

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790951

研究課題名(和文)

線維化における炎症性細胞の役割

研究課題名(英文)

The role of inflammatory cells in the process of fibrosis

研究代表者

安岡 秀剛 (YASUOKA HIDEKATA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60365260

研究成果の概要(和文):

線維化における炎症性細胞、特に単球の役割を追究した。まず線維化疾患の代表的な線維化疾患である強皮症で単球について解析した。強皮症末梢血単球は versican を高発現していた。versican は MCP-1 に結合し、単球の遊走を誘導したことから、versican は MCP-1 の貯蔵庫となり、局所への単球の浸潤を誘導することで、線維化に関与する可能性が考えられた。さらに単球の浸潤が先行する遺伝子改変マウスでその形質を調べた。遺伝子改変マウスでは先行する単球の浸潤ののちに線維化が生じている可能性が示唆された。以上より単球が線維化の機序に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文):

The aim of this study is to clarify the role of inflammatory cells in the process of fibrosis. We focused on monocytes, then we first examined the phenotype of circulating monocytes in systemic sclerosis (SSc), which is a prototype of fibrotic disease. In SSc monocytes, expression of versican, one of extracellular matrix components was upregulated. Versican was bound to MCP-1, and the versican-MCP-1 complex induced migration of monocytes effectively. Thus, versican serves as a reservoir of chemokine such as MCP-1 and migration of monocyte is induced via concentration gradient of MCP-1. Thus, migrated monocyte may be involved in the process of fibrosis. We then examined the role of monocytes infiltrated into the tissue, using a mouse model which induced massive migration of monocytes into tissues. We found that this mouse could induce deposition of extracellular matrices especially surrounding of infiltrating monocytes. These results suggest that monocytes play an important role in the process of fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：線維化、炎症、単球

## 1. 研究開始当初の背景

線維化は、創傷治癒の一過程であるが、過剰

な線維化が生じると正常組織が置換され、機能低下・喪失が生じる。過剰な線維化が生じることにより起きる代表的な疾患として、局

所に起きるものとしては特発性肺線維症 (IPF)、全身に起きるものとしては全身性強皮症 (SSc) がある。しかしながら、この病態を根治できる治療はいまだなく、臓器移植以外に方法がないのが現状である。いまだ予後が不良であることから、機序の解明と新たな治療法の確立が急務とされている。これまで線維化に関する研究は TGF- $\beta$ あるいは TGF- $\beta$ -Smad の系等に代表されるように単因子あるいは一つの系がその病態に関与する可能性が追究されてきた。しかし、いずれの系も単独ではその病態を制御できていないことから、複数の系あるいは身体のあるシステムが線維化を制御しているのではないかと仮説した。これまで SSc や IPF 病変部局所で線維化に先立ち、あるいは線維化とともに炎症性細胞浸潤が存在することが報告されている。また、これまで線維化に関与する細胞は線維芽細胞と考えられてきたが、近年、線維芽細胞の活性化にとどまらず、上皮細胞の分化転換、骨髄細胞や血液細胞から間葉系細胞へ分化した細胞など、線維芽細胞以外の系統の細胞が線維化に関与する可能性が示唆されている。特に、これまで線維化機序の追究がなされてきたが、多くの知見はサイトカインの一つである TGF- $\beta$ を軸とした系の関与を示すものであった。TGF- $\beta$ は線維芽細胞に作用し、ECM の産生を促すとともに線維芽細胞の増殖にも関わるとされ、線維化の主要制御因子と考えられてきた (Leask A. FASEB J, 2004)。しかし、*in vivo* ではTGF- $\beta$ 投与のみでは線維化を維持していくことはできず、(Takehara K. J Rheumatol, 2003)、また抗 TGF- $\beta$ 抗体を用いた SSc に対する臨床試験は線維化に対する効果がなかったこと (Denton CP et al. Arthritis Rheum, 2007)から TGF- $\beta$ のみで線維化の機序を説明するのは不十分と考えられるようになってきた。この中で線維化に共通して関わる現象として線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化(Zhang K et al. Am J Pathol, 1994)、および上皮細胞の間葉系細胞への分化が関与する可能性が示され(Lee JM et al. J Cell Biol, 2006)、線維芽細胞のみならず、他の lineage の細胞が線維化に関与する可能性が考えられてきた。間質性肺炎を伴う SSc 患者の気管支肺泡洗浄液でのリンパ球増加が示され、炎症性細胞の浸潤が線維化病変の進展への関与が示唆

されている(Harrison NK et al. Am Rev Respir Dis, 1991)、が炎症性細胞が線維化の誘導に必要な点については現在でも結論が出ていない難題である(Gauldie J and Strieter RM. Am J Respir Crit Care Med, 2002)。最近我々のグループでは、末梢血単球の一群に線維化に関与する細胞が存在する可能性も指摘している (Kuwana M et al. J Leukoc Biol, 2003) ことから、炎症性細胞、特に単球が線維化の機序に関与する可能性が考えられる。また線維化モデル動物でも単球が病態に関連する可能性を報告してきた (Yasuoka H et al. Am J Pathol, 2006, Yasuoka H et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009)

2 . 研究の目的

## 2 . 研究の目的

本研究では炎症性細胞、特に単球に着目し、それらが線維化疾患における役割についてまず明らかとし、単球が実際に線維化の過程に関与しているのか明らかとすることを目的とした。

## 3 . 研究の方法

(1) 線維化を来す代表的な疾患である強皮症患者の末梢血より末梢血単核球 (PBMC) を比重遠心法で分離したのち、magnetic beads 法で単球を抽出し、同様の方法を用いて抽出した健常人単球と比較した。

単球における遺伝子発現は強皮症の病態に関連すると想定される細胞外マトリクス・接着因子、ケモカイン・ケモカインレセプター、血管内皮細胞関連の遺伝子を含んだ330 遺伝子をスクリーニングできる oligo GE array® でスクリーニングし、半定量的および定量的 RT-PCR でスクリーニングで抽出された遺伝子の発現を確認した。蛋白発現は ELISA およびイムノプロットで解析し、デンシトメトリーをもちいて定量化した。さらに抽出された分子の線維化における役割を検討した。

(2) 単球が組織に浸潤することにより、線維化が実際に進行するか検討するために、単球の浸潤を認める遺伝子改変マウスを用い、そのマウスで単球の浸潤に引き続いて線維化が認められるか検討した。Hematoxylin-Eosin 染色および Masson-Trichrome 染色により、

組織学的に検討した。

#### 4. 研究成果

(結果)

(1) 強皮症末梢血単球では健常人と比較し、oligo GE array のスクリーニングではI型コラーゲン、CCR1、IL-8、MMP-2、CCRL2、versican、L-selectin、MCP-1が高発現していた。半定量的および定量的 PCR で確認すると、細胞外マトリクスの一つである versican 遺伝子と MCP-1 遺伝子が抽出された。蛋白レベルでの発現を確認すると、最終的に versican が高発現していることが明らかとなった。Versican を構成するコンドロイチン硫酸鎖 (CS) は、ケモカインや成長因子等と結合することが知られているが、強皮症ではケモカインの一つであるMCP-1 とその病態との関連が既に報告されている (Distler O et al. Arthritis Rheum, 2001)。そこで、CS が MCP-1 と結合する可能性を検討した。その結果、MCP-1 は CS に結合していることが示された。さらに MCP-1 は単球を遊走させるケモカインであることから、CS と結合した MCP-1も単球の遊走を促進するか、migration assay で検討した。その結果、CS と結合したMCP-1は単球の遊走を濃度依存性に促進した。さらに CS に結合した MCP-1 がプロテアーゼの分解から保護されているか、エラスターゼ、カテプシンG、トリプシン処理後の MCP-1 量をイムノプロットで検討した。CS に結合した MCP-1 はいずれのプロテアーゼによる分解から保護されていた。以上より、強皮症では局所で蓄積された versican が MCP-1 の貯蔵庫として働き、結果として形成される濃度勾配に従って単球が浸潤し、更なる線維化に関与する可能性が示唆された。更に MCP-1 はプロテアーゼの分解から保護されていたことから、この positive cycle が維持され、線維化を慢性的に進行させている可能性が示唆され、強皮症等の線維化疾患の病態に関連する可能性が考えられた。

(2) 浸潤した単球が、実際に線維化に関与しているか検証するために、単球の浸潤が先行する遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。ヘマトキシリンエオジン染色およびマッソントリクローム染色を行った結果、10週

令の時点で、野生型のマウスと比較し遺伝子改変マウスで単球の浸潤が実際に先行し、その周囲の間質に線維化が生じていることが明らかとなった。

(意義について)

これまで線維化に対する治療として、これまで副腎皮質ステロイドやシクロホスファミドを中心とした免疫抑制療法の効果が解析されてきたが、線維化に対し限定的な効果は認められるものの、予後を変えるだけの十分な効果は得られていなかった。またこれまで、炎症性細胞の存在が線維化病態へ直接的に関与する可能性についての報告はサイトカインやケモカイン、B細胞が線維化に重要な役割を果たす可能性についての報告があった。しかし包括的に炎症性細胞の存在そのもの、あるいは単球が線維化病態に関与する可能性の報告は極めて少なかった。

過去の我々の知見、本研究の結果、および過去の報告、すなわち強皮症の肺線維症病変部でリンパ球および形質細胞の浸潤を認めていたこと(Harrison NK et al. Am Rev Respir Dis, 1991) などから、炎症性細胞の存在が線維化病態へ関与する可能性は高いと考えられる。本研究では特に単球の浸潤が著明に認められるマウスで線維化が誘導されたことにより、単球系細胞が線維化疾患の病態に関与する可能性がある。またこのモデルを用いることにより明らかとなった、単球を介した線維化のメカニズムを元に新たな治療ターゲットの抽出を可能にできる可能性がある。さらに、従来の免疫抑制療法の意義を再検討することができる。と考える。

一方で、さらにこのモデルを用いることで、線維化に関与する線維芽細胞以外の系統の細胞への影響も解析することができる。将来はそれら知見を実際にヒトの疾患にフィードバックし、新たな治療法の樹立、あるいは従来の免疫抑制療法を含めた治療の適応など、これまでより一歩進んだ治療効果のある選択肢を選ぶことができる可能性があり、線維化疾患の新たなブレイクスルーとなる可能性がある。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計2件)

- 1) Yasuoka H. et al. Upregulated expression of versican in monocytes from patients with systemic sclerosis: role in amplification of monocytes-chemoattractant protein-1 (MCP-1) activity at site of fibrosis. 1<sup>st</sup> Systemic Sclerosis World Congress. Feb 12th, 2010, Florence, Italy.
- 2) Yasuoka H. et al. Upregulated versican in monocytes from patients with systemic sclerosis: Role in Amplification of monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) activity at site of fibrosis. Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology. Oct 20th, 2009, Philadelphia, PA, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

安岡 秀剛 (YASUOKA HIDEKATA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60365260

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし