛋白量を ELISA 法で測定した (Table 1)。 17β -エストラジオール刺激により I 型コラーゲンの産生は上昇する傾向がみられたが、統計学的有意差はなかった。また、TIMP-1 においてはすべての濃度で有意な差はなかった。一方、MMP-1 の産生はコントロールに比べ 10^{-12}M 及び 10^{-10}M 濃度で有意に低下した (Fig2)。

3) 17β -エストラジオール刺激におけるヒト真皮線維芽細胞の TGF- β 1 の mRNA 発現の変化

17β -エストラジオール刺激いずれの濃度でも TGF- β 1 の mRNA の発現に差は見られなかった (Fig3)。

4) 17β -エストラジオール刺激におけるヒト真皮線維芽細胞の TGF- β 1 の産生の変化

培養上清中の蛋白量を ELISA 法で測定したところ (Table 2)、 17β -エストラジオール 10^{-8}M という高濃度域で TGF- β 1 の産生が有意に増加した (Fig4)。

5) 正常皮膚線維芽細胞内において 17β -エストラジオールによりリン酸化 TGF- β II 型受容体産生への変化

17β -エストラジオール添加による TGF- β II 型受容体のリン酸化については有意な変化は

なかった (Fig5)。

D. 考案

近年エストロゲン補充療法が、更年期以後に増加する虚血性心疾患、骨粗鬆症などに対し有効であることが知られている⁸⁻¹²⁾。エストロゲンと皮膚との関連では、閉経後のエストロゲン欠乏が女性の皮膚の老化に関与することが指摘されている^{2,13-16)}。過去の*in vitro*の研究では、エストロゲンが線維芽細胞のコラーゲン産生を増加させ、一方でコラーゲン分解を抑えるとされてきた^{2,7,17-20)}。

今回我々の研究では 17β -エストラジオール刺激によってコラーゲン産生は増加傾向を示し、さらに、低濃度域では MMP-1 の産生量を有意に減少させた。また、高濃度域では TGF- β 1 の産生量を有意に増加させた。しかし、ヒト線維芽細胞における TGF- β II 型受容体のリン酸化はすべての濃度においてみられなかった。

以上の結果から 17β -エストラジオール刺激による MMP-1 抑制が組織へのコラーゲン沈着を増加させる可能性が示された。

E. 結論

17β -エストラジオールはヒト真皮線維芽細胞由来の MMP-1 を介することによりヒトの真皮リモデリングに関与するが、その機序は TGF- β 1 を介さない可能性が示唆された。ホルモン補充療法の臨床的効果の機序としては、I 型コラーゲン以外の細胞外基質成分、例えばヒアルロン酸の変化などが関与する可能性があり、今後の検討課題である。

F. 文献

- [1] Schmidt JB, Binder M, Macheiner W, Kainz C, Gitsch G, Bieglmayer C. Treatment of skin ageing symptoms in perimenopausal females with estrogen compounds, a pilot study. *Maturitas* 1994; 20: 25-30.
- [2] Castelo-Branco C, Duran M, Gonzalez-Merlo. Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Maturitas* 1992; 15: 113-9.
- [3] Dunn LB, Damesyn M, Moore AA, Reuben DB, Greendale GA. Does estrogen prevent skin aging? Results from the first national health and nutrition examination survey (NHANESI). *Arch Dermatol* 1997; 133: 339-42.
- [4] Brincat MP. Hormone replacement therapy and the skin. *Maturitas* 2000; 35: 107-17.
- [5] Sator PG, Schmidt JB, Sator MO, Huber JC, Hönigsmann H. The influence of hormone replacement therapy on skin ageing, a pilot study. *Maturitas* 2001; 39: 43-55.
- [6] Haczynski J, Tarkowski R, Jarzabek K, Slomczynska M, Wolczynski S, Magoffin DA, Jakowicki JA, Jakimiuk AJ. Human cultured skin fibroblasts express estrogen receptor α and β . *Int J Mol Med* 2002; 10: 149-53.
- [7] Surazynski A, Jarzabek K, Haczynski J, Laudanski P, Palka J, Wolczynski S. Differential effects of estradiol and raloxifene on collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *Int J Mol Med* 2003; 12: 803-9.
- [8] Holland N, Studd J, Mansell JP, Leather AT, Bailey AJ. Changes in collagen composition and cross-links in bone and

- skin of osteoporotic postmenopausal women treated with percutaneous estradiol implants. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 180-3.
- [9] White RE, Darkow DJ, Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 1995; 77: 936-42.
- [10] Brincat M, Galea R, Baron YM, Xuereb A. Changes in bone collagen makers and in bone density in hormone treated and untreated postmenopausal women. *Maturitas* 1997; 27: 171-7.
- [11] Punnonen R. Effect of castration and peroral estrogen theraph on the skin. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1972; 21: 3-44.
- [12] Brincat M, Yuen AW, Stud JW, Montgomery J, Magos AL, Savvas M. Response of skin thickness and metacarpal index to estradiol theraph in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1987; 70: 538-41.
- [13] Maheux R, Naud F, Rioux M, Grenier R, Lemay A, Guy J, Langevin M. A randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effect of conjugated estrogens on skin thickness. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 642-9.
- [14] Sumino H, Ichikawa S, Abe M, Endo Y, Ishikawa O, Kurabayashi M. Effects of aging, menopause, and hormone replacement therapy on forearm skin elasticity in women. *JUNE* 2004; 52: 945-9.
- [15] Affinito P, Palomba S, Sorrentino C, Di Carlo C, Bifulco G, Arienzo MP, Nappi C. Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen. *Maturitas* 1999; 33: 239-47.
- [16] Sumino H, Ichikawa S, Abe M, Endo Y, Nakajima Y, Minegishi T, Ishikawa O, Kurabayashi M. Effects of aging and postmenopausal hypoestrogenism on skin elasticity and bone Mineral density in Japanese women. *Endocrine J* 2004; 51: 159-64.
- [17] Brincat M, Kabalan S, Studd J, Moniz CF, Trafford J, Mbbs JM. A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness, and bone mass in the postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1987; 70: 840-5.
- [18] Moalli PA, Klingensmith WL, Meyn LA, Zyczynski HM. Regulation of matrix metalloproteinase expression by estrogen in fibroblasts that are derived from the pelvic floor. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 72-9.
- [19] Soto T, Ito A, Mori Y, Yamashita K, Hayakawa T, Nagase H. Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. *Biochem J* 1991; 275: 645-50.
- [20] Chen B, Wen Y, Wang H, Polan ML. Differences in estrogen modulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-1 expression in cultured fibroblasts from continent and incontinent women. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 59-65.

G. 研究発表

1. 論文発表

LuDan Qu Masatoshi Abe Yoko
 Yokoyama Osamu Ishikawa
 Effects of 17 β -estradiol on Matrix
 Metalloproteinase-1 synthesis by
 human dermal fibroblasts 投稿中

2. 学会発表
 なし

H. 知的所有権の出願 ・ 登録状況
 なし

Fig 1

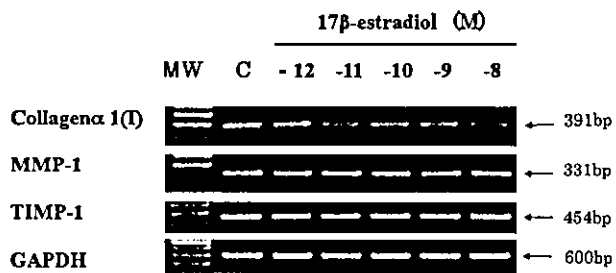


Fig1: 17 β -エストロジオール刺激におけるヒト真皮線維芽細胞のI型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 のmRNA発現量の変化

Fig 2a procollagen type I C-peptide

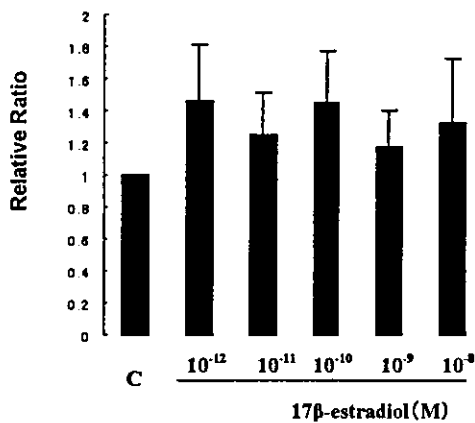


Fig 2 b

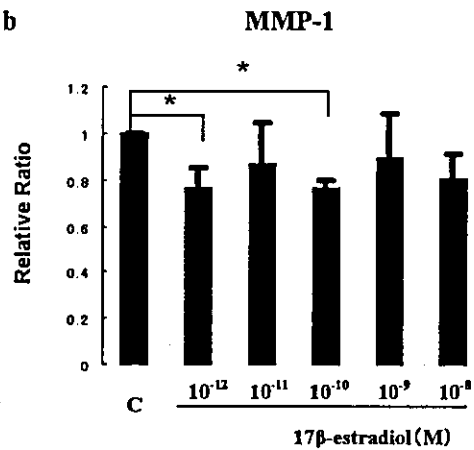


Fig 2c

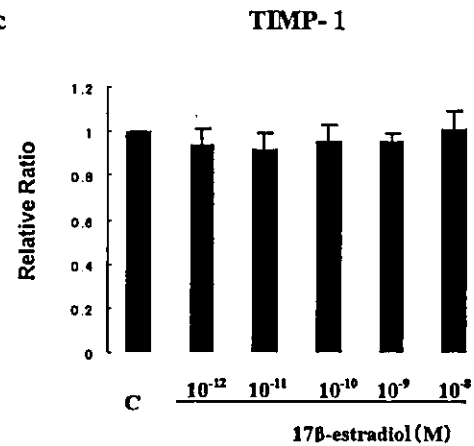


Fig2: 17 β -エストロジオール刺激におけるヒト真皮線維芽細胞の (a)、I 型コラーゲン (b) MMP-1、(c) TIMP-1 産生量の変化

Fig 3

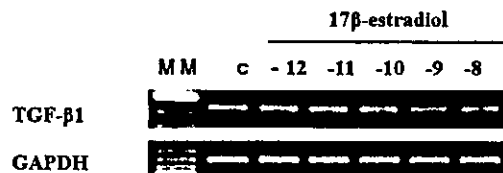


Fig 3: 17 β -エストロジオール刺激におけるヒト真皮線維芽細胞のTGF- β 1 のmRNA発現量変化

Fig 4

ト真皮線維芽細胞の TGF-β 1 産生量の変化

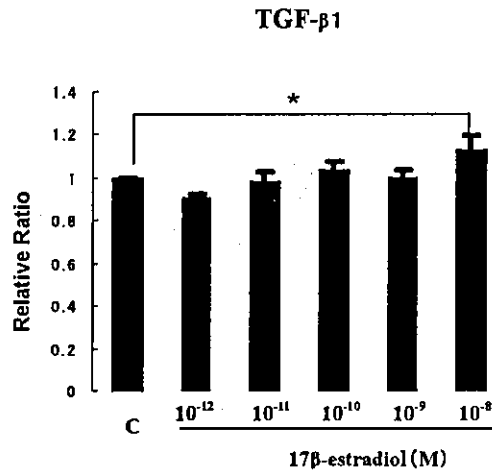


Fig4: 17β-エストラジオール刺激におけるヒ

Fig5

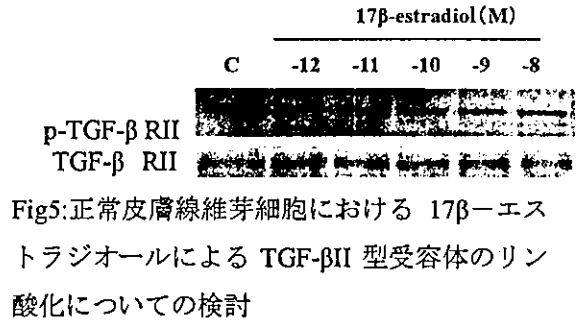


Fig5:正常皮膚線維芽細胞における 17β-エストラジオールによる TGF-βII 型受容体のリン酸化についての検討

Table1. 17β-エストラジオール刺激による真皮線維芽細胞の I 型コラーゲン C-peptide (PIP)、MMP-1、TIMP-1 の産生の変化

	Control	10 ⁻¹² M	10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M
PIP (10~640ng/ml)	170.67±41.00	222.34 ±14.90	198.67±37.67	223.67±38.35	181.33±11.57	194.67±12.91 (ng/ml)
MMP-1 (6.25~100ng/ml)	21.87±3.67	16.30±1.91	19.67±5.45	16.77±3.11	20.17±5.88	18.10±4.31 (ng/ml)
TIMP-1 (51~2000ng/ml)	700.00±49.33	651.00±22.00	638.33±14.24	666.67±49.10	665.00±18.93	705.00±39.69 (ng/ml)

Mean ± SEM (): detectable ranges

Table2. 17β-エストラジオール刺激によるヒト真皮線維芽細胞の TGF-β1 の産生の変化

	Control	10 ⁻¹² M	10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M
TGF-β (7~2000pg/ml)	41.67±6.98	37.67±6.17	37.50±7.29	38.33±6.27	38.83±7.53	43.00±6.73 (pg/ml)

Mean ± SEM (): detectable ranges

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

Hepatocyte Growth Factor の I 型コラーゲン代謝に対する作用

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 神人正寿 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、hepatocyte growth factor (HGF)は in vivo において線維化病変を改善する作用を有することが知られている。しかし、HGF の線維化改善作用に関する in vitro でのメカニズムの検討には未だ乏しい。今回我々は HGF の作用を正常及び汎発性強皮症由来線維芽細胞で比較し、その作用のメカニズムをコラーゲンの産生系および分解系の双方の面から in vitro で検討しようと考えた。まず HGF が I 型コラーゲン発現に及ぼす影響を検討したところ、HGF 刺激により強皮症由来線維芽細胞では I 型コラーゲン分泌量が減少したが正常細胞では有意な変化を認めなかった。しかし、両細胞において alpha2(I)コラーゲン遺伝子 mRNA 発現量には変化は見られなかった。一方、強皮症由来線維芽細胞では正常細胞と比較して HGF による MMP-1 産生増加率が高かった。強皮症由来線維芽細胞においては正常細胞と比較して HGF receptor である c-met が強発現しており、そのために HGF に対する反応性が亢進しているのではないかと考えられた。以上より、HGF は MMP を介して強皮症由来線維芽細胞からのコラーゲン分泌量のみを抑制すると考えられ、本症の治療に応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

生体において線維芽細胞から分泌された細胞外マトリックスは、組織の恒常性維持のため適度に分解される必要がある。皮膚組織真皮において I 型コラーゲンの分解に関与しているのは線維芽細胞や血球系などから分泌される MMP とよばれる分解酵素の中でも特に別名 collagenase と呼ばれる matrix metalloproteinase (MMP)-1, 8, 13、主に

MMP-1 であることが知られている。一方、MMP を阻害する酵素として tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)が存在し、特に TIMP-1 および TIMP-2 については詳細な検討がなされている。MMP と TIMP は 1:1 で互いに拮抗し、MMP が優位になると分解能が増加することからコラーゲンの量は減少し、TIMP が優位になると分解能が低下することからコラーゲンの量が増加し線維化に傾