

8. Verrecchia F, Mauviel A. TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cell Signal*. 2004, 16 :873-80.
9. 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.
10. Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH Jr, Milstien S, Spiegel S. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions. *J Biol Chem*. 2005 Nov 4;280(44):37118-29.
11. Kihara A, Anada Y, Igarashi Y. Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J Biol Chem*. 2005 Dec 20;

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

山中 正義、石川 治 Sphingosine Kinase のコラーゲン遺伝子発現に与える影響について 第37回日本結合組織学会学術集会 2005年5月27日

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

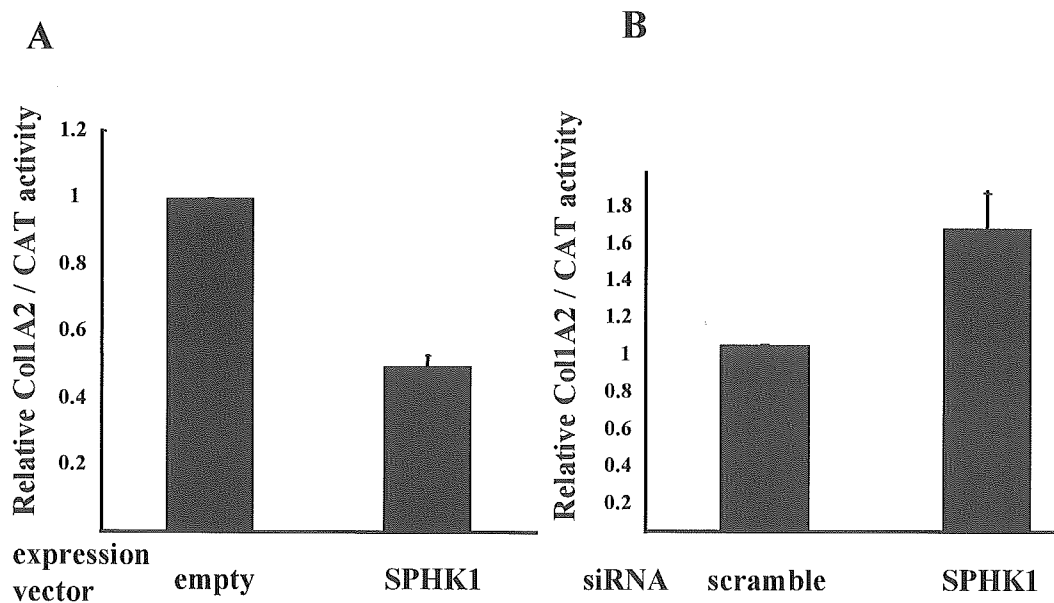


図1 SPHK1 の I 型コラーゲン遺伝子転写活性に与える影響

A. SPHK1 遺伝子強制発現細胞の I 型 collagen 遺伝子の転写活性に与える影響

B. RNAi 法による SPHK1 遺伝子発現抑制細胞の I 型 collagen 遺伝子の転写活性に与える影響

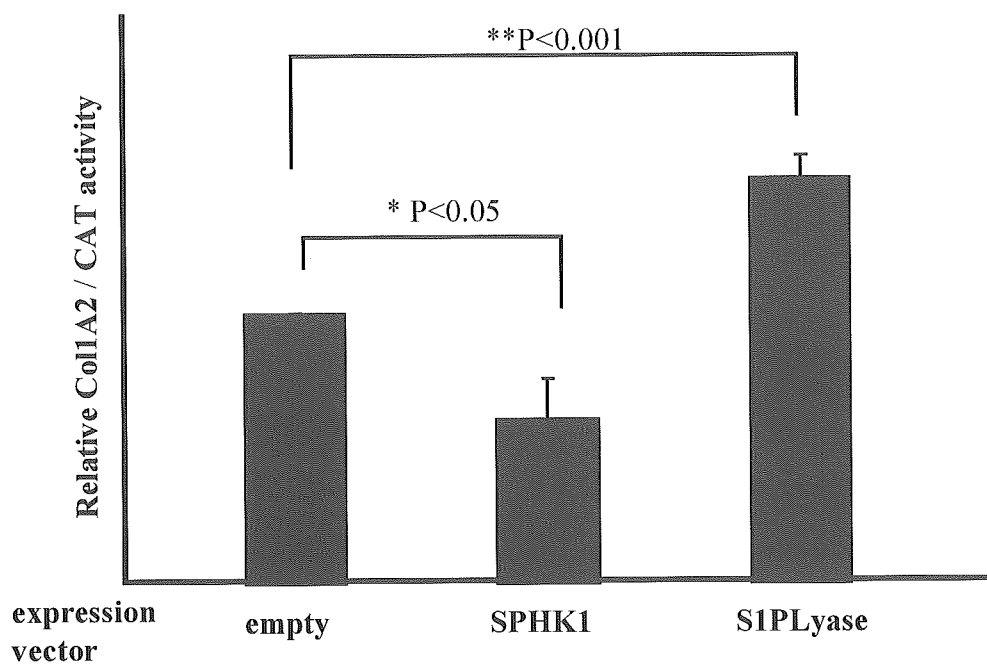


図2 SIP-lyase 遺伝子の I 型 collagen 遺伝子転写活性に与える影響

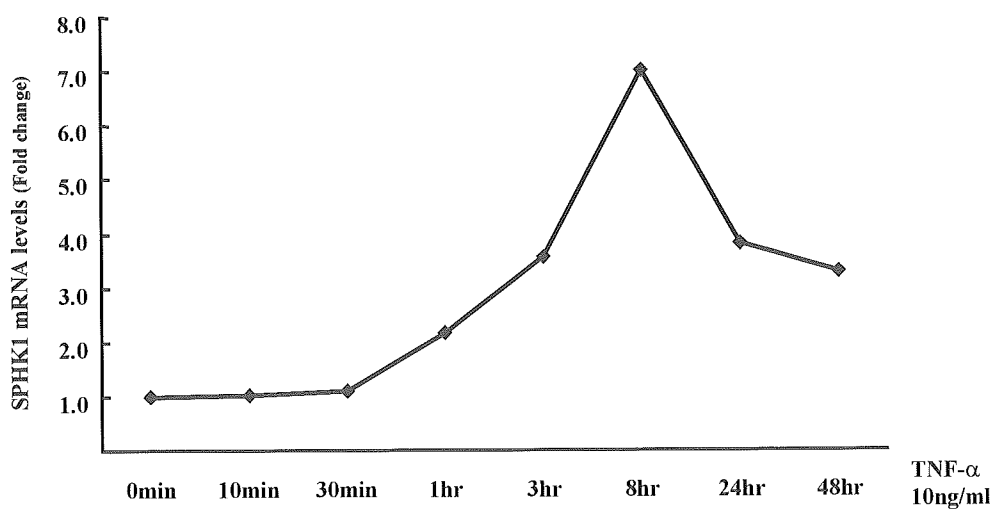
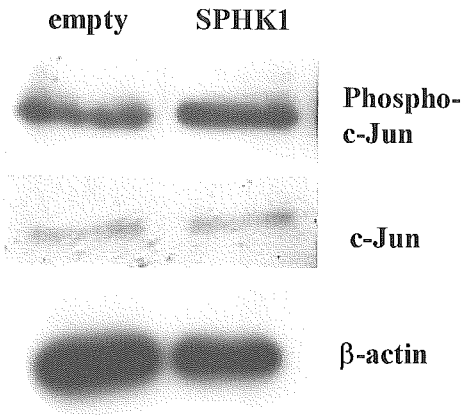


