

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461459

研究課題名(和文) 全身性強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの役割・病態的意義

研究課題名(英文) The role of apelin in skin sclerosis in systemic sclerosis

研究代表者

横山 洋子 (Yokoyama, Yoko)

群馬大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：00241901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症の皮膚の線維化に伴って脂肪組織が減少することが知られており、脂肪組織から産生されるサイトカイン(アディポカイン)が線維化の制御に関与することが注目されている。アペリンはアディポカインの一つであり、受容体であるAPJと結合し、血管新生、心臓機能、脂肪細胞機能などを制御する。アペリンと線維化については、明らかになっていないため、線維化におけるアペリンの役割を解明することを目的とした。その結果、アペリンがヒト皮膚線維芽細胞の線維化を抑制的に制御することを明らかにし、その機序について解明しつつある。本研究の成果によって、強皮症の皮膚線維化に対する臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It is known that adipose tissue decreases along with fibrosis in systemic sclerosis, and that cytokine (adipokine) produced from adipose tissue is involved in the regulation of fibrosis. Apelin is one of adipokines and binds to the receptor, APJ, and regulates angiogenesis, cardiac function, adipocyte functions. Since apelin and fibrosis have not become clear, we aimed to elucidate the role of apelin in fibrosis. As a result, we clarified that apelin regulates fibrosis suppressively, and its mechanism is being elucidated. Based on the results of this study, clinical application to skin sclerosis in systemic sclerosis can be expected.

研究分野：線維化

キーワード：全身性強皮症 皮膚線維化 アペリン

## 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は、皮膚および内臓臓器の線維化、血管異常、免疫異常(自己抗体)を特徴とする発症機序不明の全身性疾患である。全身臓器の線維化・血管障害によって、消化器障害、肺線維症、肺高血圧症、腎硬化症などを合併する。皮膚の線維化に伴って脂肪組織が減少することが知られており、近年、脂肪組織から産生されるサイトカイン(アディポカイン)が皮膚の線維化の制御に関係することが注目されている。

アペリンは、脂肪細胞から産生されるアディポカインの一つであり、血管内皮細胞や線維芽細胞からも産生される。受容体である APJ に結合し下流にシグナルを伝えて、主に血管新生、心臓機能、脂肪細胞機能などを制御する。APJ は広く発現しているが、特に血管内皮細胞、平滑筋細胞に多く発現している。血管内皮細胞や周皮細胞から分泌されたアペリンが、血管内皮細胞上の APJ に結合し血管径を拡大させ、血流量を増大させることが明らかとなっている。肺高血圧症患者の肺血管内皮細胞におけるアペリンの発現は低下しており、アペリンの低下によって血管平滑筋細胞や内皮細胞の増殖が起こるといった報告や、アペリン KO マウスでは低酸素誘導性の肺高血圧症が増悪し、肺高血圧症患者の血清中アペリンが低下しているとの報告があり、アペリンの発現低下が肺高血圧症の病態(血管平滑筋細胞と内皮細胞の増殖亢進)に関与していると考えられる。

アペリンと線維化に関しては、アペリン/APJ シグナルは心臓の線維化を抑制するという報告や、アペリン KO マウスでは血管狭窄によって誘導される心臓の線維化が亢進するという報告があり、アペリンが線維化抑制作用を持つことが示唆されている。一方で、肝細胞ではアペリンが線維化を亢進させるという報告もある。また、強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの役割は明らかになっていない。そこで、強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの役割を解明することを目的とした。

## 2. 研究の目的

アペリンがヒト皮膚線維芽細胞の線維化を抑制的に制御するのかどうかを明らかにする。

**健常人由来線維芽細胞と強皮症患者由来線維芽細胞のアペリン・APJ 発現量を比較する。**

**siRNA 法によってヒト線維芽細胞のアペリンの発現を抑制したときに、線維化に関与する因子(1型コラーゲン量、CTGF、TGF- $\beta$ 、MMP-1、TIMP、 $\alpha$ SMA など)の発現が亢進するのかどうか明らかにする。**

**アペリン蛋白による刺激によって線維芽細胞の線維化を抑制できるか明らかにする。**

**in vivo モデルを用いてアペリンによる線維化の制御、役割を明らかにする。**

## 3. 研究の方法

**健常人由来線維芽細胞と強皮症患者由来線維芽細胞のアペリン・APJ 発現量を比較する。**

健常人由来線維芽細胞と強皮症患者由来線維芽細胞を培養して、アペリン・APJ 発現量をリアルタイム PCR 法やウエスタンブロット法、免疫染色で比較する。

**siRNA 法によってヒト線維芽細胞のアペリンの発現を抑制したときに、線維化に関与する因子(1型コラーゲン量、CTGF、TGF- $\beta$ 、MMP-1、TIMP、 $\alpha$ SMA など)の発現が亢進するのかどうか明らかにする。**

培養ヒト皮膚線維芽細胞における線維化変化(1型コラーゲン産生能、細胞増殖能など)におけるアペリンの役割について検討を行う。正常由来線維芽細胞を用いて、siRNA 法によるアペリンの発現抑制を行い、線維化に関与する因子(1型コラーゲン量、CTGF、TGF- $\beta$ 、MMP-1、TIMP、 $\alpha$ SMA など)の発現をリアルタイム PCR 法で検討する。

**アペリン蛋白による刺激によって線維芽細胞の線維化を抑制できるか明らかにする。**

アペリン蛋白を培養線維芽細胞に添加して線維化に与える影響を調べる。正常及び強皮症患者由来皮膚線維芽細胞は TGF- $\beta$  刺激によって線維化が誘導されることが知られているが、この TGF- $\beta$  刺激下でアペリン蛋白を低濃度から高濃度の様々な条件で添加、培養し、線維化に関与する因子(1型コラーゲン量、CTGF、TGF- $\beta$ 、MMP-1、TIMP、 $\alpha$ SMA など)の発現を検討する。

**in vivo モデルを用いてアペリンによる線維化の制御、役割を明らかにする。**

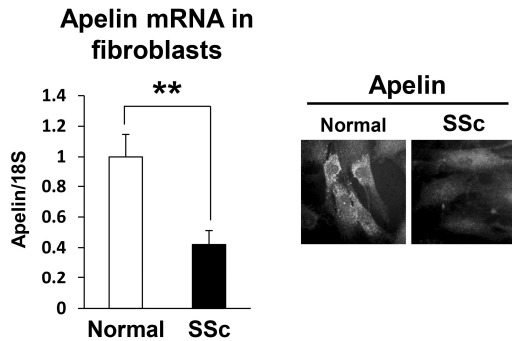
プレオマイシン誘導皮膚線維化マウスの皮膚硬化部にアペリンを注射してアペリンによる線維化の抑制効果について検討する。皮膚より RNA を抽出してリアルタイム PCR 法にて線維化に関する因子(TGF- $\beta$ 、1型コラーゲン、CTGF、 $\alpha$ SMA、MMP-1 など)の発現を比較する。免疫染色にて、硬化部に浸潤する細胞の種類や数の比較も行う。

## 4. 研究成果

**健常人由来線維芽細胞と強皮症患者由来線維芽細胞のアペリン・APJ 発現量を比較する。**

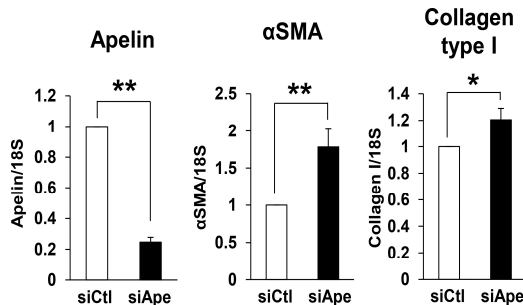
強皮症由来線維芽細胞のアペリンの発現(mRNA 量や蛋白量)は正常人由来線維芽細胞と比べて有意に低下していることを見出した(次ページ図参照)。一方、APJ の発現量に差はみられなかった。また、線維化に関与する SMA、1型コラーゲン、TIMP-1 の産生

量を定量し、強皮症由来線維芽細胞でいずれの産生量も増加していることを確認した。この結果より、皮膚線維芽細胞の線維化にアペリンが抑制的に働いている可能性が示唆された。



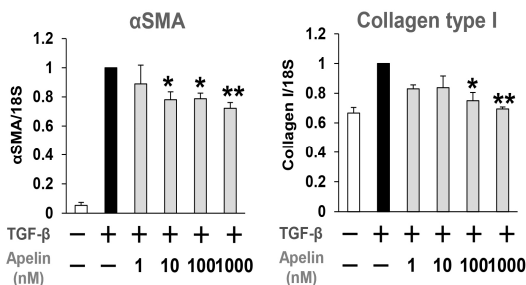
**siRNA 法によってヒト線維芽細胞のアペリンの発現を抑制したときに、線維化に関与する因子(1型コラーゲン量、CTGF、TGF- $\beta$ 、MMP-1、TIMP、 $\alpha$ SMA など)の発現が亢進するのかどうか明らかにする。**

アペリンの線維化への抑制性制御を解明するために正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。その結果、siRNA 法によるアペリンの発現抑制によって、正常ヒト線維芽細胞の $\alpha$ SMA、I型コラーゲン、スフィンゴシンキナーゼ1 (SPHK1) の発現が亢進した。(下図参照)



**アペリン蛋白による刺激によって線維芽細胞の線維化を抑制できるか明らかにする。**

TGF- $\beta$  刺激による $\alpha$ SMA、I型コラーゲン、SPHK1 の発現亢進はアペリンの添加によって濃度依存性に抑制された。これらの結果より、アペリンは、TGF- $\beta$  刺激による線維化に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。



### **in vivo モデルを用いてアペリンによる線維化の制御、役割を明らかにする**

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスに対するアペリン投与の影響についても検討した。その結果、プレオマイシンによって生じた皮膚線維化がアペリン腹腔内投与によって抑制された。また、線維化部位におけるIL-6、TGF- $\beta$ 、CTGFのmRNA量はアペリンの投与によって抑制された。これらの結果より、in vivo においてもアペリンが線維化を抑制する可能性が示唆された。

### **考案**

アペリンが心臓の線維化を亢進させることや、肺高血圧症の血管周囲の線維化に関与することが報告されているが、皮膚における線維化における役割は明らかになっていない。今回、我々は強皮症患者皮膚線維芽細胞を用いて検討を開始した。その結果、強皮症由来線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下していた。一方、APJの発現量に変化はなかった。

アペリンの線維化への抑制性制御を解明するために正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。その結果、siRNA 法によるアペリンの発現抑制によって、正常ヒト線維芽細胞の $\alpha$ SMA、I型コラーゲン、SPHK1の発現が亢進した。また、TGF- $\beta$  刺激による $\alpha$ SMA、I型コラーゲン、SPHK1の発現亢進はアペリンの添加によって抑制された。これらの結果より、アペリンは、TGF- $\beta$  刺激による線維化に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。

最後に、プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスにおいて、プレオマイシンによって生じた皮膚線維化がアペリン投与によって抑制されることを示した。アペリンが強皮症の抗線維化に対する治療に応用できる可能性が示唆された。

今回の研究結果より、強皮症線維芽細胞ではアペリンの産生が抑制されていると考えられる。また、強皮症の皮膚硬化部位では脂肪細胞が減少しているため、アペリン産生が低下していることも線維化に寄与している可能性がある。強皮症の皮膚硬化部位では、アペリンの産生低下によってアペリンによるTGF- $\beta$ シグナルの抑制が減弱し、線維化亢進につながっている可能性が示唆された。

### **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)  
なし

〔学会発表〕(計1件)

Yokoyama Y, Ogino S, Uchiyama A, Yamada K, Uehara A, Ishikawa O, Motegi S.

Inhibitory regulation of apelin on fibrosis in systemic sclerosis.

The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology

2015 年 12 月 11 日 ~ 2015 年 12 月 13 日,  
Okayama

6 . 研究組織

(1)研究代表者

横山 洋子 (YOKOYAMA Yoko)

群馬大学・医学部・技術専門職員

研究者番号 : 00241901