

た。正常皮膚線維芽細胞は強皮症患者と年齢・性別がほぼ一致した健常人の前腕皮膚から単離・培養した。これらの検体の採取は被験者の同意および施設の承認を得た上で行った。

2) 免疫プロットティング

培養皮膚線維芽細胞から whole cell lysate を作成し、各 15 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。ニトロセルロース膜を一次抗体と反応させた後、Horse-radish peroxidase と結合した二次抗体と反応させ、enhanced chemiluminescence で発光させた。

3) quantitative real-time PCR

培養皮膚線維芽細胞から Trizol を用いて全 RNA を抽出した。cDNA の合成には iScript cDNA synthesis kit (BioRad) を使用した。Quantitative real-time PCR には CyberGreen PCR master mix fast (Applied Biosystems) を用いた。PCR は 95°C 5 秒、annealing は 60°C 30 秒の条件下で 40 サイクル行った。各遺伝子の発現量の比較には比較 Ct 法を用い、内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

4) プラスミドの作成

COL1A2/ chloramphenicol acetyltransferase (CAT) construct はヒト $\alpha 2$ (I) collagen (COL1A2) 遺伝子プロモーターの sequential deletion construct (-353、-264、-186、-148) に CAT reporter 遺伝子を結合させて作成した。

5) CAT reporter assay

細胞を 50% confluent の状態で serum free medium に交換し、24 時間後に各種プラスミド 2 μ g と内在性コントロールとして Green Fluorescence Protein (GFP) 0.1 μ g を FuGENETM6 (Roche) を用いて transfection した。24 時間後に一部の正常皮膚線維芽細胞細胞を 200 nM の ET-1 で刺激し、さらに 24 時間後に Trizol で回収した。一方、強皮症皮膚線維

芽細胞は transfection して 24 時間後に一部の細胞を 20 μ M のボセンタンで刺激し、さらに 24 時間に Trizol で回収した。quantitative real-time PCR にて CTA 遺伝子の mRNA の発現量を比較した。Transfection 効率は GFP 遺伝子の mRNA の発現量で補正した。

6) DNA affinity precipitation (DNAP)

培養皮膚線維芽細胞から核蛋白を抽出し、各 15 μ g の検体を使用した。10 mM Tris-HCl [pH 8.0]、40 mM KCl、1 mM DTT、6% glycerol、0.05% NP-40 含む Gel Shift Binding Buffer 中で検体と 20 μ g の poly (dI-dC) を混合し、さらに streptavidine beads を加えて 4°C で 30 分間反応させた (pre-clear)。Streptavidine beads を除いた後、COL1A2-Ets binding site oligo 25 μ L を加え 4°C で 24 時間反応させた。その後、streptavidine beads を加えて 2 時間反応させた。beads と結合した蛋白を 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。抗 Fli1 抗体を用いた免疫プロット法により、Fli1 蛋白を検出した。

7) 統計学的解析

統計的な解析には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。

C. 研究結果

1) 正常皮膚線維芽細胞において ET-1 刺激は TGF- β 刺激よりも早期に COL1A2 遺伝子の発現を亢進させる

正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激は用量依存性に COL1A2 遺伝子の mRNA の発現量を亢進させ (図 1A)、蛋白レベルでも同様の結果が得られた (図 1B)。また、正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激による COL1A2 遺伝子の mRNA の発現亢進は刺激 30 分後から認められた (図 1C)。一方、

正常皮膚線維芽細胞における TGF- β 刺激による COL1A2 遺伝子の mRNA の発現亢進は、刺激 6 時間後から認められた (図 1D)。以上の結果より、ET-1 は TGF- β よりも早期に COL1A2 遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。

2) 正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激に対する COL1A2 遺伝子プロモーターの responsive element は -353~-264 の領域に存在する

正常皮膚線維芽細胞において CAT reporter assay を行ったところ、-353 COL1A2/CAT construct では ET-1 刺激により転写活性が約 5 倍に亢進した。一方、-264COL1A2/CAT construct においては ET-1 刺激はその転写活性に影響を及ぼさなかった (図 2)。以上より、正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激に対する COL1A2 遺伝子プロモーターの responsive element は -353~-264 の領域に存在することが示された。

3) 正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激は転写因子 Fli1 のリン酸化を誘導し、その DNA 結合能を抑制する

COL1A2 遺伝子プロモーターの -353~-264 の領域には、強力な転写抑制因子である Fli1 の結合部位 (-285~-282) が存在する^[4]。Fli1 はスレオニン 312 でリン酸化されるとリジン 380 でアセチル化され DNA 結合能を失う (図 3A)^[5,6]。そこで、正常皮膚線維芽細胞において ET-1 刺激が Fli1 のリン酸化に及ぼす影響について検討したところ、ET-1 刺激 15 分後から Fli1 のリン酸化は著明に亢進した (図 3B)。さらに、正常皮膚線維芽細胞において ET-1 刺激は Fli1 の COL1A2 遺伝子プロモーターへの結合を抑制した (図 3C)。以上の結果から、正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 は Fli1 の DNA 結合能を抑制することによって、COL1A2 遺伝子の発現を亢進させることが明らかとなった。

4) 強皮症皮膚線維芽細胞において、ボセンタンは Fli1 の DNA 結合能を亢進させることにより I 型コラーゲンの発現を抑制する

強皮症線維芽細胞を ET-1 受容体拮抗薬であるボセンタンで 24 時間処理すると、I 型コラーゲン蛋白の発現量が用量依存性に抑制された (図 4A)。次に、強皮症皮膚線維芽細胞において COL1A2 遺伝子プロモーターのボセンタンに対する responsive element を調べたところ、-353~-264 bp の領域に存在した (図 4B)。さらに、強皮症皮膚線維芽細胞においてボセンタンは用量依存性に Fli1 のリン酸化を抑制し (図 4C)、Fli1 の COL1A2 遺伝子プロモーターへの結合能を亢進させた (図 4D)。以上の結果から、強皮症皮膚線維芽細胞においてボセンタンは Fli1 の DNA 結合能を亢進させることで抗線維化作用を示すことが明らかとなった。

D. 考案

正常皮膚線維芽細胞に対して ET-1 は極力な線維化誘導作用を示し^[7]、ボセンタンは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^[3]ことが明らかにされているが、その詳細な機序についてはこれまで不明であった。今回の検討により、①正常皮膚線維芽細胞において ET-1 は転写因子 Fli1 のリン酸化を誘導し、その DNA 結合能を抑制することにより、COL1A2 遺伝子の発現を亢進させること、②ボセンタンは強皮症皮膚線維芽細胞において転写因子 Fli1 のリン酸化を抑制し、その DNA 結合能を亢進させることで、COL1A2 遺伝子の発現を抑制する、ことが明らかとなった。

転写因子 Fli1 は強皮症皮膚線維芽細胞において、epigenetic な機序によりその発現が抑制されていることが示されており、本症の遺伝因子の一つと考えられている。その発現は転写レベルで強力に抑制さ

れているが、Fli1 は DNA 結合能が亢進すると protein stability が亢進し、蛋白発現量が亢進することが既に明らかにされている^[5]。したがって、ボセンタンは転写に作用することなく Fli1 蛋白の発現を亢進させることができる薬剤である。転写因子 Fli1 の恒常的発現低下が強皮症を発症する上での遺伝因子の一つであるとする、ボセンタンはその異常を是正できる可能性がある薬剤である。ボセンタンは組織移行性が約 1% と極めて低いという特性があるため、皮膚線維芽細胞に対して臨床的な効果を示さない可能性が指摘されているが、本薬剤の抗線維化作用の機序の一つが明らかとなったことは強皮症の治療戦略を考える上で非常に有用であると考えられる。

E. 結 論

強皮症皮膚線維芽細胞において、ボセンタンは Fli1 のリン酸化を抑制し、DNA 結合能を亢進させることで COL1A2 遺伝子の発現を抑制し、抗線維化作用を示すことが明らかとなった。

F. 文 献

1. Matucci-Cerinic M, et al.: Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 32-8.
2. Korn JH, et al. : Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3985-93.
3. Shi-Wen X, et al. : Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile pheno-

type of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 2004; 15: 2707-19.

4. Czuwara-Ladykowska J, et al. : Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem.* 276: 20839-20848, 2001.
5. Asano Y, et al. : 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, 2007.
6. Asano Y, Trojanowska M. Phosphorylation of Fli1 at threonine 312 by protein kinase C delta promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol.* 29: 1882-1894, 2009.
7. Lagares D, et al. Endothelin 1 contributes to the effect of transforming growth factor b1 on wound repair and skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* 62; 878-889, 2010.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
Akamata K, Asano Y, Sato S. Bosentan reverses the profibrotic phenotype of systemic sclerosis dermal fibroblasts through increasing the DNA binding ability of transcription factor Fli1. ACR/ARHP Scientific Meeting 11, November 5-9, 2011 Chicago

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

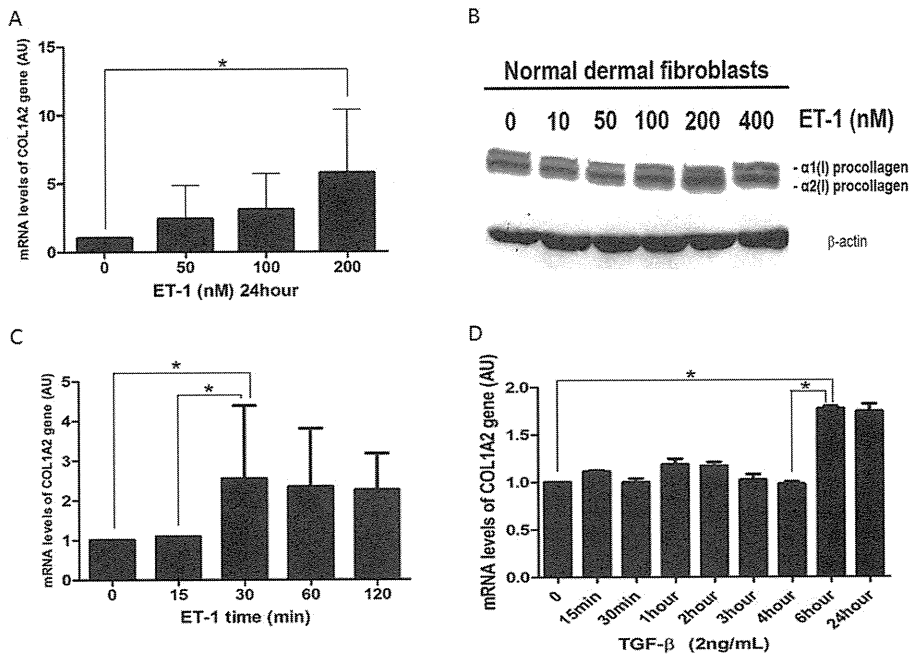


図 1 :

- A. 正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激は用量依存性に COL1A2 遺伝子の mRNA の発現を亢進させた。
- B. 正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激は用量依存性に I 型コラーゲン蛋白の発現を亢進させた。
- C. 正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激 30 分後より COL1A2 遺伝子の mRNA の発現が亢進した。
- D. 正常皮膚線維芽細胞において、TGF- β 刺激後 6 時間より COL1A2 遺伝子の mRNA の発現が亢進した。

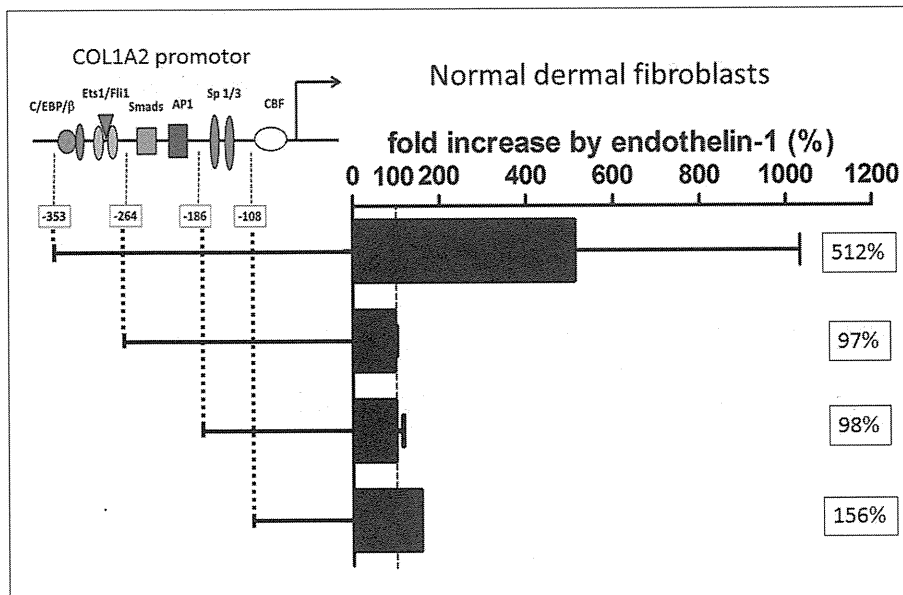


図 2 : 正常皮膚線維芽細胞において、COL1A2 遺伝子プロモーターの ET-1 に対する responsive element は -353 ~ -264 bp 領域に存在する。

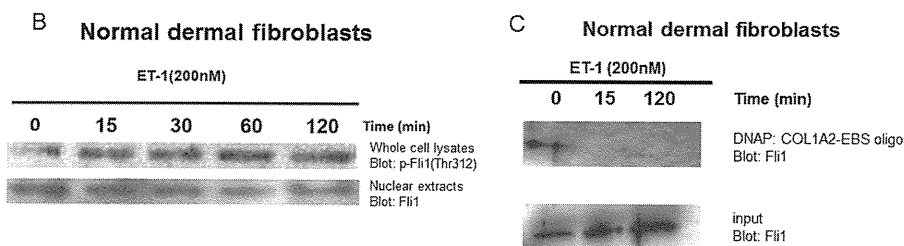
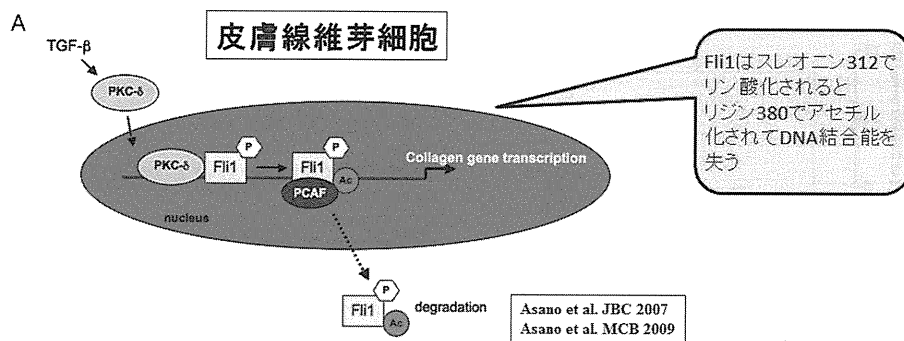


図 3 :

- A. TGF- β 刺激後、Fli1 は PKC-d によりスレオニン 312 でリン酸化されると、PCAF によりリジン 380 でアセチル化され、その結果 DNA 結合能を失う。
- B. 正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激 15 分後から Fli1 のリン酸化は著明に亢進する。
- C. 正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激は Fli1 の DNA 結合能を抑制した。

