第 37 回総会ポスター賞受賞記念論文

総 説 (推薦論文)

推薦者: 日本臨床免疫学会理事, 第 37 回総会長 住田孝之

強皮症病態におけるマスト細胞の関与～マスト細胞を標的とした治療の可能性～

湯川宗之助^{*1}, 山岡 邦 宏^{*1}, 澤 向 範 文^{*1}島 尻 正 平^{*2}, 齋 藤 和 義^{*1}, 田 中 良 哉^{*1}

Involvement of mast cells in systemic sclerosis

Sonosuke YUKAWA^{*1}, Kunihiro YAMAOKA^{*1}, Norifumi SAWAMUKAI^{*1},
Shohei SHIMAJIRI^{*2}, Kazuyoshi SAITO^{*1} and Yoshiya TANAKA^{*1}^{*1}The First Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Occupational and
Environmental Health, Japan^{*2}The Department of Second Pathology and Cell Biology, School of Medicine, University of Occupational and
Environmental Health, Japan

(Received February 18, 2010)

summary

Systemic sclerosis is characterized by tissue fibrosis, obliterative microangiopathy and immune abnormalities. The etiology of SSc is largely unknown and is known to be resistant to existing corticosteroid and immunosuppressive drugs. Therefore, establishment of a treatment strategy especially for SSc patients with organ involvement is strongly desired. Mast cells are widely recognized as effector cells in allergic disorders and other IgE-mediated immune responses. However, recently, mast cells have become known to play a role in bridging innate immunity and adaptive immunity. Additionally, there is growing evidence of mast cell to be involved in pathogenesis of rheumatoid arthritis, and is expected as a novel therapeutic target. We describe here the role of mast cell in SSc pathology and suggest as a novel therapeutic target.

Key words——mast cell; systemic sclerosis; pulmonary arterial hypertension; imatinib

抄 録

強皮症は皮膚および内臓諸臓器の線維化と末梢循環障害を主徴とする結合組織疾患である。原因は依然不明で、既存のステロイドや免疫抑制剤に抵抗性であり、皮膚線維化だけでなく臓器病変も含めた治療法の確立は急務である。

一方、マスト細胞は寄生虫に対する防御機構やアレルギー性疾患などとの関与は良く知られているが、最近になり自然免疫から獲得免疫の移行に重要である事や関節リウマチの病態にも関与し治療標的の可能性が示唆される様になっている。本稿では、マスト細胞の強皮症病態への関与について我々の知見も踏まえて概説し、マスト細胞を標的とした強皮症治療の可能性について述べる。

はじめに

強皮症は皮膚および内臓諸臓器の線維化と末梢循環障害を主徴とする、依然原因不明の結合組織疾患である。1942 年米国の病理学者である Klemperer は強皮症を含む 6 つの疾患を膠原線維や結合組織、血管周囲にフィブリノイド変性を呈する疾患群として

膠原病の古典的概念を提唱した。これまでにこれら疾患の病変部位はマスト細胞の主要な存在部位に一致することが知られるようになった。マスト細胞はこれまでアレルギーなどの自然免疫の主役と考えられてきたが、近年自然免疫から獲得免疫の移行に重要である事や、関節リウマチの病態にも関与し治療標的としての可能性が期待されている^{1~3)}。加えて、マスト細胞は皮膚線維芽細胞の増殖を刺激し、コラーゲン産生を促すことや、強皮症のモデルマウスである Tight-skin (Tsk) マウスにおいて、真皮

