

令和元年5月24日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15544

研究課題名(和文) 全身性強皮症に対する表皮細胞を標的とした核酸医薬外用薬の開発

研究課題名(英文) The development of oligonucleotide therapeutics targeting epithelial cells in systemic sclerosis

研究代表者

浅野 善英 (Asano, Yoshihide)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60313029

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(SSc)患者の一部にケブネル現象による皮膚硬化が生じる点に着目し、表皮細胞依存性線維化誘導因子の同定、および表皮細胞を標的とした治療薬開発を目的に本研究を立案した。表皮細胞特異的Fli1欠失マウスを用いた解析結果からIL-1 alpha, CTGFが、SSc患者の血清と皮膚組織を用いた解析結果からpsoriasinとLL-37が「表皮細胞由来線維化誘導因子」として同定された。現在、これらの分子の発現を表皮細胞において抑制する方法として、マイクロニードルや外用薬など、核酸医薬(siRNA, microRNAなど)の局所療法の開発を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症(SSc)の主要3病態は免疫異常・炎症、血管障害、線維化であるため、これまで本症に対する新規薬剤の治療開発は免疫担当細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞に対する作用に注目して進められてきた。本研究では、SScの線維化の病態に表皮細胞が関与していること、および表皮細胞がSScに対する新規治療薬開発の対象となりうる可能性を示した点に新規性があり、今後のSScに対する創薬を考えるうえで一石を投じる研究成果と言える。

研究成果の概要(英文)：Based on the clinical observation that a part of patients with systemic sclerosis (SSc) develops skin sclerosis due to Koebner phenomenon, we investigated molecules involved in this phenomenon and sought to develop a new treatment targeting such molecules against skin sclerosis of SSc. We identified IL-1 alpha and CTGF that are involved in the epithelial cell-dependent induction of skin fibrosis in epithelial cell-specific Fli1 knockout mice (Fli1 flox/flox; K14-Cre) which spontaneously develop skin fibrosis. We also found the potential of epithelial cell-producing psoriasin and LL-37 to promote the development of skin fibrosis in the clinical studies with sera and skin sections of SSc patients. We are currently going to generate oligonucleotide therapeutics targeting these molecules produced by epithelial cells by using drug delivery system such as ointment, cream and microneedle.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：全身性強皮症 表皮細胞 線維化 外用薬 マイクロニードル

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 (systemic sclerosis: SSc) は線維化・血管障害・免疫異常を主要 3 病態とすると膠原病である。それ故に、本症の基礎研究および治療開発は線維芽細胞、血管を構成する細胞 (血管内皮細胞、血管周皮細胞/血管平滑筋、血管内皮前駆細胞)、免疫担当細胞 (B 細胞、T 細胞、マクロファージなど) を対象に進められてきた。しかし、近年、SSc 患者の病変部皮膚では表皮細胞にも疾患特異的な形質が存在し、その異常が線維芽細胞の活性化を介して線維化を誘導しうるということが明らかとなり、表皮細胞が新たな創薬の標的となりうる可能性が示唆されている。一方、申請者は 2014 年に SSc の主要 3 病態を疾患特異的な列挙性をもって再現する世界初の遺伝子改変マウスの確立に成功した。さらに、上皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1* KcK0 マウス) において、表皮細胞依存性の皮膚線維化の機序が存在することを明らかにした。以上の基礎研究の成果は、*Fli1* KcK0 マウスを活用することにより、SSc の皮膚線維化における表皮細胞の役割を明らかにすること、さらに表皮細胞を標的とした治療戦略の検討が可能であることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が独自に開発した新規 SSc モデルマウスを用いて「SSc の表皮細胞の形質異常の病的意義」を解明し、「siRNA 含有外用薬による表皮細胞を標的とした新規 SSc 治療薬」を開発することである。

3. 研究の方法

Fli1 KcK0 欠失マウスの作製

Fli1^{flox/flox} マウス (ボストン大学 Maria Trojanowska 教授より供与) と *K14-Cre* マウスを交配し、*Fli1* KcK0 マウス (*Fli1*^{flox/flox}; *K14-Cre*) を作製した。実験動物の取り扱いに関しては、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守し、東京大学大学院医学系研究科の動物倫理規定に従い、麻酔や安楽死などを含め適切に施行した。

ヒト検体について

SSc 患者の病変部皮膚、および健常人の病変部皮膚については、前者は通常診療で診断目的に皮膚生検を行う際に、後者は健常人に対して治療目的に皮膚良性腫瘍切除術を行う際に、得られた皮膚検体を使用した。血清については、SSc 患者および健常人について、通常診療で行う採血の際に得られる残血清を使用した。なお、対象となる皮膚検体と血清の回収および研究での使用については、個々の対象者から事前に文書による同意を得ており、研究内容については東京大学医学部附属病院倫理委員会の承認を受けている (審査番号 695-13)。

組織学的検討

マウス皮膚検体およびヒト皮膚検体を用いて、H&E 染色とトルイジンブルー染色を行った。また、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) を用いて抗体 IL-1 α 抗体、抗 CCN2 抗体、抗 psoriasin 抗体、抗 LL-37 抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

Fli1 KcK0 マウスの病態解析

Fli1 KcK0 マウスと対照マウス (*Fli1*^{flox/flox}) から表皮細胞を単離し、DNA microarray 解析を行ったところ、*Fli1* KcK0 マウス由来の表皮細胞では線維芽細胞を活性化する因子である IL-1 α と CCN2 の発現が亢進していた。一方、先行研究において、*Fli1* KcK0 マウスでは皮膚および食道の重層扁平上皮において SSc に類似した形質が再現される、*Fli1* KcK0 マウスでは皮膚と食道の線維化、および間質性肺疾患が自然発症する、*Fli1* KcK0 マウスでは胸腺髄質上皮細胞において Aire の発現が低下し、免疫寛容の破綻が生じている、*Fli1* KcK0 マウスから単離した T 細胞を *Rag1*^{-/-} マウスに養子移入すると、間質性肺疾患が再現できるが、皮膚と食道の線維化は再現できない、成熟 B 細胞および成熟 T 細胞を持たない *Fli1* KcK0 マウス (*Rag1*^{-/-}; *Fli1*^{flox/flox}; *K14-Cre* マウス) では皮膚と食道の線維化は生じるが、間質性肺疾患は生じない、ことが示されており、*Fli1* KcK0 マウスでは上皮細胞の活性化に依存する皮膚線維化の機序が存在することが明らかとなっていた。そこで、成熟 B 細胞および成熟 T 細胞を持たない *Fli1* KcK0 マウスの皮膚の病理組織を詳細に検討したところ、対照マウスに比して肥満細胞の浸潤、および肥満細胞の脱顆粒が亢進していることが明らかとなった。IL-1 α は肥満細胞による IL-6 の産生を誘導すること、SSc の皮膚硬化において IL-6 が重要な役割を果たしていることから、SSc の表皮細胞依存性皮膚硬化の機序の一つとして「表皮細胞の IL-1 α 産生亢進 肥満細胞から IL-6 産生亢進 線維芽細胞の活性化」という機序が存在する可能性が示唆された。CCN2 は重要な線維化誘導因子である点を考え合わせると、IL-1 α 、CCN2 が表皮細胞を標的とした抗線維化療法の対象蛋白となりうるということが示唆された。

SSc に生じる限局性強皮症 (localized scleroderma; LSc) 様皮膚硬化の解析

一部の SSc 患者は mechanical stress を受けやすい部位に LSc 様皮疹を生じる。この皮疹の形成において、表皮細胞依存性皮膚硬化の機序が関与している可能性が考えられるため、ヒト病理組織を用いて検討を行った。まず、LSc 様皮疹では表皮細胞の空胞変性、個細胞壊死、および組織学的色素失調がみられ、表皮細胞を標的とした炎症 (液状変性) が生じていることが明らかとなった (通常の SSc の病変部皮膚では見られない所見)。次に皮膚検体を用いて IL-1 α

の免疫染色を行ったところ、LSc 様皮疹では表皮細胞における IL-1 α の産生が亢進していることが明らかとなった。さらに皮膚検体を用いてトルイジンブルー染色を行ったところ、LSc 様皮疹では肥満細胞の脱顆粒像が顕著にみられることが明らかとなった。以上の検討結果から、LSc 様皮疹では「表皮細胞の IL-1 α 産生亢進 肥満細胞から IL-6 産生亢進 線維芽細胞の活性化」の機序が存在する可能性が示唆された。

SSc の皮膚線維化における表皮細胞由来抗菌ペプチドの役割

表皮細胞が産生する線維化関連因子の一つとして、抗菌ペプチドが挙げられる。過去の報告を参考に、線維化機序に関連している可能性のある抗菌ペプチドとして、psoriasin と LL-37 に注目して検討を行った。皮膚検体を用いて免疫染色を行ったところ、SSc 患者の病変部皮膚において両蛋白の発現量が亢進していた。Psoriasin については表皮細胞に autocrine に作用して IL-6 の産生を亢進させること、LL-37 については形質細胞様樹状細胞の遊走を促し、IFN- α を介して血管障害を誘導して皮膚線維化を増強することが先行研究で示されており、これらの機序を介して線維化に関与していると推測された。実際に、ヒトで血清を用いて解析を行ったところ、SSc 患者では健常人に比して血清中 psoriasin 濃度が上昇しており、その程度はびまん性皮膚硬化型 SSc 患者において顕著であった。また、SSc 患者では健常人に比して血清中 LL-37 濃度が上昇しており、さらに血清中 LL-37 濃度はスキンスコアと正の相関を示した。

表皮細胞を標的とした創薬

以上の結果は、IL-1 α , CCN2, psoriasin, LL-37 が SSc の表皮細胞を標的とした治療戦略を開発する上で、標的分子となりうることを示唆している。現在、これらの分子の発現を表皮細胞において抑制する方法として、核酸医薬の開発を進めている。Drug delivery system としては、ヒアルロン酸マイクロニードルを候補として考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Saigusa R, Asano Y, Yamashita T, Takahashi T, Nakamura K, Miura S, Ichimura Y, Toyama T, Taniguchi T, Sumida H, Tamaki Z, Miyazaki M, Yoshizaki A, Sato S. Systemic sclerosis complicated with localized scleroderma-like lesions induced by Köbner phenomenon. *J Dermatol Sci*. 2018;89(3):282-289.

2. Takahashi T, Asano Y, Yamashita T, Nakamura K, Saigusa R, Miura S, Ichimura Y, Toyama T, Hirabayashi M, Taniguchi T, Yoshizaki A, Sato S. A potential contribution of psoriasin to vascular and epithelial abnormalities and inflammation in systemic sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(2):291-297.

3. Takahashi T, Asano Y, Sugawara K, Yamashita T, Nakamura K, Saigusa R, Ichimura Y, Toyama T, Taniguchi T, Akamata K, Noda S, Yoshizaki A, Tsuruta D, Trojanowska M, Sato S. Epithelial Fli1 deficiency drives systemic autoimmunity and fibrosis: Possible roles in scleroderma. *J Exp Med*. 2017;214(4):1129-1151.

4. Takahashi T, Asano Y, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Ichimura Y, Toyama T, Taniguchi T, Yoshizaki A, Tamaki Z, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S. A potential contribution of antimicrobial peptide LL-37 to tissue fibrosis and vasculopathy in systemic sclerosis. *Br J Dermatol*. 2016;175(6):1195-1203.

〔学会発表〕(計4件)

1. 三枝良輔、浅野善英、山下尚志、高橋岳浩、中村洸樹、三浦俊介、市村洋平、遠山哲夫、谷口隆志、住田隼一、玉城善史郎、宮寄美幾、吉崎歩、佐藤伸一。全身性強皮症患者に伴う限局性強皮症様皮疹に関する検討。第22回強皮症研究会議。2019年

2. Asano Y. Skin research provides a window into new aspects of systemic disease pathogenesis. International Investigative Dermatology 2018 (招待講演)(国際学会)2018年

3. Asano Y. Skin research provides a window into new aspects of systemic disease pathogenesis. 1st Joint Symposium of Department of Dermatology, Seoul National University and The University of Tokyo (招待講演)(国際学会)2018年

4. 浅野善英. 上皮細胞の形質異常から見てきた強皮症の新たな病態仮説。第80回日本皮膚科学会東京支部学術大会 シンポジウム。2017年

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：Maria Trojanowska
ローマ字氏名：Maria Trojanowska

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。