

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461680

研究課題名(和文) 全身性強皮症ならびに強皮症モデルマウスにおけるSyk阻害剤の有効性の検討

研究課題名(英文) The role of Syk in the pathogenesis of systemic sclerosis

研究代表者

竹原 和彦 (Takehara, Kazuhiko)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50142253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Sykファミリーに属するSykならびにZAP70は、B細胞受容体、T細胞受容体、Fc受容体などのシグナル伝達に關与する分子で、細胞の活性化に必須の役割を担っている。我々は、強皮症のモデルマウス(皮膚硬化型慢性GVHDモデル)を用いて、Syk阻害剤の有効性について検討した。Syk阻害剤の投与にて皮膚硬化型慢性GVHDの改善がみられ、T細胞およびマクロファージからのサイトカイン産生が抑制された。また、強皮症患者末梢血B細胞ではSykのリン酸化亢進は認めなかった。以上より、強皮症患者ではSykのリン酸化亢進は認めなかったものの、強皮症マウスモデルからはSykが治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease (Scl-cGVHD) is a model for human Scl-cGVHD and systemic sclerosis (SSc). Syk is a protein tyrosine kinase that has an important role in transmitting signals from a variety of cell surface receptors. This study aims to investigate the effect of a Syk inhibitor, R788, on Scl-cGVHD and role of Syk in patients with SSc. Allogeneic BMT increased Syk phosphorylation in T, B, and CD11b+ cells. Early administration of Syk inhibitor attenuated severity and fibrosis of Scl-cGVHD. Syk inhibitor also reduced skin mRNA expressions of IL-13, IL-17A, and TGF- β 1. However, Syk phosphorylation in B cell of SSc patients was not increased compared with that of normal control. The current studies suggested that Syk inhibitor is a potential candidate for use in treating patients with Scl-cGVHD and SSc.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 B細胞 Syk

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は抗核抗体に代表される自己免疫現象を背景に、皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管病変によって特徴づけられる膠原病である。全身性強皮症に対する有効な治療法は未だ確立されておらず、その開発が急務である。これまでに全身性強皮症の病態にはB細胞の活性化や分化の異常が示されている (Arthritis Rheum 50:1918-27,2004)。B細胞の強力な活性化因子である血清BAFF濃度が全身性強皮症患者において上昇しており、皮膚硬化の重症度と相関していることが示されている (Arthritis Rheum 54: 192-201, 2006)。また、全身性強皮症のモデルマウスであるTight skin (Tsk)マウスの皮膚硬化の進展にはB細胞の異常活性化が重要であり、B細胞受容体(BCR)のシグナル伝達を促進するCD19分子を欠損させると皮膚硬化の減弱が認められる (J Clin Invest 109: 1453-62,2002)。さらに抗CD20抗体による強皮症発症早期からのB細胞除去療法が、Tskマウスの皮膚硬化を有意に抑制することが示されている (Am J Pathol. 169: 954-966, 2006)。Tskマウスのみならず、Bleomycin誘導性強皮症モデルマウスや Sclerodermatous-choronic GVHD (Scl-cGVHD)マウスにおいても、B細胞がその病態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなっていることより、B細胞を標的とした治療法が全身性強皮症に有効である可能性が推測される。

B細胞は抗体産生のみならず、抗原提示能やサイトカイン産生、T-B細胞相互作用を有しており、自己免疫反応を促進すると考えられてきた。しかしながら近年、B細胞の中には自己免疫反応を抑制する作用を有する細胞集団も存在することが明らかとなってきた。このようにB細胞は均一な細胞集団ではなく、“悪玉”と“善玉”の2つに分けることができる。“悪玉”B細胞はeffector B細胞と呼ばれ、T細胞の活性化作用をもち、自己免疫や炎症を促進する働きがある。一方、“善玉”B細胞は自己免疫や炎症を抑制する働きがある (Nature Reviews Immunology. 10: 236-247 2010)。自己免疫性疾患である多発性硬化症のマウスモデルである Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)の発症前に抗CD20抗体を用いB細胞を除去するとEAEがより重症化し、EAE発症後にB細胞を除去すると症状が改善する (J Clin Invest. 118: 3420-3430, 2008)。発症前のB細胞除去が重症化をもたらす機序は、炎症を抑制するregulatory B細胞が除去されたからであり、EAEの早期ではregulatory B細胞がeffector B細胞よりも優位な状態であると考えられる。一方、EAE後期ではeffector B細胞がregulatory B細胞よりも優位な状態であることが考えられる。以上よりeffector B細胞とregulatory B細胞のバランスが自己免疫の病態形成に非常に重要であり、全身性

強皮症においても例外でない。実際Scl-cGVHDマウスにおいて、effector B細胞は病勢を悪化させることが示されている (Biol Blood Marrow Transplant 16:1222-1230, 2010)。

2. 研究の目的

Syk (Spleen tyrosine kinase) は、血液・免疫系の組織に発現する非受容体型チロシンキナーゼでB細胞の分化に重要な役割を担っている。Sykは、B細胞受容体(BCR)のすぐ下流に位置しBCRを介したシグナル伝達において中心的な役割を果たすため、Sykの欠如は、BCRシグナル伝達が遮断されB細胞の分化がプレB細胞への移行段階でストップする。またBCRによるシグナル伝達は、B細胞の抗体産生細胞への分化・増殖までを含む幅広いB細胞応答を制御する重要な調節点である。Sykには10カ所の自己リン酸化部位があり、それぞれの生理的役割が既に明らかにされている。近年、Sykを特異的に阻害する経口薬剤(Fostamatinib:R788)が開発され、現在米国で関節リウマチのフェーズの試験中である。またB細胞リンパ腫、前骨髄球形白血病や自己免疫疾患(特発性血小板減少性紫斑病)の病態への関与も報告されている。本研究は、強皮症モデルマウスにSyk阻害剤を投与し、皮膚硬化の進展が抑制されるかを検討する。さらに強皮症患者B細胞におけるSykの過剰発現の有無も解析し、将来の強皮症治療への応用の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) Scl-GVHDモデル

レシピエントとして、BALB/c (H-2d)マウスないしはCD19欠損BALB/c (H-2d)マウスを使用した。ドナーとして、B10.D2 (H-2d)マウスないしはCD19欠損B10.D2 (H-2d)マウスを使用した。B10.D2マウスから骨髄細胞(10×10^6 細胞)と脾臓細胞(10×10^6 細胞)を採取し、800cGy照射されたBALB/c (H-2d)マウスに骨髄移植し、皮膚硬化型慢性GVHDを誘導した。なお、本プロトコールは金沢大学学際科学実験センター実験動物研究施設の研究計画として承認を受けている。

(2) Syk阻害剤による治療

Syk阻害剤としてR788を使用した。R788は30mg/kgを経口にて移植後14日から42日まで投与した。Control groupは蒸留水を投与した。

(3) GVHD スキンスコア

以下のスコアリングシステムを用いた。スコア0=正常、スコア1=皮膚病変<1cm²、スコア2=皮膚病変1-2cm²、スコア3=皮膚病変2-5cm²、スコア4=皮膚病変5-10cm²、スコア5=皮膚病変10-15cm²、スコア6=皮膚病変15-20cm²、スコア7=皮膚病変>20cm²。尻尾の皮膚病変は0.4、耳や手足の皮膚病変を0.3とし、すべての合計点で示した。

(4) 病理組織学的検討

皮膚病変は H&E 染色、Masson's trichrome 染色にて評価した。病理組織学的スコアは epidermal morphology, dermal fibrosis, inflammation, subdermal fat, skin appendage number をそれぞれ 0-2 で評価した。

(5) 皮膚組織 mRNA 解析

皮膚組織から mRNA を抽出し、real-time RT-PCR にて遺伝子 mRNA を解析した。

(6) 末梢血中における phospho Syk 解析

末梢血中のリンパ球を分離し、刺激後、抗 phospho Syk 抗体で染色し、FACS にて解析した。

(7) 統計

全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で示した。有意差検定は Student's t test を使用した。

4. 研究成果

(1) 皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおける Syk の活性化

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルマウスで Syk が活性化されているかを、抗リン酸化 Syk 抗体を用いて FACS にて解析した。GVHD マウスの T 細胞、B 細胞、マクロファージにおいて、Syk のリン酸化が亢進していた (図 1)。

