

Rapamycin 添加による強皮症皮膚線維芽細胞の
Type I collagen 産生に対する影響について

玉城 善史郎

目次

1)	目的と背景	…P. 4
2)	対象及び方法	…P. 8
1.	試薬	…P. 8
2.	細胞培養	…P. 8
3.	Western blotting	…P. 9
4.	RNA 抽出及び Quantitative Real-Time RT-PCR	…P. 9
5.	mRNA stability 計測	…P. 10
6.	プラスミド	…P. 10
7.	DNA transfection 及び luciferase assay	…P. 10
8.	細胞生存率計測	…P. 11
9.	統計学的検討	…P. 11
3)	結果	
1.	Rapamycin 添加における正常皮膚線維芽細胞及び強皮症皮膚線維芽細胞の細胞生存率	…P. 12
2.	正常皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン蛋白量の変化	…P. 12
3.	TGF- β 刺激による正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白量の変化及び rapamycin 添加の影響	…P. 13
4.	強皮症皮膚線維芽細胞及び正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白量及び mRNA 発現量	…P. 14

5. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン蛋白質の 変化	…P. 15
6. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン mRNA 発現量の変化	…P. 16
7. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン mRNA stability の変化及び遺伝子転写活性の影響	…P. 17
8. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による MMP-1 蛋白質の変化	…P. 19
9. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による MMP-1 の mRNA 発現 量の変化	…P. 20
10. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による MMP-1 の遺伝子転写 活性への影響	…P. 21
11. 強皮症皮膚線維芽細胞における p70S6Kinase の TGF- β 刺激によるリン 酸化	…P. 22
12. Rapamycin 添加による TGF- β 刺激強皮症皮膚線維芽細胞の p70S6Kinase のリン酸化に対する影響	…P. 23
4) 考察	…P. 24
5) 参考文献	…P. 29
6) 図表	…P. 35
7) 謝辞	…P. 54

1) 目的と背景

全身性強皮症(systemic sclerosis: SSc) は、皮膚や肺などの内臓諸臓器の線維化を特徴とする疾患である (1)。本症は皮膚の線維化の範囲の広い diffuse cutaneous SSc (dcSSc) と皮膚の線維化が四肢末端に限局される limited cutaneous SSc (lcSSc)に分類され、一般に dcSSc は lcSSc に比較して内臓病変も高度で予後不良であるといわれている。皮膚の線維化を起こす機序としては、未だ不明であるが、自己免疫、微小血管障害、炎症、さらに皮膚の構成成分の一つであるコラーゲンという分子の代謝異常の関連も示唆されている。これらの異常が線維芽細胞とよばれる細胞に影響を与えることによって、細胞外基質とよばれる細胞間に存在する構成物質の過剰沈着が起こり、皮膚を含めた諸臓器の過剰な線維化が引き起こされていると推察されている。(2-5)

膠原線維の主成分はコラーゲンであり、コラーゲンは主にグリシンやプリン、ヒドロキシプリンというアミノ酸で組成される tropocollagen とよばれる分子が構成単位となり、それらが架橋された蛋白である。特に哺乳類においては I 型コラーゲンがその主成分と考えられている。I 型コラーゲンは $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の 2 種類のポリペプチド鎖で構成されており、 $\alpha 1$ 鎖 2 本と $\alpha 2$ 鎖 1 本の 3 本がらせん型を作りながら形成されている。I 型コラーゲンは細胞内でプロコラーゲンとして産生されたのちに、細胞外に分泌され、ペプチダーゼによる N,C 両末端のペプチドが切断され生成される。皮膚においては主として 皮膚線維芽細胞で作られていることが知られている。全身性強皮症の皮膚の線維化に関しては皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン過剰産生、分解能の低下が重要な役割を果たしていると考えられている。皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲンの合成亢進において

は、種々のサイトカインが関与していると考えられている。中でも TGF- β が中心的な役割を果たしていると考えられており、TGF- β 刺激により Smad 分子などのシグナル伝達を介してコラーゲンの遺伝子転写活性、蛋白産生の亢進が行われることが知られている。そのため、正常皮膚線維芽細胞に TGF- β 刺激を行うとコラーゲンを含めた細胞外基質の過剰産生がみられ、強皮症皮膚線維芽細胞が細胞外基質を過剰産生するのと類似の状態を示すといわれている(6)。また、皮膚の線維化の分解において、重要な働きを示す分子として matrix metalloproteinases (MMPs) がある。MMPs は現在 20 種類以上知られており、その中において、主に I 型コラーゲンと III 型コラーゲンを分解する働きをもコラーゲナーゼ群とよばれる群が存在し、その中の有名な酵素の一つとして MMP-1 があげられる。MMP-1 は細胞外に分泌されて活性化し、I 型コラーゲンなどの細胞外基質を分解することで、皮膚の線維化を抑制している (7)。TGF- β などによる線維化の亢進と MMPs などによる線維化の抑制がバランスよく働くことで皮膚の線維化が調節されていると考えられている。

全身性強皮症の皮膚の線維化の治療に関しては、以前 D-ペニシラミンの内服療法がおこなわれてきたが、1990 年代の大規模な無作為二重盲検試験においてその有用性が否定された (8)。現在では副腎皮質ステロイド内服療法が一般的であり、概ね良好な効果がみられている。しかしながら、副腎皮質ステロイドが無効、あるいは効果不十分な例もみられ、また、種々の副作用から使用困難な例もみられる。そのため、現在その他の様々な治療法の検討がなされている。その一つとしてガンマグロブリン大量静注療法が良好な結果を示しており (9)、今後の治療法として期待が持たれているが、薬剤が非常に高価であることや、未知の感染症のリスクを伴うことが指摘されている。さらに近年免疫抑制剤による皮膚の線維化抑制効果についても注目がなされており、シクロスポリ

ン A や FK506 が線維化抑制に有用であったとの報告も見られている (10-13)。

強皮症患者の皮膚の線維化の原因の一つに免疫異常が考えられているが、Asano らは、免疫異常、炎症、血管傷害などの細胞の周囲環境の影響を受けない培養細胞である強皮症皮膚培養線維芽細胞においても FK506 が I 型コラーゲンの産生を低下させると報告しており (10)、FK506 の皮膚の線維化を抑制するメカニズムとして、免疫を抑制する以外の作用も存在すると考えられている。FK506 やシクロスポリン A という免疫抑制剤において実際に全身性強皮症患者の皮膚の線維化の抑制に有効であったとする報告もあるが、副作用として腎障害が高頻度にみられており (12,14)、頻度は低いながらも強皮症患者においては強皮症腎という腎障害をおこす危険性も考慮する必要がある。

Rapamycin は 1975 年に *Streptomyces hygroscopicus* という放線菌から産生される有機化合物 (分子量 914.2 (C₅₁H₇₉NP₁₃) 図 1) として発見され (15)、マクロライド系の抗生物質のひとつとして知られている。Rapamycin は臓器移植の際などに用いられる免疫抑制剤として知られる FK506 (tacrolims) と類似の構造を有しており、細胞内で FK 506 binding protein12 (FKBP12) と複合体を形成する。その後、mTOR (mammalian target of rapamycin) とよばれる蛋白に結合することで、mTOR のシグナルを抑制することが知られている (16-19)。

mTOR は、分子量 290KD の巨大なセリン・スレオニンキナーゼである。p70S6kinase をリン酸化することで蛋白合成に関わる S6 蛋白のリン酸化を促進し、また eIF4E(eukaryotic translation initiation factor 4E)、4EBPS (eIF4E binding protein) などの分子を活性化することで I 型コラーゲンなども含めた蛋白合成や細胞の増殖や成長を制御していると考えられている。(20-22 (図 2))

Rapamycin は mTOR の経路を阻害することで、蛋白の合成を抑制すること

が知られている(18)。Rapamycin は T 細胞の活性化やクローン性増殖を阻害すること、あるいは B 細胞からプラズマ細胞への分化を阻害し、抗体産生を抑制することにより免疫抑制作用を示すといわれている (23)。また、rapamycin は細胞周期の G1 期から S 期への移行を阻害するため、細胞増殖抑制効果を持つことから抗癌剤としての作用が注目されている (24, 25)。さらに、近年、その線維化抑制作用においても注目されており、マウス由来の腎メサンギウム培養細胞における細胞外基質の過剰な沈着の抑制 (26)、ラットモデルでの肝硬変に対する線維化抑制などの報告 (27)、ヒト培養肺線維芽細胞においてコラーゲンの産生抑制や 4EBPS の経路を介して MMP-1 の産生亢進による線維化抑制作用を示す (28) との報告が見られている。Rapamycin は FK506 やシクロスポリン A などの免疫抑制剤に比較して腎毒性が非常に低いという特徴をもち、海外で既に移植後の免疫抑制剤として活用されており、今後、強皮症患者の皮膚の線維化に対しても有効な薬剤として期待できる薬剤である。

今回、我々は rapamycin のこのような線維化抑制作用について、特に I 型コラーゲンの産生、分解に対する作用やそのメカニズムに関して検討した。

2) 対象及び方法

試薬

Rapamycinは、Calbiochem社 (La Jolla, CA) より購入した。Recombinant human TGF- β 1はR&D systems社 (Minneapolis, MN) より購入した。Actinomycin D及び抗 β -actin抗体はSigma社 (St. Louis, MO) より購入した。Luciferase assay kit、 β -Galactosidase Enzyme Assay kitはPromega社 (Madison, WI) より購入した。免疫ブロッティングに用いた抗 α 2(I)collagen抗体 (抗 α 2(I)procollagenを特異的に認識する抗体であるが、一部抗 α 1(I)procollagenも認識する抗体であり、以下抗I型コラーゲン抗体と略す) はSouthern Biotechnology Associates社 (Birmingham, AL) より購入した。抗MMP-1抗体はChemicon社 (San Francisco, CA) より購入した。抗phospho-p70S6kinase抗体、抗p70S6kinase抗体はCell Signaling社 (Danvers, MA) より購入した。FuGENE™ 6はRoche Diagnostics社 (Indianapolis, IN) より購入した。Quantitative Real-Time RT-PCRに用いたI型コラーゲン (α 2) 遺伝子プライマー、MMP-1遺伝子プライマーはApplied Biosystems社 (Foster City, CA) より購入した。

細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞は、発症2年以内でdcSScに分類される全身性强皮症患者の皮膚硬化を伴う前腕伸側より得た(29)。正常皮膚線維芽細胞は、健常人の前腕伸側より得た。これらの検体の採取は東京大学医学部倫理委員会の規定

に基づき被験者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 濃度の L-グルタミンと 50 μ g/ml ゲンタマイシン MEM、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%air にて継代した。培養線維芽細胞は継代 3 代目から 8 代目の細胞を用いた。

Western blotting

皮膚線維芽細胞を4 $^{\circ}$ Cのphosphate buffered saline(PBS)で洗浄し、1% Triton X-100 in 50 mM, Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1mM CaCl₂, 10 μ g/ml leupeptin, pepstatin, aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)よりなるlysis bufferにて溶解した。不溶分画は20,000G、15分遠心にて除去した。蛋白濃度測定試薬 (Bio-Rad社, Hercules, CA)を用いて補正を行ったうえで、細胞溶解液あるいは培養液を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 (ICN/CAPPEL社, Aurora, OH) と結合した二次抗体と反応後、enhanced chemiluminescenceで発光し、X-Rayフィルム(Amersham Biosciences社, Piscataway, NJ)に感光させた。その後、個々に得られたバンドの濃度をscanning densitometry (NIH-Image ver 6.0) で定量化した。(30)。

RNA抽出及びQuantitative Real-Time RT-PCR

Total RNAはQIAGEN社 (Valencia, CA) のQIA shredder及びRNeasy protect mini kitにて抽出した。

Invitogen社(Carlsbad, CA)のsuperscript III first standard synthesis system for RT-PCRを用いて1 µgのtotal RNAを逆転写した後に、PRISM 7000 Sequence detection system(Applied Biosystems)にてQuantitative Real-Time RT-PCRを施行した。

mRNA stability

subconfluentまで培養した細胞に転写阻害薬であるactinomycin D (1µg/ml) 添加後、1時間後にrapamycinを添加した。rapamycin添加後0時間、3時間、6時間、12時間、24時間後に抽出したtotal RNAを逆転写し、Quantitative Real-Time RT-PCR法を用いてI型コラーゲンあるいはMMP-1のmRNA stabilityを計測した。

プラスミド

-773COL1A2-Luxコンストラクトは過去の報告(31)を参考に全長3500bpのヒトα2(I)collagen遺伝子プロモーターの-773bpから+58bp領域に luciferase reporter 遺伝子を結合させて作成した。全長4372bpのMMP-1-LuxコンストラクトはMMP-1遺伝子プロモーターにluciferase reporter 遺伝子を結合させて作成されたものでDr Constance E. より供与をうけた(32)。プラスミドはCsClを用いて超遠心法(room temperature, 100,000rpm, 4h)にて2回精製を施行したものをを用いた。

DNA transfection及びluciferase assay

皮膚線維芽細胞を直径100mm dishに約1 x10⁵個播種し、48時間後に

FuGENE™ 6を用いて、-773COL1A2-Luxコンストラクト2 μ gあるいはMMP-1-Lux コンストラクト2 μ gをtransfectionした。その際に、内在性コントロールとして、pSV- β -Galactosidase Control Vector (Promega社) 1 μ gもtransfectionした。細胞はsubconfluentまで培養し、serum freeにて24時間後にrapamycinを添加した。その後、reporter lysis buffer (Promega社) にて溶解した。不溶分画は20000G、2分間の遠心にて除去した。luciferase活性をLuminescencer-PSN AB-2200 (ATTO社, Tokyo, Japan) を用いて測定し、 β ガラクトシダーゼ活性で補正した (30)。

細胞生存率計測

正常及び強皮症皮膚線維芽細胞を 4 well の chamber slide を用いて subconfluent になるまで培養したあと、各々 0、0.01、0.1、1.0、10nM の濃度の rapamycin を添加し、24、48、72 時間後の細胞に対して Trypan blue 染色を用いて顕微鏡下で 2 視野 (約 400 細胞) において生存率を測定した。

統計学的検討

データは平均値 \pm SEMを用いて表した。平均値の比較にはMann-Whitney U testを用いた。危険率 $p < 0.05$ のものを有意とした。

3) 結果

1. Rapamycin 添加における正常皮膚線維芽細胞及び強皮症皮膚線維芽細胞の細胞生存率

はじめに、rapamycin の皮膚線維芽細胞に対する細胞毒性について検討した。0nM、0.01nM、0.1nM、1.0nM、10nM の rapamycin を正常(図 3A)及び強皮症皮膚線維芽細胞 (図 3B) に添加して、各々の 24 時間、48 時間、72 時間後の細胞の生存率を Trypan blue 染色を用いて測定した。正常及び強皮症皮膚線維芽細胞において、10nM までの rapamycin 濃度存在下において、72 時間までの生存率に有意差はみられなかった。強皮症皮膚線維芽細胞において 0~10nM の範囲の rapamycin 添加では細胞毒性は見られないことが示され、以降の実験はこの範囲の濃度で行った。

2. 正常皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン蛋白量の変化

皮膚線維芽細胞において、rapamycin 添加により、I 型コラーゲン蛋白量がどのように変化するかを検討するために、正常皮膚線維芽細胞を用いて実験を行った。正常皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養したし、24 時間 serum free にした後、図に示した濃度の rapamycin を添

加し、72 時間後に抽出した蛋白を 10%SDS ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後に、抗 I 型コラーゲン抗体、抗 β -actin 抗体と反応させた (図 4A)。正常皮膚線維芽細胞において、rapamycin 添加により、I 型コラーゲンの蛋白の発現量は低下した。Rapamycin 濃度が 0.1nM より有意な低下が見られ (64%)、1.0nM (62%)、10nM(54%)と I 型コラーゲンの蛋白の発現量の濃度依存的な低下がみられた(図 4B)。

3. TGF- β 刺激による正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白量の変化及び rapamycin 添加による TGF- β 刺激正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白量の変化

皮膚線維芽細胞に対して TGF- β 刺激を行うとコラーゲンの遺伝子転写活性、蛋白産生の亢進が行われることが知られている。そのため、正常皮膚線維芽細胞に TGF- β 刺激を行うとコラーゲンを含めた細胞外基質の過剰産生がみられ、強皮症皮膚線維芽細胞が細胞外基質を過剰産生するのと類似の状態を示すといわれている。今回用いた正常皮膚線維芽細胞において、TGF- β 刺激を行うことで、実際に I 型コラーゲンの蛋白量の亢進が認められるか、また、TGF- β 刺激をした正常線維芽細胞に rapamycin を添加することで I 型コラーゲンの蛋白量にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

正常皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養し、24 時間 serum free にした後、無刺激あるいは 2ng/ml の TGF- β 刺激に加えて 0nM,0.1nM,1.0nM,10nM の濃度の rapamycin を各々添加した後、72

時間後に蛋白を抽出し、western blotting 法にて比較検討した(図 5A)。正常皮膚線維芽細胞において、TGF- β 刺激により I 型コラーゲンの蛋白量が有意に亢進した (6.02 倍)。また、TGF- β 刺激により亢進した I 型コラーゲンの蛋白の発現も rapamycin 添加により rapamycin 添加 1.0nM にて 70%、10nM にて 68%と濃度依存的に有意に抑制がみられた。(図 5B)。

4. 強皮症皮膚線維芽細胞及び正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白量及び mRNA 発現量

強皮症皮膚線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞に比較して I 型コラーゲンの蛋白量、mRNA 発現量の亢進がみられていることが知られている。今回用いた強皮症皮膚線維芽細胞が正常皮膚線維芽細胞に対して実際に I 型コラーゲンの蛋白量、mRNA 発現量の亢進がみられるかどうか検討した。

はじめに、各々の細胞を subconfluent まで培養し、24 時間 serum free とした後、72 時間後に蛋白を抽出、western blotting 法にて検討した。強皮症皮膚線維芽細胞 4 検体、正常皮膚線維芽細胞 3 検体について (図 6A) 測定を行った。その結果、強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞と比較して、I 型コラーゲンの発現量は蛋白レベルで 2.0 倍と有意に亢進していた (図 6B)。また、同様の条件で培養した正常及び強皮症皮膚線維芽細胞から mRNA を抽出し、逆転写した後に Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の mRNA 発現量を測定した。

強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞と比較して、I型コラーゲンの発現量は mRNA レベルで 2.3 倍と有意に亢進していた (図 6C)。

5. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン蛋白量の変化

正常皮膚線維芽細胞に対して TGF- β 刺激を行うと、I 型コラーゲンの蛋白産生の亢進が行われ、それに対して rapamycin を添加することで I 型コラーゲンの産生を抑制することが示された。強皮症皮膚線維芽細胞においても rapamycin を添加することで I 型コラーゲンの蛋白量が低下するかどうかについて検討した。強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン蛋白量の変化を、1) rapamycin の濃度による変化、2) 経時的変化について検討した。

1) rapamycin の濃度による変化

強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養し、24 時間 serum free 後、rapamycin を 0nM, 0.1nM, 1.0nM, 10nM の濃度において添加し、cell lysate 及び supernatant を western blotting 法を用いて検討した (図 7A)。Rapamycin 添加にて 72 時間後の強皮症皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲンの蛋白発現量は有意に低下していた。Rapamycin 添加にて有意に蛋白量が低下しており、supernatant にて 1.0nM にて 69%、10nM にて 56%にまで低下しており、cell lysate にて 0.1nM にて 65%、1.0nM にて 57%にまで低下していた (図 7B)。

2) 経時的変化

同様に培養、処理した強皮症皮膚線維芽細胞に rapamycin を 1.0nM 添加後、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間に採取し、cell lysate を用いて、western blotting 法を用いて検討した (図 7C)。また、rapamycin 1.0nM 添加後、24 時間後より I 型コラーゲンの蛋白発現量の有意な低下がみられ (81%)、48 時間後に 63%、72 時間後 60% にまで低下していた (図 7D)。

6. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン mRNA の変化

強皮症皮膚線維芽細胞に rapamycin を添加することで cell lysate 中の I 型コラーゲンの蛋白量が低下することが示された。cell lysate 中の I 型コラーゲンの蛋白量の低下の原因としては、mRNA 発現量の低下と翻訳合成の低下、阻害などが考えられる。そのため、まずは強皮症皮膚線維芽細胞に rapamycin を添加することで I 型コラーゲンの mRNA の発現量が低下するかどうか検討した。強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン mRNA 発現量を、1) rapamycin の濃度による変化、2) 経時的変化 について検討した。

1) rapamycin の濃度による変化

強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養し、24 時間 serum free にした後、rapamycin を 0nM, 0.01nM, 0.1nM, 1.0nM, 10nM の濃度において添加し、48 時間後に mRNA を抽出、逆転写した後に Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の mRNA 発現量を測

定した。その結果、rapamycin 添加にて強皮症皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲンの mRNA 発現量は有意に低下していた (図 8A)。

2) 経時的变化

同様に強皮症皮膚線維芽細胞を同様に培養した後、rapamycin を 1.0nM 添加し、0 時間、12 時間、24 時間、48 時間後に採取して Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の mRNA 発現量を測定した。rapamycin 添加にて 0.01nM より有意に mRNA 発現量が低下しており (60%)、rapamycin 0.1nM にて 67%、1.0nM で 55%までの低下がみられた。また、rapamycin 1.0nM 添加後、24 時間より I 型コラーゲンの mRNA 発現量の有意な低下がみられ(74%)、48 時間後に 65%にまで低下していた (図 8B)。

7. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲ

ン mRNA stability への影響及び遺伝子転写活性の影響

強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲンの mRNA 発現量の低下の要因として I 型コラーゲンの遺伝子転写活性の低下あるいは転写後の mRNA stability の低下、もしくはその両方が関与することなどが考えられる。そのため、強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲンの mRNA 発現量の低下の要因について検討するために、強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲンの遺伝子転写活性及び mRNA stability について検討した。

まず、強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲンの遺伝子転写活性を測定するために、強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養し、I 型コラーゲンの遺伝子転写活性を測定する際に用いられる I 型コラーゲン遺伝子プロモーターに luciferase 遺伝子を結合した -773COL1A2-Lux コンストラクト及び内在性コントロールとして β -ガラクトシダーゼベクターをトランスフェクションした。24 時間 serum free にした後、rapamycin を各々 0nM、0.1nM、1.0nM、10nM 添加し 24 時間後、48 時間後に、luciferase 活性を測定した。強皮症皮膚線維芽細胞において、rapamycin 存在下におけるヒト I 型コラーゲン遺伝子転写活性は 24 時間後 (図 9A)、48 時間後(図 9B)でも有意な変化はみられなかった。

mRNA は転写後に時間経過とともに徐々に分解されていくため、安定性 (mRNA stability) を保つために修飾をうける。内的、あるいは薬剤を含めた外的刺激により、この修飾部分あるいは mRNA への直接の影響が加わることでその安定性が変化することが知られている。そのため、rapamycin が強皮症皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲンの mRNA stability に影響を与えるかどうか検討した。一般的に mRNA stability の測定に際しては、細胞に転写阻害薬を添加することで、新たな転写を抑制し、既存の mRNA の転写後時間経過による残存量を計測するという方法を用いる。まず転写活性を測定した際と同様に培養した強皮症皮膚線維芽細胞に転写阻害薬の *actinomycin D* を 1 μ g/ml 添加し、1 時間後に rapamycin を添加した。添加後 0 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に抽出した total RNA を逆転写し、Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて、 $\alpha 2$ (I)collagen の mRNA

stability を計測した。rapamycin 添加により、強皮症皮膚線維芽細胞における $\alpha 2$ (I) collagen の mRNA stability は 24 時間後において有意に低下していた。すなわち rapamycin 添加後 0 時間の mRNA 量と比較して 24 時間後の段階で、rapamycin 無添加群で 45% の mRNA の減少に対し、1.0nM 添加群で 64% の mRNA の減少がみられ、rapamycin 添加群で有意に mRNA stability の低下がみられた(図 9C)。

以上のことより、強皮症皮膚線維芽細胞における rapamycin 添加による I 型コラーゲンの mRNA 発現量の低下は遺伝子転写活性によるものではなく mRNA stability の低下によるものと考えられた。

8. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による MMP-1 蛋白 量の変化

皮膚の線維化において大切な要素は I 型コラーゲンを含めた細胞外基質の産生と分解のバランスであると考えられている。

Rapamycin 添加により強皮症 皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲンの産生の低下がおこることは前述の通りである。次に rapamycin が細胞外基質の分解に関与するかどうか検討することとした。細胞外基質を分解する際に重要な働きを示す分子として MMP-1 があげられる。MMP-1 は細胞外に分泌されて活性化し、I 型コラーゲンなどの細胞外基質を分解することで、細胞外基質の過剰沈着を防ぎ、皮膚の線維化を抑制している。そのため、強皮症皮膚線維芽細胞において rapamycin 添加により、MMP-1 の蛋白量に影響を及ぼすかどうか

かについて検討するため、1) rapamycin の濃度による変化、2) 経時的変化について検討した。

1) rapamycin の濃度による変化

強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養、24 時間 serum free の後、rapamycin を 0nM, 0.1nM, 1.0nM, 10nM の濃度において添加し、cell lysate、あるいは supernatant を採取し、western blotting 法を用いて検討した (図 10A)。rapamycin 添加 72 時間後の強皮症皮膚線維芽細胞の MMP-1 の蛋白発現量は有意に亢進していた。rapamycin 添加にて有意に蛋白発現量が亢進しており、supernatant において 0.1nM で 1.82 倍、1.0nM で 1.78 倍、10nM で 2.43 倍に蛋白量の亢進がみられ、cell lysate においては 0.1nM で 1.79 倍、1.0nM で 2.60 倍、10nM で 2.80 倍にまで、濃度依存性に亢進していた (図 10B)。

2) 経時的変化

同条件で培養した強皮症皮膚線維芽細胞に rapamycin を 1.0nM 添加後、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間に採取して同様に cell lysate を用いて、western blotting 法を用いて検討した (図 10C)。rapamycin 1.0nM 添加後、48 時間後より MMP-1 の蛋白量の有意な亢進がみられ (1.52 倍)、72 時間後に 1.90 倍にまで亢進していた (図 10D)。

以上のことから、rapamycin は強皮症皮膚線維芽細胞に働きかけ、MMP-1 の蛋白量を亢進させることが示された。

9. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加における MMP-1 mRNA 発現量の変化

Rapamycin 添加により、強皮症皮膚線維芽細胞における MMP-1 の蛋白量の亢進が mRNA の発現量と関連するかどうかをみるために、強皮症皮膚線維芽細胞における rapamycin 添加による MMP-1 の mRNA 発現量について 1) rapamycin の濃度による変化、2) 経時的変化について検討した。

1) rapamycin の濃度による変化

強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養し、24 時間 serum free 後、rapamycin を 0nM,0.1nM,1.0nM,10nM の濃度において添加し、4 時間後に mRNA を抽出し、逆転写した後に Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の MMP-1 の mRNA 発現量を測定した。その結果、rapamycin 添加にて強皮症皮膚線維芽細胞の MMP-1 の mRNA 発現量は 1.0nM より有意に亢進がみられ (1.78 倍)、10nM にて 2.43 倍までの亢進していた。(図 11A)。

2) 経時的変化

さらに、同条件で培養し、rapamycin を 1.0nM 添加した後に、0 時間、12 時間、24 時間、48 時間に採取して同様に Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の MMP-1 の mRNA 発現量を測定した。rapamycin1.0nM にて、48 時間後に有意に MMP-1 の mRNA 発現量が亢進していた (1.63 倍) (図 11B)。

10. 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による MMP-1 の遺伝子転写活性への影響

強皮症皮膚線維芽細胞において rapamycin 添加による MMP-1 の mRNA 発現量亢進が MMP-1 遺伝子転写活性亢進によるものかどうか検討した。

強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養、24 時間 serum free 後、2.0 μ g の full length の MMP-1-Lux コンストラクトをトランスフェクションした。その後 rapamycin を各々 0nM、0.1nM、1.0nM、10nM 添加し 24 時間後、48 時間後に reporter lysis buffer を用いて、luciferase 活性を測定した。強皮症皮膚線維芽細胞において、rapamycin 存在下 (0.1nM、1.0nM、10nM) における MMP-1 遺伝子転写活性は 24 時間後にて有意な変化はみられなかった (図 12A)。rapamycin 存在下 48 時間後において 0.1nM より MMP-1 の遺伝子転写活性の亢進がみられ (2.42 倍)、1.0nM にて 3.69 倍、10nM にて 3.77 倍と濃度依存的な遺伝子転写活性の亢進がみられた (図 12B)。以上により rapamycin 添加により、強皮症皮膚線維芽細胞の MMP-1 の遺伝子転写活性が亢進していることが示された。

11. 強皮症皮膚線維芽細胞における p70S6K の TGF- β 刺激によるリン酸化

強皮症皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲンの過剰産生において、TGF- β signal が重要な働きを示すことが知られている。次に、TGF- β 刺激が I 型コラーゲンなどの蛋白合成に関与する p70S6kinase のリン酸化

化に影響を与えるかについて検討した。強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent にまで培養し、24 時間 serum free 後、各々の時間 (0min, 30min, 60min, 2h, 4h, 8h, 24h) TGF- β 2 μ g/ml にて刺激した後、western blotting 法にて p70S6kinase のリン酸化を測定した。loading control として total p70S6kinase を用いた (図 13A)。強皮症皮膚線維芽細胞において、TGF- β 刺激により、p70S6kinase のリン酸化の亢進がみられた。2 時間後より時間依存的にリン酸化の亢進がみられ、24 時間後も有意にリン酸化の亢進が持続していた (図 13B)。

以上のことより、TGF- β 刺激により強皮症皮膚線維芽細胞の p70S6kinase のリン酸化の亢進がみられた。

12. Rapamycin 添加による TGF- β で刺激した強皮症皮膚線維芽細胞の p70S6kinase のリン酸化に対する影響

次に、強皮症皮膚線維芽細胞に rapamycin を添加することで、TGF- β 刺激により亢進した p70S6kinase のリン酸化を抑制できるかどうかについて検討した。強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養し、24 時間 serum free 後、無刺激、あるいは rapamycin 0nM、0.1nM、1.0nM、10nM を添加 1 時間後、TGF- β 2.0 μ g/ml にて刺激し、24 時間後に western blotting 法にて p70S6kinase のリン酸化を測定した。loading control として total p70S6kinase を用いた (図 14A)。強皮症皮膚線維芽細胞では TGF- β 刺激により p70S6kinase のリン酸化が亢進するが、rapamycin は 0.1nM より、有意にこのリン酸化を抑制した (図 14B)。

4) 考察

はじめに rapamycin の強皮症皮膚線維芽細胞に対する細胞毒性について検討したところ、今回の 10 nM までの実験の範囲内では細胞毒性はみられなかった (図 3A,B)。移植後の免疫抑制療法として使用される場合の血中濃度が約 10nM であること (23) から今回の実験で用いた濃度は臨床で使用される範囲内であり、かつ細胞毒性の問題はないと考えられた。

次に 皮膚線維芽細胞において、rapamycin 添加による I 型コラーゲン蛋白への影響について、正常皮膚線維芽細胞を用いて検討したところ、正常皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲンの蛋白量が有意に低下した (図 4A,B)。培養線維芽細胞における rapamycin の I 型コラーゲンの蛋白産生抑制に関しては培養ラット血管平滑筋細胞 (34) や、培養マウス腎メサンギウム細胞 (26) など様々な報告がみられ、培養ヒト皮膚線維芽細胞においても約 1nM において I 型コラーゲン蛋白量の低下がみられることが報告されている(35)。

正常皮膚線維芽細胞は TGF- β 刺激により、I 型コラーゲン蛋白量の亢進がみられ、強皮症皮膚線維芽細胞に似た特徴を示すことが知られている。今回用いた正常皮膚線維芽細胞においても TGF- β 刺激により、I 型コラーゲン蛋白量の亢進がみられた。さらに、TGF- β 刺激を行った正常皮膚線維芽細胞に rapamycin を添加すると I 型コラーゲン蛋白量が 1nM 以上の濃度で有意に低下したことより (図 5A,B)、細胞毒性のない範囲で I 型コラーゲン蛋白量を抑制することがわかった。

次に、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞の間での I 型コラーゲンの

蛋白量、mRNA 発現量について検討したところ、蛋白レベルで、2.0 倍、mRNA レベルで 2.3 倍と亢進しており（図 6A,B）、過去の報告（10,33）とほぼ同様の結果がみられた。強皮症皮膚線維芽細胞においても rapamycin 添加により I 型コラーゲンの蛋白量の低下がみられるか検討したところ、0.1nM~10nM と比較的 low 濃度の範囲で I 型コラーゲンの蛋白量の低下がみられることが示された（図 7A~D）。

次に、rapamycin による I 型コラーゲン蛋白の発現抑制作用がどのような機序で行われているかを検討するために、rapamycin 添加による I 型コラーゲンの mRNA 発現量、遺伝子転写活性、mRNA stability を測定した。その結果、I 型コラーゲンの mRNA の発現量が低下し（図 8A,B）、mRNA stability の低下も見られたが（図 9C）、遺伝子転写活性には有意な変化はみられなかった（図 9A,B）。以上のことから rapamycin による I 型コラーゲン mRNA の発現抑制に関しては遺伝子転写活性によるものではなく、mRNA stability の低下が関与していると考えられ、転写後レベルで制御されていると考えられた。従来よりコラーゲンの発現制御に関しては、mRNA stability が重要な調節因子であることが示されている。（36）。また、Asano らは強皮症皮膚線維芽細胞においても FK506 添加により I 型コラーゲンの産生が低下し、その一因が I 型コラーゲンの mRNA stability の低下によるものであると報告している（10）。今回の実験により、強皮症皮膚線維芽細胞において、rapamycin 添加による I 型コラーゲン産生低下に mRNA stability が関与していることが示された。

強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲンの蛋白量低下は、cell lysate のみならず、supernatant でもみられるため、rapamycin 添加により I 型コラーゲンの転写、翻訳合成過程などの直接的な作用以外に、細胞外においても I 型コラーゲン蛋白の分解を促進している可能性が考えられた。コ

ラーゲン分解作用を有する分子として MMP-1 が有名であり、細胞外に分泌されて活性化し、I 型コラーゲンなどの細胞外基質を分解することで、皮膚の線維化を抑制しているといわれている。さらにヒト肺線維芽細胞において JNK/c-Jun のカスケードを介して rapamycin が MMP-1 の蛋白、mRNA の発現量を亢進させたという報告もみられる (14)。そのため、強皮症皮膚線維芽細胞において rapamycin 添加による supernatant 中の I 型コラーゲン蛋白量の低下に MMP-1 が関与しているかどうかについて検討した。強皮症皮膚線維芽細胞において rapamycin 添加により、celllysate, supernatant とともに MMP-1 の蛋白量の有意な亢進 (図 10A~D)、さらに mRNA 発現量の亢進もみられた (図 11A,B)。MMP-1 の mRNA 発現量の亢進に関しては MMP-1 遺伝子転写活性の亢進によるものであることも示された (図 12A,B)。以上のことから、rapamycin は強皮症皮膚線維芽細胞に作用し、MMP-1 の産生亢進、分泌増加を促すことによって、細胞外に分泌された I 型コラーゲンの分解やその過剰沈着を抑制する可能性が示唆された。

種々の細胞において、mTOR の活性化を介した p70S6kinase のリン酸化が細胞の成長や分化、蛋白合成に重要な役割を示すとされている。I 型コラーゲンの蛋白合成に関しても mTOR の活性化が関与しているといわれており (22)、さらに、皮膚線維芽細胞において、p70S6kinase のリン酸化が I 型コラーゲンの産生を亢進させているという報告もある (35)。その機序として、リン酸化 p70S6kinase が、リボソームの 40S サブユニットに存在する S6 蛋白をリン酸化することで mRNA の翻訳が開始され、I 型コラーゲンを含めた蛋白合成が亢進するということが知られている (21)。そのため、強皮症皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン産生過剰に重要な役割を示す TGF- β が p70S6 kinase のリン酸化に関与するかどうかを調べた。その結果、TGF- β 刺激にて p70S6 kinase のリン酸

化がおこり、24 時間以上続くことが示された (図 13A,B)。これにより、強皮症皮膚線維芽細胞において TGF- β による I 型コラーゲンの蛋白発現増加に p70S6 kinase のリン酸化が関与している可能性が示唆された。さらに、強皮症皮膚線維芽細胞に TGF- β 刺激を加え、さらに rapamycin 添加した場合、無刺激下の状態よりもさらに p70S6 kinase のリン酸化が抑制された (図 14A,B)。このことより、強皮症皮膚線維芽細胞における rapamycin 添加による I 型コラーゲンの低下には P70S6kinase のリン酸化の抑制が関与している可能性が考えられた。以上のことより、rapamycin は強皮症皮膚線維芽細胞に働きかけることで、1) I 型コラーゲンの message stability の低下、2) 翻訳抑制による I 型コラーゲン蛋白産生の低下、さらに 3) MMP-1 蛋白量の亢進を促すことにより、I 型コラーゲンの過剰沈着を抑制していると考えられた (図 15)。これらから、rapamycin が全身性強皮症の皮膚の線維化を抑制することのできる有効な薬剤になりえると考えられた。

今回、我々の実験では、培養皮膚線維芽細胞において rapamycin が I 型コラーゲン蛋白の産生を抑制し、分解を促進することを示した。今後の臨床応用を考えると、皮膚硬化モデルマウスなどを使った in vivo での rapamycin の線維化抑制作用の検討が必要であると考えられた。全身性強皮症において、皮膚の線維化はしばしば大小関節の可動域の低下を引き起こすことにより、食事や歩行動作などの日常生活に様々な支障をきたす。皮膚の線維化に対する治療として近年、FK506 やシクロスポリン A などの免疫抑制剤を用いた報告もあるが、いずれも副作用として腎障害が高頻度にみられている (12,14)。Rapamycin はそれらの免疫抑制剤に比較して腎毒性が非常に低いという利点があり、皮膚の線維化を抑制する薬剤として有望であると考えた。今回は皮膚の線維化に関する検討のみであったが、全身性強皮症では皮膚以外の臓器においても肺線維症

や強皮症腎といった線維化をもたらす重篤な症状もみられ、それらに対しても有効である可能性が考えられた。

5) 参考文献

1. LeRoy EC: Systemic sclerosis (scleroderma). Edited by Wyngarden JB, Smith LH, Bennett JC. Cecil textbook of medicine. 19th ed. Philadelphia: WB Saunders 1992:1530–1535
2. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA Jr, Rodnan GP: Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis: quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984, 27:645–653
3. Ferrarini M, Steen V, Medsger TA Jr, Whiteside TL: Functional and phenotypic analysis of T lymphocytes cloned from the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990, 79: 346–352
4. Abraham D, Lupoli S, McWhirter A, Plater-Zyberk C, Piela TH, Korn JH: Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1991, 34:1164–1172.
5. White B : Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1995, 7: 541–545
6. Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K: Blockade of endogenous transforming growth factor β signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor β receptors. *Arthritis Rheum*

2001, 44: 474–480

7. Ra HJ, Parks WC: Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *MatrixBiol* 2007, 26: 587-596
8. Clements PJ, Frust DE, Wong WK: High-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis , analysis of a two year, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 1999, 42 : 1194–1203
9. Ihn H, Mimura Y, Yazawa N, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K: High-dose intravenous immunoglobulin infusion as treatment for diffuse scleroderma. *Br J Dermatol* 2007, 156:1058-1060
10. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. :Differential effects of the Immunosuppressant FK-506 on Human $\alpha 2(I)$ collagen gene expression and transforming growth factor β signaling in normal and scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2005, 52: 1237–1247
11. Clements PJ, Lachenbruch PA, Sterz M, Danovitch G, Hawkins R, Ippoliti A: Cyclosporine in systemic sclerosis: results of a forty-eight-week open safety study in ten patients. *Arthritis Rheum* 1993, 36: 75–83
12. Morton SJ, Powell RJ: Cyclosporin and tacrolimus: their use in a routine clinical setting for scleroderma. *Rheumatology* 2000, 39: 865–869
13. Levy Y, Sherer Y, Langevitz P, Lorber M, Rotman P, Fabrizzi F: Skin

- score decrease in systemic sclerosis patients treated with intravenous immunoglobulin: a preliminary report. *Clin Rheumatol* 2000, 19: 207–211
14. Filaci G, Cutolo M, Scudeletti M, Indiveri F, Puppo F: Cyclosporin A and iloprost treatment of systemic sclerosis: clinical results and interleukin-6 serum changes after 12 months of therapy. *Rheumatology* 1999 ;38: 992-996
 15. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot* 1975, 28: 721–726
 16. Brown EJ, Albers MW, ShinTB, Ichikawa K, Keith CT, Lan WS, Schreiber SL: A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994, 369: 756–758
 17. Hay N, Sonenberg N: Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004 , 18: 1926–1945
 18. Jaeschke A, Dennis PB, Thomas G: mTOR: a mediator of intracellular homeostasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004, 279: 283–298
 19. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J: Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 1992, 69: 1227–1236
 20. Brown EJ, Beal PA, Keith CT, Chen J, Shin TB, Schreiber SL: Control of p70S6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 1995, 377: 441–446
 21. Volarevic S, Thomas G: Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in

- cell growth. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001, 65: 101–127.
22. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, Manning AM, Anderson DW: SP600125, an anthracyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(24):13681-13686
 23. Webster AC, Lee VW, Chapman JR, Craig JC: Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Transplantation* 2006, 81: 1234–1248
 24. Huang S, Houghton PJ: Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents from bench to clinic. *Curr Opin Investig Drugs* 2002, 3: 295–304
 25. Elit L : CCI-779 Wyeth. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002, 3 :1249–1253
 26. Lock HR, Sacks SH, Robson MG: Rapamycin at subimmunosuppressive levels inhibits mesangial cell proliferation and extracellular matrix production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007. 292: 76–81
 27. Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J: Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *J Hepatol* 2006, 45: 786–796
 28. Nicolas Poulalhon, Dominique Farge, Nina Roos, and Franck Verrecchia, Modulation of collagen and MMP-1 gene expression in fibroblasts by the immunosuppressive drug rapamycin. *Biol. Chem* 2006, 281: 33045–33052

29. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Tamaki K: Involvement of the constitutive complex formation of c-Ski/SnoN with Smads in the impaired negative feedback regulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2007, 56:1694-1705.
30. Ihn H, Yamane K, Asano Y, Kubo M, Tamaki K: IL-4 up-regulates the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in dermal fibroblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Immunol* 2002, 168: 1895-1902
31. Ihn H, Ohnishi K, Tamaki T, LeRoy EC, Trojanowska M: Transcriptional regulation of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene. Combined action of upstream stimulatory and inhibitory cis-acting elements. *J Biol Chem* 1996, 271: 26717-26723
32. Verheijen JH, Nieuwenbroek NM, Beekman B, Hanemaaijer R, Verspaget HW, Ronday HK, Bakker AH: Modified proenzymes as artificial substrates for proteolytic enzymes: Colorimetric assay of bacterial collagenase and matrix metalloproteinase activity using modified pro-urokinase. *Biochem J* 1997, 323: 603-609
33. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K: Constitutive thrombospondin-1 overexpression contributes to autocrine transforming growth factor-beta signaling in cultured scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol* 2005; 166(5): 1451-1463
34. Li JP, Yang JY, Chen W, Zhuang WQ, Wang JB: Impact of sirolimus on collagen synthesis in vascular smooth muscle cells: experiment with rat.

Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2007, 87(37): 2653-2656

35. Ohguchi K, Banno Y, Akao Y, Nozawa Y: Involvement of phospholipase D1 in collagen type I production of human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 348(4): 1398-1402
36. Krupsky M, Kuang PP, Goldstein RH: Regulation of type I collagen mRNA by amino acid deprivation in human lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1997, 272(21):13864-13868.

6) 図表

図1

Rapamycin 構造式

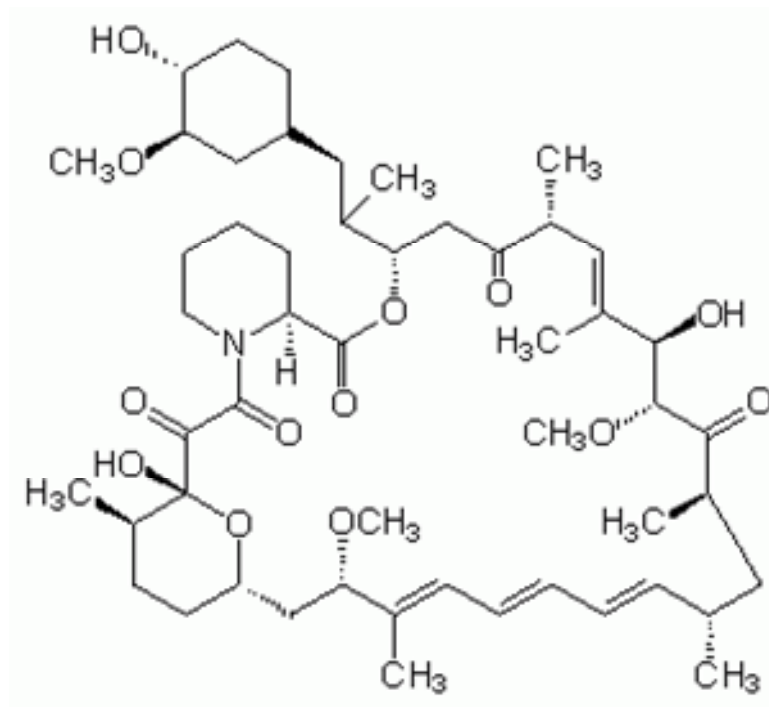
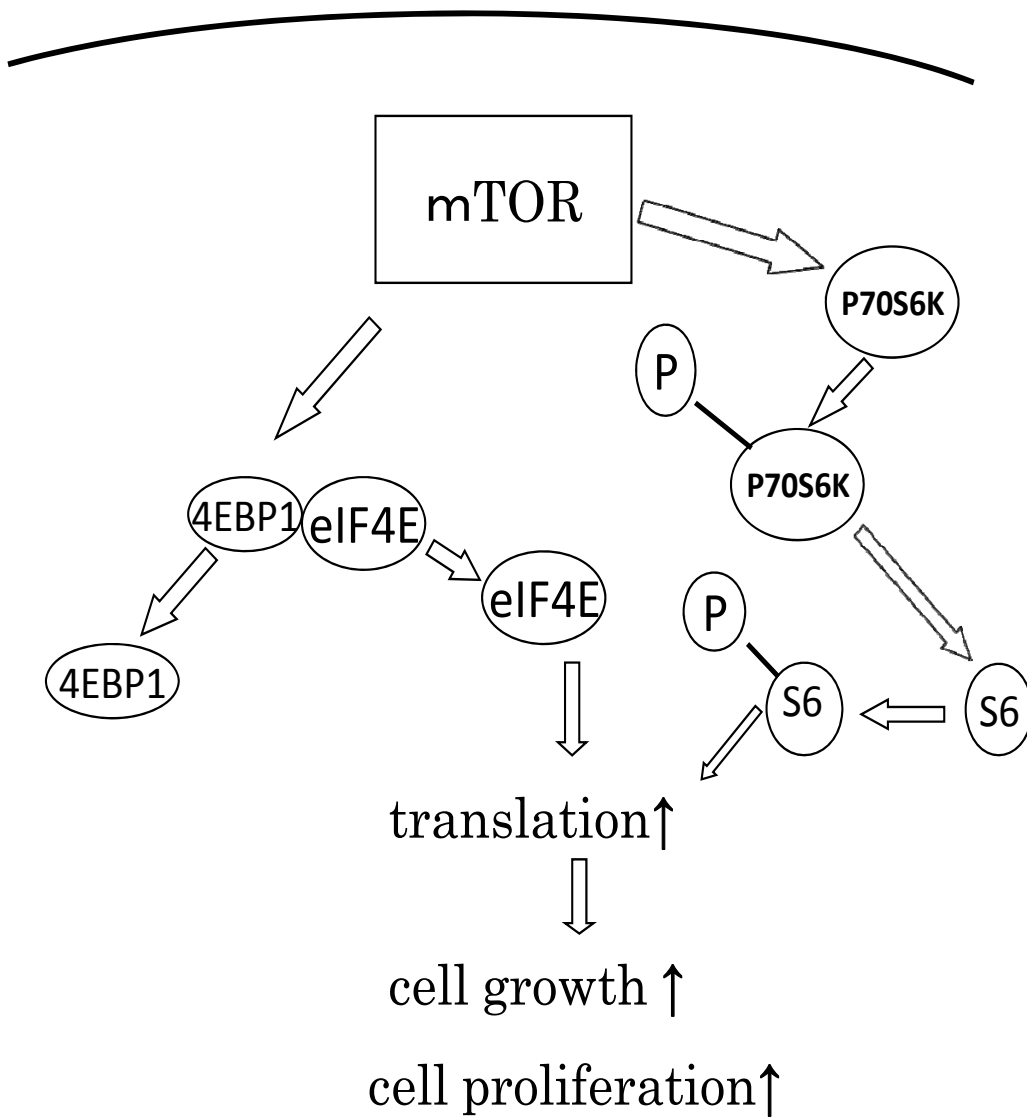


図2

mTOR signal cascade



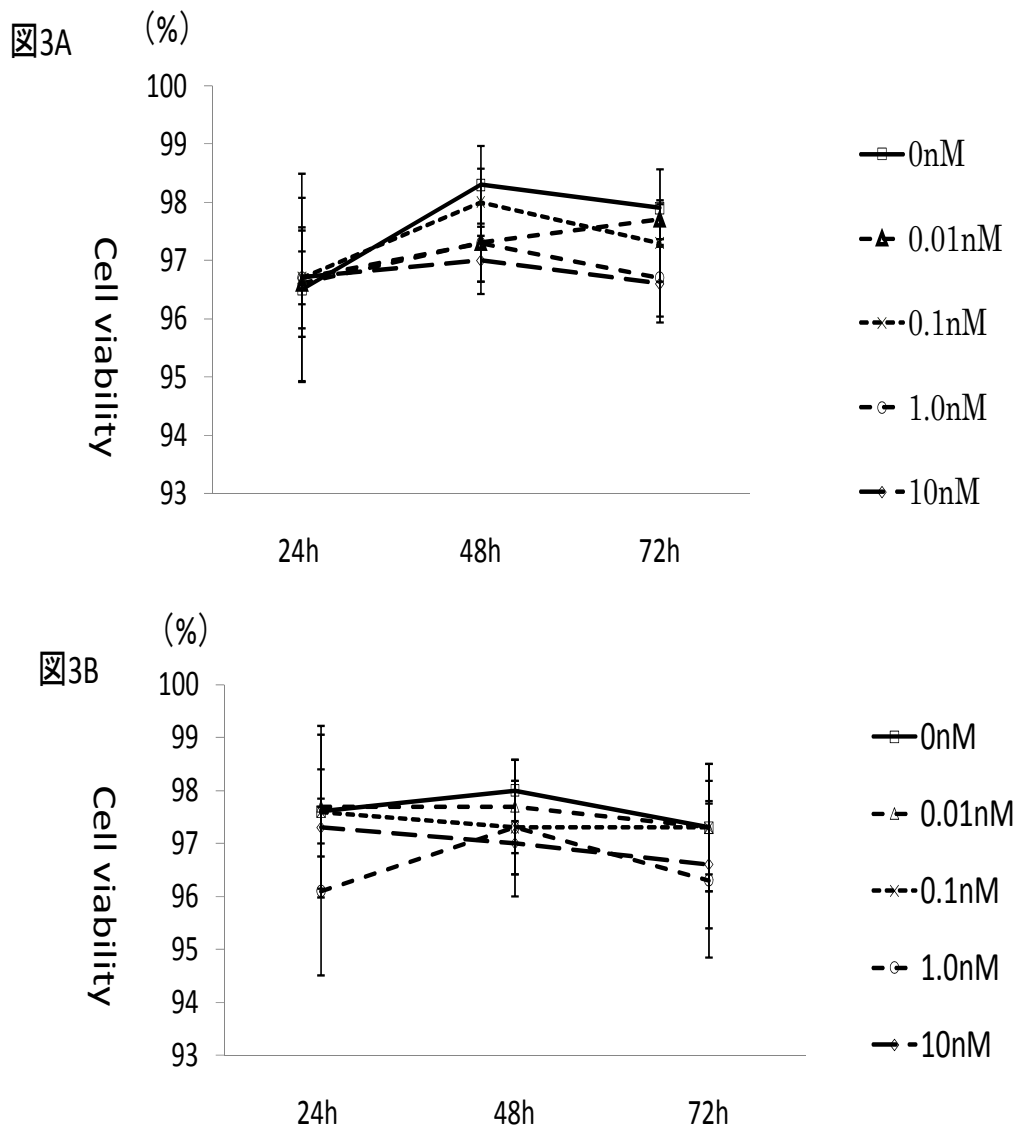


図3 Rapamycin 添加による正常皮膚線維芽細胞及び強皮症皮膚線維芽細胞の細胞生存率

正常3検体(A)及び強皮症皮膚線維芽細胞3検体(B)を4穴chamber slideでsubconfluentになるまで培養したあと、0nM、0.01nM、0.1nM、1.0nM、10nMのrapamycinを添加し、各々の濃度の24時間、48時間、72時間後の細胞の生存率を測定した。Trypan blue染色にて顕微鏡下で2視野(約400細胞)の生存率を測定した。(n=3)

図4A

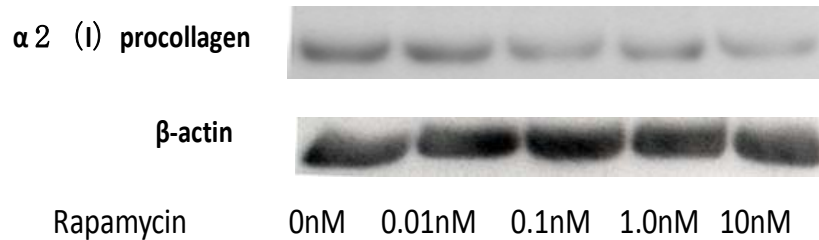


図4B

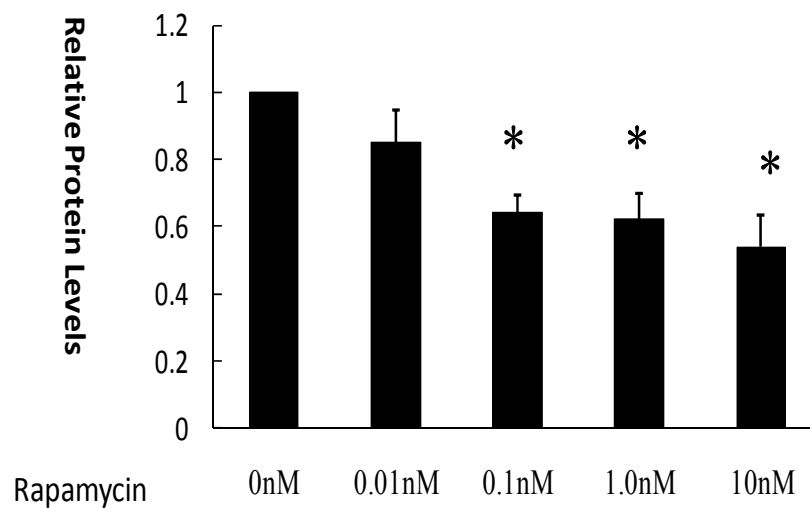


図 4 正常皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン蛋白量の変化

- A. 正常皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養した後、0 nM、0.01 nM、0.1 nM、1.0 nM、10nM の濃度の rapamycin を添加 48 時間後に抽出した蛋白を抗 I 型コラーゲン抗体、抗 β -actin 抗体と反応させた。
- B. 個々に得られたバンドの濃度を scanning densitometry で定量化し、 β -actin で補正した。それらを平均し、rapamycin 無添加群の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表した。*は無添加群に比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=4)

図5A

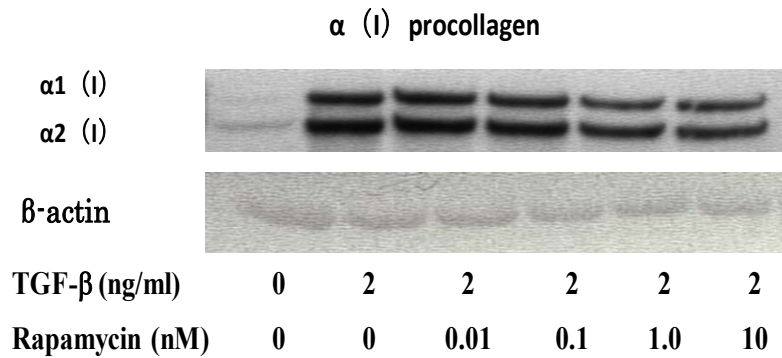


図5B

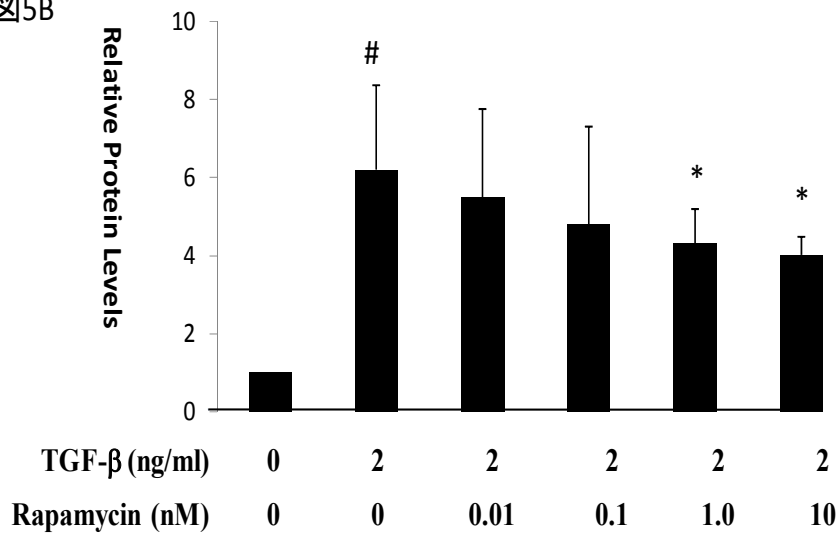


図 5 TGF-β刺激による正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白量の変化及び rapamycin 添加の影響

A. 正常皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養したのち、無刺激あるいは 2.0ng/ml の TGF-β1 刺激に加えて 0nM,0.1nM,1.0nM,10nM の濃度の rapamycin を各々添加した。72 時間後に蛋白を抽出し、抗 I 型コラーゲン抗体、抗β-actin 抗体と反応させた。

B. 個々に得られたバンドの濃度を scanning densitometry で定量化し、β-actin で補正した。それらを平均し、rapamycin 無添加群の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表している。#は $P < 0.05$ をもって無刺激群に比較して有意な I 型コラーゲン蛋白発現量の亢進があることを示している。*は $P < 0.05$ をもって TGF-β 刺激 rapamycin 無添加群に比較して、 $P < 0.05$ をもって有意に I 型コラーゲン蛋白発現量が低下していることを示している。(n=4)

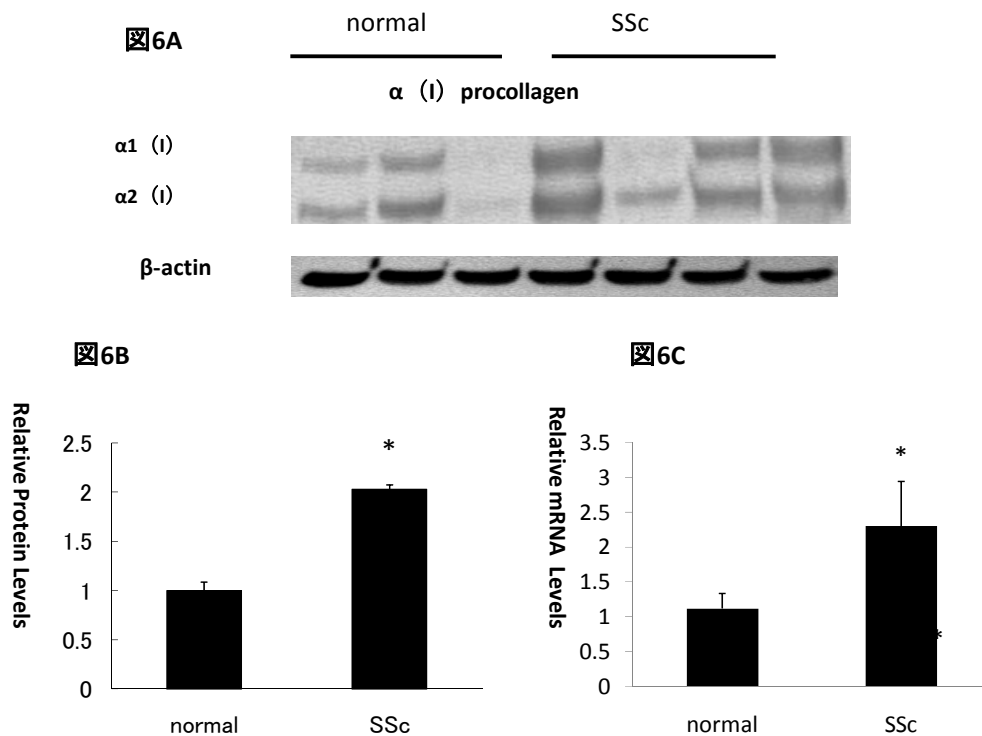


図 6 強皮症皮膚線維芽細胞及び正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白量及び mRNA 発現量

