

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08415

研究課題名(和文) 抗CTGF抗体による新規強皮症治療の可能性の検討

研究課題名(英文) possibility of new therapeutic agent for systemic sclerosis by anti-CTGF antibody

研究代表者

森本 真司 (Morimoto, Shinji)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：00348947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CTGFは線維化マーカーのhallmarkであり、近年全身性強皮症においてもCTGFの関与が報告されている。我々は、topoisomerase1を用いた強皮症モデルマウス及び、古典的な線維化モデルマウスであるプレオマイシン誘導肺障害マウスを用い、抗CTGF抗体を投与し、肺病理による線維化、ヒドロキシプロリン定量、肺組織の炎症および線維化に関連する遺伝子の発現解析を行った。肺病理や肺組織中のヒドロキシプロリン定量では、抗CTGF抗体投与による線維化の抑制を認める傾向がみられた。肺組織の遺伝子発現解析でも、SPP1、IL-6において、抗CTGF抗体投与による線維化の抑制を認める傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTGFはCCN familyに属する成長因子であり、皮膚、心臓、肺、肝臓や腎臓を含む多臓器の線維化のhallmarkであり、CTGFを標的とした抗線維化薬はSScの主要病変の皮膚硬化を改善するのみならず、間質性肺炎、肺高血圧症、強皮症腎ならびに腸管の線維化等の重篤な内臓合併症を抗CTGF抗体で同時に改善することが我々の研究結果から予測されることが研究成果の学術的意義である。またSScの根源的病因である線維化を抗CTGF抗体投与にて抑制することにより、SScの生命予後の改善を期待できることが社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is known to be refractory disease due to fibrosis of the skin and internal organs. Although connective tissue growth factor (CTGF) has been well-documented in SSc fibrosis, CTGF has not been fully investigated. We studied the effects of Anti-CTGF antibody in SSc mice model. We examined pulmonary fibrosis and skin fibrosis in the mice model. Dermal sclerosis, pulmonary fibrosis and cytokine production were assessed. As for skin and pulmonary fibrosis in the topoisomerase mice model, there were no statistically significant difference in the treatment with anti-CTGF antibody, but it had tendency to mitigate both fibrosis. In terms of fibrotic cytokine, SPP1 and smooth muscle actin (ACTA2) had tendency to be reduced by treatment with anti-CTGF antibody. Anti-CTGF antibody may have anti-fibrotic effects in mice models of systemic sclerosis. Further researches are required to evaluate it.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：強皮症 抗CTGF抗体 抗線維化 間質性肺炎 皮膚硬化 炎症性サイトカイン

## 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 (systemic sclerosis: SSc) は皮膚および内臓諸臓器の線維化、微小血管障害、自己抗体産生を特徴とする結合組織疾患である。我が国の推定患者数は3万人程度とされる。SScは皮膚硬化のみならず多彩な臓器病変を伴い、特に間質性肺炎や肺高血圧症、腸管の線維化にもなう気腫性病変などの重篤な合併症の存在する症例は悪性腫瘍の予後に匹敵することから、これらの病態の克服が重要な課題である。SScの主な病因は異なる複数の自己抗体による自己免疫、および自然免疫と適応免疫の両方が活性化されていることによる血管病変、ならびに不可逆的癒痕化と臓器不全をきたす皮膚と内臓の線維化と考えられている。強皮症の線維化を促進するサイトカインとして TGF- $\beta$  transforming growth factor- $\beta$ )、IL (interleukin)-6、IL-4/IL-13、CTGF (connective tissue growth factor; CCN2)などが知られている。これらの分子のうちこれまでの報告において強皮症患者では血清中の CTGF 濃度が著明に上昇していることが報告されている (Igarashi A. et al. J Invest Dermatol. 1996; 106: 729-733.)。CTGF は CCN family に属する成長因子であり、皮膚、心臓、肺、肝臓や腎臓を含む多臓器の線維化の hallmark であり、さらに軟骨細胞では軟骨内膜の骨化を促進、腎のメサンジウム細胞では線維化の促進、内皮細胞においては血管新生の促進作用が明らかにされている。現在、SScの病因のひとつである線維化を抑える根本的な治療は開発はなされていない。我々は、SScの根源的病因である線維化を抗 CTGF 抗体投与にて抑制することにより、SScの生命予後の改善を期待できると考え本研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、SScの根源的病因である線維化を抑制する抗線維化薬となりうる抗 CTGF 抗体を創薬し、多彩な臓器病変の進展抑制とその生命予後を改善することにある。先に述べたように CTGF は CCN family に属する成長因子であり、皮膚、心臓、肺、肝臓や腎臓を含む多臓器の線維化の hallmark であり、さらに軟骨細胞では軟骨内膜の骨化を促進、腎のメサンジウム細胞では線維化の促進、内皮細胞においては血管新生の促進作用が明らかにされている。CTGF は insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)、von willebrand factor type C (VWC)、thrombospondin type 1 repeat (TSP-1)、C terminal module (CT) の4つの module から形成されている。我々は DNA 免疫法により独自に樹立した naïve form の4つのモジュールに対する中和活性を持つ抗 CTGF モノクローナル抗体を有しており、この CTGF を標的とした抗線維化薬により SScの主要病変の皮膚硬化を改善するのみならず、間質性肺炎、肺高血圧症、強皮症腎ならびに腸管の線維化等の重篤な内臓合併症を同時に改善させることが目的である。

### 3. 研究の方法

2種類の強皮症モデルマウス、ブレオマイシン (BLM) 誘導肺障害と、Topoisomerase (以下 Topo ) と Complete Freund's Adjuvant (以下 CFA) の混合による誘導マウスを用いて、肺線維化が、我々が所有する抗 CTGF 抗体投与によって軽減されるか否かについて検討した。BLM 誘導肺障害マウスは、6週齢の C57BL/6J (雌) の背部に生理食塩水 (200  $\mu$ l)  $\pm$  BLM (100 mg/kg) を充填した持続皮下投与ポンプを留置し7日間投与した。Negative control 群 (以下 control : 0.9% NaCl 持続皮下投与 + control IgG 腹腔内投与)、Positive control 群 (以下 BLM 群 : BLM 持続皮下投与 + control IgG 腹腔内投与)、治療群 (BLM 持続皮下投与 + 抗 CTGF 抗体腹腔内投与) の3つに分類し、誘導3日前より control IgG または抗 CTGF 抗体 10 mg/kg を1週間毎に腹腔内へ投与した。誘導28日目で sacrifice し、肺の病理学的評価、生化学、免疫学的評価を行った。Topo 誘導モデルマウスは、6週齢の C57BL/6J (雌) の背部に、Topo (75 U) と CFA (150  $\mu$ l) の混和物を2週間ごとに皮下注射した (合計4回)。control 群、Topo + CFA 群、治療群の3つに分類し、誘導1週間前より control IgG または抗 CTGF 抗体 10 mg/kg を1週間毎に腹腔内へ投与した。誘導8週後 sacrifice し、肺の病理学的評価、生化学的、免疫学的評価を行った。

### 4. 研究成果

BLM 誘導肺障害の表現型を示す (Figure 1)。

BLM 群では2匹の死亡例が見られたが、control 群、治療群共に全例生存した (Figure 1A)。BLM 群と治療群において肺病理の線維化スコア、ヒドロキシプロリン定量の有意差はないが、治療による抑制の傾向をみとめた (Figure 1C,D)。肺病理所見は Masson-trichrome 染色の結果、膠原線維は、治療によって抑制効果の傾向をみとめた (Figure 1B)。また、肺組織の線維化系サイトカイン、炎症性サイトカインの mRNA 発現量は、治療による有意差はみとめなかったが、IL-6、Spp1 において治療による低下傾向をみとめた (Figure 2)。

次に、Topo 誘導マウスにおける表現型を示す (Figure 3)。

肺病理では、control に比べ、Topo1+CFA 群や治療群で膠原線維は増加していた。また、肺組織の線維化系サイトカイン、炎症性サイトカインの mRNA 発現量において、治療群と PC 間での有意差はみられなかったが、Spp1、Acta2 では低下の傾向をみとめた (Figure 4)。

Figure 1

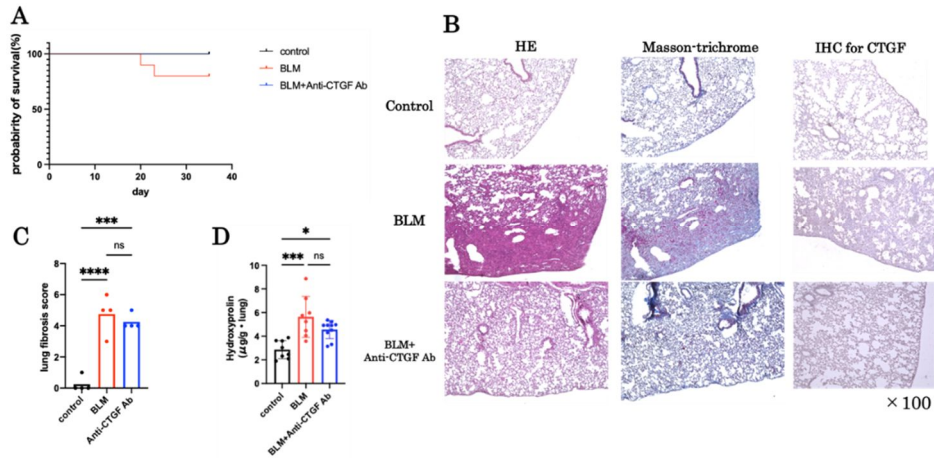


Figure 2

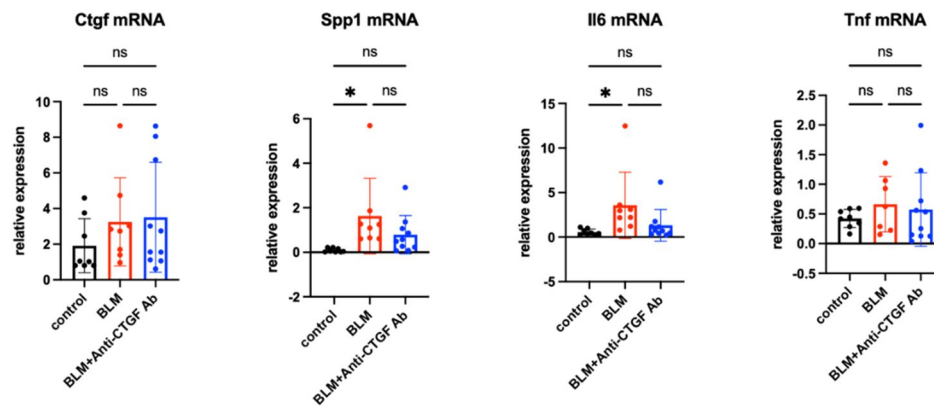


Figure 3

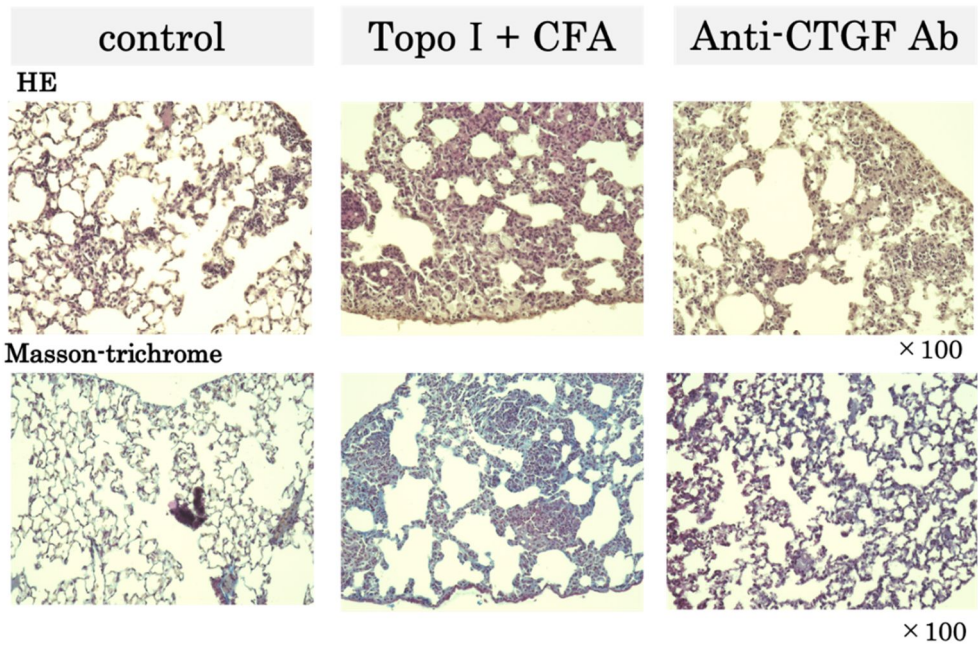
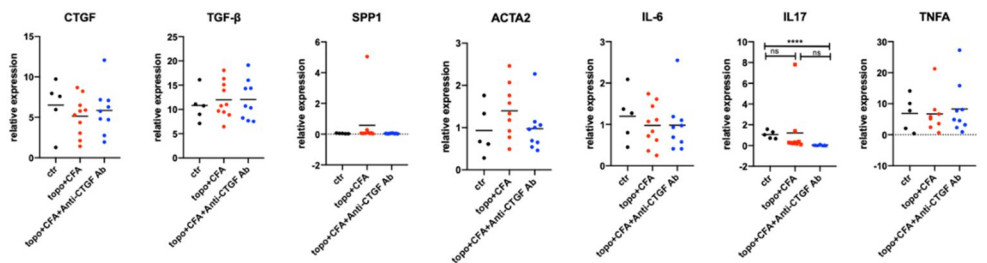


Figure 4



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7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 Yoshida Yuko, Hayakawa Kunihiro, Fujishiro Maki, Ikeda Keigo, Tsushima Hiroshi, Hirai Takuya, Kawasaki Mikiko, Tominaga Mitsutoshi, Suga Yasushi, Takamori Kenji, Watanabe Yoshifumi, Sekigawa Iwao, Morimoto Shinji	4. 巻 529
2. 論文標題 Social defeat stress exacerbates atopic dermatitis through downregulation of DNA methyltransferase 1 and upregulation of C?C motif chemokine receptor 7 in skin dendritic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1073 ~ 1079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.06.157	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 -
1. 著者名 Hayakawa Kunihiro, Kawasaki Mikiko, Hirai Takuya, Yoshida Yuko, Tsushima Hiroshi, Fujishiro Maki, Ikeda Keigo, Morimoto Shinji, Takamori Kenji, Sekigawa Iwao	4. 巻 20
2. 論文標題 MicroRNA-766-3p Contributes to Anti-Inflammatory Responses through the Indirect Inhibition of NF- B Signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 809 ~ 809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20040809	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 -
1. 著者名 Suzuki Satoshi, Ogiwara Kei, Nishi Takuya, Sakuma Shota, Akira Maiko, Iwasaki Masako, Honda Daisuke, Takahara Hisatsugu, Ikeda Keigo, Yamaji, Naoto Tamura Ken, Morimoto Shinji, Rinno Hisaki	4. 巻 3
2. 論文標題 A Case of MPO-ANCA Positive Systemic Lupus Erythematosus Developed into Acute Kidney Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Clinical and Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26502/acmcr.96550134	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 -

1. 著者名 Hayakawa Kunihiro, Ikeda Keigo, Fujishiro Maki, Yoshida Yuko, Hirai Takuya, Tsushima Hiroshi, Miyashita Tomoko, Morimoto Shinji, Suga Yasushi, Takamori Kenji, Ogawa Hideoki, Sekigawa Iwao	4. 巻 30
2. 論文標題 Connective Tissue Growth Factor Neutralization Aggravates the Psoriasis Skin Lesion: The Analysis of Psoriasis Model Mice and Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Dermatology	6. 最初と最後の頁 47 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5021/ad.2018.30.1.47	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 -

1. 著者名 Ikeda Keigo, Sekiguchi Naoya, Hirai Takuya, Tanji Kana, Zushi Atsuko, Inoue Mayumi, Takasago Masayuki, Komatsu Takaaki, Morimoto Shinji, Yamaji Ken, Takamori Kenji, Tamura Naoto, Sekigawa Iwao	4. 巻 16
2. 論文標題 Securely collecting multidimensional health information from patients with rheumatoid arthritis using smart device technology: Beneficial effect for physicians and patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Musculoskeletal Care	6. 最初と最後の頁 494 ~ 499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/msc.1354	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 -

1. 著者名 Niimi Naoko, Miyashita Tomoko, Tanji Kana, Hirai Takuya, Watanabe Kozo, Ikeda Keigo, Morimoto Shinji, Sekigawa Iwao	4. 巻 -
2. 論文標題 Aortic Aneurysm as a Complication of Granulomatosis with Polyangiitis Successfully Treated with Prednisolone and Cyclophosphamide: A Case Report and Review of the Literature	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/9682801	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 -

1. 著者名 Hirai Takuya, Ikeda Keigo, Tsushima Hiroshi, Fujishiro Maki, Hayakawa Kunihiro, Yoshida Yuko, Morimoto Shinji, Yamaji Ken, Takasaki Yoshinari, Takamori Kenji, Tamura Naoto, Sekigawa Iwao	4. 巻 38
2. 論文標題 Circulating plasma microRNA profiling in patients with polymyositis/dermatomyositis before and after treatment: miRNA may be associated with polymyositis/dermatomyositis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-017-0058-1	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Hayakawa K, Fujishiro M, Yoshida Y, Kataoka Y, Sakuma S, Nishi T, Ikeda K, Morimoto S, Takamori K, Sekigawa I.	4. 巻 13
2. 論文標題 Exposure of female NZBWF1 mice to imiquimod-induced lupus nephritis at an early age via a unique mechanism that differed from spontaneous onset.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 33-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cei/uxac012.	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木 智, 西 卓也, 作間 渉太, 池田 圭吾, 山路 健, 田村 直人, 森本 真司
2. 発表標題 長期経過で複数回の間質性肺炎増悪を来した抗MDA5抗体陽性CADM3例の臨床的検討
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津島浩, 森本 真司, 平井 琢也, 池田 圭吾, 山路 健, 関川 巖, 田村 直人
2. 発表標題 SLE治療過程におけるmiRNAの変動解析について
3. 学会等名 日本内科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口 ゆき乃, 鈴木 智, 中澤 武司, 大谷 友也, 池田 圭吾, 森本 真司
2. 発表標題 大型血管炎との鑑別を要したStreptococcus pseudopneumoniaeによる感染性解離性大動脈瘤について
3. 学会等名 第682回日本内科学会関東地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西 卓也, 藤城 真樹, 早川 国宏, 鈴木 智, 池田 圭吾, 森本 真司, 山路 健, 田村 直人
2. 発表標題 末梢血細胞分画変動及びB細胞内シグナルへの影響から検証したベリムマブの役割
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下 雅和, 小笠原 倫大, 多田 久里守, 草生 真規雄, 箕輪 健太郎, 安倍 能之, 塚原 隆伊, 森本 真司, 梁 広石, 天野 浩文, 野澤 和久, 松平 蘭, 片桐 彰, 山路 健, 田村 直人
2. 発表標題 全身性エリテマトーデス患者における生活の質、骨密度、睡眠時間に関する検討 順天堂SLE前向きレジストリ研究(JUMP study)より
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野嶋 仁貴, 鈴木 智, 大谷 友也, 篠浦 まりな, 池田 圭吾, 山路 健, 田村 直人, 森本 真司
2. 発表標題 MPO-ANCA陽性でループス様症状と血管炎症状が混在した腎炎患者に関する検討
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 智, 篠浦 まりな, 大谷 友也, 池田 圭吾, 山路 健, 田村 直人, 森本 真司
2. 発表標題 入院加療を要した成人発症Still病36例の臨床的特徴と治療成績の検討
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------