

博士論文

ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの
線維化と免疫異常の病態に対して
レチノイド Am80 が及ぼす影響についての検討

遠山 哲夫

目次

1) 要旨	4
2) 序文	5
3) 研究方法	11
a) 動物	
b) ブレオマイシン(BLM)誘発強皮症モデルマウスの作成	
c) Am80 の投与	
d) 免疫染色と組織学的評価	
e) 皮膚のハイドロキシプロリン測定	
f) 皮膚における各種遺伝子の mRNA 発現量の検討	
g) フローサイトメトリーによる解析	
h) 腹腔内マクロファージの回収	
i) マクロファージのフェノタイプの解析	
j) ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞の培養と解析	
k) ヒト皮膚微小血管内皮細胞の培養と解析	
l) マウス皮膚切片の免疫蛍光染色	
m) ヒト皮膚線維芽細胞の培養	
n) 免疫ブロッティング	

o) Promoter assay	
p) mRNA の安定性の解析	
q) 統計学的解析	
4) 結果	25
a) Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける皮膚線維化を改善する	
b) Am80 は CD4 陽性 T 細胞の IL-4、IL-17A、IFN- γ の産生を抑制する	
c) Am80 はマクロファージが M2 マクロファージになるのを抑制する	
d) Am80 は皮膚微小血管内皮細胞において ICAM-1 の発現を抑制する	
e) Am80 は endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) を抑制する	
f) Am80 は、COL1A2 遺伝子の転写活性を下げるだけでなく、mRNA の安定性を変化させることによって、皮膚線維芽細胞に対し抗線維化作用を発揮する	
5) 考察	53
6) 謝辞	64
7) 引用文献	65

1) 要旨

全身性強皮症は皮膚および内臓の線維化と血管障害を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。本研究は **BLM** 誘発強皮症モデルマウスにおいてレチノイド **Am80** が様々な機序を介して皮膚線維化を抑制することを明らかにした。皮膚線維芽細胞に対しては、**Am80** は I 型コラーゲンの産生を抑制した。免疫細胞に対しては、**Am80** は **CD4** 陽性 T 細胞の分化を抑制し、マクロファージを線維化促進作用のある **M2** 型から **M1** 型へとシフトさせた。血管内皮細胞に対しては、**Am80** は **ICAM-1** の発現を抑制し、**EndoMT** を抑制した。以上より **Am80** は線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞に働くことで、抗線維化作用を有することが示された。

2) 序文

全身性強皮症（systemic sclerosis; SSc）は皮膚および内臓の線維化と血管障害を特徴とする全身性の自己免疫疾患である[1]。本症の皮膚硬化は一般に手指に初発し、びまん皮膚硬化型全身性強皮症では皮膚硬化は近位へと拡大する。皮膚病理学的所見としては、真皮下層から膠原線維の膨化増生が始まり、真皮中層、場合によっては上層まで線維化がみられることが挙げられる[2]。線維化による内臓病変として最も多いのは食道をはじめとする消化管病変、次に肺病変が続く[3]。消化管病変は平滑筋の萎縮と線維化がその病理学的特徴である[4] [5]。これにより蠕動運動障害が生じ、逆流性食道炎、便通障害などの機能障害を生じる。肺病変は間質性肺病変が最も頻度が高い。組織学的には non-specific interstitial pneumonia (NSIP) パターンに分類される[6]。初診時から進行しない例から数年で呼吸不全に陥る例まで多様であり、進行例に対する治療は困難である場合が多い。

強皮症における線維化は細胞外基質の過剰沈着が主体であり、皮膚における線維化の主たる成分はⅠ型コラーゲンである[7]。その他Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ型コラーゲンやフィブロネクチン、グリコサミノグリカンなどの細胞外基質の過剰沈着もみられることが明らかになっている[8] [9]。全身性強皮症ではコラーゲン合

成が転写レベルで亢進していることが示されている[10]。この亢進には種々のサイトカインの過剰発現が関与していると考えられているが、中でも transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)および connective tissue growth factor (CTGF) が中心的な役割を果たしている。TGF- β 1 シグナリングの異常は強皮症皮膚線維芽細胞が恒常的に活性化される中心的な機序の一つであり、強皮症線維芽細胞では TGF- β 1 の下流にある Smad3 が恒常的にリン酸化していることが知られている[11]。また TGF- β 1 は、latency associated peptide (LAP)と結合した潜在型として細胞から分泌されるが、これが受容体と結合するためには LAP から分離して活性型になる必要がある。強皮症皮膚線維芽細胞の細胞表面ではインテグリン α V β 5 やトロンボスポンジン 1 の発現が亢進しており、TGF- β 1 が LAP から離れて活性型になるのを促進している[12] [13]。CTGF は全身性強皮症の硬化皮膚において mRNA 量が増加しており、血清においてその蛋白量が上昇している[14] [15]。マウスにおいて TGF- β 1、CTGF の線維化における役割を検討した報告では、CTGF 投与を TGF- β 1 に先行させても線維化は誘導されないが、TGF- β 1 を CTGF に先行し投与すると線維化が誘導された[16]。このことより CTGF は、TGF- β 1 と協調して線維化を促進すると考えられている。

さらにコラーゲンの分解機構の異常も強皮症における皮膚硬化に関わっている。Matrix metalloproteinase-1 (MMP1)はヒトにおける I 型コラーゲンの主要な分

解酵素である。マウスにおいて MMP1 は胎児期にしか発現しておらず、ヒト MMP1 と同様の機能を持つのは MMP13 である。強皮症の病変皮膚では MMP1 の活性が低下し、I 型コラーゲンの分解が抑制されている[17]。

血管障害も強皮症の病態形成に大きく関与し、全身性强皮症発症初期においては皮膚硬化が始まる以前からレイノー現象がみられる場合が多い[18]。また、指尖部潰瘍や壊疽は強皮症患者の手や足の機能を損なう重大の症状の一つである。これらは末梢の血流が低下する冬季に増悪する傾向にあるが、難治で 1 年中改善しない例も多い。内膜の肥厚を伴う小血管障害と、中膜の肥厚を主体とする中血管障害の両者がその病態として指摘されている[19] [20] [21] [22]。また強皮症患者皮膚では、血管内皮細胞が活性化しており、intercellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1)や vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)の発現が亢進しており、マクロファージやリンパ球など炎症細胞が健常皮膚より多く血管から遊走していることが知られている[23] [24]。これにより慢性の炎症が生じる結果、過剰な細胞外基質の蓄積が起こり、線維化につながると言われている[25]。

また、主として免疫細胞より産生される様々な細胞成長因子、サイトカイン、ケモカインも強皮症の発症に関与する[26]。これらの産生亢進が、I 型コラーゲンなどの細胞外基質の過剰沈着を誘導し、異常な血管新生や免疫反応を引き起こすことが示唆されている[27] [28]。たとえば、強皮症患者の皮膚において、T

細胞の浸潤が増しており、その中でも CD4 陽性 T 細胞の浸潤が増えており、皮膚におけるサイトカイン産生が上昇するが知られている[29]。

特に、Interleukin (IL)-4 や IL-13 といった Th2 サイトカインが強皮症患者血清で上昇していることが報告されており[30]、これらが線維芽細胞からのコラーゲン産生を促進しており、線維化促進作用があると考えられている[31] [32]。以上のように、全身性強皮症は、線維化、血管障害、免疫異常を特徴とする全身性疾患であり、これらが相互に関係しあって、複雑な病態を形成している。

全身性強皮症に対して様々な治療法が試みられているが未だ満足の結果は得られていない。

皮膚硬化に対しては全身ステロイド投与が治療の第一選択である。[33] [34]。また、近年エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンが、全身性強皮症における肺高血圧に対し使用されシクロフォスファミドは全身性強皮症の間質性肺病変に対する治療薬として使用されている。しかし、これら治療薬の有用性は限定的である[35] [36] [37] [38] [39]。このように全身性強皮症に対し十分な効果を持つ治療薬は未だなく、その開発が待たれている。

レチノイド Am80 は急性前骨髄性白血病に対する治療薬として開発され、タ

ミバロテンとして臨床で使用されている薬剤である。レチノイドはレチノイン酸受容体に結合し、その作用を発揮する合成物質の総称である。様々な種類のレチノイドが開発されており、その作用はレチノイドごとに異なる。Am80 はレチノイン酸受容体 α 、 β に結合し、 γ には結合しない、また細胞質内のレチノイン酸結合蛋白と親和性が低いという薬理的特徴を有しており、他のレチノイドに見られない特徴を有する[40]。レチノイン酸受容体 γ からのシグナルは CD8 陽性 T 細胞やマクロファージからの炎症性サイトカイン発現を亢進させることより、レチノイン酸受容体 γ に結合しない Am80 は他のレチノイドと比較しより炎症状態を改善させる方向に働くと考えられる[41]。また全トランス型レチノイン酸 (all-trans retinoic acid; ATRA) は表皮の増殖と分化を亢進させるが、Am80 はこうした作用がほとんどないとされる[42]。

Am80 は、RAR α を介し転写因子 KLF5 に結合し、平滑筋細胞の活性化を抑制することでアンギオテンシン II により誘発される心筋の線維化、心肥大を緩和することが知られている[43]。

Am80 の免疫系に対する作用としては、T 細胞の Th1 への分化を促進し、Th17 や制御性 T 細胞への分化を抑制することが知られている[44]。また、Am80 によりマウスのリンパ球における IL-6 産生が抑制されるなどの報告がある[45]。

レチノイドの血管障害に対する影響についてもいくつかの報告があり、例え

ば ATRA は血管平滑筋細胞の増殖を抑制することで動脈硬化の病態を改善するとともに[46] [47]、血管平滑筋において NO 産生酵素をリン酸化することで NO 産生を亢進させ、血流を改善させる[48]。これらの報告より、Am80 が線維化、炎症・免疫異常、血管障害を改善することで、全身性強皮症に対し、治療的効果を示す可能性が考えられた。

本研究は、BLM 誘発強皮症モデルマウスを用いて、全身性強皮症の主たる三要素である線維化、血管障害、炎症・免疫異常に対する Am80 の効果を検討することにより、全身性強皮症の新しい治療法に結びつけることを目的とした。

3) 対象および方法

a) 動物

本研究では野生型マウス C5BL/6 マウス (WT)を日本 SLC (Hamamatsu, Japan)より購入し、使用した。すべてのマウスは実験開始時に 6-8 週齢で統一した。雌、雄とも同様の実験結果が得られたが、皮膚線維化の評価において、ベースラインの真皮の厚さを統一するため、雌を使用した。マウスは specific pathogen free 環境で水と餌は自由に摂取できる形で飼育した。すべての実験プロトコールは東京大学の動物実験委員会の承認を受けた。

b) ブレオマイシン(BLM)誘発強皮症モデルマウスの作成

マウスの皮下に BLM を局所注入することで、皮膚および肺の線維化が促進される。BLM 誘発強皮症モデルマウスは、強皮症モデルマウスとして一般的に使用されている動物モデルの一つである。

今回は日本化薬株式会社 (Tokyo, Japan)のブレオ注射用 15mg を 15ml の phosphate-buffered saline (PBS)に溶解した。

上記 BLM 溶解液 200ml (200mg)を剃毛したそれぞれのマウスの背部皮下に 4

週間連日注射した。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注射した。最終注射日翌日に背部皮膚を回収した。

c) Am80 の投与

Am80 は首藤紘一氏 (財団法人乙卯研究所 所長)より供与を受けた。マウス飼料 MF をオリエンタル酵母工業株式会社 (Tokyo, Japan)より購入し、これを粉砕したものに 100mg と 50mg の Am80 を 5kg の MF に混ぜたものをそれぞれオリエンタル酵母工業株式会社にて成形し、低濃度と高濃度の Am80 配合マウス飼料を作成した。マウスの体重、マウス飼料の 1 日摂取量を測定し、2 種類の Am80 配合マウス飼料を調節することで約 1mg/kg/day の用量で Am80 を経口投与した。コントロール群では通常のマウス飼料 MF を投与した[49]。Am80 投与は BLM、または PBS の皮下注射開始の 1 週間前から行った。

PBS を皮下注射し通常のマウス飼料 MF を経口投与した群、PBS を皮下注射し Am80 配合マウス飼料を経口投与した群、BLM を皮下注射し通常のマウス飼料 MF を経口投与した群、BLM を皮下注射し Am80 配合マウス飼料を経口投与した群の 4 群に分け、解析にはそれぞれ 5-8 匹のマウスを用いた。いずれの研究も東京大学動物実験規則を遵守して行った。

d) 免疫染色と組織学的評価

上記 4 群のマウスから背部皮膚を採取して 10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋の後、切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。一検体中 10 箇所をランダムに選び、皮膚の厚さを測定した。皮膚の厚さは表皮顆粒層の上端から真皮と皮下脂肪織の境界までの長さとして定義した。次に、トリイズンブルー染色、抗マウス CD4 抗体 (BD PharMingen, San Diego, CA, USA)、抗マウス CD8 抗体 (BD PharMingen)、抗マウス F4/80 抗体 (Serotec Inc., Eching, Germany)を用いて免疫染色を行い、それぞれ陽性細胞数を 400 倍の倍率で一検体中 10 箇所をランダムに選び測定し、その平均値を求めた。以上の測定および検討は 2 人の検者が盲検し、結果を平均した。

e) 皮膚のハイドロキシプロリン測定

ハイ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。

f) 皮膚における各種遺伝子の mRNA 発現量の検討

各群のマウス皮膚より RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen inc., Germantown, MD, USA)を用いて total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR MasterMix (TOYOBO, Osaka, Japan)を使用し、cDNA を作成した。各種遺伝子の mRNA 発現量を定量的 real-time PCR で測定した。

定量的 real-time PCR には THUNDERBIRD qPCR Mix (TOYOBO)、Applied Biosystem StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied biosystem, Foster City, CA, USA) を用いて行った。

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*/*GAPDH*)遺伝子を用いてターゲット遺伝子の mRNA の相対発現量を算出した。それぞれの検体は triplicate で測定し、平均値を解析に用いた。PCR のために用いられたプライマーを以下に示す（以下すべて大文字のものはヒト、頭文字のみ大文字のものはマウスにおける遺伝子であることを示す）。

Colla1 forward 5'-GCCAAGAAGACATCCCTGAAG-3' および reverse

5'-TGTGGCAGATACAGATCAAGC-3';

Colla2 forward 5'-GCAGGTTCACCTACTCTGTCCT-3' および reverse

5'-CTTGCCCCATTCATTTGTCT-3'

Col3a1 forward 5'-TTTGTGCAAGTGGAACCTG-3' および reverse

5'-TGGACTGCTGTGCCAAAATA-3';

Col5a1 forward 5'-GGACTAGTCCGCTTTCAACTTGTCCGATGG-3' および

reverse 5'-GTGGTCACTGCGGCTGAGGAACTTC-3';

Mmp13 forward 5'-GCCAGAACTTCCCAACCAT-3' および reverse

5'-TCAGAGCCCAGAATTTTCTCC-3'

Tgfb1 forward 5'-GCAACATGTGGAAGCTCTACCAGAA-3' および reverse

5'-GACGTCAAAAGACAGCCACTCA-3';

Ctgf forward 5'-GTGCCAGAACGCACACTG-3' および reverse

5'-CCCCGGTTACTCTCCAAA-3';

Il4 forward 5'-CAACGAAGAACACCACAGAG-3' および reverse

5'-GGACTTGGACTCATTTCATGG-3';

Il6 forward 5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3' および reverse

5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3';

Il10 forward 5'-TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA-3' および reverse

5'-ACAGGGGAGAAATCGATGACA-3';

Il13 forward 5'-GGATATTGCATGGCCTCTGTAAC-3' および reverse

5'-AACAGTTGCTTTGTGTAGCTGA-3';

Il17a forward 5'-CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC-3' および reverse

5'-AGCTTTCCCTCCGCATTGACACAG-3';

Tnfa forward 5'-ACCCTCACACTCAGATCATCTTC-3' および reverse

5'-TGGTGGTTTGCTACGACGT-3';

Ifng forward 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' および reverse

5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3';

Mcp1 forward 5'-CATCCACGTGTTGGCTCA-3' および reverse

5'-GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT- 3'

Ym1 forward 5'-GGGCATACCTTTATCCTGAG-3' および reverse

5'-CCACTGAAGTCATCCATGTC- 3';

Inos forward 5'-CGAAACGCTTCACTTCCAA-3' および reverse

5'-TGAGCCTATATTGCTGTGGCT-3';

Il12p35 forward 5'-ACTCTGCGCCAGAAACCTC-3' および reverse

5'-CACCTGTTGATGGTCACGAC-3'

Icam1 forward 5'-GACGCAGAGGACCTTAACAG-3' および reverse

5'-GACGCCGCTCAGAAGAAC-3';

Gapdh forward 5'-CGTGTTCTACCCCCAATGT-3' および reverse

5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT- 3';

COL1A2 forward 5'-GATGTTGAACTTGTTGCTGAGG-3' および reverse 5'

-TCTTTCCCATTCATTTGTCTT-3' ;

MMP1 forward 5'-GCTAACCTTTGATGCTATAACTACGA-3' および reverse

5'-GGATTTGTGCGCATGTAGAA-3';

CTGF forward 5'-TTGCGAAGCTGACCTGGAAGAGAA-3' および reverse

5'-AGCTCGGTATGTCTTCATGCTGGT - 3';

INOS forward 5'-CAACGTGGAATTCACCTCAGC-3' および reverse

5'-ATCGAAGCGGCCGTACTT-3'

IL12p35 forward 5'-GATGAGCTGATGCAGGCC-3' および reverse

5'-AGTCCTCCACCTCGTTGTCCGTGA-3'

ICAM1 forward 5'-TAGAGACCCCGTTGCCTAAA-3' および reverse

5'-TCATACACCTTCCGGTTGTTC-3';

GAPDH forward 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' および reverse

5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3';

g) フローサイトメトリーによる解析

前述と同様の方法にマウスを4群に分け、**BLM** もしくは **PBS** を7日間皮下注射したマウスを作成し、翌日に腋窩リンパ節、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、サイトカインを細胞内染色するため 1 µg/ml の brefeldin A (GolgiStop; BD Pharmingen) 存在下で 10 ng/ml の phorbol 12-myristate

13-acetate (PBS) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) と 1 μ g/ml の ionomycin (Sigma-Aldrich) にて 4 時間リンパ球を刺激した。その後細胞を FACS buffer (1% ウシ胎児血清含有 PBS) により洗浄し、細胞表面を抗 CD4 抗体 (RM4-5; Biolegend, San Diego, CA, USA)および 抗 CD25 抗体 (PC01; Biolegend) 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 (11B11; BioLegend)、抗 IL-17A 抗体 (TC11.18H10; BioLegend)、抗 IFN- γ 抗体 (XMG1.2; BioLegend)、抗 T-bet 抗体 (4B10; Biolegend)、抗 GATA-3 抗体 (TWAJ; eBioscience, San Diego, CA, USA)、抗 ROR- γ t 抗体 (B2D; eBioscience)、および抗 Foxp3 抗体 (FJK-16s; eBioscience) にて染色を行った。細胞表面マーカーの解析では、抗 CD4 抗体、抗 CD62L 抗体 (MEL-14; Biolegend)、抗 CD44 抗体(IM7; Biolegend) にて染色を行った。細胞を洗浄後、FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) にて解析を行った。ネガティブコントロールとして同濃度の蛍光標識アイソタイプコントロール抗体を用いて染色を行った。

h) 腹腔内マクロファージの回収

6-8 週齢の野生型マウス C57BL/6 に 3% の thioglycollate broth を 1ml 腹腔内注射し、4 日後にマウスに 0.25%のウシ胎児血清含有 PBS を腹腔内注射した後、腹

腔に 25 ゲージ針を穿刺し、腹腔内液を回収した。回収した腹腔内液を遠心し、上清を廃棄したのち、1%のペニシリンとストレプトマイシンを含む 10%のウシ胎児血清含有 RPMI 培養液にて再懸濁した。 1×10^7 cells/ml の細胞密度になるように希釈した後、6 ウェルの細胞培養プレートに入れて 5% CO₂、37°C に設定したインキュベータで 15 分間培養した。その後プレートに固着していない浮遊細胞を RPMI 培養液で洗い破棄した。この洗浄操作を 4 回繰り返した。プレートに固着した細胞を腹腔内マクロファージとして、5% CO₂、37°C に設定したインキュベーター内で培養した。

i) マクロファージのフェノタイプの解析

上記の腹腔内マクロファージを 20 ng/ml の IL-4 (R & D systems, Minneapolis, MN, USA) もしくは 20 ng/ml の IL-10 (R & D systems) と 10ng/ml TGF- β 1 (R & D systems) にて、Am80 存在および非存在下で 24 時間刺激した。Total RNA を前述の方法で回収し、定量的 real-time PCR にて各種 mRNA 発現量を解析した。次に細胞表面マーカーを解析するため、上述の通りに 24 時間刺激した細胞の培養液を吸い取り、1 mM ethylenediamine tetraacetic acid 含有 PBS を加え、プレートに固着した細胞を擦り取り、細胞懸濁液を回収した。回収したマクロファージのフェノタイプを調べるため、スキャベンジャーレセプターである CD204 とマン

ノースレセプターである CD206 を細胞表面マーカーとして、抗 CD204 抗体 (NSU; R & D systems)、抗 CD206 抗体 (C068C2; Biolegend) にて染色し、フローサイトメトリーで解析した。

j) ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞の培養と解析

THP-1 細胞は 1980 年に急性単球性白血病の 1 歳患児から確立されたヒト単球系細胞株である。THP-1 細胞は American Tissue Culture Collection (Rockville, MA, USA) から購入した。THP-1 細胞を 10% ウシ胎児血清含有 RPMI 培養液にて、5% CO₂、37°C に設定したインキュベーター内で培養した。THP-1 細胞を、Am80 存在および非存在下で 100 ng/ml の IFN- γ (R&D Systems) で 6 時間刺激したのち、100 ng/ml の lipopolysaccharides (InvivoGen, San Diego, CA, USA) で 24 時間刺激することで M1 マクロファージ様細胞に分化させた。Total RNA を前述の方法で回収し、定量的 real-time PCR にて各種 mRNA 発現量を解析した。

k) ヒト皮膚微小血管内皮細胞の培養と解析

ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HDMEC) は Lonza Ltd. (Baxel, Switzerland) より購入し、EGM BulletKit (Lonza Ltd.) 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。HDMECs

に Am80 もしくはそれと同量の溶媒である DMSO を加え、1 時間後、0.5 ng/ml の TNF- α を加え、24 時間刺激した。Total RNA を前述の方法で回収し、定量的 real-time PCR にて各種 mRNA 発現量を解析した。

l) マウス皮膚切片の免疫蛍光染色

皮膚切片を乗せたスライドを blocking solution (3%牛血清アルブミン (Sigma-Aldrich), 0.02% Triton X-100 含有 PBS)にて 30 分間固定を行った。その後 1 次抗体を塗布し 4°C で一晩反応させた。1 次抗体としてヤギ抗マウス VE-cadherin 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、ウサギ抗マウス fibroblast-specific protein 1 (FSP1) 抗体(Abcam, Cambridge, MA, USA)を用いた。その後切片を PBS で洗浄した後、2 次抗体をかけ 1 時間室温で反応させた。2 次抗体として Alexa fluor 488 ロバ抗ヤギ抗体 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) and Alexa fluor 594 ロバ抗ウサギ抗体 (Invitrogen)を用いた。DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を切片に滴下し、カバースリップを乗せた。Biozero BZ-8100 (KEYENCE, Osaka, Japan)を用い、488 nm (緑)、594 nm (赤)、405 nm (青)の波長の解析を行った。

m) ヒト皮膚線維芽細胞の培養

健常人皮膚からヒト正常皮膚線維芽細胞を採取した。これらの検体の採取は被験者の同意および施設の承認を得た上で行った。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培地を使用した。室温 37℃、CO₂ 濃度 5% に保持したインキュベーター内で単層培養し、3～10 回継代した細胞を使用した。

細胞は subconfluence になるまで上述した 10% 牛胎児血清含有培地にて培養し、その後実験に使用する前に 24 時間無血清添加 0.1% 牛血清アルブミン含有培地にて培養した。Am80 もしくはそれと同量の溶媒である DMSO を加え、1 時間後、2 ng/ml の TGF- β 1 (R & D systems) を加え 24 時間刺激した。

n) 免疫ブロッティング

培養皮膚線維芽細胞を 4℃ の PBS で洗浄し、物理的に擦り取り、遠心にて上清を破棄した後、pellet を 1% TritonX-100、50 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、3 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、50 mM NaF、2 mM Na₃VO₄、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、10 mg/ml leupeptin、10 mg/ml pepstatin、10 mg/ml aprotinin を含有する lysis buffer にて溶解し細胞溶解液を作成した。不溶分画は 15 分間 13000rpm にて遠心し除去した。Bio-rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて、上清のタンパク質濃度を測定した。各 15

μg の検体を、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜をやぎ抗ヒト type 1 collagen 抗体 (Southern Biotechnology associate, Birmingham, AL, USA)、マウス抗ヒト MMP1 抗体 (Chemicon, San Francisco, CA, USA) を用いて反応させた後、Horse-radish peroxidase と結合した二次抗体と反応させ、enhanced chemiluminescence で発光させた。

o) Promoter assay

ヒト COL1A2 遺伝子のプロモータ活性を調べるため、ヒト COL1A2 遺伝子 promoter の-722bp から+58 領域に firefly luciferase reporter 遺伝子を結合させて -722 COL1A2/Lux constructs を作成した[12]。これと併せて renilla luciferase construct を X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)を用いてヒト正常皮膚線維芽細胞に transfection した。24 時間培養したのち、上述と同様に Am80 存在および非存在下で 2 ng/ml TGF-β1 にて 24 時間刺激を加えた。Whole cell lysate を回収し、luciferase 活性を Dual-Luciferase assay kit (Promega, Madison, WC, USA)にて測定した。Renilla luciferase activity にて補正した相対 luciferase activity を解析した[50]。

p) mRNA の安定性の解析

COL1A2 遺伝子の mRNA の安定性を解析するため、Am80 の存在下および非存在下で 2ng/ml TGF- β 1 にてヒト正常皮膚線維芽細胞の刺激を開始した後、1.0 μ g/ml actinomycin D (Sigma-Aldrich)を加えて転写を止め、一定時間経過した後 total RNA を回収した。COL1A2 遺伝子の mRNA 量を定量的 real-time PCR にて解析した。

q) 統計学的解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。 $p < 0.05$ を有意とした。多群間の比較においては、まずノンパラメトリック多重比較検定で Steel-Dwass 法を用いた。正規性、等分散が認められたものは、Bonferroni/Dunn 法、もしくは、Tukey-Kramer 法を用いた。等分散がみとめられなかったものに対しては、Scheffe's F test を用いた。上記はすべて危険率 5 %にて有意差を検討した。

なお、患者検体の取り扱いは、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。

4) 結果

a) Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける皮膚線維化を改善する

Am80 の皮膚線維化に対する効果を検討するため、BLM 誘発強皮症モデルマウスを用いて、皮膚厚を測定した。BLM は 4 週間投与し、その翌日の背部皮膚にて検討を行った。BLM 投与によりマウス皮膚厚は PBS 投与群よりも有意に増加したが、Am80 投与により BLM 投与による皮膚肥厚は約 20.2% 軽減した。(PBS 群 $182.5 \pm 6.614 \mu\text{m}$ 、PBS+Am80 群 $172.5 \pm 11.99 \mu\text{m}$ 、BLM 群 $345 \pm 28.5 \mu\text{m}$ 、BLM+Am80 群 $275 \pm 13.36 \mu\text{m}$) (図 1、2)。

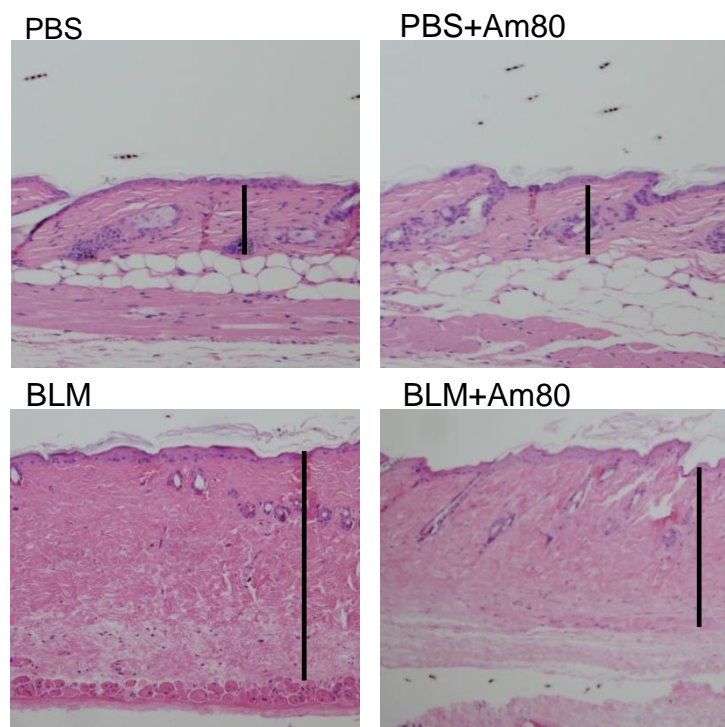


図 1 BLM 誘発強皮症モデルマウスと PBS 投与した野生型マウスにおける Am80 投与による皮膚厚の影響：4 週間の BLM または PBS 投与後、各群のマウス背部から採取した皮膚をヘマトキシリン・エオジン染色した。写真はそれらの代表的なものである。図の bar は顆粒層の上端から真皮と皮下脂肪織の境界までを示しており、これを皮膚厚と定義した。

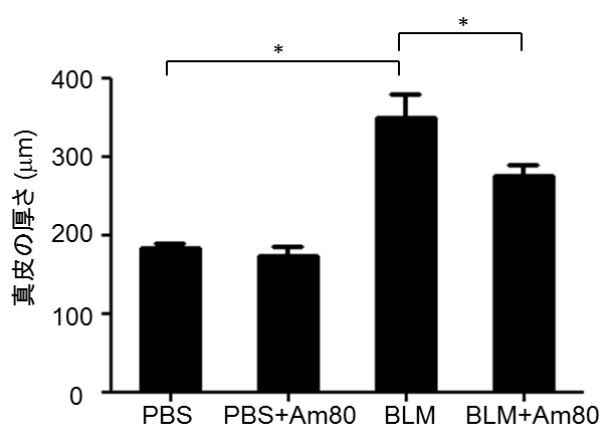


図 2 BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける各群の真皮の厚さ：4 週間の BLM または PBS の皮下注射を行い、背部皮膚における真皮の厚さを各切片 5 か所測定し、その平均値を各切片の真皮の厚さとした。(各群 n = 6–12 匹；* は Bonferroni/Dunn 法にて危険率 5 % で有意差があることを示す)。

皮膚肥厚と同様、Am80 投与により BLM 投与による皮膚のコラーゲン含有量増加も約 16.8%軽減した (BLM 群 2.259 ± 0.1224 、BLM+Am80 群 1.879 ± 0.1114) (図 3)。

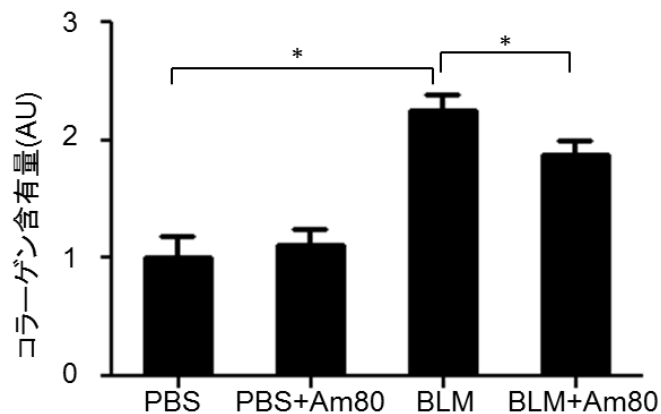


図 3 BLM もしくは PBS4 週間投与した後、各群の背部皮膚における相対コラーゲン含有量をヒドロキシプロリンアッセイにて測定した。(各群 $n = 4-5$ 匹; *は Bonferroni/Dunn 法にて危険率 5 %で有意差があることを示す)。

BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける細胞外基質に関連した遺伝子の mRNA 量を検討したところ、Am80 投与により *Colla1*、*Colla2*、*Col3a1* と *Col5a1* 遺伝子の mRNA の発現量は有意に減少する一方で、コラーゲンを分解する matrix metalloproteinase の一つである *Mmp13* 遺伝子の mRNA 発現量は有意に増加した (図 4)。

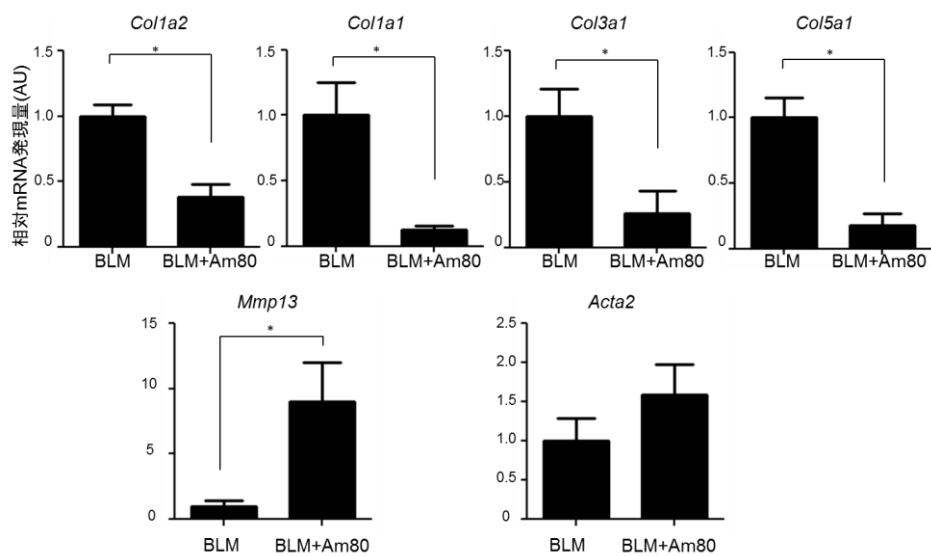


図4 BLM誘発強皮症モデルマウス皮膚における細胞外基質に関連した遺伝子の mRNA 量: BLM4週間投与後の *Col1a1*、*Col1a2*、*Col3a1*、*Col5a1*、*Mmp13*、*Acta2* 遺伝子の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR で測定した。(各群 n = 6–12 匹; * $P < 0.05$)

次に線維化を促進する細胞成長因子である TGF- β 1 と CTGF について調べたところ、両者ともその mRNA 発現が Am80 で有意に抑制されることが示された(図 5)。

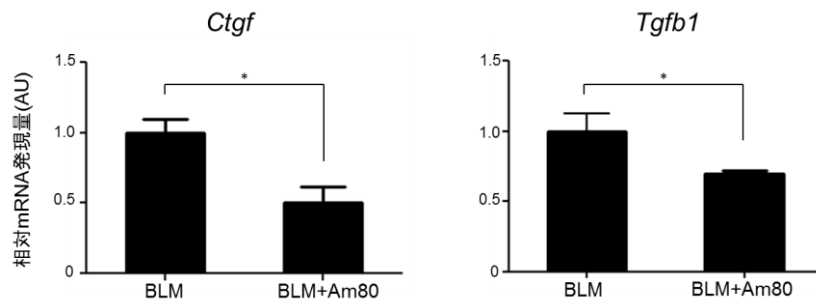


図 5 BLM を 4 週間投与した後のマウス皮膚における *TGF- β 1* および *CTGF* 遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR で測定した。(各群 n = 6–12 匹; * $P < 0.05$)

次に BLM 投与マウス皮膚におけるサイトカインの発現について着目した。炎症反応が十分に起こっていると考えられる BLM 投与開始後 1 週間目の皮膚を回収して、解析した。tumor necrosis factor- α (TNF- α)、chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) / monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)、interferon (IFN)- γ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17A といったサイトカイン、ケモカインの mRNA の発現を調べたところ、Am80 は *Tnfa*、*Ifng*、*Mcp1*、*Il4*、*Il10*、*Il13*、*Il17a* 遺伝子の mRNA 量を有意に抑制した (図 6)。

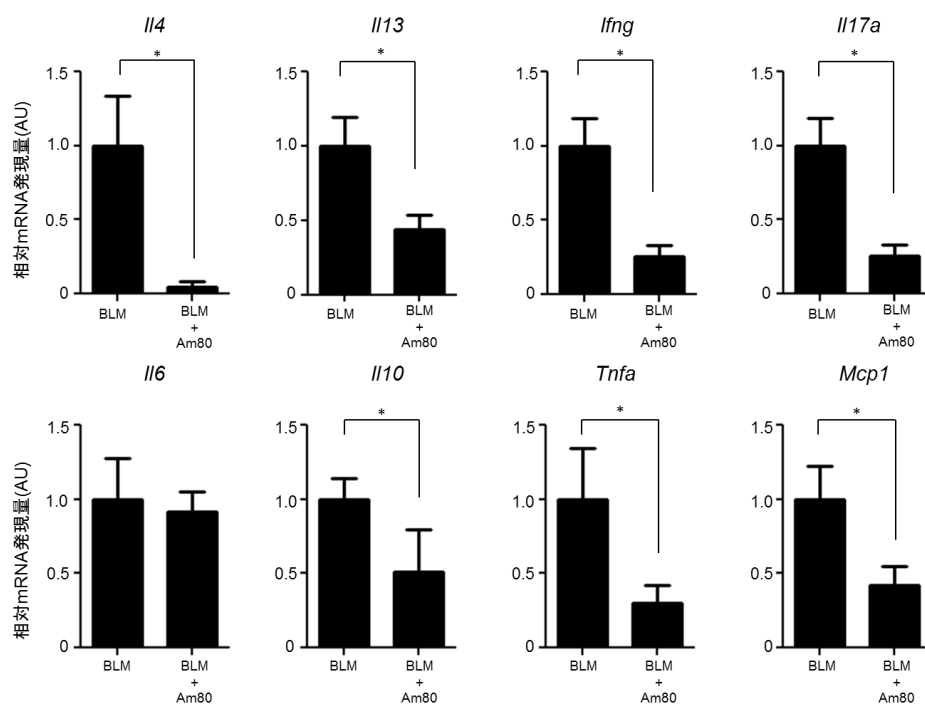


図6 BLM誘発強皮症モデルマウス皮膚における各種サイトカイン、ケモカインのmRNA量:BLMを1週間投与し、その翌日背部皮膚を回収した。Am80投与、非投与群で*Il4*、*Il13*、*Ifng*、*Il17a*、*Il6*、*Il10*、*Tnfa*、*Mcp1*遺伝子のmRNAを定量的RT-PCRで測定した(各群n = 6-12匹; * $P < 0.05$)。

以上よりAm80は様々なサイトカイン、ケモカイン、細胞成長因子といった液性因子の発現を調節し、またコラーゲンの発現を抑制する一方で分解を促進することにより、BLM誘発強皮症モデルマウスの皮膚の線維化を抑制することが示唆された。

b) Am80はCD4陽性T細胞のIL-4、IL-17A、IFN- γ の産生を抑制する

前述の通り、Am80 は様々なサイトカイン、ケモカイン、細胞成長因子の発現を抑制した。そこで我々は、サイトカインを産生するリンパ球、特に CD4 陽性 T 細胞に着目し、それに対する Am80 の作用を検討した。

BLM 投与による皮膚所属リンパ節におけるリンパ球数の変化について検討したところ、BLM 投与群では PBS 投与群と比較して有意にリンパ球数が増加したが、Am80 投与によりこの数は約 38.7%減少した (PBS 群 $3.31 \pm 0.31 \times 10^6$ 、BLM 群 $6.92 \pm 1.22 \times 10^6$ 、BLM+Am80 群 $4.43 \pm 0.53 \times 10^6$) (図 7)。

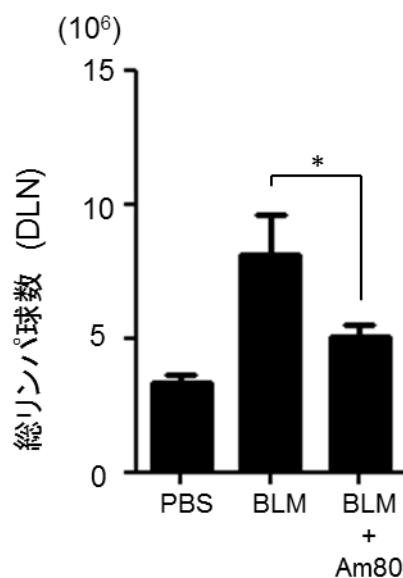


図 7 BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける Am80 投与による皮膚所属リンパ節（腋窩、鼠径リンパ節）のリンパ球数の変化。BLM は 1 週間投与し、その翌日に回収した(各群 n = 5–10 匹; *は Scheffe's F test にて危険率 5 %で有意差があることを示す)。

次に所属リンパ節での CD4 陽性細胞における Am80 の作用を検討した。

PBS と比較し、BLM 投与により所属リンパ節での INF- γ 、IL-4、IL-17A 産生 CD4 陽性 T 細胞数は増加したが、Am80 によりその数は有意に減少した。(図 8)。BLM は T-bet、GATA-3、ROR- γ t といったそれぞれ Th1、Th2、Th17 に分化する際の master regulator である転写因子の発現を亢進させたがそれらの発現を Am80 は有意に抑制した (図 8)。CD4 陽性細胞中の INF- γ 、IL-4、IL-17A 産生細胞の割合についても、上記と同様の結果が得られた。

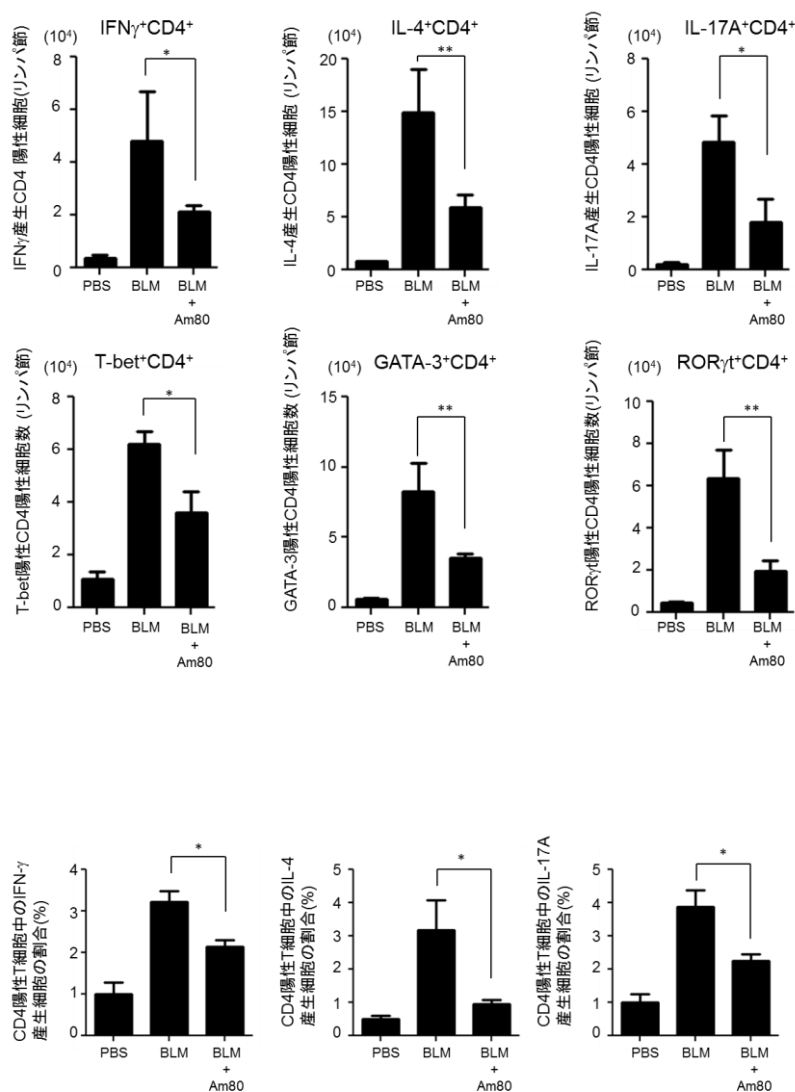


図 8 BLM 投与マウスにおける Am80 投与による Th1、Th2、Th17 T 細胞数の変化 : BLM を 1 週間投与後回収した末梢リンパ節（腋窩、鼠径リンパ節）における Am80 投与による IFN- γ 、IL-4、IL-17A 陽性 CD4 陽性 T 細胞数の変化と CD4 陽性細胞に対する割合を flow cytometry にて解析した。また、Th1、Th2、Th17 の master regulator である転写因子 T-bet、GATA-3、ROR- γ t 陽性 CD4 陽性 T 細胞数についても同様に解析した(各群 n = 5-10 匹; *は Bonferroni/Dunn 法にて危険率 5 %で有意差があることを示す。**は Steel-Dwass 法にて危険率 5 %で有意差があることを示す)。

Am80 により、BLM 投与マウスでの $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 制御性 T 細胞の発現は有意に減少した (図 9)。

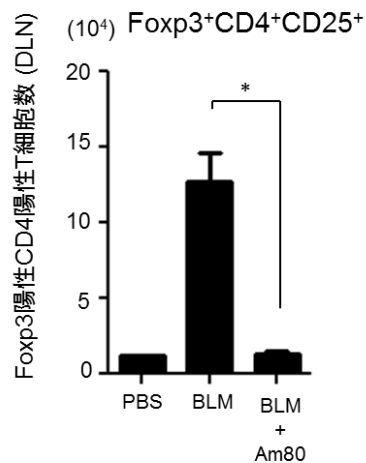


図 9 BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、BLM を 1 週間投与後回収した末梢リンパ節中の Am80 投与による制御性 T 細胞数の変化: $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 細胞数を flow cytometry を用いて解析した(各群 $n = 5-10$ 匹; *は Steel-Dwass 法にて危険率 5 %で有意差があることを示す)。

これらの結果より、Am80 が T 細胞の分化に影響を与えている可能性を考え、

CD4 陽性 T 細胞におけるナイーブ T 細胞の割合に着目した。

Am80 により CD4 陽性細胞中のナイーブ T 細胞($\text{CD62L}^+\text{CD44}^{\text{low}}$ cells)の割合は増加し、一方でエフェクターメモリー T 細胞($\text{CD62L}^-\text{CD44}^{\text{high}}$ cells)の割合は減少した (ナイーブ T 細胞; PBS 群 $83.99 \pm 1.09 \%$ 、BLM 群 $76.22 \pm 2.60 \%$ 、BLM+Am80

群 83.90 ± 0.91 %、エフェクターメモリーT細胞；PBS 群 4.94 ± 0.82 %、BLM 群 9.02 ± 0.56 %、BLM+Am80 群 3.92 ± 0.45 %)。

これらの結果より、Am80 は、ナイーブ T 細胞の分化を抑制し、サイトカインを産生するエフェクター細胞になるのを抑制する作用を有することが示唆された

(図 10)。

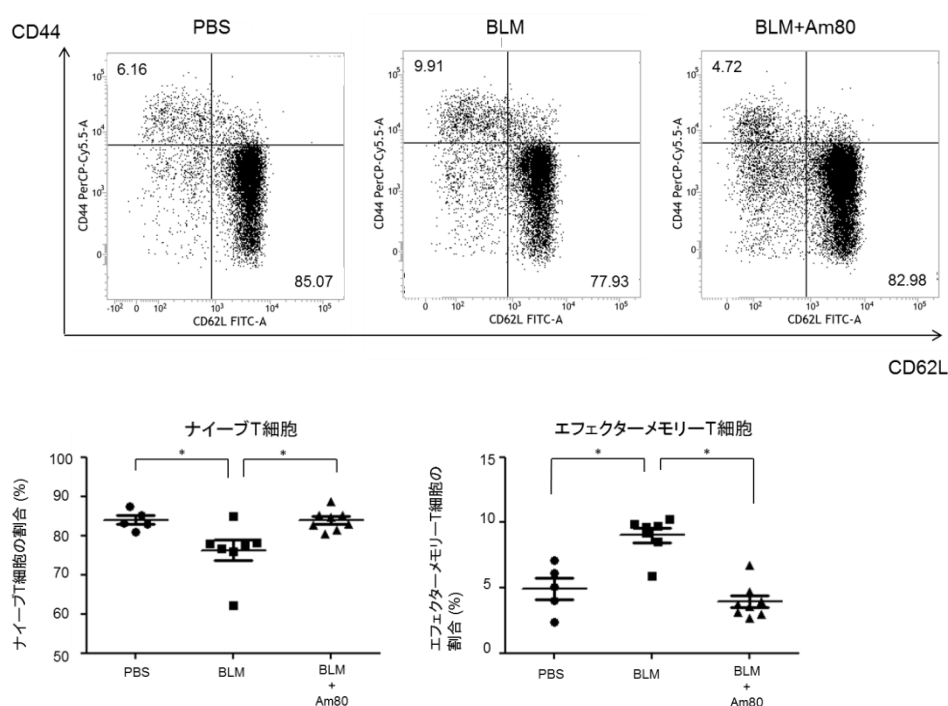


図 10 BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける Am80 投与によるナイーブ T 細胞とエフェクターメモリーT細胞の割合の変化:CD62L⁺CD44^{low}ナイーブ T 細胞と CD62L⁺CD44^{high}エフェクターメモリーT細胞の割合を flow cytometry にて解析した。棒線は中央値±SEM を示す。代表的な FACS plots を併せて示した(各群 n = 5-8 匹; *は Steel-Dwass 法にて危険率 5 %で有意差があることを示す)。

c) Am80 は M2 マクロファージへの分化を抑制し、M1 マクロファージへの分化を促進する

活性化マクロファージは大きく M1、M2 マクロファージに分かれ、M2 マクロファージは細胞外基質の構成要素を産生することで、線維化を促進させると言われている。そこで我々は Am80 がマクロファージに与える影響について検討した。

Ym1、Fizz1 は M2 マクロファージのマーカーと広く認知されている分子であるが[51]、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて Am80 はこれらの遺伝子の mRNA 発現を有意に抑制した (図 11)。

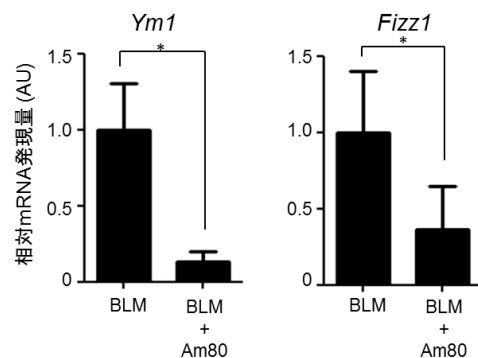


図 11 BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける Am80 投与による M2 マクロファージのマーカーの変化:BLM 投与後 1 週間のマウス皮膚における *Ym1*、*Fizz1* 遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR にて解析した(各群 n = 5–10 匹; * $P < 0.05$)。

Am80 がマクロファージに対し、直接的な作用を持つことを裏付けるため、腹腔内マクロファージを用いて、M2 マクロファージのマーカーの発現を調べた。

Am80 は in vitro において IL-4 で刺激したマウス腹腔内マクロファージの *Ym1*、*Fizz1* 遺伝子の mRNA 発現を有意に抑制した (図 12)。

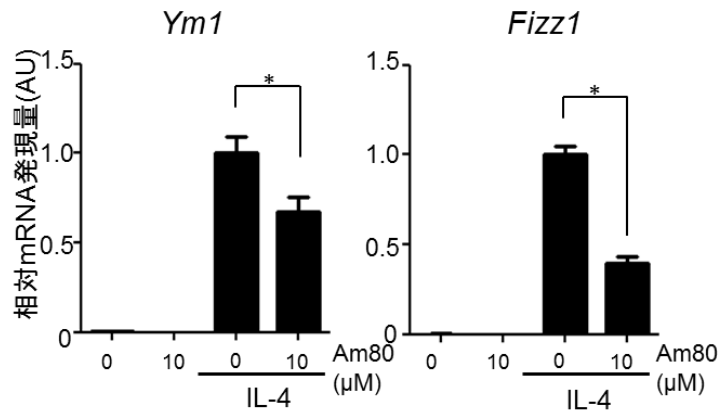


図 12 IL-4 にて刺激したマウス腹腔内マクロファージに対する Am80 の影響：*Ym1*、*Fizz1* 遺伝子の mRNA を定量的 RT-PCR にて解析した(各群 n = 4–8; *は Scheffe's F test にて危険率 5 %で有意差があることを示す)。

さらに Am80 は M2 マクロファージの細胞表面マーカーである CD204、CD206 の発現を抑制し、とりわけ CD206 については用量依存性に発現を抑制した (CD206; Am80 10uM : 0.758 ± 0.011 、30mM: 0.703 ± 0.010 、CD204; Am80 10uM : 0.815 ± 0.020 、30mM: 0.837 ± 0.012) (図 13)。

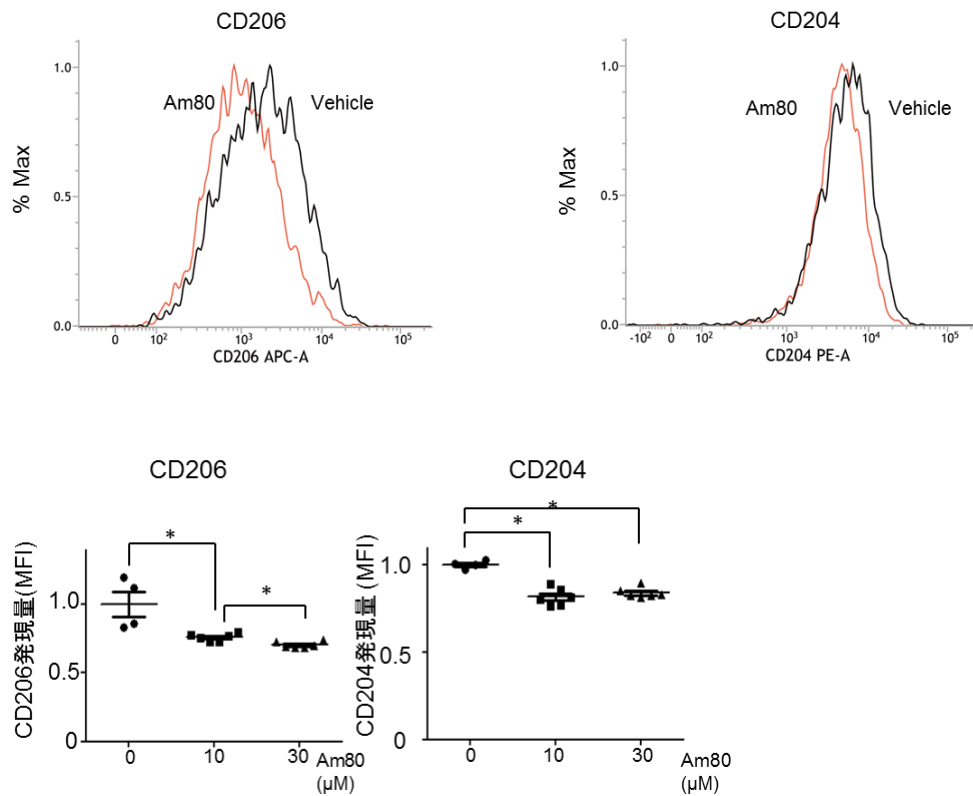


図 13 マウス腹腔内マクロファージにおける Am80 投与による CD204、CD206 発現に対する影響：腹腔内マクロファージを Am80 存在、非存在下で IL-10 と TGF- β 1 にて刺激し、flow cytometry にて解析した。上図は代表的なヒストグラムを提示した(各群 $n = 4-6$ 匹, $*P < 0.05$)。下図は mean fluorescence intensity (MFI)の相対値を示した。棒線は中央値 \pm SEM である($n = 4-8$; *は Steel-Dwass 法にて危険率 5 %で有意差があることを示す)。

M1 マクロファージは INOS や IL-12 を発現することが知られているが、Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、これらの mRNA の発現を有意に促進した (図 14)。

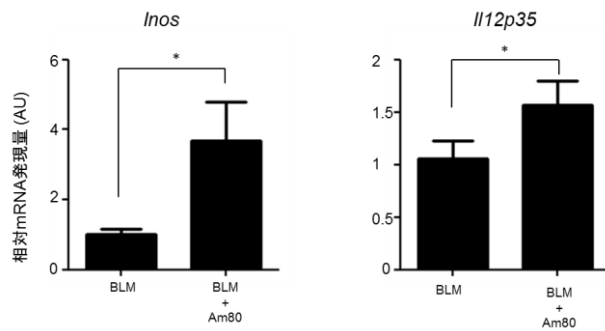


図 14 BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける Am80 投与の INOS、IL-12 発現に対する影響：マウス皮膚における *Inos*、*Il12p35* 遺伝子の mRNA を定量的 RT-PCR にて解析した(各群 n = 5–10 匹; * $P < 0.05$)。

また in vitro において Am80 は、IFN- γ と lipopolysaccharides で刺激した THP-1 細胞における *INOS* 遺伝子と *IL12p35* 遺伝子の mRNA の発現を促進した。*INOS* 遺伝子の mRNA 量は IFN- γ と lipopolysaccharides との刺激で約 5.3 倍に増加したのに対し、Am80 を加えると約 20.5 倍になり、増加幅は有意に大きくなった。また *IL12p35* 遺伝子の mRNA 量は IFN- γ と lipopolysaccharides との刺激で約 2.7 倍に増加したのに対し、Am80 を加えると約 6.5 倍になり、増加幅は有意に大きくなった (図 15)。

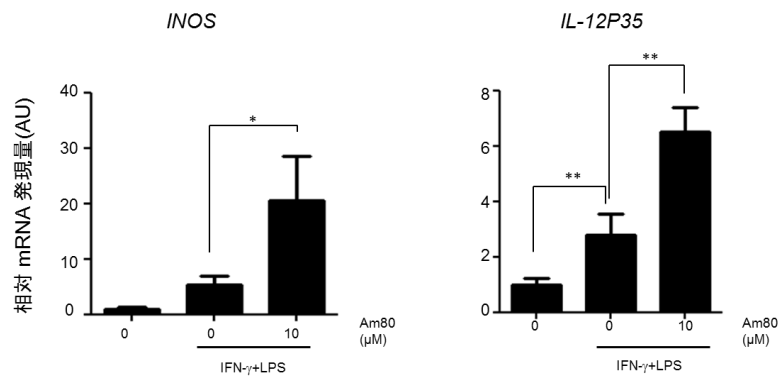


図 15 IFN- γ と lipopolysaccharides で刺激した THP-1 細胞における Am80 の影響: *INOS*、*IL12P35* 遺伝子の mRNA を定量的 RT-PCR にて解析した(各群 $n = 4-8$; * は Bonferroni/Dunn 法にて危険率 5 %で有意差があることを示す。**は Steel-Dwass 法にて危険率 5 %で有意差があることを示す)。

これらの結果より、Am80 は M2 マクロファージへの分化を抑制し、M1 マクロファージへの分化を促進することが示唆された。

d) Am80 は皮膚微小血管内皮細胞において ICAM-1 の発現を抑制する

細胞接着因子のひとつである ICAM-1 は線維化を促進する作用を有するが、BLM 投与によりその発現が上昇することが知られている[52]。ICAM-1 の発現に対する Am80 の作用を検討したところ、Am80 により BLM 投与マウスの皮膚における *ICAM1* 遺伝子の mRNA 発現は有意に減少した (図 16)。

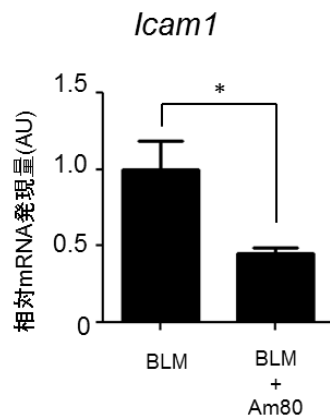
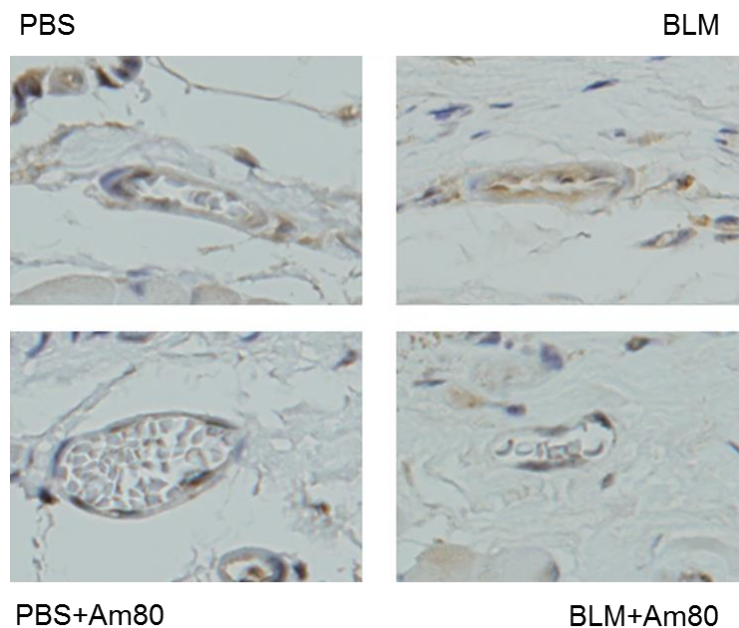


図 16 BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける Am80 投与による ICAM-1 発現への影響:*Icam1* 遺伝子の mRNA を定量的 RT-PCR にて解析した。(各群 n = 5–10 匹; * $P < 0.05$)

次にどの細胞に発現する ICAM-1 が Am80 の影響を受けているのか確認するために、抗 ICAM-1 抗体を用いた免疫染色を施行したところ、皮膚微小血管内皮細胞における ICAM-1 発現は BLM により増加し、その増加は Am80 投与で軽減した (図 17)。染色の程度により、「染まらない」、「少し染まる」、「濃く染まる」という 3 段階に分類しカウントした (図 17)。それぞれを 1、2、3 と数値化し、Steen-Dwass 法にて解析した。これにより Am80 投与により、有意に ICAM-1 の染色が下がることが示された。



	染まらない	少し染まる	濃く染まる
PBS	10	15	0
PBS+Am80	17	17	0
BLM	2	36	18
BLM+Am80	19	30	4

(単位は個)

図 17 BLM 誘発強皮症モデルマウスと PBS 投与した野生型マウスにおける Am80 投与による ICAM-1 発現への影響：各群のマウス背部皮膚を抗 ICAM-1 抗体にて免疫染色した。表は BLM 誘発強皮症モデルマウスと PBS 投与した野生型マウスにおける Am80 投与による ICAM-1 発現への影響：染色の程度を 3 段階で評価し、それぞれの個数をカウントしたものを示す

また、皮膚線維芽細胞やリンパ球に対しても BLM 投与で ICAM-1 発現が増強し、Am80 投与で発現が減弱する傾向がみられた。次に Am80 の皮膚微小血管内皮細

胞における ICAM-1 発現への影響が直接的なものであるかを調べるため、HDMEC を用いて検討したところ、TNF- α で刺激した HDMEC において、*ICAM-1* 遺伝子の mRNA 量は約 28 倍に増加し、Am80 投与で約 15%減少した（図 18）。

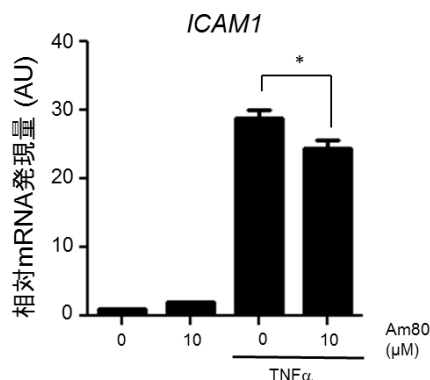


図 18 TNF- α にて刺激した HDMEC における Am80 の影響：*ICAM1* 遺伝子の mRNA を定量的 RT-PCR にて解析した。(各群 n = 5; *は Scheffe's F test にて危険率 5 %で有意差があることを示す)。

さらに、BLM 投与マウスの皮膚における細胞浸潤について免疫化学染色にて調べたところ、Am80 投与により、マスト細胞、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の浸潤が減少していた（マスト細胞；PBS 群 4.88 ± 0.37 、BLM 群 9.21 ± 0.42 、BLM+Am80 群 5.82 ± 0.28 、マクロファージ；PBS 群 2.90 ± 0.20 、BLM 群 4.53 ± 0.50 、BLM+Am80 群 2.19 ± 0.23 、CD4 陽性 T 細胞；PBS 群 5.88 ± 0.96 、BLM 群 37.20 ± 2.98 、BLM+Am80 群 27.90 ± 2.52 、CD8 陽性 T 細胞；PBS 群 7.05 ± 0.39 、BLM 群 10.80 ± 0.54 、BLM+Am80 群 7.27 ± 0.99 (/HPF)）

(図 19)。以上の結果から、Am80 は皮膚微小血管内皮細胞において、ICAM-1 の発現を抑制することで、皮膚への炎症細胞の浸潤を軽減し、炎症反応の結果生じる皮膚線維化を抑制する可能性があることが示唆された。

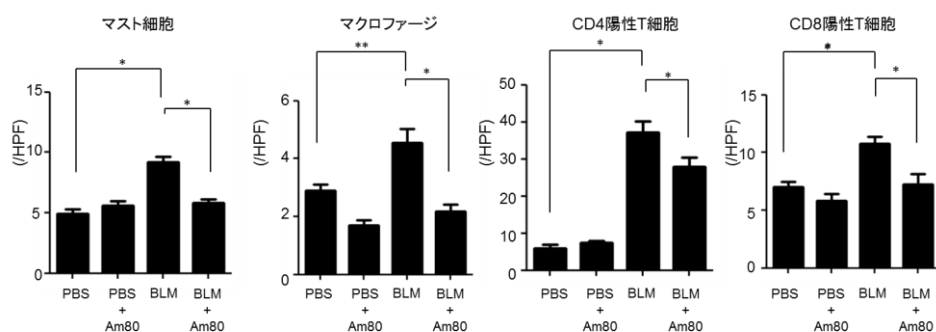
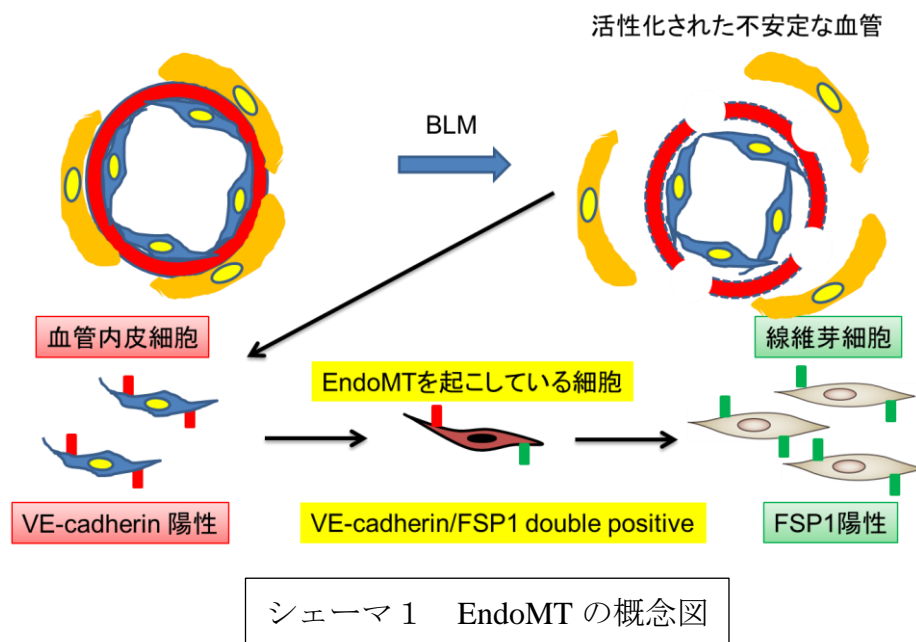


図 19 BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける細胞浸潤に対する Am80 の影響：各群のマウス背部皮膚をトリジンブルー染色と抗 F4/80、抗 CD4、抗 CD8 抗体にて免疫染色した。100 倍の 1 視野におけるマスト細胞、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞のそれぞれをカウントした。
(各群 n = 4-8; *は Steel-Dwass 法にて危険率 5 % で有意差があることを示す)。

e) Am80 は endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT)を抑制する

EndoMT は内皮細胞が間葉系細胞へと変化する現象であり、心臓、腎臓などの線維化に重要な役割を果たしている[53] [54] [55]。Am80 が EndoMT に与える影響を調べるため、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、VE-cadherin と FSP1 の二重蛍光染色を行った。VE-cadherin は通常血管内皮細胞に発現し、FSP1 は線維芽細胞特異的に発現しているが、EndoMT を起こしている細胞はこの両者を発現することが知られている[56]。



BLM 投与により VE-cadherin/FSP1 double-positive の細胞が増加し (8.85 ± 0.98 /HPF)、EndoMT が起こっていることが示唆された。一方 Am80 投与によりその VE-cadherin/FSP1 double-positive の細胞が減少した (5.66 ± 0.57 /HPF) (図 20)

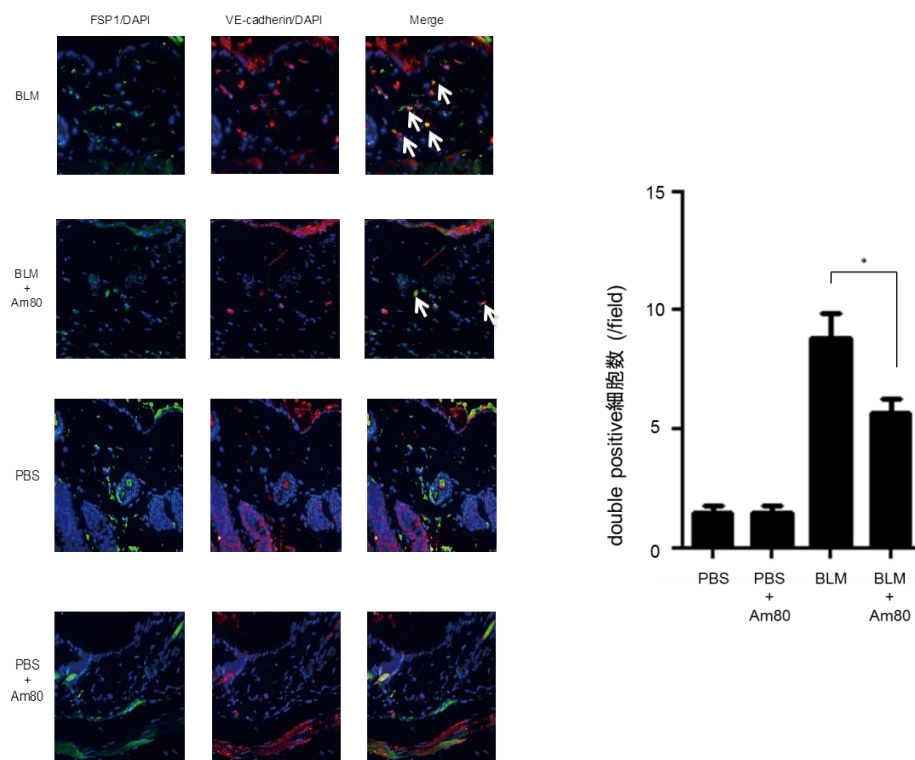


図 20 BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) に対する Am80 の影響：各群のマウス皮膚を FSP1 (緑)、VE-cadherin (赤)、DAPI (青) にて蛍光染色した。白矢印は double positive 細胞を指し、EndoMT を起こしている細胞を意味する。200 倍の 1 視野における FSP1/VE-cadherin double positive 細胞数をカウントした (*は Scheffe's F test にて危険率 5 % で有意差があることを示す)。

この結果より、Am80 は EndoMT を抑制することが、皮膚線維化の抑制の機序のひとつである可能性が示唆された。

f) Am80 は、COL1A2 遺伝子の転写活性を下げるだけではなく、mRNA の安定性を変化させることによっても、皮膚線維芽細胞に対し抗線維化作用を発揮する

最後に、Am80 が直接皮膚線維芽細胞に作用するのかをヒト正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。ヒト正常皮膚線維芽細胞において、TGF- β 1 で刺激すると COL1A2 遺伝子の mRNA 発現は亢進し、MMP1 遺伝子の mRNA 発現は減少した。Am80 は TGF- β 1 による COL1A2 遺伝子の mRNA 発現亢進と、MMP1 遺伝子の mRNA の発現の減少を Am80 の用量依存的に緩和させた(COL1A2; 0 μ M Am80 : 1.643 ± 0.322 , 1 μ M: 1.405 ± 0.407 , 10 μ M: 1.041 ± 0.166 , MMP1; 0 μ M Am80: 0.478 ± 0.121 , 1 μ M: 0.464 ± 0.126 , 10 μ M: 0.836 ± 0.008) (図 21)。

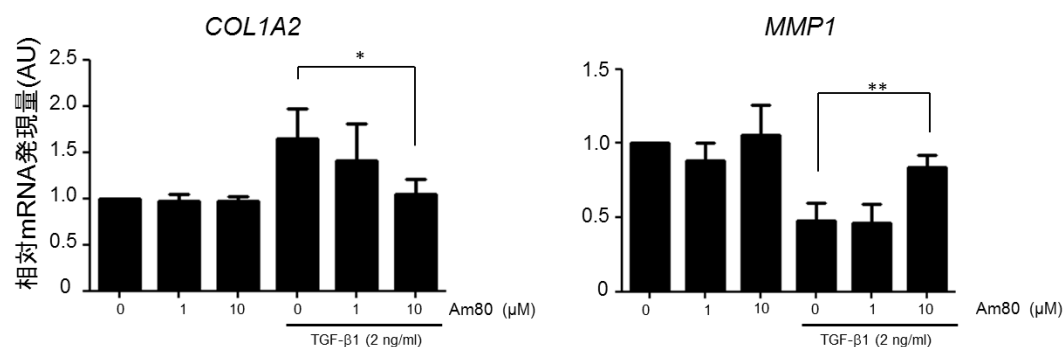


図 21 TGF-β1 で刺激したヒト正常皮膚線維芽細胞における Am80 の影響: *COL1A2*, *MMP1* 遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR にて測定した (各群 $n = 4-5$; *は Scheffe's F test にて危険率 5 % で有意差があることを示す。**は Bonferroni/Dunn 法にて危険率 5 % で有意差があることを示す)。

また、TGF-β1 刺激により皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白量が増加し、Am80 投与によりその増加が軽減した (図 22)。

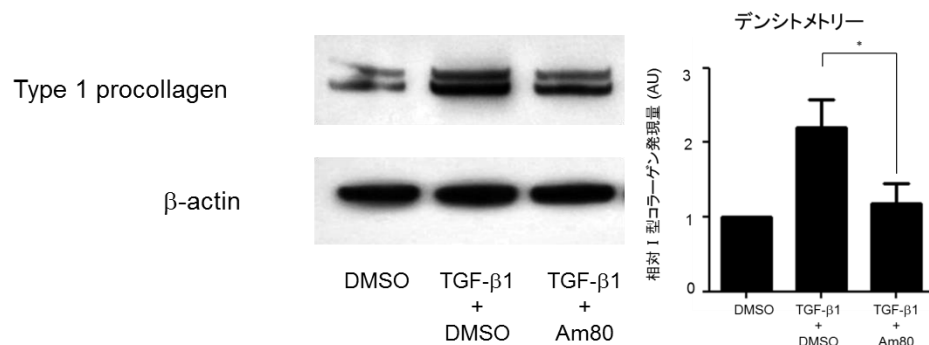


図 22 TGF-β1 で刺激したヒト正常皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン産生に対する Am80 の影響：I 型コラーゲンの蛋白量を免疫ブロッキングにて評価した。I 型コラーゲンはα1 鎖とα2 鎖の procollagen 鎖から形成されており 2 本のバンドとして見える。Image J を用いてデンストメトリーを行った。β-actin に対する I 型コラーゲンの比を計算し、相対 I 型コラーゲン発現量を示した (n = 9; *は Bonferroni/Dunn 法にて危険率 5 % で有意差があることを示す)。

加えて、ヒト正常皮膚線維芽細胞を TGF-β1 で刺激すると *CTGF* 遺伝子の mRNA 量は 3.87 ± 0.22 倍に増加したが、1 μM の Am80 添加で 3.02 ± 0.20 倍、10 μM の Am80 添加で 2.89 ± 0.16 倍と *CTGF* 遺伝子の mRNA 量は減少した (図 23)。

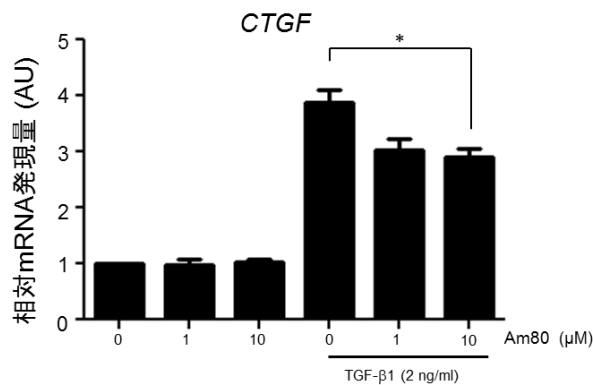


図 23 TGF-β1 で刺激したヒト正常皮膚線維芽細胞における CTGF 産生に対する Am80 の影響: *CTGF* 遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR にて測定した (各群 n = 5; *は Bonferroni/Dunn 法にて危険率 5 % で有意差があることを示す)。

Luciferase assay を行い Am80 が COL1A2 遺伝子の転写活性に与える影響を調べたところ、TGF-β1 刺激で上昇した COL1A2 遺伝子の転写活性は Am80 投与しない場合を 1 とすると Am80 投与により 1 μM で 0.782 ± 0.076 、3 μM で 0.727 ± 0.043 、10 μM で 0.570 ± 0.028 と用量依存的に抑制された (図 24)。

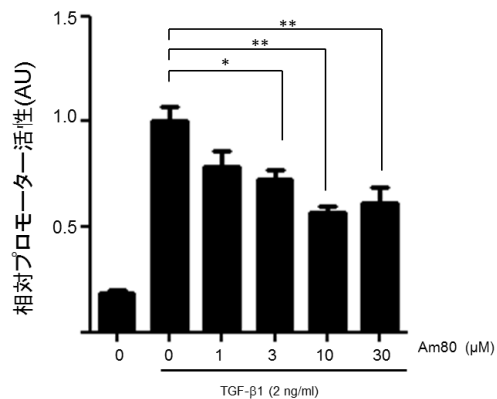


図 24 TGF-β1 で刺激したヒト正常皮膚線維芽細胞における COL1A2 遺伝子の転写活性を luciferase assay を用いて示した (各群 n = 5; *は Bonferroni/Dunn 法にて危険率 5 %で有意差があることを示す, ** は Bonferroni/Dunn 法にて危険率 1 %で有意差があることを示す)。

さらに、Am80 投与で COL1A2 遺伝子の mRNA の安定性が低下した (vehicle versus Am80; 6 時間後 0.868 ± 0.050 versus 0.643 ± 0.039 、8 時間後 0.607 ± 0.036 versus 0.343 ± 0.037 、12 時間後 0.527 ± 0.067 versus 0.329 ± 0.025) (図 25)。

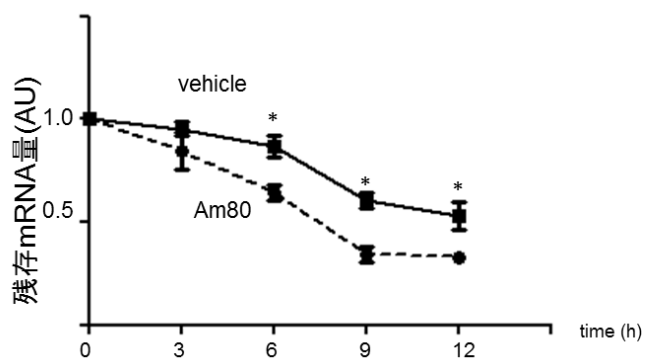


図 25 アクチノマイシン D を加え、細胞の転写反応を止めたのち、各時間経過後 COL1A2 遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR にて測定した。(各群 n = 5; * $P < 0.05$)

以上の結果より、Am80 は、I 型コラーゲンの転写活性を下げるのに加えて、転写後の I 型コラーゲン mRNA の安定性を下げることにより、I 型コラーゲン産生を抑制し、MMP1 の発現を促進し、コラーゲン分解を促進させることで、皮膚線維芽細胞に対して抗線維化作用を有することが示唆された。

5) 考案

本研究により、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて Am80 が、T 細胞、マクロファージといった免疫細胞、微小血管内皮細胞、皮膚線維芽細胞など様々な細胞に働きかけることにより、抗線維化作用を有することが示唆された。

Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、コラーゲン産生を抑制し、その分解を亢進することで、皮膚線維化を抑制した。Am80 は T 細胞の分化を抑制することで炎症を緩和し、マクロファージを、線維化を促進すると言われている M2 フェノタイプから M1 に変化させた。また Am80 は皮膚微小血管内皮細胞に作用し、細胞接着分子の発現を調節することにより炎症細胞の皮膚への浸潤を軽減し、それらの細胞により誘導されうる線維化を抑制するとともに、EndoMT を抑制することで活性化線維芽細胞の供給を下げることで線維化を抑制することを示した。

さらに Am80 が MMP1 の発現を促進し、I 型コラーゲンをはじめとするコラーゲン発現を抑制することで、直接皮膚線維芽細胞に対して抗線維化作用をもたらすことを示した。

レチノイン酸の主たる作用である細胞の分化や増殖に対する影響に加えて、

ナイーブ T 細胞から Th1、Th17 T 細胞への分化を抑制し、Foxp3⁺iTreg への分化を誘導するなど免疫細胞の機能や分化・増殖にも影響を与える[57]。Am80 も免疫系を調整することで実験的炎症モデル、自己免疫性疾患モデルにおいて病態を改善させる作用があることが指摘されている[58] [59]。さらに ATRA では改善が見られなかったコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて Am80 は病態を改善させたとする報告がある[60]。しかしながら、Am80 の全身性強皮症に対する作用は明らかにされていなかった。本研究は、Am80 が BLM 誘発強皮症モデルマウスの線維化を改善させることを示した、初めてのものである。

はじめに我々は BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚における、線維化促進作用をもつ細胞成長因子である TGF- β 1、CTGF に着目した。TGF- β 1 は通常は不活化された状態で存在するが、強皮症においては TGF- β 1 の異常な活性化がみられ、CTGF の発現増加とあいまって強皮症における皮膚硬化の病態に深くかかわっていることが指摘されている[61] [62] [14]。今回我々の研究で、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいてこれらの細胞成長因子の mRNA の発現量が Am80 により減少することが示された。また、Am80 は TGF- β 1 にて刺激した皮膚線維芽細胞における CTGF 遺伝子の mRNA 発現量も抑制することが示された。これらの結果から Am80 は線維化の促進に寄与する 2 つの細胞成長因子、TGF- β 1 と CTGF

の発現を抑制することで、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚線維化を改善させることが示唆された。

次に我々は免疫系、特にサイトカインとリンパ球に着目した。全身性強皮症において MCP-1、TNF- α 、IL-4、IL-13、IL-10、IL-17A などのサイトカインは強皮症患者の血清または病変皮膚において発現が亢進しており、その病態に関連していることが指摘されている[63] [64]。抗トポイソメラーゼ-1 抗体陽性をはじめとするびまん皮膚硬化型全身性強皮症患者において、皮膚硬化は数年で進行し、その後強皮症の皮膚硬化は減弱する傾向にあり、皮膚硬化が進行する初期段階では Th2 反応が亢進するが、皮膚硬化が減弱する段階では Th2 優位な反応から Th1 優位な反応にシフトすることが知られている[65]。Th2 反応の亢進に伴い、IL-4、IL-13 といった Th2 サイトカインが上昇するため、これらのサイトカインが全身性強皮症において線維化を促進する作用を有するという考えを支持するものである。

また近年 IL-17A の強皮症における働きについての報告が相次いでいる[66] [67] [68]。IL-17A をノックアウトすると、BLM 誘発強皮症モデルマウスと TSK-1 強皮症モデルマウスにおいて皮膚線維化が減弱したという報告や[69]、強皮症患者の皮膚、血中の Th17 細胞数は健常人と比較し増加しており、疾患活動性と相

関が見られたという報告がある[70]。これらの報告から IL-17A の発現亢進が全身性強皮症において皮膚線維化の形成に寄与していると考えられている。本研究では Am80 投与により BLM 投与後のマウス皮膚における MCP-1、TNF- α 、IL-4、IL-13、IL-10、IL-17A の発現量が減少し、こうした Th2、Th17 サイトカインを含む線維化を促進するサイトカインの減少が病態の改善に繋がると考えられた。

IFN- γ は抗線維化作用を有するとされる Th1 サイトカインであり[71]、BLM 誘発肺線維症モデルマウスにおいて IFN- γ は肺の線維化を抑制するという報告がある[72]。しかしながら、今回の実験では BLM 投与後のマウス皮膚における IFN- γ 発現量も Am80 投与で減少した。Am80 は Th2、Th17 サイトカインに加えて Th1 サイトカインの産生も抑制することより、多方向への T 細胞分化を抑制する可能性が考えられた。

このことを検討するため、皮膚所属リンパ節からリンパ球を回収し、Am80 の影響を調べたところ、CD4 陽性 IL-4、IL-17A、IFN- γ 産生細胞数は何れも減少し、皮膚におけるサイトカイン発現と合致する結果を得た。さらに Am80 投与で Foxp3 陽性 CD25 陽性の制御性 CD4 陽性 T 細胞数の減少が見られた。次に Am80 が CD4 陽性 T 細胞の分化に与える影響を検証するため、ナイーブ T 細胞とエフェクター T 細胞の割合を調べたところ、Am80 投与でナイーブ T 細胞の割合が増加し、T 細胞の活性化マーカーである CD44 を高発現した活性化したエフェクタ

一T細胞の割合は低下した。ナイーブT細胞が活性化することでTh1、Th2、Th17、もしくは制御性T細胞へと分化すること[73][74][75]を考慮すると、Am80はナイーブT細胞の活性化を制御し、T細胞の分化を全般的に妨げることで、T細胞におけるサイトカイン産生を抑制するという仮説を支持する結果が得られた。

既存の報告では、コラーゲン誘発関節炎モデル、クローン病モデルにおいて、Am80がTh1/Th17優位からTh2優位にT細胞のフェノタイプを変化させることにより病態を改善させたという報告[76]や、*in vitro*でAm80がTh1への分化を抑制し、Th2への分化を促進させるという報告がある一方で、Am80がTh1への分化を促進し、Th17への分化を抑制するという報告[77]や、アレルギー性気管支炎モデルマウスにおいてAm80がTh2反応を抑制することで病態を改善するという報告[78]があり、Am80のTh1/Th2/Th17のバランスに対する作用については統一した見解が得られていない。今回我々が得た結果を踏まえると、Am80はCD4陽性T細胞のあらゆる方向の分化を抑制する作用を有するものの、どの方向への分化をどの程度抑制するかに関してはAm80の濃度や疾患に応じて様々であり、条件に応じてTh1、Th2、Th17の何れかが相対的に優位になるのではないかと考えている。ここで、Am80投与で易感染性が生じるのではないかと懸念が生じる。臨床的には、市販後調査でAPLの治療薬として投与された約500例において、実際に感染症が生じた症例として3例が報告されている。APL自

体が、正常白血球が減少することにより易感染性を有する疾患であるため、この報告数は決して多いものではないと考えられる。一方で、動物実験においては寄生虫 *Trichuris muris* 感染に対して、Am80 が腸粘膜の炎症を増悪させるという報告がある[79]。この報告では、Am80 投与で CD4 陽性 T 細胞の浸潤は増加するが、その活性化が阻害されている可能性がある」と論じており、今回の本研究の結果と一致する点がある。これらのことから、Am80 はあらゆる感染に対する防御力を低下させるほどの作用はないが、ある特定の感染に対する抵抗力を低下させる可能性があると考えられる。臨床使用に際してはこの点を注視する必要がある。

活性化マクロファージは、発現する蛋白や機能によりいくつかのサブセットに分類される[80]。

その中の 1 つに M1 マクロファージがある。これは IFN- γ 刺激もしくは Toll 様受容体からのシグナルにより分化する。M1 マクロファージは IL-6、IL-12、IL-23 を分泌したり、iNOS を発現したりすることにより、Th1、Th17 優位な炎症状態を誘導する[81]。その他のサブセットとして M2 マクロファージがある。これは Th2 サイトカインである IL-4、IL-13、もしくは IL-10 により誘導される[82]。

M2 マクロファージは mannose receptor である CD206、macrophage scavenger

receptor である CD204、hemoglobin scavenger receptor である CD163、resistin-like α である Fizz1、chitinase 3-like 3 である Ym1 や arginase-1 を発現し、これらは M2 マクロファージのマーカーとして用いられている[83]。M2 マクロファージは T 細胞に対する抗原提示能を欠き、炎症を惹起するサイトカイン産生に乏しい[84] 一方、細胞外基質の構成要素を分泌することで、創傷治癒や線維化に寄与する [51]。M2 マクロファージと全身性強皮症の関連についてはいくつかの報告がみられる。M2 マクロファージのマーカーである血清可溶性 CD163 濃度が全身性強皮症患者においては健常人と比較し上昇しており、可溶性 CD163 濃度が高い全身性強皮症患者では右室圧の上昇および呼吸機能検査における%DLco の低下が見られる[85]。また間質性肺病変のある全身性強皮症患者の肺胞マクロファージは健常人と比較して CD206 の発現量が亢進している[86]。更に CD163 陽性、CD204 陽性細胞数は健常人の皮膚と比較し全身性強皮症の皮膚において増加している[87]。今回の我々の検討において、Am80 が BLM 誘発強皮症モデルマウス皮膚、および IL-4 により活性化されたマウス腹腔マクロファージにおいて、Ym1、Fizz1 遺伝子の mRNA 発現を抑制した。また Am80 投与によりマウス腹腔内マクロファージの CD204、CD206 の発現が減弱した。一方、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚、および IFN- γ 、LPS により刺激した THP-1 細胞において、Am80 投与により iNOS、IL-12p35 遺伝子の mRNA 発現量は増加した。従って、

Am80 は M2 型から M1 型へとマクロファージを変化させることで、抗線維化に寄与することが考えられた。マクロファージのフェノタイプおよび分化については解明されていない部分が多く、さらなる研究が必要と考えた。

本研究において、Am80 が血管内皮細胞における ICAM-1 の発現を抑制すること示した。血管内皮細胞における ICAM-1 の発現は全身性強皮症において線維化、呼吸機能低下に関与している[88]。松下らは ICAM-1 欠損により、強皮症モデルマウスの一つである tight skin マウスの皮膚硬化が減弱したと報告している[89]。また吉崎らは ICAM-1 欠損により皮膚、肺の線維化が抑制され、同時に皮膚、肺における Th2、Th17 関連サイトカインが減少するとともに肺胞洗浄液における Th2、Th17 細胞数が減少したと報告している[52]。今回の我々の検討結果は、これらの報告と矛盾しない結果であり、Am80 投与による血管内皮細胞における ICAM-1 発現の減少が Am80 の抗線維化作用の機序の一つと考えられた。

Am80 が直接血管内皮細胞に作用し ICAM-1 発現を抑制するのかを検討したところ、Am80 投与により TNF- α により活性化された HDMECs の ICAM-1 mRNA は低下した。一方、血管内皮細胞における ICAM-1 の発現は炎症により亢進することより、Am80 は血球細胞からの炎症性サイトカイン産生を低下させることにより間接的に血管内皮細胞における ICAM-1 発現を抑制することも考えられる。

従って、Am80 は血管内皮細胞に対して直接のおよび間接的に作用し、ICAM-1 発現を抑制すると考えた。

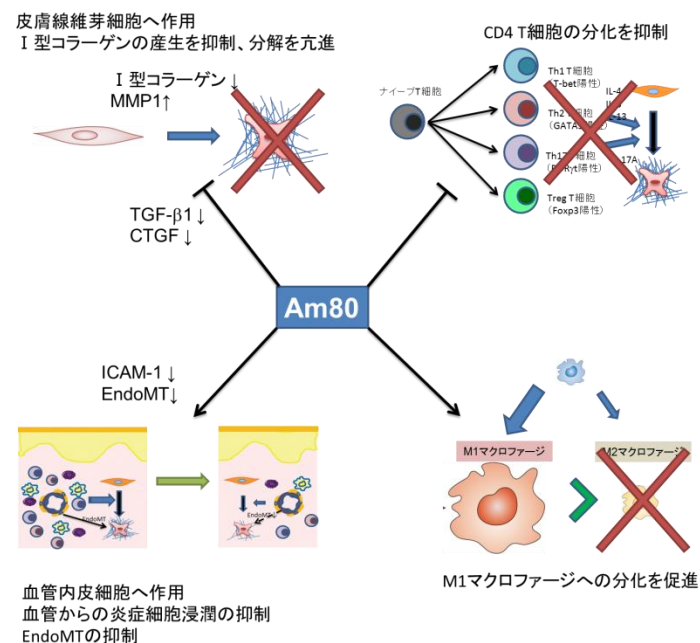
更に、我々は Am80 投与で BLM 誘発強皮症モデルマウス皮膚における EndoMT を抑制することを示した既存の報告では、BLM 誘発強皮症モデルマウスや tight skin マウスにおいても EndoMT が亢進しており、血管異常や線維化に関与していると言われている[90] [91]。

また EndoMT の亢進には TGF- β 1 を介したプロテインキナーゼ C δ -c-Abl キナーゼへの活性化[92]や、IFN- γ を介した ET-1 や TGF- β 2 の増加[93]が重要であり、これらの経路は強皮症の病態形成にも関係する[94] [95] [96]。Am80 投与により IFN- γ や TGF- β 1 が減少することから、Am80 はこれらサイトカイン産生の低下を通じて EndoMT を抑制していると考えた。

最後に Am80 がどのような機序で皮膚線維芽細胞への抗線維化作用を示すかを検討したところ、Am80 は I 型コラーゲンの産生を抑制し、MMP1 によるコラーゲン分解を促進することが明らかとなった。さらに Am80 は線維芽細胞において、COL1A2 遺伝子の転写活性を抑制し、その mRNA の安定性を下げることによって、I 型コラーゲンの蛋白量発現を抑制することを示した。レチノイン酸は

Smad2/3 のリン酸化を抑制し、核内移行を抑制することで TGF- β 1 シグナリングを阻害する[97]。TGF- β 1 シグナリングは COL1A2 遺伝子の転写を促進することを考慮すると、レチノイン酸は TGF- β 1 シグナリングを阻害することで COL1A2 遺伝子の転写を抑制することが考えられた。COL1A1 遺伝子 mRNA に関しては、レチノイン酸投与がアミノ酸欠乏を引き起こすことでその安定性を下げるとする報告があるが[98]、COL1A2 遺伝子 mRNA の安定性についてこの機序が働くかは明らかでない。また、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質(hnRNP) A1、E1、K が COL1A1、COL1A2、COL3A1 遺伝子の mRNA の 3'末端に結合し、その安定性を高め、コラーゲン合成を促進することが知られているが[99]、ATRA は hnRNP K を減少させるという報告があり[100]、Am80 による COL1A2 遺伝子 mRNA 安定性の低下も hnRNP の減少を介している可能性が考えられた。

本研究により、レチノイド Am80 が BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、免疫細胞、血管内皮細胞、皮膚線維芽細胞に作用し、BLM 誘発強皮症モデルマウスへの抗線維化作用を有することを示された。



シエーマ 2 Am80 の各種作用のまとめ

これにより Am80 は全身性強皮症に対する新たな抗線維化薬になる可能性が示唆された。Am80 はすでに急性前リンパ球性白血病の治療薬として臨床使用されており、その有害事象についても十分データが蓄積されてきている。市販後調査においてレチノイン酸症候群は 500 例中 13 例で出現したが、ATRA と比較しその症状は軽度であると考えられている。ただし、間質性肺炎発生後、肺うっ血で死亡した症例も 1 例報告があり、レチノイン酸症候群への対応には十分な注意を要する。今後は、安全性の検討を十分に行いつつ、全身性強皮症に対する臨床応用を目指して取り組んでいきたいと考えている。

6) 謝辞

大学院で学ぶ機会をお与え下さり、終始懇切なご指導ご鞭撻を賜りました
東京大学医学部皮膚科学教室、佐藤伸一教授に深謝いたします。また、本研
究に共同研究者としてご協力くださった東京大学医学部皮膚科学教室、門野
岳史准教授、浅野善英講師に深謝いたします。

また、Am80 をご供与いただいた財団法人乙卯研究所、首藤紘一所長に深
謝いたします。

7) 引用文献

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*; 15: 202-5. 1988
2. Clements PJ, Lachenbruch PA, Seibold JR, Zee B, Steen VD, Brennan P, et al. Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J Rheumatol*; 20: 1892-6. 1993
3. Lock G, Holstege A, Lang B, Scholmerich J. Gastrointestinal manifestations of progressive systemic sclerosis. *Am J Gastroenterol*; 92: 763-71. 1997
4. Young MA, Rose S, Reynolds JC. Gastrointestinal manifestations of scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am*; 22: 797-823. 1996
5. Sjogren RW. Gastrointestinal motility disorders in scleroderma. *Arthritis Rheum*; 37: 1265-82. 1994
6. Fujita J, Yoshinouchi T, Ohtsuki Y, Tokuda M, Yang Y, Yamadori I, et al. Non-specific interstitial pneumonia as pulmonary involvement of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*; 60: 281-3. 2001
7. Ihn H, Tamaki K. Increased phosphorylation of transcription factor Sp1 in

scleroderma fibroblasts: association with increased expression of the type I collagen gene. *Arthritis Rheum*; 43: 2240-7. 2000

8. Bezerra MC, Teodoro WR, de Oliveira CC, Velosa AP, Ogido LT, Gauditano G, et al. Scleroderma-like remodeling induced by type V collagen. *Arch Dermatol Res*; 298: 51-7. 2006

9. Martin P, Teodoro WR, Velosa AP, de Moraes J, Carrasco S, Christmann RB, et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*; 11: 827-35. 2012

10. Ihn H, Ohnishi K, Tamaki T, LeRoy EC, Trojanowska M. Transcriptional regulation of the human alpha2(I) collagen gene. Combined action of upstream stimulatory and inhibitory cis-acting elements. *J Biol Chem*; 271: 26717-23. 1996

11. Ihn H. Autocrine TGF-beta signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci*; 49: 103-13. 2008

12. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Constitutive thrombospondin-1 overexpression contributes to autocrine transforming growth factor-beta signaling in cultured scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol*; 166: 1451-63. 2005

13. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Involvement of

alphavbeta5 integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta1 in autocrine transforming growth factor beta signaling in systemic sclerosis fibroblasts.

Arthritis Rheum; 52: 2897-905. 2005

14. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, et al.

Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*;

105: 280-4. 1995

15. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al.

Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J*

Rheumatol; 27: 149-54. 2000

16. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, et al.

Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol*; 181: 153-9.

1999

17. Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol*; 37:

11-25. 2010

18. Sunderkotter C, Riemekasten G. Pathophysiology and clinical consequences of

Raynaud's phenomenon related to systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*; 45 Suppl 3: iii33-5. 2006

19. Youssef P, Englert H, Bertouch J. Large vessel occlusive disease associated with CREST syndrome and scleroderma. *Ann Rheum Dis*; 52: 464-6. 1993

20. Norton WL, Nardo JM. Vascular disease in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Intern Med*; 73: 317-24. 1970

21. Campbell PM, LeRoy EC. Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Semin Arthritis Rheum*; 4: 351-68. 1975

22. Ichimura Y, Asano Y, Hatano M, Tamaki Z, Takekoshi T, Kogure A, et al. Significant attenuation of macrovascular involvement by bosentan in a patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis with multiple digital ulcers and gangrene. *Mod Rheumatol*; 21: 548-52. 2011

23. Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK, Harlow LA, et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. *Pathobiology*; 61: 239-46. 1993

24. Gruschwitz MS, Vieth G. Up-regulation of class II major histocompatibility complex and intercellular adhesion molecule 1 expression on scleroderma fibroblasts

and endothelial cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha in the early disease stage. *Arthritis Rheum*; 40: 540-50. 1997

25. Rabquer BJ, Koch AE. Angiogenesis and vasculopathy in systemic sclerosis: evolving concepts. *Curr Rheumatol Rep*; 14: 56-63. 2012

26. Asano Y. Future treatments in systemic sclerosis. *J Dermatol*; 37: 54-70. 2010

27. Stafford L, Englert H, Gover J, Bertouch J. Distribution of macrovascular disease in scleroderma. *Ann Rheum Dis*; 57: 476-9. 1998

28. Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol*; 2: 679-85. 2006

29. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Jr., Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum*; 27: 645-53. 1984

30. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*; 24: 328-32. 1997

31. Duncan MR, Berman B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human

interleukin 6. *J Invest Dermatol*; 97: 686-92. 1991

32. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*; 4: 583-94. 2004

33. Sharada B, Kumar A, Kakker R, Adya CM, Pande I, Uppal SS, et al. Intravenous dexamethasone pulse therapy in diffuse systemic sclerosis. A randomized placebo-controlled study. *Rheumatol Int*; 14: 91-4. 1994

34. Takehara K. Treatment of early diffuse cutaneous systemic sclerosis patients in Japan by low-dose corticosteroids for skin involvement. *Clin Exp Rheumatol*; 22: S87-9. 2004

35. Taniguchi T, Asano Y, Hatano M, Tamaki Z, Tomita M, Kawashima T, et al. Effects of bosentan on nondigital ulcers in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol*; 166: 417-21. 2012

36. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*; 346: 896-903. 2002

37. Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, Mayes MD, Hsu VM, Carpentier P, et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*; 70: 32-8. 2011

38. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med*; 354: 2655-66. 2006
39. Hoyles RK, Ellis RW, Wellsbury J, Lees B, Newlands P, Goh NS, et al. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of corticosteroids and intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine for the treatment of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Arthritis Rheum*; 54: 3962-70. 2006
40. Miwako I, Kagechika H. Tamibarotene. *Drugs Today (Barc)*; 43: 563-8. 2007
41. Dzhagalov I, Chambon P, He YW. Regulation of CD8⁺ T lymphocyte effector function and macrophage inflammatory cytokine production by retinoic acid receptor gamma. *J Immunol*; 178: 2113-21. 2007
42. Yoshimura K, Uchida G, Okazaki M, Kitano Y, Harii K. Differential expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) mRNA in normal human keratinocytes induced by a variety of natural and synthetic retinoids. *Exp Dermatol*; 12 Suppl 2: 28-34. 2003
43. Nagai R, Shindo T, Manabe I, Suzuki T, Kurabayashi M. KLF5/BTEB2, a Kruppel-like zinc-finger type transcription factor, mediates both smooth muscle cell activation and cardiac hypertrophy. *Adv Exp Med Biol*; 538: 57-65; discussion 6. 2003

44. Nagai H, Matsuura S, Bouda K, Takaoka Y, Wang T, Niwa S, et al. Effect of Am-80, a synthetic derivative of retinoid, on experimental arthritis in mice. *Pharmacology*; 58: 101-12. 1999
45. Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Murakami Y, Ishido M, Miyasaka N, et al. The effect of synthetic retinoid, Am80, on T helper cell development and antibody production in murine collagen-induced arthritis. *Mod Rheumatol*; 20: 244-51. 2010
46. Miano JM, Berk BC. Retinoids: versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype. *Circ Res*; 87: 355-62. 2000
47. Miano JM, Berk BC. Retinoids: new insight into smooth muscle cell growth inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 21: 724-6. 2001
48. Uruno A, Sugawara A, Kanatsuka H, Kagechika H, Saito A, Sato K, et al. Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation*; 112: 727-36. 2005
49. Miwako I, Shudo K. Oral administration of synthetic retinoid Am80 inhibits the development of type 1 diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Biol Pharm Bull*; 32: 157-9. 2009
50. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Impaired

Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest*; 113: 253-64. 2004

51. Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Jr., Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol*; 19: 448-53. 2007

52. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, et al. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J Immunol*; 185: 2502-15. 2010

53. Chaudhuri V, Zhou L, Karasek M. Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis. *J Cutan Pathol*; 34: 146-53. 2007

54. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med*; 19: 1047-53. 2013

55. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 293: L1-8. 2007

56. Stawski L, Han R, Bujor AM, Trojanowska M. Angiotensin II induces skin fibrosis: a novel mouse model of dermal fibrosis. *Arthritis Res Ther*; 14: R194. 2012

57. Lee SW, Choi H, Eun SY, Fukuyama S, Croft M. Nitric oxide modulates

TGF-beta-directive signals to suppress Foxp3⁺ regulatory T cell differentiation and potentiate Th1 development. *J Immunol*; 186: 6972-80. 2011

58. Ding W, Shimada H, Li L, Mittal R, Zhang X, Shudo K, et al. Retinoid agonist Am80-enhanced neutrophil bactericidal activity arising from granulopoiesis in vitro and in a neutropenic mouse model. *Blood*; 121: 996-1007. 2013

59. Miyabe Y, Miyabe C, Nanki T. Could retinoids be a potential treatment for rheumatic diseases? *Rheumatol Int*. 2014

60. Kuwabara K, Shudo K, Hori Y. Novel synthetic retinoic acid inhibits rat collagen arthritis and differentially affects serum immunoglobulin subclass levels. *FEBS Lett*; 378: 153-6. 1996

61. Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Co-localization of transforming growth factor beta 2 with alpha 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest*; 86: 917-22. 1990

62. Higley H, Persichitte K, Chu S, Waegell W, Vancheeswaran R, Black C. Immunocytochemical localization and serologic detection of transforming growth factor beta 1. Association with type I procollagen and inflammatory cell markers in diffuse and limited systemic sclerosis, morphea, and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum*; 37: 278-88. 1994

63. Koca SS, Ozgen M, Dagli F, Tuzcu M, Ozercan IH, Sahin K, et al. Proteasome inhibition prevents development of experimental dermal fibrosis. *Inflammation*; 35: 810-7. 2012
64. Matsushita M, Yamamoto T, Nishioka K. Upregulation of interleukin-13 and its receptor in a murine model of bleomycin-induced scleroderma. *Int Arch Allergy Immunol*; 135: 348-56. 2004
65. 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: 275-84. 2006
66. Liu X, Gao N, Li M, Xu D, Hou Y, Wang Q, et al. Elevated levels of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in systemic sclerosis patients contribute to the secretion of IL-17 and immunosuppression dysfunction. *PLoS One*; 8: e64531. 2013
67. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *J Immunol*; 188: 3573-83. 2012
68. Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by

dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts.

Arthritis Res Ther; 15: R151. 2013

69. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice.

Arthritis Rheum; 64: 3726-35. 2012

70. Yang X, Yang J, Xing X, Wan L, Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. *Arthritis*

Res Ther; 16: R4. 2014

71. Emmez H, Kardes O, Dogulu F, Kurt G, Memis L, Baykaner MK. Role of antifibrotic cytokine interferon-gamma in the prevention of postlaminectomy peridural fibrosis in rats. *Neurosurgery*; 62: 1351-7; discussion 7-8. 2008

72. Hyde DM, Henderson TS, Giri SN, Tyler NK, Stovall MY. Effect of murine gamma interferon on the cellular responses to bleomycin in mice. *Exp Lung Res*; 14: 687-704. 1988

73. Youngblood B, Hale JS, Ahmed R. T-cell memory differentiation: insights from transcriptional signatures and epigenetics. *Immunology*; 139: 277-84. 2013

74. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*; 112: 1557-69. 2008

75. Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zajac AJ, Weaver CT. Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors. *Nature*; 452: 356-60. 2008
76. Klemann C, Raveney BJ, Klemann AK, Ozawa T, von Horsten S, Shudo K, et al. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*; 174: 2234-45. 2009
77. Iwata M, Eshima Y, Kagechika H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol*; 15: 1017-25. 2003
78. Wu J, Zhang Y, Liu Q, Zhong W, Xia Z. All-trans retinoic acid attenuates airway inflammation by inhibiting Th2 and Th17 response in experimental allergic asthma. *BMC Immunol*; 14: 28. 2013
79. Hurst RJ, De Caul A, Little MC, Kagechika H, Else KJ. The retinoic acid receptor agonist Am80 increases mucosal inflammation in an IL-6 dependent manner during *Trichuris muris* infection. *J Clin Immunol*; 33: 1386-94. 2013
80. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*; 8: 958-69. 2008
81. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat*

Immunol; 12: 231-8. 2011

82. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*; 117: 1155-66. 2007

83. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*; 122: 787-95. 2012

84. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*; 80: 1298-307. 2006

85. Nakayama W, Jinnin M, Makino K, Kajihara I, Makino T, Fukushima S, et al. Serum levels of soluble CD163 in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int*; 32: 403-7. 2012

86. Pechkovsky DV, Prasse A, Kollert F, Engel KM, Dentler J, Luttmann W, et al. Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clin Immunol*; 137: 89-101. 2010

87. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, 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

88. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, et al. Serum

adhesion molecule levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicentre, prospective, observational study. *PLoS One*; 9: e88150. 2014

89. Matsushita Y, Hasegawa M, Matsushita T, Fujimoto M, Horikawa M, Fujita T, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Immunol*; 179: 698-707. 2007

90. Xu H, Zaidi M, Struve J, Jones DW, Krolikowski JG, Nandedkar S, et al. Abnormal fibrillin-1 expression and chronic oxidative stress mediate endothelial mesenchymal transition in a murine model of systemic sclerosis. *Am J Physiol Cell Physiol*; 300: C550-6. 2011

91. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 43: 161-72. 2010

92. Li Z, Jimenez SA. Protein kinase Cdelta and c-Abl kinase are required for transforming growth factor beta induction of endothelial-mesenchymal transition in vitro. *Arthritis Rheum*; 63: 2473-83. 2011

93. Chrobak I, Lenna S, Stawski L, Trojanowska M. Interferon-gamma promotes vascular remodeling in human microvascular endothelial cells by upregulating endothelin (ET)-1 and transforming growth factor (TGF) beta2. *J Cell Physiol*; 228:

1774-83. 2013

94. Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum*; 46: 1703-13. 2002

95. Horstmeyer A, Licht C, Scherr G, Eckes B, Krieg T. Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1. *FEBS J*; 272: 6297-309. 2005

96. Akamata K, Asano Y, Aozasa N, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, 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

97. Yang KL, Chang WT, Hung KC, Li EI, Chuang CC. Inhibition of transforming growth factor-beta-induced liver fibrosis by a retinoic acid derivative via the suppression of Col 1A2 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun*; 373: 219-23. 2008

98. Varga J, Diaz-Perez A, Rosenbloom J, Jimenez SA. PGE2 causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*; 147: 1282-8. 1987

99. Thiele BJ, Doller A, Kahne T, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. RNA-binding proteins heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, E1, and K are

involved in post-transcriptional control of collagen I and III synthesis. *Circ Res*; 95: 1058-66. 2004

100. Harris MN, Ozpolat B, Abdi F, Gu S, Legler A, Mawuenyega KG, et al. Comparative proteomic analysis of all-trans-retinoic acid treatment reveals systematic posttranscriptional control mechanisms in acute promyelocytic leukemia. *Blood*; 104: 1314-23. 2004