

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461471

研究課題名(和文)末梢血単球を標的とした強皮症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel strategies for treating systemic sclerosis focusing on circulating monocytes

研究代表者

桑名 正隆 (KUWANA, Masataka)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50245479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚や肺など内臓諸臓器の線維化を特徴とする強皮症は、いまだ有効な治療法の確立していない難治性病態として残されている。強皮症患者にみられる病変を再現したマウスモデルを用いて解析したところ、病変出現に先行して組織へのマクロファージの浸潤がみられた。それらのほとんどは、線維化促進効果が知られているM2サブセットで、その分化に転写因子Fra-1が関わっていた。強皮症患者の末梢血単球でもFra-1発現が上昇しており、単球におけるFra-1高発現によりM2マクロファージへの分化が促進され、それらが皮膚や肺にリクルートされ線維化が誘導される強皮症のメカニズムが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis or scleroderma is characterized by excessive fibrosis of the skin and other internal organs, and still remains an intractable condition based on lack of any effective therapeutics. In this study, we have found that macrophages are recruited to the affected organs before development of apparent fibrosis in a mouse model for systemic sclerosis. Macrophages detected in the affected organs are primarily fibrogenic M2 macrophages, which are upregulated under a control of transcription factor Fra-1. Gene expression of Fra-1 is also increased in circulating monocytes derived from patients with systemic sclerosis, compared with those from healthy controls. In summary, our results together indicate that upregulated expression of Fra-1 promotes differentiation of monocytes into M2 macrophages, which are recruited to the skin and other organs affected and promote excessive fibrosis.

研究分野：膠原病学

キーワード：強皮症 単球 マクロファージ 肺高血圧症 肺線維症 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

近年の新規治療薬の導入や合併症対策により膠原病の生命予後は改善したが、いまだ難治性病態が残されており、その克服が膠原病診療の大きな課題である。特に、全身性強皮症 (SSc) にみられる線維化、血管リモデリングに対し、その進行を阻止する効果が実証された治療法はない。SSc では、間質性肺疾患による肺線維症と肺動脈内腔狭小化による肺高血圧症が死因の半数以上を占め、これら肺病変の克服なくして予後の改善は望めない。肺高血圧症治療に導入された選択的肺血管拡張薬の効果は限定的で、数年の延命が得られるに過ぎない。したがって、SSc の病態形成機序に基づいた根治的治療の開発が切望されている。

肺線維症と肺高血圧症に共通する病態は肺胞間隔壁および血管壁病的線維化である。これまでSScの基本病態である線維化を人為的に制御するための治療標的が模索されてきたが、有効性が実証された治療法はない。例えば、線維芽細胞の活性化因子を標的とした治療 (抗 TGF- 抗体、イマチニブなど) の臨床試験は全て失敗に終わっている。このように未だ有効な治療が開発できない理由として、SSc 病態 (線維化、血管病変の両者) を的確に再現する動物モデルが存在しないこと、創傷治癒と線維化の過程を分離させる治療標的の欠如の2点が挙げられる。申請者はこれまでヒト末梢血 CD14⁺単球の多機能前駆細胞としての生理的・病的役割に着目し、単球が炎症・免疫応答だけでなく、間葉系細胞や血管内皮細胞への分化や多彩な液性因子産生を介して組織修復、線維化に深く関わることを明らかにしてきた。そこで、SSc 病態における末梢血単球の役割を追究し、SSc 患者由来末梢血 CD14⁺単球が血管内皮前駆細胞として血管障害の進展と密接に関連し、線維芽細胞への分化や線維化促進因子分泌を介して線維化を促進することを明らかにした。これら研究成果より、「病変部組織にリクルートされた単球が脈管形成・血管新生や線維芽細胞活性化の上流に位置し、強皮症に

おける血管リモデリングや線維化の初期段階で重要な働きをする」という仮説を提唱した。

最近、私たちは転写因子 AP-1 の構成蛋白 Fra-1 を遺伝子導入により高発現させたマウス (Fra-1-TG マウス) が 12 週齢を越えると皮膚および肺 (血管、間質) の線維化を認め、致命的となることを見出した。本マウスの詳細なフェノタイプを検討したところ、SSc 患者にみられる特徴的な病理変化 (皮膚真皮の線維化、肺胞間隔壁の線維化、肺小～細動脈内腔狭窄) を自然発症することから、SSc の病態解析に有用なモデルと考えられる。今回、Fra-1-TG マウスモデルを用いてSSc病態形成初期の単球の役割を検討した。

2. 研究の目的

本研究テーマでは、SSc の新たな治療標的として末梢血単球に着目し、その線維化・血管リモデリング進展プロセスにおける役割を新規SSc動物モデルFra-1-TGマウスおよびSSc患者検体を用いて追究した。

3. 研究の方法

1) Fra-1-TGマウス

MHCクラス Ⅱ 遺伝子プロモーターコントロール下でFra-1を発現させたTGマウス (C57BL/6 x CBA、F1) および野生型マウスを用いた。さらに、ドキシサイクリン (Dox) 投与によりFra-1発現が誘導される conditional TGマウス (cFra-1-TGマウス) を作成した。

2) 組織学評価

マウスより肺組織を採取し、10%ホルマリンで固定後にHematoxylin-Eosin染色、Masson's trichrome染色を行った。免疫染色では、抗CD68抗体、抗CD11b抗体 (単球)、抗CD3抗体 (T細胞)、抗CD45R/B220抗体 (B細胞)、抗Fra-1抗、抗 α SMA抗体、抗arginase-1 (Arg-1) 抗体、抗IL-10抗体を用いた。抗CD68抗体、抗CD206抗体に加えてTOPROによる核染色を組み合わせ

た蛍光多重染色では、CD68⁺CD206⁺細胞をM1、CD68⁺CD206⁻細胞をM2とした。

3) *in vitro*での骨髄単核球からマクロファージへの分化

cFra-1-TGマウス由来の骨髄細胞から比重遠心法で単核球を分離し、さらにM-CSF (100 U/ml)存在下で7日間培養した。培養時にDOX (1.0 µg/mL)添加することでFra-1の発現を誘導した。

4) 遺伝子発現解析

培養細胞より全RNAを分離し、定量的PCRによりM1/M2関連遺伝子 (TNF、IL12、IL10、12/15lox、fizz1、ym1、arg1およびアクトン) の発現を検討した。

5) SSc患者におけるFra-1発現の検討

SSc患者44例および対照の健常人36例の末梢血単核球から磁気ビーズ結合抗CD14抗体を用いて単核球を分離した。単核球より全RNAを分離し、定量的PCRによりAP-1関連遺伝子 (Fra-1、Fra-2、c-Fos、FosB、c-Jun、JunD、JunB、ATF-2、STF-3、BATFおよびGAPDH) の発現を検討した。mRNA発現はGADPHとの比率で表した。

4. 研究成果

私たちが見出した転写因子AP-1を構成するFra-1を高発現するトランスジェニック(TG)マウスは皮膚硬化、肺間質の線維化、肺動脈のリモデリングが12ヶ月程度の経過で緩徐に進行し、間質性肺疾患と肺高血圧症で死に至る。そこで、まずFra-1-TGマウスおよび野生型マウスの肺組織における単核球およびT細胞、B細胞浸潤の経時的な変化を免疫組織化学染色により評価した。その結果、Fra-1-TGマウスでは肺間質の線維化や肺動脈の内膜・中膜の増殖と肥厚、線維化に先行してCD11b⁺/CD68⁺のマクロファージの浸潤がみられた。一方、全期間を通じてT細胞、B細胞の浸潤の程度はFra-1-TGマウスと野生型マウスで差はなかった。次に、組織に浸潤するマクロファージのM1/M2サブセットを調べたところ、Fra-1-TGマウスではCD68⁺CD206⁺M1に比べて、CD68⁺CD206⁻M2マクロファージが圧倒

的に多く浸潤していた。肺組織におけるM2/M1比を求めると、Fra-1-TGマウスで野生型マウスに比べて有意に上昇していた (4.7 ± 0.9 versus 0.2 ± 0.1 , $P < 0.05$)。

さらに、単核球/マクロファージにおけるFra-1高発現がM2への分化を誘導するかを追究するため、DOX存在下でFra-1を発現するcFra-1-TGを作成し、骨髄から単核球を分離した。マクロファージへの分化培養系にDOXあるいは対照液を添加したところ、両者でM1関連遺伝子 (TNF、IL12) の発現に差はなかった。一方、M2関連遺伝子 (IL10、12/15lox、fizz1、ym1、arg1) の発現はDOX添加により上昇し、特にIL10と12/15loxの発現増加は顕著であった ($P < 0.05$)。さらに、多重免疫染色でFra-1-TGマウスの肺組織で増加しているCD68⁺CD206⁻M2マクロファージではarg1の蛋白発現がみられることを確認した。なお、野生型マウスの肺組織ではCD68⁺CD206⁻arg1⁺M2マクロファージは検出されなかった。以上より、単核球/マクロファージ系細胞におけるFra-1高発現によりM2マクロファージへの分化が促進され、それらが皮膚や肺組織にリクルートされ組織の線維化を促進する機序が明らかとなった。

最後に、Fra-1-TGマウスで観察されたM2マクロファージ偏位の上流で制御しているFra-1発現がSSc患者末梢血単核球でもみられるかを検討した。検討したSSc患者は女性41例 (93%)、びまん皮膚硬化型が18例 (41%)、抗トポイソメラーゼ抗体陽性12例 (27%)、抗セントロメア抗体陽性19例 (43%)であった。AP-1関連分子の発現を網羅的に検索したところ、SSc患者では健常人に比べてFra-1のみならずFra-2、c-Fos、ATF-3の発現が上昇していた ($P = 0.00001, 0.002, 0.0005, 0.0009$)。臨床的にはびまん皮膚硬化型の発症早期に顕著にFra-1発現が高く、特に急速に進行する病初期に単核球におけるFra-1発現の重要性が確認された。

以上、モデルマウスおよびSSc患者での解析から、単核球/マクロファージ系細胞にお

ける Fra-1 高発現により M2 マクロファージへの分化が促進され、それらが皮膚や肺組織にリクルートされ組織の線維化を促進する機序が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Kuwana M, Shirai Y, Takeuchi T. Elevated serum Krebs von den Lungen-6 in early disease predicts subsequent deterioration of pulmonary function in patients with systemic sclerosis and interstitial lung disease. *J Rheumatol* 2016; 43(10): 1825-31. 査読有
2. Kahaleh B, Guiducci S, Kuwana M. Recent updates in experimental protocols for endothelial cells. *J Scleroderma Rel Dis* 2016; 1(3): 257-65. 査読有
3. 桑名正隆: 単球由来多能性細胞を用いた膠原病治療の可能性を探る. *分子リウマチ治療* 2016; 9(3): 19-23. 査読有
4. 桑名正隆: 強皮症性混合型肺高血圧症に対する病態評価と治療のポイント. *内科* 2016; 117(3): 449-54. 査読無
5. Hamaguchi Y, Kodera M, Matsushita T, Usuda T, Kuwana M, Takehara K, Fujimoto M. Clinical and immunological predictors of scleroderma renal crisis in Japanese systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase III antibodies. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67(4): 1045-52. 査読有
6. Kimura M, Tamura Y, Takei M, Yamamoto T, One T, Kuwana M, Fukuda K, Satoh T. Rapid initiation of intravenous epoprostenol infusion is the favored option in patients with advanced pulmonary arterial hypertension. *PLoS One* 2015; 10(4): e0121894. 査読有
7. Tamura Y, Kimura M, Takei M, Ono T, Kuwana M, Satoh T, Fukuda K, Humbert M. Oral vasopressin receptor antagonist tolvaptan in right heart failure due to pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2015; 46(1): 283-6. 査読有
8. Shirai Y, Okazaki Y, Inoue Y, Tamura Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Kuwana M. Elevated pentraxin 3 in systemic sclerosis: associations with vascular manifestations and defective vasculogenesis. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67(2): 498-507. 査読有
9. 桑名正隆: 強皮症の新たな治療概念. *臨床リウマチ* 2015; 27(4): 281-7. 査読無
10. 桑名正隆: 強皮症重症例に対する治療. *分子リウマチ治療* 2015; 8(4): 50-3. 査読無
11. 桑名正隆: 免疫抑制薬の臨床応用実践論. 全身性強皮症. *炎症と免疫* 2015; 23(1): 90-5. 査読無
12. Kaji K, Noreen F, Medsger TA Jr, Satoh T, Hoshino K, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Lucus M, Schnure A, Ogawa F, Sato S, Takehara K, Fujimoto M, Kuwana M. Autoantibodies to RuvBL1 and RuvBL2: a novel systemic sclerosis-related antibody associated with diffuse cutaneous and skeletal muscle involvement. *Arthritis Care Res* 2014; 66(4): 575-84. 査読有
13. Kuwana M, Okazaki Y. Impaired *in vivo* neovascularization capacity of endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(5): 1300-5. 査読有
14. 桑名正隆: 強皮症の病態と最新治療. *Medicina* 2014; 51(13): 2409-13. 査読無

[学会発表](計 8 件)

1. Yamaguchi Y, Shirai Y, Ono J, Kawaguchi Y, Izuhara K, Kuwana M, Aihara M: An Increased Circulating Level of Periostin in Patients with

- Systemic Sclerosis: Associations with Functional Impairment in Various Affected Organs. 80th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Washington, DC). 2016. 11.
2. Kuwana M: Predictors of Digital Ulcer in SSc: Endothelial Progenitor Cells and Circulating Biomarkers. 18th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress. (Shanghai). 2016. 9.
 3. Yasuoka H, Tam Y. Y, Okazaki Y, Tamura Y, Matsuo K, Takeuchi T, Kuwana M: M2-Shifted Mice Recapitulate Dermal and Pulmonary Remodeling. 4th Systemic Sclerosis World Congress (Lisbon). 2016. 2
 4. Shirai Y, Takeuchi T, Kuwana M. Efficacy and Safety of Tocilizumab in Patients with Systemic Sclerosis: Experiences in a Routine Clinical Setting. 4th Systemic Sclerosis World Congress (Lisbon). 2016. 2
 5. Kuwana M, Hasegawa, M Shirai Y, Ishikawa O, Endo H, Ogawa F, Goto D, Sato S, Ihn H, Kawaguchi Y, Takehara K: Parameters That Predict Worsening of Skin Thickness in Patients with Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. 79th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Francisco). 2015. 11
 6. Shirai Y, Takeuchi T, Kuwana M: Clinical Utility of Serial KL-6 Measurement in Interstitial Lung Disease Associated with Systemic Sclerosis. 79th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Francisco). 2015. 11
 7. **桑名正隆**: 強皮症に対する IL-6 阻害療法. 第 59 回日本リウマチ学会総会 (名古屋). 2015. 4.
 8. Shirai Y, Okazaki Y, Inoue Y, Tamura Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Kuwana M: Elevated Pentraxin 3 in Patients with Systemic Sclerosis: Associations with Vascular Manifestations and Defective Vasculogenesis. The 78th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Boston). 2014. 11.
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕なし
- 6 . 研究組織
研究代表者
桑名 正隆 (KUWANA, Masataka)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 5 0 2 4 5 4 7 9