

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17456

研究課題名(和文) PDEに注目した強皮症の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of systemic sclerosis and development of novel therapeutic strategy focusing on PDE

研究代表者

樋口 智昭 (Tomoaki, Higuchi)

東京女子医科大学・医学部・寄附部門講師

研究者番号：80836966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、ホスホジエステラーゼ(PDE)を阻害することが、強皮症の病態である自己免疫異常(炎症)、線維化、血管障害の「3つの異常」の改善につながると考えて研究を行った。具体的には、PDEのアイソザイムの1つである、PDE4に着目し、強皮症皮膚線維芽細胞および強皮症モデルマウスに対する、PDE4阻害薬であるアプレミラストの線維化抑制作用についての検討を行った。培養強皮症皮膚線維芽細胞細胞にアプレミラストを添加したところ、皮膚線維芽細胞からのI型コラーゲン産生を抑制した。さらに、強皮症モデルマウスであるブレオマイシンマウスにアプレミラストを投与すると、皮膚硬化の進展を抑制することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、PDE4阻害薬が強皮症の病態である線維化の進行を抑制しうることが、強皮症皮膚線維芽細胞を用いた検討でも実証された。さらに、強皮症マウスモデルを用いた検証でも、PDE4阻害が皮膚線維化進展を抑制するだけでなく、強皮症の病態である、自己免疫異常や炎症を制御しうることが示された。これらの結果は、これまで標準治療が確立されていない強皮症に対し、PDE4阻害薬が革新的治療法となるポテンシャルを有することを示唆し、新規治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted a study based on the idea that inhibiting phosphodiesterase (PDE) could lead to the improvement of the "three pathological abnormalities" in systemic sclerosis: 1) autoimmunity/inflammation, 2) fibrosis, and 3) vascular change. We particularly focused on one of the PDE isozymes, PDE4, and investigated the antifibrotic effects of apremilast, a PDE4 inhibitor, on systemic sclerosis skin fibroblasts and a scleroderma model mouse. When apremilast was added to cultured systemic sclerosis skin fibroblasts, it inhibited the production of type I collagen. Furthermore, administering apremilast to bleomycin-induced model mice was able to suppress the progression of skin sclerosis.

研究分野：リウマチ性疾患

キーワード：強皮症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症 (SSc) は、自己免疫異常・炎症を基盤とした進行性の皮膚硬化および微小血管障害を特徴とする結合組織疾患である。これまでに、TGF- $\beta$  や IL-6 などのサイトカイン阻害薬をはじめとするさまざまな薬剤の SSc の皮膚硬化に対する有効性と安全性が、臨床試験で評価されてきた。しかし、ほとんどの薬剤が効果不十分または有害事象のため、あらかじめ定められた主要評価項目基準を達成することができなかった。

ホスホジエステラーゼ (PDE) は、環状ヌクレオチドをその直鎖形に変換する加水分解酵素である。PDE は、環状アデノシン-リン酸 (cAMP)、環状グアノシン-リン酸 (cGMP)、またはその両方に作用する 11 のアイソザイムを有する。その中で、PDE4 は臨床応用のために特に広く研究されてきた。PDE4 は、脳、心血管組織、平滑筋、皮膚、リンパ球、単球、マクロファージなどの免疫細胞に広く発現する。PDE4 の阻害が、炎症を制御することが示されており、PDE4 阻害剤であるアプレミラストは、乾癬性関節炎、尋常性乾癬、ベーチェット病で保険適応を取得している。

抗炎症効果に加えて、PDE4 阻害剤には抗線維化作用も報告されている。PDE4 阻害により、SSc 由来の皮膚線維芽細胞および TGF- $\beta$  で刺激された健康な皮膚線維芽細胞からの細胞外マトリックス産生を抑制することが示され、さらに、強皮症マウスモデルを用いた解析で、PDE4 阻害剤が線維化を促進する炎症細胞・免疫細胞の働きを阻害することで皮膚硬化の進展を抑制することが示されている。これらの研究の多くは、抗炎症作用の結果として抗線維化作用がもたらされることを示唆するが、本研究代表者は、PDE4 が炎症だけでなく線維化にも直接作用する重要な分子であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、強皮症病態における、PDE4 阻害薬の抗炎症作用、抗線維化作用を評価することである。具体的な評価項目は以下の通りである。皮膚線維芽細胞を用いた PDE4 阻害による線維化抑制効果の解析、強皮症モデルマウスを用いた PDE4 阻害による線維化抑制効果の解析。

### 3. 研究の方法

#### (1) 皮膚線維芽細胞を用いた PDE4 阻害による線維化抑制効果の解析

健常皮膚線維芽細胞は購入した初代培養細胞を用いた。強皮症皮膚線維芽細胞は 2013 年 ACR/EULAR SSc 分類基準を満たした患者より採取した。線維芽細胞は、10%FCS および抗生物質を添加した DMEM 培地で 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  環境下で培養した。添加実験 24 時間前に 10%FCS を含まない DMEM に置換した。定量リアルタイム PCR 実験では、線維芽細胞に TGF- $\beta$  1 10 ng/mL、アプレミラストを添加し、48 時間後に total RNA を回収した。ウエスタンブロッティング実験では、TGF- $\beta$  1 10 ng/mL、アプレミラストを添加し 72 時間後に cell lysate を回収した。細胞内 cAMP 濃度測定では、市販の酵素免疫測定法 (EIA) キットを用いて測定した。

#### (2) 強皮症モデルマウスを用いた PDE4 阻害による線維化抑制効果の解析

生後 6 週の BALB/c マウスの背部にプレオマイシンを 4 週間にわたり皮下注射し、皮膚硬化モデルを作製した。対照群には PBS を皮下注射した。アプレミラスト群では、1 mg/kg または 5 mg/kg を皮下注射と同じタイミングで腹腔内投与した。投与終了後にマウス皮膚を採取し、皮膚厚、コラーゲン量、SMA 陽性筋線維芽細胞数を測定した。

### 4. 研究成果

健常人皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞の細胞内 cAMP 濃度を測定し比較したところ、強皮症皮膚線維芽細胞の細胞内 cAMP 濃度が有意に低かったが、アプレミラスト添加で細胞内 cAMP 濃度が上昇することを確認した。強皮症皮膚線維芽細胞にアプレミラストを添加したところ、濃度依存的に COL1A1、COL1A2、CTGF、ACTA2 mRNA 発現が低下した (図 1a)。さらに、健常人皮膚線維芽細胞 TGF- $\beta$  1 を添加し上昇した COL1A1、COL1A2、CTGF、ACTA2 mRNA 発現が、アプレミラスト添加で低下した (図 1b)。

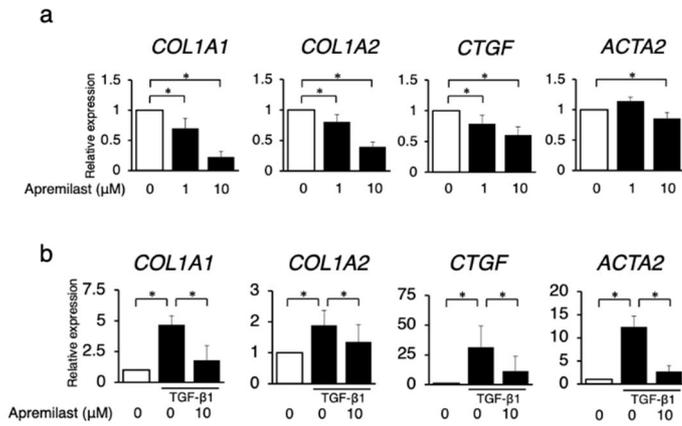


図1 (a) 強皮症皮膚線維芽細胞に対するアプレミラストの作用。(b) 健常人皮膚線維芽細胞に対するアプレミラストの作用。\* p<0.05。

ウエスタンブロッティング法を用いて、タンパクレベルでの発現を調べたところ、同様に、アプレミラスト添加で、I型コラーゲン、CCN2発現の低下を認めた。プレオマイシン誘導皮膚硬化マウスモデルを用いた解析でも、プレオマイシン投与により誘導された皮膚硬化の進展がアプレミラスト投与により抑制された。具体的には、アプレミラスト投与により、皮膚厚、コラーゲン量が低下し、SMA陽性筋線維芽細胞数の減少を認めた(図2a, b)。

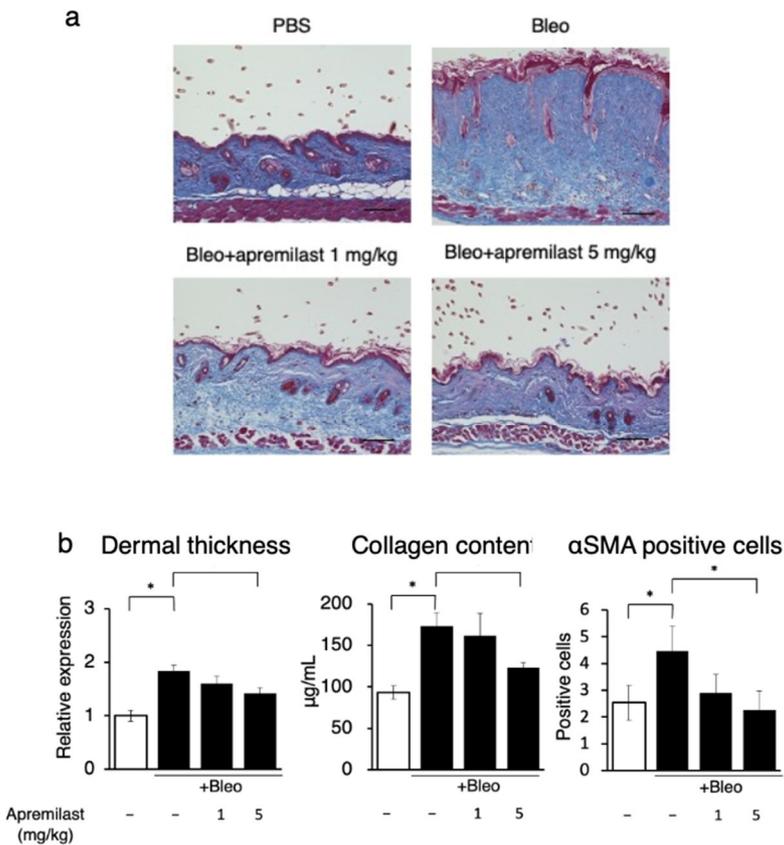


図2 プレオマイシン誘導皮膚硬化モデルマウスに対するアプレミラストの作用。(a) 代表的な皮膚組織所見 (Masson Trichrome 染色)。(b) アプレミラスト投与による皮膚厚、コラーゲン量、SMA陽性細胞の変化。\* p<0.05。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takagi Kae, Kawamoto Manabu, Higuchi Tomoaki, Tochimoto Akiko, Hirose Hikaru, Harigai Masayoshi, Kawaguchi Yasushi  | 4. 巻<br>803             |
| 2. 論文標題<br>Characteristics of Japanese patients with systemic sclerosis complicated with calcinosis   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Rheumatic Diseases   | 6. 最初と最後の頁<br>808       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/1756-185X.14121  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Higuchi Tomoaki, Tanaka Eiichi, Inoue Eisuke, Abe Mai, Saka Kumiko, Sugano Eri, Sugitani Naohiro, Higuchi Yoko, Ochiai Moeko, Yamaguchi Rei, Sugimoto Naoki, Ikari Katsunori, Yamanaka Hisashi, Harigai Masayoshi | 4. 巻<br>-               |
| 2. 論文標題<br>Impact of concomitant chronic kidney disease on hospitalised infections and remission in patients with rheumatoid arthritis: results from the IORRA cohort   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Modern Rheumatology   | 6. 最初と最後の頁<br>-         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/mr/roab082   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Takagi Kae, Kawamoto Manabu, Higuchi Tomoaki, Tochimoto Akiko, Harigai Masayoshi, Kawaguchi Yasushi   | 4. 巻<br>23              |
| 2. 論文標題<br>Single nucleotide polymorphisms of the HIF1A gene are associated with susceptibility to pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis and contribute to SSc PAH disease severity                         | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Rheumatic Diseases   | 6. 最初と最後の頁<br>674 ~ 680 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/1756-185X.13822  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Higuchi Tomoaki, Takagi Kae, Tochimoto Akiko, Ichimura Yuki, Hirose Hikaru, Sawada Tatsuo, Shibata Noriyuki, Harigai Masayoshi, Kawaguchi Yasushi   | 4. 巻<br>13              |
| 2. 論文標題<br>Antifibrotic effect of apremilast in systemic sclerosis dermal fibroblasts and bleomycin-induced mouse model   | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>-         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-023-46737-1   | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Hirose Hikaru, Higuchi Tomoaki, Takagi Kae, Tochimoto Akiko, Ichimura Yuki, Katsumata Yasuhiro, Harigai Masayoshi, Kawaguchi Yasushi                                  | 4. 巻<br>27      |
| 2. 論文標題<br>Association of elevated serum carbohydrate antigen 19 9 levels with extensive interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis: A cross sectional study | 5. 発行年<br>2023年 |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Rheumatic Diseases   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/1756-185X.14978   | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tomoaki Higuchi, Yasushi Kawaguchi  |
| 2. 発表標題<br>FOXN1 regulates fibrotic activity of skin fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis |
| 3. 学会等名<br>The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology                                      |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takagi Kae, Kawaguchi Yasushi, Higuchi Tomoaki, Okamoto akiko, Fukasawa Chikako, Harigai Masayoshi |
| 2. 発表標題<br>日本人男性全身性強皮症(Systemic sclerosis:SSc)の特徴   |
| 3. 学会等名<br>第65回日本リウマチ学会総会・学術集会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tomoaki Higuchi, Kae Takagi, Akiko Tochimoto, Takanari Norose, Ikuko Masuda, Tatsuo Sawada, Noriyuki Shibata, Toshiro Morohoshi, Masayoshi Harigai, Yasushi Kawaguchi |
| 2. 発表標題<br>2-carba-cPA ameliorates experimental dermal fibrosis by suppressing the activation of fibroblasts and immune cells  |
| 3. 学会等名<br>6th SSc World Congress (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tomoaki Higuchi, Kae Takagi, Akiko Tochimoto, Yasuhiro Katsumata, Masayoshi Harigai, Yasushi Kawaguchi |
| 2. 発表標題<br>Apremilast attenuates the progression of bleomycin-induced skin fibrosis in mice                       |
| 3. 学会等名<br>第64回日本リウマチ学会   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>樋口智昭, 田中榮一, 井上永介, 阿部麻衣, 阪久美子, 菅野瑛梨, 杉谷直大, 樋口陽子, 落合萌子, 山口麗, 杉本直樹, 猪狩勝則, 中島亜矢子, 谷口敦夫, 山中寿, 針谷正祥 |
| 2. 発表標題<br>慢性腎臓病の合併が関節リウマチ治療に与える影響-IORRAコホートをを用いた検討  |
| 3. 学会等名<br>第64回日本リウマチ学会  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計5件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>樋口 智昭, 川口 鎮司                       | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>技術情報協会                             | 5. 総ページ数<br>6   |
| 3. 書名<br>創薬研究者・アカデミア研究者が知っておくべき最新の免疫学とその応用技術 |                 |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>樋口 智昭, 川口 鎮司                                  | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>日本臨床社   | 5. 総ページ数<br>5   |
| 3. 書名<br>日本臨床 別冊(呼吸器症候群II) 6. 肺血管炎 (5) 顕微鏡的多発血管炎による肺血管炎 |                 |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>川口 鎮司, 樋口 智昭                                    | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>日本臨床社   | 5. 総ページ数<br>6   |
| 3. 書名<br>日本臨床 別冊(呼吸器症候群II) 3. 肺高血圧症 (3) 特に強皮症に伴う肺動脈性肺高血圧症 |                 |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>樋口 智昭, 川口 鎮司                    | 4. 発行年<br>2022年 |
| 2. 出版社<br>科学評論社                           | 5. 総ページ数<br>5   |
| 3. 書名<br>EUSTARデータベースからみた強皮症における進行性間質性肺疾患 |                 |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>東京女子医科大学病院膠原病リウマチ痛風センター、針谷 正祥、猪狩 勝則   | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>メジカルビュー社                              | 5. 総ページ数<br>700 |
| 3. 書名<br>Evidence based medicineを活かす 膠原病・リウマチ診療 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|