

要な役割を果たしていると推測した。1) 他の線維化を本態とする疾患において TSP-1 の重要性が報告されている。2) 強皮症患者の血清 TSP-1 値は正常人に比較し有意に高いことが報告されている。3) 強皮症患者はしばしば難治性の皮膚潰瘍を形成するが、これは TSP-1 トランスジェニックマウスでも認められている。

はじめに我々は培養強皮症皮膚線維芽細胞および強皮症患者皮膚組織の真皮膠原線維間においてそれぞれ正常人由来のものに比べ有意に TSP-1 の発現が亢進していることを見出した。さらに、強皮症皮膚線維芽細胞中の TSP-1 発現亢進は autocrine TGF- β 刺激に依存していることを次の二つの結果より推測した。ひとつは強皮症皮膚線維芽細胞において内因性 TGF- β 産生を抑制するか TGF- β に対する中和抗体を加えると TSP-1 産生が低下することであり、もうひとつは正常皮膚線維芽細胞において外因性 TGF- β 刺激により TSP-1 産生が亢進することである。我々は以前、強皮症皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲンの過剰発現が autocrine TGF- β 刺激に依存していることを明らかにした (1)。TSP-1 は I 型コラーゲンと同様、細胞外マトリックスの 1 つであるが、I 型コラーゲンと異なり、TGF- β を活性化する作用を持つ。このことは TSP-1 自体が強皮症皮膚線維芽細胞における autocrine TGF- β 刺激の活性化に関与しており、これらで形成される autocrine TSP-1-TGF- β positive feedback loop が I 型コラーゲンなど他の細胞外マトリックスの産生を促進している可能性を示唆している。また過剰発現された TSP-1 が強皮症患者で見られる創傷治癒遅延を引き起こしている可能性も考えられる。これらの可能性は正常皮膚線維芽細胞に TSP-1

を過剰発現させると I 型コラーゲンの発現が亢進すること、強皮症皮膚線維芽細胞において内因性 TSP-1 の産生抑制や TSP-1 の機能抑制が I 型コラーゲンの発現の低下をもたらしたという結果により確認された。ただし、強皮症皮膚線維芽細胞における TSP-1 の産生抑制や機能抑制がもたらす I 型コラーゲンの発現の低下は完全ではなく、抑制後も正常皮膚線維芽細胞よりはその発現は強かった。また、正常皮膚線維芽細胞に TSP-1 を一過性に過剰発現させた場合に亢進した I 型コラーゲンの発現量も無刺激下の強皮症皮膚線維芽細胞あるいは正常皮膚線維芽細胞が TGF- β 刺激された際の I 型コラーゲンの発現量には及ばなかった。さらに、理論的には正常皮膚線維芽細胞においても、ひとたび TGF- β の活性化が起これば、それは TSP-1 の産生増加につながり、さらに TGF- β の活性化がおこるという positive feedback loop が形成され、活性化した TGF- β による種々の細胞外マトリックスの産生誘導がひきおこされるはずである。実際には正常皮膚線維芽細胞ではこのようなことが起きないのは、正常皮膚線維芽細胞には何らかの negative feedback の系が存在するものと推測される。そして、その存在の検索が今後の研究課題である。強皮症皮膚線維芽細胞における autocrine TGF- β 刺激の恒常的な活性化を抑制し、過剰に発現された I 型コラーゲンを減少させたという点で TSP-1 が汎発性強皮症を始めとした線維化を伴う疾患の治療の target となりうる可能性を強く示唆していると考えられた。

E. 結論

TSP-1 は強皮症患者真皮および強皮症患者由来線維芽細胞中において有意に発現が亢進しており、同細胞における autocrine TGF- β 刺激の恒常的な活性化に関わっている可能性が示された。

F. 文献

1. Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K: Blockade of endogenous transforming growth factor- β signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts. -Association with increased expression of transforming growth factor- β receptors. Arthritis Rheum 2001, 44:474-480

2. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribiero F, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouk N: Thrombospondin-1 is a major activator of TGF β 1 in vivo. Cell 1998, 93: 1159-1170

G. 研究発表

- 1.論文発表 Am J Pathol 2005 ;166:1451-63.に発表済み
- 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 培養正常および強皮症皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン, TSP-1蛋白の発現とSmad3のリン酸化

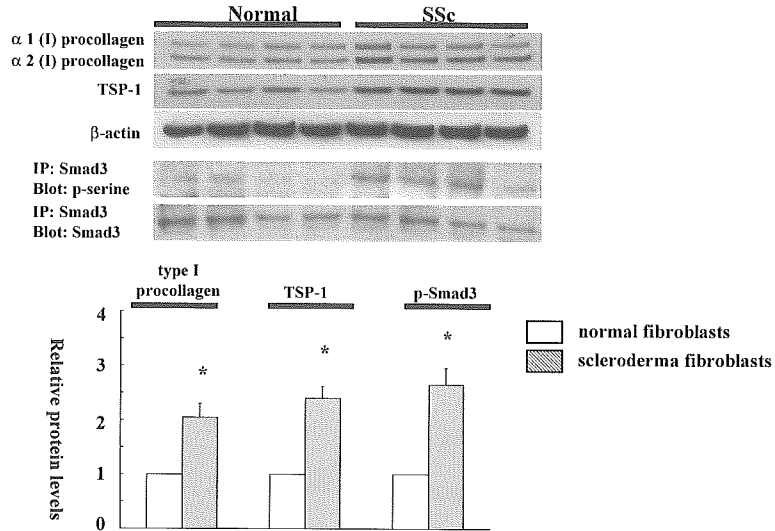


図1B 培養正常および強皮症皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲンとTSP-1 mRNAの発現

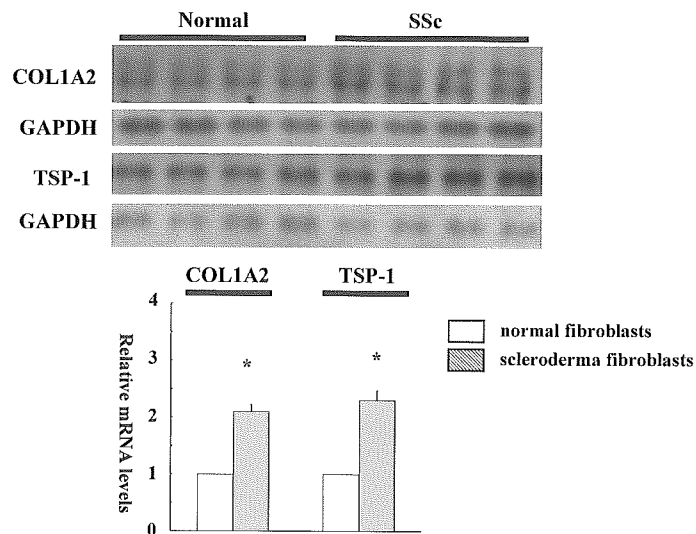


図1C 正常および強皮症患者皮膚切片におけるTSP-1蛋白の発現

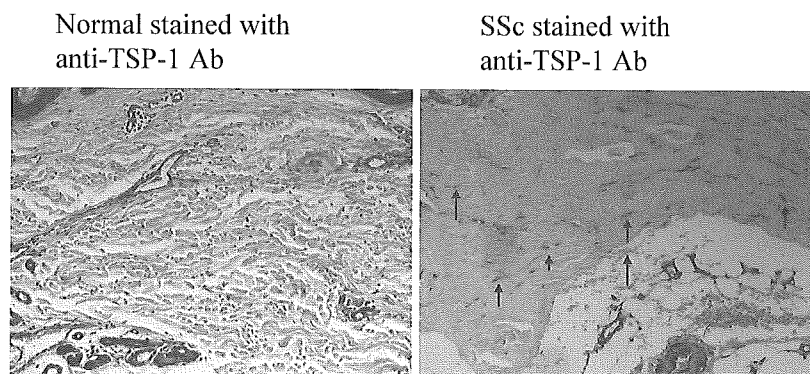


図 1A, B: 培養正常および強皮症皮膚線維芽細胞における TSP-1 発現量の比較
免疫ブロット法および Northern ブロット法による TSP-1 の検出。C: 正常及び強皮症患者皮膚切片中の
TSP-1 発現量の比較。免疫組織染色法による TSP-1 の検出。

図2A 抗TGFβ中和抗体および TGFβ 1 antisenseoligoの正常及び強皮症線維芽細胞におけるTSP-1蛋白発現量に対する影響

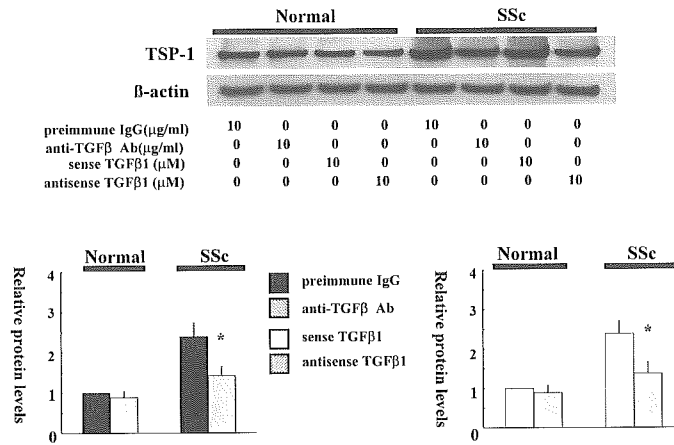


図2B 抗TGFβ中和抗体および TGFβ 1 antisenseoligoの正常及び強皮症線維芽細胞におけるTSP-1mRNA発現量に対する影響

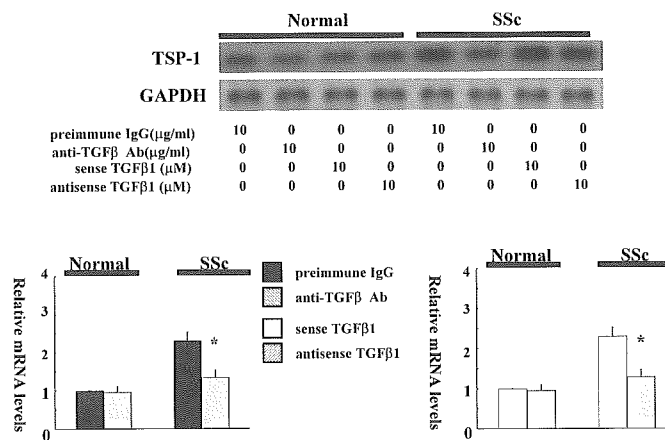


図2A, B: 抗TGFβ中和抗体および TGFβ 1 antisenseoligoの正常及び強皮症線維芽細胞におけるTSP-1発現量に対する影響

免疫ブロット法および Northern ブロット法による TSP-1 の検出。

図3 外因性TGFβの正常細胞におけるTSP-1発現量に対する影響

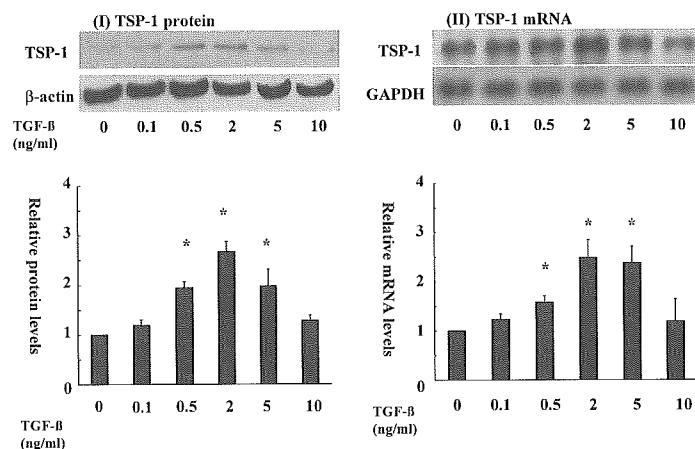


図3: 外因性 TGFβの正常細胞における TSP-1 発現量に対する影響

免疫ブロット法および Northern ブロット法による TSP-1 の検出。

図4A 正常および強皮症線維芽細胞におけるTSP-1 mRNA stability

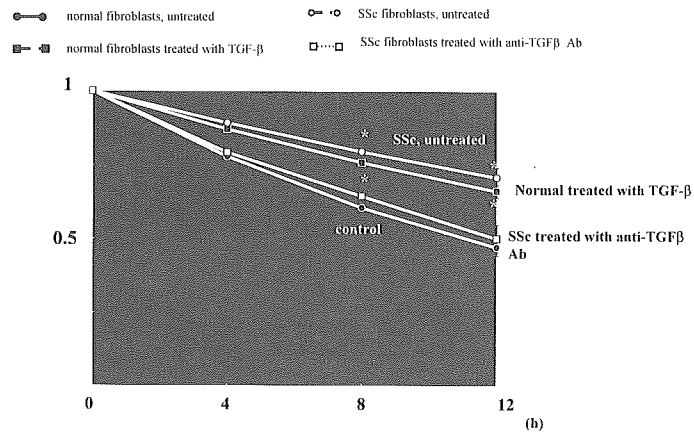


図4A: 正常および強皮症線維芽細胞におけるTSP-1 mRNA stability Northernプロット法によるTSP-1を検出し、分解されたmRNAの割り合いを算出。

図4B培養正常および強皮症皮膚線維芽細胞におけるTSP-1 promoter 活性 (無刺激/TGFβ刺激下)

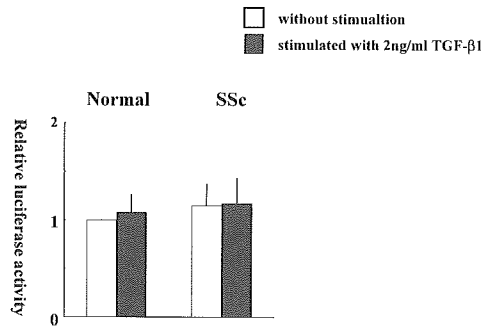


図4B: 培養正常および強皮症皮膚線維芽細胞におけるTSP-1 promoter 活性 (無刺激/TGFβ刺激下) Reporter assayによるTSP-1/ルシフェラーゼ活性の測定。

図5A TSP-1 blocking peptideおよび TSP-1 antisenseoligoの正常及び強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲン蛋白発現量に対する影響

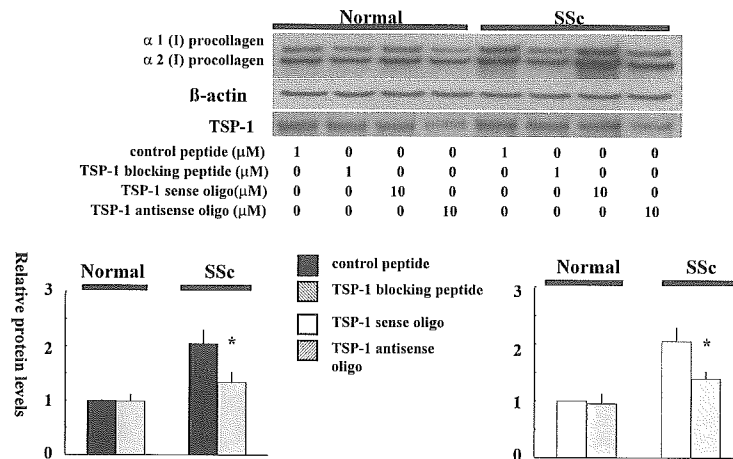


図5A: TSP-1 blocking peptideおよび TSP-1 antisenseoligoの正常及び強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲン蛋白発現量に対する影響 免疫プロット法によるtype I procollagenの検出。

図5B TSP-1 blocking peptideおよび TSP-1 antisenseoligoの正常及び強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲンmRNA発現量に対する影響

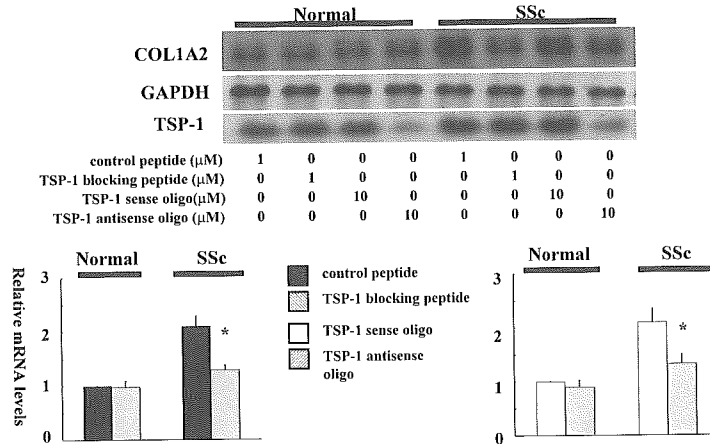


図5B: TSP-1 blocking peptideおよび TSP-1 antisenseoligoの正常及び強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲンmRNA発現量に対する影響
Northern プロット法によるα2(I) collagen の検出。

図5C TSP-1 blocking peptideおよび TSP-1 antisenseoligoの正常及び強皮症線維芽細胞におけるSmad3リン酸化に対する影響

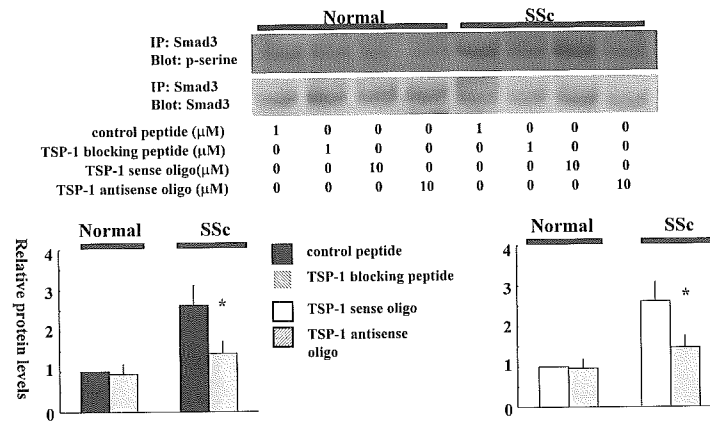


図5C: TSP-1 blocking peptideおよび TSP-1 antisenseoligoの正常及び強皮症線維芽細胞におけるSmad3リン酸化に対する影響。
免疫沈降法によるp-Smad3の検出。

図6A TSP-1 過剰発現の正常及び強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲン蛋白発現量に対する影響

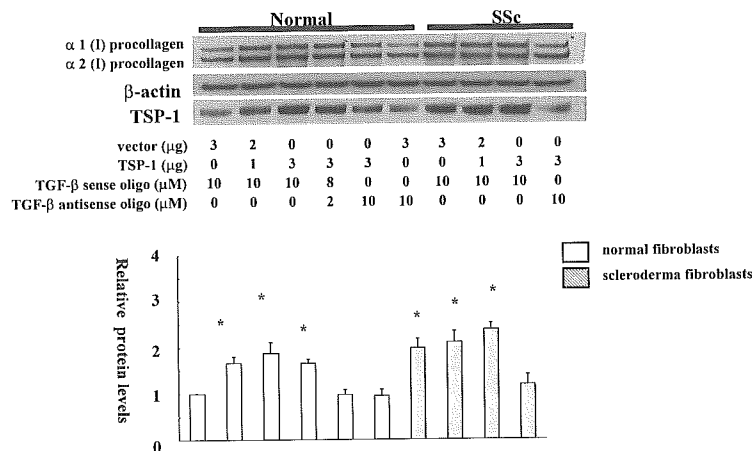


図 6A: TSP-1 過剰発現の正常及び強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲン蛋白発現量に対する影響
免疫プロット法による type I procollagen の検出。

図6B TSP-1 過剰発現の正常線維芽細胞におけるSmad3リン酸化に対する影響

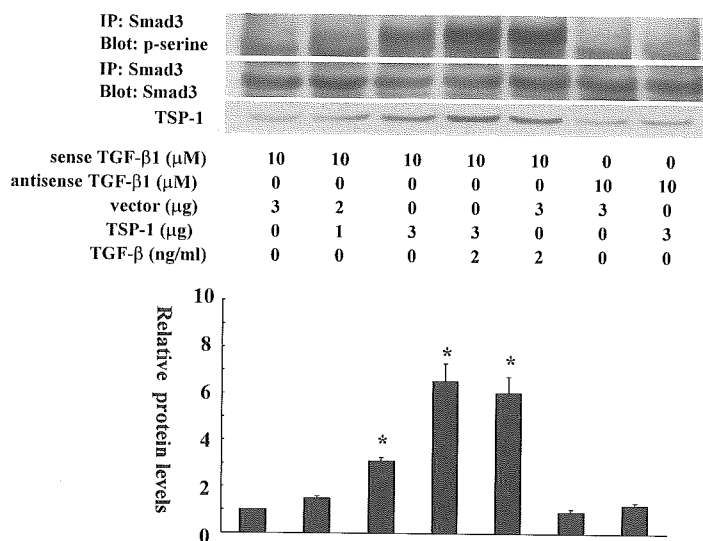


図 6B: TSP-1 過剰発現の正常線維芽細胞における Smad3 リン酸化に対する影響。免疫沈降法による p-Smad3 の検出。

図7 外因性latent TGFβの, TSP-1を過剰発現させた細胞におけるI型コラーゲンプロモーター活性に対する影響

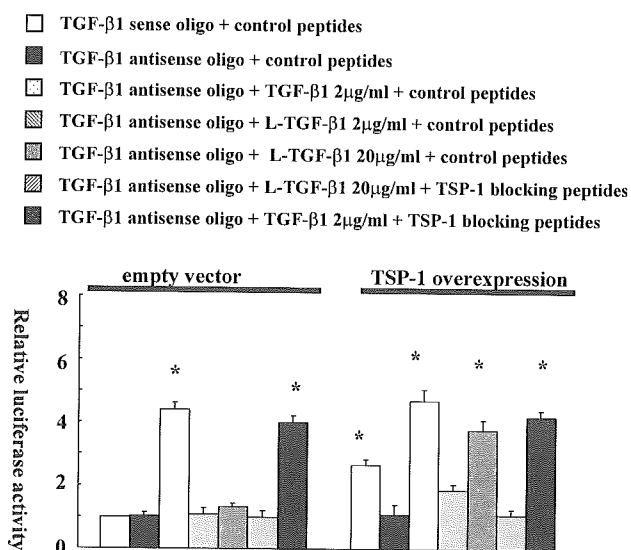


図 7:外因性 latent TGFβの, TSP-1 を過剰発現させた細胞における I 型コラーゲンプロモーター活性に対する影響

Reporter assay による COL1A2 ルシフェラーズ活性の測定。

ヒト線維芽細胞の細胞外基質関連蛋白産生に対する シクロスポリンの影響

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	安部正敏	群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学講師
協力者	曾我部陽子	群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学
協力者	横山洋子	群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学
協力者	周東朋子	群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学
協力者	石渕裕久	群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学
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

強皮症や皮膚筋炎の間質性肺炎に対するシクロスポリンの臨床的評価は高いが、その奏功機序に関する検討は少ない。今回我々は、本剤のヒト線維芽細胞の細胞外基質関連蛋白の産生に対する影響を検討した。線維芽細胞をシクロスポリン存在下で単層培養し、上清中の I 型コラーゲン、matrix metalloproteinase (MMP)-1, 2, 9、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 濃度を測定し、併せて増殖能および線維芽細胞の形態形成に対する影響を検討した。その結果、CyA は、1000ng/ml で I 型コラーゲンおよび TIMP-1 の産生を低下させた。また、MMP-1 については、刺激後 24 時間では濃度依存的に MMP-1 を低下させたが、刺激後 48 時間では CyA1000ng/ml のみで低下した。MMP-2 については、1000 および 100ng/ml で低下がみられた。MMP-9 に対し CyA は何ら影響を及ぼさなかった。他方、CyA100 および 10ng/ml は、線維芽細胞増殖能を抑制し形態形成にも影響を及ぼした。今回の研究で、CyA が真皮線維芽細胞代謝に影響を及ぼす可能性が示唆されたが、全身性强皮症の治療応用を明らかにするためには更なる検討が必要であると考えた。

A. 研究目的

全身性强皮症や皮膚筋炎の間質性肺炎に対するシクロスポリン（以下 CyA と略）の臨床的評価は高い（1）が、その奏功機序に関する検討は少ない。また全身性强皮症の皮膚硬化に対する本剤の効果は、報告により様々であり、まだ一定の見解が得られて

いないようである（2、3）。本剤は皮膚科領域においても尋常性乾癬など、日常臨床においても幅広く用いられている薬剤であり（4）、免疫抑制剤の中でも骨髄抑制も少ないことから、比較的使いやすい薬剤である。すなわち、本剤の全身性强皮症に対する効果の有無を検討することは、今後の全身性

強皮症治療においても大きな意味があることであると考えられる。

近年、歯科領域や整形外科領域においては、本剤の線維芽細胞の細胞外基質関連蛋白の産生に対する影響が多数報告されているものの、未だ一定の見解はみられていないようである(5~11)。そこで今回我々は、CyAの真皮線維芽細胞の細胞外基質関連蛋白産生に対する直接効果を検討した。

B. 研究方法

1) 培養細胞

患者の同意を得た上で、手術時に得られた正常部皮膚を用い、型どおりの explant culture 法にてヒト真皮線維芽細胞を得た。線維芽細胞は継代培養後、5代以前の細胞を実験に供した。

2) ヒト真皮線維芽細胞の形態および微小管形成に対する CyA の影響

線維芽細胞を I 型コラーゲンコートしたカバーガラス上に播種し、10%仔牛血清 (FBS) (Cytosystems; Castle Hill, NSW, Australia) 存在下および非存在下において、CyA1000~0.1 ng/ml (ノバルティスファーマ(株)より供与) で刺激した。4時間後アクチンストレスファイバーおよび微小管形成を観察する目的で、それぞれ RITC-conjugated phalloidin (Molecular Probes, Inc.; Eugene, OR, USA) および Mouse anti-tubulin antibody (Sigma, Steinheim; St. Louis, MO, USA)、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG H+L antibody (Molecular Probes, Inc.) を用い二重染色した。

また同様の実験について、線維芽細胞を Vitrogen "100" collagen (Cohesion; Palo Alto, CA) コラーゲンゲル中に包埋し、三次元構造で同様の検討を行った。

3) 線維芽細胞の細胞外基質関連蛋白産生に対する CyA の影響

線維芽細胞を 96well プラスティックプレートに播種し、コンフルエントになるまで 10%FBS 存在下に培養した。Wash out の後 CyA1000~0.01 ng/ml 存在下に培養を続け、24 および 48 時間後に上清を回収し、上清中の I 型コラーゲン (Takara Bio Inc.; Otsu, Shiga, Japan)、matrix metalloproteinase (MMP)-1, 2, 9、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 (以上 DAIICHI Fine Chemical Co., Ltd.; Takaoka, Toyama, Japan) に対する CyA の影響を ELISA 法で検討した。

4) 線維芽細胞増殖能に対する CyA の影響

線維芽細胞を 96well プラスティックプレートに播種し、10%FBS 存在下に培養した。サブコンフルエントに達したところで、CyA1000~0.01 ng/ml を加え更に培養を続け、24 および 48 時間後 CellTiter96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega Corp.; Madison, WI, USA) にて処理し、490nm 吸光度を測定することで増殖能を検討した。

5) 統計学的検討

各データの平均値の比較には Mann-Whitney 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

1) ヒト真皮線維芽細胞の形態および微小管形成に対する CyA の影響

まず、二次元での検討を行ったところ、血清非存在下において、CyA100ng/ml は線維芽細胞の突起形成を阻害した。この効果は濃度依存的に消失した。この際微小管の形成には影響を及ぼさなかった。他方血清存在下においては、CyA は線維芽細胞の形態および微小管形成に影響を及ぼさなかった (図 1)。

次にコラーゲンゲル中にて線維芽細胞の形態変化を三次元で検討した。その結果、血清非存在下においては、線維芽細胞は多方向に突起を伸ばした。しかし、CyA100ng/ml 存在下では明らかに形態が異なり、双極方向に細胞形態が延長した。この効果は濃度依存的に消失した。また、この際に微小管への影響は及ぼさなかった。一方、血清存在下においても、線維芽細胞は多方向に突起を伸ばしたが、CyA100ng/ml 存在下では双極方向に細胞形態が延長した。この効果は濃度依存的に消失した (図 2)。また、この際に微小管への影響は及ぼさなかった。

以上より CyA は線維芽細胞に対し、特に三次元構造下で、形態形成に影響を及ぼすことが明らかとなった。

2) I 型コラーゲン産生に対する CyA の影響

CyA は、刺激後 24 時間および 48 時間において、1000ng/ml で明らかに I 型コラーゲン産生量を低下させた。しかし、これ以下の濃度においては、明らかな変化はみられなかった (図 3)。

3) MMP-1 産生に対する CyA の影響

CyA は、刺激後 24 時間では濃度依存的に線維芽細胞の MMP-1 産生を低下させた。しかし、刺激後 48 時間では CyA1000ng/ml のみが MMP-1 産生量を低下させた。(図 4)。

4) MMP-2 産生に対する CyA の影響

CyA は、刺激後 24 時間および 48 時間において、1000、100ng/ml で明らかに MMP-2 産生量を低下させた。しかし、これ以下の濃度においては、明らかな変化はみられなかった (図 5)。

5) MMP-9 産生に対する CyA の影響

CyA は、刺激後 24 時間および 48 時間において、すべての濃度で MMP-9 産生量に対し影響を及ぼさなかった (図 6)。

6) TIMP-1 産生に対する CyA の影響

CyA は、刺激後 24 時間および 48 時間において、1000ng/ml で明らかに TIMP-1 産生量を低下させた。しかし、これ以下の濃度においては、明らかな変化はみられなかった (図 7)。

7) 線維芽細胞増殖能に対する CyA の影響

CyA は、刺激後 24 時間および 48 時間において、100、10ng/ml で明らかに増殖能が低下した。しかし、これ以外の濃度においては、明らかな変化はみられなかった (図 8)。

D. 考案

全身性強皮症の皮膚硬化病変に対する CyA の有効性はまた一定の見解をみていないのが現状である。しかし、他科領域における研究では、本剤が細胞質内でシクロフ

イリンと結合して、転写因子 NF-AT (nuclear factor of activated T cells) の活性化と核内移行を阻害し、リンパ球の活性化を抑制する傍ら、直接あるいは間接作用によりいくつかの MMP ファミリーの産生を調節することが明らかとなっている (5)。特に関節リウマチ (RA) においては、本剤による MMP 発現調節が病態制御には重要であるとのコンセンサスが出来ているようである (6)。現在までのところ、ヒト皮膚に関する報告では、CyA の角化細胞に対する報告はなされているが、線維芽細胞に対する報告は僅かである。CyA の全身性強皮症の皮膚効果病変に対する効果の有無を明らかにするためには、本剤のヒト真皮線維芽細胞代謝に関する基礎的研究が不可欠である。

今回の検討で、CyA は 1000ng/ml で線維芽細胞由来 I 型コラーゲンおよび TIMP-1 を低下させることが明らかとなった。また、MMP-1 については、刺激後 24 時間では濃度依存的に MMP-1 を低下させたが、刺激後 48 時間では CyA1000ng/ml のみが低下させた。MMP-2 については、1000 および 100ng/ml で低下がみられた。MMP-9 に対し CyA は、何ら影響を及ぼさなかった。他方、CyA100 および 10ng/ml は、線維芽細胞増殖能を抑制し、形態学的変化をもたらした。

これまでの他科領域における線維芽細胞の細胞外基質関連蛋白代謝についての報告では、まず RA の滑膜線維芽細胞からの MMP-1 と MMP-13 の産生抑制が報告されている (7)。さらに、歯肉組織由来の線維芽細胞では MMP-1 発現の抑制が報告されており (8)、この事実は本剤が有する歯肉腫脹の一因、つまり MMP-1 産生抑制による基質増生が原因と考えられている (9)。また、この

MMP-1 産生抑制の機序については CyA の直接作用と TGF- β を介する間接作用が推定されている (10, 11)。本剤は臨床現場において、患者末梢血濃度いわゆるトラフレベルが測定できる薬剤であるが、今回検討した濃度は血中においては十分患者の生体内で起こりうる濃度である。しかしながら、強皮症病変部位において血管から周囲組織へどれ位移行がみられるのか、つまり本剤内服中の患者の真皮レベルでの濃度は不明である。トラフレベルから考え合わせると、今回 CyA により影響がみられた殆どの濃度は生体レベルより高いと推定され、トラフ値以下で考えた場合、MMP-1 を低下させかつ、線維芽細胞の増殖を抑制するという結果が、臨床効果を示唆するデータといえるのかもしれない。しかし、全身性強皮症の臨床応用を探るまでには遺伝子レベルを含めた更なる検討が必要であろう。

E. 結論

CyA はヒト真皮線維芽細胞に対し影響を及ぼすことが示唆されたが、全身性強皮症における真皮線維芽細胞の直接効果については更なる検討が必要である。

F. 文献

1. 藤澤朋幸、八木健、小林淳、菅沼秀基、斎藤好久、高嶋義光、中村祐太郎、須田隆文、千田金吾、中村浩淑. 亜急性に進行し、シクロスポリンが奏効した全身性強皮症に伴う間質性肺炎の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌 2003, 41: 480-485.
2. Genth E. Evidence-based therapy of systemic sclerosis. Z Rheumatol. 2001, 60:

464-468.

3. Zandman-Goddard G, Tweezer-Zaks N, Shoenfeld Y. New therapeutic strategies for systemic sclerosis--a critical analysis of the literature. *Clin Dev Immunol.* 2005, 12: 165-173.

4. Abe M, Ishikawa O, Miyachi Y. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets during cyclosporin administration in patients with psoriasis vulgaris. *Eur J Dermatol* 1997, 7: 417-420.

5. 田中良哉. MMP に対するシクロスポリンの作用. *医薬ジャーナル* 2004, 40: 2022-2027.

6. Rutkauskaite E, Zacharias W, Schedel J, Müller-Ladner U, Mawrin C, Seemayer CA, Alexander D, Gay RE, Aicher WK., Michel BA., Gay S, Pap T. Ribozymes that inhibit the production of matrix metalloproteinase 1 reduce the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2004, 50: 1448-1456.

7. Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Jones SA, Caterson B, Flannery CR. Cyclosporin A inhibition of aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2002, 46: 124-129.

8. Hyland PL, Traynor PS, Myrillas TT, Marley JJ, Linden GJ, Winter P, Leadbetter N, Cawston TE, Irwin CR. The effects of cyclosporin on the collagenolytic activity of gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2003 74: 437-445.

9. Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Torri C, Stabellini G, Ferrario VF, Gioia M. Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast

collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. *Biomed Pharmacother.* 2004, 58: 231-238.

10. Cotrim P, de Andrade CR, Martelli-Junior H, Grander E, Sauk JJ, Coletta RD. Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblasts is regulated by transforming growth factor (TGF)-beta1 autocrine stimulation. *J Periodontol.* 2002, 73: 1313-1322.

11. Cotrim P, Martelli-Junior H, Grander E, Sauk JJ, Coletta RD. Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor-beta1. *J Periodontol.* 2003, 74: 1625-1633.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

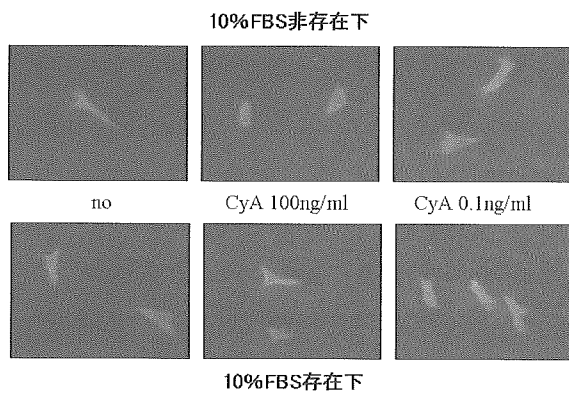


図1 二次元における線維芽細胞の形態学的変化における CyA の影響

血清非存在下では CyA100ng/ml により明らかに形態の変化がみられる。

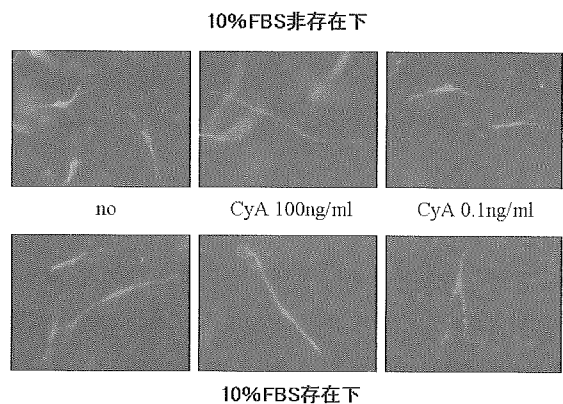


図2 三次元における線維芽細胞の形態学的変化における CyA の影響

三次元においては血清の有無に関わらず、CyA100ng/ml により明らかに形態が変化している。

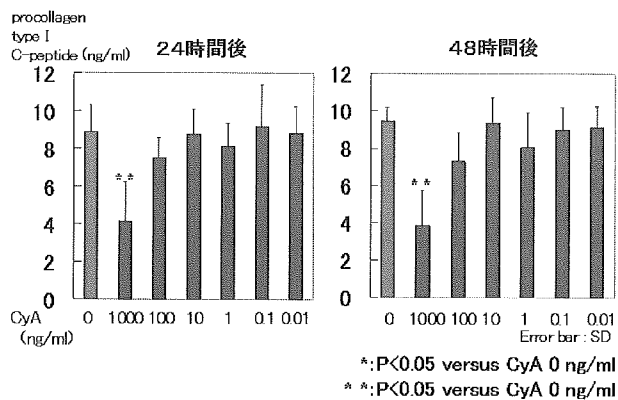


図3 線維芽細胞由来 I 型コラーゲンに対する CyA の影響

CyA1000ng/ml により明らかな I 型コラーゲン産生低下がみられる。

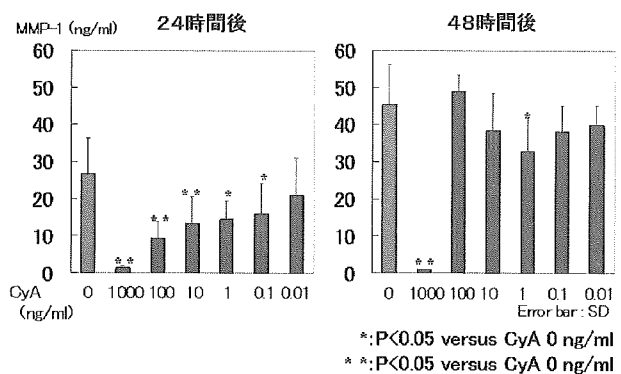


図4 線維芽細胞由来 MMP-1 に対する CyA の影響

CyA 刺激後 24 時間では濃度依存的に MMP-1 産生低下がみられるが、48 時間後では CyA1000ng/ml のみで MMP-1 産生低下がみられる。

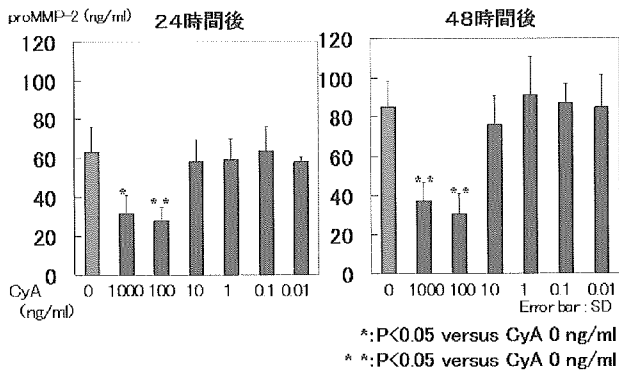


図5 線維芽細胞由来 MMP-2 に対する CyA の影響

CyA1000ng/ml により明らかな MMP-2 産生低下がみられる。

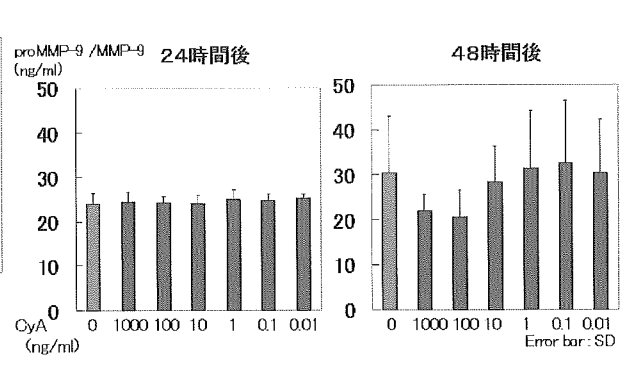


図6 線維芽細胞由来 MMP-9 に対する CyA の影響

CyA はいずれの濃度でも MMP-9 産生に影響を及ぼさなかった。

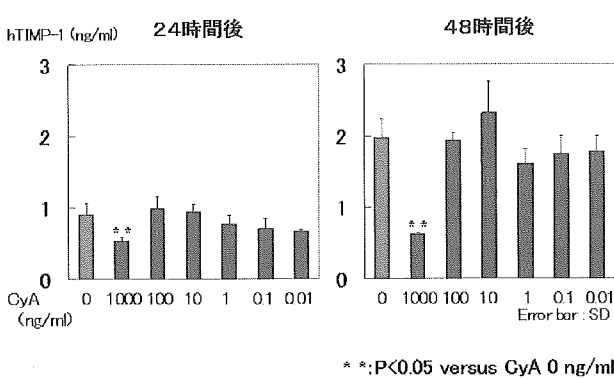


図7 線維芽細胞由来 TIMP-1 に対する CyA の影響

CyA1000ng/ml により明らかな TIMP-1 産生低下がみられる。

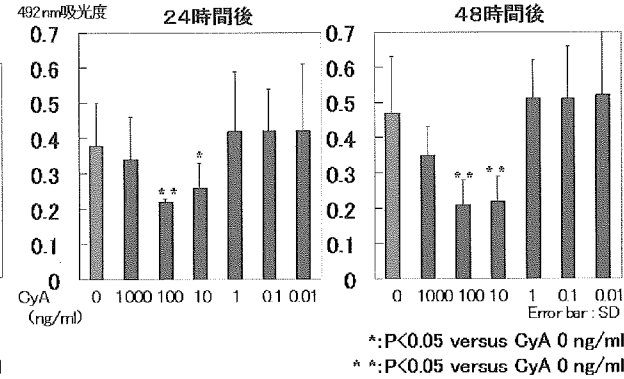


図8 線維芽細胞増殖能に対する CyA の影響

CyA100 および 10ng/ml で線維芽細胞増殖能の低下がみられる。

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

タクロリムスによる強皮症線維芽細胞の IL-1 α 産生抑制

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

栃本明子 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター助手

副島誠 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター助手

菅野朗子 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター助手

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、IL1A 遺伝子の転写調節因子として EBP1 (ErbB3 binding protein 1) を同定した。EBP1 は、FKBP8 (FK506 binding protein 8) と複合体を形成していることがわかり、EBP1 の核内への移行に重要であることが推定された。今回、タクロリムス (FK506) が EBP1/FKBP8 複合体の核内移行を抑制することにより、IL-1 α の転写、産生を低下させることを示す。これらの結果から、タクロリムスは、IL-1 の転写を抑制することにより強皮症の線維化を抑制する可能性が示唆され、有効な強皮症の治療法となることが推測された。

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。線維芽細胞のコラーゲン過剰産生に、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}。また、IL-1 α の転写にかかわる因子が、ErbB3-binding protein 1 (EBP1) と FK506-binding protein 8 (FKBP8) であることを我々は明らかにした。今回は、FKBP motif を有する FKBP8 と EBP1 との複合体の形成

に対して、タクロリムスの添加が影響をおよぼすかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) FKBP8 の免疫染色法

ヒト FKBP8 に対する抗体を作成するため、FKBP8 のアミノ酸配列より抗原性の高いと判定された部位のペプチド (CYGPQGSRSPTYI) を合成し、New Zealand 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、fluorescence-anti rabbit IgG 抗体反応後、蛍光顕微鏡にて FKBP8 の細胞内局在を検討した。

2) siRNA を用いた FKBP8 の抑制

FKBP8 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。

3) IL1A 遺伝子転写活性の測定

IL1A 遺伝子の-1437 から+39 までの転写調節領域を promoterless pGL3 に組み込む (pGL3/IL1A)。pGL3 および phRL-TK を強皮症線維芽細胞に遺伝子導入し、48時間後の細胞抽出液のルシフェラーゼ活性を測定した。種々の濃度の FK506 添加の系は、遺伝子導入する24時間前から添加し、遺伝子導入時にも同濃度の FK506 を添加した。

4) mRNA の定量

線維芽細胞から total RNA を抽出し、superscript III にて cDNA に変換し、特異的なプライマーおよび TaqMan probe をもちいた定量 RT-PCR をおこなった。

6) IL-1 α およびコラーゲン産生量

線維芽細胞の産生する細胞内 IL-1 α および上清中コラーゲン産生量を IL-1 α ELISA kit (R & D) および procollagen type I c-peptide EIA kit (Takara) を用いて検討した。

C. 研究結果

1) タクロリムスの IL-1 α mRNA におよぼす作用 (図1)

強皮症線維芽細胞を種々の濃度のタクロリムス添加の無血清培地にて24時間培養し、細胞から RNA を抽出した。濃度依存的に IL-1 α mRNA の発現量は低下した。同様に、IL-6 mRNA の発現量を検討した結果、24時間ではタクロリムスは、IL-6 mRNA 発現量に影響をおよぼさなかった。

2) タクロリムスの細胞内 IL-1 α 産生量におよぼす影響 (図2)

強皮症線維芽細胞に種々の濃度のタクロリムスを添加し、72時間後の細胞内 IL-1 α の産生量を測定した。濃度依存的に IL-1 α の産生量は低下し、100 nM 以上にて有意な低下を示した。一方、正常線維芽細胞は、無刺激では、細胞内 IL-1 α の産生量は、測定感度以下であった。10 ng/ml の IL-1 β の添加にて、細胞内の IL-1 α は有意に増加したが、この産生増加には、タクロリムスの効果は認められなかった。

3) タクロリムスの IL1A 遺伝子の転写活性におよぼす作用 (図3)

ルシフェラーゼベクター、pGL3 に IL1A 遺伝子の転写領域を組み作製したベクターを pGL3/IL1A とする。このベクターを強皮症線維芽細胞に遺伝子導入し、48時間後の細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。無刺激にて転写活性は増加していた。ベクターの遺伝子導入と同時にタクロリムスを添加すると、濃度依存的にルシフェラーゼ活性は低下した。

4) FKBP の細胞内局在

強皮症線維芽細胞をタクロリムス添加24時間培養後と無刺激24時間培養後に 2%パラフォルムアルデヒドと 0.1% TritonX100 にて固定し、FKBP8 の抗体にて免疫染色を行った。図4に示すように、タクロリムス投与により、FKBP8 は、核内への移行が阻害された。

5) 強皮症線維芽細胞のコラーゲン産生におよぼすタクロリムスの影響

強皮症線維芽細胞の培養上清に種々の濃度のタクロリムスを添加し、上清中に産生される procollagen c-peptide を測定した。タクロリムスの濃度依存的に酸性量は減少した(図5)。

D. 考案

強皮症線維芽細胞の IL-1 α 発現に關与する EBPI および FKBP8 の複合体は、タクロリムスと相互作用し、その結果、EBPI/FKBP8 の核内への移行を阻害した。IL1A の転写に重要な役割をしている EBPI/FKBP8 複合体の核内移行の抑制は、IL-1 α mRNA 発現低下を惹起した。従来より、FKBP8 は、FK506 binding motif を有することは明らかであったが、FK506 との結合能はないと考えられていた。今回、我々の結果では、EBPI/FKBP8 の複合体では、FK506 との相互作用を呈することが明らかとなった。

E. 結論

強皮症の線維化に対し、タクロリムスは、新たな治療薬となる可能性があり、今後、臨床応用を行って行く必要があると考える。

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.

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.

