

## D-17 全身性強皮症患者皮膚線維芽細胞のタイプIコラーゲン $\alpha 2$ (COL1A2) プロモーターの in vivo フットプリント法を用いた解析

大西一徳、久保田弥恵、石川 治

(群馬大学医学部皮膚科)

[目的] 全身性強皮症 (SSc) 患者皮膚由来培養線維芽細胞では、I型コラーゲンの合成が正常人皮膚由来培養線維芽細胞に比し亢進し、その異常はコラーゲン遺伝子の転写レベルでの亢進であることが知られている。今回我々は、培養皮膚由来線維芽細胞のCOL1A2 プロモーターにおける蛋白 (転写因子) -DNA 結合状態について、正常人と SSc 患者の間に違いがあるかを検討した

[対象ならびに方法] アメリカリウマチ学会の SSc 診断基準を満たす52歳及び24歳の女性患者の皮膚硬化の明らかな前腕皮膚より通常の explant culture 法で得られた線維芽細胞を用いた。対照とした正常皮膚線維芽細胞は24歳、女性の前腕及び21歳、男性の大腿皮膚より同様の方法で得られた線維芽細胞を用いた。全ての線維芽細胞は、継代3代でほぼコンフルエントに達した時点で実験に供した。SSc 患者及び正常人皮膚由来培養線維芽細胞を dimethyl sulfate (DMS) で処理後に genomic DNA を抽出し、ligation-mediated PCR を行った後、6-FAM 標識したプライマーを用いて Vent polymerase で伸長し、得られた 6-FAM 標識 DNA のフラグメントを genetic analyzer で解析した。

[結果] 抽出した genomic DNA に DMS を作用させて得られた対照と、培養細胞に直接 DMS を作用させた後 DNA を抽出して得られたパターンとの比較では、これまで報告されている転写因子の結合部位やその近傍に差異が認められたが、その差異の多くは正常人と SSc 患者の間での変化は明らかでなかった。しかしながら、-170bp 近傍では正常人と SSc 患者の間で明らかな差異が認められた。

[考察] 今回の結果では、正常人と SSc 患者との間で明らかな差異の認められた部位が、-155、-173 bp の何らかの転写活性を抑制する因子が結合する部位に認められ、そのパターンが対照とした裸の DNA と SSc 患者とが類似し正常人とは異なっていたことは、正常人でこの部位に結合する抑制因子が SSc 患者では結合していないために、COL1A2 遺伝子転写活性が正常人に比し亢進している可能性も考えられる。

In vivo Footprinting Analysis on the Human  $\alpha 2$  (I) Collagen (COL1A2) Gene Promoter of Dermal Fibroblasts Derived from Patients with Systemic Sclerosis

Kazunori Ohnishi, Yae Kubota, Osamu Ishikawa

Department of Dermatology, Gunma University School of Medicine

## D-18 factor XIIIa 陽性 dermal dendrocyte の発現する XVI 型コラーゲンは、factor XIIIa による NC11 domain を介した架橋を形成する

赤木 淳、多島新吾、石橋 明 (防衛医大・皮)、竹鼻 眞、小林 静子 (共立薬科大・生理解剖)、山口典子 (東京医科歯科大難治研・成人疾患研究部門分子病態)

[目的]  $\alpha_1$ (XVI) は FACIT グループのコラーゲンであり、すでに一次構造は決定しているが、生理機能は不明である。今回我々は、factor XIIIa 陽性 dermal dendrocyte において  $\alpha_1$ (XVI) が発現していることを見だし、 $\alpha_1$ (XVI) の架橋形成に factor XIIIa (plasma transglutaminase) が関与しているかどうか検討した。

[対象ならびに方法] (1) 正常皮膚や、樹状細胞が豊富に存在するとされる皮膚線維腫、尋常性乾癬などの組織において、 $\alpha_1$ (XVI) と factor XIIIa の抗体で二重染色を行った。さらに、末梢血単球を GM-CSF, IL-4 存在下で培養して樹状細胞を誘導する in vitro のモデルを用いて、 $\alpha_1$ (XVI) と factor XIIIa 両者の協調的発現を、RT-PCR 法、免疫沈降法により検討した。(2)  $\alpha_1$ (XVI) 分子が factor XIIIa の基質としなり得るかを検討するため、 $\alpha_1$ (XVI) の noncollagenous (NC) domain に対する recombinant peptide を用いて、 $^3\text{H}$  putrescine への取り込み能を測定した。

[結果] 正常皮膚、皮膚線維腫、尋常性乾癬いずれにおいても、 $\alpha_1$ (XVI) と Factor XIIIa の陽性細胞は大部分一致していた。in vitro の系では mRNA レベル、蛋白レベルいずれにおいても、樹状細胞へ分化が誘導されるに従って、両者の発現は協調して増強していた。また、 $\alpha_1$ (XVI) NC domain の  $^3\text{H}$  putrescine への取り込みでは、fibronectin とほぼ同等の値を示し、 $\alpha_1$ (XVI) が factor XIIIa の有効な基質となっていることが示された。実際  $\alpha_1$ (XVI) NC domain と factor XIIIa を反応させると高分子複合体を SDS-PAGE で検出した。

[結論] 以上より、XVI 型コラーゲンは factor XIIIa 陽性 dermal dendrocyte の有効な分子マーカーであり、NC11 domain が factor XIIIa の有効な基質となりこれが安定化に寄与していると考えられる。

Type XVI collagen, a possible molecular marker of factor XIIIa<sup>+</sup> dermal dendrocytes, is a potential substrate for factor XIIIa

Atsushi Akagi, Shingo Tajima, Akira Ishibashi

Dept of Dermatology, National Defense Medical College

Makoto Takehana, Shizuko Kobayashi

Dept of Physiology and Anatomy, Kyoritsu College of Pharmacy

Noriko Yamaguchi

Dept of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University