

BLM 誘発強皮症モデルマウスの線維化と免疫異常の病態における 転写因子 Fli1 の役割についての検討

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 谷口隆志 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 市村洋平 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 高橋岳浩 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 遠山哲夫 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 野田真史 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 青笹尚彦 東京大学医学部附属病院皮膚科 助教
協力者 赤股 要 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
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

全身性強皮症では転写因子 Fli1 の発現が恒常的に低下しており、その異常が本症における線維芽細胞と血管内皮細胞の恒常的活性化に深く関与している可能性が示唆されている。今回我々は Fli1^{+/-} マウスを用いてブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症モデルマウスを作成し、転写因子 Fli1 の発現低下が BLM によって誘発される皮膚線維化に及ぼす影響を検討した。Fli1^{+/-} マウスでは、BLM 投与により野生型マウスと比較してより高度な皮膚硬化が誘導された。その機序について BLM 投与 1 週間の炎症期を含めて検討した。皮膚線維芽細胞においては、潜在型 TGF- β の活性化に関与する integrin α V β 3、integrin α V β 5 の発現が、Fli1^{+/-} マウスでは野生型マウスに比較して亢進していた。また、Fli1^{+/-} マウスでは皮膚組織へのマクロファージの浸潤が増え、特に線維化に深く関与する M2 マクロファージの浸潤が野生型マウスに比較して亢進していた。血管内皮細胞に関しては、Fli1^{+/-} マウスでは野生型マウスに比較して、線維化を促す細胞接着分子と考えられている GlyCAM-1 と ICAM-1 の mRNA の発現量が亢進していた。以上より、強皮症の病態において重要な役割を果たしていると考えられている線維芽細胞・マクロファージ・血管内皮細胞が活性化される機序に、転写因子 Fli1 の発現異常が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は血管障害と線維化を特徴とする原因不明の自己免疫疾患である。強皮症患者の病変部皮膚では、炎症や血管障害により線維芽細胞が恒常的に活性化され、細胞外マトリックスの産生亢進と分解遅延を引き起こし、結果的に細胞外マトリックスが過剰に沈着する。転写因子 Fli1 は皮膚線維芽細胞においてはヒト α 2(I) コラーゲン遺伝子の強力な

転写抑制因子として¹⁾⁻³⁾、血管内皮細胞においては血管新生の過程を制御する重要な転写因子として機能しているが⁴⁾、全身性強皮症では転写因子 Fli1 の発現が恒常的に低下しており、本症における線維芽細胞と血管内皮細胞の恒常的活性化に深く関与している^{2, 3, 4)}。一方、本症の免疫異常の病態に対して Fli1 の発現異常が及ぼす影響は、現時点では不明である。今回我々は Fli1^{+/-} マウスを用いてブレオマイシン

(BLM) 誘発強皮症モデルマウスを作成し、同モデルマウスの線維化と免疫異常の病態において Fli1 遺伝子の恒常的発現低下が及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1) BLM 誘発強皮症モデルマウスの作成

本研究では、C57BL/6 系統を遺伝的背景とする 8 週齢の Fli1^{+/-} マウスと野生型マウスを用いて BLM 誘発強皮症モデルマウスを作成した。BLM 誘発強皮症モデルマウスは、BLM (Nippon Kayaku Co. Ltd) 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 200 µg を連日皮下投与することで作成した。コントロールとして、PBS のみを BLM と同様の方法でマウスに投与した。解析にはそれぞれ 5-8 匹のマウスを用いた。いずれの研究も東京大学動物実験規則を遵守して行なった。

2) 病理組織学的検討

1 週間、4 週間の BLM および PBS 投与が終了したマウスの背部皮膚を採取し、一部をパラフィン包埋し、6 µm 切片を作成した。ヘマトキシリン & エオジン染色を行い、一検体中 10 箇所を無作為に選び、真皮の厚さを測定した。抗マウス CD4 抗体 (BD PharMingen)、抗マウス CD8 抗体 (BD PharMingen)、抗マウス F4/80 抗体 (Serotec Inc.)、抗マウス arginase1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を用いて免疫染色を行い、それぞれ陽性細胞数を 400 倍の倍率で一検体中 10 箇所を無作為に選び測定し、その平均値を求めた。また、抗 integrin β3 抗体 (BD PharMingen)、抗 integrin β5 抗体 (BD PharMingen) を用いて免疫染色を行った。

3) 皮膚におけるサイトカインの発現量の検討

各マウス皮膚より RNeasy spin column (Qiagen

inc.) を用いて mRNA を抽出し、Fli1、TGF-β1、integrin αV、integrin β3、integrin β5、IL-1β、TNFα、iNOS、arginase1、Fizz1 の発現量を定量的 real-time PCR で測定した。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に用いた。

4) 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

1) 皮膚組織における Fli1 遺伝子の mRNA の発現量の検討

最初に、Fli1^{+/-} マウスにおける転写因子 Fli1 のノックダウン効率を検討するために、皮膚組織における Fli1 遺伝子の mRNA の発現量について検討した。ベースラインでは Fli1^{+/-} マウスでは野生型に比較し、皮膚における Fli1 遺伝子の mRNA の発現量は野生型マウスの平均発現量の 40%±23% (平均値±標準偏差) に減少していた (図 1)。

2) Fli1^{+/-} マウスでは BLM 投与により皮膚硬化がより高度に生じた

BLM を 4 週間投与することによって、Fli1^{+/-} マウスでは野生型マウスに比較してより高度な皮膚硬化が誘導された (図 2)。

3) Fli1 遺伝子の発現低下が炎症期の線維芽細胞、免疫担当細胞、血管内皮細胞へ及ぼす影響

3-1) Fli1^{+/-} マウスでは、BLM 投与により皮膚線維芽細胞において integrin αVβ3、integrin αVβ5 の発現がより高度に誘導された

まずはじめに皮膚組織中における TGF-β1 遺伝子の mRNA の発現量について検討したところ、ベースライン、BLM 投与 1 週間、BLM 投与 4 週間において、Fli1^{+/-} マウスと野生型マウスで有意な差は見られなかった (図 3)。そこで、Fli1 遺伝子の発現

低下が線維芽細胞において成長因子以外に及ぼす影響について検討した。組織中では TGF- β 1 は、latency associated peptide (LAP) が結合した潜在型 TGF- β 1 として存在しており、LAP が酵素的ないしは立体構造の変化によって除去されることで活性型 TGF- β 1 となり、その生物学的な効果を発揮する⁵⁾。integrin α V β 3、integrin α V β 5 は潜在型 TGF- β 1 の受容体であり、LAP の立体構造の変化をもたらすことで TGF- β 1 を活性化することが報告されている。強皮症皮膚線維芽細胞では、これらの integrin の発現が恒常的に亢進しており、同細胞における autocrine TGF- β signaling の確立に関与している可能性が示唆されている^{6, 7, 8)}。そこで、皮膚線維芽細胞における integrin α V β 3、integrin α V β 5 の発現について検討した。ベースライン、BLM 投与 1 週間、BLM 投与 4 週間の皮膚組織での mRNA の発現量を比較したところ、Fli1^{+/-} マウスでは野生型マウスと比較して BLM 投与 1 週間において integrin α V、integrin β 3、integrin β 5 の mRNA の発現量が亢進していた (図 4)。そこで、皮膚組織の線維芽細胞における integrin β 3、integrin β 5 の免疫染色を行ったところ、Fli1^{+/-} マウス、野生型マウスともに BLM により integrin の発現が誘導されていたが、Fli1^{+/-} マウスでより高度に発現が亢進していた (図 5)。以上より、Fli1 遺伝子の発現低下が線維芽細胞において integrin の発現を亢進させ、潜在型 TGF- β 1 の活性化を通じて膠原線維産生を促進している可能性が考えられた。

3-2) Fli の発現低下は、BLM 投与 1 週間の炎症期において皮膚への M2 マクロファージの浸潤をより高度に誘導した

BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいては、BLM 投与 3 日目から皮膚組織にマクロファージを中心とした炎症細胞浸潤がみられ、継続投与により増数し、

投与 2 週間から 3 週間でピークにその後は減少していくことが報告されている⁹⁾。また、BLM 吸入による間質性肺炎モデルマウスにおいては、M2 マクロファージ浸潤が線維化の形成に関与している¹⁰⁾。強皮症皮膚組織には M2 マクロファージが多く浸潤していることから¹¹⁾、マクロファージの皮膚浸潤とそのフェノタイプの異常は線維化と密接に関係していると考えられる。皮膚組織における炎症細胞浸潤について検討したところ、Fli1^{+/-} マウスでは野生型マウスと比較して、炎症細胞数、CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数は減少していたが、F4/80 陽性のマクロファージや線維化を誘導するフェノタイプである M2 マクロファージのマーカーである arginase1 陽性細胞の浸潤は増加していた (図 6)。皮膚組織におけるサイトカイン、酵素の mRNA 発現を検討すると、全身性強皮症にて発現が亢進しているサイトカイン・酵素の mRNA が Fli1^{+/-} マウスにて亢進していた (図 7)。Fli1 遺伝子の発現低下が免疫担当細胞においても強皮症の炎症に類似した病態・線維化を促すフェノタイプを誘導するため、Fli1^{+/-} マウスでは BLM 投与により線維化が強力に誘導される可能性が示唆された。

3-3) Fli1^{+/-} マウスの皮膚では、BLM 投与により線維化を促すと考えられている細胞接着分子の発現が亢進する

次に、Fli1 遺伝子の発現低下が血管内皮細胞の形質変化に及ぼす影響について、細胞接着分子に注目して検討を行った。各種細胞接着分子のノックアウトマウスを用いた検討では、BLM 誘発性の皮膚線維化は、L-selectin 遺伝子あるいは ICAM-1 遺伝子の欠失により抑制されるが、P-selectin 遺伝子あるいは E-selectin 遺伝子の欠失では亢進する¹²⁾。このことから、GlyCAM-1 (L-selectin と結合する) と ICAM-1 は線維化促進に関与する細胞接着分子、P-

selectin と E-selectin は線維化抑制に関与する細胞接着分子と考えられる。BLM 投与 1 週間の炎症期の皮膚組織にてこれらの細胞接着分子の mRNA の発現量を検討したところ、Fli1^{+/-} マウスでは野生型マウスに比較して GlyCAM-1 遺伝子、ICAM-1 遺伝子の mRNA の発現量が亢進していた (図 8)。以上より、血管内皮細胞においても Fli1 遺伝子の発現低下が線維化を促す細胞接着分子の発現パターンを誘導し、線維化の亢進に寄与している可能性が示唆された。

D. 考 案

全身性強皮症では転写因子 Fli1 の発現が恒常的に低下しており、この異常が本症における皮膚線維芽細胞と血管内皮細胞の恒常的活性化に関与している可能性が示唆されている。一方、本症の免疫異常の病態に対して Fli1 の発現異常が及ぼす影響は不明であった。今回の BLM 誘発強皮症モデルマウスを用いた検討では、Fli1^{+/-} マウスにおいて野生型マウスに比較して BLM によって皮膚線維化がより高度に誘発され、転写因子 Fli1 が強皮症の病態に深く関与するとする仮説を支持する結果となった。そこで、その機序について、強皮症の病態に重要である線維芽細胞、免疫担当細胞、血管内皮細胞に注目し、BLM によって誘発される炎症期において検討した。線維芽細胞においては、Fli1 遺伝子の発現低下により BLM による integrin α V β 3、integrin α V β 5 の発現がより高度に亢進することが示唆された。Fli1 の発現低下が integrin の発現亢進を通じて、潜在型 TGF- β 1 の活性化をもたらす膠原線維産生を促進している可能性が考えられた。

免疫担当細胞については、BLM 投与により引き起こされる炎症において、Fli1^{+/-} マウスでは野生型マウスに比較してマクロファージの浸潤が亢進していた。特に arginase1 (線維化と深く関連する M2 マ

クロファージのマーカー) 陽性細胞の浸潤が増加していた。このことから、BLM 投与による皮膚における炎症細胞浸潤についても、Fli1 遺伝子の発現低下がマクロファージの浸潤増加やそのフェノタイプの変化に関与し、線維化を誘導している可能性が考えられた。

血管内皮細胞においても、Fli1 遺伝子の発現低下により、線維化促進に関与する細胞接着分子である GlyCAM-1 と ICAM-1 の発現が亢進した。以上の結果から、Fli1 遺伝子の発現低下が血管内皮細胞における細胞接着分子の発現を変化させ、線維化の亢進に寄与している可能性が示唆された。

今回我々は BLM 誘発強皮症モデルマウスを用いて転写因子 Fli1 の発現低下が皮膚線維化の病態に及ぼす影響を検討した。今回の検討結果により、強皮症の発症に重要な役割を果たしていると考えられている線維芽細胞・免疫担当細胞・血管内皮細胞の全てにおいて、転写因子 Fli1 の発現低下が線維化を促す形質変化を誘導する可能性が示唆された。以上の検討結果は、転写因子 Fli1 が全身性強皮症の治療戦略における新たな target となりうる可能性を示している。

E. 結 論

Fli1 遺伝子の恒常的な発現低下は、皮膚線維芽細胞、皮膚血管内皮細胞、マクロファージにおいて線維化に関連した形質変化を誘導し、全身性強皮症の病態形成に関与している可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Czuwara-Ladykowska J, Shirasaki F, Jackers P, Watson DK, Trojanowska M.: Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276: 20839-48

2. Asano Y, Markiewicz M, Kubo M, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol.* 2009; 29: 425-34
 3. Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, Jablonska S, Blaszczyk M, Watson DK, Trojanowska M. Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol.* 2003; 163: 571-81
 4. Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol.* 2010; 176: 1983-98
 5. Annes, J. P., J. S. Munger, and D. B. Rifkin. Making sense of latent TGF- β activation. *J. Cell Sci.* 2003; 116: 217-224
 6. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Involvement of α v β 5 integrin-mediated activation of latent transforming growth factor β 1 in autocrine transforming growth factor β signaling in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 2897-905
 7. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Increased expression of integrin α v β 3 contributes to the establishment of autocrine TGF- β signaling in scleroderma fibroblasts. *J Immunol.* 2005; 175: 7708-18.
 8. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Increased expression levels of integrin α v β 5 on scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol.* 2004; 164: 1275-92
 9. Takagawa S, Lakos G, Mori Y, Yamamoto T, Nishio-ka K, Varga J. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor- β /Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2003; 121: 41-50
 10. Gibbons MA, MacKinnon AC, Ramachandran P, Dhaliwal K, Duffin R, Pythian-Adams AT, van Rooijen N, Haslett C, Howie SE, Simpson AJ, Hirani N, Gauldie J, Iredale JP, Sethi T, Forbes SJ. Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184: 569-81
 11. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, Yonemura Y, Komohara Y, Takeya M, Mitsuya H, Ihn H. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12: R128
 12. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J Immunol.* 201; 185: 2502-15
- 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

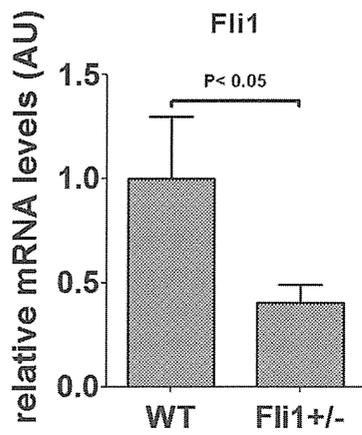


図1：皮膚組織における Fli1 遺伝子の mRNA の発現量
皮膚における Fli1 遺伝子の mRNA の発現量は、Fli1^{+/-} マウスでは野生型マウスの 40%±23% (平均値±標準偏差) に減少していた。

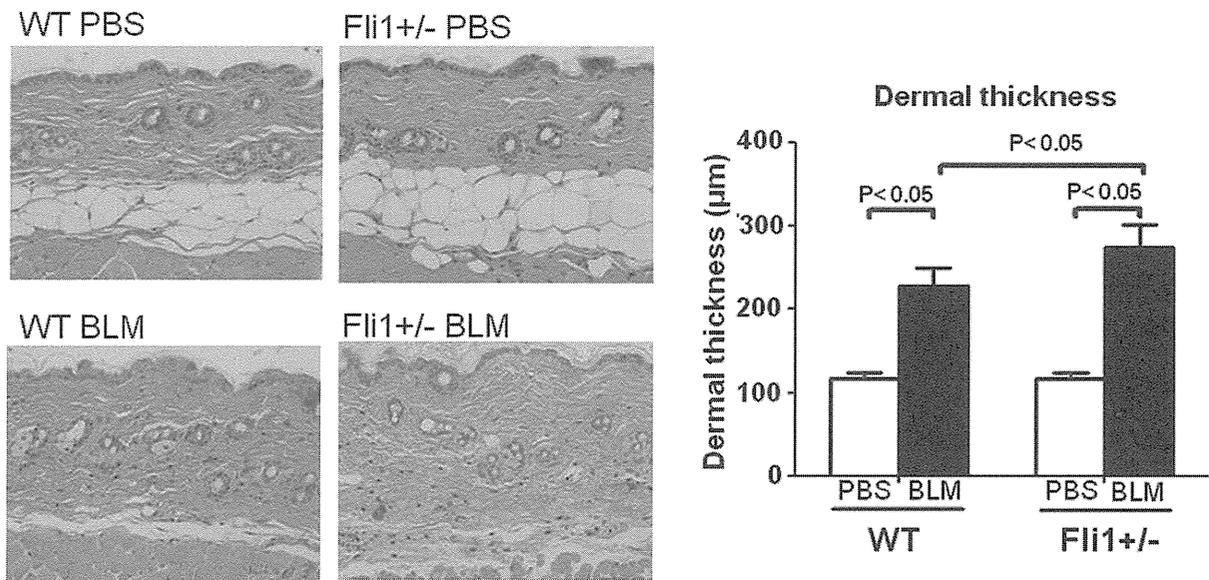


図2：BLM 投与 4 週間における Fli1^{+/-} マウスと野生型マウスにおける皮膚組織の比較
Fli1^{+/-} マウスでは BLM 投与 4 週間で野生型マウスに比較して、皮膚硬化がより高度に誘導された。

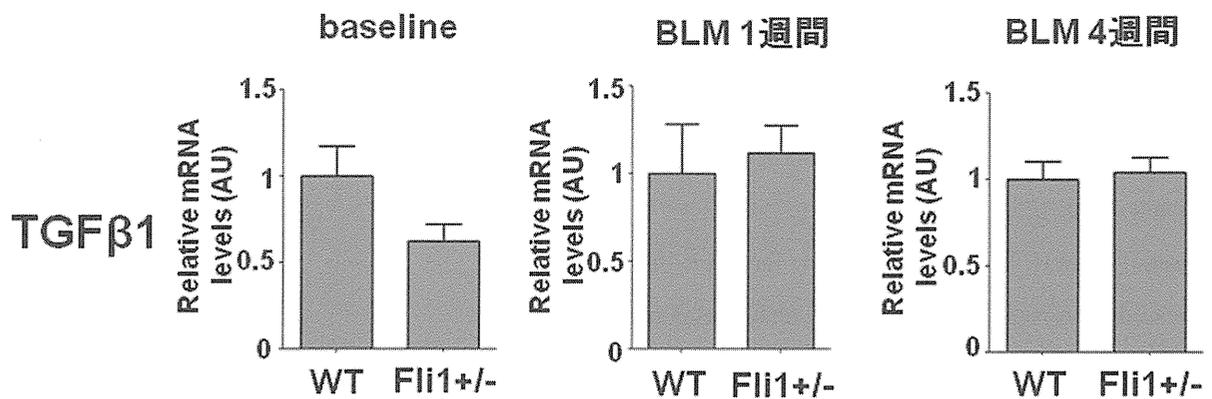


図3：ベースライン、BLM 投与 1 週間、BLM 投与 4 週間での皮膚組織における TGF-β1 遺伝子の mRNA の発現量
Fli1^{+/-} マウス、野生型マウスで TGF-β1 遺伝子の mRNA の発現量に有意な差は見られなかった。

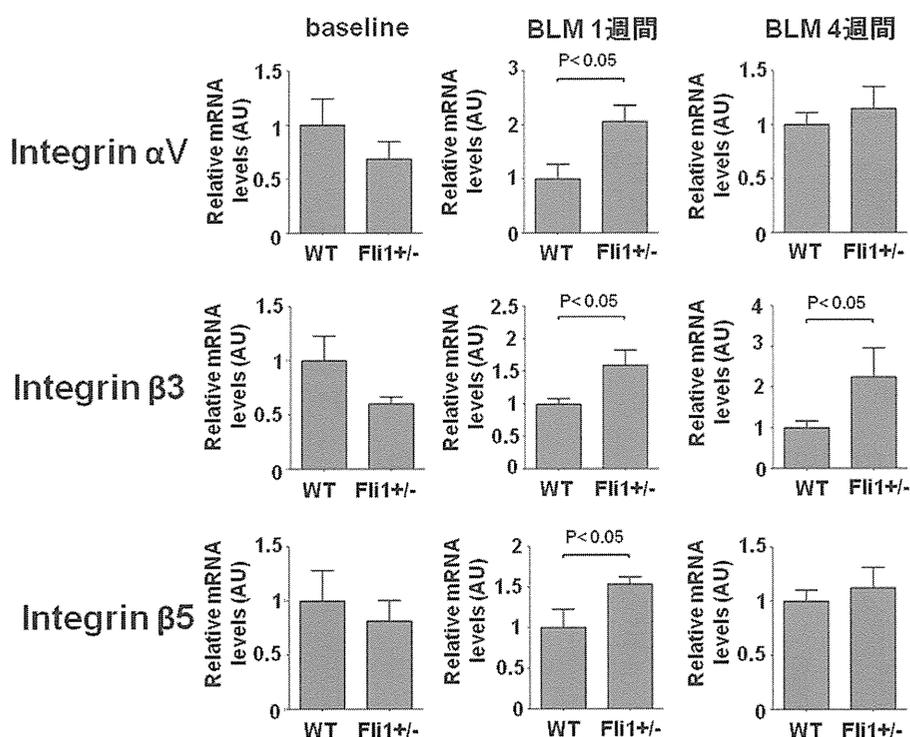


図4：ベースライン、BLM投与1週間、BLM投与4週間での皮膚における integrin αV 遺伝子、integrin β3 遺伝子、integrin β5 遺伝子の mRNA の発現量
 BLM投与1週間の炎症期皮膚において Fli1^{+/-} マウスでは野生型マウスに比較して integrin αV 遺伝子、integrin β3 遺伝子、integrin β5 遺伝子の mRNA の発現量が亢進していた。

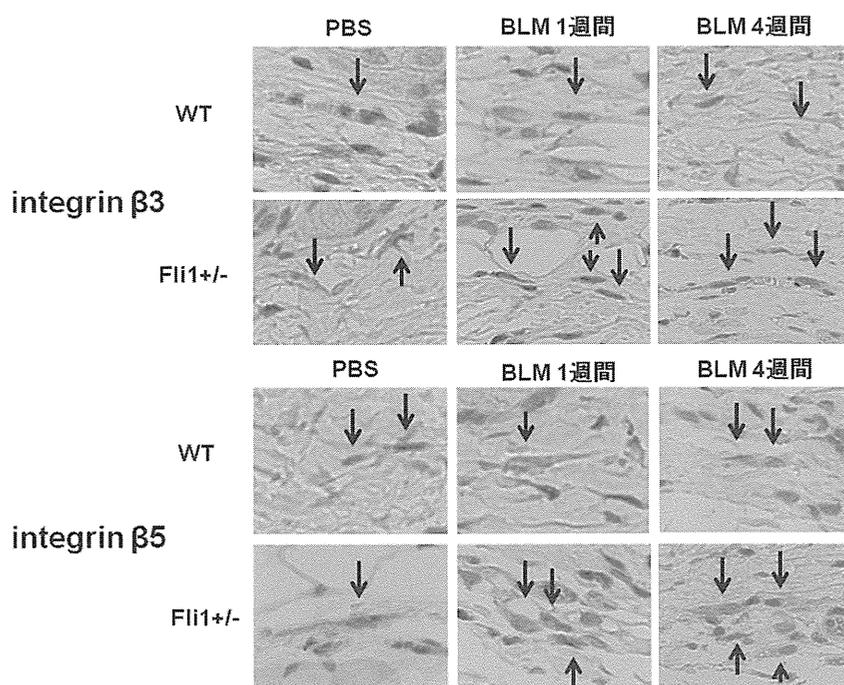


図5：PBS投与、BLM投与1週間、BLM投与4週間での皮膚線維芽細胞における integrin β3 蛋白、integrin β5 蛋白の発現量
 野生型マウスにおいても BLM投与によって皮膚線維芽細胞の integrin β3、integrin β5 の発現が誘導されたが、Fli1^{+/-} マウスではより高度に発現が誘導された。

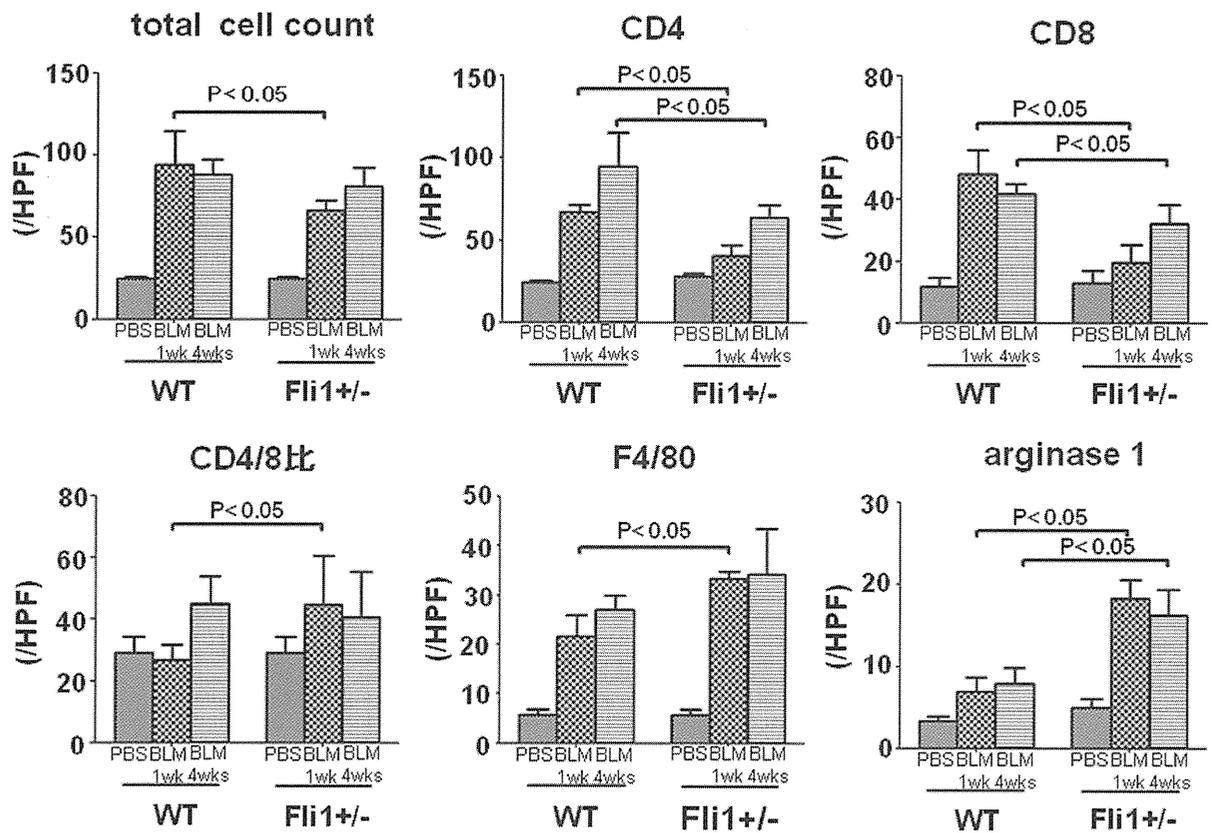


図6：PBS投与、BLM投与1週間、BLM投与4週間での真皮への浸潤細胞数、CD4陽性細胞数、CD8陽性細胞数、F4/80陽性細胞数、arginase1陽性細胞数

Fli1^{+/-}マウスでは野生型マウスに比較してCD4陽性細胞、CD8陽性細胞の浸潤は抑制されていた。一方でF4/80陽性のマクロファージの浸潤が亢進していた。また、M2マクロファージのマーカであるarginase1陽性細胞の浸潤もFli1^{+/-}マウスでは野生型マウスに比較して亢進していた。

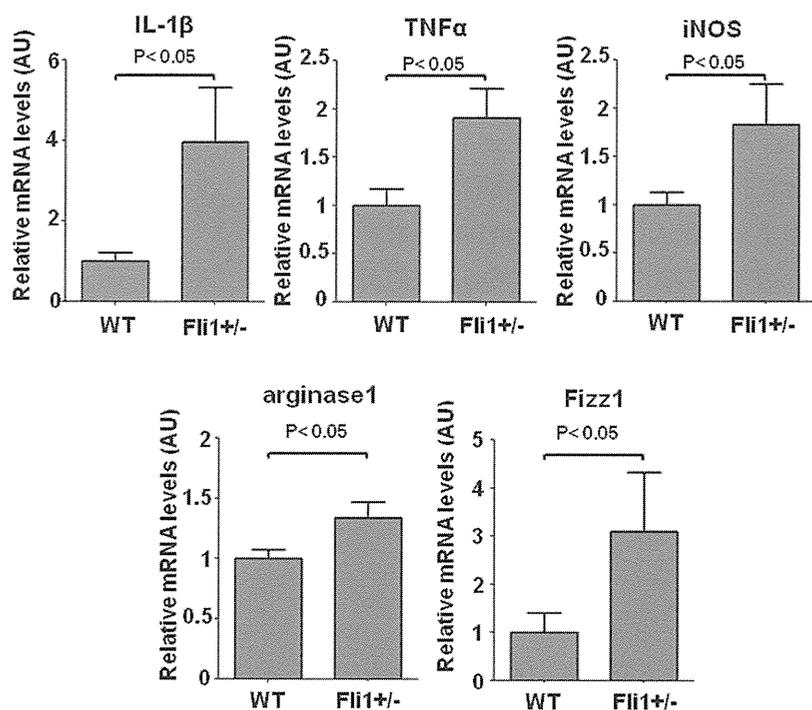


図7：BLM投与1週間での皮膚組織でのサイトカイン・酵素の発現量
 強皮症にて上昇しているサイトカイン・酵素やM2マクロファージのマーカーの
 mRNAの発現量が上昇していた。

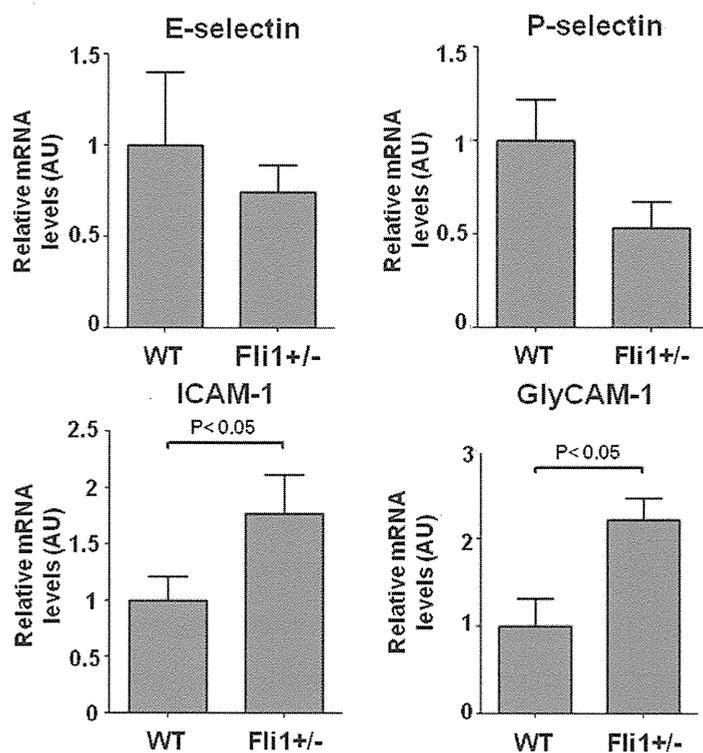


図8：BLM投与1週間での皮膚組織での細胞接着分子の発現量
 Fli1^{+/-}マウスは野生型マウスに比較してBLM投与1週間の炎症期に、
 線維化促進に関連する細胞接着分子であるGlyCAM-1とICAM-1の
 mRNAの発現量が亢進していた。

ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの線維化および免疫異常における Toll 様受容体 4 の役割についての検討

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 高橋岳浩 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 赤股 要 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 谷口隆志 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 野田真史 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 市村洋平 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 遠山哲夫 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
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

Toll 様受容体 (TLR) 4 はグラム陰性菌の構成成分であるリポ多糖 (LPS) を認識し、広く自然免疫系において重要な役割を果たしている。一方、近年、非感染性の慢性炎症および自己免疫疾患においても、その病態形成において TLR4 が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。今回我々は、C57BL/6 系統を遺伝的背景とする野生型マウスおよび TLR4 ノックアウトマウスを用いてブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを作成し、同モデルの皮膚・肺の線維化の病態において TLR4 が果たしている役割について検討した。TLR4 ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較してブレオマイシンによる皮膚と肺の線維化が有意に抑制され、皮膚への炎症細胞浸潤とサイトカイン産生も有意に抑制された。以上の結果から、ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの皮膚・肺の線維化の病態において、TLR4 を介したマクロファージ等の炎症細胞の活性化の重要性が示唆された。

A. 研究目的

免疫系の重要な役割は、感染症の原因となる病原体の侵入を認識し、それを排除することにある。免疫系は大きく獲得免疫系と自然免疫系に分かれ、自然免疫系は獲得免疫系における抗体のような特異的な病原体認識機構を持たず、広く細菌、真菌などに病原体に共通の構造を認識して、感染防御反応を誘導する免疫系であり、この免疫系において中心的な役割を果たしているのが Toll 様受容体 (TLR) である^[1]。近年、TLR はこのような病原体などの異物を認識するだけでなく、炎症などによって生じる自己の成分に対する応答にも関与していることが報告

されている^[2]。

TLR には現在 10 種類の存在が知られており、そのうち TLR4 はグラム陰性菌の外膜の構成成分であるリポ多糖 (LPS) を認識する受容体として最もよく研究されている TLR の一つであるが、上記のように自己に対する炎症・免疫応答、すなわち非感染性の慢性炎症疾患、自己免疫疾患における重要な役割が示唆されてきている^[3]。

今回我々は TLR4 ノックアウトマウスを用いて、ブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症モデルマウスを作成し、野生型マウスとの比較を行うことで、本モデルマウスの線維化、免疫異常における TLR4 の

役割について検討した。

B. 研究方法

1) マウス

6-8 週齢の C57BL/6 系統を遺伝的背景とする野生型マウスおよび TLR4 ノックアウトマウスを用いて、BLM 誘発強皮症モデルマウスを作成した。BLM 誘発強皮症モデルマウスは BLM (Nippon Kayaku Co. Ltd., Tokyo) をリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) に 1 mg/ml になるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛した各マウスの背部皮膚へ 3 週間にわたり 27 ゲージの注射針で 300 μ g を隔日皮下投与することで作成した。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 6 匹以上のマウスを用いた。いずれの研究においても東京大学動物実験規則を遵守した。

2) 組織学的評価

3 週間の BLM あるいは PBS 投与を終了した各マウスから、最終投与日の翌日に背部皮膚および肺を採取し、一部をパラフィン包埋し、6 μ m 切片を作成した。ヘマトキシリン&エオジン染色を行い、皮膚については一検体中 5 カ所を無作為に選び、真皮の厚さを測定した。肺に関しては左肺中葉の無作為に選ばれた部分を 100 倍の拡大率で観察し、線維化の程度を Ashcroft らの提唱するスコアで評価した^[4]。抗マウス F4/80 抗体を用いて免疫染色を行い、マクロファージ数を 400 倍の拡大率で一検体中 5 カ所を無作為に選びカウントした。同様にトルイジンブルー染色した皮膚検体において肥満細胞数をカウントした。さらに、抗マウス MCP-1 抗体を用いて免疫染色を行い、MCP-1 陽性細胞数をカウントした。

3) 皮膚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

含まれるアミノ酸で、その量はコラーゲン量を反映する。皮膚における線維化を評価するため、皮膚 4mm パンチ検体におけるヒドロキシプロリン量を Total Collagen Assay Kit (QuickZyme Biosciences, Leiden, Netherlands) を用いて測定した。

4) 皮膚および肺におけるサイトカインの発現量の検討

各マウス皮膚および肺より RNeasy spin column (Quiagen Inc., Crawley, UK) を用いて mRNA を抽出し、MCP-1、IL-6、TNF- α 、IL-1 β の発現量を real time RT-PCR にて測定した。

5) 血清中のサイトカインの検討

BLM の投与が終了したマウスより血清を採取し、MCP-1、IL-6 の濃度を ELISA キットにより測定した (R&D systems, Minneapolis, MN)

6) 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

TLR4 ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比較して BLM により誘発される真皮の肥厚が有意に抑制されていた。また、BLM 投与後の TLR4 ノックアウトマウスでは、BLM 投与後の野生型マウスに比較してヒドロキシプロリン量は有意に低下していた (図 1、各 p<0.05)。肺においても同様に、TLR4 ノックアウトマウスの BLM 群では、野生型マウスの BLM 群と比較して、肺胞隔壁の肥厚および炎症細胞浸潤の程度は抑制されており、Ashcroft らによる肺の線維化スコアについても TLR4 ノックアウトマウスの BLM 群では野生型マウスの BLM 群に比較して有意に低値を示した (図 2、p<0.05)。

皮膚および肺組織中における炎症性サイトカインの mRNA の発現量について RT-PCR 法にて検討し

たところ、いずれの組織においても、TLR4 ノックアウトマウスの BLM 群では野生型マウスの BLM 群に比較して MCP-1、IL-6、TNF- α 、IL-1 β の発現が有意に低下していた（図 3、各 $p < 0.05$ ）。さらに、全身性強皮症および BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて線維化の病態に重要と考えられている MCP-1、IL-6 について、ELISA 法で血清中濃度を測定したところ、野生型マウスの BLM 群に比較して TLR4 ノックアウトマウスの BLM 群では有意に低値を示した（図 4、各 $p < 0.05$ ）。

次に、皮膚における炎症細胞浸潤を比較するため、背部皮膚におけるマクロファージ、マスト細胞をそれぞれ F4/80 染色、トルイジンブルー染色にて検討したところ、BLM 依存性の細胞浸潤は、野生型マウスに比較して TLR4 ノックアウトマウスで有意に抑制されていた（図 5、 $p < 0.05$ ）。

さらに、浸潤単核球における MCP-1 の発現量について免疫染色により検討した。野生型マウスでは、PBS 群に比較して BLM 群において MCP-1 陽性細胞数の著明な上昇がみられたが、TLR4 ノックアウトマウスでは PBS 群に比較して BLM 群で若干の陽性細胞の増加は見られたものの、野生型マウスに比較して増加の程度は有意に抑制されていた（図 6、 $p < 0.05$ ）。

D. 考 察

TLR はパターン認識受容体ファミリーに属し、自然免疫系において病原体の認識と炎症性シグナル応答に重要であることが知られている。このうち、TLR4 は病原体センサーとしてグラム陰性菌の構成成分である LPS を認識し、細菌感染の免疫応答に中心的な役割を果たしているとされる。一方で、非感染性の慢性炎症にも TLR が関与していることが報告されており、このような病態においては自己の

細胞から分泌される代謝産物、死細胞や細胞外基質より放出される因子（例：ヒアルロン酸、HMGB-1、熱ショックタンパク質、ファイブロネクチン細胞外ドメイン）が内因性リガンドとして作用していると考えられている^[2]。

これまでも、例えば関節リウマチにおける TLR4 とその内因性リガンドであるヒアルロン酸、HMGB-1、ファイブロネクチン細胞外ドメインの関与^[5, 6]、SLE における TLR7/8 とその内因性リガンドである RNA^[7] など、自己免疫性疾患における TLR の役割について報告されているが^[3]、最近になって Bhattacharyya らにより全身性強皮症における TLR4 の関与が報告された^[8]。それによると、全身性強皮症患者の皮膚においては TLR4 の発現、および、ファイブロネクチン細胞外ドメイン、Tenascin-C、ヒアルロン酸などの TLR4 の内因性リガンドの発現が亢進しており、*in vitro* では、ヒト皮膚線維芽細胞において、TLR4 シグナリングの活性化が TGF- β 1 によるコラーゲン産生亢進を増強し、強皮症における線維化の病態に寄与する、との知見が報告されている。また、Yoshizaki らは、全身性強皮症患者血清中における TLR4 の内因性リガンド、すなわちヒアルロン酸、HMGB-1 濃度が疾患重症度と相関していると報告している^[9, 10]。

さらに、全身性強皮症の病態モデルとして広く用いられている BLM 誘発強皮症モデルマウス^[11] においても、TLR4 のさまざまな関与が報告されている。*in vitro* では BLM 投与は血管内皮細胞、線維芽細胞によるフリーラジカル産生を促し、そのフリーラジカルによる酸化ストレス刺激で線維芽細胞がヒアルロン酸など TLR の内因性リガンドの産生を亢進させると報告されている^[12-14]。また、*in vivo* では前出の Bhattacharyya らの報告によると^[8]、① TLR4 の細胞内シグナリングドメインにミスセンス変異を

有することで知られる C3H/HeJ マウスを用いて BLM 誘発強皮症モデルマウスを作成したところ、野生型マウスに比較して皮膚硬化が減弱した、②野生型マウスにおいても C3H/HeJ マウスにおいても、BLM 処理により、皮下注射局所皮膚でのファイブロネクチン細胞外ドメイン、Tenascin-C といった TLR4 の内因性リガンドの発現の著明な亢進が見られた、としている。しかし、当研究における BLM 誘発強皮症モデルマウスに用いられたマウス C3H/HeJ マウスは TLR4 の細胞内シグナリングドメインのミスセンス変異以外にも染色体の逆位など様々な遺伝子異常、染色体の異常を有しており^[15,16]、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける TLR4 シグナリングの役割を純粹に評価するためには、TLR4 ノックアウトマウスでの評価が必要と考えられる。本研究では TLR4 ノックアウトマウスを用いて BLM 誘発強皮症モデルマウスを作成し、野生型マウスとの相違を比較検討することで、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける線維化と免疫異常の病態において TLR4 の果たす役割を検討した。

今回の検討において、TLR4 ノックアウトマウスで皮膚硬化および肺の線維化が有意に抑制された理由として

① BLM 皮下注射局所組織中の TLR4 内因性リガンドに対する反応の欠如からマクロファージ等の炎症細胞の浸潤が有意に減少し、

② TLR4 シグナリングの欠如によりそれらの細胞からの MCP-1 等の pro-fibrotic cytokine の発現が有意に減弱した

ことが考えられる。今回の検討では BLM 投与開始 3 週間で検体を採取した。BLM 投与局所皮膚における MCP-1 の発現は投与開始後 2-3 週間後の「炎症期」では浸潤単核球に多いが、4 週以降では線維芽細胞により強く見られるようになるとの報告があ

る^[17]。長期における線維化の維持については、TLR4 シグナリング増強による TGF β 1 刺激の増強など、他の機序でも TLR4 が線維化に関与する可能性も考えられる。また、ヒアルロン酸、HMGB-1 など TLR4 の内因性リガンドとされるものは他の TLR (TLR2 など) の内因性リガンドとも言われており、これらの関与についても検討の余地がある。

これまでの既報告、および今回の検討結果を踏まえて、特に初期の「炎症期」における BLM 誘発モデルマウスの線維化成立の機序としては以下のような仮説をたてることが可能と思われる。すなわち、① BLM 投与により局所皮膚での血管内皮細胞などからのフリーラジカルの産生、酸化ストレスが誘導される ②線維芽細胞からヒアルロン酸、HMGB-1 など TLR4 内因性リガンドの産生が上昇する ③ TLR4 を介したマクロファージなどの炎症細胞の異常活性化、MCP-1 等の pro-fibrotic cytokine の産生が上昇する ④線維芽細胞によるコラーゲンの産生亢進と線維化、という機序である。このような機序に加えて、既報告のような線維芽細胞における TLR4 シグナリングによる TGF- β 1 などの産生亢進、他の TLR を介した内因性リガンドの関与などが複雑に相互作用して BLM による線維化の誘発に帰結すると考えられ、これらは全身性強皮症における線維化の機序にも関連するものと考えられる。

E. 結 論

TLR4 ノックアウトマウスでは BLM により誘発される皮膚および肺の線維化、および、皮膚組織中での炎症性サイトカインの発現が減弱した。BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚・肺の線維化の病態において、TLR4 を介したマクロファージ等の炎症細胞の活性化の重要性が示唆された。

F. 文 献

1. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.
2. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 446-58.
3. Drexler SK, Foxwell BM. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 506-18.
4. 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.
5. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis and rheumatism* 2003; 48: 971-81.
6. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 31332-9.
7. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *The Journal of experimental medicine* 2005; 202: 1171-7.
8. Bhattacharyya S, Kelley K, Melichian DS, et al. Toll-Like Receptor 4 Signaling Augments Transforming Growth Factor-beta Responses: A Novel Mechanism for Maintaining and Amplifying Fibrosis in Scleroderma. *The American journal of pathology* 2013; 182: 192-205.
9. Yoshizaki A, Komura K, Iwata Y, et al. Clinical significance of serum HMGB-1 and sRAGE levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J Clin Immunol* 2009; 29: 180-9.
10. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, et al. Clinical significance of serum hyaluronan levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *The Journal of rheumatology* 2008; 35: 1825-9.
11. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *The Journal of investigative dermatology* 1999; 112: 456-62.
12. 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.
13. Asai T, Ohno Y, Minatoguchi S, et al. The specific free radical scavenger edaravone suppresses bleomycin-induced acute pulmonary injury in rabbits. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2007; 34: 22-6.
14. 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. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1996; 14: 131-8.
15. Akeson EC, Donahue LR, Beamer WG, et al. Chromosomal inversion discovered in C3H/HeJ mice. *Genomics* 2006; 87: 311-3.
16. Sundberg JP, Boggess D, Silva KA, et al. Major locus on mouse chromosome 17 and minor locus on chromosome 9 are linked with alopecia areata in C3H/HeJ mice. *The Journal of investigative dermatology* 2003; 120: 771-5.

17. Yamamoto T, Nishioka K. Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *The Journal of investigative dermatology* 2003; 121: 510-6.

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

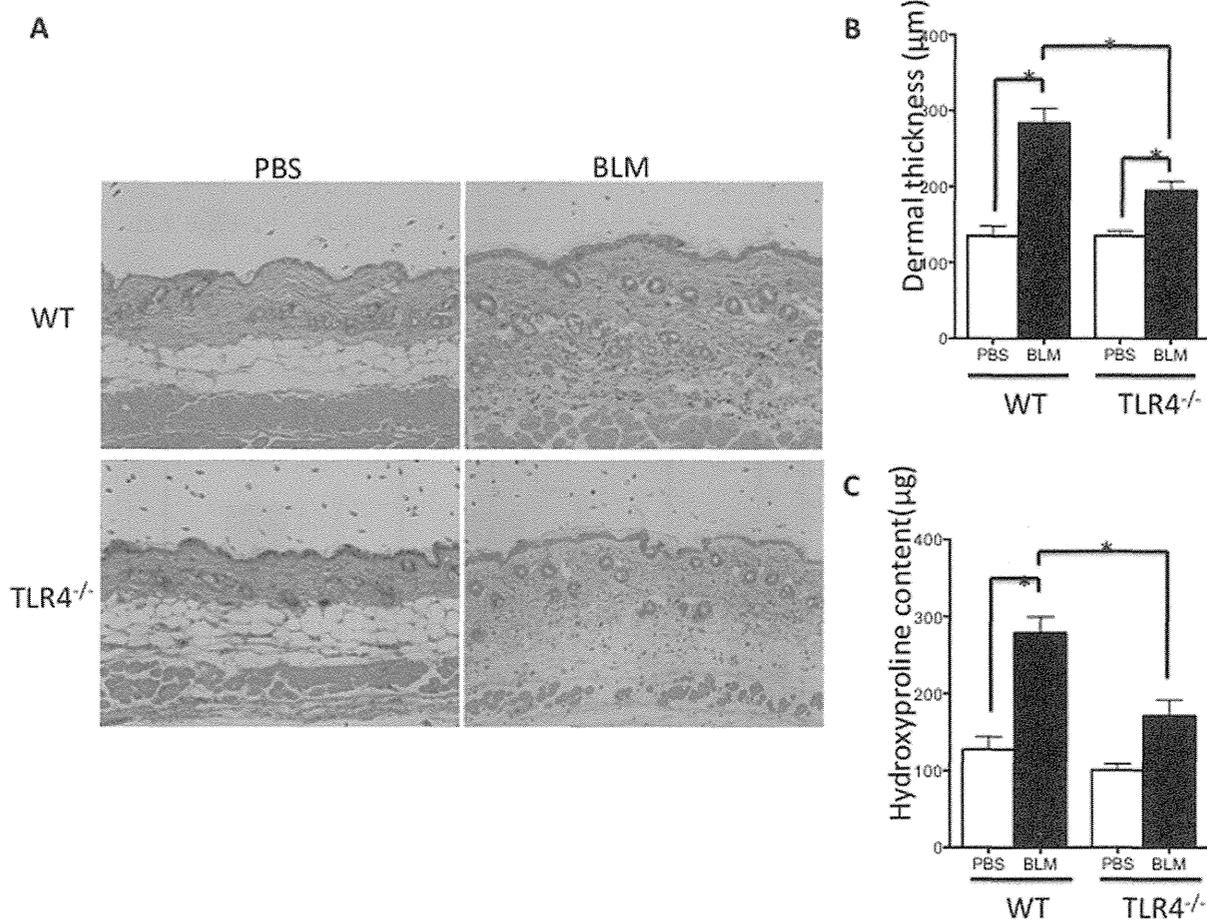


図1: BLM誘発強皮症モデルマウスにおける皮膚硬化 (A; H & E 染色、200倍)。真皮の厚さを各群において比較した (B)。また、ハイドロキシプロリン量を示した (C)。* p < 0.05

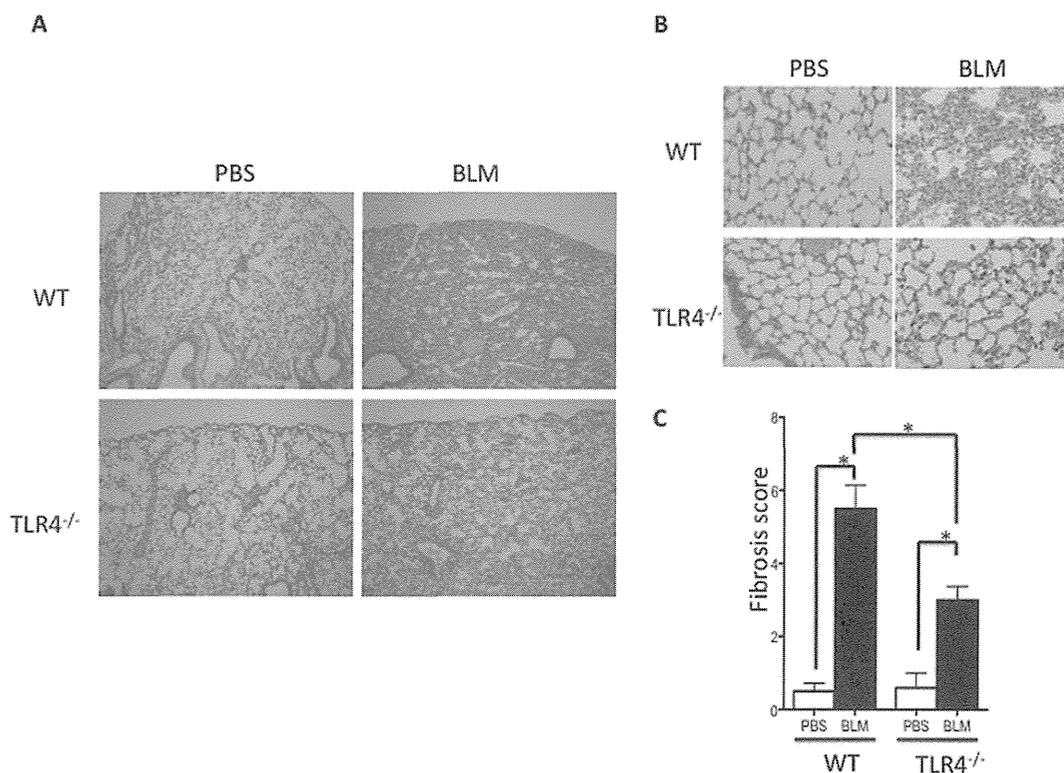


図2：BLM誘発強皮症モデルマウスにおける肺の線維化（A；H & E染色、200倍）（B；H & E染色、400倍）。線維化の程度をスコアリングした（C）。* $p < 0.05$

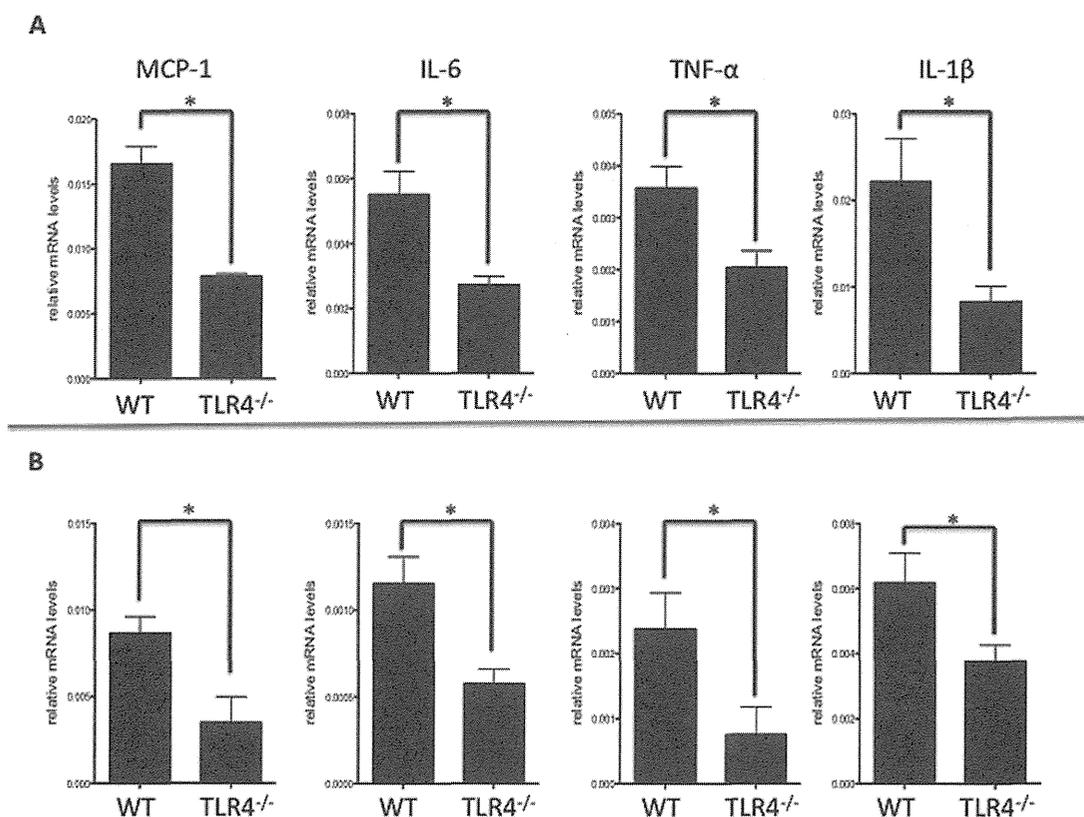


図3：BLM誘発強皮症モデルマウスの皮膚（A）、肺（B）における各種サイトカインのmRNAの発現量。* $p < 0.05$

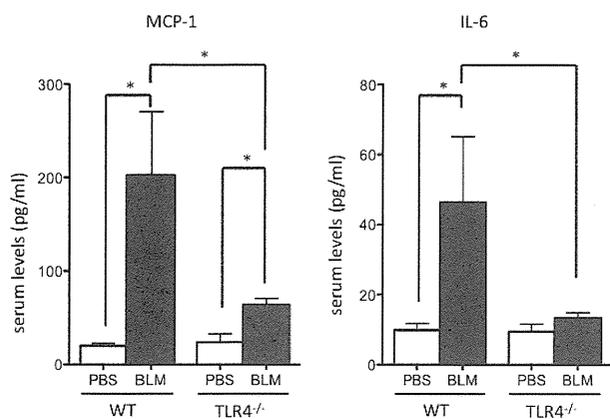


図4：BLM誘発強皮症モデルマウスにおける血清中サイトカイン濃度。* p<0.05

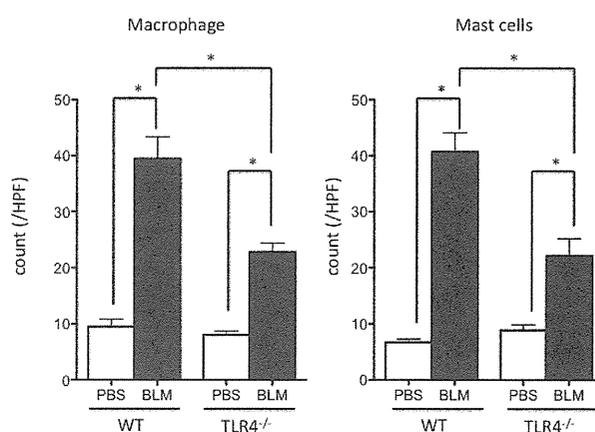


図5：BLM誘発強皮症モデルマウスの皮膚におけるマクロファージおよびマスト細胞の浸潤数の比較。* p<0.05

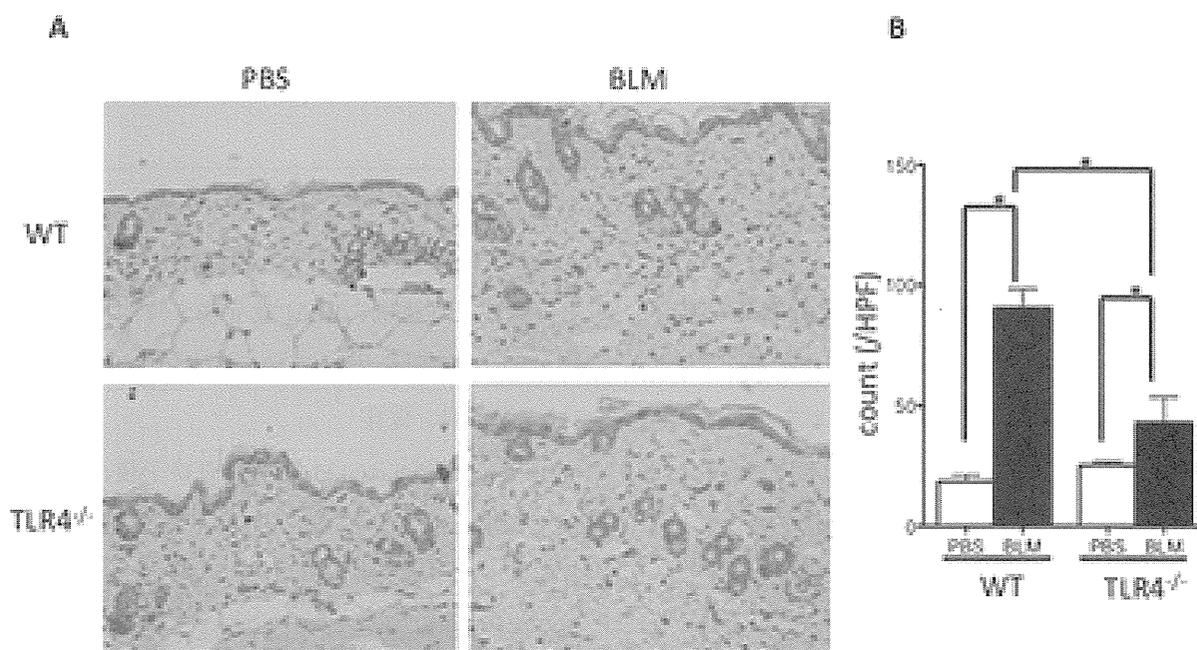


図6：BLM誘発強皮症モデルマウスの皮膚におけるMCP-1免疫染色(A)。また、高視野倍率にて陽性細胞数をカウントし、各群で比較した(B)。* p<0.05

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルマウスにおける リゾホスファチジン酸阻害薬の効果についての検討

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 大橋威信 福島県立医科大学医学部皮膚科 大学院生

研究要旨

リゾホスファチジン酸 (LPA) は G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) を介し、多彩な機能を発揮する生理活性脂質である。その役割として線維芽細胞の運動促進活性、種々の細胞において炎症性サイトカインの発現誘導活性を持ち、炎症や組織修復に機能することが示唆されている。近年、LPA₁ 受容体欠損マウスではブレオマイシン誘導性皮膚硬化が抑制されており、LPA は高親和性 LPA₁ 受容体を介して、ブレオマイシン誘導モデルマウスにおける線維化の重要なメディエーターであることが明らかにされた。今回我々は、ブレオマイシン誘導性皮膚硬化に対する LPA₁ および LPA₃ 阻害薬 Ki16425 の効果を検討した。C3H/HeJ マウスの背部に、ブレオマイシン (250 µg/ml) を皮内注射し、6 時間後に Ki16425 (1 mg/kg/day、10 mg/kg/day) を同部位に局注する処理を、週 3 回 4 週間繰り返した。組織学的に、Ki16425 投与群でどちらの濃度においても皮膚硬化は抑制される傾向がみられた。現在さらに検討中である。

A. 研究目的

我々は、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。今回、このモデルを用いて LPA 阻害薬を投与し、ブレオマイシン誘導皮膚硬化および肺線維化に与える影響について検討した。

B. 研究方法

1) BLM による皮膚硬化の誘導

C3H/HeJ マウス (6 週令、雌) の背部にブレオマイシン (BLM) (Nippon Kayaku Co. Ltd.) をリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) に 250 µg/ml となるように溶解し、週 3 回 (月・水・金) を 4 週間、27G 針を用いて 100 µl ずつ皮下投与した。

2) LPA 阻害薬 (Ki16425) の投与

BLM 投与部位に、Ki16425 (Santa Cruz Biotechnology) を、オリーブオイルに溶解し、濃度を 1

mg/kg、10 mg/kg となるように調節し、週 3 回 (月・水・金) を 4 週間、BLM 投与後 8 時間間隔を開けてから、27G 針を用いて 100 µl ずつ皮下投与した。

3) 皮膚採取、保存

BLM および Ki16425 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、背部を 8 mm パンチで表皮から皮下脂肪を含めた皮膚全層で採取した。検体は半割し、ホルマリン固定ならびに -80°C で冷結保存した。

4) 組織病理学的検討

標本は HE、toluidin blue 染色を施行した。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。

5) 皮膚および肺組織中のコラーゲン定量

Sircol Collagen Assay kit (Bioolor) を用いて、真皮内および肺組織内コラーゲンの定量を行った。1 mol CH₃COOH で組織片をホモジェネードしたの

ち、上記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。

6) RNA 抽出と Realtime RT-PCR

Total RNA は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて抽出した。Total-RNA (500~1000 µg/ml) を TURBO DNA-free kit (Applied BioSystems Japan) を用いて DNase 処理を行った。cDNA は Total RNA 1.25~2.5 µg から High Capacity RNA to cDNA kit (Applied BioSystems Japan) を用いて作成した。collagen α1(I) の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)。

collagen α1 (I)

5'CAGGGTATTGCTGGACAACGTG3'

3'GGACCTTGTTTGCCAGGTTCA5'

Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems Japan) を用いて sample を調節し、realtime PCR を行った。

7) 統計学的検討

2 群間の分布は Mann-Whitney U-test を使用し、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

1) 皮膚硬化および肺線維化の抑制

Ki16425 投与群 (1 mg/kg、10 mg/kg) は PBS 投与群と比較し、皮膚組織では HE 染色、Masson trichrome 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おり、組織学的な皮膚硬化の抑制がみられた (図 1)。膠原線維束の肥厚には、Ki16425 の濃度の違いによる有意差は認められなかった (図 2)。肺組織においては、肺胞壁の浮腫を伴う肥厚の減少、炎症細胞浸潤の減少を認めた (図 6)。

2) 肥満細胞浸潤抑制

Ki16425 投与群は PBS 投与群に比較して、真皮内、

肺組織内ともに肥満細胞数が有意に減少していた。浸潤した肥満細胞数には、Ki16425 投与濃度による有意差は認められなかった (図 3)。

3) コラーゲン量の変化

Ki16425 投与群で、皮膚および肺組織内のコラーゲン量は PBS 投与群に比べて減少する傾向が認められた (図 4、7)。

4) collagen α1 (I) mRNA の発現

Ki16425 投与群で、collagen α1 (I) mRNA の発現量は PBS 投与群に比べて抑制される傾向が認められた (図 5)。

D. 考案

BLM 投与により誘導された皮膚硬化および肺線維化は、LPA₁ および LPA₃ 阻害薬である Ki16425 の同日内投与で抑制された。Ki16425 の投与する濃度としては、1 mg/kg/day、10 mg/kg/day ともに皮膚硬化および肺線維化抑制の程度には有意差は見られず、低濃度の Ki16425 によっても線維化は抑制されることがわかった。

今回我々の検討では、Ki16425 投与によって真皮内に浸潤する肥満細胞数が減少した。これまでの報告で、片側尿管閉塞で誘導される尿細管間質性線維症モデルマウスでは総 LPA 濃度と LPA₁ の mRNA 量が増加し、LPA₃ の mRNA が減少しており、LPA₁ 遺伝子欠損マウスではこのモデルによる線維症の症状が緩和されていることがわかっている。また、尿細管間質性線維症モデルマウスにおいて Ki16425 投与により TGF-β、CTGF mRNA 量の減少が報告されている¹⁾。この結果は皮膚硬化において重要な役割を果たす肥満細胞の浸潤は LPA₁ を阻害することで TGF-β が減少し誘導が抑制されると考えられる。また、LPA₁ はコラーゲン産生の増加に関わっていることが推測された。BLM 気管内投与による肺線維

症モデルマウスでは、肺胞組織障害後の肺洗浄液の LPA 濃度が上昇しているが、*Lpa₁^{-/-}* マウスでは、その症状の度合いが有意に低下していた²⁾。LPA₁ の選択アンタゴニストで経口薬候補物質である AM966 は、BLM 誘導肺線維症モデルマウスでの血液の血管外漏出、炎症や肺線維症の症状は明らかに軽減した³⁾。我々の検討でも、Ki16425 投与により肺の線維化の抑制、コラーゲン産生量の減少を認め、肺の線維化にも LPA₁ が関与していることが確認された。ヒト強皮症の皮膚の線維芽細胞の方が正常者の皮膚線維芽細胞と比べて筋線維芽細胞様に分化しており、LPA に対する Cl⁻ チャンネル開口応答性が高いこと⁴⁾ が報告されており、LPA₁ 阻害薬が今後ヒト強皮症の新規治療薬となりうる可能性が示唆される。

E. 結 論

LPA₁ 阻害薬である Ki16425 は BLM 誘導性強皮症モデルマウスにおける線維化を改善させることが示唆された。今後、Ki16425 の抗線維化の機序について詳細な検討を行う予定である。

F. 文 献

1. Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, et al: LPA₁ receptor

activation promotes renal interstitial fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1781: 582-587

2. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, et al: The lysophosphatidic acid receptor LPA₁ links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 2008, 14: 45-54
3. Swncy JS, Chapman C, Crea LD, et al: A novel, orally active LPA₁ receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *Br J Pharmacol* 2010, 160: 1699-1713
4. Yin Z, Carbone LD, Gotoh M, et al: Lysophosphatidic acid-activated Cl⁻ current activity in human systemic sclerosis skin fibroblasts. *Rheumatology (oxford)* 2010, 49: 2290-2297

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