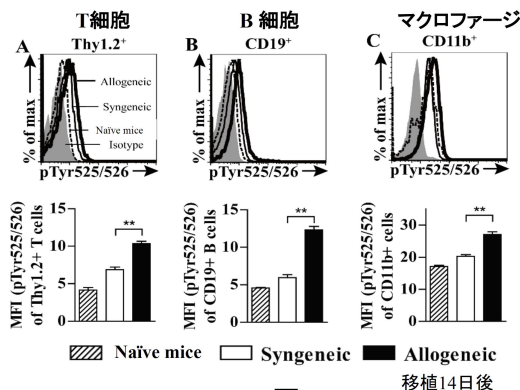


図 1

(2) 皮膚硬化型慢性 GVHD に対する Syk 阻害剤の効果

Syk 阻害剤の有効性を調べるために皮膚硬化型慢性 GVHD モデルマウスに、移植 14 日後より Syk 阻害剤を投与した。Syk 阻害剤投与群ではコントロール群と比べ有意にスキンスコアの改善が見られた (図 2)。また、線維化をマッソントリクローム染色で評価したところ、皮膚および肺の線維化も Syk 阻害剤投与群において有意に改善した (図 2)。

(3) サイトカイン産生能に対する Syk 阻害剤の効果

次に T 細胞、B 細胞、マクロファージのサイトカイン産生能に対する、Syk 阻害剤の効果を解析した。T 細胞は TNF- α 、IL-13、IL-17 を、B 細胞は IL-10 を、マクロファージは IL-6 を、細胞内サイトカイン染色にて評価した。T 細胞においては、TNF- α 産生の変化はみられなかったが、線維化を促進するサイトカインである IL-13、IL-17 の産生が Syk 阻害剤投与群において低下していた。

一方、B 細胞の IL-10 産生は不変であった。

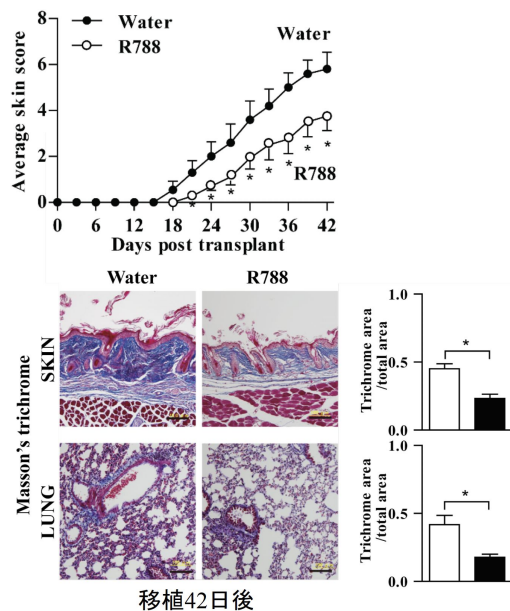


図 2

マクロファージでは、IL-6 産生が Syk 阻害剤投与群において低下した。

(4) T 細胞・マクロファージ活性化に対する Syk 阻害剤の効果

細部分裂能の解析には CFSE 染色による proliferation assay を使用した。Syk 阻害剤は CD4 ならびにマクロファージの細胞分裂を阻害した。

(5) Syk 阻害剤の皮膚硬化型慢性 GVHD モデルの皮膚におけるサイトカイン発現量に対する効果

皮膚から RNA を抽出し、real-time PCR を行った。TNF- α mRNA 発現は不変だが、IL-6、IL-13、IL-17、TGF- β 1 mRNA 発現が Syk 阻害剤により有意に抑制された (図 3)。

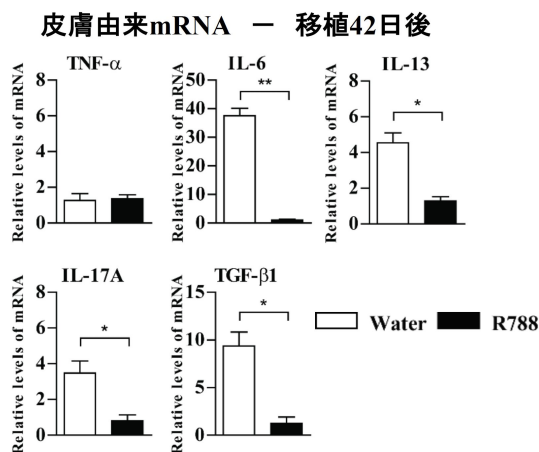


図 3

(6) 強皮症患者皮膚における Syk の発現解析
 健常人、強皮症患者皮膚組織における Syk の発現解析を行ったが、いずれの組織においても Syk の発現は認められなかった。

(7) 強皮症患者末梢血 B 細胞における phospho Syk の解析

全身性强皮症患者末梢血 B 細胞で Syk が活性化されているかを、抗リン酸化 Syk 抗体を用いて FACS にて解析した。強皮症患者末梢血 B 細胞の Syk のリン酸化は健常人と比べ亢進は認めなかった (図 4)。

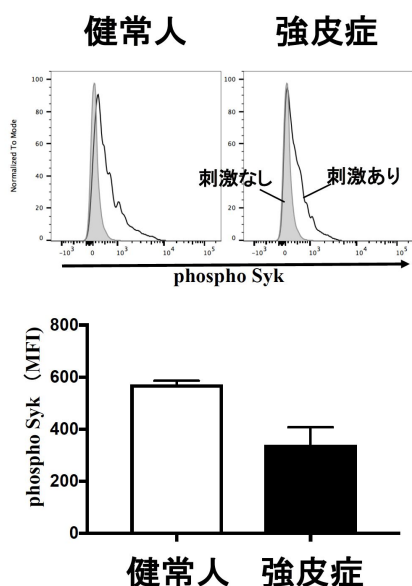


図 4

(8) まとめ

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルの T 細胞、B 細胞、マクロファージにおいて Syk のリン酸化が亢進していることより、Syk が治療のターゲット候補となることが明らかとなった。さらに Syk 阻害剤の投与により皮膚硬化型慢性 GVHD モデルが改善した。その作用機序としては、2 つの経路が明らかとなった。まず、1 つ目は、T 細胞ならびにマクロファージのサイトカイン産生に対する阻害作用である。2 つめは T 細胞ならびにマクロファージの活性化阻害作用である。B 細胞の Syk の活性は見られたが、Syk 阻害剤の B 細胞を介した抑制機序は明らかではなかった。一方、全身性强皮症患者末梢血 B 細胞の Syk のリン酸化は健常人と比べ亢進は認めなかった。以上より、全身性强皮症患者末梢血 B 細胞では Syk のリン酸化亢進は認めなかったものの、強皮症マウスモデルにおいて Syk は重要な役割を有しており、Syk が治療標的となる可能性が示唆された。

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 11 件)

1. Terao C, Kawaguchi T, Dieude P, Varga J,

Kuwana M, Hudson M, Kawaguchi Y, Matucci-Cerinic M, Ohmura K, Riemekasten G, Kawasaki A, Airo P, Horita T, Oka A, Hachulla E, Yoshifuji H, Caramaschi P, Hunzelmann N, Baron M, Atsumi T, Hassoun P, Torii T, Takahashi M, Tabara Y, Shimizu M, Tochimoto A, Ayuzawa N, Yanagida H, Furukawa H, Tohma S, Hasegawa M, Fujimoto M, Ishikawa O, Yamamoto T, Goto D, Asano Y, Jinnin M, Endo H, Takahashi H, Takehara K, Sato S, Ihn H, Raychaudhuri S, Liao K, Gregersen P, Tsuchiya N, Ricciari V, Melchers I, Valentini G, Cauvet A, Martinez M, Mimori T, Matsuda F, Allanore Y. Transethnic meta-analysis identifies GSDMA and PRDM1 as susceptibility genes to systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2017 doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210645. [Epub ahead of print] { 査読有り }

2. Matsushita T, Date M, Kano M, Mizumaki K, Tennichi M, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Blockade of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibits Murine Sclerodermatous Chronic Graft-versus-Host Disease. *Am J Pathol*. 187: 841-850. 2017 doi: 10.1016/j.ajpath.2016.12.016. { 査読有り }

3. Ikawa Y, Hamaguchi Y, Mugii N, Matsushita T, Takehara K. Classification of Japanese patients with mild/early systemic sclerosis (SSc) by the 2013 ACR/EULAR classification criteria for SSc. *Mod Rheumatol*. 14: 1-4. 2016 DOI:10.1080/14397595.2016.1250332 { 査読有り }

4. Takeuchi A, Matsushita T, Kaji K, Okamoto Y, Yasui M, Hirata M, Oishi N,

- Higashi A, Seishima M, Asano T, Fujimoto M, Kuwana M, Takehara K, Hamaguchi Y. Autoantibody to scaffold attachment factor B (SAFB): A novel connective tissue disease-related autoantibody associated with interstitial lung disease. *J Autoimmun.* 76: 101-107. 2016 doi: 10.1016/j.jaut.2016.09.006. { 査読有り }
5. Matsushita T, Hasegawa M, Takehara K. Watermelon stomach and colon in a patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Mod Rheumatol.* 27: 376-377. 2016 doi: 10.1080/14397595.2016.1207287. { 査読有り }
6. Hamaguchi Y, Sumida T, Kawaguchi Y, Ihn H, Tanaka S, Asano Y, Motegi SI, Kuwana M, Endo H, Takehara K. Safety and tolerability of bosentan for digital ulcers in Japanese patients with systemic sclerosis: Prospective, multicenter, open-label study. *J Dermatol.* 44:13-17.2016 doi: 10.1111/1346-8138.13497. { 査読有り }
7. Furukawa H, Oka S, Kawasaki A, Shimada K, Sugii S, Matsushita T, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kobayashi K, Osada A, Ihata A, Kondo Y, Nagai T, Setoguchi K, Okamoto A, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Kono H, Katayama M, Hirohata S, Sumida T, Migita K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S, Nagaoka S, Takehara K, Tohma S, Tsuchiya N. Human Leukocyte Antigen and Systemic Sclerosis in Japanese: The Sign of the Four Independent Protective Alleles, DRB1*13:02, DRB1*14:06, DQB1*03:01, and DPB1*02:01. *PLoS One.* 11:e0154255. 2016 doi: 10.1371/journal.pone.0154255. { 査読有り }
8. Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Naka K, Hirao A, Muramatsu M, Takehara K, Fujimoto M. A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses allergic disease through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activation. *J Allergy Clin Immunol.* 138: 1170-1182. 2016 doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1319. { 査読有り }
9. Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M. Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: association with autoantibody production and disease activity. *Rheumatology (Oxford).* 55: 263-7. 2016 doi: 10.1093/rheumatology/kev331. { 査読有り }
10. Hamaguchi Y, Kodera M, Matsushita T, Hasegawa M, Inaba Y, Usuda T, Kuwana M, Takehara K, Fujimoto M. Clinical and immunological predictors of scleroderma renal crisis for Japanese systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase III autoantibodies. *Arthritis Rheumatol.* 67: 1045-52. 2015 doi: 10.1002/art.38994. { 査読有り }
11. Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, Naka T. Proteomic identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology (Oxford)*

54: 349-58 2015 doi:
10.1093/rheumatology/keu325. { 査読有
り }

[学会発表](計 7件)

1. Takehara K (招待講演): Current topics in systemic sclerosis. 10th Asian Dermatological Congress. October 2016. Mumbai, India
2. Takehara K (招待講演): Current topics in systemic sclerosis. Vietnamese Society of Dermatology & Venereology. March 2016, Vietnam
3. Ikawa Y, Mugii N, Matsushita T, Hamaguchi Y, Takehara K: Sensitivity and specificity of the 2013 ACR/EULAR classification criteria for systemic sclerosis in Japanese patients with early systemic sclerosis. 4th Systemic Sclerosis World Congress. February 2016, Lisbon, Portugal
4. Takehara K and DU Clinical Trial Group In Japan: Safety and efficacy of bosentan treatment in Japanese patients with digital ulcers associated with systemic sclerosis. 4th Systemic Sclerosis World Congress. February 2016, Lisbon, Portugal
5. Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Decreased Levels of Regulatory B cells in Patients with Systemic Sclerosis: Association with autoantibody production. 45th Annual ESDR Meeting. September 2015 Rotterdam, Netherlands
6. 竹原和彦, 清水恭子, 松下貴史, 濱口 儒人: 抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性の小児限局性強皮症の 1 例, 日本皮膚科学会新潟地方会 2015 年 4 月、新潟
7. Takehara K (招待講演): Clinical significance of antinuclear antibodies in connective tissue disease 21st Regional Conference of Dermatology, April 2014,

Danang, Vietnam.

[図書](計 2件)

1. Fujimoto M, Takehara K. Transforming Growth Factor- and Connective Tissue Growth Factor. Systemic sclerosis, Takehara K, Fujimoto M, Kuwana M, Eds., Springer :137-153 , 2016
2. Matsushita T, Takehara K. The Role of B Cells in Systemic Sclerosis. Systemic sclerosis, Takehara K, Fujimoto M, Kuwana M, Eds., Springer :173-185 , 2016

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等:なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹原 和彦 (TAKEHARA, Kazuhiko)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 50142253

(2)研究分担者

松下 貴史 (MATSUSHITA, Takashi)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号: 60432126