

Title	Blockade of Interleukin-6 Receptor Alleviates Disease in Mouse Model of Scleroderma
Author(s)	北場, 俊
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58989">https://hdl.handle.net/11094/58989</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	北場 俊 <small>きたば しゅん</small>
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 24986 号
学位授与年月日	平成 24 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Blockade of Interleukin-6 Receptor Alleviates Disease in Mouse Model of Scleroderma (抗 IL-6 受容体抗体はブレオマイシン誘導性強皮症モデルマウスの症状を改善する)
論文審査委員	(主査) 教授 片山 一朗 (副査) 教授 竹田 潤二 教授 細川 互

## 論文内容の要旨

## [ 目的 ]

強皮症は肺や皮膚など多臓器に進行性の線維化をきたす原因不明の自己免疫疾患である。皮膚の硬化が進行すると関節の可動域制限や呼吸苦が生じ、患者の QOL を著しく損なう。しかし、強皮症における皮膚硬化のメカニズムは完全に解明されておらず、効果的な治療法も未だ確立されていない。

これまでに、強皮症患者では血中 IL-6 値が高値を示し、重症度との間に強い相関を認めるなど IL-6 と強皮症との関連性が多数報告されている。また、細胞レベルにおいても、IL-6 は線維芽細胞を活性化し、コラーゲン産生を促進する事が知られている。強皮症の病態における IL-6 の役割は未だ不明瞭であるが、様々な報告から IL-6 は強皮症の病態に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究ではブレオマイシン (BLM) 誘導性皮膚硬化モデルマウスを用い、皮膚硬化における IL-6 の関与と IL-6 を標的とした強皮症治療の可能性について検討を行った。

## [ 方法ならびに成績 ]

## 1 BLM 誘導皮膚硬化モデルと IL-6 の関連

今回の検討に用いた BLM 誘導皮膚硬化モデルマウスは、BLM(1mg/ml) 100  $\mu$ l を 6 週齢 C57BL/6(WT) マウスの剃毛した背部に 28 日間皮下投与し作成した。

はじめに、このモデルマウスの血清、皮膚硬化部そして皮膚所属リンパ節における IL-6 の発現を検討した。29 日目に血清 IL-6 値を ELISA 法で測定、皮膚硬化部と所属リンパ節の IL-6 の発現を real-time PCR 法に

で測定し、対照マウスに比し IL-6 が上昇している事を確認した。

## 2 BLM 誘導皮膚硬化モデルにおける抗 IL-6 受容体抗体(MR16-1)の効果

次に、このモデルマウスにMR16-1もしくはコントロール抗体を静脈内(Day 0)と腹腔内(Day 7, 14, 21)に投与し、皮膚硬化を予防できるか検討した。29日目に皮膚硬化度を vesmeter にて評価し、硬化皮膚を組織学的に検討した。MR16-1投与群において、皮膚硬化度は有意に抑制された。組織学的にも真皮の厚さが有意に抑制され、強皮症初期に増加する $\alpha$  smooth muscle actin( $\alpha$ SMA)陽性線維芽細胞(myofibroblast)数、肥満細胞数も減少していた。

次にMR16-1の治療効果を検討するために、BLMを28日間連続投与し、皮膚硬化を誘導した後にMR16-1もしくはコントロール抗体をDay28, 35, 42, 49に投与した。予防実験と同様、皮膚硬化度、真皮の厚さ、myofibroblast数、肥満細胞数はMR16-1により有意に改善された。以上よりMR16-1はこのモデルマウスの皮膚硬化に対する治療効果があると考えた。

## 3 BLM 誘導皮膚硬化モデルにおける IL-6 の関与

次に、皮膚硬化形成におけるIL-6の関与をIL-6KOマウスを用いて検討した。BLMを28日間投与したIL-6KOマウスは、WTマウスに比べ皮膚硬化、myofibroblast数、肥満細胞数すべて減少していた。IL-6は皮膚硬化形成に貢献することが示された。

## 4 皮膚硬化における IL-6 の作用点の検討

次に、皮膚硬化形成におけるIL-6の役割を検討するために、IL-6KOマウスより分離した線維芽細胞にIL-6(1ng/ml, 10ng/ml)を負荷し、myofibroblastへの誘導を $\alpha$ SMAの発現で評価した。その結果、IL-6は線維芽細胞を濃度依存的に活性型のmyofibroblastへ分化させた。また、IL-6によるmyofibroblastの誘導はMR16-1とERK inhibitorにて抑制された。以上より、IL-6は線維芽細胞に直接作用し、活性型のmyofibroblastへの分化を誘導し、皮膚硬化を誘導する可能性が示唆された。

## 5 皮膚硬化におけるリンパ節の関与についての検討

最後に、皮膚所属リンパ節と皮膚硬化の関連性について検討した。モデルマウスの皮膚所属リンパ節は有意に腫大し、細胞数も増加していたが、その構築はWTマウスと比し差は認められなかった。MR16-1投与群あるいはIL-6KOマウスではリンパ節腫大が軽減されたので、IL-6は皮膚硬化時のリンパ節腫大に関与する可能性が示唆された。腫大したリンパ節の細胞分画をflow cytometryにて検討したところ、MR16-1による皮膚硬化抑制時にPlasmacytoid dendritic cells (pDCs)数の増加を認めた。治癒過程において、pDCsが何らかの形で関与している可能性が示唆された。

## [ 総 括 ]

抗IL-6受容体抗体はBLM誘導性皮膚硬化を有意に改善したことより、IL-6をターゲットとした治療が強皮症患者の皮膚硬化の新たな治療法になる可能性が示唆された。

本研究では、抗マウスIL-6受容体抗体(MR16-1)とIL-6ノックアウト(KO)マウスを用いて、プレオマイシン(BLM)誘導皮膚硬化モデルにおけるIL-6の役割と、抗IL-6受容体抗体の治療薬としての可能性を検討した。

BLMをC57BL/6(WT)マウスとIL-6KOマウスの背部に皮下注射し、皮膚硬化モデルを作成した。MR16-1の皮膚硬化に対する予防または治療効果を検討するために、BLMと同時に硬化病変形成後にMR16-1をマウスに投与し、その治療効果を評価した。WTマウスは、IL-6KOマウスに比べ著明な皮膚硬化とリンパ節腫脹を認めた。MR16-1は、予防的および治療的投与いずれも皮膚硬化を著明に改善させ、所属リンパ節の腫脹も縮小させた。また細胞レベルの検討においても、IL-6刺激は線維芽細胞を活性型のmyofibroblastへ誘導し、MR16-1はそのmyofibroblastへの誘導を抑制した。以上の結果は、IL-6をターゲットとした治療が強皮症患者の新たな治療法になる可能性を示唆しており、学位の授与に値すると考えられる。