

おいは、ATA+ACA-SSc 群において、欠失アリの有意な増加が検出された(アリルモデル:P=0.020, OR 1.77, 劣性モデル:P=0.028, OR 1.89)。

dcSSc 群および ILD 合併群においては、欠失アリの増加傾向が観察されたものの、統計学的有意差には到達しなかった。

D. 考案

本研究では、ATA+SSc における *LILRA3* 欠失アリの増加が観察された。アジア系集団では ATA+SSc や dcSSc の頻度が欧米集団と比較して高いことが知られ [7]、HLA-class II アリの集団差に基づく可能性が指摘されている [8]。本研究から、同様に顕著な集団差が観察される *LILRA3* 欠失アリについても、東アジア集団における ATA+SSc 群の増加の一因となっている可能性が示唆された。

LILRA3 については、ドイツ人集団において、欠失アリが MS や SS のリスクと関連し、中国人集団では非欠失アリが RA や SLE のリスクに関連するとの結果が報告されている。本研究では、欠失アリが SSc のリスクと関連する可能性が示唆され、ドイツ人集団における自己免疫疾患との関連と同じ傾向であった。これらの違いが各自己免疫疾患の病態形成機序の違いによるものか否かについては、今後、それぞれの疾患の独立の再現研究の結果を確認の上、判断すべきであると考えられる。

LILRA3 の機能には未知の部分が多いが、最近、*LILRA3* 分子が単球や B 細胞に結合し、

活性化や IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10 などの産生を誘導するとの報告がある [9]。一方、*LILRA3* のリガンドの一つである HLA-G は、SSc の皮膚における発現も報告されていることから [10]、この経路が SSc の病態に関連する可能性も考えられる。

さらに、*LILRA3* 欠失アリは、隣接する抑制型受容体 *LILRB2* の低発現アリと強い連鎖不平衡にあることが報告されている [3]。今回観察された関連の分子機構として、*LILRB2* 低発現が関与している可能性も考えられる。

本研究の限界として、ATA+SSc の頻度が低いため、サンプルサイズが限られることが挙げられ、今後、再現研究により、関連を確認していくことが必要である。

LILRA3 は可溶性分子、*LILRB2* は細胞表面分子であることから、関連が確立した場合は、治療薬や診断薬の分子標的になる可能性を有している。今後、関連の確認とともに、病態における役割を解明する必要がある。

E. 結論

LILRA3 欠失アリが抗 topoisomerase I 抗体陽性全身性強皮症に関連する可能性が初めて示唆された。

F. 文献

1. Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K, Takanashi M, Satake M, et al. Long-term persistence of both functional and non-functional alleles at the leukocyte immunoglobulin-like

receptor A3 (LILRA3) locus suggests balancing selection. *Hum Genet* 2006; 119: 436-443.

2. Koch S, Goedde R, Nigmatova V, Epplen JT, Müller N, et al. Association of multiple sclerosis with ILT6 deficiency. *Genes Immun* 2005; 6: 445-447.

3. Hirayasu K, Ohashi J, Tanaka H, Kashiwase K, Ogawa A, et al. Evidence for natural selection on leukocyte immunoglobulin-like receptors for HLA class I in Northeast Asians. *Am J Hum Genet* 2003; 82: 1075-1083.

4. Kabalak G, Dobberstein SB, Matthias T, Reuter S, The YH, et al. Association of immunoglobulin-like transcript 6 deficiency with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2923-2925.

5. Du Y, Cui Y, Liu X, Hu F, Yang Y, et al. Contribution of functional LILRA3, but not functional LILRA3, to sex bias in susceptibility and severity of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2014; 66: 822-830.

6. Du Y, Su Y, He J, Yang Y, Shi Y, et al. Impact of the leucocyte immunoglobulin-like receptor A3 (LILRA3) on susceptibility and subphenotypes of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2014; e-pub ahead of print 6 June 2014; doi:10.1136/annrheumdis-2013-204441/

7. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:35-42.

8. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Inoko H,

Tsuji K. The HLA-DR and DQ genes control the autoimmune response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis (scleroderma). *J Clin Invest* 1993; 92: 1296-1301.

9. Low HZ, Reuter S, Topperwien M, Dankenbrink N, Peest D, et al. Association of the LILRA3 deletion with B-NHL and functional characterization of the immunostimulatory molecule. *PLoS ONE* 2013; 8: e81360.

10. Wastowski IJ, Sampaio-Barros PD, Amstalden EM, Palomino GM, Marques-Neto JF, et al. HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2009; 36:1230-1234.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 土屋尚之 : 全身性強皮症の疾患感受性遺伝子解析 . *医学のあゆみ* 2014;251 (8) , 614-619.

2. 学会発表

1. Hachiya Y, Kawasaki A, Matsushita T, Furukawa H, Nagaoka S, Shimada K, Sugii S, Sumida T, Tohma S, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S, Takehara K, Tsuchiya N. Association of leukocyte immunoglobulin-like receptor A3 (LILRA3) deletion polymorphism with systemic sclerosis. 2014 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Nov 16, 2014, Boston, USA.

2. 八谷有紀、川崎 綾、松下貴史、古川 宏、長岡章平、島田浩太、杉井章二、住田

孝之、當間重人、長谷川稔、藤本 学、
佐藤伸一、竹原和彦、土屋尚之。免疫
グロブリン様受容体 LILRA3 欠失多型と
全身性強皮症との関連。日本人類遺伝
学会第 50 回大会、2014 年 11 月 21 日、
船堀タワーホール、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおける p38 MAPK の役割の検討

担当責任者 竹原和彦 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授
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 伊達 睦 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 大学院生
業務主任者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授

研究要旨

p38 MAPK は様々な環境因子に反応し炎症を亢進する。強皮症様モデルマウスの一つである皮膚硬化型慢性 GVHD モデルを用い、p38 MAPK の活性を野生型マウスと比較すると、皮膚硬化型慢性 GVHD モデルの方が p38 MAPK のリン酸化が亢進していた。さらに、皮膚硬化型慢性 GVHD モデルに p38 MAPK 阻害剤を投与すると、TNF- α などの炎症性サイトカイン、TGF- β や collagen 1A2 の発現量が抑制された。また、真皮内に浸潤する T 細胞やマクロファージの数が減少、皮膚の線維化の改善を認めた。以上より、強皮症において p38 MAPK が治療標的になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器の線維化を来す膠原病で、その原因は未だ不明であり、早急に新規治療標的を定める必要がある。強皮症患者では、真皮内にリンパ球やマクロファージの浸潤を認め、血清中に多くサイトカインが認められることから、炎症反応が関与していると考えられる。

炎症時に活性化するシグナル経路の一つに p38 MAPK 経路がある。p38 MAPK と強皮症に関係性を示す報告があり、強皮症患者の線維芽細胞では健常者の線維芽細胞より p38 MAPK が亢進しているという報告がある(4,5)。本研究では、皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおける p38 MAPK の役割について検討した。

B. 研究方法

1) 皮膚硬化型慢性 GVHD モデル作成

8 週齢から 12 週齢の雄の B10. D2 (H-2d) がドナーとして、雌の Balb/c (H-2d) がレシピエントとして用いられた。レシピエントに 800cGy 放射し (MBR-1520R, Hitachi, Biotech, Auburn, CA)、抗 Thy1.2 microbeads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) を用い T 細胞を除去した骨髓と脾臓細胞を 0.5ml PBS 中に各々 1×10^7 細胞用意し尾静脈に移入することで、皮膚硬化型慢性 GVHD 化モデルマウスを作成。

2) 阻害剤

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルマウスに p38 MAPK 阻害剤である VX702 (Cayman Chemical,

Ann Arbor, MI, USA)を、骨髄移植した日を Day0 とし、Day7 から Day35 の四週間、10mg/kg/day 経口投与させた。コントロールとして蒸留水を投与した。

3) スキンスコア

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおいて、線維化の進行に伴い脱毛が始まることから、線維化進行の判断基準に脱毛面積（以下、スキンスコアと呼ぶ）を用いる。健康な皮膚状態=0点、脱毛面積が1cm²以下=1点、1cm²~2cm²=2点、2cm²~5cm²=3点、5cm²~10cm²=4点、10cm²~15cm²=5点、15cm²~20cm²=6点、20 cm²以上=7点とし、最小値が0点、最高値が7点と定めた。

4) 病理解析

皮膚は10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。薄切後（5μm）、切片は HE と Masson' s trichrome で染色した。皮膚の厚さと線維化の割合を調べるために、1切片あたり無作為に4か所ずつ測定し平均をとった。また、皮膚の厚さは表皮から脂肪組織の間と定めた。

5) 免疫学組織

皮膚を採取後、凍結切片を作製するために包埋剤（OCT コンパウンド：サクラフィンテック株式会社）を使用し液体窒素の中で凍らせ、-80℃で保存した。薄切後（5μm）、4℃でアセトンで固定し、TBS で洗浄する。その後、ラット血清を用いブロッキングを行い、一次抗体であるラット抗マウス CD4 抗体（BD PharMigen™、Clone:RM4-5）、ラット抗マウス CD8 抗体（BD PharMigen™、Clone:53-6.7）、ラット抗マウス CD11b 抗

体（BD PharMigen™、Clone:M1/70）、ラット抗マウス B220 抗体（BD PharMigen™、Clone: RA3-6B2）で染色した。真皮内に浸潤する細胞を測定するために、1切片あたり無作為に4か所ずつ測定し平均をとった。

6) リアルタイム PCR

採取した皮膚から、RNeasy スピンカラム（Qiagen, Hilden, Germany）を使用し total RNA を回収した。total RNA は random hexamers（Applied Biosystems, Foster City, CA）逆転写酵素反応を利用し cDNA を作製した。IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-10, TGF-β, CTGF, col I A2 mRNA がリアルタイム PCR 定量化装置（Applied Biosystems, Foster City, CA）を使用し解析された。リアルタイム PCR は ABI Prism 7000 sequence detector（Applied Biosystems）で行われた。mRNA を標準化するために GAPDH を用い、リアルタイム PCR で作られた生成物の相対的発現を評価するために ΔΔCt 法を使用した。

7) p38 MAPK リン酸化検出

脾臓を採取し、リンパ球やマクロファージを回収し、10×10⁶cells に対し刺激を加えたものと加えないものを用意する（40nM PMA、37℃、12分間）。そして、BD Cytotfix™ buffer を使用し細胞を固定し（37℃、30分間）、BD Phosflow™ Perm Buffer III を使用し膜透過処理を行う（on ice、30分間）。その後、細胞は BD Pharmingen™ Stain Buffer を用い二度洗浄し、Alexa Fluor 488 mouse anti-p38 MAPK（pT180/pY182）抗体で染色した。染色後、細胞は FACS Canto により検出され、リン酸化の割合を比較した。

フローサイトメトリー解析はFlowJoにより行った。

C. 研究結果

1) 皮膚硬化型慢性 GVHD モデルの炎症性細胞は野生型マウスより p38 MAPK が活性化している

p38 MAPK の活性化はリン酸化により制御されている。このことから、皮膚硬化型慢性 GVHD モデルマウス(Sc1-cGVHD)と野生型マウスの炎症性細胞において、p38 MAPK のリン酸化の割合を比較した。各々のマウスの脾臓からリンパ球とマクロファージを 1×10^7 細胞数回収し、p38 MAPK を活性化させるために 40nM PMA で刺激し、p38 MAPK 抗体で染色し、リン酸化の割合をみた。

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルの方が野生型マウスと比べ、p38 MAPK のリン酸化の割合が高い結果となった。このことから、皮膚硬化型慢性 GVHD モデルマウスの炎症性細胞では野生型マウスと比べ MAPK が活性化していることが示唆された。

2) p38 MAPK 阻害剤によりスキンスコアが減少した

1) より、皮膚硬化型慢性 GVHD モデルの炎症性細胞では MAPK が活性化していることが示唆されたので、p38 MAPK の活性を阻害することで炎症反応を抑制させ、線維化を抑制できるのではないかと考えた。

p38 MAPK 阻害剤を骨髄移植から一週間経過した day7 から 4 週間経口投与させた群とコントロール群に分け、day35 に解析した。(図 2 を参照)

p38 MAPK 阻害剤を経口投与した群ではスキンスコアが 1.4 点 (n=7)、コントロール群では 3.4 点 (n=4) になり、p38 MAPK の活性を阻害する事で有意差を持ってスキンスコアが減少した。このことから、p38 MAPK 阻害は線維化の抑制効果が示唆された。

3) p38 MAPK 阻害剤により皮膚の厚さと線維化の割合が減少した

病理学的に皮膚の構造を調べるために HE 染色を、線維化の割合を調べるために Masson's Trichrome 染色を day35 の皮膚組織を用いて行った。HE 染色において、p38 MAPK 阻害剤を投与した群では皮膚の厚さが $161.3 \mu\text{m}$ (n=7)、水だけ投与した群では $226.9 \mu\text{m}$ (n=4) となった。また、Masson's Trichrome 染色において、p38 MAPK 阻害剤を投与した群では膠原繊維染色された領域は $112.3 \mu\text{m}$ (n=7)、水だけ投与した群では $156.3 \mu\text{m}$ (n=4) となった。このことから、p38 MAPK 阻害は線維化の割合を減少させることが示唆された。

4) p38 MAPK 阻害剤により真皮内に浸潤する炎症性細胞が減少した

皮膚真皮内に浸潤する炎症性細胞数 (CD4、CD8、CD11b) を調べた。(day35 の皮膚組織を用いた。) p38 MAPK 阻害剤を投与する事で、真皮内に浸潤する CD4 陽性細胞が 70%、CD8 陽性細胞が 65%、CD11b 陽性細胞が 80% 減少した。このことから、p38 MAPK 阻害剤投与により、皮膚真皮内に浸潤する炎症性細胞が大幅に減少した。

5) p38 MAPK 阻害剤によりコラーゲンの mRNA 発現量が減少した

p38 MAPK 阻害剤投与により真皮内に浸潤する炎症性細胞が減少したことから、真皮内に浸潤した炎症性細胞が線維化を促進させる様々なサイトカインを産生することが考えられるので、以下のようなサイトカイン (IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、TGF- β 、CTGF、col1A2) の発現量を調べるためにリアルタイム PCR 解析を行った。(day35の皮膚組織を用いた。)

炎症性サイトカインである IL-1 β や TNF- α については、p38 MAPK 阻害剤投与によりやや減少したが、他のサイトカインについては mRNA 量に差がみられなかった。また、炎症反応を抑制させる働きのある IL-10 についても、コントロール (水だけ投与群) と比較し、差がみられなかった。一方、線維化を促すのに重要だと言われている TGF- β や CTGF の mRNA 量はコントロールと大きな差は認められなかったが、col1A2 の mRNA 量は p38 MAPK 阻害剤投与により有意差を持って減少した。このことから、p38 MAPK 阻害剤投与によりコラーゲンの発現量が減少し、線維化の抑制効果が示唆された。

D. 考 案

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおいて、p38 MAPK を阻害する事で、線維化の抑制を認めた。そして、Day35 の皮膚を用いたリアルタイム PCR の結果においては、線維化に重要なコラーゲン産生の減少が見られた。また、真皮内に浸潤する炎症性細胞の減少も認められた。

以上より、p38 MAPK は皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおいて重要な役割を有しており、その阻害により皮膚硬化型慢性 GVHD の抑制効果が見られた。

E. 結 論

強皮症において p38 MAPK が治療標的となる可能性が示された。

F. 文 献

1. Toshiyuki Yamamoto. Characteristics of Animal Models for Scleroderma. *Current Rheumatology Reviews*;2005;1:101-109
2. Herlaar E, Brown Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 1999;2: 717-72
3. Le Huu, D, Matsushita T, et al. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2013;121:3274-83.
4. Sato M, Shegogue D. Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2002;118:704-11.
5. Hironobu I, Kenichi Y, et al. Increased Phosphorylation and Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase p38 in Scleroderma Fibroblasts. *J Invest Dermatol*;2005;125:247-55
6. Aouadi, M, Binetruy, B, et al. Role of MAPKs in development and differentiation:

- lessons from knockout mice.
 Biochim;2006:88:1091-8
7. Cuenda, A. Rousseau, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim Biophys Acta;2007: 1773:1358-75
 8. Damjanov, N, Kauffman, R. S, et al. Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. Arthritis Rheum;2009:60:1232-41
 9. Goldstein, D. M, Kuglstatler, A, et al. Selective p38alpha inhibitors clinically evaluated for the treatment of chronic inflammatory disorders. Med Chem;2010;53:2345-53
 10. Le Huu, D, Matsushita, T, et al. FTY720 ameliorates murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease by promoting expansion of splenic regulatory cells and inhibiting immune cell infiltration into skin. Arthritis Rheum;2013:65:1624-35
 11. Kolosova, I, Nethery, D, et al. Role of Smad2/3 and p38 MAP kinase in TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition of pulmonary epithelial cells. J Cell Physiol;2011:226:1248-54
 12. Le Huu, D, Kimura, H, Mutsumi D, et al. Blockade of Syk ameliorates the development of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. J Dermatol Sci;2014:74:214-21
 13. Saklatvala, J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. Curr Opin Pharmacol;2004:4:372-7
 14. シグナル伝達研究最前線 2012 実験医学増刊;2012:30:72-9
- G. 研究発表**
1. 論文発表
なし
 2. 学会発表
日本研究皮膚科学会 ポスター 2014
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
なし

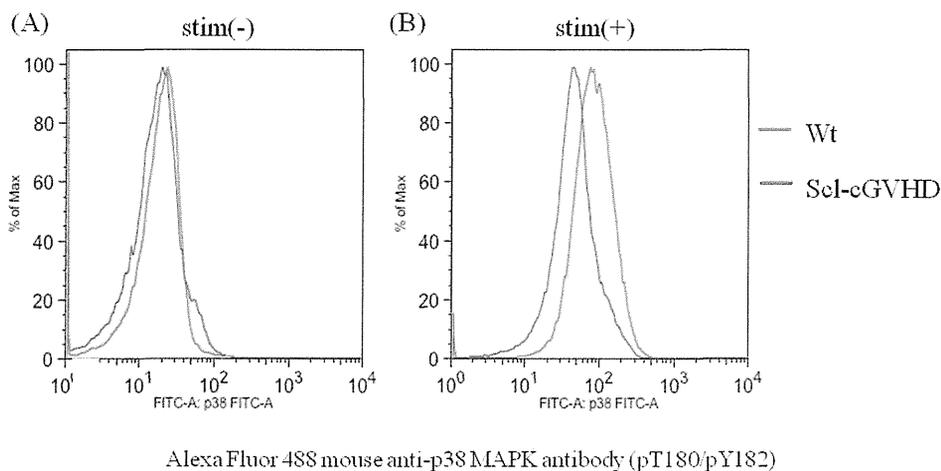


図 1:皮膚硬化型慢性 GVHD モデルと野生型マウスにおける p38 MAPK のリン酸化の割合
 (A) リンパ球とマクロファージに PMA で刺激前
 (B) リンパ球とマクロファージに PMA で刺激後

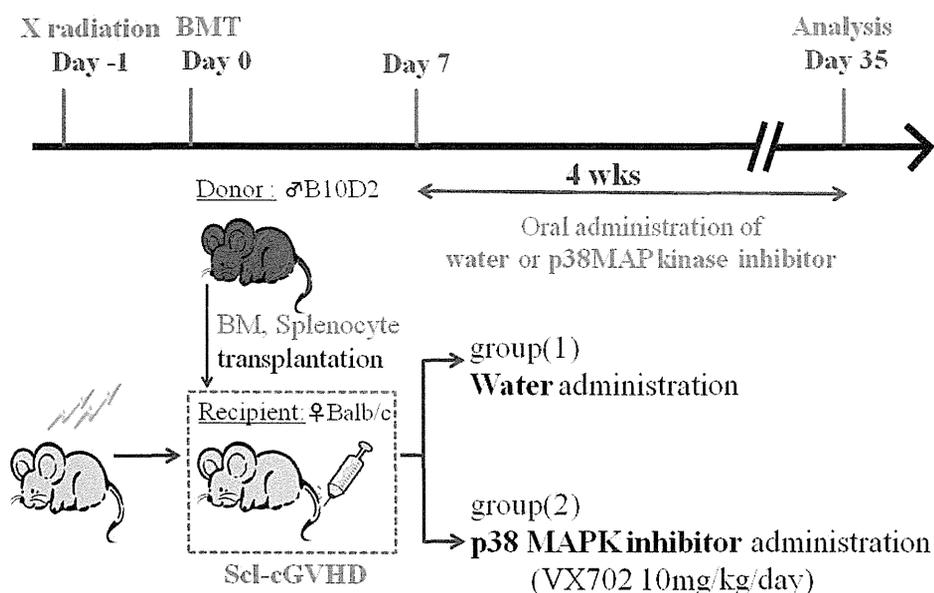


図 2:阻害剤投与期間

骨髄移植から一週間経過した day7 から 4 週間 p38 MAPK 阻害剤を経口投与させた群と水だけ投与した群に分け、day35 に解析した。

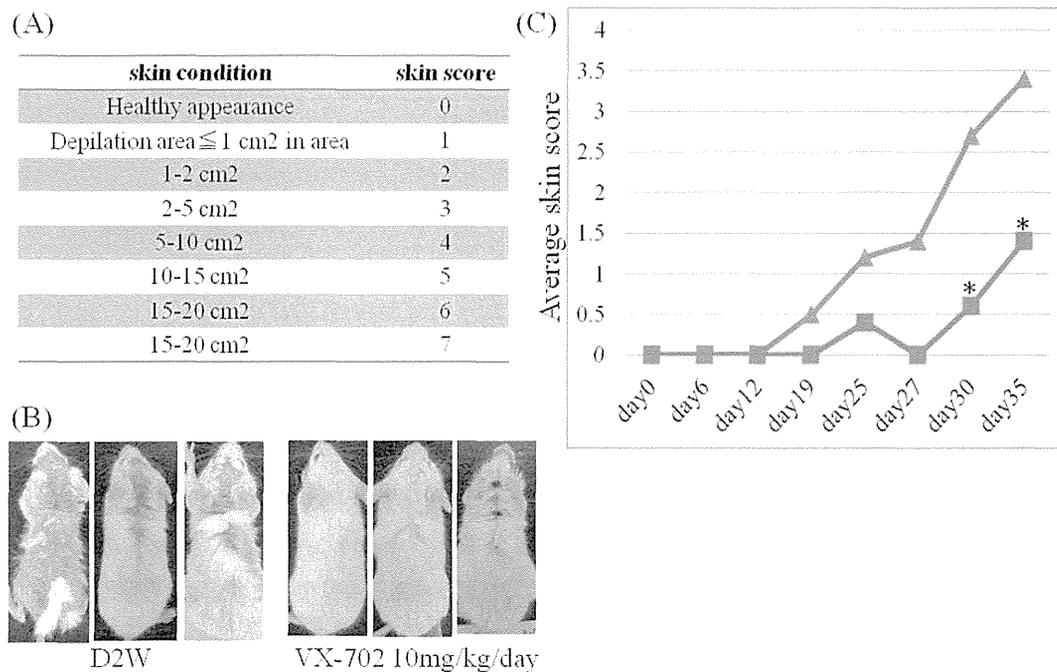


図 3:p38 MAPK 阻害剤投与におけるスキンスコアによる線維化抑制の検討

(A)脱毛面積に応じて点数化し、点数をスキンスコアとし、スキンスコアを表に示した。

(B)左三枚の写真は水のみ投与した群、右三枚の写真は p38 MAPK 阻害剤を投与した群。両者移植後 Day 35 のマウス。

(C)水のみ投与した群と p38 MAPK 阻害剤を投与した群の、移植後のスキンスコアの推移をグラフ化した。▲水のみ投与群 (n=6)、■p38 MAPK 阻害剤投与群(n=4)を示す。*P<0.05

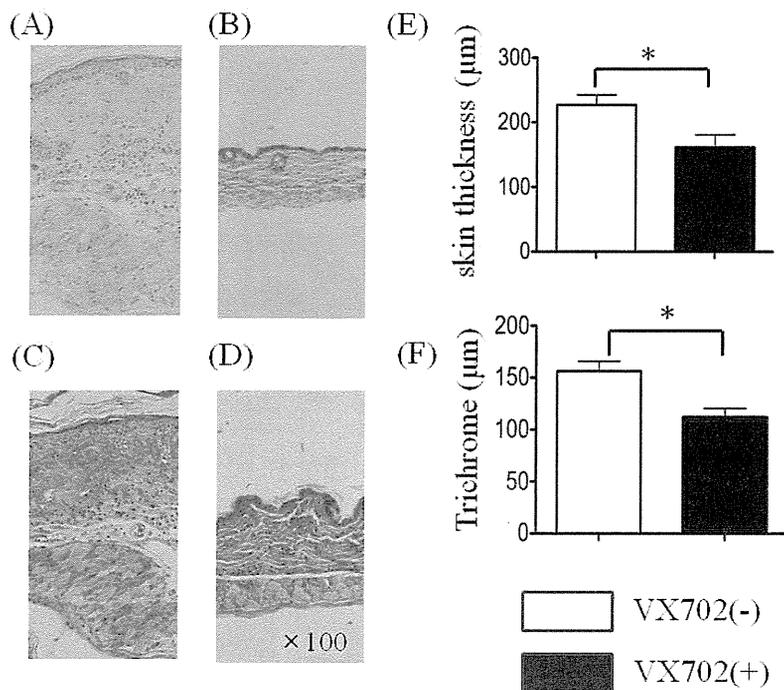


図 4: p38 MAPK 阻害剤投与による皮膚病理組織の結果

組織切片は骨髄移植後 Day35 の皮膚である。

(A) 水のみ投与したマウス群の皮膚を HE 染色した (n=6)。

(B) p38 MAP kinase 阻害剤 (VX702) を投与したマウス群の皮膚を HE 染色した (n=4)。

(C) 水のみ投与したマウス群の皮膚を Masson' s Trichrome 染色した (n=6)。

(D) p38 MAP kinase 阻害剤 (VX702) を投与したマウス群の皮膚を Masson' s Trichrome 染色した (n=4)。

(E) 皮膚の厚さについて p38 MAP kinase 阻害剤投与群 (n=4) と水のみ投与群 (n=6) で比較した。

*P<0.05

(F) 線維化の割合について p38 MAP kinase 阻害剤投与群 (n=4) と水のみ投与群 (n=6) で比較した。

*P<0.05

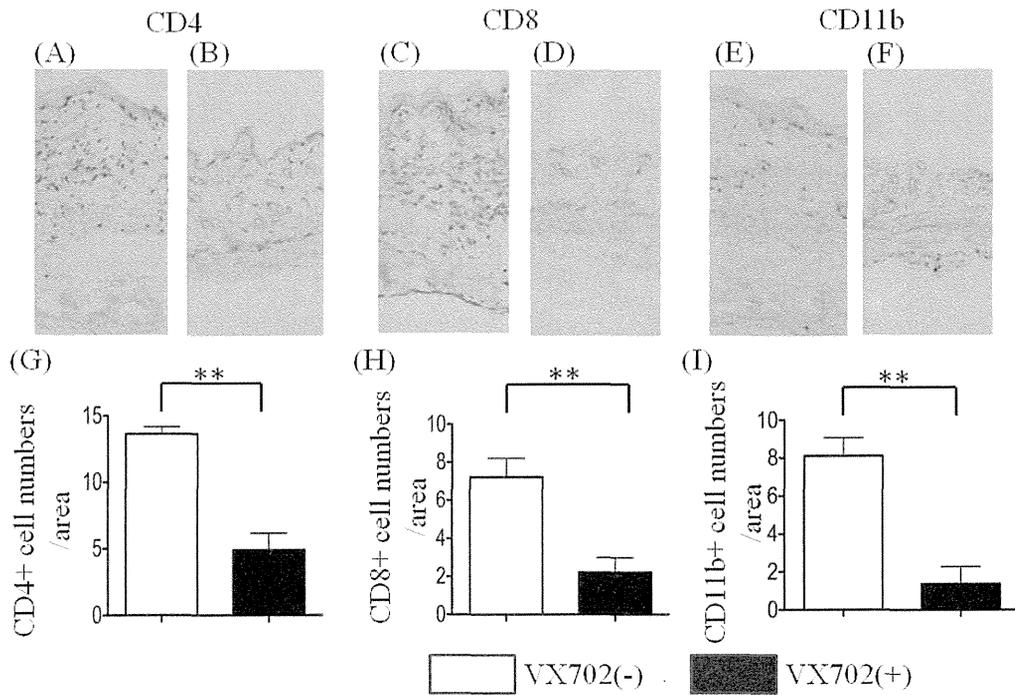


図 5: p38 MAPK 阻害剤投与による免疫組織化学の結果

組織切片は骨髄移植後 Day35 の皮膚である。

(A)水のみ投与したマウス群の皮膚から CD4 陽性細胞を検出した (n=6)。

(B)p38 MAP kinase 阻害剤投与群の皮膚から CD4 陽性細胞を検出した (n=4)。

(C)水のみ投与したマウス群の皮膚から CD8 陽性細胞を検出した (n=6)。

(D)p38 MAP kinase 阻害剤投与群の皮膚から CD8 陽性細胞を検出した (n=4)。

(E)水のみ投与したマウス群の皮膚から CD11b 陽性細胞を検出した (n=6)。

(F)p38 MAP kinase 阻害剤投与群の皮膚から CD11b 陽性細胞を検出した (n=4)。

(G)真皮内に浸潤する CD4 陽性細胞数について p38 MAP kinase 阻害剤投与群 (n=4) と水のみ投与群 (n=6) で比較した。 **P<0.01

(H)真皮内に浸潤する CD8 陽性細胞数について p38 MAP kinase 阻害剤投与群 (n=4) と水のみ投与群 (n=6) で比較した。 **P<0.01

(I)真皮内に浸潤する CD11b 陽性細胞数について p38 MAP kinase 阻害剤投与群 (n=4) と水のみ投与群 (n=6) で比較した。 **P<0.01

