

ことが判明したが、詳細なメカニズムは不明であった。c-Myc は COL1A2 の転写の抑制に関与する可能性があることが以前より示されているが皮膚線維芽細胞における TGF- $\beta$ との関連は不明であった。今回の検討では TGF- $\beta$ での COL1A2 の上昇を c-Myc が抑制した。さらに TGF- $\beta$ 刺激にて c-Myc が抑制されているが、CTGF ではより顕著に抑制されていた。以上より CTGF による線維化の維持には c-Myc が関与している可能性が示唆された。今回の検討では、正常細胞でおこなった実験であり、強皮症の細胞では異なる反応を示す可能性も十分に考えられる。よって、今後は強皮症細胞と正常人線維芽細胞における比較を行う方針である。

## E. 結論

正常人線維芽細胞において COL1A2 の発現は TGF- $\beta$ 単独より CTGF との同時刺激において有意に上昇し、c-Myc の発現は同時刺激により有意に継続的に減少した。さらに同刺激にて Smad2 のリン酸化が維持された。また、c-Myc を強制発現すると、TGF- $\beta$ による COL1A2 の promoter 活性を抑制した。よって COL1A2 の発現調節には c-Myc の抑制が関与している可能性が示唆された。

## F. 文献

1. 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 1997;237(2):292-6.

2. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, 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 1999;181(1):153-9.
3. Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, et al. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. J Cell Physiol 2005;203(2):447-56.
4. Yang BS, Geddes TJ, Pogulis RJ, de Crombrughe B, Freytag SO. Transcriptional suppression of cellular gene expression by c-Myc. Mol Cell Biol 1991;11(4):2291-5.

## G. 研究発表

なし

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

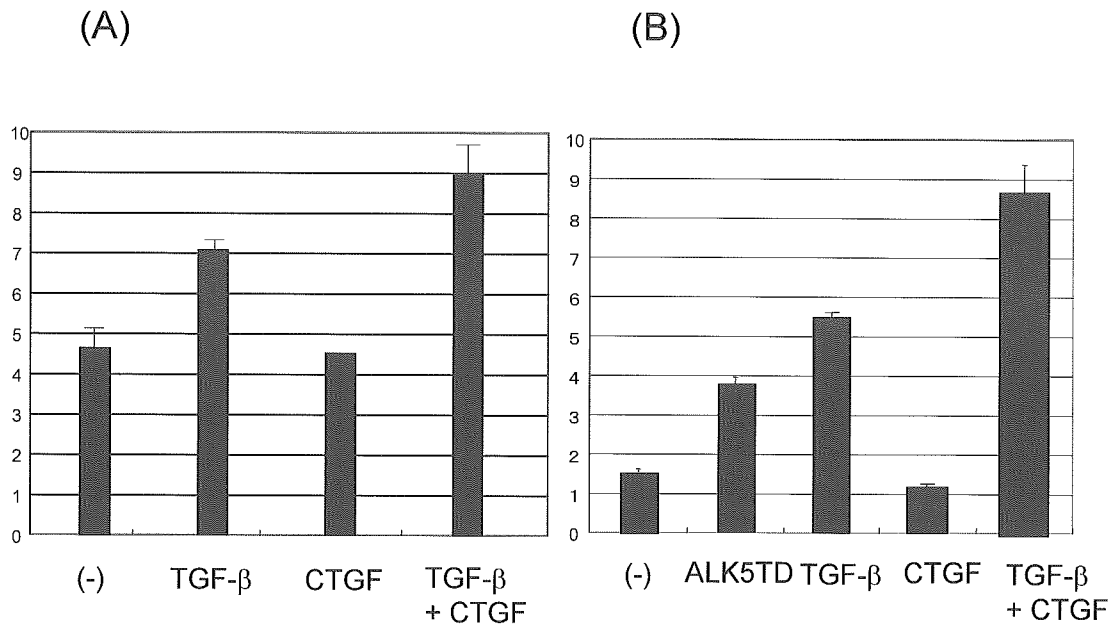


図 1 TGF-β, CTGF 刺激による COL1A2 の mRNA での発現とプロモータ活性。  
 (A) 正常細胞を用いての COL1A2 の mRNA レベルでの発現を real-time PCR にて検討した。  
 (B) NIH3T3 細胞を用いて COL1A2 の活性を検討した。

