

平成21年4月10日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18790779

研究課題名（和文）全身性強皮症におけるImatinibの抗線維化効果の検討

研究課題名（英文） Anti-fibrotic effect of Imatinib on systemic sclerosis

研究代表者

石田 済（ISHIDA WATARU）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：30362007

研究成果の概要：

diffuse cutaneous scleroderma (以下、dSSc) 患者真皮において線維芽細胞内の c-Abl のリン酸化が上昇し、dSSc 真皮における c-Abl 活性化の亢進が示唆された。また in vitro において Imatinib Mesylate は dSSc 線維芽細胞における亢進した I 型コラーゲンの増生を抑制することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,300,000	0	2,300,000
2007年度	600,000	0	600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	180,000	3,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：全身性強皮症，線維芽細胞，TGF- $\beta$ ，線維化，c-Abl，非レセプター型キナーゼ阻害剤，メシル酸イマチニブ

## 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(Systemic Sclerosis, SSc)は皮膚、肺、腎などの多臓器に線維化を来す自己免疫疾患として知られており、その経過は長期にわたり膠原線維の増生と蓄積を各臓器にもたらす。肺や腎臓など内臓病変の高度な線維化は予後に大きな影響を与える一方、皮膚の線維化は患者の著しい QOL の低下を招く。近年その病因・病態は研究されているが今なお不明な点が多く、治療に関しても自己免疫疾患との観点から副腎皮質ステロイ

ドや免疫抑制剤等を用いた治療が行われているが、線維化の抑制、防止に有効な治療法は未だ確立していなかった。

我が国で既に慢性骨髄性白血病(Chronic Myelogenous Leukemia, CML)と KIT (CD117) 陽性消化管間質腫瘍の治療薬として使用されている Imatinib Mesylate(Glivac®, Imatinib、メシル酸イマチニブ)は c-Abl、Src、c-Kit などのチロシンキナーゼ活性を阻害するが、近年この薬剤が Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )誘導性の膠原線維増生を抑制すると報告され、最

近、Imatinibが肺、腎、骨髄の線維化を抑制したとする報告が相次いでいた。またTGF- $\beta$ によるc-Ablの活性化は線維芽細胞特異的に引き起こることが示された。一方、c-Ablを基点とした膠原線維増生の機序は、TGF- $\beta$  I型レセプターによるSmad2/3のリン酸化経路から独立したものと考えられ、また他の病態でc-Abl下流のシグナル伝達にはExtracellular Signal Regulated Kinase (ERK)やp38経路の関与が報告されているが、未だ皮膚線維芽細胞における膠原線維増生の機序に関するc-Abl下流のシグナル伝達系の解明には至っていなかった。

## 2. 研究の目的

今回我々はin vitroとin vivoの多方向よりImatinibの抗線維化とそのメカニズムを解明することにより、SScの病態であるTGF- $\beta$ シグナル伝達経路の活性化による膠原線維増生に対する有用性を示すことを目指す。

新たにSScに有効な化学物質の検索や、特殊抗体を作成し、検討するよりも実用に至る期間・コストの大幅な短縮が期待でき、また既に身体への影響も臨床試験で検討されて、副作用の報告の蓄積もされてきている薬剤であることから、早期のSScへの臨床応用の可能性を求めることができると考えた。

具体的には、全身性強皮症患者の皮膚線維芽細胞におけるc-Ablキナーゼ活性を評価し、SScにおける皮膚線維芽細胞内でのc-Ablの活性化を確認し、ImatinibによるTGF- $\beta$ 誘導性の膠原線維増生の抑制の確認と、さらに皮膚線維芽細胞の膠原線維増生におけるc-Abl下流のTGF- $\beta$ 伝達経路を特定することにより、Imatinibの抗線維化のin vitroでの作用メカニズムを明確にすることを目指した。

## 3. 研究の方法

1) diffuse cutaneous scleroderma(以下、dSSc)患者と対照健常者皮膚の抗c-Abl、抗リン酸化c-Abl抗体で免疫組織染色を行い、真皮におけるc-Abl陽性線維芽細胞数とリン酸化c-Abl陽性線維芽細胞数を計測し、真皮におけるc-Ablの活性化を検討した。

