

図1: CAT法による、正常人および強皮症患者皮膚由来線維芽細胞における alpha2(I)コラーゲン遺伝子転写活性の比較。

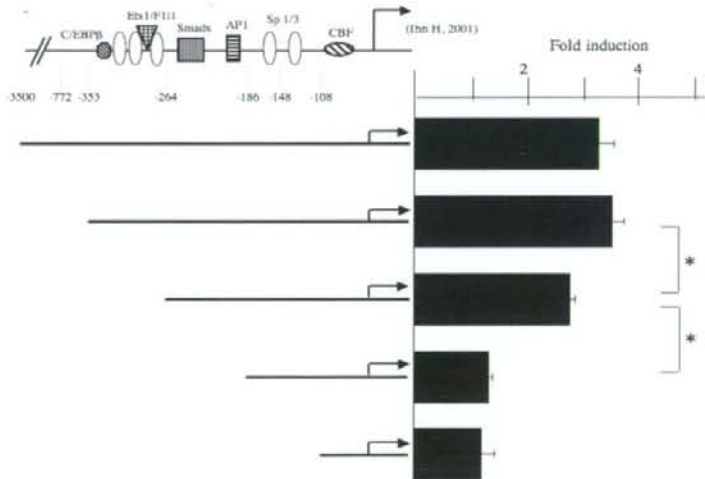


図2:CAT法による、正常および強皮症患者皮膚由来線維芽細胞における連続5' deletion変異 alpha2(I)コラーゲン遺伝子プロモーターの転写活性の測定。

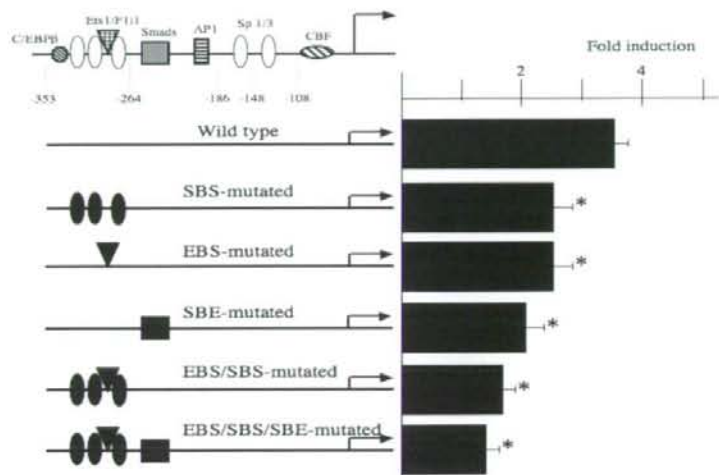


図 3:CAT 法による、正常および強皮症患者皮膚由来線維芽細胞における部位特異的変異導入 alpha2(I)コラーゲン遺伝子プロモーターの転写活性の測定。

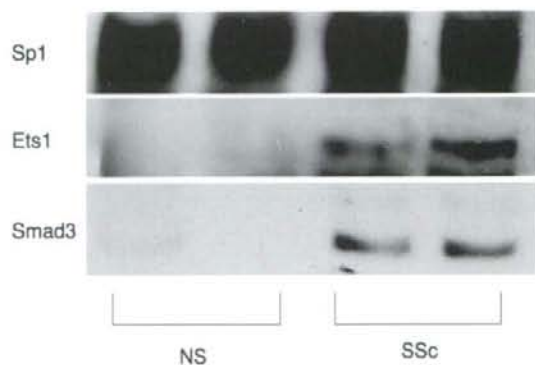


図 4:DNA affinity precipitation 法を用いた正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞における Sp1, Ets1 および Smad3 の alpha2(I)コラーゲン遺伝子プロモーターへの結合能の比較。

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

低酸素刺激による真皮線維芽細胞のI型コラーゲン代謝とHIF-1との関連

研究分担者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
協力者 横山洋子 群馬大学医学部医学系研究科皮膚病科学
協力者 安部正敏 群馬大学医学部医学系研究科皮膚科学講師
研究代表者 佐藤伸一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授

研究要旨

強皮症における低酸素応答性転写因子（hypoxia inducible factor：HIF-1）の役割と、そのサイレンシングが将来の治療応用が可能か否かに関する基礎的検討を行った。

まず、健常人および強皮症患者由来の真皮線維芽細胞を低酸素刺激し、I型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1のmRNA発現量およびタンパク量を通常酸素濃度と比較検討した。その結果、I型コラーゲンは、いずれの線維芽細胞でもmRNA発現量およびタンパク量ともに低酸素刺激で増加した。また、健常人由来線維芽細胞では低酸素刺激24時間でTIMP-1量も増加していた。いずれの細胞もMMP-1に有意な変化はみられなかった。これらのことから、全身性強皮症においては低酸素刺激によりI型コラーゲン代謝のバランスが合成促進の方へ傾き、真皮における病的線維化の一因になる可能性が考えられた。次に、低酸素刺激によるHIF-1 α サブユニットの経時的発現は、健常人および強皮症患者由来の真皮線維芽細胞とも12時間をピークに増加しその後減少することを確認した。RNAi法でHIF-1 α をサイレンシングしたところ、健常人および強皮症患者由来の真皮線維芽細胞ともにMMP-1のmRNA発現量およびタンパク量の増加がみられ、HIF-1がMMP-1に抑制的に作用することが明らかになった。この関与は低酸素だけでなく、通常酸素濃度でもみられた。I型コラーゲン、TIMP-1についてはHIF-1の関与はなかった。以上より、HIF-1 α siRNAの局所的な導入により、硬化部位の酸素濃度にかかわらずMMP-1の産生亢進によって皮膚硬化が改善する可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症の病態形成においては、血管内皮細胞傷害によって惹起される低酸素状態が深く関与することが指摘されている。しかし、NOや血管内皮細胞傷害因子の面からの検討が殆どであり、低酸素刺激により真皮線維芽細胞のコラーゲン産生が促進する」とした報告（1）以外に、真皮細胞外基質と低酸

素状態の関連を調べた報告は少ない。さらに低酸素ストレスに対する応答機構の中心因子である低酸素応答性転写因子（hypoxia inducible factor-1, HIF-1）の関与については未だ不明な点が多い。今回我々は、全身性強皮症における低酸素状態と細胞外基質代謝との関連を見出すことにより、全身性強皮症に対する新たな治療法の開発も視野に入れた基礎的検討

を行った。

B. 研究方法

1) 細胞培養

健康人7名および全身性強皮症患者3名について、患者の同意を得た上で皮膚を採取し、型通りの explant culture 法にて真皮由来線維芽細胞を得た。線維芽細胞は10%牛胎児血清含有 DMEM 培地にて継代し、実験は継代3~8代目のものを供した。低酸素培養はマルチガスインキュベータ (アステック) 内で1% O₂条件下で無血清培地を用い培養した。

2) HIF-1 α サイレンシング

HIF-1 α サイレンシングはRNAi法を用いた。siRNAはBLASTサーチを用いてHIF-1 α に特異的な配列をデザインし、センスとアンチセンスをアニーリングして入手した。線維芽細胞を6ウェルプレートに1ウェルあたり1x10⁶個播種し、リポフェクタミン2000 (invitrogen) を使用しトランスフェクションした。低酸素実験にはトランスフェクション後26時間以降の細胞を使用した。なお、サイレンシング確認は細胞抽出液10~20 μ gを電気泳動し、HIF-1 α 抗体(BD Transduction Laboratories)を用いてウエスタンブロットを行った。また同抗体を使用し、蛍光抗体法にてHIF-1 α の発現を確認した。

3) mRNA発現とタンパク量の定量

mRNA発現実験は、培地を無血清培地に交換し、低酸素または通常酸素濃度(CO₂インキュベーター)で6、24、48時間培養した後、細胞を回収し ISOGENE (Nippongene) を用いて mRNA を抽出した。Random primer を用いた逆転写反応にて cDNA を合成し、Taqman Gene Expression Assays および7300 Real time PCR System (Applied Biosystems)を用いてI型コラーゲン(COL1A1)、MMP-1、TIMP-1、18S(インターナルス

タンダード)の mRNA 発現量を定量した。タンパク量は、24 および 48 時間培養した後の培養上清を、I型コラーゲンはタカラバイオ社、MMP-1、TIMP-1は第一ファインケミカル社製の ELISA 法で定量した。培養上清の回収と同時に各ウェルの細胞数を測定し、細胞数あたりのタンパク量を算出の上比較検討した。また、線維芽細胞を低酸素に0.5、1、2、4、8、12、24、48時間下にて培養し、細胞抽出液を用いてHIF-1 α の発現をウエスタンブロット法で確認した。検出されたバンドは1次元電気泳動画像解析ソフトウェア Basic Quantifier (リライオン)を用いて定量した。

C. 研究結果

1) 低酸素と通常酸素濃度におけるI型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1のmRNA発現およびタンパク量の比較

健康人由来の線維芽細胞(n=7)では通常酸素濃度に比べ、低酸素刺激でI型コラーゲンのmRNA発現量が有意に増加した。強皮症由来線維芽細胞(n=3)のため、有意差検定は行わなかったが、いずれの時間も低酸素条件下で増加する傾向がみられた。MMP-1、TIMP-1のmRNA発現量については健康人、強皮症ともに低酸素刺激による有意な変化はなかった(図1)。

一方、タンパク量については、I型コラーゲン合成量は健康人由来線維芽細胞で通常酸素濃度に比較し低酸素刺激で有意に増加した。強皮症由来細胞でも低酸素刺激で増加した。健康人由来細胞ではTIMP-1量も24時間で有意に増加していた。しかし、それ以外では低酸素刺激により有意に変化したものはなかった(図2)。

2) 低酸素刺激におけるHIF-1 α の経時的発現

低酸素刺激による健康人(n=3)および強皮症由来細胞(n=3)のHIF-1 α の経時的発現は、いずれの細胞

でも経時的に増加し、12時間でピークを迎えた。また、0時間（通常酸素濃度）でも僅かながら発現を認めた(図3)。

3) HIF-1 α サイレンシングによるI型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1のmRNA発現およびタンパク量

ウェスタンブロット法にて、HIF-1 α 抑制が確認できた細胞を用いて実験を進めた(図4-a)。さらに蛍光抗体法では、未処理のコントロールおよびリポフェクタミン2000のみ処理のMOCKでは核内にHIF-1 α の蛍光がみられたが、HIF-1 α サイレンシングにより、核内のHIF-1 α の蛍光が減弱することを確認した(図4-b)。

HIF-1 α サイレンシングによるそれぞれのmRNA発現量をmockとHIF-1 α siRNAトランスフェクションで比較した。その結果、I型コラーゲン、TIMP-1では健常人由来線維芽細胞(n=5)および強皮症由来真皮線維芽細胞(n=3)のいずれも、通常酸素濃度および低酸素刺激による発現量に明らかな変化はなかった。一方、MMP-1のmRNA発現量はHIF-1 α サイレンシングにより、健常人由来細胞で通常酸素濃度、低酸素刺激ともにすべての時間（6、24、48時間）で有意に増加し、強皮症由来線維芽細胞でも同様の傾向が見られた(図5)。

タンパクレベルで比較すると、mRNA発現と同様にI型コラーゲン合成量、TIMP-1量ではHIF-1 α サイレンシングによる明らかな変化はなかった。一方、MMP-1量は健常人由来線維芽細胞では、HIF-1 α サイレンシングによって、通常酸素濃度、低酸素刺激ともに、24時間と48時間で有意に増加していた。強皮症由来線維芽細胞でも同様の傾向だった(図6)

D. 考案

全身性強皮症にみられる病的線維化は、細胞外基

質の産生と分解の均衡が崩れることによりもたらされると考えられている。その原因はTGF- β をはじめ様々な増殖因子が考えられるが、今回の検討から、ヒト真皮線維芽細胞は低酸素刺激によってもI型コラーゲン代謝のバランスが合成促進へと傾き、結果として細胞外にコラーゲンが蓄積されることが明らかとなった。

低酸素ストレスに対する応答機構の中心因子であるHIF-1は、解糖系酵素の活性化、血管新生による血流量増加、赤血球増加による酸素運搬効率の増大等をもたらすことが知られている(2、3)。HIF-1はHIF-1 α とHIF-1 β のサブユニットから構成されるヘテロ二量体で、このうちHIF-1 β はARNTであり、低酸素応答に直接関与するのはHIF-1 α である。通常の酸素濃度ではHIF-1 α タンパクは合成後速やかにユビキチン系で分解される。しかし、低酸素下では、そのまま安定化し核内に移行して β ユニットと二量体を形成し、DNAの低酸素反応領域に結合して下流にある標的遺伝子の転写を活性化する。

今回の検討では、健常人由来真皮線維芽細胞と強皮症由来真皮線維芽細胞ともにHIF-1 α サイレンシングによりMMP-1は増加しており、HIF-1のI型コラーゲン代謝におけるMMP-1抑制効果が明らかとなった。また、その作用は低酸素下だけでなく、通常酸素濃度においてもみられ、その増加は低酸素下と同程度以上である事実は興味深く、今後さらに検討を進める予定である。

E. 結論

今回の研究からHIF-1 α siRNAの局所的な導入により、硬化部位の酸素濃度にかかわらず、MMP-1産生が亢進することにより皮膚硬化が改善する可能性が期待され、HIF-1 α をターゲットとしたRNAi法は将

来的に強皮症における皮膚硬化改善の治療法となる可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Falanga V, Martin TA, Takagi H, Kirsner RS, Helfman T, Pardes J, Ochoa MS. Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1993 Nov; 157(2):408-12.
2. Hirota K. Hypoxia-inducible factor 1, a master transcription factor of cellular hypoxic gene expression. *J Anesth.* 2002; 16(2):150-9.
3. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006 Nov; 70(5):1469-80.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

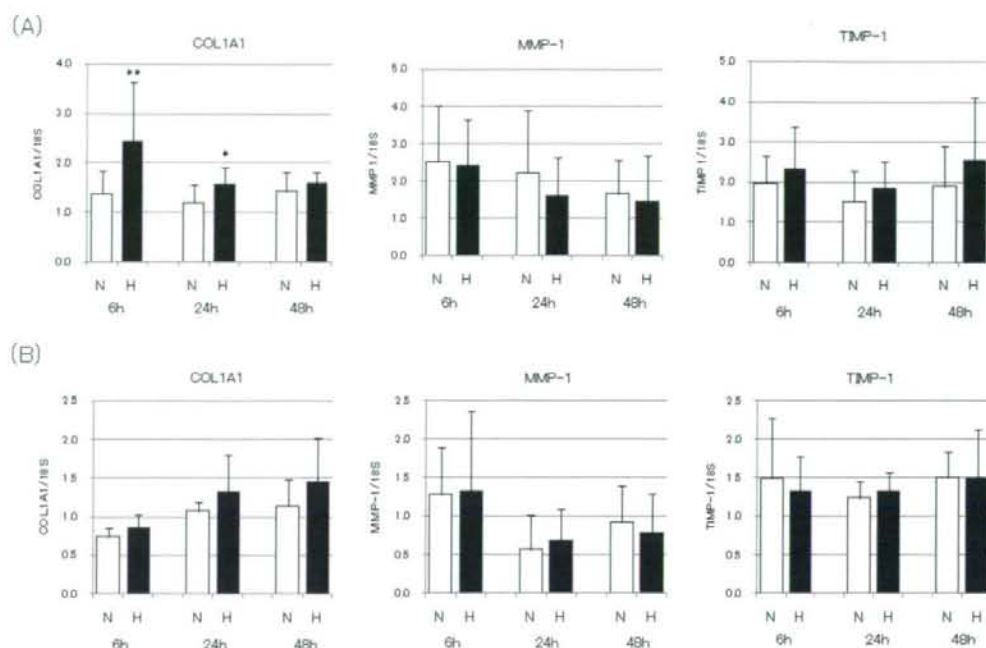


図1: 低酸素刺激による真皮線維芽細胞におけるI型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 mRNAの発現量の変化。(A) 健康人由来真皮線維芽細胞(n=7)、(B) 強皮症由来真皮線維芽細胞(n=3)、N: Normoxia 通常酸素濃度、H: Hypoxia 低酸素状態 (1% O₂)、mean±S.D.、** p<0.02、* p<0.05

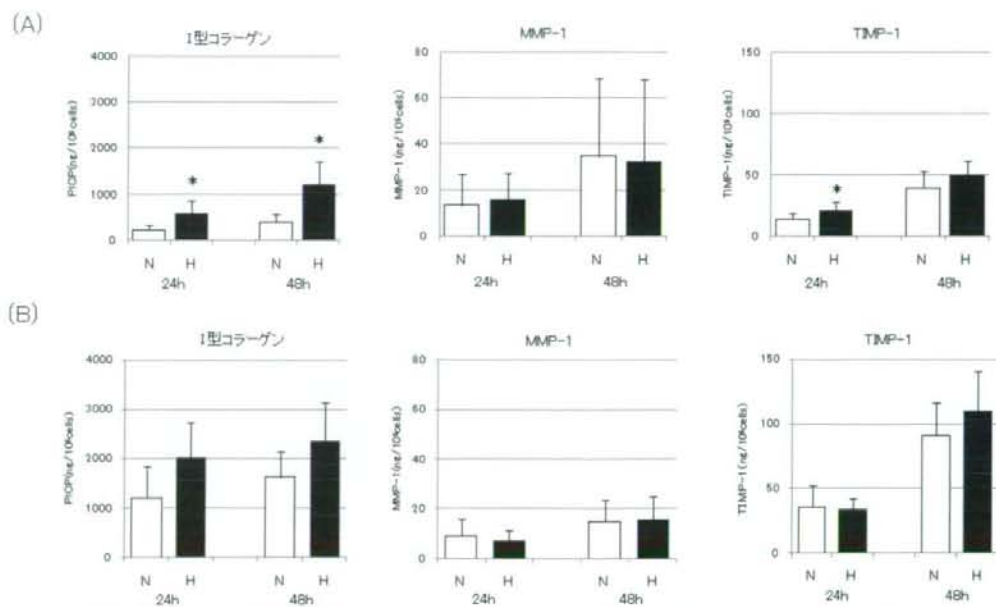


図2: 低酸素刺激による真皮線維芽細胞におけるI型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1タンパク産生量の変化。各データを比較するため、細胞数10⁵あたりの量を算出。(A) 健康人由来真皮線維芽細胞(n=7)、(B) 強皮症由来真皮線維芽細胞(n=3)、N: Normoxia 通常酸素濃度、H: Hypoxia 低酸素状態 (1% O₂)、mean±S.D.、* p<0.05

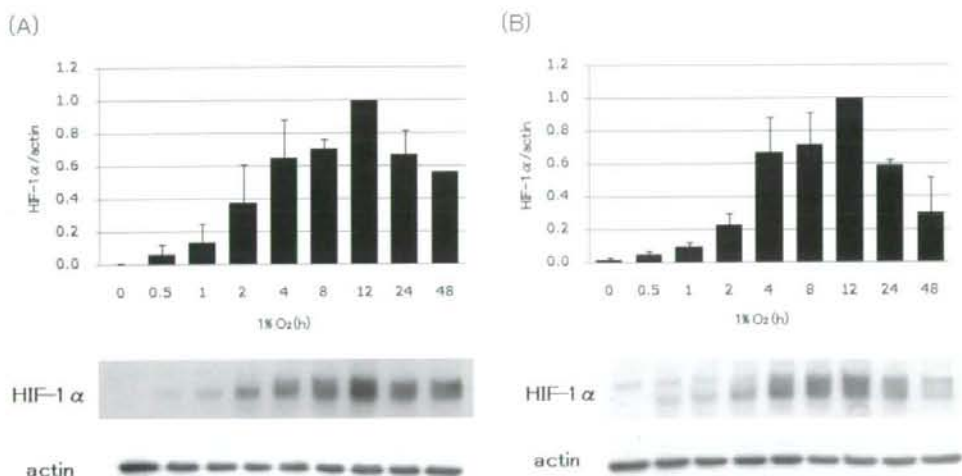


図 3: 低酸素状態における HIF-1 α 発現の経時的変化。最大バンドの定量値を 1.0 としてグラフに表した。
 (A) 健康人由来真皮線維芽細胞(n=3)、(B) 強皮症由来真皮線維芽細胞(n=3)、mean+S.D.

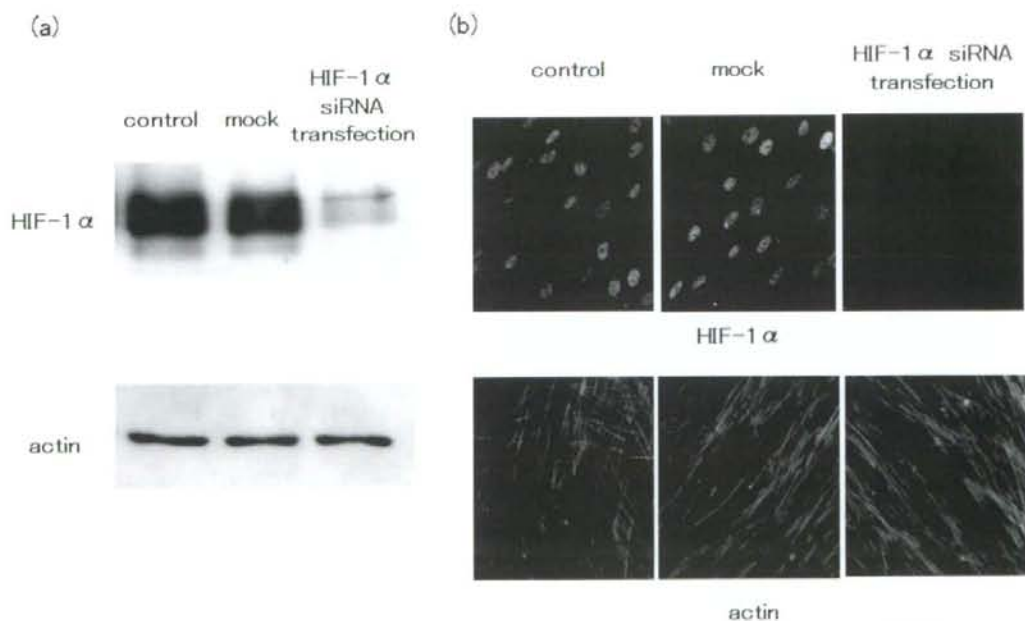


図 4: RNAi 法による真皮線維芽細胞の HIF-1 α 発現抑制。(a)ウエスタンブロット法、(b)蛍光抗体法

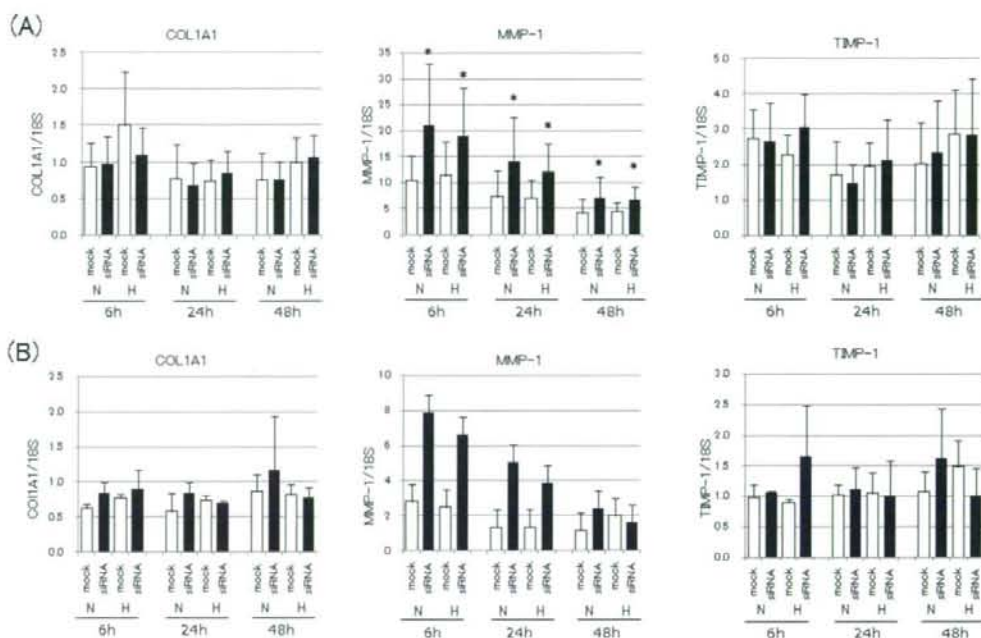


図5: HIF-1 α サイレンシングによるI型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 mRNAの発現量の変化。それぞれをmockと比較した。(A) 健康人由来真皮線維芽細胞(n=5)、(B) 強皮症由来真皮線維芽細胞(n=3)、siRNA: HIF-1 α siRNA transfection、N: Normoxia通常酸素濃度、H: Hypoxia低酸素状態 (1% O₂)、mean±S.D.、* p<0.05

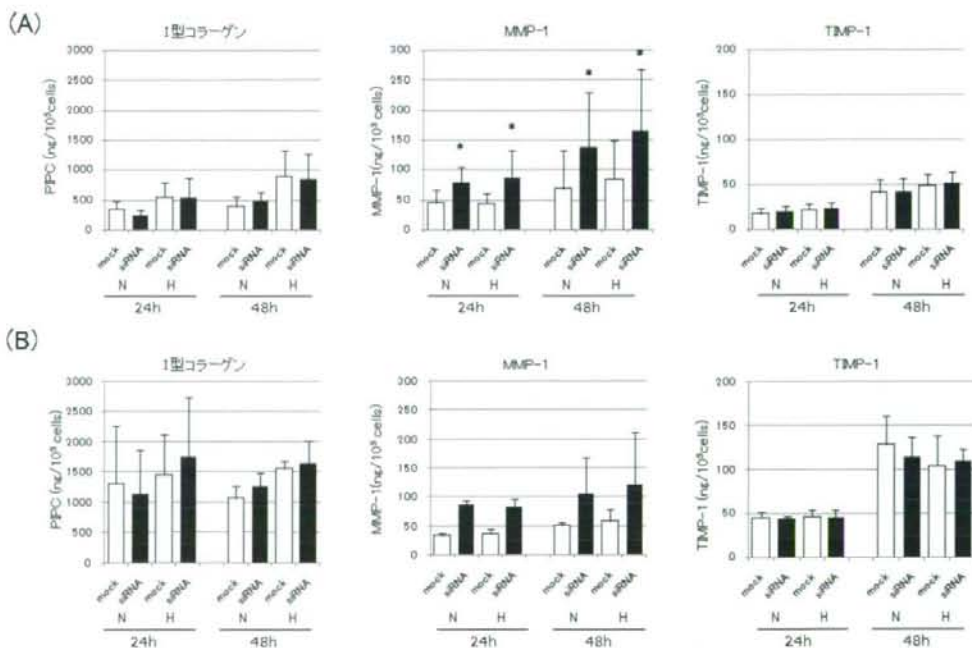


図6: HIF-1 α サイレンシングによるI型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 タンパク産生量の変化。各データを比較するため、細胞数10⁵あたりの量を算出しmockと比較した。(A) 健康人由来真皮線維芽細胞(n=5)、(B) 強皮症由来真皮線維芽細胞(n=3)、siRNA: HIF-1 α siRNA transfection、N: Normoxia通常酸素濃度、H: Hypoxia低酸素状態 (1% O₂)、mean±S.D.、* p<0.05

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

bFGF による培養ヒト皮膚線維芽細胞増殖刺激の機序について

研究分担者 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 牧野 貴充 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学大学院生
協力者 伊方 勝敏 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学大学院生
協力者 藤澤 明彦 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学大学院生
協力者 神人 正寿 熊本大学大学院医学薬学研究部形成外科学講師
協力者 井上 雄二 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学講師

研究要旨

basic Fibroblast growth factor(bFGF、FGF-2)は線維芽細胞のほか、表皮細胞、血管内皮細胞での細胞増殖や分化誘導、炎症細胞、マクロファージの活性化などの作用を有する。創傷治癒において肉芽形成、血管新生、再上皮化など重要な役割を担っている。2001年遺伝子組み換えヒト bFGF が皮膚潰瘍治療薬として保険適応され、現在、皮膚潰瘍の治療において幅広く使用されている。また強皮症に伴う難治性の指尖潰瘍、皮膚潰瘍でも非常に有用である。今回我々は *in vitro* で bFGF によるヒト皮膚線維芽細胞の増殖刺激の機序について検討を行った。bFGF は高い細胞増殖刺激活性を示し、MEK 特異的阻害剤(PD98059,U0126)によって細胞増殖刺激は阻害された。また免疫ブロット法を用いて細胞内シグナル伝達経路である extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 の活性化を認めた。以上の結果より bFGF の細胞増殖刺激に MEK-ERK1/2 が関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

Fibroblast growth factors(FGFs)は生体内で多臓器の細胞に分布するポリペプチドの増殖因子の一群を総称する。basic Fibroblast growth factor(bFGF、FGF-2)は、現在同定されている22種類のFGFsの1種である¹⁾。

bFGFの機能は、線維芽細胞のほか、表皮細胞での細胞増殖や分化誘導、制御、また血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の増殖、炎症細胞、マクロ

ファージの活性化などであり、多機能因子として作用する。

2001年遺伝子組み換えヒト bFGF が皮膚潰瘍治療薬として保険適応され、今後、骨組織再生、歯槽骨再生などの分野においても応用が期待されている。

今回、我々は *in vitro* で bFGF によるヒト皮膚線維芽細胞の増殖刺激試験を行った。bFGF の線維芽細胞増殖活性は以前より広く認識されてい

るが、その詳細なメカニズムは生物種、また細胞種によって相違点が多く、不明な点が多い。今回、我々は *in vitro* でヒト皮膚線維芽細胞を用いて bFGF の細胞増殖刺激の機序を細胞内シグナル伝達について検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

線維芽細胞は健常者より皮膚生検にて得た。熊本大学医学部付属病院倫理委員会より承諾された文書にて説明し同意、署名を得た。初代培養は 10%ウシ血清を加えた MEM 培養液で 37°C、5%CO₂ 培養器内で個別に培養を行った^{2,3)}。フラスコ内で単層培養にて維持し、3-7 継代目の細胞を用いた。

2) 細胞数測定法

ヒト皮膚線維芽細胞を 24 穴プレート中で 2×10⁴/well の濃度で播種し、10%ウシ血清含有 MEM 培養液で 48 時間培養し、培養液を無血清 MEM 培養液に替え 24 時間培養し、細胞を静止状態にした。その後 1%ウシ血清含有 MEM 培養液中に bFGF を添加し一定時間培養し、細胞をトリプシン-EDTA (免疫生物研究所社) で剥離した後、細胞数を Coulter® Particle Counter (Beckman Colter 社) で測定した⁴⁾。

3) 免疫プロット法

ヒト皮膚線維芽細胞を 6 穴プレート中で 4×10⁵/well の濃度で培養した。細胞を静止状態にした後、阻害剤、bFGF で刺激し一定時間反応させた。PBS で 2 回洗浄後、Denaturing Cell Extraction Buffer (Biosouce 社)、Protease Inhibitor Cocktail (SIGMA 社)、Phenylmethylsulfonyl fluoride (Alexis

Biochemical 社)を加え、攪拌、遠心分離を行い、細胞から抽出液を精製した。SDS, 2-mercaptoethanol を加え、8%SDS-PAGE スラブルゲルで電気泳動を行った。泳動後、PVDF 膜に転写し、抗 p44/42MAP Kinase ウサギ抗体 (Cell Signaling 社)、抗 phospho-p44/42MAP (Thr202/Tyr204) Kinase ウサギ抗体 (Cell Signaling 社)を一次抗体として反応後、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling 社)を二次抗体として反応させた。化学発光検出には Chemi-Lumi One (ナカライテスク社)を用いた。⁵⁻⁸⁾

4) RNA 干渉法

多種の細胞での遺伝子発現抑制効果が証明されているデザイン済の siRNA である、SignalSilence® p44MAPK siRNA (Human Specific) (Cell Signaling 社)、SignalSilence® Pool p42 MAPK siRNA (Cell Signaling 社)を用いた。また生体内の mRNA と同一性がなく、RNAsiRNA を陰性コントロールとして導入試薬に Lipofectamine RNAi max (Invitrogen 社)を用い、指示書に従い RNA 導入を行った。導入 48 時間後に無血清 MEM 培養液に替え 24 時間培養し、bFGF を添加し細胞数測定法、免疫プロット法で評価を行った。

5) 統計解析法

Mann-Whitney U 検定を行い、順位和より 2 群間の比較を解析した。P<0.05 の場合を有意の差と判定した。

C. 研究結果

1. bFGF は濃度依存性に線維芽細胞の増殖を刺激した (表 1)。

培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、上記の細胞数測定法を行った。1%ウシ血清含有 MEM 培養液を陰性コントロールとし、bFGF の濃度を 10, 20, 50, 200, 500ng/ml と変化させ、培養液に添加した。bFGF 添加 144 時間後に細胞数を測定した。結果は濃度依存性に線維芽細胞数の増加を認め、bFGF 500ng/ml では増殖活性が减弱するいわゆる“ベル型”の反応を呈した。本研究で用いた bFGF 50ng/ml の濃度ではコントロールと比較し約 2 倍の細胞増殖活性を認めた。

2. bFGF は時間依存性に線維芽細胞の増殖を刺激した (表 2)。

同様に 1%ウシ血清含有 MEM 培養液中に bFGF 50ng/ml を添加し細胞数測定法を行った。結果は時間依存性に線維芽細胞数の増加を認めた。本研究では bFGF 添加後の培養時間を 144 時間に設定した。

3. MEK 阻害剤は bFGF による細胞増殖活性を抑制した (表 3)。

MEK 特異的阻害剤 (PD98059, U0126) をそれぞれ 10 μ M, 30 μ M の濃度で前処理し 1 時間後に、bFGF 50ng/ml を添加し 144 時間後に細胞数測定法を行った。結果は PD98059, U0126 のそれぞれにおいて濃度依存性に細胞増殖活性を抑制した。また p38MAPK 阻害剤である SB203580 は細胞増殖活性を抑制しなかった。

4. bFGF は ERK をリン酸化し活性化し、MEK 阻害剤にて ERK の活性化は阻害された。

bFGF 50ng/ml を添加後、上記の免疫プロット法を行った。結果は bFGF を添加し 15 分後より ERK1/2 のリン酸化を認め、徐々に减弱しながら bFGF 添加 4 時間後まで ERK のリン酸化は持続した (図 1)。次に PD98059, U0126 にて前処理し 1

時間後に、bFGF 50ng/ml を添加し 15 分後に免疫プロット法を行った。結果は PD98059 によって部分的に ERK のリン酸化は阻害され、U0126 によって、より強力に ERK のリン酸化は阻害された (図 2)。

5. ERK1,2 siRNA にて ERK の合成は抑制され、細胞増殖活性は抑制された。

ERK1,2 のそれぞれの mRNA に相補的な siRNA を用いて上記の RNA 干渉法を行った。siRNA を導入後に bFGF を添加し、免疫プロット法、細胞数測定法を行った。免疫プロット法では、ERK1,2 の siRNA によってそれぞれ ERK1,2 の合成は抑制され、さらに ERK1,2 のリン酸化も抑制された (図 3)。細胞数測定法でも同様に ERK1,2 の siRNA によって細胞増殖活性は抑制された (表 4)。

D. 考案

Fibroblast growth factors (FGFs) は生体内で多臓器の細胞に分布するポリペプチドの増殖因子の一群を総称する。1974 年最初に、牛の脳下垂体で発見され⁹⁾、以後積極的に FGF 遺伝子研究が進み、現在、ヒトでは構造、生化学的特長、分布より 7 種類のサブファミリーに分類され、22 種類の FGFs (FGF1-14, 16-23) が同定されている¹⁾。

一方、FGF レセプター (FGFR) は、免疫グロブリン様部分、膜貫通部分、そして細胞質内のチロシンキナーゼ部分の 3 つの領域に分けられる、膜貫通型のチロシンキナーゼ受容体で二量体を形成している。FGFR 1-5 の 5 種類が存在し、生体内で FGFR-1 は脳、骨、腎臓、皮膚、肺、心臓、筋の細胞に分布し、FGFR-2 は肝臓、脳、腎臓、

皮膚、肺、FGFR-3 は脳、腎臓、皮膚、肺、FGFR-4 は肺、肝臓、腎臓、FGFR-5 は脳、皮膚、肺、精巣と幅広く多種の細胞上に重複しながら存在する。なお皮膚線維芽細胞には FGF-1,2 が発現している¹⁰⁾。それぞれの FGFR に複数のアイソフォームが存在し、22 種類の FGF に対応している^{11,12)}。

FGFs の機能は、線維芽細胞のほか、表皮細胞での細胞増殖や分化誘導、制御を有する形態形成因子、また血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の増殖、炎症細胞、マクロファージの活性化など組織障害時の組織修復因子、生体の恒常性を維持する代謝調節因子として多機能におよび、重要な役割を担っている¹³⁾。

1984 年 FGF は精製法の違いから、acidic Fibroblast growth factor と basic Fibroblast growth factor (bFGF、FGF-2) に分類され¹⁴⁾、その後、bFGF は蛋白合成時の翻訳開始領域の差から 18-24kDa の異なる分子量の bFGF が相次いで分離された¹⁵⁾。その内で、18kDa の bFGF は細胞質内に局在し、高分子型 (22,22.5,24kDa) bFGF は主に核内に局在している¹⁶⁾。1986 年に bFGF のヒト型 cDNA がクローニングされ¹⁷⁾、2001 年遺伝子組み換えヒト bFGF が皮膚潰瘍治療薬として保険適応され、今後、骨組織再生、歯槽骨再生などの分野においても応用が期待されている¹⁸⁾。

本研究で行った増殖刺激試験の結果より、bFGF は濃度依存性、時間依存性にヒト皮膚線維芽細胞の増殖を刺激した。また Gospodarowicz⁸⁾ により報告されているように、マウス由来の 3T3 線維芽細胞では、無血清培養液中で、bFGF は細胞増殖活性を示さないが、血清含有培養液

では bFGF は増殖を刺激する。本研究でも低濃度の 1% ウシ血清培養液中では bFGF 非添加群は細胞増殖を刺激しなかったが、1% ウシ血清培養液中で bFGF は強い細胞増殖活性を有した。

細胞数測定法において、MEK 特異的阻害剤 (PD98059, U0126) は bFGF による細胞増殖活性を有意に抑制した。このことより bFGF による細胞増殖刺激では、MEK が関与している可能性が示唆された。さらに、免疫プロット法において、bFGF により ERK1/2 がリン酸化され、活性化しており、MEK 特異的阻害剤 (PD98059, U0126) の前処理により bFGF 存在下でも ERK1/2 のリン酸化は阻害されることがわかった。以上より bFGF の刺激は、MEK-ERK の細胞内シグナル伝達を經由し細胞増殖を活性化していることが示された (図 4)。

この仮説を裏付けるように、ERK1,2 の遺伝子発現を特異的に抑制する siRNA による RNA 干渉法でも、ERK1,2 をそれぞれ抑制することで、同様に bFGF による細胞増殖刺激を抑制することができた。

また、他のサイトカインと同様に bFGF のシグナル伝達も複数の経路が予測され、今後検討の余地があると考えられる。

E. 文献

1. Itoh N, Ornitz DM: Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. Trends Genet 2004; 20:563-569
2. Ihn H, Ohnishi K, Tamaki T, LeRoy EC, Trojanowska M: Transcriptional regulation of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene. Combined action of upstream

- stimulatory and inhibitory cis-acting elements. *J Biol Chem* 1996; 271:26717-26723
3. Ihn H, LeRoy EC, Trojanowska M: Oncostatin M stimulates transcription of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene via the Sp1/Sp3-binding site. *J Biol Chem* 1997; 272:24666-24672
 4. Ihn H, Kikuchi K, Soma Y, Sato S, Fujimoto M, Tamaki T, Igarashi A, Takehara K: The stimulatory effects of PDGF and TGF- β 1 on dermal fibroblast attachment. *Acta Derm Venereol* 1995; 75:367-71
 5. Ihn H, and Trojanowska M: Sp3 is a transcriptional activator of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3712-3717
 6. Ihn H, Tamaki K: Increased phosphorylation of transcription factor Sp1 in scleroderma fibroblasts: Association with increased expression of the type I collagen gene. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2240-2247
 7. Ihn H, Tamaki K: Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Immunol* 2000; 165:2149-2155
 8. Jinnin M, Ihn H, Asano Y, Yamane K, Trojanowska M, Tamaki K: Tenascin-C upregulation by transforming growth factor- β in human dermal fibroblasts involves Smad3, Sp1, and Ets1. *Oncogene* 2004; 23:1656-1667
 9. Gospodarowicz D: Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 1974; 249:123-127
 10. Takenaka H, Yasuno H, Kishimoto S: Immunolocalization of fibroblast growth factor receptors in normal and wounded human skin. *Ach Dermatol Res* 2002; 294:331-338
 11. Bottcher RT, Niehrs C: Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* 2005; 26:63-77
 12. 横井 勇人、武田 洋幸: FGFレセプターを介したシグナルの機能と多様性. *細胞工学* 2005; 24:1055-1059
 13. 伊藤 信行: FGFとFGFレセプターファミリー: 広がる研究フィールド. *細胞工学* 2005; 24:1034-1036
 14. Böhlen P, Baird A, Esch F, Ling E, Gospodarowicz D: Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81:5363-5368
 15. Nugent Ma, Iozzo RV, Molecules in focus: Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32:115-120
 16. Bugler B, Amalric F, Prats H: Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth

- factor. Mol Cell Biol 1991; 11:573-577
17. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, et al.: Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. EMBO J 1986; 5:2523-2528
18. 中村 俊之: 遺伝子組換えヒトFGF2の開発研究と臨床応用. 細胞工学2005; 24:1069-1072

F. 論文発表

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

bFGF の濃度変化による細胞増殖活性

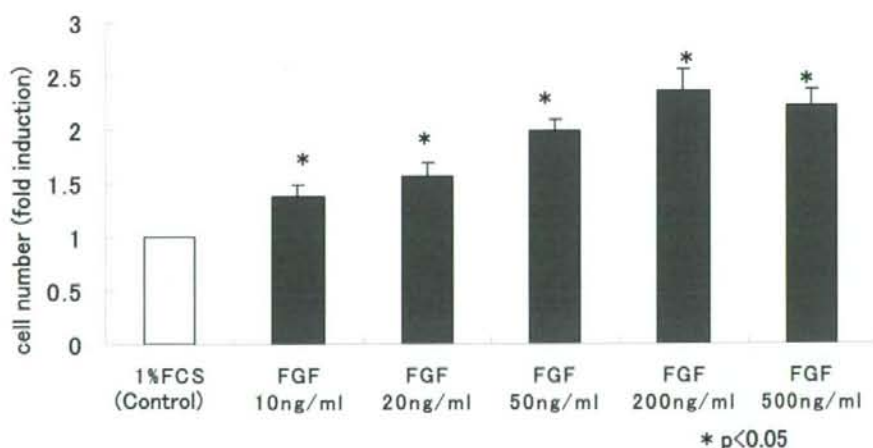


表 1. ヒト皮膚線維芽細胞を培養し静止状態とした後、10-200ng/ml の濃度の bFGF を添加し、144 時間培養後、Colter® Particle Counter を用いて細胞数を測定した。

培養時間変化による細胞増殖活性

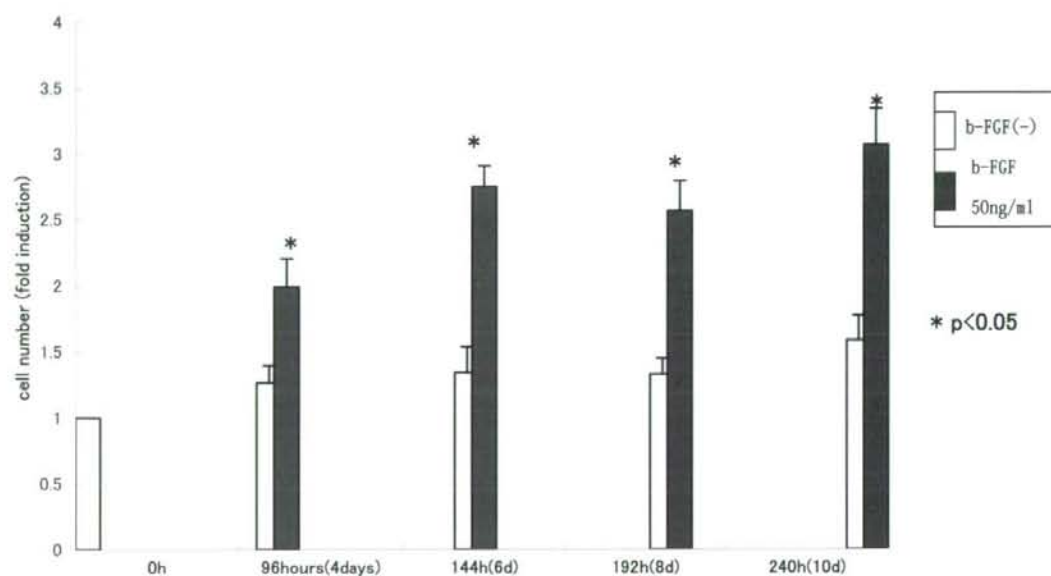


表2. 培養時間を96-240時間と変化させ、bFGF添加群（黒色棒グラフ）、非添加群（白色棒グラフ）でColter® Particle Counterを用いて細胞数を測定した。

MEK阻害剤による細胞増殖活性

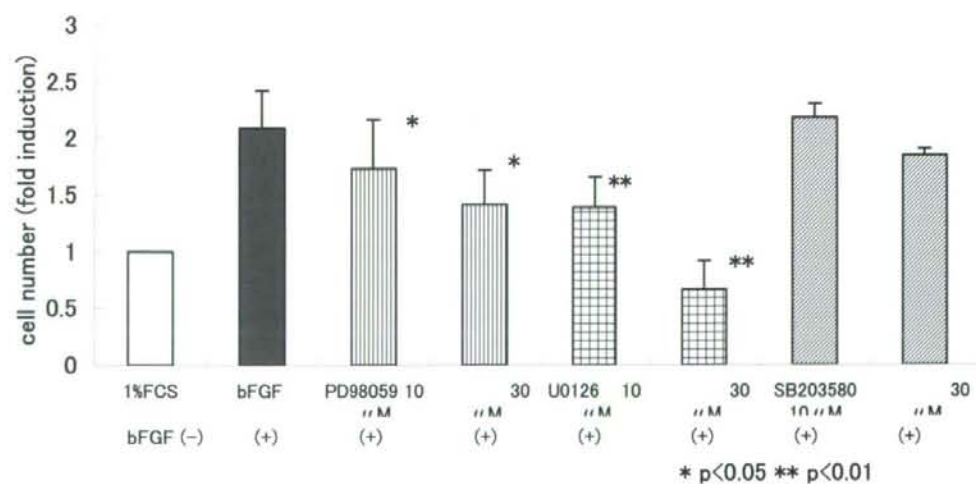


表3. MEK阻害剤(PD98059,U0126)、p38MAPK(SB203580)にて前処理後、bFGFを添加し、144時間培養後、Colter® Particle Counterを用いて細胞数を測定した。

ERK1,2 siRNA による細胞増殖活性

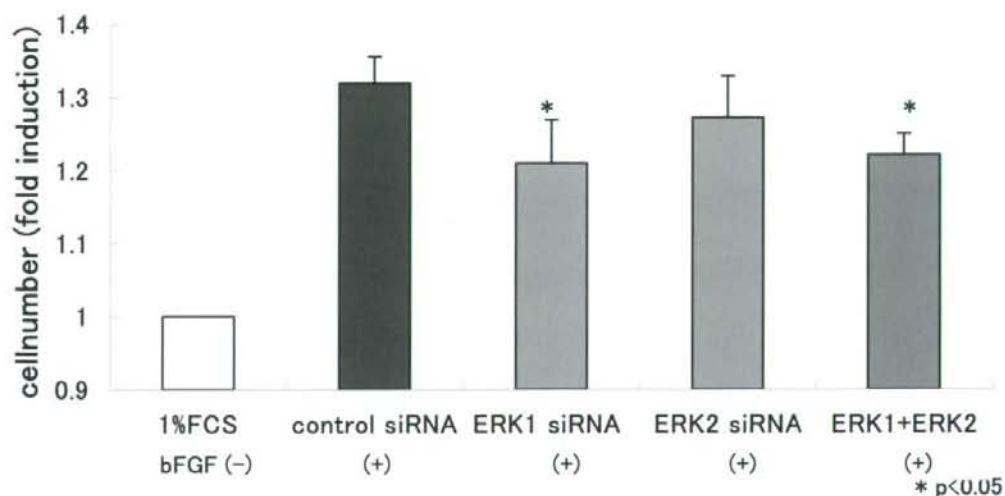


表4. ERK1,2 mRNA と相補的な siRNA および、いずれの mRNA とも干渉しない negative control siRNA を導入後、bFGF を添加し、144 時間培養後、Colter® Particle Counter を用いて細胞数を測定した。

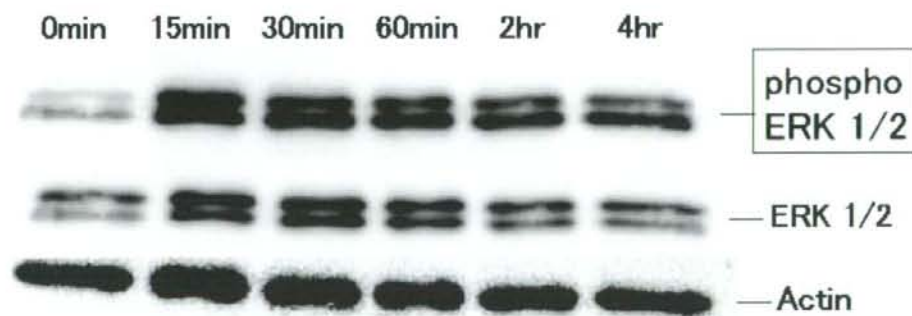


図1 : bFGF は ERK を活性化した。

培養細胞を静止状態とした後、bFGF 50ng/ml を添加し、反応時間を変化させ、全細胞抽出液を使用した。免疫ブロット法にて ERK1/2 のリン酸化を検出した。

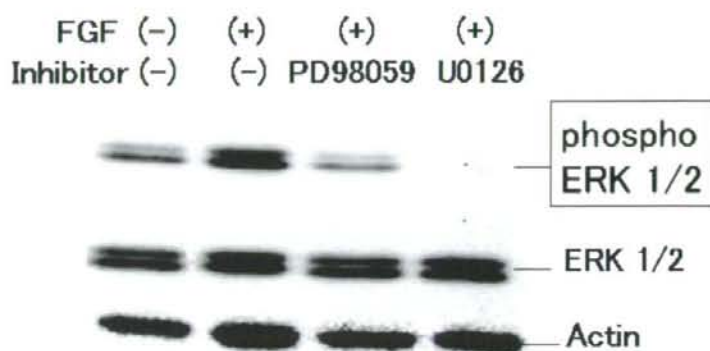


図 2 : MEK 阻害剤は ERK の活性化を抑制した。

MEK 阻害剤 (PD98059 30 μ M, U0126 30 μ M) にて前反応後、bFGF 50ng/ml 添加 15 分後に、全細胞抽出液を使用した。免疫ブロット法にて ERK のリン酸化を検出した。

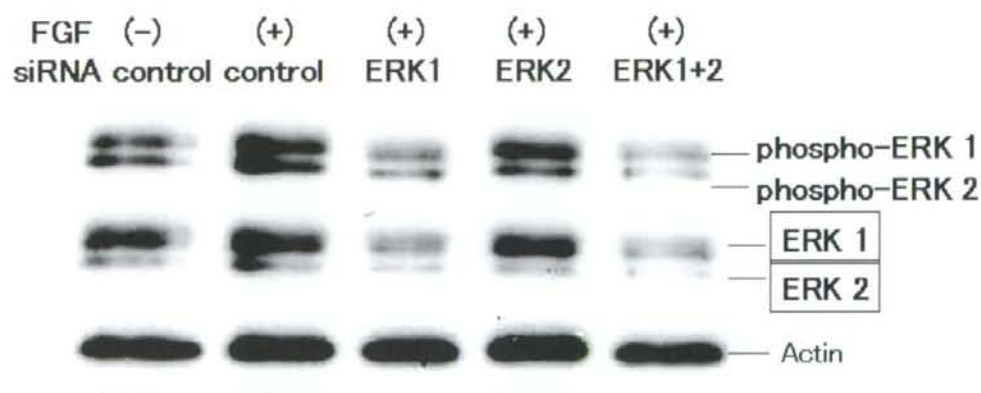


図 3 : ERK1, ERK2 の siRNA は ERK1, 2 の活性化を抑制した。

ERK1, ERK2 mRNA に相補的な siRNA を導入後、bFGF 50ng/ml 添加 15 分後に全細胞抽出液を使用した。免疫ブロット法にて ERK1, 2 のリン酸化を検出した。

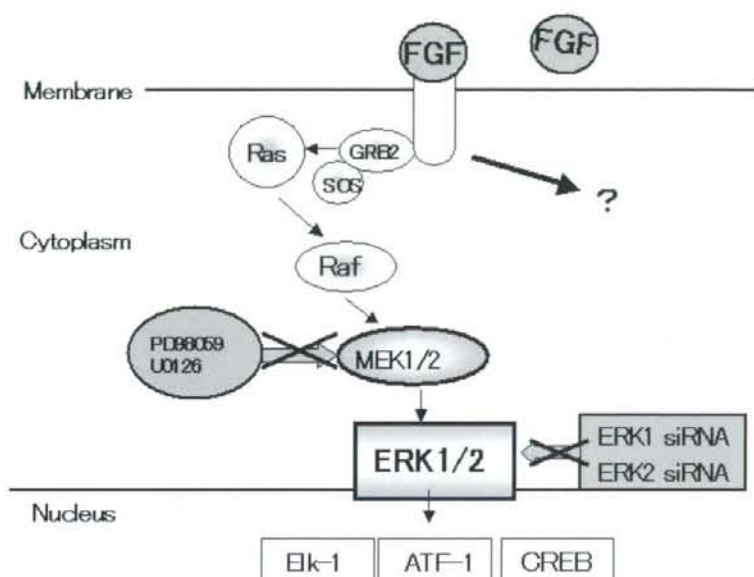


図4: 今回検討した情報伝達経路

bFGFにより培養ヒト皮膚線維芽細胞の増殖は活性化され、MEK阻害剤(PD98059 30 μ M, U0126 30 μ M)により増殖活性は阻害された。また bFGFにより ERK1/2は活性化され、ERK1, ERK2の siRNAにより増殖活性は抑制された。

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

全身性強皮症の 12-Lipoxygenase(12-LOX)過剰発現に関する検討

研究分担者 遠藤平仁 北里大学医学部膠原病・感染内科学准教授
研究協力者 橋本 篤 北里大学医学部膠原病・感染内科学助教

研究要旨

アラキドン酸はリポキシゲナーゼを介して様々な生理活性物質リポイドメディエータを産生し機能を発揮する。Platelet type 12-Lipoxygenase(12-LOX)はアラキドン酸から 12-(S)-Hydroxytetraenoic acid(12-(S)-HETE)を産生する。12-LOX は血小板のみならず白血球、平滑筋、血管内皮細胞、角化細胞、滑膜細胞などそして様々な腫瘍細胞に発現している。腫瘍細胞は 12-LOX 発現が腫瘍の増殖、浸潤、血管新生、接着分子発現に関与している。強皮症(SSc)患者血漿中 12-(S)-HETE は健常人、関節リウマチより高値を呈し、また LXA₄も高値を呈していた。びまん性皮膚硬化型 SScは限局型より高値であり皮膚硬化の進展例に多い傾向が認められた。一方 15-(S)-HETE,LTB₄は健常人と差が無くRAより低値であった。SSc末梢血において12-LOXmRNAの高値を認めた。15-LOXmRNAは差を認めなかった。癌細胞12-LOXは治療の標的でありSScにおいても治療標的の可能性がある。

A. 研究目的

強皮症の間質性肺炎の気管支肺胞洗浄液中のロイコトリエン:LTB₄含量は増加し一方リポキシシン LXA₄は正常と比較し低値でありLXA₄/LTB₄比が強皮症間質性肺炎では低くこのアンバランスが間質性肺炎の病態形成に重要な役割を果たしている¹⁾。またLXA₄は肺線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生抑制作用を有している²⁾。肺内 15-LOX 発現低下が関与していると考えられた³⁾。リポキシゲナーゼ(LOX)は腫瘍細胞の増殖や転移、血管新生など関与し標的分子として検討されている⁴⁾。特に12-LOXは血小板タイプであり着目されている⁵⁾。しかし強皮症の全身的なリポキシゲナーゼ機構の変化について検討した報告はない。強皮症血中のLXA₄及び

その関連物質の変化について検討した。

B. 方法

1. 全身性強皮症 32 例、平均年齢 57±10.3 歳、平均罹病期間 6.4±4.9 年、SepPackC18 カラムを用い酢酸エチルにて脂質成分を抽出しエバポレート後 PBS にて再溶解し ELISA にて 12-(S)-HETE, 15-(S)-HETE, LXA₄, LTB₄(Neogen, USA)濃度を測定した。同様に関節リウマチ(20 例)、健常人(20 人)、LXA₄, LTB₄, 12-(S)-HETE, 15-(S)-HETE 濃度を測定した。
2. 末梢血 12-LOX, 15-LOX, LXA₄ 受容体 mRNA 発現測定
文書で同意を得て EDTA 採血血液 5ml より 1000rpm