

Study of the mechanism of skin fibrosis by utilizing transgenic mice : A mouse scieroderma model

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-05-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Takehara, Kazuhiko メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00050698

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



各種遺伝子操作マウスを用いた皮膚線維化機構,
特に強皮症モデルの研究

(課題番号 14570801)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 竹原 和彦

(金沢大学大学院医学系研究科教授)

研究組織

研究代表者 竹原和彦（金沢大学大学院医学系研究科教授）
研究分担者 佐藤伸一（金沢大学大学院医学系研究科助教授）
白崎文朗（金沢大学大学院医学系研究科助手）

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,400,000 円	0 円	2,400,000 円
平成 15 年度	1,400,000 円	0 円	1,400,000 円
総計	3,800,000 円	0 円	3,800,000 円

研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

中條園子、白崎文朗、：皮膚線維化における CTGF の役割
第 102 回日本皮膚科学会総会、平成 15 年 4 月

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

はじめに

全身性強皮症は、皮膚や肺、心、腎、消化管などに広範な線維化や血管障害をきたす結合織

疾患のひとつである。線維化はコラーゲンをはじめとする細胞外基質が異常蓄積した状態である。強皮症における線維化の機序は未だ不明であるが、これまで様々な研究がなされ、血管内皮細胞、血小板、浸潤細胞などから分泌されるサイトカインが、線維芽細胞を増殖させ、細胞外基質の産生を亢進させることにより線維化が生じると考えられている¹。

TGF- β は、線維芽細胞に作用してコラーゲン合成を促進することから、強皮症の発症に関わる重要な細胞増殖因子としてこれまで注目されてきた²。さらに近年では、TGF- β の下流でその作用を仲介することから CTGF も線維化に関与する因子として注目されている。

CTGF は、TGF- β の刺激により選択的に線維芽細胞から分泌され、線維芽細胞の増殖とコラーゲンの産生を亢進させる因子と考えられている^{3,4}。全身性強皮症において、皮膚硬化部に組織学的硬化と関連した CTGF mRNA の発現がみられる⁵ ことや、患者血清中の CTGF 濃度が疾患の重症度に相関して上昇している⁶ ことが報告されている。

以前、我々は、新生マウスの皮下に TGF- β 、CTGF を注入して線維化を誘導する実験モデルの確立を試みた。TGF- β のみを注入すると、4 日目に肉芽が誘導されるが、8 日目にはこの肉芽は消失する^{7,8}。しかし、TGF- β を 3 日間注入し、次に CTGF を 4 日間注入すると線維化が形成された。また、CTGF のみを注入しても線維化はみられなかった。これより、CTGF は TGF- β により誘導された線維化を維持すると考えられた。

今回我々は、トランスジェニックマウスを用いて上記の実験モデルを作製し、この皮膚線維化モデルにおいて、コラーゲン遺伝子の転写レベルや浸潤細胞が CTGF による線維化の維持に関与しているかどうかを検討した。

研究方法

1) 使用したマウス

I 型コラーゲンは、細胞外基質の主要成分であり、2 本の $\alpha 1$ 鎖と 1 本の $\alpha 2$ 鎖によって構成される。その I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子として螢の螢光色素であるルシフェラーゼ遺伝子を結合させた融合遺伝子と、同じプロモーター領域に大腸菌の Lac Z 遺伝子を結合させた融合遺伝子を 2 種類組み込んだマウスを使用した。つまり、このマウス組織のルシフェラーゼ活性を測定することにより組織中の I 型コラーゲンの転写活性を測定することができ、また、LacZ 染色陽性細胞は I 型コラーゲン遺伝子を発現している線維芽細胞であると同定できる。

2) 皮膚線維化モデルマウスの作製

予備実験によりあらかじめ至適用量を決定した上で、TGF- β 、CTGF を PBS に溶解して最終濃度が各々 40、20 ng/ μ l になるように調整し、新生マウスの項背部に連日 20 μ l、すなわち TGF- β 800 ng、CTGF 400 ng を皮下投与した。TGF- β 、CTGF 各々 3、7 日間の単独投与と、TGF- β を 3 日間投与した後 CTGF を 4 日間投与する連続投与を行った。また、PBS をコントロールとした。最終投与から 24 時間以内に組織を採取した。

3) コラーゲン量の測定

10 μ の切片を脱パラし、脱パラした切片の肉芽組織の部分をチューブに入れ、0.1%Fast Green と 0.1%Sirius red F3BA の染色液を加え反応させた。Fast Green は非コラーゲン組織、Sirius red F3BA はコラーゲン組織に吸着する。反応液に 0.1 N NaOH:メタノール (1:1) を加え染みでてきた抽出液の上清の吸光度を 540 nm と 605 nm で測定し、コラーゲン量を計算した。

4) real-time PCR

凍結標本切片の肉芽組織の部分より RNA を抽出し、DNA の合成を行った。ABI Prism 7000 Sequence Detector System (PE Applied Biosystems,