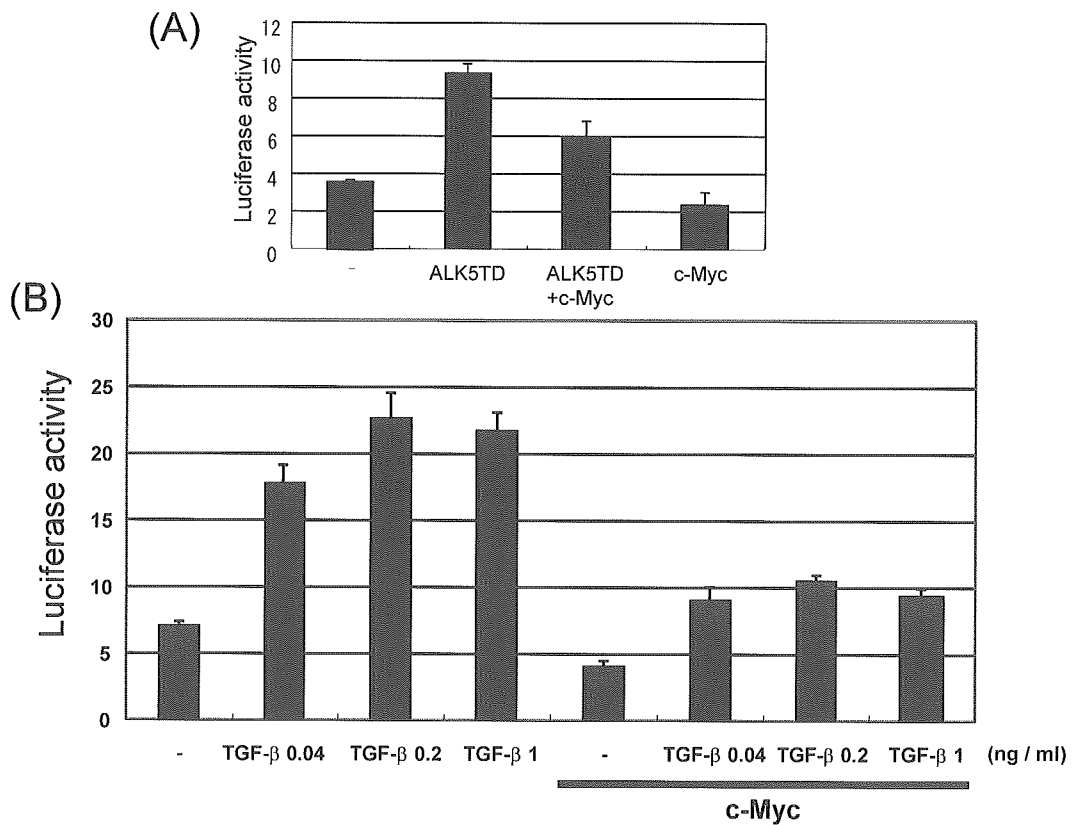


図 2 COL1A2 の転写活性における c-Myc の作用  
 (A), (B) NIH3T3 細胞を用いて ALK5TD や TGF-β、CTGF 刺激における COL1A2 の活性における c-Myc の作用を検討した。

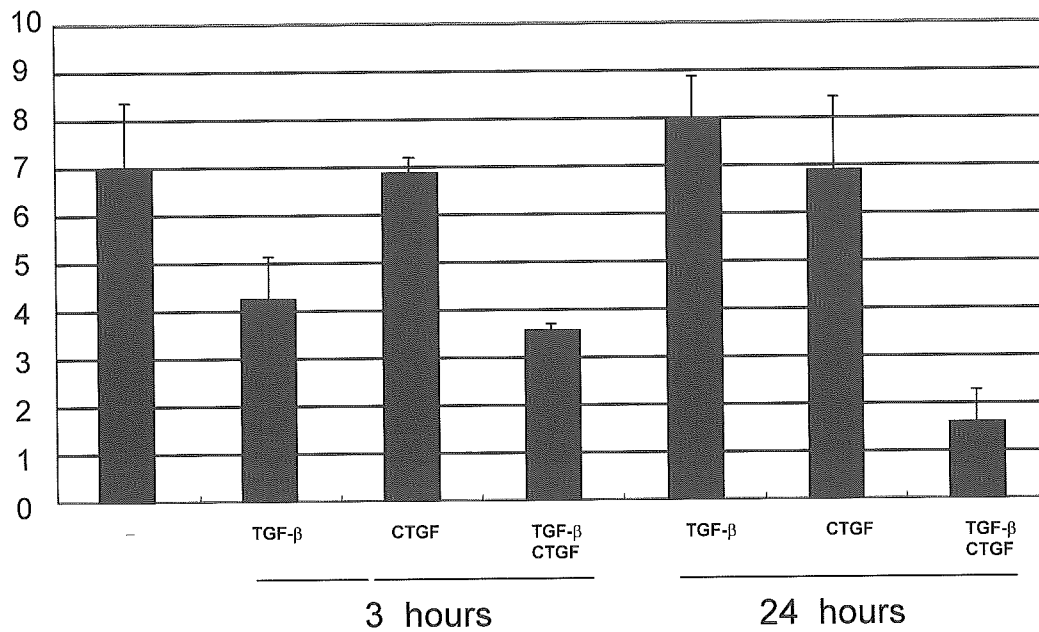


図3 c-Myc の mRNA レベルでの発現  
TGF-β、CTGF を刺激し、3 時間後、24 時間後の c-Myc の mRNA レベルでの発現を real-time PCR にて検討した。

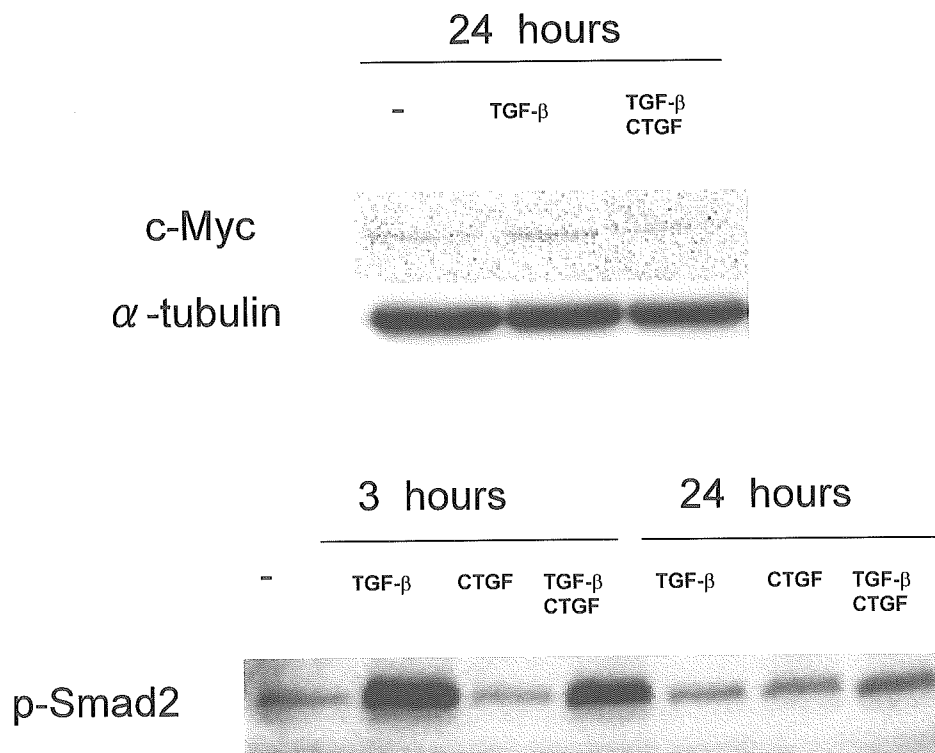


図4 c-Myc のタンパクレベルでの発現、Smad2 のリン酸化  
TGF-β、CTGF を刺激し、タンパクレベルでの c-Myc の発現と Smad2 のリン酸化を Western blotting にて検討した。

## Hepatocyte Growth Factor の Matrix Metalloproteinase-1 発現誘導作用の機序の検討

分担研究者 尹 浩信 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学教授  
協力者 神人正寿 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