^{*1}産業医科大学医学部第一内科学講座^{*2}産業医科大学医学部第二病理学講座

に脱顆粒したマスト細胞を認めるなど皮膚線維化への関与が報告されており、強皮症病態への関与が考えられるようになっている^{4~6)}。

マスト細胞とは

免疫担当細胞は骨髄幹細胞を起源とし、骨髄系幹細胞あるいはリンパ球系幹細胞を経て分化する。前者から好中球、単球、好酸球、マスト細胞など主に自然免疫に関与する細胞が、後者からは T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞など主に獲得免疫に関与する細胞が分化する。マスト細胞は、前駆細胞のまま骨髄から組織内に遊走し、最終定着組織で成熟、活性化し、様々な炎症性メディエーターを産生、脱顆粒により放出し、自然免疫応答を担う。トリプターゼ、キマーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼなどのマスト細胞が産生する酵素は、侵入した抗原を処理すると同時に、組織のリモデリングや線維化を引き起こす。ヒスタミン、ヘパリン、プロスタグランジン、セロトニンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターは、血管透過性を介して炎症の場を提供するとともに、組織浮腫を引き起こす。この現象は、強皮症の浮腫期早期にみられる手指の掻痒を伴う腫脹に一致する。また、VEGF、トリプターゼは血管新生を誘導し、IL-8、MIP-1 や MCP-1 などのケモカインは、好中球、T 細胞、単球などの免疫担当細胞の血管外遊出を介して炎症部位への集積を齎す。TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインを産生し、炎症病態の増強や遷延化を引き起こす。すなわち、マスト細胞は、アレルギー反応のみならず、自然免疫を中心とした多様な炎症病態の形成において重要な役割を担う細胞であると認識されるようになっている (図 1)。更には、補体やサイトカインによる刺激を介して、獲得免疫への移行や自己免疫疾患の病態形成過程においても重要な役割を担うことが明らかになってきている^{7~9)}。

強皮症モデルマウスにおける関与

強皮症モデルマウスにおけるマスト細胞の関与は、Tsk マウス、プレオマイシン誘導モデルマウス、慢性 GVHD モデルマウスで主にこれまで研究されている。Tsk マウスは深部真皮と皮下結合組織線維化を含む結合組織の広範囲な障害を呈する遺伝子突然変異による系統である^{10,11)}。Walker らは、Tsk マウスの線維化病変は真皮での盛んに脱顆粒したマス

ト細胞の増加によって特徴づけられ¹²⁾、マスト細胞脱顆粒抑制剤投与 (cromolyn¹³⁾、ketotifen¹⁴⁾) により線維化が減弱することを報告した。更に、Tsk マウスとマスト細胞欠損マウスを交配すると加齢と共に有意に線維化が抑制され、マスト細胞が線維化進行に必須であることが明らかとなった¹⁵⁾。また、マスト細胞の分化・増殖・遊走因子である stem cell factor (SCF)、TGF- β 1 と IL-15 発現はマスト細胞数と相関し、更に興味深いことに、正常マウスの皮膚を移植された Tsk マウスではマスト細胞および SCF、TGF- β 1 と IL-15 の増加を認めたが、Tsk マウスの皮膚を移植された正常マウスでは増加を認めなかった。これらの結果から、Tsk マウスの局所へのマスト細胞の遊走は局所環境で産生される SCF、TGF- β 1 と IL-15 によることが明らかとなった¹⁶⁾。しかし、一方では、プレオマイシン誘導モデルにおいて、組織・生化学的に強皮症に類似した真皮の線維化の進行は、脱顆粒したマスト細胞数と相関する¹⁷⁾、マスト細胞欠損マウスでの検討により、真皮性線維化に関与するものの必須ではないと結論付けられている¹⁸⁾。また、以前より慢性移植片対宿主病 (Graft versus host disease ; GVHD) 患者の一部に強皮症類似の皮膚硬化がみられることがあり、マウスにおいても同種異系の脾細胞を移植することによって同様の現象が見られる¹⁹⁾。この GVHD モデルマウスでは、誘導 2 週間以内に真皮線維化、皮膚脂肪や付属器の萎縮と単核細胞の浸潤を認め、ヒト慢性 GVHD と強皮症の組織学的類似点を持つ^{19,20)}。このモデルマウスでは、皮膚線維化の直前に著明なマスト細胞の脱顆粒を認め²⁰⁾、マスト細胞安定化剤である nedocromil が皮膚線維化を減弱させ、一方マスト細胞活性化剤である compound 48/80 は軽度慢性 GVHD の皮膚線維化を増強した²¹⁾。このように強皮症モデルマウスにおける皮膚線維化へのマスト細胞の関与は多数報告されており、線維化病態への深い関与が示唆されている。

ヒト強皮症皮膚組織におけるマスト細胞

前述の如くモデル動物とマスト細胞の関与は数々取り出さされており、ヒトにおいても早期の強皮症皮膚組織に多数のマスト細胞が存在していることは知られている。

しかし、マスト細胞と強皮症の病期・病態への関与については詳細な検討は行われていない。そこで我々は、診断目的で施行された皮膚生検検体 (強皮

図1 マスト細胞は自己免疫疾患に深く関連するさまざまな因子を産生し脱顆粒する

図2 強皮症病態に対する Imatinib の新規作用機序

症 54 症例，非強皮症（膠原病疾患）29 症例）を用いて検討した．マスト細胞同定には，toluidine blue 染色と c-Kit 免疫染色を用い，正確な標本面積当たりのマスト細胞数（/mm²）を計測するために NanoZoomer Digital Pathology（NDP）を使用した．NDP は，組織スライドを 3 分間で 19 億画素の高解像度デジタルスライドとして変換・記録するシステムで，デジタルスライドは，マウス操作により任意な位置を指定し，拡大・縮小して画面上で観察可能である．また，簡易操作で正確な標本面積が自動的に計測される．更に，一画面に 4 つのスライド

を同時に表示し，シンクロして拡大・縮小可能であり，ミラーイメージで異なる染色を比較することが可能である．この方法を用いて，強皮症 54 例と非強皮症 29 例のマスト細胞数を比較したところ，toluidine blue 染色（25.1±9.4 vs 12.9±6.9, p=0.000）と c-kit 免疫染色（30.1±11.0 vs 18.0±11.9, p=0.000）のいずれにおいても強皮症症例で真皮層に有意なマスト細胞の増加を認めた．また，toluidine blue と c-kit 免疫染色によるマスト細胞同定を比較検討したところ，ほぼ同等の強い正の相関を認めたため，マスト細胞同定にはいずれの手法も有用

であることが判明した。廉価で簡便な toluidine blue 染色を用いて以下の検討を行った。

皮膚硬化の進行とマスト細胞の関与

強皮症 54 症例の臨床的特徴を示す。平均年齢は 59.8 歳、男女比は女性 83.3% で、non-SSc 症例と有意差を認めなかった。罹病期間が平均 2 年、modified Rodnan's skin thickness score (MRSS) は平均 9.9 点であった。病型分類別では、広汎性皮膚硬化型が 48%、限局性皮膚硬化型が 52% で、臓器病変に関しては、肺高血圧合併が 25%、間質性肺炎合併が 61.1% であった。自己抗体は、抗 Scl-70 抗体陽性が 31.5%、抗セントロメア抗体陽性が 29.4% であった。

MRSS とマスト細胞の関係について検討する目的で、MRSS を 0-4 点、5-12 点、13-40 点の 3 群に分け比較したところ、MRSS の増加に伴いマスト細胞の有意な増加を認めた ($p=0.023$)。また、皮膚生検部位 skin score 別にマスト細胞を比較すると有意差は認めないものの ($p=0.115$)、生検部位 skin score が最も高い、3 点でマスト細胞が多い傾向にあった。

次に、自己抗体とマスト細胞の関係について検討を行ったところ、抗 Scl-70 抗体陽性例においてマスト細胞は有意に増加していたが、一方、抗セントロメア抗体陽性症例では、有意差は認めないものの、マスト細胞が少ない傾向にあった。抗 Scl-70 抗体陽性例では進行性の広汎な皮膚硬化を呈することが多いため、病型分類別にマスト細胞数の比較を行った。広汎性皮膚硬化型では、限局性皮膚硬化型と比較して有意にマスト細胞数は増加していた。更に、その増加したマスト細胞からは、線維化において重要な役割を果たすサイトカインであるトランスフォーミング増殖因子 (Transforming growth factor ; TGF)- β 1 と血小板由来成長因子 (Platelet-Derived Growth Factor ; PDGF) を産生していることが免疫染色および蛍光染色により明らかとなった。MRSS の結果と併せて、マスト細胞は皮膚硬化の進展に関与していることが示唆された。

強皮症の肺高血圧病態へのマスト細胞の関与

強皮症では多くの臓器病変を来すことが知られているが、中でも肺高血圧の有無は予後を大きく左右する。マスト細胞の皮膚硬化への関与が示唆されたことから、肺高血圧との関与についても検討を行

った。肺高血圧合併症例では非合併例と比較してマスト細胞は有意に増加していた。更に、肺高血圧の病勢との関連を心臓超音波検査による平均肺動脈圧と最大肺動脈圧圧較差で検討を行ったところ、いずれとも強い正の相関を認め、肺高血圧の病勢にもマスト細胞の関与が示唆された。肺高血圧病態への直接的関与を検討する目的で、強皮症関連肺高血圧剖検例の肺組織を用いて検討を行った。HE 染色では内膜の肥厚を、Elastica van Gieson (EVG) 染色で弾性線維肥厚を、そして Masson-T 染色では膠原線維の肥厚を伴う肺動脈を認め、その肺動脈周囲には多数の脱顆粒したマスト細胞が存在していた。これら肺動脈周囲のマスト細胞は TGF- β 1 と PDGF を産生していることが免疫染色および蛍光染色により明らかとなった。これらの結果は、皮膚硬化のみならず、強皮症における肺高血圧病態に直接マスト細胞が関与していることを示唆するものであり、今後の治療を考慮する上で重要な知見である。

マスト細胞を標的とした治療の可能性

強皮症における疾患修飾薬の治療目標は寿命の延長であるが、全身性硬化症の病型、進行度や臓器合併症の相違など臨床的不均一性によりこれまで臨床試験のエンドポイント設定が困難であった。腎クリーゼに対する ACE 阻害剤²²⁾、肺高血圧に対する epoprostenol²³⁾ や bosentan²⁴⁾、肺線維症に対する cyclophosphamide²⁵⁾ などは生命予後を延長する可能性が示唆されているが、特異的臓器病変に限られる使用である。

強皮症病態の特徴は、血管障害に基づく血流虚血と過剰な線維化であるが、その病態に重要な役割を果たすサイトカインとして TGF- β と PDGF が知られている。メシル酸イマチニブは、Bcr-Abl, Abl, PDGF 受容体と c-Kit に対する低分子チロキナーゼ阻害剤であり、慢性骨髄性白血病や消化管間葉腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor : GIST) に対する有効な治療薬である。しかし、近年プレオマイシン誘導モデルマウス²⁶⁾や Tsk マウス等の強皮症モデルマウスにおいてイマチニブ投与による皮膚線維化の著明な改善が報告されている²⁷⁾。実際、ヒト強皮症患者に対してイマチニブ 200mg/日内服にて MRSS、指尖潰瘍、間質性肺炎と肺高血圧の改善を認め²⁸⁾、強皮症の皮膚線維化だけでなく様々な臓器病変への有効性が期待されている。現在のところ、その作用機序は線維芽細胞増殖や細胞外基質産

生を促す c-Abl を介した TGF- β と PDGF の制御によるものとされている。しかし、マスト細胞における c-Kit を介したシグナル伝達は分化・増殖・生存に必須のシグナルであることから、Imatinib の新たな作用機序として、c-Kit 抑制を介したマスト細胞制御の可能性が考えられる。(図 2)

おわりに

強皮症は皮膚線維化だけでなく、多彩な臓器病変を来たし得る難治性結合織病であるが、自然軽快を含めた皮膚硬化の進行の程度や合併する臓器病変は多様性に富むため、その治療法の確立が困難な一因となっている。しかし今回の我々の結果は、マスト細胞による強皮症の皮膚線維化や肺高血圧病態への強い関与を示唆すると共に、治療標的とすることで新規治療法開拓の可能性をも提示するものである。

文 献

- Galli SJ, et al. : Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol Rev.* **6** : 135–142, 2005.
- Lee DM, et al. : Mast cells : a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science.* **297** : 1689–1692, 2002.
- Shin K, et al. : Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase/heparin complexes. *J Immunol.* **182** : 647–656, 2009.
- Ruoss SJ, et al. : Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest.* **88** : 493–499, 1991.
- Garbuzenko E, et al. : Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction : a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy.* **32** : 237–246, 2002.
- Walker M, et al. : Mast cells and their degranulation in the Tsk mouse model of scleroderma. *Proc Soc Exp Biol Med.* **180** : 323–328, 1985.
- McNeil HP, et al. : The mouse mast cell-restricted tetramer-forming tryptases mouse mast cell protease 6 and mouse mast cell protease 7 are critical mediators in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* **58** : 2338–2346, 2008.
- Stevens RL, et al. : Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their beta-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. *Immunol Rev.* **217** : 155–167, 2007.
- Nigrovic PA, et al. : Synovial mast cells : role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev.* **217** : 19–37, 2007.
- Green MC, et al. : Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* **82** : 493–512, 1976.
- Menton DN, et al. : The ultrastructure of collagen in the dermis of tight-skin (Tsk) mutant mice. *J Invest Dermatol* **74** : 139–147, 1980.
- Walker M, et al. : Mast cells and their degranulation in the Tsk mouse model of scleroderma. *Proc Soc Exp Biol Med* **180** : 323–328, 1985.
- Walker MA, et al. : Inhibition of fibrosis in TSK mice by blocking mast cell degranulation. *J Rheumatol* **14** : 299–301, 1987.
- Walker M, et al. : Ketotifen prevents skin fibrosis in the tight skin mouse. *J Rheumatol* **17** : 57–59, 1990.
- Everett ET, et al. : The role of mast cells in the development of skin fibrosis in tight-skin mutant mice. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **110** : 159–165, 1995.
- Wang HW, et al. : Mast cell accumulation and cytokine expression in the tight skin mouse model of scleroderma. *Exp Dermatol* **14** : 295–302, 2005.
- Yamamoto T, et al. : Animal model of sclerotic skin. I : local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* **112** : 456–462, 1999.
- Yamamoto T, et al. : Animal model of sclerotic skin. II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice. *J Rheumatol* **26** : 2628–2634, 1999.
- Jaffee BD, et al. : Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell Immunol* **77** : 1–12, 1983.
- Claman HN, et al. : Chronic graftversus- host disease as a model for scleroderma. II. Mast cell depletion with deposition of immunoglobulins in the skin and fibrosis. *Cell Immunol* **94** : 73–84, 1985.
- Levi-Schaffer F, et al. : Nedocromil sodium ameliorates skin manifestations in a murine model of chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* **19** : 823–828, 1997.
- Steen VD : Scleroderma renal crisis. *Rheum Dis Clin North Am* **29** : 315–333, 2003.

- 23) Badesch DB, et al. : Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, **132** : 425–434, 2000.
- 24) Guillevin L, et al. : Long-term effects of bosentan on quality of life, survival, safety and tolerability in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. *Ann Rheum Dis*, **65** : 392, 2006.
- 25) Tashkin DP, et al. : Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med*, **354** : 2655–2666, 2006.
- 26) Distler JH, et al. : Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum*. **56** : 311–322, 2007.
- 27) Akhmetshina A, et al. : Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum*. **60** : 219–224, 2009.
- 28) Chung L, et al. : Molecular framework for response to imatinib mesylate in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. **60**: 584–591, 2009.