

表 1. SSc における血清中 BAFF 値と臨床所見との相関

	SSc	
	Elevated BAFF (n = 43)	Normal BAFF (n = 40)
Median (range) age at onset (yr)	52 (20-77)	55 (24-80)
Sex (female/male)	34/9	36/4
Median (range) disease duration (yr)	2.3 (0.2-27)	2.2 (0.5-30)
Subtype of SSc		
Diffuse cutaneous SSc	60%	50%
Limited cutaneous SSc	40%	50%
Median (range) modified Rodnan TSS	18 (2-42)**	9 (2-24)
Clinical features		
Pitting scars	45%	39%
Contracture of phalanges	68%	39%
Diffuse pigmentation	60%	45%
Telangiectasia	43%	47%
Organ involvement		
Lung	48%	47%
Decreased %VC	40%*	18%
Decreased %DLco	78%	63%
Esophagus	50%	47%
Heart	13%	11%
Kidney	5%	3%
Joint	38%*	16%
Muscle	23%*	5%
Laboratory findings		
Anti-topoisomerase I Ab	53%	50%
Anticentromere Ab	30%	48%
Anti-RNA polymerases I/III Ab	16%	3%
Elevated ESR	48%*	29%
Elevated CRP	23%	16%
Median (range) IgG (μg/ml)	1543 (958-3320) ***	1493 (722-2890)
Median (range) IgA (μg/ml)	301 (98-769)	289 (128-645)
Median (range) IgM (μg/ml)	140 (59-829)	150 (59-445)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. SSc patients with normal BAFF levels

*** $P < 0.05$ vs. serum total IgG levels [1320 (855-2250)] of healthy controls (n = 25).

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

全身性強皮症における B 細胞機能分子多型の検討

研究協力者	土屋尚之	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野助教授
協力者	人見祐基	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野大学院生
協力者	川崎 綾	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野研究補助員
分担研究者	長谷川稔	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科講師
分担研究者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科助教授
協力者	徳永勝士	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野教授
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教授
研究分担者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚病態学教授

研究要旨

活性化型シグナル伝達分子である CD19 と抑制型分子である CD22 は、B 細胞受容体シグナルを調節するループを形成する。われわれは昨年度までに、CD19 遺伝子プロモーター領域の単一塩基多型(SNP) -499G>T が強皮症、特に、抗セントロメア抗体陽性の限局性皮膚硬化型強皮症(lcSSc)と関連すること、CD22 翻訳領域の同義置換をコードする SNP (c.2304C>A)における A/A 遺伝子型が、強皮症のみに存在し、そのすべてが lcSSc であることを報告した。今回、CD22 の強皮症関連遺伝子型と末梢血B細胞表面の CD22 発現レベルとの関連を検討したところ、強皮症関連 A/A 遺伝子型において、約 15%の発現低下が認められ、CD22 発現低下による抑制シグナルの減少が lcSSc の発症に関与する可能性が示唆された。また、BLyS (BAFF)の機能的プロモーター多型と SSsc との関連を検討したところ、統計学的有意差には到達しなかったものの、転写活性の高い遺伝子型が広汎性皮膚硬化型(dcSSc)群に増加する傾向が観察された。

A. 研究目的

CD19 はB細胞受容体(BCR)シグナルを正の方向に、CD22 は負の方向に制御する分子であり、また、CD19 は CD22 を活性化し、活性化 CD22 は CD19 の活性化を抑制する、というループを形成する。ヒト

全身性強皮症(systemic sclerosis, SSsc)患者末梢血 B細胞では、CD19 の発現が、ナイーブおよびメモリーB細胞のいずれにおいても増強している (1,2)。SSc モデルマウスである tight-skin マウスにおいては、CD19 分子のチロシンリン酸化と、CD19 依存性B細胞

胞シグナルの増強が観察され、CD19 遺伝子欠損の導入により、皮膚病変と自己抗体産生が抑制される(3)。また、CD22 リン酸化の低下も観察される(4)。

一方われわれは、全身性エリテマトーデスをはじめとする膠原病を対象として、免疫系機能分子の多型解析と関連研究を行い、CD19、CD22 に関しても、その成果を報告してきた(5,6)。われわれは、本研究班において、これらの分子を中心とする B 細胞機能関連分子多型と強皮症との関連を検討している。

昨年度までに、CD19 遺伝子プロモーター領域の単一塩基多型(SNP) -499G>T が強皮症、特に、抗セントロメア抗体陽性の限局性皮膚硬化型強皮症(lcSSc)と関連すること、SSc 関連遺伝子型においては、ナイーブ、メモリーいずれのB細胞分画においても、B細胞表面の CD19 発現強度の上昇が認められること(7)、また、昨年度の本研究班において、CD22 翻訳領域の同義置換をコードする SNP (c.2304C>A)におけるA/A 遺伝子型が、強皮症のみに存在し、そのすべてが lcSSc であることを報告した(表1)。

本年度は、lcSSc 関連 CD22 遺伝子多型について、さらに詳細な検討を加えた。また、B 細胞生存、活性化の強力な誘導因子である BAFF (BLyS, TNFSF13B)にわれわれが見出した機能的プロモーター多型(8)と強皮症の関連を検討した。

B. 研究方法

金沢大学附属病院皮膚科受診中の SSc 患者および健常対照者について、CD22 の SNP c.2304C>A (P768P)の遺伝子型と臨床病型との関連を χ^2 検定により検討した。また、末梢血B細胞表面の CD22 発現強度との関連を、フローサイトメトリーにより検討した。A/A 遺伝子型は lcSSc 6名にしか存在しないため、

C/C あるいは A/C 遺伝子型の患者における CD22 の蛍光強度を、同日に外来受診した A/A 遺伝子型の患者の CD22 蛍光強度で標準化し、相対比で示した。

また、この SNP 自体が機能的であるのか否かを検討するために、A/A 遺伝子型6例につき、CD22 の翻訳領域全長の塩基配列を決定し、ほかに共通する変異の有無を検討した。さらに、これまで未検討であった、3' 非翻訳領域の多型解析と関連研究を施行した。

また、われわれが過去に mRNA 量との関連を報告した BAFF (BLyS) プロモーター多型 -871C>T(8)につき、強皮症との関連研究を施行した。

本研究は、金沢大学及び東京大学の研究倫理審査委員会に承認を得た研究計画に基づき、インフォームド・コンセントを得て施行した。

C. 研究結果

LcSSc 関連 CD22 遺伝子型と自己抗体のパターンとの関連を解析したところ、A/A 遺伝子型6例中5例が抗セントロメア抗体陽性($P=0.008$)であり、6例すべてが topo I 抗体陰性であった(表2)。

次に、この多型と細胞表面の CD22 発現強度との関連を検討した。A/A 遺伝子型が患者群にしか存在しないため、各患者の外来受診日ごとに、A/A 遺伝子型における発現強度を標準として、A/C、C/C 遺伝子型の発現強度を比で表したところ、A/A 遺伝子型は、他の遺伝子型と比較して、細胞表面の CD22 発現強度が、平均約15%減弱していることが見出された(図1)。

