

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09968

研究課題名（和文）アペリン・APJシグナル制御による全身性強皮症の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new treatment in systemic sclerosis by regulating of apelin/APJ signaling

研究代表者

横山 洋子（Yokoyama, Yoko）

群馬大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：00241901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：全身性強皮症は皮膚および内臓臓器の線維化、血管異常、免疫異常（自己抗体）を特徴とする発症機序不明の全身性疾患である。我々は脂肪組織から産生されるサイトカイン（アディポカイン）の一つであるアペリンが皮膚線維芽細胞の線維化を抑制し、その発現低下が強皮症の病態に関連することを明らかにした。

今回、アペリンの受容体APJのアゴニストであるMM07に着目し、ヒト皮膚線維芽細胞と強皮症モデルマウスを用いた検討から、MM07はアペリンよりも少ない量で皮膚の線維化を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MM07はアペリンとは異なり、APJのバイアス型アゴニストであるため、APJに結合してもAPJは細胞内に取り込まれず、持続してAPJシグナルを活性化させることができる。そして、今回の検討からMM07はアペリンよりも高い線維化抑制効果を示すことがわかった。

全身性強皮症の皮膚線維化抑制をターゲットとする治療薬は少ない。MM07は既にヒトへ投与されており、安全性が示されていることから、強皮症の皮膚線維化に対する臨床応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune connective tissue disorder characterized by the development of fibrosis in the skin and internal organs as well as by vascular dysfunction. We demonstrated that apelin produced by adipocytes acts as an adipokine inhibit fibrosis of dermal fibroblast and low expression of apelin involve in the pathogenesis of SSc.

We focused APJ agonist MM07 in this experiment. We found that MM07 had greater potential than apelin to inhibit fibrosis of dermal fibroblast and SSc model mouse.

研究分野：線維化

キーワード：全身性強皮症 線維化 アペリン 治療 APJアゴニスト MM07

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は、皮膚および内臓臓器の線維化、血管異常、免疫異常(自己抗体)を特徴とする発症機序不明の全身性疾患であり、全身臓器の線維化・血管障害によって、消化器障害、肺線維症、肺高血圧症、腎硬化症などを合併する。皮膚の線維化に伴って脂肪組織が減少することが知られており、脂肪組織から産生されるサイトカイン(アディポカイン)が皮膚の線維化の制御に関係することが注目されている。我々はアディポカインの一つであるアペリンに着目し、ヒト皮膚線維芽細胞へのアペリンの添加実験と強皮症モデルマウスの腹腔内へのアペリン投与の実験から、アペリンが線維芽細胞の線維化を抑制し、その発現低下が強皮症の病態に関連することを明らかにした。そして、近年アペリンの受容体である APJ のアゴニストとして機能するアペリン類似物質(13 アミノ酸ペプチド)をヒトに投与した結果、末梢血液循環量が増加することが報告されたことから、ヒトに対する安全性が示されているこの APJ アゴニストを用い、強皮症由来線維芽細胞に対する線維化の抑制効果や、強皮症モデルマウスを用いた線維化、血管障害への治療効果について検討することにした。

2. 研究の目的

APJ のアゴニストである MM07 は、アペリンと同様にヒト皮膚線維芽細胞の線維化を抑制的に制御するのか、また抑制した場合、その効果をアペリンと比較する。

(1) ヒト皮膚線維芽細胞において、APJ アゴニスト(MM07) による線維化への抑制効果を調べる(in vitro)。

(2) 強皮症モデルマウスの皮膚線維化と血管障害に対する APJ アゴニスト(MM07) の治療効果を調べる(in vivo)。

(3) 強皮症患者の血清アペリン濃度を測定し、皮膚の硬化をスキンスコアや臨床症状との関連を調べる。

3. 研究の方法

(1) ヒト皮膚線維芽細胞において、APJ アゴニスト(MM07) による線維化への抑制効果を調べる(in vitro)。

培養した健常人由来皮膚線維芽細胞に MM07 を添加し、線維化に与える影響を調べる。皮膚線維芽細胞は TGF- β 刺激によって線維化が誘導されることが知られているが、この TGF- β 刺激下で MM07 を低濃度から高濃度の様々な条件で添加、培養し、線維化に関与する因子(I 型コラーゲン量、SMA、Smad2/3 など)の発現を検討する。

(2) 強皮症モデルマウスの皮膚線維化と血管障害に対する APJ アゴニスト(MM07) の治療効果を調べる(in vivo)。

ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの腹腔内にアペリンの 1/10 量の MM07 を注射し、MM07 による線維化の抑制効果と血管への影響について検討する。皮膚硬化部の HE 染色とマッソントリクローム染色を行い、皮膚の厚さやコラーゲンの量を比較する。また免疫染色にて、線維化に関わる筋線維芽細胞の数や皮膚硬化部に浸潤した炎症に関わる細胞の数、血管数の比較も行う。

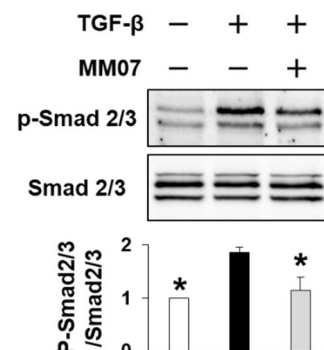
(3) 強皮症患者の血清アペリン濃度を測定し、スキンスコアや臨床症状との関連を調べる。

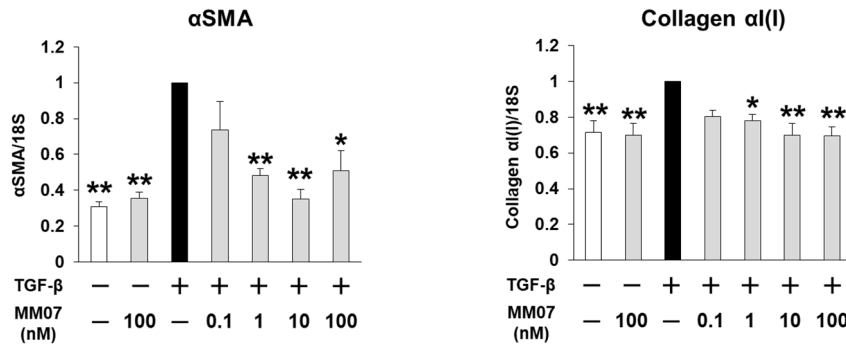
ELISA 法を用いて強皮症患者の血清中のアペリン濃度を測定し、評価するスキンスコア(MRSS)や臨床症状とアペリン濃度との関連の有無を調べる。

4. 研究成果

(1) ヒト皮膚線維芽細胞において、APJ アゴニスト(MM07) による線維化への抑制効果を調べる(in vitro)。

TGF- β 刺激は受容体を介し、下流にある Smad2/3 がリン酸化されることでシグナルが伝達されるが、ヒト皮膚線維芽細胞におけるリン酸化 Smad2/3 のタンパク発現はアペリンの 1/10 量の MM07 添加で抑制されることがわかった。また、TGF- β 刺激によっておこる SMA、I 型コラーゲンの mRNA レベルおよびタンパクレベルでの発現の亢進も MM07 の添加によって濃度依存性に抑制され、その抑制効果はアペリンの 1/10 の添加濃度でみられた。これらの結果より、MM07 は TGF- β 刺激による線維化に対して抑制的に働き、アペリンよりも抑制効果が高い可能性が示唆された。

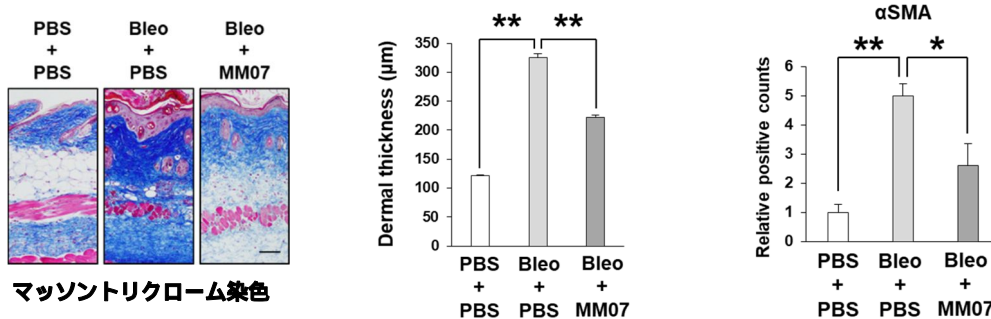




(2) 強皮症モデルマウスの皮膚線維化と血管障害に対する APJ アゴニスト(MM07) の治療効果を調べる(in vivo)。

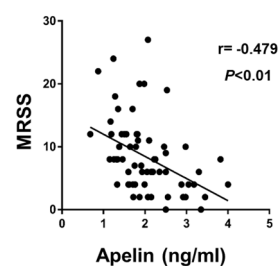
プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの皮膚硬化部位では、プレオマイシンによって生じた真皮の肥厚が MM07 の腹腔内投与により抑制されていた。またマッソントリクローム染色から、プレオマイシンによって増加したコラーゲン線維は MM07 投与により抑制されていることがわかった。皮膚硬化部において、線維化に関する SMA 陽性筋線維芽細胞数はプレオマイシンによって増加したが、MM07 投与により抑制された。炎症細胞では、CD3 陽性 T 細胞数と CD68 陽性マクロファージ数はプレオマイシン投与によって増加したが、MM07 投与により CD3 陽性 T 細胞数は抑制される傾向にあった。CD68 陽性マクロファージ数は変化しなかった。CD31 陽性血管内皮細胞数はプレオマイシン投与および MM07 投与による変化はなかった。

これらの結果から、in vivo においても MM07 は線維化を抑制し、さらにアペリンよりも抑制効果が高い可能性が示唆された。



(3) 強皮症患者の血清アペリン濃度を測定し、スキンスコアや臨床症状との関連を調べる。

強皮症患者の血清中アペリン濃度とスキンスコア (MRSS) には負の相関傾向がみられた。また、臨床症状では指尖部潰瘍と手指末節骨短縮を持つ患者は持たない患者に比べ、血清中のアペリン濃度が低いことが分かった。



今回検討を行った MM07 はアペリンとは異なり、APJ のバイアス型アゴニストであるため、APJ に結合しても APJ は細胞内に取り込まれず、持続して APJ シグナルを活性化させることができる。そして、今回の研究結果から MM07 はアペリンよりも少ない量で皮膚線維化を抑制することが明らかになった。血管障害の改善効果について十分な検討は行えなかったが、MM07 は既にヒトに投与されており、末梢血流増大効果が示されていることから、強皮症の皮膚線維化と血管障害に対する臨床応用へ期待できると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokoyama Yoko, Sekiguchi Akiko, Fujiwara Chisako, Uchiyama Akihiko, Uehara Akihito, Ogino Sachiko, Torii Ryoko, Ishikawa Osamu, Motegi Sei-ichiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Inhibitory Regulation of Skin Fibrosis in Systemic Sclerosis by Apelin/APJ Signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1661 ~ 1672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.40533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoko Yokoyama, Akiko Sekiguchi, Chisako Fujiwara, Akihiko Uchiyama, Sahori Yamazaki, Sachiko Ogino, Ryoko Torii, Osamu Ishikawa, Sei-ichiro Motegi
2. 発表標題 Inhibitory regulation of skin fibrosis in systemic sclerosis by apelin/APJ signaling
3. 学会等名 The 42nd annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	茂木 精一郎 (Motegi Sei-ichiro) (20420185)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	