

- 2) Superti-Furga, A., Rocchi, M., Schafer, B. W. & Gitzelmann, R. Complementary DNA sequence and chromosomal mapping of a human proteoglycan-binding cell-adhesion protein (dermatopontin). *Genomics* 1993; **17**: 463-7
- 3) Cronshaw, A. D. et al. TRAMP (tyrosine rich acidic matrix protein), a protein that co-purifies with lysyl oxidase from porcine skin. Identification of TRAMP as the dermatan sulphate proteoglycan-associated 22K extracellular matrix protein. *Matrix* 1993; **13**: 255-66
- 4) Neame, P. J., Choi, H. U. & Rosenberg, L. C. The isolation and primary structure of a 22-kDa extracellular matrix protein from bovine skin. *J Biol Chem* 1989; **264**: 5474-9
- 5) Domenicucci, C., Goldberg, H. A. & Sodek, J. Identification of lysyl oxidase and TRAMP as the major proteins in dissociative extracts of the demineralized collagen matrix of porcine dentine. *Connect Tissue Res* 1997; **36**: 151-63
- 6) Forbes, E. G., Cronshaw, A. D., MacBeath, J. R. & Hulmes, D. J. Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) is a tyrosine-sulphated and widely distributed protein of the extracellular matrix. *FEBS Lett* 1994; **351**: 433-6
- 7) MacBeath, J. R., Shackleton, D. R. & Hulmes, D. J. Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) accelerates collagen fibril formation in vitro. *J Biol Chem* 1993; **268**: 19826-32
- 8) Lewandowska, K. et al. Extracellular matrix adhesion-promoting activities of a dermatan sulfate proteoglycan-associated protein (22K) from bovine fetal skin. *J Cell Sci* 1991; **99**: 657-68
- 9) Kuroda, K., Okamoto, O. & Shinkai, H. Dermatopontin expression is decreased in hypertrophic scar and systemic sclerosis skin fibroblasts and is regulated by transforming growth factor-beta 1, interleukin-4, and matrix collagen. *J Invest Dermatol* 1999; **112**: 706-10
- 10) Danielson, K. G. et al. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997; **136**: 729-43
- 11) Chakravarti, S. et al. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 1998; **141**: 1277-86
- 12) Svensson, L. et al. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem* 1999; **274**: 9636-47
- 13) Kyriakides, T. R. et al. Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol* 1998; **140**: 419-30

TNF レセプター p55 ノックアウトマウスを用いた ブレオマイシン誘導皮膚硬化機序の解析

班 員：片山一朗（長崎大学 皮膚科）
研究協力者：濱崎洋一郎、室田浩之、小川文秀（長崎大学 皮膚科）、
松山俊文（長崎大学大学院医学研究科新興感染症病態制御学系）

Regulatory Mechanisms of Cutaneous Sclerosis in TNF Receptor p55 knockout Mouse

Ichiro KATAYAMA, Yoichiro HAMASAKI, Hiroyuki MUROTA, Fumihide OGAWA
Department of Dermatology, Nagasaki University School of Medicine

Toshifumi MATSUYAMA

Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University School of
Medicine

Summary

Tumore necrosis factor- α (TNF- α) is an important cytokine in early stage of systemic sclerosis (SSc), which is characterized by mononuclear cell infiltration and microvascular alteration. Most effects of TNF- α are mediated by its interaction with 2 types of TNF receptors, the type I (p55)TNF receptor TNFRp55, and the type II (p75)TNF receptor TNFRp75. In the present study, we used TNFRp55 knockout mice to investigate the potential receptor-mediated roles for TNF- α in tissue fibrosis and sclerosis using animal model of scleroderma induced by bleomycin. In TNFRp55 knockout mice, the sclerotic changes of the dermis were found after bleomycin application for 3days, while in the wild type mice, those changes were absent in the dermis. RT-PCR and western blotting analysis showed that MMP1 and MMP2 expressions were decreased in the sclerotic skin of the TNFRp55 knockout mice induced by bleomycin. RT-PCR analysis revealed that mRNA expressions of several fibrogenic cytokines such as TGF- β , PDGF, IL-4 were much more strongly induced in mice skin derived from both TNFRp55 knockout and wild type. However, the cytokine expression patterns in TNFRp55 knockout mice were same as those in wild type mice.

はじめに

強皮症患者においては、皮膚をはじめとする種々の組織で膠原線維の肥厚と増生が見られ、生化学的にコラーゲンの蓄積が見られる。これら病変の形成において、サイトカインによるコラーゲン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンの代謝調節が、重要な役目を果たしていると考えられている。サイトカインによる細胞外マトリックス代謝の調節については徐々に明らかになってきており、一般に TGF- β 、PDGF、CTGF、IL-1、IL-6などのサイトカインは線維芽細胞のコラーゲン合成に主に促進的に働き、それに対して、TNF- α はコラーゲン合成、プロテオグリカン合成に抑制的に働くとともにコラゲナーゼ産生を増加させることが報告されている¹⁾。強皮症の病態とTNF- α の関連についても、強皮症患者血清中のTNF- α 値の上昇⁴⁾や肺線維症合併との相関³⁾、分離した強皮症患者の末梢血単核球からのTNF- α 産生増加⁴⁾が示され、また、強皮症患者からの培養線維芽細胞ではTNF- α 刺激によるコラーゲン産生およびそのmRNAレベルでの抑制、そしてコラゲナーゼ活性の上昇とそのmRNAレベルの増加が認められている⁵⁾。さらに最近、強皮症におけるTNF- α 遺伝子のpolymorphismが報告されている⁶⁾。一方、強皮症とTNFレセプターについても解析がなされている。TNFレセプターにはTNFレセプター・とTNFレセプター・の2つのphenotypeがあり、それぞれ分子量が55kd、75kdであることから一般にTNFRp55、TNFRp75と呼ばれている。これらの相同性については、細胞外領域はシステインリッチな構造をとり類似しているが、細胞内領域は相同性がなく、それぞれ独立したシグナル伝達に関与すると考えられている。また、これらの細胞内領域の大きな相違は、TNFRp55にあるDeath domainがTNFRp75にないことである。これらのレセプターを介する細胞内シグナリングについては徐々に解明されており、3量対を形成するTNFRp55にリガンドが結合した後、RIP(receptor interacting protein)やTNF receptor associated factor 2などの分子を介してNF κ -B活性化やJNKの活性化によりさまざまな遺伝子の発現調節が起こると考えられている。強皮症患者では血清中の可溶性TNFRp55の増加があり、疾患の重症度や肺病変と相関するとされ⁷⁾⁸⁾、またTNFRp55は強皮症の早期皮膚病変では浸潤しているmononuclear cellの約30%に発現し、TNFRp75は早期の強皮症皮膚病変部ではほとんどのリンパ球と30~50%の内皮細胞に出現するとされている⁹⁾。しかし、TNFRp55からの細胞内シグナリングによる強皮症の線維化・硬化病変形成への役割については明らかで

はない。そこで我々はTNFRp55ノックアウトマウスにおける、ブレオマイシン誘導皮膚硬化を解析しTNFRp55を介した線維化・硬化の調節機序について検討した。

材料と方法

1. TNFRp55 ノックアウトマウス

このマウスはTNFRp55の細胞外ドメインの178アミノ酸から膜貫通領域、細胞内領域がネオマイシン耐性遺伝子に置き換えられており、そのため細胞膜上にTNFRp55の発現はない。しかし、TNFRp75の発現およびそれからの細胞内へのシグナリングは正常である。また、外観上健康であり、胸腺やリンパ球のpopulationに異常はない。

2. ブレオマイシン誘導性皮膚硬化の作成

TNFRp55ノックアウトマウス、およびコントロールとしてこのノックアウトマウスのwild typeであるC57B6マウスの背側部皮膚に、ブレオマイシン1mg/ml溶液を0.1ml、連日皮内注射した。投与後12時間、24時間、3日後、5日後、7日後、14日後に皮内注射部位の皮膚を採取し、病理組織学的検討を行うとともに、蛋白およびtotal RNAを抽出した。病理組織学的検討では真皮の厚さを測定し定量化した。統計的な解析はMann-WhitneyのU検定を用いた。

3. Western blotting

MMP-1、MMP-2の検出についてはWestern blottingを行った。抗MMP-1抗体はシグマ社から、抗MMP-2抗体は富士薬品から購入した。皮膚組織から溶解液(0.1M NaCl, 0.01M Tris-HCl (pH7.6), 0.001M EDTA(pH8.0), complete mini EDTA (Roche))にて可溶化した蛋白抽出液を、7.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDF膜に転写し、一次抗体および二次抗体と反応後、chemiluminescent法で検出した。

4. RT-PCR

マウスに作成した硬化性皮膚病変部の皮膚よりRNAを抽出、cDNAを合成し、それを鋳型としてprocollagen α 1(I)、MMP-2、MMP-9、TNF- α 、LT- α 、TGF- β 1、PDGF、IL-1および β -actin 特異的プライマーを用いて、PCR法でDNAを増幅した。

結果と考察

1. 皮膚の病理組織学的検討

TNFRp55 ノックアウトマウスの皮膚は組織学的に wild type の C57B6 とほとんど相違がなく、マウスの背部皮膚に生理食塩水 0.1ml を 7 日間連続皮内注射しても、真皮膠原線維の線維化など病理組織学的な皮膚の変化はなかった (図1)。TNFRp55 ノックアウトマウスと wild type マウスの背部皮膚に、Bleomycin 0.1mg/日 を 3 日間連続で皮内注射したところ、TNFRp55 ノックアウトマウスでは wild type マウスと比較して、表皮の肥厚と真皮膠原線維の肥厚と増生が認められた。また、wild type では主にリンパ球の細胞浸潤が見られたが、TNFRp55 ノックアウトマウスにおいて、細胞浸潤はわずかであった



図1 生理食塩水 7 日間投与後の TNFRp55 ノックアウトマウス皮膚組織

TNFRp55 ノックアウトマウスの背部皮膚に生理食塩水 0.1ml を 7 日間連続皮内注射しても、wild type マウスと比較して病理組織学的な皮膚の変化は見られない。

(図2)。Bleomycin 投与 5 日後には TNFRp55 ノックアウトマウスで真皮膠原線維の増生、肥厚がさらに高度となったのに対して、wild type マウスでは真皮膠原線維の変化はなく、炎症細胞浸潤が見られた (図3、4)。Bleomycin 投与 7 日後では TNFRp55 ノックアウトマウスの真皮膠原線維の肥厚増生は 5 日後と同程度であった。一方、wild type マウスにおいてはわずかに真皮膠原線維の増生が認められた (図3)。さらに Bleomycin 投与 14 日後は、TNFRp55 ノックアウトマウスで真皮膠原線維の肥厚、増生の進行が止まり、わずかに真皮が萎縮性であった、wild type マウスには軽度の真皮膠原線維の肥厚、増生が見られた (図5)。以上のことより TNFRp55 ノックアウトマウスでは、Bleomycin 皮内投与による皮膚硬化性病変は 3 日目には形成されており、5 日目には完成した。この硬化性病変の形成は、wild type マウスに比較して明らかに早期にであり、また炎症細胞浸潤が少ない傾向を示した。各病理組織標本で真皮の厚さをランダムに測定し定量化した (図6)。TNFRp55 ノックアウトマウスでは 3 日目、5 日目、7 日々と真皮の厚さは増加しており 14 日目に多少減少する傾向を示した。また、wild type マウスと比較して有意な増加が認められた。

Histopathologic change 3days

wild type



TNF R p55 -/-

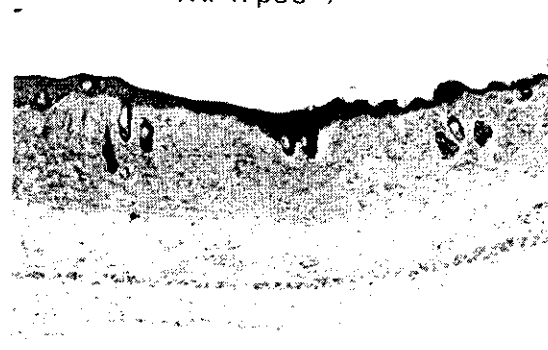


図2 Bleomycin 3 日間連続投与後の皮膚病理組織像

Bleomycin 0.1mg/日 を 3 日間連続皮内注射後、TNFRp55 ノックアウトマウスでは wild type マウスと比較して、表皮の肥厚と真皮膠原線維の肥厚と増生が認められた。

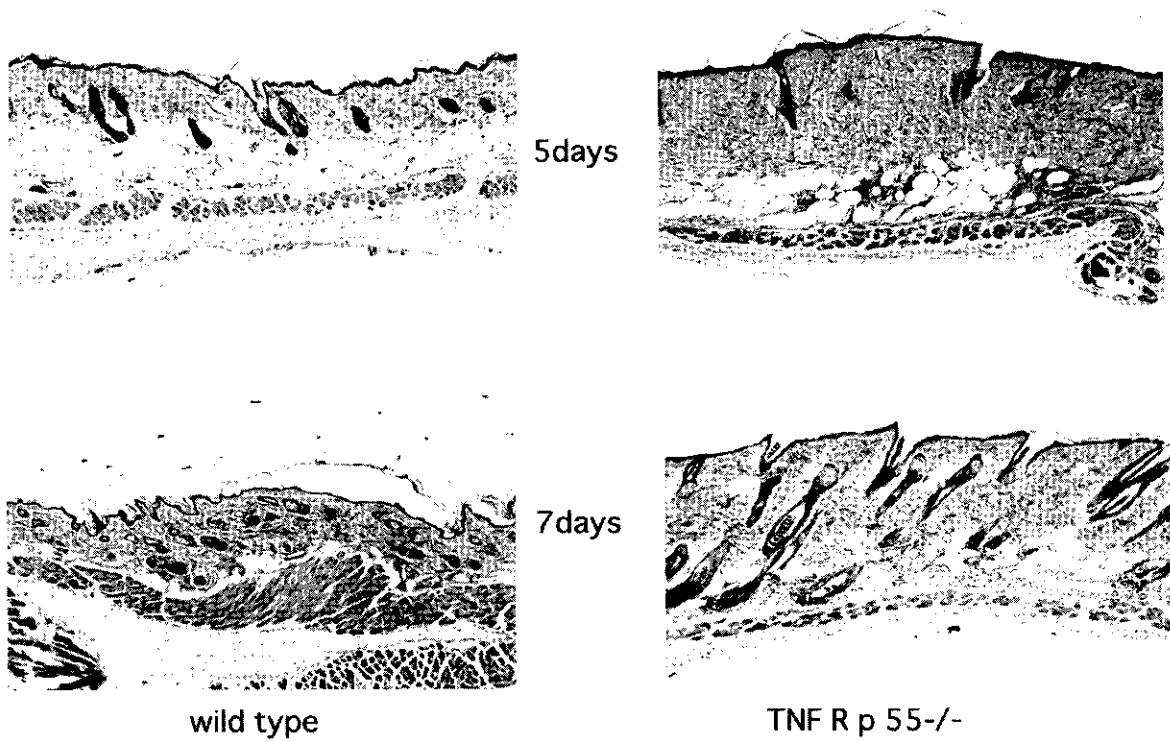


図3 Bleomycin5日、7日間連続投与後の皮膚病理組織像
 Bleomycin投与5日後、TNFRp55ノックアウトマウスで真皮膠原線維の増生、肥厚がさらに高度となった。Bleomycin投与7日後、TNFRp55ノックアウトマウスの真皮膠原線維の肥厚増生は5日後と同程度であった。

Histopathologic change 5days

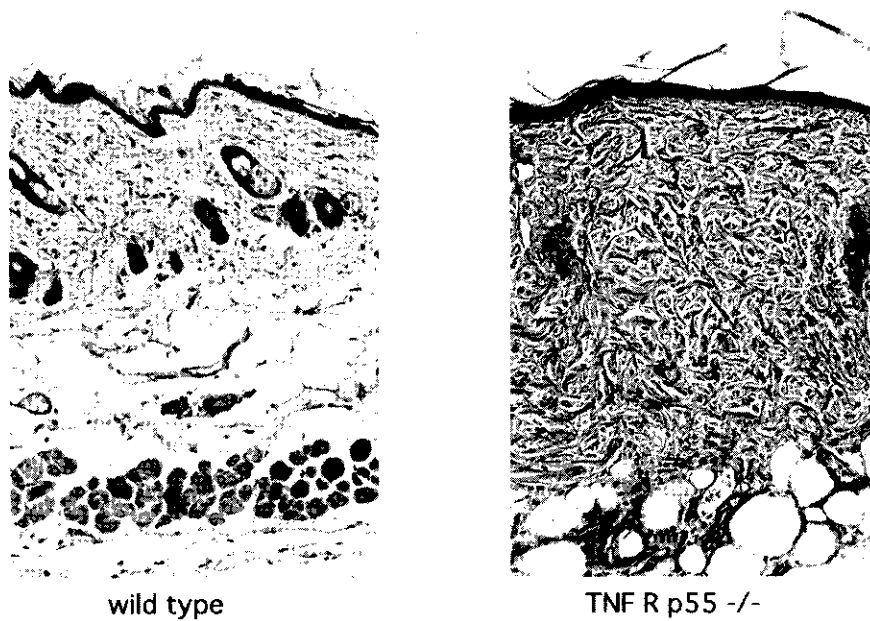


図4 Bleomycin5日連続投与後の皮膚病理組織像（強拡）

Histopathologic change 14days



wild type



TNF R p55 -/-

図5 Bleomycin14日間連続投与後の皮膚病理組織像

Bleomycin投与14日後、TNFRp55ノックアウトマウスで真皮膠原線維の肥厚、増生の進行が止まり、わずかに真皮が萎縮性であった、wild typeマウスには軽度の真皮膠原線維の肥厚、増生が見られた

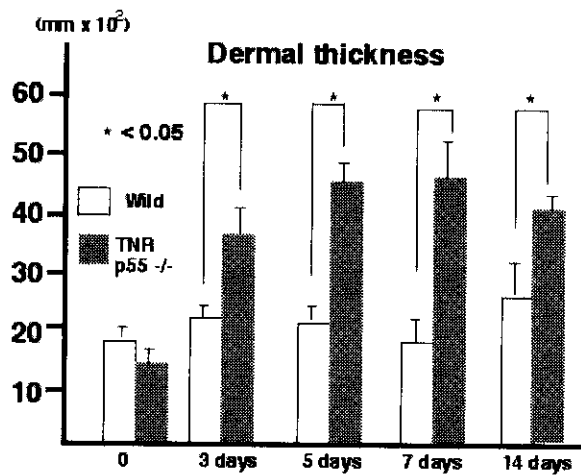


図6 真皮厚の測定

TNFRp55ノックアウトマウスでは3日目、5日目、7日々と真皮の厚さは増加した。また、wild typeマウスと比較して有意な増加が認められた。

2. マウス皮膚の procollagen、MMP の解析

病理組織学的に TNFRp55 ノックアウトマウスは、wild type マウスに比較し皮膚線維化、硬化性病変を、早期に生じる。この皮膚線維化、硬化性病変の形成における、膠原線維の合成と分解の関与を調べるため、Bleomycin連日皮内注射3日目、5日目、7日目の皮膚組織より抽出した Total RNA を用いて procollagen $\alpha 1$ (I)、MMP-2、MMP-9の RT-PCR を行った。procollagen $\alpha 1$ (I) の皮膚組織での発現は、TNFRp55 ノックアウトマウスと wild type マウスの間にほとんど相違が認められなかった。また MMP の発現誘導については、MMP-9の発現は TNFRp55 ノックアウトマウスと wild type マウスの間で差が見られなかったが、MMP-2の発現は wild type マウスで3日目に減少し、5日目から発現の誘導が見られるのに対して TNFRp55 ノックアウトマウスでは0、3、5日と発現が低下する傾向を示した (図7)。

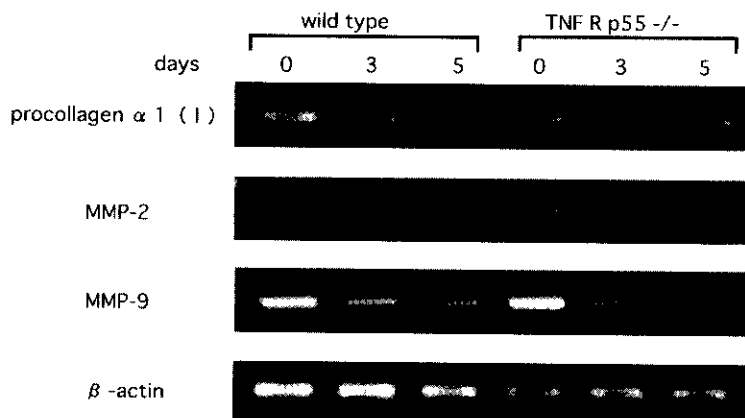


図7 procollagen $\alpha 1$ (I)、MMP-2、MMP-9mRNA 発現(Bleomycin連続投与0、3、5日目、RT-PCR) MMP-2の発現はwild typeマウスで3日目に減少し、5日目から発現の誘導が見られるのに対して TNFRp55 ノックアウトマウスでは0、3、5日と発現が低下する傾向を示した。

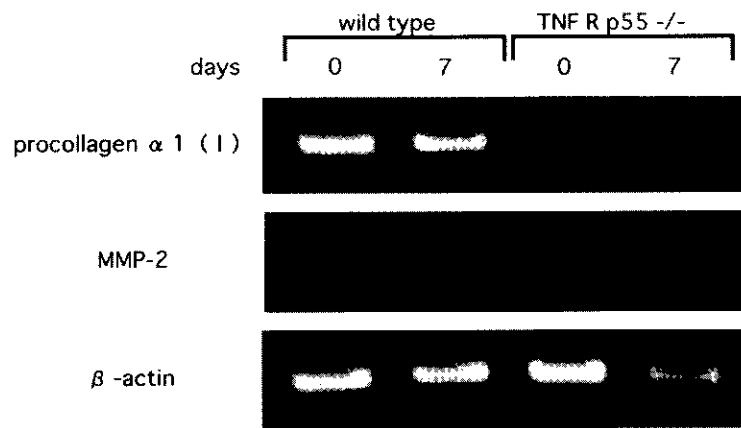


図8 procollagen $\alpha 1(I)$ 、MMP-2mRNA 発現 (Bleomycin 連続投与7日目、RT-PCR) TNFRp55 ノックアウトマウスで、MMP-2mRNA 発現消失が見られた。

Bleomycin 投与7日目についても mRNA レベルで procollagen $\alpha 1(I)$ 、MMP-2 の発現を検討したところ、やはり TNFRp55 ノックアウトマウスで、MMP-2mRNA 発現消失が見られた(図8)。以上のことより、TNFRp55 ノックアウトマウスにおける Bleomycin 誘導性皮膚線維化、硬化病変形成には MMP 発現の低下が関連していると考えた。そこで、さらに蛋白レベルで検討するため、マウス皮膚からの whole cell lysate を用いて抗 MMP-1 抗体、抗 MMP-2 抗体による Western blotting 法を行った。MMP-1 蛋白は wild type マウスで Bleomycin 連日投与3日後、5日後と徐々に増加を示した。しかし TNFRp55 ノックアウトマウスでは、MMP-1 蛋白の増加が見られなかった。MMP-2 蛋白の発現については、前述の RT-PCR での mRNA の変動とほぼ相関しており、wild type マウスでは3日目に減少し、5日目から増加が見られるのに対して、TNFRp55 ノックアウトマウスにおいて蛋白の増加はなかった(図9)。病理組織学的に3日目までに線維化の形成が生じていることより、Bleomycin 投与12時間後、24時間後の皮膚についても mRNA レベルで procollagen $\alpha 1(I)$ 、MMP-2、MMP-9 の発現を解析した。procollagen $\alpha 1(I)$ の発現は wild type マウスで変化がなかった、一方、TNFRp55 ノックアウトマウスでは12時間後軽度増加している傾向を示した。また MMP-2 の発現は、wild type マウスと比較して、TNFRp55 ノックアウトマウスにおいて、24時間後に増加を認めた(図10)。MMP-9 については wild type とノックアウトマウスの間に、発現誘導の差がないように思われた。以上のことより、wild type より早期に生じる TNFRp55 ノックアウトマウスの Bleomycin 誘導性皮膚線維化、硬

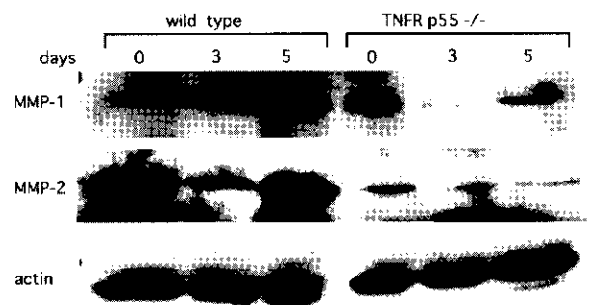


図9 MMP-1、MMP-2蛋白発現 (Western blotting) MMP-1蛋白はTNFRp55ノックアウトマウスで増加が見られなかった。MMP-2蛋白の発現もノックアウトマウスにおいては増加を認めなかった。

化病変形成に、細胞外マトリックスの分解系である MMP の、Bleomycin 投与24時間以後に生じる産生低下が、関与していることが示唆された。

3. マウス皮膚におけるサイトカイン発現の検討

Bleomycin 投与後の皮膚線維化、硬化性病変形成におけるサイトカインの関連を検討するため、Bleomycin 投与後12時間、24時間、72時間、5日目の皮膚について TNF- α 、LT- α 、TGF- $\beta 1$ 、PDGF、IL-4 の mRNA 発現を調べた(図11)。まず、TNFRp55 のリガンドである TNF- α 、LT- α についてであるが、TNF- α は wild type とノックアウトマウスの間で、その発現に差が見られなかった。しかし LT- α は、TNFRp55 ノックアウトマウスにおいて、5日目の発現が検出されなかった。TGF- $\beta 1$ については Bleomycin

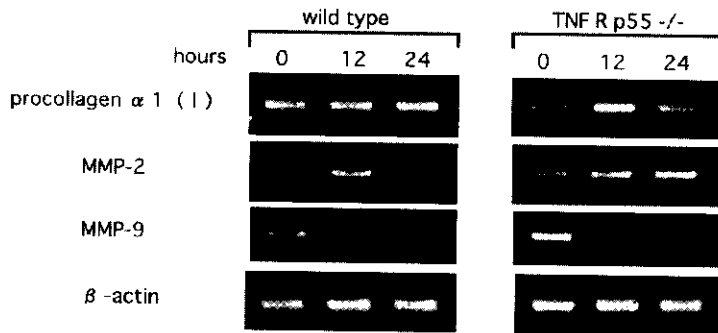


図10 procollagen $\alpha 1(I)$ 、MMP-2、MMP-9 mRNA 発現 (Bleomycin 投与 12 時間、24 時間後、RT-PCR)
TNFRp55 ノックアウトマウスでは 12 時間後軽度増加している傾向を示した。また MMP-2 の発現は、wild type マウスと比較して、TNFRp55 ノックアウトマウスにおいて、24 時間後に増加を認めた。

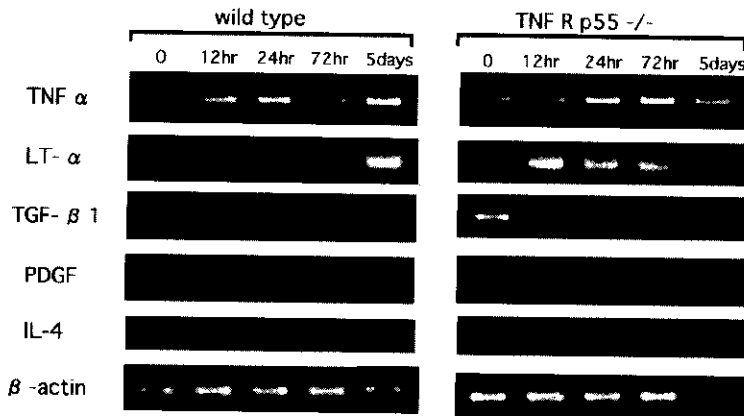


図 11 Bleomycin 投与後の TNF- α 、LT- α 、TGF- $\beta 1$ 、PDGF、IL-4 mRNA 発現 (RT-PCR)
TGF- $\beta 1$ 、PDGF、IL-4 の発現パターンは TNFRp55 ノックアウトマウスと wild type マウスで差はなかった。TNFRp55 ノックアウトマウスで、LT- α の 5 日目の発現が検出されなかった。

投与後、徐々にその発現が減少しており、wild type とノックアウトマウスの間で、ほぼ同様の発現のパターンを示していると考えた。PDGFについても、その発現に差が見られなかった。IL-4 は、wild type とノックアウトマウスの両方で 12 時間後に誘導され、24 時間後にその発現は減少を示した。そして、wild type で 5 日目からノックアウトマウスで 3 日目から発現の誘導が再び見られた。以上の結果から、一般に線維芽細胞に作用し線維化を促進させるサイトカインと考えられている TGF- $\beta 1$ 、PDGF、IL-4 の作用については、TNFRp55 ノックアウトマウスの Bleomycin 誘導性皮膚線維化、硬化性病変形成において、主な役割を果たしていないであろうことが示唆された。また、TNFRp55 ノックアウトマウスで、LT- α の 5 日目の発現が検出されなかった事は、病理組織学的に Bleomycin 投与後 5 日目の皮膚で、ノックアウトマウスにおいて、リンパ球などの炎症性浸潤細胞がわずかであった事と関連していることが考えられた。

結 論

1) TNFRp55 ノックアウトマウスでは、Bleomycin 皮内投与による皮膚硬化性病変は 3 日目には形成されており、5 日目に完成した。この硬化性病変の形成

は、wild type マウスに比較して早期であり、また炎症細胞浸潤が少ない傾向を示した。

2) この wild type より早期に生じる、TNFRp55 ノックアウトマウスの Bleomycin 誘導性皮膚線維化、硬化性病変形成に細胞外マトリックスの分解系である MMP の産生低下が関与していることが示唆された。

3) 線維芽細胞に作用し線維化を促進させるサイトカインと考えられている TGF- $\beta 1$ 、PDGF、IL-4 の作用については、TNFRp55 ノックアウトマウスの Bleomycin 誘導性皮膚線維化、硬化性病変形成において、主な役割を果たしていないであろうことが示唆された。

以上より TNF receptor の発現を調節する薬剤が皮膚の線維化、硬化性病変の治療薬となりうる可能性が示唆された。

文 献

- 1) LeRoy EC, Smith EA, et al.: A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Reum* 1989; **32**: 817-825
- 2) Rose NR, Leskovsek N: Sclero-derma: Immunopathogenesis and treatment. *Immunol Today* 1998; **19**: 499-501

- 3) Hasegawa M, Fujimoto M, et al.: Elevated serum tumor necrosis factor- α levels in patient with systemic sclerosis: Association with pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 1997; **24**: 663-665
- 4) Kantor TV, Friberg D, et al.: Cytokine production and serum levels in systemic sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; **65**: 278-285
- 5) Takeda K, Hatamoti A, et al.: Effect of tumor necrosis factor- α on connective tissue metabolism in normal and scleroderma fibroblast cultures. *Arch Dermatol Res* 1993; **284**: 440-444
- 6) Pandey JP, Takeuchi F: TNF- α and TNF- α Gene polymorphism in systemic sclerosis. *Human Immunol* 1999; **60**: 1128-1130
- 7) Majewski S, Wojas-Pelc A, et al.: Serum level of soluble TNF α receptor type I and the severity of systemic sclerosis. *Acta Derm Venereol* 1999; **79**: 207-210
- 8) Gruschwitz MS, Albrecht M, et al.: In situ expression and serum levels of tumor necrosis factor- α receptors in patients with early stages of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997; **24**: 1936-1943

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルを用いた、トレチノイントコフェリルの治療効果の検討

班 員：西岡 清（東医歯大、環境皮膚免疫学）
共同研究者：山本俊幸（東医歯大、環境皮膚免疫学）

Effect of Toretinoin Tocoferil on the Dermal Sclerosis in the Mouse Model of Bleomycin-Induced Scleroderma

Kiyoshi Nishioka and Toshiyuki Yamamoto

(Department of Dermatology, Tokyo Medical and Dental University)

Summary

We have established a mice model for scleroderma by local administration of bleomycin. The purpose of this study is to explore possible *in vivo* effects of toretinoin tocoferil on the dermal sclerosis in bleomycin-induced scleroderma. Results of histological analysis showed that dermal sclerosis induced by bleomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was reduced by subcutaneous injections of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ toretinoin tocoferil after 4 weeks, whereas dermal sclerosis was not inhibited by topical application of toretinoin tocoferil ointment in C3H mice. Dermal sclerosis was strongly induced by 1 mg/ml bleomycin treatment in B.10A mice, which was also suppressed by 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ toretinoin tocoferil injections. Our results suggest that toretinoin tocoferil has an *in vivo* anti-sclerotic effect on bleomycin-induced scleroderma.

はじめに

トレチノイントコフェリルは、レチノイン酸と α -トコフェロールとのエステル結合体であり、創傷治癒を促進させる薬理効果を有することが動物実験で示されている¹⁾。さらにヒトにおいても、トレチノイントコフェリルの長期外用によって肥厚性瘢痕や強皮症が改善されることが最近報告されている²⁾。

ブレオマイシンは頻用される抗癌剤であるが、その副作用としてヒトにしばしば肺線維症を引き起こすことはよく知られている。これを利用して、マウスやラットに実験的にブレオマイシン誘導性の肺線維症を引き起こす動物モデルは既に確立され、広く用いられている。また一方、ブレオマイシン使用中の担痛患者に実際に強皮症様病変が引き起こされた報告もわずかながらみられる³⁾。われわれはこれまでに、ブレオマイシンをマウスの皮下に頻回に局所投与することで、ヒトの強皮症と組織学的ならびに生化学的に類似する皮膚硬化を誘導することを報告してきた⁴⁾。

そこで今回、ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルマウスにおいてトレチノイントコフェリルの効果を検討する目的で、C3Hマウスに、100 μ g/mlのブレオマイシンを隔日で皮下注射するのと同時に、0.3-30 μ g/mlのトレチノイントコフェリル溶液を皮下注射し、また別の系では0.25%-2%のトレチノイントコフェリル軟膏を注射部位に塗布し、いずれも組織学的に検討した。ブレオマイシンに感受性が高いB10.Aマウスにおいても、1mg/mlのブレオマイシンと同時に30 μ g/mlのトレチノイントコフェリル溶液を隔日で皮下注射し、4週後に組織学的に検討した。

材料と方法

I. トレチノイントコフェリル皮下投与

ブレオマイシン（日本化薬）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で100 μ g/mlに調整し、C3Hマウスの背部に100 μ lずつ4週間隔日で皮下投与して皮膚硬化を誘導した。同時に、0.3 μ g/ml、3 μ g/ml、30 μ g/mlのトレチノイントコフェリル（日清キョーリン製薬より供与）溶液および0.1%アセトン溶液（対照物質）をブレオマイシン投与部位に局注した。各群n=4とした。

II. トレチノイントコフェリル外用

ブレオマイシン（日本化薬）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で100 μ g/mlに調整し、C3Hマウスの背部に100 μ lずつ4週間隔日で皮下投与して皮膚硬化を誘導した。同時に、0.25%、1%、2%濃度のトレチノイントコフェリル軟膏および軟膏基剤（対照物質）をブレオマイシン投与部位に外用した。各群n=4とした。

III. B. 10Aマウスを用いた検討

ブレオマイシン（日本化薬）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で1mg/mlに調整し、B10.Aマウスの背部に100 μ lずつ4週間隔日で皮下投与して皮膚硬化を誘導した。同時に、30 μ g/mlのトレチノイントコフェリル溶液および0.1%アセトン溶液（対照物質）をブレオマイシン投与部位に局注した。各群n=5とした。

結果

I. トレチノイントコフェリル皮下投与および外用の効果

1) 皮下投与

C3Hマウスに対し、0.3-30 μ g/mlのトレチノイントコフェリル溶液およびコントロールとして0.1%アセトン溶液をブレオマイシンとともに隔日で皮下注射した。4週間後には、コントロール群では4例中3例に、図1に示すように真皮内の膠原線維の膨化、好酸性無構造物質の真皮内への沈着を認め、硬化の所見を呈したが、残りの1例では硬化ははっきりとは誘導されなかった。これに対し、0.3 μ g/ml、3 μ g/mlの濃度のトレチノイントコフェリル溶液の局注では、それぞれ4例中3例、5例中4例に依然膠原線維の膨化、肥厚の所見を認めた（図1）。30 μ g/mlの濃度のトレチノイントコフェリル溶液の局注では5例中3例で硬化は残存するものの、好酸性無構造物質の沈着はかなり抑制されてみられ、残りの2例では図1に示すように膠原線維の膨化は減少し皮膚の硬化は抑制された。

2) 塗布投与

C3Hマウスに対し、隔日でブレオマイシンを皮下注射するのと同時に、0.25%、1%、2%のトレチノイントコフェリル軟膏およびコントロールの軟膏基剤を塗布した。コントロール群では4例中2例ではっきりとした硬化が誘導されたが残りの2例では誘導されなかった。0.25%トレチノイントコフェリル軟膏外用後では4例中4例とも、ブレオマイシン

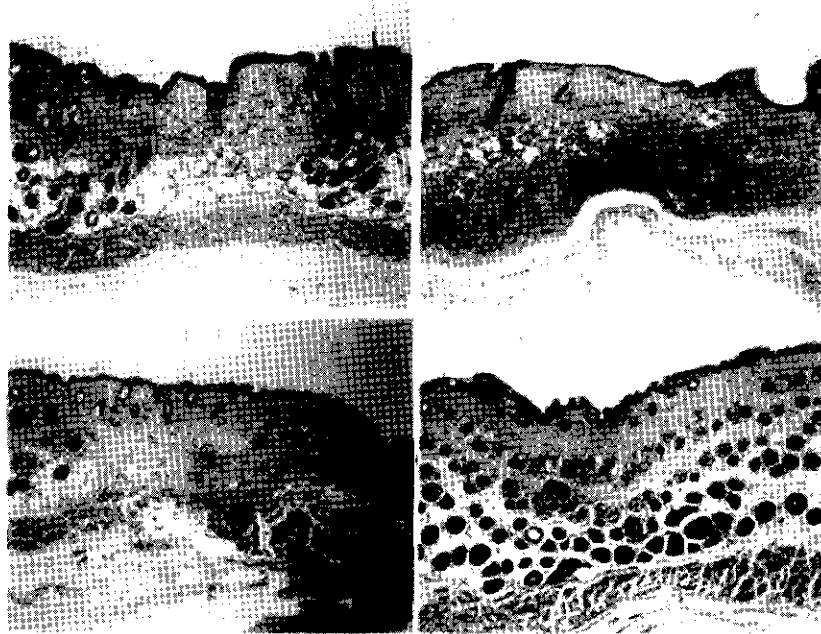


図 1:トレチノイントコフェリル皮下投与後の病理組織H&E染色像。ブレオマイシン (100 μ g/ml)をC3Hマウスの背部に隔日で局注するのと同時に、0.3 μ g/ml, 3 μ g/ml, 30 μ g/mlの濃度のトレチノイントコフェリル溶液およびコントロールの0.1%アセトン溶液を皮下投与し、4週後に組織学的に検討した。

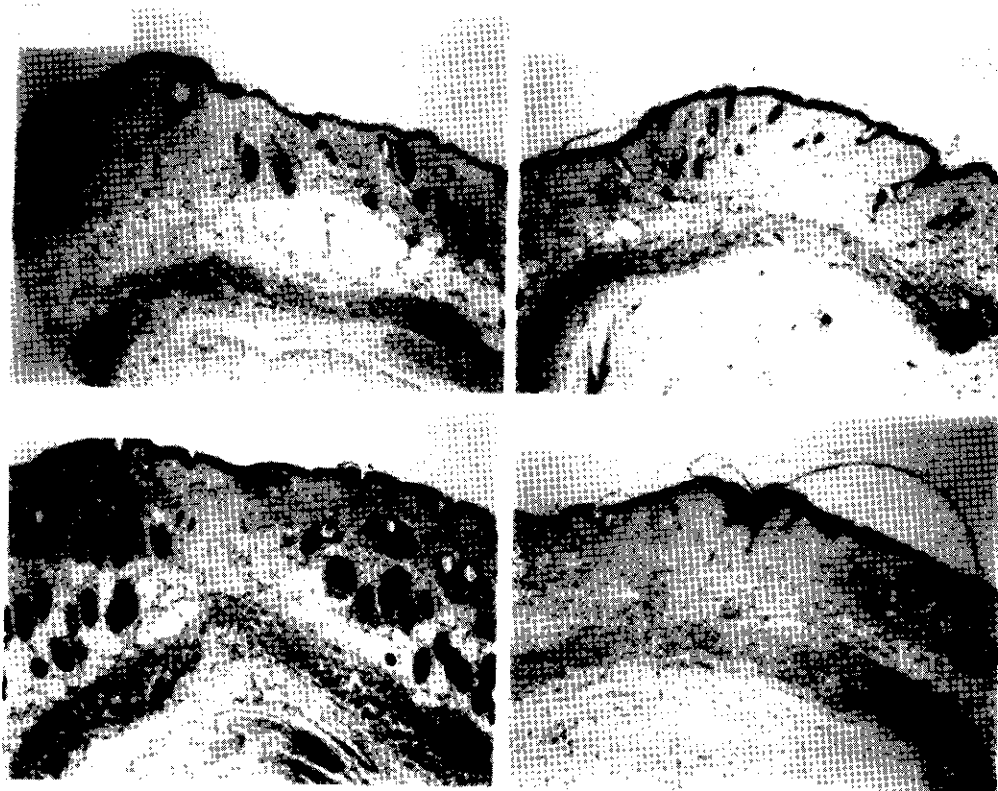


図 2:トレチノイントコフェリル外用後の病理組織H&E染色像。ブレオマイシン (100 μ g/ml)をC3Hマウスの背部に隔日で局注するのと同時に、0.25%, 1%, 2%の濃度のトレチノイントコフェリル軟膏およびコントロールの基剤をブレオマイシン注射部位に外用し、4週後に組織学的に検討した。



図 3: トレチノイントコフェリル皮下投与後の病理組織 H&E 染色像。プレオマイシン(1mg/ml)を B10. A マウスの背部に隔日で局注すると同時に、30 μ g/ml のトレチノイントコフェリル溶液およびコントロールの 0.1% アセトン溶液を皮下投与し、4 週後に組織学的に検討した。

により誘導された皮膚硬化を抑制しえず、組織学的に膠原線維の膨化、肥厚の残存を認めた。また 1% トレチノイントコフェリル軟膏の外用後では 4 例中 2 例にはっきりとした硬化の像が残存し、残りの 2 例は軽い硬化が認められた。2% トレチノイントコフェリル軟膏の外用後も 4 例中 2 例で、組織学的に膠原線維の膨化、肥厚がはっきりと認められ、2 例で軽い硬化が残存してみられた (図 2)。

II. B10. A マウスにおけるトレチノイントコフェリル皮下投与の効果

予備実験で B10. A マウスは、C 3 H マウスに比べてより一層プレオマイシンによる皮膚硬化が強く誘導されやすいことが確認されている。そこで次の実験系においてはプレオマイシンの濃度を 1mg/ml に上げ、さらにマウスの系統を替えて B10. A マウスを用いて同様の実験を行った。プレオマイシンと同時に 30 μ g/ml のトレチノイントコフェリル溶液および

コントロールの 0.1% アセトン溶液を隔日で皮下投与した。それぞれの群で n=5 ずつ実験を開始したところ、途中で、コントロール群の 1 匹が死亡したが、残りの全例においては 4 週後には図 3 に示すように、真皮膠原線維の膨化、肥厚および好酸性無構造物質の真皮内への沈着による均質化の像を認めたのに対し、トレチノイントコフェリル投与群では、5 例中 2 例で硬化は残存するものの 5 例中 3 例では硬化の程度が軽減し、うち 2 例ではほぼ抑制されてみられた。この 2 例では組織学的に膠原線維の膨化、肥厚は軽減し、さらに膠原線維間にみられる好酸性無構造物質の沈着も改善してみられた (図 3)。

考 察

本検討において、トレチノイントコフェリル溶液 (30 μ g/ml) は C 3 H マウスにおいて、プレオマイシンと同時に局注することによりプレオマイシン誘導性の皮膚硬化を抑制する傾向が組織学的に認められた。これに対して 0.3-3 μ g/ml の濃度のトレチノイントコフェリル溶液をプレオマイシンと同時に局注した群では硬化は依然残存してみられた。しかしながら、トレチノイントコフェリル軟膏の外用では、2% の濃度においても 4 例中 2 例で硬化ははっきりと残存してみられた。

最近われわれの教室での種々の strain のマウスを用いた検討の結果、B10. A 系列がよりプレオマイシンに対する感受性が高いことがわかった⁹⁾。そこで、次の実験系においてはマウスの strain を替え、さらにプレオマイシンの濃度を 1mg/ml に上げ、B10. A マウスにおいても同様の実験を行った結果、トレチノイントコフェリル溶液 (30 μ g/ml) をプレオマイシンとともに局注した群では、コントロールの 0.1% アセトン溶液局注に比べて皮膚硬化の程度がより抑制されることが、組織学的に認められた。

以上より、トレチノイントコフェリルは 30 μ g/ml の濃度によりプレオマイシン誘導性の皮膚硬化を抑制しうることが *in vivo* において確認されたものの、全例において硬化が完全に抑制されたわけではなく、B10. A 系列では 5 例中 2 例で依然として組織学的な硬化が残存していた。一つの理由としてプレオマイシンの濃度が 1mg/ml と高濃度であったために硬化の抑制が困難であった可能性が挙げられよう。今後は、実際の治療効果判定により近い条件とするために、プレオマイシンによってまず皮膚硬化を誘導した後にトレチノイントコフェリルを投与し

て硬化が抑制されるかを検討するとともに、*in vitro*の実験系において本薬剤が線維芽細胞からのコラーゲン産生を抑制するかを遺伝子、蛋白レベルで解析することが必要と思われる。

文 献

- 1) 佐京かつふみ、石川智一、西木克侑、大塚紀子、伊東 晃、森 陽：Tocoretinateの肉芽形成促進作用および血管新生促進作用．*応用薬理* 1992； 43： 87-95
- 2) Mizutani H, Yoshida T, Nouchi N, Hamanaka H, Shimizu M: Topical tocoretinate improved hypertrophic scar, skin sclerosis in systemic sclerosis and morphea. *J Dermatol* 1999; **26**: 11-17
- 3) Finch WR, Rodnan GP, Buckingham Prince RK, Winkelstein A: Bleomycin-induced scleroderma. *J Rheumatol* 1980; **7**: 651-659
- 4) Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K: Animal model of sclerotic skin I: Local injections of bleomycin induce dermal sclerosis mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; **112**: 456-462
- 5) Yamamoto T, Takahashi Y, Takagawa S, Katayama I, Nishioka K: Animal model of sclerotic skin. II: Bleomycin-induced scleroderma in genetically mast cell-deficient WBB6F1-W/W^v mice. *J Rheumatol* 1999; **26**: 2628-2634
- 6) Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K: Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000; **292**: 535-541

ヒト HGF 遺伝子導入リポソームを用いた マウス硬化皮膚の治療

班 員： 西岡 清（東医歯大、環境皮膚免疫学）
研究協力者： 呉 明花、横関博雄、山本俊幸、佐藤貴浩、
（東医歯大 環境皮膚免疫学）
金田安史（大阪大学、遺伝子治療学）

Prevention of bleomycin-induced dermal sclerosis by HGF- HVJ-liposome

Kiyoshi Nishioka, Wu Ming Hua, Hiroo Yokozeki, Toshiyuki Yamamoto, Takahiro Satoh
Department of Environmental Immunodermatology, Tokyo Medical and Dental University,
School of Graduate School
Yasufumi Kaneda
Department of Gene Therapy Science, Osaka University

Summary

We have recently established a mouse model for scleroderma induced by bleomycin (BLM). By using this animal model, we have found that human recombinant hepatocyte growth factor (HGF) protein suppressed formation of the dermal sclerosis induced by BLM. HGF is a humoral mediator of epithelial-mesenchymal interaction. Exogenous HGF proteins have prevented the progression of BLM-induced lung injury by inhibiting the induction of TGF- β . HGF may be a potent candidate to prevent or treat dermal sclerosis. In this study, by using BLM induced scleroderma model mouse, we examined the inhibitory effects of HVJ-liposome containing human HGF expressing vector (HGF-HVJ-liposome). Before development of dermal sclerosis by daily injection of bleomycin (100 μ g/ml) for 4 weeks, 5 to 10 μ g/ml HGF-HVJ-liposome was administered subcutaneously or into the skeletal muscle every 2 weeks. To examine whether HGF gene is transferred into muscle, lung, skin or kidney, RT-PCR and immunohistochemical analysis were conducted. HGF mRNA was expressed in not only muscle but also skin and lung but not in kidney. Immunohistochemical analysis revealed that HGF was detected extensively in muscle, skin and lung. Furthermore, histological examination revealed the reduction of dermal sclerosis by both the subcutaneous or intramuscular injection of HGF-HVJ-liposome. The injection of HGF-HVJ-liposome significantly induced reduction of not only the intensity of dermal sclerosis but also hydroxyproline content in the skin. Immunohistochemical analysis revealed that the injection of HGF-liposome significantly reduced the expression of TGF- β on macrophage infiltrated in the dermis of PPD-induced scleroderma. These results suggested that administration of HGF-HVJ-liposome is effective for the prevention of dermal sclerosis.

はじめに

ブレオマイシンは、マウスやラットに実験的に肺線維症をひきおこす薬剤として知られている¹⁻³⁾。すでに我々は、これまでの研究活動において、ブレオマイシンをマウスに繰り返し局所投与することにより皮膚の硬化を誘導することを見出だし、強皮症のモデルマウスとなりうる可能性を報告した⁴⁾。一方、肝細胞増殖因子(HGF)は肺線維症のモデルマウスに投与され、肺の線維化を抑制することが知られている。また昨年度の班会議でhuman HGFを皮膚硬化モデルマウスの筋肉内に投与することによりモデルマウスの皮膚硬化が抑制されることを報告した。本年度は強皮症のマウスモデルを使って、human HGF遺伝子挿入ベクターを組み込んだHVJ-liposomeによる皮膚硬化の誘導に対する抑制効果を検討した。

材料及び方法

ブレオマイシン(日本化薬:PBSで100 μ g/mlに調整, BML)をC3Hマウスに0.1mlずつ連日皮下注射し硬化を誘導すると同時に、human HGF DNA (2.2 Kb)をVector plasmidに挿入後、HVJ-liposomeに組み込み5 micro/mouse皮下に、10 micro/mouse筋肉内に2週間ごとに2回投与した⁵⁾。BLM最終投与の翌日、背部皮膚を切除し組織学的に検討した。一部の実験ではホルマリン固定した組織標本において、H&E染色以外にトルイジンブルー(pH 7.0)、ギムザ、コンゴレッド染色を各々施行し、硬化病変部における皮膚の厚さを計測した。また、径6mmのpunch biopsy皮膚中の皮膚ヒドロキシプロリン量をWoessner¹²⁾の方法を用いて測定した。さらに、human HGFがmRNA、蛋白レベルで発現しているかを明らかにするため皮膚、肺、筋肉、腎臓などの臓器の抽出液および血清よりRT-PCR法、ELISA法を用いて測定した。HGFの発現分布を検討するため、抗ヒトHGF抗体を用いて免疫組織学的に検討した。さらに、皮膚におけるTGF- β 1の発現レベルを測定するためELISA、RT-PCR法を用いてmRNA、蛋白レベルで定量した。

結果

1、HGFのmRNA、蛋白の発現

HGF遺伝子を組み込んだHVJ-liposomeの筋肉内投与によりHGFが皮膚、肺、筋肉、腎などの臓器にmRNA、蛋白レベルで発現しているか検討した。図1に示すようにHGF-liposome投後の皮膚、肺、筋肉内に

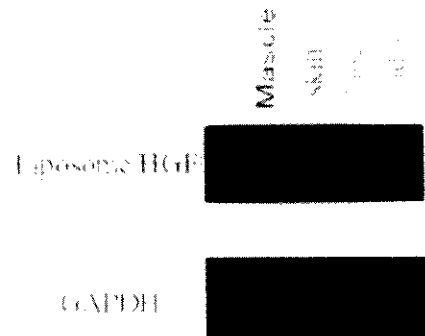


図1:各臓器におけるHGF mRNA発現

HGF-mRNAの発現が明らかにみられたが、腎からは発現が認められなかった。また、肺、皮膚、筋肉内には免疫組織化学的にもHGFが組織全体にびまん性に発現していることが確認された。さらにHGFの蛋白レベルでの発現をELISA法で検討した。その結果皮膚を含めた臓器の抽出液からは認められなかったが、HGF-liposomeの投与群の血清からのみ検出できた(図2)。

2、HGF-HVJ-liposomeの投与法の検討

HGF-HVJ-liposomeを筋肉内に投与したBMLによる皮膚硬化モデルの病理組織像を示す(図3A)。対照群のPBS処理したモデルマウスの皮膚(図3B)と比較し、明らかに皮膚硬化は抑制されていた。HGF-liposomeの筋肉内投与のみならず皮内投与でもBMLによる皮膚硬化は抑制されることが明らかになった(図4、5)。図4はBLM投与マウスにおける皮膚の厚さを比較検討したグラフであるが、HGF-liposomeの筋肉内投与群、皮下投与群ともにHGF-liposome非投与群と比較して明らかに皮膚の肥厚が抑制された。また、皮膚ヒドロキシプロリン量測定結果でも、4週間後の時点で、対照群のPBSを同期間局注したものと比較してHGF-liposome筋肉内投与群、皮内投与群ともに有意に皮膚ヒドロキシプロリン量が低下した(図5)。

