

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 遠山哲夫

本研究は、レチノイド Am80 が全身性強皮症に対する新たな抗線維化薬になりうるのか明らかにするために、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、皮膚線維芽細胞に対する作用を解析したもので、下記の結果を得ている。

1. 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たが、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。また Am80 は *Tgfb*, *Ctgf*, *Tnfa*, *Ifng*, *Ccl2*, *Il4*, *Il10*, *Il13*, *Il17a* 遺伝子の mRNA の発現を抑制した。
2. 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- $\gamma$ 、IL-4、IL-17A 発現 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- $\gamma$ 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が亢進させたがそれらを Am80 はすべて抑制した。さらに、Am80 は BLM 投与マウスでの Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup> 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<sup>-</sup>CD44<sup>high</sup> cells)の割合を減少させた。
3. BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において Am80 は *Ym1*、*Fizz1* 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- $\gamma$  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。
4. 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。免疫化学染色にて、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 投与で緩和することが示された。Am80 は TNF- $\alpha$  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。

5. Endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) に対する Am80 の影響を調べるため、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。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。

6. Am80 は TGF- $\beta$ 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。また、TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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 量も減少させた。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- $\beta$ 1 刺激で上昇した *COL1A2* 遺伝子のプロモーター活性は 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。これまで 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。