

The investigation of the mechanisms of upregulated collagen production of cytokine-induced skin fibrosis 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/10.24517/00050697

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





サイトカイン誘導性皮膚線維化マウスモデルにおける

コラーゲン合成亢進機構の解明

(課題番号 16591093)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 18 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)

金沢大学附属図書館



0700-03200-2

【はしがき】

本研究においては、全身性強皮症の線維化に関与していると考えられている TGF- β 及び CTGF の線維芽細胞におけるコラーゲン合成促進作用に関して、c-Myc の発現との関連も含め、*in vitro* の系を用いて、両サイトカインの相互作用を研究した。

【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：藤本 学（金沢大学大学院医学系研究科助教授）

白崎文朗（金沢大学医学部附属病院講師）

【交付決定額（配分額）】

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2,200,000 円	0 円	2,200,000 円
平成 17 年度	1,300,000 円	0 円	1,300,000 円
総 計	3,500,000 円	0 円	3,500,000 円

【研究発表】

(1) 学会誌等

Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, Takigawa M, Takwhara K: Connective Tissue Growth Factor Causes Persistent Pro α 2(I) Collagen Gene Expression Induced by Transforming Growth Factor- β in a Mouse Fibrosis Model. *Journal Cellular Physiology*, 2005;203(2):447-456

(2) 口頭発表

Kondo M, Shirasaki F, Takehara K: Tissue Growth Factor Maintains Transforming Growth Factor-Beta-Induced Skin fibrosis by Stimulating α 2(I) Collagen(COL1a2) Expression. The 69th American college of Rheumatology, 2005. 11

(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

研究方法

1) COL1A2, c-Myc の mRNA レベルでの発現

TGF- β 5ng/ml、CTGF150ng/ml を正常人線維芽細胞に刺激し、24 時間後に RNA を抽出し、cDNA を合成した。ABI Prism 7000 Sequence Detector System (PE Applied biosystem Foster city, CA)を用いて real time PCR 法にて検討した。

2) Luciferase assay

Dual-LuciferaseReporter Assay System kit (Promega, Madison, WI) を用いて培養細胞を溶解し、上清 10ul に発光基質液 50ul 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。

3) Western blotting

SDS-PAGE での泳動後に PVDF 膜に転写。抗 c-Myc 抗体抗体で Western blotting を行った。

成 績

1) COL1A2 の発現と転写活性

皮膚線維芽細胞に TGF- β と CTGF を同時に刺激し 24 時間後の COL1A2 の発現を real time PCR で測定した。24 時間後に COL1A2 の mRNA レベルでの発現は TGF- β で 1.5 倍程度上昇しているが、CTGF を同時に刺激した場合には 2 倍程度に上昇した。また、NIH3T3 細胞にて COL1A2 の転写活性を luciferase assay にて検討した。ALK5TD (TGF- β type I receptor の恒常活性型)を強制発現したところ、COL1A2 の活性が 2.5 倍程度上昇し、さらに TGF- β で刺激したところ、3.5倍程度に上昇し ALK5TD のみよりも顕著であった。さらに、TGF- β と CTGF の両方の刺激では 5.5 倍程度と luciferase 活性がより顕著であった。(図 1)

2) COL1A2promoter に対する c-Myc の検討。

NIH3T3 細胞に ALK5TD を強制発現すると、COL1A2 の

活性は上昇するが **c-Myc** はその活性を抑制した。また、**TGF- β** でも濃度依存性に転写が活性化するが **c-Myc** を強制発現すると、**COL1A2** の活性が抑制された。よって、**c-Myc** は **COL1A2** のプロモーターに抑制的に作用することが示唆された。(図 2)

3) **c-Myc** の発現。

皮膚線維芽細胞に **TGF- β** と **CTGF** を刺激し3時間、24時間後の **c-Myc** の mRNA レベルでの発現を real time PCR を用いて検討した。3時間後には **TGF- β** 刺激、**TGF- β** ,**CTGF** 両者の刺激で **c-Myc** の発現は低下した。一方 24 時間後では **TGF- β** ,**CTGF** 両者の刺激でのみ **c-Myc** の継続的な発現低下がみられた (図 3)。さらに Western blotting にて蛋白レベルでの発現を確認したところ、24 時間後での **TGF- β** 、**CTGF** 両者の刺激でのみ **c-Myc** の発現が抑制されていた。(図 4)

考 察

これまで我々は、新生マウスに TGF- β を持続的に作用させると肉芽組織が形成され、さらに同部位に CTGF が発現していることから、CTGF が TGF- β による線維化に関与していると考え、様々な検討を行ってきた。その結果 TGF- β と CTGF の連続投与により COL1A2 の mRNA の発現量が上昇しさらにコラーゲンの量も上昇しているということが判明したが、詳細なメカニズムは不明であった。c-Myc は COL1A2 の転写の抑制に関与する可能性があることが以前より示されているが皮膚線維芽細胞における TGF- β との関連は不明であった。今回の検討では TGF- β での COL1A2 の上昇を c-Myc が抑制した。さらに TGF- β 刺激にて c-Myc が抑制されているが、CTGF ではより顕著に抑制されていた。以上より CTGF による線維化の維持には c-Myc が関与している可能性が示唆された。(図 5)

結 論

正常人線維芽細胞において COL1A2 の発現は TGF- β 単独より CTGF との同時刺激において有意に上昇し、c-Myc の発現は同時刺激により有意に継続的に減少した。また、c-Myc を強制発現すると、TGF- β による COL1A2 の promoter 活性を抑制した。COL1A2 の発現調節には c-Myc の抑制が関与している可能性が示唆された。

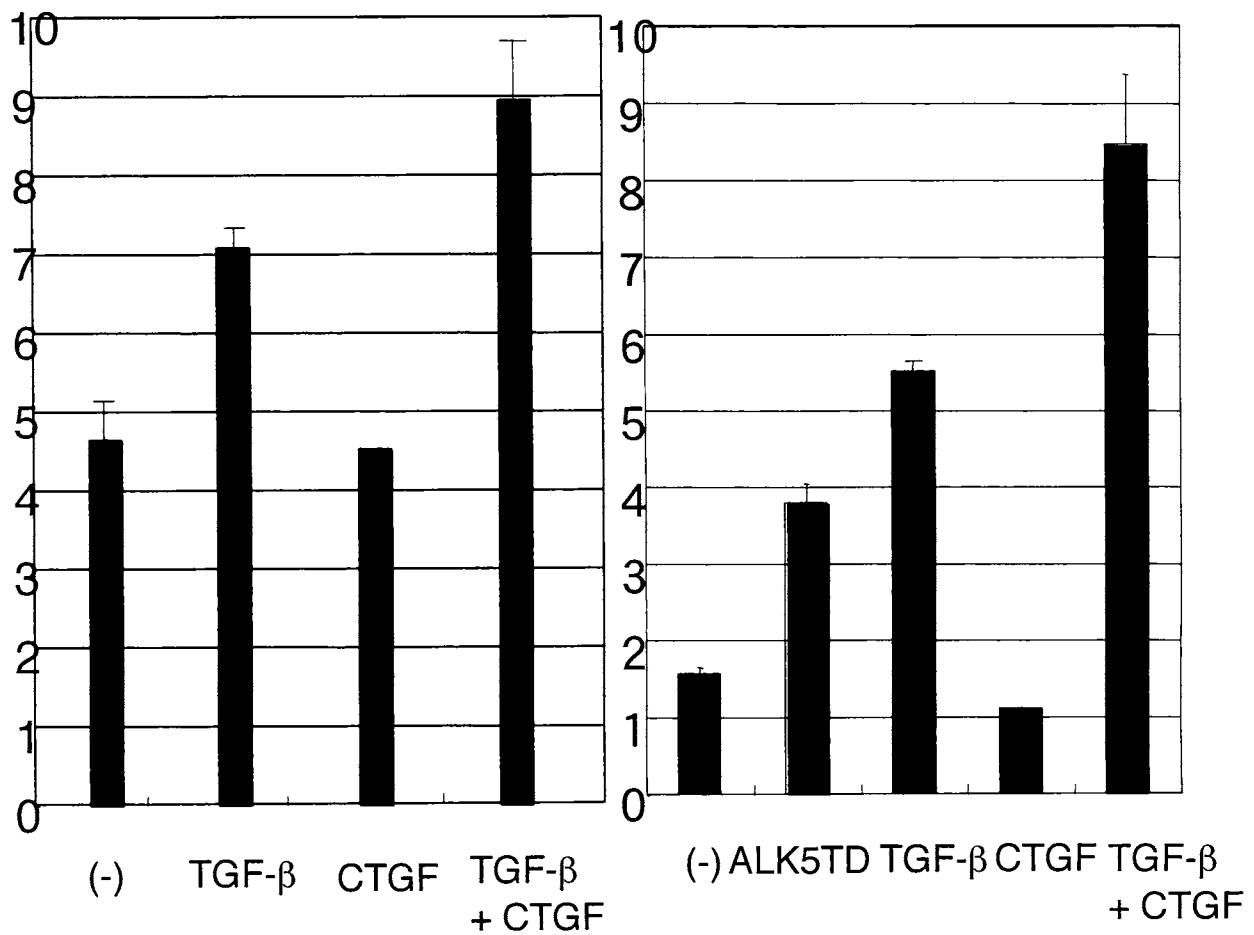
今後の課題

今回の研究により、CTGF による線維化の維持には c-Myc が関与している可能性が示唆されたが、これらは正常細胞を用いた実験であり、強皮症細胞では異なる反応を示す可能性も十分に考えられる。よって、今後は強皮症細胞と正常人線維芽細胞における比較を行う方針である。

文 献

1. 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* 1997;237(2):292-6.
2. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, 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* 1999;181(1):153-9.
3. Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, et al. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 2005;203(2):447-56.
4. Yang BS, Geddes TJ, Pogulis RJ, de Crombrughe B, Freytag SO. Transcriptional suppression of cellular gene expression by c-Myc. *Mol Cell Biol* 1991;11(4):2291-5.

図 1 TGF- β 、CTGF刺激におけるCOL1A2の mRNA発現とpromoter 活性



(a) COL1A2 mRNAの発現

(b) COL1A2 promoterの活性

図2 c-Mycを強制発現した場合のCOL1A2 promoter の活性

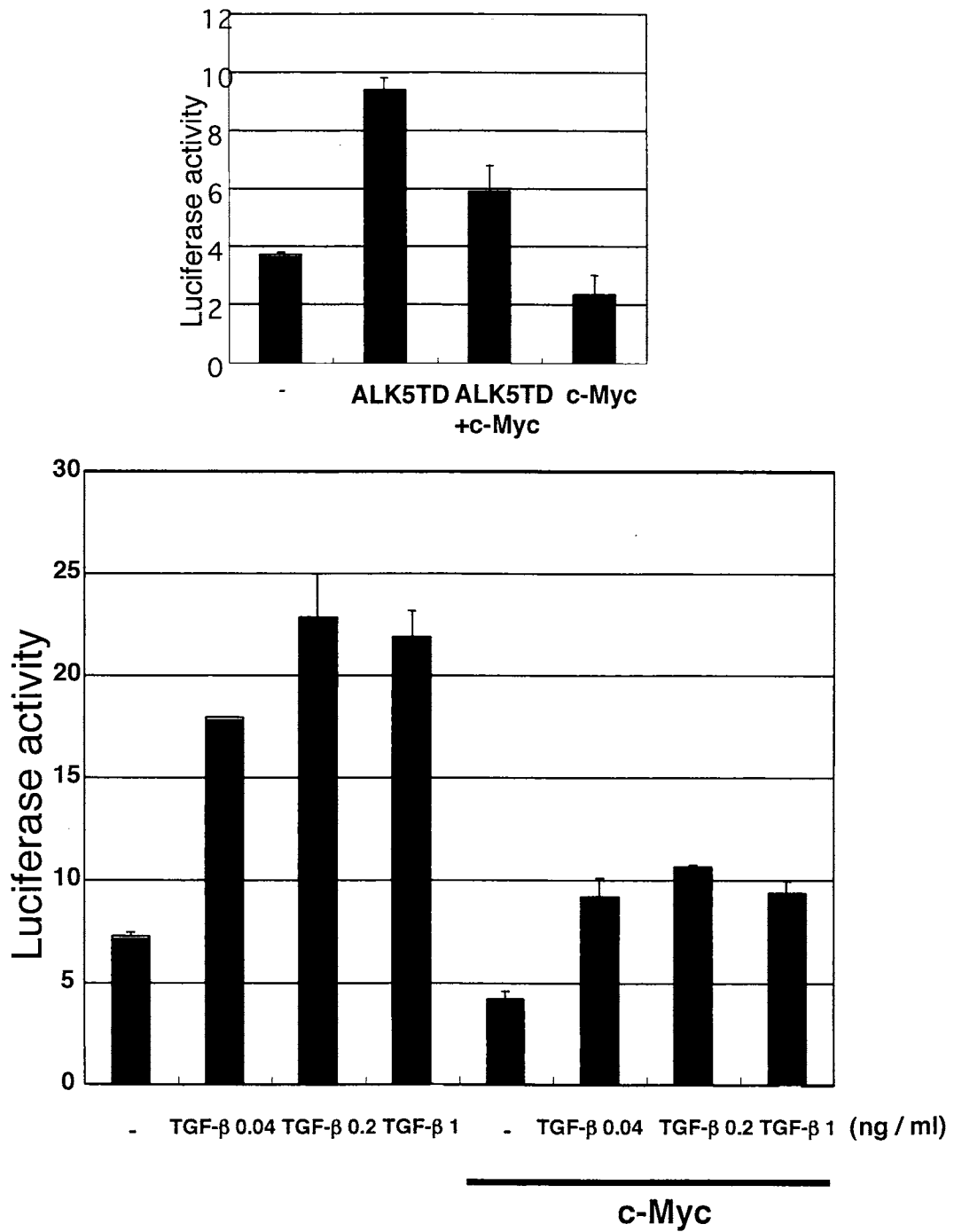


図3 正常線維芽細胞でのc-Myc の発現(mRNA)

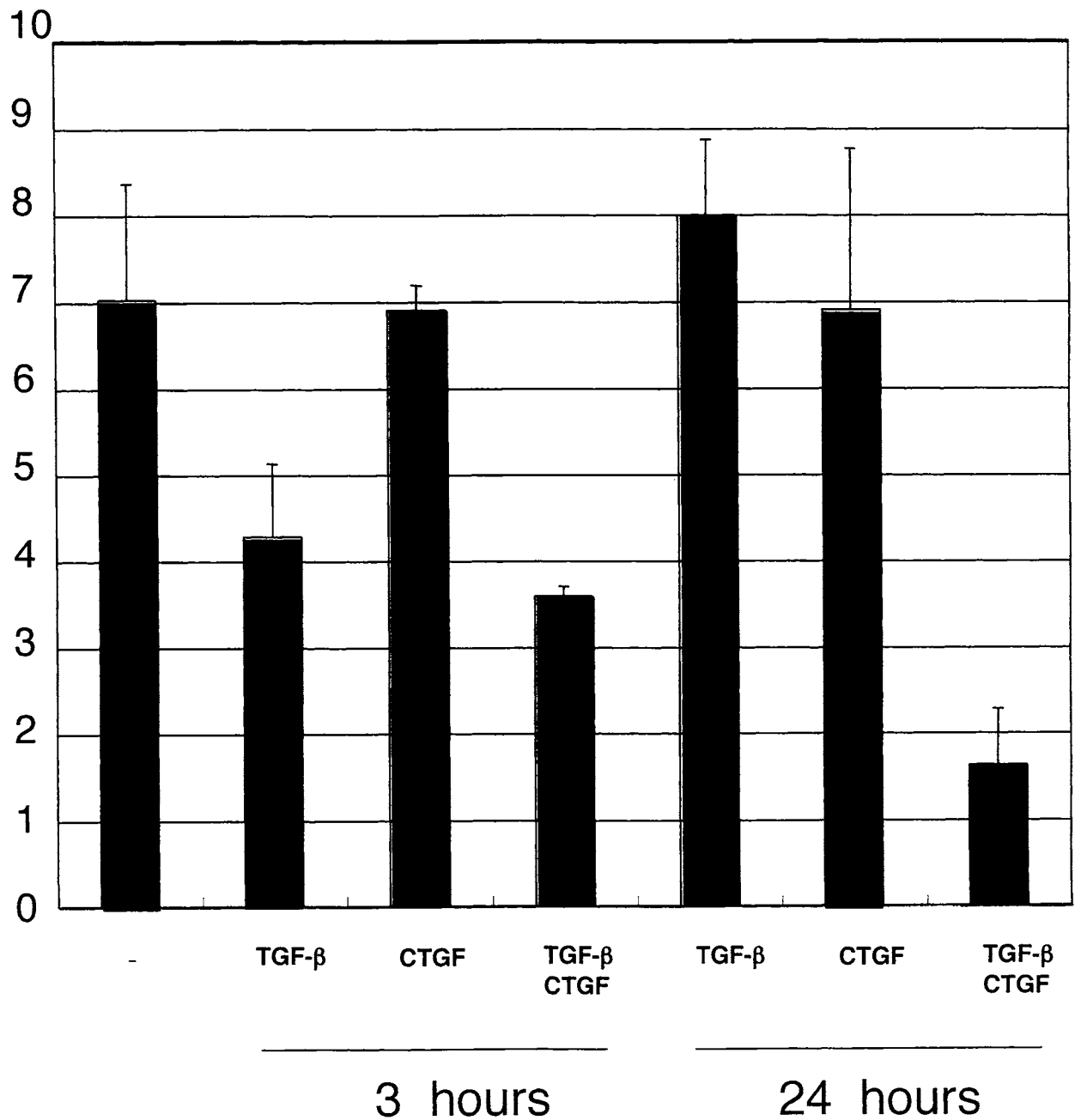


図 4 正常線維芽細胞でのc-Myc の発現
(Western blotting)

