

MMP-1 mRNA および蛋白発現を増強した (図2)。MMP-1 mRNA 発現の増強は0.1 mM からみられ (図2-A)、さらにこの増強は6時間後からみられた (図2-B)。また、蛋白レベルでもMMP-1産生は増加していた (図2-C)。以上の結果より、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。

2) MEAは ERK, JNKのリン酸化を亢進し、p38MAPK, Aktのリン酸化を抑制する。

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3に示した濃度 (0.3 mM、1.0 mM) のMEAで刺激し、1時間後、24時間後に細胞を回収し、ERK, JNK, p38 MAPK, Aktのリン酸化抗体を用いてwestern blot法を行なった。ERK, JNKは、低濃度 (0.3 mM) かつ短時間 (1時間後) からリン酸化の増強がみられ、その増強は長時間 (24時間) 持続していた。一方、p38MAPK, Aktは、長時間 (24時間) かつ高濃度 (1 mM) のMEAにより抑制された。 (図3) 以上の結果より、MEAは ERK, JNKのリン酸化を亢進し、p38MAPK, Aktのリン酸化を抑制することが明らかになった。しかしながら、p38MAPK, Aktのリン酸化の抑制効果は、高濃度かつ長時間後でのみみられていることから、MEAによる直接的な効果ではなく、MEAにより惹起された何らかの変化による二次的な作用の可能性が高い。

3) MEAはSMAD2 およびSMAD3のリン酸化には影響を与えない

MEAのSMADシグナリングにおよぼす影響を知るために、SMAD2およびSMAD3のリン酸化抗体を

用いた検討を行なったが、MEAによる明らかな変化は認めなかった。 (図4)

4) MEAによる MMP-1発現亢進作用はMEK/ERK およびJNK情報伝達系を介している。

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、MEK/ERK阻害剤であるU0126 (20 μM)、PD98059 (20 μM)、JNK inhibitor I (20 μM) を添加し、1時間後にMEA (1.0 mM) で刺激、24時間後に細胞を回収した。図5に示すようにMEAによるMMP-1のmRNA発現亢進作用はU0126、PD98059およびJNK inhibitor I 存在下で有意に減弱した (図5)。以上より、MEAによるMMP-1発現亢進作用はMEK/ERKおよびJNK情報伝達系を介していることが示唆される。

5) MEAは、p38MAPKおよびPI3KのMMP-1発現抑制作用を抑制することにより、MMP-1の発現を増強している。

次に、高濃度のMEAにより活性が抑制されるp38MAPKおよびPI3Kの阻害剤 (SB203580, LY294002) を用いて、MEAのMMP-1発現に及ぼす影響について同様の検討をした。SB203580, LY294002は、basal levelでMMP-1遺伝子発現を増強していた。更に、p38MAPKおよびPI3Kのリン酸化を抑制する濃度である1 mMのMEAを添加すると、MMP-1遺伝子発現は、相乗効果的に増強された (図6A)。これらの結果より、p38MAPKおよびPI3KはMMP-1遺伝子発現を抑制的に制御し、更にMEAは、p38MAPKおよびPI3Kの抑制的な働きを抑制することにより、MMP-1発現を増強していると考えた。

さらに、SB203580とLY294002は同様の働きを示していたが、これは、MEAがそれぞれのシグナル

伝達経路に同様の作用を及ぼしていると考えより、どちらかがどちらかを制御していると考えの方が論理的であると考え、それぞれの阻害剤が、それぞれのシグナリングにいかなる影響を及ぼすのかを検討した。その結果、SB203580はAktのリン酸化を抑制し、逆にLY294002はp38MAPKのリン酸化を増強していた(図6B)。このことは、p38MAPKがPI3Kの上流に位置することを示唆する。すなわちMEAはp38MAPKのシグナリングを抑制することによりPI3Kのシグナリングを抑制し、MMP-1発現の増強に関与していると考えた。

6) MEAによる1型コラーゲン遺伝子発現の抑制にはMEK/ERK情報伝達系が関与している

次に、それぞれの阻害剤の1型コラーゲン発現に及ぼす影響について同様に検討をした。U0126、PD98059はbasal levelでは1型コラーゲン遺伝子の発現には影響を及ぼさなかったが、MEAによる1型コラーゲン抑制を阻害していることから(図7)、MEAによる1型コラーゲン遺伝子発現の抑制にMEK/ERK情報伝達系が関与している可能性が示唆された。

7) MEAは線維芽細胞の増殖を促進する

MEAの線維芽細胞の増殖能に与える影響についてMTT assayの変法であるCellTiter96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega)を用いて検討したところ、MEAは濃度依存的に線維芽細胞の増殖を促進した(図8)。

D. 考察

今回の検討により、MEAはMEK/ERK情報伝達系およびJNK情報伝達系を介して1型コラーゲン

の発現を抑制し、MMP-1の発現を亢進していることが明らかになり、さらに、MEAはp38MAPKおよびPI3K情報伝達系にも影響を与え得ることが示唆された。これまでも、コラーゲン産生を抑制したり、MMP-1の産生を亢進するといったサイトカイン、成長因子、試薬などは多数報告されている²⁾⁻³⁾。しかしながら、強皮症治療への臨床応用となると現在までに、満足のいく治療薬はない。今回注目したMEAは、心線維化のモデル動物を用いたin vivoの実験系においてすでに線維化を抑制することが確認されていること、さらに分子量が75.11と非常に小さいため、全身投与だけでなく外用による局所投与も期待できることから、臨床応用の可能性が高い化学物質ではないかと考えている。今後、MEAのin vivoでの作用をさらに検討していく予定である。

E. 結論

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ある。

F. 文献

1. Yamamoto K, Takahashi Y, Mano T, Sakata Y, Nishikawa N, Yoshida J, Oishi Y, Hori M, Miwa T, Inoue S, Masuyama T. N-Methylethanolamine attenuates cardiac fibrosis and improves diastolic function: inhibition of phospholipase D as a possible mechanism. *Eur Heart J.* 2004 ; 25(14) : 1221-9.
2. Solis-Herruzo JA, Brenner DA, Chojkier M. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen gene transcription and collagen

synthesis in cultured human fibroblasts.

J Biol Chem. 1988 ; 263(12) : 5841-5.

3. Granstein RD, Flotte TJ, Amento EP.
Interferons and collagen production. J Invest
Dermatol. 1990 ; 95 (6 Suppl) : 75S-80S.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

日本研究皮膚科学会 第31回年次学術大会・総会

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

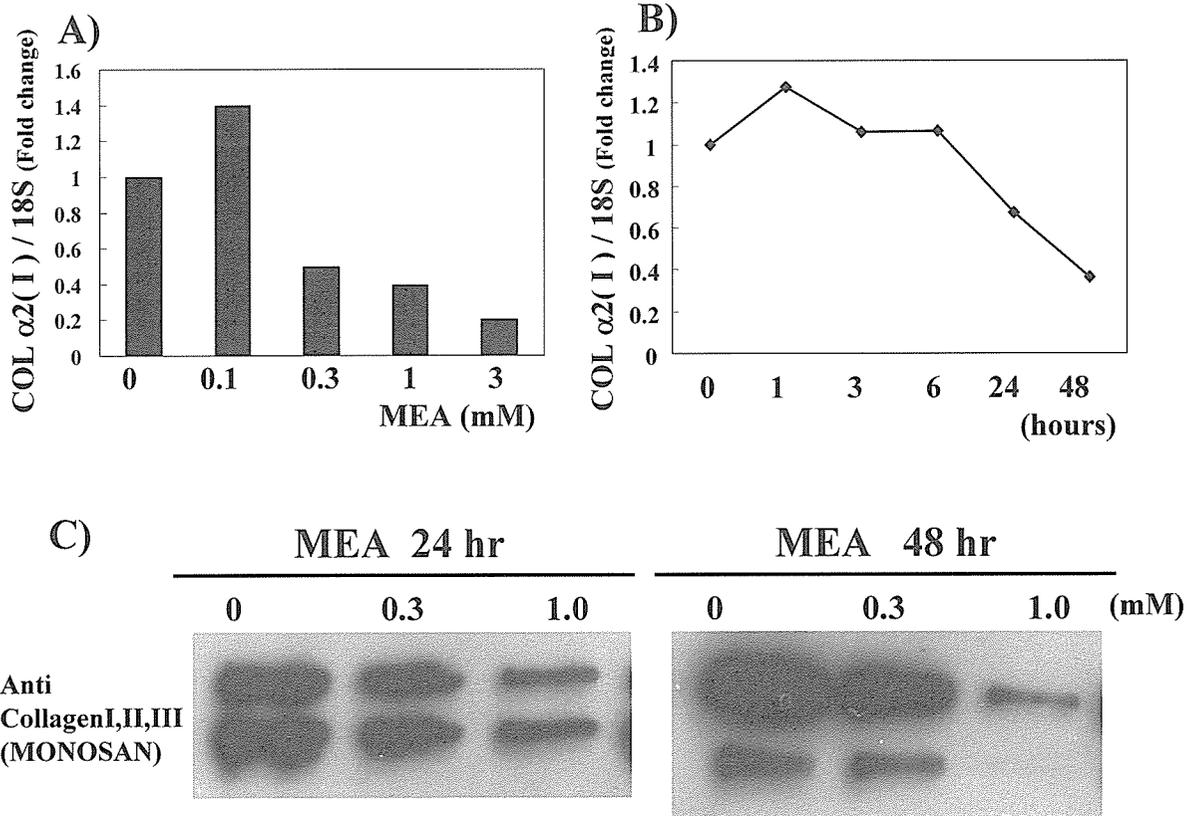


図1 MEAによるI型コラーゲンmRNA、蛋白発現に与える影響
 A. COL $\alpha 2(I)$ mRNA発現量の変化
 B. COL $\alpha 2(I)$ mRNA発現量の経時的変化
 C. I型コラーゲン蛋白発現量の変化

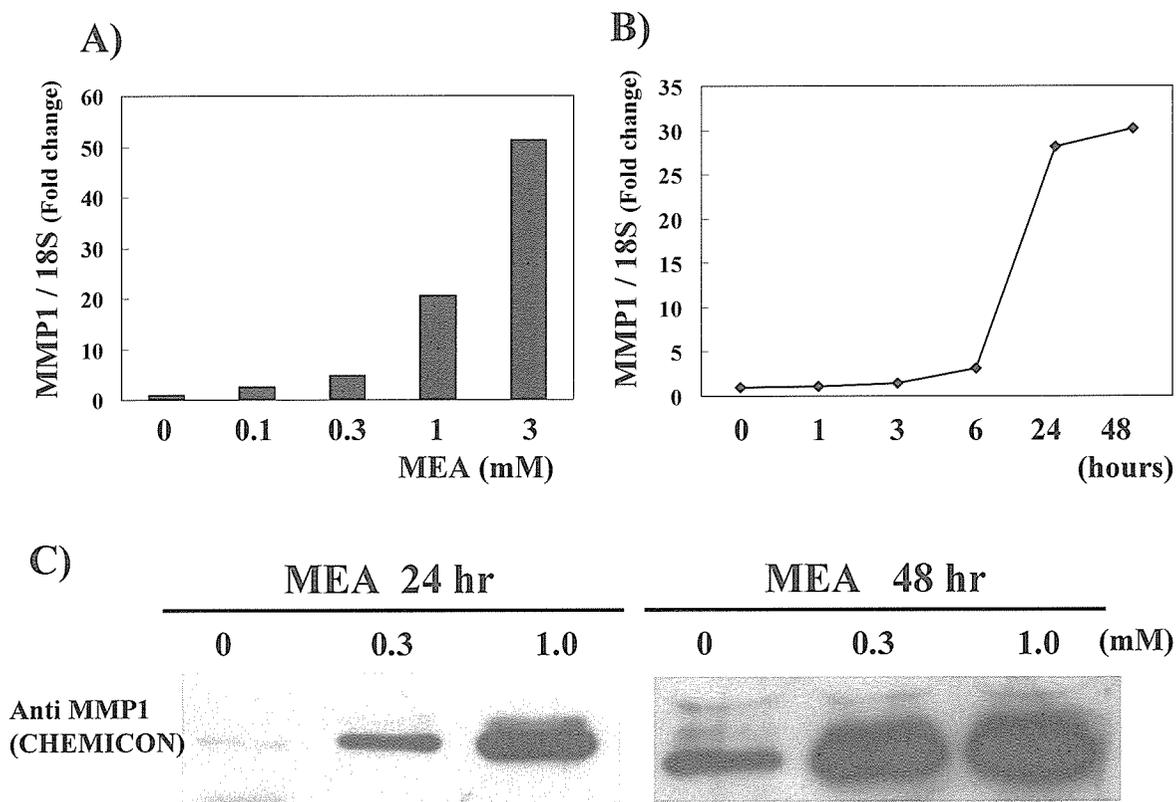


図2 MEAによるMMP-1 mRNA、蛋白発現に与える影響
 A. MMP-1 mRNA発現量の変化
 B. MMP-1 mRNA発現量の経時的変化
 C. MMP-1蛋白発現量の変化

