

123. $\alpha 2$ AP をターゲットとした強皮症治療法の開発

菅野 陽介

同志社女子大学 薬学部 臨床病態生化学教室

Key words : 全身性強皮症, $\alpha 2$ AP, 線維化

緒言

全身性強皮症は皮膚及び肺、心臓、腎臓、消化管などの内蔵諸臓器の線維化を主徴とする系統的疾患で、いわゆる膠原病の1つに分類されている。その病因は、自己免疫現象、コラーゲン代謝異常、血管障害、遺伝的素因などの様々な要因が複雑に絡み合っており形成されるため、不明な点が多く、依然としてこの疾患の治療法は確立されていない。

我々は、強皮症モデルマウスを含むいくつかの線維化病態モデルマウスを用いて、線維化病変部位に $\alpha 2$ -antiplasmin ($\alpha 2$ AP) が蓄積すること、 $\alpha 2$ AP が欠損しているマウスでは線維化の進行が著しく抑制されていることを発見した。本研究は、この $\alpha 2$ AP が全身性強皮症の発症・進行にどのように関与しているのかを明らかにすると共に、 $\alpha 2$ AP の機能抑制を行うことにより、強皮症の発症・進行の制御を行うことが出来るかどうかを明らかにすることを目的とし、ヒト及びマウスの検体を用いてその解析を行った。

方法および結果

1. 線維化における $\alpha 2$ AP の役割

Bleomycin 投与による強皮症モデルマウス群の血清中の $\alpha 2$ AP の量がコントロール群と比較して顕著に増加していた (図 1a)。続いて、 $\alpha 2$ AP をマウスの皮下に投与し、その皮膚を解析した。その結果、 $\alpha 2$ AP の投与によって、皮膚が肥大し (図 1b、c)、コラーゲン量 (図 1b、d、e) 及び筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA の発現量が顕著に増加していた (図 1e、f)。

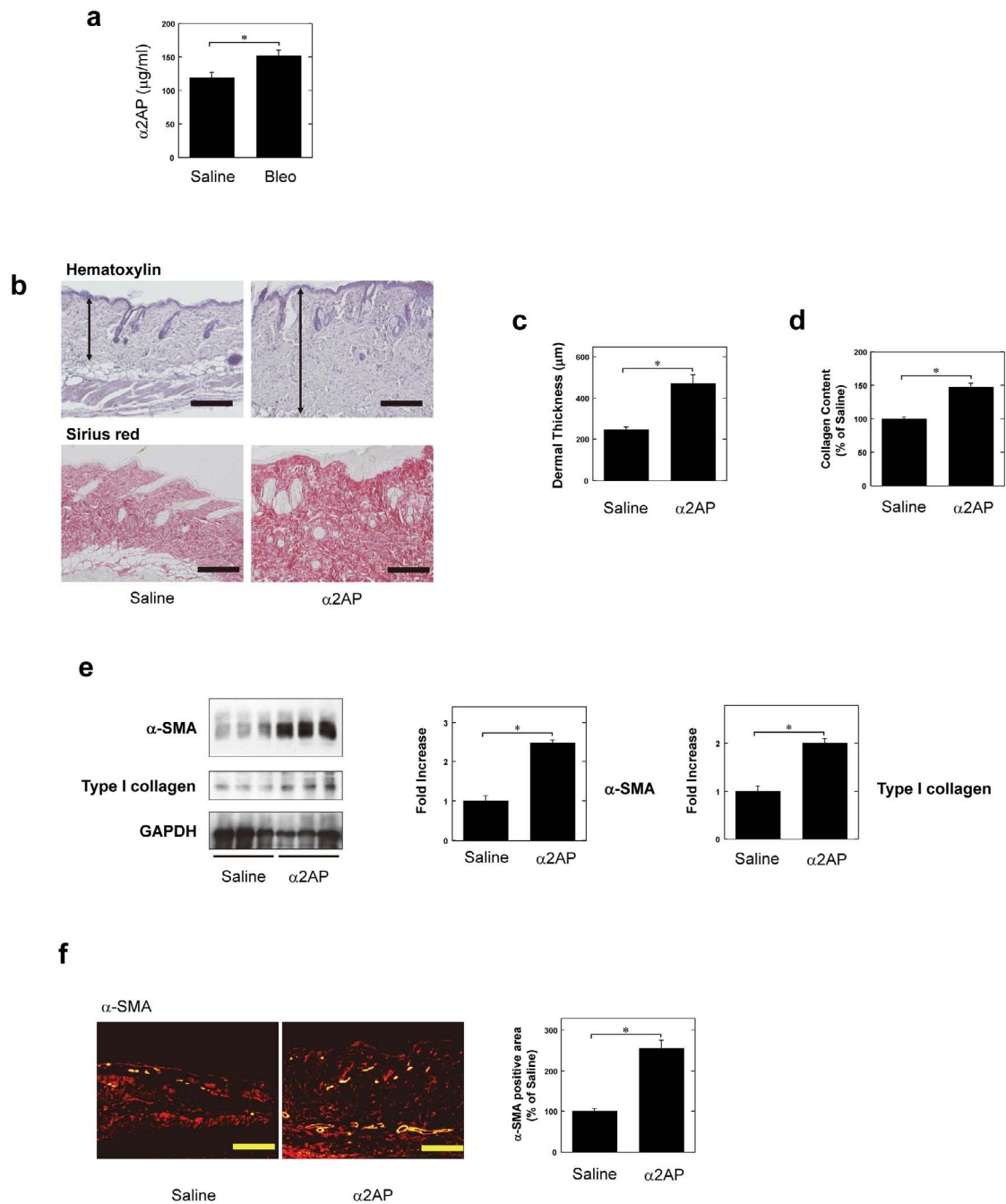


図1. 線維化における $\alpha 2AP$ の役割

(a) saline 及び bleomycin (Bleo) を投与したマウスの血清中の $\alpha 2AP$ の量を ELISA 法を用いて測定した (n=4)。 (b) saline 及び $\alpha 2AP$ を投与したマウスの皮膚の Hematoxylin 染色及び Sirius red 染色。 (c) saline 及び $\alpha 2AP$ を投与したマウスの皮膚の厚さ (n=6)。 (d) saline 及び $\alpha 2AP$ を投与したマウスの collagen 量 (n=6)。 (e) saline 及び $\alpha 2AP$ を投与したマウスの皮膚の α -SMA 及び type I collagen の発現量をウエスタンブロット法によって測定し、LSD 法を用いて検定を行った (n=3)。 (f) saline 及び $\alpha 2AP$ を投与したマウスの皮膚における α -SMA の発現量を免疫染色によって解析し、LSD 法を用いて検定を行った (n=4)。*, P < 0.01. Scale bar = 200 μm .

2. Bleomycin による強皮症モデルマウスにおける $\alpha 2AP$ の中和抗体の効果

Bleomycin による強皮症モデルマウスに $\alpha 2AP$ の中和抗体を投与し、その皮膚を解析した。その結果、 $\alpha 2AP$ の中和抗体の投与によって、bleomycin によって誘導された皮膚の肥大が緩和され (図 2a、b)、あわせて bleomycin によって誘導されたコラーゲン量 (図 2a、c、d) 及び筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA の発現量が顕著に抑制された (図 2d、e)。

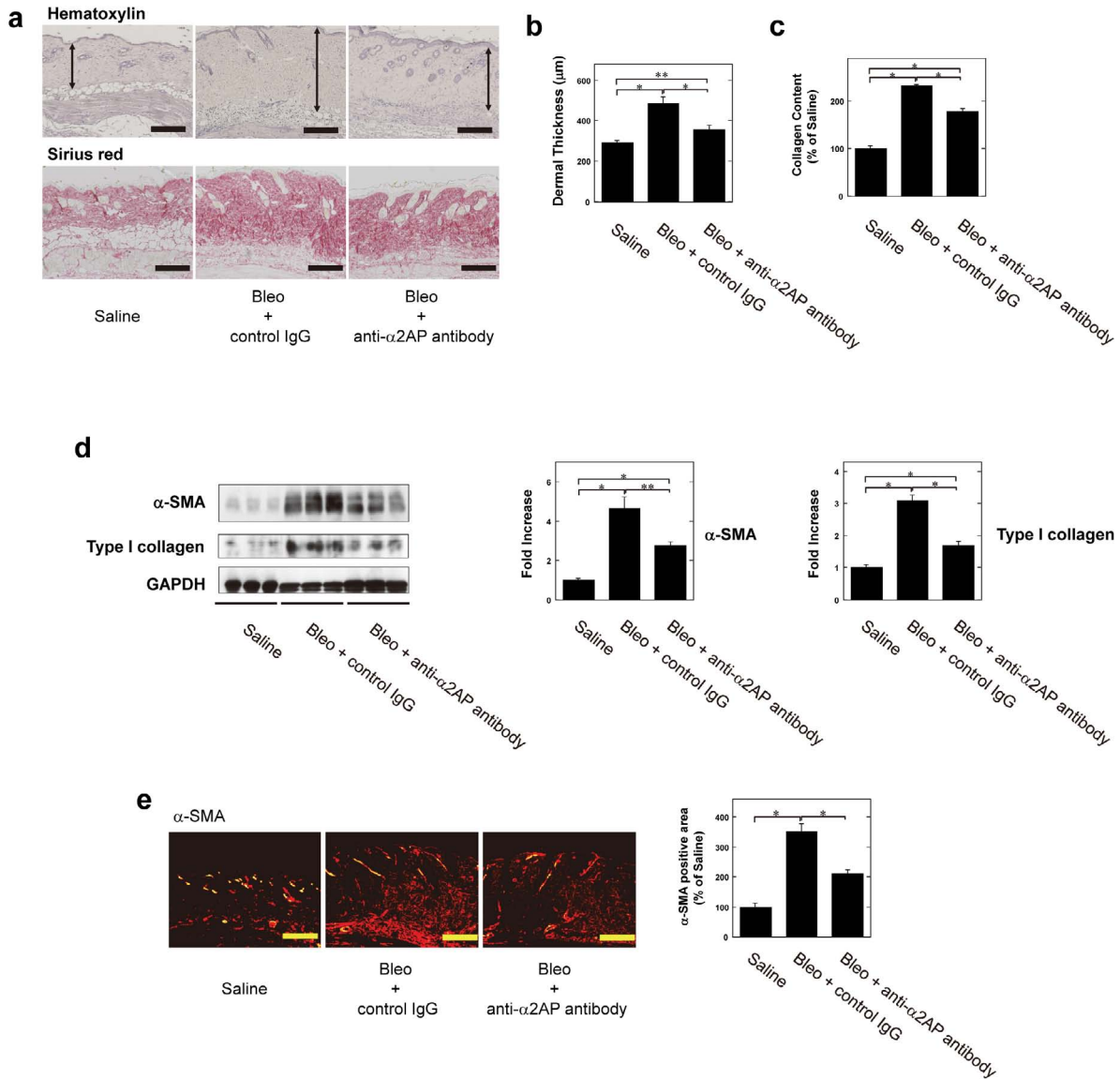


図 2. Bleomycin 投与による強皮症モデルマウスにおける $\alpha 2AP$ の中和抗体の効果

(a) saline、bleomycin (Bleo) + control IgG 及び bleomycin (Bleo) + anti- $\alpha 2AP$ antibody を投与したマウスの皮膚の Hematoxylin 染色及び Sirius red 染色。(b) saline、bleomycin (Bleo) + control IgG 及び bleomycin (Bleo) + anti- $\alpha 2AP$ antibody を投与したマウスの皮膚の厚さ (n=6)。(c) saline、bleomycin (Bleo) + control IgG 及び bleomycin (Bleo) + anti- $\alpha 2AP$ antibody を投与したマウスの collagen 量 (n=6)。(d) saline、bleomycin (Bleo) + control IgG 及び bleomycin (Bleo) + anti- $\alpha 2AP$ antibody の皮膚における α -SMA 及び type I collagen の発現量をウエスタンブロット法によって測定し、LSD 法を用いて検定を行った (n=3)。(e) saline、bleomycin (Bleo) + control IgG 及び bleomycin (Bleo) + anti- $\alpha 2AP$ antibody を投与したマウスの皮膚における α -SMA の発現量を免疫染色によって解析し、LSD 法を用いて検定を行った (n=4)。*, P<0.01; **, P<0.05. Scale bar = 200 μ m.

3. 強皮症患者の線維芽細胞における $\alpha 2AP$ の役割

健常人から採取した線維芽細胞に $\alpha 2AP$ を添加したところ、type I collagen、fibronectin、 α -SMA、TGF- β の発現が誘導された (図 3a)。続いて、健常人及び強皮症患者から採取した線維芽細胞における $\alpha 2AP$ の発現量を解析したところ、強皮症患者の線維芽細胞における $\alpha 2AP$ の発現量は、健常人の線維芽細胞と比較して顕著に増加していた (図 3b)。更に、強皮症患者の線維芽細胞に $\alpha 2AP$ の中和抗体を添加したところ、type I collagen、fibronectin、 α -SMA、TGF- β の発現は顕著に抑制された (図 3c)。

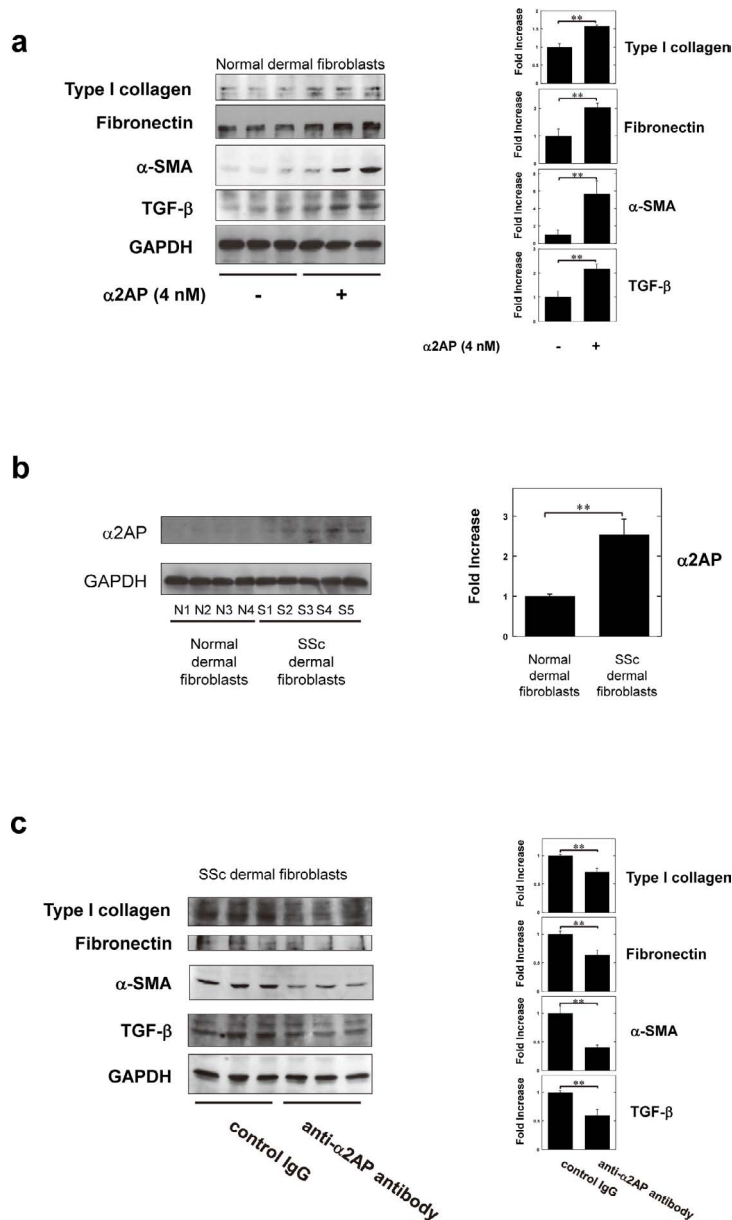


図 3. 強皮症患者の線維芽細胞における $\alpha 2AP$ の役割

(a) 健常人から採取した線維芽細胞に $\alpha 2AP$ を添加し、その細胞における type I collagen、fibronectin、 α -SMA、TGF- β の発現量をウエスタンブロット法によって測定し、LSD 法を用いて検定を行った (n=3)。(b) 健常人及び強皮症患者から採取した線維芽細胞における $\alpha 2AP$ の発現量をウエスタンブロット法によって測定し、LSD 法を用いて検定を行った (健常人 n=4、強皮症患者 n=5)。(c) 強皮症患者から採取した線維芽細胞に control IgG 及び anti- $\alpha 2AP$ antibody に添加し、その細胞における type I collagen、fibronectin、 α -SMA、TGF- β の発現量をウエスタンブロット法によって測定し、LSD 法を用いて検定を行った (n=3)。**, P<0.05.

考 察

本研究において、強皮症モデルマウスの血清中の α 2AP の量が増加すること及び α 2AP をマウスに投与することで皮膚の肥大化、細胞外基質の産生、筋線維芽細胞の分化が誘導されることを発見した。これに対して、強皮症モデルマウスに α 2AP の中和抗体を投与し、 α 2AP の機能抑制を行った結果、強皮症モデルマウスにおいて起こっていた皮膚の肥大化、細胞外基質の産生、筋線維芽細胞の分化が抑制された。これらの結果より、 α 2AP が皮膚の線維化を誘導し、強皮症の発症に関与していることが示唆された。

続いて、ヒトにおいても同様の結果が得られるかを明らかにするために健常人及び強皮症患者から採取した線維芽細胞を用いてその検証を行った。その結果、① α 2AP の添加が細胞外基質の産生、筋線維芽細胞の分化を誘導した。② 強皮症患者の線維芽細胞において α 2AP の発現が増加していた。③ α 2AP の中和抗体の添加によって、強皮症患者の線維芽細胞において起こっていた細胞外基質の産生、筋線維芽細胞の分化が抑制された。以上の結果より、 α 2AP は、強皮症の発症・進行に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

共同研究者

本研究の共同研究者は、岐阜大学医学部皮膚病態学講座の清島真理子、加納宏行、周円である。本稿を終えるにあたり、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kanno Y, Shu E, Kanoh H, Seishima M. The Antifibrotic Effect of α 2AP Neutralization in Systemic Sclerosis Dermal Fibroblasts and Mouse Models of Systemic Sclerosis. J Invest Dermatol. 2016;136(4):762-9. doi: 10.1016/j.jid.2015.12.028. PubMed.PMID: 26743600