

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

氏名 遠山哲夫

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。様々な成長因子、サイトカイン、ケモカイン、細胞接着分子がその発症に関与していることが指摘されている。これらの発現異常が、I型コラーゲンなどの細胞外基質の過剰沈着、血管新生異常や免疫異常を引き起こすことが示唆されている。皮膚硬化に対しては内服ステロイドを中心に加療され、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て使用され、シクロフォスファミドが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が、これらの有用性は限定的である。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の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 について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ール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と考えられている。たとえば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の炎症性サイトカインの発現を亢進させることが知られており、それゆえ 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作用が見込まれる。また全トランス型レチノイン酸は表皮の増殖と分化を亢進させるが、Am80 はそれらの作用がほとんどないと言われている。近年これらレチノイドの免疫系や血管系への作用についての検討がなされてきており、注目を集めている。全身性強皮症における線維芽細胞の活性化が血管や免疫系の異常により引き起こされるということを考慮すると、我々は、Am80 がそれらの異常を改善することで、全身性強皮症の線維化を抑制する治療的な作用がある可能性があると考えた。このことを示すため、ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを用いて、全身性強皮症の主要三要素である線維化、

血管障害、炎症・免疫異常の視点から Am80 の作用を検討した。

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚厚は PBS 投与マウスよりも肥厚し、Am80 投与により BLM 投与による皮膚肥厚は軽減された。皮膚肥厚と同様に、Am80 は BLM 投与による皮膚のコラーゲン含有量増加も軽減した。BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚における細胞外マトリクスに関連した遺伝子の mRNA 量を検討したところ、Am80 は *Col1a1*, *Col1a2*, *Col3a1* と *Col5a1* 遺伝子の mRNA の発現量を減少させ、matrix metalloproteinases の一つである *Mmp13* 遺伝子の mRNA 発現量を増加させた。次に線維化を促進する growth factor である transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) と connective tissue growth factor (CTGF) を調べたところ、両者ともその mRNA 発現が Am80 で抑制されることが示された。さらに、Am80 は *Tnfa*, *Ifng*, *Ccl2*, *Il4*, *Il10*, *Il13*, *Il17a* 遺伝子の発現を抑制した。以上より Am80 は様々なサイトカイン、ケモカイン、成長因子といった液性因子の発現を調節し、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。

PBS と比較し、BLM 投与により所属リンパ節での CD4 陽性 T 細胞の IFN- γ 、IL-4、IL-17A 産生 CD4 陽性 T 細胞数は増加したが、Am80 によりその数は減少した。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、それらすべての発現を Am80 は抑制した。Am80 はまた、BLM 投与マウスのリンパ節中の Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞の発現も減少させた。Am80 は CD4 陽性細胞中のナイーブ T 細胞(CD62L⁺CD44^{low} cells)の割合を増加させ、一方でエフェクターメモリー T 細胞(CD62L⁻CD44^{high} cells)の割合を減少させた。これらの結果より、Am80 はナイーブ T 細胞が分化し、サイトカインを産生するエフェクター細胞になることを抑制することが示唆された。

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、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 発現を抑制した。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 発現を抑制した。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 Am80 の用量依存性に抑制した。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の皮膚において、これらの mRNA の発現を促進した。また in vitro では Am80 は、IFN- γ と lipopolysaccharides で刺激した THP-1 細胞における *INOS* と *IL12p35* 遺伝子の mRNA の発現を亢進した。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。

線維化を促進する作用が知られている細胞接着因子のひとつである ICAM-1 について 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 発現は減少した。次に抗 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 投与で亢進し、その増加は Am80 投与で緩和された。さらに Am80 は TNF- α にて刺激した HDMEC において、その *ICAM-1* 遺伝子の mRNA 発現を抑制した。また、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 細胞の浸潤が抑制された。

Endothelial-to-mesenchymal transition (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している。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。BLM 投与により VE-cadherin/FSP1 double-positive の細胞が増加し、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。

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 によるこれらの作用を Am80 の用量依存的に緩和させた。また、TGF- β 1 刺激で皮膚線維芽細胞は I 型コラーゲンの蛋白量が増加するが、Am80 投与によりその増加が緩和された。加えて、Am80 は TGF- β 1 で刺激したヒト正常皮膚線維芽細胞において CTGF 遺伝子の mRNA 量を減少させた。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- β 1 刺激で上昇した *COL1A2* 遺伝子の転写活性は Am80 投与により抑制された。さらに、Am80 投与で *COL1A2* 遺伝子の mRNA の安定性が低下した。

本研究は、レチノイド Am80 が BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて抗線維化作用を有し、その免疫異常を改善させることを示した。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。