

学位申請論文

エリスロマイシン誘導体EM703の正常および強皮症線維芽細胞のI型コラーゲン転写に対する抑制効果

獨協医科大学 皮膚科学

池田 秀幸

要 旨 強皮症の線維化は主に線維芽細胞 (FB) の collagen 遺伝子転写の亢進によりおこる。macrolideには様々な薬理作用が知られるが最近、新しいerythromycin誘導体EM703のマウス bleomycin 誘導肺線維化を抑制する作用が報告された。今回は正常および強皮症皮膚FBの collagen 遺伝子発現に対する影響を検討した。培養FBの collagen 産生を抗 I 型 collagen 抗体で、mRNA 量を northern blot で、遺伝子の転写を luciferase assay で、collagen 上流遺伝子への核蛋白結合を gel shift assay で解析した。EM703は正常FBに対して I 型 collagen 産生、mRNA 量を最大 30% にまで濃度依存性に抑制し、I 型 collagen 遺伝子の転写を 30% に抑制した。これは上流遺伝子を下流へ徐々に delete しても見られ、わずか -133 base にまで delete しても見られた。一方、-100 の CCAAT-box を GCAAG に置換変異すると約 90% に抑制されたのみであった。しかし EM703 添加で核の CCAAT-binding factor (CBF) の結合活性の低下はなかった。同剤は強皮症FBに対しても I 型 collagen の発現を抑制した。EM703は正常および強皮症FBの I 型 collagen の転写を抑制し、それは主に CBF の結合活性の低下なしに CCAAT-box を介してなされると示唆される。

Key Words : エリスロマイシン誘導体EM703, 線維芽細胞, コラーゲン遺伝子発現, 転写, 強皮症

諸 言

全身性強皮症は皮膚並びに内臓の線維化を特徴とする疾患である。I 型コラーゲンは真皮の主成分であり、線維化ではこの I 型コラーゲンの増加が主な変化として認められる。強皮症真皮線維芽細胞の I 型コラーゲン産生の転写レベルでの上昇によりコラーゲンが過剰沈着することが、強皮症における真皮の線維化をきたす重要な病態の一つと考えられている¹⁾。一方、現在のところ線維化に対する良い治療法は未だほとんど知られていない。マクロライド系抗生物質には抗菌作用の他に抗炎症作用や線維芽細胞の増殖抑制などの薬理学的作用がわかってきている。また近年、慢性に経過し呼吸器感染症、腺外分泌不全の他に内臓の線維化のみられる遺伝性疾患である cystic fibrosis に、マクロライド系抗生物質が有効との報告がある^{2,3)}。EM703は北里大学、北里生命科学研

究所にて合成された12員環マクロライドで、抗菌作用を持たない新しいエリスロマイシンの誘導体で、nuclear factor (NF)- κ Bの活性と interleukin-8の産生を抑制して抗炎症作用を発揮することが明らかにされている⁴⁾。最近、LiらによりこのEM703がマウスのブレオマイシン誘導肺線維化を抑制し、それがTGF- β レセプターの情報伝達系の調節を介しておこることが報告された⁵⁾。そこで今回我々は、EM703の正常および強皮症皮膚由来培養線維芽細胞の I 型コラーゲン産生に対する影響を検討した。その結果、EM703に線維芽細胞の I 型コラーゲン産生を抑制する効果のあることを見出した。さらにその効果は正常に対してのみならず、強皮症線維芽細胞に対しても見られ、これらの効果は I 型コラーゲン遺伝子の転写レベルで抑制され、それが I 型コラーゲン遺伝子の CCAAT box を介してなされることを明らかにしたので報告する。

方 法

1. 患者

今回、線維芽細胞を培養し実験に用いた全身性強皮症の9症例はすべてアメリカリウマチ協会の診断基準⁶⁾を

平成18年10月26日受付、平成18年11月28日受理

別刷請求先：池田秀幸

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 皮膚科学

表1 全身性強皮症の線維芽細胞株と症例の臨床所見

症例	年齢	罹病期間	病型	生検部位	抗Scl-70抗体
強皮症-1	47	1年	全身型	前腕	(+)
強皮症-2	45	15年	全身型	前腕	(+)
強皮症-3	47	1年	限局型	前腕	(+)
強皮症-4	48	9ヶ月	全身型	腹部	(-)
強皮症-5	61	8ヶ月	全身型	腹部	(-)
強皮症-6	43	2年	全身型	前腕	(+)
強皮症-7	42	13年	全身型	前腕	(+)
強皮症-8	54	12年	全身型	前腕	(+)
強皮症-9	49	20年	全身型	前腕	(+)

満たしている(表1)。9例とも女性で、42歳から61歳、9例中8例がdiffuse typeで7例がScl-70抗体陽性である。病歴は発症から8ヶ月から20年までと様々である。

2. 薬剤

エリスロマイシンA及びその新しい誘導体であるEM703(図1)をDMSO溶解液として実験に使用した。EM703は北里研究所(東京, 日本)にて化学合成されたもので、すでに抗菌作用のないことが確認されている⁷⁾。

3. 線維芽細胞の培養

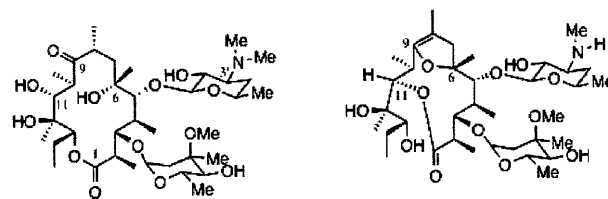
線維芽細胞の培養は線維芽細胞SSc 9株、正常3株を既報⁸⁾に従い初代培養し、細胞は10% FBS含有のDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)にて培養し維持した。各実験に2ないし5のpopulation doubling levelのものを用いた。薬剤の添加はエリスロマイシンAの $10^{-7} \sim 10^{-3}$ Mを、EM703の $10^{-7} \sim 10^{-4}$ MをDMSOに溶解して使用した。

4. 細胞増殖能 (DNA 合成量) 測定⁹⁾

正常線維芽細胞を6穴組織培養用プレートにコンフルエントに培養。マクロライド $10^{-7} \sim 10^{-3}$ M濃度で1% FBS含有のDMEMにて48時間培養、 $[6\text{-}^3\text{H}]$ thymidine (spec. act. 15.0 Ci/mmol, NEN Chemicals, Boston, MA) $1 \mu\text{Ci/ml}$ を添加しさらに3時間培養した。トリクロール酢酸にて処理後、沈殿を1M水酸化ナトリウムにて溶解、一部の放射活性をliquid scintillation counterで測定した。

