

博士論文

論文題目

全身性強皮症の病態における
転写因子IRF5の役割についての検討

氏 名 三枝 良輔

全身性強皮症の病態における
転写因子 IRF5 の役割についての検討

東京大学大学院医学系研究科

外科学専攻

指導教員 佐藤伸一 教授

申請者名 三枝 良輔

目次

1) 要旨.....	5
2) 序文.....	6
3) 研究方法	10
1) マウス	
2) 病理組織学的検討	
3) 組織中のヒドロキシプロリン測定	
4) 透過電子顕微鏡による皮膚組織の検討	
5) 各種細胞培養と分離	
6) イムノブロッティング	
7) 各種遺伝子の mRNA 発現量の検討	
8) クロマチン免疫沈降法	
9) プルダウンアッセイ	
10) レポーター遺伝子アッセイ	
11) フローサイトメトリーによる評価	
12) 皮膚血管透過性の検討	

13) 蛍光免疫染色

14) 全身性強皮症皮膚検体の採取および線維芽細胞の単離

15) SNP ジェノタイピングアッセイ

16) 統計解析

4) 結果.....21

1) *Irf5*^{-/-}マウス皮膚では細いコラーゲン線維が目立ち高次構造が異常が見られる

2) *Irf5* を欠損した線維芽細胞では全身性強皮症由来の線維芽細胞と逆の性質を示す

3) ヒト皮膚線維芽細胞において、TLR4 シグナルによって活性化された IRF5 が *COL1A2* 遺伝子を制御している

4) *Irf5*^{-/-}マウスではブレオマイシン(BLM)の投与による組織の線維化が有意に抑制される

5) *Irf5*^{-/-}マウスでは BLM 投与による組織への炎症細胞浸潤が抑制される

6) BLM 誘発モデルマウスにおいて *Irf5* の欠損は Th1 優位な環境を誘導する

7) BLM モデルにおいて *Irf5* の欠損は B 細胞の活性化を抑制する

8) *Irf5* の欠損は血管内皮細胞における細胞接着因子の発現に影響を及ぼし Th1

細胞の浸潤を誘導する

9) *Irf5* の欠損は血管の安定性の増強に寄与する

10) *Irf5*^{-/-}マウスでは BLM 投与による内皮間葉移行が抑制される

11) 全身性強皮症患者皮膚における IRF5 の発現はその臨床所見と相関を示す

12) 皮膚線維芽細胞において IRF5 自体が向線維化刺激によって活性化する

13) *IRF5* プロモーター領域の SNP は全身性強皮症の皮膚における遺伝子発現と

相関を示す

5) 考察.....45

6) まとめ.....54

7) 謝辞.....55

8) 文献.....56

9) 表.....66

要旨

IRF5 遺伝子は全身性強皮症の疾患感受性遺伝子の一つとして同定され、さらに IRF5 の発現量が強皮症の重症度を規定することが見出されている。その機序を解明するため *Irf5*^{-/-}マウスを用いてブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを作成し、同マウスでは強皮症の主要な 3 病態である皮膚および肺の線維化、血管障害、免疫異常が野生型マウスに比較して抑制されることを見出した。さらに強皮症の病態形成機序の一つとして、内因性リガンドによる TLR4 を介したシグナル経路によって活性化した IRF5 が様々な細胞において強皮症に特徴的な遺伝子発現様式を制御していることを明らかにし、これまで強皮症の病態理解に不可欠と考えられてきた IRF5 および TLR4 が強皮症の病態に果たす役割を明らかにした。

序文

全身性強皮症は免疫異常、血管障害及び線維化を 3 主徴とする原因不明の自己免疫疾患である^{1,2} (図 1)。病因学のおよび遺伝学的な検討により、全身性強皮症は遺伝的要因と環境要因の複合的な要因による多因子疾患であると考
えられている³ (図 1)。例えば全身性強皮症の最大のリスクファクターはその
家族歴であるが⁴、一方で、双生児で同時に全身性強皮症が発症する率はおよそ
5%である。さらに全身性強皮症患者の一卵性双生児においてその二卵性双生児
に比べて抗核抗体はより高頻度に検出されるが、全身性強皮症発症率は一卵性
と二卵性で相違はない⁵。加えてほとんどの全身性強皮症の疾患感受性遺伝子は
他の膠原病と共通するような HLA ハプロタイプと非 HLA 領域の免疫に関連す
る遺伝子である⁶。それゆえ、恐らく遺伝的要因は全身性強皮症を含む自己免疫
性疾患への感受性を増強させる自己免疫と関係しており、後天的な環境要因が
遺伝的に感受性の強い個人が全身性強皮症を発症することに必要であると考え
られる。このような病因学のおよび遺伝学的な知見はあるが、全身性強皮症の
発症過程や病因は未だ明らかになっていない。

全身性強皮症の病因の根底にある分子的なメカニズムを明らかにするこ

とは重要と考えられるが、その観点からみると、近年 Toll 様受容体(Toll-like receptors; TLRs)を介した自然免疫におけるシグナル伝達が様々な疾患の病因として注目されている。例を挙げると、全身性強皮症患者の皮膚線維芽細胞と血管内皮細胞は、元々細菌性リポ多糖(bacterial lipopolysaccharide; LPS)の受容体として同定された Toll 様受容体 4 (TLR4)を強発現しているが、TLR4 を介したシグナル伝達は線維芽細胞の TGF- β への反応性を高める⁷⁻⁹。また、ブレオマイシン(bleomycin; BLM)誘発全身性強皮症モデルマウスにおいて、TLR4 の欠損は皮膚および肺の線維化を抑制する⁹。内因性の TLR4 リガンドは全身性強皮症患者皮膚で上方制御されており⁷⁻⁹、その血清中濃度は合併する内臓病変の重症度および免疫異常と相関している^{10,11}。それゆえ、TLR4 を介したシグナル伝達は全身性強皮症の病因として中心的な役割を果たしている可能性があるが、TLR4 を介したシグナル伝達経路がどのように全身性強皮症の発症に寄与しているかは不明である。いくつかの独立した症例対照研究やゲノムワイド関連解析によって interferon regulatory factor (IRF) ファミリーの一つである interferon regulatory factor 5 (IRF5)が全身性強皮症の疾患感受性遺伝子の一つとして同定されている¹²⁻¹⁷。IRF は type I interferon (IFN)システムの研究で同定された分子群であるが、

自然免疫および適応免疫反応の制御において機能的多様性を持つことが示されている¹⁸。このような IRF の性質から、IRF の単一塩基多型(Single-nucleotide polymorphism; SNP)は様々な免疫、炎症疾患の発症に関連している。これまで IRF5 は特に多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、そして全身性強皮症の発症に関連が想定されている¹⁶。さらに、一部の IRF5 プロモーターの SNP と全身性強皮症の発症リスクおよび重症度との関連が報告されている¹²⁻¹⁷ が、IRF5 がどのようにその発症に寄与しているのかは未だ明らかになっていない。

TLRs への刺激は myeloid differentiation factor 88 (MyD88)依存性, 非依存性経路の活性化を引き起こす¹⁸。IRF5 は樹状細胞やマクロファージにおいてその MyD88 経路によって活性化することが報告されている¹⁹。TLR によって活性化された IRF5 はインターロイキン 6[interleukin (IL)-6]、IL-12 および腫瘍壊死因子 α の遺伝子発現を誘導する¹⁹。以上から、TLR4 を介した IRF5 の活性化が全身性強皮症の病態に関与している可能性が想定される。全身性強皮症の感受性および重症度に関連する様々な分子の制御において IRF5 が果たす役割を、TLR4 を介したシグナル伝達との関連にも注目し、IRF5 欠損マウス(*Irf5*^{-/-}マウス)を用い

て検討を行い、その知見と全身性強皮症の臨床との関連を考察した。

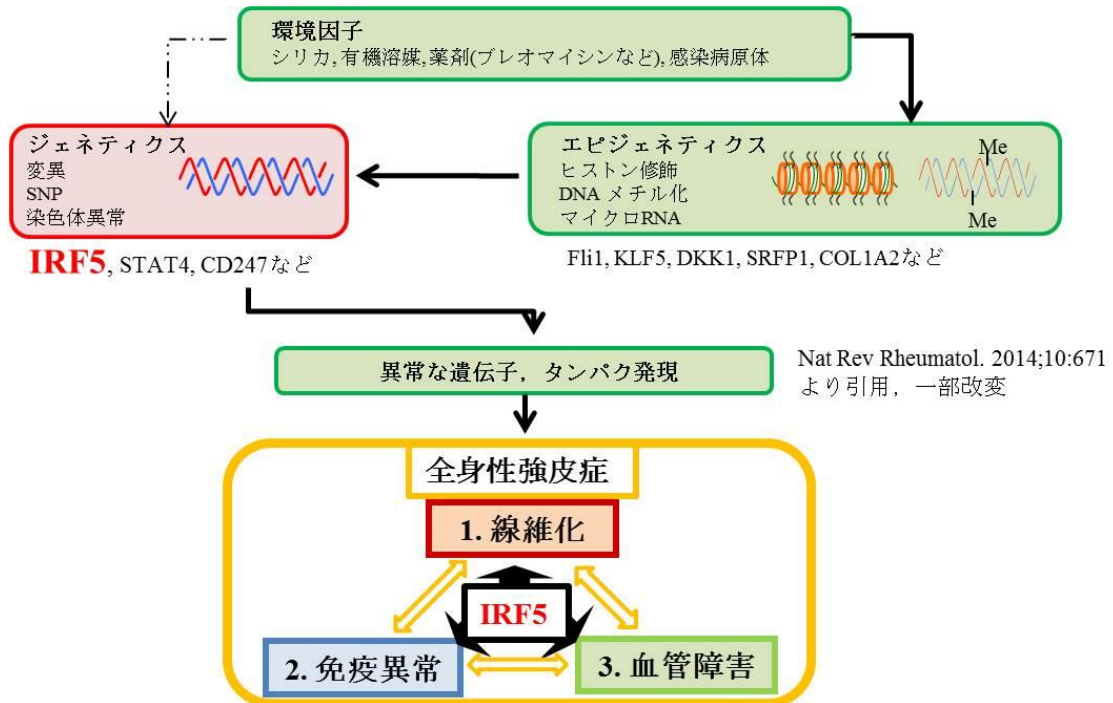


図 1. 全身性強皮症の病態：全身性強皮症は線維芽細胞の異常による組織線維化、血管内皮細胞の異常による血管障害、免疫細胞の異常による自己免疫と炎症が互いに関連しあって病態を形成している慢性疾患であり、その発症には多因子が関与している。

研究方法

1) マウス

本研究では C57BL/6 マウスを背景とする野生型マウスおよび *Irf5*^{-/-} マウスを用いて作成したブレオマイシン(BLM)誘発全身性強皮症モデルマウスを使用した。本研究には 6 週齢のマウスを用いた。BLM 誘発全身性強皮症モデルマウスはブレオマイシン(bleomycin; BLM)(Nippon Kayaku Co. Ltd)をリン酸緩衝液(phosphate-buffered saline; PBS)に 1mg/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛したそれぞれのマウスの背部皮膚へ 4 週間にわたり 27 ゲージの注射針で 200 μ g を連日皮下投与することで作成した。コントロールとして PBS のみを BLM と同様の方法でそれぞれマウスに投与した。解析にはそれぞれ 5-8 匹のマウスを用いた。なお、実験動物の取り扱いには、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。マウスの取扱いは、苦痛を最小限とするため、麻酔、安楽死などを適切に施行した(動物実験計画書 14-P-59)。

2) 病理組織学的検討

1 週間、4 週間の BLM および PBS 投与が終了したマウスの背部皮膚を採取し、一部をパラフィン包埋し、6 μ m 切片を作成した。ヘマトキシリン・エ

オシン染色およびトリジンブルー染色を行った。免疫染色は Vectastain ABC kit (Vector Laboratories、Burlingame、CA、USA)を用いて染色した。抗体は、抗マウス CD3 抗体(BD PharMingen、San Jose、CA、USA)、抗マウス B220 抗体(BD PharMingen)、F4/80 抗体 (AbD Serotec, Eching, Germany) および抗 α -smooth muscle actin (α -SMA)抗体 (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)を用いた。免疫染色は無作為に選んだ少なくとも 5 視野で測定し、それぞれのサンプルで陽性細胞を数え平均を算出した。

3) 組織中のヒドロキシプロリン測定

ヒドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれるアミノ酸で、その量はコラーゲン量を反映する。背部皮膚検体を 6mm パンチにて採取し、Total Collagen kit (QuickZyme Biosciences、Leiden、Netherlands)を用いて測定した。

4) 透過電子顕微鏡による皮膚組織の検討

検体は 2 ヶ月齢の無刺激状態マウス皮膚を酸化プロピレンに固定、処理し JEM-1200EX (JEOL Ltd、Tokyo、Japan)で観察を行った。皮膚コラーゲン線維の横断面を複数箇所ランダムに電子顕微鏡で撮影し、最低 500 本以上のコラ

ーゲン線維の直径の平均、分布と範囲を検討した。

5) 各種細胞の培養と分離

皮膚線維芽細胞培養には 10%牛胎児血清、抗生剤、抗真菌薬を添加した変法イーグル培地を使用した。室温 37°C、CO₂ 濃度 5%に保持したインキュベーター内で単層培養し、3~7 回継代した細胞を使用した。皮膚血管内皮細胞培養は Lonza Ltd. (Baxel, Switzerland)より購入し、EGM Bullet-Kit を用いて室温 37°C、CO₂ 濃度 5%に保持したインキュベーター内で単層培養し、2~4 回継代した細胞を使用した。また、マウス B 細胞および CD4 陽性 T 細胞は RPMI 培地 (Life Technologies、Gaithersburg、MD、USA) を使用し同条件で培養した。マウス B 細胞を刺激する実験では、1 ウェルあたり 10⁵ 個の細胞を 5 µg/mL 濃度の LPS および 10 µg/mL の抗 CD40 抗体(αCD40)で 48 時間刺激した。また、各種細胞の HMGB1 による刺激は 10 µg/mL で 24 時間行った。

マウス皮膚線維芽細胞の分離は、マウス皮膚をディスパーゼによって表皮と真皮に分離し、その真皮をコラゲナーゼ存在下でインキュベートし、培養することによって行った。マウス血管内皮細胞の分離は、マウス新生児皮膚をコラゲナーゼで分解し、抗 CD31 microbeads (Miltenyi Biotec、Teterow、Germany)

を使用し磁気細胞分離法で単離した。さらにマウス脾臓 B 細胞の分離には抗 CD19 microbeads (Miltenyi Biotec)を、マウス脾臓 CD4 陽性 T 細胞には Mouse CD4 T Lymphocyte Enrichment Set – DM(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)それぞれ使用した。

6) イムノブロッティング

線維芽細胞は 24 時間無血清培地で培養し回収した。全細胞溶解液と核抽出物を採取した。検体は sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Life technologies)で電気泳動し、1000 倍希釈した抗体によるイムノブロッティングを行った。バンドは enhanced chemiluminescent techniques(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)を用いて検出した。一次抗体は以下のものを用いた: 抗 type I collagen 抗体(Abcam, Cambridge, United Kingdom)、抗 MMP-13 抗体(Abcam)、抗 IRF5 抗体(Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, Tx, USA)および抗 β -actin 抗体 (Sigma-Aldrich)。二次抗体は 1000 倍希釈で以下のものを使用した: 抗マウス IgG-HRP、抗ウサギ IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)、抗ヤギ IgG-HRP 抗体(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)。

7) 各種遺伝子の mRNA 発現量の検討

培養細胞から 1 μ g の RNA を Qiagen inc (Hilden, Germany) の RNeasy Mini Kit を用いて抽出し、iScript cDNA Synthesis Kits (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて cDNA に逆転写した。定量的リアルタイム PCR は SYBR Green PCR Master Mix (Life technologies) を用い、ABI prism 7000 (Life technologies) で測定した。各マウス皮膚および肺より RNeasy spin column (Qiagen inc) を用いて mRNA を抽出し、E-selectin、P-selectin、Glycam1 および Icam1 の発現量を定量的 real-time PCR で測定した。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に用いた。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をリファレンス遺伝子として用いた。使用したプライマーの配列は表 2 に示した。mRNA 発現量の測定後に Melt curve で Tm が同じであることを確認し、各プライマーから予想される単一の増幅産物が生成していることを確認した。

8) クロマチン免疫沈降法

EpiQuik ChIP kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA) を用いて行った。細胞を 1%ホルムアルデヒドで処理し、クロスリンクしたクロマチンを平均 300-500 bp の断片に超音波で分解した。その DNA 断片は抗 IRF5 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて免疫沈降した。コントロールとして、ウサギ IgG もしく

はマウス IgG を用いた。抽出した DNA に対応する Input は免疫沈降に先行して採取した。クロスリンキングを解除した後、免疫沈降したクロマチンをアガロースゲル電気泳動及び qRT-PCR で評価した。qRT-PCR の結果は input の値で標準化した。IRF5 の予測結合部位は Tfsitescan を用いて予測した。用いたプライマーは表 3 に示した。

9) プルダウンアッセイ

センス鎖の 5' 末端にビオチンを含むオリゴヌクレオチドを使用した。配列を以下に示す: (i) IFN-stimulated response element (ISRE)を含む *COLIA2* プロモーター(転写開始点の上流-1294 塩基対から-1252 塩基対)配列のオリゴヌクレオチド; 5'- AGGGGGTGGGGGGAAGGAAGGGAAAAAGATTCTCAGGGAA-3' および 5'-TTCCCTGAGAATCTTTTTCCCTTCCTTCCCCCACCCT-3'、(ii) ISRE に変異を挿入したオリゴヌクレオチド; 5'-AGGGGGTGGGGGGAAGGAAGGTCCAAAGATTCTCAGGGAA-3' および 5'-TTCCCTGAGAATCTTTGGACCTTCCTTCCCCCACCCT-3'。これらのオリゴヌクレオチドは 95°C 1 時間で相補鎖にアニーリングした。健常人皮膚線維芽細胞からの核抽出物はストレプトアビジンアガロースゲルと 500 pmol の二本鎖

オリゴヌクレオチドと2時間室温でインキュベートした。タンパク-DNA-ストレプトアビジン-アガロース複合体はプロテアーゼインヒビターを含むPBSで4回洗浄し、抗体を用いてイムノブロットングを行った。

10)レポーター遺伝子アッセイ

X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche, Basel, Switzerland)を用いてヒト皮膚線維芽細胞にプラスミドをトランスフェクトした。細胞は24時間培養後、次の24時間TGF- β 1およびLPSで刺激を行った。HEK293T細胞も同様に X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagentを用いてトランスフェクトし48時間培養した。ホタルルシフェラーゼおよびレニラルシフェラーゼを dual luciferase reporter system (Promega, Madison, WI, USA)を用いてAB-2200 luminometer (ATTO, Tokyo, Japan)で計測した。ホタルルシフェラーゼ活性をレニラルシフェラーゼ活性で標準化した。使用したプラスミドを以下に示す; *COL1A2* プロモーター (-1500 to +200)をサブクローニング(Genscript社に依頼)したpGL4.10 [luc2] vector (Promega)、pCMV-IRF5 [Dr. PM. Pitha-Rowe (Johns Hopkins medicine, Baltimore, MD)より供与]、恒常的に活性化したIRF5のアイソフォームであるIRF5A²⁰、*TBET* プロモーター (-1659 から +51) をサブクローニングした luciferase reporter

vector[Dr. W. Leung (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN)より供与]、
プラスミドベクターは形質転換させた大腸菌(DH5 α)(Takara Bio, Shiga, Japan)
を用いて増幅させPlasmid Midi Kit (Qiagen)を用いて単離した。

11) フローサイトメトリーによる評価

前述と同じ方法で BLM を 7 日間投与したマウスを作成し、翌日腋窩リンパ節、鼠径リンパ節を採取した。リンパ節からリンパ球を回収し、1 μ g/ml のブレフェルジン A (GolgiStop; BD Pharmingen) 存在下で 10ng/ml の PMA と 1 μ g/ml のイオノマイシン(Sigma-Aldrich)にて 4 時間刺激した。その後細胞を 1% ウシ胎児血清含有 PBS により洗浄し、細胞表面を CD4 にて染色した。サンプルを fixative/permeabilization buffer (BD Pharmingen) にて処理し、抗 IL-4 抗体、抗 IL-17A 抗体および抗 IFN- γ 抗体 (すべて BioLegend, San Diego, CA, USA) にて染色を行った。細胞を洗浄後、FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences)にて解析を行った。それぞれの転写因子の検討では retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ t (ROR γ t)(eBioscience)、T-box expressed in T cells (T-bet) (BioLegend)、および GATA binding protein 3 (GATA3) (BioLegend) に対する蛍光抗体を使用した。

12) 皮膚血管透過性の検討

マウス尾静脈に0.5%でPBSに溶解したエバンスブルー (Sigma-Aldrich) を 200 μ l 注射した。30 分後に頸椎脱臼で安楽死させ、マウスの皮下を剥離し、腹部皮膚血管からのエバンスブルーの漏出を観察した。また、皮膚を 6mm パンチでくりぬき、200 μ l のホルムアミドに漬けてエバンスブルーを漏出させ、620nm の吸光度で吸光度計を用いてエバンスブルーの濃度を測定した。

13) 蛍光免疫染色

内皮間葉移行の評価のための二重蛍光染色は一次抗体として抗 VE-cadherin ヒツジ抗体と抗 fibroblast specific protein 1 (FSP1)ウサギ抗体を用い、二次抗体には fluorescein isothiocyanate (FITC) 抱合抗ウサギ IgG 抗体・Alexa Fluor donkey 555 抗ヒツジ IgG 抗体を用いた。抗 VE-cadherin ヒツジ抗体は Santa Cruz Biotechnology より、抗 FSP1 ウサギ抗体は abcam より購入した。二重蛍光免疫染色で二次抗体に用いた FITC 抱合抗ウサギ IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology より、Alexa Fluor 555 抗ヒツジ IgG 抗体は Invitrogen (Carlsbad, CA)より購入した。二重蛍光免疫染色の検討では 200 倍視野にて無作為に選んだ少なくとも 5 視野で VE-cadherin・FSP1 二重陽性細胞数を計測し、それぞれのサンプルで平均

を算出した。ヒト皮膚での線維芽細胞の検討では、一次抗体として抗 IRF5 マウス抗体(Santa Cruz Biotechnology) および抗 FSP1 ウサギ抗体を使用した。2 次抗体は、FITC 抱合抗マウス IgG 抗体(Merck Millipore、Billerica、MA、USA) および Alexa Fluor 555 抗ウサギ IgG 抗体(Life technologies)を用いた。ヒト皮膚血管内皮細胞の検討では、一次抗体として抗 IRF5 マウス抗体と抗 PECAM1 ヤギ抗体(Santa Cruz Biotechnology)を使用し、二次抗体として FITC 抱合 FITC 抱合抗マウス IgG 抗体および Alexa Fluor 555 抗ヤギ IgG 抗体(Life technologies)を用いた。Vectashield with DAPI (Vector Laboratories)を用いてカバーガラスを載せ、Bio Zero BZ-8000 (Keyence、Osaka、Japan)を使用し波長は 495 nm (緑)、565 nm (赤)および 400 nm (青)で観察した。

14) 全身性強皮症皮膚検体の採取および線維芽細胞の単離

倫理委員会にて承認を得た上で[承認番号 0695-(5)]、36 名の全身性強皮症患者[女性 33 名; 年齢中央値(25-75 パーセントイル): 57 歳(41.0 - 67.0 歳)] および 11 名の健常人(女性 8 名; 年齢中央値(25-75 パーセントイル): 50 歳(38.0 - 69.0 歳)の前腕皮膚検体から mRNA およびゲノム DNA を単離し実験に使用した。mRNA は cDNA に逆転写し qRT-PCR にて分子発現を検討した。ゲノム DNA は

Genomic DNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて抽出した。全身性強皮症患者 36 例の臨床所見は以下のものであった；びまん皮膚硬化型症例 24 例、手指潰瘍を有する症例 24 例、間質性肺疾患を有する症例 20 例。線維芽細胞は性別、年齢、皮膚採取部位が適合した 8 名のびまん皮膚硬化型全身性強皮症患者および 8 名の健常人から得た。

15) SNP ジェノタイピングアッセイ

これまで報告されている SNP である rs4728142 についてゲノム DNA を使用し TaqMan SNP genotyping assay (Life technologies) キットを用いて検討した。

16) 統計解析

統計解析には GraphPad Prism 6 を用いた。統計学的な有意差は 2 群間であれば Mann-Whitney U test を用いて、多群間であれば one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test を用いて解析した。正規分布に沿う場合には two-tailed t-test を用いた。また、場合によって独立して 2 回以上実験を行った。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と考えた。値は平均値±標準誤差で表記した。

結果

全身性強皮症の主要な 3 病態である線維化(1 - 4)、免疫異常(5 - 7)、血管障害(8 - 10)における転写因子 IRF5 の役割について、順を追ってマウスを用いた検討結果を示す。最後に全身性強皮症患者検体を用いた検討(11 - 13)を示す。

1) *Irf5*^{-/-}マウス皮膚で細いコラーゲン線維が目立ち高次構造の異常が見られる

まず IRF5 の皮膚の恒常性維持機能における役割を検討するため組織学的な検討を行った。HE 染色では *Irf5*^{-/-}マウス背部皮膚において野生型マウスに比べて細いコラーゲン線維が目立ち、ハイドロキシプロリンアッセイでもコラーゲン量の低下傾向がうかがわれた(図 2A、B)。また、そのほかの皮膚構造の異常は確認できなかった。電子顕微鏡を用いた検討でも、特に真皮深層の領域でコラーゲン線維が著明に疎になっており、線維一本一本も野生型マウスに比較し細くなっていた(図 2C)。さらに線維の直径も野生型マウスに比較しばらつきがあり、アニソコリアも見られた (図 2D)。

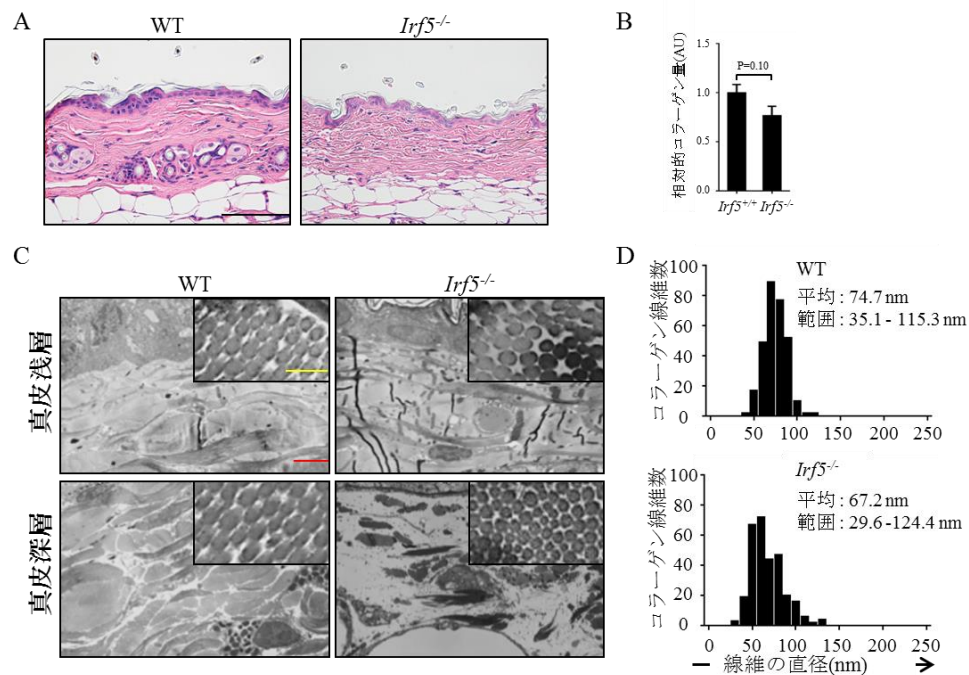


図 2. *Irf5^{-/-}*マウス皮膚のフェノタイプに関する検討

(A)野生型(WT)および *Irf5^{-/-}*マウスの無刺激状態皮膚組織像。Bar = 100 μ m。(B)皮膚におけるヒドロキシプロリン量の検討(n = 5)。(C)電子顕微鏡による皮膚コラーゲン線維に関する超微細構造の評価。Yellow bar = 200 nm、red bar = 2 μ m。(D)真皮コラーゲン線維の直径の頻度分布 (一群あたり 500 本のコラーゲン線維を計測)。

2) *Irf5* を欠損した線維芽細胞では全身性強皮症由来の線維芽細胞と逆の性質を示す

*Irf5^{-/-}*マウスにおいてコラーゲン産生の低下とコラーゲン高次構造の異常が示唆されたため、コラーゲンの主要な産生細胞である線維芽細胞につき検討した。*Irf5^{-/-}*マウスから単離した皮膚線維芽細胞は、野生型に比べて、I型コラーゲン(ブロッティングでは2本のバンドとして検出)の発現が低下し、コラー

ゲンの代謝分解に中心的な役割を果たす MMP-13 の発現が著明に上昇していた (図 3A、B)。また、クロマチン免疫沈降法で、IRF5 は *COL1A1*、*COL1A2* および *MMP13* のプロモーター領域に作用していることが示唆された(図 3C)。また、コラーゲン高次構造の異常について、関連する分子の発現を比較した。*Irf5*^{-/-}マウス由来の線維芽細胞でコラーゲン高次構造の構築に必要な分子である *Adams2*、*Lox*、*lumican*、*Decorin* の発現低下があり、組織の所見にあったような疎で細かいコラーゲン線維の形成に深く関与している可能性が示された(図 3D)。これらは、強皮症におけるそれら分子の発現と逆の発現パターンを示していた^{21,22}。

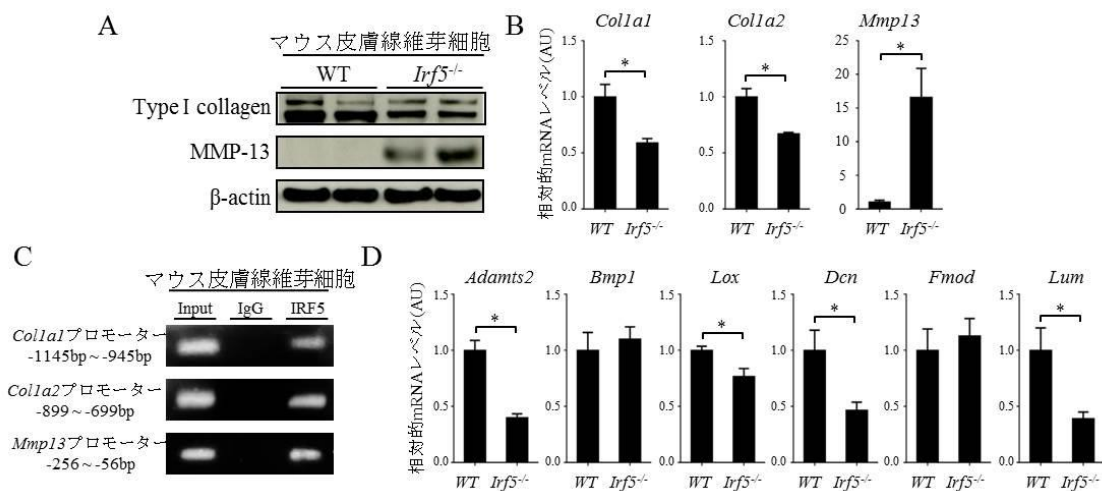


図 3. マウス皮膚線維芽細胞に関する検討

(A) 野生型 (WT) および *Irf5*^{-/-} マウス由来の無刺激培養線維芽細胞の免疫ブロットティング。(B) 野生型 (WT) および *Irf5*^{-/-} マウス由来の無刺激培養線維芽細胞の mRNA 発現の比較(n = 9)。(C) マウス皮膚線維芽細胞における抗 IRF5 抗体を用いた免疫沈降法 (n = 4)。(D) 原線維発生に関連する分子発現の qRT-PCR を用いた評価(n = 9)。*: P < 0.05 (two-tailed unpaired t-test)。

3) ヒト皮膚線維芽細胞において、TLR4 シグナルによって活性化された IRF5 が COL1A2 遺伝子を制御している

更なる検討のため、マウス皮膚線維芽細胞と同様にヒト皮膚線維芽細胞においても IRF5 が COL1A1、COL1A2 および MMP1(マウス MMP13 のカウンターパート) のプロモーター領域に作用しているか確認した(図 4A)。さらにプルダウンアッセイにより、IRF5 が COL1A2 上の IFN-stimulated response element (ISRE)に作用していることを示した(図 4B)。皮膚線維芽細胞における IRF5 の COL1A2 遺伝子発現に対する影響を検討するため、ヒト皮膚線維芽細胞に COL1A2 プロモーター-ルシフェラーゼ遺伝子構築物を一過性にトランスフェクションし、レポーター遺伝子アッセイを行い、用量依存的に IRF5 が COL1A2 プロモーター活性を高めることを示した(図 4C)。さらに、LPS と TGF-β1 は I 型コラーゲンの発現を上昇させるが⁷、それらの刺激はさらにレポーター遺伝子の発現を高めた(図 4C)。このことは TLR4 を介したシグナリングが IRF5 の転写活性を高めている可能性を示唆した。実際に IRF5 の COL1A2 プロモーターへの結合が LPS と TGF-β1 刺激によって増強された(図 4D)。さらに、TLR4 のリガンドとして生体内活性を持つ high-mobility group box 1 (HMGB1)²³ を LPS の代わりとし

て用いて刺激すると同様の結合の増強が見られた(図 4E)。ここまでの結果と合致するように、*Tlr4* 欠損(*Tlr4*^{-/-})線維芽細胞において *Colla2* プロモーターへの IRF5 結合が著明に低下していた(図 4F)。また、*Tlr4* 欠損は線維芽細胞における IRF5 の発現には影響を及ぼさなかった(図 4G)。このことから線維芽細胞において TLR4-IRF5 軸が *COL1A2* 遺伝子発現を制御している可能性が考えられた。

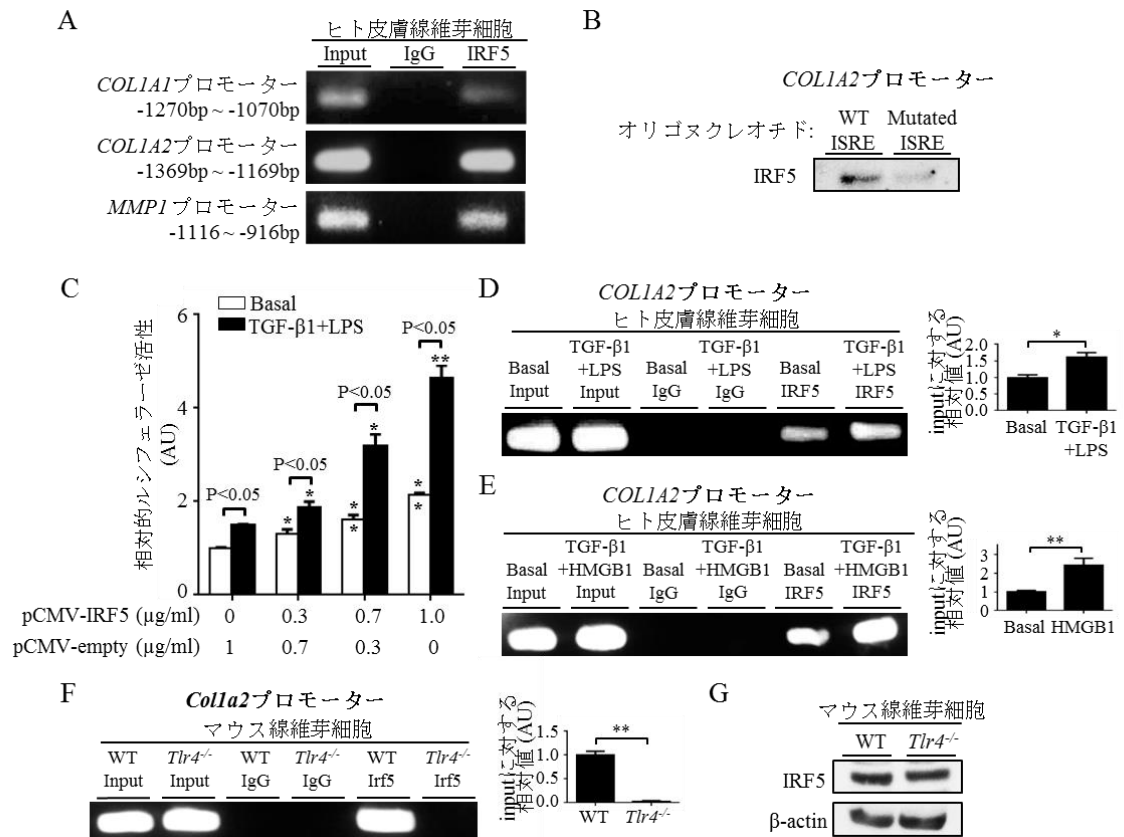


図 4. ヒト皮膚線維芽細胞に関する検討

(A、D、E) ヒト線維芽細胞における抗 IRF5 抗体を用いた免疫沈降法による評価(n = 4)。(B) プルダウンアッセイによる評価。COL1A2 プロモーターの野生型 (WT)あるいは変異型(mutated)IFN-stimulated response element (ISRE) を含むオリゴヌクレオチドによってプルダウンされたタンパクを抗 IRF5 抗体を用いたイムノブロットングで評価。(C) ヒト皮膚線維芽細胞での COL1A2 プロモーター構築物を用いたルシフェラーゼアッセイ(n = 4)。コラム上のアスタリスクは同色の一番左のコラムと比較して有意差があったことを示す。(F、G) 野生型 (WT)および *Tlr4*^{-/-} 皮膚線維芽細胞における抗 IRF5 抗体による免疫沈降法(F) および イムノブロットング(G)。C-E においては TGF-β1 と LPS あるいは HMGB1 で 24 時間刺激をおこなった。D-F においては qRT-PCR による定量的評価を 右に示した (n = 5)。*: P < 0.05、 **: P < 0.01 (two-tailed unpaired t-test)。

4) *Irf5*^{-/-}マウスでは BLM 投与による組織の線維化が有意に抑制される

BLM 投与による皮膚および肺の線維化が *Irf5*^{-/-}マウスでどのように変化するか HE 染色及びヒドロキシプロリン量の測定により検討した。*Irf5*^{-/-}マウスにおいて、BLM 投与による皮膚線維化および肺の線維化が有意に抑制されていた (図 5A-D)。

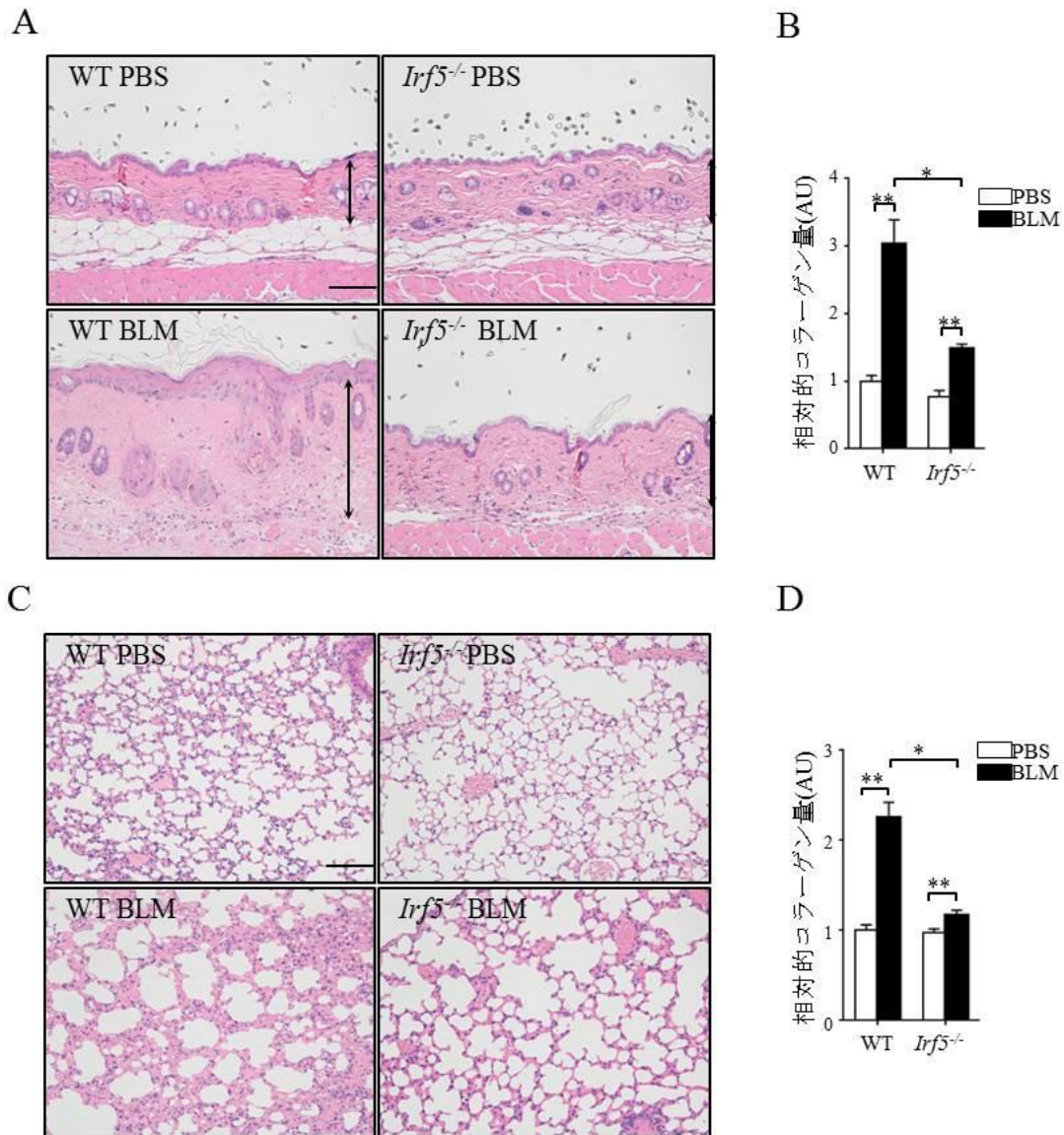


図 5. ブレオマイシン (BLM) 誘発モデルマウスの表現型に関する検討

(A、C) PBS あるいは BLM を投与した野生型(WT)および *Irf5*^{-/-} マウス皮膚組織像(A)および肺組織像(C)の検討。(B、D) 皮膚(B)および肺(D)のヒドロキシプロリンアッセイによるコラーゲン量の検討(n = 5)。Horizontal bars = 100 μ m。*: P < 0.05、 **: P < 0.01 (two-tailed unpaired t-test)。

5) *Irf5*^{-/-}マウスでは BLM 投与による組織への炎症細胞浸潤が抑制される

次に BLM 誘発全身性強皮症モデルマウスの免疫異常について IRF5 欠損が及ぼす影響について検討した。まず、BLM 投与による組織への炎症細胞浸潤につき免疫染色により検討した。皮膚および肺において、T 細胞、B 細胞、マスト細胞およびマクロファージの浸潤が *Irf5*^{-/-}マウスで野生型マウスに比べて有意に減少していた (図 6A)。このことから BLM 誘発モデルマウスにおける免疫反応に IRF5 が関与している可能性が考えられた。合致するように皮膚(図 6B) および肺(図 6C)において *Ifng* mRNA 発現が野生型マウスと比較して上昇し、IL-4 および IL-6 発現が減少していた。

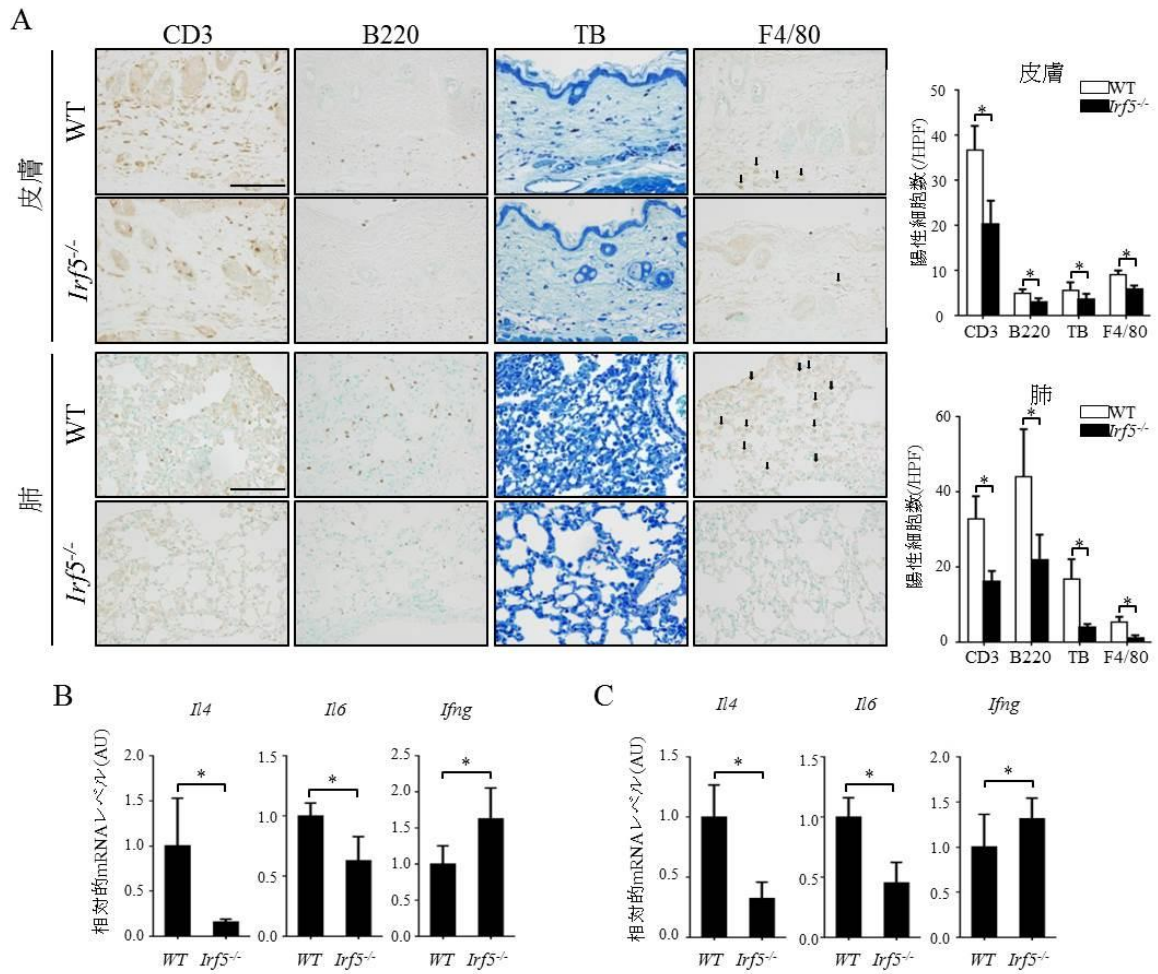


図 6. ブレオマイシン (BLM) 誘発モデルにおける炎症の評価

(A) BLM 投与後の皮膚組織および肺組織像(CD3、B220、F4/80 免疫染色および TB 染色)。矢印：F4/80 陽性細胞。400 倍一視野あたりの陽性細胞数をカウントした(n = 8)。Bar = 100 μ m。(B, C) BLM 投与した皮膚(B)および肺(C)における mRNA 発現の検討(n = 8)。*: P < 0.05(two-tailed unpaired t-test)。

6) BLM 誘発モデルマウスにおいて *Irf5* の欠損は Th1 優位な環境を誘導する

多くの自己免疫性疾患においてはナイーブ T 細胞から Th1 細胞が分化誘導され Th1 優位な環境が誘導されるのに対し、全身性強皮症では Th2 優位な環境が誘導されており、強皮症モデルマウスを用いた実験でも同様の環境が誘導される^{24,25}。上記の結果から BLM を投与した *Irf5*^{-/-}マウスにおいて Th1 タイプの免疫誘導が起きている可能性が考えられた。そこでフローサイトメトリーで CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ 、IL-4、IL-17A の発現を検討し、Th1/2/17 シフトについて検討した。*Irf5*^{-/-}マウスにおいて CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ の発現が上昇しており、Th1 へのシフトが誘導されていることが考えられた(図 7A)。

さらに、Th1 のマスター制御因子である、T-bet に関しても *Irf5*^{-/-}マウスで上昇が見られた(図 7B)。また、免疫沈降法で CD4 陽性 T 細胞における *Tbet* プロモーター領域への IRF5 結合が示され(図 7C)、IRF5 は *Tbet* 遺伝子の抑制因子として働いている可能性が示唆された。IRF5 はこれまで免疫細胞において正の制御因子として報告されているが¹⁹、負の制御因子としての報告はなされていない。

この点についてさらに検討を行うためにレポーター遺伝子アッセイを行った。HEK293T 細胞において、恒常的に活性化した IRF5 のアイソフォームである

IRF5A²⁰ と *TBET*-ルシフェラーゼ遺伝子構築物を共発現させると、IRF5A 用量依存的にルシフェラーゼ活性が抑制されていた(図 7D)。TLR4 は T 細胞の炎症反応を促進することがこれまで報告されており²⁶、T 細胞においても TLR4-IRF5 軸が BLM の誘導する免疫応答に関与している可能性が考えられた。

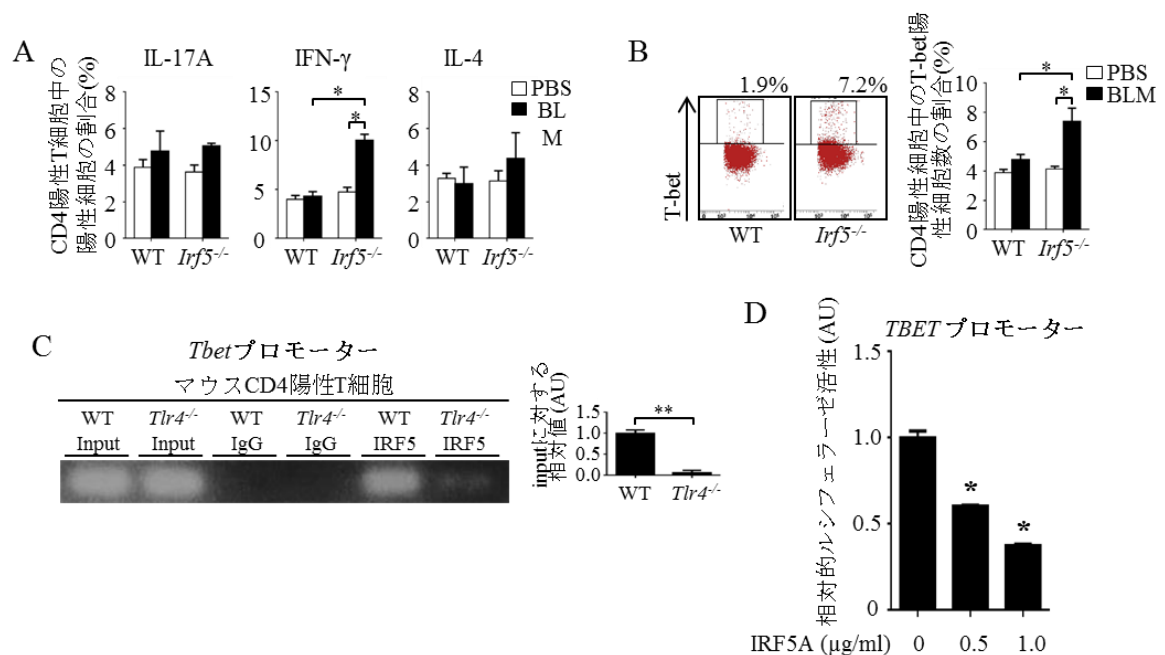


図 7. Th1/2/17 分極に対する IRF5 欠損の影響に関する検討

(A、B) BLM 投与した野生型 (WT) および *Irf5*^{-/-} マウスから採取した末梢リンパ節における IL-17A、IFN-γ および IL-4 産生 CD4 陽性細胞の割合(A)および T-bet 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合(B)をフローサイトメトリーにて評価した (n = 4)。T-bet 陽性 CD4 陽性細胞に関しては代表的なプロットの図を示した。(C) WT および *Tlr4*^{-/-} マウスから分離した CD4 陽性 T 細胞における抗 IRF5 抗体を用いた免疫沈降法。qRT-PCR による定量的な評価をおこなった(n = 5)。(D) HEK293T 細胞において *TBET* プロモーター構築物と IRF5A 発現ベクターを共導入させて行ったルシフェラーゼアッセイ (n = 4)。*: P < 0.05、**: P < 0.01 (two-tailed unpaired t-test)。

7) BLM モデルにおいて *Irf5* 欠損は B 細胞の活性化を抑制する

B 細胞における CD19 の発現は IL-6 の発現と深く関与しており²⁷、更に IL-6 は強皮症患者の皮膚、血清などで上昇している²⁸。*Irf5*^{-/-}マウスにおいては、BLM の投与による CD19 発現の上昇が抑制されており(図 8A)、さらに単離した B 細胞を用いて刺激に対する IL-6 の分泌を ELISA 法で検討したが、*Irf5*^{-/-}マウスから単離した B 細胞は LPS および抗 CD40 抗体刺激による IL-6 の分泌が低下していた(図 8B)。また、*IL6* プロモーターの ISRE に対する IRF5 の特異的な結合が示された(図 8C)。興味深いことに、*Tbet* および *Il6* プロモーターへの IRF5 の結合もそれぞれ *Tlr4* 欠損 CD4 陽性 T 細胞および *Tlr4* 欠損 B 細胞で低下しており、B 細胞においては内因性 TLR4 リガンドである HMGB1 刺激によって結合が上昇していた(図 7C、8D)。これらをまとめると、TLR4 による IRF5 の活性化が Th1 細胞の誘導と B 細胞の活性化にも関与している可能性があり、免疫細胞においてもこれらが重要な役割をはたしている可能性が示された。

