

ーニングにてこの372マーカー中133マーカーが陽性であった。これらの陽性マーカー数は統計学的に期待される数よりも多かったが、これはPooled DNA typingに依存する実験的偽陽性と考えられた。

続いてIndividual typingにより推定アリル頻度を確定するとともに、実験的偽陽性を排除した。その結果、Pooled DNA typingでの陽性マーカー47個に絞り込んだ。さらにこの47個のマーカー中、有意な頻度差を示したアリルの頻度が5%未満のものは、疾患との関連性が低いと考え、今回の解析対象から除外し、残る23マーカー周辺を感受性領域と判断した。またこのIndividual typingにより見出された23個の陽性マーカーをBonferroni's correctionにより多重検定を補正したところ、7個のマーカー(D6S0588i, D6S0483i, D6S1061, D11S0497i, D6S0025i, D10S0168i, D14S0452i)により絞り込まれた(表1)。

これら7個のマーカーのうちD6S0588i, D6S0483i, D6S1061, D6S0025iのこれらの4マーカーはHLA領域である6p21.3にマップされた。またその他の3マーカー(D11S0497i, D10S0168i, D14S0452i)はそれぞれ11q13.4, 10p13, 14q23.1へマップされた。

引き続きこれらの領域内を詳細に絞り込み、最終的に感受性遺伝子を同定するために、SNP typingを実施した。この7個のマーカー近傍から、それぞれスペーシングが数キロベースに1個のSNPマーカーを配置できるよう、合計165個を厳選した。しかしながら、この165個中技術的な理由により124マーカーを解析対象とした。また、Pooled DNA typingにて用いた患者および健常者それぞれ375個体を使用した。実験の結果、このうち54マーカーが陽性であった。さらにデータの得られた124マーカーについて、EMアルゴリズムにて推定ハプロタイプ頻度を算出し、患者および健常者間で遺伝的関連解析を実施した(表2)。なおLDブロックもこのEMアルゴリズムにて推定した。

さらに、陽性となった54マーカーについて、患者および健常者それぞれ565検体追加し、SNP typingを実施した。合計1集団当たり940検体にて統計量を算出した。その結果、45個の陽性マーカーを獲得し、さらにBonferroni's correctionでの補正を加えた解

析では24個のSNPマーカーが陽性であった。次に表3に示した、6p21.3, 11q13.4, 10p13, 14q23.1の4つ領域別に結果を詳細に解説する。

HLA領域である6p21.3において27個の陽性SNPマーカーが得られ、すでに知られている2つの関連も再現された。さらに興味深いことに、同じHLA領域内に2つの新たな感受性遺伝子を発見した。それはNOTCH4遺伝子ならびにTenascin-XB (TNXB)遺伝子であった。これらはそれぞれ既知の感受性遺伝子であるHLA-DRB1から250kbおよび300kbの距離に位置していた(図2)。図5で各候補領域内のSNPアリルの関節リウマチとの関連を示した。上段は遺伝子地図を示した。第2段はSNPの物理位置を表し、関連を示したSNPを青いバーで示した。また矢印で陽性となった多型マイクロサテライトマーカーを示した。第3段はEMアルゴリズムで規定したLDブロックを緑色で、Clarkアルゴリズムで規定したLDブロックをオレンジ色で示した。最下段のグラフはP valueを対数スケールにて表示した。赤のスポットは各遺伝子のコード領域内に存在するSNPで、青のスポットはそれ以外の領域にマップされるSNPを示した。

NOCTH4遺伝子はNOTCH transmembrane receptorsファミリーに属し、EGF(epidermal growth factor)リピートを有している。この遺伝子は、細胞増殖および分化に関与すると考えられている。NOCTH4遺伝子内に9個の関節リウマチと関連するSNPがあり、このうち2個がアミノ酸非同義置換を示すものであり、さらにこの1個のSNP(rs2071282)がこの9個の中でもっとも強い関節リウマチとの関連を示した($P=1.1 \times 10^{-11}$; $P_c=5.8 \times 10^{-10}$)。またこのSNPは第4エクソンに存在し、変異によりアミノ酸203番目のロイシンをプロリンへ置換させるものであった。一方、もう1つのSNP(rs915894) ($P=0.001$, $P_c=0.052$)は第3エクソンに存在し、その変異によりアミノ酸116番目のリジンをグルタミン酸へ置換させるものであった。TNXB遺伝子は34個のファイブロネクチンと18個のEGFリピートを有している、巨大な細胞外マトリックスをコードしている。TNXB遺伝子内に5個の関節リウマチと関連を示すSNPがあり、そのうち4個のSNP

の変異がアミノ酸非同義置換を示すものであった。さらにこの中で第 10 エクソンに存在する SNP rs185819 が最も強い関連を示した ($P=3.7 \times 10^{-5}$; $P_c=1.9 \times 10^{-3}$)。この SNP は変異によりアミノ酸 1248 番目のヒスチジンをアルギニンへと置換させるものであった。その他の関節リウマチと関連する SNP では、rs2075563 は第 29 エクソンに存在し変異によりグルタミン酸をリジンへ、rs2269428 は第 21 エクソンに存在し変異によりヒスチジンをプロリンへ、rs3749960 は第 20 エクソンに存在し変異によりフェニルアラニンをチロシンへそれぞれ置換させるものであった。

さらにハプロタイプ解析により、IkBL、NOTCH4、TNXB 遺伝子の結果が支持された。また、各遺伝子上にある 1 つの SNP よりも強いリスクを持つような、共通するハプロタイプは観察されなかった。

11q13.4 には 8 個の遺伝子 (MRPL48, UCP2, UCP3, RAB6A, FLJ11848, LOC374407, DKFZP586P0123, PLEKHB1) が存在している。MRPL48 遺伝子は哺乳類のミトコンドリア・リボゾームプロテインとの相同性が示唆されている。UCP2 および UCP3 遺伝子はミトコンドリア内膜でのトランスポータータンパクをコードしている。FLJ11848 遺伝子は細胞間インタラクションに関与する WD40 リピートを持つ。LOC374407 遺伝子は HSP40 遺伝子と相同性があり、また構造的にアポトーシスと関連するタンパクと類似性がある。DKFZP586P0123 遺伝子は 1 つのプロテインキナーゼ C の保存された領域を持つ。PLEKHB1 遺伝子はプロテインキナーゼの基質になる pleckstrin を含むタンパクをコードしている。

これらの遺伝子には 25 個の SNP が存在し、この内 15 個の SNP で統計学的に有意なマーカーであった。最も、またその次に有意であった関連を示す SNP はそれぞれ MRPL48 遺伝子の 5' UTR に位置する rs1792174 ($P=0.00045$)、さらに同じ MRPL48 遺伝子の第 3 インtron に位置する rs1792160 ($P=0.00035$) であった。MRPL48 遺伝子はその他にも有意なマーカーが 2 個存在し、第 5 インtron に位置する rs1792193

($P=0.0076$)、さらに 3' UTR に位置する rs1051090 ($P=0.0075$) であった。陽性 SNP は UCP2, UCP3, RAB38, FLJ11848 のそれぞれの遺伝子にも観察された。しかしながら、MRPL48 と FLJ11848 遺伝子に含まれる LD ブロック 'b2' には 1 つしか共通するハプロタイプが無く、このハプロタイプは MRPL48 遺伝子で観察された SNP の関連と同程度の強さの関連を示していた (図 2)。さらに MRPL48 遺伝子で検出された陽性 SNP のみが Bonferroni's correction でも統計学的有意性を保持していた。これらの結果よりこの領域に関して MRPL48 遺伝子が感受性遺伝子であると判断された。

10p13 には二つの遺伝子が存在している。1 つは機能不明の DKFZP761F241 遺伝子。もう 1 つは緑内障の発達に関与し視覚神経障害を誘導するタンパクをコードしている OPTN 遺伝子である。有意な関連を示した SNP は DKFZP761F241 遺伝子上に 1 つあるのみであるため、この遺伝子が感受性遺伝子であると考えられた。

14q23.1 に存在する遺伝子は 1 つで、神経内分泌に関与するタンパクグループの 1 つである reticulon 1 遺伝子であった。有意であった SNP はこの遺伝子上に 1 つで、第 3 インtron に位置する rs2182138 で、Bonferroni's correction にて補正後も有意な関連を示していた。

D. 結論

ゲノムワイドなマイクロサテライトを用いた関連解析により、新たに NOTCH4 遺伝子、Tenascin-XB 遺伝子、MRPL48 遺伝子、DKFZP761F241, reticulon 1 遺伝子、計 5 個の関節リウマチ感受性遺伝子を遺伝学的に同定した。また既知の感受性遺伝子である DRB1 遺伝子ならびに IkBL 遺伝子についても追試に成功し、今回の解析により合計 7 個の感受性遺伝子を同定することに成功した。

今後は同様なストラテジーにより強皮症感受性遺伝子同定へ向け解析に着手し、まずは感受性領域の特定を目指す予定である。今回、関節リウマチの感受性

領域は 47 個見出しているが、時間やコストの問題ですべてを詳細に検証できていない。しかし強皮症の解析によりオーバーラップする領域が見出された場合、即座に SNP など詳細に遺伝子マッピングすることが可能と考えられる。最終的には相互の疾患で見出された感受性遺伝子の相互作用を解析することにより、自己免疫疾患ならびに膠原病としての強皮症の発症原因を総合的に解明できると考えられる。

E. 文献

- 1) Silman AJ, Hochberg MC.: Epidemiology of the Rheumatic Diseases. Oxford University Press, 1993
- 2) 住田孝之: 関節リウマチの診断基準・病型分類・重症度 内科 2000 ; 85:1448-51.
- 3) Harvey J, Lotze M, Stevens MB, Lambert G, Jacobson D.: Rheumatoid arthritis in a Chippewa Band. I. Pilot screening study of disease prevalence. Arthritis Rheum. 1981 May;24(5):717-21.
- 4) Silman AJ, Ollier W, Holligan S, Birrell F, Adebajo A, Asuzu MC, Thomson W, Pepper L.: Absence of rheumatoid arthritis in a rural Nigerian population. J Rheumatol. 1993 Apr;20(4):618-22.
- 5) Ollier WE, MacGregor A.: Related Articles Genetic epidemiology of rheumatoid disease. Br Med Bull. 1995 Apr;51(2):267-85.
- 6) Spector TD, Perry LA, Tubb G, Silman AJ, Huskisson EC.: Low free testosterone levels in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1988 Jan;47(1):65-8.
- 7) Da Silva JA, Larbre JP, Spector TD, Perry LA, Scott DL, Willoughby DA.: Protective effect of androgens against inflammation

induced cartilage degradation in male rodents. Ann Rheum Dis. 1993 Apr;52(4):285-91.

- 8) Vyse TJ, Todd JA.: Genetic analysis of autoimmune disease. Cell. 1996 May 3;85(3):311-8.
- 9) Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J.: Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. J Rheumatol. 1986 Oct;13(5):899-902.

F. 研究発表

- 1) Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. Hum Mol Genet. 2006 Apr 1;15(7):1151-8.
- 2) Reinders J, Rozemuller EH, van der Weide P, Oka A, Slootweg PJ, Inoko H, Tilanus MG. Genes in the HLA region indicative for head and neck squamous cell carcinoma. Mol Immunol. 2000 Feb;44(5):848-55.
- 3) Kawashima M, Tamiya G, Oka A, Hohjoh H, Juji T, Ebisawa T, Honda Y, Inoko H, Tokunaga K. Genomewide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. Am J Hum Genet. 2006 Aug;79(2):252-63.

G. 知的所有権の出願・登録状況 なし

表1 Individual typingにより検出された23個の陽性マーカー

Markers	Cytobands	Number of allele	Positive allele	Allele frequencies		Fisher's exact P values				Odds Ratio	
				Control	Case	2x2	PC	2xm	PC	Ratio	95%CI
D6S0588i	6p21.3	10	5	0.430	0.572	0.00000055	0.000014	0	0	1.78	1.45 - 2.18
D6S0483i	6p21.3	18	7	0.089	0.176	0.00000092	0.00024	0	0	2.18	1.59 - 2.98
D6S1061	6p21.3	24	16	0.095	0.183	0.000001	0.00026	0	0	2.14	1.57 - 2.90
D11S0497i	11q13.4	5	2	0.513	0.613	0.000031	0.008	0.00052	0.012	1.55	1.26 - 1.91
D6S0025i	6p21.3	6	2	0.125	0.185	0.002	0.51	0.0005	0.012	1.59	1.20 - 2.11
D10S0168i	10p13	4	2	0.406	0.499	0.0005	0.13	0.001	0.024	1.44	1.18 - 1.77
D14S0452i	14q23.1	9	4	0.370	0.452	0.001	0.26	0.0006	0.014	1.40	1.14 - 1.72
D8S0127i	8q13.3	16	3	0.116	0.069	0.002	1	0.009	0.25	0.57	0.40 - 0.81
D7S0086i	7p21.1	11	4	0.095	0.053	0.002	1	0.03	0.75	0.54	0.36 - 0.80
D10S0607i	10q26.13	5	1	0.827	0.882	0.003	1	0.02	0.5	1.59	1.19 - 2.14
D13S0561i	13q31.1	10	8	0.130	0.183	0.005	1	0.16	1	1.50	1.13 - 2.00
G08462	5q14.1	9	4	0.190	0.136	0.005	1	0.09	1	0.67	0.51 - 0.89
D16S0496i	16q12.2	10	7	0.204	0.267	0.005	1	0.07	1	1.41	1.11 - 1.79
D5S0228i	5q12.1	11	7	0.305	0.371	0.004	1	0.02	0.5	1.35	1.09 - 1.67
D5S400	5q34	18	2	0.063	0.101	0.008	1	0.03	0.75	1.69	1.15 - 2.46
D6S0811i	6q22.33	6	3	0.445	0.515	0.008	1	0.01	0.25	1.31	1.07 - 1.61
D20S910	20p12.1	14	7	0.301	0.365	0.009	1	0.18	1	1.34	1.08 - 1.66
D4S0017i	4q25	22	5	0.071	0.111	0.009	1	0.12	1	1.64	1.14 - 2.35
D16S0232i	16q24.1	4	2	0.444	0.380	0.01	1	0.06	1	0.77	0.63 - 0.95
D3S1500i	3p24.3	4	1	0.781	0.725	0.01	1	0.005	0.13	0.74	0.58 - 0.94
D20S470	20p12.1	14	7	0.111	0.073	0.02	1	0.59	1	0.64	0.45 - 0.91
DXS0486i	Xq25	8	1	0.116	0.090	0.09	1	0.19	1	0.68	0.51 - 1.04
D18S0090i	18q12.1	20	13	0.193	0.153	0.05	1	0.54	1	0.76	0.58 - 0.99

