

yama I, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/WV mice. J Rheumatol 1999, 26: 2628-34.

6. Leask A. Towards an anti-fibrotic therapy for scleroderma: targeting myofibroblast differentiation and recruitment. Fibrogenesis Tissue Repair

2010, 27: 8-13.

G. 研究発表

1. 論文報告は未発表。
2. 本学会のみ口頭にて発表。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

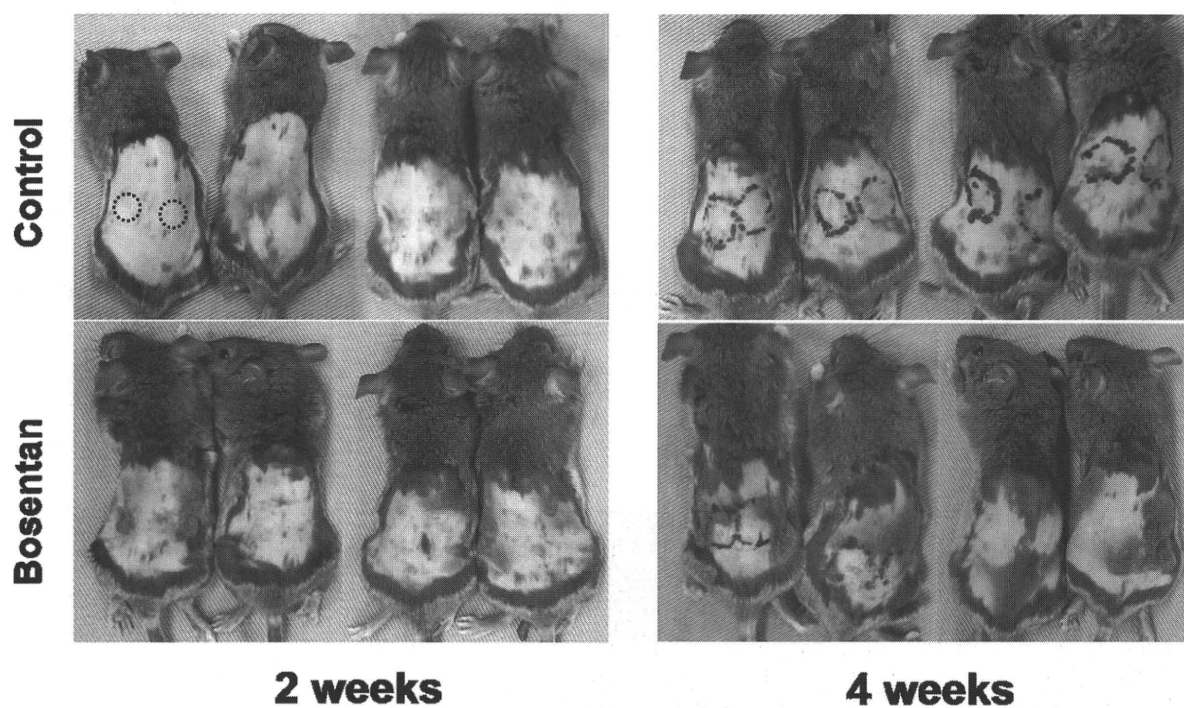


図1：背部皮下へBLMを隔日で局注すると同時に、ボセンタンを経口投与した群（n=4）、ならびに同量の生食を投与した対照群（n=4）における局注部の発毛の変化を2～4週間目に評価した。

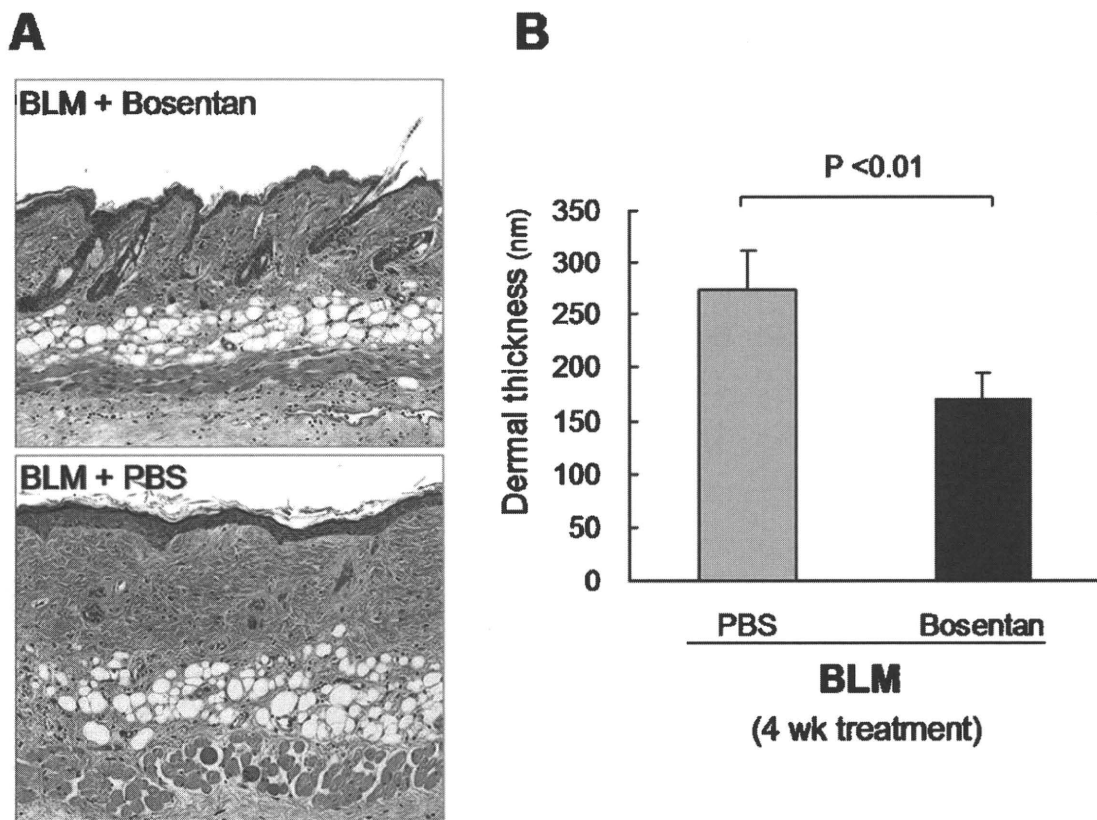


図2：BLM局注4週目における経口ボセンタン同時投与群、ならびに生食群の皮膚病理組織所見、真皮膠原線維の変化と肥厚（A）。両群の真皮厚の差は統計学的に有意であった（ $p < 0.05$ 、B）。

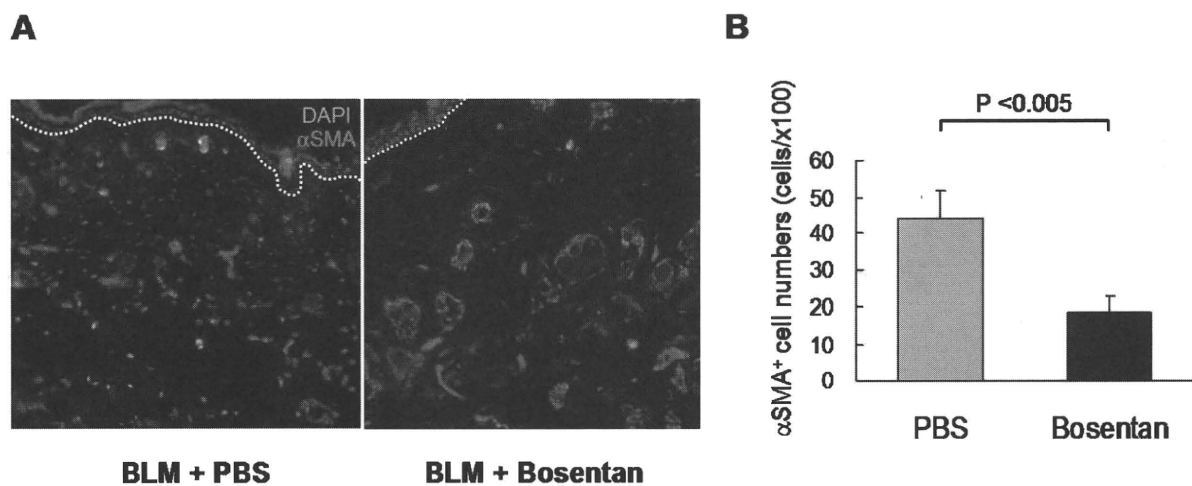


図3：BLM局注4週目皮膚における α SMA陽性筋線維芽細胞の分布の相違。経口ボセンタン投与群（ $n = 4$ ）ならびに生食群（ $n = 4$ ）の免疫蛍光染色像を比較し（A）、統計学的に有意差を認めた（B）。

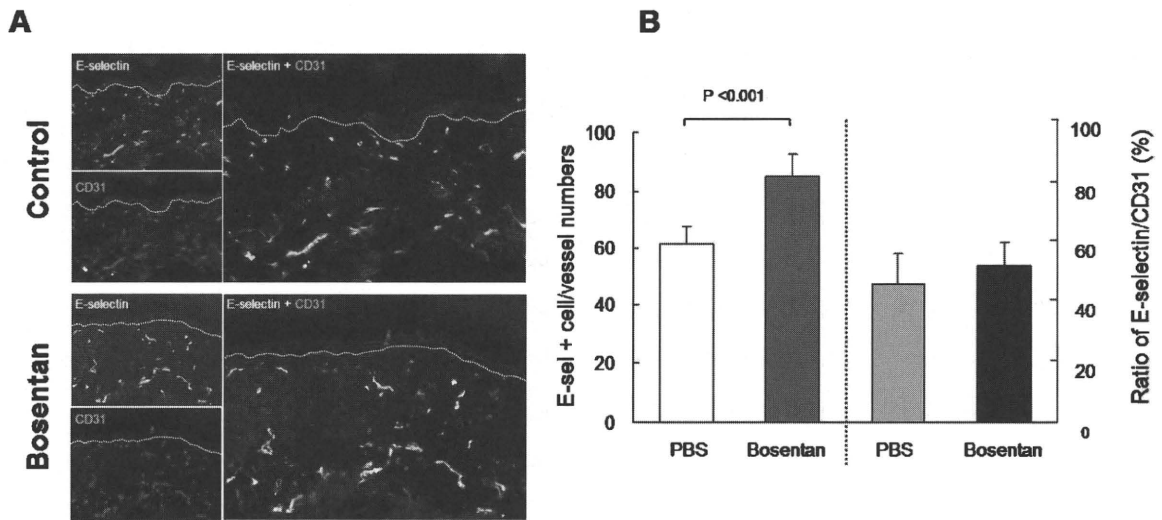


図4：BLM局注4週目皮膚におけるCD31陽性（赤）ならびにe-selectin陽性（緑）の血管内皮細胞の分布の相違。経口ボセンタン投与群（n=4）ならびに生食群（n=4）の免疫蛍光染色像を比較し（A）、統計学的に有意差を認めた（B）。

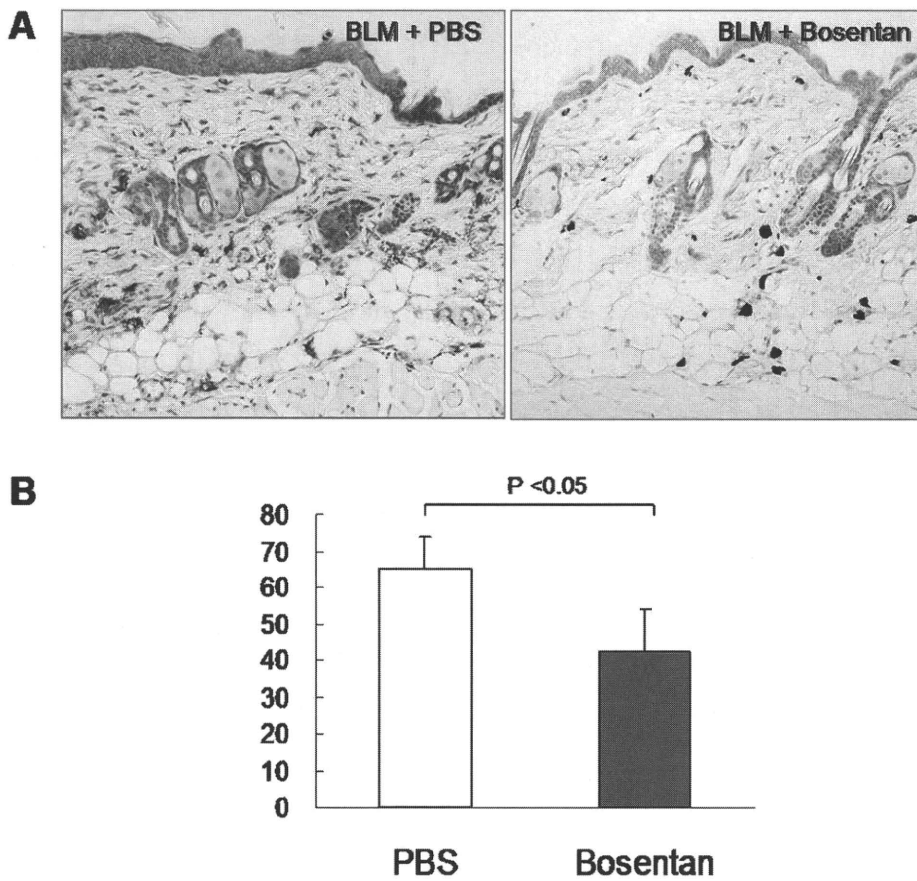


図5：BLM局注4週間目皮膚における肥満細胞の分布の相違。経口ボセンタン投与群（n=4）ならびに生食群（n=4）のトルイジンブルー染色で比較し（A）、統計学的に有意差を認めた（B）。

エダラボンは Tight-skin (TSK) マウスおよび ブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症マウスモデルにおける 線維化と自己免疫異常を改善する

研代表究者 佐藤伸一 東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
協力者 吉崎 歩 長崎大学病院皮膚科・アレルギー科 医員
研究分担者 小川文秀 長崎大学病院皮膚科・アレルギー科 講師
協力者 築場広一 長崎大学病院皮膚科・アレルギー科 助教
協力者 吉崎麻子 長崎大学病院皮膚科・アレルギー科 医員
研究分担者 浅野善英 東京大学医学部附属病院皮膚科 講師

研究要旨

エダラボンは日本で開発された、世界で唯一のフリーラジカル除去剤であり、フリーラジカルが引き起こす脳梗塞後の組織障害を防ぐ目的で使用されている薬剤である。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エダラボンの効果を検討した。BLM は活性酸素を誘導することがよく知られており、BLM 誘発 SSc モデルマウスは強い酸化ストレスにさらされているが、今回の我々の検討ではエダラボンはこの酸化ストレスを軽減し、BLM 誘発 SSc モデルマウスに認められる皮膚硬化と肺線維化を有意に抑制した。同時にエダラボンは BLM 誘発 SSc モデルマウスに認められる皮膚への炎症細胞浸潤とサイトカイン産生の亢進、および自己抗体産生も抑制した。さらにブレオマイシンはそれ自体が炎症細胞からの活性酸素産生を増強し、生み出された活性酸素は線維芽細胞のコラーゲン産生と内因性 toll-like receptor リガンドであるヒアルロン酸の産生を亢進することが示された。TSK マウスにおいても、酸化ストレスが線維化に大きく関与していることが報告されているが、今回の検討においても TSK マウスは強い酸化ストレスの存在下にあることが示され、BLM 誘発 SSc モデルマウスと同様に、線維化とサイトカイン過剰産生および自己免疫異常は、エダラボンによって抑制された。このように、二つの異なる SSc モデルマウスにおいて、線維化を抑制したエダラボンは、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ある¹⁾。病因は未だ明らかとなっていないものの、SSc 患者ではレイノー症状などの虚血に

よりフリーラジカルの産生が亢進していることが示されており、これによる強い酸化ストレスが病態形成に重要な役割を果たしていると考えられている^{2,3)}。実際、SSc 患者血清中における酸化ストレスマーカーである 8-isoprostane 値は病勢と正の相関を認め

ることが報告されている⁴⁾。さらに、一酸化窒素 (NO) をはじめとするフリーラジカルは、内因性 toll-like receptor (TLR) リガンドの一つであるヒアルロン酸などの産生を亢進させ、炎症反応を誘導することが示唆されている⁵⁾。

ブレオマイシン (BLM) を連日皮下投与して作成する BLM 誘発 SSc モデルマウスは、皮膚硬化および肺線維化、自己免疫異常、サイトカイン産生過剰を呈し、ヒトの SSc をよく模倣したモデルマウスである^{6,7)}。BLM はフリーラジカルを誘導することが知られており、BLM 誘発 SSc モデルマウスで認められるこれらの異常は、酸化ストレスの影響が大きく関与していると考えられている⁸⁾。別の SSc モデルマウスとして TSK マウスが挙げられるが、これは著明な皮膚線維化と自己免疫異常を呈する突然変異種として継代されたマウスであり、BLM 誘発 SSc モデルマウスと同様に SSc の動物モデルとして広く認知されている⁹⁾。近年の報告によると、TSK マウスにおいてもヒトの SSc 患者と同様に、線維化および自己免疫異常に対するフリーラジカルの関与が示唆されている¹⁰⁾。

エダラボンは日本で開発された世界初のフリーラジカル除去剤であり、臨床の現場においては脳梗塞の急性期に対して用いられる¹¹⁾。脳梗塞では虚血によるフリーラジカルの産生が、組織障害に寄与することが知られており、エダラボンはこれに対する優れた保護作用を有している¹²⁾。これまでの知見から、SSc の病態形成においてフリーラジカルと酸化ストレスが大きく関与していることは明らかであると考えられる。今回我々はエダラボンによるフリーラジカル除去効果は SSc の病態形成を妨げ、新規治療法となる可能性を仮説として提唱し、BLM 誘発 SSc モデルマウスおよび TSK マウスの 2 つの異なった

SSc モデルを用いて検討を行った。

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¹³⁾。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し行った。

2) エダラボンの投与

エダラボン (Tanabe-Mitsubishi Pharma, Tokyo, Japan) を生理食塩水に溶解し、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尾静脈より静注投与した。コントロール群には生理食塩水のみを投与した。

3) 組織病理学的検討

4 週間のエダラボ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¹⁴⁾。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。好中球の数に対しても同様の検討を行った。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¹⁵⁾、Schrier ら¹⁶⁾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) 血清中のサイトカインおよび 8-isoprostane の検討

エダラボンの投与が終了したマウスより血清を採取し、IL-6、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。同様に 8-isoprostane の濃度を ELISA キットを用いて測定した (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

6) 皮膚および肺におけるサイトカインの発現量および 8-isoprostane 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-6、IFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α の発現量を real time RT-PCR にて測定した。また、皮膚、肺に

おける 8-isoprostane の産生量をキットを用いて測定した。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

7) 炎症細胞のフリーラジカル産生能に対する BLM の効果

野生型マウスの脾臓より AutoMACS isolator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて抽出した T 細胞、B 細胞、マクロファージおよび好中球を BLM で刺激し、フリーラジカルの産生能を検討した。フリーラジカル産生の指標として、NO をはじめとする窒素酸化物である NO_x を Griess 法にて測定した¹⁷⁾。

8) NONOate の線維芽細胞に対する効果

野生型マウス背部皮膚より線維芽細胞を抽出、培養した¹⁵⁾。線維芽細胞を 12 時間 serum free とした後、NO の供与体である NONOate (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) 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。

9) γ グロブリンの検討

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

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

BLM誘発SScモデルマウスでは野生型マウスと比べて真皮の肥厚と肺線維化を認めた(図1)。4週間の観察において、時間の経過と共にこれらの線維化は増強することが確認された。エダラボンはBLMによる皮膚硬化を投与後2週間目から、肺線維化を投与後3週間目から有意に抑制し(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、エダラボンは皮膚および肺におけるヒドロキシプロリンの産生量も有意に抑制した。(p<0.05)。BLM誘発SScモデルマウス皮膚には野生型マウスと比べ、多くのT細胞、B細胞、マクロファージ、好中球の浸潤を認めたが、エダラボンはこれらの炎症細胞浸潤を抑制した(図2;p<0.05)。

BLM誘発SScモデルマウスにおけるサイトカイン産生の検討では、BLMによって誘導されたIL-6、IFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α の発現量は野生型マウスに比べ増加していたが(p<0.05)、この増加はエダラボンによって有意に抑制された(p<0.05;図2)。サイトカイン産生量についても検討をおこなったが、BLMによって誘導されたサイトカインの過剰産生は、エダラボンによって有意に抑制された(図3;p<0.05)。

BLM誘発SScモデルマウスにおける酸化ストレスを検討するために、酸化ストレスマーカーである8-isoprostaneの産生量を測定したが、BLM誘発

SScモデルマウスにおける8-isoprostane産生量は野生型マウスと比べ著明に増加しており、BLM誘発SScモデルマウスは強い酸化ストレスの存在下にあることが示唆された。

野生型脾臓抽出炎症細胞を用いた検討では、BLMの刺激によりB細胞、マクロファージおよび好中球からのNOx産生の亢進が認められた(図4)。BLMの投与量が50ng/mlまでは、それぞれの炎症細胞からのNOx産生亢進が認められたが、それ以上の濃度ではNOx産生亢進は失われた。野生型マウス皮膚線維芽細胞における検討では、NONOateの刺激によって濃度依存的なコラーゲン産生能の亢進を認めた(図4)。この一方でNONOate刺激は線維芽細胞の増殖能には影響を及ぼさなかった。

BLM投与によって引き起こされる自己抗体産生についても検討を行ったが、エダラボンを投与されたBLM誘発SScモデルマウスではIgM、IgG1、IgG2a、IgG3と抗topo I抗体の産生が有意に抑制された(p<0.05;図5)。

TSKマウスについてもBLM誘発SScモデルマウスと同様の検討を行ったが、エダラボンの投与はTSKマウスにおいて認められる、皮下結合組織層の線維化、自己免疫異常、サイトカイン産生の亢進を有意に抑制した(図6)。

D. 考案

脳梗塞急性期の治療薬として用いられるエダラボンであるが、先に述べた様にその作用はフリーラジカルを除去することにより発揮される¹²⁾。フリーラジカルが病態に関与する疾患は多数あるが、近年、間質性肺炎のモデルマウスであり、気管内にBLMを投与して作成するBLM誘発肺臓炎モデルにおいて

も、エダラボンのもつ肺線維化に対する優れた抑制効果が報告されている¹⁸⁾。しかしながら、フリーラジカルが病態形成に大きく関与するSScに対するエダラボンの効果に関しては、これまでに検討されていなかった。今回の我々の研究では、エダラボンはBLM誘発SScモデルマウスが呈する皮膚硬化、肺線維化、自己免疫異常、サイトカイン過剰産生を有意に改善した。さらに、TSKマウスにおいてもエダラボンは皮膚硬化とサイトカイン過剰産生および自己免疫異常を抑制する効果を示した。これらのことから、エダラボンは免疫学的な異常を改善することでSScモデルマウスに認められる線維化を抑制することが示唆された。

BLMは血管内皮細胞や線維芽細胞からのフリーラジカル産生を促すことが知られており、結果としてサイトカイン産生、コラーゲン産生、炎症細胞浸潤を引き起こすとされている^{7,18,19)}。実際に今回の我々の検討でもBLM誘発SScモデルマウスでは8-isoprostaneの産生亢進が認められており、このことはBLMによって酸化ストレスが誘導されたことを意味する。加えて、酸化ストレスの一因となるフリーラジカルであるNOを放出するNONOateは、線維芽細胞からのコラーゲン産生能を誘導することが示された。つまり、BLMによってもたらされた酸化ストレスは線維芽細胞からのコラーゲン産生を促進すると考えられる。さらにBLMはそれ自体が線維芽細胞や炎症細胞をはじめとする種々の細胞を活性化させることが報告されている²⁰⁻²²⁾。今回の検討ではBLMによる刺激はそれ自体がB細胞、マクロファージおよび好中球からのフリーラジカル産生を促進することが示された。TSKマウスにおいても、血管内皮細胞の機能不全によりフリーラジカル産生は増強しており、このことは線維化に対して重要な

役割を果たしていることが知られている^{10,23,24)}。今回の検討でも、TSKマウスにおける酸化ストレスマーカーは増加が見られ、エダラボンは酸化ストレスを軽減すると同時に線維化も抑制した。

SScにおいてはT細胞やB細胞、マクロファージ、好中球などの炎症細胞に異常活性化が認められ、活性化した炎症細胞は皮膚や肺に対して浸潤し、線維芽細胞からのコラーゲン産生を促進していることが知られている^{25,26)}。この現象はBLM誘発SScモデルやTSKマウスにおいても認められ^{7,27,28)}、今回の検討ではエダラボンによる、これらの炎症細胞の皮膚および肺への浸潤抑制効果が示された。さらにエダラボンは、SScモデルマウスにおける自己免疫異常も抑制した。近年、自己免疫疾患における免疫学的異常は内因性TLRリガンドが大きな役割を果たしていることが報告されている²⁹⁾。SScにおいても内因性TLRリガンドの一つであるヒアルロン酸やhigh-mobility group box 1の増加が、病勢と正の相関を示すことが報告されている^{30,31)}。ヒアルロン酸の合成酵素(HAS: hyaluronic acid synthase)にはHAS1からHAS3までの3種類が確認されているが、このうちHAS2は酸化ストレスによって発現が上昇することが知られている³²⁾。今回の検討でも線維芽細胞に対するフリーラジカル刺激はHAS2の発現を亢進させていた。これらのことから、フリーラジカルは内因性TLRリガンドの発現を亢進させることでTLRを介した炎症細胞の異常活性化を引き起こし、免疫学的異常をもたらすことが示唆され、エダラボンはフリーラジカルを除去することで、これらの異常を改善し、BLM誘発SScモデルマウスおよびTSKマウスの線維化と免疫学的異常を是正したと考えられた。

以上の結果より、エダラボンは2つの異なった

SScモデルの線維化を抑制する作用を有することが示唆された。エダラボンは、脳梗塞に対してすでに広く用いられており、SScと同じくフリーラジカルが病態に関与していると考えられている筋萎縮性側索硬化症に対しても治験が行われているなど、比較的安全性に優れた薬剤である。現時点においてSScに対する有効な治療法ははまだ十分に開発されておらず、エダラボンは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

エダラボンはSScのモデルマウスであるBLM誘発SScモデルマウスおよびTSKマウスにおける線維化を改善させることが示唆された。いまだ十分な治療法が開発されていないSScに対して、エダラボンは新規治療薬の一つとなりうる可能性がある。

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. 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 up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(11): 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(1-3):

1-15.

4. Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Hasegawa M, Takehara K, et al. Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology.* 2006; 45(7): 815-8.
5. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Sama D, et al. The antioxidant effect exerted by TGF- β -stimulated hyaluronan production reduced NF- κ B activation and apoptosis in human fibroblasts exposed to FeSo₄ plus ascorbate. *Mol Cell Biochem.* 2008; 311(1-2): 167-77.
6. Yamamoto T. The bleomycin-induced scleroderma model: what have we learned for scleroderma pathogenesis? *Arch Dermatol Res.* 2006; 297(8): 333-44.
7. 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.
8. Manoury B, Nenau S, Leclerc O, Guenon I, Boichot E, Planquois JM, et al. The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2005; 6: 11-22.
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. 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(3): 272-80.
11. Abe K, Yuki S, Kogure K. Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke*. 1988; 19(4): 480-5.
 12. Group EABIS. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis*. 2003; 15(3): 222-9.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Matsushita Y, Hasegawa M, Matsushita T, Fujimoto M, Horikawa M, Fujita T, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Immunol*. 2007; 179(1): 698-707.
 16. 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.
 17. Paul-Eugene N, Kolb JP, Sarfati M, Arock M, Ouaz F, Debre P, et al. Ligation of CD23 activates soluble guanylate cyclase in human monocytes via an L-arginine-dependent mechanism. *J Leukoc Biol*. 1995; 57(1): 160-7.
 18. Asai T, Ohno Y, Minatoguchi S, Funaguchi N, Yuhgetsu H, Sawada M, et al. The specific free radical scavenger edaravone suppresses bleomycin-induced acute pulmonary injury in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34(1-2): 22-6.
 19. Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996; 14(2): 131-8.
 20. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 1988; 141(7): 2407-12.
 21. Iharada A, Kaneko K, Tsuji S, Hasui M, Kanda S, Nishiyama T. Increased nitric oxide production by T- and B-cells in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009; 24(5): 1033-8.
 22. Kobayashi S, Imajoh-Ohmi S, Kuribayashi F, Nunoi H, Nakamura M, Kanegasaki S. Characterization of the superoxide-generating system in human peripheral lymphocytes and lymphoid cell lines. *J Biochem*. 1995; 117(4): 758-65.
 23. Marie I, Beny JL. Endothelial dysfunction in murine model of systemic sclerosis: tight-skin mice 1. *J Invest Dermatol*. 2002; 119(6): 1379-87.
 24. Weihrauch D, Xu H, Shi Y, Wang J, Brien J, Jones DW, et al. Effects of D-4F on vasodilation, oxidative stress, angiotensin, myocardial inflam-

- mation, and angiogenic potential in tight-skin mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293 (3): H1432-H41.
25. 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.
26. 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.
27. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, et al. Cell Adhesion Molecules Regulate Fibrotic Process via Th1/Th2/Th17 Cell Balance in a Bleomycin-Induced Scleroderma Model. *J Immunol.* 2010; 185: 2502-15.
28. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Takenaka M, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(8): 2476-87.
29. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(11): 823-35.
30. Yoshizaki A, Komura K, Iwata Y, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. Clinical significance of serum HMGB-1 and sRAGE levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J Clin Immunol.* 2009; 29(2): 180-9.
31. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Hara T, Ogawa F, Muroi E, et al. Clinical significance of serum hyaluronan levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J Rheumatol.* 2008; 35 (9): 1825-9.
32. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Angela D, Ferlazzo AM, Calatroni A. TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-1beta modulate hyaluronan synthase expression in human skin fibroblasts: synergistic effect by concomital treatment with FeSO4 plus ascorbate. *Mol Cell Biochem.* 2006; 292(1-2): 169-78.

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

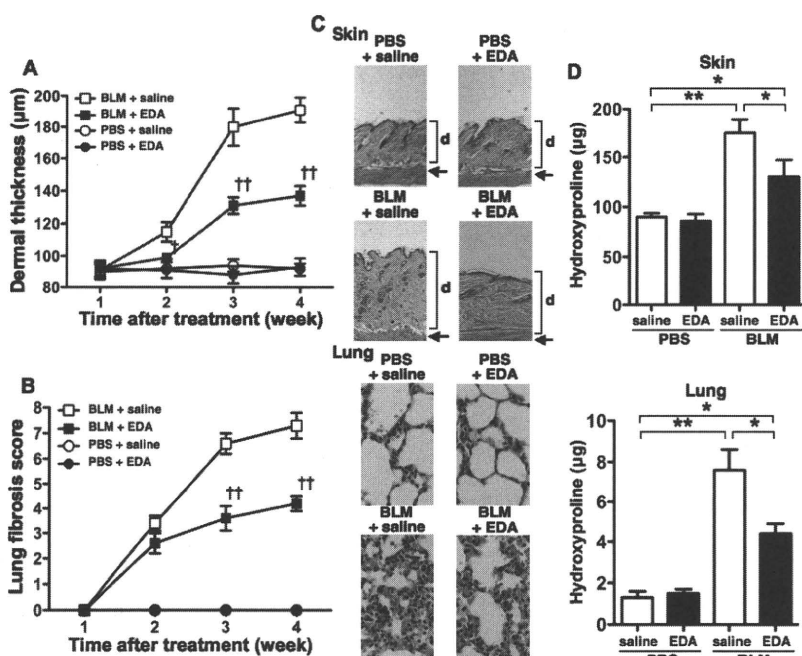


図1：BLM誘発SScモデルマウス（BLM）における皮膚硬化と肺線維化を経時的に示した（A, B）。コントロールとしてPBSを4週間皮下投与した野生型マウス（PBS）を用いた。4週間後における皮膚硬化および肺線維化を組織学的に示した（C; 100倍）。真皮を（d）、皮筋層を矢印でそれぞれ表す。ヒドロキシプロリン産生量を示した（D）。EDAはエダラボンを表す。生理食塩水を投与したBLM誘発SScマウスと比べて† $p < 0.05$ 、†† $p < 0.01$ を表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

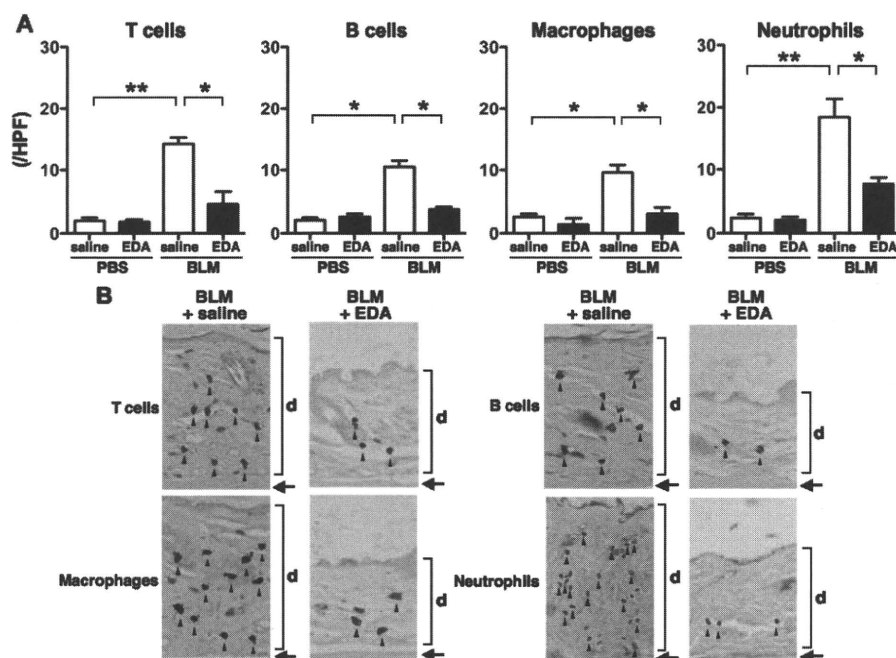


図2：BLM誘発SScモデルマウス（BLM）皮膚におけるT細胞、B細胞、マクロファージおよび好中球の浸潤数（A）と免疫染色像（B; 200倍）を示した。コントロールとしてPBSを4週間皮下投与した野生型マウス（PBS）を用いた。EDAはエダラボンを表す。真皮を（d）、皮筋層を矢印でそれぞれ表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

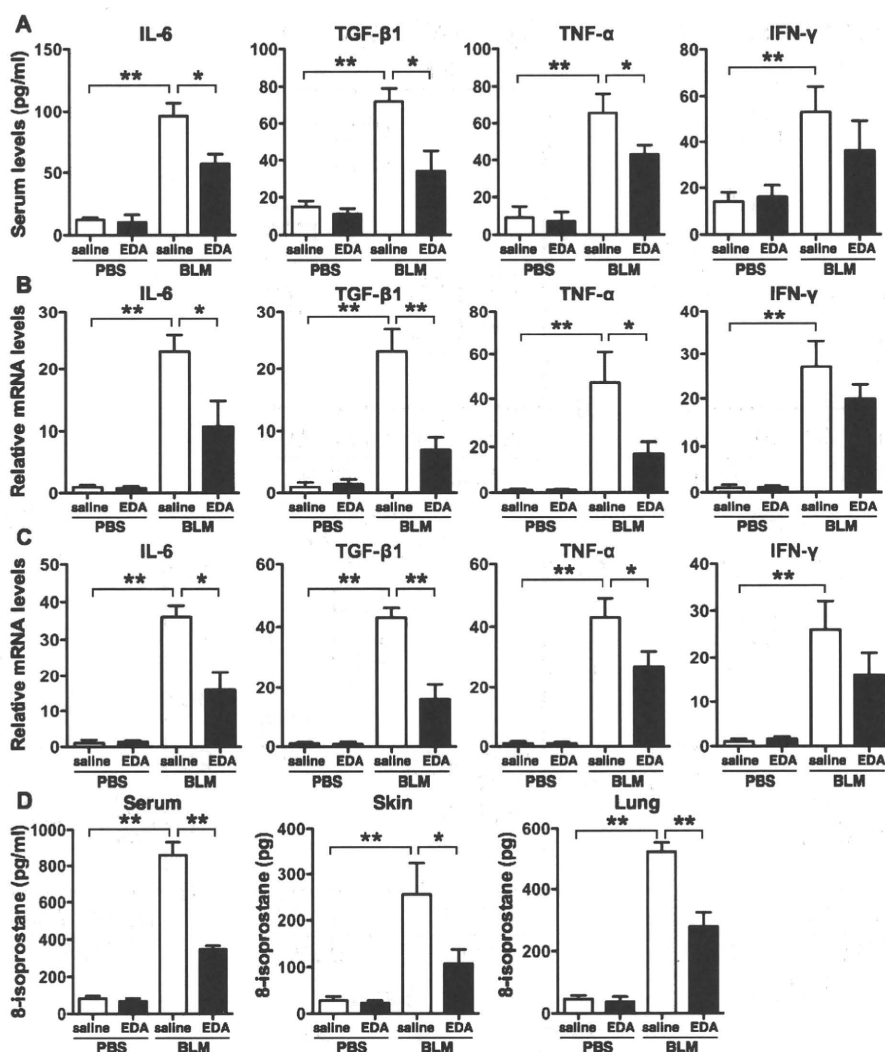


図3：BLM誘発SSモデルマウス（BLM）血清（A）、皮膚（B）、肺（C）におけるサイトカイン産生量を示した。血清、皮膚、肺における8-isoprostane値を示した（D）。コントロールとしてPBSを4週間皮下投与した野生型マウス（PBS）を用いた。EDAはエダラボンを表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

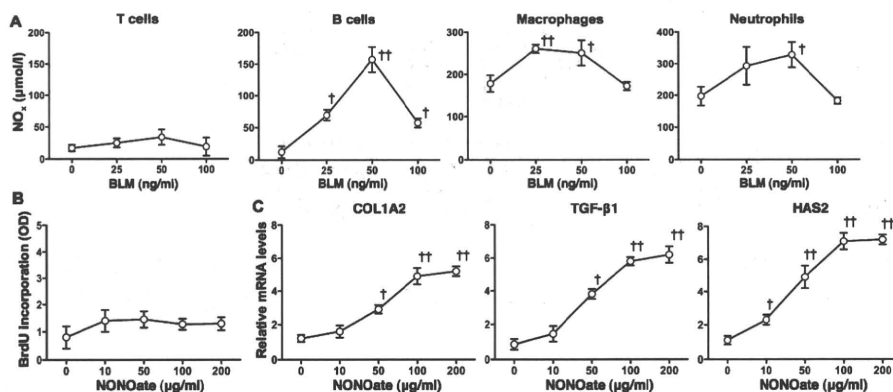


図4：野生型脾臓抽出T細胞、B細胞、マクロファージ、好中球をBLMで刺激したときのNO_x産生量を示した（A）。野生型皮膚線維芽細胞をNONOateで刺激したときの増殖能（B）、COL1A2、TGF-β1、HAS2発現量（C）を示した。それぞれの無刺激条件下と比べて† $p < 0.05$ 、†† $p < 0.01$ を表す。

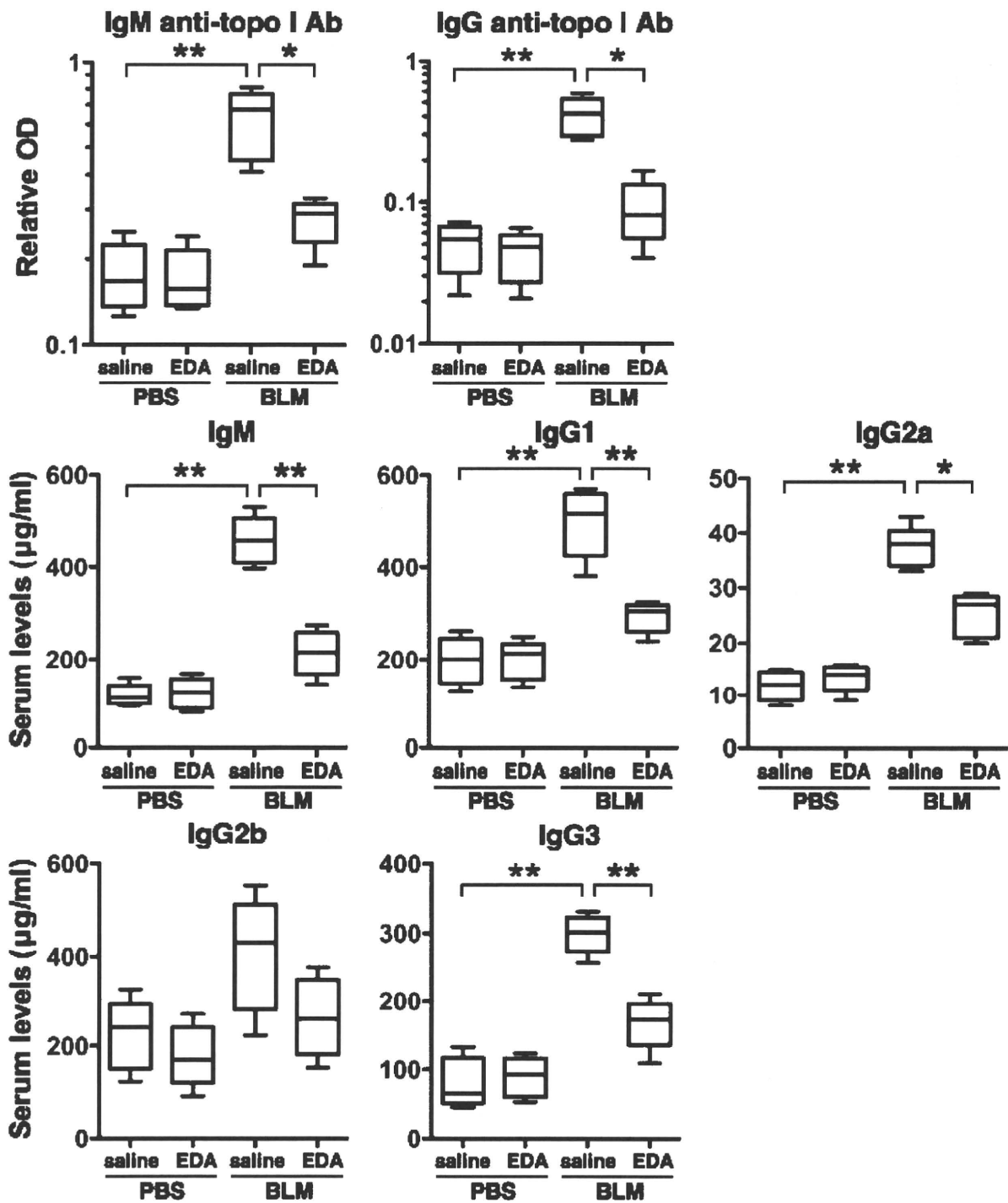


図5：血清中の抗 topo I 抗体と γ グロブリンの濃度を示した。BLM は BLM 投与 SSc モデルマウス、PBS は PBS 投与野生型マウス、EDA はエダラボンをそれぞれ表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

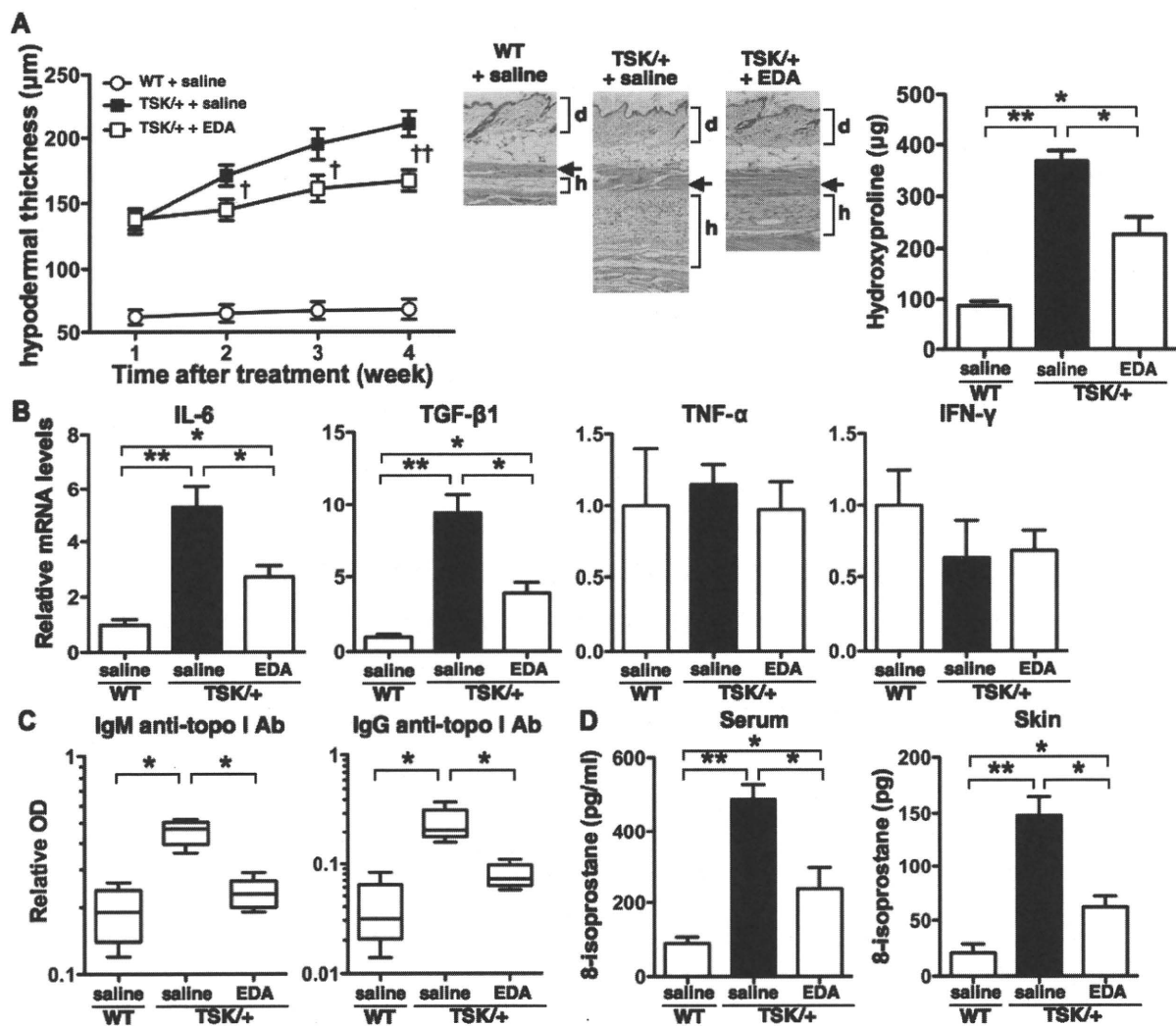


図6：TSKマウスの皮下結合組織肥厚を経時的に示し、エダラボン（EDA）投与4週間後の組織像とヒドロキシプロリン量を示した（A）。皮膚におけるサイトカイン発現量を real-time PCR にて測定した（B）。抗 topo I 抗体の産生量（C）および 8-isoprostane 値（D）を ELISA にて測定した。TSK/+ は TSK マウスを、WT は野生型マウスを、EDA はエダラボンをそれぞれ表す。PBS は PBS 投与群を、BLM は BLM 投与群を、BLM+Rapa は BLM およびラパマイシン投与群をそれぞれ表す。生理食塩水を投与した TSK マウスと比べて † p<0.05、†† p<0.01 を表す。* p<0.05、** p<0.01 を表す。

ブレオマイシン誘発肺臓炎モデルにおける 抗 CD20 抗体療法の効果についての検討

研究分担者 藤本 学 金沢大学医薬保健研究域医学系血管新生・結合組織代謝学（皮膚科）
准教授

協力者 濱口儒人 金沢大学医学部附属病院皮膚科 講師

研究協力者 長谷川稔 金沢大学医学部附属病院皮膚科 講師

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

主任研究者 佐藤伸一 東京大学医学部附属病院皮膚科 教授

研究要旨

抗 CD20 抗体を用いた B 細胞除去療法は、B 細胞由来悪性リンパ腫のみならず、関節リウマチや全身性エリテマトーデス、尋常性天疱瘡などの自己免疫疾患に幅広く用いられ、その有用性が報告されている。しかし、全身性強皮症の代表的合併症である肺線維症に対する有用性は確立していない。B 細胞は抗体産生以外に様々な機能を有していることが明らかになってきているが、なかでも炎症をコントロールする制御性 B 細胞に注目が集まっている。しかし、線維化における制御性 B 細胞を含めた B 細胞の役割はいまだ明らかではない。そこで本研究ではブレオマイシン誘発肺臓炎モデルを用いて肺線維化における B 細胞の役割と抗 CD20 抗体療法の効果について検討した。抗 CD20 抗体を事前に投与して B 細胞を除去したマウスにブレオマイシンを投与したところ、コントロール抗体を投与したマウスに比べ肺の線維化は増悪していた。一方、ブレオマイシンを投与した 3 日後の炎症期に抗 CD20 抗体を投与したマウスでは、コントロール抗体を投与したマウスに比べ肺の線維化は軽減していた。また、B 細胞を欠損したマウスにブレオマイシンを投与したところ、野生型マウスに比べ肺の線維化は増悪していたが、事前に野生型マウスの制御性 B 細胞を含む B 細胞分画を移入した B 細胞欠損マウスでは、B 細胞を移入していないマウスに比べ肺の線維化は軽減した。以上より、肺の線維化において B 細胞の役割は発症期と炎症期では異なっている可能性があり、発症期では主に制御性 B 細胞が炎症をコントロールしている可能性が考えられた。また、炎症期に抗 CD20 抗体を投与することで、線維化を抑制できる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

間質性肺炎は全身性強皮症の予後を左右する重要な合併症の一つである。これまでに報告された治療法の中で最も有効性が高いとされているのはエンドキサン療法であるが¹⁾、効果が一時的であるとの報告もあり、間質性肺炎に対する治療法の確立は喫緊

の課題である。抗 CD20 抗体を用いた B 細胞除去療法は、B 細胞由来悪性リンパ腫のみならず関節リウマチや全身性エリテマトーデス、尋常性天疱瘡などの自己免疫疾患に用いられ、その有用性が報告されている。全身性強皮症に対する B 細胞除去療法の効果については、皮膚硬化には効果がなく間質性肺炎

を含めた他臓器病変に対する有効性は検討できなかったとする報告²⁾、皮膚硬化には有効だったものの呼吸機能は改善しなかったとする報告³⁾などがある。しかし、これらは少数例による検討であり、肺線維症に対するB細胞除去療法の有効性は確立されていないのが現状である。

これまでB細胞は抗体産生細胞としての側面から研究が進められてきたが、近年、B細胞には抗原提示能やサイトカイン産生、T細胞との相互作用など、多彩な機能を有していることが報告されている。なかでも、炎症をコントロールする制御性B細胞が一つのトピックになっている。制御性B細胞はIL-10を産生するB細胞サブセットであり、これまでにマウスでの検討では、接触過敏反応モデル⁴⁾、実験的脳脊髄炎モデル⁵⁾、NZB/Wマウスを用いた全身性エリテマトーデスモデル⁶⁾で制御性B細胞が細胞浸潤等をコントロールして病態に重要な役割を果たしていることが報告されている。一方、肺線維化におけるB細胞の役割については、B細胞がCXCR3を介して肺へ浸潤し線維化に関与しているとする報告⁷⁾、B細胞がTLR4を介してブレオマイシンによる線維化と抗体産生に関与しているとする報告⁸⁾があるが、肺線維化における制御性B細胞を含めたB細胞の役割は十分には解明されていない。

そこで、本研究では肺線維化におけるB細胞の役割と抗CD20抗体によるB細胞除去療法の効果を検討することを目的に、ブレオマイシン誘発肺臓炎モデルを用いて検討を行った。

B. 研究方法

1) マウス

6~8週齢の野生型マウス(C57BL/6)と μ MTマウスを用いた。

2) 抗体の投与

ブレオマイシンを投与する7日前と3日後に250 μ gのマウス抗マウスCD20モノクローナル抗体(MB20-11、IgG2a/c)あるいはコントロール抗体を経静脈的に投与した。

3) 肺線維症の誘発と評価

8mg/kgのブレオマイシンを経気管支的に投与した。ブレオマイシン投与8日後に、末梢血、脾臓、気管支肺胞液洗浄中の浸潤細胞をフローサイトメトリーを用いて解析した。ブレオマイシン投与16日後に肺を採取し、肺の線維化を組織学的に検討した。線維化の評価には重症度スコアを用いた(文献、濱口、AJP)。

4) B細胞移入実験

野生型マウスの脾臓から抗Thy1.2抗体を用いてT細胞を除去し、B細胞分画を分離した。ブレオマイシンを投与する1日前に分離したB細胞分画を μ MTマウスに経静脈的に移入した。

5) 統計学的検討

2群間の比較にはMann-Whitney's U testを、多群間の比較にはBonferroni's testを用いた。

C. 研究結果

1) 抗CD20抗体投与が肺線維化に及ぼす影響

ブレオマイシンを投与する7日前に抗CD20抗体を投与して事前にB細胞を除去したマウスでは、コントロール抗体を投与したマウスに比べ肺の線維化は増悪していた(図1A)。一方、炎症期であるブレオマイシン投与3日後に抗CD20抗体を投与したマウスではコントロール抗体を投与したマウスに比べ肺の線維化は改善していた。組織学的に評価した線維化スコアでも同様の結果が得られた(図1B)。

2) μ MT マウスにおける検討

事前に B 細胞を除去したマウスで肺の線維化が増悪した機序を検討するため、B 細胞欠損マウスである μ MT マウスを用いて検討した。 μ MT マウスでは野生型マウスに比べ肺の線維化は増悪していた(図 2A)。一方、ブレオマイシンを投与する 1 日前に野生型マウスの B 細胞分画を経静脈的に移入した μ MT マウスでは、B 細胞分画を移入しなかった μ MT マウスに比べ肺の線維化は改善していた。

D. 考 案

今回の研究で、肺の線維化において B 細胞は異なる 2 つの役割を有している可能性があることが明らかになった。すなわち、発症期では B 細胞は抑制的に働いて炎症をコントロールし、炎症期では肺への細胞浸潤を促進する働きである。このことは、B 細胞除去療法を間質性肺炎に応用するにあたり重要な要因であると考えられる。

全身性強皮症は様々な臓器症状を合併するが、中でも間質性肺炎は予後を規定する重要な合併症として知られている。間質性肺炎を合併した症例の 10 年生存率は 42% であり⁹⁾、間質性肺炎に対する治療法の確立が求められている。近年、間質性肺炎に対する治療としてエンドキサン療法の有用性が報告されている¹⁾。また、ミコフェノール酸モフェチルやシクロスポリンの有効性も報告されている。しかし、エンドキサンパルスは効果が持続しないという問題点が指摘されており、他の免疫抑制剤も効果が限定的である。全身性強皮症に合併した間質性肺炎では、B 細胞が有意に肺に浸潤しているとの報告があり¹⁰⁾、B 細胞除去療法の効果が期待されている。しかしこれまでの B 細胞除去療法の有効性についての報告では、無効だったとする報告と有効だったとする報

告があり、その有用性は確立されていない。今回の検討で炎症期に抗 CD20 抗体を投与すると線維化が抑制されたことから、炎症期の B 細胞除去療法は間質性肺炎に対する有用な治療法となり得る可能性があることを示唆している。

B 細胞は抗原と出会って活性化され、形質細胞に分化して抗体を産生するのが主な役割と考えられてきた。しかし、B 細胞は樹状細胞やマクロファージと同じく抗原提示能を有している。また、CD40 や ICOS-L などの共刺激分子を発現し、T 細胞上の対応する共刺激分子と結合することで T 細胞にシグナルを伝達し T 細胞を活性化する。これらの T 細胞を活性化する B 細胞はエフェクター B 細胞と呼ばれ、従来は免疫反応において補助的な役割を果たしているに過ぎないと考えられていた B 細胞が、実は種々の免疫応答で重要役割を果たしていることが明らかになってきている。

B 細胞の多様性が明らかになるにつれ、エフェクター B 細胞とは反対に炎症をコントロールする B 細胞の存在が明らかになってきた。当初は IL-10 を産生する B 細胞として認識されてきたこれらの B 細胞サブセットは、近年、CD1d^{hi}CD5⁺ の表現型を持つことが明らかになり、制御性 B 細胞と呼ばれる。制御性 B 細胞は IL-10 を産生することで炎症をコントロールすると考えられており、接触過敏反応モデルでは制御性 B 細胞が欠損すると炎症が増悪し⁴⁾、実験的脳脊髄炎モデルでは免疫時に制御性 B 細胞が欠如すると炎症が増悪する⁵⁾ ことが報告されている。本研究でもブレオマシン投与前に B 細胞を除去したマウスや B 細胞欠損マウスでは線維化が増悪し、B 細胞欠損マウスに野生型マウスの B 細胞を移入したマウスでは線維化が軽減したことから、線維化の発症期に B 細胞は抑制的な働きを有している

可能性が示唆された。またこれらの抑制作用は移入したB細胞に含まれている制御性B細胞による可能性があると考えられる。

本研究では、1) 制御性B細胞のみを移入したときの線維化抑制効果、2) B細胞除去療法が炎症期における肺への細胞浸潤に及ぼす影響（特に制御性T細胞やマクロファージ、好中球など）、3) B細胞除去療法がサイトカインやケモカイン産生に及ぼす影響、について検討できておらず、今後これらの点を明らかにしていきたいと考えている。

E. 結論

肺の線維化において、B細胞は炎症のコントロールと促進という相反する役割を有している可能性が考えられた。また、炎症のコントロールには制御性B細胞が関与している可能性が示唆された。

F. 文献

1. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 2655-66.
2. Lafyatis R, Kissin E, York M et al. B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 578-83.
3. Bosello S, De Santis M, Lama G et al. B cell depletion in diffuse progressive systemic sclerosis: safety, skin score modification and IL-6 modulation in an up to thirty-six months follow-up open-label trial. *Arthritis Res Ther*; 12: R54.
4. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM et al. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28: 639-50.

5. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD et al. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest* 2008; 118: 3420-30.
6. Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H et al. Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J Immunol*; 184: 4801-9.
7. Komura K, Yanaba K, Horikawa M et al. CD19 regulates the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a mouse model. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3574-84.
8. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K 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: 1650-63.
9. Steen VD, Conte C, Owens GR et al. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1283-9.
10. Lafyatis R, O'Hara C, Feghali-Bostwick CA et al. B cell infiltration in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 3167-8.

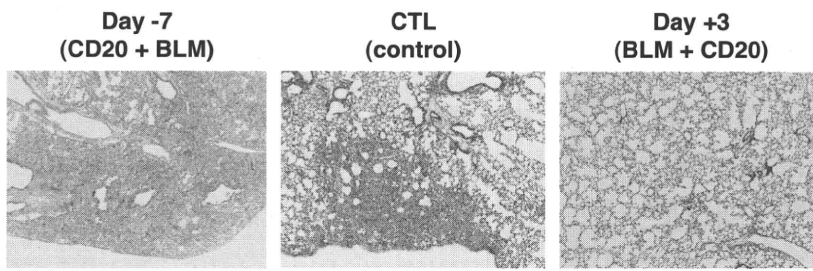
G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

A.



B.

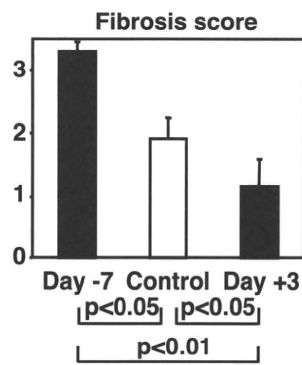
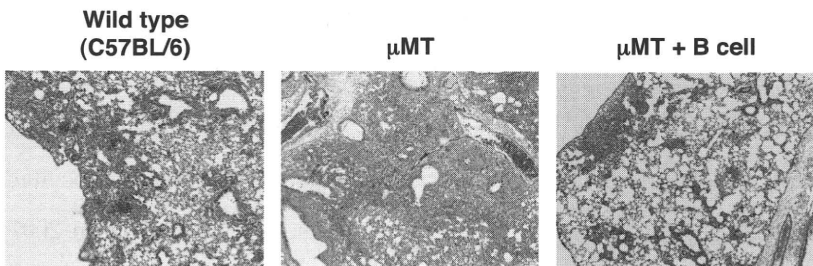


図1：ブレオマイシン投与16日後における肺の線維化。A. 抗CD20抗体あるいはコントロール抗体を投与したマウスにおける代表的な肺組織所見（H&E染色、x30）。B. 各群における線維化スコア。

A.



B.

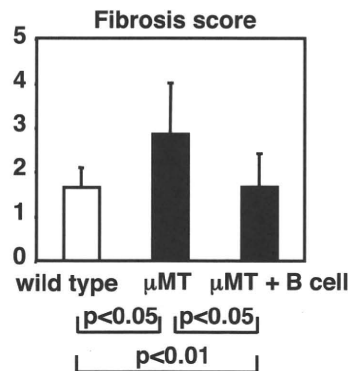


図2：ブレオマイシン投与16日後における肺の線維化。A. 野生型マウス、 μ MTマウス、 μ MTマウスにB細胞を移入したマウスにおける代表的な肺組織所見（Masson Trichrome染色、x30）。B. 各群における線維化スコア。