

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、CO₂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。ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HDMECs) は Lonza (Walkersville, MD)より購入し、培養には EGM-2 Bullet Kit (Lonza)を添加した EBM-2 (Lonza)培地を用いた。室温 37°C、CO₂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。

4) RNA 干渉法による一時的遺伝子サイレンシング、および TNF- α 刺激

培養皮膚線維芽細胞に対して 10 nM Fli1 siRNA (Santa Cruz)、PGRN siRNA (Santa Cruz) または scrambled non-silencing RNA (Santa Cruz) と HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Germany)を加えて 48 時間培養し、さらに 24 時間血清飢餓状態で培養してから検体を採取した。さらにそのうちのいくつかでは 24 時間 TNF- α (PeproTech)による刺激を加えた。

5) 皮膚における各種遺伝子の mRNA の発現量の検討

各マウス皮膚より RNeasy spin column (Qiagen inc.)を用いて mRNA を抽出し、PGRN、TNF- α 、 α 2(I) collagen (COL1A2)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) 培養細胞における各種遺伝子の mRNA の

発現量の検討

培養細胞から RNeasy spin column (Qiagen inc.)を用いて mRNA 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。

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 μ 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 techniques (Thermo Scientific)で発光させた。

8) クロマチン免疫沈降法

クロマチン免疫沈降法には EpiQuik ChIP kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA)を使用説明書に準じて用いた。培養皮膚線維芽細胞を 1%ホルムアルデヒドで処理しクロマチンをクロスリンクしたのち、超音波破碎装置を用いて 300-500 bp のサイズに破碎した。次に、タンパクとクロスリンクした DNA の断片に対して各種抗体を用いて目的の複合体を採取した。各種抗体の陰性コントロールとして、非特異的ウサギ IgG もしくはマウス IgG を用いた。Input には免疫沈降前の検体を使用した。クロスリンクを Proteinase K を用いて消失させてから、残存した DNA を検体として定量的 real-time PCR を行い、生成した産物をアガロースゲル電気泳動に

より検出した。定量的 real-time PCR には PGRN のプロモーター領域を増幅できるようにプライマーを設計した。

9) 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) 全身性強皮症皮膚線維芽細胞において PGRN は発現が亢進している

強皮症患者の病変部皮膚では、健常人皮膚と比較して PGRN の発現が亢進しており(図 1A, B)、特に皮膚線維芽細胞において発現亢進が顕著であった(図 1C, D)。また、強皮症患者の病変部皮膚では、健常人皮膚と比較して PGRN 遺伝子の mRNA の発現量が有意に亢進していた(図 1E)。

2) 皮膚線維芽細胞において、Fli1 は PGRN 遺伝子に対して転写抑制因子として機能している

正常皮膚線維芽細胞に scrambled non-silencing RNA あるいは Fli1 siRNA を transfection すると、Fli1 siRNA 導入正常皮膚線維芽細胞ではコントロールと比較して、PGRN の発現が亢進した(図 2 A)。一方、HDMECs では Fli1 siRNA は PGRN の発現には影響を及ぼさなかった。次に、ヒト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ところ、Fli1 は PGRN 遺伝子プロモーターに結合していた(図 2B)。また、強皮症皮膚線維芽細胞では、正常皮膚線維芽細胞と比較

して PGRN 遺伝子プロモーターへの Fli1 の結合量が有意に低下していた(図 2C)。

3) Fli1^{+/+}マウスの皮膚線維芽細胞では PGRN の発現が亢進している

上記の検討により、ヒト皮膚線維芽細胞において Fli1 は PGRN 遺伝子の転写抑制因子として機能していることが示唆された。そこで次に、Fli1 の発現低下が *in vivo* で PGRN 遺伝子の発現を誘導するか否かについて、Fli1^{+/+}マウスを用いて検討したところ、同マウスでは野生型マウスと比較して皮膚線維芽細胞において PGRN 蛋白の発現が亢進していた(図 3A, B)。

4) BLM 誘発強皮症モデルマウスでは皮膚線維芽細胞における PGRN の発現が亢進している

次に、PBS 投与マウスと BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚組織における PGRN の発現量について検討を行った。BLM 誘発強皮症モデルマウスの病変部皮膚における PGRN 遺伝子の mRNA の発現量は、PBS 投与マウスと比較して有意に亢進していた(図 4A)。また、BLM 誘発強皮症モデルマウスの病変部皮膚における *Tnfa* 遺伝子の mRNA の発現量も、PBS 投与マウスと比較して有意に亢進していた(図 4A)。このように、BLM 誘発強皮症モデルマウスでは抗線維化作用を有する TNF- α の発現が亢進しているながら、組織学的には高度な線維化が認められる。そこで、線維芽細胞において PGRN の発現が亢進して TNF- α の抗線維化作用に対して拮抗的に作用している可能性を考え、免疫染色による検討を行った。仮説通り、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚では、PBS 投与マウスと比較して皮膚線維芽細胞において

PGRN 蛋白の発現が亢進していた(図 4B)。

5) 強皮症皮膚線維芽細胞は PGRN の発現を介して TNF- α の抗線維化作用に抵抗性を示す

BLM 誘発強皮症モデルマウスと同様に、強皮症患者の皮膚では TNF- α の発現が亢進しているが、皮膚線維芽細胞では PGRN の発現が亢進しており、組織学的には顕著な線維化が認められる。また、強皮症皮膚線維芽細胞は TNF- α の抗線維化作用に対して抵抗性であることが *in vitro* の検討で既に明らかにされている。そこで次に、培養強皮症皮膚線維芽細胞を用いて、実際に PGRN が TNF- α の抗線維化作用に拮抗しているか否かについて検討を行った。図 5A に示すように、強皮症皮膚線維芽細胞は *in vitro* においても、正常皮膚線維芽細胞と比較して I 型コラーゲン蛋白を過剰産生し、PGRN 蛋白についても同様に過剰産生していた。次に、PGRN siRNA が強皮症皮膚線維芽細胞の TNF- α に対する反応性に及ぼす影響について検討したところ、PGRN siRNA で処理することにより強皮症皮膚線維芽細胞では TNF- α 刺激により I 型コラーゲン産生が抑制された。一方で、scrambled non-silencing RNA で処理した強皮症皮膚線維芽細胞では、TNF- α 刺激により I 型コラーゲン産生は影響を受けなかった(図 5B)。最後に、PGRN の TNF- α に対する拮抗作用について、正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。図 5C に示すように、正常皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白の産生量および *COL1A2* 遺伝子の mRNA の発現量は TNF- α 刺激により抑制されたが、PGRN で処理することにより TNF- α のこれらの作用は消失した。以上の結果から、強皮症皮膚線維芽細胞

は PGRN を過剰に発現することにより TNF- α の抗線維化作用に拮抗しており、この機序が同細胞の恒常的活性化に関与していることが明らかとなった。

D. 考案

今回我々は、強皮症皮膚線維芽細胞において PGRN の発現が亢進していることを明らかにした。過去の報告において、皮膚線維芽細胞は低酸素、アプトーシス環境下において PGRN を発現し、その PGRN の作用によりアプトーシスから保護されることが明らかにされている¹²。全身性強皮症患者の皮膚では血管障害により低酸素状態となっていることが知られているが、今回の検討結果から、強皮症線維芽細胞における PGRN の発現亢進は、低酸素環境下で同細胞をアプトーシスから保護し、線維化の誘導に関与している可能性が示唆された。

強皮症皮膚線維芽細胞は TNF- α の抗線維化作用に抵抗性であり、この形質が高 TNF- α 濃度下で同細胞が活性化状態を維持する機序に関与していると考えられてきたが、現在までその詳細な分子メカニズムは不明であった。今回の我々の検討により、皮膚線維芽細胞において PGRN は TNF- α の抗線維化作用に拮抗すること、および強皮症皮膚線維芽細胞における PGRN の発現亢進が同細胞の TNF- α への不応性に深く関与していることが明らかとなった。更に、我々のこれまでの研究によって、強皮症皮膚線維芽細胞の形質変化には転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下が重要であることが示されているが、同細胞における PGRN 遺

伝子の発現亢進においても転写因子 Fli1 の発現低下が深く関与していることが *in vivo* および *in vitro* の検討で明らかとなった。

本研究は「Fli1 の発現異常に基づく強皮症病態一元化仮説」に基づき立案されたが、以上の結果は同概念がこれまで不明であった強皮症皮膚線維芽細胞の TNF- α への不応性をも説明し得ることを示している。今後、同概念に基づき強皮症の病態について更に検討を進める予定である。

E. 結 論

強皮症皮膚線維芽細胞において PGRN の発現が亢進していた。アポトーシス抑制作用、TNF 受容体へのアンタゴニスト作用などを介して、PGRN は強皮症皮膚線維芽細胞の恒常的活性化に関与している可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Asano Y. Future treatments in systemic sclerosis. *J Dermatol* 2010; 37:54-70.
2. Jian J, Konopka J, Liu C. Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *J Leukoc Biol* 2013; 93:199-208.
3. He Z, Ong CH, Halper J, Bateman A. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med* 2003; 9:225-9.
4. Ong CH, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 2003; 18:1275-88.
5. He Z, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)* 2003; 81:600-12.
6. Cenik B, Sephton CF, Kutluk Cenik B, Herz J, Yu G. Progranulin: a proteolytically processed protein at the crossroads of inflammation and neurodegeneration. *J Biol Chem* 2012; 287:32298-306.
7. Tang W, Lu Y, Tian QY, Zhang Y, Guo FJ, Liu GY, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science* 2011; 332:478-84.
8. Solis-Herruzo JA, Brenner DA, Chojkier M. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; 263:5841-5.
9. Kähäri VM, Chen YQ, Su MW, Ramirez F, Uitto J. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma suppress the activation of human type I collagen gene expression by transforming growth factor-beta 1. Evidence for two distinct mechanisms of inhibition at the transcriptional and posttranscriptional levels. *J Clin Invest*

- 1990; 86:1489-95.
10. Verrecchia F, Pessah M, Atfi A, Mauviel A. Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J Biol Chem* 2000; 275:30226-31.
 11. Yamane K, Ihn H, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K. Antagonistic effects of TNF-alpha on TGF-beta signaling through down-regulation of TGF-beta receptor type II in human dermal fibroblasts. *J Immunol* 2003; 171:3855-62.
 12. Guerra RR, Kriazhev L, Hernandez-Blazquez FJ, Bateman A. Progranulin is a stress-response factor in fibroblasts subjected to hypoxia and acidosis. *Growth Factors* 2007; 25:280-5.
 13. Gruschwitz MS, Vieth G. Up-regulation of class II major histocompatibility complex and intercellular adhesion molecule 1 expression on scleroderma fibroblasts and endothelial cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha in the early disease stage. *Arthritis Rheum* 1997; 40:540-50.
 14. Chizzolini C, Rezzonico R, Ribbens C, Burger D, Wollheim FA, Dayer JM. Inhibition of type I collagen production by dermal fibroblasts upon contact with activated T cells: different sensitivity to inhibition between systemic sclerosis and control fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1998; 41:2039-47.
 15. Chizzolini C, Parel Y, De Luca C, Tyndall A, Akesson A, Scheja A, et al. Systemic sclerosis Th2 cells inhibit collagen production by dermal fibroblasts via membrane-associated tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2593-604.
 16. Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, et al. Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol* 2003; 163:571-81.
 17. Asano Y, Czuwara J, Trojanowska M. Transforming growth factor-beta regulates DNA binding activity of transcription factor Fli1 by p300/CREB-binding protein-associated factor-dependent acetylation. *J Biol Chem* 2007; 282:34672-83.
 18. Asano Y, Markiewicz M, Kubo M, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol* 2009; 29:425-34.
 19. Nakerakanti SS, Kapanadze B, Yamasaki M, Markiewicz M, Trojanowska M. Fli1 and Ets1 have

- distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program. *J Biol Chem* 2006; 281:25259-69.
20. Shirasaki F, Makhlef HA, LeRoy C, Watson DK, Trojanowska M. Ets transcription factors cooperate with Sp1 to activate the human tenascin-C promoter. *Oncogene* 1999; 18:7755-64.
21. Czuwara-Ladykowska J, Sementchenko VI, Watson DK, Trojanowska M. Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta. *J Biol Chem* 2002; 277:20399-408.
22. Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2006; 54:2271-9.

