

K. Distinct associations of the leukocyte immunoglobulin-like receptor (LIR)1 and *LIR6* polymorphisms with susceptibility to RA and SLE. 日本免疫学会総会学術集会記録 33:214, 2003.

28. 江原幸和、土屋尚之、櫻井大祐、山口晃弘、松多邦雄、徳永勝士:ヒト follistatin-related protein (FRP)遺伝子多型の関節リウマチとの関連の検討。日本免疫学会総会学術集会記録 33:214, 2003.

29. Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno NH, Takahashi K, Tokunaga K: Induction of proliferation and activation of endothelial cells by overexpression of ID gene. 日本免疫学会総会学術

集会記録 33:224, 2003.

30. 申栄吉、土屋尚之、櫻井大祐、川崎綾、長谷英徳、大梶祐頼、津野寛和、高橋孝喜、小端哲二、徳永勝士:ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)におけるBLySの発現:日本免疫学会総会学術集会記録 33:319, 2003.

31. Tokunaga K, Tsuchiya N. Diversity of immune regulation genes and their associations with immune disorders. RERF International Workshop: Regulation of immunological homeostasis in inflammatory response and disease development. 2004, January 16-17, Hiroshima.

表 1. 金沢大学にて試料提供を受けた強皮症患者群および健常対照群における CD19-499G>T 多型

-499G>T	強皮症群(n=134)		健常対照群(n=96)		P	オッズ比 (95%信頼区間)
遺伝子型頻度						
T/T	8	(6.0)	6	(6.3)	0.008	1.35(0.44-4.13)
T/G	63	(47.0)	26	(27.1)		2.46(1.39-4.35)
G/G	63	(47.0)	64	(66.6)		1
アリル陽性率						
T(+)	71	(53.0)	32	(33.3)	0.003	2.18(1.31-3.86)
G(+)	126	(94.0)	90	(93.8)	NS	
アリル頻度						
T	79	(29.5)	38	(19.8)	0.019	1.69(1.09-2.62)
G	189	(70.5)	154	(80.2)		

()%, NS:有意差なし

表 2. 金沢大学にて試料提供を受けた強皮症患者群および健常対照群における CD19 3'非翻訳領域 GT リピート多型

c.*132(GT) _n	強皮症群 (n=134)		健常対照群(n=96)		P	オッズ比 (95%信頼区間)
アリル陽性率						
10 (+)	1	(0.7)	1	(1.0)	NS	
12 (+)	123	(91.8)	88	(91.7)	NS	
13 (+)	19	(14.2)	20	(20.8)	NS	
14 (+)	53	(39.6)	25	(26.0)	0.03	1.86(1.05-3.28)
15 (+)	3	(2.2)	3	(3.1)	NS	
18 (+)	9	(6.7)	5	(5.2)	NS	
アリル頻度						
10	1	(0.4)	1	(0.5)	NS	
12	179	(66.8)	135	(70.3)	NS	
13	20	(7.5)	20	(10.4)	NS	
14	56	(20.9)	28	(14.6)	NS	
15	3	(1.1)	3	(1.6)	NS	
18	9	(3.4)	5	(2.6)	NS	

()%, NS:有意差なし

表 3. CD19 -499G>T と 3'非翻訳領域 GT リピート間の連鎖不平衡

-499T-(GT) ₁₄	ハプロタイプ頻度	D'	P
健常対照群	0.129	0.859	4.3 x 10 ⁻²³
強皮症群	0.183	0.826	6.0 x 10 ⁻²⁷

表 4. -499T と(GT)₁₄ アリルが強皮症疾患感受性におよぼす影響の独立性の検討

-499T	(GT) ₁₄	強皮症(n=134)		健常対照群(n=96)		P	オッズ比 (95%信頼区間)
+	+	47	(35.1)	22	(22.9)	0.009	2.28(1.23-4.23)
+	-	24	(17.9)	10	(10.4)	0.022	2.56(1.15-5.75)
-	+	6	(4.5)	3	(3.1)	NS	2.14(0.24-18.8)
-	-	57	(42.5)	61	(63.5)	-	1

各群の P, オッズ比は、-499T 陰性、(GT)₁₄ 陰性群との比較である。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

強皮症における可溶性 CD1d 遺伝子発現に関する研究

分担研究者 後藤大輔 筑波大学臨床医学系内科助手
協力者 松本 功 筑波大学臨床医学系内科講師
協力者 伊藤 聡 筑波大学臨床医学系内科講師
協力者 堤 明人 筑波大学臨床医学系内科助教授
協力者 住田孝之 筑波大学臨床医学系内科教授

