

F. 文 献

1. Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
2. Denli A, Tops B, Plasterk R, Ketting R, Hannon G. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-5.
3. Farh K, Grimson A, Jan C, Lewis B, Johnston W, Lim L, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 2005; 310: 1817-21.
4. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.
5. Bostjancic E, Glavac D. Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases. *Acta Dermatoven-erol Alp Panonica Adriat* 2008; 17: 95-102.
6. Herrera B, Lockstone H, Taylor J, Ria M, Barrett A, Collins S, et al. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2010; 53: 1099-109.
7. Kuehbach A, Urbich C, Dimmeler S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 12-5.
8. Chen Y, Gorski D. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* 2008; 111: 1217-26.
9. Furer V, Greenberg J, Attur M, Abramson S, Pillinger M. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol* 2010; 136: 1-15.
10. Davidson-Moncada J, Papavasiliou F, Tam W. MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 183-94.
11. Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, Matsushita Y, Komura K, Ogawa F, et al. BAFF antagonist attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2772-80.
12. Martin M, Buckenberger J, Jiang J, Malana G, Nuovo G, Chotani M, et al. The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. *J Biol Chem* 2007; 282: 24262-9.
13. Nuovo G. In situ detection of precursor and mature microRNAs in paraffin embedded, formalin fixed tissues and cell preparations. *Methods* 2008; 44: 39-46.
14. Kroh E, Parkin R, Mitchell P, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) . *Methods* 2010; 50: 298-301.
15. Lewis B, Burge C, Bartel D. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.
16. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2004; 2: e363.
17. Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes & development* 2004; 18: 1165-78.
18. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005; 37: 495-500.
19. Long JM, Lahiri DK. MicroRNA-101 downregulates

Alzheimer's amyloid-beta precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. Biochemical and biophysical research communications 2011; 404: 889-95.

20. Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Hata N, Shono T, Suzuki S, et al. MiRNA-196 Is Upregulated in Glioblastoma But Not in Anaplastic Astrocytoma and Has Prognostic Significance. Clin Cancer Res 2010.
21. Li Y, Zhang M, Huijun C, Dong Z, Ganapathy V, Thangaraju M, et al. Ratio of miR-196s to HOXC8 mRNA Correlates with Breast Cancer Cell Migration and Metastasis. Cancer Res 2010.
22. Kucich U, Rosenbloom J, Shen G, Abrams W, Hamilton A, Sebti S, et al. TGF- β 1 stimulation of fibronectin transcription in cultured human lung fibroblasts requires active geranylgeranyl transferase I, phosphatidylcholine-specific phospholipase C, protein kinase C-delta, and p38, but not erk1/erk2. Arch Biochem Biophys 2000; 374: 313-24.
23. Kucich U, Rosenbloom J, Shen G, Abrams W, Blas-

kovich M, Hamilton A, et al. Requirement for geranylgeranyl transferase I and acyl transferase in the TGF- β -stimulated pathway leading to elastin mRNA stabilization. Biochem Biophys Res Commun 1998; 252: 111-6.

24. Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. Arthritis and rheumatism 2010; 62: 1733-43.

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

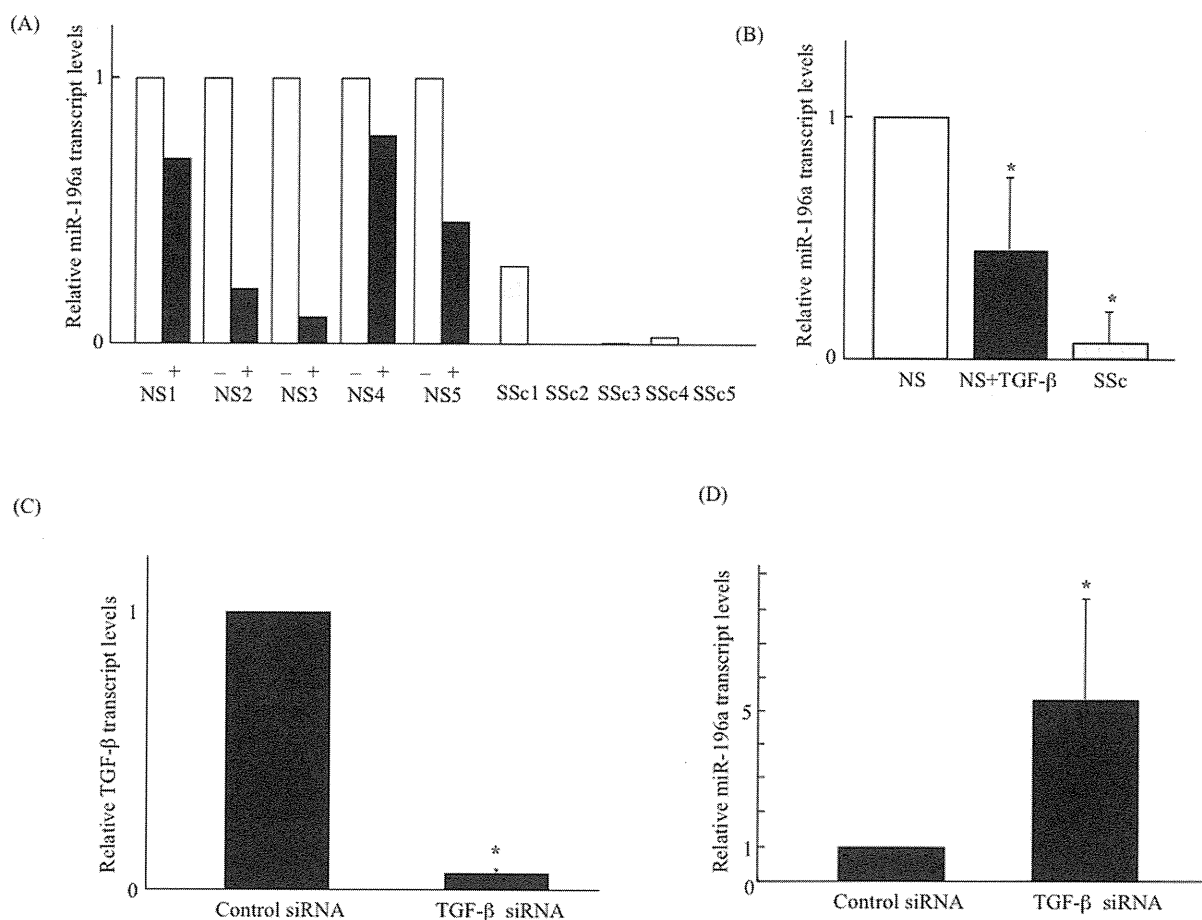


図1：(A)：各5例の培養正常皮膚線維芽細胞 (TGF-β1 非投与群、投与群)、強皮症患者皮膚線維芽細胞の相対的 miR-196a レベルを real-timePCR で解析した。正常皮膚線維芽細胞 (TGF-β1 非投与群) の miR-196a レベル (1.0) と比較した。

(B)：図1 (A) における平均 miR-196a のレベルを示した。*p<0.05

(C)：強皮症患者皮膚線維芽細胞に TGF-β1 siRNA を導入し、TGF-β1 の相対レベルを real-timePCR で解析した。control siRNA のレベル (1.0) と比較して示した。*p<0.05

(D)：強皮症患者皮膚線維芽細胞に TGF-β1 siRNA を導入し、miR-196a の相対レベルを real-timePCR で解析した。control siRNA のレベル (1.0) と比較して示した。*p<0.05

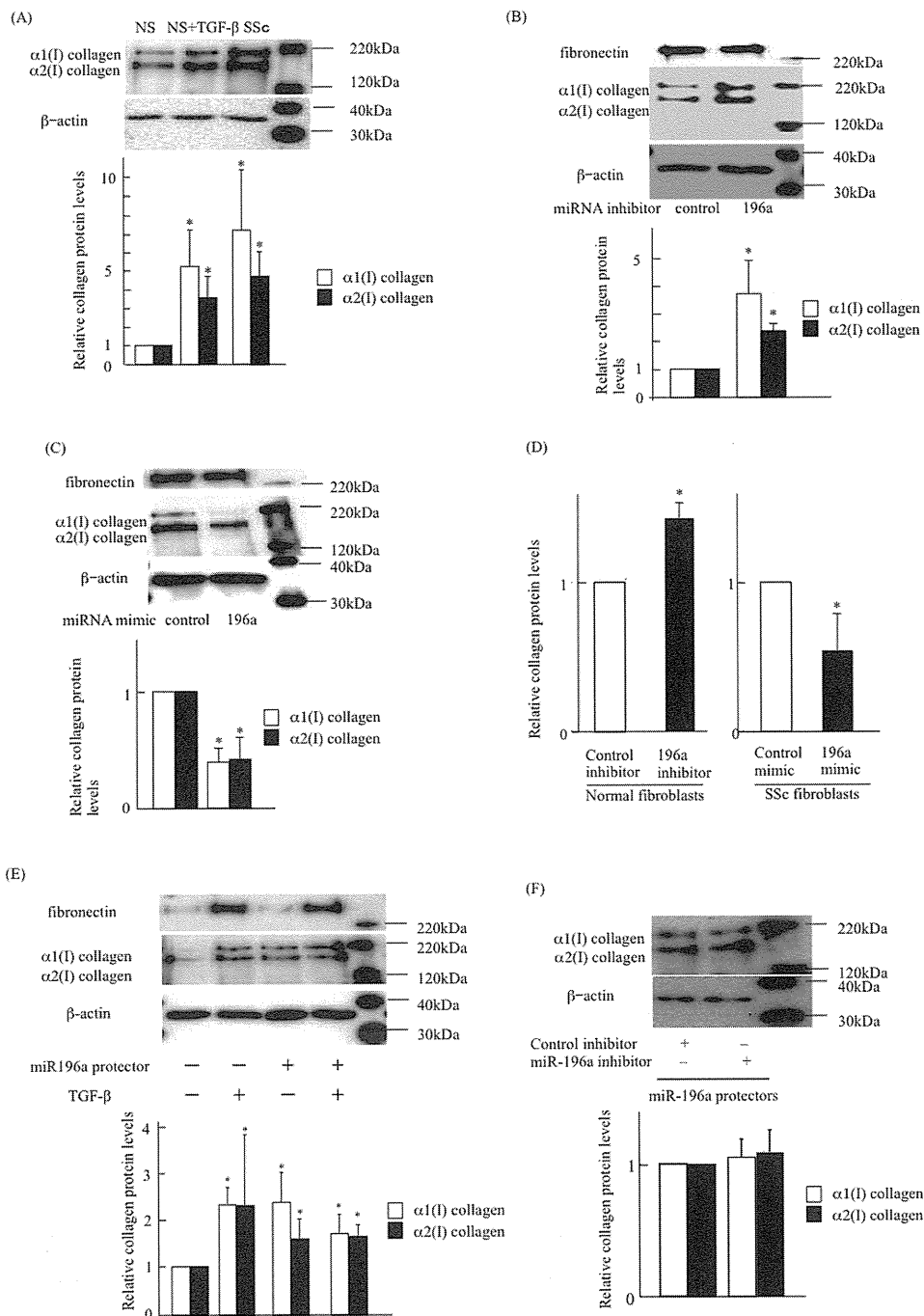


図 2 : (A) : 上段 : 培養正常皮膚線維芽細胞 (TGF- β 1 非投与群、投与群)、強皮症患者皮膚線維芽細胞の type I collagen 蛋白の発現に関して免疫プロット法で解析した。下段 : α 1(I) collagen、 α 2(I) collagen 蛋白の発現に関してデンシトメトリーで数値化した。 β -actin で補正した。それぞれ培養正常皮膚線維芽細胞 (TGF- β 1 非投与群) のレベル (1.0) と比較して示した。* p <0.05
(B) : 上段 : 培養正常皮膚線維芽細胞に control inhibitor、miR-196a inhibitor を導入し免疫プロット法で解析した。下段 : α 1(I) collagen、 α 2(I) collagen 蛋白の発現に関してデンシトメトリーで数値化した。 β -actin で補正した。それぞれ control inhibitor のレベル (1.0) と比較して示した。* p <0.05
(C) : 上段 : 強皮症皮膚線維芽細胞に control mimic、miR-196a mimic を導入し免疫プロット法で解析した。下段 : α 1(I) collagen、 α 2(I) collagen 蛋白の発現に関してデンシトメトリーで数値化した。 β -actin で補正した。それぞれ control mimic のレベル (1.0) と比較して示した。* p <0.05
(D) : 左側 : 培養正常皮膚線維芽細胞に control inhibitor、miR-196a inhibitor を導入し EIA 法で type I collagen 蛋白のレベルを解析した。control inhibitor のレベル (1.0) と比較して示した。* p <0.05。右側 : 強皮症皮膚線維芽細胞に control mimic、miR-196a mimic を導入し EIA 法で type I collagen 蛋白のレベルを解析した。control mimic のレベル (1.0) と比較して示した。* p <0.05。
(E) : 上段 : 培養正常皮膚線維芽細胞に control protector、 α 1(I) α 2(I) collagen に対する特異的 miR-196a protector を導入し、さらに TGF- β 1 非投与群、投与群にわけて免疫プロット法で解析した。下段 : α 1(I) collagen、 α 2(I) collagen 蛋白の発現に関してデンシトメトリーで数値化した。 β -actin で補正した。それぞれ control protector (TGF- β 1 非投与群) のレベル (1.0) と比較して示した。* p <0.05
(F) : 上段 : 培養正常皮膚線維芽細胞に α 1(I) α 2(I) collagen に対する特異的 miR-196a protector 存在下で control inhibitor、miR-196a inhibitor を導入し免疫プロット法で解析した。下段 : α 1(I) collagen、 α 2(I) collagen 蛋白の発現に関してデンシトメトリーで数値化した。 β -actin で補正した。それぞれ control inhibitor のレベル (1.0) と比較して示した。* p <0.05

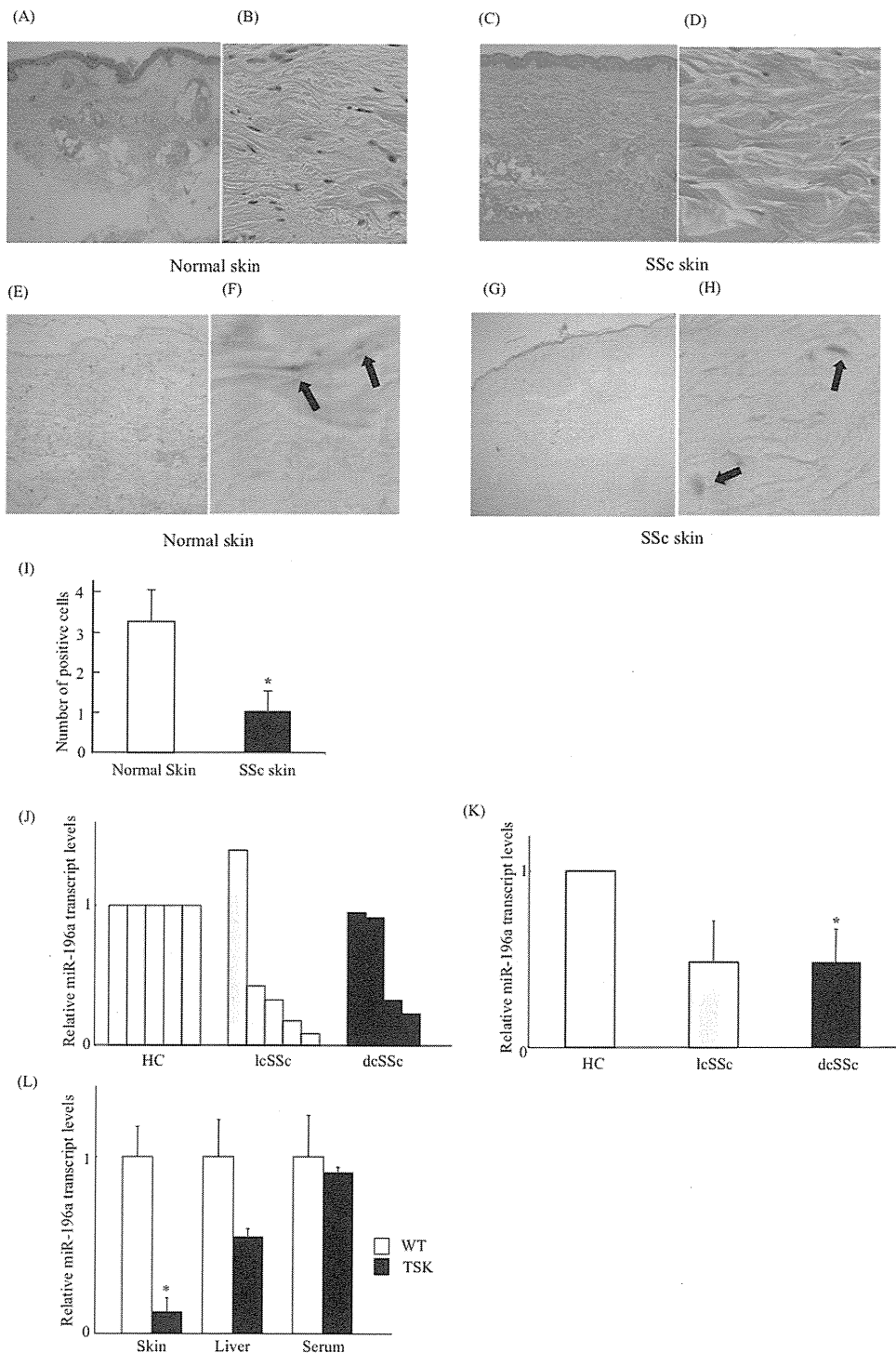


図3 : (A-D) 正常皮膚組織 (A, B) と強皮症皮膚組織 (C, D) の H & E 染色をしめた。×40 倍 (A, C)、×400 倍 (B, D) (E-H) 正常皮膚組織 (E, F) と強皮症皮膚組織 (G, H) を in situ hybridization 法で miR-196a を染色した。miR-196a は青色に染色される。×40 倍 (E, G)、×400 倍 (F, H)

(I) 正常皮膚組織と強皮症皮膚組織における in situ hybridization 法で染色された核の数の比較。

(J) 各 5 例の正常、lcSSc、dsSSc の皮膚組織における相対的 miR-196a レベルを real-timePCR で解析した。正常皮膚組織の miR-196a レベル (1.0) と比較した。

(K) 図 3 (K) における平均 miR-196a のレベルを示した。* $p < 0.05$

(L) 各 3 例の TSK マウスと野生型の皮膚、肝臓、血清の相対的 miR-196a レベルを real-timePCR で解析した。野生型の miR-196a レベル (1.0) と比較した。* $p < 0.05$

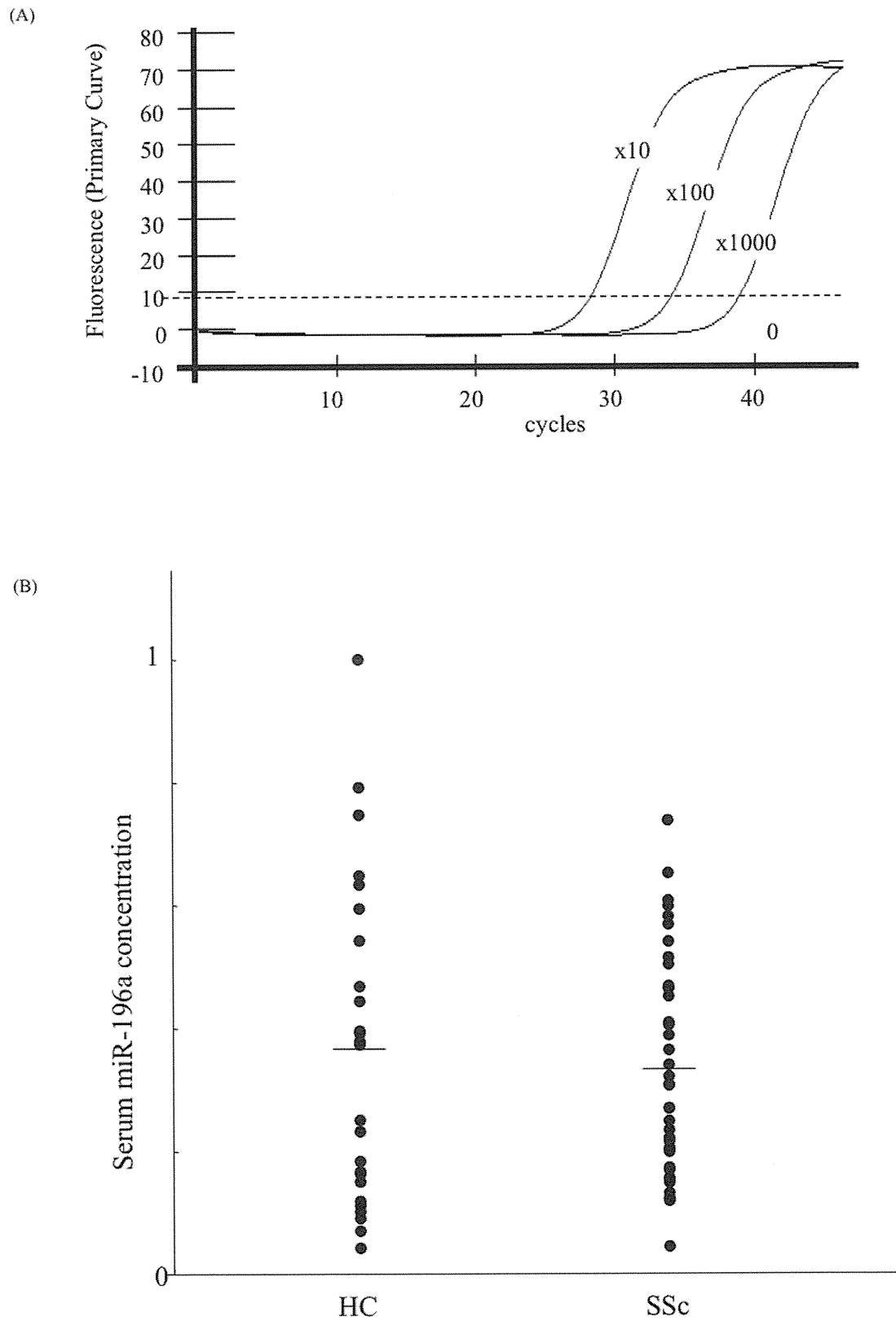


図 4 :

(A) 正常人の血清より miR-196a を抽出し、それを、10 倍希釈、100 倍希釈、1000 倍希釈を行い real-timePCR を施行した。
 (B) 正常人 25 例、強皮症患者 40 例 (dcSSc 20 例、lcSSc 20 例) の血清より miR-196a を抽出し real-timePCR で解析した。横線は平均を示す。

表 1. PCR Array の結果

miRNA name	NS	NS + TGF- β	SSc	miRNA name	NS	NS + TGF- β	SSc
let-7a	-6.69	-4.95	-4.44	miR-132	-1.53	ND	0.38
let-7b	-6.34	-4.77	-4.27	miR-133b	8.39	8.76	8.54
let-7c	-1.05	0.79	1.43	miR-134	-1.23	0.98	1.71
let-7d	1.17	1.84	2.82	miR-137	0.15	2.17	2.44
let-7e	-2.28	-1.16	-0.39	miR-141	2.75	10.10	5.59
let-7f	3.58	12.17	6.08	miR-142-3p	4.29	12.96	6.35
let-7g	-3.02	-1.73	-1.09	miR-142-5p	6.10	11.55	8.49
let-7i	-2.34	-1.61	-1.76	miR-146a	-1.99	1.31	1.47
miR-1	9.33	ND	4.77	miR-146b-5p	-1.01	2.22	3.53
miR-7	11.33	5.10	8.30	miR-150	-0.46	1.80	2.63
miR-9	8.83	ND	6.69	miR-155	0.58	3.24	3.19
miR-10a	-2.85	-1.46	2.37	miR-181a	2.50	ND	0.94
miR-10b	-2.75	-0.31	0.13	miR-182	2.29	6.08	6.64
miR-15a	1.20	ND	2.44	miR-183	2.66	4.23	9.75
miR-15b	-4.97	-2.57	-1.54	miR-185	1.41	ND	5.23
miR-16	-6.67	-4.67	-3.29	miR-192	-0.90	5.06	3.44
miR-17	-1.70	0.08	0.14	miR-194	7.31	6.01	3.03
miR-18a	2.98	3.23	3.13	miR-195	-5.83	-3.65	-2.64
miR-18b	5.68	6.15	6.01	miR-196a	-2.61	-0.55	5.61
miR-20a	-0.58	-0.51	0.57	miR-205	1.40	4.19	4.43
miR-20b	4.06	3.63	5.58	miR-206	3.01	6.93	6.69
miR-21	-9.32	-8.06	-7.14	miR-208a	-0.24	2.55	3.50
miR-22	-1.45	ND	-0.83	miR-210	-0.93	1.58	1.51
miR-23b	-5.64	-4.68	-4.41	miR-214	-3.61	-2.33	-1.79
miR-24	-5.01	-3.72	-4.35	miR-215	7.37	10.67	7.66
miR-26a	-5.35	-4.04	-3.67	miR-218	-1.18	1.25	2.53
miR-33a	8.38	6.00	7.76	miR-219-5p	9.58	4.40	4.69
miR-92a	-3.00	-1.17	-1.22	miR-222	-0.83	-0.83	-0.29
miR-93	-0.39	0.19	1.93	miR-223	7.30	3.20	4.73
miR-96	1.24	ND	3.42	miR-301a	8.71	3.73	9.20
miR-99a	-2.82	-1.27	0.13	miR-302a	8.74	5.61	10.10
miR-100	-6.65	-4.80	-3.64	miR-302c	8.99	10.85	8.45
miR-101	0.57	1.64	1.35	miR-345	3.46	3.45	2.71
miR-103	-0.44	0.45	0.14	miR-370	1.65	4.14	4.33
miR-106b	0.60	1.44	2.82	miR-371-3p	2.57	4.36	4.63
miR-122	10.31	ND	11.82	miR-375	-1.84	1.50	1.90
miR-124	0.01	2.61	2.03	miR-378	11.66	5.06	4.40
miR-125a-5p	-5.13	-3.27	-2.29	miR-424	-3.07	-3.05	-3.06
miR-125b	-9.49	-3.62	-6.21	miR-452	4.82	8.88	5.92
miR-126	1.83	3.08	5.19	miR-488	7.50	9.06	9.57
miR-127-5p	9.71	7.52	7.75	miR-498	8.28	8.82	8.00
miR-128	0.26	3.61	2.80	miR-503	2.26	3.68	4.83
miR-129-5p	-0.70	1.45	1.86	miR-518b	12.04	8.31	7.76
miR-130a	1.93	6.77	2.89	miR-520g	9.18	13.74	11.03

normal fibroblasts (NS)、TGF- β を投与した normal fibroblasts (NS + TGF- β)、scleroderma fibroblasts (SSc) から抽出した miRNA を同量混合し各グループで PCR Array を施行。 $\Delta\Delta$ CT を示す。

表 2. 強皮症患者における血清 miR196a 値と臨床所見および検査値との相関

	Patients with nomal miR-196a levels (n=18)	Patients with lower miR-196a levels (n=22)
Clinical and serological features		
Age at onset (year)	63.4	56.5
Duration of disease (month)	48.5	64.8
Type (diffue: limited)	4:14	16:6 *
MRSS (point)	7.7	15.9 *
Clinical features		
Pitting scars/ulcers	25.0	70.6 *
Nailfold bleeding	60.0	33.3
Raynoud's phenomenon	100	84.2
Telangiectasia	40.0	35.3
Contracture of phalanges	100	88.9
Calcinosis	0	0
Diffuse pigmentation	33.3	57.1
Short SF	80.0	80.0
Sicca symptoms	50.0	70.0
Organ involvement		
Pulmonary fibrosis	37.5	40.0
Mean %VC	94.7	92.6
Mean %DLCO	78.6	75.9
Pulmonary hypertension	55.5	54.5
Oesophagus	7.1	31.5
Heart	40.0	50.0
Kidney	6.7	0
Joint	27.7	13.6
ANA specificity		
Anti-topo I	33.3	27.2
Anti-centromere	66.6	40.0
Anti-U1 RNP	11.1	9.1

MRSS, modified Rodnan Total skin thickness score; SF, sublingual frenulum; VC, vital capacity; DLco, diffusion capacity for carbon monooxidase; ANA, antinuclear antibodies; Anti-topo I, anti-topoisomerase I antibody; Anti-centromere; anti-centromere antibody. *p<0.05

全身性強皮症における discoidin domain receptor 2(DDR2)の機能の検討

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 牧野雄成 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皮膚機能病態学 講師

研究要旨

Discoidin domain receptor 2 (DDR2) は細胞膜に存在する受容体型チロシンキナーゼであり、I型コラーゲンをリガンドとし、コラーゲン代謝を通して様々の細胞機能に参与する。本研究では、全身性強皮症 (SSc) の培養皮膚線維芽細胞における DDR2 の役割を検討し、さらに DDR2 による I 型コラーゲン制御への microRNA (miRNA) の関与を検討した。SSc 培養皮膚線維芽細胞では健常人と比較して、DDR2 の mRNA、蛋白発現量が有意に低下していた。この低下は、TGF- β 1 の阻害によって回復した。健常人の培養皮膚線維芽細胞では、DDR2 の過剰発現によって I 型コラーゲンの増加を生じた。一方 DDR2 の阻害は、I 型コラーゲンを標的とする miRNA、miR-196a 量の増加と、I 型コラーゲンの低下をもたらした。しかし SSc の培養皮膚線維芽細胞では、miR-196a 量は健常人より低下しており、さらに DDR2 の阻害による miR-196a の増加が起こらなかった。以上より、SSc 培養皮膚線維芽細胞では自己 TGF- β 1 刺激により DDR2 が低下していると推測された。また健常人では DDR2 低下が miR-196a 上昇を生じることで I 型コラーゲンの低下に参与するが、SSc ではこれが障害されていた。よって DDR2 と miR-196a による I 型コラーゲン制御の障害は、SSc での過剰なコラーゲン産生の維持に参与することが示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は、皮膚の硬化を主症状とし、皮膚だけでなく多臓器にも線維化を生じうる疾患である。その皮膚硬化部位では細胞外基質が過剰に蓄積しているが、最も多い細胞外基質は I 型コラーゲンであり、その主な産生細胞は皮膚線維芽細胞である。全身性強皮症の皮膚線維芽細胞が過剰な細胞外基質を産生するように活性化する機序の詳細はまだ明らかになっていない。

今回我々は Discoidin domain receptor 2 (DDR2) の全身性強皮症における役割を検討した。Discoidin domain receptor 2 (DDR2) は、コラーゲンをリガンドとする細胞膜受容体型チロシンキナーゼファミリーとして知られている¹⁾。DDR2 は主に線維芽細胞

など間葉系細胞での発現がみられ、I～III、X型コラーゲンをリガンドとする。DDR2 がどのようなシグナルの活性に参与しているかまだ不明な点が多いが、matrix metalloproteinase を介するコラーゲンのリモデリング、細胞外基質による細胞間相互作用、細胞運動や接着の制御、細胞の増殖や遊走、および腫瘍細胞の進展などにおける関与がこれまで報告されている^{2,3)}。

皮膚線維芽細胞、I型コラーゲン、皮膚線維芽細胞で発現している DDR2、の相互の関係は全身性強皮症の病態に参与すると考えられ、今回の研究対象とした。

B. 研究方法

1) ヒト皮膚組織

皮膚組織は熊本大学病院皮膚科形成再建科を受診した全身性強皮症患者 10 名の前腕皮膚より取得した。内訳は、5 名が limited cutaneous systemic sclerosis (lcSSc)、5 名が diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) であった。対照とした皮膚組織は 5 名の健康人より取得した。組織採取にあたってはヘルシンキ宣言の精神を尊重し、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、署名を得て行った。

2) 皮膚線維芽細胞培養

細胞培養には 10% 仔牛血清、抗生剤、抗真菌剤を添加した変法イーグル培地を使用した。室温 37°C、CO₂ 濃度 5% に保持したインキュベーター内で単層培養し、3~6 回継代した細胞を使用した。

3) 全 RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR 法

培養線維芽細胞からの RNA 抽出には ISOGEN (ニッポンジーン) を用いた。ホルマリン固定後パラフィン包埋した組織切片からの RNA 抽出には RNeasy® FFPE Kit (QIAGEN) を使用した。抽出した RNA は一本鎖 cDNA へ合成し、定量的リアルタイム PCR 法で相対定量を行った。

4) 蛋白抽出と免疫ブロット法

皮膚線維芽細胞からの蛋白抽出には、Denaturing Cell Extraction Buffer (BIOSOURCE) を用いた。蛋白定量にはウエスタンブロット法を用いた。

5) 免疫沈降法

線維芽細胞を溶解回収した抽出液を遠心した後、上清を回収した。上清に抗 DDR2 抗体と Protein A/G Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology) を加え、室温 4°C で一晩回転混和することで DDR2 蛋白を回収した。

6) 免疫染色法

4 μm のホルマリン固定パラフィン切片を用いた。マイクロウェーブ法にて抗原回復を行い、内因性ベルオキシダーゼ不活化後に 0.5% ウシ血清アルブミン溶液でブロッキングを行った。4°C 下で一晩一次抗体を反応させたのち、ベルオキシダーゼ化学発光を用いた方法で抗体を検出した。

7) プレオマイシン局所注射によるマウス皮膚硬化モデル

生後 8 週、雄の C57BL/6 マウス (日本クレア) の背部皮下に、1 mg/ml 濃度となるよう PBS で希釈したプレオマイシン (日本化薬) 溶液を 1 日 1 回 100 μl、4 週間局所注射した。注射終了翌日に注射部皮膚を採取し、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定後にパラフィン包埋した。マウスを用いた実験は熊本大学動物実験計画書によって許可された手順に従って行った。

8) 培養線維芽細胞からの miRNA 抽出と、リアルタイム PCR 法による相対定量

培養皮膚線維芽細胞から採取した全 RNA からの miRNA 抽出には RT2 qPCR-Grade miRNA Isolation Kit (SABioscience) を使用した。抽出した miRNA は RT2 miRNA First Strand Kit (SABioscience) を用いて一本鎖 cDNA に合成し、リアルタイム PCR 法にて相対定量を行った。

9) 培養線維芽細胞への一過性形質導入

TGF-β1 と DDR2 それぞれの遺伝子発現を抑制するデザイン済みの small interfering RNA (siRNA) を細胞に用いて、目的遺伝子の抑制を行った。また目的とする内在性 miRNA の機能を効果的に模倣するようにデザインされた miRNA mimic と、miRNA が標的とする mRNA 上の特定結合部位をプロテクトするようデザインされた一本鎖の修飾 RNA である miScript target protector は QIAGEN より購入し、細胞へ導入した。

10) レンチウイルスベクターによる皮膚線維芽細胞への遺伝子導入

ヒト DDR2 蛋白全長をコードする cDNA を組み込んだプラスミドを利用してレンチウイルスベクターを作成し、培養皮膚線維芽細胞へ感染させることで DDR2 を過剰発現するよう形質転換させた。レンチウイルス感染から 96 時間後の皮膚線維芽細胞から得た試料を免疫ブロット法に使用した。

11) 統計解析

独立した 2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を使用した。P<0.05 を統計学的に有意な差と判定した。

C. 研究結果

1) 全身性強皮症皮膚ならびに培養皮膚線維芽細胞における DDR2 の発現 (図 1)