5. I型コラーゲン産生量測定

2株の正常及び2株の強皮症線維芽細胞を用いて実験を行った。6穴組織培養用プレート(COSTAR®, 6 Well Cell Culture Cluster, Corning, NY, USA)にコンフルエントに培養。培養液を $10^{-7} \sim 10^{-4}$ M濃度の



エリスロマイシン A

EM 703

図1 エリスロマイシンAおよびEM703の構造式

Erythromycin Aあるいは 10^{-7} M $\sim 10^{-5}$ M濃度のEM703の添加された1% FBS含有DMEMに交換。細胞を48時間培養した後培養上清を集め、一部のtype I collagen量をELISAを用いて測定した。type I collagen抗体を含むELISA kit (Chondrex)を使用した。

6. RNAの抽出とノーザンブロット¹⁰⁾

全RNAをphenol/guanidium isothiocyanate (TRIzol® Reagent, インビトロジェン, 東京)により培養線維芽細胞より抽出した。各RNA (5 μg per lane)を1%アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロン・フィルターに移し、ethidium bromide染色により泳動量を確認、UV cross linkingで固定後、prehybridizationし、定法により各DNA probeとhybridizationした。DNA probeとして $\alpha 1$ (I) collagen¹¹⁾とglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた¹²⁾。それぞれのcDNA probeはnick translation法を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (Amersham, England)を用い行った。filterは洗浄後、放射線フィルムに感光、現像しデントメーターで放射能活性を数値化した。

7. 使用したDNAとその構造

プラスミッドp2.3KCOL1A1Lucはヒト $\alpha 1$ (I) コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーター部分-2.3キロ塩基対 (kbp) から+42 base pair (bp) がルシフェラーゼ遺伝子に融合したものである。すでに報告されているp2.3K $\alpha 1$ (I) CAT¹³⁾のSacI-KpnI断片(-2.3 kb \sim +42 bp)をpGEM7 (+) (Promega)のmulticloning siteのSacI-KpnI部に挿入しサブクローニングし、そのSacI-XhoI断片を切り出しpGL2-Basic (Promega)のSacI-XhoI部にその断片を挿入し作成した。p332COL1A1Lucは同様に作成した。すなわち、すでに報告されているp332 $\alpha 1$ (I) CAT¹³⁾のSacI-KpnI断片(-320 bp \sim +42 bp)をpGEM7 (+)のSacI-KpnI部に挿入しサブクローニングし、そのSacI-XhoI断片を切り出しpGL2-BasicのSacI-XhoI部に挿入し作成した。プラスミッド

p133COL1A1Lucはp332COL1A1Lucの-332にあるXbaI部より exonuclease III を用いたHenikoffの方法¹⁴⁾で転写開始点方向へのdeletionを行い、正確なdeletionの端の位置をsequencingにより確認することにより作成した。さらに332-100m-COL1A1Lucはp332COL1A1Lucの-97~-100に位置するCCAATをGCAAGへと短い置換変異を加えたプラスミッドである。これはp332COL1A1Lucの-255 PvuII~-16 ApaIに変異を含んだ長い合成オリゴDNAを挿入することにより作成した。

8. 一過性遺伝子移入およびルシフェラーゼアッセイ

細胞の一過性のtransfectionはFuGene 6 kit (Roche Applied Science) を用い既報¹⁵⁾に従って行った。5 × 10⁵個の線維芽細胞を6-well 組織培養プレートに撒き培養。2日後にCOL1A1を2,300 bpあるいは332 bp, 133 bp持つ、また332 bpの-100に位置するCCAAT boxをGCAAGに置換変異させたDNAのluciferase construct 1.0 μgと、20 ngのphRL-SV40 Vector (Promega) をco-transfectionさせた。48時間後、細胞を回収しpassive lysis buffer (Promega) で溶解しlysateを準備、Luciferase 活性をDual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いルミノメーターで測定した。ルシフェラーゼアッセイには内在性対照としてSV40 earlyエンハンサープロモーターとウミシイタケルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を持つphRL-SV40 Vector (Promega) とCMVimmediate earlyエンハンサープロモーターとウミシイタケルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を持つphRL-CMV Vector (Promega) を用いた。すべての実験はtriplicateで行い少なくとも3回繰り返した。

9. 核蛋白の抽出およびGel mobility shift assay

150 mm × 25 mm dishにコンフルーエントに線維芽細胞を培養し、PBSで洗浄後ラバーポリスマンを用いて細胞を得た。核はGroudineの方法¹⁶⁾にて単離した。核は4倍量の以下を含むバッファーAすなわち20 mM Hepes (pH 7.9), 1 mM EGTA, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 400 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 0.01% Nonidet P-40, 0.5 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml pepstatin Aに懸濁、それを30分間4℃でスターラーで混和して抽出し、15000回転でEppendorf tubeで5分間4℃で遠心、上清を4時間、以下のバッファーBすなわち20 mM Hepes (pH 7.9), 50 mM NaCl, 0.1 mM Na₂EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 20% (v/v) glycerolで透析した。それを15000回転でEppendorf tubeで5分間4℃で遠心し、上清を核蛋白として用いた。

蛋白濃度はprotein assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.)にて測定した。線維芽細胞から抽出された蛋白濃度は約2 mg/mlでそれを1 mg/mlにバッファーBで調製して実験に用いた。

Gel mobility shift assayは既報¹⁷⁾に従って行った。1-2 μgの核蛋白を10 μl以下の溶液で20分26℃でインキュベーションした。溶液は20 mM Hepes (pH7.5), 0.5mg/ml BSA, 150 mM NaCl, 1mM Na₂ EDTA, 0.5mM DTT, 2.5 μgのpoly-dI-dC, T4 polynucleotide kinaseで[³²P]をエンドラベルした10⁴ c.p.m. (approx. 0.2 ng)のdouble-stranded DNAを含む。反応後、2 μlのsample buffer [30% (v/v) glycerol, 0.2% (w/v) Bromophenol Blue and 0.2% (w/v) Xylene Cyanol]を加え、6% poly-acrylamide gelでTBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid and 8 mM Na₂ EDTA)にて電気泳動した。ゲルをX線フィルムにてfluorographyを行いデンストメーターにて解析した。

10. 統計処理

結果をcontrolに対するpercentage (平均値±Standard error of mean)で表し、統計的有意差はStudent's t testで測定した。

結 果

1. EM703の細胞増殖能に及ぼす影響

Erythromycin AおよびEM703の線維芽細胞のコラーゲン産生への影響が細胞の増殖の変化を介してなされるかどうかを見る目的でまず細胞の増殖能として、DNA合成への影響を検討した。Erythromycin Aにおいて正常細胞におけるDNA合成能は10⁻⁷ M~10⁻⁴ M濃度で特に変化は見られなかった。10⁻³ M濃度では浮遊し死滅する細胞が観察されるとともに著しいDNA合成の低下(対照の約40%へ)が認められtoxic doseであった(図2a)。一方EM703の正常細胞におけるDNA合成能は10⁻⁷ M~10⁻⁵ M濃度で特に変化は見られなかった。10⁻⁴ M濃度では浮遊し死滅する細胞が観察されるとともに対照の約67%とDNA合成の低下が認められ、toxic doseであった。なお5 × 10⁻⁵ Mでも検討したがDNA合成能の低下は見られなかった(図2b)。

2. 正常および強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲン産生量に対するEM703の影響

Erythromycin AおよびEM703が線維芽細胞の増殖への影響がないことが明らかにされたので、次に同剤の正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞のI型コラーゲン産生に対する影響を検討した。ELISAにより測定された

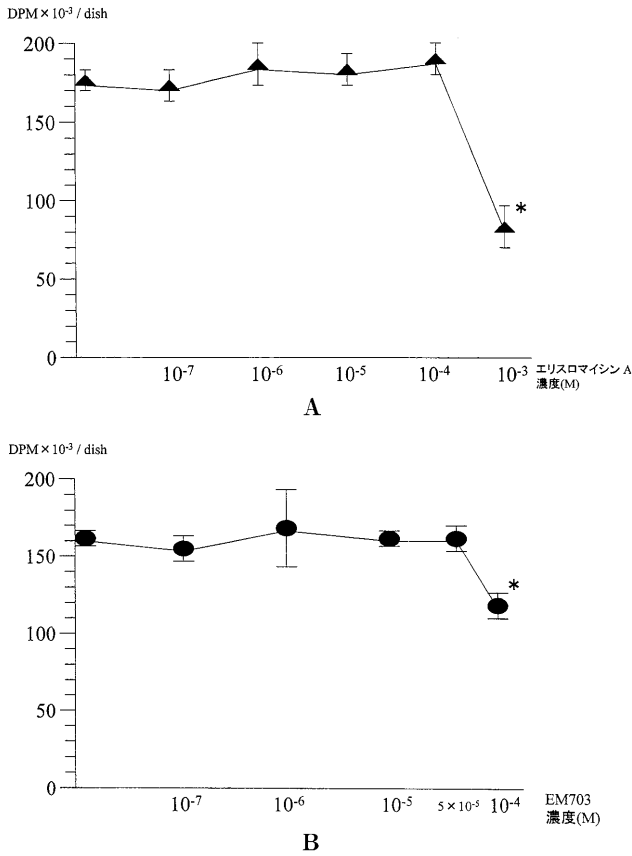


図2 正常線維芽細胞におけるDNA合成に対するマクロライドの効果。

コンフルエントの培養線維芽細胞にエリスロマイシンA, EM703をそれぞれ加え, 48時間培養. さらに [6-³H] thymidine 1 μCi/mlを添加し3時間培養した. 細胞層を1 M NaOHで溶解し, 放射活性を測定した. A, 10⁻⁷ M~10⁻³ MのエリスロマイシンA. B, 10⁻⁷ M~10⁻⁴ MのEM703. 結果をそれぞれ4 dishesのmeans ± SEMで表した.

* ; p < 0.01 (vs.マクロライド無添加)

正常線維芽細胞の培養液中のI型コラーゲン量は, Erythromycin A 10⁻⁷ M~10⁻⁴ M濃度の添加によってI型コラーゲン産生量は軽度増加する傾向がみられたが有意に変化は認められなかった(図3a). 一方, EM703の10⁻⁷ M~10⁻⁵ M濃度の添加により正常線維芽細胞の培養液中のI型コラーゲン産生量は濃度依存的に抑制された. 10⁻⁵ M濃度ではcontrolに対して有意に平均40.5%まで減少した(図3b). 強皮症線維芽細胞に対してもEM703の10⁻⁷ M~10⁻⁵ M濃度の添加により培養液中のI型コラーゲン産生量は濃度依存的に抑制された. 10⁻⁵ M濃度ではcontrolに対して有意に平均39.5%まで減少した(図3c).

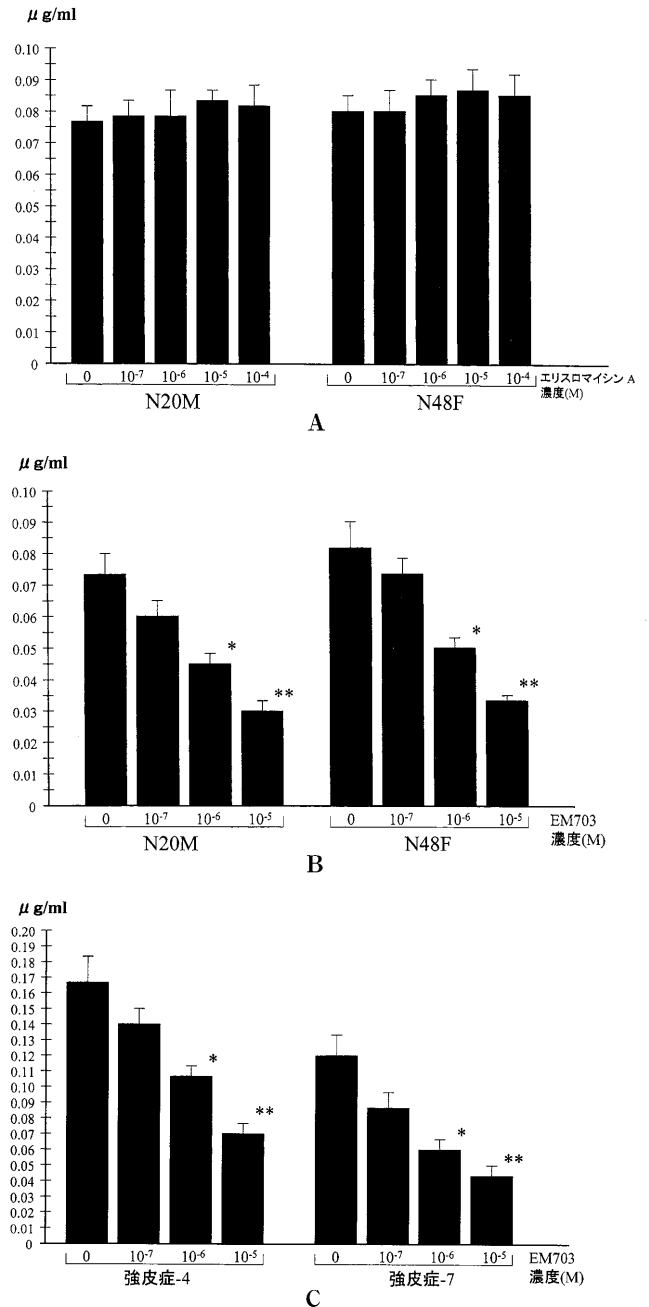


図3 正常および強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲンに対するマクロライドの効果。

AB, 正常線維芽細胞を6穴のプレートに撒き, コンフルエントの状態に10⁻⁷ M~10⁻⁴ MのエリスロマイシンA (A)あるいは10⁻⁷ M~10⁻⁵ MのEM703 (B)含有の培地に変え, 48時間培養後, 培地の一部を抗I型コラーゲン抗体を用いたELISAにてI型コラーゲン量を測定した. C, 同様に強皮症線維芽細胞でI型コラーゲンに対するEM703の効果測定. N20M; 20歳の男性の皮膚由来線維芽細胞N48F; 48歳の女性の皮膚由来線維芽細胞. 結果をそれぞれ4 dishesのmeans ± SEMで表した.