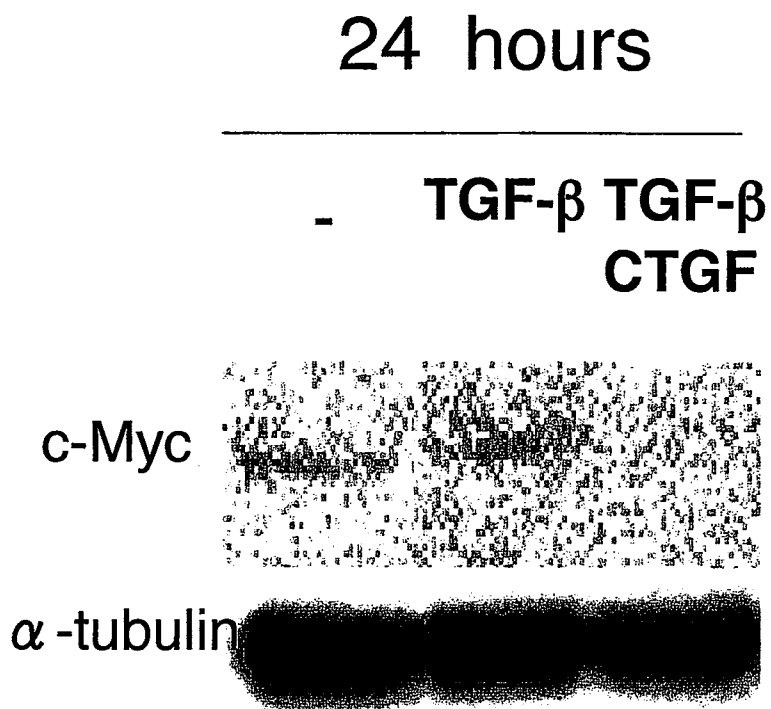


図5 c-MycとCOL1A2 promoterの関与