図3 TNFαの SPHK1 遺伝子発現に与える影響

A



B

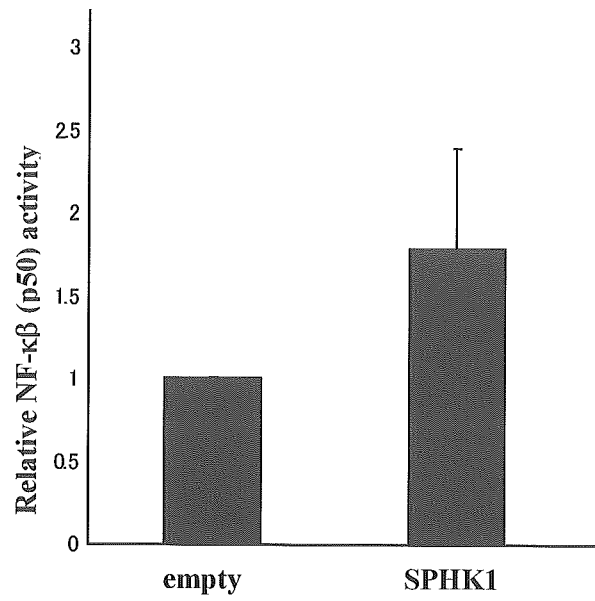


図4 SPHK1 遺伝子の JNK および NF- κ B シグナルに与える影響

		SPHK1	COL1A2
SSc	44F	1.245	2.391
	53F	2.315	1.813
	54F	1.713	1.235
	40F	0.713	1.348
	57F	2.043	1.135
	average	1.606	1.584
normal	43F	1.000	1.000
	37F	1.270	0.919
	18F	1.051	0.860
	average	1.107	0.926

表1 強皮症患者由来線維芽細胞における SPHK1 mRNA 発現

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

ヒト皮膚線維芽細胞におけるEGFによるI型コラーゲン
発現抑制の機序について

分担研究者	尹 浩信	熊本大学大学院医学薬学研究部総合医薬科部門 皮膚機能病態学分野教授
研究協力者	三村佳弘	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
協力者	浅野善英	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	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	山根謙一	東京大学大学院医学系研究科・医学部皮膚科学助手
協力者	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

汎発性強皮症の線維化において中心的役割を担っているとされる type I collagen は種々のサイトカインや MMP-1 などにより、その発現量が調節されている。今回、我々は EGF による I 型コラーゲンおよび MMP-1 発現制御のメカニズムを、正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。

A. 研究目的

汎発性強皮症の病因の1つとして線維化がある。線維化における主な構成蛋白の一つであるI型コラーゲンの発現量は様々なサイトカインや MMP-1などの他の蛋白により調節されている。EGFは多くの生理的作用を有するサイトカインであるが、I型コラーゲンの産生を抑制し、MMP-1の産生を増加させることが知られている (1)。

今回、我々はEGFによるI型コラーゲンおよび MMP-1発現制御のメカニズムを、正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

1) 免疫ブロット法
培養細胞の上清をポリアクリルアミドゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗 type I collagen 抗体および抗 MMP-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色させた。

2) ノーザンブロット法
guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法を用いて抽出した RNA を 1%アガロースゲルに泳動し、ナイロン膜に転写した。膜を cDNA プローブと反応させ、フィルムに露光した。

3) luciferase assay 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。

C. 研究結果

EGF は I 型コラーゲンの産生を抑制するだけでなく、分解を促進することで、その発現量を減少させる

図 1A に示すように正常皮膚線維芽細胞における EGF による type I procollagen 蛋白発現量の抑制効果は上清中において、細胞溶解液中よりも大きかった。また図 1B に示すように MMP の阻害剤である GM1489 存在下では EGF による type I procollagen 蛋白発現量の抑制効果(上清中)は減少した。以上より EGF は I 型コラーゲンの産生を抑制するだけでなく、分解を促進することで、その発現量を減少させることが判明した。

EGF は I 型コラーゲン遺伝子転写活性には影響しないが、主として **message stability** を低下させることにより、その遺伝子発現量を抑制する。

図 2A, B に示すように EGF (20ng/ml) は 24h をピークとして α 2(I) collagen mRNA 発現量を有意に減少させ、またその **message stability** を有為に低下した。また、図 2C に示すように EGF は type I collagen promoter 活性には影響しなかった。以上より、EGF による type I collagen 遺伝子発現量の低下は主として **post-transcriptional level** で行われていることが示唆された。

EGF は主として MMP-1 遺伝子転写活性を上昇

させることにより遺伝子発現量を増加させる。

図 3A, B に示すように EGF は MMP-1 蛋白および mRNA 発現量を有意に増加させた。また、図 3C に示すように EGF は MMP-1 の遺伝子転写活性も亢進させた。以上より、EGF は主として MMP-1 遺伝子転写活性を上昇させることにより遺伝子発現量を増加させることが示唆された。

EGF による I 型コラーゲン発現抑制および MMP-1 発現亢進作用のいずれも、MEK/ERK 情報伝達系を介するものである。

図 4A に示すように EGF による type I collagen 蛋白発現抑制効果は MEK/ERK 阻害剤である U0126 および PD98059 存在下で有為に減弱した。また、図 4B に示すように EGF による MMP-1 蛋白発現亢進作用もまた PD98059 存在かにて減弱した。さらに図 4C に示すように EGF による α 2(I) collagen および MMP-1 mRNA 発現量に対する影響も PD98059 存在下で減弱した。また、正常線維芽細胞を EGF (20ng/ml) で刺激すると約 15 分後をピークとして有為に ERK のリン酸化が亢進した(図 4D)。EGF による type I procollagen および MMP-1 蛋白発現量に対する影響は dominant negative ERK の強発現により有為に減弱した(図 4E)。最後に EGF 刺激により亢進した MMP-1 プロモーター活性は dominant negative ERK の強発現により、著明に減少した(図 4F)。

D. 考察

今回の検討により、EGF は type I collagen および MMP-1 のいずれも MEK/ERK 情報伝達系を介しその発現量を調節することが明らかとなった。このことは将来、線維化の治療戦略を考える上で有用な情報となりうるものである。

E. 結論

EGF は type I collagen の産生を抑制するだけでなく分解も促進している。Type I collagen の遺伝子発現量は主として post-transcriptional level で行っているのに対し、MMP-1 の遺伝子発現量は transcriptional level で行われている。一方、EGF による type I collagen および MMP-1 発現量の調節はいずれも MEK/ERK 情報伝達系を介するものである。

F. 文献

1. Moon SE, Bhagavathula N, Varani J., 2002. Keratinocyte stimulation of matrix

metalloproteinase-1 production and proliferation in fibroblasts: regulation through mitogen-activated protein kinase signalling events. Br J Cancer 87:457-464

G. 研究発表

- 1.論文発表 なし
- 2.学会発表 H17 年度強皮症研究会議

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

図1A EGFによるtype I procollagen発現抑制は細胞溶解液より上清中の方が大きい

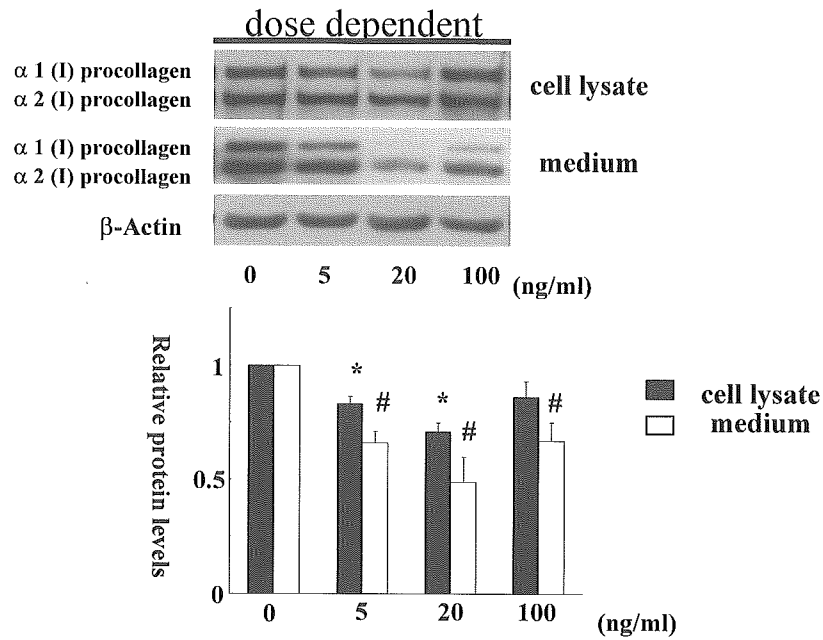


図1B MMP-1の作用を抑制すると上清中におけるEGFによるtype I procollagen発現抑制は減弱する。

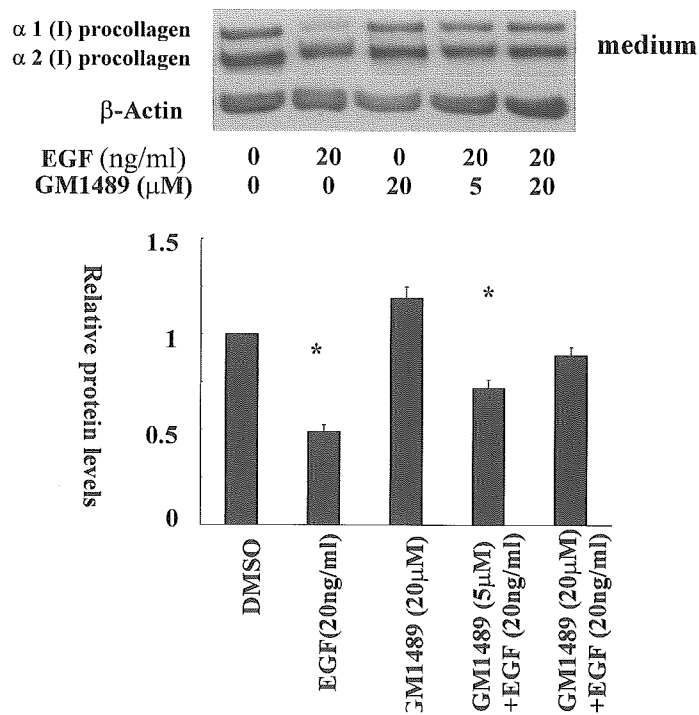


図1: EGFによる正常線維芽細胞におけるtype I procollagen蛋白量の調節(免疫ブロット法による検出)

(A) 上清中および細胞溶解液中の蛋白発現量

(B) GM1489(MMP阻害剤)存在下における上清中の蛋白発現量

図2A EGFは $\alpha 2(I)$ collagen mRNA の発現を抑制する。

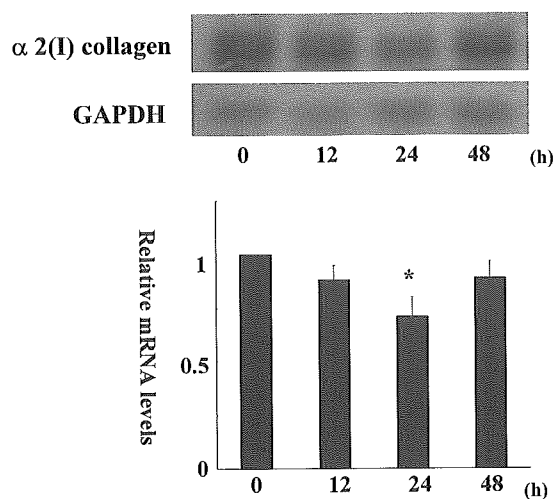


図2B EGFは $\alpha 2(I)$ collagen mRNA のmessage stabilityを低下させる。

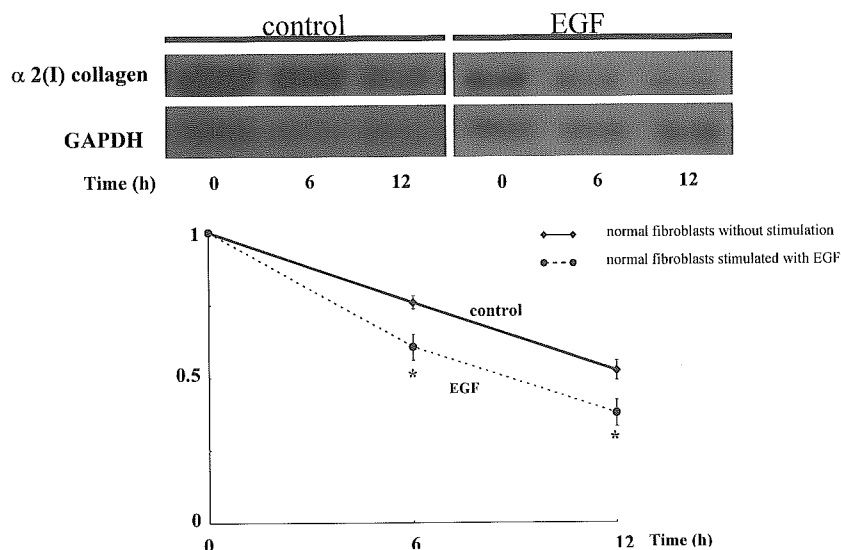


図2C EGFはtype I collagenのpromoter activityには影響しない。

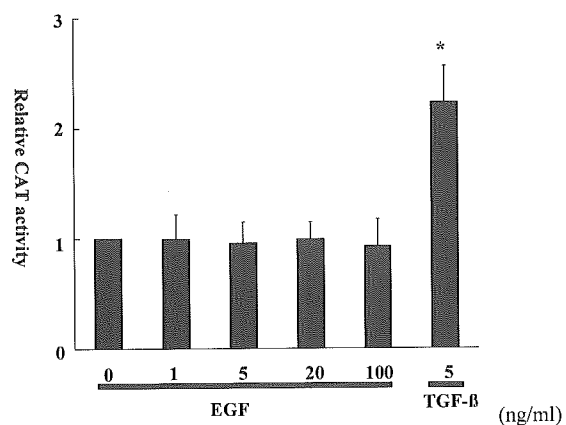


図2: EGFによる $\alpha 2(I)$ collagen mRNA発現量の調節メカニズム

- (A) EGFによる時間依存性の影響
- (B) message stability に対する影響
- (C) promoter 活性に対する影響

図3A EGFはMMP-1 蛋白発現を増加させる。

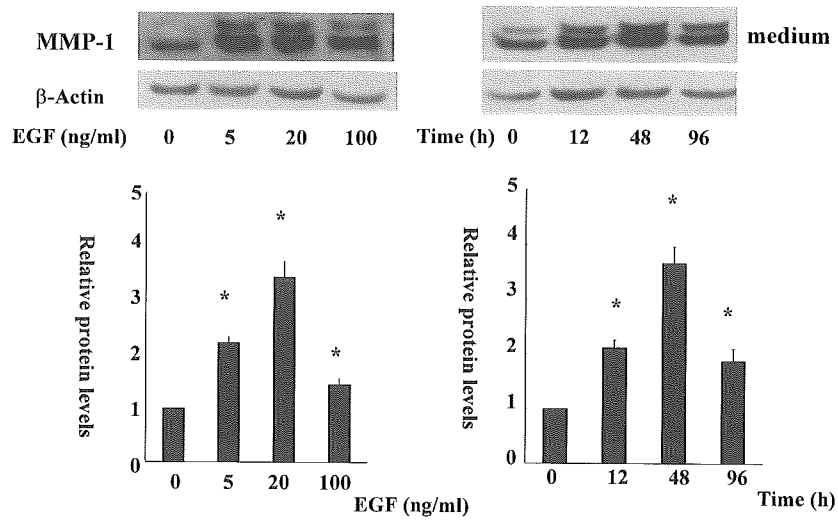


図3B EGFはMMP-1 mRNA発現を増加させる。

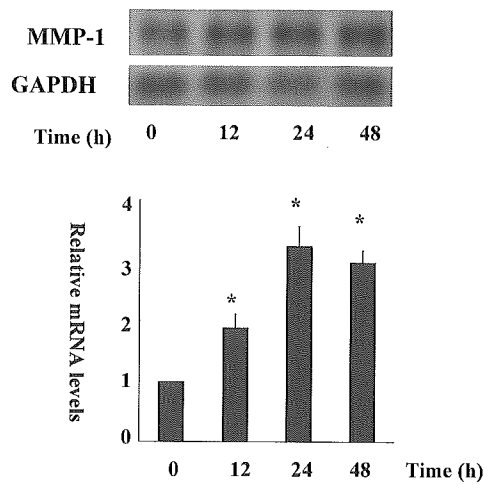


図3C EGFはMMP-1 promoter activityを増加させる。

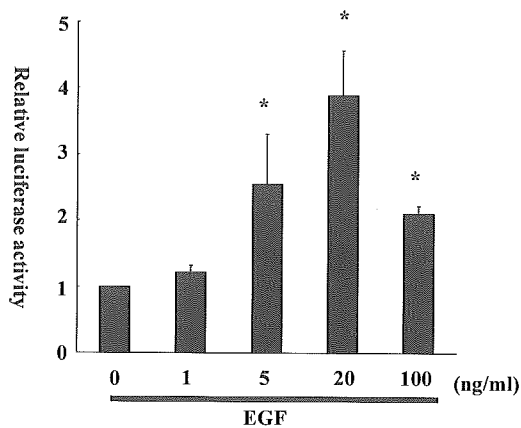


図 3: EGF による MMP-1 発現量調節およびそのメカニズム

(A)蛋白発現量に対する影響 (B)mRNA 発現量に対する影響 (C) promoter 活性に対する影響

図4A EGFのtype I procollagen蛋白抑制作用はMEK/ERK 情報伝達系を介する。

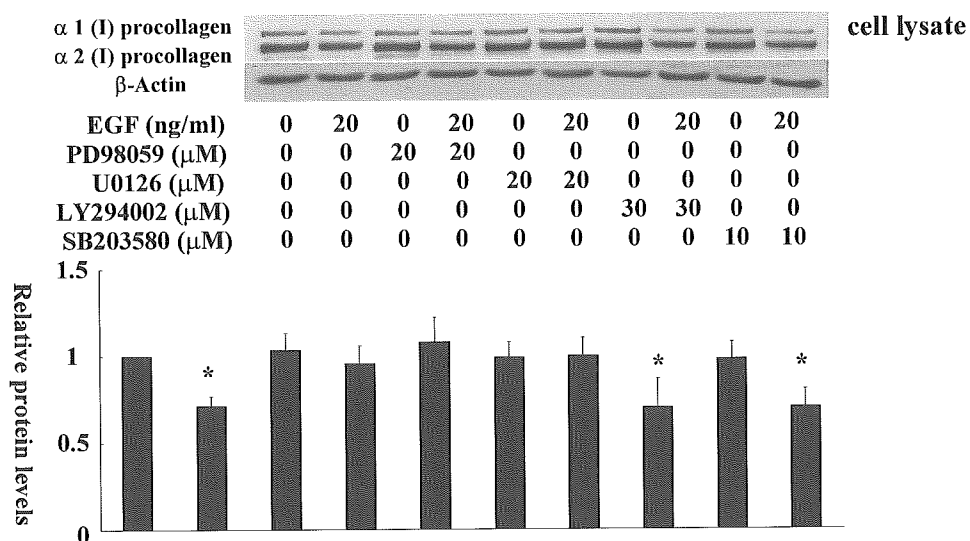


図4B EGFのMMP-1蛋白増加作用はMEK/ERK 情報伝達系を介する。

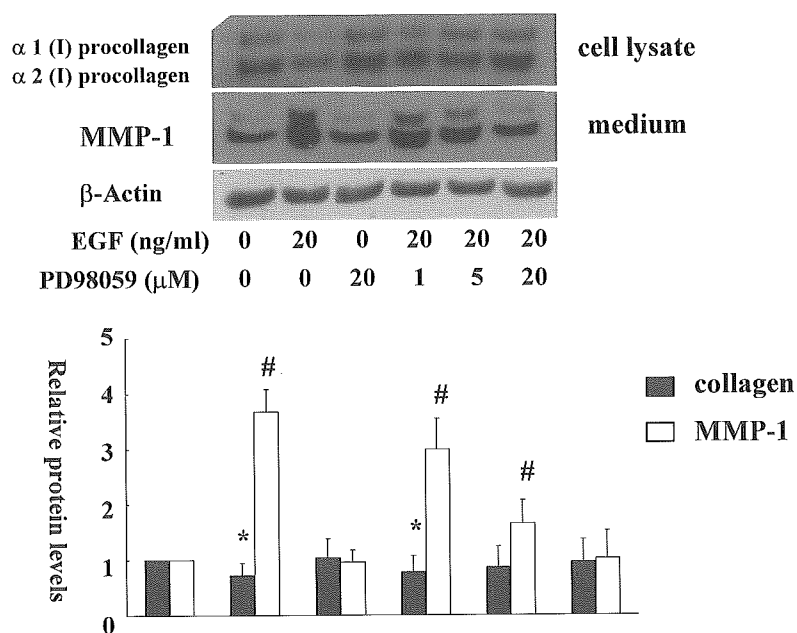


図4C EGFの $\alpha 2(I)$ collagen mRNA 抑制作用及び MMP-1 mRNA 増加作用はMEK/ERK 情報伝達系を介する。

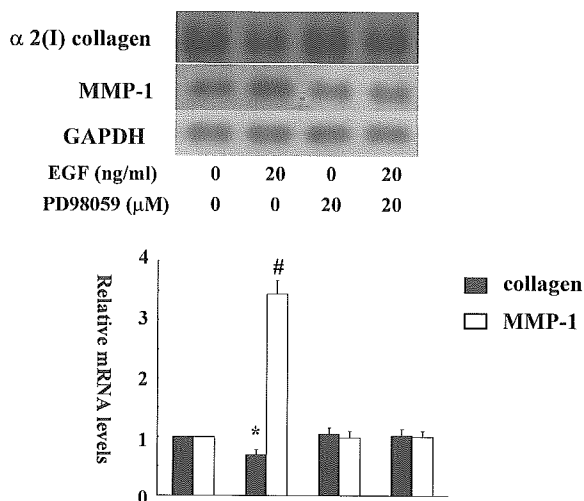


図4D EGFはERKのリン酸化を亢進させる。

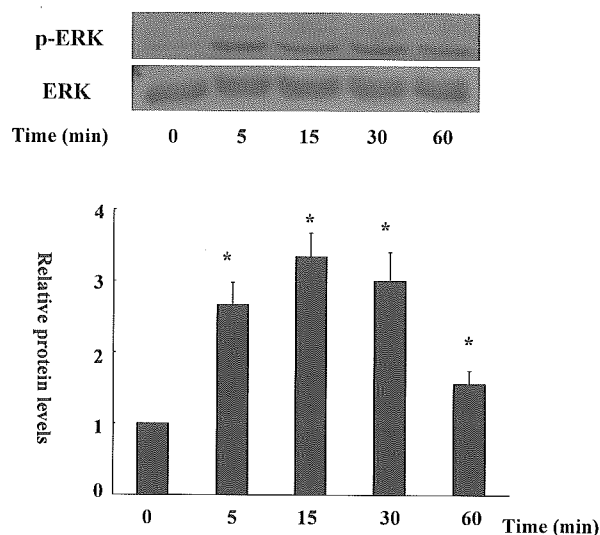


図4E Dominant negative ERKはEGFのtype I procollagen蛋白抑制作用及びMMP-1 蛋白増加作用を減弱する。

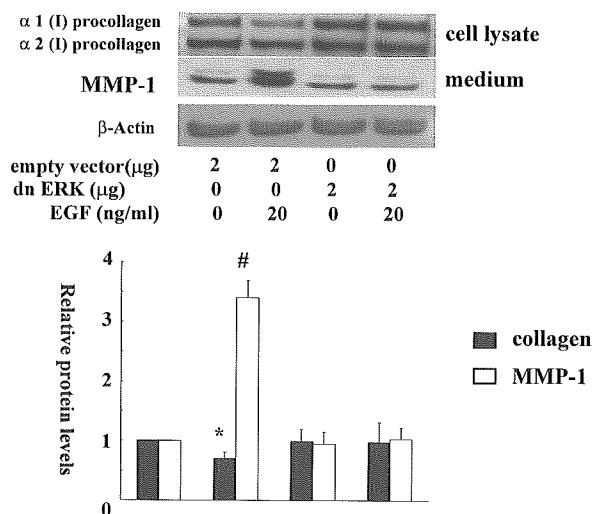


図4F Dominant negative ERKはEGFのMMP-1 promoter activity 亢進作用を減弱する。

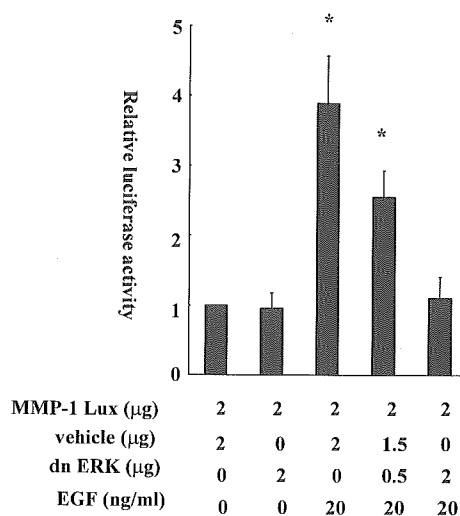


図 4: EGF による type I collagen および MMP-1 発現調節における情報伝達系

- (A) EGF による各種情報伝達阻害剤存在下における type I procollagen 蛋白発現量に対する影響
- (B) PD98059 存在下における MMP-1 蛋白発現量に対する影響
- (C) PD98059 存在下における $\alpha 2(I)$ collagen および MMP-1 mRNA 発現量に対する影響
- (D) EGF による ERK リン酸化に対する影響
- (E) dn ERK を強発現させた際の EGF による type I procollagen および MMP-1 蛋白発現量に対する影響
- (F) dn ERK を強発現させた際の EGF による MMP-1 promoter 活性に対する影響

IL-13 による皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン遺伝子 発現亢進の機序の検討

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 山根謙一 東京大学大学院医学系研究科・医学部皮膚科学助手
協力者 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

IL-13 は多機能を持つサイトカインであるが、B 細胞や単球に対する研究が現在まで行なわれているが、高親和性受容体を有する線維芽細胞に対する作用はほとんど検討されていない。正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いた cDNA microarray 解析によって、 $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子が IL-13 の標的遺伝子であることが示された。さらに IL-13 は I 型コラーゲン蛋白、 $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子 mRNA 発現を亢進し、その作用は転写レベルで制御され、PI3 キナーゼ阻害剤で抑制された。以上の結果より皮膚線維化における IL-13、PI3 キナーゼの関与が示唆され、また強皮症患者では血清 IL-13 が上昇していることから、強皮症の線維化に IL-13 が関与する可能性が考えられた。

A. はじめに

汎発性強皮症(systemic sclerosis; SSc)は皮膚および内蔵諸臓器の線維化が病変の主体であり TGF- β の関与が示唆されている(1,2)。しかしながら、TGF- β 以外にもコラーゲンなどの細胞外マトリックス産生を強力に促進するサイトカインが存在し、線維化において中心的な役割を果たす可能性がある。今回注目した IL-13 は活性化した

Th2 細胞から産生される多機能なサイトカインで、現在まで B 細胞と単球に対する作用が主に検討されている。特に B 細胞の増殖、分化、MHC class II や CD23 の発現促進、IgE クラススイッチなどの作用があることが知られている。しかしながら、高親和性受容体を有する線維芽細胞に対する作用はほとんど検討されていない。今回我々は、正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いた cDNA

microarray 解析によって、 $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子が IL-13 の標的遺伝子であることを見出し、さらなる検討より強皮症の線維化に IL-13 が関与する可能性が考えられた。

B. 材料と方法

免疫ブロット法 正常ヒト皮膚線維芽細胞を confluent まで培養し、24 時間無血清の状態にし、従来の方法で細胞抽出液、上清を得た。ポリアクリルアミドゲルにて泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体と反応後二次抗体と反応させ、chemiluminescence 法にて検出した。

DNA transfection 皮膚線維芽細胞を播種し、FuGene を用いて full-length の $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子 promoter を用いた CAT vector をトランスフェクションした。

C. 結果と考察

正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いた cDNA microarray 解析によって IL-13 刺激によって発現が亢進する遺伝子(表 1)および発現が低下する遺伝子(表 2)が明らかになった。 $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子が IL-13 刺激によって発現が最も亢進することが明らかとなったため、 $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子発現を促進する TGF- β 関連遺伝子の発現を cDNA microarray 解析によって検討したところ、IL-13 刺激によって TGF- β 関連遺伝子の発現は変化しないか低下したため、IL-13 刺激による $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子発現亢進に TGF- β は関与しないと考えられた(表 3)。

免疫ブロット法を用いて I 型コラーゲン蛋白の発現を検討したところ、IL-13 刺激によって I 型コラーゲン蛋白は量依存性、時間依存性に発現が亢進した(図 1、2)。さらに Northern Blot 法にて $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子の発現を検討したところ、IL-13 刺激によって $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子の発現は亢進し、その peak は 12 時間であった(図 3)。さらに actinomycin D にて $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子の発現亢進は抑制され、cycloheximide にて抑制されなかったため、IL-13 刺激による $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子発現亢進は、転写レベルで制御され、蛋白の新生を介しないことが示された(図 4)。

IL-13 刺激による $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子発現亢進は、転写レベルで制御されることが示されたため、full-length の $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子 promoter を用いた CAT assay を行ない、IL-13 刺激によって $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性は量依存性に亢進することが示された(図 5)。

さらに IL-13 刺激による $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子発現亢進に関与する情報伝達経路を明らかにするため、ERK 阻害剤(PD98059)、p38MAPK 阻害剤(SB202190、SB203580)、PI3 キナーゼ阻害剤(LY294002)を用いて検討したところ、IL-13 刺激による $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性亢進は PI3 キナーゼ阻害剤 LY294002 によってのみ阻害され、この作用が PI3 キナーゼを介することが示された(図 6)。さらにこの結果は免疫ブロット法を用いた I 型コラーゲン蛋白発現の検討にて確認された(図 7)。

この結果より、皮膚線維化における IL-13、PI3 キナーゼの関与が示唆され、また強皮症患者では血清 IL-13 が上昇していることから、強皮症の線維化に IL-13 が関与する可能性が考えられ

た。

D. 文献

1. Ihn H. 2002. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- β and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 14: 681-685,
2. Ihn H. 2002. The role of TGF- β signaling in the pathogenesis of fibrosis in scleroderma. *Arch Immunol Ther Exp* 50: 325-331.

