

20010840

厚生科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

強皮症に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

平成14(2002)年3月

主任研究者 新海 法

厚生労働省保健医療局疾病対策課

Annual Report of Ministry of Health, Labour and Welfare
Scleroderma Research Committee
Japan, 2001

Chairman: Hiroshi Shinkai, M.D.

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

強皮症に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 新海 宏

平成14年（2002）年3月

目 次

I. 総括研究報告

強皮症の病因・病態および治療に関する研究

新海 洵 …… 1

II. 分担研究報告

1. 強皮症に関する臨床調査個人票の有用性の検討

森 満 …… 5

2. 分光画像技術による強皮症の評価

新海 洵 …… 7

3. 抗RNAポリメラーゼI/III抗体検出のためのELISAの開発

桑名 正隆 …… 9

4. 血清IL-12レベル高値検出強皮症患者群の臨床像の解析と意義

前川嘉洋 …… 12

5. 汎発性強皮症皮膚線維芽細胞におけるインテグリン $\alpha v \beta 5$ の
発現レベルとその意義についての検討

尹 浩信 …… 15

6. 強皮症患者由来線維芽細胞における細胞外マトリックス蛋白
およびサイトカイン受容体の発現の解析

新海 洵 …… 17

7. 皮膚線維芽細胞におけるEGFによるII型TGF- β 受容体発現
亢進の機序について

尹 浩信 …… 19

8. 全身性強皮症患者皮膚線維芽細胞のタイプIコラーゲン $\alpha 2$
プロモーターの解析

石川 治 …… 21

9. 正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン
マトリックスによるコラーゲン合成制御機構の研究

畑 隆一朗 …… 23

10. オリゴヌクレオチドを用いたヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写
制御の解析

尹 浩信 …… 25

11. Interferonによるコラーゲン遺伝子の転写抑制機構の解析

稲垣 豊 …… 27

12. Transforming growth factor- β シグナルにおけるSmad3の
機能的意義の解明

森 聖二郎 …… 29

13. プレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルにおける、monocyte
chemoattractant protein-1 (MCP-1)の検討

西岡 清 …… 31

14. TNFレセプターp55欠損(TNFRp55 $^{-/-}$)マウスにおける皮膚
線維化形成機序の解析

片山一朗 …… 33

15. ヒトHGF遺伝子導入リボソームを用いた皮膚硬化モデルマウスの治療

西岡 清 …… 36

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

厚生科学研究補助金（特定疾患研究研究事業）
総括研究報告書

強皮症の病因・病態および治療に関する研究

主任研究者 新海 滋 千葉大学 皮膚科教授

研究要旨：強皮症は単なるコラーゲンの線維化のみならず、コラーゲン線維の硬化性変化を病理組織学的にしめし、皮膚を始めとして、肺、腎に同様の変化を来す。コラーゲン線維化機序についてはコラーゲン遺伝子発現の亢進を来すが、この発現には種々のサイトカイン、とりわけTGF- β 、IL-4が関与することが判明してきた。強皮症の線維芽細胞ではこれらのサイトカインの受容体が亢進して、細胞内の情報伝達系が亢進し、コラーゲン遺伝子発現を来している。さらにコラーゲン遺伝子の発現には遺伝的要因も存在することが判明した。線維の硬化性変化はコラーゲンと親和性を示す分子にも異常を来していることが判明した。コラーゲン線維として沈着するには分解系の異常も関与している。いわゆる細胞外マトリックスを構成する分子が複雑にからみあって組織を構成しているが、未知の構成分子も存在する。このためコラーゲン分子の発現を抑えても線維化を予防するには困難と思える。しかしインターフェロン、TNF発現、HGFによる遺伝子治療に期待がもたれる。自己抗体と病態は特異的である。これまでポリメラーゼ抗体が皮膚硬化が急速に進行し、腎硬化を来す例に認められ、簡単に臨床検査レベルで調べることが望まれていた。RPC155上の主要なエピトープを用いたELISAは感度、特異性ともに高い簡便な抗RNAP I/III抗体のスクリーニング法であることが確認され、簡易法を開発した。

分担研究者	所属施設名・職名
石川 治	群馬大学医学部皮膚科教授
稲垣 豊	国立金沢病院 内科医師
尹 浩信	東京大学医学部皮膚科講師
片山 一朗	長崎大学医学部皮膚科教授
桑名 正隆	慶応義塾大学医学部 先端医科学講師
西岡 清	東京医科歯科大学環境皮膚免疫学教授
畑 隆一郎	神奈川歯科大学口腔生化学 教授
前川 嘉洋	国立熊本病院皮膚科医長
森 聖二郎	千葉大学医学部第二内科講師
森 満	札幌医科大学公衆衛生学教授

A. 研究目的

強皮症の病因・病態についてはまだ不明な点が多く、患者のQOLを著しく障害する臓器線維症、ことに皮膚硬化に対する有効な治療法もない。治療法の決定には病期による病態の把握、臨床像と自己抗体の関連を早急に検討することが重要である。当班ではこれまで本症は単なる臓器線維症と異なり、コラーゲン線維の硬化が特徴であり、多因子により発症すること

を述べてきた。そこで病因・病態および危険因子の検討を最近の線維化機構の分子レベルの研究に焦点をあて将来の治療の開発につなげるように検討した。さらに臨床的に応用出来るように自己抗体の簡易検出法を開発した。また疫学班の協力を得て個人票情報をデータ化した電子ファイルを用いた解析からデータの有用性を検討した。

B. 研究方法

- 1) 臨床調査個人票情報をデータ化した電子ファイルを用い解析
- 2) 病因・病態および危険因子の検討
- 3) 自己抗体の高感度検出法の開発
- 4) 治療法の開発

C. 研究結果と考察

平成11年度に医療費の公費負担を受けた強皮症11,381例の臨床調査個人票情報をデータ化した電子ファイルを用い解析から、全体の性比（女性/男性）は7.3で、30歳未満では値が低かった。

このことは病因に対する性別の反応性が、年齢階級で違いがあることを示している可能性がある。定罹病期間は平均約8～11年の罹病期間と推定できた。男性で約8年、女性で約10～11年で、男女別推

定発症年齢分布は女性では発症が35歳代から、男性では40歳代から増加してくる。レイノー現象出現率は20歳以上で高い出現率を示し、特に40歳以上80歳未満では90%以上であった。

関連係数0.25以上を示す自覚症状と臨床検査成績の組み合わせでは自覚症状の嚥下障害と臨床検査所見の食道機能異常、呼吸困難と肺線維症の関連係数は0.5以上で、消化器症状では嚥下障害と便通異常も関連が強い。また、嚥下障害と呼吸困難も関連を持つ。自己抗体では抗Topo-I抗体が肺線維症と関連を持ち、かつ抗セントロメア抗体とは相反する関連を持つことがわかった。

自己抗体（抗Topo-I抗体、抗セントロメア抗体）の保有と肺機能検査成績結果の割合%VCとDLCOは抗セントロメア抗体のみ陽性例が、抗Topo-I抗体のみ陽性例や両者とも陽性例より肺機能低下例が少ない傾向にある。

分光画像による強皮症の評価

安静時のoxyHb分布画像

安静時の健常者は10例全ての人が指先のoxyHbが一番多く、SSc患者は8例中2例に指先の虚血が認められ、8例中2例で全体のoxyHbが多い人が認められた。総ヘモグロビンの変化

冷却30秒後の左手の3領域は、速やかにtotalHbが回復してくる。これは、健常者、SSc患者共に見られた。冷却をしていない右手は、健常者では冷却中にtotalHbが安静時と変化が認められないかまたは上昇する。一方、SSc患者は8例全例において、冷却中にtotalHbが減少することが認められた。このことは、SSc患者は対側の手の温度低下を回復させる機能がうまくいっていない事を示唆している。