Foster city, CA) を用いて、real-time PCRを行った。マウスのⅠ型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (COL1A2) のプライマーとして 5'-CAA CCC AGC GAA GAA CTC ATA-3' (forward)、5'-GCC ACC ATT GAT AGT CTC TCC TAA C-3' (reverse)、プローブとして 5'-CGC CCA GGC CAA GCA TGT C-3'を使用した。コントロール遺伝子として GAPDH を用い、 $\Delta\Delta CT$ 法により発現量比を算定した。

5) ルシフェラーゼ活性測定

肉芽組織を乳鉢ですりつぶした後細胞融解液で 15 分間溶かし、10000rpm で 1 分間遠心した。上清 20 μ l に発光基質液 100 μ l を添加しルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は 1mg あたりの値で比較した。

6) X-gal 染色

凍結切片を 4%パラホルムアルデヒドで 5 分間固定し PBS で 10 分間 $\times 2$ 回洗浄した。4mM フェロシアンカリウム、4mM フェリシアンカリウム、2mM 塩化マグネシウム、1mg/ml X-gal で 37 $^{\circ}$ C、48 時間染色した。その後エオジンでカウンター染色し、PBS で 10 分間 $\times 2$ 回洗浄し封入した。

7) 組織染色

パラフィン切片を用いて、肥満細胞とマクロファージについて染色を行った。肥満細胞はトルイジンブルー染色、マクロファージは抗マウスマクロファージ抗体 (F4/80, clone A3-1, ACM, UK) を用いた免疫染色を行った。

成 績

1) コラーゲン量

Sirius redF3BA を用いて測定した肉芽組織中のコラーゲン量は、TGF β 単独投与では、4 日目に最も増加し 8 日目には減少した。TGF β 、CTGF 連続投与

では、8 日目に著明にコラーゲン量が増加していた（図 1）。これらの結果は、組織学的所見とほぼ一致した。

また、real-timePCR で測定した肉芽組織中の COL1A2 mRNA 発現量は、TGF β 単独投与では 4 日目に最も増加し、8 日目には減少した。それに対し、TGF β /CTGF 連続投与では、8 日目に COL1A2 mRNA 発現量は増加していた（図 2）。

これより、CTGF は TGF β により誘導されたコラーゲン産生を *in vivo* で亢進することが示された。

2) コラーゲン遺伝子の転写活性

2、4、6、8 日目に肉芽組織を採取しルシフェラーゼ活性を経時的に測定すると、TGF- β 単独投与では 4 日目にピークを示した。単独投与では、8 日目にほぼ 0 となったのに対し、TGF β /CTGF 連続投与では、ルシフェラーゼ活性は 8 日目にも高値を維持した（図 3）。すなわち、I 型コラーゲン遺伝子の転写活性は、CTGF の投与により維持されと考えられた。

肉芽組織の凍結切片を用いて X-gal 染色による LacZ の検出を行い、陽性細胞数を 400 倍の視野で計測した。TGF- β 3 日間投与群に比べ、TGF- β /CTGF 連続投与群の X-gal 陽性細胞数は有意に高値を示した（図 4）。すなわち、CTGF による線維化には、コラーゲン遺伝子が転写されている線維芽細胞の増加が関与していると考えられた。

3) 浸潤細胞数の計測

トリジンブルー染色にて肥満細胞数を計測すると、TGF- β 3 日間投与群で有意に肥満細胞数が増加していた。8 日目の肥満細胞数は TGF β 群がほぼ 0 になったのに対し、TGF- β /CTGF 連続投与群では増加していた（図 5）。

F4/80 抗体を用いた免疫染色にてマクロファージ数を計測したところ、TGF- β /CTGF 連続投与群でマクロファージ数は有意に増加していた（図 6）。

これより、肥満細胞やマクロファージの増加は、CTGF による線維化に何らかの関連があると考えられた。

考 察

以前、我々は、TGF- β 単独投与により一過性の肉芽組織が誘導され、TGF- β にひき続き CTGF を投与すると肉芽組織は消失せずに線維化組織が形成されることを組織学的に示した。

今回の検討では、以前我々が作製した皮膚線維化モデルマウスにおける、TGF- β や CTGF 単独投与と TGF- β /CTGF 連続投与のコラーゲン量や COL1A2 の mRNA 発現量は組織学的所見と一致するものであった。つまり、TGF- β は、コラーゲン産生を一過性に誘導する作用があり、CTGF は誘導する作用は少ないが、誘導されたコラーゲン産生を亢進させる作用があると考えられた。

COL1A2 の転写活性は、TGF- β 単独投与では 4 日目をピークに低下し、8 日目にはほぼ 0 となるのに対し、TGF- β /CTGF 連続投与では高値が維持された。さらに、連続投与の 8 日目では COL1A2 遺伝子を発現する線維芽細胞数の増加を認め、CTGF は線維芽細胞数の増加により COL1A2 の転写活性を維持し、コラーゲン産生を亢進させると考えられた。

