

図2 健常人と強皮症患者における、初回登録時のケモカインやサイトカインの血清中濃度。

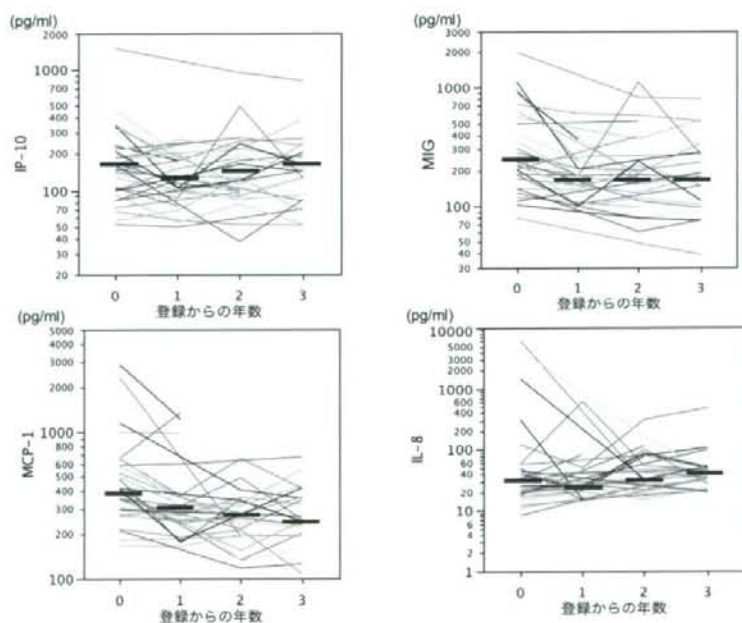


図3 経過中の全症例の血清中ケモカインの変動。短い横線は中央値を示す。

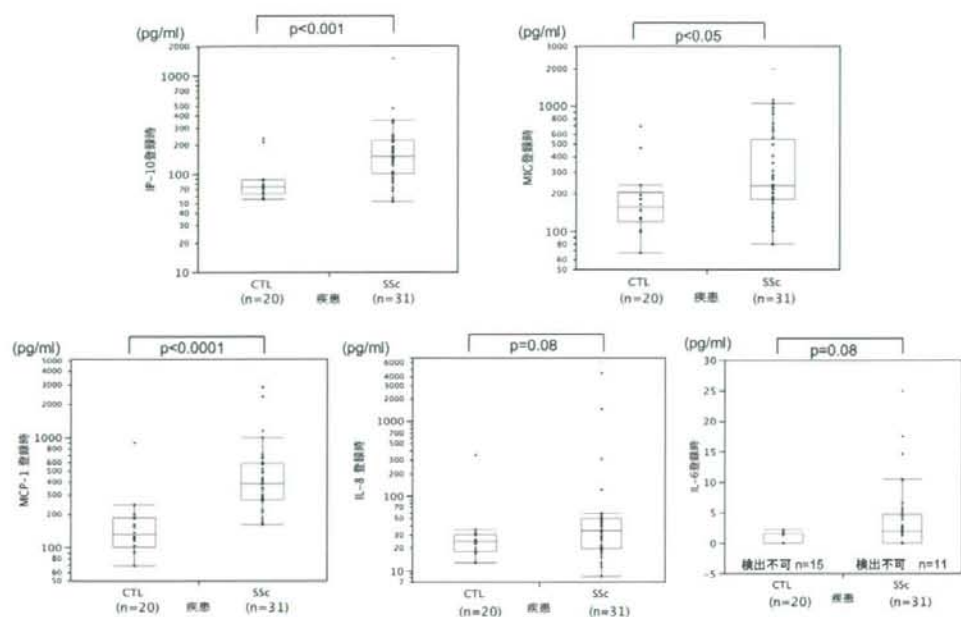


図2 健常人と強皮症患者における、初回登録時のケモカインやサイトカインの血清中濃度。

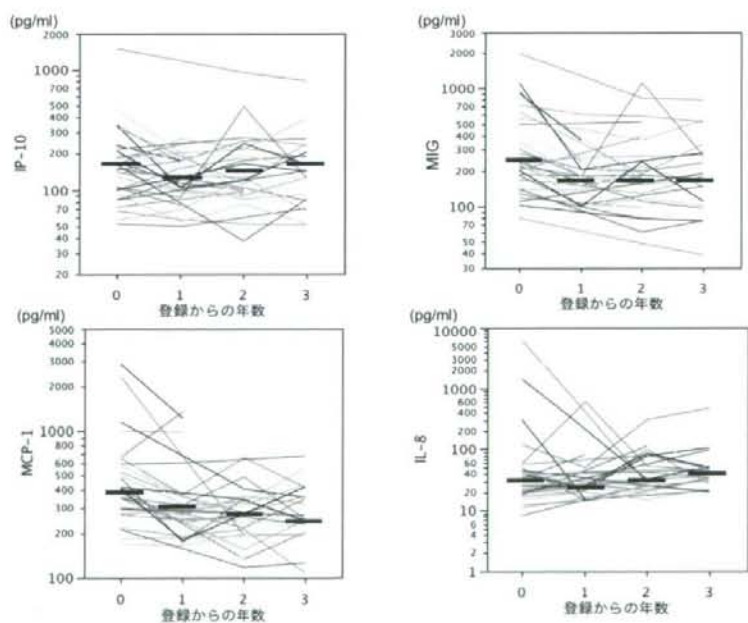


図3 経過中の全症例の血清中ケモカインの変動。短い横線は中央値を示す。

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(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

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
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
協力者	築場広一	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	岩田洋平	社会保険中京病院皮膚科医員
協力者	小村一浩	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教
研究分担者	小川文秀	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学講師

研究要旨

細胞接着分子である L-selectin、ICAM-1、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 を欠損したマウスを用いて BLM 誘発 SSc モデルを作製し、皮膚および肺の線維化における接着分子の役割を検討した。L-selectin、ICAM-1 およびその両者のノックアウトマウスでは皮膚、肺への炎症細胞浸潤、線維化ともに野生型マウスに比べ有意に抑制されており、PSGL-1、P-selectin、E-selectin ノックアウトマウスおよび抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin ノックアウトマウスでは有意に亢進していた。皮膚、肺、血清中のサイトカイン産生において、L-selectin、ICAM-1 およびその両者のノックアウトマウスでは Th1 偏倚を認め、PSGL-1、P-selectin、E-selectin ノックアウトマウスおよび抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin ノックアウトマウスでは Th2、Th17 偏倚を認めた。L-selectin、ICAM-1 およびその両者のノックアウトマウスでは Th2 細胞と Th17 細胞の減少と Th1 細胞の増加が、P-selectin、E-selectin ノックアウトマウスでは Th1 細胞の減少と Th2、Th17 細胞の増加が、PSGL-1 ノックアウトマウスと抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin ノックアウトマウスでは Th1、Th2 細胞の減少と Th17 細胞の増加が気管支肺胞洗浄液中で認められた。野生型脾臓抽出 T 細胞を用いたリンパ球 subset の検討では、Th1 細胞で PSGL-1 の高発現と LFA-1 の低発現が、Th2 細胞と Th17 細胞で LFA-1 の高発現と PSGL-1 の低発現が認められた。このことから、BLM 誘発 SSc モデルにおいて、これらの細胞接着分子は、Th バランスを制御することで皮膚および肺の線維化に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

強皮症(systemic sclerosis; SSc)は免疫学的異常を背景に、皮膚硬化と内臓諸臓器の線維化を

主徴とする疾患で、病因は未だ明らかになっていない(1)。SSc 患者皮膚には CD4⁺ T 細胞の浸潤を認め、サイトカイン産生を介して線維化に寄与して

いるものと考えられている (2)。Th2 サイトカインのひとつであるインターロイキン (interleukin; IL)-4 や Th17 サイトカインのひとつである IL-17 は SSc 患者由来線維芽細胞を刺激し膠原線維の産生を増強する (3-7)。さらに SSc 患者血清中の IL-4 と IL-17 の増加が報告されており、Th2、Th17 サイトカインは SSc の皮膚硬化および肺線維化に密接に関与していると考えられている (3-6, 8)。

ブレオマイシン(BLM)誘発 SSc モデルは皮膚硬化、肺線維症、サイトカイン産生、SSc 特異的自己抗体産生を認め、SSc をよく模倣したモデルと考えられている (9)。加えて、SSc 患者と同様に皮膚および肺における炎症細胞浸潤を認める (9)。近年、炎症細胞の組織への浸潤は、白血球に発現する L-selectin、lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)と、血管内皮細胞に発現する intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、E-selectin、P-selectin を介して行われることが広く知られるようになってきた (10)。それに伴い、疾患動物モデルにおける細胞接着分子の役割に関しても多数報告されている。Tight-skin マウスを用いた研究では、L-selectin、ICAM-1 のノックアウトは皮膚への炎症細胞浸潤を抑制し、線維化を改善する (11)。同様に L-selectin と ICAM-1 のノックアウトは BLM 誘発肺臓炎モデルの肺線維症を改善させ、arthus reaction モデルでは反応の減弱をもたらす (12-14)。抗体を用いた E-selectin、P-selectin、PSGL-1 の障害では arthus reaction を減弱させ、E-selectin、P-selectin、L-selectin、ICAM-1 のノックアウトでも同様に arthus reaction の減弱を認める (15, 16)。このように細胞接着分子の障害、もしくはノックアウトは炎症反応を抑制する

という報告がある一方で、BLM 誘発肺臓炎のモデルでは E-selectin と P-selectin のノックアウトは肺線維症を増悪させるという報告もある (17)。つまり、細胞接着分子と炎症の関与はモデルによって様々であり、BLM 誘発 SSc モデルに関しては未だ検討されていない。

今回我々は、L-selectin、ICAM-1、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 のノックアウトマウスを用いて BLM 誘発 SSc モデルを作製し、細胞接着分子の線維化に果たす役割を検討した。

B. 研究方法

1) マウス

C57BL/6 を背景とする L-selectin ノックアウト^{-/-} マウス、ICAM-1^{-/-} マウス、P-selectin^{-/-} マウス、E-selectin^{-/-} マウス、PSGL-1^{-/-} マウスおよび E-selectin マウス^{+/+} に抗 P-selectin 抗体を投与したマウスと野生型 C57BL/6 マウスを用いた。本研究には 6 週齢のマウスを用いた。BLM (Nippon Kayaku Co. Ltd., Tokyo) をリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) に 1 mg/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛したそれぞれのマウスの背部皮膚へ 4 週間にわたり 27 ゲージの注射針で 300 μ g を連日皮下投与した (18)。コントロールとして PBS のみを BLM と同様の方法でそれぞれのマウスに投与した。以下の解析にはそれぞれ最低 6 匹のマウスを用いた。

2) 組織病理学的検討

4 週間の BLM および PBS 投与が終了したマウスから背部皮膚と肺を採取し、一部をパラフィン包埋し、6 μ m 切片を作製した。ヘマトキシリン&エオジン染色とヴァンギーソン染色を行い、皮膚に関しては一検体中 10 箇所をランダムに選び、表皮、真

皮、皮下脂肪織の厚さを測定した。肺に関しては左中葉のランダムに選ばれた部分を100倍の拡大率で観察し、線維化の程度を Ascroft らの提唱するスコア法で評価した(19)。トルイジンブルー染色を行い、肥満細胞の数を400倍の拡大率で一検体中10箇所をランダムに選び測定した。抗マウス F4/80 抗体(Serotec Inc., Oxford, UK)、抗マウス CD3 抗体(BD PharMingen, San Diego, CA, USA)、抗マウス B220 抗体(BD PharMingen)を用いて免疫染色を行い、それぞれマクロファージ、T細胞、B細胞の数を400倍の拡大率で一検体中10箇所をランダムに選び測定した。以上の測定および検討はマウス病理に精通した2人の検者が盲検し、結果を平均した。

3) 皮膚および肺組織中のハイドロキシプロリン測定

ハイドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれるアミノ酸で、その量はコラーゲン量を反映する。従って、皮膚および肺における線維化を評価するため、それぞれ Matsushita ら(11)、Schrier ら(20)の方法に準じ組織中のハイドロキシプロリン量を測定した。

4) 気管支肺胞洗浄液(BAL)の採取

4週間のBLM及びPBS投与後に、生食1回1mlで肺を軽くマッサージしながら洗浄して洗浄液を回収した。同様の操作を3回繰り返した。BALの回収量は1検体当たり2.5mlであった。回収したBALは細胞数の測定と細胞分画の評価に用いた。細胞数はBurger-Turk算定板を用い算定した。細胞分画の評価はまず、細胞沈殿法により細胞標本を作成し、May-Giemsa染色と、マクロファージに対して抗マウスF4/80抗体(Serotec Inc.)、T細胞に対して抗マウスCD3抗体(BD PharMingen)、B

細胞に対して抗マウスB220抗体(BD PharMingen)を用いて免疫染色を行い検討した。細胞分画は任意に選定した視野で、計200個の細胞を算定して検討した。好中球の同定は形態学的に行った。

5) 血清中のサイトカインの検討

BLMおよびPBS投与が終了したマウスより血清を採取し、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、Interferon (IFN)- γ 、tumor growth factor (TGF)- β 1、および tumor necrosis factor (TNF)- α (Biosource International Inc., Camarillo, CA, USA)の濃度をELISAキットにより測定した。それぞれの検体はduplicateで測定し、平均値を解析に使用した。

6) 皮膚および肺におけるサイトカインの発現量の検討

各マウス皮膚および肺よりRNeasy spin column (Qiagen Inc., Crawley, UK)を用いてmRNAを抽出し、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α の発現量をreal time RT-PCRにて測定した。それぞれの検体はduplicateで測定し、平均値を解析に使用した。

7) マウス皮膚線維芽細胞に対するIL-4、IFN- γ 、IL-17刺激効果の検討

マウス背部皮膚より~らの方法に準じて線維芽細胞を抽出、培養した。線維芽細胞を12時間serum freeとした後、IL-4(10 ng/ml)、IFN- γ (10 ng/ml)、IL-17(50 ng/ml)で24時間刺激した(R&D systems., Minneapolis, MN)。刺激後にmRNAを抽出し、COL1A2とTGF- β 1の発現量をreal time RT-PCRにて定量した。Proliferation assayでは刺激後にBrdU(10 μ M)を加え、24時間培養後ELISAにてBrdUの取り込みを評価することで検討した。

8) γ グロブリンの検討

BLM および PBS 投与が終了したマウスより血清を採取し、血清 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA の濃度を ELISA キットにて検討した(Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA)。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

9) 自己抗体の検討

血清中の自己抗体を、MBL 社製(Medical & Biological Laboratories Co., Nagoya)のヒト抗 topoi I 抗体、抗 U1-RNP 抗体、抗二本鎖(double-stranded; ds)DNA 抗体測定 ELISA キットを用いて抗体価を測定した。このとき 2 次抗体として抗マウス Ig 抗体を使用した。抗 CENP B 抗体(Funakoshi Co., Tokyo)、抗ヒストン抗体(Funakoshi Co.)、抗一本鎖(single-stranded; ss)DNA 抗体(Shibayagi Inc., Gunma)、リウマトイド因子(RF; Shibayagi Inc.)の測定も ELISA キットを用いて行った。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

10) BAL 中の T 細胞サブセットの検討

BAL から得られた細胞を細胞表面の CD4 と intracellular IL-4、IFN- γ 、IL-17 をそれぞれの抗体(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を用いて染色をすることで Th1、Th2、Th17 細胞の T 細胞サブセットをフローサイトメトリーにて検討した。

11) Th 細胞における LFA-1 および PSGL-1 発現の検討

6 週齢の野生型マウスから得られた脾臓より CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec., Bergisch Gladbach, Germany)を用い CD4⁺ T 細胞を分離した後、Th1、Th2、Th17 condition で培養し、それぞれのサブセットを得た(21)。抗 LFA-1 抗体、

抗 PSGL-1 抗体を用いて細胞表面の LFA-1 および PSGL-1 発現をフローサイトメトリーにて検討した(BD Bioscience)。

12) 統計学的検討

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。p<0.05 を有意とした。

C. 研究結果

BLM 投与野生型マウスでは、PBS 投与野生型マウスと比べて 2.3 倍の真皮肥厚を認めた(p<0.01)。この BLM による真皮肥厚は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは野生型マウスと比べてそれぞれ 16%、26%、47%抑制されていた(p<0.05)。一方 P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスでは、野生型マウスと比べそれぞれ 14%、16%、30%、31%真皮肥厚の増加を認めた(p<0.05、図 1A)。皮膚組織中のハイドロキシプロリン量に関しても真皮肥厚を反映して同様の変化を示した(p<0.05、図 1B)。肺に関しても皮膚と同様に BLM 投与野生型マウスでは PBS 投与野生型マウスと比べ著しい線維化とハイドロキシプロリンの増加を認め(p<0.01)、その線維化とハイドロキシプロリン量は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスで有意に抑制されており(p<0.05)、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスでは有意に亢進していた(p<0.05、図 2A、B)。皮膚および肺への炎症細胞浸潤数は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて減少しており、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウス

とE-selectin ノックアウトマウスに抗P-selectin 抗体を投与したマウスでは増加していた ($p < 0.05$, 図 1C、2C)。

BLM 投与野生型マウスでは PBS 投与野生型マウスと比べ、血清、皮膚、肺組織中の有意な IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α の上昇を認めた ($p < 0.01$)。これらの BLM によるサイトカインの増加は Th2 サイトカインである IL-4 と、Th17 サイトカインである IL-17 においては L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは抑制されており ($p < 0.05$)、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗P-selectin 抗体を投与したマウスでは亢進していた ($p < 0.05$)。一方 Th1 サイトカインである IFN- γ の産生量は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは増加しており ($p < 0.05$)、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗P-selectin 抗体を投与したマウスでは減少していた ($p < 0.05$, 図 3)。

IL-4、IFN- γ 、IL-17 による野生型線維芽細胞の刺激では、IL-4 および IL-17 により線維芽細胞の増殖亢進が、IFN- γ により増殖抑制が認められた ($p < 0.01$)。コラーゲン産生を反映する COL1A2 と TGF- β 1 についても同様に IL-4 および IL-17 刺激で産生亢進が認められ、IFN- γ 刺激で産生抑制が認められた ($p < 0.01$, 図 4)。

血清中の γ グロブリン量の検討では BLM 投与野生型マウスでは PBS 投与野生型マウスと比べて産生量の増加が認められ ($p < 0.01$)、この BLM による産生増加は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは抑制され、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin

ノックアウトマウスに抗P-selectin 抗体を投与したマウスでは亢進していた ($p < 0.05$, 図 5)。

自己抗体の検討では、BLM 投与野生型マウスにおいては、PBS 投与野生型マウスに比べ IgM 型抗 topoisomerase I 抗体、抗 U1-RNP 抗体、抗 ssDNA 抗体、抗 histone 抗体、IgG 型抗 topoisomerase I 抗体、抗 histone 抗体、RF の増加を認めた ($p < 0.05$)。BLM 投与 L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスにおいては、これらの自己抗体の増加は著しく抑制されており、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗P-selectin 抗体を投与したマウスでは著明に亢進していた ($p < 0.05$, 図 6)。

BAL 中の T 細胞サブセットにおける検討では BLM 投与野生型マウスでは PBS 投与野生型マウスと比べて Th1、Th2、Th17 細胞の顕著な増加を認めた ($p < 0.001$)。BLM 投与 L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは BLM 投与野生型マウスと比べて Th1 細胞の増加と、Th2 細胞、Th17 細胞の減少が認められ、P-selectin、E-selectin ノックアウトマウスでは Th1 細胞の減少と Th2 細胞、Th17 細胞の増加が認められた ($p < 0.05$)。、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗P-selectin 抗体を投与したマウスにおいては、Th1 細胞と Th2 細胞の減少が認められ、Th17 細胞の増加が認められた ($p < 0.05$, 図 7)。

Th1、Th2、および Th17 細胞へ分化させた野生型脾臓 T 細胞における検討では、Th1 細胞では ICAM-1 と結合して細胞浸潤に関与する LFA-1 の発現抑制と、主に P-selectin や E-selectin と結合して細胞浸潤に関与する PSGL-1 の発現亢進が、

Th2 細胞と Th17 細胞では LFA-1 の発現亢進と PSGL-1 の発現抑制が Th0 細胞と比較して認められた ($p < 0.01$)。Th2 細胞と Th17 細胞を比べると、Th17 細胞で LFA-1 の高発現と、PSGL-1 の低発現を認めた ($p < 0.01$, 図 8)。

D. 考案

白血球と血管内皮細胞における細胞接着分子の発現は、炎症局所における白血球の浸潤と極めて密接に関り、炎症反応において重要な役割を果たすことが知られている (22-24)。自己免疫疾患においても、細胞接着分子の関わりが示唆されており (25)、SSc の病態形成にも大きな役割を果たしていることが考えられる。今回の検討では、BLM 誘発 SSc モデルで L-selectin、ICAM-1 を欠損させると BLM によって誘導された SSc 患者と共通の特徴である皮膚硬化と肺線維症の改善を認め、皮膚および肺への炎症細胞浸潤の減少、皮膚、肺、血清中の Th2 サイトカインである IL-4 と、Th17 サイトカインである IL-17 の産生抑制、血清中の γ グロブリンと自己抗体の産生抑制を認めた。BAL における T 細胞サブセットの検討では、L-selectin、ICAM-1 の欠損で Th1 細胞の増加を認め、Th2 細胞と Th17 細胞の減少を認めた。一方、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 の欠損では BLM によって誘導される皮膚硬化と肺線維症の増悪、炎症細胞浸潤の増加、IL-4 と IL-17 の産生亢進、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生抑制および γ グロブリンと自己抗体の産生増加を認めた。BAL における T 細胞サブセットは Th1 細胞の減少と Th2 細胞および Th17 細胞の増加を認めた。このように細胞接着分子は SSc の病態形成に大きな役割を果たすことが示唆された。

SSc において血清中の増加が認められる IL-4 などの Th2 サイトカインは、線維芽細胞の増殖亢進とコラーゲン産生増加を来し、線維化に対して大きな役割を果たすことが知られている (26, 27)。また、近年 Th17 サイトカインである IL-17 も線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を亢進させ、SSc において皮膚および肺の線維化を亢進させることが報告されている (8)。一方 Th1 サイトカインである IFN- γ は線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を抑制することが報告されている (4)。今回の検討においても、L-selectin、ICAM-1 ノックアウトマウスでは IL-4 と IL-17 の産生低下に一致して線維化の改善が認められ、E-selectin、P-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスでは IL-4 と IL-17 の増加および IFN- γ の低下に一致して線維化の増悪が認められた。実際に野生型マウスから得られた線維芽細胞における IL-4、IFN- γ 、IL-17 による刺激効果を検討したところ、IL-4 と IL-17 刺激で線維芽細胞の増殖亢進とコラーゲン産生亢進が認められ、IFN- γ 刺激で線維芽細胞の増殖およびコラーゲン産生抑制が認められた。このことから、L-selectin、ICAM-1、E-selectin、P-selectin、PSGL-1 はサイトカイン産生を制御することで BLM 誘発 SSc モデルの線維化に関与することが示唆された。

BLM 誘発 SSc モデルでは、BLM による血管内皮細胞のアポトーシスと、ヒアルロン酸や High-mobility group 1 box protein などの内在性 TLR リガンドが組織障害の結果誘導され、これにより B 細胞表面に発現する CD19 を介して B 細胞の活性化がおこり、SSc 患者に特異的に検出される抗 topo I 抗体をはじめとする様々な自己抗体と、高 γ グロブリン血症が誘導されることが知られている (9)。今回の検討では L-selectin、ICAM-1 およ

びその両者のノックアウトでBLMによって誘導されたγグロブリンと自己抗体の産生は抑制されており、E-selectin、P-selectin、PSGL-1 ノックアウトで亢進していた。これらの結果は前述したそれぞれのノックアウトマウスにおける Th2 サイトカイン産生とも一致しており、γグロブリンと自己抗体の産生量は Th2 バランスを反映すると考えられた。

細胞接着分子は白血球が炎症局所へ浸潤する際に重要な役割を果たすが、その機能は白血球表面に発現する L-selectin、LFA-1、PSGL-1 と血管内皮細胞表面に発現する ICAM-1、E-selectin、P-selectin、Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1) の interaction によって発現される。L-selectin (CD62L) はほとんど全ての白血球に発現しており、血管内皮細胞上に発現する GlyCAM-1 と結合する (28)。L-selectin は炎症細胞浸潤の最初のステップである capture に重要と考えられており、L-selectin は GlyCAM-1 と結合した後 matrix metalloproteinase によって切断される (29-31)。この L-selectin の切断により炎症細胞浸潤の次のステップである rolling が効率的に行われ、LFA-1 の活性化が誘導されることにより、LFA-1 と ICAM-1 による firm adhesion および組織への浸潤が進行する (32)。E-selectin (CD62E) は転写制御によって誘導される細胞接着分子であり、血管内皮細胞の活性化数時間後に細胞表面に発現する (33)。一方 P-selectin (CD62P) は血管内皮細胞では Weibel-Parade 体に存在し、刺激後数分で細胞表面に移動する。加えて P-selectin は活性化血小板にも存在する (34)。PSGL-1 は造血系細胞表面に広く発現しており、E-selectin (CD62E)、P-selectin (CD62P) と主に結合し、capture および rolling に大きく関与することが知られている

(34-36)。これに加えて最近の知見では、これらの細胞接着分子は T 細胞サブセットの浸潤を制御することが知られている。Th1 細胞は PSGL-1 を強発現しており E-selectin、P-selectin と機能的に結合して浸潤を促し (34, 36)、さらに P-selectin と E-selectin の発現は Th2 細胞および Th17 細胞の浸潤には必須ではないかもしくは抑制すると報告されている (37, 38)。一方、LFA-1 は ICAM-1 を介して Th2 細胞と Th17 細胞の浸潤を促進し、また Th0 細胞から Th2 および Th17 細胞への分化を促進することが報告されており (39, 40)、これらの作用は L-selectin によって LFA-1 の活性が上昇されることにより強められるとされる (41, 42)。つまり、PSGL-1 と E-selectin、P-selectin の結合は Th1 細胞の浸潤に必要であり、Th2 細胞および Th17 細胞の浸潤には関与しないか抑制に関わり、L-selectin、LFA-1、ICAM-1 は Th2 細胞および Th17 細胞の浸潤に必要であり、Th1 細胞に関しては影響が少ないと考えられる。しかしながら、PSGL-1 は Th2 細胞の浸潤を促進させるという報告 (43)、L-selectin は Th2 細胞よりもむしろ Th1 細胞に強く発現しており Th1 細胞の浸潤を促進するという報告 (44)、さらには ICAM-1 を介した刺激は IL-12 や IFN- γ の存在下で、すでに Th2 細胞へ分化した T 細胞から IFN- γ 産生などの Th1 型の反応を誘導するという報告がみられ (32)、どの細胞接着因子がどの T 細胞サブセットの浸潤に優位に関わるかは未だ明らかではない。今回の我々の検討では BAL 中の T 細胞サブセットは L-selectin と ICAM-1 のノックアウトで Th1 細胞の増加と Th2 細胞、Th17 細胞の減少が認められ、L-selectin と ICAM-1 の両者のノックアウトではその差はさらに顕著となった。また、E-selectin と P-selectin のノッ

クアウトでは BAL 中の Th2 細胞および Th17 細胞の増加が認められ、Th1 細胞の減少を認めた。さらに PSGL-1 ノックアウトと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を用いて E-selectin と P-selectin の両者を阻害したところ、BAL 中の Th17 細胞の増加と Th1 細胞および Th2 細胞の減少を来した。さらに T 細胞サブセットの組織浸潤における細胞接着分子の役割をさらに明らかにするため、野生型脾臓抽出 CD4⁺ T 細胞を Th1、Th2、Th17 細胞へ分化させて行った、細胞表面の LFA-1 および PSGL-1 の検討では、Th1 細胞で PSGL-1 の強発現を認め、Th2 および Th17 細胞では LFA-1 の強発現を認めた。Th1 細胞における LFA-1 発現と Th2 および Th17 細胞における PSGL-1 の発現は Th0 細胞に比べ有意に抑制されていた。このことから BLM 誘発 SSc モデルにおいて、L-selectin、ICAM-1 は Th2 細胞および Th17 細胞の LFA-1 を介して浸潤促進に関わっており、PSGL-1、E-selectin、P-selectin は Th1 細胞の PSGL-1 を介して浸潤を促進させることが示唆された。E-selectin と P-selectin はどちらか一方が機能を失った場合、のこりの一方が欠損した接着分子を補って PSGL-1 と結合して働くことが知られており (45-47)、E-selectin と P-selectin の両者の阻害では単独のノックアウトで認められた Th1 細胞の浸潤抑制のみならず Th2 細胞の浸潤も抑制されたことから、これらの細胞接着分子は Th2 細胞の浸潤促進にも関わっていることが示唆された。

今回の検討から BLM 誘発 SSc モデルにおいて細胞接着分子は、Th バランスを制御することにより密接に線維化の形成、自己抗体産生に関与していることが示され、今後さらなる研究によって治療への応用が期待される。

E. 結論

BLM 誘発 SSc モデルにおいて誘導される皮膚および肺の線維化、Th2 および Th17 サイトカイン産生、 γ グロブリン産生、自己抗体産生は L-selectin、ICAM-1、E-selectin、P-selectin、PSGL-1 によって制御されていた。これらの細胞接着分子は Th 細胞バランスを変化させることによって病態に深く関わっている可能性が示された。

F. 文献

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger Jr TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-205.
2. Chizzolini C. T lymphocyte and fibroblast interactions: the case of skin involvement in systemic sclerosis and other examples. *Springer Semin Immunopathol* 1999;21(4):431-450.
3. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J. Rheumatol.* 2006;33(2):275-284.
4. Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, Nagaoka T, Hamaguchi Y, Nishijima C, et al. Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis.[In Process Citation]. *J. Rheumatol.* 2000;27(12):2838-42.
5. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.*

- 1998;25:308-313.
6. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 1997;24(2):328-32.
 7. Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(12):679-685.
 8. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43(11):2455-2463.
 9. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol* 2008;172(6):1650-1663.
 10. Sato S. [Role of cell adhesion molecules in wound healing]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2001;24(3):98-111.
 11. Matsushita Y, Hasegawa M, Matsushita T, Fujimoto M, Horikawa M, Fujita T, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Immunol* 2007;179(1):698-707.
 12. Hamaguchi Y, Nishizawa Y, Yasui M, Hasegawa M, Kaburagi Y, Komura K, et al. Intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin regulate bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2002;161(5):1607-1618.
 13. Komura K, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Saito E, Kaburagi Y, Yanaba K, et al. Ultraviolet light exposure suppresses contact hypersensitivity by abrogating endothelial intercellular adhesion molecule-1 up-regulation at the elicitation site. *J Immunol* 2003;171(6):2855-2862.
 14. Shimada Y, Hasegawa M, Kaburagi Y, Hamaguchi Y, Komura K, Saito E, et al. L-selectin or icam-1 deficiency reduces an immediate-type hypersensitivity response by preventing mast cell recruitment in repeated elicitation of contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 2003;170(8):4325-4334.
 15. Yanaba K, Komura K, Horikawa M, Matsushita Y, Takehara K, Sato S. P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for the development of cutaneous vasculitis induced by immune complex deposition. *J Leukoc Biol* 2004;76(2):374-382.
 16. Yanaba K, Kaburagi Y, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. Relative contributions of selectins and intercellular adhesion molecule-1 to tissue injury induced by immune complex deposition. *Am J Pathol* 2003;162(5):1463-73.
 17. Horikawa M, Fujimoto M, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Kawasuji A, et al. E- and P-selectins synergistically inhibit bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2006;169(3):740-749.
 18. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112(4):456-462.
 19. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988;41(4):467-70.
 20. Schrier DJ, Phan SH, McGarry BM. The effects of the nude (nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation. *Am Rev Respir Dis* 1983;127(5):614-7.

21. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007;445(7129):766-770.
22. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1999;341:738-746.
23. Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75-81.
24. Hubner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fassler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 1996;8:548-556.
25. McMurray RW. Adhesion molecules in autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum* 1996;25(4):215-233.
26. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , and interferon- γ levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1992;35(1):67-72.
27. Giacomelli R, Cipriani P, Lattanzio R, Di Franco M, Locanto M, Parzanese I, et al. Circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with systemic sclerosis (SSc) and correlate with serological and clinical features of the disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1997;108(1):42-46.
28. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 1995;9:866-873.
29. Migaki GI, Kahn J, Kishimoto TK. Mutational analysis of the membrane-proximal cleavage site of L-selectin: Relaxed sequence specificity surrounding the cleavage site. *J. Exp. Med.* 1995;182:549-557.
30. Chen A, Engel P, Tedder TF. Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J. Exp. Med.* 1995;182:519-530.
31. Walcheck B, Kahn J, Fisher JM, Wang BB, Fisk RS, Payan DG, et al. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 1996;380:720-723.
32. Radhakrishnan S, Wiehagen KR, Pulko V, Van Keulen V, Faubion WA, Knutson KL, et al. Induction of a Th1 response from Th2-polarized T cells by activated dendritic cells: dependence on TCR:peptide-MHC interaction, ICAM-1, IL-12, and IFN- γ . *J Immunol* 2007;178(6):3583-3592.
33. Borges E, Tietz W, Steegmaier M, Moll T, Hallmann R, Hamann A, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J. Exp. Med.* 1997;185:573-578.
34. Hirata T, Merrill-Skoloff G, Aab M, Yang J, Furie BC, Furie B. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J Exp Med* 2000;192(11):1669-1676.
35. Clark JG, Mandac-Dy JB, Dixon AE, Madtes DK, Burkhart KM, Harlan JM, et al. Trafficking of Th1 cells to lung: a role for selectins and a P-selectin glycoprotein-1-independent ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30(2):220-227.
36. Borges E, Tietz W, Steegmaier M, Moll T, Hallmann R, Hamann A, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J Exp Med* 1997;185(3):573-578.
37. Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, et al. P- and E-selectin

- mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997;385(6611):81-83.
38. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005;22(3):285-294.
39. Lee SH, Prince JE, Rais M, Kheradmand F, Ballantyne CM, Weitz-Schmidt G, et al. Developmental control of integrin expression regulates Th2 effector homing. *J Immunol* 2008;180(7):4656-4667.
40. Wang Y, Kai H, Chang F, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, et al. A critical role of LFA-1 in the development of Th17 cells and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353(4):857-862.
41. Hwang ST, Singer MS, Giblin PA, Yednock TA, Bacon KB, Simon SI, et al. GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates $\beta 2$ integrins on naive peripheral lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1996;184:1343-1348.
42. Gopalan PK, Smith CW, Lu HF, Berg EL, McIntire LV, Simon SI. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 in shear flow can be activated through L-selectin. *J. Immunol.* 1997;158:367-375.
43. Mangan PR, O'Quinn D, Harrington L, Bonder CS, Kubes P, Kucik DF, et al. Both Th1 and Th2 cells require P-selectin glycoprotein ligand-1 for optimal rolling on inflamed endothelium. *Am J Pathol* 2005;167(6):1661-1675.
44. Savage ND, Harris SH, Rossi AG, De Silva B, Howie SE, Layton GT, et al. Inhibition of TCR-mediated shedding of L-selectin (CD62L) on human and mouse CD4⁺ T cells by metalloproteinase inhibition: analysis of the regulation of Th1/Th2 function. *Eur J Immunol* 2002;32(10):2905-2914.
45. Labow MA, Norton CR, Rumberger JM, Lombard-Gillooly KM, Shuster DJ, Hubbard J, et al. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity* 1994;1:709-720.
46. Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, et al. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J. Exp. Med.* 1996;183:2329-2336.
47. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 1996;84:563-574.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

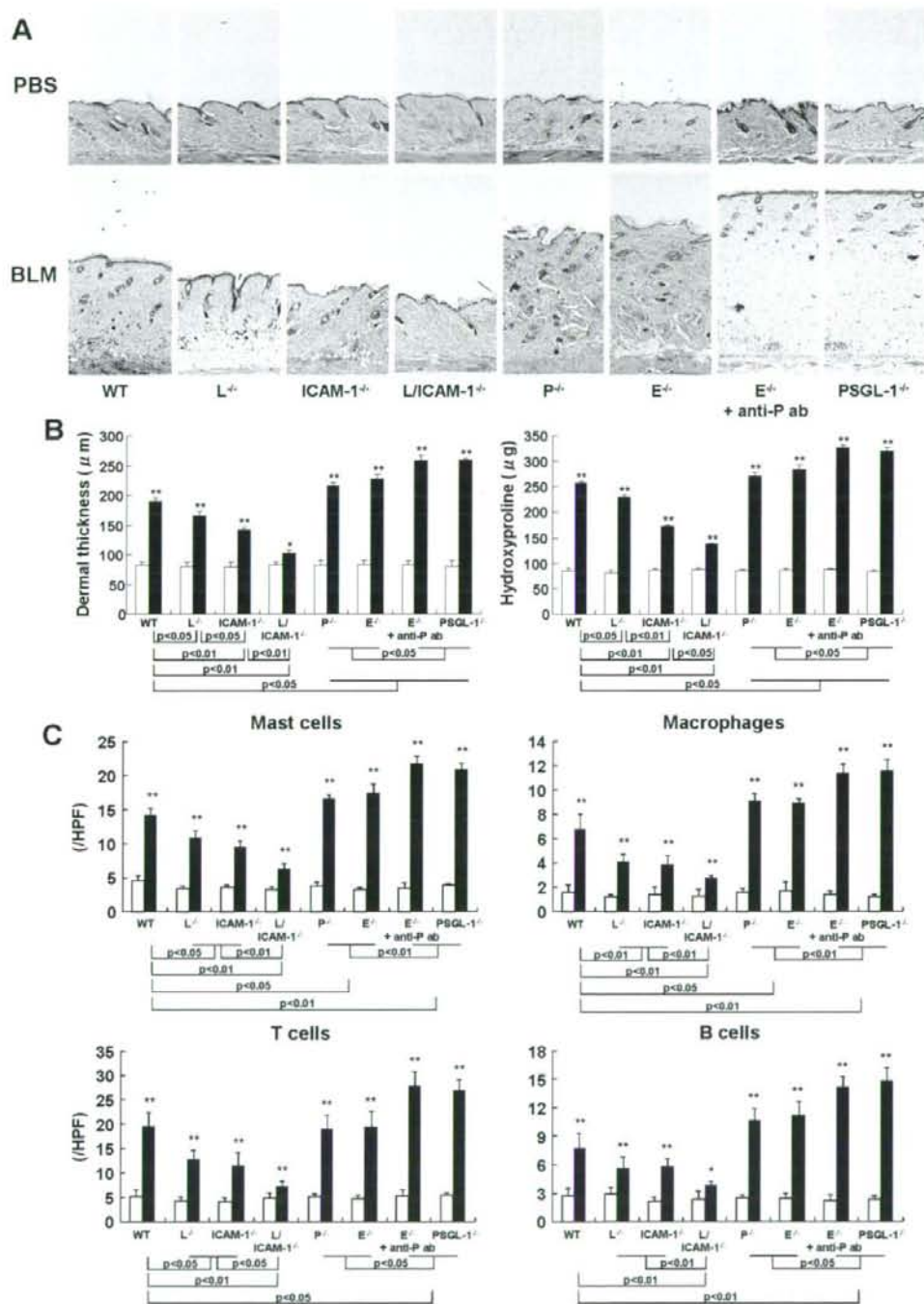


図1: 皮膚の線維化を組織病理学的に示した(A)。真皮の厚さとハイドロキシプロリン産生量(B)、炎症細胞浸潤数(C)を示した。白の棒グラフはPBS投与群を、黒の棒グラフはBLM投与群を表す。WTは野生型マウスを、L^{-/-}はL-selectin ノックアウトマウスを、ICAM-1^{-/-}はICAM-1 ノックアウトマウスを、L/ICAM-1^{-/-}はL-selectinとICAM-1の両者のノックアウトマウスを、E^{-/-}はE-selectin ノックアウトマウスを、P^{-/-}はP-selectin ノックアウトマウスを、E^{-/-} + anti-P abはE-selectin ノックアウトマウスに抗P-selectin抗体を投与したマウスを、PSGL-1^{-/-}はPSGL-1 ノックアウトマウスをそれぞれ表す。それぞれのPBS投与群と比べて* p<0.05, ** p<0.01を表す。

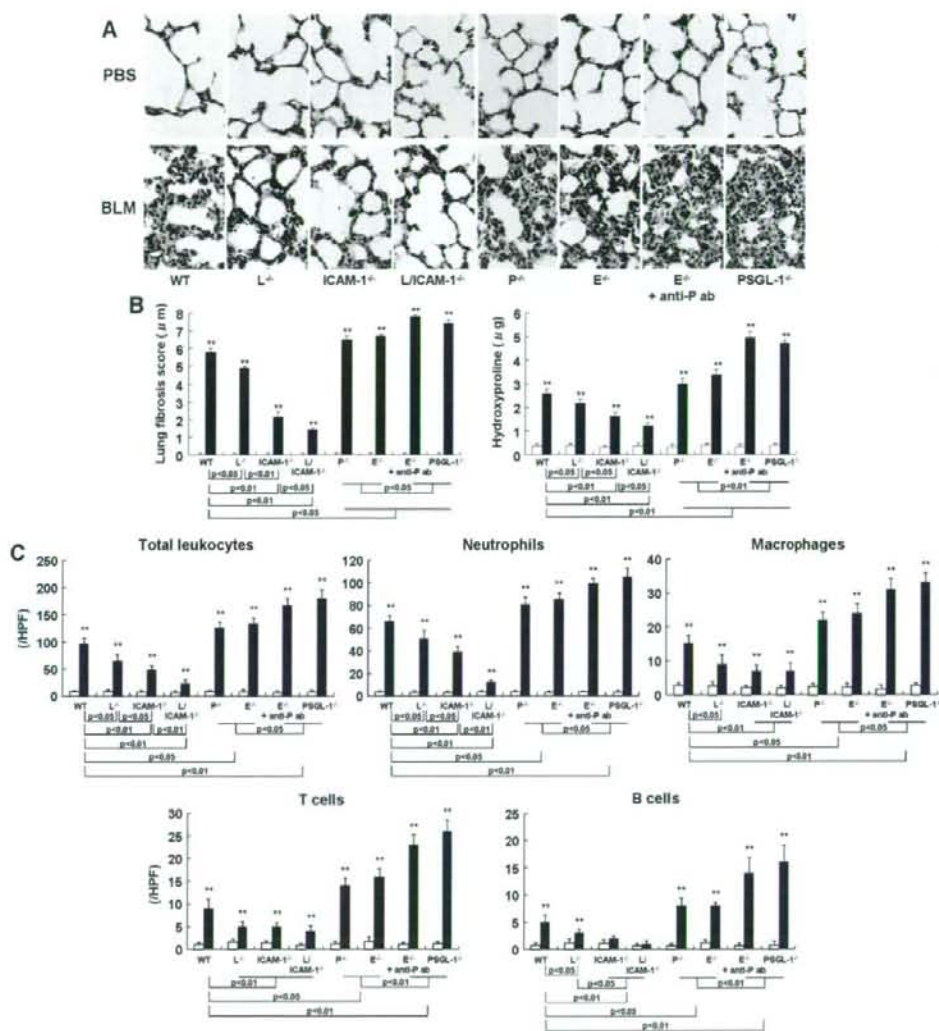


図 2: 肺の線維化を組織病理学的に示した(A)。真皮の厚さとハイドロキシプロリン産生量(B)、炎症細胞浸潤数(C)を示した。それぞれの PBS 投与群と比べて * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ を表す。

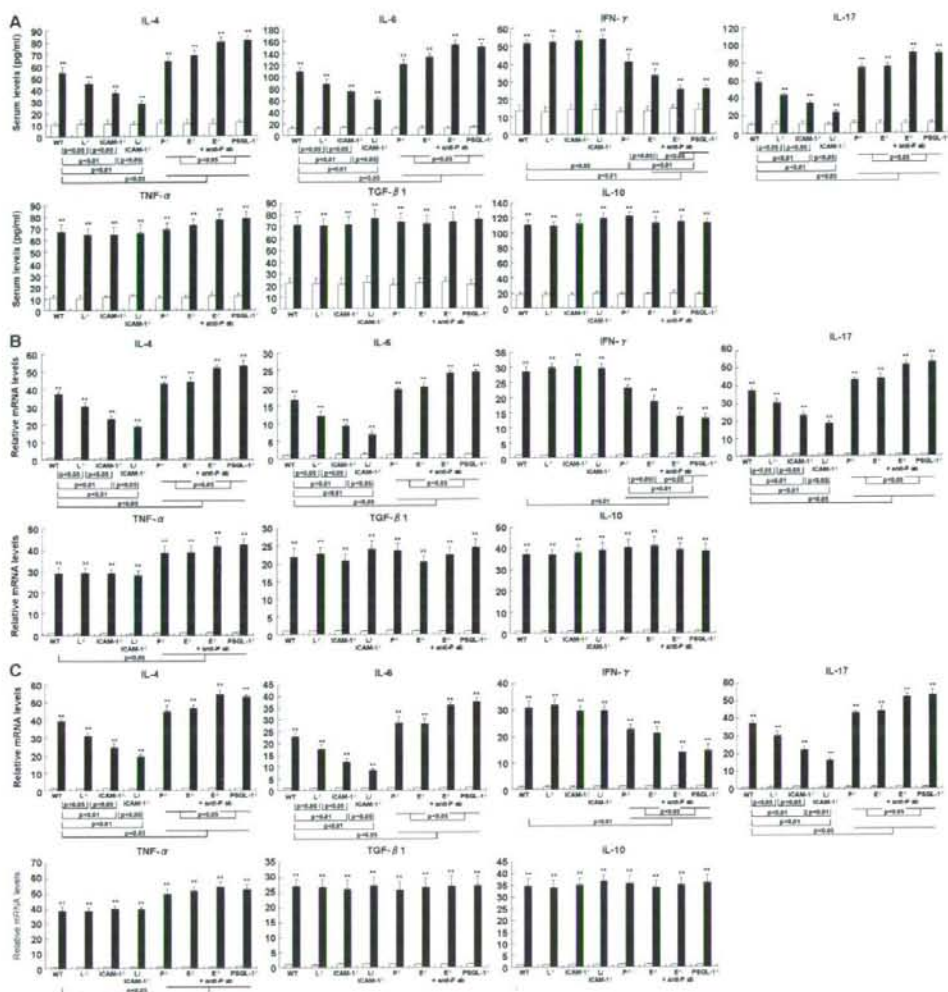


図3: 血清中のサイトカイン濃度(A)と皮膚(B)、肺(C)におけるmRNAの発現量を示した。それぞれのPBS投与群と比べて** $p < 0.01$ を表す。

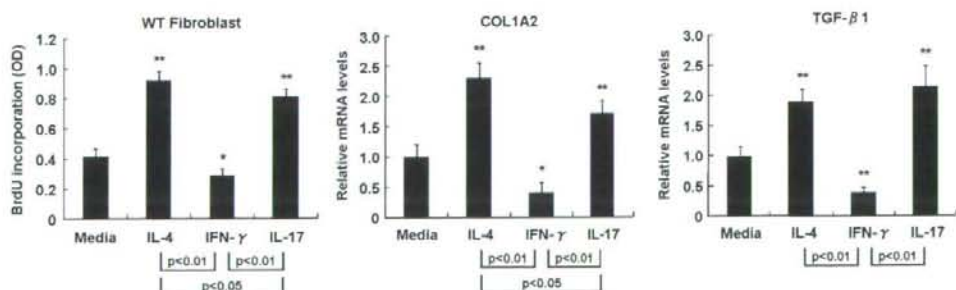


図4: IL-4、IFN- γ 、IL-17で線維芽細胞を刺激したときの proliferation assay と COL1A2、TGF- β 1の発現量を示した。Proliferation assay は BrdUの取り込みをELISAにて評価することで行った。Mediaは無刺激を表す。無刺激群と比べて* $p < 0.05$ を表す。

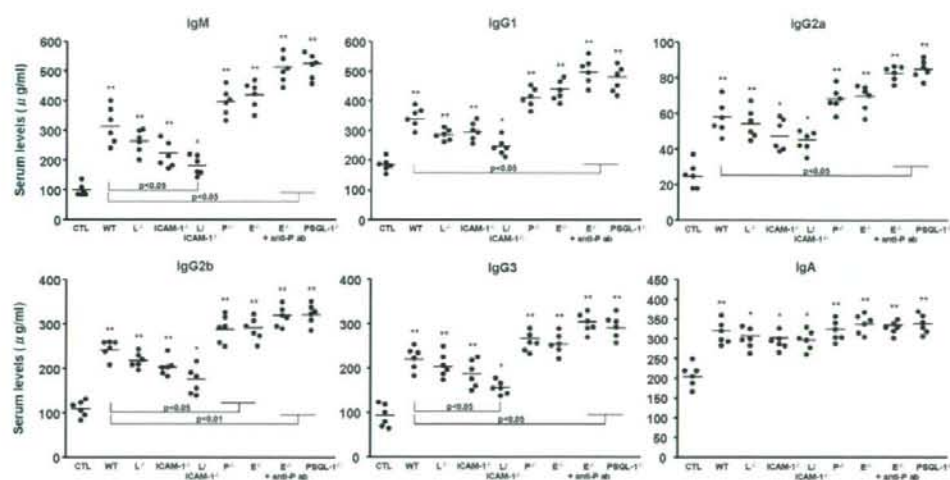


図5: 血清中のγグロブリンの濃度を示した。CTLはPBS投与野生型マウスを表す。CTLと比べて* p<0.05、** p<0.01を表す。

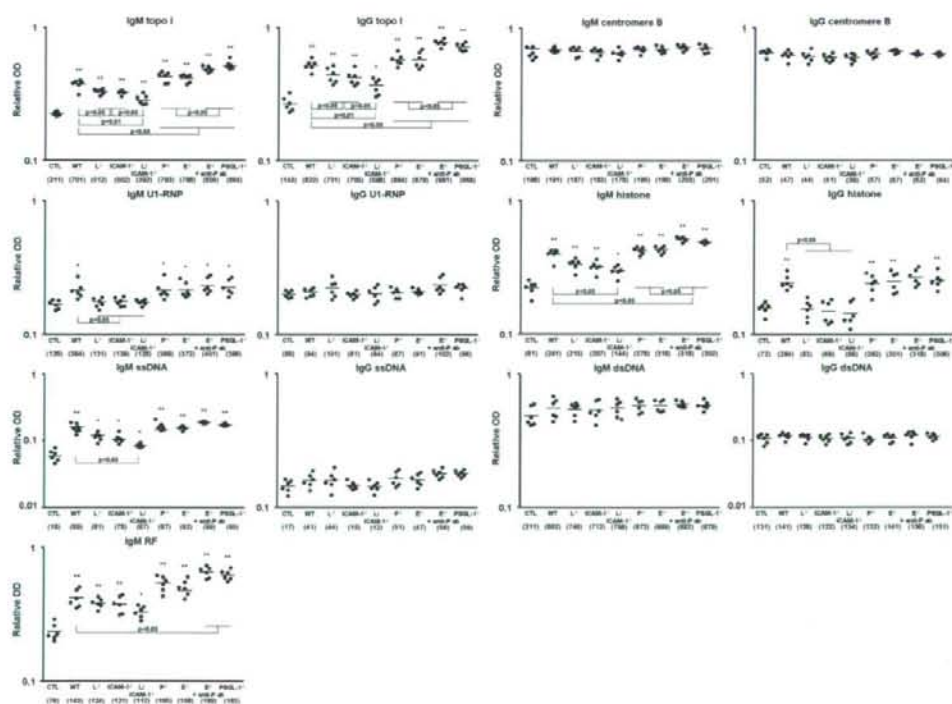


図6: 血清中の自己抗体量を示した。CTLと比べて* p<0.05、** p<0.01を表す。

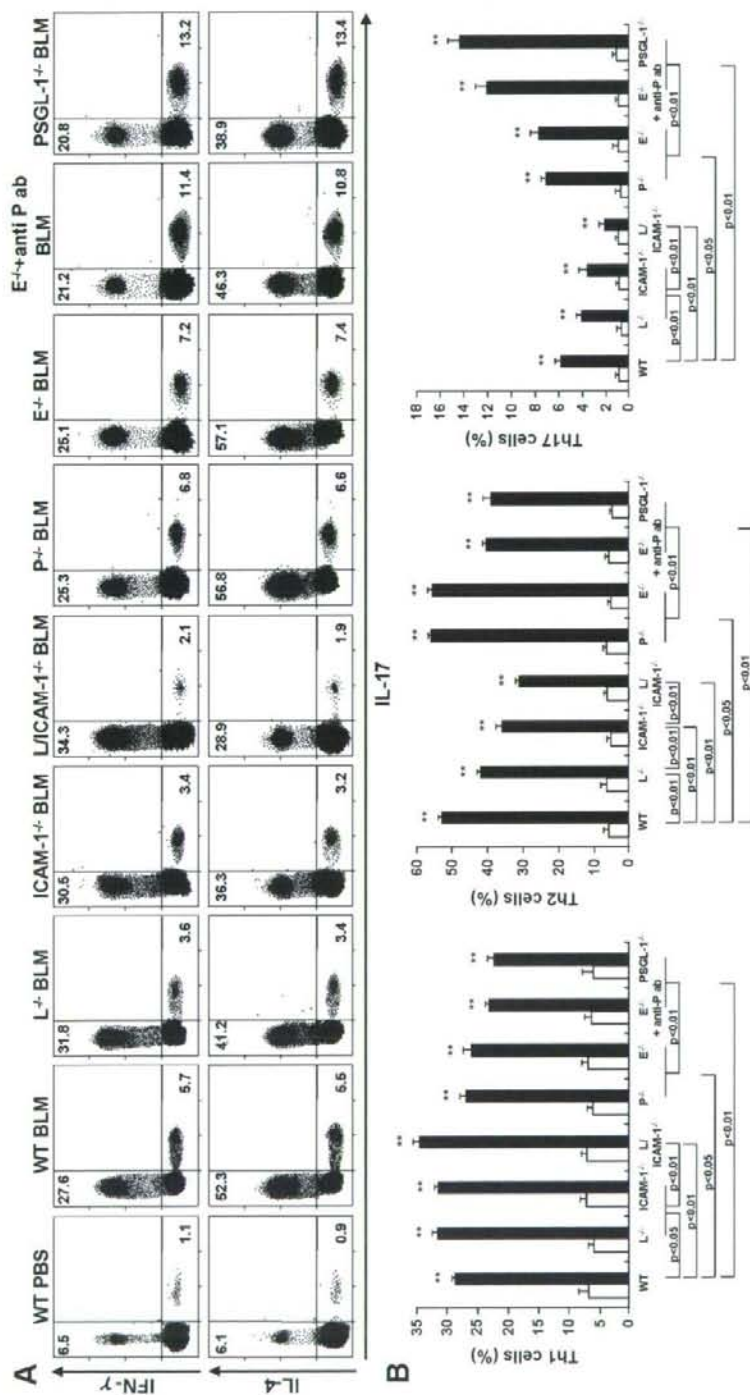


図 7: BAL 中の T 細胞サブセットの population (A) と平均値 (B) を示した。それぞれの群において 10 匹のマウスを用いた。PBS 投与群と比べて ** $p < 0.001$ を表す。

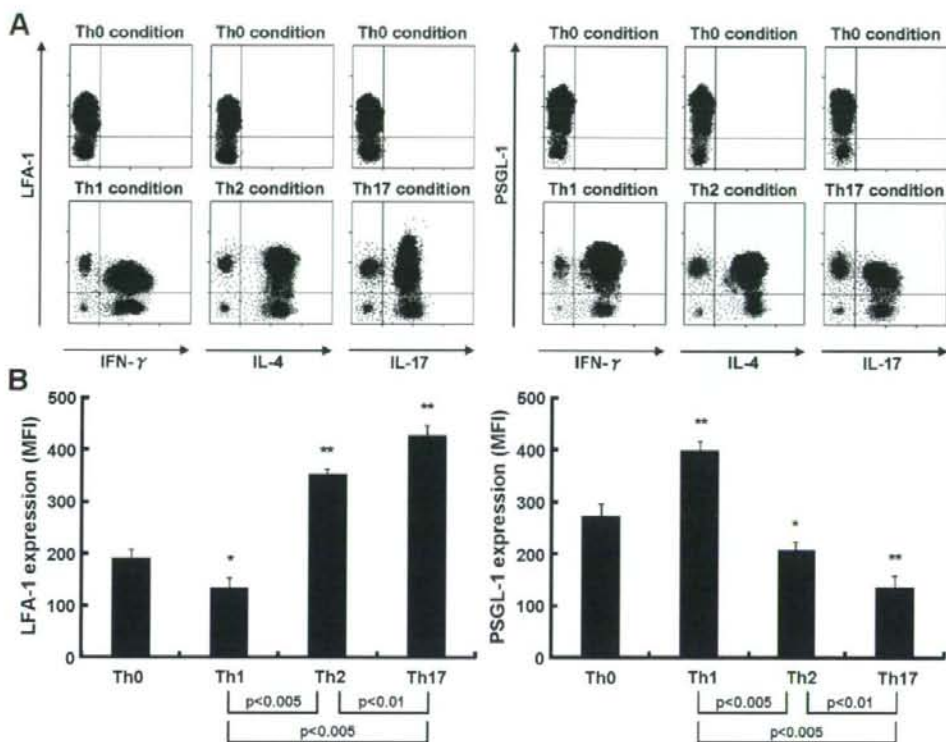


図 8: 野生型マウスから得られた線維芽細胞を Th1、Th2、Th17 condition で培養してそれぞれのサブセットへ分化させ、LFA-1 と PSGL-1 の発現を示した。それぞれの population(A)と発現量の相対値を mean fluorescence intensity (MFI) にて示した(B)。Th0 細胞と比べて * $p < 0.01$ 、** $p < 0.001$ を表す。

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

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

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講師
協力者	田中千洋	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者	濱口儒人	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
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
協力者	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

ブレオマイシン(BLM)誘導性強皮症モデルにおける、inducible costimulator (ICOS)とそのリガンドである inducible costimulator ligand (ICOSL) の役割を検討した。BLMを気管支内、皮下に投与した所、ICOS^{+/+}マウスでは、野生型マウスに比べて局所のサイトカイン、ケモカインが減少して肺や皮膚の炎症や線維化が軽快し、生存期間が延長した。一方、ICOSL^{-/-}マウス、ICOS^{+/+}ICOSL^{-/-}マウスでは局所のTNF- α が増加して肺や皮膚の炎症や線維化が悪化し、生存期間が短縮した。興味深いことに、ICOS^{+/+}マウスでは、CD14 陽性マクロファージや B220 陽性 B 細胞における ICOSL の発現が野生型マウスに比べ有意に増加し、ICOSL^{-/-}マウスでは CD4 陽性 T 細胞での ICOS の発現が著明に増加していた。マクロファージや B 細胞に発現する ICOSL の発現量が、肺や皮膚の重症度と負の相関を示すものと考えられ、現在その詳しい機序について検討中である。以上より、BLM による強皮症マウスモデルにおいて、ICOS は炎症や線維化を促進し、ICOSL は抑制に働いている事が示された。

A. 研究目的

全身性強皮症などの膠原病では、自己抗体の産生がみられることなどから、T 細胞や抗原提示細胞などによる獲得免疫が重要な役割を果たしていると考えられている。獲得免疫における T 細胞と抗原提示細胞の相互作用に重要な補助分子として inducible costimulator (ICOS) と inducible costimulator ligand (ICOSL) があり、ICOS と ICOSL

は現在知られている唯一のリガンド同士である¹。ICOS は T 細胞にのみ発現するのに対し、ICOSL はマクロファージ、B 細胞、樹状細胞などの抗原提示細胞以外にも、繊維芽細胞や肺上皮細胞、血管内皮細胞などにも発現するとされる²。ICOS、ICOSL 軸は獲得免疫での役割のみが検討されてきたが、ICOSL はマクロファージなどの自然免疫に働く細胞や、繊維芽細胞や上皮細胞にも発現している。さら