

令和元年6月10日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06973

研究課題名(和文)全身性強皮症の皮膚線維化におけるトロンボスポンジン1の役割の検討

研究課題名(英文)The role of thrombospondin 1 to the excessive production of type I collagen in systemic sclerosis

研究代表者

牧野 雄成(Makino, Katsunari)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任助教

研究者番号：00433037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症とは、皮膚の硬化を主体として、多臓器にも線維化を生じ得る疾患である。皮膚の硬化部位ではⅠ型コラーゲンなどの過剰な産生が生じているが、なぜこの過剰な線維化が生じているかはまだ明らかになっていない。本研究では、トロンボスポンジン1(TSP1)という蛋白が、過剰な線維化に関与していると推測し、TSP1を高発現するマウス(TSP1トランスジェニックマウス)を作成して検討を行った。しかしTSP1トランスジェニックマウスでは、Ⅰ型コラーゲンのmRNAの発現は正常マウスと比較して差がなかった。しかしTSP1については別の視点から、さらなる検討を行う必要があると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症とは、皮膚の硬化を主体として、多臓器にも線維化を生じ得る疾患である。皮膚の硬化部位ではⅠ型コラーゲンなどの過剰な産生が生じているが、なぜこの過剰な線維化が生じているかはまだ明らかになっていない。本研究では、トロンボスポンジン1(TSP1)という蛋白が、過剰な線維化に関与していると推測し、TSP1を高発現するマウス(TSP1トランスジェニックマウス)を作成して検討を行った。しかしTSP1トランスジェニックマウスでは、Ⅰ型コラーゲンのmRNAの発現は正常マウスと比較して差がなかった。しかしTSP1については別の視点から、さらなる検討を行う必要があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is characterized by excess deposition of collagen and tissue fibrosis in the skin. Little is known about the exact mechanism which mediates the excessive collagen expression in these disorders. In this study, we evaluated the possibility that thrombospondin-1 play some roles in the pathogenesis of fibrosis in SSc. We generated transgenic mice expressing thrombospondin-1 and analyzed the mRNA expression in the skin of those mice. Contrary to expectations, the col1a1 and col1a2 mRNA levels in the skin of transgenic mice were not different from control mice. Further studies are needed to investigate the role of thrombospondin-1 in SSc.

研究分野：皮膚科学

キーワード：thrombospondin 1 systemic sclerosis fibrosis

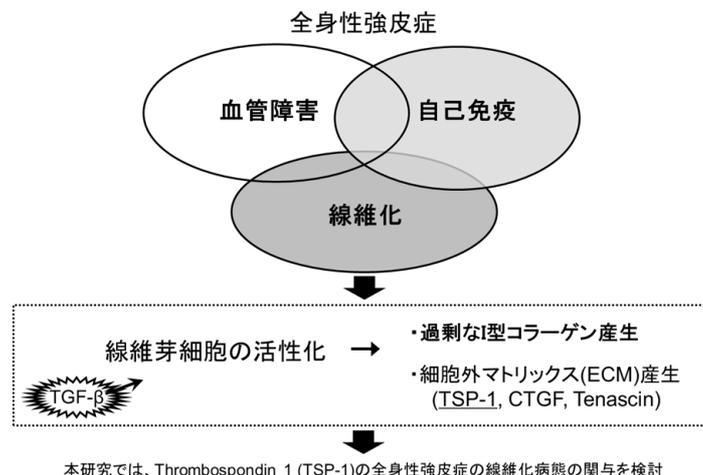
1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症とは、皮膚の硬化を主症状とし、皮膚だけでなく心臓、肺、腎臓、消化管など多臓器にも線維化を生じうる疾患である。血管障害、自己免疫異常、代謝異常などが相互に関連して病態が形成されると考えられているが病因ははまだ明らかになっていない。全身性強皮症の硬化皮膚では、活性化された線維芽細胞が過剰に I 型コラーゲンを産生することが硬化の主要因とされる(Allanore Y et al. Nat Rev Dis Primers 2015)。そのため、線維芽細胞において過剰な I 型コラーゲンの産生が起こる機序や、過剰な I 型コラーゲンの産生を抑制する方法は、治療への応用が期待される点からも過去精力的に研究されてきた。これまでに申請者も、I 型コラーゲンのレセプターである discoidin domain receptor 2 (DDR2) や、I 型コラーゲンを標的とする microRNA let-7a が、全身性強皮症の過剰な I 型コラーゲン産生に関与していることを報告している(Makino K et al. J Invest Dermatol 2013)。