全身性強皮症において、DDR2 の mRNA 量は、皮膚組織と線維芽細胞いずれにおいても正常人より有意に低下していた (図 1a、図 1b)。また DDR2 蛋白量は全身性強皮症の培養皮膚線維芽細胞で低下していた (図 1c)。皮膚組織の免疫染色法において、健康人の真皮線維芽細胞では DDR2 は強染色を呈するが、全身性強皮症の真皮線維芽細胞では染色性が低下していた (図 1d)。さらにブレオマイシン誘導硬化皮膚モデルマウスの皮膚組織にて DDR2 の免疫染色を行ったが、真皮線維芽細胞は、コントロール注射マウス皮膚より DDR2 染色性が低下していた (図 1d)。

2) 全身性強皮症の皮膚線維芽細胞における DDR2 低下の機序 (図 2)

全身性強皮症と健康人の培養皮膚線維芽細胞にアクトノマイシン D 処理を行い、新規の RNA 合成を抑制、抑制から 12 時間後までの DDR2 の mRNA 量をリアルタイム PCR 法で比較したが、有意な差を

認めず (図 2a)、DDR2 の mRNA の低下は転写レベルでの産生低下によると示唆された。DDR2 の低下が生じる機序として、全身性強皮症の皮膚線維芽細胞で提唱されている自己 TGF- β 1 刺激仮説に着目した⁴⁾。外因性の TGF- β 1 刺激を加えると、健康人、全身性強皮症どちらにおいても DDR2 の mRNA 量と蛋白量は低下した (図 2b、2c)。逆に内因性 TGF- β 1 を siRNA で阻害すると、健康人では TGF- β 1 siRNA によって DDR2 蛋白量に変化はない (図 2d)。しかし、全身性強皮症において内因性 TGF- β 1 を阻害すると、DDR2 の蛋白量は増加した (図 2d 右)。

3) 培養皮膚線維芽細胞における DDR2 の I 型コラーゲン制御機構 (図 3、図 4)

DDR2 のチロシンリン酸化状態を免疫沈降法にて比較したが、TGF- β 1 刺激のない健康人、TGF- β 1 刺激を加えた健康人、TGF- β 1 刺激のない全身性強皮症、の培養皮膚線維芽細胞において DDR2 蛋白のリン酸化したチロシン量に差を認めなかった (図 3a)。

次に DDR2 の発現量に伴って I 型コラーゲン量に変化するか、健康人の培養皮膚線維芽細胞で検討した。DDR2 siRNA によって DDR2 を阻害すると、I 型コラーゲンの mRNA 量と蛋白量は減少した (図 3b、図 3c)。逆にレンチウイルスベクターを用いて線維芽細胞に DDR2 を強発現させると I 型コラーゲン蛋白量は増加した (図 4b)。この増加はコントロールのレンチウイルス感染ではみられなかった (図 4a)。全身性強皮症の培養皮膚線維芽細胞に DDR2 を過剰発現させた場合も同様に、I 型コラーゲン蛋白量は増加した (図 4c)。

4) DDR2 による I 型コラーゲン制御への miRNA の関与 (図 5)

DDR2 による I 型コラーゲン制御への microRNA

(miRNA) の関与を検討した。I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖両方の mRNA を標的とする miR-196a 量は、健常人の培養皮膚線維芽細胞で DDR2 を siRNA により阻害すると有意に増加した (図 5a)。次に miR-196a が培養皮膚線維芽細胞において実際に I 型コラーゲン量の変化を生じうるのか検討した。miR-196a mimic 導入により I 型コラーゲン量は減少した (図 5b)。さらに miR-196a mimic と miR-196a miScript Target protector の両方を導入すると、この miR-196a mimic 導入による I 型コラーゲンの減少は阻害された (図 5b)。以上から培養皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖は miR-196a の直接の標的となることが示された。

全身性強皮症の培養皮膚線維芽細胞では miR-196a 量は有意に低下していた (図 5d)。また健常人と異なり、全身性強皮症で DDR2 を阻害しても miR-196a 量の変化は生じなかった (図 5c)。

D. 考案

全身性強皮症の培養皮膚線維芽細胞において、DDR2 の mRNA、蛋白発現量はいずれも減少していた。また全身性強皮症の皮膚線維芽細胞において DDR2 が低下する機序を検討し、TGF- $\beta 1$ 刺激が関与していることを示した。

さらに健常人の皮膚線維芽細胞において、DDR2 を強発現すると I 型コラーゲンは増加し、逆に DDR2 を阻害すると I 型コラーゲンは減少する。この DDR2 による I 型コラーゲン制御に miR-196a が関与している可能性が示された。miRNA は蛋白をコードしていない non coding RNA であり、mRNA の 3' 非翻訳領域の特異的な部位に結合し、標的 mRNA の安定性や蛋白への翻訳を阻害することで遺伝子発現を調節する^{5,6)}。健常人では DDR2 は miR-196a を負に制御していると考えられ、そのた

め DDR2 を抑制すると miR-196a は上昇し、上昇した miR-196a は I 型コラーゲン量の低下につながる。全身性強皮症では自己 TGF- $\beta 1$ 刺激によって I 型コラーゲン産生が誘導される一方、TGF- $\beta 1$ 刺激により DDR2 発現は低下すると考えられた。本来 DDR2 の低下は I 型コラーゲンを低下させる方向に制御し、miR-196a は増加すると予想されたが、全身性強皮症では miR-196a 発現は低下したままであった。この miR-196a の低下はさらに I 型コラーゲン増加に寄与すると予想された。

E. 結論

全身性強皮症では DDR2 の発現が低下しており、さらに miR-196a を介した DDR2 による I 型コラーゲン調節が障害されている可能性を示した。この DDR2 や miR-196a による線維化の調節メカニズムを明らかにすることは、今後病態の解明や治療につながる可能性がある。

F. 文献

- 1) Vogel W, Abdulhussein R, Ford C. (2006) Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal*. 18: 1108-16.
- 2) Carafoli F, Bihan D, Stathopoulos S, et al. (2009) Crystallographic insight into collagen recognition by discoidin domain receptor 2. *Structure*. 17: 1573-81.
- 3) Klatt A, Zech D, Kühn G, et al. (2009) Discoidin domain receptor 2 mediates the collagen II-dependent release of interleukin-6 in primary human chondrocytes. *J. Pathol*. 218: 241-7.
- 4) Leroy EC, Smith E, Kahaleh M, Trojanowska M, Silver R. (1989) A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. Is transforming growth factor β the answer? *Arthritis Rheum*. 32:

817-25.

- 5) Furer V, Greenberg J, Attur M, Abramson S, Pillinger M. (2010) The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. Clin. Immunol. 136: 1-15.
- 6) Lu LF, Liston A. (2009) microRNA in the immune system, microRNA as an immune system. Immunol-

ogy. 127: 291-8.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

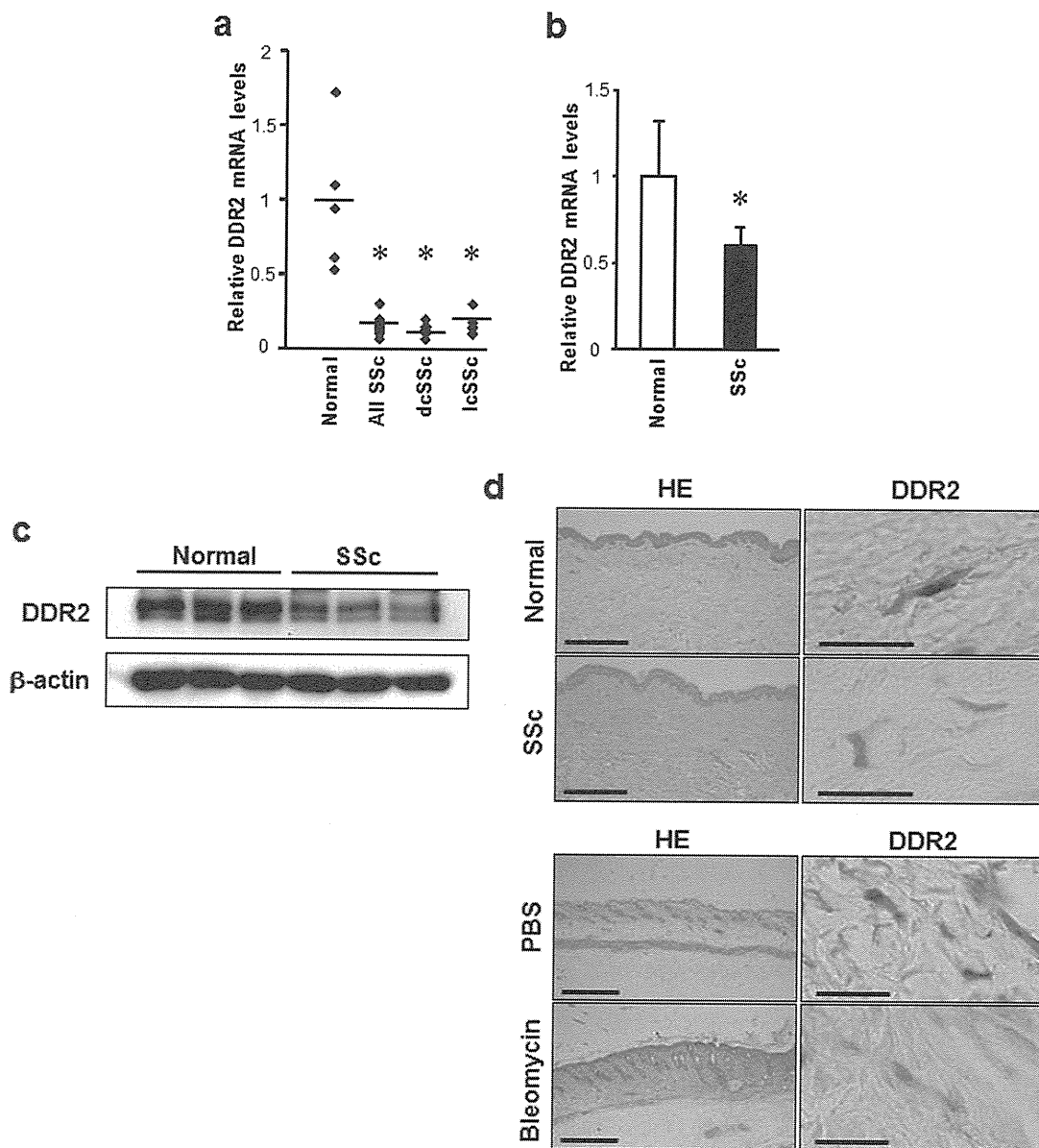


図 1 :

(a) 皮膚組織中の DDR2 mRNA 量。健常人 5 名、dcSSc 5 名、lcSSc 5 名。* $P < 0.05$ 。(b) 培養皮膚線維芽細胞中の DDR2 mRNA 量。平均 + SD。健常人 5 名、SSc 5 名。* $P < 0.05$ 。(c) 培養皮膚線維芽細胞中の DDR2 蛋白量。(d) 上段は健常人と SSc 皮膚組織、下段は PBS 皮下注射と、ブレオマイシン皮下注射のマウス皮膚。

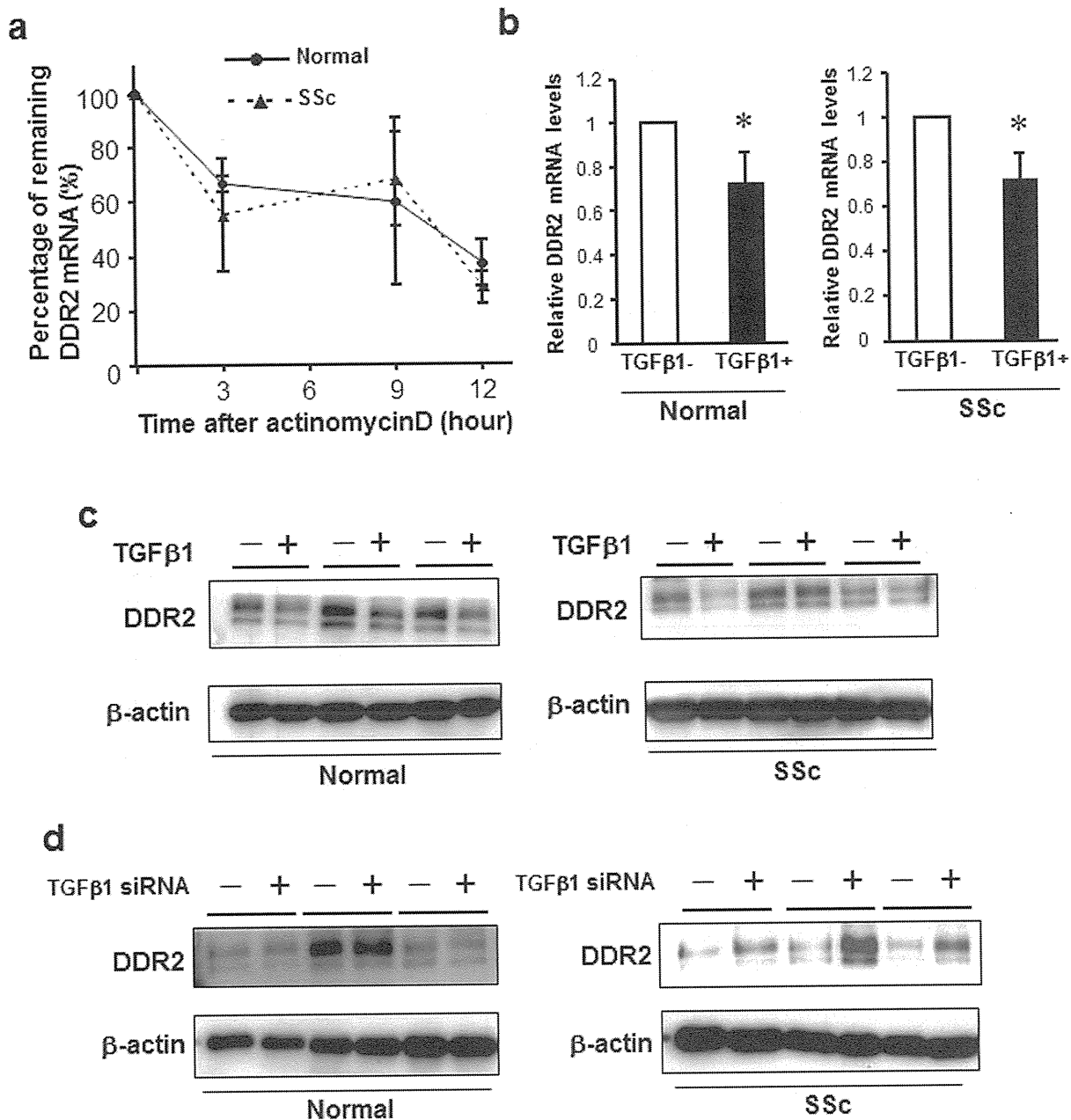


図 2 :

(a) 培養皮膚線維芽細胞における、アクチノマイシン D 投与 3、9、12 時間後の DDR2 mRNA 量。平均 ± SD。(b) TGF-β1 刺激の有無による 24 時間後の DDR2 mRNA 量。平均 ± SD。* P < 0.05。(c) TGF-β1 刺激の有無による 24 時間後の DDR2 蛋白量。(d) TGF-β1 siRNA 導入 96 時間後の DDR2 蛋白量。

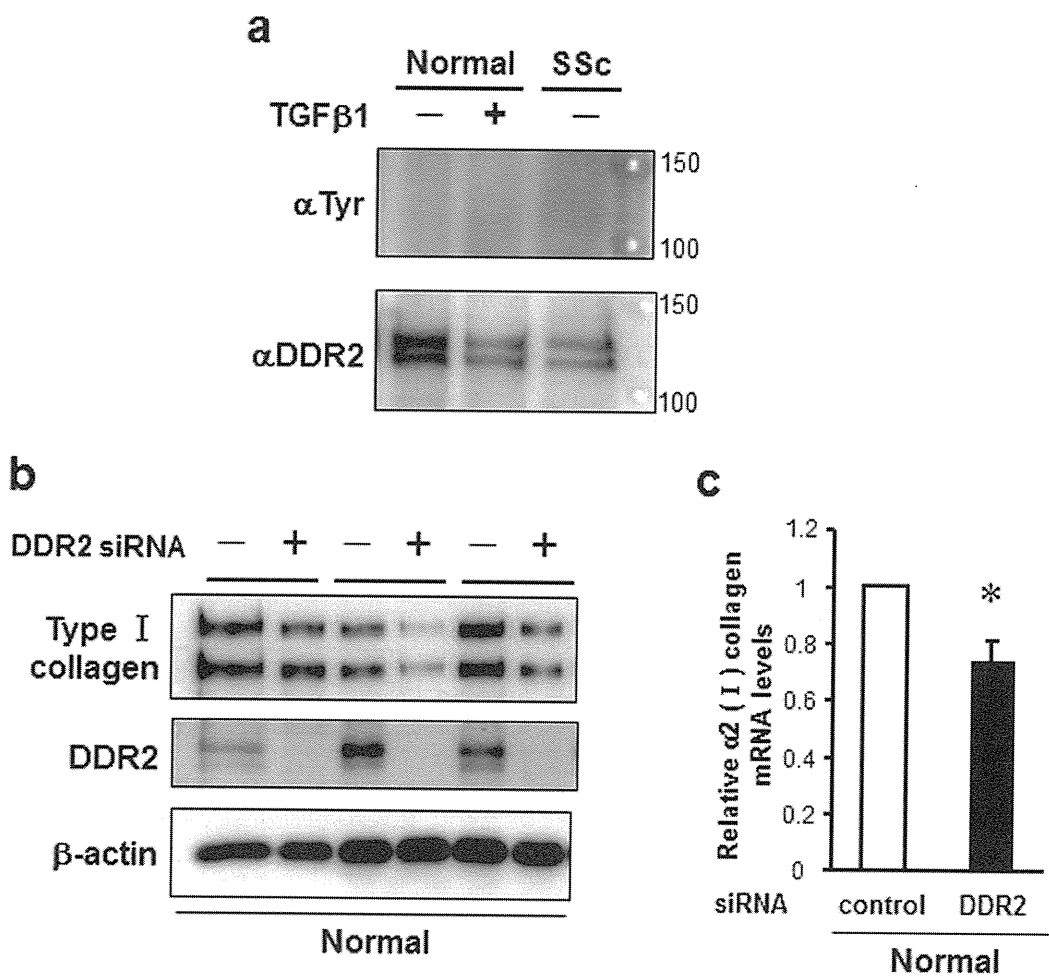


図 3 :

(a) 抗 DDR2 抗体による免疫沈降。抗リン酸化チロシン抗体 (α Tyr) と抗 DDR2 抗体 (α DDR2)。(b) 健康人の培養皮膚線維芽細胞にて、DDR2 siRNA 導入 96 時間後の I 型コラーゲン、DDR2 蛋白量。(c) 健康人培養皮膚線維芽細胞にて、DDR2 siRNA 導入 24 時間後の α 2(I) コラーゲン mRNA 量。平均 + SD。

* $P < 0.05$ 。

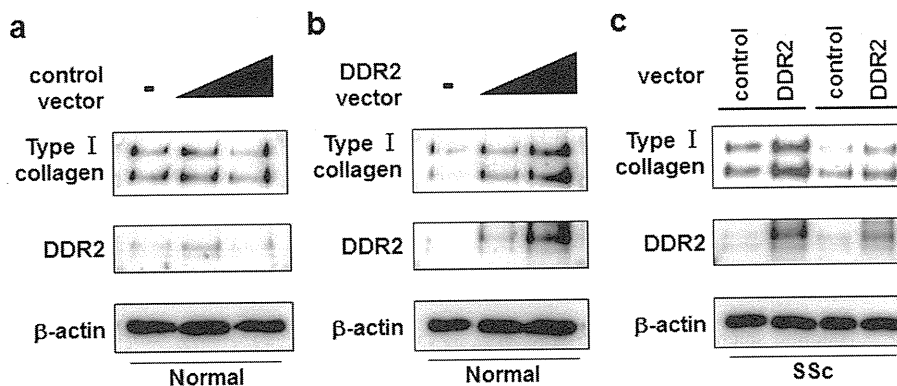


図 4 :

(a) 健常人培養皮膚線維芽細胞に、コントロールレンチウイルス培養液を 0、2、5 μ l 感染させ、回収した I 型コラーゲン、DDR2 蛋白量。(b) 健常人培養皮膚線維芽細胞に、DDR2 レンチウイルス培養液を 0、2、5 μ l 感染させ、回収した I 型コラーゲン、DDR2 蛋白量。(c) SSc 培養皮膚線維芽細胞に、コントロールレンチウイルス培養液 5 μ l と、DDR2 レンチウイルス培養液 5 μ l を感染後の I 型コラーゲンと DDR2 蛋白量。

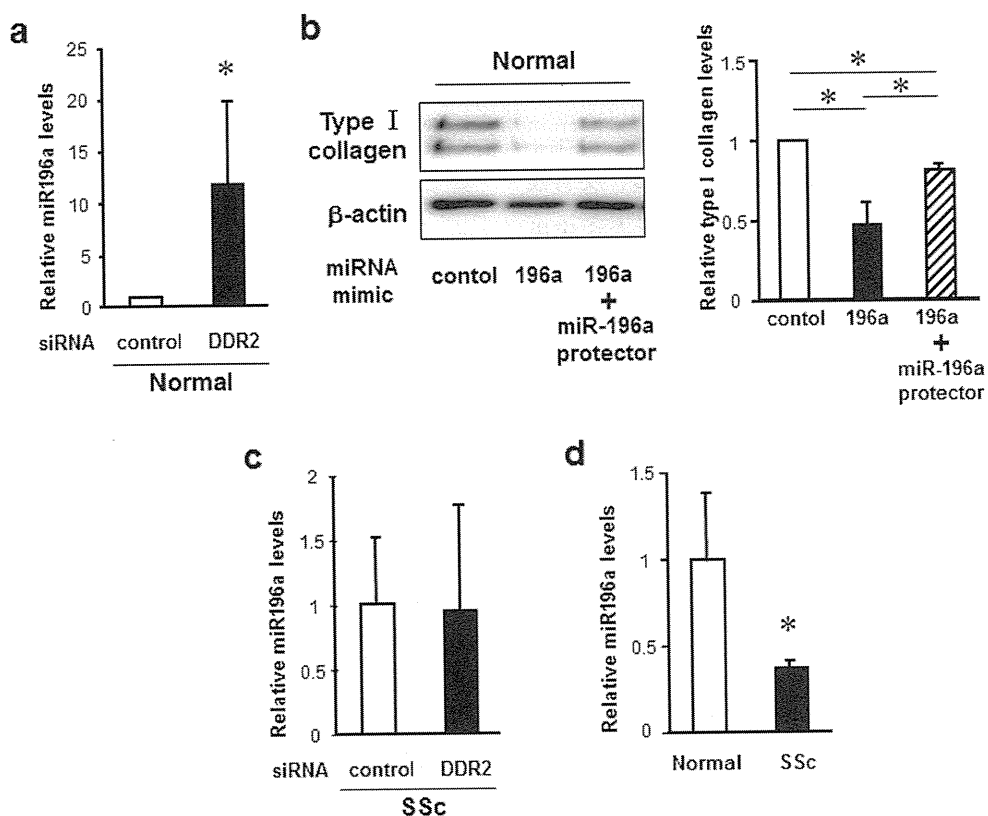


図 5 :

(a) 健常人培養皮膚線維芽細胞にて、DDR2 siRNA 導入後の miR-196a 量。平均+SD。* $P < 0.05$ 。(b) 健常人培養皮膚線維芽細胞に、コントロール miRNA mimic、miR-196a mimic、miR-196a mimic と miR-196a miScript Target protector 混合、の 3 パターンで形質導入後の I 型コラーゲン蛋白量 (左図)。右図は同実験、健常人 3 名を数値化。平均+SD。* $P < 0.05$ 。(c) SSc 培養皮膚線維芽細胞に DDR2 siRNA 導入後の miR-196a 量。平均+SD。(d) 健常人と SSc の培養皮膚線維芽細胞中の miR-196a 量。平均+SD。

* $P < 0.05$ 。

全身性強皮症の皮膚線維化に対する細胞老化の関与

研究協力者 小川文秀 長崎大学病院 皮膚科・アレルギー科 講師

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

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) 患者皮膚において細胞老化のマーカーである senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -Gal) の発現を検討した。まず、年齢と性別、採取部位を一致させた SSc 患者と健常人の前腕皮膚を採取し、SA- β -Gal の発現を比較した。SSc 患者皮膚では真皮に有意に SA- β -Gal の発現が亢進していた。次に、SSc 患者皮膚の皮膚硬化部位 (前腕) と非硬化部位 (上腕) で SA- β -Gal の発現を比較した。その結果、硬化部位では SA- β -Gal の発現が亢進していたが、非硬化部位では SA- β -Gal の発現はほとんど認められなかった。皮膚硬化部位での SA- β -Gal の発現は、真皮線維芽細胞であると思われたため、SSc 患者由来線維芽細胞、および健常人由来皮膚線維芽細胞を培養し、SA- β -Gal の発現を比較した。培養線維芽細胞においても SSc で SA- β -Gal の発現が亢進していた。以上の結果より、SSc の皮膚硬化には細胞老化の関与が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は、皮膚硬化のみならず、全身の諸臓器に線維化をきたす疾患である。SSc の典型的な臨床症状として Raynaud 症状があり、SSc 患者皮膚は Raynaud 症状による虚血再還流障害を繰り返すことにより、常に酸化ストレスに曝されていると考えることができる。SSc の皮膚硬化は四肢のとくに上肢末梢側から左右対称性に硬化が中枢側にむかって進行し、萎縮期になると中枢側から皮膚硬化は少し、軽快する。また、SSc 皮膚では膠原線維の膨化・増生は認められるものの、線維芽細胞数自体は増加しておらず、むしろ減少しているような印象すらうける。

細胞老化は、テロメアの短縮によって細胞の増殖限界をむかえて引き起こされるのみならず、酸化ストレスをはじめとする様々なストレスによっても引き起こされることが知られている。細胞老化を起こした細胞は死滅するわけではなく、生体内に長期間存在し、サイトカインやマトリクスメタロプロテア

ーゼをはじめとする様々なサイトカインを分泌することが明らかとなっており、この現象は senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれている。生体内に老化細胞が増えると老化細胞から分泌される SASP 因子を介して周囲の組織に慢性炎症や発がんを引き起こされると考えられている。さらに SASP は線維化や抗線維化に関与していることが報告されている。

今回、SSc 皮膚硬化に細胞老化が関与している可能性を考え、患者皮膚を用いて細胞老化のマーカーである SA- β -Gal の発現を検討した。

B. 研究方法

- 1) 対象患者 文書にて同意を得た SSc 患者、健常人皮膚を採取した。
- 2) 採取した皮膚は、半分は線維芽細胞の培養を行い、半分は OTC コンパウンドに包埋し、 -80°C で保存した。使用時にクリオスタットを用いて、薄切スライドグラスに貼付する。4% パラホルムアルデヒド

固定を行い、PBSにて洗浄した。

X-gal stock: 40 mg/ml in dimethylformamide

SA- β -Gal staining solution:

0.221 g of Potassium Ferrocyanide (MW 422.4 g/mol;
5 mM final)

0.165 g of Potassium Ferricyanide (MW 329.2 g/mol;
5 mM final)

200 μ l of 1 M MgCl₂ (2 mM final)

を混合し PH6.0 に調製する。0.5 ml の X-gal stock を
19.5 ml の SA- β -Gal staining solution と混合し、切片
に添加、37°C overnight incubate する。PBS で洗浄し、
ヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察
する。培養線維芽細胞も同様に観察する。

C. 研究結果

年齢と性別を一致させた SSc 皮膚、健常人皮膚で
は、SSc では真皮に SA- β -Gal の発現が高値を示して
いたが、健常人の皮膚では発現は認められなかった
(図 1)。次に、SSc 患者皮膚での硬化部（前腕）、非
硬化部（上腕）における SA- β -Gal の発現を検討した。
硬化部では SA- β -Gal の発現は増強していたが、非
硬化部の発現増強は認められなかった（図 2）。SSc
皮膚での SA- β -Gal の発現亢進は、真皮であり線維
芽細胞であると思われたため、SSc と健常人皮膚か
ら採取した培養線維芽細胞をもちいて、SA- β -Gal の
発現を検討した。その結果、SSc 由来皮膚線維芽細
胞では健常人由来線維芽細胞と比較して SA- β -Gal
の発現が亢進していた（図 3）。

D. 考案

SSc 皮膚硬化部位には、SA- β -Gal の発現亢進が認
められたが、線維化にどのように関わっているかは
現段階では明らかではない。線維化をむしろ減弱す

るために細胞老化が起こり、SASP が働いていると
いう報告もあることから、今後、さらなる検討が必
要である。

E. 結論

以上の結果より、SSc の皮膚硬化には細胞老化が
関与している可能性が考えられた。今後、他の老化
マーカーなどを用いた検討や線維化をきたす他疾患
での SA- β -Gal の発現を検討していく予定である。

F. 文献

1. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1961. 25: p. 585-621.
2. Hayflick, L., The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 1965. 37: p. 614-36.
3. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990. 345(6274): p. 458-60.
4. Coppe, J.P., et al., Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 2008. 6(12): p. 2853-68.

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

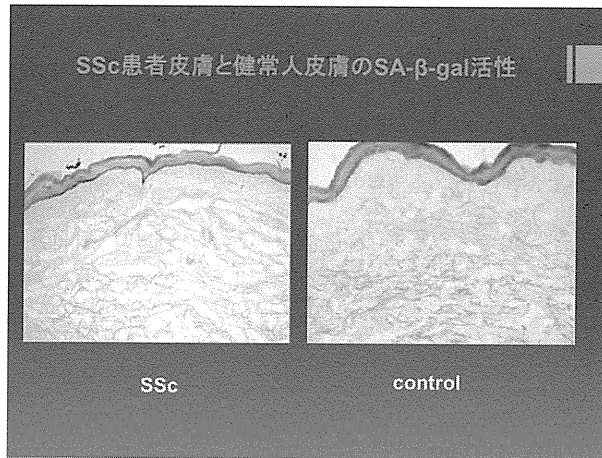


図1：年齢と性別を一致させた全身性強皮症患者と健常人皮膚のSA-β-Galの発現。全身性強皮症患者では、真皮にSA-β-Galの発現が増強している。

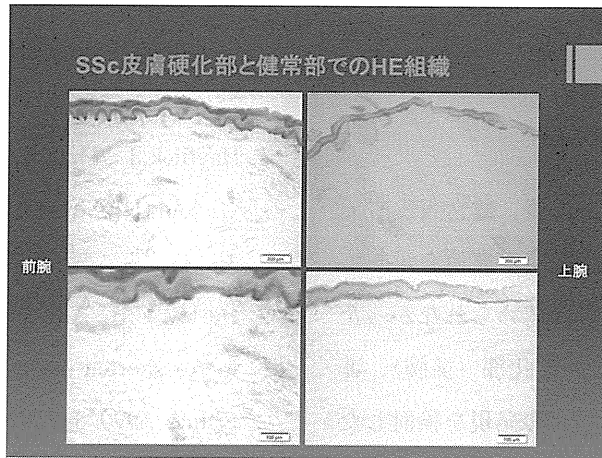


図2：全身性強皮症患者：皮膚硬化部（前腕）、非硬化部（上腕）でのSA-β-Galの発現。硬化部ではSA-β-Galの発現が増強しているが、非硬化部での発現増強は認められない。

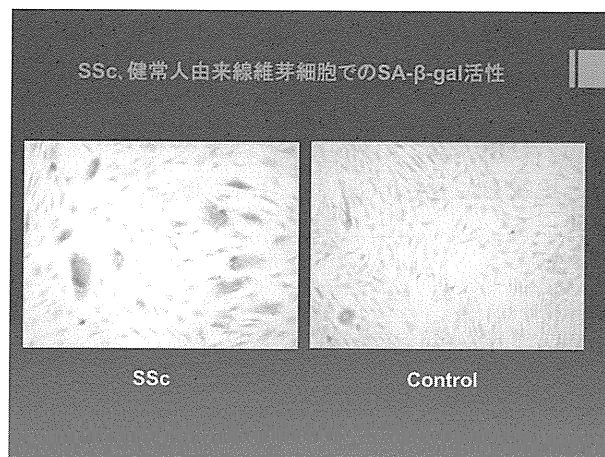


図3：全身性強皮症、健常人由来培養皮膚線維芽細胞でのSA-β-Galの発現。全身性強皮症由来培養線維芽細胞では、細胞の形も大型化し、SA-β-Galの発現が増強している。

ボセンタンが強皮症皮膚線維芽細胞に対して抗線維化作用を示す 分子メカニズムについての検討

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 赤股 要 東京大学医学部附属病院 皮膚科 大学院生
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

正常皮膚線維芽細胞が TGF- β 刺激により活性化される過程において、エンドセリンは重要な役割を果たしている。エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンは培養強皮症肺線維芽細胞に対して強力な抗線維化作用を示すが、その詳細な機序は不明である。今回我々は、強皮症皮膚線維芽細胞におけるボセンタンの抗線維化作用およびその分子メカニズムを明らかにすることを目的に検討を行った。正常皮膚線維芽細胞をエンドセリン 1 (ET-1) で刺激すると I 型コラーゲン産生は亢進し、ヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン (COL1A2) プロモーターにおける ET-1 への responsive element は -353~-264 領域に存在していた。同領域は COL1A2 遺伝子の強力な転写抑制因子である Fli1 への結合部位 (-285~-282) を含んでいるため、ET-1 が Fli1 の転写活性に及ぼす影響を検討したところ、正常皮膚線維芽細胞では ET-1 刺激により Fli1 はスレオニン 312 でリン酸化され、COL1A2 プロモーターへの結合能が低下した。一方、強皮症皮膚線維芽細胞では Fli1 は恒常的にリン酸化し、COL1A2 プロモーターへの結合能が低下しているが、同細胞をボセンタンで処理すると Fli1 のリン酸化は抑制され、COL1A2 プロモーターへの結合能は亢進し、COL1A2 遺伝子の発現は強力に抑制された。以上より、ET-1 は Fli1 の DNA 結合能を抑制することにより強力な線維化作用を示すこと、ボセンタンは強皮症皮膚線維芽細胞に対して抗線維化作用を示す機序の一つが「Fli1 の DNA 結合能の亢進作用」であることが明らかとなった。

A. 研究目的

全身性強皮症 (SSc) は皮膚および肺をはじめとした内臓諸臓器の線維化と血管障害を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。その病因は未だ不明であるが、近年 SSc の線維化と血管障害の病態にエンドセリンが関与している可能性が示唆されている。エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンは強皮症の線維化や血管障害の治療薬として期待されている。2つの良質な無作為化二重盲検試験により、ボセンタンには SSc に伴う指尖潰瘍の新規発症を抑制する効果があることが示されている^[1,2] が、抗線維化作用に関しては明確なエビデンスは示されてい

ない。一方、ボセンタンは培養強皮症肺線維芽細胞に対して強力な抗線維化作用を示すことが明らかにされている^[3]。今回我々は、ボセンタンが強皮症皮膚線維芽細胞において抗線維化を示す可能性およびそのメカニズムを明らかにすることを目的として本研究を行った。

B. 研究方法

1) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞は東京大学医学部附属病院皮膚科を受診した全身性強皮症患者 (発症 2 年以内、diffuse cutaneous type) の前腕皮膚から単離・培養し