

用を持つことが明らかになっている。抗酸化作用の機序として活性酸素⁵⁾や過酸化亜硝酸⁶⁾といった酸化ストレスの原因物質を直接除去することや、抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現を増加させ、一酸化炭素を介して除去するといった機序⁷⁾が考えられている。実際に投与する場合、主に濃度を一定に保つ目的で H₂S の供与体として硫化水素ナトリウム (NaHS) を用いる。そして NaHS は動物モデルにおいて炎症、虚血再還流、循環ショックに対し、治療効果が報告されている⁸⁾。

TSK マウスは著明な皮膚線維化を呈する突然変異として継代されたマウスであり、SSc 動物モデルとして広く認知されている⁹⁾。皮膚におけるコラーゲン蓄積や自己抗体の産生に加えて、抗酸化酵素の発現低下が認められることが近年明らかになった¹⁰⁾。

本研究では SSc において皮膚の線維化が H₂S で抑制できるかどうかを TSK マウスに NaHS を投与することにより検討した。

B. 研究方法

1) マウス

SSc モデルマウスとして TSK マウス、コントロールとして C57BL/6 マウスを用いた。

2-a) NaHS の投与

1 週齢のマウスに 4 週間にわたり PBS で希釈した NaHS を 100 μ mol/kg、連日腹腔内注射した。また、試薬の対照として PBS のみを同様のスケジュールで腹腔内投与した。

2-b) 組織学的評価

マウスの背部皮膚より 6 mm 径のパンチで生検した。試料よりパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン & エオジン染色した。TSK マウスの皮膚硬化を反映する皮下結合組織層の厚さを光学顕微鏡で

測定し、線維化の指標とした。

2-c) マウス由来皮膚中ヒドロキシプロリン量の測定

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あり、その量はコラーゲン量を反映する。凍結保存した皮膚サンプル中のヒドロキシプロリン量を生化学的に測定し、線維化の指標とした。

2-d) 血清学的検討

自己抗体産生に対する影響を検討するために、採取したマウス血清について、TSK マウスで発現が高い抗トポイソメラーゼ I 抗体、IgM 型抗 ss-DNA 抗体、IgM 抗 ds-DNA 抗体について MBL 社製測定キットをモデファイして測定した。具体的にはこれらのキットはヒト抗体測定用のため、二次抗体がマウス免疫グロブリンを認識するように抗マウス免疫グロブリン抗体へとキットにあらかじめ添付されている二次抗体を置換して測定を行った。それぞれのサンプルは duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

2-e) リアルタイム RT-PCR 法による HO-1 mRNA 発現の定量的解析

TSK マウスで発現が低下することが報告されている、抗酸化酵素である HO-1 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で定量的に測定した。

2-f) TSK マウス由来線維芽細胞の COL1A2 発現のリアルタイム RT-PCR 法による検討

TSK マウス皮膚より繊維芽細胞を培養した。培養した線維芽細胞は 12 時間血清を除去した DMEM 培地に培地を置き換えたのち、DMEM 培地で希釈した 1 μ M、10 μ M、50 μ M の NaHS で刺激し 24 時間後細胞を回収した。細胞から RNA を回収し、COL1A2 の発現をリアルタイム RT-PCR を行ない

定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は長崎大学動物実験規則を遵守し行った。

C. 研究結果

1) 組織学的評価

TSK マウスでは野生型マウスと比較して皮下結合織の厚さが9.1倍となるが、NaHS投与により69%薄くなった(図1 A, B; $p < 0.01$)。しかし、野生型マウスよりは依然として有意に肥厚していた($p < 0.01$)。NaHS投与は野生型マウスの皮下結合織の厚さには影響を及ぼさなかった。

2) 生化学的評価

皮膚の線維化の指標となるコラーゲン量についてヒドロキシプロリン量を定量することにより評価した。TSK マウスでは野生型と比較してヒドロキシプロリン量が3.8倍($p < 0.0001$)となり、NaHS投与により38%減少した(図2; $p < 0.05$)。

3) 血清学的評価

TSK マウスにおいてNaHS投与により、IgM型抗ss-DNA抗体は有意に減少した(図3; $p < 0.05$)。抗トポイソメラーゼI抗体とIgM型抗ds-DNA抗体量は変化がなかった。

4) 抗酸化酵素の発現

HO-1 mRNAの発現はTSK マウスにおいては野生型マウスと比較して減少していた($p < 0.05$)。NaHS投与により有意に増加し、野生型マウスと同水準となった(図4; $p < 0.01$)。このNaHS投与によるHO-1発現の増加は野生型マウスにおいても認められた($p < 0.05$)。

5) TSK マウス由来線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響

COL1A2の発現は50 μ MのNaHSで処理すると

有意差を持って減少した(図5; $p < 0.05$)。1 μ M、10 μ M処理では減少はするものの有意な差を認めなかった。

D. 考案

本研究によりH₂Sの供与体であるNaHSの投与により、TSKマウスの皮膚硬化が改善し、一部の抗体ではあるが、自己抗体の産生が抑制されることが明らかとなった。

本研究ではTSKマウスにおいて増加していたIgM型抗ss-DNA抗体の発現がNaHS投与により減少した。しかしながら抗トポイソメラーゼI抗体やIgM型抗ds-DNA抗体量には影響がなかった。硫化水素が自己抗体産生に及ぼす影響として、MRL/lprマウスにおいてループス腎炎が改善するとともにIgG型抗ds-DNA抗体が減少するという報告がある¹¹⁾。しかし、硫化水素の自己抗体産生に及ぼす影響は明らかにされていない。本研究の結果結果から硫化水素は部分的にはあるが自己抗体産生に関与していると考えた。

TSKマウスの皮膚において抗酸化作用を示すHO-1が減少していることが報告されている¹⁰⁾。本研究ではNaHS投与によりこの減少したHO-1の発現が回復することが示された。HO-1欠損が線維化を増強するとする報告はある¹²⁾が、HO-1が皮膚線維化に関わる詳細なメカニズムは明らかになっていない。

さらにNaHS投与によりTSKマウス由来線維芽細胞によるCOL1A2の発現が抑制された。活性酸素種は心筋の線維化を促進することが知られており¹³⁾、NaHSはコラーゲン量を減少させることが知られている¹⁴⁾。これらのことから、NaHSが直接コラーゲン産生を抑制する可能性、活性酸素種を除去

することにより TSK マウスにおける皮膚線維化を阻害している可能性が考えられる。また前述のごとく抗酸化酵素 HO-1 の発現増強を介して線維化を阻害している可能性も考えられる。

E. 結 論

NaHS の投与により TSK マウスの皮膚硬化は改善した。このことから H₂S が SSc の治療に有用である可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Herrick AL, Rieley F, Schofield D, Hollis S, Braganza JM, Jayson MI: Micronutrient antioxidant status in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1994; 21: 1477-83.
2. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, et al.: Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma: fibroblast phenotype by the constitutive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2653-64.
3. Simonini G, Pignone A, Generini S, Falcini F, Cerinic MM: Emerging potentials for an antioxidant therapy as a new approach to the treatment of systemic sclerosis. *Toxicology* 2000; 155: 1-15.
4. Stipanuk MH, Beck PW: Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 1982; 206: 267-277.
5. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, et al.: Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 756-763.
6. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, et al.: The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem* 2004; 90: 765-768.
7. Qingyou Z, Junbao D, Weijin Z, Hui Y, Chaoshu T, Chunyu Z: Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 30-37.
8. Szabó C.: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 917-935.
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: 493-512.
10. Dooley A, Low SY, Holmes A, Kidane AG, Abraham DJ, Black CM, et al.: Nitric oxide synthase expression and activity in the tight-skin mouse model of fibrosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 272-280.
11. Takeda Y, Takeno M, Iwasaki M, Kobayashi H, Kirino Y, Ueda A, et al.: Chemical induction of HO-1 suppresses lupus nephritis by reducing local iNOS expression and synthesis of anti-dsDNA antibody. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 237-244.

