

に、ICOS-ICOSL 軸は一般に線維化に関与すると考えられている。Th2 サイトカインの産生に重要な働きを有することが知られている²。近年、強皮症などの膠原病においても、獲得免疫だけでなく自然免疫の病態への関与が指摘されてきている³。このため、ICOS や ICOSL が、強皮症の病態における、自然免疫、獲得免疫、線維化などに関与している可能性は否定できない。今回我々は ICOS、ICOSL のいずれかが、あるいは両方を欠損したマウスを使用して、ブレオマイシン(BLM)誘導性強皮症モデルにおける ICOS、ICOSL の役割について検討したので報告する。

B. 研究方法

1) マウス

C57BL/6 background の ICOS^{-/-}マウス、ICOSL^{-/-}マウスを Jackson 社から購入して繁殖した。また、これらの2系統を掛け合わせて、ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-}マウスを作成した。対象コントロールとして、Jackson 社から購入した C57BL/6 野生型マウスを使用した。6~8週齢の雌のマウスを用い、BLM を生理食塩水に 1mg/ml となるように溶解して気管支内に 150~200 μ l を投与、もしくは腰背部の皮下に 300 μ l を連日4週間投与した⁴。コントロールとして生理食塩水のみを同様の方法で投与した。

2) 病理組織学的検討

気管支内投与した群では生存期間の計測を行い、それとは別に3週間後の肺を採取した。皮下投与した群では4週間皮下注射後の皮膚と肺を採取した。Hematoxylin-Eosin 染色、Azan-Mallory 染色、Masson-Trichrome 染色を行い線維化の程度を評価した。肺の線維化は、Aschcroft らにより提唱された重症度スコア⁵を用いて、皮膚の線維化は真皮の

厚さで定量的に測定した。

3) 浸潤細胞の評価

マウスに対する抗 F4/80 抗体、抗 B220 抗体、抗 CD3 抗体、抗 MPO 抗体、抗 α -SMA 抗体を用いて、肺や皮膚のパラフィン切片を免疫染色した。それぞれの検体の5つの切片につき、陽性細胞数を400倍の拡大率で5視野をランダムに選び測定し、1視野あたりの平均を算出した。

4) サイトカイン、ケモカインの測定

摘出した肺全体と300 μ l の蛋白溶解液(10 mmol/L PBS, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Nonidet P-40, 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid)⁶をよく攪拌し、15000rpm、15分間の遠心後、上清を採取した。この上清中のTNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-6、IL-10、IL-12の濃度をCBAキットを用いて測定した。また、各検体(上清)における蛋白濃度をprotein assayキットを用いて測定し、得られたサイトカイン、ケモカインの濃度を蛋白濃度で割った値をサイトカイン、ケモカインの相対的な濃度として解析に用いた。

5) 気管支肺胞洗浄液中の細胞における ICOS、ICOSL の発現

BLM 気管支内投与7日後のマウスから気管支肺胞洗浄液を採取した。採取した細胞をマウスに対する抗 CD4 抗体、抗 CD14 抗体、抗 B220 抗体、抗 ICOS 抗体、抗 ICOSL 抗体で蛍光免疫染色し、flow cytometry で発現量や発現細胞の数を測定した。

C. 研究成果

1) 生存率

BLM 気管支内投与後の生存期間は、ICOS^{-/-}マウスでは野生型マウスよりも延長していたが、意外

にも ICOSL^{+/+}と ICOS^{+/+}ICOSL^{+/+}マウスは逆に短縮していた。21 日目時点の生存率の比較では、野生型マウスの 36%に比べて ICOS^{+/+}マウスが 60%と有意に高く、ICOSL^{+/+}マウスと ICOS^{+/+}ICOSL^{+/+}マウスではそれぞれ、15%、18%と有意に低かった(図1)。

2) 線維化の評価

野生型マウスにおいて、高容量の BLM を連日皮下投与することにより、皮膚だけでなく肺にも、気管支内1回投与と同様の線維化が生じる事が確認できた。気管支内投与により生じた肺の線維化、皮下投与により生じた肺、皮膚の線維化は、いずれも野生型マウスに比べ ICOS^{+/+}マウスで軽症であり、ICOSL^{+/+}マウス、ICOS^{+/+}ICOSL^{+/+}マウスでは重症であった(図2、3)。気管支内投与よりも皮下注射の方が、左右差や個体差の少ない間質性肺炎が誘導できたので、以下の肺の実験にはことわりのない限り、皮下注射の系を用いた。肺の線維化の指標である Ashcroft らによる肺の線維化スコアにおいても野生型マウスに比べ ICOS^{+/+}マウスは有意に低いスコアであり、ICOSL^{+/+}マウス、ICOS^{+/+}ICOSL^{+/+}マウスでは有意に高いスコアを示した。真皮の厚さにおいても同様の傾向を認めた(図4)

3) 浸潤細胞数の推移

肺の組織に浸潤している F4/80 陽性マクロファージ、B220 陽性 B 細胞、CD3 陽性 T 細胞、MPO 陽性好中球は、野生型マウスで 7 日目から増加していた。ICOS^{+/+}マウスでは、野生型に比べてマクロファージ、B 細胞、T 細胞、好中球の細胞浸潤はいずれもほとんどの経時的なポイントで減少していた。一方、ICOSL^{+/+}マウス、ICOS^{+/+}ICOSL^{+/+}マウスでは野生型マウスよりも細胞浸潤は増加する傾向にあり、特に 7 日目で顕著であった。

皮膚では、野生型マウスにおけるマクロファージ、T 細胞、好中球の浸潤は 7 日目から増加していた。肺と同様に ICOS^{+/+}では野生型よりも浸潤細胞は少なく、ICOSL^{+/+}マウス、ICOS^{+/+}ICOSL^{+/+}マウスでは増加している傾向にあり、特に 7 日目では著明に浸潤細胞数が増加していた。(図5、6)

4) 組織蛋白抽出液中のサイトカインやケモカインの濃度

野生型マウスに比べ、ICOS^{+/+}マウスでは TNF- α 、MCP-1、IFN- γ 、IL-6、IL-10 が減少していたが、ICOSL^{+/+}マウス、ICOS^{+/+}ICOSL^{+/+}マウスでは TNF- α が増加していた(図7)。IL-12 はいずれの系統でも野生型と差がなかった。

5) マクロファージ、B 細胞における ICOSL の発現と T 細胞における ICOS の発現

気管支内投与後の、BAL 中の細胞における ICOS と ICOSL の発現をフローサイトメトリーで測定した。興味深いことに、BLM1回投与 7 日目の時点で、ICOS^{+/+}マウスでは、CD14 陽性マクロファージ、B220 陽性 B 細胞での ICOSL の発現が野生型マウスに比べてそれぞれ 223%、306%に増加していた。一方、ICOSL^{+/+}マウスでは、CD4 陽性 T 細胞での ICOS の発現が野生型マウスに比べ 364%と著明に亢進していた。ICOS、ICOSL はいずれも day7 の時点で最も発現が亢進していた(図8)。

D. 考案

ICOS と ICOSL は、現在知られている唯一のリガンド同士であり、それぞれ欠損マウスは同じ表現型をとると考えられている⁷。ICOS は T 細胞、特にメモリー T 細胞に発現し、一方 ICOSL は B 細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞に主として発現する。これらの ICOS-ICOSL 軸を介して、Th2 サイトカ

インの産生や抗体産生に重要な働きを有する¹²ことから、ICOS と ICOSL が強皮症の線維化や自己抗体の産生に関与しているのではないかという仮説のもとに本研究を開始した。しかし、ICOS^{+/+}マウスでは、予想したように肺や皮膚の炎症や線維化が軽快して生存期間が延長したのに対し、ICOSL^{+/+}マウスや ICOS^{-/-}ICOSL^{+/+}マウスでは逆に炎症や線維化が悪化して、生存期間が短縮した(図1~5)。獲得免疫が関与する多発性硬化症モデルでは、induction phase で ICOS に対するブロッキング抗体を投与すると増悪し、effector phase で投与すると軽症化するという報告がある^{8,9}。また、同じく獲得免疫のモデルである関節リウマチモデルでは ICOSL の中和抗体の投与により、関節炎や抗体産生が抑制されることが報告されている¹⁰。しかし、ICOS と ICOSL の役割は同一視されているため、これまで ICOS と ICOSL を同時にブロックしたり、ICOS^{+/+}マウスと ICOSL^{+/+}マウスでの症状の違いを比較した報告は見つからない。

膠原病においては、従来より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が、近年では他の膠原病だけでなく全身性強皮症においても、toll-like receptor (TLR) などを介する自然免疫系もその病態に重要な影響を及ぼす事が示唆されている³。BLM 誘導性強皮症モデルは、抗原特異的な疾患誘発モデルではなく、BLM が直接に、あるいは BLM により誘導されたアポトーシス細胞やヒアルロン酸分解物などが TLR を介してマクロファージなどの自然免疫担当細胞を活性化し、炎症や線維化を促進するサイトカインやケモカインの産生を誘導するものと考えられている^{11,12}。今回の結果からは、自然免疫においては、ICOSL が ICOS-ICOSL 軸を介さない作用を有している可能性が考えられ

た。実際、ICOS は T 細胞のみに発現するが、ICOSL は自然免疫において重要な役割を担っているマクロファージや樹状細胞にも発現している。また、興味深いことに ICOS^{+/+}マウスではマクロファージや B 細胞における ICOSL が高発現し、ICOSL^{+/+}や両方を欠損したマウスでは、T 細胞上の ICOS の発現が劇的に増加していた(図7)。ICOSL の発現が亢進している ICOS^{+/+}マウスでは炎症や線維化は軽度であり、ICOS の発現が亢進している ICOSL^{+/+}マウス、ともに発現していない ICOS^{-/-} ICOSL^{+/+}マウスでは炎症、線維化とも増強した(図1~6)。つまり、重症度は T 細胞における ICOS の発現ではなく、マクロファージや B 細胞における ICOSL の発現量と逆相関していた。このことから、著者らは ICOSL が ICOS を介さない役割を自然免疫においては有しているのではないかと考えている。最も考えられる機序としては、ICOSL が BLM により産生されたアポトーシス細胞やヒアルロン酸分解産物による TLR のシグナルを負に制御して、細胞の活性化や炎症・線維化に関わるサイトカインやケモカインの産生を抑制するというものである。マクロファージや B 細胞に発現する ICOSL が、発現細胞の活性化や TLR のシグナルに影響を及ぼすかどうかについては現時点ではわかっていない。しかし、ICOSL は TLR ligand により発現が低下することという報告¹³もあり、ICOSL と TLR との間に相互作用が存在する可能性は否定できない。

今後、BLM 投与後に、ICOSL の発現量がマクロファージや B 細胞の活性化、サイトカイン・ケモカインの産生、および TLR のシグナルにどのような影響を及ぼすか検討する予定である。また、BLM により自己抗体産生が誘導されることが知られており¹²、それに対する影響も検討したい。

E. 結論

ブレオマイシン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可能性が示された。

F. 文献

1. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*. 1999;402:827-832
2. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515-548
3. Fineschi S, Goffin L, Rezzonico R, Cozzi F, Dayer JM, Meroni PL, Chizzolini C. Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. *Arthritis Rheum*. 2008;58:3913-3923
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 sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol*. 1999;112:456-462
5. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*. 1988;41:467-470.
6. Mori R, Kondo T, Nishie T, Ohshima T, Asano M. Impairment of skin wound healing in beta-1,4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. *Am J Pathol*. 2004;164:1303-1314
7. Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, Dong C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:14163-14168
8. Rottman JB, Smith T, Tonra JR, Ganley K, Bloom T, Silva R, Pierce B, Gutierrez-Ramos JC, Ozkaynak E, Coyle AJ. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol*. 2001;2:605-611
9. Sporici RA, Beswick RL, von Allmen C, Rumbley CA, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Perrin PJ. ICOS ligand costimulation is required for T-cell encephalitogenicity. *Clin Immunol*. 2001;100:277-288
10. Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. *J Immunol*. 2002;169:4332-4339
11. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1996;271:17771-17778

12. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol.* 2008;172:1650-1663
13. Farina C, Theil D, Semlinger B, Hohlfeld R, Meinel E. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol.* 2004;16:799-809

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

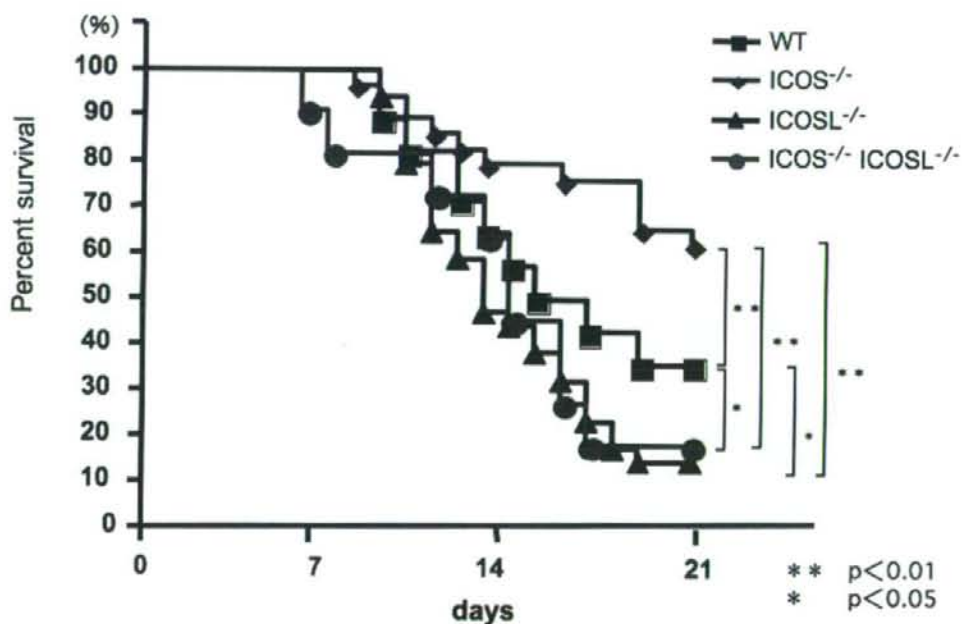


図1 プレオマイシン気管支内投与後の生存曲線。

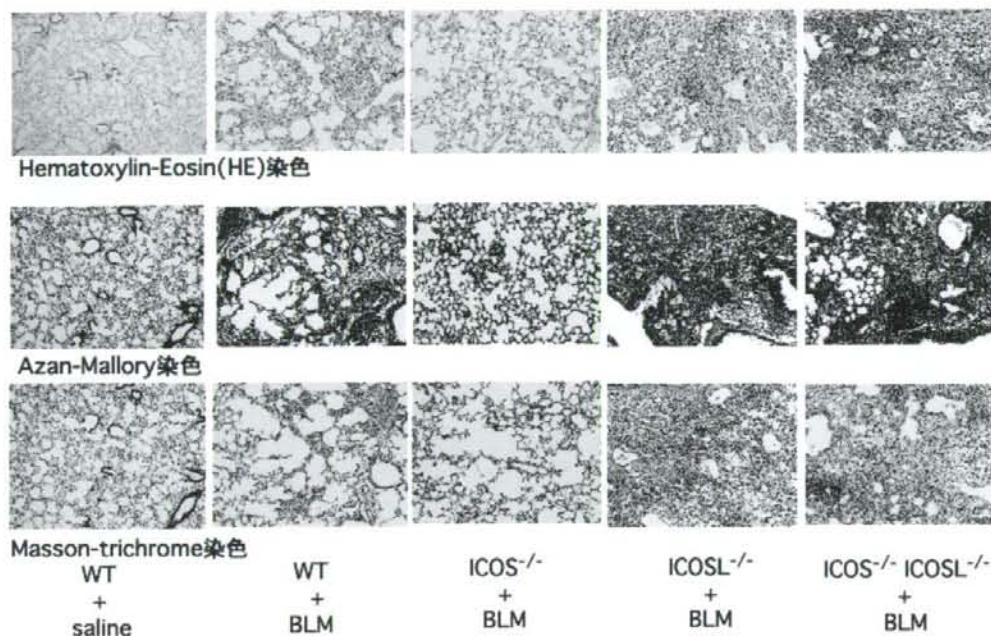


図2 プレオマイシン気管支内投与21日後の肺の病理組織像と Ashcroft らによる肺線維化スコア。

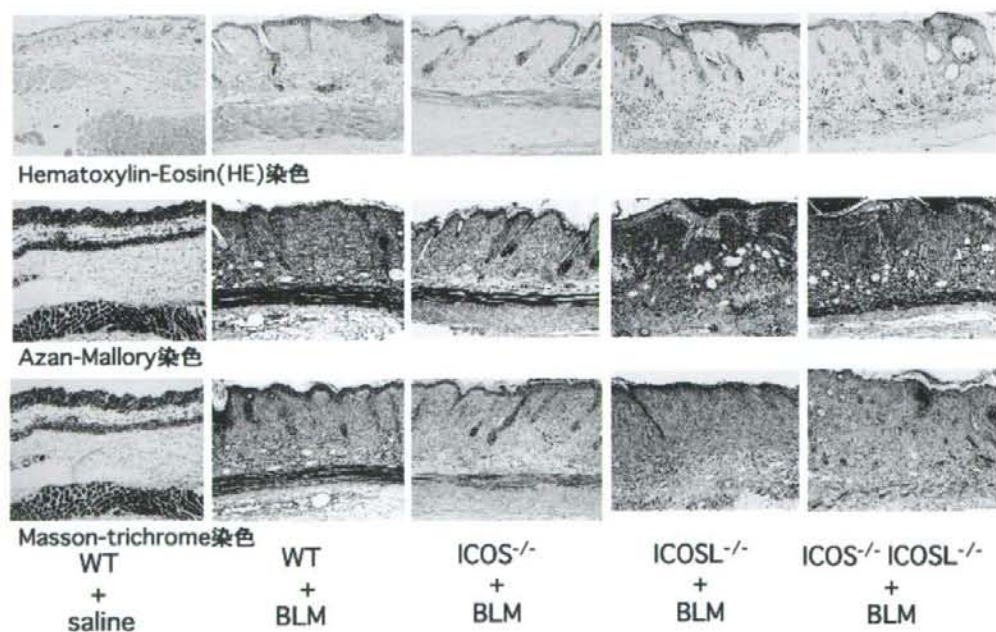


図3 プレオマイシン皮下投与28日後の皮膚の病理組織像と真皮の厚さ。

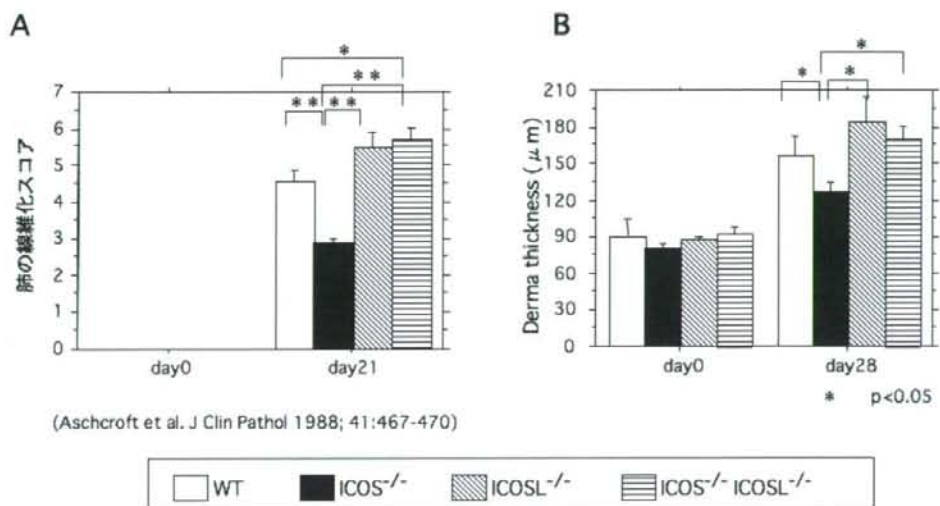


図4 A 肺の線維化スコア, B 真皮の厚さ

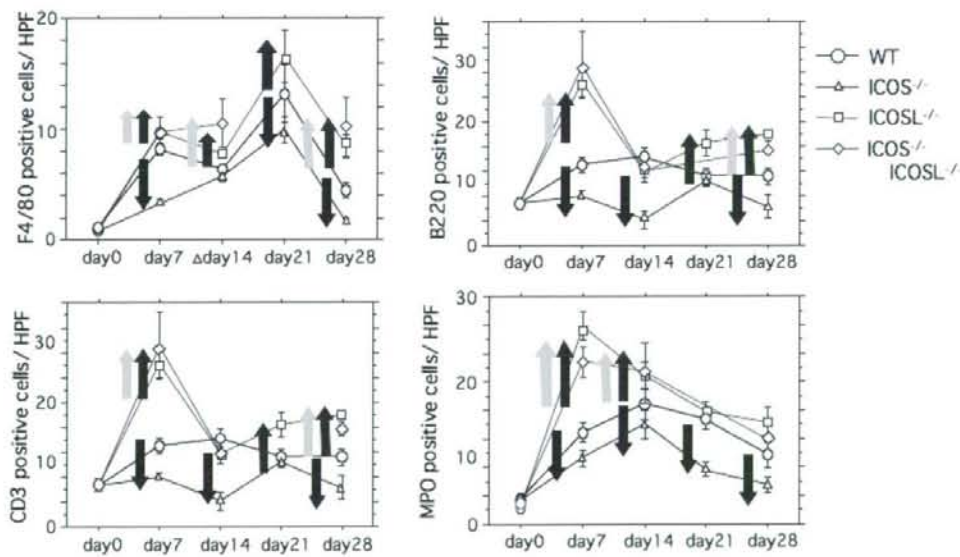


図5 肺の浸潤細胞数の推移

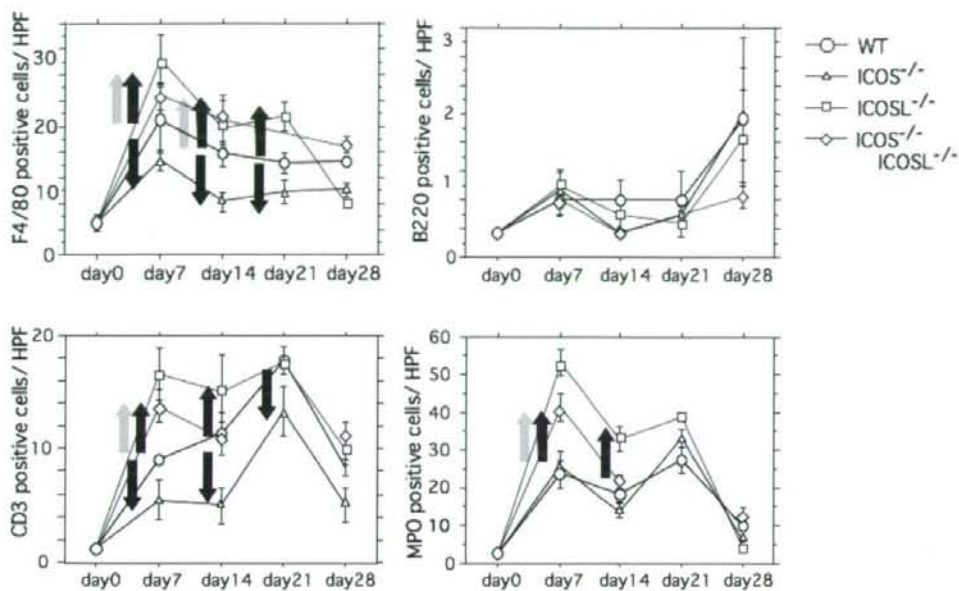


図6 皮膚の浸潤細胞数の推移

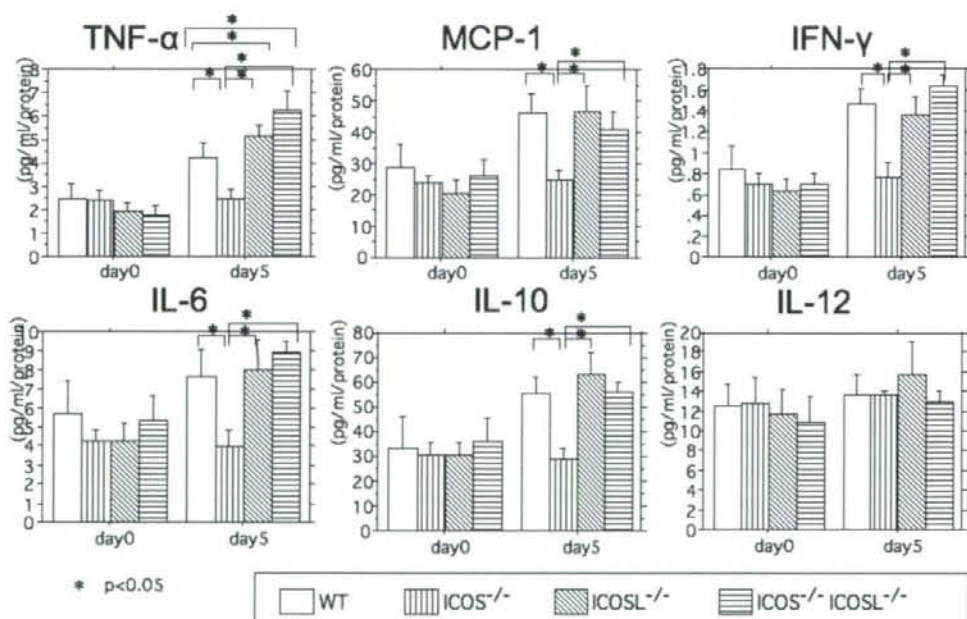


図7 肺の蛋白抽出液中のサイトカイン、ケモカインの濃度

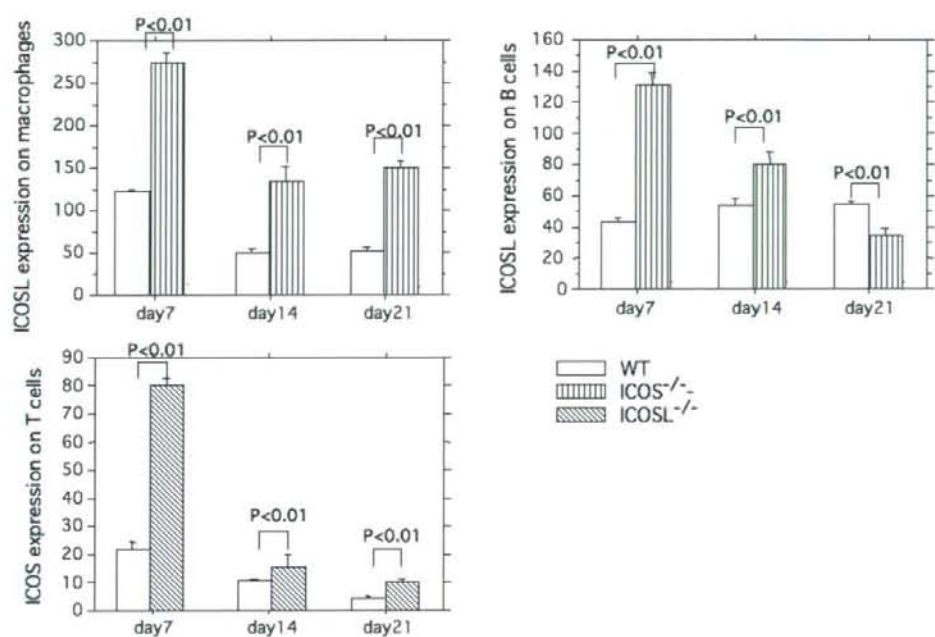


図8 気管支肺胞洗浄液中のマクロファージ、B細胞におけるICOSLの発現とT細胞におけるICOSの発現

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

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

研究協力者 稲垣 豊 東海大学医学部基盤診療学系教授
協力者 東山礼一 東海大学医学部奨励研究員
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
協力者 渋沢弥生 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学
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

近年、骨髄由来細胞が皮膚の創傷部位に流入し、I型コラーゲンを産生することで創傷治癒の促進に関与する可能性が報告された。しかしながら、これらの研究における骨髄由来細胞の同定法やコラーゲン産生の検出法は特異性に欠け、詳細な細胞動態や分化過程に関しても十分に解明されていない。また、病的な皮膚線維化の進展に骨髄由来細胞がどの程度関わっているかは全く解明されておらず、そのメカニズムも不明である。そこで今回、I型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子（COL1A2）の組織特異的エンハンサー・プロモーターとEGFPとを連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作製して、生理的な創傷治癒過程ならびに病的な線維化過程における骨髄由来細胞の皮膚組織への生着とコラーゲン産生への関与を比較検討した。このマウス由来の骨髄細胞を移植した同系マウスにブレオマイシン誘導性の皮膚線維症を作製したところ、線維性に肥厚した真皮内に少数のEGFP陽性細胞が出現し、I型コラーゲンを産生する骨髄由来細胞を特異的に検出することが可能であった。これらの骨髄由来細胞は間葉系細胞の形態を示したが、筋線維芽細胞のマーカーである α SMAとの共発現は認められなかった。一方、皮膚の全層欠損後の創傷治癒過程においてEGFP陽性の骨髄由来細胞は検出されず、生理的な創傷治癒過程と病的な線維化過程においては骨髄由来のコラーゲン産生細胞は異なる動態を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

強皮症は、皮膚をはじめとする全身諸臓器にコラーゲンやその他の細胞外マトリックス成分の異常沈着をきたす、原因不明の疾患で

ある。コラーゲンは、細胞外マトリックスの主要成分として、組織や臓器形態の保持のみならず組織修復や創傷治癒においても重要な役割を演じているが、その産生調節機構

が破綻をきたすと組織に過剰なコラーゲンが沈着し、皮膚・肺・腎・肝・脾など諸臓器の線維化を引き起こす。

近年、骨髄から皮膚の創傷部位に動員され生着した細胞が、I型コラーゲンを産生することで創傷治癒促進に関与する可能性が報告された^{1,2)}。しかしながら、骨髄由来細胞の同定方法やコラーゲン産生の評価方法は報告によりまちまちで、感度および特異性にも乏しいため、骨髄由来細胞がどの程度創傷治癒に寄与しているかは十分に解明されていない。また、病的な皮膚線維化進展に骨髄由来細胞がどの程度に関わっているかは全く解明されておらず、そのメカニズムも不明であった。

そこで今回、I型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(COL1A2)の組織特異的エンハンサー・プロモーターとEGFPとを連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作製し(図1)、骨髄由来細胞の皮膚組織への生着とコラーゲン産生とを特異的に検出する系を確立するとともに、生理的な創傷治癒と病的な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の有無を比較検討した。

B. 研究方法

上記のトランスジェニックマウス(COL/EGFP Tg)、また対照として恒常的にEGFPを発現するCAG/EGFP Tgの骨髄細胞 5×10^6 個を、致死照射を行った同系マウスの静脈内に投与して骨髄を置換した。骨髄置換後8週を経過したこれらのレシピエントマウスまたはCOL/EGFP Tg自体の背部に、5 mm径のPunch biopsyによる皮膚全層欠損、もしくはブレオ

マイシン(Bleo)を含有したポリ乳酸マイクロスフェアの単回注射による皮膚線維症を誘導した。

Punch biopsy 7日後、またはBleo注射21日後に皮膚組織を採取して、この際みられる骨髄由来細胞の皮膚組織への生着と同細胞におけるCOL1A2プロモーターの活性化を、それぞれCAG/EGFPレシピエントマウス、もしくはCOL/EGFPレシピエントマウスにおけるEGFP蛍光の共焦点レーザー顕微鏡観察により検出した。また、COL/EGFPレシピエントマウスにおけるCOL1A2プロモーターの活性化をCOL/EGFP Tgの場合と比較し、骨髄由来細胞のコラーゲン産生への関与の程度を評価した。さらに、骨髄由来コラーゲン産生細胞の筋線維芽細胞への分化の有無を、抗 α -smooth muscle actin (α SMA)抗体ならびにAlexa660結合ストレプトアビジンを用いた免疫蛍光染色により検討した。この際に共焦点レーザー顕微鏡観察の妨げとなる線維化組織内の自家蛍光は、EGFPとAlexa660の蛍光波長を特異的に検出するEmission Fingerprinting法³⁾を用いて除外した。

C. 研究結果

CAG/EGFPレシピエントマウスを用いた検討では、Punch biopsyによる皮膚全層欠損から癒着治癒へと至る過程において、肉芽組織に血球細胞を主体として無数のEGFP陽性骨髄由来細胞が浸潤していた(図2)。また、Bleo含有ポリ乳酸マイクロスフェアを皮下注射したCAG/EGFPレシピエントマウスでは、局所の真皮が線維性に肥厚し、この線維形成部位や

下層の皮下組織内に血球系や間葉系細胞など様々な形態を示す骨髄由来細胞の浸潤と分化が認められた(図3)。

一方、COL/EGFP Tg に Punch biopsy により皮膚全層欠損を作製した後の肉芽組織(図4)と Bleo 注射により線維性肥厚した真皮組織(図5)の両者において、EGFP 陽性すなわち COL1A2 プロモーターが活性化した間葉系細胞が多数認められ、いずれもその約半数は α SMA 陽性の myofibroblasts であった。

さらに、COL/EGFP レシビエントマウスを用いた検討では、Bleo 投与により線維性に肥厚した真皮内にごく少数の EGFP 陽性細胞、すなわち骨髄由来のコラーゲン産生細胞が検出され間葉系細胞の形態を示していたが、 α SMA との共発現は認められなかった。また、その数は COL/EGFP Tg で認められた皮膚組織固有のコラーゲン産生細胞数に比較してはるかに少数であった。一方、Punch biopsy 後の創傷治癒過程においては、同様の骨髄に由来する EGFP 陽性のコラーゲン産生細胞は検出されなかった。

D. 考案

骨髄には、高い自己複製能とともに全血球細胞への多分化能を有する幹細胞が存在する。加えて近年では、血球以外の細胞への分化能も証明され、再生医学の分野で注目されるに至った。実際、移植された骨髄細胞が様々な皮膚の構成細胞に分化することで、欠損した皮膚組織が再生することが実験的に証明されている^{4,5)}。加えて最近では、骨髄由来細胞が皮膚の創傷部位に生着し、I 型コラーゲンを産生することで創傷

治癒の促進にも関与する可能性が報告された¹⁾。しかしながら、これらの研究における骨髄由来細胞の同定は FACS・Y-FISH・骨髄細胞の遺伝的ラベリングなど、様々な方法が用いられており、コラーゲン産生の評価も感度および特異性に優れた方法がないことが大きな欠点となっている。また、骨髄由来細胞が皮膚線維化進展にどの程度関わっているかは全く解明されておらず、生理的創傷治癒と病的線維化過程との差異も不明である。

今回用いた COL1A2 上流のエンハンサー配列(図1)は、胎児の発生過程を含めて I 型コラーゲンの産生細胞においてのみその活性化が見られ、強い組織特異性を有しているのが特徴である⁶⁾。このエンハンサーを COL1A2 プロモーター、さらには EGFP に連結することで、共焦点レーザー顕微鏡下にコラーゲンの産生細胞を高感度かつ特異的に検出することが可能になった。

この融合遺伝子を保持したトランスジェニックマウス(COL/EGFP Tg)およびその骨髄細胞を移植したレシビエントマウスに Punch biopsy による皮膚全層欠損あるいは Bleo の投与により皮膚線維症を作製し、COL1A2 プロモーターの活性化と骨髄由来細胞のコラーゲン産生への関与を比較検討した。その結果、いずれのモデルにおいても皮膚組織内に顕著な COL1A2 プロモーターの活性化が確認されたが、骨髄由来のコラーゲン産生細胞は Bleo 投与により線維性に肥厚した真皮内においてのみ認められた。このことは、生理的な創傷治癒と病的な線維化過程においては骨髄由来細胞のコラーゲン産生への関与が異なることを示している。また、Bleo 誘発皮膚線維症に

においても骨髄から動員されたコラーゲン産生細胞数は皮膚組織固有のコラーゲン産生細胞数に比較してはるかに少数であり、これまで他臓器で報告された結果に反して、皮膚線維化の進展における骨髄由来細胞のコラーゲン産生への関与は非常に少ないことが明らかになった。

今後、このマウスを用いて皮膚の創傷治癒や線維化の進展過程における I 型コラーゲンの産生を単一細胞レベルでかつ経時的に解析し、線維化進展のメカニズムの解明や新規治療法の開発へと繋げたい。

E. 結 論

I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子上流に存在する組織特異的なエンハンサーとプロモーター、さらに EGFP とを連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを樹立した。このトランスジェニックマウスもしくはその骨髄細胞を移植したレシピエントマウスを用いることで、皮膚組織固有あるいは骨髄由来コラーゲン産生細胞を特異的に検出することが可能となり、臓器線維化の進展メカニズムを解明する上で有用な手段になりうると考えられた。

F. 文 献

- 1) Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, et al: Multiple organ engraftment by bone marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone marrow transplanted mice. *Stem Cells* 21: 514-520, 2003
- 2) Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, et al: In

vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrous lesions. *Stem Cells* 23: 699-706, 2005

- 3) Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, et al: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 45: 213-222, 2007
- 4) Kataoka K, Medina RJ, Kageyama T, et al: Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. *Am J Pathol* 163: 1227-1231, 2003
- 5) Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, et al: Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 196: 245-250, 2003
- 6) Bou-Gharios G, Garrett LA, Rossert J, et al: A potent far-upstream enhancer in the mouse pro $\alpha 2(I)$ collagen gene regulates expression of reporter genes in transgenic mice. *J Cell Biol* 134: 1333-1344, 1996

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yutaka Inagaki, Kiyoshi Higashi, Miwa Kushida, Yun Yu Hong, Sachie Nakao, Reiichi Higashiyama, Tadashi Moro, Johbu Itoh, Toshiyuki Mikami, Toru Kimura, Goshi Shiota, Ichiro Kuwabara, Isao Okazaki: Hepatocyte growth factor

- suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology* 134: 1180-1190, 2008
- 2) Tadashi Moro, Yoshihito Shimoyama, Miwa Kushida, Yun Yu Hong, Sachie Nakao, Reiichi Higashiyama, Yoshihiko Sugioka, Hideo Inoue, Isao Okazaki, Yutaka Inagaki: Glycyrrhizin and its metabolite inhibit Smad3-mediated type I collagen gene transcription and suppress experimental murine liver fibrosis. *Life Sciences* 83: 531-539, 2008
- 3) 稲垣 豊、東山礼一: 肝線維化機序の解明で今何が問題になっているのか. *肝胆膵* 57: 187-192, 2008
2. 学会発表
- 1) 茂呂 忠、中尾祥絵、東山礼一、池田一雄、岡崎 勲、稲垣 豊: マウス部分胆管結紮モデルの確立と抗線維化薬の薬効評価への応用. 第40回日本結合組織学会学術大会・第55回マトリックス研究会大会合同学術集会、2008年5月29日、東京
- 2) 東山礼一、中尾祥絵、茂呂 忠、渋沢弥生、石川 治、岡崎 勲、稲垣 豊: 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合成への関与. 第40回日本結合組織学会学術大会・第55回マトリックス研究会大会合同学術集会、2008年5月30日、東京
- 3) 稲垣 豊、東山礼一、池田一雄、岡崎 勲: 骨髄由来細胞は肝線維化の進展に関与するか. 第44回日本肝臓学会総会、2008年6月6日、松山
- 4) 東山礼一、稲垣 豊、渡辺 哲、岡崎 勲: 骨髄由来細胞の動員とMatrix metalloproteinases (MMPs)発現による肝線維化改善機序の解明. 第44回日本肝臓学会総会、ワークショップ(8)「肝障害と修復に関する研究の展開」、2008年6月6日、松山
- 5) 根本 朋幸、山崎 幸直、稲垣 豊: マウス非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデルにおける分枝鎖アミノ酸(BCAA)の有効性の検討. 第50回日本消化器病学会大会、2008年10月2日、東京
- 6) 稲垣 豊: 臓器線維症の病態と治療戦略. 第49回日本組織細胞化学会総会学術集会、シンポジウム(2)「線維化機構の分子形態的解析」、2008年10月5日、長崎
- 7) 稲垣 豊: 線維化治療と再生医学との接点. 第32回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「NASHへの挑戦—創薬の可能性を探る—」、2008年10月7日、東京
- 8) Yutaka Inagaki, Reiichi Higashiyama, Tadashi Moro, Sachie Nakao, Kazuo Ikeda, Isao Okazaki: Little contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2008. 11. 3, San Francisco, CA
- 9) Reiichi Higashiyama, Tadashi Moro, Sachie Nakao, Tetsu Watanabe, Veli-Matti, Kahari, Noriko Hattori,

Yasunori Okada, Isao Okazaki, Yutaka Inagaki: Matrix metalloproteinases enhance migration of bone marrow-derived cells and contribute to the regression of experimental liver fibrosis. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2008. 11. 3, San Francisco, CA

10) 東山礼一、茂呂 忠、中尾祥絵、岡崎 勲、稲垣 豊: 骨髄細胞由来 Matrix metalloproteinases (MMPs)による肝線維化改善機序の解明. 第22回肝類洞壁細胞研究会、ワークショップ2「肝再生と肝類洞壁細胞」、2008年11月29日、久留米

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

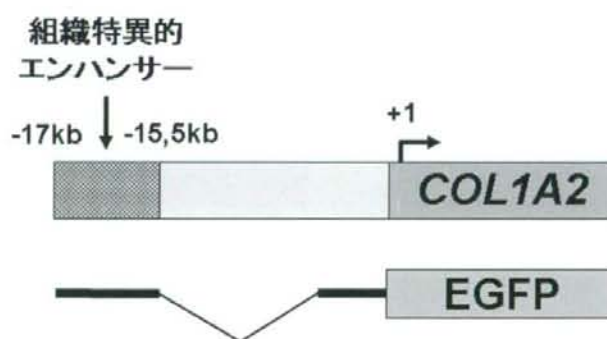


図1: COL1A2 エンハンサー・プロモーター/EGFP 融合遺伝子

COL1A2 遺伝子の転写開始部位の上流-17.0 から-15.5 kb 間には、胎児の発生過程から出生・成熟後を通じて I 型コラーゲンの産生細胞においてのみ活性化が認められる組織特異性の高いエンハンサーが存在する。このエンハンサーを近位部プロモーター、さらに EGFP に連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス(COL/EGFP Tg)を用いることで、共焦点レーザー顕微鏡下にコラーゲン産生細胞を高感度かつ特異的に検出することが可能になった。
+1: 転写開始部位。

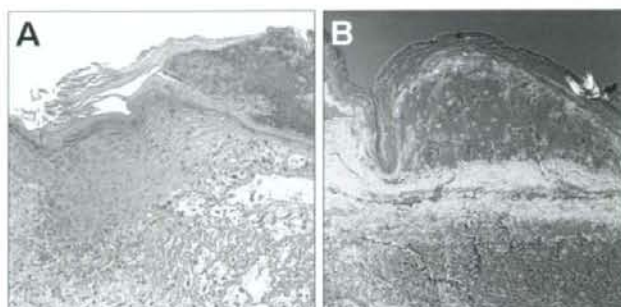


図 2 : 皮膚全層欠損後の治癒過程における骨髄由来細胞の動員と肉芽組織への生着

Punch biopsy による皮膚の全層欠損を作製した CAG/EGFP レシビエントマウスでは肉芽組織が形成され (A)、同部には血球細胞を主体とする無数の骨髄由来細胞の浸潤が認められた (B)。

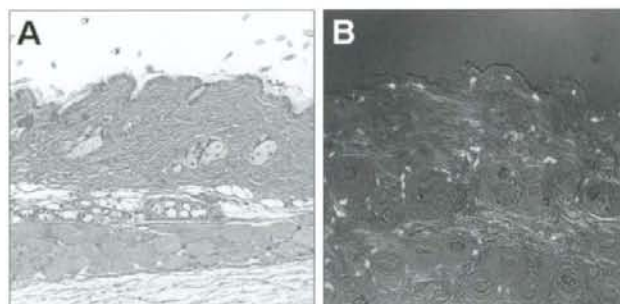


図 3 : プレオマイシン誘発皮膚線維症における骨髄由来細胞の動員と皮膚組織への生着

プレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアを皮下注射した CAG/EGFP レシビエントマウスでは局所の真皮が線維性に肥厚して (A)、この線維形成部位や皮下組織内に血球系や間葉系細胞など様々な形態を有する骨髄由来細胞の浸潤と分化が認められた (B)。

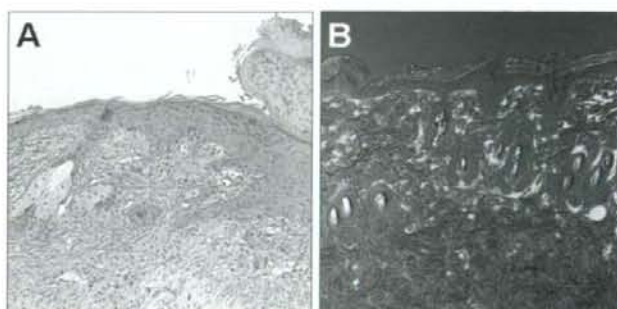


図4：皮膚全層欠損後の治癒過程におけるI型コラーゲンプロモーターの活性化

COL/EGFP Tgの背部にPunch biopsyによる皮膚の全層欠損を作製すると肉芽組織が形成され(A)、EGFP陽性すなわちCOL1A2プロモーターが活性化した間葉系細胞が多数認められた(B)。

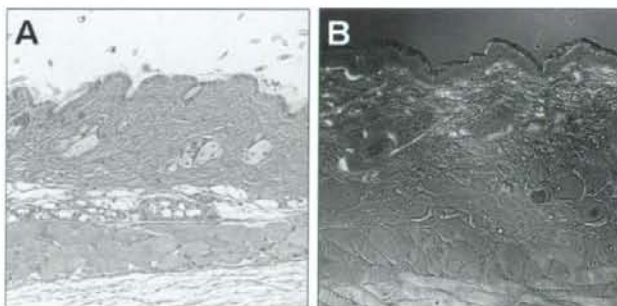


図5：ブレオマイシン皮下投与による皮膚線維症の誘導とI型コラーゲンプロモーターの活性化

COL/EGFP Tgの背部にブレオマイシンを含有したポリ乳酸マイクロスフェアを単回皮下注射すると真皮が線維性に肥厚し(A)、同部にEGFP陽性すなわちCOL1A2プロモーターが活性化した間葉系細胞が多数認められた(B)。

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

強皮症末梢血単球のフェノタイプ解析

研究分担者	桑名正隆	慶應義塾大学医学部内科准教授
協力者	増田絢子	慶應義塾大学医学部内科大学院生
協力者	安岡秀剛	慶應義塾大学医学部内科助教
協力者	山口由衣	横浜市立大学大学院環境免疫皮膚科学助教
協力者	岡崎有佳	慶應義塾大学医学部内科大学院生
協力者	佐藤隆司	慶應義塾大学医学部内科特別研究助教

研究要旨

強皮症は過剰な線維化を特徴とする疾患であるが、その機序にはいまだ不明な点が多い。近年、様々な線維化病態への末梢血単球の関与が示されている。そこで、本研究では単球の強皮症病態への関与を追究することを目的とした。末梢血単球における遺伝子発現プロファイルをDNAアレイを用いて網羅的に解析した結果、強皮症で高発現する遺伝子として MCP-1 および Versican が抽出された。これら遺伝子の発現レベルを定量的 PCR 法を用いて強皮症および健常人と比較すると、強皮症で有意に高いことが確認された。免疫染色による解析では単球細胞質で Versican と MCP-1 は共存していた。末梢血単球を用いた *In vitro* の実験系で Versican が MCP-1 と結合することで単球の遊走を促進することが示された。したがって、強皮症では末梢血単球で Versican と MCP-1 の発現が亢進し、病変局所での MCP-1 の濃度勾配が形成され、末梢血単球のさらなる遊走と MCP-1 を介した線維化プロセスが促進される可能性が考えられた。

A. 研究目的

強皮症は皮膚および内臓諸臓器における過剰な線維化を特徴とする疾患である。組織学的特徴として、発症早期には血管周囲を主体とした単球、リンパ球の浸潤が認められ、進行期には細胞外マトリックスの沈着による過剰な線維化が認められる¹⁾。しかし、その原因や機序にはいまだ不明な点が多い。

近年、線維化の病因として、炎症性細胞由来の細胞成長因子・サイトカイン・ケモカインが線維芽細胞を刺激し、線維化を促進する可能性が指摘されてい

る。線維化を誘導することが知られる液性因子として TGF- β 、PDGF、IL-1、IL-6、MCP-1 などが挙げられるが、末梢血単球はこれら線維化促進因子を産生する細胞の一つである。強皮症患者の皮膚に浸潤した単核細胞(特に活性化マクロファージ)は TGF- β 、PDGF を発現し、単球を遊走するケモカインの MCP-1 は肺や皮膚などの強皮症の病変局所で増加し²⁾、その受容体である CCR2 をノックアウトしたマウスではプレオマイシン投与に伴う線維化が抑制される³⁾。また、末梢血単球が MCP-1/CCR2 の刺

激によりI型コラーゲンを産生するという報告があり、末梢血単球が細胞外マトリックスを産生して直接線維化を引き起こす可能性も指摘されている⁹⁾。

しかし、強皮症病態における末梢血単球の寄与はいまだ明らかでない。そこで、本研究では末梢血単球の強皮症病態への関与を追究した。

B. 研究方法

1. 対象

文書によるインフォームドコンセントにより本研究内容に承諾を得た、アメリカリウマチ学会(ACR)の分類基準¹⁰⁾を満たす強皮症患者 36 例(男女比 4 : 32, 55.3 ± 15.9 歳)を対象とし、健常人 32 例をコントロールとした。強皮症患者 22 例(61.6%)は diffuse 型、全例でレイノー現象を認め、22 例(61.6%)で間質性肺炎を認めた。

2. 末梢血単球の網羅的な遺伝子発現解析

強皮症患者 10 例(男女比 2 : 8, 46.4 ± 13.2 歳, 全例 diffuse 型)を対象とし、コントロールとして健常人 10 例を用いた。末梢血 20mL から分離した末梢血単核球(PBMC)より、MACS ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いて CD14 陽性単球を分取した。CD14 陽性単球より全 RNA を抽出し、同量の全 RNA を総量が 3-5 μ g になるよう各 5 例分ずつをまとめ、それぞれ Group1(NHC-1, SSc-1) および Group2(NHC-2, SSc-2)と 2 群作成した。それぞれ 3 種類の Oligo GEArray[®] System (SuperArray)とハイブリダイズさせ、合計 330 遺伝子について、強皮症と健常人で発現が異なる候補遺伝子をスクリーニングした(Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecule, Human Endothelial Cell Biology, Human Chemokine and Receptors)。各種遺伝子の発現量は GAPDH 発現量で補正し、候補遺伝子の選択基準は強皮症患者と健常人の間で発現比が 1.5 倍以上異なる遺伝子とした。

網羅的解析によるスクリーニングで抽出された候補遺伝子は、さらに定量的 PCR 法による確認を行った。CD14 陽性単球より全 RNA を抽出し、逆転写酵素により作成した cDNA および TaqMan[®] Gene Expressions Assays の TaqMan プローブ(Versican; Hs00171642, MCP-1 ; Hs00234140, Applied Biosystems)を用いた。各遺伝子の発現量は GAPDH 発現量で補正して比較した。

3. 末梢血単球中の Versican・MCP-1 の局在解析

CD14 陽性単球を RPMI1640 で懸濁し、BD BioCoat[™] Poly-D-Lysine Cellware (BD Biosciences)の各ウェルに 10⁵ 細胞ずつ分注した。37°C、5% CO₂の条件下で 2 時間培養した後、冷アセトンで固定し、5% BSA/PBS で 30 分間ブロッキングした。それぞれマウス抗ヒトゴルジ体モノクローナル抗体(Molecular Probes)またはウサギ抗ヒト MCP-1 ポリクローナル抗体(Abcam)、およびヤギ抗ヒト Versican モノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)と反応させ、さらに Alexa Fluor[®] 488 標識抗マウス抗体または Alexa Fluor[®] 488 標識抗ウサギ抗体、および Alexa Fluor[®] 568 標識抗ヤギ抗体(Molecular Probes)と反応させた。また、核の対比染色には To-Pro-3 (Molecular Probes)を使用した。共焦点レーザー顕微鏡で観察し、末梢血単球における MCP-1 および Versican の局在を解析した。

4. 末梢血単球の機能的解析

プレートにコートした CS 鎖(CS-B, 生化学工業)に結合した MCP-1 が CD14 陽性単球の遊走を促進するかを Migration Assay で検討した。

CS 鎖を Carbonate buffer (Na₂CO₃ 15mM、NaHCO₃ 10mM)で希釈し、Costar Transwell[®] (Coning)の下層に 4°C で 24 時間以上かけてコートした。結合しなかった CS 鎖を洗浄した後、PBS で 50ng/mL に希釈したリコンビナント ヒト MCP-1(R&D Systems)を添加し、37°C で 2 時間インキュベートさせ

た。CS 鎖に結合しなかった MCP-1 は PBS で 5 回洗浄した後、1%BSA 添加 RPMI 1640 を $600\mu\text{L}$ ずつ分注し、上層に健康人由来の CD14 陽性単球を 3×10^5 細胞ずつ分注して 2 時間培養した。遊走率は下層へ移動した細胞数を計算版によりカウントし、分注した総細胞数における割合(%)として算出した。さらに CS 鎖および MCP-1 を添加していないコントロールでの遊走率を 100%として換算し、それぞれ比較した。また、一部の実験で CS 鎖に MCP-1 を結合させた後に抗ヒト MCP-1 抗体(R&D Systems)もしくはネガティブコントロールマウス IgG1(Dako)を加えて室温 30 分間で反応させた。さらにコートする CS 鎖の量が異なる 3 種類のプレート($10\mu\text{g/mL}$ 、 $50\mu\text{g/mL}$ 、 $250\mu\text{g/mL}$)を作成し、それぞれの MCP-1 による遊走率を比較した。

3. 統計学的解析

2 群間の比較は Mann-Whitney U -test を用いて検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

1. 末梢血単球の網羅的な遺伝子発現解析

健康人および強皮症患者単球由来の CD14 陽性末梢血単球より mRNA を抽出し、健康人と強皮症で発現レベルに差のある候補遺伝子を DNA アレイによるスクリーニングにより選択した。その結果、8種類の遺伝子(Type I collagen, Versican, Selectin-L, MCP-1, IL-8, MMP2, CCRI, CCRL2)が強皮症単球で高発現する候補遺伝子として抽出された。これら8種類の候補遺伝子について、さらに強皮症 34 例と健康人 32 例で定量的 PCR 法を用いて mRNA 発現レベルを比較した結果、強皮症単球で高発現する遺伝子として MCP-1 ($p = 0.04$)および Versican ($p < 0.01$)が同定された(図 1)。また、Versican に含まれる 4 種類の splice variant ごとの mRNA 発現レベル解析の結果、Versican-0 ($p = 0.02$)、Versican-1 ($p =$

0.03)が強皮症末梢血単球で高発現していた。

2. 末梢血単球中の Versican・MCP-1 の局在解析

末梢血単球中における MCP-1 および Versican の局在を明らかにするために免疫染色を行った。その結果、MCP-1 および Versican は局在が一致し、ゴルジ体に偏在していた。この結果は強皮症と健康人で差はなかった。

3. 末梢血単球を用いた機能的解析

CS 鎖に結合した MCP-1 が単球遊走に与える影響を追及するため、健康人単球を用いた Migration assay で検討した。その結果、MCP-1 のみを添加したプレートではみられなかった遊走活性が、CS 鎖をコートすることで確認された(図 2)。さらに、CS 鎖に結合した MCP-1 による遊走活性は、MCP-1 に対する中和抗体で抑制された(図 3-a)。また、CS 鎖の濃度が異なる条件での遊走活性を比較したところ、濃度依存的に増強された(図 3-b)。

D. 考案

今回の解析より、強皮症患者の末梢血単球に高発現する遺伝子として MCP-1 および Versican が同定された。したがって強皮症末梢血単球は健康人と異なるフェノタイプを有していた。

Versican はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一種で、コアタンパクと CS 鎖から構成される。コアタンパクの長さおよび CS 鎖の本数により、4 種類の splice variant が存在する⁶⁾。Versican には、ヒアルロン酸、I 型コラーゲンなどと結合する細胞外マトリックスとしての機能および CS 鎖を介したケモカイン貯蔵体としての機能という2つの作用が考えられている⁶⁾。本研究の解析では強皮症で Versican-0、Versican-1 が高発現していたが、これらはいずれもコアタンパクが長く、多くの CS 鎖をもつことから、ケモカインやサイトカインと結合する能力が高いと考えられる。実際、CS 鎖を用いた In vitro での機能的解