全身性強皮症の皮膚線維芽細胞が過剰な I 型コラーゲンを産生する機序として、最も重要と考えられるシグナルは transforming growth factor β (TGF- β) と考えられている(Lafyatis R. Nat Rev Rheumatol. 2014)。全身性強皮症の皮膚線維芽細胞は、健常人の皮膚線維芽細胞と比較して過剰に TGF- β シグナルが加わったような振る舞いをするとされる。そして一般的に TGF- β は、線維芽細胞において強力に I 型コラーゲン産生を誘導する。こうした過剰な TGF- β シグナルは、全身性強皮症のみならず、肺、肝臓、心臓、腎臓など様々な臓器における線維化病態でも報告されている。従って全身性強皮症の硬化病態において、何が TGF- β シグナルに影響を与えるのかを検討することは重要であり、本研究では、細胞外マトリックスであるトロンボスポンジン 1 (Thrombospondin 1, TSP1) に注目した。

TSP1 は細胞外マトリックスとして、細胞間の情報伝達や血管新生への関与が報告されている。全身性強皮症の皮膚線維芽細胞では、TSP1 の発現上昇が報告されており、また皮膚組織における TSP1 の上昇はバイオマーカーとしても報告されている(Rice LM et al. Arthritis Rheumatol 2015)。重要な点は、TSP1 が潜在型 TGF- β を活性化すると報告されていることである。そのため全身性強皮症における過剰な TSP1 産生は、TGF- β の活性化を介するなどの機序によって、過剰な I 型コラーゲン産生に関与していると推測される。線維芽細胞は、皮膚において TSP1 を産生する主な細胞の一つである。申請者らは、線維芽細胞に代表される I 型コラーゲン 2 鎖を発現する細胞において TSP1 が過剰産生されるトランスジェニックマウスの作成を行い、本マウスにおいて線維化が生じるかどうか検討を行うなど、全身性強皮症における TSP1 の役割について検討を行うことが必要であると考えた。

本研究の特色として、全身性強皮症の皮膚硬化のバイオマーカーとして知られる TSP1 が、単独で皮膚硬化を起こすかどうか、また強皮症モデルマウスにおける皮膚硬化を増強するかどうかを、申請者ら独自のトランスジェニックマウスで行う点があげられる。本研究を通して、全身性強皮症の硬化皮膚において過剰な TSP1 の発現が硬化の進展に関与することが判明すれば、全身性強皮症の皮膚硬化にたいする治療へのターゲットとして TSP1 が候補の一つとなり、実際の治療につながる基礎研究になり得ると考えられた。



本研究では、Thrombospondin 1 (TSP-1)の全身性強皮症の線維化病態の関与を検討

2. 研究の目的

上記の背景で述べたように、全身性強皮症において皮膚硬化は最も重要な症状であり、硬化皮膚では活性化した線維芽細胞から過剰なⅠ型コラーゲン産生が生じている。細胞外マトリックスであるトロンボスポンジン 1 (thrombospondin 1, TSP1)は全身性強皮症の皮膚硬化のバイオマーカーであることが過去に報告されている。本研究では、TSP1 が皮膚硬化に影響を与えるかどうか検討を行うため、Ⅰ型コラーゲンⅡ鎖依存性に TSP1 を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて研究を行い、全身性強皮症の線維化病態における TSP1 の関与について検討することを目的とした。

具体的には、自然状態において皮膚の硬化が生じるかどうか検討を行い、さらに全身性強皮症のマウス皮膚硬化モデルとして過去に報告された、アンジオテンシン II 持続投与により誘導されるマウスの皮膚硬化が、TSP1 トランスジェニックマウスで増強されるか評価する。また TSP1 マウスとコントロールマウスの皮膚の相違点を、RNA マイクロアレイなどを用いて比較する。一方、マウス皮膚から培養した皮膚線維芽細胞が過剰なⅠ型コラーゲンを産生するか検討を行う。さらに全身性強皮症患者の皮膚組織や培養皮膚線維芽細胞での TSP1 発現を確認するとともに、TSP1 マウスのマイクロアレイなどから得られた情報を患者検体でも同様に認めるか評価を行う。当初の予定では、研究期間に具体的には以下実験を行うことを検討した。

- 1)Ⅰ型コラーゲンⅡ鎖依存性に TSP1 を発現する、TSP1 トランスジェニックマウスを作成する。
- 2)TSP1 トランスジェニックマウスにおいて自然に皮膚硬化が生じるのか検討を行う。また皮膚以外の臓器の形態異常等をスクリーニングする。
- 3)強皮症のモデルマウスとして過去に報告された、アンジオテンシン II 持続投与による皮膚硬化誘導を、TSP1 トランスジェニックマウスに応用し、TSP1 トランスジェニックマウスにおいて皮膚硬化が増強されるか検討する。またアンジオテンシン II モデルマウスでは心臓の線維化も生じるため、心臓の線維化も同時に評価する。
- 4)2)や3)で得られたマウス皮膚組織から RNA を回収し、マイクロアレイの結果から gene set enrichment analysis(GSEA)解析等を行い、TSP1 トランスジェニックマウスではどのようなシグナルに影響を与えるのか検討する。
- 5)TSP1 トランスジェニックマウスの皮膚から皮膚線維芽細胞を分離し、Ⅰ型コラーゲンの発現や、TGF- β 刺激による線維化関連遺伝子の発現を、コントロールマウスの皮膚線維芽細胞と比較する。
- 6)全身性強皮症患者の皮膚組織や培養皮膚線維芽細胞での TSP1 発現上昇を確認する。またマイクロアレイにより得られた結果が、患者組織においても認めるか検討する。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、当初以下の研究方法を予定している。

a TSP1 トランスジェニックマウスの樹立

Ⅰ型コラーゲンⅡ鎖依存性に TSP1 を発現するトランスジェニックマウスの作成を行う。マウス作成に使用する DNA は、eGFP とⅠ型コラーゲンⅡ鎖プロモーター下に TSP1 を有する設計を予定しており、さらに TSP1 には Flag と His タグが付されている。F0 世代以降のマウスを樹立するため交配を繰り返し、ジェノタイピング用の PCR や皮膚組織からのウエスタンブロット等により TSP1 を高発現するマウスを選択する。

b.TSP1 トランスジェニックマウスにおける皮膚硬化の評価

TSP1 トランスジェニックマウスが自然状態で皮膚硬化を生じるか検討するため、生後 1 週間~3 ヶ月の間で皮膚を採取し、Ⅰ型コラーゲンが自然に増加していないかⅠ型コラーゲンの mRNA の発現比較を行う。また本マウスは過去に報告されていないマウスであるため、骨などⅠ型コラーゲンを豊富に含む組織を中心に、形態等に異常がないか表現型の確認を行う。次に自然状態での皮膚硬化の評価だけではなく、最近全身性強皮症の動物モデルとして報告されたアンジオテンシン II 持続投与による皮膚硬化モデルを使用する。アンジオテンシン II モデルでは、アンジオテンシン II の溶解液を充填した浸透圧ポンプをマウス皮下に留置し、持続的なアンジオテンシン II 投与を可能とする。2 週間後、ポンプ付近の皮膚では皮膚硬化が誘導されて

いる。TSP1 トランスジェニックマウスにアンジオテンシン モデルを適応し、TSP1 トランスジェニックマウスで皮膚硬化がより増強されるかヒドロキシプロリンアッセイにより皮膚硬化を評価する。

c TSP1 トランスジェニックマウスにおける TGF- β 関連シグナルの評価

TGF- β は、線維芽細胞におけるコラーゲン産生という主要な役割を、線維化病態において担っている。申請者は、TSP1 は TGF- β シグナルに影響を与えると推測している。そのため、組織からの qPCR 法や、smad 等の免疫染色を行い、TSP1 トランスジェニックマウスにおいて TGF- β の下流シグナルが増強されているか評価を行う。

d マウス皮膚からの RNA マイクロアレイと gene set enrichment analysis(GSEA) 解析

自然状態やアンジオテンシン 刺激された TSP1 トランスジェニックマウスの皮膚組織から RNA を回収し、RNA マイクロアレイを用いてコントロール皮膚組織と比較する。得られたマイクロアレイデータは、Reactome などを用いた gene set enrichment analysis(GSEA) 解析を行い、TSP1 の過剰発現がどのようなパスウェイに影響を与えるのか検討する。

e TSP1 トランスジェニックマウスの培養皮膚線維芽細胞での Ⅰ型コラーゲンの発現

TSP1 トランスジェニックマウスの背部皮膚より、collagenase を用いた方法により皮膚線維芽細胞を培養する。TSP1 トランスジェニックマウスの線維芽細胞では TSP1 は高発現していると推測されるが、線維芽細胞における Ⅰ型コラーゲン発現を qPCR やウエスタンブロット法によりコントロールと比較する。また Ⅰ型コラーゲン以外にも、CCN2 といった profibrotic gene の発現についても同様に評価する。

f 全身性強皮症患者の皮膚組織、培養皮膚線維芽細胞における TSP1 の発現

全身性強皮症患者の皮膚組織や、培養皮膚線維芽細胞における TSP1 の発現を免疫染色やウエスタンブロット法により確認する。

g 全身性強皮症患者における TSP1 関連シグナルの評価

TSP1 トランスジェニックマウスから得られたマイクロアレイ解析の中で、増加または減少しているターゲットを認めた場合、それが全身性強皮症患者の皮膚組織や培養皮膚線維芽細胞でも認められるか検討を行う。

4. 研究成果

Ⅰ型コラーゲン 2 鎖依存性に TSP1 を発現するトランスジェニックマウスの作成を行った。マウス作成に使用した DNA には eGFP を付し、Ⅰ型コラーゲン 2 鎖プロモーター下に TSP1 が発現される設計とし、さらに TSP1 の前後に Flag と His タグを付した。得られた TSP1 トランスジェニックマウスから回収した皮膚より RNA を抽出し、Ⅰ型コラーゲンの 1 鎖と 2 鎖の mRNA (col1a1、col1a2) について、コントロールマウスの皮膚と qPCR 法において比較を行った。TSP1 トランスジェニックマウスでは、Ⅰ型コラーゲンの 1 鎖と 2 鎖の mRNA (col1a1、col1a2) が増加している予想であったが、予想に反してコントロールマウスとの差がみられなかった。また、TSP1 トランスジェニックマウスに明らかな形態異常は現時点で認めていない。今後、TSP1 トランスジェニックマウスの長期経過によって皮膚硬化が出現するかどうかや、全身性強皮症の皮膚硬化モデルとして報告されている、アンジオテンシン II の持続皮下投与による皮膚硬化モデルにおいて、TSP1 トランスジェニックマウスで皮膚硬化が増悪するかについても検討を行う必要がある。現時点では、TSP1 トランスジェニックマウスの解析では有意義なデータが得られていないが、全身性強皮症の線維化病態における TSP1 の関与については、さらなる検討が必要と考えている。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。