

令和 2 年 4 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16019

研究課題名（和文）全身性強皮症の皮膚硬化に対するボツリヌス毒素の治療効果と機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the therapeutic effect and mechanism of botulinum toxin on skin sclerosis in systemic sclerosis

研究代表者

関口 明子（Sekiguchi, Akiko）

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60774396

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、皮膚や臓器の線維化(硬化)と血管異常、免疫異常を生じる原因不明の難病である。最近、ボツリヌス毒素は免疫機能や線維芽細胞増殖能など、様々な細胞機能を制御することが注目されている。本研究では、ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの病態（皮膚線維化、血管障害）に対するボツリヌス毒素の治療効果について検討し、その機序を明らかにしつつある。酸化ストレス障害に対するボツリヌス毒素の影響についても検討を行った。本研究の成果によって、強皮症の皮膚線維化の新たな治療法の開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって、ボツリヌス毒素が強皮症の2つの主要病態（皮膚硬化と末梢循環障害）を改善できる画期的な治療薬となる可能性が期待できる。本邦では、ボツリヌス毒素がすでに様々な疾患（腋窩多汗症など）で保険適応を持っており、本研究結果を進展させて、強皮症の血管障害と皮膚硬化に対する適応拡大を目指すことができる。

研究成果の概要（英文）：Systemic sclerosis is an intractable disease of unknown cause that causes fibrosis (sclerosis) of the skin and organs and vascular and immune abnormalities. Recently, botulinum toxin has been shown to regulate various cellular functions, including immune function and fibroblast proliferative capacity. In this study, the therapeutic effects of botulinum toxin on the pathogenesis (skin fibrosis, vasculopathy) of bleomycin-induced scleroderma in a mouse model of the disease are investigated and the mechanism is being elucidated. The effect of botulinum toxin on oxidative stress disorder was also investigated. The results of this study may lead to the development of new treatments for skin fibrosis in systemic sclerosis.

研究分野：皮膚科

キーワード：全身性強皮症 皮膚硬化 ボツリヌス毒素

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、皮膚および内臓の線維化、血管障害、免疫異常を特徴とする発症機序不明の全身性疾患である。皮膚硬化は皮膚の真皮内に存在する線維芽細胞からの過剰な膠原線維の産生が関与している。その機序の一つとして、血管障害による低酸素が誘導する酸化ストレスが線維化に関与することが示唆されている。活性酸素の産生を調節する NOX の阻害剤や、酸化ストレスを改善させる薬剤(エダラボン)がマウス皮膚線維化モデルを改善することや、強皮症線維芽細胞では NOX4 と活性酸素の発現が亢進していることが報告されている(Arthritis Rheum 2011;63:3086, Curr Rheumatol Rep 2015;17:473.)。また、免疫異常(浸潤細胞から産生される TGF- 等のサイトカイン)など様々な機序が想定されている。

ボツリヌス毒素はボツリヌス菌から産生される神経毒素で、神経終末におけるアセチルコリンや、その他の神経伝達物質(ノルエピネフリンなど)も阻害する。我々は、皮膚虚血再還流障害モデルマウスを作成し、ボツリヌス毒素の治療効果と機序の解明を試みた。その結果、ボツリヌス毒素注入が、皮膚虚血再還流障害によって生じる血管障害を抑制して、虚血が改善されて皮膚潰瘍の出現が有意に減少することを見出した。また、その機序として、低酸素による酸化ストレス障害や小胞体ストレスの抑制を見出した(Scientific Reports, 2015; 5: 9072.)。