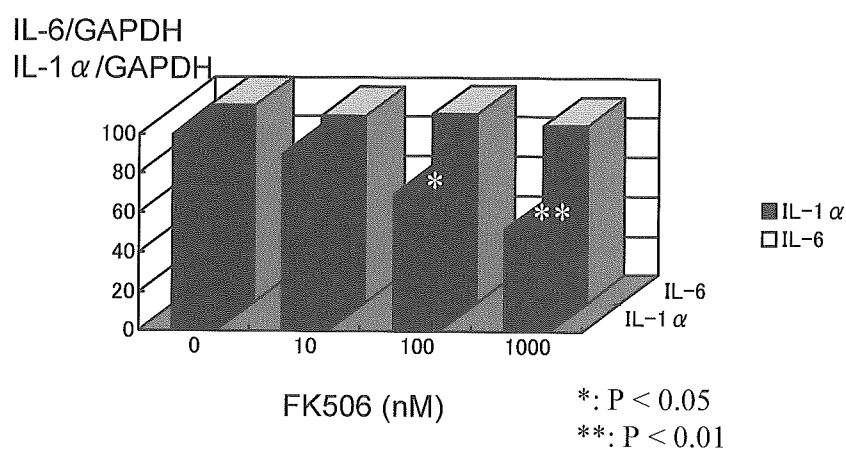


図1. タクロリムスの IL-1 α mRNA におよぼす影響

培養強皮症線維芽細胞に種々の濃度のタクロリムスを添加し、24時間後の細胞を回収した。RNAを抽出し、TaqMann probe を用いて、IL-1 α および IL-6 の定量 real-time PCR を行った。

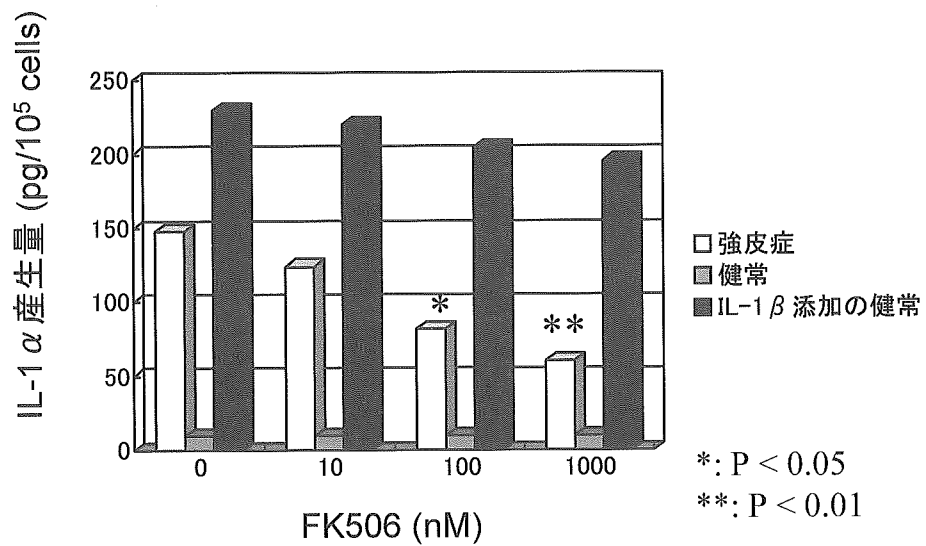


図2. タクロリムスの IL-1 α 産生におよぼす効果

種々の濃度のタクロリムスを培地に添加し、72時間培養後の細胞抽出液を回収した。IL-1 α を ELISA 法にて測定した。

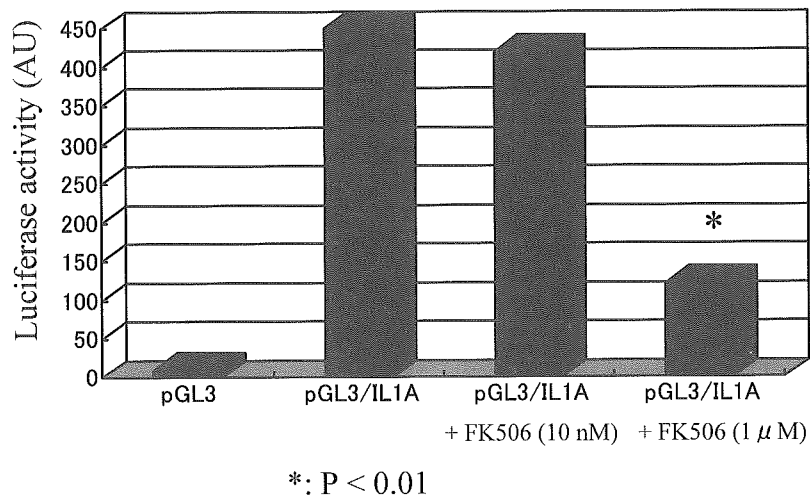
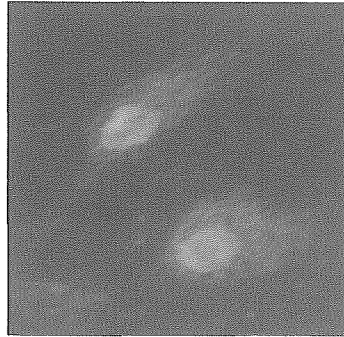


図3. タクロリムスの IL1A 転写活性におよぼす影響

IL1A 遺伝子の転写調節領域を含む 5'-flanking region を pGL3 に組み込み、強皮症線維芽細胞に遺伝子導入した。同時に、タクロリムスを添加した。48時間後の細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

FK506

無添加



1 μ M 添加

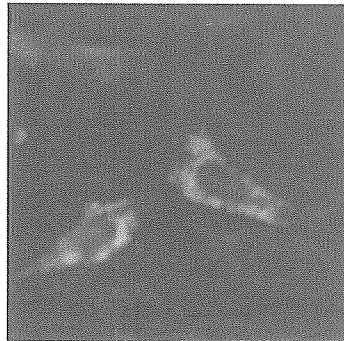


図4. FKBP8 の細胞内局在

強皮症線維芽細胞をタクロリムス1 μ M 添加群と非添加群を chamber slide にて作製し、24時間後に細胞を固定し、抗 FKBP8 抗体にて免疫染色をおこなった。

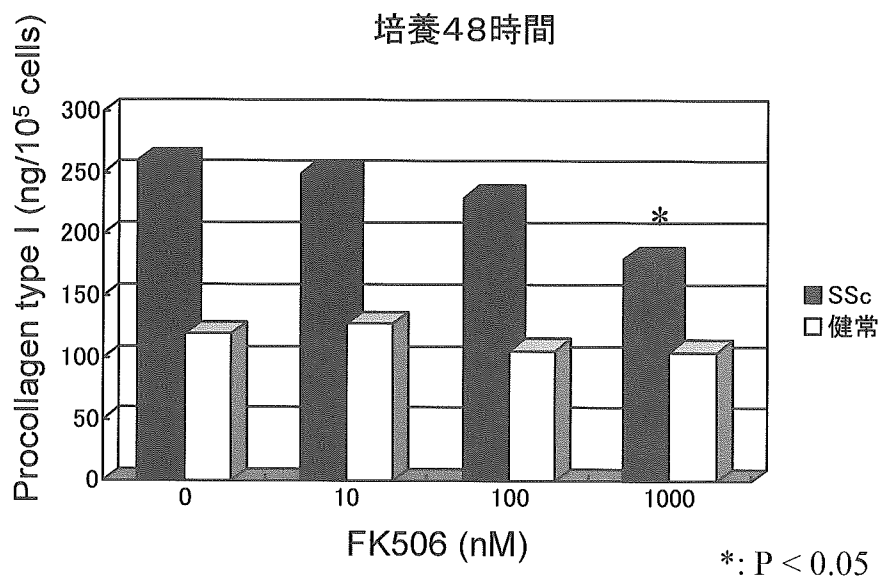


図5. 培養上清中プロコラーゲンの産生量

強皮症(SSc)および健常線維芽細胞をもちいて、種々の濃度のタクロリムス添加にて72時間培養した上清中プロコラーゲン量を、ELISA にて測定した。