E. 研究発表

1. 論文発表

Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K: Interleukin-13 stimulates the transcription of the human α 2(I) collagen gene in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, 279: 41783-41791, 2004.

2. 学会発表

第796回 日本皮膚科学会東京地方会(研究地方会)

第37回日本結合組織学会学術大会

F. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

表 1. 正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いた cDNA microarray 解析によって IL-13 刺激によって発現が亢進する遺伝子。

IL-13-regulated genes identified by microarray analysis

Gene name	Gene accession number	Expression ratio
Genes most highly induced		
α 2(I) collagen	NM_000089	5.96
activating transcription factor 3	NM_004024	2.60
Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	AF220656	2.32
G protein-coupled receptor	U67784	2.02
hexokinase 1	AF016365	2.02
Arabidopsis chlorophyll ab binding protein	AB038714	1.72

表 2. 正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いた cDNA microarray 解析によって IL-13 刺激によって発現が低下する遺伝子。

IL-13-regulated genes identified by microarray analysis

Gene name	Gene accession number	Expression ratio
Genes most decreased		
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	X16354	0.12
hepatic leukemia factor	M95585	0.13
neuropeptide Y receptor Y1	NM_000909	0.14
protein kinase C binding protein 2	AF221520	0.15
aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	AL031230	0.17
interleukin-16	M90391	0.23
early growth response 2	NM_000399	0.26
transcription factor AP-2 γ	U85658	0.31
coagulation factor II (thrombin) receptor	NM_001992	0.34
γ -aminobutyric acid (GABA) A receptor ϵ	U92285	0.34
human proteinase activated receptor-2	U67058	0.36
tumor necrosis factor superfamily, member 11	AF053712	0.36
G protein-coupled receptor 37	U87460	0.37
tumor necrosis factor superfamily, member 10b	AF016266	0.40
α 1 integrin	X68742	0.41
Rac/Cdc-42 guanine exchange factor 6	D25304	0.41
bullous pemphigoid antigen 1	NM_001723	0.44
Nephronophthisis 1	NM_000272	0.44
bone morphogenetic protein 4	NM_001202	0.46
thyroid hormone receptor interactor 4	NM_016213	0.46
mitogen-activated protein kinase kinase 6	U39657	0.46
nuclear antigen Sp100	AF056322	0.48
corticotropin releasing hormone receptor 1	X72304	0.49
bone morphogenetic protein 7	NM_001719	0.49
TNF receptor-associated factor 1	NM_005658	0.50
bone morphogenetic protein 6	NM_001718	0.56
interferon regulatory factor 2	NM_002199	0.57
transmembrane protein 1	AB001523	0.58

表 3. 正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いた cDNA microarray 解析による TGF- β 関連遺伝子の発現の IL-13 刺激による変化。

IL-13-regulated genes identified by microarray analysis

Gene name	Gene accession number	Expression ratio
Transforming growth factor-β-related Genes		
transforming growth factor- β 1	NM_000660	1.01
transforming growth factor- β 2	NM_003238	0.34
transforming growth factor- β 3	NM_003239	0.42
transforming growth factor- β receptor III	NM_003243	0.78
transforming growth factor- β receptor II	D50683	0.62

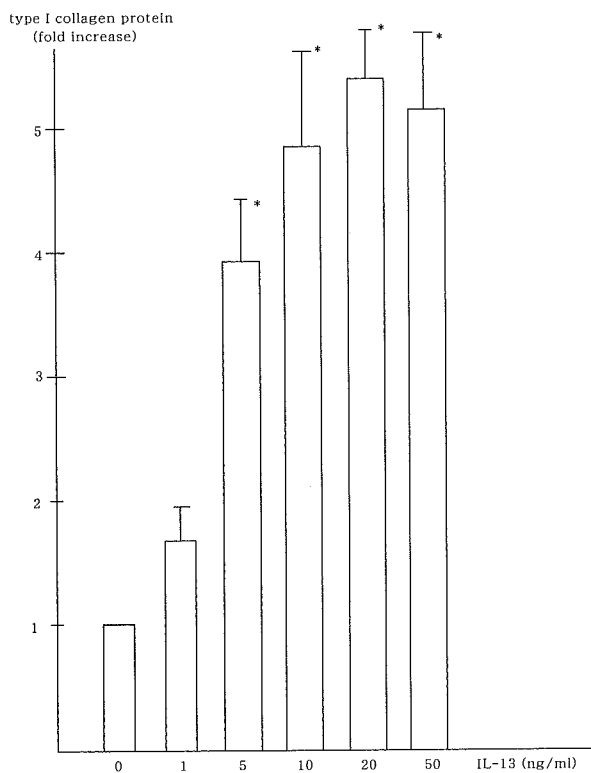


図 1. 免疫ブロット法による I 型コラーゲン蛋白発現の IL-13 刺激による変化。

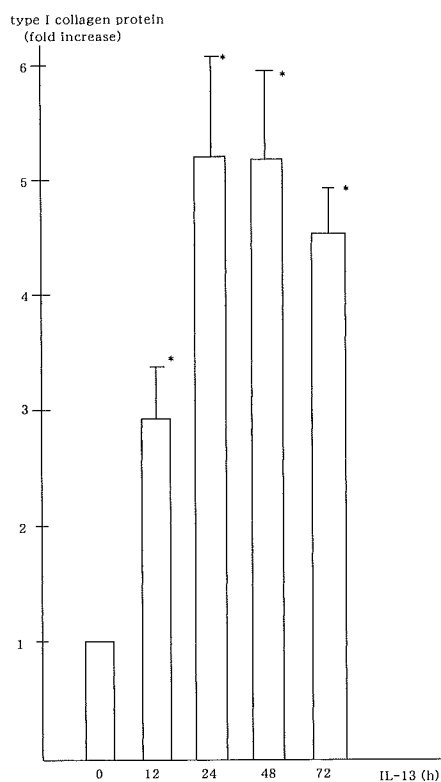


図 2. I 型コラーゲン蛋白発現の IL-13 刺激による時間的变化。

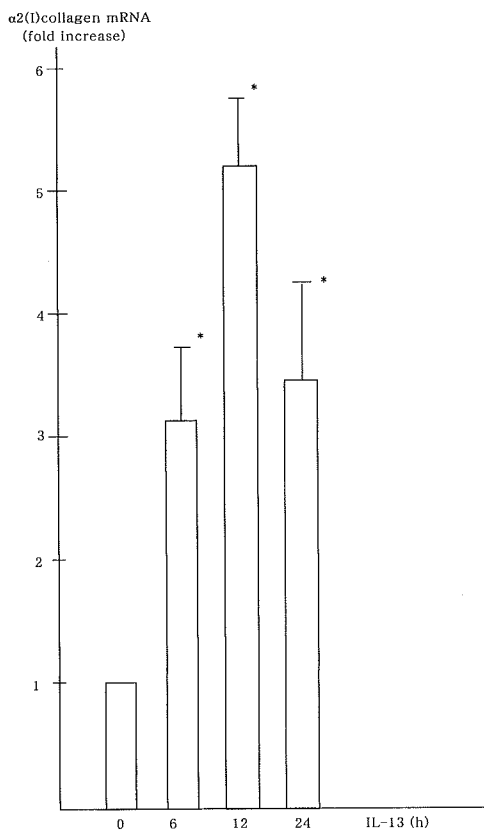


図 3. Northern Blot による alpha2(I) collagen mRNA 発現の IL-13 刺激による変化。

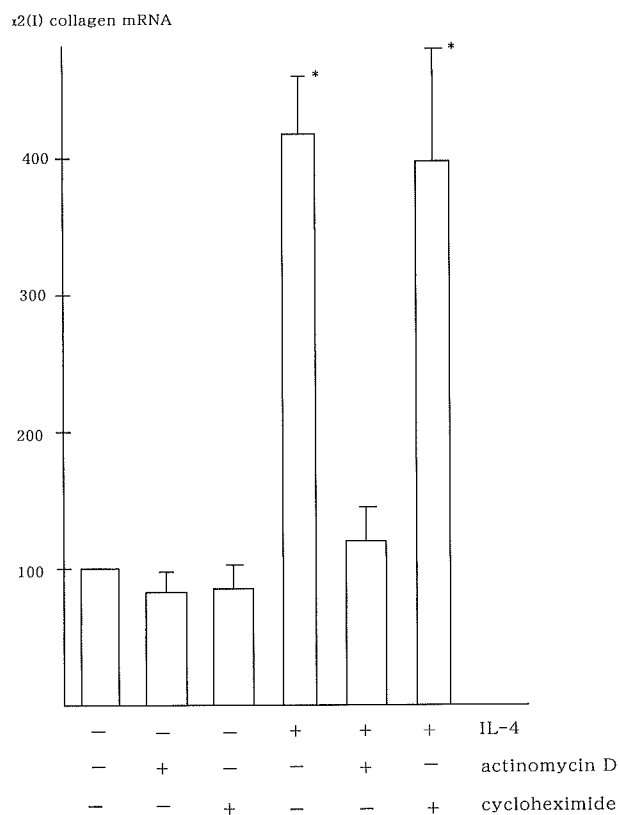


図 4. Northern Blot による alpha2(I) collagen mRNA 発現の actinomycin D あるいは cycloheximide 存在下での IL-13 刺激による変化。

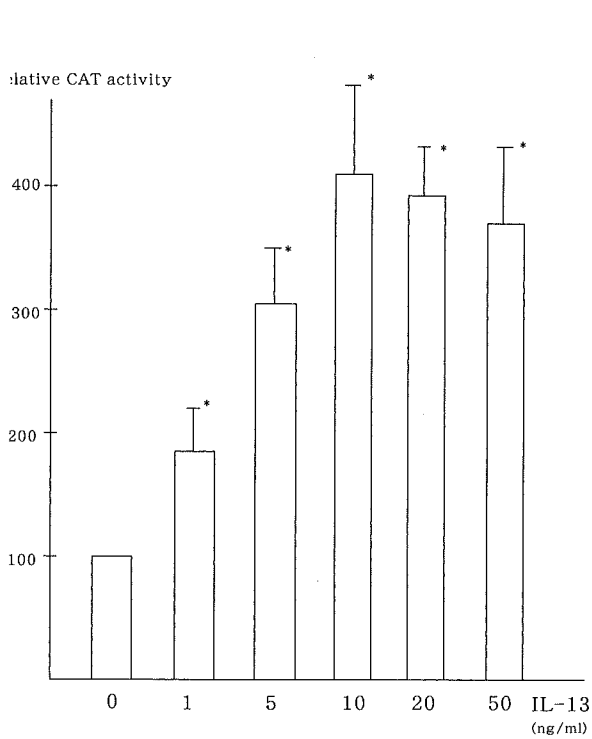


図 5. CAT assayn による $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性の IL-13 刺激による変化。

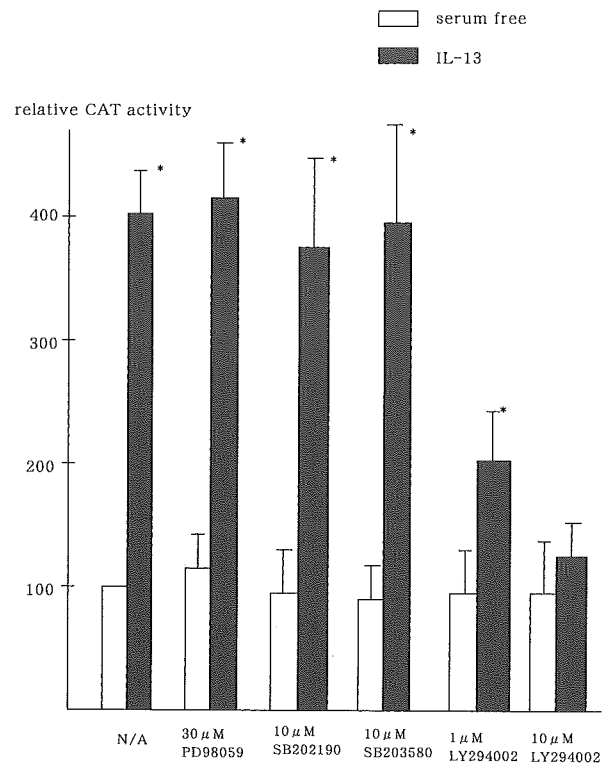


図 6. 情報伝達阻害剤下での CAT assayn による $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写活性の IL-13 刺激による変化。

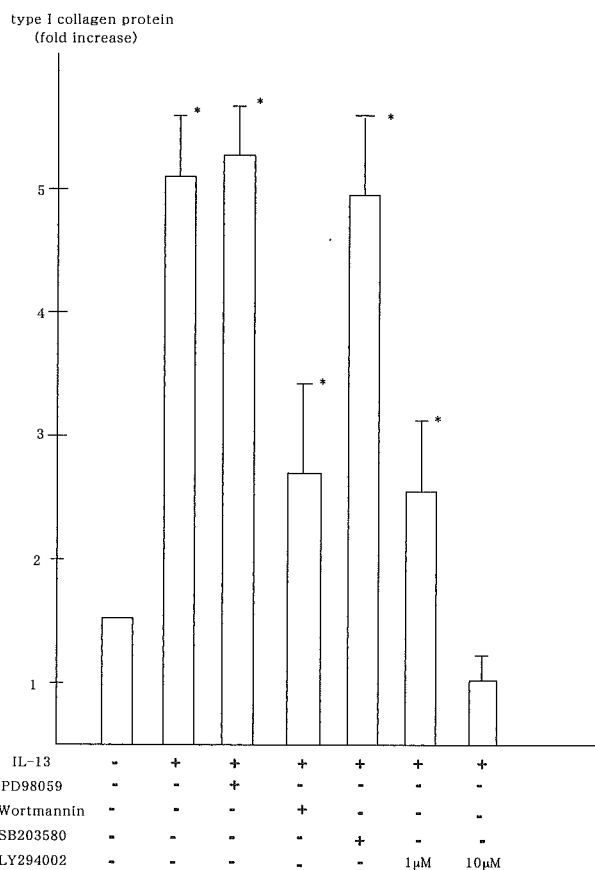


図 7. 情報伝達阻害剤下での免疫ブロット法によるI型コラーゲン蛋白発現の IL-13 刺激による変化。

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

強皮症線維芽細胞におけるトロンボスポンジン I の
発現について

分担研究者 尹 浩信 熊本大学大学院医学薬学研究部総合医薬科部門
皮膚機能病態学分野教授
研究協力者 三村佳弘 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
協力者 浅野善英 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 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 山根謙一 東京大学大学院医学系研究科・医学部皮膚科学助手
協力者 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

汎発性強皮症の線維化において中心的役割を担っているとされる TGF- β は latent form として分泌されるため、その受容体に結合し作用を発揮するには活性化される必要がある。トロンボスポンジン I は TGF- β を活性化することが知られてる。今回我々は強皮症におけるトロンボスポンジン I の発現とその役割について研究した。

A. はじめに

皮膚線維芽細胞における細胞外マトリックスの産生および分解は、様々な成長因子や炎症性サイトカインおよび細胞-細胞外マトリックス間の相互作用により制御されている。その中でも強皮症における線維化病巣の形成に中心的役割を担っていると考えられているのが transforming growth factor- β (TGF- β) である。培養強皮症皮膚線維芽細胞の特徴の多くは TGF- β 刺激下の培養正常皮膚線維芽細胞の特徴に似ている。逆に、強皮症皮膚線維芽細胞において内因性 TGF- β 産生を抑制すると I 型コラーゲンの発現が減少することが報告されており、強皮症皮膚線維

芽細胞の特徴の多くは autocrine TGF- β loop の作用により維持されている可能性が指摘されてきた (1)。

TGF- β は通常 bioactive peptide TGF- β 1, latency-associated peptide- β 1 (LAP- β 1), and latent TGF- β binding protein-1 の 3 つの蛋白の複合体 (latent complex of TGF- β) として分泌される。この形態では TGF- β はその受容体に結合することはできず、その結合前に形態を変化させる (活性化される) 必要がある。TGF- β の活性化メカニズムの 1 つが latent complex of TGF- β と細胞外マトリックスのひとつである TSP-1 との結合によるものである。そして、この活性化メカニズムは *in*

vivo において極めて重要であることが報告されている (2)。

本研究は、培養強皮症皮膚線維芽細胞において、特に TSP-1 がいかに autocrine TGF- β loop に形成に関与しているかということに焦点を当て、その皮膚線維化における役割を明らかにすることを主目的としている。まず培養強皮症皮膚線維芽細胞および強皮症皮膚における TSP-1 の発現量について検討を行った。また TSP-1 の発現亢進が強皮症皮膚線維芽細胞において、主たる細胞外マトリックスのひとつである I 型コラーゲン産生亢進に関与している可能性を見出し、その機序を明らかにした。本研究により、①強皮症皮膚線維芽細胞における autocrine TGF- β loop の確立に、TSP-1 依存性の latent TGF- β 1 の活性化が関与していること、② TSP-1 antisense oligonucleotide および TSP-1 blocking peptide により強皮症皮膚線維芽細胞における恒常的な TGF- β signaling の活性化および I 型コラーゲンの発現亢進を有意に抑制できることが明らかとなった。これらの結果から、TSP-1 は汎発性強皮症の治療の target となりうる重要な蛋白であることが示された。

B. 材料と方法

免疫プロット法および免疫沈降法 正常および強皮症患者由来皮膚線維芽細胞を confluent まで培養し、24 時間無血清の状態にし、従来の方法で細胞抽出液、上清を得た。ポリアクリルアミドゲルにて泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体と反応後二次抗体と反応させ、chemiluminescence 法にて検出した。また各種抗体を用いて従来の方法で免疫沈降を行ない、そ

の後免疫プロット法を行ない、chemiluminescence 法にて検出した。

免疫組織染色 パラフィン包埋組織片を用意し、Vecstain ABC kit (Vector Laboratories 社)を用いて免疫組織染色を行った。抗 TSP-1 抗体は全て 100 倍希釈して用いた。Vector Red を用いて発色させ、ヘマトキシリンで染色した。

Northern プロット法 正常および強皮症患者由来皮膚線維芽細胞を confluent まで培養し従来の方法により RNA を抽出し、各種 DNA probe と反応させた。

DNA transfection 皮膚線維芽細胞を播種し、FuGene を用いて human TSP-1 cDNA, COL1A2/CAT, p3TP-lux を単独あるいは同時にトランスフェクションした。

C. 結果

まず正常および強皮症皮膚線維芽細胞における TSP-1 の発現を免疫プロット法、Northern プロット法および免疫染色法にて検討した。TSP-1 の発現は強皮症皮膚線維芽細胞および真皮中において有意に亢進していた(図 1A-C)。

次に TGF- β の中和抗体である抗 TGF- β 抗体および TGF- β 1 antisense oligonucleotide が強皮症皮膚線維芽細胞における TSP-1 の発現に及ぼす影響について検討した。抗 TGF- β 抗体および TGF- β 1 antisense oligonucleotide は強皮症皮膚線維芽細胞における TSP-1 の蛋白及び mRNA 発現量を有意に抑制した(図 2A-B)。次

に培養正常皮膚線維芽細胞における TGF- β 1 刺激による TSP-1 発現に対する影響を検討した。図 3 に示すように、TGF- β 1 の刺激により TSP-1 の蛋白発現量は 2ng/ml で 48 時間後にピーク (約 2.7 倍) となり、また mRNA 発現量は 2ng/ml で 24 時間後ピーク (約 2.6 倍) となった。また、従来の方法により、強皮症細胞における TSP-1 mRNA の発現亢進および TGF- β 1 の刺激による TSP-1 mRNA 発現亢進はいずれも post-transcriptional level でおこっていることが判明した (図 4A, B)。次に TSP-1 blocking peptide および TSP-1 antisense oligonucleotide が強皮症皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲンの発現及び Smad 3 のリン酸化に及ぼす影響について検討した。図 5A, B, C に示すように TSP-1 blocking peptide および TSP-1 antisense oligonucleotide は強皮症皮膚線維芽細胞における type I procollagen 蛋白 α 2(I) collagen mRNA の発現および Samd3 のリン酸化レベルを有意に抑制した。しかし、いずれも正常細胞と同レベルにまで抑制することはできなかった。次に TSP-1 を一過性に強発現して type I procollagen 蛋白発現量を western blotting により検討した。図 6A に示すように正常皮膚線維芽細胞において TSP-1 の一過性強発現により type I procollagen 蛋白発現量は TSP-1 の量依存性に最高約 1.9 倍に増加した。また、TSP-1 強発現によるこの増強作用は TGF- β 1 antisense oligonucleotide 存在下では認められなかった。これに対し、強皮症皮膚線維芽細胞においては TSP-1 を一過性強発現させても type I procollagen 蛋白発現量に有意な増加を認めなかった。さらに図 6B に示すように正常皮膚線維芽細胞に TSP-1 を一過性強発現させた場合、

Samd3 のリン酸化が亢進した。しかし強皮症皮膚線維芽細胞に TSP-1 を一過性強発現させた場合は Samd3 のリン酸化に有意な変化は見られなかった。また、正常皮膚線維芽細胞の TSP-1 過剰発現における Samd3 のリン酸化レベルは TGF- β 1 刺激下の (vector 過剰発現された) 正常皮膚線維芽細胞におけるリン酸化レベルには及ばなかった。TSP-1 を過剰発現させた細胞における α 2(I) collagen 遺伝子転写活性をおよびその活性に対する latent TGF- β 1 刺激野江依拠を調べた。図 7 に示すように TGF- β 1 antisense oligonucleotide による前処理により TSP-1 過剰発現による α 2(I) collagen 遺伝子転写活性は vector 過剰発現と同レベルにまで有意に減少した。また (active) TGF- β 1 刺激は TSP-1 過剰発現および vector 過剰発現において同程度 α 2(I) collagen 遺伝子転写活性を亢進させた。一方、latent TGF- β 1 添加は TSP-1 過剰発現においては有意に α 2(I) collagen 遺伝子転写活性を亢進させたが、vector 過剰発現では有意な亢進作用を認めなかった。さらに、latent TGF- β 1 添加による TSP-1 過剰発現における α 2(I) collagen 遺伝子転写活性亢進作用は TSP-1 blocking peptide 存在下ではほぼ完全に消失した。

D. 考案

これまでの報告では、強皮症皮膚線維芽細胞の TGF- β 産生量は正常皮膚線維芽細胞と同程度であるとされており (1)、強皮症皮膚線維芽細胞における autocrine TGF- β 刺激の活性化には TGF- β の活性化が非常に重要であると推測される。我々は次の 3 つの点から TSP-1 が強皮症皮膚線維芽細胞における TGF- β の活性化に重