

学位論文

Doctoral Thesis

強皮症線維芽細胞におけるインターロイキン17のシグナル伝達と  
細胞外マトリックス発現制御機構についての研究

(The study of the interleukin-17 signaling and the regulatory mechanisms of  
extracellular matrix in systemic sclerosis)

中嶋 泰治

Taiji Nakashima

指導教員

尹 浩信 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻皮膚病態治療再建学

2012年

# 学 位 論 文

## Doctoral Thesis

論文題名 : 強皮症線維芽細胞におけるインターロイキン17のシグナル伝達と  
細胞外マトリックス発現制御機構についての研究  
(The study of the interleukin-17 signaling and the regulatory mechanisms of  
extracellular matrix in systemic sclerosis)

著者名 : 中 嶋 泰 治  
Taiji Nakashima

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻皮膚病態治療再建学  
尹 浩 信 教授

審査委員名 : 病態生化学担当教授 山縣 和也  
免疫学担当教授 阪口 薫雄  
分子遺伝学担当教授 尾池 雄一

2012年度

## 目次

1. 要旨.....	3
2. 参考論文.....	4
3. 謝辞.....	5
4. 略語一覧.....	6
5. 研究の背景と目的.....	7
6. 実験方法.....	10
6.1 試薬.....	10
6.2 患者材料と倫理声明.....	10
6.3 IL-17A と IL-17F の血清中濃度測定.....	11
6.4 細胞培養.....	11
6.5 細胞溶解と免疫ブロット.....	12
6.6 免疫組織化学的検査.....	12
6.7 ブレオマイシンによる皮内処置.....	13
6.8 RNAの分離と定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法.....	13
6.9マイクロRNAの分離、逆転写とマイクロRNA発現のPCR解析.....	14
6.10一過性形質移入.....	15
6.11統計学的解析.....	16
7. 実験結果.....	17
7.1 SSc患者の血清と病変皮膚におけるIL-17AとIL-17F発現量.....	17
7.2 SSc線維芽細胞におけるIL-17RA蛋白とmRNAの発現.....	23

7.3 IL-17 の存在下と非存在下での ECM 関連遺伝子の PCR アレイ 解析.....	31
7.4 IL-17A によるコラーゲン発現制御へのマイクロ RNA の関与.....	38
8. 考察.....	43
9. 結語.....	48
10.参考文献.....	49

## 1. 要旨

背景：インターロイキン(IL)17ファミリーの中で、インターロイキン17Aとインターロイキン17Fは、アミノ酸配列の類似性を共有しA型インターロイキン17受容体(IL-17RA)に結合する。IL-17シグナル伝達は様々な自己免疫疾患の病因に関与しているが、その細胞外マトリックス発現の制御機構における役割とその全身性強皮症(SSc)の表現形への寄与は明らかではない。

方法と結果：上記のことを明らかにするために、我々はIL-17Aと同様にIL-17FとIL-17RAの発現パターンを健常人とSSc患者との間で比較し、SScにおける細胞外マトリックス発現の制御におけるIL-17シグナル伝達経路の関与を調べた。この研究により、SSc患者の皮膚と血清においてIL-17A発現は増加しIL-17F発現は増加していなかったことが明らかとなった。一方内因性のトランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\beta$ 1活性化のためにSScの線維芽細胞におけるIL-17RAの発現は正常線維芽細胞と比較して有意に減少していた。またIL-17Aは $\alpha$ 1(I)コラーゲンと結合組織増殖因子(CTGF)の蛋白発現を減少させたが、IL-17Fは減少させなかった。さらにmiR-129-5pは、強皮症線維芽細胞において抑制されているマイクロRNAの一つであるが、IL-17A存在下で増加し $\alpha$ 1(I)コラーゲンの減少に関与していた。

結論と考察：IL-17シグナル伝達経路はmiR-129-5pの発現増加と $\alpha$ 1(I)コラーゲンの抑制を介して線維化抑制の効果を持つ。SSc線維芽細胞において、TGF- $\beta$ 1による内因性活性化はコラーゲン産生を刺激している。同時にTGF- $\beta$ 1はIL-17受容体のダウンレギュレーションによりIL-17シグナル伝達を阻害する。このことはまた過度のコラーゲン蓄積と組織の線維化に寄与する。TGF- $\beta$ とIL-17Aからなるサイトカインネットワークによる線維化の新しい制御機構を明らかにすることは、この疾患の新規の治療手段の開発に役立つと考えられた。

## 2. 参考論文

### ①関連論文

1. Taiji Nakashima, Masatoshi Jinnin, Keitaro Yamane, Noritoshi Honda, Ikko Kajihara, Takamitsu Makino, Shinichi Masuguchi, Satoshi Fukushima, Yoshinobu Okamoto, Minoru Hasegawa, Manabu Fujimoto, and Hironobu Ihn  
Impaired IL-17 Signaling pathway Contributes to the Increased Collagen Expression in Scleroderma Fibroblasts  
J Immunol. 2012 Apr 15;188(8):3573-83.

### ②その他の論文

1. Taiji Nakashima, Masatoshi Jinnin, Tomomi Etoh, Satoshi Fukushima, Shinichi Masuguchi, Keishi Maruo, Yuji Inoue, Tsuyoshi Ishihara, and Hironobu Ihn  
Down-Regulation of mir-424 Contributes to the Abnormal Angiogenesis via MEK1 and Cyclin E1 in Senile Hemangioma: its Implications to Therapy  
PLoS One. 2010 Dec 14; 5(12): e14334.

### 3. 謝辞

本研究は、平成 19 年から平成 24 年にかけて、熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学教室にて行いました。本論文の作成にあたり、多忙な中御指導、御助言を賜りました指導教官の尹浩信教授に心より感謝申し上げます。

神人正寿講師には、関連論文の細部にわたり多大な御支援、御教授をいただきました。また福島聡講師には、実験に関する様々な相談に乗っていただき精神的にも支えられました。両先生に対し、ここに深い尊敬と感謝の念を表します。

また、当教室の井上准教授をはじめ、医局員、大学院生、研究技師、事務職員の皆様には有形、無形の支援を賜りました。この場を借りて感謝申し上げ、お礼の言葉とさせていただきます。

最後に、いつも私のことを気遣い協力してくれた家族に対して感謝の言葉を捧げます。

#### 4. 略語一覽

ACR, American College of Rheumatology

CTGF, connective tissue growth factor

dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis

ECM, extracellular matrix

FCS, fetal calf serum

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

IGF, insulin-like growth factor

IL, interleukin

IL-17RA, interleukin-17 receptor type A

lcSSc, limited cutaneous systemic sclerosis

MEM, modified Eagle's medium

MMP, matrix metalloproteinase

PBS, phosphate-buffered saline

PCR, polymerase chain reaction

PDGF, platelet-derived growth factor PCR, polymerase chain reaction

PM/DM, polymyositis/dermatomyositis

PVDF, polyvinylidene fluoride

SLE, systemic lupus erythematosus

SSc, systemic sclerosis

TGF, transforming growth factor

Th, T helper cells

UTR, untranslated region

## 5. 研究の背景と目的

全身性強皮症(SSc)は、典型的には皮膚と内臓の線維化を来す後天性の疾患である。この疾患の病態は明らかではないけれども、その病態には、炎症や自己免疫的機序、血管障害が含まれ、それらが線維芽細胞の活性化と細胞外マトリックス(ECM)の異常な蓄積に繋がる(1, 2)。したがって線維化の原因である異常な SSc 線維芽細胞は、正常なメカニズムより逃れた細胞のサブセットから発生するのかもしれない(3, 4)。

SSc における線維芽細胞の活性化のメカニズムは明らかではないが、SSc 線維芽細胞の多くの特徴はトランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\beta$ 1 により刺激された健常な線維芽細胞の特徴に類似している(5, 6)。TGF- $\beta$ 1 の間葉系細胞への主要な効果は細胞外マトリックスの沈着を刺激することである。SSc の病変部皮膚より採取した培養皮膚線維芽細胞は、様々なコラーゲンの転写産物の増加を示す。その主なものは $\alpha$ 1(I)と $\alpha$ 2(I)コラーゲンから構成される I 型コラーゲンである(7-10)。一方抗 TGF- $\beta$ 1 中和抗体を用いて TGF- $\beta$ 1 のシグナル伝達をブロックすると培養 SSc 線維芽細胞における亢進したコラーゲンの mRNA の発現を正常化した(11)。しかしながら SSc 線維芽細胞の培養液中 TGF- $\beta$ 1 濃度は正常線維芽細胞と比較して変化がなかった(11)。したがって SSc における線維芽細胞の活性化は内因性の TGF- $\beta$ 1 活性化の結果であろうということが示唆された。このことは最近の知見によって裏付けられた。すなわち (i) SSc 線維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子の転写活性は正常線維芽細胞と比較して恒常的に亢進しているが、外因性の TGF- $\beta$ 1 への反応性は SSc 線維芽細胞において低下していると報告されている(9)。そして (ii) TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達のメディエーターである

Smad3 のリン酸化レベルと DNA 結合活性は、SSc 線維芽細胞において恒常的に亢進している(12)。加えて、結合組織増殖因子(CTGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、インターロイキン(IL)-1、IL-6、IL-7 を含めたその他のサイトカインもまたこの疾患の病変形成に関与していると報告されている(13-17)。それゆえ SSc 線維芽細胞の活性化を媒介するサイトカインネットワークを明らかにすることは、SSc の炎症、自己免疫学的機序と血管障害を明らかにすることと同様に、この疾患の分子メカニズムを理解し新しい治療方法を開発するために重要である。

インターロイキン 17(IL-17)は、6つのメンバー(A-F)から構成されるサイトカインファミリーである。その中でも IL-17A は IL-17 ファミリーの中で最初に発見されたサイトカインであり、IL-17F と 50%のアミノ酸配列同一性を共有する。IL-17A と IL-17F は Th17 細胞系列から生成されるホモダイマーのサイトカインであり、炎症反応に関与するサイトカインとケモカインの誘導を含む類似した生物活性を有している(18-21)。その一方 IL-17 受容体ファミリーは5つのメンバーから構成される。すなわち RA, RB, RC, RD そして RE である。IL-17A と IL-17F は IL-17RA(これはまた IL-17R ともいわれる)と結合することが示されており、IL-17RA は IL-17A と IL-17F の生物学的活性に必要である(22-27)。

IL-17A と IL-17F は関節リウマチ、多発性硬化症、炎症性腸疾患、喘息、乾癬などの様々な自己免疫疾患に関与すると考えられている(26-32)。加えていくつかの研究で IL-17A は SSc の病態形成に関与することが示されている。たとえば村田らは IL-17A の血清中濃度は健常対照群と比較して SSc 患者において上昇している。皮膚硬化の重症度と逆相関すると報告している(33)。さらに SSc 患者の末梢血 T 細胞は IL-17A を多く産生すると報告されている(34)。しかしながら、SSc 患者の IL-17A 血清中濃度については依然として議論の余地があると

考えられる。なぜなら Grouh らは IL-17A の血清中濃度は SSc 患者において減少していると結論づけているからである(35)。その一方で IL-17A は SSc 線維芽細胞において細胞増殖を刺激し、インビトロで内皮細胞において接着分子や IL-1 の産生を誘導する(34)。以上より、この疾患の病変形成における IL-17 のシグナル伝達経路の正確な役割は十分には明らかにはされていない。この点を明らかにするために我々は IL-17A と同様に IL-17F と IL-17RA の発現パターンを健常人と SSc 患者との間で比較し、SSc における ECM 発現の制御における IL-17 シグナル伝達経路の関与を調べた。

## 6. 実験方法

### 6.1 試薬

組換え型のヒト IL-17A、IL-17F、PDGF、IGF-1 と IL-17A の抗体(MAB3171) と IL-17RA の抗体(AF177)は R&D systems (Minneapolis, MN)より購入した。アクチノマイシン D、ジメチル・スルホキシド、GAPDH の抗体(G9545)は Sigma (Saint Louis, MO)より購入した。抗 Smad3 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)より購入した。抗 I 型コラーゲン抗体(1301-01)は Southern Biotech (Birmingham, AL)より、抗 CTGF 抗体(ab6992)は Abcam (Cambridge, United Kingdom)よりそれぞれ購入した。

### 6.2 患者材料と倫理声明

血清サンプルは 20 人の SSc 患者(5 人の男性と 15 人の女性 ; 年齢は 28-84 歳、平均 58.3 歳)から得た。すべての SSc 患者は LeRoy らにより提案された分類基準(36)にもとづき分類された、10 人は diffuse cutaneous SSc (dcSSc)の患者であり、10 人は limited cutaneous SSc (lcSSc)の患者であった。すべての患者は American College of Rheumatology (ACR)により提唱された診断基準を満たしていた(37)。10 人の全身性エリテマトーデス(SLE)患者と 10 人の多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM)患者もまたこの研究に含まれた。コントロールの血清サンプルは 10 人の年齢と性別を一致させた健常人ボランティアより採取した。この研究にて報告した臨床上のデータと検査値は血清サンプルを採取した際に得られたものである。SSc 患者の皮膚生検の検体は病変部位より採取した。コントロールの皮膚サンプルは、植皮術をうけた健常人患者の日常的には廃棄している皮膚より入手した。サンプルは採皮後直ちにホルマリン固定し、次にパラフィン包埋した。

ヘルシンキ宣言にしたがいこの研究に患者と健常ボランティアが参加する前に倫理審査委員会の承認と書面によるインフォームドコンセントを得た。

### 6.3 IL-17A と IL-17F の血清中濃度測定

IL-17A と IL-17F の血清中濃度 は特異的酵素免疫吸着測定法(ELISA)キット(それぞれ R&D Systems, Minneapolis, MN と BioLegend, San Diego CA のキット)を用いて測定した。IL-17A もしくは IL-17F のモノクローナル抗体を用いてマイクロタイターのウェルをプレコートした。血清の一定分量をそれぞれのウェルに加え、次に IL-17A もしくは IL-17F に対するペルオキシダーゼ結合型の抗体を加えた。過酸化水素とテトラメチルベンジジン・ペルオキシダーゼを用いて発色させ、吸光度 450nm にて測定した。波長の補正は吸光度 540nm にて行った。それぞれのサンプルにおける IL-17A もしくは IL-17F の濃度は検量線からの補正により測定した。

### 6.4 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞は発症より2年未満の5人のdiffuse cutaneous SSc患者の病変部位(前腕伸側)から皮膚生検により得た(38)。コントロールの線維芽細胞は5人の健常人の生検組織より入手した。健常人はSSc患者と年齢、性別、生検部位をそれぞれ一致させた。倫理審査委員会の承認と書面によるインフォームドコンセントをヘルシンキ宣言にしたがい得た。培養皮膚線維芽細胞は、10%FCS(fetal calf serum)と抗生剤・抗真菌剤(Invitrogen, Carlsbad, CA)を加えたMEM (modified Eagle's medium)を入れた25-cm<sup>2</sup>の培養フラスコにて確立した。異なる個体から個別に分離した単層培養培養は37°C、5%CO<sub>2</sub>の環境下で維持した。

3継代目から6継代目の線維芽細胞を実験に使用した。細胞は実験開始前に12から24時間無血清の状態とした。

## 6.5 細胞溶解と免疫ブロット

線維芽細胞はコンフルエントになるまで培養し、次に培養液を除去した。残った細胞はリン酸緩衝食塩水(PBS)にて2回洗浄し、Denaturing Cell Extraction Buffer (BIOSOURCE, Camarillo, CA)を用いて溶解した。一定量の細胞可溶化物(蛋白濃度にて規格化)は10%ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミド・ゲル上にて電気泳動により分離されPVDF膜に転写した。次にPVDF膜は、IL-17RA、I型コラーゲン、CTGF、GAPDHの抗体とともにインキュベーションした。PVDF膜は2次抗体とともにインキュベーションし、免疫反応したバンドはECLシステム(Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL)を用いて視覚化した。バンドの濃度はChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)上でQuantity One 1D analysis software version 4.6.6を使用して測定した。

## 6.6 免疫組織化学的検査

パラフィン包埋切片(4 $\mu$ mの厚さ)は、キシレンにより脱パラフィン化した後、段階的にエタノール系列にて再水和した。IL-17Aの免疫染色のために、抗原は、pH6のクエン酸緩衝液と共に9分間マイクロ波乾燥器にてインキュベーションし賦活化した。内因性ペルオキシダーゼ活性は0.3%過酸化水素を溶解したメチルアルコールを用いて阻害し、切片は5%ロバ血清を用いて20分間阻害した。そして次に抗IL-17A抗体(1:100)と48時間4°Cで反応させた。過剰な抗体をPBSにて洗浄した後、サンプルは西洋わさびペルオキシダーゼでラベルした抗マウス抗体(ニチレイ、東京、日本)とともに30分間、37°Cでインキュベ

トした。

IL-17RA の免疫染色のために、抗原は pH9.0 のクエン酸緩衝液とともに 9 分間マイクロ波乾燥器にてインキュベーションし賦活化した。抗 IL-17RA 抗体 (1:100) と西洋わさびペルオキシダーゼにてラベルした抗ヤギ抗体(ニチレイ、東京、日本) を使用した。反応はジアミノベンジン基質システム(同仁堂、熊本、日本)を使用して視覚化した。スライドはメイヤー・ヘマトキシリン液にて対比染色し、光学顕微鏡(オリンパス BX50、東京、日本)にて検討した。

### 6.7 ブレオマイシンによる皮内処置

ブレオマイシン(日本化薬、東京、日本) は 1mg/ml の濃度にて PBS に溶解し濾過し無菌化した。以前の報告に述べられているように、6 週齢の C57BL/6 マウスの剃毛した背部に 4 週間隔で連日、ブレオマイシン(300 $\mu$ g)もしくは PBS を皮内に注射した(39, 40)。最終の注射の次の日に背部の皮膚は摘出し、10%ホルマリン溶液にて固定しパラフィンに包埋した。

### 6.8 RNA の分離と定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法

全 RNA は、培養細胞からは ISOGEN (ニッポンジーン、東京、日本)を用いて、もしくはパラフィン包埋切片からは RNeasy FFPE kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、それぞれ抽出した。

PCR アレイ解析(SABioscience)のためのファーストストランドの相補 DNA は、RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABiosciences)を使用して合成した。相補 DNA は RT<sup>2</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix と混合し、混合液は 84 個のヒト RNA のプライマーを含む 96-well Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array (SA Biosciences)に加えた。PCR は Takara Thermal Cycler Dice (TP800)®にて行った。

それぞれの RNA のサイクルの閾値(Ct)は Thermal Cyclers Dice Real Time System ver2.10B を使用して計算し抽出した。未加工の Ct 値は、ハウスキーピング遺伝子の値を使用して規準化した。

定量的リアルタイム PCR のために、ファーストストランドの相補 DNA はオリゴチミジンプライマーとランダと 6 量体を含んだ PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ社、滋賀、日本)により合成した。 GAPDH のプライマーは SABiosciences (Frederick, MD)から購入し、IL-17A、IL-17F、IL-17RA、CTGF、Smad3、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$  受容体 I、II、III のプライマーはタカラバイオ社から購入した。12.5 $\mu$ l の SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ社)と 1 $\mu$ l のそれぞれのプライマーを含んだ 25 $\mu$ l の反応液において、1 $\mu$ l の希釈したファーストストランド相補 DNA を増幅のために使用した。(逆転写されていない)RNA を ネガティブコントロールとして使用した。DNA は、Takara Thermal Cyclers Dice (TP800)を用いて 5 秒、95 $^{\circ}$ C の条件で変性を、またアニーリングのために 30 秒、60 $^{\circ}$ C の条件で 40 サイクル増幅した。それぞれの PCR 反応から得られたデータは、Thermal Cyclers Dice Real Time System version 2.10B (タカラバイオ社)を使用して解析した。反応の特異度は融解曲線の解析から判定した。それぞれの対象の遺伝子と GAPDH の遺伝子の発現量は検量線法により計算した。それぞれの対象の遺伝子について少なくとも 3 回の個別の実験を行った。

## 6.9 マイクロ RNA の分離、逆転写とマイクロ RNA 発現の PCR 解析

全 RNA からのマイクロ RNA の分離は RT<sup>2</sup> qPCR-Grade miRNA Isolation Kit (SA Bioscience)を使用して行った。RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (SABioscience)のために、マイクロ RNA は RT<sup>2</sup> miRNA First Strand Kit (SABiosciences)を使用してファーストストランド相補 DNA に逆転写した。相補 DNA は RT<sup>2</sup> SYBR

Green/ROX qPCR Master Mix と混合し、その混合物は 88 のヒトマイクロ RNA プライマーを含む 96-well RT<sup>2</sup> miRNA PCR Array (SABiosciences)に加えた。PCR は Takara Thermal Cycler Dice (TP800)<sup>®</sup>にて製造者プロトコールにしたがい行った。それぞれのマイクロ RNA の Ct 値は Thermal Cycler Dice Real Time System ver2.10B を使用して計算した。未加工の C<sub>t</sub> 値は低分子 RNA のハウスキーピング遺伝子の値を使用して規準化した。

定量的リアルタイム PCR のために、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (タカラ)をファーストストランド相補 DNA を合成するために使用した。miR-129-5p のプライマーのシーケンスは miRBase (<http://www.mirbase.org>)に基づき設計した:CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC。PCR は Takara Thermal Cycler Dice (TP800)<sup>®</sup>にて製造者プロトコールにしたがい行った。DNA は、5 秒、95°C の条件で変性を、またアニーリングのために 20 秒、60°C の条件で 40 サイクル増幅した。それぞれの PCR 反応から得られたデータは Thermal Cycler Dice Real Time System ver2.10B (タカラバイオ社)を使用して解析した。miR-129-5p の転写物のレベルは U6 の値を使用して規準化した。

## 6.10 一過性形質移入

TGF-β1、Smad3、IL-17RA に対する siRNAs は Santa Cruz Biotechnology より購入した。miR-129p-5p の microRNA mimic と miScript Target Protector は Qiagen から購入した。形質移入薬としてリポフェクタミン RNAiMAX (Invitrogen) を使用した。逆形質移入のために、siRNA、マイクロ RNA、mimic、miScript Target プロテクター (6pmol) を形質移入試薬とともに混合したものを、細胞を播種したプレートに加え、(リアルタイム PCR の場合) 12 時間もしくは(免疫ブロッキングの場合) 120 時間、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下でインキュベーションした。

対照実験では siRNA の標的遺伝子の転写物の量は 80%以上減少し、マイクロ RNA の発現はミミックの形質移入により少なくとも 5 倍以上に増加した。

### 6.11 統計学的解析

統計学的解析は、平均値の比較のためにはマン・ホイットニーの U 検定を用いて、頻度の解析のためにはフィッシャーの正確確率検定を用いて行った。0.05 未満の p 値は有意であるとみなした。

