

令和元年6月10日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10165

研究課題名(和文)線維化におけるTGF- 情報伝達の関与についての研究

研究課題名(英文)The investigation on the involvement of TGF-beta signal transduction in fibrosis

研究代表者

尹 浩信 (IHN, HIRONOBU)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：20282634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：線維化の代表的疾患である全身性強皮症の皮膚組織と培養線維芽細胞、integrin V 5 stable transfectant、TSP-1 stable transfectantを用いて DNA microarray 法にて過剰発現/発現低下する分子を同定した。micro RNA array によって過剰発現/発現低下するmicro RNAを同定した。これらのmicro RNA の機能を正常皮膚線維化細胞に導入して検討した。線維芽細胞特異的 TSP-1 transgenic mouseを確立し、皮膚、肺、肝を病理組織学的に検討し、phenotypeの解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維化の機序は未だ明らかでなく、線維化の治療も未だ確立せず、本邦においても、世界中でも多くの方が線維化を伴う疾患に罹患し、苦しみ、また結果として死を迎えている。線維化は、TGF およびTGF 情報伝達の関与が考えられているが、その詳細は明らかではない。本研究により、線維化に対するTGF 情報伝達の関与が詳細に明らかになれば、線維化治療のターゲット明らかになり、線維化治療法の開発が進み、学術的にも社会的にも大きなインパクトがある。

研究成果の概要(英文)：We identified the molecules up-regulated or down-regulated with cDNA microarray analyses using skin sections and cultured dermal fibroblasts from patients with systemic sclerosis (SSc). We also identified microRNAs up-regulated or down-regulated with microRNA array analyses in SSc. We identified the such molecules in integrin V 5 stable transfectants and TSP-1 stable transfectants. And we investigated the function of these microRNAs. We established TSP-1 transgenic mice using collagen promoter/ enhancer, and confirmed the extent of the over-expression of it in each organ. We investigated the skin, lung, and liver histologically, and investigated the expression of various molecules. And we investigated the existence of M2 macrophages and the expression of B cell markers, Th2 cytokine, and interleukin-17

研究分野：皮膚科学

キーワード：遺伝子 細胞・組織 シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

線維化は種々の疾患の諸臓器において認められ、各臓器の線維化には共通の機序が存在するものと考えられている。しかしながら、線維化における TGF- β 情報伝達経路活性化の詳細な機序はかなり明らかとなっているが、いまだその全貌は明らかとは言いえない。本研究では(1)線維化病変において異常発現する DNA、mRNA、microRNA、情報伝達分子を同定し、その機能や細胞外マトリックス、サイトカインやインテグリンとの相互作用を検討するとともに、(2) collagen promoter/ enhancer を用いた線維芽細胞特異的 TSP-1 transgenic mouse を用いて線維化の in vivo の新規モデルを作成し、それらの分子の機能も検討したい。(3) また我々の最近の研究で、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性全身性強皮症患者の DNA サンプルを収集し genome-wide association study (GWAS) を行って全身性強皮症疾患感受性遺伝子であることが明らかになった XVI 型コラーゲン遺伝子の線維化への関与も明らかにしたい。

2. 研究の目的

線維化は全身性強皮症、肺線維症、肝硬変、腎硬化症、動脈硬化などの諸臓器において認められ、各臓器の線維化には共通の機序が存在するものと考えられている。線維化は血管障害やリンパ球活性化に始まり、各種サイトカイン、インテグリン、細胞-細胞外マトリックス相互作用による線維芽細胞の活性化による細胞外マトリックス代謝調節亢進に至る可能性が示唆されている。線維化病変部の線維芽細胞は細胞外マトリックスの過剰産生、分解阻害物質である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) の過剰発現、分解物質である matrix metalloproteinase (MMP) の産生低下が報告され、TGF- β が線維化において主要な役割を果たしていると考えられる(1)。しかしながら線維化病変部の TGF- β の発現は変化せず(1)、申請者らは autocrine TGF- β loop 仮説 (TGF- β の発現は変化せず TGF- β 情報伝達系が活性化していることにより細胞外マトリックス合成が亢進している) という全く新しい仮説を提唱し、注目を集めている(1)が、線維化における TGF- β 情報伝達経路活性化の詳細な機序は未だ明らかとなっていない。

線維化における TGF- β 情報伝達経路活性化の機序を検討して、申請者は現在までに TGF- β 受容体過剰発現、Smad7/Smurf の機能低下、integrin α V β 5 過剰発現とトロンボスポンジン-1 (TSP-1) 過剰発現の線維化の病因への関与を証明した。

しかしながら、これらの分子がどのように線維化を形成するのか、相互作用で線維化を形成するのか、あるいは他の分子と協調して線維化を形成するのか、未だ明らかとなっていない。本研究では現在まで明らかとなっている線維化に関与する分子をあらためて明らかとし、その相互作用、細胞外マトリックス、各種サイトカインやインテグリンとの相互作用を検討し、線維化の機序を詳細に明らかにしたい。

(1) まず全身性強皮症、肝硬変、肺線維症の組織および病変部の培養線維芽細胞において DNA microarray 法にて過剰発現する分子、発現低下する分子を検討し、また micro RNA array によって過剰発現する micro RNA、発現低下する micro RNA を同定し、さらには情報伝達に関しては情報伝達 protein array を行い、それぞれ同定された分子の発現量、線維化におけるその機能、細胞外マトリックス、サイトカインやインテグリンとの相互作用について検討したい。

また integrin α V β 5 stable transfectant (線維化のモデルとしてエレクトロポレーション法を用いて線維芽細胞に integrin α V β 5 を恒常的に過剰発現させた細胞)、TSP-1 stable transfectant を用いて DNA microarray 法、realtime PCR を用いた micro RNA array 法、情報伝達 protein array を行い、線維化 phenotype を形成しているか、何が異なっているのか詳細に検討したい。

(2) 更には collagen promoter/ enhancer を用いた線維芽細胞特異的 TSP-1 transgenic mouse を用いて全身性強皮症、肝硬変、肺線維症の組織および病変部の培養線維芽細胞から同定された分子の発現量、線維化におけるその機能、サイトカインやインテグリンとの相互作用について検討し、さらに線維化においてその役割が注目されている M2 macrophage の存在や B 細胞表面マーカー、Th2 サイトカインや IL-17 の発現についても検討したい。

(3) また我々の最近の研究で、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性全身性強皮症患者の DNA サンプルを収集し genome-wide association study (GWAS) を行って全身性強皮症疾患感受性遺伝子であることが明らかになった XVI 型コラーゲン遺伝子の線維化への関与も明らかにしたい。

これらの研究は申請者の知る限り、本邦のみならず、他国においても全く行われていない研究であり、斬新・独創的な研究と考えられる。線維化に対しては既存の治療薬では効果が全くないかあるいは軽度改善を認める程度であり、新しい治療法の開発が求められている。この検討により、線維化の病態形成の機序の解明に繋がり、いまだ治療法のない線維化に対する選択的に同定された分子を阻害することによって副作用の少ない線維化の新しい治療法や低分子化合物などの医薬品の開発に繋がる可能性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

1) 線維化病変部から得られた培養線維芽細胞、integrin α V β 5 stable transfectant、TSP-1 stable transfectant を用いて、異常発現する DNA、microRNA、情報伝達分子を同定し、その

機能や TGF- 受容体や TGF- 情報伝達経路 (Smad2、Smad3、Smad4、p300/CBP、p38 MAPK、PI3 kinase) との interaction や種々の integrin との相互作用について検討した。2) 更には collagen promoter/enhancer を用いた線維芽細胞特異的 TSP-1 transgenic mouse を用いて上記の実験で新規に同定された分子の発現量、線維化におけるその機能、TGF- 受容体や TGF- 情報伝達経路との interaction や種々の integrin との相互作用についても検討した。3) 我々の最近の研究で、全身性強皮症疾患感受性遺伝子であることが明らかになった XVI 型コラーゲン遺伝子の線維化への関与も研究した。

4 . 研究成果

線維化の代表的疾患である全身性強皮症の皮膚組織および硬化病変部からの培養皮膚線維芽細胞を用いて DNA microarray 法にて過剰発現する分子および発現低下する分子を同定した。また micro RNA array によって過剰発現する micro RNA、発現低下する micro RNA を同定した。その中でも miR-150、miR-196a が線維化に重要な micro RNA であることが明らかとなり、これらの micro RNA の機能を重点的に検討している。さらに、integrin α 5 stable transfectant (線維化のモデルとしてエレクトロポレーション法を用いて、線維芽細胞に integrin α 5 を恒常的に過剰発現させた細胞) TSP-1 stable transfectant を用いて DNA microarray 法、realtime PCR を用いた micro RNA array 法を行い、過剰発現する分子、発現低下する分子を同定し、さらには過剰発現する micro RNA、発現低下する micro RNA を同定した。これらの micro RNA 機能を正常皮膚線維芽細胞に導入して検討した。

また、collagen promoter / enhancer を用いた線維芽細胞特異的 TSP - 1 transgenic mouse を確立し、各臓器に TSP - 1 が overexpression しているか、またその程度も確認した。さらには、皮膚、肺、肝を病理組織学的に検討し、線維化で重要と考えられる分子の発現量等検討を行い、phenotype の解析を行っている。

さらに線維化においてその役割が注目されている M2 macrophage の存在や B 細胞表面マーカー、Th2 サイトカインや IL-17 の発現についても検討した。

線維化を形成するのに重要な分子、microRNA の候補を明らかにすることが出来たので、これらの分子あるいは microRNA の機能や線維化における役割を今後明らかにし、更に分子間 interaction を解析するための基盤が確立出来た。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 32 件)

- (1) Ogata-Aoki H, Higashi-Kuwata N, Hattori SI, Hayashi H, Danish M, Aoki M, Shiotsu C, Hashiguchi Y, Hamada A, Kobayashi H, Ihn H, Okada S, Mitsuya H. Raltegravir blocks the infectivity of red-fluorescent-protein (mCherry)-labeled HIV-1JR-FL in the setting of post-exposure prophylaxis in NOD/SCID/Jak3-/- mice transplanted with human PBMCs. *Antiviral Res*, 149: 78-88, 2018. 査読あり
doi: 10.1016/j.antiviral.2017.09.003.
- (2) Yamamoto Y, Makino T, Kudo H, Ihn H, Murakami Y, Matsufuji S, Fujiwara K, Shin M. Expression and distribution patterns of spermine, spermidine, and putrescine in rat hair follicle. *Histochem Cell Biol*, 149: 161-167, 2018. 査読あり
doi: 10.1007/s00418-017-1621-1.
- (3) Inoue M, Miyashita A, Noguchi H, Hirose N, Nishimura K, Masuda M, Ihn H. Case report of cutaneous protothecosis caused by *Prototheca wickerhamii* designated as genotype 2 and current status of human protothecosis in Japan. *J Dermatol*, 45: 67-71, 2018. 査読あり doi: 10.1111/1346-8138.14010.
- (4) Luong VH, Chino T, Oyama N, Matsushita T, Sasaki Y, Ogura D, Niwa SI, Biswas T, Hamasaki A, Fujita M, Okamoto Y, Otsuka M, Ihn H, Hasegawa M. Blockade of TGF- β /Smad signaling by the novel small compound HHP-15 ameliorates experimental skin fibrosis. *Arthritis Res Ther*, 20: 46, 2018. 査読あり
doi: 10.1186/s13075-018-1534-y.
- (5) Okiyama N, Asano Y, Hamaguchi Y, Jinnin M, Motegi S, Koizumi H, Hasegawa M, Ishikawa O, Sato S, Takehara K, Yamamoto T, Fujimoto M, Ihn H. Impact of a new simplified disability scoring system for adult patients with localized scleroderma. *J Dermatol*, 45: 431-435, 2018. 査読あり doi: 10.1111/1346-8138.14214.
- (6) Sawamura D, Jinnin M, Inoue K, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H. Regulatory mechanisms of collagen expression by interleukin-22 signaling in scleroderma fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 90: 52-59, 2018. 査読あり doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.12.017
- (7) Ikeda I, Igata T, Ihn H. First aid for skin tears by mini patch grafting from the flap edge. *J Emerg Med*, 54: 514-515, 2018. 査読あり
doi: 10.1016/j.jemermed.2017.12.017

- (8) Noda-Yamashita T, Kajihara I, Kidou M, Ihn H. Dyskeratosis congenita associated with congenital hypothyroidism. *J Dermatol*, 45: e76-e77, 2018. 査読あり
doi: 10.1111/1346-8138.14109
- (9) Sonoda-Shimada K, Kajihara I, Shimada S, Igata T, Jinnin M, Honda Y, Ihn H. Case of pigmented lipofibromatosis in a 27-year-old woman. *J Dermatol*, 45: e128-e129, 2018. 査読あり doi: 10.1111/1346-8138.14147.
- (10) Kanamori S, Kajihara I, Kanazawa-Yamada S, Otsuka-Maeda S, Ihn H. Expression of aurora kinase A in dermatofibrosarcoma protuberans. *J Dermatol*, 45: e507-e508, 2018. 査読あり doi: 10.1111/1346-8138.14235.
- (11) Sawamura S, Jinni M, Kajihara I, Makino K, Aoi J, Ichihara A, Makino T, Fukushima S, Ihn H. Do scleroderma patients look young?: Evaluation by using facial imaging system. *Drug Discov Ther* 11: 342-345, 2018. 査読あり doi: 10.5582/ddt.2017.01059.
- (12) Asano Y, Jinnin M, Kawaguchi Y, Kuwana M, Goto D, Sato S, Takehara K, Hatano M, Fujimoto M, Mugii N, Ihn H. Diagnostic criteria, severity classification, and guidelines of systemic sclerosis. *J Dermatol*, 45: 633-691, 2018. 査読あり
doi: 10.1111/1346-8138.14162.
- (13) Shimada S, Fukushima S, Niimori D, Miyashita A, Setoyama H, Sasaki Y, Ihn H. Dabrafenib and trametinib combination therapy safely performed in a patient with metastatic melanoma after severe liver toxicity due to vemurafenib. *J Dermatol*, e157-e158, 2018. 査読あり doi: 10.1111/1346-8138.14206.
- (14) Sawamura S, Makino T, Johno T, Yamashita J, Niimori D, Fukushima S, Ihn H. Severe bacterial sepsis results in delayed diagnosis of tuberculous lymphadenitis in a rheumatoid arthritis patient treated with adalimumab. *Intractable Rare Dis Res*, 7: 138-140, 2018. 査読あり doi: 10.5582/iridr.2018.01050.
- (15) Asano Y, Fujimoto M, Ishikawa O, Sato S, Jinnin M, Takehara K, Hasegawa M, Yamamoto T, Ihn H. Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of localized scleroderma. *J Dermatol*, 45: 755-780, 2018. 査読あり doi: 10.1111/1346-8138.14161.
- (16) Jinnin M, Yamamoto T, Asano Y, Ishikawa O, Sato S, Takehara K, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H. Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of eosinophilic faciiitis. *J Dermatol*, 45: 881-890, 2018. 査読あり
doi: 10.1111/1346-8138.14160.
- (17) Hasegawa M, Ishikawa O, Asano Y, Sato S, Jinnin M, Takehara K, Fujimoto M, Yamamoto T, Ihn H. Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of lichen sclerosus et atrophics. *J Dermatol*, 45: 891-897, 2018. 査読あり
doi: 10.1111/1346-8138.14171.
- (18) Noguchi H, Matsumoto T, Hiruma M, Asao K, Hirose M, Fukushima S, Ihn H. Topical efinazonazole: A promising therapeutic medication for tinea unguium. *J Dermatol*, 45: 1225-1228, 2018. 査読あり doi: 10.1111/1346-8138.14575.
- (19) Tsukamoto H, Fujieda K, Miyashita A, Fukushima S, Ikeda T, Kubo Y, Senju S, Ihn H, Nishimura Y, Oshiumi H. Combined Blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 Signaling Abrogates Mutual Regulation of Their Immunosuppressive Effects in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res*, 78: 5011-5022, 2018. 査読あり
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0118.
- (20) Yamashita T, Jinnin M, Makino K, Kajihara I, Aoi J, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H. Serum cytokine profiles are altered in patients with progressive infantile hemangioma. *BioScience Trends*, 12: 438-441, 2018. 査読あり
doi: 10.5582/bst.2018.01118.
- (21) Hirose M, Noguchi H, Yaguchi T, Matsumoto T, Hiruma M, Fukushima S, Ihn H. Onychomycosis caused by *Aspergillus subramaniani*. *J Dermatol*, 45: 1362-1366, 2018. 査読あり doi: 10.1111/1346-8138.14616.
- (22) Noguchi H, Matsumoto T, Hiruma M, Asao K, Hirose M, Fukushima S, Ihn H. Topical efinaconazole: A promising therapeutic medication for tinea unguium. *J Dermatol*, 45: 1225-1228, 2018. 査読あり doi: 10.1111/1346-8138.14575.
- (23) Miyamura T, Kajihara I, Makino K, Ihn H. Sweet 's syndrome with laryngoparalysis due to laryngitis. *J Dermatol*, 45: e295-e296, 2018. 査読あり
doi: 10.1111/1346-8138.14351.
- (24) Sawamura S, Niimori D, Ihn H. A case of leg cellulitis caused by multidrug-resistant *Streptococcus pseudoporcinus*. *Intractable Rare Dis Res*, 7: 280-282, 2018. 査読あり doi: 10.5582/iridr.2018.01110.
- (25) Tanoue Y, Toyoda T, Sun J, Tateishi C, Endo S, Motoyama N, Araki K, Wu D, Okuno Y, Tsukamoto T, Takeya M, Ihn H, Vaziri C, Tateishi S. Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure. *J Invest Dermatol*, 138: 2550-2557, 2018. 査読あり doi: 10.1016/j.jid.2018.05.015.

- (26) Takamatsu K, Nakane S, Suzuki S, Kosaka T, Fukushima S, Kimura T, Miyashita A, Mukaino A, Yamakawa S, Watanabe K, Jinnin M, Komohara Y, Ihn H, Ando Y. Immune checkpoint inhibitors in the onset of myasthenia gravis with hyperCKemia. *Ann Clin Transl Neurol*, 5: 1421-1427, 2018. 査読あり doi: 10.1002/acn3.654.
- (27) Fujisawa Y, Funakoshi T, Nakamura Y, Ishii M, Asai J, Shimauchi T, Fujii K, Fujimoto M, Katoh N, Ihn H. Nation-wide survey of advanced non-melanoma skin cancers treated at dermatology department in Japan. *J Dermatol Sci*, 92: 230-236, 2018. 査読あり doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.10.004.

〔学会発表〕(計 56 件)

- (1) Tsuruta-Kadohisa M, Fukushima S, Miyashita A, Aoi J, Kubo Y, Nakahara S, Kuriyama H, Kimura T, Ihn H. The novel diagnostic system to distinguish melanoma from nevus using droplet digital PCR. 2018.5.16-19 International Investigative Dermatology (Orland, Florida)
- (2) Miyashita A, Fukushima S, Nakahara S, Kubo Y, Tokuzumi A, Tsuruta-Kadohisa M, Kimura T, Kuriyama H, Ihn H. Pretreatment serum CTLA-4 is a potential biomarker of a risk of immune-related adverse events in metastatic melanoma. 2018.5.16-19 International Investigative Dermatology (Orland, Florida)
- (3) Fukushima S, Inamori Y, Kubo Y, Nakahara S, Miyashita A, Kadoshita M, Tokuzumi A, Masuguchi S, Niimori D, Jinnin M, Ihn H. Serum levels of soluble programmed death-ligand 1 in patients with metastatic melanoma treated with anti-programmed death-ligand 1 antibodies. 2018.6.13-15 The 13 th Meeting of German-Japanese Society of Dermatology (Munich)
- (4) Jinnin M, Fukushima S, Ihn H. Long-term observation of dermoscopic findings in patients with infantile hemangioma. EADC 2018.6.20-23 East Asia Dermatology Congress (Kunming, China)
- (5) Isei T, Yokota K, Uhara H, Fujisawa Y, Takenouchi T, Kiyohara Y, Uchi H, Saruta H, Ihn H, Inozume T, Watanabe D, Takahashi A, Fukushima S, Tanaka M, Yamazaki N. Topline results from phase II of combination treatment with canerpatorev (HF10), an oncolytic viral immunotherapy, and ipilimumab in patients with unresectable or metastatic melanoma after anti-PD-1 therapy. 2018. 10. 19-23 ESMO 2018 (Munich, Germany)

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 尹浩信 他、金原出版、創傷・褥瘡・熱傷ガイドライン、2018、352

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。