

総 説 (2021年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞研究)

COL22A1に着目した皮膚線維化と創傷治療における 病態解明と新規治療法応用への基盤構築

渡 邊 友 也

横浜市立大学大学院医学研究科 環境免疫病態皮膚科学

要 旨: 全身性強皮症 (Systemic sclerosis; SSc) で認められる過剰な線維化は皮膚のみならず全身の諸臓器に及び、様々な機能不全やQOLの傷害を引き起こす一方で、この病的な線維化に対して有効性を示す「抗線維化薬」は極一部であり、皮膚線維化に有効かつ適応のある新規治療薬の開発が強く望まれている。我々はRNAシーケンスとヒト皮膚検体を用いた*Ex vivo*実験系を用いた解析から、新規の線維化に関与する遺伝子であるCOL22A1を同定した。本研究では、線維化病態の中心である皮膚線維芽細胞におけるCOL22A1の発現・機能・線維化病態への関与について検討し、COL22A1が線維化の進行と維持に重要な上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) に α -SMAの発現制御を介して関与している可能性を明らかにした。COL22A1の活性や発現の制御を詳細に解明することで線維化治療の新規知慮薬開発の基盤となる可能性が期待される。

Key words: 全身性強皮症 (Systemic sclerosis), 皮膚線維化 (Skin fibrosis), 線維芽細胞 (Fibroblasts), COL22A1, TGF- β

はじめに

全身性強皮症 (Systemic sclerosis; SSc) は皮膚のみならず全身の諸臓器の過剰な線維化、自己抗体産生、微小血管障害の3つを特徴とする結合組織疾患である¹⁾。SScの病態は複雑であり、まず血管内皮障害をトリガーとし、自然免疫 (単球・マクロファージ) と獲得免疫 (T細胞・B細胞) の活性化が起こり、血管外への遊走、組織への浸潤が生じる。これらの免疫応答により活性化された間葉系細胞が線維芽細胞へと分化する。さらに分化した筋線維芽細胞からコラーゲンを始めとした細胞マトリックスが過剰産生され、病的線維化が起こる²⁾。過剰な線維化により皮膚は硬化し、肺・消化管・心臓・腎臓などの機能障害をきたし、生命予後に大きな影響を与える³⁾。線維化の詳細なメカニズムは未だ不明な点も多いが、細胞外マトリックスを過剰産生する線維芽細胞の持続活性が病態の中心とされ、細胞外マトリックスの合成系及び分解系の双方が関与し、繰り返す慢性炎症や上皮障害な

どにより両者のバランスが崩れ、過剰な線維化を引き起こすと考えられている⁴⁾。これらのSSc病態の複雑さが皮膚硬化を始めとした線維化治療に対する標準治療の確立に大きな障害となっている。病的線維化を改善する「抗線維化薬」はピルフェニドンとニンテグニブが本邦で上市されているが、適応は特発性肺線維症と全身性強皮症に伴う間質性肺疾患の肺線維化のみに限定されており、皮膚線維化への有効性は示されていない。近年、抗CD20抗体であるリツキシマブの皮膚硬化への有効性が報告されているが、免疫抑制と感染症の観点から全ての患者への適応は難しく、皮膚線維化を対象とした新規治療薬の開発が強く望まれている。

我々は皮膚線維化の治療標的のひとつとしてCollagen 22A1 (COL22A1) に着目し研究を行っている。COL22A1は、ヒト染色体の8q24.2に存在し、主要なコラーゲンと共重合して構造を形成し、線維組織とその環境間のリガンド相互作用を媒介するfibril-associated collagen with interrupted triple helices (FACIT) タンパク質ファミリーに

渡邊友也, 横浜市金沢区福浦3-9 (236-0004), 横浜市立大学大学院医学研究科 環境免疫病態皮膚科学

属するマイナーコラーゲンである⁵⁾。COL22A1は筋腱接合部、腱、心臓、関節軟骨、皮膚に発現しており、特に皮膚においては皮膚上皮細胞や線維芽細胞の細胞接着リガンドとして働くことが知られている⁵⁾。また、COL22A1の特異的な機能として、筋腱接合部の安定化および骨格筋の付着力強化が挙げられ、ゼブラフィッシュでのCOL22A1欠損モデルでは筋ジストロフィー様表現型を示したことが報告されている⁶⁾。臨床面では、頭頸部の扁平上皮癌においてCOL22A1の発現上昇を認めており、予後予測のマーカーとしての可能性が示唆されている⁷⁾。さらにびまん性皮膚硬化型全身性強皮症患者32例の末梢血からも抽出したDNAを用いた全エクソームシーケンシング (whole-exome sequencing, WES) によってCOL22A1の発現が全身性強皮症の細胞外マトリックス関連経路において有意に上昇していることが見出された⁸⁾。