CD22 と強皮症との関連が、本多型自体によるものであるか否かを検討するために、まず、A/A 遺伝子型6検体すべてについて、全翻訳領域の塩基配列

を決定したが、新たな変異は見出されなかった。さらに、これまで多型解析を行っていなかった 3' 非翻訳領域の多型解析を行ったところ、反復配列多型、2塩基挿入、2個所の SNP の計4個所の多型が新たに見出された。これらについて強皮症との関連研究を行ったところ、有意な関連は検出されなかった。

BLyS (BAFF)のプロモーター -871C>T と強皮症の関連研究では、プロモーター活性が高いことが示唆される T アリルのホモ接合体が dcSSc に増加し、lcSSc に減少する傾向が観察されたが、統計学的有意差には至らなかった(表3)。

D. 考案

CD22 多型が lcSSc に関連すること、関連遺伝子型においては、CD22 の表面発現強度が低下することが示唆された。前年度までの研究において、発現増強を伴う CD19 多型が lcSSc と関連することを報告したが(7)、CD22 は CD19 の脱リン酸化により、CD19 の正のシグナルを抑制することが知られていることから、今回の結果から、CD19/CD22 ループの遺伝的多型が、特に lcSSc の遺伝素因の一つとなっていることがさらに支持された。

本多型はアミノ酸置換を伴わない多型であるため、これらと連鎖不平衡にある別の変異・多型が機能的意義を有する可能性を、全翻訳領域と 3' 非翻訳領域の変異スクリーニングにより検討したが、ほかに SSc と有意な関連を有する変異・多型は検出されず現時点では、本多型自体が転写効率、mRNA 安定性や翻訳効率などに影響して、蛋白発現レベルを低下させる可能性が支持される。

一方、B 細胞の生存・活性化誘導因子である BAFF(BLyS)では、統計学的有意差に到達しなかったものの、われわれが過去に報告した(8)、BAFF

mRNA の増加を伴うアリルのホモ接合体が dcSSc に増加し、lcSSc では減少する傾向が観察された。これは、最近報告された、皮膚硬化と BAFF との関連を示す松下らの論文(9)と整合性を持つ知見であり、今後、症例数を増やした検討が必要と考えられる。

E. 結論

B 細胞の活性化あるいは抑制因子の遺伝的多型が強皮症感受性あるいは臨床病型決定因子の一つとなっている可能性が示唆された。

F. 文献

1. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000; 165: 6635-6643.
2. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* 2004;50:1918-1927.
3. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, Nagaoka T, Takehara K, Tedder TF, Sato S. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002, 109: 1453-1462.
4. Asano N, Fujimoto M, Yazawa N, Shirasawa S, Hasegawa M, Okochi H, Tamaki K, Tedder TF, Sato S. B lymphocyte signaling established by the CD19/CD22 loop regulates autoimmunity in the tight-skin mouse. *Am J Pathol* 2004, 165: 641 - 650.

5. Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hagiwara K, Kano H, Takazoe M, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K: Polymorphisms of human *CD19* gene: Possible association with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun* 2002, 3 Suppl 1:S21-30.
6. Hatta Y, Tsuchiya N, Matsushita M, Shiota M, Hagiwara K, Tokunaga K: Identification of the gene variations in human *CD22*. *Immunogenetics* 49: 280-286, 1999.
7. Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S. Association of functional *CD19* polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50: 4002-4007, 2004.
8. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Analysis on the association of human *BLYS* (*BAFF*, *TNFSF13B*) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 3: 424-429, 2002.
9. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis. Enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* 54, 192-201, 2006.
- Kohda D, Maenaka K, Tokunaga K. Extensive polymorphisms of LILRB1 (ILT2, LIR1) and their association with HLA-DRB1 shared epitope negative rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 14, 2469-2480, 2005.
2. Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, Tsuchiya N, Honda H, Yamamoto K, Tokunaga K, Honda Z. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet* 14, 2881-2892, 2005.
3. Tsuchiya N, Kyogoku C: Role of Fcγ receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: Insights from Asia. *Autoimmunity* 38:347-352, 2005.
4. Tsuchiya N, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K: Association of HLA-DRB1*0901-DQB1*0303 haplotype with microscopic polyangiitis in Japanese. *Genes Immun* (in press)
5. Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K: Association of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* (in press).
6. 申栄吉、土屋尚之:BAFF(BLyS)とその受容体の生理的役割と病態との関連。臨床免疫 43: 47-54, 2005.
7. 土屋尚之:自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子-最近の話題-。最新医学 60(6月増刊号):1357-1355, 2005.
8. 土屋尚之:多因子遺伝病としてのリウマチアレルギー疾患:全身性エリテマトーデス。最新医学 60(9

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuroki K, Tsuchiya N, Shiroishi M, Rasubala L, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kusaoi M, Murakami Y, Takiguchi M, Juji T, Hashimoto H,

月増刊号):2120-2130, 2005.

9. 土屋尚之、本田善一郎:目で見るバイオサイエンス:全身性エリテマトーデスに見られる遺伝子多型。

内科 96:1115-1119, 2005.

10. 土屋尚之:免疫疾患の疾患感受性遺伝子。シミュレーション内科「リウマチ・アレルギー疾患を探る」(山本一彦編) 永井書店。pp7-10, 2005.

11. 土屋尚之:SLEおよびSLEモデルマウスにおける疾患感受性遺伝子解析。リウマチ・膠原病最新トピックス 変わりゆく研究と診療(竹原和彦、佐藤伸一、桑名正隆編) 診断と治療社, pp.34-37, 2005.

全身性強皮症との関連。日本人類遺伝学会第50回大会抄録集 p148, 2005年9月19日~22日、倉敷。

2. 土屋尚之:ヒトリウマチ性疾患の遺伝子解析による病態関連分子の検出(シンポジウム)。日本臨床免疫学会会誌 28:216, 2005. 第33回日本臨床免疫学会、2005年10月28日~29日、京都。

3. 人見祐基、土屋尚之、長谷川稔、藤本学、佐藤伸一、徳永勝士:ヒト CD22 遺伝子多型と全身性強皮症との関連。日本免疫学会総会・学術集会記録、35:200, 2005.

