

200936037A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 伸一

平成22年（2010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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 伸一

平成22年（2010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（東京大学大学院医学系研究科皮膚科学）

II. 分担研究報告

1. プレオマイシン誘導性皮膚硬化における Sunitinib の効果について…………… 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, 若槻妙子
2. 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) を標的とした新規治療法の試み…………… 9
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, 若槻妙子
3. Tight-skin (TSK) マウスおよびプレオマイシン (BLM) 誘発強皮症 (SSc) マウスモデルにおけるラパマイシンの効果に関する検討…………… 18
研究代表者 佐藤伸一（東京大学大学院医学系研究科皮膚科学）
協力者 吉崎 歩, 築場広一
研究分担者 浅野善英, 小川文秀
4. Tight skin (TSK) マウスにおける硫化水素の効果…………… 30
研究代表者 佐藤伸一（東京大学大学院医学系研究科皮膚科学）
協力者 室井栄治, 吉崎 歩, 築場広一, 原 肇秀, 竹中 基, 清水 和宏
研究分担者 小川文秀
5. TGF- β /Smads シグナルを抑制する新規低分子化合物の強皮症モデルに対する治療効果の検討…………… 37
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 松下幸世, 堀川真由香, 白崎文朗, 東 清史, 冨ヶ原祥隆, 金子秀雄
竹原和彦
研究分担者 藤本 学
研究代表者 佐藤伸一
6. 汎発性強皮症患者の皮膚硬化および微小血管障害に対するメシル酸イマチニブの効果…………… 46
研究代表者 佐藤伸一（東京大学大学院医学系研究科皮膚科学）
研究分担者 浅野善英
協力者 玉城善史郎, 川嶋智彦, 冨田 学, 宮寄美幾, 谷口隆志, 蘆田龍一
波多野将, 八尾厚史, 志賀太郎, 絹川弘一郎

7. 全身性強皮症に合併した難治性皮膚潰瘍に対するボセンタンの有効性～7例の自験例についての報告～……………50
 研究代表者 佐藤伸一（東京大学大学院医学系研究科皮膚科学）
 協力者 吉崎 歩， 築場広一， 岩田洋平
 研究分担者 小川文秀
8. 全身性強皮症の指尖潰瘍に対するボセンタン投与例の検討……………54
 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）
 協力者 永井弥生， 長谷川道子
9. 全身性強皮症に見出された新規抗核抗体：抗 RuvBL1/RuvBL2 抗体……………60
 研究分担者 桑名正隆（慶應義塾大学医学部リウマチ内科）
 協力者 加治賢三， 佐藤隆司， 星野香菜， 濱口儒人， 竹原和彦
 研究分担者 藤本 学， 小川文秀
 研究協力者 長谷川稔
 研究代表者 佐藤伸一
10. 強皮症患者における抗トポイソメラーゼI抗体はいつから産生されるか？……………66
 研究分担者 桑名正隆（慶應義塾大学医学部リウマチ内科）
 協力者 鍋木淳一
11. 循環血中血管内皮前駆細胞（EPC）定量法の標準化……………71
 研究分担者 桑名正隆（慶應義塾大学医学部リウマチ内科）
 協力者 岡崎有佳， 佐藤隆司， 安岡秀剛
12. 強皮症肺線維症における NAMPT/PBEF/Visfatin の検討……………77
 研究分担者 遠藤平仁（東邦大学医療センター大森病院膠原病科）
13. IL-2/18 誘導間質性肺炎における NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の役割……………81
 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， 古賀洋平， 杉原誠人， 林 太智， 千野裕介， 松本 功， 伊藤 聡， 住田孝之
14. マトリックスの合成と分解からみた臓器線維症の治療戦略……………88
 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， 三上健一郎
 研究代表者 佐藤伸一
15. 強皮症の病態におけるアクチビンの関与……………93
 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）
 協力者 高木香恵， 深澤千賀子， 栃本明子， 大田ゆう子

16. Basic fibroblast growth factor による培養ヒト皮膚線維芽細胞増殖刺激作用に
関与するシグナル経路の検討…………… 99
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学)
協力者 牧野貴充, 神人正寿, 伊方勝敏, 藤澤明彦, Faith Muchemwa,
井上雄二
17. 転写因子 Flil が angiogenesis における血管内皮細胞の動態に及ぼす影響…………… 113
研究分担者 浅野善英 (東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科)
協力者 Lukasz Stawski, Maria Trojanowska
18. メシル酸イマチニブによる皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン産生抑制の
機序…………… 123
研究分担者 浅野善英 (東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科)
協力者 Andrea Bujor, Maria Trojanowska
19. ガドリニウムによる皮膚線維化・石灰化誘導機序についての検討…………… 132
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
20. 全身性強皮症と FAM167A (C8orf13) -BLK および STAT4 領域遺伝子多型の
関連…………… 139
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)
研究協力者 長谷川稔
研究分担者 川口鎮司, 藤本 学
研究代表者 佐藤伸一
協力者 伊東郁恵, 川崎 綾, 竹原和彦, 原まさ子
21. 汎発性強皮症における血清 soluble VEGF2 型レセプター濃度の検討…………… 146
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学)
協力者 神人正寿
22. 全身性強皮症における血清 vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D)
値の検討…………… 152
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学)
協力者 本多教稔, 神人正寿, 梶原一亨, 牧野貴充
23. 全身性強皮症における血清 CXCL16 値は皮膚硬化の重症度と相関する…………… 157
研究代表者 佐藤伸一 (東京大学大学院医学系研究科皮膚科学)
研究協力者 築場広一
24. 汎発性強皮症における血清 soluble CD163 濃度の検討…………… 161
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学)
協力者 中山若菜, 神人正寿, 牧野貴充, 梶原一亨

25. 全身性強皮症患者血清における血管新生因子の検討…………… 165
 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. 全身性強皮症における血清 Carbonic Anhydrase IX (CA9) 値の検討…………… 171
 研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学)
 協力者 牧野雄成, 神人正寿, 中山若菜, 梶原一亨, 牧野貴充
27. 新規抗リン脂質抗体フォスファジルセリン依存性 IgM 型抗プロトロンビン抗体 (IgM-aPS/PT) の臨床的特徴 (第2報)…………… 175
 研究分担者 藤本 学 (金沢大学大学院医学系研究科皮膚科)
 研究協力者 山崎雅英, 長谷川稔
 協力者 竹原和彦
28. 全身性強皮症における肺高血圧症スクリーニングの検討…………… 180
 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
29. ¹³C-呼気試験を用いた全身性強皮症腸管病変の定量的解析…………… 185
 研究分担者 遠藤平仁 (東邦大学医療センター大森病院膠原病科)
 協力者 山本竜太, 瓜田純久, 川合眞一
30. 全身性強皮症における消化管機能の定量化法に関する研究…………… 189
 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 稲木杏吏
31. 全身性強皮症における特定疾患臨床調査個人票の解析…………… 193
 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
32. 強皮症合併間質性肺炎に対する喫煙の影響…………… 199
 研究協力者 安井正英 (金沢市立病院呼吸器内科)
 研究協力者 長谷川稔
 協力者 竹原和彦
33. 汎発性強皮症における cobblestone appearance の検討…………… 207
 研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学)
 協力者 梶原一亨, 神人正寿, 牧野貴充

34. 全身性強皮症のリハビリテーション—その自主トレーニングの提案—	211
研究協力者	麦井直樹 (金沢大学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	八幡徹太郎, 染矢富士子, 堀江 翔, 竹原和彦
研究代表者	佐藤伸一
35. morphea 様皮疹を伴った全身性強皮症の臨床的特徴	225
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	斎藤 敦, 加治賢三, 濱口儒人, 竹原和彦
研究協力者	長谷川稔
36. 全身性強皮症合併肺動脈性肺高血圧症の長期生命予後についての研究	229
研究協力者	田中住明 (北里大学医学部膠原病感染内科学)
37. 経皮的血行再建術 (PTA) が奏功した全身性強皮症の 1 例 (PTA: percutaneous transluminal angioplasty)	232
研究分担者	尹 浩信
協力者	緒方亜紀 (熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学)
38. トラクリア (ボセンタン [®]) が皮膚硬化の改善に著効した全身性強皮症の 1 例	235
研究分担者	山本俊幸 (福島県立医科大学皮膚科学)
協力者	尾山徳孝, 中村妙子, 西部明子
39. 全身性強皮症と ANCA 関連腎炎で加療中に汎発性膿疱乾癬を合併した 1 例	239
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	上原顕仁, 長谷川道子, 永井弥生, 田村敦志
40. Gemcitabine により誘発されたと考えた強皮症様皮膚硬化の 1 例	244
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	熊田朗子, 加治賢三, 濱口儒人, 大坪公士郎, 竹原和彦
研究分担者	藤本 学
研究代表者	佐藤伸一
41. 全身性強皮症における血清 pulmonary and activation-regulated chemokine/ CCL18 値は間質性肺炎の鋭敏なマーカーになり得る	249
研究協力者	小寺雅也 (社会保険中京病院皮膚科)
研究協力者	長谷川稔
研究者	小村一浩, 築場広一, 竹原和彦
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	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学	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	東邦大学医療センター大森病院膠原病科	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
浅野 善英	東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科	助教	
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	金沢大学医薬保健研究域医学系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	金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学（血液内科）	講師
	麦井 直樹	金沢大学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	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 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	東邦大学医療センター大森病院膠原病科 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	慶應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
研究分担者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科 助教

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った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に伴う免疫学的異常として、新規自己抗体の同定、抗トポイソメラーゼ I 抗体と臨床症状発現との時間的関連性などについて解析した。その他、FAM167A-Blk 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では、I型コラーゲン産生が亢進しているが、それに対するメシル酸イマチニブの抑制機序について解析した。また、VisfatinのSSc関連間質性肺炎に対する関与についても解析を行った。

(3) SScにおける血管異常

SScにおける循環血中血管内皮前駆細胞の増減に関する従来の報告は結果が一致していないことから、その定量法の標準化を試みた。また、SScの血管障害に対するFlil1の関与について、血管内皮細胞特異的Flil1欠失マウスを用いて解析した。

(4) 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) マウスを用いて、ラパマイシン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) 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有効性を検証した：①皮膚硬化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、②イマチニブの肺高血圧症、皮膚硬化、微小循環障害への有効性。

(2) SScの病態や臨床症状と関連する血清マーカーを同定するために、血清CXCL16値、血清可溶性

VEGF2型受容体値、血清angiogenin値を測定し、各種臨床症状との関連性を解析した。

(3) 実態調査のために、特定疾患臨床調査個人票約6500件を解析した。

(4) 従来より、機能評価が困難であった下部消化管病変の評価方法について検討した。

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

SScでは自己抗体は特定の臨床像としばしば関連するため病因論的にも臨床的にも重要である。SScの3.7%に抗RuvBL1/RuvBL2抗体が新規自己抗体として同定された（桑名）。臨床的にはdiffuse型のSScに多く、間質性肺炎、心筋障害、血清CK値上昇と相関していたことから、臨床的に重要な自己抗体となり得る可能性がある。また、抗トポイソメラーゼI抗体はSScの症状発現とほぼ同時に陽性となり、クラススイッチが起こることも明らかになり、SScにおける自己抗体と症状発現との時間的関係が初めて示された（桑名）。IL-2/18誘導間質性肺炎モデルで、NK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞が関与していることも明らかにされたことから、間質性肺炎が生じる新しい機序が提示された（後藤）。

これまで全身性エリテマトーデスや関節リウマチとの関連が報告されているFAM167A-Blk遺伝子間SNP rs13277113とSScとの関連性が見いだされた（土屋）。この多型は、複数のリウマチ性疾患に共通した遺伝因子であることが解明された。

(2) コラーゲン産生亢進を誘導する線維芽細胞異常

Visfatinが培養肺線維芽細胞を活性化し、間質性肺炎を伴うSScの気管支肺胞洗浄液中や肺組織中に発現し、プレオマイシン誘導性間質性肺炎におい

ても、その病変の進行と並行して増加していた（遠藤）。従って、visfatin は SSc 関連間質性肺炎の病態に関与していることが明らかにされ、治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

メシル酸イマチニブは SSc をはじめ、多くの線維性疾患の治療に有効性が期待されているが、イマチニブが I 型コラーゲン産生を抑制する新しい機序として、I 型コラーゲン遺伝子の強力な転写抑制因子である Fli1 を介することを明らかにした（浅野）。

(3) SSc における血管異常

SSc における循環血中血管内皮前駆細胞の増減に関する従来の報告は結果が一致していないことから、EUSTAR により推奨された 2 つの方法の有用性を比較検討した。部分的に濃縮した EPC 分画を用いたフローサイトメトリーによる CD34⁺C133⁺ VEGFR2⁺ 細胞の検出に、死細胞の除去、蛍光ビーズによる定量化を組み合わせることで、再現性のある結果が得られ、循環血中血管内皮前駆細胞の定量法の標準化を示した（桑名）。

Fli1 は angiogenesis に密接に関与している転写因子であり、SSc の血管障害に関与が示唆されている。血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスが SSc に見られる微小血管障害を来す機序について明らかにした（浅野）。

