

ビタミンCと上皮成長因子によるヒト皮膚線維芽細胞の増殖とコラーゲン代謝調節機構の分子細胞生物学的研究

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

畑 隆一郎

L-Ascorbic acid 2-phosphate (Asc 2-P), a long-acting vitamin C derivative, stimulated transcription of genes for $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ and $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ collagen in normal human skin fibroblasts after 8 h of treatment in the absence or in the presence of cycloheximide, indicating Asc 2-P stimulates transcription of type I collagen genes in the absence of protein synthesis. The transcriptional rate in these cells reached the maximum value after 40 h of treatment, and at that time it was 3 to 4 times higher than that of the control cells cultured in the absence of Asc 2-P. Steady state levels of mRNAs for $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ and $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ chains were also increased to be 3 to 4 times higher than the control levels by treatment of the cells with Asc 2-P for 72 h. When the fibroblasts obtained from a patient with Ehlers-Danlos syndrome were treated with Asc 2-P, the derivative also stimulated transcription of the gene for $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ chain and accumulation of mRNA for $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ chain. On the other hand, Asc 2-P failed to stimulate transcription of the $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ gene or an increase in mRNA for $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ chain. Sodium ascorbate showed effects quite similar to those of Asc 2-P, when fibroblasts obtained from a normal control or the patient were cultured for 16 h with it.

These results indicate the existence of *cis*-regulatory elements responsible for transcriptional activation by Asc 2-P or ascorbic acid in $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ and $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ genes of normal fibroblasts. These data also suggest some defect(s) of these elements in the $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ gene of the patient with Ehlers-Danlos syndrome.

1. 緒言

細胞外マトリックスが細胞の増殖、細胞の機能制御に大きな役割を果していることが明らかにされつつある。我々は個体の発生、老化、および生体のホメオスタシスの維持において、細胞外マトリックスが重要な機能を持つことから、細胞外マトリックスを神経系、内分泌系、免疫系とならぶ第四の生体制御系として位置づけ¹⁾、その代謝調節機構と作用機構を分子レベルで明らかにしたいと考えている。

I型コラーゲンは細胞外マトリックスの主要成

分であり、高等動物においては、生体蛋白質のおよそ20%を占め、組織形成、多細胞体制の維持に必須の成分である。

I型コラーゲンの構造の異常、あるいは合成の低下は骨形成不全症、エーラー・ダンロス症(EDS)、壊血病の病因となり、器官の形成異常、機能不全を引き起こし、重症の場合は個体の死を招く。一方、I型コラーゲンの組織への異常な蓄積は、肝硬変、動脈硬化、強皮症等の臓器線維症を引き起こす。それ故、正常な細胞ではI型コラーゲンを構成する $\alpha_1(\text{I})$ 鎖と $\alpha_2(\text{I})$ 鎖遺伝子の発現は厳密に調節されていると考えられる。

Molecular Cell Biological Studies on the Regulation of Growth and Collagen Metabolism in Human Skin Fibroblasts by Vitamin C and Epidermal Growth Factor

Ryu-Ichiro Hata

我々は細胞外マトリックスの代謝調節の研究中に、上皮成長因子(EGF)とビタミンC(VitC)および活性持続型ビタミンC(Asc2-P)が共に種々の細胞の増殖を促進するが、I型コラーゲンに関しては、ビタミンCとAsc2-Pが合成を活性化するのに対して、EGFは合成の阻害をすることを見いだし²⁻⁴⁾、さらに、これがI型コラーゲンの遺伝子の転写レベルの調節であることを明らかにした⁵⁾。

本研究では皮膚の組織形成と代謝調節機構を明らかにすることを目的として、この分子機構を解析した。

2. 実験方法

正常および $\alpha_2(I)$ 鎖の合成欠損を示すEDS患者⁶⁾の皮膚線維芽細胞を10%のウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地で定常期まで培養後Asc2-PあるいはVitC存在下に時間を変えて培養し、I型コラーゲンを構成する $\alpha_1(I)$ 鎖と $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写活性、mRNA量、およびそれぞれのポリペプチド鎖の合成量を調べた。方法は既報の方法によった^{5, 6)}。

3. 結果及び考察

3.1 活性持続型ビタミンCによるヒト皮膚線維芽細胞のI型コラーゲン遺伝子の転写活性化のキネティクス

正常細胞をAsc2-Pで処理すると、8時間後には $\alpha_1(I)$ 鎖、および、 $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写活性は有意に上昇し、また、シクロヘキシミドを共存させて、蛋白質の合成を95%阻害しても、両遺伝子の転写活性化は同様に起こる(Fig.1A)。これらの結果はAsc2-P処理によるシグナルは、新たな蛋白質合成を介さずに直接 $\alpha_1(I)$ 鎖と $\alpha_2(I)$ 鎖の遺伝子を活性化することを示している。転写活性はAsc2-P処理40時間後に最大を示し、以後漸減した。mRNA量はこれを追いかけるように増加し、処理3日後に最大となった⁷⁾。

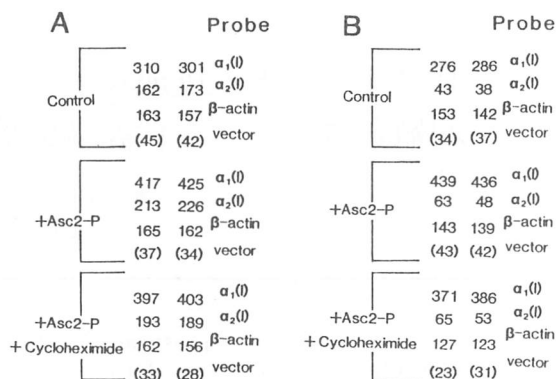


Fig.1 Hybridization of mRNA precursors during in vitro transcription. A, normal control; B, EDS.

16時間の処理ではAsc2-PとVitCによる $\alpha_1(I)$ 鎖と $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写活性化、mRNA量、コラーゲン合成量に差はなく、長時間処理によって観察された両者の効果の差³⁾は、その安定性の差によると考えられる(Table 1)。

さらに、Asc2-P処理による時間変化を調べると、転写活性化、およびmRNA量は、未処理の細胞の3倍となったが、ポリペプチド鎖の合成は最大6倍に活性化されており、Asc2-PはI型コラーゲン遺伝子の転写活性化の他に、mRNAの安定化、あるいは、翻訳過程の活性化作用もあると考えられる⁷⁾。

3.2 エーラー・ダンロス症患者皮膚線維芽細胞における $\alpha_2(I)$ 鎖の遺伝子の転写異常

EDS患者細胞における $\alpha_2(I)$ 鎖の発現異常の

Table 1 Effects of Sodium Ascorbate and Ascorbic Acid 2-Phosphate on the Expression of Type I Collagen Genes^a

	DNA Content (%)	Protein Synthesis (%)		Relative ^b Rate of Collagen (%)	Type I Production (%)		mRNA Level (%)		Primary Transcripts (%)	
		COL	NCP		α_1	α_2	α_1	α_2	α_1	α_2
Control	100 ± 2	100 ± 9	100 ± 12	7.0 ± 0.6	100	100	100	100	100	100
+NaAsc	124 ± 9	201 ± 9	124 ± 14	10.7 ± 0.4	223	244	171	180	180	202
+Asc2-P	117 ± 1	218 ± 10	147 ± 4	10.0 ± 0.4	233	225	164	175	205	234

^aHuman skin fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum in the absence or presence of 0.2 mM sodium ascorbate (NaAsc) or 0.2 mM ascorbic acid 2-phosphate (Asc 2-P) for 16 hours.

^bRelative rate of collagen production to total protein production.

原因を明らかにするために患者細胞を上記と同様の処理をすると、 $\alpha_1(I)$ 鎖についてはAsc2-P処理により正常細胞と同様に転写の活性化、mRNA量の増加、 $\alpha_1(I)$ 鎖の合成活性化が起こったが、 $\alpha_2(I)$ 鎖の場合は、Asc2-P未処理の時は正常細胞と比較して転写は1/4、mRNA量は1/10以下であり、 $\alpha_2(I)$ 鎖の合成は全く検出されなかった(Fig.1B)。Asc2-Pで8時間から6日間の処理では、 $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写活性化、mRNA量の上昇は起こらず、 $\alpha_2(I)$ 鎖の合成も検出できなかった。EDS患者細胞の $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子をSouthern Blot法で調べると、そのサイズおよび遺伝子量は正常細胞と違いはなかった。これらの結果は、このEDS患者細胞においては、 $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写機構に異常があり、Asc2-Pによる活性化を受けないと考えられる⁷⁾。

4. 総括

VitCは抗壊血病因子として発見された。VitCはコラーゲンの合成において、コラーゲン分子特有のヘリックス構造を形成するのに必須であるヒドロキシプロリン形成の際の酵素のコファ

クターとしての役割が報告されていたが、本研究は、VitCあるいはAsc2-Pのシグナルが直接I型コラーゲン遺伝子の転写を活性化することが明らかにした。この機構をさらに解明することにより、細胞の代謝を活性化する、新しい型の化粧品開発に有効であると考えられる。

文献

- 1) R. Hata and H. Senoo: *Tiss. Cult. Res. Commun.* 11:337-343, 1992.
- 2) R. Hata, H. Sunada, K. Arai et al.: *E. J. Biochem.* 173:261-267, 1988.
- 3) R. Hata and H. Senoo: *J. Cell. Physiol.* 138: 8-16, 1989.
- 4) 畑 隆一郎, 妹尾 春樹: *日経サイエンス* 1992年2月号:88-97.
- 5) S. Kurata and R. Hata: *J. Biol. Chem.* 266: 9997-10003, 1991.
- 6) R. Hata, S. Kurata and H. Shinkai: *E. J. Biochem.* 174:231-237, 1988.
- 7) S. Kurata, H. Senoo and R. Hata: *Exptl. Cell Res.* 206:63-71, 1993