

図4 IL-20がFli1発現に及ぼす影響

(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。mRNA発現量はリアルタイムPCR法を用いて比較した (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。Ets1, Fli1の抗体にて免疫プロット法を行なった。図1Bと同じ手法でバンドを定量化し、Ets1とFli1のタンパク発現の比率をバーグラフに示した (n=3)。*P<0.05

(C) 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。抗Fli1抗体を用いて細胞溶解物を免疫沈降し、免疫プロット法にてFli1のリン酸化およびアセチル化の程度を測定した (n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(D) 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。細胞DNAを剪断し、クロマチン(入力DNA)を抗Fli1抗体もしくはIgGアイソタイプ対照抗体で免疫沈降を行なった。沈降物を $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーターのプライマーを用いてPCRで増幅させ、アガロースゲル電気泳動にて検出した (n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(E) 図2Aと同じ手法でSmad3, endoglinおよびcaveolin-1のmRNA発現量を測定した (n=7)。*P<0.05

(F) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、Fli1 siRNA存在下と非存在下でIL-20 (100 ng/ml)にて12時間培養した。I型コラーゲン発現を免疫プロット法にて測定した (n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

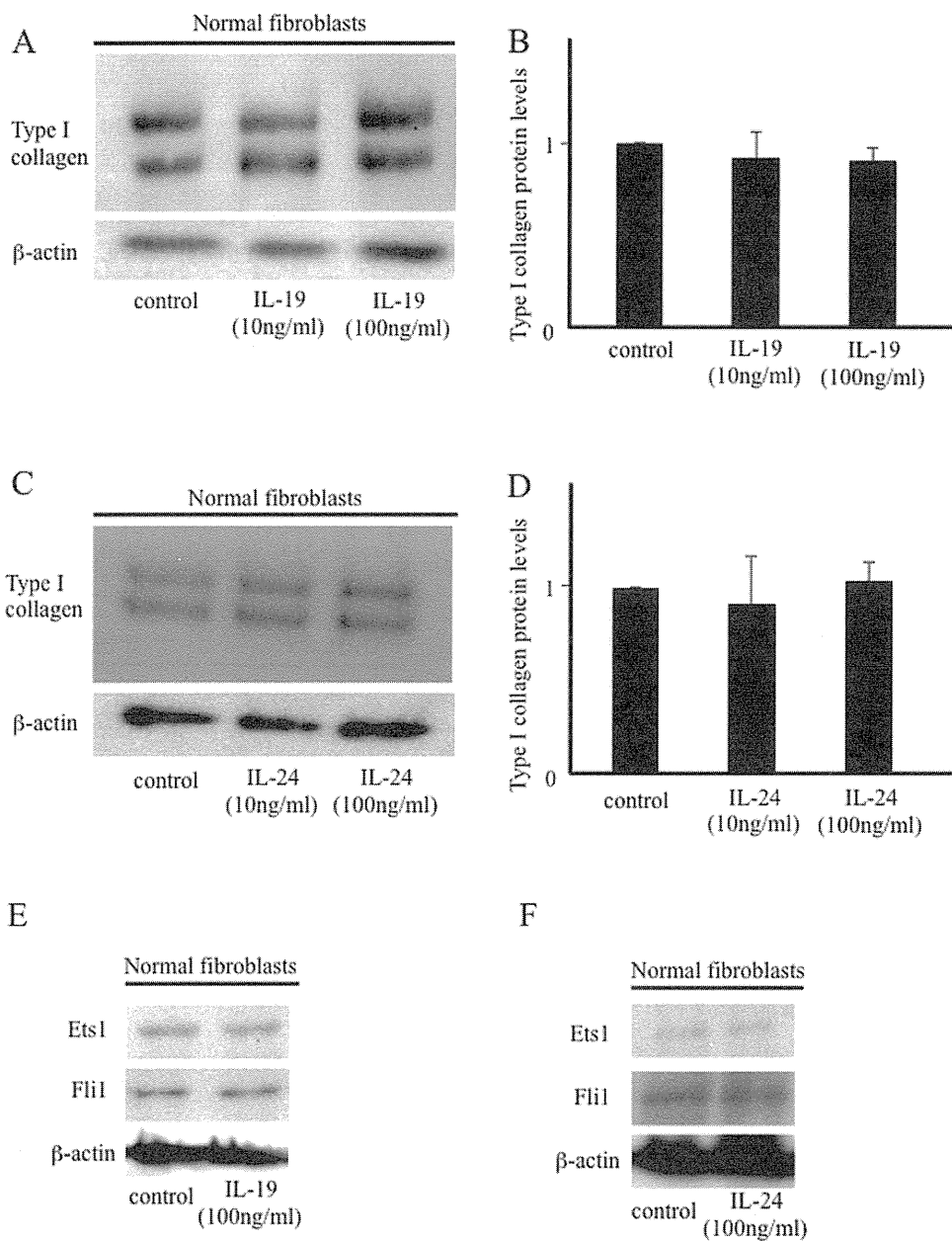


図5 正常皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン発現に対するIL-19およびIL-24の効果

(A-D) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-19およびIL-24(ともに100ng/ml)存在下と非存在下で24時間培養した。I型コラーゲンおよび β -アクチンの抗体にて免疫プロット法を行なった。図1Bと同じ手法にてバンドを定量化し、バーグラフに示した(n=3)。

(E,F) Ets1, Fli1のタンパク発現量は免疫プロット法にて測定した。

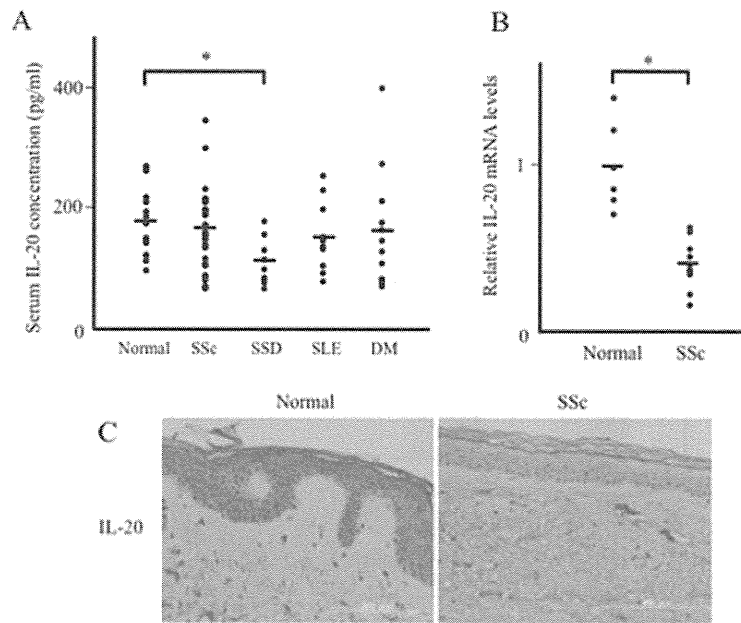


図6 リウマチ性疾患患者の血清および皮膚組織における IL-20 濃度

(A) ELISA 法による血清 IL-20 濃度測定。血清サンプルは SSc (n=33)、SSD (n=9)、SLE (n=10)、DM (n=12) および健常人 (n=15) より採取した。バーは各群の平均値を示した。*P<0.05

(B) 全 RNA を SSc 患者 12 名と健常人 6 名の皮膚組織から抽出した。IL-20 mRNA の発現をリアルタイム PCR によって分析した。*P<0.05

(C) IL-20 による皮膚パラフィン切片の免疫染色。(左) が健常人、(右) が SSc 患者。倍率×200 (n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

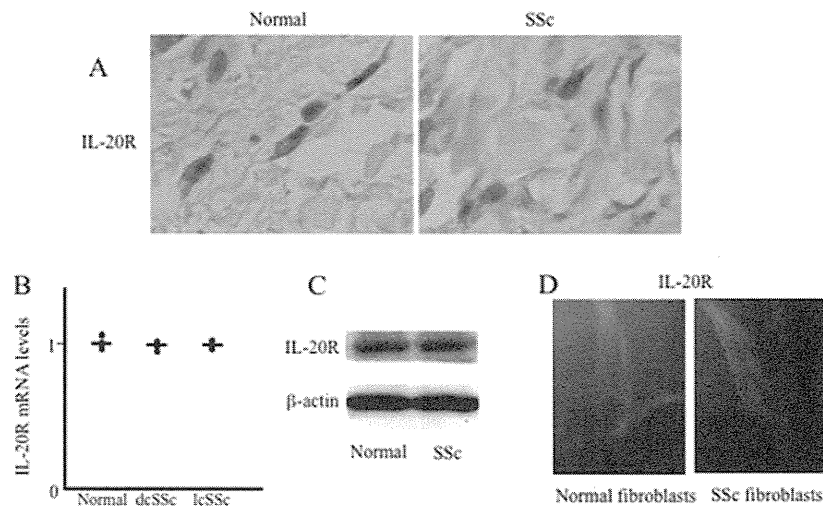


図7 線維芽細胞における IL-20 受容体の発現

(A) IL-20 受容体による皮膚パラフィン切片の免疫染色。(左) が健常人、(右) が SSc 患者。倍率×400 (n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(B) 全 RNA を SSc 患者 12 名と健常人 6 名の皮膚組織から抽出した。IL-20 受容体の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法によって分析した。

(C) 正常線維芽細胞と SSc 線維芽細胞の溶解物からタンパクを回収し、IL-20 受容体の抗体を用いて免疫プロット法を行なった。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(D) 正常線維芽細胞と SSc 線維芽細胞において IL-20 受容体の抗体を用いて免疫蛍光顕微鏡検査を行なった。倍率×1000 (n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

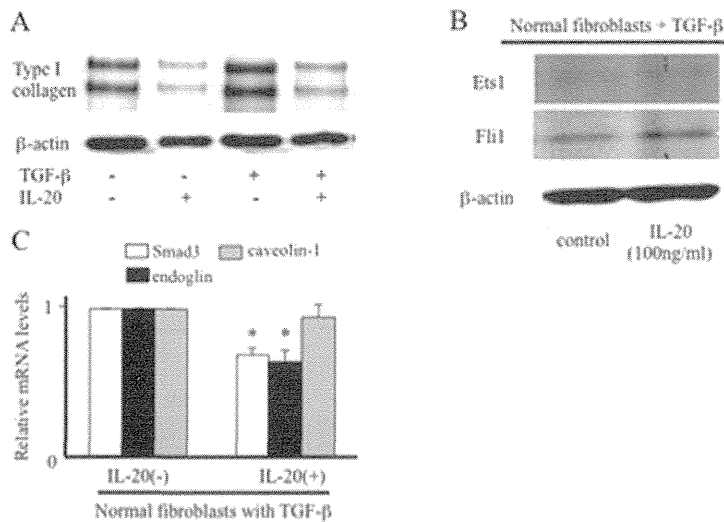


図 8 TGF- β 刺激した正常線維芽細胞における I 型コラーゲン発現に対する IL-20 の効果

- (A) 正常線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、IL-20 (100 ng/ml) および/または TGF- β (2 ng/ml) で 24 時間培養した。I 型コラーゲンの発現を免疫ブロット法にて測定した (n=3)。3 つの独立した実験のうち代表的なものを示した。
- (B) 正常線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、TGF- β (2 ng/ml) 存在下で IL-20 (100 ng/ml) を加えて 24 時間培養した。Ets1, Fli1 の発現を免疫ブロット法にて測定した (n=3)。3 つの独立した実験のうち代表的なものを示した。
- (C) 正常線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、TGF- β (2 ng/ml) 存在下で IL-20 (100 ng/ml) で 12 時間培養した。Smad3, endoglin および caveolin-1 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で比較した (n=7)。*P<0.05

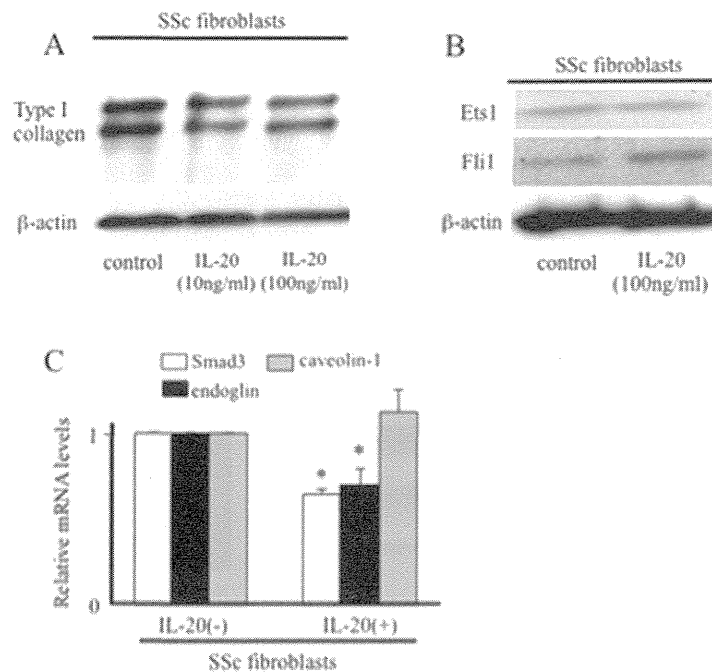


図 9 SSc 線維芽細胞における I 型コラーゲン発現に対する IL-20 の効果

- (A) SSc 線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、IL-20 (100 ng/ml) で 24 時間培養した。I 型コラーゲンの発現を免疫ブロット法にて測定した (n=3)。3 つの独立した実験のうち代表的なものを示した。
- (B) SSc 線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、IL-20 (100 ng/ml) で 24 時間培養した。Ets1, Fli1 の発現を免疫ブロット法にて測定した (n=3)。3 つの独立した実験のうち代表的なものを示した。
- (C) SSc 線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、IL-20 (100 ng/ml) で 12 時間培養した。Smad3, endoglin および caveolin-1 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で比較した (n=7)。*P<0.05

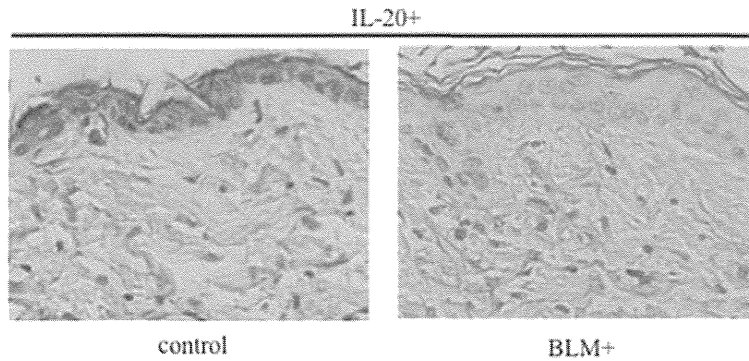


図 10 IL-20 によるマウスの皮膚パラフィン切片の免疫染色。(左) が PBS を投与された野生型マウス、(右) がブレオマイシンを投与されたマウス。倍率×200 (n=5)。5つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

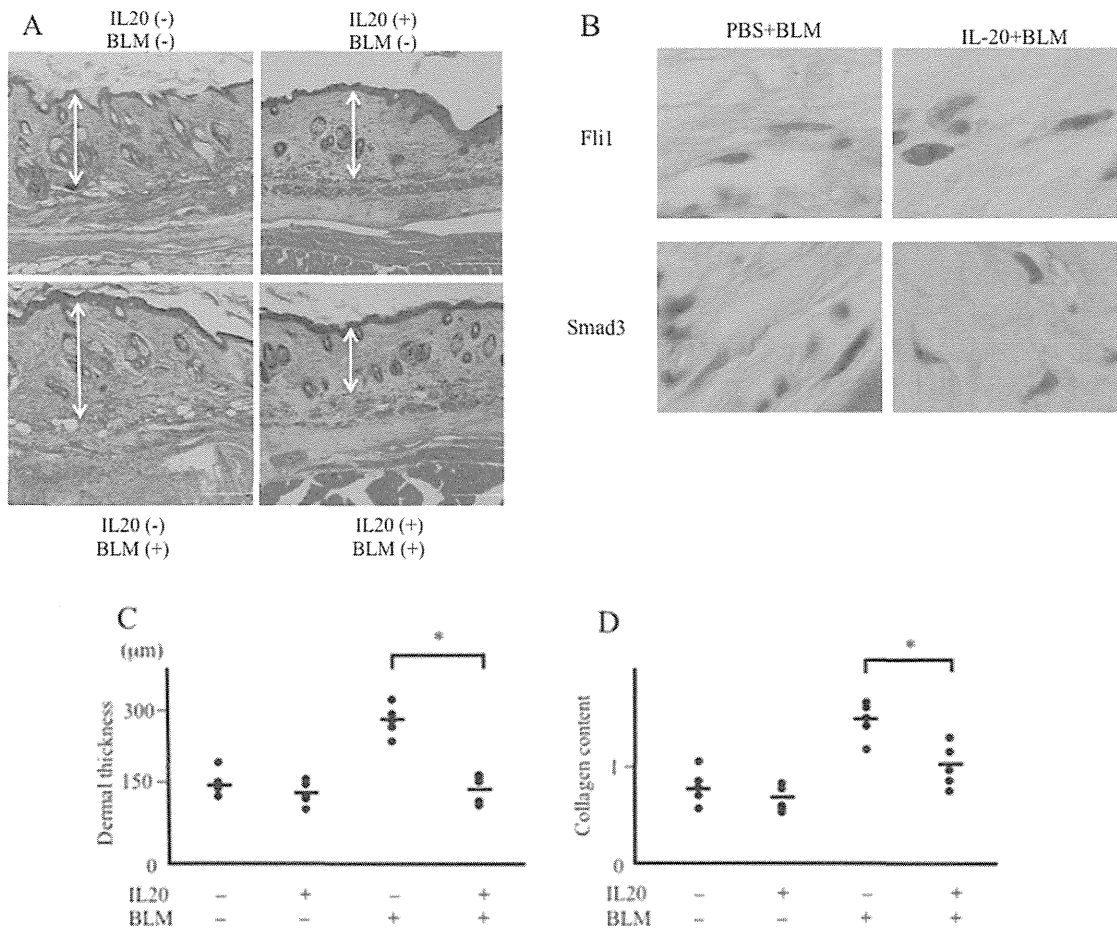


図 11 ブレオマイシン誘発皮膚線維化モデルマウスに対する IL-20 の効果

(A) マウスの皮膚パラフィン切片の H-E 染色。(左上) が PBS のみを投与された野生型マウス、(右上) が IL-20 と PBS を投与された野生型マウス。(左下) がブレオマイシンと PBS を投与されたマウス。(右下) が IL-20 とブレオマイシンを投与されたマウス。スケールバーは 0.1 mm。それぞれ 5つのサンプルのうち代表的な結果を示した。

(B) マウスの皮膚パラフィン切片を用いた Fli1 (上段)、Smad3 (下段) による免疫染色。

(左) がブレオマイシン+PBS、(右) がブレオマイシン+IL-20 をそれぞれ投与されたマウス。倍率×400 (n=5)。5つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(C) 図 11A における皮膚の厚さの測定値。バーは各群の平均値を示した (n=5)。*P<0.05

(D) 図 11A における皮膚切片でのコラーゲン含有量 (n=5)。バーは各群の平均値を示している。*P<0.05

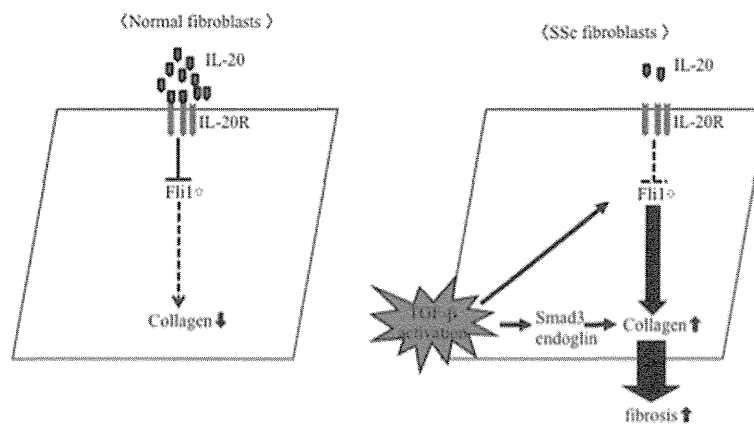


図 12

表 1. 細胞外マトリックス関連遺伝子の PCR アレイの結果

Symbol	Name	Fold change
<u>Up-regulated genes by IL-20</u>		
THBS2	thrombospondin 2	113.77
TGIF1	TGF β -induced factor homeobox 1	57.28
MMP9	matrix metalloproteinase 9	33.13
<u>Down-regulated genes by IL-20</u>		
MMP3	matrix metalloproteinase 3	0.02
SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1	0.02
SMAD3	SMAD family member 3	0.02
DCN	decorin	0.03
PLAU	plasminogen activator, urokinase	0.03
LOX	lysyl oxidase	0.03
COL1A2	collagen, type 1, α 2	0.03
ENG	endoglin	0.05
CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22 kDa	0.05
IL5	interleukin 5	0.06
FASLG	Fas ligand	0.06
IL10	interleukin 10	0.06
IL1A	interleukin 1, α	0.06

独立した 3 人の健常人の皮膚線維芽細胞からの mRNA を同量混合し、IL-20 刺激群と非刺激群に分け、mRNA の発現プロファイルを PCR アレイにて評価した。倍率変化は 1/2 (それぞれの mRNA の Δ Ct 値 - コントロールの mRNA の Δ Ct 値) を示す。 Δ Ct 値はそれぞれの mRNA の Ct 値 - house keeping 遺伝子の Ct 値で算出。遺伝子は増加または減少したもののうち IL-20 刺激により 16 倍以上変化があったもののみを表示。

表 2. 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

	Patients with normal IL-20 levels (n = 16)	Patients with reduced IL-20 levels (n = 17)
Mean age at onset (y)	54.9	62.3
Mean duration of disease (y)	61.6	71.4
Type (diffuse: limited)	5: 11	8: 9
MRSS (point)	10.2	13.1
Clinical features		
Pitting scars	50.0	41.2
Ulcers	31.3	23.5
Nailfold bleeding	43.8	58.8
Raynaud's phenomenon	93.8	94.1
Telangiectasia	18.8	11.8
Contracture of phalanges	68.8	76.5
Calcinosis	0	5.9
Diffuse pigmentation	12.5	35.3
Short SF	43.8	52.9
Sicca symptoms	31.3	35.3
Organ involvement		
Pulmonary fibrosis		
Mean percent VC	99.0	94.6
Mean percent DLco	79.8	79.8
Pulmonary hypertension	43.8	58.8
Esophagus	12.5	52.9*
Heart	25.0	35.3
Kidney	12.5	0
Joint	18.8	35.3
Thrombosis	0	0
ANA specificity		
Anti-topo I	31.3	23.5
Anti-centromere	56.3	41.2
Anti-U1 RNP	18.8	11.8

値は全てパーセンテージを示す。

*P<0.05 versus patients with normal IL-20 levels using Fisher's exact probability test.

