

強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの抑制性制御

研究分担者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授
協力者 横山洋子 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者 茂木精一郎 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 講師

研究要旨

アペリンは、主に血管新生、心機能、脂肪細胞機能などを制御する分子として知られていたが、近年、線維化への関与も報告されている。強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの役割を解明することを目的として検討した。強皮症由来線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下していた。アペリンの発現は TGF- β 刺激によって抑制されることも明らかにし、強皮症由来線維芽細胞におけるアペリンの発現低下は TGF- β シグナルの亢進による可能性が示唆された。次に、アペリンの線維化への影響をみるため、アペリンの発現を抑制する方法とアペリンを添加する 2 種類の方法によって検討した。その結果、siRNA 法によるアペリンの発現抑制は、正常ヒト線維芽細胞の α SMA の発現を亢進させた。一方、TGF- β 刺激による α SMA, 1 型コラーゲン、TIMP-1, SPHK1 の発現亢進はアペリンの添加によって抑制された。これらの結果より、アペリンは、TGF- β 刺激による α SMA, 1 型コラーゲン、TIMP-1, SPHK1 の発現亢進に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。

A. 研究目的

アペリンは、主に血管内皮細胞、脂肪細胞から産生され、受容体である APJ に結合し、下流にシグナルを伝えて、主に血管新生、心臓機能、脂肪細胞機能などを制御する。APJ は、広く発現しているが、特に血管内皮細胞、平滑筋細胞に多く発現している。アペリンによる血管新生、血管機能の制御については、血管内皮細胞や周皮細胞から分泌されたアペリンが、血管内皮細胞上の APJ に結合し、血管径を拡大させ、血流量を増大させることが明らかとなっている。胎生期アペリントランスジェニックマウスでは血管径が拡大し、胎生期のアペリン KO マウスでは血管径と血管量の低下が見られた[1, 2]。

アペリンと肺高血圧症についても知られており、肺高血圧症患者の肺血管内皮細胞におけるアペリンの発現は低下しており、アペリンの低下によって、

microRNA が抑制され、FGF2 や FGF レセプター 1 の発現が亢進し、血管平滑筋細胞や内皮細胞の増殖が起こるという報告[3]や、アペリン KO マウスでは低酸素誘導性の肺高血圧症が増悪し[4]、肺高血圧症患者の血清中アペリンが低下している等の報告[5]がある。これらの結果から、アペリンの発現低下が肺高血圧症の病態（血管平滑筋細胞と内皮細胞の増殖亢進）に関与していると考えられる。

アペリンと線維化に関しては、アペリン KO マウスでは血管狭窄によって誘導される心臓の線維化が野生型と比べて亢進するという結果からアペリンが線維化を抑制するという報告[6, 7]と、肝臓の線維化が亢進するという相反する報告[8]がある。アペリンと強皮症については、強皮症患者の血清中アペリンは、正常人と比べて差はないが、早期の強皮症患者の血清中アペリンは高値であり、発症から 10

年以上経過した患者においては、肺高血圧症や皮膚潰瘍といった血管病変を有する患者の血清中アペリンは血管病変がない患者に比べると高いとの報告がある[9]。しかし強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの役割は明らかになっていない。そこで、強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの役割を解明することを目的に検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞は diffuse cutaneous type の強皮症患者 5 人の同意を得たうえで前腕から採取した。正常皮膚線維芽細胞は健常人 7 人の同意を得たうえで前腕より採取した。線維芽細胞は 10% 牛胎児血清含有 DMEM 培地にて培養し、実験に用いた。

2) mRNA と蛋白量の評価

mRNA 量の評価は real time PCR 法を、蛋白量は ELISA 法を用いて測定した。

3) siRNA 法

対象 siRNA ないしアペリン siRNA を線維芽細胞にトランスフェクションし、24 時間後に実験を行った。

C. 研究結果

強皮症と正常ヒト皮膚由来線維芽細胞のアペリン/APJ 発現量の比較 (図 1)

はじめに、強皮症と正常ヒト由来皮膚線維芽細胞を培養し、アペリンと APJ の発現量を比較した。強皮症では、正常に比べ、アペリンの発現が有意に低下していた。APJ には有意な発現変化はなかった。また、線維化に関与する α SMA、1 型コラーゲン、TIMP-1 の産生量を定量し、強皮症由来線維芽細胞でいずれの産生量も増加していることを確認した。

アペリン siRNA による正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響 (図 2)

次に、強皮症線維芽細胞でみられたアペリンの発現低下が線維化に関与しているかどうか検討するために、RNAi 法によってアペリンの発現を抑制して、線維化への影響について検討した。

まず、正常ヒト皮膚由来線維芽細胞において、siRNA 法でアペリンの産生が 8 割程度抑制されることを確認した。アペリンの発現抑制により、 α SMA の発現が有意に亢進した。I 型コラーゲンと TIMP-1 の発現も亢進する傾向が見られた。CTGF の発現に変化はみられなかった。これらの結果より、アペリンは α SMA の発現を抑制する可能性が示唆された。

アペリン添加による正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響 (図 3)

アペリンが α SMA の発現を抑制するかどうかをさらに検討するために、線維芽細胞にアペリンを添加してその抑制効果について検討した。アペリンを添加してから 1 時間後に TGF β で刺激し、 α SMA の発現量をリアルタイム PCR で解析した。その結果、TGF β 刺激によって亢進した α SMA の発現量は、アペリンの添加によって、濃度依存性に抑制された。また、TGF β 刺激によって亢進した 1 型コラーゲンと TIMP-1 の発現量も、アペリンの添加によって、濃度依存性に抑制された。

次に、TGF β 刺激によるアペリンの発現量を検討したところ、TGF β 刺激によって、アペリンの発現量が有意に低下した。

これらの結果より、TGF β 刺激によってアペリン産生は低下し、アペリンの添加によって、 α SMA の発現が抑制される可能性が示唆された。

次に、TGF β はスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) を介して α SMA や TIMP-1 を誘導することが報告さ

れていることから[10, 11]、SPHK1の発現についても検討した。その結果、TGF β 刺激によって亢進したSPHK1の発現は、アペリンの添加によって濃度依存性に抑制された。これらの結果より、アペリンは、TGF- β 刺激による α SMA, 1型コラーゲン、TIMP-1の発現亢進に対して、SPHK1の発現制御を介して抑制的に働いている可能性が示唆された。

D. 考案

アペリンが心臓の線維化を亢進させることや、肺高血圧症の血管周囲の線維化に関与することが報告されているが、皮膚における線維化における役割は明らかになっていない。今回、我々は強皮症患者皮膚線維芽細胞を用いて検討を開始した。その結果、強皮症由来線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下していた。一方、APJの発現量には変化なかった。アペリンの発現はTGF- β 刺激によって抑制されることを明らかにしたことから、強皮症由来線維芽細胞におけるアペリンの発現低下はTGF- β シグナルの亢進による可能性が示唆された。また、TGF- β シグナルの亢進によるアペリンの抑制が、皮膚の線維化だけではなく、強皮症の血管異常や肺高血圧症と関連する可能性も示唆される。

アペリンの線維化への抑制性制御を解明するために、正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。アペリンの線維化への影響をみるために、アペリンの発現を抑制する方法とアペリンを添加する2種類の方法によって検討した。その結果、siRNA法によるアペリンの発現抑制によって、正常ヒト線維芽細胞の α SMAの発現が亢進し、1型コラーゲンとTIMP-1の発現は増加傾向がみられた。また、TGF- β 刺激による α SMA, 1型コラーゲン、TIMP-1の発現亢進は、アペリンの添加によって抑制された。さらに、TGF- β 刺激によるSPHK1の発現亢進は、アペリン

の添加によって抑制された。これらの結果より、アペリンは、TGF- β 刺激による α SMA, 1型コラーゲン、TIMP-1の発現亢進に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。また、その機序にはSPHK1の発現制御を介している可能性が示唆された。

今回の研究によって、アペリンが、TGF- β 刺激による α SMA, 1型コラーゲン、TIMP-1の発現亢進に対して抑制的に働くことを明らかにした。一方、アペリンの発現はTGF- β シグナルによって抑制されることも示した。これらの結果より、アペリン/APJシグナルとTGF- β シグナルは互いに抑制しあう可能性が示唆された。

E. 結論

今回の研究によって、アペリンが、TGF- β 刺激による線維化に対して抑制的に働くこと、アペリンの発現はTGF- β シグナルによって抑制されることを明らかにした。強皮症由来線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下していたことから、強皮症の皮膚線維化の機序の一部にアペリンが関連する可能性が示唆された。

F. 文献

1. Kidoya H, et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 2008; 27: 522-34.
2. Kidoya H et al. Biology of the apelin-APJ axis in vascular formation. *J Biochem.* 2012; 152: 125-31.
3. Kim J et al. An endothelial apelin-FGF link mediated by miR-424 and miR-503 is disrupted in pulmonary arterial hypertension. *Nat Med.* 2013 Jan; 19(1): 74-82.
4. Chandra SM et al. Disruption of the apelin-APJ system worsens hypoxia-induced pulmonary hyperten-

sion. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011; 31: 814-20.

5. Alastalo TP, et al. Disruption of PPAR γ / β -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. J Clin Invest. 2011; 121: 3735-46.

6. Kuba K, et al. Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. Circ Res. 2007; 101: e32-42.

7. Sato T, et al. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. J Clin Invest. 2013; 123: 5203-11.

8. Melgar-Lesmes P et al. Hypoxia and proinflammatory factors upregulate apelin receptor expression in human stellate cells and hepatocytes. Gut. 2011; 60: 1404-11.

9. Aozasa N, et al. Serum apelin levels: clinical association with vascular involvements in patients with systemic sclerosis. J Eur Acad Dermatol Venereol.

2013; 27: 37-42.

10. Yamanaka M, et al. Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. J Biol Chem. 2004; 279: 53994-4001.

11. Kono Y, et al. Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF-beta1. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007; 37: 395-404.

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

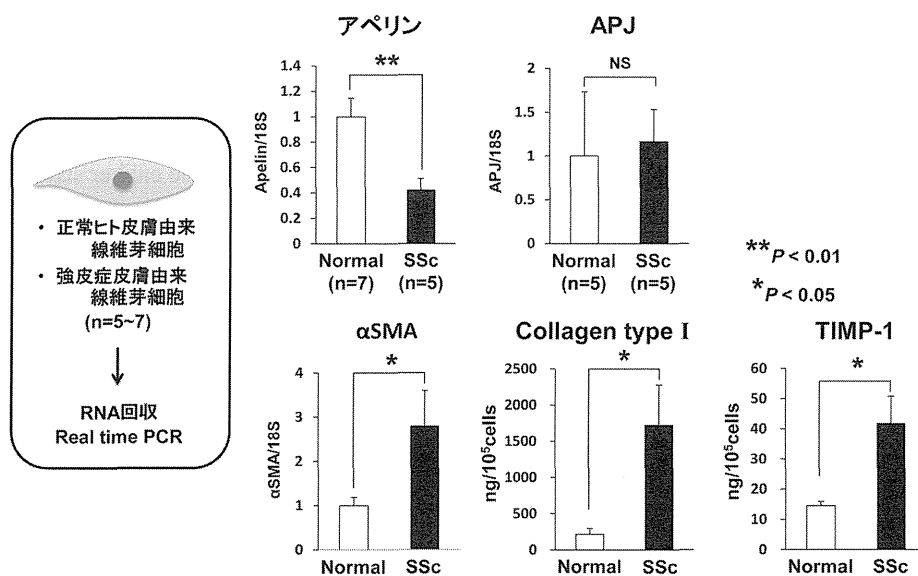


図1：強皮症と正常ヒト皮膚由来線維芽細胞のアペリン/APJ発現量の比較
強皮症由来線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下している。

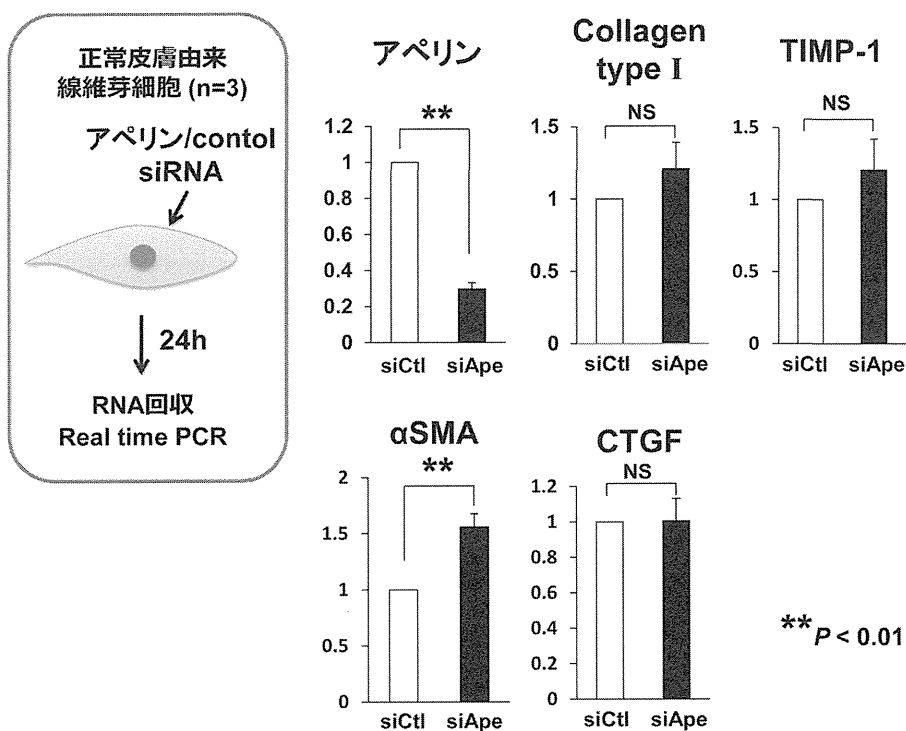


図2：アペリン siRNA による正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響
siRNA によるアペリンの発現抑制によって、線維芽細胞の α SMA の発現が亢進した。

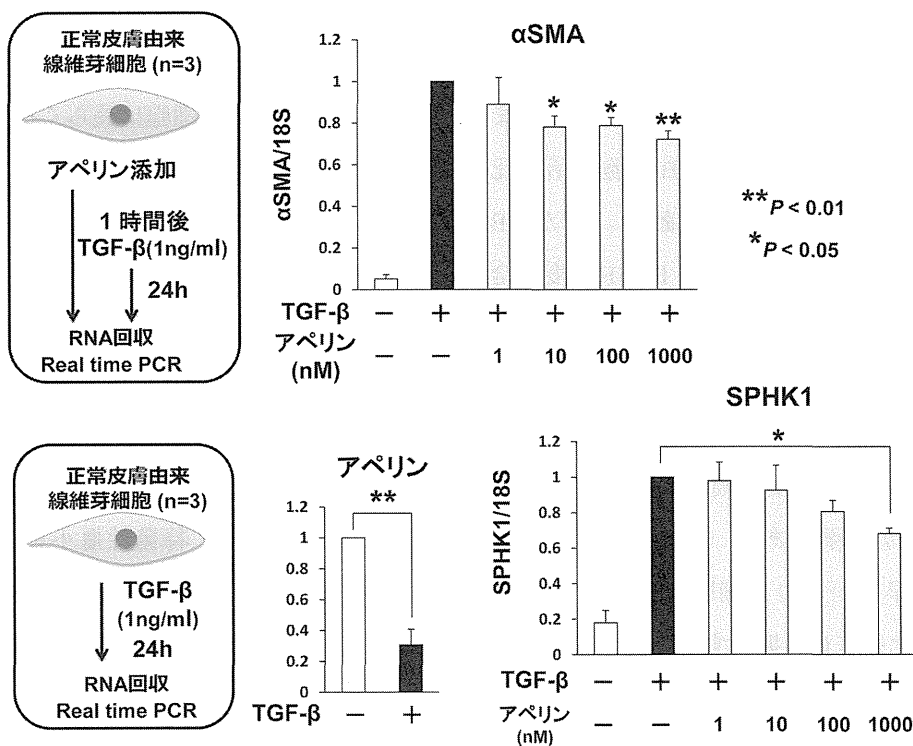


図3：アペリン添加による正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響
アペリンは、TGF- β 刺激による α SMA, 1 型コラーゲン、TIMP-1 の発現亢進に対して、SPHK1 の発現制御を介して抑制的に働いている可能性が示唆された。