(4) 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 の投与による皮膚硬化の改善のメカニズムを明らかにした（山本）。さらに、TSK マウスで、抗酸化作用を有する硫化水素を投与したところ皮膚硬化の改善が認められた（小川）。同様に、TSK マウスやブレオマイシン誘発皮膚硬化モデルにおいて、免疫抑制薬であるラパマ

イシンが皮膚硬化を軽減することが示された（佐藤）。さらに、TSK マウスやブレオマイシン誘発性間質性肺炎モデルにおいて、転写因子 YB-1 の核内移行の活性化を介して TGF- β /Smads を阻害する化合物 HSc025 の投与によって線維化が軽減された（長谷川）。ブレオマイシン誘導性皮膚硬化に対して、分子生物薬 sunitinib の有効性を示す結果も提示された（山本）。このように、本年度も SSc の新規治療となり得るシーズを得ることができた。

2. 臨床研究

昨年度に引き続き、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンが、皮膚潰瘍を改善することを示す報告がなされた（佐藤、石川）。また、イマチニブが SSc に伴う肺高血圧症、皮膚硬化および微小血管障害に対して有用性を示唆する臨床研究も報告された（浅野）。

臨床症状と相関する血清マーカーの同定に関して、血清 CXCL16 値と皮膚硬化の相関（佐藤）、血清可溶性 VEGF2 型受容体値と毛細血管拡張の相関（尹）、血清 angiogenin 値と皮膚硬化の相関（藤本）などが示された。

特定疾患臨床調査個人票について約 6500 件を解析し、実態調査も行った（小川）。従来より、機能評価が困難であった下部消化管病変について、¹³C 呼吸試験（遠藤）や核医学的な定量評価法（中嶋）がその評価に有用であることが示された。さらに、SSc の QOL を改善するツールとして有用性が高く期待されているリハビリテーションについて、その最終的なプログラムが報告された。これをインターネットで公開することによって、患者自身がリハビリテーションを行うことが可能となり、QOL の向上が図れるものと期待される。

C. 結 論

基礎研究では、新規自己抗体の同定、FAM167A-Blk の遺伝子多型、イマチニブによるコラーゲン産生抑制機序の解明、visfatin の SSc 関連間質性肺炎に対する関与、循環血中血管内皮前駆細胞の定量法の標準化、血管障害に対する Fli1 の関与などが主な進歩であった。さらに、動物モデルを用いて、ラパマイシン、硫化水素、HSc025、sunitinib など治療のターゲットとなる候補分子を同定することができた。

臨床研究では、皮膚潰瘍に対するエンドセリン受容体拮抗薬の有用性、肺高血圧症、皮膚硬化および微小血管障害に対するイマチニブの有用性が示唆された。また特定疾患臨床調査個人票について約 6500 件を解析し、実態調査も行った。下部消化管病変の評価方法についても進歩が見られた。これら以外に、昨年度はホームページ上に SSc 診療医のリストを掲載することによって、患者が出来るだけ早く SSc の専門家に受診できるようなシステムを構築した。

II. 分担研究報告

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化における Sunitinib の効果について

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 若槻妙子 福島県立医科大学医学部皮膚科 大学院生

研究要旨

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化に対する分子生物薬 sunitinib の効果検討を行った。C3H/HeJ マウスの背部に、ブレオマイシン (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を皮内注射すると同時に、sunitinib (4 mg/kg/day、40 mg/kg/day) を3週間 (週5回) 経口投与した。観察期間内では sunitinib は tolerable であり、皮膚硬化の誘導は、病理組織学的に抑制されてみられた。真皮厚、病変部に浸潤する肥満細胞数、皮膚のコラーゲン含有量も有意に抑制されてみられた。一方、ブレオマイシン処理により皮膚硬化を誘導した後に sunitinib を投与した postonset experiment では、皮膚硬化は抑制されなかった。ブレオマイシン処理により、真皮線維芽細胞様細胞に phospho-PDGF receptor が発現してみられ、sunitinib が PDGF receptor のリン酸化を抑制するチロシンキナーゼ阻害作用を有するために皮膚硬化を抑制する機序が推察されるが、さらに詳細な検討が必要である。

A. 研究目的

われわれは、これまでにブレオマイシンの局所投与によりマウスに皮膚硬化を誘導し、強皮症モデルとして報告してきた。このモデルを用いて様々な治療薬の線維化抑制効果が報告されている。

近年、imatinib を始めとする幾つかの生物製剤がヒト強皮症および強皮症モデルマウスにおいて皮膚硬化を抑制したとの報告が散見され、新たな治療薬としての可能性が期待されている。

Sunitinib は、種々のチロシンキナーゼを阻害するマルチキナーゼ阻害剤であり、VEGF 受容体を始め、PDGF 受容体、KIT などのリン酸化を抑え活性化を抑制する。今回、このモデルに sunitinib を全身投与し、ブレオマイシン誘導性皮膚硬化に与える影響を検討した。

B. 研究方法

I. Ongoing experiment

C3H/HeJ マウス (6週令、雌) (n=5) の背部に、ブレオマイシン (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) およびコントロールの PBS を 100 μl ずつ、週5日間、計3週間皮内注射した。同時に、sunitinib (Pfizer 社より供与) を生食に溶解し、4 mg/kg および 40 mg/kg の投与量になるよう調整し、経口ゾンデ針を用いて週5回、3週間経口投与した。その後 8 mm パンチでブレオマイシン処理部を採取し、ホルマリン固定ならびに -80°C で凍結保存した。標本は HE、Masson trichrome、toluidin blue 染色を試行した。真皮に浸潤する肥満細胞数は、toluidin blue 染色した標本を X400 視野でカウントした。また collagen 測定キットを用いて皮膚に含有されるコラーゲン量を測定し

た。

II. Post-onset experiment

はじめにブレオマイシンのみの投与で皮膚硬化を誘導したのち、sunitinib (40 mg/kg) を週に5回、3週間投与した (n=5)。同様に皮膚を採取し、病理組織学的に検討した。

C. 研究結果

I.

はじめに、ブレオマイシン処理した病変部皮膚における phospho-PDGF-R ($-\alpha$, $-\beta$) の発現を免疫組織学的に検討した (抗体はいずれも Santa Cruz 社)。

真皮内の線維芽細胞様細胞に、どちらも陽性所見がみられた (図1)。

II.

Ongoing experiment では、ブレオマイシンによる皮膚硬化の誘導は抑制され、HE 染色像でみられる真皮膠原線維の膨化・肥厚は有意に抑制されてみられた (図2)。さらに、真皮厚、肥満細胞数、皮膚に含有されるコラーゲン量はいずれも有意に減少してみられた (図3-5)。

III.

一方、post-onset experiment では、皮膚硬化の誘導は sunitinib 投与によっても抑制されなかった。

D. 考察

今回の検討で、ブレオマイシンによって誘導された皮膚硬化病変は、sunitinib を同時に全身投与することによって抑制されることが確認された。

Sunitinib は3週間の観察期間内で tolerable であった。

Sunitinib の臓器線維化に対する過去の報告は、ラットの肝線維化を抑制したという報告が見られる程度である (1)。Sunitinib の抗線維化機序については未だ不明であるが、一つは PDGF-R のリン酸化を抑制する機序が推察される。さらに、VEGR-R を同時に抑制する働きもその一端を担っているのかもしれない。

E. 結論

今後、sunitinib の抗線維化の機序についてのさらなる検討と、肺線維化に対する抑制効果の評価、および血清学的な変動なども検討していきたい。

F. 文献

1. Tugues, S., Fernandez-Varo, G., J., et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007; 46: 1919.

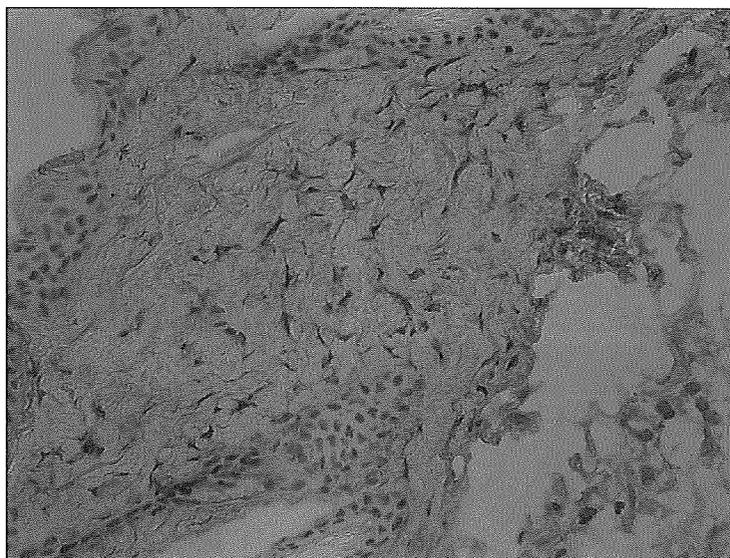


図1：ブレオマイシン処理した皮膚病変部における phospho-PDGF-R- β の発現

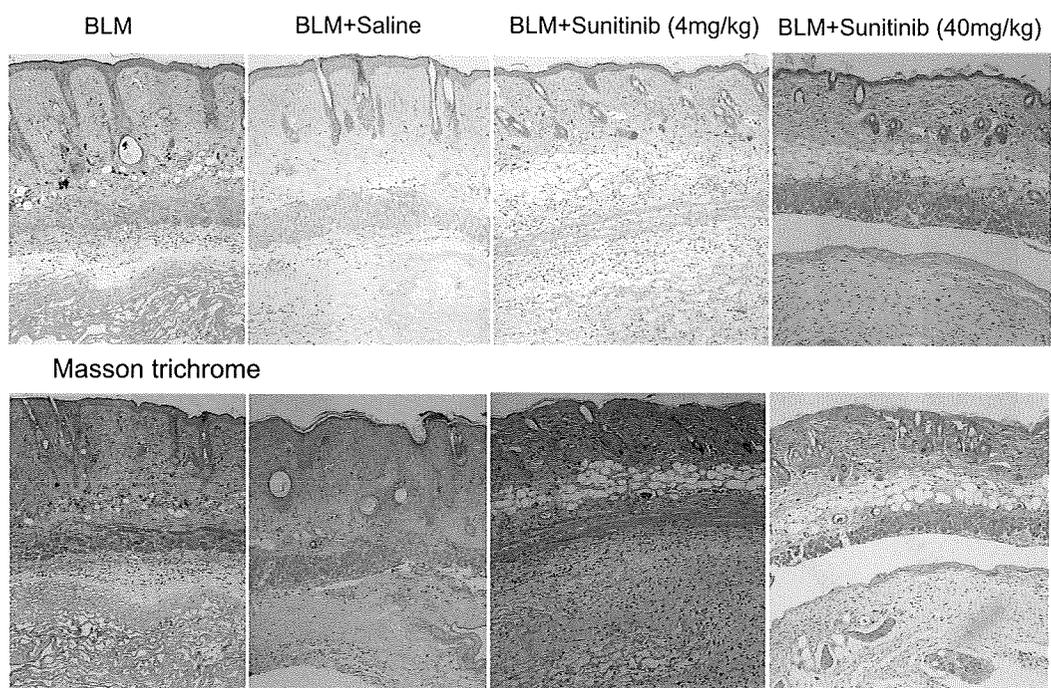


図2：病理組織学的所見

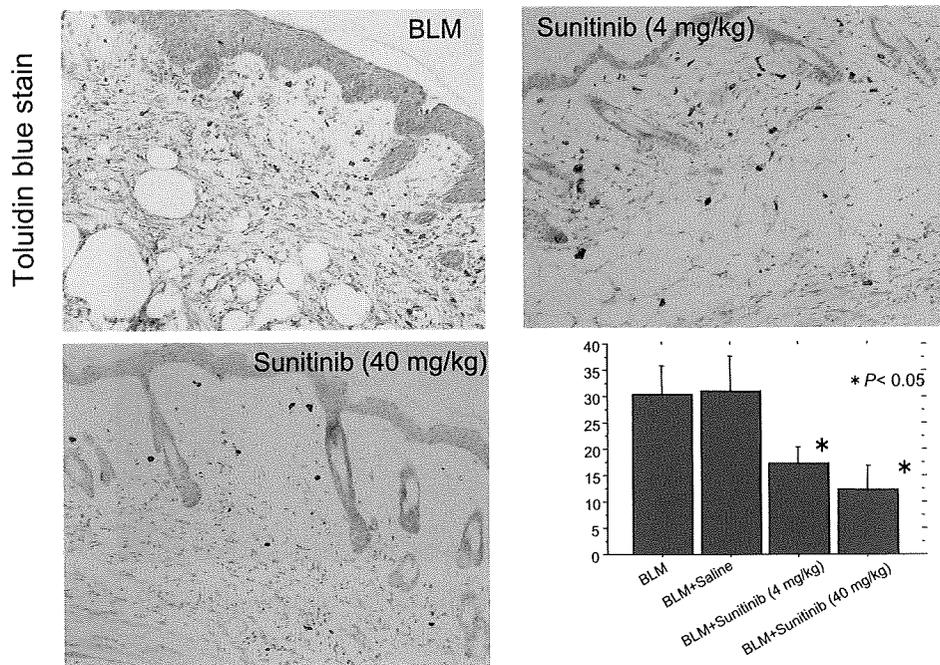


図 3：肥満細胞数

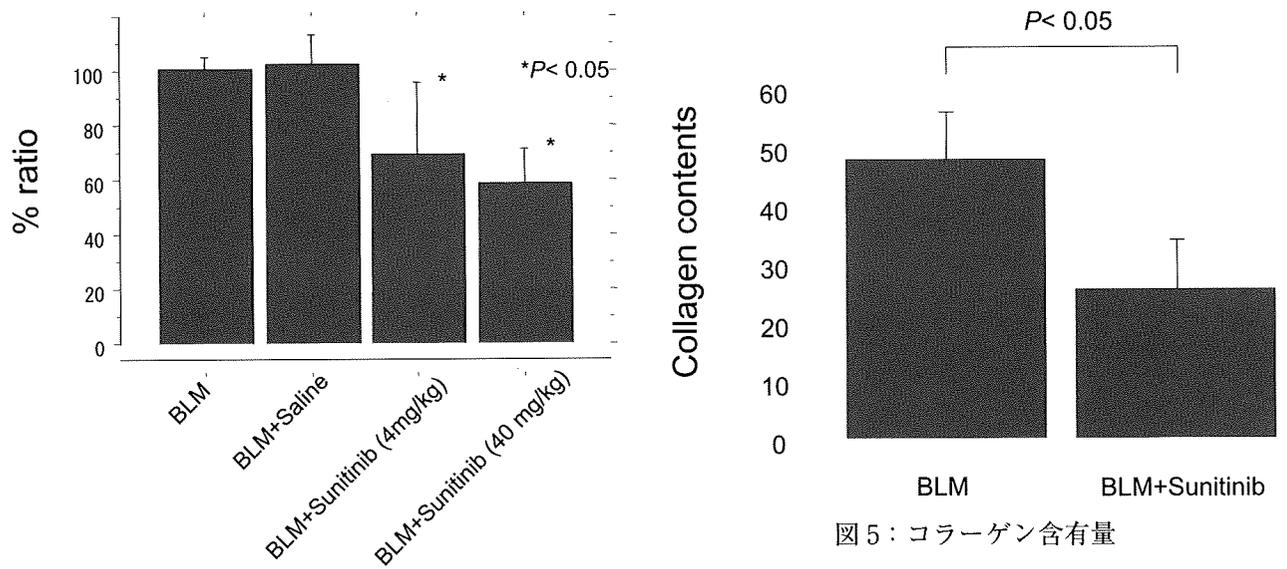


図 4：真皮厚

図 5：コラーゲン含有量

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) を標的とした新規治療法の試み

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 若槻妙子 福島県立医科大学医学部皮膚科 大学院生

研究要旨

全身性強皮症はレイノー症状や、皮膚硬化、指尖潰瘍などを特徴とし、肺や腎臓、消化管などの線維化をも引き起こす難治性疾患である。しかし皮膚硬化の発症機序は未だ不明で、確立された治療法もないのが現状である。皮膚硬化の形成には様々なサイトカインや細胞増殖因子が関与しているが、中でも transforming growth factor- β (TGF- β) は線維芽細胞の増殖を促すと共に、細胞外基質蛋白の産生を促進し、強皮症発症の中心的な役割を果たしている。今回我々は活性型 TGF- β を潜在型に置換する蛋白である、latency-associated peptide (LAP) リコンビナント蛋白を皮膚局所に投与することで、ブレオマイシンによって誘導される皮膚硬化が抑制されることを、病理組織学的に検証した。また LAP の投与により、早期に皮膚局所での活性型 TGF- β 濃度が低下し、潜在型に置換されていることが示唆された。さらに TGF- β の下流に位置し、皮膚線維化に直接関与する connective tissue growth factor (CTGF) や collagen α 1 (I) の mRNA は、LAP 投与により投与後 1~2 週で有意に発現が抑制されることが示された。しかしながらブレオマイシンを 4 週間先に投与し、皮膚硬化病変を完成させた後に、LAP を投与しても皮膚硬化の抑制は認められなかった。したがって LAP 投与による抑制効果は、ブレオマイシンによって誘導される皮膚硬化の初期段階において有効であると考えられた。

A. 研究目的

本研究の目的は全身性強皮症の新規治療法を開発することである。そこでブレオマイシン (BLM) 投与で誘導される強皮症モデルマウスを用い、LAP 投与による皮膚硬化抑制の程度について検討した。

B. 研究方法

1) BLM による皮膚硬化の誘導

C3H/HeJ 系メスマウス (6 週令) (日本クレア、東京) を用いた。マウスの飼育条件は室温 21~24℃、

湿度 50~60%、照明点灯時間は 7:00~19:00 である。

マウスの背部皮膚を約 3 cm² の範囲で剃毛した後、ブレオマイシン (BLM) (日本化薬、東京) は phosphate-buffered saline (PBS) で最終濃度 250 μ g/ml に調整したものを 0.1 ml/day、週に 5 回 (月~金) で 4 週間、27G シリンジを用いて皮内投与した (BLM 投与量 25 μ g/日、総量 500 μ g/4 週間)。皮膚の剃毛およびブレオマイシンの皮内投与は、99% ジエチルエーテルによる吸入麻酔下で行った。

2) LAP 処理

BLM 投与部位に、human TGF- β 1 LAP (R & D, Minneapolis, USA) を、週に 5 回 (月～金) で 4 週間、27G シリンジを用いて BLM と同時に皮内投与した。LAP の濃度は、50 ng/ml と 500 ng/ml とし、1 回あたり 50 μ l 投与した。LAP 投与総量は 50 ng/ml 群で 50 ng、500 ng/ml 群で 500 ng である。対照群は等量の PBS 投与とした。(n=4~9)

また LAP 1 週間、2 週間の短期間投与群では、同一個体のマウス背部の左側に 1 週間 BLM および LAP を同時投与した。同様に右側には BLM と LAP の同時投与を 2 週間行った。LAP 投与総量は 1 週間群で 12.5 ng、2 週間群で 25ng である。(n=4~7)

3) 皮膚採取

LAP および BLM 投与期間終了後、マウスを 99% ジエチルエーテル吸入麻酔下で頸椎脱臼させ、背部皮膚を 6 mm デルモパンチにて、表皮から皮下脂肪を含めた皮膚全層で採取した。

4) 免疫染色

採取した 6 mm 皮膚片を半割し、10% ホルマリン固定ののち、パラフィンに包埋した。病理組織標本作成に当たっては 2 μ m で超薄切片を作成し、カラッジのヘマトキシリン液およびエオジン液にて染色を行った。マッソン・トリクローム染色は 2 μ m の切片にて、レゾルシンフクシン液およびマッソン液で染色した。

トルイジンブルー染色には 3 μ m の切片を用い、トルイジンブルー液にて染色した (n=6)。真皮厚計測、ならびに真皮内に浸潤した肥満細胞数の測定は以下の方法で行った。同部位から採取した皮膚での連続切片を上記のごとく染色し、光学顕微鏡 100 倍で観察した、3 視野中に観察される最も厚い真皮の厚さを計測した。また肥満細胞数については、光

学顕微鏡 400 倍 (High-power view) にて観察されるランダムな 3 視野中に、真皮内に浸潤した肥満細胞数を計測し、その平均値を算出した。

5) 皮膚組織中の RNA 抽出

BLM および LAP の投与期間が 1 週間、2 週間、4 週間の時点で皮膚を採取した。採取した 6 mm 片の皮膚を半割し、-80°C 保存の後、ISOGEN (ニッポンジーン、東京) を用いて total RNA の抽出を行った。組織片に ISOGEN 500 μ l を添加してから、ホモジェネードし、クロロホルムおよびイソプロパノール処理により、total RNA を抽出した。(n=4~9)

6) RT-PCR

Total RNA (500~1000 μ g/ml) を TURBO DNA-free kit (Applied BioSystems Japan, 東京) を用いて、DNase 処理を行った。Total RNA (1.25~2.5 μ g) を DNase 2 μ l および バッファー 10 μ l を添加し、37°C でインキュベートしてから DNase 不活化処理を施行した。さらに High capacity RNA to cDNA kit (Applied BioSystems Japan, 東京) にて 37°C、60 分間の逆転写反応を行い、95°C で 5 分の熱処理にて逆転写反応を停止させ、first-strand cDNA を合成した。

7) Realtime-PCR

マウス GAPDH、TGF- β 1、CTGF、collagen α 1 (I) について、背部皮膚組織から合成した cDNA をテンプレートに用いて、リアルタイム PCR を行った。

使用したプライマーデザインは以下のとおりである (TaKaRa Perfect Realtime サポートシステム、タカラバイオ、大津、滋賀)。

GAPDH :

5'TGTGTCCGTCGTGGATCTGA3'

3'TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG5'