2) 継代培養した成人正常皮膚線維芽細胞とdSSc患者皮膚線維芽細胞を用い、Imatinib刺激24時間後に培養細胞抽出液を回収し、ウエスタンブロット法において抗I型コラーゲン抗体と抗アクチン抗体にて染色した。

3) TGF- $\beta$ 刺激における細胞内シグナル伝達に対するImatinibの影響をTGF- $\beta$ シグナル伝達系であるSmad、ERK、p38シグナル伝達系のシグナル伝達蛋白であるSmad2/3、ERK1/2、p38MARKのリン酸化にて評価した。

## 4. 研究成果

SScと病理診断されたdiffuse cutaneous scleroderma(以下、dSSc)患者と同性と同年代であり、病理診断にて真皮に組織学的に異常を認めない症例を対照健常者として、それぞれの皮膚生検標本を抗c-Abl抗体と抗リン酸化c-Abl抗体で免疫組織染色を行い、真皮での陽性線維芽細胞を計測した。

c-Abl陽性線維芽細胞は、dSSc患者と対照健常者皮膚では統計学的に有意な差を認めなかった(図1、2)。

リン酸化c-Abl陽性線維芽細胞ではdSSc患者真皮が対照健常者皮膚に比べ、有意に増加していた(図3、4)。

次に、継代培養した成人正常皮膚線維芽細胞とdSSc患者皮膚線維芽細胞を用い、Imatinib刺激24時間後に培養細胞抽出液を回収し、ウエスタンブロット法において抗I型コラーゲン抗体と抗アクチン抗体にて染色した。TGF- $\beta$ 刺激を培養細胞抽出液回収1時間前に行った成人正常皮膚線維芽細胞では、I型コラーゲンの増生が確認され、Imatinibの前処理にてこの増生が、抑制された。そしてdSSc由来線維芽細胞ではTGF- $\beta$ 非存在下においてもI型コラーゲンの恒常的な産生亢進が認められ、Imatinibの投与によりこの亢進した産生が抑制された(図5)。

培養foreskin線維芽細胞を用いて、TGF- $\beta$ 刺激後6時間、24時間後にそれぞれ培養細胞抽出液を回収した。ウエスタンブロット法において、抗Smad1/2/3抗体・抗リン酸化Smad2/3抗体、抗p44/42MAPK抗体・抗リン酸化p44/42MAPK抗体、抗p38MARK抗体・抗リン酸化p38MARK抗体にて染色した。TGF- $\beta$ と同時刺激をしたImatinib処理の有無によりそれぞれのシグナル伝達蛋白のリン酸化に変化が生じるか比較した。しかし、Imatinibによるリン酸化への影響は認められなかった。

また、ImatinibのTGF- $\beta$ シグナル伝達以外への刺激がRNA合成や蛋白合成を促し、合成された蛋白を介する反応がTGF- $\beta$ シグナル伝達系へ二次的に影響している可能性を排除するため、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキサミドやRNA合成阻害剤アクトマイシンDによる前処置を行い、同様にTGF- $\beta$ とイマチニ

ブ刺激によるそれぞれの伝達蛋白のリン酸化への影響を検討したが、リン酸化に差異を認めることは出来なかった。

以上により、dSSc 患者真皮内の線維芽細胞では健常者皮膚のそれに比べ、c-Abl のリン酸化される割合が多く、つまりは c-Abl の活性化が恒常的に起こっていることが示唆された。さらに、成人健常者真皮より継代培養された皮膚線維芽細胞において TGF-β 刺激にて増生した I 型コラーゲンが Imatinib にて増生阻害されたことが確認された。またそれと同等に dSSc 患者真皮より継代培養された線維芽細胞に恒常的に生じている I 型コラーゲンの増生も Imatinib の投与により抑制されたことが確認できた。これらは dSSc 患者真皮内の線維芽細胞において恒常的に c-Abl 活性が亢進しており、また SSc の病態に深く関与していると考えられている TGF-β 刺激性のコラーゲン増生を、Imatinib が抑制し得る可能性を示している。

そして、in vitro において c-Abl 活性の TGF-β シグナル伝達系への影響を Smad2/3、ERK1/2 また p38MAPK のリン酸化の変化により、検討したが、それぞれの蛋白の上位のシグナルを阻害することによるものではなく、未知のシグナル伝達系もしくは、Smad2/3、ERK1/2 また p38MAPK のリン酸化より下流のシグナルを抑制することによって起こっていると推察された。さらに蛋白合成阻害剤や RNA 合成阻害剤により前処理した線維芽細胞を用いて、下流のシグナルの抑制をより限定しようと試みたが、TGF-β 刺激による ERK1/2、p38MAPK のリン酸化を Imatinib が蛋白合成を介することなく抑制するか確認したが、その差異を確認するには至らなかった。

今回 Imatinib によるコラーゲン増生抑制のメカニズムを in vitro にて示すことが出来なかったが、dSSc 患者の病態において Imatinib が抗線維化に作用することは示すことができたと考える。現在世界中で CML 等の治療薬として利用され、投薬量や副作用等、既に多くの検討がなされている。今後は複数の SSc 病態モデルマウスを用い、Imatinib による抗線維化の効果の確認や、作用機序の確立を明らかにし、SSc 患者治療への応用が早期に実現させ、SSc 患者に対する副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤等を用いた治療以外への、線維化の抑制や防止に有効な治療法の確立に貢献したい。

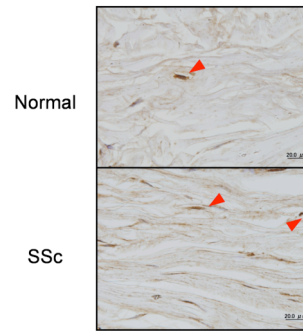


図 1：健常皮膚真皮(Normal)とdSSc 患者真皮における c-Abl 陽性線維芽細胞

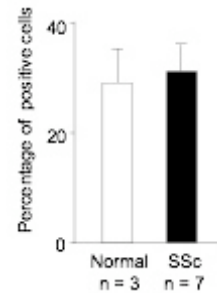


図 2：健常皮膚真皮(Normal)とdSSc 患者真皮における c-Abl 陽性線維芽細胞数

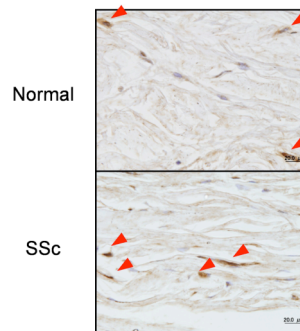


図 3：健常皮膚真皮(Normal)とdSSc 患者真皮におけるリン酸化 c-Abl 陽性線維芽細胞

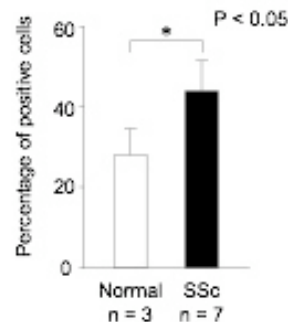


図 4：健常皮膚真皮(Normal)とdSSc 患者真皮におけるリン酸化 c-Abl 陽性線維芽細胞数

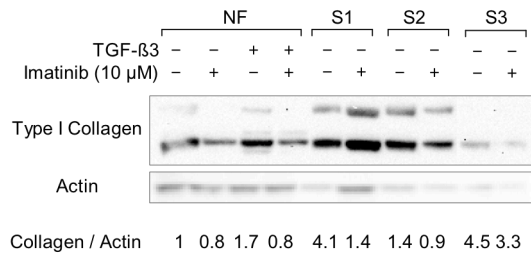


図5：成人正常皮膚線維芽細胞(NF)とdSSc患者皮膚線維芽細胞(S1-3)の細胞抽出液におけるウエスタンブロット結果

## 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)

[学会発表] (計 3件)

①石田 澂、Novel role of c-Abl tyrosine kinase in profibrotic TGF-beta responses: selective modulation by imatinib mesylate Professor E. Carwile LeRoy Memorial International Workshop on Scleroderma、2007. 5. 20、東京

②石田 澂、Novel role of c-Abl tyrosine kinase in profibrotic TGF-beta responses: selective modulation by imatinib mesylate 日本研究皮膚科学会第 32 回年次学術大会、平成 19 年 4 月 19 日、京都

③石田 澂、抗癌剤グリベック®の強皮症における抗線維化作用および c-Abl の発現と活性に対する影響についての検討、平成 18 年度第 10 回強皮症研究会議、2007. 1. 13、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 澂 (ISHIDA WATARU)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：30362007