3、TGF- β 1の発現の検討

すでに我々の教室では強皮症のモデルマウス誘導においてTGF- β 1が関与していることを報告した⁴⁾。

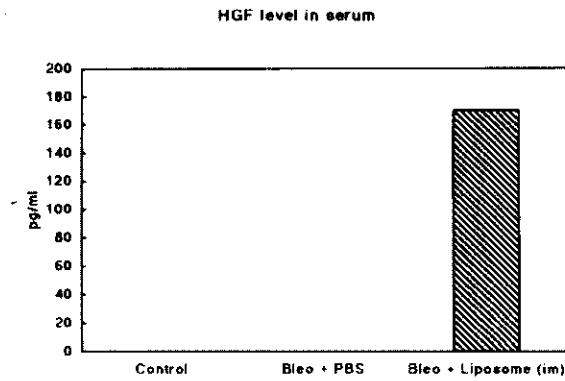


図2：血清中のHGF量

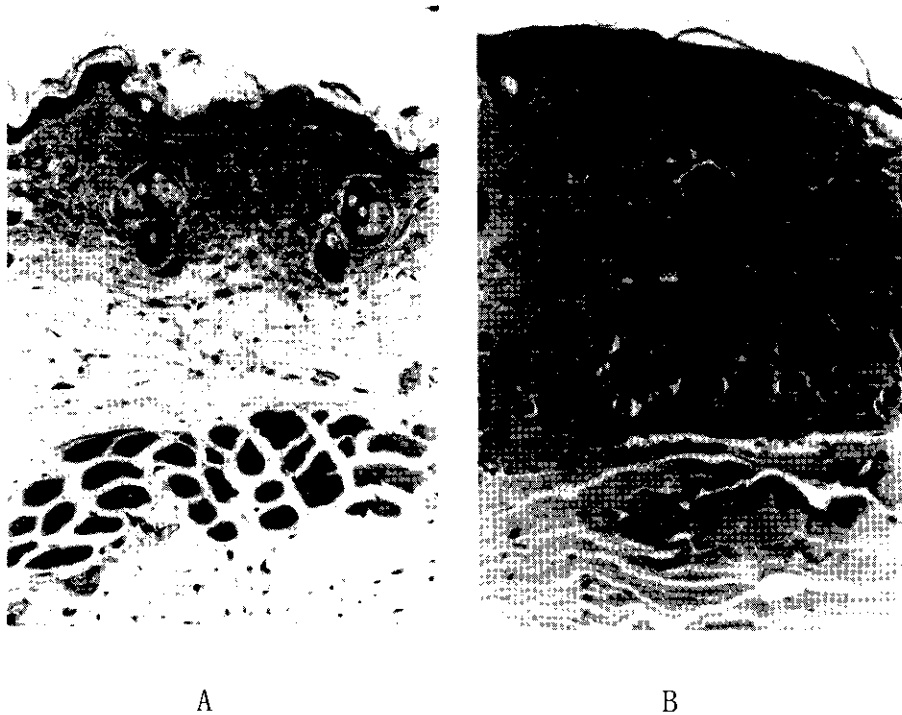


図3：病理組織学的検討

A. HGF-liposome 筋肉内投与群、 B. PBS の筋肉内投与群

今回のHGFによる皮膚硬化抑制効果がTGF- β 1が関与した反応であるかどうかを明らかにするため、liposome 投与群、非投与群間で免疫組織化学的手法、ELISA法、RT-PCR法を用いて比較検討した。免疫組織化学的検討で明らかにHGF-liposome非投与群のBLM誘導硬化皮膚に、紡錘形、大型円形の細胞が強くTGF- β 1の発現が見られたが、HGF-liposome投与群では発現レベルが減弱していた。さらに皮膚に

おけるTGF- β 1陽性細胞数を検討したが有意差は見られなかった。しかし、皮膚抽出液におけるTGF- β 1量はELISAにより検討した結果、HGF-liposome投与群では非投与群に比べ有意に減少していた(図6)。以上の事よりHGFはTGF- β 1産生細胞数を減少させるのではなく、マクロファージ、線維芽細胞などにおけるTGF- β 1の産生量を抑制することが示唆された。

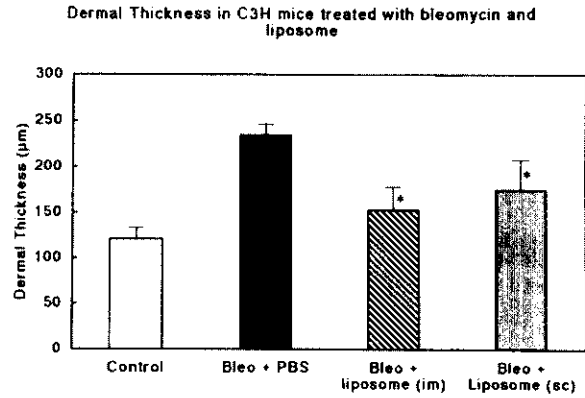


図4 : HGF-liposome 投与による皮膚の厚さの検討

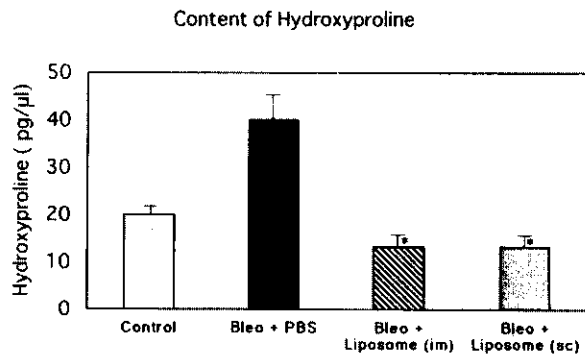


図6 : HGF-liposome による皮膚抽出液中の TGF-β 1 量の検討

考案

BLM 投与皮膚硬化モデルマウスにおいて、ヒト HGF 遺伝子を挿入したベクターを組み込んだ HVJ-liposome を皮下投与もしくは筋肉内投与することにより皮膚硬化誘導が抑制されることが明らかになった。HGF-liposome を筋肉内に投与したとき筋肉、皮膚、肺では HGF の mRNA 発現が認められたが、腎では認められなかった。しかし、腎硬化症において HGF-liposome の筋肉内投与が有効であるとする報告⁶⁾

もあり、腎組織の抽出液中に HGF-mRNA が発現しなかったのは技術的な問題である可能性が高いため再検の必要がある。また、HGF の蛋白レベルは、HGF-liposome 投与 4 週間後に皮膚、肺等の局所に定量できる量が検出できず、血清中に大量の HGF が検出できたこと、免疫組織学的に HGF が皮膚、肺にび慢性に染色されることより、筋肉の細胞より産生された HGF が血中に大量に循環して皮膚、肺などの臓器に至った可能性が示唆された。

HGF 投与により皮膚硬化が改善した機序を解析する

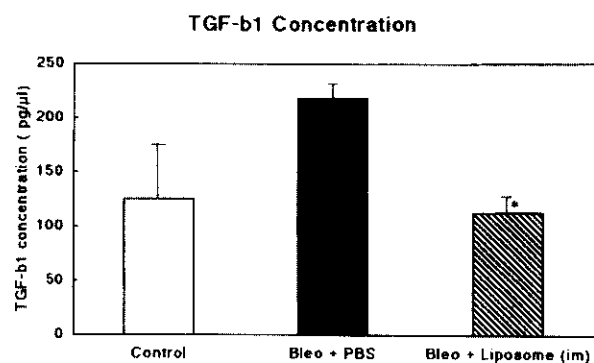


図6 : HGF-liposome による皮膚抽出液中の TGF- β 1 量の検討

ため皮膚局所の TGF- β 1 の発現を解析した。その結果 HGF-liposome 投与により明らかに皮膚局所の TGF- β 1 の発現が mRNA レベル、蛋白レベルで抑制されていた。しかし、皮膚局所の TGF- β 1 陽性細胞の数は HGF-liposome 投与群、非投与群間で差が認められなかった。このことはマクロファージ、線維芽細胞の TGF- β 1 産生能が抑制された可能性を示唆する結果である。最近、慢性腎炎モデルマウスでも HGF を投与することにより腎臓における線維化が抑制されること、さらに抑制機序に関して HGF が TGF- β 、PDGF の産生を抑制することが腎炎モデルマウスでも明らかにされている⁹⁾。この報告は我々の結果を支持する報告と考えられた。今後、HGF が TGF- β 1 の産生を阻害する機序、TGF- β 1 の阻害以外の皮膚硬化抑制機序について引き続き検討を加える予定である。また、今回 HGF-liposome が皮膚硬化の誘導を制御する可能性が明らかにされたが、すでに誘導された皮膚硬化を HGF-liposome を投与することにより治療することができるかについても検討する予定である。

文 献

- 1) Adamson LVR: Drug-induced pulmonary fibrosis. *Environ Health Perspect* 1984; **55**: 25-36
- 2) Aso Y, Yoneda K, Kikkawa Y: Morphological and biological study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. *Lab Invest* 1976; **35**: 558-568
- 3) Chandler DB: Possible mechanisms of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Clin Chest Med* 11; *Biophys Acta* 1988; **968**: 45-50
- 4) Yamamoto T et al: Animal model of sclerotic skin. I: Local injection of bleomycin induced sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; **112**: 456-462
- 5) Ueki T et al: HGF gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nature Med* 1999; **5**: 226-230
- 6) Mizuno S et al: HGF prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease 1998; **101**: 1827-1834

平成12年度事業報告