

2008J4044A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業
強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 伸一

平成21年（2009年）3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業
強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 伸一

平成21年（2009年）3月

【目 次】

班員名簿

I. 総括研究報告

- 強皮症における病因解明と根治的治療法の開発 1
研究代表者 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)

II. 分担研究報告

1. プレオマイシン誘導性強皮症モデルマウスにおける、transforming growth factor- β (TGF β) を標的とした皮膚硬化抑制の試み 5
研究分担者 山本俊幸 (福島県立医科大学医学部皮膚科)
協力者 尾山徳孝, 若槻(中村)妙子
2. Tight skin(TSK)マウスにおけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果10
研究分担者 小川文秀 (長崎大学医学部附属病院皮膚科・アレルギー科)
協力者 原 肇秀, 室井栄治, 吉崎 歩
研究代表者 佐藤伸一
3. 全身性強皮症患者の指尖部潰瘍に対するボセンタン治療17
研究分担者 川口鎮司 (東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター)
協力者 大田ゆう子, 高木香恵, 栃本明子, 原 まさ子
4. 高圧酸素療法が有効であった全身性強皮症に伴う指趾潰瘍の4例22
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院皮膚機能病態学)
協力者 青井 淳, 牧野貴充, 永廣利恵, 吉野雄一郎
5. IL-2/18誘導間質性肺炎の病態解明とTGF- β シグナル制御による治療効果の検討26
研究分担者 後藤大輔 (筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学)
協力者 瀬川誠司, 吉賀洋平, 林 太智, 松本 功, 伊藤 聡, 住田孝之
6. 全身性強皮症間質性肺炎のLipoxinA₄ (LXA₄)産生異常と実験間質性肺炎におけるLXA₄による治療効果34
研究分担者 遠藤平仁 (北里大学医学部膠原病・感染内科学)
協力者 北里英郎, 橋本 篤
7. シクロホスファミド静注およびステロイド内服併用療法による間質性肺病変合併強皮症の4年間の治療成績40
研究分担者 川口鎮司 (東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター)
協力者 栃本明子, 高木香恵, 大田ゆう子, 立石睦人, 原 まさ子

8. 強皮症(SSc)合併間質性肺炎に対するシクロホスファミドパルス療法後の維持療法としてミゾリピンを用いた2例 48
 研究代表者 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)
 協力者 吉崎 歩, 築場広一, 岩田洋平, 小村一浩
 研究分担者 小川文秀
9. サイクロホスファミドパルス療法後にシクロスポリンによる後療法を要した活動性間質性肺炎合併全身性強皮症 54
 研究協力者 小寺雅也(社会保険中京病院皮膚科)
 協力者 臼田俊和, 飯島亜由子, 村瀬由美, 加藤恵子, 岩田洋平
10. 強皮症に伴う末期間質性肺疾患に対するボセンタンの有効性 59
 研究分担者 桑名正隆(慶應義塾大学医学部内科)
 協力者 古屋善章
11. 強皮症早期重症例の長期経過観察—中間報告— 64
 研究協力者 長谷川 稔(金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学)
 研究分担者 石川 治, 尹 浩信, 遠藤平仁, 川口鎮司, 桑名正隆, 後藤大輔,
 高橋裕樹, 藤本 学
 協力者 久保正英, 佐々木哲雄, 室 慶直, 竹原和彦
 研究代表者 佐藤伸一
12. ブレオマイシン(BLM)誘発強皮症(SSc)マウスモデルにおける細胞接着分子の役割に関する検討 73
 研究代表者 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)
 協力者 吉崎 歩, 築場広一, 岩田洋平, 小村一浩,
 研究分担者 小川文秀
13. ブレオマイシン誘導性強皮症マウスモデルにおけるinducible costimulator(ICOS)、inducible costimulator ligand(ICOSL)の役割に関する検討 90
 研究協力者 長谷川 稔(金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学)
 協力者 田中千洋, 濱口儒人, 竹原和彦
 研究分担者 藤本 学
 研究代表者 佐藤伸一
14. 皮膚創傷治癒ならびに線維化過程における骨髄由来細胞のコラーゲン産生への関与 100
 研究協力者 稲垣 豊(東海大学医学部基盤診療学系)
 協力者 東山礼一, 洪沢弥生
 研究分担者 石川 治
 研究代表者 佐藤伸一
15. 強皮症末梢血単球のフェノタイプ解析 108
 研究分担者 桑名正隆(慶應義塾大学医学部内科)
 協力者 増田絢子, 安岡秀剛, 山口由衣, 岡崎有佳, 佐藤隆司

16. CTGF遺伝子多型と強皮症発症との関与……………115
 研究分担者 川口鎮司（東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター）
 研究分担者 桑名正隆，藤本 学
 研究協力者 土屋尚之，長谷川 稔
 研究代表者 佐藤伸一
 協力者 大田ゆう子，高木香恵，栃本明子，竹原和彦，伊東郁恵
17. 全身性強皮症とinterferon regulatory factor 5 (IRF5)領域遺伝子多型の関連……………121
 研究協力者 土屋尚之（筑波大学大学院人間総合科学研究科）
 協力者 伊東郁恵，川崎 綾，竹原和彦，原 まさ子
 研究分担者 川口鎮司，藤本 学
 研究協力者 長谷川 稔
 研究代表者 佐藤伸一
18. タキサン製剤による皮膚硬化形成機序についての検討 ……………129
 研究分担者 石川 治（群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学）
 協力者 山中正義，岡田悦子
 研究代表者 佐藤伸一
19. ガドリニウムによる皮膚線維化・石灰化形成機序についての検討……………137
 研究分担者 石川 治（群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学）
 協力者 岡田悦子，山中正義
 研究代表者 佐藤伸一
20. 強皮症皮膚由来線維芽細胞におけるalpha2(I) collagen遺伝子転写活性化に寄与する調節配列の検討……………146
 研究分担者 尹 浩信（熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学分野）
 協力者 神人正寿
21. 低酸素刺激による真皮線維芽細胞のI型コラーゲン代謝とHIF-1との関連……………153
 研究分担者 石川 治（群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学）
 協力者 横山洋子，安部正敏
 研究代表者 佐藤伸一
22. bFGFによる培養ヒト皮膚線維芽細胞増殖刺激の機序について ……………160
 研究分担者 尹 浩信（熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学）
 協力者 牧野貴充，伊方勝敏，藤澤明彦，神人正寿，井上雄二
23. 全身性強皮症の12-Lipoxygenase (12-LOX) 過剰発現に関する検討……………170
 研究分担者 遠藤平仁（北里大学医学部膠原病・感染内科学）
 研究協力者 橋本 篤
24. 全身性強皮症(SSc)における血清Pentraxin3 (PTX3)値と臨床症状の検討……………175
 研究代表者 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）
 協力者 岩田洋平，吉崎 歩

25. 全身性強皮症患者血清における血管新生因子の検討183
 研究分担者 藤本 学 (金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学)
 協力者 濱口儒人, 竹原和彦
 研究協力者 長谷川 稔
 研究代表者 佐藤伸一
26. 新規抗リン脂質抗体「フォスファチジルセリン依存性IgM型抗プロトロンビン抗体」
 の臨床的意義191
 研究協力者 山崎雅英 (金沢大学大学院医学系研究科血液内科)
 研究協力者 長谷川 稔
 研究分担者 藤本 学
 協力者 竹原和彦
27. 全身性強皮症患者におけるダーモスコープを用いた爪上皮出血点ならびに拡大し
 た爪郭毛細血管ループの観察198
 研究代表者 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)
 協力者 室井栄治, 原 肇秀, 築場広一
 研究分担者 小川文秀
28. 全身性強皮症における毛細血管拡張のダーモスコピー所見の検討204
 研究分担者 藤本 学 (金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学)
 研究協力者 長谷川 稔
 協力者 濱口儒人, 竹原和彦
29. 強皮症の肺病変の評価における6分間歩行後の前額部経皮的末梢酸素飽和度の有
 用性の検討209
 研究協力者 麦井直樹 (金沢大学医学部附属病院リハビリテーション部)
 研究協力者 長谷川 稔
 研究分担者 藤本 学
 協力者 生田宗博, 染矢富士子, 八幡徹太郎, 堀江 翔, 竹原和彦
 研究代表者 佐藤伸一
30. 全身性強皮症における下部消化管通過機能の定量化法の考案219
 研究協力者 中嶋憲一 (金沢大学医薬保健研究域医学系・核医学)
 協力者 稲木杏史
31. 強皮症と多発性筋炎/皮膚筋炎における間質性肺炎の比較検討224
 研究協力者 安井正英 (金沢市立病院呼吸器科)
 研究分担者 長谷川 稔
 協力者 竹原和彦
32. 全身性強皮症における関節炎の検討231
 研究分担者 高橋裕樹 (札幌医科大学医学部第一内科)
 協力者 山本元久, 鈴木知佐子

| | |
|--|-----|
| 33. 抗U3 RNP抗体陽性全身性強皮症8例の臨床的特徴について | 237 |
| 研究分担者 藤本 学 (金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学) | |
| 協力者 濱口 儒人, 竹原和彦 | |
| 研究協力者 長谷川 稔 | |
| 研究代表者 佐藤伸一 | |
| 34. 薬剤性赤芽球癬を伴った全身性強皮症の1例 | 244 |
| 研究分担者 石川 治 (群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学) | |
| 協力者 須藤麻梨子, 長谷川道子, 永井弥生 | |
| 研究代表者 佐藤伸一 | |
| 35. Tumoral calcinosisを合併した全身性強皮症の1例 | 251 |
| 研究分担者 石川 治 (群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学) | |
| 協力者 長谷川道子, 曾我部陽子, 永井弥生 | |
| 研究代表者 佐藤伸一 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 255 |

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発班
班員名簿

| 区分 | 氏名 | 所属等 | 職名 |
|-------|-------|---|-------|
| 研究代表者 | 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 |
| 研究分担者 | 石川 治 | 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学 | 教授 |
| | 尹 浩信 | 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学 | 教授 |
| | 山本 俊幸 | 福島県立医科大学医学部皮膚科 | 教授 |
| | 遠藤 平仁 | 北里大学医学部膠原病・感染内科学 | 准教授 |
| | 川口 鎮司 | 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター | 准教授 |
| | 桑名 正隆 | 慶應義塾大学医学部内科学教室リウマチ内科 | 准教授 |
| | 高橋 裕樹 | 札幌医科大学第一内科 | 准教授 |
| | 藤本 学 | 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科 | 准教授 |
| | 小川 文秀 | 長崎大学医学部附属病院皮膚科・アレルギー科 | 講師 |
| | 後藤 大輔 | 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾病制御医学専攻臨床免疫学(膠原病リウマチアレルギー) | 講師 |
| 研究協力者 | 稲垣 豊 | 東海大学医学部基盤診療学系 | 教授 |
| | 土屋 尚之 | 筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻 | 教授 |
| | 中嶋 憲一 | 金沢大学大学院医学系研究科バイオトレーサ診療学(核医学診療科) | 講師 |
| | 長谷川 稔 | 金沢大学医学部附属病院皮膚科 | 講師 |
| | 小寺 雅也 | 社会保険中京病院皮膚科 | 医長 |
| | 安井 正英 | 金沢市立病院呼吸器科 | 医長 |
| | 山崎 雅英 | 金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学(血液内科) | 助教 |
| | 麦井 直樹 | 金沢大学医学部附属病院リハビリテーション部 | 作業療法士 |

I. 総括研究報告

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

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

| | | |
|-------|------|----------------------------------|
| 研究代表者 | 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 |
| 研究分担者 | 石川 治 | 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学 教授 |
| 研究分担者 | 尹 浩信 | 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学 教授 |
| 研究分担者 | 山本俊幸 | 福島県立医科大学医学部皮膚科 教授 |
| 研究分担者 | 遠藤平仁 | 北里大学医学部膠原病・感染内科学 准教授 |
| 研究分担者 | 川口鎮司 | 東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター 准教授 |
| 研究分担者 | 桑名正隆 | 慶応義塾大学医学部内科学教室リウマチ内科 准教授 |
| 研究分担者 | 高橋裕樹 | 札幌医科大学医学部第一内科 准教授 |
| 研究分担者 | 藤本 学 | 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 准教授 |
| 研究分担者 | 小川文秀 | 長崎大学医学部・歯学部附属病院皮膚科・アレルギー科 講師 |
| 研究分担者 | 後藤大輔 | 筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫学 講師 |

A. 研究目的

全身性強皮症(systemic sclerosis; SSc)は皮膚および肺、腎、消化管、心をはじめとする内臓諸臓器を系統的に侵す慢性疾患であり、膠原病に分類される。SSc は1)膠原線維の増生(皮膚硬化、肺線維症)、2)血管病変(レイノー症状、指尖部虫喰状瘡痕・潰瘍、肺高血圧症、強皮症腎クリーゼ)、3)自己免疫(自己抗体)といった3つの病態よりなる。

膠原線維の増生については、線維芽細胞の内在的な機能異常によってコラーゲン産生が増加するという仮説や、皮膚に浸潤するT細胞がサイトカインを産生し、それが線維芽細胞を刺激してコラーゲン産生を増加させるという仮説が提唱

されている。しかし、血管病変がどのような機序で起こるのか、さらに血管病変と膠原線維の増生の間にはどのような因果関係が存在するのか、自己免疫は膠原線維の増加や血管病変とどのように関係するのか、などについては未だ不明といわざるを得ない。従って、現時点ではこの3つの病態を統一的に説明しうる一元化された病態仮説は見いだされていない。

また、治療に関しても、近年シクロホスファミドがSScに伴う間質性肺炎に対してプラセボと比較して初めてその有効性が示された。しかしながら、シクロホスファミド治療終了1年後にはその有効性が消失することから、シクロホスファミド治療がSScの根治的治療となり得るかどうかについては

未だ一定の見解がない。その他、様々な薬剤がSScに対して試みられてはいるものの、未だ根治的治療たり得るものは見いだされていないのが現状である。

本研究では、実績のある本邦のSScの専門家を過不足なく集め研究チームを編成することによって、SScの病因解明、そして根治的治療法の開発に向けた研究を計画した。

1. 基礎研究—病因・病態解明プロジェクト

(1) 自己免疫と免疫学的異常

SScではT細胞、B細胞などの様々な免疫担当細胞の異常がこれまで報告されている。さらに、SSc病変部では、T細胞やマクロファージなどが浸潤し、線維化を誘導するサイトカインを産生することによってSScのコラーゲン合成を惹起しているとする考えもある。そこで、プレオマイシン誘発SScモデルにおいて、T細胞などの免疫担当細胞の浸潤に重要な役割を果たす細胞接着分子の皮膚硬化への関与を検討した。さらに、同様のSScモデルにおいてT細胞の活性化に必要なICOSとICOSLの役割も検討した。SSc患者末梢血単球のフェノタイプについてもDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その他、interferon regulatory factor 5 (IRF5)の遺伝子多型についても解析した。

(2) コラーゲン産生亢進を誘導する線維芽細胞異常

SScで見られるコラーゲン産生増加の機序の一つとして、 $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写活性が、SSc由来皮膚線維芽細胞で上昇していることが見いだされている。今回その活性化に関与する転写制御領域および転写因子の同定を試みた。また、SScで観察されるコラーゲンの過剰な産生

に重要な役割を果たしているとされているconnective tissue growth factor (CTGF)の遺伝子多型についても解析を行った。

(3) SSc動物モデルを用いた薬剤の有効性のスクリーニング

プレオマイシン誘導性SScモデル、tight-skin (TSK)マウス、IL-2/18誘導間質性肺炎モデルを用いて、ヒストン・デアセチラーゼ阻害剤(trichostatin A; TSA)を始めとした各種薬剤の有効性についてスクリーニングを行った。

2. 臨床研究

(1) 竹原班によって2002年に開始された重症型のSSc早期例の登録および経過観察プロジェクトにおいて、まずは金沢大学の症例について予備的に、臓器病変の進行と相関する血清学的指標の抽出を試みた。

(2) 肺線維症に対するシクロホスファミド療法の後療法として、既存薬のミノリピンやシクロスポリンの有効性について検討した。

(3) その他、既存の治療薬で、本症に有効と考えられる以下の薬剤についても有効性を検証した：
①間質性肺炎に対するシクロホスファミド静注療法の4年間の経過観察結果、②血管病変に対するエンドセリン受容体拮抗薬(ボセンタン)の有効性、③末期間質性肺炎疾患に対するボセンタンの有効性、④皮膚潰瘍に対する高圧酸素療法の有効性。

(4) ダーモスコピーを用いて爪郭部の毛細血管を拡大することにより、血管障害の検出感度を高めた早期診断法の有用性を検討した。

B. 研究方法と研究結果

1. 基礎研究—病因・病態解明プロジェクト

(1) 自己免疫と免疫学的異常

ブレオマイシン誘発SScモデルにおいて、T細胞などの免疫担当細胞の浸潤に重要な役割を果たしている細胞接着分子の皮膚硬化への関与を検討したところ、L-セレクチンやICAM-1を欠損したマウスでは皮膚硬化や間質性肺炎の改善が見られた(佐藤)。逆に、P-セレクチンやE-セレクチンを欠損したマウスでは、線維化の悪化が認められた。この結果は、線維化を軽減するような免疫担当細胞が存在し、その細胞の臓器への浸潤はP-セレクチンやE-セレクチンに依存することを示唆している。従って、ヒトのSScでも線維化を軽減するような免疫担当細胞が存在し、それを移入することによって線維化が改善する可能性を示唆する研究成果である。

さらに、同じSScモデルにおいてT細胞の活性化に必要なICOSとICOSLの役割も検討した。T細胞に発現するICOSを欠くマウスでは、肺や皮膚の線維化が改善した(長谷川)。従って、ICOSは線維化治療の有望なターゲットとなることが示唆された。さらに、ヒトSSc末梢血単球における遺伝子発現についてDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) 産生がSScでは健康人と比較して高発現していることが明らかとなった(桑名)。従って、MCP-1がSScの線維化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

I型インターフェロンの誘導に関与する転写因子であり、炎症性サイトカインの産生を誘導するIRF5の遺伝子多型についても解析したが、IRF5の5kb下流に位置するrs2280714においてIRF5 mRNAの増加と相関するAアレルの頻度が、SSc、

特にSScの重症型で有意に増加していることを見いだした(土屋)。

(2) コラーゲン産生亢進を誘導する線維芽細胞異常

SSc由来皮膚線維芽細胞で上昇している $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写活性には、Sp1、Ets、及び Smad 結合部位を含む領域が必要であることが見いだされ、SScで見られるコラーゲン産生増加の分子機序の一端が解明された(尹)。

また、SScで観察されるコラーゲンの過剰な産生に重要な役割を果たしていると考えられている CTGF の遺伝子多型について、CTGF 遺伝子の翻訳開始部位から -945 の single nucleotide polymorphism (SNP, rs6918698) G/C を検討したところ、日本人SSc患者ではGアレルの頻度が健康人に比較して有意に高いことが示された(川口)。この研究成果は、CTGF 遺伝子が日本人においてSScの疾患感受性遺伝子の一つであることを示唆している。

(3) SSc 動物モデルを用いた薬剤の有効性のスクリーニング

ブレオマイシン誘導性SScモデルにおいて、TGF β 1 latency associated peptide の投与により皮膚硬化が改善されることが明らかとなった(山本)。さらに、TSKマウスで、ヒストン・デアセチラーゼ阻害剤であるTSAを投与したところ皮膚硬化の改善が認められた(小川)。IL-2/18誘導間質性肺炎モデルでは、TGF- β シグナル抑制によって間質性肺炎の改善が見られた(後藤)。さらに、ブレオマイシン誘発性間質性肺炎モデルにおいて、lipoxin A₄産生酵素15-LOX遺伝子導入によって間質性肺炎の軽減と生存率の改善を認めた(遠藤)。このように、本年度はSSc治療

のターゲットとなる候補分子をいくつか同定することができた。

2. 臨床研究

竹原班によって2002年に開始された重症型のSSc早期例の登録および経過観察プロジェクトにおいて、まずは金沢大学の症例について予備的に検討したところ血清中MCP-1やIL-6値などが上昇しており、肺線維症や皮膚硬化と関連することが明らかとなった(長谷川)。

肺線維症に対するシクロホスファミド療法の後療法として、ミゾリピンやシクロスポリンが有効であることを示唆する報告がなされた(佐藤、小寺)。

その他、間質性肺炎に対するシクロホスファミド静注療法後4年間の経過観察の結果、1年目以降の再発が半数で見られることが明らかとなった(川口)。エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンが、指尖部潰瘍やレイノー症状を改善することを示唆する報告がなされた(川口)。さらに、末期間質性肺疾患に対してボセンタン投与群では、生命予後が改善される傾向が認められた(桑名)。最後に、皮膚潰瘍に対する高圧酸素療法の有効性を示す報告もなされた(尹)。これらの薬剤の有効性については、今後症例数を増やして検討を続ける必要がある。

ダーモスコピーを用いて爪郭部の毛細血管を拡大することにより、血管障害の検出感度を高めた早期診断法の有用性を検討したところ、本方法で拡張毛細血管が2個以上の指を1本以上認める場合には、高い感度と特異度でSScの診断が可能となり、早期診断法としての有用性が示された(佐藤)。

C. 結論

基礎研究では、線維化への細胞接着分子の関与、SSc由来単球のフェノタイプの同定、コラーゲン遺伝子転写活性亢進の分子機序の解明、CTGF遺伝子多型の同定が主な進歩であった。さらに、動物モデルを用いて、ヒストン・デアセチラーゼ阻害剤など治療のターゲットとなる候補分子をいくつか同定することができた。

臨床研究では、重症型のSSc早期例の登録プロジェクトで、病気の進行と関連する可能性のある血清学的指標の候補を同定した。さらに、肺線維症に対するシクロホスファミド療法の後療法として、ミゾリピンやシクロスポリンが有効である可能性も示された。その他、末期間質性肺疾患や血管病変に対するエンドセリン受容体拮抗薬の有効性が示唆された。最後にダーモスコピーを用いて爪郭部の毛細血管を拡大することによる早期診断法が示された。

II. 分担研究報告

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

ブレオマイシン誘導性強皮症モデルマウスにおける、transforming
growth factor- β (TGF β)を標的とした皮膚硬化抑制の試み

| | | |
|-------|----------|------------------|
| 研究分担者 | 山本俊幸 | 福島県立医科大学医学部皮膚科教授 |
| 協力者 | 尾山徳孝 | 福島県立医科大学医学部皮膚科講師 |
| 協力者 | 若槻(中村)妙子 | 福島県立医科大学医学部皮膚科 |

研究要旨

皮膚硬化においてはさまざまなサイトカイン、ケモカインや細胞増殖因子が関与していることが知られている。中でも TGF β は線維芽細胞の増殖を促すとともに、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスの産生を促進することで、その中心的な役割を果たす。生体内における TGF β は、そのほとんどが latency-associated peptide(以下 LAP)と結合した潜在型として存在しており、潜在型 TGF β の活性化は TGF β 活性の極めて重要な過程である。今回我々はブレオマイシン(以下 BLM)で誘導した強皮症モデルマウスの皮膚硬化部位に、LAP を同時投与することによって、活性型 TGF β 1 の潜在化を介した皮膚硬化抑制を試みた。50ng/ml、500ng/ml の LAP を総量 2ml 局所投与することにより、皮膚硬化の誘導は有意に抑制され、病理組織学的に真皮内の肥厚した膠原線維束が減少し、真皮内の肥満細胞数も減少した。さらに LAP 投与において、皮膚組織中の活性型 TGF β 1 濃度は有意に抑えられた。以上の結果より、皮内の LAP 連続投与により、活性型 TGF β 1 の潜在化を介した皮膚硬化抑制が確認された。

A. 研究目的

強皮症において進行する皮膚硬化に対しては、未だ確立された治療法がないのが現状である。また強皮症のみならず、皮膚硬化を来す様々な疾患において、細胞外マトリックスの維持、分解などを調節し、線維芽細胞増殖に促進的に働く TGF β の中心的な役割は広く知られている¹⁾。

強皮症においては患者皮膚組織中で、血管周囲の炎症細胞周囲に TGF β および type 1 collagen の mRNA の発現が亢進していることが確認されており²⁾、強皮症の病態形成の初期段階において TGF β が重要な役割を果たしている

と考えられる。現在強皮症をはじめとする皮膚硬化を来す疾患において、TGF β を抑制するための様々な治療的試みが行われている。しかし実際には TGF β 1 中和抗体を用いた強皮症の治療段階の治療では、明らかな臨床症状の改善には結びつかず、新たな TGF β の抑制系が模索されている³⁾。

TGF β は生体内では2量体として存在し、そのほとんどが病変部に浸潤した炎症細胞や線維芽細胞、血小板など様々な細胞から潜在型として産生される。そして熱や酸、プラスミンなどの作用によって LAP が外れて活性化⁴⁾。これまでにも GVHD や肝線維化、肺線維化などに対し

てLAPを用いた治療的試みが行われてきた⁵⁾⁶⁾。我々はこれまでBLM誘導性の強皮症モデルマウスを用いて、様々な実験的治療を試みてきた⁷⁾。今回はこのTGF β の特性を踏まえ、マウスと相同性の高いhuman LAPのリコンビナント蛋白をマウス皮内に投与することで、BLM誘導性の皮膚硬化病変の病態抑制につながるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 強皮症モデルマウスの作成

6週齢のCH3/HeJメスマウスを用い、背部皮膚を剃毛の後、皮下にPBSで溶解したブレオマイシン(BLM)(日本化薬)250 μ g/mlを0.1ml/day4週間連続、5回/週(総量2ml)皮内投与した。

2) LAPを用いた治療

BLM投与部位に、human TGF β 1 latency associated peptide (RSD)を、4週間連続、5回/週(総量2ml)同時に皮内投与した。投与濃度は50ng/ml群、500ng/ml群、コントロールとしてのPBS投与群とし、それぞれの群において4~6匹のマウスを用いた。

3) ELISA

皮膚組織中のTGF β 1濃度測定は、硬化を起こした皮膚片(各々3mg)をホモジェネードして上清を抽出し、mouse TGF β 1 ELISAシステム(RSD)を用いて行った。

4) 免疫染色

パラフィン切片を用いて、ヘマトキシリンエオジン染色およびマツソントリクローム染色、トルイジンブルー染色を行った。

5) コラーゲン定量

硬化誘導部位の皮膚組織をLAP投与群、コントロール群から2箇所(3mg)採取し、1mol CH₃COOHでホモジェネードしたのち、Sircol

Collagen Assay kit(Biocolour)を用いて、真皮内コラーゲンの定量を行った。

C. 研究結果

1) BLM投与による皮膚硬化誘導

BLM250 μ g/mlおよびPBS4週間投与にて、真皮全層にわたって肥大した膠原線維束が密に増加し、病理組織学的に皮膚の硬化が誘導されていることを確認した。(図1)

2) LAP投与による真皮内膠原線維厚の抑制

LAP投与群はPBS群と比較し、HE染色、マツソントリクローム染色ともに、肥厚した真皮内膠原線維束の減少が明らかに認められた。(図2)

マツソントリクローム染色で濃染した膠原線維の厚さを計測したところ、コントロール群と比較し、LAP投与群では有意に膠原線維束の厚さが減少していた。(図3)

3) 皮膚組織中のTGF β 1濃度の抑制

LAP投与群において、BLMによって誘発された皮膚硬化部位の活性型TGF β 1濃度は、有意に抑制された。(図4)

4) 真皮内コラーゲン定量

LAP投与濃度に依存して、コラーゲン量が減少する傾向が見られたが、各群に統計的な有意差は得られなかった。(図5)

5) 肥満細胞浸潤の抑制

トルイジンブルー染色後、真皮内に浸潤した肥満細胞数をカウントしたところ、コントロールに比較して、LAP投与群では有意に減少していた。(図6)

D. 考案

今回の検討ではBLM誘導性強皮症モデルマウスにおいて、皮内のLAP連続投与により、病理組織学的に有意に皮膚硬化を抑制することが確認できた。またLAP投与部の皮膚組織中の

活性型 TGF β 1 蛋白濃度は、コントロール群と比較して、明らかに低下していた。これらより BLM によって誘導される皮膚硬化は、活性型 TGF β 1 を介して促進され、さらに LAP の投与によって活性型 TGF β 1 を潜在化することで、抑制されることが示された。

しかし実際の皮膚組織中の総 TGF β 1 濃度はかなり高値であり、そのうちの程度の活性型 TGF β 1 が LAP の投与により潜在型に置換されたかは不明である。また肥大した膠原線維の厚さ、LAP 投与部の皮膚組織中の活性型 TGF β 1 濃度の減少は、投与した LAP 濃度(50mg/ml, 500ng/ml)への依存は見られなかった。

肥満細胞は CCL-2 や CCL-5 などのケモカインや様々な細胞成長因子を産生し、強皮症の病態形成に寄与すると考えられている⁸⁾。今回の検討においても浸潤した肥満細胞数は、LAP 投与群で減少しており、LAP 投与による皮膚硬化抑制が、肥満細胞の浸潤を抑制することが、一つの機序と考えられた。真皮コラーゲン量において、LAP 投与群とコントロール群で統計学的な有意差が得られなかったが、測定時の皮膚組織サンプルがかなり少量であり、各群にばらつきが出てしまったためと考えられ、今後追加検討を行う予定である。

今後は LAP の投与適切な投与濃度、投与時期、皮膚硬化抑制の持続期間などについて、さらに詳細に検討する必要がある。また LAP 投与の影響下における TGF β 、CTGF をはじめとする様々な細胞調節因子やサイトカインの mRNA 発現についての検証を行う予定である。

E. 結論

BLM 誘導性強皮症モデルマウスの皮膚局所において、BLM とともに LAP を 4 週間連続で皮内同時投与することで、真皮内の肥大した膠原

線維の増生は減少し、皮膚硬化の誘導は有意に抑制された。また LAP 投与により、皮膚局所の TGF β 1 の産生が抑えられた。さらに皮膚病変部に浸潤する肥満細胞の数は、LAP 投与群で減少した。

F. 文献

- 1) Akhurst JR: TGF β signaling in health and disease: Nature genetics 2004;36,8,790-792
- 2) Kulozik M et al.: Co-Localization of Transforming Growth Factor β 2 with α 1(1) Procollagen mRNA in Tissue Sections of Patients with Systemic Sclerosis: J Clin Invest 1990, 86, 917-922
- 3) Denton PC et al.: Recombinant Human Anti-Transforming Growth Factor β 1 Antibody Therapy in Systemic Sclerosis: Arthritis and Rheumatism 2007,51,323-333
- 4) Taipale J et al.: Latent Transforming Growth Factor β 1 Associates to Fibroblast Extracellular Matrix via Latent TGF β Binding Protein: J Cell Biol 1994,124,171-181
- 5) Bottinger PE et al.: The recombinant proregion of transforming growth factor β 1 (Latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor β 1 in transgenic mice: Proc Natl Acad Sci 1996,93,5877-5882
- 6) Zang Y et al.: Latency-Associated Peptide Prevents Skin Fibrosis in Murine Sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease, a Model for Human

Scleroderma: J Invest Dermatol 2003,
121,713-719

345-356

- 7) Yamamoto T: The bleomycin-induced
scleroderma model: what have we
learned for scleroderma pathogenesis?:
Arch Dermatol Res 2006,297,333-344
- 8) Yamamoto T: Chemokines and
Chemokine Receptors in Scleroderma:
Int Arch Allergy Immunol 2006, 140,

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ブレオマイシン投与による皮膚硬化

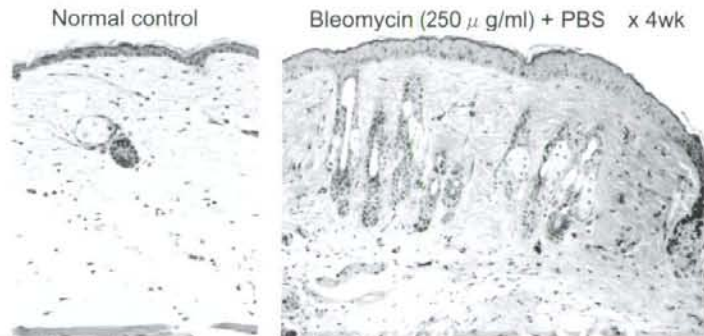


図1:何も投与していないマウス皮膚組織と、ブレオマイシン 250 μ g/ml \times 5 回/週を4週間連皮下投与した皮膚硬化部位の病理組織像。

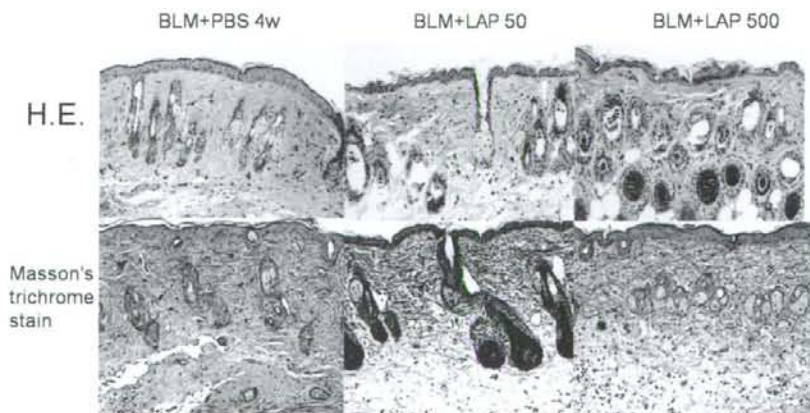


図2: HE染色、マッソントリクローム染色
コントロール群およびLAP投与群における皮膚硬化部位の肥大した膠原線維束の比較。

真皮 膠原線維の厚さ

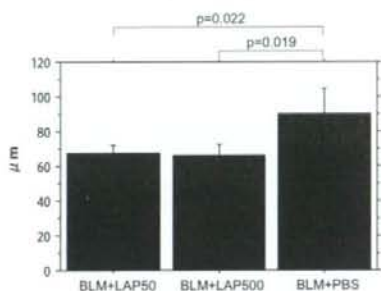


図 3: マッサントリクローム染色で濃染した、真皮膠原線維の厚さの比較。

皮膚組織中の活性型TGFβ1濃度

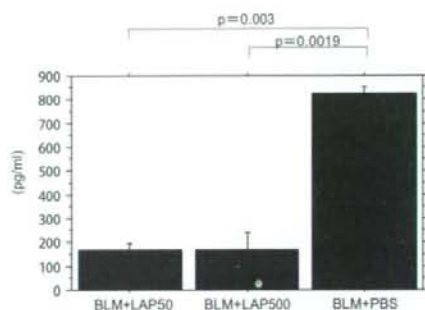


図 4: 皮膚組織中の活性型 TGFβ1 の比較。

真皮コラーゲン定量 (sircol collagen assay)

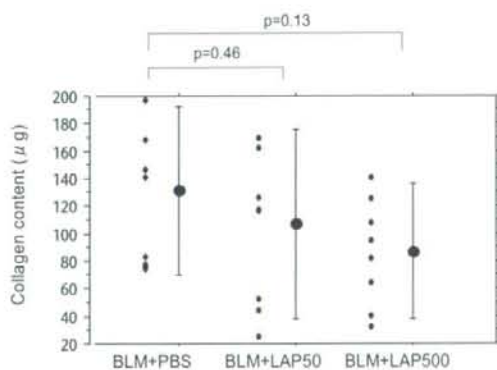


図 5: 真皮内コラーゲン定量。

真皮内の肥満細胞数

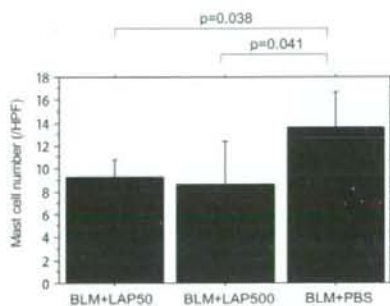


図 6: 真皮内に浸潤した肥満細胞数の比較。

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) マウスにおけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果

| | | | |
|-------|------|-----------------------|----|
| 研究分担者 | 小川文秀 | 長崎大学医学部附属病院皮膚科・アレルギー科 | 講師 |
| 協力者 | 原 肇秀 | 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 | 助教 |
| 協力者 | 室井栄治 | 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 | 助教 |
| 協力者 | 吉崎 歩 | 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 | 医員 |
| 研究代表者 | 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 |

研究要旨

全身性強皮症(systemic sclerosis; SSc)の線維芽細胞はコラーゲンや他の細胞外マトリクスの産生が非常に高いという特徴を持つ。この線維化のメカニズムをヒストンのアセチル化・脱アセチル化に注目し研究を行った。強皮症マウスモデルである TSK/+マウスに、ヒストン脱アセチル酵素阻害剤であるトリコスタチン A(TSA)を局注し、皮膚硬化が改善されるかどうかを検討した。TSK/+マウスの背部に TSA(0.5 µg/g/day)を週 5 回、4 週間局注した。組織学的に皮下組織の菲薄化を認め皮膚硬化の改善が確認できた。また、採取皮膚からの mRNA 発現を検討したところ、COL1A、FGF、IL-4、IL-6 などの発現抑制が認められた。一方、TSA 投与の前後では、抗トポイソメラーゼ I 抗体の発現に変化は認められなかった。さらに、TSK/+マウスから培養した線維芽細胞を TSA で刺激したところ、COL1A の発現低下が認められた。以上の結果から、ヒストン脱アセチル酵素阻害剤は SSc の治療薬となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

SSc は皮膚および内臓諸臓器の線維化を特徴とする膠原病であり、全身性免疫疾患に分類されている。SSc の線維芽細胞はコラーゲンや他の細胞外マトリクスの産生が非常に高いという特徴を持つ。しかし、線維芽細胞の活性化のメカニズムは依然として不明なままである。

1) SSc での線維化

SSc では 80%以上の症例でレイノー症状を伴うことが知られている。レイノー症状による虚血再灌流障害の結果生じる酸化ストレスなどの結果 [1,

2]、血管内皮障害、リンパ球・単球の浸潤・活性化が起こり、これら炎症細胞の放出するサイトカインや細胞成長因子などが線維化を誘導していることが考えられている。線維化は細胞外マトリクスの過剰沈着が主体であり、I 型コラーゲン、フィブロネクチン、グリコサミノグリカンなどが増加していると報告されている [3, 4]。このコラーゲン合成亢進は、転写レベルの異常、すなわちコラーゲン遺伝子転写亢進によることが示唆されている。そこで今回、遺伝子の転写を調節する因子について注目した。