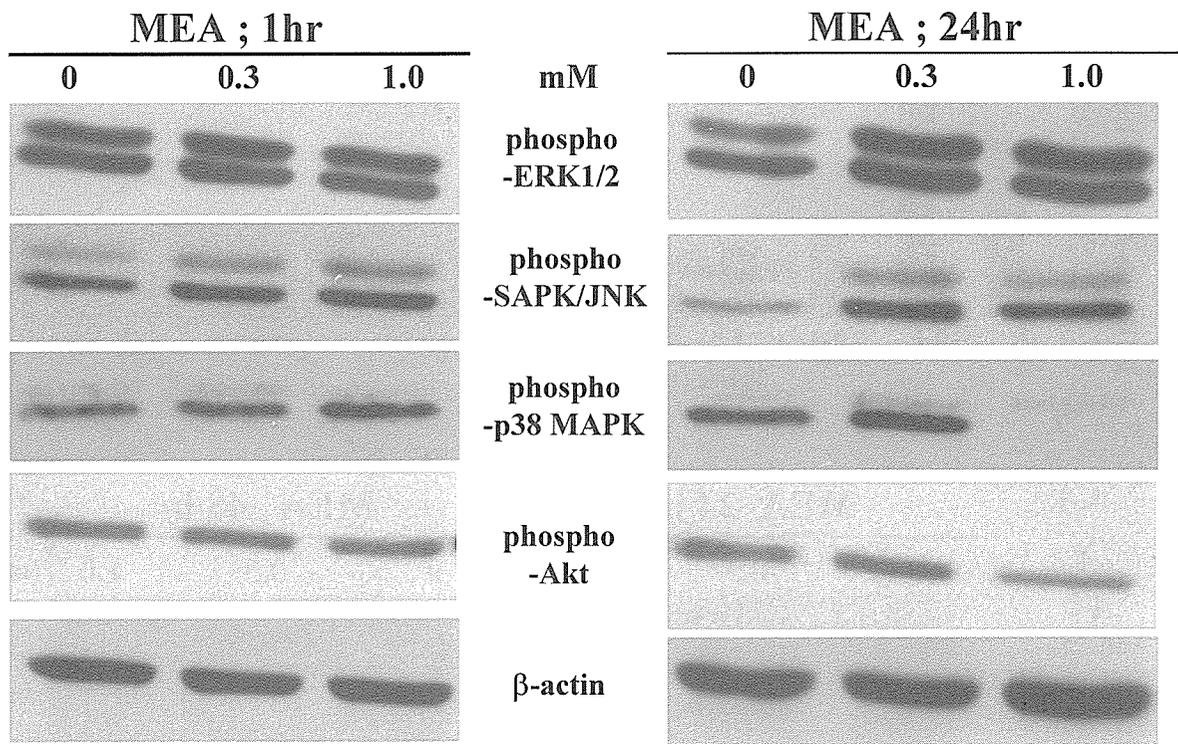


図3 MEAによるERK/MEK, SAPK/JNK, p38 MAPK, Akt リン酸化に与える影響

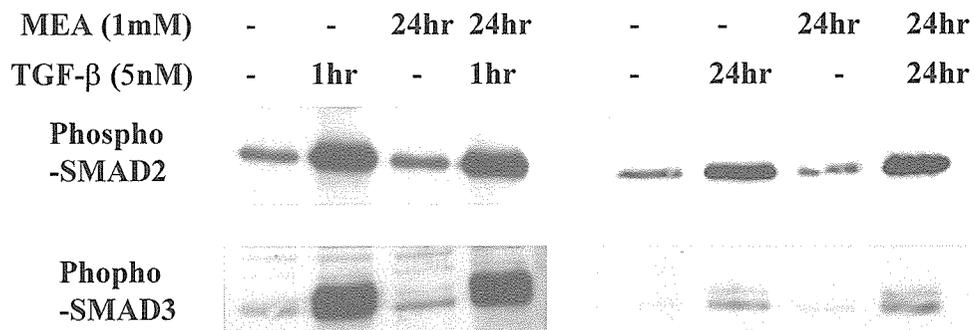
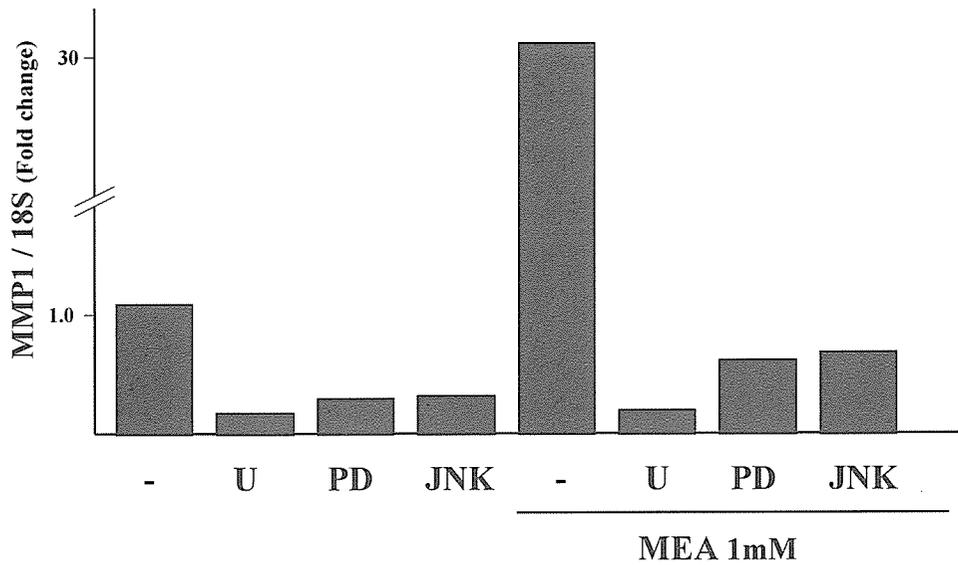
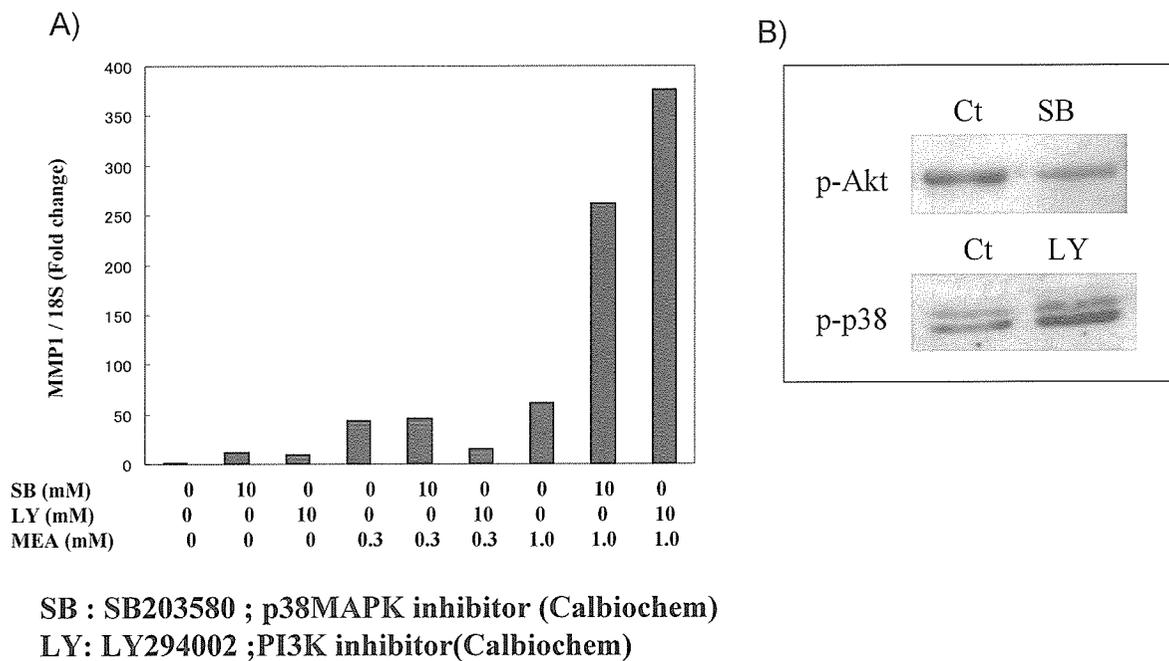


図4 MEAによるSMAD2、SMAD3 リン酸化に与える影響



PD : PD98059 ;ERK1/2 inhibitor (Calbiochem)
 U : U0126 ;ERK1/2 inhibitor (Calbiochem)
 JNK : JNK inhibitor I (Calbiochem)

図5 MEK/ERKおよびJNK阻害剤存在下におけるMEAによるMMP-1mRNA発現に与える影響



SB : SB203580 ; p38MAPK inhibitor (Calbiochem)
 LY : LY294002 ;PI3K inhibitor(Calbiochem)

図6
 A. p38MAPKおよびPI3K阻害剤存在下におけるMEAによるMMP-1mRNA発現に与える影響
 B. p38MAPK阻害剤のAkt リン酸化に与える影響およびPI3K阻害剤のp38 MAPKリン酸化に与える影響

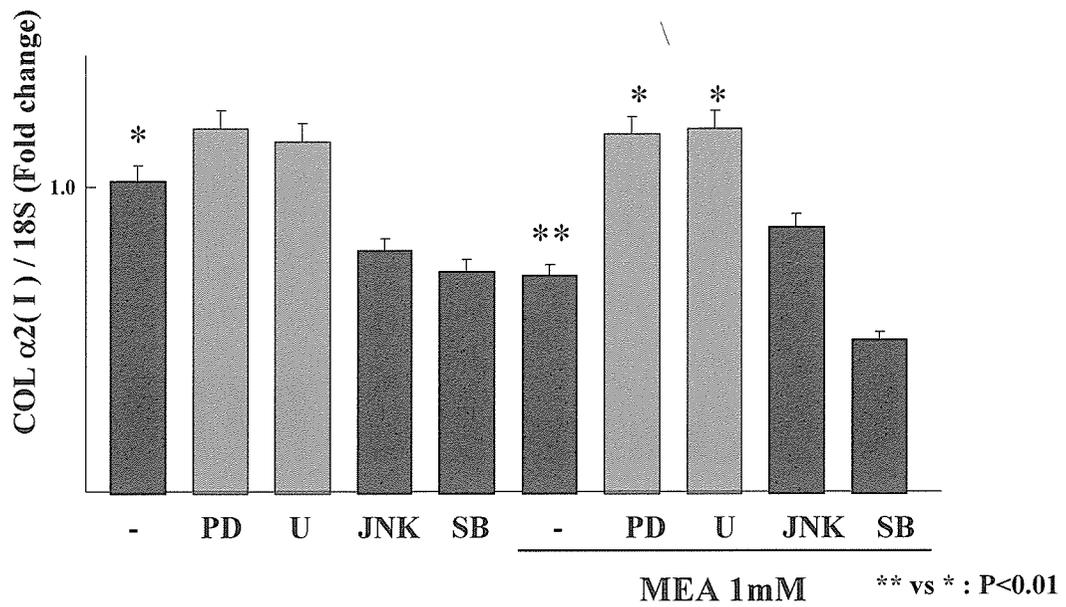


図7 MEK/ERK, JNKおよびp38 MAPK阻害剤存在下におけるMEAによるCOLα2 (I) mRNA発現に与える影響

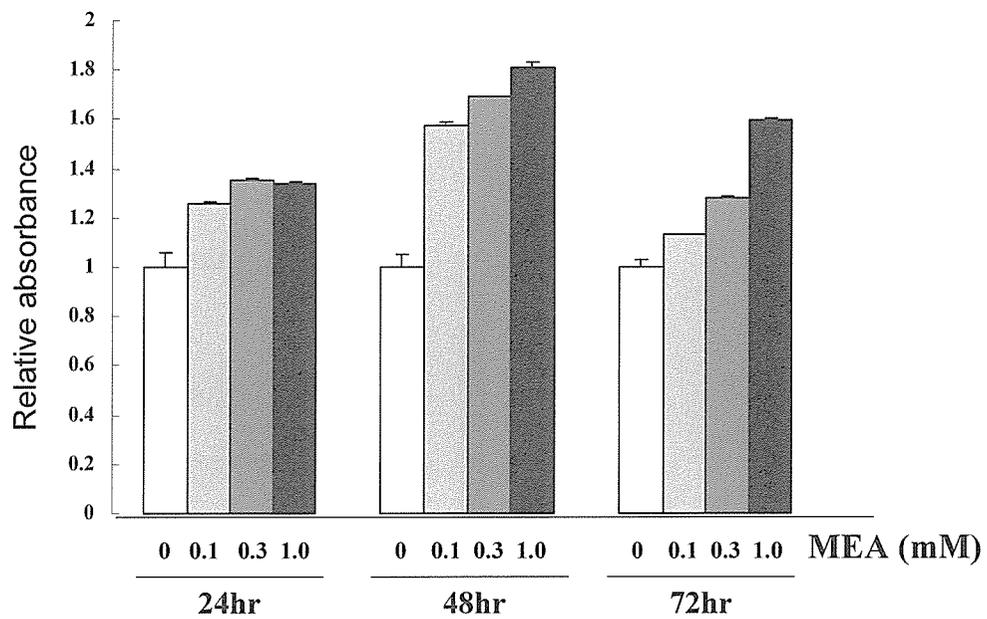


図8 MEAの細胞増殖に与える影響

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

Transgenic dual reporter mouse を用いたマトリックス合成と分解
の包括的解析

研究協力者 稲垣 豊 東海大学医学部基盤診療学系助教授
協力者 東山礼一 東海大学大学院医学研究科大学院生
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

臓器線維症は、その部位と原因とにかかわらず、組織にコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスが過剰に沈着し、臓器の機能障害をきたした病態である。組織におけるコラーゲン含量は合成系と分解系との適切なバランスの上に維持されており、このバランスの不均衡が線維化の発症・進展をもたらす。しかしながら、コラーゲンとこれを分解するコラゲナーゼ(MMP)の協調的あるいは相反的な産生調節機構は、十分に解明されていない。そこで今回、 $\alpha 2(I)$ コラーゲンプロモーター(COL1A2)/EGFP(緑色蛍光)と MMP-13 プロモーター/DsRed2(赤色蛍光)の2種の癒合遺伝子を組み込んだ Transgenic dual reporter mouse を作製した。このマウスに四塩化炭素を単回投与したところ、中心静脈周囲の壊死巣に EGFP 陽性細胞が出現し、一部の細胞では活性化星細胞のマーカーである α SMA との共発現が確認された。この際に、MMP-13プロモーターにより誘導されるDsRed2の発現は認められなかったことから、肝細胞壊死に伴ってコラーゲン合成と分解のバランスが相対的に前者に傾いていることが示された。

A. 研究目的

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

これら諸臓器の線維化は各種感染症のほか、臓器障害性の化学物質への曝露や手術後の瘢痕などによりもたらされ、線維化がさらに臓器障害をきたすという悪循環を形成する。近年では、かつては救命しえなかった重篤な急性疾患が救命できるようになり、一方で慢性疾患の治療管理が向上したこともあり、臓器線維症の患者は急速に増加している。それはすなわち、強皮症や特発性間質性肺炎などの原因不明の難病、急性心筋梗塞後の心臓線維

症、ウイルス性ならびにアルコール性肝硬変、慢性糸球体腎炎・糖尿病性腎症による腎臓の硬化、塵肺などの肺線維症などであり、その総数はがん患者をもはるかに凌ぐ。

組織におけるコラーゲンの含量は、合成と分解との適切なバランスの上に維持されており、このバランスの不均衡が線維化の発症・進展をもたらす。しかしながら、コラーゲンとこれを分解するコラゲナーゼ(MMP)の協調的あるいは相反的な産生調節機構は、十分に解明されていない。そこで今回、 $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーター(COL1A2)/EGFP(緑色蛍光)とMMP-13遺伝子プロモーター/DsRed2(赤色蛍光)の2種の癒合遺伝子を組み込んだ Transgenic dual reporter mouse を用いて、コラーゲン合成系と分解系とを包括的に解析することを試みた。

B. 研究方法

COL1A2 (-17.0 から -15.5 kb を -350 の近位プロモーターに連結)あるいは MMP-13 遺伝子プロモーター (-700 bp) をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子に連結したプラスミドを作製し、これを培養星細胞にトランスフェクションし、両プロモーターの活性化をルシフェラーゼ・アッセイにより確認した。また、COL1A2 プロモーター/EGFP と MMP-13 プロモーター/DsRed2 とを連結させたプラスミドを作製し(図1)、同様に培養星細胞にトランスフェクションして、共焦点レーザー顕微鏡下に2種の蛍光の発現を観察した。

これら基礎的検討結果を踏まえて、次に COL1A2/EGFP と MMP-13/DsRed2 の両癒合遺伝子を含む DNA 断片を顕微鏡下に胚注入し、Transgenic dual reporter mouse を作製した。

導入遺伝子の存在は、各癒合遺伝子に特異的なプライマーを用いた tail DNA サンプルの PCR によりスクリーニングした。

この Transgenic dual reporter mouse の皮下に 1 mL/kg 体重の四塩化炭素投与を単回投与して肝細胞壊死を惹起し、72時間後に肝組織を採取した。HE 染色により肝細胞壊死を確認するとともに、EGFP と DsRed2 の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また α SMA 抗体や F4/80 抗体を用いた免疫蛍光染色を行ない、EGFP/DsRed2 との共発現を検討することで、COL1A2 もしくは MMP-13 プロモーターが活性化された細胞の発現形質を解析した。

C. 研究結果

ルシフェラーゼ・アッセイにより、トランスフェクションされた COL1A2 ならびに MMP-13 遺伝子プロモーターが培養星細胞で活性化していることを確認した。また、各々の遺伝子の発現を促進することが知られている TGF- β (COL1A2) あるいは TPA (MMP-13) 刺激を行うと、いずれもルシフェラーゼ活性を有意に増加させた。

また、COL1A2 プロモーター/EGFP と MMP-13 プロモーター/DsRed2 を連結したプラスミドをトランスフェクションした培養星細胞を共焦点レーザー顕微鏡下に観察すると、2種の蛍光の共発現が確認できた。

COL1A2/EGFP と MMP-13/DsRed2 遺伝子とを安定保持した2系統の Transgenic dual reporter mouse を樹立した。このマウスの皮下に四塩化炭素を単回投与して、72時間後に肝組織を観察すると、中心静脈周囲の壊死巣に EGFP の発現、すなわち COL1A2 プロモーターの活性化が確認さ

れた(図2)。また、その一部の細胞は α SMA 陽性細胞と一致した。一方、肝組織中に MMP-13 プロモーターにより誘導される DsRed2 の蛍光は認められなかった。

D. 考案

組織におけるコラーゲンの含量は、合成と分解との適切なバランスの上に維持されている。肝臓においては星細胞が I 型コラーゲンならびにこれを分解する間質性コラゲナーゼ(MMP-13)双方の産生細胞とされているが、星細胞における I 型コラーゲンと MMP-13 との協調的あるいは相反的な産生調節機構は十分に解明されていない。また我々は、実験的肝線維症からの回復過程において、骨髄由来細胞が MMP-13/-9 を順次産生して線維化改善に寄与することを明らかにしてきた^{1,2)}が、その一方で骨髄から線維肝組織へ流入・生着した細胞が I 型コラーゲンを産生して線維化の進展に関わるという報告もあり、未だ一致した見解は得られていない。コラーゲンの合成系と分解系とを包括的にかつ経時的に解析する研究が望まれる所以である。

今回用いた COL1A2 と MMP-13 遺伝子のプロモーター断片は、培養星細胞を用いたトランスフェクション・アッセイ上いずれも十分な基礎転写活性と刺激因子(TGF- β あるいは TPA)に対する反応性を有していた。また、共焦点レーザー顕微鏡により同定可能な蛍光強度(EGFP および DsRed2)を示した。

これらの基礎的検討結果を踏まえて作製された Transgenic dual reporter mouse の皮下に四塩化炭素を単回投与すると、中心静脈周囲の壊死巣に EGFP の発現、すなわち COL1A2 プロモ

ーターの活性化が確認された。一方で、MMP-13 プロモーターにより誘導される DsRed2 の発現は認められなかったことから、肝細胞壊死に伴ってコラーゲン合成と分解のバランスが相対的に前者に傾いていることが示された。

本研究では、線維化を惹起する手段として四塩化炭素肝傷害を用いたが、強皮症や特発性肺線維症など全身諸臓器にみられる線維症には、その発症機序に多くの共通性が認められる。また、皮膚・肺・心筋などの線維化の進展あるいは改善過程においても骨髄由来細胞の関与を示唆する結果も報告されている。本研究により I 型コラーゲンと MMP-13 との協調的あるいは相反的な産生調節機構が解明され、さらにコラーゲン産生細胞から MMP-13 産生細胞への分化誘導が可能となれば、他臓器にみられる難治性線維症にも広く応用が可能であり、その貢献は計り知れない。

E. 結論

COL1A2/EGFP と MMP-13/DsRed2 を保持した Transgenic dual reporter mouse は、コラーゲン合成系と分解系とを包括的に解析することで、臓器線維化の進展ならびに改善の病態解明に有用な手段になりうると考えられた。

F. 文献

- 1) Tetsu Watanabe, Maki Niioka, Shigenari Hozawa, Kaori Kameyama, Tatsuhiko Hayashi, Masao Arai, Akiko Ishikawa, Katsuya Maruyama and Isao Okazaki: Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and

recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride.

J Hepatol 33: 224-235, 2000

- 2) Reiichi Higashiyama, Yutaka Inagaki, Yun Yu Hong, Miwa Kushida, Sachie Nakao, Maki Niioka, Tetsu Watanabe, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki, Goshi Shiota, Isao Okazaki: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. Hepatology 45: 213-222, 2007

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nobuhiro Izumi, Shinjiro Mizuguchi, Yutaka Inagaki, Shizuya Saika, Norifumi Kawada, Yuji Nakajima, Kiyotoshi Inoue, Shigefumi Suehiro, Scott L Friedman, Kazuo Ikeda: BMP-7 opposes TGF β 1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. Am J Physiol Lung Cellular and Molecular Physiology 290: L120-L126, 2006
- 2) Yutaka Inagaki, Isao Okazaki: Emerging insights into transforming growth factor- β and Smad signalling in hepatic fibrogenesis. Gut 56: 284-292, 2007
- 3) Reiichi Higashiyama, Yutaka Inagaki, Yun Yu Hong, Miwa Kushida, Sachie Nakao, Maki Niioka, Tetsu Watanabe, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki, Goshi Shiota,

Isao Okazaki: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice.

Hepatology 45: 213-222, 2007

- 4) Kohji Kinoshita, Yuji Iimuro, Jiro Fujimoto, Yutaka Inagaki, Kazuhiko Namikawa, Hiroshi Kiyama, Yuji Nakajima, Kohji Otagawa, Norifumi Kawada, Scott L Friedman, Kazuo Ikeda: Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre-LoxP system to antagonise hepatic fibrosis. Gut 2007 (in press)
- 5) Kohji Kinoshita, Yuji Iimuro, Kohji Otagawa, Shizuya Saika, Yutaka Inagaki, Yuji Nakajima, Norifumi Kawada, Scott L Friedman, Kazuo Ikeda: Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. Gut 2007 (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) 東山礼一、稲垣 豊、中尾祥絵、新岡真希、渡辺 哲、岡野栄之、松崎有未、汐田剛史、岡崎 勲: 骨髄由来細胞の分化誘導による臓器線維症の治療戦略. 第 53 回マトリックス研究会大会、2006 年 3 月 25 日、箱根
- 2) 稲垣 豊、汐田剛史、岡崎 勲: HGFとTGF- β のクロストークからみた肝線維化と再生の病態連繫. 第 92 回日本消化器病学会総会、ワークショップ(3)「消化器臓器線維化の分子

- 機構(消化器疾患の線維化と再生)」、2006年4月20日、小倉
- 3) 稲垣 豊：成長因子・サイトカインのシグナル伝達からみた臓器線維症の病態とその制御。第38回日本結合組織学会学術大会、2006年5月11日、前橋
 - 4) 東山礼一、稲垣 豊、下山喜士、櫛田美和、洪 雲玉、中尾祥絵、渡辺 哲、井上秀雄、岡崎 勲：グリチルリチンとその代謝産物によるコラーゲン遺伝子転写阻害と肝線維化抑制機序の解明。第38回日本結合組織学会学術大会、2006年5月11日、前橋
 - 5) 稲垣 豊、東山礼一、渡辺 哲、岡崎 勲：グリチルリチンおよびその代謝産物による肝線維化抑制機序の解明。第42回日本肝臓学会総会、ワークショップ(2)「肝線維化の分子機構と治療」、2006年5月25日、京都
 - 6) 東山礼一、稲垣 豊、渡辺 哲、岡崎 勲：自家骨髄細胞の肝内移行とMMP発現誘導に基づく肝線維症の治療戦略。第42回日本肝臓学会総会、ワークショップ(2)「肝線維化の分子機構と治療」、2006年5月25日、京都
 - 7) Reiichi Higashiyama, Yutaka Inagaki, Yun Yu Hong, Miwa Kushida, Sachie Nakao, Maki Niioka, Tetsu Watanabe, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki, Goshi Shiota and Isao Okazaki: Contribution of bone marrow-derived cells to the spontaneous regression of liver fibrosis in mice. American Association for the Study of Liver Diseases, Basic Research Single Topic Conference "Hepatic Fibrosis", 2006. 6. 9, Warrenton, VA
 - 8) Yutaka Inagaki: Treatment Strategy for Hepatic Fibrosis Targeting TGF- β /Smad Signaling. Minophagen International Symposium 2006: Liver Cell Injury, Pathogenesis and Therapeutic Implications. 2006年9月8日、東京
 - 9) 稲垣 豊：肝線維化機序の解明と分子制御。第38回日本臨床分子形態学会、シンポジウム(2)「肝疾患の up-date」、2006年9月29日、宇部
 - 10) 稲垣 豊、東山礼一、岡崎 勲：Transgenic dual reporter mouse を用いたコラーゲン合成と分解の包括的解析。第20回肝類洞壁細胞研究会、2006年12月2日、富士吉田
- H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

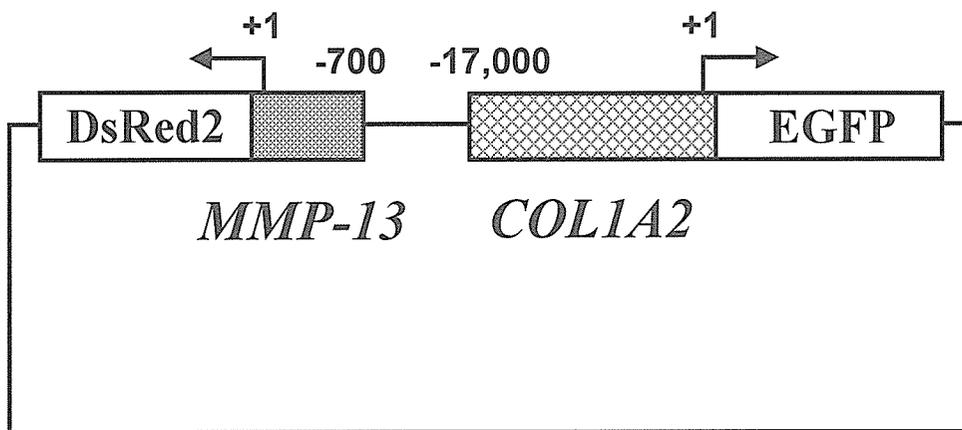


図1：COL1A2プロモーター/EGFPとMMP-13プロモーター/DsRed2とを連結させたプラスミド
 COL1A2 プロモーター(-17.0から-15.5 kbを-350の近位プロモーターに連結)を緑色蛍光EGFP遺伝子に、またMMP-13遺伝子プロモーター(-700 bp)を赤色蛍光DsRed2遺伝子にそれぞれ癒合させ、両者をhead to headに連結させたプラスミドを作製して、培養活性化星細胞へのトランスフェクションならびにTransgenic dual reporter mouseの作製に使用した。
 +1：転写開始部位

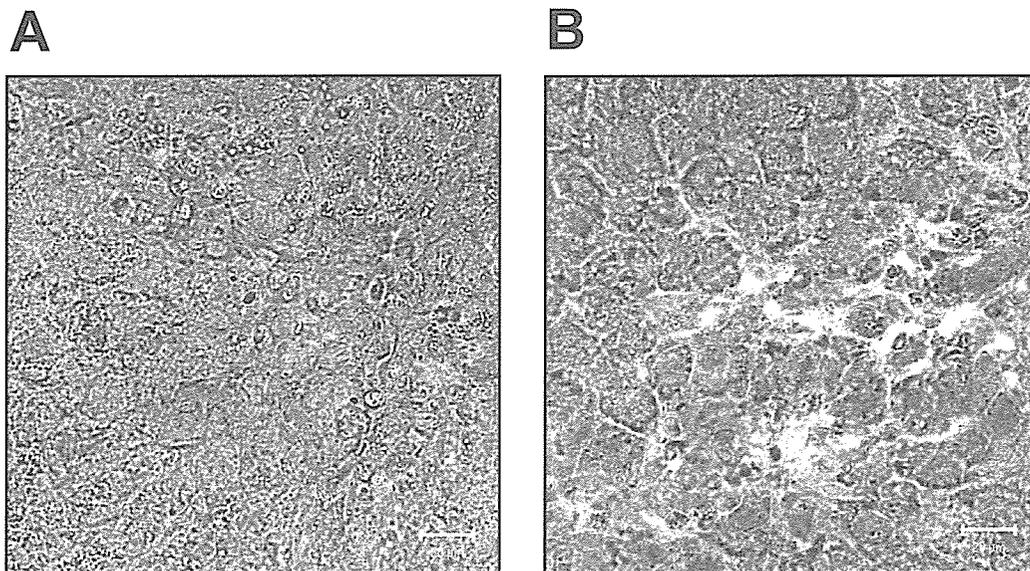


図2：四塩化炭素単回投与によるCOL1A2プロモーターの活性化
 野生型マウス (A) あるいはTransgenic dual reporter mouse (B) の皮下に、四塩化炭素を単回投与して72時間後に肝組織を観察すると、後者では中心静脈周囲の壊死巣にEGFPの発現、すなわちCOL1A2プロモーターの活性化が確認された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

抗癌剤グリベック®の強皮症における抗線維化作用および
c-Abl の発現と活性に対する影響についての検討

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	石田 濟	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科助手
協力者	Swati Bhattacharyya	Division of Rheumatology, orthwestern University Feinberg School of Medicine
協力者	Minghua Wu	Division of Rheumatology, Northwestern University Feinberg School of Medicine
協力者	Monique Hinchcliff	Division of Rheumatology, Northwestern University Feinberg School of Medicine
協力者	Yasuji Mori	Division of Rheumatology, Northwestern University Feinberg School of Medicine
協力者	John Varga	Division of Rheumatology, Northwestern University Feinberg School of Medicine

研究要旨

c-Abl ノックアウトマウス胎児線維芽細胞において TGF- β 誘導性 I 型コラーゲン増生が欠如し、恒常活性型の Bcr-Abl のトランスフェクションによって I 型コラーゲン産生が増加した。772COL1A2-CAT によるレポーター解析では c-Abl の導入によりプロモーター活性が相加的に亢進した。健常者真皮と比べ全身性強皮症真皮での c-Abl 陽性線維芽細胞数に違いはなかったが、リン酸化 c-Abl 陽性線維芽細胞は有意に増加していた。TGF- β 誘導による細胞外マトリックス蛋白 mRNA の増加や PAI-1 と I 型コラーゲン蛋白の強発現、772COL1A2-CAT のプロモーター活性の亢進をもメシル酸イマチニブは抑制した。またメシル酸イマチニブは TGF- β 誘導性の Smad2/3 のリン酸化を修飾せず、核内への集積にも影響しなかった。全身性強皮症皮膚線維芽細胞の恒常的な I 型コラーゲンの強発現をメシル酸イマチニブは抑制した。以上により c-Abl は I 型コラーゲン発現に重要な役割を担い、全身性強皮症においてその活性が亢進していることが示唆され、メシル酸イマチニブは TGF- β 誘導性線維化反応を阻害する可能性が示された。

A. 研究目的

全身性強皮症(scleroderma、以下 SSc)は皮膚、肺、腎臓など全身の臓器に線維化を来す疾患で、TGF- β はコラーゲンの増生、各種サイトカイン産生、筋線維芽細胞への分化を誘導し、SScの線維化に重要な働きをすると考えられている(1,2)。

c-Abl は非レセプター型チロシンキナーゼで、PDGF、EGF、放射線照射やDNAのダメージによりリン酸化を受け、活性化し、アポトーシス、粘着性、増殖が誘導される(3, 4, 5)。

抗癌剤グリベック®(一般名、メシル酸イマチニブ)は2001年に開発されたチロシンキナーゼ阻害剤で、選択的にキナーゼドメインのリン酸化部位を覆うことによりc-Ablならびに慢性性骨髄性白血病の原因蛋白と考えられるc-Ablの変異蛋白であるBcr-Ablの活性化を抑制する(6, 7)。近年、メシル酸イマチニブが肺、腎、骨髄の線維化を抑制したとする報告が相次いでいる(8-11)。またTGF- β によるc-Ablの活性化が線維芽細胞特異的に示され、メシル酸イマチニブがこのc-Ablのリン酸化を抑制することが示されている(12)。

我々はSScの病態の理解と治療薬の開発の一環として、TGF- β 刺激による線維化を阻害する新しい方法の模索をしており、今回、TGF- β の反応におけるc-Ablの働きを検討し、*in vitro*でのTGF- β 誘導性線維化反応に対するメシル酸イマチニブ効果を検証した。

B. 研究方法

1) 培養細胞と各種試薬

培養細胞は従来の方法で継代培養した成人

正常皮膚線維芽細胞とdiffuse cutaneous scleroderma(以下、dSSc)患者皮膚線維芽細胞、fore skin由来の線維芽細胞、c-Ablノックアウトマウス胎児由来線維芽細胞(13)を用い、またNIHT3細胞も利用した。試薬による反応は0.1%FBSに調整したDMEMに培養液を交換24時間後、場合によっては10 μ Mのメシル酸イマチニブ(NOVARTIS)を加え、更に30分後にTGF- β 1、 β 2、 β 3にて刺激した。

2) Western blot 法

培養細胞抽出液をSDS-PAGEにて電気泳動。ニトロセルロース膜に転写し、膜上の蛋白を抗type I collagen抗体、抗PAI-1抗体、抗phospho-Smad1/3抗体、抗Smad1/2/3抗体、抗Actin抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体にて発色・検出した。

3) Northern blot 法

full confluentまで培養した線維芽細胞からISOGEN(日本ジーン)を用いてRNAを抽出し、各種DNAプローブ(COL1A1、COL1A2、Fibronectin、CTGF、PAI-1、TIMP-1、18S rRNA)と反応させ検出した。

4) DNA affinity purification assay

培養細胞の核内抽出液にビオチンラベルしたSmad binding element(SBE)オリゴヌクレオチドを反応させ、アビジンビーズを加え免疫沈降を行った。免疫沈降物を上記Western blot法同様に泳動、転写し、抗phospho-Smad2抗体、抗phospho-Smad3抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体にて発色・検出し

た。

5) Transient transfection

subconfluent の状態の培養細胞に SuperFect (QIAGEN) を用いて 772COL1A2-CAT レポーターコンストラクトと Bcr-Abl 発現コンストラクトの transient transfection を行った。細胞抽出液に butlyl-CoA と [¹⁴C]-chloramphenicol を加え、Butylated chloramphenicol を抽出し、液体シンチレーションカウンターにて計測した。

6) 免疫組織染色法

40 歳代女性の抗 topoisomerase I 抗体陽性ないし抗 RNP 抗体陽性で病理診断にて SSc と診断された dSSc 7 例と対照健常者 (40 歳代女性) 3 名のパラフィン包埋組織片を用意し、抗 c-Abl、phospho-c-Abl 抗体を反応させ、CSA System(Dako)を用いて染色した。

C. 研究結果

1) TGF-β誘導性コラーゲン発現における c-Abl の重要性の検討

Western blot 法において、c-Abl ノックアウトマウス胎児線維芽細胞内の TGF-β誘導性の I 型コラーゲンの発現が消失した(図 1a)。

Transient transfection 法を用いて、Bcr-Abl を NIH3T3 細胞に一時的に導入したところ、正常マウス胎児線維芽細胞に比べ I 型コラーゲンの基礎的発現が亢進し、TGF-β刺激による更なる亢進を認めた。またメシル酸イマチニブを前投与したところ、TGF-βによる誘導のみならず基礎的発現も抑制した(図 1b)。

また TGF-βに反応するプロモーター領域を含む COL1A2-CAT と Bcr-Abl を一時的に形質導入し、レポーターアッセイを行ったところ、Bcr-Abl による I 型コラーゲンの基礎的転写亢進を認めた(図 1c)。

以上により、TGF-β誘導による I 型コラーゲンの転写・発現における c-Abl の重要性が確認された。

2) dSSc 真皮における c-Abl 活性化についての検討

対照健常者皮膚真皮と dSSc 患者皮膚真皮において c-Abl ならびに phospho-c-Abl の免疫組織染色を行った。真皮の c-Abl 陽性線維芽細胞を計測したところ、健常者と dSSc 患者では統計学的差は認めなかった(図 2a)。一方 phospho-c-Abl 陽性線維芽細胞では、dSSc 患者真皮において有意に増加していた(図 2b)。またブレオマイシン真皮局注全身性強皮症モデルマウスでも同様の検討を行ったところブレオマイシン局注により phospho-c-Abl 陽性線維芽細胞が有為に増加した(data not shown)。

以上により dSSc 患者真皮において線維芽細胞内の c-Abl のリン酸化が上昇しており、dSSc 真皮における c-Abl 活性化の亢進が示唆された。

3) TGF-β誘導性線維化に対するメシル酸イマチニブの作用についての検討

次に fore skin 由来線維芽細胞に TGF-β刺激を行い、TGF-β関連細胞外マトリックス蛋白の転写調節や翻訳、発現に対するメシル酸イ

マチニブの作用を評価した。

Northern blot 法において、TGF- β 刺激後 24 時間、48 時間において I 型コラーゲン、Fibronectin、CTGF、PAI-1 がそれぞれ mRNA 翻訳が著明に亢進していた。メシル酸イマチニブを TGF- β 刺激 30 分前に前投与することによりこの誘導を阻害することができた(図 3a)。また I 型コラーゲンと PAI-1 の蛋白の発現を Western blot 法で確認したところ、24 時間 TGF- β 刺激による誘導はメシル酸イマチニブの前投与により抑制された(図 3b)。

更に COL1A2-CAT レポーターコンストラクトの一時的な導入によるレポーター解析ではメシル酸イマチニブの前投与による I 型コラーゲンの TGF- β 誘導が消失していた(図 3c)。

以上により、TGF- β 誘導性線維化作用はメシル酸イマチニブにより抑制されたと考えた。

4) TGF- β /Smad シグナル伝達系に対するメシル酸イマチニブの作用についての検討

Western blot 法により成人正常線維芽細胞における TGF- β 刺激 90 分後の Smad3 のリン酸化を評価した。TGF- β 刺激 30 分前のメシル酸イマチニブの前投与を行ったが、Smad3 のリン酸化に影響はなかった(図 4a)。また fore skin 由来線維芽細胞において、TGF- β 刺激 90 分後に核内蛋白を採取し、Smad が結合するオリゴヌクレオチドである Smad binding element(SBE)により沈降させ、phospho-Smad を抗体により検出したところ、TGF- β 刺激による phospho-Smad2 ならびに phospho-3 の核内への集積は、メシル酸イマチニブにより影響を受けなかった(図 4b)。

これらにより、TGF- β /Smad シグナル伝達系非依存的にイマチニブが作用していると考えた。

5) dSSc 線維芽細胞に対するメシル酸イマチニブの効果についての検討

最後に dSSc 由来線維芽細胞と成人正常線維芽細胞を用いて I 型コラーゲン増生に対するメシル酸イマチニブの効果について検討した。

dSSc 由来線維芽細胞では TGF- β 非存在下においても I 型コラーゲンの恒常的な産生亢進が認められ、メシル酸イマチニブの投与によりこの亢進した産生が抑制された(図 5)。

これによりメシル酸イマチニブは SSc 線維芽細胞における亢進した I 型コラーゲンの増生を抑制することが示唆された。

D. 考 案

c-Abl ノックアウトマウス胎児線維芽細胞を用いて TGF- β 誘導性の I 型コラーゲンの産生を評価したところ、TGF- β 刺激がなくても I 型コラーゲンを検出したことから(図 1a)、c-Abl が基礎的なコラーゲン産生に必須ではないと考えられるが、TGF- β 刺激による産生の亢進は欠如しており(図 1a)、また Transient transfection 法による恒常活性型の Bcr-Abl の導入により、コラーゲン増生が相加的に亢進していることを Western blot 法、コラーゲンのプロモーター領域のレポーター解析により示され(図 1b、c)、TGF- β 刺激によるコラーゲン増生におけるシグナル伝達に c-Abl が重要な働きをしていると考えられる。

既に c-Abl より下流のシグナル伝達系を担う蛋白として p38、ERK、p73 などの報告がなされているが(14, 15, 5)、線維芽細胞における TGF- β 刺激を伝達するシグナル系は未だ明らかになっていない。

そして c-Abl 上のスレオニンやチロシン残基のリン酸化が c-Abl のキナーゼ活性に重要であることが既に示されており(14)。また c-Abl のリン酸化の著しい上昇が子宮漿液性乳頭癌の免疫組織染色により確かめられている(15)。これらの知見を踏まえると、今回我々が示した dSSc 患者真皮における線維芽細胞の c-Abl のリン酸化の亢進は(図 2b)、dSSc 真皮の線維芽細胞内での c-Abl の活性化の亢進を示唆していると考え、SSc での TGF- β 誘導性の線維化に c-Abl の活性亢進が関連していると考えられる。

一方、慢性骨髄性白血病の決定的な検査所見であるフィラデルフィア染色体は、その原因である第 9 染色体と第 22 染色体の転座により生じ、この転座により産生される融合蛋白 Bcr-Abl が慢性骨髄性白血病の病因と考えられている(16)。

c-Abl キナーゼ阻害剤であるメシル酸イマチニブは慢性骨髄性白血病がん細胞が異常産生する融合蛋白 Bcr-Abl の恒常的な活性亢進を抑制する目的で開発された(17)。メシル酸イマチニブは Bcr-Abl が有するキナーゼドメインを覆うことにより Bcr-Abl 自身のリン酸化を抑制し、この薬理効果は正常 c-Abl のリン酸化抑制にも有効である。

我々は正常線維芽細胞における線維化に関連する I 型コラーゲンを含む各種蛋白の

TGF- β 誘導による翻訳亢進と、I 型コラーゲンのプロモーター活性亢進と強発現をメシル酸イマチニブが抑制することを示した(図 3a、b、c)。また *in vitro* において dSSc 由来の線維芽細胞の恒常的な I 型コラーゲン産生亢進をメシル酸イマチニブが抑制したことも示した(図 6)。既に肺、腎臓、骨髄における線維化をこのメシル酸イマチニブが抑制したとする発表が相次いでおり(8-11)、SSc の TGF- β 誘導性線維化においても、メシル酸イマチニブの抗線維化作用が期待される。

なお、メシル酸イマチニブの抗線維化作用は、TGF- β 刺激による線維化に著しい反応を示す Smad シグナル伝達系を介さずに作用していると考えられるが(図 5a、b)、数ある TGF- β 刺激のシグナル伝達系のうちいずれが重要な働きをしているかは更なる検討が必要である。

また Smad シグナル経路を介さない c-Abl のキナーゼ阻害剤であるメシル酸イマチニブは、線維芽細胞特異的に作用し、他のメカニズムによる抗線維化作用を有する治療方法と合わせ利用することにより、相乗的な抗線維化効果を発揮することが期待出るかもしれない。

E. 結 論

c-Abl は線維化反応をもたらす TGF- β に対する新しい細胞内の標的であり、コラーゲン産生刺激に必要な蛋白と考えられる。

全身性強皮症病変部において、メシル酸イマチニブは線維芽細胞特異的に Smad 非依存性シグナル伝達系の TGF- β 誘導性線維化反応を抑制すると考えられた。

c-Abl を標的にすることは、全身性強皮症

や他の線維化病変における線維化反応を阻害する新しい戦略となり得ると考えた。

F. 文 献

1. Smith EA, LeRoy EC. A possible role for transforming growth factor-beta in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* 1990 Dec;95(6 Suppl):125S-127S.
2. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000 Oct;43(10):2230-9.
3. Renshaw MW, McWhirter JR, Wang JY. *Mol Cell Biol.* 1995 Mar;15(3):1286-93.
4. Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JY, Hope TJ. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 23;95(13):7457-62.
5. Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature.* 1999 Jun 24;399(6738):814-7.
6. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996 Jan 1;56(1):100-4.
7. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000 Sep 15;289(5486):1938-42.
8. Beham-Schmid C, Apfelbeck U, Sill H, Tsybrovsky O, Hofler G, Haas OA, Linkesch W. Treatment of chronic myelogenous leukemia with the tyrosine kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. *Blood.* 2002 Jan 1;99(1):381-3.
9. Daniels CE, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Murphy SJ, Limper AH, Leof EB. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(9):1308-16.
10. Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J.* 2005 Jan;19(1):1-11.
11. Distler JH, Jungel A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE, Michel BA, Hauser T, Schett G, Gay S, Distler O. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2006 Dec 28;56(1):311-322

12. Wilkes MC, Leof EB. Transforming growth factor beta activation of c-Abl is independent of receptor internalization and regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and PAK2 in mesenchymal cultures. *J Biol Chem.* 2006 Sep 22;281(38):27846-54. Epub 2006 Jul 24.
13. Koleske AJ, Gifford AM, Scott ML, Nee M, Bronson RT, Miczek KA, Baltimore D. Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron.* 1998 Dec;21(6):1259-72.
14. Brasher BB, Van Etten RA. c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *J Biol Chem.* 2000 Nov 10;275(45):35631-7.
15. Slomovitz BM, Broaddus RR, Schmandt R, Wu W, Oh JC, Ramondetta LM, Burke TW, Gershenson DM, Lu KH. Expression of imatinib mesylate-targeted kinases in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004 Oct;95(1):32-6. Click here to read
16. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature.* 1985 Jun 27-Jul 3;315(6022):758-61.
17. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Related Articles, Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996 May;2(5):561-6.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
2006 American College of Rheumatology Annual Meeting

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし