

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

皮膚線維化過程における
CTGF 発現に対する
SRF, MRTF 関与の検討

梁川志保^{1), 2)}

¹⁾ 岩手医科大学, 医歯薬総合研究所: 神経科学研究部門

²⁾ 岩手医科大学医学部, 皮膚科学講座

Running title:
CTGF 発現に対する SRF, MRTF の関与
梁川志保

要旨

Connective tissue growth factor (CTGF) の過剰産生は、線維増殖性疾患、瘢痕形成などの組織線維化に密接に関与している。組織線維化の過程において transforming growth factor β 1 (TGF β 1) によって発現誘導される CTGF 遺伝子の転写調節には転写因子 serum response factor (SRF) およびその調節因子である myocardin-related transcription factor (MRTF) の関与が示唆されているが、十分な解析がされていない。我々は今回、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて CTGF 発現制御における SRF の役割を詳細に解析した。その結果、TGF β 1 による速やかな CTGF 発現誘導においては意外にも MRTF は関与しておらず、異なる調節因子である ternary complex factor (TCF) が p38 活性化を介して SRF と協調的に CTGF の発現を亢進していることを明らかにした。さらに TGF β 1 により発現誘導された CTGF は、皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換を誘導することを見出した。

Key words: TGF β 1, CTGF, SRF, human dermal fibroblast, fibrosis

I. 緒言

肺、腎、肝臓、皮膚などの臓器の線維化は重症化すると生命を脅かす原因となり、その治療および予防が生命予後にもたらす影響は大きい。様々な臓器の線維化を特徴とする代表的疾患の1つに全身性強皮症がある。全身臓器の線維化を引き起こす原因として炎症細胞、内皮細胞から放出される様々な成長因子やサイトカインの関与が報告されているが、その中でも中心的な役割を果たすと考えられるのが transforming growth factor- β (TGF β)、殊に TGF- β 1 である^{1, 2)}。TGF- β 1 は皮膚線維芽細胞で転写因子 Smad2/3 および Smad4 を介して I 型コラーゲン遺伝子発現を誘導するが、強皮症患者の皮膚線維芽細胞では TGF β のオートクラインにより恒常的活性化が起こり、I 型コラーゲン遺伝子の発現が亢進するとされる³⁾。CTGF もまた、全身性強皮症の病因として重要なサイトカインと考えられてきた。CTGF は CCN ファミリーの1つで、CCN2 として知られる分泌型タンパク質である。細胞増殖、細胞外マトリックスの産生、細胞遊走および血管新生の亢進など多岐にわたる作用が知られ、創傷部皮膚で発現亢進した CTGF は線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックス産生を亢進することで治癒を促進する⁴⁾。一方、全身性強皮症患者の血清および皮膚、培養線維芽細胞では CTGF の過剰発現が確認され⁵⁻⁷⁾、他の多くの線維化疾患においても発現の異常亢進が認められている。これらことから、CTGF 発現制御の破綻が皮膚を始め組織線維化の要因となる可能性が示唆される。慢性的な CTGF 過剰発現のメカニズムについてこれまでに解析例はあるが、いまだ未解明な部分も多い^{7, 8)}。

また線維芽細胞や上皮細胞から生じる筋線維芽細胞(myofibroblast)は、各臓器において細胞外マトリックスを過剰産生し、線維化の過程に密接に関わっていることが明らかとなっている⁹⁾。この引き金となる有力候補も TGF- β 1 であり、上皮細胞の転写制御因子 MRTF を活性化し、さらに Smad 系を介した細胞接着の解離、SRF を介した細胞骨格のリモデリングによる運動能亢進とともに、筋線維芽細胞への形質転換を惹起する¹⁰⁾。前述した CTGF 遺伝子の転写調節領域にも SRF 認識配列となる CArG 配列が存在しているが¹¹⁾、これまで SRF

を介した CTGF 発現の制御については未解明な部分が多かった。CTGF は筋線維芽細胞への形質転換に関与することも報告されている⁸⁾。以上のことから、皮膚線維芽細胞において TGF- β 1 が MRTF/SRF を活性化することで CTGF 発現の亢進や筋線維芽細胞への形質転換を引き起こし、線維化を惹起しているのではないかと推測される。そこで本研究では、ヒト皮膚由来の培養線維芽細胞を使用して、TGF- β 1 依存的な CTGF 発現における MRTF, SRF の役割を明らかにするとともに、その活性制御に関わるメディエーターについて解析、検討を行った。

II. 研究材料及び方法

1. 培養細胞

成人ヒト皮膚線維芽細胞 (PromoCell) は培養フラスコ (IWAKI) 中で Fibroblast Growth Medium2 (PromoCell) を用い, 37°C, 5%CO₂ 存在下で培養を行った. 継代培養は 0.25%トリプシン (Nacalai) 溶液処理によって行った.

2. siRNA 導入

ヒト皮膚線維芽細胞を細胞密度 2×10^4 細胞/cm² で播種し, Lipofectamine RNAiMAX Regent (Life Technologies) を用いて各種 siRNA を導入した. siRNA 導入 24 時間後に PBS で洗浄後, 0.2%BSA (ウシ血清アルブミン) および 1%Insulin-Transferrin-Selenium-X (ITS)(Life Technologies) 添加 Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) に培養液を交換した. その 24 時間後より TGFβ1 を 20 ng/ml の濃度で添加し, 24 時間および 120 時間後にサンプル化した. siRNA はすべて Sigma から入手した. 各 siRNA のターゲット配列は以下のとおりである. ヒト SRF: CCGCGTGAAGATCAAGATGGA, ヒト MRTF-A: GACACCTCGGAATTGCACTTT, ヒト MRTF-B: GGACGAGAGAACAACACTAGTGG, ヒト TCFs: CAGAAGTTTGTCTACAAGTTT, ヒト CTGF: CCTATCAAGTTTGAGCTTT. 対照として発現抑制効果を持たないことが検証されたコントロール siRNA (Sigma) を用いた.

3. ウェスタン解析

細胞を PBS で洗浄後, SDS サンプルバッファー [125 mM Tris-HCl, pH6.8, 2%SDS, 10%グリセロール, 0.01%BPB+1%プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai), 1%ホスファターゼ阻害剤カクテル (Nacalai)] を用いて細胞を溶解した. SDS サンプルはポリアクリルアミドゲル (10~11%) を用いて SDS-PAGE を行い, PVDF 膜 (Millipore) に転写した. 5%スキムミルクを含む TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.01% Tween20) で 30 分のブロッキング後, 抗体反応を行った. 一次抗体は標的タンパク質に対する特異抗体, 抗 α-Smooth Muscle 抗体 (1A4; Sigma), 抗 CTGF 抗体 (L-20;

Santa Cruz), 抗 α -tubulin 抗体 (DM1A ; Sigma) を CanGet Signal solution (TOYOBO) で希釈して用い, 二次抗体として一次抗体に対応した HRP 標識抗マウス IgG 抗体, 抗ヤギ IgG 抗体 (GE healthcare) を用い, 化学発光により検出した.

4. 定量的リアルタイム PCR

Real Time ready Cell Lysis Kit (Roche) により調製した RNA を含む細胞溶解液を鋳型として, Transcriptor Universal cDNA Master (Roche) を用い cDNA を合成した. 定量的リアルタイム PCR は KAPA SYBR[®] FAST qPCR Master Mix (日本ジェネティクス) を用い, 95°C 30 秒, (95°C 5 秒-60°C 30 秒) \times 40 サイクルの反応条件で行った. 内部標準遺伝子にはグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を用いた. 遺伝子特異的なプライマーは以下の配列を使用した. ヒト CTGF : 5'-TGGAAGAGAACATTAAGAAGGGC-3' (forward), 5'-GCTCAAACCTTGATAGGCTTGGAG-3' (reverse), ヒト α -SMA (ACTA2) : 5'-CTGACCCTGAAGTACCCGATAGAA-3' (forward), 5'-GGGGCAACACGAAGCTCATT-3' (reverse), ヒト GAPDH : 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' (forward), 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'.

5. 免疫染色

ヒト皮膚線維芽細胞を細胞密度 2×10^4 細胞/cm² としてカバーガラス上に播種し, 前述と同様 siRNA の導入および無血清処理, TGF β 1 刺激を行った. TGF β 1 刺激開始 120 時間後に固定液 (4% パラホルムアルデヒド, 4% スクロース, PBS) で 15 分間固定した. その後 PBS で洗浄し, 37°C でブロッキング液 (0.2% TritonX-100, 0.2% BSA, 2% スキムミルク, PBS) を用いて 30 分間染色前処理を行った. 標的タンパク質に対する特異抗体, 抗 α -Smooth Muscle 抗体 (1A4 ; Sigma) を用いて 4°C で一晩の反応後, Alexa488 蛍光標識二次抗体 (Life Technologies) を用いて検出した. 繊維状アクチンは Alexa568 蛍光標識ファロイジン (Life Technologies) を用いて染色した.

6. 試薬

試薬の入手先および使用濃度は以下の通りである。TGF β 1 : 20 ng/ml (R&D systems), Jasplakinolide : 100 nM, LatrunculinB : 1 μ M, SB220025 : 20 μ M, U0126 : 20 μ M, anisomycin : 4 μ M, SP600125 : 20 μ M (いずれも Calbiochem)。各種阻害薬は、サンプル化の 6 時間前に投与した。各阻害薬のコントロールとして溶媒であるジメチルスルホキサイド(DMSO)を使用した。

7. 統計学的解析

各実験は独立の実験として 3 回以上実施した。実験結果の統計処理は両側分布の Student の t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと見なした。

III. 結果

1. TGF β 1 刺激 24 時間後の CTGF 発現における MRTF および SRF の発現抑制の影響

ヒト皮膚線維芽細胞を用いて SRF, MRTF の siRNA を導入し, それぞれの遺伝子を発現抑制した際の TGF β 1 依存的な CTGF 発現の変化 (24 時間後) を定量的リアルタイム PCR およびウエスタンブロット法にて検討した. MRTF は myocardin, MRTF-A, MRTF-B よりなるファミリーを形成し, 線維芽細胞では MRTF-A と MRTF-B が発現している. MRTF-A, MRTF-B の siRNA は混合して使用した (MRTFs siRNA). なお siRNA を導入したそれぞれの遺伝子の発現量は, コントロール siRNA と比較し 20~30% 以下に低下していることを定量的リアルタイム PCR で確認した. その結果, SRF の発現抑制により TGF β 1 刺激に伴う CTGF mRNA 発現増加の約 50% が抑制された. 一方, MRTF-A と MRTF-B の共発現抑制では影響が認められなかった (図 1A). ウエスタン解析でも同様に, SRF の発現抑制により TGF β 1 刺激による CTGF タンパク質発現量亢進の減少を認めたが, MRTF-A と MRTF-B の共発現抑制で CTGF 発現誘導に影響は認められなかった (図 1B). これより TGF β 1 依存的な CTGF 発現誘導に SRF は関与しているが, MRTF は関与していない可能性が示唆された.

2. Jasplakinolide による CTGF 発現の変化

TGF β 1 依存的な CTGF 発現に対する MRTF の関与についてさらに検証を行うため, MRTF 活性化作用を示す Jasplakinolide を用いた実験を行った. MRTF は単量体アクチンとの結合が外れると核内へ移行し, SRF と結合し細胞骨格制御などに関わる SRF 標的遺伝子群の発現を亢進する¹²⁾. Jasplakinolide は繊維状アクチンの安定化によって単量体アクチンを枯渇させ, MRTF の核内移行を促進して SRF 依存性転写を活性化する¹²⁾. 従って MRTF が CTGF の遺伝子発現に関与している場合, Jasplakinolide は TGF β 1 非依存的に CTGF 遺伝子発現を亢進する. しかし検証の結果, Jasplakinolide 投与によって CTGF の発現誘導は起こらず, TGF β 1 による発現誘導も逆に阻害される結果となった (図 2). この際, 陽性対照として MRTF-SRF 依存的に発現制御を受ける α -SMA

の発現亢進は認められた (data not shown) .これらの結果より, TGF β 1 依存的な初期の CTGF 発現誘導において MRTF は関与せず, 異なる経路による SRF 活性化が起こっている可能性が示唆された.

3. TCF の発現抑制および p38 活性化による CTGF 発現の変化

CTGF 発現に関与する SRF の活性化経路を検証するため, Rho-アクチン-MRTF 経路以外の SRF の活性化経路として知られる MAP キナーゼ経路の関与について阻害薬を用いた実験を行った. SB220025, U0126, SP600125 はそれぞれ p38, MEK, JNK の阻害薬である. これらを添加した際, TGF β 1 依存的な CTGF mRNA 発現量は SB220025 によって大きく抑制され (約 80%減少), SP600125 でも抑制 (約 60%減少) された (図 3A). 一方, p38 の活性化剤である anisomycin を添加すると著明な CTGF mRNA 発現亢進が起こることを確認した (図 3B). 以上より, ヒト皮膚線維芽細胞における TGF β 1 依存的な CTGF 発現誘導には, ストレス応答に関わる MAP キナーゼ, 特に p38 が関与している可能性が示唆された. そこで, SRF の調節因子として MAP キナーゼにより活性制御を受ける TCF に注目した. TCF には, Elk1, Net, Sap1 の 3 種が存在する. この 3 つすべてを発現抑制するように設計した siRNA (TCFs siRNA) を遺伝子導入し, TGF β 1 依存的な CTGF 発現量の変化を検討した. その結果, CTGF の発現は大きく抑制 (約 60%減少) され (図 3C), ウェスタン解析においても TGF β 1 刺激による CTGF タンパク質発現亢進の減少が認められた (図 3D). これより TGF β 1 依存的な CTGF 発現制御には, p38 活性化から TCF を介した SRF の活性化が関与していることが示唆された.