以上より、TGF β が線維化を誘導し、CTGF が線維化を維持すると考えられたが、この線維化の機序をさらに検討するために浸潤細胞についての検討を行った。

これまで、肥満細胞やマクロファージが線維化組織で増加していることが報告されていること^{9,10} から、我々は組織染色によりこれらの細胞の検討を行った。TGF- β /CTGF 連続投与で、肥満細胞、マクロファージともに増加しており、CTGF による線維化の維持に関与していると考えられた。これらの細胞は様々なサイトカインやケモカインを放出することから、今後はこの皮膚線維化モデルにおいて、サイトカインやケモカインについてもさらに検討する必要があると思われた。

結論

以上、皮膚線維化モデルマウスにおける実験結果より、我々は図 7 に示す強皮症における二段階線維化仮説を考えた。TGF- β は線維化を誘導し CTGF の産生を刺激する。正常部では、CTGF や炎症細胞は消失し線維化も消失するが、強皮症の皮膚硬化部では、CTGF の産生が増加し、線維芽細胞の増加、コラーゲン産生の促進により線維化は維持され、その過程に肥満細胞やマクロファージが関与していると考えられた。

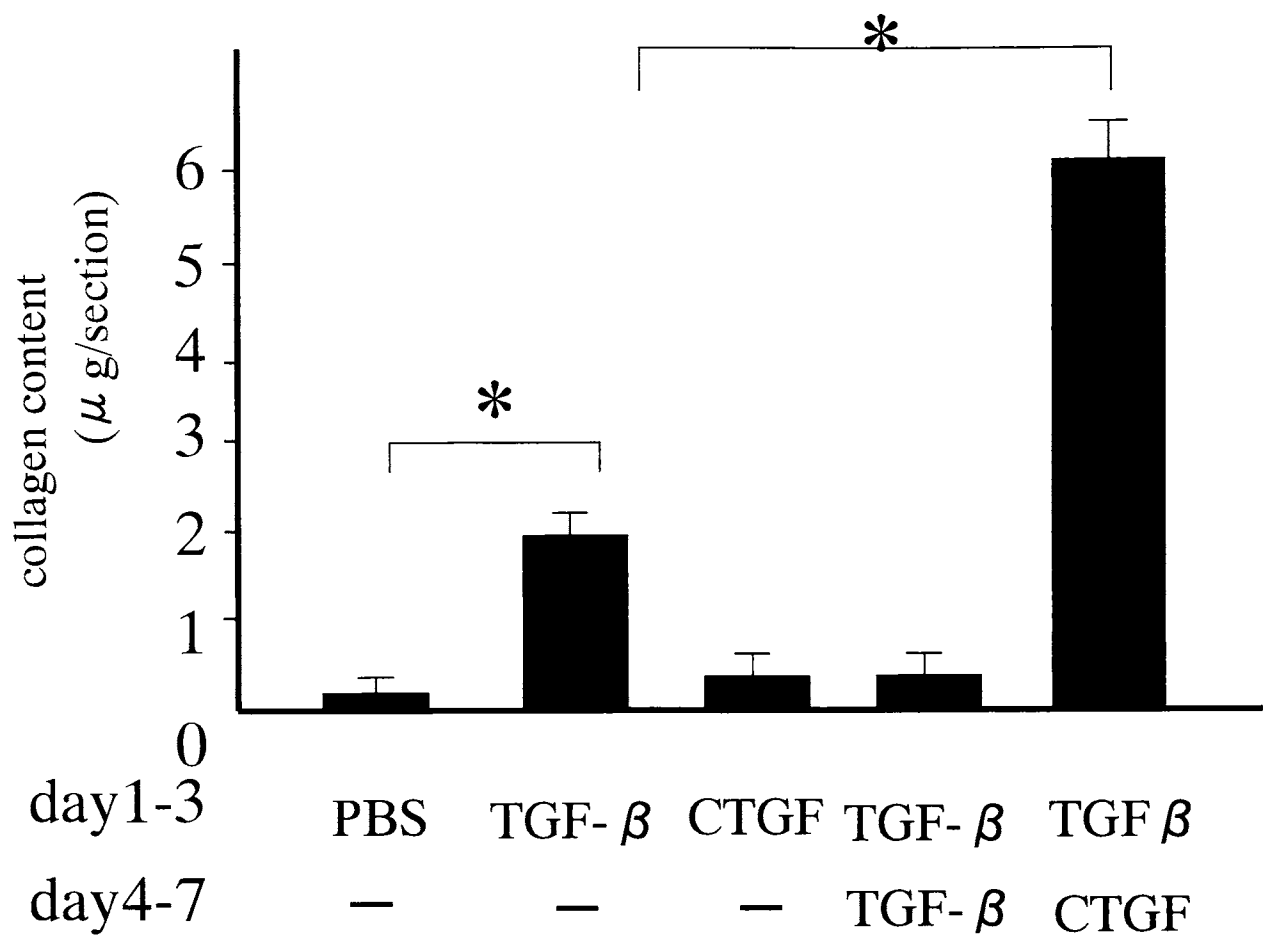
今後の課題

今回の研究により肥満細胞、マクロファージが CTGF による線維化の維持に関与していると考えられたが、これらの細胞は様々なサイトカインやケモカインを放出することから、今後はこの皮膚線維化モデルにおいて、サイトカインやケモカインについてもさらに検討する必要があると思われた。

文 献

1. Jimenez SA, Hitraya E, Varga J,: Pathogenesis of scleroderma. Collagen. Rheum Dis Clin North Am 22:647-74, 1996
2. LeRoy EC, Smith EA, Kahaleh MB, Trojanowska M, Silver RM: A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. Is transforming growth factor beta the answer? Arthritis Rheum 32:817-25, 1989
3. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR: Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. Mol Biol Cell 4:637-45, 1993
4. Takehara K: Growth regulation of skin fibroblasts. J Dermatol Sci 24 Suppl 1: S70-7, 2000
5. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, Takehara K: Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. J Invest Dermatol 105:280-4, 1995
6. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K: Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. J Rheumatol 27:149-54, 2000

7. Shinozaki M, Kawara S, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takehara K: Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by transforming growth factor beta—simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 240:292-7, 1997
8. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, et al: Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 181:153-9, 1999
9. Isikawa O, Ishikawa H: Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 19: 1202-6, 1992
10. Nishioka K, Kobayashi Y, katayama I, Takijiri C: Mast cell numbers in diffuse scleroderma. *Arch Dermatol* 123:205-8, 1987



* : $p < 0.001$

図1 TGF- β 、CTGF皮下注後のコラーゲン量の変化

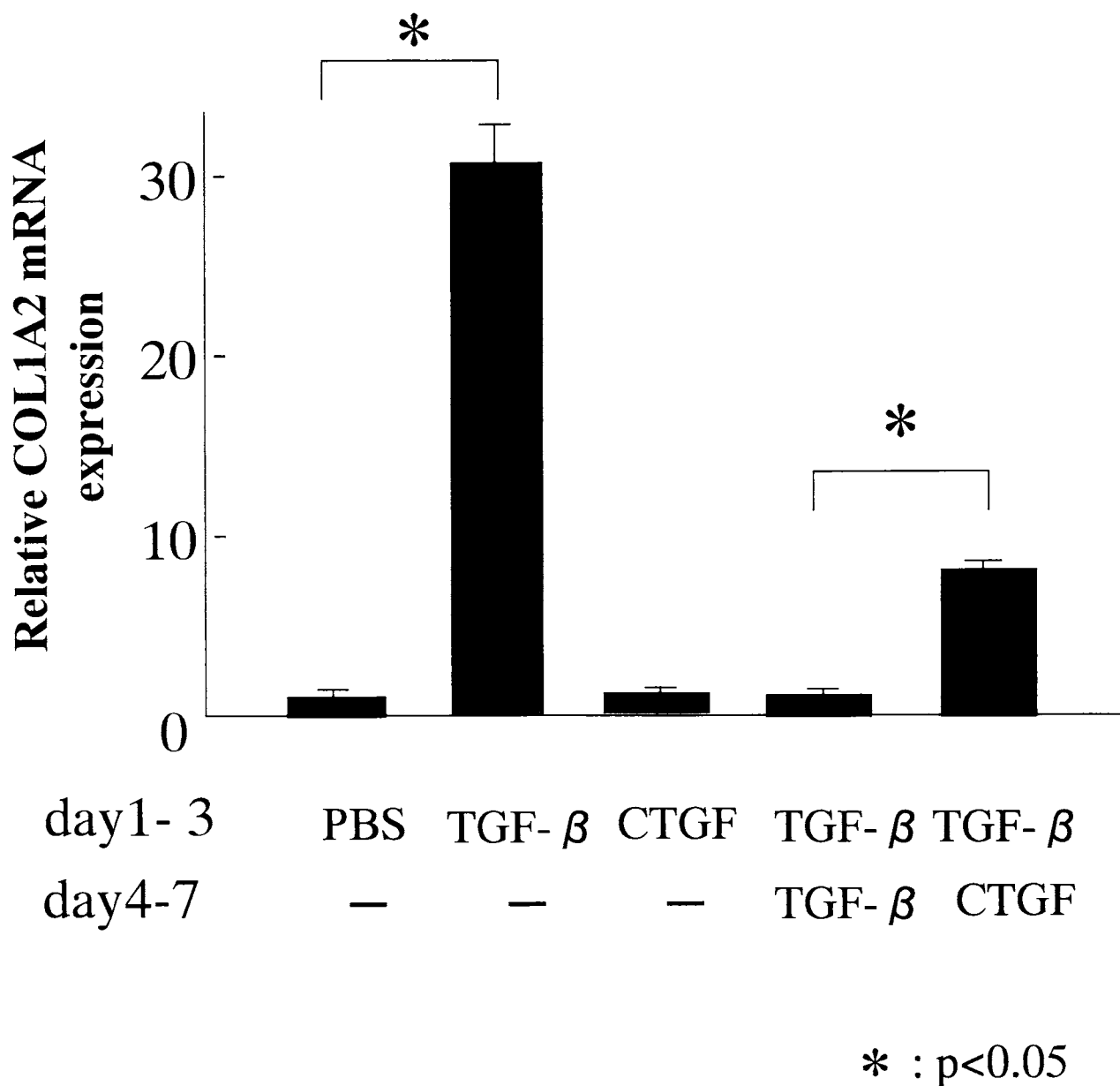


図2 TGF- β 、CTGF皮下注後のコラーゲンmRNA発現量

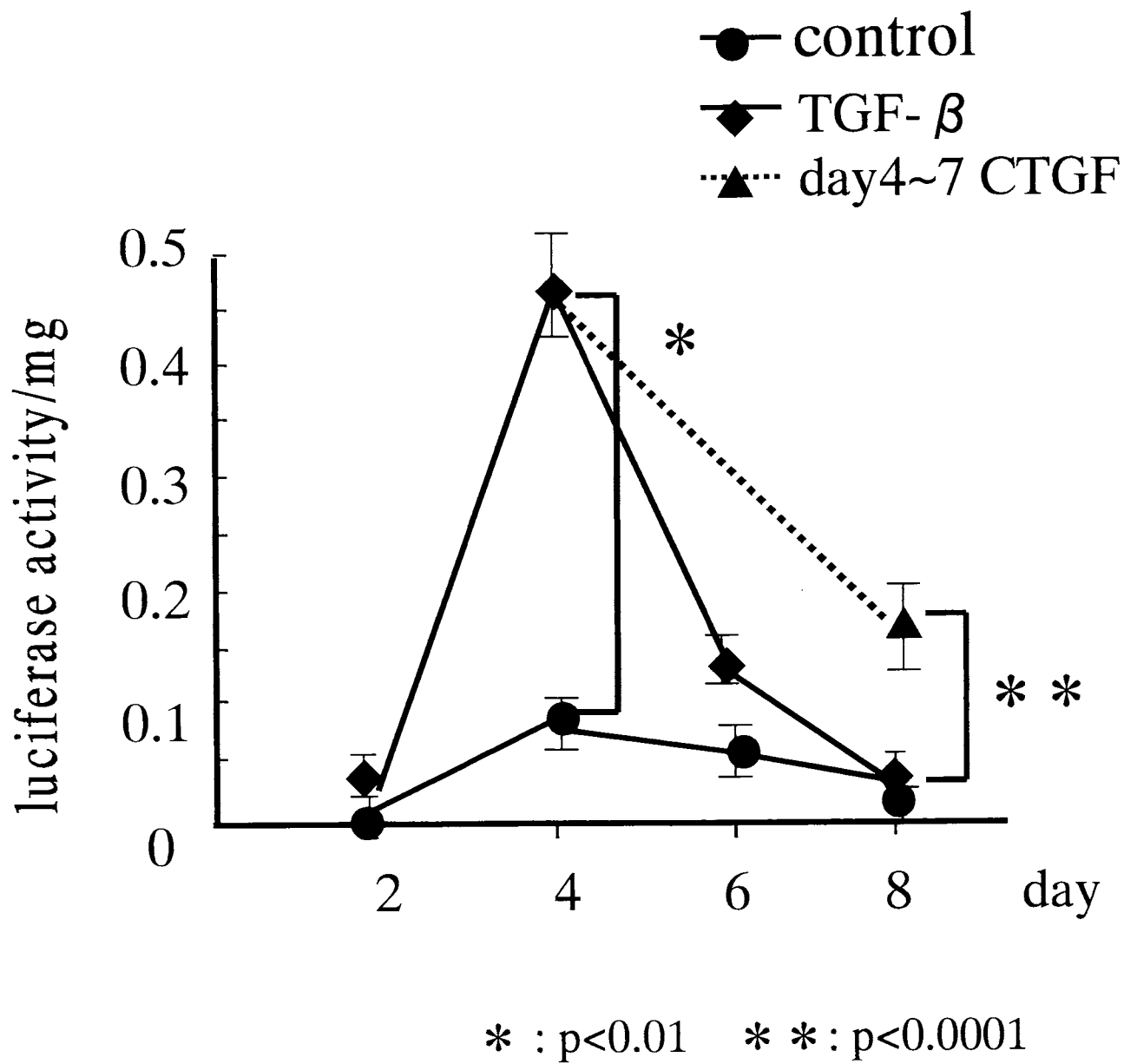


図3 TGF- β 、CTGF皮下注後のルシフェラーゼ活性の変動

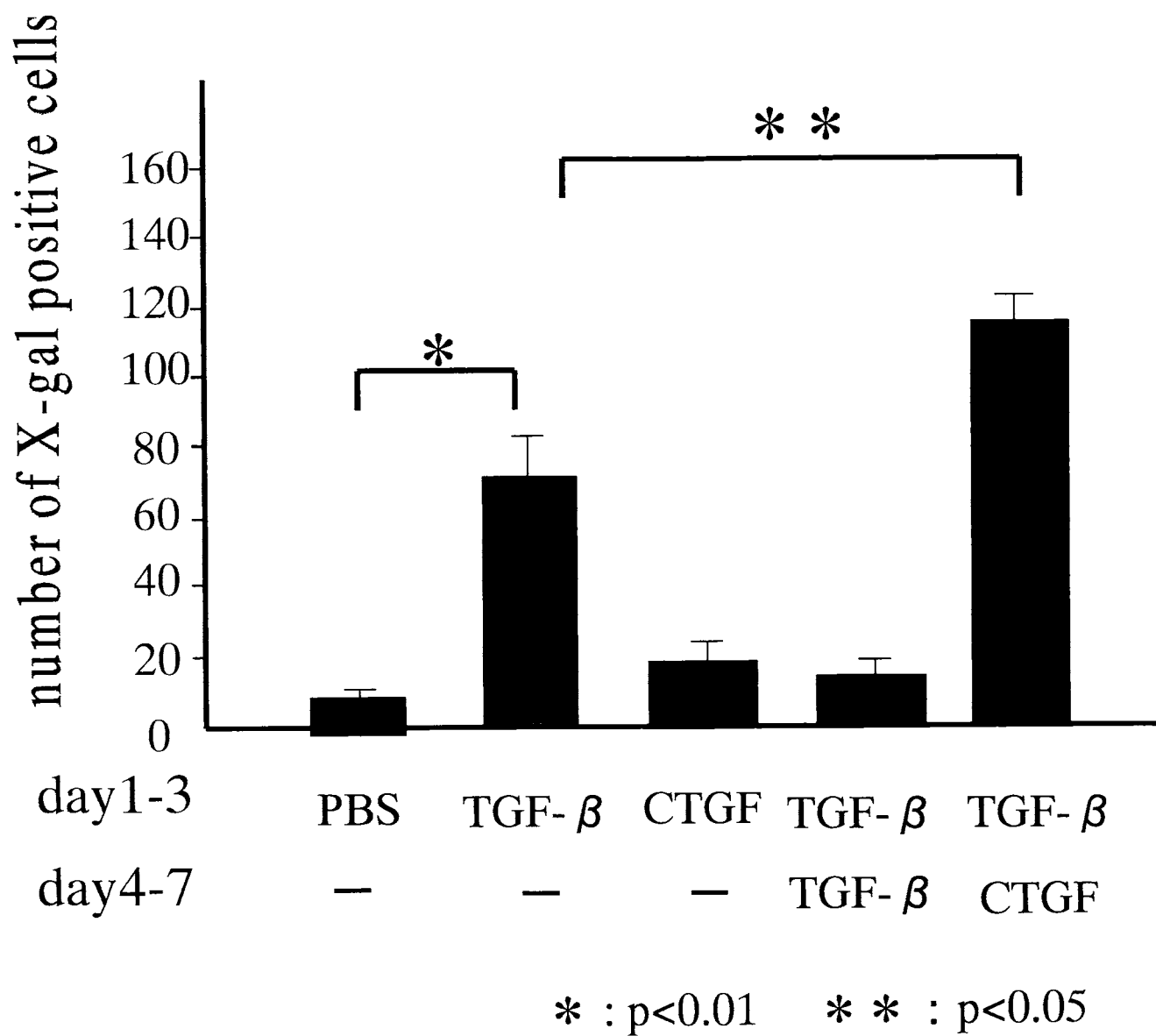


図4 TGF- β 、CTGF皮下注後のX-gal陽性線維芽細胞数

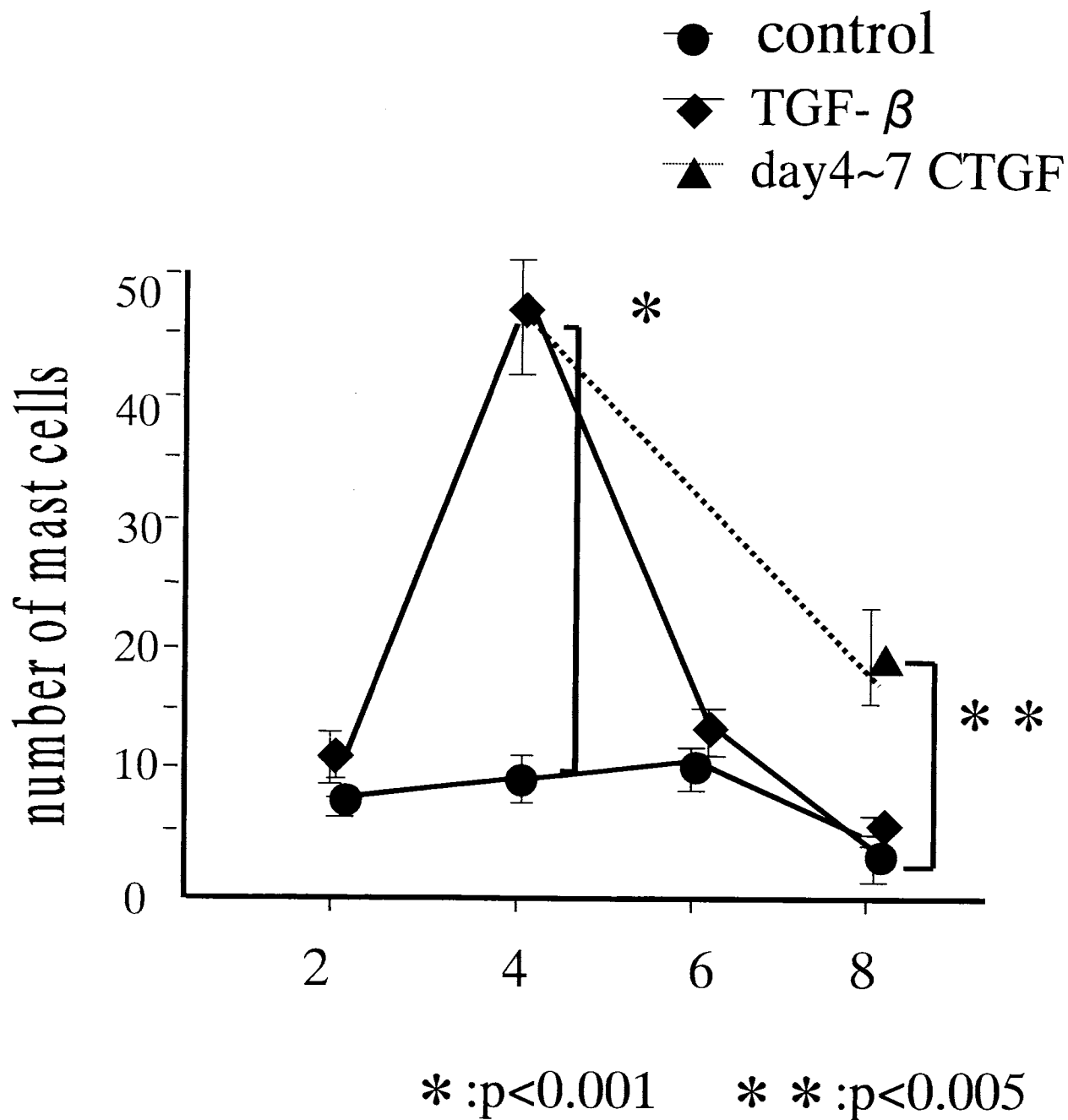


図5 TGF- β 、CTGF皮下注後の肥満細胞数の変動

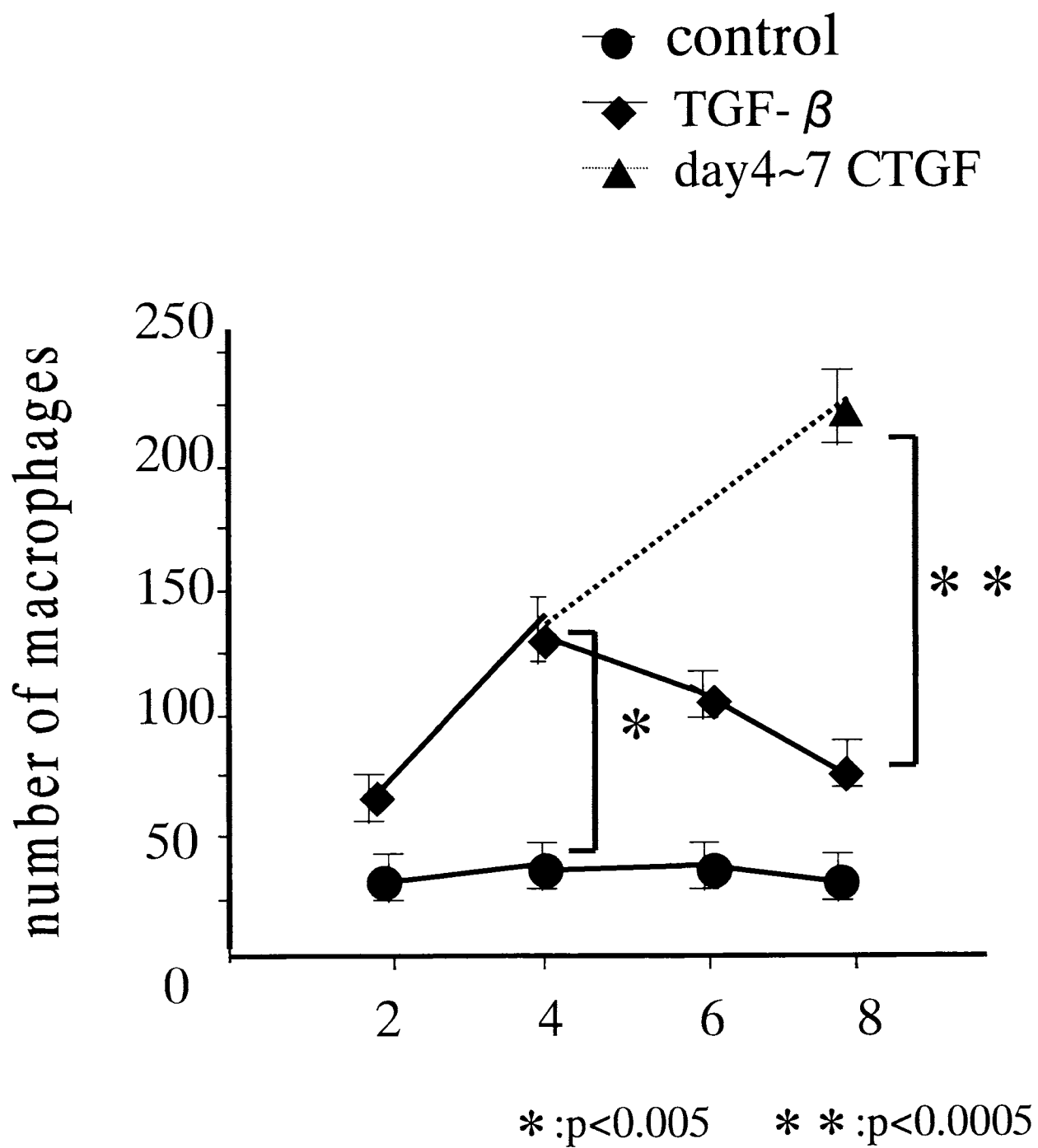


図6 TGF- β 、CTGF皮下注後のマクロファージ数の変動

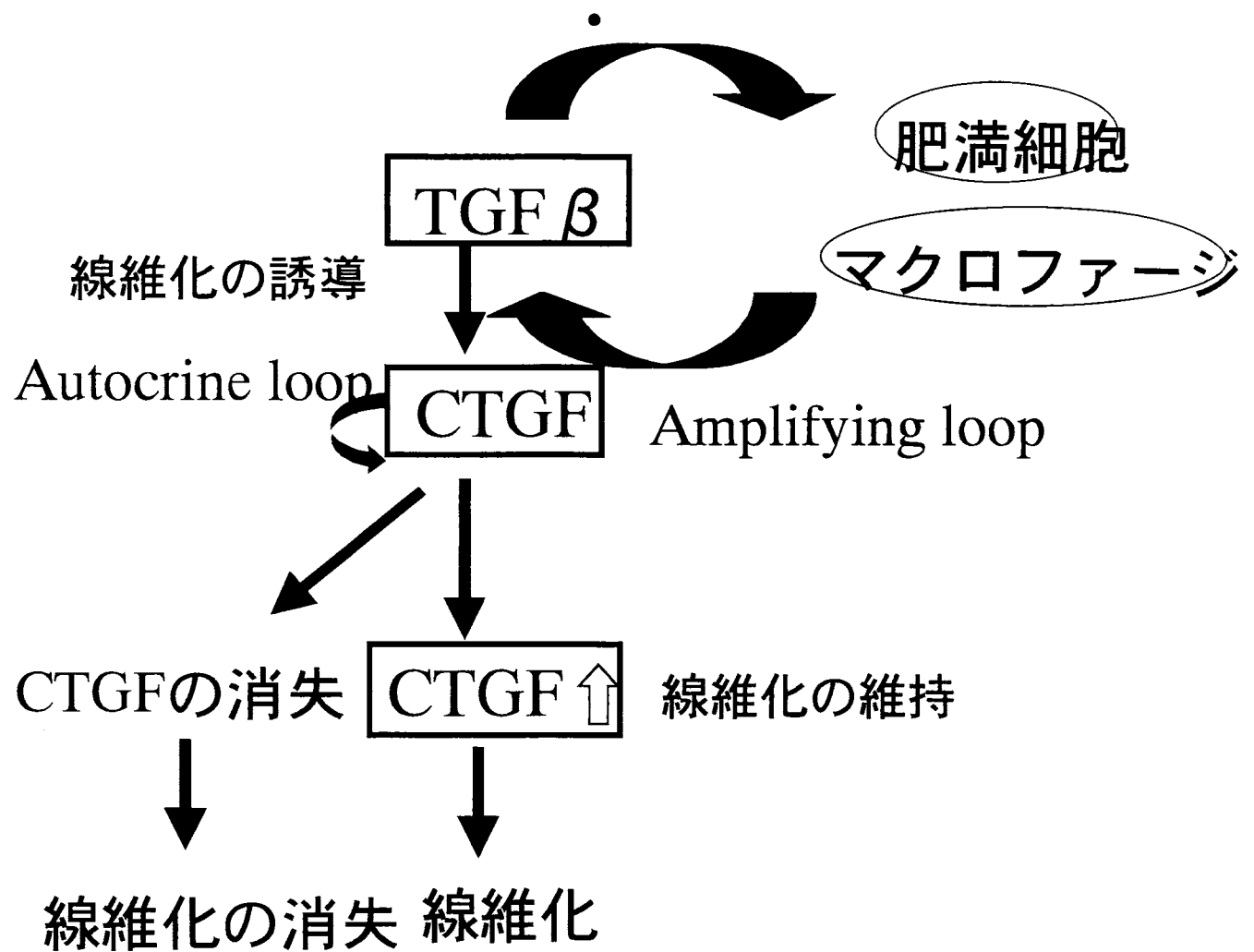


図7 皮膚線維化の機序（仮説）