

論文の内容の要旨

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

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。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。これまでの研究で全身性強皮症は多因子疾患であり、遺伝要因と環境因子の両者がその複雑な病態形成に重要であることがわかってきている。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。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 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。また 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。

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・皮膚掻痒症といった皮膚科領域の治療薬として使用されるが、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- β 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。またグリチルリチン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があることが示されている。

更には、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きたすことが示されている。そして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。これまでグリチルリチンとその代謝産物の効果があると認められている線維化、血管障害、免疫環境異常といった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あると期待できる。そこで今回、全身性強皮症のモデルマウスとして広く用いられているブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症モデルマウス並びに全身性強皮症における血管障害を模した *Fli1*ECKO マウスにグリチルリチンを投与し、全身性強皮症の病態に対する影響について検討を行った。

まずはグリチルリチンが皮膚の線維化に及ぼす影響について検討を行った。BLM 誘発強皮症モデルマウスは皮膚線維化を引き起こすが、グリチルリチンは BLM で誘発される皮膚肥厚を有意に抑制し、皮膚におけるヒドロキシプロリン含有量も有意に抑制した。また皮膚におけるコラーゲン産生を担う筋線維芽細胞数の減少と *Col1a1*, *Col1a2*, *Col3a1* 遺伝子の発現の抑制および *Mmp13* 遺伝子の発現を亢進させた。皮膚の線維化の誘導、維持には線維芽細胞における TGF- β と CTGF の発現が重要である。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いて *Tgfb1* と *Ctgf* 遺伝子の発現量に影響を与えなかった。TGF- β 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- β signaling を亢進させる。TGF- β signaling の下流には転写因子 Smad3 が存在し、Smad3 が核内に移行することにより、コラーゲン遺伝子の転写を促進する。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。このことはグリチルリチンが TGF- β の活性化の抑制に関与している可能性を示唆する結果となった。そこで次に TGF- β の活性化に対するグリチルリチンの影響について検討を行った。TGF- β を活性型へ変換させる因子として、線維芽細胞表面における integrin $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, そして thrombospondin 1 (TSP-1) の発現が挙げられる。BLM 誘発強皮症モデルマウスの線維芽細胞においてもそれぞれの発現が亢進していることが知られている。そこで各種因子の発現について検討を加えたところ、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 TSP-1 の発現を抑制することが確認された。また TGF- β 1 で刺激した正常ヒト皮膚線維芽細胞において、グリチルリチンは Smad3 の発現を低下させ、さらにはそのリン酸化や Ets1 といったタイプ 1 コラーゲン発現を亢進させるような転写因子の発現も抑制した。一方で抑制系の転写因子である *Fli1* への発現には影響を及ぼさなかった。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- β 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。

次にグリチルリチンの全身性強皮症類似の免疫環境に対する影響について検討を行った。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。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いて *I11b*、*I14*、*I16* 遺伝子の発現量を抑制し、炎症細胞における IL-1b、IL-6 の発現を抑制した。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 Th2 優位な炎症環境を抑制していると予想された。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- γ 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。更には皮膚の線維化に寄与する M2 マクロファージのマーカーである Arginase-1 の発現の低下も認められた。以上の結果はグリチルリチンが全身性強皮症における Th2 優位な免疫環境の異常を是正する効果があることを示していると考えられた。

全身性強皮症の血管障害は血管新生の亢進と血管内皮間葉移行の亢進が特徴とされる。本研究でグリチルリチンは BLM によって誘導される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、血管内皮間葉移行を抑制していることが示された。また血管の安定性のマーカーのひとつである α -SMA の血管周囲における発現を亢進させた。これらのことはグリチルリチンが BLM によって引き起こされる血管内皮間葉移行や血管の安定性の低下を改善することを示唆する結果となった。さらにグリチルリチンは全身性強皮症における血管障害を模した *Fli1* ECKO マウスにおいて VE-Cadherin、PECAM-1、PDGF-B といった血管内皮細胞の接着に関係する因子の発現を上昇させた。そして重要なことにグリチルリチンの投与によって *Fli1* の発現の回復は起きていなかった。すなわち全身性強皮症の血管障害において、*Fli1* の発現低下は重要な役割を担っているが、グリチルリチンは *Fli1* を介さない経路によって全身性強皮症の血管障害を改善していることが示唆された。

BLM 誘発強皮症モデルマウス及び *Fli1* ECKO マウスを用いた本研究によって、グリチルリチンが全身性強皮症類似の線維化の抑制と免疫環境の改善、そして血管障害の改善に効果を有することが明らかになった。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、安全に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。