

E. 結 論

IL-6 は Scl-cGVHD の発症に重要な役割を有している。IL-6 阻害療法は Scl-cGVHD ならびに全身性強皮症の有効な治療法となる可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Chen X, Das R, Komorowski R, Beres A, Hessner MJ, Mihara M, et al. (2009) Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood* 114: 891-900.
2. Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S (2011) Serum chemokine and cytokine levels as indicators of disease activity in patients with systemic sclerosis. *Clinical rheumatology* 30: 231-7.
3. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK (2011) The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6: 509-37.
4. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Takeuchi T (2008) Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 112: 3959-64.
5. Sato S, Hasegawa M, Takehara K (2001) Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with

total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *Journal of dermatological science* 27: 140-6.

6. Serada S, Fujimoto M, Mihara M, Koike N, Ohsugi Y, Nomura S, et al. (2008) IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 9041-6.
7. Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC (2002) Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J Immunol* 168: 3088-98.
8. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugrajah S, et al. (2005) Reduced frequency of FOXP3 + CD4 + CD25 + regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 106: 2903-11.

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

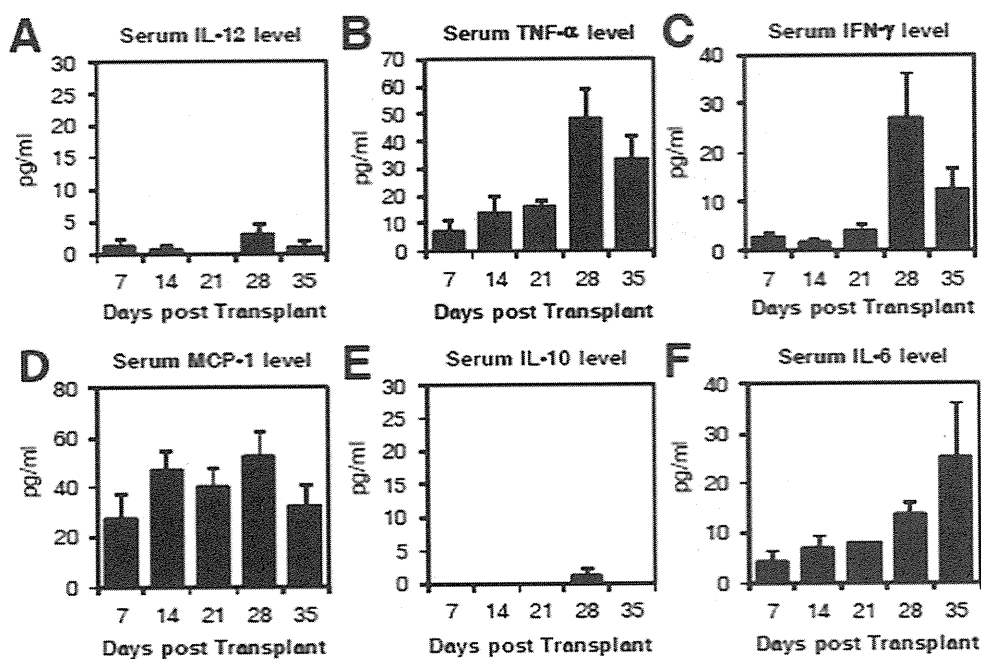


図1：Scl-cGVHDモデルにおけるサイトカイン濃度の変化
 (A) 血清IL-12p70濃度, (B) 血清TNF- α 濃度, (C) 血清IFN- γ 濃度, (D) 血清MCP-1濃度,
 (E) 血清IL-10濃度, (F) 血清IL-6濃度

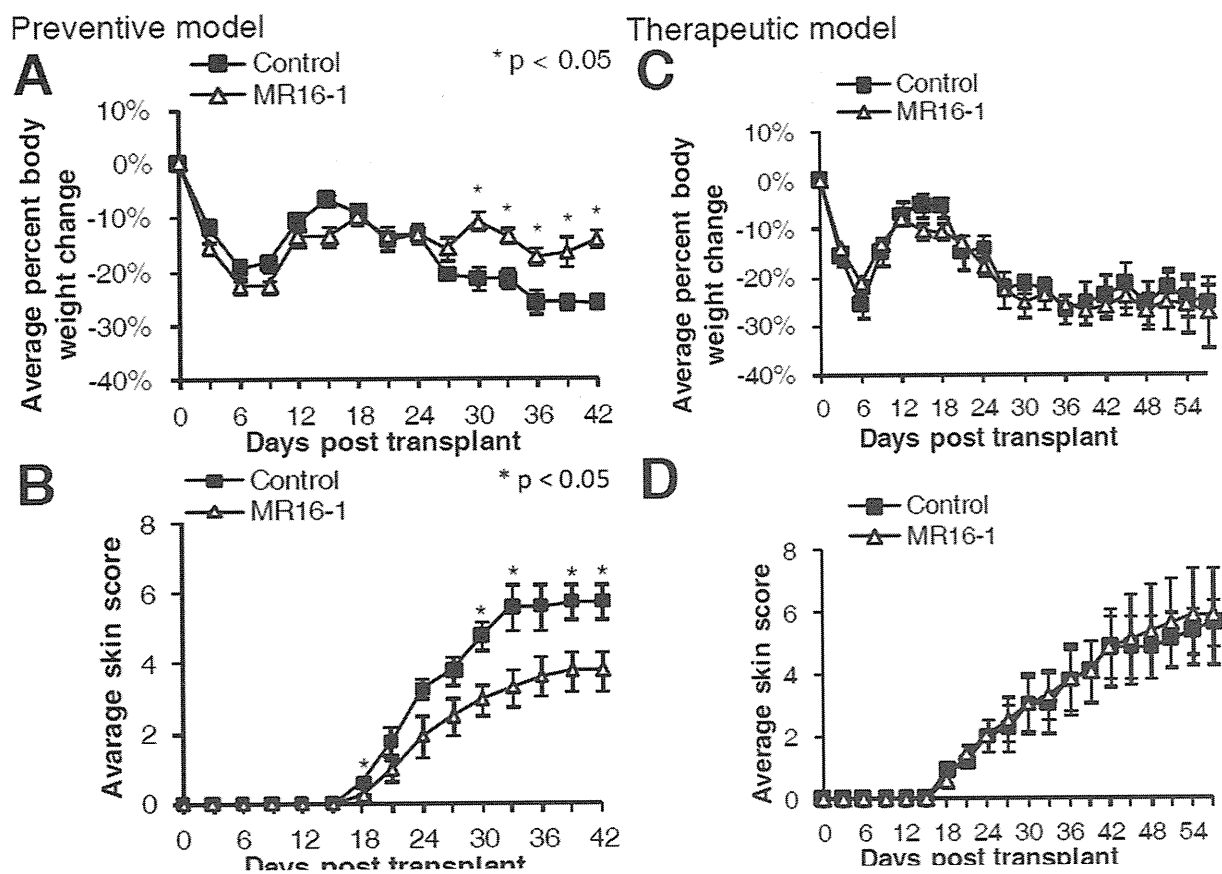


図2：Scl-cGVHDモデルにおけるMR16-1の効果
 (A-B) 予防モデル；(C-D) 治療モデル：体重変動ならびにスキンスコア。* p < 0.05.

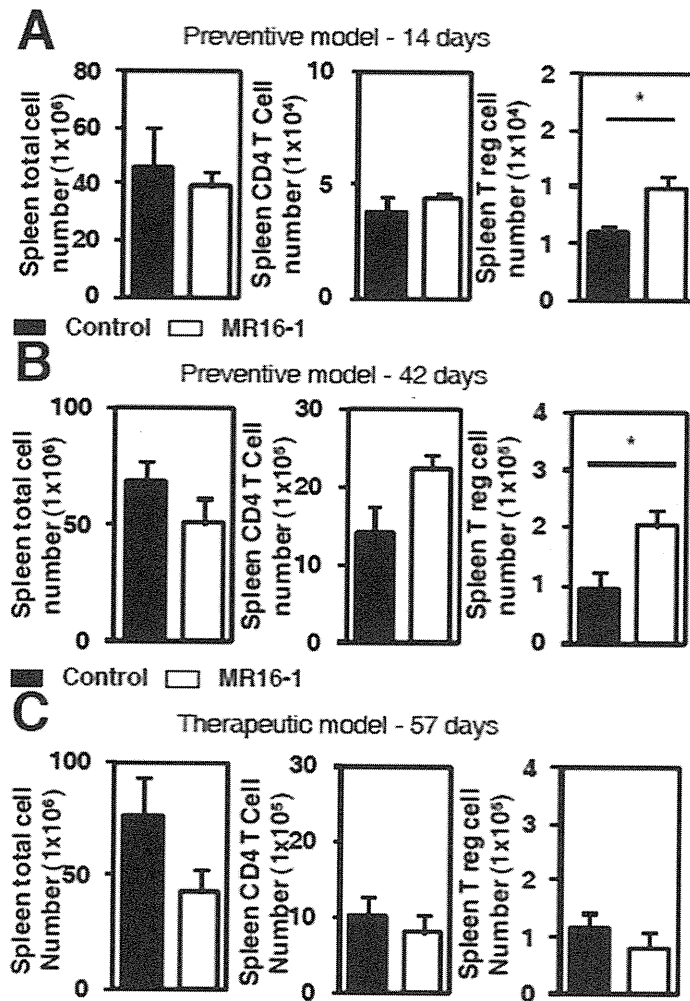


図3：MR16-1 投与後の制御性 T 細胞の増加
 (A) 骨髄移植 14 日後、(B) 42 日後、(C) 57 日後。* p<0.05.

血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスにおける創傷治癒異常についての検討

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
協力者 Maria Trojanowska Professor, Arthritis Center, Boston University
研究代表者 佐藤伸一 東京大学医学部附属病院 皮膚科 教授

研究要旨

全身性強皮症は皮膚及び内臓諸臓器の線維化と血管障害と特徴とする全身性の自己免疫疾患である。その病因はいまだ不明であるが、最近我々は転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下が本症の線維化と血管障害の病態に関与している可能性を明らかにした。血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失 (Fli1 ECKO) マウスは全身性強皮症に伴う臨床症状は示さないが、その血管障害の基盤となる病理組織学的な変化を再現できる。今回我々は、全身性強皮症における創傷治癒異常の機序に転写因子 Fli1 の発現異常が関与している可能性について検討を行うため、Fli1 ECKO マウスにおける創傷治癒異常の有無およびその機序について検討を行った。一連の実験により、① Fli1 ECKO マウスは野生型マウスと比較して、創傷治癒が著明に遅延する、② Fli1 ECKO マウスでは創作成後 14 日目において新生血管の数が著明に減少している、③ Fli1 ECKO マウスでは創作成後 7 日目の肉芽組織において赤血球を含まない新生血管が多い、④ Fli1 ECKO マウスでは sprouting vessel において tip cell への分化に異常がある、⑤ Fli1 遺伝子の発現低下はマウス皮膚血管内皮細胞において Notch1 遺伝子と Dll4 遺伝子の発現を抑制する、ことが明らかとなった。創傷治癒の過程において、sprouting vessel における tip cell への分化は新生血管と既存血管の吻合において非常に重要な役割を果たしていることから、Fli1 ECKO マウスでは血管の吻合の過程に障害があり創傷治癒が遅延している可能性が示された。以上の結果より、全身性強皮症患者の創傷治癒遅延の機序の一つとして、転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下による新生血管と既存血管の吻合異常が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は皮膚及び内臓諸臓器の線維化と血管障害と特徴とする全身性の自己免疫疾患である。その病因はいまだ不明であるが、最近我々は転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下が本症の線維化と血管障害の病態に関与している可能性を明らかにした^[1]。皮膚線維芽細胞における転写因子 Fli1 の発現低下は同細胞を活性化して筋線維芽細胞への分化を促す^[2,3]。血管内皮細胞における転写因子 Fli1 の発現低下は血管新生に必要な一連の遺伝子プログラムを活性化する^[4]。我々はこれまでに、血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失 (Fli1 ECKO) マウスは全身性強皮症

に伴う臨床症状は示さないが、その血管障害の基盤となる病理組織学的な変化と機能異常 (細動脈の狭窄、毛細血管の拡張、血管透過性の亢進など) を再現できることを明らかにした^[4]。したがって、同マウスは全身性強皮症に伴う血管障害のモデル動物となる可能性が示唆されている。

全身性強皮症の主要な臨床症状の一つとして、難治性皮膚潰瘍がある。近年、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンが強皮症に伴う指尖部皮膚潰瘍の新規発症を抑制する効果があることが2つの良質な無作為化二重盲検試験で明らかにされた^[5,6]。しかしながら、強皮症に伴う皮膚潰瘍の治癒を促進

する効果が明確に示されている薬剤は現時点では存在せず、その開発も遅れている。その要因の一つとして、強皮症に伴う創傷治癒異常の詳細な機序について未だ不明な点が多いことが挙げられる。そこで、今回我々は強皮症の血管障害モデルマウスである Fli1 ECKO マウスを用いて、創傷治癒異常の有無およびその機序について検討し、強皮症に伴う創傷治癒異常の機序の一端を明らかにすることを目的に検討を行った。

B. 研究方法

1) 血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失(Fli1 ECKO)マウス

Fli1^{fllox/fllox} mouse と Tie2-Cre mouse を交配し、Fli1^{fllox/fllox};Tie2-Cre(+) mouse (Fli1 ECKO mouse) を作成した。同マウスでは皮膚血管内皮細胞 (MDMEC) における Fli1 遺伝子の mRNA の発現量は野生型マウス由来の MDMEC と比較して約 20-50% に減少していた^[4]。

2) Wound healing experiment

雄、月齢 3 カ月の野生型マウス (C57/BL6) および Fli1 ECKO マウスの背部に直径 4 mm の full-thickness skin punch wound を 2 つ作り、day1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 に sacrifice し、皮膚標本をホルマリン固定し、パラフィンブロックを作製した。

3) FITC-dextran injection

創作成 14 日目のマウスの尾静脈から FITC-dextran を注射し、5 分後にマウスを sacrifice した。創部周囲の皮膚を剥離し、蛍光顕微鏡下で真皮と脂肪組織の境界部の血管構造を観察した。

4) Retina assay

マウスの眼から網膜を単離し、matrigel 上で 21 日間培養した。網膜由来の sprouting vessel の構造および分裂像の有無について顕微鏡下で観察した。

5) 免疫プロット法

MDMEC から whole cell lysate を作成し、各 15 μ g の検体を 10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後、ニトロセルロース膜を特異的抗体と反応させた。その後、horseradish peroxidase と結合した二次抗体と反応させ、enhanced chemiluminescence で発光させ、X-ray フィルムに感光させた。

6) クロマチン免疫沈降法

MDMEC を 1% ホルムアルデヒドを用いて室温で 10 分間固定したのち、細胞を回収し、核蛋白を抽出した。Sonicator で DNA を破碎したのち、抗 Fli1 抗体で免疫沈降を行った。沈降された DNA 蛋白複合体からフェノール・クロロフォルム抽出にて核酸成分を精製した。マウス Notch1 遺伝子プロモーターおよびマウス Dll4 遺伝子プロモーターにおける Fli1 の putative binding site を Tfsitescan で同定し、その領域を PCR にて増幅し、1% アガロースゲルを用いた電気泳動により PCR 産物の有無を検出した^[4]。

なお、実験動物の取り扱いには、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。マウスの取扱いは、苦痛を最小限とするため、麻酔、安楽死などを適切に施行した。

C. 研究結果

1) Fli1 ECKO マウスにおける創傷治癒異常

Fli1 ECKO マウスでは野生型マウスと比較して、創傷治癒が著明に遅延していた (図 1A)。特に創作成 5 日後、7 日後、9 日後、11 日後において有意に遅延していた (図 1B)。

2) Fli1 ECKO マウスにおける血管新生異常

Fli1 ECKO マウスにおける創傷治癒遅延に血管新生の異常が関与している可能性について検討するた

め、創作成 14 日目において癒痕組織における血管構造について検討を行った。FITC-dextran を用いて新生血管を可視化した結果を図 2 に示す。野生型マウスでは癒痕の中心部に向かう新生血管が多数みられるが、Fli1 ECKO マウスでは癒痕の中心部付近では新生血管がほとんど見られなかった。以上の結果から、Fli1 ECKO マウスでは血管新生の異常が創傷治癒遅延に関与している可能性が示された。

次に、血管新生のどの過程に異常があるか検討するため、創作成 7 日目における肉芽組織に注目した。図 3 に示すように、野生型マウスでは肉芽組織には微小な新生血管が数多くみられ、それらの新生血管は赤血球で満たされていた。一方、Fli1 ECKO マウスでは肉芽組織に認められる血管の直径が大きく、赤血球を含まない新生血管が多く認められた。以上の結果から、Fli1 ECKO マウスでは新生血管と既存血管の吻合に異常がある可能性が示された。

3) Fli1 ECKO マウスにおける tip cell 分化異常

創傷治癒の過程における新生血管と既存血管の吻合には、既存血管からの sprouting vessel における tip cell への分化が重要な役割を果たしている。そこで、次に Fli1 ECKO マウスにおける tip cell への分化異常の有無について検討するために、retina assay を行った。野生型マウスの retina を matrigel 上で培養すると、正常な sprouting vessel が認められた (図 4A)。一方、Fli1 ECKO マウスの retina を matrigel 上で培養すると、sprouting vessel において hyperbranching が認められ、また tip cell と考えられる細胞の分裂像が認められた (図 4B)。以上の結果から、Fli1 ECKO マウスでは tip cell への分化異常があることが示された。

4) 転写因子 Fli1 が血管内皮細胞における Notch1-Dll4 signaling に及ぼす影響

Tip cell への分化には Notch1-Dll4 signaling が重要

であることが明らかにされている。そこで、Fli1 の発現低下が Notch1 遺伝子および Dll4 遺伝子の発現に及ぼす影響について、MDMEC を用いて検討した。野生型マウスの MDMEC と比較して、Fli1 ECKO マウス由来の MDMEC では Notch1 蛋白および Dll4 蛋白の発現量が著明に減少していた (図 5A)。次に、転写因子 Fli1 によって Notch1 遺伝子および Dll4 遺伝子の発現が直接制御されているか否かについて検討するため、クロマチン免疫沈降を行ったところ、野生型マウス由来の MDMEC ではこれらの遺伝子のプロモーター領域に Fli1 が結合していた (図 5B)。以上の結果から、Fli1 の発現低下は Notch1 遺伝子および Dll4 遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。

D. 考案

今回の検討により、① Fli1 ECKO マウスでは創傷治癒が著明に遅延している、② Fli1 ECKO マウスでは創傷部における新生血管の数が減少している、③ Fli1 ECKO マウスでは肉芽組織において新生血管と既存血管の吻合に異常がある、④ Fli1 ECKO マウスでは sprouting vessel における tip cell への分化に異常がある、⑤血管内皮細胞において Fli1 の発現低下は Notch1 遺伝子と Dll4 遺伝子の発現を抑制する、ことが明らかとなった。以上の結果から、Fli1 ECKO マウスでは血管内皮細胞における Notch1-Dll4 signaling が破綻し、その結果 sprouting vessel における tip cell への分化が阻害され、新生血管と既存血管の吻合が障害されるために創傷治癒が遅延すると考えられた。

全身性強皮症に伴う難治性皮膚潰瘍においては、徹底した wound care によって良好な肉芽形成が得られた場合でも、その肉芽組織が容易に壊死組織へと置換されてしまうことをしばしば経験する。全身

性強皮症においては転写因子 Fli1 の発現が恒常的に低下していることを考慮すると、このような強皮症に伴う創傷治癒異常の機序の一つとして、新生血管と既存血管の吻合異常が関与している可能性が考えられる。

我々はこれまでに、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンおよび PDGF receptor、c-Abl、c-kit のチロシンキナーゼ阻害薬であるメシル酸イマチニブは、強皮症皮膚線維芽細胞において転写因子 Fli1 の発現異常を是正する作用があることを明らかにしてきた^[7]。これらの薬剤は実際に強皮症に伴う肺動脈性肺高血圧症や難治性皮膚潰瘍などの血管障害に伴う臨床症状に有用である可能性が示唆されている。以上の実験結果や臨床データは、転写因子 Fli1 が強皮症の治療のターゲットとなり得る可能性を示唆している。したがって、Fli1 ECKO マウスを用いた血管障害の検討や治療薬の検討は、強皮症の新規治療薬の開発に有用であると考えられた。

E. 結 論

Fli1 ECKO マウスでは創傷治癒が著明に遅延しており、その機序の一つとして新生血管と既存血管の吻合異常が関与していることが明らかとなった。全身性強皮症における創傷治癒異常の過程に、転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下による血管の吻合異常が関与している可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Asano Y, Bujor AM, Trojanowska M. : The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* 59: 153-62, 2010.
2. Nakerakanti SS, et al. : Fli1 and Ets1 have distinct

roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program. *J Biol Chem.* 281: 25259-69, 2006.

3. Asano Y, et al. : Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol.* 29: 425-34, 2009.
4. Asano Y, et al. : Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol.* 176: 1983-98, 2010.
5. Matucci-Cerinic M, et al. : Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 32-8.
6. Korn JH, et al. : Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3985-93.
7. Bujor AM, et al. : The c-Abl tyrosine kinase controls protein kinase C δ -induced Fli-1 phosphorylation in human dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 63: 1729-37, 2011.

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

Asano Y, Sato S. The mechanism of impaired wound healing in animal models with increased vascular senescence. The 36th Annual Meeting of the JSID, Kyoto, Japan 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

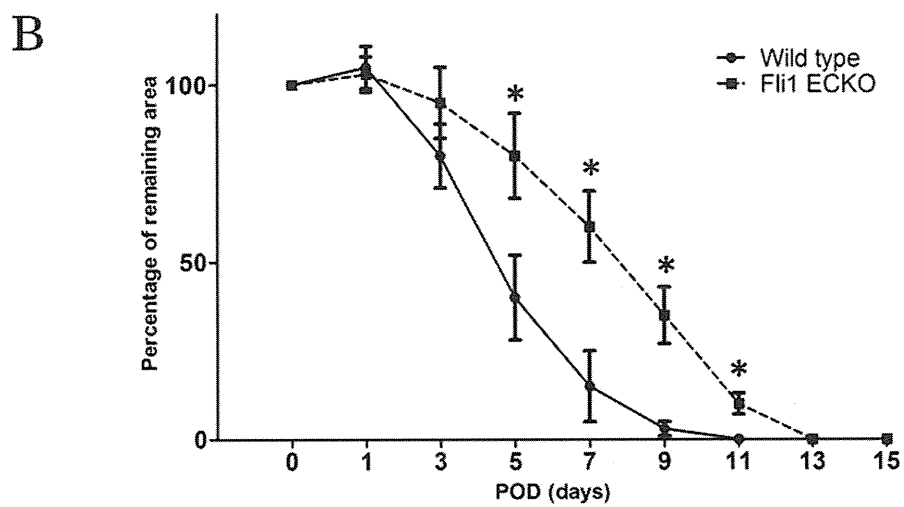
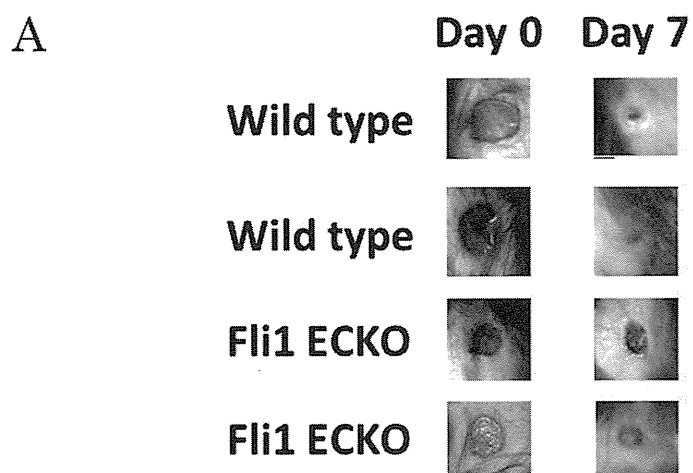
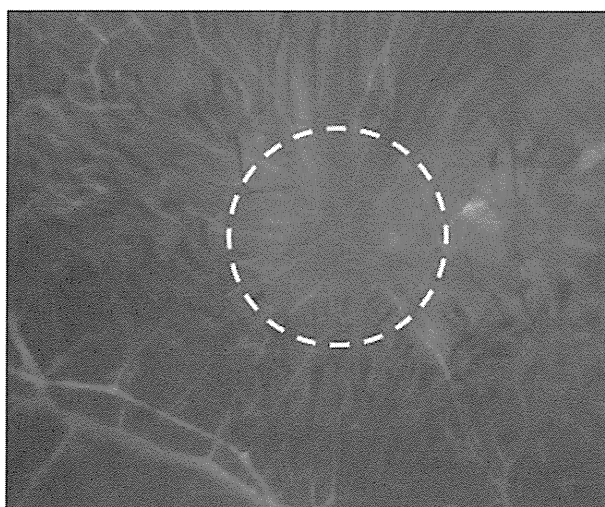


図1：野生型マウスと Fli1 ECKO マウスにおける創傷治癒の比較
 A：創作成時および7日後における創傷。B：創作成後13日目までの創傷治癒の比較。

野生型マウス



Fli1 ECKOマウス

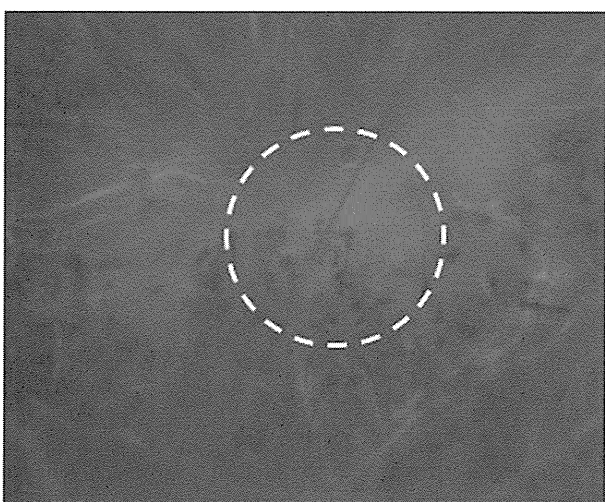
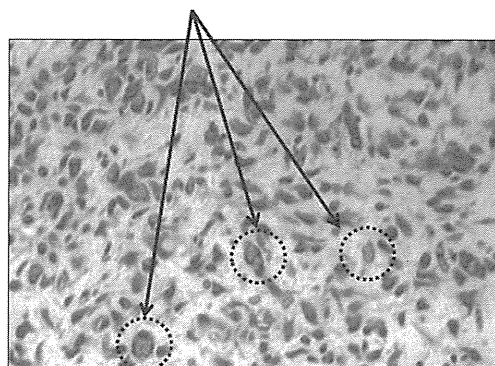


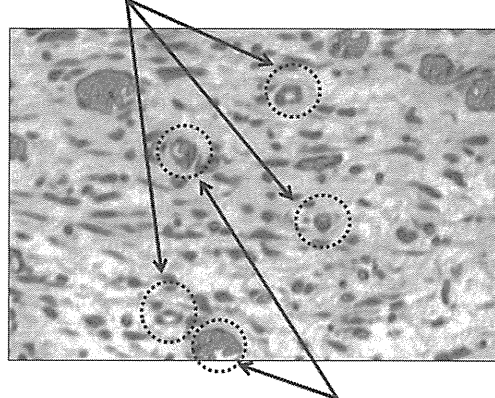
図2：創傷治癒後の癒痕部位とその周囲における血管構造の比較

創作成後14日目に尾静脈よりFITC-dextranを注入し、癒痕部位およびその周囲の血管構造について検討した。A：野生型マウスでは癒痕の中心に向かって新生血管が多数認められた。B：Fli1 ECKOマウスでは癒痕部において新生血管がほとんど認められなかった。

- A 野生型マウス：創作成7日後
新生血管は赤血球で満たされている



- B Fli1 ECKOマウス：創作成7日後
赤血球を含まない新生血管



赤血球で部分的に満たされている新生血管

図3：創傷作成後7日目の肉芽組織における新生血管についての検討

A：野生型マウスではほぼ全ての新生血管が赤血球で満たされていた。B：Fli1 ECKOマウスでは赤血球を含まない新生血管が多数認められた。

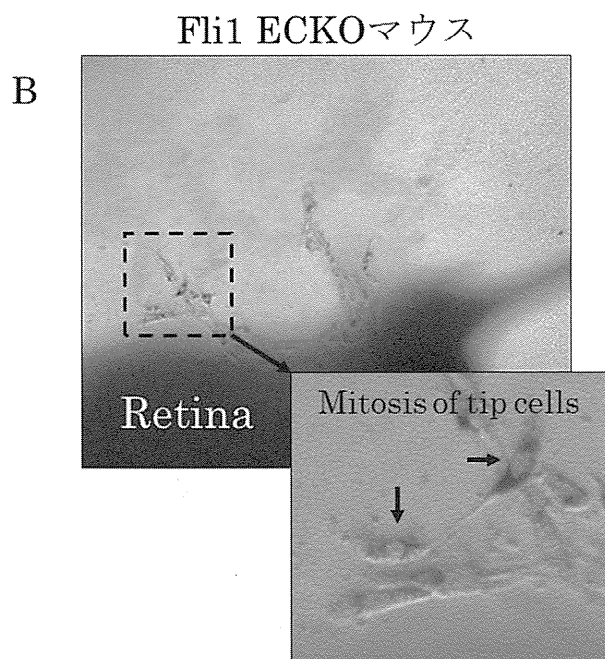
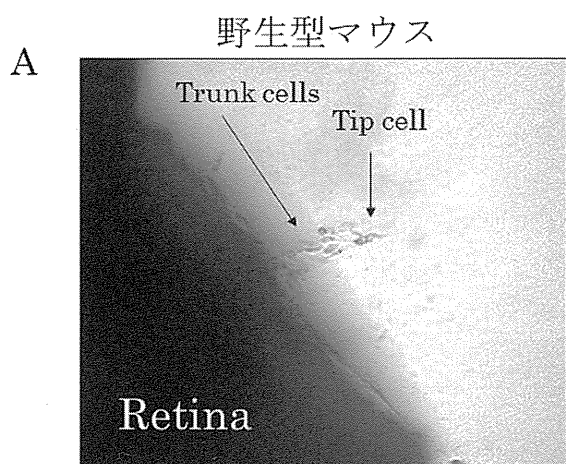


図4：Retina assayによるtip cellへの分化についての検討
 A：野生型マウスでは、正常な sprouting vessel が認められた。
 B：Fli1 ECKO マウスでは、sprouting vessel の hyper-branching と tip cell の分裂像を認めた。

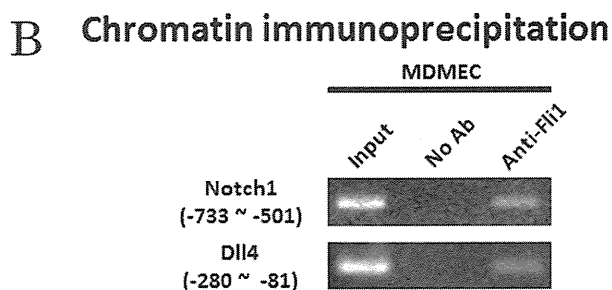
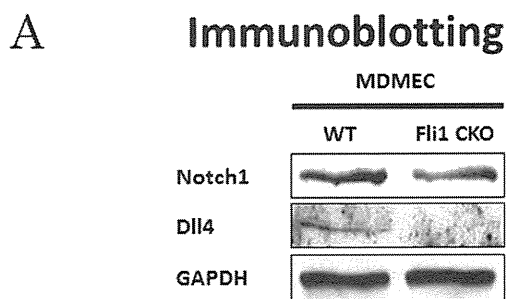


図5：転写因子 Fli1 の発現低下が Notch1 遺伝子と Dll4 遺伝子の発現に及ぼす影響の検討

A：野生型マウスおよび Fli1 ECKO マウス由来の MDMEC を用いて免疫プロット法を行ったところ、Fli1 ECKO マウス由来の MDMEC では Notch1 蛋白および Dll4 蛋白の発現が低下していた。B：野生型マウス由来の MDMEC を用いたクロマチン免疫沈降法により、転写因子 Fli1 が Notch1 遺伝子および Dll4 遺伝子のプロモーター領域に結合することが示された。

強皮症の線維化病態における Notch シグナルの関与

研究分担者	川口鎮司	東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病 准教授
協力者	高木香恵	東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病
協力者	深澤千賀子	東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病
協力者	栃本明子	東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病
協力者	大田ゆう子	東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病

研究要旨

強皮症における線維化の病態形成には、浸潤した単核球や傷害をうけた血管内皮細胞からのサイトカインや成長因子の誘導が重要な働きを担っている。病変局所における TGF β 、PDGF 経路の活性化や CTGF の産生の亢進が、線維化を形成されることが想定されているが⁽¹⁾、詳細は依然として不明である。Notch シグナルは、細胞間相互作用を通して細胞の分化を制御する機構で、あらゆる臓器や細胞の分化に重要な役割をはたしている。近年 Notch シグナルは強皮症における線維化に関与していると報告されているが、詳細は不明である。今回われわれは強皮症の線維化における Notch シグナルの関与について検討した。

A. 研究目的

強皮症は皮膚をはじめとした諸臓器の線維化と末梢循環不全を特徴とする疾患である。病因については未だ不明な点が多く、このため有効な治療法が確立されていない。肺や消化管、腎など諸臓器の過剰な線維化は機能障害をきたし、また末梢循環不全はレイノー現象、肺高血圧症、腎クリーゼ、皮膚潰瘍などの原因となる。さらに末梢循環不全により虚血となった組織では傷害をうけた血管内皮細胞からサイトカインが産生され、結果免疫学的活性化がみられ、血管障害や線維化の進行を促進する。強皮症の線維化病態における線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックス (ECM) 産生亢進については様々な研究がなされている。

Notch シグナルは、細胞間相互作用を通して細胞の分化を制御する機構で、あらゆる臓器や細胞の分化に重要な役割をはたしている。従来は神経系や血液系の細胞分化を制御する経路として研究されてき

た。Notch 受容体は Notch 1、2、3、4 からなる膜貫通タンパクで、リガンドは多くが知られているが、代表的なものとして DLL1、Jagged1、2、DLL3、DLL4 などがある。はじめに非切断型の Notch は Furin によって切断され 2 量体となり、細胞膜に表出される (S1 切断)、ついでリガンド刺激により TACE や ADAM によりその細胞外ドメインが切断され取り除かれ (S2 切断)、最後に Notch extracellular truncated (NEXT) domain が γ セレクターゼによって切断され Notch intracellular domain (NICD) になり、核内へ移行する。

Notch シグナルはわずかな活性の差でも大きな結果の違いを引きおこし、また同じ細胞に対しても分化を抑制することも促進することもあり、このため context dependent とも表現されている。

近年、Notch を介したシグナル伝達経路は、様々なあらゆる臓器、細胞の分化に重要な役割を担うことがわかってきた。最近 Notch シグナルは強皮症に

おける線維化に関与していると報告されているが、詳細は不明であり、今回われわれは強皮症の線維化における Notch シグナルの関与について検討した。

B. 研究方法

健常者・強皮症患者皮膚線維芽細胞における Notch リガンドおよび受容体の mRNA・蛋白の発現を PCR 法、定量 PCR 法、免疫染色法、Western blotting (WB) 法、flow cytometry (FCM) 法で確認した。ウイルスベクターを用いて活性化型 Notch の遺伝子導入を行い、Notch シグナルを活性化させ、培養上清中の procollagen type 1C peptide (PIP) 量を ELISA 法で測定し、検討した。

C. 研究結果

健常者、強皮症患者の皮膚線維芽細胞にはともに Notch1、2、3 とリガンドである DLL1、DLL4、JAG1 mRNA の発現を認め、Notch1、2、3 いずれも強皮症皮膚線維芽細胞は健常人と比べて Notch mRNA の発現は低い傾向にあった。Notch1、3 の蛋白発現を免疫染色法、WB、FCM で比較検討した結果いずれも同様に発現を確認できるが、健常者皮膚線維芽細胞に比し、強皮症患者皮膚線維芽細胞では Notch1、3 の発現は低い傾向だった。正常線維芽細胞のなかでも特に胎児より得られた皮膚線維芽細胞では Notch1、3 の発現は亢進していた。正常皮膚線維芽細胞を TGF β で刺激後、NICD の発現を WB で検討した結果、TGF β 刺激後 NICD の発現は亢進していることが明らかとなった。

Notch シグナルは強皮症の線維化に対してどのように関与しているかを確認する目的でウイルスベクターを用いて活性化型 Notch の遺伝子導入を行い、Notch シグナルを強発現した線維芽細胞の procollagen type 1 C peptide (PIP) 量の産生量を測定した。

結果、Notch シグナルを強発現した線維芽細胞は強発現していない線維芽細胞と比べて PIP 産生量は有意な増加を認めなかった。

D. 考察

Notch という名称はもともとショウジョウバエの羽に由来するもので、下等動物の発生の研究対象として始まったものである。次第に下等動物のみでなく哺乳動物の発生や恒常性維持に多様な役割をもつことが明らかになり、発生期においては血管、中枢神経、造血のみならず、腎や肝などの臓器発生にも関与していることが明らかになってきた。また種々の幹細胞の分化抑制や前駆細胞の増殖・維持に関与するとされ、このため Notch シグナルの異常は様々な疾患の発症に関連すると考えられている。このなかで近年 Notch シグナルと強皮症との関連性をみた研究がなされ、Notch シグナルは強皮症の皮膚線維芽細胞では発現が亢進しており、また Notch シグナルを制御する γ セクレターゼを制御することで強皮症における線維化を抑制することが報告されている^(2,3,4)。

今回われわれの研究結果では、健常者線維芽細胞と同様に強皮症患者の線維芽細胞に Notch のリガンドおよびレセプターの発現が確認された。しかしその発現量は mRNA および蛋白レベルにおいても、これまでの報告とは異なり、差を認めず、むしろ胎児由来の正常線維芽細胞のほうが、その発現量は多い傾向にあった。このことは強皮症の病態よりも、むしろ発生学的な原因が大きいと考えられ、このため今後発生学的に同じ継体数の細胞間で比較検討することが必要と考えている。また negative feedback の可能性や核内移動の経路についても検討する必要性を考えている。

さらに皮膚線維芽細胞の collagen 産生における

Notch シグナルの関連性を確認する目的で、ウイルスベクターを用いて健常線維芽細胞に Notch 遺伝子を導入し、Notch シグナルを強発現した線維芽細胞の collagen 産生を procollagen type1 (PIP) 量を測定することで検討した。結果皮膚線維芽細胞が産生する PIP 量は Notch 遺伝子を導入していない線維芽細胞と比して有意な増加は認めなかった。このことより Notch シグナルの発現を強化することは皮膚線維芽細胞における collagen 産生促進には関与しないと考えられた。

平滑筋細胞の分化における研究では状況において平滑筋細胞の分化を正にも負にも制御することがわかっている。また腫瘍化との関連性をみた報告では活性化型 Notch1 が転写 coactivator である p300 を介した TGF β 経路を抑制し、その細胞増殖抑制作用を喪失し腫瘍化へ導かれるというものがある⁽⁵⁾。この報告からは Notch シグナルの亢進は TGF β 経路が非活性化に関与しているとも考えられる。しかしわれわれの研究結果においては TGF β によって Notch シグナルの活性化を示す NICD の発現亢進を認めた。TGF β は強皮症における線維化に関与しており、TGF β により Notch シグナルが亢進していることはこれまでの報告を裏づけるものである。

Notch 経路における活性化突然変異は、T 細胞白血病の腫瘍形成を促進するが、最近これと同じ経路が骨髄性白血病の発症を抑制しているとの報告がある⁽⁶⁾。この報告によると造血幹細胞で Notch 経路を不活性化すると、慢性骨髄単球性白血病 (CMML) に似た骨髄性疾患が発症した。また CMML 患者では Notch 経路の遺伝子に変異が見つかり、Notch 経路は、骨髄球系の分化プログラムを抑制することが明らかになった。これらの発見は、Notch 経路が造血系で発がん性と腫瘍抑制性の両方の機能を果たすこと、また重要な細胞運命決定を調節していること

を証明している。上記の平滑筋細胞の報告ともあわせて考察すると、同じ細胞に対しても正にも負にも働きうるシグナルであることが予想される。強皮症における Notch シグナルの働きにおいても線維化の病態を促進することに働くか、抑制することに働くか、context dependent である可能性があり今後のより詳細な研究の蓄積が必要と考える。

E. 結 論

強皮症皮膚線維芽細胞において Notch 受容体の発現は低下していた。一方で正常線維芽細胞は TGF β によって Notch シグナルの活性化を示す NICD の発現亢進を認めた。今後より詳細な研究を重ねる必要があると考えられた。

F. 文 献

1. Varga J, et al.: Systemic sclerosis: a prototypic multi-system fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 557-67.
2. Dees C, et al.: Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jul; 70(7): 1304-10. Epub 2011 Mar 30.
3. Dees C, et al.: Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jul; 70(7): 1304-10. Epub 2011 Mar 30.
4. Kavian N, et al.: Targeting ADAM-17/notch signaling abrogates the development of systemic sclerosis in a murine model. *Arthritis Rheum.* 2010 Nov; 62(11): 3477-87. doi: 10.1002/art.27626.
5. Masuda S, et al.: Notch1 oncoprotein antagonizes TGF-beta/Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of coactivator p300. *Cancer Sci,*

2005; 96: 274-282.

6. Apostolos K et al.: A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. Nature 473, 7346 (May 2011)

F. 研究発表

学会発表

1. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会；

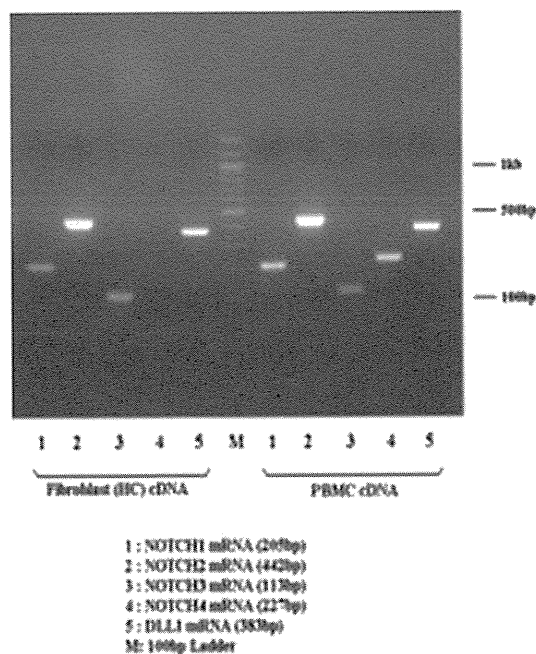
2011年7月；強皮症の線維化病態における Notch シグナルの関与.

2. 第75回米国リウマチ学会；2011年11月； Notch pathway is activated in Systemic Sclerosis (SSc) .

G. 知的財産権の出題・登録状況

なし

A; PCR



B; Quantitative PCR

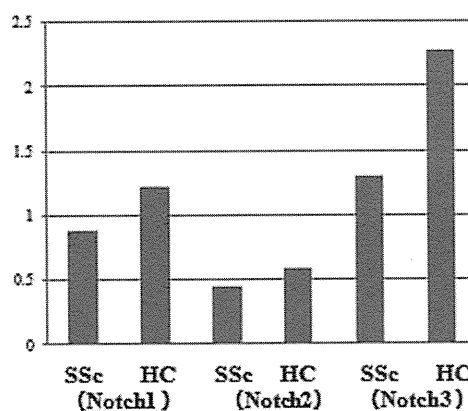


図 1A,B : 健常者皮膚線維芽細胞で Notch1、2、3 の mRNA の発現が確認されたが、Notch1、2、3 いずれも強皮症皮膚線維芽細胞は健常人と比べて Notch の発現は低い傾向にあった。

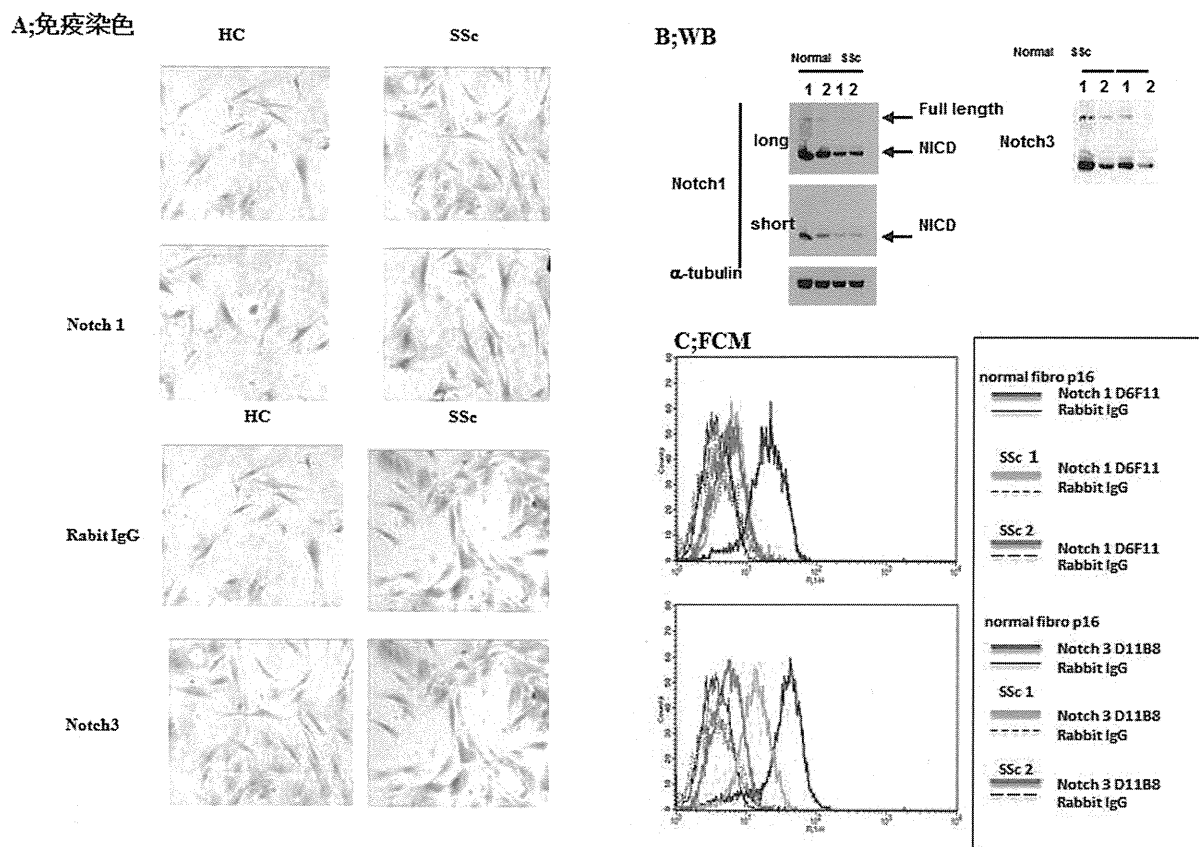


図 2A、B、C：皮膚線維芽細胞の Notch1、3 発現を免疫染色法、Western blotting (WB) 法および flow cytometry (FCM) 法で確認した。強皮症、健康人皮膚線維芽細胞ともに Notch1、3 の発現が認められたものの、その発現量は強皮症患者皮膚線維芽細胞のほうがやや低下していた

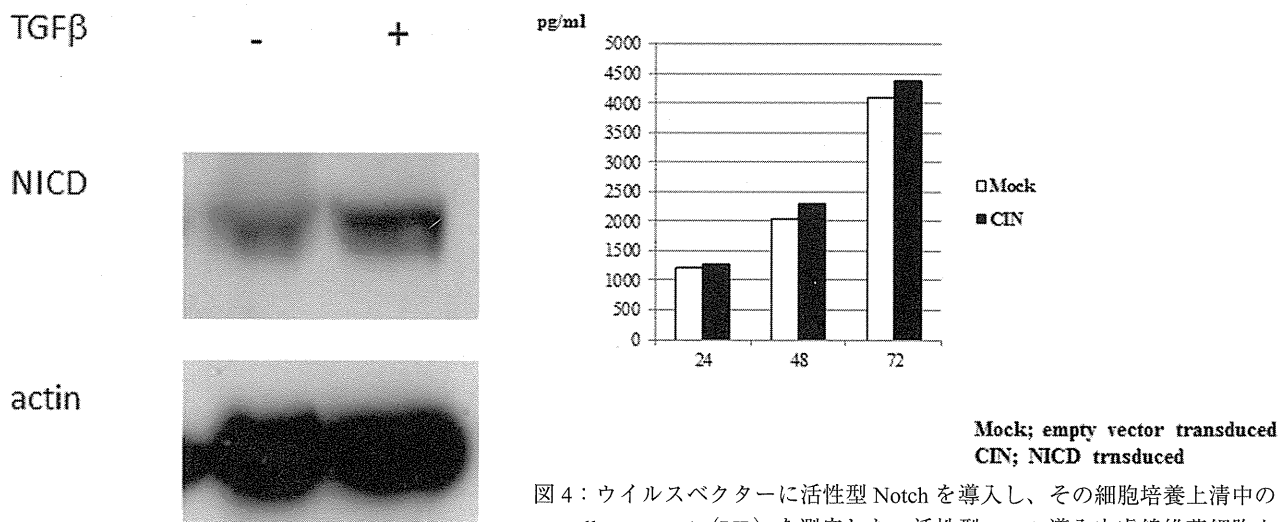


図 3：TGFβ 刺激後の NICD の発現を WB 法で確認した。TGFβ 刺激後 NICD の発現は亢進した

図 4：ウイルスベクターに活性型 Notch を導入し、その細胞培養上清中の procollagen type1 (PIP) を測定した。活性型 Notch 導入皮膚線維芽細胞上清中の PIP は軽度増加したが著明ではなかった。

全身性強皮症の皮膚線維化における microRNA-196a の関与の検討

研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学 教授
協力者	本多教稔	熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学 大学院生
協力者	神人正寿	熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学 講師
協力者	牧野貴充	熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学 助教
協力者	牧野勝成	熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学 大学院生
協力者	岡本芳伸	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学（皮膚科）大学院生
研究協力者	長谷川稔	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学（皮膚科）講師
研究分担者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学（皮膚科）准教授

研究要旨

microRNA (miRNA) は non coding RNA の一種で平均 22 塩基程度の長さを持ち mRNA の 3' 非翻訳領域の相補的配列に結合し標的 mRNA の安定性や蛋白への翻訳を阻害する事で遺伝子発現調節を行なっている。miRNA は様々な疾患に関与していることが報告されているが、全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) における miRNA に関する報告は少ない。そこで我々は SSc の皮膚線維化における miRNA の関与の検討を行った。SSc の病態において TGF- β signaling の重要性はこれまで報告されてきている。まず、正常皮膚由来線維芽細胞、TGF- β 1 で刺激を加えた正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞より miRNA を抽出しアレイで網羅的に比較した。その結果、TGF- β 1 で刺激を加えた正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞において複数の miRNA の発現が低下していた。その中で、miR-196a は in vivo、in vitro ともに SSc で発現が低下していた。正常皮膚由来線維芽細胞において miR-196a の発現を阻害すると type I collagen の発現が増加し、強皮症皮膚由来線維芽細胞において miR-196a の発現を増加させると type I collagen の発現が低下した。次に強皮症患者 40 例 (diffuse cutaneous SSc; dcSSc 20 例、limited cutaneous SSc; lcSSc 20 例)、正常対照群 25 例で血清 miR-196a 値を測定した。強皮症患者群と正常対照群に有意差は見られなかった。強皮症患者群の中で血清 miR-196a が低値を示す群では、dcSSc の割合、modified Rodnan total skin thickness score、潰瘍の有病率が高かった。以上より、miR-196a は強皮症の線維化に関与していると考えられた。また、miR-196a による type I collagen の発現の調節は miRNA を用いた新たな治療につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、エピジェテイクスと呼ばれる、DNA への後天的な修飾による遺伝子発現の制御機構を研究する分野の中で、microRNA (miRNA) が注目されている。miRNA は蛋白をコードしていない non coding RNA の一種で、平均 22 塩基程度の長さをもつ短いボ核酸分子である。miRNA は mRNA の 3'

非翻訳領域 (UTR) の相補的配列に結合し、翻訳を阻害することで遺伝子発現の調節をしている¹⁻³。ヒトゲノムには 1000 以上の miRNA が存在し、60% 以上の遺伝子の発現を制御すると考えられている⁴。miRNA は免疫異常、癌、代謝異常など様々な疾患の発症に関与していることが明らかになっている⁵⁻¹⁰。しかしながら、全身性強皮症 (systemic scler-

rosis; SSc) における miRNA に関する報告は少ない。そこで我々は全身性強皮症の皮膚線維化における miRNA の関与の検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

皮膚組織は熊本大学病院皮膚科を受診した SSc 患者 10 例および正常人 5 例を対象とした。SSc 患者のうち、diffuse type (dcSSc) が 5 例、limited type (lcSSc) が 5 例であった。血清は SSc 患者 40 例および正常人 25 例を対象とした。SSc 患者のうち、dcSSc が 20 例、lcSSc が 20 例であった。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) 細胞培養

発症二年以内の dcSSc 患者 3 名の前腕由来の皮膚線維芽細胞および正常人 3 名の皮膚線維芽細胞を使用した。

3) 免疫ブロット法

細胞溶解液をポリアクリルアミドゲルに泳動し、PVDF 膜に転写した、PVDF 膜を抗 type I collagen 抗体、抗 fibronectin 抗体、抗 β -actin 抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて発色させた。

4) 細胞溶解液中の type I collagen 値の測定

細胞溶解液中の type I collagen 値の測定には pro-collagen type I C terminal peptide (PIP) EIA kit (TAKARA Bio Inc) を使用した。PIP モノクローナル抗体が被覆されたプレートに細胞溶解液を加えて、次に酵素標識抗体溶液を加えて反応させた。さらに酵

素基質溶液を加えて発色させ、450 nm における吸光度を測定、標準曲線を作成し検体中の PIP 濃度を算出した。

5) PCR Array analysis

SSc 患者の皮膚組織から miRNeasy FFPE kit (Qiagen)、RT2 miRNA First Strand Kit (SABiosciences) を用いて miRNA を抽出し、96-well RT2 miRNA PCR Array (SABioscience) にて PCR Array 解析を行った。

Quantitative real-time PCR には Takara Thermal Cycler Dice (TP800) を用いた。miR-196a、U6、Snord68 プライマーは SA Bioscience 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 40 サイクル行った。各遺伝子の発現は standard curve method を用い、ヒトは U6 で、マウスは Snord68 で補正した。

6) マウス

C57BL/6 の背景をもつ TSK マウスの検体は金沢大学皮膚科学講座より譲渡されたものであり、金沢大学の動物実験に関する規約に承認されている¹¹。

7) In situ hybridization

miR-196a に相補的な配列を持つ 5'-locked digoxigenin-labeled nucleic acid (LNA) probe と scrambled negative control は Exiqon より購入した^{12, 13}。4 μ m に薄切した正常および強皮症患者のパラフィン包埋組織を用いて In situ hybridization 法を施行し、その後標本を光学顕微鏡にて観察した。

8) Transient transfection

Control siRNA, TGF- β siRNA は Santa Cruz Bio technology より miRNA inhibitors, mimics, miScript Target protectors は Qiagen より購入した。transfection reagent として Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いた。reverse 法で siRNAs, miRNA inhibitors (50 nM), mimics (5 nM), protectors (500 nM) を transfection reagent

と共に皮膚線維芽細胞を播種すると同時に導入した。導入後 48-96 時間、37°C、5% CO₂ でインキュベートし、その後細胞取得を行った。

9) 血清 miRNA の抽出と real-time PCR での解析

血清 100 μ l に対し、コントロールとしてヒト由来ではない *C. elegans* miR-39 (5 fmol/ μ l) を 5 μ l (Takara Bio Inc) を加え miRNeasy Mini kit (Qiagen)、miRNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) を用い、プロトコールに従って血清 miRNA の抽出を行った¹⁴。cDNA の合成は miRNA with Mir-X miRNA First Strand Synthesis (Takara Bio Inc) を用いた。Quantitative real-time PCR には Takara Thermal Cycler Dice (TP800®) を用いた。PCR は denaturation は 95°C 5 秒、annealing は 60°C で 20 秒の条件下で 40 サイクル行った。miR-196a の発現は standard curve method を用い、cel-miR-39 で補正した。

C. 研究結果

1) 正常皮膚由来線維芽細胞に比べ TGF- β で刺激を加えた正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞において複数の miRNA の発現が低下している

まず、強皮症の発症にどの miRNA が関与しているか調べるため、細胞の分化、発生に関する 88 の miRNA を含む Kit を用いて miRNA PCR Array 解析を行った。正常皮膚由来線維芽細胞、TGF- β 1 で刺激を加えた正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞各 5 例から抽出した miRNA をそれぞれ同量混合し各グループの miRNA の発現を比較検討した。その結果、TGF- β 1 で刺激を加えた正常皮膚線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞において複数の miRNA の発現が低下していた (表 1)。miRNA の target の予測に TargetScan (version 5.1、<http://www.targetscan.org/>), MiRanda (August 2010 Release、

<http://www.microna.org/>), DIANA microT (version 3.0、<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) を使用し、 α 1(I) \cdot α 2(I) collagen 両方を制御しうる miRNA として miR-196a に注目した¹⁵⁻¹⁸。

Array の結果では miR-196a は TGF- β 1 で刺激を加えた正常皮膚由来線維芽細胞 (2.06-cycle difference; 4.17-fold change in $\Delta\Delta$ CT method)、強皮症皮膚由来線維芽細胞 (8.22-cycle difference; 298.17-fold change) で低下していた。次に miR-196a の特異的な primer を用いて各 5 例それぞれに quantitative real-time PCR を行った。予想されたとおり、miR-196a は TGF- β 1 で刺激を加えた正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞すべてで発現が低下しており (図 1A)、統計学的有意差もみられた ($p < 0.05$ 、図 1B)。興味深いことに、強皮症皮膚由来線維芽細胞で TGF- β に特異的 siRNA を用いて TGF- β signaling を阻害したところ (図 1C)、miR-196a の発現は有意に増加した。(図 1D)。強皮症皮膚由来線維芽細胞において TGF- β を阻害することにより miR-196a の発現が回復したことは、強皮症における miR-196a の発現低下の原因が TGF- β signaling の活性化にあると考えられた。

2) miR-196a の発現の低下は type I collagen の発現の増加をもたらす

α 1(I)、 α 2(I) collagen の発現は正常皮膚由来線維芽細胞に比べ TGF- β 1 で刺激を加えた正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞で増加している (図 2A)。次に我々は、正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞で miR-196a の発現低下が type I collagen の発現増加に寄与しているか、miRNA inhibitor と mimic を用いて検討した。正常皮膚由来線維芽細胞において特異的 miRNA inhibitor の導入による miR-196a の低下は有意に α 1

(I)、 $\alpha 2(I)$ collagen の増加をもたらした (図 2B)。一方、強皮症皮膚由来線維芽細胞において、特異的 miRNA mimic の導入による miR-196a の発現の増加は type I collagen の発現の低下をもたらした (図 2C)。Fibronectin は miR-196a の標的でないため miRNA inhibitor と mimic の影響を受けなかった (図 2B、2C)。これらの結果は miR-196a の target は $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ collagen であることを示している。また、同様の実験を procollagen type I-C-terminal peptide を用いた EIA 法で行った所、同様の結果を得た。(図 2D)。

さらに、 $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ collagen の 3'UTR に miR-196a が直接作用するか検討を行った。検討には $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ collagen の mRNA の 3'UTR で、miR-196a が結合する部位に相補的な配列を持ち、miRNA と mRNA の作用を特異的に阻害する作用を持つ miScript Target Protector (Qiagen) (<http://www.qiagen.com/products/miscripttargetprotectors.aspx>) を用いた¹⁹。miR-196a protector の導入は type I collagen の発現の増加をもたらしたが、Fibronectin に影響はなかった。これは miR-196a が type I collagen の 3' UTR に直接作用することを示している。さらに miR-196a protector の存在下では TGF- β 刺激における type I collagen の増加を認めなかった。これは type I collagen の 3' UTR がすでに miR-196a protector によって阻害されており TGF- β を介した miR-196a の低下が type I collagen の発現に影響を与えなかったためと考えられた (図 2E)。この結果と一致して、miR-196a protector は miR-196a inhibitor を介した $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ collagen の増加を阻害した (図 2F)。したがって、強皮症皮膚由来線維芽細胞において miR-196a は type I collagen の発現の増加に直接関与していると考えられた。

3) in vivo における皮膚由来線維芽細胞と miR-196a

の発現

我々は次に、in vivo における miR-196a の発現を検討した。病理組織学的に、正常皮膚組織に比べ (図 3A、B)、SSc の皮膚組織は 膠原線維の増加と肥厚が特徴である (図 3C、D)。In situ hybridization 法では、正常皮膚由来線維芽細胞に miR-196a の発現が認められるが (図 3E、F)、強皮症皮膚由来線維芽細胞ではほとんど認められなかった (図 3G、H)。実際、in situ hybridization 法における miR-196a 陽性の核の数は SSc の皮膚で有意に低かった (図 3I)。加えて、我々は正常皮膚と SSc の皮膚より miRNA を抽出し real-timePCR で比較を行った。正常皮膚 5 例と比べ、lcSSc では 5 例中 4、dcSSc では 5 例全てで miR-196a の発現が低下していた (図 3J)、そして dcSSc 皮膚は miR-196a の発現が正常皮膚と比べ有意に低下していた (図 3K)、これは線維芽細胞を用いた in vitro の結果とも一致した (図 1A、B)。次に、TSK マウスの皮膚、肝臓、血清より miRNA を抽出し real-time PCR にて検討した。TSK マウスの皮膚における miR-196a は野生型に比べ有意に低かった ($p < 0.05$ 、図 3L)。一方、肝臓と血清における miR-196a の発現は低下傾向にあるものの有意差はなかった。以上より in vitro と、in vivo とともに線維化した皮膚では miR-196a の発現が低下していると考えられた。

4) SSc 患者における血清 miR-196 値と臨床所見および検査所見との相関

最後に我々は SSc 患者の血清 miR-196a 値を測定し、miR-196a が疾病マーカーになりうるかを評価した。これまで体液中の miR-196a 発現についての報告はなされていない。そのため、miR-196a が実際血清で検知可能か評価を行った。正常人の血清より miRNA を抽出し特異的 miR-196a primer を用いて quantitative real-time PCR で評価した (図 4A)。

miR-196a は検知され、また Ct 値は希釈倍率を上げるに従って増加した。この結果、血清中の miR-196a は定量的に検知可能であると考えられた。

SSc 患者 40 例（男性 9 例、女性 31 例；dcSSc 20 例、lcSSc 20 例） 正常人 25 例より血清を用いて miR-196a 値の検討を行った。正常人と SSc 患者で優位差は認めなかった ($p=0.90$ by Mann-Whitney test、図 4B)。しかしながら、SSc 患者における miR-196a 値と臨床所見および検査所見との相関を検討すると、SSc 患者における miR-196a 値が低下している群では有意に dcSSc : lcSSc の割合 (16 : 6 vs 4 : 14、 $p<0.05$) と modified Rodnan total skin thickness score (MRSS) (15.9 versus 7.7、 $p<0.05$) が高かった (表 2)。また pitting scar の有病率も高かった (70.6% versus 25.0%、 $p<0.05$)。

D. 考 案

本研究で我々は SSc の皮膚線維化における miR-196a の関与を検討し 3 つの知見を得た。

まず、我々は PCR Array を用いて TGF- β 1 で刺激を加えた正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞において発現が増加または低下している miRNA を同定した。 α 1(I)、 α 2(I) collagen 両方の regulator として miR-196a に注目した。miR-196a は glioblastoma や breast cancer など他の疾患ですでに検討されているものもあるが^{20,21}、SSc を含む自己免疫疾患においては miR-196a の検討が行われたものはない。

次に我々は皮膚由来線維芽細胞における miRNA の新しい target を見出した。正常皮膚由来線維芽細胞における miR-196a の低下は type I collagen の増加をもたらす、強皮症皮膚由来線維芽細胞において miR-196a の増加は type I collagen の低下をもたらした。正常線維芽細胞において、TGF- β 1 で刺激する

と miR-196a の低下を介し type I collagen の発現が増加すると考えられた。TGF- β signaling の中で Smad は重要な mediator として知られているが、近年 PKC- δ 、phosphatidylcholine-specific phospholipase C、geranylgeranyl transferase I、p38 mitogen-activated protein kinase などその他の経路が報告されている^{22,23}。miR-196a も同様に TGF- β の下流のターゲットの一つである可能性がある。強皮症皮膚由来線維芽細胞にみられる miR-196a の発現の低下は TGF- β signaling の活性化の結果であり、type I collagen の増加に何らかの役割を果たしていると考えられた。

Mauere らは miR-29a の低下が強皮症皮膚由来線維芽細胞の細胞外マトリックスの過剰発現に寄与していると報告した²⁴。我々の研究結果は、miRNA が SSc の発症に関与しているというこの報告に一致している。さらに我々は SSc において組織または血清中の miRNA 値について検討を行った。我々の行った方法で血清中の miR-196a 値を定量的に検討した報告は今までにない。SSc 患者における血清 miR-196a 値低下群で有意に dcSSc : lcSSc の割合、MRSS の値、pitting scar の有病率が高かった。従って血清 miR-196a 値は type I collagen の産生の活動性を反映し疾病マーカーとなりうると考えられた。しかしながら今回 SSc 患者と正常人の間で血清 miR-196a 値に有意な差は認めなかった。これは対象症例数が少なかった可能性もあり、今後さらなる症例数の追加による検討が必要と考えられた。

E. 結 論

SSc の線維化の過程には数多くの要因があると考えられるが、miR-196a もまたその一因を担っている可能性がある。miRNA による collagen の制御機構の解明は、miRNA を用いた新たな治療につながると考えられた。