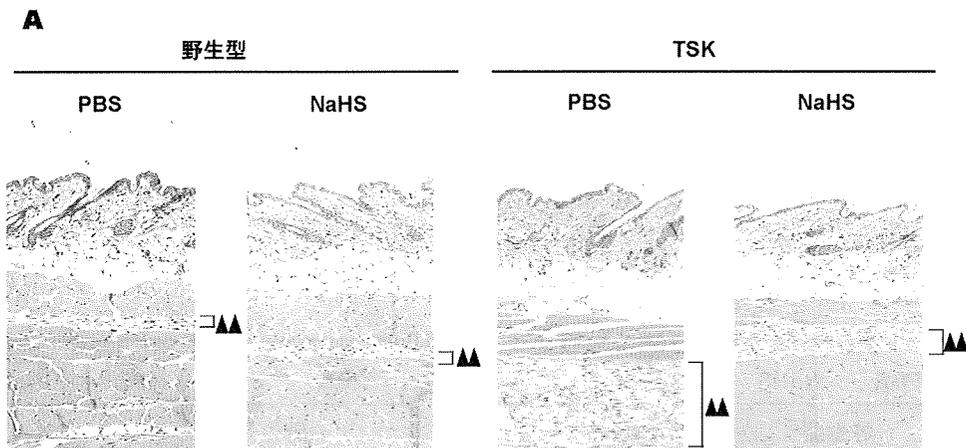
12. Kie JH, Kapturczak MH, Traylor A, Agarwal A, Hill-Kapturczak N: Heme oxygenase-1 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1681-1691.
13. Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Yao L, et al.: Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 230-238.
14. Shi YX, Chen Y, Zhu YZ, Huang GY, Moore PK, Huang SH, et al.: Chronic sodium hydrosulfide treatment decreases medial thickening of intramyocardial coronary arterioles, interstitial fibrosis, and ROS production in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2093-2100.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. 2009 ACR 73th/ARHP 44th Annual Scientific Meeting
 2. 第37回日本臨床免疫学会総会
 3. 日本研究皮膚科学会第34回年次学術大会・総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



B 皮下結合組織層の厚さ

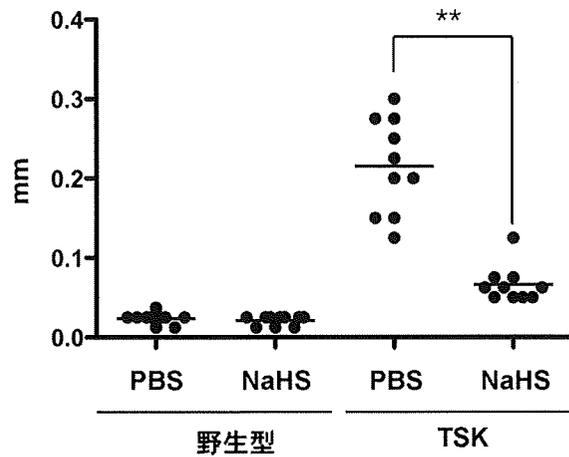


図1：NaHS投与群、非投与群におけるTSKマウス、コントロールマウスの皮下結合組織層厚の変化 (** p < 0.01、▲▲皮下結合組織層)

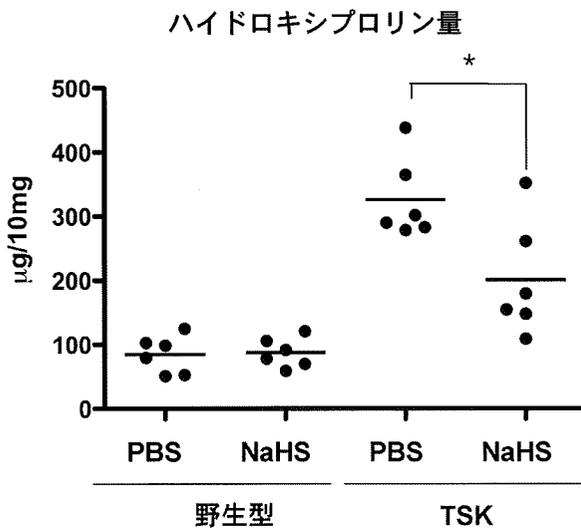


図2：NaHS投与群、非投与群におけるTSKマウス、コントロールマウスの皮膚10mgあたりのハイドロキシプロリン量の変化 (* p < 0.05)

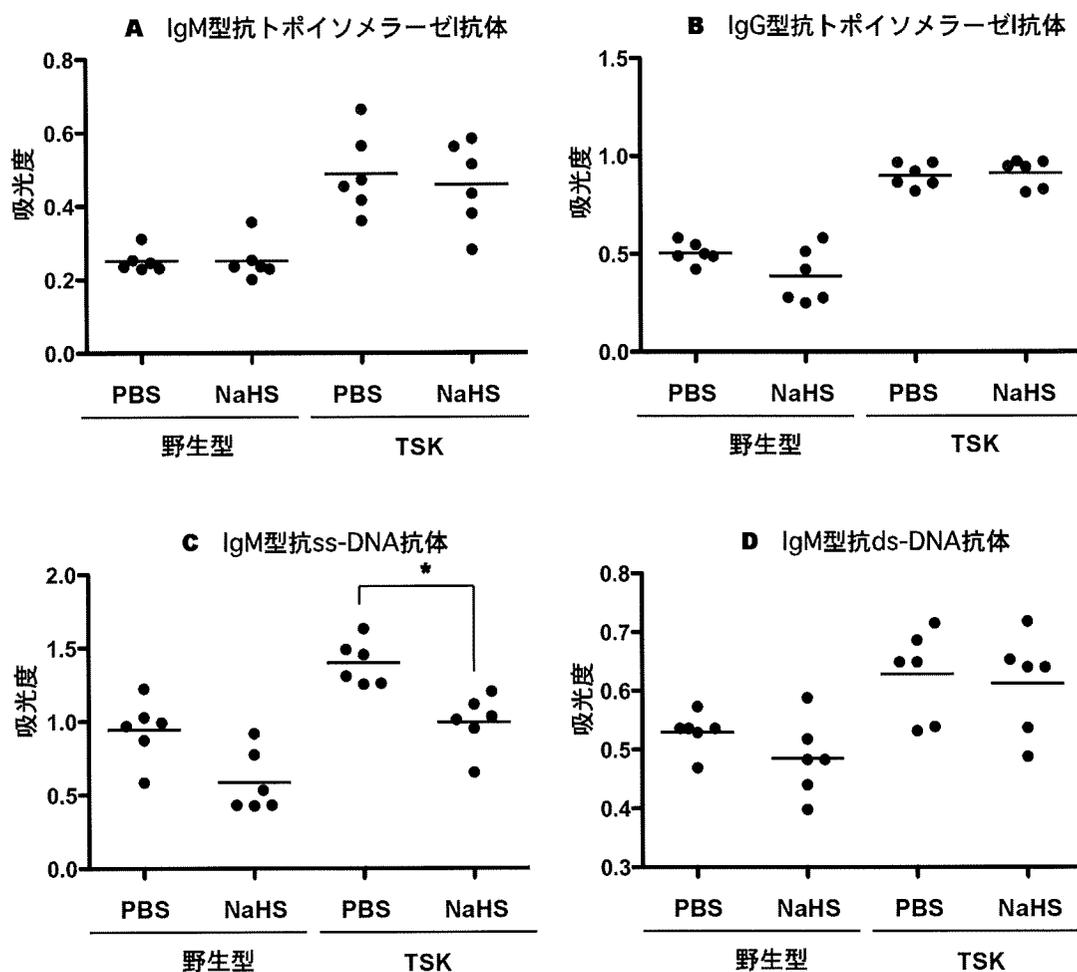


図3：NaHS投与群、非投与群における TSK マウス、コントロールマウスの血清中自己抗体量の変化 (* $p < 0.05$)

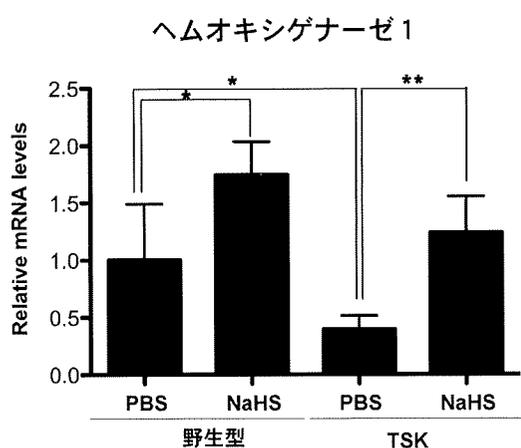


図4：NaHS投与群、非投与群における TSK マウス、コントロールマウスの皮膚 HO-1 mRNA 発現量の変化 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

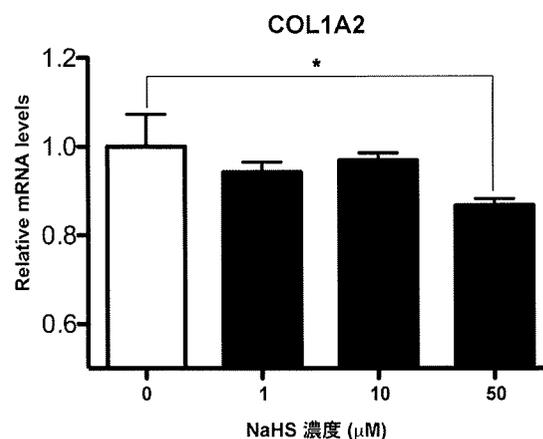


図5：TSK マウス由来皮膚線維芽細胞の COL1A2 発現に及ぼす NaHS の効果 (* $p < 0.05$)

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

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	松下幸世	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者	堀川真由香	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者	白崎文朗	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者	東 清史	住友化学生物環境科学研究所
協力者	富ヶ原祥隆	住友化学生物環境科学研究所
協力者	金子秀雄	住友化学生物環境科学研究所
分担研究者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 准教授
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

研究要旨

山椒の抽出液中にヒト皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子の発現を抑制する成分 (サンショール) を同定し、サンショールを含む活性化合物をリード化合物とし、種々構造最適化を行い、新規低分子化合物 HSc025 を見出した。そこで、HSc025 のヒト皮膚線維芽細胞に対する作用機序を検討した。また、本薬剤内服の tigh skin mouse (TSK/+マウス) の皮膚硬化、プレオマイシン誘導性肺線維症への効果を検討した。ヒトの皮膚線維芽細胞をあらかじめ HSc025 と反応させた場合、Smad 依存性のプロモーターの活性化を用量依存的に抑制した。HSc025 は、TGF- β 誘導性のコラーゲンやファイブロネクチンの発現を *in vitro* で有意に抑制した。しかし、HSc025 は TGF- β で誘導された Smad3 のリン酸化には直接影響を及ぼさず、Y-box protein 1 の核内への移行を促進することにより、Smad 依存性のコラーゲンの転写を抑制している可能性が示唆された。HSc025 の内服は、TSK/+マウスの皮膚硬化やプレオマイシン誘導性肺線維症の線維化を有意に抑制した。これらの結果から、TGF- β /Smad のシグナルを抑制する新規低分子化合物である HSc025 が、皮膚や肺の線維化を抑制することが示された。HSc025 内服治療が、全身性強皮症に対する治療法として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis ; SSc) は、皮膚や内臓の線維化により特徴づけられる膠原病である。その病因は不明であるが、線維化に中心的な役

割を果たすと考えられているメディエーターは transforming growth factor (TGF)- β である。TGF- β は Smads のリン酸化と核内移行を誘導し、細胞外基質蛋白遺伝子の転写を活性化させる。このため、

TGF- β やそのシグナルが、SSc の治療のターゲットとして注目されている。

これまでに、薬用植物から見つかったいくつかの抽出物が、様々な臓器の線維化を抑制することが知られている。例えば、植物アルカロイドのひとつである halofuginone は、TGF- β /Smad のシグナルを抑制してコラーゲン産生を抑制する¹⁾。我々は以前に、interferon- γ /Y-box binding protein 1 (YB-1) シグナルが2つの機序でコラーゲン遺伝子の発現を抑制することを報告した²⁾。ひとつは、IFN- γ によって YB-1 が核内に移行すると、YB-1 が *COL1A2* の近位プロモーター領域にある IFN- γ response element (IgRE) と結合することにより、*COL1A2* の転写を抑制するものである。もうひとつは、YB-1 が Smad3 と co-activator p300 との結合を物理的に妨害して TGF- β /Smad3 シグナルを核内で阻害することにより、*COL1A2* の転写を抑制するというものである。

我々（協力者の東ら）は、山椒の抽出液中にヒト皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子の発現を抑制する成分（サンシオール）を同定し、サンシオールを含む活性化合物をリード化合物とし、種々構造最適化を行い、新規低分子化合物 HSc025 を見出した。そこで、HSc025 のヒト皮膚線維芽細胞に対する作用機序を検討した。また、本薬剤内服の tight skin mouse (TSK/+マウス)³⁾ の皮膚硬化、プレオマイシン誘導性肺線維症⁴⁾ への効果を検討した。

B. C. 方法と結果

HSc025 は YB-1 の活性化と核内移行を介してコラーゲン遺伝子の発現を抑制する

これまでの検討から、YB-1 は IgRE を介して *COL1A2* のプロモーターの活性化を抑制することが示されている²⁾。我々は、約 150 種の薬用植物抽

出物から、IgRE を含むコラーゲンプロモーターのプラスミドの活性を抑制するが、IgRE を欠くプラスミドには影響しない抽出物を cell-based reporter assay によりスクリーニングした。その結果、3 種の抽出物が見つかり、そのうちのひとつである山椒抽出物からサンシオールを活性成分として同定し、サンシオール含む活性化合物をリード化合物とし、種々構造最適化を行い、内服に適した新規低分子化合物 HSc025 を見出した。なお、サンシオールの化学構造は、Smad3 の活性化抑制物質である halofuginone とは全く異なっていた（図 1）。ヒトの皮膚線維芽細胞 (Clontech, Palo Alto, CA) を HSc025 で前処理すると、-342COL-Luc や -161COL-Luc の活性は有意に抑制されたが、IgRE を欠く -124COL-Luc には影響を与えなかった（図 2A）。次に、HSc 025 に対する核内での YB-1 の相対量についての影響を western blotting で検討したところ、HSc025 の用量依存的に核内の YB-1 の量は増加した（図 2B）。さらに、siRNA により YB-1 の発現を抑制したところ、HSc025 による *COL1A2* のプロモーター活性の抑制効果がみられなくなった（図 2C）。これらの結果から、HSc025 が YB-1 の核内への移行を促進することにより、*COL1A2* の転写を抑制していることが示唆された。

HSc025 は Smad のリン酸化抑制を介さずに TGF- β によるコラーゲン発現を阻害する

HSc025 が、TGF- β /Smad シグナルを機能的に抑制するかどうかを確認するために、ヒト皮膚線維芽細胞に -342COL-Luc や SBE₄-TATA-Luc をトランスフェクトし、HSc025 とさまざまな濃度でインキュベートして TGF- β によるコラーゲンのプロモーターや Smad を介した転写の活性化への影響を検討したところ、HSc025 は濃度依存的にこれらの転

写活性を抑制した (図3)。また、HSc025 のヒト皮膚線維芽細胞における *COL1A2* や fibronectin の遺伝子の発現への影響を調べたところ、TGF- β により上昇したこれらの遺伝子発現を HSc025 は濃度依存的に抑制した (図4A)。また、これと一致して、コラーゲン産生の評価として測定した TGF- β による培養液中のヒドロキシプロリン量の増加も有意に抑制された (図4B)。

Halofuginone は、TGF- β の刺激後に、Smad3 のリン酸化やその後の核内移行を阻害することが知られている¹⁾。HSc025 も Smad3 に影響するかどうかを検討した。ヒト線維芽細胞の核蛋白を用いた western blotting では、TGF- β によって核内へのリン酸化 Smad3 の増加がみられた (図5A)。Halofuginone や activin receptor-like kinase 5 抑制剤の SB431542 は有意にそれを抑制したが、HSc025 は抑制しなかった。これを Smad3 の免疫蛍光染色でも確認した (図5B)。Halofuginone や SB431542 は TGF- β による Smad3 の核内移行を抑制したが、HSc025 は抑制しなかった。このことから、HSc025 は Smad3 のリン酸化や核内移行の抑制を介さずに TGF- β によるコラーゲンの発現を阻害するものと考えられた。HSc025 の内服は、マウスモデルにおいて線維化を抑制する

以上より、ヒトの皮膚線維芽細胞において、HSc025 は YB-1 の核内移行を促進することにより、*COL1A2* の転写を抑制しているものと考えられた (図6)。これらの結果を踏まえて、マウスの強皮症モデルである TSK/+ マウスに生後4週より14日間連日 HSc025 を内服させて、皮膚硬化への影響をみた。なお、マウスのすべての実験は、金沢大学で承認されたプロトコールに基づいて施行した。比較のために、TSK/+ マウスで線維化抑制効果が知ら

れている halofuginone^{1,5)} を腹腔内注射した群も設けた。TSK/+ マウスの皮膚にみられる皮下結合組織の肥厚やヒドロキシプロリンの増加は、HSc025 の投与により、halofuginone より劣るものの、コントロールに比べて有意に抑制された (図7)。これまでに、プレオマイシン誘導性の肺線維症モデルにおける halofuginone の効果については、線維化に有効であったという報告⁶⁾ と、有効ではなかったとする報告⁷⁾ がみられる。プレオマイシン誘導性の肺線維症モデルでは、halofuginone 投与群では Ashcroft スコア⁸⁾ の有意な低下はみられなかったが、HSc025 を内服することにより、有意な低下が認められた。ヒドロキシプロリン量については、HSc025 は halofuginone と同程度に低下させた (図8)。なお、HSc025 の内服による明らかな副作用は確認されなかった。このように、HSc025 の内服は、皮膚や肺の線維化モデルに有意な効果を示した。

D. 考案

HSc025 が YB-1 の核内移行を促進する機序は明らかではないが、*in vitro* の検討では、HSc025 が Smad 依存性の細胞外基質蛋白遺伝子の転写活性化を抑制することが示唆された。なお、HSc025 は、リン酸化した Smad3 の核内での量に影響しなかったことから、Smad3 のリン酸化や核内移行には影響しないものと考えられる。これらの結果は、HSc025 が YB-1 を介して、核内での TGF- β /Smad3 シグナルを阻害する可能性を示している。我々や他のグループのこれまでの研究から、IFN- γ は、転写因子 STAT-1 α や YB-1 が Smad3-p300 の相互作用を阻害することにより間接的に TGF- β /Smads シグナルを阻害することが知られている^{2,9)}。さらに私たちは、casein kinase II 依存性のシグナルが、IFN- γ を

介した YB-1 の核内移行を制御する可能性を報告している。一方、YB-1 の細胞内貯留に重要なアンカープロテインの存在を指摘する報告もある。HSc025 が YB-1 の核内移行を活性化する詳細な機序については、現在検討中である。

本研究で、HSc025 は、問題となる副作用もみられず、2つのマウス線維化モデルにおいて、線維化を抑制した。TSK/+マウスの皮膚硬化に対する効果は、halofuginone より劣ったものの、コントロールに比べて有意な効果を示した。一方、ブレオマイシン誘導性肺線維症に対する効果は、HSc025 は halofuginone よりも大きな効果を示した。このことは、HSc025 が Halofuginone に比べて皮膚よりも肺によく効くことを必ずしも示しているとは限らない。TSK/+マウスは Fibrillin-1 遺伝子の変異による遺伝的な線維化モデルであり、ブレオマイシンは化学物質により誘導される線維化モデルである。前者は炎症細胞浸潤が乏しく、後者は炎症細胞の浸潤を伴う点でも異なる。今回の結果が、皮膚と肺の臓器の違いによるものか、遺伝子異常による先天的なモデルと化学物質により誘導される炎症の強いモデルとの間の違いによるものかは、現時点ではわからない。この点を明らかにするために、現在ブレオマイシンにより誘導される皮膚の線維化における HSc025 の効果についても検討している。いずれにしても、Halofuginone に比べて内服が可能な HSc025 は、その安全性と併せて、臨床応用しやすい薬と考えられる。

E. 結 論

新規化合物である HSc025 は、ヒトの皮膚線維芽細胞において、TGF- β /Smad のシグナルを、Smad3 のリン酸化や核内移行を阻害することなく、YB-1 の核内移行を促進することにより抑制する可能性が示

された。また、HSc025 が強皮症の動物モデルにおいて、線維化を有意に抑制することが示された。HSc025 は、SSc の治療薬として期待できる薬と考えられた。

F. 文 献

1. McGaha TL, Phelps RG, Spiera H, Bona C. Halofuginone, an inhibitor of type-I collagen synthesis and skin sclerosis, blocks transforming-growth-factor-beta-mediated Smad3 activation in fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 461-70.
2. Higashi K, Inagaki Y, Fujimori K, Nakao A, Kaneko H, Nakatsuka I. Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J Biol Chem* 2003; 278: 43470-9.
3. 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: 493-512.
4. Fleischman RW, Baker JR, Thompson GR et al. Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. *Thorax* 1971; 26: 675-82.
5. Pines M, Snyder D, Yarkoni S, Nagler A. Halofuginone to treat fibrosis in chronic graft-versus-host disease and scleroderma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 417-25.
6. Nagler A, Firman N, Feferman R, Cotev S, Pines M, Shoshan S. Reduction in pulmonary fibrosis in vivo by halofuginone. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1082-6.
7. Tzurel A, Segel MJ, Or R, Goldstein RH, Breuer

R. Halofuginone does not reduce fibrosis in bleomycin-induced lung injury. *Life Sci* 2002; 71: 1599-606.

8. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988; 41: 467-70.
9. Feng XH, Zhang Y, Wu RY, Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev* 1998; 12: 2153-63.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M et al. A novel inhibitor of Smad-dependent transcrip-

tional activation suppresses tissue fibrosis in mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3465-75.

2. 学会発表

1. Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M, Higashi K, Tomigahara Y, et al. A novel inhibitor of Smad-dependent transcriptional activation suppresses tissue fibrosis in model mice of systemic sclerosis. American Association of Immunologists, Seattle, USA, 2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況

東と富ヶ原は、HSc025 やその類縁体に関して物質及び用途（抗線維化製剤）としてのパテントを有している。

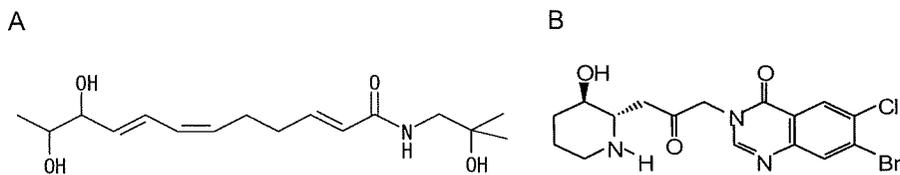


図1：A. サンショールと B. halofuginone の化学構造

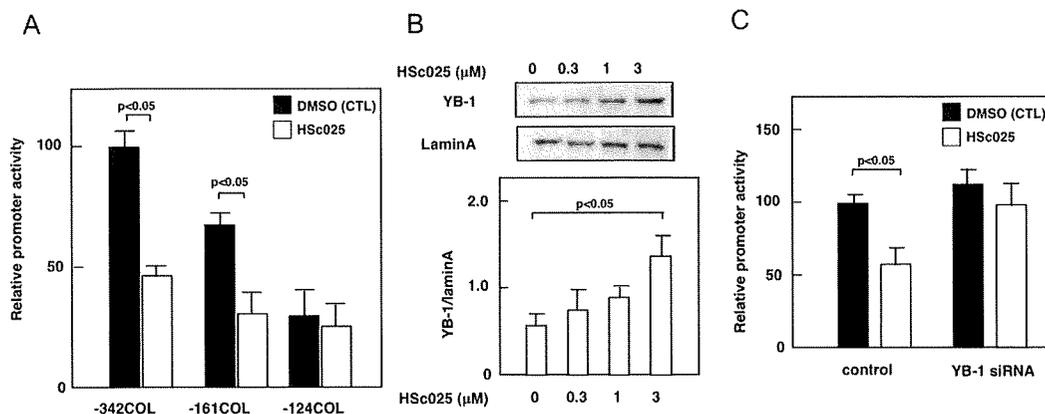


図2：HSc025はYB-1の核内への移行を促進してCOL1A2の転写を低下させる

A. ヒトの線維芽細胞をHSc025とインキュベートしたところ、-342COLと-161COLのluciferase活性は有意に抑制されたが、YB-1の結合部位であるIgREを欠く-124COLには影響がみられなかった。
 B. HSc025による核内におけるYB-1の量の変化を評価したところ、HSc025の用量依存的にYB-1の核内量は増加した。
 C. YB-1をsiRNAによってノックダウンした細胞では、HSc025とインキュベートしても、COL1A2の転写抑制効果はみられなかった。

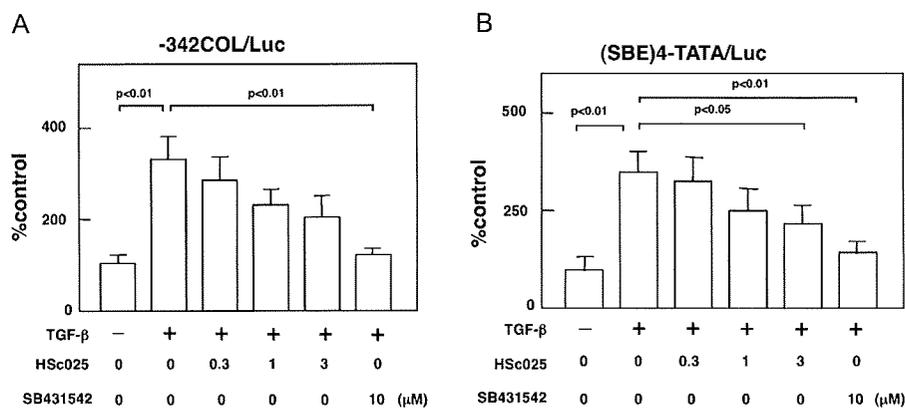


図3：HSc025は、ヒト線維芽細胞において、TGF-β/Smadシグナルを抑制する

A. ヒト皮膚線維芽細胞を種々の濃度のHSc025とインキュベートすることにより、TGF-βにより上昇したコラーゲンのプロモーター活性は用量依存的に抑制された。
 B. HSc025はTGF-βにより誘導されたSmad binding elementsの転写活性を用量依存的に抑制した。

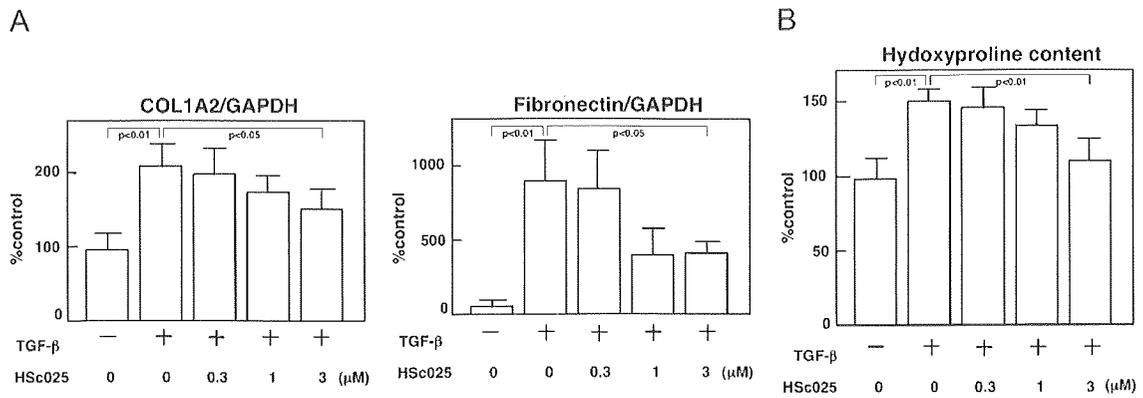


図4：HSc025は、ヒト線維芽細胞において、TGF-βで誘導されるコラーゲンの産生を抑制する
 A. HSc025のヒト皮膚線維芽細胞におけるCOL1A2やfibronectinの遺伝子の発現への影響を調べたところ、HSc025は3μMにおいて、TGF-βにより上昇したこれらの遺伝子発現を有意に抑制した。
 B. コラーゲン産生の評価として測定したTGF-βによる培養液中のヒドロキシプロリン量の増加も有意に抑制された。

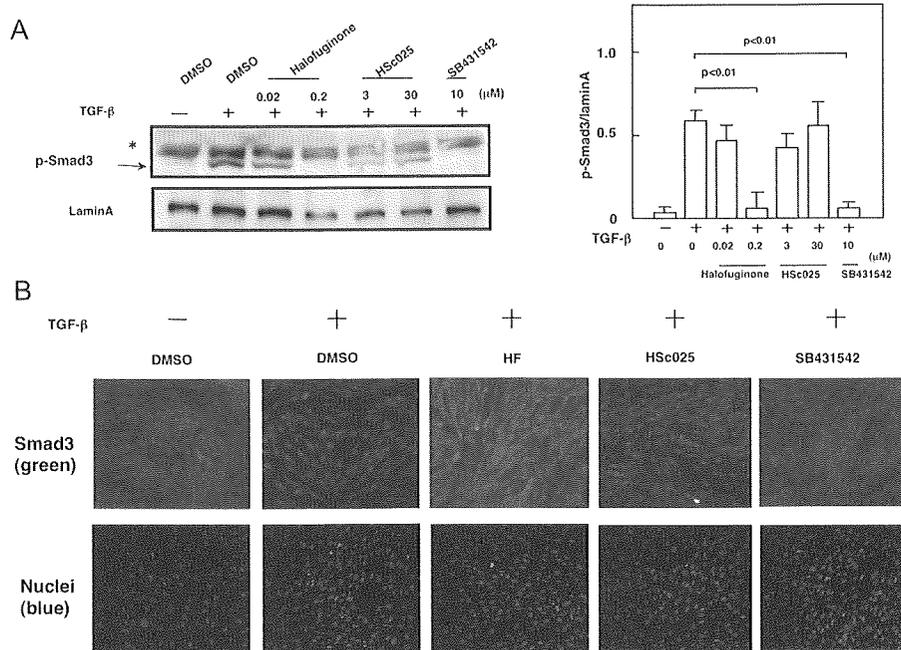
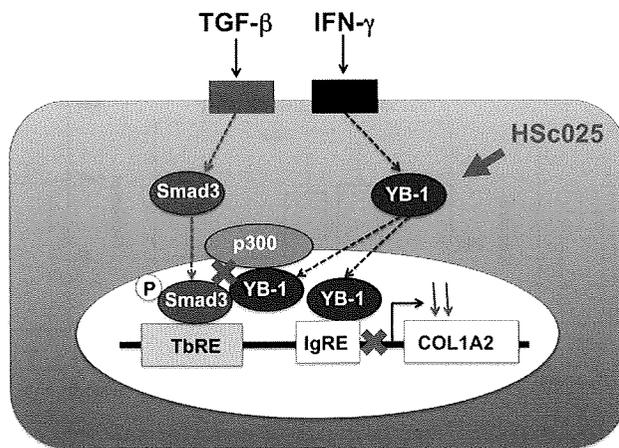


図5：HSc025は、TGF-βで誘導されるSmad3のリン酸化及び核内移行に影響を与えない
 A. TGF-βで誘導されるSmad3のリン酸化に対し、HSc025は影響を与えなかった。
 B. TGF-βで誘導されるリン酸化Smad3の核内移行に対し、HSc025は影響を与えなかった。



YB-1:Y-box protein 1, TbRE:TGF-β response element, IgRE:IFN-γ response element

図6：HSc025は、YB-1の核内移行を促進することで、TGF-β誘導性のコラーゲン発現を抑制する。これまでの、IFN-γがCOL1A2の転写を抑制する機序として、2つの経路が考えられている。ひとつは、IFN-γによってYB-1が核内に移行すると、YB-1がCOL1A2の近位プロモーター領域にあるIFN-γ response elementと結合することにより、COL1A2の転写を抑制するものである。もうひとつは、YB-1がSmad3とco-activator p300との結合を物理的に妨害してTGF-β/Smad3シグナルを核内で阻害することにより、COL1A2の転写を抑制するというものである。今回の検討から、ヒトの皮膚線維芽細胞において、HSc025はYB-1の核内移行を促進することにより、COL1A2の転写を抑制しているものと考えられた。

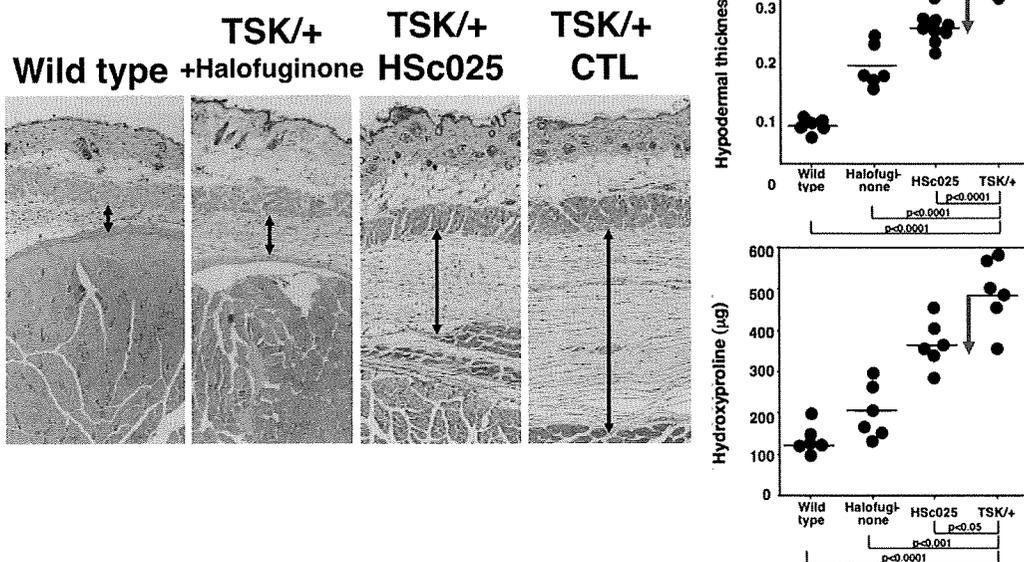
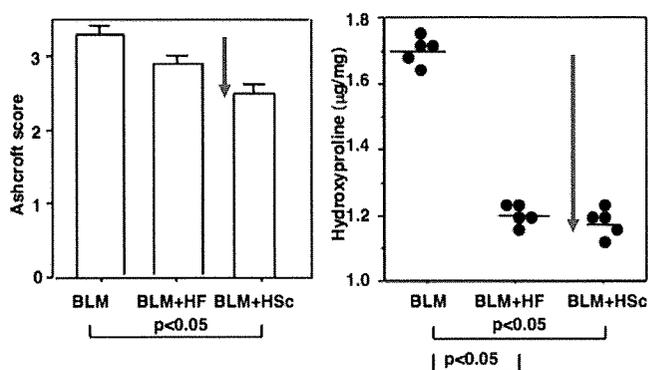
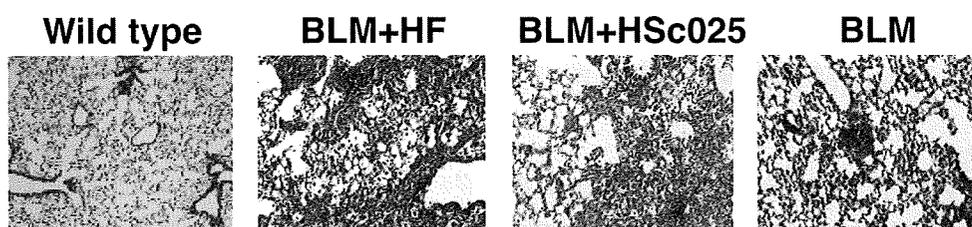


図7：HSc025はTSK/+による皮膚硬化を抑制した

TSK/+マウスに、生後4週より14日間連日HSc025を内服させて、皮膚硬化への影響をみた。比較のために、線維化抑制効果が知られているhalofuginoneを腹腔内注射した群も設けた。TSK/+マウスの皮膚にみられる皮下結合組織の肥厚やハイドロキシプロリンの増加は、HSc025の投与により、halofuginoneより劣るものの、コントロールに比べて有意に抑制された。



BLM: bleomycin, HF: halofuginone

図 8 : HSc025 はブレオマイシン誘導性の肺線維症を抑制した

ブレオマイシン誘導性の肺線維症モデルでは、halofuginone 投与群では Ashcroft スコアの有意な低下はみられなかったが、HSc025 を内服することにより有意な低下が認められた。ハイドロキシプロリン量については、HSc025 は halofuginone と同程度に低下させた。

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

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	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
協力者	玉城善史郎	東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科 助教
協力者	川嶋智彦	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	富田 学	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	宮壽美幾	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	谷口隆志	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	蘆田龍一	東京警察病院皮膚科
協力者	波多野将	東京大学大学院医学研究科・医学部循環器内科
協力者	八尾厚史	東京大学大学院医学研究科・医学部循環器内科
協力者	志賀太郎	東京大学大学院医学研究科・医学部循環器内科
協力者	絹川弘一郎	東京大学大学院医学研究科・医学部循環器内科

研究要旨

メシル酸イマチニブは、チロシンキナーゼ阻害薬として知られており、Bcr-Abl、C-Kit、PDGF 受容体、c-Abl のチロシンキナーゼ活性を抑制するがん分子標的治療薬である。汎発性強皮症患者 3 例に対して、合併する肺動脈性肺高血圧に対してメシル酸イマチニブ (100 mg/day) を投与し、皮膚硬化ならびに微小血管障害に対する効果について検討した。皮膚硬化に関しては全例において mTSS の低下や 3 例中 2 例において手指屈曲拘縮の軽減がみられ、1 例においては間接可動域の拡大もみられた。微小血管障害に関しても、3 例中 2 例で NFB の消失がみられた。メシル酸イマチニブは抗線維化作用や血管のリモデリング作用が示唆されており、今後汎発性強皮症の様々な線維化病態、血管障害に対する有効な薬剤となりうると期待される。

A. 研究目的

汎発性強皮症は線維化や血管障害が皮膚および全身の諸臓器にみられる疾患である。病因はまだまだ解明されていないが、免疫異常、コラーゲンの代謝異常、微小血管障害が複合的に絡み合っていると考えられる。汎発性強皮症の皮膚症状としては、Rayn-

aud 現象、手指を含めた全身の皮膚硬化、手指屈曲拘縮、爪上皮出血点 (NFB) などがみられ、その他、pitting scar や毛細血管拡張、calcinosis などがみられることが多い。また、内臓病変としては、肺線維症をはじめとして、肺高血圧症、強皮症腎クリーゼ、逆流性食道炎や腸蠕動運動の低下などがあげられる。

メシル酸イマチニブは近年、慢性骨髄性白血病における骨髄の線維化を抑制したという報告¹⁾、線維芽細胞において TGF- β により活性化された c-Abl に対してそのリン酸化を抑制したという報告²⁾、TSK-1 モデルマウスにおいて c-Abl、PDGF 受容体のリン酸化抑制により、抗線維化作用がみられたという報告³⁾、また、特発性肺動脈性肺高血圧患者に投与した際に、血管のリモデリング作用にその有用性が認められたとの報告がみられ⁴⁾、汎発性強皮症の皮膚硬化や微小血管障害などに有効と考えられる。

今回、我々は合併する肺動脈性肺高血圧に対してメシル酸イマチニブ (100 mg/day) を投与した汎発性強皮症患者 3 例における皮膚硬化ならびに微小血管障害に対する効果について検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は汎発性強皮症 3 例。

全例において肺高血圧症を合併しており、肺高血圧症に対して患者本人および家族に対して説明を行い、同意を得たうえで、メシル酸イマチニブ 100 mg/day 投与を行った。

2) 評価方法

メシル酸イマチニブ内服前、内服 3 カ月、6 か月後 (症例 2 のみ内服 1 ヶ月後も含む) における、modified Rodnan's total skin thickness score (mTSS)、関節可動域、Raynaud 現象、NFB、手指屈曲拘縮の経時的変化を測定し、メシル酸イマチニブ内服による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効果を評価した。

C. 研究結果

メシル酸イマチニブ 100mg/day 内服後 6 か月に

て、全例において mTSS の減少、Raynaud 現象の消失がみられた。さらに 3 例中 2 例において NFB の消失、手指屈曲拘縮の軽減がみられた。また、3 例中 1 例において、関節可動域の拡大もみられた。

D. 考案

今回の症例検討により、メシル酸イマチニブが汎発性強皮症の皮膚硬化ならびに微小血管障害に対して今後、有効な治療薬となりえる可能性が示唆された。これまでのメシル酸イマチニブの汎発性強皮症に対する効果を検討した症例報告においては、皮膚硬化、肺線維症、肺高血圧症、手指潰瘍に対するものであった⁵⁻⁹⁾ が、今回我々の症例においては、さらに、Raynaud 現象や NFB についてもメシル酸イマチニブの効果がみられたことが特徴的であると考えられた。メシル酸イマチニブの汎発性強皮症への作用として、c-Abl や PDGF 受容体のリン酸化を抑制することによって、抗線維化作用や血管のリモデリングを促すことが考えられている^{2,3)}。それにより皮膚硬化、手指屈曲拘縮、肺線維症や消化管機能障害、肺高血圧、NFB、Raynaud 現象の症状の改善や強皮症腎の予防などに有効な薬剤となりうる可能性が示唆される。しかしながら、症例によって、効果の違いや、効果不十分あるいは無効である場合もあると考えられる。その原因の一つとして、 α 1-Acid Glycoprotein (AGP) という急性期反応蛋白があげられる。AGP はイマチニブに結合し、その作用を阻害するといわれており、汎発性強皮症患者において、健常人と比較して AGP の有意な上昇がみられたとの報告もあり¹⁰⁾、汎発性強皮症患者において、イマチニブの無効例においては AGP がイマチニブの効果を阻害している可能性が考えられる。しかし、エリスロマイシン、クラリスロマイシン添加にて AGP

のイマチニブ阻害作用は抑制されるという報告¹¹⁾もみられ、エリスロマイシンあるいはクラリスロマイシンの併用により、無効例などにおいても効果が十分期待できる可能性があり、これらの薬剤の併用療法も検討する価値があると考えられた。

E. 結論

メシル酸イマチニブは汎発性強皮症患者の皮膚硬化およびRaynaud症状やNFBなどの微小血管障害に対して効果がみられ、今後有用な薬剤となりえると考えられた。また、今後、エリスロマイシンやクラリスロマイシンなどとの併用療法も検討する必要があると考えられた。

F. 文献

1. Beham-Schmid C, Apfelbeck U, Sill H, Tsybrowsky O, Höfler G, Haas OA, Linkesch W: Treatment of chronic myelogenous leukemia with the tyrosine kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. *Blood*. 2002; 99: 381-3.
2. Wilkes MC, Leof EB: Transforming growth factor beta activation of c-Abl is independent of receptor internalization and regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and PAK2 in mesenchymal cultures. *J Biol Chem*. 2006; 281: 27846-54
3. Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Busch N, Zwerina J, Schett G, Distler O, Distler JH: Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 219-24.
4. Souza R, Sitbon O, Parent F, Simonneau G, Humbert M: Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2006; 61: 736
5. Sabnani I, Zucker MJ, Rosenstein ED, Baran DA, Arroyo LH, Tsang P, Zubair M, Rivera V: A novel therapeutic approach to the treatment of scleroderma-associated pulmonary complications: safety and efficacy of combination therapy with imatinib and cyclophosphamide. *Rheumatology*. 2009; 48: 49-52
6. Ten Freyhaus H, Dumitrescu D, Bovenschulte H, Erdmann E, Rosenkranz S: Significant improvement of right ventricular function by imatinib mesylate in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Clin Res Cardiol*. 2009; 98: 265-7.
7. Sfikakis PP, Gorgoulis VG, Katsiari CG, Evangelou K, Kostopoulos C, Black CM. Imatinib for the treatment of refractory, diffuse systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2008; 47: 735-7.
8. Chung L, Fiorentino DF, Benbarak MJ, Adler AS, Mariano MM, Paniagua RT, Milano A, Molecular framework for response to imatinib mesylate in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 584-91.
9. Kameda H: Imatinib. *Nihon Rinsho Meneki Gakkaikai Kaishi*. 2009; 32 (2) : 77-84.
10. Kucharz EJ, Grucka-Mamczar E, Mamczar A, Brzezinska-Wcislo L: Acute-phase proteins in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2000; 19: 165-6.
11. Azuma M, Nishioka Y, Aono Y, Inayama M,

Makino H, Kishi J, Shono M, Kinoshita K, Uehara H, Ogushi F, Izumi K, Sone S: Role of al-
phal-acid glycoprotein in therapeutic anifibrot-
ic effects of imatinib with macrolides in mice.
Am J Respir Crit Care Med. 2007; 176: 1243-50.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

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～

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 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
協力者 岩田洋平 社会保険中京病院皮膚科 医員
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

全身性強皮症において指尖潰瘍は、患者の QOL を著しく損なう重要な症状の一つである。指尖潰瘍は末梢循環不全を背景に引き起こされるが、この末梢循環障害を引き起こす因子として、エンドセリン-1 がよく知られている。また、全身性強皮症患者では血清中のエンドセリン濃度の上昇が報告されている。エンドセリン受容体拮抗薬（ボセンタン）は肺高血圧症の治療薬として開発されたが、近年、末梢循環不全に対しても有効であることが報告されている。今回我々は、7例の強皮症患者における指尖潰瘍に対してボセンタンを使用した。いずれの症例においても、ボセンタンの投与後は投与前と比較し、著名に指尖潰瘍の改善を認めた。全身性強皮症の指尖潰瘍に対して、ボセンタンは有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症（systemic sclerosis; SSc）の合併症の一つである指尖潰瘍は末梢循環不全が原因とされる¹⁻³⁾。エンドセリンは肺高血圧症の増悪因子として知られているが、近年、末梢循環不全を引き起こす因子としても報告されている⁴⁻⁸⁾。エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンは、肺高血圧症に対する治療薬として開発されたが、近年、SScの指尖潰瘍をはじめとする皮膚潰瘍に対しても優れた効果を示すことが randomized controlled study により証明されており、ボセンタン投与群では非投与群と比べ指尖潰瘍の発生数は有意に減少した⁸⁾。しかしながらこの報告では、ボセンタンは指尖潰瘍が治癒する

期間を短縮させることはできなかった。

今回我々は、7例 SSc 患者における指尖潰瘍に対するボセンタンの効果を検討した。

B. 研究方法

長崎大学病院皮膚科・アレルギー科に通院中の SSc 患者のうち、指尖潰瘍を生じた7例を対象とした（表1）。全例に併用薬として、ベラプロスト 60-120 μg /日の投与が行われた。新規の指尖潰瘍の数を検討するため、ボセンタン投与の1年前までさかのぼって、投与前1年間および投与後1年間の間に発症した指尖潰瘍の数を記録した。また、指尖潰瘍の治癒に要する期間を検討するため、ボセンタン投