

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

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

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

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

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

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

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 102 回日本皮膚科学会総会

第 31 回日本臨床免疫学総会

H 知的財産の出願・登録状況

なし

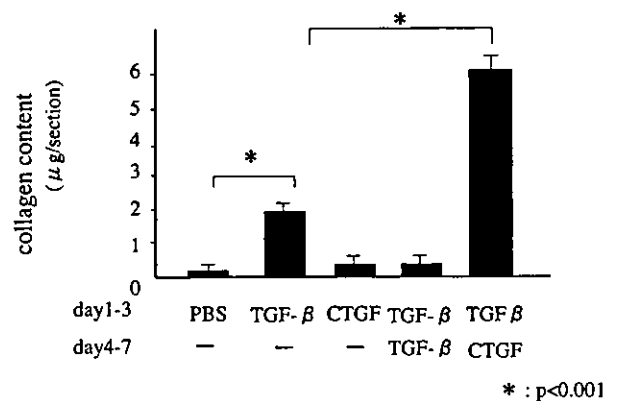


図 1 : TGF-β、CTGF 皮下注後のコラーゲン量の変化

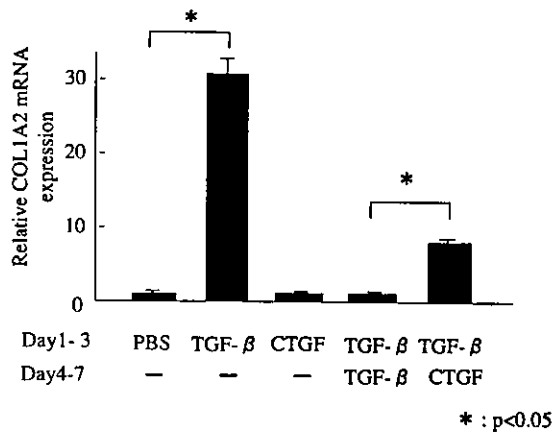


図2 : TGF-β、CTGF 皮下注後のコラーゲン mRNA 発現量

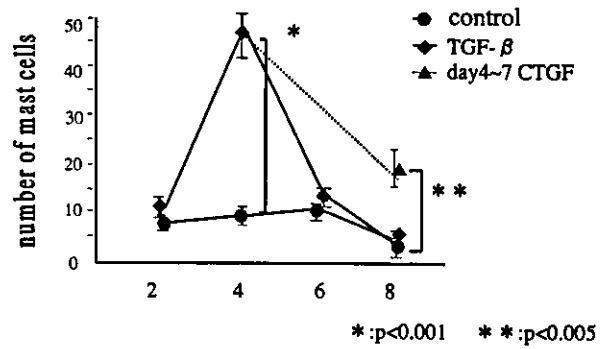


図5 : TGF-β、CTGF 皮下注後の肥満細胞数の変動

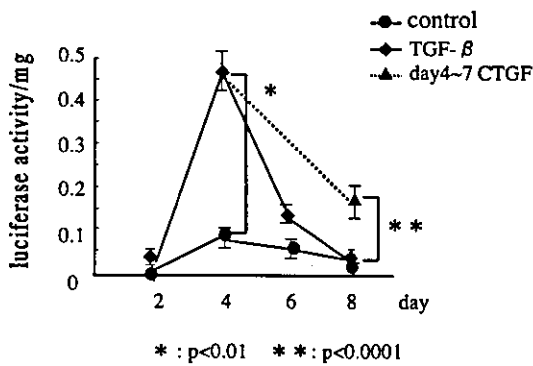


図3 : TGF-β、CTGF 皮下注後のルシフェラーゼ活性の変動

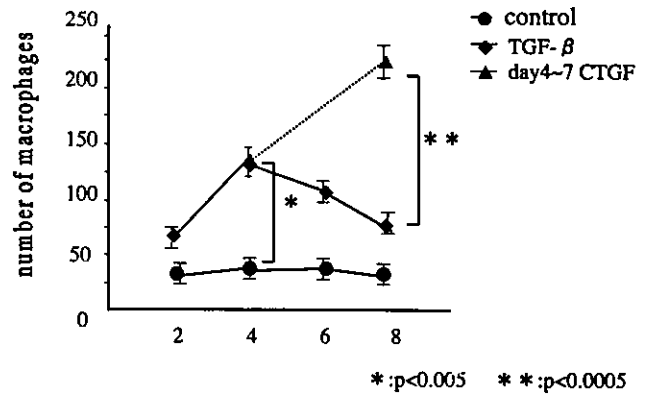


図6 : TGF-β、CTGF 皮下注後のマクロファージ数の変動

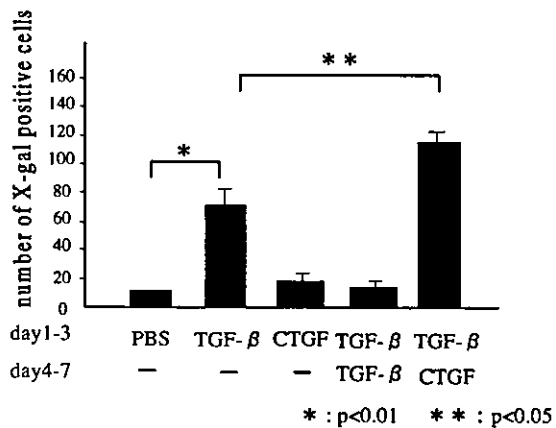


図4 : TGF-β、CTGF 皮下注後の X-gal 陽性線維芽細胞数

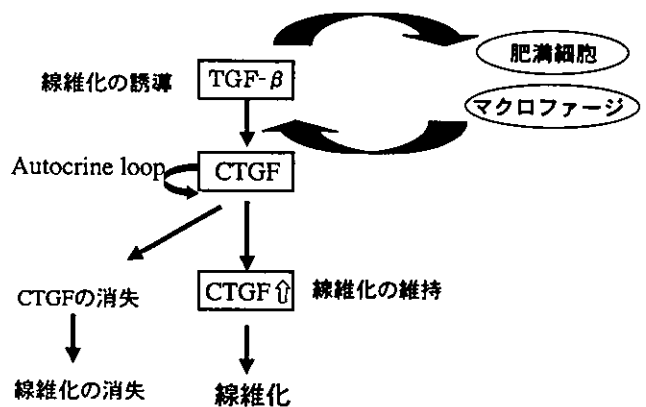


図7 : 皮膚線維化の機序

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, Upsala, 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、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℃ 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℃ 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 皮膚および健常人皮膚における 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。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) 健常人皮膚における 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, 健常人皮膚と異なり, 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 tyep 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, Grotenddorff 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

