

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791288

研究課題名(和文) 膠原病の難治性皮疹に対するヒドロキシクロロキンの作用機序の解明

研究課題名(英文) the elucidation of the mechanisms of hydroxychloroquine for skin lesions in connective tissue diseases

研究代表者

池田 高治 (Ikeda, Takaharu)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20422933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドロキシクロロキン(HCQ)の日本人での効果は不明であった。全身性エリテマトーデス(SLE)、皮膚エリテマトーデス(CLE)への本邦でのpilot studyを施行し、4施設の同様な研究を共同でまとめ、論文発表した。HCQの動物実験の報告はほぼない。LEモデルマウス・MRL/lprマウスのLE様皮疹のHCQ投与での改善効果・出現抑制効果について検討し、IID2013で発表した。Bleomycin誘導皮膚硬化モデルマウスのHCQ投与での硬化改善効果についての研究を立案した。まず本マウスの線維化にかかわる機序を、紫外線照射による改善有無の研究として検討し、ICCLE2013で発表した。

研究成果の概要(英文)：1. Hydroxychloroquine (HCQ) is not an approved drug in Japan. We conducted the pilot study that Japanese refractory CLE cases who were administrated HCQ were evaluated about the degree of the improvement of the skin lesions. More, 27 patients who were administrated HCQ at 4 hospitals were also evaluated in cooperation. We reported the results in medical journals. 2. There are almost no articles about the experiments on animals which were treated with HCQ. We administrated HCQ to MRL/lpr mice, model mice for SLE with LE-like skin lesions, and examined its effects on LE-like lesions. We reported the results in IID 2013. 3. We planned the study that BLM-induced sclerotic skin mice were administrated HCQ. Before the start of this study, for the investigation of the mechanisms of the skin sclerosis in this model mice skin, we examined the effects of UVA1 irradiation for sclerotic skin using this model mice. We reports the results in ICCLE 2013.

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：ヒドロキシクロロキン ループスエリテマトーデス 全身性強皮症

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) および皮膚エリテマトーデス (CLE) は原因不明の自己免疫疾患である。これらによる不可逆的な皮膚病変は、患者の Quality of Life を著しく低下させる。

SLE の皮膚症状や CLE には、従来副腎皮質ステロイド剤 (ステロイド) 外用剤が一般的に使用されるが治療困難な場合も多い。難治性である場合、ステロイドや免疫抑制剤を内服せざるを得ない症例も多いが、それらの投薬の場合、易感染性・消化管障害・代謝異常・骨粗鬆症・精神症状など全身的で深刻な副作用の出現が懸念される。

HCQ は、海外では関節リウマチや SLE の関節・皮膚症状、CLE の標準的治療法として長年使用され、海外の SLE 治療ガイドラインにも、臓器障害のない SLE の皮膚症状に対する治療薬として記載されている。しかし、本邦では HCQ は未承認薬であり使用されていない。

また HCQ は古くから使用されているため、in vivo の動物実験での明確な作用機序の解明はなされていない。

2. 研究の目的

(1) 本邦の治療抵抗性の CLE や SLE の皮膚病変を有する症例に HCQ を投与し、日本人でも HCQ 使用が有効であることを、臨床的に pilot study として証明する。

(2) LE モデルマウス・MRL/lpr マウスに HCQ を投与し、LE 皮膚症状に対する HCQ の作用機序を検討する。

(3) Bleomycin (BLM) 誘導皮膚硬化モデルマウスに HCQ を投与し、硬化皮膚に対する HCQ の効果の有無を検討する。そのため、本モデルマウスの線維化機序を解明する必要があり、紫外線照射による改善の有無の結果から検討する。本モデルマウスの硬化皮膚では、浸潤細胞の Fas/FasL mediated apoptosis が生じ、皮膚肥満細胞数とともに皮膚硬化の進行と相関する。一方 UVA1 療法は、強皮症など皮膚硬化病変や乾癬の治療に使用され、乾癬では pathogenic な皮膚浸潤細胞の apoptosis 誘導、MRL/lpr マウスでは皮膚肥満細胞の apoptosis 誘導により皮膚病変が改善するとされる。UVA1 を照射し改善した硬化皮膚を用いて、本モデルマウスの線維化の機序を検討する。

3. 研究の方法

(1) 治療抵抗性の CLE 症例や、内臓病変の活動性または増悪がない SLE で難治性皮膚病変を有する症例で、インフォームドコンセントを得られ、HCQ 投与に支障のある除外基準を満たさない 7 例に対し、理想体重により HCQ を 1 日 200-400mg、16 週間投与した。経過中、CLASI score により、皮膚症状の活動病変と

慢性病変の変動を評価した。また、疾患活動性を示しうる補体や自己抗体なども継時的に測定した。

同時期に同様の条件下で行った本邦 4 施設の症例 27 例を集積し、CLASI 活動性指数の変動を評価した。

(2) 3 か月齢雌 MRL/lpr マウスを、HCQ4mg/kg/day 混合水、HCQ40mg/kg/day 混合水、無混合水投与の 3 群に分類し、4 か月投与した。投与終了後、背部皮膚・腎を採取し、ホルマリン固定・パラフィン包埋し、皮膚は HE 染色・トルイジンブルー染色、腎は HE 染色・PAS 染色に供した。

各群の投与終了時の死亡率、背部皮膚の LE 様病変の出現頻度、皮膚浸潤肥満細胞数、尿蛋白量、RT-PCR にて採取皮膚の IL-2 mRNA 量を検索した。

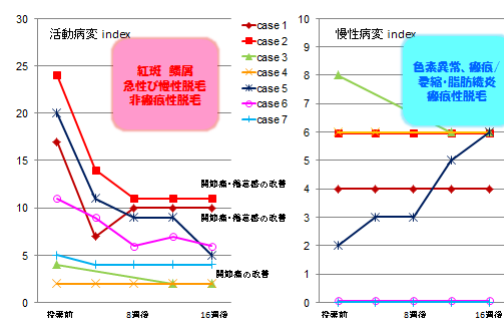
(3) 6 週齢雌 Balb/c マウスの背側に、BLM10µg/PBS100µl 皮下注射を 4 週間連日投与し、BLM 誘導皮膚硬化モデルマウスを作成した。マウスを、硬化皮膚に週 5 日間 UVA1 照射 2 週間 1 回 10J/cm²、40J/cm²、無照射、を各群 4-6 匹で 3 群に分類した。照射終了翌日に硬化皮膚を採取し、ホルマリン固定・パラフィン包埋し、HE 染色・TUNEL 染色・トルイジンブルー染色・免疫組織化学的染色に供した。

皮膚真皮厚、皮膚浸潤細胞の apoptosis 数・肥満細胞数、TGF-β/Smad signaling について検討した。

4. 研究成果

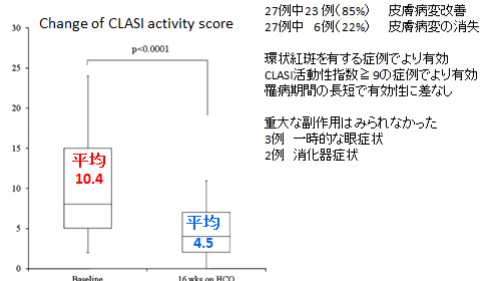
(1) 7 例中 4 例で皮膚症状の活動病変に改善を認めた。関節症状を有した 3 例中 3 例で関節症状の軽減を認めた。Study 終了後投与を中止した 3 例中 3 例で皮膚症状・倦怠感の再燃を認めた。自己抗体・補体価などの変動を認めなかった。投薬中断を必要とする重大な副作用はみられなかった。

結果 Index の変動



本邦 4 施設の症例集積では、27 例中 23 例で皮膚病変の改善を認め、うち 6 例では皮膚症状の消失をみた。重大な副作用はみられなかった。27 例の CLASI 活動性指数は、HCQ 投与により有意な低下が確認された。

結果



これにより、本邦においても HCQ の効果が十分期待できると判断した。

(2)無混合水投与群の LE 病変出現率 6 匹/13 匹に対し、HCQ4mg/kg/day 混合水投与群 3 匹/11 匹、HCQ40mg/kg/day 混合水投与群 1 匹/10 匹で有意に低下した。

Mice	—	Only Macroscopic Skin lesions or pathological change +	Macroscopic Skin lesions and pathological change ++	Total
water	7	1	5	13
HCQ 4mg	8	1	2	11
HCQ 40mg	9	1	0	10#

無混合水投与群の死亡率 4 匹/17 匹に対し、HCQ 混合水投与群 2 匹/23 匹であり、

Mice	Total number	Number of dead mice
Water	17	4(24%)
HCQ	23	2(9%)
HCQ(4mg)	12	1(8%)
HCQ(40mg)	11	1(9%)

浸潤肥満細胞数、尿蛋白量、IL-2 mRNA 量とともに有意差は認められなかった。

これにより、LE モデルマウスでの HCQ の皮膚病変出現抑制効果が確認された。

(3)モデルマウスの硬化皮膚の真皮厚は、UVA1 照射により有意に薄化した。真皮内 TUNEL 陽性細胞密度・肥満細胞密度は、UVA1 照射により有意に減少した。真皮内細胞中の TGF 陽性細胞の割合に有意な変動はみられなかったが、Smad7 陽性細胞密度・TGF R 陽性細胞密度は、UVA1 照射により有意に減少した。

本モデルマウスの硬化皮膚では、TGF R 陽性細胞が増加していることが報告されており、UVA1 による皮膚硬化改善効果は、受容体発現低下による TGF signaling 抑制による可能性が示された。本モデルマウスの硬化皮膚では、TGF signaling に抑制的な Smad7 発現が上昇し、TGF R の安定性が向上していると報告されており、UVA1 照射により TGF /Smad signaling 異常が改善された可能性が示された。

これにより、本モデルマウスに HCQ を投与した場合、TGF /Smad signaling の変動が起こるかを観察する必要があると判断された。

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4件)

1. Ishiguro M, Hashizume H, Ikeda T, Yamamoto Y, Furukawa F: Evaluation of the Quality of Life in Lupus Erythematosus Patients with Cutaneous Lesions in Japan, *Lupus* 2014;23(1):93-101. 査読有
DOI: 10.1177/0961203313509293.

2. Yokogawa N, Tanikawa A, Amagai M, Kato Y, Momose Y, Arai S, Eto H, Ikeda T, Furukawa F : Response to Hydroxychloroquine in Japanese patients with Lupus-Related Skin Disease Using the Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index (CLASI), *Mod Rheumatol* 23:318-322, 2013 査読有
DOI: 10.1007/s10165-012-0656-3.

3. 池田高治 古川福実: ヒドロキシクロロキンによる膠原病皮膚病変の治療、*臨床皮膚科* 67 : 165-167 , 2013 査読無

4. Ikeda T, Kanazawa N, Furukawa F: Hydroxychloroquine administration for Japanese lupus erythematosus in Wakayama: A pilot study. *J Dermatol* 39: 531-535、2012 査読有
DOI: 10.1111/j.1346-8138.2011.01448.x.

[学会発表](計8件)

1. Shimomatsu T, Hong-jin Li, Ikeda T, Kanazawa N, Furukawa F: The effect of hydroxychloroquine on the lupus erythematosus-like skin lesion in MRL/lpr mice, *International Investigative Dermatology* 2013, May 8-11, 2013, Edinburgh, Scotland

2. Shimomatsu T, Hong-jin Li, Ikeda T, Kanazawa N, Furukawa F: Hydroxychloroquine reduces the lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice, *3rd International Conference on Cutaneous Lupus Erythematosus*, May 6-8, 2013, Edinburgh, Scotland

3. Ikeda T, Kanazawa N, Furukawa F: The possible mechanisms of ultraviolet A1 irradiation in the improvement of bleomycin-induced scleroderma, *3rd International Conference on Cutaneous Lupus Erythematosus*, May 6-8, 2013, Edinburgh, Scotland

4. 下松達哉, 池田高治, 李 洪錦, 金澤伸雄, 古川福実: ループスエリテマトーデス様皮膚疹

を呈する MRL/lpr マウスに対するヒドロキシクロロキンの効果、第 112 回日本皮膚科学会総会、2013.6.14-16、 横浜

5. 池田高治:ループスエリテマトーデスへのヒドロキシクロロキンの投与効果 . 第 63 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2012.10.13-14、大阪

6. 池田高治、古川福実:紫外線照射による皮膚硬化モデルマウスの硬化皮膚改善の機序について、第 40 回日本臨床免疫学会総会、2012.9.27-29、東京

7. 池田高治、古川福実:ループスエリテマトーデスの皮膚病変に対するヒドロキシクロロキンの使用経験、第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2011.7.17-20、神戸

8. 池田高治、金澤伸雄、古川福実:ループスエリテマトーデスの皮膚病変に対するヒドロキシクロロキンの臨床使用経験、第 110 回日本皮膚科学会総会、2011.4.15-17、横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

池田 高治 (IKEDA TAKAHARU)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20422933