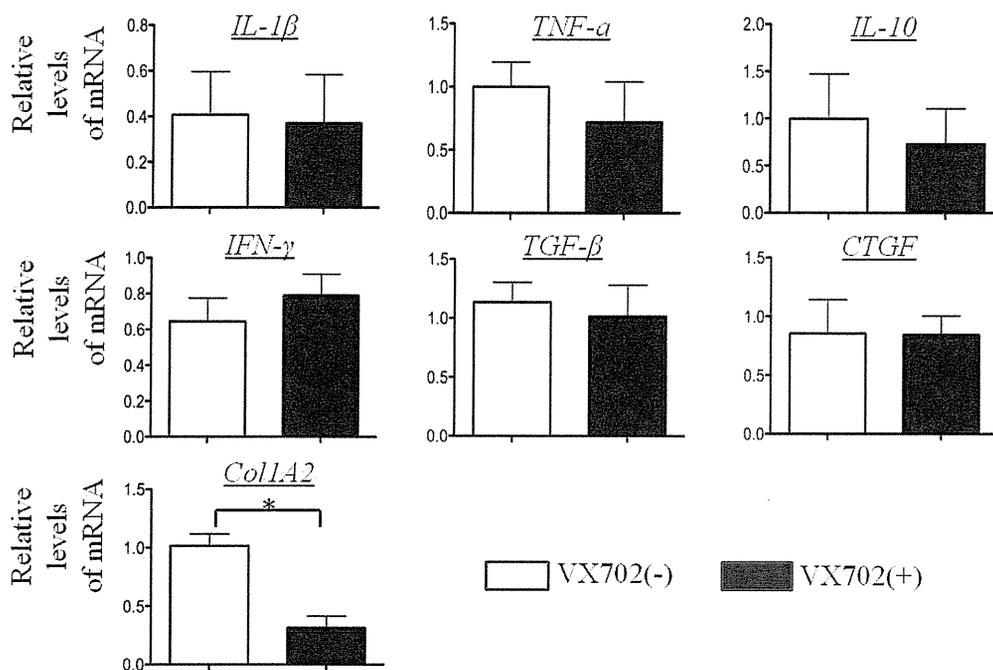


図 6: Day35 の皮膚における様々なサイトカインについてのリアルタイム PCR 解析

Day35 の皮膚組織を用いて、*IL-1β*、*TNF-α*、*IFN-γ*、*IL-10*、*TGF-β*、*CTGF*、*col1A2* についてリアルタイム PCR を行い、p38 MAP kinase 阻害剤投与群 (n=4) とコントロール群 (n=6) で mRNA の発現量に差があるか検討した。p38 MAP kinase 阻害剤投与により、コラーゲンの発現量が顕著に減少した。*P<0.05

全身性強皮症の皮膚線維化における EBI3 の関与の検討

業務主任者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授
協力者 工藤英郎 熊本大学医学部附属病院総合臨床研究部 客員助教
担当責任者 神人正寿 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 准教授

研究要旨

インターロイキン(IL)-12ファミリー(IL-12, IL-23, IL-27 及び IL-35)は様々な自己免疫性疾患の病態に関与しており、全身性強皮症(Systemic sclerosis; SSc)の病態形成においても何らかの役割を果たしていると考えられている。我々は、培養皮膚線維芽細胞において IL-35 刺激により I 型コラーゲンタンパクの発現が減少していることを見出した。さらに IL-35 を構成するサブユニットである Epstein-Barr-virus-induced gene3 (EBI3)が I 型コラーゲンタンパクの発現減少に寄与していると考えた。この機序として、EBI3 は miR-4500 発現亢進を介して I 型コラーゲン mRNA の安定性を低下させる可能性が示唆された。一方、SSc 患者の皮膚組織中では EBI3 発現は減少しており、SSc 線維芽細胞におけるコラーゲン過剰産生に寄与しているかもしれないと考えた。そこで、ブレオマイシン誘発性皮膚線維化モデルマウスにおいて EBI3 投与を行なったところ、線維化を改善させることができた。EBI3 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-12 ファミリーは IL-12 と相同性を持つサイトカイン(IL-23, IL-27 及び IL-35)から構成され、それぞれの受容体が同定されている(図 1A)。主にマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に発現し、様々な自己免疫性疾患の病態形成に関与している¹。これらのサイトカインは T 細胞の分化を制御する役割を持っているが、IL-27 は Th1 細胞の分化初期に作用し²、IL-12 は Th1 細胞の増殖と維持にあたり³、IL-23 は Th17 細胞の生存に必須である等⁴、個々のサイトカインの役割は異なっている。本研究では、培養皮膚線維芽細胞における IL-12 ファミリーの I 型コラーゲン発現への影響について検討した。IL-35 及びその構成サブユニットである EBI3 が I 型コラーゲン発

現を低下させることを見出したため、健常人および SSc 患者において血清および皮膚組織における IL-35 及び EBI3 発現を比較した。このようにして SSc で見られる細胞外マトリックス調節異常に対する EBI3 シグナル伝達の関与について検証した。

B. 研究方法

1) 患者背景

血清試料は 33 例の SSc 患者 (男性 5 例、女性 28 例; 年齢 24-85 歳 (平均 58.4 歳)) より取得した。内訳は、dcSSc13 例、lcSSc20 例であった。健常人 15 例は年齢および性別の一致する者を選択した。10 例の全身性エリテマトーデス患者、12 例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

健康成人 7 例および皮膚硬化出現から 2 年以内の SSc 患者 7 例の前腕からの皮膚生検組織より線維芽細胞の培養を行なった。初代培養は 10%ウシ血清、抗生剤(ペニシリン G、ストレプトマイシン)、抗真菌剤(アムホテリシン B)を添加した変法イーグル培地(MEM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を使用し、室温 37°C、二酸化炭素濃度 5%のインキュベーター内で個別にシャーレで培養を行なった。25cm² フラスコ内で単層培養にて維持し、5-10 回継代した細胞を用いた。全ての実験の前に培養細胞は 24 時間無血清培地の環境下においてうえで使用した。

3) 免疫プロット法

培養皮膚線維芽細胞より抽出したタンパクを一定に調整した細胞溶解液を、10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE スラブゲル)で 100V、20mA で 120 分間電気泳動を行い、分離したタンパクを PVDF 膜(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)にセミドライブロッキング方式で転写した。0.1%スキムミルクにてブロッキングを行い、1 次抗体溶液中に 4°C で 1 晩ローテーションさせながら反応させた。1 次抗体の濃度は I 型コラーゲン(1:320)(Southern Biotech, Birmingham, AL)、 β -actin (1:1000)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)とした。Tris-buffered saline (TBS)に

0.1%Tween20 を加え、洗浄後、室温にて 1 時間 horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体を反応させ、再度洗浄を行なった。Thermo の化学発光システムを用いて目的とするタンパクを検出した。バンドは、ChemiDocTM XRS System (Bio-Rad Laboratories) で検出し、Quantity One 1-D analysis を使用して測定した。

4) PCR アレイ

cDNA を RT² SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Qiagen)と混合し、細胞外マトリックス関連遺伝子のプライマー 84 種類が各 well に配置された 96-well Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array (Qiagen)に加えた。PCR は Takara Thermal Cycler Dice (TP800®) (Takara Bio)で行なった。得られた threshold cycle (Ct)値は Thermal Cycler Dice Real Time System version 2.10B (Takara Bio)を使用して分析した。 β 2 マイクログロブリン、HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)、RPL13A (60S ribosomal protein L13 α)、GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)、 β -actin などの housekeeping 遺伝子にて補正を行い、 $\Delta\Delta$ Ct 法にて解析を行なった。

5) 定量的リアルタイム RCR 法

各プライマー、テンプレート、SYBR Premix Ex Taq Kit (Takara Bio)を混合し、PCR 反応を行なった。DNA は 95°C で 5 秒の熱変性と 60°C、30 秒間のアニーリングを 40 サイクル行い、得られた threshold cycle (Ct)値は Thermal Cycler Dice Real Time System version 2.10B (Takara Bio)を使用して分析した。反応の特異性は、融解曲線分析で確認した。目的遺伝子

と GAPDH 遺伝子のそれぞれの検量線を作成し、GAPDH 遺伝子を housekeeping 遺伝子として相対定量を行なった。GAPDH プライマーは Qiagen から、その他のプライマーは Takara Bio から購入した。

6) 一過性形質導入

目的とする内在性 miRNA の機能を効果的に模倣するようにデザインされた miRNA mimic、目的とする内在性 miRNA の機能を効果的に阻害するようにデザインされた miRNA inhibitor、miRNA が標的とする mRNA 上の特定結合部位をプロテクトするようデザインされた一本鎖の修飾 RNA である miScript target protector は QIAGEN より購入した。導入試薬には Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用い、指示書に従いリバース法で形質導入を行なった。mimics (5nM)、protectors (500nM) はそれぞれ導入試薬と混和し、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、48-96 時間、37°C、5%CO₂ でインキュベートした。

7) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

血清 IL-35 濃度は、Human IL-35 ELISA kit (CUSABIO, Wuhan, China) を用いて測定を行なった⁵。IL-35 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-35 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ジンペルオキシダーゼを用いて 450nm における吸光度を測定した。波長補正は 540nm で行なった。各サンプル中の IL-35 濃度は標準曲線からの補正值により求めた。

8) プレオマイシン誘発性皮膚線維化モデルマウスの作成

プレオマイシン (Nippon Kayaku, Tokyo, Japan) を 1mg/mL の濃度で PBS に溶解し、濾過滅菌した。プレオマイシン (300 μg) 又は PBS を 6 週齢の BALB/c マウスの剃毛された背部の皮膚に週 6 日、週 1 日は PBS 又は EBI3 を皮内注射した^{6,7}。注射は 27 ゲージの針を用いて投与する液量は均等になるように行なった。4 週間にわたってこれを繰り返し、最後の注射が終わった翌日に背部の皮膚を切り取った。皮膚組織は 10%ホルマリン溶液中で固定し、パラフィン包埋した。切片をヘマトキシリン&エオジン染色し、真皮の厚さを盲検的に 2 名の研究者によって表皮・真皮接合部から真皮・皮下脂肪織接合部までの距離を測定することによって評価を行なった。

9) 免疫染色

厚さ 4 μm に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 pH9 (ニチレイ) にて 10 分間、121°C で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 次抗体は EBI3 (Abcam, Cambridge, United Kingdom), gp130 (Santa Cruz Biotechnology) を 0.5%ウシ血清アルブミン溶液で希釈し、4°C で一晩反応させた。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。

10) コラーゲンアッセイ

マウス皮膚のパラフィン切片におけるコラーゲン量を Semi-Quantitative Collagen Assay Kit (Chondrex, Redmond, WA)を用いて定量化した。厚さ 20 μ m に剥切した切片をキシレンにつけ脱蠟させ、傾斜アルコールにて再水和させた後、室温にて 30 分間染色液に浸漬させた。染色液を洗浄し、残った染色液に漂白液を添加し回収し、それを分光光度計 ND-1000 (NanoDrop technologies, Wilmington, DE)を用いて、540nm と 605nm の波長で測定した。得られた値を以下の式に基づいてコラーゲン濃度を算出した⁸。

$$\text{Collagen } (\mu\text{g} / \text{section}) = (\text{OD}_{540} - (\text{OD}_{605} \times 0.291)) / 37.8 \times 1000$$

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) 培養皮膚線維芽細胞において EBI3 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、培養皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン発現に対する IL-12ファミリーの効果について調べるために、免疫プロットを行なった。I

型コラーゲンタンパクの発現は IL-12 でわずかに増加し、IL-23 及び IL-35 では減少した。IL-27 においては変化を認めなかった(図1B)。さらに、我々は二量体を構成することによって IL-12ファミリーサイトカインへと変化する個々のサブユニット(p19, p28, p35, p40及びEBI3)においてもコラーゲン発現に対する影響を検討したところ、EBI3においてのみI型コラーゲンタンパク発現の減少を認めた(図1C)。

EBI3によるコラーゲンタンパク発現の減少は濃度依存的であり、デンシトリーにて定量化を行なったところ統計学的に有意な差を認めた(図2A)。そこで、我々はEBI3の細胞外マトリックスに対する効果に着目し、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3系統の独立した健常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、

EBI3(100ng/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名のサンプルを等量ずつ混合し、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ところ、刺激群で18の遺伝子に発現上昇を認め、22の遺伝子で発現が減少した。ヒト α 2(I)コラーゲン遺伝子の発現はEBI3刺激により(0.38-fold)減少した(表1)。EBI3は α 1(III)コラーゲン遺伝子の発現も減少させた(0.08-fold)。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)増やして再検証を行なったところ、 α 1(I)と α 2(I)コラーゲンのmRNAはともに減少したものの、どちらも統計学的に有意な

差は認められなかった(図2B)。次にEBI3によるI型コラーゲンタンパク発現の低下は、転写レベルまたは翻訳レベルのどちらで行なわれるか判断するために、コラーゲンmRNA及びタンパクの安定性について半減期を調べることとした。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、EBI3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の減少率はmRNAの安定性を示しており、EBI3刺激群では非刺激群と比較して減少率は有意に大きかった(図2C)。同様にde novoタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドを加え、I型コラーゲンタンパク合成をブロックし、タンパクの安定性を検証した。EBI3刺激の有無で経時的なI型コラーゲンタンパク発現の変化を免疫ブロットによって調べたところ、EBI3はタンパクの半減期にはほとんど影響を与えなかった(図2D)。このことから、EBI3はコラーゲンmRNAの安定性に影響を与えることによって、I型コラーゲンタンパクの発現減少を引き起こしていると考えた。そこで我々はEBI3によるI型コラーゲンmRNAの安定性の変化にmicroRNAが関与している可能性を考え、

TargetScan version 6.2

(<http://www.targetscan.org>)より $\alpha 1(I)$ 及び $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の両方に影響を与える18のmiRNA(miR-25, miR-26a, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-32, miR-92a, miR-98, miR-196a, miR-363, miR-367, miR-4458, miR-4500, let-7a, let-7b, let-7e,

let-7f, let-7g)をリストアップし、EBI3刺激による各々のmiRNAの発現を検討した。すると、この中でmiR-4500の発現のみが統計学的に有意な増加を示した(図3A)。さらにmiR-4500 mimicを培養皮膚線維芽細胞に一過性形質導入し、I型コラーゲンタンパク発現を免疫ブロットにて確認したところ、EBI3刺激時と同様に発現の低下を認めた。このことからEBI3刺激時のI型コラーゲンタンパクの発現低下はmiR-4500発現を介して誘導されたものと考えた。

2) SSc 患者の血清における IL-35 および皮膚組織における EBI3 の発現

次に、我々は ELISA 法によって SSc 患者における血清 IL-35 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 4A に示すように、平均血清 IL-35 濃度は健常人および各種リウマチ性疾患の間で有意な差は認めなかった。血清 IL-35 値を平均値で2群に分けて、臨床症状を比較したところ、IL-35 高値群で毛細血管拡張が有意に低いことが分かった(表 2)。また、EBI3 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 4B)。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なったところ、正常皮膚では表皮に EBI3 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 4C)。このように SSc 皮膚組織における EBI3 発現は恒常的に減少して

いる。また、EBI3 の受容体である gp130 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 gp130 タンパク発現が認められた(図 4D)。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 gp130 発現は同程度であり(図 4E)、in vitro で培養皮膚線維芽細胞を用いた免疫プロット法においても、gp130 発現は正常と SSc を比べて明らかな差はなかった(図 5C)。まとめると、EBI3 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 EBI3 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) SSc 線維芽細胞における I 型コラーゲン発現に対する EBI3 の効果

次に SSc 線維芽細胞において EBI3 が I 型コラーゲン発現に及ぼす影響について検証したところ、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 5A) および miR-4500 発現の誘導(図 5B)が認められた。

4) プレオマイシン誘発性皮膚線維化モデルマウスに対する EBI3 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 のモデルマウスとして使用されている⁹。図 6A ではヒトの免疫染色と同様に、コントロールマウスでは表皮に EBI3 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 EBI3 発現は減少していた。炎症細胞や血管内皮細胞における EBI3 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 EBI3 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、プレオマイシン誘発性皮膚線維化モデルマウス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 μ g)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 EBI3(3.5 μ g)を注射した(図 6B)。プレオマイシンを投与しなかった群では EBI3 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。EBI3 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、EBI3 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 6C)。また、皮膚の厚さを測定したところ、EBI3 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 6D)。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 EBI3 によって統計学的に有意に減少していた(図 6E)。このように、EBI3 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

本研究では、IL-12 サイトカインファミリーと細胞外マトリックス調節異常との関連を調べた。この中でも IL-35 は制御性 T 細胞(Treg)より産生されるサイトカインであり、培養皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲンタンパク発現を減少させた。IL-35 は、免疫寛容の維持および自己免疫を防ぐことによって Treg の免疫抑制機

能を媒介すると考えられている¹⁰。例えば、炎症性腸疾患のモデルマウスにおいて、TregのいずれかでIL-35のサブユニット(p35またはEBI3)の枯渇は、炎症を抑制する機能を限弱させることが報告されている¹¹。IL-12サイトカインファミリーのサブユニットのうち、EBI3のみがin vitroで濃度依存的にI型コラーゲンタンパクの発現を減少させた。また、IL-12またはIL-23がそれぞれI型コラーゲンタンパクの発現を増加または減少させたにも関わらず、これらのサブユニット(p19, p35 および p40)単体では影響を及ぼさなかった。一般的に、生体内においてサブユニット自体は生物学的活性を有していないといわれている。しかし、最近の報告では、EBI3が単体で自己免疫性ブドウ膜の発症に関与していることが示唆され¹²、SLEの活動期には血清中で発現が低下していることが報告される等¹³、自己免疫性疾患の病態形成に影響を与えていると考えられている。EBI3の発現が直接的に、あるいは細胞培地に添加後に内在性のp35または他のタンパクと複合体を形成して細胞外マトリックスの発現に影響を与えているのか、その機序は明らかとはなっていないが、その点を検証するためにさらなる研究が必要であると考えられる。EBI3はFoxp3の下流標的であるため¹⁴、IL-35の発現はTregに特異的であると考えられてきた。しかし、EBI3は大動脈平滑筋細胞を含むその他の細胞においても発現されることが報告されている¹⁵。我々の研究の結果では、ケラチノサイトもまたEBI3を発現しており、さらにSSc患者の表皮においてEBI3発現は減少していた。IL-35はTreg細胞の増殖を誘導するが、Th17細胞の発達を抑制することが報

告されている¹⁶。我々は以前にSSc患者におけるIL-17の発現増加を報告している¹⁷。SScにおけるEBI3の発現減少は、IL-17の誘導に寄与していると考えられる。

我々はマウスモデルにおけるEBI3の補充によってブ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。このモデルはSScの線維化に対するEBI3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サートが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^{18,19}。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²⁰。EBI3による線維化調節機構を明らかにすることは、この病気のよりよい理解と新しい治療法につながる可能性がある。

E. 結論

EBI3は、miR-4500発現亢進を介してコラーゲン mRNAの安定性を低下させる。また、SSc皮膚におけるEBI3の減少は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EBI3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。EBI3投与はSScの新しい治療につながる可能性がある。生体内においてEBI3やその受容体であるgp130の機能や発現を今後、さらに検討していく必要がある。