表2 関節リウマチと相関するLDブロックならびにハプロタイプ

Block*	Cytobands	name	size (kb)	SNPs		Included genes	Number of SNPs	Number of haplotype	Positive haplotype	Haplotype frequencies			Fisher's exact P values		Odds Ratio		
				end	start					name	Control	95%CI	Case	95%CI	2x2	PC	Ratio
6p21.3	a1	8.28	rs2071595	-	rs2071592	BAT1-ikBL	5	5	4	0.074	0.055-0.093	0.028	0.018-0.040	0.000033	0.0037	0.35	0.21-0.59
	a2	0.04	rs2239708	-	rs2071591	IKBL	2	3	1	0.451	0.415-0.485	0.495	0.459-0.531	0.10	1	1.19	0.97-1.46
	a3	19.03	rs2289475	-	rs1046089	BAT2	3	4	4	0.008	0.003-0.015	0.012	0.005-0.020	0.45	1	1.51	0.93-4.26
	a4	127.07	rs2242658	-	rs707929	BAT3-C6orf27	10	11	4	0.072	0.056-0.090	0.030	0.019-0.041	0.00014	0.016	0.39	0.23-0.64
	a5	4.13	rs2242688	-	rs2075800	LSM2-HSPA1L	2	3	3	0.126	0.102-0.150	0.089	0.070-0.109	0.024	1	0.88	0.49-0.94
	a6	58.45	rs2242569	-	rs429150	TNKB	9	9	2	0.362	0.326-0.399	0.264	0.232-0.298	0.000046	0.0051	0.63	0.50-0.78
	a7	9.75	rs206018	-	rs2849012	NOTCH4	2	3	1	0.673	0.640-0.708	0.774	0.745-0.805	0.000015	0.0017	1.66	1.32-2.09
	a8	0.85	rs422951	-	rs415929	NOTCH4	8	3	3	0.103	0.083-0.126	0.203	0.175-0.231	0.00000010	0.000011	2.20	1.64-2.95
	a9	0.02	rs915894	-	rs443198	NOTCH4	2	4	2	0.493	0.480-0.531	0.432	0.400-0.465	0.020	1	0.78	0.64-0.96
	DRB1	0.28	rs2308754	-	rs1141742	DRB1	64	29	*0405	0.129		0.276		0.0000000000013	0.00000000014	2.67	2.04-3.49
a10	16.35	rs2071798	-	rs2071550	DQB2	3	4	4	0.089	0.052-0.089	0.025	0.014-0.037	0.000077	0.0088	0.35	0.20-0.60	
11q13.4	b1	6.86	rs2008734	-	rs8590	PLEKHB1	2	3	2	0.412	0.376-0.447	0.479	0.445-0.513	0.011	1	1.31	1.07-1.61
	b2	139.37	rs1792174	-	rs935985	MRPL48 - FLJ11848	8	6	1	0.600	0.461-0.533	0.595	0.565-0.629	0.00019	0.021	1.48	1.21-1.82
	b3	4.89	rs565717	-	rs680339	UCP2	2	2	2	0.454	0.417-0.489	0.535	0.501-0.569	0.0027	0.31	1.38	1.12-1.69
	b4	9.02	rs688514	-	rs2075577	UCP3	2	3	2	0.352	0.320-0.387	0.273	0.240-0.308	0.0010	0.11	0.69	0.55-0.86
	b5	17.81	rs898650	-	rs1527302	DKFZP596P0123	2	3	2	0.353	0.320-0.388	0.267	0.238-0.297	0.00044	0.049	0.67	0.54-0.84
10p13	c1	3.89	rs1947979	-	rs571068		2	4	3	0.175	0.150-0.203	0.120	0.097-0.145	0.0035	0.39	0.64	0.48-0.88
	c2	6.07	rs2244380	-	rs765884	OPTN	2	3	3	0.101	0.079-0.123	0.121	0.100-0.145	0.25	1	1.22	0.89-1.69
	c3	13.64	rs999999	-	rs1324252	OPTN	2	3	3	0.039	0.027-0.052	0.047	0.032-0.063	0.52	1	1.22	0.74-2.01
14q23.1	d1	28.88	rs1952043	-	rs2182138	RTN1	3	5	3	0.207	0.180-0.238	0.158	0.133-0.185	0.014	1	0.72	0.55-0.93
	d2	19.22	rs927326	-	rs2084992	RTN1	2	4	2	0.457	0.423-0.493	0.509	0.472-0.545	0.050	1	1.23	1.01-1.51

厚生労働科学研究費補助金（難治疾患克服研究事業）
分担研究報告書

皮膚線維化における TGF- β 、CTGF と c-Myc、Miz1 との関連

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

研究要旨

皮膚線維芽細胞において、Transforming growth factor- β (TGF- β)と Connective tissue growth factor (CTGF) 影響下での Collagen1A2 (COL1A2)の発現と c-Myc との関連を正常細胞と強皮症細胞で比較した。COL1A2 の発現は TGF- β 単独より CTGF との同時刺激において両細胞で有意に上昇した。また c-Myc の発現は正常細胞では両リガンドの同時刺激で発現が低下したが強皮症細胞では逆に上昇した。また Miz1 の発現は強皮症細胞では同時刺激にて低下したが、正常細胞では変化がみられなかった。COL1A2 の転写活性は c-Myc で抑制されるが、Miz1 によりさらに抑制された。また、Miz1 の発現は強皮症細胞での同時刺激で低下していた。以上より TGF- β と CTGF による COL1A2 の発現には c-Myc, Miz1 が関連しており、正常細胞と強皮症細胞では両者の発現の違いにより COL1A2 が上昇することが示された。

A. 研究目的

強皮症の線維化は、TGF- β により Smad を中心としたシグナルが活性化され、Smad や様々な転写因子が COL1A2 の転写を活性化し、その発現が上昇することが一因とされている。一方で線維化病変には CTGF が発現し、また、CTGF は TGF- β により誘導されることから我々は両リガンドが線維化に関連している可能性を考えた。そこでマウスの皮下に TGF- β や CTGF を注入することで肉芽組織を形成する系を確立し、COL1A2 の発現を調べたところ、TGF- β のみでは生じた肉芽が数日以内に消失する

のに対して、TGF- β と CTGF を同時に注入すると形成された肉芽が持続した(1)。今回我々は TGF- β と CTGF の COL1A2 上昇に対して、シグナルや転写因子について in vitro で検討した。

B. 研究方法

1) 細胞の培養

正常皮膚線維芽細胞、強皮症皮膚線維芽細胞は皮膚生検にて採取したものを患者の同意を得て用いた。細胞は 10%BSA、および 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin を加えた high-glucose DMEM

培地 (Sigma-Aldrich) でそれぞれ維持し、3-6 passage の細胞を用いた。NIH3T3 細胞は low glucose DMEM 培地 (Sigma-Aldrich)、10% BSA、100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin で培養した。TGF- β 1 は R&D Systems より、CTGF は日本農産より購入した。

2) ルシフェラーゼアッセイ

細胞に FuGENE6 transfection reagent (Roche Diagnostics) を用いて c-Myc, Miz-1 と COL1A2 promoter を発現させた。transfection と同時に TGF- β 1 (5ng/ml) と CTGF (150ng/ml) を刺激し 24 時間後に回収し、luciferase reporter assay system (Promega) を用いて解析した。

3) Quantitative TaqMan RT-PCR

細胞に TGF- β 1 と CTGF を刺激してから 24 時間後に、RNeasy (Qiagen) を用いて回収し、Reverse Transcription System (Promega) を用いて cDNA にした。COL1A2, c-Myc, β -actin の発現は Assays-on-Demand Gene Expression probes (Applied Biosystems) を用いて解析した。

4) Western blotting, Immunoprecipitation

細胞は氷冷PBS(-)で2回洗った後、lysis buffer (20 mM Tris-Hcl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM EDTA, 1% proteinase inhibitor (Roche Applied Science))にて可溶化した。細胞溶液は 30分間 4℃でインキュベートしたのち 15000 rpmにて20分遠心し、上清を実験に用いた。調製したサンプルは Bradford

法で蛋白定量した。その後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に (SDS-PAGE) より分離後、セミドライ法により PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを TBS-tween で希釈した5% skim milk でインキュベーションした後、それぞれ適した濃度で1次抗体を加え一晩インキュベーションした。TBS-tween で3回洗浄した後、TBS-tween で10000倍に希釈した2次抗体を加え30分インキュベーションした。

これを TBS-tween で3回洗浄した後 enhanced chemiluminescence (Bio-Rad) を用いてバンドを検出した。抗リン酸化 Smad2 抗体は筑波大学伊東進先生よりいただいた。また、および抗リン酸化 Smad1/3 抗体、抗Smad2/3 抗体は Cell Signaling Technology、抗c-Myc 抗体、抗Miz1抗体は Santa Cruz Biotechnology、 α -Tubulin抗体は Sigma-Aldrich から購入して使用した。

C. 研究結果

1) COL1A2 の転写

NIH3T3 に TGF- β を刺激すると濃度に応じて COL1A2 の luciferase activity の上昇を認め、c-Myc を強制発現すると抑制された (Figure 1A)。また、TGF- β と CTGF との同時刺激にて COL1A2 の持続的転写活性の上昇がみられたが、c-Myc にて抑制された (Figure 1B)。

2) 線維芽細胞における COL1A2, c-Myc の発現

正常細胞に TGF- β と CTGF を刺激すると、TGF- β のみでの COL1A2 の mRNA の上昇が、CTGF との同時刺激にて発現上昇が持続した

(Figure2A)。一方で c-Myc は TGF- β では変化がみられないが、CTGF との同時刺激で発現が低下した(Figure2B)。この結果は蛋白レベルでも同様であった(Figure2C)。また Smad2,3 は TGF- β と CTGF の両方の同時刺激にてより強くリン酸化していた(Figure2C)。一方で強皮症細胞では正常細胞と同様に両リガンドの同時刺激で COL1A2 の発現が上昇していたが、c-Myc の発現は mRNA でも蛋白レベルでも上昇していた。一方で Smad2,3 のリン酸化は TGF- β 単独と TGF- β と CTGF の両方の同時刺激にて差をみとめなかった (Figure3)。

3) Miz1 と COL1A2 との関連、線維芽細胞での発現

c-Myc と Miz1 の発現による、COL1A2 の転写活性を調べた。c-Myc, Miz1 単独では COL1A2 の転写活性に変化はないが、両方の強発現にて抑制された (Figure4A)。また強皮症細胞では TGF- β と CTGF の同時刺激において Miz1 の持続的発現低下を認めたが、正常細胞では変化がなかった(Figure4B)。

D. 考案

TGF- β による COL1A2 の上昇は Smads(2, 3)、Sp-1(4)等が関連していることが知られている。今回我々は c-Myc が線維芽細胞にて Collagen の発現に関与することから(5)、TGF- β と CTGF における COL1A2 の上昇に c-Myc が関連している可能性を考えた。また、c-Myc の target gene に対して抑制的にはたらくことが知られている Miz1 の発現も同時に検討した。その結果、TGF- β と CTGF の両方の同時刺激によ

る COL1A2 の上昇を c-Myc が抑制した。よって、両リガンドによる COL1A2 の発現には c-Myc が関連している可能性が考えられた。次に正常細胞と強皮症細胞で、Smad 2,3 のリン酸化と c-Myc, Miz1 の発現を比較すると、両細胞で TGF- β と CTGF の同時刺激で COL1A2 の発現が持続的に上昇した。正常細胞では Smad の持続的リン酸化とともに c-Myc は発現が低下したが、Miz1 は変化がなかった。一方で強皮症細胞では Smad のリン酸化には TGF- β のみと TGF- β と CTGF の同時刺激では差を認めなかったが、c-Myc は上昇し、Miz1 は低下した。これらのことから正常細胞では Smad のリン酸化により c-Myc が低下することにより COL1A2 が上昇する可能性が考えられた。一方で強皮症細胞では Smad のリン酸化とともに c-Myc が増加し、同時に Miz1 が低下することが重要である可能性が考えられた。c-Myc は強皮症細胞にて正常細胞より発現が mRNA レベルで上昇することが以前から知られているが、その作用は細胞増殖が主な作用であると考えられてきた。しかし今回の結果で COL1A2 の発現にも関与している可能性が示された。しかし強皮症の c-Myc の発現には Smad だけでは説明できず、今後の検討が必要であると考えられる。

E. 結論

正常細胞では c-Myc が低下することにより COL1A2 が上昇する可能性が考えられた。一方で強皮症細胞では c-Myc が増加し、同時に Miz1 が低下することが、COL1A2 の発現に関与する可能性が示された。

F. 文献

1. 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.
2. Chen SJ, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M, Varga J. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. *J Invest Dermatol* 1999;112(1):49-57.
3. Chen SJ, Yuan W, Lo S, Trojanowska M, Varga J. Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human alpha2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF-beta. *J Cell Physiol* 2000;183(3):381-92.
4. Tamaki T, Ohnishi K, Hartl C, LeRoy EC, Trojanowska M. Characterization of a

GC-rich region containing Sp1 binding site(s) as a constitutive responsive element of the alpha 2(I) collagen gene in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1995;270(9):4299-304.

5. 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

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

AMERICAN COLLEGE OF
RHEUMATOLOGY (2006)

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

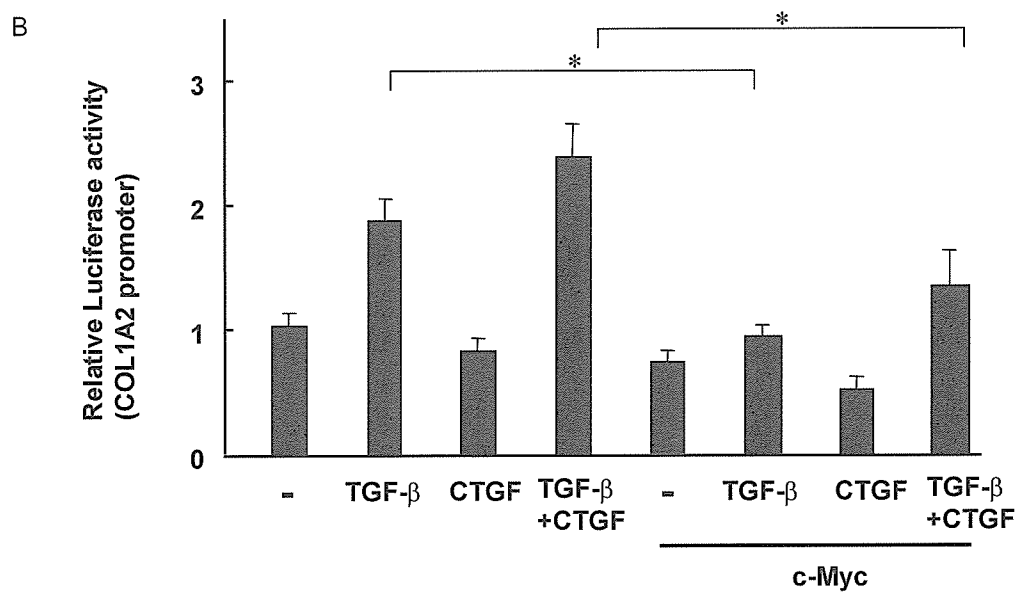
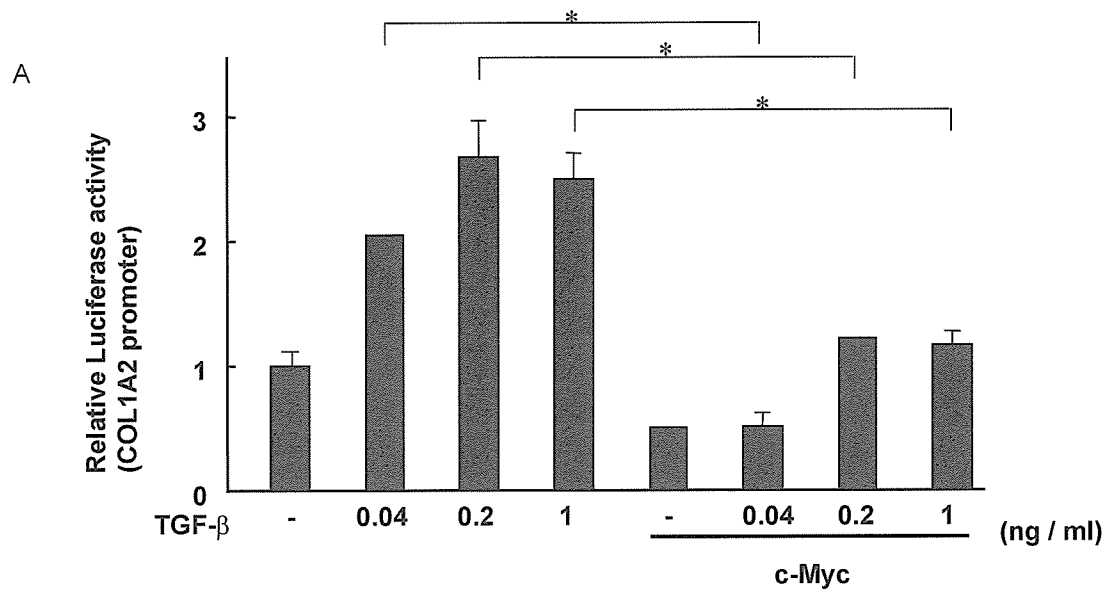


図1: TGF- β 単独、もしくはTGF- β , CTGF刺激におけるCOL1A2のルシフェラーゼ活性とc-Mycとの関連。

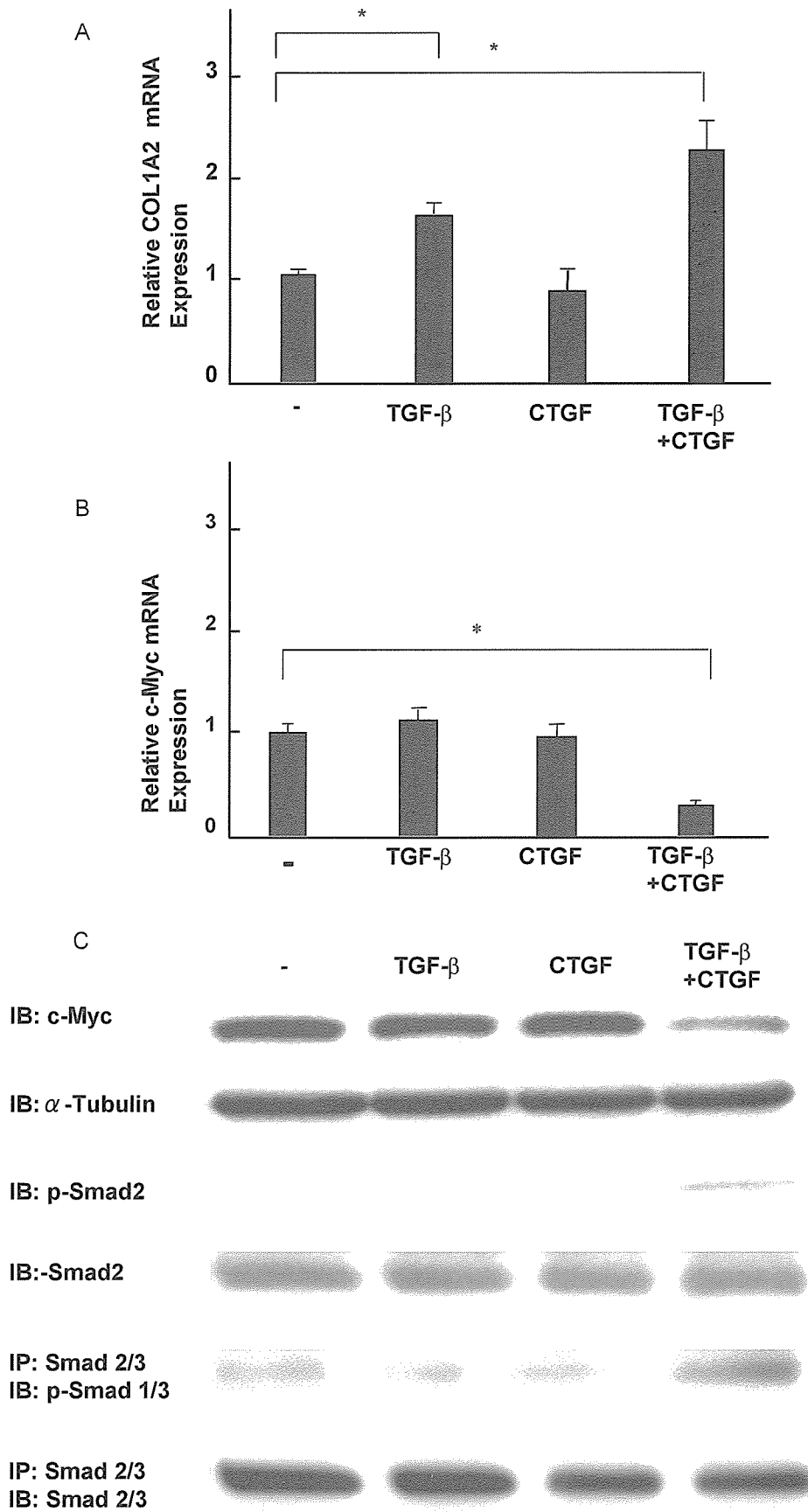


図2： 正常線維芽細胞におけるTGF- β ，CTGF刺激におけるCOL1A2、c-Mycの発現、Smad2/3のリン酸化。

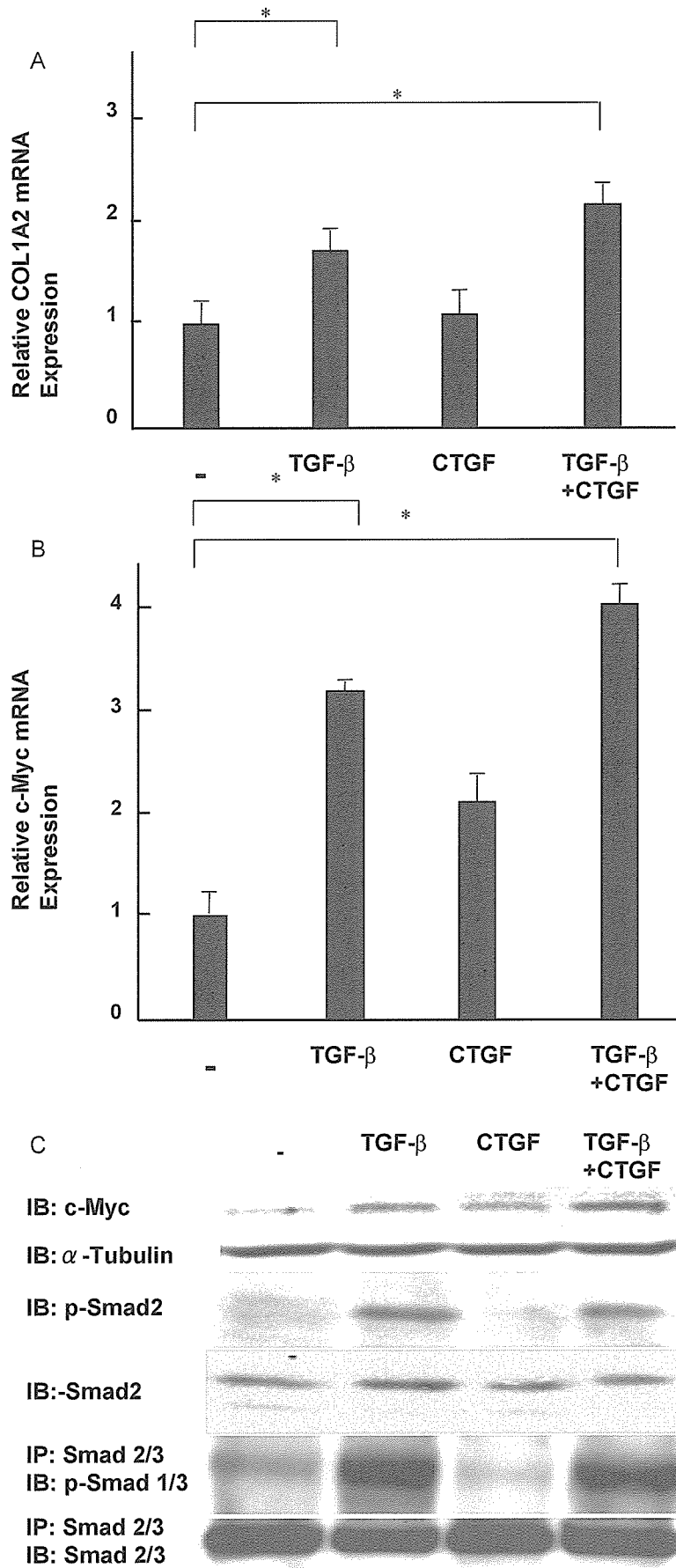


図3: 強皮症線維芽細胞におけるTGF-β, CTGF刺激におけるCOL1A2、c-Mycの発現、Smad2/3のリン酸化。

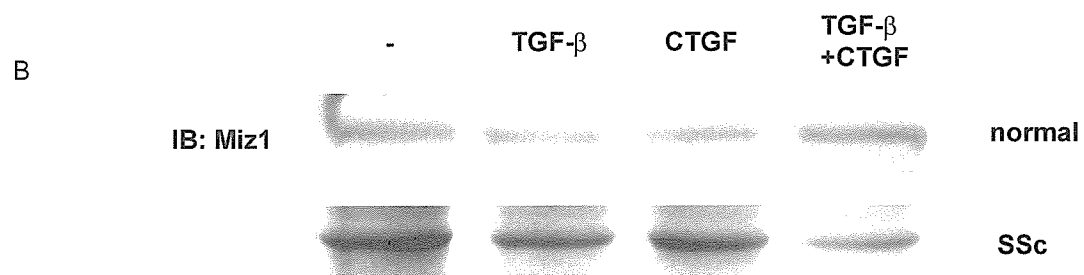
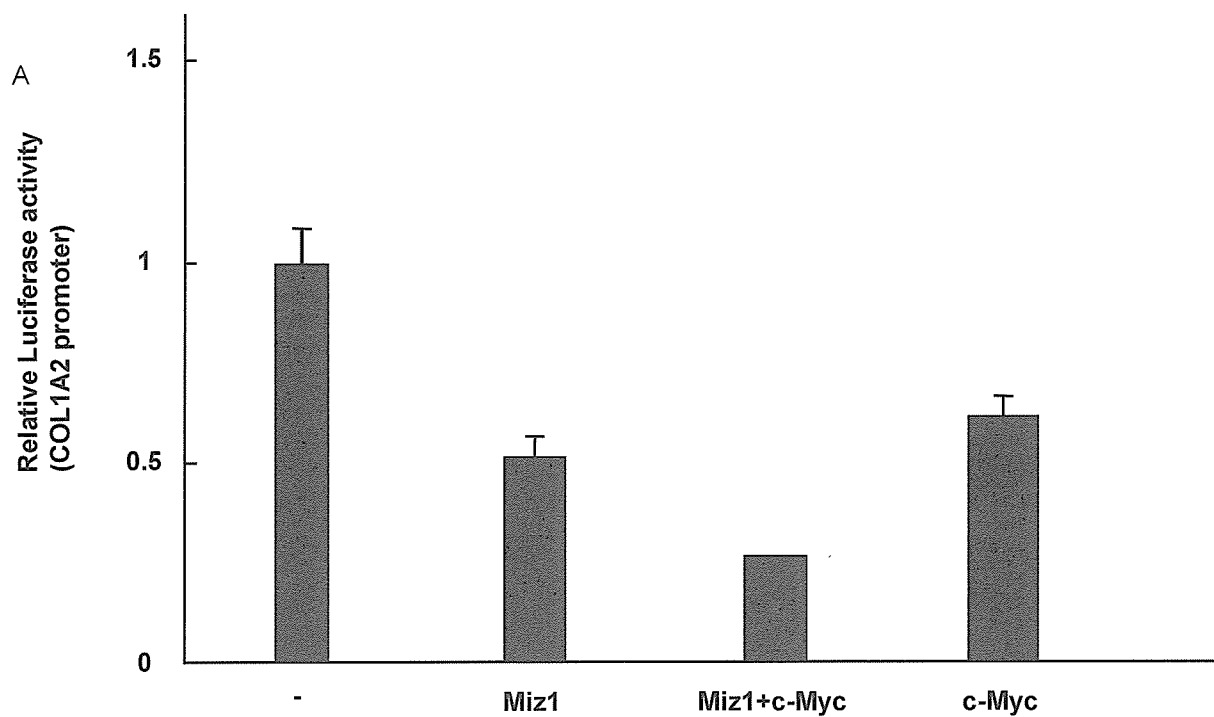


図4: c-Myc, Miz1とCOL1A2のルシフェラーゼ活性との関連。また、正常細胞と強皮症細胞でのMiz1の発現の比較。

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

汎発性強皮症皮膚線維芽細胞における p38 MAPK の
リン酸化及び活性化について

分担研究者 尹 浩信 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学教授
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 (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、病変部線維芽細胞における I 型コラーゲンや fibronectin などの細胞外マトリックスの過剰産生がその病態形成の中心であり、その異常には TGF- β 情報伝達の異常が関与すると考えられている。近年 TGF- β 情報伝達の下流として p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) の関与も知られるようになってきた。今回我々は、SSc 線維芽細胞における p38 MAPK のリン酸化、活性化およびその細胞外マトリックス過剰産生の関与について検討した。p38 MAPK は SSc 線維芽細胞において恒常的にリン酸化および活性化し、p38 MAPK 阻害剤あるいは dominant negative p38 MAPK は SSc 線維芽細胞における I 型コラーゲンや fibronectin の産生、転写活性を阻害し、SSc 線維芽細胞における細胞外マトリックス過剰産生に p38 MAPK の恒常的なリン酸化および活性化が関与していると考えられた。

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、病変部線維芽細胞における I 型コラーゲンや fibronectin などの細胞外マトリックスの過剰産生がその病態形成の中心であり、その異常には TGF- β 情報伝達の異常が関与すると考えられている (1, 2)。TGF- β 情報伝達には Smad2、Smad3、Smad4 や p300/CBP が関与

することがよく知られているが、近年 p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) の関与も知られるようになってきた。

p38 MAPK は炎症性サイトカイン、ホルモン、熱刺激などのストレス刺激によって活性化される情報伝達物質であり、MKK3/6、TAK1 の下流に存在し、ATF-2、ELK-1、Sap1a、MEF2C、Max、MAPKAPK2/3、MNK1/2 などの上流に位置することが知られている。p38 MAPK には α 、 β 、 γ 、 δ の

4つのアイソザイムが存在し、p38 MAPK α 、 β はほとんど全ての種類の細胞に発現し、p38 MAPK γ は主に筋に発現し、p38 MAPK δ は肺、腎、前立腺、脾臓に存在し、また皮膚線維芽細胞には p38 MAPK α 、 β が存在することが知られている。

今回我々は、SSc 線維芽細胞における p38 MAPK のリン酸化、活性化およびその細胞外マトリックス過剰産生の関与について検討した。

B. 材料と方法

免疫プロット法 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 のヒト $\alpha 2(I)$ 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

リン酸化した p38 MAPK を認識する抗体を用いた免疫プロット法にて p38 MAPK のリン酸化の程度を正常ヒト皮膚培養線維芽細胞と SSc 皮膚培養線維芽細胞において検討した。図 1 に示すように程度の差があるものの SSc 皮膚培養線維芽細胞においては p38 MAPK のリン酸化が

亢進していることが確認された。さらに酵素活性を検討するために p38 MAPK in vitro kinase assay を行った (図 2)。リン酸化した p38 MAPK を認識する抗体を用いた免疫プロット法の結果と一致して、図 2 に示すように程度の差があるものの SSc 皮膚培養線維芽細胞においては p38 MAPK の酵素活性が亢進していることが確認された。

次に SSc 皮膚培養線維芽細胞における p38 MAPK のリン酸化の亢進、酵素活性の亢進の意義を明らかにするため、p38 MAPK 阻害剤存在下での細胞外マトリックスの発現を検討した。図 3 に示すように p38 MAPK 阻害剤存在下では、正常ヒト皮膚培養線維芽細胞の I 型コラーゲン産生能はほとんど変化なかったが、SSc 皮膚培養線維芽細胞の I 型コラーゲン産生能は、p38 MAPK 阻害剤によって濃度依存性に阻害された。また図 4 に示すように p38 MAPK 阻害剤存在下では、正常ヒト皮膚培養線維芽細胞の fibronectin 産生能はほとんど変化なかったが、SSc 皮膚培養線維芽細胞の fibronectin 産生能は、p38 MAPK 阻害剤によって濃度依存性に阻害された。

SSc 皮膚培養線維芽細胞における I 型コラーゲンの過剰発現は転写レベルで制御されているためヒト $\alpha 2(I)$ collagen promoter 領域を含んだ CAT vector を用いた CAT assay を行い、コラーゲン遺伝子転写活性について検討した。図 5 に示すように、正常ヒト皮膚培養線維芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子転写活性は p38 MAPK 阻害剤 (SB212090、SB203580) 存在下でも MEK 阻害剤 (PD98059) 存在下でもほとんど変化なかったが、SSc 皮膚培養線維芽細胞の I 型コラー

ゲン遺伝子転写活性は、p38 MAPK 阻害剤によって濃度依存性に阻害された。

また dominant negative p38 MAPK を一過性過剰発現することによってさらに特異的に p38 MAPK 情報伝達経路を阻害して I 型コラーゲン遺伝子転写活性を検討した。図 6 に示すように、正常ヒト皮膚培養線維芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子転写活性は dominant negative ERK 一過性強発現しても、dominant negative p38 MAPK 一過性強発現してもほとんど変化なかったが、SSc 皮膚培養線維芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子転写活性は、dominant negative ERK 一過性強発現にてほとんど変化なかったが、dominant negative p38 MAPK α 、dominant negative p38 MAPK β 、によって濃度依存性に阻害された。

この結果より、p38 MAPK は SSc 線維芽細胞において恒常的にリン酸化および活性化し、I 型コラーゲンや fibronectin などの過剰産生に関与していると考えられた。

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

Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Increased phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase p38 in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 125: 247-255, 2005.

2. 学会発表

第 798 回 日本皮膚科学会東京地方会（研究地方会）

F. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

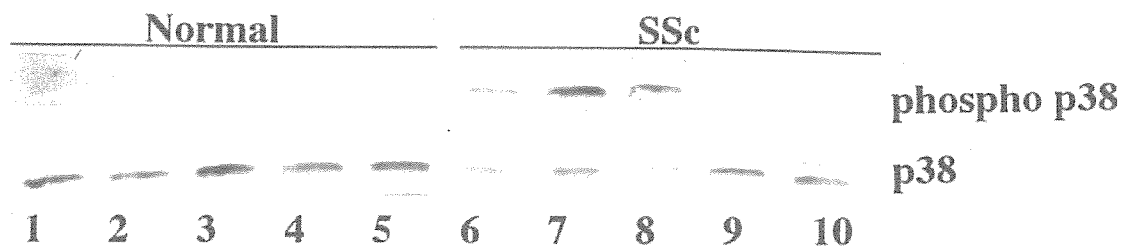


図1. 免疫ブロット法によるp38 MAPKのリン酸化の程度。

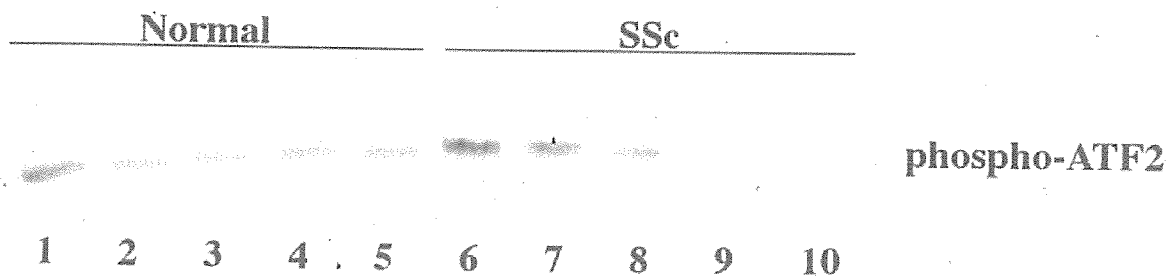


図2. p38 MAPKのin vitro kinase活性。

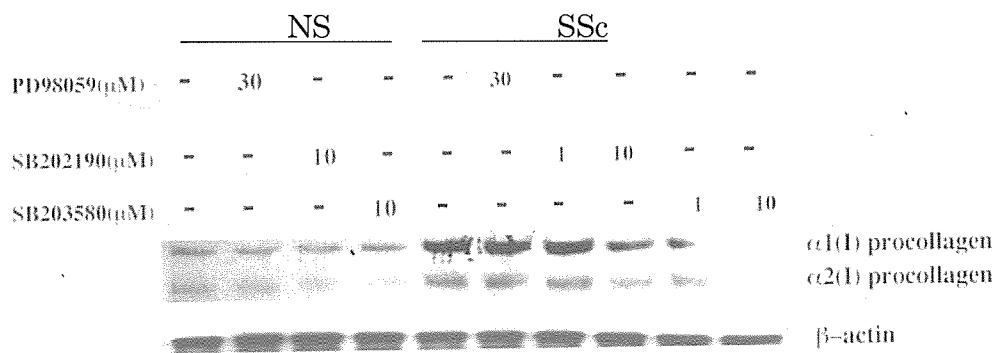


図3. p38 MAPK阻害剤存在下でのI型コラーゲンの発現。

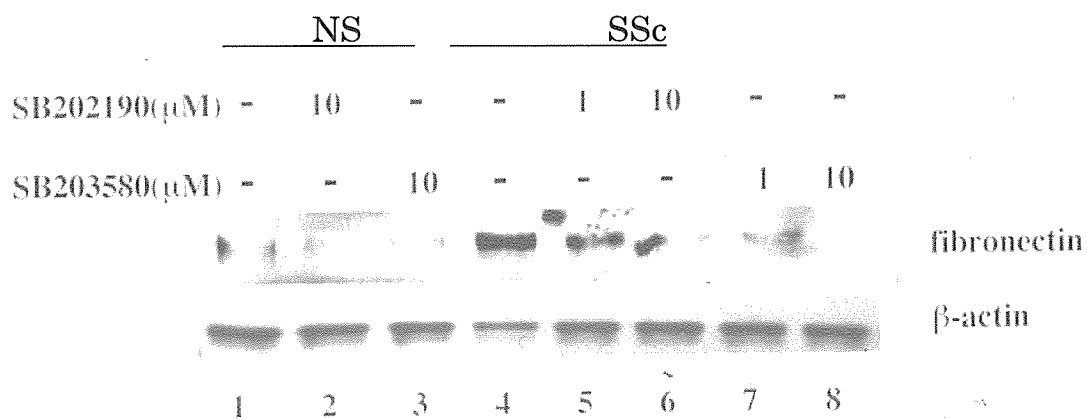


図4. p38 MAPK阻害剤存在下でのfibronectinの発現。

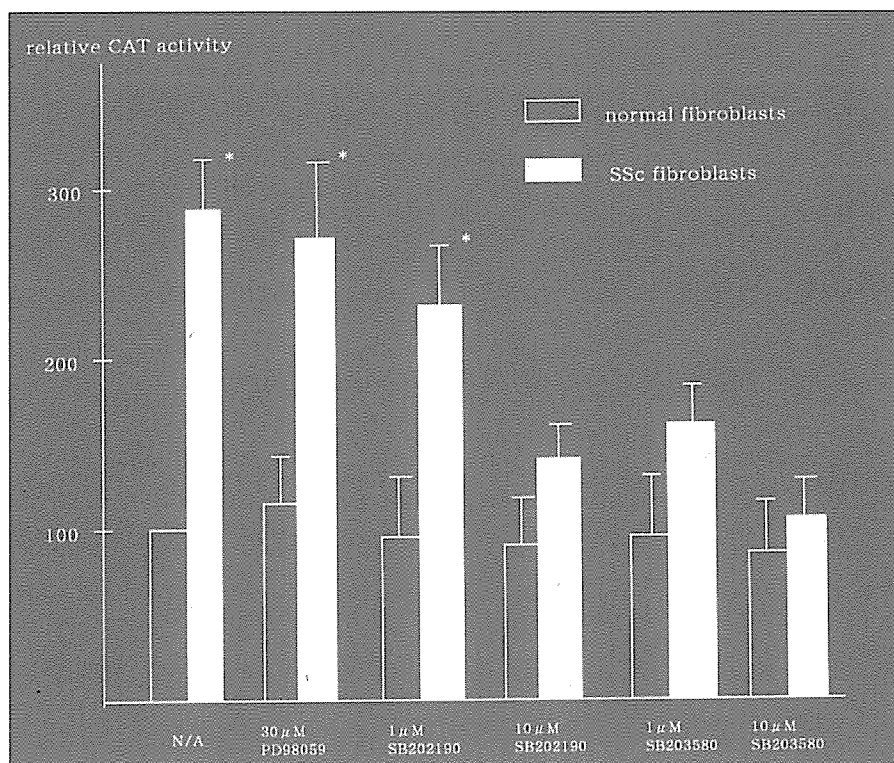


図5. p38 MAPK阻害剤存在下でのI型コラーゲン遺伝子転写活性。

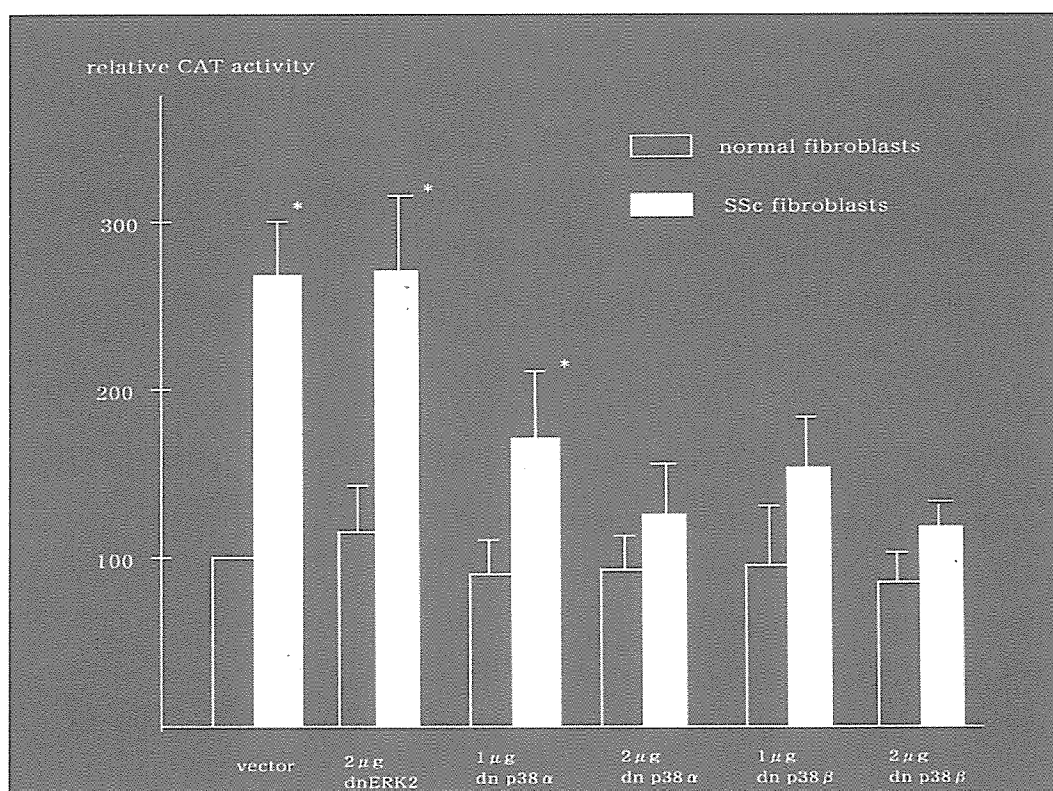


図6. dominant negative p38 MAPK存在下でのI型コラーゲン遺伝子転写活性。

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

ヒト皮膚線維芽細胞におけるMEA (*N*-methylethanolamine) の
細胞外基質関連遺伝子制御機構

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 群馬大学医学部医学系研究科皮膚病態学助手
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

全身性強皮症の病態形成機序の1つとしてI型コラーゲンをはじめとする細胞外基質の過剰沈着が考えられおり、その制御が強皮症治療のターゲットの1つとなる。最近、心室線維化モデルマウスにMEA (*N*-methylethanolamine) を投与したところ、心室の線維化が抑制されたとする報告がなされたが、その詳細なメカニズムについては検討されていない。そこで今回我々は、MEA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。その結果、MEAはI型コラーゲンの発現を抑制し、MMP-1の発現を亢進することが明らかになった。更に、MEAによるMMP-1の発現亢進には、MEK/ERK、JNK情報伝達系によるpositive regulation及びp38MAPK、PI3K情報伝達系によるnegative regulationが関与していること、またMEAによるI型コラーゲンの発現抑制は、MEK/ERK情報伝達系を介している可能性を明らかにした。以上の結果より、MEAは細胞外基質の産生を抑制すると共に分解を増強することにより、全身性強皮症のような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

全身性強皮症を形成する主な病態の一つとして、コラーゲンをはじめとする細胞外基質の過剰沈着が考えられている。即ち、生理的な状態においては均衡が保たれている細胞外基質の産生と分解のバランスが、全身性強皮症という病的状態においては、細胞外基質の産生に分解が追いつかずに、細胞外基質が過剰に蓄積すると考えられている。

全身性強皮症の治療を考えると、細胞外基質の産生を抑える、もしくは分解を増強するという戦略が浮かび上がってくる。

今回我々は、細胞外基質の産生を抑制し、分解を亢進させることによって、全身性強皮症治療に応用し得る化学物質の1つとして、*N*-methylethanolamine (MEA) に注目した。

Yamamoto¹⁾ らは、心線維症のモデルラットに

MEAを経口的に投与したところ心臓の線維化が抑制されたと報告をした。その機序として、コラーゲン産生の抑制、コラゲナーゼ産生の亢進を示したが、その詳細なメカニズムについては検討されていない。そこで今回我々は、MEAの I 型コラーゲンおよびMMP-1発現に与える影響をヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて詳細に検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

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、explant culture 法にてヒト真皮由来線維芽細胞を得た。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、実験は継代 3~8 代目の線維芽細胞を用いた。

2) リアルタイム PCR 法

培養皮膚線維芽細胞から ISOGENE (Nippongene) を用いて mRNA を抽出し、Random primer を用いた逆転写反応にて cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を行なった。Applied Biosystems 社の 7300 Real time PCR System を用いた Taqman Gene Expression Assays にて、COL 1 A2, MMP-1, 18S (内部標準)の mRNA 発現量を定量した。

3) Western blot 法

サンプルは培養上清ないし細胞抽出液を用いた。抽出バッファの組成を以下に示す。Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), NaCl (150 mM), 1 % Nonidet P-40, 15 mM NaF, 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 10 μ g / mL aprotinin, 10 μ g / mL leupeptin。サンプルを SDS-PAGE で分離後、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) を用いて検出した。抗体は mouse monoclonal collagen

I,II,III (MONOSAN), rabbit polyclonal MMP1 (CHEMICON), rabbit polyclonal phospho-ERK1/2, phospho-SAPK/JNK, phospho-p38 MAP Kinase, phospho-Akt(Cell Signaling Technology), rabbit polyclonal phospho-SMAD2 (Calbiochem), rabbit polyclonal phospho-SMAD3 (R&D systems), mouse monoclonal β -actin (SIGMA) を用いた。

4) cell proliferation assay

96 well plate に 2500 個 / well で線維芽細胞を播種し、10%FBS 存在下に 24 時間培養後、無血清培地に交換し、MEA 0.1,0.3,1.0 mM を添加し、24, 48, 72 時間後に CellTiter96 AQueous one solution cell proliferation assay (Promega) を用いて細胞増殖能を検討した。

C. 研究結果

1) MEAはI 型コラーゲンの発現を抑制し、MMP-1の発現を亢進する

正常皮膚線維芽細胞をコンフルエントまで培養し、一晚無血清状態にした後、図1、2に示した濃度・時間で刺激し、細胞および細胞上清を回収した。回収した細胞よりRNAを抽出しリアルタイムPCR法にて I 型コラーゲン、MMP-1mRNA発現量を測定し、細胞上清中の I 型コラーゲン、MMP-1 蛋白量を western blot法にて検出した。

図1に示すように、MEAは I 型コラーゲン mRNAおよび蛋白発現を抑制することが明らかになった。抑制効果は濃度依存的で、0.3mMより I 型コラーゲンmRNA発現を抑制していた(図1-A)。また、その抑制効果はMEA添加6時間後にはみられず、24 時間後よりみられた(図1-B)。さらに蛋白レベルでも産生抑制が確認された(図1-C)。同様にMEAのMMP-1 mRNAおよび蛋白発現に及ぼす影響について検討をしたところ、MEAは