

表 6. PH が進行した群 (N=7) と PH 非進行群 (N=16) の臨床的特徴の比較

項目	Average (N=7)	SD	Average (N=16)	SD	p値
PVR (WU)	3.7	1.3	2.6	1.2	0.064
CO (L/min)	4	0.9	3.8	1.6	NS
mPAP (mmHg)	21.6	3.1	16.2	3.9	0.004
PAWP (mmHg)	7.3	2	7.8	3.1	NS
%DLco (%)	43.9	15.5	71.8	16.6	0.001
%DLco/VA (%)	75.4	30.2	99.2	25.2	0.063
BNP (pg/ml)	70.4	87.9	103.8	117.1	NS
eRVSP by UCG (mmHg)	38	19.8	37.7	7.7	NS
Age (y.o.)	56.3	12.7	61.4	14.4	NS
Duration (yrs)	20.7	13.8	14.2	10.4	NS
Interval (days)	632	247	588	292	NS
HR (bpm)	72.6	9.1	66.5	10.4	0.197
SaO2 (%)	95.1	3.4	96.3	2.8	NS
%VC (%)	72.2	13.3	88.6	25	0.118
FEV1.0G (%)	80.1	6	81.5	7.3	NS
%FEV (%)	70.8	14.9	92.1	24.7	0.047

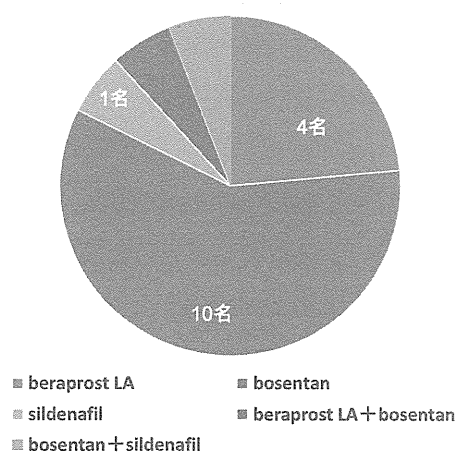


図 1. 追加された PAH 治療薬の内訳

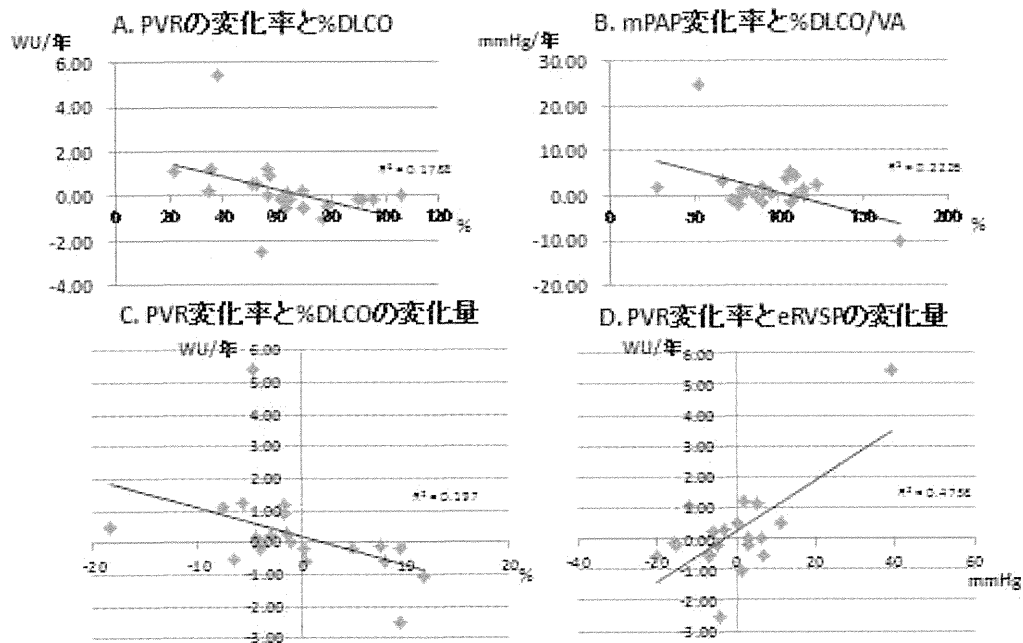


図2. PVRの変化率と各パラメータの相関関係
 A. PVRの変化率とbaselineの%DLCOとの関係、B. mPAPの変化率とbaselineの%DLCO/VAの関係、
 C. PVRの変化率と%DLCOの変化量との関係、D. PVRの変化率とeRVSPの変化量との関係)

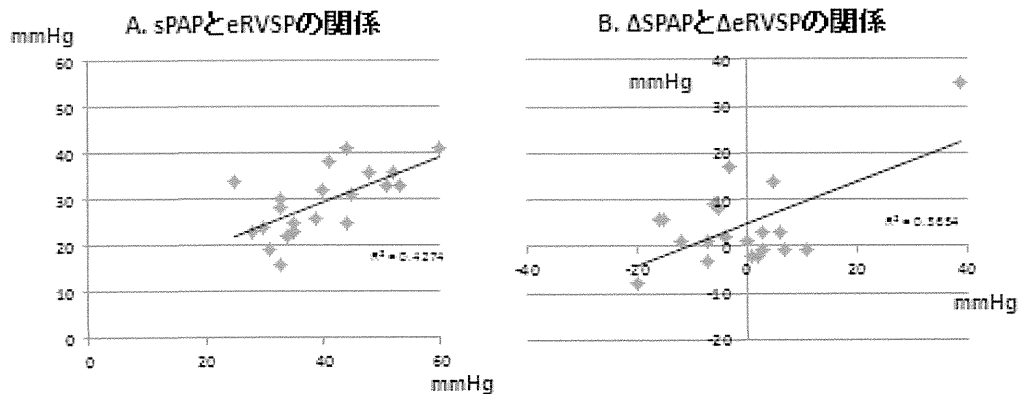


図3. 心エコーとカテーテル検査の比較(A. sPAPとeRVSPの関係、B. ΔsPAPとΔeRVSPの比較)
 R²はPearson相関係数(P* < 0.05)

強皮症患者からの iPS 細胞の樹立

担当責任者 江良択実 熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野 教授
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

