

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2012

課題番号：24890076

研究課題名（和文） 強皮症のモデルマウスにおける抗CTGF抗体の治療効果および作用機序

研究課題名（英文） Antifibrotic effect and role of antibody to connective tissue growth factor in an animal model of scleroderma

研究代表者

中條 園子 (CHUJO SONOKO)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：20401911

研究成果の概要（和文）：ブレオマイシン誘発性強皮症マウスおよび TSK/+マウスにおける抗CTGF抗体の治療効果を検討した。抗CTGF抗体をブレオマイシンと同時に投与した群、ブレオマイシンにより線維化を誘導した後に投与した群、TSK/+マウスに投与した群では、コントロール群に比べ有意に線維化の減少を認めた。以上より、抗CTGF抗体は皮膚線維化を抑制する効果があることが示され、CTGFを直接誘導するのでない動物モデルにおいてもその効果をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated antifibrotic effect of antibody to connective tissue growth factor (CTGF) in an animal model of skin fibrosis. Anti-CTGF antibody reduced skin fibrosis in a bleomycin-induced scleroderma mouse model and a tight skin mouse. It suggested that anti-CTGF antibody is capable of blocking the development of skin fibrosis in an animal model not induced by exogenous application of growth factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：皮膚免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：強皮症、線維化、CTGF

1. 研究開始当初の背景

皮膚や肺、腎臓などの内臓臓器の線維化は、全身性強皮症の特徴的な症状であり、重症の皮膚線維化や内臓臓器の線維化は日常生活を困難とするばかりでなく、生命予後に大き

く影響する。しかしながら、現在のところ線維化に対する有効な治療法は確立されていない。近年強皮症の線維化形成における細胞増殖因子を含めたサイトカインの関与について徐々に明らかになってきており、主要な

サイトカインをターゲットとした抗線維化薬の開発が世界中で注目されている。

結合組織増殖因子 (Connective tissue growth factor : CTGF) は、血小板由来増殖因子 (Platelet-derived growth factor : PDGF) 類似の生理活性物質を有するが構造の異なる蛋白質であり、臍帯静脈血管内皮細胞より分泌されるものとして報告された (Bradham DM et al. : J Cell Biol 1991)。さらにその後、形質転換増殖因子 (Transforming growth factor : TGF) - β 刺激下によって線維芽細胞から産生される (Igarashi A et al. : Mol Biol Cell 1993)、線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を促進することが明らかとなった (Grotendorst GR: Cytokine Growth Factor 1997)。強皮症においては、皮膚硬化部に組織学的硬化と関連した CTGF-mRNA の発現が見られることや (Igarashi A et al. : J Invest Dermatol 1995)、患者血清中の CTGF 濃度が皮膚硬化の範囲や間質性肺炎の程度と相関して上昇することが報告されており (Sato S et al. : J Rheumatol 2000)、CTGF は強皮症の病態形成において中心的な役割を果たす増殖因子と考えられるようになってきた。

申請者らが、新生マウス皮下への細胞増殖因子投与による皮膚線維化モデルの確立を試みたところ、TGF- β のみでは一過性に線維化は誘導されるもののその後線維化は消失し、CTGF を相加的に作用させた状況においてのみ持続的な線維化が維持されるとの結果を得た (Mori T et al. : J Cell Phys 1999)。また、プロコラーゲンプロモーター領域トランスジェニックマウスを用いた実験においては、TGF- β と CTGF の同時投与および連続投与によりプロコラーゲンプロモーターの活性は TGF- β 単独投与より亢進し、コラーゲン産生性の線維芽細胞の増加も認めた

(Chujo S et al. : J Cell Phys 2005)。このように、過去の報告や我々の結果から CTGF は強皮症の線維化において適切な治療ターゲットと考えられる。

CTGF は、N 末端ドメインと C 末端ドメインを有する 4 つのモジュールで構成される多機能増殖因子として知られており、それぞれのモジュールは異なる生物活性に参与する。例えば、CTGF の N 末端半分は細胞分化や細胞外マトリックス産生を刺激し、C 末端半分は細胞増殖を刺激することが示されている。このことから、異なるモジュールに対する抗体は CTGF の機能に対し、異なる作用を示すと考えられる。

以上のことから、申請者らは CTGF 蛋白全長に対する抗 CTGF 抗体、および CTGF のモジュール 1~4 のいずれか 1 つを特異的に認識することができるモジュール特異的抗体を作製した。そして新生マウス皮下に TGF- β と抗 CTGF 抗体の同時投与を試みた。抗 CTGF 抗体を投与した群ではコントロール群に比べ線維化の誘導が抑制され、さらにモジュールごとの抑制効果を比較したところ、抗 CTGF-モジュール 2 抗体が最も高い抑制効果を示した (Ikawa Y et al. : J Cell Phys 2008)。このことより、抗 CTGF 抗体は TGF- β 投与により誘導された内因性 CTGF を阻害する可能性が考えられ、モジュール特異的抗体各々が線維化に対する抑制効果が異なることが示された。しかしながら、このモデルは TGF- β 皮下注といういわば CTGF が関与することが明白な系であり、強皮症のより複雑な病態を反映する系での検討が必要である。

そこで、今回申請者らは抗 CTGF 抗体および抗 CTGF モジュール特異的抗体が、CTGF を直接誘導するのではない動物モデルにおいて効果をもたらすのかを明らかにするために、強皮症の代表的な動物モデルであるブレ

オマイシン誘発性強皮症マウスおよび TSK/+マウスを用いて、抗体の効果および作用機序を検討することとした。

2. 研究の目的

全身性強皮症は皮膚や内臓臓器の線維化を特徴とし、様々なサイトカインがその病態形成に参与している。しかし、サイトカインをターゲットとした有効な治療法は未だ確立されておらず、その開発が望まれている。CTGF は、TGF- β の刺激により誘導され、線維芽細胞を増殖しコラーゲン産生を促進するサイトカインであり、抗線維化治療のターゲットの1つとして近年注目されている。本研究は、全身性強皮症の動物モデルであるブレオマイシン誘発性強皮症マウスおよび Tight skin mouse-1 (TSK/+マウス) における抗 CTGF 抗体の治療効果およびその作用機序を検討するものである。

3. 研究の方法

(1) DNA 免疫法による抗ヒトおよびマウスモノクローナル CTGF モジュール 2 抗体の作製

申請者らのこれまでの検討により、CTGF のうちモジュール 2 に対する抗体が線維化の抑制効果がもっとも期待できるため、ヒトおよびマウス CTGF のモジュール 2 に対するモノクローナル抗体を作製した。ヒトおよびマウス CTGF のモジュール 2 cDNA を発現ベクターにクローニングし、その発現ベクターをマウスに導入後、細胞表面における発現レベルを確認した。その結果より複数の発現ベクターから適切な発現ベクターを選択した。選択した発現ベクターをマウスに投与し、B 細胞とミエローマ細胞を回収し融合させ (ハイブリドーマの作製)、モノクローナル抗体を精製した。この抗 CTGF モジュール 2 抗体を用い

て、以下の実験を行った。

(2) ブレオマイシン誘発性強皮症マウスモデルにおける抗 CTGF 抗体による抗線維化作用の検討

ブレオマイシン誘発性マウスは、ブレオマイシンを連日皮内注射して作製した。抗 CTGF 抗体を皮内注射にて投与し、その効果を検討した。抗 CTGF 抗体による抗線維化作用は、以下の 3 パターンで検討した。

- ① 線維化を予防できるか:ブレオマイシンの投与前に抗 CTGF 抗体を投与
- ② 線維化を抑制できるか:抗 CTGF 抗体をブレオマイシンと同時に投与
- ③ 線維化を改善できるか:ブレオマイシンを連日皮内注射し皮膚線維化を誘導した後に、抗 CTGF 抗体を投与

マウスの皮膚線維化の程度を、組織学的検討、組織中のコラーゲン量の定量、myofibroblast 数から評価した。

(3) TSK/+マウスにおける抗 CTGF 抗体による線維化の抑制効果の検討

TSK/+マウスに抗 CTGF 抗体の皮内注射を行い、抗線維化作用を検討した。マウスの皮膚線維化の程度は、2. と同様に、組織学的検討、組織中のコラーゲン定量、myofibroblast 数から評価した。

4. 研究成果

ブレオマイシン誘発性強皮症マウスでは、ブレオマイシン投与前に抗 CTGF 抗体を投与した群ではコントロールと比較し、組織学的に線維化の抑制は認めなかった。また、組織中のコラーゲン量、myofibroblast 数に有意差は認めなかった。それに対し、ブレオマイシンと同時に抗 CTGF 抗体を投与した群では、コントロール群に比べ組織学的に有意に線維

化の減少を認め、組織中のコラーゲン量、myofibroblast 数も有意に減少していた。また、ブレオマイシンにより線維化を誘導した後に抗 CTGF 抗体を投与した群においても、同様に組織学的な線維化、組織中のコラーゲン量、myofibroblast 数においてコントロール群に比べ有意に減少を認めた。

さらに TSK/+マウスでは、抗 CTGF 抗体の投与によりコントロール群に比べ有意に線維化の減少を認め、組織中のコラーゲン量、myofibroblast 数においてもコントロールに比べ有意に減少を認めた。

以上のことより、抗 CTGF 抗体は皮膚線維化を抑制、改善する効果があることが示され、CTGF を直接誘導するのではない動物モデルにおいても効果をもたらすことが証明された。

5. 主な研究論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下腺)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中條 園子 (CHUJO SONOKO)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：20401911

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし