

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09763

研究課題名(和文) 抗CX3CL1中和抗体を用いた全身性強皮症の治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy using anti-CX3CL1 antibody in systemic sclerosis

研究代表者

長谷川 稔 (Hasegawa, Minoru)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：50283130

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)：強皮症の2つのマウスモデルで抗CX3CL1抗体治療の効果を検証した。1つ目のモデルでは、連日ブレオマイシンを皮下注して皮膚の線維化と血管障害を誘導した。しかし、抗CX3CL1抗体やCX3CR1の欠損は、CX3CR1陽性細胞の浸潤、線維化、血管障害を有意に抑制した。また、線維化関連分子の発現が抗CX3CL1抗体投与により有意に抑制された。2つ目のモデルでは、新生仔にTGF-beta、続いてCTGFを皮下注して皮膚硬化を誘導した。抗CX3CL1抗体を事前投与しておくこと、皮膚硬化が有意に抑制された。明らかな副作用はなかった。抗CX3CL1抗体は、皮膚線維化疾患の新規治療薬になりうるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the efficacy of anti-mouse CX3CL1 monoclonal antibody (mAb) therapy for skin lesion in two different mouse models of systemic sclerosis (SSc). In the first model, daily subcutaneous bleomycin injections induced skin fibrosis and vascular injury subsequent to inflammation in C57BL/6 mice. However, administration of anti-CX3CL1 mAb or CX3CR1 deficiency significantly inhibited them via reduced dermal infiltration of CX3CR1+ cells. Results of RNA sequencing and qRT-PCR demonstrated that expression of fibrogenic molecules induced by bleomycin injection, was significantly suppressed by anti-CX3CL1 mAb therapy. In the second model, BALB/c newborn mice received subcutaneous injections of TGF-β followed by that of CTGF. However, pretreatment of anti-CX3CL1 mAb significantly inhibited the skin fibrosis and inflammation of this model. No obvious side effects were found. Anti-CX3CL1 mAb therapy could be a novel approach for inflammatory-driven fibrotic skin disorders.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：強皮症 CX3CL1 新規治療 疾患モデル 線維化

## 1. 研究開始当初の背景

CX3CL1(fractalkine)は、活性化した血管内皮細胞、上皮細胞などに発現し、接着分子としての機能も併せ持つユニークな膜結合型ケモカインである(1)。CX3CL1の受容体であるCX3CR1は、単球、キラーリンパ球などに選択的に発現する。単球は、成熟サブセットと未熟サブセットに大きく分類できる。成熟サブセットはCX3CR1<sup>hi</sup>でCCR2<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、Ly6C<sup>-</sup>であるのに対し、未熟サブセットはCX3CR1<sup>low</sup>でCCR2<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、Ly6C<sup>+</sup>の表現型を呈する。未熟サブセットが急性炎症の際に骨髄から誘導されて血管から病変部組織に浸潤するのに対して、成熟サブセットはもともと末梢の皮膚などにも存在し、慢性炎症、創傷治癒、組織再生などに働くものと考えられている。このため、CX3CL1-CX3CR1の経路が過剰に働くと、慢性炎症や線維化が誘導される可能性がある。

我々は以前に、全身性強皮症患者の血清中ではCX3CL1の濃度が著明に上昇し、皮膚硬化の重症度や指尖潰瘍などの末梢循環障害と関連していることを報告した(2)。このため、強皮症ではCX3CL1-CX3CR1の経路が過剰に働いており、これを抑制することで線維化や血管障害を軽減できるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

そこで、共同研究者から供与された中和作用を有するハムスター抗マウスCX3CL1モノクローナル抗体を、強皮症のモデルマウスに投与して、皮膚硬化が抑制されるかどうかを検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) Bleomycin (BLM) 誘導性強皮症モデル

生後8~10週の雌のC57BL/6J野生型マウスの背部に、BLM 150 µgを4週間連日皮下注射して皮膚硬化を誘導した。このモデルにお

いて、抗CX3CL1中和抗体500 µgまたはコントロールIgG 500 µgを週に2回腹腔内注射して、有用性を検討した。また、CX3CR1欠損マウスにおいても、同様にBLMの連日投与を行って皮膚硬化を誘導した。

### (2) 皮膚の線維化の評価

注射した局所の皮膚にH&E染色またはMasson's trichrome染色を行い、真皮の厚さの測定や線維化の範囲を測定した。また、組織中のコラーゲン量を、Silcol assayにより測定した。

### (3) 皮膚の炎症細胞の評価

BLM連日皮内注射中の局所皮膚におけるCX3CR1の発現細胞を、抗CX3CL1抗体を用いた蛍光免疫組織染色で確認した。T細胞やマクロファージの皮膚への浸潤細胞数は、それぞれCD3とF4/80に対する抗体を用いた免疫組織化学染色にて解析した。また、皮膚より白血球を分離し、各種表面マーカーに対する抗体で染色してフローサイトメトリーにより解析した。

### (4) 皮膚の血管障害の評価

BLM投与開始14日後のマウスに、DyLight649ラベルされたトマトレクチンを静注した。5分後に2%PFA/HBSS(+)で還流固定し、背部皮膚を採取し、1晩4℃で浸漬固定した。PBSに置換後、透明化処理後に、皮下側から2光子レーザー顕微鏡で観察した。観察部位はBLM注射中心部から3mm離れた箇所とした。データは皮筋から真皮までZスキャンし、スタッキングしたものを示した。

### (5) Growth factor (GF) 誘導性強皮症モデル

生後数日までの新生仔マウスにTGF-beta3 400ngを3日間、次いでCTGF 200ngを4日間連日背部に皮下注射投与して皮膚硬化を誘導した。このモデルにおいて、抗CX3CL1中和抗体200 µgまたはコントロールIgG(ハムスターIgG)200 µgを週に3回皮下注射して効果を比較した。

(6) その他

本研究は、福井大学医学部動物実験委員会の承認を受けて施行した。統計学的な有意差の有無は、unpaired t-test を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 抗 CX3CL1 モノクローナル抗体投与は、BLM による皮膚の線維化を抑制した。

BLMを連日28日間皮下投与した背部皮膚の評価において、HE染色における真皮の厚さと Masson's trichrome染色標本上で青色に染色された面積は、抗CX3CL1抗体投与群ではコントロールIgG投与群に比較して有意に減少していた (図1A、 $p<0.05$ )。また、Sircol assayにより測定した組織中のコラーゲン量も、抗CX3CL1抗体投与群ではコントロールIgG投与群に比較して有意に減少していた (図1A、 $p<0.05$ )。経過中に明らかな抗CX3CL1抗体の副作用は認められなかった。

(2) CX3CR1 の欠損は、BLM による皮膚の線維化を軽減させた。

CX3CR1欠損マウスにBLMの皮下注射をした場合、野生型マウスに比べてHE染色による皮膚の厚さ、Masson's trichrome染色で評価した組織学的な線維化の範囲、Sircol assayで測定した組織中のコラーゲン量のいずれもが、有意に軽減していた (図1B、 $p<0.05$ )。これらの結果は、抗CX3CL1抗体を使用してCX3CL1の作用を阻害した場合と同程度であった。

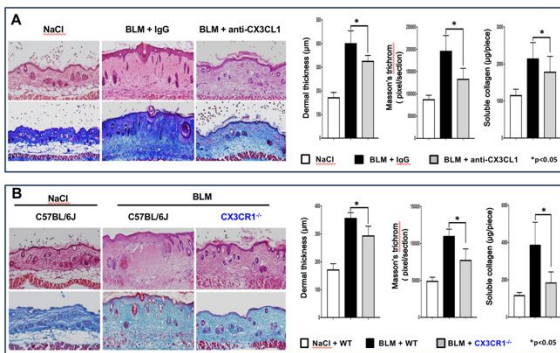


図1

(3) 抗 CX3CL1 抗体投与は BLM 連日投与皮膚における CX3CR1 陽性細胞を減少させた。

BLMの連日投与14日後には、CX3CR1陽性細胞が著明に増加していた。多重染色の結果から、その大半はF4/80陽性のマクロファージと考えられた。しかし、抗CX3CL1抗体投与群では、そのようなCX3CR1陽性細胞の増加が著明に抑制されていた (図2A)。

(4) 抗 CX3CL1 抗体投与は BLM 連日投与皮膚でのマクロファージやT細胞を減少させた。

このようなBLM注射部位での細胞を定量的に比較するために、CD3とF4/80に対する抗体で染色し、CD3は1つの切片全体で、F4/80は200倍の視野あたりの陽性細胞数を測定した。BLMを連日14日間皮下注射することにより、真皮内に多数のF4/80陽性マクロファージと少数のCD3陽性T細胞が認められた (図2B)。しかし、抗CX3CL1抗体投与群では、F4/80陽性マクロファージ、CD3陽性T細胞のいずれにおいても、コントロールIgG投与群に比べて有意な陽性細胞数の減少が認められた (図2B)。

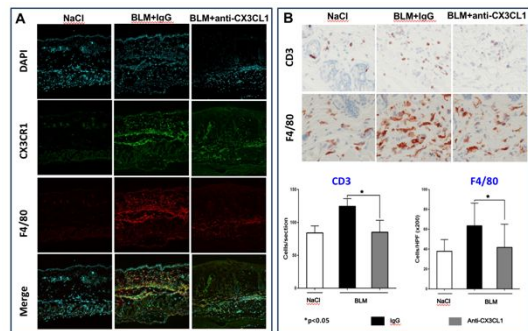


図2

(5) 抗 CX3CL1 抗体投与は BLM 連日投与皮膚における白血球中の一部のマクロファージのサブセットの増加を抑制した。

BLMを連日投与した皮膚からCD45陽性白血球を分離し、フローサイトメトリーにて解析した。CX3CR1は末梢血では発現細胞が多数確認できたが、皮膚の白血球はCX3CR1が内在化しているものと思われ、前述の免疫組織染色のような発現細胞を検出できなかった。

Day14の時点で、コントロールIgG群ではBLM

の投与により CD45<sup>+</sup>白血球中の CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup>のマクロファージの割合が著増したが、抗 CX3CL1 抗体投与群では有意に抑制された(図3)。また、CD45<sup>+</sup>白血球中の CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>のマクロファージの割合がコントロール IgG 群では BLM の投与により増加したが、抗 CX3CL1 抗体投与により有意に抑制された(図3)。皮膚から白血球を抽出する過程でどうしても個々の検体によって白血球の数自体にはばらつきが生じるため、マクロファージの各サブセットの数への影響はフローサイトメトリーで評価できなかった。しかし、免疫組織染色で明らかにマクロファージが抗体治療で減少していたことを考えると、皮膚におけるこれらの2つのマクロファージのサブセットは、抗 CX3CL1 抗体によって顕著に減少したものと考えられた。

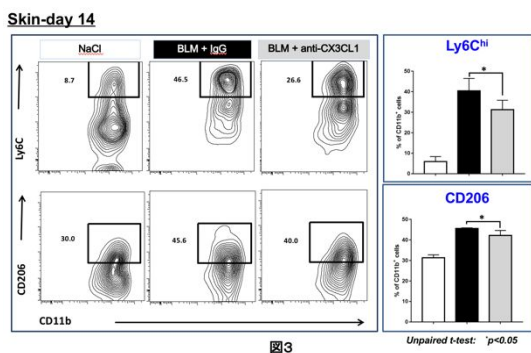


図3

(6) 抗 CX3CL1 抗体の投与は BLM 投与による血管障害を抑制した。

NaCl 皮内注射コントロール群、BLM 皮内注射とコントロール IgG を腹腔内投与したコントロール IgG 群、BLM 皮内注射と抗 CX3CL1 抗体を投与した抗 CX3CL1 抗体群において、各群 3 匹ずつで比較した。透明化した皮膚において、血管のイメージング検査を施行した(図4)。BLM 投与 14 日後の BLM 注射部周囲の皮膚の真皮から皮筋層までの血管は、コントロール IgG 投与群では破壊されて、顕著な減少が認められた。しかしながら、抗 CX3CL1 抗体投与群では血管の減少が抑制される傾向が認められた。

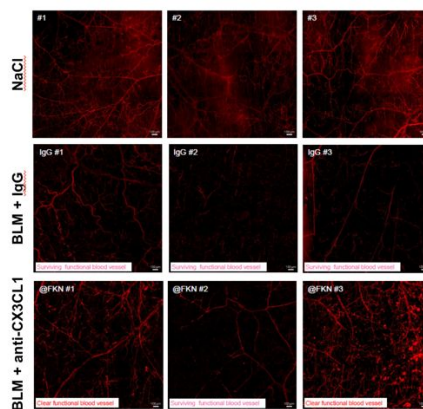


図4

(7) 抗 CX3CL1 抗体の事前投与は GF 誘導性の皮膚硬化を抑制した。

この新生仔マウスに TGF-beta3 を 3 日間、その後 CTGF を 4 日間皮下注射して線維化を誘導するモデルにおいて、GF 投与開始と同時に抗 CX3CL1 抗体治療を開始した場合は、コントロール IgG 投与群や PBS 投与群と計測器で測定した皮膚の厚さに有意な差がみられなかった(図5)。

しかし、このモデルでは 1 週間という短期間で評価が必要なため、GF 投与開始の 1 週間前より抗 CX3CL1 抗体投与を開始したところ、PBS 投与群やコントロール IgG 投与群に比べて皮膚の厚さが有意に減少した ( $p < 0.001$ , 図5)。

組織中のコラーゲンの含有量も、線維化誘導と同時に抗 CX3CL1 抗体投与を開始した場合には有意な影響がみられなかった(データ非表示)、1 週間前から投与すると有意に減少した ( $p < 0.01$ , 図5)。

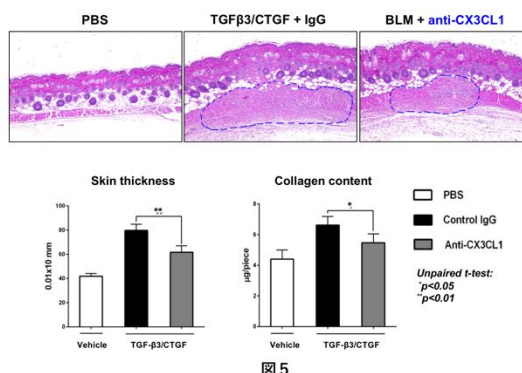


図5

(8) 考察

BLM 誘導性の皮膚硬化モデルでは抗 CX3CL1 モノクローナル抗体投与によって皮膚硬化

の進行が有意に抑制された。また、CX3CL1の特異的な受容体である CX3CR1 の欠損マウスでも抗体によるものと同程度の皮膚硬化の軽減が見られた。このことから、抗 CX3CL1 抗体は *in vivo* でもほぼ完全に CX3CL1-CX3CR1 軸を抑制しているものと考えられた。また、BLM による血管障害が抗 CX3CL1 抗体によって抑制されることが明らかとなった。さらには、TGF-beta と CTGF の連日皮下投与で誘導される新生仔マウスの皮膚硬化においても、抗 CX3CL1 抗体の事前投与が線維化を抑制した。

BLM 投与 14 日後の評価ではマクロファージを主体とする CX3CR1 陽性細胞が増加する傾向がみられたが、抗 CX3CL1 抗体の投与はそれを著明に抑制した。また、BLM 注射 14 日後の皮膚のマクロファージのフローサイトメトリーでの解析では、抗 CX3CL1 抗体の投与は CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> のマクロファージを有意に減少させた。また、抗 CX3CL1 抗体の投与は CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> のマクロファージも有意に減少させた。CD206 は線維化などに作用するとされる M2 マクロファージのマーカーのひとつとして知られているが、抗 CX3CL1 抗体が本当に M2 マクロファージを減少させるのかどうか、他のマーカーも含めた更なる検討が必要である。また、より早い時期や遅い時期で、増加するマクロファージのサブセットに違いがみられるか、それらに対して抗 CX3CL1 抗体がどのように作用するかを今後検討する予定である。なお、最近の報告では、急性炎症で組織に浸潤した CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> のマクロファージが、Th2 サイトカインによって慢性期には M2 マクロファージに分化して線維化に関与する可能性が指摘されている(3)。これらの過程に CX3CL1-CX3CR1 経路がどのように関わっているのかを明らかにする必要がある。

皮膚を透明化して血管を観察するイメージングの検討により、BLM は真皮や皮筋層の

血管を破壊して減少させること、抗 CX3CL1 抗体の投与はそれを抑制することがわかった。全身性強皮症の血管障害が進行すると、毛細血管などの血管が破壊されて血管が減少していく破壊性血管障害が認められる。今回の検討では毛細血管の観察が困難であったが、真皮や皮下などの血管は BLM 投与で明らかに増加したが、抗 CX3CL1 抗体はそれを抑制した。今後は、CX3CL1 がどのように血管障害に関与するかについても検討していきたい。

抗 CX3CL1 モノクローナル抗体治療は、強皮症にみられる皮膚の炎症、線維化、血管障害のいずれにも有用な可能性があり、今後はそれらの作用機序をより明らかにしていきたい。現在、関節リウマチやクローン病患者に対して、抗 CX3CL1 モノクローナル抗体投与の臨床試験が進行中である。将来的には強皮症患者に対する臨床試験に発展できるように努めていきたい。

#### <引用文献>

1. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 Jan;24(1):34-40.
2. Hasegawa M, Sato S, Echigo T, Hamaguchi Y, Yasui M, Takehara K. Up regulated expression of fractalkine/CX3CL1 and CX3CR1 in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Jan;64(1):21-8.
3. Wermuth PJ, Jimenez SA. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases. *Clin Transl Med*. 2015 Feb 7;4:2.

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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

VH Luong, Chino T, Oyama N, Obara T, Kuboi Y, Ishii N, Machinaga A, Ogasawara H, Ikeda W, Imai T, Hasegawa M. Anti-CX3CL1 monoclonal antibody therapy suppresses the development of bleomycin-induced and growth factors-induced skin fibrosis in mice. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society(ICIS 2017) . Kanazawa. 2017/10/29-11/2 .

VH Luong, Chino T, Oyama N, Obara T, Kuboi Y, Ishii N, Machinaga A, Ogasawara H, Ikeda W, Imai T, Hasegawa M. Anti-CX3CL1 antibody therapy attenuates the development of inflammation, fibrosis, and vascular injury in experimental models of scleroderma .The 42th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology . Kochi . 2017/12/15-17 .

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[ その他 ]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福井大学

学術研究院医学系部門

教授

長谷川 稔 ( MINORU HASEGAWA )

研究者番号 : 50283130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし