

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08656

研究課題名(和文) 創傷治癒および全身性強皮症の血管障害における単球マクロファージの病態的関与

研究課題名(英文) Pathological involvement of monocyte/macrophages in wound healing and vascular abnormalities in systemic sclerosis

研究代表者

山口 由衣 (YAMAGUCHI, Yukie)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：60585264

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)：SSc病態における単球分化に必須の転写因子IRF8の関与を検討した。SSc由来単球において有意な発現低下を認め、IRF8発現低下単球誘導Mqでは線維化促進型を示した。骨髄球特異的IRF8KOマウスでは皮膚線維化が増強し、単球のIRF8制御異常がSSc病態に関わることが示された。次に創傷治癒とIRF8の関連について検討した。本マウスの創傷治癒モデルでは、創傷治癒が遅延した。遅延部周囲の皮膚における接着および血管新生関連因子発現は有意に上昇し、アンフィレグリンが減少した。また、異常な血管新生が観察された。単球IRF8発現異常が、創傷治癒遅延や血管異常を呈するSSc病態にも関与することが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は、血管障害と過剰線維化の双方が主要な病態であり、両者を一元化する病態解明、新規治療開発が重要な課題である。単球マクロファージ系細胞が、強皮症の病態に重要な関与をしていることはこれまでも示唆されており、我々は、その分化制御を行う転写因子に着目した解析を行ってきた。これまでの研究と今回の研究により、線維化と創傷治癒異常・血管異常の双方にIRF8が関与する可能性が示唆されている。強皮症の血管異常におけるIRF8の関与をさらに深く解明することで、新規治療開発に結び付けられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to evaluate whether IRF8 is involved in abnormal wound healing and vasculopathy as critical features of SSc pathology. An involvement of IRF8 in wound healing process was evaluated in full-thickness skin wound model and wound closure was further assessed in myeloid-specific IRF8 knockout mice (IRF8KO). Upregulation of IRF8 was observed in skin wound model of WT, suggesting IRF8 involvement in wound healing. Wound closure was significantly delayed in IRF8KO mice. Histological analysis found smaller granulation tissue in IRF8KO mice. mRNA levels of adhesion and angiogenesis-related factors such as S1pr1, GlyCAM1, and P-Selectin were upregulated and amphiregulin was downregulated in IRF8KO mice. Abnormal angiogenesis with enhanced number of small vessels was observed in IRF8 KO mice. The results suggest that IRF8 in myeloid lineage cells plays important roles in wound healing and may mimic a part of SSc pathology.

研究分野：線維化、膠原病

キーワード：創傷治癒 単球マクロファージ 全身性強皮症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過剰な臓器の線維化や血管リモデリングを特徴とする全身性強皮症 (SSc) は、他の膠原病と比較しても明らかに有効性の示された治療法の存在しない難治性の疾患である。これまでの研究成果により、線維化病態における TGF- β シグナルの重要性や、免疫細胞や線維芽細胞の機能異常、血管内皮前駆細胞異常などが示されているが、SSc 病態を全般的に説明しうる成果には乏しい状態である。SSc は遺伝素因と環境因子が相互に影響しあう多因子疾患と考えられているが、双生児研究や Type I IFN の関与からも環境因子の重要性が示唆される。近年、SSc をはじめとする線維化病態形成における単球・マクロファージ (M ϕ) の重要性が着目されている。SSc 患者末梢血では単球が増加、活性化しており、病変部局所では、単球走化因子やケモカインの発現上昇を認める。SSc 病変部では、M2M ϕ が優位であり、より線維化促進に働くことが示されている。さらに、SSc 患者では、治療前後における病変皮膚の遺伝子解析において、治療有効例では M2M ϕ 関連遺伝子が最も顕著な変化を示しており、単球 M ϕ 系細胞がいかに病態形成のエフェクターとして重要であることを示している。我々はこれまで、SSc 患者由来単球を用いたマイクロアレイ解析や、腫瘍モデルを用いた *in vivo* 解析により、SSc の単球において形質異常が存在し、血管障害へ直接的に関与し、より線維化への誘導を示す形質を持っていることを報告してきた (Yamaguchi Y et al. *Arthritis Res Ther.* 2010; *Histol Histopathol.* 2013; *Arthritis Res Ther.* 2013)。近年着目しているのは、インターフェロン制御因子 8 (IRF8) である。IRF8 は、単球や M ϕ への分化に必須の転写因子として報告され、他の IRF 因子とは異なる特徴を持つ。これまでの我々の研究成果では、dcSSc 患者の PBMCs および末梢血単球では IRF8 発現が有意に低下し、その程度は皮膚硬化スコア mRSS に逆相関していた。IRF8 発現を RNA 干渉法で低下させたヒト単球や、単球から培養したヒト M ϕ を用いてフェノタイプ解析を行ったところ、pro-fibrotic な M2 フェノタイプを示した。さらに、骨髓球特異的 IRF8 ノックアウトマウスでは、ブレオマイシン誘導の皮膚線維化を増強させた (Ootake Y et al. *JID* 2021)。これらの検討の多くは、ヒト検体で解析しており、単球における IRF8 発現制御が実際の SSc 患者における線維化病態に強く関与することを示唆している。一方、SSc の重要な病態として血管新生、脈管形成異常があるが、創傷治癒過程においても単球 M ϕ が強く関与することから、本研究では、IRF8 を中心とする単球分化・形質異常が、SSc の創傷治癒・血管障害、免疫異常にさらに関与する可能性を検討した。

2. 研究の目的

IRF8 を介する単球分化・形質異常が、SSc の創傷治癒・血管障害に関与する可能性を検討

3. 研究の方法

(1) 創傷治癒過程における IRF8 発現検討

正常の創傷治癒過程において、単球 M ϕ の制御因子である IRF8 がどのように発現し、創傷治癒過程に貢献しているかを検討するため、B6 の WT マウスを用いて創傷治癒モデル(背部 1 cm x 1 cm)を作成する。さらに、皮膚における IRF8 発現を mRNA およびタンパクレベルで経時的に検討する。

(2) LsM-Cre IRF8^{fl/fl} マウスを用いた創傷治癒モデル解析

単球 M ϕ をメインとした骨髓球の IRF8 のみを欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (LysM-Cre IRF8^{fl/fl} マウス: IRF8cKO) を使用し、A と同様の創傷治癒モデルを作成、WT マウスと創傷治癒過程を比較することで、単球 M ϕ の IRF8 発現低下が創傷治癒へ及ぼす影響を検討する。直接的な創傷の大きさ、創縮小率、組織学的解析、CD31 等染色による血管評価、PCR や WB を用いた血管新生マーカー、接着因子マーカー発現検討などを行う。

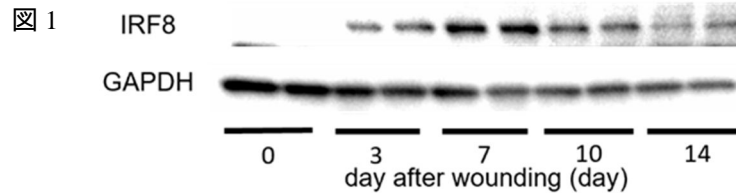
(3) IRF8 発現低下単球・M ϕ を用いた血管新生 *in vitro*, *in vivo* 解析

IRF8 発現低下単球が直接的に血管新生に及ぼす影響を検討する。具体的には、健常人末梢血より単球を分離し、RNA 干渉で IRF8 発現を低下させた単球や単球由来 M ϕ を用いて、ヒト皮膚血管内皮細胞と混合し、マトリゲルプレート上に培養することで、血管内皮細胞が管腔構造を作る過程にどのような影響を与えるかを 3 次元で評価する。また、それらに差があった場合には、培養上清における血管新生因子他の発現差を検討する。*in vivo* 解析では、ヒト大腸がん細胞 CT-26 を用いる腫瘍血管モデルを作成する。具体的には、IRF8 の発現を低下させたヒト単球、コントロール単球を、それぞれ CT26 と混合し、SCID マウスの背部に皮下注射し、7 日後の腫瘍形成、血管新生を評価する。

4. 研究成果

(1) 創傷治癒過程における IRF8 発現検討

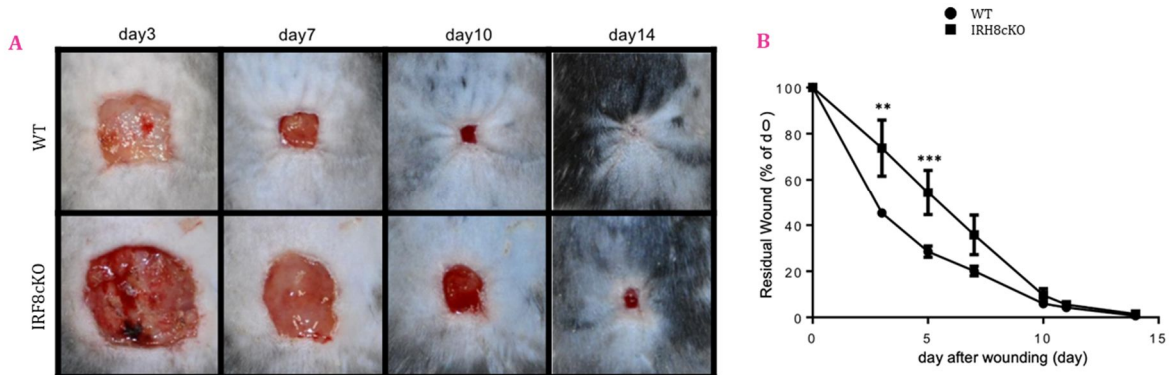
創傷治癒過程における WT マウスの IRF8 のタンパクレベルでの発現をウェスタンブロッティング法で測定した。WT マウスにおける IRF8 のタンパク発現は創傷後 3 日目から観察され、7 日目にピークを認めた (図 1)。これにより、創傷治癒過程の特に早期から中期に IRF8 が関与することが示唆された。



(2) LsM-Cre IRF8^{fl/fl} マウスを用いた創傷治癒モデル解析

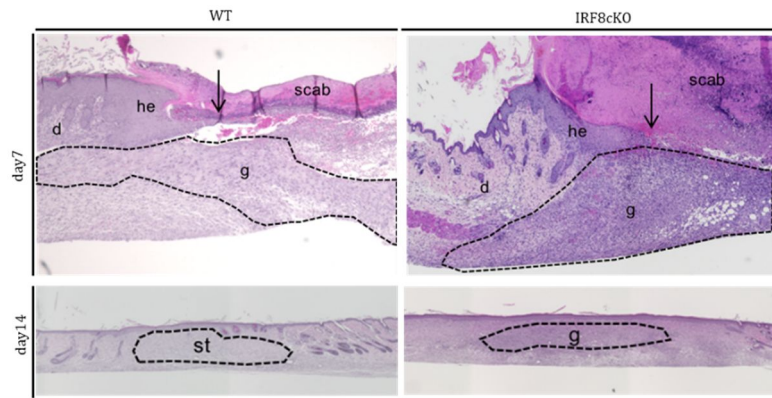
単球における IRF8 の発現低下が創傷治癒の及ぼす影響を検討するため、骨髓球特異的 IRF8KO マウス (IRF8^{cKO} マウス) と WT マウスを用いた創傷治癒モデルマウスにおける創傷治癒過程を比較した。代表的な写真を図 2A に示す。IRF8^{cKO} マウスでは、初期および中期において創閉鎖の遅延が観察された。各時点で、画像解析を用いて創傷面積を求め、残存創傷面積をグラフ化した (n=6 for each time point and genotype, ***p < 0.001, **p < 0.01; two way repeated-measure ANOVA with the Bonferroni post hoc test)。創傷後 3 日目と 5 日目において IRF8^{cKO} マウスは、WT マウスと比較して創閉鎖が有意に遅延した (図 2B)。

図 2

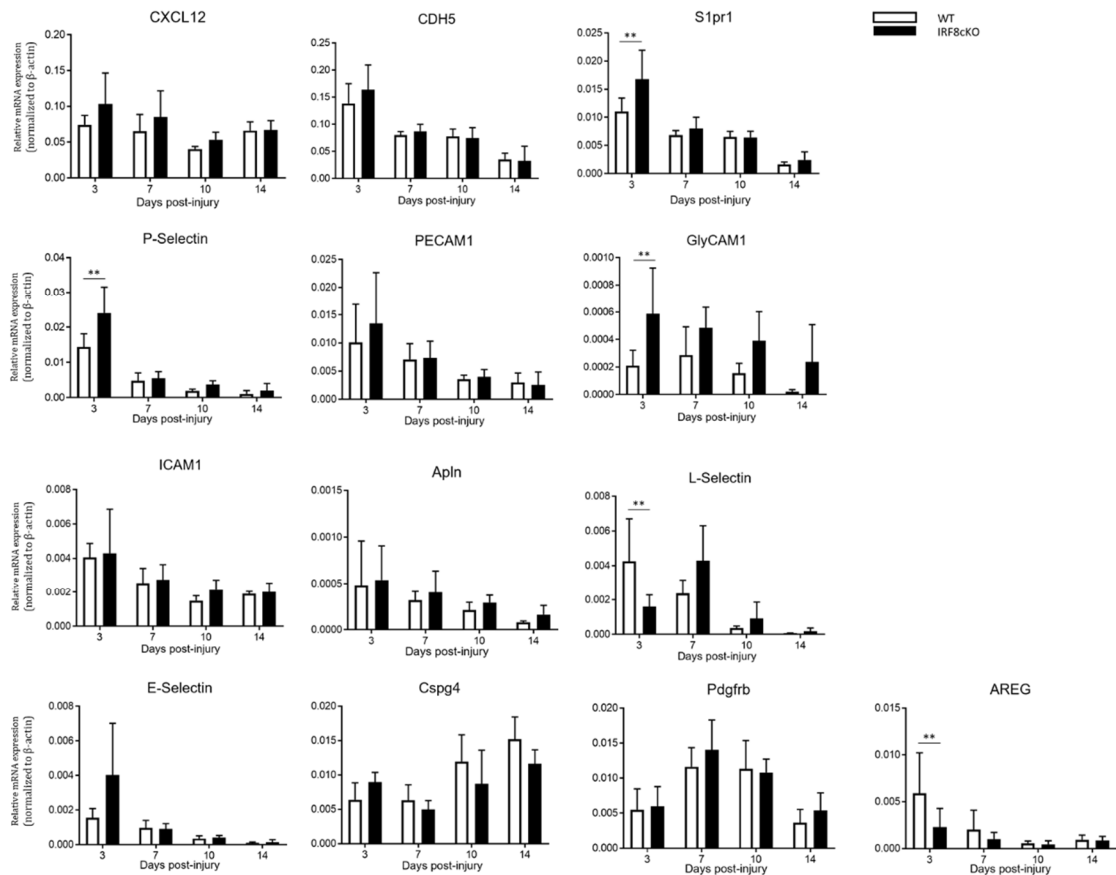


組織学的検討のため、IRF8^{cKO} マウスと WT マウスの創傷治癒過程における 7 日目と 14 日目の創傷部の HE 染色を図 3 に示した。7 日目では、IRF8^{cKO} マウスの肉芽組織は WT マウスと比較して減少し、痂皮の量は増加していた。また、IRF8^{cKO} マウスの創傷部では、赤血球漏出が多く見られた。14 日目には両者とも創閉鎖をしたが、WT マウスは癒痕組織であったのに対し、IRF8^{cKO} マウスでは肉芽組織の残存が観察された。(d: dermis, g: granulation tissue, he: hypertrophic epidermal wound edge, : distance between epithelial tips, st: scar tissue)。

図 3

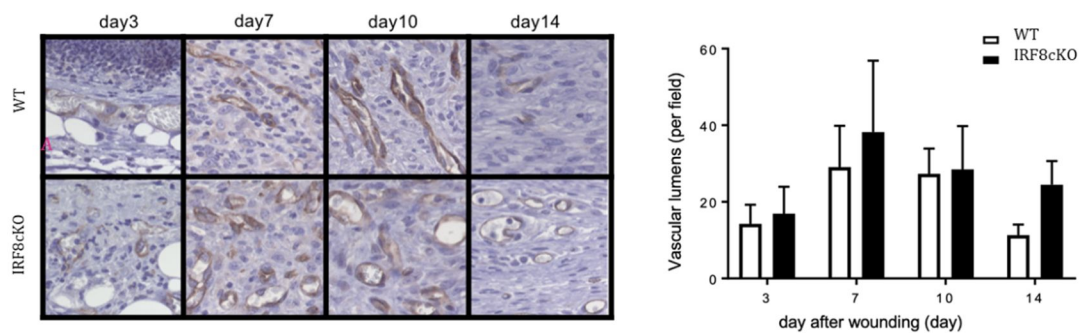


創傷治癒過程における IRF8cKO マウスと WT マウスの創部周囲の血管新生関連因子、接着分子、血管安定化因子の mRNA 発現を測定した。創傷治癒過程の初期において IRF8cKO マウスでは、血管新生関連因子や接着分子 (S1pr1, GlyCAM1, P-selectin) の mRNA 発現が WT マウスに比べ有意に上昇した。一方、L-セレクチン、血管安定化因子 (アンフィレグリン:AREG) の mRNA 発現は、IRF8cKO マウスで有意な低下が認められた。(n=5-6 for each time point and genotype, **p < 0.01; two way repeated-measure ANOVA with the Bonferroni post hoc test).



創傷治癒の遅延した IRF8cKO マウスでは、逆に血管新生因子や接着因子の発現が増加し、血管内皮安定化因子発現が低下していたため、創部周囲の血管数を WT マウスと比較した。CD31 陽性内皮細胞の代表画像を図 4 に示した。IRF8cKO マウスでは WT マウスに比べて微小血管密度が目立つ傾向にあり、また、IRF8cKO マウスでは、創傷後 7 日目と 14 日目に血管内腔密度の上昇傾向を認めた。血管数は強拡大で独立した 3 視野でカウントし、結果は平均値で表した (n=5 for each time point and genotype, two way repeated-measure ANOVA with the Bonferroni post hoc test)。以上より、IRF8 発現低下により、創傷治癒は遅延するが、その初期過程で、異常な血管新生、血管内皮細胞の不安定化が生じている可能性が示唆された。

図 4



(3) IRF8 発現低下単球・M ϕ を用いた血管新生 in vitro, in vivo 解析

(2)で得られた結果をより確認するため、マトリゲルを用いた血管腔形成モデル、SCID マウスを用いた腫瘍血管新生モデルで解析中であり、Preliminary であるが、同様の傾向を示している。異常な血管新生がどのように創傷治癒遅延に導かれるか、また、創傷治癒過程後期における IRF8 の影響は引き続き解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 3件）

1. 著者名 Nanri Y, Nunomura S, Watanabe T, Ohta S, Yamaguchi Y, Izuhara K	4. 巻 104(3)
2. 論文標題 Expression profile of periostin isoforms in systemic sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 210-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.10.005	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 Ototake Y, Yamaguchi Y, Asami M, Komitsu N, Akita A, Watanabe T, Kanaoka M, Kurotaki D, Tamura T, Aihara M	4. 巻 141(8)
2. 論文標題 Downregulated IRF8 in monocytes/macrophages of systemic sclerosis patients may aggravate the fibrotic phenotype	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 1954-1963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2021.02.015	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 Yamaguchi Y	4. 巻 71(2)
2. 論文標題 Exploring the deeper linkage between adverse drug reactions and autoimmune diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 161-162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2022.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda S, Yamaguchi Y, Baba T, Sekine A, Ogura T	4. 巻 165
2. 論文標題 Letter comments on anti-PD(L)1 immunotherapies in patients with cancer and with pre-existing systemic sclerosis: a post-marketed safety assessment study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eur J Cancer	6. 最初と最後の頁 205-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejca.2022.01.020	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 Watanabe Y, Yamaguchi Y	4. 巻 71(2)
2. 論文標題 Drug allergy and autoimmune diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 179-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 山口由衣	4. 巻 1(1)
2. 論文標題 膠原病の手の皮疹とその鑑別	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 皮膚科	6. 最初と最後の頁 125-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 M, Ototake Y, Akita A, Asami M, Ikeda N, Watanabe T, Kanaoka M, Yamaguchi Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Periostin; an inducer of pro-fibrotic phenotype in monocytes and monocyte-derived macrophages in systemic sclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One	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) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Suzuki M, Enoki A, Asami M, Ototake Y, Ikeda N, Yamaguchi Y
2. 発表標題 Periostin may act on monocytes to be differentiated into macrophages with fibrotic phenotype in patients with systemic sclerosis
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口由衣
2. 発表標題 教育講演49 全身性強皮症の診療を楽しもう 押さえておくべき全身性強皮症の基本
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口由衣
2. 発表標題 シンポジウム2 基本から学ぶ皮膚血管炎，血管障害：苦手意識を克服します これが皮膚動脈炎だ
3. 学会等名 第51回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊友也，秋田亜紗美，乙竹 泰，金岡美和，池田信昭，伊藤秀一，山口由衣
2. 発表標題 限局性強皮症に対するプレドニゾンとメトトレキサートの有効性の検討
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊友也，榎 亜紗美，鈴木麻生，乙竹 泰，金岡美和，山口由衣
2. 発表標題 抗SS-A抗体陽性全身性強皮症の臨床的特徴
3. 学会等名 第51回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 乙竹 泰, 金岡美和, 榎 亜紗美, 菊地彩音, 鈴木麻生, 渡邊友也, 山口由衣
2. 発表標題 当科のエリテマトーデス症例におけるヒドロキシクロロキン中止例の解析
3. 学会等名 第85回日本皮膚科学会東京支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 乙竹 泰, 鈴木華織, 榎 亜紗美, 鈴木麻生, 渡邊友也, 金岡美和, 山口由衣
2. 発表標題 エリテマトーデスにおけるヒドロキシクロロキン長期投与の臨床的解析
3. 学会等名 第51回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Imai S, Akita A, Ikeda N, Ototake Y, Yamaguchi Y
2. 発表標題 Delayed wound healing and vascular abnormality observed in myeloid-specific Interferon Regulatory Factor 8 knockout mice
3. 学会等名 ISID meeting 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊友也, 榎 亜紗美, 鈴木麻生, 乙竹 泰, 金岡美和, 山口由衣
2. 発表標題 全身性強皮症における抗SS-A抗体の臨床的意義の検討
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山口由衣 他 (高橋健造・佐伯秀久 編)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 340
3. 書名 皮膚疾患 最新の治療2021-2022	

1. 著者名 山口由衣 他 (藤本学 編)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 528
3. 書名 皮膚科ベストセレクション 皮膚科 膠原病 皮疹から全身を診る	

〔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
---------	---------