レイノー現象は、ほとんどの全身性強皮症患者に初発症状として出現する現象である。手指の小動脈の攣縮によって虚血再還流が起こり、手指の色調が変化し、痛みやしびれを伴う。最近、我々は、10 人のレイノー現象をもつ強皮症患者に対して A 型ボツリヌス毒素を手指基部に注入し、高い有効性・安全性を本邦で初めて報告した (Journal of Dermatology 2016; 43: 56)。さらに、45 人の強皮症患者を無投与群、および B 型ボツリヌス毒素を 250, 1000, 2000 単位注入する 4 群にランダム化割り付けし、B 型ボツリヌス毒素の効果を検討した。レイノー症状の重症度と痛み・痺れは、1000, 2000 単位群において、無投与群、250 単位群と比べて有意に改善し、投与 12 週間後まで効果が得られた。皮膚温度や指尖部潰瘍も有意に改善した。重大な副作用はみられず、有効性・安全性が示唆された(Motegi S, Sekiguchi A et al. Acta Derato-Venereologica 2017; 97: 843)。これらの結果より、臨床的にボツリヌス毒素が血管拡張作用を有し、血流量を亢進させて組織の低酸素と組織障害を改善させることが示唆された。

興味深いことに、表皮細胞に Tie2 を発現させて乾癬様皮膚炎が誘導されたマウスにボツリヌス毒素を注入すると浸潤する T 細胞と樹状細胞が減少し皮疹が改善したという報告やアレルギー性鼻炎マウスにボツリヌス毒素を吸入させると症状が改善するといった報告がみられ、ボツリヌス毒素が免疫機能を制御する可能性も示唆される(J Invest Dermatol 2012;132:1927-30, Life Sci. 2016; 147: 132)。さらに、創傷治癒後に創部が盛り上がる「肥厚性癬痕」の病変部の線維芽細胞にボツリヌス毒素を反応させると、増殖能が抑制されることも報告されている(J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008;61:1128.)。ボツリヌス毒素が血管内皮細胞増殖因子 VEGF の発現を亢進させて血管新生能を亢進させることも報告されている(Int J Mol Med. 2017;40:713.)。

我々の研究成果やこれまでの海外の研究成果より、ボツリヌス毒素は、血管拡張、疼痛抑制、酸化ストレス障害の抑制、免疫機能制御、増殖抑制など、多様な機能を有する薬剤であることが示唆される。そこで、我々は、ボツリヌス毒素がもつこれらの機能によって、強皮症の皮膚線維化に対しても効果を示すのではないかという仮説を想定した。

2. 研究の目的

本研究では、強皮症由来線維芽細胞やブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスにおけるボツリヌス毒素の治療効果を明らかにし、その機序を解明することが目的である。

具体的に以下の 2 つの目的・目標を挙げる。

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの病態(皮膚線維化、血管障害)に対するボツリヌス毒素の治療効果とその機序を解明する。

強皮症患者由来皮膚線維芽細胞に対するボツリヌス毒素の線維化抑制効果とその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの病態(皮膚線維化、血管障害)に対するボツリヌス毒素の治療効果とその機序を解明する。

マウス背部の皮下にプレオマイシンを2週間、連日注入し皮膚線維化を誘導する。この皮膚線維化モデルをすでに確立させている。この皮膚線維化モデルマウスに対して、ボツリヌス毒素の治療効果を検討する。ボツリヌス毒素は、プレオマイシンを注入する24時間前(予防効果)と、1週間後(治療効果)に皮下注入する方法の2種類を行う。プレオマイシン投与後に皮膚を採取し、病理組織学的に皮膚の肥厚の程度を計測する。また、コラーゲン量を定量する。免疫染色やFACSによって浸潤細胞の数や種類を検討する。皮膚線維化部位からmRNAを抽出し、リアルタイムPCR法によって、炎症性サイトカイン(Th1, Th2, Th17関連サイトカイン)や、線維化に関する因子(1型コラーゲン, CTGF, MMP, TGF- など)、酸化ストレス障害に関する因子(NO, NOX など)について検討を行う。また、血管障害を評価するために、血管量や血栓量、TUNEL法による血管内皮細胞のアポトーシス量について検討を行う。また、上記の全ての研究計画において、A型とB型のボツリヌス毒素の両方について検討を行う。A型とB型の違いは、B型は値段がA型の約6割と安いこと、効果発現が早いこと、疼痛への効果が高いことなどが知られている。2種類を検討、比較することで、より経済的で効果の高い治療法を確立することが期待できる。

強皮症患者由来皮膚線維芽細胞に対するボツリヌス毒素の線維化抑制効果とその機序を明らかにする。

線維化の病態において重要な因子に対するボツリヌス毒素の影響について、強皮症患者由来線維芽細胞を用いて検討を行う。強皮症患者由来皮膚線維芽細胞を数種類用いて、線維化に関与する因子である、1型コラーゲン、TGF- β , CTGF, SMA, MMP, TIMPなどの発現に対するボツリヌス毒素の影響について、免疫染色、ウエスタンブロット法、リアルタイムPCR法を用いて検討を行う。また、ボツリヌス毒素による強皮症由来線維芽細胞の増殖能と過酸化水素刺激によるROS産生への影響を検討する。NOXファミリーは活性酸素の産生を調節する因子であり、強皮症皮膚線維芽細胞ではNOX4の発現が亢進している。活性酸素の産生が増加することによって、筋線維芽細胞への分化が亢進している(Curr Rheumatol Rep. 2015;17:473.)。そこで、強皮症由来線維芽細胞を用いて、NOXファミリーの発現に対するボツリヌス毒素の影響について検討を行う。様々なボツリヌス毒素の濃度、反応時間を設定して検討を行う。

4. 研究成果

プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの皮膚硬化に対するボツリヌス毒素局所注射の治療効果について検討した結果、ボツリヌス毒素の投与によって、皮膚硬化が抑制される傾向が得られた。また、病理組織学的に皮膚真皮の厚さや、コラーゲン量、浸潤する免疫細胞の数を検討した結果でも、ボツリヌス毒素によって抑制効果が得られた。皮膚線維化部位からmRNAを抽出し、リアルタイムPCR法によって、炎症性サイトカイン(Th1, Th2, Th17関連サイトカイン)や、線維化に関する因子(1型コラーゲン, CTGF, MMP, TGF- など)、酸化ストレス障害に関する因子(NO, NOX など)について検討を行った結果、ボツリヌス毒素で様々な変化がみられた。また、血管障害を評価するために、血管量や血栓量、TUNEL法による血管内皮細胞のアポトーシス量につ

いて検討を行った結果、こちらもボツリヌス毒素投与によって、抑制効果が得られた。また、強皮症患者由来皮膚線維芽細胞を数種類用いて、線維化に関与する因子である、1型コラーゲン、TGF- β 、CTGF、SMA、MMP、TIMP や酸化ストレス関連因子などの発現に対するボツリヌス毒素の影響について、免疫染色、ウエスタンブロット法、リアルタイムPCR法を用いて検討を行った結果、ボツリヌス毒素によって様々な変化がみられた。これらの成果より、ボツリヌス毒素は酸化ストレスの抑制を介してプレオマイシン誘導皮膚線維化を抑制している可能性が示唆された。これらの成果を国際学会でも発表した。今後は、さらに詳細な検討を追加して、論文報告を行う予定としている。ボツリヌス毒素は効果が3～6か月間持続することが特徴である。従って、一度、注射を行えば、その後に頻回投与を行う必要がないことも利点であり、治療薬として応用できる可能性を秘めている薬剤と考える。本研究成果によって、ボツリヌス毒素が強皮症の2つの主要病態（皮膚硬化と末梢循環障害）を改善できる画期的な治療薬となる可能性が期待できる。本邦では、ボツリヌス毒素がすでに様々な疾患（腋窩多汗症など）で保険適応を持っており、本研究成果を進展させて、強皮症の血管障害と皮膚硬化に対する適応拡大を目指すことができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	Hritu Baral, Akiko Sekiguchi, Yuta Inoue, Syahla Nisaa Amalia, Sahori Yamazaki, Chisako Fujiwara, Akihiko Uchiyama, Sachiko Ogino, Yoko Yokoyama, Ryoko Torii, Mari Hosoi, Osamu Ishikawa, and Sei-ichiro Motegi
2. 発表標題	Inhibitory effect of botulinum toxin B on bleomycin-induced skin fibrosis in mice: Possible regulation of oxidative stress
3. 学会等名	The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年	2019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
--	---------------------------	-----------------------	----