

強皮症の皮膚線維化における IL-17 signaling の関与

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 教授

協力者 中嶋泰治 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 大学院生

研究要旨

強皮症患者において血清 IL-17A および IL-17F 値を ELISA 法にて測定したところ、血清 IL-17A 値のみ患者群において上昇していた。一方、皮膚線維芽細胞は IL-17 受容体を発現していた。線維芽細胞における細胞外マトリックス発現に対する IL-17 の影響を PCR アレイなどを用いて解析し、本症の皮膚線維化において IL-17 signaling が関与している可能性について検討した。

A. 研究目的

汎発性強皮症（以下 SSc）の病因として、主に線維化、免疫異常、血管障害などのファクターが挙げられている。このうち線維化は主に I 型 collagen の転写レベルでの増加が原因で、この増加には TGF-beta1 が誘導するシグナル、特に Smad の系が関与していると考えられている。TGF-beta が receptor に結合すると、Smad2 および Smad3 を誘導し、Smad4 と複合体を形成して核内に移行する。この複合体は target 遺伝子に結合し、さらには Sp1 などの他の転写因子とも相互作用して転写活性を増強する。過去の報告においては、(i) SSc 患者皮膚由来線維芽細胞では、TGF-beta レセプターの強発現が見られる (ii) TGF-beta シグナルを中和抗体あるいはアンチセンスオリゴを用いて阻害した場合、alpha2 (I) collagen 遺伝子の発現が抑制される (iii) Smad3 のリン酸化あるいは DNA 結合能が増加している (iv) alpha2 (I) collagen 遺伝子の増加にもかかわらず TGF-beta に対する反応性は低下している。これらの結果をもとに、我々は SSc 由来線維芽細胞において autocrine TGF-beta signaling が存在しているのではないかと仮説を立てた¹⁻⁴⁾。

同様に、connective tissue growth factor (CTGF)、Interleukin (IL)-1、IL-6 や IL-7 も本症への関与が指摘されており、これらによって構成されるサイトカインネットワークが本症に特徴的な線維化、免疫異常、血管病変に寄与している可能性がある⁵⁻⁷⁾。

一方、IL-17 は Th17 より産生され炎症反応などに関与するサイトカインとして近年様々な疾患において注目されており、A~F の 6 種類の subtype のうち A がもっともよく知られているが最近では F についても研究が進んでいる。同様にレセプターについても RA~RE の 5 種類が存在することが知られているが、IL-17A および F は RA に結合することが知られている。

SSc においては、血清 IL-17A 濃度が上昇している事および SSc 患者皮膚由来線維芽細胞に IL-17A を強発現する事で細胞増殖や内皮細胞障害が誘導されるという報告があるが^{8,9)}、本症における IL-17F の関与、レセプターの発現、あるいは IL-17 の細胞外マトリックスに対する影響などは未だ調べられていない。今回、我々はこれらに注目し検討した。

B. 研究方法

1) 対象

熊本大学病院皮膚科を受診した SSc 患者 20 例、強皮症関連病態患者 (SSD) 10 例および正常人 10 例を対象とした。SSc 患者のうち、5 例が男性、15 例が女性であり、diffuse type (dcSSc) が 10 例、limited type (lcSSc) が 10 例で、全例が American College of Rheumatology の強皮症診断基準を満たしていた。臨床所見および検査所見は血清の採取時に得たものを使用した。本研究は、Declaration of Helsinki に基づき、倫理委員会の審査を経て、患者および正常人の同意を得て行った。

また、皮膚組織は SSc 患者病変部より採取し、直後にホルマリン固定しパラフィンにて包埋した。

2) ELISA 法

血清 IL-17A および IL-17F 濃度の測定には ELISA kit (R&D および Biolegend) を使用した。モノクローナル抗体が被覆されたプレートに血清を加えて反応させ、さらに酵素標識抗体溶液を加えて反応させる。酵素基質溶液を加えて発色させ、450nm における吸光度を測定、標準曲線を作成し検体中の IL-17 濃度を算出した。

3) 細胞培養

diffuse cutaneous type の SSc 患者 5 名の前腕由来の皮膚線維芽細胞および正常人 5 名由来の皮膚線維芽細胞を使用した。

4) 免疫プロット法

培養細胞の上清をポリアクリルアミドゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗 type I collagen 抗体などと反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて発色させた。

5) quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

cDNA の合成には PrimeScript RT reagent キット (Takara) を使用した。Quantitative real-time PCR には Takara Thermal Cycler Dice (TP800) と SYBR Premix ExtaqII (Takara) を用いた。プライマーは SA Bioscience あるいは Takara より購入した。PCR は denaturation は 95°C 5 秒、annealing は 60°C で 30 秒の条件下で 50 サイクル行った。各遺伝子の発現は standard curve method を用いて算出し、GAPDH で補正した。

PCR アレイは RT² First Strand Kit (SABiosciences) および 96-well Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array (SA Biosciences) を用いて行った。

C. 研究結果

1) SSc 患者の血清 IL-17A および 17F 濃度

図 1 に示す通り、血清 IL-17A 濃度は正常人に比べ SSc 患者で有意に上昇しており、これは過去の報告通りであった^{8,9)}。一方、IL-17F 濃度は正常人や他の膠原病患者と比較しても有意な差はみられず、また個々の患者において IL-17A 濃度と 17F 濃度に相関は見られなかった。

また、SSc 患者において IL-17A 濃度と臨床症状との相関を調べたところ、IL-17A 上昇群では IL-17A 正常群と比べて pitting scar/ulcer の頻度が高い傾向が見られたが $p=0.19$ と有意差は見られなかった (表 1)。

2) SSc 患者皮膚由来線維芽細胞における IL-17 レセプター発現

続いて、IL-17A および 17F 共通のレセプターである IL-17RA について、SSc 患者での発現を調べた。

これまで皮膚線維芽細胞での IL-17RA 発現については確認されていなかったが、正常皮膚由来線維芽細胞と SSc 皮膚由来線維芽細胞で発現を比較したところ、SSc 患者で有意に発現が減少していることが免疫ブロット法にて判明した (図 2)。またこの減少は mRNA レベルである事が real-time PCR 法にて確認された (図 2)。

3) IL-17 のコラーゲン発現に対する影響

最後に、IL-17A および 17F の細胞外マトリックス発現に対する影響を調べた。

Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array (SA Biosciences) を用いて複数の細胞外マトリックス関連遺伝子の発現を網羅的に解析した。無刺激あるいは IL-17A、IL-17F 刺激を行った正常皮膚由来線維芽細胞で発現状況を比較したところ、コラーゲン遺伝子や matrix metalloproteinase および tissue inhibitor of metalloproteinase 遺伝子などの発現は IL-17A あるいは 17F 存在下でも有意な変化は見られなかった (表 2)。

しかし蛋白レベルにおいては、IL-17A は I 型コラーゲンの発現を有意に抑制した。一方、IL-17F にはそのような作用は見られなかった (図 3)。また SSc 皮膚由来線維芽細胞でも、レセプターの発現低下を反映してか IL-17A のコラーゲン発現抑制作用は見られなかった (図 4)。

D. 考 案

本研究で得られた結果を元に、我々は本症において図 5 にしめすようなモデルが存在する可能性を考える。

まず、SSc 線維芽細胞では IL-17 レセプターの発現が低下している。IL-17A がコラーゲン発現抑制作用を有することを考えると、IL-17 レセプター発現

低下に起因する IL-17 シグナルの抑制は本症においてコラーゲン発現の増強に寄与し、本症に特徴的な線維化を誘導している可能性がある。またレセプターの低下に対して、IL-17A が feedback mechanism によって増加している可能性があり、その増加した IL-17A により本症の血管障害が引き起こされると考えられる。

E. 結 論

IL-17 シグナルは SSc の病態に関与している可能性がある。今後の研究により、IL-17、特に 17A が治療のターゲットとなる可能性がある。

F. 文 献

1. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J. Clin. Invest.* 1974; 54: 880-9
2. Jimenez SA, Feldman G, Bashey RI, Bienkowski R, Rosenbloom J. Co-ordinate increase in the expression of type I and type III collagen genes in progressive systemic sclerosis. *Biochem. J.* 1986; 237: 837-843
3. Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Direct demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 187: 45-50
4. Hitraya EG, Jimenez SA. Transcriptional activation of the $\alpha 1(I)$ procollagen gene in systemic sclerosis dermal fibroblasts. Role of intronic sequences. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1347-1354

5. Takehara K. Pathogenesis of systemic sclerosis. J. Rheumatol. 2003; 30: 755-759
6. Kawaguchi Y. IL-1 *a* gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. Clin. Exp. Immunol. ; 1994; 97: 445-50
7. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS: Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. J Rheumatol 1992;19:1207-11
8. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Komura K, Sato S: Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? J Dermatol Sci. 2008; 50: 240-2
9. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I: Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2000; 43: 2455-63
- G. 研究発表**
- 1) 論文発表
Nakashima T, Jinnin M, Honda N, Kajihara I, Makino T, Masuguchi S, Fukushima S, Okamoto Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H: Impaired interleukin-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts: In submission
- 2) 学会発表
H23年度強皮症研究会議
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
なし

表1. 強皮症患者における血清 IL-17A 濃度と臨床症状・検査所見との相関

	Patients with elevated IL-17A levels (n=9)	Patients with normal IL-17A levels (n=11)
Mean age at onset (years)	56.3	60.5
Duration of disease (years)	5.3	3.9
Type (diffuse:limited)	3:6	7:4
CLINICAL FEATURES		
Pitting scars/ulcers	77.8	45.5
Nailfold bleeding	44.4	54.5
Raynoud' s phenomenon	77.8	81.8
Telangiectasia	33.3	9.1
Contracture of phalanges	33.3	63.6
Calcinosis	0	9.1
Diffuse pigmentation	0	36.4
Short SF	44.4	63.6
Sicca symptoms	11.1	27.3
ORGAN INVOLVEMENT		
Pulmonary fibrosis		
Mean %VC	94.2	93.5
Mean %DLco	83.8	78.1
Pulmonary hypertension	0	0
Oesophagus	0	27.3
Heart	22.2	18.2
Kidney	0	0
Joint	22.2	0
Thrombosis	0	0
ANA SPECIFICITY		
Anti-topo I	55.6	36.4
Anticentromere	33.3	18.2
Anti-U1 RNP	33.3	9.1

表2. PCR アレイの結果

Symbol	Name	Fold change
<u>Gene name</u>	<u>Up-regulated genes by IL-17A</u>	
ITGB2	Integrin, beta 2	58.32
MMP16	Matrix metalloproteinase 16	21.5
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	6.76
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	5.68
ITGA8	Integrin, alpha 8	3.35
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	3.26
ITGA4	Integrin, alpha 4	2.28
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	2.21
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	2.08
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	2.04
COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1	2.01
<u>Gene name</u>	<u>Down-regulated genes by IL-17A</u>	
ITGA2	Integrin, alpha 2	0.04
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	0.11
ITGAM	Integrin, alpha M	0.24
ITGA5	Integrin, alpha 5	0.25
SELP	Selectin P	0.29
ITGB3	Integrin, beta 3	0.3
LAMB3	Laminin, beta 3	0.34
ITGB4	Integrin, beta 4	0.39
ITGAL	Integrin, alpha L	0.41
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.42
ITGA3	Integrin, alpha 3	0.43
CTGF	Connective tissue growth factor	0.44
VTN	Vitronectin	0.44
ITGA6	Integrin, alpha 6	0.48
<u>Gene name</u>	<u>Up-regulated genes by IL-17F</u>	
MMP12	Matrix metalloproteinase 12	224.1
MMP16	Matrix metalloproteinase 16	93.57
ITGB2	Integrin, beta 2	39.07
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	38.27
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	19
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	11.54
ITGA5	Integrin, alpha 5	6.36
COL6A2	Collagen, type VI, alpha 2	5.42
ECM1	Extracellular matrix protein 1	2.96
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	2.94
ITGA7	Integrin, alpha 7	2.6

表 2. PCR アレイの結果 (続き)

Symbol	Name	Fold change
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	2.55
MMP3	Matrix metalloproteinase 3	2.19
NCAM1	Neural cell adhesin molecule 1	2.07
ITGA4	Integrin, alpha 7	2.01
<u>Gene name</u>	<u>Down-regulated genes by IL-17F</u>	
ITGAM	Integrin, alpha M	0.01
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	0.01
CTNND2	Catenin (cadherin-associated protein) , delta 2	0.01
VTN	Vitronectin	0.01
ADAMTS8	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8	0.04
MMP7	Matrix metalloproteinase 7	0.06
ADAMTS13	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 13	0.06
MMP10	Matrix metalloproteinase 10	0.07
SELP	Selectin P	0.07
MMP13	Matrix metalloproteinase 13	0.08
SELE	Selectin E	0.08
LAMA1	Laminin, alpha 1	0.11
HAS1	Hyaluronan synthase 1	0.12
MMP15	Matrix metalloproteinase 15	0.13
ITGAL	Integrin, alpha L	0.14
MMP8	Matrix metalloproteinase 8	0.15
ITGB3	Integrin, beta 3	0.19
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesin molecule 1	0.21
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.23
MMP11	Matrix metalloproteinase 11	0.29
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	0.31
LAMA3	Laminin, alpha 3	0.32
CNTN1	Contactin 1	0.36
ITGA3	Integrin, alpha 3	0.37
ITGB4	Integrin, beta 4	0.38

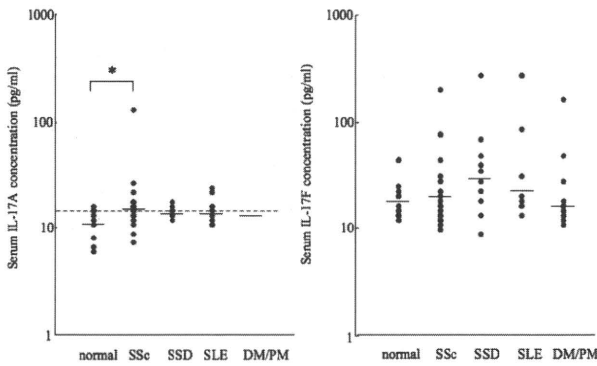


図1：強皮症患者における血清IL-17Aおよび17F濃度

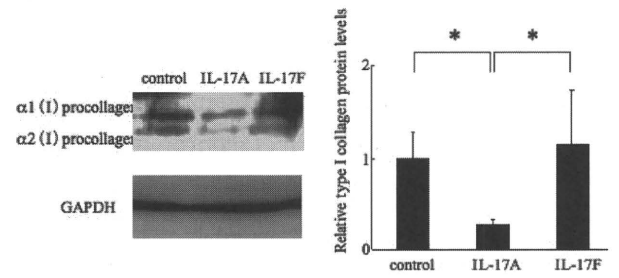


図3：正常皮膚由来線維芽細胞におけるIL-17のI型コラーゲン発現に対する作用

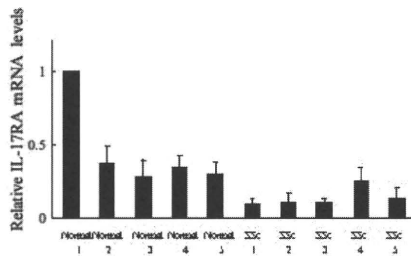
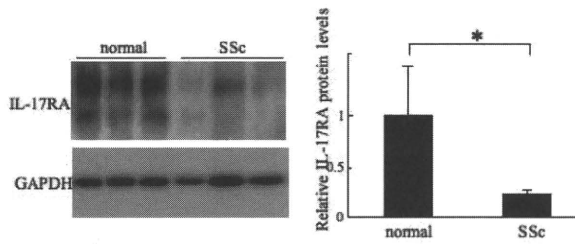


図2：皮膚由来線維芽細胞におけるIL-17レセプターの発現

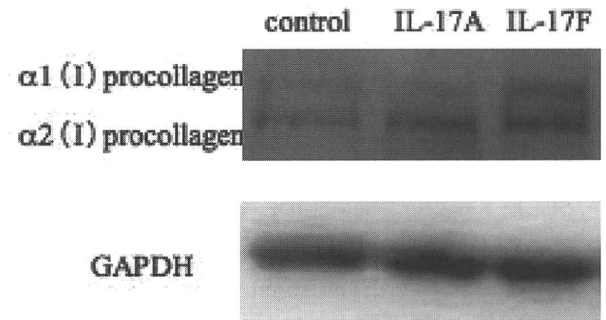


図4：強皮症皮膚由来線維芽細胞におけるIL-17のI型コラーゲン発現に対する作用

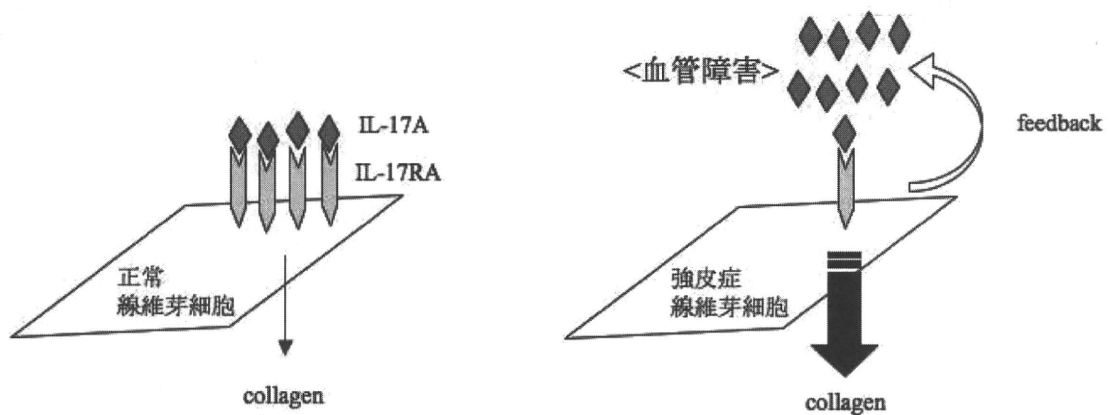


図5：強皮症におけるIL-17シグナル

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-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'

TGF- β 1 :

5'TTCCGCTGCTACTGCAAGTC3'

3'AGGGCTGTCTGGAGTCCTCA3'

CTGF :

5'ACCCGAGTTACCAATGACAATACC3'

3'CCGCAGAACTTAGCCCTGTATG5'

collagen α 1 (I) :

5'CAGGGTATTGCTGGACAACGTG3'

3'GGACCTTGTTTGCCAGGTCA5'

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 投与群が対照群に比較し、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、これらの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たと報告している。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ば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ことは、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。ブ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

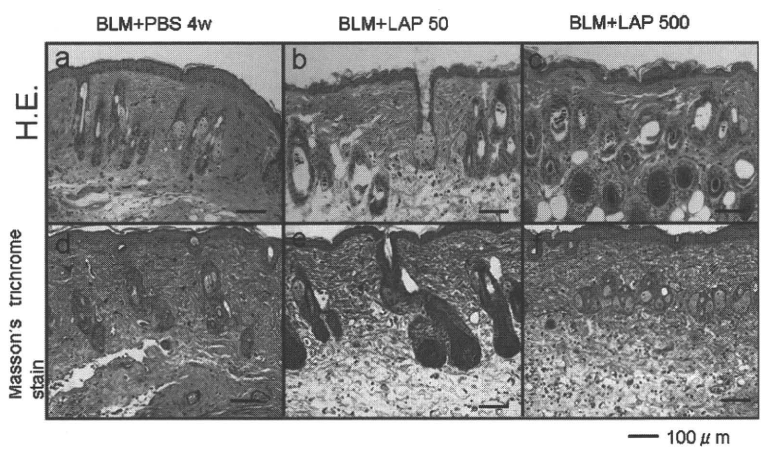


図 1a-f : LAP 投与 4 週間後の皮膚病理組織像

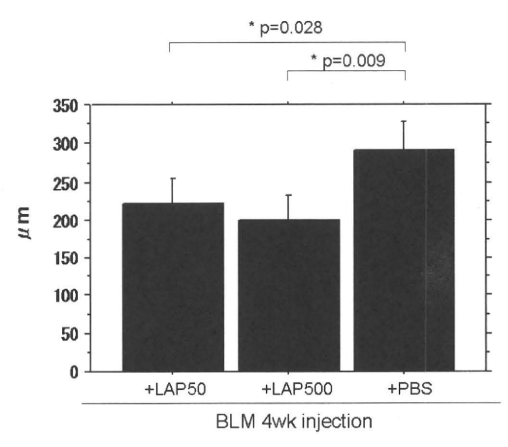


図 1g : LAP 投与 4 週間後の真皮膠原線維厚

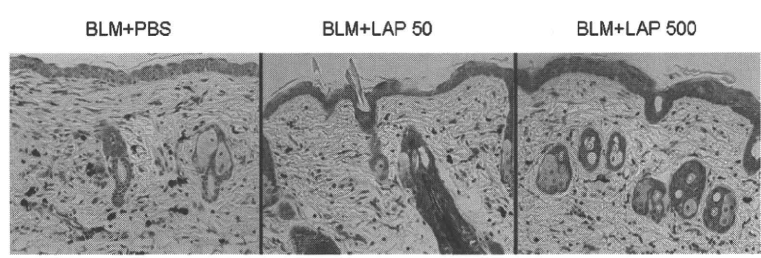


図 2a : 真皮内に浸潤した肥満細胞 (トルイジンブルー染色)

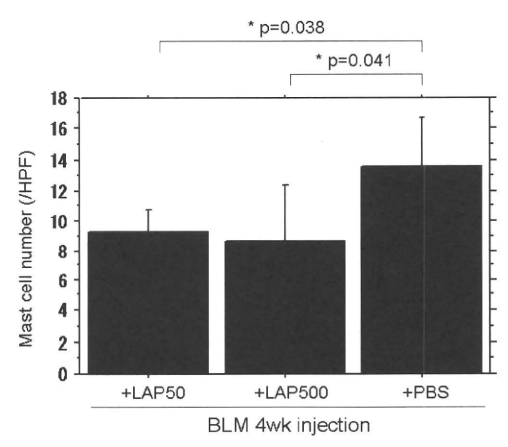


図 2b : 真皮内に浸潤した肥満細胞数の比較

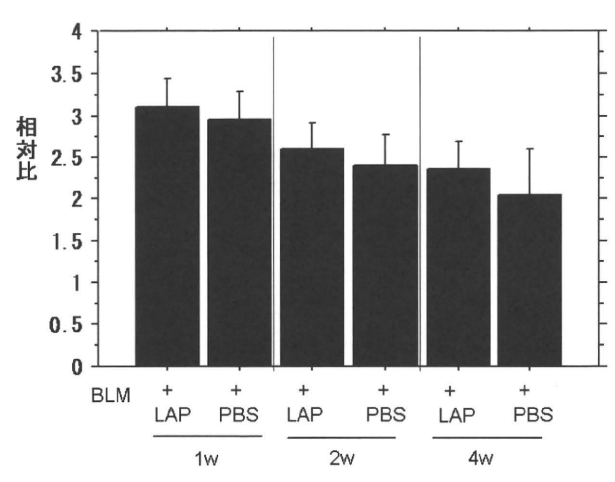


図 3 : 皮膚組織中に発現した TGF-β1 mRNA 定量

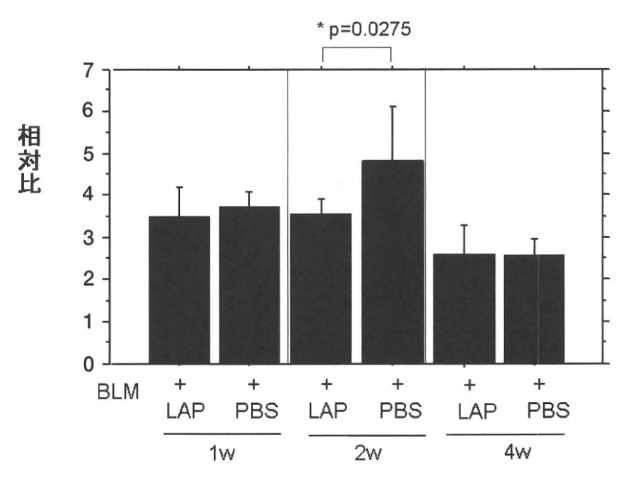


図 4 : 皮膚組織中に発現した CTGF mRNA 定量

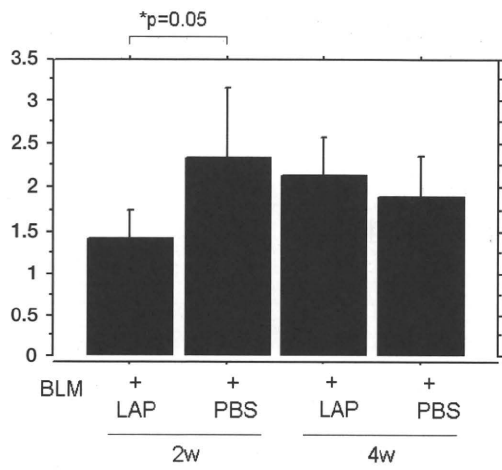


図5：皮膚組織中に発現した collagen α1 (I) mRNA 定量

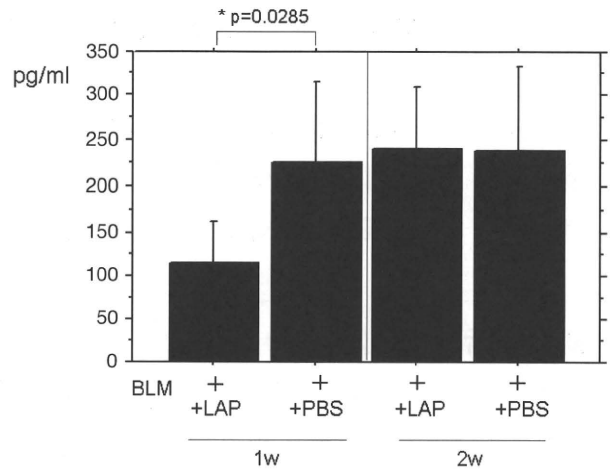


図6：LAP 投与部位における活性型 TGF-β1 濃度

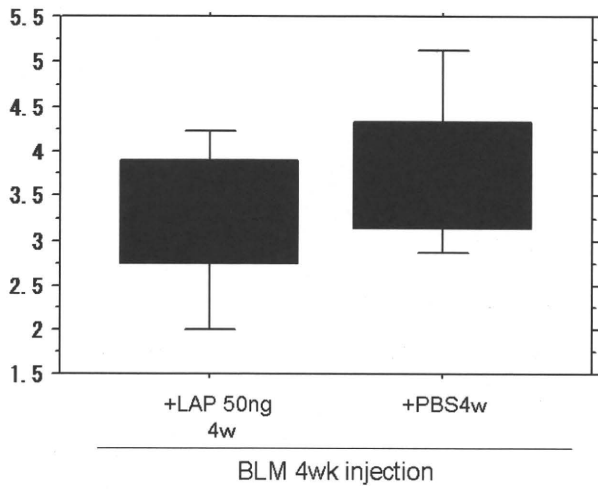


図7：コラーゲン定量

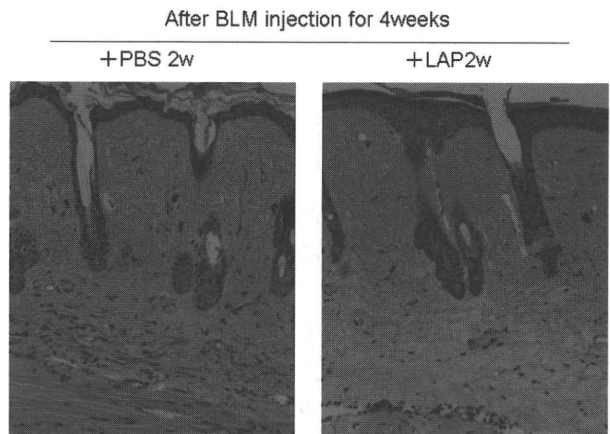


図8：皮膚硬化完成後のLAP投与効果 (HE染色)

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を皮内注するのと同時に、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

はじめにプ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、プ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、プ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、プ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.

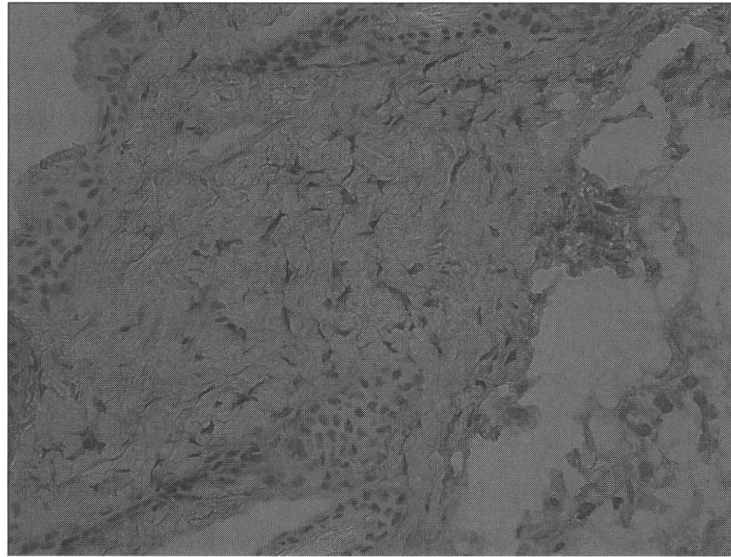


図1：ブレオマイシン処理した皮膚病変部における phospho-PDGF-R- β の発現

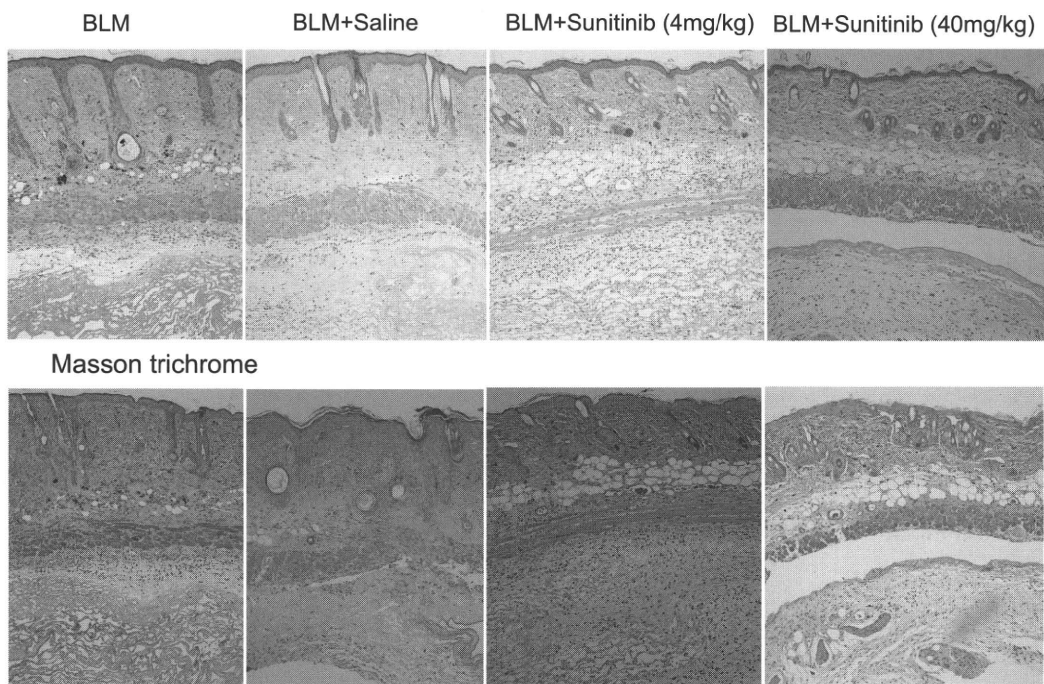


図2：病理組織学的所見