4. CTGF 遺伝子発現抑制による α -SMA 発現の変化

各臓器の線維化部位に認められる特徴的所見として, 筋線維芽細胞の出現がある. この線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換に TGF β 1 が深く関与していることが報告されている¹⁰⁾. また, 線維化に深く関わる CTGF も TGF β 1 依存的に速やかに発現が亢進する. そこでヒト皮膚線維芽細胞を用い, CTGF による筋線維芽細胞への形質転換に及ぼす影響について検討した. 筋線維芽細胞への形質転換の指標は, 平滑筋型 α アクチン (α -SMA) の発現とした. ヒト皮膚線

維芽細胞に TGF β 1 刺激を加えた際、24 時間ではほとんど α -SMA 発現の亢進は見られないが、長期的に投与することで発現が亢進してくることが認められた (data not shown).そこで siRNA を用いて CTGF を発現抑制した上で TGF β 1 刺激 120 時間後の α -SMA 発現の変化を検証した. その結果、CTGF の発現抑制により α -SMA の mRNA 発現誘導が対照と比較し約 60%減少することが確認された (図 4A). ウェスタン解析でも同様に、CTGF の発現抑制によって α -SMA タンパク質の発現減少を認めた (図 4B). さらに α -SMA の発現および細胞の形態的变化について免疫染色により観察を行った. その結果、コントロール siRNA では TGF β 1 の 120 時間投与によりストレスファイバーは太くはつきりとした状態に変化し、 α -SMA 陽性となっていた. これに対し、CTGF siRNA では TGF β 1 長期刺激後も α -SMA の発現は起こらず、さらにストレスファイバーも TGF β 1 刺激をしない細胞と同様に細い状態であった (図 4C). これらの結果より、CTGF はヒト皮膚線維芽細胞において、TGF β 1 刺激による筋線維芽細胞への形質転換の過程に必須の役割を果たすことが明らかとなった.

IV. 考察

各臓器の線維化は著しい QOL の低下を招くだけでなく重症化により生命予後を脅かす原因ともなり、その治療や予防法の確立が医療に与える影響は大きい。しかし現時点では有効な治療法は存在せず、早期の確立が望まれている。

CTGF は細胞増殖や細胞外マトリックスの産生など組織線維化に密接に関与していると考えられている。全身性強皮症を始めとする多くの線維化疾患においても発現の異常亢進が認められることから¹³⁾、CTGF 発現抑制は線維化疾患の治療や予防のカギとなると考えられる。組織の線維化には TGF β 1 が重要な役割を果たすことが知られているが、CTGF 遺伝子の発現も TGF β 1 によって強く誘導される。TGF β 1 による CTGF 発現誘導について、これまで TGF β シグナル伝達で代表的な Smad を介した経路について主に解析がなされてきた¹⁴⁻¹⁶⁾。その中で、細胞内のアクチン動態により活性が制御される MRTF-SRF 経路を介した CTGF 発現誘導を示唆する報告もある¹¹⁾。しかし、その詳細は明らかでなかった。我々はこれまで、TGF β 1 による上皮細胞から筋線維芽細胞への上皮 - 間葉転換の過程に MRTF-SRF 経路による遺伝子発現制御が深く関わることを明らかにしてきた¹⁰⁾。そこで皮膚繊維芽細胞における CTGF の発現誘導への MRTF による転写制御の関与を想定して検討を行った。その結果、TGF β 1 刺激後速やかに起こる CTGF 発現誘導には、SRF による転写活性化が重要であることが確認された (図 1)。しかも SRF による転写活性化に機能していると想定された MRTF の関与がないことが明らかとなった (図 1, 図 2)。Jasplakinolide による MRTF 活性化は α -SMA など MRTF-SRF 経路によって制御される標的遺伝子群を活性化するが¹²⁾、CTGF 発現に関しては効果がないどころか TGF β 1 による発現誘導をむしろ阻害する結果となった (図 2)。一般に SRF はそれ単独では転写活性化能が弱く、MRTF のような転写調節因子が協調的に働くことにより標的遺伝子の転写活性を亢進する¹²⁾。SRF 依存的な転写制御に関わる経路としては主に 2 種が知られている。1 つは低分子量 G タンパク質 Rho 依存的なアクチン動態依存的な MRTF を介する経路、もう 1 つは MAP キナーゼによる TCF 活性化を介する経路である¹²⁾。いずれの調節因子も SRF と結合して異なる標的遺伝

子群の活性化に機能し、主に MRTF 経路は細胞骨格や細胞運動、筋分化に関わる遺伝子群を制御し、TCF 経路は細胞増殖に関わる前初期遺伝子 (immediate early genes) を制御していることが知られている¹²⁾。我々の解析結果では、MAP キナーゼのうち細胞のストレス応答に関わる p38 と JNK、特に p38 の活性化が重要であることが明らかになった (図 3)。さらに TCF の発現抑制により TGF β 1 依存性 CTGF 発現誘導が顕著に抑制されたことから、TGF β 1-p38-TCF/SRF という経路によって CTGF 発現誘導が起こることが示唆された (図 3)。MRTF と TCF は SRF との結合に対して競合することが知られており¹²⁾、Jasplakinolide による MRTF 活性化が TGF β 1 依存性の CTGF 発現を抑制した原因は TCF-SRF 経路を阻害した可能性が考えられる。

前述のとおり、全身性強皮症をはじめケロイド、肺線維症、糸球体硬化症などの線維化疾患では、TGF β 1 依存的な CTGF 発現において Smad 系の関与が数多く報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。しかし今回の我々の解析によって、皮膚線維芽細胞において TCF-SRF 経路は CTGF 発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。p38 は炎症、虚血などのストレス応答で活性化される¹⁷⁾。全身性強皮症では自己免疫異常や虚血が、ケロイド形成では炎症による創傷治癒の遅延などが発症に関わっているという報告もあり^{18,19)}、本来は生理的な創傷治癒過程にも重要な働きを持つ CTGF の発現制御に p38 経路が深く関わっている可能性がある。近年、p38 は炎症や免疫異常が関与する疾患において注目されており¹⁷⁾、新たな治療・創薬のターゲットとなりうる可能性が示唆される。

さらに今回の解析から、ヒト皮膚線維芽細胞において TGF β 1 による筋線維芽細胞への形質転換に CTGF の発現誘導が必須であることを明らかにした (図 4)。筋線維芽細胞は盛んな細胞増殖、細胞外マトリックス産生および不可逆的な収縮により組織の肥厚、硬化、拘縮などに関わることから⁹⁾、今回明らかにした p38-TCF/SRF による CTGF の発現制御に加え、CTGF の機能部位に対する中和抗体や阻害ペプチドといった分子標的治療薬などの CTGF 発現抑制あるいは機能抑制が、これら症状に対する治療ターゲットとなり得ることを示している。

本研究を臨床検体を用いた解析でさらに検討することにより，CTGF 発現異常が関わる皮膚線維化病変の発症メカニズムの解明につながることも期待される．

稿を終えるに当たり，本研究の機会を与えてくださり，御指導・御校閲を賜りました岩手医科大学医歯薬総合研究所神経科学研究部門・祖父江憲治副学長ならびに岩手医科大学皮膚科学講座・赤坂俊英教授に厚く御礼申し上げます．

また，本研究の研究方針ならびに実験手技，論文作成などに一貫して熱心な御指導を賜りました岩手医科大学医歯薬総合研究所神経科学研究部門・真柳平講師に心より御礼申し上げます．

利益相反：本論文内容に関連する著者の利益相反はない．

文献

- 1) Pannu J and Trojanowska M: Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 16, 739-745, 2004.
- 2) Jinnin M: Mechanism of skin fibrosis in sclerosis. *J Dermatol* 37, 11-25, 2010.
- 3) Ihn H: Autocrine TGF β signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermal Sci* 49, 103-113, 2008.
- 4) Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al.: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Res* 16, 585-601, 2008.
- 5) Igarashi A, Nashiro K, Kikuti K, et al.: Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 105, 280-284, 1995.
- 6) Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, et al.: 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, 149-154, 2000.
- 7) Denton CP and Abraham DJ: Transforming growth factor- β and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 13, 505-511, 2001.
- 8) Sonnylal S, Shi-wen X, Leoni P, et al.: Selective expression of connective tissue growth factor in fibrosis in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum* 62, 1523-1532, 2010.
- 9) Boris H, Sem HP, Victor J, et al.: The myofibroblast one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170, 1807-1816, 2007.

