

TGF- β 1 :

5'TTCCGCTGCTACTGCAAGTC3'

3'AGGGCTGTCTGGAGTCCTCA3'

CTGF :

5'ACCCGAGTTACCAATGACAATACC3'

3'CCGCAGAACTTAGCCCTGTATG5'

collagen α 1 (I) :

5'CAGGGTATTGCTGGACAACGTG3'

3'GGACCTTGTTTGCCAGGTTC5'

いずれのプライマーも最終濃度 10 μ M に調節して、以下の反応系に用いた。PCR は cDNA テンプレート を 2 μ l、sense/antisense 鎖プライマーを各 0.5 μ l ずつ、Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems Japan, 東京) 10 μ l、DNase/RNase free water 7 μ l で調整し、95°C で 20 秒の熱変性、95°C で 3 秒、60°C で 30 秒を 1 サイクルとし、合計 40 サイクルで反応させた。

8) ELISA

皮膚組織中の活性型 TGF- β 1 濃度測定は、mouse TGF- β 1 ELISA システム (R&D systems, Minneapolis) を用いて行った。上述のごとく、硬化を起こした皮膚片を 6 mm デルモパンチで採取し、その半量を ELISA システムの付属溶解液 (RD5-53) を用いてホモジェネードして上清を抽出し、推奨される標準プロトコールの酸処理を加えずに抗原抗体反応を行うことで、生体内における活性型 TGF- β 1 量を定量した。450 nm のスペクトロメーター (BIORAD Japan, 東京) にて波長を測定し、標準曲線に照合して濃度を検出した。(n=5~6)

9) コラーゲン定量

BLM で誘導された硬化誘導部位の皮膚組織を LAP 投与群、対照群から各々 6 mm デルモパンチで採取し、その全量を Sircol Collagen Assay kit (Bio-

color, Northen Island) を用いて、真皮内コラーゲンの定量を行った。1mol CH₃COOH で皮膚組織片をホモジェネードしたのち、上記のキットから得られた上清を、540 nm の UV イルミネーター (SHIMADZU, 京都) にて波長を測定し、標準曲線に照合して濃度を検出した。(n=5)

10) 統計処理

統計処理には StatView-J 5.0 ソフトを用い、2 群間の比較において、Mann-Whitney U 検定を行った。P 値が 0.05 以下の際に、統計学的有意差があるとみなした。

C. 研究結果

1) LAP 投与による皮膚硬化の抑制

LAP 投与群 (総量 50 ng、500 ng) は PBS 投与群と比較し、HE 染色、マッソントリクローム染色ともに、肥厚した真皮膠原線維束が明らかに減少していた (図 1a-f)。

マッソン・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、対照群と比較し、LAP 投与群では有意に膠原線維束の厚さが減少していた。膠原線維束の肥厚には、LAP の濃度の違いによる有意差は認められなかった (図 1g)。(LAP 50 ng 投与群 ; 222+ - 32.7 μ m、LAP 500 ng 投与群 200.4+ - 32.79 μ m v.s. PBS 投与群 ; 290.8+ - 37.22 μ m、いずれも p<0.05)。

また BLM と同時に LAP 1 週間、2 週間 (いずれも LAP 濃度は 2.5 ng/回) と短期間投与した群においては、皮膚硬化抑制は認められなかった。

2) 肥満細胞浸潤の抑制

トルイジンブルー染色を行い、真皮内に浸潤した肥満細胞数を計測した。BLM 投与群に比較して、LAP 投与群では真皮内の肥満細胞数が有意に減少

していた (LAP 50 ng 投与群 ; 9.25 ± 1.52 個 /HPF、LAP 500 ng 投与群 ; 8.66 ± 3.66 個 /HPF v.s. PBS 投与群 ; 13.60 ± 3.09 個 /HPF、いずれも $p < 0.05$) (図 2a, b)。浸潤した肥満細胞数には、LAP 投与量による有意差は認められなかった。

3) LAP 投与部位における mRNA の経時的変化

BLM (総量 500 μg) および LAP (総量 50 ng) を同時投与した群において、背部皮膚病変部における TGF- β 1、CTGF mRNA レベルについて各々投与後 1 週間、2 週間、4 週間に測定した。また collagen α 1 (I) については、投与後 2 週間、4 週間で比較した。

TGF- β 1 においては、薬剤投与後 1 週間で皮膚局所における mRNA 発現量は最大量に達し、2 週間、4 週間と経時的に減少していった。しかしいずれの時期においても、LAP 投与による有意な変化は見られなかった (図 3)。

CTGF は投与後 2 週間で mRNA 発現量は最大量に達し、この時点での mRNA レベルは LAP 投与群が対照群と比較し、有意に抑制されていた (図 4)。

また collagen α 1 (I) に関しては LAP 投与 2 週間において、対照群と比較して mRNA 発現が抑えられる傾向が見られた (図 5)。

4) LAP 投与部位における TGF- β 1 の変化

LAP/BLM 投与部位を 1 週間後、2 週間後に採取し、皮膚局所の活性型 TGF- β 1 の濃度を ELISA 法にて測定した。活性型 TGF- β 1 は LAP 投与後 1 週間で、対照群と比較して有意に抑制された (図 6)。LAP 投与 2 週間では有意差は認められなかった。

5) Collagen contents

Sircol collagen assay kit を用いて、皮膚組織中のコラーゲン量を測定した。LAP 4 週間投与群で、コラーゲン量は対照群に比べて減少する傾向が認められた (図 7)。

6) 皮膚硬化病変完成後の LAP 投与効果

はじめに BLM のみを 4 週間投与した後に、LAP (50 ng/ml) を投与し、完成した皮膚硬化の誘導が抑制されるかを検討した。

しかし、この post-onset experiment においては、皮膚硬化の抑制は認められなかった (図 8)。

D. 考 案

BLM (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 連続投与により誘導された皮膚硬化は、4 週間の LAP 連続同時投与で抑制された。LAP の投与量としては、総量 50 ng、500 ng ともに皮膚硬化抑制の程度には有意差は見られず、低濃度の LAP によっても皮膚硬化は抑制されることがわかった。LAP の投与期間においては、1 週間、2 週間の投与では、抑制効果は得られなかった。これは Zhang ら¹⁾ の GVH 反応による皮膚硬化抑制モデルと比べ、皮内の投与ではより長期の LAP 投与が必要であること示唆する結果であった。この理由としては、BLM 誘導性強皮症モデルは頻回の BLM 投与を行うこと、我々の実験では LAP を皮膚局所に少量しか投与していないためであると考えられた。

強皮症患者においては、病変部皮膚のみならず、非病変部の皮膚においても肥満細胞数が増加することが知られている^{2,3)}。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^{4,5)}。実際に BLM 誘導性強皮症モデルマウスにおいても、皮膚硬化の誘導に伴って肥満細胞数が増加する⁶⁾ が、今回の我々の検討では、LAP 投与によって活性型 TGF- β を抑えることで、真皮内に浸潤する肥満細胞数が減少した。この結果は皮膚硬化において重要な成長因子である TGF- β 1 が肥満細胞の浸潤を誘導するという Gruber ら⁹⁾ や Olsson ら¹⁰⁾ の説を裏付け

るものであった。さらに Shiota ら¹¹⁾ は Tsk マウスにおいて皮膚硬化に関連した肥満細胞を、connective-tissue-type mast cell (CTMC) と呼称し、これらを特異的に抑制することで、皮膚硬化が抑制されたと報告している。また同じ Tsk マウスに肥満細胞の安定化を図るケトチフェンを投与することによって、皮膚線維化が抑制されたという報告も見られる¹²⁾ が、実際に強皮症患者を対象としたケトチフェン投与による二重盲検試験では、明らかな治療効果は得られていない¹³⁾。強皮症において肥満細胞が病態の一部を形成することは、今回の結果や過去の報告からも明らかであるが、今後もさらなる検討が必要である。

