

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 6月11日現在

機関番号：26401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591466

研究課題名（和文） 線維芽細胞の上皮-間葉移行および間葉-上皮移行に基づいた強皮症の新規治療法

研究課題名（英文） Novel therapeutic strategy for scleroderma based on fibroblastic epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition

研究代表者

池田 光徳（IKEDA MITSUNORI）

高知県立大学看護学部・教授

研究者番号：70212785

研究成果の概要（和文）：間葉系特異的 SIP1 ノックアウトマウスを作製した。このマウスの皮膚線維芽細胞の I 型および III 型コラーゲン mRNA の発現量は低下しており、MMP13 の mRNA 発現量は上昇していた。マウスの真皮および脂肪織は菲薄化しており、ブレオマイシンによる皮膚線維化の誘導が抑制された。SIP1 は、上皮-間葉移行では E-カドヘリンの発現を抑制するが、皮膚線維化ではコラーゲン合成を促進していた。強皮症に対する新たな治療法として SIP1 が標的分子になる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We generated mesodermal-specific SIP1 knockout mice. The expression of type I and type III collagen mRNA in the fibroblasts of the mice was suppressed, while MMP13 mRNA expression was up-regulated. The mice showed thinning of dermis and subcutaneous fatty tissue. The injected sites of bleomycin, a skin fibrosis inducer, showed attenuated fibrosis in the mice. Although SIP1 suppressed the expression of E-cadherin in the process of epithelial-mesenchymal transition, SIP1 promoted the collagen production in the process of skin fibrosis. We consider that SIP1 is one of the target molecules for the treatment of scleroderma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
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：皮膚炎症・再生学・膠原病

1. 研究開始当初の背景

がんなどの上皮性細胞は脱分化して遊走能の高い間葉細胞の表現型を獲得し、転移が可能になる。この現象を上皮-間葉移行（EMT）という。転移先では逆に遊走能の低い上皮細胞の表現型を獲得し、そこに住み着く。これ

を間葉-上皮移行（MET）という。線維芽細胞などの間葉系細胞に EMT が誘導されると、より間葉細胞の表現型を獲得して膠原線維増生が高まるのではないかと。逆に線維芽細胞に MET が誘導されると、上皮細胞の表現型を獲得して膠原線維増生は減少するのではない

か。強皮症は、線維芽細胞による膠原線維の過剰産生が起こる疾患である。そこで我々は、「線維芽細胞の EMT/MET を制御 (MET を誘導) することで膠原線維の産生を減少させて強皮症の治療を行えるのではないか」という仮説を立てた。E-cadherin は EMT の誘導に伴いその発現が抑制される。Smad-interacting protein 1 (SIP1) は E-cadherin のプロモーターに結合し転写を抑制する。このことから、SIP1 は E-cadherin の抑制を介する EMT の誘導に重要な転写因子と考えられる。

2. 研究の目的

線維芽細胞における膠原線維増生の分子生物学的機序を明らかにするために SIP1 に着目した。SIP1 は TGF- β シグナリングに関わる Smads に結合するタンパク質で、転写リプレッサーとして働くことが示された。TGF- β /Smads 経路が膠原線維合成に関係していることは既に知られているが、膠原線維合成経路における SIP1 の役割はわかっていない。そこで、ブレオマイシン皮下投与による実験的強皮症モデルにおいて線維芽細胞 (などの中胚葉系細胞) で SIP1 をノックアウトしたマウスと野生型マウス間で比較して、膠原線維の過剰産生系における SIP1 の役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) SIP1 ノックアウトマウスの作成

(中胚葉条件付き) SIP1 ノックアウトマウス (SIP1 cKO マウス) は、SIP1flox/flox マウスと Prx1-Cre マウスとを交配することによって、prx1 プロモーターが働く中胚葉系細胞で Cre を発現させるようにして作成した。SIP1 cKO マウスのフェノタイプは、全身の肉眼的に観察し、5 週齢の背部、腹部および肢の皮膚を採取してそれらの皮膚厚を組織学的にも計測することにより野生型マウスのものと比較した。

(2) 初代皮膚線維芽細胞の培養

初代皮膚線維芽細胞 (DFs) は、SIP1 cKO マウスまたは野生型マウスから採取した。線維芽細胞の培養は通常の方法で行った。

(3) SIP1 mRNA のノックダウン

In vitro で DFs での SIP1 遺伝子をノックダウンするために、SIP1 特異的 siRNA を用いた。DFs での SIP1、Col1a2、Col3a1、MMP13 mRNA の発現量は、定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) によって分析した。

(4) SIP1、コラーゲンおよびマトリックスメタロプロテイナーゼ mRNA の発現

転写レベルでの SIP1、Col1a2、Col3a1、MMP13 の発現量は、培養 SIP1 cKO マウス DFs から得た mRNA を用いて定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) によって分析した。

(5) 実験的強皮症モデル

生体内での膠原線維の過剰産生を誘発するために、ブレオマイシン (BLM) 50 μ g/100 μ l を 1 日おきに 4 週間にわたって SIP1 cKO マウスないし野生型マウスの皮下に注射した。注射部位の真皮の厚さは HE 染色組織標本から計測した。対象として両マウスに PBS (100 μ l) 皮下注射した部位を用いた。

4. 研究成果

(1) SIP1 ノックアウトマウスの肉眼的フェノタイプ

SIP1 cKO マウスは、野生型マウスと比較して著明な成長遅滞を示し、体毛 (および頭毛)、歯牙、頭蓋および皮膚の形成に異常を示した。とくに四肢近位部の皮膚は弛緩していた (図 1 矢印)。



図 1 SIP1 ノックアウトマウスの肉眼的フェノタイプ

(2) SIP1 ノックアウトマウスの組織学的フェノタイプ

SIP1 cKO マウスは、野生型マウス (WT) と比較して真皮および皮下脂肪組織の形成不全がみられた。胸部および肢の皮膚厚において野生型マウスとの間に有意差があった (図 2)。

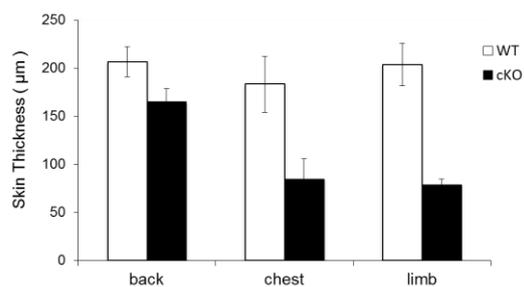


図 2 各部位の皮膚の厚さ

(3) 線維芽細胞における SIP1 のノックダウンの効果

In vitro で培養 DFs の SIP1 をノックダウン (KD) すると、Col1a2 と Col3a1 mRNA の発現が減少したが、MMP13 mRNA の発現は増加した (図 3)。Col1a2、Col3a1 および MMP13 mRNA のいずれの発現量も対照 siRNA をトランスフェクションした DFs との間に有意差を認めた。

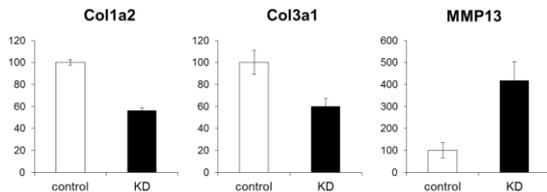


図3 正常線維芽細胞におけるSIP1のノックダウンの効果

(4) SIP1 ノックアウトマウスにおけるSIP1、コラーゲンおよびマトリックスメタロプロテナーゼ mRNA の発現

qRT-PCR 分析では、SIP cKO マウスからの DFs は SIP1 mRNA の発現がなかった。SIP cKO マウスの DFs では、Col1a2 および Col3a1 mRNA の発現が減少していたが、MMP13 mRNA の発現は逆に増加していた (図 4)。Col3a1 では有意差がみられなかったが、Col1a2 および MMP13 では有意差がみられた。これらの結果は、SIP1 ノックダウン DFs での結果と一致した。

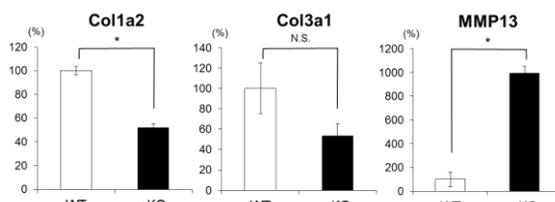


図4 SIP1 ノックアウトマウスにおけるSIP1、コラーゲンおよびマトリックスメタロプロテナーゼ mRNA の発現

(5) ブレオマイシン皮下注射に対する皮膚肥厚作用

BLM の皮下注射は、野生型マウス皮膚での膠原線維過剰増生を引き起こした (図 5)。一方、SIP cKO マウスは、BLM 処置に対して野生型マウスと比較してより小さい反応を示した。すなわち、PBS 皮下注射部位より真皮の肥厚がみられたが、BML 処置野生型マウスでの真皮肥厚に比べて著明に少ない肥厚であった。

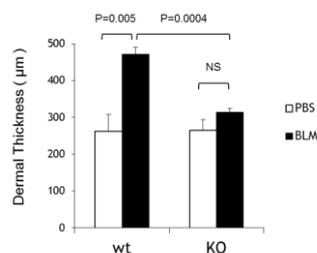


図5 ブレオマイシン皮下注射に対する皮膚肥厚作用

(6) 結果のまとめ

DFs におけるコラーゲン合成において、SIP1

は、線維化関連遺伝子を増強し、線維化抑制関連遺伝子を抑制することにより TGF- β シグナリングを促進する重要な分子であることが示された。SIP1 分子を有効に制御することで、真皮膠原線維増加疾患である硬皮症の新規治療が行えるものと考えられる。

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 14 件)

- ① 寺石美香、三好研、佐野栄紀、池田光徳、大畑雅典、クリオグロブリン血症性紫斑から濾胞性リンパ腫の診断に至った1例、西日本皮膚科、査読有、74 巻、2012、22-26
- ② 佐野栄紀、成人に対する生物学的製剤と免疫抑制薬リウマチ領域 生物学的製剤 乾癬、アレルギー・免疫、査読有、19 巻、2012、256-262
- ③ 寺石美香、青木奈津子、北川伸子、佐野栄紀、乳児線維性過誤腫の1例、臨床皮膚科、査読有、65 巻、2011、563-566
- ④ 志賀建夫、横川真紀、佐野栄紀、乾癬・掌蹠膿疱症 (case 12) 爪乾癬に対するターゲット型エキシマライト療法、Visual Dermatology、査読有、10 巻、2011、824-825
- ⑤ 佐野栄紀、乾癬の病態と治療 乾癬の病態、病態、日本皮膚科学会雑誌、査読有、121 巻、2011、2995-2996
- ⑥ Miyoshi K、Takaishi M、Nakajima K、Ikeda M、Kanda T、Tarutani M、Iiyama T、Asao N、DiGiovanni J、Sano S、Stat3 as a Therapeutic Target for the Treatment of Psoriasis: A Clinical Feasibility Study with STA-21, a Stat3 Inhibitor、Journal of Investigative Dermatology、査読有、Vol. 131、2011、105-117、DOI:10.1038/jid.2010.255.
- ⑦ Takahashi A、Nakajima K、Ikeda M、Sano S、Pre-treatment with misoprostol prevents food-dependent exercise-induced anaphylaxis (FDEIA)、International Journal of Dermatology、査読有、Vol. 50、2011、237-238、DOI: 10.1111/j.1365-4632.2010.04314.x
- ⑧ 志賀建夫、岸本英樹、青木奈津子、樽谷勝仁、佐野栄紀、体表リンパ流分布図に沿った広範囲に皮疹が分布した習慣性丹毒の1例、臨床皮膚科、査読有、65 巻、2011、67-71
- ⑨ 志賀建夫、畠山暢生、神経症状が先行し、蜂窩織炎様臨床像を呈した Churg-Strauss 症候群、皮膚科の臨床、査読有、53 巻、2011、200-203

- ⑩ 池田光徳、黄色腫と組織球症の診断と治療、日本皮膚科学会雑誌、査読有、120巻、2010、3000-3002
- ⑪ 高橋綾、中島喜美子、池田光徳、佐野栄紀、チアマゾール内服中の母親より出生した先天性皮膚欠損症の男児2例、日本皮膚科学会雑誌、査読有、120巻、2010、1881-1885
- ⑫ 志賀建夫、中島喜美子、佐野栄紀、小玉肇、全身に紫斑を生じたアナフィラクトイド紫斑、皮膚病診療、査読有、32巻、2010、33-36
- ⑬ 池田光徳、青木奈津子、山本真有子、佐野栄紀、松本茂、原発性皮膚 CD30 陽性リンパ増殖症に対する各種治療法の検討、高知女子大学紀要 看護学部編、査読有、58巻、2010、51-55
- ⑭ 池田光徳、膿疱を形成する薬疹：AGEP、DIHS、好中球性皮膚症などを含む、MB Derma、査読有、155巻、2009、19-25

〔学会発表〕(計18件)

- ① Sano S, Epicutaneous treatment with TLR7 agonist leads to lupus glomerulonephritis in wild-type mice, The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011. 12. 09、国立京都国際会館(京都府)
- ② Shiga T, Topical tacrolimus treatment does not facilitate UV-induced carcinogenesis in a mouse model, The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011. 12. 09、国立京都国際会館(京都府)
- ③ Sano S, Mouse Model for Psoriatic Arthritis, 22nd World Congress of Dermatology, 2011. 05. 24、COEX Convention and Exhibition Center (Seoul, Korea)
- ④ Teraishi M, Role of Smad-interacting protein 1 in collagen synthesis of dermal fibroblasts, Australasian Society for Dermatology Research annual scientific meeting, 2011. 05. 18、Perth Convention Exhibition Center (Perth, Australia)
- ⑤ Shiga T, Topical tacrolimus treatment does not facilitate UV-induced carcinogenesis in a mouse model, The 71th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2011. 05. 04、JW Marriott Desert Ridge Resort and Spa (Phoenix, U.S.A.)
- ⑥ Yokogawa M, Topical treatment with imiquimod suppressed UVB-induced skin carcinogenesis in a mouse model, 40th

- Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 2010. 09. 08 - 11, Scandic Marina Congress Center (Helsinki, Finland)
- ⑦ 志賀建夫、爪乾癬に対するターゲット型エキシマランプ(VTRAC™)の有用性、第25回日本乾癬学会学術大会、2010. 09. 04、宇部全日空ホテル(山口県)
- ⑧ 寺石美香、皮膚線維芽細胞のコラーゲン合成における Smad interacting protein 1 (SIP1)の働き、第17回分子皮膚科学フォーラム、2010. 07. 09、ホテルオークラ福岡(福岡県)
- ⑨ 志賀建夫、A Case of Anaphylactoid Purpura with Nephritis Possibly Associated with Tonsillitis, 第7回国際扁桃・粘膜免疫シンポジウム、2010. 07. 08、旭川グランドホテル(北海道)
- ⑩ Teraishi M, Role of Smad-interacting protein 1 (SIP1) in collagen synthesis of dermal fibroblasts, 2010 Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2010. 05. 05 - 08, Hilton Atlanta Hotel (Atlanta, U.S.A.)
- ⑪ 池田光徳、黄色腫と組織球症の診断と治療、第109回日本皮膚科学会総会・学術大会、2010. 04. 18、大阪国際会議場(大阪府)
- ⑫ 志賀建夫、サプリメントにより誘発された Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP)の1例、第109回日本皮膚科学会総会、2010. 04. 17、大阪国際会議場(大阪府)
- ⑬ Teraishi M, Role of Smad-interacting protein 1 (SIP1) in collagen synthesis of dermal fibroblasts, 第32回日本分子生物学会年会、2009. 12. 12、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑭ Teraishi M, Role of Smad-interacting protein 1 (SIP1) in collagen synthesis of dermal fibroblasts *in vitro* and *in vivo*, The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2009. 12. 04、福岡国際会議場(福岡県)
- ⑮ 池田光徳、原発性皮膚 CD30 陽性リンパ増殖症の1例、第25回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会、2009. 05. 09、高知新阪急ホテル(高知県)
- ⑯ 寺石美香、ケトプロフェン外用により皮疹が軽減した Dorfman-Chanarin 症候群、第108回日本皮膚科学会総会、2009. 04. 24、福岡国際会議場(福岡県)
- ⑰ 矢田部愛、エンブレル®が有用であったリウマトイド血管炎に伴う皮膚潰瘍、第

108 回日本皮膚科学会総会、2009. 04. 24、
福岡国際会議場（福岡県）

- ⑱ 喜多川千恵、治療に難渋した膿疱を伴う
皮膚アレルギー性血管炎の 1 例、第 108
回日本皮膚科学会総会、2009. 04. 24、福
岡国際会議場（福岡県）

〔図 書〕（計 5 件）

- ① 池田光徳、講談社、皮膚科診療カラーア
トラス大系（鈴木啓之、神崎保編）第 7
巻、2011、71
② 池田光徳、メディカルレビュー社、皮膚
で見つける全身疾患～頭のとっぺんか
らつま先まで～、2011、30
③ 池田光徳、医学書院、今日の診断指針（第
6 版）、2010、1573－1574
④ 池田光徳、診断と治療社、高齢者の皮膚
トラブル FAQ、2010、180－183
⑤ 池田光徳、文光堂、皮膚疾患診療実践ガ
イド第 2 版、2009、511－512

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_drmtl/rese
arch/](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_drmtl/research/)

[http://www.cc.u-kochi.ac.jp/era/kenkyu/i
keda-mi.pdf](http://www.cc.u-kochi.ac.jp/era/kenkyu/ikeda-mi.pdf)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 光徳（IKEDA MITSUNORI）
高知県立大学・看護学部・教授
研究者番号：70212785

(2) 研究分担者

寺石 美香（TERAISHI MIKA）
高知大学・医学部付属病院・医員
研究者番号：40437736
佐野栄紀（SANO SHIGETOSHI）
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：80273621
志賀建夫（SHIGA TAKEO）
高知大学・医学部付属病院・医員
研究者番号：70444768

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：