

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25年3月11日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591245

研究課題名（和文） 全身性強皮症モデルマウスの皮膚硬化に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果

研究課題名（英文） The effect of trichostatin A, one of the histone deacetylase inhibitor, on skin fibrosis of systemic sclerosis mouse model

研究代表者

小川 文秀 (OGAWA FUMIHIDE)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：10333519

研究成果の概要（和文）：

全身性強皮症は全身の皮膚硬化をきたす膠原病である。全身性強皮症のモデルマウスにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチンAを皮下注射し、皮膚硬化の改善を検討した。その結果、TSAを投与した群では、皮膚硬化が著明に改善されており、さらに皮膚硬化に関係が深いコラーゲンの産生も mRNA レベルで著明に抑制されていた。しかし、ブレオマイシンで誘発した皮膚硬化には TSA は効果を示さなかった。このことより皮膚硬化のメカニズムの違いにより効果に差がある可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Systemic sclerosis (SSc) is connective tissue disorder characterized by severe fibrosis of the skin and various internal organs. Tight skin (TSK/+) mouse is a putative murine model of SSc characterized by excessive collagen deposition in skin. Bleomycin-induced SSc model mouse, which is another model of SSc, is established using subcutaneous bleomycin treatment. TSA was injected subcutaneously into the back of the TSK/+, bleomycin-induced SSc model mice, and wild type mice. TSA significantly decreased the development of TSK mouse skin fibrosis by reducing the hypodermal thickness. Furthermore, skin mRNA expressions of type I collagen and fibrogenic cytokines were markedly attenuated by TSA administration. However, TSA could not decrease the skin sclerosis of bleomycin-induced SSc model. These results suggest that TSA decreases skin fibrosis only in TSK mouse by regulating expression of collagen and fibrogenic cytokines and does not affect systemic immune level. The effect of TSA for skin sclerosis may depend on the pathogenesis of sclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：皮膚科学

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、皮膚硬化、ヒストン脱アセチル化酵素、モデルマウス、トリコスタチンA

1. 研究開始当初の背景

SScは皮膚および内臓諸臓器の線維化を特徴とする膠原病であり、全身性免疫疾患に分類されている。重症型の10年生存率は約60%とされており、新規治療法の開発が急務である。SScの線維芽細胞はコラーゲンや他の細胞外マトリクスの産生が非常に高いという特徴を持つ。しかし、線維芽細胞の活性化のメカニズムは依然として不明なままである。

(1) SScでの線維化

SScでは80%以上の症例でレイノー症状を伴う。レイノー症状による虚血再灌流障害の結果生じる酸化ストレスなどの結果、血管内皮障害、リンパ球・単球の浸潤・活性化が起こり、これら炎症細胞の放出するサイトカインや細胞成長因子などが線維化を誘導していることが考えられている。線維化は細胞外マトリクスの過剰沈着が主体であり、I型コラーゲン、フィブロネクチン、グリコサミノグリカンなどが増加していると報告されている。このコラーゲン合成亢進は、転写レベルの異常、すなわちコラーゲン遺伝子転写亢進によることが示唆されている。そこで今回、遺伝子の転写を調節する因子について検討を行うこととした。

(2) ヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase; HDAC)とヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase inhibitor; HDAC inhibitor)

最近注目されているタンパク質の翻訳後修飾としてアセチル化・脱アセチル化があげられる。染色体DNAはクロマチンとよばれる高次構造を呈しており、クロマチンはヒストンオクタマーに、DNAが巻き付いた構造をとっている。近年、転写誘導に際してヒストン修飾によるクロマチンの構造変化が重要な役割を果たすことが知られてきている。転写の促進に関しては、転写コアクチベータのヒストンアセチル化酵素(histone acetylase transferase; HAT)活性により周囲のヒストンがアセチル化され、これを誘因としクロマチンのリモデリングが起こり転写因子とRNAポリメラーゼによる転写が開始される。一方、転写の抑制としては脱アセチル化を触媒するHDACがある。細胞の内部では通常、クロマチンは脱アセチル化状態に保たれており、転写の促進が必要な時にのみアセチル化されると考えられている。この転写を調節するHDACに対する阻害剤がHDAC inhibitorであり、その代表的なものがトリコスタチンA(trichostatin A; TSA)である。TSAは細胞周期停止作用や細胞分化、そして細胞のアポトーシスを増強する作用がある。そのため、近年、抗がん作用をもつ薬物として研究が行われている。さらに興味深いことにTSAは抗炎症作用、抗線維化作

用を持つと考えられており、肝線維症や放射線照射による皮膚の線維化防止に対しての効果が期待されている薬物である。

(3) SSc患者血清中のHDACに対する自己抗体

我々は、SSc患者血清中のHDAC-3に対する自己抗体を測定した。SScの自己免疫によって、HDAC-3への自己抗体がSScでは産生されるという仮説を立て実験を行ったが、予想に反して、SSc患者血清中のIgG型およびIgM型HDAC-3抗体の値は健常群、全身性エリテマトーデス患者、皮膚筋炎患者と比較して有意に低いことが明らかとなった。さらに、HDAC-3活性について検討したところ、対照群から抽出したIgGではHDAC-3活性は抑制できたが、SSc患者血清から分離したIgGではその活性は抑制できなかった。これらの結果から、SSc患者ではその免疫異常により健常人では正常に産生されるHDACに対する自己抗体産生が行われず、それが、病態に関与している可能性が考えられた。すなわち、健常群では抗HDAC-3抗体産生が認められたことから、血清中の抗HDAC-3抗体は病態を抑制するprotectiveな働きを持つ自己抗体である可能性を考えた。HDACに対する自己抗体が低いSScではHDACの活性が亢進しており、その結果、遺伝子転写を抑制するヒストンアセチル化とヒストン脱アセチル化に異常をきたし、それがSScの線維化を引き起こしている可能性が考えられる。

(4) HDACと制御性T細胞(regulatory T cell; Treg)

SScではTregに対する機能的異常が存在する可能性が近年報告されている。また、マウスにTSAを投与するとTregの割合と絶対数が1.5倍に増加することが報告されている。さらに、TSAの投与により、リンパ組織におけるTregの割合が増加し、炎症性腸炎モデルでは症状が軽快することも併せて報告されており、Tregを介したHDACによる免疫性疾患の治療の可能性が示唆されている。また、SScの線維化に深く関与しているTGF- β やIL-6の刺激はTregに特異的に発現しているFoxP3のアセチル化に影響を与え、クロマチン結合に関与することも報告されている。以上のことから、今回、TSK/+マウスで検討するHDAC inhibitor(TSA)はHDAC活性を直接的に抑制、あるいはTregを介して抑制することにより線維芽細胞からのコラーゲンの産生を抑え、病態を改善させる可能性があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

SScにおいて皮膚の線維化がHDAC inhibitorで抑制できるかどうかをSScのモデルマウスであるTSK/+マウスを用いて検

討を行い、SScの線維化のメカニズムを明らかにすることである。また、前述したようにSSc患者血清中ではHDACに対する自己抗体が低下しているため、線維芽細胞における転写異常により線維化を引き起こしている可能性が考えられる。SScのモデルマウスであるTSK/+マウスにTSAを投与することにより、皮膚硬化の改善を確認し、線維化に関するコラーゲンや細胞外マトリクスの産生や各種サイトカイン、接着分子などの発現を検討し、SScの線維化のメカニズムを明らかにし、SScに対する新規治療の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 皮膚硬化の評価方法

① TSAの投与

3~4週齢のマウスの背部に、0.5 µg/g/dayのDMSOに溶解したTSAを週5日、4週間皮下注射する。対照としてC57BL/6マウスにも同様のスケジュールで皮下注射を行う。試薬の対照として、DMSOのみをTSK/+マウス、C57BL/6マウスに同様のスケジュールで皮下注射する。

② 組織学的評価

ジエチルエーテルにて安楽死処置を行った後、呼吸停止、心停止を確認する。マウスの背部を剃毛し、70%アルコールで消毒する。頸部から上背部にかけての皮膚を下床の筋肉・骨も含めて一括として横断する。皮膚組織は4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン包埋する。6µmの厚さのセクションを作り、ヘマトキシリン&エオジン染色を行う。TSK/+マウスの皮膚硬化・肥厚は真皮の線維化によるものではなく、皮下の粗な結合組織層の肥厚による。従って皮膚の厚さは、この皮下結合組織の厚さを測定することによって評価する。一つのセクションに対して10カ所を無作為に選んで、その厚さを測定する。すべてのセクションにおいて、3人の研究者が独立して皮下結合組織層の厚さをマウスや試薬投与に関する情報を伏せた状態で測定し、最終的に平均値を算出する。さらに、膠原線維のマーカであるハイドロキシプロリン量を測定し、皮膚硬化の程度を定量化する。

③ 血清学的・免疫学的評価

TSAは遺伝子の転写に影響を与える可能性があり、全身的な影響を検討するために、線維芽細胞からの膠原線維の産生に影響を与えるサイトカインであるIL-4、IL-6、IL-13等安楽死処置前に採取していた血清をELISAキット(R&D社)を用いて測定する。TSK/+マウスで発現が高いトポイソメラーゼI抗体の発現をMESACUP-2テストSc1-70キット(MBL社)をモディファイして測定する。具体的には、このキットはヒト抗体測定用のため、二次抗

体がマウスIgGを認識するようにHRP-conjugated anti-mouse IgG抗体(Southern Biotechnology社)とキットにあらかじめ含まれている二次抗体を置換して測定を行う。さらに、同時に分離回収したリンパ球を用いて、Tregの割合を検討する。具体的には、TregはFACSを用いて、抗CD4抗体、抗CD25抗体(BD Pharmingen社)、抗FoxP3抗体(eBioscience社)を用いて同定する。CD4+CD25+FoxP3+のT細胞をTregとしてカウントする。ただし、Foxp3の同定には細胞膜の透過処理が必要なため、問題がある場合には、CD127-を代替マーカーとしてTregの同定を行う。

④ 線維芽細胞の培養・ストック 6週齢のTSK/+マウスおよびC57BL/6マウスをエーテルで麻酔後、マウスの背部を剃毛し、70%アルコールで消毒する。背部の皮膚を眼科用クーパーにて1cm x 1cm大の大きさに切除する。イソジン液にて30秒消毒後、PBSにて洗浄する。シャーレ上で皮下脂肪を除去。11番メスをもちいて皮膚を1mm角に細切する。細切した皮膚片は真皮側が下になるように培養用シャーレに置き、15分間静置する。静置後、10%組織培養用ウシ胎児血清加Dulbecco's Modified Eagle Medium (10%FBS加DMEM培地)にて、37°C、5% CO₂の条件下で培養を開始する。7~10日ほど静置しておく、皮膚片の周囲から線維芽細胞が増殖してくるため、0.05%トリプシンEDTA溶液(WAKO社)で線維芽細胞を剥がし、次に75cm²フラスコへと継代する。さらに細胞がコンフルエントになった時点で、継代を行い、翌年の実験のため細胞のストックを行う。細胞はcryogenic tube内にセルバンカー(十慈フィールド社)を用いて懸濁し、実験まで液体窒素タンク中に保管・保存を行う。

(2) マウス皮膚からのリアルタイムPCR法による細胞外マトリクス、細胞成長因子のmRNAの解析

TSA投与後一ヶ月におけるマウス皮膚でのサイトカイン、細胞成長因子のmRNA発現をリアルタイムPCR法にて定量的に解析する。検討項目として、①線維芽細胞から産生される細胞外マトリクスであるコラーゲンなど、②線維芽細胞から膠原線維の産生を増強するIL-4、IL-6、IL-13などを測定する。細胞成長因子としてbasic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β 、connective tissue growth factorなどについて測定する。具体的には、まず、全RNAを凍結組織皮膚よりQIAGEN RNeasy spin column(QIAGEN社)を用いて単離する。RNAはその後cDNAにReverse Transcription System(Promega社)にて逆転写する。プライマーとプローブはPre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents

(Applied Biosystems) にてデザインする。リアルタイム PCR は以下の条件で ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて行う; 50°C、2 分間を 1 サイクル、95°C、10 分間を 1 サイクル、92°C、15 秒間を 40 サイクル。mRNA の標準化は Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて行う。GAPDH での PCR 産物と比較して、ターゲットとなる転写産物の相対発現量を $\Delta\Delta CT$ method にて算出する。つまり、fold induction は $2^{-[\Delta\Delta CT]}$ と定義され、ここで Ct は threshold cycle、つまりサンプルの比較蛍光がバックグラウンド蛍光をこえるサイクル数をさす。 $\Delta\Delta CT = [\text{ターゲットとなる遺伝子の Ct (発現量不明のサンプル)} - \text{GAPDH の Ct (発現量不明のサンプル)}] - [\text{ターゲットとなる遺伝子の Ct (キャリブレーションのサンプル)} - \text{GAPDH の Ct (キャリブレーションのサンプル)}]$ 。TSA 非投与群ないしは野生型マウスにおけるサイトカインの mRNA 発現量をキャリブレーションとして使用する。それぞれのサンプルは triplicate で行い、平均の Ct を解析に使用する。

(3) 培養線維芽細胞での細胞外マトリクス、細胞成長因子の mRNA の定量的解析

TSK/+, C57BL/6 マウスから採取した線維芽細胞を 10%FBS 加 DMEM 培地で培養する。70% コンフルエントになった時点で実験に用いる。予め至適濃度を設定しておいた TSA を FBS 無添加 DMEM 培地へ加え、培養線維芽細胞に刺激を与える。刺激後、0、4、6、12、24 時間後に細胞を回収し、細胞から全 RNA を QIAGEN RNeasy spin column を用いて回収する。RNA 量を定量後、前述の如く、リアルタイム PCR を行い、膠原線維産生に関わる IL-4、IL-6、IL-13 さらに細胞成長因子の basic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β , connective tissue growth factor などについて検討を行い、TSA のこれら因子についての関与を解析する。同時に、各群の線維芽細胞における HDAC 活性を測定する (BioVisionsya 社)。

(4) 統計解析

統計解析については、2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を用い、多群間の検定には Bonferroni's test を用いる。

4. 研究成果

全身性強皮症のモデルであるタイトスキーンマウス (TSK/+) にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A を皮下注射にて投与したところ、投与群が有意に皮膚硬化の抑制を認めることができた。TSA 群と非投与群マウスの皮膚を回収し、線維芽細胞から産生される細胞外マトリクスであるコラーゲン、線維化に関与するサイトカインである IL-4、IL-6、IL-13 などの mRNA 測定をお

こなった。さらに細胞成長因子として fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor- β (TGF- β) などの mRNA 測定をおこなった。その結果、コラーゲン mRNA は TSK/+マウスで TSA 投与前は wild type mouse と比較して有意に高値を示していたが、TSA 投与後は有意に低下していた。また、FGF も TSK/+マウスでは TSA 投与前はコントロールと比較して非常に高い値を示していたが、投与後は低下し、コントロールとの有意差はなくなった。他のサイトカインや成長因子である TGF- β , IL-4, IL-6 も TSA 投与前は TSK/+マウスで有意に高値を示していたが、投与後は低下し、コントロールとの差はなくなった。さらに、TSA 投与前後でのマウス血清を用いて、抗トポイソメラーゼ I 抗体、IL-4、IL-6 の比較を行った。その結果、TSA 投与前後でのこれら抗体、サイトカインの発現量に変化は認められなかった。以上のことより、TSA が皮膚硬化に与える影響は全身的なものではなく、局所における反応であると考えられたため、TSK/+マウス、コントロールマウスより皮膚線維芽細胞を培養し、TSA 刺激の有無により、コラーゲン mRNA、各種サイトカイン、成長因子 mRNA の発現を比較した。TSA 刺激前は、TSK/+マウス由来線維芽細胞はコラーゲン mRNA、IL-6 mRNA が有意に高値を示していたが、TSA 添加によりその発現は低下し、有意差は消失した。以上の結果より、TSA は皮膚線維芽細胞に作用し、TSK/+マウスの皮膚硬化を抑制していることが推察された。また、ブレオマイシンをマウスに局注して作成した、全身性強皮症モデルマウスにたいしてもトリコスタチンを皮下注射にて投与し、線維化の抑制効果を検討した。予想に反して、ブレオマイシン局注モデルに関してはトリコスタチンは効力を発揮しなかった。以上の結果より、トリコスタチン A の皮膚線維化抑制は、線維化のメカニズムにより異なる可能性が考えられた。今後はそれぞれの線維化メカニズムを詳細に検討していく必要がある。

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 6 件)

1. Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Kaji K, Asano Y, Ogawa F, Yamaoka T, Fujikawa K, Tsukada T, Sato K, Echigo T, Hasegawa M, Takehara K Autoantibodies to small ubiquitin-like modifier activating enzymes in Japanese patients with dermatomyositis: comparison with a UK Caucasian cohort. Ann Rheum Dis 72(1): 151-153, 2013. 査読有り

2. Shimizu K, Ogawa F, Hara T, Yoshizaki A, Muroi E, Akiyama Y, Yanaba K, Yamaoka T, Sato S Exogenous application of hydrogen sulfide donor attenuates inflammatory reactions through L-selectin involved pathway in the cutaneous reverse passive Arthus reaction. J Leukoc Biol: accepted, 2013. 査読有り
3. Fujimoto M, Hamaguchi Y, Kaji K, Matsushita T, Ichimura Y, Kodera M, Ishiguro N, Ueda-Hayakawa I, Asano Y, Ogawa F, Fujikawa K, Miyagi T, Mabuchi E, Hirose K, Akimoto N, Hata N, Tsutsui K, Higashi A, Igarashi A, Seishima M, Hasegawa M, Takehara K Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcription intermediary factor 1 family proteins. Arthritis Rheum 64(2): 513-522, 2012. 査読有り
4. Tomita H, Ogawa F, Yoshizaki A, Akiyama Y, Kinoshita N, Utani A Periorbital milia-like calcinosis. Clin Exp Dermatol 37(7): 787-788, 2012. 査読有り
5. Shimizu K, Ogawa F, Yoshizaki A, Akiyama Y, Kuwatsuka Y, Okazaki S, Tomita H, Takenaka M, Sato S Increased serum levels of soluble CD163 in patients with scleroderma. Clin Rheumatol 31(7): 1059-1064, 2012. 査読有り
6. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, Inoue K, Ishikawa O, Kawaguchi Y, Kuwana M, Muro Y, Ogawa F, Sasaki T, Takahashi H, Tanaka S, Takehara K, Sato S Investigation of prognostic factors for skin sclerosis and lung function in Japanese patients with early systemic sclerosis: a multicentre prospective observational study. Rheumatology (Oxford) 51(1): 129-133, 2012. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

1. Ogawa F, Tomita H, Kuwatsuka Y, Shimizu K, Sato S, Utani A: The effect of trichostatin a, one of the histone deacetylase inhibitor, on skin fibrosis mouse. 2011 ACR 75th/ARHP 46th Annual Scientific Meeting, 2011/11/4-2011/11/9 Chicago, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 文秀 (OGAWA FUMIHIDE)
長崎大学・大学病院・講師
研究者番号: 10333519

(2) 研究分担者

清水 和宏 (SHIMIZU KAZUHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号: 80170968

佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 20215792
(H22-23 のみ)