

# 皮膚の恒常性維持における転写補助因子 MRTF-A/B の役割

大阪大学大学院・医学系研究科

林 謙一郎

Skin fibroblasts themselves are the cells that produce extracellular matrix (ECM), but their ability to produce ECM and motility are low under the normal conditions. In contrast, when skin tissues are injured, they are changed to myofibroblasts. Myofibroblasts exhibit an enhanced motility and accumulate at the injured area. There, they vigorously produce ECM for wound healing. Such phenotypic modulation of skin fibroblasts is caused by the inflammatory response as follows. Skin injury activates the secretion of inflammatory cytokines such as transforming growth factor- $\beta$ s (TGF- $\beta$ s) from inflammatory cells and the normal skin fibroblasts stimulated by these cytokines are converted into myofibroblasts. However, this mechanism has not been fully characterized. In this study, I addressed this molecular event and found that factor X (anonymity because of unpublished results) plays a critical role in the myofibroblastic phenotypic modulation of skin fibroblasts. Novel findings revealed by this study are as follows: 1) Myocardin related transcription factors A and B (MRTF-A/B) play a critical role in exhibition of myofibroblastic phenotype of skin fibroblasts, 2) In skin fibroblasts, MRTF-A/B are usually localized in the nuclear but their functions remain inactivated because of low level expression of factor X, 3) The expression levels of myofibroblasts markers such as  $\alpha$ SM-actin and collagens are up-regulated concomitant with the increase in the expression of factor X in TGF- $\beta$ -stimulated skin fibroblasts, 4) siRNA-mediated knockdown of factor X suppresses the TGF- $\beta$ -induced up-regulation of these myofibroblastic markers, 5) Factor X binds to both of serum response factor (SRF) and MRTF-A and activates the SRF/CARg-box mediated transcription.

## 1. 緒言

皮膚は表皮と真皮の2層構造になっており、外部からの刺激(紫外線、乾燥や温度変化)から、内部の器官を守り、体温の調節や体内の水分・体液を保持するバリア機能を果たしている。表皮層はケラチノサイトとそれが分化(角化)し上層へ移行した細胞(角質化細胞)から構成されている。表皮構成細胞はケラチンを多量に含みバリア機能と体内の水分が過剰に蒸散するのを防ぐ保湿機能を担っている。真皮層は細胞外マトリクス(ECM)(コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸)とこれらを産生する線維芽細胞から構成され、皮膚の形状維持や弾力性を保つ機能を果たしている<sup>1)</sup>。線維芽細胞はECM産生細胞であるが、炎症のない正常状態ではこの活性は弱くかつ細胞運動能も低く保たれている。しかしながら、創傷による炎症反応が起こるとマクロファージなどの炎症細胞からサイトカイン(TGF- $\beta$ など)が分泌される。これらの刺激を受けた線維芽細胞はECM産生能及び運動能の亢進した筋線維芽細胞に形質転換し創傷治癒を促す<sup>2)</sup>。治癒が完了した後はTGF- $\beta$ 受容体の発現低下により筋線維芽細胞の形質発現は減衰し、正常線維芽細胞へ戻る。



The roles of MRTF-A/B in the homeostasis of skin

Ken'ichiro Hayashi

Graduate School of Medicine, Osaka University

$\alpha$ SM-actin及びコラーゲンの発現増強は筋線維芽細胞マーカーとして知られている。これらの遺伝子の転写調節領域(プロモーターやそれと関連した領域[イントロン])にはCARg-boxと呼ばれる転写因子、serum response factor (SRF)の結合サイト(シスエレメント)が存在し、SRF/CARg-boxを介して正の転写制御を受ける<sup>3)</sup>。この転写制御にはSRFの転写補助因子であるmyocardin related transcription factors (MRTF-A及びMRTF-B [MRTF-A/B])の活性化を必要とする。一般的にはMRTF-A/Bは細胞内に局在し、Rhoの活性化による細胞内での単量体G-actin量の減少(アクチンダイナミクス)に伴い一過性に核内移行する。核内でSRFはMRTF-AまたはMRTF-Bと複合体を形成しCARg-boxに結合することでSRFの転写因子としての機能を活性化させる。我々の研究グループはこのアクチンダイナミクスに依存したMRTF-A/Bの活性化(核内移行)の分子機構を解明した。この概略を以下に記す。MRTF-A/Bの核移行シグナル(NLS)はN末に存在するG-actin結合ドメイン(RPEF motifs)の間隙に位置するためG-actin量の多い状況下ではG-actinとRPEL motifsとの結合が優先し、importin  $\alpha/\beta$ 1とNLSとの結合は拮抗的に阻害される。このため、MRTF-A/Bは細胞質に留まる。一方、G-actin量が減少した状況下ではimportin  $\alpha/\beta$ 1とNLSとの結合が可能になり、核内移行する<sup>4)</sup>。核内から核外への移行はCrm1を介して行われる<sup>5)</sup>。

MRTF-A/Bの活性化はSRF/CARg-boxを介した転写を促進し、細胞骨格タンパク質及びコラーゲンなどのECMやその受容体タンパク質(integrinなど)の発現を誘導する。その結果、細胞運動が亢進する。しかしながら、

コスメトロジーの観点から皮膚における MRTF-A/B の役割及びその制御機構に関する研究は限定的で十分な解析はなされていない。MRTF-A/B による細胞機能制御が皮膚の恒常性維持に関わり、傷害に応答した創傷治癒や老化または紫外線による皮膚機能低下と MRTF-A/B の制御が連携すると考えた。この可能性を探究し、コスメトロジーに新たな研究視点を導入することを目指して本研究を開始した。本研究を立案した時点で初代培養正常皮膚線維芽細胞では他の培養細胞とは異なり Rho の活性化に依存せず MRTF-A/B は恒常的に核局在することを見いだしていた。

炎症に伴う筋線維芽細胞の慢性的な活性化は線維化疾患（肝硬変、肺腎線維症や強皮症）惹起の要因であると考えられている。筋線維芽細胞のオリジンとして正常線維芽細胞の他、間質細胞、血中に存在する骨髄由来の幹細胞や上皮・内皮細胞が知られている。上皮・内皮細胞から筋線維芽細胞への形質転換は上皮・内皮間葉転換という概念として研究が進められており、この場合も TGF- $\beta$  を介したシグナル伝達系の関与が明らかにされている。しかしながら、筋線維芽細胞への形質転換の分子機構の完全解明には至っていない（図 1）。

前述したように、正常皮膚線維芽細胞では MRTF-A/B は恒常的に核局在するため、筋線維芽細胞への形質転換の過程での MRTF-A/B の活性化は細胞内局在変化では説明できない。これまでに得た知見から正常皮膚線維芽細胞では MRTF-A/B が恒常的に核局在するが、筋線維芽細胞様

の形質発現が抑制されていると考えた。この仮説に立脚すると核内での MRTF-A/B 機能 on/off 機構の存在が示唆された。本研究では皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換における核内での MRTF-A/B の機能制御に焦点を当て解析を行った。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞培養

ヒト初代培養皮膚線維芽細胞（ATCC CRL-2072）を種々の ECM でコートした培養プレートに接種し DMEM-10% FCS で培養を行った。

### 2.2. 遺伝子及びタンパク質発現解析

細胞運動や ECM 産生の関わる遺伝子の発現を mRNA 及びタンパク質レベルで解析した。解析方法として定量的リアルタイム RT-PCR（RT-qPCR）法及びイムノブロット法を用いた。指示された条件化で培養した皮膚線維芽細胞から RNA を抽出・粗精製した後、cDNA 合成を行い、SYBR Green により増幅遺伝子を検出する RT-qPCR を行った。イムノブロットの場合は 2% SDS サンプルバッファーで溶解させた細胞総抽出液を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で含有されているタンパク質を分離後、ウェスタンブロット法により PVDF メンブレンに転写し、目的とするタンパク質の抗体を用いてイムノブロットを行い解析した。

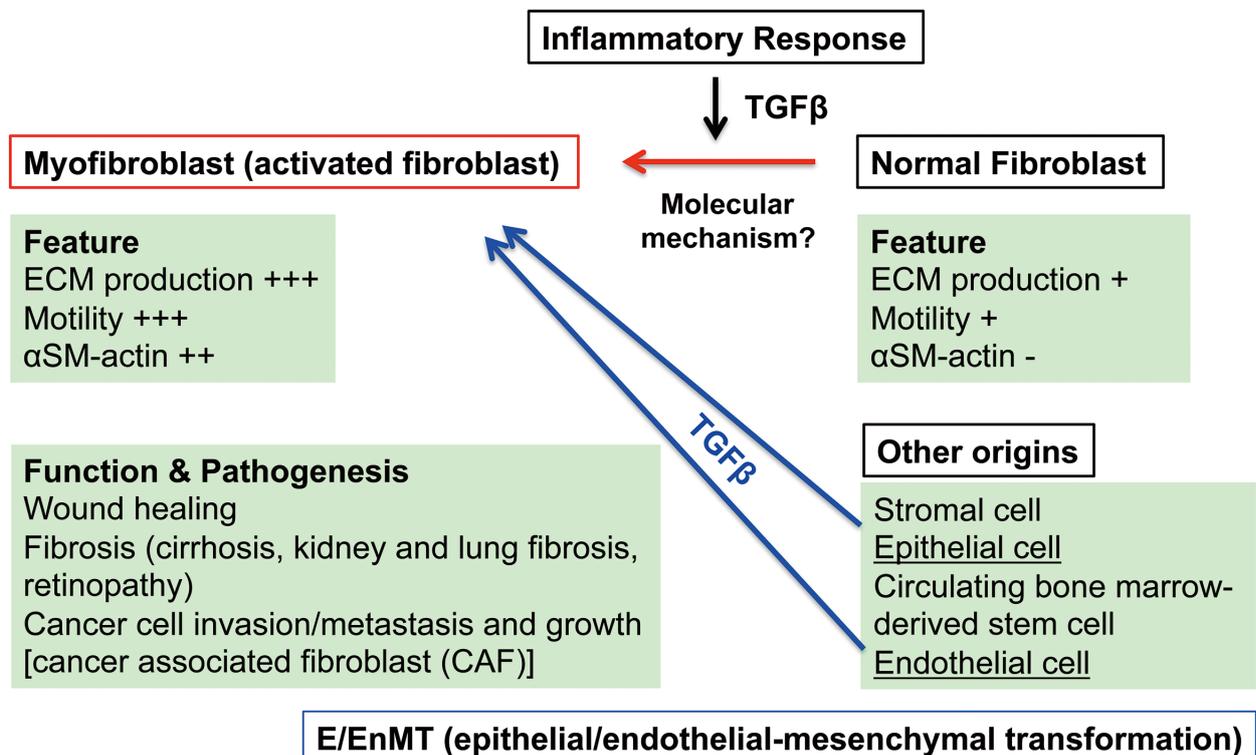


図 1 筋線維芽細胞への形質転換経路の概略

### 2. 3. siRNAの導入

siRNAはシグマアルドリッチ社から購入した。siRNAの細胞への導入はLipofectamine RNAiMAXを用いた。

### 2. 4. プロモーターアッセイ

レポーターとして3×CArG-luciferase<sup>3)</sup>を用いてSRF/CArG-boxを介した転写活性の定量的解析を行った。このレポーターと指示された発現 plasmids を培養細胞に導入し、48時間後に転写活性を計測した。導入効率の違いによる luciferase 活性のばらつきを補正する目的でSV40プロモーターから転写されるβ-galactosidase発現ユニットがコードされた補正用 plasmid も共に導入した。SRF/CArG-boxを介した転写活性はβ-galactosidase活性で補正した luciferase 活性に基づき比較した。

### 2. 5. 細胞運動能の解析

二次元的な細胞運動は創傷治癒アッセイにより解析を行った。100%コンフレントな培養細胞の培養プレートをスクラッチして一定サイズの帯状の創傷を作成し、細胞遊走によってふさがり様子を観察した。細胞遊走を定量化するため、スクラッチ前と一定期間後の同視野を撮影し遊走面積を計測した。

### 2. 6. 細胞染色

種々の条件下で培養した皮膚線維芽細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、指示された抗体で免疫染色を行った。Alexa Fluor 568で標識された2次抗体を用いて標的タンパク質を検出した。同時にHoechst 33342で核を染色した。

### 2. 7. タンパク質-タンパク質相互作用

In vitro 転写・タンパク質合成システム (Promega) を用いて調製したそれぞれのTag付きタンパク質溶液を混合し、指示されたTag抗体を用いて免疫沈降を行った。共沈降した分画に存在するタンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離後、ウェスタンブロットを行い、指示されたTag抗体を用いたイムノブロットによりタンパク質-タンパク質相互作用を解析した。

## 3. 結果

### 3. 1. 培養条件に依存した皮膚線維芽細胞の形質発現

初代培養正常ヒト皮膚線維芽細胞（以降、皮膚線維芽細胞と省略する）を通常の培養条件下（コラーゲンなどのECMでコートしない培養プレート培養）で培養を行うと、筋線維芽細胞のマーカーであるαSM-actin及びコラーゲンの著明な発現が認められた。これらの遺伝子はSRF/CArG-boxを介した転写制御を受けるため、SRF転写補助

因子であるMRTF-A/Bの発現をsiRNAの導入によりノックダウンさせた。この結果、αSM-actin及びコラーゲンの発現は著明に低下し、細胞運動能も低下した（創傷治癒アッセイによる）（図2）。

以上の結果から、通常の培養条件下では皮膚線維芽細胞は筋線維芽細胞様の形質発現することが判明し、この形質発現はMRTF-A/Bに依存することが明らかになった。培養条件が皮膚線維芽細胞の形質発現に及ぼす影響を検討する目的でECMコートしたプレートで培養を行い筋線維芽細胞のマーカーの発現を検証した。ECMとしてコラーゲンゲル、コラーゲンフィルム（希釈したコラーゲンを薄くコーティング）及びマトリゲルを試した。いずれのECMでコートしたプレート上で培養した皮膚線維芽細胞では著明な筋線維芽細胞マーカーの発現低下が認められた。筋線維芽細胞マーカーの発現低下は基質の硬さに影響されなかった（軟らかい基質：コラーゲンゲル及びマトリゲル；硬い基質：コラーゲンフィルム）。これらの実験結果から接着した基質の硬さではなくECMとの接着が筋線維芽細胞様の形質発現を抑制していることがわかった。一般的にMRTF-A/Bの機能発現は細胞内局在変化に依存しているため、上記の結果はMRTF-A/Bの細胞内局在変化に起因する可能性が考えられた。このため、MRTF-A/Bそれぞれの抗体で免疫染色を行い、細胞内局在を検証した。この結果、皮膚線維芽細胞では恒常的にMRTF-Aは核にMRTF-Bは核と細胞質の両方に局在することが判明した。EMCの有無に関わらず、いずれの培養条件下でもMRTF-A/Bの局在には相違が認められなかった（図3）。従って、MRTF-A/Bの細胞内局在制御ではなく核内においてMRTF-A/Bの機能を直接制御する機構の存在が示唆された。

### 3. 2. 皮膚線維芽細胞の形質発現制御因子の探索と検証

更なる検証のため、細胞運動や筋線維芽細胞への形質転換に関連する遺伝子発現のECM依存性をRT-qPCRによ

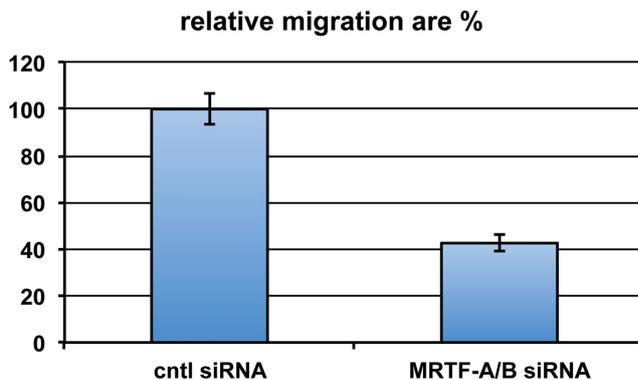


図2 創傷治癒アッセイによる細胞運動能の比較  
コントロール (cntl) siRNA 導入した細胞の移動領域を100%として表示。

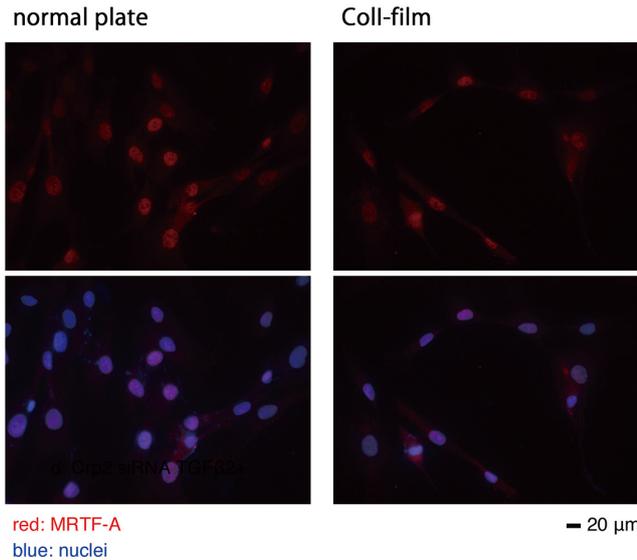


図3 MRTF-Aの細胞内局在の比較(通常の培養プレートvsコラーゲンフィルム)

MRTF-Bについても培養条件の相違による細胞内局在変化は認められない。

り比較した。この結果、細胞質と核の両方に局在するタンパク質(未発表のためX因子として表記)の発現がECM上で培養した場合に筋線維芽細胞のマーカーと同様に著明に減少することを見いだした(図4)。

この因子と筋線維芽細胞形質発現との相関を明らかにする目的でTGF-βにより誘導される遺伝子発現を解析した。通常の培養条件下で培養した皮膚線維芽細胞をTGF-βで刺激すると、さらなる筋線維芽細胞マーカーの発現が増強される。予め、皮膚線維芽細胞にX因子のsiRNAを導入しておくこと、このTGF-βに依存する筋線維芽細胞マーカーの発現増強が著明に抑制された。さらに、X因子のsiRNAを介したノックダウンは細胞運動能を大幅に減弱させた。この結果からX因子が筋線維芽細胞形質発現に重要な役割を果たしていることが判明した。

このX因子の関わる現象の分子機構の解明を目指して解析を続けた。まず、転写レベルでの解析のためプロモーターアッセイを行った。レポーターとしてベータGalプロモーターの上流にSRFのシスエレメントであるCArG-boxをタンデムに3個挿入した3×CArG-luciferaseを用いた。皮膚線維芽細胞にこのレポーターとMRTF-AとX因子の発現 plasmidsを導入すると著しいluciferase活性の上昇が認められたが、X因子の発現 plasmidのみを導入した場合には活性上昇は起こらなかった。以上の結果から、X因子の機能としてMRTF-Aを介したSRF/CArG-boxによる転写調節における正の制御が示唆された。最近の我々の研究で、ヒト初代培養血管内皮細胞(以降、血管内皮細胞と省略する)でもMRTF-A/Bは恒常的に核に局在するがSRF/CArG-boxを介した転写系を活性化せず、NFκB

	Coll-gel	Coll-film
αSM-actin	↓	↓
CollI	↓	↓
X factor	↓	↓
TGF-β1	—	↓
TGF-β2	↓	↓
Thymosin β4	—	—
SRF	—	—
MRTF-A	↑	↑
MRTF-B	↑	↑
GATA4	—	↓
GATA5	↑	↓
GATA6	↑	↓

図4 ECMが皮膚線維芽細胞の遺伝子発現に及ぼす影響  
通常の培養プレート(ECMなし)で培養した場合を基準にした結果。(↑:発現上昇、↓:発現減少、—:変化なし)

と結合してNFκBを介した炎症性遺伝子の発現を抑制する役割を担っていることを明らかにしている<sup>6)</sup>。皮膚線維芽細胞と血管内皮細胞の間でX因子の発現を比較すると、血管内皮細胞ではX因子の発現は極めて弱いことが判明した。そこで、血管内皮細胞で3×CArG-luciferaseを用いたプロモーターアッセイを行ったところ、X因子の発現 plasmidを共発現させることでluciferase活性の上昇が認められた。この実験結果は前述したX因子の機能を強く支持するものである。

X因子の機能を検証する目的でin vitroでのタンパク質-タンパク質相互作用を調べた。この結果、X因子はSRF及びMRTF-Aと結合することが判明した。以上の結果から、X因子はSRF/CArG-boxを介した転写活性を促進させる機能を有することが判明した。

#### 4. 考察・総括

本研究で皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換にはMRTF-A/Bが重要な役割を担うことを明らかにし、さらに細胞内局在変化以外の新たなMRTF-A/Bの活性化のメカニズムを見いだした。一般的な細胞ではMRTF-A/Bは細胞質に局在し、Rhoの活性化した条件下でアクチンダイナミクス依存性に細胞質から核内に移行することで活性化される。しかしながら、皮膚線維芽細胞では恒常的にMRTF-A/Bは核局在するため、その活性化は細胞内の局在変化では説明できない。本研究での一連の解析によりMRTF-A/Bの活性化は皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換に重要で、このプロセスにX因子は決定的な機能を果たすことが判明した。

正常皮膚線維芽細胞ではMRTF-A/Bは恒常的に核局在するが、ECMの過剰産生や細胞運動の亢進などの筋線維芽細胞的な形質発現を發揮せず恒常性が維持される。わかりやすく説明すると、創傷が癒えた後、その傷痕が少し盛り上がった状態で治癒することが見られる。この盛り上がっているのが線維化した皮膚組織である。しかしながら、傷害のない皮膚組織ではこのような状態にならず、正常な状態が維持される。つまり、正常皮膚線維芽細胞では核局在するMRTF-A/Bの機能が抑制されている。本研究ではこの抑制されたMRTF-A/B機能発現を活性化する因子としてX因子を同定した。X因子の発現はTGF- $\beta$ に依存性は発現上昇するが、ECMと接着した状況では発現が抑制される。従って、ECMを介したシグナル伝達系がX因子の発現を抑制することが示唆されるが、この分子機構の解明は今後の課題である。これまでの研究結果から、以下のモデルが提唱できると考えている。正常皮膚組織の線維芽細胞はECM層に存在するため、X因子の発現は抑制されるため核内のMRTF-A/B機能は阻害された状態が維持され、過剰なECM産生や細胞運動能の亢進は抑えられている。しかしながら、皮膚組織傷害によるECM層の損傷により皮膚線維芽細胞はECMから剥離し、さらに炎症細胞から分泌されるTGF- $\beta$ 刺激を受けることでX因子の発現増強が誘起される。この結果、X因子がSRF及びMRTF-A/Bと結合し、MRTF-A/B機能が活性化され、皮膚線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換が惹起される。このモデルは皮膚の恒常性維持に限定されたものではなく、筋線維芽細胞の寄与が示唆されている疾患（肝硬変、肺腎線維症、強皮症、網膜症などの線維化症やガン関連線維芽細胞[ガン組織の微小環境に局在する筋線維芽細胞]を介した扁平上皮ガンの浸潤・転移)の発症・進展にも関わり、これらの疾患の病態解明にも適応できると考えている。さ

らに、X因子の機能阻害はこれら線維化疾患の予防や治療に応用できると思われ、新たな創薬ターゲットになる可能性がある。このような視点から今後の研究を進めてゆきたい。

(引用文献)

- 1) Wang Y, Viennet C, Robin S, Berthon JY, He L, Humbert P. Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation. *J. Dermatol. Sci.* 88: 159-166. (2017)
- 2) Glim JE, van Egmond M, Niessen FB, Everts V, Beelen RH. Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair Regen.* 21: 648-60. (2013)
- 3) Morita T, Mayanagi T, 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)
- 4) Nakamura S, Hayashi K, Iwasaki K, Fujioka T, Egusa H, Yatani H, Sobue K. Importin  $\alpha/\beta$ 1 heterodimer-mediated nuclear import of myocardin family members. *J. Biol. Chem.* 285: 37314-33723. (2010)
- 5) Hayashi K, Morita T. Differences in the nuclear export mechanism between myocardin and myocardin-related transcription factors A. *J. Biol. Chem.* 288: 5743-5755. (2013)
- 6) Hayashi K, Murai T, Oikawa H, Masuda T, Kimura K, Muehlich S, Prywes R, Morita T. A novel inhibitory mechanism of MRTF-A/B on the ICAM-1 gene expression in vascular endothelial cells. *Sci. Rep.* 5: 10627. (2015)