

dcSSc 患者の前腕から施行した。健常群皮膚線維芽細胞の取得は成人健常者の非露光部の体幹より皮膚生検にて得た。熊本大学大学院生命科学研究部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、抗生剤、抗真菌剤を加えた Eagle 培養液で 37℃、95%の空気、5%の CO₂ 濃度、培養器内で個別にシャーレ上で培養を行った。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。

3) 蛋白質量の評価は western blot 法を用いて、mRNA 量の評価は real time PCR 法を用いて確認した。

4) プレオマイシン誘発性強皮症モデルマウスの作成

プレオマイシン（日本化薬）を PBC にて 1 mg/ml になるよう希釈し、C57BL/6 マウスの剃毛した背部皮内にプレオマイシン 300 μ g もしくは PBS を 4 週間連日注射した⁴⁾。注射最終日翌日に背部皮膚を取得後、10%ホルマリン固定後にパラフィン包埋した。検体は金沢大学皮膚科学講座より譲渡されたものであり、金沢大学の動物実験に関する規約に承認されている⁵⁾。

5) 免疫染色

4 μ m に薄切したパラフィン包埋組織にキシレンを用いて脱パラフィン、アルコールを用いて脱水した。抗原賦活化液 pH 9（ニチレイ）にて 10 分間、121℃にてオートクレーブ処理を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性阻害のために、5%ヤギ血清にて常温にて 20 分間静置した後に、抗 TSP-2 抗体（1 : 150）に 4℃にて一晩静置した。PBS にて洗浄施行し、HRP 標識ヤギ抗マウス抗体（ニチレイ）を 37℃にて 30 分間静置した。Diaminobenzidine substrate system（ケミカル同人）を用いて視覚化し、マイヤーの

ヘマトキシリンで染色した。その後、標本を光学顕微鏡にて観察した（OLYMPUS BX50, Tokyo, Japan）。

6) RNA 干渉法

TSP-2 siRNA、MMP-2 siRNA、および生体内の mRNA と相同性がない control siRNA-A を陰性コントロールとして Santa Cruz Biotechnology より購入した。導入試薬に Lipofectamine RNAi max[®]（Invitrogen）を用い、reverse 法で RNA 導入を行った。reverse 法は、皮膚線維芽細胞を 10%ウシ血清含有し、抗生剤抗真菌剤を含まない Eagle 培養液で播種すると同時に TSP-2 siRNA、MMP-2 siRNA、control siRNA を導入試薬と混合し導入した。導入 12 時間後に total RNA を、導入 120 時間後に蛋白および後述する migration assay のための細胞取得を行った。

7) 血清 TSP-2 濃度の測定

TSP-2 に特異的な specific enzyme-linked immunosorbent assay kit を R&D Systems（Minneapolis, MN）より購入し、プロトコールに基づき施行した。

8) 統計解析法

グラフは 3 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-test および Fisher's exact probability 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) 強皮症皮膚線維芽細胞における TSP-2 合成は転写レベルで低下している。

TGF β -1 刺激ありもしくはなしの健常コントロール皮膚線維芽細胞（normal fibroblasts、以下 NF）および強皮症患者皮膚線維芽細胞（SSc fibroblasts、以下 SF）においての、細胞内抽出物による TSP-2

蛋白量を検討した。免疫ブロット法にて、NF より有意にSFにてTSP2蛋白量は低下していた(図1a)。以上より、SFにおいてTSP-2蛋白合成量が低下していることが示された。一方で、TGF β 刺激はTSP-2蛋白量に関与していなかった(図1a)。次に、同様の条件下におけるmRNA量をリアルタイムPCR法にて検討したところ、有意にSFにて減少を認めた(図1b)。これらより、SFにおけるTSP-2蛋白合成量の低下はmRNAレベルの低下に起因することが示された。加えて、抗TGF- β 抗体添加ありもしくはなしのNFおよびSFにおけるTSP-2 mRNA量を検討したが、差異は認めなかった(図1c)。これより、SFにおけるTSP-2 mRNA量の低下はTGF- β シグナルとの関連性はないことが示された。さらに、SFのmRNAレベルの低下に関して転写レベルもしくは転写後レベルでの変化に起因するのかを検討するために、アクチノマイシンD(RNA合成阻害剤)を用いてRNAの安定性を検討することにした。アクチノマイシンD処理12時間後のTSP-2 mRNA減少に関して、有意差を認めなかった(図1d)。以上より、SFにおけるTSP-2 mRNAの減少は転写レベルの産生低下によることが示された。

2) 強皮症皮膚線維芽細胞の細胞外分泌 TSP-2 蛋白量は増加している。

SFにおいて細胞外分泌 TSP-2 蛋白量が低下しているかどうかを検討した。興味深いことに、免疫ブロット法にて、SFはNFに比してTSP-2の増加を認めた(図2a)。また、我々は既報告のように⁶⁾、SFの細胞外分泌MMP-2蛋白量が低下していることを確認した。TSP-2がMMP-2の基質であることを考慮すると⁷⁾、SFにおける細胞外での分解能力の低下があると推定した。この仮定を証明するために、細

胞外への蛋白輸送阻害作用をもつ brefeldin A (BFA) をSFに添加してTSP-2蛋白の動態を検討した。BFAを添加後に細胞外TSP-2蛋白の安定性を評価したところ、SFのTSP-2蛋白の半減期はNFと比して有意に延長しており、上記の仮説を満足すると考えられた(図2b)。

3) 強皮症患者皮膚組織でも皮膚線維芽細胞と同様にTSP-2蛋白の分解低下が示唆された。

*in vivo*におけるTSP-2の動態を評価した。*in vitro*の結果と同様に皮膚組織からtotal RNAを採取して施行したリアルタイムPCR法では健常群に比して、有意に強皮症患者群で低下を認めた(図3a)。しかしパラフィン包埋組織による免疫染色の結果では、健常群の線維芽細胞ではTSP-2は不明瞭である一方で、強皮症患者群でTSP-2は肥大したコラーゲン線維間に強く発現していた(図3b)。さらにブレオマイシン誘発性強皮症モデルマウスの皮膚組織においては、コントロールであるPBS注射マウスの皮膚組織をと比較して、TSP-2陽性の皮膚線維芽細胞を認めた。これらの結果は、健常組織より、線維化が亢進している組織に、細胞外のTSP-2蛋白が増加していることを示していた。強皮症の組織でmRNAが減少しており、細胞外TSP-2蛋白が増加していたという結果は、*in vivo*と*in vitro*が同様の結果を示していると考えられた。そしてこの相違は細胞外TSP-2蛋白の分解能力の低下によるものと考えられた。細胞外でTSP-2蛋白が増加していることは強皮症の病態に関連していることが考えられる。

4) 強皮症患者群では血清 TSP-2 値が高値であった。

強皮症患者での血清TSP-2濃度を測定した。血清TSP-2濃度は健常コントロール群に比して、有意に高値であった(図4、平均 \pm 標準偏差 36.3 ± 13.5 vs 27.1 ± 7.6 mg/dl, $p < 0.02$)。

5) 皮膚線維芽細胞にて TSP-2 をノックダウンすることにより I 型コラーゲンの産生が低下する。

強皮症における TSP-2 の役割を解明するために、TSP-2 siRNA を用いて細胞内蛋白の動態を検討した。NF および SF ともに、MMP-1 は変化を認めなかった一方で、I 型コラーゲン蛋白の産生低下を認めた (図 5)。

D. 考案

この研究によって、TSP-2 の強皮症への関与に関して、大きく 2 つのことが明らかになった。

第一に、*in vitro* にて、SF において細胞外に分泌される TSP-2 蛋白が増加している一方で、細胞内の TSP-2 蛋白合成が低下していた。TGF β もしくは抗 TGF- β 抗体投与によって TSP-2 の発現は影響を受けなかった。*in vivo* でも同様に、TSP-2 mRNA は低下していたが、強皮症患者皮膚組織にて TSP-2 蛋白の沈着および強皮症患者にて血清 TSP-2 濃度の上昇を認めた。この細胞内/細胞外で相反する TSP-2 の発現は、細胞外での TSP-2 分解活性の低下 (もしくは MMP2 の低下) によると説明できる。

第二に、皮膚線維芽細胞における TSP-2 の機能を検討した。TSP-2 自身が、I 型コラーゲン蛋白産生を阻害していることを明らかにした。TGF β 刺激がコラーゲン合成を誘導していることを考慮すると 8、TSP-2 は TGF β と同様の作用を有しており、細胞外で蓄積する TSP-2 蛋白が強皮症における線維化に寄与しているのかもしれない。しかしながら、細胞内 TSP-2 合成は SF にて減少していた。それはあたかも、細胞外に蓄積する TSP2 や組織の線維化に対するネガティブフィードバック機構のようであると思われた。

E. 結論

本研究により導かれた TSP-2 に関する強皮症の病態を示す仮設モデルを図 6 に示す。強皮症において、皮膚線維芽細胞内での TSP-2 産生低下が転写レベルで認められる一方で、組織および血清における TSP-2 の増加を認めたことは細胞外 TSP-2 蛋白の分解活性低下に基づくものと思われる。この細胞外における TSP-2 の蓄積により誘導されるコラーゲン合成によって組織の線維化が促進されることが明らかになった。一方で、細胞内 TSP-2 合成低下は、蓄積する細胞外 TSP-2 および組織線維化に対するネガティブフィードバック機構のひとつとして引き起こされているが、コラーゲン合成を正常化するには不十分な反応であるように考えられた。TSP-2 による線維化を検討することが、強皮症の新しい治療に寄与する可能性が示唆された。

F. 文献

- 1 Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 961-8.
- 2 Bornstein P, Agah A, Kyriakides TR. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1115-25.
- 3 Armstrong LC, Björkblom B, Hankenson KD et al. Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1893-905.
- 4 Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 456-62.

- 5 Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M et al. BAFF antagonist attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2772-80.
- 6 Kuroda K, Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 567-72.
- 7 Prudova A, auf dem Keller U, Butler GS et al. Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 894-911.
- 8 Ellis I, Grey AM, Schor AM et al. Antagonistic effects of TGF-beta 1 and MSF on fibroblast migration and hyaluronic acid synthesis. Possible implications for dermal wound healing. *J Cell Sci* 1992; 102 (Pt 3): 447-56.

G. 研究発表

1. 論文発表

Ikko Kajihara, Masatoshi Jinnin, Takamitsu Makino et al. Unique expression pattern of thrombospondin-2 contributes to the excessive expression of type I collagen in scleroderma fibroblasts.

J Invest Dermatol; in revision

2. 学会発表

Ikko Kajihara, Masatoshi Jinnin, Takamitsu Makino et al. Unique expression pattern of thrombospondin-2 contributes to the excessive expression of type I collagen in scleroderma fibroblasts.

The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (Fukushima) . 2009. 12

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

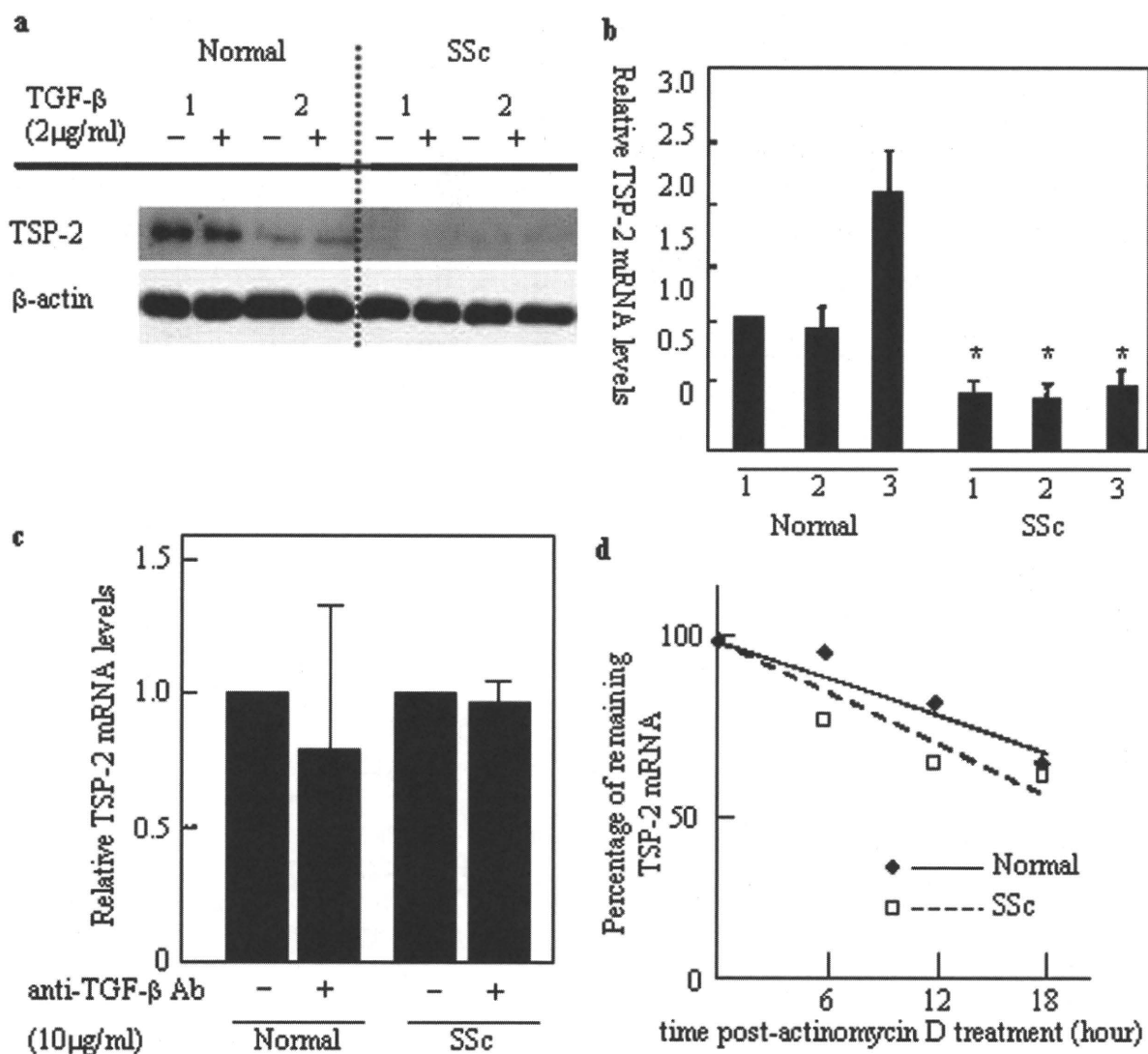


図1：a. 培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞内 TSP-2 蛋白の発現に関して免疫プロット法により解析した。各細胞は TGF β 投与有無の条件下にて 24 時間培養したものである。
b. 培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞内 TSP-2 mRNA の発現に関してリアルタイム PCR 法により解析した。GAPDH で正常化した TSP-2 の相対的レベルを、NF1 のレベル (1.0) と比較して示した。* $p < 0.05$ 。
c. control IgG もしくは抗 TGF- β 抗体 (48 時間) 存在下における培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞内 TSP-2 mRNA の発現とリアルタイム PCR 法により解析した。GAPDH で正常化した TSP-2 の相対的レベルを、NF のレベル (1.0) と比較して示した。
d. アクチノマイシン D 2.5 μ g/ml 投与 (6, 12, 18 時間) 有無における培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞内 TSP-2 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法により解析した。GAPDH で正常化した TSP-2 の相対的レベルを、投与無しのレベル (1.0) と比較して示した。

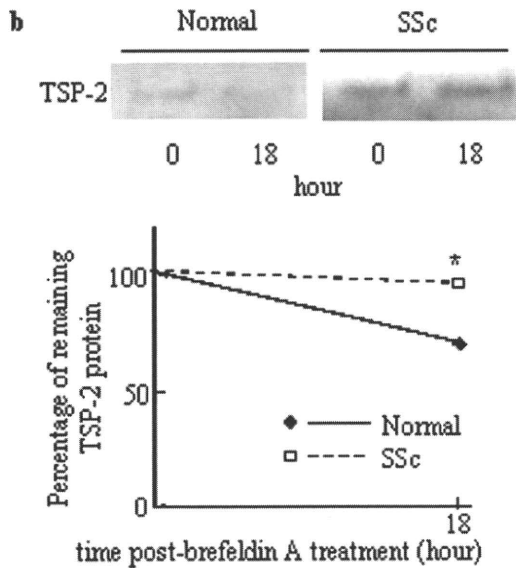
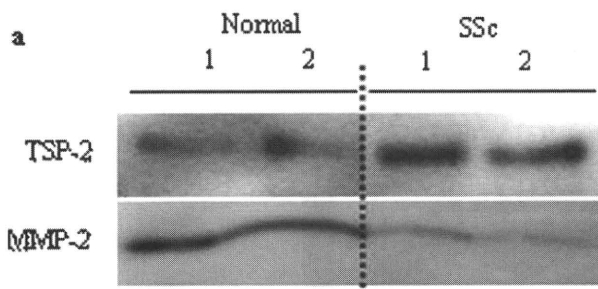


図2: a. 培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞より分泌された細胞外 TSP-2 および MMP-2 蛋白の発現を免疫ブロット法により解析した。各細胞は 24 時間無血清培地にて培養したものである。細胞数にて投与量を補正した。
b. 培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞に対して、BFA を投与後 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 6、12、18 時間後の細胞外 TSP-2 蛋白の発現を免疫ブロット法により解析した。図は 18 時間後の免疫ブロット法によるものであり、グラフは BFA 投与後の細胞外 TSP-2 蛋白の分解活性に関して、無処理状態を 100% として処理したものの。

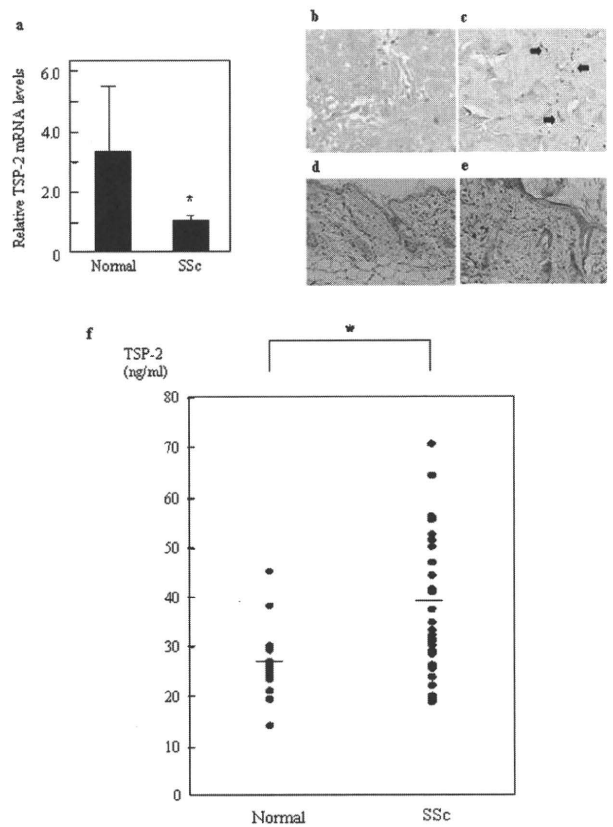


図3: a. 健常群 3 例および dcSSc 患者群 6 例の皮膚組織における TSP-2 mRNA の発現に関してリアルタイム PCR 法により解析した。GAPDH で正常化した TSP-2 の相対的レベルを、dcSSc 患者のレベル (1.0) と比較して示した。* $p < 0.05$ 。
b, c, d, e. 健常コントロール群 (b)、強皮症患者群 (b)、PBS 注入マウス (c)、ブレオマイシン誘発性強皮症モデルマウス (e) の皮膚組織における TSP-2 の発現に関して免疫染色により解析した。 $\times 200$ 。矢印にて TSP-2 陽性の部分を一部に示す。
f. 健常群 14 例および強皮症患者群 33 例の血清 TSP-2 蛋白濃度を ELISA により解析した。* $p < 0.05$ 。

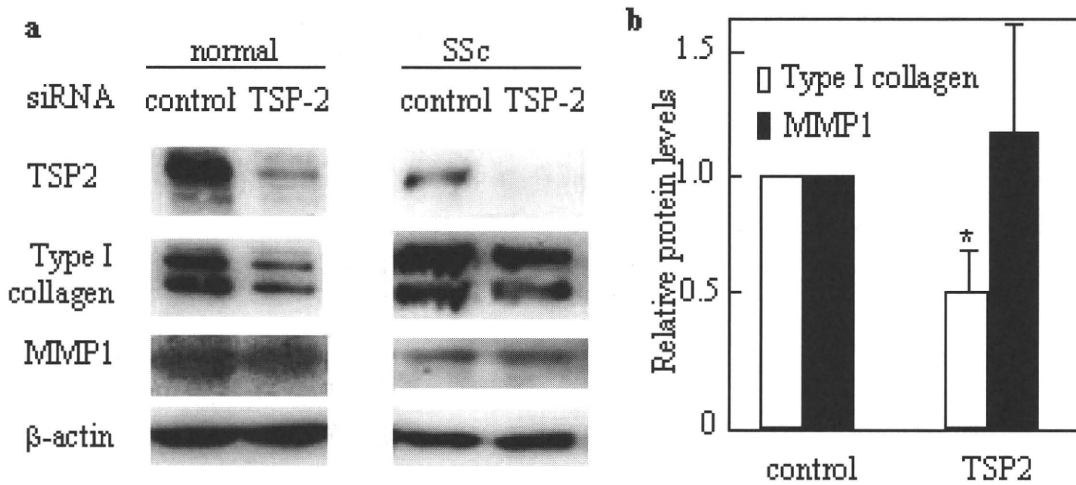


図4：a. 培養正常（normal）および強皮症（SSc）皮膚線維芽細胞に対して、control siRNA および TSP-2 siRNA を導入して120時間後の細胞内 COL-1 および MMP-1 蛋白の発現に関して免疫ブロット法により解析した。
 b. 培養正常皮膚線維芽細胞に対して、control siRNA および TSP-2 siRNA を導入して細胞内 I 型コラーゲン蛋白および MMP-1 蛋白の発現に関してデンストメトリーにて数値化した。 β アクチンにて補正した。

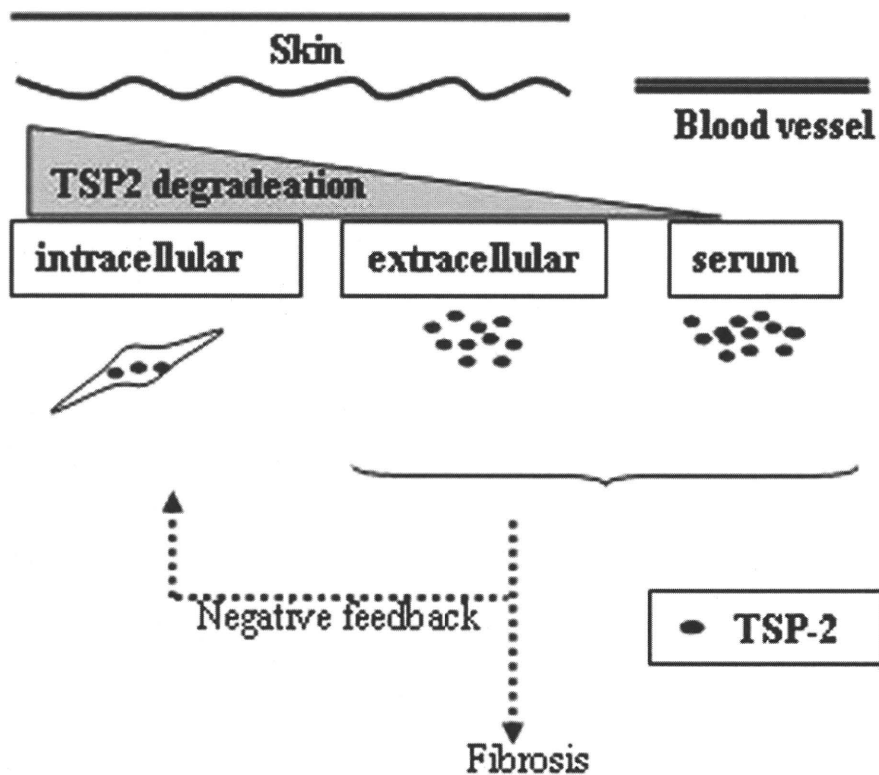


図5：強皮症における TSP-2 の発現と機能に関する略図

転写因子 Fli1 が I 型コラーゲン遺伝子の 転写抑制因子として機能するメカニズム

研究分担者 浅野善英 東京大学医学部附属病院皮膚科 講師

協力者 Maria Trojanowsk Division of Rheumatology and Immunology,
Medical University of South Carolina, Professor

研究要旨

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。その機序として、Fli1 が転写活性化因子である Ets1 と競合的に $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーター領域の Ets binding site に結合することが明らかにされているが、その他の機序が存在する可能性も示されている。今回我々は、Fli1 が転写抑制因子として作用する別の機序として、Fli1 が HADC1 と interact し、p300 によるヒストンのアセチル化を阻害することによって $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写活性を抑制していることを明らかにした。つまり、Fli1 は passive repressor としてのみではなく、active repressor としても作用することが示された。以上の結果は、Fli1 が極めて強力な転写抑制因子であり、その発現低下が強皮症皮膚線維芽細胞の恒常的活性化に深く関与している可能性を示している。Fli1 の転写抑制活性を亢進させる作用をもつメチル酸イマチニブが強力な抗線維化作用を示すことを鑑みると、Fli1 が強皮症の治療戦略を考える上で一つの重要な target となりうることを示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は血管障害と線維化を特徴とする原因不明の自己免疫疾患である。強皮症患者の病変部皮膚では、炎症や血管障害により線維芽細胞が恒常的に活性化され、細胞外マトリックスの産生亢進と分解遅延を引き起こし、結果的に細胞外マトリックスが過剰に沈着する。強皮症皮膚線維芽細胞が恒常的に活性化される機序は単一ではないが、最近我々は強皮症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である Fli1 の発現が恒常的に減少しており、その異常により同細胞が恒常的に活性化されている可能性を明らかにした¹⁻³⁾。また、強皮症の新しい治療薬として注目されているメ

チル酸イマチニブが抗線維化作用を示す機序の一つとして、同薬により Fli1 の転写抑制活性が亢進することを明らかにした⁴⁾。このように Fli1 は強皮症の新しい治療の target となりうる分子であるが、この転写因子が強力な転写抑制活性を示す機序については十分には検討されていない。

Fli1 が転写抑制因子として機能する機序の一つとして、同転写因子が転写活性化因子 Ets1 と競合的にヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン (COL1A2) 遺伝子プロモーターの -285~-282 領域の Ets binding site に結合することが示されている¹⁾。つまり、Fli1 は passive repressor として機能することが明らかにされている。しかしながら、① DNA 結合能をもたない Fli1

mutant protein (Flii W321D) では転写抑制活性は低下するもののその活性は完全には失われない、② Flii の DNA 結合部位のみの deletion mutant (Flii DBD) でも Flii の転写活性は低下するもののその活性は完全には失われない、といった実験事実から、Flii が転写抑制因子として機能する機序には、Ets1 と拮抗する以外の別の機序も存在する可能性が示唆されている¹⁾。

転写因子が転写活性を抑制する機序の1つとして、histone deacetylase (HDAC) を recruit してヒストンのアセチル化を抑制することで、DNA の高次構造の変化を介して転写を抑制する機序がある。今回我々は、HDAC に注目し、Flii が転写因子として機能する機序を明らかにすることを目的に本研究を行った。

B. 研究方法

1) 細胞培養

正常皮膚線維芽細胞は、Medical University of South Carolina で出生した男児の陰茎包皮から単離・培養した。これらの検体の採取は被検者の保護者の 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)、2mM L-グルタミンと 50 μ g/ml ゲンタマイシン含有 MEM にて 37 $^{\circ}$ 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。293T 細胞は American Type Culture Collection より購入し、線維芽細胞と同様の条件で培養した。

2) pCTAP-Flii construct の作成

pCTAP vector を stratagene より購入し、multiple cloning site に in frame となるように Flii 遺伝子の cDNA を挿入した。発現する蛋白が機能的な Flii 蛋白であることを COL1A2 promoter を用いた

reporter assay で確認した。また、2つの tag (streptavidin-binding peptide と calmodulin-binding peptide) が機能していることも免疫沈降法で確認した⁵⁾。また、pCTAP-Flii construct を発現する adenovirus も作成した。

3) proteomic analysis

293T 細胞に adenovirus を用いて pCTAP-Flii を強発現し、48 時間後に細胞抽出液を準備した。この細胞抽出液から、streptavidin resin と calmodulin resin を利用して Flii を含む転写因子複合体を精製し、二次元電気泳動を行い、銀染色で蛋白を検出した。コントロールとして、empty vector を 293T 細胞に強発現して得られた細胞抽出液を使用した。コントロールと比較して、Flii transfectant において変化のあったスポットをゲルから切り出し、mass spectrometry で蛋白同定を行った。

4) 免疫プロットティング

皮膚線維芽細胞あるいは 293T 細胞を 4 $^{\circ}$ C の phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、1% Triton X-100、50mM Tris-HCl [pH 7.4]、150mM NaCl、3mM MgCl₂、1mM CaCl₂、10 μ g/ml leupeptin、10 μ g/ml pepstatin、10 μ g/ml aprotinin、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含有する lysis buffer にて溶解した。不溶分画は 15 分間 20000G 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 μ g 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。

5) in vivo acetylation assay

293T 細胞に histon acetyltransferase (HAT) 活性を持つ転写補助因子 (p300、CBP、PCAF) あるいは HAT 活性を欠失した mutant construct (p300/ Δ HAT、PCAF/ Δ HAT) を pCTAP-Fli1 と共に一過性強発現し、48 時間後に細胞抽出液を準備した。この細胞抽出液を用いて、streptavidin resin により Fli1 蛋白を沈降し、沈降された蛋白を用いて免疫ブロット法にてアセチル基を検出した⁵⁾。

5) クロマチン免疫沈降法

皮膚線維芽細胞を 1% ホルムアルデヒドを用いて室温で 10 分間固定したのち、細胞を回収し、核抽出物を準備した。Sonicator で DNA を破碎したのち、抗 Fli1 抗体、抗 p300 抗体、抗 HDAC1 抗体、抗アセチル化ヒストン H3 抗体で免疫沈降を行った。沈降された DNA 蛋白複合体からフェノール・クロロフォルム抽出にて核酸成分を精製した。ヒト COL1A2 promoter の -404~-237 領域を PCR にて増幅し、1% アガロースゲルを用いた電気泳動により PCR 産物の有無を検出した^{5,6)}。

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。

C. 研究結果

1) Fli1 は HDAC1 と転写因子複合体を形成する

293T 細胞に pCTAP-Fli1 あるいは empty vector を一過性強発現し、この細胞の抽出液から streptavidin resin と calmodulin resin を用いて tandem affinity purification を行い、得られた蛋白を二次元電気泳動にて分離した (図 1A)。Fli1 による TAP で得られたスポットのうち、empty vector 用いて行った TAP では検出されなかったスポットをゲルから切り出し mass spectrometry を施行したところ、

Fli1 に interact する蛋白として HDAC1 が同定された。ヒト皮膚線維芽細胞を用いて同様の実験を行ったところ、やはり HDAC1 が同定された。次に、ヒト皮膚線維芽細胞の細胞抽出液を用いて、Fli1 と HDAC1 の interaction の有無を免疫沈降法により検討したところ、図 1B に示すように Fli1 と HDAC1 の interaction が確認された。一方、Fli1 と HDAC3 の interaction は検出限界以下であった。以上の結果から、ヒト皮膚線維芽細胞において、無刺激下で Fli1 は HDAC1 と転写因子複合体を形成していることが示された。

2) HDAC1 は Fli1 のアセチル化を制御している

我々は過去に、Fli1 は PCAF によりアセチル化され、その結果 DNA 結合能を失うことを明らかにした⁵⁾。Fli1 は HDAC1 と interaction することから、HDAC1 によって脱アセチル化されている可能性が示唆される。その点について検討するため、293T 細胞を用いた in vivo acetylation assay を行った。図 2 に示すように、Fli1 は PCAF によりアセチル化されたが、HDAC1 を強発現することでそのアセチル化の程度は著明に抑制された。以上より、HDAC1 は Fli1 と interaction し、Fli1 を脱アセチル化することが示された。