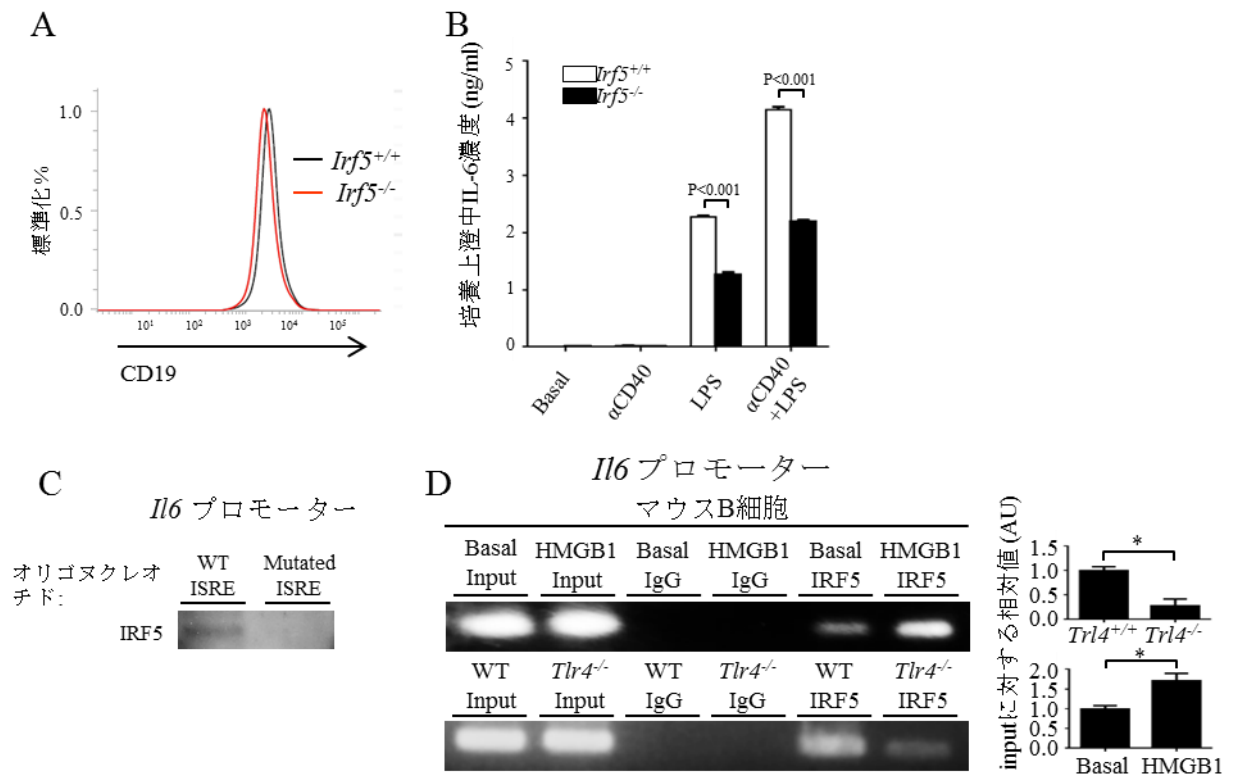


図 8. B 細胞に関する検討

(A)フローサイトメトリーによる BLM 投与したマウスの脾臓 B 細胞における CD19 発現量の比較。(B)マウス脾臓から単離した B 細胞の培養上澄中における IL-6 分泌量の比較(n = 8、*P=0.05)。48 時間 LPS および抗 CD40 抗体(αCD40)で 48 時間刺激した。(C)プルダウンアッセイによる評価。*I16* プロモーターの野生型 (WT) および変異型 IFN-stimulated response element (ISRE) を含むオリゴヌクレオチドによってプルダウンされたタンパクを抗 IRF5 抗体をもちいたイムノブロッキングで評価。(D) 上段：無刺激状態あるいは HMGB1 で刺激した野生型マウスから分離した B 細胞における抗 IRF5 抗体を用いた免疫沈降法。下段：野生型 (WT)および *Tlr4*^{-/-}マウスから分離した B 細胞における抗 IRF5 抗体を用いた免疫沈降法。qRT-PCR による定量的な評価をおこなった(n = 5)。*: P < 0.05 (two-tailed unpaired t-test)。

8) *Irf5* の欠損は血管内皮細胞における細胞接着因子の発現に影響を及ぼし Th1

細胞の浸潤を誘導する

次に、血管内皮細胞上に発現する細胞接着因子の発現を BLM を投与した *Irf5*^{-/-} マウスにおいて検討を行った。BLM を投与した皮膚において E-selectin、P-selectin の発現が有意に上昇し(図 9A)、一方で肺においては P-selectin の発現が低下していたが、Glycam1、Icam1 の発現が有意に低下し特に Glycam1 の発現が著明に低下していたことから相対的に Th2/17 を誘導する接着因子が発現低下していることが示唆された (図 9B)。E-selectin および P-selectin は Th1 細胞の、Glycam1 および Icam1 は Th2/17 細胞の組織への浸潤を誘導しており²⁹、血管内皮細胞における接着分子の発現状態からも *Irf5*^{-/-} マウスにおいて Th1 優位な環境が誘導され線維化の抑制に寄与している可能性が示された。

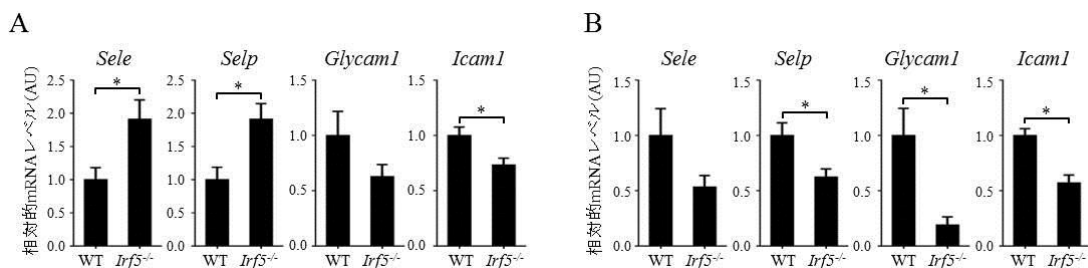


図9. BLM投与後組織におけるTh1/2/17シフトに関連する細胞接着因子のmRNA発現に関するqRT-PCRによる検討

(A、B) 野生型 (WT) および *Irf5*^{-/-} マウス皮膚(A)と肺(B)から単離した細胞接着因子に関する mRNA 発現の比較(n = 8)。*: P < 0.05 (two-tailed unpaired t-test)。

9) *Irf5* の欠損は血管の安定性に寄与する

続いて、全身性強皮症の主要3病態の一つである血管障害について、BLMを投与した *Irf5*^{-/-}マウスで検討した。BLM投与マウスにおいて、調整したエバンスブルーを尾静注し検討した血管透過性の評価では、野生型マウスで血管透過性が上昇し色素が漏出しているのに対し、*Irf5*^{-/-}マウスでは色素の血管外漏出がみられず(図 10A)、血管がより安定化していることが示唆された。血管壁細胞のフェノタイプは血管の成熟に寄与しているが、 α -SMAは成熟血管のマーカーと成りうる³⁰。皮膚小血管における α -SMAの発現を免疫染色で検討したところ、無刺激状態およびBLMを投与した *Irf5*^{-/-}マウスにおいて血管周皮細胞で α -SMAの発現が上昇しており、先の実験で見られた血管安定性に寄与している可能性があることが示された(図 10B)。

更なる検討のために、マウスから単離した血管内皮細胞におけるmRNA発現の比較を行った。*Irf5*^{-/-}マウス由来の血管内皮細胞において、血管安定性に寄与していると考えられているVE-cadherinおよびPdgfbの発現が上昇しており、血管内皮間および血管内皮と周皮細胞間の相互作用が増強され血管が安定化している可能性が示唆された(図 10C)。さらに、IRF5は血管内皮細胞にお

いて *Pdgfb* および *Cdh5* のプロモーター領域に作用している可能性が免疫沈降法によって示された(図 10D)。さらに線維芽細胞における *Colla2* プロモーターに関する検討結果と同様に、*Tlr4* 欠損血管内皮細胞において IRF5 結合が著明に低下し、内因性 TLR4 リガンドである HMGB1 刺激によって結合が上昇しており(図 10E)、血管内皮細胞においても IRF5-TLR4 軸が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

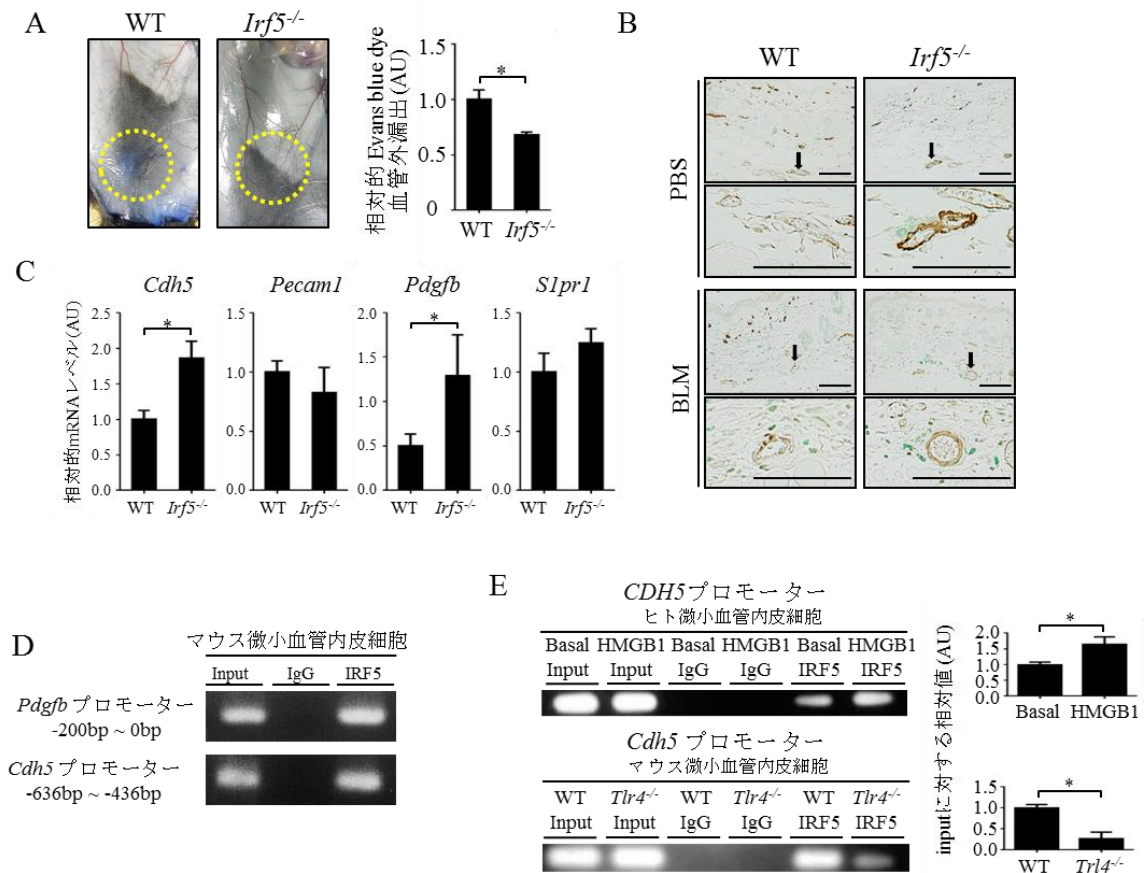


図 10. 血管の安定性に関する検討

(A) 野生型(WT)および *Irf5*^{-/-}マウスを用いたエバンスブルー尾静注による BLM 投与が誘導する血管透過性の亢進に関する検討。右にエバンスブルー色素の漏出をホルムアルドによって溶出させ計測し、比較した(n = 6)。(B) 免疫染色による血管周皮細胞における α -SMA 発現の評価。(C)マウス皮膚から単離した血管内皮細胞における mRNA 発現の比較(n = 5)。(D)マウス皮膚微小血管内皮細胞における抗 IRF5 抗体を用いた免疫沈降法による評価。(E) 上段：無刺激状態あるいは HMGB1 で刺激したヒト微小血管内皮細胞における抗 IRF5 抗体を用いた免疫沈降。下段：WT および *Tlr4*^{-/-}マウスから分離した血管内細胞における抗 IRF5 抗体を用いた免疫沈降。 *: P < 0.05 (two-tailed unpaired t-test)。

10) *Irf5*^{-/-}マウスでは BLM 投与による内皮間葉移行が抑制される

内皮間葉移行は、血管内皮細胞から活性化状態にある線維芽細胞を供給することで、線維化を来す疾患の進行に深く関与しているという報告があり、マウスにおいて BLM はこのプロセスを誘導し、全身性強皮症においてもその関与が想定されている³¹⁻³³。そこで IRF5 の欠損が内皮間葉移行に及ぼす影響についても検討した。*Irf5*^{-/-}マウスの皮膚において、BLM の投与により内皮間葉移行を起こしていると考えられる FSP-1(線維芽細胞のマーカー)および VE-Cadherin(血管内皮細胞のマーカー)を両方発現する細胞(ダブルポジティブ細胞)の誘導が野生型マウスと比較して有意に抑制されていた (図 11)。

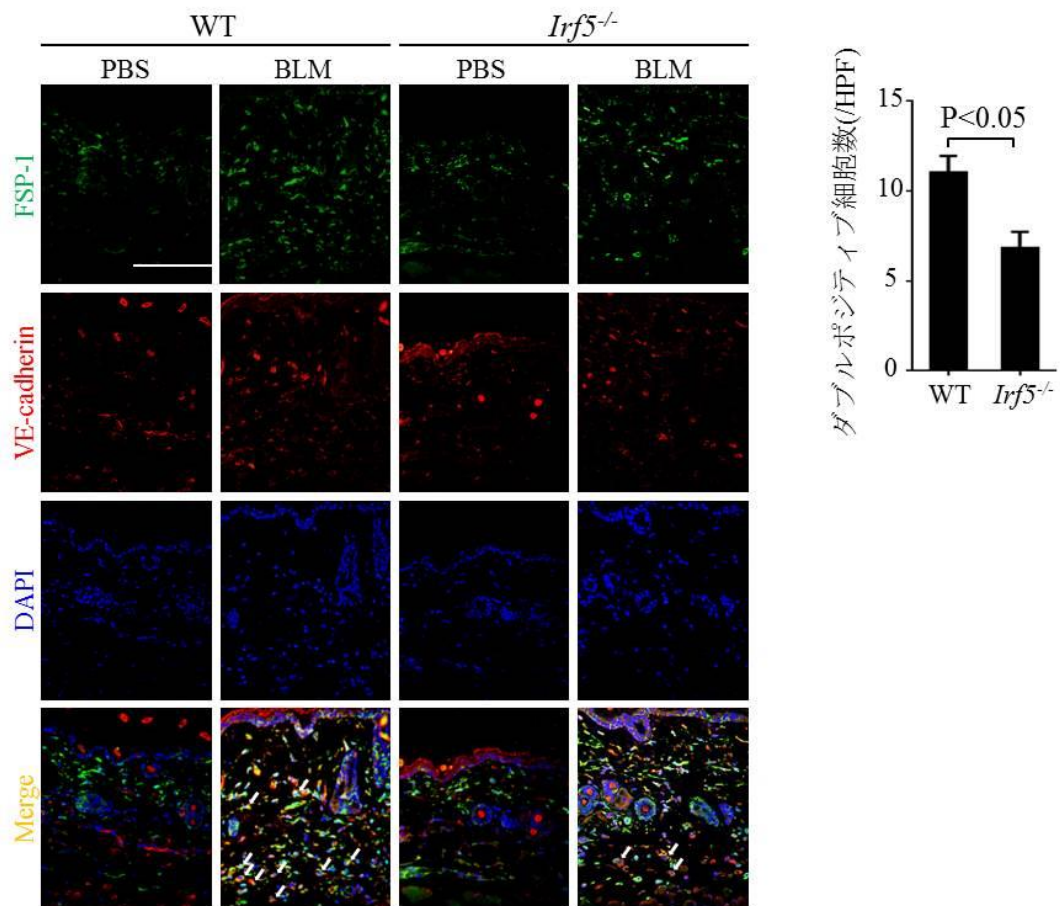


図 11. 内皮間葉移行の評価

PBS および BLM の投与 7 日目の野生型(WT)および IRF5 欠損(*Irf5*^{-/-})マウス皮膚検体を用いて、FSP1(緑)、VE-Cadherin(赤)および DAPI(青)陽性細胞を検出した。矢印：FSP1/VE-cadherin ダブルポジティブ細胞。Bar = 100 μ m (n = 4)

11) 全身性強皮症患者皮膚における *IRF5* の発現はその臨床所見と相関を示す

ここまでのマウスの実験結果をふまえ、全身性強皮症の患者での臨床的特徴と *IRF5* 発現の関連性を評価した。まず、*IRF5* の mRNA の発現は有意に全身性強皮症皮膚で健常人と比較し上昇していた (図 12A)。さらに強皮症皮膚におけるその *IRF5* の発現上昇に寄与する細胞を検討するため蛍光染色を施行したが、皮膚線維芽細胞および内皮細胞において *IRF5* の発現上昇が観察された (図 12B、C)。さらに、その全身性強皮症皮膚で上昇した *IRF5* mRNA レベルは *COL1A1*、*COL1A2* および *CTGF* の mRNA レベルと正の相関を示しており (図 12D)、臨床症状との関連として、皮膚硬化範囲の広いびまん性全身性強皮症では限局性全身性強皮症と比較して、皮膚における *IRF5* mRNA レベルが上昇していた (図 12E)。また、全身性強皮症における血管障害としての手指潰瘍がある群でない群と比較して *IRF5* mRNA レベルが上昇していた (図 12E)。このように、全身性強皮症患者で *IRF5* の発現量と臨床症状に相関が見られ、ここまでのマウスでの検討の結果と矛盾しない結果が得られた。

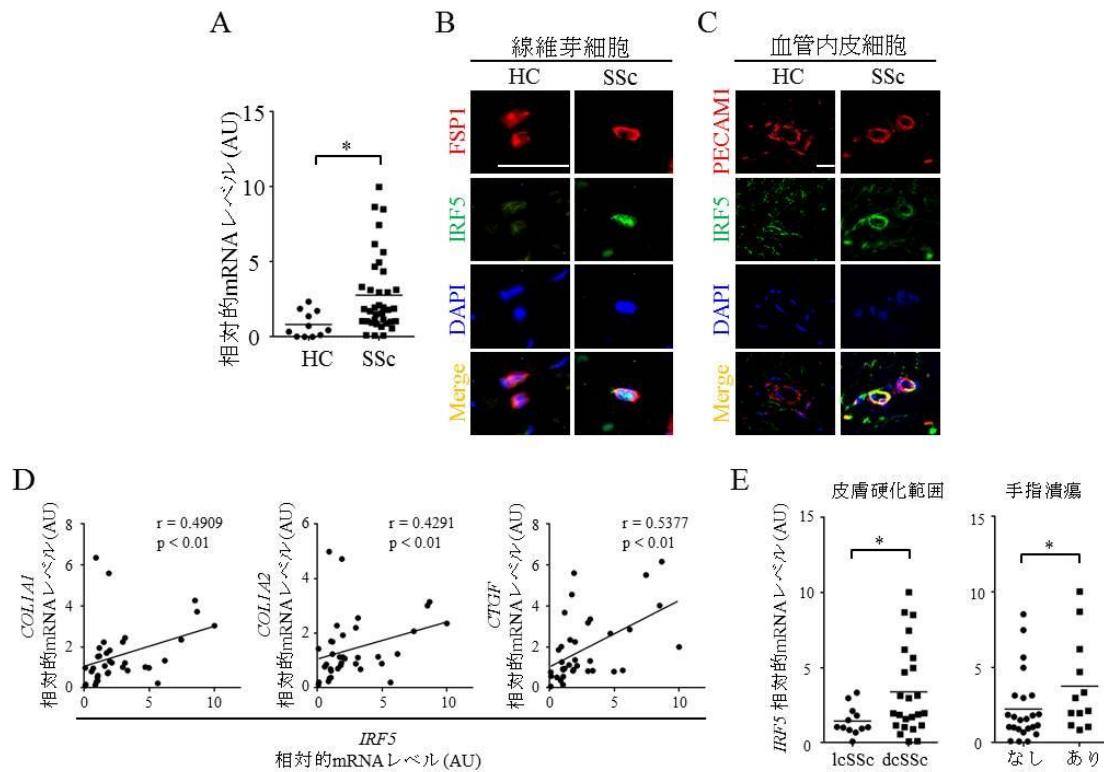


図 12. ヒト皮膚における IRF5 の発現に関する検討

(A) 健常人皮膚(HC)と全身性強皮症(SSc)患者皮膚における IRF5 の mRNA 発現の比較。(B)皮膚線維芽細胞における IRF5 の発現の蛍光染色による評価。FSP1 (赤), IRF5 (緑)および DAPI (青) 陽性細胞を検討した(n = 4)。Bar = 20 μ m。(C) 血管内皮細胞における IRF5 の発現の蛍光染色による評価。PECAM1 (赤)、IRF5 (緑)および DAPI (青) を検討した(n = 4)。Bar = 20 μ m。(D) 強皮症皮膚における、IRF5 の mRNA 発現量と COL1A1、COL1A2、CTGF の mRNA 発現量の相関。(E) 皮膚における IRF5 mRNA レベルの比較。左：びまん皮膚硬化型 SSc (diffuse cutaneous SSc ;dcSSc)と限局皮膚硬化型 SSc(limited cutaneous SSc; lcSSc) 。右：指尖潰瘍(ulcer)の既往の有無による比較。*: P <0.05 (two-tailed unpaired t-test)。

12) 皮膚線維芽細胞において IRF5 自体が向線維化刺激によって活性化する

in vitro の検討では、IRF5 の mRNA レベルは全身性強皮症皮膚線維芽細胞

で健常人皮膚線維芽細胞に比較し上昇しており(図 13A)、COL1A2 mRNA レベ

ルと正の相関があった(図 13B)。さらに、正常皮膚線維芽細胞で、LPS および TGF- β 刺激によって IRF5 の発現が上昇していることが mRNA およびタンパクレベルで確認された(図 13C)。全身性強皮症皮膚線維芽細胞において IRF5 自体が線維化を誘導するような刺激によって活性化されることが示された。

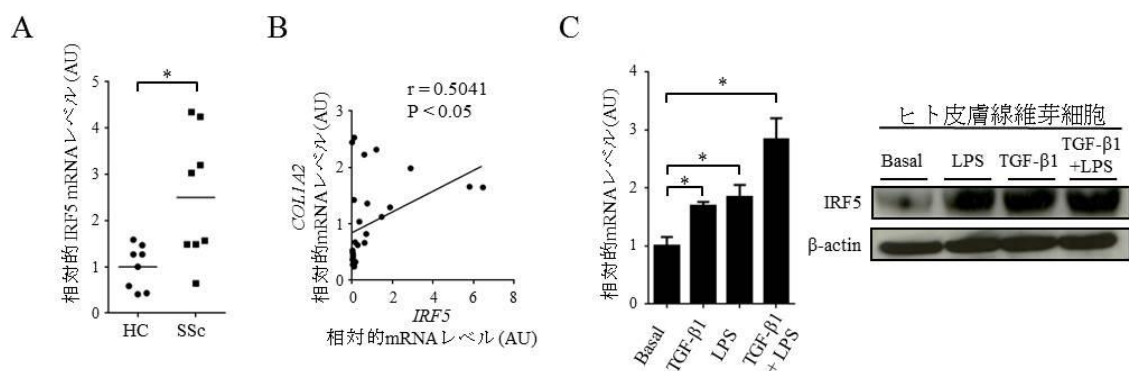


図 13. ヒト線維芽細胞を用いた IRF5 発現に関する検討

(A)健常人(HC)および強皮症患者(SSc)由来の皮膚線維芽細胞における IRF5 mRNA レベルの比較 (n = 8)。(B)ヒト皮膚線維芽細胞における IRF5 mRNA と COL1A2 mRNA レベルの相関。(C) LPS および TGF- β 1 で刺激したヒト皮膚線維芽細胞の mRNA レベルおよびタンパクレベルでの IRF5 発現の比較 (n = 5)。
*: P < 0.05 (two-tailed unpaired t-test)。

13) IRF5 プロモーター領域の SNP は全身性強皮症の皮膚における遺伝子発現と相関を示す

SNP rs4728142 は IRF5 プロモーターに位置し、そのマイナーアレルである 'A' は日本人の 9%に見られる³⁴。rs4728142 'A' アレルと重篤な臨床所見の軽

減の相関が報告されている³⁴。*IRF5* mRNA レベルは GG 遺伝子型を持つ全身性強皮症患者皮膚に比較し AA 遺伝子型を持つ全身性強皮症患者で低下していた(図 14)。同様に *COL1A1*、*COL1A2* 及び *CTGF* mRNA レベルは AA 遺伝子型を持つ全身性強皮症患者皮膚で低下していた(図 14)。さらに、‘A’ アリルを持つ群で、全身性強皮症に合併する重要な予後因子である間質性肺病変が比較的軽症である傾向(呼吸機能検査において%一酸化炭素拡散能が 70%未満である患者割合の低下傾向)がみられた(表 4)。このことから rs4728142 ‘A’ アリルをもつ全身性強皮症患者では、線維化の誘導に関与する分子発現の低下とともに、臨床症状の軽減が見られ、*IRF5* がその過程に深く関与している可能性が示された。

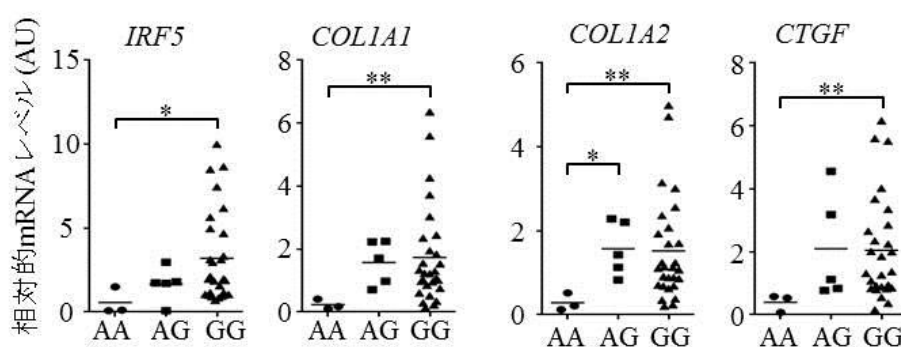


図 14. SNP タイプによる各種 mRNA 発現の比較

AA、AG および GG 遺伝子型を持つ強皮症皮膚での *IRF5*、*COL1A1*、*COL1A2* および *CTGF* mRNA 発現の比較。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ (two-tailed unpaired t-test)。

考察

本研究では **IRF5** が全身性強皮症の病態に果たす役割を、全身性強皮症モデルマウスを用いて示した。**IRF5** は免疫システムの制御因子の一つとして、全身性強皮症を含む免疫異常に関連した様々な疾患において疾患感受性遺伝子として同定されてきた¹⁶。本研究では、*Irf5* の欠損は **BLM** モデルマウスにおいて線維化、血管障害、炎症のいずれも抑制していた (図 15)。さらに、**IRF5** が活性型あるいは抑制型の転写因子として、線維芽細胞・血管内皮細胞・免疫細胞において様々な標的遺伝子のプロモーター領域に作用することで、線維化・血管障害・免疫異常といった全身性強皮症の病態形成メカニズムの様々な側面に関与していることを示し、今回の検討でこれら全身性強皮症の主要 3 病態における多彩な **IRF5** の役割を明らかにした。

- I型コラーゲン ↓ MMP-13 ↑
- 脆いコラーゲン線維の形成

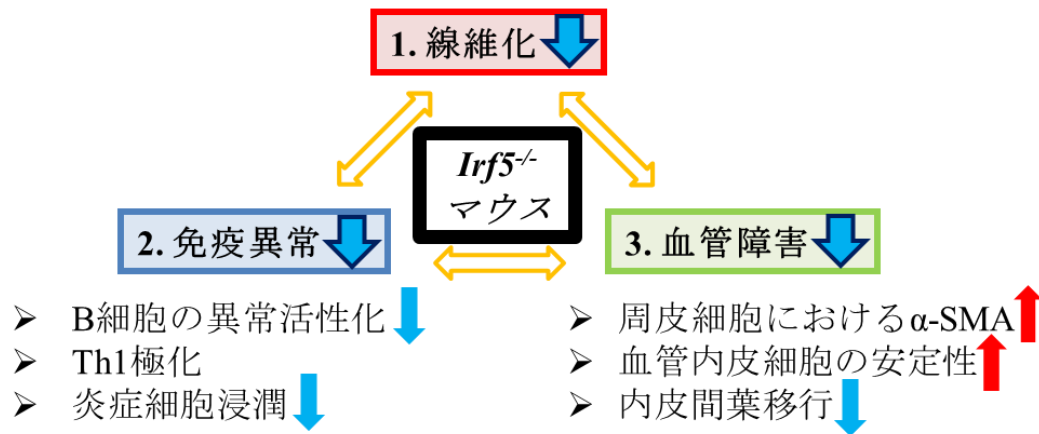


図 15. *Irf5*^{-/-}マウスではブレオマイシン投与による線維化、免疫異常、血管障害が抑制されている：同様のメカニズムで全身性強皮症における IRF5 の発現低下が臨床症状の軽減に寄与している可能性が示唆される。

近年、自然免疫を介した線維芽細胞の活性化が全身性強皮症およびそのマウスモデルで報告されている。全身性強皮症においては、HMGB1、ヒアルロン酸およびフィブロネクチンエクストラドメインといった内因性の TLR4 リガンドの血清中濃度および皮膚での発現が上昇している^{7,8,10,11}。これまでの *in vitro* の実験で、これらのリガンドによって誘導された TLR4 シグナリングが線維芽細胞の活性化に寄与していることが示されている^{7,8}。このシグナルは TGF-β シグナリングも活性化し、実際に TLR4 シグナルの阻害によって線維芽細胞の TGF-β 依存性、非依存性の活性化を抑制する^{7,8}。さらに *Tlr4* 欠損マウスでは BLM

によって誘導された皮膚の線維化は、内因性 TLR4 リガンドが上昇しているにも関わらず著明に抑制されていた⁹。これらのことから TLR4 シグナリングは直接線維芽細胞を活性化することにより皮膚線維化を誘導する可能性が考えられる。本研究で示したように *Irf5*^{-/-}皮膚線維芽細胞は通常の生理的条件下で抗線維化の性質を示した。加えて、特に TGF- β 1 および TLR4 刺激を介して IRF5 は *COL1A2* プロモーター活性を高め、さらにそれらの刺激は線維芽細胞における IRF5 の発現を上昇させた。その結果を支持するように、*Tlr4*^{-/-}マウス皮膚線維芽細胞において IRF5 の *Colla2* プロモーターへの結合が著明に抑制されていた。このことから、皮膚線維芽細胞において少なくとも部分的には IRF5 を介して TLR4 シグナリングによる TGF- β の活性化が誘導されている可能性が示唆された。*Irf5*^{-/-}マウスの皮膚のフェノタイプは全身性強皮症皮膚と組織学的、あるいは超微細構造のレベルにおいて逆のフェノタイプを示しており、また IRF5 は全身性強皮症皮膚線維芽細胞において上方制御されていたことから、IRF5 は全身性強皮症の組織の線維化においてかなり重要な役割を果たしていると考えられる。これは全身性強皮症皮膚において *IRF5* mRNA レベルと *COL1A1*、*COL1A2* および *CTGF* mRNA レベルが強い正の相関を持っていることから裏付けられた。

全身性強皮症の血管障害は、血管を構成する組織の増殖によって引き起こされる増殖性血管障害と血管構造の破壊を引き起こす破壊性血管障害とに分類され、特有の構造的、機能的異常によって規定される²。これらの病態として、血管の安定化の障害と新生血管形成の異常による血管の恒常性の破綻とが挙げられており³⁵、手指の潰瘍や肺高血圧症といった臨床症状を引き起こすと考えられている。全身性強皮症の血管障害は全身性強皮症皮膚においては α -SMA 発現が壁細胞で低下することで血管の不安定化が起き、血管新生を誘導するシグナル経路の活性化に寄与する³⁰。このような血管障害、血管の不安定化は BLM モデルでも誘導されるが、*Irf5*^{-/-}マウスでは α -SMA 発現が上昇しており BLM 投与後も皮膚血管の安定性が維持されていた。このことは IRF5 が血管の安定と血管新生促進のバランスを一部規定していることを示唆する。合致するように IRF5 は重要な分子である VE-cadherin と PDGF-B をそれぞれコードする *CDH5* と *PDGFB* 遺伝子プロモーターに結合し血管の安定性と血管新生を制御している可能性が実験で示された。さらに、血管の活性化と線維化を関連付けるものとして内皮間葉移行が全身性強皮症およびそのマウスモデルで重要である^{36,37}が、IRF5 が欠損することで BLM を投与した皮膚において血管周囲の領域にお

ける FSP1 と VE-cadherin のダブルポジティブ細胞の増加が抑制されたことから、IRF5 は内皮間葉移行の重要な制御因子として作用している可能性が示された。

また、TLR4 の活性化によって *CDH5* プロモーターへの IRF5 の結合が増強していた。TLR4 とその内因性リガンドは線維化と同様に血管新生においても重要であると報告されており^{38,39}、本研究は IRF5 が TLR4 を介した血管新生において果たす役割を新しく見出し、TLR4-IRF5 軸が全身性強皮症に特徴的な血管障害を制御している可能性が示唆された。

CD4 陽性 T 細胞の浸潤は細胞接着因子によって規定されているが、全身性強皮症とそのマウスモデルにおいてそのプロセスが注目されている^{29,36}。細胞接着因子を欠損したマウスの検討によって ICAM-1 と GlyCAM-1 は BLM の投与による Th2/Th17 細胞やマクロファージおよびマスト細胞の浸潤による線維化を促進し、P-selectin と E-selectin は Th1 細胞の浸潤を誘導し線維化を抑制することが示されている²⁹。また、発症早期のびまん皮膚硬化型全身性強皮症においては ICAM-1 や GlyCAM-1 といった線維化を誘導する細胞接着因子が相対的に発現上昇している³⁶。今回、IRF5 を欠損させることで線維化を誘導する細胞接着因子の相対的発現低下が起こり、マクロファージやマスト細胞の浸潤を抑制

し Th1 優位のサイトカインバランスを誘導していた。このことは、IRF5 が線維化を促進するような炎症の誘導に寄与していることを示唆する。加えて、BLM を投与した *Irf5*^{-/-}マウスにおいて Th1 分極が誘導されていたことは、IRF5 が *Tbet* プロモーターに直接作用していることによって引き起こされている可能性が考えられた。このことは、IRF5 が Th1 細胞の局所への誘導だけでなく、直接的に CD4 陽性 T 細胞において Th1 細胞の誘導に寄与していることを示した。また、*Tbet* プロモーターへの IRF5 の結合は *Tlr4*^{-/-}CD4 陽性 T 細胞で抑制されており、TLR4-IRF5 軸の活性化が Th1 細胞の分化抑制を介して全身性強皮症に特徴的な Th2/Th17 分極²を誘導している可能性も考えられた。ただし、これまで全身性強皮症に先んじて IRF5 多型との関連が報告、検討されてきた全身性エリテマトーデスでも、IRF5 は重要な役割を果たしていると考えられているが、興味深いことにそのマウスモデルでは IRF5 欠損によって Th2 分極が亢進すると報告されており^{40,41}、本論文の検討結果とは相反している。全身性強皮症と全身性エリテマトーデスには抗核抗体の産生など共通する部分もあるが病態は大きく異なり、さらに全身性エリテマトーデスあるいはそのモデルマウスでは TLR7 や TLR9 などの病態への関与が指摘され分子メカニズムにも大きな違いがあることが想定

される。IRF5はその病態の違いにどのように関与しうるかは更なる検討課題の一つと考えられる。

B細胞の活性化は全身性強皮症の免疫異常において重要な役割を果たしている⁴²。線維芽細胞、血管内皮細胞およびT細胞と同様に、IRF5の欠損はCD19の下方制御やIL-6分泌の低下といった全身性強皮症と逆のB細胞のフェノタイプへの変化を誘導した。全身性強皮症ではB細胞上のCD19の発現が上昇しB細胞の異常な活性化状態に寄与しているが、その上昇は10~20%程度であり、わずかな発現変化でも病態形成に関与している可能性がある⁴¹。さらに、IRF5はマウスB細胞において*Il6*プロモーターに作用し、そのプロモーターへの結合は*Tlr4*欠損B細胞において減少し、TLR4の活性化により増加した。それゆえ、TLR4-IRF5軸はB細胞の活性化にも直接寄与している可能性が考えられた。また、B細胞の組織への浸潤が抑制されたのと同時に、IL-6の発現はBLMを投与した*Irf5*^{-/-}マウスの組織で低下していたが、IL-6が筋線維芽細胞の分化を誘導しコラーゲン合成を促進し、Th2/Th17細胞の分化を促進しTh1分極を抑制することがこれまで報告されており^{43,44}、IL-6産生の抑制はBLM投与した*Irf5*^{-/-}マウスにおける線維化の抑制に大きく寄与している可能性が考えられた。ただ

し、近年 *Irf5*^{-/-}マウスで *Dock2* 遺伝子のフレームシフト変異が生じ、特に B 細胞の機能異常などに大きく寄与していると新たに報告されている⁴⁵ ため、今回の *Irf5*^{-/-}マウスから得られた、特に B 細胞に関する知見などは *Dock2* の発現異常によって生じている可能性は否定できず、今後の検討が必要であると考えられる。

マウスの実験結果を考察すると、全身性強皮症において *IRF5* の発現が上方制御されていることが主要 3 病態の形成に寄与していると想定された。ヒトにおける検討では、*IRF5* 発現は全身性強皮症患者皮膚の線維芽細胞及び血管内皮細胞において発現上昇しており、さらに *IRF5* mRNA レベルは全身性強皮症の皮膚線維芽細胞において *COL1A1*、*COL1A2* および *CTGF* mRNA レベルと正の相関があった。加えて rs4728142 ‘A’ アリルが *IRF5* 発現の低下と臨床症状の軽減と関連しているというこれまでの報告と矛盾せず、AA 遺伝子型を持つ全身性強皮症皮膚線維芽細胞は GG 遺伝子型を持つものに比べ *COL1A1*、*COL1A2* および *CTGF* mRNA レベルが有意に低下していた。また、全身性強皮症における血管障害における *IRF5* の関与を反映するように、指尖部潰瘍が過去にあった群あるいは現在ある群では皮膚における *IRF5* mRNA レベルがそうでない群に比べ上昇していた。全身性強皮症は疾患特異的なフェノタイプを持つ線維芽細胞、

血管内皮細胞、免疫細胞の複合的な相互作用によって病態が規定されているが、**IRF5** の発現低下によるそれぞれの細胞の全身性強皮症様のフェノタイプの抑制が全身性強皮症の臨床所見の軽減につながっている可能性が考えられる。このように本研究はこれまでに報告されていた **rs4728142** ‘A’アレルと全身性強皮症の臨床症状の軽減との関連を説明しうる分子的メカニズムを示した。

最後に、今回様々な細胞において **TLR4** を介した **IRF5** の活性化が全身性強皮症の病態形成に重要である可能性が示されたが、その活性化に至る詳細な分子メカニズムに関しては未だ検討できおらず、今後 **IRF5** あるいは **TLR4** が新たな治療標的となりうるためにはその分子メカニズムの解明は必須と考えられ、今後の大きな検討課題であると考えられた。

まとめ

今回 IRF5 が様々な細胞のターゲット遺伝子を直接的に転写制御することで全身性強皮症の主要 3 病態に関与していることを示した。これまでに IRF5 は様々な免疫関連および炎症性分子の転写活性化因子として知られているが¹⁹、他の一部の IRF で報告されている²⁰ ような、活性化・抑制性の両方の性質を持ち機能するという報告はなされていない。本研究では抑制性の因子として IRF5 が *Tbet* 遺伝子に作用していることを明らかにした点でも重要な検討であったと考えられる。さらに、*Irf5* の欠損が皮膚線維芽細胞において *Mmp13* 遺伝子発現を、血管内皮細胞において *Cdh5* 遺伝子発現を上昇させ IRF5 が免疫細胞だけでなく様々な細胞で転写抑制因子として機能している可能性を示唆した。今後このような IRF5 の抑制的な機能のメカニズムを更に検討することは必要であると考えられる。また、TLR4-IRF5 軸を介した自然免疫シグナリングは様々な細胞において全身性強皮症様のフェノタイプを誘導しており、環境因子と内因性リガンドが全身性強皮症の発症と維持に果たす役割をさらに理解する鍵となる可能性がある。最後に、本研究はこれらの分子を新たな標的とする治療の可能性を示した。

謝辞

大学院で学ぶ機会を与えて下さり、終始懇切な御指導御鞭撻を賜りました東京大学医学部皮膚科学教室、佐藤伸一教授に深謝致します。また、本研究の共同研究者として御指導御協力頂いた東京大学医学部皮膚科学教室、浅野善英准教授に深謝いたします。さらに、マウス皮膚の電子顕微鏡による観察に御指導御協力いただいた大阪市立大学大学院医学研究科皮膚病態学、鶴田大輔教授に深謝いたします。最後に、*Irf5*^{-/-}マウスおよび **IRF5A** をご供与いただいた東京大学生産技術研究所、谷口維紹特任教授に深謝いたします。

文献

1. Asano, Y. Future treatments in systemic sclerosis. *J Dermatol* 2010;37:54-70.
2. Asano Y, Sato S: Vasculopathy in scleroderma. *Semin Immunopathol* 2015
3. Broen JC, Radstake TR, Rossato M: The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:671-681.
4. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD: Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001;44:1359-1362.
5. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Wright TM: Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48:1956-1963.
6. Broen JC, Radstake TR, Rossato M: The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:671-681.
7. Bhattacharyya S, Kelley K, Melichian DS, Tamaki Z, Fang F, Su Y, Feng G, Pope RM, Budinger GR, Mutlu GM, Lafyatis R, Radstake T, Feghali-Bostwick C, Varga J: Toll-Like Receptor 4 Signaling Augments Transforming Growth Factor- β Responses: A

Novel Mechanism for Maintaining and Amplifying Fibrosis in Scleroderma. *Am J Pathol* 2013;182:192-205.

8. Bhattacharyya S, Tamaki Z, Wang W, Hinchcliff M, Hoover P, Getsios S, White ES, Varga J: FibronectinEDA promotes chronic cutaneous fibrosis through Toll-like receptor signaling. *Sci Transl Med* 2014;6:232ra250.

9. Takahashi T, Asano Y, Ichimura Y, Toyama T, Taniguchi T, Noda S, Akamata K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S: Amelioration of tissue fibrosis by toll-like receptor 4 knockout in murine models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:254-265.

10. Yoshizaki A, Komura K, Iwata Y, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Clinical significance of serum HMGB-1 and sRAGE levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J Clin Immunol* 2009;29:180-189.

11. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Hara T, Ogawa F, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Clinical significance of serum hyaluronan levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *The Journal of rheumatology* 2008;35:1825-1829.

12. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Fajardy I, Diot E, Granel B, Sibilia J, Cabane J, Mouthon L, Cracowski JL, Carpentier PH, Hachulla E, Meyer O, Kahan A, Boileau C, Allanore Y: Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009;60:225-233.
13. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Hikami K, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N: Association of a functional polymorphism in the IRF5 region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2009;60:1845-1850.
14. Dieude P, Dawidowicz K, Guedj M, Legrain Y, Wipff J, Hachulla E, Diot E, Sibilia J, Mouthon L, Cabane J, Amoura Z, Cracowski JL, Carpentier P, Avouac J, Meyer O, Kahan A, Boileau C, Allanore Y: Phenotype-haplotype correlation of IRF5 in systemic sclerosis: role of 2 haplotypes in disease severity. *J Rheumatol* 2010;37:987-992.
15. Radstake TR, Gorlova O, Rueda B, Martin JE, Alizadeh BZ, Palomino-Morales R, Coenen MJ, Vonk MC, Voskuyl AE, Schuerwegh AJ, Broen JC, van Riel PL, van 't Slot R, Italiaander A, Ophoff RA, Riemekasten G, Hunzelmann N, Simeon CP,

Ortego-Centeno N, González-Gay MA, González-Escribano MF, Airo P, van Laar J, Herrick A, Worthington J, Hesselstrand R, Smith V, de Keyser F, Houssiau F, Chee MM, Madhok R, Shiels P, Westhovens R, Kreuter A, Kiener H, de Baere E, Witte T, Padykov L, Klareskog L, Beretta L, Scorza R, Lie BA, Hoffmann-Vold AM, Carreira P, Varga J, Hinchcliff M, Gregersen PK, Lee AT, Ying J, Han Y, Weng SF, Amos CI, Wigley FM, Hummers L, Nelson JL, Agarwal SK, Assassi S, Gourh P, Tan FK, Koeleman BP, Arnett FC, Martin J, Mayes MD, Group SS: Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat Genet* 2010;42:426-429.

16. Tang L, Chen B, Ma B, Nie S: Association between IRF5 polymorphisms and autoimmune diseases: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2014;13:4473-4485.

17. Allanore Y, Saad M, Dieudé P, Avouac J, Distler JH, Amouyel P, Matucci-Cerinic M, Riemekasten G, Airo P, Melchers I, Hachulla E, Cusi D, Wichmann HE, Wipff J, Lambert JC, Hunzelmann N, Tiev K, Caramaschi P, Diot E, Kowal-Bielecka O, Valentini G, Mouthon L, Czirják L, Damjanov N, Salvi E, Conti C, Müller M, Müller-Ladner U, Riccieri V, Ruiz B, Cracowski JL, Letenneur L, Dupuy AM, Meyer O, Kahan A, Munnich A, Boileau C, Martinez M: Genome-wide scan identifies TNIP1,

PSORS1C1, and RHOB as novel risk loci for systemic sclerosis. *PLoS Genet* 2011;7:e1002091.

18. Honda K, Taniguchi T: IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006;6:644-658.

19. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW, Taniguchi T: Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005;434:243-249.

20. Negishi H, Yanai H, Nakajima A, Koshiba R, Atarashi K, Matsuda A, Matsuki K, Miki S, Doi T, Aderem A, Nishio J, Smale ST, Honda K, Taniguchi T: Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat Immunol* 2012;13:659-666.

21. Noda S, Asano Y, Nishimura S, Taniguchi T, Fujiu K, Manabe I, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Akamata K, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Tsuruta D, Trojanowska M, Nagai R, Sato S: Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun* 2014;5:5797.

22. Rimar D, Rosner I, Nov Y, Slobodin G, Rozenbaum M, Halasz K, Haj T, Jiries N,

Kaly L, Boulman N, Daood R, Vadasz Z: Brief report: lysyl oxidase is a potential biomarker of fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:726-730.

23. Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ: The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol* 2013;93:865-873.

24. O'Reilly S, Hugel T, van Laar JM: T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:1540-1549.

25. Takahashi T, Asano Y, Ichimura Y, Toyama T, Taniguchi T, Noda S, Akamata K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S: Amelioration of Tissue Fibrosis by Toll-like Receptor 4 Knockout in Murine Models of Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:254-265.

26. Reynolds JM, Martinez GJ, Chung Y, Dong C: Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:13064-13069.

27. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, Fan B, O'Connor RA, Anderton SM, Bar-Or A, Fillatreau S, Gray D: B cell depletion therapy ameliorates

autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 2012;209:1001-1010.

28. Khan K, Xu S, Nihtyanova S, Derrett-Smith E, Abraham D, Denton CP, Ong VH: Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1235-1242.

29. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S: Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J Immunol* 2010;185:2502-2515.

30. Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M: Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol* 2010;176:1983-1998.

31. Trojanowska M: Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:453-460.

32. Xu H, Zaidi M, Struve J, Jones DW, Krolikowski JG, Nandedkar S, Lohr NL, Gadicherla A, Pagel PS, Csuka ME, Pritchard KA, Weihrauch D: Abnormal fibrillin-1

expression and chronic oxidative stress mediate endothelial mesenchymal transition in a murine model of systemic sclerosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300:C550-556.

33. Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Trojanowska M, Sato S: Fli1 haploinsufficiency induces fibrosis, vascular activation and immune abnormalities resembling systemic sclerosis in bleomycin-treated mice. *Arthritis Rheumatol* 2014

34. Sharif R, Mayes MD, Tan FK, Gorlova OY, Hummers LK, Shah AA, Furst DE, Khanna D, Martin J, Bossini-Castillo L, Gonzalez EB, Ying J, Draeger HT, Agarwal SK, Reveille JD, Arnett FC, Wigley FM, Assassi S: IRF5 polymorphism predicts prognosis in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1197-1202.

35. Maurer B, Reich N, Juengel A, Kriegsmann J, Gay RE, Schett G, Michel BA, Gay S, Distler JH, Distler O: Fra-2 transgenic mice as a novel model of pulmonary hypertension associated with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1382-1387.

36. Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Trojanowska M, Sato S: Fibrosis, vascular activation, and immune abnormalities resembling systemic sclerosis in bleomycin-treated fli-1-haploinsufficient mice.

Arthritis Rheumatol 2015;67:517-526.

37. Jimenez SA: Role of endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of the vascular alterations in systemic sclerosis. *ISRN Rheumatol* 2013;2013:835948.

38. Murad S: Toll-like receptor 4 in inflammation and angiogenesis: a double-edged sword. *Front Immunol* 2014;5:313.

39. Yang S, Xu L, Yang T, Wang F: High-mobility group box-1 and its role in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2014;95:563-574.

40. Xu Y, Lee PY, Li Y, Liu C, Zhuang H, Han S, Nacionales DC, Weinstein J, Mathews CE, Moldawer LL, Li SW, Satoh M, Yang LJ, Reeves WH: Pleiotropic IFN-dependent and -independent effects of IRF5 on the pathogenesis of experimental lupus. *J Immunol* 2012;188:4113-4121.

41. Feng, D., Yang, L., Bi, X., Stone, R.C., Patel, P., and Barnes, B.J. (2012). Irf5-deficient mice are protected from pristane-induced lupus via increased Th2 cytokines and altered IgG class switching. *Eur J Immunol* 42, 1477-1487.

42. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF: Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol*

2004;41:1123-1133.

43. O'Reilly S, Cant R, Ciechomska M, van Laar JM: Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis? *Clin Transl Immunology* 2013;2:e4.

44. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA: Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 1997;185:461-469.

45. Purtha WE, Swiecki M, Colonna M, Diamond MS, Bhattacharya D: Spontaneous mutation of the Dock2 gene in Irf5^{-/-} mice complicates interpretation of type I interferon production and antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E898-904.

表 1. 略語一覧

α -SMA	α -smooth muscle actin
ISRE	IFN-stimulated response element
BLM	bleomycin
CTGF	connective tissue growth factor
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSP1	fibroblast specific protein 1
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HC	Healthy control
IFN- γ	interferon- γ
IRF5	Interferon regulatory factor 5
LPS	lipopolysaccharide
MMP13	matrix metaroproteinase 13
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
SSc	Systemic Sclerosis
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
TLR4	toll-like receptor 4

表 2. 使用したプライマー

遺伝子	Forward 配列	Reverse 配列
<i>Colla1</i>	5' -GCCAAGAAGACATCCCTGAAG- 3'	5' -TGTGGCAGATACAGATCAAGC- 3'
<i>Colla2</i>	5' -CACCCCAGCGAAGAACTCATA- 3'	5' -GCCACCATTGATAGTCTCTCC- 3'
<i>Mmp13</i>	5' -TGGACCTTCTGGTCTTCTGG- 3'	5' -TCATGGGCAGCAACAATAAA- 3'
<i>Adamts2</i>	5' -AGTGGGCCTGAAGAAGTG- 3'	5' -CAGAAGGCTCGGTGTACCAT- 3'
<i>Bmp1</i>	5' -AGCAGGCTGCAGTTCTCAGACAGC- 3'	5' -GAATGTGTTCCGGGCATAGTGCAT- 3'
<i>Lox</i>	5' -CAGGCTGCACAATTTACC- 3'	5' -CAAACACCAGGTACGGCTTT- 3'
<i>Dcn</i>	5' -TGAGCTTCAACAGCATCACC- 3'	5' -AAGTCATTTGCCCAACTGC- 3'
<i>Fmod</i>	5' -CAATGTCTACACCGTCCCTGA- 3'	5' -AGAAGGCTGTGGAGTTGAAG- 3'
<i>Lum</i>	5' -AGATGCTTGATCTTGGAGTAAGACAGT- 3'	5' -CAATGAACTGAAAAGTTTGATGTGAA- 3'

<i>Selp</i>	5' -TCCAGGAAGCTCTGACGTACTTG- 3'	5' -GCAGCGTTAGTGAAGACTCCGTAT- 3'
<i>Sele</i>	5' -TGAAGTGAAGGGATCAAGAAGACT- 3'	5' -GCCGAGGGACATCATCACAT- 3'
<i>Icam1</i>	5' -GACGCAGAGGACCTTAACAG- 3'	5' -GACGCCGCTCAGAAGAAC- 3'
<i>Glycam1</i>	5' -GACGCAGAGGACCTTAACAG- 3'	5' -GACGCCGCTCAGAAGAAC- 3'
<i>Il4</i>	5' -CAACGAAGAACACCACAGAG- 3'	5' -GGACTTGGACTCATTCATGG- 3'
<i>Il6</i>	5' -GATGGATGCTACCAAAGTGGAT- 3'	5' -CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA- 3'
<i>Ifng</i>	5' -TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA- 3'	5' -TGGCTCTGCAGGATTTTCATG- 3'
<i>Cdh5</i>	5' -GTTCAAGTTTGCCCTGAAGAA- 3'	5' -GTGATGTTGGCGGTGTTGT- 3'
<i>Pecam1</i>	5' -CGGTGTTTCAGCGAGATCC- 3'	5' -CGACAGGATGGAATCACA- 3'
<i>Pdgfb</i>	5' -CGGCCTGTGACTAGAAGTCC- 3'	5' -GAGCTTGAGGCGTCTTGG- 3'
<i>Slpr1</i>	5' -CGGTGTAGACCCAGAGTCTC- 3'	5' -AGCTTTTCCTTGGCTGGAG- 3'
<i>Gapdh</i>	5' -CGTGTTCCTACCCCAATGT- 3'	5' -TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT- 3'
<i>IRF5</i>	5' -GCCTTGTTATTGCATGCCAGC- 3'	5' -AGACCAAGCTTTTCAGCCTGG- 3'
<i>COL1A1</i>	5' -CCAGAAGAAGCTGGTACATCAGCA- 3'	5' -CGCCATACTCGAACTGGGAAT- 3'
<i>COL1A2</i>	5' -GATGTTGAACTTGTGCTGAGG- 3'	5' -TCTTTCCCATTCATTTGTCTT- 3'
<i>CTGF</i>	5' -TTGCGAAGCTGACCTGGAAGAGAA- 3'	5' -AGCTCGGTATGTCTTCATGCTGGT- 3'
<i>GAPDH</i>	5' -ACCCACTCCTCCACCTTTGA- 3'	5' -CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA- 3'

表 3. プロモーターアッセイ(免疫沈降法)で用いたプライマー配列

遺伝子	Forward 配列	Reverse 配列
<i>Colla1</i>	5' -TCCCTCAGCTACCAAACACA- 3'	5' -TGCAGAATGAACAGGTAGAAGG- 3'
<i>Colla2</i>	5' -GCTGTGGAAGGGGTCATAAA- 3'	5' -CCCTCCTCCATCCTCTCTCT- 3'
<i>Mmp13</i>	5' -TTCTGAGGCCTTCAAGGAAA- 3'	5' -ATAGTGGGGAGAAGCAGCAG- 3'
<i>Tbet</i>	5' -AGGCGTGAGAATGCTCAGAT- 3'	5' -CCCCAATCTGGGAAAGAGTC- 3'
<i>Il6</i>	5' -TTTCAGCCTGGAATCATTCTG- 3'	5' -TAACCCCTCCAATGCTCAAG- 3'
<i>Cdh5</i>	5' -AGCCCATCACCCAGTATTTG- 3'	5' -GCAGCTGAGAAACGTGACAG- 3'
<i>Pdgfb</i>	5' -CTGAAGGGTGGCAACTTCTC- 3'	5' -GGCTCGGGTCAGTCTGTCTA- 3'
<i>COL1A1</i>	5' -CAATGACCGGGATTTTCAAG- 3'	5' -AAAGCCCCTTCTCCAGTTGT- 3'
<i>COL1A2</i>	5' -CAGAAGCTGCTGATGGAGTT- 3'	5' -GGGGCCTAGTTAGAGTGCT- 3'
<i>MMP1</i>	5' -GCACCAAGGAGCGAAGATAG- 3'	5' -GAGAAGACCCCTCATCCACA- 3'
<i>PDGFB</i>	5' -GACGGGAAGATCATGTTGGT- 3'	5' -AACCTGGAGATGGGGCTATT- 3'
<i>CDH5</i>	5' -ACCTGCCTGAGACAGAGGAA- 3'	5' -CCTGGGAATCTGTCTTTGA- 3'

表 4. SNP rs4728142 のアリルタイプによる臨床所見の比較

	GG 遺伝子型 N = 28	GA、AA 遺伝子型 N=8 (3)	P 値
間質性肺病変	16	4 (1)	1.0
%VC <80%	7	1 (0)	0.65
%DLco <70%	10	0 (0)	0.076

%VC: %肺活量、%DLco:%一酸化炭素拡散能、括弧内は AA 遺伝子型を持つ患者数。