

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13401  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24591644  
研究課題名(和文) サイトカインを標的とする強皮症の治療戦略

研究課題名(英文) Cytokine-targeted therapy of scleroderma

## 研究代表者

長谷川 稔 (Hasegawa, Minoru)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：50283130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17Aの各欠損マウスに、ブレオマイシン連日皮内投与による強皮症モデルを誘導した。このうち、IL-17A欠損マウスだけが有意に皮膚硬化が軽減した。IL-17Aの欠損により、白血球の皮膚浸潤やTGF- $\beta$ やCTGFの発現が抑制された。ブレオマイシンの注射は、Th17細胞の分化を誘導し、皮膚におけるIL-17A発現を増強させた。皮膚の培養線維芽細胞は、IL-17Aの添加によりTGF- $\beta$ 、CTGF、コラーゲンの産生を増加させた。IL-17Aが、TGF- $\beta$ やCTGFの発現を促進することにより、強皮症の線維化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To compare the roles of Th1, Th2, and Th17 cytokines, we applied bleomycin-induced scleroderma model to mice deficient for interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL) -4, and IL-17A. The loss of IL-17A significantly attenuated bleomycin-induced skin fibrosis, whereas deficiency of IFN- $\gamma$  or IL-4 did not. The leukocyte infiltration and mRNA expression levels of TGF- $\beta$  and CTGF in the bleomycin-injected skin were significantly reduced in IL-17A-deficient mice. Bleomycin injection stimulated the differentiation of naive T cells into Th17 cells and increased IL-17 expression in the skin. Cell lines of skin fibroblasts expressed increased TGF- $\beta$ , CTGF, and collagen by the addition of IL-17A. IL-17A, a representative Th17 cytokine, plays a dominant role during the development of skin fibrosis. That is, bleomycin injection induces IL-17A production and increased IL-17A likely stimulates collagen production from fibroblasts probably via cytokine production such as TGF- $\beta$  and CTGF in mice.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：強皮症 線維化 サイトカイン

## 様式 C-19, F-19, Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチなど、他の膠原病の治療法が開発されて行く中で、皮膚や内臓臓器に線維化を来す全身性強皮症（以下強皮症）においては、これまで有効な治療法が開発されていない。その原因は不明であり、線維化の促進や維持作用を有するTGF- $\beta$ やCTGFなどの成長因子が病態に関与していると考えられている。

以前より、線維化を呈する疾患では、全身性強皮症を含めてヘルパーT細胞 (Th) 1よりもTh2サイトカインが線維化に関与すると考えられてきた。しかし、近年の研究で強皮症患者の末梢血中ではTh17細胞が増加しており、Th17細胞から産生されるinterleukin (IL) -17Aをはじめとするサイトカインが炎症や線維化に関与している可能性が示唆されている。また、強皮症患者の血清中ではIL-17Aが増加しており、末梢血リンパ球や病変部皮膚においてIL-17Aの発現亢進が認められている。

強皮症の動物モデルとして現在最も使用されているのはブレオマイシン (BLM) 誘導性強皮症モデルである。その機序はよくわかっていないが、これまでの報告で、代表的なTh1サイトカインであるリコンビナントinterferon (IFN)- $\gamma$ の全身投与は皮膚硬化を軽減させ、IFN- $\gamma$ 欠損マウスでは肺線維症が抑制されることが報告されている。代表的なTh2サイトカインであるIL-4欠損マウスでは、BLM誘導性肺線維症への影響は認められないとの報告がある。しかし、BLM誘導性の皮膚硬化に関して、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17Aの欠損マウスでの検討の報告はみられていない。

### 2. 研究の目的

そこで、Th1、Th2、Th17のそれぞれ代表的なサイトカインであるIFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17Aの各遺伝子欠損マウスに、ブレオマイシン誘導性強皮症モデルを惹起し、それぞれのサイトカインが皮膚の線維化にどのように作用するかを検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス

IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17Aの各欠損マウスは、東京大学医科学研究所の岩倉洋一郎教授より供与いただいた。少なくともC57BL/6野生型マウスと8回以上バッククロスしたものを用い、コントロールとしてはJackson Laboratoryから購入したC57BL/6野生型マウスを用いた。

#### (2) BLM投与

それぞれの系統のマウスにおいて、300 $\mu$ gのBLMを背部に4週間連日皮下注射投与して皮膚硬化を誘導した。

#### (3) 皮膚の炎症や線維化の評価

注射した局所の皮膚を、H&E、Masson's trichrome、Van Gieson染色などを行い、線維化の程度を評価した。また、 $\alpha$ -SMA染色により、myofibroblastの数を算定した。また、CD3陽性T細胞、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 陽性好中球、F4/80陽性マクロファージの皮膚への浸潤細胞数は、それぞれの抗原に対する抗体を用いた免疫組織科学的に解析した。組織中や培養上清中のコラーゲン量は、Sirius redとFast greenのコラーゲンへの結合性を利用したコラーゲン定量法、またはSilcol assayにより測定した。

#### (4) サイトカインなどの測定

皮膚、脾臓T細胞、培養皮膚線維芽細胞に

おける各種サイトカイン、ケモカイン、接着分子の mRNA の発現量は、real time PCR により測定した。また、皮膚組織抽出液中のサイトカインの濃度は、総蛋白量を揃えたうえで、ELISA にて測定した。

#### (5) Th17 細胞の検出

抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を固相化した培養プレートに、脾臓から磁石ビーズを用いて抽出した CD4 陽性 T 細胞を加え、37 にて 48 時間培養した。培養細胞内の IL-17A を抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて IL-17A 産生 Th 細胞 (Th17 細胞) を検出した。

#### (6) 培養細胞での検討

マウスの皮膚由来線維芽細胞株 (NIH3T6) に IL-17A、または陽性コントロールとして TGF- $\beta$ 1 を添加して 24 時間培養した。培養上清中のコラーゲン量と線維芽細胞におけるサイトカインの発現を前述の方法にて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) IL-17A の欠損は BLM 誘導性の皮膚の炎症や線維化を抑制した

BLM を 28 日間連日背部に皮内注射したところ、IFN- $\gamma$  や IL-4 の欠損マウスでは野生型マウスと真皮の厚さに差がみられなかったが、IL-17A 欠損マウスでは有意な真皮の厚さの減少が認められた (図 1 A, B)。このため、IL-17A 欠損マウスで皮膚の厚さが減少する機序を検討した。IL-17A 欠損マウスでは、Van Gieson 染色陽性の真皮の範囲、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞数、組織中のコラーゲンの含有量が野生型マウスに比べてそれぞれ有意に減少していた (図 1 C)。また、IL-17A 欠損マウスでは、CD3 陽性 T 細胞、MPO 陽

性好中球、F4/80 陽性マクロファージの皮膚への浸潤が、減少していた (図 2)。

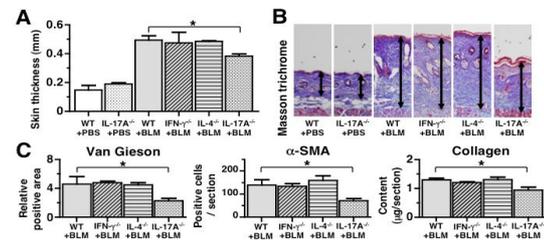


図 1

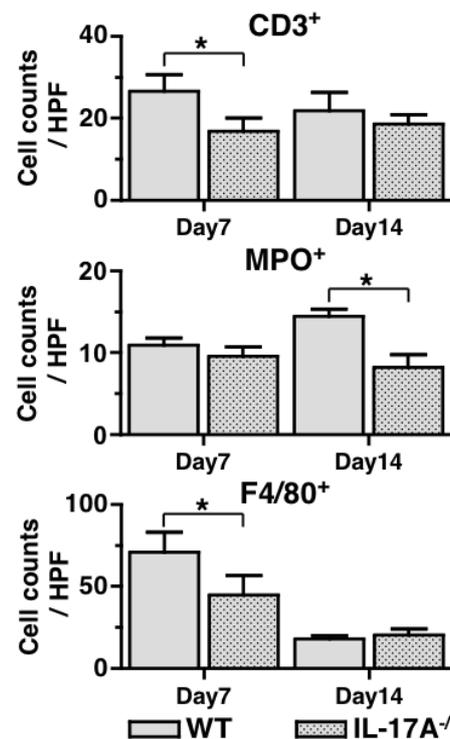


図 2

#### (2) BLM 投与は、皮膚や脾臓 T 細胞における IL-17A の発現を誘導した

BLM の投与が IL-17A の発現に影響するかどうかを検討した。BLM の連日投与は、脾臓 T 細胞における IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-17A、TGF- $\beta$ 1 の mRNA の発現を有意に上昇させ、特に IL-17A の上昇は顕著であった (図 3 A)。また、BLM の投与は、野生型マウスの皮膚抽出液中における IL-17A 量を有意に増加させた (図 3 B)。さらに、BLM 投与により、脾臓での IL-17A 産生 Th 細胞、すなわち

Th17 細胞が有意に増加した (図 3C)。

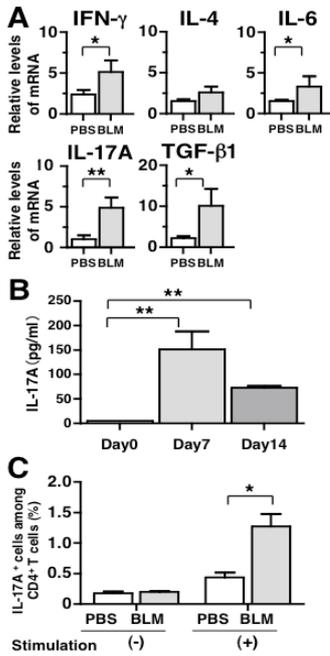


図 3

(3) IL-17A 欠損マウスでは、皮膚での TGF- $\beta$ 1 や CTGF の発現が低下していた

次に、BLM 誘導性皮膚硬化の過程において、IL-17A 欠損マウスにおける各種サイトカイン、ケモカイン、接着分子などの局所皮膚での発現が、野生型マウスと差がみられるかどうかを検討した。IL-17A 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて TGF- $\beta$ 1、CTGF の mRNA の発現が著明に低下していた (図 4A)。CXCL2、CCL2、CCL3 などのケモカインの発現は変わらなかったが、ICAM-1 の mRNA の発現が有意に低下していた (図 4B)。

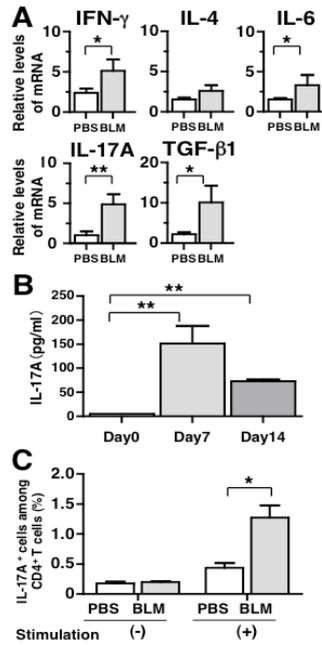


図 4

(4) IL-17A は線維芽細胞からのコラーゲン産生と TGF- $\beta$ 1 や CTGF の発現を促進した

IL-17A の皮膚線維化への関与を *in vitro* でも確認するために、リコンビナント IL-17A を培養皮膚線維芽細胞株に添加したところ、濃度依存性にコラーゲン産生の亢進が認められた (図 5A)。また、TGF- $\beta$ 1 の作用には及ばなかったが、線維芽細胞における TGF- $\beta$ 1 や CTGF の mRNA の発現を有意に促進させた (図 5B)。

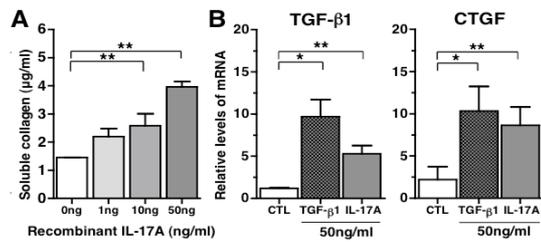


図 5

(5) 結果のまとめ

本研究では、IL-17A が BLM 誘導性強皮症モデルにおける皮膚硬化の形成に重要な役割を果たすことが示された。IFN- $\gamma$ 、IL-4、

IL-17A のそれぞれの欠損マウスにおいて、IL-17A 欠損マウスだけ皮膚硬化が軽減した。また、IL-17A の欠損により、経過中の TGF-β1、CTGF、ICAM-1 の発現亢進が抑制された。野生型マウスにおいて、BLM の連日皮内注射は、同部の皮膚や脾臓における IL-17A の発現を促進させた。さらに、培養皮膚線維芽細胞株にリコンビナントの IL-17A を添加すると、コラーゲンの産生と TGF-β1 や CTGF の発現が亢進した。

これらの結果から、IFN-γ や IL-4 よりも、IL-17A が直接または TGF-β1 や CTGF の誘導を介してブレオマイシン誘導性皮膚硬化の形成に関与していると考えられた。

#### (6) 結語

ヒトに対する IL-17A の中和抗体は、皮膚の炎症性疾患である乾癬ですでに保険収載され、他の自己免疫疾患や炎症性疾患に対して臨床試験が行われている。強皮症患者においてもその効果の検証が必要と考えられた。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, Fujimoto M, Takehara K. Potential roles of interleukin 17A in the development of skin fibrosis. Arthritis Rheum 64:3726-35, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

長谷川 稔 (MINORU, HASEGAWA)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：50283130

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし