

【要約】

修士課程優秀論文

皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおける p38 MAP kinase の役割の検討

The inhibitor of p38 MAP kinase suppresses skin fibrosis in the sclerodermatous chronic GVHD.

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科血管新生・結合組織代謝学
(皮膚科学)

伊 達 睦

1. はじめに

全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器の線維化を来す膠原病である。その原因は未だ不明であり、早急に新規治療標的を定める必要がある。強皮症患者の病変初期の皮膚では、リンパ球、マクロファージ等の炎症性細胞の浸潤を認めることから、これらの細胞浸潤が線維化の進行の引き金になっている可能性が考えられる(1)。また、強皮症患者の血清中に炎症性サイトカインが多く検出されることから、免疫応答や炎症反応が強皮症の病態に関与していることが示唆される(1, 2)。炎症時に活性化するシグナル経路の一つに p38 MAP kinase 経路がある(3)。p38 MAP kinase と強皮症における過去の研究は、強皮症患者の皮膚線維芽細胞において p38 MAP kinase が亢進していることが報告されている(4)。本研究では、強皮症モデルマウスの一つである皮膚硬化型慢性 GVHD モデル (Scl-cGVHD) における p38 MAP kinase の役割について検討した。

2. 方法

Scl-cGVHD マウスは、レシピエントとなる放射線照射した BALB/c マウスに、マイナー組織適合抗原の異なる B10.D2 マウスの骨髄および脾臓細胞を移植して作製した(5)。移植21日後から強皮症の主症状である皮膚や内臓の線維化を認める。この Scl-cGVHD マウスに p38 MAP kinase 阻害剤を投与し、線維化に対する効果を検討した。

3. 結果

Scl-cGVHD マウスのリンパ球およびマクロファージでは p38 MAP kinase の活性化を認める

p38 MAP kinase の活性化はリン酸化により制御されている。このことから、Scl-cGVHD マウスと野生型マウスのリンパ球とマクロファージにおいて、p38 MAP kinase のリン酸化を比較した。各々のマウスの脾臓からリンパ球とマクロファージを回収し PMA で刺激後、リン酸化 p38 MAP kinase 抗体で染色したところ、Scl-cGVHD マウスでは p38 MAP kinase のリン酸化が野生型マウスの比で亢進していた。以上より、Scl-cGVHD マウス

スでは p38 MAP kinase が重要な役割を果たしていることが示唆された。

p38 MAP kinase 阻害剤投与によりスキンスコアが減少

次に、Scl-cGVHD マウスに p38 MAP kinase 阻害剤を投与し線維化の抑制効果を検討した。Scl-cGVHD マウスにおいて、線維化の進行に伴い脱毛が始まることから、線維化進行の判断基準に脱毛面積(以下、スキンスコアと呼ぶ)を用いた。健康な皮膚状態=0点、脱毛面積が1cm²以下=1点、1cm²~2cm²=2点、2cm²~5cm²=3点、5cm²~10cm²=4点、10cm²~15cm²=5点、15cm²~20cm²=6点、20cm²以上=7点とし、最小値が0点、最高値が7

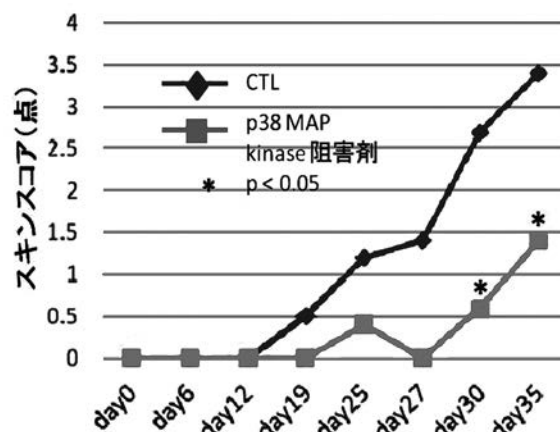


図 1:p38 MAP kinase 阻害剤投与におけるスキンスコアによる線維化抑制の検討
PBS 投与群と p38MAP kinase 阻害剤投与群の両者で移植後のスキンスコアの推移をグラフ化した(左三枚の写真:コントロール群、右三枚の写真:p38 MAP kinase 阻害剤投与群)

点と定めた。p38 MAP kinase阻害剤 (VX702, Cayman Chemical) を骨髓移植から一週間経過した day7 から4週間経口投与した群とPBSを投与したコントロール群に分け、day35に解析した。コントロール群のスキンスコア3.4点 (n=4) と比べ、p38 MAP kinase 阻害剤投与群ではスキンスコアが1.4点 (n=6) と有意な抑制効果が認められた。p38 MAP kinase 阻害剤により線維化ならびに、炎症性細胞浸潤が抑制された

Day35の皮膚組織を用いてH&E染色とMasson's Trichrome染色を行った。H&E染色で皮膚の線維化した部分の厚さを測定したところ、PBS投与群では226.9 μm (n=4)であったが、p38 MAP kinase 阻害剤投群では161.3 μm (n=7)、と有意な抑制効果が認められた。さらに膠原繊維を染色するMasson's Trichrome染色でもコントロール群では156.3 μm (n=4)であったが、p38 MAP kinase 阻害剤投群では112.3 μm (n=7)、と有意な抑制効果が認められた。

さらに、皮膚真皮内に浸潤する細胞数 (CD4, CD8, CD11b) を調べたところ、p38 MAP kinase 阻害剤投与によりCD4陽性T細胞が70%、CD8陽性T細胞が65%、CD11b陽性マクロファージが80%減少していた。

p38 MAP kinase 阻害剤によりコラーゲンの mRNA 発現量が減少

真皮内での様々なサイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β , CTGF, col1A2) の発現量をリアルタイムPCRを用いて解析した。炎症性サイトカインであるIL-1 β およびTNF- α mRNA発現量は、p38 MAP kinase 阻害剤投与により減少する傾向が見られたが、他のサイトカインについては差はみられなかった。また、炎症反応を抑制させる働きのあるIL-10についても、コントロール群、p38 MAP kinase 阻害剤投群において差がみられなかった。一方、コラーゲン産生の指標であるcol1A2のmRNA発

現量はp38 MAP kinase 阻害剤投与により有意に減少していた。以上の結果からp38 MAP kinase 阻害剤投与によりコラーゲン産生量が減少することが示された。

4. まとめ

Scl-cGVHDマウスにおいて、p38 MAP kinase 阻害により線維化の抑制を認めた。Day35の皮膚を用いたリアルタイムPCRの結果では、線維化に重要なコラーゲン産生の減少が見られ、また真皮内の炎症性細胞浸潤の減少も認められた。本研究により、p38 MAP kinaseはScl-cGVHDマウスにおいて重要な役割を有していること、また強皮症においてp38 MAP kinaseが治療標的となる可能性が示された。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、金沢大学大学院血管新生・結合組織代謝学教室の竹原和彦教授、松下貴史講師には温かい御指導、御助言を賜りましたこと、心より御礼申し上げます。また動物実験施設の方々、そして直々に御指導下さいました技術補佐員の方々、血管新生・結合組織代謝学教室の皆様へ深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) Roumm, A. D, et al. Arthritis Rheum.. 27:645-53, 1984
- 2) Zhang Y, et al. J Immunol. 168:3088-98, 2002
- 3) Kumar S, et al. Nature Reviews Drug Discovery. 2: 717-26, 2003
- 4) Ihn H, et al. J Invest Dermatol. 125: 247-55, 2005
- 5) Le Huu D, et al. Blood. 121: 3274-83, 2013



Profile

2013年 鳥取大学医学部生命科学科卒業
2015年 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科修士課程修了 (皮膚科)