

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09541

研究課題名(和文) 膠原病リウマチ疾患の難治性病態に対するWntシグナル阻害による新規治療戦略の創出

研究課題名(英文) Novel strategies for treatment of rheumatic diseases by Wnt signal blockades

研究代表者

斉藤 和義 (SAITO, Kazuyoshi)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：30279327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膠原病の組織リモデリングにおける上皮間葉および血管内皮間葉転換の病態形成への関与を検討した。膠原病リウマチ性疾患の組織においては、線維化・血管リモデリングの進行を認めている部位にはmyofibroblastの増生が認められ、これらのmyofibroblastおよび血管内皮細胞上にはWnt10Aが強く発現しており、組織における線維化病態に関与している可能性が示唆された。また腎間質由来線維芽細胞へのWnt10A強制発現は、ファイブロネクチン産生を増強し、腎障害に関与することが示唆された。以上から、Wnt10Aを介する間葉転換の制御が膠原病における組織リモデリングの加療標的になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the mechanism of EMT and EndoMT in tissue remodeling and fibrosis of rheumatic diseases and to develop a new treatment strategy for rheumatic diseases.

We conducted immune-staining of skin, lung and kidney tissue from rheumatic disease including rheumatoid arthritis, systemic sclerosis and vasculitis. As a result, a hyperplasia of myofibroblast was observed at the site of prominent progression of tissue fibrosis and vascular remodeling due to endothelial cell proliferation. Immuno-staining revealed both the myoblast and endothelial cells express Wnt10A, suggesting signaling through Wnt10A might involvement in irreversible remodeling in rheumatic diseases. These provocative findings suggest that the inhibition of EndMT/EMT may be a promising target for clinical therapeutic translation in settings such as tissue remodeling which cause of irreversible organ damage in rheumatic diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リモデリング抑制 Wnt10 膠原病

1. 研究開始当初の背景

がん細胞増殖と創傷治癒との関連が報告されて久しいが、この概念は、良性の創傷治癒ではケロイドを生じるが、癌では治癒しない創傷として過剰な自律性増殖をきたすというものである (Matthias S, et al. Nature Rev Mol Cell Bio1. 9:628-638, 2008.)。すなわち、感染、炎症、酸化、UV などのさまざまなストレスによる組織の障害からの治癒過程において、正常な過程では線維芽細胞の秩序ある造成と器質の補填が合目的におこなわれ、創傷治癒とともにケロイドとして収束する。一方、無秩序な自律性増殖を表現する場合には癌化ととらえられる。この組織の修復過程において、上皮間葉転換に加えて、最近、血管内皮間葉転換と呼ばれる血管内皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得する現象が重要な働きを担うことが明らかになってきた。共同研究者の河野らは、今までにストレスによる癌化に関して検討してきたが、癌化やその転移において癌周囲の線維芽細胞が重要な働きを担い、血管、間質新生に関与するとともに、この線維芽細胞の機能には Wnt ファミリーからのシグナルが関与することを DNA マイクロアレイ解析から見出した (Kabashima K et al. Am J Pathol. 2010 Feb;176(2):721-32.)。

一方、膠原病リウマチ疾患では、関節滑膜、肺、皮膚、腎、消化管、血管などに間葉系細胞の増殖を著し、その結果として全身の不可逆的な臓器障害がもたらされる。最近治療の進歩により、多くの膠原病疾患の予後が改善されているにも関わらず、皮膚筋炎にみられる急速進行性間質性肺炎、強皮症の皮膚硬化・潰瘍形成、全身性エリテマトーデスや血管炎症候群などの急速進行性糸球体腎炎・線維性硬化、肺高血圧症などの病変の進行を確実に制御する治療法は存在しない。自己免疫を介在するこのような様々な組織障害とそれに引き続いて生じる病的な修復による線

維化や血管内皮細胞の過剰増殖によるリモデリングは、ケロイドと癌の中間的な位置づけとも考えられ、上皮間葉転換あるいは血管内皮間葉転換が重要な役割を担うことが推測されているが、間葉転換や Wnt ファミリーに着目した病理組織での詳細な検討、遺伝子発現、転写因子レベルでの解析は行われておらず、間葉転換に着目した詳細な検討を行い治療への糸口とする。

2. 研究の目的

膠原病リウマチ疾患では、関節滑膜、肺、腎、消化管、血管などに間葉系細胞の増殖を著し、その結果として全身に不可逆的な臓器障害がもたらされる。この組織の線維化・リモデリングにおいて、結合組織に存在する線維芽細胞、マクロファージ、リンパ球などの様々な細胞が、斯様な病態形成に重要な役割を果たしている。最近、このリモデリングの過程において、創傷治癒の際に認められる上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal transition: EMT) あるいは血管内皮間葉転換 (Endothelial-Mesenchymal transition) が重要な役割を担うこと、その過程において Wnt ファミリーの発現細胞が関与することが示唆されているが、病理組織、遺伝子発現、転写因子レベルでの詳細な検討はなされていない。本研究では、膠原病の組織リモデリングにおける上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal transition) および血管内皮間葉転換 (Endothelial-Mesenchymal transition) の 2 種の間葉転換の病態への関与、調節機序の解明とその制御による治療創生を目的とする。

3. 研究の方法

膠原病リウマチ疾患のリモデリング病変部に存在する線維芽細胞、血管内皮細胞などが間葉細胞に形質転換される機構に関して

(1) 膠原病リウマチのリモデリング病態局所の組織染色による EMT による間葉細胞の存在と周辺の間質細胞を組織染色して Wnt ファミリー発現細胞と EMT における役割を検討する。

(2) 病変組織における遺伝子発現に関して正常組織を対照として Differential display による遺伝子発現を比較検討して特異的に発現している遺伝子を網羅的に解析する。

(3) (1) で得られた事実をもとに *in vitro* で滑膜細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、間葉幹細胞などと Wnt ファミリー強制発現細胞共培養して、*in vitro* における間葉転換の再現を確認する。その際に関葉転換に関わる Wnt シグナル伝達系、転換細胞への生存シグナル、細胞周期、血管新生、間葉転換にかかわる液性因子、細胞表面機能分子、シグナル伝達系、転写因子活性化への関与等を明らかにする。

(4) SCID マウスに線維芽細胞、血管内皮細胞、滑膜細胞を移植した系において Wnt ファミリー強制発現細胞を同時移植することで *ex vivo* での間葉転換の系を確立する。

(5) (2)-(4) において薬剤を添加してそのアウトプットをもって新たな治療戦略を確立する。

4. 研究成果

膠原病において間質に顕著な線維芽細胞・血管内皮細胞の増成が認められる組織における Wnt ファミリー発現状況を病理学的に検討した。関節リウマチ、強皮症、皮膚筋炎、血管炎症候群に認められる間質性肺炎、肺高血圧症における血管病変の生体および剖検病理試料における Wnt ファミリー発現細胞、間葉転換細胞を免疫組織学的染色にて同定し単位面積あたりの発現細胞数、存在範囲、周囲細胞との分布などを解析した。評価においては、組織スライドを 3 分間で 19 億画素の高解像度デジタルスライドに変換・記録し、

NanoZoomer Digital Pathology (NDP) を用い、標本面積 (mm²) に占める間葉転換細胞、Wnt ファミリー発現細胞の分布などを検討した。間葉系細胞マーカーとしては SM を、上皮・血管内皮系細胞マーカーとしては β -catenin を用いた。また、上皮間葉、血管内皮転換と密接に関与し、血管リモデリングと閉塞、肺・皮膚硬化に関わる TGF β 発現も検討した。その結果、上記の膠原病リウマチ性疾患の組織においては、線維化・血管リモデリングの進行を認めている部位に組織には myofibroblast の増生が認められた。この組織を Wnt 10A に対する抗体で組織染色したところ、血管内皮に加えて myofibroblast も染色された。すなわち、これらの Wnt 10 陽性 myofibroblast が組織における線維化病態に関与している可能性が示唆された。現在完成した Wnt 10 ノックアウトマウスを用いて実験的間質性肺炎、皮膚硬化に対する同遺伝子の関与の検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

① Wang KY, Yamada S, Izumi H, Tsukamoto M, Nakashima T, Tasaki, Guo X, Uramoto H, Sasaguri Y, Kohno K.

Critical *in vivo* roles of WNT10A in wound healing by regulating collagen expression/synthesis in WNT10A-deficient mice. PLoS One、査読有、Vol.13、No.3、2018、e0195156

DOI:10.1371/journal.pone.0195156

Machida J, Goto H, Tatematsu T, Shibata A, Miyachi H, Takahashi K, Izumi H, Nakayama A, Shimozato K, Tokita Y.

WNT10A variants isolated from Japanese

patients with congenital tooth agenesis
Human Genome Variation、査読有、Vol.4、
2017年、17047~17047
DOI:10.1038/hgv.2017.47

Oda K, Yatera K, Izumi H, Ishimoto H,
Yamada S, Nakao H, Hanaka T, Ogoshi T,
Noguchi S, Mukae H.
Profibrotic role of WNT10A via TGF-
signaling in idiopathic pulmonary
fibrosis. Respiratory Research、査読
有、Vol.17、2016、39
DOI: 10.1186/s12931-016-0357-0.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 和義 (SAITO, Kazuyoshi)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：3 0 2 7 9 3 2 7

(2)研究分担者

和泉 弘人 (IZUMI, Hiroto)
産業医科大学・産業生体科学研究所
・准教授
研究者番号：5 0 2 8 9 5 7 6