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚由来の線維芽細胞や末梢血液細胞に 4 つの初期化因子 (Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc) を発現させ作製する。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。そこで解析に必要な細胞を作り出し研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。皮膚生検や採血サンプルから作製できるので、多くの疾患から作製可能である。iPS 細胞樹立のために、国内で開発されたセンダイウイルスベクター (SeV ベクター) をさらに改良した新型ベクターを開発した。新しいベクターは、iPS 細胞作製に用いる初期化因子が染色体に組み込まれないうえに、誘導効率が高く、また、ベクターを早期に除去できる利点をもつ。本研究班の協力のもと、強皮症 13 症例の皮膚生検サンプルを現在までに提供していただき、全例から皮膚由来線維芽細胞を樹立した。このうちの 4 症例から iPS 細胞を樹立した。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚由来の線維芽細胞や末梢血液細胞に 4 つの初期化因子 Sox2、KLF4、Oct3/4、cMyc を発現させ作製した多能性幹細胞である。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。そこで患者由来の iPS 細胞を樹立し、その細胞から病気の標的細胞を作り出して研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。今回、難治性疾患の 1 つである強皮症患者から iPS 細胞の樹立を行った。

B. 研究方法

1. iPS 細胞樹立のための皮膚線維芽細胞の樹立

患者の皮膚生検から、皮膚由来初代線維芽細胞を樹立する。

2. 新型センダイウイルスベクター (SeV) の開発

iPS 細胞の誘導効率の向上と早期のウイルス除去を可能とする SeV を開発するために、Sox2、KLF4、Oct3/4 の初期化因子が 1 つのウイルスベクターゲノム上にタンデムに並んだベクターを作成する。

このベクターを使い、ヒト線維芽細胞や血液細胞からの iPS 細胞の誘導効率やウイルスの除去率等を調べる。

3. SeV を使った iPS 細胞の確立

SeV によって患者由来線維芽細胞へ初期因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を一過性に発現させ iPS 細胞の樹立を行う。

樹立した iPS 細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60 の免疫染色による iPS 細胞の確認を行う。さらに、未分化マーカーの発現を PCR にて確認する。

(倫理面への配慮)

1) 倫理審査

疾患由来の iPS 細胞作製とその解析については倫理委員会ですでに承認済みである。また患者サンプルの提供については、提供機関の倫理審査委員会の承認があることを確認した後、研究を行う。

2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノムそのものの情報を得るわけではない。作製した iPS 細胞等を用いた病因解析・治療薬開発研究は本研究では行わない。また、研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報公表されることはない。本研究のために特別に用意した番号によって管理し、人種・性別・年齢・診断名以外の患者情報はサンプル提供を行う臨床機関にて管理を行う。作製した iPS 細胞は所属機関において施錠できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)、同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

皮膚由来線維芽細胞を得るための皮膚生検は通常の医学診療の範囲で行われている方法に準じて行う。痛みは、局所麻酔注射

の時のみである。瘢痕は普通のけがの場合と同じである。以上より、危険性はほとんどない。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

C. 研究結果

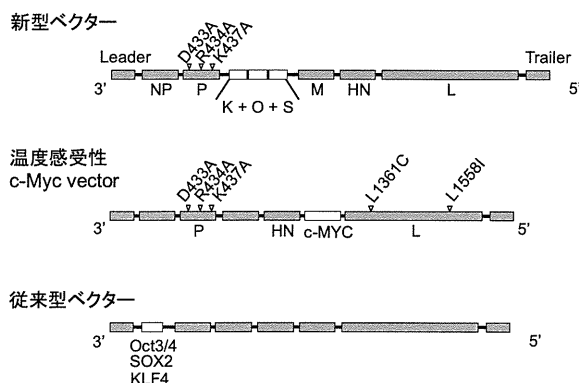
1. 皮膚由来線維芽細胞の樹立

患者からの同意が得られた 13 例の症例において皮膚生検を行い、全例から iPS 細胞作成に必要な皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。

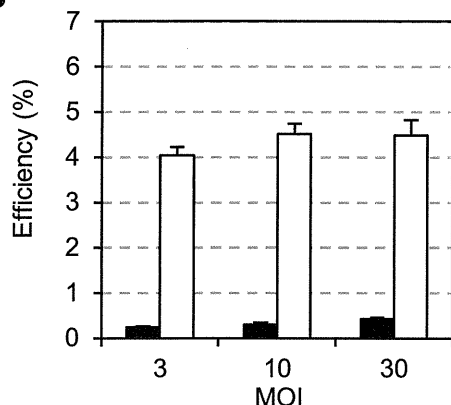
2. 新型ベクターの開発

方法で述べたように初期化因子をタンデムにつないだゲノムウイルスベクターを作成した(図 1 A)。このベクターを使ってヒト線維芽細胞から iPS 細胞を作製すると 4% という高効率で作成可能であった(図 1 B)。また、コロニーピックアップ後すぐにウイルス除去ができることがわかった(図 1 C)。

A



B



C

	Time of temperature shift	
	Passage 1	Passage 2
Conventional vector	0/22 (0%)	0/22 (0%)
TS12KOS vector	19/23 (84.7%)	15/23 (65.2%)

図1 新型SeV

- A. SeVの構造
- B. ヒト線維芽細胞からのiPS細胞の樹立効率
- C. SeVの除去率

3. iPS細胞の樹立

症例から樹立した皮膚由来線維芽細胞を用いてiPS細胞の作製を行った。線維芽細胞に初期化因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を持つセンダイ・ウイルスを感染させ、感染後1週間目にマイトマイシ

ンで処理したマウス胎仔初代線維芽細胞 (MEF) 上へまきなおした。

感染から14日後ぐらいからコロニーが出現した。感染から25日目にコロニーを顕微鏡下にてピックアップしそれぞれのクローンを培養、増幅した。その後、ウイルス除去のために培養の温度を38度へシフトさせた。用いたセンダイウイルスベクターは温度感受性株のために38度では増殖が停止し、結果としてウイルスベクターフリーのiPS細胞を得ることができる。PCRにてウイルス除去を確認した後、未分化マーカーの発現を免疫染色とRT-PCRにて調べ、iPS細胞であることを確認した。この研究で計4症例から40数株のウイルスベクターフリーのiPS細胞株を樹立した(図2)。

D. 考察

強皮症患者13例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、その細胞を使って4症例からiPS細胞樹立を行った。線維芽細胞樹立のためには生検が必要であり、樹立まで1ヶ月かかる。従来型のSeVでは、そこからウイルス除去まで3か月程度を要していたが、新型ではコロニーピックアップ直後に半数以上のコロニーでウイルスが除去されていた。これは、従来型はMycのみが温度感受性ウイルスであったが、新型では1つの温度感受性ウイルスに3つの初期化因子を挿入したためと考えられる。今後は、血液細胞からの樹立を行う予定である。血液細胞由来の細胞をiPS細胞作製のソースとすることで、生検を行わずに末梢血の採血でiPS細胞作製が可能となるために安全かつ容易

に行える。

今後、作製した iPS 細胞から血管内皮細胞を分化誘導し、疾患の病態解析を進める予定である。

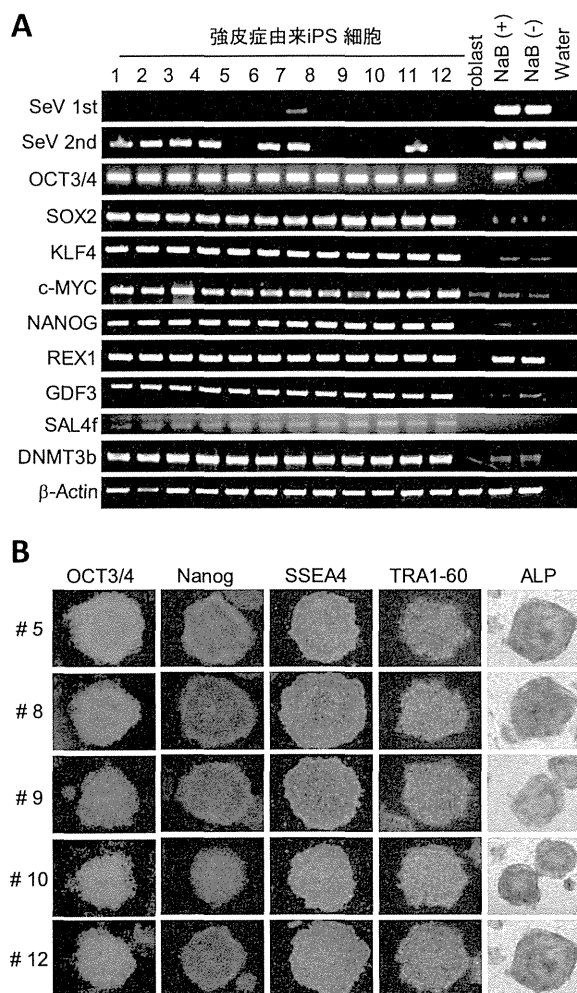


図2 樹立したiPS細胞

- A. 未分化マーカーの発現 (RT-PCR)、
 B. 未分化マーカーの発現 (免疫染色) とアルカリフォスファターゼ染色 (ALP)

E. 結論

患者 13 例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、そのうち 4 例から iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は形態的にも、また、

未分化マーカーの発現でも iPS 細胞に矛盾することがなかった。したがって、iPS 細胞が樹立されたと言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H and Era T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. *PLoS One*. 9 :e113052, 2014.

2. 学会発表

- Soga M, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo M, Irie T, Endo F and Era T. Establishment of disease model using induced pluripotent stem cells derived from Niemann-Pick disease type C. INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESEARCH 12th annual meeting. Vancouver, June 18th, 2014.
- 江良択実 骨・代謝性疾患由来 iPS 細胞を使った疾患モデルと治療薬開発 第 35 回日本炎症・再生医学会年会 教育講演 2014 年 7 月 2 日、沖縄
- 江良択実 iPS 細胞研究の進展 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム 疾患 iPS 細胞 2014 年 10 月 15 日 京都
- 江良択実 iPS 細胞を使った難病研究 第

27 回 日本動物実験代替法学会大会 シンポジウムヒト iPS 細胞を用いた創薬研究の新たな展開 2014 年 12 月 7 日 横浜

G. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルマウスにおける リゾホスファチジン酸受容体(LPA_{1,3})拮抗薬の抗線維化効果の検討

担当責任者 山本俊幸 福島県立医科大学医学部皮膚科 教授
協力者 大橋威信 福島県立医科大学医学部皮膚科 助手
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

リゾホスファチジン酸(LPA)はG蛋白質共役型受容体(GPCR)を介し、多彩な機能を発揮する生理活性脂質である。近年、ヒト強皮症の血清中や皮膚線維芽細胞でLPAの発現が亢進していることが報告された。また、皮膚や肺、腎を含む線維症モデルにおいても、LPA₁受容体欠損により線維化の誘導が抑制されており、LPAは高親和性LPA₁受容体を介して線維化を誘導する重要なメディエーターであることが明らかにされた。その役割として線維芽細胞の運動促進活性や、種々の細胞において炎症性サイトカインの発現誘導活性を持ち、炎症や組織修復に機能することが示唆されている。

本研究では、ブレオマイシン(BLM)誘導性強皮症モデルマウスを用いて、LPA_{1,3}受容体拮抗薬(Ki16425)を局所投与し、皮膚硬化および肺線維化に与える影響について検討した。C3H/HeJマウスの背部に、BLM(250 μ g/ml)を皮内注射し、6時間後にKi16425(1mg/kg/day、10mg/kg/day)を同部位に局注する処理を週5回4週間繰り返した。組織学的に、Ki16425投与群で皮膚硬化および肺線維化は抑制される傾向がみられた。

A. 研究目的

我々は、これまでにBLMの局所投与によりマウスに皮膚硬化を誘導し、強皮症モデルとして報告してきた。今回、このモデルを用いてLPA_{1,3}受容体拮抗薬を投与し、ブレオマイシン誘導性皮膚硬化および肺線維化に与える影響について検討した。

27G針を用いて100 μ lずつ皮下投与した。

2) LPA_{1,3}受容体拮抗薬(Ki16425)の投与

BLM投与部位に、Ki16425(Santa Cruz Biotechnology)をsesame oilに溶解し、濃度を1mg/kg、10mg/kgとなるように調節し、週5回を4週間、BLM投与6時間後に27G針を用いて100 μ lずつ皮下投与した。

3) 皮膚採取、保存

BLMおよびKi16425投与期間終了後、マウスをセボフルラン吸入麻酔下で、頸椎脱臼させ、背部を8mmパンチで表皮から皮下脂肪を含めた皮膚全層で採取した。検体は半割し、ホルマリン固定ならびに-80 $^{\circ}$ Cで冷結保存した。

B. 研究方法

1) BLMによる皮膚硬化および肺線維化の誘導

C3H/HeJマウス(6週令、雌)の背部にBLM(Nippon Kayaku Co. Ltd.)をリン酸緩衝液(phosphate-buffered saline; PBS)に250 μ g/mlとなるように溶解し、週5回を4週間、

4) 組織病理学的検討

標本はヘマトキシリン&エオジン(HE)染色と、エラスティカ・マッソン染色を行い、皮膚に関しては1検体中10箇所をランダムに選んだ、表皮-真皮境界部と真皮-皮下脂肪織との距離(真皮厚)を測定した。肺に関しては左中葉のランダムに選ばれた部分を100倍の拡大率で観察し、線維化の程度をAschcroftらの提唱しているスコア法で評価した¹⁾。トルイジンブルー染色を行い、肥満細胞の数を400倍の拡大率で1検体中10箇所をランダムに選び測定した。 α -SMA染色、抗マウス phospho-Smad2/3抗体を用いた免疫染色を行い、陽性の筋線維芽細胞の数を400倍の拡大率で1検体中10箇所をランダムに選び測定した。

5) 皮膚および肺組織中のハイドロキシプロリン測定

Sircol Collagen Assay kit(Biolor)を用いて、真皮内および肺組織内のハイドロキシプロリンの定量を行った。1mol CH₃COOHで組織片をホモジェネードしたのち、上記キットから得られた上清を540nmのUVイルミネーター(SHIMADZU、京都)にて波長を測定し、標準曲線に照合して濃度を検出した。

6) RNA抽出とRealtime RT-PCR

Total RNAはISOGEN(ニッポンジーン)を用いて抽出した。Total-RNA(500~1000 μ g/ml)をTURBO DNA-free kit(Applied BioSystems Japan)を用いてDNase処理を行った。cDNAはTotal RNA1.25-2.5 μ gからHigh Capacity RNA to cDNA kit(Applied BioSystems Japan)を用いて作成した。プライマーデザインは(表1)のとおりである(TaKaRa Perfect Realtime サポー

トシステム)。Fast SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems Japan)を用いて sampleを調節し、realtime PCRを行った。

7) 統計学的検討

2群間の分布はMann-Whitney U-testを使用し、 $p<0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

1) 皮膚硬化および肺線維化の抑制

Ki16425投与群(1mg/kg、10mg/kg)では、コントロール群と比較して真皮膠原線維束が明らかに減少しており、組織学的な皮膚硬化の抑制がみられた(図1)。膠原線維束の肥厚には、Ki16425の濃度の違いによる有意差は認められなかった(図2)。肺組織においては、Ki16425投与群はコントロール群と比較して、肺胞壁の浮腫を伴う肥厚の減少、炎症細胞浸潤の減少を認め(図11)、肺線維スコアも減少していた(図12)。

2) 肥満細胞浸潤抑制

Ki16425投与群はコントロール群と比較して、真皮内の肥満細胞数が有意に減少していた(図3)。浸潤した肥満細胞数には、Ki16425投与濃度による有意な差は認められなかった(図4)。

4) 筋線維芽細胞増殖の抑制

Ki16425投与群はコントロール群と比較して、真皮内の α -SMA陽性筋線維芽細胞が有意に減少していた(図5)。浸潤した筋線維芽細胞数には、Ki16425投与濃度による有意な差は認められなかった(図6)。

5) phospho-Smad 2/3 発現の抑制

Ki16425投与群はコントロール群と比較して、真皮内の phospho-Smad 2/3 陽性筋線維芽細

胞が有意に減少していた(図 6)。浸潤した陽性数には、Ki16425 投与濃度による有意な差は認められなかった(図 7)。

6) ハイドロキシプロリン量の減少

Ki16425 投与群で、皮膚および肺組織内のハイドロキシプロリン量はコントロール群に比べて有意な減少が認められた。Ki16425 投与濃度によるハイドロキシプロリン量の有意な差は認められなかった(図 9, 13)。

7) サイトカイン、collagen $\alpha 1(I)$ mRNA の発現

TGF- $\beta 1$ 、CTGF、MIP-1 α 、IFN- γ 、collagen $\alpha 1(I)$ mRNA の発現レベルが Ki16425 投与により有意に抑制されていた(図 10)。

D. 考案

今回我々の研究では、LPA $_{1,3}$ 受容体拮抗薬 Ki16425 は BLM 誘導性強皮症モデルマウスが呈する皮膚硬化、肺線維化、サイトカイン過剰産生を有意に改善した。その抗線維化効果の機序として、①TGF- β /Smad シグナル回路活性の抑制、②筋線維芽細胞の蓄積の抑制、③肥満細胞の浸潤の抑制が考えられた。

これまでの報告で、片側尿管閉塞で誘導される尿細管間質性線維症モデルマウスにおいても、Ki16425 投与により尿細管の線維化が抑制され、尿細管間質の TGF- β 、CTGF mRNA 量が減少することが報告されている²⁾。また、尿細管由来筋線維芽細胞に LPA と TGF- $\beta 1$ を同時刺激すると CTGF の発現が亢進することが示されている²⁾。我々の検討でも、Ki16425 投与により、皮膚における TGF- $\beta 1$ 、CTGF の mRNA 量の減少を認めた。また、強皮症の線維化に重要な役割を果たす筋線維芽細胞の Smad 2/3 のリン酸化も

抑制した。これらの結果より、BLM 誘導性強皮症モデルにおいて、LPA は TGF- $\beta 1$ /Smad シグナル回路および、CTGF を介した回路の活性化に関与している可能性示唆される。

また、ヒト強皮症の皮膚線維芽細胞は正常者の皮膚線維芽細胞と比べて筋線維芽細胞様に分化しており、LPA に対する Cl⁻チャンネル開口応答性が高く³⁾、LPA 刺激により筋線維芽細胞の増殖が亢進することが報告されている⁴⁾。我々は、Ki16425 投与により BLM 局所投与による α -SMA 陽性筋線維芽細胞の増殖が抑制されることを示した。この結果より、Ki16425 は線維芽細胞から筋線維芽細胞の形質転換を阻害することで線維化を抑制している可能性が考えられる。

BLM 誘導性強皮症モデルマウスでは真皮内の肥満細胞浸潤が亢進しており、TGF- β や線維化形成に関与するサイトカインを放出ことが明らかにされている^{5,6)}。また、ヒト肥満細胞の遊走は LPA 刺激により活性化され⁷⁾、LPA $_1$ 、LPA $_3$ 受容体を介する LPA の刺激によって、肥満細胞からヒスタミン遊離が亢進することが報告されている⁸⁾。我々の検討で、Ki16425 の局所投与により、BLM による肥満細胞の浸潤が抑制されることを示した。このことは、LPA は、肥満細胞を介した線維化に関与している可能性が示唆される。

E. 結論

LPA $_{1,3}$ 阻害薬である Ki16425 は BLM 誘導性強皮症モデルマウス (*in vivo*) における皮膚および肺の線維化を改善させることが示唆された。

F. 文献

1. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. J Clin

Pathol 1988; 41: 467-70

2. Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, et al.
 Biochim Biophys Acta 2008; 1781: 582-587

3. Yin Z, Carbone LD, Gotoh M, et al.
 Rheumatology (Oxford) 2010; 49:
 2290-2297.

4. Fang X, Yu S, LaPushin R, et al. Biochem J
 2000; 352: 135-143.

5. Yamamoto T, Takahashi Y, Takagawa S,
 et al. J Rheumatol 1999; 26: 2628-2634.

6. Ozbilgin MK, Inan S. Clin Rheumatol
 2003; 22: 189-195.

7. Bagga S, Price KS, Lin DA, et al. Blood
 2004; 104: 4080-4087.

8. Hashimoto T, Ohata H, Honda K. J
 Pharmacol Sci 2006; 100: 82-87.

G. 研究発表

1. 論文発表
 Experimental Dermatology: 投稿中
2. 学会発表
 1. 日本研究皮膚科学会 第 39 回年次学術
 大会・総会
 2. The 11th Meeting of the German-Japan
 Society of Dermatology

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1

	Sense	Antisense
TGF-β1	5'-TTTCCGCTGTGCTACTGCAAGTC-3'	3'-AGGGCTGTCTGGAGTCCTCA-5'
CTGF	5'-ACCCGAGTTACCAATGACAATACC-3'	3'-CCGCAGAACTTAGCCCTGTATG-5'
MIP-1α	5'-CATGACACTCTGCAACCAAGTCTTC-3'	3'-ACTTTGGTCGTCGAAACGAG-5'
IFN-γ	5'-TGACGGGAGCACCTGTTACAC-3'	3'-GATGTATGATTTGTATGCCAGCTTT-5'
TNF-α	5'-CAACGGCACCGTGACAATC-3'	3'-TCACATCATTCAACACGGATGGAGG-5'
collagen α1(I)	5'-CAGGGTATTGCTGGACA-3'	3'-GGACCTTGTTTGCCAGGTTCA-5'
GAPDH	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'	3'-TTGCTGTTGAAGAAGTCGCAGGAG-5'

図 1:皮膚病理組織像

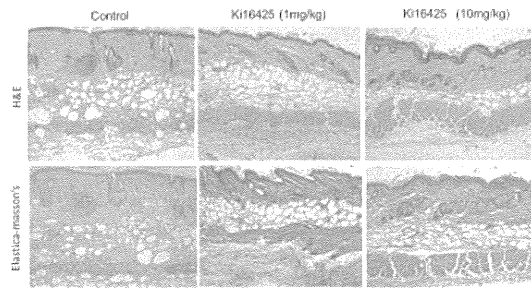


図 2:真皮膠原線維厚

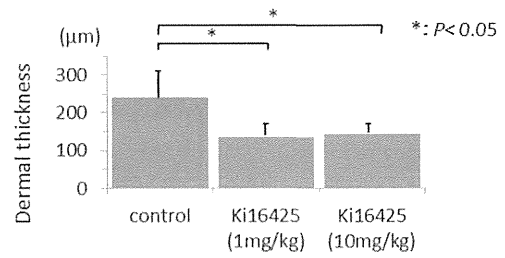


図 3:トルイジンブルー染色

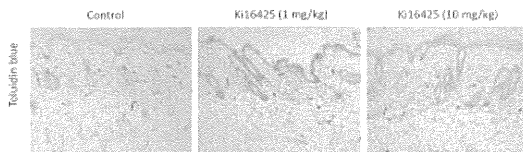


図 4:肥満細胞数

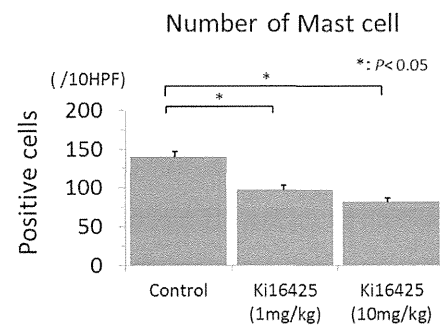


図 5:α-SMA 染色

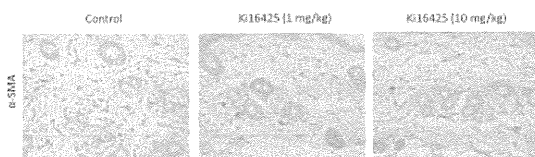


図 6:α-SMA 染色陽性筋線維芽細胞数

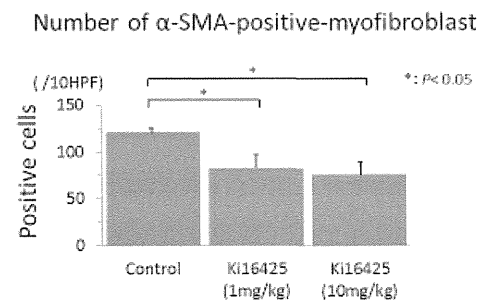


図 7:抗 phospho-Smad 2/3 抗体染色

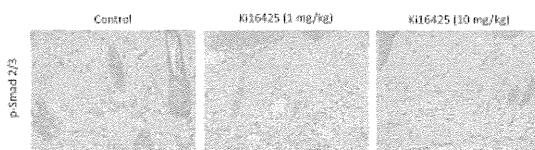


図 8:phospho-Smad 2/3 陽性細胞数

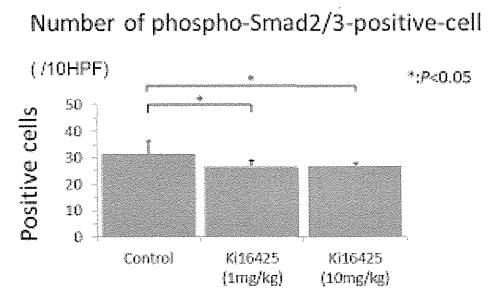


図 9: ハイドロキシプロリン量(皮膚)

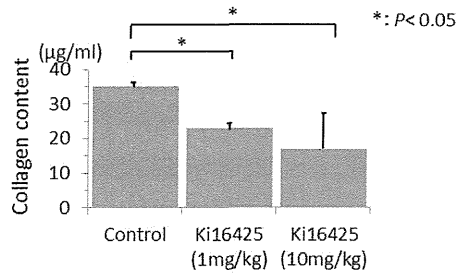


図 10: サイトカイン、COL1A1 mRNA 定量

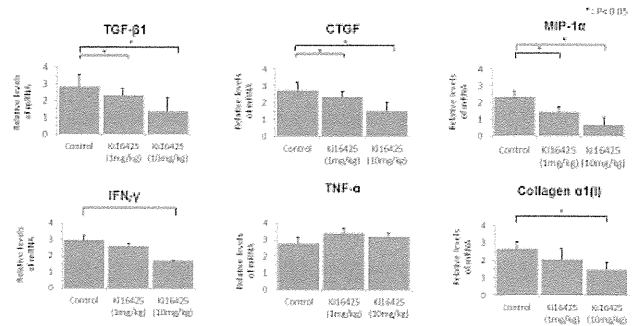


図 11: 肺病理組織像

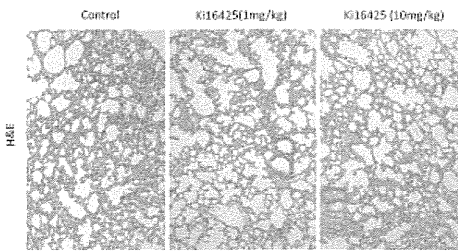


図 12: 肺線維スコア

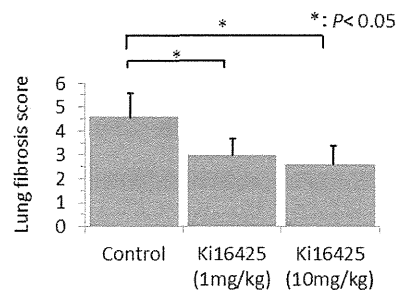
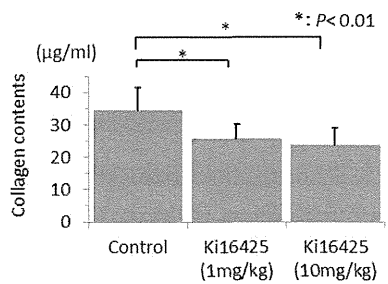


図 13: ハイドロキシプロリン量(肺)



マウス皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおける Syk 阻害剤の有効性についての検討

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
担当責任者 藤本 学 筑波大学医学医療系皮膚科 教授
担当責任者 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
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

Syk ファミリーに属する Syk ならびに ZAP70 は、B 細胞受容体、T 細胞受容体、Fc 受容体などのシグナル伝達に関与する分子で、細胞の活性化に必須の役割を担っている。我々は、強皮症のモデルマウス（皮膚硬化型慢性 GVHD モデル）を用いて、Syk 阻害剤の有効性について検討した。Syk 阻害剤の投与にて皮膚硬化型慢性 GVHD の改善がみられ、T 細胞およびマクロファージからのサイトカイン産生が抑制された。強皮症において Syk 阻害剤の有効性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (Systemic sclerosis, SSS) 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る。SSc 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¹。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 Scl-cGVHD を誘導することができ、SSc のモデルマウスとして有用である。

Spleen tyrosine kinase (Syk) と Syk family である ZAP70 は B 細胞、T 細胞、マクロファージなどの種々の細胞に発現しており、各細胞の受容体、すなわち B 細胞受容体、T 細胞受容体、Fc 受容体のシグナル伝達において重要な役割を有している²。この Syk の活性化は

サイトカイン産生ならびに細胞分裂を促進する作用が知られている。近年、Syk が関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫性疾患の治療ターゲットとして注目されている³。Syk 阻害薬としては、経口投与できる R788 という低分子化合物が用いられており、R788 は、R406 のプロドラッグで、生体内で強力な Syk 阻害剤に変換される⁴。

本研究では、強皮症モデルマウスに Syk 阻害剤を投与し、皮膚硬化の進展が抑制されるかを検討した。

B. 研究方法

1. Scl-cGVHD モデル

レシピエントとして、BALB/c (H-2d) マウス
ないしは CD19 欠損 BALB/c (H-2d) 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。B10. D2 マウスから骨髓細胞 (10×10^6
細胞) と脾臓細胞 (10×10^6 細胞) を採取し、800
cGy 照射された BALB/c (H-2d) マウスに骨髓移
植し、皮膚硬化型慢性 GVHD を誘導した。なお、
本プロトコールは金沢大学学際科学実験セン
ター実験動物研究施設の研究計画として承認
を受けている。

2. Syk 阻害剤による治療

Syk 阻害剤として R788 を使用した。R788 は
30mg / kg を経口にて移植後 14 日から 42 日
まで投与した。Control group は蒸留水を投
与した。

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 $<1\text{cm}^2$ 、ス
コア 2= 皮膚病変 $1-2\text{cm}^2$ 、スコア 3= 皮膚病変
 $2-5\text{cm}^2$ 、スコア 4= 皮膚病変 $5-10\text{cm}^2$ 、スコア
5= 皮膚病変 $10-15\text{cm}^2$ 、スコア 6= 皮膚病変
 $15-20\text{cm}^2$ 、スコア 7= 皮膚病変 $>20\text{cm}^2$ 。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. 皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおける Syk の活性化

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルマウスで Syk
が活性化されているかを、抗リン酸化 Syk 抗体を
用いて FACS にて解析した。GVHD マウスの T
細胞、B 細胞、マクロファージにおいて、Syk のリ
ン酸化が亢進していた (図1)。

2. 皮膚硬化型慢性 GVHD に対する Syk 阻害剤 の効果

Syk 阻害剤の有効性を調べるために皮膚硬化
型慢性 GVHD モデルマウスに、移植 14 日後より
Syk 阻害剤を投与した。SYK 阻害剤投与群では
コントロール群と比べ有意にスキンスコアの改善
が見られた (図 2)。また、線維化をマッソントリク
ローム染色で評価したところ、皮膚および肺の線
維化も SYK 阻害剤投与群において有意に改善
した (図 2)。

3. サイトカイン産生能に対する Syk 阻害剤の 効果

次に T 細胞、B 細胞、マクロファージのサイトカ
イン産生能に対する、Syk 阻害剤の効果を解析
した。T 細胞は TNF α 、IL-13、IL-17 を、B 細胞は
IL-10 を、マクロファージは IL-6 を、細胞内サイト
カイン染色にて評価した。T 細胞においては、
TNF α 産生の変化はみられなかったが、線維化
を促進するサイトカインである IL-13、IL-17 の産
生が Syk 阻害剤投与群において低下していた。
一方、B 細胞の IL-10 産生は不変であった。
マクロファージでは、IL-6 産生が Syk 阻害剤投
与群において低下した (図3)。

4. T細胞・マクロファージ活性化に対する Syk 阻害剤の効果

細部分裂能の解析には CFSE 染色による proliferation assay を使用した。Syk 阻害剤は CD4 ならびにマクロファージの細胞分裂を阻害した (図 4, 5)。

5. Syk 阻害剤の皮膚硬化型慢性 GVHD モデルの皮膚におけるサイトカイン発現定量に対する効果

皮膚から RNA を抽出し、real-time PCR を行った。TNF- α mRNA 発現は不変だが、IL-6, IL-13, IL-17、TGF β mRNA 発現が Syk 阻害剤により有意に抑制された。

D. 考案

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルの T 細胞、B 細胞、マクロファージにおいて Syk のリン酸化が亢進していることより、Syk が治療のターゲット候補となることが明らかとなった。さらに Syk 阻害剤の投与により皮膚硬化型慢性 GVHD モデルが改善した。その作用機序としては、2つの経路が明らかとなった。まず、1つ目は、T 細胞ならびにマクロファージのサイトカイン産生に対する阻害作用である。2つめは T 細胞ならびにマクロファージの活性化阻害作用である。一方、B 細胞の Syk の活性は見られたが、Syk 阻害剤の B 細胞を介した抑制機序は明らかではなかった。これらより、Syk 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 Syk が治療標的となる可能

性が示された。

F. 文献

- 1 Varga, J. & Abraham, D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *The Journal of clinical investigation* 117, 557-567, doi:10.1172/JCI31139 (2007).
- 2 Pamuk, O. N. & Tsokos, G. C. Spleen tyrosine kinase inhibition in the treatment of autoimmune, allergic and autoinflammatory diseases. *Arthritis research & therapy* 12, 222, doi:10.1186/ar3198 (2010).
- 3 Nijjar, J. S., Tindell, A., McInnes, I. B. & Siebert, S. Inhibition of spleen tyrosine kinase in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 52, 1556-1562, doi:10.1093/rheumatology/ket225 (2013).
- 4 Weinblatt, M. E. *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis and rheumatism* 58, 3309-3318, doi:10.1002/art.23992 (2008).

G. 研究発表

1. 論文発表
Le Huu D, Kimura H, Date M, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Hau KT, Fujimoto M, Takehara K, Matsushita T. 2014. Blockade of Syk ameliorates the development of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *J Dermatol Sci.* 74:214-21.
2. 学会発表

sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. J Dermatol Sci. 74:214-21.

2. 学会発表

Matsushita T, Le Huu D, Kimura H, Date M, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Blockade of Syk Ameliorates the Development of Sclerodermatous Chronic Graft-Versus-Host Disease. ESDR 2014, Copenhagen, Sep 13, 2014 (oral)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

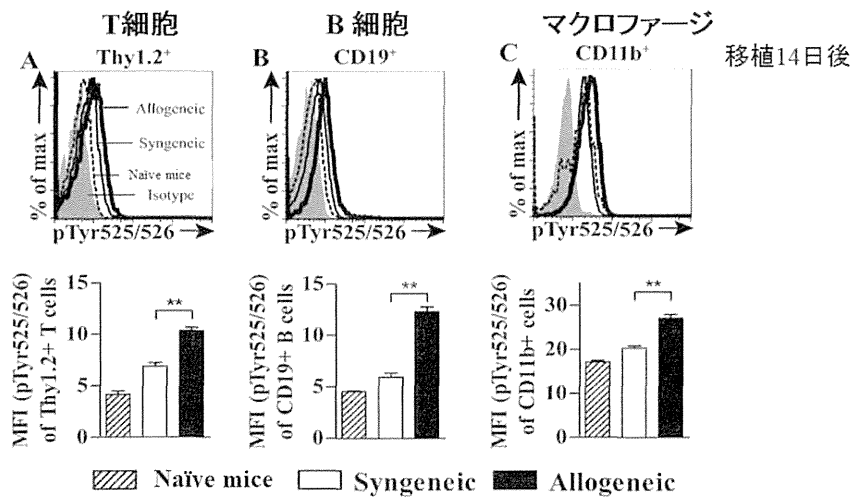


図1

図1: 皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおける Syk の活性化

(A) T細胞、(B) B細胞、(C) マクロファージ。太線が皮膚硬化型慢性 GVHD モデル (allogeneic)、細線がコントロールマウス (syngenic)。(CD19^{-/-} donor)。**p<0.01.

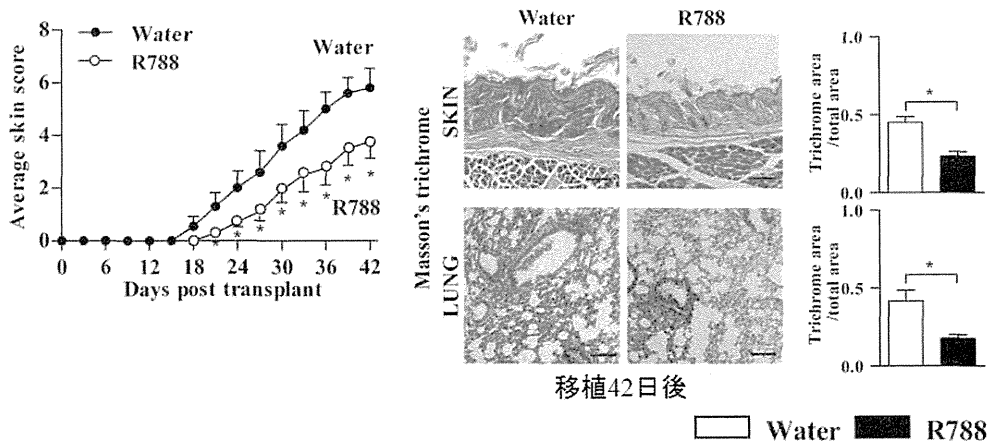


図2

図2: 皮膚硬化型慢性 GVHD に対する Syk 阻害剤の効果

Syk 阻害剤 (R788) と蒸留水 (water) を皮膚硬化型慢性 GVHD モデルマウスに、移植 14 日後から 42 日後まで投与。Syk 阻害剤投与群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、**p<0.01.

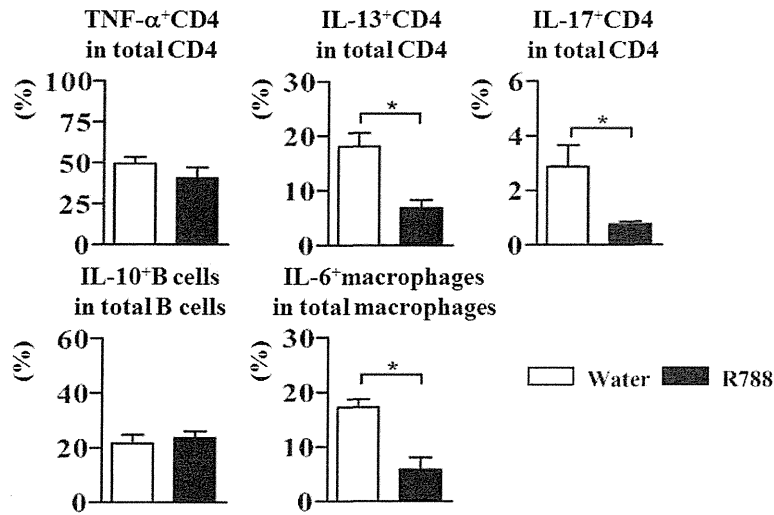


図3

図3: サイトカイン産生能に対する Syk 阻害剤の効果

T細胞は TNF α 、IL-13、IL-17 を、B細胞は IL-10 を、マクロファージは IL-6 を、細胞内サイトカイン染色にて解析した。* $p < 0.05$ 。

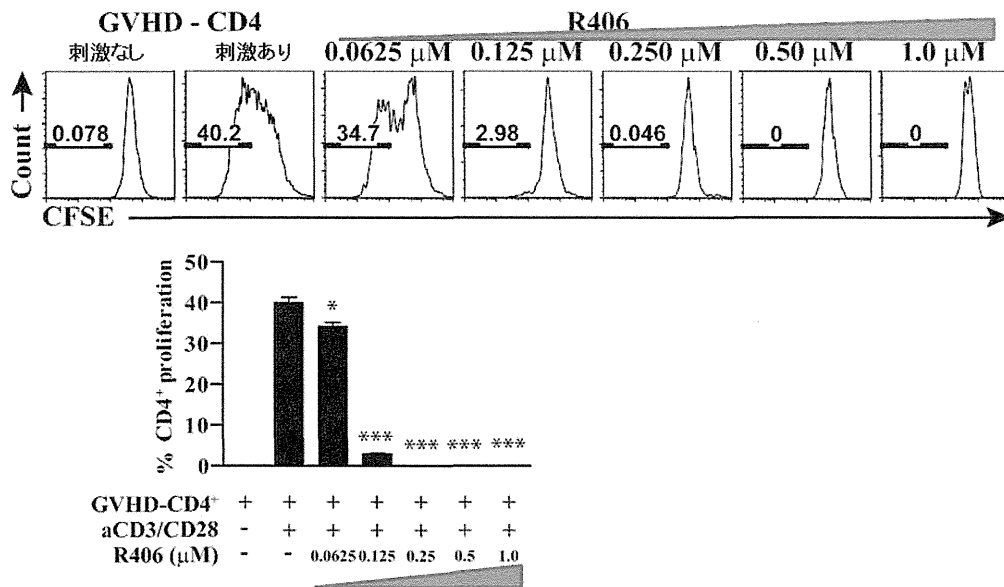


図4

図4: T細胞活性化に対する Syk 阻害剤の効果

GVHD マウスから CD4陽性 T細胞を抽出、CFSE でラベルした後、CD3/CD28 抗体で刺激しました。Syk 阻害剤 (R406) を低濃度から高濃度まで添加した。* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ 。

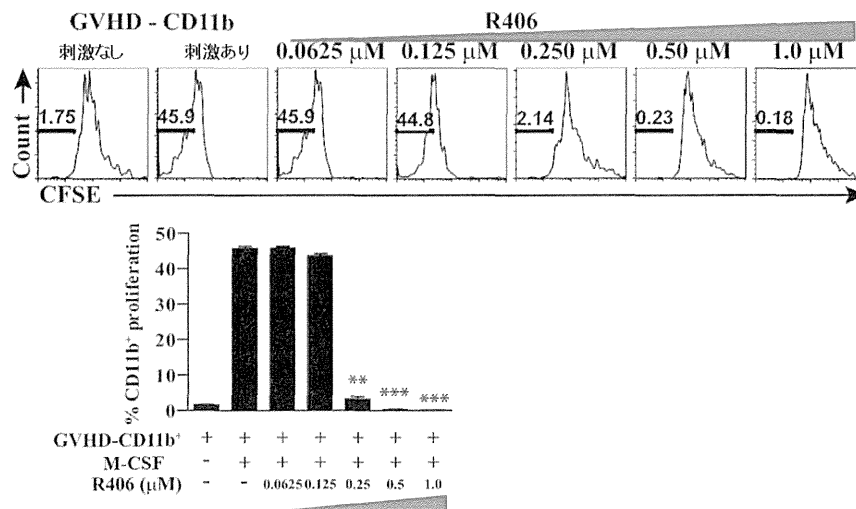


図5

図5:マクロファージ活性化に対する Syk 阻害剤の効果

GVHD マウスからマクロファージを抽出、CFSE でラベルした後、M-CSF で刺激しました。Syk 阻害剤 (R406) を低濃度から高濃度まで添加した。* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ 。

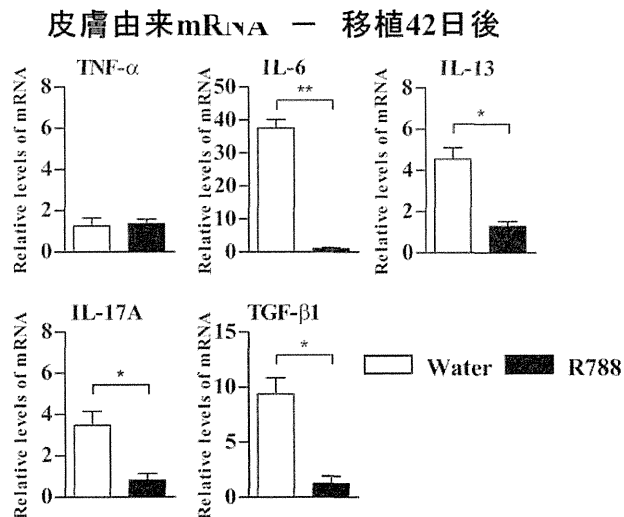


図6

図6: Syk 阻害剤の皮膚硬化型慢性 GVHD モデルの皮膚におけるサイトカイン発現定量に対する効果

皮膚硬化型慢性 GVHD モデル皮膚から RNA を抽出し、サイトカイン mRNA の real-time PCR を行った。

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ 。