G. 研究発表

1. 論文発表

Ichimura Y, Asano Y, Sato S, Kadono T, et al.:
 Progranulin overproduction due to Fli1 deficiency contributes to the resistance of dermal fibroblasts to tumor necrosis factor α in systemic sclerosis
Arthritis & Rheumatology (in revision)

2. 学会発表

Ichimura Y, Asano Y, Sato S, Kadono T, et al.:
 Progranulin overproduction due to Fli1 deficiency contributes to the resistance of dermal fibroblasts to tumor necrosis factor α in systemic sclerosis
 2014 ACR/ARHP Annual Meeting, Boston.
 Poster.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

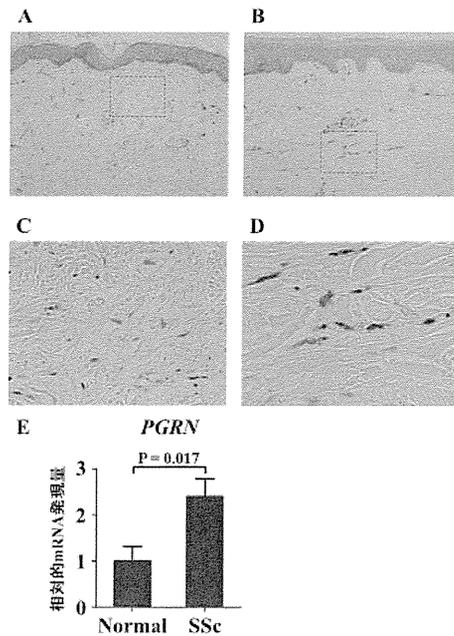


図 1: 健常人および全身性強皮症患者皮膚組織における PGRN の発現

A-D. 健常人(A, C)と全身性強皮症患者(B, D)の皮膚組織を用いて、PGRN の免疫組織染色を行った。
E. 健常人および全身性強皮症患者由来皮膚組織における PGRN の mRNA の発現量を定量的 RT-PCR を用いて検討した。

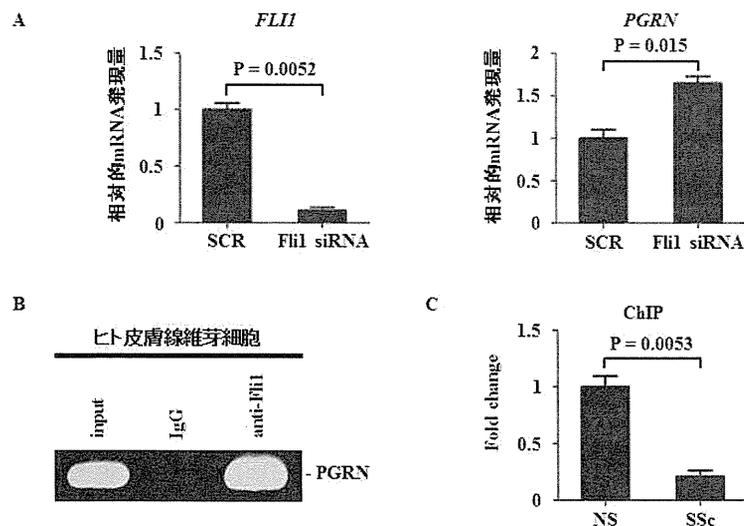


図 2: 皮膚線維芽細胞において Fli1 は PGRN 遺伝子の転写抑制因子として機能している

A. 正常人皮膚線維芽細胞に scrambled non-silencing RNA (SCR) または Fli1 siRNA を transfection し、Fli1 遺伝子および PGRN 遺伝子の mRNA の発現量を定量的 real-time PCR で検討した。
B. 正常皮膚線維芽細胞と抗 Fli1 抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。
C. 定量的 real-time PCR により結合量を定量化し、input で補正した。

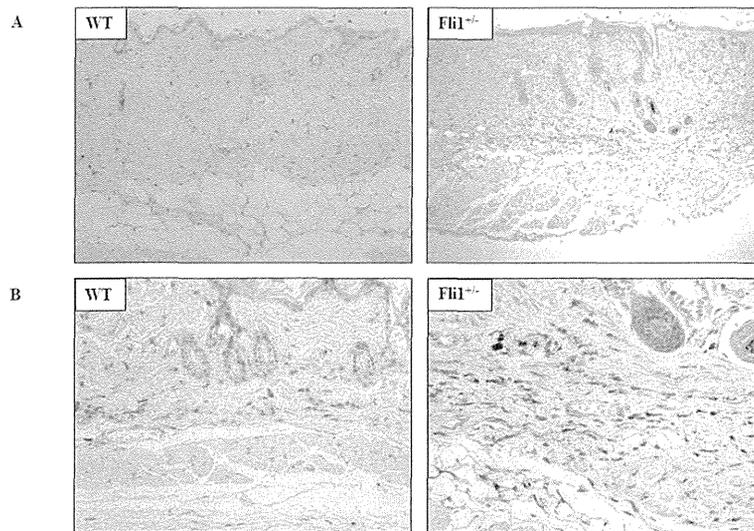


図 3: 野生型マウスおよび *Fli1*^{-/-}マウスの皮膚組織における PGRN の発現量の検討
 野生型マウス(WT)および *Fli1*^{-/-}マウスの背部皮膚組織を用いて、PGRN の免疫組織染色を行った。
 A は弱拡大像、B は強拡大像を示す。

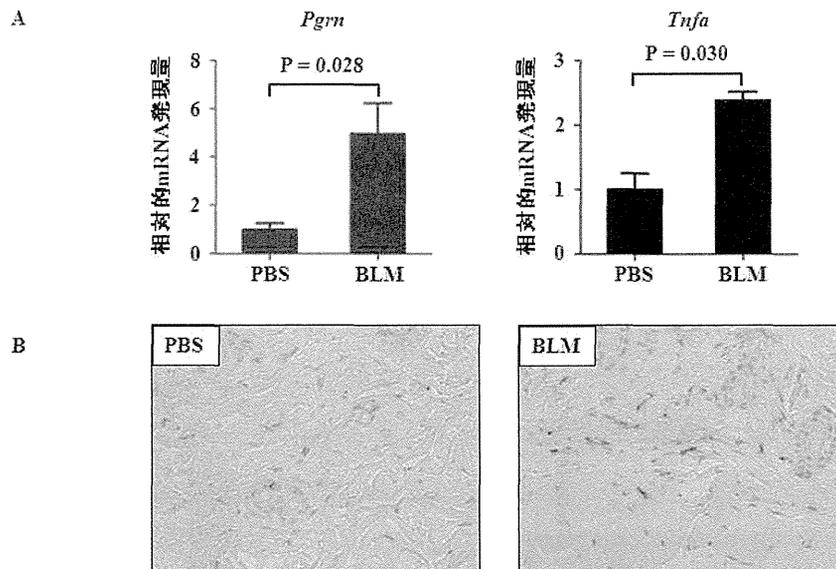


図 4: BLM 誘発強皮症モデルマウス皮膚組織における PGRN の発現
 A. PBS 投与マウスおよび BLM 誘発強皮症モデルマウスの背部皮膚における *Pgrn* 遺伝子および *Tnfa* 遺伝子の mRNA の発現量の検討。
 B. PBS 投与マウスおよび BLM 誘発強皮症モデルマウスの背部皮膚組織における PGRN 蛋白の発現量を免疫染色にて検討した。

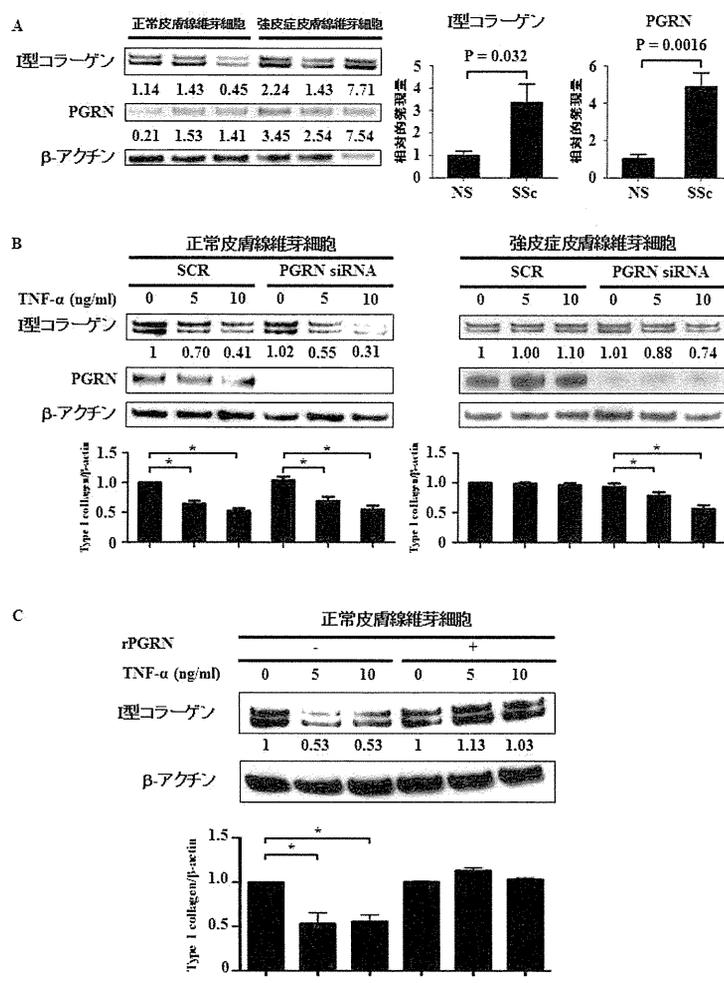


図 5: 強皮症皮膚線維芽細胞は PGRN を強発現することにより、TNF- α の抗線維化作用に対して抵抗性を示す

A. 正常皮膚線維芽細胞および強皮症皮膚線維芽細胞を用いて、免疫ブロット法を行った。Densitometryによりバンドを定量化し、I型コラーゲンおよびPGRNの発現量をβ-アクチンで補正した(*P < 0.05)。

B. 正常皮膚線維芽細胞および強皮症皮膚線維芽細胞に scrambled non-silencing RNA (SCR)または PGRN siRNA を transfection し、24 時間無血清培地で培養した後、TNF- α (5 ng/ml, 10 ng/ml)で 24 時間刺激し、免疫ブロット法を行った。Densitometryによりバンドを定量化し、I型コラーゲンおよび PGRN の発現量をβ-アクチンで補正した(*P < 0.05)。

C. 正常皮膚線維芽細胞を PGRN (200 ng/ml)存在下および非存在下において、TNF- α で 24 時間刺激し、免疫ブロット法を行った。Densitometryによりバンドを定量化し、I型コラーゲンの発現量をβ-アクチンで補正した(*P < 0.05)。

ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの線維化、血管障害および炎症・免疫異常の病態における転写因子 IRF5 の役割についての検討

担当責任者	佐藤伸一	東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
担当責任者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
協力者	三枝良輔	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	中村洸樹	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	山下尚志	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	市村洋平	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	高橋岳浩	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	遠山哲夫	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	谷口隆志	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	吉崎 歩	東京大学医学部附属病院皮膚科 助教
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

転写因子 interferon regulatory factor 5 (IRF5)には直接機能的意義を有する複数の多型部位が存在し、ゲノムワイド関連解析によってその遺伝子多型と全身性強皮症の関連が見出されている。今回我々は *Irf5* knockout マウス(*Irf5*^{-/-} マウス)を用いてブレオマイシン(BLM)誘発強皮症モデルマウスを作成し、全身性強皮症の主要 3 病態(線維化、血管障害、炎症・免疫異常)における IRF5 の役割について検討した。*Irf5*^{-/-} マウスの無刺激状態の皮膚では、野生型マウスに比べ細いコラーゲン線維束が目立ち、I型コラーゲンの発現低下および MMP-13 の発現亢進がみられた。また、BLM 投与による皮膚硬化および肺線維化が野生型マウスに比較し、*Irf5*^{-/-} マウスにおいて抑制されていた。一方、IRF5は血管内皮細胞において、強皮症の血管障害に関与する様々な遺伝子の発現を直接制御しており、*Irf5*^{-/-} マウスでは angiostatic な状態が誘導されていた。また、BLM 処理した *Irf5*^{-/-} マウスでは、CD4 陽性 T 細胞で IFN- γ の発現亢進、皮膚および肺組織中の細胞接着分子 ICAM-1、GlyCAM-1 の発現低下がみられ、Th1 優位な免疫応答が誘導されていた。以上のように全身性強皮症の主要 3 病態が BLM 処理した *Irf5*^{-/-} マウスにおいて抑制されることから、IRF5 が本症の発症に強く関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5)は転写因子であり、ウイルス感染や Toll-like receptor (TLR) 7、8、9 の刺激を受けてリン酸化され、核内移行し、1 型 interferon、Interleukin (IL) -6、

IL-12、tumor necrosis factor α 、chemokine、apoptosis 関連遺伝子など多数の遺伝子を誘導する。IRF5はマクロファージなどの免疫担当細胞では TLR3、4、5、7、9 の活性化による炎症性サイトカイン産生に関与している。

IRF5には、直接機能的意義を有する複数の多型部位が存在し、ゲノムワイド関連解析によって *IRF5* 遺伝子領域の functional genetic variants が全身性強皮症(SSc)と関連があることが示唆された [1]。また、*IRF5* 遺伝子プロモーター領域の別の single nucleotide polymorphism (SNP)は SSc患者において *IRF5* 転写レベルの低下と関連しており、さらには longer survival と milder ILD と関連しているという報告がある [2]。

SSc は多因子疾患であり、環境因子、遺伝因子、エピジェネティック因子が複雑に相互作用することによってその病態が形成されていると考えられているが、今回我々が注目している *IRF5* はプロモーター領域の SNP が疾患感受性や疾患重症度に関連していることが示すように、遺伝因子に分類される[3]。このように *IRF5* は SSc の病態に深く関与している可能性が示されてきたが、実際に *IRF5* が SSc の病態に及ぼす影響についてはいまだ明らかでない。そこで、今回我々は BLM 誘発強皮症モデルを用いて強皮症の主要3病態(線維化、血管障害、炎症・免疫異常)における転写因子 *IRF5* の役割について検討をおこなった。

B. 研究方法

1) マウス

本研究では C57BL/6 マウスを背景とする野生型マウスおよび *Irf5*^{-/-}マウスを用いて作成した BLM 誘発 SSc 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 SSc 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 1mg/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 μ 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。なお、実験動物の取り扱いには、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。マウスの扱いは、苦痛を最小限とするため、麻酔、安楽死などを適切に施行した。

2) 病理組織学的検討

1 週間、4 週間の BLM および PBS 投与が終了したマウスの背部皮膚を採取し、一部をパラフィン包埋し、6 μ m 切片を作成した。ヘマトキシリン&エオジン(H.E.)染色を行った。抗マウス CD3 抗体 (BD PharMingen)、抗マウス B220 抗体 (BD PharMingen) およびトルイジンブルー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。また、抗 α -smooth muscle actin (α SMA)抗体 (Abcam)染色を行った。

3) 蛍光染色(内皮間葉移行の検討)

Goat anti-VE-cadherin 抗体 (sc-6458; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit anti-fibroblast specific protein 1 (FSP1)抗体 (ab41532; abcam, Cambridge, U.K.)を 1 次抗体として使用し、FITC conjugated donkey anti-rabbit IgG 抗体 (sc-2090; Santa Cruz Biotechnology)、Alexa Fluor donkey 555 anti-goat IgG 抗体 (A21432; Invitrogen、Carlsbad、CA)を 2 次抗体として使用し、Vectashield with DAPI (Vector Laboratories、Burlingame、CA)をマウントし、Bio Zero BZ-8000

(Keyence, Osaka, Japan)を 495 nm (green)、565 nm (red)、400 nm (blue)の条件で使用し観察した。

4)組織中のハイドロキシプロリン測定

ハイ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 6mm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)皮膚におけるサイトカインの発現量の検討

各マウス皮膚および肺より RNeasy spin column (Qiagen inc.)を用いて mRNA を抽出し、*Sele*、*Selp*、*Glycam1*、*Icam1* 遺伝子の mRNA 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)細胞培養と isolation

皮膚線維芽細胞培養には 10%牛胎児血清、抗生剤、抗真菌薬を添加した変法イーグル培地を使用した。室温 37°C、CO₂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。ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HDMEC) は Lonza (Walkersville, MD)より購入し、培養には EGM-2 Bullet Kit (Lonza)を添加した EBM-2 (Lonza)培地を用いた。室温 37°C、CO₂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。また、マウス B 細胞は RPMI 培地 (Life Technologies) を使用し同条件で培養した。マウス血管内皮細胞の isolation には anti-CD31 microbeads (Miltenyi Biotec)を、マウス脾臓 B 細胞の isolation には anti-CD19 microbeads (Miltenyi

Biotec)を使用した。

7)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 RNeasy spin column (Qiagen inc.)を用いて mRNA 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。

8) Evans blue 尾静注による、BLM 投与が誘導する血管透過性の亢進に関する検討

BLM 投与開始後、7 日目に尾静脈から PBS に溶解させた 0.5%濃度の Evans blue (Sigma Aldrich)を 200μl 投与し、30 分後に皮膚における血管透過性の評価を行った。

9) scratch assay

Human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs)を 24 well plate で subconfluent まで培養し、IRF5 siRNA あるいは scrambled non-silencing RNA を transfection した。その後、confluent になるまで培養し、mytomycin C で処理して細胞分裂を抑制した。200μl 用の yellow chip で細胞を scratch して線状に wound を作成し、6 時間後、12 時間後、24 時間後に HDMECs の migration を観察した。

10) tube formation assay

HDMECs を 6 well plate で subconfluent まで培養し、IRF5 siRNA あるいは scrambled non-silencing RNA を transfection した。その後、confluent になるまで培養しその細胞を 24well plate に 30%confluent になるように撒き、細胞が plate に接着したのを確認した後、matrigel を overlay した。

11) apoptosis assay

24 well plate で HDMECs を confluent になるまで培養し、IRF5 siRNA あるいは scrambled non-silencing RNA を transfection した。1% serum 存在下あるいは serum free の条件下で HDMECs を培養し、7-AAD で染色し FACS を用いて apoptosis を生じている細胞の割合を観察した。

12) Flow cytometry (FACS)による評価

前述と同じ方法で BLM 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 μ g/ml の brefeldin A (GolgiStop; BD Pharmingen) 存在下で 10ng/ml の PMA と 1 μ 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 bugger (BD Pharmingen) にて処理し、anti-IL-4 (11B11)、anti-IL17A (TC11.18H10) および anti-IFN- γ (WMG1.2; 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。

13) 統計学的検討

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

C. 研究結果

1) *Irf5*^{-/-} マウスの皮膚ではコラーゲンの減少と高次構造の異常がみられる

まずはじめに、*Irf5*^{-/-} マウスの背部皮膚の構造について HE 染色で検討したところ、表皮、血管、

皮下脂肪組織、炎症細胞浸潤などについては野生型マウスと比較して差は認められなかった。一方、*Irf5*^{-/-} マウスでは真皮におけるコラーゲン線維芽が野生型マウスと比較して細く(図 1a)、hydroxyproline assay においても皮膚におけるコラーゲンの沈着量が野生型マウスと比較して少ない傾向が認められた(図 1b)。また、電子顕微鏡を用いた検討においても、*Irf5*^{-/-} マウスでは特に真皮深層でコラーゲン線維が顕著に疎になっており、個々の線維も野生型マウスに比較し細くなっていた(図 1c)。さらに個々のコラーゲン線維径も野生型マウスに比較しばらつきが大きかった(図 1d)。

2) *Irf5*^{-/-} 皮膚線維芽細胞ではコラーゲンの代謝および fibrillogenesis に関与する分子の発現が SSc 皮膚線維芽細胞と逆の形質を示す

Irf5^{-/-}マウスの皮膚においてコラーゲンの沈着量の低下と高次構造の異常が認められたため、次に *Irf5*^{-/-}皮膚線維芽細胞の形質について検討した。*Irf5*^{-/-}皮膚線維芽細胞は、野生型皮膚線維芽細胞に比べて、I 型 コラーゲン蛋白の発現が低下し、MMP-13 蛋白の発現が顕著に亢進しており、mRNA の検討においても同様の結果であった(図 2a)。また、ヒト正常皮膚線維芽細胞を用いたクロマチン免疫沈降法による検討では、IRF5 は *COL1A2* 遺伝子および *MMP1* 遺伝子のプロモーター領域に結合していることが示された(図 2b)。また、コラーゲンの fibrillogenesis に関与する遺伝子の発現について検討したところ、*Irf5*^{-/-}皮膚線維芽細胞では野生型皮膚線維芽細胞と比較して *Adams2*、*Lox*、*Dcn*、*Lum* 遺伝子の発現が低下しており、電顕所見にあったような疎で細かいコラーゲン線維の形成に深く関与してい

る可能性が示唆された。一方、強皮症皮膚線維芽細胞では *DCN* 遺伝子の発現は低下しているが、*ADAMTS2*, *LOX*, *LUM* 遺伝子の発現は亢進していることが知られている[4, 5]。以上の結果から、*Irf5*^{-/-}皮膚線維芽細胞ではコラーゲンの代謝および fibrillogenesis に関与する多くの遺伝子において、強皮症皮膚線維芽細胞と逆の発現形式を示すことが明らかとなった(図 2c)。

3) *Irf5*^{-/-} マウスでは BLM 投与による皮膚および肺の線維化が抑制される

次に、*Irf5*^{-/-} マウスに BLM を投与し、IRF5 が *in vivo* の線維化反応に及ぼす影響について検討した。病理組織像およびコラーゲン含量で検討したところ、*Irf5*^{-/-} マウスでは野生型マウスと比較して皮膚および肺において線維化反応が有意に抑制されていた(図 3a-d)。

4) *Irf5*^{-/-} マウスでは BLM 投与による炎症細胞浸潤が抑制される

線維化反応においては、炎症を介した線維芽細胞の活性化も重要な役割を果たしている。そこで、BLM により惹起される炎症に対して IRF5 が及ぼす影響について検討した。*Irf5*^{-/-} マウスでは、皮膚および肺において T 細胞、B 細胞および肥満細胞の浸潤が野生型マウスに比べて有意に低下していた(図 4a-d)。

5) *Irf5*^{-/-} マウスでは BLM 投与による B 細胞の活性化が抑制されている

B 細胞において CD19 の発現量は IL-6 の産生量と深く関与しており[6]、更に SSc 患者の皮膚、血清などでは IL-6 の発現が上昇している[7]。そこで、BLM 処理したマウスの脾臓由来 B 細胞における CD19 の発現量を検討したところ、*Irf5*^{-/-} マウスでは BLM 投与による CD19 の発現誘導が

抑制されており(図 5a)、クロマチン免疫沈降法では IRF5 の CD19 プロモーター領域への作用が示唆された(図 5b)。また、脾臓由来 *Irf5*^{-/-} B 細胞では野生型 B 細胞と比較して、刺激に対する IL-6 の分泌量が低下していた(図 5c)。

6) *Irf5*^{-/-} マウスでは BLM 刺激により Th1 優位な炎症環境が誘導される

浮腫期・硬化期の SSc では Th2 優位な炎症環境が誘導されており、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいても同様の炎症環境が誘導される[8, 9]。そこで、flow cytometry により所属リンパ節(腋窩リンパ節および鼠径リンパ節)由来の CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ 、IL-4、IL-17A の発現を調べ、Th1/2/17 バランスについて検討した。BLM 処理した *Irf5*^{-/-} マウスでは PBS 処理群に比べて IFN- γ を産生する CD4 陽性 T 細胞の割合が上昇しており、Th1 優位な炎症の誘導が示唆された(図 6a)。BLM 投与による Th1/2/17 バランスの変化には細胞接着分子が深く関与していることが知られているため[10]、皮膚と肺における細胞接着分子の発現についても検討したところ、BLM 処理した *Irf5*^{-/-} マウスの病変部皮膚では *Sele* 遺伝子と *Selp* 遺伝子の mRNA の発現量が有意に亢進しており(図 6b)、肺では *Glycam1* 遺伝子と *Icam1* 遺伝子の mRNA の発現量が有意に低下していた(図 6c)。以上より、細胞接着分子の発現様式からも BLM 処理した *Irf5*^{-/-} マウスでは Th1 優位な炎症環境が誘導されていることが示された。

7) *Irf5*^{-/-} マウスは BLM 投与による血管の不安定化に対して抵抗性である

SSc において線維芽細胞の活性化には血管の活性化も重要な役割を果たしている。そこで、

次に IRF5 が血管の形質に及ぼす影響について検討した。BLM 処理したマウスに対して Evans blue 色素を尾静注して皮膚における血管透過性を検討したところ、野生型マウスでは BLM 投与部位に一致して色素の漏出がみられ、血管透過性が亢進していたが、*Irf5*^{-/-}マウスでは色素の血管外漏出はみられず、血管が安定化していることが示唆された(図 7a)。血管の安定化には血管周皮細胞と血管内皮細胞の相互作用が重要な役割を果たしており、一般に血管周皮細胞における α -SMA の発現量は血管の安定性と正比例することが知られている。そこで、血管周皮細胞における α -SMA の発現量を免疫染色で検討したところ、PBS 処理群および BLM 投与群のいずれにおいても *Irf5*^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して血管周皮細胞の α -SMA の発現量が亢進していた(図 7b)。さらに血管の安定化について分子レベルで確認するため、マウスから単離した皮膚微小血管内皮細胞(MEMECs)を用いて、*Cdh5*、*Pdgfb*、*Pecam1*、*Slp1* 遺伝子の発現を検討した。*Irf5*^{-/-} MDMECs では野生型 MDMECs に比較して *Cdh5*、*Pdgfb* 遺伝子の発現が上昇しており、血管内皮細胞間および血管内皮細胞と血管周皮細胞間の相互作用が増強している可能性が示唆された(図 7c)。さらに、HDMECs を用いたクロマチン免疫沈降法において、IRF5 は *CDH5*、*PDGFB* 遺伝子のプロモーター領域に結合していることが示された(図 7d)。以上より、*Irf5*^{-/-}マウスでは血管が安定化していることが示された。

8) IRF5 の発現低下は血管内皮細胞において angiostatic な形質を誘導する

Irf5^{-/-}マウスで認められた血管の形質変化に

ついて更に確認するため、IRF5 siRNA で処理した HDMECs を用いた検討を行った。IRF5 siRNA で処理した HDMECs は SCR で処理した HDMECs に比較して、migration が抑制され(図 8a)、tube formation 活性も低下していた(図 8b)。さらに、アポトーシスに関しても、IRF5 siRNA で処理した HDMECs で抑制されていた(図 8c)。以上より、IRF5 の発現低下により、血管内皮細胞において angiostatic な性質が誘導されることが示唆された。SSc 患者の血管内皮細胞が恒常的な活性化状態にあることを鑑みると[11]、*Irf5*^{-/-}マウスの血管は SSc の血管とは逆の形質を示していることが示唆された。

9) *Irf5*^{-/-}マウスでは BLM 投与による内皮間葉移行が抑制される

内皮間葉移行は、血管内皮細胞から活性化状態にある線維芽細胞を供給することで、線維化を来す疾患の進行に深く関与している。SSc および BLM 誘導強皮症モデルマウスの線維化の病態においても、この機序が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている [12-14]。そこで、IRF5 が内皮間葉移行に及ぼす影響について検討した。FSP1 と VE-cadherin による蛍光二重染色により評価したところ、BLM 処理した *Irf5*^{-/-}マウスの病変部皮膚では、BLM 処理した野生型マウスに比較して FSP1 と VE-cadherin の二重陽性細胞の数が有意に減少していた(図 9a, b)。以上より、*Irf5*^{-/-}マウスでは BLM 投与による内皮間葉移行が抑制されており、線維化の抑制に関与していると考えられた。

D. 考案

SSc では末梢血単球における転写因子 IRF5 発

現の低下と臨床症状の軽減が関連しているという報告があり、本症において IRF5 が疾患感受性や重症度を制御する重要な因子であると推察されている。しかしながら、これまで IRF5 が本症の病態においてどのような細胞でどのような役割を果たしているかは不明であった。今回の BLM 誘発強皮症モデルマウスを用いた検討では、*Irf5*^{-/-}マウスにおいて野生型マウスに比較して BLM による皮膚線維化が抑制されることが明らかとなり、転写因子 IRF5 が SSc の病態に関与しているとする過去のデータを支持する結果が得られた。

IRF5 が SSc の病態に関与する機序を明らかにするため、線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞に注目してさらに検討した。IRF5 の発現低下は、線維芽細胞においては I 型 コラーゲンの発現低下と MMP-1 の発現上昇を誘導し、また fibrillogenesis に関連する分子の発現を変化させることで、線維化を抑制している可能性が示唆された。免疫細胞については、*Irf5*^{-/-}マウスでは細胞接着分子の発現が変化しており、炎症細胞浸潤が抑制され、Th1 優位な炎症環境が誘導されていた。また、血管内皮細胞については、IRF5 の発現低下により angiostatic な形質が誘導されており、SSc の血管とは逆の形質を示していると考えられた。以上の結果より、IRF5 の発現低下は SSc の病態に関与する様々な細胞において SSc 独特の形質発現を抑制する可能性が明らかとなった。

今回の検討結果は、SSc の発症病理に重要な役割を果たしていると考えられている線維芽細胞・免疫細胞・血管内皮細胞の全てが活性化される機序に転写因子 IRF5 の発現異常が関与している可能性を示しており、転写因子 IRF5 が

SSc の治療戦略における新たな target となりうる可能性を示している。

E. 結 論

今回の検討により、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、IRF5 knockout は、線維化の抑制、免疫異常の抑制、血管障害の抑制をもたらし、強皮症の主要 3 病態を抑制する作用があることが明らかとなった。これらの結果は、SSc 患者において IRF5 の転写レベルの低下が臨床症状の軽減と関連があるというこれまでの報告と矛盾しないような結果となった。

F. 文 献

- 1 Dieude P, Guedj M, Wipff J, et al. Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009;60(1):225-33.
- 2 Sharif R, Mayes MD, Tan FK, et al. IRF5 polymorphism predicts prognosis in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71(7):1197-202.
- 3 Broen JC, Radstake TR, Rossato M. The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(11):671-81.
- 4 Noda S, Asano Y, Nishimura S, et al. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun* 2014;5:5797.
- 5 Rimar D, Rosner I, Nov Y, et al. Brief report: lysyl oxidase is a potential biomarker of fibrosis

- in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(3):726-30.
- 6 Barr TA, Shen P, Brown S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 2012;209(5):1001-10.
- 7 Khan K, Xu S, Nihtyanova S, et al. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71(7):1235-42.
- 8 O'Reilly S, Hugle T, van Laar JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51(9):1540-9.
- 9 Takahashi T, Asano Y, Ichimura Y, et al. Amelioration of Tissue Fibrosis by Toll-like Receptor 4 Knockout in Murine Models of Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67(1):254-65.
- 10 Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, et al. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J Immunol* 2010;185(4):2502-15.
- 11 Asano Y, Stawski L, Hant F, et al. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol* 2010;176(4):1983-98.
- 12 Trojanowska M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(8):453-60.
- 13 Xu H, Zaidi M, Struve J, et al. Abnormal fibrillin-1 expression and chronic oxidative stress mediate endothelial mesenchymal transition in a murine model of systemic sclerosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300(3):C550-6.
- 14 Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, et al. Fli1 haploinsufficiency induces fibrosis, vascular activation and immune abnormalities resembling systemic sclerosis in bleomycin-treated mice. *Arthritis Rheumatol* 2014.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Saigusa R, Asano Y, Sato S, et al.: The impact of IRF5 deficiency on fibrosis, vasculopathy, and immune abnormality in a bleomycin-treated murine model of systemic sclerosis

日本研究皮膚科学会 第 39 回年次学術大会・総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1

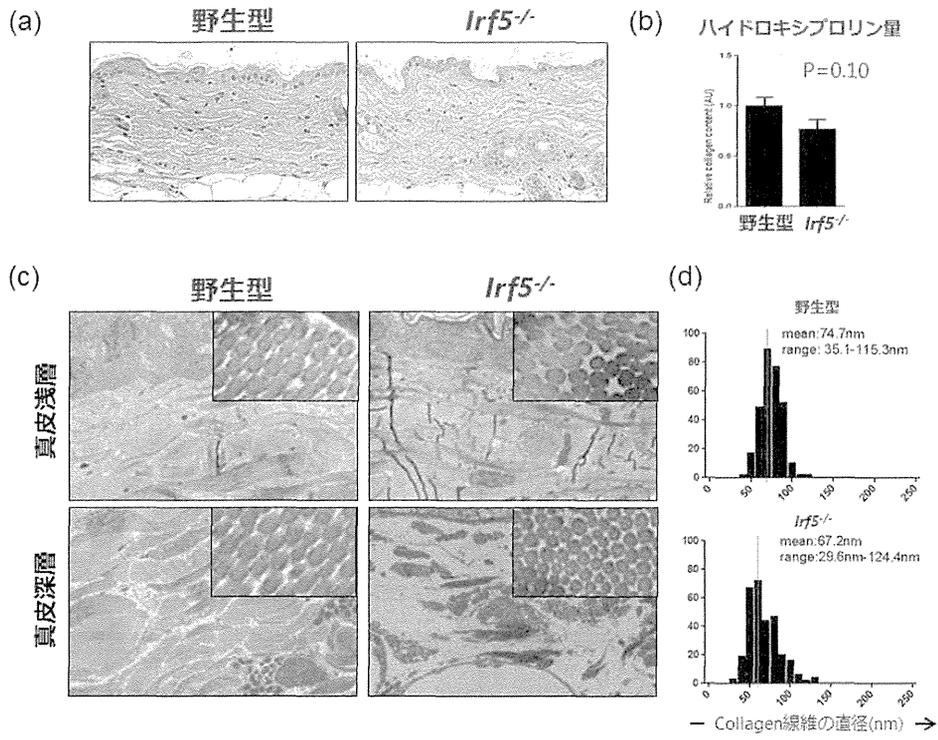


図 1: *Irf5*^{-/-} マウスの皮膚ではコラーゲンの減少と高次構造の異常がみられる

- Irf5*^{-/-} マウスと野生型マウスの皮膚病理組織像(HE 染色)。
- Irf5*^{-/-} マウスと野生型マウスの皮膚におけるコラーゲン含量を hydroxyproline assay で検討した。
- Irf5*^{-/-} マウスと野生型マウスの皮膚におけるコラーゲンの高次構造を電子顕微鏡で観察した。
- Irf5*^{-/-} マウスと野生型マウスの皮膚におけるコラーゲン線維の直径の分布。

図2

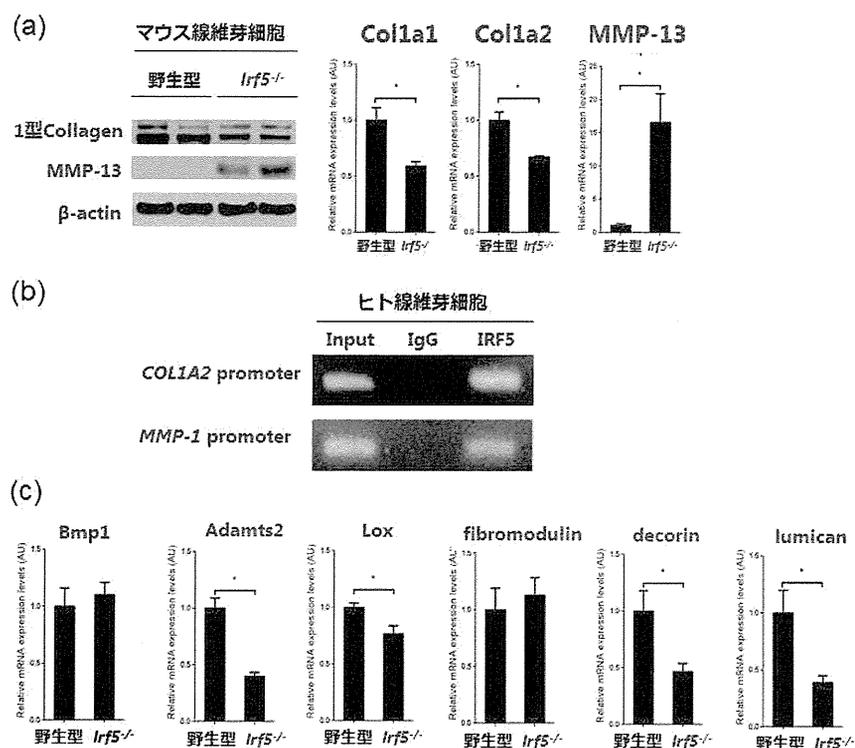


図 2: *Irf5*^{-/-} 皮膚線維芽細胞ではコラーゲンの代謝および fibrillogenesis に関与する分子の発現が SSc 皮膚線維芽細胞と逆の形質を示す

- Irf5*^{-/-} マウス由来皮膚線維芽細胞と野生型マウス由来皮膚線維芽細胞を用いて、I型コラーゲンと MMP-13 の発現量について免疫ブロット法と定量的 real-time PCR で検討した。
- ヒト正常皮膚線維芽細胞と抗 IRF5 抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。
- Irf5*^{-/-} マウス由来皮膚線維芽細胞と野生型マウス由来皮膚線維芽細胞を用いて、fibrillogenesis 関連遺伝子の mRNA の発現量について定量的 real-time PCR で検討した。

図3

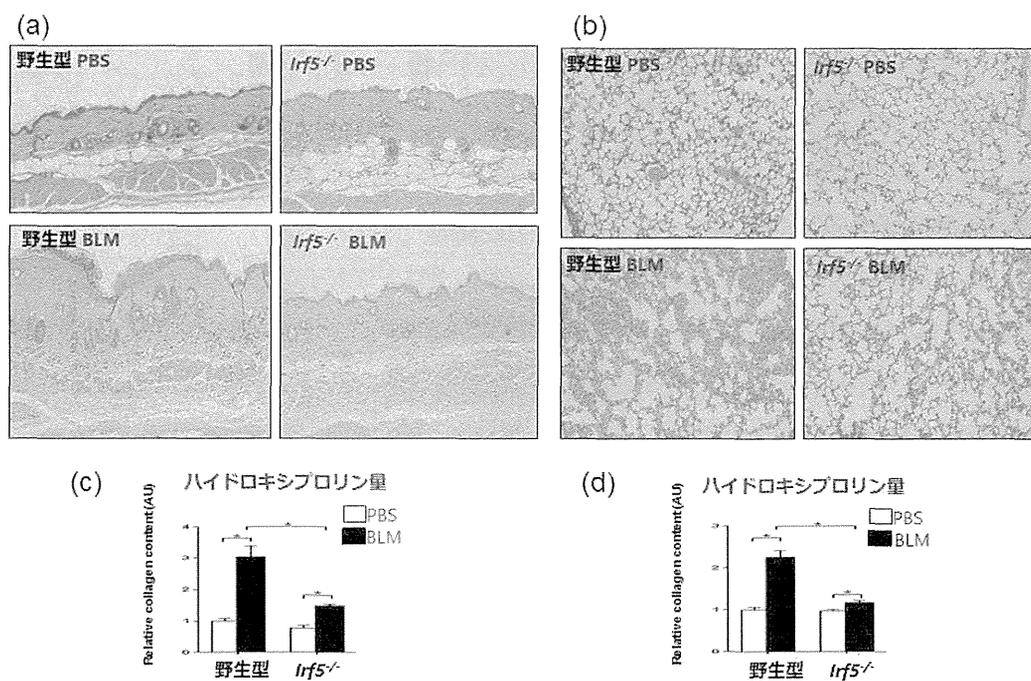


図 3: *Irf5*^{-/-} マウスでは BLM 投与による皮膚および肺の線維化が抑制される

a, b. *Irf5*^{-/-} マウスおよび野生型マウスを BLM あるいは PBS で 4 週間処理し、皮膚(a)および肺(b)の病理組織像を比較した(HE 染色)。

c, d. *Irf5*^{-/-} マウスおよび野生型マウスを BLM あるいは PBS で 4 週間処理し、皮膚(c)および肺(d)におけるコラーゲン含量を hydroxyproline assay で検討した(* P = 0.05)。