

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21591456
研究課題名（和文） 強皮症の病態における ICOS と ICOSL の役割の解明と治療への展開
研究課題名（英文） Investigation and therapeutic application of ICOS and ICOSL in systemic sclerosis
研究代表者 長谷川 稔（HASEGAWA MINORU） 金沢大学・附属病院・講師 研究者番号：50283130

研究成果の概要（和文）：ICOS と ICOSL の線維化における役割を明らかにするために、ICOS 欠損マウス、ICOSL 欠損マウス、ICOS と ICOSL の二重欠損マウスにおいて、ブレオマイシンの気管内投与による肺線維症モデルとブレオマイシンの連日皮内注射による皮膚と肺の線維化モデルの検討を行った。ICOS の欠損は肺や皮膚の線維化が軽減したが、ICOSL や ICOS と ICOSL の二重欠損により線維化は悪化した。ICOS 欠損マウスでは ICOSL の発現が上昇しており、マクロファージや B 細胞における ICOSL の発現量が線維化の程度と逆相関した。これらの結果から、抗原提示細胞に発現した ICOSL はブレオマイシン誘導性の線維化の病態に何らかの抑制性の作用を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We assessed the roles of ICOS and ICOSL in tissue fibrosis by administering bleomycin intratracheally or intradermally into ICOS and/or ICOSL-deficient mice. The loss of ICOS attenuated fibrosis of lungs and skin, whereas deficiency of ICOSL aggravated it. Mice deficient in both ICOS and ICOSL also exhibited accelerated fibrosis, reflecting a dominant role for ICOSL over ICOS in this model. ICOSL expression on macrophages and B cells in bronchoalveolar fluids was significantly elevated in ICOS-deficient mice compared to wild type mice during this process. Thus, ICOSL expression levels on B cells and macrophages were inversely associated with the severity of tissue fibrosis. Our results indicate that ICOSL expression on antigen presenting cells plays a previously unknown regulatory role during the development of bleomycin-induced tissue fibrosis which is independent of the ICOS-ICOSL pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：強皮症、線維化、ICOS、ICOSL、ブレオマイシン、皮膚、肺

1. 研究開始当初の背景

T 細胞と B 細胞間の補助シグナルである

ICOS-ICOSL 軸の異常は、獲得免疫に影響を

及ぼす。しかし、ICOSLはマクロファージにも発現することから、ICOS や ICOSL は自然免疫にも関与している可能性がある。しかし、線維化など自然免疫の関与が強い病態における ICOS-ICOSL シグナルの役割はよくわかっていない。そこで、全身性強皮症（強皮症）などの線維化の病態における ICOS や ICOSL の役割を検討するという着想に至った。

2. 研究の目的

(1)ブレオマイシン誘導性強皮症モデルでの検討

ICOS 欠損マウス、ICOSL 欠損マウス、ICOS と ICOSL の二重欠損マウスにおいて、ブレオマイシンの気管内投与における肺線維症とブレオマイシンの連日皮下注射による皮膚と肺の線維化モデルを誘導し、ICOS や ICOSL の欠損が与える影響と機序について検討する。

(2)強皮症患者における検討

マウスだけでなく、実際の強皮症患者においても ICOS や ICOSL が病態に関与しているかどうかを明らかにするために、末梢血 T 細胞での ICOS の発現と、ICOS 発現 T 細胞の機能に関して検討する。B 細胞やマクロファージにおける ICOSL の発現についても同様に調べる。強皮症患者の皮膚における ICOS や ICOSL の発現についても検討する。

3. 研究の方法

(1)ブレオマイシン誘導性強皮症モデルでの検討

ICOS 欠損マウスと ICOSL 欠損マウスに

ブレオマイシンによる皮膚や肺の線維化を誘導した場合に、野生型マウスに投与した場合と比べてどのような違いがみられるかを明らかにする。また、ICOS と ICOSL の両方を欠損したマウスを作成して、同様に解析する。

- 皮膚や肺の線維化の程度の評価：マッソントリクローム染色、 α SMA 染色、ハイドロキシプロリンの測定、皮膚については真皮の厚さ、肺については間質性肺炎スコアなどを用いる。また、肺病変の重症度を明らかにするために、生存曲線を作成する。
- 皮膚や肺への浸潤細胞の評価：免疫組織染色に加え、肺では気管支肺胞洗浄液中の細胞のサブセットや活性化をフローサイトメトリーで解析する。また、これらの浸潤細胞における ICOS、ICOSL、他の共刺激分子の発現量を測定する。
- 皮膚や肺でのサイトカインの発現の評価：皮膚溶解抽出液中のサイトカイン、ケモカイン、細胞成長因子を ELISA 等により測定する。

(2)強皮症患者における検討

上記のような動物実験での成果が、実際の強皮症でも矛盾しないかどうかを確認する。強皮症患者の皮膚や肺の病変部組織に、ICOS 発現 T 細胞や ICOSL を発現するマクロファージや B 細胞がどれくらい存在するかを免疫多重染色にて明らかにする。また、強皮症患者の末梢血の T 細胞における ICOS の発現レベル、マクロファージや B 細胞上の ICOSL の発現レベルについて、フローサイトメトリーで検討する。これらの発現レベルが、健常人や他の膠原病患者と比べて違いがみられるかどうか、強皮症の各種臨床症状や治療との間に有意な相関がみられるかどうかを検討する。また、強皮症患者から採取した末梢血

T細胞に発現する ICOS を、in vitro で抗体を用いて共刺激した際に、炎症や線維化に関与するサイトカインの産生能に関して健常人と違いがみられるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1)ブレオマイシン誘導性強皮症モデルでの検討

ICOS欠損マウスでは線維化が軽減し、ICOSL欠損マウス、ICOS/ICOSL二重欠損マウスでは逆に悪化した。また、ICOS欠損マウスではB細胞やマクロファージでのICOSLの発現が増加、ICOSL欠損マウスではT細胞におけるICOSの発現が増加していた。これらの結果から、ICOSLの発現が線維化と逆相関すること、すなわち、ICOSLが線維化の抑制に働いている可能性が示された。

ブレオマイシンの投与は、組織でのヒアルロン酸分解物やアポトーシス細胞などの産生を促し、これがマクロファージやB細胞などに発現するtoll-like receptorに結合することにより、細胞が活性化してサイトカイン産生が促進されることが報告されている。このため、ICOS欠損マウス、ICOSL欠損マウス、ICOS/ICOSL二重欠損マウスよりマクロファージやB細胞を採取して培養し、ヒアルロン酸、HMGP-1、LPSなどのtoll-like receptor 2, 4のリガンドを添加し、線維化に関与するサイトカインの産生やシグナルにおけるICOSLの役割をin vitroで検討した。しかし、明らかな機序は特定できなかった。

ただし、in vivoでは、各系統の線維化の重症度は、肺や皮膚などの病変局所におけるTGF-betaの発現とよく相関しており、ICOSやICOSLがTGF-betaの発現を介して線維化に関

与している可能性が示された。

(2)強皮症患者における検討

免疫組織学的な検討により、発症早期で皮膚硬化の進行時期にある強皮症患者の皮膚病変部組織では、ICOS発現T細胞やICOSLを発現するマクロファージの浸潤が増加していた。また、強皮症患者の末梢血のT細胞におけるICOSの発現レベル、マクロファージやB細胞上のICOSLの発現レベルについて、フローサイトメトリーで検討した。ICOSの発現は、発症早期の強皮症重症例で、健常人に比べて有意に増加していた。一方、ICOSLの発現は、強皮症患者と健常人の間で有意な差がみられなかった。さらに、強皮症患者から採取した末梢血T細胞に発現するICOSを、in vitroで抗体を用いて共刺激した際に、炎症や線維化に関与するサイトカインの産生が、健常人由来のT細胞に比べて増強していた。そして、血清中の可溶性ICOSが強皮症患者で健常人より顕著に増加しており、病気の重症度や活動性と相関することが明らかとなった。これらの結果から、ICOSのシグナル増強が、強皮症の特に発症早期の進行に関与している可能性が示唆された。また、血清中の可溶性ICOSは強皮症の病勢や重症度の指標となりうるものと思われた。

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)

[雑誌論文] (計1件)

①Tanaka C, Fujimoto M, Hamaguchi Y, Sato S, Takehara K, Hasegawa M. Inducible costimulator ligand (ICOSL) regulates bleomycin-induced Lung and skin fibrosis independently of the

ICOS-ICOSL pathway. Arthritis Rheum
62:1723-32, 2010, 査読有
DOI: 10.1002/art.27428

〔学会発表〕（計 1 件）

① Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Takehara K.
Augmented ICOS-ICOS ligand signaling axis in patients with early diffuse cutaneous systemic sclerosis. ACR/ARHP Scientific Meeting. 2011年11月8日, マコーミックプレイス(シカゴ、USA).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 稔 (MINORU HASEGAWA)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：50283130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし