

機関番号：87301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791082

研究課題名(和文) ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスにおける細胞接着分子の解析

研究課題名(英文) Cell adhesion molecules regulate fibrotic process in a bleomycin-induced scleroderma model.

研究代表者

吉崎 歩 (YOSHIZAKI AYUMI)

長崎医療センター・皮膚科・医師

研究者番号：40530415

研究成果の概要(和文)：L-selectin と ICAM-1 それぞれのノックアウトマウスではブレオマイシンによって誘導された皮膚硬化と肺線維化の有意な抑制が認められ、これとは逆に E, P-selectin と PSGL-1 それぞれのノックアウトマウスでは線維化の増悪が認められた。このことは、L, E, P-selectin, ICAM-1 および PSGL-1 が、未だ有効な治療法が開発されていない SSc に対する新たな治療ターゲットとなり得ることを示していると考えられる。今後更なる検討を経て、SSc の新規治療法が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study suggests that L-selectin and ICAM-1 regulate Th2 and Th17 cell accumulation into the skin and lung, leading to the development of fibrosis, and that P-selectin, E-selectin, and PSGL-1 regulate Th1 cell infiltration, resulting in the inhibition 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	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：モデルマウスの作成・繁殖、免疫組織学的実験と解析

キーワード：強皮症・細胞接着分子・動物モデル・T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は皮膚硬化と内臓諸臓器の線維化を主徴とする自己免疫疾患で、患者の QOL および予後を著しく障害する重大な疾患であるが、未だ病因は解明されていない。線維化の形成には局所に浸潤する白血球によって産生されるサイトカインが重要な役割を果たしていることが知られているものの、白血球が線維化の生じる組織に浸潤する分子メカニズムについては明らかではない。そこで、白血球の血管外浸潤を担う主要な細胞接着分子であ

る L, E, P -selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM) -1, および P-selectin glycoprotein ligand (PSGL) -1 の SSc における役割について、各細胞接着分子欠損マウスを用いたブレオマイシン (bleomycin; BLM) 誘発 SSc モデルにおいて解析する。

SSc は、皮膚および内臓諸臓器の線維化を主徴とする膠原病であり、国の特定疾患 (いわゆる難病) に指定されており、国民の健康を犯す重大な疾患である。内臓諸臓器の線維化として間質性肺炎を約 60% の患者に認め、

重症型の 10 年生存率は約 60%とされており、新規治療法の開発が急務である。SSc の病因は未だ解明されていないが、皮膚および内臓諸臓器の線維化は免疫機能が異常に亢進した結果もたらされると考えられているため、現在、免疫抑制剤を中心とした対症療法が行われている。しかし、このような免疫抑制剤には、大きな副作用を伴うため、たとえ疾患の改善がある程度見られたとしても、患者の QOL は著しく阻害されている。また、重症例では免疫抑制剤の投与にもかかわらず体幹の皮膚および内臓の硬化のために死亡することも多い。それゆえ、SSc の病態生理の解明と、それに基づいた新規治療のターゲットとなる分子の同定が切に望まれている。

SSc 患者の皮膚に認められる炎症細胞の浸潤は、線維化において重要な役割を果たす。浸潤した炎症細胞から分泌される IL-4 や IL-6 などの Th2 サイトカインは、線維芽細胞からの膠原線維の産生を増強することが広く知られている。増生した膠原線維の主要な構成分子である低分子ヒアルロン酸は炎症細胞浸潤の誘導、および浸潤した炎症細胞の更なる活性化を引き起こし、皮膚および肺の線維化に関与していることを近年、研究代表者は見いだした (Yoshizaki A et al, *J Rheumatol* 2008; 35(9):1825-9)。また、SSc の主要病態の 1 つである末梢循環障害によって生じた組織障害は皮膚および血清中の high-mobility group box-1 protein の増加を来し、炎症細胞浸潤の誘導、活性化を引き起こし、皮膚および肺の線維化に関与していることを見いだした (Yoshizaki A et al, *J Clin Immunol* 2008; in press)。このように炎症細胞の組織への浸潤は皮膚および肺の線維化の進行に深く関与している。

炎症細胞の局所への浸潤は①捕捉/ローリング、②活性化、③固着、④血管外への遊走といった一連のステップを介して行われ、この過程で白血球や血管内皮細胞に発現する細胞接着分子が重要な働きを担っている(図参照)。浸潤の最初のステップである①捕捉/ローリングは、P, E, L-selectin といった 3 つの selectin ファミリーによって制御される。これら selectin のリガンドとしては PSGL-1 が同定されている。PSGL-1 は P-selectin と強く結合するが、E-selectin や L-selectin とも弱いながら結合する。また、浸潤の③固着のステップは血管内皮細胞に発現する ICAM-1 によって制御されている。これら細胞接着分子は、線維化を来す様々な病態を制御することが明らかにされており、研究代表者の所属する研究グループもこれまで、各細胞接着分子の肺線維症における役割 (Hamaguchi Y et al, *Am J Pathol* 2002, Horikawa M et al, *Am J Pathol* 2006)、tight-skin マウスでの皮膚線維化における

役割 (Matsushita Y et al, *J Immunol* 2007) を報告してきた。しかし、各細胞接着分子の役割は炎症モデルによって異なるため、SSc の線維化形成において、どの細胞接着分子がどの程度関与しているかを明らかにするためには、個々の細胞接着分子の SSc モデルにおける役割を系統的に解析する必要がある。

BLM を皮下投与して作製する BLM 誘発 SSc モデルマウスは、皮膚および肺の線維化、自己抗体の産生、真皮への炎症細胞浸潤を呈し、SSc 患者の病態をよく反映するモデルマウスであると考えられている。BLM 誘発 SSc モデルマウスの皮膚硬化および肺線維化や自己抗体産生の機序は未だ解明されていないが、BLM 投与によって皮膚および肺に対して誘導された組織障害はヒアルロン酸の増加を引き起こし、炎症細胞浸潤の促進、炎症細胞の活性化、サイトカインの産生亢進を介して線維化を増悪させることを研究代表者は近年見いだした (Yoshizaki A et al, *Am J Pathol* 2008)。BLM 投与によって引き起こされる一連の炎症細胞活性化は、ヒト SSc 患者においても認められる現象であり、BLM 誘発 SSc モデルマウスにおける皮膚および肺線維化の誘導は SSc と類似した免疫学的異常によることが推察される。

研究代表者らのグループは皮膚に線維化をきたす tight-skin マウスや、BLM を気管内に投与して作製する間質性肺炎のモデルにおいて各細胞接着分子の役割をそれぞれの細胞接着分子を欠損するマウスを用いて解析した。ICAM-1 の発現を欠損させると Th2 サイトカインである IL-4, IL-6 の発現低下と皮膚及び肺線維化の改善を認めた (Matsushita Y et al, *J Immunol* 2007, Hamaguchi Y et al, *Am J Pathol* 2002)。一方、E, P-selectin の発現を欠損させると Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  の発現低下と肺線維化の増強を認めた (Horikawa M et al, *Am J Pathol* 2006)。このように細胞接着分子は Th1/Th2 サイトカインバランスの調節、ひいては Th1/Th2 細胞の浸潤を制御していることが示唆されている(図参照)。しかしながら BLM 誘発 SSc モデルにおける細胞接着分子の役割は明らかにされていない。さらに細胞接着分子が Th1/Th2 細胞バランスを制御するという直接的な研究は未だなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は ICAM-1, L, E, P-selectin, および PSGL-1 の BLM 誘発 SSc モデルマウスにおける役割とその相互作用を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

それぞれの細胞接着分子ノックアウトマウスに BLM 誘発 SSc モデルマウスを導入し、

皮膚および肺の線維化、サイトカイン産生、気管支肺胞洗浄液中のリンパ球分画の解析を行う。

#### 4. 研究成果

L-selectin と ICAM-1 それぞれのノックアウトマウスではブレオマイシンによって誘導された皮膚硬化と肺線維化の有意な抑制が認められ、これとは逆に E, P-selectin と PSGL-1 それぞれのノックアウトマウスでは線維化の増悪が認められた。このことは、L, E, P-selectin, ICAM-1 および PSGL-1 が、未だ有効な治療法が開発されていない SSc に対する新たな治療ターゲットとなり得ることを示していると考えられる。今後更なる検討を経て、SSc の新規治療法が開発されることが期待される。

#### 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 件)

- ① Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki As, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Asano Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis Arthritis Rheum 査読有, 62(8): 2476-2487, 2010.
- ② Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, T fF Tedder, Sato S. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. J Immunol. 査読有, 185(4): 2502-2515, 2010
- ③ Yoshizaki A, Komura K, Iwata Y, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S. Clinical significance of serum HMGB-1 and sRAGE levels in systemic sclerosis: association with disease severity. J Clin Immunol. 査読有, 29(2): 180-189, 2009.
- ④ Yoshizaki A, Sato S. Olopatadine hydrochloride inhibits scratching behavior induced by a proteinase-activated receptor 2 agonist in mice. J Dermatol Sci. 査読有, 56(2): 136-139, 2009.
- ⑤ Yoshizaki A, Nakayama T, Naito S, Sekine I. Expression patterns of angiopoietin-1, -2, and tie-2 receptor in ulcerative colitis support involvement of the angiopoietin/tie pathway in the

progression of ulcerative colitis. Dig Dis Sci. 査読有, 54(10): 2094-2099, 2009.

[学会発表] (計 件)

- ① 吉崎 歩, 宿輪哲生, 吉崎麻子, 小川文秀, 清水和宏, 佐藤伸一. 強皮症合併間質性肺炎に対するエンドキサンパルス療法後の維持療法としてミゾリピンを用いた5例. 日本皮膚科学会長崎地方会第 310 回例会. 2010. 4. 4. 長崎大学医学部第一講義室.
- ② 吉崎 歩, 築場広一, 小川麻子, 小村一浩, 岩田洋平, 小川文秀, 浅野善英, 長谷川稔, 藤本 学, 佐藤伸一. Tight-skin(TSK)マウスおよびブレオマイシン(BLM)誘発強皮症マウスモデルにおけるラパマイシンの効果に関する検討. 厚生労働省「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」研究班 2009 年度班会議・第 13 回強皮症研究会議. 2010. 1. 16. 豊島区・大正製薬(株)本社 2 号館.
- ③ 吉崎 歩, 築場広一, 小川麻子, 小村一浩, 岩田洋平, 小川文秀, 佐藤伸一. 全身性強皮症に合併した難治性皮膚潰瘍に対するボセンタンの有効性～7 例の自験例についての報告～. 厚生労働省「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」研究班 2009 年度班会議・第 13 回強皮症研究会議. 2010. 1. 16. 豊島区・大正製薬(株)本社 2 号館.
- ④ 吉崎 歩, 小川文秀, 梶山雄一郎, 清水和宏, 佐藤伸一, 鳥山 史. 強皮症との鑑別が難渋した抗アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) 抗体症候群の一例. 日本皮膚科学会長崎地方会第 308 回例会. 2009. 7. 19. 佐世保市立総合病院講堂.
- ⑤ 吉崎 歩, 小川麻子, 築場広一, 小村一浩, 小川文秀, 佐藤伸一. 強皮症 (SSc) 合併間質性肺炎 (IP) に対するエンドキサンパルス療法後の維持療法としてミゾリピンを用いた 2 例. 第 73 回日本皮膚科学会東部支部学術大会. 2009. 9. 26. 甲府市・甲府富士屋ホテル.
- ⑥ 吉崎 歩, 築場広一, 小村一浩, 岩田洋平, 小川文秀, 長谷川稔, 藤本 学, 佐藤伸一. 強皮症 (SSc) 合併間質性肺炎 (IP) に対するエンドキサンパルス療法後の維持療法としてミゾリピンを用いた 2 例. 厚生労働省「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」研究班 2008 年度班会議・第 12 回強皮症研究会議 (SSc, Scleroderma Study Conference). 2009. 1. 17. 文京区・エーザイ (株).
- ⑦ 吉崎 歩, 築場広一, 小村一浩, 岩田洋平, 小川文秀, 長谷川稔, 藤本 学, 佐藤伸一. ブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症マウスモデルにおける細胞接着分子の役割に関する検討. 厚生労働省「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」研究班 2008 年

度班会議・第 12 回強皮症研究会議 (SSc, Scleroderma StudyConference). 2009.1.17. 文京区・エーザイ (株) .

〔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〕

無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉崎 歩 (YOSHIZAKI AYUMI)

長崎医療センター・皮膚科・医師

研究者番号 : 40530415

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し