

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461672

研究課題名(和文) 全身性強皮症モデルマウスの皮膚硬化・肺線維症に対する vorinostat の効果

研究課題名(英文) The effect of vorinostat on skin fibrosis and lung fibrosis of systemic sclerosis mouse model

研究代表者

小川 文秀 (OGAWA, Fumihide)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：10333519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症は全身の皮膚硬化をきたす膠原病である。全身性強皮症のモデルマウスにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である vorinostat を皮下注射し、皮膚硬化の改善を検討した。だが、vorinostat 投与群で皮膚硬化の改善はみられなかった。正常ヒト線維芽細胞と SSc 線維芽細胞を用い、in vitro で vorinostat の濃度を検討し、COL1A2 などの変動を mRNA レベルで検討したが有意な発現の変動はみられなかった。原因として、Vorinostat は他の HDAC 阻害剤と比較して HDAC を抑制する効果が弱いことや強皮症に対して特異的作用が弱いためではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is connective tissue disorder characterized by severe fibrosis of the skin and various internal organs. Tight skin (TSK/+) mouse is a putative murine model of SSc characterized by excessive collagen deposition in skin. Vorinostat, a kind of histone deacetylase inhibitor, was injected subcutaneously into the back of the TSK/+ and wild type mice. As a result, vorinostat could not decrease the development of TSK mouse skin fibrosis. We examined the suitable concentration of the vorinostat in vitro by using human skin fibroblasts of SSc or normal human skin. However, mRNA expressions of type I collagen or fibrogenic cytokines were not markedly attenuated by vorinostat administration. These results suggest that vorinostat have little specificity on the SSc skin fibrosis. Also, these result may reflect the fact that vorinostat may have little effect on the HDAC inhibition relative to other HDAC inhibitors.

研究分野：皮膚科学

キーワード：細胞外マトリックス 全身性強皮症 マウスモデル vorinostat

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(SSc)は皮膚および内臓諸臓器の線維化を特徴とする膠原病であり、全身性免疫疾患に分類されている。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の線維芽細胞はコラーゲンや他の細胞外マトリクスの産生が非常に高いという特徴を持つ。しかし、線維芽細胞の活性化のメカニズムは依然として不明なままである。

(1) SScでの線維化

SScでは80%以上の症例でレイノー症状を伴う。レイノー症状による虚血再灌流障害の結果生じる酸化ストレスなどの結果、血管内皮障害、リンパ球・単球の浸潤・活性化が起こり、これら炎症細胞の放出するサイトカインや細胞成長因子などが線維化を誘導していることが考えられている。線維化は細胞外マトリクスの過剰沈着が主体であり、I型コラーゲン、フィブロネクチン、グリコサミノグリカンなどが増加していると報告されている。このコラーゲン合成亢進は、転写レベルの異常、すなわちコラーゲン遺伝子転写亢進によることが示唆されている。そこで今回、遺伝子の転写を調節する因子について検討を行うこととした。

(2) ヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase; HDAC)とヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase inhibitor; HDAC inhibitor)

最近注目されているタンパク質の翻訳後修飾としてアセチル化・脱アセチル化があげられる。染色体DNAはクロマチンとよばれる高次構造を呈しており、クロマチンはヒストンオクタマーに、DNAが巻き付いた構造をとっている。近年、転写誘導に際してヒストン修飾によるクロマチンの構造変化が重要な役割を果たすことが知られてきている。転写の促進に関しては、転写コアクチベータのヒストンアセチル化酵素(histone acetylase

transferase; HAT) 活性により周囲のヒストンがアセチル化され、これを誘因としクロマチンのリモデリングが起こり転写因子とRNAポリメラーゼによる転写が開始される。一方、転写の抑制としては脱アセチル化を触媒するHDACがある。細胞の内部では通常、クロマチンは脱アセチル化状態に保たれており、転写の促進が必要な時にのみアセチル化されると考えられている。この転写を調節するHDACに対する阻害剤がHDAC inhibitorであり、その代表的なものとしてトリコスタチンA(trichostatin A; TSA)やボリノスタット(Vorinostat)があげられる。TSAやVorinostatは細胞周期停止作用や細胞分化、そして細胞のアポトーシスを増強する作用がある。そのため、近年、抗がん作用をもつ薬物として研究が行われている。さらに興味深いことにTSAやVorinostatは抗炎症作用、抗線維化作用を持つと考えられており、肝線維症や放射線照射による皮膚の線維化防止に対する効果が期待されている。

(3) HDACとSScとの関わり

我々は、SSc患者血清中のHDAC-3に対する自己抗体を測定した。SScの自己免疫によって、HDAC-3への自己抗体がSScでは産生されるという仮説を立て実験を行ったが、予想に反して、SSc患者血清中のIgG型およびIgM型HDAC-3抗体の値は健常群、全身性エリテマトーデス患者、皮膚筋炎患者と比較して有意に低いことが明らかとなった。さらに、HDAC-3活性について検討したところ、対照群から抽出したIgGではHDAC-3活性は抑制できたが、SSc患者血清から分離したIgGではその活性は抑制できなかつた。これらの結果から、SSc患者ではその免疫異常により健常人では正常に産生されるHDACに対する自己抗体産生が行われず、それが、病態に関与している可能性が考えられた。すなわち、健常群では抗HDAC-3抗体産生が認められたことから、血清中の抗HDAC-3抗体は病態を抑制する

protective な働きを持つ自己抗体である可能性を考えた。HDAC に対する自己抗体が低い SSc では HDAC の活性が亢進しており、その結果、遺伝子転写を抑制するヒストンアセチル化とヒストン脱アセチル化に異常をきたし、それが SSc の線維化を引き起こしている可能性が考えられる。

(4) HDAC 阻害剤と制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) ; SSc の病態との関わり

一方で SSc では Treg に対する機能的異常が存在する可能性が近年報告されている。また、マウスに TSA を投与すると Treg の割合と絶対数が 1.5 倍に増加することが報告されている。さらに、TSA の投与により、リンパ組織における Treg の割合が増加し、炎症性腸炎モデルでは症状が軽快することも併せて報告されており、Treg を介した HDAC による免疫性疾患の治療の可能性が示されている。また、SSc の線維化に深く関与している TGF- β や IL-6 の刺激は Treg に特異的に発現している FoxP3 のアセチル化に影響を与え、クロマチン結合に関与することも報告されている。

(5) TSA と SSc

以上のことから、SSc の皮膚線維化において HDAC は病態に何らかの形で関与しており、HDAC 阻害剤によって線維化が抑制されるのではないかと推察した。そこで、以前我々は TSK /+マウスに TSA を投与し、マウスの皮膚組織から mRNA を採取し、細胞外マトリックスと線維化に関与するサイトカインの検討を行った。その結果、TSA の投与により mRNA レベルでコラーゲンの有意な抑制がみられ、FGF や IL-4, IL-6, TGF- β の有意な低下を認めた。だが、ブレオマイシン誘導の全身性強皮症モデルマウスでは TSA はコラーゲンを抑制しえなかった。

2. 研究の目的

HDAC 阻害剤である Vorinostat は TSA と同様に多種の HDAC を阻害する薬剤であり、

Vorinostat は HDAC 阻害剤としては本邦で初めて皮膚 T 細胞リンパ腫に高価を保険適応となった。そこで今回、Vorinostat を用い、SSc において皮膚の線維化が抑制できるかどうかを SSc のモデルマウスである TSK/+マウスに投与し、線維化のメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。また、前述したように SSc 患者血清中では HDAC に対する自己抗体が低下しているため、線維芽細胞における転写異常により線維化を引き起こしている可能性が考えられる。SSc のモデルマウスである TSK/+マウスに TSA を投与することにより、皮膚硬化の改善を確認し、線維化に関するコラーゲンや細胞外マトリックスの産生や各種サイトカイン、接着分子などの発現を検討した。本研究を通じて SSc の線維化のメカニズムを明らかになれば、Vorinostat は実臨床で使用されている薬剤であるため、迅速な臨床応用が可能と考えられ、SSc に対する新規治療の確立が速やかに進むと考えた。

3. 研究の方法

(1) 皮膚硬化の評価方法

① Vorinostat の投与

3~4 週齢のマウスの背部に、0.5 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{day}$ の DMSO に溶解した Vorinostat を週 5 日、4 週間皮下注射した。対照として C57BL/6 マウスにも同様のスケジュールで皮下注射を行った。試薬の対照として、DMSO のみを TSK/+マウス、C57BL/6 マウスに同様のスケジュールで皮下注射した。

② 組織学的評価

ジエチルエーテルにて安楽死処置を行った後、呼吸停止、心停止を確認した。マウスの背部を剃毛し、70%アルコールで消毒した。頸部から上背部にかけての皮膚を下床の筋肉・骨も含めて一括として横断した。皮膚組織は 4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン包埋した。6 μm の厚さのセクションを作り、ヘマトキシリン&エオジン染色を行った。

TSK/+マウスの皮膚硬化・肥厚は真皮の線維化によるものではなく、皮下の粗な結合組織層の肥厚による。従って皮膚の厚さは、この皮下結合組織の厚さを測定することによって評価した。一つのセクションに対して10カ所を無作為に選んで、その厚さを測定した。すべてのセクションにおいて、3人の研究者が独立して皮下結合組織層の厚さをマウスや試薬投与に関する情報を伏せた状態で測定し、最終的に平均値を算出した。さらに、膠原線維のマーカであるハイドロキシプロリン量を測定し、皮膚硬化の程度を定量化した。また、Vorinostat 群と非投与群マウスの皮膚から mRNA を回収し、線維芽細胞から産生される細胞外マトリックスである COL1A1、COL1A2 などや線維化に関与するサイトカインである IL-4、IL-6、IL-13 などの mRNA 測定をおこなった。さらに細胞成長因子として fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor- β (TGF- β) などの mRNA 測定をおこなった。

③ 血清学的・免疫学的評価

Vorinostat は遺伝子の転写に影響を与える可能性があり、全身的な影響を検討するために、線維芽細胞からの膠原線維の産生に影響を与えるサイトカインである IL-4、IL-6、IL-13 等安楽死処置前に採取していた血清を ELISA キット (R&D 社) を用いて測定する。TSK/+マウスで発現が高いトポイソメラーゼ I 抗体の発現を MESACUP-2 テスト Sc1-70 キット (MBL 社) をモディファイして測定する。具体的には、このキットはヒト抗体測定用のため、二次抗体がマウス IgG を認識するように HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (Southern Biotechnology 社) とキットにあらかじめ含まれている二次抗体を置換して測定を行う。さらに、同時に分離回収したリンパ球を用いて、Treg の割合を検討する。具体的には、Treg は FACS を用いて、抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体 (BD Pharmingen 社)、抗 FoxP3

抗体 (eBioscience 社) を用いて同定する。CD4+CD25+FoxP3+ の T 細胞を Treg としてカウントする。ただし、Foxp3 の同定には細胞膜の透過処理が必要なため、問題がある場合には、CD127- を代替マーカーとして Treg の同定を行う。

④ 線維芽細胞の培養・ストック

6週齢の TSK/+マウスおよび C57BL/6 マウスをエーテルで麻酔後、マウスの背部を剃毛し、70%アルコールで消毒する。背部の皮膚を眼科用クーパーにて 1cm x 1cm 大の大きさに切除する。イソジン液にて 30 秒消毒後、PBS にて洗浄する。シャーレ上で皮下脂肪織を除去。11 番メスをもちいて皮膚を 1mm 角に細切する。細切した皮膚片は真皮側が下になるように培養用シャーレに置き、15 分間静置する。静置後、10%組織培養用ウシ胎児血清加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (10%FBS 加 DMEM 培地) にて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養を開始する。7~10 日ほど静置しておく、皮膚片の周囲から線維芽細胞が増殖してくるため、0.05%トリプシン EDTA 溶液 (WAKO 社) で線維芽細胞を剥がし、次に 75cm² フラスコへと継代する。さらに細胞がコンフルエントになった時点で、継代を行い、翌年の実験のため細胞のストックを行う。細胞は cryogenic tube 内にセルバンカー (十慈フィールド社) を用いて懸濁し、実験まで液体窒素タンク中に保管・保存を行う。

(2) マウス皮膚線維芽細胞を培養し、Vorinostat を添加したのち mRNA を回収、RT-PCR 法による細胞外マトリックス、細胞成長因子の解析

TSK/+、C57BL/6 マウスから採取した線維芽細胞を 10%FBS 加 DMEM 培地で培養する。70%コンフルエントになった時点で実験に用いる。予め至適濃度を設定しておいた Vorinostat を FBS 無添加 DMEM 培地へ加え、培養線維芽細胞に刺激を与える。刺激後、0、4、6、12、24 時間後に細胞を回収し、細胞から全 RNA を QIAGEN RNeasy spin column を用いて回収す

る。RNA量を定量後、RT-PCRを行い、膠原線維産生に関わるIL-4、IL-6、IL-13さらに細胞成長因子のbasic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β 、connective tissue growth factorなどについて検討を行い、Vorinostatが及ぼすこれら因子についての関与を解析した。

(3) ヒト正常線維芽細胞と強皮症患者線維芽細胞を培養、細胞外マトリクスと細胞成長因子のmRNAの定量的解析

年齢を一致させた強皮症患者4名と対照群4名から皮膚線維芽細胞を培養し、Vorinostatを添加する。MTSアッセイを行い、細胞毒性を検討し、至適濃度と指摘投与時間を検討した。その後、mRNAを上述の方法で採取し、RT-PCR法にて膠原線維産生に関わるIL-4、IL-6、IL-13さらに細胞成長因子のbasic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β 、connective tissue growth factorなどについて検討を行った。

(4) 統計解析

統計解析については、2群間の比較にはMann-Whitney U-testを用い、多群間の検定にはBonferroni's testを用いた。

4. 研究成果

全身性強皮症のモデルであるタイトスキヌマウス(TSK/+)にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるvorinostatを皮下注射にて投与したが、投与群は有意に皮膚硬化を抑制しえなかった。また、vorinostat群と非投与群マウスの皮膚を回収し、線維芽細胞から産生される細胞外マトリクスであるCOL1A1、COL1A2などや線維化に関与するサイトカインであるIL-4、IL-6、IL-13などのmRNA測定をおこなった。さらに細胞成長因子としてfibroblast growth factor (FGF),

transforming growth factor- β (TGF- β)などのmRNA測定をおこなった。しかし、その結果はwild type mouseと比較して有意差はみられなかった。またvorinostatが全身に及ぼす影響を調べるため、マウス血清中の抗トポイソメラーゼI抗体、IL-4、IL-6の比較を行ったが、有意差はみられなかった。同様に、Tregの細胞数においても投与群と非投与群で差はみられなかった。

原因としてvorinostatの至適濃度や毒性を再検討すると同時に、ヒトサンプルにおいてはvorinostatどのような影響を及ぼすのかを検討する必要があると考えた。そこで、ヒト正常線維芽細胞と強皮症患者の線維芽細胞を4サンプルずつ準備した。MTSアッセイにていずれの細胞においてもvorinostatは濃度1.0-1.2 μ M、投与時間24時間が至適であると判断した。同条件でそれぞれの線維芽細胞を培養し、vorinostatを投与したのちにmRNAを回収し、RT-PCRでCOL1A1、COL1A2などの細胞外マトリクスやIL-4などのサイトカインやTGF- β などの細胞成長因子を測定した。しかし、vorinostat投与によってCOL1A1などの細胞外マトリクスの変動はみられなかった。また、上述したサイトカインや細胞成長因子についても有意な変動はみられなかった。原因として、vorinostatはTSAなどの他のHDAC阻害剤と比較してHDACを抑制する効果が弱いことや、強皮症線維芽細胞に対して特異的に作用しないためではないかと推察された。今後は、SAHAの濃度条件の再検討に加え、他のHDAC阻害剤を用いて全身性強皮症の線維化が抑制しうるかを検討すべきと考えた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

1. 東 美智子, 東 江里夏, 芦田美輪, 小川文秀, 林 徳真吉, 宇谷厚志: 前額部

に紅斑局面、体幹四肢に丘疹・紅斑を呈した IgG4 関連疾患の特異疹の 1 例. 西日本皮膚科 査読有 78(1): 24-28, 2016. <http://doi.org/10.2336/nishinihonhifu.78.24>

2. Kuwatsuka Y, Shimizu K, Akiyama Y, Koike Y, Ogawa F, Furue M, Utani A: Yusho patients show increased serum IL-17, IL-23, IL-1beta, and TNF alpha levels more than 40 years after accidental polychlorinated biphenyl poisoning. J Immunotoxicol 査読有 11(3): 246-249, 2014. 10.3109/1547691X.2013.835890
3. Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Kaji K, Asano Y, Ogawa F, Yamaoka T, Fujikawa K, Tsukada T, Sato K, Echigo T, Hasegawa M, Takehara K: Auto-antibodies to small ubiquitin-like modifier activating enzymes in Japanese patients with dermatomyositis: comparison with a UK Caucasian cohort. Ann Rheum Dis 査読有 72(1): 151-153, 2013. 10.1136/annrheumdis-2012-201736

[学会発表] (計 4 件)

1. 銚塚さやか、銚塚 大、富村沙織、山岡俊文、樺山雄一郎、岩田洋平、武石恵美子、小川文秀、土居剛士、廣瀬寮二、宇谷厚志: 長崎大学病院皮膚科における 10 年間の乳房外 Paget 病の統計. 日本皮膚科学会長崎地方会第 327 回例会 (2015/12/5, 長崎市・長崎大学病院第四講義室)
2. 福地麗雅、銚塚 大、富村紗織、武石恵美子、山岡俊文、樺山雄一郎、小川文秀、土居剛士、廣瀬寮二、宇谷厚志: 当院における悪性黒色腫 10 年間の統計. 日本皮膚科学会長崎地方会第 327 回例会 (2015/12/5, 長崎市・長崎大学病院第四

講義室)

3. 富田 元、銚塚 大、小池雄太、浅井 幸、小川文秀、谷岡未樹、宇谷厚志: Pazopanib が著効した血管肉腫の 1 例. 第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 (2013/8/9~8/11, 甲府市・甲府富士屋ホテル)
4. 小川文秀、浅野善英、石井貴之、川上民裕、小寺雅也、藤本 学: 【教育講演 36. 創傷・熱傷ガイドライン—第 1 版の課題と改訂に向けた取り組み】 膠原病・血管炎に伴う皮膚潰瘍診療ガイドラインについて. 第 112 回日本皮膚科学会総会 (2013/6/14~6/16, 横浜市・パシフィコ横浜)

[図書] (計 2 件)

1. 小川文秀: 全身性強皮症に合併する逆流性食道炎に対するエソメプラゾールの有用性. in 強皮症における病因解明と根治的治療法の開発 (厚生労働科学研究費補助金: 難治性疾患克服研究事業) 平成 24 年度総括・分担研究報告書. 査読無し (佐藤伸一 eds.) 東京; pp. 180-182, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 文秀 (OGAWA, Fumihide)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
客員研究員
研究者番号: 10333519

(2) 研究分担者

銚塚 大 (KUWATSUKA, Yutaka)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
助教
研究者番号: 90437864