## 7. 実験結果

### 7.1 SSc 患者の血清と病変皮膚における IL-17A と IL-17F 発現量

最初の実験として、我々は SSc 患者における IL-17A と IL-17F の血清中濃度について酵素免疫吸着測定法(ELISA)を用いて測定した。図 1a は SSc 患者の IL-17A の平均血清中濃度は、その他の SLE と PM/DM を含む膠原病と同様に、健常対照群と比較して高いことを示しており、SSc 患者と健常対照群の値の間で有意差を認めた(平均±S.E.: 20.0±5.4 vs 11.2±1.1mg/dl,  $p<0.05$ )。カットオフ値を健常対照群の 99 パーセンタイルに設定したとき、IL-17A の血清中濃度は SSc 患者 20 人中 9 人(45%)において増加していた。その一方、健常対照群、SSc 患者、その他の膠原病患者の間で、IL-17F の血清中濃度に有意差を認めなかった(図.1b)。加えて、それぞれの患者群において IL-17A と IL-17F の血清中濃度の間に関係性を認めなかった。

表 1 は IL-17A の血清中濃度と SSc 患者の臨床所見と検査所見の関連性を示している。IL-17A が上昇していた患者群では IL-17A が正常レベルの群と比較して指尖虫喰状癬痕(pitting scars)を有する率が有意に高かった(77.8% vs 27.3%,  $p<0.05$ )。おそらく患者数が少ないために有意差を認めることは出来なかったが、以前の報告に一致するように(33)、IL-17A が正常レベルの群よりも IL-17A 上昇群では modified Rodman skin thickness score (MRSS) が低い傾向にあった(7.4 vs 16.5)。IL-17A 上昇群と正常群との間で、その他の臨床所見や検査所見において、統計学的に有意差を認めなかった。例えば、IL-17A 正常群と比較して、IL-17A 上昇群の患者は 3 つの主要な自己抗体(抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗セントロメア抗体、抗 U1RNP 抗体)を 2 つ以上もつ傾向があった(22.2 vs 9.1%)。また一方 IL-17A 上昇群の患者と比較して、IL-17A 正常群の患者は 3 つの主要

な自己抗体以外のその他の自己抗体をもつ傾向があった(44.5 vs 22.2%)。しかしながら統計学的な有意差は認めなかった。それゆえ SSc 患者においてのみ IL-17A の血清中濃度が上昇していたということは、このサイトカインが SSc の病変形成において何らかの役割を果たしているかもしれないということを示唆している。

そこで、IL-17A の発現が生体内の SSc 患者の病変皮膚においても増加しているかどうかを明らかにするために、全 RNA を 10 人の SSc 患者と 7 人の健康者由来の皮膚組織から抽出し、リアルタイム PCR を行った。SSc 患者の病変皮膚組織の IL-17A mRNA の発現もまた健康対照群に比較して有意に上昇していた( $p < 0.05$ , 図. 1c)。一方 IL-17F の mRNA は皮膚において検出されなかった。免疫組織化学染色でも IL-17A の発現が SSc 患者皮膚に浸潤するリンパ球に認められたが、健康者皮膚では認められなかった(図. 1d)。したがって、IL-17A の発現は SSc 患者の血清と病変皮膚にて増加していた。

図 1

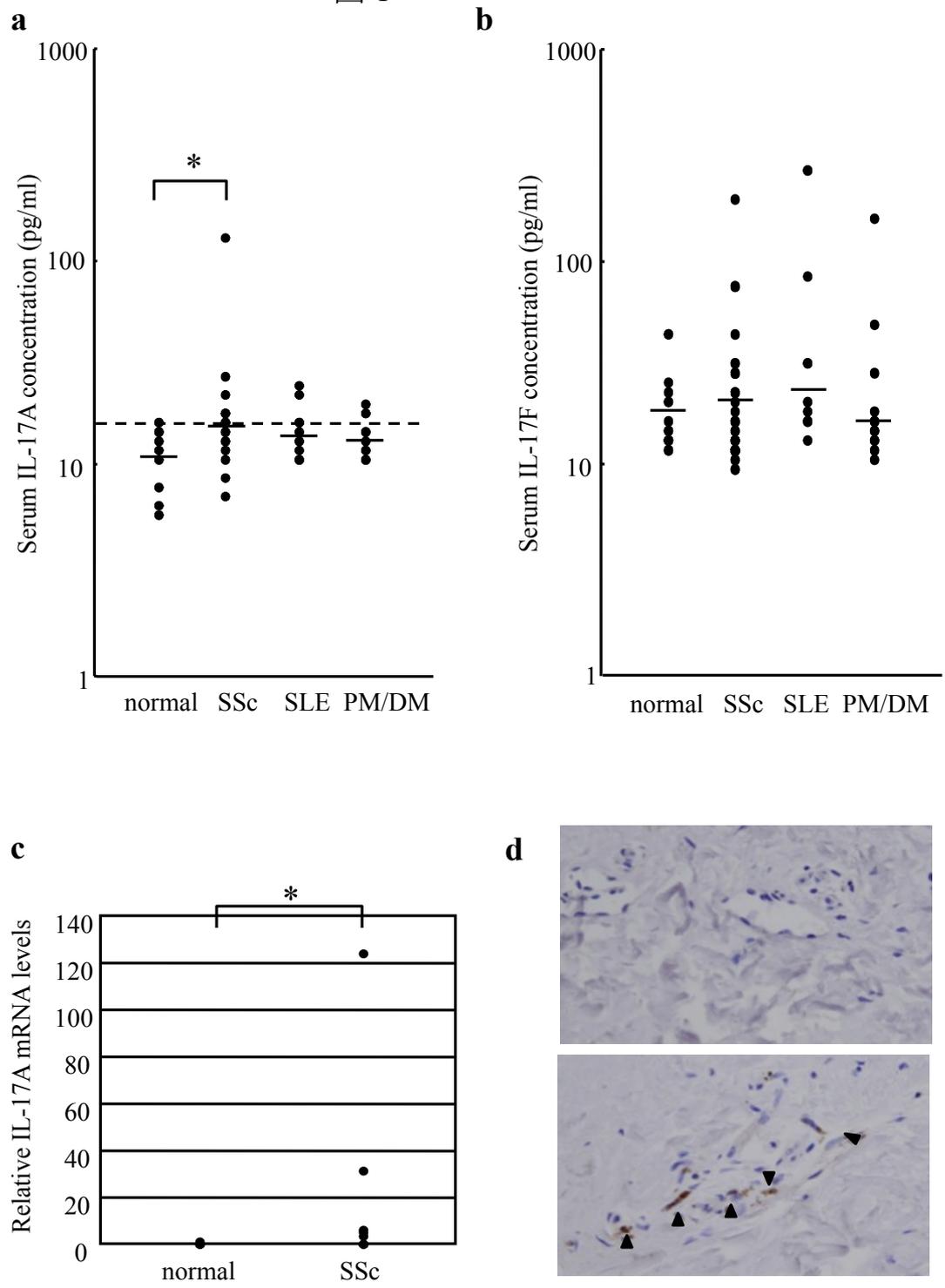


図 1. SSc、SLE、PM/DM 患者の IL-17A と IL-17F の血清濃度

血清サンプルは、全身性強皮症患者(SSc, n=20)、全身性エリテマトーデス患者(SLE, n=10)、多発性筋炎/皮膚筋炎患者(PM/DM, n=10)、健常ドナー(n=10)から得

た。y 軸は対数のスケールで、実験方法に述べたように ELISA にて測定した L-17A (a)と IL-17F (b)の血清濃度を指し示している。バーは平均値を示す。(a)において、水平方向の点線は健常対照群の 99 パーセントイルに設定されたカットオフ値を示している。\* $p < 0.05$  は健常対照群の値と比較した場合である。

(c) 全 RNA は 10 人の SSc 患者と 7 人の健常ドナーの皮膚組織から抽出し、次に IL-17A と GAPDH の mRNA の発現を決定するために定量的リアルタイム PCR を行った。健常ドナーのサンプルにおける最高値を 1 とした。\* $p < 0.05$  は正常皮膚における値と比較した場合である。

(d) パラフィン切片にて『実験方法』にて述べたように IL-17A の免疫組織化学的解析を行った。(上のパネル) ヒト正常皮膚、本来の拡大率 x100、(下のパネル) SSc の皮膚、x100。

**表 1. IL-17A 血清濃度と SSc 患者臨床所見、血清学的特徴との相関**

	IL-17A 上昇患者群(n=9)	IL-17A 正常患者群(n=11)
発症時平均年齢(年)	56.3	60.5
罹病期間(年)	5.3	3.9
病型(diffuse:limited)	3:6	7:4
MRSS (点数)	7.4	16.5
<b>臨 床 所 見</b>		
指尖虫喰状癬痕	77.8*	27.3
皮膚潰瘍	44.4	36.4
爪上皮出血点	44.4	54.5
レイノー現象	77.8	81.8
毛細血管拡張	33.3	9.1
手指屈曲拘縮	33.3	63.6
石灰沈着	0	9.1
全身色素沈着	0	36.4
舌小帯短縮	44.4	63.6
乾燥症状	11.1	27.3
<b>臓 器 合 併 症</b>		
肺線維症		
平均%VC	94.2	93.5
平均%DLco	83.8	78.1
肺高血圧	0	0
食道病変	0	27.3
心病変	22.2	18.2
腎病変	0	0
関節症状	22.2	0
血栓症	0	0
<b>抗核抗体検査所見</b>		
抗トポイソメラーゼ I 抗体	55.6	36.4
抗セントロメア抗体	33.3	18.2
抗 U1 RNP 抗体	33.3	9.1
オーバーラップ	22.2	9.1
その他	22.2	44.5

表示のない値はパーセンテージである。

MRSS=modified Rodman skin thickness score; VC=肺活量; DLco=肺拡散能;

オーバーラップ=抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗セントロメア抗体、抗 U1 RNP 抗体の中で 2 個以上の自己抗体が陽性、その他=抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗セントロメア抗体、抗 U1 RNP 抗体以外の自己抗体が陽性。

\* $P < 0.05$  はフィッシャーの正確確率検定を使用して IL-17A 非上昇群と比較した場合である。

## 7.2 SSc 線維芽細胞における IL-17RA 蛋白と mRNA の発現

次に、我々は SSc 患者における IL-17 受容体(IL-17RA)の発現を調べた。IL-17RA は多くの組織に広範に分布していることが知られているが(25)、皮膚線維芽細胞における受容体の発現はいまだ十分には調べられていない。図 2a と 2b に示したように、免疫ブロット法により SSc 患者の培養線維芽細胞における IL-17RA の蛋白発現は健常皮膚線維芽細胞と比較して有意に減少していることが明らかとなった。加えて我々は培養正常皮膚線維芽細胞が IL-17RA mRNA を皮膚ケラチノサイトの 20%の範囲内で発現しているということを見出した。ケラチノサイトは受容体を豊富に発現すると報告されているポジティブコントロールである(41)。そして IL-17RA mRNA の発現もまた 5 人の SSc 患者全ての線維芽細胞において低下していた( $p < 0.05$ , 図.2c)。したがって減少した IL-17RA の蛋白合成は SSc 患者の IL-17A mRNA 発現低下から生じるのかもしれない。SSc 患者の線維芽細胞における IL-17RA は *in vitro* において少なくとも 15 継代まで維持される(図. 2d)。一方外因性の TGF- $\beta$ 1 による刺激は正常線維芽細胞における IL-17RA の発現を有意に抑制したが、SSc 患者の線維芽細胞においては変化がなかった(図. 2c)。さらに SSc 線維芽細胞において TGF- $\beta$ 1 siRNA により抑制されていた IL-17RA は正常化した、正常線維芽細胞において変化はなかった(図. 2e)。このような結果は SSc 線維芽細胞における IL-17RA 発現の低下は、序文に述べたようにこの細胞における内因性の TGF- $\beta$  の活性化により引き起こされるかもしれないことを示している。加えて Smad3 siRNA により Smad3 をノックダウンした場合には、SSc 線維芽細胞における IL-17RA の発現は回復した(図.2f)。したがって TGF- $\beta$ 1 の IL-17RA への影響は Smad 依存性であることが示唆された。一方、線維化のその他の重要なメディエーターである PDGF と IGF-1 は IL-17RA の発現に対する有意な影響を持っていなかった(図. 2g)。さらに外因性の IL-17A と IL-17F のどちらも IL-17RA 発現を抑制しなかった(図. 2h)。このことは