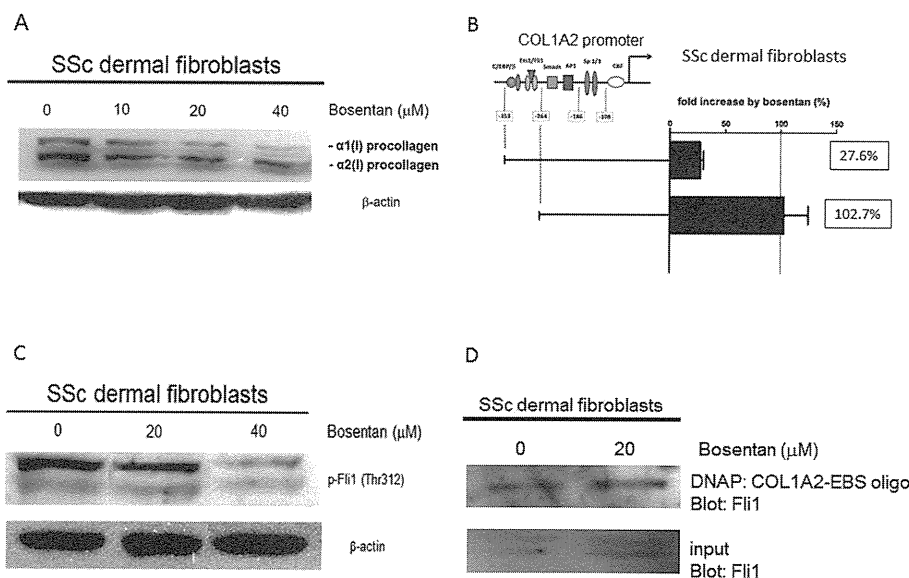


図 4 :

- A. 強皮症線維芽細胞をボセンタンで 24 時間処理すると、I 型コラーゲン蛋白の発現が用量依存性に抑制された。
- B. 強皮症皮膚線維芽細胞において、COL1A2 遺伝子プロモーターのボセンタンに対する responsive element は -353~-264 bp 領域に存在する。
- C. 強皮症皮膚線維芽細胞において、ボセンタンは用量依存性に Fli1 のリン酸化を抑制した。
- D. 強皮症皮膚線維芽細胞において、ボセンタンは Fli1 の DNA 結合能を亢進させた。

アトルバスタチンの皮膚線維芽細胞におよぼす影響

研究分担者 川口鎮司 東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病 臨床教授
協力者 大田ゆう子 東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病 医員
協力者 高木香恵 東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病 准講師
協力者 栃本明子 東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病 助教

研究要旨

全身性強皮症 (SSc) は、多臓器の線維化を主症状とする原因不明の自己免疫疾患である。アトルバスタチンは全身性強皮症の血管病変 (レイノー現象、指尖部潰瘍) に有用であることが報告されている。近年、肝臓や心臓におけるアトルバスタチンの抗線維化作用が報告されている。

今回の研究では、全身性強皮症皮膚線維芽細胞に対するアトルバスタチンの影響について検討した。Diffuse type 全身性強皮症 (SSc) 患者の皮膚線維芽細胞を使用した。アトルバスタチンを皮膚線維芽細胞に添加したところ、コラーゲンおよび IL-6 の産生が抑制された ($p < 0.001$)。またアトルバスタチン $10 \mu\text{M}$ 添加により COL1A2 および IL-6 mRNA の発現が有意に低下した ($P = 0.035$, $P = 0.002$)。さらに、LY294003 (PI3K 阻害剤) 添加で有意にコラーゲン産生が抑制され ($p < 0.01$)、LY294003 (PI3K 阻害剤) および Y27632 (ROCK 阻害剤) 添加で有意に IL-6 産生が抑制された ($p < 0.01$)。さらに、ウエスタンブロット解析によりアトルバスタチンが PI3K および Akt のリン酸化を抑制することが示された。

以上の結果より、アトルバスタチンは PI3K/Akt 経路を介して強皮症皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン産生を低下させ、全身性強皮症に伴う血管病変のみならず、線維化病変に対しても有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (SSc) は、皮膚硬化、間質性肺病変、消化管蠕動障害、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、心筋障害などで特徴付けられる原因不明の結合組織疾患である^[1]。自己抗体や遺伝子変異が臨床症状を反映するという報告もある。

アトルバスタチンは、スタチンの一種で、メバロン酸経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を選択的かつ競合的に阻害することにより肝臓のコレステロール合成を抑制する。

2006 年に桑名らによって、アトルバスタチンが、骨髄からの血管内皮前駆細胞を誘導することにより、レイノー現象や、指尖部潰瘍といった全身性強皮症

に伴う血管病変に有用であることが報告された^[2,3]。当センターにおいて、強皮症患者 49 人を対象にアトルバスタチンの Raynaud 現象に対する効果についての調べたところ、アトルバスタチン投与群において有意な Raynaud condition score および patient pain VAS の改善を認めた。このほかいくつかの pilot study においてスタチンは全身性強皮症に伴う血管病変に対して有用であること、vWF や TAT などを減少させ、内皮細胞保護作用があることなどが示されている^[4,5]。また、近年、ラットを用いた実験により、アトルバスタチンが肝星細胞の活性化を阻害し線維化を抑制する^[6]、心臓線維芽細胞において PI-3 kinase、Smad3 のリン酸化を阻害し、endoglin 発現を

抑制することにより心臓線維化を抑制する^[7]などの報告がされている。

そこで、今回我々は全身性強皮症患者の皮膚線維芽細胞におけるアトルバスタチンの作用について検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

Diffuse cutaneous type 全身性強皮症患者 5 人より採取した 3-5 継代の皮膚線維芽細胞を用いた。

2) 試薬

アトルバスタチン 0-10 μ を使用した。

MEK 阻害剤として U0126、PI3K 阻害剤として LY294002、ROCK 阻害剤として Y27632 を用いた。

3) 方法

① アトルバスタチン 0, 0.1, 1, 10 μ M 添加 24、48、72 時間後の培養上清中の Collagen type 1C peptide、IL-6 を ELISA にて測定した。

② アトルバスタチン 0, 10 μ M 添加 24 時間後の COL1A2 および IL-6 mRNA を real-time PCR にて測定した。

③ MEK、PI3K、Rho 阻害剤添加 24 時間、48 時間、72 時間後の培養上清中 Collagen type 1C peptide、IL-6 を ELISA にて測定した。

④ アトルバスタチンによる Erk1/2、PI3K、Akt のリン酸化への影響を Western blot にて解析した。

3) 統計

解析は、Student's t test を用いた。

C. 研究結果

1) アトルバスタチンのコラーゲンおよび IL-6 産生に対する影響 (図 1)

アトルバスタチン非添加群の 24 時間後の Collagen Type 1 C peptide 量を 1 とした。アトルバスタチン添

加 72 時間後に濃度依存性に有意差をもって、コラーゲンの産生が抑制された ($p < 0.001$)。IL-6 産生については、アトルバスタチン 10 μ M 添加 48 時間、72 時間後において有意に IL-6 産生が抑制された ($p < 0.001$)。

2) アトルバスタチンの COL1A2 および IL-6 mRNA への影響 (図 2)

COL1A2 および IL-6 mRNA はともにアトルバスタチン 10 μ M 添加群では、非添加群に比して有意に mRNA の発現が抑制された ($P = 0.035$, $P = 0.002$)。

3) シグナル伝達阻害剤によるコラーゲンおよび IL-6 産生に対する影響 (図 3)

スタチンが関与するとされる MEK、PI3K、ROCK の選択的阻害剤を用いた。コラーゲン産生については、LY294003 (PI3K 阻害剤) 添加 48 時間後、72 時間後で有意にコラーゲン産生が抑制された ($p < 0.01$, $p < 0.001$)。IL-6 産生については、LY294003 (PI3K 阻害剤) および Y27632 (ROCK 阻害剤) 添加 48 時間後、72 時間後で有意に IL-6 産生が抑制された ($p < 0.01$)。

4) 細胞内シグナル伝達

Western blot におけるアトルバスタチンの各種細胞内シグナル伝達物質のリン酸化への影響を検討した。アトルバスタチン添加により、PI3K および Akt のリン酸化が抑制されたが、Erk のリン酸化については変化がみられなかった。以上の結果からアトルバスタチンは PI3K/Akt 経路を介してコラーゲンの産生を抑制していることが推測される。

D. 考案

今回の研究で、我々はアトルバスタチンが、全身性強皮症皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン産生および IL-6 産生を抑制することを明らかにした。さら

に、各種リン酸化阻害剤添加によるコラーゲン産生の測定やアトルバスタチン添加による細胞内シグナル伝達の詳細検討としてPI3K、Aktのリン酸化をWestern blottにて解析し、アトルバスタチンのコラーゲン産生抑制作用に、PI3K/Aktのリン酸化に関わる経路が存在する可能性が示唆された。

2006年にLounevaらによりシンバスタチンにおいてメバロン酸経路を介してコラーゲン産生が抑制された報告されている^[7]。今回アトルバスタチンにおいても同様の作用が認められたことから、他のスタチンにおいても同様の作用が認められる可能性が考えられる。

また、シンバスタチンにより抑制されたコラーゲン産生が、メバロン酸、Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)を添加した場合に改善したが、Farnesyl pyrophosphate (FPP)添加によっても改善は認められなかったと報告されている。アトルバスタチンのコラーゲン産生抑制作用がメバロン酸経路を介しているかどうかについて今後検討の必要があると考える。

また、今回ウエスタンブロットによる細胞内伝達経路としては、PI3K、Akt、Erkについてのみ検討を行っており、今後Rho経路についても追加検討を予定している。

コラーゲン産生とPI3Kについては、2004年に浅野らにより、PI3K選択的阻害剤添加により全身性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が現象することが報告されている。我々の検討においてもPI3K選択的阻害剤を皮膚線維芽細胞に添加した際にコラーゲン産生が抑制しており、全身性強皮症皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生においてPI3Kが重要な役割を果たしていると考えられる。

E. 結 論

アトルバスタチンはPI3K/Akt経路を介して強皮

症皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン産生を低下させた。アトルバスタチンは強皮症における血管病変のみならず、線維化病変に対しても有効である可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Medsger TA Jr. Systemic sclerosis (scleroderma): clinical aspects. In: Koopman WJ, ed. , Arthritis and allied conditions, 14th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 2001: 1590-624.
2. Kuwana M, Kaburaki J, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Increase in circulating endothelial precursor by atorvastatin in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2006; 54: 1946-51.
3. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J. Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. Mod Rheumatol 2009; 19: 530-5.
4. Furukawa S, Yasuda S, Amengual O, Horita T, Atsumi T, Koike T. Protective effect of pravastatin on vascular endothelium in patients with systemic sclerosis: a pilot study Ann Rheum Dis 2006; 65: 1118-1120.
5. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Statins: potentially useful in therapy of systemic sclerosis-related Raynaud' s phenomenon and digital ulcers. J Rheumatol 2008; 35: 1801-8.
6. Trebicka J, Henneberg M, Odenthal M, Shir K, Klein S, Granzow M, et al. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. J Hepatol 2010; 53: 702-12.
7. Shyu KG, Wang BW, Chen WJ, Kuan P, Hung CR. Mechanism of inhibitory effect of atorvastatin on en-

doglin on encoding expression induced by transforming growth factor-beta 1 in cultured cardiac fibroblasts. Eur J Heart Fail 2010; 12: 219-26.

8. Loueva N, Huaman G, Fertala J, Jimenez SA. Inhibition of systemic sclerosis dermal fibroblast type I collagen production and gene expression by simvastatin. Arthritis Rheuma 2006; 54: 1298-1308

9. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Takami K. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in $\alpha 2(I)$ collagen gene expression in normal and

scleroderma fibroblasts. J immunol 2004; 172: 7123-35

G. 学会発表

第 55 回日本リウマチ学会総会

EAGOR 2011

American College of Rheumatology 2011 にて発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

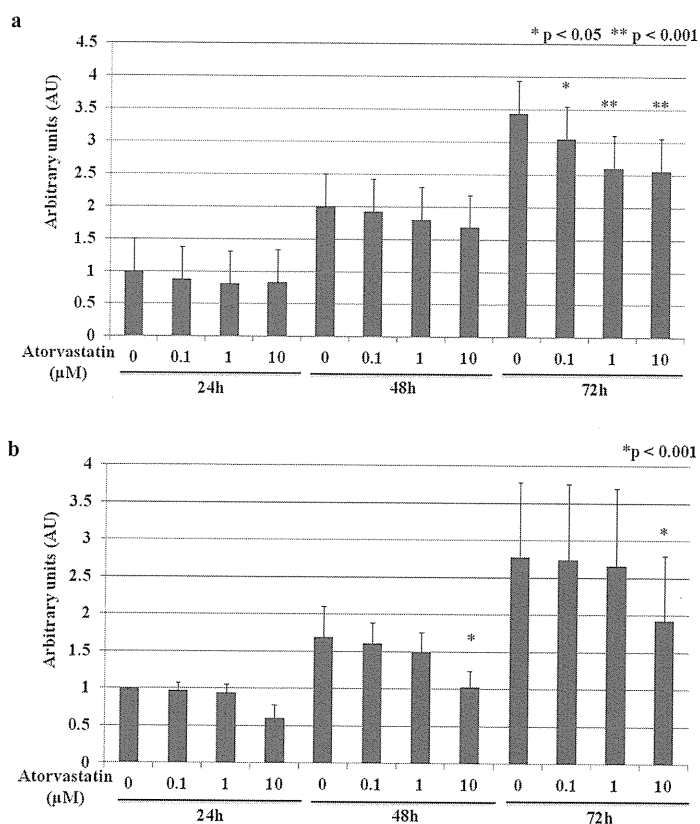


図 1 :

a. アトルバスタチンのコラーゲン産生に対する影響

アトルバスタチン添加 72 時間後にて濃度依存性に有意差をもって、Collage の産生が低下した。

b. アトルバスタチンの IL-6 産生に対する影響

アトルバスタチン 10 μM 添加 48 時間、72 時間において有意に IL-6 の産生が抑制された。

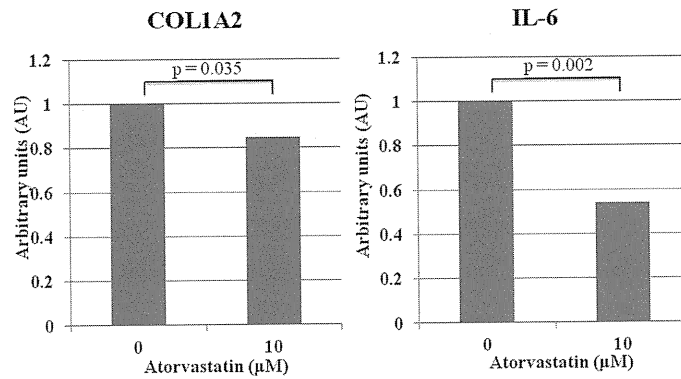


図2：アトルバスタチンのCOL1A2およびIL-6 mRNAに対する影響
COL1A2、IL-6ともにアトルバスタチン10μM添加群では、非添加群に比して有意にmRNAの発現が抑制された。

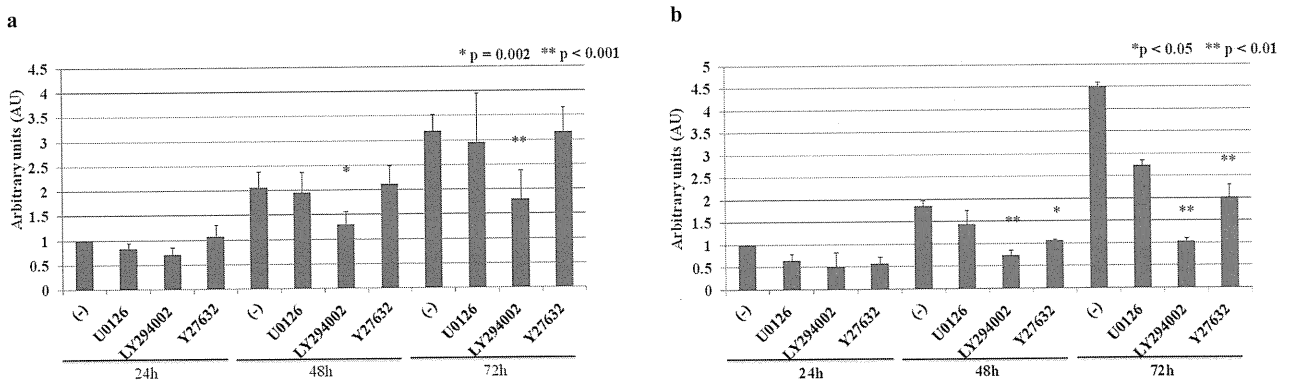


図3：

a. 阻害剤添加によるコラーゲン産生への影響

PI3K阻害剤であるLY294002添加後48時間、72時間において有意にコラーゲン産生が抑制されました。

b. 阻害剤添加によるIL-6産生への影響

LY294002、Y27632添加後48時間、72時間後のIL-6産生が有意に抑制された。

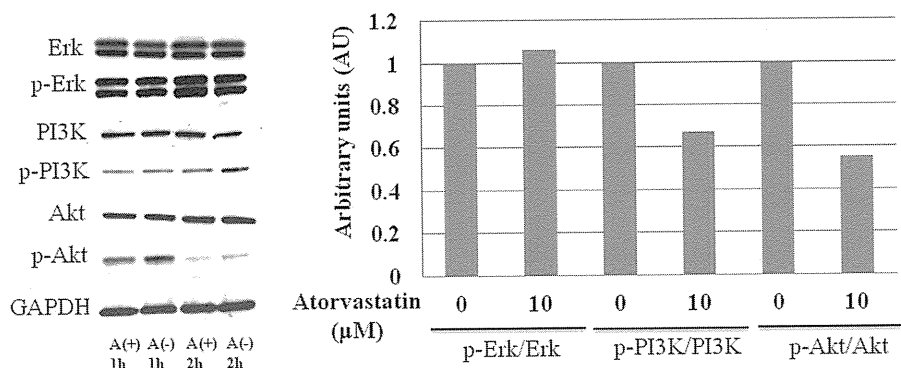


図4. アトルバスタチンによるErk、PI3K、Aktのリン酸化に対する影響

サリドマイドによる全身性強皮症患者由来真皮線維芽細胞への影響

研究分担者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学 教授
協力者 上原顕仁 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学
協力者 横山洋子 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学
協力者 安部正敏 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学 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

サリドマイドが全身性強皮症に対して、治療効果を示すという報告がある。しかし、サリドマイドがヒト真皮線維芽細胞におよぼす作用の詳細は未だ不明である。今回我々は、健常人および全身性強皮症患者由来の真皮線維芽細胞を用い、サリドマイドのヒト真皮線維芽細胞由来細胞外基質代謝に与える影響を検討した。

今回の検討結果では、サリドマイドは蛋白レベルにおいて健常人と全身性強皮症患者由来真皮線維芽細胞のI型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1産生に影響を与えなかった。しかし、遺伝子レベルにおいては、サリドマイドが全身性強皮症患者由来真皮線維芽細胞のI型コラーゲン $\alpha 1$ 、MMP1、TIMP1発現を低下させる傾向がみられた。

A. 研究目的

近年、サリドマイドが全身性強皮症治療に有効であるとする報告がみられるが、その機序の詳細は不明である。全身性強皮症患者 11 例に対する open trial の報告¹⁾によると、その効果は、指尖潰瘍の改善、逆流性食道炎の改善、病理組織学的な真皮線維化の改善、患者の血漿中 IL-12、TNF- α 値の上昇とされている。さらに、この報告ではサリドマイド未治療の全身性強皮症患者由来の末梢血単核球細胞を抗 CD3 抗体で活性化した後、サリドマイドを添加したところ IL-2、IL-3、GM-CSF、IFN- γ の産生や T 細胞における CD40 ligand の発現の亢進がみられたとされ、免疫学的作用への効果が示唆されている。

今回、サリドマイドの全身性強皮症治療への臨床応用の可能性を検討する目的で、健常人および全身性強皮症患者由来の真皮線維芽細胞を用い、サリドマイドのヒト真皮線維芽細胞由来細胞外基質代謝に対する効果を検討した。

B. 研究方法

インフォームド・コンセントを得た上で、健常人および全身性強皮症患者各 3 例より真皮線維芽細胞を得た。それぞれの線維芽細胞を培養し、培地中にサリドマイドを 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した。サリドマイドは R 体、S 体の光学異性体がある。本実験では臨床現場で使われている両者が等量で混ざったラセミ体を使用した。なお、臨床試験において日本人多発性骨髄腫患者 13 例にサリドマイドを標準量の 100 mg 単回投与したときのサリドマイドの最高血中濃度は $1.68 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$ と報告されている²⁾。

1) 細胞増殖能の測定

6well プレートに 5×10^4 個 /well で細胞を播種し 48 時間培養、サリドマイド添加 24 時間前に 0.5% FBS 入り培地に交換、添加 48 時間後にコールターカウンターにて細胞数を測定した。

2) Real time PCR 法による細胞外基質関連蛋白遺伝

子発現の変化の検討

6well プレートに 10×10^4 個 /well で細胞を播種し 96 時間培養、サリドマイド添加 24 時間前に 0.5% FBS 入り培地に交換、添加 6 時間後に細胞を回収した。その後 RNA を抽出し、real time PCR 法を行い、ヒト真皮線維芽細胞由来 I 型コラーゲン $\alpha 1$ (Hs00164004_m1、Life Technologies Co., Carlsbad、

CA, USA)、MMP1 (Hs00233958_m1、Life Technologies Co.)、TIMP1 (Hs00171558_m1、Life Technologies Co.) の発現を検討した。

3) ELISA 法による細胞外基質関連蛋白の産生量の変化の検討

6well プレートに 10×10^4 個 /well で細胞を播種し 48 時間培養、サリドマイド添加 24 時間前に無血清培地に交換、添加 48 時間後に上清を回収し E-LISA 法にて I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (Takarara Bio Inc., Otsu, Japan)、MMP-1 (Daiichi Fine Chemical Co. Ltd., Takaoka, Japan)、TIMP-1 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) を定量した。

C. 研究結果

1) サリドマイドの細胞増殖能への影響

サリドマイドは、いずれの濃度においても健常人、強皮症由来真皮線維芽細胞の増殖能に影響を与えなかった (図 1)。24 時間後も検討したが、同様の結果であった。

2) サリドマイドのヒト真皮線維芽細胞由来細胞外基質関連蛋白遺伝子発現への影響

① サリドマイドの I 型コラーゲン $\alpha 1$ 発現への影響

サリドマイドは、いずれの濃度においても健常人では I 型コラーゲン $\alpha 1$ の発現に影響を与えなかった。一方、サリドマイド非添加群において強皮症で健常人と比較し I 型コラーゲン $\alpha 1$ の発現は亢進していた。サリドマイドは強皮症で 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 添加群

において非添加群と比較して I 型コラーゲン $\alpha 1$ の発現を低下させた (図 2a)。

② サリドマイドの MMP1 発現への影響

サリドマイドは、いずれの濃度においても健常人では MMP1 の発現に影響を与えなかった。一方、サリドマイドは強皮症で 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 添加群において非添加群と比較して MMP1 の発現を低下させた (図 2b)。

③ サリドマイドの TIMP1 発現への影響

サリドマイドは、いずれの濃度においても健常人では TIMP1 の発現に影響を与えなかった。一方、サリドマイド非添加群においては強皮症で健常人と比較し TIMP1 の発現が亢進していた。また、サリドマイドは強皮症で 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 添加群において非添加群と比較して TIMP1 の発現を低下させた (図 2c)。

3) サリドマイドの線維芽細胞由来細胞外基質関連蛋白産生への影響

① サリドマイドの I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド産生への影響について

サリドマイドは、いずれの濃度においても健常人および強皮症で I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド産生に影響を与えなかった (図 3a)。

② サリドマイドの MMP-1 産生への影響について

サリドマイドは、いずれの濃度においても健常人および強皮症で MMP-1 産生に影響を与えなかった (図 3b)。

③ サリドマイドの TIMP-1 産生への影響について

サリドマイドは、いずれの濃度においても健常人および強皮症で TIMP-1 産生に影響を与えなかった (図 3c)。

D. 考察

サリドマイドは分子量 258.23 ダルトンであり、basicFGF、VEGF、インテグリンの発現抑制³⁾⁻⁵⁾、TNF α

産生抑制⁶⁾、NF- κ B の転写活性抑制⁷⁾ などの作用が知られており、その結果血管新生が阻害されると考えられている。本邦において、サリドマイドは再発または難治性の多発性骨髄腫に保険適応を有するのみで、全身性強皮症に対しての保険適応はない。

サリドマイドの線維芽細胞に対する作用の詳細は未だ不明である。過去の報告では、サリドマイドがマウス胎児由来の線維芽細胞の増殖を抑制したとする報告⁸⁾ や、サリドマイドがヒトの myeloma cell line において MMP1 の遺伝子発現を抑制したとする報告がある⁹⁾。また、ブレオマイシンにより誘導した肺線維症モデルマウスの肺組織において、サリドマイドが I 型コラーゲン、TGF β 1、IL-6 の mRNA 発現を抑制し、組織学的に線維化を改善したとする報告がある¹⁰⁾。さらにこの報告ではサリドマイドがヒト胎児肺線維芽細胞にて IL-6 を抑制し、細胞増殖を抑制したとされている。また、サリドマイドはヒト胎児肺線維芽細胞において I 型コラーゲン、TGF β 1 の mRNA 発現を抑制したという報告もある¹¹⁾。さらに、サリドマイドは肝硬変モデルマウス由来の線維化した肝臓において TIMP-1、TIMP-2、TGF β 1、TNF α の蛋白産生を抑制し、肝硬変の進行を抑制したとする報告もある¹²⁾。

しかし、強皮症ではブレオマイシン誘導強皮症モデルマウスにおいて、サリドマイドは皮膚の厚さ、血清中の TNF α 、IL-6、TGF β 1 に対して影響を与えなかったとする報告もある¹³⁾。

E. 結 論

今回の検討結果では蛋白レベルにおいて、サリドマイドは健常人と全身性強皮症患者由来真皮線維芽細胞の I 型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 産生に影響を与えなかった。しかし、遺伝子レベルにおいては、サリドマイドにより全身性強皮症患者において I 型

コラーゲン α 1、MMP1、TIMP1 発現が低下する傾向がみられたことより、サリドマイドは全身性強皮症において細胞外基質代謝に影響を及ぼす可能性は否定できない。

F. 文 献

1. Oliver SJ, Moreira A, Kaplan G. Immune stimulation in scleroderma patients treated with thalidomide. *Clin Immunol* 2000; 97: 109-20.
2. 日本病院薬剤師会 . 医薬品インタビューフォーム : サレド[®]カプセル 50 サレド[®]カプセル 100. 2011.
3. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4082-5.
4. Li X, Liu X, Wang J, Wang Z, Jiang W, Reed E, Zhang Y, Liu Y, Li QQ. Effects of thalidomide on the expression of angiogenesis growth factors in human A549 lung adenocarcinoma cells. *Int J Mol Med* 2003; 11: 785-90.
5. Stephens TD, Bunde CJ, Fillmore BJ. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 1489-99.
6. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991; 173: 699-703.
7. Moreira AL, Friedlander DR, Shif B, Kaplan G, Zagzag D. Thalidomide and a thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation in vitro. *J Neurooncol*. 1999; 43: 109-14.
8. Miyata M, Tamura E, Motoki K, Nagata K, Yamazoe Y. Thalidomide-induced suppression of embryo fibroblast proliferation requires CYP1A1-mediated

activation. Drug Metab Dispos 2003; 31: 469-75.

9. Wang HY, Zhang M, He PC, Yang BJ, Shao LY, Shao WB. Changes of gene expression profile in human myeloma cell line induced by thali-domide. Zhong-guo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2010; 18: 396-402.

10. Tabata C, Tabata R, Kadokawa Y, Hisamori S, Taka-hashii M, Mishima M, Nakano T, Kubo H. Thalido-mide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. J Immunol 2007; 179: 708-14.

11. Choe JY, Jung HJ, Park KY, Kum YS, Song GG, Hyun DS, Park SH, Kim SK. Anti-fibrotic effect of thalidomide through inhibiting TGF- β - induced ERK1/2 pathways in bleo-mycin-induced lung fibro-sis in mice. Inflamm Res 2010; 59: 177-88.

12. Yeh TS, Ho YP, Huang SF, Yeh JN, Jan YY, Chen MF. Thalidomide salvages lethal hepatic necroinflamma-

tion and accelerates recovery from cirrhosis in rats. J Hepatol 2004; 41: 606-12.

13. Koca SS, Isuk A, Ozercan IH, Ustundag B, Evren B, Metin K. Effectiveness of etane-rcept in bleomycin-induced experimental scleroderma. Rheumatology 2008; 47: 172-5.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

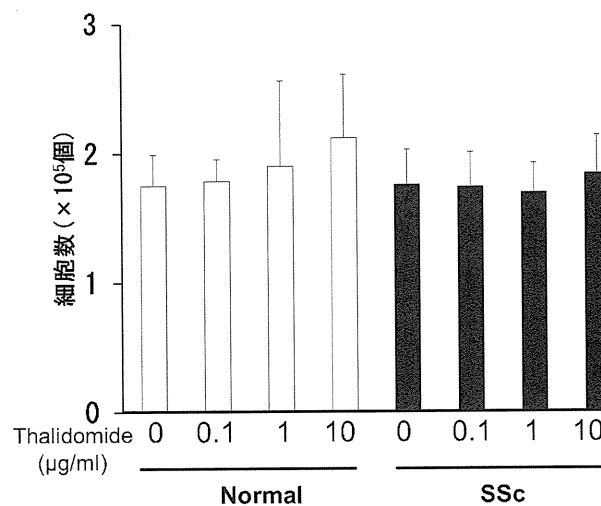


図1：サリドマイドの細胞増殖能への影響
 平均値 ± SD。Normal：健常人、SSc：強皮症。

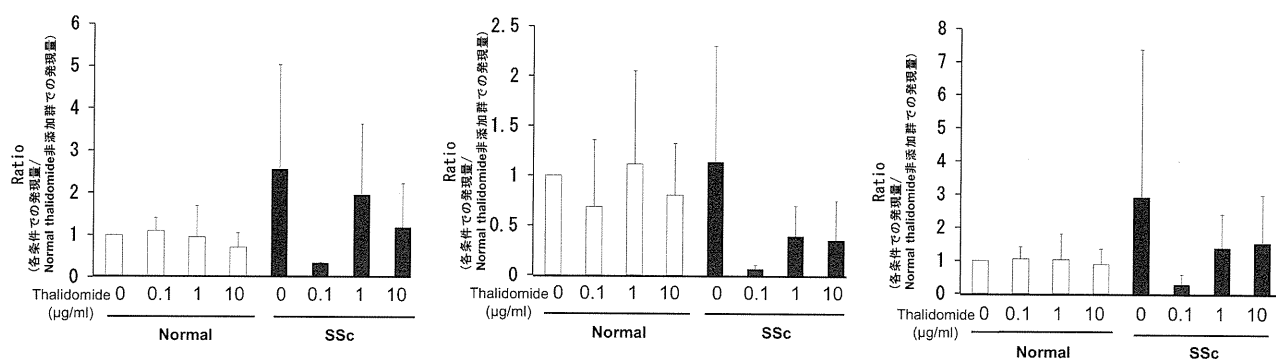


図2：サリドマイドの線維芽細胞由来細胞外基質関連蛋白遺伝子発現への影響

a サリドマイドのI型コラーゲン $\alpha 1$ 発現への影響

I型コラーゲン $\alpha 1$ 発現量は18Sで補正し、各値は健常人由来真皮線維芽細胞のサリドマイド非添加群I型コラーゲン $\alpha 1$ 発現量との比で示した。平均値 \pm SD。Normal：健常人、SSc：強皮症。

b サリドマイドのMMP1発現への影響

MMP1発現量は18Sで補正し、各値は健常人由来真皮線維芽細胞のサリドマイド非添加群MMP1発現量との比で示した。平均値 \pm SD。Normal：健常人、SSc：強皮症。

c サリドマイドのTIMP1発現への影響

TIMP1発現量は18Sで補正し、各値は健常人由来真皮線維芽細胞のサリドマイド非添加群TIMP1発現量との比で示した。平均値 \pm SD。Normal：健常人、SSc：強皮症。

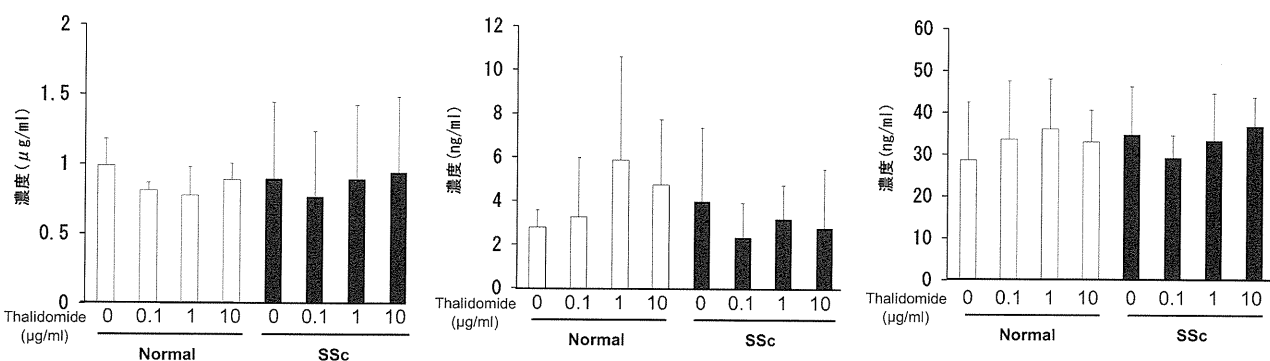


図3：サリドマイドの線維芽細胞由来細胞外基質関連蛋白産生への影響

a サリドマイドのI型プロコラーゲンC末端プロペプチド産生への影響

平均値 \pm SD。Normal：健常人、SSc：強皮症。

b サリドマイドのMMP-1産生への影響

平均値 \pm SD。Normal：健常人、SSc：強皮症。

c サリドマイドのTIMP-1産生への影響

平均値 \pm SD。Normal：健常人、SSc：強皮症。

全身性強皮症患者皮膚線維芽細胞における vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現調節

研究分担者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授
協力者 梶原一亨 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学
協力者 神人正寿 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 講師
協力者 本多教稔 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学
協力者 牧野雄成 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学
協力者 牧野貴充 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 助教

研究要旨

全身性強皮症 (systemic sclerosis, SSc) 患者皮膚組織および血清中では vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現が増加しており、VEGF の制御不能な発現増加が逆に血管新生を阻害している可能性が指摘されている。我々は全身性強皮症患者皮膚線維芽細胞における VEGF の発現および発現調節に関して検討を行った。強皮症患者皮膚組織では健常群に比して、有意に VEGF mRNA の増加を認めた。強皮症患者皮膚線維芽細胞 (SSc fibroblasts、以下 SF) は、健常コントロール皮膚線維芽細胞 (normal fibroblasts、以下 NF) より有意に VEGF mRNA および蛋白は有意に増加していた。NF は TGF- β 1 刺激にて VEGF mRNA および蛋白は増加していた。また SF は TGF- β 1 siRNA 導入にて VEGF mRNA の減少を認めた。さらに VEGF プロモーター領域に存在する Smad binding elements (SBE) に結合する Smad 3 蛋白は SF で増加していた。以上より、強皮症患者における VEGF 強発現に関して、TGF- β シグナルを介した皮膚線維芽細胞が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

VEGF は、血管内皮細胞の増生、生存、接着、遊走などに関与しており、悪性疾患や自己免疫疾患において重要な役割を果たしている¹⁾²⁾。SSc において、血清中では VEGF 値の発現が増加しており、皮膚硬化や血清中 TGF- β 値と相関することが報告されている³⁾⁴⁾⁵⁾。また、血管内皮細胞に VEGF が強発現しており、VEGF の制御不能な発現増加が逆に血管新生を阻害している可能性が報告されている⁶⁾⁷⁾。しかし、強皮症皮膚線維芽細胞における VEGF の発現および発現調節に関する報告は未だなされていないため、今回、我々は検討した。

B. 研究方法

1) 皮膚組織

熊本大学病院皮膚科を受診した健常人 5 例、SSc 患者 3 例、SLE 患者 4 例、皮膚筋炎患者 4 例より採取した。本研究は Declaration of Helsinki に基づき、倫理委員会の審査を経て、患者および健常人の同意を得て行った。皮膚組織は採取直後にホルマリン固定しパラフィンにて包埋した。

2) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞の取得は発症 2 年以内の 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) RNA 抽出と quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

皮膚組織からの Total RNA の抽出には RNeasy FFPE キット (Qiagen) を用いた。cDNA の合成には PrimeScript RT reagent キット (Takara) を使用した。Quantitative real-time PCR には Takara Thermal Cycler Dice (TP800) と SYBR premix ExtaqII (Takara) を用いた。VEGF-A および GAPDH プライマーは SA Bioscience より購入した。PCR には denaturation は 95℃ 5 秒、annealing は 60℃で 30 秒の条件下で 50 サイクル行った。各遺伝子の発現は standard curve method を用い、GAPDH で補正した。

4) 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 2×10^5 /well の密度で培養した。培養液を無血清 Eagle 培養液に替え 24 時間培養し、細胞を静止状態にした後、各種薬剤にて反応させた。PBS で 2 回洗浄後、Denaturing Cell Extraction Buffer[®] (Biosource International, Camarillo, CA, U. S. A.), Protease Inhibitor Cocktail[®] (Sigma-Aldrich), Phenyl-methylsulfonyl fluoride (Alexis Bio-chemicals, Lausen, Switzerland) を加え、氷上にて 30 分間反応、攪拌、4℃、15 分間遠心分離を行い、細胞から抽出液を精製した。SDS、2-mercaptoethanol を加え、10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE スラブゲル) で 20 mA/gel、90 分間、電気泳動を行った。泳動後、PVDF 膜に 2 mA/cm、1 時間、転写し、Blocking One P buffer (ナカライテスク、京都、日本) にて 20 分ブロッキング後、室温、1 時間もしくは 4℃、1 晩、一次抗体

を反応させた。Tris-buffered saline (TBS) に 0.1% Tween 20 を加え、洗浄後、室温、1 時間、horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体を反応させ、再度洗浄した。PVDF 膜に結合した抗体の化学発光検出には Chemi-Lumi One[®] (ナカライテスク) を用いた。

5) VEGF 蛋白濃度測定

VEGF 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。

6) RNA 干渉法

TGF- β 1 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 TGF- β 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 の取得を行った。

7) DNA affinity precipitation assay

ヒト VEGF プロモーター領域には 3×CAGA 配列を有する SBE 領域が存在しており、ビオチン化プローブとして、-541~-512 bp に位置する (1) VEGF promoter oligo: 5'-GCTGACGGACAGACAGACAGACAGACCGCCCC および (2) positive control oligo: 5'-TCGAGAGCCAGACAAGGAGCCAGACAAGGAGCCAGACACTCGAG (3) negative control oligo: 5'-GCTGACGGATATATATATATACACCGCCC をそれぞれ作成した。これらは相補的な配列の oligonucleotide とアニーリングした。ヒト皮膚線維芽細胞を 10 cm dish で sub-confluent になるまで培養した。培養液を無血清 Eagle 培養液に替え 24 時間培養し、細胞を静止状態にした後、各種薬剤にて反応させた。PBS で 2 回洗浄後、lysis buffer を加え⁸⁾、氷上にて 30 分間

反応、攪拌、4℃、15 分間遠心分離を行い、細胞から抽出液を精製した。蛋白濃度を 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ にした抽出液に Poly (dI-dC) を加えた後に、それぞれの oligonucleotide を添加した。さらに streptavidin agarose を添加後、lysis buffer にて洗浄し、95℃×3 分間反応後に上澄みを回収した。上澄みを免疫プロット法にて解析した。

8) 統計解析法

グラフは 3 回の実験結果を総合し、中間値±標準偏差を提示した。Mann-Whitney U-test を用いて解析した。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いて VEGF 産生は増加している。

まず、SSc 患者皮膚において皮膚での VEGF 発現が既報告³⁾⁴⁾⁵⁾のように血清 VEGF 値の上昇の原因となるかを検討した。健常人 5 例、SSc 患者 3 例、SLE 患者 4 例、皮膚筋炎患者 4 例の皮膚組織から total RNA を抽出し、real-Time PCR を施行したところ、SSc 患者にて有意に皮膚組織中の VEGF mRNA の発現が有意に上昇していることが分かった (図 1a)。次に 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 VEGF 蛋白量を検討した。免疫プロット法にて、NF に比して SF において VEGF 蛋白量は増加しており、NF において TGF- β -1 刺激は VEGF 蛋白量を増加させた (図 1b)。次に、同様の条件下における蛋白量を ELISA 法にて検討したところ、有意に SF にて増加を認め (図 1c)。さらに、mRNA 量を real time PCR 法にて検討したところ、有意に SF にて増加を認め (図 1d)。これらより、SF における VEGF 蛋白合成量の

増加は mRNA レベルの増加に起因することが示された。

2) 皮膚線維芽細胞において VEGF 産生増加は TGF- β シグナルが関与している。

図 1b に示したように、NF において TGF- β -1 刺激にて VEGF 産生が増加したことより、TGF- β シグナルと VEGF 発現調節に関して検討した。ELISA 法において、NF において TGF- β -1 刺激は VEGF 蛋白量を増加させた (図 2a)。同様の条件下における mRNA 量を real time PCR 法にて検討したところ、有意に NF において TGF- β -1 刺激により増加させた (図 2b)。さらに強皮症皮膚線維芽細胞における autocrine TGF- β シグナルと VEGF 産生調節の役割を解明するために、TGF- β -1 siRNA を用いて検討したところ、有意に VEGF mRNA の産生低下を認めた (図 2c)。

3) 強皮症皮膚線維芽細胞における VEGF 産生増加は TGF- β シグナルにおける SBE に結合する Smad3 蛋白増加に基づく。

SF の mRNA レベルの増加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 VEGF mRNA 減少に関して、有意差を認めなかった (図 3a)。以上より、SF における VEGF mRNA は転写レベルの産生増加によることが示された。

さらに SF で重要なシグナル伝達経路である autocrine TGF- β signaling によって VEGF 遺伝子転写が促進されている詳細な機序を検討するために、DNA affinity precipitation assay を用いて NF および SF における VEGF プロモーターに結合している Smad3 蛋白量を検討することにした。VEGF プロモーター領域には図 3b に示すように、-532~-521 bp 領域に SBE である CAGA 配列を有している。VEGF pro-

moter oligo, positive control oligo, negative control oligo を使用して、NF と SF および TGF β -1 刺激ありもしくはなしの NF における VEGF 遺伝子プロモーター領域に結合している Smad3 蛋白量を検討した。NF に TGF β -1 刺激を加えると Smad3 蛋白量が増加し、また NF に比して SF で Smad3 蛋白量が増加していた(図 3c)。これらの結果により、SF において TGF- β /Smad3 により VEGF 産生増加が起こっていることが分かった。

D. 考案

この研究によって、SF における VEGF 産生および発現調節に関して、大きく 3 つのことが明らかになった。

1 つ目は、皮膚組織すなわち in vivo において、SSc において有意に VEGF mRNA が強発現しており、培養皮膚線維芽細胞すなわち in vitro においても有意に VEGF mRNA が強発現していたことである。Distelerらはケラチノサイトや血管内皮細胞において VEGF が強発現していることを報告しており⁹⁾、我々の結果によって、強皮症における VEGF 産生増加の一因として皮膚線維芽細胞が関与していることが示された。

2 つ目は NF において転写レベルで TGF- β 刺激にて VEGF 発現が増強され、さらには SF において TGF- β をノックダウンすると VEGF mRNA 発現が低下することである。これらの結果は低酸素により誘導される VEGF 産生¹⁰⁾ ではなく、恒常的に SF において TGF- β シグナルにて VEGF 産生が増加していることが分かった。

3 つ目は SF における VEGF 産生増加は Smad 経路に起因していたことである。NF に比して、SF において I 型コラーゲン α (II) プロモーターに結合する Smad3 蛋白が増加していることが報告されてお

り¹¹⁾、我々の結果は SF における Smad 経路を介した autocrine TGF- β signaling は I 型コラーゲン産生増加のみならず、VEGF 産生増加も引き起こしていることを明らかにした。

E. 結論

本研究により導かれた SF における VEGF 発現調節に関する強皮症の病態を示す仮設モデルを図 4 に示す。我々は SF において autocrine TGF- β signaling により、VEGF 強発現が引き起こされることを明らかにした。過剰は VEGF 産生により強皮症患者の血管障害が引き起こされることが過去に報告されている¹²⁾。TGF- β /Smad 経路は強皮症において、組織線維化のみならず、血管障害にも関与していることが示唆された。TGF- β /Smad 経路を治療のターゲットとして検討することが、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. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* 2005; 209-231.
2. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312: 549-560.
3. Kikuchi K, Kubo M, Kadono T, Yazawa N, IHN H, et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in collagen diseases. *Br J Dermatol* 1998; 139: 1049-1051.
4. Choi JJ, Min DJ, Cho ML, Min SY, Kim SJ, et al. Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003; 30: 1529-1533.
5. Papaioannou AI, Zakyntinos E, Kostikas K, Ki-

- ropoulos T, Koutsokera A, et al. Serum VEGF levels are related to the presence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *BMC Pulm Med* 2009; 9: 18.
6. Distler O, Distler JH, Scheid A, Acker T, Hirth A, et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 2004; 95: 109-116.
7. Davies CA, Jeziorska M, Freemont AJ, Herrick AL. The differential expression of VEGF, VEGFR-2, and GLUT-1 proteins in disease subtypes of systemic sclerosis. *Hum Pathol* 2006; 37: 190-197.
8. Asano Y, Ihn H, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Involvement of v5 integrin in the establishment of autocrine TGF-signaling in dermal fibroblasts derived from localized scleroderma. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1761-1769.
9. Distler O, Distler JH, Scheid A, Acker T, Hirth A, et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 2004; 95: 109-116.
10. Beyer C, Schett G, Gay S, Distler O, Distler JH. Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 220
11. Ihn H, Yamane K, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K. Constitutively phosphorylated Smad3 interacts with Sp1 and p300 in scleroderma fibroblasts. *Rheumatology* 2006; 45: 157-165.
12. LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 675-694.

G. 研究発表

1. 論文発表

現在、英文雑誌に投稿中である。

2. 学会発表

Ikko Kajihara, Masatoshi Jinnin, Takamitsu Makino et al. Scleroderma dermal fibroblasts overexpress vascular endothelial growth factor due to autocrine transforming growth factor β signaling.

The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (Kyoto). 2011. 12

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし