

図5：ERK、JNKの合成抑制による細胞増殖刺激の抑制

(a) ヒト皮膚線維芽細胞を6穴プレート中で 4×10^5 /wellの密度で培養し、control siRNA (20 $\mu\text{mol/L}$) (lane 1, 2)、ERK1 siRNA (10 $\mu\text{mol/L}$) (lane 3)、ERK2 siRNA (10 $\mu\text{mol/L}$) (lane 4)、ERK1とERK2 siRNAの両方 (lane 5)をプロトコールに従いforward法にて導入した。その後、細胞を48時間培養し、24時間静止状態にした後、1回のみbFGF 50 ng/mlで刺激し15分間反応させた。図4aと同様に免疫プロット法を行った。

(b) ヒト皮膚線維芽細胞を24穴プレートに 2×10^4 /wellの密度で培養し、図5aと同様にsiRNAをforward法にて導入した。その後、細胞を48時間培養し、24時間静止状態にした。その後1%ウシ血清含有Eagle培養液中に1度のみbFGF 50 ng/ml添加後、144時間培養し、細胞をトリプシン-EDTAで剥離した後、細胞数をCoulter[®] Particle Counter (Beckman Coulter)で測定した。グラフは4回の実験結果を総合し、中間値 \pm 標準偏差を提示した。Mann-Whitney U検定を行い、* $p < 0.05$ はcontrol siRNA導入、bFGF添加群(黒棒)と比較した。

(c) ヒト皮膚線維芽細胞を6穴プレート中で 4×10^5 /wellの密度で培養し、control siRNA (20 $\mu\text{mol/L}$) (lane 1,2) JNK1 siRNA (20 $\mu\text{mol/L}$) (lane 3)をプロトコールに従いreverse法にて導入した。その後、細胞を48時間培養し、24時間静止状態にした後、1度のみbFGF 50 ng/mlで刺激し15分間反応させた。図4bと同様に免疫プロット法を行った。

(d) ヒト皮膚線維芽細胞を24穴プレートに 2×10^4 /wellの密度で培養し、図5cと同様にsiRNAをreverse法にて導入した。その後、細胞を48時間培養し、24時間静止状態にした。その後1%ウシ血清含有Eagle培養液中に1回のみbFGF 50 ng/ml添加後、144時間培養し、細胞をトリプシン-EDTAで剥離した後、細胞数をCoulter[®] Particle Counter (Beckman Coulter)で測定した。グラフは4回の実験結果を総合し、中間値 \pm 標準偏差を提示した。Mann-Whitney U検定を行い、* $p < 0.05$ はcontrol siRNA導入、bFGF添加群(黒棒)と比較した。

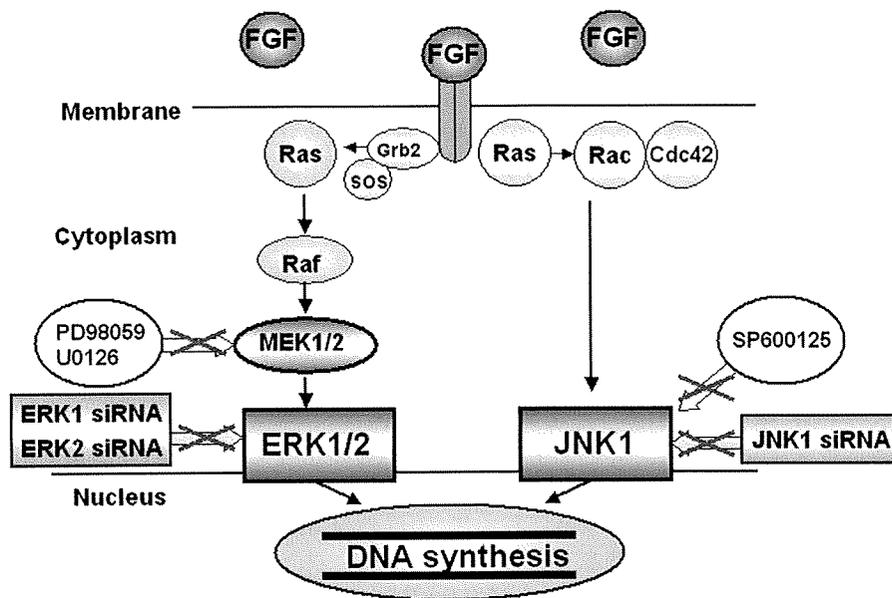


図6：bFGFによる皮膚線維芽細胞の増殖機序の模式図

細胞外に存在する bFGF は細胞表面の FGFR と結合、リン酸化し、Grb2/SOS と結合、Ras の活性化を誘導する。その後、MEK1/2-ERK1/2 経路を活性化する。PD98059 と U0126 は MEK1/2 のリン酸化を特異的に阻害し、ERK1、ERK2 の siRNA はそれぞれ ERK1、ERK2 のタンパク合成を抑制する。bFGF はまた Ras-Rac/cdc42 経路を活性化し、JNK 経路の活性化を誘導する。SP600125 は JNK1 のリン酸化を阻害し、JNK1 の siRNA は JNK1 のタンパク合成を抑制する。ERK1/2 と JNK1 の経路がヒト皮膚線維芽細胞の増殖に関与している。

転写因子 Fli1 が angiogenesis における血管内皮細胞の動態に及ぼす影響

研究分担者 浅野善英 東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科 助教
協力者 Lukasz Stawski Division of Rheumatology and Immunology, Medical University of South Carolina, Research assistant
協力者 Maria Trojanowska Division of Rheumatology and Immunology, Medical University of South Carolina, Professor

研究要旨

Fli1 は血管内皮細胞 (EC) の動態を制御する重要な転写因子の一つである可能性が示唆されている。今回われわれは、angiogenesis に注目し、Fli1 の発現量と EC の動態の関係について検討を行った。C57/BL6 mice を用いた wound healing experiment により、angiogenesis の早期 (detachment of pericytes) において EC における Fli1 の発現は著明に減少し、晩期 (reattachment of pericytes) において再上昇した。培養ヒト皮膚血管内皮細胞 (HDMEC) を用いた in vitro の実験では、HDMEC を Fli1 siRNA で処理すると、EC-EC interaction を制御する蛋白 (VE-cadherin, PECAM-1) と EC-pericyte interaction を制御する蛋白 (VE-Cadherin, PDGF-B, S1P₁) の発現が減少し、type IV collagen 分解酵素である MMP-9 の発現が亢進した。また、Fli1 siRNA で処理した HDMEC では cell migration、cell survival、tube formation activity が亢進していた。以上より、Fli1 は angiogenesis における EC の動態を制御する上で中心的な役割を担っていることが明らかとなった。

A. 研究目的

転写因子 Fli1 は、皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲン遺伝子の強力な転写抑制因子として機能している¹⁻⁴⁾。我々はこれまでに、強皮症皮膚線維芽細胞では Fli1 の発現が著明に減少しており、この異常が強皮症皮膚線維芽細胞が恒常的に活性化されている機序に関与している可能性を示してきた⁵⁾。一方、Wang らは強皮症皮膚線維芽細胞において、Fli1 は epigenetic な機序によってその発現が転写レベルで抑制されていることを明らかにした⁶⁾。この発見により、Fli1 遺伝子の発現異常は強皮症の発症病理において genetic background として関与

している可能性が考えられるようになった。つまり、Fli1 遺伝子の発現異常は、線維芽細胞の活性化のみではなく、血管内皮細胞や免疫担当細胞の活性化にも関与していることを意味する。そこで血管内皮細胞における Fli1 の機能に目を移してみると、Fli1 knockout mouse は胎生 11.5 日で中枢神経系における著明な出血を来たして死亡することが明らかにされており⁷⁾、Fli1 が血管内皮細胞の機能において重要な役割を果たしていることがわかる。最近の研究により、胎生 11.5 日は脈管系の発生の過程が vasculogenesis から angiogenesis に移行する時期であることが明らかにされた。以上のデータを鑑みると、

Fli1 は angiogenesis の過程において血管内皮細胞の動態を制御する重要な転写因子である可能性が示唆される。そこで、今回われわれは angiogenesis における転写因子 Fli1 の機能を明らかにすることを目的とし、検討を行った。

B. 研究方法

1) wound healing experiment

C57/BL6 (male, 3-month old) の背部に直径 4 mm の full-thickness skin punch wound を 2 つ作り、day1, 3, 5, 7 に sacrifice し、皮膚標本をホルマリン固定し、パラフィンブロックを作製した。

2) 免疫染色

Vector 社の vectastain ABC kit を使用した。一次抗体は Fli1 (BD Bioscience)、 α -smooth muscle actin (α -SMA) (Biomarker) を使用した。

3) ヒト皮膚血管内皮細胞 (human dermal microvascular endothelial cells: HDMECs)

HDMECs は、Medical University of South Carolina で出生した新生児の陰茎包皮から単離・培養した。

4) Fli1 siRNA adenovirus の作成

参考文献 2 を参照。

5) DNA microarray

6 well dish で subconfluent の HDMEC に Fli1 siRNA adenovirus を感染させ、72 時間後に RNA を抽出した。解析は Human Endothelial Cell Gene Array (HS-036, SuperArray Bioscience, USA) を用いた。

6) scratch assay

6 well plate で HDMEC を subconfluent になるまで培養し、Fli1 siRNA adenovirus あるいは SCR adenovirus を感染させた。その後、confluent にな

るまで培養し、Mitomycin C で処理した後、200ml 用の yellow chip で細胞を線状に scratch した。HDMEC の migration を 6 時間後、12 時間後、24 時間後に観察した。

7) apoptosis assay

24 well plate で HDMEC を confluent になるまで培養し、Fli1 siRNA adenovirus あるいは SCR adenovirus を感染させた。その後、matrigel を overlay し、5% serum 存在下あるいは serum free の条件下で HDMEC を培養した。propidium iodide を用いて染色し、apoptosis を生じている細胞の割合を算出した。

8) 3D angiogenesis model

6 well plate で HDMEC を subconfluent になるまで培養し、Fli1 siRNA adenovirus あるいは SCR adenovirus を感染させた。その後、confluent になるまで培養し、その細胞を 24 well plate に 30% confluent になるように撒き、細胞が plate に接着したのを確認した後、matrigel を overlay した。さらに、線維芽細胞を含む matrigel を overlay し、24 時間後、48 時間後、72 時間後における tube formation を調べた。

なお、実験動物の取り扱いには、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。マウスの取扱いは、苦痛を最小限とするため、麻酔、安楽死などを適切に施行した。

C. 研究結果

1) 血管内皮細胞における Fli1 の発現量は angiogenesis の初期に低下し、晩期に再上昇する

angiogenesis は 6 つのステップからなる (図 1)。個々のステップにおける血管内皮細胞の Fli1 の発現量を調べるため、wound healing experiment を

行った。図2に示すように、正常皮膚においては血管内皮細胞は Fli1 を発現しており、周辺細胞（マーカー： α -SMA）にしっかりと取り囲まれていた。図3に示すように Day 3 の wound 周辺の真皮浅層には拡張した小血管が増生しており、これらの血管では α -SMA が陰性であり、血管内皮細胞においても Fli1 の発現は検出限界以下であった。以上より、angiogenesis の早期において血管内皮細胞における Fli1 の発現量が減少し、周辺細胞も消失していることが示された。一方、図4に示すように、Day 7 では血管内皮細胞が Fli1 を発現している新生血管（図4B）と、血管内皮細胞が Fli1 を発現していない新生血管（図4C）があり、前者は周辺細胞に取り囲まれており、後者は周辺細胞を伴っていなかった。以上より、angiogenesis の6番目のステップ（reattachment of pericyte）では血管内皮細胞における Fli1 の再発現が重要な役割を果たしていると考えられた。これらの結果から、血管内皮細胞における Fli1 の発現は、angiogenesis の1番目のステップで減少し（6番目のステップと逆の現象であるため）、6番目のステップで再上昇すると考えられた（図5）。

2) 血管内皮細胞における Fli1 の発現低下は angiogenesis の①、②のステップを活性化する

図5に示した仮説を証明するため、培養ヒト皮膚血管内皮細胞（HDMEC）を用いて in vitro の実験を行った。まず、血管内皮細胞における Fli1 の発現レベルが低下すると angiogenesis の①、②のステップが活性化されるか否かについて検討を行うため、Fli1 siRNA adenovirus を HDMEC に感染させ、DNA microarray を行った。血管内皮細胞の接着を担う細胞表面蛋白（VE-Cadherin、PECAM-1）と血管内皮細胞と周辺細胞の interaction を制御する細胞表面蛋白（VE-Cadherin、PDGF-B、S1P₁）の

発現が Fli1 の発現減少と比例するように低下し、一方、血管内皮細胞由来のプロテアーゼで血管基底膜の分解を制御する MMP-9 の発現が、Fli1 の発現減少と反比例するように亢進した。これらの結果は、quantitative real-time PCR を用いた検討で再現性が確認できた（表1）。以上の結果は、angiogenesis の①、②のステップが、Fli1 の発現減少により活性化されていることを示している。

3) 血管内皮細胞における Fli1 の発現低下は angiogenesis の③のステップ（migration of endothelial cells）を活性化する

次に、HDMEC に Fli1 siRNA adenovirus を感染させ、scratch assay を行った。図6に示すように、Fli1 siRNA で処理した HDMEC は、SCR で処理した HDMEC と比較して migration が亢進していた。また、transwell assay も行ったが、やはり Fli1 siRNA で処理した HDMEC は、SCR で処理した HDMEC と比較して migration が亢進していた（data not shown）。以上の結果より、血管内皮細胞における Fli1 の発現低下は angiogenesis の③のステップを活性化することが示された。

4) 血管内皮細胞における Fli1 の発現低下は angiogenesis の④のステップ（proliferation of endothelial cells）を活性化する

次に、HDMEC に Fli1 siRNA adenovirus を感染させ、apoptosis assay を行った。図7に示すように、serum free あるいは 1% serum 存在下、いずれの条件においても、Fli1 siRNA で処理した HDMEC は、SCR で処理した HDMEC と比較して cell survival が亢進していた。以上の結果より、血管内皮細胞における Fli1 の発現低下は angiogenesis の④のステップを活性化することが示された。

5) 血管内皮細胞における Fli1 の発現低下は angio-

genesis の⑤のステップ (tube formation) を活性化
する

次に、HDMEC に Fli1 siRNA adenovirus を感染
させ、3D angiogenesis assay を行った。図 8 に示
すように、Fli1 siRNA で処理した HDMEC は、
SCR で処理した HDMEC と比較して tube forma-
tion activity が亢進していた。以上の結果より、血
管内皮細胞における Fli1 の発現低下は angiogene-
sis の⑤のステップを活性化することが示された。

D. 考 案

今回の検討により、angiogenesis の個々の過程に
おける血管内皮細胞の動態を制御する上で転写因子
Fli1 が非常に重要な役割を果たしていることが示さ
れた。この結果は、Fli1 knockout mouse が脈管系
の発生の過程が vasculogenesis から angiogenesis
に移行する胎生 11.5 日に著明な出血を来たして死
亡するという過去の報告⁷⁾ を裏付けるデータである。
また、2008 年に Liu らは、Fli1 が angiogenesis を
制御する遺伝子 network のトップに来ることを報
告しており⁸⁾、転写因子 Fli1 は angiogenesis におい
て極めて重要な遺伝子であることがわかる。