IL-17RA は TGF- $\beta$ 1 刺激により特異的に制御されていることを示唆している。

定常状態の mRNA は、遺伝子転写レベルと mRNA の安定性の一方もしくは両方に影響されうる。SSc 線維芽細胞における IL-17RA mRNA の減少が転写レベルと転写後レベルのどちらによるのかを決定するために、正常線維芽細胞と SSc 線維芽細胞において新規の mRNA 合成を RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D により阻害した。図. 3a に示したように両方の細胞において 12 時間のアクチノマイシン D による処理を行うと mRNA の分解が生じ IL-17RA の mRNA は減少した。IL-17RA mRNA の減少割合は正常線維芽細胞と SSc 線維芽細胞との間で類似しており、このことは IL-17RA mRNA の安定性が SSc 線維芽細胞において低下していないことを示唆している。以上より SSc 皮膚線維芽細胞において IL-17RA の発現は、おそらく転写レベルにおいて TGF- $\beta$  シグナル伝達を介して減少していると考えられた。

さらに、*in vivo* の IL-17RA mRNA の発現を調べた。皮膚組織より抽出した全 RNA を用いたリアルタイム PCR では、健常対照群と比較して SSc 患者皮膚組織における IL-17RA の mRNA の発現は有意に低いことが示された(図. 3b)。このことは培養細胞の結果と一致する(図. 2a-c)。さらに我々は MRSS と SSc 患者皮膚の IL-17RA mRNA レベルとの間で中等度の逆相関があることを見出したが、統計学的には有意ではなかった( $r=-0.61$ ,  $p=0.28$ )。

我々はまた、*in vivo* の IL-17RA 蛋白の発現を評価するために、SSc 患者と健常人由来のパラフィン包埋皮膚切片を用いて免疫組織化学染色を行った。IL-17RA の発現は正常皮膚線維芽細胞において強く認められたが、肥厚した膠原線維間の SSc 線維芽細胞においてはほとんど認められなかった(図. 3c と d)。なおアイソタイプのコントロールの抗体を用いた陰性コントロールではほとんど染色を認めず、バックグラウンドは全く染色されていなかった。加えて、*in vivo*

においてIL-17RAの発現パターンを調べるために、ブレオマイシン処理後の皮膚線維化モデルマウス由来のパラフィン包埋切片をIL-17RAについて染色した。IL-17RA染色陽性の紡錘形の線維芽細胞はPBS処理後のコントロールのマウス皮膚に検出された。一方ブレオマイシン処理後の肥厚した皮膚では認めなかった(図. 3e と f)。つまりin vitroとin vivoで、IL-17RA の発現は線維化の状態では低下していた。

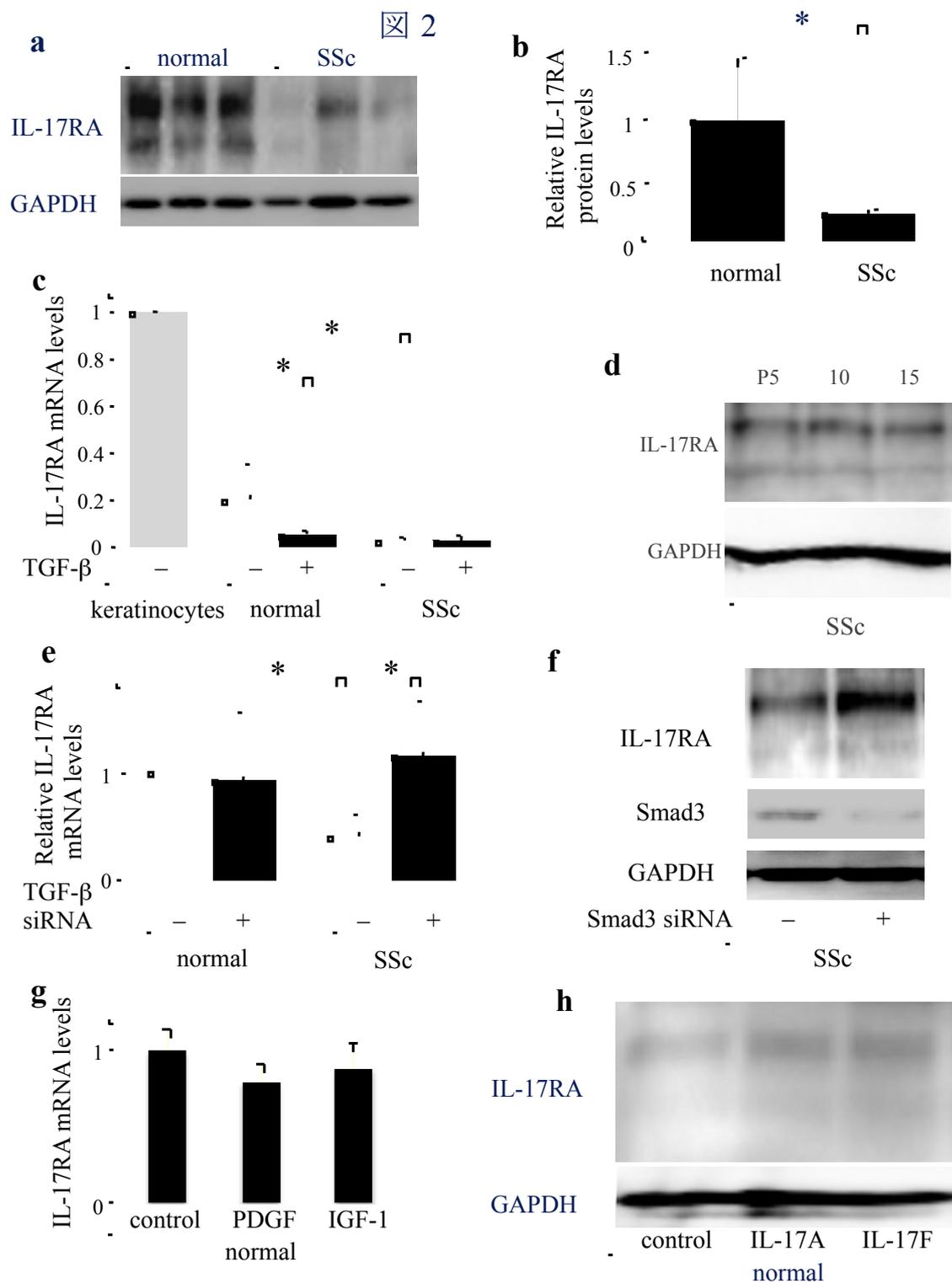


図 2. *in vitro* での SSc 線維芽細胞における IL-17RA の発現

(a, b) 正常と SSc 患者の線維芽細胞間の IL-17RA 蛋白発現量の比較

健常ドナーと SSc 患者からのヒト皮膚線維芽細胞をそれぞれ同じ条件下でコン

フルエントになるまで培養し、次に 24 時間無血清の状態とした。細胞可溶化物は IL-17RA の抗体を用いて免疫ブロッティングに使用した。GAPDH をコントロールとして用いた。3 つの正常線維芽細胞と SSc 線維芽細胞の代表的な結果を示した(a)。 スキャニング濃度測定により定量化し同じサンプルの GAPDH 量にて補正した IL-17RA の蛋白発現量を正常線維芽細胞の値(1.0)と比較して示した。データは独立した 3 つの実験の平均±S.E.を表す。\* $p < 0.05$  は正常線維芽細胞の値と比較した場合である(b)。

(c) 5 人の健常人と 5 人の SSc 患者からのヒト皮膚線維芽細胞を TGF- $\beta$ 1 (2ng/ml) を投与した場合と投与しなかった場合で 12 時間培養し全 RNA を抽出した。IL-17RA と GAPDH の mRNA 発現を決定する定量的リアルタイム PCR を行った。正常ヒトケラチノサイトにおける値を 1 に設定した。データは 5 つの独立した実験の平均± S.E.を表す。

(d) 可溶化物は 5、10、15 継代目の培養した SSc 皮膚線維芽細胞から入手した。細胞可溶化物は IL-17RA の抗体を用いた免疫ブロッティングに使用した。GAPDH をコントロールとして使用した。

(e) IL-17RA の発現に対する TGF- $\beta$ 1 の siRNA の効果は図. 2c に述べたようにリアルタイム PCR により調べた。線維芽細胞は TGF- $\beta$ 1 siRNA(黒いバー)もしくはコントロール siRNA(白いバー)を用い形質移入した。形質移入された正常線維芽細胞の値を 1 に設定した。データは 3 つの独立した実験の平均± S.E.を表している。

(f) 『実験方法』に述べたように SSc 線維芽細胞はコントロールもしくは Smad3 の siRNA を用い形質移入した。細胞可溶化物は IL-17RA、Smad3、GAPDH の抗体を用いて免疫ブロッティングに使用した。

(g) 正常線維芽細胞は PDGF もしくは IGF-1 (250ng/ml)の存在下もしくは非存在

下で 12 時間インキュベーションした。IL-17RA の mRNA レベルを評価するために定量的リアルタイム PCR を行った。未処理細胞の平均値を 1 とした。データは 3 つの独立した実験の平均±S.E.を表す。

**(h)** 正常皮膚線維芽細胞はIL-17A もしくはIL-17F(250ng/ml)の存在下もしくは非存在下で 24 時間インキュベーションし、細胞可溶化物は IL-17RA の抗体とともに免疫ブロッティングに使用した。

図 3

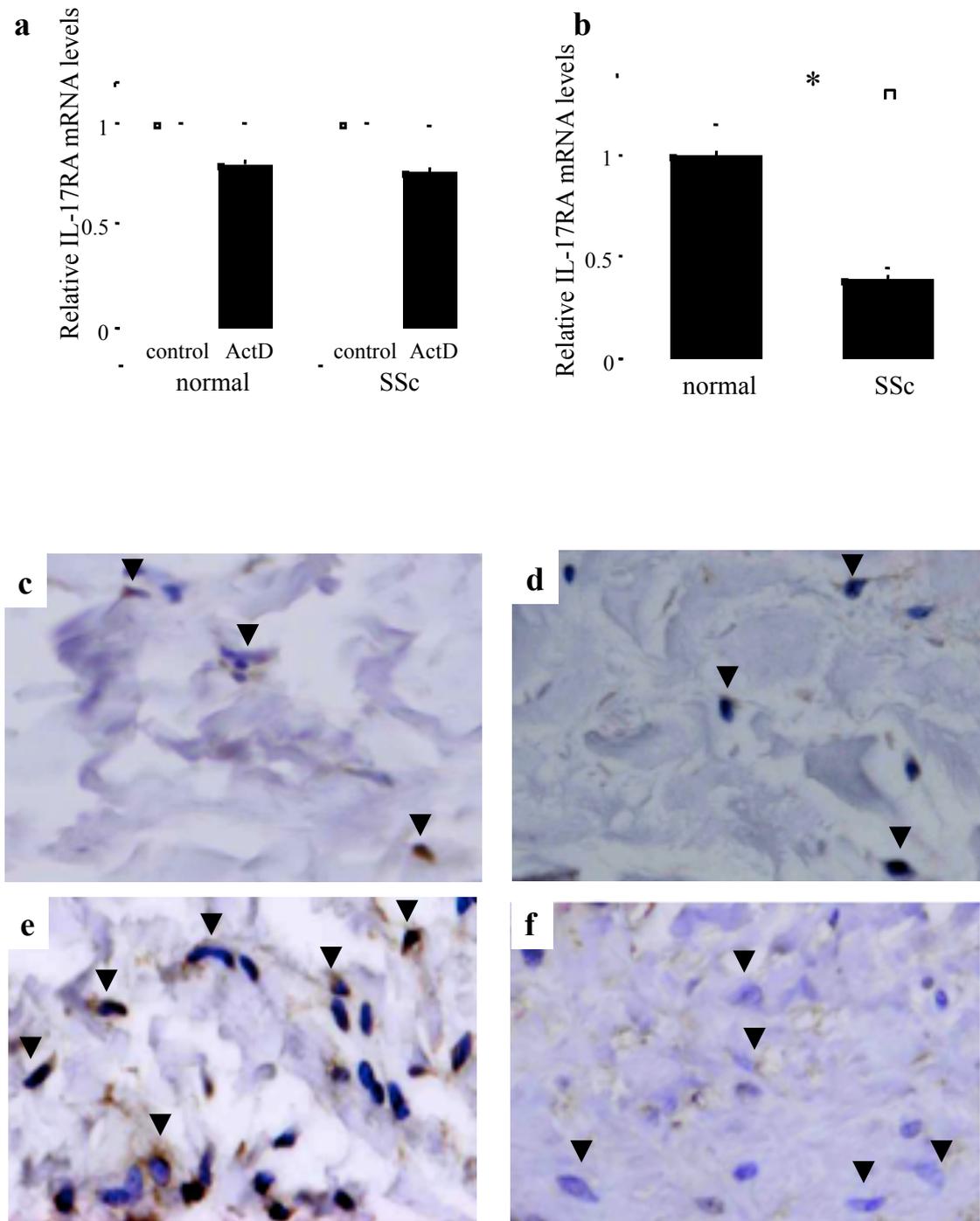


図 3. SSc 線維芽細胞における IL-17RA の発現低下の機序。

(a) 正常と SSc の皮膚線維芽細胞を 24 時間無血清の状態としアクチノマイシン D(2.5ng/ $\mu$ l)の存在下と非存在下で 12 時間インキュベーションした。定量的リア

リアルタイム PCR を IL-17RA の mRNA 量を評価するために行った。未処理細胞における値を 1 に設定した(白い棒)。データは 3 つの独立した実験の平均±S.E.を表す。

**(b)** SSc 患者病変皮膚と正常皮膚から入手した全 RNA を使用して IL-17RA と GAPDH の mRNA 発現を決定するために、定量的リアルタイム PCR を行った。

\* $p < 0.05$  は正常皮膚における値と比較した場合である(1.0)。

**(c-f)** パラフィン切片は『実験方法』に述べたように IL-17RA の免疫組織化学的解析に使用した。**(c)** ヒト正常皮膚、本来の拡大率 x400、**(d)** SSc 患者皮膚、x400、**(e)** PBS 処理したマウス皮膚、x400、**(f)** ブレオマイシン処理したマウス皮膚、x400。線維芽細胞は黒い矢印により示した。

### 7.3 IL-17 の存在下と非存在下での ECM 関連遺伝子の PCR アレイ解析

次に IL-17 シグナル伝達経路の ECM 発現への影響と SSc の病態形成における IL-17 のシグナル伝達経路の関与を調べた。

IL-17A もしくは IL-17F にて処理した線維芽細胞における ECM 関連遺伝子の発現パターンの違いを同定するために、84 個の ECM 関連遺伝子からなる PCR アレイ解析を行った。正常ヒト皮膚線維芽細胞をコンフルエントになるまで培養し IL-17A もしくは IL-17F にて 12 時間刺激、その後全 RNA を抽出した。 $\Delta\Delta\text{CT}$  法にて 2 倍の差を有意であると考えた場合、IL-17A にて処理した線維芽細胞において 84 個中 11 個の遺伝子は発現が上昇しており、未処理の細胞と比較して 14 個の遺伝子は発現が減少していた。一方 IL-17F にて処理した線維芽細胞においては 15 個の遺伝子は発現が増加しており 24 個の遺伝子は発現が減少していた (表 2: 完全なデータセットは GEO microarray data repository, [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), accession number GSE33581 にて利用可能)。ヒトの  $\alpha 1(\text{I})$  コラーゲン遺伝子の発現は IL-17A もしくは IL-17F の処理によりわずかに減少していたが ( $\Delta\Delta\text{CT}$  法において IL-17A では 0.80 倍の増加、IL-17F では 0.70 倍の増加)、有意な差ではなかった。加えて、フィブロネクチンやテネイシン C などのその他のマトリックス遺伝子は、IL-17A もしくは IL-17F により有意に変化していなかった。しかしながら我々はアレイ解析にて、組織の線維化を誘導し SSc の病変形成に関与している CTGF(13) の mRNA 発現は、未処理細胞と比較して IL-17A 処理により有意に減少していた (0.44 倍)、IL-17F では有意には減少していなかった (0.58 倍)。この結果をリアルタイム PCR にて確認した。未処理細胞や IL-17F 処理細胞と比較して、IL-17A 処理により平均の CTGF の転写レベルは有意に減少していた (図. 4a)。免疫ブロットでも IL-17A が CTGF の蛋白発現を減少させていることが明らかとなった (図. 4b と c)。それ故 IL-17A は

CTGF 発現低下を介して抗線維化効果を持つのかもしれないし、IL-17F ではそうではなかった。

一方では免疫プロテイングにより、正常線維芽細胞において、未処理の細胞と比較して IL-17A 処理により  $\alpha 1(I)$ コラーゲンの蛋白合成は有意に減少していた( $p < 0.05$ )が、IL-17F では変化がなかった(図. 4d と e)。アレイ解析の結果を考慮すると、正常線維芽細胞において mRNA レベルを変えずに IL-17A は転写後の過程で  $\alpha 1(I)$ コラーゲンの蛋白発現を減少させると考えられた。

以上より、IL17Aは $\alpha 1(I)$ コラーゲンとCTGFの発現に対して抑制効果を持つのかもしれないし、SSc線維芽細胞におけるTGF- $\beta 1$ シグナル伝達によるIL-17RAのダウンレギュレーションを介したIL-17Aの抑制は、導入にて述べたように、亢進したコラーゲンの蓄積とSScの線維症の特徴に寄与している。この考えを検証するために、SSc線維芽細胞において、未処理の細胞と比較してIL-17AとIL-17Fによる処理より  $\alpha 1(I)$  コラーゲンの蛋白発現は変化しなかった(図. 4f)。おそらくこれはIL-17RAのダウンレギュレーションによるものであろう。

IL-17A刺激によるCTGF発現低下は、CTGFはTGF- $\beta 1$ の下流のターゲットであるため、TGF- $\beta$ は線維芽細胞におけるIL-17のシグナル伝達を阻害するだけでなく、IL-17もまたTGF- $\beta$  のシグナル伝達を阻害する可能性を示唆する。しかしながらアレイのデータは、IL-17AもしくはIL-17FはTGF- $\beta$ のその他の標的分子であるフィブロネクチン、テネイシンCやMMP-1の発現に影響しないことを示唆している(表 2) (42-44)。加えて、Smad3、TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta$ 受容体I、II、IIIを含むTGF- $\beta$ 関連分子の発現レベルはIL-17AとIL-17Fにより影響されなかった(図. 4g)。それゆえ、IL-17はTGF- $\beta$ シグナル伝達を阻害していないと考えられた。

表 2. PCRアレイ解析による IL-17A もしくは IL-17F の存在下と非存在下での細胞外マトリックス遺伝子の発現プロファイル

略号	遺伝子名	倍数変化
<u>IL-17A により発現が増加した遺伝子</u>		
ITGB2	Integrin, $\beta$ 2	58.32
MMP16	Matrix metalloproteinase 16	21.5
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	6.76
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	5.68
ITGA8	Integrin, $\alpha$ 8	3.35
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	3.26
ITGA4	Integrin, $\alpha$ 4	2.28
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	2.21
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	2.08
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	2.04
COL16A1	Collagen, type XVI, $\alpha$ 1	2.01
<u>IL-17A により発現が減少した遺伝子</u>		
ITGA2	Integrin, $\alpha$ 2	0.04
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	0.11
ITGAM	Integrin, $\alpha$ M	0.24
ITGA5	Integrin, $\alpha$ 5	0.25
SELP	Selectin P	0.29
ITGB3	Integrin, $\beta$ 3	0.3
LAMB3	Laminin, $\beta$ 3	0.34
ITGB4	Integrin, $\beta$ 4	0.39
ITGAL	Integrin, $\alpha$ L	0.41
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.42
ITGA3	Integrin, $\alpha$ 3	0.43
CTGF	Connective tissue growth factor	0.44
VTN	Vitronectin	0.44
ITGA6	Integrin, $\alpha$ 6	0.48
<u>IL-17F により発現が増加した遺伝子</u>		
MMP12	Matrix metalloproteinase 12	224.1
MMP16	Matrix metalloproteinase 16	93.57
ITGB2	Integrin, $\beta$ 2	39.07

TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	38.27
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	19
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	11.54
ITGA5	Integrin, $\alpha$ 5	6.36
COL6A2	Collagen, type VI, $\alpha$ 2	5.42
ECM1	Extracellular matrix protein 1	2.96
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	2.94
ITGA7	Integrin, $\alpha$ 7	2.6
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	2.55
MMP3	Matrix metalloproteinase 3	2.19
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	2.07
ITGA4	Integrin, $\alpha$ 7	2.01
<u>IL-17F により発現が減少した遺伝子</u>		
ITGAM	Integrin, $\alpha$ M	0.01
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	0.01
CTNND2	Catenin (cadherin-associated protein), $\delta$ 2	0.01
VTN	Vitronectin	0.01
ADAMTS8	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8	0.04
MMP7	Matrix metalloproteinase 7	0.06
ADAMTS13	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 13	0.06
MMP10	Matrix metalloproteinase 10	0.07
SELP	Selectin P	0.07
MMP13	Matrix metalloproteinase 13	0.08
SELE	Selectin E	0.08
LAMA1	Laminin, $\alpha$ 1	0.11
HAS1	Hyaluronan synthase 1	0.12
MMP15	Matrix metalloproteinase 15	0.13
ITGAL	Integrin, $\alpha$ L	0.14
MMP8	Matrix metalloproteinase 8	0.15
ITGB3	Integrin, $\beta$ 3	0.19
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	0.21
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.23
MMP11	Matrix metalloproteinase 11	0.29
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	0.31

LAMA3	Laminin, $\alpha$ 3	0.32
CNTN1	Contactin 1	0.36
ITGA3	Integrin, $\alpha$ 3	0.37
ITGB4	Integrin, $\beta$ 4	0.38

---

3 検体の正常線維芽細胞からの mRNA の等量混合物を IL-17A もしくは IL-17F の存在下もしくは非存在下にて処理し準備した。そして mRNA 発現プロファイルを PCR アレイにより評価した。未加工のサイクル閾値(Ct) は 5 つのハウスキーピング遺伝子の平均値を使用して規準化した。倍数変化( $1/2^{\text{未加工のそれぞれの mRNA の Ct 値} - \text{ハウスキーピング遺伝子の Ct 値}}$ )を示した。

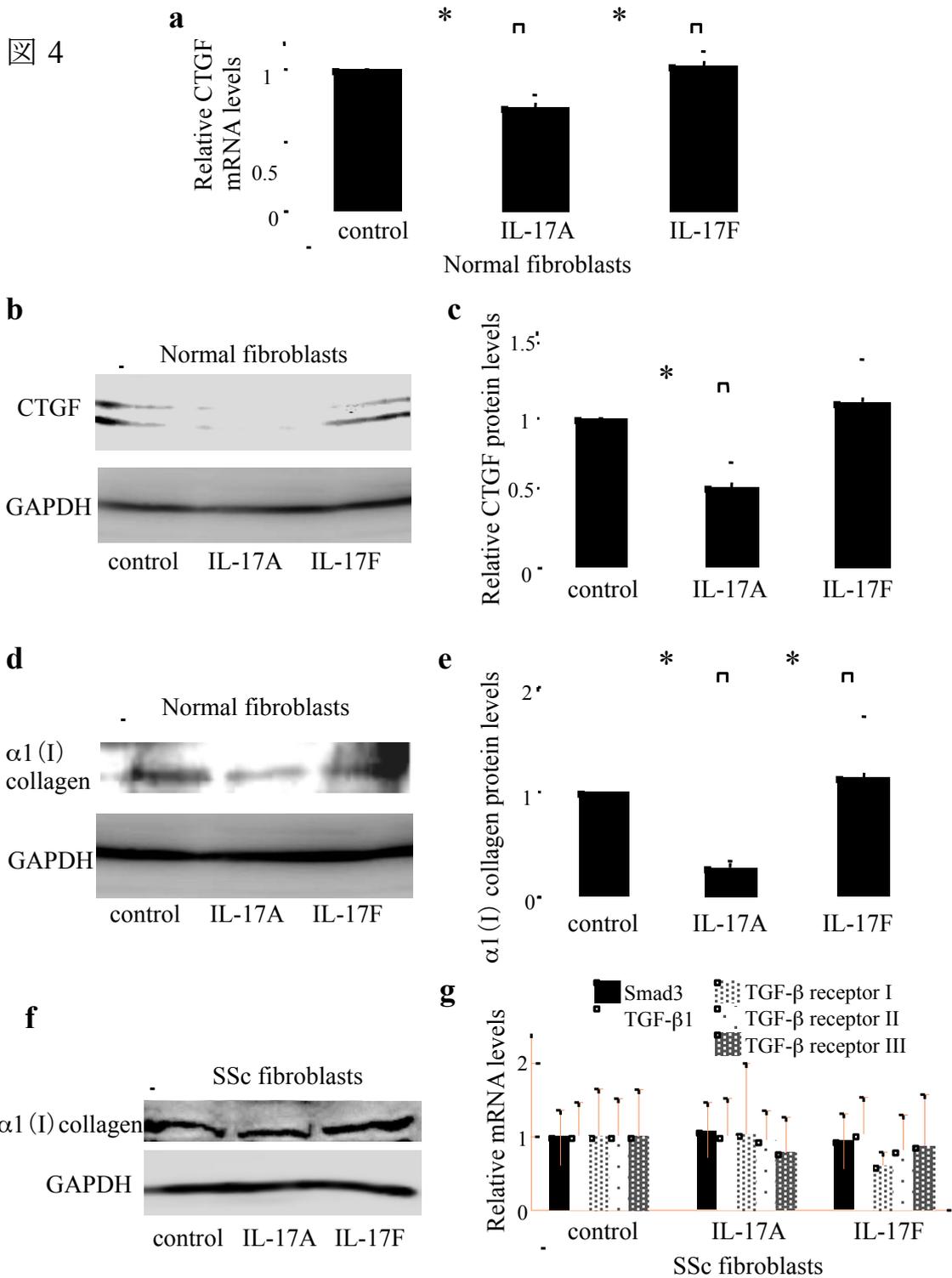


図 4. 正常線維芽細胞における IL-17A と IL-17F の ECM 発現への影響

(a) ヒト皮膚正常線維芽細胞はコンフルエントになるまで培養し、次に 24 時間無血清の状態とした。細胞は IL-17A もしくは IL-17F (250ng/ml) の存在下もしくは

は非存在下にて 12 時間インキュベーションし、CTGF と GAPDH の mRNA 量を評価するために定量的リアルタイム PCR を行った。同じサンプルの GAPDH により規準化した CTGF の平均の相対的な転写物の量は、未処理細胞における量 (1.0) と比較して示した。データは 3 つに独立した実験の平均±S.E.を表す。

\* $p < 0.05$  は IL-17A で処理した正常線維芽細胞における値と比較した場合である。

**(b, c)** ヒト皮膚線維芽細胞は IL-17A もしくは IL-17F の存在下もしくは非存在下で 24 時間インキュベーションし、CTGF や GAPDH の抗体を用いて免疫ブロッキングを行った**(b)**。図 2b に述べたように、スキャニング濃度測定により定量化した CTGF の蛋白発現量を示した**(c)**。

**(d, e)** 正常細胞は IL-17A もしくは IL-17F (250ng/ml) の存在下もしくは非存在下で 24 時間インキュベーションし、免疫ブロッキングを行った**(d)**。図 2b において述べたように、スキャニング濃度測定により定量化した $\alpha 1(I)$ コラーゲン発現量を示した**(e)**。

**(f)** SSc 線維芽細胞は IL-17A もしくは IL-17F (250ng/ml) の存在下もしくは非存在下にて 24 時間インキュベーションし、図. 4d に述べたように免疫ブロッキングを行った。

**(g)** 正常線維芽細胞は IL-17A もしくは IL-17F (250ng/ml) の存在下もしくは非存在下にて 12 時間インキュベーションした。定量的リアルタイム PCR を Smad3、TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta$ 受容体 I、II、III 型の mRNA 量を評価するために行った。未処理細胞の平均値を 1 に設定した。データは 5 つの独立した実験の平均±S.E.を表す。

#### 7.4 IL-17A によるコラーゲン発現制御へのマイクロ RNA の関与

最後に、我々はIL-17AによるmRNAレベルを変化させることのない $\alpha 1(I)$ コラーゲン蛋白の制御機構を明らかにすることを試みた。

マイクロRNAは通常標的遺伝子の翻訳を阻害し、標的転写産物の分解を引き起こさないため、我々はマイクロRNAがこの過程に関与していると仮定した。我々はこの分野で代表的なプログラムであるTargetScan (version 5.1, <http://www.targetscan.org/>)とMiranda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)を使用したマイクロRNA標的遺伝子予想にしたがい、 $\alpha 1(I)$ コラーゲンの制御因子としてmiR-129-5pに着目した(45)。図. 5aはmiR-129-5pの平均の転写物のレベルは未処理の細胞と比較してIL-17A処理により有意に増加( $p < 0.05$ )しており、IL-17Fではそうではなかったということを示している。このことはIL-17AもしくはIL-17Fの $\alpha 1(I)$ コラーゲン発現に対する影響と一致していた(図. 4d)。

その上、 $\alpha 1(I)$ コラーゲンの3'末端非翻訳領域(3' UTR)の構成は転写プロモーターの活性測定には利用できないので、miR-129-5pと $\alpha 1(I)$ コラーゲン3'非翻訳領域の直接相互作用を特定するために、我々はmicroRNA mimicとmiScript Target プロテクター(Qiagen)を使用した。このmiScript Target プロテクターは相互作用で特異的に干渉するように設計された1本鎖の改変RNAであるが、一方同じ miR-129-5p のその他の標的の制御は影響されない(<http://www.qiagen.com/products/miscripttargetprotectors.aspx>) (46)。コントロール・プロテクターの存在下では、正常線維芽細胞においてmiR-129-5p mimicの過剰発現により $\alpha 1(I)$ コラーゲンの蛋白発現は抑制された(図. 5b)。このことは $\alpha 1(I)$ コラーゲンはmiR-129-5p の標的である可能性を確認するものである。一方、miR-129-5pに特異的なプロテクターはmiR-129-5p mimicを介する $\alpha 1(I)$ コラーゲンの抑制を阻害した(図. 5b)。したがってこのことはmiR-129-5pと $\alpha 1(I)$ コラーゲ

ン3'UTRの直接的な相互作用を示唆している。

つまりIL-17AはmiR-129-5pを介して $\alpha$ 1(I)コラーゲン蛋白の発現を制御しているかもしれない。興味深いことに、ヒト細胞の分化と発生に関与する88個のmicroRNAから成るPCRアレイ解析にて、いくつかのmicroRNAは正常線維芽細胞と比較してSSc線維芽細胞において発現が低下しており(表 3)、miR-129-5pはSSc線維芽細胞において発現が減少していたmicroRNAの中の一つであった( $\Delta\Delta$ CT法において0.22倍の変化であり、完全なデータセットはGEOのマイクロアレイ・データ・リポジトリにて利用できる：[www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)、受け入れ番号はGSE34142)。miR-129-5pに特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCRにてSSc線維芽細胞におけるmiR-129-5pの抑制が確認された(図. 5c)。これらの結果は、IL-17Aは正常皮膚線維芽細胞においてmiR-129-5pの誘導により $\alpha$ 1(I)コラーゲンの合成を阻害するが、そのシグナルはSScにおいてIL-17RAの発現低下により抑制されており、このことがmiR-129-5pの発現低下と $\alpha$ 1(I)コラーゲンの発現増加を引き起こすことを示唆している。この仮説を裏付ける事実として、正常線維芽細胞におけるmiR-129-5pレベルはIL-17RA siRNAにより減少した(図. 5d)。