	In situ hybridization			II型受容体		免疫染色		II型受容体	
	I型受容体		No.	表皮細胞	線維芽細胞	I型受容体	線維芽細胞	表皮細胞	線維芽細胞
	表皮細胞	線維芽細胞		表皮細胞	線維芽細胞	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（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

強皮症皮膚線維芽細胞における
Smad7の発現量とその意義

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

The principal effect of TGF- β 1 on mesenchymal cells is its stimulation of extracellular matrix synthesis. Numerous previous reports indicated the significance of autocrine TGF- β loop in the pathogenesis of scleroderma. In this study, we focused on Smad7, an inhibitor of TGF- β signaling, to further understand the autocrine TGF- β loop in scleroderma. Scleroderma fibroblasts exhibited the up-regulated expression of Smad7 compared with normal fibroblasts in *in vivo* and *in vitro*. The up-regulated Smad7 constitutively made complex with TGF- β receptors in scleroderma fibroblasts. Furthermore, the inhibitory effect of Smad7 on the human α 2(I) collagen promoter activity was completely impaired in scleroderma fibroblasts. These results indicate that the impaired Smad7 inhibitory effect on TGF- β signaling might contribute to maintain the autocrine TGF- β loop in scleroderma fibroblasts. To our knowledge, this is the first report which indicates the disturbed negative regulation of TGF- β signaling in fibrotic disorders.

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。我々はこれまでに、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により、autocrine TGF- β loop が形成され、この異常が強皮症皮膚線維芽細胞における細胞外マトリックスの過剰発現に関与していることを示してきた。

今回我々が注目した Smad7 は、TGF- β signaling の negative regulation において中心的な役割を果たす蛋白である。TGF- β 刺激は膜蛋白である type I receptor が、細胞内 second messenger 蛋白である Smad2, Smad3 をリン酸化することにより細胞内へと伝達される。Smad7 は TGF- β 刺激後数時間で発現し、type I receptor に結合し、Smad2, Smad3 が type I receptor によりリン酸化される過程を阻害する。また、Smad7 は Smurf1,2 を TGF- β receptor へ recruit し、Smurf1,2 による TGF- β type I receptor の分解を誘導すると考えられている。

今回我々は、Smad7 に注目し、強皮症皮膚線維芽細胞における TGF- β signaling の negative regulation の異常について明らかにするために検討を加えた。

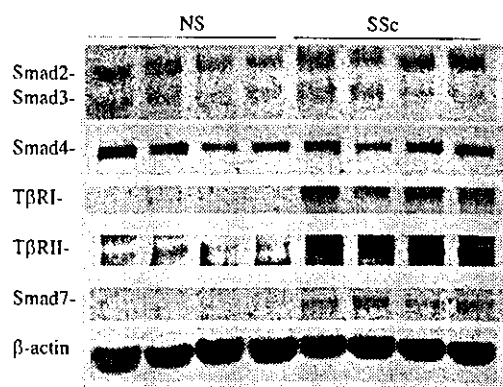
B. 研究結果と考案

強皮症皮膚線維芽細胞における TGF- β receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 の発現レベル

まず、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞において TGF- β type I receptor, type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 の発現量を Western blot 法にて比

較した。図1に示すように、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 TGF- β type I receptor, type II receptor および Smad7 の発現量が亢進していた。一方、Smad2, Smad3, Smad4 の発現量については両者の間に有意な差は認めなかった。

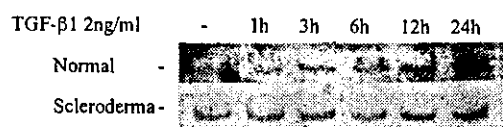
図1



TGF- β 刺激に対する Smad7 の発現レベルの変化

次に、TGF- β 刺激による Smad7 の発現量の変化について比較した。正常皮膚線維芽細胞では TGF- β 刺激により Smad7 の発現量が時間依存性に亢進したが、強皮症皮膚線維芽細胞では TGF- β 刺激により Smad7 の発現量に変化は認めなかった (図2)。

図2

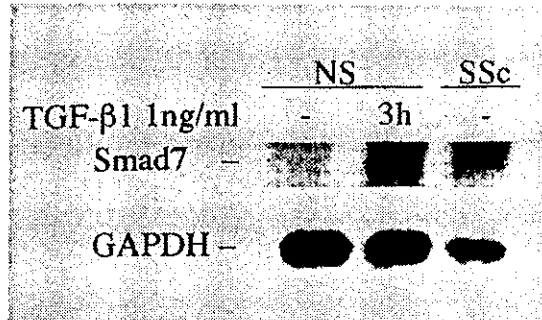


強皮症皮膚線維芽細胞における Smad7 の mRNA の発現レベル

次に、Northern blot 法を用いて Smad7 の

mRNA の発現量について検討した。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、Smad7 の mRNA の発現量が約3倍に亢進しており、その発現量は正常皮膚線維芽細胞を TGF- β 刺激して3時間後の Smad7 の mRNA の発現量とほぼ同等であった (図3)。

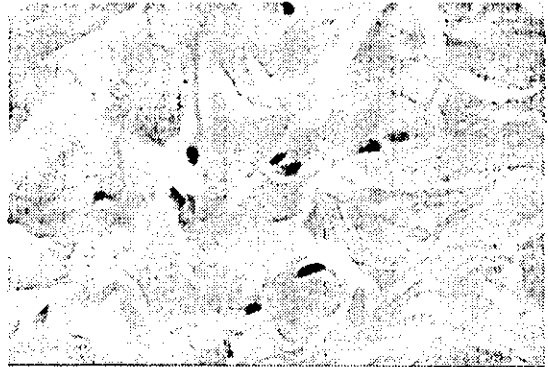
図3



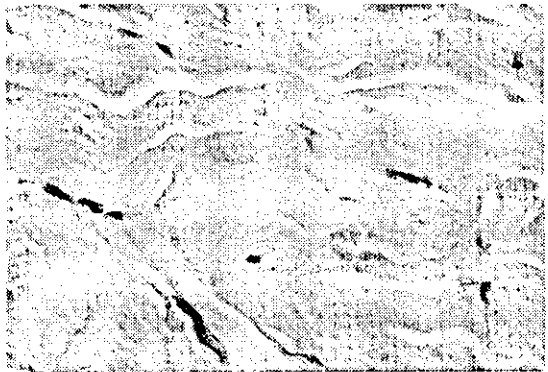
強皮症皮膚における Smad7 の発現レベル次に in vivo における Smad7 の発現量について免疫組織染色を用いて検討した。図4に示すように、強皮症患者皮膚では正常人皮膚に比べて、線維芽細胞における Smad7 の発現量が亢進していた。

図4

NS



SSc

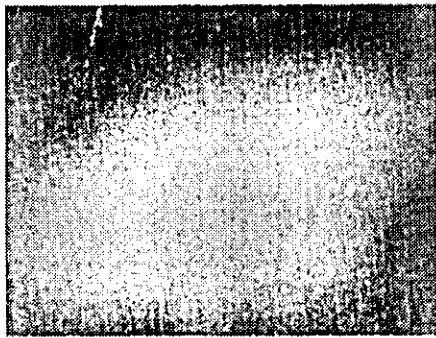


強皮症皮膚線維芽細胞における Smad7 の細胞内局在

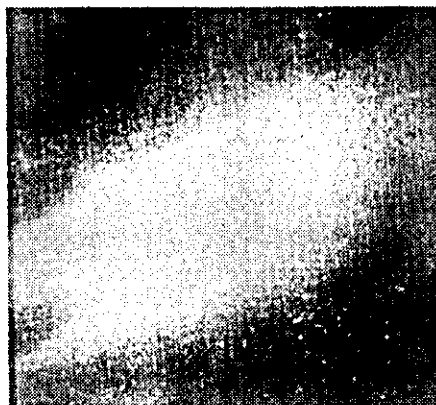
次に蛍光抗体法を用いて、Smad7 の細胞内局在について検討した。図5に無刺激下における染色の結果を示す。強皮症皮膚線維芽細胞では Smad7 は細胞質に dot 状に局在していたが、正常皮膚線維芽細胞では Smad7 の発現量は検出限界以下でその局在を明らかにすることはできなかった。

図5

NS



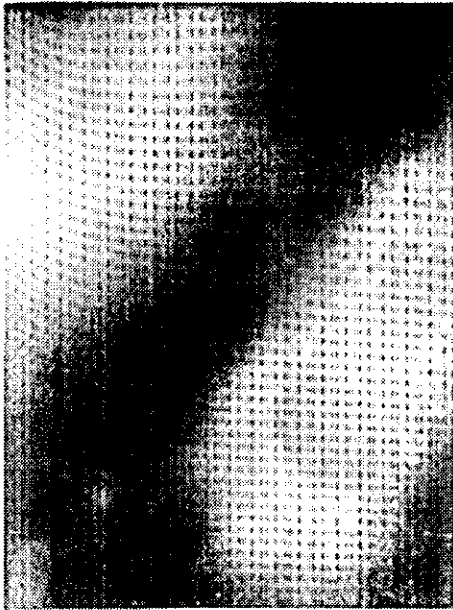
SSc



強皮症皮膚線維芽細胞において、Smad7 の細胞内局在を更に明らかにするため、TGF- β type I receptor および type II receptor との二重染色を行った。図6に示すように、type I receptor、type II receptor とともに細胞質に dot 状に局在しており、その分布は Smad7 の分布と完全に一致した。以上より、強皮症皮膚線維芽細胞では Smad7 が恒常的に TGF- β receptor と complex を形成している可能性が示唆された。

図 6

Smad7



overlay



TβRI



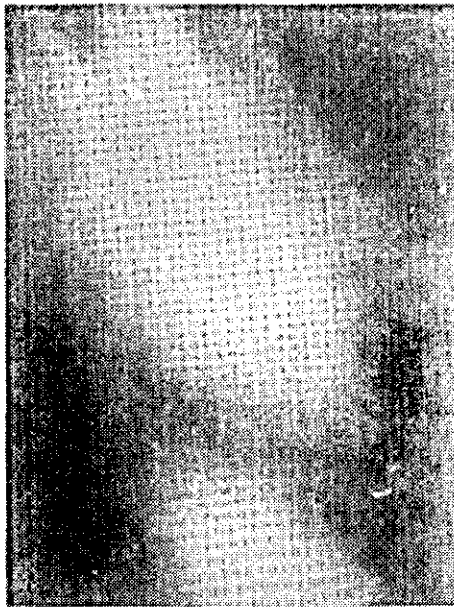
Smad7



Overlay



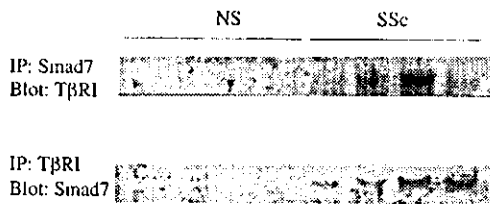
TβRII



強皮症皮膚線維芽細胞における Smad7 と TGF- β type I receptor の interaction

次に免疫沈降法にて、Smad7 と TGF- β type I receptor の結合について検討した (図7)。抗 Smad7 抗体で免疫沈降し、抗 TGF- β type I receptor 抗体で検出した場合、および抗 TGF- β type I receptor 抗体で免疫沈降し、抗 Smad7 抗体で検出した場合、いずれにおいても、強皮症皮膚線維芽細胞においてのみ、Smad7 と TGF- β type I receptor の結合が確認できた。

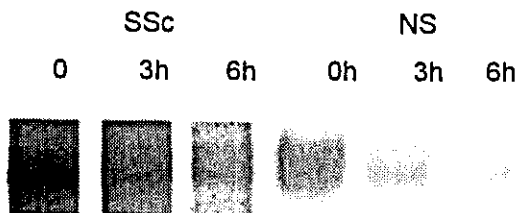
図7



強皮症皮膚線維芽細胞における TGF- β type I receptor の protein stability

次に、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞における type I receptor の degradation を比較するため s35 を用いた pulse chase 法にて検討した。図8に示すように、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有意に type I receptor の分解が減少していた。

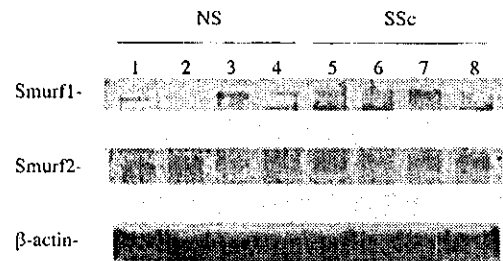
図8



強皮症皮膚線維芽細胞における Smurf1/2 の発現レベル

次に Smurf1 および Smurf2 の発現量について比較した。強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞では、Smurf1/2 の発現量に有意差は認められなかった (図9)。

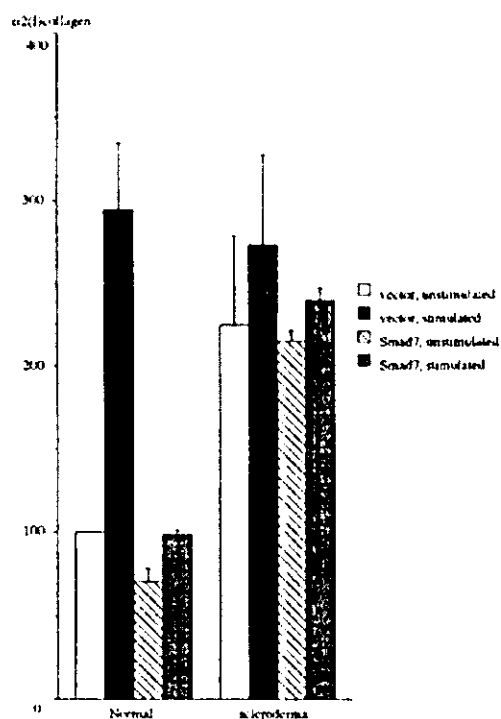
図9



強皮症皮膚線維芽細胞における Smad7 の human $\alpha 2(I)$ collagen promoter 活性に対する抑制効果

最後に Smad7 を一過性強発現させ、人 $\alpha 2(I)$ collagen promoter 活性に与える影響を検討した (図 10)。正常皮膚線維芽細胞では Smad7 の一過性強発現により TGF- β 刺激による $\alpha 2(I)$ promoter activity の亢進は完全に抑制された。一方、強皮症皮膚線維芽細胞においては Smad7 の一過性強発現は $\alpha 2(I)$ collagen promoter 活性を抑制しなかった。以上の結果から強皮症皮膚線維芽細胞では Smad7 に対する反応性が低下している可能性が示唆された。

図 10



C. 結語

今回の検討により, TGF- β signaling の negative regulation の異常が強皮症皮膚線維芽細胞における細胞外マトリックス過剰産生に寄与している可能性が示唆された。

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

強皮症 (SSc) 線維芽細胞における IL-1 α 転写調節因子の解析

分担研究者

川口鎮司 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター講師

協力者

原まさ子 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター教授

研究要旨

強皮症に特徴的な臓器の線維化は、病変局所の線維芽細胞の細胞外マトリックス産生異常に起因している。我々は、強皮症線維芽細胞の一つの機能異常として、細胞内 IL-1 α の構成的な発現をみつけた。さらに、IL-1 α の過剰な産生がコラーゲン産生亢進に関与していることを報告してきたが、その過剰産生の機序は明かとなっていない。そこで、IL1A 遺伝子の転写調節部位の遺伝子配列をプローブとして、DNA 結合因子を同定し、その機能を解析した。その結果、EBP1 (ErbB3 binding protein 1) と FKBP38 (FK506 binding protein 38) が強皮症線維芽細胞の IL-1 α の発現に重要な働きをしていることがわかった。さらに、FKBP38 の過剰発現により正常線維芽細胞の発現するコラーゲン量を増加させることが可能であった。

A. 研究目的

強皮症の病態が、線維芽細胞の異常により形成されていることは多くの研究者によって認められている¹⁻⁵。一方、線維芽細胞の異常が、線維芽細胞自身の異常なのか、組織に浸潤してくる単核球により引き起こされるのか、あるいは、なんらかの自己抗体により惹起されるのかは未だに不明である。我々のグループでの研究により、線維芽細胞のコラーゲン産生に、内因性の IL-1 α 過剰産生が重要な働きを呈していることがわかってきている^{6,7}。しかし、IL-1 α の産生・発現を誘導している機序は不明である。IL-1 α の転写調節部位は

以前に我々が同定しており⁸、今回の研究では、その転写調節部位に、結合する転写調節因子の同定とその因子の機能解析を行った。

B. 研究方法

1) yeast-One hybrid 法, bacterial two-hybrid 法
IL1A の転写調節領域の配列を3回繰り返した2本鎖 DNA を作成し、その DNA 配列に結合する蛋白質を、線維芽細胞の cDNA library から、yeast-One Hybrid 法(Clontech 社)にてスクリーニングした。また、EBP1 をプローブとして pBT ベクターに組み込み、BacterioMatch two-hybrid (Stratagene) 法にて

EBP1 に結合する因子を同定した。

2) EBP1 の免疫染色法

ヒト EBP1 に対する抗体を作成するため、EBP1 のアミノ酸配列より抗原性の高いと判定された c 末から 150 から 163 のアミノ酸を有するペプチドを作成した (キアゲン)。NewZealand White のウサギに 3 回、抗原を注射し、血清を採取した。Affinity column を用いて精製をした。この抗体を 1 次抗体として、ABC 法にて、DAB で染色した。

3) siRNA を用いた FKBP38 の抑制

EBP1 遺伝子、FKBP38 遺伝子に対して特異的な配列を pSilencer neo vector (Ambion 社) に組み込む。Lipofection 法にて線維芽細胞に遺伝子導入し、G418 を用いて stable transfectant を作成した。

4) 遺伝子導入法を用いた FKBP38 の強制発現

FKBP38 遺伝子を pcDNA4 (Invitrogen) ベクターに組み込み、lipofection 法を用いて、線維芽細胞に遺伝子導入した。FKBP38 には、N 末に X-press ペプチドのタグが入るようにデザインされている。G418 にて選択を行ない、stable transfectant を作成した。

5) FKBP38 の mRNA の解析

線維芽細胞の発現する mRNA を RT-PCR 法で解析した。

6) コラーゲン産生量

線維芽細胞の発現するコラーゲン産生量を procollagen type I c-peptide EIA kit (Takara) を用いて検討した。

C. 研究結果

1) Yeast One-hybrid 法、Two-hybrid 法によるスクリーニング

EBP1 が IL1A の転写調節領域に結合する蛋白質として同定され、その EBP1 に結合する蛋白質として、FKBP38 が同定された。EBP1 と FKBP38 の線維芽細胞内での結合を確認するため、正常線維芽細胞に、FKBP38 の遺伝子を組み込んだ発現ベクター pcDNA4 を遺伝子導入した。その後、細胞内および核内抽出液を用いて、抗 EBP1 抗体にて、免疫沈降を行ない、SDS-PAGE での泳動後に、PVDF 膜に転写し、抗 X-press 抗体を用いて、Western blot を行なった。図 1 に示すように、FKBP38 を発現している線維芽細胞では、EBP1 の結合因子として、免疫沈降してくることが確認された。

2) FKBP38 の発現

図 2 に示すように、強皮症では、構成的な FKBP38 mRNA の発現が認められたが、健常人では、認められなかった。また、限局型皮膚強皮症由来線維芽細胞で、内因性 IL-1 α の発現が低い細胞では、FKBP38 の発現は少なかった。

3) EBP1 の細胞内局在

EBP1 は、強皮症由来線維芽細胞では核内に集積するが、正常線維芽細胞では、細胞質に

のみ存在する。この強皮症で見られる EBPI の核内集積に、FKBP38 が必要であるがどうかを検討した。強皮症の線維芽細胞に siRNA 法を用いて、FKBP38 を抑制したところ、図 3 に示すように EBPI の核内への移行は抑制された。一方、正常線維芽細胞に FKBP38 を強制発現させると、細胞質に存在した EBPI は、核内への移行を示した (図 4)。

4) FKBP38 の細胞内 IL-1 α およびプロコラーゲン産生におよぼす影響

図 5、図 6 に示すように、正常線維芽細胞に FKBP38 を強制発現させると、細胞内 IL-1 α 量と培養上清中のプロコラーゲン産生量は、有意に増加した。

D. 考案

強皮症線維芽細胞が IL-1 α を過剰に産生していることには、EBPI および FKBP38 複合体の転写調節因子としての作用が重要であった。EBPI は、昨年の本研究班での報告で示したように、強皮症および正常線維芽細胞にて構成的に発現がみられるが、細胞内での局在が異なっていた。FKBP38 は、強皮症線維芽細胞では、強発現していたが、正常線維芽細胞では発現がみられなかった。さらに、EBPI の核内移行に、FKBP38 が重要な働きをしていることが明かとなり、強皮症線維芽細胞の活性化に FKBP38 の担う役割は大きいと考える。FK506 は、FKBP との高い親和性を有しており、FKBP38 の生物学的な作用を抑制する意味で、有効な細胞内 IL-1 α の抑制薬となりうると考える。

我々は、IL-1 α が、細胞から放出され標的細胞上の受容体を介するシグナル伝達の系とは異なり、細胞内から核内へ移行し、コラーゲンの産生に影響を与えていることを報告してきた⁶。近年、上皮、間葉系細胞では、pro-IL-1 α は分泌されずに、核に集積し、特定の遺伝子の転写を調節しているとする論文が発表された^{9,10}。我々の考えを裏付ける結果であり、強皮症の線維化において、過剰な細胞内 IL-1 α 産生を抑制するか、IL-1 α の核内移行を抑制することが治療に結びつく可能性があると考えられる。細胞内 pro-IL-1 α を抑制する意味から、FK506 は、有用な治療法となる可能性があり、今後検討するべきと考える。

E. 結論

強皮症線維芽細胞では、EBPI/FKBP38 が核内に集積し、その結果、構成的な IL-1 α の発現が誘導され、コラーゲン合成が亢進している可能性が示唆された。強皮症の病態に EBPI/FKBP38 複合体の発現が重要であると考える。

F. 文献

1. LeRoy EC: Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro. A possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 1974;54:880-889.
2. Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K: Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol*

- 1998;25:296-301.
3. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, 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;105:280-284.
 4. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith EA, LeRoy EC: 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. Kawaguchi Y, Harigai M, Hara M, Suzuki K, Kawakami M, Ishizuka T, et al: Increased interleukin 1 receptor, type I, at messenger RNA and protein level in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:1504-1510.
 6. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM: Endogenous IL-1 α from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest* 1999;103:1253-1260.
 7. Kawaguchi, Y: 1994. IL-1 α gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 97:445-450.
 8. Kawaguchi Y, Hara M, Kamatani N, Wright TM: Identification of an IL1A gene segment that determines aberrant constitutive expression of interleukin-1 α in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:193-202.
 9. Hu B, Wang S, Zhang Y, Feghali CA, Dingman JR, Wright TM. A nuclear target for interleukin-1 α : interaction with the growth suppressor p53 modulates proliferation and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10008-10013
 10. Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN. The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2434-2439