2. 学会発表

1. 人見祐基、土屋尚之、長谷川稔、藤本学、竹原和彦、佐藤伸一、徳永勝士:ヒト CD22 遺伝子多型と

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

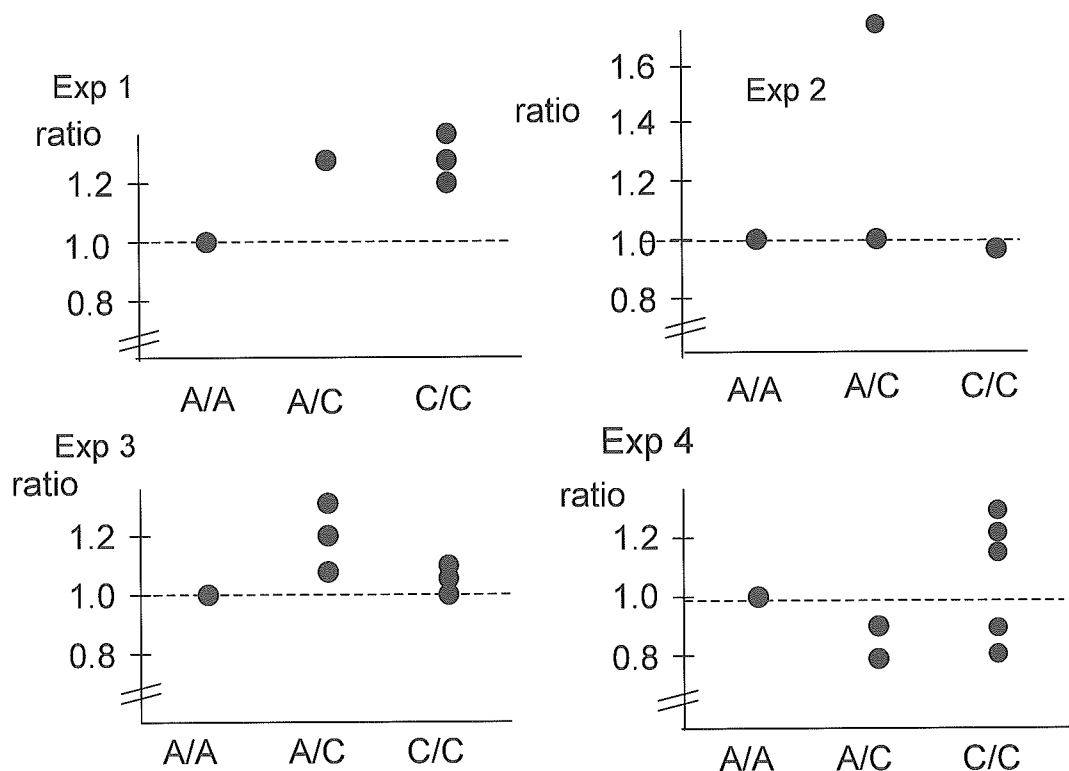


図1 CD22 c.2304 遺伝子型と末梢血B細胞表面における CD22 発現強度

強皮症に関連した c.2304 A/A 遺伝子型は強皮症患者のみに見られたため、それぞれの外来受診日ごとに、A/A 遺伝子型患者末梢血B細胞における CD22 発現強度を標準とし、A/C および C/C 遺伝子型患者における発現強度の比を提示した。全体として、A/A 遺伝子型では、ほかの遺伝子型と比較して、平均約15%の発現低下が検出された。

表1 強皮症におけるCD22 多型

	強皮症群全体		限局性皮膚硬化型		広汎性皮膚硬化型		健常対照群	
c.2304C>A(P768P)								
A/A	6	(4.8)	6	(7.6)	0	(0)	0	(0)
A/C	25	(19.8)	15	(19.0)	10	(21.3)	18	(19.4)
C/C	95	(75.4)	58	(73.4)	37	(78.7)	75	(80.6)
A/A	6	(4.8)	0	(0)	6	(7.6)	0	(0)
C/C+A/C	120	(95.2)	47	(0)	73	(92.4)	93	(100)

()内に%を示す。

*c.2304 A/A 対 (A/C + C/C)の比較において、強皮症群全体と健常対照群間に $P=0.025$, 限局性皮膚硬化型強皮症群と健常対照群間に $P=0.007$ の有意差が検出された。

表2 自己抗体とCD22 多型の関連

	抗セントロメア抗体				抗 topo I 抗体				健常対照群	
	+		-		+		-			
A/A	5	(8.5)	1	(1.5)	0	(0)	6	(6.5)	0	(0)
A/C	12	(20.3)	13	(19.4)	6	(17.7)	19	(20.7)	18	(19.4)
C/C	42	(71.2)	53	(79.1)	28	(82.3)	67	(72.8)	75	(80.6)

抗セントロメア抗体陽性群対健常対照群 A/A vs (A/C + C/C)で $P=0.008$

表3 BAFF(BLyS) -871C>Tと強皮症の関連

	強皮症群全体		限局性皮膚硬化型		広汎性皮膚硬化型		健常対照群	
T/T	26	(20.6)	13	(16.5)	13	(27.7)	22	(24.2)
T/C	64	(50.8)	44	(55.7)	20	(42.6)	50	(54.9)
C/C	36	(28.6)	22	(27.8)	14	(29.8)	19	(20.9)

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

TGF- β シグナルの低分子化合物による抑制

分担研究者 宮園 浩平 東京大学大学院医学系研究科
分子病理学・教授
協力者 今村 健志 癌研究会・癌研究所生化学部・部長
協力者 野出 學 京都薬科大学薬品製造学・教授
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・教授

研究要旨

TGF- β (transforming growth factor- β)は組織の線維化を促進する因子であることから強皮症の病因との関わりが注目されている。我々はこれまで TGF- β シグナルを抑制する化合物の研究を進めてきたが、今回新たに A-83-01 が TGF- β I 型レセプターのキナーゼ活性を阻害し、TGF- β シグナルを抑制することが明らかとなった。TGF- β は NMuMG 細胞の上皮-間葉分化転換 (EMT; epithelial-mesenchymal transition) を促進するが A-83-01 はこの作用を強く抑制した。A-83-01 は ALK-5 の他 ALK-4 や ALK-7 のシグナルも抑制したが、他のキナーゼに対する作用は顕著ではなかった。今後、A-83-01 の *in vivo* での作用を検討して予定である。

A. 研究目的

TGF- β (transforming growth factor- β)は、元来は間葉系細胞の形質転換を促進する因子の一つとして発見されたが、その後、多くの細胞の増殖を抑制する因子であることが明らかとなった因子である。さらに TGF- β は細胞外マトリックスタンパク質の産生を促進し、これを分解する酵素の活性を抑制する傾向がある。このことから TGF- β は代表的な線維化促進因子として知られるようになり、強皮症の進展に深く関わっていることが示唆され研究が行われてきた。近年、TGF- β のシグナル伝達機構が詳細に解明され、これにより

TGF- β シグナルを制御する分子が数多く同定され、これらの分子と強皮症をはじめとする種々のヒト線維性疾患との関連も注目されてきている。また、TGF- β シグナルを制御する薬剤が次々と開発されてきており、臨床治験が開始されつつある。こうした薬剤は今後、強皮症の治療にも有効であることが期待されることから、本研究では強力な TGF- β 阻害剤の開発を目指して研究を行った。

B. 研究方法

1) すでに報告されている TGF- β 阻害剤

SB431542 などをもとに17種類の化合物を合成した。

2) Smadの転写活性は9xCAGA-Luxなどの特異的リポーター遺伝子を用いて行った。細胞増殖に与える影響はMv1Lu細胞を用い、細胞数をカウントした。

3) Smad2 や p38 MAP kinase、ERKなどのリン酸化は特異抗体を用いてイムノブロットングで確認した。

4) TGF- β によるEMTはNMuMG細胞を用いて形態の変化を確認した。さらにE-cadherinなどの上皮または間葉系細胞マーカーの変動をmRNAレベルでRT-PCRを用いて、タンパクレベルではイムノブロットングを用いて確認した。

本研究で用いた細胞は市販のもののみを用い、患者由来のサンプルは用いていない。本研究では動物実験は行っていない。

C. 研究結果

1) A-83-01はALK-5キナーゼ活性を強力に抑制した

リポーターアッセイの結果、17種類の化合物のうち3種類が強力にTGF- β シグナルを抑制した。このうち、A-100-01は細胞に弱いながらも毒性が認められた。A-77-01はすでにSayerら[1]によって報告された化合物と同一であったが、A-83-01は新規の構造を持っていた。

A-83-01、A-77-01ともに100 nM以下の低濃度でTGF- β シグナルを抑制し、過去に報告されているSB-431542より強力にシグナルを抑制した(図1A)。A-83-01のIC₅₀は12 nM、A-77-01のIC₅₀は25 nMでA-83-01の方がより低濃度でTGF- β シグナルを抑制した。なお、A-83-01、

A-77-01ともにBMPのシグナルは抑制しなかった。

これまで報告されているTGF- β レセプターキナーゼ阻害剤は、TGF- β I型レセプターであるALK-5だけでなく、activinのI型レセプターであるALK-4や、NodalのI型レセプターであるALK-7も抑制する。A-83-01についてALK-4、ALK-7に対する活性を検討したところ、ALK-4のシグナルをIC₅₀ = 45 nMで、ALK-7のシグナルをIC₅₀ = 7.5 nMで抑制することが明らかとなった。一方、BMPのI型レセプターであるALK-2、ALK-3、ALK-6のシグナルは10 μ M以上の濃度で始めて抑制が見られた。

2) A-83-01はTGF- β 増殖抑制活性を抑制する
TGF- β は上皮細胞の増殖を抑制することからA-77-01やA-83-01がTGF- β による増殖抑制を抑制するかどうかを確認した。その結果、1 μ MのA-77-01とA-83-01はともにTGF- β による増殖抑制作用をキャンセルした(図1B)。これに対し、SB-431542もTGF- β の作用に拮抗するもののその作用は1 μ Mでは不十分であった。

3) A-83-01はTGF- β によるSmad2のリン酸化を抑制する

TGF- β はSmad2とSmad3を介してシグナルを伝達する。リン酸化Smad2抗体を用いてA-77-01とA-83-01の作用を検討したところ、両者ともにTGF- β によるSmad2のリン酸化を抑制した(図1C)。これに対し、SB-431542もSmad2のリン酸化を抑制したが、その作用は不十分であった。またSmadシグナル以外のシグナルに対する影響を見たところ、血清刺激によるERK1/2のリン酸化

には A-77-01 と A-83-01 は影響を与えなかった。また高浸透圧刺激による p38 のリン酸化には 10 μ M の高濃度においてのみ、弱い抑制活性が見られるのみであった。

4) A-77-01 は TGF- β による EMT を抑制する

TGF- β は種々の上皮細胞に作用して EMT を誘導する。とくに NMuMG 細胞には典型的な EMT を誘導する。EMT を起こすと形態変化、E-cadherin の発現の減少に加え、fibronectin や N-cadherin の産生の上昇が見られ、近年、組織の線維化には EMT が密接に関与していることが示唆されている。NMuMG 細胞を用いて A-77-01 と A-83-01 の作用を検討したところ、両者ともに TGF- β による EMT を抑制し、fibronectin や N-cadherin の産生を抑制し、E-cadherin の産生を mRNA、タンパクレベルの両方で促進した(図2 A~C)。

D. 考察

TGF- β シグナルを抑制して治療に応用しようという試みは、強皮症などの線維性疾患を中心に進められ、その効果が期待されている。

TGF- β の拮抗剤は標的細胞の外で作用するものと標的細胞内で作用するものに大別できる。標的細胞の外で作用するものとしては TGF- β に対する種々のモノクローナル抗体やアンチセンスオリゴヌクレオチドがあげられ、しかしこれまでのところ、強皮症に対しては TGF- β モノクローナル抗体の作用は十分ではないとの報告もあり、今後の検討が必要であろう。

一方、今回研究に用いた化合物は TGF- β I 型レセプターの ATP 結合部位に結合してその作用

を抑制するものである。低分子化合物はモノクローナル抗体に比べて代謝が早いことや分子量が小さいため、組織への浸透性が極めてよいことなどが特徴である。しかし、TGF- β I 型レセプターの ALK-5 とアクチビンの I 型レセプターの ALK-4、および Nodal のレセプターである ALK-7 が構造的にきわめて類似していることから低分子化合物はこれらのレセプターの作用をすべて抑制することが特徴である。我々は今回報告した化合物を比較的大量の合成することができたことから、今後はこれらの化合物の *in vivo* での作用を検討していく予定である。

E. 結論

TGF- β I 型レセプターのキナーゼ活性を阻害する化合物として新たに A-83-01 を同定した。A-83-01 は ALK-5 の他 ALK-4 や ALK-7 のシグナルも抑制したが、他のキナーゼに対する作用は顕著ではなかった [2]。今後、A-83-01 の *in vivo* での作用を検討していく予定である。

F. 文献

1. Sawyer JS, Anderson BD, Beight DW, et al. Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted pyrazole inhibitors of the transforming growth factor- β type I receptor kinase domain. *J Med Chem.* 2003; 46: 3953-6.

2. Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, et al. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor- β . *Cancer Sci.* 2005; 96: 791-800.
3. Suzuki, H., Watabe, T., Kato, M., Miyazawa, K., and Miyazono K. (2005) Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells. *Blood* 105 (6), 2372-2379.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuratomi, G., Komuro, A., Goto, K., Shinozaki, M., Miyazawa, K., Miyazono, K., and Imamura, T. (2005) 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.* 386 (3), 461-470.
2. Yamamoto, K., Sokabe, T., Watabe, T., Miyazono, K., Yamashita, J.K., Obi, S., Ohura, N., Matsushita, A., Kamiya, A., and Ando, J. (2005) Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 (4), H1915-1924.
4. Kawazu, M., Asai, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Saito, T., Goyama, S., Mitani, K., Miyazono, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M., and Hirai, H. (2005) Functional domains of Runx1 are differentially required for CD4 repression, TCR β expression, and CD4/8 double-negative to CD4/8 double-positive transition in thymocyte development. *J. Immunol.* 174 (6), 3526-3533.
5. Moren, A., Imamura, T., Miyazono, K., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2005) Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT-domain ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* 280 (23), 22115-22123.
6. Kano, M.R., Morishita, Y., Iwata, C., Iwasaka, S., Watabe, T., Ouchi, Y., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2005) VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B/PDGFR β signaling. *J. Cell Sci.* 118 (16): 3759-3768.

7. Tojo, M., Hamashima, Y., Hanyu, A., Kajimoto, T., Saitoh, M., Miyazono, K., Node, M., and Imamura, T. (2005) The ALK-5 Inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor- β . *Cancer Sci.* 96 (11), 791-800.
8. Azuma, H., Ehata, S., Miyazaki, H., Watabe, T., Maruyama, O., Imamura, T., Sakamoto, T., Kiyama, S., Kiyama, Y., Ubai, T., Inamoto, T., Takahara, S., Itoh, Y., Otsuki, Y., Katsuoka, Y., Miyazono, K., and Horie, S. (2005) Effect of Smad7 expression on metastasis of mouse mammary carcinoma JygMC(A) cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (23), 1734-1746.
9. Miyazono, K., Maeda, S., and Imamura, T. (2005) BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16 (3), 251-263.

2. 学会発表

なし

Ⅱ. 知的所有権の出願・登録状況

なし

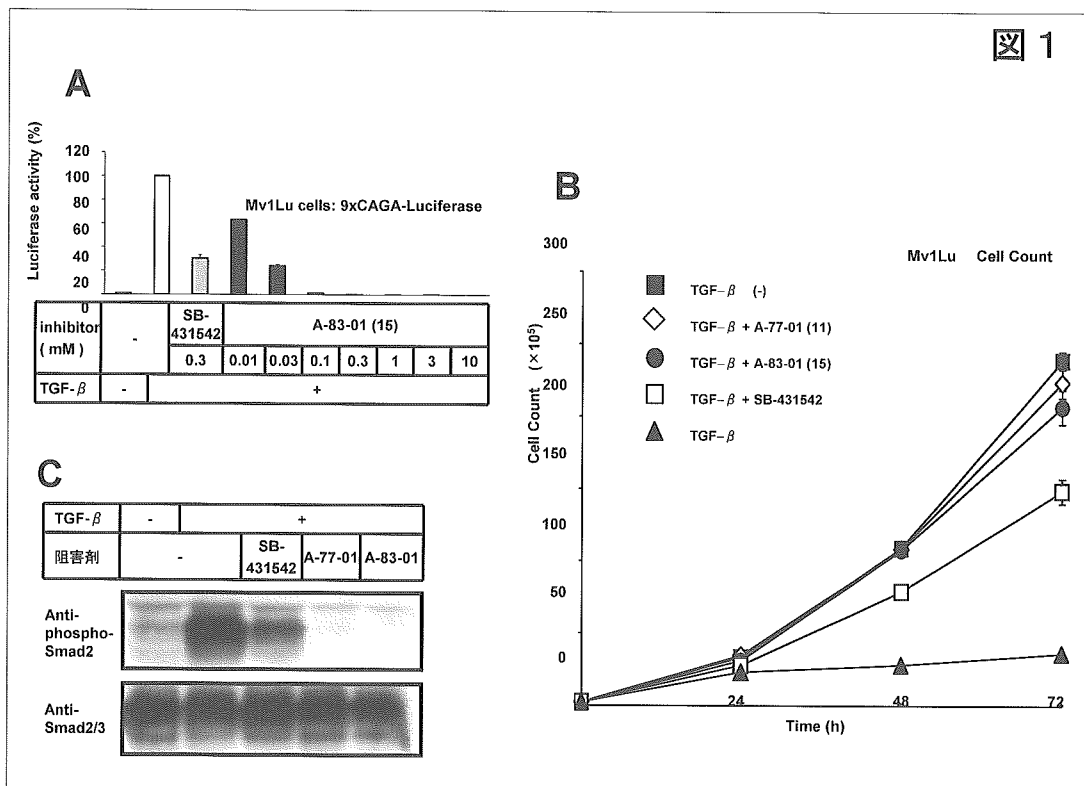


図1 TGF- β レセプターキナーゼ阻害剤 (A-83-01) による TGF- β のシグナルと増殖抑制の阻害。(A) A-83-01 は用量依存性に TGF- β の転写活性を抑制した。(B) A-83-01 と A-77-01 はともに TGF- β による Mv1Lu 細胞の増殖抑制作用を抑制した。(C) A-83-01 と A-77-01 はともに TGF- β による Smad2 のリン酸化を抑制した。

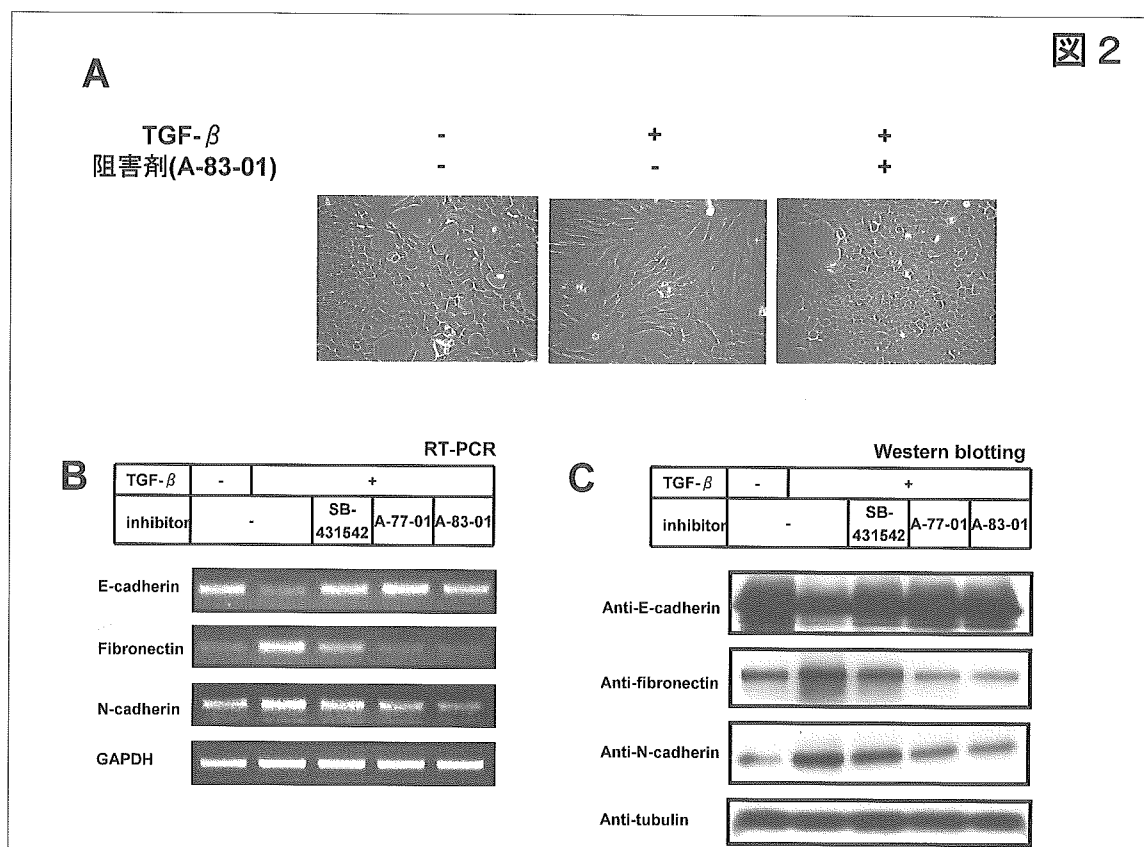


図2 TGF- β レセプターキナーゼ阻害剤 (A-83-01) による TGF- β 誘導性 EMT の阻害。(A) A-83-01 は NMuMG 細胞に対する TGF- β 誘導性の EMT を抑制した。(B 及び C) A-83-01 と A-77-01 はともに TGF- β による E-cadherin の発現抑制を消失し、fibronectin や N-cadherin の発現促進を mRNA レベル (RT-PCR; B)、またはタンパクレベル (イムノブロッティング; C) で抑制した。

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

骨髄由来細胞の分化誘導に基づく臓器線維症の治療戦略

研究協力者 稲垣 豊 東海大学医学部基盤診療学系助教授
協力者 東山礼一 東海大学大学院医学研究科大学院生
協力者 岡崎 勲 東海大学医学部基盤診療学系教授
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

臓器線維症は、その部位と原因とにかかわらず、組織にコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスが過剰に沈着し、臓器の機能障害をきたした病態である。肝線維症の終末像である肝硬変症は、これまで進行性かつ不可逆性と考えられてきたが、最近ではその原因を除去することで正常肝に近い状態にまで改善することが臨床的にも実証された。我々は、四塩化炭素投与による実験的肝硬変症からの回復期に、コラーゲン線維を分解する MMP-13 が一過性に発現することを見出した。GFP transgenic mouse を用いた骨髄移植実験では、この時期に一致して多数の骨髄由来細胞が肝内に浸潤・増殖し、線維束周囲に認められた。この骨髄由来細胞は MMP-13 ならびに MMP-9 を発現することで、肝線維化改善に寄与していた。また、G-CSF 投与および HGF transgenic mouse を用いた検討では、MMP-9 発現細胞の増加を認めた。これらの結果に基づいて、骨髄由来細胞の MMP 産生細胞への分化誘導を利用した肝線維症治療を模索している。

A. 研究目的

強皮症は、全身諸臓器にコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの異常沈着をきたす原因不明の疾患である。コラーゲンは、細胞外マトリックスの主要成分として組織・臓器形態の保持のみならず組織修復や創傷治癒においても重要なはたらきを演じているが、その産生調節機構が破綻をきたすと組織への過剰なコラーゲン沈着をもたらす。皮膚・肺・腎・肝・脾など諸臓器の線維化を引き起こす。

これら諸臓器の線維化は各種感染症のほか、

臓器障害性の化学物質への曝露や手術後の瘢痕などによりもたらされ、線維化がさらに臓器障害をきたすという悪循環を形成する。近年では、かつては救命しえなかった重篤な急性疾患が救命できるようになり、一方で慢性疾患の治療管理が向上したこともあり、臓器線維症の患者は増加傾向にある。それはすなわち、強皮症や特発性間質性肺炎などの原因不明の難病、急性心筋梗塞後の心臓線維症、ウイルス性ならびにアルコール性肝硬変、慢性糸球体腎炎・糖尿病性腎症による腎臓の線

維化、塵肺などの肺線維症などであり、その総数はがん患者をはるかに凌ぐ。

これまで我々は、四塩化炭素投与によるラットの実験的肝線維症の回復過程において、コラーゲン線維を分解する間質性コラゲナーゼ (MMP-13) が一過性に発現し¹⁾、その産生細胞の一部が神経原性の幹細胞マーカー Musashi-1 陽性の骨髄由来細胞であることを明らかにした²⁾。本研究では、肝線維化の改善過程における骨髄由来細胞の役割をさらに明らかにするため、GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を同系マウスに移植し、肝内へ浸潤・増殖したこれら骨髄由来細胞が MMP 産生細胞へと分化する過程を詳細に観察した。

B. 研究方法

GFP トランスジェニックマウス (C57BL/6 由来) の骨髄より 5×10^6 個の骨髄細胞を採取し、9.5 Gy の致死性 X 線照射をした同系マウスに経静脈的に移植した。このレシピエントマウスに、移植 3 ヶ月後より 25% 四塩化炭素 (1mg/kg 体重) を 3 日毎に計 30 回皮下投与した。一部のマウスには、四塩化炭素最終投与前の 7 日間、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の G-CSF を連日皮下投与した。

また、骨髄由来細胞の浸潤・増殖や発現形質に対する HGF の効果を明らかにするために、アルブミンプロモーターを用いて HGF を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて同様の GFP 骨髄移植と肝線維化実験を行った。

四塩化炭素最終投与から 2 日、5 日、9 日目に肝臓を摘出し、Sirius red 染色により線維化の程度を評価した。この線維化の進展過程

と投与中止後の回復過程において、移植された GFP マウス由来の骨髄細胞が肝内へ浸潤・増殖する動態を、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また CD34 抗体・Ov-6 抗体・AFP 抗体・Albumin 抗体・ αSMA 抗体、F4/80 抗体・MMP-13 抗体・MMP-9 抗体を用いた免疫蛍光染色を行ない、GFP との共発現を検討することで、骨髄由来細胞の肝内での発現形質を解析した。

C. 研究結果

四塩化炭素計 30 回の投与により、肝小葉構造の改築と結節形成を伴う肝硬変への進展が確認された。四塩化炭素最終投与後 2 日目には、多数の GFP 陽性骨髄由来細胞が門脈域と線維束に沿って分布していた。5 日目ないし 9 日目になると著明な線維吸収がみられ、これに伴って GFP 陽性細胞も減少した。

四塩化炭素最終投与後 2 日目および 5 日目の門脈域と線維束周囲には MMP-13 と MMP-9 の発現が認められた。これらの MMP 産生細胞の約半数が GFP 陽性であり、骨髄由来と考えられた。GFP 陽性細胞は CD34 陽性の血球系幹・前駆細胞のほか、Ov-6 陽性の Ova1 細胞や、F4/80 陽性の Kupffer 細胞へと分化していた。一方、AFP あるいは Albumin の発現は稀で、今回の実験系では αSMA 陽性の活性化星細胞への分化は認められなかった。

G-CSF 投与群では、非投与群と比較して門脈域ならびに線維束周囲の GFP 陽性細胞が多く認められた (図)。また、MMP-9 陽性細胞も増加しており、四塩化炭素最終投与後 5 日目における線維吸収が、非投与群に比して有意

に促進していた (図)。同様に、HGF トランスジェニックマウスにおける線維肝からの回復過程でも MMP-9 産生細胞の増加が認められ、同トランスジェニックマウスに G-CSF 投与を行うことで MMP-9 産生細胞数は相乗的に増加した。

D. 考 案

これまで再生医学の領域では、骨髄細胞の移植、または組織幹細胞の分化誘導による臓器再生が多数試みられているが、肝線維化の改善におけるこれらの細胞の役割についてはなお不明な点が多い。本研究では、MMP 発現に着目して肝線維化改善過程における骨髄由来細胞の肝内動態を解析し、さらに G-CSF や HGF を用いた際の骨髄細胞の動員や発現形質の変化について検討を行った。

骨髄由来細胞は肝線維化に伴って肝内に多数が浸潤・増殖しており、G-CSF 投与によりその動員が増強された。また、骨髄由来細胞は形態学的にさまざまな細胞に分化し、線維束周囲に MMP-13 や MMP-9 の発現が認められたことから、肝線維化の改善に寄与していると考えられた。本研究により、骨髄幹細胞を増殖させ、さらに MMP 産生細胞へと分化誘導する有効な方法が開発されれば、幹細胞を外来的に移植せずとも自家骨髄幹細胞を線維化組織に動員することで、非侵略的な線維症治療に結びつくことが期待される。とりわけ、G-CSF や HGF の投与は MMP-9 産生細胞を増加させたことから、骨髄由来細胞の分化誘導に基づく線維症治療への応用が期待される。

本研究は、骨髄由来細胞の動態を通して、

臓器線維症からの回復過程を包括的に研究するものである。当面は肝硬変モデルを用いて研究を進めるが、骨髄細胞の動員と分化誘導により肝線維症の改善がみられれば、強皮症や特発性肺線維症など全身諸臓器にみられる難治性の線維症にも広く応用可能であり、その貢献は計り知れない。

E. 結 論

骨髄由来細胞の線維化組織への動員と、MMP 産生細胞への分化誘導に基づく、臓器線維症治療の新しい概念と治療戦略とを提唱した。

F. 文 献

- 1) Tetsu Watanabe, Maki Niioka, Shigenari Hozawa, Kaori Kameyama, Tatsuhiko Hayashi, Masao Arai, Akiko Ishikawa, Katsuya Maruyama and Isao Okazaki: Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 33: 224-235, 2000
- 2) Tetsu Watanabe, Maki Niioka, Shigenari Hozawa, Yoshihiko Sugioka, Masao Arai, Katsuya Maruyama, Hideyuki Okano and Isao Okazaki: Stem cells expressing matrix metalloproteinase-13 mRNA appear during regression reversal of hepatic cirrhosis. Okazaki I, Ninomiya Y, Friedman SL and Tanikawa K (Eds), *Extracellular Matrix and the Liver - Approach to Gene Therapy*, Academic

Press, New York, 2003, 361-388

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sonoko Chujo, Fumiaki Shirasaki, Shigeru Kawara, Yutaka Inagaki, Takuro Kinbara, Masaharu Takigawa, Kazuhiko Takehara: Connective tissue growth factor causes persistent pro α 2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor- β in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 203: 447-456, 2005
- 2) Tomoaki Yoshino, Hideaki Sumiyoshi, Toshitaka Shin, Noritaka Matsuo, Yutaka Inagaki, Yoshifumi Ninomiya and Hidekatsu Yoshioka: Multiple proteins are involved in the protein-DNA complex in the proximal promoter of the human α 1(III) collagen gene (*COL3A1*). *Biochim Biophys Acta* 1729: 94-104, 2005
- 3) Yutaka Inagaki, Miwa Kushida, Kiyoshi Higashi, Johbu Itoh, Reiichi Higashiyama, Yun Yu Hong, Norifumi Kawada, Kazuhiko Namikawa, Hiroshi Kiyama, George Bou-Gharios, Tetsu Watanabe, Isao Okazaki and Kazuo Ikeda: Cell type-specific intervention of TGF- β /Smad signaling suppresses collagen gene expression and hepatic fibrosis in mice. *Gastroenterology* 129: 259-268, 2005
- 4) Gianluca Svegliati-Baroni, Yutaka

Inagaki, Ana-Rosa Rincon-Sanchez, Cindy Else, Stefania Saccomanno, Antonio Benedetti, Francesco Ramirez and Marcos Rojkind: Early response of α 2(I) collagen to acetaldehyde in human hepatic stellate cells is TGF- β -independent. *Hepatology* 42: 343-352, 2005

5) Nobuhiro Izumi, Shinjiro Mizuguchi, Yutaka Inagaki, Shizuya Saika, Norifumi Kawada, Yuji Nakajima, Kiyotoshi Inoue, Shigefumi Suehiro, Scott L Friedman and Kazuo Ikeda: BMP-7 opposes TGF β 1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. *Am J Physiol (Lung Cellular and Molecular Physiology)*, 2005 in press

2. 学会発表

- 1) 稲垣 豊、渡辺 哲、岡崎 勲: TGF- β /Smad シグナルを標的とした肝線維化治療のストラテジー. 第91回日本消化器病学会総会、シンポジウム(4)「肝線維化抑制の治療へのニューアプローチ」、2005年4月14日、東京
- 2) **Yutaka Inagaki**, Miwa Kushida, Johbu Itoh, Reiichi Higashiyama, Yun Yu Hong, Tetsu Watanabe, Isao Okazaki, Kiyoshi Higashi, Kazuo Ikeda: Treatment strategy for organ fibrosis by cell type-specific intervention of TGF- β /Smad signaling. 第37回日本結合組織学会学術大会、2005年5月26日、富山
- 3) 稲垣 豊、東山礼一、渡辺 哲、岡崎 勲、池田一雄、汐田剛史: Hepatocyte Growth Factor によるコラーゲン遺伝子転写の抑制機序. 第41回日本肝臓学会総会、ワークシ

ヨップ(7)「肝線維化」、2005年6月17日、大阪

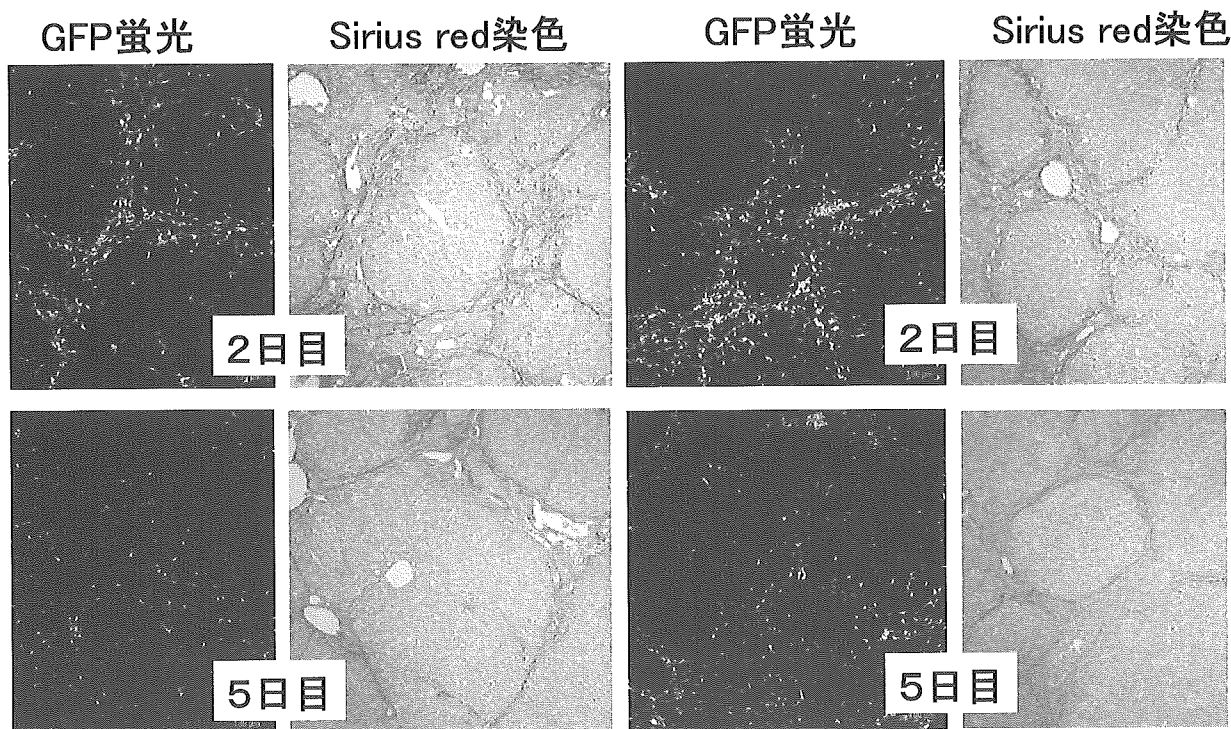
- 4) 東山礼一、稲垣 豊、渡辺 哲、岡崎 勲、: 骨髄由来細胞を用いた肝線維症治療の試み. 第41回日本肝臓学会総会、ワークショップ(4)「肝再生と再生医療」、2005年6月17日、大阪

- 5) **Yutaka Inagaki**, Miwa Kushida, Johbu Itoh, Yun Yu Hong, Reiichi Higashiyama, Tetsu Watanabe and Isao Okazaki: Hepatocyte growth factor counter-represses Smad3-

dependent $\alpha 2(I)$ collagen gene transcription by modifying the reciprocal balance between ERK1/2 and p38 mitogen activated protein kinase signals. 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2005. 11. 14, San Francisco, CA

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし



無治療レシピエント

G-CSF投与レシピエント

図：四塩化炭素反復投与中止後の肝線維化改善過程における骨髄由来細胞の動態

骨髄を GFP 発現細胞で置換した後に四塩化炭素を計 30 回にわたって皮下投与し、最終投与後 2 日目および 5 日目の肝組織における GFP 陽性骨髄由来細胞の浸潤・増殖と線維化の程度とを、それぞれ共焦点レーザー顕微鏡と Sirius red 染色を用いて観察した。一部のレシピエントマウスには、四塩化炭素最終投与前の 7 日間、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の G-CSF を連日皮下投与して、無治療レシピエントマウスにおける所見と比較した。

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

皮膚線維化における CTGF と c-Myc の関連

協力者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科助教授
協力者	近藤美幾	金沢大学医学部附属病院皮膚科医員
協力者	白崎文朗	金沢大学医学部附属病院皮膚科講師
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教授

研究要旨

強皮症の線維化には TGF- β をはじめとした様々なサイトカインが関与している。その中で我々は TGF- β で早期に誘導される connective tissue growth factor (CTGF)に着目し、新生マウスの皮下に両者を同時に注射することにより線維化を誘導する実験モデルを作成し、CTGF は TGF- β による $\alpha 2$ (I) collagen (COL1A2)の発現誘導を維持することにより線維化の維持に関与することを示した。そこで今回我々は皮膚線維芽細胞において、TGF- β と CTGF 存在下での COL1A2 の発現と COL1A2 の転写抑制に関与すると報告されている c-Myc との関連を調べた。COL1A2 の発現は TGF- β 単独より CTGF との同時刺激において有意に上昇した。また c-Myc の発現は同時刺激により有意に継続的な減少がみられた。さらに、c-Myc を強制発現すると、TGF- β による COL1A2 promoter の活性化を抑制した。また TGF- β と CTGF の同時刺激にて Smad2 のリン酸化が維持された。以上のことから COL1A2 の発現調節には c-Myc が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は皮膚や肺、心、腎などの内臓諸臓器の線維化や血管障害をきたす結合組織疾患である。線維化は細胞外基質の異常沈着が原因であると考えられており、様々なサイトカインが関与していることが知られている。これまで我々は TGF- β と TGF- β で早期に誘導される CTGF に着目し線維化を誘導する実験モデルを確立した(1)。その結果、TGF- β と CTGF の両者を注入することに

より COL1A2 の転写が促進し線維化が維持されることが判明した(2, 3)。

c-Myc は癌遺伝子であり、一般的には細胞増殖や分化に関与することにより癌化のメカニズムの中核を担うとされている遺伝子の一つであるが、近年、造血幹細胞での分化や増殖にも関与していることが解明され、注目を浴びている。また、c-Myc は以前より COL1A2 の転写の抑制に関与することが知られている(4)。そこで今回我々は

CTGF の線維化維持と c-Myc との関連について皮膚線維芽細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

1) 細胞内の COL1A2, c-Myc の発現

(a) mRNA の発現

TGF- β と CTGF を正常人線維芽細胞に刺激し RNA を抽出し、cDNA を合成した後に、real time PCR 法にて検討した。

(b) タンパクの発現

SDS-PAGE での泳動後に PVDF 膜に転写。抗 c-Myc 抗体と抗 phospho-Smad2 抗体で Western blotting を行った。

2) Luciferase assay

Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega) を用いて培養細胞を溶解し、上清 10ul に発行基質液 50ul を添加しルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果

1) COL1A2 の発現と転写活性

皮膚線維芽細胞に TGF- β と CTGF を刺激し 2 4 時間後の COL1A2 の発現を real time PCR にて測定した。2 4 時間後に COL1A2 の mRNA レベルでの発現は TGF- β で 1.5 倍程度上昇しているが、CTGF を同時に刺激した場合には 2 倍程度上昇した。また、NIH3T3 細胞にて COL1A2 の転写活性を luciferase assay にて検討した。ALK5TD (TGF- β type I receptor の恒常活性型) を強制発現したところ、COL1A2 の活性が 2.5 倍程度上昇し、さらに TGF- β で刺激したところ、3.5 倍程度上昇し ALK5TD のみよりも顕著であった。さらに、TGF- β と CTGF の両方の刺激では 5.5 倍程度

と luciferase 活性がより顕著であった。

2) COL1A2 promoter に対する c-Myc の検討。

NIH3T3 細胞に ALK5TD を強制発現すると、COL1A2 の活性は上昇するが c-Myc はその活性を抑制した。また、TGF- β でも濃度依存性に転写が活性化するが c-Myc を強制発現すると、COL1A2 の活性が抑制された。よって、c-Myc は COL1A2 のプロモーターに抑制的に作用することが示唆された。

3) c-Myc の発現。

皮膚線維芽細胞に TGF- β と CTGF を刺激し 3 時間、2 4 時間後の c-Myc の mRNA レベルでの発現を real time PCR を用いて検討した。3 時間後には TGF- β 刺激、TGF- β , CTGF 両者の刺激で c-Myc の発現は低下した。一方 24 時間後では TGF- β , CTGF 両者の刺激でのみ c-Myc の継続的な発現低下がみられた。さらに Western blotting にて蛋白レベルでの発現を確認したところ、24 時間後での TGF- β , CTGF 両者の刺激でのみ c-Myc の発現が抑制されていた。さらに、このときの Smad2 の活性を検討したところ、TGF- β , CTGF 両者の刺激において Smad2 が活性化していた。以上のことから、TGF- β , CTGF による COL1A2 の上昇は Smad が活性化し c-Myc を抑制する可能性があると考えられた。

D. 考案

これまで我々は、新生マウスに TGF- β を持続的に作用させると肉芽組織が形成され、さらに同部位に CTGF が発現していることから、CTGF が TGF- β による線維化に関与していると考え、様々な検討を行ってきた。その結果 TGF- β と CTGF の連続投与により COL1A2 の mRNA の発現量が上昇しさらにコラーゲンの量も上昇しているという