慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | 強皮症の線維化病態における血小板の役割 |
| Sub Title | Role of platelets in the fibrotic process in systemic sclerosis |
| Author | 安岡, 秀剛(Yasuoka, Hidekata) |
| Publisher | |
| Publication year | 2016 |
| Jtitle | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2015. ) |
| JaLC DOI | |
| Abstract | 強皮症(SSc)の線維化病態における血小板の役割を追究した。SScおよび健常人由来の血小板RNAを用いたPCR arrayで病態への関与が示唆される遺伝子, 蛋白を同定した。その結果, CXCL5が同定され, 線維芽細胞培養中にCXCL5を添加すると細胞外マトリクス産生が増強した。さらにアスピリンによる血小板機能抑制マウス, または血小板機能が低下しているベータ3インテグリン欠損マウスを用いて線維化を誘導したところ野生型よりも線維化が抑制されていた。以上より, 血小板は線維化誘導に重要な役割を果たし, 特にSScでは血小板が微小血管障害部位でCXCL5を放出し, 線維化病態に関わる可能性があると考えられた。<br>Fibrosis is an important physiological process in the wound healing, and platelets are thought to play an important role, especially in the earlier step. Our aim in this study is to identify the role of platelets in the pathogenesis of SSc, a prototype of fibrotic diseases. mRNA expression profile of 168 genes were screened by PCR array, and expression of candidates were confirmed by semi-quantitative and quantitative PCR and immunoblot. Finally, CXCL5 was identified as a molecule associated with SSc. Interestingly, fibronectin production was enhanced by addition of recombinant CXCL5 in the culture of skin fibroblasts. Furthermore, Induction of fibrosis in animal model under suppression of platelet function by aspirin or knocking out of beta3-integrin, resulted in attenuation of fibrosis compared with non-treated or wild-type mice, respectively, suggesting that platelets play an important role in the induction of fibrosis. |
| Notes | 研究種目 : 基盤研究(C)(一般)<br>研究期間 : 2013 ~ 2015<br>課題番号 : 25461485<br>研究分野 : 膠原病 |
| Genre | Research Paper |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25461485seika |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２８　年　　６　月　　１　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2013～2015
課題番号：　２５４６１４８５

研究課題名（和文）強皮症の線維化病態における血小板の役割

研究課題名（英文）Role of platelets in the fibrotic process in systemic sclerosis

研究代表者
安岡　秀剛（YASUOKA, HIDEKATA）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：６０３６５２６０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：強皮症(SSc)の線維化病態における血小板の役割を追究した。SScおよび健常人由来の血小板RNAを用いたPCR arrayで病態への関与が示唆される遺伝子、蛋白を同定した。その結果、CXCL5が同定され、線維芽細胞培養中にCXCL5を添加すると細胞外マトリクス産生が増強した。さらにアスピリンによる血小板機能抑制マウス、または血小板機能が低下しているベータ3インテグリン欠損マウスを用いて線維化を誘導したところ野生型よりも線維化が抑制されていた。以上より、血小板は線維化誘導に重要な役割を果たし、特にSScでは血小板が微小血管障害部位でCXCL5を放出し、線維化病態に関わる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Fibrosis is an important physiological process in the wound healing, and platelets are thought to play an important role, especially in the earlier step. Our aim in this study is to identify the role of platelets in the pathogenesis of SSc, a prototype of fibrotic diseases. mRNA expression profile of 168 genes were screened by PCR array, and expression of candidates were confirmed by semi-quantitative and quantitative PCR and immunoblot. Finally, CXCL5 was identified as a molecule associated with SSc. Interestingly, fibronectin production was enhanced by addition of recombinant CXCL5 in the culture of skin fibroblasts. Furthermore, Induction of fibrosis in animal model under suppression of platelet function by aspirin or knocking out of beta3-integrin, resulted in attenuation of fibrosis compared with non-treated or wild-type mice, respectively, suggesting that platelets play an important role in the induction of fibrosis.

研究分野：　膠原病

キーワード：　強皮症　血小板　線維化

## １．研究開始当初の背景

過剰な線維化の過程における重要なキープレーヤーは現在でも線維芽細胞で、その役割は、活性化に伴う増殖および細胞外マトリクスの産生亢進と考えられている。これまでの線維化研究の大半は、線維芽細胞が 1)線維芽細胞自身のフェノタイプの変化（遺伝子やタンパク発現の変化）あるいは 2)外的因子による刺激を介した線維芽細胞の活性化、の結果として上記役割を果たすことを示している。しかし報告が多数集積する TGF-β であっても、抗 TGF-β 抗体投与の治験が行われるに至ったにもかかわらず十分な臨床的な効果は認められなかった(*Denton CP et al. Arthritis Rheum, 2007*)ことから、**現時点では単因子のみ、あるいは線維芽細胞のみといったシングルシステムでの解析では不十分と考えられている。最近の研究では線維芽細胞以外の様々な細胞システムの関与が注目されている (図 1)。**

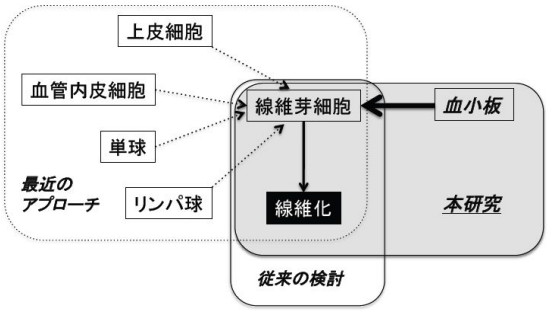


図１．本研究の位置づけ

例えば SSc 患者由来の単球 (*Higashi-Kuwata N et al. Arthritis Res Ther, 2010* など) やリンパ球 (*Hugle T et al. Arthritis Rheum 2012* など)、血管内皮細胞、上皮細胞がそれぞれ健常人由来の細胞と比較検討され、その役割が追究されている(図 1)。**血小板は**一般的には止血に関与するとされ、創傷治癒では図 2 に示すように、**最初に傷害部位に関わる**。近年血小板は多岐にわたるサイトカイン・ケモカインや成長因子などを内包していることが明らかとなり、免疫を含めた止血以外の役割をもつことも知られるようになってきた (*Semple J et al. Nat Rev Immunol, 2011*)。これまで SSc においても血小板機能 (*Cuenca R et al. Med Clin, 1990* など) や、血小板活性化マーカーの発現など強皮症の血小板の特徴を調べた検討 (*Solannilla A et al. Rheumatology, 2009* など) や血小板由来のマイクロパーティクルに関する検討 (*Guiducci S et al. Arthritis Rheum, 2008* など) が散見されるが、**血小板の線維化などの SSc の病態への直接的な関与を追究した研究はこれまでほとんどない**。

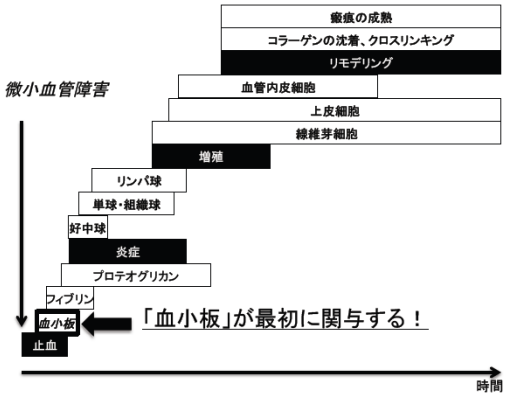


**図２．創傷治癒の時間的経過**

## ２．研究の目的

線維化は創傷治癒の一過程で、組織の修復にかかわる生理的現象であるが、制御を失い過剰な線維化が生じると臓器の機能を不可逆的に障害する。全身性強皮症(SSc)はその代表的な疾患で、肺・心臓・腎などの vital organ も障害される予後不良の疾患である。しかし今だ線維化を制止できる有効な治療法はない。本研究ではこれまで検討されることのなかった血小板に着目し、全身性強皮症の線維化病態における役割を解明することにより、線維化機序の解明および線維化を制御可能な新規治療標的を追究することを目的とした。

## ３．研究の方法

### *(1)　SSc の血小板は健常人と比較し、その性格が異なっているか？*

### ①SSc 患者由来血小板における遺伝子発現プロファイルの解析

年齢・性をマッチさせた SSc、健常人各 10 例の末梢血より得た血小板より total RNA を抽出、等量ずつプールしたのち、PCR array (SABiosciences™)で測定した。選択した遺伝子群は SSc の病態と関連が推測される 2 アレイ (Chemokine and chemokine receptors, Endothelial cell biology の 2 種類) 計 168 遺伝子について検討した。2 セットで上昇を認めた遺伝子を候補として抽出した。

### ②SSc 多数例を用いた標的遺伝子・タンパク発現レベルの解析と臨床特徴との関連

年齢・性をマッチさせた SSc23 例、健常人 24 例の血小板より得た mRNA を用い、半定量的 PCR と定量的 PCR (TaqMan™ quantitative PCR) の 2 段階で発現レベルを比較した。候補遺伝子のタンパク発現解析は whole cell lysate を用いた immunoblot を行った。発現レ

ベルは Image J を用いた定量化により評価した。さらに標的タンパク/遺伝子の発現レベルと臨床情報を比較し、標的タンパク/遺伝子高発現例の特徴を検討した。

**③SSc 多数例を用いた血小板の活性化状態についての解析**

***(2) SSc の血小板由来の因子および血小板は in vitro で線維芽細胞を活性化させるか？***

①血小板が候補因子を介して線維芽細胞の形質に影響を与えるか評価した。SSc および健常人由来の血小板と健常ヒト線維芽細胞の共培養を行う。この系で候補因子を抗体で中和ないしはその受容体をブロックすることでその影響を評価した。
②さらに候補因子を健常ヒト線維芽細胞に加えて培養し、線維芽細胞の細胞外マトリクス産生能（コラーゲン、フィブロネクチン）を評価した。いずれも細胞外マトリクスの産生を immunoblot で半定量的に比較した。

***(3) 血小板の存在は in vivo で線維化を引き起こすか？***

**①血小板機能を欠いたβ3 インテグリンノックアウトマウスを用いた線維化誘導**
**②線維化誘導マウスにおける抗血小板薬アスピリンの効果の解析**

血小板の存在が線維化に影響するか解析するために血小板機能が欠損しているβ3 インテグリン欠損マウスおよび血小板機能を抑制する治療を施したマウスを用い、繊維化への影響を評価した。これらのマウスブレオマイシン経気道的に 3 IU/kg 投与し、28 日後にマウスより肺組織を抽出し、肺の線維化を半定量的に評価した。評価法は：1) Hematoxylin&Eosin 染色や Masson-Trichrome 染色を用い、Ashcroft score (*Ashcroft TA et al.J Clin Pathol, 1988*)で線維化の程度を評価した。

## ４．研究成果

***1) SSc の血小板は健常人と比較し、その性格が異なっているか？***

**①SSc 患者由来血小板における遺伝子発現プロファイルの解析**

血小板における mRNA 発現について検討した。mRNA 発現のスクリーニングにスライドに示す PCR array を用いた。病態に関連すると推測される２種類のプラットフォーム、168 遺伝子についてスクリーニングした。ケモカインおよびそのレセプター遺伝子のプラットフォームで検討した結果、CCL5、CCRL2、CXCL5、HIF1A、IL-8、CYFIP2 の 6 遺伝子が候補として抽出された。また endothelial cell biology 関連遺伝子のプラットフォームで検討した結果、CCL5、CFLAR、CRADD 、 TYMP 、 FLT1 、 PECAM1 、 PLA2G4C、SELE の 8 遺伝子が候補として抽出され、計 14 遺伝子が抽出された。

**②SSc 多数例を用いた標的遺伝子・タンパク発現レベルの解析と臨床特徴との関連**

さらに血小板におけるこれら 14 遺伝子の発現について半定量的 PCR で比較した。血小板で恒常的に発現していると考えられている ITGA2B の発現を対照とし、それぞれその比を発現レベルとした。14 遺伝子のうち RT-PCR で解析可能であったのは PECAM、PLA2G4C、CXCL5、CCL5、CRADD の 5 遺伝子であった。このなかで強皮症 23 例、対照として健常人 24 例における遺伝子発現ついて検討した。この結果、半定量的 PCR では CXCL5 のみが強皮症由来の血小板で健常人と比較し高発現していることが明らかとなった（$P < 1 \times 10^{-5}$）。さらに、CXCL5 について定量的 PCR でその発現について検討した。定量的 PCR でも CXCL5 は強皮症血小板で高発現し（$P < 0.02$）、健常人の 4.6 倍で、候補遺伝子と考えられた。CXCL5 は CXC ケモカインの一つで好中球のリクルートや活性化に関与することが知られており、IL1β や TNFα でのその発現が誘導されることが知られている。またレセプターは CXCR2 で、CXCR2 を発現する好中球、マスト細胞、血管内皮細胞のリクルートに関与していることが報告されている。

CXCL5 がタンパクレベルでも高発現しているか、血小板の lysate を用いた免疫ブロットで検討した。タンパクレベルの検討でも CXCL5 は強皮症血小板で健常人の 1.6 倍高発現しており（$P < 0.0001$）、実際に生理的に意義を持つ可能性が示唆された。なお、発現レベルと臨床特徴について検討したが、明らかな関連は示されなかった。

**③SSc 多数例を用いた血小板の活性化状態についての解析**

血小板の代表的な機能は 3 つあり、活性化による形態変化、放出能、凝集能の獲得がある。対象はアメリカリウマチ学会の分類予備基準を満たす強皮症 49 例、健常人 23 例で強皮症の臨床特徴は表 1 に示す。16%で抗血小板薬が、半数以上がプロスタグランジン製剤を内服していた。活性化血小板の比率をフローサイトメトリーで検討した。血小板のマーカーを CD41、活性化マーカーとして CD62P を用いた。強皮症では健常人と比較し活性化血小板の比率が増加していた（$P < 0.0001$）。

**表 1.血小板の活性化状態を評価した全身性強皮症(SSc)49 例および健常人の内訳**

| | |
|---|---|
| **Systemic sclerosis (SSc)** | **49** |
| **Healthy controls** | **23** |
| Age (years) (mean ± SD) | 61.8 ± 12.4 |
| Male : Female | 4 : 45 |
| Diffuse : Limited | 7 : 42 |
| Age at onset (years) (mean ± SD) | 49.5 ± 13.9 |
| Disease duration at exam (years) | 12.6 ± 10.6 |
| Autoantibodies | |
| anticentromere antibody | 25 (51 %) |
| anti-Topoisomerase I antibody | 5 (10 %) |
| anti-U1RNP antibody | 5 (10 %) |
| anti-Th/To antibody | 4 ( 6 %) |
| anti-RNA polymerase III antibody | 1 ( 2 %) |
| Antiplatelets | 8 (16 %) |
| Cilostazol (Pletaal®) | 6 (12 %) |
| Sarpogrelate (Amplag®) | 2 ( 4 %) |
| Aspirin | 2 ( 4 %) |
| Prostanoids | 26 (53 %) |

***(2) SSc の血小板由来の因子および血小板は in vitro で線維芽細胞を活性化させるか？***

血小板の存在が強皮症の特徴である線維化、とりわけ細胞外マトリクスの産生への寄与の可能性を考え、血小板と線維芽細胞の共培養系を樹立し、細胞外マトリクスの産生への影響について検討した。健常線維芽細胞と強皮症由来の血小板を 96 時間共培後、harvest し、細胞外マトリクス産生を免疫ブロットで検討した。血小板を共培養することにより細胞外マトリクスであるフィブロネクチンの産生が増強されていた。

これまでの知見からは CXCL5 は上述に示したように生体内ではケモカインをして働くことが示されているが、過去にケモカインの一つである CCL2 は細胞外マトリクスの誘導を介して線維化と関連していることが示されている。そこで、CXCL5 に関しても細胞外マトリクスの産生を誘導し、線維化に寄与している可能性を考え、in vitro の系で検討した。血小板と線維芽細胞との共培養系での細胞外マトリクス産生の誘導は中和抗体である抗 CXCL5 抗体、CXCL5 レセプターアンタゴニストを投与することにより、部分的に抑制された。さらに CXCL5 のリコンビナントタンパクで線維芽細胞を刺激し、細胞外マトリクス産生が誘導されるか検討した。陽性コントロールとして PDGF、TGF-βを用い、フィブロネクチンの産生を確認した。CXCL5 刺激でもフィブロネクチンの発現が誘導されていることが示された。以上より、強皮症では血小板のフェノタイプが変化し、血小板内で増加している CXCL5 の放出を介して線維化を誘導し、強皮症の病態に寄与する可能性が考えられた。

***(3) 血小板の存在は in vivo で線維化を引き起こすか？***

血小板の機能が線維化に影響するか解析するために、野生型マウスに経気道的にブレオマイシン（3IU/kg）投与後、連日アスピリンあるいは PBS を投与し、28 日後に肺組織における線維化状態を評価した。アスピリン投与群では野生型マウスに比較し、肺線維化の程度が軽度で、Ashcroft score は低値であった (0.50 ± 0.58 vs 4.25 ± 0.96, $P < 0.05$)。さらに血小板機能が欠損しているβ3 インテグリンホモノックアウトマウスおよび野生型とノックアウトのヘテロマウスに同様にブレオマイシンを投与し、線維化の程度について検討した。ホモノックアウトマウスではヘテロに比較し、肺線維化の程度が軽度で、Ashcroft score は低値であった (1.11 ± 0.60 vs 4.15 ± 1.46, $P < 0.0002$)。以上より実際血小板の存在により線維化が誘導され、その機能を抑制することにより線維化が改善する可能性が示された。今後 CXCL5 レセプターリガンドを投与することにより、その効果が得られるか検討したいと考えている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

なし

〔学会発表〕（計 6 件）

① Yasuoka H, Kato M, Yoshimoto K, Yamaoka K, Takeuchi T. Circulating platelets are activated and associated with disease activity of patients with rheumatoid arthritis. EULAR2016, Jun 11, 2016, London (UK).（発表決定）

② 安岡秀剛、加藤三保子、吉本桂子、山岡邦宏、竹内勤．血小板の活性化状態は関節リウマチ(RA)の活動性と関連する．第 60 回日本リウマチ学会、2016 年 4 月 23 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

③ 安岡秀剛、竹内勤、桑名正隆．全身性強皮症(SSc)における血小板の活性化状態．第 19 回強皮症研究会議、2016 年 1 月 16 日、大正製薬本社（東京都・豊島区）

④ 安岡秀剛、加藤三保子、吉本桂子、竹内勤．血小板の活性化状態と関節リウマチ(RA)の病態との関連．第 2 回 JCR ベーシックカンファレンス、2015 年 10 月 2 日、東京大学鉄門記念講堂（東京都・文京区）

⑤ Yasuoka H, Stern K, Okazaki Y, Nishimoto T, Takeuchi T, Kuwana M. Abberant circulating platelets in patients with systemic sclerosis: roles in fibrosis. American College of Rheumatology, Oct 28,2013, San Diego (USA)

⑥ 安岡秀剛、竹内勤、桑名正隆．強皮症

の病態における血小板の役割.　第 57 回日本リウマチ学会、2013 年 4 月 18 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

〔図書〕（計　0　件）
なし

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
なし

○取得状況（計 0 件）
なし

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
安岡　秀剛（YASUOKA, Hidekata）
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：60365260