

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09898

研究課題名(和文) 全身性強皮症の病態形成におけるマスト細胞および生理活性物質の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of mast cells and bioactive substances in the pathogenesis of systemic sclerosis

研究代表者

赤星 光輝 (AKAHOSHI, Mitsuteru)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40391841

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)：全身性強皮症患者末梢血におけるエンドセリン1およびアンジオテンシンII濃度は、間質性肺炎合併例や抗Scl-70抗体陽性患者において健常人と比較し高い傾向が認められた。血清ヒスタミン値は間質性肺炎や肺高血圧症合併例で上昇しており、肺機能や間質性肺炎マーカーとの相関が認められた。また、強皮症患者やブレオマイシン誘導性強皮症モデルの皮膚病変部ではマスト細胞の発現亢進・活性化が見られ、マスト細胞欠損マウス、chymase欠損マウスにおいては強皮症病態が野生型モデルより軽微であった。以上より、強皮症病態形成における種々の生理活性物質の調節を介したマスト細胞およびchymaseの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は病態の解明が十分でなく有効な治療法の乏しい難治性疾患である。これまでエンドセリン-1やアンジオテンシン IIといった生理活性物質の強皮症病態形成における役割が示されてきた。マスト細胞は強皮症皮膚病変部で増加しており、種々の生理活性物質の産生・分解にマスト細胞由来のプロテアーゼ(キマーゼなど)が関与していることより、マスト細胞がこれら生理活性物質の発現調節を通じて強皮症の病態形成に関与している可能性を本研究で検証した。その結果、強皮症病態形成におけるキマーゼや生理活性物質の役割が示唆され、マスト細胞やそのプロテアーゼをターゲットにした治療が強皮症病態に有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In peripheral blood of patients with systemic sclerosis (SSc), endothelin 1 (ET-1) and angiotensin II (AT II) concentrations tended to be higher in SSc patients with interstitial pneumonia (IP) and those who had positive for anti-Scl-70 antibody than in healthy subjects. Serum histamine levels were elevated in SSc patients with IP or pulmonary hypertension, and correlated with pulmonary function (VC, DLCO) and IP markers (KL-6, SP-D). In addition, increased numbers of activated mast cells (MCs) were observed in skin lesions of SSc patients and the bleomycin-induced scleroderma model, and there was less severe pathology in skin lesions of MC-deficient mice or chymase-deficient mice than in the wild-type model. Taken together, a role of MCs and MC-derived chymase, through the regulation of various bioactive substances such as ET-1 and AT II, was indicated in the pathological mechanism of SSc.

研究分野：リウマチ・膠原病学

キーワード：マスト細胞 強皮症 生理活性物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症では皮膚病変部にマスト細胞が増加していることがこれまで多くの研究で示されている。具体的には、ヒト強皮症やそのモデルマウスにおける皮膚のマスト細胞数・脱顆粒の増加(Hawkins RA, et al. *Ann Intern Med* 1985;102:182. Seibold JR, et al. *Arthritis Rheum* 1990;33:1702.)、マスト細胞の活性化を反映した血中ヒスタミンやトリプターゼレベルの上昇(Falanga V, et al. *Arch Dermatol* 1990;126:336. Irani AM, et al. *Arthritis Rheum* 1992;35:933.)が認められている。マスト細胞はプロテアーゼなど顆粒メディエーターの作用により、線維芽細胞増殖やコラーゲン産生を亢進させることで線維化病態に関与することが示唆されており(Ruoss SJ, et al. *J Clin Invest* 1991;88:493. Garbuzenko E, et al. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:237.)、マスト細胞プロテアーゼ阻害薬によるモデルマウス皮膚硬化の進行抑制(Shiota N, et al. *Br J Pharmacol* 2005;145:424.)、またヒトでの IL-6 阻害薬治療による皮膚硬化の改善に伴ったマスト細胞数の低下(Kitaba S, et al. *Am J Pathol* 2012;185:165.)も確認されている。病態に関しては、強皮症皮膚でのマスト細胞の脱顆粒による TGFβ分泌(Hügler T, et al. *Arthritis Rheum* 2011;63:795.)、IL-17A 陽性マスト細胞の増加(Truchetet ME, et al. *Arthritis Rheum* 2013;65:1347.)、マスト細胞における TSLP の高発現(Usategui A, et al. *Ann Rheum Dis* 2013;72:2018.)等の報告がある。

一方、マスト細胞については、その「抗毒素作用」が最近注目されている。1971年 Higginbotham と Karnella はマスト細胞由来のヘパリンによってハチ毒やヘビ毒の毒性が減弱する可能性を報告し(Higginbotham RD and Karnella S. *J Immunol* 1971;106:233.)、1991年には生物学者 Margie Profet が、マスト細胞や IgE メカニズムは生物/環境毒素に対する生体のバックアップ防御機構であるとする“toxin hypothesis(毒素仮説)”を提唱した(Profet M. *Q Rev Biol* 1991;66:23)。これらの仮説は長らく注目されてこなかったが、近年マスト細胞が特定のヘビ毒やハチ毒、トカゲ毒等への抵抗性を増強させる働きが証明され(Metz M, et al. *Science* 2006;313:526. Akahoshi M, et al. *J Clin Invest* 2011;121:4180.)、種々の動物毒およびその主要な毒性物質に対する innate な生体防御反応に寄与していることが示された。さらにその後 2 つのグループからの報告により、IgE や Fcε受容体を介した Th2 型免疫反応(獲得免疫)によっても動物毒やそのコンポーネントに対する抵抗性を増強させているというエビデンスが示された(Marichal T, et al. *Immunity* 2013;39:963. Palm NW, et al. *Immunity* 2013;39:976)。これら一連の研究から、マスト細胞が innate あるいは IgE 依存性の獲得免疫応答により、放出されたプロテアーゼを含めたマスト細胞顆粒内容物による毒素の解毒分解作用等による機序を介して、動物毒や環境毒素に対する抵抗性を増強させ生体防御における重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これは進化的に我々哺乳類におけるマスト細胞の本来持つ重要な役割が、広く環境中の毒性物質に対する防御反応であることを強く示唆するものと言える。

リウマチ専門医として膠原病患者の診療にあたり改めて全身性強皮症の病態を考えてみた時に、「マスト細胞」さらに「毒素/有害物質」というキーワードが強皮症病態でも共通して関わっていることに強い関心を抱いた。すなわち強皮症は薬物・シリカ・有機溶媒への長期暴露で発症する例が知られており、ブレオマイシン連続投与による強皮症モデルの存在、さらにシリコン等によるヒトアジュバント病でも定型的な強皮症病態をきたす例が知られている。これら既知の観察事項に加え、強皮症は膠原病のなかでも特に環境要因との関連性が高いと考えられている点、病変部でのマスト細胞数の増加と活性化、などを勘案すると、(少なくとも一部の)強皮症病態は(一定の遺伝要因に加え)何らかの環境要因が作用し、マスト細胞が関わる「慢性持続的な異物・有害物質(環境毒素)への生体反応」あるいは「長期間にわたって誘導された炎症病態に対する(過剰な)組織修復作用」の結果もたらされるのではないかと仮説が強く支持されるものと考えられた。このような研究を通じて新たな視点で強皮症病態の評価を行うことがその病態・発症機序への理解につながり、ひいては予防や新規治療アプローチに寄与する知見が得られることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、全身性強皮症の病態形成に関わると考えられる種々の生理活性物質の分解産生調節を介してマスト細胞がどのように強皮症病態を修飾しているかを明らかにすることを目的とする。マスト細胞欠損マウスやプロテアーゼ欠損マウスを用いて、主にブレオマイシン誘導性強皮症モデルでの解析を行うことで強皮症・線維化病態形成におけるマスト細胞、特にそのプロテアーゼの役割を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 全身性強皮症患者の皮膚生検サンプルにおけるマスト細胞の量的質的評価

強皮症診断目的で皮膚生検を施行した症例において、生検サンプルを用いて toluidine blue 染色、加えてトリプターゼ染色、c-kit 免疫染色を行い、標本面積当たりのマスト細胞数 (/mm²) を計測するとともに脱顆粒の程度を評価し、マスト細胞の強皮症皮膚病変部における質的量的評価を行う。これまで当科の症例での検討の結果、強皮症皮膚での一部活性化を伴うマスト細胞の増加を確認している。

(2) 全身性強皮症患者における生理活性物質濃度およびマスト細胞活性化マーカーの評価

九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科に入院・通院中で同意の得られた全身性強皮症患者より末梢血を採取し、エンドセリン-1 (ET-1)、アンジオテンシン II (AT II) などの生理活性ペプチド濃度を ELISA 法で測定する。それぞれの結果を、患者臨床症状 (皮膚硬化の程度、間質性肺炎や肺高血圧合併の有無など) や検査データ (自己抗体の種類、肺機能検査など) との比較を行う。また、強皮症患者におけるマスト細胞の活性化状態を評価するため、マスト細胞活性化マーカーである末梢血中のヒスタミン、トリプターゼ値を ELISA 法で測定し、臨床データとの比較、また皮膚生検を行っている患者においては、その皮膚マスト細胞数や脱顆粒の程度との比較も行う。

(3) 強皮症病態形成における生理活性物質、マスト細胞および chymase (キマーゼ) の意義:

臨床サンプルの解析とともに、代表的な強皮症モデルであるブレオマイシン (BLM) 誘導性強皮症モデルマウスを用いての解析を行う。BLM 至適投与プロトコルを検討した後、まず野生型マウス (C57BL/6J) と Kit 遺伝子変異をもつマスト細胞欠損マウス (C57BL/6-Kit^{W-sh/W-sh}) での BLM 反応性、すなわち BLM 長期皮下投与による皮膚硬化・線維化変化を比較する。両者で差が認められた場合、さらにマスト細胞ノックインマウス (野生型マウス由来の培養マスト細胞を移入したマスト細胞欠損マウス) を作成し、3群間での反応性比較も検討する。

ET-1 や AT II といった生理活性ペプチドは、線維芽細胞分化、細胞外マトリックス/コラーゲン産生を誘導し強皮症・線維化病態に関わることが知られている。またこれらの生理活性ペプチドはマスト細胞由来のプロテアーゼによって活性/分解調節を受けるため、BLM 誘導モデルにおいてこれらの生理活性ペプチドの血中濃度もあわせて評価・比較を行う。さらに、マスト細胞プロテアーゼ欠損/不活化マウス、とくに chymase 欠損マウスについても海外の共同研究者から供与を受け、上記 BLM 誘導モデル作成し、線維化病態の重症度、血中生理活性ペプチド濃度 (ET-1, AT II など) の変化を評価する。

4. 研究成果

(1) 全身性強皮症患者末梢血における ET-1 および AT II 濃度は、間質性肺炎合併例や抗 Scl-70 抗体陽性患者において健常人と比較し高い傾向が認められた。

(2) 血清ヒスタミン値は間質性肺炎や肺高血圧症合併例で上昇しており、肺機能や間質性肺炎マーカーとの相関が認められた。

(3) 強皮症患者やブレオマイシン誘導性強皮症モデルの皮膚病変部ではマスト細胞の発現亢進・活性化が見られ、マスト細胞欠損マウス、chymase 欠損マウスにおいては強皮症病態が野生型モデルより軽微であった。

以上より、強皮症病態形成における種々の生理活性物質の調節を介したマスト細胞および chymase の関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Ayano M, Tsukamoto H, Mitoma H, Kimoto Y, Akahoshi M, Arinobu Y, Miyamoto T, Horiuchi T, Niino H, Nagafuji K, Harada M, Akashi K. CD34-selected versus unmanipulated autologous haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe systemic sclerosis: a post hoc analysis of a phase I/II clinical trial conducted in Japan. *Arthritis Res Ther*. 2019;21(1):30. (査読あり)

2. Ueda S, Akahoshi M, Takeda A, Inoue Y, Omoto A, Ayano M, Kimoto Y, Mitoma H, Arinobu Y, Niiro H, Tsukamoto H, Horiuchi T, Hikita SI, Fukuhara T, Ishibashi T, Sonoda KH, Akashi K. Long-term efficacy of infliximab treatment and the predictors of treatment outcomes in patients with refractory uveitis associated with Behçet's disease. Eur J Rheumatol. 2018;5(1):9-15. (査読あり)
3. Nakagawa J, Koyama Y, Kawakami A, Ueki Y, Tsukamoto H, Horiuchi T, Nagano S, Uchino A, Ota T, Akahoshi M, Akashi K. A novel scoring system based on common laboratory tests predicts the efficacy of TNF-inhibitor and IL-6 targeted therapy in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective, multicenter observational study. Arthritis Res Ther. 2017;19(1):185. (査読あり)
4. Tsuzuki H, Arinobu Y, Miyawaki K, Takaki A, Ota SI, Ota Y, Mitoma H, Akahoshi M, Mori Y, Iwasaki H, Niiro H, Tsukamoto H, Akashi K. Functional interleukin-33 receptors are expressed in early progenitor stages of allergy-related granulocytes. Immunology. 2017;150(1):64-73. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

柏戸佑介、赤星光輝、綾野雅宏、木本泰孝、三苦弘喜、有信洋二郎、赤司浩一、堀内孝彦、新納宏昭。「全身性強皮症症例における皮膚病理所見の免疫学的検討」第 57 回 九州リウマチ学会

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：有信 洋二郎

ローマ字氏名：ARINOBU, Yojiro

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 90467928

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。