しかし、実際の皮膚におけるCOL22A1の詳細な機能を解析した研究は現在のところほとんどない。そこで我々はCOL22A1の活性化と皮膚線維化病態を解明することで、皮膚線維化における新規治療法応用への基盤を構築することができるのではないかと考えた。

Ex vivo ヒト皮膚検体を用いたRNAシーケンス解析とCOL22A1の同定

全身性強皮症の皮膚硬化に対する治療標的となりうる新規遺伝子を見出すため、我々はヒト皮膚検体を用いたEx vivo実験系を用いた。Ex vivo実験系は血流こそないものの、実際の生体皮膚構造を維持しており、マウスモデルや線維芽細胞を用いたIn vitro実験系と比較して、よりヒトに近い状態を反映していると考えられている⁹⁾。この実験系を用いたRNAシーケンス解析で、我々は代表的な線維化促進因子であるTransforming Growth Factor- β (TGF- β) によって発現が強く誘導される今までに報告のない複数の線維化関連遺伝子を見出した¹⁰⁾。その中でもTGF- β 刺激によって最も強く発現が誘導されていたのがCOL22A1であった。更に、解析に用いたヒト皮膚Ex vivoモデルがSSc患者の皮膚モデルとして妥当か評価するために、TGF- β で刺激した皮膚線維芽細胞で同定された遺伝子群¹¹⁾とSSc皮膚検体における遺伝子群¹²⁾について、バイオインフォマティクスを用いて比較解析したところ、遺伝子の発現パターンに類似の反応性を認め、TGF- β 刺激で刺激したヒト皮膚Ex vivoモデルはSScに特徴的な真皮の線維化のモデルとして適していることが示唆された。加えて、上述したようにWES解析によってCOL22A1が全身性強皮症の細胞外マトリックス関連経路において重要であることが示唆されていることから⁸⁾、COL22A1に着目して解析を進めた。

線維芽細胞および皮膚におけるCOL22A1の発現解析

TGF- β で刺激されたヒト皮膚Ex vivoモデルでCOL22A1の発現が上昇することを示したが、線維化病態の中心である健康人由来の皮膚線維芽細胞におけるCOL22A1の発現変化を詳細に解析した。その結果、TGF- β 刺激により皮膚線維芽細胞のCOL22A1発現は有意に上昇することを確認した。また、TGF- β で刺激されたEx vivoヒト皮膚検体を用いた蛍光免疫染色でも真皮層におけるCOL22A1の発現上昇を認めた。さらに、TGF- β 刺激後の経時的な解析を行い、COL22A1は刺激後4時間という短時間で発現が有意に上昇することを明らかにした。この発現のスピードはCollagen 1A1 (COL1A1)、Fibronectin (FN)、 α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)などの他の線維関連遺伝子よりも早く、同じく線維化関連遺伝子の中でも中心的な機能を担っている遺伝子の1つであるConnective Tissue Growth Factor (CTGF)と似た発現パターンであった。さらに、皮膚線維芽細胞以外でのCOL22A1の発現を解析したところ、ヒト肺線維芽細胞とヒト肺胞基底上皮腺癌細胞由来のA549細胞株においてもTGF- β 刺激後に有意な発現の上昇を認めており、皮膚線維化のみならず、間質性肺炎などの肺線維化にもCOL22A1が関与している可能性が示唆された。

TGF- β 刺激回路におけるCOL22A1の発現制御の解析

COL22A1の発現誘導がTGF- β 刺激特異的なのか、それとも他の線維化誘導因子によっても誘導されるのかを明らかにするために、TGF- β 以外の線維化誘導因子であるIL-6、プレオマイシン、Platelet-Derived Growth Factor-BBで皮膚線維芽細胞を刺激したところ、COL22A1の発現誘導は見られなかった。一方で、女性ホルモンであるエストロゲンの一種類であるエストラジオール (E2) は、皮膚における細胞外マトリックスの産生を促進し、E2刺激によって皮膚線維芽細胞とEx vivoヒト皮膚検体ではFNの発現上昇や真皮の線維化による肥厚が報告されており、重要な線維化関連因子とされている¹³⁾。E2で皮膚線維芽細胞とEx vivoヒト皮膚検体を刺激したところ、COL22A1の有意な発現上昇が報告されている¹⁴⁾。以上より、COL22A1は皮膚においてTGF- β の他、E2によっても発現が誘導されることが分かった。

更に、TGF- β シグナルのどのカスケードがCOL22A1の発現誘導に関与しているかを解析するために、皮膚線維芽細胞にActivin-like kinase 5 (ALK5)、MAP/ERK kinase (MEK)、Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)、およびc-Jun N-terminal kinase (JNK)の各シグナル阻害剤を加えて、

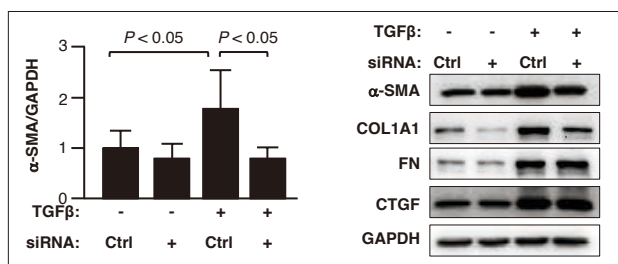


図1 皮膚線維芽細胞におけるCOL22A1-siRNAノックダウンにより α -SMAなどの線維化関連遺伝子は抑制される。

TGF- β で刺激したところ、COL22A1のmRNA・タンパク発現ともにALK5およびMEKシグナル阻害剤で有意に低下した。この結果からTGF- β によるCOL22A1の発現誘導は、ALK5およびMEKシグナルを介することが明らかになった。

SSc患者由来皮膚線維芽細胞におけるCOL22A1発現解析

WES解析によって示されたCOL22A1がSScの病態形成に関与しているのかを明らかにするために、SSc患者由来の検体を用いてCOL22A1の発現解析を行った。この解析には、健康人由来の皮膚線維芽細胞、SSc患者の皮膚硬化部位と非硬化部位由来の皮膚線維芽細胞を用いてmRNAとタンパクの発現を解析した。その結果、健康人由来とSSc患者の非硬化部位由来の皮膚線維芽細胞の発現に差はなかった一方で、SSc患者の皮膚硬化部位由来の皮膚線維芽細胞においてCOL22A1の発現がmRNA・タンパクともに有意に上昇していることを見出した。このことから、COL22A1がSScの皮膚線維化病態に強く関与していることが示唆された。

心筋線維症におけるCOL22A1の病態関与

COL22A1の全身性強皮症以外の線維化疾患とのかわりについて、心筋線維症での関与が報告されている。Liらは28系統の実験用近交系マウスの遺伝子型と表現型の情報を用いて、ゲノムワイド関連解析(genome-wide association studies: GWAS)を行い、COL22A1の多型がジストロフィー性心筋線維症の形成および重症度と関連していることを見出した¹⁵⁾。同様に、実験用近交系マウスの大規模パネルを用いた慢性ストレス誘発性心臓病理に関する別の独立した研究においても、GWASの結果と同様にCOL22A1が心筋線維症と関連していることが報告されている¹⁶⁾。さらに、心臓線維化の特徴的所見である病的な心肥大において、心筋組織中のCOL22A1の発現レベ

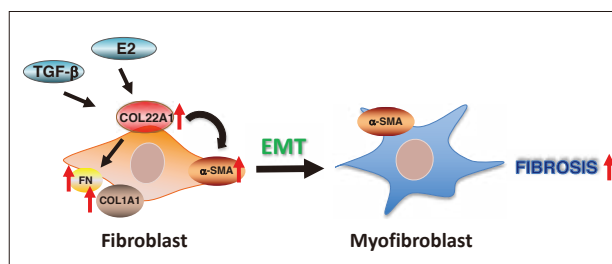


図2 COL22A1による皮膚線維化促進機序の仮説。COL22A1は α -SMAの発現抑制機序を介して、筋線維芽細胞への上皮間葉転換を促進することで線維化病態の形成に関与していると考えられる。

EMT: epithelial-mesenchymal transition, 上皮間葉転換

E2: estradiol, エストラジオール

ルおよびCOL22A1の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)パターンと心臓のサイズに相関が見出されており、COL22A1が心臓の発達または肥大のいずれかに影響を与えると同時に、心臓の線維化に影響を及ぼすことが示唆されている¹⁷⁾。

COL22A1の皮膚線維化促進機序の解析

COL22A1の皮膚線維化における病態形成の関与を明らかにするために、健康人由来の皮膚線維芽細胞をCOL22A1-siRNAでノックダウン後にTGF- β で刺激し、線維化関連遺伝子の発現を解析した。COL22A1の発現が低下した状態の皮膚線維芽細胞ではCOL1A1, FNの他、 α -SMAの発現が強く抑制された。さらに機能面においては、COL22A1が皮膚線維芽細胞の収縮能に影響するかどうかを調べるために、COL22A1をノックダウンした皮膚線維芽細胞のコラーゲンゲル収縮能について検討した。その結果、COL22A1のノックダウンはゲル収縮能をわずかに減少させたものの有意な変化は認めず、収縮能に大きな影響を及ぼさなかった(図1)。

線維化の過程において、線維芽細胞はTGF- β などのサイトカイン、PDGFなどの成長因子、メカニカルストレスなどによって活性化され、 α -SMAを発現する筋線維芽細胞に分化する。この現象を上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)と呼び、筋線維芽細胞は、コラーゲンなどの様々な細胞外マトリックスを産生し線維化の形成に強く関与することが報告されている¹⁸⁾。実際に肺組織において、TGF- β 刺激によって肺胞上皮細胞の筋線維芽細胞への転換を促進することが知られている¹⁹⁾。 α -SMAは筋線維芽細胞のマーカーであり、皮膚線維芽細胞のCOL22A1の発現抑制下では、その発現が抑制されることから、COL22A1は線維芽細胞や皮膚の上皮細胞から筋線維芽細胞への移行に関連し線維化病態に関与している可能性が考えられた(図2)。過去の報告では、COL22A1は成長期毛包の下3分の1の周囲に高発現し、皮膚上皮細胞や線維芽細胞の細胞接着リガンドとして働

いていることが報告されている²⁰⁾。また、 α -SMAが毛包に発現し、毛包由来の平滑筋細胞が α -SMAを発現していることが報告されていることから²¹⁾、毛包は、皮膚線維化における筋線維芽細胞の供給源となり得ることが考えられる。毛包は毛包周囲の線維化に関与しており、以上の知見からCOL22A1が毛包由来の平滑筋細胞の細胞接着や移動を促進し、毛包周囲の線維化に重要な役割を果たしている可能性があり、皮膚線維化のみならず創傷治癒におけるCOL22A1の関与が示唆されている。

おわりに

TGF- β などの線維化促進因子であるCOL22A1は、 α -SMAの発現制御を介して線維芽細胞から筋線維芽細胞への上皮間葉転換を促進することで線維化病態に関与していると考えられる。しかしながら、皮膚におけるCOL22A1の作用機序や発現調節機序はまだ不明な点が多い。そのため、COL22A1の発現を制御する機序をより詳細に解明することで、線維化に対する新たな治療法となることが期待される。現在、著者らは全身性強皮症以外の病的な線維化疾患であるケロイドや肥厚性癬痕についてもCOL22A1の発現解析を行うとともに、マウスの円形皮膚全層欠損潰瘍による創傷治癒モデルを用いて創傷治癒過程におけるCOL22A1の発現解析を行い、線維化や創傷治癒におけるCOL22A1の詳細な機能について検討中である。