我々はこれまでに、強皮症患者の病変部の皮膚に
おいて、血管内皮細胞における Fli1 蛋白の発現量
が減少していることを明らかにした⁵⁾。このデータ
を今回の結果に当てはめて考えてみると、図 9 に示
すように強皮症では血管内皮細胞が恒常的に活性化
され、angiogenesis の①～⑤のステップが活性化さ
れていることになる。我々は血管内皮細胞特異的
Fli1 欠失マウス (Fli1 ECKO mouse) を作成し、
既にこの仮説について検証を行った⁹⁾。Fli1 ECKO
mouse では皮膚の血管が非常に脆弱化しており、
毛細血管の拡張・微小動脈瘤の形成・細動脈の狭窄

などが出現した。Fli1 ECKO mouse の皮膚から単
離してきた血管内皮細胞は、wild type mouse 由来
の血管内皮細胞に比べて、VE-Cadherin、PECAM-1、
PDGF-B、S1P₁ の発現が減少しており、MMP-9 の発
現が亢進していた。以上の結果は、Fli1 ECKO mice
では angiogenesis が活性化されることによって、
血管の脆弱化・毛細血管の拡張・細動脈の狭窄とい
った異常が出現していることを意味している。これ
らの異常はそれぞれ、爪郭部出血点 (血管の脆弱化)、
毛細血管拡張、指尖壊疽や肺動脈性肺高血圧症 (細
動脈の狭窄) などの強皮症患者の臨床症状の出現に
関与している可能性が考えられる。

我々はこれまでに、強皮症皮膚線維芽細胞におい
て Fli1 の発現が減少しており、その異常が本症に
おける線維芽細胞の恒常的な活性化に関与してい
ることを示してきた。今回の結果は、強皮症患者の皮
膚では血管内皮細胞においても Fli1 の発現が減少
し、その異常が強皮症患者の微小血管障害の発症機
序に関与している可能性を示すものである。また、
Fli1 は免疫担当細胞の機能にも深く関与し、① SLE
患者の PBMC では Fli1 の発現が亢進しているこ
と¹⁰⁾、② H-2Kk-Fli1 transgenic mouse は lupus ne-
phritis を発症すること¹¹⁾、③ SLE のモデルマウス
である MRL/mpr mouse に Fli1 +/- を導入する
と lupus nephritis の発症が抑えられること¹²⁾、な
どが報告されており、その発現異常が自己免疫疾患
の発症に関与している可能性が示されている。以上
の結果は、強皮症の発症病理において重要な役割を
果たしていると考えられている線維芽細胞・血管内
皮細胞・免疫担当細胞の全てが活性化される機序に
転写因子 Fli1 の発現異常が関与している可能性を
示唆しており、転写因子 Fli1 が汎発性強皮症の新
たな治療戦略における target となりうる可能性を

示している。

E. 結 論

今回の検討により、転写因子 Fli1 は angiogenesis における血管内皮細胞の動態を制御する重要な因子であることが示された。その発現異常は、強皮症の微小血管障害の発症に関与している可能性がある。既に強皮症皮膚線維芽細胞においても転写因子 Fli1 の発現異常が報告されており、同転写因子は強皮症の発症機序に深く関与している可能性があり、新しい治療戦略の target となりうると考えられた。

F. 文 献

1. Czuwara-Ladykowska J, Shirasaki F, Jackers P, Watson DK, Trojanowska M: Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway, *J Biol Chem* 2001; 276: 20839 – 48
2. Nakerakanti SS, Kapanadze B, Yamasaki M, Markiewicz M, Trojanowska M: Fli1 and Ets1 have distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program, *J Biol Chem* 2006; 281: 25259-69
3. Asano Y, Czuwara J, Trojanowska M: Transforming growth factor- β regulates DNA binding activity of transcription factor Fli1 by p300/CREB-binding protein-associated factor-dependent acetylation. *J Biol Chem* 2007; 282: 34672-83
4. Asano Y, Trojanowska M: Phosphorylation of Fli1 at threonine 312 by protein kinase C- δ promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor- β . *Mol Cell Biol* 2009; 29: 1882-94
5. Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, Jablonska S, Blaszczyk M, Watson DK, Trojanowska M: Persistent downregulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol* 2003; 163: 571-81
6. Wang Y, Fan PS, Kahaleh B: Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2271-9
7. Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, Favier R, Bernstein A: Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity* 2000; 13: 167-77
8. Liu F, Walmsley M, Rodaway A, Patient R: Fli1 acts at the top of the transcriptional network driving blood and endothelial development. *Curr Biol* 2008; 18: 1234-40
9. Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M: Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis - a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol* in press
10. Georgiou P, Maroulakou IG, Green JE, Dantis P, Romano-Spica V, Kottaridis S, Lautenberger JA, Watson DK, Papas TS, Fischinger PJ, Bhat NK: Expression of ets family of genes in sys-

temic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. Int J Oncol 1996; 9: 9

11. Zhang L, Eddy A, Teng YT, Fritzler M, Kluppel M, Melet F, Bernstein A: An immunological renal disease in transgenic mice that overexpress Fli-1, a member of the ets family of transcription factor genes. Mol Cell Biol. 1995; 15: 6961-70.
12. Zhang XK, Gallant S, Molano I, Moussa OM, Ruiz P, Spyropoulos DD, Watson DK, Gilkeson G: Decreased expression of the Ets family transcription factor Fli-1 markedly prolongs survival and significantly reduces renal disease in MRL/lpr mice. J Immunol 2004; 173: 6481-9

G. 研究発表

1. 論文発表

Asano Y, Yamasaki M, Trojanowska M. Fli1 governs the process of angiogenesis. in preparation

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

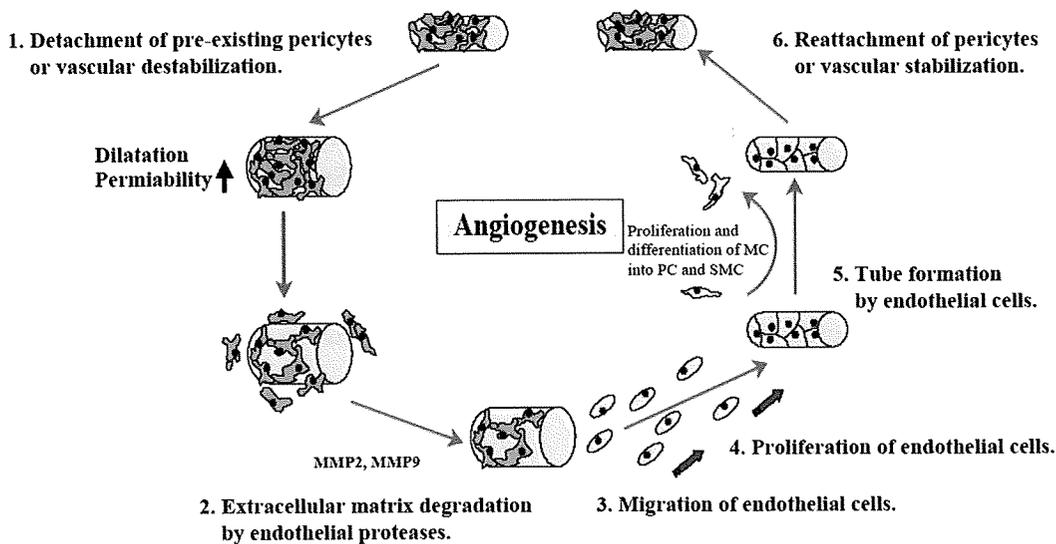


図1：Angiogenesisは6つのステップから構成されている

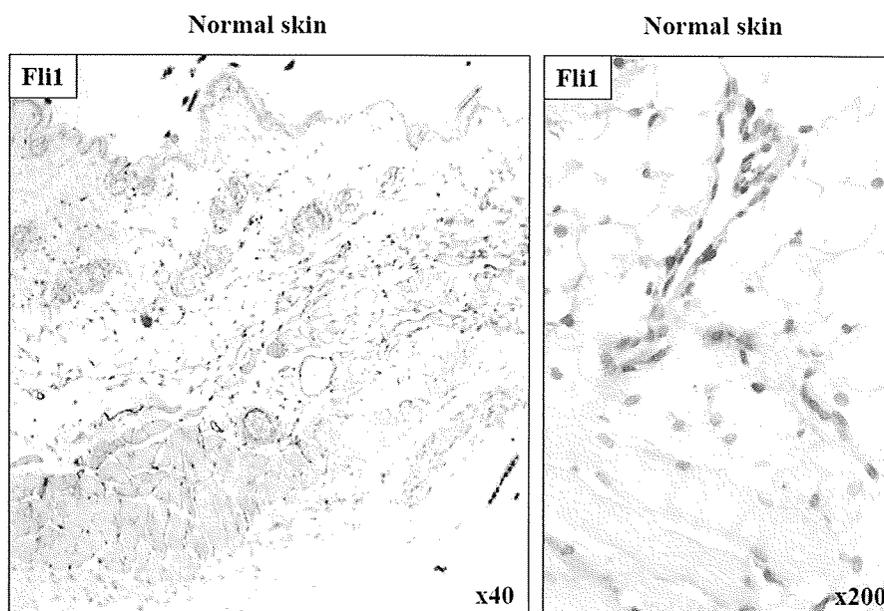


図2：正常マウス皮膚では血管内皮細胞において Fli1 は豊富に発現している
 C57/BL6 (male, 3-month old) の背部の皮膚を 6mm punch biopsy instrument にて切除し、ホルマリン固定後、パラフィン切片を作成した。Vectastain ABC kit を使用して、Fli1 の免疫染色を行った。



図3：angiogenesis の早期において血管内皮細胞では Fli1 の発現が著明に低下する
 C57/BL6 (male, 3-month old) の背部に 4mm punch biopsy instrument を用いて wound を 2つ作り、day1, 3, 5, 7 に mouse を sacrifice し、皮膚標本をホルマリン固定し、パラフィンブロックを作製した。Vectastain ABC kit を使用して、Fli1 と α -SMA の免疫染色を行った。

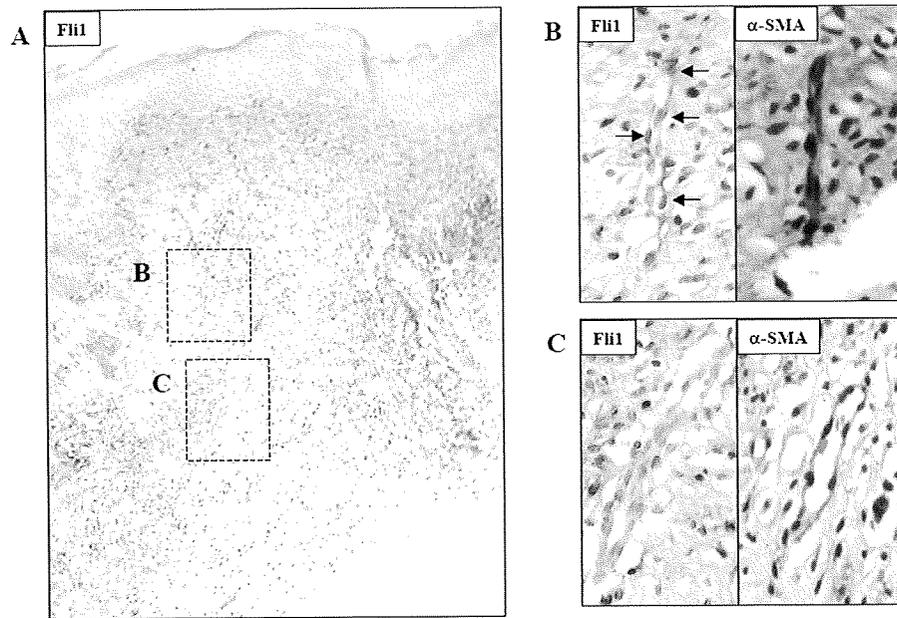


図4：angiogenesisの晩期において、血管内皮細胞におけるFli1の発現量と血管壁における α -SMAの発現量（pericyte marker）は相関する。

C57/BL6 (male, 3-month old) の背部に4mm punch biopsy instrumentを用いてwoundを2つ作り、day1, 3, 5, 7にmouseをsacrificeし、皮膚標本をホルマリン固定し、パラフィンブロックを作製した。Vectastain ABC kitを使用して、Fli1と α -SMAの免疫染色を行った。

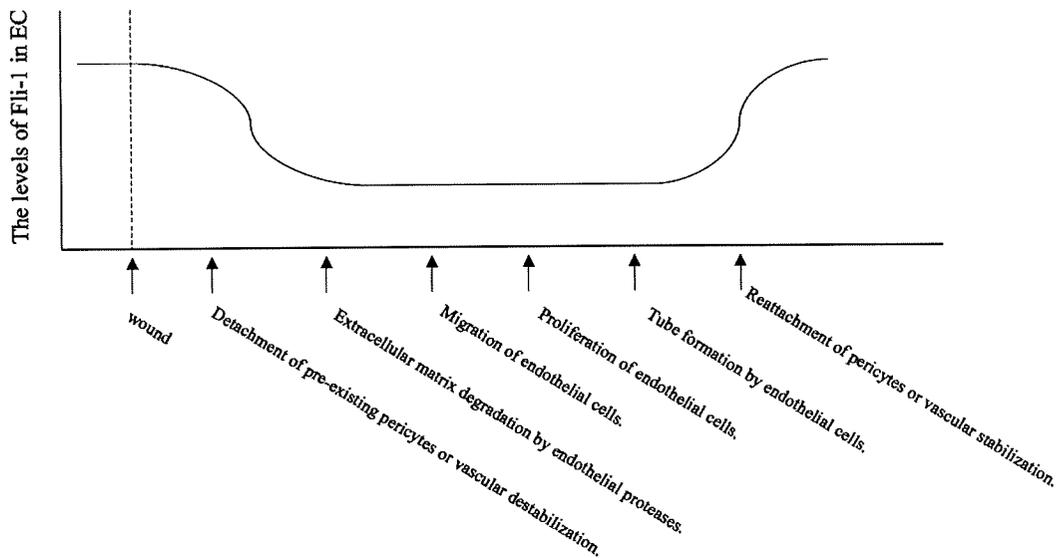


図5：血管内皮細胞における転写因子Fli1の発現量とangiogenesisの6つのステップの関係
Fli1は正常な状態では血管内皮細胞に多く発現しているが、angiogenesisの早期（ステップ①）にその発現量が減少し、晩期（ステップ⑥）にその発現量が再上昇すると考えられる。

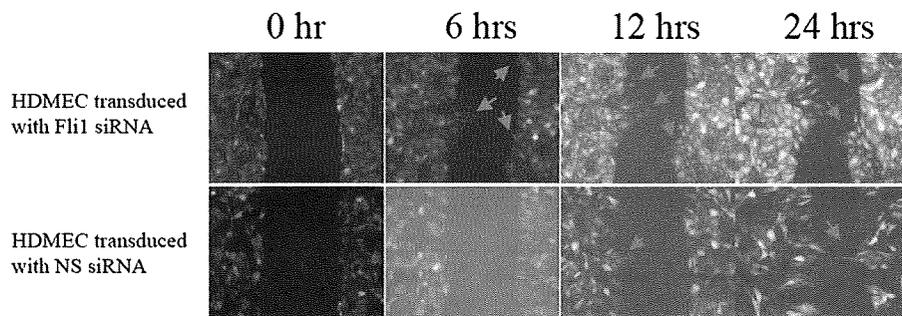


図 6 : Fli1 の発現が減少すると、血管内皮細胞の migration 活性が亢進する。

HDMEC を 24 well plate で subconfluent まで培養し、Fli1 siRNA adenovirus あるいは SCR adenovirus を感染させた。その後、confluent になるまで培養し、mitomycin C で処理して細胞分裂を抑制した。200ml 用の yellow chip で細胞を scratch して線状に wound を作成し、6 時間後、12 時間後、24 時間後に HDMEC の migration を観察した。

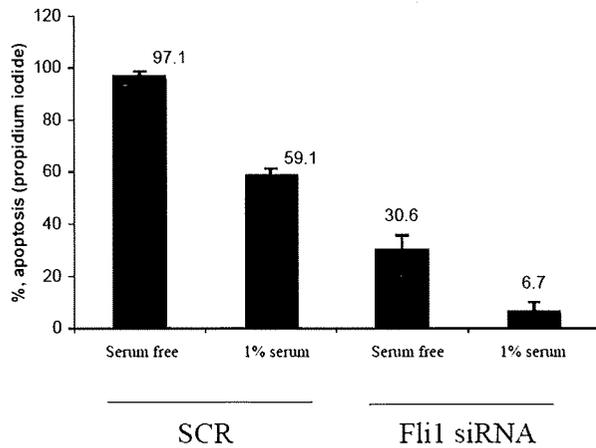


図 7 : Fli1 の発現が減少すると、血管内皮細胞の cell survival が亢進する。

24 well plate で HDMEC を confluent になるまで培養し、Fli1 siRNA adenovirus あるいは SCR adenovirus に感染させた。その後、matri-gel を overlay し、1% serum 存在下あるいは serum free の条件下で HDMEC を培養し、propidium iodide で染色し、apoptosis を生じている細胞の割合を算出した。

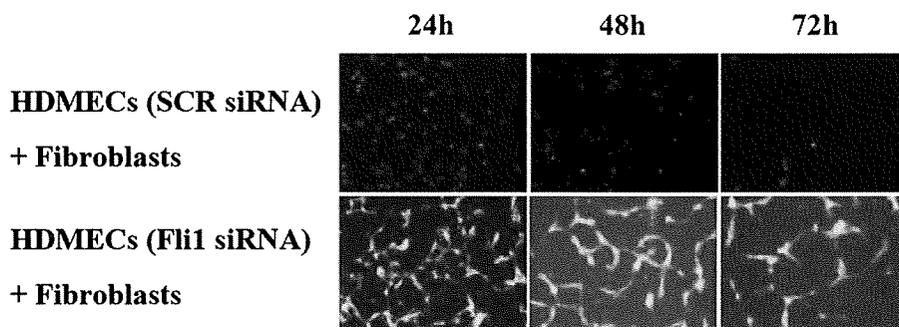


図 8 : Fli1 の発現量が減少すると、血管内皮細胞の tube formation activity が亢進する。

6 well plate で HDMEC を subconfluent になるまで培養し、Fli1 siRNA adenovirus あるいは SCR adenovirus に感染させた。その後、confluent になるまで培養し、その細胞を 24 well plate に 30% confluent になるように撒き、細胞が plate に接着したのを確認した後、matri-gel を overlay した。さらに、線維芽細胞を含む matri-gel を overlay し、24 時間後、48 時間後、72 時間後における tube formation を調べた。

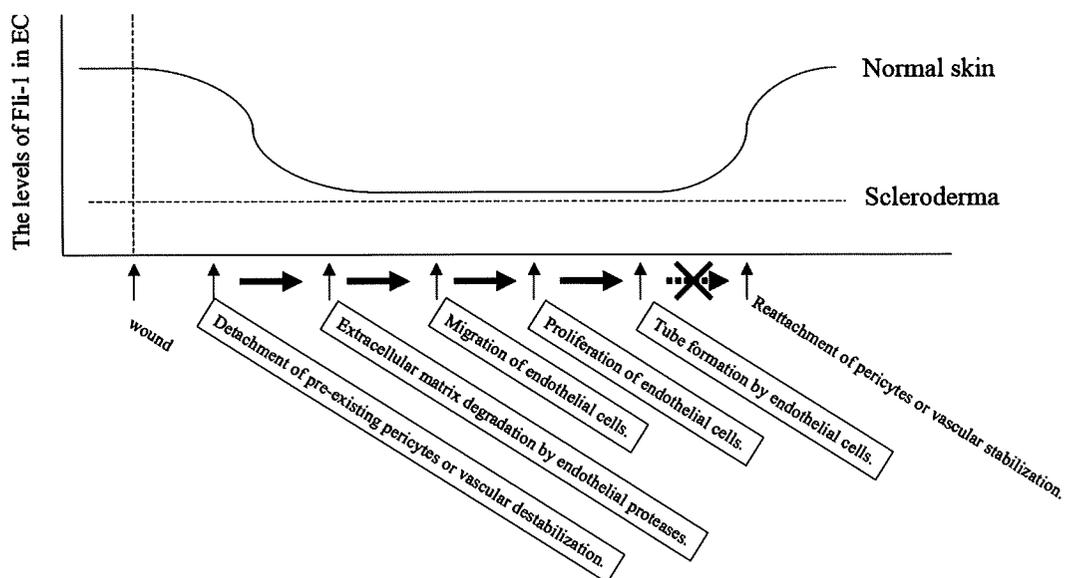


図9：強皮症の血管内皮細胞では Fli1 の発現量が恒常的に減少し、血管内皮細胞が恒常的に活性化されている。

表1. Fli1 siRNA が HDMEC における EC-EC interaction、EC-Pericyte interaction、vascular basement membrane remodeling に関する遺伝子の発現に及ぼす影響

Gene	HDMEC (Fli1 siRNA/SCR)
Fli1	48.9 +/- 7.5*
VE-Cadherin	65.2 +/- 11.8*
PECAM-1	74.8 +/- 3.6*
COL4A1	102.4 +/- 9.0
MMP-2	97.9 +/- 7.9
MMP-9	171.4 +/- 15.6*
PDGF-B	59.3 +/- 9.9*
S1P ₁	66.9 +/- 4.7*
N-Cadherin	88.6 +/- 15.5
Tie2	84.4 +/- 4.7

*P<0.05

メシル酸イマチニブによる 皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン産生抑制の機序

研究分担者 浅野善英 東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科 助教
協力者 Andrea Bujor Division of Rheumatology and Immunology, Medical
University of South Carolina, Postdoctoral fellow
協力者 Maria Trojanowska Division of Rheumatology and Immunology, Medical
University of South Carolina, Professor

研究要旨

メシル酸イマチニブは PDGF receptor、c-Abl、c-kit の tyrosine kinase inhibitor として作用する分子標的薬で、慢性骨髄性白血病や消化管間質腫瘍などの治療薬として本邦でも幅広く臨床応用されている。一方、近年汎発性強皮症の皮膚硬化や肺動脈性肺高血圧症の治療に同薬が非常に有効であった症例が報告されている。最近、その抗線維化作用の機序の一つとして、イマチニブが転写因子 Egr-1 の発現を抑制することが示された。今回われわれは、TGF- β signaling の新しい non-canonical pathway として、“c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway” を新たに同定し、イマチニブがこの pathway を阻害することが同薬の抗線維化作用の機序の一つであることを明らかにした。我々は既に、強皮症皮膚線維芽細胞および血管内皮細胞では Fli1 の発現が恒常的に減少しており、その異常が強皮症の線維化と微小血管障害の発症に関与している可能性を明らかにしている。以上の結果は、イマチニブは Fli1 を target とした新しい治療として、強皮症の線維化と微小血管障害の両方に有効である可能性を示唆している。

A. 研究目的

メシル酸イマチニブは PDGF receptor、c-Abl、c-kit の tyrosine kinase inhibitor として作用する分子標的薬で、慢性骨髄性白血病や消化管間質腫瘍などの治療薬として本邦でも幅広く臨床応用されている。近年、イマチニブが汎発性強皮症をはじめとし、nephrogenic systemic fibrosis や骨髄移植後 GVHD に伴う皮膚硬化などの線維性疾患の治療に非常に有効であった症例が報告されている¹⁻⁴⁾。Bhattacharyya らはイマチニブが線維化を抑制する機序の一つとして、同薬が TGF- β 刺激による転写因子 Egr-1

の誘導を抑制することを報告した⁵⁾。

一方、我々はこれまでに、皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲン遺伝子の強力な転写抑制因子として機能する転写因子 Fli1 に注目し、同転写因子の発現が強皮症皮膚線維芽細胞では著明に低下していることを示し、この異常が強皮症皮膚線維芽細胞が恒常的に活性化されている機序の一つである可能性を示してきた⁶⁻¹¹⁾。また、Wang らは強皮症皮膚線維芽細胞において、転写因子 Fli1 の発現量が epigenetic な機序によって低下していることを証明し、同転写因子が強皮症の genetic background の 1 つである

可能性を明らかにした¹²⁾。

以上、①転写因子 Fli1 が強皮症皮膚線維芽細胞の活性化に密接に関係している、②イマチニブが強皮症をはじめとした線維性疾患の治療に有効である、という2点を鑑み、今回われわれは、イマチニブが転写因子 Fli1 を介して強皮症皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生を抑制している可能性があると考え、検討を行った。

B. 研究方法

1) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞は、発症2年以内で diffuse type に分類される汎発性強皮症患者の皮膚硬化を伴う前腕伸側より得た。正常皮膚線維芽細胞は、汎発性強皮症患者と年齢および性別がほぼ一致した健康人の前腕伸側より得た。これらの検体の採取は被検者の informed consent および施設の承認を得た上で行った。培養線維芽細胞は10%仔牛血清(FBS)、2 mM L-グルタミンと50 mg/ml ゲンタシン含有 MEM にて37°C、5% CO₂、95% air にて継代し、継代3代目から6代目の細胞を用いた。

2) 免疫ブロッティング

皮膚線維芽細胞を4°Cのphosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl [pH 7.4]、150 mM NaCl、3 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、10 mg/ml leupeptin、10 mg/ml pepstatin、10 mg/ml aprotinin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含有する lysis buffer にて溶解した。不溶分画は15分間20000 G 遠心にて除去した。Bio-Rad 蛋白質濃度測定試薬を用いて上清の蛋白質量を測定し、各10 μg の検体を10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。その後、ニトロセルロース膜を

特異的抗体と反応させた。horseradish peroxidase と結合した二次抗体と反応させ enhanced chemiluminescence で発光させ、X-ray フィルムに感光させた。

3) RNA 抽出と quantitative real-time PCR

Total RNA は Isogen (MRC Inc.) を用いて抽出した。cDNA は2 μg の total RNA から cDNA synthesis kit (Roche) を用いて作成した。IQ-Sybr green mix (Bio-Rad) を使用して sample を調整し、Icycler machine (Bio-Rad) を用いて quantitative real-time PCR を行った。コントロールとして β-actin を使用した。

4) プラスミド

-772 COL1A2/CAT construct はヒト α2(I) collagen 遺伝子 promoter の-772 から+58 領域に chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter 遺伝子を結合させて作成した。

5) DNA transfection および chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay

皮膚線維芽細胞を直径100 mm dish に1×10⁵ 個播種し、48時間後 FuGENETM6 を用いて、各種 plasmid を transfection した。細胞は48時間あるいは72時間培養し、その後 reporter lysis buffer (Promega) にて溶解した。不溶分画は2分間20000 G 遠心にて除去した。CAT 活性を測定し、b ガラクトシダーゼ活性で補正した。

6) 統計学的検討

平均値の比較には Mann-Whitney test を用いた。p<0.05 を有意とした。

なお、患者検体の取り扱いには、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。患者検体(皮膚標本、培養皮膚線維芽細胞)を使用する場合は患者の同意を得て行った。

C. 研究結果

1) イマチニブは皮膚線維芽細胞における転写因子 Fli1 の発現を亢進させる

正常皮膚線維芽細胞をイマチニブ (10 μ M) 存在下で 24 時間培養したところ、I 型コラーゲンの発現量は著明に抑制された。一方、転写因子 Fli1 の発現量は蛋白レベルで亢進した (図 1A)。しかしながら、Fli1 の mRNA レベルは変化しなかった (図 1B)。以上の結果から、イマチニブは Fli1 の protein stability を亢進させることにより、Fli1 蛋白の発現レベルを上昇させ、I 型コラーゲン産生を抑制している可能性が考えられた。

2) c-Abl は PKC- δ を活性化し、phosphorylation-acetylation cascade を介して Fli1 の DNA 結合能を減少させる

我々はこれまでに、TGF- β 刺激後、活性化された PKC- δ によって Fli1 は COL1A2 promoter 上で threonine 312 でリン酸化され、その後、PCAF によって lysine 380 でアセチル化されることによって DNA 結合能を失い、proteasomal pathway によって分解されることを明らかにした (図 2A)。したがって、次にイマチニブが Fli1 のリン酸化に及ぼす影響を検討した。図 2B に示すように、TGF- β 刺激後 2 時間で Fli1 は threonine 312 でリン酸化するが、その効果はイマチニブでほぼ完全に抑制された。また、basal level の Fli1 の threonine 312 におけるリン酸化もイマチニブにより著明に抑制された (図には示していないが、イマチニブで処理すると Fli1 蛋白の総発現量が亢進するため、相対的にリン酸化されている Fli1 の割合は減少している)。

次に、TGF- β 刺激により c-Abl が PKC- δ を活性化し、Fli1 の発現量が減少している可能性について検討するため、c-Abl の constitutive active form で

ある Bcr-Abl を正常皮膚線維芽細胞に強発現し、Fli1 のリン酸化に及ぼす影響を検討した。図 2C に示すように、Bcr-Abl の一過性強発現により、Fli1 の threonine 312 のリン酸化が著明に亢進し、その効果は TGF- β 刺激によるものよりも強かった。以上の結果から、活性化された c-Abl は PKC- δ を介して Fli1 のリン酸化を誘導することが示された。

3) イマチニブは “c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway” を抑制することにより COL1A2 遺伝子の発現を抑制する

次に、Bcr-Abl、constitutive active PKC- δ が COL1A2 gene の転写活性に及ぼす影響、およびイマチニブと Rottlerin (PKC- δ inhibitor) がそれらの効果に及ぼす影響を CAT promoter assay で検討した。図 3A に示すように、CA-PKC-d を一過性強発現すると human COL1A2 promoter 活性は有意に亢進したが、その効果はイマチニブでは完全には抑制することができなかった。一方、図 3B に示すように Bcr-Abl を一過性強発現すると human COL1A2 promoter 活性は有意に亢進したが、その効果は Rottlerin でほぼ完全に抑制された。以上の結果は、c-Abl が PKC- δ の上流に位置していることを示している。これまで得られた結果は、TGF- β は “c-Abl-PKC- δ pathway” を介して Fli1 をリン酸化し、さらに phosphorylation-acetylation cascade により Fli1 の DNA 結合能を制御していること、イマチニブは c-Abl の tyrosine kinase 活性を抑制することにより、PKC- δ による Fli1 のリン酸化とアセチル化を抑制し、DNA 結合能を亢進させ、COL1A2 遺伝子の発現を抑制していることが示された。

4) イマチニブは Egr-1 の発現を抑制することにより I 型コラーゲン遺伝子の発現を抑制する

図 3A に示すように、CA-PKC-d による COL1A2

promoter 活性の亢進は、イマチニブにより軽度ではあるが有意に抑制される。そこで、イマチニブの Egr-1 に対する効果について検討を行った。図 4A に示すように、過去の報告⁵⁾と同様にイマチニブは Egr-1 の発現を有意に抑制した。以上の結果は、図 4B に示すように、c-Abl を介する TGF- β signaling の non-canonical pathway として、“c-Abl-ERK-Egr-1 pathway” と “c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway” の二つが存在することを示している。

5) 強皮症皮膚線維芽細胞では “c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway” が活性化されている

最後に、強皮症皮膚線維芽細胞における “c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway” について検討を行った。強皮症皮膚線維芽細胞では、C-Abl の発現量が亢進しており (図 5A)、Fli1 のリン酸化が亢進していた (図 5A、C)。強皮症皮膚線維芽細胞における PKC- δ の発現については Jimenez ら¹³⁾ が既に報告しているように、正常皮膚線維芽細胞と比較して有意に亢進しており、特に核内で発現が亢進している (図 5B、文献 13 から抜粋)。また、強皮症皮膚線維芽細胞における Fli1 の発現量は、既にわれわれが報告しているように、総蛋白量は正常皮膚線維芽細胞と比較して有意に低下している (図 5D、文献 10 より抜粋)。以上の結果から、強皮症皮膚線維芽細胞では “c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway” が活性化されていることが示された。

D. 考案

これまでに、イマチニブが線維性疾患の治療に有効である可能性を示す多くの報告がある。2004 年に Daniels らによってマウスにおけるブレオマイシン誘発性肺線維症の発症がイマチニブによって抑制されることが報告された¹⁴⁾のを筆頭に、2005 年 Wang

らはラットの腎硬化症モデルにおいて、イマチニブがその発症を抑制すること¹⁵⁾、2006 年には Distler らが、マウスにおけるブレオマイシン誘発性皮膚硬化をイマチニブが抑制すること¹⁶⁾を報告している。動物モデルへの有効性が明らかにされた後、ヒトの線維性疾患への有効例の報告が相次ぎ、汎発性強皮症をはじめ、nephrogenic systemic fibrosis や骨髄移植後慢性 GVHD における強皮症様皮膚硬化にも有効であった症例が報告されている¹⁻⁴⁾。その作用機序については、c-Abl を介する系であることや Smad 非依存性であることは明らかにされていたが、詳細は不明であった。2009 年、Bhattacharyya ら⁵⁾は皮膚線維芽細胞において TGF- β 刺激により c-Abl が活性化され、続いて ERK の活性化を介して転写因子 Egr-1 の発現が亢進し、その結果として I 型コラーゲン遺伝子の発現量が亢進する機序を明らかにし、イマチニブが線維化を抑制する機序の一つとして、この pathway を抑制することを証明した。今回われわれは、この “c-Abl-ERK-Egr-1 pathway” とは別に “c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway” が存在することを明らかにし、イマチニブがこの pathway を抑制することによって線維化を抑制することを明らかにした。

転写因子 Fli1 は皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲンの強力な転写抑制因子として機能している⁶⁾。我々はこれまでに、① TGF- β 刺激により phosphorylation-acetylation cascade を介して Fli1 は COL1A2 promoter から解離すること^{8,9)}、② Fli1 siRNA で処理すると正常皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲンの発現量は著明に亢進し、その効果は TGF- β 刺激に匹敵すること⁷⁾、を示し、Fli1 が皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲンの産生を制御する転写因子として極めて重要であることを明らかにした。また、強皮症皮膚線維芽細胞では Fli1 の発

現量が著明に減少していることも明らかにし¹⁰⁾、Fli1 の発現異常が強皮症皮膚線維芽細胞が恒常的に活性化されている機序に関与している可能性を示してきた。一方、Wang らは強皮症皮膚線維芽細胞においては Fli1 遺伝子の promoter 領域でヒストン H3、H4 のアセチル化が減少していることと CpG island のメチル化が亢進していることを証明し、同細胞において epigenetic な機序で Fli1 遺伝子の転写が抑制されていることを明らかにした¹²⁾。以上の結果は、①強皮症皮膚線維芽細胞において Fli1 の発現を亢進させることにより同細胞の恒常的な活性化を抑制できる可能性があること、②そのためには転写亢進以外の機序で Fli1 の発現を亢進させる必要があることを示している。我々は既に“TGF- β -PKC- δ -Fli1 pathway”の活性化は、Fli1 の転写には作用せず、Fli1 の protein stability を低下させることで Fli1 の発現量を減少させることを明らかにしている^{8,9)}。つまり、イマチニブは“c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway”を抑制することにより、Fli1 の protein stability を上昇させることにより、Fli1 の発現を亢進させ、I 型コラーゲンの転写を抑制していることを示している。したがって、イマチニブは Fli1 を target とした治療戦略として非常に promising な薬剤であると考えられる。

イマチニブは強皮症をはじめとした線維性疾患の治療に非常に有効であった症例の報告があるが、一方で最近欧米で行われた特発性間質性肺炎の治験では、イマチニブは肺の線維化に対して明らかな有効性を示さなかったと報告されている¹⁷⁾。プレオマイシン肺線維症モデルマウスでは、イマチニブは発症早期には効果があるが、ある程度病変が完成されてから投与を開始すると治療効果を示さないと報告されている。その原因として、急性期蛋白の一つであ

る α 1-acid glycoprotein (AGP) がイマチニブの inhibitor として作用することが明らかにされている¹⁸⁾。過去の報告によると、強皮症患者では健康人に比べて AGP の量が多いことが明らかにされており¹⁹⁾、強皮症患者においてイマチニブの治療効果が症例によりことなるのは AGP が関与している可能性がある。エリスロシンやクラリスロマイシンは AGP と結合することが知られており、動物モデルではこれらの薬剤とイマチニブを同時に投与すると、線維化が完成したマウスにおいてもイマチニブの治療効果が確認できるとされている¹⁸⁾。今後、強皮症患者においても、エリスロシンやクラリスロマイシンの併用してイマチニブの治療効果をみていく必要があるだろう。

E. 結 論

TGF- β signaling の non-canonical pathway として、今回新たに“c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway”を同定した。イマチニブはこの pathway を抑制することにより、Fli1 の protein stability を亢進させ、その発現を亢進させる。強皮症皮膚線維芽細胞では epigenetic な機序で Fli1 の転写が強力に抑制されていることを鑑みると、イマチニブは強皮症の線維化の病態の治療に有効である可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Sfikakis PP, Gorgoulis VG, Katsiari CG, Evangelou K, Kostopoulos C, Black CM: Imatinib for the treatment of refractory, diffuse systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47: 735-7
2. Kay J, High WA: Imatinib mesylate treatment of nephrogenic systemic fibrosis. *Arthritis*

- Rheum. 2008; 58: 2543-8
3. Magro L, Catteau B, Coiteux V, Bruno B, Jouet JP, Yakoub-Agha I: Efficacy of imatinib mesylate in the treatment of refractory sclerodermatous chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 42: 757-60
 4. Moreno-Romero JA, Fernández-Avilés F, Carreras E, Rovira M, Martínez C, Mascaró JM Jr: Imatinib as a potential treatment for sclerodermatous chronic graft-vs-host disease. *Arch Dermatol.* 2008; 144: 1106-9
 5. Bhattacharyya S, Ishida W, Wu M, Wilkes M, Mori Y, Hinchcliff M, Leof E, Varga J: A non-Smad mechanism of fibroblast activation by transforming growth factor- β via c-Abl and Egr-1: selective modulation by imatinib mesylate. *Oncogene* 2009; 28: 1285-97
 6. Czuwara-Ladykowska J, Shirasaki F, Jackers P, Watson DK, Trojanowska M: Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway, *J Biol Chem* 2001; 276: 20839-48
 7. Nakerakanti SS, Kapanadze B, Yamasaki M, Markiewicz M, Trojanowska M: Fli1 and Ets1 have distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program, *J Biol Chem* 2006; 281: 25259-69
 8. Asano Y, Czuwara J, Trojanowska M: Transforming growth factor- β regulates DNA binding activity of transcription factor Fli1 by p300/CREB-binding protein-associated factor-dependent acetylation. *J Biol Chem* 2007; 282: 34672-83
 9. Asano Y, Trojanowska M: Phosphorylation of Fli1 at threonine 312 by protein kinase C- δ promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor- β . *Mol Cell Biol* 2009; 29: 1882-94
 10. Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, Jablonska S, Blaszczyk M, Watson DK, Trojanowska M: Persistent downregulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin, *Am J Pathol* 2003; 163: 571-81
 11. Asano Y, Markiewicz M, Kubo M, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M: Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 425-34
 12. Wang Y, Fan PS, Kahaleh B: Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2271-9
 13. Jimenez SA, Gaidarova S, Saitta B, Sandorfi N, Herrich DJ, Rosenbloom JC, Kucich U, Abrams WR, Rosenbloom J: Role of protein kinase C- δ in the regulation of collagen gene expression in scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1395-403
 14. Daniels CE, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Murphy SJ, Limper AH, Leof EB: Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- β and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest.* 2004; 114: 1308-16

15. Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R: Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF- β pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J* 2005; 19: 1-11
16. Distler JH, Jüngel 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* 2007; 56: 311-22
17. Varga J, Pasche B: Transforming growth factor- β as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 200-6
18. Azuma M, Nishioka Y, Aono Y, Inayama M, Makino H, Kishi J, Shono M, Kinoshita K, Uehara H, Ogushi F, Izumi K, Sone S: Role of α 1-acid glycoprotein in the therapeutic antifibrotic effects of imatinib with macrolides in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176: 1243-50
19. Kucharz EJ, Grucka-Mamczar E, Mamczar A,

Brzezinska-Wcislo L: Acute-phase proteins in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2000; 19: 165-6

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Bujor A, Asano Y, Hant F, Trojanowska M. Fli1 is a downstream target of imatinib mesylate in the treatment of SSc fibrosis. in preparation
2. 学会発表
 1. Bujor MA, Asano Y, Hant NF, Trojanowska M. Activation of the TGF- β /c-Abl/PKC- δ /Fli-1 pathway is a major contributor to SSc fibrosis. ACR/ARHP Scientific Meeting 09, October 17-21, 2009 Philadelphia

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

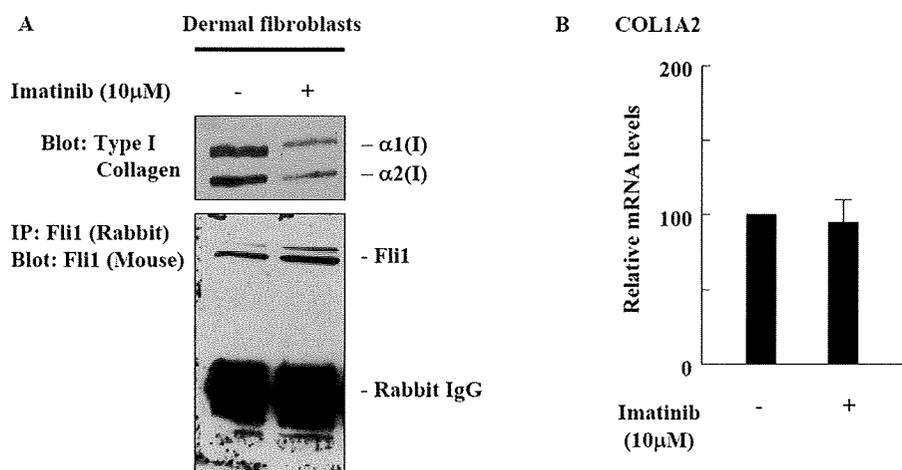


図 1 : A. イマチニブは正常皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲンの発現を抑制した。一方、イマチニブは Fli1 蛋白の発現を亢進させた。B. イマチニブは Fli1 の mRNA の発現量には影響を及ぼさなかった

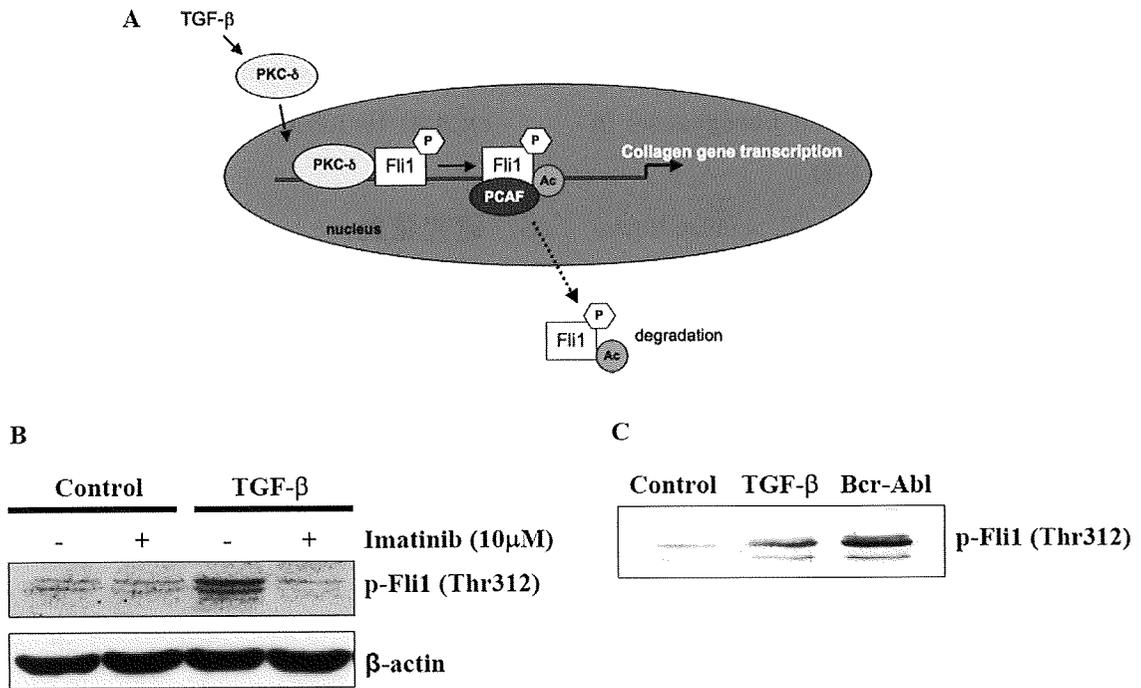


図 2 : A. Fli1 の転写活性を制御する phosphorylation-acetylation cascade。B. イマチニブは basal および TGF- β 刺激による Fli1 のリン酸化を抑制した。C. c-Abl の constitutive active form である Bcr-Abl を皮膚線維芽細胞に一過性強発現すると Fli1 はリン酸化され、その効果は TGF- β 刺激よりも強かった。

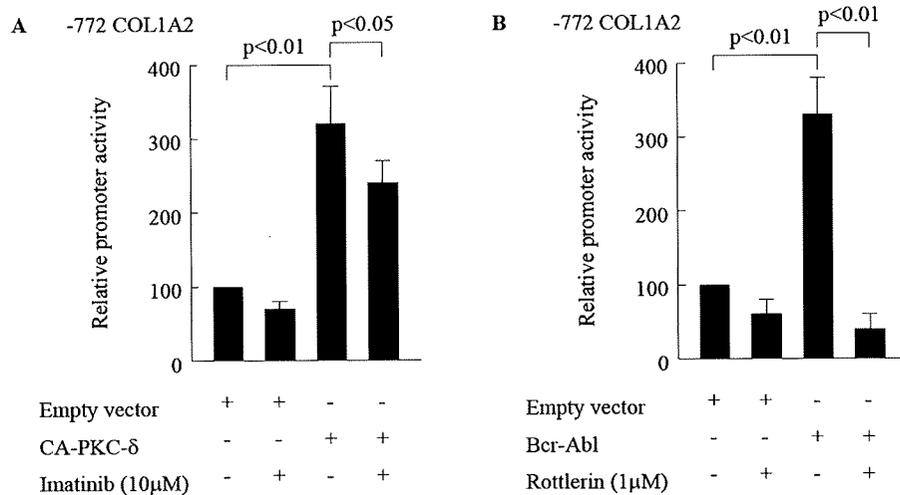


図 3 : A. constitutive active PKC- δ を正常皮膚線維芽細胞に一過性強発現すると、human COL1A2 promoter の転写活性は著明に亢進した。イマチニブはこの CA-PKC- δ の効果を軽度抑制したが、完全に抑制することはできなかった。B. Bcr-Abl を正常皮膚線維芽細胞に一過性強発現すると、human COL1A2 promoter の転写活性は著明に亢進したが、その効果は Rottlerin でほぼ完全に抑制された。