

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791083

研究課題名（和文） 強皮症モデルマウスにおける皮膚硬化に対する硫化水素による抗酸化療法の検討

研究課題名（英文） Hydrogen Sulfide Attenuates the Development of Skin Fibrosis in Tight-Skin Mice

研究代表者

室井 栄治（MUROI EIJI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80420636

研究成果の概要（和文）：

近年全身性強皮症の病態に酸化ストレスが関与していることが示されている。そして抗酸化療法が有望視されている。硫化水素は高濃度では毒性を呈するが、低濃度では抗酸化作用を持つ。全身性強皮症モデルマウスである TSK マウスに硫化水素の供与体である硫化水素ナトリウム (NaHS) を投与すると皮膚効果の改善、抗 ss-DNA 抗体の減少を認めた。また抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ I の発現増加、一酸化窒素産生酵素である eNOS の発現を低下させた。さらに培養 TSK マウス皮膚線維芽細胞に NaHS 処理を行うと I 型コラーゲン遺伝子の発現が阻害された。これらの事から硫化水素は全身性強皮症の治療薬として有望であると考えた。

研究成果の概要（英文）：

Oxidative stress has been suggested to contribute to clinical manifestations associated with systemic sclerosis (SSc). Hydrogen sulfide (H_2S) can neutralize a variety of reactive species and thereby exhibits the cytoprotective effects. In this study, we assessed the therapeutic effect of H_2S on a tight-skin (TSK) mouse, a mouse model for human SSc. NaHS treatment significantly reduced hypodermal thickness by 70%. NaHS treatment decreased anti-ssDNA IgM antibody levels in wild type and TSK mice. NaHS significantly increased HO-1 gene expression in the TSK skin to a similar level of the wild type skin. NaHS treatment significantly reduced eNOS expression in the TSK/+ skin. Furthermore, pro α 2 (I) collagen gene expression by cultured TSK fibroblasts was inhibited by NaHS treatment. In the current study, H_2S showed remarkable effectiveness in TSK/+ mice, suggesting that oxidative stress is critical for the development of skin fibrosis in TSK/+ mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
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：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：全身性強皮症、硫化水素、酸化ストレス、自己抗体、抗酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は皮膚および内臓諸臓器の血管障害と線維化を主徴とする膠原病であり、我が国の特定疾患 (いわゆる難病) に指定されている。現在、免疫抑制剤を中心とした治療が行われているが、免疫抑制剤は副作用を伴うため、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、特に肺線維症とそれに引き続く呼吸不全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、それに基づいた有効性の高い新規治療薬の開発が切に望まれている。

SSc の重要な臨床的特徴として、組織の線維化に先行して生じる血管病変が挙げられる。SSc の血管病変は広範囲であるが、代表的なものとして①Raynaud 現象に代表される、繰り返す一過性の血管攣縮による組織虚血と再還流、②血管内皮細胞の増殖性変化、があり、これは指尖部の癰痕・潰瘍、肺高血圧症、強皮症腎クリーゼを来す。このような組織の虚血・再還流はフリーラジカルであるスーパーオキシド (O_2^-) の産生をきたし、酸化ストレス過剰状態を引き起こす。近年 SSc の病態・病変形成に酸化ストレスが深く関与していることを示す研究成果が相次いで報告されている。このことから抗酸化療法は SSc の治療法として有望視されている。

TSK マウスはフィブリリン遺伝子を重複して有する突然変異を持ち、SSc 動物モデルとして広く認知されている。TSK マウスでは SSc に類似した皮膚硬化が見られ、自己抗体も産生される。また酸化ストレスが過剰であることが報告されている一方で、抗酸化物質が減少していることも示されている。このことから TSK マウスにおける皮膚硬化形成や自己抗体産生の機序は未だ解明されていないが、SSc と類似した酸化ストレスの関与が推察される。

硫化水素 (H_2S) は無色、可燃性、水溶性、腐卵臭の気体で 1713 年に最初に記載されて以来、毒性のガスとして知られている。しかし近年 H_2S は高濃度では毒性を呈するが、低濃度では抗酸化作用を持つことが明らかになっている。抗酸化作用の機序として活性酸素や過酸化亜硝酸といった酸化ストレスの原因物質を直接除去することや、抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現を増加させ、一酸化炭素を介して除去するといった機序が考えられている。実際に投与する場合、主に濃度を一定に保つ目的で H_2S の供与体として硫化水素ナトリウム (NaHS) を用いる。NaHS は動物モデルにおいて炎症、虚血再還流、循環ショックに対し、治療効果が報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SSc モデルマウスである TSK マウスに対する抗酸化物質 H_2S の供与体である NaHS の効果、そのメカニズムを明らかにすることにより SSc に対する新規治療法に結びつけることである。

3. 研究の方法

(1) TSK マウスへの NaHS 投与と検体採取、評価

TSK マウスに生後 1 週より 4 週間にわたり PBS で希釈した NaHS を $100\mu\text{mol/kg}$ の濃度で連日腹腔内注射した。コントロールとして同量の PBS のみを投与した TSK マウスを用いた。

NaHS もしくは PBS を投与した生後 5 週のマウスから背部皮膚を使い捨て滅菌済み 6mm 径のパンチにて生検した。また血液を採取した。生検した組織の一部は 3.5% パラホルムアルデヒド固定後、パラフィン包埋し、切片をヘマトキシリン&エオジン染色した。皮下結合組織層の厚さを測定し、線維化の指標とした。ハイドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれ、その量はコラーゲン量を反映する。そこで別途凍結保存した背部皮

膚サンプルを十分乾燥させ、ハイドロキシプロリン量を測定し、客観的な線維化の指標とした。また採取した血液より血清を分離し、市販の抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗一本鎖 DNA 抗体、抗二本鎖 DNA 抗体測定キットを用いて各自己抗体を測定した。

さらに背部皮膚における、抗酸化酵素である HO-1 と細胞障害性を有する一酸化窒素 (NO) 産生に 関 与 す る endothelial nitricoxide synthase (eNOS) の mRNA 発現を real-time PCR 法にて定量的に測定した。まず全 RNA を凍結皮膚組織より QIAGEN RNeasy spin column (QIAGEN 社) を用いて単離した。RNA はその後 cDNA に Reverse Transcription System (Promega 社) にて逆転写した。プライマーとプローブは Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents (Applied Biosystems) にてデザインした。Real-time PCR は ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて行った。

(2) 線維芽細胞への NaHS 投与によるコラーゲン産生変化の評価。

TSK マウスの背部皮膚から、線維芽細胞を培養した。線維芽細胞を 1 μ M、10 μ M、50 μ M の NaHS、PBS で 24 時間刺激し、mRNA を抽出し、I 型コラーゲンの mRNA の発現を上述の real-time PCR 法で測定した。

4. 研究成果

生後 1 週の TSK マウスに NaHS (100 μ mol/kg) を 4 週間連日腹腔内投与したところ、線維化の指標となる皮下結合組織層の厚さは約 70% 減少した (図 1A, B)。しかし野生型のマウスと比較すると依然として有意に厚かった。一方 NaHS 投与は野生型マウスの皮下結合組織層の厚さに影響しなかった。またコラーゲン量を反映するハイドロキシプロリンの量も TSK マウスに NaHS を投与することにより有意に減少した (図 1C)。これらのことから、NaHS 投与による皮膚硬化の改善が明らかとなった。

自己抗体産生に及ぼす影響については NaHS の投与により IgM 型抗 ss-DNA 抗体量は減少したが、IgM 型抗トポイソメラーゼ I 抗体、IgG

型抗トポイソメラーゼ I 抗体、IgM 型抗 ds-DNA 抗体量に変化は認められなかった (図 2)。NaHS の投与により野生型マウスにおいても IgM 型抗 ss-DNA 抗体量は減少したが、IgM 型抗トポイソメラーゼ I 抗体、IgG 型抗トポイソメラーゼ I 抗体、IgM 型抗 ds-DNA 抗体量に変化は認められなかった。これらのことから NaHS 投与による自己抗体産生の抑制が示された。

H₂S は抗酸化酵素である HO-1 を増加させることにより抗酸化作用を示すとされていることに一致して、TSK マウスでは野生型マウスよりも減少していた HO-1 mRNA の発現が NaHS 投与により野生型マウスと同じレベルまで増加した (図 3A)。また野生型マウスにおいても NaHS 投与は HO-1 の発現を増加させた。また NaHS は細胞障害性を持つ NO の産生を eNOS の発現を低下させることにより阻害することが知られており、TSK マウスにおいて eNOS の発現を減少させた (図 3B)。しかし野生型マウスにおいては NaHS 投与は eNOS mRNA 発現に影響しなかった。これらのことから NaHS 投与による抗酸化作用が確認できた。

さらに培養 TSK マウス皮膚線維芽細胞に 50 μ M の NaHS で処理を行うと I 型コラーゲン (pro α 2 (I) collagen) mRNA の発現低下が認められた (図 4)。1 から 10 μ M の NaHS では I 型コラーゲン mRNA の発現が低下する傾向であったが有意差は無かった。この結果より、NaHS は線維芽細胞に作用し、コラーゲン産生を抑制していることが示された。

以上の結果から H₂S は全身性強皮症の治療薬となりうる可能性が示唆された。その機序として、自己抗体産生抑制、HO-1 発現増加、eNOS 発現抑制による NO 産生抑制、線維芽細胞のコラーゲン産生抑制作用により、TSK マウスの皮膚硬化を改善すると考えられた。

これらの結果はリウマチ・膠原病分野の英文雑誌に現在投稿中である。

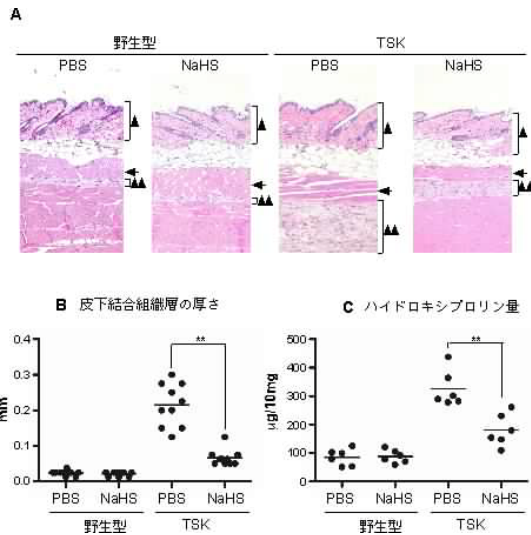


図 1

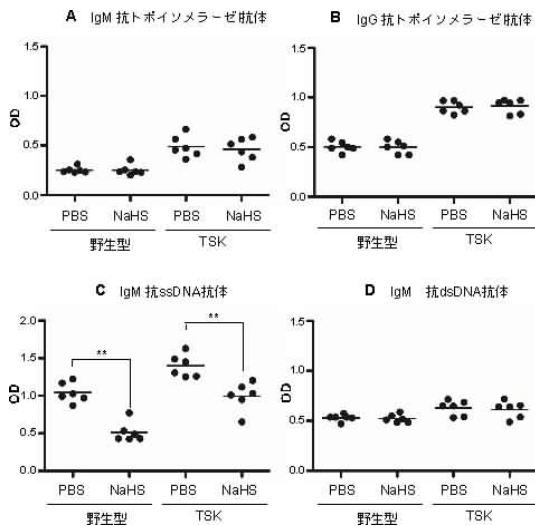


図 2

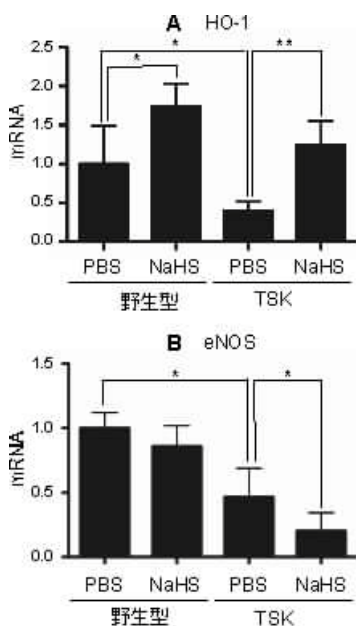


図 3

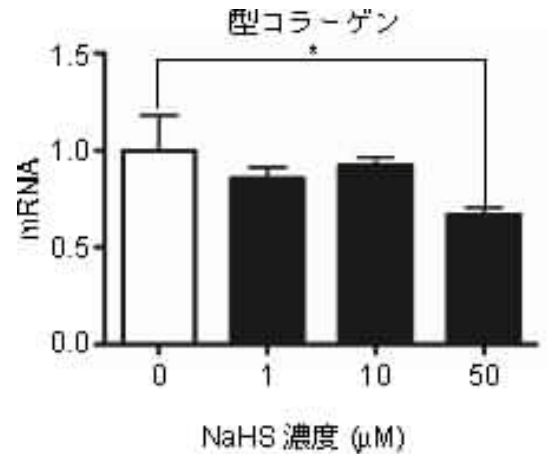


図 4

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)

[学会発表] (計 5 件)

1. 室井栄治: 全身性強皮症モデルマウスである tight-skin マウスの皮膚硬化に対する硫化水素の効果. 1st JSID Young Academician-Fostering Seminar Kisaragi Juku (2010/2/11-13, 沖縄・ホテル日航アリビラ読谷リゾート沖縄)

2. 室井栄治ほか: Tight skin (TSK)マウスにおける硫化水素の効果. 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(2010/1/16, 豊島区・大正製薬(株)本社 2 号館)

3. Muroi E, et al.: Hydrogen sulfide attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. 日本研究皮膚科学会第 34 回年次学術大会・総会 (2009/12/4-6, 福岡市・JAL リゾートシーホークホテル福岡)

4. 室井栄治ほか: Hydrogen sulfide attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. 第 37 回日本臨床免疫学会総会(2009/11/13-15, 千代田区・東京ステーションコンファレンス)

5. Muroi E, et al: Hydrogen sulfide attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. 2009 ACR 73th/ARHP 44th Annual Scientific Meeting (2009/10/18-20, Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室井 栄治 (MUROI EIJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80420636