

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791084

研究課題名(和文) 低酸素ストレスと皮膚線維化の関連の検討

研究課題名(英文) the contribution of hypoxia to skin fibrosis

研究代表者

神人 正寿 (JINNIN MASATOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：60401048

研究成果の概要(和文)：我々の研究により、CA9 および miR-29a が強皮症のトリガーとして機能している可能性、強皮症において VEGF-A/VEGFR2 シグナルが活性化しリンパ管においても血管と同様の発達障害が存在している可能性、さらに CD163 の増加および adiponectin の低下が低酸素状態の維持に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

Our study revealed (i) CA9 and miR-29a may function as the trigger of scleroderma, (ii) in scleroderma, VEGF-A/VEGFR2 signal may be activated and lymphoid vessels are also impaired by excessive VEGF signal, and (iii) overexpressed CD163 and reduced adiponectin may contribute to the maintenance of hypoxic condition in this disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：細胞・組織、ストレス、病理学

1. 研究開始当初の背景

汎発性強皮症の病因として主に線維化、血管障害、免疫異常などの因子が挙げられている。このうち皮膚線維化は真皮での I 型コラーゲンの増加が本態であるが、その原因として患者皮膚由来線維芽細胞から産生される I 型コラーゲン量が増加していることが挙げられる (Ihn H, J Dermatol Sci. 2008;49:103)。さらに強皮症線維芽細胞では MMP の分泌減少

と TIMP の分泌増加が報告されていることから (Kuroda K et al. Arch Dermatol Res. 1997;289:567)、本症における線維化にはコラーゲンの産生増加と分解能低下の 2 つの要素が関与していると考えられる。

強皮症皮膚由来培養線維芽細胞では、TGF- β の全発現量に変化がみられないのにも関わらず下流の転写因子 Smad のリン酸化を認め、この転写因子が I 型コラーゲンの a1

鎖および a2 鎖遺伝子転写活性を賦活化するという TGF- β シグナル経路の異常活性化が見られる (Ihn H, *J Dermatol Sci*. 2008;49:103)。その原因として研究代表者は患者皮膚組織および患者由来培養線維芽細胞において avb5 integrin あるいは avb3 integrin の発現が増加しており、この増加した integrin が TGF- β を活性化している可能性を示した (Asano Y et al. *J Immunol*. 2005;175:7708; Asano Y et al. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2897)。よって、強皮症線維芽細胞でのコラーゲン遺伝子転写活性化における現時点でのもっとも上流のイベントは integrin の発現増加であると考えられる。しかし integrin が何故増加しているのかに関しては未だ不明である。また、I 型コラーゲンの代謝にもっとも深く関与する MMP-1, TIMP-1 および TIMP-2 のうち MMP-1 および TIMP-1 に関しては TGF- β 刺激によりそれぞれ低下または増加するため (Asano Y et al. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1761)、Integrin 発現増加で活性化された TGF- β は MMP-1 発現抑制および TIMP-1 発現誘導によりコラーゲン代謝を抑制することで組織の線維化をさらに促進していると考えられる。しかし TIMP-2 量は TGF- β 刺激では増加しないため (Ihn H et al. *J Immunol*. 2002;168:1895)、独立した発現制御を受けている可能性がある。

冒頭に挙げた本症の 3 主徴は、しばしば抗核抗体などに代表される免疫異常、Raynaud 現象などの末梢循環障害、そして皮膚および内臓の線維化の順に出現するため、研究代表者は本症の線維化は血管障害・末梢循環障害により惹起されるというという仮説を立てた。この仮説を証明するには、本症において低酸素ストレスが存在すること、低酸素状態が持続する機序、さらに低酸素状態においてコラーゲン発現が増加する機序を明らかにする必要がある。

過去の報告では強皮症皮膚組織および血液中において低酸素マーカーである Glut-1 および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 発現量が増加している (Davies C et al. *Hum Pathol*. 2006; 37:190)。これらの低酸素マーカーの増加は本症における低酸素ストレスの存在を示唆する。しかし線維化の程度や治療効果との相関は明らかにされておらず、低酸素ストレスと線維化とを関連づけるにはさらなる検討が必要と考えられる。加えて、本症では低酸素状態が持続しているにもかかわらず代償性の血管新生が阻害されており (Distler O et al. *Circ Res*. 2004;95:109)、低酸素ストレスによる線維化の成立に大き

く関与していると考えられる。前述のごとく本症皮膚組織にて VEGF が増加しているにもかかわらず血管新生が生じない理由として Distler らは VEGF の制御不能な上昇が逆に血管新生を阻害していると考えしているが、研究代表者は何らかの理由で VEGF のアンタゴニストも増加しているため結果的に VEGF が中和されている可能性を考えている。

最後に、様々な臓器由来の培養線維芽細胞では低酸素刺激によりコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの産生が増加することが知られている (Distler JH et al. *Arthritis Rheum*. 2007;56:4203)。よって低酸素ストレスが本症の線維化に関与している可能性が高いと考えられるが、この増加が転写レベルでのものかどうかはこれまで検討されていない。また、I 型コラーゲン遺伝子プロモーター領域には低酸素ともっとも密接に関係する転写因子 hypoxia inducible factor (HIF)-1 の結合配列が見られないことから、低酸素刺激による I 型コラーゲン発現誘導作用は HIF-1 の直接的な作用ではない可能性がある。研究代表者は、低酸素ストレスによる HIF-1 の発現増加は、integrin や TIMP-2 の発現を誘導することによって前述のような I 型コラーゲン発現増加を惹起している可能性に着目した。

2. 研究の目的

汎発性強皮症における皮膚線維化がレイノー現象に代表される末梢循環障害により惹起されている可能性を検討するため、低酸素ストレスと皮膚組織の線維化の関係を *in vitro* および *in vivo* にて調べる。

3. 研究の方法

平成 21 年度は、強皮症患者由来皮膚および血液中の CA9 および VEGF アンタゴニスト発現量などの測定、正常皮膚線維芽細胞に低酸素ストレスを与えた場合の遺伝子発現の変化の検討、およびマウス皮膚での低酸素ストレスによる線維化誘導の試みを行い、平成 22 年度はそれらの結果をもとにさらに解析を進める予定であった。

4. 研究成果

我々はまず汎発性強皮症の皮膚組織における VEGF レセプターの発現を検討し、VEGF2 型レセプター (VEGFR2) および VEGFR3 の蛋白発現および mRNA 発現が正常組織に比べて増加していることと、D2-40 染色にて強皮症ではリンパ管が減少かつ拡張していることを見いだした (Kuwata N et al, *in submission*; Honda N et al, *Br J Dermatol*. 2010; 163:776)。リンパ管が減少しているにもかか

わらず VEGF-D や VEGFR3 の発現が増加していることから、制御不能な VEGF-D/VEGFR3 シグナルの活性化が逆に正常なリンパ管形成を阻害している可能性があると思われた。また、本症患者血清の解析により、M2 マクロファージのマーカーであり VEGF との関連も示唆されている CD163 の血清濃度が強皮症患者において有意に増加している事も見いだすことができた (Nakayama Y et al, Rheumatol Int 2010) (Jerry B et al. J Pathol 2006; 209: 34).

つづいて、我々は血清可溶性 VEGFR2 濃度を本症患者において測定し、2 つの知見を得た。(1)女性 SSc 患者の血清可溶性 VEGFR2 値は正常人よりも有意に高値を示す (Jinnin M et al. Br J Dermatol. 2010;162:751)。(2)SLE 患者群では健常群より血清可溶性 VEGFR2 値が有意に上昇している。また血清可溶性 VEGFR2 値上昇例では CH50 の減少が見られたことから、血清濃度は SLE の病勢と関連している可能性がある (Ogata A et al, in submission)。

次に低酸素マーカーである血清 CA9 濃度は強皮症の前駆状態である scleroderma spectrum disorder (SSD)患者で健常群と比べ有意に減少していた。また CA9 低値例では diffuse cutaneous SSc (dcSSc)が多くみられた。(Makino K et al. in submission)。同様に、我々は SSD 患者群では hypoxia inducible factor3 など target とする microRNA である miR-29a の血清濃度が有意に低下している事を報告した (Kawashita Y et al, J Dermatol Sci. 2011;61:67)。よって、CA9 および miR-29a は本症の前駆状態において既に減少しており、本症のトリガーとなっている可能性があると考えられた。

さらに我々は血清 adiponectin 濃度が dcSSc 患者で有意に減少し、線維化の程度と相関することを発見した (Arakawa H et al, Exp Dermatol in press)。よって adiponectin は本症における低酸素状態の維持に関与している可能性がある。

以上、我々の研究によ CA9 および miR-29a が強皮症のトリガーとして機能している可能性、本症において VEGF-A/VEGFR2 シグナルが活性化しリンパ管においても血管と同様の変化が存在している可能性、さらに CD163 の増加および adiponectin の低下が低酸素状態の維持に関与している可能性が示された。

一方、低酸素刺激下での線維芽細胞での線維化関連遺伝子の誘導やマウスモデルの作成については、様々な条件を設定して何らかの変化を観察したいと考えていたが、これまでに安定した結果を得られておらず、今後研究の継続が必要である。

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 20 件)

①Makino K, Jinnin M, Kajihara I, et al. Circulating miR-142-3p levels in patients with systemic sclerosis, Clin Exp Dermatol, 査読あり, in press

②Ichihara A, Jinnin M, Yamane K, et al. microRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris, Br J Dermatol, 査読あり, in revision

③Arakawa H, Jinnin M, Muchemwa FC, et al. Adiponectin expression is decreased in the involved skin and sera of diffuse cutaneous scleroderma patients, Exp Dermatol, 査読あり, in press

④Oyama R, Jinnin M, Kakimoto A, et al. Circulating microRNA associated with TNF- α signaling pathway in patients with plaque psoriasis, J Dermatol Sci., 査読あり, 61巻, 2011, 209-211

⑤Kanemaru H, Fukushima S, Yamashita J, Honda N, Oyama R, Kakimoto A, Masuguchi S, Ishihara T, Inoue Y, Jinnin M, Ihn H. The circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker, J Dermatol Sci., 査読あり, 61巻, 2011, 187-193

⑥Moriya C, Jinnin M, Yamane K, et al. Expression of matrix metalloproteinase-13 is controlled by IL-13 via PI3K/Akt3 and PKC- δ in normal human dermal fibroblasts, J Invest Dermatol., 査読あり, 131巻, 2011, 655-661

⑦Nakashima T, Jinnin M, Etoh T, et al. Down-regulation of mir-424 contributes to the abnormal angiogenesis via MEK1 and cyclin E1 in senile hemangioma: its implications to therapy, PLoS One, 査読あり, 5巻, 2010, e14334

⑧ Kawashita Y, Jinnin M, Makino T, et al. Circulating miR-29a levels in patients with scleroderma spectrum disorder, J Dermatol Sci., 査読あり, 61巻, 2011, 67-69

⑨Nakayama W, Jinnin M, Makino K, et al. Serum levels of soluble CD163 in patients

with systemic sclerosis, Rheumatol Int., 査読あり, 2010

⑩Asano Y, Ihn H, Jinnin M, et al. Altered dynamics of transforming growth factor β (TGF- β) receptors in scleroderma fibroblasts, Ann Rheum Dis., 査読あり, 70 巻, 2011, 384-387

⑪Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis, Arthritis Res Ther., 査読あり, 12巻, 2010, R128

⑫Jinnin M, Ishihara T, Boye E, et al. Recent progress in studies of infantile hemangioma, J Dermatol., 37 巻, 2010, 283-298

⑬Honda N, Jinnin M, Kajihara I, Impaired lymphangiogenesis due to excess vascular endothelial growth factor-D/Flt-4 signalling in the skin of patients with systemic sclerosis, Br J Dermatol., 査読あり, 163巻, 2010, 776-780

⑭Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis, J Dermatol. 査読なし, 37巻, 2010, 11-25

⑮Muchemwa FC, Jinnin M, Wakasugi S, et al. A novel COL1A1 exon 14/PDGFB fusion gene in dermatofibrosarcoma protuberans, Eur J Dermatol., 査読あり, 20巻, 2010, 390-391

⑯Igata T, Jinnin M, Makino T, Up-regulated type I collagen expression by the inhibition of Rac1 signaling pathway in human dermal fibroblasts, Biochem Biophys Res Commun., 査読あり, 393 巻, 2010, 101-105

⑰Makino T, Jinnin M, Muchemwa FC, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of human dermal fibroblasts via the ERK1/2 and JNK pathways, Br J Dermatol., 査読あり, 162巻, 2010, 717-723

⑱Jinnin M, Makino T, Kajihara I, et al. Serum levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with systemic sclerosis, Br J Dermatol., 査読あり, 162 巻, 2010, 751-758

⑲Ashida R, Ihn H, Mimura Y, Jinnin M, et al. Clinical and laboratory features of Japanese patients with scleroderma and telangiectasia, Clin Exp Dermatol., 査読あり, 34巻, 2009, 781-783

⑳Jinnin M, Ihn H, Asano Y, et al. Retrospective study of clinical and laboratory features in Japanese scleroderma patients with cardiac involvement, J Dermatol Sci., 査読あり, 55 巻, 2009, 70-72

[学会発表] (計 5 件)

①神人正寿ら, 汎発性強皮症における血清 soluble VEGF 2 型レセプター濃度の検討, 強皮症研究会議, 2010 年 1 月 16 日, 東京 (大正製薬本社ビル)

②本多教稔, 神人正寿ら, 全身性強皮症における血清 vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) 値の検討, 強皮症研究会議, 2010 年 1 月 16 日, 東京 (大正製薬本社ビル)

③牧野雄成, 神人正寿ら, 全身性強皮症における血清 Carbonic Anhydrase IX (CA9) 値の検討, 強皮症研究会議, 2010 年 1 月 16 日, 東京 (大正製薬本社ビル)

④中山若菜, 神人正寿ら, 全身性強皮症における血清 CD163 値の検討, 強皮症研究会議, 2010 年 1 月 16 日, 東京

⑤神人正寿, Cellular and Molecular Basis of Hemangioma, グローバル COE リエゾンラボ研究会, 2011 年 2 月 16 日, 熊本 (熊本大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神人 正寿 (JINNIN MASATOSHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号: 60401048