

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15511

研究課題名(和文) 全身性強皮症の主要3病態のすべてを抑える画期的治療法の開発

研究課題名(英文) The development of new therapies targeting the three cardinal pathological processes of systemic sclerosis

研究代表者

佐藤 伸一 (Sato, Shinichi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：20215792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器の血管障害と線維化を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。我々は先行研究において、血管内皮細胞特異的Fli1欠失マウスが強皮症の血管障害を忠実に再現することを見出し、同マウスとブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを併用することにより、強皮症の主要3病態を分けて解析する実験系を確立した。本研究ではこのシステムを活用し、グリチルリチンおよびシクロホスファミドが強皮症の主要3病態に及ぼす影響について検討を行い、それぞれの薬剤の強皮症の病態に対する作用点を明らかにした。グリチルリチンについては特許出願しており、現在全身性強皮症患者を対象に特定臨床研究を行っている。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is a multisystem autoimmune disease characterized by vasculopathy and fibrosis of the skin and various internal organs. We recently established a new experimental system in which the three pathological features of SSc, such as immune abnormality, vasculopathy, and tissue fibrosis, can be separately assessed by using endothelial cell-specific Fli1 knockout mice, which mimic SSc vasculopathy, and bleomycin-treated mice, which resemble inflammation and tissue fibrosis of SSc. In this study, we identified the mechanisms by which glycyrrhizin and cyclophosphamide affect the developmental process of SSc by using this experimental system. At the time of writing, glycyrrhizin is applied for a patent, and we are conducting a prospective clinical study to evaluate the efficacy of glycyrrhizin on SSc vasculopathy.

研究分野：膠原病、特に全身性強皮症

キーワード：全身性強皮症 動物モデル 線維化 血管障害 免疫異常 Fli1 ブレオマイシン

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症（以下、強皮症）は線維化・血管障害・免疫異常を主要3病態とする膠原病であり、指定難病に認定されている。その病因は未だ不明であり、病態に立脚した確立された治療法は存在しない。現時点では主要3病態のうちの1つ、特に免疫異常を標的とした治療法はあるものの、それだけでは効果は全く不十分と言わざるを得ない。強皮症患者の予後を改善するためには、本症の主要3病態を同時に等しく抑制する治療法の開発が急務である。

シクロホスファミドパルス療法は強皮症に伴う間質性肺疾患の標準治療薬として以前から使用されており、他の免疫抑制薬と一線を画する効果を示す。その背景として、同薬は免疫抑制作用の他に、骨髄から末梢血中に血管内皮前駆細胞を誘導して血管障害を改善させる作用がある。こうした事実は、2つの病態に同時に作用する薬剤は治療効果が高いことを示唆している。しかし、現時点では強皮症の主要3病態を同時に等しく抑制する治療法は開発されていない。

強皮症の治療開発が遅れている背景として、その病態を忠実に反映した動物モデルが過去に存在しなかったことが挙げられる。そのような状況の中、申請者は2014年に強皮症の主要3病態を「免疫異常→血管障害→線維化」という病態の列挙性をもって忠実に再現する世界初の遺伝子改変マウスの作成に成功した。また、プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスと血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスを併用して、線維化・炎症と血管障害に対する薬剤の治療効果を分けて解析する手法を確立した。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、上記の研究資材と研究手法を併用して、「強皮症の主要3病態を同時に等しく抑制する薬剤を同定すること」あるいは「薬剤の組合せにより強皮症の主要3病態のすべてを抑制する治療法を開発すること」が本研究の目的である。本研究の特色は、複数の強皮症モデルマウスを用いて線維化・血管障害・免疫異常の病態別解析を実現している点である。強皮症治療薬は作用機序が不明なものが多いが、作用点に基づく薬剤の層別化は、効率的な併用療法を考案する上で大変有用であり、本症の治療戦略の発展に大きく貢献できると予想される。

3. 研究の方法

(1) マウス

本研究では8週齢(C57BL/6)のマウスを用いてプレオマイシン(BLM)誘発強皮症モデルマウスを作成した。BLM誘発強皮症モデルマウスはBLM(日本化薬)をリン酸緩衝液(PBS)に1mg/mlとなるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛したマウスの背部皮膚へ4週間ないし1週間にわたり300 μ lずつ連日皮内注射を行うことにより作成した。対照群としてPBSのみをBLMと同様の方法でマウ

スに投与した。血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失(*Fli1* ECKO)マウス(*Fli1*^{fllox/fllox}; *Tie2-Cre*)はボストン医科大学のMaria Trojanowska氏より供与を受けた。いずれの研究も東京大学動物実験規則を遵守して行った。

(2) グリチルリチンの投与

グリチルリチン酸モノアンモニウム(宏輝システムズ)をPBSに溶き、30mg/kgになるようにマウスの腹腔内に連日投与した。

(3) 皮膚のハイドロキシプロリン測定

背部皮膚検体を6mmパンチにて採取し、Total Collagen kit (QuickZyme Biosciences, Netherland)を用いて測定した。

(4) 免疫染色

BLM誘発強皮症モデルマウスの背部皮膚のパラフィン切片を作成し、H&E染色を行い真皮の厚さを測定した。またVEVTOUR M.O.M Immunodetection Kit (Vector laboratories)の製品マニュアルにしたがって、抗 α -smooth muscle actin (α -SMA)抗体(Sigma-Aldrich)と反応させた後、DAB(0.2mg/ml, DOJINDO LABORATORIES)で発色させた。

(5) 各種遺伝子のmRNAの発現量の検討

マウスの背部皮膚もしくは培養細胞から、RNeasy min kit (Qiagen)を用いてTotal RNAを作成した。作成したTotal RNAよりRverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO LIFE SCIENCE)を用いてcomplementary DNAを作成した。Realtime quantitative PCRはSYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies)とABI Prism 7000 system (Life Technologies)を用いて測定を行った。各々のmRNA量は*Gapdh* mRNAを用いて補正した。

(6) 免疫ブロッティング

培養皮膚線維芽細胞からwhole cell lysateを作成し、各15 μ gの検体を10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を一次抗体と反応させた後、horse-radish peroxidaseと結合した二次抗体と反応させ、enhanced chemiluminescenceで発光させた。

(7) Intracellular cytokine staining

1週間の処理を行ったBLM誘発強皮症モデルマウスを用いた。最終投与翌日にマウスの両側鼠径リンパ節と脾臓を摘出した。リンパ節はすり潰してリンパ球を分離した。脾臓から取り出した血球は、RBC lysis buffer (0.0017M Trizma, Sigma-Aldrich, 0.1M NH₄Cl 2.675g, Sigma-Aldrich)を添加してリンパ球を分離した。リンパ球は抗CD3抗体(17A2)、抗CD4抗体(RM4-5)、抗CD8抗体(53-6.7)を用いて表面抗原の染色を行った。また10ng/ml phorbol myristate acetate (Sigma-Aldrich), 1g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich), 1g/ml brefeldin A (GolgiStop; BD Pharmingen)で4時間刺激を行い、抗IL-4抗体(11B11, BioLegend), 抗IL-17A抗体(TC11-18HC0.1, BioLegend), 抗IFN- γ 抗体(XMG1.2, BioLegend)を用いて、細胞内抗原の染色を行

った。染色されたリンパ球を FACS Verseflow cytometer (BD Biosciences) を用いて解析した。

(9) 蛍光二重染色

BLM 誘発強皮症モデルマウスの注射部位の皮膚検体を用いて、パラフィン切片を作成し、一次抗体として rabbit 抗 VE-cadherin 抗体 (Santa Cruz Biotechnolog) と goat 抗 fibroblast-specific protein 1 (FSP1) 抗体 (abcam) を、二次抗体として FITC-conjugated donkey 抗 rabbit IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnolog) と Alexa Fluor donkey 555 抗 goat IgG 抗体 (Invitrogen, Carlsbad) を用いて反応させ、Vectashield with DAPI (Vector Laboratories) で核の染色を行い、Bio Zero BZ-8000 (Keyence) を用いて 495nm (green), 565 nm (red), 400 nm (blue) の波長で観察を行った。緑色に観察される FSP1 と赤色に観察される VE-cadherin が同時に染まる細胞の数の比較を行った。

(10) 血管の構造的評価

マウスの尾静脈から FITC-dextran (2000 kDa, 20 mg/ml in PBS) を 200 μ l 注射し、5 分後にマウスを安楽死させた。背部皮膚を剥離し、蛍光顕微鏡下で真皮と脂肪組織境界部の血管構造を観察した。

(11) 血管の透過性の評価

マウスの尾静脈から Evans blue 色素 (0.5% in PBS) を 200 μ l 注射し、30 分後にマウスを安楽死させた。腹側皮膚を剥離し色素の漏出を肉眼的に確認した。Evans blue 色素の定量化は、血管を避けるように 4mm パンチで皮膚を 3 箇所採取し、formamide (150 μ l) で溶解させた後、620nm の蛍光波長で観察した。

(12) 統計学的解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。多群間の比較には分散分析法 (ANOVA) と Bonferroni post hoc test を用いた。P<0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1) グリチルリチンに関する解析

①グリチルリチンは BLM による皮膚硬化を減弱する

BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、グリチルリチンは真皮の肥厚および皮膚におけるハイドロキシプロリンの含有量を有意

に抑制した (図 1)。また、*Colla1*, *Colla2*, *Col3a1* の mRNA の発現量を有意に抑制し、*Mmp13* の mRNA の発現量を有意に亢進させた。さらに、皮膚における筋線維芽細胞の数を有意に減少させた。以上の結果から、グリチルリチンは線維芽細胞の活性化を抑制することにより BLM 誘発性の皮膚線維化を減弱していることが明らかとなった。

②グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、皮膚線維芽細胞における autocrine TGF- β signaling を阻害し、かつ線維化関連遺伝子の転写を制御する Smad3 と Ets1 の発現を抑制する

皮膚の線維化には線維芽細胞における TGF- β signaling の活性化と CTGF の発現亢進が重要である。そこで、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚においてこれらの成長因子の発現量について検討してみたところ、グリチルリチンはいずれの発現量も mRNA レベルでは抑制しないことが明らかとなった。次に、TGF- β signaling の活性化の状態について Smad3 の免疫染色で確認したところ、グリチルリチンは皮膚線維芽細胞において Smad3 の発現を顕著に抑制していた。以上の結果から、グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、TGF- β の発現量は抑制しないが、線維芽細胞における TGF- β signaling は抑制することが明らかとなった。

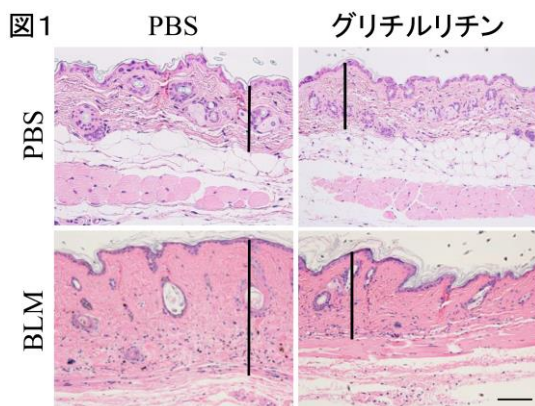
TGF- β は latency-associated peptide (LAP) と結合した潜在型として各種細胞から産生されるが、細胞外において LAP から解離することで活性型となり、その生理作用を発揮できるようになる。そこで、LAP の受容体として作用し、かつ LAP と TGF- β の解離を促す細胞表面分子、すなわち integrin α V β 3, α V β 5, thrombospondin 1 に注目して検討を進めることとした。BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚においてこれらの分子の mRNA の発現量を検討したところ、グリチルリチンの投与により *Thbs1* mRNA の発現量が抑制されることが明らかとなった。

次に、培養皮膚線維芽細胞を用いて、グリチルリチンが線維化関連遺伝子の発現を制御している転写因子に及ぼす影響を検討したところ、Smad3 の発現量およびそのリン酸化が抑制された。Ets1 および Fli1 についても検討したところ、Ets1 の発現量は抑制されたが、Fli1 の発現量は変化しなかった。

以上の結果から、グリチルリチンは線維芽細胞に作用して、「thrombospondin 1 の発現を抑制することにより autocrine TGF- β signaling を阻害すること」、「線維化関連遺伝子の発現を制御する Smad3 と Ets1 の働きを抑制すること」により抗線維化作用を発揮していることが明らかとなった。

③グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、Th2 優位の免疫応答を改善する

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、グリチルリチンは *Il1b*, *Il4*, そして *Il6*



の mRNA の発現量を抑制した。これらのことから、グリチルリチンは皮膚の線維化につながる Th2 優位な免疫応答を抑制していると考えられた。この結果をさらに検証するため、皮膚所属リンパ節及び脾臓から回収した細胞を FACS にて解析したところ、グリチルリチンは Th1 細胞と Th17 細胞の割合には影響を与えなかったが、Th2 細胞の割合を有意に低下させた。以上の結果から、グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において Th2 優位な免疫応答を抑制することにより、抗線維化作用を発揮している可能性が示唆された。

④グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、血管内皮間葉移行を抑制する

過去の検討において、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚では血管内皮間葉移行が亢進していることが示されており、線維化の機序の一つとして重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、グリチルリチンが血管内皮間葉移行に影響を及ぼしているか否かについて蛍光二重染色で検討したところ、グリチルリチン投与群の皮膚では VE-cadherin と FSP-1 に共陽性となる細胞数が有意に減少していた。さらに、血管内皮間葉移行を制御する転写因子 Snail-1 についても検討したところ、その mRNA の発現量は有意に抑制されていた。以上の結果から、グリチルリチンは血管内皮間葉移行を抑制することにより抗線維化作用を発揮していると考えられた。

⑤グリチルリチンは全身性強皮症の血管障害を模した血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスにおける血管障害を改善する

Fli1 ECKO マウスは全身性強皮症の血管障害を模倣するが、その機序の一つとして血管内皮細胞と血管周皮細胞の相互作用の減弱 (pericyte loss) が重要な役割を果たしていると考えられている。この現象は、血管周皮細胞における α -SMA の発現量を調べることで評価が可能である。つまり、血管周皮細胞において α -SMA の発現が低下している場合は pericyte loss が生じて血管が不安定になっているが、逆に α -SMA の発現が亢進している場合は血管周皮細胞と血管内皮細胞は強固に相互作用して成熟した血管を形成している。そこで、グリチルリチンが *Fli1* ECKO マウスの血管に及ぼす影響について α -SMA の免疫染色で検討したところ、グリチルリチンにより *Fli1* ECKO マウスの血管周皮細胞における α -SMA の発現は亢進した。また、Evans blue 色素を用いた血管透過性試験を行ったところ、グリチルリチンにより *Fli1* ECKO マウスの血管透過性の異常は改善した。一方、*Fli1* ECKO マウスでは全身性強皮症に特徴的に認められる細動脈の狭窄や毛細血管拡張がみられるが、グリチルリチンを 2 週間投与してもこれらの血管の構造異常は改善しなかった。*Fli1* ECKO マウスの血管の不安定化には、

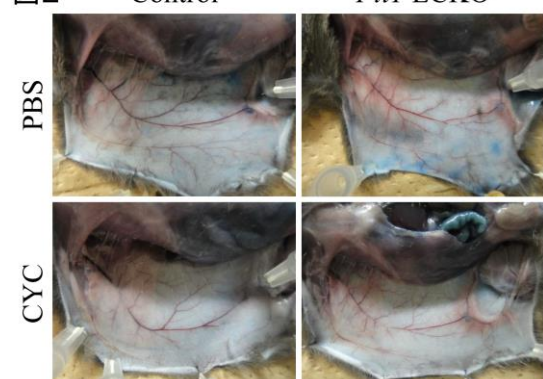
血管内皮細胞における VE-cadherin, PECAM-1, PDGF-B, S1P₁ の発現低下が重要であることが知られているが、グリチルリチンを投与した *Fli1* ECKO マウスの皮膚では *Cad5*, *Pecam1*, *Pdgfb* の mRNA の発現量が亢進していた。なお、グリチルリチンは培養皮膚微小血管内皮細胞において *Fli1* の発現量には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、グリチルリチンは *Fli1* 依存性の血管障害を *Fli1* 非依存性の機序を介して改善する作用があることが明らかとなった。

(2) シクロホスファミド(CYC)に関する解析

①CYC には *Fli1* ECKO マウスの血管の脆弱性を改善させる作用がある

Fli1 ECKO マウス (*Fli1*^{flox/flox}; *Tie2-Cre*) と対照マウス (*Fli1*^{flox/flox}) に CYC あるいは PBS を腹腔内投与し、CYC が皮膚微小血管の脆弱性に及ぼす影響を評価した。我々の先行研究において、*Fli1* ECKO マウスでは皮膚微小血管が脆弱化しており、Evan blue 色素静注試験では皮膚微小血管の周囲に顕著な色素漏出が生じることが明らかとなっている。CYC あるいは PBS を腹腔内投与し、2 週間後に Evan blue 色素静注試験を行ったところ、対照マウスでは両群とも肉眼的に明らかな色素の漏出を認めなかったが、*Fli1* ECKO マウスでは CYC 投与群において PBS 投与群と比較して色素の漏出が顕著に低下していた (図 2)。

図 2 Control *Fli1* ECKO



肉眼的に色素漏出が確認できなかった部位から生検トレパン (直径 6mm) で皮膚を採取し、ホルムアミドで Evans blue 色素を抽出し、吸光度測定にて定量化したところ、*Fli1* ECKO マウスでは CYC 投与により色素漏出が顕著に抑制されていることが明らかとなった。以上より、CYC には *Fli1* ECKO マウスの血管の脆弱性を改善させる作用があり、その効果は投与後 2 週間で十分発揮されることが明らかとなった。

②CYC には *Fli1* ECKO マウスの血管構造の異常を改善させる作用がある

Fli1 ECKO マウスおよび対照マウスに CYC あるいは PBS を腹腔内に 2 週間間隔で 3 か月まで反復投与し (合計 6 回)、投与開始から 2 週間後と 3 か月後において尾静脈から FITC-dextran を投与して皮膚微小血管の構造を評価した。*Fli1* ECKO マウスでは「細動脈狭窄」と「毛細血管拡張」がみられることが

既に明らかになっているが、投与開始から 3 か月後の *Fli1* ECKO マウスでは CYC 群において PBS 群と比較して血管の構造異常は顕著に改善していた。一方、投与開始から 2 週間後の *Fli1* ECKO マウスでは CYC 群と PBS 群の両群間で血管の構造異常に差は認められなかった。以上の結果から、CYC には *Fli1* ECKO マウスの血管構造の異常を改善させる作用があり、その効果の発現には血管脆弱性の改善よりも時間を要することが明らかとなった。

③CYC は pericyte loss を改善させることにより、*Fli1* ECKO マウスの血管障害を改善させる

先行研究において、*Fli1* ECKO マウスで特徴的にみられる血管の脆弱性と構造異常は「血管内皮細胞と血管周皮細胞の相互作用の減弱 (pericyte loss)」が原因であることが示されている。そこで、CYC が pericyte loss を改善させる可能性について、 α -SMA の免疫染色により評価した。*Fli1* ECKO マウスでは対照マウスと比較して、皮膚の微小血管において α -SMA の発現が低下していたが、CYC 投与 2 週間後ではその発現量は対照マウスとほぼ同等のレベルにまで回復していた。したがって、CYC は pericyte loss を改善させることにより、*Fli1* ECKO マウスの血管障害を改善している可能性が示唆された。

上記の結果を踏まえ、さらに pericyte loss に関与する分子の発現量について、皮膚検体を用いた定量的 real-time PCR 法で解析した。先行研究において、*Fli1* ECKO マウス由来の培養皮膚微小血管内皮細胞では VE-cadherin, PECAM-1, S1P₁ の発現が低下していることが示されているが、CYC 投与により皮膚組織における *Cdh5*, *Pecam1*, *S1p1* の mRNA の発現量は野生型とほぼ同等のレベルにまで回復した。以上より、CYC は血管内皮細胞に作用して pericyte loss を改善させることにより、*Fli1* ECKO マウスの血管障害を改善させていることが明らかとなった。

(3) 今回の研究成果の意義

BLM 誘発強皮症モデルマウスと *Fli1* ECKO マウスを併用することにより、グリチルリチンが強皮症の主要 3 病態 (線維化、血管障害、免疫異常) のすべてに作用して疾患修飾作用を示す可能性が明らかとなった。また、CYC については、*Fli1* ECKO マウスを用いた検討により同薬が血管障害に対しても強い疾患修飾作用を示すことが明らかになり、CYC が強皮症の皮膚硬化や間質性肺疾患に対して疾患修飾作用を示す機序の一端が明らかとなった。

以上より、複数のモデルマウスを用いた検討が新規強皮症治療薬のスクリーニングシステムとして有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Yamashita T, Asano Y, Taniguchi T, Nakamura K, Saigusa R, Miura S, Toyama T, Takahashi T,

Ichimura Y, Yoshizaki A, Trojanowska M, Sato S. Glycyrrhizin Ameliorates Fibrosis, Vasculopathy, and Inflammation in Animal Models of Systemic Sclerosis. *J Invest Dermatol.* 2017; 137: 631-640.

[学会発表] (計 1 件)

Yamashita T, Asano Y, Miyagawa T, Hirabayashi M, Nakamura K, Saigusa R, Miura S, Toyama T, Takahashi T, Ichimura Y, Taniguchi T, Yoshizaki A, Trojanowska M, Sato S. Cyclophosphamide improves vascular abnormalities in endothelial cell-specific *Fli1* knockout mice mimicking scleroderma-related vasculopathy. The 41st annual meeting of the society for investigative dermatology. Kochi, Japan

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 強皮症予防および/または治療剤

発明者: 佐藤伸一、浅野善英、山下尚志

権利者: 佐藤伸一、浅野善英、山下尚志

種類: 用途

番号: 特願 2015-192743

取得年月日: 2015 年 9 月 30 日

国内外の別: PCT(移行前)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 伸一 (Sato, Shinichi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 20215792