分光画像技術は、非接触・非侵襲な安全でかつ短時間に画像情報を取得できる装置であり、SSc患者の酸素代謝の評価、薬効評価に有用と考えている。

病因・病態および危険因子の検討

IL-12は免疫応答におけるTh1およびTh2システム間のバランスを制御する重要な役割を担っていると現在認識されている。本研究の目的は、IL-12を37名の強皮症患者（dcSSc 27名、lcSSc 10名）から採取した血清をELISA法を用いて解析した。SLE（n=6）患者および健常者コントロール（n=41）血清と比較して、強皮症患者血清（n=37）は有意に高いレベルを示した。とくにdcSSc患者はlcSSc患者に比べより高い血清IL-12レベルを呈した。これらの血清IL-12レベルの上昇は、IL-6、IL-8、TNF α やIFN γ などの炎症性サイトカインの血清レベルとは相関を示さなかった。

RT-PCR解析の結果、IL-12p40のmRNAは強皮症患者および健常者コントロール生検皮膚組織いずれにも発現していた。IL-12の高い血清レベル（350pg/ml以上）を示す患者では、指尖部潰瘍形成との有意な相関が認められたほか（ $p<0.05$ ）、血沈やCRPなどの非特異的炎症パラメータ、レイノー現象などの末梢循環不全、食道症状が出現しやすい傾向がみられた。以上の結果より、皮膚硬化や虚血変化にIL-12が関与する可能性が示唆された。

強皮症患者皮膚におけるコラーゲンマトリックスの異常蓄積の原因を明らかにするために、細胞の微小環境を形成するコラーゲンマトリックスによる皮膚線維芽細胞のコラーゲン合成制御について調べた。皮膚線維芽細胞のコラーゲン合成活性はポリスチレン培養皿よりもI型コラーゲン上では促進され、三次元のI型コラーゲンゲル内では逆に阻害を受ける。強皮症患者線維芽細胞のコラーゲン合成は対照の細胞と同様な制御を受けたが、I型コラーゲン上でも、三次元のI型コラーゲンゲル内においても対照の細胞より活性が高かった。COL1A1遺伝子では、第一イントロンに、COL1A2鎖遺伝子では上流3.4キロ塩基対に二次元的コラーゲンマトリックスに応答してCOL1A2鎖遺伝子の転写を促進する配列の存在することを示していた。即ち、細胞は細胞外マトリックスの示す位置情報をインテグリンなどのレセプターを介して細胞内に伝達して応答していると考えられた。

細胞外マトリックスの主要な構成蛋白の一つであるビトロネクチンは、様々なprotease inhibitorと結合し、その活性を調節していることが知られている。細胞外マトリックス中のビトロネクチンはインテグリン $\alpha v \beta 5$ を介して線維芽細胞により分解されることから、インテグリン $\alpha v \beta 5$ により細胞外マトリックス中のproteolytic cascadeが制御されている可能性が示唆されている。強皮症皮膚線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞と比較して2倍程度のインテグリン $\beta 5$ を発現しており、細胞表面のインテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現量も、強皮症皮膚線維芽細胞で亢進していた。免疫染色でも、強皮症患者の皮膚線維芽細胞においてインテグリン $\beta 5$ の発現が亢進していた。インテグリン $\beta 5$ を正常皮膚線維芽細胞において一過性に強発現したところ、human $\alpha 2(I)$ collagen promoter activityの亢進が認められた。以上の結果は、強皮症皮膚線維芽細胞におけるインテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現の亢進が、細胞外マトリックスのproteolytic cascadeを調節しているのみでなく、 α -型コラーゲン遺伝子の発現の亢進にも関与している可能性を示唆していると考えられた。

強皮症患者由来線維芽細胞は、健常者由来の細胞に

比し、コラーゲンCOL1A2の発現増加とともに、IL-4R α の発現増加も認められた。一方、デルマトポンチン(DPT)の発現は著明に抑制されていた。健常者線維芽細胞ではDPTを抑制しない濃度のIL-4で、患者線維芽細胞においてDPTの発現を明らかに抑えた。同時にこの濃度で患者線維芽細胞においてCOL1A2の発現を明らかに増加させた。以上より、強皮症患者におけるDPTの発現減少は、IL4-R α の発現増加によることが示唆された。強皮症で見られたIL-4受容体の発現増加は、膠原線維沈着増加の原因の可能性があると考えられた。

汎発性強皮症皮膚線維芽細胞は、正常皮膚線維芽細胞と比較してI型、II型TGF- β 受容体の発現が亢進し、EGFはII型TGF- β 受容体遺伝子発現量、蛋白量を増加させた。

線維化を生じるSScとケロイド由来の線維芽細胞においてプロモーターの同部位におけるDNAと転写因子の結合状態などに違いがあることが明かとなり、線維化を来すSScやケロイドでは、COL1A2遺伝子プロモーターの-155 ~ -173 bp近傍が転写活性の亢進に重要と考えられた。

汎発性強皮症におけるコラーゲン遺伝子発現亢進の機序を明らかにするため、ヒト $\alpha 2(I)$ collagen遺伝子プロモーター領域について解析を行い、同遺伝子プロモーター領域に4つのcis-acting elementが存在し、転写因子Sp1/Sp3が結合することを明らかとした。合成オリゴヌクレオチドを用いて各elementに対するSp1/Sp3結合能、機能について検討し、Sp1/Sp3はGC-boxまたはTCCTCC motifを介して作用し、転写抑制領域(TCCCC領域)はこれらの領域に対するSp1/Sp3の結合を阻害し、この作用によって転写抑制領域はヒト $\alpha 2(I)$ collagen遺伝子転写制御を行っていると考えられた。

TGF- β の血管平滑筋細胞に対する作用としては、増殖抑制、遊走促進、マトリックス産生促進などが知られている。Smad3のTGF- β シグナルに占める機能的意義を明らかにするため、Smad3欠損マウス由来細胞と野生型マウス由来細胞との間でTGF- β に対する反応性を比較した。Smad3がTGF- β の細胞遊走シグナル伝達に抑制的に働いている可能性を示唆した。TGF- β 刺激された細胞におけるアクチンストレスファイバーの形成を検討すると、野生型マウス由来細胞では、刺激後4時間の時点ではほぼ全ての細胞においてアクチンストレスファイバーの出現をみるのに対し、Smad3欠損マウス由来細胞では、TGF- β 刺激によるアクチンストレスファイバーの形成は認められなかった。

臓器線維化においてMCP-1の発現が増強しているこ

とが報告され、強皮症においてもMCP-1の発現が増強している。そこで、ブレオマイシン(BLM)誘導性皮膚硬化モデルを用いてMCP-1の発現を検討した。BLM(1mg/ml)をC3Hマウスに隔日で4週間反復投与し、各週においてMCP-1の発現を蛋白、mRNAレベルで検討した。免疫染色では硬化病変部において浸潤する単核球、線維芽細胞に陽性所見を認めた。病変部組織よりtotal RNAを抽出し、RT-PCR法での検討では2-3週にmRNAの発現のピークを認めた。MCP-1のレセプターであるCCR-2の発現も硬化の誘導に伴い亢進してみられた。以上より、BLMによる皮膚硬化の誘導においてMCP-1は重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

強皮症の患者血清中の可溶性TNFRp55については、皮膚硬化の重症度や内臓病変、皮膚症状、他の検査値との相関は明らかではない。そこで、強皮症患者血清中の可溶性TNFRp55をELISA法を用いて測定し、発症年齢やBarnettのtype、skin score (Modified Rodnan Total Skin Thickness Score:TSS)等の臨床所見、肺線維症などの内臓病変、各種皮膚症状、およびP- \cdot -Pなどの検査値と可溶性TNFRp55の測定値間の相関性について統計的に解析した。その結果、可溶性TNFRp55測定値は、Barnettのtype \cdot の患者群において正常およびtype \cdot の患者群に比較して有意な上昇を認め、またskin score (TSS)、P- \cdot -P、血清 $\beta 2$ microglobulin、immunoglobulin Gの値および手指爪上皮出血と相関を示した。

自己抗体の高感度検出法の開発

抗RNAポリメラーゼ(RNAP) I/III抗体は強皮症に特異性がきわめて高く、皮膚硬化が急速に進行して強皮症腎を高頻度に伴うdiffuse型に高頻度に検出されることから、強皮症の診断、病型分類、治療方針の決定に際してきわめて有用な自己抗体である。しかし、煩雑な免疫沈降法が唯一の検出法であるため、一般診療の場では普及していない。RNAP IIIのサブユニットのひとつであるRPC155のアミノ酸残基(AA)732-1166番に強皮症患者血清中の抗RNAP I/III抗体により認識される主要なエピトープが存在することが明らかにした。リコンビナント断片を作成し、抗RNAP I/III抗体陽性血清との反応性を免疫ブロット法により調べた。その結果、RPC155のAA891-1020が抗RNAP I/III抗体により共通して認識されるエピトープの最小領域であることが明らかとなった。しかし、この領域の抗体との強い結合にはさらに約60個のC末端側のアミノ酸配列が必要であったことから、強皮症患者血清中の抗RNAP I/III抗体はRPC155分子上の高次構造を認識すると考えられた。RPC155の主要なエピトー

ブ部分を含むリコンビナント蛋白を抗原として用いた ELISA では、従来の免疫沈降法により抗RNAP I/III 抗体が陽性の血清は全て高値を示したが、抗RNAP I/III 抗体陰性の強皮症患者、全身性エリテマトーデス患者、健康人の血清ではいずれも低値であった。したがって、RPC155上の主要なエピトープを用いたELISA は感度、特異性ともに高い簡便な抗RNAP I/III 抗体のスクリーニング法と考えられた。

治療法の開発

Interferon (IFN) γ および IFN α がコラーゲン発現に対して抑制的にはたらくことが報告されていたが、その作用機序については十分に解明されていなかった。初代培養皮膚線維芽細胞を用いて、 $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子 (COL1A2) の基礎転写および TGF- β による転写促進に対する IFN γ と IFN α の抑制効果を、トランスフェクション法により解析した。その結果、IFN γ と IFN α は COL1A2 プロモーター上の TGF- β - responsive element に結合する Smad3 と拮抗して COL1A2 転写を抑制し、その作用は p300 依存性であった。IFN α の細胞内シグナルが COL1A2 転写を抑制することが明らかになった。線維化治療として IFN α は有効と考えられた。

TNF Rp55-/- マウスにブレ オマイシンを皮下投与することで野生型に比べ早期に著しい皮膚硬化を来すこと、さらに TNFRp55 を介したシグナルが細胞外マトリックス分解系において重要な役割を担っている可能性を示した。上記現象が *in vitro* でも再現できることを確認し、TNF α の発現を促進させることにより線維化を抑制する可能性を見出した。

マウスにブレイマイシン (BML) を投与すると同時に HGF-リポソーム (HGF-liposome) を筋肉に投与することにより皮膚硬化の誘導を抑制することを見出し、また BLM を皮下投与によりすでに誘導された皮膚硬化モデルマウスに HGF-liposome を筋肉内に投与して真皮の肥厚、コラーゲン量ともに減少することを確認した。HGF-liposome を投与することにより皮膚の TGF- β 1 蛋白量、mRNA 発現量ともに抑制された。以上のことより、HGF-liposome の筋肉内投与による強皮症の遺伝子治療の可能性が示唆された。

D. 結論

他の臓器線維症を含めた病因病態との関連および治療の開発が重要である。

強皮症に関する臨床調査個人票の有用性の検討

分担研究者 森 満 （札幌医科大学公衆衛生学 教授）

研究要旨： 特定疾患治療研究事業で医療費の公費負担を受けている強皮症患者の臨床調査個人票の有効利用法を検討した。具体的には、平成11年度に公費負担を受けた者の臨床調査個人票をデータ化した電子ファイルを用いて、統計解析を試みた。対象は平成10年と平成11年に臨床調査個人票が記載された症例で、解析は基本的属性を調べ、記載項目ごとのクロス集計を行った。その結果、疾患の男女比、年齢階級別度数分布のほか、推定罹病期間と推定発症年齢を知ることができた。また、クロス集計ではクラメルの関連係数を用いて性別、自他覚症状、臨床検査所見の関連性を検討することができた。これらの解析結果により、臨床調査個人票は疾患の基本的属性と特徴を多数例より検索でき、その有用性が示された。

A. 研究目的

特定疾患治療研究事業の対象疾患では、臨床調査個人票に症例の基本的属性及び臨床検査所見等が記載されている。この臨床調査個人票の有効利用を図る目的で、強皮症の記載項目の統計解析を継続している。昨年度は都道府県別罹患数、性別及び年齢階級別罹患数を調べた。その後、症例数の登録作業が進み、平成13年度は多数例を用いての解析となり、今後解析結果の有効利用が期待される。

B. 研究方法

平成11年度に医療費の公費負担を受けた強皮症11,381例の臨床調査個人票情報をデータ化した電子ファイルを用いた。この登録された症例の内、平成10年と平成11年に臨床調査個人票が記載された症例を選び、10,956例を統計解析対象とした。

統計解析では、男女別に年齢階級別度数分布を調べて、その度数の比を求めた。また、臨床調査個人票には発症年月の記載項目もあるので、今回の臨床調査個人票が記載された年月より推定罹病期間を計算して、推定発症年齢を求めてみた。さらに、クロス集計も行い、性別、自他覚症状、検査成績の関連性を調べ、その関連の強さをクラメルの関連係数を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

データファイルの管理は厳重に行い、解析時には、個人情報に関するデータは用いなかった。

C. 研究 結果と考案

1 年齢階級別男女比

全体の性比（女性／男性）は7.3であるが、年齢階級によって違いがみられた。特に30歳未満では値が低かった。このことは病因に対する性別の反応性が、年齢階級で違いがあることを示している可能性がある。

2 男女別推定罹病期間

平均約8～11年の罹病期間と推定できた。すなわち、発症してから最新の臨床調査個人票記載時までの期間は男性で約8年、女性で約10～11年であることがわかる。また、中央値を参考にすると男性の50%が7年以内の経過であり、女性の50%が9年以内の経過であることがわかる。診断治療に変化が生じた時にこれらの値が、どのように推移していくのか今後注目される。

3 男女別推定発症年齢分布

女性では発症が増加してくる年齢は35歳代からであり、男性ではやや遅れて40歳代からであると考えられる。

4 年齢階級別レイノー現象出現率

20歳以上で高い出現率を示し、特に40歳以上80歳未満では90%以上であった。レイノー現象は他の膠原病の可能性も含めて、強皮症でも比較的早期より出現するので、診断に至るまでの重要な所見であると思われる。

5 男女別の自他覚症状と臨床検査成績項目での「あり」の割合

男性の割合が女性より多かった項目は、自覚症状では呼吸困難であり、臨床検査所見では肺線維症、高血圧、悪性腫瘍であった。

6 関連係数0.25以上を示す自覚症状と臨床検査成績の組み合わせ

自覚症状の嚥下障害と臨床検査所見の食道機能異常、呼吸困難と肺線維症の関連係数は0.5以上と大きく十分に了解できる。さらに、消化器症状では嚥下障害と便秘異常も関連が強い。また、嚥下障害と呼吸困難も関連を持つ。自己抗体では抗Topo-(I)抗体が肺線維症と関連を持ち、かつ抗セントロメア抗体とは相反する関連を持つことがわかった。

7 自己抗体(抗Topo-I抗体, 抗セントロメア抗体)の保有と肺機能検査成績結果の割合

%VCとDLCOは抗セントロメア抗体のみ陽性例が、抗Topo-I抗体のみ陽性例や両者とも陽性例より肺機能低下例が少ない傾向にあるが、数値の記載のない症例が多いので今後とも検討の必要がある。

D. 結論

強皮症では、臨床調査個人票の基本的属性を調べ、記載項目を適切に組み合わせクロス表を検討することにより、当該疾患についての有用な情報を得ることが可能であると判断された。

分光画像技術による強皮症の評価

分担研究者：新海 宏 千葉大学医学部 皮膚科 教授

研究要旨： 生体の末梢循環を評価する目的で皮膚の酸素代謝を計測する4波長分光画像装置を開発した。この装置は、CCDカメラを用いて生体皮膚内部からの拡散反射光を検出し皮膚中のメラニン、酸素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビンの分布を画像化する。本報告では、強皮症患者の患部である掌の末梢循環を冷却負荷（10℃、30秒）を行い評価した結果について報告する。ヘモグロビン分布画像から強皮症患者の中指先は血流が低く、冷却負荷に対しての血管機能不全が示唆された。このことより、この分光画像装置が強皮症患者のヘモグロビン酸素代謝を評価するのに有効であると思われた。

A. 研究目的

CCDカメラを用いて、生体皮膚中の色素であるメラニン、酸素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビンの分布を画像化する研究が進められている。

可視から近赤外領域の光が生体中の水、タンパク質や骨に吸収されることなく、表皮に存在するメラニン、真皮に存在する血液中の酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンに強く吸収される性質を利用するものである。生体皮膚に光を照射し、皮膚内部より拡散反射してきた光を可視光領域の4波長に分光してCCDカメラで画像検出後、この4波長の画像間演算により、メラニン、酸素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビンの分布画像を算出する。この技術は、末梢循環の状態を画像で得られる新しい技術として注目されている。

今回、強皮症患者（SSc）の掌における末梢血液循環を評価する目的で、片方の掌に冷却負荷を施し、その後の血流変化を分光画像技術により観察した。

B. 研究方法

1. 対象

千葉大学医学部附属病院皮膚科外来に通院中SSc患者8例（男女比 1:7、平均年齢 55 ± 3.84 ）と健常人ボランティア10例（男女比 1:9、平均年齢 56 ± 7.78 ）を対象に測定を行なった。

2. 測定プロトコール

測定部位は患部である両掌を測定した。測定部屋は室温約25℃に設定し、座位の姿勢で、発砲スチロール製の手固定台の上に、両掌を上に向けて置いて測定した。両手の高さがほぼ心臓の高さに調節した。被験者は約5～10分の安静ののち、分光画像装置の連続測定を開始した。最初の2分30秒間は安静測定を

行った後、被験者の左掌を10℃に冷却したアルミ金属製プレートの上に30秒間密着させた。負荷30秒後、元の場所に戻し測定を続けた。画像測定間隔は、負荷を戻した直後は約3秒、それ以外は15秒～30秒間隔で測定をおこなった。

（倫理面への配慮）

説明を行い、協力を得た患者に施行した。データファイルの管理は厳重に行い、解析時には、個人情報に関するデータは用いなかった。

C. 結果と考察

1. 安静時のoxyHb分布画像

冷却負荷を実施する前の安静時の健常者は10例全ての方が指先のoxyHbが一番多くなっていた。一方、SSc患者は8例中2例に指先の虚血が認められ、8例中2例で全体のoxyHbが多い人が認められた。

2. 総ヘモグロビンの変化

健常者1例とSSc患者1例の冷却負荷中の総ヘモグロビン（oxyHbとdeoxyHbの和、以下略totalHb）。データを抽出した領域は、左手と右手の各中指、薬指、掌中央の3箇所である。冷却30秒後の左手の3領域は、速やかにtotalHbが回復してくる。これは、健常者、SSc患者共に見られた。冷却をしていない右手は、健常者では冷却中にtotalHbが安静時と変化が認められないかまたは上昇する。一方、SSc患者は8例全例において、冷却中にtotalHbが減少することが認められた。このことは、SSc患者は対側の手の温度低下を回復させる機能がうまくいっていない事を示唆している。健常者とSScの冷却していない右手中指の冷却前後のtotalHb変化が健常者は平均 -10.83 ± 10.00 、SSc患者は平均 -29.47 ± 14.08 で、SSc患者の方が、対側

のtotalHb減少が大きかったことを示している。このように、10℃で30秒という軽い冷却負荷による皮膚組織の血液分布を鋭敏に検出することができ、この分光画像装置の有効性が確認できた。このように分光画像技術は、非接触・非侵襲な安全でかつ短時間に画像情報を取得できる装置であり、SSc患者の酸素代謝の評価、薬効評価に有用ではないかと考えている。今後は、従来装置であるサーモグラフィー、ドップラー血流計との比較データを蓄積して、有効性を確かめていきたい。

D. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示

抗RNAポリメラーゼI/III抗体検出のためのELISAの開発

分担研究者 桑名 正隆 慶応義塾大学医学部 先端医科学専任講師

研究要旨：抗RNAポリメラーゼ（RNAP）I/III抗体は強皮症に特異性がきわめて高く、皮膚硬化が急速に進行して強皮症腎を高頻度に伴うdiffuse型に高頻度に検出されることから、強皮症の診断、病型分類、治療方針の決定に際してきわめて有用な自己抗体である。しかし、煩雑な免疫沈降法が唯一の検出法であるため、一般診療の場では普及していないのが現状である。我々はRNAP IIIのサブユニットのひとつであるRPC155のアミノ酸残基（AA）732-1166番に強皮症患者血清中の抗RNAP I/III抗体により認識される主要なエピトープが存在することが明らかにした。さらに詳細にAA732-1166に含まれるエピトープ領域を調べため、AA732-1166のNおよびC末端から短くした12のリコンビナント断片を作成し、抗RNAP I/III抗体陽性血清との反応性を免疫ブロット法により調べた。その結果、RPC155のAA891-1020が抗RNAP I/III抗体により共通して認識されるエピトープの最小領域であることが明らかとなった。しかし、この領域の抗体との強い結合にはさらに約60個のC末端側のアミノ酸配列が必要であったことから、強皮症患者血清中の抗RNAP I/III抗体はRPC155分子上の高次構造を認識すると考えられた。さらにRPC155の主要なエピトープ部分を含むリコンビナント蛋白を抗原として用いたELISAでは、従来の免疫沈降法により抗RNAP I/III抗体が陽性の血清は全て高値を示したが、抗RNAP I/III抗体陰性の強皮症患者、全身性エリテマトーデス患者、健常人の血清ではいずれも低値であった。したがって、RPC155上の主要なエピトープを用いたELISAは感度、特異性ともに高い簡便な抗RNAP I/III抗体のスクリーニング法と考えられた。