図 5

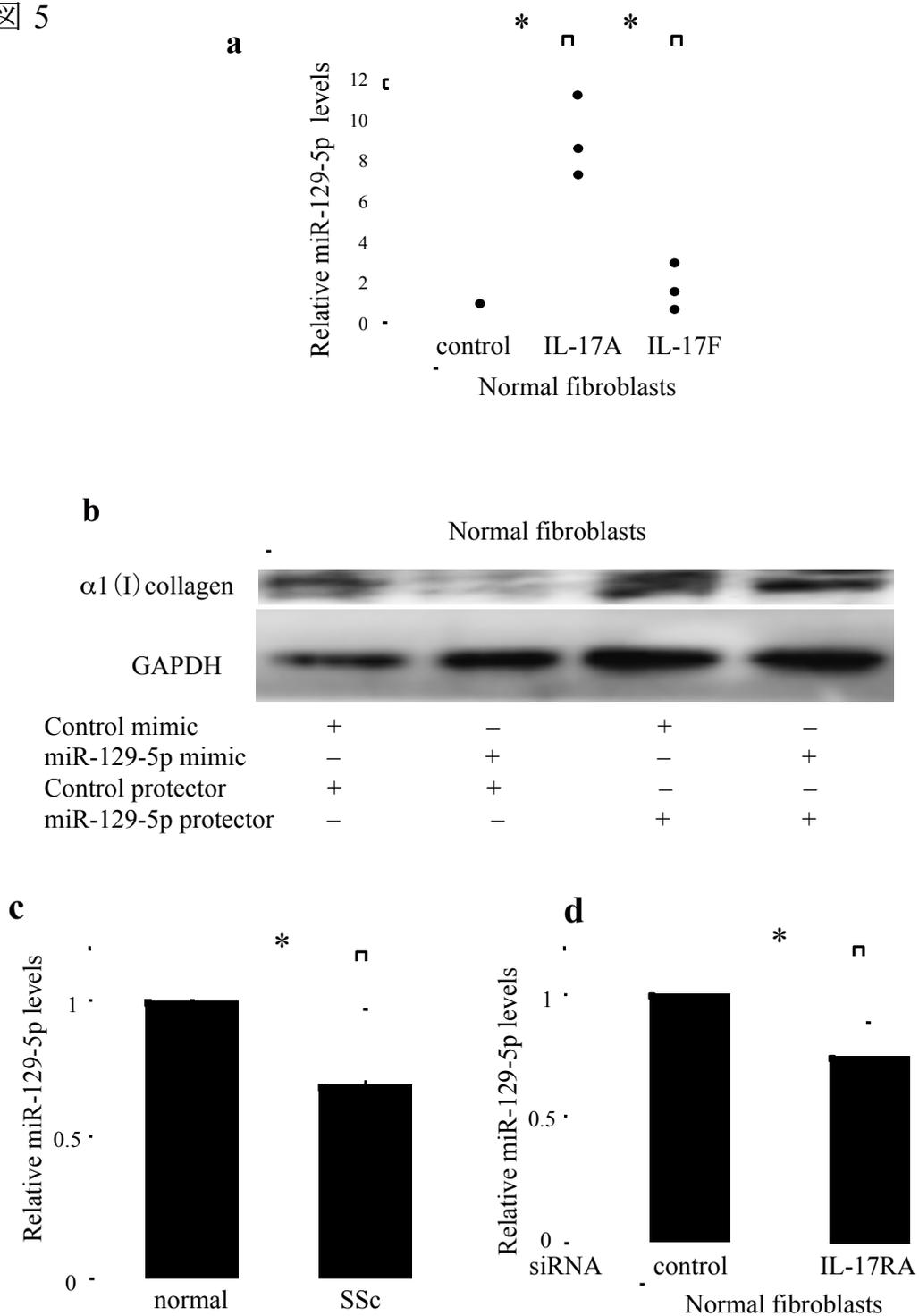


図 5. IL-17A の miR-129-5p 発現への影響

(a) 正常ヒト皮膚線維芽細胞は IL-17A もしくは IL-17F (250ng/ml)の存在下もしくは非存在下にて 12 時間インキュベーションし、microRNA を抽出した。相対

的な miR-129-5p 発現量(U6にて規準化した)は定量的リアルタイムPCRにより特定した。データは縦軸にて示した(n=3)。未処理細胞における値を1と設定した。 $*p<0.05$  は IL-17A 処理細胞における値と比較した場合である。

**(b)** 正常皮膚線維芽細胞はコントロールもしくは miR-129-5p mimic を用いてコントロールもしくは 129-5p 特異的な microRNA プロテクターの存在下にて『実験方法』において述べたように形質移入した。細胞は 120 時間後に回収した。細胞可溶化物は免疫ブロッティングに使用した。

**(c)** 正常と SSc の皮膚線維芽細胞は同じ条件にて培養し、microRNA を回収した。相対的な miR-129-5p 発現量(U6にて規準化)は定量的リアルタイムPCRにより測定した。正常線維芽細胞における値を1と設定した。データは3つの独立した実験の平均±S.E.を表す。 $*p<0.05$  は正常線維芽細胞における値と比較した場合である。

**(d)** 正常線維芽細胞は IL-17RA siRNA もしくはコントロールの siRNA を用いて形質移入した。相対的な miR-129-5p 発現量 (U6にて規準化) は定量的リアルタイムPCRにより測定した。コントロール siRNA にて形質移入した細胞における値を1に設定した。データは3つの独立した実験の平均±S.E.を表す。

表 3. マイクロアレイ解析による SSc 皮膚線維芽細胞において発現低下

していた microRNA の要約

遺伝子名	倍数変化	遺伝子名	倍数変化
miR-10a	<0.01	miR-210	0.20
miR-142-3p	<0.01	miR-370	0.20
miR-146a	<0.01	miR-100	0.21
miR-196a	<0.01	miR-128	0.22
miR-206	0.05	miR-129-5p	0.22
miR-185	0.05	miR-488	0.23
miR-146b-5p	0.07	miR-93	0.24
miR-208a	0.09	miR-125a-5p	0.25
miR-192	0.10	miR-21	0.28
miR-15b	0.13	miR-142-5p	0.28
let-7c	0.13	miR-10b	0.28
miR-195	0.16	miR-155	0.28
miR-126	0.16	let-7a	0.32
miR-124	0.18	miR-17	0.32
miR-16	0.18	let-7g	0.33
miR-99a	0.20		

5 人の正常患者と 5 人の SSc 患者由来の microRNA の等量混合物を準備し、それぞれの細胞における RNA 発現プロファイルは PCR アレイ解析を用いて評価した。Ct(閾)値は 4 つのハウスキーピング遺伝子の平均値を用いて標準化した。倍数変化 ( $1/2^{\text{それぞれの microRNA の未処理 Ct 値} - \text{small RNA のハウスキーピング遺伝子の Ct 値}}$ ) を示した。

## 8. 考察

この研究は、3つの主要知見により、ECMの制御におけるIL-17のシグナル伝達経路の役割とSSc表現型へのその関与を明らかにした。

SSc患者におけるIL-17Aの血清中濃度については依然として議論の余地があり、その臨床的意義は明らかとはなっていない。この研究は、SSc患者のIL-17A血清濃度が有意に高くIL-17Fは差がないこと、しかもIL-17A血清濃度高値例は指尖虫喰状癬痕を有する傾向があることを示している。さらにIL-17A高値例では正常例よりもskin scoreが低い傾向があった。つまりこのことはIL-17Aの線維化抑制効果を示唆している。しかしながらこの研究ではSSc患者の血清サンプルの数が確定的な結論を得るにはあまりに限られている。そのため、さらに大きな研究が将来必要であると考えた。

第2に我々は、正常線維芽細胞と比較してSSc線維芽細胞におけるIL-17RAの発現は、in vivoとin vitroにて転写レベルで有意に低下していた。SSc線維芽細胞において内因性のTGF- $\beta$ の活性化が起きていると考えられている。今回の結果は、TGF- $\beta$ 1は受容体を介してIL-17シグナル伝達に阻害効果を持ち、IL-17シグナル伝達経路はSScにおけるIL-17RAの発現低下のために抑制され、SSc患者におけるIL-17A血清濃度の上昇はネガティブフィードバックから生じること示唆していると考えられた。

この研究ではまた外因性のIL-17AとIL-17Fの正常ヒト皮膚線維芽細胞におけるECM発現への影響についても検討した。IL-17Aは線維芽細胞の増殖活性を刺激すると考えられているが(34)、ECM制御におけるIL-17シグナル伝達経路の正確な役割はいまだ十分には明らかにはされていない。in vitroのIL-17によるECM関連遺伝子のPCRアレイにおける変化に基づき、我々はCTGFと

$\alpha 1(I)$ コラーゲン遺伝子に着目した。IL-17A は CTGF と  $\alpha 1(I)$ コラーゲンの蛋白発現を減少させたが、IL-17F では変化はなかった。microRNA 解析にて、 $\alpha 1(I)$ コラーゲンの負の制御因子であるかもしれない miR-129-5p は IL-17A による刺激により SSc 線維芽細胞において減少しているが、正常細胞においては発現が増加していた。平均わずか 22 ヌクレオチドの長さの短いリボ核酸分子である microRNA は、mRNA の 3' UTR における相補的配列に結合する転写後の制御因子であり、遺伝子発現抑制をもたらす。この分野での最近の研究では microRNA は in vivo において免疫応答や発癌と同様に血管形成においても役割を果たしていることが指摘されている(47-51)。この研究では microRNA はまた ECM 制御に関与していることを示唆している。

我々の研究にはいくつかの制限がある。第一に、皮膚の IL-17RA の mRNA 発現量は SSc 患者の MRSS と逆相関する傾向があった。このことは IL-17 シグナル伝達の抗線維化効果を示唆していると考えた。第二に、以前の報告では IL-17A の受容体への結合親和性は IL-17F よりも高いことが示唆されている(52, 53)。したがって、親和性の違いは IL-17A と IL-17F の ECM 発現への異なる効果を説明出来るのかもしれないが、我々はこの研究においてこの仮説を証明できなかった。加えて IL-17A は密接なアミノ酸配列同一性と RA 受容体を IL-17F とのみ共有するが、他の IL-17 ファミリーとは共有しない。それゆえ、我々は IL-17 ファミリーのその他の 4 つのメンバーが IL-17A と比べて ECM 発現に関して類似した効果を持つかどうかを特定することは出来なかった。これらの点は今後の研究において明らかにされるべきであろう。

結論として、IL-17 シグナル伝達経路は miR-129-5p の発現増加と  $\alpha 1(I)$ コラーゲンの発現低下を介して抗線維化効果を持つと考えられた。SSc 線維芽細胞において、TGF- $\beta 1$  による内因性活性化はコラーゲン産生を亢進している。同時

に TGF- $\beta$ 1 は IL-17 受容体の発現低下により IL-17 シグナル伝達を阻害した。このことはまた過度のコラーゲン蓄積と組織の線維化に寄与すると考えられた(図. 6)。IL-17 シグナル伝達抑制による CTGF の誘導もまた線維化を促進するであろう。その一方、SSc 病変皮膚と血液中に増加した IL-17 発現はネガティブ・フィードバック・メカニズムによるものかもしれない。これらの効果は IL-17A に特異的であった。TGF- $\beta$ 1 と IL-17A から成るサイトカインネットワークによる線維化の新規の制御機構を明らかにするさらに大規模な研究は、この疾患に対する新しい治療方法の開発につながると考えられた。

図 6

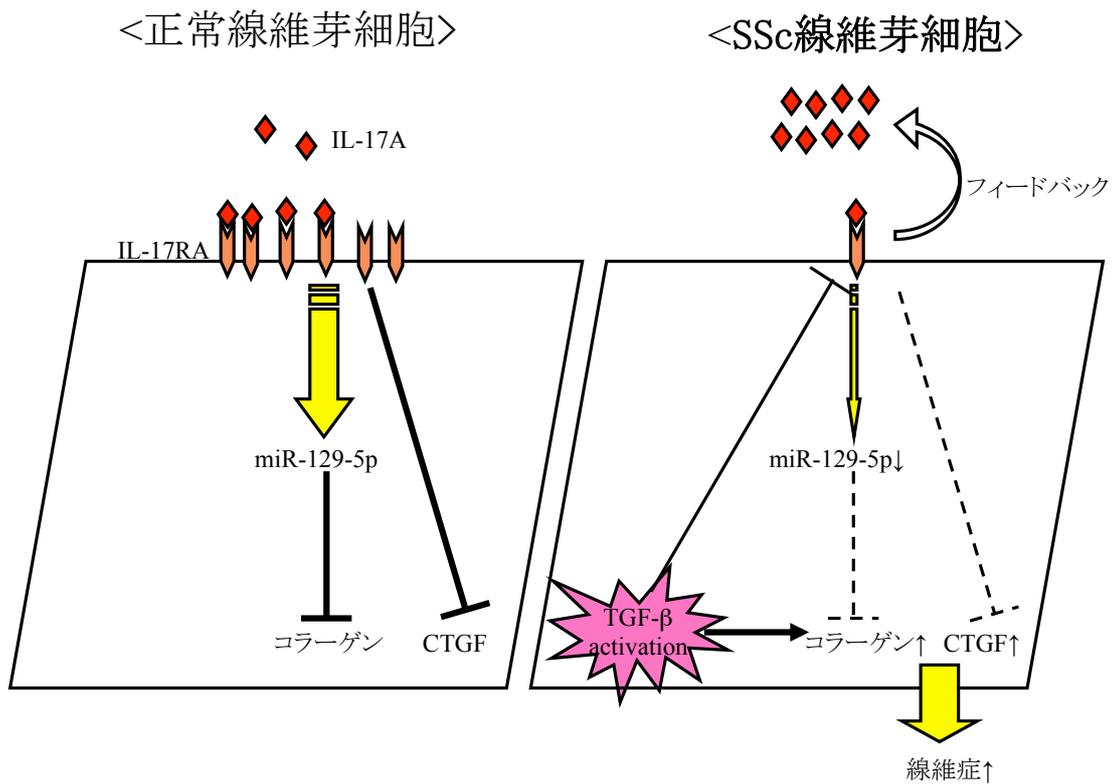


図 6. SSc 線維芽細胞における IL-17 シグナル伝達のモデル

IL-17 シグナル伝達経路は抗線維化作用の効果を持つ。すなわち正常線維芽細胞における外因性の IL-17A 刺激は CTGF の発現を減少させ、miR-129-5p を

介してコラーゲンの発現量を減少させる。

SSc 線維芽細胞において、内因性 TGF- $\beta$ 1 の活性化はコラーゲン産生を促進する。同時に TGF- $\beta$ 1 は IL-17 受容体の発現抑制により IL-17A シグナル伝達を阻害し、そのことはまた過度のコラーゲンの蓄積と組織の線維化に寄与している。IL-17A シグナルの抑制による CTGF の誘導もまた線維化を促進する。その一方、血清と SSc 患者病変皮膚での増加した IL-17A はおそらくこの疾患におけるネガティブフィードバックによるものである。

## 9. 結語

TGF- $\beta$  と IL-17A からなるサイトカインネットワークによる線維化の新しい制御機構を明らかにすることは、この疾患の新規の治療手段の開発に役立つであろう。

## 10. 参考文献

1. Korn, J. H. 1989. Immunologic aspects of scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1:479-484.
2. Mauch, C., and T. Krieg. 1990. Fibroblast-matrix interactions and their role in the pathogenesis of fibrosis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 16:93-107.
3. Mauch, C., E. Kozłowska, B. Eckes, and T. Krieg. 1992. Altered regulation of collagen metabolism in scleroderma fibroblasts grown within three-dimensional collagen gels. *Exp. Dermatol.* 1:185-190.
4. Jelaska, A., M. Arakawa, G. Broketa, and J. H. Korn. 1996. Heterogeneity of collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts: increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 39:1338-1346.
5. Massagué, J. 1990. Transforming growth factor- $\beta$  family. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 6:597-641.
6. LeRoy, E. C., E. A. Smith, M. B. Kahaleh, M. Trojanowska, and R. M. Silver. 1989. A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. Is transforming growth factor  $\beta$  the answer? *Arthritis Rheum.* 32:817-825.
7. LeRoy, E. C. 1974. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J. Clin. Invest.* 54:880-889.
8. Jimenez, S. A., G. Feldman, R. I. Bashey, R. Bienkowski, and J. Rosenbloom. 1986. Co-ordinate increase in the expression of type I and type III collagen genes in progressive systemic sclerosis. *Biochem. J.* 237:837-843.
9. Kikuchi, K., E. A. Smith, E. C. LeRoy, and M. Trojanowska. 1992. Direct

- demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:45-50.
10. Hitraya, E. G., and S. A. Jimenez. 1996. Transcriptional activation of the  $\alpha 1(I)$  procollagen gene in systemic sclerosis dermal fibroblasts. Role of intronic sequences. *Arthritis Rheum.* 39:1347-1354.
  11. Ihn, H., K. Yamane, M. Kubo, and K. Tamaki. 2001. Blockade of endogenous transforming growth factor  $\beta$  signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor  $\beta$  receptors. *Arthritis Rheum.* 44:474-480.
  12. Asano, Y., H. Ihn, K. Yamane, M. Kubo, and K. Tamaki. 2004. Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF- $\beta$  signaling in scleroderma fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 113:253-264.
  13. Takehara, K. 2003. Hypothesis: pathogenesis of systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 30:755-759.
  14. Kawaguchi, Y. 1994. IL-1 $\alpha$  gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 97:445-450.
  15. Feghali, C. A., K. L. Bost, D. W. Boulware, and L. S. Levy. 1992. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J. Rheumatol.* 19:1207-1211.
  16. Overbeek MJ, Boonstra A, Voskuyl AE, Vonk MC, Vonk-Noordegraaf A, van Berkel MP, Mooi WJ, Dijkmans BA, Hondema LS, Smit EF, Grünberg K. 2011. Platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  and epidermal growth factor receptor

- in pulmonary vasculature of systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension versus idiopathic pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease: a case-control study. *Arthritis Res Ther.* Epub.
17. Brissett M, Veraldi KL, Pilewski JM, Medsger TA Jr, Feghali-Bostwick CA. 2011. Localized expression of tenascin in systemic sclerosis-associated lung fibrosis and its regulation by IGF binding protein (IGFBP)-3. *Arthritis Rheum.* Epub.
  18. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. de Sauvage, and A. L. Gurney. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278:1910-1914.
  19. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
  20. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6:1123-1132.
  21. Iwakura, Y., and H. Ishigame. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116:1218-1222.
  22. Hymowitz, S. G., E. H. Filvaroff, J. P. Yin, J. Lee, L. Cai, P. Risser, M. Maruoka, W. Mao, J. Foster, R. F. Kelley, G. Pan, A. L. Gurney, A. M. de Vos, and M. A. Starovasnik. 2001. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding.

*EMBO J.* 20:5332-5341.

23. Yao, Z., M. K. Spriggs, J. M. Derry, L. Strockbine, L. S. Park, T. VandenBos, J. D. Zappone, S. L. Painter, and R. J. Armitage. 1997. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine*. 9:794-800.
24. Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon, and J. K. Kolls. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194:519-27.
25. Yao, Z., W. C. Fanslow, M. F. Seldin, A. M. Rousseau, S. L. Painter, M. R. Comeau, J. I. Cohen, and M. K. Spriggs. 1995. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3:811-821.
26. Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201:233-240.
27. Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6:1133-1141.
28. Arican, O., M. Aral, S. Sasmaz, and P. Ciragil. 2005. Serum levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and

- correlation with disease severity. *Mediators Inflamm.* 2005:273-279.
29. Bessis, N., and M. C. Boissier. 2001. Novel pro-inflammatory interleukins: potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 68:477-481.
  30. Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and Y. Fujiyama. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52:65-70.
  31. Kawaguchi, M., L. F. Onuchic, X. D. Li, D. M. Essayan, J. Schroeder, H. Q. Xiao, M. C. Liu, G. Krishnaswamy, G. Germino, and S. K. Huang. 2001. Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma. *J. Immunol.* 167:4430-4435.
  32. Lubberts, E., L. A. Joosten, M. Chabaud, L. van Den Bersselaar, B. Oppers, C. J. Coenen-De Roo, C. D. Richards, P. Miossec, and W. B. van Den Berg. 2000. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J. Clin. Invest.* 105:1697-1710.
  33. Murata, M., M. Fujimoto, T. Matsushita, Y. Hamaguchi, M. Hasegawa, K. Takehara, K. Komura, and S. Sato. 2008. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *J. Dermatol. Sci.* 50:240-242.
  34. Kurasawa, K., K. Hirose, H. Sano, H. Endo, H. Shinkai, Y. Nawata, K. Takabayashi, and I. Iwamoto. 2000. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 43:2455-2463.
  35. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L, Mayes MD,

- Reveille JD, Agarwal SK. 2009. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther.* 11:R147. Epub
36. LeRoy, E. C., C. Black, R. Fleischmajer, S. Jablonska, T. Krieg, and T. A. J. Medsger. 1988. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 15:202-206.
37. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. 1980. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 23:581-590.
38. Ihn, H., E. C. LeRoy, and M. Trojanowska. 1997. Oncostatin M stimulates transcription of the human  $\alpha 2(I)$  collagen gene via the Sp1/Sp3-binding site. *J. Biol. Chem.* 272:24666-24672.
39. Yamamoto, T., S. Takagawa, I. Katayama, K. Yamazaki, Y. Hamazaki, H. Shinkai, and K. Nishioka. 1999. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 112:456-462.
40. Tanaka, C., M. Fujimoto, Y. Hamaguchi, S. Sato, K. Takehara, and M. Hasegawa. 2010. Inducible costimulator ligand regulates bleomycin-induced lung and skin fibrosis in a mouse model independently of the inducible costimulator/inducible costimulator ligand pathway. *Arthritis Rheum.* 62:1723-1732.
41. Johansen, C., P. A. Usher, R. B. Kjellerup, D. Lundsgaard, L. Iversen, and K. Kragballe. 2009. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in

- lesional psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* 160:319-324.
42. Koji Y. Arai and Toshio Nishiyama. 2007. Developmental changes in extracellular matrix messenger RNAs in the mouse placenta during the second half of pregnancy: possible factors involved in the regulation of placental extracellular matrix expression 1. *Biol. Reprod.* 77:923–933
  43. Jinnin, M., H. Ihn, Y. Asano, K. Yamane, M. Trojanowska and K. Tamaki. 2004. Tenascin-C upregulation by transforming growth factor- $\beta$  in human dermal fibroblasts involves Smad3, Sp1, and Ets1. *Oncogene* 23:1656-1667
  44. Weihua Yuan and John Varga. 2001. Transforming growth factor- $\beta$  repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J. Biol. Chem.* 276:38502-38510
  45. Lewis, B. P., C. B. Burge, and D. P. Bartel. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
  46. Long, J. M., and D. K. Lahiri. 2011. MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid- $\beta$  precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404:889-895.
  47. Kuehbacher, A., C. Urbich, and S. Dimmeler. 2008. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends. Pharmacol. Sci.* 29:12-15.
  48. Chen, Y., and D. H. Gorski. 2008. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* 111:1217-1226.
  49. Furer, V., J. D. Greenberg, M. Attur, S. B. Abramson, and M. H. Pillinger. 2010. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases.

*Clin. Immunol.*

50. Lu, L. F., and A. Liston. 2009. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology* 127:291-298.
51. Davidson-Moncada, J., F. N. Papavasiliou, and W. Tam. 2010. MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183:183-194.
52. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, de Vos AM, Starovasnik MA. 2001. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J.* 20:5332-41.
53. Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, Harder B, Okada S, Ostrander CD, Kreindler JL, Aujla SJ, Reardon B, Moore M, Shea P, Schreckhise R, Bukowski TR, Presnell S, Guerra-Lewis P, Parrish-Novak J, Ellsworth JL, Jaspers S, Lewis KE, Appleby M, Kolls JK, Rixon M, West JW, Gao Z, Levin SD. 2007. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol.* 179:5462-73.