- 10) Morita T, Mayanagi T and Sobue K: Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial-mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol* 179, 1027-1042, 2007.
- 11) Muehlich S, Cicha I, Garlich KD, et al.: Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, 1732-1738, 2007.
- 12) Posern G and Treisman R: Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* 16, 588-596, 2006.
- 13) Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, et al.: Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keroid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 106, 729-33, 1996.
- 14) Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, et al.: Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signaling by BMP and TGF β . *Nat Cell Biol* 4, 599-604, 2002.
- 15) De Winter P, Leoni P and Abraham D: Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors* 26, 80-91, 2008.
- 16) Lee HS: Paracrine role for TGF- β -induced CTGF and VEGF in mesangial matrix expansion in progressive glomerular disease. *Histol Histopathol* 27, 1131-1141, 2012.
- 17) Kremtsov DN, Thornton TM, Teuscher C, et al.: The Emerging Role of p38 Mitogen-Activated protein Kinase in Multiple Sclerosis and Models. *Mol Cell Biol* 33, 3728-3734, 2013.
- 18) Kom JH: Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1, 479-484, 1989.

- 19) Mauch C and Krieg T: Fibroblast-matrix interactions and their role in the pathogenesis of fibrosis. Rheum Dis Clin North Am 16, 93-107, 1990.

SRF acts as a crucial regulator of TGF β 1-induced CTGF expression
in human dermal fibroblasts

Shiho YANAGAWA^{1), 2)}

¹⁾ Department of Neuroscience, Institute of Biomedical Sciences,
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

²⁾ Department of Dermatology, School of Medicine, Iwate Medical
University, Morioka, Japan

Abstract

Hyperproduction of connective tissue growth factor (CTGF) is implicated in various organ fibrosis including skin. Although previous reports had suggested that the MRTF-SRF pathway, which plays a critical role in actin dynamics-dependent transcriptional regulation, mediates TGF β -induced CTGF expression, the precise molecular mechanism has not been elucidated so far. In this report, we examined the contributions of SRF and MRTF on TGF β -induced CTGF expression in human dermal fibroblasts. Unexpectedly, our results demonstrated that MRTF is not required for TGF β -induced immediate CTGF expression, but SRF acts as a crucial regulator in cooperation with TCF, another transcriptional co-factor for SRF, via activation by p38MAPK. We furthermore demonstrated that depletion of CTGF expression prevented TGF β 1-dependent transformation from dermal fibroblasts to myofibroblasts involved in profibrotic events. Our results have suggested that inhibition of TCF/SRF-dependent CTGF induction may be a potential therapeutic target for skin fibrosis.

付図説明

図 1. 各種 siRNA 導入による 24 時間 TGF β 1 刺激後の CTGF 遺伝子およびタンパク質発現の変化

siRNA の導入後 TGF β 1 を投与して 24 時間後にサンプル化した.

A. CTGF mRNA 発現量の変化

B. CTGF タンパク質発現量の変化

各数値は平均値 \pm 標準誤差. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s : 有意差なし.

図 2. MRTF 活性化剤投与時の CTGF mRNA 発現量の変化

各数値は平均値 \pm 標準誤差. n.s : 有意差なし.

図 3. MAP キナーゼ阻害薬, p38 活性化剤投与時および TCFs siRNA 導入時の CTGF mRNA 発現量, タンパク質発現量の変化

各試薬は TGF β 1 投与後 18 時間後に添加し, 6 時間後 (TGF β 1 開始から 24 時間後) にサンプル化した.

A-C. CTGF mRNA 発現量の変化

D. CTGF タンパク質発現量の変化

各数値は平均値 \pm 標準誤差.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

図 4. CTGF siRNA 導入による 120 時間 TGF β 1 刺激後の SMA 遺伝子およびタンパク質発現の変化

A. α -SMA mRNA 発現量の変化

B. α -SMA タンパク質発現量の変化

C. α -SMA 染色および細胞骨格の変化

上段 : α -SMA 染色像, 下段 : phalloidin 染色像

スケールバー : 50 μ m

各数値は平均値 \pm 標準誤差.* $p < 0.05$, ** $p < 0.0$