A. 無刺激の強皮症皮膚線維芽細胞及び正常皮膚線維芽細胞から抽出した蛋白を抗 I 型コラーゲン抗体、抗 β -actin 抗体と反応させた。左 3lane は各々 3 検体の正常皮膚線維芽細胞の結果を、右 4lane は各々 4 検体の強皮症皮膚線維芽細胞の結果を示している。

B. 正常皮膚線維芽細胞 3 検体、強皮症皮膚線維芽細胞 4 検体の個々に得られたバンドを scanning densitometry で定量化し、 β -actin で補正した。それらを平均し、正常皮膚線維芽細胞の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表している。*は正常皮膚線維芽細胞と比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=3~4)

C. 無刺激の強皮症及び正常皮膚線維芽細胞から抽出した total RNA を逆転写し Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の I 型コラーゲンの mRNA 発現量を測定した。正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲンの mRNA 発現量の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表している。*は正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲンの mRNA 発現量と比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n = 3~4)

図7A

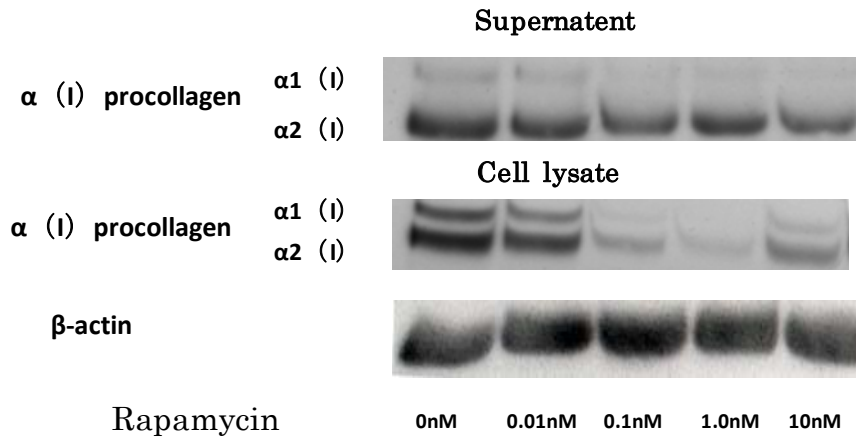


図7B

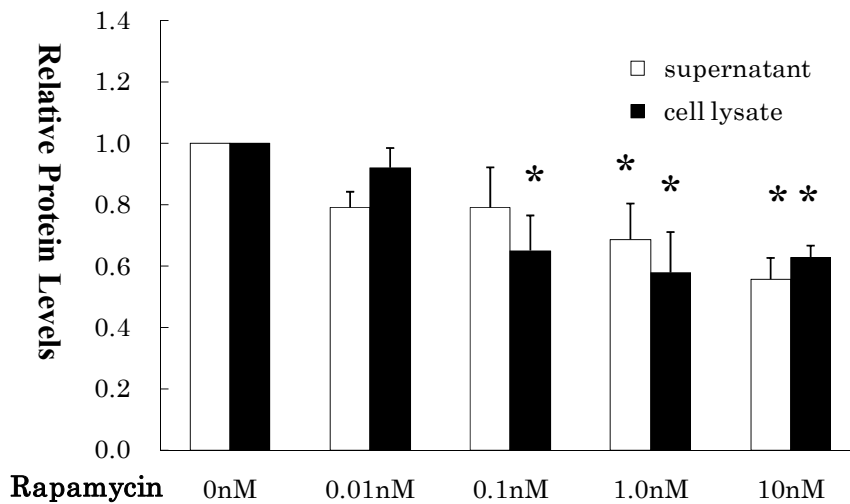


図7 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン蛋白量の変化

A. 強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養した後、図に示した濃度の rapamycin を添加 48 時間後に抽出した蛋白を抗 I 型コラーゲン抗体、抗 β -actin 抗体と反応させた。

B. 個々に得られたバンドの濃度は scanning densitometry で定量化し、 β -actin で補正した。それらを平均し、rapamycin 無添加群の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表している。*は無添加群に比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=5~6)

図7C

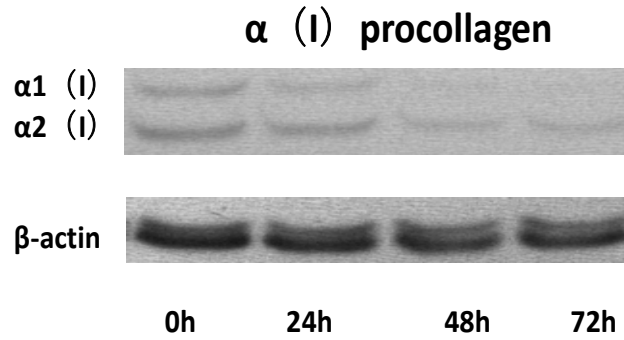


図7D

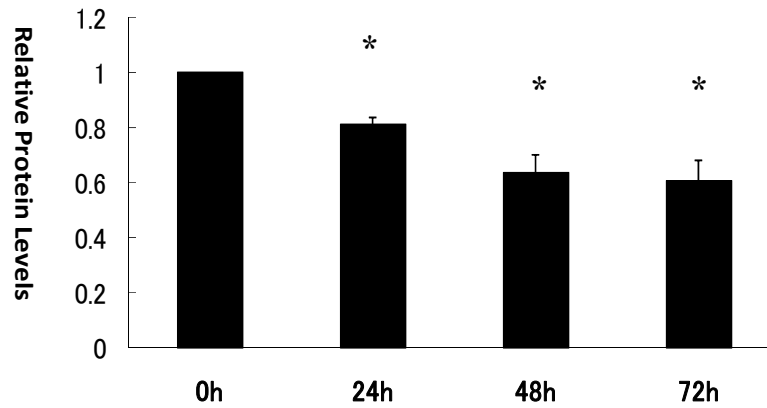


図 7 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン蛋白量の変化

C. 強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養した後に 1nM の rapamycin 添加した。rapamycin 添加した後、0 時間、12 時間、24 時間、48 時間後に抽出した蛋白を 1 抗 I 型コラーゲン抗体、抗 β -actin 抗体と反応させた。

D. 個々に得られたバンドの濃度は scanning densitometry で定量化し、 β -actin で補正した。それらを平均し、rapamycin 無添加群の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表している。
*は無添加に比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=4)

図 8A

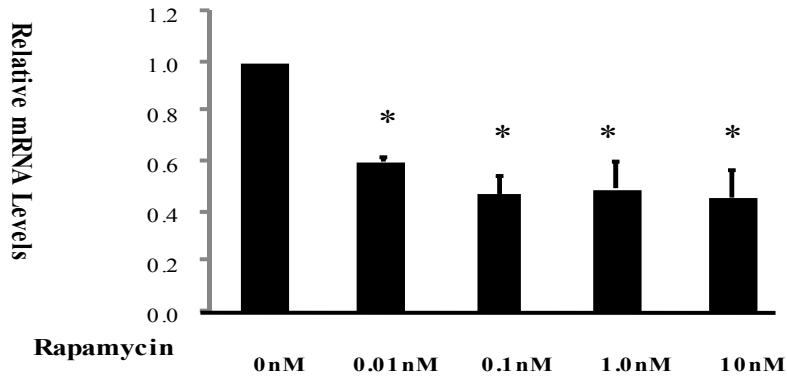


図 8B

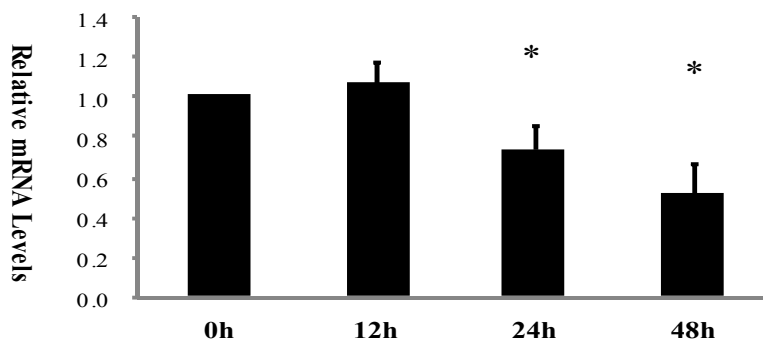


図 8 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン mRNA 発現量の変化

A. 強皮症皮膚線維芽細胞に対して図に示した濃度の rapamycin を添加した 48 時間後に、抽出した total RNA を逆転写した後、Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の I 型コラーゲンの mRNA 発現量を測定した。無刺激群の mRNA 発現量の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表している。*は無刺激群の mRNA 発現量に比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=4)

B. 強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養した後に、1.0nM の rapamycin を添加した。rapamycin 添加後 0 時間、12 時間、24 時間、48 時間後に抽出した total RNA を逆転写した後、Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の I 型コラーゲンの mRNA 発現量を測定した。無刺激群の mRNA 発現量の平均濃度をと 1 とし、棒グラフで表している。*は無刺激群の mRNA 発現量に比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=4)

図9A

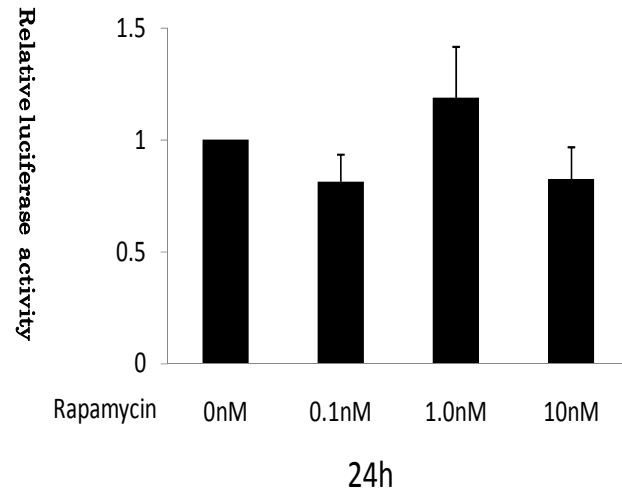


図9B

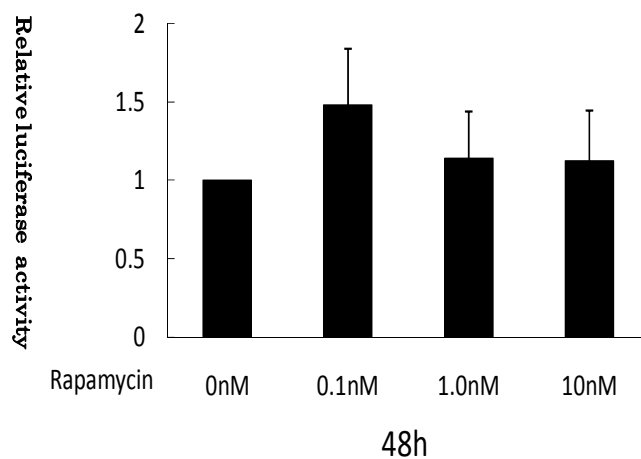


図 9 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲンの遺伝子転写活性への影響

- A. 強皮症皮膚線維芽細胞を 100mm dish に 1.0×10^5 個播種し、subconfluent になった後、-773COL1A2-Lux コンストラクトをトランスフェクションした。24 時間培養後、24 時間 serum free の状態にて rapamycin を各々 0、0.1、1.0、10nM 添加し 24 時間後に I 型コラーゲン ($\alpha 2$) の luciferase 活性を測定し、 β ガラクトシダーゼ活性で補正した。(n=5)
- B. 図 7 B と同条件下にて 48 時間後に reporter lysis buffer を用いて、I 型コラーゲン ($\alpha 2$) の luciferase 活性を測定し、 β ガラクトシダーゼ活性で補正した。(n=6)

