

博士論文

論文題目

ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスならびに  
血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの病態に対し  
グリチルリチンが及ぼす影響についての検討

氏名 山下尚志

ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスならびに  
血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの病態に対し  
グリチルリチンが及ぼす影響についての検討

所属：医学系研究科外科学専攻

指導教員：佐藤 伸一

申請者名：山下 尚志

## 目次

1)	要旨.....	5
2)	序文.....	6
3)	研究方法 .....	10
1)	動物	
2)	細胞培養	
3)	コラーゲンの定量	
4)	病理学的、免疫組織学的検討	
5)	RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR	
6)	免疫ブロッティング	
7)	蛍光二重染色	
8)	細胞内染色	
9)	皮膚血管の描出	
10)	皮膚血管透過性の検討	
11)	統計解析	

4)	結果.....	16
1)	グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚線維化を抑制する	
2)	グリチルリチンは皮膚線維芽細胞における TGF- $\beta$ の活性化を抑制する	
3)	グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスの Th2 優位の免疫環境を改善し、皮膚における M2 マクロファージの浸潤を抑制する	
4)	グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスの血管内皮間葉移行を抑制し、血管の安定性も回復させる	
5)	グリチルリチンは全身性強皮症血管障害を模した血管内皮細胞特異的 <i>Fli1</i> 欠失マウスの血管障害を改善する	
5)	考察.....	44
6)	まとめ.....	51
7)	謝辞.....	53
8)	文献.....	54
8)	表.....	62

## 要旨

本研究では全身性強皮症の病態に対するグリチルリチンの影響について検討を加えた。ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスにおいてグリチルリチンは皮膚線維化を抑制した。機序としてグリチルリチンが皮膚線維芽細胞におけるTGF- $\beta$ の活性化を抑制していることが判明した。またTh2優位の免疫環境の改善と血管内皮間葉移行を抑制することも明らかになった。さらに血管内皮細胞特異的*Fli1*欠失マウスにおいて強皮症類似の血管障害を改善した。本研究により、グリチルリチンが全身性強皮症の病態において、線維化及び血管障害の改善に有益であり、新しい治療薬となる可能性があることが示された。

## 序文

全身性強皮症は血管障害と各種臓器の線維化を特徴とする原因不明の自己免疫疾患である<sup>1</sup> (図 1)。その発症のメカニズムについての詳細は未だ明らかになっておらず、いくつかの薬剤が病態改善薬として用いられているが、効果は限定的であり単剤での根治的治療薬は見出されていない。そのような状態の中、種々の薬剤を組み合わせながら全身性強皮症の治療が行われているが、病態が悪化する前に早期治療介入することが昨今の課題の一つである<sup>2</sup>。一方、グリチルリチンは甘草の主成分であり漢方薬として古来用いられてきた。西洋医学では蕁麻疹・皮膚癢痒症といった皮膚科領域の治療薬としての他に、肝硬変や肝炎等の慢性肝疾患の治療薬としても広く用いられている薬剤である。その効果は疾患モデル動物からも検討されており、グリチルリチンとその代謝産物は TGF- $\beta$ シグナリングやその他の線維化経路を抑制することにより、肝硬変や肺線維症の動物モデルの線維化病態を改善することが報告されている<sup>3,4</sup>。他には血管内皮細胞の遊走能や増殖能の亢進といった血管新生異常を改善する効果や<sup>5</sup>、モノクロタリン誘発肺高血圧モデルラットにおいて肺高血圧や血管リモデリングの改善をもたらすことが示されている<sup>6</sup>。更にはグリチルリチンとその代謝産

物は喘息やくも膜下出血の疾患モデルマウスにおいて、Th2 優位な免疫環境を抑制することが報告されている<sup>7-10</sup>。

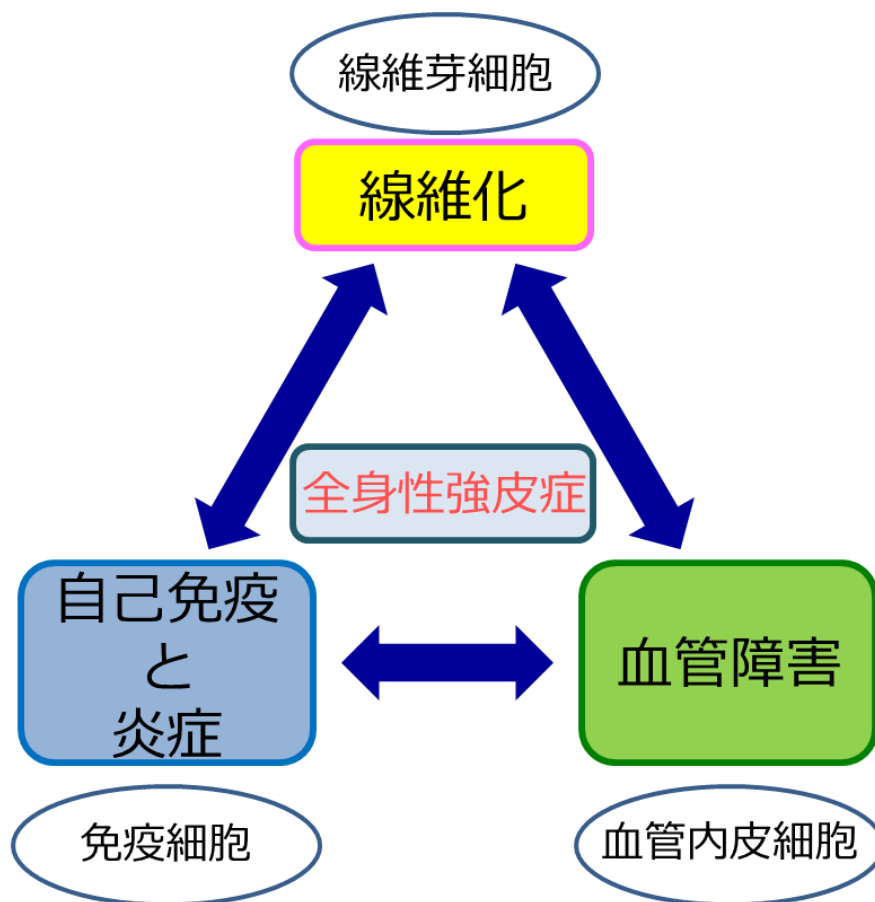


図1 全身性強皮症の病態:全身性強皮症は線維芽細胞の異常による組織の線維化、血管内皮細胞の異常による血管障害、免疫細胞の異常による自己免疫異常と炎症が互いに関連しあって病態を形成している慢性疾患である。

これまでにグリチルリチンとその代謝産物の効果が認められている、線維化、免疫環境異常、血管障害の病態異常は全身性強皮症の病態における主要 3 徴候と合致しており、グリチルリチンとその代謝産物が全身性強皮症の病態に対し改善を促す効果が期待できる。このような背景から本研究ではグリチルリチンを全身性強皮症モデルマウスへ投与を行い、その効果の有無を検討することとした。モデルマウスには線維化、免疫環境異常、血管障害を再現するブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症モデルマウス<sup>11,12</sup>を用いることにした。しかしながら、このマウスは線維化や免疫環境異常については全身性強皮症類似の病態を作り出すものの、血管障害については全身性強皮症の病態を忠実には再現しない (図 2 左)。そこで本研究においては全身性強皮症類似の血管障害をきたすモデルマウスも用いることによりグリチルリチンの効果を検討することとした。

転写因子 Friend leukemia integration 1 (Fli1) は E26 transformation-specific (ETS) 転写因子ファミリーの一つであるが、全身性強皮症患者の線維芽細胞、血管内皮細胞において低下しており、全身性強皮症の病態にその発現低下が重要な役割を担っていることが示唆されている<sup>13</sup>。特に血管内皮細胞における Fli1 の発現は重要であり、*Fli1* 完全欠失マウスが脈管系の発生過程において脈管形成か



ら血管新生に移行する胎生 11.5 日で致死的な出血を呈する事実はそれを裏付けている<sup>14</sup>。更に *Fli1* は血管新生を制御する遺伝子 network のトップにあるとの報告<sup>15</sup>もあり、全身性強皮症の血管障害において *Fli1* の発現低下が重要な意義を持っていると推察される。そのような見地の元作成した血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1* ECKO マウス) は皮膚微小血管における構造の異常と安定性の低下といった全身性強皮症類似の血管障害を呈することが判明している<sup>16</sup>。

以上のことから本研究では、BLM 誘発強皮症モデルマウスと *Fli1* ECKO マウスを用いることで (図 2 右)、全身性強皮症類似の線維化、免疫環境異常、血管障害を再現し、グリチルリチンがその病態に及ぼす影響についての総合的な検討を行った。

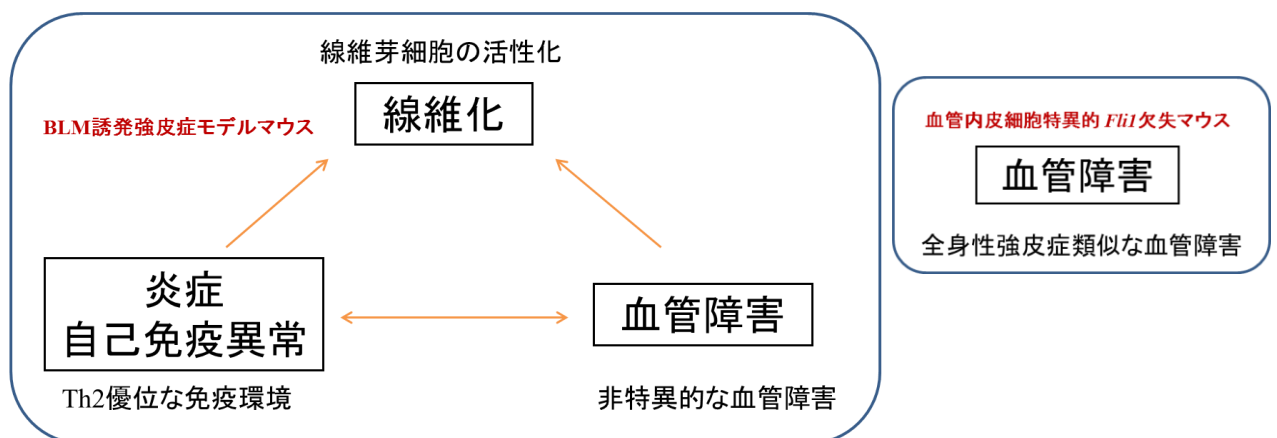


図 2 全身性強皮症モデルマウス : BLM 誘発強皮症モデルマウスは全身性強皮症の 3 主徴を再現するが、血管障害については非特異的な障害を呈す(左)。血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスは全身性強皮症類似の血管障害を呈す(右)。

## 研究方法

### 1) 倫理

本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、患者検体についてはインフォームド・コンセントを得て使用した。また動物実験についても東京大学動物実験規則を遵守して行った。

承認番号 患者検体：695-(5)、動物実験：14-P-58

### 2) 動物

本研究では8週齢のC57BL/6マウスを用いてBLM誘発強皮症モデルマウスを作成した。BLM誘発強皮症モデルマウスはブレオマイシン (BLM) (日本化薬, tokyo, Jpn) をリン酸緩衝液 (phosphate-buffer 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週間ないし1週間にわたり300 $\mu$ lずつ連日皮内注射を行うことにより作成した。対照群としてPBSをBLMと同様の方法でそれぞれのマウスに投与した。また血管内皮細胞特異的*Fli1* 欠失マウス (*Fli1*<sup>fllox/fllox</sup> ; *Tie2-Cre*, *Fli1* ECKOマウス) はボストン医科大学内科関節炎センターのMaria Trojanowska氏より供与を受けた。同マウスの対照群として同胎の*Fli1*<sup>fllox/fllox</sup>マウスを用いた。マウスへのグリチルリチンの投与

はグリチルリチン酸モノアンモニウム (COKEY, Tokyo, Japan) をPBSで溶解し、30mg/kgになるようにマウスの腹腔内に連日投与した。

### 3) 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞培養には10%牛胎児血清、抗生剤、抗真菌剤を添加した変法イーグル培地を使用した。室温37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%に保持したインキュベーター内で単層培養し、3~6回継代した細胞を使用した。刺激の24時間前から血清成分がない培養液に変更し、飢餓状態とした。その後TGF-β1 (R&D Systems, MN) を2ng/mlの濃度になるように培養液に添加し、同時にグリチルリチンを0-250μg/mlの濃度で添加し24時間培養を行った。

### 4) 病理学的、免疫組織学的検討

上記BLM誘発強皮症モデルマウスの背部皮膚を用いて、パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン染色を行い、真皮の厚さと脂肪織の厚さをランダムに7か所から計測した。免疫染色にはα-SMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、Smad3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、arginase-1 (Santa Cruz Biotechnology)、MMP-13 (abcam, Cambridge, U.K.)、thrombospondin-1 (Santa Cruz Biotechnology)、IL-1β (Santa Cruz Biotechnology)、IL-6 (Santa Cruz Biotechnology)、

Snail-1 (Santa Cruz Biotechnology)、VE-Cadherin (Santa Cruz Biotechnology) の各抗体を、また免疫蛍光染色には一次抗体としてrabbit抗VE-cadherin抗体 (Santa Cruz Biotechnology) とgoat抗fibroblast-specific protein 1 (FSP-1)抗体 (abcam)、二次抗体としてFITC-conjugated donkey 抗rabbit IgG抗体 (Santa Cruz Biotechnolog)とAlexa Fluor donkey 555 抗goat IgG抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いた。その後Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で核の染色を行い、Bio Zero BZ-8000 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて495nm (緑)、565 nm (赤)、400 nm (青) の波長で観察を行った。緑色に観察されるFSP-1と赤色に観察されるVE-Cadherin が同時に染まる細胞を観察した。

## 5) コラーゲンの定量

QuickZyme Total Collagen Assay (QuickZyme Biosciences, Leiden, Netherlands) の説明書に従い、皮膚組織を6N HClで20時間、95°Cで加水分解し、キットの試薬を用いてその吸光度を測定し、定量化した。皮膚検体はマウス背部正中皮膚を6mmパンチ生検で採取したものを検体として用いた。

## 6) RNA の抽出と定量的リアルタイム PCR

培養細胞から 1 $\mu$ g の RNA を Qiagen 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。いずれの検体も triplicates としてその平均を値として用いた。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロール遺伝子として用い、Comparative Ct 法を用いて補正を行った。用いた primer 配列は表 1 に示す。

## 7) 細胞内染色

1 週間 BLM の投与を行ったマウスの両側鼠径リンパ節と脾臓を、BLM 最終投与翌日に摘出した。リンパ節はすり潰してリンパ球を単離した。脾臓から取り出した血球に、RBC lysis buffer (0.0017M Trizma, Sigma-Aldrich, 0.1M NH<sub>4</sub>Cl 2.675g, Sigma-Aldrich) を添加することでリンパ球を単離した。リンパ球は抗 CD3 抗体 (17A2)、抗 CD4 抗体 (RM4-5)、抗 CD8a 抗体 (53-6.7) を用いて表面抗原の染色を行った。また 10 ng/ml phorbol myristate acetate (Sigma-Aldrich)、1 g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich)、1 g/ml brefeldin A (GolgiStop; BD PharMingen) で

4時間刺激を行い、抗 IL-4 抗体 (11B11)、抗 IL-17A 抗体 (TC11-18HC0.1)、抗インターフェロン(IFN)- $\gamma$  抗体 (XMG1.2) (抗体は全て BioLegend, San Diego ,CA, USA)を用いて、細胞内抗原の染色を行った。染色されたリンパ球を FACS Verseflow cytometer (BD Biosciences) を用いて解析した。

#### 8) 免疫ブロッティング

培養皮膚線維芽細胞から whole cell lysate を作成し、各 15 $\mu$ g の検体を 10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を一次抗体と反応させた後、horse-radish peroxidase と結合した二次抗体と反応させ、enhanced chemiluminescence で発光させ観察した。

#### 9) 皮膚血管の描出

マウス尾静脈に 20 mg/ml の濃度で PBS に溶解した FITC 抱合デキストラン (Sigma-Aldrich, 2000 kDa) を 200  $\mu$ l 注射した。5分後に頸椎脱臼で安楽死させ、マウスから背部皮膚を採取した。皮膚組織をスライドガラス上に、切離面を下にして置き、蛍光顕微鏡で血管の構造を観察した。

#### 10) 皮膚血管透過性の検討

マウス尾静脈に 0.5%の濃度で PBS に溶解した Evans blue 色素(Sigma-Aldrich)

を 200 $\mu$ 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 Evans blue 色素の漏出を観察した。また、皮膚を 6mm パンチでくりぬき、200 $\mu$ l の formamide で温置した。24 時間後に漏出した Evans blue 色素の濃度を 620nm の吸光度で吸光度計を用いて測定した。

## 11) 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。 $P < 0.05$  を統計学的に有意と考えた。値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。

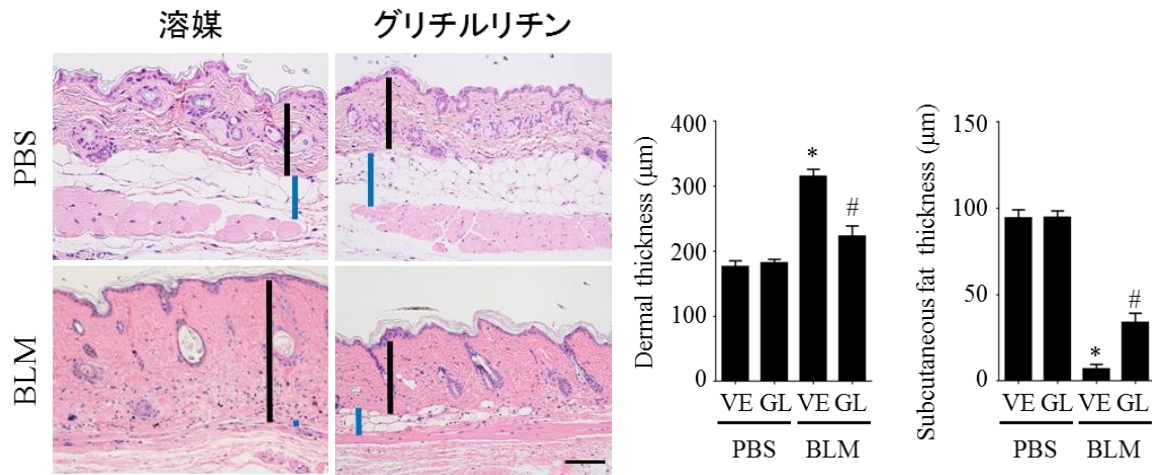
## 結果

### 1) グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚線維化を抑制する

まず初めにグリチルリチンの効果を検討するために BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいてグリチルリチンが皮膚線維化に影響を及ぼすかどうか検討を行った。BLM を C57BL/6 マウスの背部皮内に 4 週間連日注射すると同時に腹腔内にグリチルリチン (30mg/kg) もしくは PBS の投与を行った。BLM をマウスの背部皮内に注射することにより、真皮厚の増加と脂肪織厚の減少が起きることが知られている<sup>12,17</sup>。BLM の皮内注射を行った群において、グリチルリチン投与群では PBS 投与群と比較し皮膚肥厚が有意に抑制され、減少していた脂肪織厚も回復した (図 3)。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<sup>18</sup>。グリチルリチン投与群ではマウスの皮膚におけるヒドロキシプロリン含有量も抑制された (図 4)。また線維芽細胞の中でも筋線維芽細胞はコラーゲン産生を積極的に担う細胞であり、 $\alpha$ -SMA の発現が亢進することが知られている<sup>19</sup>。グリチルリチン投与により、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞数の減少 (図 5) も認められた。以上の結果より、グリチルリチンは BLM によって誘導される、筋線維芽細胞を抑制し、皮膚線維化を抑制



することが示唆された。



**図3 皮膚真皮厚と脂肪織厚の検討**：マウスの背部皮膚に4週間連日BLMもしくはPBSの皮内注射を行った。同時にグリチルリチン(GL)もしくはPBS(溶媒[VE])の腹腔内投与も行った。皮膚はヘマトキシリン&エオジン染色を行い、真皮の厚さと脂肪織の厚さを評価した。黒いバーは真皮厚を示し、青いバーは脂肪織厚を示す。倍率100倍における代表的な視野を提示する。スケールバーの大きさは100μmを示す。それぞれのグラフは平均値 ± 標準誤差を示す。(n = 6-7)、\*P<0.05 versus PBS-VE群、#P<0.05 versus BLM-VE群

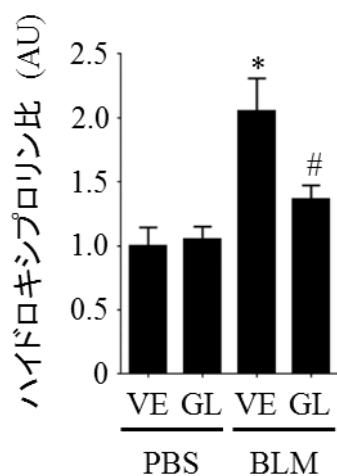


図 4 皮膚コラーゲン量の検討：皮膚に含有されているヒドロキシプロリン量の定量化を行った。コントロールに対する比を示す。それぞれのグラフは平均値 ± 標準誤差を示す。(n = 6-7)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、\*P<0.05 versus PBS-VE 群、# P<0.05 versus BLM-VE 群、AU:任意単位

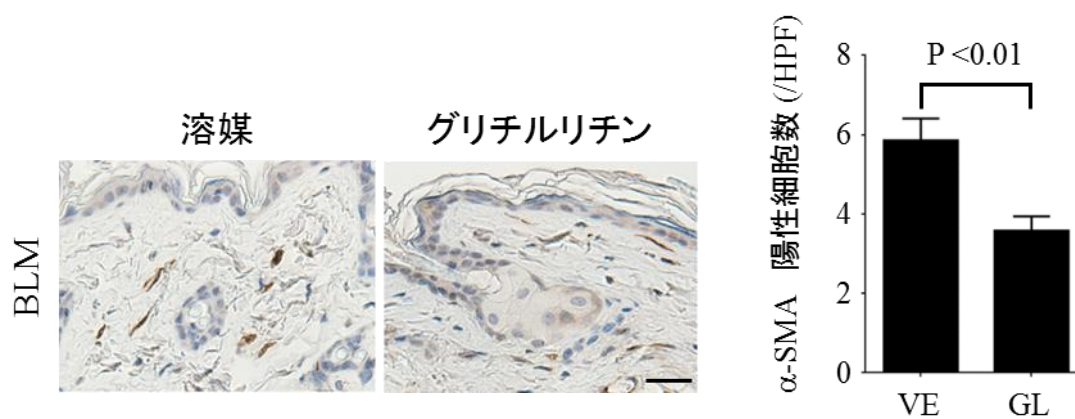


図 5 皮膚筋線維芽細胞数の検討：皮膚における $\alpha$ -SMA 染色を行った。 $\alpha$ -SMA 陽性紡錘形細胞数の計測を行った。スケールバーの大きさは 20 $\mu$ m を示す。それぞれのグラフは平均値 ± 標準誤差を示す。(n = 6-7)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、HPF:高倍率視野

次に完成された皮膚線維化にグリチルリチンが及ぼす影響について検討を行った。既報告<sup>20,21</sup>にあるようにマウスの背部に先行して3週間のBLM皮内注射を行い、追加で3週間のPBSもしくはBLMの皮内注射を行った。追加のBLM皮内注射期間はグリチルリチンもしくはPBSを腹腔内に同時投与した。追加で3週間のBLM皮内注射を行った群において、グリチルリチン投与群ではPBS投与群と比較し、皮膚肥厚の有意な抑制を認めた。抑制の程度は、先行して3週間のBLM皮内注射後、追加で3週間のPBS皮内注射を行った群と同程度の皮膚の厚さまでの抑制であり、6週間の間BLMを一度も皮内注射しなかった群の厚さにまでは改善しなかった(図6)。 $\alpha$ -SMA陽性細胞数も同様の結果となった(図7)。これらのことからグリチルリチンはBLM誘発強皮症モデルマウスの皮膚の線維化に対し予防的効果は示すものの、完成された線維化には治療的効果が少ないものと考えられた。

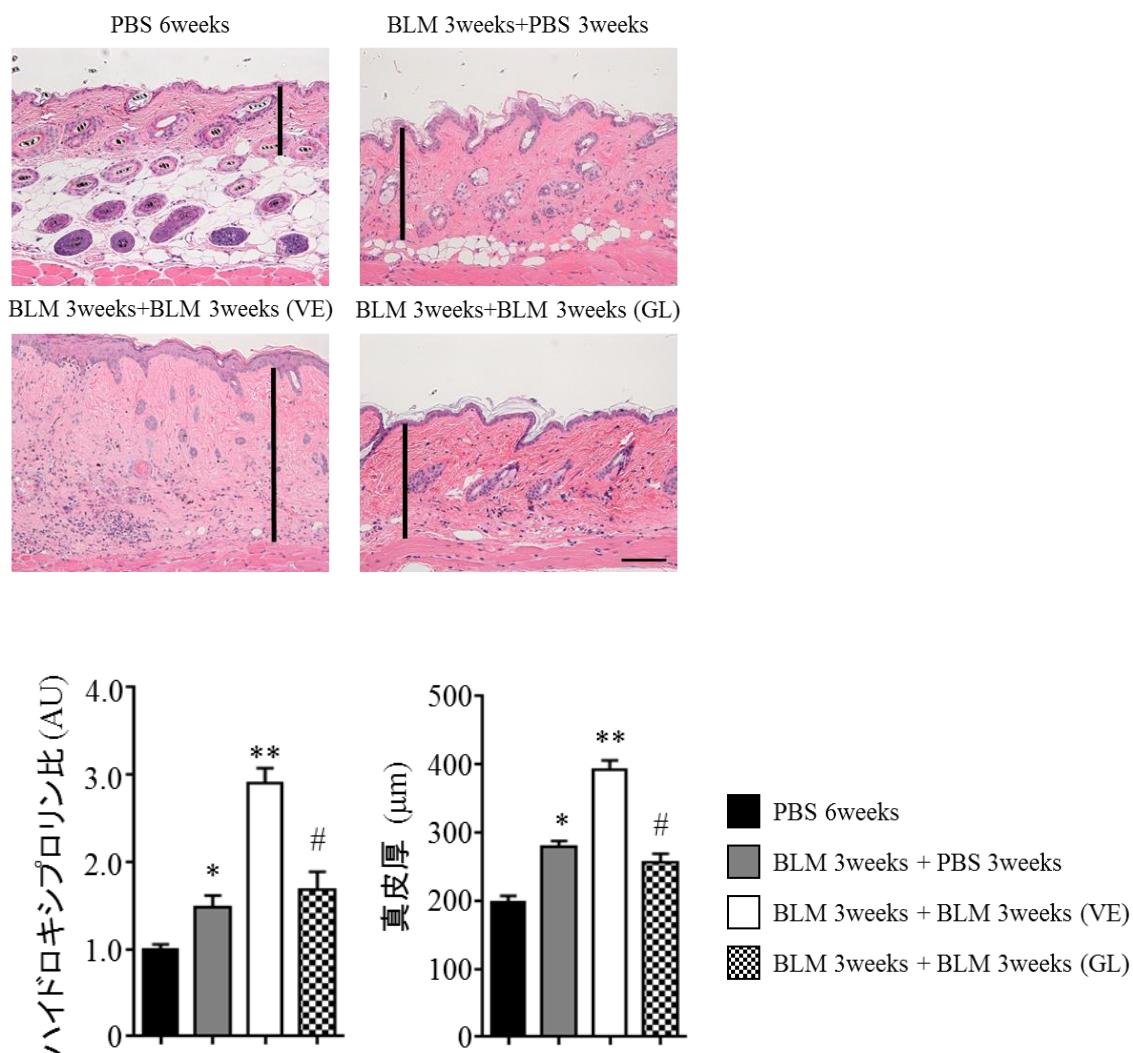


図 6 皮厚と皮膚コラーゲン量の検討：マウスの背部皮膚に 3 週間連日 BLM もしくは PBS の皮内注射を行った。その後追加で 3 週間の BLM もしくは PBS の皮内注射を行った。追加の期間は同時にグリチルリチン (GL) もしくは PBS (溶媒[VE]) の腹腔内投与も行った。皮膚はヘマトキシリン&エオジン染色を行い、真皮の厚さを評価した。黒いバーは真皮厚を示す。倍率 100 倍における代表的な視野を提示する。スケールバーの大きさは 100 $\mu$ m を示す。また皮膚に含有されているヒドロキシプロリン量の定量化を行った。コントロールに対する比を示す。それぞれのグラフは平均値  $\pm$  標準誤差を示す。(n = 6)、\*P<0.05 versus PBS 6weeks 群、\*\*P<0.05 versus BLM3 weeks+PBS 3weeks 群、# P<0.05 versus BLM3 weeks+BLM 3weeks (VE) 群、AU:任意単位

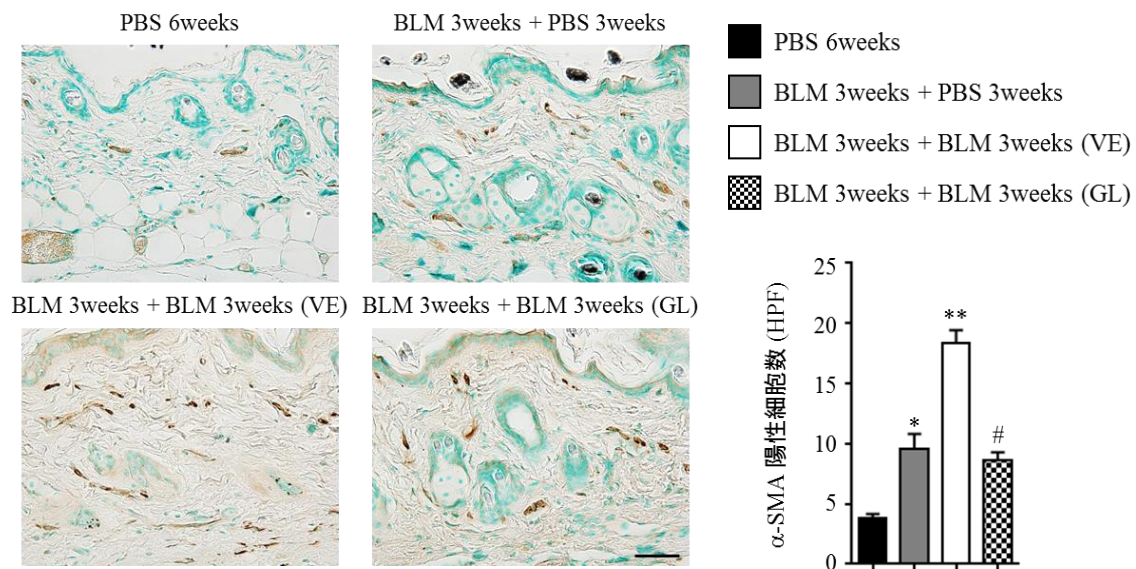


図 7 皮膚筋線維芽細胞数の検討：皮膚における $\alpha$ -SMA 染色を行った。 $\alpha$ -SMA 陽性紡錘形細胞数の計測を行った。スケールバーの大きさは  $50\mu\text{m}$  を示す。それぞれのグラフは平均値  $\pm$  標準誤差を示す。(n = 6)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、\* $P < 0.05$  versus PBS 6weeks 群、\*\* $P < 0.05$  versus BLM3 weeks+PBS 3weeks 群、#  $P < 0.05$  versus BLM3 weeks+BLM 3weeks (VE) 群、HPF:高倍率視野

続いて皮膚線維化の機序に関する解析を行った。線維化の主要因は真皮におけるコラーゲンの増加<sup>2,22</sup>であるため、まずはコラーゲンの生成と分解にかかわっている分子の遺伝子発現へのグリチルリチンが及ぼす影響について検討を行った。4週間 BLM を皮内注射したマウスの皮膚検体において、グリチルリチン投与群ではコラーゲンの生成に関わっている遺伝子である *Colla1*, *Colla2*,

*Col3a1* 遺伝子の発現量が有意に抑制され、分解に関わっている遺伝子である *Mmp13* 遺伝子の発現量が有意に亢進した (図 8)。MMP-13 の発現の亢進は免疫染色によっても確認された (図 9)。これらのことから BLM 誘発強皮症モデルマウスにおけるグリチルリチンの抗線維化作用は、コラーゲンの生成抑制と分解亢進によるものがひとつの機序であると考えられた。

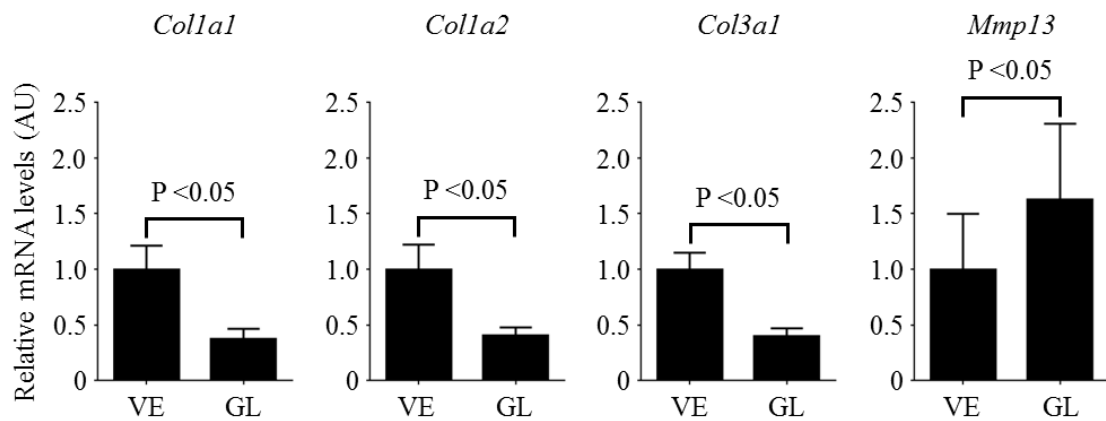


図 8 皮膚におけるコラーゲン生成/分解遺伝子発現量の検討：皮膚における *Colla1*、*Colla2*、*Col3a1*、*Mmp13* の mRNA 量を qRT-PCR を用いて測定した。それぞれのグラフは平均値 ± 標準誤差を示す。(n = 6-7)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、AU:任意単位



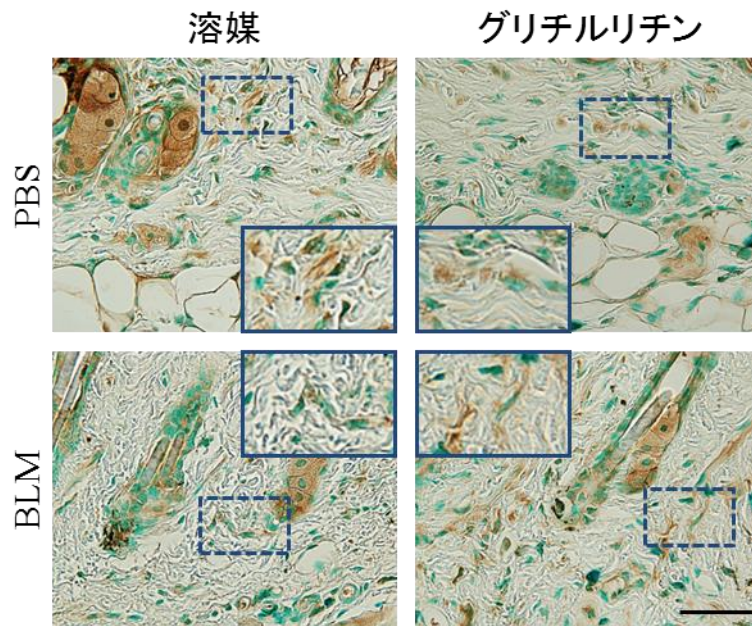


図 9 皮膚における MMP-13 発現の検討:皮膚における MMP-13 染色を行った。スケールバーの大きさは 20 $\mu$ m を示す。(n = 5) 挿入図:点線で囲われた代表的な線維芽細胞の拡大図

## 2) グリチルリチンは皮膚線維芽細胞における TGF- $\beta$ の活性化を抑制する

皮膚の線維化の誘導、維持には線維芽細胞における TGF- $\beta$ と CTGF の発現が重要である<sup>23</sup>。そこで BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において *Tgfb1* と *Ctgf* 遺伝子の発現量の比較を行ったが、グリチルリチン投与による変化は認めなかった (図 10)。TGF- $\beta$ は潜在型から活性型に変わることにより生理活性を持ち TGF- $\beta$  シグナリングを亢進させる<sup>24-26</sup>。TGF- $\beta$  シグナリングの亢進は転写因子 Smad3 の核内移行を亢進させ、皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子の転写を強力に促進する<sup>22</sup>(図 11)。BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚線維芽細胞では、グリチルリチン投与群において Smad3 の核内/細胞質内発現共に抑制されていることが判明した (図 12)。これらのことからグリチルリチンは TGF- $\beta$ の発現そのものを抑制するのではなく、TGF- $\beta$ の活性化を抑制して抗線維化作用をもたらしている可能性が示唆された。



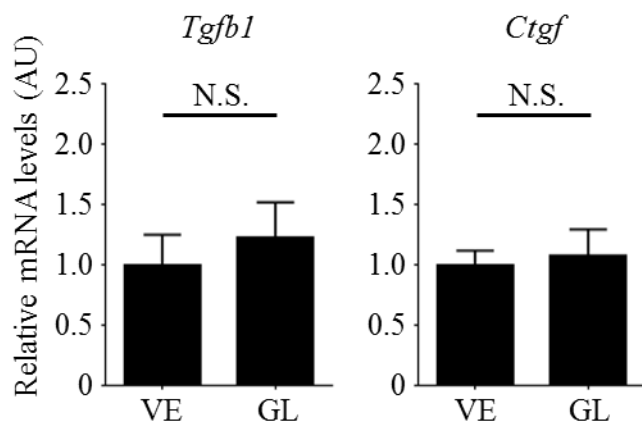


図 10 皮膚における *Tgfb* と *Ctgf* 遺伝子発現量の検討：マウスの背部皮膚に 4 週間連日 BLM の皮内注射を行った。同時にグリチルリチン (GL) もしくは PBS (溶媒[VE]) の腹腔内投与も行った。皮膚における *Tgfb1* と *Ctgf* の mRNA 量を qRT-PCR を用いて測定した。それぞれのグラフは平均値 ± 標準誤差を示す。(n = 6-7)、AU:任意単位、N.S.: not significant

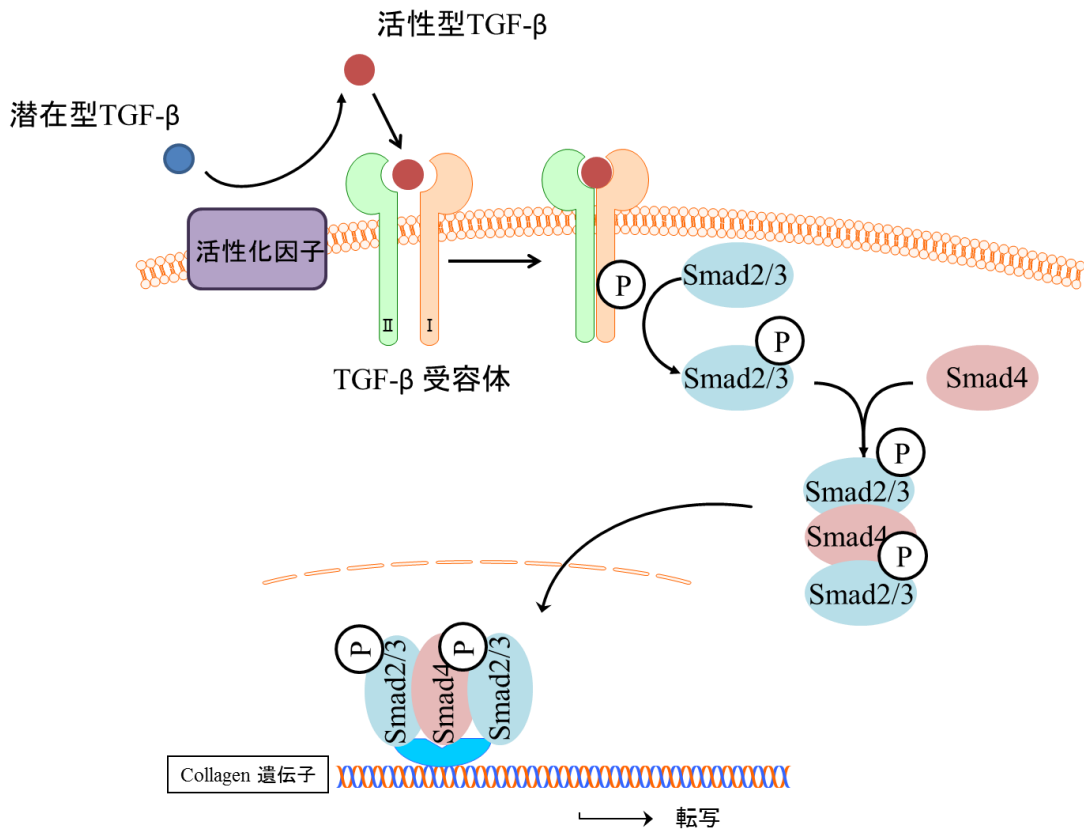


図 11 TGF-βと Smad シグナリング：線維芽細胞において潜在型 TGF-βは細胞表面の活性化因子により活性型 TGF-βに転換される。活性型 TGF-βは Smad2/3 のリン酸化を亢進させ、Smad4 と複合体を形成し核内移行する。核内移行した Smad 複合体は collagen 遺伝子の promoter 領域に結合し、その転写を亢進させる。

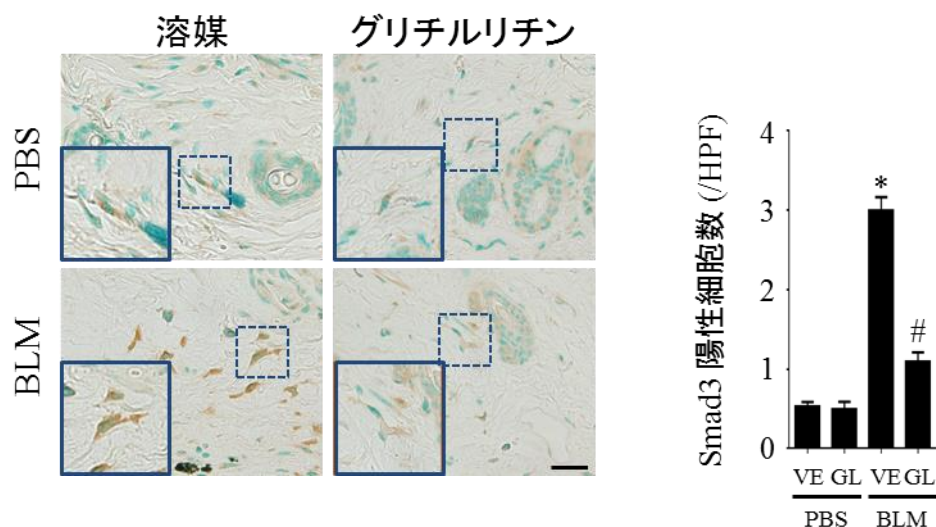


図 12 線維芽細胞における Smad3 の核内、核外発現の検討:皮膚における Smad3 染色を行った。また核内が Smad3 陽性となった細胞数の計測を行った。スケールバーの大きさは 20 $\mu$ m を示す。それぞれのグラフは平均値  $\pm$  標準誤差を示す。(n = 6-7)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、\*P<0.05 versus PBS-VE 群、# P<0.05 versus BLM-VE 群、挿入図:点線で囲われた代表的な線維芽細胞の拡大図

そこで次に TGF- $\beta$ の活性化の抑制の機序について検討を行った。TGF- $\beta$ は latency associated protein (LAP) が結合した状態で生合成される。LAP が結合している状態では TGF- $\beta$ は不活性であり、潜在型と称される。何らかの過程によって LAP が除去されることで初めて活性型として生理活性を持つことになる<sup>24-26</sup>。活性化の機序はいくつか存在するが、細胞表面における TGF- $\beta$ を活性型へ変換させる因子としては integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ V $\beta$ 5, そして thrombospondin 1 (TSP-1) があり、BLM 誘発強皮症モデルマウスの線維芽細胞でもそれぞれの発現が亢進していることが知られている<sup>24,27</sup>。そこで BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚にお

ける各種遺伝子の発現量を検討したところ、グリチルリチン投与群の皮膚において、*Itgav*、*Itgb3*、*Itgb5* 遺伝子の発現量は不変であるが、*Tbsp1* 遺伝子の発現量が抑制されることが確認された (図 13)。また皮膚線維芽細胞における TSP-1 の蛋白発現量も抑制されることが確認された (図 14)。

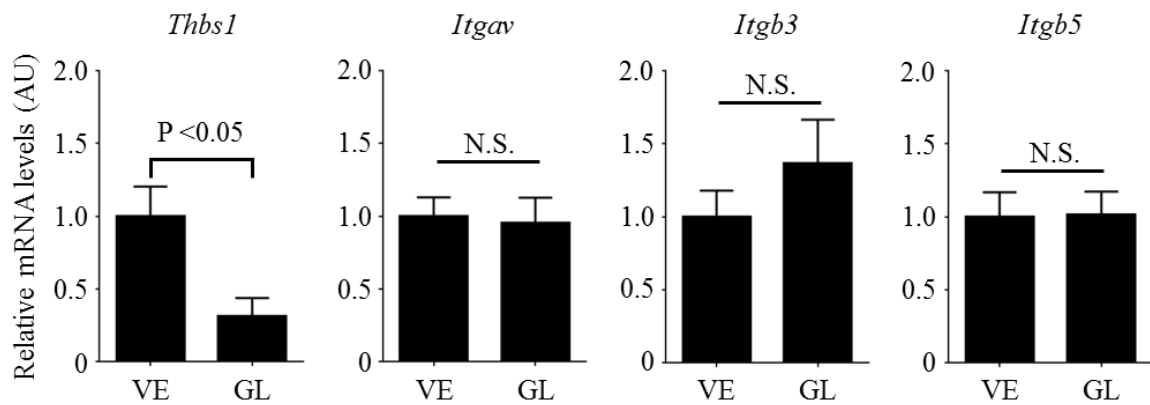


図 13 皮膚における線維芽細胞表面の TGF- $\beta$ 活性化因子発現量の検討：皮膚における *Thbs1*、*Itga*、*Itgb3*、*Itgb5* の mRNA 量を qRT-PCR を用いて測定した。それぞれのグラフは平均値  $\pm$  標準誤差を示す。(n = 6-7)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、AU:任意単位、N.S.: not significant

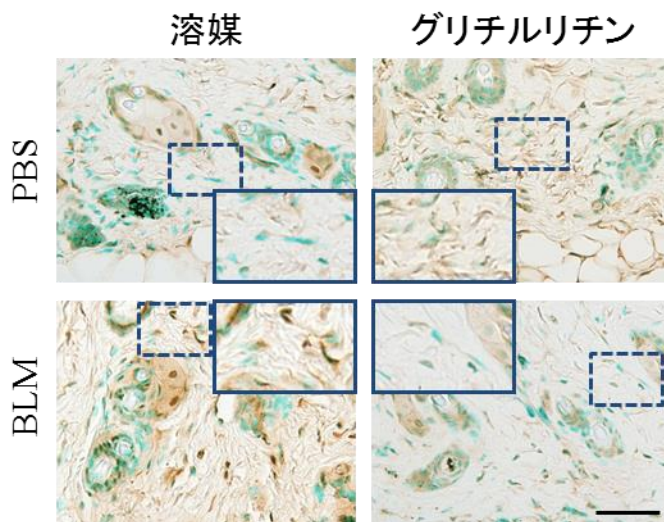


図 14 皮膚における TSP-1 発現の検討:皮膚における TSP-1 染色を行った。スケールバーの大きさは 20 $\mu$ m を示す。(n = 5)、挿入図:点線で囲われた代表的な線維芽細胞の拡大図

引き続き細胞内における機序について検討を行った。TGF- $\beta$ 1 で刺激した皮膚線維芽細胞では I 型コラーゲンの発現が亢進する<sup>28</sup>。そこで TGF- $\beta$ 1 で刺激した正常ヒト皮膚線維芽細胞にグリチルリチンの添加を行ったところ、濃度依存性に I 型コラーゲンの発現が低下した。また BLM 誘発強皮症モデルマウスの線維芽細胞と同様に Smad3 の発現が低下した。さらにはそのリン酸化や Ets1 といった I 型コラーゲン発現を亢進させる転写因子<sup>13</sup> の発現も抑制した。一方で抑制系の転写因子である Fli1<sup>13</sup> への発現には影響を及ぼさなかった (図 15)。これ

らのことから、グリチルリチンは細胞表面における TGF- $\beta$ の活性化の抑制といった核外の機序と、コラーゲン遺伝子の転写活性を亢進させる Smad3 とそのリン酸化、Ets1 といった転写因子の抑制による核内の機序の両方の機序を通じて抗線維化作用を有していると考えられた。

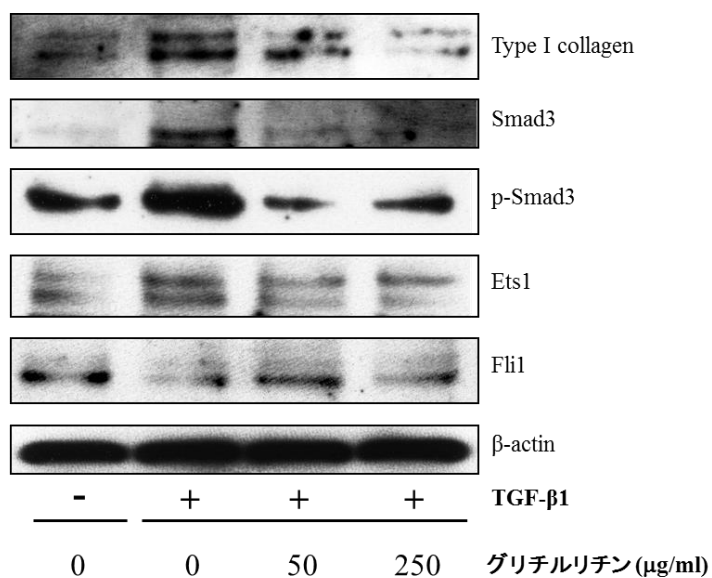


図 15 TGF- $\beta$ 1 刺激を行った培養ヒト皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲンと転写因子の蛋白発現量の検討：健常人から採取した培養ヒト皮膚線維芽細胞に TGF- $\beta$ 1 刺激を行い、濃度を分けてグリチルリチンを添加し Type I collagen、Smad3、Phospho-Smad3、Ets1、Fli1、 $\beta$ -actin の蛋白量を比較した。3 検体による独立した検討を行った。代表的な結果を示す。

### 3)グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスの Th2 優位の免疫環境を改善し、皮膚における M2 マクロファージの浸潤を抑制する

次にグリチルリチンの BLM 誘発強皮症モデルマウスの免疫環境に対する影響について検討を行った。まず初めに 1 週間 BLM を背部皮内に注射すると同時に腹腔内にグリチルリチンもしくは PBS の投与を行ったマウスの皮膚において、炎症性サイトカイン/ケモカインである *Tnfa*、*Il1b*、*Ccl2*、*Ifng*、*Il4*、*Il6*、*Il10*、*Il13*、*Il17a* の遺伝子発現量を測定した。その結果、グリチルリチン投与群において *Il1b*、*Il4*、そして *Il6* 遺伝子の発現量が抑制されていることが判明した (図 16)。IL-1 $\beta$  と IL-6 は皮膚の炎症細胞で発現が低下していることも免疫染色で確認した (図 17)。これらのことからグリチルリチンは皮膚の線維化につながる炎症環境、特に Th2 優位な免疫環境<sup>29,30</sup>を抑制していると予想された。

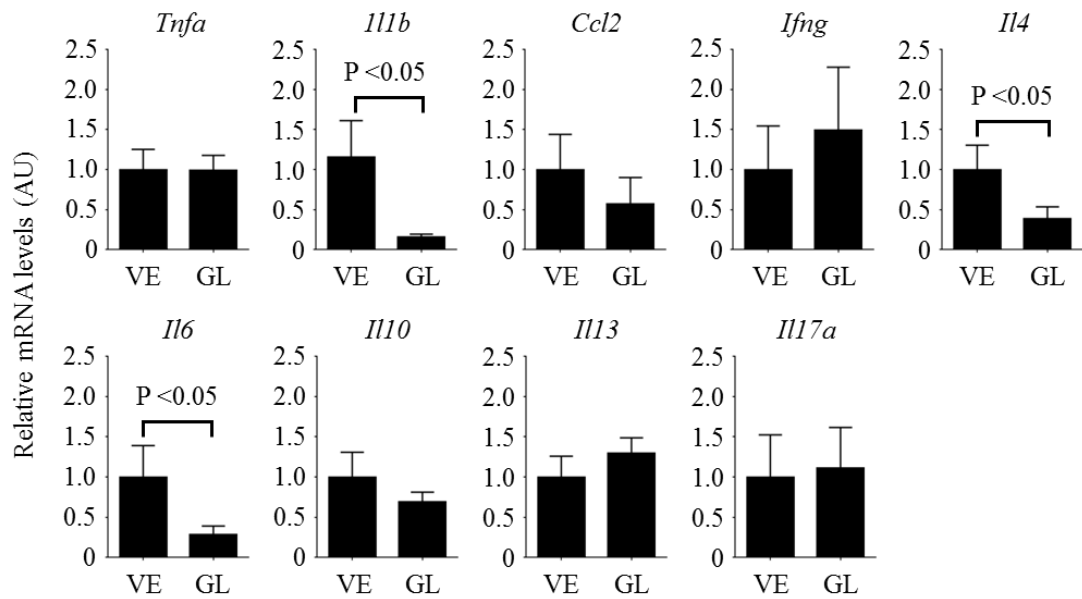


図 16 皮膚における各種サイトカイン遺伝子発現量の検討: マウスの背部皮膚に 1 週間連日 BLM の皮内注射を行った。同時にグリチルリチン (GL) もしくは PBS (溶媒[VE]) の腹腔内投与も行った。皮膚における *Tnfa*、*Il1b*、*Ccl2*、*Ifng*、*Il4*、*Il6*、*Il10*、*Il13*、*Il17a* の mRNA 量を qRT-PCR を用いて測定した。それぞれのグラフは平均値 ± 標準誤差を示す。(n = 8-9)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、AU:任意単位

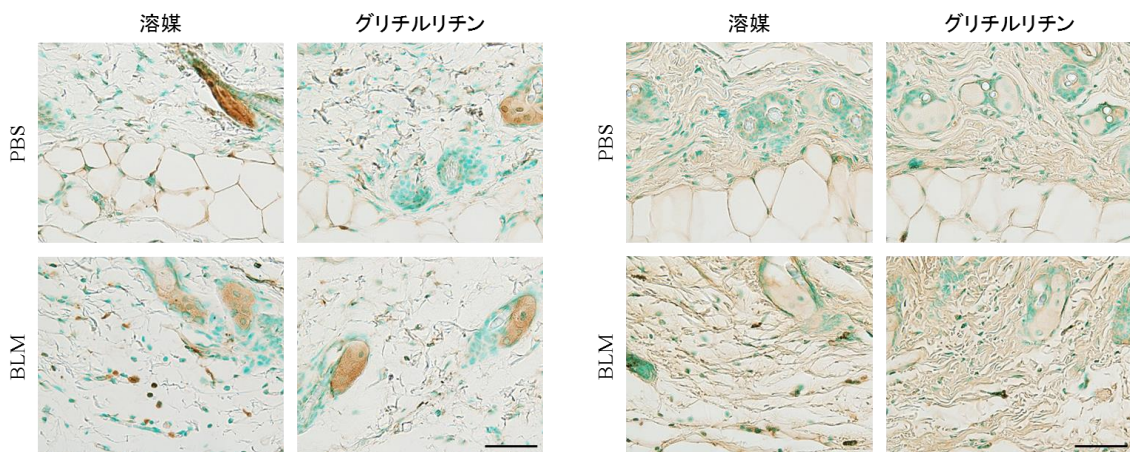


図 17 皮膚における IL-1β と IL-6 発現の検討: 皮膚における IL-1β (左図) と IL-6 (右図) の染色を行った。スケールバーの大きさは 20μm を示す。(n = 5)



次に皮膚所属リンパ節及び脾臓から回収した細胞を FACS Verseflow cytometer (BD Biosciences) にて解析した。CD4 陽性 T 細胞の解析において、IFN- $\gamma$  と IL-17A 発現細胞の割合に変化は認めなかったが、グリチルリチン投与群では IL-4 発現細胞の割合は有意に低下していることが判明した (図 18)。これらのことからグリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて IL-4 の発現を抑制することにより、線維化を誘導する Th2 優位な免疫環境を抑制することで抗線維化作用を示していると考えられた。また皮膚の線維化において M2 マクロファージの役割が重要なことがわかっており<sup>31</sup>、そのマーカーである *Arg1* 遺伝子<sup>27</sup> の発現量はグリチルリチン投与群において低下した (図 19)。そして Arginase-1 陽性細胞数もグリチルリチン投与群において減少した (図 20)。これらのことから、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚においてグリチルリチンは M2 マクロファージの皮膚浸潤を抑制することでも抗線維化作用を有していると考えられた。

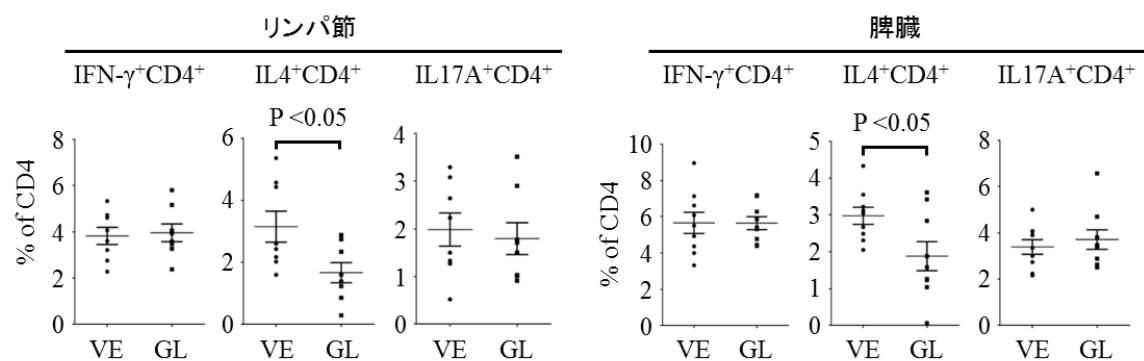


図 18 CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカイン発現の検討: マウスの背部皮膚に 1 週間連日 BLM の皮内注射を行った。同時にグリチルリチン (GL) もしくは PBS (溶媒[VE]) の腹腔内投与も行った。最終投与翌日にマウスの両側鼠径リンパ節と脾臓を摘出した。FACS analysis を用いて、CD4 陽性 T 細胞のうち核内に IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17A を発現している細胞の割合を測定した。皮膚所属リンパ節 (左図) と脾臓 (右図) を示す。それぞれのグラフは平均値  $\pm$  標準誤差を示す。(n = 8-9)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン

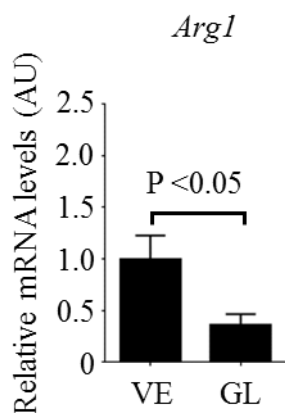


図 19 皮膚における *Arg1* 遺伝子発現量の検討: 皮膚における *Arg1* の mRNA 量を qRT-PCR を用いて測定した。それぞれのグラフは平均値  $\pm$  標準誤差を示す。(n = 8-9)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、AU:任意単位

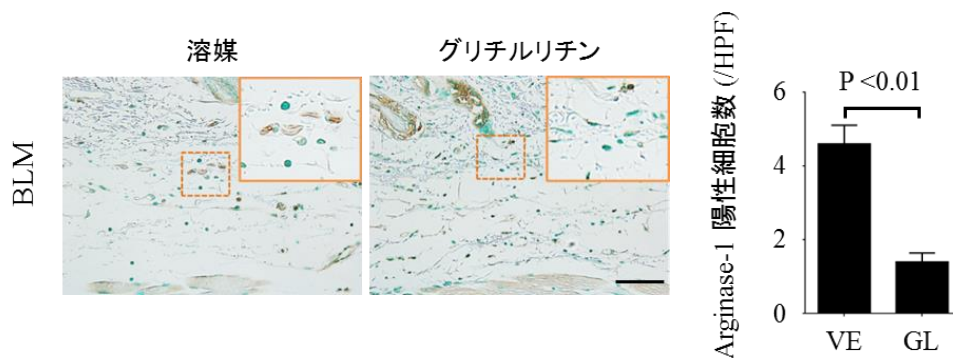


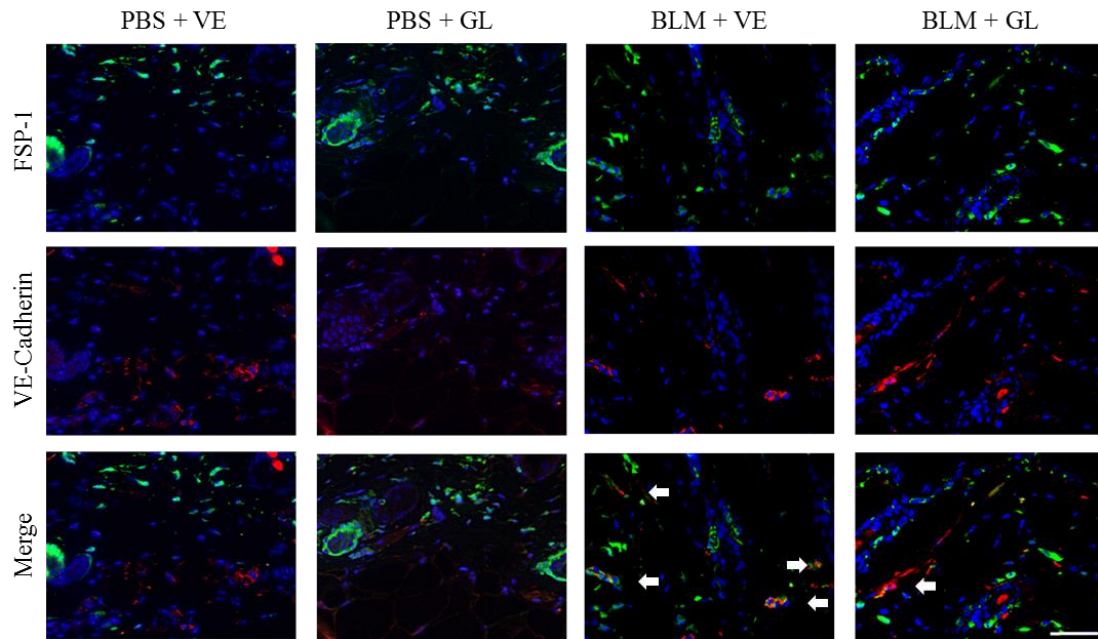
図 20 皮膚における Arginase-1 発現の検討:皮膚における Arginase-1 の染色を行った。また Arginase-1 陽性の類円形細胞数の計測を行った。スケールバーの大きさは 20 $\mu$ m を示す。それぞれのグラフは平均値  $\pm$  標準誤差を示す。(n = 5)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、HPF:高倍率視野、挿入図:点線で囲われた代表的な炎症細胞の拡大図

#### 4) グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスの血管内皮間葉移行を抑制

##### し、血管の安定性も回復させる

血管障害が線維化を引き起こす機序のひとつに血管内皮間葉移行が挙げられる。血管が傷害を受けると血管内皮細胞が間質へ遊走し線維芽細胞に転換する現象であり、転換した線維芽細胞が膠原線維を産生することで線維化に寄与している<sup>32,33</sup>。BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において血管内皮間葉移行は亢進しており、転換した細胞は血管内皮細胞の性質と線維芽細胞の性質の両方を併せ持つため、VE-Cadherin と FSP-1 が共に陽性になることが知られている<sup>27</sup>。

そこで今回、グリチルリチンの血管内皮間葉移行に対する影響を検討するために、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚における VE-Cadherin と FSP-1 の共陽性細胞数の計測を行った。その際 FSP-1 は炎症環境において、マクロファージやリンパ球でも陽性になるため<sup>33,34</sup>、線維芽細胞を示唆する紡錘形細胞に絞って観察を行った。BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、グリチルリチン投与群では VE-Cadherin と FSP-1 の紡錘形共陽性細胞数の減少を認め (図 21)、血管内皮間葉移行を司る転写因子である Snail-1 の mRNA、蛋白発現量を低下させた (図 22)。



**図 21 皮膚組織における内皮間葉転換の検討**：マウスの背部皮膚に 4 週間連日 BLM の皮内注射を行った。同時にグリチルリチン (GL) もしくは PBS (溶媒 [VE]) の腹腔内投与も行った。マウスの背部皮膚のパラフィン切片を用いて、間葉系細胞のマーカである FSP-1 (緑色) と血管内皮細胞のマーカである VE-cadherin (赤色) の蛍光二重免疫染色を行った。共陽性細胞を白の矢印で示す。染色はそれぞれ 4 検体ずつ行い、計測は 1 サンプルあたり無作為に少なくとも 5 視野ずつ行った。200 倍視野代表的な視野を提示する。スケールバーの大きさは 20 $\mu$ m を示す。

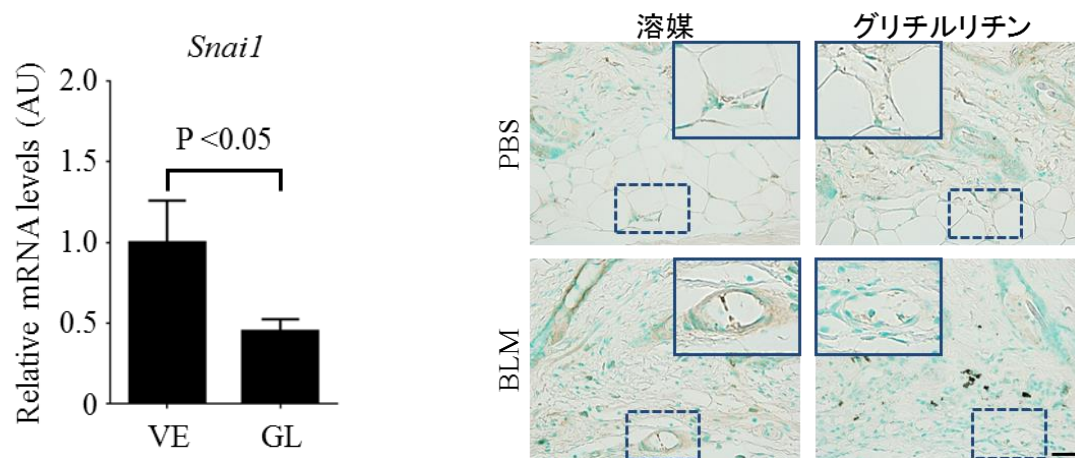


図 22 皮膚における *Snail* の遺伝子発現量と、血管内皮細胞における *Snail-1* の蛋白発現の検討：(左図) 皮膚における *Snail* の mRNA 量を qRT-PCR を用いて測定した。それぞれのグラフは平均値 ± 標準誤差を示す。(n = 6)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン。(右図) 皮膚微小血管における *Snail1* の発現を免疫染色で検討した。スケールバーの大きさは 20μm を示す。(n = 5)、AU:任意単位、挿入図:点線で囲われた代表的な皮膚微小血管の拡大図

次に血管の安定性についての検討を行った。皮膚微小血管の周囲には周皮細胞が接着しており、血管の安定性を高めている。周皮細胞は $\alpha$ -SMA に陽性となるが、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚微小血管の周囲において $\alpha$ -SMA の発現は低下していることが知られている。これは血管内皮細胞と周皮細胞の接着が疎な状態 (pericyte loss) が起きているためと考えられる<sup>35</sup>。今回の検討においてグリチルリチン投与群では血管周囲における $\alpha$ -SMA の発現が回復した (図

23)。これは BLM によって低下した皮膚微小血管内皮細胞と周皮細胞の接着が  
増強された結果と考えられた。以上の検討より、グリチルリチンは BLM 誘発強  
皮症モデルマウスの血管内皮細胞に対し、血管内皮間葉移行を抑制することで  
皮膚の線維化を抑制し、また周皮細胞との接着を増強することにより血管の安  
定性を高めていると考えられた。

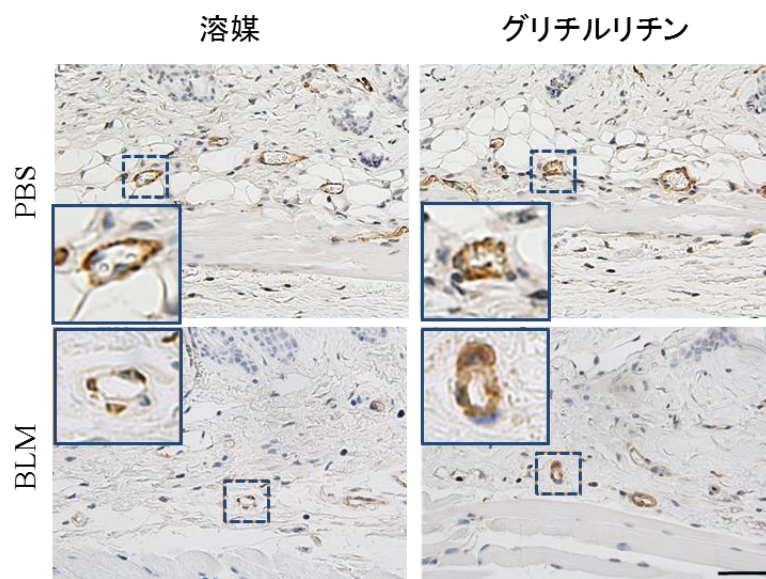


図 23 pericyte loss の検討：皮膚における $\alpha$ -SMA 染色を行い皮膚微小血管周囲の $\alpha$ -SMA 発現に着目した。スケールバーの大きさは  $20\mu\text{m}$  を示す。(n = 6)、挿入図:点線で囲われた代表的な皮膚微小血管の拡大図

## 5)グリチルリチンは全身性強皮症の血管障害を模した血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの血管障害を改善する

上述の通り、グリチルリチンはBLM誘発強皮症モデルマウスにおける pericyte loss を改善させた。Pericyte loss は全身性強皮症の血管障害に特徴的な動脈の狭窄や動脈瘤、血管の安定性の低下を引き起こす原因と考えられている<sup>36</sup>。*Fli1* ECKO マウスは pericyte loss を含めた全身性強皮症類似の血管障害を呈することが判明している<sup>16</sup>。そこで本研究では *Fli1* ECKO マウスを用いて、グリチルリチンがその病態に対して及ぼす影響の検討も併せて行った。8週齢の *Fli1* ECKO マウスに対し2週間のグリチルリチンもしくはPBSの腹腔内投与を行った。グリチルリチン投与群では、皮膚微小血管周囲における $\alpha$ -SMAの発現が上昇した(図24)。しかしながら *Fli1* ECKO マウスで認める動脈の狭窄や動脈瘤の形成といった血管構造異常の改善を認めなかった(図25)。一方でEvans blue色素の血管外への漏出を抑制し、血管の透過性の亢進の改善を認めた(図26)。



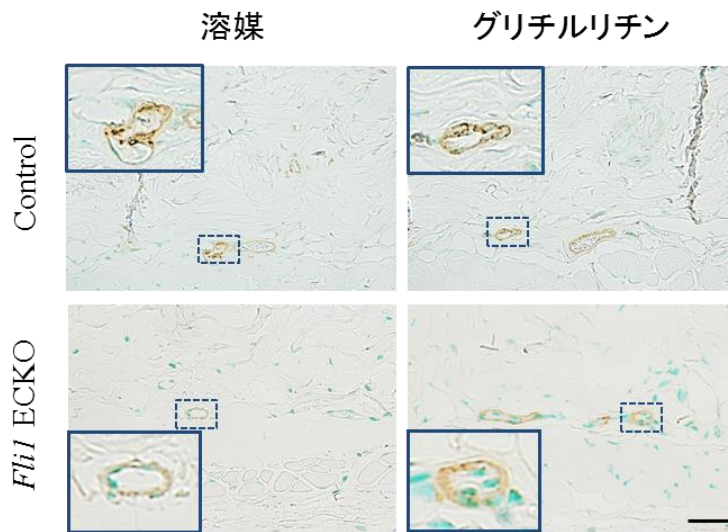


図 24 pericyte loss の検討 : Fli1 ECKO マウスにグリチルリチン (GL) もしくは PBS (溶媒[VE]) の腹腔内投与を 2 週間連日行った。皮膚における $\alpha$ -SMA 染色を行い皮膚微小血管周囲の $\alpha$ -SMA 発現に着目した。スケールバーの大きさは 20 $\mu$ m を示す。(n = 5)、挿入図:点線で囲われた代表的な皮膚微小血管の拡大図

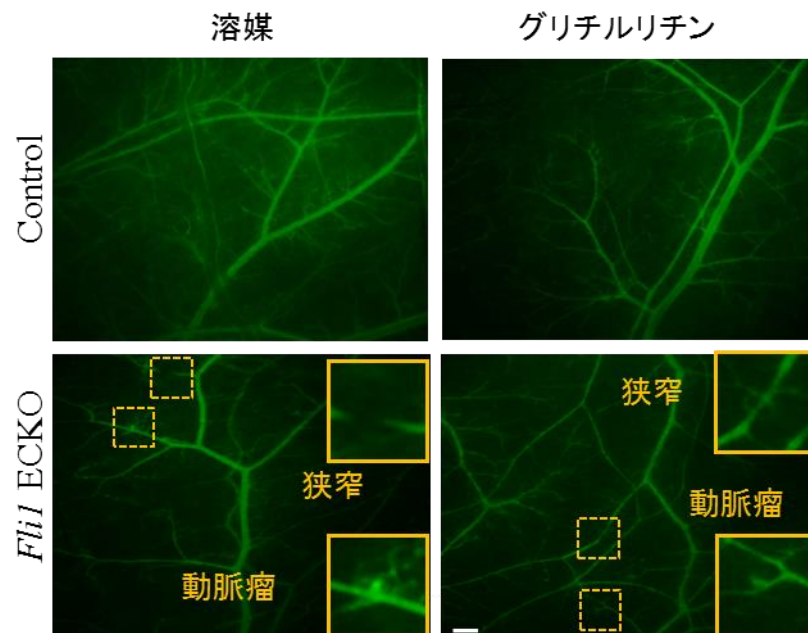


図 25 マウス皮膚血管構造異常の検討 : 20 mg/ml の FITC 抱合デキストランを 200  $\mu$ l 尾静注し、背部皮膚の血管構造を蛍光顕微鏡にて観察した。代表的な異常構造を示す。スケールバーの大きさは 200 $\mu$ m を示す。(n = 5)、挿入図:点線で囲われた stenosis や microaneurysm の拡大図

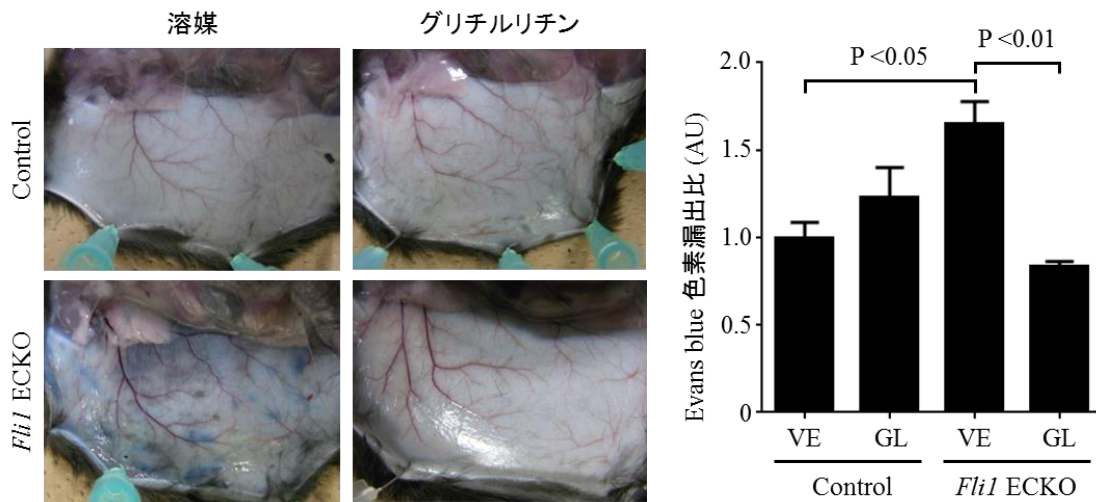


図 26 マウス皮膚血管透過性の検討：0.5% Evans blue 色素を 200  $\mu$ l 尾静注し、腹部血管からの Evans blue の漏出を検討した。また、Evans blue 色素の漏出を定量化し、コントロールに対する比を計測した。スケールバーの大きさは 1cm を示す。それぞれのグラフは平均値  $\pm$  標準誤差を示す。(n = 6)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、AU:任意単位

全身性強皮症において血管新生は異常亢進しており、*Fli1* ECKO マウスの皮膚微小血管においては、血管新生関連遺伝子であり血管内皮細胞同士の接着を司る VE-Cadherin と PECAM-1 が、そして血管内皮細胞と周皮細胞の接着を司る PDGF-B の発現が低下し、全身性強皮症類似の血管障害を呈することが知られている<sup>16</sup>。グリチルリチン投与群ではマウス皮膚におけるこれらの遺伝子の発現量が回復していた (図 27)。また血管内皮細胞における VE-Cadherin の発現量についても免疫染色で上昇していることが確認された (図 28)。一方でグリチルリチン投与におけるマウス皮膚の *Fli1* 遺伝子の mRNA の発現量に変化を認めなか

った (図 27)。これらのことからグリチルリチンは *Fli1* ECKO マウスにおいて、異常に低下した血管新生関連遺伝子の発現を回復させ、血管の安定性を回復させるものの、その機序は血管内皮細胞における *Fli1* の発現の回復とは異なる機序であることが示唆された。

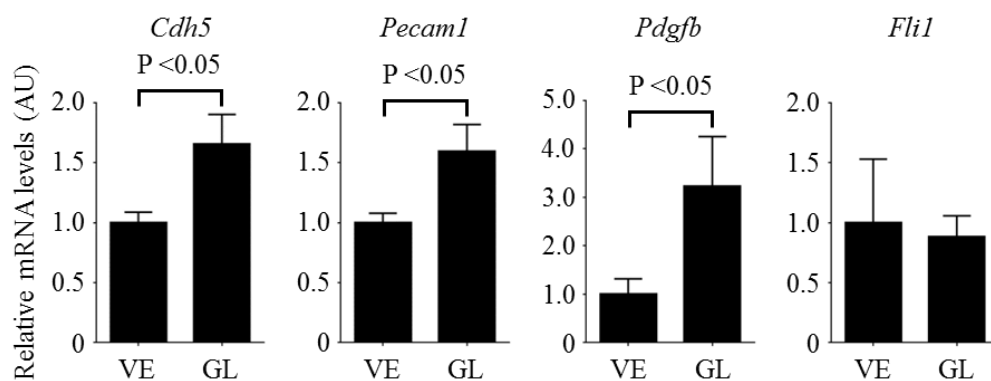


図 27 皮膚における血管内皮細胞関連接着分子と *Fli1* 遺伝子発現量の検討：皮膚における *Cdh5*、*Pecam1*、*Pdgfb*、*Fli1* の mRNA 量を qRT-PCR を用いて測定した。それぞれのグラフは平均値 ± 標準誤差を示す。(n = 6)、VE:溶媒、GL:グリチルリチン、AU:任意単位

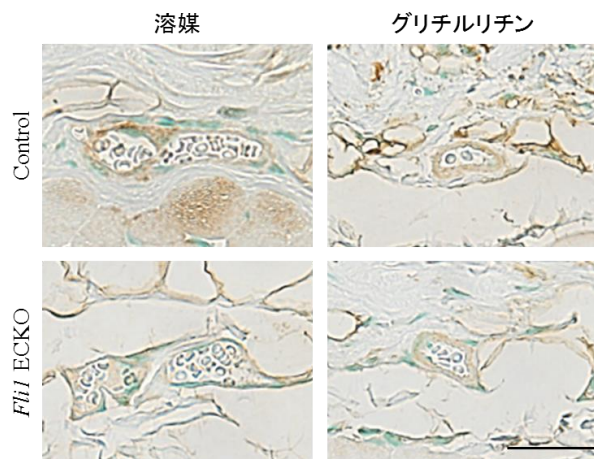


図 28 血管内皮細胞における VE-Cadherin の蛋白発現の検討：皮膚微小血管における VE-Cadherin の発現を免疫染色で確認した。スケールバーの大きさは 20 $\mu$ m を示す。(n = 5)

## 考察

本研究ではグリチルリチンが BLM によって誘導される全身性強皮症類似の皮膚線維化に対し、線維芽細胞の活性化、Th2 優位な免疫環境、M2 マクロファージの浸潤、血管内皮間葉移行といった要因を抑制することにより抗線維化作

用を有することを示した。また血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスを用いることにより、*Fli1* の発現低下によって引き起こされる全身性強皮症類似の血管障害を改善することを示した。これらの結果はグリチルリチンが全身性強皮症の病態に対し幅広い改善効果を有する可能性を示唆する結果となった(図 29)。

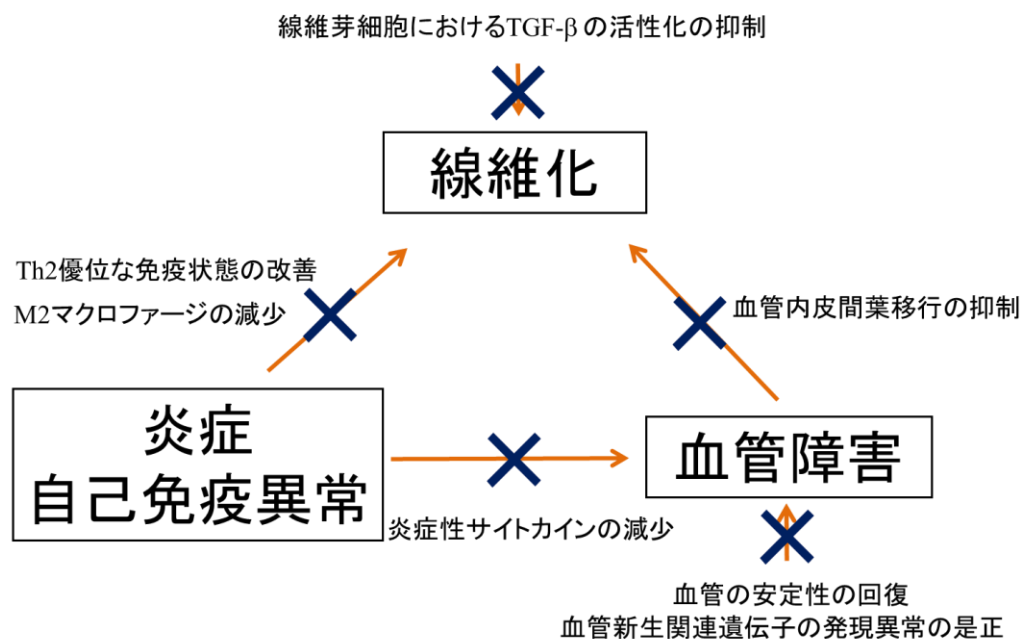


図 29 全身性強皮症疾患モデルマウスの病態に対するグリチルリチンの作用:全身性強皮症の3主徴に対するグリチルリチンの作用の模式図

まず線維化についての検討であるが、全身性強皮症の皮膚硬化に対しては皮膚線維芽細胞の活性化に関する研究が進んでいる<sup>37</sup>。本研究では線維芽細胞における TGF- $\beta$ の活性化とコラーゲン遺伝子の活性化に関わる転写因子に着目し研究を進めた。TGF- $\beta$ は二量体の前駆蛋白として線維芽細胞等で産生される。前駆蛋白はさらに切断を受け、LAP と活性型 TGF- $\beta$ が非共有結合をした small latent TGF- $\beta$  complex を形成する。更に LAP 側に Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs) が結合し large latent complex として存在する。この状態が潜在型 TGF- $\beta$ であり、LTBPs 側がフィブリリン 1 およびフィブロネクチンと相互作用を介し、細胞外マトリックスに貯蔵されている<sup>24,26</sup>。皮膚線維芽細胞において TGF- $\beta$ の活性化の過程は細胞表面にある TSP-1 等の LAP 受容体で行われる<sup>25</sup>。今回の検討においてグリチルリチンは TSP-1 の発現を抑制することが判明し、LAP 受容体における活性型 TGF- $\beta$ への転換を抑制していることが示唆された。更にグリチルリチンはコラーゲン遺伝子の転写活性を亢進させる転写因子である Smad3 やそのリン酸化、そして Ets1 の発現を抑制した。グリチルリチンとその代謝物が TGF- $\beta$ 経路に影響を与えることはその他の疾患モデル動物や細胞にて既に報告されている。経口投与の際に生じる代謝産物である

glycyrrhetic acid は TGF- $\beta$  刺激によって活性化された肝星状細胞において、核内への Smad3 の移行を抑制することにより I 型コラーゲンの産生を抑制していることが示されている<sup>3</sup>。またグリチルリチンは四塩化炭素で誘導されたラットにおける肝線維化を Smad2、Smad3、SP-1 の発現を減少させることによって抑制したとの報告もある<sup>38</sup>。更にグリチルリチンの他の代謝産物である glycyrrhizic acid は BLM によって誘導されたラットにおける肺線維化を炎症、酸化ストレス、上皮間質転換、TGF- $\beta$  経路の抑制を通じて改善することが示されている<sup>4</sup>。また glycyrrhizic acid は 3T6 線維芽細胞の増殖を抑制し、細胞周期を休止期に導きアポトーシスを引き起こすことが報告されている<sup>4</sup>。これらの既報告からもグリチルリチンとその代謝産物が様々な疾患モデル動物や病態環境細胞に対し抗線維化作用を有しており、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいても同様な作用を示したと考えられる。

次に全身性強皮症類似の免疫環境に対する検討であるが、全身性強皮症の初期の病態において、免疫状態は Th2 と Th17 優位に傾いており、マウスの皮膚に BLM を 1 週間投与することにより Th2、Th17 優位の全身性強皮症の初期の免疫状態を模することができることが知られている<sup>27,39</sup>。また CD4 陽性 T 細胞の免疫

バランスに対するグリチルリチンの影響については、**concanavalin A** によって誘導される肝線維化モデル動物によって既に報告され、**Th1/Th2**、**Th17/Treg** バランスを **Th1** と **Treg** 優位にすることにより肝線維化を抑制することが示されている<sup>40</sup>。本研究ではグリチルリチンは **BLM** 誘発強皮症モデルマウスの皮膚における **IFN- $\gamma$** 、**IL-10**、**IL-17A** の遺伝子発現量に影響を及ぼさないものの、**IL-4** と **IL-6** の遺伝子発現量は抑制することを確認した。また皮膚所属リンパ節及び脾臓から採取した **CD4** 陽性 **T** 細胞の解析を行ったところ、**INF- $\gamma$**  と **IL-17A** 発現細胞の割合に変化は生じないものの、**IL-4** 発現細胞の割合の低下を確認した。以上の結果はグリチルリチンが **BLM** 誘発強皮症モデルマウスにおける **Th1/Th2** の免疫環境の異常を是正する作用がある可能性を示している。前述の通り、全身性強皮症の病態において、初期の免疫状態は **Th2** と **Th17** 優位に傾いており **late stage** になるにしたがって **Th1** へとシフトする。**IL-17A** は皮膚線維芽細胞に対して抗線維化作用を発揮するが、全身性強皮症の線維芽細胞における **IL-17** 受容体 **A** の発現は低下しているため<sup>41</sup>、**IL-17A** に対する反応性そのものも低下している。そのため **Th2** 優位なサイトカインの産生を抑制することが、全身性強皮症の皮膚の線維化を抑制することに重要である。グリチルリチンは **BLM** により誘

導される免疫異常に対し、特に Th2 優位なサイトカインの産出を抑制する。このことは全身性強皮症の病態を改善させる可能性を示す結果と考えられる。

最後に血管障害に対する検討であるが、グリチルリチンは全身性強皮症類似の血管障害に対してもその改善作用を有することが判明した。全身性強皮症の血管障害は血管内皮間葉移行の亢進と血管新生の亢進が特徴とされる<sup>36</sup>。本研究により、グリチルリチンは BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、血管内皮間葉移行を司る転写因子 Snail-1 の発現を低下させ、血管内皮間葉移行そのものも抑制していることが明らかになった。さらに、全身性強皮症に特徴的な血管障害を模した *Fli1* ECKO マウスにおいて、グリチルリチンは血管の透過性の亢進を改善させると共に、VE-Cadherin、PECAM-1、PDGF-B といった血管新生遺伝子の発現の異常を回復させ血管の安定性を高めた。一方で血管の構造異常は改善させなかった。血管の構造異常は血管内皮細胞の異常や、血管内皮細胞と周皮細胞の接着の異常等の複合的な要因で引き起こされる。グリチルリチンを投与することにより、これらの異常は改善したものの、今回の実験系で構造異常そのものが改善しなかった。その理由としては、投与期間が 2 週間と短かったことや血管内皮細胞における *Fli1* の発現を回復しなかったため早急な改善が



難しかったことが理由と考えられ、今後長期投与における検討が必要になってくるものと思われる。

グリチルリチンの全身性強皮症に対する治療薬としての可能性であるが、*Klf5* と *Fli1* の **double heterozygous** 欠失マウスが免疫異常、血管障害、組織の線維化といった全身性強皮症の主要 3 病態を自然発症するモデルマウスとして着目されている<sup>42</sup>。またボセンタンは *Fli1* の発現が低下した細胞において、その発現を回復し、全身性強皮症類似の病態表現異常を改善することが知られている<sup>43,44</sup>。これらの報告からも *Fli1* の発現低下が全身性強皮症の病態において重要なことが示唆されるが、実臨床において *Fli1* を回復させるボセンタンが全身性強皮症の病態全てを改善するわけではない。今回の検討において、グリチルリチンは **TGF- $\beta$** によって刺激された線維芽細胞の *Fli1* の発現に影響を及ぼさず、*Fli1* **ECKO** マウスの血管内皮細胞における *Fli1* の発現にも影響を及ぼさなかった。すなわちグリチルリチンが *Fli1* の発現に影響を及ぼさずに、線維化、免疫環境の変化、血管障害といった全身性強皮症の病態に対し、効果を有することが判明した。これらの結果は *Fli1* の発現の回復を促す薬剤に加えてグリチルリチン

を用いることで、全身性強皮症の臨床において相加的な効果が期待できること

を示唆する結果となった。

## まとめ

本研究では他疾患において広く知られたグリチルリチンの抗線維化作用を BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚線維化において確認した。また全身性強皮症類似の血管障害を呈する血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの血管異常を改善させることも確認した。その中でグリチルリチンの持つ抗線維化作用は TGF- $\beta$  の活性化、Th2 優位の免疫環境、血管内皮間葉移行の亢進といった全身性強皮症類似の様々な病態異常に対し、それを改善させることで作用していることが判明した。また *Fli1* の発現低下が引き起こす全身性強皮症類似の血管障害に対しても血管の安定性を高めることによりその障害を改善していることが示された。これらの抗線維化、血管の安定性の改善といった機序は *Fli1* の発現の回復とは異なった機序で起きていた。グリチルリチンは広く実臨床に用いられている薬剤である。全身性強皮症の病態は炎症・免疫異常、血管障害、線維化と進行していくが、炎症の早期から全身性強皮症類似の環境を改善させるグリチルリチンは早期介入薬の開発が望まれる全身性強皮症の病態に対し、安全かつ効果的に作用する薬剤となる可能性が高い。また *Fli1* の発現に影響を与えないことで、

Fli1 の発現を回復させる他剤との併用の相乗効果も期待できる薬剤となっている。本研究が全身性強皮症の治療の一助となることが期待される。

## 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。最後に、*Fli1*<sup>flox/flox</sup> ; Tie2-Cre;マウスを御供与頂いた Arthritis Center, Rheumatology, Boston University School of Medicine の Maria Trojanowska 先生に深謝いたします。

## 文献

1. Denton, C.P. Systemic sclerosis: from pathogenesis to targeted therapy. *Clin Exp Rheumatol* 33, S3-7 (2015).
2. Distler, J.H., et al. Frontiers of antifibrotic therapy in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* (2016).
3. Moro, T., et al. Glycyrrhizin and its metabolite inhibit Smad3-mediated type I collagen gene transcription and suppress experimental murine liver fibrosis. *Life Sci* 83, 531-539 (2008).
4. Gao, L., et al. Glycyrrhizic acid alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Front Pharmacol* 6, 215 (2015).
5. Kim, K.J., Choi, J.S., Kim, K.W. & Jeong, J.W. The anti-angiogenic activities of glycyrrhizic acid in tumor progression. *Phytother Res* 27, 841-846 (2013).
6. Yang, P.S., et al. Glycyrrhizin, inhibitor of high mobility group box-1, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats. *Respir Res* 15, 148 (2014).
7. Chang, C.Z., Wu, S.C. & Kwan, A.L. Glycyrrhizin Attenuates

Proinflammatory Cytokines through a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma-Dependent Mechanism and Experimental Vasospasm in a Rat Model. *J Vasc Res* 52, 12-21 (2015).

8. Ma, C., et al. Immunoregulatory effects of glycyrrhizic acid exerts anti-asthmatic effects via modulation of Th1/Th2 cytokines and enhancement of CD4(+)CD25(+)Foxp3+ regulatory T cells in ovalbumin-sensitized mice. *J Ethnopharmacol* 148, 755-762 (2013).

9. Sun, Q., et al. Glycyrrhizic acid confers neuroprotection after subarachnoid hemorrhage via inhibition of high mobility group box-1 protein: a hypothesis for novel therapy of subarachnoid hemorrhage. *Med Hypotheses* 81, 681-685 (2013).

10. Wu, Q., et al. Regulation of Th1/Th2 balance through OX40/OX40L signalling by glycyrrhizic acid in a murine model of asthma. *Respirology* 21, 102-111 (2016).

11. Beyer, C., Schett, G., Distler, O. & Distler, J.H. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum* 62, 2831-2844 (2010).

12. Yamamoto, T. The bleomycin-induced scleroderma model: what have we

learned for scleroderma pathogenesis? *Arch Dermatol Res* 297, 333-344 (2006).

13. Kubo, M., et al. Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol* 163, 571-581 (2003).

14. Spyropoulos, D.D., et al. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 20, 5643-5652 (2000).

15. Liu, F., Walmsley, M., Rodaway, A. & Patient, R. Fli1 acts at the top of the transcriptional network driving blood and endothelial development. *Curr Biol* 18, 1234-1240 (2008).

16. Asano, Y., et al. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol* 176, 1983-1998 (2010).

17. Marangoni, R.G., et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol* 67, 1062-1073 (2015).

18. Qiu, B., et al. Measurement of hydroxyproline in collagen with three different methods. *Mol Med Rep* 10, 1157-1163 (2014).



19. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200, 500-503 (2003).
20. Huang, J., et al. Nintedanib inhibits fibroblast activation and ameliorates fibrosis in preclinical models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 75, 883-890 (2016).
21. Zhang, Y., et al. Inhibition of casein kinase II reduces TGFbeta induced fibroblast activation and ameliorates experimental fibrosis. *Ann Rheum Dis* 74, 936-943 (2015).
22. Jinnin, M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol* 37, 11-25 (2010).
23. Chujo, S., et al. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 203, 447-456 (2005).
24. Lafyatis, R. Transforming growth factor beta--at the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 10, 706-719 (2014).
25. Robertson, I.B., et al. Latent TGF-beta-binding proteins. *Matrix Biol* 47, 44-53 (2015).

26. Shi, M., et al. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* 474, 343-349 (2011).
27. Taniguchi, T., et al. Fibrosis, vascular activation, and immune abnormalities resembling systemic sclerosis in bleomycin-treated Fli-1-haploinsufficient mice. *Arthritis Rheumatol* 67, 517-526 (2015).
28. Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M. & Tamaki, K. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum* 44, 474-480 (2001).
29. Needleman, B.W., Wigley, F.M. & Stair, R.W. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 35, 67-72 (1992).
30. Yoshizaki, A., et al. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J Immunol* 185, 2502-2515 (2010).
31. Higashi-Kuwata, N., et al. Characterization of monocyte/macrophage subsets

in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 12, R128 (2010).

32. Jimenez, S.A. Role of endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of the vascular alterations in systemic sclerosis. *ISRN Rheumatol* 2013, 835948 (2013).

33. Mendoza, F.A., Piera-Velazquez, S., Farber, J.L., Feghali-Bostwick, C. & Jimenez, S.A. Endothelial Cells Expressing Endothelial and Mesenchymal Cell Gene Products in Lung Tissue From Patients With Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol* 68, 210-217 (2016).

34. Inoue, T., Plieth, D., Venkov, C.D., Xu, C. & Neilson, E.G. Antibodies against macrophages that overlap in specificity with fibroblasts. *Kidney Int* 67, 2488-2493 (2005).

35. Toyama, T., et al. Tamibarotene Ameliorates Bleomycin-Induced Dermal Fibrosis by Modulating Phenotypes of Fibroblasts, Endothelial Cells, and Immune Cells. *J Invest Dermatol* 136, 387-398 (2016).

36. Asano, Y. & Sato, S. Vasculopathy in scleroderma. *Semin Immunopathol* 37,

489-500 (2015).

37.       Bhattacharyya, S., Wei, J. & Varga, J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* 8, 42-54 (2012).

38.       Qu, Y., Zong, L., Xu, M., Dong, Y. & Lu, L. Effects of 18alpha-glycyrrhizin on TGF-beta1/Smad signaling pathway in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 1292-1301 (2015).

39.       Matsushita, T., Hasegawa, M., Hamaguchi, Y., Takehara, K. & Sato, S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J Rheumatol* 33, 275-284 (2006).

40.       Tu, C.T., et al. Glycyrrhizin regulates CD4+T cell response during liver fibrogenesis via JNK, ERK and PI3K/AKT pathway. *Int Immunopharmacol* 14, 410-421 (2012).

41.       Nakashima, T., et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *J Immunol* 188, 3573-3583

(2012).

42. Noda, S., et al. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun* 5, 5797 (2014).

43. Akamata, K., et al. Bosentan reverses the pro-fibrotic phenotype of systemic sclerosis dermal fibroblasts via increasing DNA binding ability of transcription factor Fli1. *Arthritis Res Ther* 16, R86 (2014).

44. Akamata, K., et al. Endothelin receptor blockade ameliorates vascular fragility in endothelial cell-specific Fli-1-knockout mice by increasing Fli-1 DNA binding ability. *Arthritis Rheumatol* 67, 1335-1344 (2015).

表 1. Sequences of primers for qRT-PCR

Genes	Primer sequences	
<i>Colla1</i>	Forward:	5'-GCCAAGAAGACATCCCTGAAG-3'
	Reverse:	5'-TGTGGCAGATACAGATCAAGC-3'
<i>Colla2</i>	Forward:	5'-GGAGGGAACGGTCCACGAT-3'
	Reverse:	5'-GAGTCCGCGTATCCACAA-3'
<i>Col3a1</i>	Forward:	5'-TTTGTGCAAGTGG AACCTG-3'
	Reverse:	5'-TGGACTGCTGTGCCAAAATA-3'
<i>Mmp13</i>	Forward:	5'-TGATGGCACTGCTGACATCAT-3'
	Reverse:	5'-TGTAGCCTTTGGA ACTGCTT-3'
<i>Ctgf</i>	Forward:	5'-GTGCCAGAACGCACACTG-3'
	Reverse:	5'-CCCCGGTTACTCCAAA-3'
<i>Tgfb1</i>	Forward:	5'-GCAACATGTGGA ACTCTACCAGAA-3'
	Reverse:	5'-GACGTCAAAAGACAGCCACTCA-3'
<i>Thbs1</i>	Forward:	5'-TGGTAGCTGGAAATGTGGTG-3'
	Reverse:	5'-CAGGCACTTCTTTGCACTCA-3'
<i>Itgav</i>	Forward:	5'-GGTGTGGATCGAGCTGTCTT-3'
	Reverse:	5'-CAAGGCCAGCATTACAGTG-3'
<i>Itgb3</i>	Forward:	5'-GTGGGAGGGCAGTCCTCTA-3'
	Reverse:	5'-CAGGATATCAGGACCCTTGG-3'
<i>Itgb5</i>	Forward:	5'-ACCTGCCAAGATGGCATATC-3'
	Reverse:	5'-CACGGACACTTCAAAGGATG-3'
<i>Il1b</i>	Forward:	5'-TTGACGGACCCCAAAGAT-3'
	Reverse:	5'-GAAGCTGGATGCTCTCATCTG-3
<i>Il4</i>	Forward:	5'-ACGGAGATGGATGTGCCAAACGTC-3'
	Reverse:	5'-CGAGTAATCCATTTGCATGATGC-3'
<i>Il6</i>	Forward:	5'-GATGGATGCTACCAA ACTGGAT-3'
	Reverse:	5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3'
<i>Arg1</i>	Forward:	5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3'
	Reverse:	5'-CAGATATGCAGGGAGTCACC-3'

<i>Snail1</i>	Forward:	5'-CAACTATAGCGAGCTGCAGGA-3'
	Reverse:	5'-ACTTGGGGTACCAGGAGAGAGT-3'
<i>Cad5</i>	Forward:	5'-TCCTCTGCATCCTCACTATCACA-3'
	Reverse:	5'-GTAAGTGACCAACTGCTCGTGAAT-3'
<i>Pecam1</i>	Forward:	5'-TCCCTGGGAGGTCGTCCAT-3'
	Reverse:	5'-GAACAAGGCAGCGGGGTTTA-3'
<i>Pdgfb</i>	Forward:	5'-CCCACAGTGGCTTTTCATTT-3'
	Reverse:	5'-GTGGAGGAGCAGACTGAAGG-3'
<i>Fli1</i>	Forward:	5'-ACTTGGCCAAATGGACGGGACTAT-3'
	Reverse:	5'-CCCGTAGTCAGGACTCCCG-3'
<i>Gapdh</i>	Forward:	5'-CGTGTTCTACCCCAATGT-3'
	Reverse:	5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-3'

表 2 略語一覽

qRT-PCR	quantitive real time polymerase chain reaction
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
MMP13	matrix metaroproteinase 13
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
CTGF	connective tissue growth factor
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PDGF-B	platelet derived growth factor-B
FITC	fluorescein isothiocyanate
Th	helper T
TNF	tumor necrosis factor
CCL2	C-C motif chemokine