マウス皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおける 制御性 B 細胞の役割についての検討

研究分担者 藤本 学 筑波大学医学医療系皮膚科 教授
研究協力者 長谷川稔 福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学 教授
協力者 松下貴史 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 講師
協力者 濱口儒人 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 准教授
協力者 竹原和彦 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授
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

制御性 B 細胞は IL-10 産生を介して免疫反応を抑制する。今回、強皮症の病態における制御性 B 細胞の役割を検討するため、制御性 B 細胞を遺伝的に欠く CD19 欠損マウスを使用し、強皮症のマウスモデルである皮膚硬化型慢性 GVHD を誘導した。CD19 欠損マウスは野生型マウスと比べより重症の皮膚硬化型慢性 GVHD を発症した。以上より制御性 B 細胞が強皮症の病態に抑制的に働く可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は抗核抗体に代表される自己免疫現象を背景に、皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管病変によって特徴づけられる膠原病である。これまでに全身性強皮症患者の病態には B 細胞の活性化や分化の異常が示されている（文献 1）。また、B 細胞の強力な活性化因子である血清 BAFF 濃度が全身性強皮症患者において上昇しており、皮膚硬化の重症度と相関していることが示されている（文献 2）。さらに、全身性強皮症の動物モデルマウスである Tight skin (Tsk) マウスの皮膚硬化の進展には B 細胞の異常活性化が重要であり（文献 3）、抗 CD20 抗体による発症早期からの B 細胞除去療法が、Tsk マウスの皮膚硬化を有意に抑制することが示されている（文献 4）。以上より、全身性強皮症患者ならびに強皮症モデルマウスの病態および線維化において B 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。自己免疫疾患における B 細胞の

重要性は、関節リウマチ患者においてリツキサン[®]（抗 CD20 抗体）による B 細胞除去療法が予想以上の治療効果を挙げたことから、全世界で脚光を浴びるようになった。B 細胞は長らく抗体産生能ばかりが注目されていたが、抗体産生のみならず抗原提示能、サイトカイン産生、T-B 細胞相互作用を介して免疫反応を促進することが示され、自己免疫疾患における B 細胞の重要性が飛躍的に高まることとなった。その後、自己免疫疾患に対する B 細胞除去療法の適応疾患は急速に拡大され、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、皮膚筋炎、天疱瘡、ANCA 関連血管炎、特発性血小板減少性紫斑病など枚挙に暇がない。さらに近年、全身性強皮症に対する B 細胞除去療が複数報告され、治療効果が認められたとの報告も散見される。しかしながら、B 細胞除去療法が自己免疫疾患に対して必ずしも有益でない症例も報告されており、リツキサン[®]投与後に多発性硬化症の再発が誘導された症例や尋常性乾

癬を発症した症例などが存在する。この理由としては、B細胞が自己免疫や炎症を促進する作用だけでなく、抑制する作用も併せ持っているため、B細胞除去療法により自己免疫現象を増悪させた可能性が考えられる。この相反するB細胞集団は、“悪玉”と“善玉”B細胞の概念で理解されている。“悪玉”B細胞はeffector B細胞と呼ばれ、T細胞の活性化作用をもち、自己免疫や炎症を促進する働きがある。一方、“善玉”B細胞は制御性B細胞と呼ばれ自己免疫や炎症を抑制する働きがある（文献5）。制御性B細胞はIL-10を特異的に産生するB細胞亜集団と定義され、IL-10の産生により過剰な免疫反応や炎症を抑制する。近年、IL-10産生制御性B細胞がCD1d^{high}CD5⁺の表現型を有し（文献6）炎症反応および自己免疫反応の抑制に非常に重要であることが示されている（文献7,8）。この制御性B細胞を制御する分子としてCD19が重要であり、CD19を遺伝的に欠損したマウスでは制御性B細胞が欠損しているため炎症反応や自己免疫反応の増悪が認められる。

全身性強皮症は皮膚硬化型慢性GVHD (Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease, Scl-cGVHD) との共通点が知られている（文献9）。B10.D2 (H-2^d) マウスの骨髄をBALB/c (H-2^d) マウスに移植することにより皮膚硬化型慢性GVHDを誘導することができ、強皮症のモデルマウスとして有用である。

今回、我々はCD19欠損マウスを使用し、強皮症モデルマウスにおける制御性B細胞の役割を検討した。

B. 研究方法

1. マウス

レシピエントとして、BALB/c (H-2 d) マウスないしはCD19欠損BALB/c (H-2 d) マウスを使用し

た。ドナーとして、B10.D2 (H-2d) マウスないしはCD19欠損B10.D2 (H-2d) マウスを使用した。

2. Scl-GVHD モデル

B10.D2 マウスから骨髄細胞（10 x10⁶ 細胞）と脾臓細胞（10×10⁶ 細胞）を採取し、800 cGy 照射されたBALB/c (H-2 d) マウスに骨髄移植し、皮膚硬化型慢性GVHDを誘導した。

3. GVHD スキンスコア

以下のスコアリングシステムを用いた。

スコア0=正常、スコア1=皮膚病変<1 cm²、スコア2=皮膚病変1-2 cm²、スコア3=皮膚病変2-5 cm²、スコア4=皮膚病変5-10 cm²、スコア5=皮膚病変10-15 cm²、スコア6=皮膚病変15-20 cm²、スコア7=皮膚病変>20 cm²。尻尾の皮膚病変は0.4、耳や手足の皮膚病変を0.3とし、すべての合計点で示した。

4. 病理組織学的検討

皮膚病変はH&E染色、Masson's trichrome染色にて評価した。病理組織学的スコアはepidermal morphology, dermal fibrosis, inflammation, subdermal fat, skin appendage numberをそれぞれ0-2で評価した。

5. 統計

全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で示した。有意差検定はStudent's t testを使用した。

C. 研究結果

1. CD19欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性GVHD

CD19欠損マウスは遺伝的にIL-10産生制御性B細胞を欠損しているため制御性B細胞の解析に有用である。CD19欠損B10.D2マウス(ドナーマウス)およびCD19欠損BALB/cマウス(レシピエントマウス)を作製し、皮膚硬化型慢性GVHDモデルを誘導して制御性B細胞の役割を解析した。CD19欠

損 B10.D2 マウスの骨髄および脾臓を、放射線照射された BALB/c マウスに移入したところ（ドナー由来の制御性 B 細胞だけが欠損している）、コントロール群に比べより重症の皮膚硬化型慢性 GVHD を発症した（図 1）。一方、B10.D2 マウスの骨髄および脾臓を、放射線照射された CD19 欠損 BALB/c マウスに移入した場合は（レシピエント由来の制御性 B 細胞だけが欠損している）、コントロール群と比べ有意差がなかった。以上の結果より、皮膚硬化型慢性 GVHD マウスの抑制機序においてドナー由来の制御性 B 細胞が重要であることが示された。

2. CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD の病理組織学的検討

コントロール群と CD19 欠損ドナー群の皮膚硬化型慢性 GVHD の背部皮膚および肺での線維化を組織学的に検討したところ CD19 欠損ドナー群では IL-10 産生制御性 B 細胞が存在しないため炎症反応および線維化の抑制作用が減弱し、より高度な線維化が認められた（図 2）。

3. 制御性 B 細胞移入による CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD に対する効果

CD19 欠損 B10.D2 マウスをドナーとして使用（ドナー由来の制御性 B 細胞だけが欠損している）した皮膚硬化型慢性 GVHD マウスに制御性 B 細胞（CD1d^{hi}CD⁵⁺ B 細胞）と他の B 細胞（CD1d^{lo}CD⁵⁺ B 細胞）をそれぞれ骨髄移植と同日に移植したところ、制御性 B 細胞（CD1d^{hi}CD⁵⁺ B 細胞）を移植した群では皮膚硬化型慢性 GVHD の改善効果が認められた（図 3）。しかしながら、骨髄移植後 21 日目に制御性 B 細胞（CD1d^{hi}CD⁵⁺ B 細胞）を移植しても、皮膚硬化型慢性 GVHD の改善効果は認めなかった。以上の結果より、制御性 B 細胞は皮膚硬化型慢性 GVHD の発症早期において抑制効果を有していること、さらには慢性 GVHD に対する制御性 B 細胞

を用いた治療の可能性が示された。

D. 考案

皮膚硬化型慢性 GVHD マウスモデルの実験から、制御性 B 細胞は強皮症病態において抑制的に働くことが明らかとなった。

ヒトでの制御性 B 細胞の研究も進んでおり、ヒトの IL-10 産生性 regulatory B 細胞は CD19⁺CD-24^{hi}CD38^{hi} または CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ と報告されている。近年、全身性強皮症に対する B 細胞を標的とした抗体療法が注目されており、rituximab 以外にも種々の抗 CD20 抗体、抗 CD22 抗体（epratuzumab）、抗 BAFF 抗体（belimumab）が使用され始めている。今後、全身性強皮症の治療として B 細胞除去療法が行われることが予想されるが、制御性 B 細胞の存在にも留意する必要があると思われる。

E. 結論

制御性 B 細胞は強皮症モデルマウスにおいて抑制的に働くことが示された。

F. 文献

1. Sato S, et al. Arthritis Rheum 50: 1918-27,2004
2. Matsushita T, et al. Arthritis Rheum 54: 192-201, 2006
3. Saito E, et al. J Clin Invest 109: 1453-62,2002
4. Hasegawa M, et al. Am J Pathol. 169(3): 954-966. 2006
5. DiLillo DJ, et al. Ann N Y Acad Sci.1183: 38-57. 2010
6. Yanaba K, et al. Immunity 28, 639-650. 2008
7. Matsushita T, et al. J Clin Invest 118: 3420-30. 2008;
8. Matsushita T, et al. J Immunol. 85: 2240-52. 2010

9. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117 (3): 557-67.

important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood* 121: 3274-3283.

2. 学会発表

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Le Huu, D., Matsushita, T., Jin, G., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Takehara, K., Tedder, T.F., and Fujimoto, M. 2013. Donor-derived regulatory B cells are

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

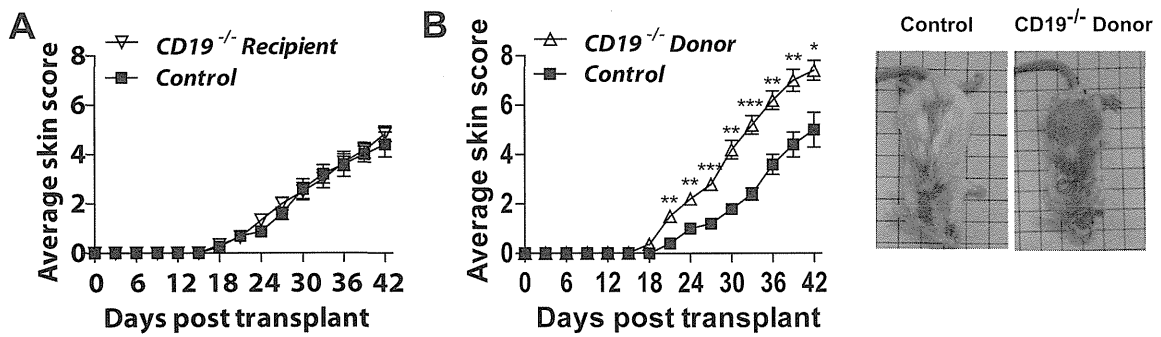


図1：CD19欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性GVHD

(A) レシピエント由来の制御性B細胞が欠損 (CD19^{-/-} recipient)。(B) ドナー由来の制御性B細胞が欠損 (CD19^{-/-} donor)。
*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

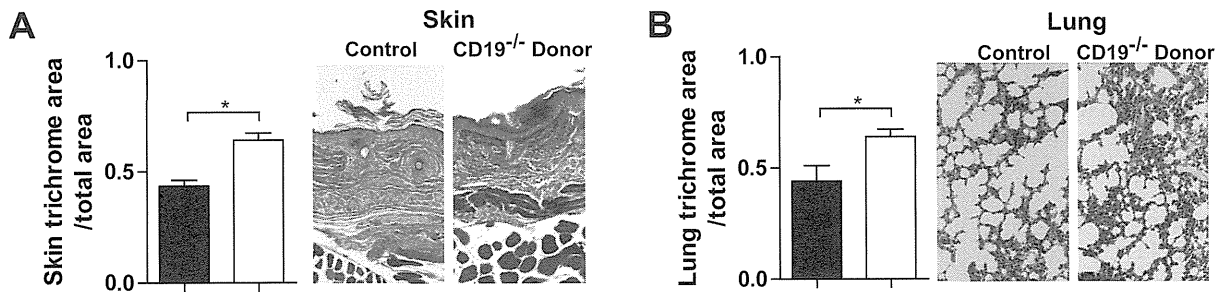


図2：ドナーCD19欠損マウスにおける皮膚および肺の線維化

(A,B) ドナーCD19欠損マウスとコントロールマウスの皮膚および肺を骨髄移植後42日後に採取し、trichome染色にて線維化の程度を評価した。*p<0.05

A Cell separation

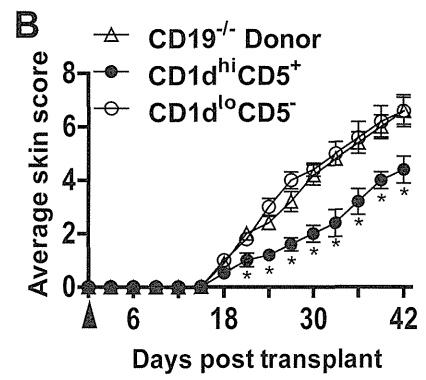
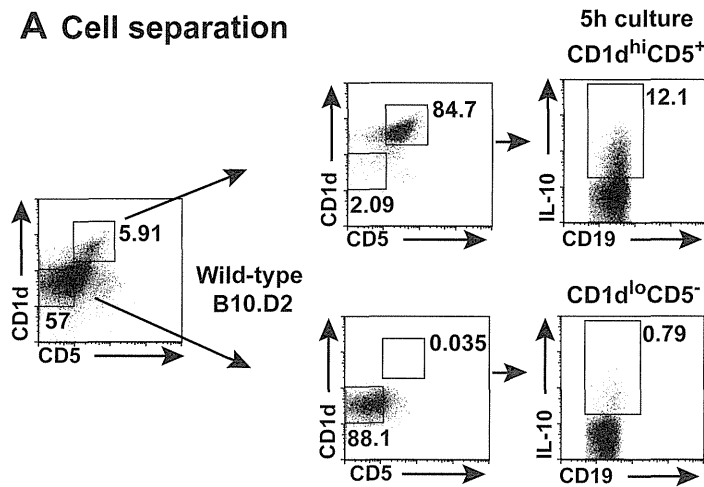


図3 : CD1^{hi}CD5⁺ 制御性 B 細胞の移植実験

(A) CD1^{hi}CD5⁺ B 細胞と CD1^{lo}CD5⁻ B 細胞を FACS でソーティング。5 時間培養後に IL-10 の産生を測定すると、CD1^{hi}CD5⁺ B 細胞群のみで IL-10 の産生が認められた。

(B) ドナー CD19 欠損マウスに CD1^{hi}CD5⁺ B 細胞を移植すると皮膚硬化型慢性 GVHD の改善がみられた。一方、CD1^{lo}CD5⁻ B 細胞を移植しても改善効果は認められなかった。*p < 0.05

全身性強皮症の皮膚線維化における IL-20 の関与の検討

研究分担者 尹 浩信 熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 教授

協力者 工藤英郎 熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 大学院生

協力者 神人正寿 熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 講師

研究要旨

インターロイキン (IL)-20 は様々なリウマチ性疾患の病態に関与していると考えられているが、全身性強皮症 (Systemic sclerosis; SSc) における役割はこれまで検討されていない。我々は、培養皮膚線維芽細胞において IL-20 刺激により I 型コラーゲン蛋白発現が減少していることを見出した。この機序として、IL-20 は Fli1 発現亢進を介して I 型コラーゲン遺伝子転写を低下させると同時に、Smad3 や endoglin の発現低下を引き起こし、SSc 皮膚線維芽細胞における TGF- β の作用を抑制する可能性が示唆された。一方、IL-19 や IL-24 はコラーゲン発現に影響を与えなかった。また、マウスモデルでは IL-20 投与によってプレオマイシン誘発性皮膚線維化を改善させることができた。IL-20 投与は SSc の新しい治療につながる可能性がある。

A. 研究目的

IL-20 は IL-10 ファミリーに属するサイトカインであり、主に単球やケラチノサイトなどに発現し、様々なリウマチ性疾患の病態形成に関与している¹⁻⁴。しかし、細胞外マトリックス発現調節や SSc の表現型への寄与については未だ解明されていない。本研究では、培養皮膚線維芽細胞における IL-20 の I 型コラーゲン発現への影響について検討した。また、健常者および SSc 患者において血清および皮膚組織における IL-20 発現を比較した。さらに SSc で見られる細胞外マトリックス調節異常に対する IL-20 シグナル伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 患者背景

血清試料は 33 人の SSc 患者 (男性 5 人、女性 28 人; 年齢 24-85 歳 (平均 58.4 歳)) より取得した。内訳は、dcSSc は 13 人、lcSSc は 20 人であった。

健常群 15 名は年齢および性別一致する者を選択した。10 名の全身性エリテマトーデス患者、12 名の皮膚筋炎患者からも血清を採取した。皮膚生検は非露光部の体幹もしくは前腕より行った。検体取得に際して、熊本大学大学院生命科学研究部倫理委員会より承諾された文書にて説明し同意、署名を得た。

2) 細胞培養

SSc 皮膚線維芽細胞の取得は発症 2 年以内の dcSSc 患者の前腕から施行した。健常成人の皮膚については手術の際に不要となった植皮片を利用した。検体採取に際しては、ヘルシンキ宣言の精神を尊重し、熊本大学大学院生命科学研究部倫理委員会より承諾された文書にて説明し同意、署名を得た。初代培養は 10% ウシ血清、抗生剤、抗真菌剤を加えた Eagle 培養液で 37°C、5% の CO₂ 濃度、培養器内で個別にシャーレ上で培養を行った。フラスコ内で単層培養にて維持し、3-7 回継代した細胞を用いた。

3) タンパク量の評価は免疫ブロット法を用いて、mRNA 量の評価はリアルタイム PCR 法を用いて確

認した。

4) 免疫沈降法

培養皮膚線維芽細胞を PBS で洗浄後、回収し、Pierce IP lysis buffer (Thermo, Rockford, IL)、Halt phosphatase inhibitor cocktail (Thermo)、Protease Inhibitor Cocktail[®] (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を加え、タンパクを抽出した。細胞溶解液に control IgG と protein G-Sepharose (GE Healthcare, Waukesha, WI) を加えてプレクリアを行い、monoclonal mouse Fli1 antibody (BD Bioscience, San Jose, CA) と protein G-Sepharose beads を加え、4°C でローテーションさせながら一晩反応させた。Pierce IP lysis buffer で洗浄後、アガロースに結合したタンパクを sample buffer で 95°C 熱処理を行い抽出し、免疫プロット法にて検出した。1 次抗体はそれぞれ polyclonal rabbit antiphospho-Fli1 antibody (東京大学皮膚科浅野善英先生より提供)⁵ と anti-acetylated lysine antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) を使用した。転写膜はストリッピングを行い、rabbit polyclonal anti-Fli1 antibody (Santa Cruz Biotechnology) にて再反応を行なった⁶。

5) クロマチン免疫沈降法

EpiQuik ChIP kit (Epigentek, Farmingdale, NY) を用いてプロトコールに従って実験を行なった⁵。培養皮膚線維芽細胞をトリプシンにて回収し、1%ホルムアルデヒドで 10 分間固定を行い、架橋されている DNA を超音波処理装置にて剪断した。DNA の断片を IgG isotope control antibody または polyclonal anti-Fli1 antibody にて免疫沈降を行い、回収したサンプルを $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子のプライマー (forward, 5'-CTGGACAGCTCCTGCTTTGAT-3' reverse, 5'-CTTTCAAGGGGAAACTCTGACTC-3') を用いて PCR にて増幅させ、エチジウムブロマイド入りのアガロースゲルで電気泳動を行なった。

6) ブレオマイシン誘発性強皮症モデルマウスの作成

ブレオマイシン (日本化薬) を PBC にて 1 mg/ml になるよう希釈し、BALB/c マウスの剃毛した背部皮内にブレオマイシン 300 μ g もしくは PBS を 4 週間連日注射した⁷。注射最終日の翌日に背部皮膚を採取後、10% ホルマリン固定し、パラフィン包埋した。

7) プラスミド構築、一過性形質導入、CAT アッセイ

完全長のヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子と 5' の欠失したシリーズにそれぞれクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) を連結させプラスミドを構築した⁸。CAT アッセイのため、培養線維芽細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を導入試薬として構築したプラスミドを形質導入した⁸。導入効率のわずかな変動を補正する目的で、pSV- β -galactosidase vector (Promega, Madison, WI) を全ての反応に含ませた。48 時間インキュベートさせた後、細胞を回収し、CAT-ELISA (Roche, Mannheim, Germany) にて細胞溶解物における CAT 活性を比色分析した⁹。siRNA のリバーズ法での形質導入では、siRNA は導入試薬である Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) と混和し、培養液中の線維芽細胞に反応させた後、細胞をシャーレに播種し、48 時間、37°C、5%CO₂ でインキュベートした。Fli1 に対する siRNA とコントロール siRNA は Dharmacon (Rockford, IL) より購入した。

8) 免疫蛍光顕微鏡検査法

培養皮膚線維芽細胞を four-well LAB TEK chambers (Nunc, Naperville, IL) 上でサブコンフルエントになるまで増殖させた。4% パラホルムアルデヒドで 15 分間固定を行い、PBS で洗浄後、1% BSA/PBS (pH 7.3) でブロッキングを行なった。1 次抗

体は IL-20R を 2 次抗体は the donkey anti-goat IgG-FITC (ともに Santa Cruz Biotechnology) を用いて行なった。蛍光を可視化するため Zeiss の蛍光顕微鏡を使用した¹⁰。

9) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

血清 IL-20 濃度は、ELISA kit (Human IL-20 Immunoassay, R&D Systems) を用いて測定を行なった^{11,12}。IL-20 抗体がプレコートされたマイクロタイターウェル内に、IL-20 のペルオキシダーゼ標識抗体に続いて、患者血清を一定分量加えた。発色は過酸化水素とテトラメチルベンジンはペルオキシダーゼを用いて 450 nm における吸光度を測定した。波長補正は 540 nm で行なった。各サンプル中の IL-20 濃度は標準曲線からの補正值により求めた。

10) 免疫染色

4 μ m 薄切したパラフィン包埋組織にキシレンを用いて脱パラフィン、アルコールを用いて脱水した。抗原賦活化液 pH 9 (ニチレイ) にて 10 分間、121 $^{\circ}$ C にてオートクレーブ処理を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性阻害のために、5% ヤギ血清にて常温で 20 分間静置した後に、1 次抗体を 0.5% ウシ血清アルブミン溶液で希釈し、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。1 次抗体の濃度は IL-20 (1 : 100)、IL-20R (1 : 100)、Fli1 (1 : 50)、Smad3 (1 : 50) とした。PBS で洗浄後、HRP 標識した 2 次抗体 (Nichirei, Tokyo, Japan) を滴下し、1 時間反応させた。PBS 洗浄後、HRP の基質である diaminobenzidine (Dojin, Kumamoto, Japan) を反応させ、シグナルを検出し、Mayer's hematoxylin で核染色を行なった。標本は光学顕微鏡 (Olympus BX50; Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。

11) 統計学的分析

バーグラフで表示された結果は、少なくとも 3 回の独立した実験データの平均 + SE に基づくもので

ある。統計解析には統計解析ソフト Statcel3 (OMS) を用いた。独立した 2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を使用した。臨床所見や検査所見の比較には Fisher's exact probability test を使用した。P < 0.05 を統計学的な有意差と判断した。

C. 研究結果

1) 培養線維芽細胞において IL-20 が細胞外マトリックス関連遺伝子の発現に及ぼす効果

まず、細胞外マトリックスの発現に対する IL-20 の効果について調べるために、84 の細胞外マトリックス関連遺伝子を含むキットを用いて PCR アレイを行なった。サンプルとしては 3 系統の独立した健康人の皮膚組織から作成した培養線維芽細胞を用いた。24 時間の無血清培地による処理を行なった後、IL-20 (100 ng/ml) で 12 時間刺激を行なった群と非刺激群をそれぞれ分け、全 RNA の回収を行なった。3 名のサンプルを同量ずつ混合し、刺激群と非刺激群で PCR 反応を行い、 $\Delta\Delta$ Ct 法にて比較を行なった。結果は 16 fold change 以上のもののみを示す (表 1)。この中でも、我々はヒト α 2(I) コラーゲン遺伝子の発現が IL-20 刺激により (0.03-fold) 減少していることに着目した。定量的リアルタイム PCR 法にて α 1(I) と α 2(I) コラーゲンの両方で特異的なプライマーを用いて、サンプル数を (n=7) 増やして行なったところ、PCR アレイの結果と一致して、 α 1(I) と α 2(I) コラーゲンの mRNA は、IL-20 刺激により、ともに発現が有意に低下した (図 1A)。さらに免疫ブロット法では I 型コラーゲンのタンパク産生は IL-20 刺激により濃度依存性に減少し、その差は有意であった (図 1B)。次に IL-20 による I 型コラーゲンの発現低下は、転写レベルまたは翻訳レベルで行なわれるかどうか判断するために、コラーゲン mRNA の安定性を検証した。mRNA の定常状態レ

ベルは遺伝子の転写または mRNA の安定性のレベルによって制御されるため、線維芽細胞に RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D を加えることによって、IL-20 存在下でも非存在下でも de novo mRNA の合成はブロックされる。アクチノマイシン D 処置後の I 型コラーゲン mRNA の減少率に 2 群間で有意差は認められなかった (図 2A)。同様に de novo タンパク合成およびタンパク分解酵素の発現時にシクロヘキシミドでブロックしたところ、IL-20 刺激はコラーゲタンパクの半減期にほとんど影響を与えなかった (図 2B)。このようにコラーゲンの mRNA やタンパクの安定性に対する IL-20 の効果は明らかでなく、むしろタンパク質分解酵素はコラーゲン発現に対する IL-20 の効果に参与する可能性は低いと考えられた。したがって、IL-20 はコラーゲンの mRNA やタンパクの安定性には影響せず、転写レベルに影響を与えていると考えた。次に IL-20 によるヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーターの応答領域を明らかにするために、正常線維芽細胞における IL-20 の存在下または非存在下で CAT レポーター遺伝子に連結されたプロモーターの 5' 末端欠失変異体の活性を比較した。全長の塩基対 -3500 ~ +58 bp の construct、および -353 ~ +58 bp の construct ではともに IL-20 刺激により、非刺激群と比較してプロモーター活性の低下を認めた (0.3-fold)。一方、さらに短い -264 ~ 58 bp の construct では IL-20 刺激による変化が認められなかった。このため IL-20 に対する応答領域は -353 ~ -264 bp の間に存在することが示された (図 3)。IL-20 に対する応答領域 (-353 ~ -264 bp) には Sp1、Ets ファミリー転写因子 (Ets1, Fli1 など) および CCAAT/エンハンサー結合タンパク β (C/EBP β) の結合部位が含まれている。PCR アレイの結果によると Sp1 と C/EBP β の発現は IL-20 による影響はほ

とんど受けなかった。リアルタイム PCR では IL-20 は Fli1 の mRNA 発現を誘導することを示したが、Ets1 の変化は有意ではなかった (図 4A)。さらに、Fli1 のタンパク発現も IL-20 刺激により増加した (図 4B)。Fli1 は Ets1 と結合部位を共有する。加えて Fli1 は in vitro の過剰発現系において Ets1 と競合して $\alpha 2(I)$ コラーゲンのプロモーター活性を阻害することによって、Ets1 と Fli1 のバランスはコラーゲン発現をコントロールすると考えられている¹³⁻¹⁵。我々は Ets1 と Fli1 タンパク発現の比率は IL-20 刺激により有意に減少することを突き止めた。また、過去の文献によると、Fli1 タンパクの安定性や転写活性は、リン酸化やアセチル化といった翻訳後修飾により厳密に制御されていると考えられている⁶。しかし、IL-20 は Fli1 のリン酸化やアセチル化を変化させなかった (図 4C)。ただし、IL-20 はクロマチン免疫沈降法においてはコラーゲンプロモーター上の Fli1 活性を増加させた (図 4D)。これらの結果は、IL-20 がリン酸化やアセチル化を変化させることなく、直接 Fli1 mRNA レベルの誘導を通じて Fli1 タンパクを増加させることを示している。一方で、我々はリアルタイム PCR によって、その他のヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲンプロモーター関連の転写因子の mRNA 発現を調べた。c-Myb, c-fos および c-jun の発現は IL-20 による影響を受けなかった (図 4A)。Caveolin-1 は PCR アレイでは IL-20 によって発現低下したが、サンプル数を増やすとその差は有意ではなくなった (n=7, 図 4E)。Smad3 と endoglin といった TGF- β シグナル伝達の媒介物はアレイの結果と一致し、IL-20 によって mRNA の発現は減少した (図 4E)。しかしながら、Smad3 や endoglin は無刺激下ではコラーゲンの転写に影響を及ぼさないことが示されており^{16,17}、これらの減少では正常線維芽細胞において IL-20 により $\alpha 2(I)$ コラーゲン

発現が低下することを説明できない。従って、IL-20はFli1の発現を介してI型コラーゲンの転写を減少させていると考えた。我々の仮説と一致して、IL-20のコラーゲン転写活性抑制効果はFli1 siRNAの一過性形質導入によって抑制された(図4F)。はじめに記載したようにIL-20, IL-19およびIL-24はそれぞれ異なる機能を持つものの、受容体を共有している¹⁸。我々はIL-19, IL-24についてもin vitroでコラーゲン発現を調節するかどうかを調べた。免疫ブロット法にてIL-19およびIL-24刺激を加えた正常線維芽細胞は無刺激の細胞と比較してI型コラーゲン発現に有意な変化はなかった(図5A-D)。またEts1とFli1の比率についても同様に免疫ブロット法にて検証したが、特に有意な変化はなかった(図5E, F)。従って、IL-20受容体に関連するサイトカインのうち、Fli1発現亢進を介してコラーゲンの発現低下を引き起こすのはIL-20に特異的である可能性が高いと考えた。

2) 強皮症患者血清と皮膚組織におけるIL-20の発現

次に、我々はELISA法によってSSc患者における血清IL-20濃度を測定した。コントロールとして年齢と性別の合致した健常人と、比較のため全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus; SLE)や皮膚筋炎(Dermatomyositis; DM)などのリウマチ性疾患患者の血清サンプルも同時に測定した。図6Aに示すように、平均血清IL-20濃度は健常人と比較して各種リウマチ性疾患にてやや減少を認めしたが、有意差はなかった。一方で、SScの診断基準は満たさないが、将来的にSScへと進行する可能性が高い¹⁹⁻²¹と言われているSSD患者では有意に血清IL-20濃度の低下を認めた。表2はSSc患者の臨床症状および検査所見と血清IL-20濃度との関連を示している。IL-20減少群(健常人の平均値以下)では正常群と比較して食道病変の有病率(52.9対

12.5%, $P < 0.05$)が有意に高かった。Modified Rodnan's total skin thickness score (MRSS)もわずかとはいえ、IL-20減少群で上昇した。しかし対照的に、IL-20 mRNA発現はSSc患者の皮膚組織で健常人と比較して有意に減少していた(図6B)。さらにパラフィン包埋皮膚切片を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、正常皮膚では表皮にIL-20の発現が強く検出されたが、SScの萎縮性表皮においてはほとんど検出されなかった(図6C)。このように血清IL-20濃度はSScの前駆症状の段階で減少しているのに対し、SSc皮膚組織におけるIL-20発現は恒常的に減少している。また、IL-20受容体が皮膚線維芽細胞に発現しているという報告は過去にはなかったが、in vivoでの免疫染色において、正常皮膚とSSc皮膚組織では同程度に紡錘形の細胞にIL-20受容体タンパク発現が認められた(図7A)。また、パラフィン包埋切片より抽出した全RNAを用いてリアルタイムPCR法を行なったところ、正常皮膚とSSc皮膚組織ではIL-20受容体発現は同程度であり(図7B)、in vitroで培養線維芽細胞を用いての免疫ブロット法(図7C)と蛍光免疫顕微鏡検査(図7D)では、どちらもIL-20受容体発現は正常とSScを比べて明らかな差はなかった。まとめると、IL-20はI型コラーゲン発現に対して抑制的に働き、SSc皮膚組織でIL-20発現低下が起こっていることはコラーゲンの過剰な蓄積と線維化に寄与していると考えられる。

3) TGF- β 刺激した正常線維芽細胞とSSc線維芽細胞におけるI型コラーゲン発現に対するIL-20の効果

次にTGF- β 刺激した正常線維芽細胞においてIL-20がI型コラーゲン発現に及ぼす影響について検証した。外因性のIL-20はI型コラーゲン発現を減少させるとともに、IL-20存在下ではTGF- β はコ

ラーゲン発現を誘導することができない (図 8A)。つまり、IL-20 は TGF- β の作用を抑制するだけでなく、I 型のコラーゲン発現を減少させる 2 つの効果を発揮していると考えられる。予想通り TGF- β 存在下で IL-20 によって Fli1 タンパク質の発現は増加し (図 8B)、一方で Smad3 や endoglin の発現が有意に減少した (図 8C)。IL-20 は Fli1 の誘導を介しコラーゲン転写を減少させ、一方で Smad3 や endoglin を発現低下させて、TGF- β の効果を抑制しているかもしれない。SSc の線維芽細胞においても、TGF- β 刺激した正常線維芽細胞と同様にコラーゲンタンパク発現の減少 (図 9A) や Fli1 タンパク発現の誘導 (図 9B)、Smad3 や endoglin の減少 (図 9C) が観察された。

4) プレオマイシンによる皮膚線維化モデルマウスに対する IL-20 の効果

マウスの皮膚にプレオマイシンを注射することによって誘導される線維化は SSc のマウスモデルとして使用されている⁷。図 10 ではヒトの免疫染色と同様に、マウスにおいてもコントロールマウスでは表皮に IL-20 の発現が強く見られるのに対し、プレオマイシンマウスでは表皮の IL-20 発現は減少していた。炎症細胞や血管内皮細胞における IL-20 発現の差はコントロールマウスとプレオマイシンマウスを比較してもわずか、あるいは同等であった。従って、我々は IL-20 を補充することによって SSc の線維化を改善させることができるかどうかプレオマイシンマウスモデルで検証することにした。実験方法に記載したように、プレオマイシン (300 μg) またはコントロールとして PBS をマウスの背部の皮膚に局所的に週 6 回注射した。同時に週 1 回は PBS または IL-20 (3.5 μg) を注射した。プレオマイシンを投与しなかった群では IL-20 はわずかに皮膚の厚さを低減させたが、統計学的に有意ではなかった。

IL-20 を投与しなかったプレオマイシン投与群では肥厚したコラーゲン線維束は著明に増加したが、IL-20 投与群ではプレオマイシンにより誘発された皮膚肥厚を改善させた (図 11A)。パラフィン包埋したマウスの皮膚切片を用いた免疫組織化学染色では、in vitro の結果と一致して、線維芽細胞様紡錘形細胞において Smad3 の発現はプレオマイシンマウスで減少した一方で、Fli1 の発現は増加した (図 11B)。また、皮膚の厚さを測定したところ、IL-20 によってプレオマイシン誘発性の皮膚肥厚は統計学的に有意に改善することが示された (図 11C)。また、プレオマイシン投与群では皮膚組織切片のコラーゲン含有量は IL-20 によって統計学的に有意に減少していた (図 11D)。このように、IL-20 の投与はプレオマイシンによって誘発される線維化を改善させることが示された。

D. 考案

皮膚において、IL-20 はケラチノサイトの増殖を誘導することは知られているが、真皮の線維芽細胞への影響は未だに調べられていない。我々の研究では、 $\alpha 2$ (I) コラーゲン mRNA の発現は転写レベルにおいて IL-20 により減少するが、それは正常線維芽細胞において Fli1 タンパク発現の誘導を介して生ずることを明らかにした。本研究では、 $\alpha 1$ (I) コラーゲンの調節機構については明らかにしなかった。しかし、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ は協調して働くことが知られており、我々は同様のメカニズムで IL-20 刺激により $\alpha 1$ (I) コラーゲン発現低下が生じたのかもしれないと考えた⁷。また、SSD 患者では健常人と比べて血清 IL-20 濃度が統計学的に有意に低下していた。前述したように、SSD は SSc の前駆症状の段階であり、SSc の線維化は不可逆であるため、早期診断と慎重なフォローアップが必要とされる。このため SSD

の概念は有用である。血清 IL-20 濃度は、健常人と SSD 患者を区別する上で有用である可能性がある。一般的に SSD 患者では線維化が生じていないが、本研究における症例では血管障害に関連づけられる顕著な臨床症状を示していた (表 3)。血管新生における IL-20 の役割に関する報告がいくつかあることを考えると、SSD 患者における血清 IL-20 濃度の減少は血管障害の病因と結びつき、線維化を誘導している可能性があることを示唆している^{22,23}。しかし、本研究に含まれる SSD 患者の全てが将来的に SSc へと進展することが確立されている訳ではない。このため、SSD から SSc へと進展した患者の血清 IL-20 濃度に関する経時的研究を行なうことが将来的に必要である。我々は IL-20 の発現が SSc の表皮において減少していることを明らかにした。IL-20 を媒介とする SSc の線維化仮説モデルを図 12 に示す。SSc の皮膚における IL-20 の発現減少は Fli1 の発現低下を誘導し、SSc の線維芽細胞を活性化させ、コラーゲンの過剰発現を促す可能性がある。Fli1 は SSc 線維芽細胞において恒常的に発現が低下していることが報告されており、それはおそらく TGF- β シグナル伝達²⁴ および IL-20 減少により Fli1 の発現低下を増強させていると考えられている。外因性の IL-20 を投与することは Fli1 発現量の回復と Smad3 および endoglin の抑制を介して、効果的にコラーゲンの発現を減少させると考えられた。また、SSc では表皮萎縮が知られており、これはケラチノサイトの増殖因子である IL-20 が減少することが関与しているかもしれないと考えた。一方、乾癬においては IL-20 が表皮において過剰発現し、特徴的なケラチノサイトの増殖および表皮肥厚につながると考えられている²⁵。これは乾癬の皮膚が慢性炎症にも関わらず真皮の線維化から保護されている理由を説明するかもしれない。我々はマウスモデルにおける

IL-20 の補充によってブレオマイシン誘発性線維化を改善させることができた。このモデルは SSc の線維化に対する IL-20 による治療の有効性を示すものである。現状ではステロイド、シクロフォスファミドおよびメトトレキセートが SSc の重度の皮膚線維化に対する第一選択薬として考えられている^{26,27}。しかし、従来行なわれているこれらの治療法は限定的な効果しか持っておらず、さらに多くの場合、様々な重大な副作用を伴う²⁸。IL-20 による線維化調節機構を明らかにすることは、この病気によりよい理解と新しい治療法につながる可能性がある。しかしながら、in vivo および in vitro の間で生じた実験結果における潜在的な矛盾については考えておく必要がある。例えば、更なる研究としてマウスの線維芽細胞における IL-20 受容体の機能および発現を検討する必要がある。同様に in vitro で Fli1 siRNA がコラーゲンに対する IL-20 の阻害効果を抑制するといった結果は、in vivo においても Fli1 ノックアウトマウスにおいてブレオマイシン誘発性皮膚線維化に対する IL-20 の効果がどうなるか検証する必要があると考える。

E. 結 論

IL-20 は、Fli1 発現亢進を介してコラーゲン転写を抑制すると同時に Smad3 や endoglin の発現低下を引き起こし、SSc 線維芽細胞における TGF- β の作用を抑制する。また、SSc 皮膚における IL-20 の減少は血管障害や線維化に寄与すると考えられる。我々はマウスモデルにおいて IL-20 の投与によってブレオマイシン誘発性皮膚線維化を改善させた。IL-20 投与は強皮症の新しい治療につながる可能性がある。生体内において IL-20 やその受容体の機能や発現を今後、さらに検討していく必要がある。

F. 文 献

1. Hsu YH, Li HH, Hsieh MY et al.: Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2722–33
2. Li HH, Cheng HH, Sun KH et al.: Interleukin-20 targets renal mesangial cells and is associated with lupus nephritis. *Clin Immunol* 2008; 129: 277–85
3. Wei CC, Chang MS.: A novel transcript of mouse interleukin-20 receptor acts on glomerular mesangial cells as an aggravating factor in lupus nephritis. *Genes Immun* 2008; 9: 668–79
4. Sa SM, Valdez PA, Wu J et al.: The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol* 2007; 178: 2229–40
5. Noda S, Asano Y, Akamata K et al.: Constitutive activation of c-Abl/protein kinase C- δ /Fli1 pathway in dermal fibroblasts derived from patients with localized scleroderma. *Br J Dermatol* 2012; 167: 1098–105
6. Asano Y, Trojanowska M.: Phosphorylation of Fli1 at threonine 312 by protein kinase C δ promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor β . *Mol Cell Biol* 2009; 29: 1882–94
7. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I et al.: Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 456–62
8. Ihn H, Ohnishi K, Tamaki T et al.: Transcriptional regulation of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene. Combined action of upstream stimulatory and inhibitory cis-acting elements. *J Biol Chem* 1996; 271: 26717–23
9. Filippova M, Song H, Connolly JL et al.: The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 21730–9
10. Asano Y, Ihn H, Yamane K et al.: Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF- β signaling in scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 2004; 113: 253–64
11. Jinnin M, Makino T, Kajihara I et al.: Serum levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2010; 162: 751–8
12. Wolk K, Witte E, Warszawska K et al.: The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2009; 39: 3570–81
13. Czuwara-Ladykowska J, Shirasaki F, Jackers P et al.: Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 20839–48
14. Czuwara-Ladykowska J, Sementchenko VI, Watson DK et al.: Ets1 is an effector of the transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF- β . *J Biol Chem* 2002; 277: 20399–408
15. Jinnin M, Ihn H, Yamane K et al.: $\alpha 2(I)$ collagen gene regulation by protein kinase C signaling in human dermal fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1337–51
16. Asano Y, Ihn H, Yamane K et al.: Phosphatidylinosi-

- tol 3-kinase is involved in $\alpha 2(I)$ collagen gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *J Immunol* 2004; 172: 7123-35
17. Morris E, Chrobak I, Bujor A et al.: Endoglin promotes TGF- β /Smad1 signaling in scleroderma fibroblasts. *J Cell Physiol* 2011; 226: 3340-8
18. Wegenka UM.: IL-20: biological functions mediated through two types of receptor complexes. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21: 353-63
19. Maricq HR, McGregor AR, Diat F et al.: Major clinical diagnoses found among patients with Raynaud phenomenon from the general population. *J Rheumatol* 1990; 17: 1171-6
20. Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE et al.: Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 998-1006
21. Ihn H, Sato S, Tamaki T et al.: Clinical evaluation of scleroderma spectrum disorders using a points system. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: 391-5
22. Hsieh MY, Chen WY, Jiang MJ et al.: Interleukin-20 promotes angiogenesis in a direct and indirect manner. *Genes Immun* 2006; 7: 234-42
23. Heuzé-Vourc'h N, Liu M, Dalwadi H et al.: IL-20, an anti-angiogenic cytokine that inhibits COX-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 470-5
24. Asano Y, Markiewicz M, Kubo M et al.: Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 425-34
25. Blumberg H, Conklin D, Xu WF et al.: Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 2001; 104: 9-19
26. Apras S, Ertenli I, Ozbalkan Z et al.: Effects of oral cyclophosphamide and prednisolone therapy on the endothelial functions and clinical findings in patients with early diffuse systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2256-61
27. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR et al.: A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1351-8
28. Hausteil UF.: Systemic sclerosis- scleroderma. *Dermatol Online J* 2002; 8: 3
- G. 研究発表**
1. 論文発表
Kudo H, Jinnin M, Asano H et al.: Decreased IL-20 expression in scleroderma skin contributes to cutaneous fibrosis. *Arthritis & Rheumatism*, in press
2. 学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
なし

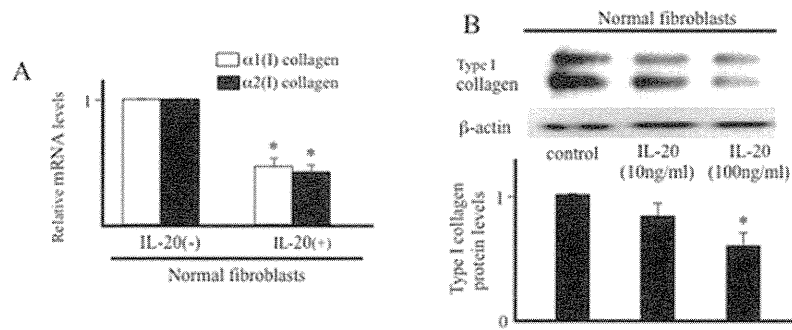


図1 正常皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン発現に対するIL-20の効果

(A) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20 (100 ng/ml) 存在下と非存在下で12時間培養した。 $\alpha 1(I)$ および $\alpha 2(I)$ コラーゲンのmRNA発現量をリアルタイムPCR法によって比較した (n=7)。*P<0.05

(B) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20 (100 ng/ml) 存在下と非存在下で24時間培養した。細胞溶解液からタンパクを抽出し、免疫ブロット法を行なった。I型コラーゲンのタンパク発現量はデンシトリーによってバンドを定量化し、同じサンプル中の β -アクチン発現量にて補正を行なった。バーグラフは非刺激の線維芽細胞のサンプル (1.0) に対しての相対値を示した (n=3)。*P<0.05

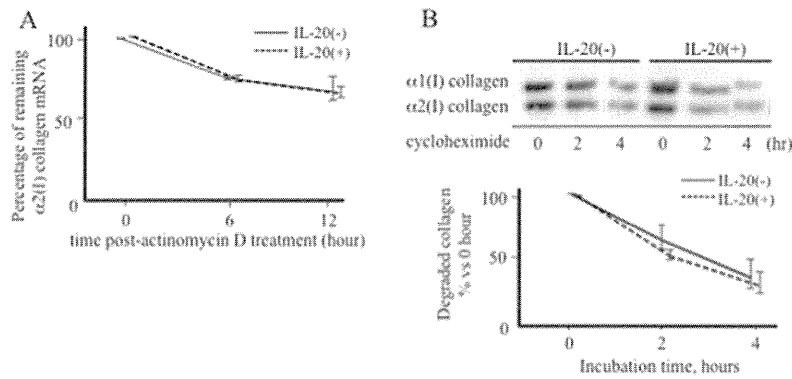


図2 IL-20 刺激の有無によるI型コラーゲンのmRNAおよびタンパクの半減期

(A) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20 (100 ng/ml) 存在下と非存在下で12時間培養し、アクチノマイシンD (2.5 μ g/ml) を作用させた。反応後、6時間、12時間のタイミングで全RNAを回収し、 $\alpha 2(I)$ コラーゲンのmRNA発現量をリアルタイムPCR法によって比較した (n=3)。

(B) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20 (100 ng/ml) 存在下と非存在下で24時間培養し、シクロヘキシミド (10 μ g/ml) を作用させた。反応後、2時間、4時間のタイミングでタンパクを回収し、I型コラーゲンタンパク発現を免疫ブロット法にて評価した。グラフは、デンシトリーによってバンドを定量化し、0時間後の数値を100とし、2時間後、4時間後の数値を相対評価したものである。実線はIL-20非刺激群、破線はIL-20刺激群をそれぞれ示した (n=3)。

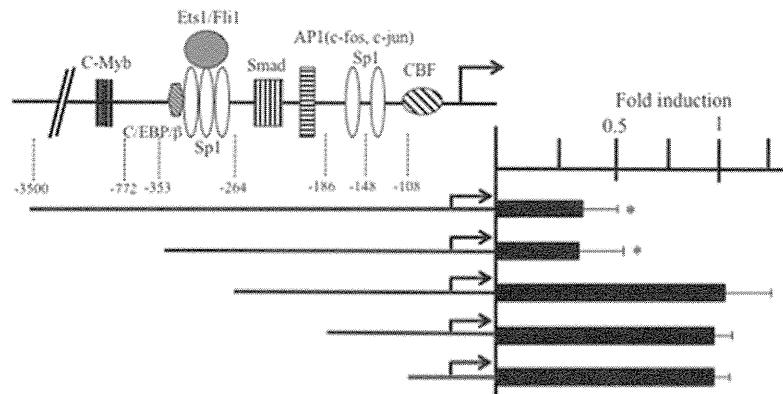


図3 CAT アッセイ

$\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーターconstructを正常線維芽細胞に一過性形質導入後、IL-20 (100 ng/ml) の存在下、非存在下で24時間培養した。バーグラフはIL-20非刺激群 (1.0) に対するIL-20刺激群のCATの活動性を相対評価で示した (n=3)。*P<0.05