

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20909

研究課題名（和文）全身性強皮症の皮膚硬化におけるCXCL16の関与と治療ターゲットとしての検討

研究課題名（英文）The role of CXCL16 in dermal fibrosis of systemic sclerosis

研究代表者

井川 徹也（Ikawa, Tetsuya）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40962791

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、全身性強皮症の皮膚硬化におけるCXCL16の役割を解明することである。健常者と比べ、全身性強皮症患者の線維芽細胞においてCXCL16の発現が高かった。正常ヒト皮膚線維芽細胞CXCL16で刺激するとコラーゲン、TGFβ1などの線維化に関連する遺伝子の発現が増強した。次にマウスを用いて、ブレオマイシンで皮膚硬化を誘発し、同時にCXCL16遺伝子を抑制したところ、皮膚硬化が抑制され、線維化に関連する遺伝子の発現も抑制された。さらなる検討により、CXCL16はCXCR6を受容体として線維化のシグナルを伝え、細胞内でSMAD3のリン酸化が亢進することで線維化を促すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は免疫異常を背景とし、皮膚や内臓諸臓器の異常な線維化を伴う難病だ。皮膚硬化はほぼ必発の症状であり、患者のQOLを著明に低下させる。しかし皮膚の線維化のみを特異的に抑制する治療はなく、ステロイドなどの全身的な免疫抑制が治療の中心である。その為、広範囲の急速進行性の皮膚硬化以外は治療の対象とならないのが現状だ。線維化に関連する分子を特定できれば、免疫抑制をせずに済み、軽症の皮膚硬化も治療できるようになる。今回の結果はCXCL16が全身性強皮症の皮膚硬化に関与しており、CXCL16の抑制は症状を軽減することが示された。以上から、CXCL16は治療ターゲットとして有望であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of the study is to investigate the role of CXCL16 in dermal fibrosis of scleroderma. Skin sections obtained from scleroderma patients showed higher expression of CXCL16 on fibroblasts. CXCL16 stimulation significantly increased expression of fibrosis-related molecules such as type 1 collagen, SNAI1, alpha-SMA, and TGFβ1 in normal human dermal fibroblasts (NHDFs). CXCL16 expression was increased under CXCL16 stimulation in FLI1-suppressed NHDFs, which implies a feed-forward loop formation in scleroderma. CXCL16 mRNA expression in vivo experiments using bleomycin-induced scleroderma model with CXCL16 siRNA showed decreased dermal thickness and mRNA expression of fibrosis-related molecules. Additionally, in vitro experiments on NHDFs exhibited that CXCL16 increased the phosphorylation of SMAD3 after binding CXCR6 and increased fibrosis. These findings showed that CXCL16 exacerbates fibrosis by triggering Smad3 signaling pathway, which can be a good treatment target in scleroderma.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 皮膚硬化 ケモカイン CXCL16

1．研究開始当初の背景

全身性強皮症（SSc）は免疫異常を背景とし、皮膚や内臓諸臓器の異常な線維化を伴う難病である。皮膚硬化はほぼ必発の症状であり、患者の QOL を著明に低下させる。しかし皮膚の線維化のみを特異的に抑制する治療はなく、ステロイドなどの全身的な免疫抑制が治療の中心である。その為、広範囲の急速進行性以外の皮膚硬化は治療の対象となりにくい。線維化に関連する分子を特定できれば、全身的な免疫抑制をせずに軽症の皮膚硬化も治療できるようになる。

2．研究の目的

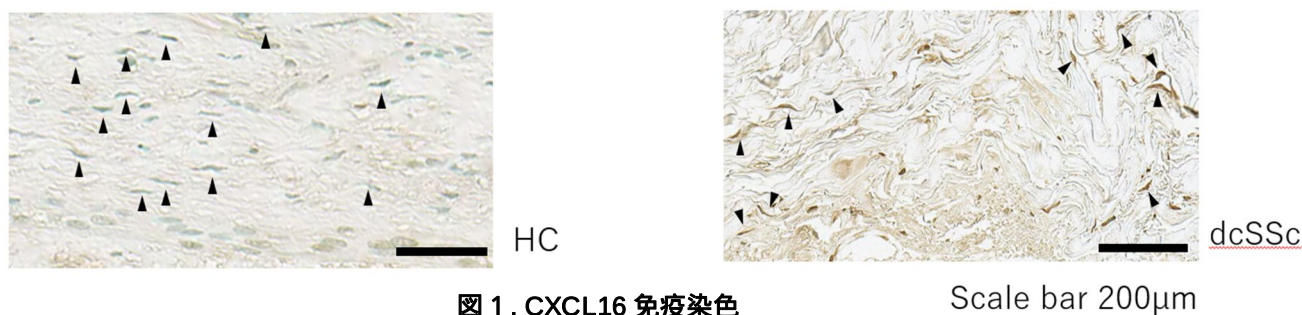
ケモカインは白血球遊走を主機能とするサイトカインの一種であり、SSc との関連については複数の報告がある[1, 2]。ケモカインは直接的に線維芽細胞に作用して効果を発揮する作用もあるため[3]、治療ターゲットとできれば異常な炎症反応と異常な皮膚線維化シグナルの両面にアプローチできる。今回は、比較的新しく発見された CXCL16 というケモカインに着目した。すでに内臓諸臓器の線維化を呈する疾患において CXCL16 の発現亢進が報告されているが[4]、SSc での検討はまだ少なく、SSc の血清中での上昇が報告されているのみである[5]。今回は CXCL16 の SSc の皮膚線維化における関与を検討し、CXCL16 の抑制が皮膚の線維化を改善するのか、治療ターゲットとしての可能性について検討を行うことを目的とした。

3．研究の方法

全身性強皮症患者の皮膚生検組織、ヒト皮膚正常線維芽細胞、ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを用いて CXCL16 の皮膚線維化における重要性を評価した。評価方法として、免疫組織染色、定量的リアルタイム PCR、ウェスタンブロット、免疫細胞染色を用いた。細胞実験においては、強皮症モデルとして FLI1 遺伝子を siRNA でノックダウンした細胞を用いた。FLI1 は様々な皮膚組織において、その欠損が SSc に類似したフェノタイプを示すことが報告されている[6-8]。実際にヒトにおいてもその異常が SSc に関与していることが報告されている[9]。

4．研究成果

（1）最初に、健常者皮膚（ $n = 6$ ）と全身性強皮症患者（ $n = 12$ 。うち dcSSc は $n = 6$ 、lcSSc は $n = 6$ ）の皮膚を用いて、CXCL16 の免疫染色を行った。図 1 に示すように全身性強皮症患者の皮膚において、CXCL16 は線維芽細胞でより優位に発現が高かった（ $p = 0.025$ ）。dcSSc と lcSSc 間には差はなかった。表皮細胞、血管内皮細胞、浸潤免疫細胞における発現には有意差はなかった。全身性強皮症の硬化した皮膚の線維芽細胞では CXCL16 が過剰発現していることが示された。



（2）次に、正常ヒト皮膚線維芽細胞を CXCL16 で刺激した。この実験では、転写因子 FLI1 遺伝子を抑制した細胞を強皮症モデルとして用いた。正常ヒト皮膚線維芽細胞を CXCL16 で単純刺激すると、CXCR6 の mRNA 発現が有意に低下、COL1A1、COL1A2、TGFβ1、SNAIL、ACTA2 の mRNA 発現が有意に上昇した（図 2）。細胞を FLI1 siRNA で処理し CXCL16 で刺激すると、CXCL16、CXCR6 の発現上昇がさらに増強された（図 2）。CXCL16 の強皮症モデル細胞での上昇はタンパクレベルでも示された（図 3）。CXCL16 が線維化関連遺伝子の発現を上昇し、CXCL16 は

FLI1 の抑制によりフィードフォワードループが形成されており、それにより常に線維化関連因子の発現が亢進している可能性が示された。免疫細胞染色を行い、線維芽細胞を CXCL16 で刺激したところ、alpha-SMA、COL1、SNAI1、TGFB1 のタンパク発現が有意に上昇した（図 4）。

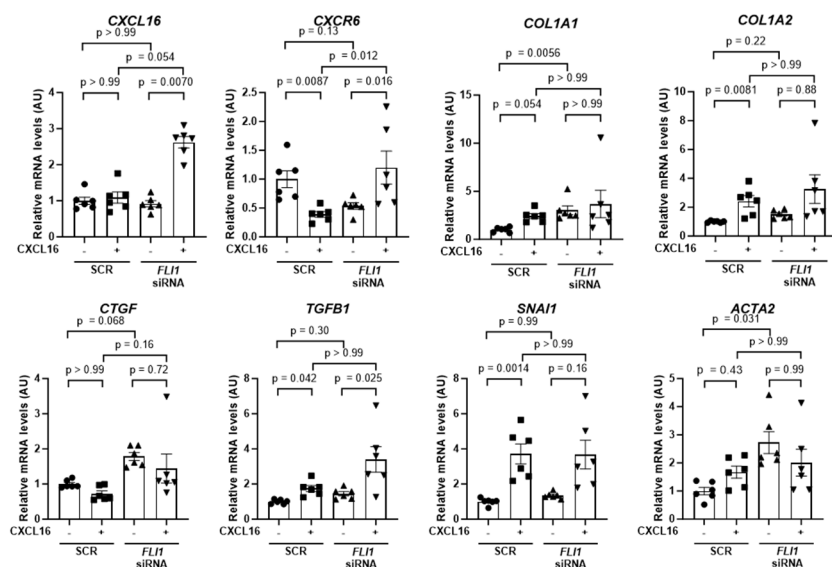


図 2. ヒト正常線維芽細胞を CXCL16 で刺激した際の線維化関連因子の mRNA 発現

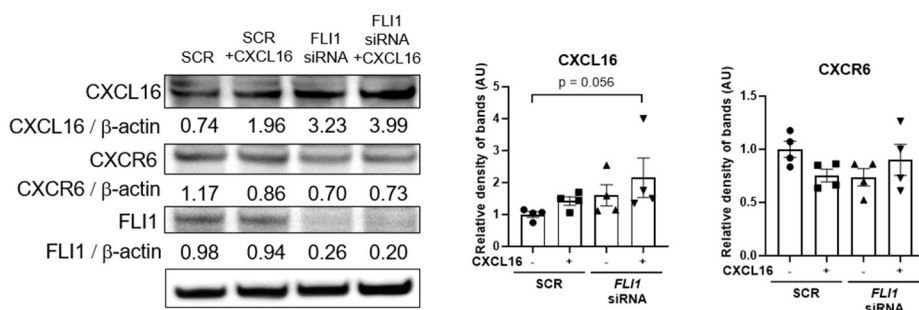


図 3. ヒト正常線維芽細胞を CXCL16 で刺激した際の CXCL16 と CXCR6 のタンパク発現

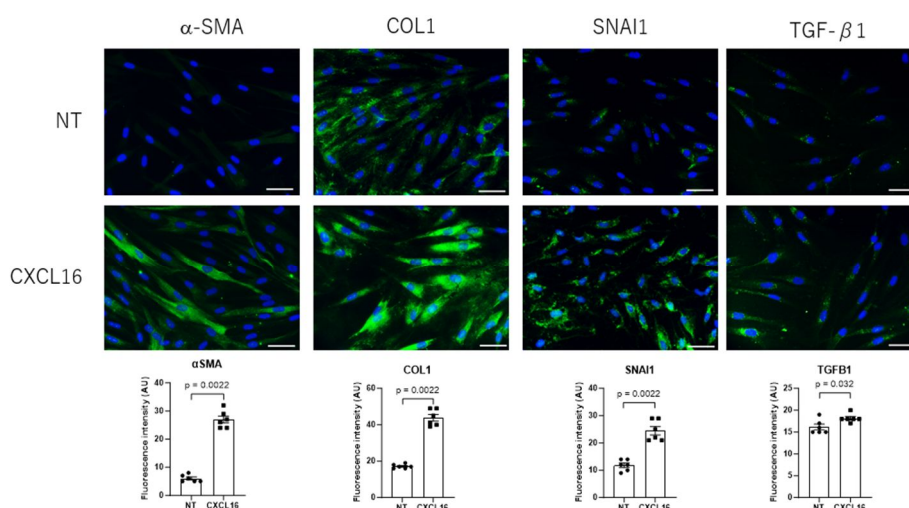


図 4. ヒト正常線維芽細胞を CXCL16 で刺激した線維化関連遺伝子のタンパク発現

(3) ここまで、CXCL16 は SSc の病態に関連している可能性が示唆された。次に、CXCL16 の抑制で皮膚硬化が改善するかマウスを用いて実験を行った。プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスに同時に siRNA を用いて CXCL16 の発現を皮膚局所で抑制した。その結果、真皮の厚みが薄くなり（図 5） 各種線維化関連因子（*Col1A1*, *Col1a2*, *Ctgf*, *Tgfb1*, *Snai1*, *Acta2*）の発現も低下した（図 6）。以上から、CXCL16 は強皮症の線維化に関与しており、それを抑制することで皮膚硬化が抑制されることが示された（図 5）。

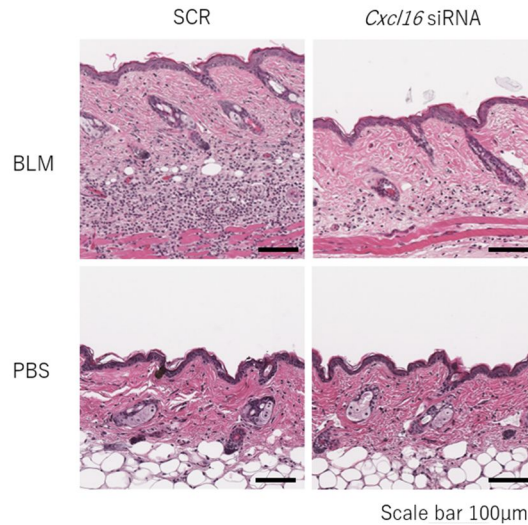


図 5. プレオマイシンで皮膚硬化を誘発し同時に *CXCL16* を抑制すると皮膚硬化が改善した

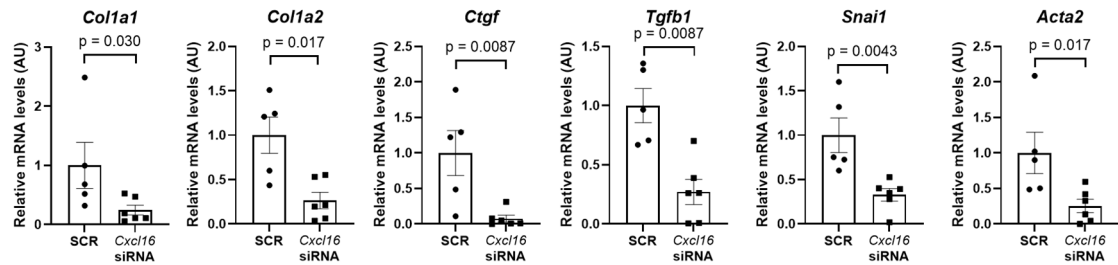


図 6. 図 5 で得られたマウス皮膚の線維化関連因子の mRNA 発現

(4) In vivo で *CXCL16* siRNA を導入した実験では線維化関連因子の低下 (*Col1a1*, *Col1a2*, *Ctgf*, *TGFβ1*, *Snai1*, *Acta2*) がみられた。これらの遺伝子は、線維化の経路として主要な Wnt/ β -catenin 経路と、TGF β 経路の下流で活性化される遺伝子である。*CXCL16* がこれらの経路を直接活性化している可能性を考え、線維芽細胞における β -catenin の蓄積、SMAD3 のリン酸化が *CXCL16* 刺激で増強するかウェスタンブロットで検討を行った。 β -catenin は変化がなかったが、SMAD3 のリン酸化は優位に上昇した。*CXCL16* が TGF β によって活性化される経路を独立で活性化し、SMAD3 のリン酸化を経て線維化関連因子の発現上昇を促す可能性が示唆された (図 7)。

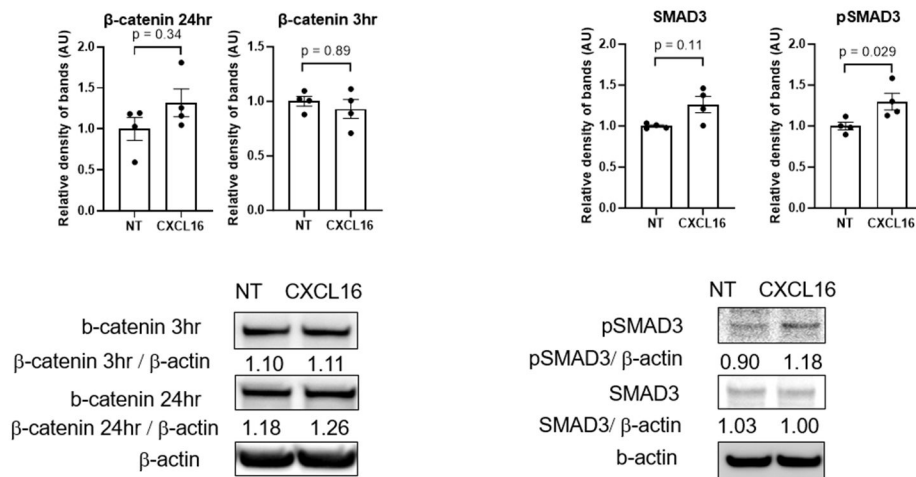


図 7. *CXCL16* 刺激によって活性化される細胞内シグナルの検討

(5) 続いて、可溶性 *CXCL16* は *CXCR6* のみならず、膜貫通型 *CXCL16* にも結合してシグナルを伝達することが報告されていることから[10]、可溶性 *CXCL16* のシグナルがどちらを介して伝わっているのか検討した。ヒト正常線維芽細胞を用いて、*CXCR6* siRNA で *CXCR6* の発現を低下させてから *CXCL16* で刺激した。*CXCL16* 刺激で線維化関連因子の遺伝子発現は上昇したが、*CXCR6* siRNA を作用させてから *CXCL16* で刺激すると、*COL1A*、*COL1A2*、*ACTA2*、*TGFβ1*、*SNAI1* の mRNA の発現が低下した (図 8)。一方、*CXCL16* siRNA を作用させて *CXCL16* で刺激

した場合には、線維化関連遺伝子の発現は上昇したことから、CXCL16 の線維化シグナルは、CXCR6 を通して作用する可能性が考えられた。

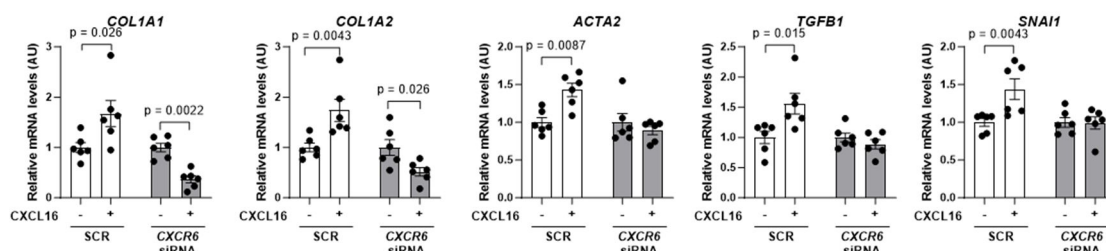


図 8. 線維芽細胞を CXCR6 siRNA で作用させたのちに CXCL16 で刺激した際の線維化関連因子の mRNA 発現

(6) CXCL16 は強皮症患者の線維芽細胞で発現が上昇しており、その CXCL16 はパラクリン、オートクリン機構で自身または周囲の線維芽細胞を刺激して各種線維化関連遺伝子の発現を増強していることが明らかとなった。そのシグナルは CXCR6 を介して伝わり、細胞内で SMAD3 のリン酸化を促して線維化関連遺伝子の発現を促していることが示唆された。そして、CXCL16 を抑制することでブレオマイシン誘発強皮症マウスモデルの皮膚線維化が抑制されたことから、CXCL16 は全身性強皮症の皮膚硬化の治療のターゲットとなる可能性が示された。

【引用文献】

- Ikawa T, Miyagawa T, Fukui Y, Minatsuki S, Maki H, Inaba T, et al. Association of serum CCL20 levels with pulmonary vascular involvement and primary biliary cholangitis in patients with systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis*. 2021;24(5):711-8.
- Ikawa T, Miyagawa T, Fukui Y, Toyama S, Omatsu J, Awaji K, et al. Endothelial CCR6 expression due to FLI1 deficiency contributes to vasculopathy associated with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2021;23(1):283.
- Pierce EM, Carpenter K, Jakubzick C, Kunkel SL, Evanoff H, Flaherty KR, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts migrate and proliferate to CC chemokine ligand 21. *Eur Respir J*. 2007;29(6):1082-93.
- Zuo S, Zhu Z, Liu Y, Li H, Song S, Yin S. CXCL16 Induces the Progression of Pulmonary Fibrosis through Promoting the Phosphorylation of STAT3. *Can Respir J*. 2019;2019:2697376.
- Yanaba K, Muroi E, Yoshizaki A, Hara T, Ogawa F, Shimizu K, et al. Serum CXCL16 concentrations correlate with the extent of skin sclerosis in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2009;36(9):1917-23.
- Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, et al. Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol*. 2003;163(2):571-81.
- Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, et al. Fibrosis, vascular activation, and immune abnormalities resembling systemic sclerosis in bleomycin-treated Fli-1-haploinsufficient mice. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(2):517-26.
- Takahashi T, Asano Y, Sugawara K, Yamashita T, Nakamura K, Saigusa R, et al. Epithelial Fli1 deficiency drives systemic autoimmunity and fibrosis: Possible roles in scleroderma. *J Exp Med*. 2017;214(4):1129-51.
- Yamashita K, Kawasaki A, Matsushita T, Furukawa H, Kondo Y, Okiyama N, et al. Association of functional (GA)_n microsatellite polymorphism in the FLI1 gene with susceptibility to human systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(11):3553-62.
- Hattermann K, Bartsch K, Gebhardt HH, Mehdorn HM, Synowitz M, Schmitt AD, et al. "Inverse signaling" of the transmembrane chemokine CXCL16 contributes to proliferative and anti-apoptotic effects in cultured human meningioma cells. *Cell Commun Signal*. 2016;14(1):26.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------