

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19473

研究課題名(和文)皮膚免疫を標的とした全身性強皮症に対する新規治療戦略

研究課題名(英文)A new therapeutic strategy against systemic sclerosis targeting skin immunity

研究代表者

浅野 善英 (ASANO, YOSHIHIDE)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60313029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：強皮症の臓器線維化は皮膚から始まること、皮膚は外界と接する免疫臓器であること、などの事実から、皮膚免疫が本症の多臓器線維化を制御している可能性を考え、本研究を立案した。強皮症病変部皮膚では真皮樹状細胞のRALDH1活性が低下してiTregの誘導が抑制されているが、本研究ではBLM誘発強皮症モデルマウスにおいて皮膚のRALDH1の発現を抑制すると皮膚・肺・食道の線維化が亢進することが明らかとなった。以上より、皮膚におけるRALDH1活性が強皮症の皮膚硬化を制御し、さらに肺と食道の線維化を制御している可能性が示唆された。現在、RALDH1の発現を誘導するmicroRNAの同定を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、アレルギー疾患においては皮膚免疫の重要性が示されており、アトピー性皮膚炎が喘息や花粉症、食物アレルギーの発症につながるアレルギーマーチという概念が確立されている。本研究結果は、全身性強皮症に代表される膠原病においても皮膚免疫が多臓器障害を制御している可能性を示唆している。申請者は既に全身性エリテマトーデスにおいて皮膚免疫がその発症に深く関わることを明らかにしているが、これらの研究成果は皮膚免疫が全身性免疫疾患の治療戦略の標的となり得ることを示唆している。皮膚は外用薬や貼付薬で容易にアクセス可能であり、新規治療薬開発の観点からも学術的・社会的意義の高い研究成果である。

研究成果の概要(英文)：The etiology of systemic sclerosis (SSc) still remains unknown, but we hypothesized that skin immunity may regulate multi-organ fibrosis based on the following facts: organ fibrosis begins in the skin and the skin is the largest immune organ of the human body in contact with the outside world. Our previous study suggested that RALDH1 activity of dermal DCs in SSc lesional skin is decreased and induction of iTregs is suppressed. The present study showed that suppression of RALDH1 expression in the skin of BLM-treated mice increased fibrosis not only in the skin but also in the lungs and esophagus. These results suggest that RALDH1 activity in the skin regulates skin stiffness in SSc and may also regulate pulmonary and esophageal fibrosis. We are currently working to identify microRNAs that induce RALDH1 expression.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：全身性強皮症 皮膚免疫 制御性T細胞 核酸医薬 臓器線維化

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(以下、強皮症)は皮膚・内臓諸臓器の血管障害と線維化を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。その原因はいまだ不明であり、確立された治療法はない。本邦の推定患者数は3万強、多臓器に高度な線維化を来す重症型の10年生存率は約60%と低く、その病態解明と治療開発は医学研究者に課された喫緊の課題の一つである。本症は皮膚硬化の範囲に基づき2病型に分類される。びまん皮膚硬化型(皮膚硬化が肘を越えて近位に及ぶ病型)では発症数年以内に皮膚硬化が進行し、並行して内臓諸臓器の線維化(間質性肺疾患など)も進行するが、限局皮膚硬化型(皮膚硬化が肘より遠位に限局する病型)では内臓諸臓器の線維化は軽症に留まる。このように強皮症では皮膚硬化と内臓諸臓器の線維化は強く相関する。重要な点として、強皮症では皮膚硬化が先行し、続いて内臓病変が進行する。つまり、皮膚免疫の異常が他臓器の線維化に関与している可能性が示唆される。

近年、皮膚免疫と他臓器免疫の関連について、アトピー疾患の臨床研究を軸に大幅にその病態理解が進んだ。アトピー性皮膚炎では皮膚バリア機構の破綻により皮膚において免疫細胞が活性化され、その免疫細胞が気道粘膜や腸管粘膜などのバリア臓器における免疫応答を修飾し、喘息や食物アレルギーの発症に関与すると考えられている。つまり、皮膚免疫は全身性免疫疾患の病態形成において非常に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

申請者は20年以上にわたり強皮症の基礎研究に従事してきたが、その研究過程で独自に開発した強皮症モデルマウス(*Klf5^{+/+};Flt1^{+/+}*マウス)には皮膚バリア機能の低下があること、強皮症患者においても皮膚バリア機能の低下があることを見出した(未発表データ)。以上の研究結果に基づき、皮膚バリア機能の異常が皮膚における免疫応答の質的異常の誘導、ひいては内臓諸臓器における免疫応答の異常に関与している可能性を考えるに至った。

一方、申請者は皮膚線維化における樹状細胞(DC)の役割についても研究してきた。野生型マウスの真皮では、bleomycin (BLM) 刺激によりCD103-CD11b-DCがRALDH1(レチノイン酸合成酵素の一つ)を高発現し、レチノイン酸の産生亢進を介してTregの誘導を促進し、皮膚線維化を抑制することを明らかにした(Miura S, Asano Y, et al. J Dermatol Sci 2020)。同研究の重要な知見として、RALDH1の発現は皮膚ではDCに特異性が高いため、*Raldh1* siRNAを皮膚に投与すると選択的にDCに作用させることができる、アテロコラーゲンは皮膚に選択的にsiRNAを投与できるため皮膚以外の臓器への作用を無視できる、の2点が挙げられる。つまり、アテロコラーゲンをを用いて*Raldh1* siRNAを皮膚に投与することにより、皮膚におけるTregの誘導を選択的に抑制したBLM誘発強皮症モデルマウスを作製できるため、皮膚におけるTregの誘導が皮膚以外の臓器の線維化に及ぼす影響を検討することが可能となる。なお、BLM誘発強皮症モデルは皮膚、肺、食道、唾液腺に線維化を誘導できるため、「皮膚免疫異常を基盤とした多臓器線維化メカニズム」を解析するうえで、非常に優れた動物モデルである。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では上記の「皮膚におけるTregの誘導を選択的に抑制したBLM誘発強皮症モデル」を活用して、皮膚におけるTregの誘導異常が皮膚以外の臓器線維化に及ぼす影響を検討する。さらに、RALDH1の発現を増強するmicroRNA(あるいはmicroRNA inhibitor)を同定し、microneedleによるdrug delivery systemを用いた創薬(核酸医薬)の基盤構築も目指す。つまり、本研究の目的は皮膚免疫が多臓器線維化に及ぼす影響の検討、真皮DCを標的とした核酸医薬開発の基盤構築、の2点である。

3. 研究の方法

本研究ではアテロコラーゲンをを用いて皮膚に*Raldh1* siRNAを投与し、そのうえでBLM誘発強皮症モデルを作製する。この方法で真皮におけるTregの誘導を抑制できる。肺由来DCを用いてRALDH1活性を調べることで、皮膚に投与する*Raldh1* siRNAが他臓器に作用しないことを確認する。*Raldh1* siRNA処理BLM誘発強皮症モデルマウスでは皮膚線維化が亢進するが、肺の線維化の程度について、HE染色、Masson-Trichrome染色、定量的PCR、hydroxyproline assayで検討する。皮膚におけるTreg誘導のみが抑制されるモデルなので、皮膚以外の臓器の線維化が亢進していれば、皮膚免疫が他臓器病変の形成に関与している可能性が示唆される。次に、皮膚所属リンパ節由来DCを用いて、RALDH1の発現制御に関連するmicroRNA(あるいはmicroRNA inhibitor)の同定を試みる。microRNAの検索にはデータベースを用いる。microRNA(あるいはmicroRNA inhibitor)が同定できたら、アテロコラーゲンをを用いてBLM誘発強皮症モデルマウスの皮膚にそれらを投与し、臓器線維化が抑制されるか否かを検討する。

4. 研究成果

(1). *Raldh1* siRNAの皮下投与がBLM誘発強皮症モデルの多臓器線維化に及ぼす影響

8週齢の野生型マウスに対してBLMを4週間投与し、BLM誘発強皮症モデルマウスを作製した。一部のマウスは、アテロコラーゲンをを用いてBLM投与部位に*Raldh1* siRNAあるいはscrambled non-silencing RNA (SCR)を2週間に1回、皮下投与した。4週時点において、皮膚およ

び肺の線維化の程度について検討した。皮膚については、*Raldh1* siRNA を投与することにより、SCR に比して真皮厚とコラーゲンの含量が有意に亢進した。皮膚における mRNA の発現量について検討したところ、*Raldh1* siRNA で処理したマウスでは SCR に比して *Il4* と *Il13* の mRNA の発現量が有意に亢進していたが、*Il17a*, *Il10*, *Ifng* の mRNA の発現量には変化はなかった。また、*Tgfb1* と *Acta2* の mRNA の発現量は亢進していたが、*Ctgf* の mRNA の発現量には変化はなかった。同じ条件下において皮膚を用いてフローサイトメーターで検討したところ、*Raldh1* siRNA で処理したマウスは SCR に比して $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞の割合が有意に低下していた。

次に、同じ条件下で肺線維化の程度について検討した。肺における *Raldh1* mRNA の発現量については、*Raldh1* siRNA を皮下に投与したマウスと SCR を皮下に投与したマウスで差はなかった。このことから、皮下投与した *Raldh1* siRNA の作用は皮膚に留まり他臓器には及んでいないと推測された。肺組織におけるコラーゲンの含量については、*Raldh1* siRNA で処理したマウスにおいて SCR 処理したマウスに比して増加傾向にあり ($P=0.052$) Ashcroft score についても同様の傾向であった ($P=0.082$)。肺組織における mRNA の発現量を検討したが、*Il13*, *Il17a* が上昇傾向にあり (いずれも $P=0.052$)、*Il10* は有意に低下していた ($P=0.017$)。一方、*Ifng*, *Il4*, *Il6* には変化はなかった。また、*Tgfb1* には変化はなかったが、*Ctgf* は有意に亢進し、*Acta2* は上昇傾向にあった ($P=0.082$)。

食道については病理組織学的な評価のみを行った。Lamina Propria の厚さを Masson Trichrome 染色で評価したが、*Raldh1* siRNA で処理したマウスにおいて、SCR で処理したマウスに比して有意に肥厚していた。

(2) . *Raldh1* mRNA の発現量を亢進させる microRNA の同定

Raldh1 mRNA の発現を制御する可能性のある microRNA をデータベース検索による 3 つ抽出し、培養マウス皮膚線維芽細胞に作用させることにより、*Raldh1* mRNA の発現が亢進することを確認した。

(3) . microRNA が BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚と肺の線維化に及ぼす影響の検討

3 種類の microRNA をアテロコラーゲンを用いて BLM 誘発強皮症モデルの皮下に投与し、皮膚の線維化の程度について検討した。今回用いた 3 つの microRNA では、コントロールに比して皮膚の線維化の程度に変化は見られなかった。microRNA によるオフターゲット効果により RALDH1 への効果が相殺されている可能性が考えられるため、現在別の microRNA を用いて検討を進めている。

以上の検討結果から、BLM 誘発強皮症モデルマウスでは、皮膚で誘導された iTreg が肺に移行し、肺線維化を制御している可能性が示唆される。今後は皮膚における RALDH1 活性の制御が強皮症の治療戦略となる可能性について、microRNA を用いてさらに検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miura Shunsuke, Watanabe Yusuke, Saigusa Ryosuke, Yamashita Takashi, Nakamura Kouki, Hirabayashi Megumi, Miyagawa Takuya, Yoshizaki Ayumi, Trojanowska Maria, Sato Shinichi, Asano Yoshihide	4. 巻 23
2. 論文標題 Fli1 deficiency suppresses RALDH1 activity of dermal dendritic cells and related induction of regulatory T cells: a possible role in scleroderma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-021-02520-z	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浅野善英
2. 発表標題 会頭特別企画1 Dermatropic/trophic 他科領域と繋がる皮膚科研究 皮膚と他臓器病変をつなぐ：全身性強皮症
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～2022年

1. 発表者名 Yoshihide Asano
2. 発表標題 What can we learn from Fli1-deficient mice, new animal models of systemic sclerosis?
3. 学会等名 1st International Society for Investigative Dermatology meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------