3) p300 は Fli1 のアセチル化を抑制し、DNA 結合能を亢進させる

我々は過去に、Fli1 のアセチル化を制御する histone acetyltransferase 活性をもつ蛋白を同定する目的で in vivo acetylation assay を行い、PCAF が Fli1 のアセチル化を著明に亢進させることを見出したが、同時に p300 が Fli1 のアセチル化を抑制し、DNA 結合能を亢進させることを見出した (図 3A、3B)⁵⁾。Fli1 の DNA 結合能はそのアセチル化の状態によって制御されるため、HDAC 活性を持たない

p300 が Fli1 を脱アセチル化するには、p300 存在下で Fli1 と HDAC1 の interaction が亢進している可能性がある。この仮説を検討するため、293T 細胞を用いて p300 存在下で Fli1 と HDAC1 の interaction を検討した。図 4 に示すように、p300 存在下では Fli1 と HDAC1 の interaction が著明に亢進した。以上の結果から、p300 存在下では Fli1 と HDAC1 の interaction が著明に亢進することが示された。

4) Fli1 と p300 および PCAF の interaction は、Fli1 のスレオニン 312 のリン酸化により制御されている

これまでの実験により、Fli1 は PCAF によりアセチル化される一方で、p300 存在下では HDAC1 により脱アセチル化されることが示された。Fli1 と PCAF の interaction は Fli1 のスレオニン 312 におけるリン酸化により制御されるため⁶⁾、Fli1 と p300 の interaction も Fli1 の同部位におけるリン酸化により制御されている可能性がある。この点を明らかにするために、293T 細胞を用いて、Fli1 T312A mutant (リン酸化抵抗性の mutant) と p300 および PCAF との interaction を調べた。図 5 に示すように、Fli1 T312A mutant では p300 との interaction が著明に亢進した。以上の結果から、Fli1 のリン酸化は、その親和性を p300 から PCAF へと変化させることで、アセチル化を制御していることが明らかとなった。

5) HDAC1 は COL1A2 promoter のヒストンのアセチル化を抑制している

最後に、Fli1 と interact した HDAC1 が COL1A2 promoter のアセチル化を抑制しているか否かについて、クロマチン免疫沈降法を用いて検討した。図 6A に示すように、無刺激下では、COL1A2 promoter の -404~-237 領域に Fli1、p300、HDAC1 の complex が結合していることが示された。TGF- β 刺

激により、p300 の DNA 結合量が増加し、Fli1 と HDAC1 の DNA 結合量が著明に減少し、同時にヒストンのアセチル化が著明に亢進した (図 6B)。一方、アデノウイルスを用いて Fli1 を一過性強発現すると、Fli1 と HDAC1 の DNA 結合量が増加し、それに反比例してヒストンのアセチル化が抑制された (図 6C)。以上の結果から、Fli1 は HDAC1 を recruit することにより、ヒストンを脱アセチル化し (あるいは p300 によるヒストンのアセチル化を抑制し)、COL1A2 の転写を抑制していることが示された。

D. 考 察

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⁾。過去の報告では、Fli1 は転写活性化因子である Ets1 と競合してヒト COL1A2 遺伝子プロモーターの Ets binding site に結合することにより、ヒト COL1A2 遺伝子の発現を抑制することが示されている¹⁾。しかしながら、Fli1 mutant construct を一過性強発現する実験系により、Fli1 が I 型コラーゲン遺伝子の転写抑制因子として機能する機序は、Ets1 に競合する機序のみではないことが示唆されていた¹⁾。我々はこれまでに転写因子 Fli1 の転写活性を制御している機序に注目し、Fli1 の活性を制御する "phosphorylation-acetylation cascade" を同定した^{5,6)}。つまり、Fli1 は PKC- δ によりスレオニン 312 でリン酸化され、この部位でリン酸化された Fli1 は PCAF との interaction が亢進するため、PCAF によりリジン 380 でアセチル化される。アセチル化された Fli1 は DNA 結合能を失い、速やかに分解される。今回我々は、Fli1 がアセチル化される蛋白であることに注目し、Fli1 が HDAC1 と interact し、HDAC1 により脱アセチル化され、DNA 結

合能を増すことを明らかにした。また、HDAC1 と interact した Fli1 は DNA 結合能を増すことから、Fli1 は HDAC1 を DNA へと recruit する役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、p300 と Fli1 は相互作用し、その結果として Fli1 と HDAC1 の interaction が増すため、p300-Fli1-HDAC1 が複合体を形成し、p300 によるヒストンのアセチル化を HDAC1 が抑制している可能性が示された。以上の結果は、Fli1 が HDAC1 を介してヒストンのアセチル化を抑制し、結果的に DNA の高次構造を変化させることでヒト COL1A2 遺伝子の転写を抑制していることを示している。つまり、Fli1 は passive repressor および active repressor としての機能を併せ持った非常に強力な転写抑制因子であることが明らかとなった。

E. 結 論

転写因子 Fli1 は Ets1 と競合して Ets binding site に結合するのみでなく、HDAC1 を介してヒストンのアセチル化を抑制することにより、ヒト COL1A2 遺伝子の強力な転写抑制因子として機能していることが明らかとなった。この事実は Fli1 の恒常的な発現低下が異なる 2 つの作用によって強皮症皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子の発現亢進に関与していることを示している。転写因子 Fli1 を再活性化させる作用をもつメチル酸イマチニブが強力な抗線維化作用を示すことを鑑みると⁴⁾、同転写因子が強皮症の治療戦略を考える上で一つのターゲットとなりうると考えられる。

F. 文 献

1. Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, et al.: Per-

sistent downregulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol* 2003; 163: 571-81.

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, 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.
4. Bujor A, Asano Y, Hant F, Trojanowska M. Fli1 is a downstream target of imatinib mesylate in the treatment of SSc fibrosis. *Arthritis Rheum* in press
5. 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.
6. 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.

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

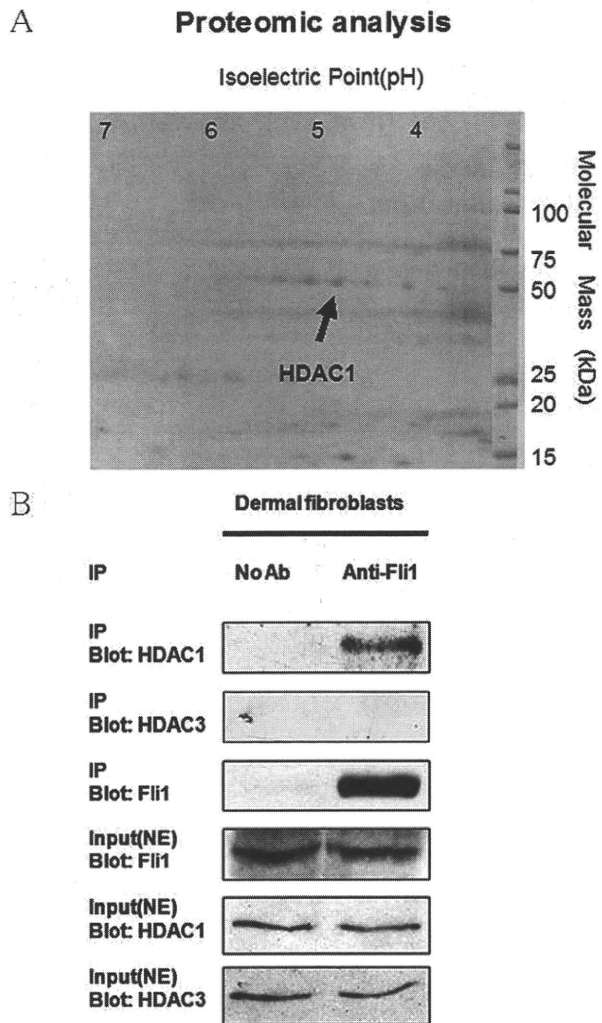


図1: A. streptavidin-binding peptide と calmodulin-binding peptide を tag として持つ recombinant Fli1 construct を 293T 細胞に一過性強発現し、細胞抽出液から streptavidin resin と calmodulin resin を用いて Fli1 を含む転写因子複合体を精製した。精製された蛋白を用いて二次元電気泳動を行い、蛋白を銀で染色した。得られたスポットをゲルから切り出し、mass spectrometry で蛋白の同定を行った。矢印は HDAC1 蛋白に該当するスポットを示す。

B. ヒト皮膚線維芽細胞において、Fli1 は HDAC1 と interact していた。

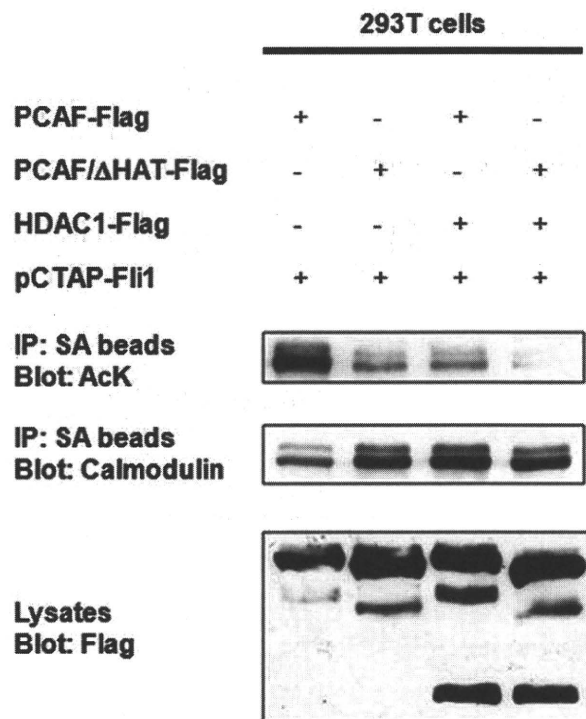


図2: 293T 細胞を用いた in vivo acetylation assay によって、HDAC1 は PCAF による Fli1 のアセチル化を著明に抑制することが示された。

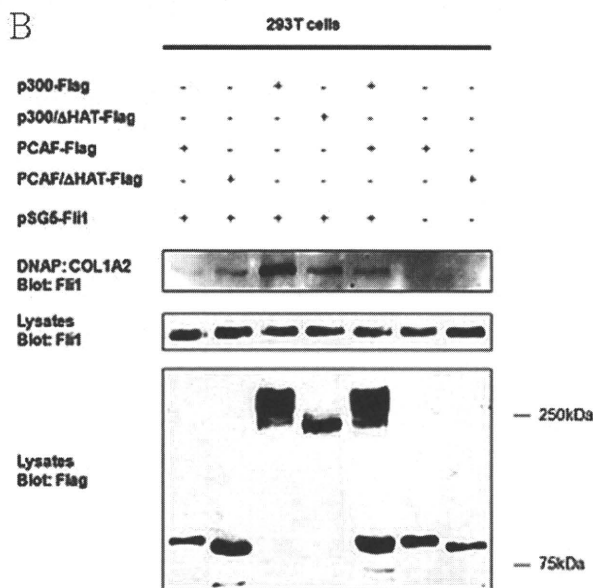
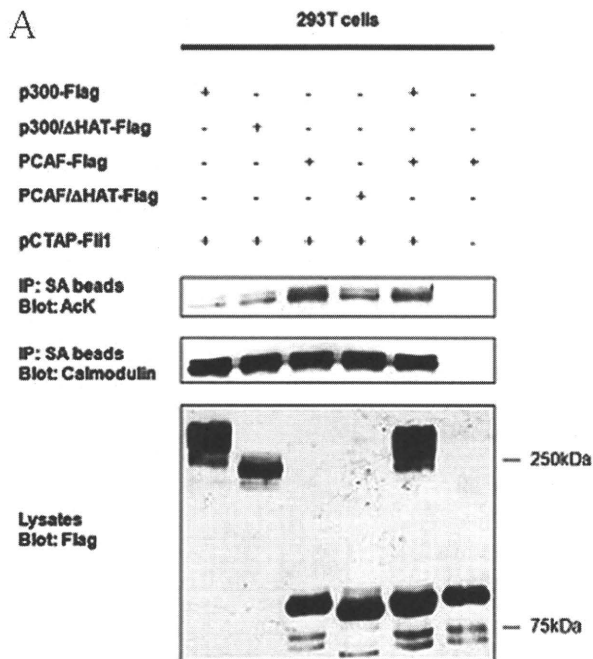


図3: A. 293T細胞を用いた *in vivo* acetylation assayにて、PCAFはFli1のアセチル化を亢進させ、p300はFli1のアセチル化を抑制した。B. 293T細胞にFli1と各種HAT活性をもつ転写補助因子を一過性強発現し、Fli1のDNA結合能についてDNA affinity precipitation assayにて検討した。PCAFはFli1のDNA結合能を低下させ、p300はFli1のDNA結合能を亢進させた。

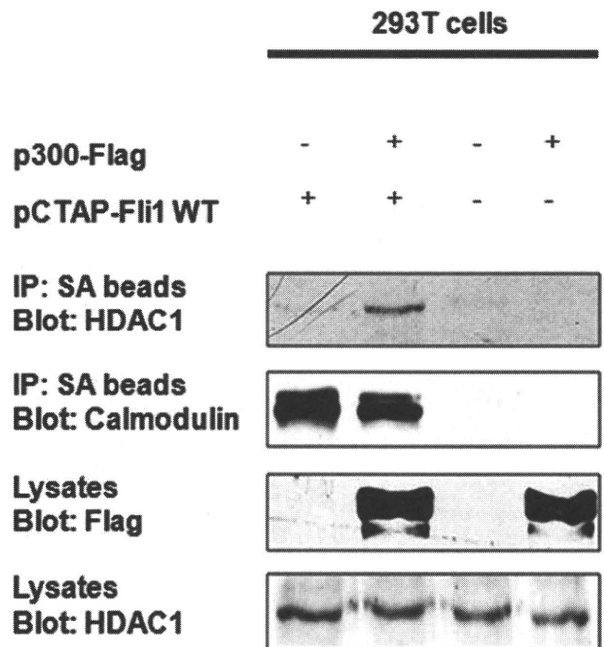


図4: 293T細胞にFli1およびp300あるいはempty vectorを一過性強発現し、Fli1とHDAC1のinteractionを免疫沈降法にて検討した。p300存在下において、Fli1とHDAC1のinteractionは著明に亢進した。

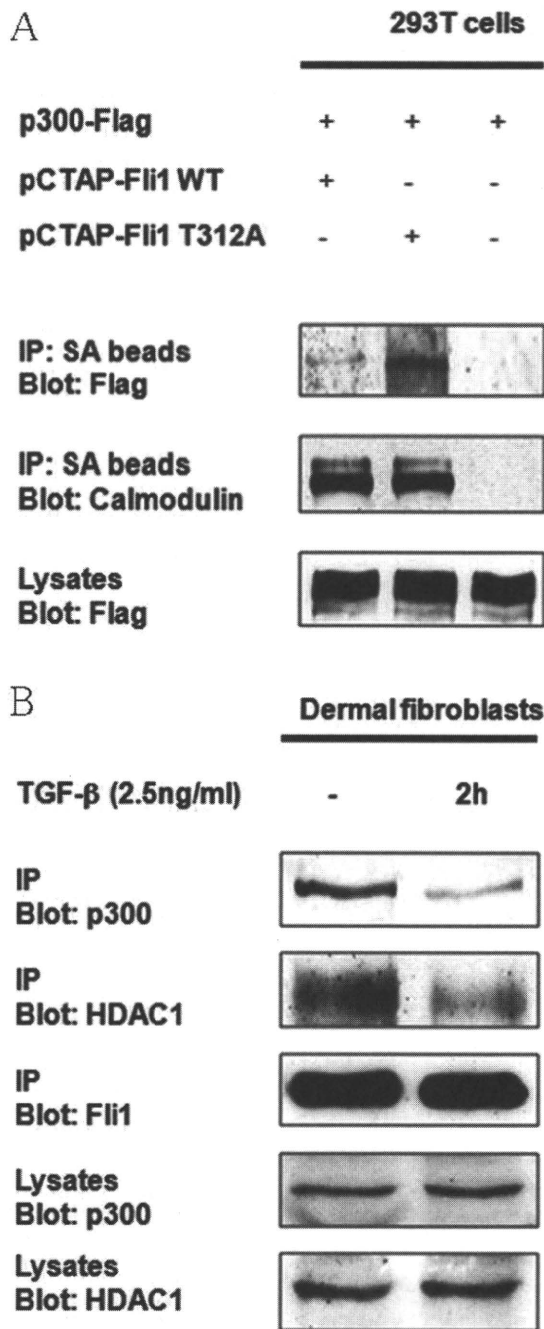


図5：A. 293T細胞に wild type Fli1 あるいは Fli1 T312A mutant を p300 と同時に一過性強発現したところ、Fli1 T312A mutant と p300 の interaction は wild type Fli1 と p300 の interaction と比較して著明に亢進していた。B. 正常皮膚線維芽細胞では、無刺激下では Fli1、p300、HDAC1 は転写因子複合体を形成しているが、TGF- β 刺激2時間後では Fli1 と HDAC1 あるいは p300 との interaction は著明に減少していた。

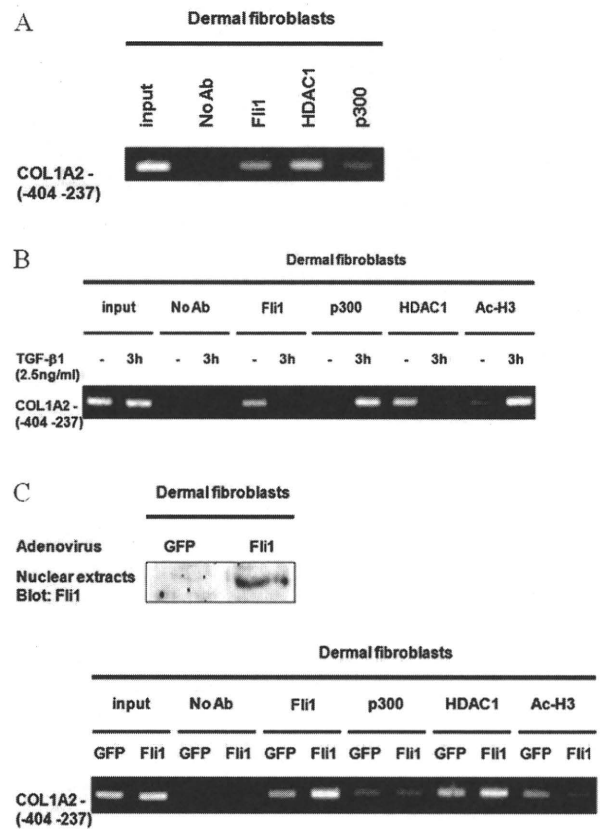


図6：A. ヒト皮膚線維芽細胞を用いたクロマチン免疫沈降法では、無刺激下において COL1A2 promoter の -404~-237 領域に Fli1、p300、HDAC1 が結合していた。B. TGF- β 刺激3時間後において、同領域への Fli1 と HDAC1 の結合は低下し、p300 の結合は亢進していた。また、ヒストン H3 のアセチル化が亢進していた。C. ヒト皮膚線維芽細胞にアデノウイルスを用いて Fli1 を一過性強発現したところ、Fli1 と HDAC1 の同領域への結合が亢進し、ヒストン H3 のアセチル化は低下した。

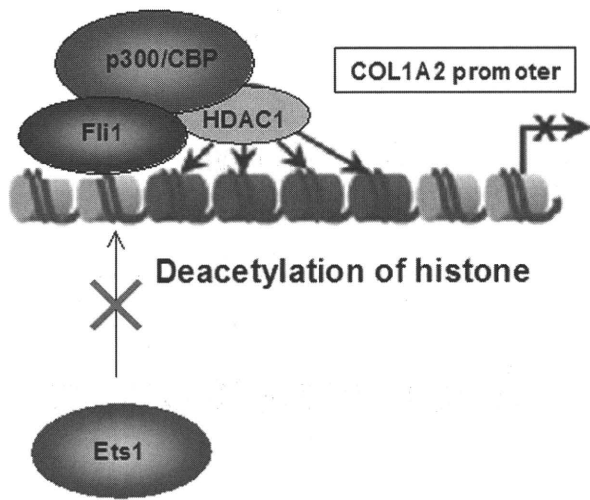


図7：Fli1がヒトCOL1A2遺伝子の転写抑制因子として機能する機序のまとめ。Fli1はEts1と競合的にEts binding siteに結合することにより、passive repressorとして機能する。一方、Fli1はHDAC1をpromoterへとrecruitし、HDAC1によるヒストンの脱アセチル化を促す（p300によるヒストンのアセチル化を抑制する）ことにより、active repressorとして機能する。

転写因子 Fli1 によるエストロゲン受容体 ER α の発現調節

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 服部友保 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 助教

協力者 Maria Trojanowska Boston University School of Medicine, Arthritis Center, Prof.

研究代表者 佐藤伸一 東京大学医学部附属病院皮膚科 教授

研究要旨

エストロゲンは皮膚のコラーゲン合成を促進し、皮膚老化、創傷治癒に関わる事が知られているが、真皮線維芽細胞における作用機序はあまり知られていない。一方、転写因子 Fli1 は真皮線維芽細胞において、TGF- β シグナル下で I 型コラーゲン遺伝子の転写活性を抑制する。どちらのシグナルも細胞外基質の発現調節に関わる事から、両者のクロストークを明らかにすることは、その調節機序を知る上で意義あるものと考えられる。本研究ではまずヒト真皮線維芽細胞を用いて TGF- β 刺激の Estrogen receptor α (ER α) 発現量への影響を調べたところ、TGF- β 刺激 24 時間後に ER α mRNA、タンパク量が増加した。また Fli1 特異的 siRNA により Fli1 発現量を低下させると同様に ER α 発現量は増加した。Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 解析で、Fli1 は ER α プロモーターに結合しており TGF- β 刺激 24 時間後に解離することが分かった。Fli1 ヘテロノックアウトマウス由来の培養真皮線維芽細胞において ER α mRNA、タンパクは野生型に比べて高発現しており、マウス皮膚組織を用いた免疫組織化学染色においても Fli1 ヘテロノックアウトマウス皮膚の真皮線維芽細胞に ER α タンパクは優位に発現していた。このように真皮線維芽細胞において Fli1 が ER α 発現の転写抑制因子として機能することが明らかになった。

A. 研究目的

Fli1 は Ets 転写因子ファミリーに属する転写因子の一つあり、近年の研究で真皮線維芽細胞においてコラーゲンをはじめとするさまざまな遺伝子の発現調節に関わっていることが明らかになっている。特に I 型コラーゲン産生の抑制因子としての働きはよく研究されており、TGF- β シグナル下で Fli1 がコラーゲンプロモーターから解離する事がコラーゲン遺伝子の転写を活性化させる¹⁾。強皮症患者の皮膚においては Fli1 の発現量は低下しており、Fli1 の発現量低下が I 型コラーゲンの発現量増加と関連づけら

れたことから、生体レベルで Fli1 が強皮症の病態において重要な役割を果たしている可能性が考えられる²⁾。一方エストロゲンは性ホルモンのひとつで、皮膚においてコラーゲン合成を促進し皮膚を厚くすることや、創傷治癒を促進する事などが知られている。一般にエストロゲンは 2 種類のエストロゲンレセプター ER α と ER β を介してシグナルを伝える。ER は核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子である。皮膚におけるエストロゲンの作用についてはよく検討されている一方で、真皮線維芽細胞における ER の役割についてはあま

り知られていない。

エストロゲンシグナルと TGF- β シグナルは両者とも細胞外基質遺伝子の発現に関わり、また両シグナルはそれぞれの下流の転写因子 ER α と Smad2/3 の結合を介してクロストークする³⁾。Fli1 は TGF- β シグナル下で重要な役割を持つ転写因子であり、ER α が Fli1 とともにクロストークする事で真皮線維芽細胞において細胞外基質遺伝子の発現を調節する可能性が考えられる。そこで今回我々は TGF- β /Fli1 シグナルが ER α の発現調節に関わるかを検討した。

B. 研究方法

- 1) 正常ヒト真皮線維芽細胞を用いて、TGF- β 刺激、siRNA による Fli1 抑制による ER α の発現への影響をリアルタイム RT-PCR 法やウエスタンブロット法で検討した。
- 2) Fli1 の ER α プロモーターへの結合の有無を Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 解析で検討した。TGF- β 刺激によるこの結合への影響も同時に検討した。
- 3) Fli1 ヘテロノックアウトマウスから真皮線維芽細胞を分離培養し、ER α 発現量をリアルタイム RT-PCR 法やウエスタンブロット法で検討した。
- 4) Fli1 ヘテロノックアウトマウスの皮膚切片を用いて免疫組織化学染色により真皮における ER α 発現の分布を検討した。

C. 研究結果

まずヒト真皮線維芽細胞細胞における TGF- β の ER α 発現量に対する影響を検討した。線維芽細胞を TGF- β で刺激し 24 時間後に総 RNA、総タンパクを抽出し、リアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法により ER α の発現量の変化を調べたところ、

TGF- β 刺激により ER α mRNA 発現量は 1.3 倍、ER α タンパク発現量は 1.7 倍に増加した (図 1)。

次に Fli1 の ER α 発現への影響を調べるために、Fli1 特異的な siRNA を用いて Fli1 の発現を抑制した。Fli1siRNA 導入 72 時間後、Fli1 mRNA、Fli1 タンパク発現量は著明に低下した。この状況下での ER α 発現量を調べると、TGF- β 刺激の際と同様に ER α mRNA は 1.4 倍、ER α タンパクは 1.8 倍に増加した (図 2)。

Fli1 が ER α mRNA の発現に関わる事から、真皮線維芽細胞において Fli1 が ER α 発現に転写レベルで関与している可能性が示唆された。そこで Fli1 が ER α の発現調節を行うために ER α のプロモーター領域に結合するかどうかを検討した。ER α プロモーターを解析すると 4 カ所の Ets binding site が推定されたため、図 3a に示すように配列特異的プライマーを 3 カ所に設定し ChIP 解析を行った。Fli1 は ER α プロモーター上の -1300 から -1090bp の領域には結合していなかったが、より近位の -681 から -523bp、-458 から -298bp の領域に結合していた。この結合は TGF- β 刺激 3 時間後には変化なかったが、24 時間後には消失していた (図 3b)。TGF- β 刺激により Fli1 が ER α プロモーターから解離したと考えられた。

以上の結果よりヒト真皮線維芽細胞において、Fli1 は ER α プロモーターに結合して ER α 発現の抑制因子として働いていると考えられた。

生体内における Fli1 の ER α 発現への影響を調べるため、遺伝子導入マウスを用いた。Fli1 ノックアウトマウスは血管系の未発達により胎生致死となるため、Fli1 ヘテロノックアウトマウスを用いた。マウスから真皮線維芽細胞を分離しリアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法で Fli1 の発現量を

調べたところ、Fli1 ヘテロノックアウトマウスにおける Fli1 の発現量は野生型の約 50% であった。Fli1 ヘテロノックアウトマウスの線維芽細胞において ER α mRNA、タンパクは野生型よりそれぞれ 1.9 倍、2.5 倍高発現していた (図 4a)。さらにマウス皮膚切片を用い、免疫組織化学染色で ER α タンパクの発現の分布を検討したところ、野生型マウス皮膚の真皮では一部の細胞のみが ER α 陽性であったが、Fli1 ヘテロノックアウトマウスでは真皮のほとんどの細胞が ER α 陽性であった。真皮の線維芽細胞を数え ER α 陽性細胞の割合を検討したところ、Fli1 ヘテロノックアウトマウスの線維芽細胞は 2.5 倍高頻度に ER α を発現していた (図 4b)。

以上の結果より Fli1 ヘテロノックアウトマウスの線維芽細胞において ER α が高発現していることが明らかになり、生体内における Fli1 の ER α 発現への関与が示唆された。

D. 考察

今回の検討でヒトやマウスの真皮線維芽細胞において Fli1 が ER α 発現の転写抑制因子として働いている事が明らかになった。強皮症などの Fli1 発現が抑制された状況下では ER α を介したエストロゲンシグナルが増強されていることが推測される。これまでにエストロゲンが真皮線維芽細胞においてコラーゲンなどの細胞外基質の発現を増加させ、この反応が強皮症患者由来の真皮線維芽細胞においてより著明だったことが報告されており⁴⁾、その過程に ER α が関与している可能性が示唆される。

Selective ER modulator であるタモキシフェンは限局性强皮症やケロイド由来の線維芽細胞で抗線維化作用を発揮する⁵⁾。また強皮症患者における ER α 遺伝子の single-nucleotide polymorphism が示され

るなど⁶⁾、皮膚線維化と ER α が関わりうることを示す報告も増えてきている。線維化の過程における重要性が示されてきた TGF- β シグナルとのクロストークを通してエストロゲン/ER α シグナルの役割を明らかにすることは、強皮症の病態をさらに深く解明し新たな治療を模索する上で有益であると考えられた。

E. 結論

今回の研究から真皮線維芽細胞において転写因子 Fli1 が ER α 発現の抑制因子として働く事が明らかになった。

F. 文献

1. Asano Y, Czuwara J, Trojanowska M (2007) Transforming growth factor-beta regulates DNA binding activity of transcription factor Fli1 by p300/CREB-binding protein-associated factor-dependent acetylation. *J Biol Chem.* 282: 34672-34683.
2. Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, et al. (2003) Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol.* 163: 571-581.
3. Matsuda T, Yamamoto T, Muraguchi A, Saaticioglu F (2001) Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3. *J Biol Chem.* 276: 42908-42914.
4. Soldano S, Montagna P, Brizzolara R, Sulli A, Parodi A, Serio B, et al. (2010) Effects of estrogens on extracellular matrix synthesis in

cultures of human normal and scleroderma skin fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 1193: 25-29.

5. Ayoub N, Bouaziz JD, Barete S, Frances C (2004) Regression of morphea plaques after tamoxifen therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 18: 637-638.
6. Hoshi M, Yasuoka H, kuwana M (2008) Estrogen receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic sclerosis. *Clin Exp*

Rheumatol. 26: 914-917.

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35回年次学術大会総会

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

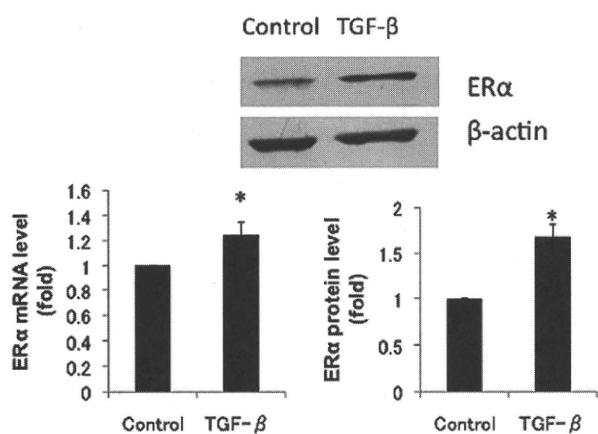


図1：ヒト真皮線維芽細胞における TGF-β 刺激による ERα 発現への影響。

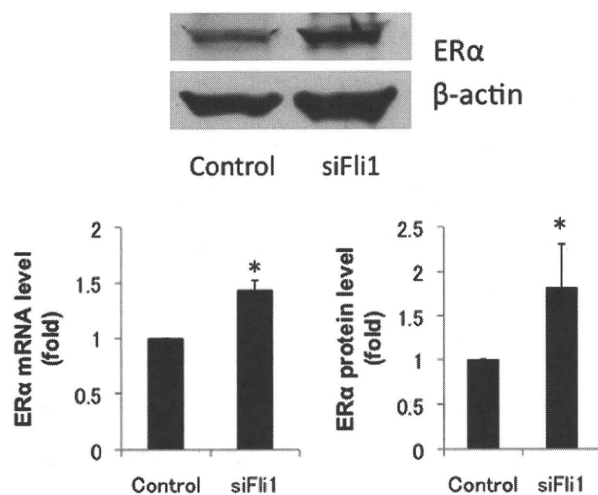


図2：ヒト真皮線維芽細胞における siFli1 による ERα 発現への影響。