A. 研究目的

強皮症患者血清中にはトポイソメラーゼIやセントロメアなど重要な生物活性を持つ核蛋白に対する自己抗体が高頻度に検出される。これら自己抗体は強皮症に特異的であることから、その診断に用いられている。強皮症患者血清中にはRNAP IとRNAP IIIを同時に認識する抗体（抗RNAP I/III抗体）が検出され、抗RNAP I/III抗体は強皮症に特異性がきわめて高く、急速に皮膚硬化が進行するdiffuse型に高頻度に検出される。特に、同抗体陽性例は強皮症腎を高率に併発し、適切な治療が行われなときわめて予後が悪い。日本人強皮症患者における抗RNAP I/III抗体の陽性頻度は約5%と少ないが、欧米白人強皮症患者での頻度は20%を越える。したがって、抗RNAP I/III抗体は強皮症の診断、病型分類、治療方針の決定に際してきわめて有用な自己抗体である。しかし、現時点では大量のアイソトープと培養細胞を用いる煩雑な免疫沈降法が抗RNAP I/III抗体を検出する唯一の方法である。そのため、一般検査室での抗RNAP I/III抗体の検出は困難であり、臨床的に有用なマーカーであるにもかかわらず、普及していないのが現状である。

したがって、抗RNAP I/III抗体により高頻度に認識されるエピトープを含むサブユニットが同定され

ば、そのサブユニットを分子生物学的手法を用いて大量に発現させ、酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA）などのsolid-phase assayの抗原として利用できる。エピトープ部分をさらに詳細に解析し、主要なエピトープを含むリコンビナント蛋白を抗原として用いた抗RNAP I/III抗体のELISAを確立することを目的とした。

B. 研究方法

対象 強皮症患者105例を対象とした。このうち16例は免疫沈降法で抗RNAP I/III抗体陽性であった。コントロールとして全身性エリテマトーデス（SLE）61例、健常人61例の血清を用いた。

免疫沈降法 35Sメチオニン（TRAN35S-LABEL; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA）で標識したHeLa細胞の可溶性細胞抽出物を抗原とした免疫沈降法を行った。RNAP Iの高分子サブユニット（190-kDa蛋白と126-kDa蛋白）とRNAP IIIの高分子サブユニット（155-kDa蛋白と138-kDa蛋白）をすべて沈降した血清を抗RNAP I/III抗体陽性とした。

RPC155をコードするcDNAの分離 RPC155のcDNAの塩基配列（accession no. NM_007055）をもとに特異的

なプライマーを合成した。ヒト白血病細胞株 K562 の mRNA から逆転写反応により得られた一本鎖 cDNA をテンプレートとした PCR により、RPC155-C (RPC155 のアミノ酸残基 [AA] 732-1166 番) をコードする cDNA を増幅した。また、RPC155-C の cDNA をテンプレートとした PCR により、計 12 種類の RPC155-C の部分断片をコードする cDNA を増幅した。

RPC155 のリコンビナント断片の発現 RPC155-C あるいはその部分断片をコードする cDNA を蛋白発現ベクター pMAL-c2 の MalE 遺伝子の下流にフレームを合わせてサブクローニングした。リコンビナント蛋白を maltose-binding protein (MBP) との融合蛋白として発現させた。一部の試験では、大腸菌で発現させたリコンビナント蛋白をアミロースレジンを用いて精製した。

免疫ブロット法 RPC155-C のリコンビナント断片を発現した大腸菌成分を 10% ポリアクリルアミド-SDS ゲル電気泳動で分画し、ニトロセルロース膜に電気的に転写した。

C. 結果と考察

RPC155-C 上の主要なエпитープ領域の同定 RPC155-N および C 末端から短くした C1-C5 の 5 つのリコンビナント断片を新たに PCR 法により作成した。抗 RNAP I/III 抗体陽性 11 血清との反応性を免疫ブロット法により検討すると、全ての血清は C3 と C4 を認識したが、C1、C2、C5 とは反応しなかった。さらに C3 と C4 の共通部分をコードする C-a から C-g までの 7 つのリコンビナント断片を作成し、同様に抗 RNAP I/III 抗体陽性 11 血清との反応性を調べた。抗 RNAP I/III 抗体陽性 11 血清はすべて C-c および C-g と反応したが、他のリコンビナント断片は認識しなかった。C-c のコードする RPC155 の AA891-1020 が強皮症患者血清中の抗 RNAP I/III 抗体により共通して認識されるエпитープの最小領域であることが明らかとなった。ただし、一部の血清で C-c に対する反応性が C-g に対する反応性に比べて非常に弱かったため、患者血清中の抗体との強い結合には C-c 部分に加えて C-g に余分に含まれるアミノ酸部分も必要ことが推測された。さらに、この領域に存在するエпитープが抗 RNAP I/III 抗体陽性血清に特異的であることを確認するため、検体数を増やして免疫ブロット法による C-g に対する反応性を検討した。その結果、C-g に対する反応性は抗 RNAP I/III 抗体陽性強皮症 16 例全例で検出されたが、抗 RNAP I/III 抗体陰性強皮症 55 例、健常人 26 例では検出されなかった。

C-c から C 末端の 13 アミノ酸を欠損した C-b は全く反応性を有さないことから、AA1008-1020 が抗体との結合に必須と考えられる。しかしながら、AA1008-1020 を含む C-d (AA950-1080)、C-e (AA961-1080)、C-f (AA1004-1080) は抗体と結合しないことから、AA1008-1020 に加えて AA891-950 部分も抗体の認識に必要と考えられる。これらの成績は、患者血清中の抗 RNAP I/III 抗体は連続したアミノ酸配列 (linear epitope) ではなく、ある程度の長さの配列により構成される高次構造 (discontinuous or conformational epitope) を認識する可能性が高い。これらリコンビナント蛋白は 2-メルカプトエタノール存在下での SDS-PAGE 後にも抗原性を有していたことから、エピトープは還元状態でも残存する高次構造であることが推測される。AA891-1020 には親水性および疎水性のアミノ酸領域が交互に出現することから α helix 構造をとっていると考えられ、表面に露出している不連続のアミノ酸残基によってエピトープが構成されている可能性が考えられた。この点は強皮症患者に特異的な他の自己抗体である抗トポイソメラーゼ I 抗体により認識される主要なエピトープが高次構造により構成されていることとも一致する。

抗 RNAP 抗体検出のための ELISA 法の確立

抗 RNAP I/III 抗体の検出には C-c よりも C-g の方が適していると判断した。そこで、C-g を大腸菌で発現させた後にアフィニティークラムにより精製し、ELISA の抗原として用いた。従来の免疫沈降法により抗 RNAP I/III 抗体が陽性の血清は全て抗 C-g 抗体高値を示したが、抗 RNAP I/III 抗体陰性の強皮症血清、コントロールとして用いた SLE 患者血清、健常人血清では C-g に対する反応性はいずれも低値であった。健常人の平均 $+5 \times$ 標準偏差である 4.15 ユニットをカットオフとすると、抗 C-g 抗体の陽性頻度は抗 RNAP I/III 抗体陽性例で 100%、他では 0% となり、C-g を用いた ELISA は感度、特異性ともに 100% のきわめて優れた抗 RNAP I/III 抗体の検出法であることが明らかとなった。したがって、本検出法は大量の検体を簡便にスクリーニングできる利点を有することから、一般診療における強皮症の診断にきわめて有用と考えられる。強皮症腎を併発した際には、早期に ACE 阻害薬による治療を開始することで、生命予後の著明な改善が得られている。したがって、本抗体の簡便な検出法が普及すれば、強皮症腎の早期発見、早期治療が可能となり、強皮症患者の予後の改善にも貢献するものと思われる。

D. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示
2. 学会発表

抗Th/To抗体のRNaseP構成蛋白に対する反応の多様性. 第45回日本リウマチ学会総会(東京). 2001. 5.

強皮症(SSc)線維芽細胞における自己抗原PHETの発現レベルの検討. 第45回日本リウマチ学会総会(東京). 2001. 5.

Differences in anti-Th/To autoantibody response between systemic sclerosis and other autoimmune diseases. The 65th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Francisco). 2001. 11.

E. 知的財産権の出願

1. 特許取得 申請中

血清 IL-12 レベル高値検出強皮症患者群の臨床像の解析と意義

分担研究者 前川嘉洋 国立熊本病院 皮膚科医長

研究要旨：IL-12は免疫応答におけるTh1およびTh2システム間のバランスを制御する重要な役割を担っていると現在認識されている。本研究の目的は、IL-12を含む炎症性サイトカインの血清レベルを測定し、全身性強皮症の患者の病態および臨床像におけるこれらサイトカインの関与を調べることである。ACRの診断基準を満たす総計37名の強皮症患者（dcSSc 27名、lcSSc10名）から採取した血清をELISA法を用いて解析した。SLE（n=6）患者および健常者コントロール（n=41）血清と比較して、強皮症患者血清（n=37）は有意に高いレベルを示した。とくにdcSSc患者はlcSSc患者に比べより高い血清IL-12レベルを呈した。これらの血清IL-12レベルの上昇は、IL-6、IL-8、TNF α やIFN γ などの炎症性サイトカインの血清レベルとは相関を示さなかった。RT-PCR解析の結果、IL-12p40のmRNAは強皮症患者および健常者コントロール生検皮膚組織いずれにも発現していた。IL-12の高い血清レベル(350pg/ml以上)を示す患者では、指尖部潰瘍形成との有意な相関が認められたほか（ $p<0.05$ ）、血沈やCRPなどの非特異的炎症パラメータ、レイノー現象などの末梢循環不全、食道症状が出現しやすい傾向がみられた。以上の結果より、皮膚硬化や虚血変化にIL-12が関与する可能性が示唆され、今後、全身性強皮症の病態や予後を含む臨床像におけるIL-12の役割を明らかにし、治療的アプローチを模索する必要がある

A. 研究目的

全身性強皮症の皮膚線維化のメカニズムとして、TGF- β やCTGFなどのサイトカインを介した二段階線維化仮説が考えられているが、その病因・病態は未だ不明な点が多い。

一方、インターロイキン12（IL-12）は、樹状細胞、単球・マクロファージやB細胞から産生される分子量70kDaのリンホカインであり、免疫細胞反応のTh1/Th2バランスをTh1系にシフトさせるメディエーターとして、とくにTh1/Th2サイトカイン産生バランスの観点からも重要な制御因子であると考えられる。免疫系のTh1/Th2バランスの概念をそのまま膠原病に応用できるか否かは議論の多いところであるが、強皮症患者の病態をIL-12の観点から調べた報告は少ない。前回、強皮症の一部に血清IL-12レベルの高値を示す患者群が存在することを報告した。

そこで今回、患者血清検体数を増やすとともに、より高感度のELISAキットを用いて病型別強皮症病態の背景因子としてのIL-12を含む炎症性サイトカイン血清レベルを測定し、また通常法による皮膚生検標本を用いて皮膚組織局所におけるこれらサイトカイン産生環境を調べた。

B. 研究方法

1. 患者と血清・検体

国立熊本病院皮膚科および熊本大学附属病院第二内科外来に通院中の、SSc患者37名（dcSSc:27名；lcSSc:10名）、SLE患者6名および健常者41名より末梢血を採取した。なお、皮膚生検を併行し得た患者については、皮膚局所のサイトカインmRNA発現を調べるために皮膚組織の一部を直ちに凍結保存した。

2. 臨床評価

臨床評価は、年齢、性別、罹病期間、レイノー症状、指尖部癒痕・潰瘍、舌小帯短縮、手指拘縮、色素沈着、毛細血管拡張、石灰沈着、各臓器障害：食道（蠕動低下）；肺（X線またはHRCTによる肺線維化）；肺機能（%DLco低下、%VC低下）；心臓（心嚢液貯留など心エコー異常または心電図異常）；腎臓（尿所見異常または血清Cr値異常）；関節（関節痛）；骨格筋（筋力低下または血清CK値上昇）に関して陽性率を求めた。

3. ELISA法による血清中の各種サイトカイン濃度の測定

血清中のIL-1ra、IL-6、IL-10、IL-12、IFN γ 、TNF α 、TGF β 、bFGFの各サイトカイン濃度をELISAキッ

トを用いて測定した。

4. RT-PCR法による皮膚局所の炎症性サイトカイン mRNA 発現解析

皮膚局所のサイトカイン mRNA 発現を調べるために生検皮膚組織の一部を直ちに凍結保存したのち、RNA を抽出した。さらに cDNA を作製後、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、TGF β などの各サイトカインのセンスおよびアンチセンスプライマーセットを用いて PCR 法によりサイトカイン mRNA の検出を試みた。

5. 統計処理

各患者群の血清サイトカイン値の比較には Mann-Whitney U test を用いて検討した。

臨床所見の患者群間陽性率の比較は Fisher's exact probability test を用いて検討した。P 値の判定は $p < 0.05$ を有意とした。

C. 結果

1. ELISA法による血清中の炎症性サイトカインの定量および病型間比較

健常者群 (n=41) および全身性エリテマトーデス (SLE, n=6) に比べ、強皮症患者において血清 IL-12 が有意に高いレベルを示すを見出した ($p < 0.05$)。また dcSSc 群では、健常者コントロール群との間により有意な差が認められた ($p < 0.005$)。dcSSc および lcSSc の病型間には IL-12 の血清レベルに有意な差はなかったが、全体的に dcSSc においてより高い血清レベルを呈する例が多かった。一方、これら血清 IL-12 検出 SSc 患者群において、他の炎症性サイトカイン血清レベルとの統計上の有意な相関は得られなかった。また、特異性は低いものの従来より SSc 患者で高いとされていた IL-6、IL-1ra、IL-8 や TNF α などの各炎症性サイトカインは、確かに健常者コントロールに比べ高い傾向を呈したが、lcSSc 群の IL-1ra 血清レベルを除き、統計上の有意差は見られなかった。他方、IL-12 で誘導される Th1 系列のサイトカインである IFN γ の産生は少なくとも、SSc 患者の血清レベルでは相関しなかった。

2. 血清 IL-12 レベル高値検出 SSc 患者群の臨床像の解析

血清中に IL-12 がコントロールよりも有意に高いレベル (>350 pg/mL) で検出される強皮症患者の一部 (血清 IL-12 高値群, n=9) がどのような臨床的特徴を示すのかを調べた。その結果、抗トポイソメラーゼ I 抗体や抗セントロメア抗体などの特異抗体の陽性率には差がなく、CRP や血沈など非特異的な陽性炎症性

指標の頻度が高い傾向がみられた。またレイノー現象、指尖部潰瘍瘢痕、毛細血管拡張などの症状の陽性率が高く、罹患臓器としては、食道、肺、関節所見に高い陽性率が認められた。しかしながら、今回の調査では血清 IL-12 検出患者群と未検出患者群の間での陽性率の比較を Fisher's exact probability test を用いて行った結果、統計学上では指尖部潰瘍瘢痕のみ血清 IL-12 検出 SSc 患者群において有意に高い陽性率を示した ($p < 0.005$)。

3. SSc 患者皮膚生検組織における炎症性サイトカイン mRNA 発現解析

診断時における SSc 患者皮膚生検組織における各種サイトカインの mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検討した。通常法による皮膚生検標本を用いた場合、 β -actin に比べ GAPDH の検出がより安定しており、コントロール mRNA として適当であった。IL-12p40 に対するプライマーを用いて測定した結果、新規発症 SSc 患者 8 症例において IL-12 mRNA の発現がより強く認められたが、一方、正常皮膚 3 例においても検出された。そのほか SSc では IL-6、IL-8、TGF β の各 mRNA 発現がみられた。TGF β の mRNA は正常皮膚でも認められたが、SSc においてより強く発現していた。

D. 考察

強皮症患者において血清 IL-12 レベルが SLE や健常者コントロールに比較して有意に高い。活性化 T 細胞により発現される CD40 L 分子が、主にマクロファージなどの CD40 陽性細胞にシグナルを伝えることから IL-12 産生が誘導される。さらに産生された IL-12 は T ナイーブ細胞に作用し、IFN γ や IL-2 を産生するようになる Th1 系への分化をシフトさせたり、NK 細胞を活性化させることが知られ、細胞性免疫が主病態の膠原病と考えられる慢性関節リウマチにおいても血清レベルが高い。

強皮症患者の Th1/Th2 バランスについては Th2 系優位な免疫系の制御も報告されているが、Th1 系サイトカインの関与も指摘されている。また、末梢血単核細胞 (PBMC) による IL-12 産生能も SSc 患者において有意に高値を呈したことから、患者血清 IL-12 の産生細胞が PBMC 中の単球であることも示唆されている。初診症例の通常生検皮膚標本を用いて、他の炎症性サイトカイン mRNA に加えて、IL-12 mRNA が発現していることを見出した。これら皮膚局所での IL-12 産生と血清中の IL-12 が強皮症病態に及ぼす生物学的作用の特異性や異同については、活性型 IL-12p70 を測定するなど現在検討中であり、今後の研究の課題のひとつであると考えられる。

血清IL-12値がコントロールに比べ有意に高いレベルを示すSSc患者群の臨床像を解析した結果、指尖部潰瘍瘻痕の陽性率が統計上有意に高いなど末梢循環不全病態と関連性が高いことを見出した。また、SSc患者皮膚生検組織のRT-PCR法を用いたサイトカインmRNA発現解析により、局所においても、IL-12が産生されている可能性を明らかにした。IL-12が、TGF β などの血管新生作用を有するサイトカイン環境を抑制的に制御している可能性がすでに指摘されていることから、指尖部潰瘍形成後の組織修復/再生段階における血管新生機能不全状態の表現としての陥凹型瘻痕が形成されやすい。

また最近、強皮症の動物モデルのひとつとされるtight-skinマウスにIL-12をコードしたプラスミドを投与すると皮膚のコラーゲン蓄積を抑えられるなど、IL-12の強皮症病態に対する治療効果を期待する報告もあり、IL-12産生誘導制御を利用した新しい強皮症治療への方策につながる可能性が期待される。

汎発性強皮症皮膚線維芽細胞におけるインテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現レベルと
その意義についての検討

分担研究者 尹 浩信 東京大学医学部 皮膚科講師

研究要旨： 汎発性強皮症皮膚線維芽細胞では主要なコラーゲン受容体であるインテグリン $\alpha 1 \beta 1$ と $\alpha 2 \beta 1$ の発現が減少しており、この異常が汎発性強皮症皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン遺伝子の発現亢進に関与している可能性が示唆されているが、その他のインテグリンの発現に関する検討はこれまでにない。細胞外マトリックスの主要な構成蛋白の一つであるビトロネクチンは、様々なprotease inhibitorと結合し、その活性を調節していることが知られている。細胞外マトリックス中のビトロネクチンはインテグリン $\alpha v \beta 5$ を介して線維芽細胞により分解されることから、インテグリン $\alpha v \beta 5$ により細胞外マトリックス中のproteolytic cascadeが制御されている可能性が示唆されている。本研究では強皮症皮膚線維芽細胞のインテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現レベルとその意義について検討した。強皮症皮膚線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞と比較して2倍程度のインテグリン $\beta 5$ を発現しており、細胞表面のインテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現量も、強皮症皮膚線維芽細胞で亢進していた。Actinomycin Dを用いてインテグリン $\beta 5$ のmessage stabilityについて検討したところ、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞の半減期には有意差は認められなかった。免疫染色では、強皮症患者の皮膚線維芽細胞においてインテグリン $\beta 5$ の発現が亢進していた。インテグリン $\beta 5$ を正常皮膚線維芽細胞において一過性に強発現したところ、human $\alpha 2(I)$ collagen promoter activityの亢進が認められた。以上の結果は、強皮症皮膚線維芽細胞におけるインテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現の亢進が、細胞外マトリックスのproteolytic cascadeを調節しているのみでなく、I型コラーゲン遺伝子の発現の亢進にも関与している可能性を示唆していると考えられた。

A. 研究目的

インテグリンは、細胞間および細胞-細胞外マトリックス間の接着過程において重要な役割を果たす分子であり、近年の研究により、細胞の増殖や分化、形態形成、組織修復など広範な現象において重要な機能を担うことが分かってきている。強皮症皮膚線維芽細胞においても、これまでにインテグリンの発現量の異常について多くの報告があるが、これらの過去の報告では、type I collagen受容体であるインテグリン $\alpha 1 \beta 1$ および $\alpha 2 \beta 1$ の発現量の異常にのみ焦点が当てられてきた。

正常皮膚線維芽細胞において、インテグリン $\alpha 1 \beta 1$ は、type I collagen 遺伝子の発現抑制に関与し、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ はcollagenaseの発現亢進に関与していることが知られている。強皮症皮膚線維芽細胞ではこれらのコラーゲン受容体の発現が減少しており、その結果、type I collagen metabolismのnegative feedback機構が破綻していると考えられている。しかしながら、強皮症皮膚線維芽細胞において、integrin $\alpha 1 \beta 1$ と $\alpha 2 \beta 1$ の発現量の異常はないとした報告もあり、コラーゲン受容体の発現量について

は未だ一定した見解は未だ得られていない。

今回我々が注目した、インテグリン $\alpha v \beta 5$ は細胞外マトリックス中のビトロネクチンをligandとしており、創傷治癒の過程で、表皮細胞の遊走に重要な役割を果たしていると考えられている。インテグリン $\alpha v \beta 5$ は線維芽細胞にも発現しており、線維芽細胞はインテグリン $\alpha v \beta 5$ を介したendocytosisにより細胞外マトリックス中のvitronectinを分解することが知られている。また、細胞外マトリックス中のvitronectinはplasminogen activator inhibitor-type 1をはじめ、幾つかのprotease inhibitorと結合し、その活性を調節する機能をもっていることが報告されている。以上より、線維芽細胞に発現しているインテグリン $\alpha v \beta 5$ は、細胞外マトリックス中のvitronectinの分解を制御する事により、各種protease inhibitorの活性をも制御し、細胞周囲のproteolytic cascadeを調節している可能性が考えられている。しかしながら、線維化を主徴とする疾患において、インテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現異常に関する報告はこれまでない。

そこで、今回我々は強皮症皮膚線維芽細胞における

インテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現レベルとその意義について検討した。

B. 研究方法

正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞における integrin $\alpha v \beta 5$ の発現量

正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞の integrin $\beta 5$ subunit の発現量について、whole cell lysate を用いた immunoblotting にて検討した。細胞表面での integrin $\alpha v \beta 5$ receptor の発現量を検討するため、細胞表面に発現している蛋白を biotin でラベルし、integrin $\beta 5$ subunit に対する抗体を用いて免疫沈降法を行った。

正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞の integrin $\beta 5$ subunit 遺伝子の発現量

integrin $\beta 5$ subunit 遺伝子の発現量について、Northern blot 法を用いて検討した。

C. 結果

正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞における integrin $\alpha v \beta 5$ の発現量

正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞の integrin $\beta 5$ subunit の発現量について、whole cell lysate を用いた immunoblotting にて検討した。 β -actin にて補正したところ、強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞と比較して、integrin $\beta 5$ subunit の発現が約3倍に亢進していた。次に、細胞表面での integrin $\alpha v \beta 5$ receptor の発現量を検討するため、細胞表面に発現している蛋白を biotin でラベルし、integrin $\beta 5$ subunit に対する抗体を用いて免疫沈降法を行った。強皮症皮膚線維芽細胞では正常皮膚線維芽細胞に比べて integrin $\alpha v \beta 5$ receptor の発現量が著明に亢進していた。

正常皮膚線維芽細胞と強皮症皮膚線維芽細胞の integrin $\beta 5$ subunit 遺伝子の発現量

次に、integrin $\beta 5$ subunit 遺伝子の発現量について、Northern blot 法を用いて検討した。GAPDH で補正すると、強皮症皮膚線維芽細胞では、正常皮膚線維芽細胞に比べて、integrin $\beta 5$ subunit 遺伝子の発現量は約3倍に亢進していた。次に、強皮症皮膚線維芽細胞における integrin $\beta 5$ subunit 遺伝子の発現亢進が転写レベルの亢進なのか、message stability によるものなのかを検討するため、アクチノマシンD を加える直前、加えて4時間後、8時間後の integrin $\beta 5$ subunit 遺伝子の発現量を Northern blotting にて検討した。integrin $\beta 5$ subunit 遺伝子発現量の

半減期は、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞との間で有意差は認められなかった。このことから、強皮症皮膚線維芽細胞における integrin $\beta 5$ subunit の発現量の亢進は転写レベルでの調節の異常である可能性が示唆された。

正常皮膚と強皮症患者皮膚における integrin $\beta 5$ subunit の発現量

強皮症患者の皮膚と正常人の皮膚において、免疫組織染色を用いて、integrin $\beta 5$ subunit の発現量について検討した。強皮症患者の皮膚では正常対照群の皮膚と比較して、線維芽細胞および膠原線維間に integrin $\beta 5$ subunit の強い発現を認めた。

インテグリン $\alpha v \beta 5$ 発現亢進がコラーゲン遺伝子発現に及ぼす影響

integrin $\alpha v \beta 5$ receptor の発現量亢進が、線維芽細胞の細胞外マトリックス産生に及ぼす影響を調べるため、正常皮膚線維芽細胞に integrin $\beta 5$ subunit を一過性に強発現させ、CAT assay を用いて human $\alpha 2(I)$ collagen promoter 活性を調べた。integrin $\alpha v \beta 5$ receptor を強発現させた群では、vector のみを強発現させた群に比べ、promoter 活性が約1.4倍と有意に亢進していた。以上より、integrin $\alpha v \beta 5$ receptor の発現亢進がコラーゲン遺伝子の発現亢進に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

今回の検討により、in vivo および in vitro において強皮症皮膚線維芽細胞のインテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現量が亢進していることが示された。この結果は、強皮症皮膚において proteolytic cascade の何らかの異常が細胞外マトリックスの沈着に関与している可能性を示唆していると考えられた。また、インテグリン $\alpha v \beta 5$ を正常皮膚線維芽細胞に一過性強発現させることによりコラーゲン遺伝子の転写活性の亢進が認められたことから、インテグリン $\alpha v \beta 5$ の発現量の亢進は強皮症皮膚線維芽細胞の phenotype の変化にも関与している可能性が示された。

E. 結論

強皮症皮膚において proteolytic cascade の何らかの異常が細胞外マトリックスの沈着に関与している可能性を示唆していると考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表 刊末に一括表示

強皮症患者由来線維芽細胞における細胞外マトリックス蛋白および サイトカイン受容体の発現の解析

分担研究者 新海 滋 千葉大学 皮膚科教授

研究要旨： 胞外マトリックス蛋白およびサイトカイン受容体の発現をRT-PCRにより解析した。強皮症患者由来線維芽細胞は、健常者由来の細胞に比し、コラーゲンCOL1A2の発現増加とともに、IL-4R α の発現増加も認められた。一方、デルマトポンチン（DPT）の発現は著明に抑制されていた。健常者線維芽細胞ではDPTを抑制しない濃度のIL-4で、患者線維芽細胞においてDPTの発現を明らかに抑えた。同時にこの濃度で患者線維芽細胞においてCOL1A2の発現を明らかに増加させた。以上より、強皮症患者におけるDPTの発現減少は、IL-4R α の発現増加によることが示唆された。強皮症で見られたIL-4受容体の発現増加は、膠原線維沈着増加の原因の可能性があると考えられた。

A. 研究目的

強皮症は、自己抗体産生などの免疫異常と、皮膚をはじめとして全身臓器の膠原線維の異常沈着をその組織学的特徴とする疾患である。膠原線維の線維形成には、fibril associated molecules (FAMs) とよばれる種々の生体分子が重要な役割を占めている。1型コラーゲンが線維形成をしてゆく際に、FAMのデコリン (DCN)、デルマトポンチン (DPT)、トロンボスポンジン-2 (TSP-2)、ファイブロモジュリン (Fm)、5、16型コラーゲンなどが、線維形成速度・線維径などを調節していると考えられた。今回我々は、このFAMsの発現を強皮症患者由来の線維芽細胞を用い解析を試みた。DPTは明らかに強皮症で減少していたが、その減少の機序を解明する目的で、IL-4、TGF- β およびその受容体の発現を調べた。

B. 研究方法

材料と方法

線維芽細胞 6例の強皮症患者、4例の年齢の一致した健常者の線維芽細胞の5-7継代細胞を用いた。

RT-PCR 線維芽細胞を10% FBS/DMEMにて、培養しearly confluentで、RNAを回収した。

またIL-4刺激試験では、24時間の血清非存在下でstarveし、さらに24時間サイトカイン刺激を0.1% BSA/DMEMで行い、RNAを回収した。また、PCR産物は1%アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色をし、写真をとり、スキャンし、photoshopにて取り込んだ。それぞれの産物の相対量をNIHimageにて算出し、student's-t testにて、有意差検定をした。

C. 結果と考察

6例の強皮症患者 (SSc)、4例の年齢の一致した健常者 (control) の線維芽細胞をもちいRT-PCRを行った。コラーゲン分子、FAMs、IL-4、TGF- β 1, 2受容体の発現をRT-PCRで調べ、電気泳動した。コラーゲンでは、5型に変化はないものの、1型A2鎖、16型が強皮症患者で増加していた。FAMsでは、DCN、TSP-2、Fmは、変化はないが、DPTの著明減少が強皮症患者でみられた。正常線維芽細胞においてDPTの減少は、IL-4により引き起こされることを我々はすでに報告している。そこで強皮症患者、健常者由来線維芽細胞に、IL-4の発現が見られるか否かをしらべたが発現は認められなかった。

TGF- β 受容体1、2は、患者、健常者において、差は認められなかった。次にIL-4受容体の発現が、強皮症患者で明らかに増加していた。さらに、IL-4受容体の増加をサイトカインに対する反応性を見ることで確認した。IL-4受容体の特に増加した強皮症2例、健常者2例を用い、IL-4を0.1 ng/mlの濃度で刺激した。その後RT-PCRを行い、COL1A2、DPTの増減を調べた。強皮症患者の線維芽細胞では、この濃度のIL-4で、COL1A2の増加、DPTの減少が見られた。一方、健常者線維芽細胞では、変化が見られなかった。これらの事より、強皮症患者の線維芽細胞ではIL-4受容体の発現増加がありそれが、コラーゲン合成増加、DPTの減少に繋がっている可能性を示している。

D. 結論

強皮症では線維芽細胞のIL-4受容体の発現増加があり、細胞外に浸潤する細胞が分泌するIL-4に反応