

図 6: ボセンタンが *Fli1*<sup>+/-</sup>マウスの血管障害に及ぼす影響

- A. *Fli1*<sup>+/-</sup>マウスの皮膚微小血管内皮細胞における Fli1 蛋白の発現量を、ボセンタン投与群と PBS 投与群で免疫染色により比較した。
- B. 同様の条件のマウスにおいて、Evans blue dye を尾静脈から投与し、皮膚の血管透過性について評価した。

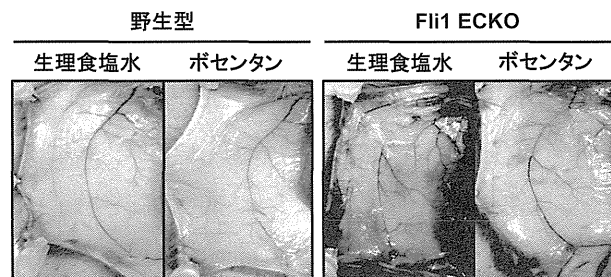


図 7: ボセンタンが *Fli1* ECKO マウスの血管障害に及ぼす影響

ボセンタンあるいは PBS を投与した *Fli1* ECKO マウスにおいて、Evans blue dye を尾静脈から投与し、皮膚の血管透過性について評価した。

### *Fli1* ECKO マウスから得られたマウス微小皮膚血管内皮細胞(MDMECs)を用いたクロマチン免疫沈降法

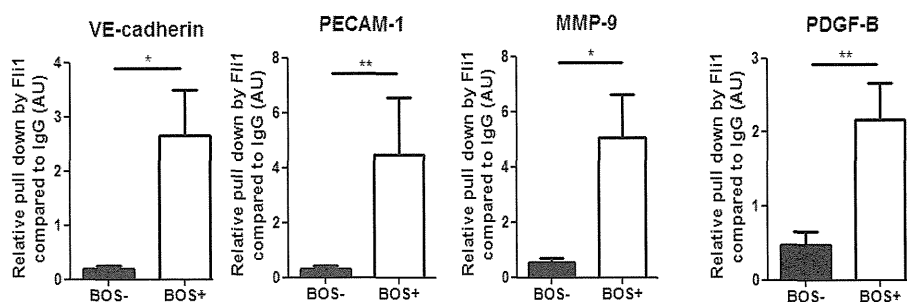


図 8: ボセンタンが *Fli1* ECKO マウスの血管障害に及ぼす影響

*Fli1* ECKO マウス由来の皮膚血管内皮細胞をボセンタン存在下で培養し、Fli1 の DNA 結合能についてクロマチン免疫沈降法で検討した。

# 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 ～第2報～

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 助手

## 研究要旨

リゾホスファチジン酸 (LPA) は6種類以上の特異的な G 蛋白質共役型受容体を介した多彩な機能を発揮する生理活性脂質である。近年、LPA<sub>1</sub> は強皮症における皮膚硬化の形成に関与してい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強皮症モデルマウスを持用いて、LPA 阻害薬 Ki16425 の治療効果を検討した。Ki16425 はブレオマイシンと同時投与において、皮膚硬化および肺の線維化を抑制した。LPA 阻害薬は強皮症に有用な治療薬である可能性が示唆された。

## 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

C3H/HeJ マウス (6 週令、雌) の背部にブレオマイシン (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 100  $\mu\text{l}$  皮内注射し、Ki16425 (Santa Cruz Biotechnology) の濃度を 1 mg/kg、10 mg/kg となるように調節し、同日内に同部位に 100  $\mu\text{l}$  皮内注射した。週3回 (月・水・金) を4週間投与した。その後、背部を 8 mm パンチでブレオマイシン注射部位の皮膚および肺組織を採取し、ホルマリン固定ならびに  $-80^{\circ}\text{C}$  で冷結保存した。標本は HE、Masson trichrome、Toluidin blue 染色を施行した。また 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。マウス MIP-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  について、背部皮膚組

織を用いて RNA 抽出と Realtime RT-PCR を行った。

## C. 研究結果

ブレオマイシンによる皮膚硬化の誘導は Ki16425 によって抑制され、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。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。背部皮膚病変部における collagen $\alpha$ 1 (I)、MIP-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  mRNA 発現量は Ki16425 投与により有意に減少してみられた。TNF- $\alpha$  では有意な変化は認めなかった。

肺病変においても Ki16425 により線維化は抑制されてみえた。肺に含有されるコラーゲン量も有意に減少していた。

Ki16425 の皮膚および肺での効果は 1 mg/kg/day、10 mg/kg/day いずれの群においても同様の効果を示した。

## D. 考案

前回までの検討で BLM 投与により誘導された皮

膚硬化および肺線維化は、LPA<sub>1</sub> および LPA<sub>3</sub> 阻害薬である Ki16425 の同日内投与で抑制されることが確認された。Ki16425 の投与する濃度としては、1 mg/kg/day、10 mg/kg/day と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 投与によってマクロファージや Th1 細胞からのサイトカイン過剰産生を抑制することがわかった。Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  は線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を抑制する。LPA<sub>1</sub> 受容体はヒト強皮症皮膚線維芽細胞にも発現しており、その感受性が亢進していることが報告されている<sup>1)</sup>。Ki16425 は皮膚線維芽細胞に直接作用し、抗線維化作用を示していることが示唆された。また、肥満細胞やマクロファージ、T 細胞など他の細胞に LPA が直接作用しているか、今後検討が必要である。

## E. 結 論

LPA<sub>1</sub> 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。現在、Ki16425 の抗線維化の機序について TGF- $\beta$ 、CTGFなどを始めとする fibrogenic cytokine の発現レベルを現在検討中である。

## F. 文 献

1. Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, et al: LPA<sub>1</sub> receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1781: 582-587

## 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

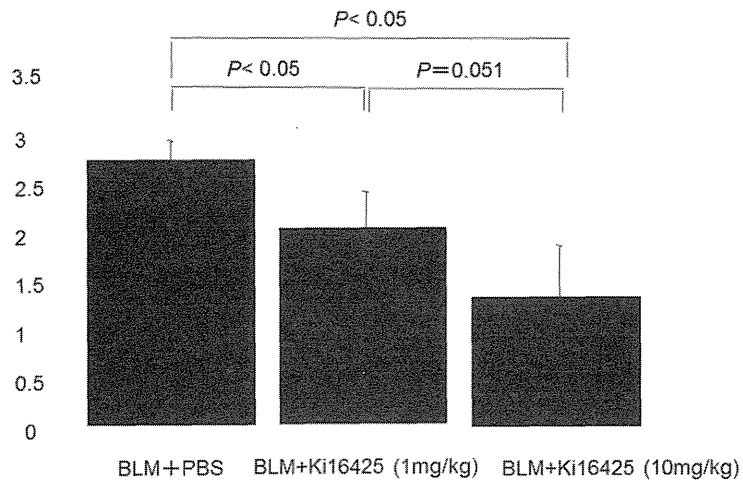


图 1 : MIP-1 $\alpha$  mRNA 定量

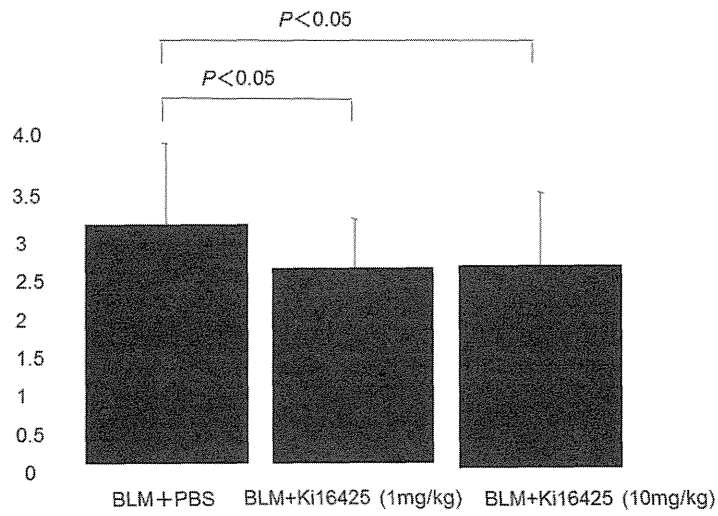


图 2 : IFN- $\gamma$  mRNA 定量

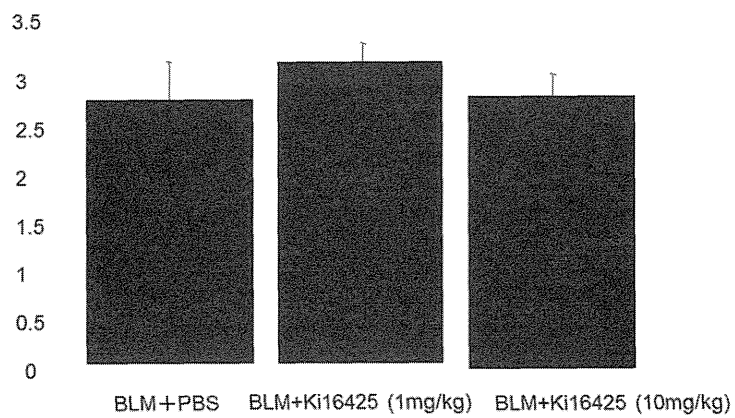


图 3 : TNF- $\alpha$  mRNA 定量

## ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの線維化と免疫異常の病態に 対してレチノイド Am80 が及ぼす影響についての検討

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	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	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	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	赤股 要	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	門野岳史	東京大学医学部附属病院皮膚科	准教授
協力者	首藤紘一	財団法人乙卯研究所	理事 所長

### 研究要旨

Am80 は日本で開発された合成レチノイドで、急性前骨髄性白血病の治療薬として臨床使用されている薬剤である。近年 Am80 の持つ免疫調節作用が、各種疾患モデルを用いた検討により明らかにされている。今回我々はブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症モデルマウスを用いて、Am80 が全身性強皮症の線維化と免疫異常の病態に及ぼす影響について検討した。BLM 誘発強皮症モデルマウスでは、Am80 投与によりコントロール群と比較して皮膚線維化が有意に抑制された。また、Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける TGF $\beta$ 1、CTGF やその他線維化を促進する各種サイトカインの産生を抑制し、皮膚における肥満細胞、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を抑制した。ヒト皮膚線維芽細胞において、Am80 は COL1A2 遺伝子の mRNA の発現を抑制し、MMP1 遺伝子の mRNA の発現を亢進させることで、I 型コラーゲン蛋白の発現量を抑制している可能性が示唆された。免疫細胞においては、BLM 誘発強皮症モデルマウスの末梢リンパ節から回収したリンパ球を解析したところ、Am80 投与群で CD4 陽性 T 細胞における IL-4、IL-17A、IFN $\gamma$  の産生が抑制されていた。血管内皮細胞では、線維化を促す細胞接着分子である ICAM-1 の発現が Am80 により抑制された。以上より、全身性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・免疫細胞・血管内皮細胞のそれぞれにおいて、Am80 は線維化を抑制するフェノタイプを誘導し、強力な抗線維化作用を発揮すると考えられた。今回の検討結果から、Am80 は全身性強皮症の新たな疾患修飾薬となりう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<sup>1)</sup>。

Am80 は合成レチノイドの 1 つであり、レチノイ

ド受容体と結合し、レチノイン酸様作用を発揮するが、レチノイン酸や他のレチノイドと異なり、レチノイン酸受容体 (RAR)  $\alpha$ 、 $\beta$  と結合するが、RAR $\gamma$  には結合しないという特徴がある<sup>2)</sup>。そのため RAR $\gamma$  の活性化を介する基底細胞増殖作用や炎症惹起作用を有しないと考えられている。近年 Am80 はコラーゲン誘発関節炎モデルや実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルにおいて抗炎症作用を発揮することが示された<sup>3)4)</sup>。また、Am80 には Th17 や regulatory T cell (Treg) の分化を抑制し、Th1 の分化を促進する作用があるという報告<sup>5)</sup> や、動脈硬化モデルマウスにおいてマクロファージから産生される IL-6 を Am80 が抑制するという報告があり<sup>6)</sup>、Am80 の持つ免疫調節作用に注目が集まっている。今回我々は Am80 の持つ免疫調節作用が強皮症の病態形成を妨げ、新規治療薬の候補となる可能性を仮説として提唱し、BLM 誘発強皮症モデルマウス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 マウスを用いて作成した BLM 誘発強皮症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 誘発強皮症モデルマウスはブレオマイシン (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  $\mu$ g 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 と同様の方法でそれぞれマウスに投与した。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った。

### 2) Am80 の投与

Am80 (the Research Foundation ITSUU Laboratory, Tokyo, Japan) をマウス飼料 MF (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) に 50 mg Am80 in 5 kg MF の割合で混ぜ、約 1 mg/kg/day の容量で経口投与した。コントロール群では通常の MF を投与した。

### 3) 病理組織学的検討

4 週間の Am80 の投与が終了した BLM 誘発強皮症モデルマウスから背部皮膚を採取し、一部をパラフィン包埋し、6  $\mu$ m 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 箇所をランダムに選び、真皮の厚さを測定した。トルイジンブルー染色、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.) 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 箇所をランダムに選び測定し、その平均値を求めた。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。また、抗 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 抗体 (BD PharMingen) 染色を行い、皮膚血管内皮細胞における染色を評価した。

### 4) 皮膚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。背部皮膚検体を 6 mm パンチにて採取し、Total Collagen kit (QuickZyme Biosciences, Leiden, The Netherlands) を用いて測定した。

### 5) 皮膚における各種遺伝子の mRNA 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、 $\alpha 2(1)$ collagen (COL1A2)、matrix metalloproteinase (MMP) 13、connective tissue growth factor (CTGF)、tumor growth factor (TGF)- $\beta 1$ 、Interferon (IFN)- $\gamma$ 、tumor necrosis factor

(TNF) $\alpha$ 、interleukin (IL)-4、IL-17A、IL-10、ICAM-1 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。

#### 6) 細胞培養

正常ヒト皮膚線維芽細胞は強皮症患者と年齢、性別がほぼ一致した健常人の前腕皮膚から単離、培養した。これらの検体の採取は被験者の同意および施設の承認を得た上で行った。皮膚線維芽細胞培養には 10% 牛胎児血清、抗生剤、抗真菌剤を添加した変法イーグル培地を使用した。室温 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% に保持したインキュベーター内で単層培養し、3~7 回継代した細胞を使用した。

ヒト皮膚血管内皮細胞 (HDMECs) 培養は Lonza Ltd. (Baxel, Switzerland) より購入し、EGM Bullet-Kit を用いて室温 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% に保持したインキュベーター内で単層培養し、2~4 回継代した細胞を使用した。

#### 7) 免疫ブロッティング

培養皮膚線維芽細胞から whole cell lysate を作成し、各 15  $\mu$ 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。ニトロセルロース膜を 1 次抗体と反応させた後、horse-radish peroxidase と結合した二次抗体と反応させ、enhanced chemiluminescence で発光させた。

#### 8) 培養細胞における各種遺伝子の mRNA 発現量の検討

培養細胞から Trizol RNA Isolation Reagents (Life technologies) を用いて全 RNA を抽出した。cDNA の合成には ReverTra Ace qPCR MasterMix (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用した。定量的 real-time PCR には THUNDERBIRD qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いた。