表3. SSD患者の臨床学的特徴

patient No.	Sex/age	skin sclerosis	pulmonary changes	ANA	Raynaud phenomenon	NFB	point
1	F/47	—	—	Topo-I	—	—	5
2	F/48	swollen	—	others	Triphasic	—	5
3	F/45	—	—	Topo-I	—	—	5
4	F/57	swollen	—	others	Triphasic	1. or 2 fingers	6
5	F/68	—	—	U1-RNP	Triphasic	—	6
6	F/80	—	—	ACA	Triphasic	1. or 2 fingers	7
7	F/58	swollen	—	ACA	Triphasic	1. or 2 fingers	8
8	F/62	—	+,VC \geq 80%	ACA	Triphasic	—	8
9	F/75	—	+,VC \geq 80%	ACA	Triphasic	—	8

強皮症患者における毛髪中 microRNA 発現の検討

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 王 中志 熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 研究員

研究要旨

様々な疾患において血清 microRNA のバイオマーカーとしての有用性が示されている。最近、毛髪中にも microRNA が安定して存在する事が報告された。我々は全身性強皮症患者 11 例および正常対照群 13 例を対象として、毛根・毛髪と血清から microRNA を抽出し、real-time PCR を用いて miR-196a の発現量を調べた。強皮症患者では毛髪中の miR-196a 発現が有意に減少していた。

A. 研究目的

microRNA (miRNA) は、ターゲットとなる mRNA の発現を制御する小分子 non-coding RNA で、遺伝子発現・発生・細胞増殖・分化・アポトーシスなど、種々の細胞機能において重要な役割を果たすことが知られている。また様々な疾患において miRNA の発現パターンがバイオマーカーとして有用であることに注目が集まっている。最近、毛髪中にも miRNA が安定して存在する事が報告された (Lefkowitz et al. PLoS One 2011)。しかしながら、強皮症における毛髪中 miRNA 発現に関する報告は少ない。そこで我々は強皮症における毛髪 miRNA のバイオマーカーとしての有用性の検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

血清および毛根と毛髪は熊本大学病院皮膚科を受診した全身性強皮症患者 11 例および正常人 13 例から採取し、直ちに -80°C に保存した。強皮症患者は全例が American College of Rheumatology の強皮症診断基準を満たしていた。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。

2) 血清 miRNA の抽出

血清 100 μl に対し *C. elegans* miR-39 (5 fmol/ μl , Takara Bio Inc) を 5 μl 加え抽出率の補正に使用した。miRNeasy Mini kit (Qiagen) と 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。

3) 毛根 miRNA の抽出

一本の毛根を水とエタノールで洗浄し、800 μl の Isogen (Nippon Gene) に溶かして、*C. elegans* miR-39 (5 fmol/ μl) を 5 μl を加え、プロトコールに従って毛根 miRNA の抽出を行った。

4) 毛髪 miRNA の抽出

miRNeasy RNA isolation kit®, mirVana™ miRNA Isolation Kit® (Ambion)、Isogen® および Isohair® (Nippon Gene) + Isogen® の 4 種類の方法を用い、プロトコールに従って毛髪 miRNA の抽出を行った。

(4)については、毛髪を水とエタノールで洗浄し、Isohair kit に含まれる enzyme solution と lysis solution で溶解して、Isogen を用い、プロトコールに従って毛髪 miRNA の抽出を行った。

5) real-time PCR による解析

血清および毛根と毛髪から抽出した miRNA は Mir-X miRNA First Strand Synthesis (Takara) を用いて一本鎖 cDNA に合成し、リアルタイム PCR 法にて相対定量を行った。

6) miRNA PCR array analysis

正常人の血清および毛根と毛髪から miRNA を抽出し、miScript II RT kit (Qiagen) を用いて cDNA に合成し、96-well miScript miRNA PCR array (Qiagen) を用いて PCR Array 解析を行った。

C. 研究結果

1) 毛根と毛髪からの miRNA 抽出方法の比較

まず、毛根は Isogen を用いて 4°C で一晩 incubate することにより溶解することが出来た。抽出した RNA を鋳型にして miRNA-150 と U6 のプライマーを用いて real-time PCR を行ったところ増幅がみられた (表 1)。Negative control として手術に使用するナイロン糸を用いたが、miRNA は検出されなかった。

一方、毛髪は miRNeasy RNA isolation kit®, mirVana miRNA Isolation Kit®, Isogen® そして Isohair® + Isogen® による方法を比較し、Isohai と Isogen を用いて毛髪 1-10 本 (約 5 cm) を溶解し (図 1-a)、十分な miRNA を抽出することが出来た (表 2)。毛髪のを増やすごとに miR-150 と U6 の Ct 値が小さくなる、つまりこれらの抽出量が増加していると考えられた。

2) 毛根と毛髪 miRNA 発現の再現性

三人の正常人で、頭の二ヶ所から毛根と毛髪を採取してデータの再現性を調べた。miR-150 と U6 発現の同一人由来の 2 サンプル間の違いは 2 倍以内に治まっていたので、再現性があると判断した (図 1-b,c)。

3) 血清・毛根・毛髪 miRNA 発現量の相関

正常人 10 人の血清および毛根と毛髪のみRNA を等量で混合し 88 種類の miRNA を PCR アレイで解析した (表 3)。血清および毛根と毛髪のみRNA 発現を比較したところ、基本的に 3 者に強い相関は無かったため、独立したマーカーとして機能する可能性が考えられた (図 1-d, e, f)。

4) 強皮症患者における毛根・毛髪 miR-196a 発現

以上の予備実験を経て、毛髪と毛根のみRNA の臨床的な意義を調べた。miR-196a はコラーゲンを target とする miRNA で、強皮症の皮膚や線維細胞では減少しコラーゲン増加の一因になっていると考えられているが、血清では減少していないため疾患マーカーとしては使用できない (Honda N, et al. J Immunol 2012)。

我々は正常人と強皮症患者の血清および毛根と毛髪での miR-196a 発現を比較した。過去の報告通り血清では正常と強皮症で差は無かったが、強皮症の毛根では少し減少して、毛髪では有意に減少した (図 2)。毛髪のみRNA-196a 濃度で ROC 曲線を作成したところ、曲線下面積は 0.75 となり 0.7 を超えているため、正常人と強皮症患者を区別するマーカーとして感度と特異度のバランスがよく、診断マーカーとして有用であることが示された (図 3)。

D. 考案

強皮症患者では血管の狭小化がみられるため、時に頻回の採血が困難である。毛髪は血液に比べより簡便に採取できるため、強皮症患者で毛のみRNA 発現量が疾患マーカーとなればより非侵襲的に診断や病勢の評価を行うことが出来ると考えられる。

何故皮膚で減少している miR-196a が血清や毛根では減少しておらず毛髪でまた減少しているのかについては不明であるが、一つの仮説として血清・毛

根でもごくわずかに miR-196a が減少しているが、そのような血清・毛根由来の小さな変化が毛がのびるに従って積分されて、毛髪では大きな変化が見やすくなっている可能性があると考えている。

そのため、毛髪 miRNA は感染症などの急性疾患よりも強皮症のような慢性疾患においてより有用な疾患マーカーとなり得ると考える。

E. 結論

我々の研究により毛根や毛髪から効率的に miRNA が抽出できる事が分かり、毛髪中の miR-196a は強皮症の診断マーカーになる可能性がある事が示された。

F. 文献

1. Honda N, et al. TGF- β -mediated downregulation of microRNA-196a contributes to the constitutive up-regulated type I collagen expression in scleroderma dermal fibroblasts. J Immunol. 2012 Apr 1; 188(7):

3323-31.

2. Lefkowitz GK et al.: The post-apoptotic fate of RNAs identified through high-throughput sequencing of human hair. PLoS One. 2011; 6(11): e27603.

G. 研究発表

1. 論文発表

Detection of hair-microRNAs as the novel potent biomarker: evaluation of the usefulness for the diagnosis of scleroderma. Wang Z, Jinnin M, Kudo H, Inoue K, Nakayama W, Honda N, Makino K, Kajihara I, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H. J Dermatol Sci. 2013 Nov; 72(2): 134-41.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 正常人の毛根からの miRNA 抽出

		miR-150	U6
Isogen [®]	a hair root	31.54	19.16
	surgical nylon suture	—	—
	blank	—	—

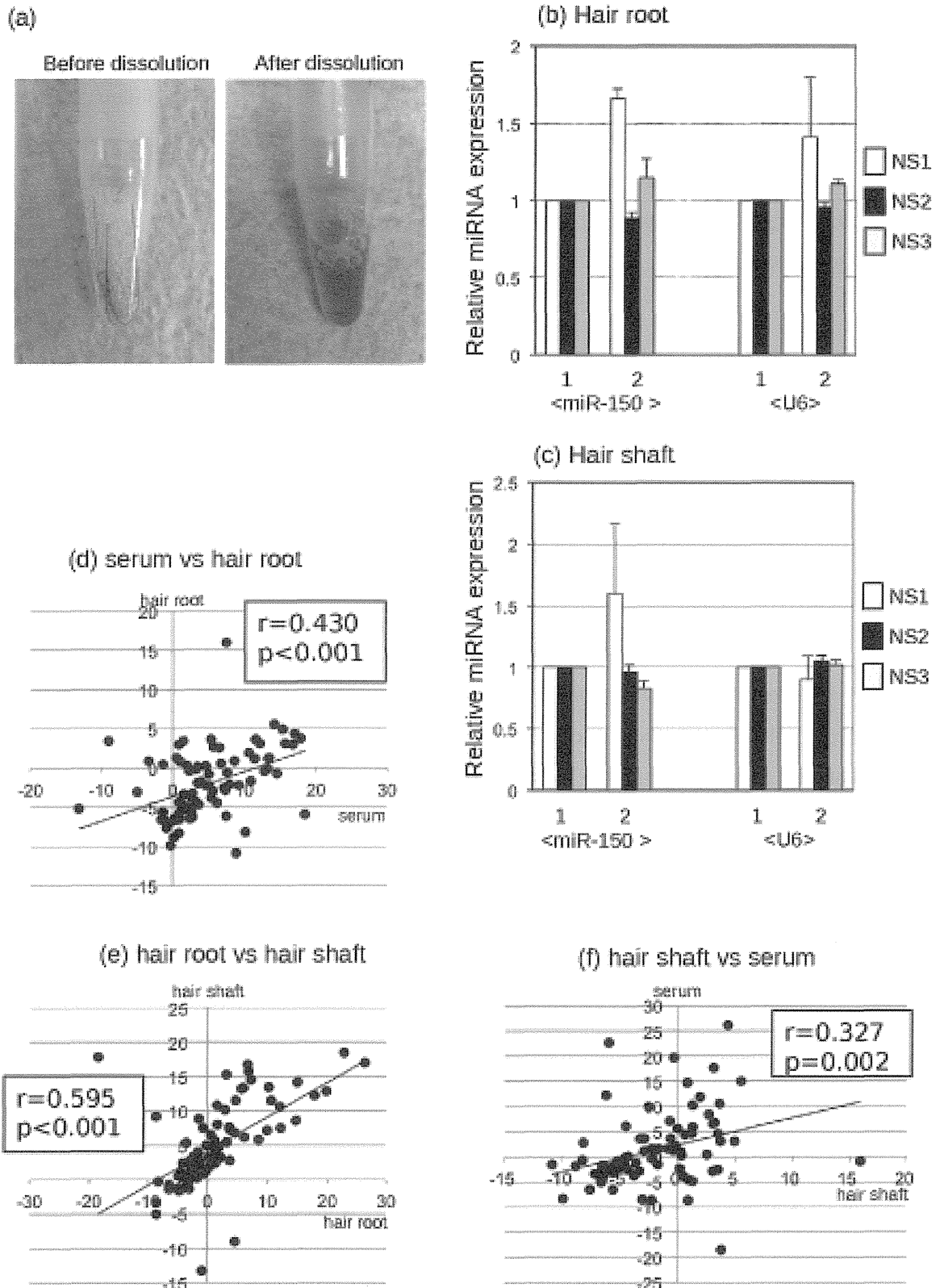


図1：(a) Isohair kit を用いた毛髪 の溶解前 と溶解後
 (b, c) 毛根 と毛髪 の miRNA 発現 の再現性。正常人 3 例 (NS1-3) の頭部 の二ヶ所 から毛根 および毛髪 を採取 して miR-150 と U6 発現 を real-time PCR で解析 した。
 (d, e, f) 血清 ・ 毛根 ・ 毛髪 miRNA の発現量 の相関。

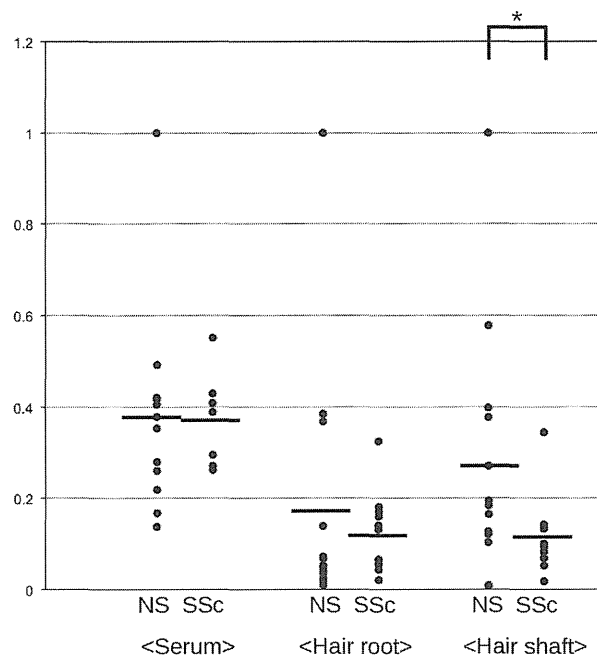


図2：正常人13例と強皮症患者10例の血清および毛根と毛髪よりmiRNAを抽出しreal-time PCRにてmiR-196aの発現量を解析した。横線は平均を示す。* p<0.05

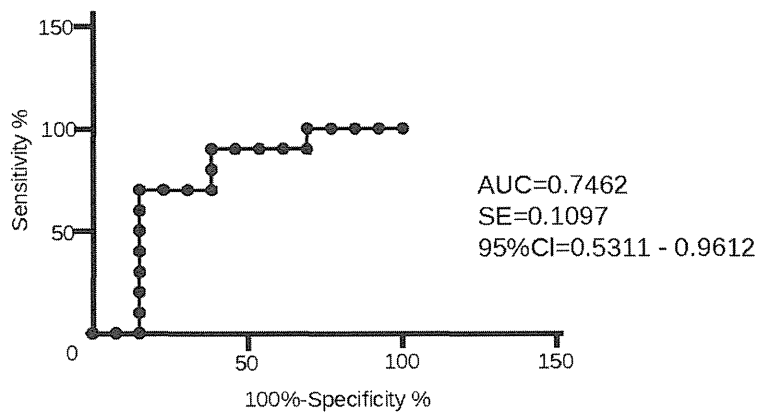


図3：毛髪miR-196aのROC曲線。

表2. 正常人の毛髪からのmiRNA抽出

	Ct	miR-150	U6
hair shafts (one piece)		33.28	26.73
hair shafts (five piece)		28.60	22.34
hair shafts (ten piece)		27.88	21.98
surgical nylon sutures		—	—
blank		—	—

表 3. PCR Array の結果

miRNA name	serum	hair root	hair shaft	miRNA name	serum	hair root	hair shaft
let-7a	-6.71	0.08	-3.82	miR-133a	5.54	14.20	15.04
let-7c	-3.34	1.49	-2.82	miR-133b	1.25	13.48	10.24
miR-1	3.78	17.79	-18.4	miR-134	1.95	10.67	11.99
miR-7	-0.67	7.62	3.60	miR-141	3.02	0.90	-2.78
miR-9	3.08	12.23	17.77	miR-143	-2.56	7.10	9.93
miR-10a	-0.38	12.81	19.79	miR-145	-2.90	7.32	3.64
miR-10b	-0.08	13.23	5.67	miR-146a	-4.48	6.15	6.06
miR-15a	-3.24	2.79	3.65	miR-148a	-4.32	0.93	-2.55
miR-15b	-4.97	1.50	-2.06	miR-150	-8.13	10.22	2.79
miR-16	-8.84	0.20	-1.85	miR-155	1.24	13.37	5.91
miR-17	-5.22	-13.22	-1.00	miR-184	3.44	-9.02	4.53
miR-17*	0.60	6.81	4.47	miR-191	-6.30	2.73	-2.93
miR-18a	-4.30	3.30	0.12	miR-192	-2.16	7.98	1.53
miR-19a	-6.35	0.77	-2.06	miR-193a-5p	-2.27	5.00	-0.32
miR-19b	-6.48	1.06	-1.75	miR-195	-8.26	0.86	-0.63
miR-20a	-7.13	-0.58	-3.35	miR-196a	2.54	6.57	0.5
miR-21	-6.58	0.79	-2.78	miR-200a	3.44	1.51	-2.55
miR-22	-5.63	1.01	-1.93	miR-200b	0.92	1.06	-4.45
miR-23a	-7.60	-0.81	-6.53	miR-200c	1.25	0.53	-4.93
miR-24	-6.54	-1.55	-4.80	miR-203	0.92	-3.34	-8.60
miR-25	-6.52	2.43	-4.25	miR-204	15.94	7.54	-0.85
miR-26a	-6.60	-1.29	-5.04	miR-205	-3.02	-4.96	-8.53
miR-26b	-6.36	-1.28	-3.27	miR-206	3.03	16.74	6.60
miR-27a	-5.64	-1.39	-6.53	miR-208a	4.36	17.03	26.26
miR-29a	-5.22	2.51	-1.58	miR-210	-0.19	3.28	2.08
miR-30d	-5.45	2.05	-2.97	miR-211	-0.40	2.36	1.23
miR-30e	-5.22	1.59	-0.93	miR-214	1.17	11.46	4.61
miR-31	0.47	-1.29	-3.91	miR-215	-0.75	14.51	7.16
miR-34a	0.30	1.98	0.24	miR-221	-4.95	2.21	-1.35
miR-92a	-9.92	-0.32	-8.34	miR-222	-3.67	2.59	-1.27
miR-93	-5.49	2.62	-2.23	miR-223	-10.86	8.84	-1.51
miR-96	3.68	5.41	3.12	miR-224	0.16	3.43	-2.44
miR-100	-1.91	3.44	1.24	miR-296-5p	2.68	5.76	8.45
miR-103a	-4.58	1.27	-0.20	miR-372	3.14	15.75	6.80
miR-106b	-6.33	0.27	-2.62	miR-373	4.94	15.31	3.11
miR-107	0.27	4.61	0.95	miR-374a	-2.94	5.65	1.09
miR-122	-5.95	18.48	22.71	miR-375	-3.78	5.34	-3.71
miR-124	-2.27	9.26	-8.72	miR-376c	0.84	8.65	14.69
miR-125b	-5.65	-1.41	-3.04	miR-423-5p	-4.62	3.62	-1.72
miR-126	-6.20	7.47	12.21	miR-499-5p	3.59	11.58	10.55
miR-128	-2.23	4.58	1.68	miR-574-3p	-1.75	3.97	-1.61

全身性強皮症に類似する線維化、血管障害、免疫異常を呈した KLF5、Fli1 ダブルヘテロ欠損マウスの解析

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	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	西村 智	自治医科大学分子病態研究部 教授
協力者	藤生克仁	東京大学医学部附属病院循環器内科 特任助教
協力者	真鍋一郎	東京大学医学部附属病院循環器内科 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	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	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	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	赤股 要	東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者	鶴田大輔	大阪市立大学皮膚科 教授
協力者	Maria Trojanowska	Arthritis Center, Boston University School of Medicine Professor
協力者	永井良三	自治医科大学 学長
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 (SSc) は血管障害と皮膚および内臓諸臓器の線維化を特徴とする膠原病で、その発症には免疫異常の関与が示唆されている。SSc の病因はいまだ不明であり、その多様な病態を一元的に説明し得る仮説は現時点では存在しない。SSc を発症する上で最も強い危険因子は家族歴とされているが、患者の家族内で個々の家族構成員が SSc に罹患する危険性は 1% 未満にとどまる。こうした事実より、SSc は多因子疾患であり、その発症には遺伝因子のみならず、環境因子が深く関与していると考えられている。環境因子の影響により誘導される遺伝情報の変化の一つとしてエピジェネティック制御が挙げられるが、我々は SSc 皮膚線維芽細胞においてエピジェネティック制御を介して発現が強力に抑制されている 2 つの転写因子 (Friend leukemia virus integration 1 [Fli1] と Krüppel-like factor 5 [KLF5]) に注目し、これらの転写因子の二重ヘテロ欠損 ($Klf5^{+/-}; Fli1^{+/-}$) マウスを作成することにより、SSc の主要 3 病態 (免疫異常・血管障害・線維化) の全てを再現できる新規モデルマウスの作成に成功した。同マウスの病態の詳細を解析することにより、SSc の病態解明・新規治療の開発が期待される。

A. 研究目的

転写因子 Fli1 は、皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲン遺伝子の強力な転写抑制因子として機能している¹。また、線維芽細胞における Fli1 遺伝子の発現低下は、TGF- β signaling の活性化を模倣した遺

伝子の発現変化を誘導する。全身性強皮症 (SSc)

患者由来の皮膚線維芽細胞では Fli1 遺伝子の発現が epigenetic 制御を介して恒常的に低下していることが知られており²、この異常が同細胞の恒常的な活性化に深く関与している可能性が示唆されてい

る³⁻⁵。

Fli1^{+/-}マウスの皮膚では、I型コラーゲンの発現量が mRNA レベルおよび蛋白レベルで亢進しており、*Fli1* 遺伝子の発現低下は皮膚線維芽細胞の活性化を *in vivo* で誘導しうる事が明らかにされている。しかしながら、同マウスの皮膚では真皮の肥厚は認められない。つまり、同マウスの皮膚では、過剰産生されたコラーゲンを皮膚組織へ蓄積させ、線維化を確立する重要な因子が欠損している可能性が示唆される。

TGF- β signaling の活性化は線維化反応において極めて重要な役割を果たしているが、*in vivo* において組織の線維化を誘導するには、TGF- β signaling の活性化に加えて connective tissue growth factor (CTGF) の発現亢進が不可欠である^{6,7}。重要なことに、*Fli1*^{+/-}マウスの皮膚では、CTGF 遺伝子の発現量には変化がないことが明らかにされている。つまり、*Fli1* 遺伝子の恒常的発現低下に加え、CTGF 遺伝子の恒常的発現亢進が生じれば、*in vivo* において自然に皮膚線維化が誘導できる可能性が示唆される。

KLF5 は諸臓器での線維化反応を制御する重要な転写因子で、心筋線維芽細胞においては線維化反応を誘導し⁸、腎尿細管細胞においては線維化を抑制する⁹。皮膚線維化における KLF5 の役割に関してはこれまで明らかにされていなかったが、SSc 患者の病変部皮膚を用いた DNA アレイ解析により、KLF5 の発現低下が示されている¹⁰。そこで我々は KLF5 が皮膚線維化に及ぼす影響に注目して検討を行ったところ、正常皮膚線維芽細胞において KLF5 は CTGF 遺伝子の強力な転写抑制因子として機能しており、その発現低下により CTGF 遺伝子の発現が著明に亢進することが明らかとなった。つまり、*Fli1* 遺伝子の恒常的な発現低下により TGF- β signaling の部分的な活性化が生じ、KLF5 遺伝子の

恒常的な発現低下により CTGF 遺伝子の発現亢進を誘導できるため、理論的にはこの2つの転写因子の発現を同時に抑制することで、*in vivo* において線維化反応を誘導できる可能性が示唆される。

本研究では、上記の仮説を証明することを目的として、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスを作成し、SSc の主要病態が再現できるかどうかについて検討を行った。

B. 研究方法

患者と皮膚線維芽細胞培養

ヒト皮膚検体は発症から2年以内のびまん性皮膚硬化型 SSc (diffuse cutaneous SSc: dcSSc) 患者8人(7人は抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性、1人は抗核抗体陰性)の前腕伸側遠位 1/3 から採取した。いずれの患者も臨床所見と組織学的所見に基づいて診断され、ほかの膠原病は合併していなかった。コントロール群の検体は年齢、性別、部位がほぼ合致した8人の健常人から採取した。研究は東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を得た上で、また被験者全員から書面上の同意を得た上で行った。線維芽細胞は上記の皮膚検体から同時に採取し、10%ウシ胎児血清を加えた minimal essential medium を用いて培養した。すべての培養線維芽細胞を用いた実験では継代数が3~6のものを用いた。

動物モデル

Klf5^{+/-} マウスは東京大学循環器内科の藤生克仁先生、真鍋一郎先生、永井良三先生から提供していただいた¹¹。*Fli1*^{+/-} マウスは過去に報告されているものを用いた¹²。タイトスキン (Tsk/+) マウスは Jackson Laboratory から購入した。すべての実験は東京大学医学系研究科の動物倫理規定に従って行った。麻酔にはエチルエーテルの吸入を用い、エチルエーテルによる吸入麻酔を深くすることで安楽死を行った。ブレオマイシンを用いた皮膚線維化誘発モ

デルでは、6週齢の雌マウスの背部皮膚に対してブレオマイシンを隔日で3週間皮下投与した。

免疫染色法

ヒトとマウスの検体はホルマリンで固定してからパラフィンで包埋し、切片を作り、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて染色した。皮膚の厚さや細胞数は無作為に選んだ少なくとも5視野で2人の検者 (S.N., Y.A.) で測定し、それぞれのサンプルで平均を算出した。

免疫プロット

Confluent となった培養皮膚線維芽細胞を血清飢餓状態で24時間培養し、全細胞抽出物¹³と核内抽出物¹⁴を用意した。皮膚と肺の組織はRIPAバッファー (Santa Cruz) 中で鉗子を用いて小さく刻み、遠心し、上清を抽出した。そうして得られた検体を sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて電気泳動し、chemiluminescent techniques (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) を用いてバンドを検出した。

RNAの抽出と定量的リアルタイムPCR

肺や皮膚組織、培養細胞から1 µgのRNAをQiagenのRNeasy Mini Kitを用いて抽出し、iScript cDNA Synthesis Kits (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いてcDNAに逆転写した。定量的リアルタイムPCRはSYBR Green PCR Master Mix (Life technologies) を用い、ABI prism 7000 (Life technologies) で測定した。いずれの検体も triplicates としてその平均を値として用いた。18S rRNAをリファレンス遺伝子として用いた。mRNA発現量の測定後にMelt curveを測定し、各プライマーから予想される単一の増幅産物が生成していることを確認した。

生体分子イメージング

マウス生体内での皮膚における血管構造や血行動

態を検索するため、我々は過去の報告¹⁵を改良した方法で多光子顕微鏡を用いた。マウスはウレタン (1.5 g/kg) で麻酔し、倒立顕微鏡 (Nikon, Eclipse Ti, Tokyo, Japan) を用いて観察した。Texas-Red-dextran (25 mg/kg, 70 kDa, Invitrogen, San Diego, D1830) と Hoechst 33342 (10 mg/kg, Invitrogen, H1399) を尾静脈に注射し、それぞれ血管と細胞の核を可視化した。組織はTi: sapphire laser (Visio II, Coherent, Santa Clara, CA) を用いて860 nmの波長で励起し、Nikon A1R-MP systemを用いて撮影した。写真はNIS-Elements software (Nikon) を用いて解析した。

統計解析

統計解析にはGraphPad Prism 5を用いた。統計学的な有意差は2群間であればMann-Whitney U testを用いて、多群間であればoneway ANOVAとBonferroni post hoc testを用いて解析した。正規分布に沿う場合にはtwo-tailed t-testを用いた。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と考えた。値は平均値 \pm s.e.mで表記した。

C. 研究結果

SSc患者の皮膚線維芽細胞ではepigenetic制御によりKLF5の発現が抑制されている

免疫染色により、SSc患者の皮膚組織ならびに皮膚線維芽細胞では健常人の組織や細胞に比べてKLF5の発現が抑制されていることが明らかとなった (図1 a)。SScにおけるECMの過剰産生はepigenetic制御による影響を強く受けていることが知られている¹⁶⁻¹⁸。そこで、培養皮膚線維芽細胞を5-aza-2'-deoxycytidine (DNAメチル化阻害薬) とtrichostatin A (ヒストン脱アセチル化阻害薬) で処理したところ、SSc皮膚線維芽細胞におけるKLF5遺伝子のmRNAの発現量は正常皮膚線維芽細胞と同等のレベルにまで充進し、一方、COL1A2遺伝子の

mRNA の発現量は正常皮膚線維芽細胞と同等のレベルにまで抑制された (図 1 b)。以上のことから、エピジェネティック制御が SSc 皮膚線維芽細胞における KLF5 遺伝子の発現低下に関与している可能性が示唆された。

KLF5 は CTGF 遺伝子の転写抑制因子である

皮膚線維化における KLF5 の機能を解析するため、野生型マウスと *Klf5*^{+/-} マウスから皮膚線維芽細胞を採取して培養し、各種線維化関連遺伝子の mRNA の発現量を定量的リアルタイム PCR 法で解析した。すると、CTGF の発現が *Klf5*^{+/-} 皮膚線維芽細胞では野生型皮膚線維芽細胞に比較して 50% 上昇していた (図 2)。一方で、I 型コラーゲン、 α -SMA、integrin- β 5 といった他の線維化マーカーの発現量には両群の間で差は認められなかった。次に、ヒト包皮線維芽細胞に対して siRNA を用いて KLF5 遺伝子の発現を抑制したところ、同様に CTGF 蛋白の発現量は、定常状態、TGF- β 1 刺激下のいずれの場合においても顕著に亢進した (図 3 a)。さらに、KLF5 の発現ベクターを CTGF 遺伝子プロモーターとともにヒト包皮線維芽細胞に対しトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイでプロモーター活性を測定したところ、KLF5 の用量依存性に最大 65%、CTGF 遺伝子のプロモーター活性が減少した (図 3 b)。

次に、KLF5 と CTGF 遺伝子プロモーターの相互作用を調べるため、培養正常皮膚線維芽細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。すると、KLF5 は CTGF 遺伝子プロモーター領域に結合し、SSc 皮膚線維芽細胞や TGF- β 1 刺激下の正常皮膚線維芽細胞では無刺激の正常皮膚線維芽細胞に比較してその結合量が減少していた (図 3 c)。さらに、CTGF 遺伝子プロモーター上の KLF5 結合部位を特定するため、KLF5 が結合する可能性のある部位を検索し、

それぞれの部位に Mutagenesis 法を用いて変異を導入した (図 3 d)。それぞれの変異プロモーターをヒト包皮線維芽細胞にトランスフェクションしたところ、KBE1 (KLF5 binding site 1; 転写開始点から -112~-105 bp) に変異を加えた場合にのみプロモーター活性が 2 倍に上昇したため、KBE1 に KLF5 が結合し、CTGF 遺伝子の転写抑制因子として働いている可能性が示唆された (図 3 e)。

KLF5 と Fli1 は共同して CTGF の転写活性を抑制する

Ets 転写因子ファミリーに属する Ets1 と Fli1 はいずれも CTGF 遺伝子プロモーター上の KBE1 近傍に結合することが過去に報告されている (転写開始点から -126~-77 bp)^{4,19}。そこで、我々は KLF5 と Ets1 または Fli1 との間における物理的相互作用の有無を検討するため、正常皮膚線維芽細胞を用いて免疫沈降法を行った。すると、KLF5 と Fli1 は核内で複合体を形成していることが明らかとなったが、KLF5 と Ets1 の間に物理的相互作用は観察されなかった (図 4 a)。次に、KLF5 と Fli1 が機能的にも共同して CTGF 遺伝子プロモーター活性を制御しているかどうかを検討するため、ヒト包皮線維芽細胞に対して KLF5 発現ベクターと Fli1 発現ベクターを同時にトランスフェクションして検討を行った。すると、Fli1 単独では CTGF 遺伝子プロモーター活性はわずかに減少するにとどまったが、Fli1 と KLF5 が同時に作用すると転写抑制効果は相乗的に亢進した (図 4 b)。同様に、ヒト包皮線維芽細胞に対して siRNA を用いて KLF5 と Fli1 の発現を同時に低下させると、CTGF 蛋白の発現量が相乗的に増加した (図 4 c)。一方、I 型コラーゲン蛋白の発現量については、Fli1 siRNA により発現が上昇したが、KLF5 siRNA では発現量に変化は見られなかった。

***Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスは皮膚線維化を自然発症する**

過去の報告と我々のこれまでの研究で得られた知見を考慮すると、*Fli1* 遺伝子の恒常的な発現抑制により TGF- β signaling が部分的に活性化し、KLF5 遺伝子の恒常的な発現低下により CTGF 遺伝子の発現が亢進するため、理論的にはこの2つの転写因子の発現を同時に低下させることで、線維化反応を誘導できると考えられる。一方、SSc 患者の皮膚線維芽細胞では epigenetic 制御により *Fli1*、KLF5 ともに発現が減少しているが、完全に消失しているわけではない。この状況をマウスで再現するため、KLF5 と *Fli1* のダブルヘテロ欠損マウス (*Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウス) を作成した。*Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスの生殖能力は保たれ、明らかな生存率の低下はなく、外見上の異常を示すことはなかった。皮膚線維化について組織を採取して観察したところ、2カ月齢では真皮の厚さと皮膚中のコラーゲン含有量に野生型マウスと *Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスの間で差は明らかでなかった。ところが、3カ月齢の *Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスでは野生型マウスに比較すると、真皮が45%肥厚し、コラーゲン線維は組織学的により密に配列していた (図5 a, b)。さらに、*Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスの皮膚ではコラーゲン含有量が増加していた (図5 c)。

***Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスの真皮ではSScに類似したコラーゲン細線維の異常がみられる**

2カ月齢の *Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウス皮膚を透過型電子顕微鏡で観察したところ、肥大化したコラーゲン細線維が縦断像でみられ、また細線維の直径におけるばらつきが増加している所見が横断像で観察された (野生型: 平均 60.8 nm; レンジ 34.1-92.4 nm; *Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-}: 平均 100.3 nm; レンジ 11.0-249.3 nm; 図5 d)。重要なことに、SSc 患者皮膚における細線維の異常と同様、*Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスの皮膚

では太いコラーゲン細線維が細いコラーゲン細線維と混在していた。一方で、KLF5 のヘテロ欠損単独では細線維の直径がわずかに増加するにとどまり、*Fli1* のヘテロ欠損単独では径の小さな細線維が出現するのみであった (*Klf5*^{+/-}: 平均 75.4 nm; レンジ 19.4-157.5 nm; *Fli1*^{+/-}: 平均 62.0 nm; レンジ 11.0-105.9 nm)。これらの結果から、コラーゲン細線維の形成を制御する過程である fibrillogenesis²⁰ に関わる酵素の発現が KLF5 と *Fli1* のダブルヘテロ欠損により変化している可能性が示唆された。

***Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスにおける皮膚血管障害**

SSc 患者では微小血管の構造異常²¹が生じる。*Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスでは視診による血管拡張は明らかでないものの、FITC-デキストランを尾静脈から注射してから背部皮膚を採取し、血管構造を蛍光顕微鏡で観察すると、1カ月齢という早い段階から血管の虫食い状狭窄と分枝状の血管構造が観察された (図6 a)。さらに、生体分子イメージングを多光子顕微鏡で行い、*Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスでは真皮コラーゲンの密度が高く、真皮血管の密度が減少していることを同定した (図6 b)。以上のことから、*Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスは皮膚においてSSc患者に類似した血管の構造異常^{22,23}を示すことが明らかとなった。

***Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスはSSc患者の間質性肺疾患に類似した線維化と血管病変を自然発症する**

SSc 患者では高頻度で間質性肺疾患や肺高血圧をはじめとした肺病変が観察されるため、*Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスの肺組織を検討した。すると、胸膜側の肺辺縁を中心に軽度の肺胞隔壁肥厚が2カ月齢でみられた (図7 a)。さらに、4カ月齢では肺胞構造の破壊とコラーゲン含有量の上昇が確認された (図7 b)。そして、8カ月齢ではヒトの間質性肺疾患でSSc患者に多いとされている亜型の non-specif-

ic interstitial pneumonia (NSIP) に類似した組織像を示した²⁴。NSIP に特徴的なびまん性の肺胞隔壁肥厚と散在するリンパ球浸潤がみられたが、ヒトの特発性間質性肺疾患に多いとされている usual interstitial pneumonia (UIP) で高頻度に観察される蜂窩肺はほとんど出現しなかった。また、大型の2型肺胞上皮細胞が増加していたが、UIP に特徴的な fibroblastic foci は観察されなかった。さらに、8カ月齢の肺組織では肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension; PAH) の存在を示唆するような細動脈の強い狭窄と α -SMA 陽性細胞増殖による顕著な血管壁肥厚を認めた (図7c)。UIP に特徴的な動脈の plexiform lesions はみられなかったが、隔壁間の細静脈には内膜の肥厚と局所的な内腔狭窄、血管周囲のリンパ球浸潤を認め、肺静脈閉塞性疾患 (pulmonary veno-occlusive disease; PVOD) を示唆する所見であった (図7d)。これらの線維化、血管病変はヒトの間質性肺疾患と同様、いずれも中心の気管支側ではなく、辺縁の胸膜側に症状が強かった。SSc 患者の肺組織に置いても皮膚と同様 CTGF の発現が亢進していることが報告されている²⁵。2型肺胞上皮細胞のマーカーである pro-surfactant protein C と CTGF で蛍光二重染色を行うと、 $Klf5^{+/-}; Fli1^{+/-}$ マウスでは2型肺胞上皮細胞が顕著に増加し、そのうちの多くが CTGF を発現していたため、CTGF が主に2型肺胞上皮細胞から産生されていると予想された (図8)。これらの結果は、 $Klf5^{+/-}; Fli1^{+/-}$ マウスでは月齢とともに増悪する肺病変を発症し、その組織学的特徴は SSc 患者の間質性肺疾患にきわめて類似し、2型肺胞上皮細胞からの CTGF 過剰産生が発症に関与している可能性が明らかとなった。

$Klf5^{+/-}; Fli1^{+/-}$ マウスでは B 細胞が活性化し、自己抗体産生が観察される

8カ月齢の肺組織では B 細胞のリンパ濾胞様の構

造と間質におけるびまん性の浸潤がみられ (図9a)、その所見は SSc 患者における間質性肺疾患の B 細胞浸潤に類似していた²⁶。B 細胞は IL-6 を産生する細胞の一つであることが知られており²⁷、IL-6 の発現は SSc 患者の皮膚、血清、末梢血単核球、培養皮膚・肺線維芽細胞において増加していることが過去に報告されている^{25,28-31}。そして、IL-6 を加えると培養線維芽細胞において、I 型コラーゲン、 α -SMA、CTGF の発現が増加する²⁹。我々が B 細胞の機能を解析したところ、 $Klf5^{+/-}; Fli1^{+/-}$ マウスの脾臓から取り出した B 細胞は、lipopolysaccharide (LPS) または抗 CD40 抗体の刺激に対して野生型マウスに比較すると約3倍もの量の IL-6 を産生した (図9b)。また、 $Klf5^{+/-}; Fli1^{+/-}$ マウスの B 細胞では CD19 の発現が肺では15%上昇していた (図9c)。さらに、 $Klf5^{+/-}; Fli1^{+/-}$ マウスでは抗核抗体の産生が認められた (図9D)。以上より、 $Klf5^{+/-}; Fli1^{+/-}$ マウスでは B 細胞が活性化し、活性化した B 細胞が自己抗体を産生している可能性が示唆された。

D. 考 案

SSc の疾患感受性遺伝子については GWAS などにより解析が進められてきたが、本症の発症に関与する環境因子の影響に関しては、化学物質により誘導される強皮症類似病態から一定の知見が得られているのみで、その詳細は未だ不明である。SSc の発症機序においては、遺伝子に加えて環境因子の影響が非常に大きいと考えられているが、患者由来の細胞を用いてエピジェネティック制御で発現が変化している遺伝子を同定することにより、環境因子の影響を受けている疾患感受性遺伝子の候補を同定することが可能である。転写因子 Fli1 は SSc 皮膚線維芽細胞におけるエピジェネティック制御に注目することにより特定された疾患感受性遺伝子の一つで