* ; p < 0.05 (vs.マクロライド無添加)

** ; p < 0.01 (vs.マクロライド無添加)

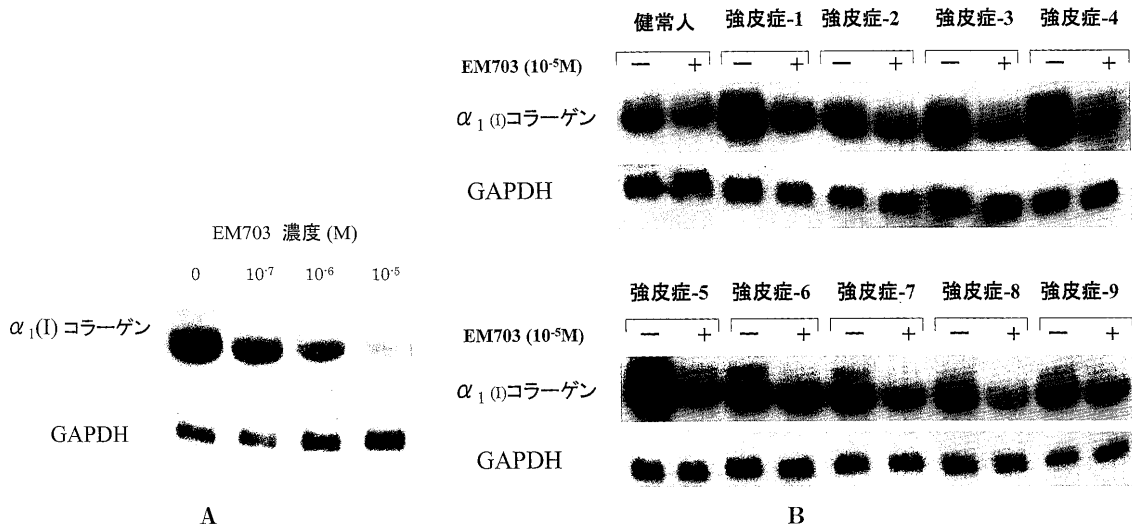


図4 正常および強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲンmRNAレベルに対するEM703の効果。
 A, 正常芽細胞 (N20M) を100 mmのdishに撒き, コンフルーエントに達した細胞に対し 10^{-7} M~ 10^{-4} M濃度のEM703を加え48時間培養. total RNAをguanidium isothiocyanateにより抽出し, 5 μ g per laneを1% agarose gelで電気泳動, Alpha 1 (I) collagenとglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNAを32Pでラベルシプロンプとして使用し, northern blotsで解析した. B, 強皮症線維芽細胞9株の細胞を100 mmのdishに撒き, コンフルーエントに達した細胞に対し 10^{-5} M EM703を添加した培地と無添加の培地で48時間培養し同様にmRNAレベルを解析した.

表2 EM703による正常線維芽細胞のI型コラーゲンm-RNAレベルに対する影響^a

	EM703 (M) の濃度		
	0	10^{-7}	10^{-5}
100	73 ± 3	56 ± 2*	31 ± 2*

a結果はデンスitメトリカルに測定した正常線維芽細胞における $\alpha 1$ (I) コラーゲンm-RNAレベルのEM703各濃度の添加培養で得られた値をEM703無添加に対する%で表した. 各値はGAPDH m-RNAレベルで補正した. 個別に行った3回の実験結果をmean ± SEMで示した.

* : P < 0.01 vs EM703無添加

3. EM703による正常および強皮症線維芽細胞のI型コラーゲン steady-state mRNA levelsの抑制効果

EM703が正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞のI型コラーゲン産生を抑制することが明らかにされたのでその抑制がコラーゲンの発現のどの段階でされるかを明らかにする目的で次にmRNAレベルを検討した. ノーザンプロット analysisの結果では 10^{-7} M~ 10^{-5} M濃度のEM703が正常線維芽細胞の $\alpha 1$ (I) コラーゲンmRNA発現を濃度依存性に抑制することが認められた (図4a). デンスitメトリカルに測定し, GAPDHの値で補正し数値化すると, EM703は $\alpha 1$ (I) コラーゲンmRNAレベルを濃度依存性に抑制し, 10^{-5} M濃度では30.2%

表3 強皮症線維芽細胞におけるI型コラーゲンm-RNAレベルに対するEM703の抑制効果^a

強皮症-1	42 ± 1*	強皮症-6	53 ± 2*
強皮症-2	46 ± 2*	強皮症-7	35 ± 2*
強皮症-3	47 ± 3*	強皮症-8	42 ± 1*
強皮症-4	52 ± 5*	強皮症-9	46 ± 1*
強皮症-5	22 ± 1*		

a結果はデンスitメトリカルに測定した強皮症線維芽細胞における $\alpha 1$ (I) コラーゲンm-RNAレベルのEM703, 10^{-5} Mの添加培養で得られたEM703無添加に対する%で表した. 各値はGAPDH m-RNAレベルで補正した. 個別に行った3回の実験結果をmean ± SEMで示した.

* : P < 0.01 vs EM703無添加

まで抑制した (表2). 強皮症線維芽細胞を用いたノーザンプロットでは, 10^{-5} M濃度のEM703の添加により9株のすべての強皮症線維芽細胞株の $\alpha 1$ (I) コラーゲンmRNA発現を抑制する結果が得られた (図4b). 同様にGAPDHの値で補正し数値化すると, 25から56%の抑制効果が見られた (表3).

4. EM703の正常および強皮症線維芽細胞のCOL1A1プロモーター活性に対する抑制効果

EM703によるI型コラーゲン産生の抑制はI型コラーゲンmRNA量もほぼ同レベルに減少させることが明らかにされたので, その抑制がI型コラーゲンの遺伝子

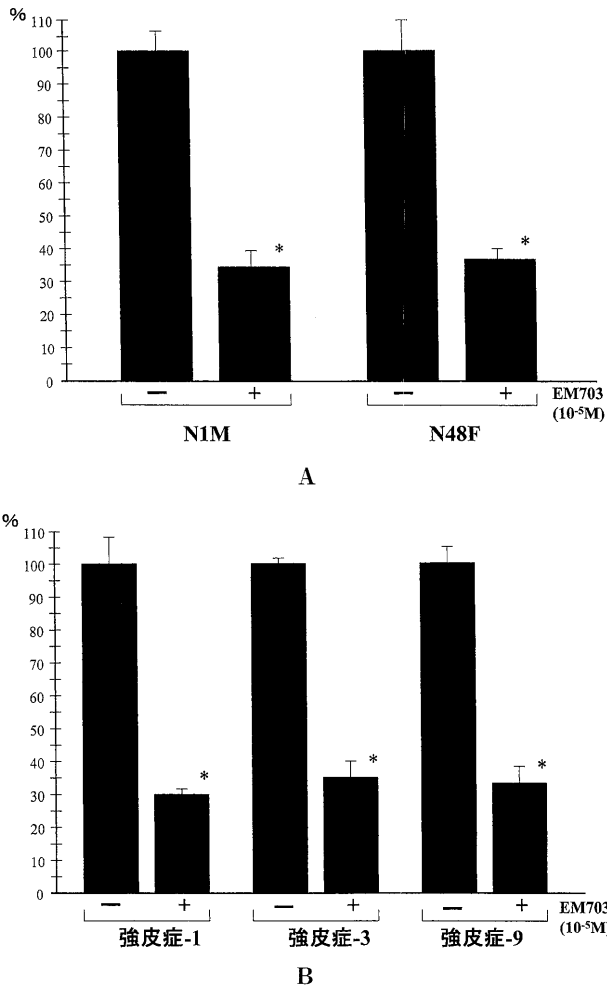


図5 正常および強皮症線維芽細胞における $\alpha 1$ (I) コラーゲン遺伝子プロモーター活性に対するEM703の効果。
 5×10^5 個の正常線維芽細胞 (A) と強皮症線維芽細胞 (B) を6-well組織培養プレートに撒き培養。2日後に 10^{-5} M EM703添加あるいは無添加1% FBS含有DMEMに培地を交換, 引き続き $1.0 \mu\text{g}$ の2.3KbpのCOL1A1上流遺伝子とluciferaseのconstructおよび20 ngのSV40 renilla luciferase constructをトランスフェクション, 48時間後に細胞を回収しlysateを準備し, luciferase活性を測定。- ; EM703添加, + ; EM703無添加, N1M ; 健常1歳男児の皮膚から得た線維芽細胞, N48F ; 健常48歳女性の皮膚から得た線維芽細胞。結果を3回の別個に行った実験のmeans \pm SEMで表す。* ; $p < 0.01$ vs. EM703無添加。

の転写のレベルでなされるかどうかを次に検討した。上流2.3 kbpの $\alpha 1$ (I) コラーゲンプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイでは 10^{-5} MのEM703の添加により $\alpha 1$ (I) コラーゲンの転写活性は正常線維芽細胞において平均30.2%にまで有意に抑制され (図5a), 強皮症線維芽細胞3株においてもほぼ同様に平均30.5%にまで有意に抑制された (図5b)。

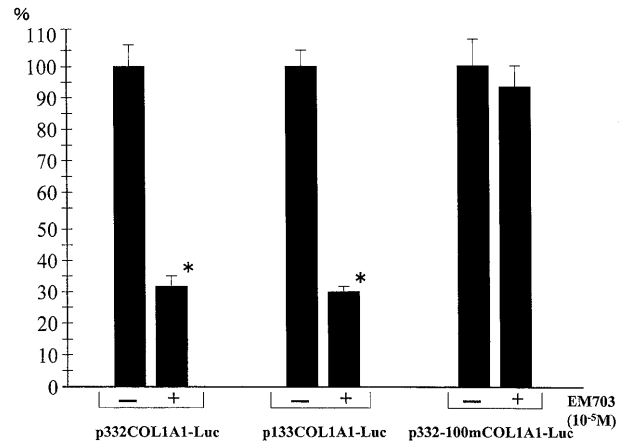


図6 EM703によるヒトCOL1A1プロモーター遺伝子活性の調節。

EM703のCOL1A1プロモーター-luciferase construct遺伝子活性, 特に2つの異なる短いCOL1A1プロモーターおよびCOL1A1のCCAAT boxの置換変異に対するEM703の効果を調べた。 5×10^5 個の正常線維芽細胞を6-well組織培養プレートに撒き培養。2日後に 10^{-5} M EM703添加あるいは無添加1% FBS含有DMEMに培地を交換, 引き続き各コラーゲンプロモーター遺伝子 $1.0 \mu\text{g}$ と20 ngのSV40 renilla luciferase constructをトランスフェクション, 48時間後に細胞を回収しlysateを準備し, luciferase活性を測定した。相対的なluciferase活性をEM703 (10^{-5} M) 無添加で培養した線維芽細胞から得られた値に対するEM703 (10^{-5} M) を添加し培養した線維芽細胞から得られた値の%で表した。実験はそれぞれ3dishesで行いmeans \pm SEMで表した。実験を3回行い結果がほぼ同じ傾向であることを確認した。

使用したDNAは以下の通りである。

p332COL1A1Luc ; -332bpから+42bpのCOL1A1とluciferaseのconstruct.

p133COL1A1Luc ; -133bpから+42bpのCOL1A1とluciferaseのconstruct.

p332-100m-COL1A1Luc ; p332COL1A1Lucの-97~-100に位置するCCAATをGCAAGへと短い置換変異を加えたconstruct.

5. $\alpha 1$ (I) コラーゲン遺伝子プロモーター領域のEM703に反応する部位の局在

さらに我々はEM703による転写の抑制が $\alpha 1$ (I) コラーゲンプロモーター遺伝子のどの部分を介してなされているかを明らかにする目的で, コラーゲンプロモーター遺伝子を種々の長さでdeletionさせた遺伝子を用いて検討した。プロモーター遺伝子はその長さがこれまでに知られているTGF- β に反応する部分である-174~-84が含まれる-332までのものと, もう1つのI型コラーゲンの転写に重要な役割をはたしているDNAエレメントであるproximal CCAAT boxが含まれる-133までを

含むものを使用した。正常線維芽細胞に 10^{-5} M濃度のEM703を添加して培養し、上流2.3キロの $\alpha 1$ (I) コラーゲンプロモーター遺伝子を種々の長さにdeletionさせた遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子にfuseさせたplasmidsをtransfectionし、ルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、プロモーター部分を332 bp, 133 bpのみにdeletionさせた遺伝子においてもEM703により $\alpha 1$ (I) コラーゲンの転写は約30%に抑制された。次いで332 bpのプロモーターを持つプラスミドの-100の位置のCCAATをGCAAGに置換変異させたもの(p332-100m-COL1A1Luc)を用いて同様の実験を行ったところ90%に抑制されたのみであった(図6)。

6. 線維芽細胞における $\alpha 1$ (I) コラーゲンプロモーター遺伝子のCCAAT boxへのCCAAT binding factor (CBF) の結合活性に対するEM703の影響

ルシフェラーゼアッセイによりEM703の $\alpha 1$ (I) コラーゲン遺伝子の転写の抑制が-100の位置にあるProximalCCAAT boxを介してなされる可能性が高いことが明らかにされたのでGel mobility shift assayを用いてその部分に結合することが知られているCBFのDNA結合活性に対するEM703の影響を検討した。Gel mobility shift assayにおいて、まず電気泳動で移動度の遅いバンド(図7の矢印)がCBFの結合を示す特異的なバンドであることが競合アッセイ(図7のレーン1とレーン2)で明らかである。培養線維芽細胞におけるCOL1A1のProximalCCAAT box(-101~-97)に対するCBFの結合活性は 10^{-5} MのEM703の添加によりほとんど変化は認められなかった(図7)。

考 察

今回の研究ではエリスロマイシン誘導体EM703が線維芽細胞のI型コラーゲンの産生を抑制することが明らかにされた。これまでに線維芽細胞のコラーゲン産生を制御する様々な因子が知られている。線維芽細胞にアスコルビン酸¹⁸⁾, TGF- β ^{19,20)}, IL-6²¹⁾を反応させることにより、また線維芽細胞を低酸素分圧の状態にすることによりI型コラーゲン遺伝子発現を増加させることが知られている²²⁾。一方線維芽細胞をTNF- α ²³⁾, IFN- γ ²⁴⁾, EGF²⁵⁾, グルココルチコイド²⁶⁾と反応させたりウイルス²⁷⁾や放射線に暴露させたり、さらに線維芽細胞を癌遺伝子、TPAなどの化学物質によりトランスフォーメーションさせたり²⁸⁾, *in vitro*で線維芽細胞を老化させた場合などにI型コラーゲンの発現は抑制される。強皮症線維芽細胞ではI型コラーゲンの産生が転写レベルで上昇していることが明らかにされており、本症の真皮に

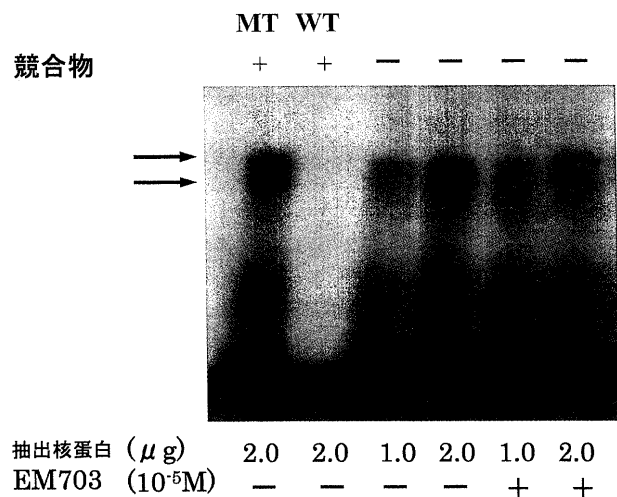


図7 EM703の線維芽細胞におけるCOL1A1のCCAAT-boxに対するCCAAT binding factorの結合活性への影響。

核蛋白の抽出とgel mobility shift assayは“材料と方法”で述べたように行った。2 μ gのEM703無添加で培養の線維芽細胞の核蛋白と32-PでラベルしたCOL1A1の-91~-111を含む48 bpのDNA断片による蛋白-DNA結合反応に、非放射性の同じDNA (WT) と-97~-100のCCAAT部にGCAAGと置換変異させたDNA (MT) をそれぞれ200倍過剰に加え競合アッセイを行った(レーン1とレーン2)。 10^{-5} M濃度のEM703の無添加あるいは添加により培養した線維芽細胞の核蛋白(1.0 or 2.0 μ g)と32-PでラベルしたCOL1A1の-91~-111を含む48bpのDNA断片との反応によるgel mobility shift assay(レーン3~レーン6)。

線維化をきたす重要な病態の一つと考えられている。その発現を抑制するこれらの因子は治療へのアプローチに重要であるが、その実際的な効果、副作用の面から実用的なものは未だ皆無と言える。

マクロライドは抗菌作用の他に抗炎症作用²⁹⁾, 腫瘍の血管新生抑制作用³⁰⁾, vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現抑制作用³¹⁾, 角化細胞における免疫調整作用³²⁾, *in vitro*における悪性腫瘍細胞の増殖抑制作用³³⁾など様々な薬理作用のあることが知られている。さらにマクロライドには線維芽細胞の増殖抑制作用も知られている³⁴⁾。また近年、常染色体劣性遺伝性疾患で、慢性に経過し呼吸器感染症、睪外分泌不全の他に内臓の線維化のみられるcystic fibrosisにAzithromycinなどのマクロライド系抗生物質が有効との報告がある^{2,3)}。EM703は北里大学、北里生命科学研究所にて合成された12員環マクロライドで、抗菌作用を持たない新しいエリスロマイシンの誘導体である。EM703はnuclear factor (NF)- κ Bの活性とinterleukin-8の産生を抑制して抗炎症作用を発揮することが明らかにされている⁴⁾。

そして最近, LiらによりこのEM703がマウスのプレオマイシン誘発肺線維化を抑制することが報告された⁵⁾. そこで今回我々は, EM703の正常および強皮症皮膚由来培養線維芽細胞のI型コラーゲン産生に対する影響を検討し, この誘導体に線維芽細胞のI型コラーゲン産生を抑制する効果のあることを見出した. その抑制は, 転写, mRNAレベルでは約30%に, 蛋白レベルでの産生量も最大約40%にまで抑制しており, EM703によるI型コラーゲン産生の抑制はほとんどが転写レベルでの抑制と考えられ, mRNAのstabilityやtranslationへの影響による抑制はほとんどないと考えられた. さらにその効果が強皮症線維芽細胞に対しても認められることを見いだした.

EM703がI型コラーゲン産生を転写レベルで抑制するそのメカニズムとしてEM703がCOL1A1 promoter activityをどのようにして調節するのかを知ることは重要である. TGF- β に関連してみられることがこれまでに知られており, 最近のLiらのプレオマイシン誘発肺線維化マウスにおけるEM703の線維化抑制のメカニズムはEM703がTGF- β レセプターの情報伝達系を調節することによりなされるとしている⁵⁾. これまでにTGF- β やTNF- α のヒト $\alpha 1$ (I)型コラーゲン転写の調節のメカニズムの検討がなされており, TGF- β では上流遺伝子-174~-84をTGF- β responsive sequencesとし, -164~-142に局在するSp1類似DNA結合部位でのDNA-蛋白質結合活性の増加を伴って, $\alpha 1$ (I)型コラーゲン転写が活性化されるとしている³⁵⁾. 我々の今回の結果では-100に位置するProximalCCAAT boxを介してなされることが明らかにされており, EM703によるI型コラーゲン産生抑制の場合にはTGF- β によるコラーゲン遺伝子の転写活性を増加させる場合のメカニズムとは異なっていた. これはその抑制効果がTGF- β responsive sequencesやSp1結合部位を介さずになされていることを意味している.

次にI型コラーゲン遺伝子のCCAAT boxに結合するCBFに関する知見を述べる. 最近Lounevaらが抗腫瘍剤であるecteinascidin 743 (ET-743)が強皮症線維芽細胞のI型コラーゲンを転写レベルで抑制すると報告している³⁶⁾. ET-743は卵巣癌や直腸癌などに抗腫瘍活性を示すアルキル化剤の抗腫瘍剤で, そのメカニズムは多くの遺伝子の転写においてCBFの機能を障害しておこるとされている. ET-743は直接にCBFのDNA結合を障害せず, プロモーター遺伝子を働かせるのに必要とされるhistone acetylaseにCBFがassociateする能力を障害するとされており, このsequence-specificな効果はMDR-1やHSP70遺伝子で示されている. しかしLounevaら

はET-743が抗腫瘍活性を示すより低濃度でCOL1A1の転写を抑制することをin vitro nuclear transcription assay (nuclear run-off assay)では証明できたが, Sp-1やCBFの結合位置を含むCOL1A1のコンストラクトによる一過性移入実験でET-743によるCOL1A1の転写の抑制は見られなかったとし, またGel mobility shift assayによってもこれらのDNA結合能に対する効果は得られなかったとしている³⁶⁾. 今回の我々の実験ではdeletionおよび点変異を加えたCOL1A1のコンストラクトを用いた一過性移入実験でEM703はProximalCCAAT boxを介してその効果が見られることを証明した. CBFはマウスCOL1A1およびCOL1A2のCCAATシーケンスに結合しその転写を活性化する因子で³⁷⁾, マウスとヒトではCCAATシーケンスの周囲のシーケンスはきわめて類似していることから³⁸⁾, ヒトにおいてもほぼ同様にコラーゲン遺伝子転写活性化に重要な働きをしていると考えられる. しかしながら今回の実験ではGel mobility shift assayでEM703はCBFの結合活性に影響を示さなかった. そこで我々はこのことについて次の三つの可能性の仮説を考えたので述べる. まず第一にEM703の添加はCBFの結合活性には影響しないがCBFを不活性型に変える. 第二にEM703の添加によってCBFの活性を抑制する因子をCBFにinteractさせる. さらに第三はEM703の添加により直接はDNAに結合しないがCBFとinteractしCOL1A1の転写活性を維持するのに不可欠なもう一つの因子を, 取り除くか不活性にさせるという考えである.

臨床的意義としては一般の臨床でエリスロマイシン200 mg, 1錠1回経口投与された時の最大血中濃度は約 1×10^{-6} Mであり (アボットジャパン, 社内資料), 今回のEM703のコラーゲン産生を有意に抑制した濃度が $10^{-6} \sim 10^{-5}$ Mであることは将来, 強皮症の治療薬として用いることが出来る可能性を有している. 今後, プレオマイシンによる皮膚線維化モデルマウスにEM703を投与しin vivoにおける皮膚の線維化に対するEM703の効果を検討する予定である.

結 論

新しいエリスロマイシン誘導体EM703は線維芽細胞のI型コラーゲン産生を転写のレベルで抑制し, その効果は正常に対してのみならず, 強皮症線維芽細胞に対しても見られた. 転写の抑制はI型コラーゲン遺伝子のCCAAT boxを介してなされるが, それは主にCBFのCCAAT boxへの結合活性の低下を伴わないメカニズムでなされることが示唆された.

謝辞 稿を終えるにあたり、御指導、御高閲を賜りました本学皮膚科学教室の山崎雙次教授に深謝いたします。また、研究を直接御指導いただきました同教室の簗持淳教授、本研究にEM703をご提供いただきました北里大学、北里生命科学研究所の砂塚敏明先生、大村智先生に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Saitta B, Gaidarova S, Cicchillitti L, Jimenez SA. : CCAAT binding transcription factor binds and regulates human COL1A1 promoter activity in human dermal fibroblasts : demonstration of increased binding in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum*, **43** : 2219-2229, 2000.
- 2) Gaylor AS, Reilly JC. : Therapy with macrolides in patients with cystic fibrosis. *Pharmacotherapy*, **22** : 227-239, 2002.
- 3) Southern KW, Barker PM. : Azithromycin for cystic fibrosis. *Eur Respir J*, **24** : 834-838, 2004.
- 4) Desaki M, Okazaki H, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K, Takizawa H. : Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of erythromycin in human bronchial epithelial cells : possible role in the signaling pathway that regulates nuclear factor- κ B activation. *Antimicrob Agents Chemother*, **48** : 1581-1585, 2004.
- 5) Li Ji Y, Azuma A, Usuki J, Abe S, Matsuda K, Sunazuka T, Shimizu T, Hirata Y, Inagaki H, Kawada T, Takahashi S, Kudoh S, Omura S. : EM703 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the inhibition of TGF- β signaling in lung fibroblasts. *Respiratory Research*, **7** : 1-13, 2006.
- 6) Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*, **23** : 581-590, 1980.
- 7) Yoshida K, Sunazuka T, Nagai K, Sugawara A, Cho A, Nagamitsu T, Harigaya Y, Otoguro K, Akagawa K, and Omura S. : Macrolides with promotive activity of monocyte to macrophage differentiation. *J. Antibiot*, **58** : 79-81, 2005.
- 8) Fleischmajer R, Perlsh JS, Krieg T, Timple R. : Variability in collagen and fibronectin synthesis by scleroderma fibroblasts in primary culture. *J Invest Dermatol*, **76** : 400-403, 1981.
- 9) Hatamochi A, Arakawa M, Takeda K, Ueki H. : Activation of fibroblast proliferation by Werner's syndrome fibroblast-conditioned medium. *J Dermatol Sci*, **7** : 210-216, 1994.
- 10) Hatamochi A, Kuroda K, Shinkai H, Kohma H, Oishi Y, Inoue S. : Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) expression in cutis laxa fibroblasts : upregulation of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 genes but not of the MMP-2 gene. *Br J Dermatol*, **38** : 757-762, 1998.
- 11) Chu ML, Myers JC, Bernard MP, Ding JF, Ramirez F. Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro alpha 1 (I) collagen chain. *Nucleic Acids Res*, **10** : 5925-5934, 1982.
- 12) Arcari P, Martinelli R, Salvatore F. : The complete sequence of a full length cDNA for human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acids Res*, **12** : 9179-9189, 1984.
- 13) Mori K, Hatamochi A, Ueki H, Olsen A and Jimenez SA. : The transcription of human $\alpha 1$ (I) procollagen gene (COL 1 A 1) is suppressed by tumor necrosis factor- α through proximal short promoter elements-evidence for suppression mechanisms mediated by two nuclear factor binding sites. *Biochem. J*, **319** : 811-816, 1996.
- 14) Henikoff S. : Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene*, **28** : 351-359, 1984.
- 15) Sato M, Shegogue D, Hatamochi A, Yamazaki S, Trojanowska M. : Lysophosphatidic acid inhibits TGF-beta-mediated stimulation of type I collagen mRNA stability via an ERK-dependent pathway in dermal fibroblasts. *Matrix Biol*, **23** : 353-361, 2004.
- 16) Groudine M, Peretz M, Weintraub H. : Transcriptional regulation of hemoglobin switching in chicken embryos. *Mol Cell Biol*, **1** : 281-288, 1981.
- 17) Hatamochi A, Mori K, Arakawa M, Ueki H, Kondo M. : Collagenase gene expression in cutis laxa fibroblasts is upregulated by transcriptional activation of the promoter gene through a 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-responsive element. *J Invest Dermatol*, **106** : 631-636, 1996.
- 18) Geesin JC, Darr D, Kaufman R, Murad S, Pinnell SR. : Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fi-

- broblast. *J Invest Dermatol*, **90** : 420-424, 1988.
- 19) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. : Transforming growth factor type beta : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(12) : 4167-4171, 1986.
 - 20) Raghov R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. : Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest*, **79** : 1285-1288, 1987.
 - 21) Duncan MR, Berman B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J Invest Dermatol*, **97** : 686-692, 1991.
 - 22) Falanga V, Martin TA, Takagi H, Kirsner RS, Helfman T, Pardes J et al. : Low oxygen tension increases mRNA levels of $\alpha 1$ (I) procollagen in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol*, **157** : 408-412, 1993.
 - 23) Solis-Herruzo JA, Brenner DA, Chojkier M. : Tumor necrosis factor alpha. inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, **263** : 5841-5845, 1988.
 - 24) Czaja MJ, Weiner FR, Eghbali M, Giambone MA, Eghbali M, Zern MA. : Differential effects of gamma-interferon on collagen and fibronectin gene expression. *J Biol Chem*, **262** : 13348-13351, 1987.
 - 25) Kurata S, Hata R. : Epidermal growth factor inhibits transcription of type I collagen genes and production of type I collagen in cultured human skin fibroblasts in the presence and absence of L-ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *J Biol Chem*, **266** : 9997-10003, 1991.
 - 26) Hamalainen L, Oikarinen J, Kivirikko KI. : Synthesis and degradation of type I procollagen mRNAs in cultured human skin fibroblasts and the effect of cortisol. *J Biol Chem*, **260** : 720-725, 1985.
 - 27) Sandmeyer S, Gallis B, Bornstein P. : Coordinate transcriptional regulation of type I procollagen genes by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem*, **256** : 5022-5028, 1981.
 - 28) Hatamochi A, Aumailley M, Mauch C, Chu ML, Timpl R, Krieg T. : Regulation of collagen VI expression in fibroblasts. Effects of cell density, cell-matrix interactions, and chemical transformation. *J Biol Chem*, **264** : 3494-3499, 1989.
 - 29) Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Sautebin L, Rombola L, Carnuccio R, Iuvone T, D'Acquisto F, Di Rosa M. : Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther*, **292** : 156-163, 2000.
 - 30) Yatsunami J, Tsuruta N, Hara N, Hayashi S. : Inhibition of tumor angiogenesis by roxithromycin, a 14-membered ring macrolide antibiotic. *Cancer Lett*, **131** : 137-143, 1998.
 - 31) Aoki D, Ueno S, Kubo F, Oyama T, Sakuta T, Matsu-shita K, Maruyama I, Aikou T. : Roxithromycin inhibits angiogenesis of human hepatoma cells *in vivo* by suppressing VEGF production. *Anticancer Res*, **25** (1A) : 133-138, 2005.
 - 32) Kobayashi M, Shimauchi T, Hino R, Tokura Y. : Roxithromycin downmodulates Th2 chemokine production by keratinocytes and chemokine receptor expression on Th2 cells : its dual inhibitory effects on the ligands and the receptors. *Cell Immunol*, **228** : 27-33, 2004.
 - 33) Kobayashi M, Shimauchi T, Hino R, Tokura Y. : Roxithromycin downmodulates Th2 chemokine production by keratinocytes and chemokine receptor expression on Th2 cells : its dual inhibitory effects on the ligands and the receptors. *Cell Immunol*, **228** : 27-33, 2004.
 - 34) Yatsunami J, Fukuno Y, Nagata M, Tominaga M, Aoki S, Tsuruta N, Kawashima M, Taniguchi S, Hayashi S. : Antiangiogenic and antitumor effects of 14-membered ring macrolides on mouse B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*, **17** : 361-367, 1999.
 - 34) Nonaka M, Pawankar R, Tomiyama S, Yagi T. : A macrolide antibiotic roxithromycin inhibits the growth of nasal polyp fibroblasts. *Am J Rhinol*, **13** : 267-272, 1999.
 - 35) Jimenez, S.A., Varga, J., Olsen, A., Li, L., Diaz, A., Herhal, J., and Koch, J. : Functional analysis of human $\alpha 1$ (I) procollagen gene promoter-differential activity in collagen-producing and-nonproducing cells and response to transforming growth factor $\beta 1$. *J. Biol. Chem*, **269** : 12684-12691, 1994.
 - 36) Louneva N, Saitta B, Herrick DJ, and Jimenez SA. : Transcriptional inhibition of type I collagen gene expression in scleroderma fibroblasts by the antineoplastic drug ecteinascidin 743. *J Biol Chem*, **278** : 40400-

- 40407, 2003.
- 37) Maity SN, Golumbek PT, Karsenty G, de Crombrughe B. : Selective activation of transcription by a novel CCAAT binding factor. *Science*, **241** : 582-585, 1988
- 38) Ravazzolo R, Karsenty G, de Crombrughe B. : A fibroblast-specific factor binds to an upstream negative control element in the promoter of the mouse alpha 1 (I) collagen gene. *J Biol Chem*, **266** : 7382-7387, 1991.