文 献

- 1) Denton CP, Khanna D: Systemic sclerosis. *Lancet*, **390** (10103) :1685 – 1699, 2017.
- 2) Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T: Scleroderma. *N Engl J Med*, **360** (19) :1989 – 2003, 2009.
- 3) Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M et al: Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis*, **69** (10) : 1809 – 1815, 2010.
- 4) Kalluri R, Sukhatme VP: Fibrosis and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **9** (4) : 413 – 418, 2000.
- 5) Koch M, Schulze J, Hansen U et al: A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J Biol Chem*, **279** (21) :22514 – 22521, 2004.
- 6) Charvet B, Guiraud A, Malbouyres M et al: Knockdown of COL22A1 gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction. *Development*, **140** (22) : 4602 – 4613, 2013.
- 7) Misawa K, Kanazawa T, Imai A et al: Prognostic value of type XXII and XXIV collagen mRNA expression in head and neck cancer patients. *Mol Clin Oncol*, **2** (2) : 285 – 291, 2014.
- 8) Mak AC, Tang PL, Cleveland C et al: Brief Report: Whole-Exome Sequencing for Identification of Potential Causal Variants for Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*, **68** (9) : 2257 – 2262, 2016.
- 9) Yasuoka H, Larregina AT, Yamaguchi Y, Feghali-Bostwick CA: Human skin culture as an ex vivo model for assessing the fibrotic effects of insulin-like growth factor binding proteins. *Open Rheumatol J*, **2** : 17 – 22, 2008.
- 10) Watanabe T, Baker Frost DA, Mlakar L, et al: A Human Skin Model Recapitulates Systemic Sclerosis Dermal Fibrosis and Identifies COL22A1 as a TGF β Early Response Gene that Mediates Fibroblast to Myofibroblast Transition. *Genes (Basel)*, **10** (2) : 75, 2019.
- 11) Sargent JL, Milano A, Bhattacharyya S et al: A TGF β responsive gene signature is associated with a subset of diffuse scleroderma with increased disease severity. *J Invest Dermatol*, **130** (3) : 694 – 705, 2018.
- 12) Milano A, Pendergrass SA, Sargent JL, et al: Molecular subsets in the gene expression signatures of scleroderma skin. *PLoS One*, **3** (7) : e2696, 2008.
- 13) Aida-Yasuoka K, Peoples C, Yasuoka H et al: Estradiol promotes the development of a fibrotic phenotype and is increased in the serum of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, **15** (1) : R10, 2013.
- 14) Baker Frost D, Savchenko A, Ogunleye A, Armstrong M, Feghali-Bostwick C: Elucidating the cellular mechanism for E2-induced dermal fibrosis. *Arthritis Res Ther*, **23** (1) : 68, 2021.
- 15) Li Q, Berndt A, Sundberg BA et al: Mouse genome-wide association study identifies polymorphisms on chromosomes 4, 11, and 15 for age-related cardiac fibrosis. *Mamm Genome*, **27** (5 – 6) : 179 – 190, 2016.
- 16) Rau CD, Wang J, Avetisyan R et al: Mapping genetic contributions to cardiac pathology induced by Beta-adrenergic stimulation in mice. *Circ Cardiovasc Genet*, **8** (1) : 40 – 49, 2015.
- 17) Shorter JR, Huang W, Beak JY et al: Quantitative trait mapping in Diversity Outbred mice identifies two genomic regions associated with heart size. *Mamm Genome*, **29** (1 – 2) : 80 – 89, 2018.
- 18) Thierry JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, **139** (5) : 871 – 890, 2009.
- 19) Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ et al: Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during

- pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci U S A, **103** (35) : 13180–13185, 2006.
- 20) Koch M, Schulze J, Hansen U et al: A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. J Biol Chem, **279** (21) : 22514–22521, 2004.
- 21) Ibrahim MM, Chen L, Bond JE et al: Myofibroblasts contribute to but are not necessary for wound contraction. Lab Invest, **95** (12) : 1429–1438, 2015.

Abstract

COLLAGEN 22A1 AS A BASIS FOR UNDERSTANDING THE PATHOPHYSIOLOGY OF SKIN FIBROSIS AND WOUND HEALING FOR DEVELOPING NOVEL THERAPIES

Tomoya WATANABE

Department of Environmental Immuno-Dermatology, Yokohama City University Graduate School of Medicine

Systemic sclerosis (SSc) is a multisystem, connective tissue disease characterized by immune dysregulation, vasculopathy, and excessive fibrosis of the skin and internal organs due to fibroblast proliferation and production of extracellular matrix. The progression of organ fibrosis leads to end-stage organ failure as a result of the loss of normal structure and function, with impaired quality of life. However, only a few “anti-fibrotic drugs” have shown efficacy against this pathological fibrosis. Thus, the development of new therapeutic agents that are effective and indicated for fibrosis are required. The COL22A1 gene regulated by TGF- β in human skin was identified using *ex vivo* human skin models and high-throughput RNA sequencing. COL22A1 expression in skin and lung fibroblasts was induced by TGF- β stimulation via activin-like kinase 5 and the mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase pathway. In addition, estradiol, which is a form of estrogen, also induced COL22A1 expression in the skin. Furthermore, mRNA and protein expression levels of COL22A1 were significantly increased in SSc skin fibroblasts, and furthermore, its involvement in cardiac fibrosis has been suggested in mice. The mechanism of COL22A1-induced fibrosis is promoted by regulation of α -SMA expression and mediates the skin fibroblast to myofibroblast transition. These studies indicated that COL22A1 is associated with the pathogenesis of fibrosis as an early response gene that may have important implications for fibroblast activation. An improved understanding of the role of COL22A1 in the pathogenesis of skin fibrosis may contribute to the development of new anti-fibrotic therapies.