今回我々は、皮膚硬化が抑制された皮膚病変部において、TGF- β 1、CTGF といった線維化関連成長因子および collagen α 1 (I) の mRNA 定量を経時的に行った。その結果、CTGF の mRNA レベルが BLM/LAP 投与 2 週間後で、対照群と比較して、有意に発現量が抑制されていた。また collagen α 1 (I) mRNA も、2 週間後に抑制される傾向が得られた。Igarashi ら¹⁴⁾ はヒトの創傷治癒機転において、TGF- β で活性化された線維芽細胞はさまざまな成長因子の中でも、最も CTGF の産生が亢進していると報告している。Quan ら¹⁵⁾ は健常ヒト線維芽細胞の培養において、TGF- β 1 を添加すると CTGF の mRNA 発現量は飛躍的に増加し、また紫外線照射による CTGF mRNA 発現の減少が抑えられるとしている。これらの結果より、TGF- β が直接 CTGF の産生に関与していることは明らかである。今回の我々の検討では CTGF mRNA 発現は LAP 投与 2 週間後に抑制されており、その前に TGF- β 1 の発現が低下していることが予想された。

TGF- β 1 に関しては、LAP 投与 1 週間で皮膚局所

における発現量が最大となり、以後 2 週間、4 週間と経時的に減少する傾向が認められた。しかし対照群と比較し、LAP 投与による TGF- β 1 mRNA 発現量は投与後 1 週間以降において、明らかな差は認められなかった。この理由としては、皮膚採取時期の問題、または皮膚硬化の段階で、抑えられた TGF- β 1 に positive feedback がかかり、局所では TGF- β 1 mRNA の抑制効果までは及ぼさない可能性などが考えられた。LAP の局所投与による TGF- β 1 mRNA 抑制効果は、さらに投与初期に起こっているのかもしれない。

また LAP 投与部の皮膚組織中の活性型 TGF- β 1 蛋白濃度は、対照群と比較して、投与後 1 週間で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、そのうちどの程度の活性型 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。Santiago ら¹⁶⁾ はこれまでに TGF- β 1 蛋白を特異的に抑制するペプチドである、P144 を BLM で誘導した皮膚硬化病変に塗布することで、塗布 2 週間後、4 週間後において、皮膚硬化を抑制することができたと報告している。蛋白レベルでの TGF- β 1 の抑制が皮膚硬化の抑制につながるものが、この報告からも明らかであり、より強力かつ早期の TGF- β 1 抑制効果が、強皮症の治療効果発現には不可欠であることが推測された。

一方、実際のヒト強皮症の治療においては、すでにおこっている皮膚硬化病変が治療の対象になる。このため、別の実験系においては、BLM 4 週間連続投与を行い、皮膚硬化が完成した後に LAP を同部

位に2週間投与し、既存の硬化病変が軽減するか否かを検討した (Post-onset experiment)。しかし、BLMによって強制的に皮膚硬化を誘導した後では、LAP投与による抑制効果は認められなかった。したがって、LAPは同時投与での皮膚硬化は抑制するものの、皮膚硬化が完成してしまっからの投与では、硬化を抑制するまでの作用はないことがわかった。TGF- β は皮膚線維化のイニシエーターで、CTGFがTGF- β によって誘導された線維化を維持すると示唆されており¹⁷⁾、我々が皮膚硬化完成後に投与したLAPが硬化を抑制しなかったという結果は、この仮説を支持するものと考えられた。今回の結果により、線維化は一旦発症してしまうとTGF- β をターゲットとするだけでは抑制するのが困難であり、できるだけ早期の治療、ならびにTGF- β の下流に位置し、線維化をより選択的に司るCTGFを抑制する方法を、今後さらに検討していきたい。

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と同時にLAPを4週間連続で皮内投与することで、真皮内の肥厚した膠原線維の増生は減少し、皮膚硬化の誘導が有意に抑制された。LAP投与2週間でCTGF、collagen 1a mRNA発現量は抑制された。また皮膚組織中の活性型TGF- β 1濃度は、LAP投与後1週間で減少した。プレオマイシン誘導性強皮症モデルマウスにおいて、LAP投与により早期に皮膚組織中の活性型TGF- β 1を潜在化に変換することが、皮膚硬化抑制に繋がると考えられた。

F. 文 献

1. Zang Y, McCormick LL, Gilliam AC: 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

2. Miller DM, Ogawa Y, Iwata KK, et al: Characterization of the binding of transforming growth factor- β 1, - β 2, and - β 3 to recombinant β 1-latenancy-associated peptide. *Mol Endocrinol* 1992, 6: 694-702

3. O'Connor McCourt, Segarubu O, Grothe S, et al: Analysis of the interaction between two TGF- β -binding proteins and three TGF- β isoforms using surface plasmin resonance. *Ann NY Acad Sci* 1995, 766: 300-302

4. Nishioka K, Kobayashi Y, Katayama I, et al: Mast cell numbers in diffuse scleroderma. *Arch Dermatol* 1987, 123: 205-208

5. Seibold JR, Giorno RC, Claman HN: Dermal mast cell degranulation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatism* 1990, 33: 1702-1709

6. Yamamoto T: The bleomycin-induced scleroderma model: what have we learned for scleroderma pathogenesis?: *Arch Dermatol Res* 2006, 297: 333-344

7. Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, et al: Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy* 2002, 32: 237-246

8. Wang HW, Tedla N, Hunt JE, et al: Mast cell accumulation and cytokine expression in the tight skin mouse model of scleroderma. *Exp Dermatol* 2005, 14: 295-302

9. Gruber BL, Marchese MJ, Kew RR: Transform-

- ing growth factor- β 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol* 1994, 152: 5860-5867
10. Olsson N, Piek E, Dijke PT, et al: Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor- β family. *J Leukoc Biol* 2000, 67: 350-356
 11. Shiota N, Kakizoe E, Shimuura K, et al: Effect of mast cell chymase inhibitor on the development of scleroderma in tight-skin mice. *Br J Pharmacol* 2005, 145: 424-431
 12. Walker M, Harley R, Leroy EC: Ketotifen prevents skin fibrosis in the tight skin mouse. *J Rheumatol* 1990, 17: 57-59
 13. Gruber BL, Kaufman LD: A double-blind randomized controlled trial of ketotifen versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis and Rheumatism* 1991, 34: 362-366
 14. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, et al: Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993, 4: 637-645
 15. Quan T, He T, Kang S, et al: Connective tissue growth factor: Expression in human skin in vivo and inhibition by ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 2002, 118, 402-408
 16. Santiago B, Canas IG, Dotor J, et al: Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor- β 1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol* 2005, 125: 450-455
 17. Takehara K: Hypothesis: Pathogenesis of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003, 30: 755-759

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 第34回日本研究皮膚科学会（福岡）にて、ポスター発表を行った。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

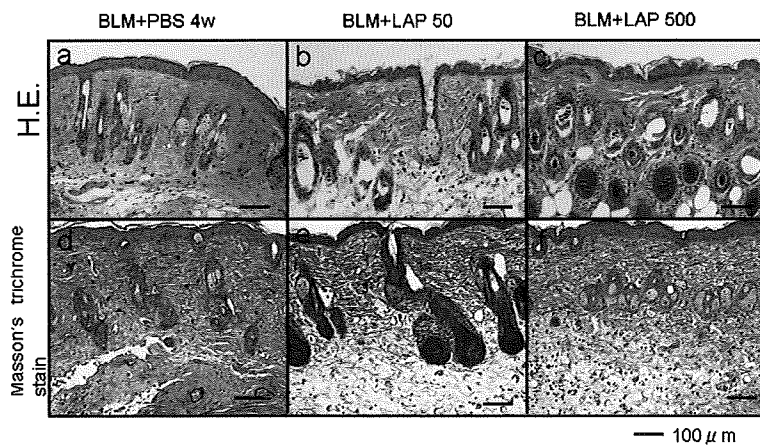


図 1a-f : LAP 投与 4 週間後の皮膚病理組織像

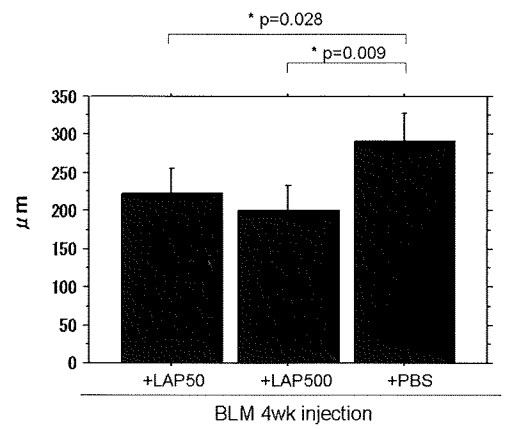


図 1g : LAP 投与 4 週間後の真皮膠原線維厚

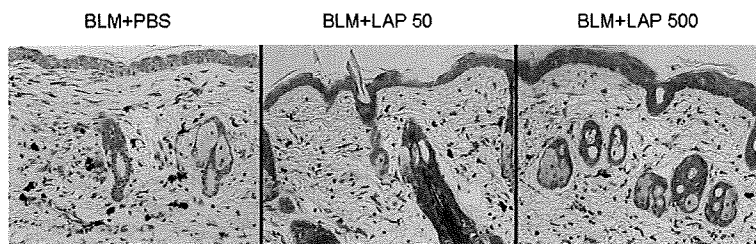


図 2a : 真皮内に浸潤した肥満細胞 (トルイジンブルー染色)

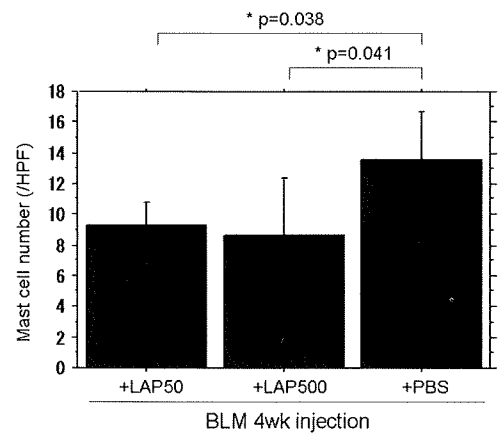


図 2b : 真皮内に浸潤した肥満細胞数の比較

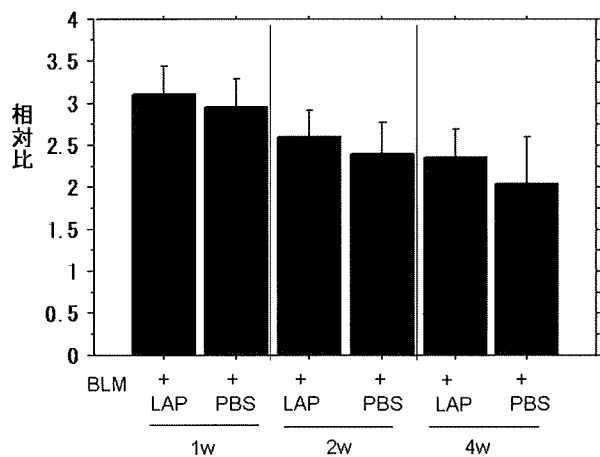


図 3 : 皮膚組織中に発現した TGF-β1 mRNA 定量

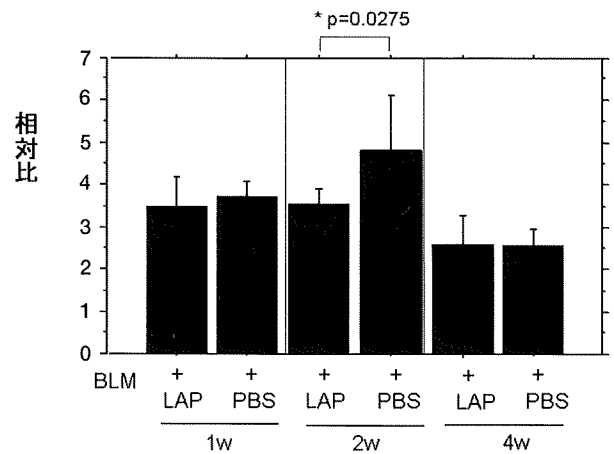


図 4 : 皮膚組織中に発現した CTGF mRNA 定量

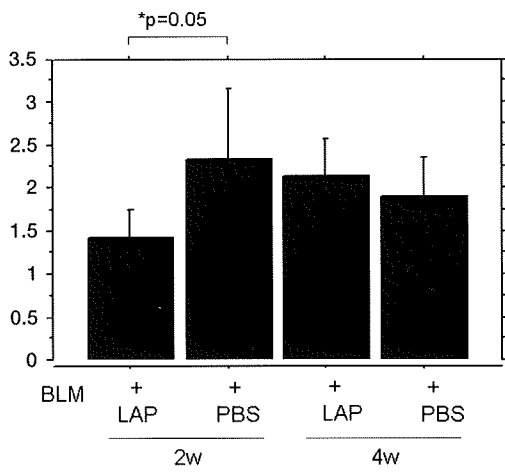


図5：皮膚組織中に発現した collagen α1 (I) mRNA 定量

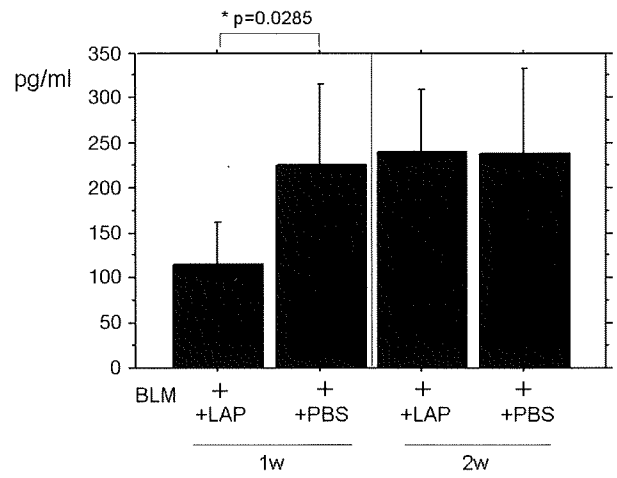


図6：LAP 投与部位における活性型 TGF-β1 濃度

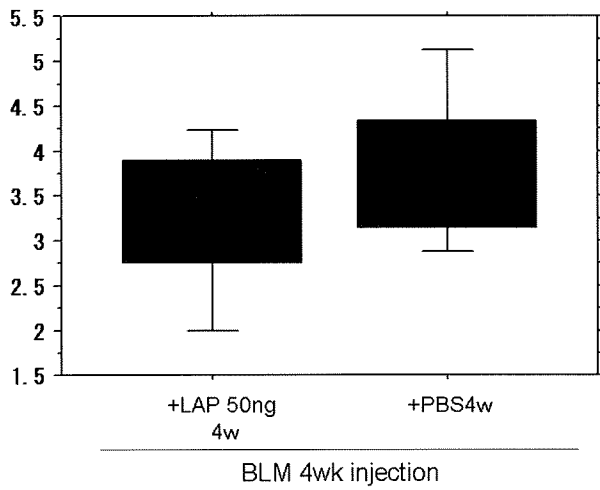


図7：コラーゲン定量

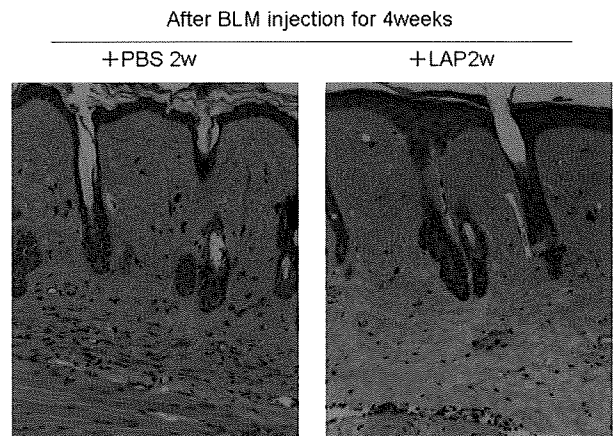


図8：皮膚硬化完成後のLAP投与効果 (HE染色)

Tight-skin (TSK) マウスおよびブレオマイシン (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

研究代表者 佐藤伸一 東京大学大学院医学系研究科 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 東京慈恵会医科大学皮膚科学 助教
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
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

ラパマイシンは放線菌由来のマクロライドであり、近年、移植後の拒絶反応抑制に優れた効果を示すことから、新たな免疫抑制薬として注目を集めている薬剤である。今回我々はSScのモデルマウスとして広く知られているTSKマウスとBLM誘発SScモデルマウスにおけるラパマイシンの効果を検討した。ラパマイシンの投与によりTSKマウスに認められる皮膚硬化と皮膚へのコラーゲンの蓄積は有意に抑制され、同時に皮膚へのT細胞浸潤も抑制された。TSKマウス皮膚で認められるサイトカイン産生の亢進もラパマイシンの投与により有意に抑制された。TSKマウス皮膚線維芽細胞を用いた検討では、IL-4の刺激によって亢進した増殖能とコラーゲン産生量は、ラパマイシンによって有意に抑制された。さらに、TSKマウス皮膚線維芽細胞において、ラパマイシンの作用する標的分子であるmammalian target of rapamycinの有意な発現亢進を認めた。TSKマウスは自己抗体の産生増加を認めることが知られているが、ラパマイシンの投与はこの自己免疫異常を抑制した。BLM誘発強皮症モデルマウスにおいても同様に、ラパマイシンは皮膚硬化、肺線維化、皮膚および肺への炎症細胞浸潤、皮膚、肺および血清中におけるサイトカイン産生亢進を有意に抑制した。このように、二つの異なるSScモデルマウスにおいて、線維化を抑制したラパマイシンは、既に様々な病態でヒトに対して優れた効果を上げており、SScの新たな治療薬となりうる可能性が示唆された。

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されていない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)}。

TSK マウスは著名な皮膚線維化を呈する突然変異種として継代されたマウスであり、SSc の動物モデルとして広く認知されている⁹⁾。別の SSc モデルである BLM 誘発 SSc モデルも同様に皮膚硬化、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^{10,11)}。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¹⁰⁾。これらのマウスモデルは SSc 患者と同様に、その発症機序として免疫学的な異常が存在することが示されているが、治療法として確立されたものは未だない。

ラパマイシンはマクロライド系の免疫抑制薬であり、すぐれた免疫抑制効果を示すことから、カルシニューリン阻害薬であるシクロスポリンやタクロリムスに次ぐ新たな免疫抑制薬として近年注目を集めている^{12,13)}。ラパマイシンの特徴として、カルシニューリン阻害薬と比較して腎毒性の発現が少なく、がん細胞の増殖を抑制する効果を持ち、サイトメガロ感染のリスクを減らすことが上げられる^{14,15)}。ラパマイシンが免疫抑制作用を示す機序としては、ラパマイシンが FK506 binding protein 12 へ結合することにより複合体を形成し、その複合体が mammalian target of rapamycin (mTOR) の機能を抑制することにより mTOR の下流へのシグナル伝達を阻害し、細胞増殖、サイトカイン産生を抑制することが示されている^{16,17)}。同時に mTOR の阻害は線維芽細胞からのコラーゲン産生を抑制することが示唆されている^{18,19)}。

今回の検討では、ラパマイシンの線維化に対する効果を TSK マウスおよび BLM 誘発 SSc モデルマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

1) マウス

本研究では C57BL/6 マウスを背景とする TSK マウスと C57BL/6 マウスを用いて作成した BLM 誘発 SSc モデルマウスを使用した。本研究には 6 週齢のマウスを用いた。BLM 誘発 SSc モデルマウスは 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 を連日皮下投与することで作成した¹¹⁾。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 10 匹のマウスを用いた。いずれの研究も長崎大学動物実験規則を遵守を行った。

2) ラパマイシンの投与

ラパマイシン (Sigma, St Louis, MO) を 0.2% sodium carboxymethyl cellulose と 0.25% polysorbate 80 による溶媒に溶解し、1.5 mg/kg/day の容量で 4 週間にわたりそれぞれのマウスへ腹腔内投与した。コントロール群には溶媒のみを投与した。

3) 組織病理学的検討

4 週間のラパマイシンの投与が終了した TSK マウスから背部皮膚を、BLM 誘発 SSc モデルマウスからは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、皮下結合組織層の厚さを測定した。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 Aschcroft らの提唱するスコア法で評価した²⁰⁾。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。

4) 皮膚および肺組織中のヒドロキシプロリン測定

ヒ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²¹⁾、Schrier ら²²⁾の方法に準じ組織中のヒドロキシプロリン量を測定した。

5) 気管支肺胞洗浄液 (BAL) の採取

4 週間のラパマイシン投与後に、BLM 誘発 SSc モデルマウスより得られた肺を生食 1 回 1 ml で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 2.5 ml 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。

6) 血清中のサイトカインの検討

ラパマイシンの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。

7) 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。

8) TSK マウス皮膚線維芽細胞に対するラパマイシンの効果における

TSK マウス背部皮膚より線維芽細胞を抽出、培養した²¹⁾。線維芽細胞を 12 時間 serum free とした後、ラパマイシンの存在下に IL-4 (10 ng/ml; R&D systems, Minneapolis, MN) で 24 時間刺激した。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。

また、TSK マウス皮膚線維芽細胞における mTOR の発現を real time PCR および western blotting 法により検討した。

9) γ グロブリンの検討

ラパマイシンの投与が終了した TSK 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。

10) 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 topo I 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。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

11) 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

TSK マウスでは野生型マウスと比べて皮下結合組織層の肥厚を認めた (図 1)。4 週間の観察において、時間と共に皮下結合組織層の厚みが増すことが確認された。ラパマイシンはこの皮下結合組織層の肥厚を投与後 2 週間目より有意に抑制し (p<0.05)、その抑制効果は 4 週間後に最大となった (p<0.01)。同様に、ラパマイシンはヒドロキシプロリンの産生量も有意に抑制した。(p<0.05)。TSK マウス皮膚には野生型マウスと比べ、多くの T 細胞の浸潤を認めたが、ラパマイシンはこの T 細胞浸潤を抑制した (p<0.05)。

TSK マウス皮膚における IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、および TGF- β 1 発現量は野生型マウスに比べ増加していたが (p<0.05)、この増加はラパマイシンによって有意に抑制された (p<0.05; 図 2)。

TSK マウス皮膚線維芽細胞における検討では、IL-4 によって引き起こされた増殖亢進と COL1A2

および TGF- β 1 の発現亢進はラパマイシンによって有意に抑制されていた (p<0.05; 図 3)。また、このラパマイシンの細胞増殖と COL1A2 および TGF- β 1 発現抑制効果は、ラパマイシンの濃度依存的に認められた。線維芽細胞における mTOR の発現は TSK マウスにおいて野生型マウスと比べ有意に亢進していた。

TSK マウスでは過去の報告通り、自己抗体の産生を認めた (図 4)。ラパマイシンはこの自己抗体産生を有意に抑制した (p<0.05)。 γ グロブリンに関しても同様に、TSK マウスでは野生型マウスに比べ産生亢進を認めたが、ラパマイシン投与によって有意に抑制された (p<0.01)。

BLM 誘発 SSc モデルマウスでは PBS 投与群と比べ、有意な皮膚硬化と肺線維化、炎症細胞浸潤を認めた (p<0.05; 図 5)。TSK マウスと同様、ラパマイシンの投与は BLM によって引き起こされたこれらの異常を有意に抑制した。BLM 投与群では PBS 投与群と比べ皮膚、肺、血清におけるサイトカイン産生の亢進を認めたが、ラパマイシンの投与によってこれらは有意に抑制された (p<0.01)。

D. 考案

ラパマイシンは mTOR の阻害薬であり、移植後の免疫抑制や全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、皮膚筋炎などにも使用され優れた効果を認める²³⁻²⁵⁾。SSc に対する有効性も過去に 2 つの論文において報告されているが、いずれも症例数は 1-3 例と少なく、また皮膚硬化などの臨床症状の推移に対する検討であり、ラパマイシンがどのような機序で線維化を抑制するかは未だはっきりとした見解がない^{26,27)}。今回の検討では、ラパマイシンの投与は 2 つの異なる SSc モデルマウスにおいて線維化、サイ

トカイン産生亢進および免疫学的異常を改善した。

SScでは免疫細胞の異常な活性化を認める²⁸⁾。さらに、TSKマウスとBLM誘発SScモデルマウスにおいても認められる、硬化した皮膚や肺で認められる活性化した免疫細胞の浸潤からは、免疫細胞の異常な活性化が線維化を引き起こしていることが示唆される^{29,30)}。今回の研究では、TSKマウスにおいて認められたラパマイシンの線維化抑制効果はT細胞の浸潤抑制効果と共に認められており、またBLM誘発SScモデルマウスにおけるラパマイシンの線維化抑制効果も、炎症細胞浸潤抑制効果と共に認められた。また、これらの浸潤した炎症細胞からは線維化を引き起こす様々なサイトカインが産生されることが知られている¹⁰⁾。今回の検討では、ラパマイシンはこれらのサイトカインの産生も抑制していた。以上より、ラパマイシンは炎症細胞浸潤とサイトカイン産生を抑制することによって線維化を抑制している可能性が示唆された。

今回の検討ではTSKマウスにおいて自己抗体の産生が認められた。TSKマウスではB細胞の異常活性化が示されており、B細胞から産生されるサイトカインがTSKマウスの皮膚硬化を誘導していることが示唆されている³¹⁾。近年、mTORはB細胞の異常活性化において大きな役割を果たしていることが報告されている³²⁾。今回の検討ではラパマイシンはTSKマウスの自己抗体産生を抑制したことから、B細胞の活動を抑制したことが示唆され、このB細胞の活動抑制が線維化抑制につながった可能性が考えられた。また、mTORはその下流にS6Kや4E-BP1を持ち、IL-4によって刺激された線維芽細胞からは、これらのmTOR-S6K、4E-BP1シグナルを介することによって種々の線維化に関与するサイトカイン産生を促されることが知られている³³⁾。実際、今

回の検討ではTSKマウス線維芽細胞は野生型マウスと比し、mTORの強発現を認めており、このことは、TSKマウス線維芽細胞のIL-4に対する反応性の鋭敏さ、ラパマイシンによる抑制効果の高さを説明すると考えられた。以上のことから、ラパマイシンは免疫細胞と線維芽細胞のmTORを抑制することによって、線維化抑制作用を発揮している可能性が示唆された。

今回の検討から、ラパマイシンはTSKマウスとBLM誘発SScモデルマウスの両モデルにおいて線維化抑制作用を持つことが示唆された。現時点において、SScに対する有効な治療はいまだ十分に開発されていない。ラパマイシンは既に種々の臓器移植において臨床治験が行われている比較的安全性の高い薬剤であり、SScに対する新規治療薬の候補の一つとして挙げられると考えられた。

E. 結 論

ラパマイシンはSScのモデルマウスであるTSKマウスおよびBLM誘発SScモデルにおける線維化を改善させることが示唆された。SScに対する新規治療薬の一つとなりうる可能性が示唆された。

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: 202-5.
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): 431-50.
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): 275-84.
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: 308-13.
 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): 679-85.
 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): 2455-63.
 9. Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol.* 1976; 82 (3): 493-512.
 10. 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): 1650-63.
 11. 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): 456-62.
 12. Kahan BD. Fifteen years of clinical studies and clinical practice in renal transplantation: reviewing outcomes with de novo use of sirolimus in combination with cyclosporine. *Transplant Proc.* 2008; 40 (10 Suppl): S17-S20.
 13. Antin JH, Kim HT, Cutler C, Ho VT, Lee SJ, Miklos DB, et al. Sirolimus, tacrolimus, and low-dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis in mismatched related donor or unrelated donor transplantation. *Blood.* 2003; 102 (5): 1601-5.
 14. Forgacs B, Merhav HJ, Lappin J, Mieles L. Successful conversion to rapamycin for calcineurin inhibitor-related neurotoxicity following liver transplantation. *Transplant Proc.* 2005; 37 (4): 1912-4.
 15. Busca A, Locatelli F, Moscato D, Falda M. Sirolimus-related toxicity in stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11 (8): 647-9.
 16. Xu G, Xia J, Hua X, Zhou H, Yu C, Liu Z, et al.

- Activated mammalian target of rapamycin is associated with T regulatory cell insufficiency in nasal polyps. *Respir Res.* 2009; 10: 13.
17. Breslin EM, White PC, Shore AM, Clement M, Brennan P. LY294002 and rapamycin cooperate to inhibit T-cell proliferation. *Br J Pharmacol.* 2005; 144 (6): 791-800.
 18. Bridle KR, Popa C, Morgan ML, Sobbe AL, Clouston AD, Fletcher LM, et al. Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways. *Liver Transpl.* 2009; 15 (10): 1315-24.
 19. Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. Noncanonical TGF-beta pathways, mTORC1 and Abl, in renal interstitial fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 298 (1): F142-F9.
 20. 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.
 21. Matsushita Y, Hasegawa M, Matsushita T, Fujimoto M, Horikawa M, Fujita T, et al. Interleukin-1 deficiency attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Immunol.* 2007; 179 (1): 698-707.
 22. 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.
 23. Bruyn GA, Tate G, Caeiro F, Maldonado-Cocco J, Westhovens R, Tannenbaum H, et al. Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a 3-month, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67 (8): 1090-5.
 24. Nadiminti U, Arbiser JL. Rapamycin (sirolimus) as a steroid-sparing agent in dermatomyositis. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52 (2 Suppl 1): 107-9.
 25. Desai N, Heenan S, Mortimer PS. Sirolimus-associated lymphoedema: eight new cases and a proposed mechanism. *Br J Dermatol.* 2009; 160 (6): 1322-6.
 26. Yoon KH. Proliferation signal inhibitors for the treatment of refractory autoimmune rheumatic diseases: a new therapeutic option. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173: 752-6.
 27. Fried L, Kirsner RS, Bhandarkar S, Arbiser JL. Efficacy of rapamycin in scleroderma: a case study. *Lymphat Res Biol.* 2008; 6 (3-4): 217-9.
 28. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* 2004; 50 (6): 1918-27.
 29. Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, Settas L, Zafiriou E, Sakkas L. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64 (8): 1233-5.
 30. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med.* 2006; 354 (25): 2655-66.
 31. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K,

Hamaguchi Y, Kaburagi Y, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest.* 2002; 109 (11): 1453-62.

32. Perl A, Fernandez DR, Telarico T, Doherty E, Francis L, Phillips PE. T-cell and B-cell signaling biomarkers and treatment targets in lupus. *Curr Opin Rheumatol.* 2009; 21 (5): 454-64.

33. Cardoso BA, Martins LR, Santos CI, Nadler LM, Boussiotis VA, Cardoso AA, et al. Interleukin-4 stimulates proliferation and growth of

T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by activating mTOR signaling. *Leukemia.* 2009; 23 (1): 206-8.

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

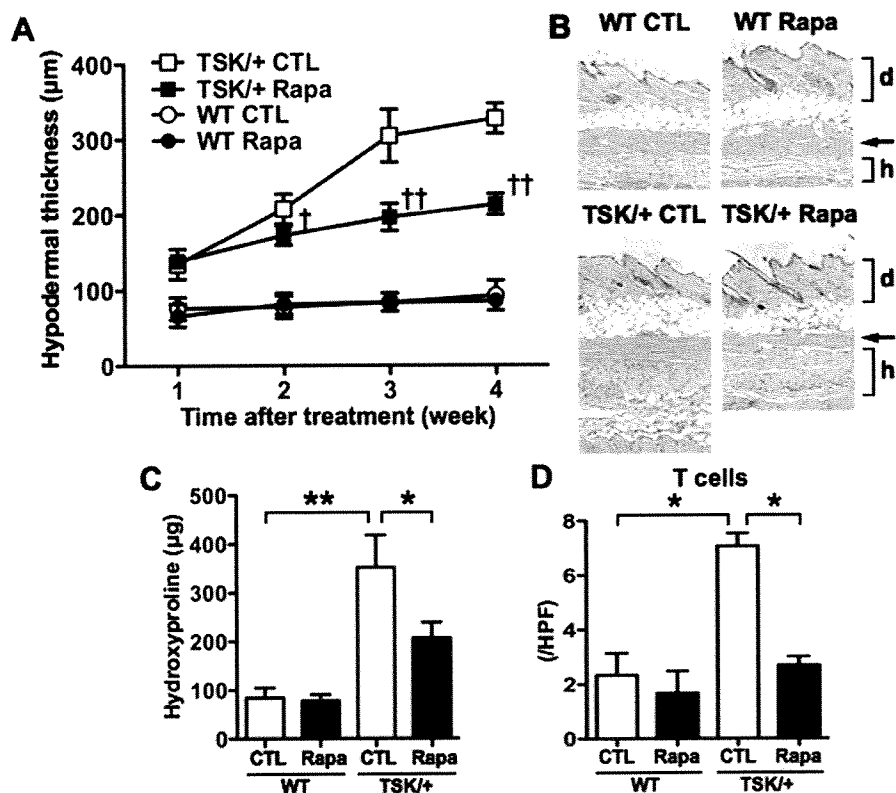


図1: TSK マウスにおける皮膚硬化を経時的に示した (A)。4 週間後における皮膚硬化を組織学的に示した (B; 40 倍)。表皮を (d)、皮筋層を矢印、皮下結合組織層を (h) でそれぞれ表す。ハイドロキシプロリン産生量 (C)、T 細胞浸潤数 (D) を示した。TSK/+ は TSK マウスを、WT は野生型マウスを、CTL はラパマイシンの溶媒のみを投与した群を、Rapa はラパマイシン投与群をそれぞれ表す。それぞれの TSK マウス CTL 群と比べて † $p < 0.05$ 、†† $p < 0.01$ を表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

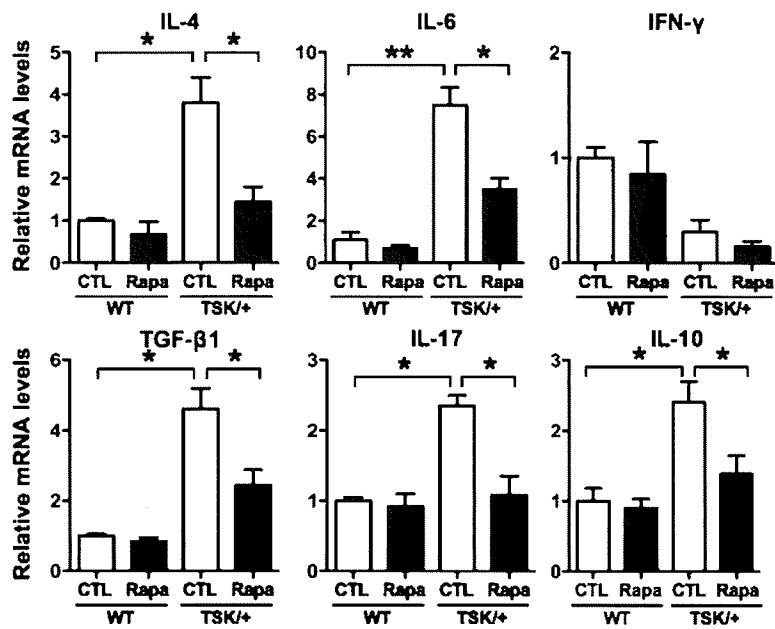


図2: TSK マウス皮膚におけるサイトカインの発現量を示した。TSK/+は TSK マウスを、CWT は野生型マウスを、CTL はラパマイシンの溶媒のみを投与した群を、Rapa はラパマイシン投与群をそれぞれ表す。* p < 0.05、** p < 0.01 を表す。

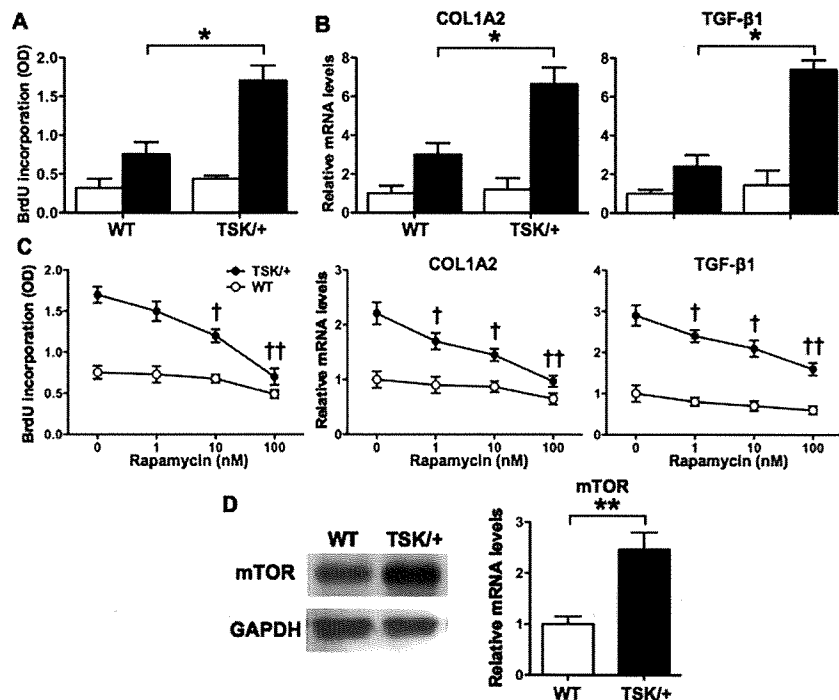


図3: TSK マウス皮膚線維芽細胞を IL-4 で刺激したときの増殖能 (A)、COL1A2、TGF-β1 発現量 (B) を示した。白棒は無刺激を表し、黒棒は IL-4 刺激を表す。IL-4 刺激下でのラパマイシン投与時の増殖能、COL1A2 および TGF-β1 発現量を示した (C)。TSK 皮膚線維芽細胞における mTOR の発現量を western blotting 法および real time PCR で示した (D)。TSK/+ は TSK マウスを、WT は野生型マウスをそれぞれ表す。それぞれの WT 群と比べて † p < 0.05、†† p < 0.01 を表す。** p < 0.01 を表す。

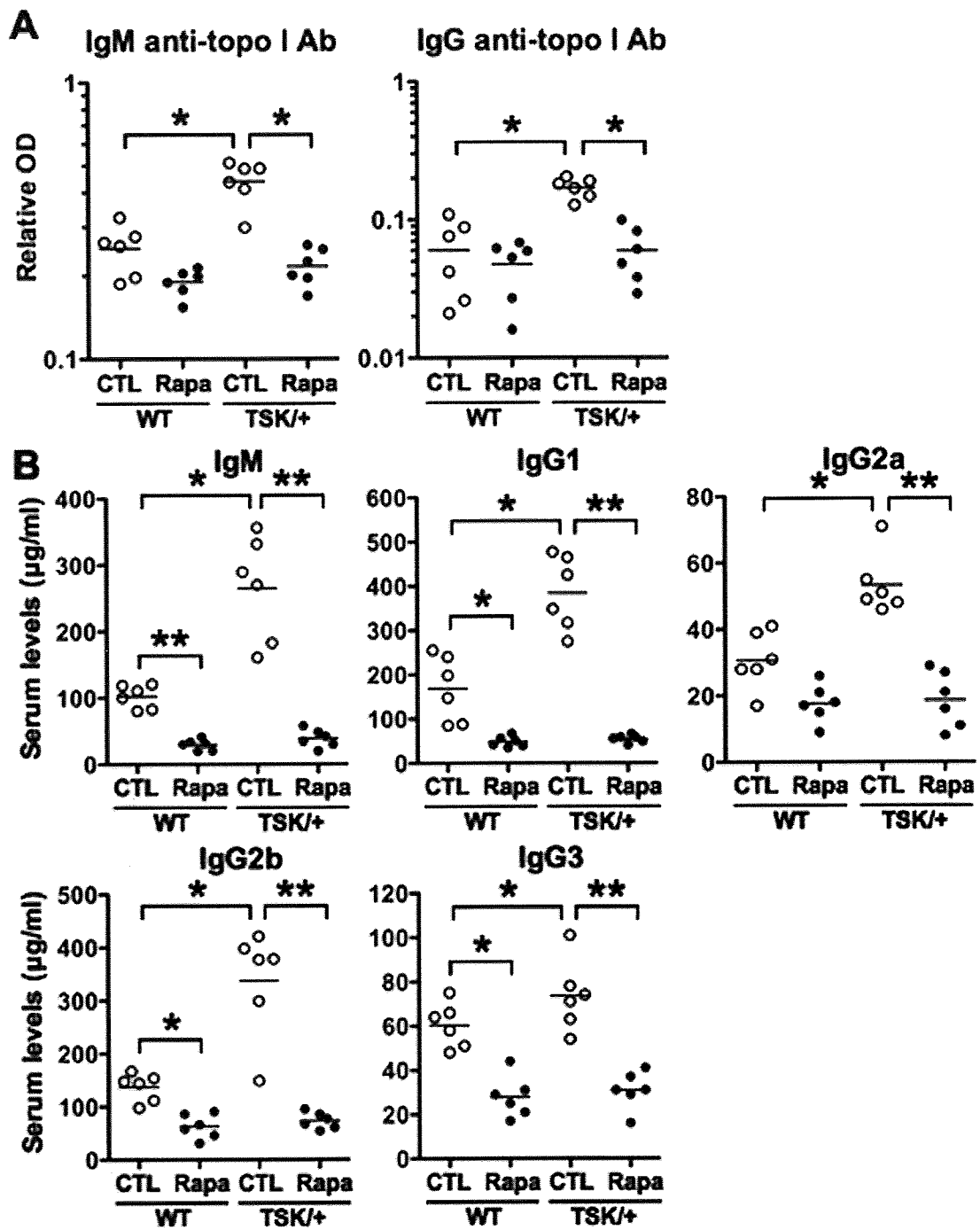


図4：血清中の抗 topo I 抗体 (A)、 γ グロブリンの濃度 (B) を示した。TSK/+ は TSK マウスを、CTL は野生型マウスを、Rapa はラパマイシンの溶媒のみを投与した群を、Rapa はラパマイシン投与群をそれぞれ表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

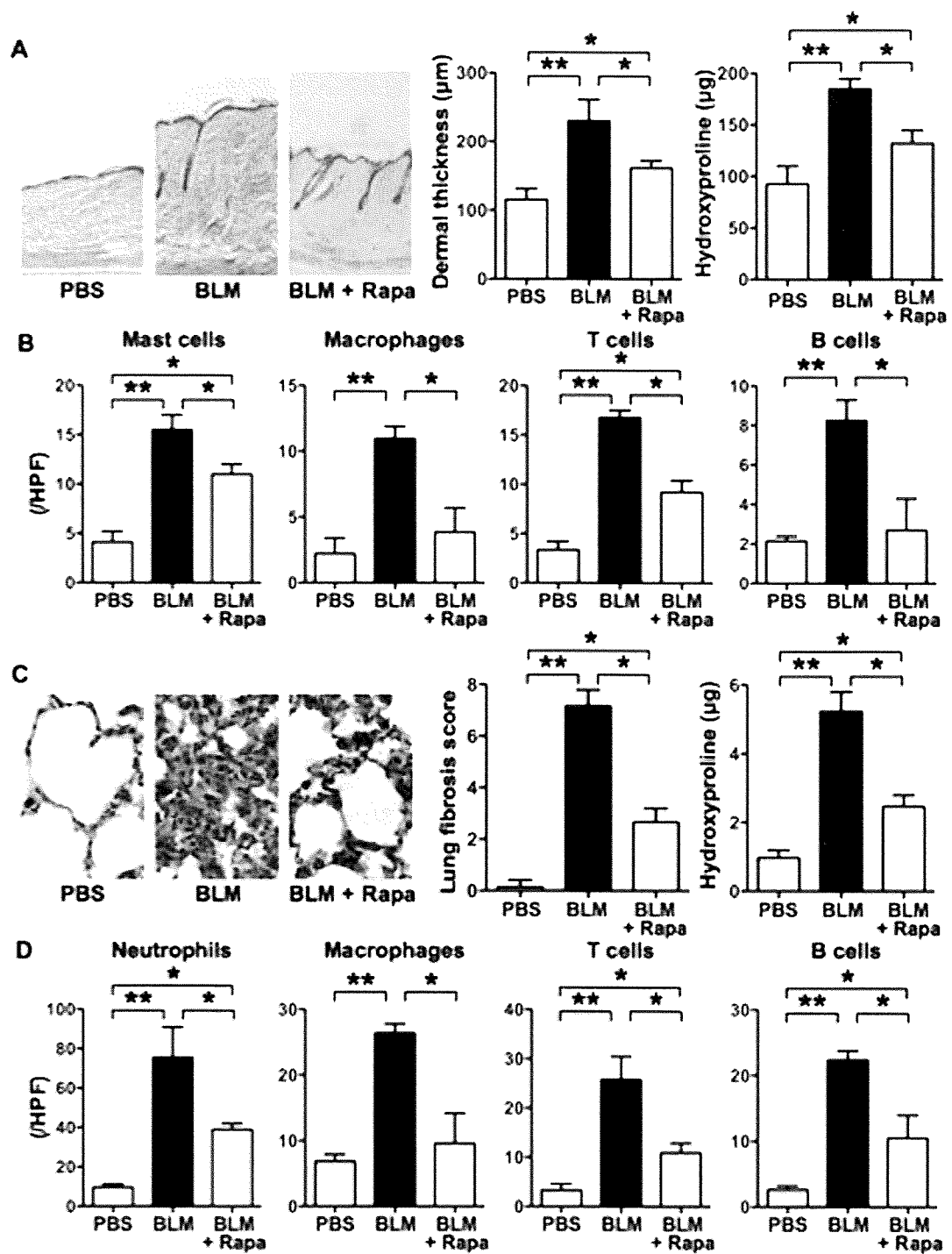


図5：BLM誘発SScモデルマウスの皮膚（A）、肺（C）を組織学的（皮膚：x40、肺：x100）に示した。同時にヒドロキシプロリン産生量を示した。皮膚（B）、肺（D）への炎症細胞浸潤数を示した。PBSはPBS投与群を、BLMはBLM投与群を、BLM+RapaはBLMおよびラパマイシン投与群をそれぞれ表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

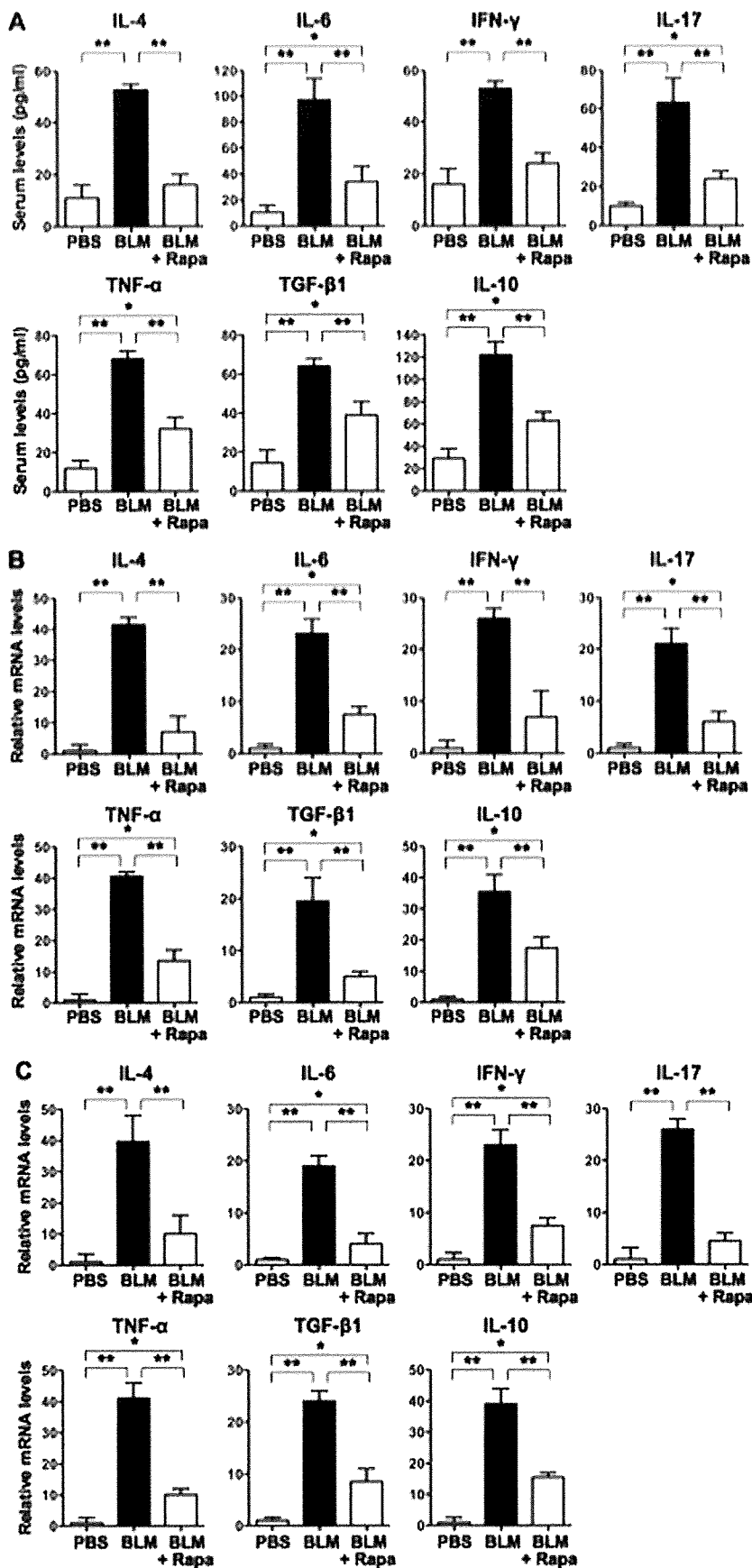


図6: BLM誘発SScモデルマウスにおける皮膚(A)、肺(B)、血清(C)におけるサイトカイン産生量を示した。PBSはPBS投与群を、BLMはBLM投与群を、BLM+RapaはBLMおよびラパマイシン投与群をそれぞれ表す。* p<0.05、** p<0.01を表す。

Tight skin (TSK) マウスにおける硫化水素の効果

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
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
協力者	築場広一	東京慈恵会医科大学皮膚科 助教
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	竹中 基	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 講師
協力者	清水和宏	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 准教授
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

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) の病態形成に酸化ストレスが関与していることが報告されている。このことから抗酸化療法が SSc の治療戦略として有望視されている。高濃度の硫化水素 (H_2S) は毒性を呈するが、低濃度では抗酸化作用を有することが近年明らかになった。そこで SSc モデルマウスである TSK マウスにおける H_2S の効果を検討するために、 H_2S の供与体である硫化水素ナトリウム (NaHS; $100 \mu\text{mol/kg}$) を連日 4 週間、腹腔内投与した。組織学的に皮下結合織の菲薄化を認め、皮膚硬化の改善が確認できた。NaHS の投与により IgM 型抗 ss-DNA 抗体量は減少したが、抗トポイソメラーゼ I 抗体量に変化は認められなかった。また皮膚では抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 mRNA の発現増強が認められた。さらに TSK マウス皮膚から培養した線維芽細胞を NaHS で刺激したところ、COL1A2 の発現低下が認められた。以上の結果から、 H_2S 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

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は皮膚および内臓諸臓器の血管障害と線維化を主徴とする膠原病である。SSc の重要な臨床的特徴として、組織の線維化に先行して生じる血管病変が挙げられる。Raynaud 現象に代表される、繰り返す一過性の血管攣縮による組織虚血と再還流はフリーラジカルであるスーパーオキシドの産生をきたし、酸化ストレス過剰状態を引き起こす。酸化ストレスは SSc の血管

障害や線維化そして抗核抗体の産生に関与している可能性が示唆されている^{1,2)}。これらのことから抗酸化療法は SSc の治療法として有望視されている³⁾。

硫化水素 (H_2S) は無色、可燃性、水溶性、腐卵臭の気体で 1713 年に最初に記載されて以来、毒性のガスとして知られている。しかしヒトをはじめとして生体内で恒常的に食餌性のシステインを主な基質として産生されていることが明らかにされた⁴⁾。また高濃度では毒性を呈するが、低濃度では抗酸化作