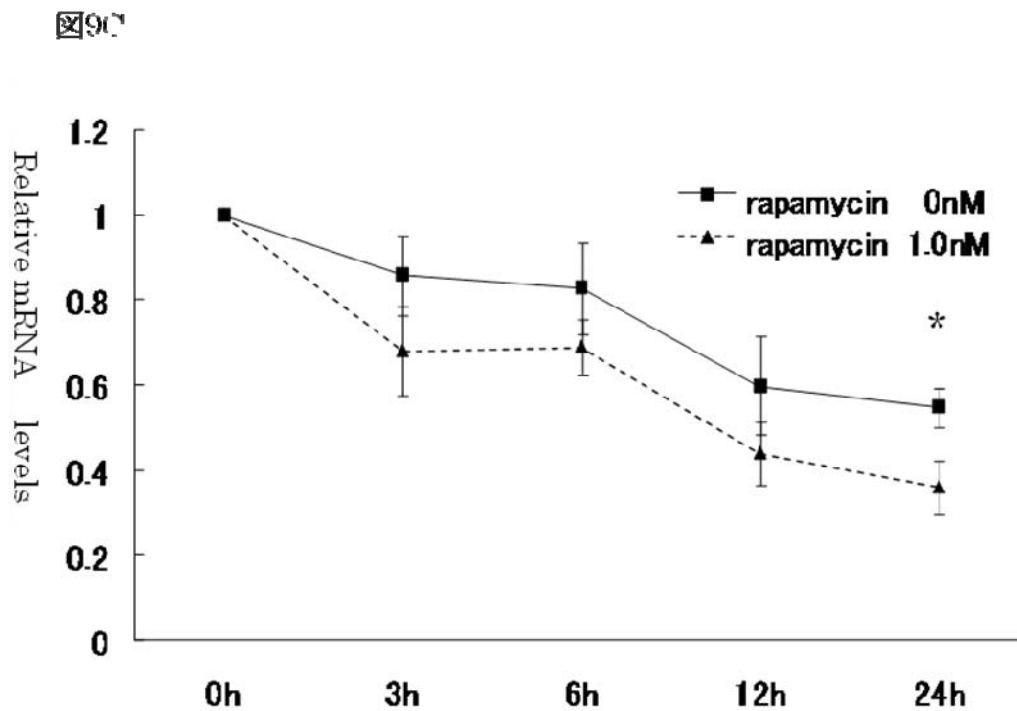


図9 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による I 型コラーゲン mRNA stability への影響

C. 強皮症皮膚線維芽細胞培養を subconfluent まで培養した後に actinomycin D 添加した後に rapamycin を添加した。rapamycin 添加後 0 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に抽出した total RNA を逆転写し、Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて、I 型コラーゲンの mRNA stability を計測した。0 時間における mRNA の発現量を 1 としたときのそれぞれの 3 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後の mRNA 量を算出し、プロットした。*は無刺激下の強皮症皮膚線維芽細胞に比較して、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=4)

図10A

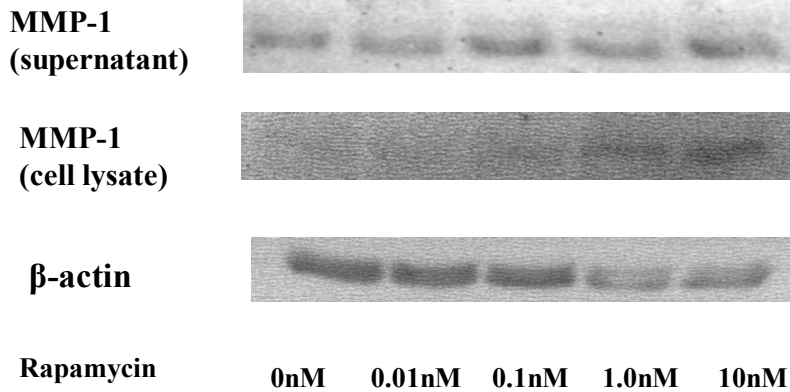


図10B

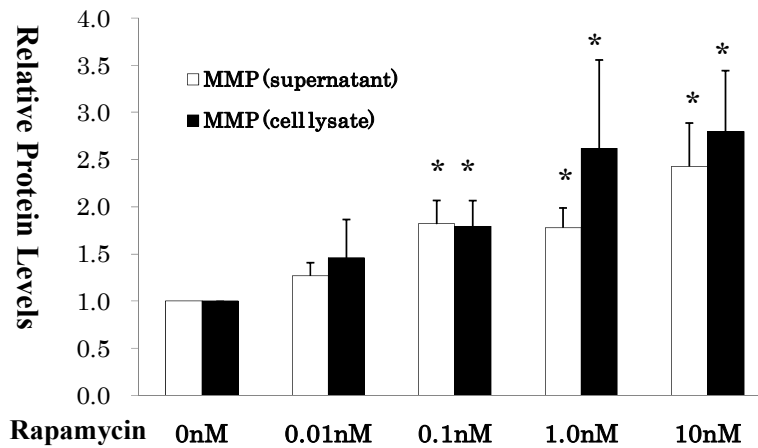


図 10 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による MMP-1 蛋白量の変化

A. 強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養した後、rapamycin を 0nM, 0.1nM, 1.0nM, 10nM の濃度において添加し、72 時間後に蛋白を抽出し、抗 MMP-1 抗体、抗 β -actin 抗体と反応させた。

B. 個々に得られたバンドの濃度は scanning densitometry で定量化し、 β -actin で補正した。それらを平均し、rapamycin 無添加群の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表している。*は無添加に比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=4)

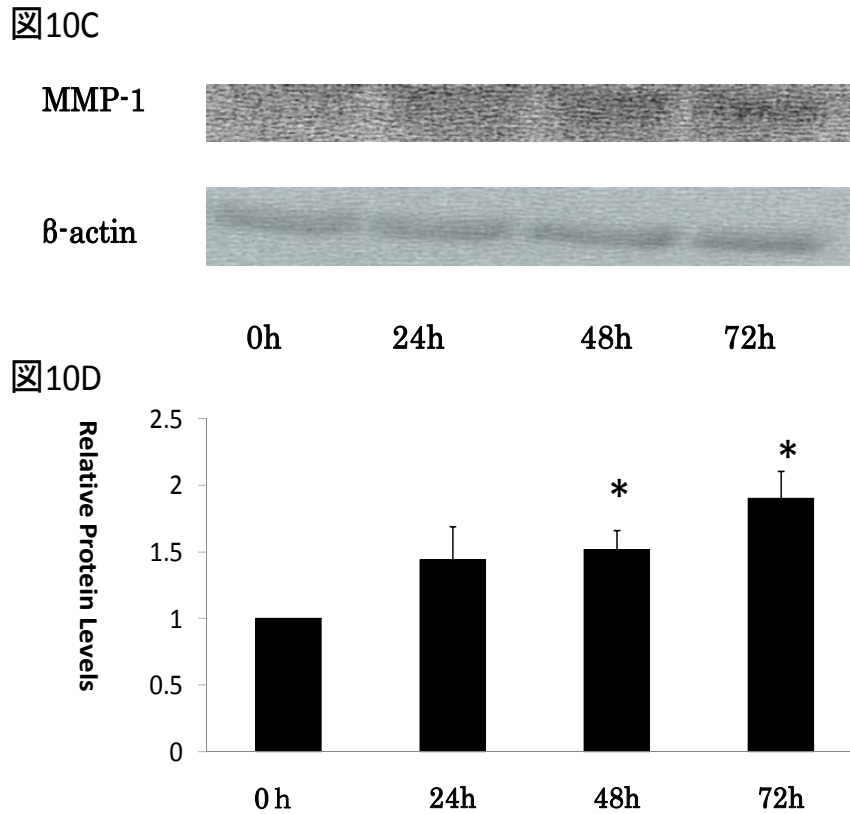


図 10 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による MMP-1 蛋白量の変化

C. 強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養した後に 1.0nM の rapamycin を添加し、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間後に抽出した蛋白を抗 MMP-1 抗体、抗 β -actin 抗体と反応させた。

D. 個々に得られたバンドの濃度を scanning densitometry で定量化し、 β -actin で補正した。それらを平均し、rapamycin 無添加群の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表している。
*は無添加に比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=4)

図11A

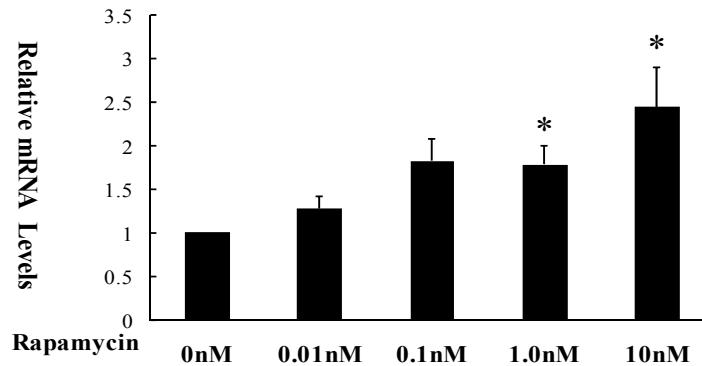


図11B

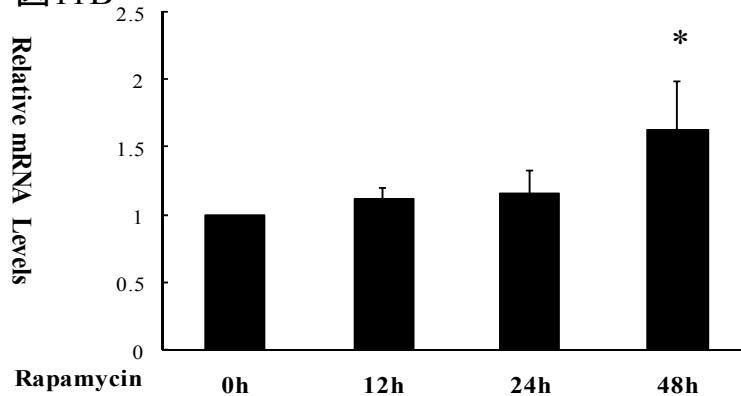


図 11 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による MMP-1 の mRNA 発現量の変化

A. 強皮症皮膚線維芽細胞を図に示した濃度の rapamycin を添加した 48 時間後に、抽出した totalRNA を逆転写した後、Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の MMP-1 の mRNA 発現量を測定した。無刺激群の mRNA 発現量の平均濃度を 1 とし、棒グラフで表している。*は無刺激群の mRNA 発現量に比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=4)

B. 強皮症皮膚線維芽細胞を subconfluent まで培養した後に、1.0nM の rapamycin を添加した。添加後 0 時間、12 時間、24 時間、48 時間後に抽出した total RNA を逆転写し、Quantitative Real-Time RT-PCR 法を用いて各々の MMP-1 の mRNA 発現量を測定した。無刺激群の mRNA 発現量の平均濃度をと 1 とし、棒グラフで表している。*は無刺激群の mRNA 発現量に比較し、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=4)

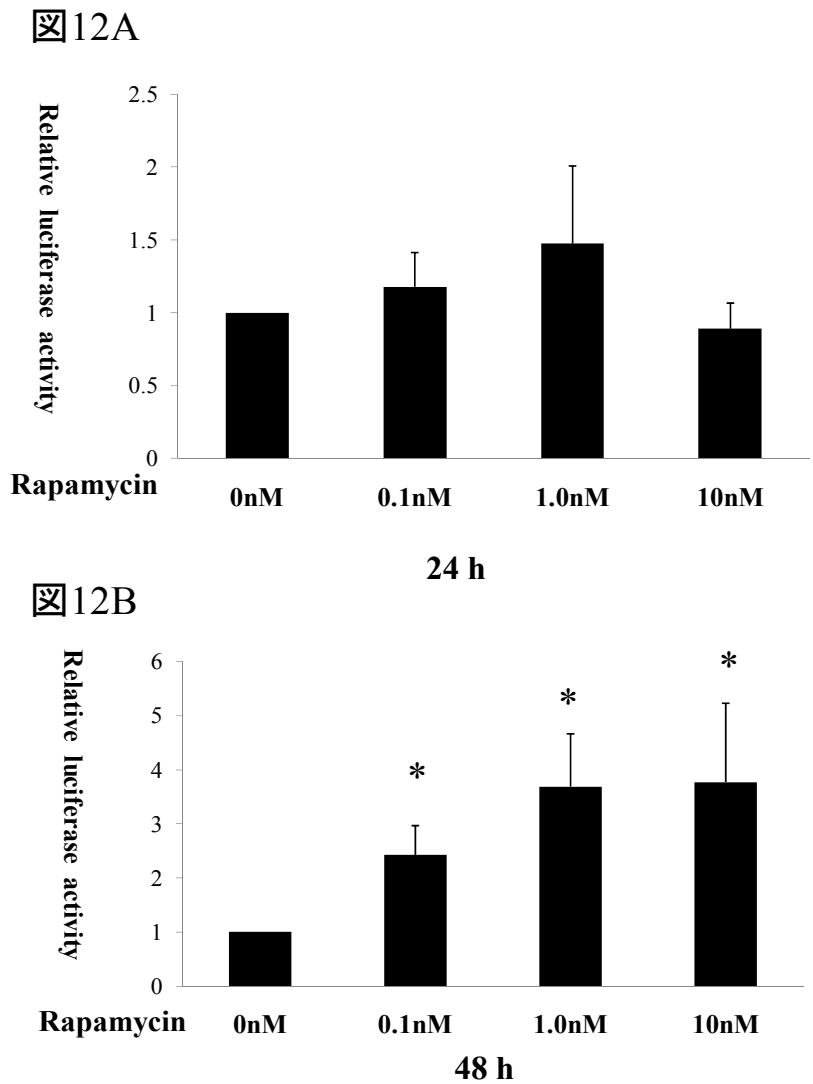


図 12 強皮症皮膚線維芽細胞の rapamycin 添加による MMP-1 の遺伝子転写活性への影響

- A. 強皮症皮膚線維芽細胞を 100mm dish に 1.0×10^5 個播種し、subconfluent になった後、MMP-1-Lux コンストラクトをトランスフェクションし 24 時間培養した。24 時間 serum free の状態にて rapamycin を各々 0、0.1、1.0、10nM 添加し 24 時間後に MMP-1 の luciferase 活性を測定し、 β ガラクトシダーゼ活性で補正した。(n=5)
- B. 図 10A と同条件下にて 48 時間後に reporter lysis buffer を用いて、MMP-1 の luciferase 活性を測定し、 β ガラクトシダーゼ活性で補正した。*は無刺激下の強皮症皮膚線維芽細胞に比較して、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。(n=6)

図13A

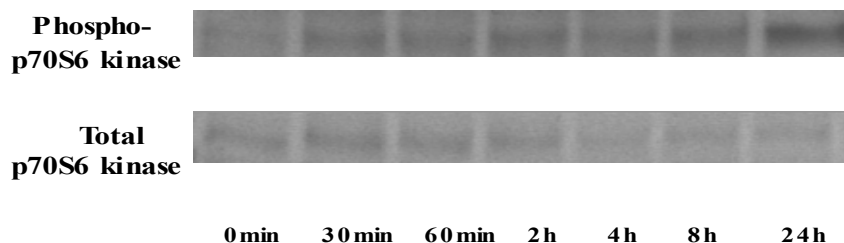


図13B

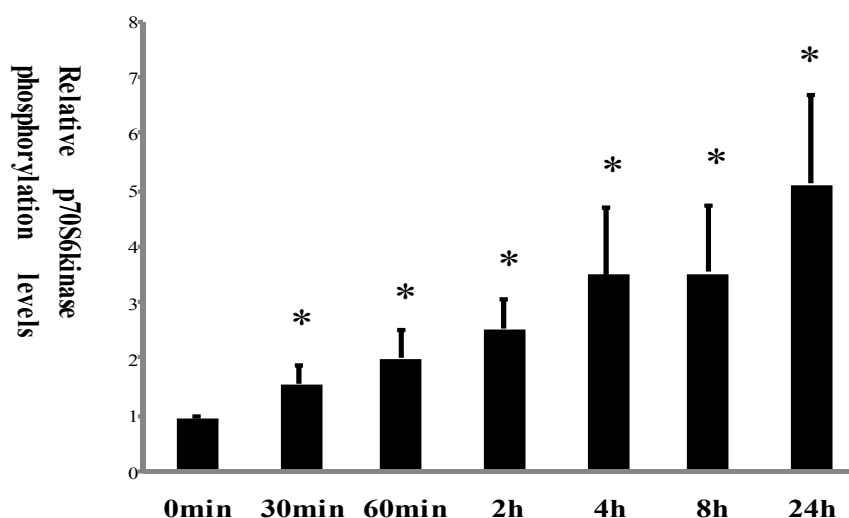


図 13 強皮症皮膚線維芽細胞における p70S6Kinase の TGF- β 刺激によるリン酸化

A. 強皮症皮膚線維芽細胞を培養後、TGF- β 刺激にて各々の時間 (0min, 30min, 60min, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h) から抽出した蛋白を電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、抗 phospho-p70S6kinase 抗体と反応させた。同ニトロセルロース膜上の抗体を除去し、loading control として抗 p70S6kinase 抗体と反応させた。

B. 個々に得られたバンドの濃度を scanning densitometry で定量化し、loading control とした total p70S6kinase 蛋白量にて補正した。それらを平均し、0min の phospho-p70S6kinase 蛋白の発現量を 1 として、棒グラフで表している。*は無刺激下の強皮症皮膚線維芽細胞と比較して、 $p < 0.05$ をもって有意差があることを示している。

(n=5)

図14 A

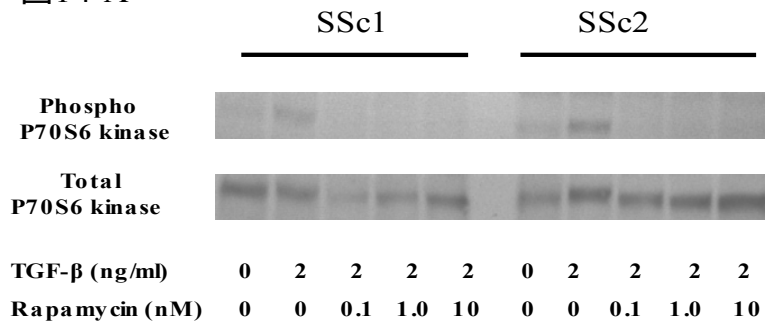


図14 B

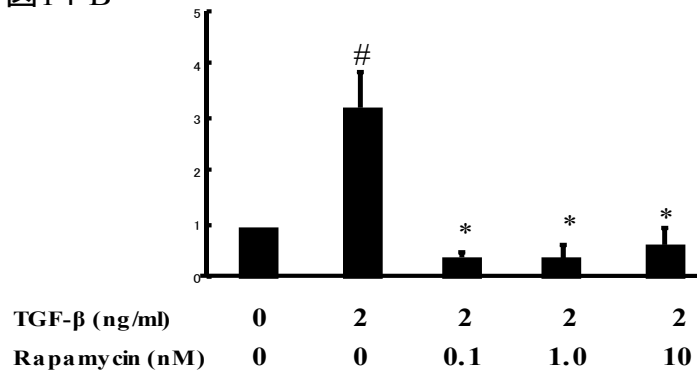


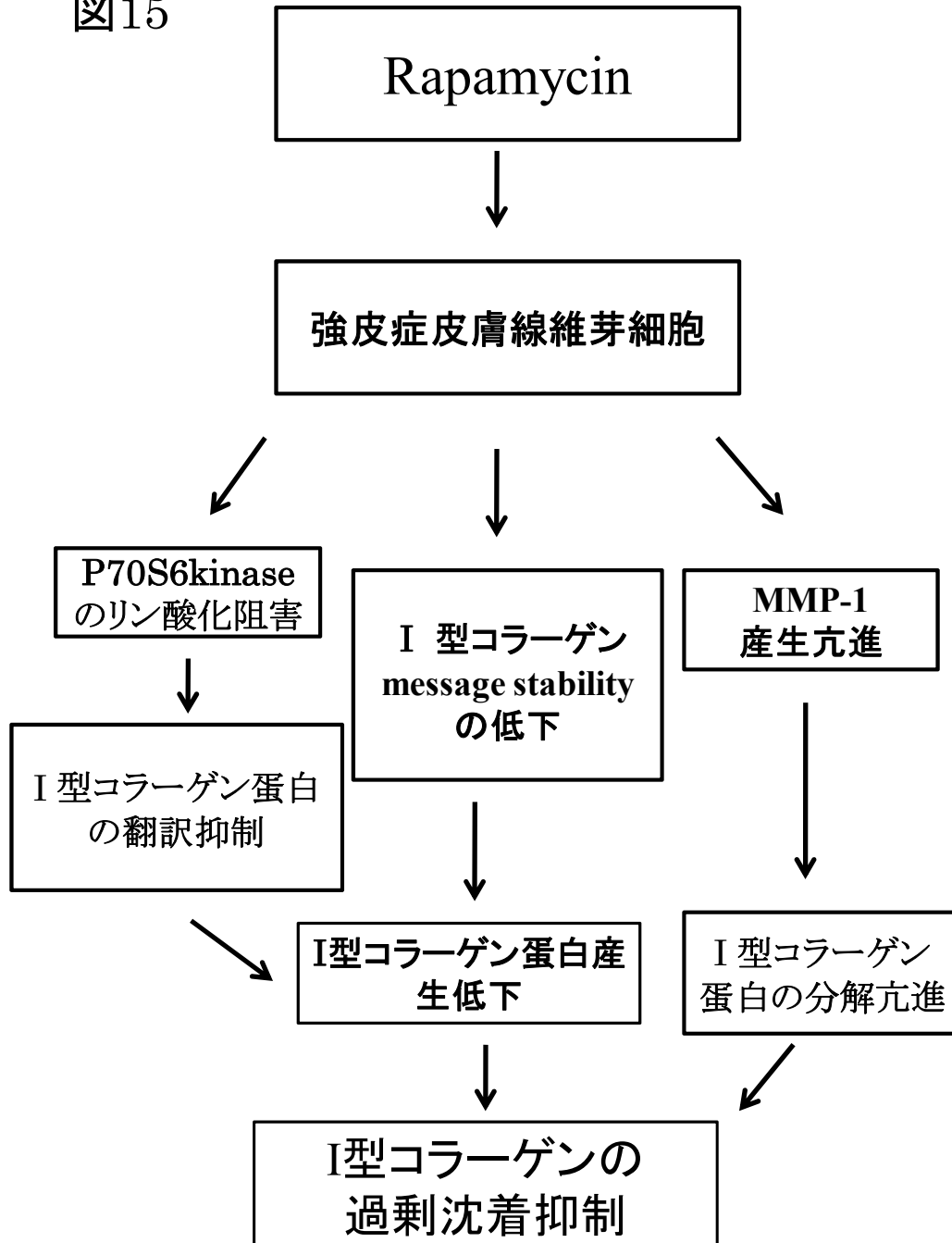
図 14 Rapamycin 添加による TGF-β刺激強皮症皮膚線維芽細胞の p70S6Kinase のリン酸化に対する影響

A. 強皮症皮膚線維芽細胞を培養し、無刺激、あるいは各々の濃度 (0、0.1、1.0、10nM) の rapamycin 添加した後に TGF-β刺激した。24 時間後に抽出した蛋白を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写し、抗 phospho-p70S6kinase 抗体と反応させた。同ニトロセルロース膜上の抗体を除去し、loading control として抗 p70S6kinase 抗体と反応させた。

B. 個々に得られたバンドの濃度を scanning densitometry で定量化し、loading control とした total p70S6kinase 蛋白量にて補正した。それらを平均し、無刺激の phospho-p70S6kinase 蛋白の発現量を 1 として、棒グラフで表している。

*は rapamycin 無添加群に比較して、 $P < 0.05$ をもって有意な p70S6kinase のリン酸化の抑制があることを示している。#は TGF-β無刺激群に比較して $P < 0.05$ をもって有意に p70S6kinase のリン酸化の亢進があることを示している。(n=4)

図15



7) 謝辞

本研究を行うにあたり、ご懇篤な指導とご高配を賜りました東京大学医学部皮膚科学教室・玉置邦彦教授及び久保正英先生（現・東京厚生年金病院皮膚科部長）、尹浩信先生（現・熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学教授）に厚く御礼申し上げます。