

図3： B細胞サブセットをフローサイトメトリーにて解析。

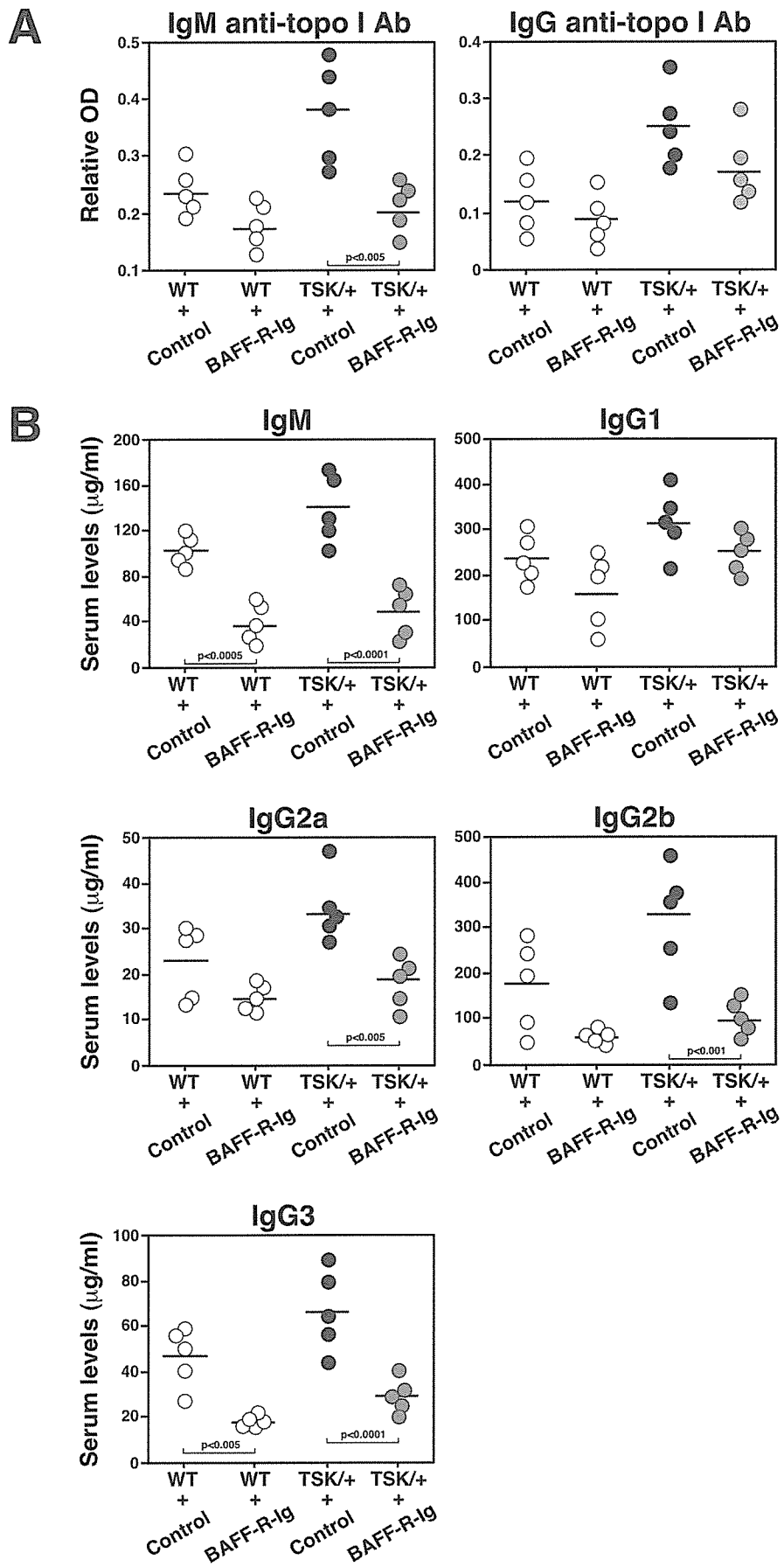


図4： トポイソメラーゼ1抗体価，免疫グロブリン定量。

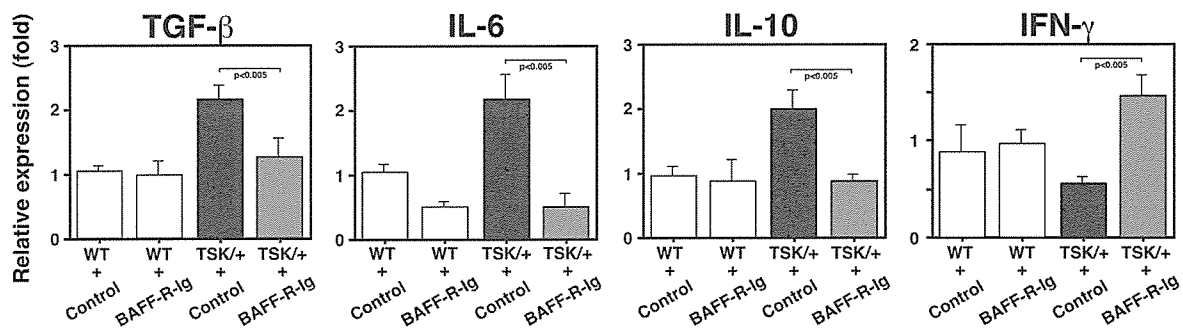


図5： マウス皮膚におけるサイトカインmRNA発現量の比較.

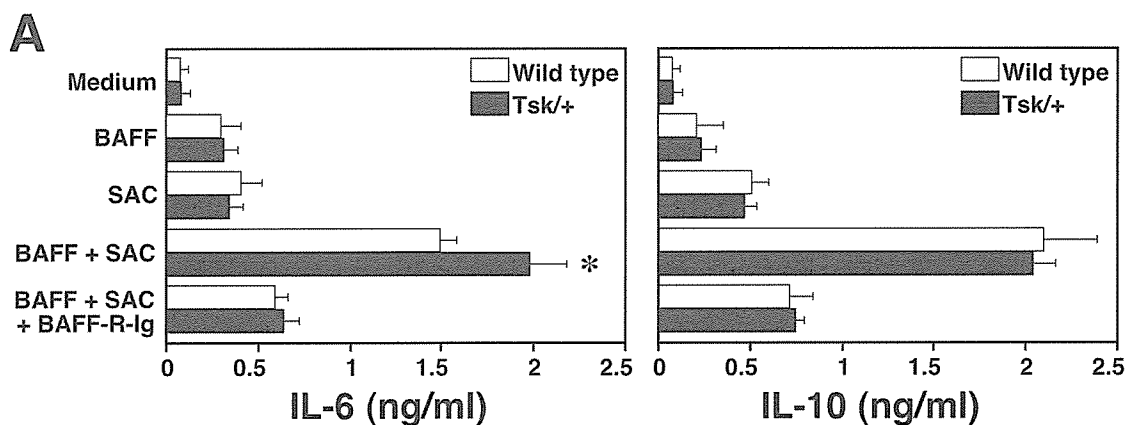


図6： マウスB細胞のサイトカイン産生能。
脾臓よりB細胞を分離しrecombinant human BAFFと *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC)にて刺激し、その培養上清中のIL-6, IL-10を測定した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

Tight-skin (TSK) マウスに対する抗 CD40L 抗体療法

分担研究者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授
	長谷川稔	金沢大学医学部附属病院皮膚科講師
協力者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
	小村一浩	長崎大学医学部・歯学部附属病院皮膚科・ アレルギー科医員
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

強皮症モデルマウスである TSK マウスの病態形成における CD40/CD40L 相互作用の関与を解析するために、抗 CD40L 抗体を投与し、それが TSK マウスの皮膚硬化、自己抗体産生に与える影響を検討した。その結果、皮膚厚が 65% 減少し、抗トポイソメラーゼ I 抗体産生が抑制された。TSK マウスの病態形成に CD40/CD40L 相互作用の関与が強く示唆され、今後 強皮症での治療のターゲットとして有用である可能性が考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症(SSc)では末梢循環不全などをはじめとした血管障害、自己抗体産生を含めた免疫亢進状態、皮膚及び内蔵諸臓器の線維化という結びつきにくい3つの現象が存在するが、これらは複雑に影響し合って病態を形成していることが予想される。しかし、これら3つの主要な要素を一元的に結びつける病態仮説は明らかにされていない。

活性化したT細胞はその表面にCD40Lを高発現させ、可溶性CD40Lを放出する。これらは生理学的活性を持ち、血管内皮細胞・Bリンパ球・線維芽細胞等に発現したCD40と相互作用する。その結果、血管内皮細胞の活性化、B細胞の活性化、線維芽細胞の増殖が認められる。

従って、SScにおいてCD40/CD40Lの相互作用に異常が存在すれば、前述した血管障害、免疫異常、線維化を一元的に説明しうるものと考えられる。

SSc患者由来の線維芽細胞にはCD40が高発現していることやSSc患者T細胞上のCD40Lは発現亢進していることが報告されている。研究者らは過去に、SSc患者血清中の可溶性CD40L値が上昇していることを見だし報告した¹。以上の所見を総合すると、CD40/CD40L相互作用とSScの病態は密接に関係している可能性が考えられる。

Tight-skin(TSK)マウスはフィブリリン遺伝子に関係する点突然変異を持ち、SSc動物モデルとして広く認知されている²。TSKマウスではSScに

類似した皮膚硬化が見られ、自己抗体も産生する。TSKマウスの皮膚硬化形成や自己抗体産生の機序は未だ解明されていないが、TSKマウスのCD19(B細胞活性化を司る重要なシグナル伝達分子)を欠損させると、皮膚線維化が抑制され、自己抗体産生が消失することより、TSKマウスにおける皮膚硬化は免疫学的なSSc酷似の背景を持っていることが推察される。本研究の目的は、SScモデルマウスであるTSKマウスの病態形成におけるCD40/CD40L相互作用の関与を解析し、SScに対する新規治療法に結びつけることである。

B. 研究方法

TSKマウスはB10.D2(58N)/Snより突然変異として継代されたマウスであり、SScの動物モデルとされている。常染色体優性変異であり、ホモ個体は子宮内死亡する。ヘテロ個体(TSK)は真皮の肥厚、硬化が顕著である。生後7日目には肩甲間の皮膚がつまみ上げにくいことで判定可能である。本研究では、尾部より抽出したDNAをPCR法を用いた分子生物学的な方法でもTSKの判定を行った。交配についてはTSKマウス雄とC57BL/6マウス雌とを掛け合わせて行った。この掛け合わせでは、50%の確率でTSKマウスが得られることになる。

TSKマウス由来皮膚の包埋 TSKマウスをエーテルで麻酔後、マウスの背部皮膚を剃毛し、70%アルコールで消毒した。背部皮膚を使い捨て滅菌済み6mm径のパンチバイオプシーにて生検し、生検した組織

の一部は3.5%パラホルムアルデヒド固定後、パラフィン包埋し、6 μ m切片をヘマトキシリン&エオジン染色した。皮下結合組織層の厚さを測定し、線維化の指標とした。厚さの測定には、タイトスキンマウス皮膚病理に精通した2人の検者が盲検し、結果を平均した。さらに、別途凍結保存した皮膚サンプルよりハイドロキシプロリン量を測定し線維化の指標とした。各解析にはそれぞれ最低10匹のマウスを用いた。

抗CD40L抗体のTSKマウスへの腹腔内注射 TSKマウスに生後1週間より100 μ g/マウスの抗CD40L抗体(MR-1抗体:BD Pharmingen)をPBS200 μ lに希釈し、週に1回の割合で腹腔内注射し、8週目に皮膚硬化や自己抗体価などを評価した。

TSKマウス由来T細胞表面のCD40L発現量の検討 TSKマウスより末梢血を採取し、標識した抗CD40L抗体および抗CD4抗体にて氷上20分間染色後、赤血球を溶血した後、フローサイトメーターにて解析した。

自己抗体の検討 抗CD40L抗体処理した8週齢マウスの血清を採取し、MBL社製のヒト抗トポイソメラーゼI抗体測定キットを用いて抗トポイソメラーゼI抗体価を測定した。このとき二次抗体として抗マウスIg抗体を使用する。それぞれのサンプルはduplicateで測定し、平均値を解析に使用した。

TSKマウス由来線維芽細胞のCD40/CD40Lシグナルに対する反応性の検討 TSKマウス由来の線維芽細胞をCD40/CD40Lシグナル活性化作用を持つ抗CD40抗体の存在下で培養し

て、その反応性を検討する。具体的には8週齢のTSKマウス背部皮膚より得られた線維芽細胞をCD40/CD40Lシグナル活性化作用を持つ抗CD40抗体と共培養した。2日後、BrdU(Roche Diagnosis社)を添加し、18時間後に細胞内BrdU検出キット(同社製)を用いることで線維芽細胞の増殖能を定量化した。さらには、培養開始2日後の2型コラーゲンのmRNA量をreal-time PCR法を用いて半定量化した。それぞれのサンプルはtriplicateで培養し、平均値を解析に使用した。さらに、8週齢のTSKマウス背部皮膚より得られた線維芽細胞を標識した抗マウスCD40抗体で染色し、CD40発現量をフローサイトメータで測定した。

TSKマウス由来のB細胞におけるCD40/CD40Lシグナルに対する反応性の検討

TSKマウス由来のB細胞を抗CD40抗体の存在下で培養して、CD40/CD40Lシグナルに対する反応性を検討した。TSKマウスの脾臓を摘出した後、単細胞に分離、赤血球を溶血し、10mlのPBSに希釈、180 μ lのマウスT細胞除去用マグネットビーズ(Dynal社)を添加、90分間4度で反応させた。得られたB細胞を2日間の培養後、[3H]でラベルしたチミジンを添加し、16時間後にシンチレーションカウンターで定量化してCD40/CD40Lシグナルへの反応性と評価した。それぞれのサンプルはtriplicateで培養し、平均値を解析に使用した。

TSKマウス血漿中の可溶性CD40L値の測定

TSKマウスより採取した血漿中の可溶性CD40L値をELISAキット(MedSystem社)を用いてキット付属のマニュアルに従って測定した。それぞれ

のサンプルはduplicateで測定し、平均値を解析に使用した。

免疫グロブリン産生量の検討 抗CD40L抗体処理した4週齢と8週齢TSKマウスの血清を採取し、Bioscience社製免疫グロブリン測定キットを用いてELISA法にて各アイソタイプの免疫グロブリン量を測定した。それぞれのサンプルはduplicateで測定し、平均値を解析に使用した。

C. 研究結果

抗CD40L抗体によりTSKマウスの筋層下結合組織厚は65%薄くなり($P < 0.0001$)、ハイドロキシプロリン量が17%低下し($P < 0.001$)、皮膚のつまみ上げも可能となった(図1)。

TSKマウスでは末梢血CD4陽性細胞でのCD40Lの発現細胞の割合が野生型マウスに比べて7.5倍増強していた($P < 0.001$)。(図2)

TSKマウスでは血漿中の可溶性CD40L値が野生型マウスに比べて4週齢で11倍、8週齢で7.7倍増加していた($P < 0.0001$)。(図3)

TSKマウス由来の線維芽細胞では*in vitro*でのCD40刺激に対する増殖活性が118%($P < 0.001$)、コラーゲン産生が56%($P < 0.03$)増強していた。(図4)

TSKマウスのB細胞では*in vitro*でのCD40刺激に対する増殖活性が53%増強していた($P < 0.0001$)。(図5)さらに*in vivo*での抗CD40L抗体投与により、TSKマウスで低下していたB細胞上のIgMの発現量が野生型マウスと同等まで改善した。(図6)さらに*in vivo*での抗CD40L抗体投

与により、血清中のIgG量が減少した(図7)。このように、TSKマウスではB細胞のCD40刺激に対する反応性が亢進しており、B細胞の活性化は抗CD40L抗体投与により正常化された。

さらに*in vivo*での抗CD40L抗体投与により、TSKマウスで血清中の抗トポイソメラーゼI抗体が産生されなくなった。(図8)

D. 考察

TSKマウスにおいてCD40/CD40L相互作用と関連すると考えられるB細胞と線維芽細胞の反応性亢進が認められ、抗CD40L抗体の投与によって、これらは正常化された。TSKマウスに血管障害は起こらないためこのモデルでの抗CD40L抗体の血管病変に対する効果は不明であるが、今後抗CD40/CD40L相互作用がSScの治療のターゲットとして期待される。すでに、CD40/CD40L相互作用を標的とした分子標的療法(抗CD154抗体、抗CD40抗体、可溶性CD40、CD40Ig遺伝子治療)が臨床試験段階もしくは前臨床試験段階にあり³、今後SScに対するこれらの治療法が検討されることが期待される。

E. 結論

抗CD40L抗体投与によりTSKマウスの皮膚硬化が改善され抗トポイソメラーゼI抗体産生が抑制された。

F. 文献

1. Komura K, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Elevated circulating CD40L concentrations in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31:514-9.
2. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, *et al*: CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002;109:1453-62.
3. Dumont FJ: IDEC-131. IDEC/Eisai. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:725-34.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

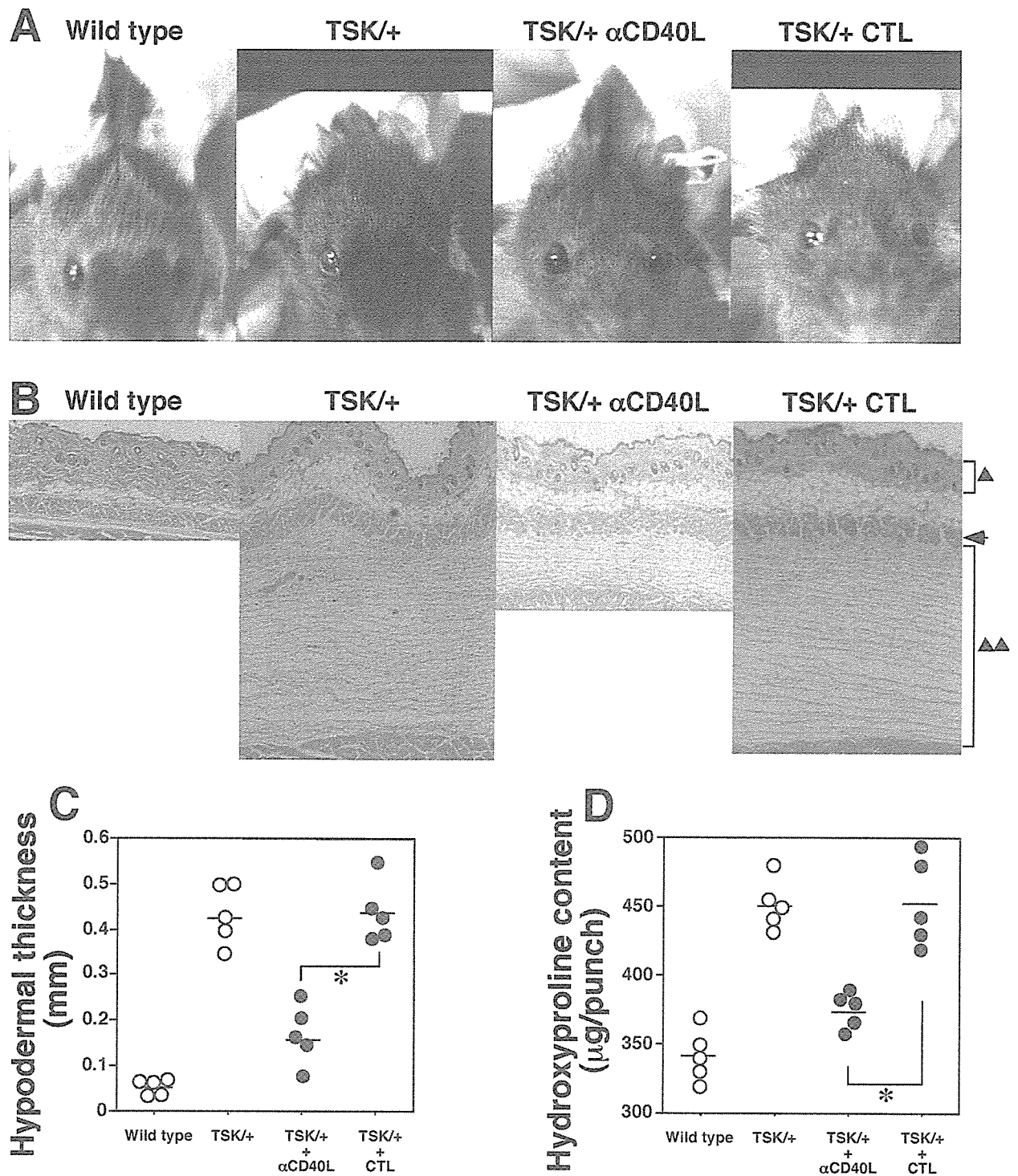


図1 野生型、TSK、抗CD40L抗体治療したTSK マウス(TSK/+ α CD40L)、およびコントロール抗体で処理したTSKマウス(TSK/+ CTL)での(A)肩甲間のつまみあげにくさ(B) 肩甲間の皮膚病理組織。(C)皮下厚。(D)ハイドロキシプロリン量。矢印は結合組織間筋層、三角は表皮、二重三角は筋層下結合組織を示す。*P<0.001。

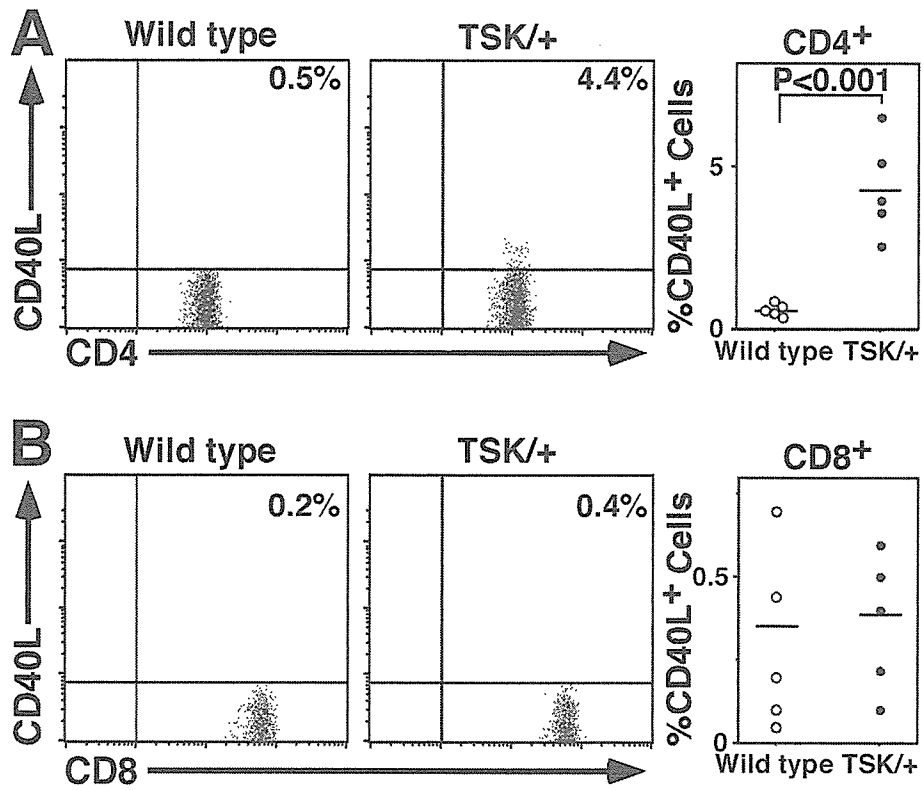


図2 末梢血単核球の2重染色像。

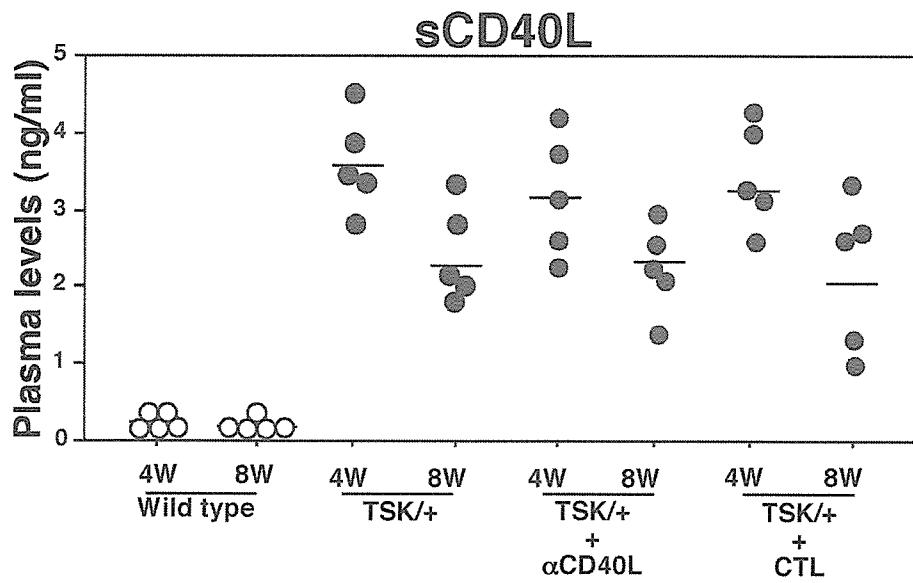


図3 血漿中の可溶性CD40L値。横線は平均値を示す。

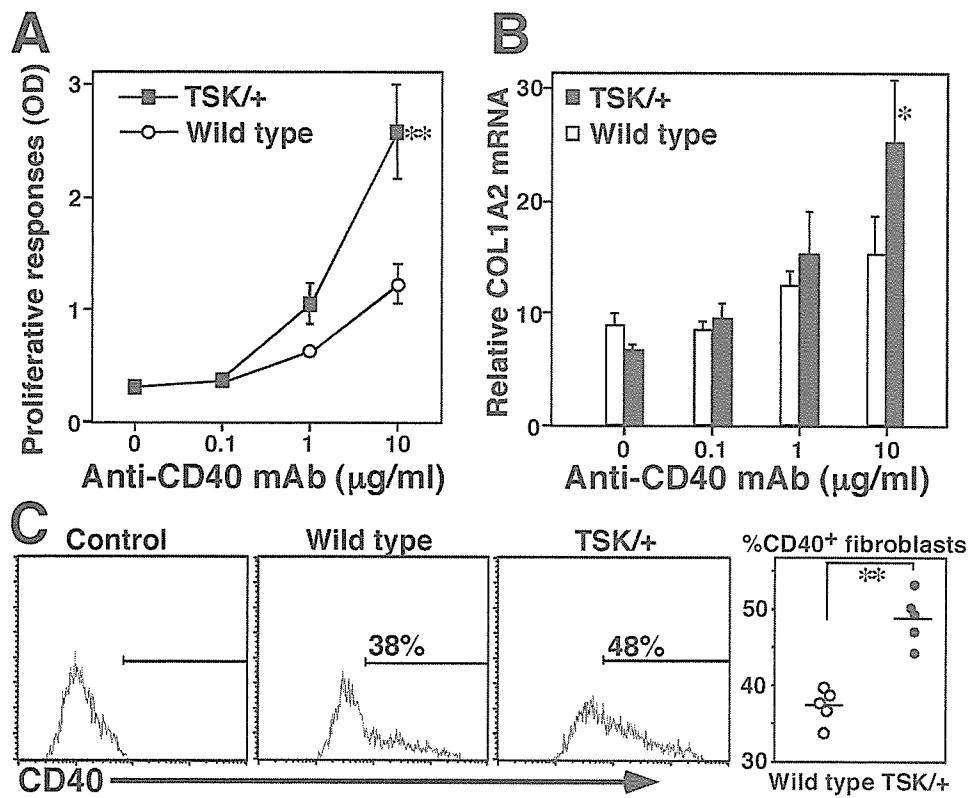


図4 (A) 抗CD40抗体に対する線維芽細胞の増殖活性。(B) 抗CD40抗体に対する線維芽細胞のコラーゲンmRNA量。(C) 線維芽細胞上のCD40の発現量。* $P < 0.05$ 。** $P < 0.001$ 。

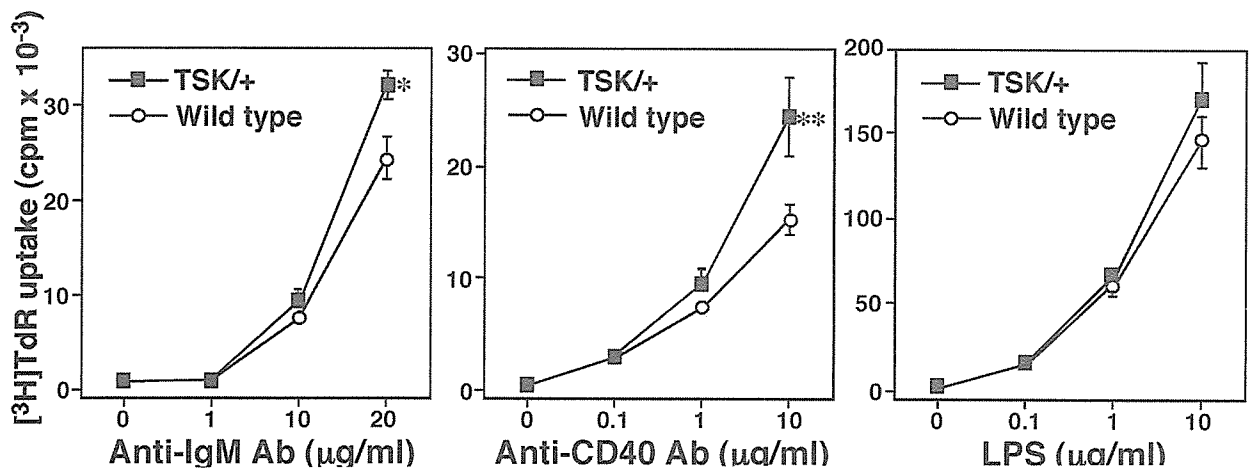


図5 抗CD40抗体などに対するTSKマウスB細胞の増殖活性。* $P < 0.05$ 。** $P < 0.001$ 。

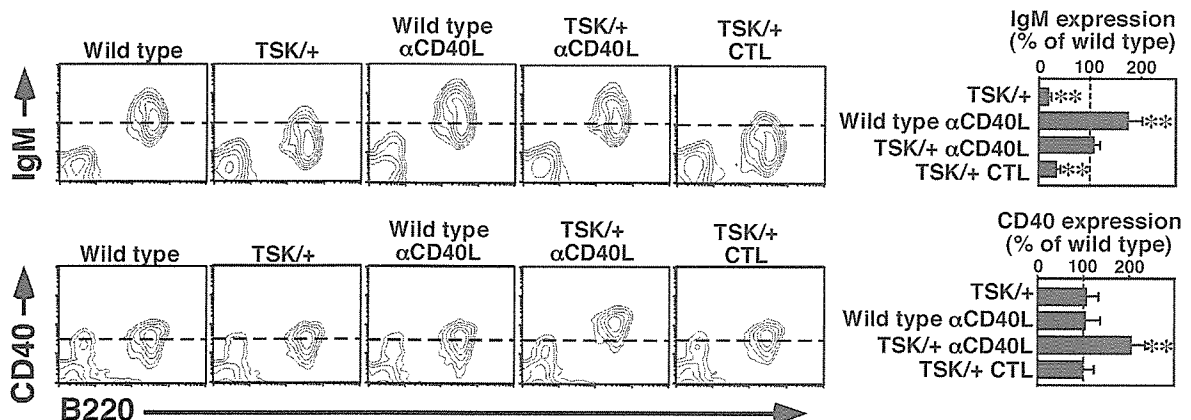


図6 末梢血単核球のIgM、CD40の発現量。* $P < 0.001$ vs. 野生型。

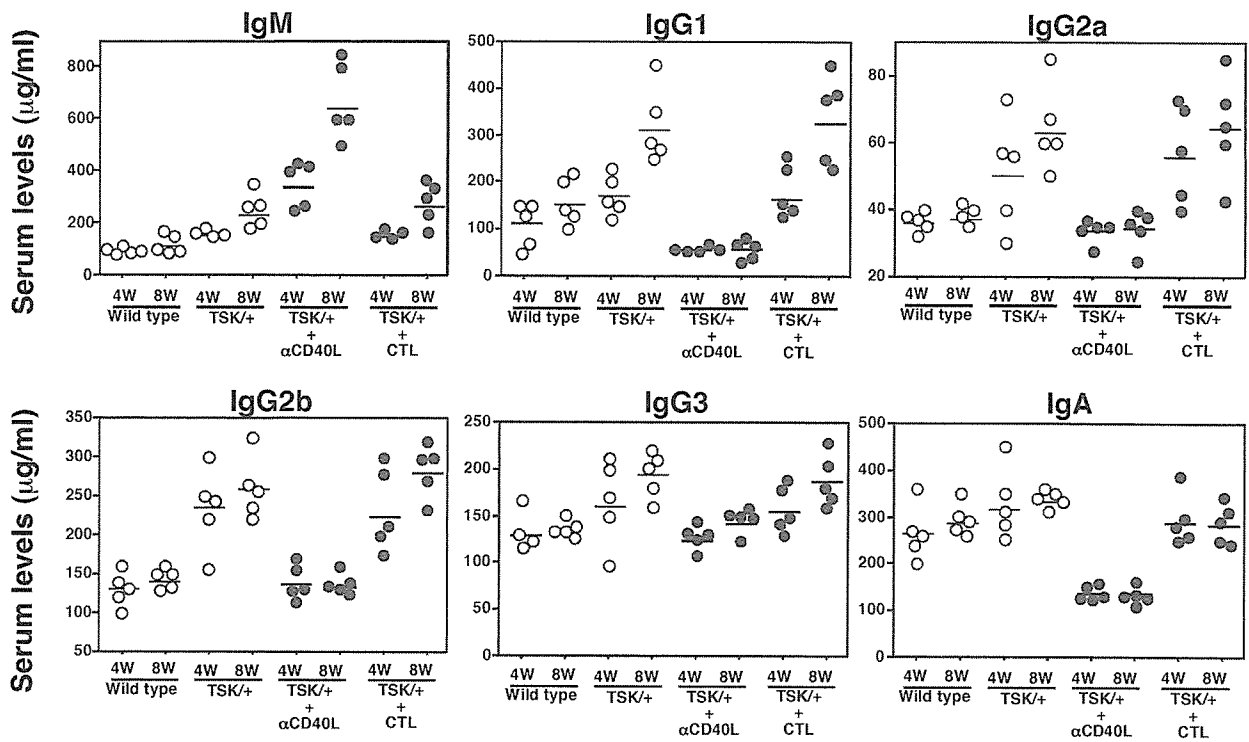


図7 野生型、TSK、抗CD40L抗体治療したTSK マウス (TSK/+ + αCD40L)、およびコントロール抗体で処理したTSKマウス (TSK/+ + CTL) での血清中の免疫グロブリン量。横線は平均値を示す。

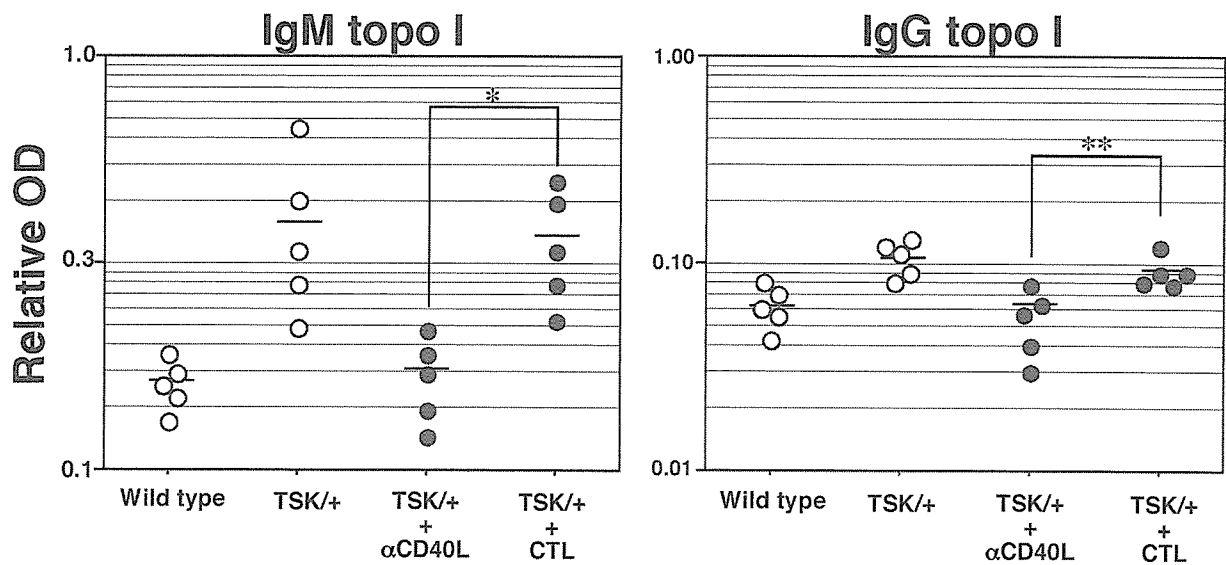


図8 野生型、TSK、抗CD40L抗体治療したTSK マウス (TSK/+ + αCD40L)、およびコントロール抗体で処理したTSKマウス (TSK/+ + CTL) での抗トポイソメラーゼI抗体値。* $P < 0.05$ 。** $P < 0.01$ 。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

TGF- β で誘導されるモデルマウスの線維化は
抗 CTGF 抗体で抑制される

主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
協力者	伊川友香	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
協力者	近藤美幾	金沢大学医学部附属病院皮膚科医員
協力者	中條園子	金沢大学医学部附属病院皮膚科助手
協力者	白崎文朗	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者	黄 宝星	日本農産工業 バイオ研究所
協力者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授

研究要旨

強皮症の線維化は、TGF- β (Transforming growth factor- β)や CTGF(Connective tissue growth factor)などの成長因子の刺激により進行することが知られている。強皮症における線維化の機序を解明するために、以前我々は TGF- β と CTGF をマウス皮下に注入し、線維化を誘導する実験モデルを確立した。TGF- β や CTGF の阻害は、線維化を抑制することが期待されるが、TGF- β は多様な生物活性を有するので、その阻害は重篤な副作用を誘発することが危惧される。そのため、より下流の CTGF を阻害することが安全かつ有効な線維化の抑制につながると考えた。そこで我々は DNA 免疫法を用い、抗 CTGF 抗体を作成し、モデルマウスの線維化を抑制するか検討した。新生 B6 マウスの項部に TGF- β と各 CTGF 抗体またはマウス血清 IgG を 3 日間投与したところ、抗体投与群で線維化の程度が抑制された。これらの結果から、今後抗 CTGF 抗体が皮膚線維化疾患の有効な治療法となることが期待された。

A. 研究目的

全身性強皮症は炎症に引き続いておこる皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管障害により特徴づけられる膠原病である。その原因はいまだ解明されていないが、線維化の過程で TGF- β や CTGF などのサイトカインが関与していることが知られている (1)。これまで我々

は TGF- β と CTGF の線維化における *in vivo*での役割を明らかにするために、これらのサイトカインを新生マウスの項部皮下に投与して実験的に線維化を誘導できるかどうかを検討した(2)。その結果、TGF- β と CTGF を同時に注入、あるいは TGF- β を最初の 3 日間注入し、次に CTGF を 4 日間投与することにより不可逆

的な線維化が認められた。これらの結果に基づき我々は全身性強皮症において TGF- β が皮膚線維化を誘導し、CTGF が線維化を維持するという「二段階仮説」を提唱している (1)。これらのサイトカインを阻害することで、線維化の抑制が期待されるが、TGF- β は成長、分化、免疫制御など線維化以外の多彩な作用を有するために、この阻害は様々な副作用が危惧される。そこで、下流遺伝子である CTGF に着目し、DNA 免疫法による抗ヒト CTGF モノクローナル抗体の精製を行った。

さらに、この抗 CTGF 抗体の有効性を *in vivo* で評価するためにマウス皮下に TGF- β と抗 CTGF 抗体を 3 日間投与し、肉芽形成が抑制されるかを検討した。

B. 研究方法

1) 抗 CTGF 抗体の精製

DNA 免疫法を用いてヒト CTGF に対する抗体の精製を試みた。マウス皮膚にヒト CTGF の全長または各 module の遺伝子を組み込んだ DNA プラスミドを導入し、約 4 週間後に各抗血清が産生されることを、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット法で確認した。

2) 線維化モデルマウスにおける抗 CTGF 抗体の効果

新生 C57BL/6 マウスの項部に TGF- β 800 ng と抗 CTGF 抗体 2 μ g あるいはコントロールとしてマウス IgG を 2 μ g を混合して、3 日間連続で皮下投与した。4 日目に組織を採取し、HE 染色切片で肉芽の程度を 3 人の観察者が評価、スコア化した。

3) コラーゲンタンパク量定量

ホルマリン固定したパラフィン切片を脱パラフィンし、肉芽部分を削り取り、チューブに入れ、0.1 % の Fast green と 0.1 % sirius red F3BA の染色液を加え反応させた。Fast green は非コラーゲン組織、Sirius red F3BA はコラーゲン組織に吸着する。反応液に 0.1 N NaOH:メタノール液を加え染み出てきた抽出液の上清の吸光度を 540 nm と 605 nm で測定し、肉芽組織内のコラーゲン量を計算した(3)。

4) 肉芽組織での COL1A2 mRNA の発現

凍結切片から RNA を抽出し、cDNA を合成した後に、real-time PCR 法にて Type 1 Collagen α 2 chain の mRNA を定量した。

C. 研究結果

1) 抗 CTGF 抗体の精製

ヒト CTGF の各 module 抗体を認識する 7 つのモノクローナル抗体を精製した (module 1 に対して 2 つ、module 2 に対して 1 つ、module 3 に対して 3 つ、module 4 に対して 1 つ)。各抗体はフローサイトメトリーでそれぞれの module に特異的に結合する事が (図 1)、ウエスタンブロット法で熱処理された抗体を認識しない事が示された (図 2)。SPR 解析では抗 CTGF module 2 抗体の結合力が最も強く、抗 CTGF module 3 抗体の結合力が弱かった (表 1)。

2) 線維化モデルマウスにおける抗 CTGF 抗体の効果

HE 染色切片では、抗体投与群における肉芽形成の程度がコントロール群に比べて抑制された。中でも、抗 CTGF module 2 抗体投与群が最も肉芽形成を抑制した (図 3)。

3) コラーゲンタンパク量定量

抗 CTGF module 2 抗体投与群では、コントロール群に比べてコラーゲンタンパク量が有意に抑制された(図 4)。

4) COL1A2 mRNA の発現

抗 CTGF module 2 抗体投与群では、コントロール群に比べて肉芽組織における Type 1 Collagen α 2 chain mRNA の発現が有意に抑制された(図 5)。

D. 考 案

近年、線維化に関連しているサイトカインを標的とした抗線維化療法が注目されているが、未だ確立された治療法はない。強皮症において、TGF- β と CTGF が線維化の中心的役割を担っていると考えられているが、前述のように TGF- β を阻害することは、その多彩な作用から個体にとって有害であると考えた。そこで我々は、下流遺伝子である CTGF をターゲットとする抗体の産生を試みた。

通常の抗体作製はペプチドや精製されたタンパク質を用いて動物に免疫して作製されるが、今回我々が用いた DNA 免疫法は目的タンパク質の遺伝子を発現ベクターの形で動物に導入して動物の体内で発現した目的タンパク質に対する抗体を回収する技術である。通常法と比較して、

1. ペプチドや精製抗原を準備する必要が無い
2. ペプチドや精製抗原で再現できない立体構造を認識する抗体を作製する事が可能
3. 中和・阻害活性のある抗体作製が可能
4. 抗複数貫通膜タンパク質や抗レセプター抗体の作製が可能

等の、通常法で作製できない抗体を作製できるという特徴がある。この方法を用いて、今回7つのモノクローナル抗 CTGF 抗体の精製に成功した。

CTGF は TGF- β の刺激により選択的に線維芽細胞に発現する。強皮症の皮膚では皮膚硬化の程度に一致して CTGF の mRNA が発現しており、萎縮期になるとその発現が見られなくなる(4)。また、強皮症患者血清中の CTGF 濃度が SLE、皮膚筋炎、健常人に比べて高値で、皮膚硬化の範囲や肺線維症の重症度をよく反映し、さらにこの血清 CTGF の上昇は強皮症において一般に硬化が進行するとされる発症 1~3 年の時期に特に観察されている(5)。

我々のこれまでの線維化モデルマウスを使用した実験でも、項部皮下に TGF- β を 3 日間投与して誘導された肉芽組織では CTGF mRNA が強く発現することが認められている(1)。これらの結果をふまえ、今回 TGF- β 投与によって誘導される内因性 CTGF を抗 CTGF 抗体が阻害するかどうかを検討し、内因性 CTGF の作用を抗 CTGF 抗体が実際に抑制することが推測された。

今後は、TGF- β を 3 日間投与後、CTGF を 4 日間投与し生じる持続性の線維化が抗 CTGF 抗体で抑制されるか、また、皮膚線維化モデルである tight-skin (TSK)マウスに抗 CTGF 抗体を投与して皮膚硬化が改善されるか、などを検討する予定である。

E. 結 論

確立された治療法がない強皮症などの皮膚線維化疾患において今後、抗 CTGF 抗体が有効

な治療法となることが期待された。

F. 文献

1. Takehara K. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. J Rheumatol. 2003; 30(4):755-9
2. Mori T, KAWARA S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A et al. Role and interaction of connective tissue growth factor-beta in persistent fibrosis:A mouse fibrosis model. J Cell Physiol. 1999;181(1):153-9
3. Alfredo L and Marcos R. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. J. Histochem. Cytochem. 1985; 33(8): 737-43
4. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, Takehara K. J Invest Dermatol. 1995; 105(2): 280-4.
5. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani

T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. J Rheumatol. 2000; 27(1): 149-54.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
伊川友香、近藤美幾、中條園子、白崎文朗、藤本学、黄宝星、竹原和彦：TGF- β で誘導されるモデルマウスの線維化が抗 CTGF 抗体で抑制された。第 31 回日本研究皮膚科学会、2006.5.31-6.2、国立京都国際会館

H. 知的所有権の出願・登録状況

抗ヒト CTGF マウス抗体特許出願中(黄)

表 1: SPR 分析による抗体乖離度の測定

Surface Plasmon Resonance (SPR) 分析

Epitope	Clone	$K_A(1/M)$	$K_D(M)$	Subtype
Module 1	30E9	3.22×10^8	3.11×10^{-9}	IgG2a
	30D2	5.33×10^8	1.88×10^{-9}	IgG1
Module 2	1A1	1.81×10^8	5.51×10^{-9}	IgG1
Module 3	21C12	*1	*2	IgG1
	21H12	*1	*2	IgG1
	22D10	*1	*2	IgG1
Module 4	8E7	3.48×10^8	3.11×10^{-9}	IgG1

•Sensor Chip CM5 by amine coupling

•Purified human CTGF (28nM) was injected over the surface of each monoclonal antibody, respectively.

*1: The K_A value could only be determined within the range of $3.16 - 8.21 \times 10^7$
 *2: The K_D value could only be determined within the range of $1.22 - 3.16 \times 10^8$
 when applied analyte concentration was raised to 2145nM (76 times higher than other analysis)

SPR 解析では、抗 CTGF module2 抗体の結合力が最も強く、抗 CTGF module 3 抗体の結合力が最も弱かった。(KD 値)

Epitope specificity of anti-CTGF mAb

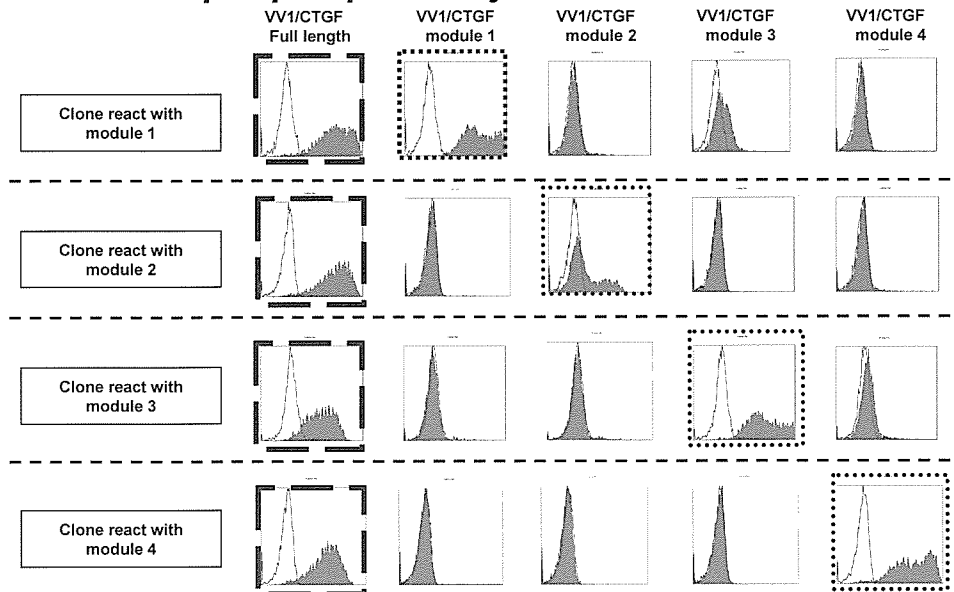


図1:フローサイトメトリーによる抗体特異性の評価

各抗体がそれぞれのmoduleに特異的に結合した。

Specificity of antibody on the native protein

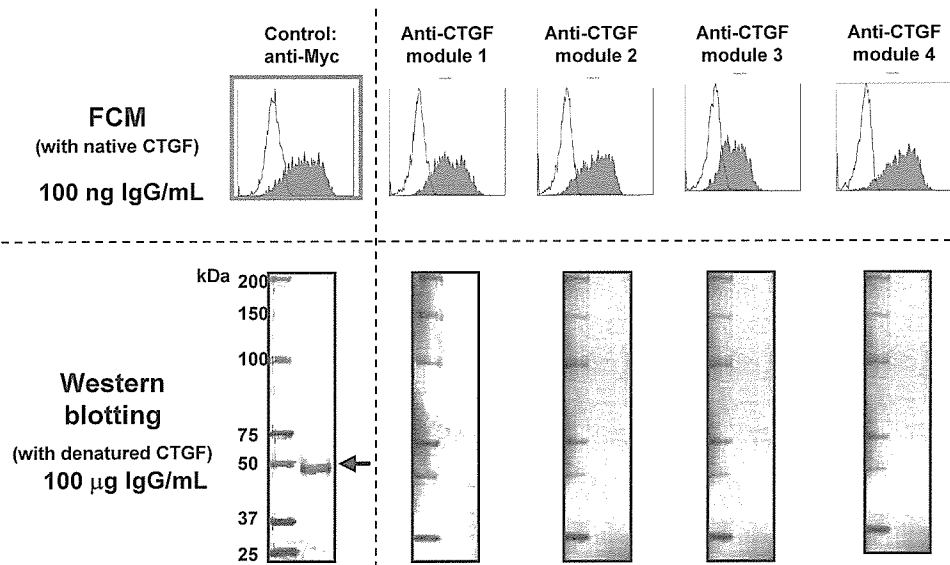


図2:Western blott法による抗体の検出

Westernblott法で熱処理された抗体は認識されない。自然な状態のCTGFのみを認識する。

Inhibitory effects of anti-human CTGF antibody (1 mg/kg body weight)

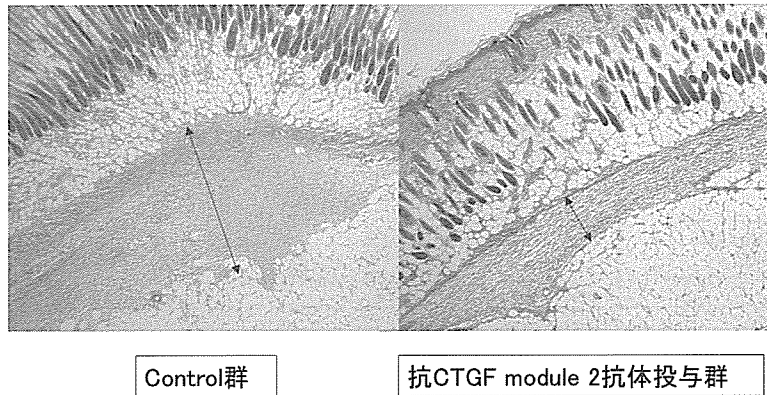


図3: 4日目の病理組織

コントロール群に比べて抗CTGF module 2抗体投与群で肉芽形成が抑制された。

Collagen contents in tissue samples

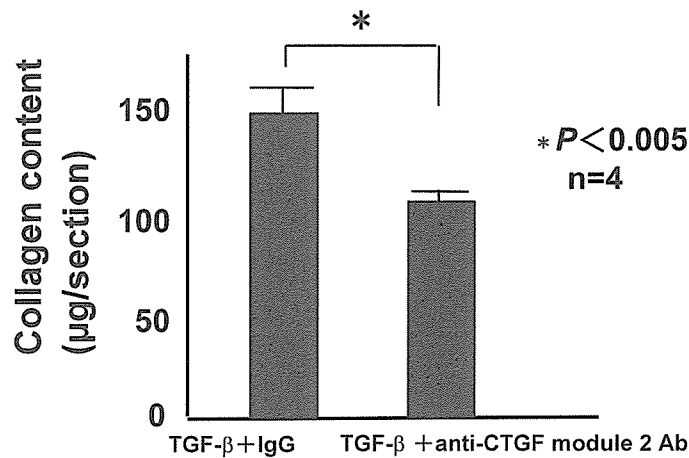


図4: 肉芽組織内のコラーゲン量

肉芽組織内のコラーゲン量は、コントロール群に比べて抗CTGF module 2抗体投与群で抑制された。

mRNA expression levels of the $\alpha 2$ chain of type I collagen in granulation tissues

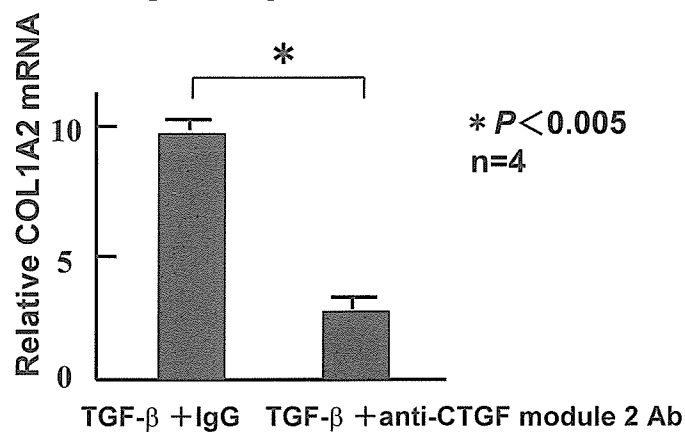


図5: 肉芽組織におけるCOL1A2 mRNA発現

肉芽組織内のCOL1A2 mRNA発現は、コントロール群に比べて抗CTGF module 2抗体投与群で抑制された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

15-リポキシゲナーゼ（15-LOX）遺伝子導入細胞移植による
線維化病変制御に関する検討

分担研究者 遠藤平仁 北里大学医学部膠原病・感染内科学助教授
研究協力者 北里英郎 北里大学医療衛生学部微生物学教授
協力者 角谷孝浩 北里大学医療衛生学部微生物学大学院

研究要旨

Lipoxin は近年発見されたりポキシゲナーゼにより合成される抗炎症リピッドメディエーターである。5LOX と 12/15LOX の 2 つの酵素を有する 2 種類の細胞を介して (Transcellular synthesis) 合成される。

Lipoxin A₄ は白血球浸潤抑制、線維芽細胞増殖抑制やコラーゲン合成抑制を惹起し強力な生体反応抑制効果を有する。Lipoxin A₄ 合成は 15LOX 発現に規定されている。15LOXcDNA をレトロウイルスベクターに組み込み線維芽細胞に感染させ持続発現した細胞 (15LOXCell) をマウス間質性肺炎モデルに投与し線維化病変の進展抑制効果を検討した。15LOXCell 投与により炎症局所に LXA₄ 産生が確認できた。プレオマイシン投与間質性肺炎モデルにおいて 15LOX Cell は肺線維化病変の進展を抑制し肺組織変化やヒドロキシプロリン含量の低下 TGFβ の発現低下を観察した。以上より 15-LOX LipoxinA₄ は線維化病変の新たな制御法に結びつく可能性がある。

A. 研究目的

強皮症の間質性肺炎の気管支肺胞洗浄液中のロイコトリエン：LTB₄ 含量は増加し一方リポキシン LXA₄ は正常と比較し低値であり LXA₄/LTB₄ 比が強皮症間質性肺炎では低くこのアンバランスが間質性肺炎の病態形成に重要な役割を果たしている。また LXA₄ は肺線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生抑制作用を有している。以上より LXA₄ の生体内の誘導や体外からの投与は間質性肺炎の新たな治療法に結びつく可能性がある。しかし LXA₄ は生体内で短時間

に分解される。合成酵素の一つである 15-LOX を持続発現させた線維芽細胞を移植することにより LXA₄ を誘導し線維化を抑制する新たな線維化治療法を考案しその基礎実験をおこなった。

B. 方法

1. C57-15LOX 細胞の作成

ヒト 15-*lox*cDNA はヒト滑膜細胞をヒトリコンビナント IL-4 で 6 時間刺激した cDNA より RT-PCR 法にて作成した。cDNA はレトロウイルスベクター

EGFP/EV 制限酵素処理にて組み込み EGFP/15-LOX を作成した。作成した EGFP/15-LOX 及び未処理の EGFP/EV をそれぞれパッケージング細胞 Ap293 に感染させ Ap293/EV、AP293/15-LOX を作成。その後、Ap293/EV 及び Ap293/15-LOX からウイルス粒子を回収し、標的細胞 C57Fibroblast 細胞に感染させ 15-LOX 高発現細胞 C57/15-LOX とコントロール細胞 C57/EV を作成した。C57/15-LOX 細胞は RT-PCR により 15-*lox* 高発現を確認した。

2. *In vivo* での作用の確認

15-LOX 高発現細胞 C57/15-LOX とコントロール細胞 C57/EV を 1×10^6 細胞/マウス C57BL6 マウス背部に作成したエアースポーチに注入1時間後尿酸塩結晶 100mg を注入し8時間後浸潤白血球数を測定。また洗浄液は SepPackC18 カートリッジカラムを用いジエチルエーテルにより抽出した Solution を乾燥し PBS にて再置換し LXA₄ を ELISA 法にて測定した。

3. プレオマイシン誘導間質性肺炎に対する C57/15-LOX 細胞の効果

C57BL6N マウス (オス 6W) に吸入器を用いプレオマイシン (科研薬) $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ を気管内に吸入させた。一群 20 匹 C57/15-LOX 細胞、コントロール C57-EV 細胞 5×10^5 を各々尾静脈より注射し2日後プレオマイシンを気管内に注入した。14日、28日飼育後、ネンブタール麻酔後、気管に生食 1 ml を用い洗浄し回収し白血球数を測定した。処分後肺を分離しホルマリン固定後パラフィン包埋し薄切しヘマトキシリンエオジン染色し組織変化を観察。

肺組織のヒドロキシプロリン量を測定。また RNA 分離後 RT-PCR 法で LXA₄ 受容体、COL、サイトカイン mRNA の発現を測定した。

C. 結果

1. C57-15LOX 細胞は RT-PCR 法で 15-LOX mRNA の発現を認めた。またアラキドン酸 $1 \mu\text{M}$ の添加によって C57-EV に 15LOX mRNA の発現は検出できなかった。また 15-HETE の産生が培養上清中に検出された。

2. C57BL6 マウスの背部皮下に空気を 5 ml 3 日置き注入し空気嚢を作成した。尿酸塩 100mg を注入8時間後白血球数であった。一方 C57-15LOX 細胞移植後尿酸塩結晶を注入し C57-EV と比較し白血球数は著明に低下を示した。また洗浄液中の LXA₄ の濃度の上昇が検出された。また LXA₄ を空気嚢に尿酸塩結晶とともに注入すると同様に浸潤白血球数は低下した。

3. プレオマイシン誘導間質性肺炎を誘導すると肺組織に LXA₄ 受容体 (ALX) mRNA が誘導された。C57-15LOX 細胞を移植すると C57-EV 細胞移植と比較しマウス生存率が延長した。また BAL の白血球数が減少した。白血球の中で好中球、リンパ球の減少が認められた。また病理組織変化において間質性肺炎の病像が顕著に改善した。プレオマイシン誘導間質性肺炎の肺組織に COL mRNA や IL-8、IL-6、MCP-1 mRNA の増加が認められるが C57-15LOX 細胞移植により肺組織の COL mRNA、IL-8、MCP-1 mRNA の発現は低下した。

D. 考察

LXA₄ はそれぞれ異なる細胞に発現する 5-LOX、12/15-LOX の 2 つの酵素を介して合成 (Transcellular synthesis) されるリピッドメディエーターである。強力な抗炎症作用を有し LTB₄ による白血球浸潤を抑制する。炎症の時間経過の中で炎症病態の始まりから 12 時間以降に合成が確認され炎症が収束する Resolution phase に合成される。その際炎症の早期より 5-LOX は持続的に発現され 15LOX は LXA₄ 発現時期に白血球のなかに誘導される。したがって炎症が進展から収束に転換する鍵になる酵素は 15LOX であるといえる。

強皮症の間質性肺炎の BAL 液中には LTB₄ 濃度が増加しており一方 LXA₄ 濃度が低くこのバランスの低下が間質性肺炎の進展に関与しているという説が報告されている。また LXA₄ は CTGF による線維芽細胞の増殖を抑制する。同様に LXA₄ は IL-1 による線維芽細胞増殖を抑制し TGF β による Collagen の産生誘導を抑制することも確認している。

ヒト erythroblastic 15-LOX cDNA をレトロウイルスベクターを用いマウス線維芽細胞に持続過剰発現した細胞を移植することにより炎症早期より LXA₄ が合成され炎症が抑えられるシステムを構築した。このプロスタグランジン酵素発現細胞を移植し間質性肺炎を抑制するシステムは PGDS 細胞により報告している。移植細胞は少なくとも 3 週間は移植局所に生存し機能をはたす。このいわゆる Cell Therapy を 15-LOX LXA₄ システムに応用し実験間質性肺炎システムに応用した。尿酸塩結晶モデルにおいては顕著に局所炎症を抑え浸

潤白血球の減少が認められた。一方 C57-EV 細胞では抑制はなく C57-15LOX 細胞のみ局所での LXA₄ 産生が確認された。LXA₄ 投与でも同等の効果が検出できたが C57-15LOX 移植細胞による LXA₄ の局所産生量は少なく検出方法等に工夫する必要がある。

リポキシゲナーゼ系は強皮症の皮膚病変や間質性肺炎で 5-LOX の過剰発現により LTB₄ が過剰に産生していることが報告されている。腎線維化やメサンジウム細胞増殖でも LXA₄ は抑制的に作用し機能制御に関与していることが報告されている。皮膚病変進展抑制に LXA₄ が関与する可能性もあり検討の必要がある。

E. 結論

レトロウイルスベクターによるヒト 15-LOX cDNA を高発現したマウス線維芽細胞を移植する Cell Therapy によりマウス間質性肺炎モデルの炎症、線維化の抑制が観察された。炎症局所による LXA₄ 誘導による抑制と考えられる。線維化病変に対するあらたな治療戦略が想定された。

F. 参考文献

1. Chang Nan, Arita Makoto, Sherhan CN, Anti-inflammatory circuitry: Lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids, 73, 163-177, 2005.
2. Kowal-Bielecka O, Kowal K, Distler O, Rojewski J, Bodzenta-Lukaszyk A, Michel BA, Gay RE, Gay S, Sierkowski S, Cyclooxygenase-and Lipoygenase-derived eicosanoids in