

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10205

研究課題名(和文) 全身性強皮症の皮膚硬化・血管障害の病態における細胞外ATPの役割

研究課題名(英文) The role of extracellular ATP in the pathogenesis of skin sclerosis and vasculopathy in systemic sclerosis

研究代表者

石川 治 (Ishikawa, Osamu)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90168188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：強皮症の血管障害によって生じた組織の低酸素が、血管内皮細胞や線維芽細胞から細胞外ATPを放出させて、放出した細胞外ATPが線維芽細胞上のP2Y2受容体と結合し、p38のチロシンリン酸化を介してIL-6産生や、増殖能の増加、Ⅰ型コラーゲンの産生増加を引き起こすことと、これらの反応が強皮症由来線維芽細胞では亢進することを明らかにし、細胞外ATPが強皮症の線維化に関与することが示唆された。また、P2Y2受容体阻害剤処理やp38の阻害剤でATPによるIL-6産生およびⅠ型コラーゲン産生が抑制されたことで、P2Y2受容体阻害剤が強皮症の線維化の治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、細胞外ATPが強皮症の血管障害と皮膚の線維化(硬化)の機序において重要な役割を果たすことを明らかにした。また、P2Y2受容体阻害剤が強皮症の線維化の治療に応用できる可能性が示唆された。本研究の成果は強皮症の2つの主要病態である血管障害と線維化の病態における細胞外ATPの役割を明らかにすることにつながり、2つの主要病態を改善することができる革新的な治療法に応用できる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：We identified that hypoxia in the tissues caused by vascular damage induces the release of extracellular ATP from vascular endothelial cells and fibroblasts, and the released extracellular ATP binds to P2Y2 receptors on fibroblasts, causing increased IL-6 production, increased proliferative capacity, and increased type I collagen production via tyrosine phosphorylation of p38. These results suggest that extracellular ATP might be involved in the mechanism of skin fibrosis in systemic sclerosis. The inhibition of ATP-induced IL-6 and type I collagen production by the inhibitor of P2Y2 receptor suggested that P2Y2 receptor inhibitor could be potentially applied in the treatment of fibrosis in systemic sclerosis.

研究分野：皮膚科

キーワード：全身性強皮症 皮膚硬化 細胞外ATP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は、皮膚や臓器の硬化(線維化)と血管異常、そして免疫異常を伴う原因不明の難病である。血管内皮細胞やその前駆細胞の機能異常によって血管内腔の狭小化、血管新生能異常が起こり組織への血流低下が起こる。皮膚硬化は血管障害に引き続いて生じるため、血管障害が皮膚硬化の原因に関連することが示唆されている。最近我々は、強皮症の血管障害(レイノー現象)の病態に関与することが知られているノルエピネフリンが皮膚硬化の病態にも関連することとそのメカニズムを明らかにした(Uehara A, Ishikawa O. Scientific reports 2016)。寒冷刺激や精神的ストレスによって産生されるノルエピネフリンが線維芽細胞上のアドレナリン

受容体と結合し、p38 のチロシンリン酸化を介して細胞増殖能の増加と IL-6 や 1 型コラーゲンの産生増加を引き起こすことを明らかにした。IL-6 は線維芽細胞の分化、増殖を誘導し、線維化を亢進させることや、強皮症患者の血清、皮膚組織で増加していることから、強皮症の皮膚硬化や病勢を反映することが知られている。ノルエピネフリン刺激による IL-6 やコラーゲン産生は強皮症由来線維芽細胞では亢進し、ノルエピネフリンが強皮症の線維化に関与することが示唆された。また、アドレナリン 受容体阻害剤(プロプラノロール)処理や p38 阻害剤によって、ノルエピネフリンによる IL-6 産生および 1 型コラーゲン産生が抑制されたことより、アドレナリン 受容体阻害剤や p38 阻害剤が強皮症の線維化の治療に応用できる可能性が示唆された(Uehara A, Ishikawa O. Scientific reports 2016)。

興味深いことに、自律神経終末においてはノルエピネフリンと一緒にアセチルコリンやアデノシン 3 リン酸(ATP)が神経伝達物質として小胞に包まれて放出されることが知られている(J Neurol. 2004; 251: 11-7, Nature 1974; 249: 843-845.)。非神経細胞でも同様のメカニズムを持つことが報告されている。ATP は、細胞内では細胞のエネルギーになる重要な物質であるが、細胞外に放出されると炎症を引き起こすことが知られており、damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs: ダメージ(傷害)関連分子パターン)の 1 つとして知られている。最近では、ATP は細胞破壊の結果としてではなく、様々な細胞外からの刺激によって生理的、能動的に放出される細胞間伝達物質として機能することが明らかになってきた。ATP が細胞外に放出される刺激として、低酸素、機械的刺激など様々な細胞へのストレスが知られているが、いまだ不明な点が多い(Placenta 2015;36:759-66)。低酸素刺激によって血管内皮細胞から産生された細胞外 ATP はオートクライン・パラクラインによって自身や周囲の細胞に作用して血管壁の肥厚やアポトーシス、炎症反応を増強させることが知られている。これらの結果より、強皮症の病変部では、血管障害による低酸素などの刺激によって細胞外 ATP が産生されて、さらなる血管障害を引き起こすことが想定されるが、これまでに詳細な検討は行われていない。また、細胞外 ATP が強皮症の皮膚硬化・線維化に与える影響については不明である。そこで、我々は、細胞外 ATP が強皮症の血管障害と皮膚の線維化(硬化)に与える影響について明らかにすることを目的とした。本研究の成果は強皮症の 2 つの主要病態である血管障害と線維化の病態における細胞外 ATP の役割を明らかにすることにつながり、2 つの主要病態を改善することができる革新的な治療法に応用できる可能性が示唆される。

我々はすでに研究を開始しており、まず強皮症患者と健常人の皮膚線維芽細胞を培養して、様々な濃度、反応時間にて ATP 刺激を行った。その結果、1mM、60 分間の ATP 刺激によって、線維芽細胞からの IL-6 や 1 型コラーゲンの産生量が一番多くみられることを見出した。また、強皮症患者の線維芽細胞は健常人の線維芽細胞と比べて IL-6 や 1 型コラーゲンの産生が多くみられた。次に ATP 受容体(P2X1~7 受容体, P2Y1~14 受容体)の発現量について検討した結果、強皮症患者と健常人の線維芽細胞で明らかな違いは見られなかった。また、数種類の ATP 受容体阻害剤を用いて、ATP による IL-6 産生への影響を調べたところ、P2 受容体のうちの P2Y2 受容体の阻害剤が有意に ATP による IL-6 産生を抑制することを明らかにした。今後は、強皮症の線維

芽細胞において、ATP から IL-6 や 1 型コラーゲンが産生されるメカニズムについて詳細に検討する。また、血管内皮細胞を用いて、ATP による血管新生・形成能への影響について検討する。また、これらの *in vitro* で得られた成果を元に、*in vivo* での研究に発展させていきたい。具体的には、強皮症の皮膚硬化のマウスモデルとして、プレオマイシン誘導皮膚線維化モデルを用いて、*in vitro* で抗線維化効果の得られた ATP 受容体阻害剤による皮膚線維化や血管障害に対する治療効果について検討を行う。

2．研究の目的

強皮症患者由来線維芽細胞を用いて、ATP 刺激によって IL-6 や 1 型コラーゲンが産生されるメカニズム（細胞内シグナル）について検討する。

強皮症の線維化を促進させる TGF- β 、エンドセリン 1、ノルエピネフリンと ATP の共刺激による線維化への影響とメカニズム（細胞内シグナル）について検討する。

プレオマイシン誘導皮膚線維化マウスモデルを用いて、*in vitro* で抗線維化効果の得られた ATP 受容体阻害剤による皮膚線維化や血管障害に対する治療効果について検討を行う。

3．研究の方法

強皮症の線維芽細胞を用いて、ATP 刺激によって IL-6 や 1 型コラーゲンが産生されるメカニズム（細胞内シグナル）について検討する。

我々はノルエピネフリン刺激によって強皮症由来線維芽細胞から IL-6 が過剰産生されることを明らかにしている (Scientific Reports 2016)。また、ノルエピネフリン刺激による IL-6 の過剰産生は細胞内伝達物質である p38 のチロシンリン酸化を介していることを明らかにし、p38 阻害剤がノルエピネフリン刺激による IL-6 産生を抑制することも明らかにした。そこで、ATP 刺激による p38 のリン酸化についてウエスタンブロット法にて検討を行う。また、ATP による IL-6 産生を抑制した ATP 受容体阻害剤の p38 のチロシンリン酸化への影響も調べる。さらに p38 阻害剤や p38 の siRNA 法によって p38 の機能や発現を低下させたときの ATP による IL-6 産生亢進への影響についても検討する。ATP 刺激によって産生された IL-6 は IL-6 受容体と複合体を形成し、線維芽細胞上の gp130 と結合シトランスシグナリングによって、STAT3 シグナルを介して 1 型コラーゲンを産生させる。そこで、この ATP 刺激による 1 型コラーゲン産生に対する ATP 受容体阻害剤の抑制効果についてウエスタンブロット法で検討する。さらに STAT3 シグナルへの影響についても検討し、細胞内シグナルを詳細に解明する。

強皮症の線維化を促進させる TGF- β 、エンドセリン 1、ノルエピネフリンと ATP の共刺激による線維化への影響とメカニズム（細胞内シグナル）について検討する。

エンドセリン 1 は強皮症患者血清や血管内皮細胞での発現が亢進しており、線維化と血管障害の病態に関与している。我々は、以前に強皮症由来線維芽細胞においてノルエピネフリンとエンドセリン 1 の共刺激によって、IL-6 産生の相乗的に亢進することを見出している (Scientific Reports 2016)。そこで、細胞外 ATP と強皮症の線維化を促進させる因子として知られている TGF- β 、エンドセリン 1、ノルエピネフリンとの共刺激による線維化への影響について検討する。また、その細胞内シグナルの相互作用についても検討を行う。エンドセリン 1 受容体拮抗薬であるボセンタンは「全身性強皮症における手指潰瘍の発症抑制」に保険適応が承認されているが、ATP 受容体阻害剤との併用によって皮膚線維化および血管障害に対して効果を示す可能性が示唆される。

プレオマイシン誘導皮膚線維化マウスモデルを用いて、*in vitro* で抗線維化効果の得られ

た ATP 受容体阻害剤による皮膚線維化や血管障害に対する治療効果について検討を行う。

我々はすでに強皮症の皮膚硬化モデルであるプレオマイシン誘導皮膚線維化モデルを確立している。我々はこれまでに、in vitro では、細胞外 ATP が皮膚線維芽細胞上の ATP 受容体(P2 受容体)に作用して IL-6 を過剰産生させて皮膚線維化に関与することを明らかにしてきた。また、P2 受容体のうち P2Y2 受容体の阻害剤 (Kaempferol と AR-C) が有意に ATP による IL-6 産生を抑制することを明らかにした。これらの成果をふまえて、マウスの皮膚線維化モデルにおける ATP 受容体(P2Y2 受容体)阻害剤の影響について検討を行う。プレオマイシンを連日皮下注射し、さらに ATP 受容体阻害剤の皮下注射も連日行う。4 週間後に皮膚を採取し、組織学的に皮膚の厚みを計測して比較する。また皮膚含有コラーゲン量をマッソントリクローム染色やハイドロキシプロリンによる定量にて比較する。皮膚硬化部位の ATP 量をルシフェラーゼ反応を利用したキット (TOYO INK) を用いて測定する。病変部位に浸潤したマクロファージ、CD3+T 細胞、筋線維芽細胞の数を測定する。また、線維化を制御する炎症性サイトカインや因子である IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α 、CTGF、MMP などの発現量についても、皮膚より mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により検討する。また、血管障害の程度を評価するために、免疫染色による血管量 (血管内皮細胞: CD31, ペリサイト: NG2 など) や血栓量、TUNEL 法によるアポトーシス量について検討を行う。

4 . 研究成果

まず低酸素処理によって、強皮症由来線維芽細胞や血管内皮細胞から細胞外 ATP が産生されることを確認した。次に、強皮症患者と健常人の皮膚線維芽細胞を培養して、様々な濃度、反応時間にて ATP 刺激を行った。その結果、強皮症患者の線維芽細胞では、健常人の線維芽細胞と比べて ATP 刺激による IL-6 の産生が亢進していることを見出した。ATP 受容体(P2X1~7 受容体、P2Y1~14 受容体)の発現量は、強皮症患者と健常人の線維芽細胞で明らかな違いは見られなかった。そこで、発現している様々なタイプの ATP 受容体に対する阻害剤を用いて、ATP による IL-6 産生への影響を調べたところ、P2Y2 受容体の阻害剤が有意に ATP による IL-6 産生を抑制することを明らかにした。

我々は、強皮症線維芽細胞からの IL-6 の過剰産生は p38 のチロシンリン酸化が重要であることを明らかにしている (Uehara A. Scientific reports 2016)。そこで、次に ATP 刺激による p38 のリン酸化について調べたところ、ATP 刺激によって、p38 のチロシンリン酸化が亢進することを明らかにした。さらに、ATP 刺激によって産生された IL-6 は IL-6 受容体と複合体を形成し、線維芽細胞上の gp130 と結合しトランスシグナリングによって、STAT3 シグナルを介して I 型コラーゲンを産生させることも明らかにした。また、ATP 刺激による p38 のリン酸化やコラーゲン産生は、P2Y2 受容体阻害剤によって抑制させることも見出した。

また、細胞外 ATP と強皮症の線維化を促進させる因子として知られているエンドセリン I、ノルエピネフリンとの共刺激による線維化への影響について検討した結果、細胞外 ATP 刺激は、エンドセリン I ないしノルエピネフリンとの共刺激によって、相加的に線維芽細胞からの IL-6 産生を増加させることを見出した。エンドセリン I 受容体拮抗薬であるボセンタンは「全身性強皮症における手指潰瘍の発症抑制」に保険適応が承認されているが、ATP 受容体阻害剤との併用によって皮膚線維化に対して効果を示す可能性が示唆された。

マウスの皮膚線維化モデル (プレオマイシン誘導皮膚線維化マウスモデル) における P2Y2 受容体阻害剤の影響について検討を行った。まず、プレオマイシン誘導皮膚線維化マウスモデルの皮膚硬化部位の ATP 量が増加していることを明らかにした。次に、プレオマイシン誘導皮膚線維化マウスモデルにおける皮膚線維化が、P2Y2 受容体阻害剤の腹腔内投与によって、抑制されることを明らかにした。血管障害については P2Y2 受容体阻害剤による影響は見られなかった。病

変部位に浸潤したマクロファージ、CD3+T 細胞、筋線維芽細胞の数も P2Y2 受容体阻害剤投与によって抑制された。

以上の結果より、強皮症の血管障害によって生じた組織の低酸素が、血管内皮細胞や線維芽細胞から細胞外 ATP を放出させて、放出した細胞外 ATP が線維芽細胞上の P2Y2 受容体と結合し、p38 のチロシンリン酸化を介して IL-6 産生や、増殖能の増加、Ⅰ型コラーゲンの産生増加を引き起こすことと、これらの反応が強皮症由来線維芽細胞では亢進することを明らかにし、細胞外 ATP が強皮症の線維化に関与することが示唆された。また、P2Y2 受容体阻害剤処理や p38 の阻害剤で ATP による IL-6 産生およびⅠ型コラーゲン産生が抑制されたことで、P2Y2 受容体阻害剤が強皮症の線維化の治療に応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Perera LMB, Sekiguchi A, Uchiyama A, Uehara A, Fujiwara C, Yamazaki S, Yokoyama Y, Ogino S, Torii R, Hosoi M, Ishikawa O, Motegi S	4. 巻 139
2. 論文標題 The Regulation of Skin Fibrosis in Systemic Sclerosis by Extracellular ATP via P2Y2 Purinergic Receptor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 890-899
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Buddhini Perera, Akihiko Uchiyama, Akiko Sekiguchi, Chisako Fujiwara, Osamu Ishikawa, Sei-ichiro Motegi
2. 発表標題 Mechanistic insight into the extracellular ATP-induced IL-6 via purinergic receptor in systemic sclerosis dermal fibroblasts
3. 学会等名 2017 Society for Investigative Dermatology Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Buddhini Perera, Akiko Sekiguchi, Akihiko Uchiyama, Akihito Uehara, Chisako Fujiwara, Sahori Yamazaki, Osamu Ishikawa, Sei-ichiro Motegi
2. 発表標題 The regulation of skin fibrosis in systemic sclerosis by extracellular ATP via P2Y2 purinergic receptor
3. 学会等名 The 42nd annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	茂木 精一郎 (Motegi Sei-ichiro) (20420185)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	