#### 9) intracellular cytokine staining

前述と同様の方法で BLM、Am80 を 7 日間投与したマウスを作成し、翌日腋窩リンパ節、鼠径リンパ節を採取した。リンパ節からリンパ球を回収し、1  $\mu$ g/ml の brefeldin A (GolgiStop; BD Pharmingen) 存在下で 10 ng/ml の PMA と 1  $\mu$ g/ml の ionomycin (Sigma-Aldrich) にて 4 時間刺激した。その後細胞を FACS buffer (1% ウシ胎児血清含有 PBS) により洗浄し、細胞表面を CD4 にて染色した。サンプルを fixative/permeabilization buffer (BD Pharmingen) にて処理し、anti-IL-4 (11B11)、anti-IL-17A (TC11.18H10) and anti-IFN- $\gamma$  (XMG1.2; all from BioLegend) にて染色を行った。細胞を洗浄後、FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) にて解析を行った。

#### 10) 統計学的解析

2 郡間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。p<0.05 を有意とした。

なお、患者検体の取り扱いには、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。

### C. 研究結果

#### 1) Am80 は BLM による皮膚硬化を減弱する

BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、Am80 は皮膚硬化を有意に抑制した。同様に、Am80 は皮膚におけるハイドロキシプロリン産生量も有意に抑制した。(図 1)。

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、Am80 は COL1A2 遺伝子の mRNA の発現量を抑制し、MMP13 遺伝子の mRNA の発現量を亢進させた。また、TGF $\beta$ 1、CTGF 遺伝子の mRNA の発現量は Am80 により抑制された (図 2)。

## 2) 皮膚線維芽細胞において Am80 は抗線維化作用を示す

TGF $\beta$ 1 にて刺激した正常ヒト皮膚線維芽細胞において、Am80 は COL1A2 遺伝子の mRNA の発現量を抑制し、MMP13 遺伝子の mRNA 発現量を亢進させた。また、TGF $\beta$ 1 にて刺激した正常皮膚線維芽細胞において、Am80 は I 型コラーゲン蛋白の発現量を抑制した (図 3)。

## 3) Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、各種サイトカインの発現量を調節することにより皮膚硬化の減弱に寄与する

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚におけるサイトカインの発現量について検討したところ、Am80 投与により TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、MCP-1、ICAM-1、IL-4、IL-17A、IL-10 の mRNA の発現量が有意に抑制された (図 4,6)。

## 4) Am80 は CD4 陽性 T 細胞からの IL-4、IL17A、IFN $\gamma$ の産生を抑制する

末梢リンパ節から回収した細胞を FACS にて解析した。Am80 投与によって、IL-4 産生 CD4 陽性 T 細胞、IL-17A 産生 CD4 陽性 T 細胞、IFN $\gamma$  産生 CD4 陽性 T 細胞の CD4 陽性 T 細胞全体に対する割合は低下した (図 5)。

## 5) Am80 は皮膚血管内皮細胞における ICAM-1 発現を抑制する

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において抗 ICAM-1 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、BLM 投与群で皮膚微小血管内皮細胞における ICAM-1 蛋白の発現量がコントロール群に比して亢進していた。また、この発現亢進は Am80 投与で抑制された (図 6)。また、HDMECs では TNF $\alpha$  によって ICAM-1 遺伝子の mRNA の発現量が亢進したが、その効果は Am80 投与により有意に抑制された (図 6)。

## 6) Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚における炎症細胞の浸潤を抑制する

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚にはコントロール群と比較して、肥満細胞、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の浸潤が亢進していたが、Am80 はこれらの炎症細胞の浸潤を抑制した (図 6)。

## D. 考 案

急性前骨髄性白血病治療薬であるレチノイド Am80 は、細胞の分化、増殖に作用するだけでなく、その免疫調節作用も近年注目されている。コラーゲン誘発関節炎モデルに対してレチノイン酸は有効性がなかったのに対し、Am80 は有効性が認められたという報告もあるように、レチノイン酸やその他のレチノイドと異なる作用を持つ可能性が示唆されている。しかしながら、自己免疫疾患の一つである全身性強皮症に対する Am80 の効果に関しては、現在まで検討されていない。今回の我々の研究では、Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスが呈する皮膚硬化、免疫異常を抑制する効果を示した。また皮膚線維芽細胞を用いて Am80 が抗線維化作用を持つことを示した。これにより Am80 は直接線維芽細胞に作用するとともに、免疫学的な異常を改善することで強皮症モデルマウスに見られる線維化を抑制することが示唆された。

皮膚線維芽細胞において、Am80 は COL1A2 遺伝子の mRNA の発現を抑制すると同時に、MMP1 遺伝子の mRNA の発現を亢進させた。その詳細な機序は不明であるが、複数の線維化関連遺伝子の発現を修飾して抗線維化作用を発揮していることから、線維化関連の重要な転写因子に対して作用してその効果を発揮している可能性が示唆される。今後、その詳細に機序に関して検討予定である。



強皮症においては TGF $\beta$ 1 や CTGF といった線維化を促進する成長因子の発現亢進が皮膚硬化の一因と考えられている<sup>7)8)9)</sup>。Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、これらの mRNA の発現量を抑制した。強皮症の皮膚において肥満細胞が重要な TGF $\beta$ 1 の産生源であることが知られているが、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて Am80 投与で皮膚における肥満細胞の浸潤が抑制されることが示された。Am80 がこれらの作用を介して CTGF、TGF $\beta$ 1 の産生を抑制することが、皮膚硬化を抑制する一つの要因となる可能性があることが示された。

次に強皮症の病態に重要と考えられているサイトカインおよび免疫細胞について検討した。強皮症において、MCP-1<sup>10)</sup>、TNF $\alpha$ <sup>11)</sup>、IFN $\gamma$ 、IL-4<sup>12)</sup>、IL-17、IL-10<sup>13)</sup> はその病態への関与が指摘されており、患者血清、または病変皮膚におけるこれらサイトカイン濃度が上昇していると言われている<sup>14)15)</sup>。BLM 誘導強皮症モデルマウス皮膚において、Am80 はこれらサイトカインの mRNA の発現量を抑制した。T 細胞は強皮症の病態において重要な働きをされている。初期の炎症期には Th2 優位な状態となり、IL-4、IL-13 といったサイトカイン産生が亢進して皮膚線維化が促されるが、萎縮期になると Th1 優位の状態となり、皮膚硬化が減弱する要因の一つとして作用すると考えられている<sup>16)</sup>。BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいても Th2 関連のサイトカインが上昇することが報告されている。また、近年 IL-17A と SSC の病態との関連が示唆されている<sup>17)18)</sup>。そこで Am80 が BLM 誘導強皮症モデルマウスのリンパ節由来の T 細胞を用いて検討したところ、CD4 陽性 T 細胞において IL-4、IL-17A、IFN $\gamma$  の産生が抑制されており、その抑制は特に IL-4 に対して強く働いていることが明らかとなっ

た。このことより Am80 は T 細胞を Th2、TH17 から Th1 優位にシフトさせ、それにより皮膚硬化を減弱する可能性があることが示唆された。

血管内皮細胞における細胞接着分子の発現に関しても、Am80 投与により線維化を促す細胞接着因子と考えられている ICAM-1<sup>19)20)</sup> の発現が抑制された。HDMECs において TNF $\alpha$  依存性に誘導された ICAM-1 遺伝子の発現が、Am80 により有意に抑制されたことから、TNF $\alpha$  など炎症性サイトカインの発現抑制を介した間接的な作用のみでなく、Am80 が直接的に皮膚血管内皮細胞に作用して ICAM-1 産生を抑制している可能性が示唆された。Am80 による ICAM-1 発現抑制は、皮膚における肥満細胞、マクロファージといった炎症細胞の浸潤の抑制の一因となっていると考えられ、皮膚硬化の抑制に寄与している可能性が考えられた。

今回我々は BLM 誘導強皮症モデルマウスを用いて、レチノイド Am80 が強皮症の皮膚硬化と免疫異常に及ぼす影響を検討した。Am80 は皮膚線維芽細胞に直接作用し、抗線維化作用を示すのみならず、免疫異常や血管内皮細胞の異常を改善することで、間接的に抗線維化作用を示している可能性が示唆された。今後はマクロファージなど他の免疫担当細胞についての検討や、他の強皮症モデルマウスを用いた検討を行う予定である。

## E. 結 論

Am80 投与によって、BLM 誘導強皮症モデルマウスにおいて、線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞それぞれで線維化を抑制するフェノタイプを呈し、線維化が抑制されることが示唆された。

## F. 文 献

1. Asano Y. Future treatments in systemic sclerosis.

- The Journal of dermatology. 2010; 37: 54–70.
2. Miwako I, Kagechika H. Tamibarotene. *Drugs of today*. 2007; 43: 563–8.
  3. Nagai H, Matsuura S, Bouda K, Takaoka Y, Wang T, Niwa S, et al. Effect of Am-80, a synthetic derivative of retinoid, on experimental arthritis in mice. *Pharmacology*. 1999; 58: 101–12.
  4. Klemann C, Raveney BJ, Klemann AK, Ozawa T, von Horsten S, Shudo K, et al. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology*. 2009; 174: 2234–45.
  5. Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Murakami Y, Ishido M, Miyasaka N, et al. The effect of synthetic retinoid, Am80, on T helper cell development and antibody production in murine collagen-induced arthritis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2010; 20: 244–51.
  6. Takeda N, Manabe I, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Kagechika H, et al. Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006; 26: 1177–83.
  7. Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Co-localization of transforming growth factor beta 2 with alpha 1(I)procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 1990; 86: 917–22.
  8. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *The Journal of rheumatology*. 2000; 27: 149–54.
  9. Takehara K. Growth regulation of skin fibroblasts. *Journal of dermatological science*. 2000; 24 Suppl 1: S70–7.
  10. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1 alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clinical and experimental immunology*. 1999; 117: 159–65.
  11. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis. *The Journal of rheumatology*. 1997; 24: 663–5.
  12. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1997; 24: 328–32.
  13. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *Journal of dermatological science*. 2001; 27: 140–6.
  14. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, et al. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PloS one*. 2009; 4: e5903.
  15. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L, et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody sub-

- sets and clinical manifestations. *Arthritis research & therapy*. 2009; 11: R147.
16. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2006; 33: 275–84.
17. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism*. 2012; 64: 3726–35.
18. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *Journal of immunology*. 2012; 188: 3573–83.
19. 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. *Journal of immunology*. 2007; 179: 698–707.
20. 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. *Journal of immunology*. 2010; 185: 2502–15.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

Tetsuo Toyama, Yoshihide Asano, Shinichi Sato, Takafumi Kadono et al.: Synthetic retinoid Am80 ameliorates dermal fibrosis and immune abnormalities of bleomycin-treated mice

第41回日本臨床免疫学会総会 2013.10

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

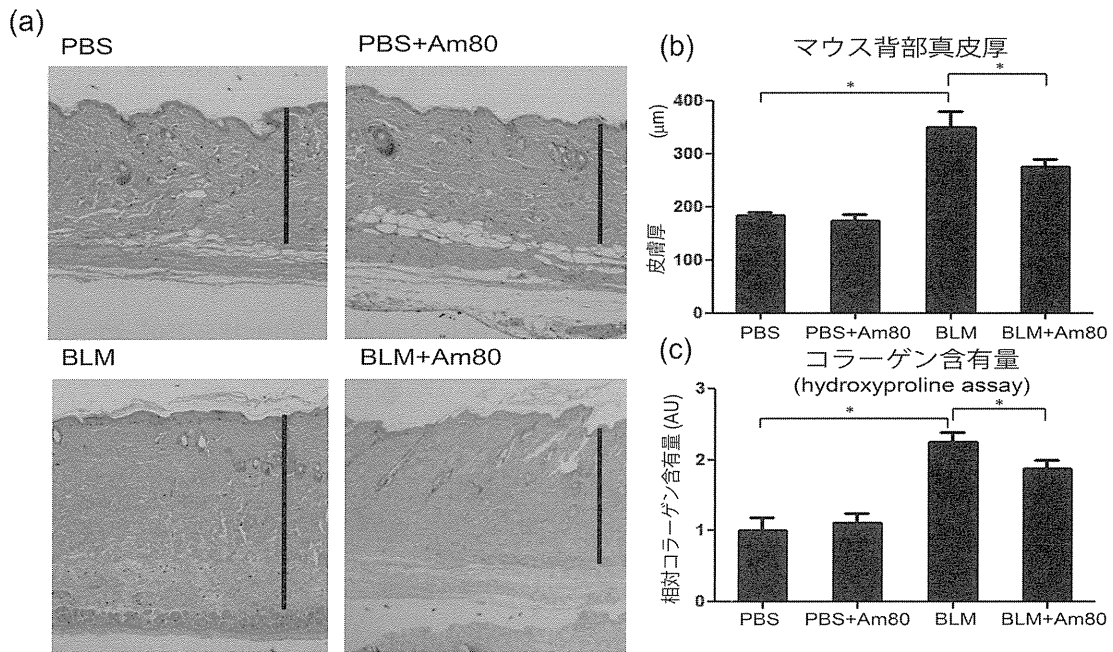


図1：(a) (b) BLM 投与後の皮膚組織像 (HE 染色) および真皮の厚さに関する検討。  
Am80 投与群で BLM による皮膚線維化が有意に減弱した (\* $P < 0.05$ )。  
(c) BLM 投与後のヒドロキシプロリン量の検討。  
Am80 投与群で有意に低下していた (\* $P < 0.05$ )。

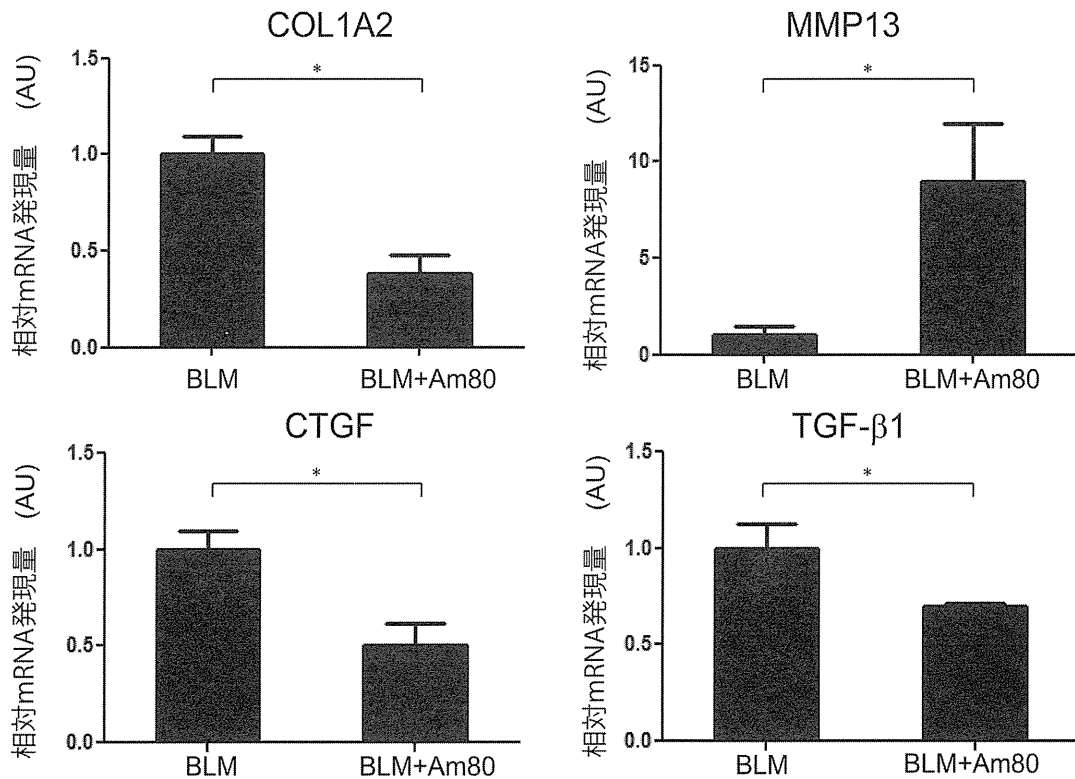
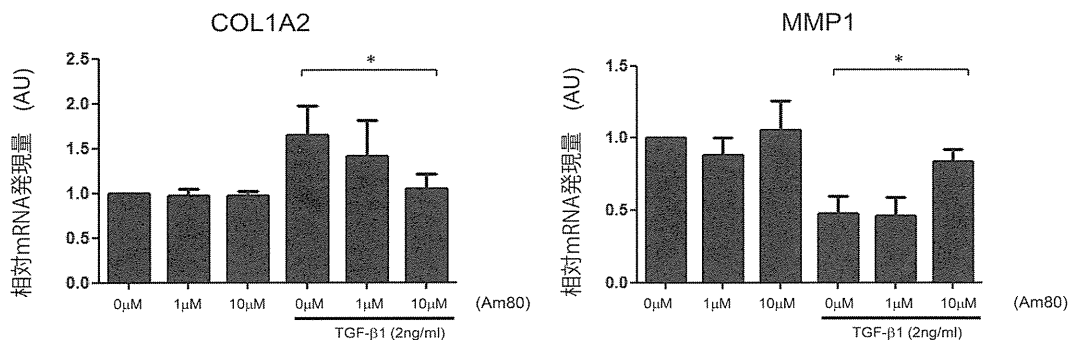


図2：BLM 誘導強皮症モデルマウスの皮膚における線維化に関連する各種遺伝子の mRNA の発現量に関する検討。  
Am80 投与により COL1A2 遺伝子の mRNA 発現量は低下し、MMP13 遺伝子の mRNA 発現量は亢進した。CTGF 遺伝子、  
TGFβ1 遺伝子の mRNA の発現量は Am80 投与で抑制された (\* $P < 0.05$ )。

(a) 正常ヒト皮膚線維芽細胞



(b) 正常ヒト皮膚線維芽細胞におけるタイプ1コラーゲン蛋白発現量

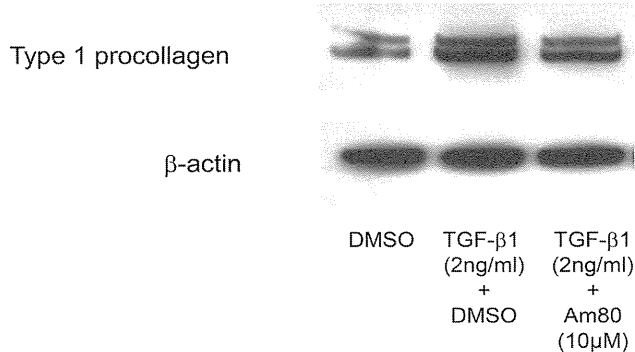


図3:(a) TGFβ1 刺激で活性化した正常ヒト皮膚線維芽細胞における COL1A2、MMP1 遺伝子の mRNA の発現量に関する検討。Am80 により、COL1A2 遺伝子の mRNA 発現量は用量依存性に抑制され、MMP1 遺伝子の mRNA の発現量は用量依存的に亢進した (\*P<0.05)。

(b) I型コラーゲン蛋白の発現量に関する検討。  
I型コラーゲン蛋白の発現量は Am80 で抑制された。

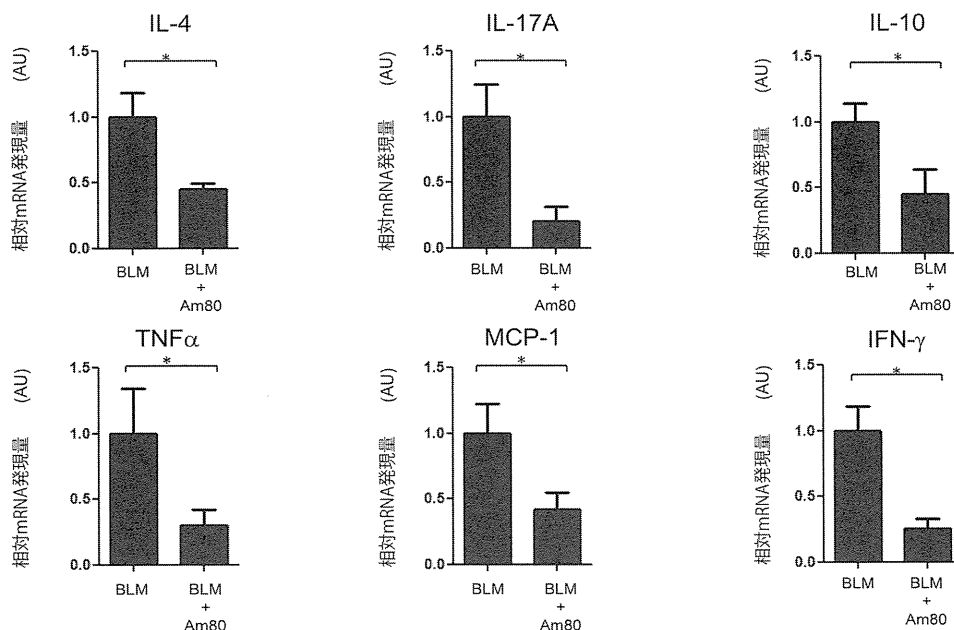
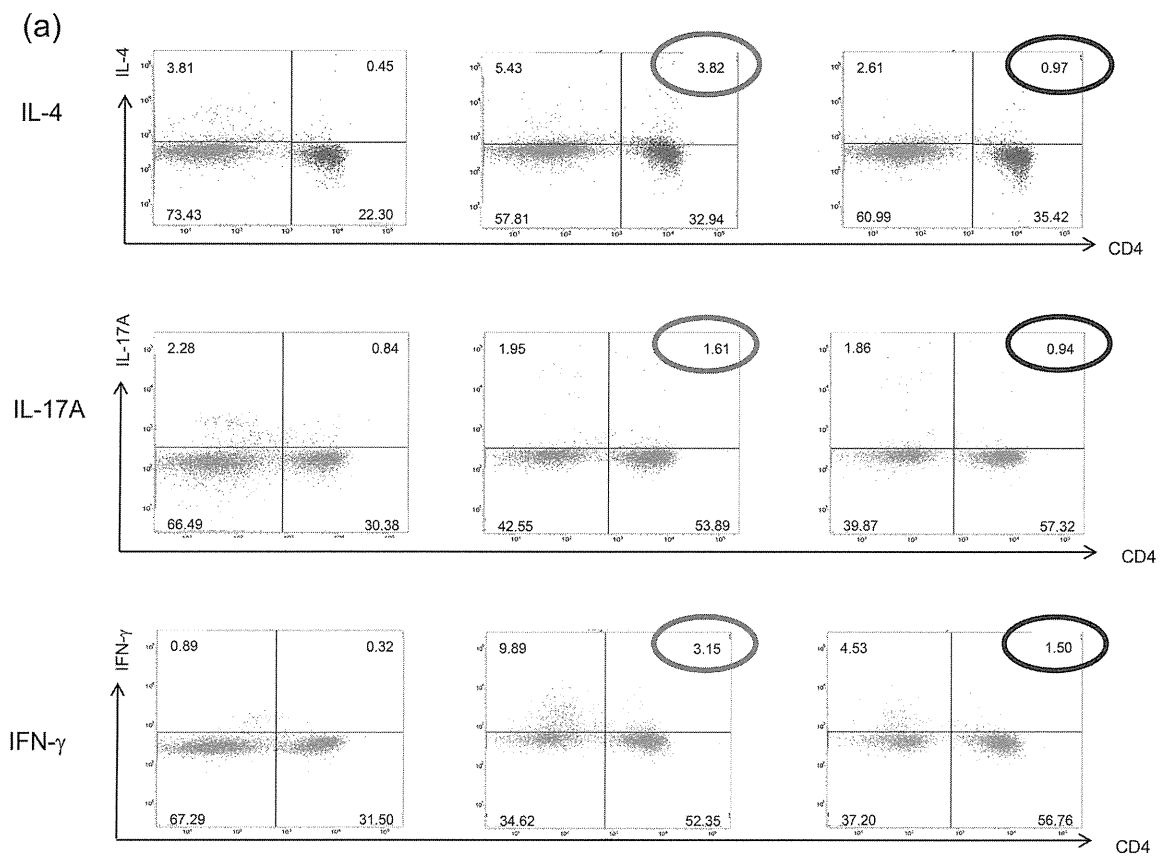


図4: BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚におけるサイトカイン・ケモカインの発現異常に対する Am80 の作用に関する検討。IL-4、IL-17A、IL-10、IFNγ、TNFα、MCP-1 について検討したところ Am80 によりその発現が抑制された (\*P<0.05)。



(b) CD4陽性T細胞における各サイトカイン産生細胞の割合

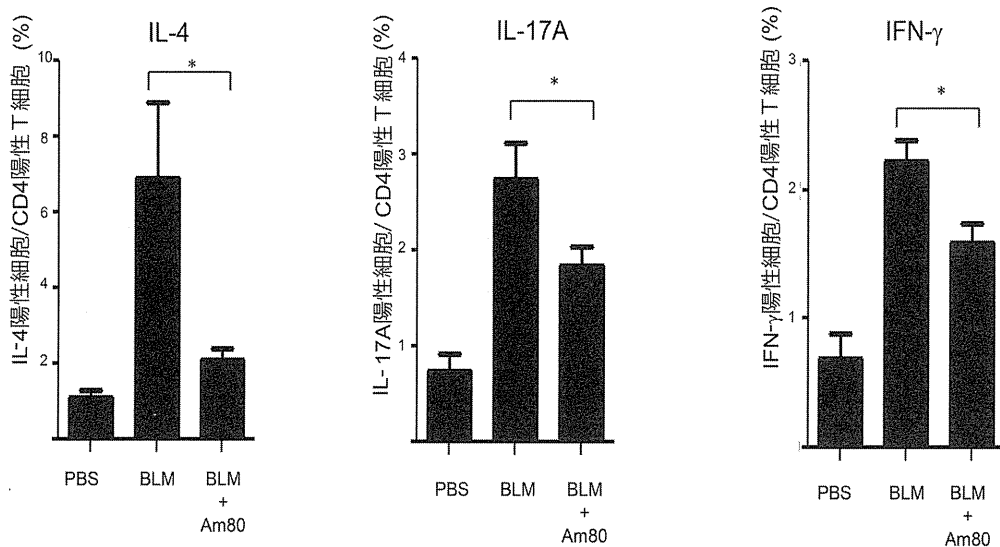


図5：(a) (b) CD4陽性T細胞におけるサイトカイン産生に対するAm80の作用。

BLM投与開始後、7日目に末梢リンパ節からリンパ球を回収した後、CD4と各種サイトカインをそれぞれ細胞表面免疫染色、細胞内免疫染色し、FACSを用いて解析した。Am80投与により、CD4陽性T細胞におけるIL-4、IL-17A、IFN $\gamma$ 産生細胞の割合は減少した(\*P<0.05)。

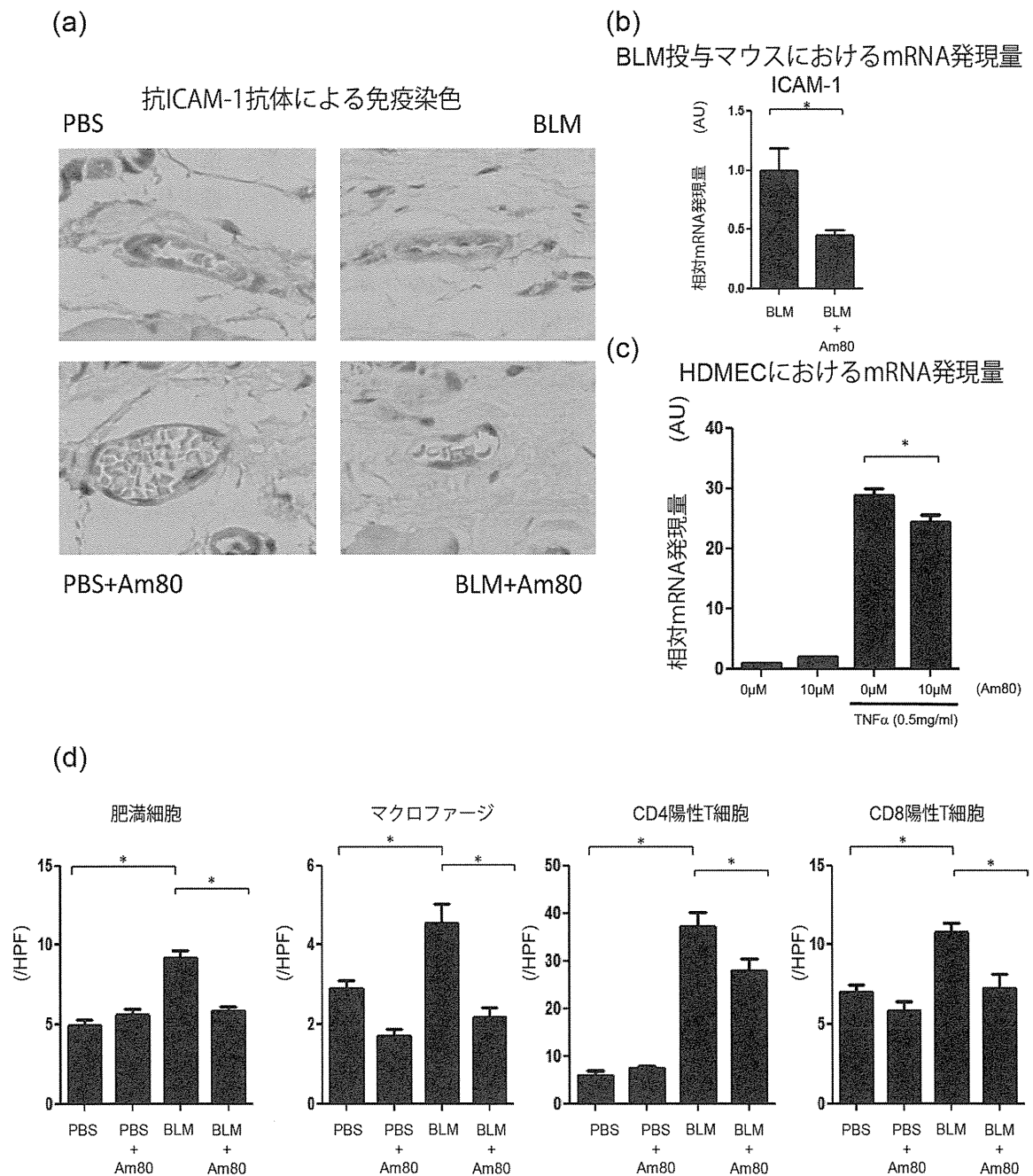


図6：(a) 皮膚血管内皮細胞における ICAM-1 蛋白の発現量に関する検討。

Am80 は、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚血管内皮細胞における ICAM-1 発現を抑制した。

(b) BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚における ICAM-1 遺伝子の mRNA の発現量に関する検討。

Am80 投与で ICAM-1 遺伝子の mRNA の発現量が抑制された (\* $P < 0.05$ )。

(c) TNF $\alpha$  刺激で活性化したヒト皮膚血管内皮細胞に対する Am80 の作用に関する検討。

Am80 投与で ICAM-1 遺伝子の mRNA の発現量は抑制された (\* $P < 0.05$ )。

(d) BLM1 週間投与したマウス皮膚における炎症細胞浸潤数の計測。

Am80 投与により肥満細胞、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の皮膚への浸潤が抑制された (\* $P < 0.05$ )。

# TGF- $\beta$ 1 刺激下におけるシルデナフィルの 抗線維化作用に関する検討

研究分担者	川口鎮司	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 臨床教授
協力者	樋口智昭	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 臨床修練生
協力者	高木香恵	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 講師
協力者	栃本明子	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 助教
協力者	大田ゆう子	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 助教

## 研究要旨

種々の疾患モデルにおいて、sGC-cGMP 経路の増強が線維化を抑制すると報告されており、cGMP 分解抑制作用を有する PDE5 阻害薬は、全身性強皮症の線維化病変を改善する可能性がある。今回我々は、TGF- $\beta$ 1 刺激下におけるシルデナフィルの作用に関し、正常成人及び強皮症由来皮膚線維芽細胞を用いて *in vitro* で検討を行った。免疫細胞染色で皮膚線維芽細胞での PDE1A 及び PDE5A の発現を確認した。細胞内 cGMP 濃度は EIA キットを用いて測定した。皮膚線維芽細胞に対し、TGF- $\beta$ 1 刺激下で種々の濃度のシルデナフィルを添加した。total RNA を回収し、quantitative real time PCR 法で mRNA 発現を評価した。強皮症由来皮膚線維芽細胞では TGF- $\beta$ 1 単独投与群に比べ、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で有意に *COL1A1*、*COL1A2*、*CTGF* 発現の抑制が認められた。一方正常皮膚線維芽細胞群でも同様の傾向が認められたが、有意差は認めなかった。*ACTA2* については、正常皮膚線維芽細胞、強皮症由来皮膚線維芽細胞、両者ともに、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で著明に発現が減少した。シルデナフィルは、TGF- $\beta$ 1 刺激で活性化された皮膚線維芽細胞の線維化作用を抑制し、さらに、強皮症由来皮膚線維芽細胞でより強い効果が認められた。

## A. 研究目的

活性化した線維芽細胞による過剰なコラーゲン産生及び細胞外マトリックス調節異常は、全身性強皮症の線維化における病態形成において重要な役割を有する。

近年、sGC-cGMP 経路の増強が血管平滑筋弛緩作用のみならず、抗線維化作用を有する可能性が示唆されている。そこで我々は、cGMP 分解抑制作用を有する PDE5 阻害薬にも同様の効果があると考え、TGF- $\beta$ 1 刺激下におけるシルデナフィルの作用に関し、正常成人及び強皮症由来皮膚線維芽細胞を用いて *in vitro* で検討を行った。

## B. 研究方法

全身性強皮症患者より採取した皮膚生検検体から分離した皮膚線維芽細胞及び、購入した正常成人皮膚線維芽細胞を用いた。採取した検体の研究目的での使用に関しては、患者から文章で同意を得た。

免疫細胞染色で皮膚線維芽細胞での PDE1A 及び PDE5A の発現を確認した。細胞内 cGMP 量は EIA キットを用いて測定した。10% Fetal bovine serum (FBS) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて皮膚線維芽細胞を培養し、sub-confluent に達した後、無血清培地で 24 時間培養した。正常皮膚線維芽細胞と強皮症由来皮膚線維芽細胞を



① control (C) 群、② TGF- $\beta$ 1 (T) 投与群、③ TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 1  $\mu$ M (T+S1) 投与群、④ TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 10  $\mu$ M (T+S10) 投与群、⑤ TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 100  $\mu$ M (T+S100) 投与群に分け、それぞれの濃度の薬剤を添加し、TGF- $\beta$ 1 により活性化した皮膚線維芽細胞に対するシルデナフィルの効果について検討を行った。

TGF- $\beta$ 1 添加 48 時間、72 時間後に皮膚線維芽細胞より total RNA を抽出し、逆転写後 quantitative real time RT-PCR 法を用いて *GAPDH* を control とし、*COL1A1*、*COL1A2*、*CTGF*、*ACTA mRNA* の発現解析を行った。

統計学的解析は、分散分析法 (ANOVA) 及び *Student's t* 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### C. 研究結果

図 1 に示す通り、皮膚線維芽細胞の PDE1A 及び PDE5A の発現が認められた。正常皮膚線維芽細胞と強皮症由来皮膚線維芽細胞両群の細胞内 cGMP 濃度の比較を行ったが、有意差はなかった。また、シルデナフィル添加により、用量依存的に細胞内 cGMP 濃度が上昇した (図 2)。研究方法で示した各群の *COL1A1*、*COL1A2*、*CTGF*、*ACTA2* 発現量の比較を行った (図 3)。強皮症由来皮膚線維芽細胞では TGF- $\beta$ 1 単独投与群に比べ、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で有意に *COL1A1*、*COL1A2*、*CTGF* 発現抑制が認められた。一方正常皮膚線維芽細胞でも同様の傾向が認められたが、有意差はなかった。*ACTA2* については、正常皮膚線維芽細胞、強皮症由来皮膚線維芽細胞、両者ともに、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で著明に発現が減少した。

### D. 考案

全身性強皮症における、sGC-cGMP 経路の増強による抗線維化作用については、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 刺激薬である BAY 41-2272 を用いた報告がある [1]。cGMP が下流に存在する PKG を活性化し、活性化 PKG によるさまざまなシグナル伝達系抑制が機序として推察されている [2] が、その詳細なメカニズムについては明らかでない。細胞内 cGMP 濃度上昇が持続することにより、抗線維化作用を示すのではないかと考えられるが、sGC-cGMP 経路は繊細な活性調節機構を有しており、活性化 PKG はネガティブフィードバック作用により、cGMP の分解酵素である PDE5 の活性を上昇させ、増加した細胞内 cGMP 濃度は分解される。そのため、PDE5 活性を阻害することが、細胞内 cGMP 濃度上昇を持続させる上で最も有効ではないかと推察している。

PDE5 阻害薬であるシルデナフィルは、種々の疾患モデルにおいて抗線維化作用を有することが報告されている。はじめに我々は、免疫細胞染色で皮膚線維芽細胞が PDE1A、PDE5A 両者ともに陽性であることを確認したが、シルデナフィルは PDE5A 阻害作用だけでなく、わずかではあるが PDE1A 阻害作用も有するため、*in vitro* では両者に対する効果があるのではないかと考えられた。すなわち、PDE5A は cGMP 分解作用のみを有するが、PDE1A は cGMP、cAMP 両者の分解作用を有するため、シルデナフィルは細胞内 cGMP、cAMP 濃度をともに上昇させる可能性がある。シルデナフィルの用量依存的な細胞内 cGMP 濃度上昇効果は確認したが、cAMP 濃度上昇効果があるのか、また、そもそも細胞内 cGMP 濃度上昇が抗線維化作用を有するかどうかについては、過去の報告はあるが [3]、一定した見解がないため、今後の課題である。

TGF- $\beta$ 1 で刺激した皮膚線維芽細胞に対するシルデナフィルの抗線維化作用を、正常成人皮膚線維芽細胞及び強皮症由来皮膚線維芽細胞を用いて検討したところ、シルデナフィル 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M では十分な効果を示さなかったが、100  $\mu$ M で *COL1A1*、*COL1A2*、*CTGF*、*ACTA2* の有意な発現低下が認められた。シルデナフィルを 100 mg/日内服した場合の血中濃度が 1  $\mu$ M 未満と考えられており、100  $\mu$ M に達する投与量を連日投与するというのは現実的ではないが、Drug Delivery System (DDS) の応用等で効率的に病変部の薬剤濃度を上げることができれば、強皮症でみられる線維化、血行障害両者を改善することによる、相加相乗効果が期待できる。今回の検討では、強皮症由来皮膚線維芽細胞は正常成人皮膚線維芽に比べ、より強いシルデナフィルの抗線維化作用が認められた。ベースラインの細胞内 cGMP 濃度が強皮症由来皮膚線維芽細胞で低いことが理由として考えられたが、差を認めなかった。別の理由として、細胞内 cGMP 濃度上昇効果が健常成人に比べ強皮症で強いのではないかと考えられるが、今後の検討が必要である。

## E. 結論

TGF- $\beta$ 1 刺激下におけるシルデナフィルの作用に関し、正常成人及び強皮症由来皮膚線維芽細胞を用いて *in vitro* で検討を行った。皮膚線維芽細胞での PDE1A 及び PDE5A の発現を確認した。強皮症由来皮膚線維芽細胞では TGF- $\beta$ 1 単独投与群に比べ、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で有意に

*COL1A1*、*COL1A2*、*CTGF*、*ACTA2* 発現が抑制された。一方正常皮膚線維芽細胞群でも同様の傾向があったが、有意差を認めなかった。シルデナフィルは TGF- $\beta$ 1 刺激で活性化された皮膚線維芽細胞の線維化作用を抑制し、さらに、強皮症群でより強い効果が認められた。

## F. 文献

1. Beyer C, Reich N, Schindler SC, Akhmetshina A, Dees C, Tomcik M, Hirth-Dietrich C, et al. : Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 1019-26
2. Takimoto E. Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ J* 2012; 76: 1819-25
3. Stratton R, Shiwen X, Martini G, Holmes A, Leask A, Haberberger T, et al. Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J Clin Invest* 2001; 108: 241-50

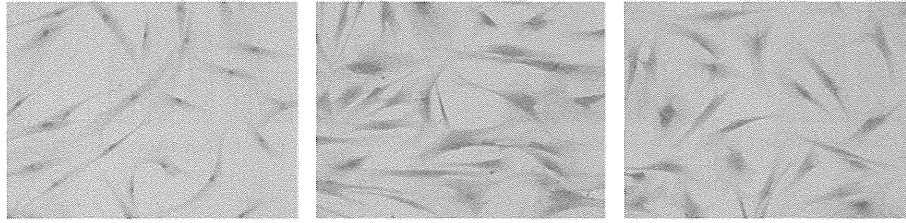
## G. 研究発表

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

## 免疫細胞染色



Isotype IgG

PDE1A

PDE5A

図1：皮膚線維芽細胞における PDE1A 及び PDE5A の発現

## 細胞内cGMP濃度の比較

## シルデナフィル投与による細胞内cGMP濃度変化

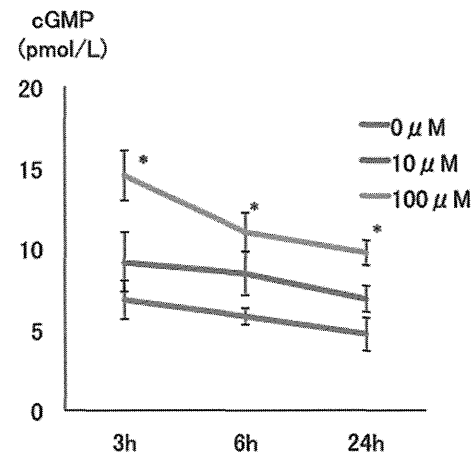
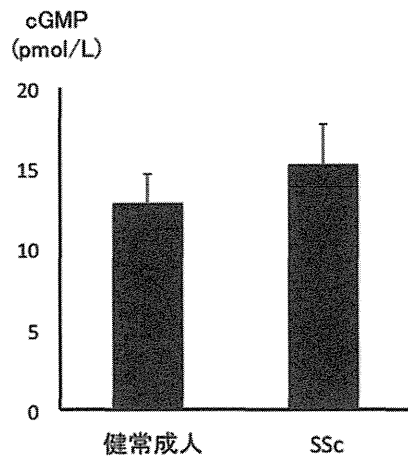


図2：(左) 通常時の正常成人皮膚線維芽細胞と強皮症由来皮膚線維芽細胞の細胞内 cGMP 濃度  
(右) シルデナフィル投与による細胞内 cGMP 濃度の変化

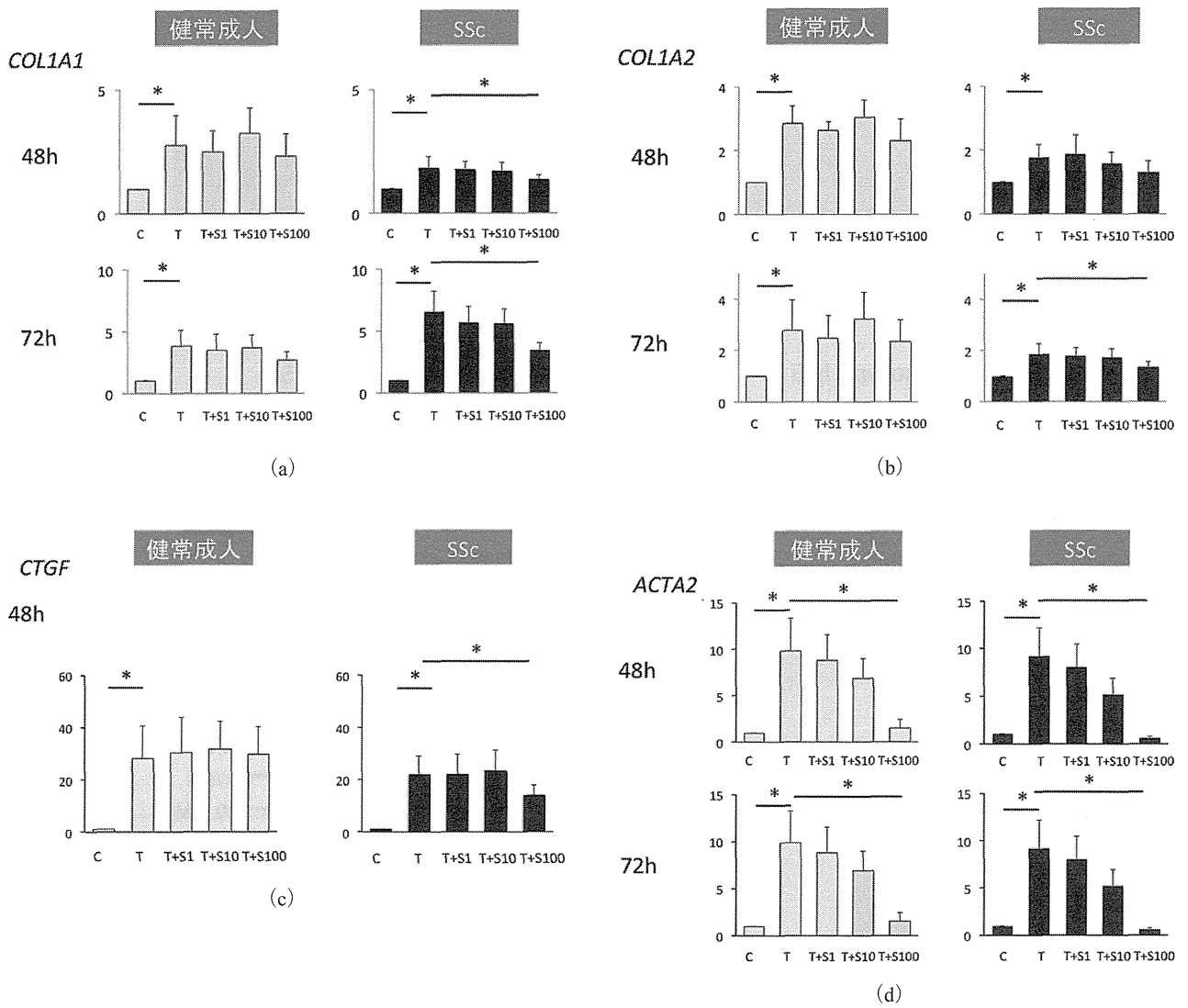


図3：TGF- $\beta$ 1 刺激下におけるシルデナフィルの各種 mRNA 発現量に対する効果  
 (a) COL1A1 (b) COL1A2 (c) CTGF (d) ACTA2