

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860955

研究課題名(和文)全身性強皮症における免疫抑制療法の作用機序の検討

研究課題名(英文)The mechanism of immunosuppressive treatment in systemic sclerosis.

## 研究代表者

牧野 貴充(Makino, Takamitsu)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：20433039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症患者の病変部皮膚組織より抽出したタンパク質でELISA Arrayの実験を行い、免疫抑制療法前後で比較し、治療前に高発現し、治療後に低下しているCD70、IL-16に注目した。皮膚組織を用いた免疫染色ではCD70-CD27、IL-16は高発現しており、重症例により高発現していた。さらに血清中でも同様に重症例において、sCD27、IL-16が高発現していることが明らかとなった。以上の結果より、免疫抑制療法が有効であった症例についてはIL-16の高発現やCD70-CD27シグナリングを介した、Tリンパ球の活性化が全身性強皮症の病態形成に重要な役割を担っていると示唆された。

研究成果の概要(英文)：At first, we examined the levels of proteins which extracted from skin sample of patients with systemic sclerosis (SSc) by the ELISA Array analysis. We focused on CD70 and IL-16 that were highly expressed before treatment and down-regulated after immunosuppressive therapy. Next, we performed immunohistochemistry of involved skin specimen. CD70-CD27 and IL-16 were overexpressed in the skin of SSc patients. Furthermore, soluble CD27 and IL-16 were also highly expressed in the sera of SSc patients by the sandwich ELISA. In conclusion, CD70-CD27 signaling and IL-16 are upregulated in SSc patients, and the activated T lymphocytes might play an important role in the pathogenesis of SSc.

研究分野：皮膚

キーワード：全身性強皮症 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(SSc)は皮膚および、肺、心臓、腎臓などの諸臓器に線維化を生じ、患者のQOLを大幅に低下させ、時に生命を脅かす難治性疾患である。

膠原病の1種に分類されており、病因として自己免疫異常や、細胞外マトリックス代謝異常、血管障害、サイトカイン異常、遺伝的背景が見いだされており、それぞれに関連して複雑なネットワークを形成して多彩な病像が形成されると考えられているが、依然として詳細は不明で、根治治療は存在しない。

また、皮膚硬化の範囲が広く、内臓病変を合併しやすい diffuse cutaneous SSc と皮膚硬化の範囲が四肢末端に限局し、内臓病変の比較的少ない limited cutaneous SSc の大きく2型に分類される。また皮膚硬化の程度や内臓病変の重症度は個人差があり症状の幅が大きいことが特徴である。以上のことはSScは多病因に起因した複数の集団から形成される疾患である可能性が示唆される。

皮膚硬化や間質性肺病変に対しては、中等量のステロイド内服療法は一般的に施行されているが、治療抵抗性の症例もしばしば経験する。難治性の症例ではシクロホスファミドの内服や大量静注療法、またシクロホスファミドをより大量に用いた末梢血幹細胞移植の有効性が報告されている。また、メソトレキサートやシクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノレートモフェチル、プレディニンなど、他の免疫抑制剤の有効性も少数ながら報告されている。しかしながら、それらの免疫抑制療法の作用機序は、依然不明のままである。

## 2. 研究の目的

我々は難治性の皮膚硬化および間質性肺病変に対し、シクロホスファミドやその他の免疫抑制剤による治療を行っている。免疫抑制療法の治療前後でのサイトカインや

microRNA の発現変化を調べることで、免疫抑制療法の作用機序を検討する。次に、免疫抑制療法が有効な症例につき、病型や臨床症状を詳細に検討することで、特徴的な所見を提示したい。

さらには、強皮症由来皮膚線維芽細胞を培養し、サイトカインや microRNA を添加、阻害することで、in vitro での細胞動態や変化を観察し、コラーゲンを中心に細胞外マトリックスやその代謝酵素に与える影響を検討する。全身性強皮症の細胞外マトリックス代謝異常の病因を解明し、皮膚硬化や組織の線維化により特異的に作用する治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

免疫抑制療法を行った難治性の全身性強皮症患者の血清および皮膚生検組織を数例集めた。これらは倫理委員会の審査を経て文章による同意を得たのち、凍結保存したものである。まず、皮膚組織の paraffin 切片から RNeasy FFPE kit (Qiagen)を用いて total RNA を抽出した。病変部皮膚組織の mRNA について RT<sup>2</sup> Profiler PCR array (SAbioscience) により SSc における病変部皮膚での mRNA 発現様式を網羅的に調べた。さらに治療前と治療後を比較することで、免疫抑制療法の作用機序を検討した。

次に免疫抑制療法による有意な変化が確認されたサイトカインの局在を免疫染色で確認した。さらに、血清中のサイトカインの発現について ELISA 法で確認した。

## 4. 研究成果

### 4.1 皮膚組織中の mRNA 発現

皮膚硬化に対し免疫抑制療法を行った全身性強皮症患者群を、治療効果があった有効群 (n=3) と効果が認められなかった無効群 (n=3) に分けた。有効群と無効群で、病変部皮膚組織の mRNA について PCR array を行った。その結果より、CNTF, IFN $\alpha$ , IL-10,

GDF-2, CD70, TNF, TNFRSF, IL-8, IL-17A, INHB $\alpha$ , TGF $\beta$ 3, IL-16, IL-18, ADIPOQ, VEGF $\alpha$ , IL-2, TXLN $\alpha$ , TNFSF-10 の mRNA は無効群と比べ有効群で高発現していた。(図1)

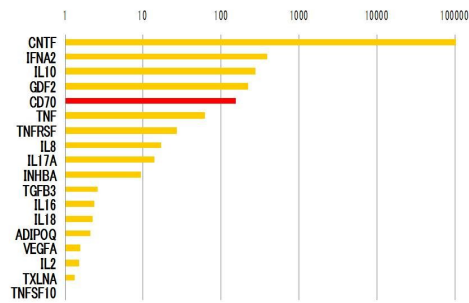


図1 PCR Array - 皮膚組織中mRNA比 (有効群/無効群)

#### 4.2 皮膚組織での CD27 の発現

CD70-CD27 シグナリングが SSc の病変部皮膚で活性化している仮説を検証するため、全身性強皮症患者 8 例に対し、皮膚組織での CD27 の免疫染色を行った。SSc の皮膚組織では真皮の毛細血管周囲のリンパ球に発現していた。(図 2a) さらに限局皮膚硬化型 SSc と比較し、びまん皮膚硬化型 SSc では CD27 は有意に高発現していた。(図 2b)

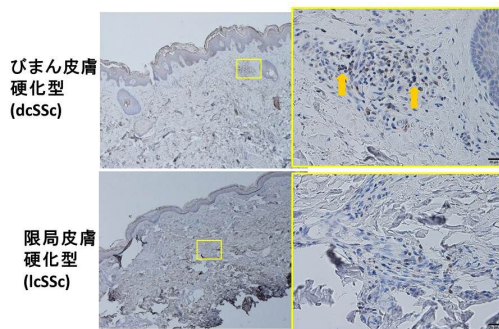


図2a 病変部皮膚組織でのCD27の発現

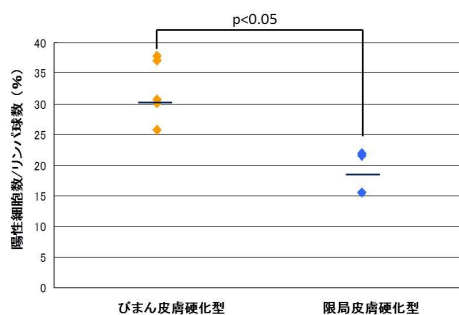


図2b 病変部皮膚組織中のCD27陽性細胞率

#### 4.3 血清中の soluble CD27 の発現

全身性強皮症患者 55 例に対し、血清中の soluble CD27 の発現について ELISA 法を行った。健常者と比較し SSc では有意に CD27 は高発現していた。さらに限局皮膚硬化型 SSc と比較し、びまん皮膚硬化型 SSc では CD27 は有意に高発現していた。また、免疫抑制療法に対する有効群と無効群の比較では有効群の血清中に CD27 が高発現している傾向がみられたが、有意差はなかった。(図 3a,b)

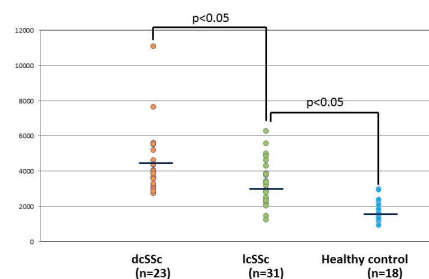


図3a 病型別の血清sCD27濃度 (ELISA法)

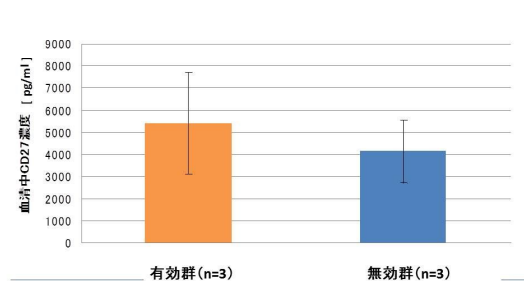


図3b シクロフォスファミドの反応性での血清sCD27濃度の比較

#### 4.4 臨床所見と血清 CD27 の相関

ELISA 法の結果から、全身性強皮症患者 55 例を CD27 上昇群 (n=36) と CD27 正常群 (n=19) に分けて、男女比や年齢、臨床所見との相関を検討した。CD27 上昇群では、びまん皮膚硬化型の割合、皮膚硬化スコアが有意に高く、石灰沈着の割合が有意に低かった。(図 4)

	sCD27上昇群 (n=36)	正常群 (n=19)
男女	8/28	12/7
年齢	67.2 (31-84)	60.6 (33-84)
罹病期間(年)	6.51	5.53
dsSSc: lcSSc	21/15	3/16
自己抗体	12/13/4	5/8/1
topo1:ACA-RNP	14 (1-41)	8.5 (0-34)
mRSS	82.4	93.3
レイノー現象(%)	38.7	42.9
指端硬化性萎縮(%)	38.2	18.8
皮膚萎縮(%)	50.0	61.5
爪上皮下出血(%)	36.0	40.0
毛細血管拡張(%)	87.1	84.6
汗腺減少(%)	4.55	25.0
乾皮症(%)	64.3	57.1
間質性肺炎(%)	52.8	41.2
心不全(%)	51.4	40.0
高血圧(%)	35.3	28.6
肝障害(%)	14.3	12.5
腎障害(%)	8.57	0.00
関節病変(%)	24.0	50.0
肺動脈狭窄(%)	29.4	18.8

Topo1:抗トポイメラーゼ I 抗体, ACA:抗セントロメア抗体, RNP:抗U1-RNP抗体  
mRSS: modified Rodnan total skin thickness score

図4 臨床所見と血清sCD27濃度の相関

## 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 8件)

- Kudo H, Wang Z, Jinnin M, Nakayama W, Inoue K, Honda N, Nakashima T, Kajihara I, Makino K, Makino T, Fukushima S, Ihn H. EB13 Downregulation Contributes to Type I Collagen Overexpression in Scleroderma Skin. J Immunol. 2015 Oct15;195(8):3565-73.
- Wang Z, Jinnin M, Kobayashi Y, Kudo H, Inoue K, Nakayama W, Honda N, Makino K, Kajihara I, Makino T, Fukushima S, Inagaki Y, Ihn H. Mice overexpressing integrin  $\alpha$ v in fibroblasts exhibit dermal thinning of the skin. J Dermatol Sci. 2015 Sep;79(3):268-78.
- Makino T, Jinnin M, Etoh M, Yamane K, Kajihara I, Makino K, Ichihara A, Igata T, Sakai K, Fukushima S, Ihn H. Down-regulation of microRNA-196a in the sera and involved skin of localized scleroderma patients. Eur J Dermatol. 2014 Jul-Aug;24(4):470-6.
- Makino K, Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H. Serum levels of soluble carbonic anhydrase IX are decreased in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis compared to those with limited cutaneous systemic sclerosis. Biosci Trends. 2014 Jun;8(3):144-8.
- Sakoguchi A, Nakayama W, Jinnin M, Wang Z, Yamane K, Aoi J, Makino K, Kajihara I, Ichihara A, Makino T, Fukushima S, Sakai K, Inoue Y, Ihn H. The expression profile of the toll-like receptor family in scleroderma dermal fibroblasts. Clin Exp Rheumatol. 2014 Nov-Dec;32(6 Suppl 86):S-4-9.
- Koba S, Jinnin M, Inoue K, Nakayama W, Honda N, Makino K, Kajihara I, Makino T, Fukushima S, Ihn H. Expression analysis of multiple microRNAs in each patient with scleroderma. Exp Dermatol. 2013 Jul;22(7):489-91.
- Ohyoshi Y, Makino T, Jinnin M, Nakayama W, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H. Serum levels of leptin receptor in patients with systemic sclerosis. Intractable Rare Dis Res. 2013 May;2(2):55-8.
- Makino K, Jinnin M, Hirano A, Yamane K, Eto M, Kusano T, Honda N, Kajihara I, Makino T, Sakai K, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H. The downregulation of microRNA let-7a contributes to the excessive expression of type I collagen in systemic and localized scleroderma. J Immunol. 2013 Apr 15;190(8):3905-15.

(学会発表)(計 4件)

- Takamitsu Makino, Masatoshi Jinnin, Miri Nakayama, Satoshi Fukushima, Shinichi Masuguchi, Hironobu Ihn. Increased CD27 expression in the skin and sera of the patients with systemic sclerosis. 4<sup>th</sup> Systemic Sclerosis World Congress, Feb 18-20, 2015, Lisbon, Portugal
- 牧野貴充、神人正寿、江藤光彦、山根恵太郎、梶原一亨、牧野雄成、福島 聡、尹 浩信 限局性強皮症における血清および皮膚組織中 miR-196a の発現低下と型コラーゲン蛋白合成の関連 第47回日本結合組織学会 2015年5月15-16日、東京
- 牧野貴充、神人正寿、江藤光彦、山根恵太郎、梶原一亨、牧野雄成、福島 聡、尹 浩信 限局性強皮症における血清および皮膚組織中 miR-196a の発現低下と線維化機序の関連 第42回臨床免疫学会 2014年9月25-27日、東京
- 牧野 貴充、神人 正寿、本多 教稔、牧野 雄成、梶原 一亨、尹 浩信 全身性強皮症、限局性強皮症における miR-196a の発現低下と皮膚線維化の機序への関与について 第18回強皮症研究会議 2015年1月17

日、東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

牧野貴充 (Makino Takamitsu) 熊本大学大  
学院生命科学研究部・講師

研究者番号：20433039

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：