

図3 唾液腺由来DNA中のY染色体特異配列のPCR解析 男児出産歴のある女性シェーグレン症候群患者12名中9名にY染色体に特異的な222bpのバンドを認めた。

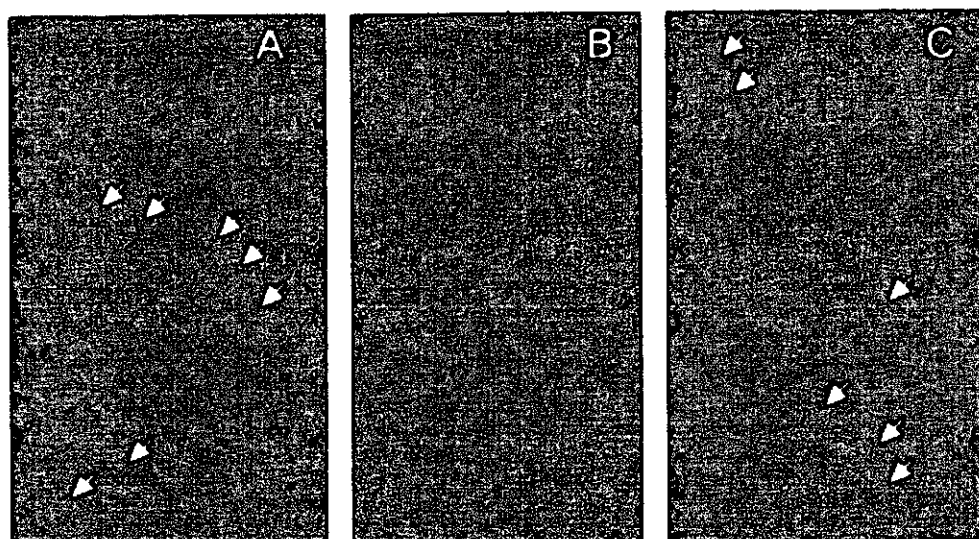


図4 女性シェーグレン症候群患者小唾液腺組織のin situハイブリダイゼーション

- A: 男性表皮Y染色体陽性細胞(→)が認められる。
- B: 女性シェーグレン症候群患者口唇粘膜(Cと同一切片) Y染色体陽性細胞を認めない。
- C: 男児出産歴のある女性シェーグレン症候群患者の小唾液腺 Y染色体陽性細胞(→)が唾液腺導管周囲に認められる。

母親SSc患者と子供でHLAクラスII抗原の一致率が高く、これによって胎児由来細胞に対するトレランスが成立しているのではないかと指摘している。そして、これらの細胞がウイルスや化学物質などの環境因子により活性化されて、発症に至ると考えている<sup>8,9)</sup>。しかし、SSc、SjSとも妊娠経験のない若い女性や男性にも少なからず発症する。この点に関しては、児に移入した母親由来細胞が同定されており<sup>12)</sup>、若い女性や男性の発病には母親由来の細胞が関与している可能性も考えられる。

患者群と比較して平均年齢は低いものの健常人女

性の半数でY染色体配列が検出されたことから、循環血液中の胎児細胞がSScやSjSの発症に直結すると結論づけることはできないが、SjSでは罹患組織に胎児由来細胞が認められ、少なくともSjSの一部の病態にはGVHD様機構が関与している可能性があると思われた。しかし、真に疾患特異的現象なのか、それとも普遍的な現象なのかを語るには、さらなるデータの蓄積が必要であろう。

#### 文 献

- 1) Bianchi DW: Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediatr* 127: 847-56, 1995
- 2) Bianchi DW, Zichwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA: Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci* 93: 705-8, 1996
- 3) Hall JM, Lingenfelter P, Adams SL, Lasser D, Hansem JA, Bean MA: Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescence in situ hybridization. *Blood* 86: 2829-32, 1995
- 4) Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS: Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 88: 4390-5, 1996
- 5) Gratwohl AA, Moutsopoulos HM, Chused TM, Akizuki M, Wolf RO, Sweet JB, Deisseroth AB: Sjögren-type syndrome after allogeneic bone-marrow transplantation. *Ann Intern Med* 87: 703-6, 1977
- 6) Lawley TJ, Peck GL, Moutsopoulos HM, Gratwohl AA, Deisseroth AB: Scleroderma, Sjögren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 87: 707-9, 1977
- 7) Nelson JL: Maternal-fetal immunology and autoimmune disease. Is some autoimmune disease autoalloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis Rheum* 39: 191-4, 1996
- 8) Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW: Microchimerism and HLA-compatible relationship of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 351: 559-62, 1998
- 9) Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA: Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *New Engl J Med* 338: 1186-91, 1998
- 10) Artlett CM, Welsh KI, Black CM, Jimenez SA: Fetal-maternal HLA compatibility confers susceptibility to systemic sclerosis. *Immunogenetics* 47: 17-22, 1997
- 11) Maloney S, Smith A, Furst DE, Myerson D, Rupert K, Evans PC, Nelson JL: Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *J Clin Invest* 104: 41-7, 1999

# 抗セントロメア抗体陽性例の HLA class II 遺伝子解析 - 全身性強皮症、原発性胆汁性肝硬変症を中心に -

班 員：石川 治 (群馬大学 皮膚科)  
共同研究者：秋元幸子、安部正敏 (群馬大学 皮膚科)  
高木 均 (群馬大学 第一内科)

## HLA class II genes in anticentromere antibody positive patients: A comparative study of systemic sclerosis, nondefinit scleroderma spectrum disorders, and primary biliary cirrhosis

Osamu Ishikawa\*, Sachiko Akimoto\*, Masatoshi Abe\*, and Hitoshi Takagi\*\*  
Departments of Dermatology\* and 1st Internal medicine\*\*,  
Gunma University School of Medicine

### Summary

To determine the association between clinical features and HLA-class II alleles in anticentromere antibody (ACA) positive patients, molecular genetic analyses of HLA-DRB1 and DQB1 alleles were performed in 119 Japanese patients with systemic sclerosis (SSc), nondefinite scleroderma spectrum disorders (nondefinite SSD) who had some SSc-related features although did not meet the American Rheumatism Association criteria, or primary biliary cirrhosis (PBC); 62 patients were positive for ACA and 57 patients were negative for ACA. Normal controls consisted of 215 unrelated Japanese individuals. In ACA positive patients, high frequency of HLA-DQB1\*0501 and DRB1\*0101 in strong linkage disequilibrium with DQB1\*0501 was found in patients with SSc ( $P < 0.0005$ , OR = 4.4), but not in patients with nondefinite SSD or PBC. In patients with PBC, the frequency of HLA-DRB1\*0803 was high compared with normal controls ( $P < 0.005$ , OR = 2.9). There was no difference in the frequency of DRB1\*0803 between two groups classified with the presence of ACA or SSc-related features. HLA-DRB1\*0803 positive SSc was frequently complicated by SjS and/or PBC which was independent of ACA positivity.

These data indicate the following possibilities: (a) HLA-DQB1\*0501/DRB1\*0101 positive patients may consist a certain group among ACA-positive patients with SSc and nondefinite SSD; (b) although DRB1\*0803 is not related to the production of ACA, this allele may be related to the susceptibility not only to PBC but also to SjS in SSc.

## はじめに

これまでの全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)におけるHLA CLASS II 遺伝子解析では、HLA CLASS II 遺伝子は線維性硬化病変の程度や予後などの臨床所見より抗セントロメア抗体(anticentromere antibody, ACA)や抗トポイソメラーゼ I 抗体(anti-DNA topoisomerase I antibody, 抗topo I 抗体)の有無や人種の別で特徴があると報告されてきた<sup>1,9)</sup>。自験62例のSScにおける解析でも、ACAや抗topo I 抗体陽性群の特徴とされるHLA-DRB1の対立遺伝子を認めた(図1)。しかし、ACAはARAの診断基準を満たすdefinite SScの他に、SScの診断基準を満たさないが、レイノー現象、強指症、爪上皮の点状出血などのSScに関連した所見があり、Maricqらが提唱したnondefinite scleroderma spectrum disorders (nondefinit SSD)<sup>2)</sup>に合致する例や原発性胆汁性肝硬変症(primary biliary cirrhosis, PBC)患者などでしばしば陽性となる。また、ACA陽性のSScはPBCやシェーグレン症候群(Sjögren's syndrome, SjS)をしばしば合併する<sup>9)</sup>。これまでに、PBCにおいても、HLA CLASS II 遺伝子解析の報告はあるが<sup>9,10)</sup>、ACAに注目して検討したものはない。今回、ACA陽性患者における疾患別の特徴ある対立遺伝子の有無、ACA陽性のSScとPBCで共通する対立遺伝子の有無を知るために、ACA陽性のSScおよびPBC患者を中心にHLA-DRB1、DQB1 遺伝子解析を行い臨床所見と比較した。

## 対象と方法

ACA陽性患者としてARAのSSc診断基準案をみたすSSc20例、nondefinite SSD25例、SSc関連の変化を認めないPBC6例の計51例を対象とした。なおACA陽性のPBCは、SScあるいはnondefinite SSDを合併した例が各6例あったため合計18例である。比較対照例としてACA陰性のSSc42例とACA陰性のPBC15例を含めた。正常コントロールは大西らによる<sup>11)</sup>日本人215例の記載に従った。SjSおよびPBCの診断は各々厚生省の診断基準<sup>12,13)</sup>に基づいて行った。

方法はPCR-RFLP(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)法を用い、28種のDRB1 allelesと18種のDQB1 allelesを解析対象とした。

統計学的解析は、フィッシャーの直接確率法および $\chi^2$ 乗検定を用いた。これまでに報告のない対立遺伝子の検定においては、フィッシャーの直接確率法より求めたP値に対象とした対立遺伝子の数を乗する補正(PCORR)をおこなっても差がある場合のみを有意差があると判定した。

## 結 果

HLA-DQB1の解析結果は、DRB1の結果と強い連鎖不均衡がありDRB1の結果を強く反映したものであったため、結果の提示は省略した。

ACA陽性患者のHLA-DRB1 遺伝子をSScを中心にまとめると、ACA陽性患者のうちARAの診断基準を満たすSScにおいてのみ、SScの解析でACA陽性例に多くみられたDRB1\*0101が高頻度に認められた。PBCでSSc関連の変化がない例はこれまで

Table 1. Frequency of selected HLA-DRB1 alleles in three groups of SSc patients defined by their antibody profiles

DNA alleles of DRB1	SSc patients				normal control (%) n = 215
	ACA* positive (%) n = 20	ACA & ATA negative (%) n = 17	ATA positive (%) n = 25	total n = 62	
0101	20.0 <sup>#</sup>	5.9	2.0	8.9	5.3
1501	5.0	8.8	6.0	6.5	8.4
1502	12.5	14.7	28.0 <sup>§</sup>	19.4	10.9
0403	7.5	0	2.0	3.2	1.4
0405	7.5	11.8	14.0	11.3	11.4
0406	7.5	8.8	4.0	6.5	3.7
0802	2.5	2.9	16.0 <sup>¶</sup>	8.1	4.0
0803	7.5	8.8	4.0	6.5	7.4
0901	17.5	11.8	10.0	12.9	14.2
1101	0	0	4.0	1.6	2.3

\* : ACA: anticentromere antibody, ATA: anti DNA topoisomerase I antibody

# : P = 0.00036, P<sub>corr</sub> < 0.01, § : P = 0.00060, P<sub>corr</sub> < 0.05

¶ : P = 0.00029, P<sub>corr</sub> < 0.01

Table 2. Frequency of selected HLA-DRB1 alleles in anticentromere antibody (ACA) positive patients

DNA alleles of DRB1	ACA positive patients			normal control (%) n = 215
	SSc (%)	nondefinite SSD (%)	PBC without SSc-related features (%)	
	n = 20	n = 25	n = 6	
0101	20.0 <sup>¶</sup>	6.0	7.1	5.3
1502	12.5	8.0	0	10.9
0401	0	4.0	0	0.9
0403	7.5	8.0	0	1.4
0405	7.5	16.0	7.1	11.4
0406	7.5	8.0	0	3.7
0802	2.5	4.0	0	4.0
0803	7.5	14.0	33.3 <sup>§</sup>	7.4
0901	17.5	8.0	0	14.2

¶ : P = 0.00036, P<sub>corr</sub> < 0.01, OR = 4.4§ : P = 0.0012, P<sub>corr</sub> < 0.05, OR = 6.2

にPBCで頻度が高いと報告のある<sup>9)</sup>DRB1\*0803が有意に多く認められた(表2)。

ACA陽性の強皮症患者をDRB1\*0101を保有するか否かに分けて臨床像を比較したところ、いずれの所見の頻度も有意差はなかったが、SjS合併率はDRB1\*0101保有例は比較的低率だった(42.9% vs 81.8%)(表3)。

undefinite SSDはSScの不全型であり臨床的にはSScと連続スペクトラム上にあると考えられている<sup>7)</sup>。DRB1\*0101保有例の特徴を明らかにするために、SScとundefinite SSDをあわせた上で、DRB1\*0101保有例と陰性例にわけて臨床像を比較した(表4)。DRB1\*0101保有例は診断基準のうち近位皮膚硬化、斑状毛細血管拡張、肺線維症のある例が有意に多く認められた(72.7% vs 23.5%, P < 0.005, 63.6% vs 20.7%, P < 0.01, 27.3% vs 2.9%, P < 0.05)。またSjS合併率はDRB1\*0101保有例

で有意に低率であった(33.3% vs 73.3%, P < 0.05)。とりわけ前腕の皮膚硬化の頻度に差があり、DRB1\*0101を保有する例は、シェグレン症候群合併が少なく、いわゆるBarnett分類のII型に相当する例、すなわちacrosclerosisのあるlimited cutaneous SScが多いと考えられた。

次にPBCにおけるDRB1遺伝子の特徴を解析した。全PBCにおいても正常コントロールに比較してDRB1\*0803が有意に多くみられたが(19.1% vs 7.4%, P < 0.005)、ACAの有無で対立遺伝子の頻度に有意差はなかった(23.7% vs 13.3%)。また、PBC患者を強皮症関連の変化の有無で分類しHLA-DRB1遺伝子頻度を比較したが、DRB1\*0803は強皮症関連の変化の有無で頻度に差はなかった(17.9% vs 20.0%)。

ACA陽性のSScとundefinite SSDおよびACA陰性のSScをDRB1\*0803が陽性例と陰性例に分け

Table 3. Clinical and laboratory findings of anticentromere antibody (ACA) positive SSc patients classified by the presence of HLA-DRB1 \*0101 allele

	ACA-positive SSc (%)	
	DRB1* 0101 positive (n = 8)	DRB1* 0101 negative (n = 12)
sclerosis of forearm skin	8/8 (100)	8/12 (66.7)
trunkal skin sclerosis	1/8 (12.5)	0/12 (0)
digital pitting scar	2/8 (25.0)	6/12 (50.0)
finger contracture	3/8 (37.5)	1/10 (10.0)
telangiectasia	6/8 (75.0)	4/10 (40.0)
lung fibrosis	3/8 (37.5)	1/12 (8.3)
esophageal dysmotility	5/6 (83.3)	6/8 (75.0)
Sjögren's syndrome	3/7 (42.9)	9/11 (81.8)
primary biliary cirrhosis	1/6 (16.7)	5/11 (45.5)
CENP-C* positivity	3/3 (100)	2/2 (100)
SS-A** positivity	1/8 (12.5)	1/12 (8.3)

\*: centromere protein C, \*\*: anti-Ro/SS-A antibody

Table 4. Clinical and laboratory findings of patients with anticentromere antibody (ACA) positive SSc or nondefinite scleroderma spectrum disorders (SSD) classified by the presence of DRB1 \*0101 allele

	ACA-positive SSc or nondefinite SSD (%)		P
	DRB1* 0101 positive (n = 11)	DRB1* 0101 negative (n = 34)	
sclerosis of forearm skin	8/11 (72.7)	8/34 (23.5)	P < 0.005
trunkal skin sclerosis	1/11 (9.1)	0/34 (0)	
digital pitting scar	2/11 (18.2)	1/31 (3.2)	
finger contracture	3/11 (27.3)	1/31 (3.2)	
telangiectasia	7/11 (63.6)	6/29 (20.7)	P < 0.01
lung fibrosis	3/11 (27.3)	1/35 (2.9)	P < 0.05
esophageal dysmotility	5/9 (55.6)	12/20 (60.0)	
Sjögren's syndrome	3/9 (33.3)	2/30 (7.3)	P < 0.05
primary biliary cirrhosis	1/9 (11.1)	11/28 (39.2)	
CENP-C*** positivity	3/5 (60.0)	5/9 (55.6)	
SS-A**** positivity	1/11 (9.1)	5/33 (15.2)	

\* centromere protein C, \*\* anti-Ro/SS-A antibody

Table 5. Clinical and laboratory findings of patients with SSc or nondefinite scleroderma spectrum disorders (SSD) classified with HLA-DRB1\*0803 positivity

Frequency of DRB1*0803	ACA-positive				ACA-negative	
	SSc 15.0 %		nondefinite SSD 20.0 %		SSc 11.9 %	
	DRB1 *0803		DRB1 *0803		DRB1* 0803	
	positive (n = 3)	negative (n = 17)	positive (n = 5)	negative (n = 20)	positive (n = 5)	negative (n = 37)
SjS*	3/3 (100.0%)	9/15 (60.0%)	2/4 (50.0%)	11/17 (64.7%)	5/5 (100%)	7/32 (21.9%)*
PBC	2/3 (66.7)	4/15 (26.7)	1/3 (33.3)	5/16 (31.3)	1/5 (20.0)	0/37 (0)
AMA	2/3 (66.7)	6/17 (35.3)	1/3 (33.3)	5/17 (29.4)	2/5 (40.0)	2/34 (5.9)
SS-A	0	2/17 (11.8)	1/5 (20.0)	3/19 (15.8)	3/5 (60.0)	4/35 (11.4)**

\* : P < 0.005, \*\* : P < 0.05

#: SjS: Sjögren's syndrome, PBC: primary biliary cirrhosis

AMA: antimitochondrial antibody, SS-A anti-Ro/SS-A antibody

て臨床所見を比較した(表5)。3群間でDRB1\*0803保有率に差はなかった(ACA陽性SScで15.0%、ACA陽性nondefinite SSDで20.0%、ACA陰性SScで11.9%)。またACAが陽性か否かに関係なくDRB1\*0803保有例は全例SjSを合併しており、PBC合併例も多かった。ACA陽性のSScはDRB1\*0803非保有例もSjSやPBC合併例が多かったが、ACA陰性でDRB1\*0803を保有しないSScはSjSやPBCの合併率は低かった。すなわち、DRB1\*0803を保有するSScはACAの有無に関わらずSjSやPBCを合併しやすく、またACA陽性のSScはDRB1\*0803非保有例でもSjSやPBCを合併しやすいと考えられた。ACA陽性のnondefinite SSDでもACA陽性のSScと同様の傾向が認められた。

## 考案

自己抗原はB細胞中でプロセッシングを受けた後、HLA Class II分子と結合しB細胞に膜表面に提示され、この自己抗原とHLA Class II分子の複合体をヘルパーT細胞は認識する。すなわち、HLA Class II分子は自己抗原との結合し易さやT細胞への認識され易さを規定し、自己抗体の産生し易さを規定している可能性があると考えられている。SScにおけるこれまでの解析でACAや抗topo I抗体の有無で特徴あるHLA-DRB1やDQB1遺伝子が見いだされていることは、先の自己抗体産生とHLA class II分子との関連を支持するものと考えられる。しかしながら、今回強皮症以外の疾患も含めたACA陽性例でDRB1の特徴をまとめたところ、さ

きのSScに対する検討で頻度が高かったDRB1\*0101は、ARAの診断基準案を満たすSScにおいてのみ高率であり、SScの不全型とも考えられるnondefinite SSDでは高くないこと、更にDRB1\*0101陽性のSScは、SjSの合併が比較的に少ないacrosclerosisのあるlimited cutaneous typeのSScという特徴があることが判明した。このことは、HLA classII遺伝子が自己抗体産生のみならず、SScの病態にも関連すること、DRB1\*0101を保有するSScは一つの臨床病型を形成していることを示唆するものと考えられる。自己抗原とHLA Class II分子の複合体を認識するT細胞の側に何らかの選択がなされ、病態形成に関与している可能性も推測される。

PBCではDRB1\*0803保有例が多いとの報告がある<sup>9)</sup>。今回の検討でもPBC全体ではDRB1\*0803が多かったが、ACAの別やSScやnondefinite SSD合併の有無でDRB1\*0803保有率に差はみられなかった。このことより、DRB1\*0803はPBCにおいてACA産生やSScの合併に関与しないことが推測された。PBCでは抗ミトコンドリア抗体(AMA)が95%以上に陽性となる。DRB1\*0803はAMA産生しやすさに関連しているのかもしれない。

ACA陰性のSScにおけるSjSやPBC合併率は、ACA陽性のSScに比較すると低い<sup>8)</sup>。しかし、今回の検討ではACA陰性例でもDRB1\*0803を保有する例はSjSやPBC合併率が高いことが判明した。他方、ACA陽性のSScやnondefinite SSDはDRB1\*0803保有例はもとより、非保有例でもSjSやPBCの合併率が高かった。以上より、DRB1\*0803のPBCのみならずSjSの罹患し易さへの関与が示唆され、またACA陽性のSScやnondefinite SSDはHLADRBI\*0803以外にもSjSやPBCを合併しやすい何らかの理由があることが推察された。

## 文 献

- 1) Reveille JD, Owerbach D, Goldstein R, et al. Association of polar amino acids at position 26 of the HLA-DQB1 first domain with the anticentromere autoantibody response in systemic sclerosis (scleroderma). *J Clin Invest* 1992;89:1208-1213.
- 2) McHugh NJ, Whyte J, Artlett C, et al. Anti-centromere antibodies (ACA) in systemic sclerosis patients and their relatives: a serological and HLA study. *Clin Exp Immunol* 1994;96:267-274.
- 3) Morel PA, Chang HJ, Wilson JW, et al. Severe systemic sclerosis with anti-topoisomerase I antibodies is associated with an HLA-DRW11 allele. *Hum Immunol* 1994;40:101-110.
- 4) Morel PA, Chang HJ, Wilson JW, et al. HLA and ethnic associations among systemic sclerosis patients with anticentromere antibodies. *Hum Immunol* 1995;42:35-42.
- 5) Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, et al. HLA class II genes associated with anticentromere antibody in Japanese patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis* 1995;54:983-987.
- 6) Kuwana M, Kaburaki J, Arnett FC, et al. Influence of ethnic background on clinical and serologic features in patients with systemic sclerosis and anti-DNA topoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum* 1999;42:465-473.
- 7) Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE, et al. Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum* 1989;32:998-1006.
- 8) Akimoto S, Ishikawa O, Muro Y, et al. Clinical and immunological characterization of patients with systemic sclerosis overlapping primary biliary cirrhosis: a comparison with patients with systemic sclerosis alone. *J Dermatology* 1999;26:18-22.
- 9) Onishi S, Sakamaki T, Maeda T, et al. DNA typing of HLA class II genes; DRB1\*0803 increases the susceptibility of Japanese to primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1994;21:1053-1060.
- 10) Seki T, Kiyasawa K, Ota M, et al. Association of primary biliary cirrhosis with human leukocyte antigen DPB1\*0501 in Japanese patients. *Hepatology* 1993;13:73-78.
- 11) Sjögren's syndrome research committee Japan: diagnostic criteria for Sjögren syndrome: annual report of the Ministry of Health and Welfare Japan, p.6, 1977.
- 12) Sasaki H, Inoue K, Higuchi K, et al. Primary biliary cirrhosis in Japan: National survey by the subcommittee on autoimmune hepatitis. *Gastro-enterologica Japonica* 1985;20:476-485.

# 強皮症の臨床像と自己抗体の関与

班 員：前川嘉洋（国立熊本病院皮膚科）

## Relationship between Clinical Features of Systemic Sclerosis and Autoantibody

Yoshihiro MAEKAWA

Department of Dermatology Kumamoto National Hospital

### Summary

To investigate the relationship between the clinical features of systemic sclerosis (SSc) and autoantibody, we analyzed 43 patients of SSc.

A 81-year-old Japanese woman, who had diabetes mellitus for these 10 years, complained of itchy and erythematous lesions on the entire body. She was treated well by oral corticosteroid under a diagnosis of drug eruption. After five months, she noticed sclerotic changes of extremities and trunk. Though we diagnosed as SSc, any autoantibodies were not found in laboratory findings. We analyzed 42 cases except one case of Barnett type 1. Anti-nuclear antibody had shown that 41 cases were positive (97.6%). Anti-topoisomerase 1 antibody was positive in 12 cases (28.5%), but no significant differences were not found between Barnett type 3 and anti-topoisomerase 1 antibody.



## はじめに

強皮症患者には抗核抗体をはじめ、各種の自己抗体の存在が知られている。今回は全く自己抗体が証明されなかった症例の報告と、自験43例の臨床症状と自己抗体の発現の関与について検討する。

### 症例と方法

患者は81歳、女性。既往歴；10年前より、糖尿病。家族歴；特記することなし。

現病歴；平成10年12月、全身の掻痒を伴う紅斑を主訴に受診、症状・病歴より中毒疹と診断し、血糖降下剤のバッチテストおよびDLSTを施行したが陰性であった。プレドニゾロン15mg/day内服にて軽快し、退院となった。平成11年4月頃より急速に進行する四肢の著明な硬化を認め(図1)、臨床的にはBarnett 3型の全身性強皮症の分布を示した。

検査成績；検血WBC 6600/ $\mu$ l (Seg71.3%, Lym 15%, Mono 9%, Eosin 3.6% Baso 1%) RBC 477万/ $\mu$ l, Hb13.1g/dl, Hct42.5%, Plts17.4万/ $\mu$ l, 血沈31/60 血液生化学：TP7.3g/dl, BUN 16mg/dl, ALP 133IU/l, Cr 0.6mg/dl, GOT 50IU/l, GPT 52IU/l, ALP 133IU/l, LAP 138IU/l, Na 143mEq/l, K 4.4mEq/l, Cl 109mEq/l, T. chol 92mg/dl, TG 162mg/dl, CRP 0.25/mg/dl, FBS 116mg/dl, HbA1C 6.6%。自己免疫検査；抗核抗体ほか自己抗体は全て陰性。組織学的所見；左前腕より生検した。表皮は萎縮し、真皮において膠原線維の膨化と増生を認め、付属器周囲に軽度の細胞浸潤を認めた(図2)。

次いで、加療中のSSc患者43名について、臨床型をBarnett分類で1型から3型に分類し、性、年齢と抗核抗体、抗DNA抗体、抗トポイソメラーゼ-1抗体(抗scl-70)、抗RNP抗体、抗セントロメア抗体について測定した。



図1：81歳、女性の臨床像



図2：真皮コラーゲン線維の硬化

### 結果

現在、当科で加療中の強皮症患者は43名(女38男5)で、Barnett分類でI型1名、II型21名、III型21名であった。抗核抗体陰性例は本例のみで、抗DNA抗体は6例、抗トポイソメラーゼ1抗体は12例、抗RNP抗体は3例、抗セントロメア抗体は3例に陽性が見られた。タイプ1は1名のみであり、以降の解析には除外し42例を解析対象とした。表1は抗体の有無とタイプ、年齢別の分布であるが、抗核抗体においては陰性が1例であるため解析の対象とならず、残りの4項目において比較的p値の小さい抗Scl-70抗体、抗セントロメア抗体において、Fisherの直接法で5%の有意水準とした場合、病型と抗体の出現頻度の差が有意とはならなかった。次に、各抗体の有無とそれによる病型出現の関係をタイプ2に対するタイプ3の出現するリスクをロジスティック回帰法で表現してみると、抗Scl-70抗体とタイプ3の関連がありそうであるが、significanceの値が0.2529と5%水準を満たさないため、有意ではなかった。

### 考案

今回報告した症例は81歳、女性で10年前から糖尿病の既往があり、その経過中に中毒疹に罹患した。プレドニゾロンで軽快したが、それより5カ月後四肢の硬化が急速に進行し、臨床的にBarnett3型の全身性強皮症の分布を示した。免疫学的検索で抗核抗体をはじめ自己抗体はすべて陰性であった。対象とした42例では抗核抗体はこの一例のみが陰性で97.6%が陽性であった。その他抗トポイソメラーゼ-1抗体は12例(28.5%)、抗RNP抗体は3例(7.1%)、抗セントロメア抗体は3例(7.1%)が

Table I Summary of Cases

			ANA		ANTIDNA		SCL-70		RNP		CENTRO	
			(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
TYPE2	AGE	30's	4	3	1	3	1	4		4		
		40's	3	2	1	2	1	3		2	1	
		50's	7	7		7		6	1	6	1	
		60's	6	4	2	4	2	5	1	5	1	
		70's	1	1		1		1		1		
TYPE3	AGE	30's	1	1			1	1		1		
		40's	7	6	4	4	3	7		7		
		50's	6	6	4	4	2	6		6		
		60's	5	4	3	3	2	4	1	5		
		70's	1	1	2	2	2	2		2		

陽性であり、竹原1)は抗トポイソメラーゼ-1抗体は皮膚硬化の範囲が軀幹におよぶdiffuse cutaneous型の全身性強皮症において高率に認められ、肺線維症との相関が強いことも明らかにしている。抗RNP抗体は浮腫性硬化の伴う例に高率に認められ、抗セントロメア抗体は趾端に限局した全身性強皮症に特異的であると述べている。野上ら2)は抗トポイソメラーゼ-1抗体陽性例ではリウマチ因子や抗DNA抗体の共存が多く、舌小帯短縮例が多く見られたと報告している。

今年度の調査43例中タイプ2と3型42例の臨床型と症状の相関についての検討は行わなかったが、自己抗体の面についてロジスティック回帰法で表現してみたところ抗トポイソメラーゼ1抗体とタイプ3との関連がありそうであるが、significancyの値は5%水準を満たさず有意でなかった。

#### 文 献

- 1) 竹原和彦, 強皮症と自己抗体, 皮膚 1991; 37: 505-509.
- 2) 野上玲子, 前川嘉洋, 当教室における汎発性強皮症の自己抗体の検討, 西日皮膚 1986; 48: 1082-1087.

# P38MAPK 特異的阻害剤 (SB203580) による マウス強皮症モデルの治療効果の検討

班 員： 片山一朗 (長崎大学 皮膚科)  
研究協力者： 浜崎洋一郎、Bae Sang Jae (長崎大学 皮膚科)  
遠藤秀治、新海 滋 (千葉大学 皮膚科)  
山本俊行、西岡 清 (東京医科歯科大学 皮膚科)

## The Evaluation of P38 MAPK Inhibitor for Scleroderma Using Bleomycin Induced Model Mouse.

Ichiro KATAYAMA, Youichirou HAMASAKI, Sang Jae BAE  
(Department of Dermatology, Nagasaki University School of Medicine)

Hideharu ENDO, Hiroshi SHINKAI

(Department of Dermatology, Chiba University School of Medicine)

Toshiyuki YAMAMOTO, Kiyoshi NISHIOKA

(Department of Dermatology, Tokyo Medical and Dental University School of Medicine)

### Summary

A specific inhibitor of p38MAPK, SB203580 decreased procollagen  $\alpha 1(I)$ mRNA expression of dermal fibroblasts stimulated with transforming growth factor  $\beta$  (TGF-  $\beta$  ), platelet-derived growth factor BB(PDGF-BB), or Interleukin-4 and enhanced interstitial collagenase (MMP-1) mRNA expression of the cells stimulated with PDGF-BB. We evaluated the effect of a specific inhibitor of p38MAPK in tissue fibrosis and sclerosis using animal model of scleroderma induced by bleomycin and studied the histological change, the accumulation of glycosaminoglycan and the content of collagen in the skin. After development of dermal sclerosis by daily injection of bleomycin (10  $\mu$ g/ml) for 10 days. A specific inhibitor of p38MAPK was administered locally for next 10 days. Histological study revealed reduction of dermal sclerosis and fibrosis and accumulation of collagenous proteins was reduced after the treatment of a specific inhibitor of p38MAPK. In contrast, dermal hyaluronan content was increased in after treatment of p38MAPK. These results suggest that a specific inhibitor of p38MAPK, SB203580 might be promising therapeutic agent for refractory skin sclerosis in scleroderma.

## はじめに

強皮症患者の皮膚では病理組織学的に真皮膠原線維の肥厚、増生、線維化が見られ、生化学的にコラーゲンの蓄積とプロテオグリカン、グリコサミノグリカンの異常が認められる。このようなコラーゲンの蓄積は、プロコラーゲン合成とコラーゲン分解の不均衡によるコラーゲン代謝の異常で生じると考えられており、強皮症患者の培養皮膚線維芽細胞において、コラーゲンが過剰に産生されている事、さらに間質型コラーゲナーゼ (MMP-1) 産生は正常ないし減少している事が報告されている<sup>1)</sup>。また、強皮症の病変部では浸潤細胞、傷害された血管内皮細胞、血小板などから分泌されるサイトカインが線維化の形成に深く関与していると考えられている。TGF- $\beta$ 、PDGF、CIGF、IL-4、IL-6などのサイトカインは線維芽細胞のコラーゲン合成に促進的に働き、TNF- $\alpha$ は抑制的に作用する事が報告されている<sup>2)</sup>。また、コラーゲンの分解系においてはTGF- $\beta$ がMMP-1の遺伝子発現を転写レベルで抑制する<sup>3)</sup>。実際に強皮症の病変部皮膚でTGF- $\beta$ 、PDGF、IL-4は免疫組織学的に検出され、TGF- $\beta$ のmRNAの発現が亢進しているという報告も見られる<sup>4)</sup>。さらに、強皮症病変部皮膚ではPDGF- $\beta$ レセプターの発現増強が見られ、強皮症線維芽細胞ではTGF- $\beta$ 刺激後にPDGF- $\alpha$ レセプターの増加が認められている<sup>5)</sup>。近年、これらのサイトカインに関して、レセプターに結合後の細胞内情報伝達系が明らかにされてきている。その中でMAPキナーゼ (MAPK: mitogen-activated protein kinase) はインスリンおよびさまざまな細胞増殖因子、発癌プロモーターなどの刺激により共通に活性化されるセリン/スレオニンキナーゼとして同定された<sup>6)</sup>。また、P38MAPKはリンパ球細胞をLPS処理した際にチロシンリン酸化される蛋白質として同定された新規のMAPKであり、古典的MAPKのTEY配列に対してTGY配列を有する<sup>7)</sup>。昨年新海らは、培養線維芽細胞におけるP38MAPKの役割について、TGF- $\beta$ 、PDGF、IL-4がP38MAPKをリン酸化し、P38MAPKの特異的阻害剤SB203580がTGF- $\beta$ 、PDGF-BB、IL-4刺激によるプロコラーゲン $\alpha$ 1(I) mRNA発現を抑制し、PDGF-BBによるMMP-1 mRNA発現を増強することを報告している<sup>8)</sup>。そこで我々は、ブレオマイシンを用いて作成した強皮症モデルマウスを用いてSB203580の皮膚硬化性病変に対する効果を検討した。

## 材料と方法

### 1. ブレオマイシンを用いた強皮症モデルマウスの作成

WBB6F1マウスの背側部皮膚にブレオマイシン1mg/ml溶液を0.1ml、10日間連日皮下注射し硬化性病変を作成した。その後、2 $\mu$  Molおよび5 $\mu$  MolのMAPK特異的阻害剤であるSB203580を、皮膚硬化部位に10日間皮下注射した。コントロールとして生理食塩水を0.1ml、10日間皮下投与した。投与終了24時間後に皮膚を採取し病理組織学的検討、コラーゲンの抽出、グリコサミノグリカンの解析を行った。SB203580投与マウスは各群4匹、コントロールについては6匹のマウスで比較検討した。

### 2. コラーゲンの解析

硬化部皮膚組織よりペプシン消化法によりコラーゲンを抽出した。皮膚組織を皮下組織を取り除き細切した後、ガラス試験管内で1mg pepsin/ml 0.5M酢酸によりover night消化を行った。遠心し上清を回収後、1M Trisを加えて中和した。上清と同量のエタノールを加えて1時間静置した後に遠心し上清を回収、SDS-PAGE sample bufferに組織重量で各サンプルが等量になるように溶解し電気泳動を行った。電気泳動のバンドはデンシトメーターで測定し半定量化した。

### 3. グリコサミノグリカンの解析

硬化部皮膚組織を細切した後、0.5M NaOH内で4℃、over night 攪拌。0.5N HClで中和した後pH8.0、60℃の条件下でプロナーゼEによる消化を行い遠心した後上清回収。トリクロロ酢酸を加え1時間氷上で静置した後遠心、上清を回収し蒸留水に対して透析したものを凍結乾燥しさせ、グリコサミノグリカン抽出物とした。アセテート膜電気泳動を畑ら<sup>9)</sup>の方法で行うとともに、ヒアルロン酸についてはヒアルロン酸結合蛋白によるサンドイッチバインディングプロテインアッセイ法により測定した。

### 4. プロコラーゲン $\alpha$ 1(I)のRT-PCR

マウスに作成した硬化性病変部の皮膚よりRNAを抽出、cDNAを合成し、それを鋳型としてプロコラーゲン $\alpha$ 1(I)および $\beta$ -アクチンの特異的プライマーを用い、PCR法にてDNAを増幅した。増幅したDNAはアガロースゲルにて電気泳動し、エチレンブロマイドを用い検出した。

## 結果

WBB6F1 マウスの背部に、1mg/mlのブレオマイシン0.1mlを10日間連日皮下投与することにより、病理組織学的に真皮膠原線維の著しい肥厚、増生および均質化が生じることを確認した。硬化病変を確認後に生理食塩水を10日間連日で局所投与したコントロール群のマウスでは病理組織学的にその硬化性病変は持続していた。一方、硬化性病変を作成後に2  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ MのP38MAPK特異的阻害剤(SB203580)投与群においては真皮膠原線維の肥厚、増生の改善を認めた(図1)。真皮の厚さを各

標本で3カ所でランダムに測定し定量化したところコントロール群に比較して2  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ MのP38MAPK特異的阻害剤(SB203580)投与群においては有為な真皮厚の減少を示した(図2)。マウス皮膚組織よりペプシン消化法を用いてコラーゲンを抽出し、SDS-PAGEを行いデンストメーターで半定量化した。ペプシン消化法で抽出されたコラーゲンは $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2ともにコントロール群に比較し2  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ MのP38MAPK特異的阻害剤(SB203580)投与群において減少していた(図3)。マウス皮膚組織よりRNAを抽出し、プロコラーゲン $\alpha$ 1(I)および $\beta$ -アクチンの特異的プライマー

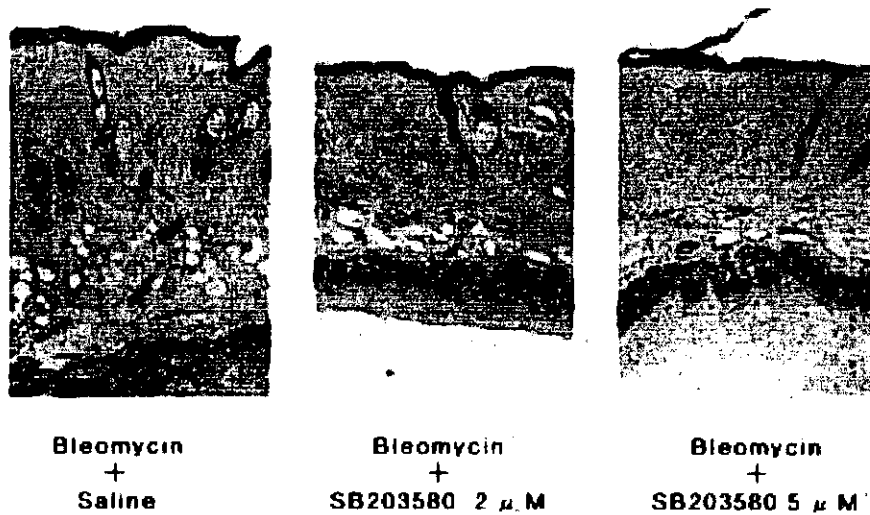


図1 プレオマイシン皮膚硬化モデルに対するSB203580の効果  
2  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ MのP38MAPK特異的阻害剤(SB203580)投与群においては真皮膠原線維の肥厚、増生の改善を認めた

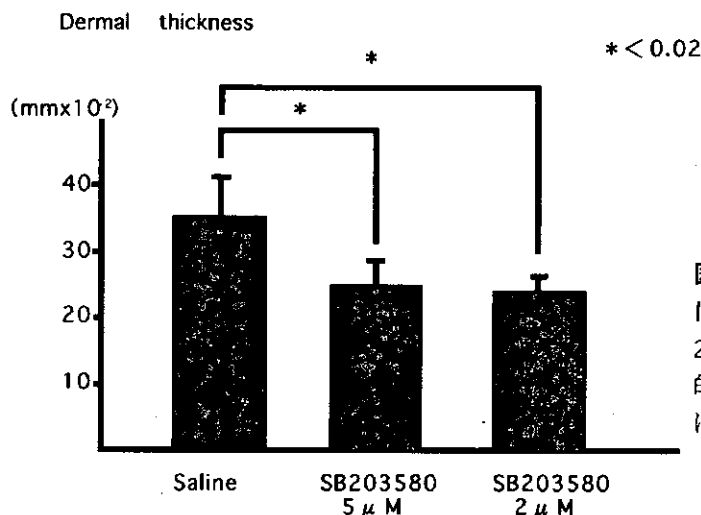


図2 プレオマイシン皮膚硬化モデルに対するSB203580の効果  
2  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ MのP38MAPK特異的阻害剤(SB203580)投与群においては有為な真皮厚の減少を示した。

を用いてRT-PCRを行った。コントロール群に比較し2  $\mu$  Mおよび5  $\mu$  MのP38MAPK 特異的阻害剤 (SB203580)投与群においてプロコラーゲン $\alpha$  1 (I) のmRNAレベルでの発現の低下が認められた (図4)。

強皮症の硬化性病変部皮膚組織においては、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンの量的質的变化が報告されている。そこで、マウス皮膚組織よりグリコサミノグリカンを抽出し、ヒアルロン酸とデルマトン硫酸を測定した。コントロール群に比較し2  $\mu$  Mおよび5  $\mu$  MのP38MAPK 特異的阻害剤 (SB203580)投与群においてヒアルロン酸の有為な増加が認められた (図5)。一方、デルマトン硫酸はコントロール群と2  $\mu$  M および5  $\mu$  M の

P38MAPK特異的阻害剤 (SB203580)投与群で有為な変化はなかった (図6)。

### 考 按

近年、強皮症の硬化性病変形成のメカニズムに対するサイトカインの関与が明らかにされてきており、その機序は、強皮症病変部に浸潤した炎症性細胞や病変部の血管内皮細胞および血小板から分泌されるサイトカインが、コラーゲンの代謝の不均衡へと導くためと考えられている。一般に、TGF- $\beta$ 、PDGF、CTGF、IL-4、IL-6などのサイトカインは線維芽細胞のコラーゲン合成に促進的に働き、TNF- $\alpha$ は抑制的に作用する事が報告されている<sup>12)</sup>。その中でも

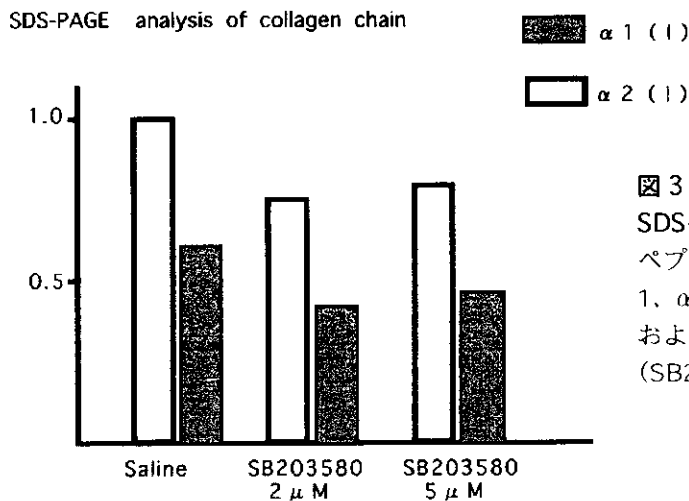


図3 皮膚組織から抽出したコラーゲンの SDS-PAGEによる検討

ペプシン消化法で抽出されたコラーゲンは $\alpha$  1、 $\alpha$  2ともにコントロール群に比較し2  $\mu$  M および5  $\mu$  MのP38MAPK 特異的阻害剤 (SB203580)投与群において減少していた。

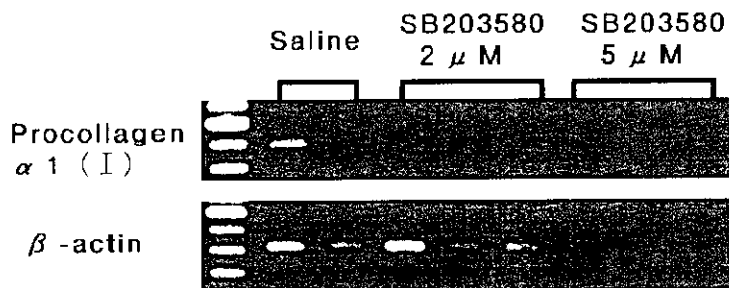


図4 マウス皮膚組織抽出RNAのプロコラーゲン $\alpha$  1 (I) RT-PCR 2  $\mu$  Mおよび5  $\mu$  MのP38MAPK 特異的阻害剤 (SB203580)投与群においてプロコラーゲン $\alpha$  1 (I) のmRNAレベルでの発現の低下が認められた。

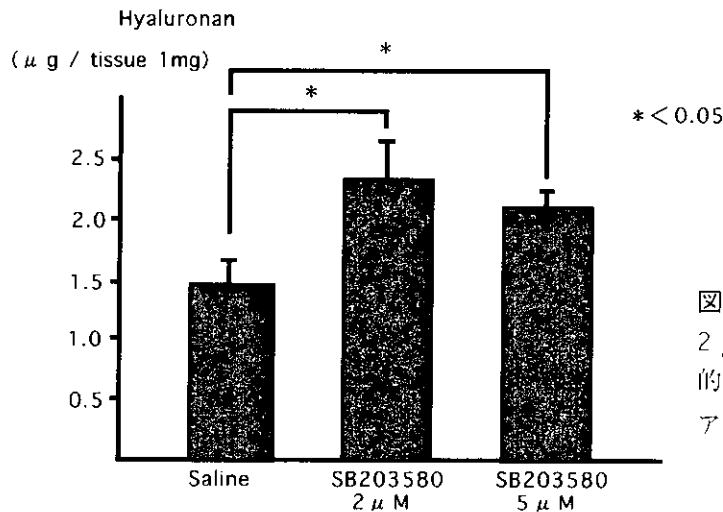


図5 皮膚組織抽出ヒアルロン酸の比較  
2 µ Mおよび5 µ MのP38MAPK 特異的阻害剤(SB203580)投与群においてヒアルロン酸の有為な増加が認められた。

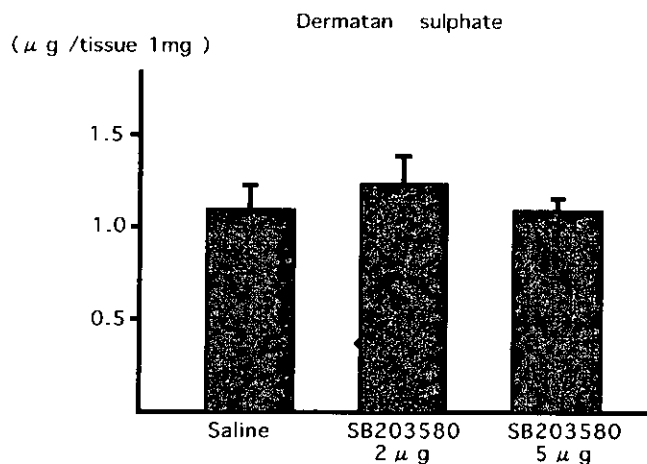


図6 皮膚組織抽出デルマタン硫酸の比較  
デルマタン硫酸はコントロール群と2 µ Mおよび5 µ MのP38MAPK 特異的阻害剤(SB203580)投与群で有為な変化はなかった。

特にTGF-βは強皮症の病変部皮膚で発現が増強し、強皮症由来の線維芽細胞の増殖を促進するという報告があり、強皮症の線維化において重要な役割を果たしていると考えられる<sup>10)</sup>。そのTGF-βの細胞内シグナル伝達系が、最近明らかにされつつある。TGF-βスーパーファミリーの蛋白質は2種類のセリン/スレオニンキナーゼ型受容体に結合し、リガンドが結合してII型受容体とI型受容体が複合体を作るとII型受容体がI型受容体を活性化する。この結果、Smadと呼ばれる一群の蛋白質が活性化され細胞内にシグナルが伝達される。また、もう一つの経路として新規のMAPKKKであるTAK-1(TGF-β activated kinase-1)の活性化およびその下流のMAPKカスケードの活性化が報告されている<sup>11)</sup>。さらに、SmadとMAPKの間には相互作用があり、receptor-regulated SmadにMAPキナーゼによっ

てリン酸化を受けるコンセンサス配列があり、EGFなどの増殖因子の作用によってMAPキナーゼが活性化されるとこの部分がリン酸化され、このリン酸化されたR-Smadは、核内への移行ができなくなり、結果的にシグナル伝達の抑制が起こるとする報告がある<sup>10)</sup>。一方、EGFやHGFなどの増殖因子はMAPKキナーゼを介してSmadをリン酸化するという報告<sup>11)</sup>もあり、まだ不明の部分も多い。いずれにしても種々の細胞内シグナル伝達系の間には複雑な相互作用があると考えられる。培養線維芽細胞においてはTGF-β、PDGF、IL-4はP38MAPKをリン酸化し、P38MAPKの特異的阻害剤SB203580がTGF-β、PDGF-BB、IL-4刺激によるプロコラーゲンα1(1)mRNA発現を抑制するとともに、PDGF-BBによるMMP-1mRNA発現を増強すると報告されている<sup>13)</sup>。そこで我々は、プレオマイシン

で作成した皮膚硬化性病変に対するp38MAPKの特異的阻害剤SB203580の効果を検討した。そしてp38MAPKの特異的阻害剤SB203580はプレオマイシンで作成した皮膚硬化性病変を改善させる結果を得た。この事は細胞内シグナル伝達蛋白の阻害剤が、強皮症の治療に有効である可能性を示唆していると考えられる。しかし、その機序については細胞内シグナル伝達系に不明の部分が多く、今後さらに検討が必要と思われる。また、実際に治療薬とした場合には皮膚以外の臓器への作用、投与方法等についての検討が重要でありさらに検討する必要があると考える。今回我々は、コントロール群に比較し2  $\mu$  Mおよび5  $\mu$  Mのp38MAPK特異的阻害剤(SB203580)投与群においてヒアルロン酸の有為な増加が認めるという結果を得た。昨年我々は、同様のプレオマイシンで作成した強皮症モデルマウスを用いて、TGF- $\beta$ の活性を抑制するMannose 6 phosphateとTGF- $\beta$ に拮抗的に作用するOctreotide acetateの治療効果を検討、報告している<sup>18)</sup>。これらの薬剤においても真皮の硬化病変改善が認められ、グリコサミノグリカンの解析でヒアルロン酸の増加が認められている。近年ヒアルロン酸の低分子フラグメントがマクロファージの浸潤や炎症性サイトカインやケモカインの放出を誘導することも報告されており<sup>19)</sup>、我々のモデルにおける硬化性病変の改善に関連している可能性を示唆するものと考えられた。

## 文 献

- 1) Uitto J, Bauer EA, Eisen AZ: Scleroderma: Increased biosynthesis of triple-helical type I and type III procollagens associated with unaltered expression of collagenase by skin fibroblasts in culture. *J Clin Invest* 1979;64:921-30.
- 2) Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y: Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblast. *J Invest Dermatol* 1994;103:359-63.
- 3) LeRoy EC, Smith EA, et al.: A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Reum* 1989;32:817-825.
- 4) Rose NR, Leskovsek N: Scleroderma: Immunopathogenesis and treatment. *Immunol Today* 1998; 19:499-501.
- 5) Sfrikakis PP, McCune BK, Tsokos M, Aroni K, Vayiopoulos G, Tsokos GC: Immunohistological demonstration of transforming growth factor-beta isoforms in skin of patients with systemic sclerosis. *Clinic Immunol Immunopathol* 1993;69:1227-34.
- 6) Kulozik M, Hogg A, Lankat BB, Krieg T: Co-localization of transforming growth factor beta 2 with alpha 1 (I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1990; 86: 917-22.
- 7) Gay S, Jones RJ, Huang GQ, Gay RE: Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor (PDGF) and sis-oncogene expression in scleroderma. *J Invest dermatol* 1989;92:301-3.
- 8) Klareskog L, Gustafsson R, Scheynius A, Hallgren R: Increased expression of platelet-derived growth factor type B receptor in the skin of patient with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1534-41.
- 9) Salmon EV, Serpier H, Nawrocki B, Gillery P, Clavel C, Kalis B, Birembaut P, Maquart FX: Expression of interleukin-4 scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Arch Dermatol* 1996;132:802-6.
- 10) Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M: Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptor by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblast. *J Exp Med* 1992;175:1227-34.
- 11) Robinson MJ, Cobb MH: Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:180-6.
- 12) Kyriakis JM, Avruch J: Protein kinase cascade activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 1996;18:567-77.
- 13) 新海 淑、遠藤秀治: 皮膚線維化におけるp38MAPKの検討。皮膚・結合組織疾患調査研究班強皮症分科会報告書 1999: 33-8
- 14) 畑隆 一郎: 酸性ムコ多糖の微量分析法。蛋白質、核酸、酵素 1973; 18: 843-857.
- 15) Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K: Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 1995; 270: 2008-11.
- 16) Kretzschmar M, Doody J, Massague J: Opposing BMP and EGF signalling pathway converge on the TGF- $\beta$  family mediator Smad1. *Nature* 1997; 389: 618-22
- 17) deCaestecker MP, Parks WT, Frank CJ, Castagnino P, Bottaro DP, Roberts AB, Lechleider RJ: Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev* 1998; 12:



1587-92.

- 18) 片山一朗、浜崎洋一郎、清水和宏、Bae Sang Jae、林 徳真吉:プレオアイシン皮膚硬化モデルマウスを用いた強皮症治療薬の検討. 皮膚・結合織疾患調査研究班強皮症分科会報告書 1999: 57-63.
- 20) Maureen RH, Marie DB, Robert MS, Clare B, Paul WN: Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN- $\gamma$  in Mouse Macrophages. *J Immunol* 1998;160:3023-30.

# ヒト培養線維芽細胞の extracellular matrix 遺伝子発現におけるブレオマイシンの効果の検討

班 員：西岡 清（東京医科歯科大学・皮膚科）  
共同研究者：山本俊幸（東京医科歯科大学・皮膚科）

## Effect of Bleomycin on Gene Expression of Extracellular Matrix in Human Dermal Fibroblasts

Kiyoshi Nishioka and Toshiyuki Yamamoto  
(Department of Dermatology, Tokyo Medical and Dental University)

### Summary

Bleomycin is a drug capable of inducing tissue fibrosis. In this study, in vitro effect of bleomycin on gene expressions of extracellular matrix encoding  $\alpha 1(I)$  collagen, fibronectin and decorin was examined in human dermal fibroblasts. Results of Northern blot analysis showed that bleomycin upregulated  $\alpha 1(I)$  collagen, fibronectin and decorin gene expression dose-dependently between 1nM-1mM. 100 nM bleomycin upregulated  $\alpha 1(I)$  collagen, fibronectin and decorin mRNA expression with a peak of 6 h following stimulation in normal skin fibroblast monolayers. In situ hybridization also showed increased expression of  $\alpha 1(I)$  transcripts in cultured fibroblasts after incubation with bleomycin. Concomitant stimulation of bleomycin and interferon- $\gamma$  (10,000 U/ml), a representative antifibrotic cytokine, partially decreased the mRNA level of  $\alpha 1(I)$  collagen, which was confirmed by both Northern blot and in situ hybridization. In addition, bleomycin mildly upregulated mRNA expressions of TGF- $\beta$  and CTGF in normal skin fibroblasts, which showed parallel increase after bleomycin treatment. Our results indicate the direct effect of bleomycin, as well as indirect effect mediated by TGF- $\beta$  and CTGF, on gene expression of extracellular matrix proteins in dermal fibroblasts, which strongly suggest the role of bleomycin in fibrosis/sclerosis.

## はじめに

ブレオマイシンは頻用される抗癌剤であるが、その副作用としてヒトにしばしば肺線維症を引き起こすことはよく知られている。これを利用して、マウスやラットに実験的にブレオマイシン誘導性の肺線維症を引き起こす動物モデルは既に確立され、広く用いられている<sup>1,2)</sup>。

また一方、ブレオマイシン使用中の担癌患者に実際に強皮症様病変が引き起こされた報告もわずかながらみられる<sup>3)</sup>。われわれはこれまでに、ブレオマイシンをマウスの皮下に頻回に局所投与することで、ヒトの強皮症と組織学的ならびに生化学的に類似する皮膚硬化を誘導することを報告してきた<sup>4)</sup>。そこで今回、ブレオマイシンの線維芽細胞に対する直接的な影響を調べる目的で、ヒト培養線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験系においてブレオマイシンの extracellular matrix の遺伝子発現に対する影響を調べた。

## 材料と方法

ヒト健康部皮膚由来線維芽細胞を 10%FCS 加 DMEM で培養し、semi-confluent に達した状態で 1nM-1  $\mu$ M のブレオマイシン (日本化薬) を加え、さらに 3-24 h 培養した後 RNAzol (Trizol, Gibco) を用いて total RNA を抽出した。特異的 cDNA probe を用いて Northern blot 法にて  $\alpha$  1(I) コラーゲン、フィブロネクチン、デコリンの mRNA 発現を検出した。一部の実験においては 3 次元の I 型コラーゲンゲル (final; 1mg/ml) 内で線維芽細胞を培養した。

また、別の系においては線維芽細胞を slide culture (Nunc) し、 $\alpha$  1(I) コラーゲン遺伝子の発現を *in situ* hybridization にて検討した。いずれの実験においても、代表的な anti-fibrotic cytokine の効果を調べるため、monolayer での線維芽細胞に 100 nM のブレオマイシンと  $10^4$  U/ml の IFN- $\gamma$  を同時に加え、6 h incubation した後 Northern blot 法、あるいは *in situ* hybridization を行った。

## 結果

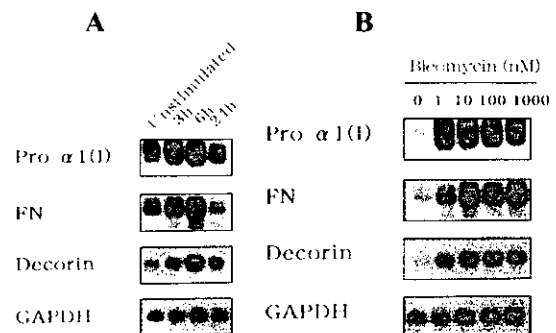
はじめに preliminary な実験としてブレオマイシンの cytotoxicity をみるため、1  $\mu$ M の濃度のブレオマイシン 24h 刺激後の線維芽細胞の morphology

に影響を与えないことを確認した。

### 1) ブレオマイシンの extracellular matrix の遺伝子発現に対する影響

はじめに 100 nM のブレオマイシンで 3-24 h 刺激後  $\alpha$  1(I) コラーゲン、フィブロネクチン、デコリンの time-dependent expression をみた。Fig. 1 A に示すようにコラーゲン、フィブロネクチン、デコリンのいずれもブレオマイシン刺激によってその mRNA 発現は upregulate され、6 h で peak を認めた。

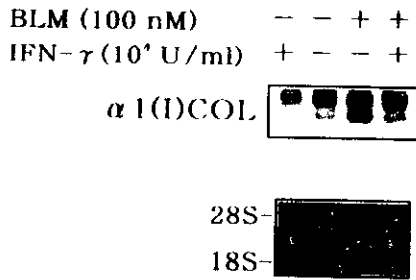
次に、1nM-1000nM の濃度のブレオマイシンで 6h 刺激後の  $\alpha$  1(I) コラーゲン、FN、デコリンの dose-dependent の expression をみた。Fig. 1 B に示すようにコラーゲン、デコリンは 1 nM - 100nM の間で濃度依存性に、またフィブロネクチンは 1-1000nM の間で濃度依存性にそれぞれ upregulate された。



**Fig. 1. (A) Time course of  $\alpha$ 1(I) collagen, fibronectin and decorin mRNA expression in normal skin fibroblasts stimulated with 100 nM bleomycin for various period from 3-24 h in monolayer cultures. Total RNA (5  $\mu$ g/lane) was analyzed by Northern blot hybridization with cDNA probes. (B) Dose effect of bleomycin on gene expression of  $\alpha$ 1(I) collagen, fibronectin and decorin. Fibroblast monolayers were cultured with a various concentration of bleomycin (1-1,000 nM) for 6 h.**

さらに、代表的な Anti-fibrotic cytokine である IFN- $\gamma$  の影響を調べるため、100 nM のブレオマイシンと  $10^4$  U/ml の IFN- $\gamma$  とを同時に加え、6 時間培養した後 total RNA を抽出し、Northern blot 法を行った。Fig. 2 に示すように、 $10^4$  U/ml の IFN- $\gamma$  は、ブレオマイシンによる  $\alpha$  1(I) コラーゲンの mRNA 発現を抑制することが確認された。

以上は monolayer での系であるが、同様の実験を 3 次元で行った。Fig. 3 に、type I コラーゲンゲル中で 3 次元培養した線維芽細胞を 100nM のブレオマイシンで 6h 刺激後、コラーゲン、FN、デコリ

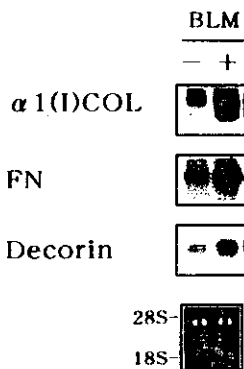


**Fig. 2. Effect of IFN- $\gamma$  on the bleomycin-elicited mRNA expression of  $\alpha 1(I)$  collagen.** Fibroblasts were concomitantly incubated with 100 nM bleomycin and IFN- $\gamma$  (10<sup>4</sup> U/ml) for 6 h in monolayers. Total RNA (5  $\mu$ g/lane) was analyzed by Northern blot hybridization with cDNA probes.

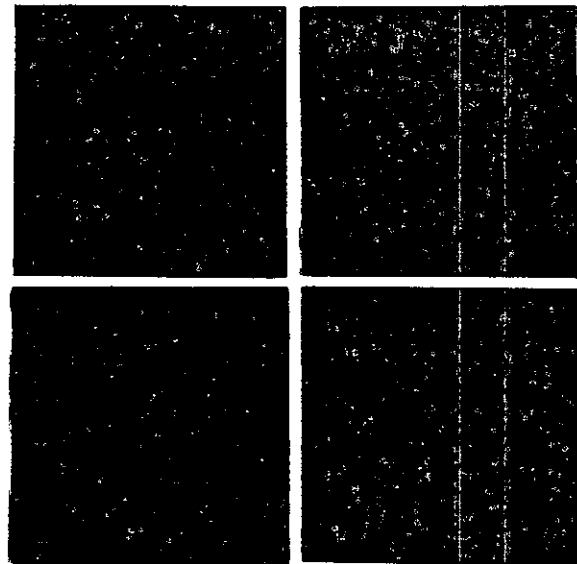
の発現を示す。プレオマイシンは3次元中でもコラーゲン、フィブロネクチン、デコリンの発現を upregulate した。

## 2) in situ hybridizationによる、培養線維芽細胞からの $\alpha 1(I)$ コラーゲンのmRNA発現の検討

線維芽細胞からの $\alpha 1(I)$ コラーゲンmRNA transcriptの局在を検討した。Fig. 4に示すように、 $\alpha 1(I)$ コラーゲンのmRNA発現はプレオマイシン (100 nM) によって upregulate され、IFN- $\gamma$  (10<sup>4</sup> U/ml) によってその発現は部分的に抑制された。なお、コントロールの sense probe で hybridize したものは positive grains は殆どみられなかった。



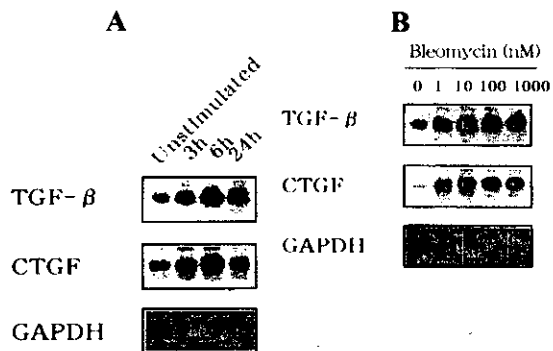
**Fig. 3. mRNA expression of  $\alpha 1(I)$  collagen, fibronectin and decorin.** Normal dermal fibroblasts were cultivated in the presence or absence of bleomycin (BLM) (100 nM) for 6 h in three-dimensional collagen lattices. Total RNA (5  $\mu$ g/lane) was analyzed by Northern blot hybridization with cDNA probes.



**Fig. 4. In situ hybridization of normal dermal fibroblasts cultures with an  $\alpha 1(I)$  procollagen probe.** Cells were cultured unstimulated (A), with bleomycin (100 nM) (B) or with bleomycin (100 nM) and IFN- $\gamma$  (10<sup>4</sup> U/ml) (C) for 24 h and subjected to in situ hybridization. (D) cells were hybridized with control sense probe.

## 3) プレオマイシンの fibrogenic cytokine の発現に対する影響

プレオマイシンの線維芽細胞からの fibrogenic cytokine の発現に対する影響を調べるため、100nMのプレオマイシンで3-24 h培養した後 total RNA を抽出し、TGF- $\beta$ 、CTGF の mRNA 発現を調べた。Fig. 5 A に示すように、TGF- $\beta$ 、CTGF いずれも 6h 後に強く upregulate された。Fig. 5 B は 1-1000nM のプレオマイシンで刺激し



**Fig. 5. (A) Time course expression of TGF- $\beta$  and CTGF mRNA in fibroblasts after stimulation with bleomycin.** Normal dermal fibroblasts were stimulated with bleomycin (100 nM) for 6-24 h in serum-free medium. **(B) Dose effect of bleomycin on gene expression of TGF- $\beta$  and CTGF.** Fibroblasts were incubated with 1-1,000 nM of bleomycin for 6h. Total RNA (5  $\mu$ g/lane) was analyzed by Northern blot hybridization with cDNA probes.