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。その線維化改善の機序の一つとして、matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)の誘導作用が挙げられる。しかし、HGF の MMP-1 誘導作用に関する *in vitro* でのメカニズムの検討には未だ乏しい。今回我々は正常皮膚線維芽細胞における HGF の MMP-1 誘導メカニズムを詳細に検討した。HGF は MMP-1 の蛋白発現を誘導したが、その誘導作用は MAPK/ERK シグナル阻害剤である PD98059 で阻害された。次に MMP-1 プロモーター遺伝子の deletion construct を用いて HGF の responsive element を検討したところ、HGF の responsive element は近位側に存在し、またその領域の Ets family の転写因子の結合部位の substitution mutation では HGF の作用が有意に抑制された。Ets family の転写因子についてさらに検討したところ、これらの転写因子のうち Ets1 は MMP-1 プロモーター活性を誘導し、一方 Fli1 はプロモーター活性を阻害し、互いに拮抗することが確認された。さらに免疫プロット法により、MMP-1 発現に対し誘導的に働く Ets1 は HGF 刺激により増加し、抑制的に働く Fli1 は減少することが示された。また HGF の Ets1 あるいは Fli1 に対する作用は、MMP-1 蛋白と同様、ERK 阻害剤である PD98059 により阻害された。つまり、HGF の Ets1 あるいは Fli1 に対する作用もまた ERK シグナルを介すると考えられた。以上の結果より、HGF は ERK シグナルを介し、Fli1 発現を減少させ Ets1 発現を誘導することで MMP-1 転写活性を誘導し、さらには MMP-1 蛋白発現を増加させると考えられ、線維化病変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 matrix

metalloproteinase (MMP)とよばれる分解酵素の中でも特に別名 collagenase と呼ばれる 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く、と考えられる。

汎発性強皮症の病因として、主に線維化、免疫異常、血管障害などのファクターが挙げられている。このうち、線維化は主にI型コラーゲンの転写レベルでの増加が原因で、この増加には TGF-beta1が誘導するシグナル、特にSmadの系が関与していると考えられている。さらには、同様にTGF-betaの作用により線維芽細胞から分泌されるMMPの減少とTIMPの増加が報告されていることから、本症における線維化の機序には、コラーゲンの産生が増加し、分解能が低下しているという、2つの要素が存在すると思われる。線維化の改善を目的としてコラーゲンの量を減少させるためには、この2つの要素を是正する必要があると考えられる。

分解能を復元するためにはMMPを増加させる、あるいはTIMPを減少させる必要があるが、MMP、特にMMP-1を誘導するサイトカインとして、今回我々はhepatocyte growth factor (HGF)に着目した。HGFは当初hepatocyteに対し増殖作用を持つ成長因子として見いだされたが、その後の研究により様々な細胞に多彩な作用を及ぼすことが判明している。レセプターであるc-metを介し

て作用を発揮することが知られているが、これは上皮系の細胞に多く発現しているとされているものの線維芽細胞などの間葉系細胞にもわずかながら発現が確認されている。

HGFの肝硬変に対する線維化改善効果はよく知られており (1)、以来様々な線維化病変に対する作用が検討されているが、動物モデルでの検討が主体で、in vitroでのメカニズムの検討には未だ乏しい。しかし、HGFの線維化改善のメカニズムの一つが、MMPの誘導作用ではないかと推測されている。

今回我々は正常皮膚線維芽細胞におけるHGFのMMP-1誘導メカニズムを詳細に検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象

正常人 5 名由来の皮膚線維芽細胞を使用した。

### 2) 免疫ブロット法

培養細胞の上清および細胞抽出液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 MMP-1 抗体、抗 TIMP-1 抗体、抗 TIMP-2 抗体、抗 ERK 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体、抗 Ets1 抗体、抗 Fli1 抗体 および抗 beta-actin 抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて発色させた。

### 3) chloramphenicol acetyltransferase (CAT)法

subconfluent の状態の線維芽細胞に、FuGENE6 (Roche) を用いて transient transfection を行った。pSV-beta-galactosidase

vector を用いて、導入効率を補正した。細胞抽出液に butyl-CoA と<sup>14</sup>C]-chloramphenicol を加え、Butylated chloramphenicol を抽出し、液体シンチレーションにてカウントした。

## C. 研究結果

### 1) 正常皮膚線維芽細胞における HGF の MMP-1 発現に対する作用

はじめに、培養上清中に蓄積される MMP-1、TIMP-1 および TIMP-2 が HGF 刺激により変化するかどうかを免疫ブロット法にて検討した。正常の線維芽細胞では HGF はこれらのうち、MMP-1 のみを誘導した(図 1a)。

このような HGF の MMP-1 誘導作用は、MAPK/ERK シグナル阻害剤である PD98059 で阻害されたが、PI3kinase の阻害剤である LY294002 では阻害されなかった。(図 1b)。

以上の結果より、HGF の MMP-1 誘導作用は ERK シグナルを介すると考えられた。

### 2) HGF の MMP-1 プロモーター転写制御

上記の MMP-1 誘導のメカニズムを転写レベルで検討するため、MMP-1 プロモーター遺伝子の deletion construct を用いて HGF の responsive element を検討した。HGF の responsive element は近位側に存在し、またその領域の Ets family の転写因子の結合部位の substitution mutation では HGF の作用が有意に抑制された。つまり、HGF は Ets family の転写因子を介して MMP-1 を誘導すると考えられた。(図 2a)

Ets family の転写因子についてさらに検討するため、これらの転写因子のうち、Ets1 あるいは Fli1 を強発現したところ、Ets1 は MMP-1 プロモ

ーター活性を誘導し、一方 Fli1 はプロモーター活性を阻害し、互いに拮抗することが確かめられた(図 2b)。免疫ブロット法により、MMP-1 発現に対し誘導的に働く Ets1 は HGF 刺激により増加し、抑制的に働く Fli1 は減少することが示された(図 2c)。さらに、HGF の Ets1 あるいは Fli1 に対する作用は、MMP-1 蛋白と同様、ERK 阻害剤である PD98059 により阻害された(図 2d)。つまり、HGF の Ets1 あるいは Fli1 に対する作用もまた ERK シグナルを介すると考えられた。

## D. 考案

我々は以前、強皮症線維芽細胞では autocrine TGF-beta シグナリングの影響によりコラーゲン発現量も増加するが、HGF receptor が強発現するため MMP-1 の増加率が高く、HGF は汎発性強皮症の病変部においてのみ MMP を介したコラーゲン蓄積抑制作用を有する可能性を示した (2)。さらに今回の検討により、HGF の MMP-1 誘導作用の機序が示されたことから、本サイトカインが理論上 chronic stage の線維化にも効果がある可能性があり、また線維化病変にのみ作用するとすれば全身投与しても副作用が少ない新しい治療法となる可能性がある、と考えられた。

## E. 結論

HGF は ERK シグナルを介して Ets1 および Fli1 の発現量を変化させることにより MMP-1 発現を誘導する。汎発性強皮症を含む線維化病変において MMP-1 を誘導することで、全く新しい治療法の開発につながる可能性がある。

## F. 文献

1. Matusuda Y, Matsumoto K, Ichida T, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal dysfunction in rats. J Biochem 1995, 118: 643-649
2. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K: Effects of hepatocyte growth factor on the expression of type I collagen and

matrix metalloproteinase-1 in normal and scleroderma dermal fibroblasts. J Invest Dermatol 2005, 24: 324-330

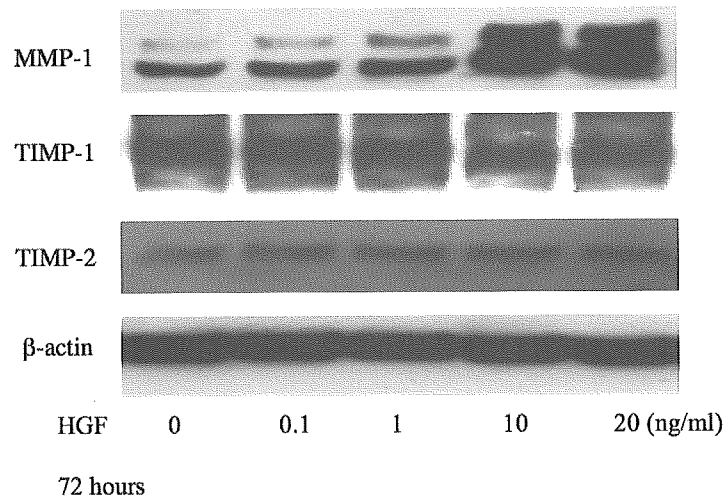
## G. 研究発表

- 1.論文発表 なし
- 2.学会発表 H18 年度強皮症研究会議

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

A



B

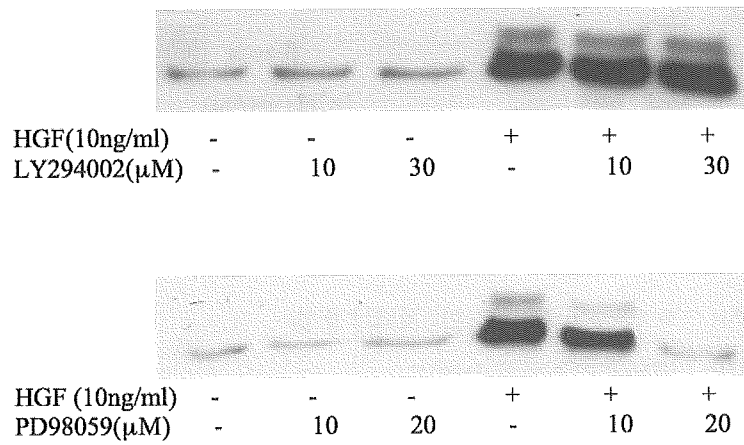


図 1: 正常人由来皮膚線維芽細胞における HGF の MMP-1 発現に及ぼす影響

a: 免疫ブロット法による MMP-1、TIMP-1 あるいは TIMP-2 蛋白の検出。

b: 免疫ブロット法による、PD98059 あるいは LY294002 存在下での MMP-1 蛋白量の検出。



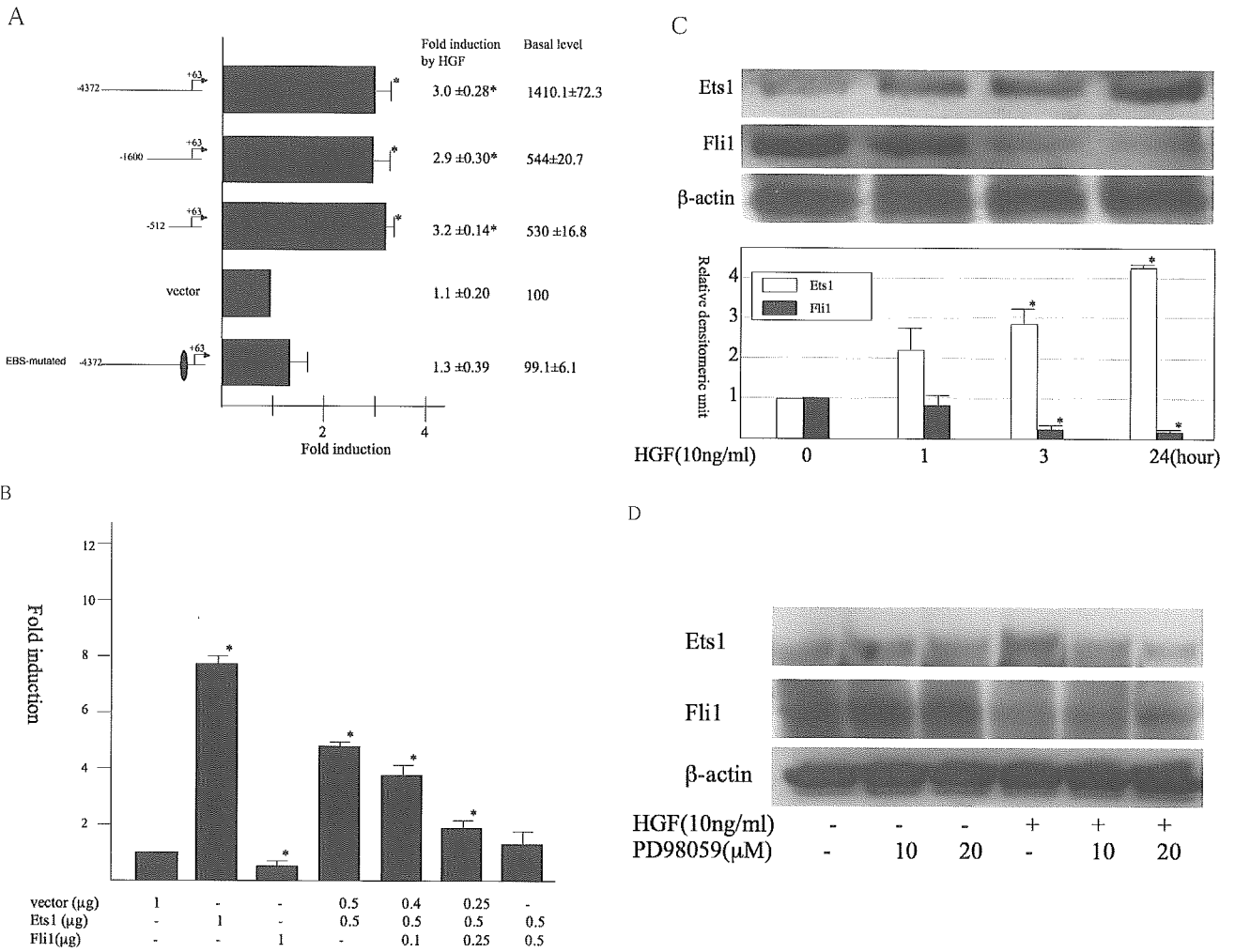


図 2: HGF の MMP-1 プロモーター転写活性に及ぼす影響

a:CAT 法による MMP-1 遺伝子転写活性の測定。

b:Ets1 あるいは Fli1 強発現下での MMP-1 遺伝子転写活性の変化。

c:免疫ブロット法による Ets1 あるいは Fli1 蛋白の検出。

d:免疫ブロット法による、PD98059 あるいは LY294002 存在下での Ets1 あるいは Fli1 蛋白量の検出。

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

## 汎発性強皮症患者由来皮膚線維芽細胞における c-Ski および SnoN の発現

分担研究者 尹 浩信 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学教授  
協力者 神人正寿 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

強皮症皮膚線維芽細胞では TGF-beta receptor が過剰発現することにより、autocrine TGF-beta loop が形成されており、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可能性が考えられている。今回我々は TGF-beta 情報伝達における negative feedback 機構を司る蛋白である c-Ski および SnoN に着目し、これらの発現を正常及び汎発性強皮症由来線維芽細胞と比較し、強皮症における negative feedback 系の様相を解析しようと考えた。強皮症線維芽細胞において c-Ski および SnoN は強く発現し、さらに Smad との相互作用も正常細胞に比べ増加していたが、c-Ski および SnoN を強発現してもコラーゲン遺伝子の転写活性は減弱しなかった。また、これらの蛋白と p300 の拮抗作用が強皮症線維芽細胞ではみられなかった。以上より、強皮症線維芽細胞においては TGF-beta に対する negative feedback として c-Ski あるいは SnoN が増加しているものの、p300 との拮抗作用を発揮できておらず、本症では TGF-beta 情報伝達の negative feedback 機構が破綻している可能性が示された。

### A. 研究目的

alpha2(I)コラーゲンプロモーター遺伝子においては、TGF-beta が receptor に結合すると、Smad2 および Smad3 を誘導し、Smad4 と複合体を形成して核内に移行する。この複合体は target 遺伝子に結合し、さらには Sp1 などの他の転写因子とも相互作用して転写活性を増強する。しかし、Smad のみでは TGF-beta に

より誘導される最大の転写活性を得ることはできず、最大の転写活性を得るには p300 あるいは CBP などの co-activator と Smad の相互作用が必要である。汎発性強皮症においては、このようなカスケードが恒常的に活性化していると考えられている。

CBP および p300 が Smad の co-activator であるのに対し、c-Ski および SnoN は、Smad の

co-repressor として知られる核内蛋白である。過去の報告では、p300 が誘導するヒストンのアセチル化を阻害したり、p300 の Smad との相互作用に拮抗することでその作用を発揮すると考えられている。

今回我々は、TGF-beta 情報伝達の negative feedback 機構において重要と考えられる c-Ski および SnoN の皮膚線維芽細胞における発現を正常および強皮症患者由来皮膚を用いて検討した。

## 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) 免疫ブロット法

培養細胞の細胞抽出液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 c-Ski 抗体、抗 SnoN 抗体、抗 Smad2/3 抗体、抗 Smad4 抗体、抗 p300 抗体および抗 beta-actin 抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて発色させた。

### 3) 免疫沈降法

細胞抽出液を protein G-Sepharose および抗 c-Ski 抗体、抗 SnoN 抗体あるいは抗 Smad3 抗体と反応させ、免疫沈降法を行った。

### 4) chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 法

subconfluent の状態の線維芽細胞に、

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

## C. 研究結果

### 1) 正常および強皮症皮膚線維芽細胞における c-Ski および SnoN 発現

はじめに、正常および強皮症線維芽細胞における c-Ski および SnoN 発現を免疫ブロット法を用いて比較した。正常細胞においては、両蛋白はほとんど発現が見られないが、TGF-beta 刺激にて発現が著明に増加した。一方、強皮症細胞においては恒常的な c-Ski および SnoN の強発現が認められた(図 1a)。

次に、免疫沈降法を用いて c-Ski と Smad3/4 の相互作用を検討した。正常線維芽細胞においては、TGF-beta 刺激により両者の相互作用は増加した(図 1b)。一方、強皮症では恒常的にこれらの相互作用が増加していた。また、同様に SnoN と Smad3/4 の相互作用もまた、正常線維芽細胞においては TGF-beta 刺激により増加し、強皮症では恒常的に相互作用が増加していた(図 1c)。このような強皮症細胞での c-Ski および SnoN の発現亢進は TGF-beta シグナリングに対する negative feedback を反映していると考えられる。

### 2) 強皮症皮膚線維芽細胞における c-Ski および SnoN の機能異常

さらに、実際に c-Ski を強発現し、alpha2(I)

コラーゲンプロモーター活性が変化するかどうかを検討した。正常細胞では TGF-beta によるコラーゲンプロモーター活性誘導作用は従来の報告通り c-Ski および SnoN 強発現により抑制される(図 2a,b)。一方、強皮症線維芽細胞においてはコラーゲンプロモーター活性は TGF-beta シグナルを反映して上昇しているが、c-Ski および SnoN を強発現してもプロモーター活性に変化はみられなかった。この結果から、強皮症においては c-Ski および SnoN が強発現し、Smad との相互作用も増加しているものの、negative feedback 機能が作働していない可能性があると考えられた。

### 3) 強皮症皮膚線維芽細胞における p300 と c-Ski/SnoN の相互作用

最後に、なぜ negative feedback 機構が破綻しているのかを検討した。前述のように c-Ski および SnoN の TGF-beta シグナル抑制メカニズムの一つに、p300 に拮抗することがあげられる。正常線維芽細胞においては c-Ski あるいは SnoN の強発現によって TGF-beta により誘導された Smad と p300 の相互作用が抑制される(図 3)。一方、強皮症では c-Ski あるいは SnoN を強発現しても相互作用に変化はみられなかった。強皮症線維芽細胞においては p300 と拮抗できないことが negative feedback の破綻の原因であると考えられた。

## D. 考案

強皮症皮膚線維芽細胞では TGF-beta type I receptor および type II receptor の発現が亢進していること、また、抗 TGF-beta1 抗体および

TGF-beta1 antisense oligo にて type I コラーゲンの発現が抑制されることがすでに示されている。このような結果から、強皮症皮膚線維芽細胞では TGF-beta receptor が過剰発現することにより、autocrine TGF-beta loop が形成されており、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可能性が考えられている。また、強皮症皮膚線維芽細胞における TGF-beta signaling の抑制系に関する検討もなされており、Smad7 による negative feedback 機構の異常が示されている(1)。加えて本研究により、強皮症皮膚線維芽細胞においては TGF-beta に対する negative feedback として c-Ski および SnoN が増加しているものの、p300 との拮抗作用を発揮できていないことが示され、本症では TGF-beta 情報伝達の negative feedback 機構が破綻している可能性が示された。c-Ski あるいは SnoN、さらには Smad7 など TGF-beta 情報伝達の negative feedback 機構のさらなる解明により、汎発性強皮症の病態がより明らかになると期待される。

## E. 結論

強皮症においては TGF-beta に対する negative feedback として c-Ski および SnoN が増加しているものの、p300 との拮抗作用を発揮できておらず、本症では TGF-beta 情報伝達の negative feedback 機構が破綻している可能性が示された。

## F. 文献

1. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. J Clin Invest 2004, 113: 253-264

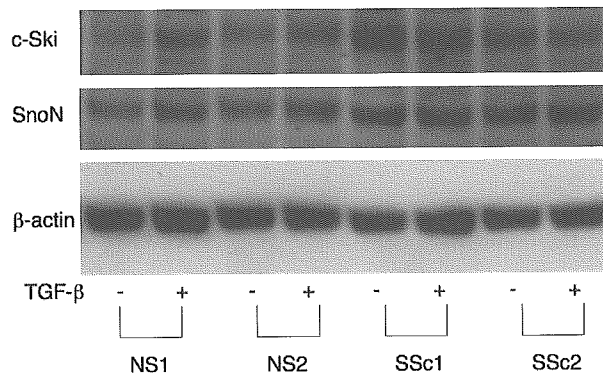
## G. 研究発表

- 1.論文発表 なし
- 2.学会発表 H18 年度強皮症研究会議

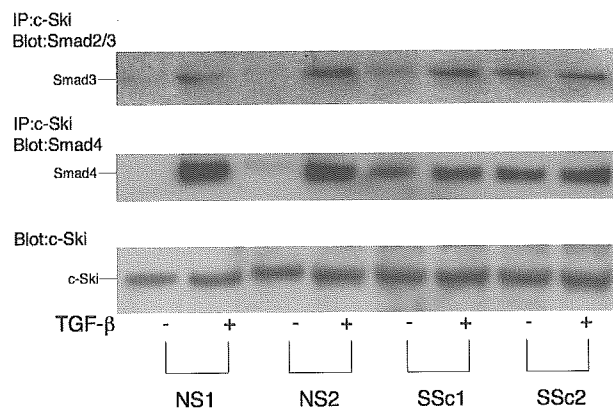
## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

A



B



C

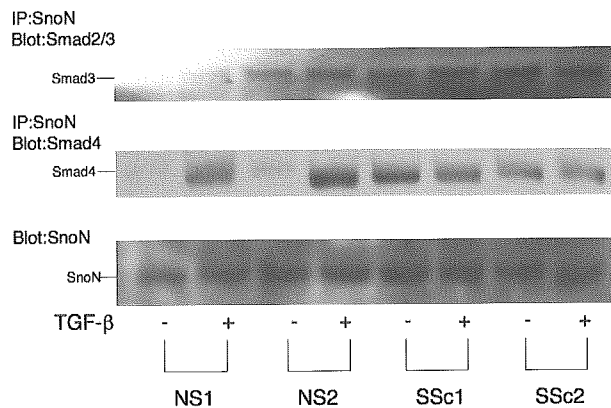


図 1 : 正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞における c-Ski および SnoN の発現

a:免疫ブロット法による、c-Ski および SnoN 蛋白の検出。

b:免疫沈降法による、c-Ski と Smad の相互作用の検出。

c:免疫沈降法による、SnoN と Smad の相互作用の検出。

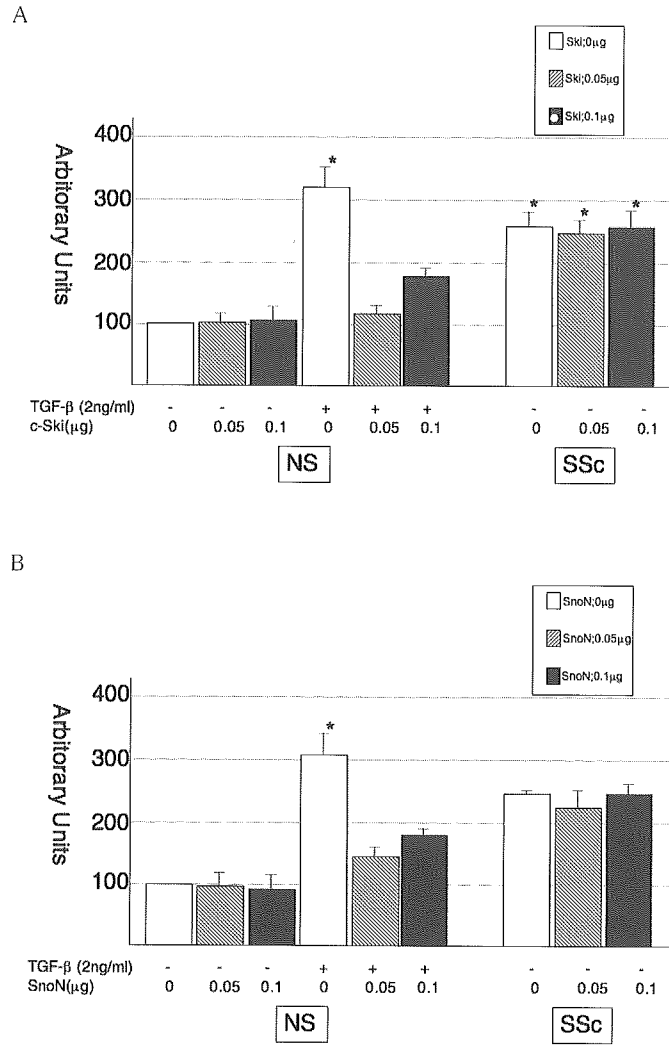


図 2: c-Ski および SnoN 強発現による alpha2(I)コラーゲン遺伝子転写活性の変化  
 a:CAT 法による、c-Ski 強発現下の alpha2(I)コラーゲン遺伝子転写活性の測定。  
 b:CAT 法による、SnoN 強発現下の alpha2(I)コラーゲン遺伝子転写活性の測定。

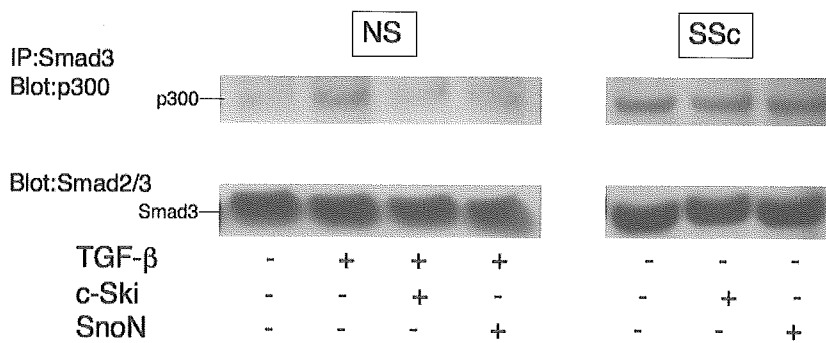


図 3:正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞における p300 と Smad の相互作用  
 免疫沈降法による、c-Ski および SnoN 強発現下の p300 と Smad の相互作用の検出。

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

## Sphingosine kinase-1 は、TNF $\alpha$ - NF- $\kappa$ B, JNK シグナル伝達経路を介して ヒト $\alpha$ 2(I) コラーゲン遺伝子の転写活性を制御している

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 $\alpha$ , TGF $\beta$  などの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いる。Sphingosine kinase-1 (SPHK1) 遺伝子を強制発現した細胞では 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 遺伝子発現を抑制した細胞では I 型コラーゲン遺伝子の転写活性は増強された。sphingosine -1- phosphate lyase (S1PLyase) 遺伝子を強制発現した細胞では I 型コラーゲン遺伝子の転写活性は増強された。以上より、SPHK1 は 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る。TNF $\alpha$ 刺激により SPHK1 遺伝子発現は増強し、SPHK1 遺伝子を強制発現した細胞では NF- $\kappa$ B、c-Jun 活性が亢進していることから、TNF- $\alpha$ は SPHK1 遺伝子発現を増強することにより NF- $\kappa$ B/ JNK シグナリングを活性化し、コラーゲン転写活性を抑制しているのではないかと考えた。

### A. 研究目的

Sphingosine-1-phosphate (S1P) は、以前は sphingosine 代謝における一つの間接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た<sup>1)3)</sup>。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- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 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<sup>13)</sup>。

SPHK の細胞外マトリックス関連遺伝子に及ぼす影響については、これまでに SPHK1 が TIMP-1 遺伝子発現を増強すること<sup>4)</sup>、ERK1/2-Ets pathway を介して MMP-1 遺伝子発現を増強する<sup>5)</sup>ことなどを報告してきたが、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<sup>6)</sup>。今回我々は、SPHK の I 型コラーゲン遺伝子転写活性に与える影響とそのメカニズムについて検討を行った。

## 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、2mM 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) DNA transfection

皮膚線維芽細胞を 6-well plate に  $1.8 \times 10^5$  個/well 撒いて、翌日 lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用い、プロトコールに準じて、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'-GGCAA GGC CTT GCA GCT C-3'<sup>7)</sup> 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) Real time PCR 法

培養線維芽細胞から ISOGENE (Nippongene, Toyama, Japan) を用いて RNA を抽出し逆転写反応にて cDNA を合成し、定量 PCR を行った。Applied Biosystems 社の 7300 Real time PCR System を用いた Taqman Gene Expression Assays にて、SPHK-1、Col1A2 および 18S (内部標準) の mRNA 発現量を測定した。

### 7) Western blot

サンプルは whole cell lysate を用いた。バッファー (Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), NaCl (150 mM), 1 % Nonidet P-40, 15 mM NaF, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g / mL aprotinin, 10  $\mu$ 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。

## 8) NF- $\kappa$ B activation

Active Motif 社 (Carlsbad, CA) のTrans-AM kit を用いて、NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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) SPHK1 が I 型コラーゲン遺伝子転写活性に及ぼす影響

正常皮膚線維芽細胞に sphingosine kinase-1 (SPHK1) 遺伝子導入プラスミドと Col1A2-CAT 遺伝子導入プラスミドを 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。SPHK1 遺伝子強制発現細胞では、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。(図 1A)

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 SPHK1siRNA を lipofectamine 2000 試薬を用いて導入。翌日細胞をトリプシン処理にて回収し、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。(図 1B)

### 2) Sphingosine-1-phosphate lyase (S1P lyase) が I 型コラーゲン遺伝子転写活性に及ぼす影響

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 遺伝子強制発現細胞では、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。(図 2)

### 3) TNF- $\alpha$ の SPHK1 遺伝子発現に及ぼす影響

TNF- $\alpha$ の SPHK1 遺伝子発現に与える影響を検討した。正常皮膚線維芽細胞に TNF- $\alpha$  (10ng/ml) を経時的に添加し、SPHK1 の mRNA 発現量を real time PCR 法にて定量的に検討した。TNF- $\alpha$ 添加 1 時間後から SPHK1mRNA 発現の増強がみられ、8 時間後をピークに 48 時間後まで発現の増強は持続していた。(図 3)

### 4) SPHK1 が JNK および NF $\kappa$ B シグナルに及ぼす影響

SPHK1 が JNK および NF $\kappa$ B pathway に及ぼす影響を調べる目的で、western blot 法で c-Jun のリン酸化を、Active Motif 社の Trans-AM kit で NF- $\kappa$ B activity を検討した。SPHK1 遺伝子強制発現細胞ではコントロールに較べて、c-Jun のリン酸化および NF- $\kappa$ B activity 共に亢進していた。(図 4)

### 5) 強皮症患者由来線維芽細胞における SPHK1mRNA 発現

発症5年以内の diffuse type の強皮症患者6名と健常人3名の皮膚より得た皮膚線維芽細胞の SPHK1mRNA 発現レベルを real time PCR 法を用いた定量 PCR にて検討した。その結果、強皮症線維芽細胞の SPHK1mRNA 発現は健常人線維芽細胞に較べて亢進している傾向がみられた。(表1)

## B. 考案

SPHK1 遺伝子強制発現細胞では、コントロールに較べて I 型 collagen 遺伝子の転写活性は抑制され、また RNAi 法を用いた SPHK 遺伝子発現抑制細胞では I 型 collagen 遺伝子の転写活性は増強されることから、SPHK1 は I 型 collagen 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る。更に、S1P を分解する酵素である S1PLyase 遺伝子強制発現細胞では、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おり、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。

以上より、SPHK1 は I 型 collagen 遺伝子の転写活性を抑制的に制御する因子であることが明らかになった。コラーゲンを抑制的に制御する因子としてはいくつかの報告があるが、今回着目したのが TNF $\alpha$ 細胞内シグナル伝達系である。TNF $\alpha$ 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 $\beta$ 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<sup>7,8)</sup>がある。Verrecchia ら<sup>8)</sup>は TNF $\alpha$ は JNK を介して TGF- $\beta$ -Smad 情報伝達系を抑制し、NF- $\kappa$ 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。SPHK1 の TNF $\alpha$ 細胞内情報伝達系への関与についても、既にいくつかの報告がある。Xia ら<sup>9)</sup>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- $\kappa$ B の活性化を誘導することを示している。

以上のような過去の報告から、TNF- $\alpha$  - SPHK - NF- $\kappa$ B/ JNK - collagen というシグナル伝達経路が存在する可能性が示唆される。

そこでまず始めに、SPHK1 の NF- $\kappa$ B/ JNK シグナリングに及ぼす影響について検討した。SPHK1 強制発現細胞ではコントロールに較べて、c-Jun のリン酸化および NF- $\kappa$ B activity 共に亢進していた。

次に、TNF- $\alpha$ の SPHK1 遺伝子発現に与える影響を検討した。正常皮膚線維芽細胞に TNF- $\alpha$  (10ng/ml) を経時的に添加し、SPHK1 の mRNA 発現量を real time PCR 法にて定量的に検討した。TNF- $\alpha$ 添加 1 時間後から SPHK1mRNA 発現の増強がみられ、8 時間後をピークに 48 時間後まで発現の増強は持続していた。以上の結果より、TNF- $\alpha$ は SPHK1 遺伝子発現を増強することにより NF- $\kappa$ B/ JNK シグナリングを活性化し、コラーゲン転写活性を抑制するのではないかと考えた。

昨年の班会議で、我々は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 SPHK 活性が低下していることを示し、SPHK 活性の低下が強皮症におけるコラーゲンの異常蓄積に関与している可能性があるのではないかと報告した。そこで今回、強皮症線維芽細胞における SPHK 活性の低下が SPHK1 遺伝子発現の低下によるものかどうかを知る目的で、real timePCR 法を用いた定量 PCR を用いて、強皮症線維芽細胞における SPHK1mRNA 発現量を検討した。その結果、予想に反して強皮症線維芽細胞における SPHK1mRNA 発現量は正常に比べて亢進している傾向がみられた。SPHK 活性と mRNA

発現量の結果の乖離については、SPHK 活性の低下により feedback 機構が働いたものという解釈ができるが、SPHK は今回検討した SPHK1 だけでなく SPHK2<sup>10)</sup>、更に最近ではマウスにおいては SPHK1a、SPHK1b の二つの isoforms が存在することも明らかになっている<sup>11)</sup>。また、SPHK 活性 assay は、sphingosine を SIP にリン酸化する能力を測定する assay であり、SPPase や SIPlyase にも影響されるため、強皮症線維芽細胞における SPHK 活性の低下をもたらす原因について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、その機序としては TNF- $\alpha$  - SPHK - NF- $\kappa$ B/ JNK - collagen というシグナル伝達経路が考えられた。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もあるが、SPHK 活性の低下をもたらす因子については今後の更なる検討を要する。

## F. 文献

- Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S.: Sphingosine kinase, sphingosine 1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1585:193-201.
- Spiegel S, Milstien S.: Sphingosine 1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003, 4:397-407.
- Stunff HL, Milstien S, Spiegel S.: Generation and Metabolism of Bioactive Sphingosine 1-Phosphate. *J Cell Biochem*. 2004, 92:882-899
- 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
- Bu S, Yamanaka M, Pei H, Bielawska A, Bielawski J, Hannun YA, Obeid L, Trojanowska M. Dihydrosphingosine 1-phosphate stimulates MMP1 gene expression via activation of ERK1/2-Ets1 pathway in human fibroblasts. *FASEB J*. 2006 Jan;20(1):184-6. 2005
- 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.
- 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.