研究要旨

NKT 細胞と強皮症をはじめとする自己免疫疾患との関係は以前から数多くの報告があるも、その原因に関しては不明のままである。今回、当教室で見出した可溶性 CD1d 分子に着目し、研究を行った。可溶性 CD1d は蛋白として発現する分子であり、予想通り細胞外へと分泌される可溶性の分子であった。血清中の可溶性 CD1d 分子の発現量を測定するため、抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体を作製し、これを用いて ELISA 法での測定法を確立している。この手法により、健常人および強皮症患者血清中の可溶性 CD1d 蛋白量を測定したところ、強皮症患者血清において可溶性 CD1d が有意に増加していた。このことより、可溶性 CD1d 分子により NKT 細胞の増殖が抑制されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

Natural Killer T 細胞 (NKT 細胞) は、第四のリンパ球とも呼ばれ、新しい T 細胞集団として近年報告されている。この細胞は、多様性を欠いた T Cell Receptor (TCR) を発現するユニークな集団で、また、認識抗原として通常の TCR がペプチド抗原を認識するのとは異なり、CD1d 上のグリコリピッド抗原を認識することも特徴とされている細胞群である¹。

NKT 細胞はまた、自己免疫病モデルマウス²や強皮症をはじめとする自己免疫病患者³⁻⁶において、選択的に減少していることも我々の以前の発表も含め、数多く報告されている。

また、我々が強皮症をはじめとした自己免疫疾患患者と健常人での NKT 細胞数を検討したデータにおいても、やはり強皮症をはじめとする種々の自己免疫疾患で、健常人と

比較して NKT 細胞が有意に減少している結果を得ている。

強皮症をはじめとする自己免疫疾患において、NKT 細胞が減っている原因を模索する間に、我々は新たな知見として、CD1d 分子に選択的スプライシングによる複数の変異型が存在する可能性を見出した。具体的には変異型 CD1d は、variant(V)1 から V8 まで 8 つのバリエーションが存在する可能性が示唆され、中でも抗原結合部位を完全に保存している V1 と V2 に関しては、何らかの機能を有する可能性が有ると考えられた⁷。また、V2 に関しては膜貫通部位が欠損していることから、可溶性の CD1d であることが予想された。

そこで本研究では、強皮症患者における NKT 細胞の増殖能の低下の原因として、完全型 CD1d 分子と2種類の抗原結合部位の保たれているアイソフォームである V1、V2 に着目し、NKT 細胞の動態との関連性について検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 免疫ブロット法

ヒトリコンビナント Flag タグ付き完全型 CD1d、変異型 CD1d をそれぞれ 12% ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は一次抗体として抗 Flag 抗体、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を用いて発色させた。また、可溶性 CD1d 作製時の実験においては、ペルオキシダーゼ標識抗 Flag 抗体を用いた。

2) ELISA

血清中の可溶性 CD1d の測定は ELISA 法にて行った。96 穴の ELISA 用プレートを 1 μ g/ml の我々が作製した抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体にて固相化し、PBS にて 8 倍希釈した BlockAce (Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Sapporo, JPN) にてブロッキングした後、TBS/TC にて 8 倍希釈した血清を入れ、37°C で 1 時間反応させた。検出には、抗 CD1d モノクローナル抗体 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) とペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を用いた。このシステムに関しては、更に感度等上げるよう改良中である。抽出した健常人の血清中可溶性 CD1d 測定時の吸光度を仮の unit/ml とした。

3) 対象患者

対象は厚生省強皮症調査研究班(1989)による強皮症の診断基準を満たす、当院通院中の強皮症患者 31 名とボランティアとして参加した健常人 34 名とした。いずれも本研究にあたり、書面にて同意を頂いた上で、対象とした。

C. 研究結果

1) 変異型 CD1d の発現と動態

まず実際に我々が見出した変異体が発現するか否か、また、V2 はその構造から予想された通り可溶性 CD1d であるか否かを検討した。V1 と V2 の cDNA をクローニングし、Flag タグ付きの発現ベクターを作製して、Cos1 細胞に形質導入を行い、抗 Flag 抗体を用いて、免疫ブロット法により、それぞれの発現を確認した(図 1)。これにより、細胞溶解液にて各

CD1d 分子の発現が確認された。さらに、V2 分子は可溶性 CD1d と考え、細胞外に分泌されると予想していたが、蛋白発現させた培養液中の蛋白を抗 Flag 抗体での免疫沈降を用いた免疫ブロット法にて解析した結果、予想通り V2 のみが培養液中に分泌されているのが確認できた。

2) 抗可溶性 CD1d 抗体の作製

さらに、変異型 CD1d 分子蛋白の発現に差があるか否かを検討するため、まず V2 分子に特異的なポリクローナル抗体を作製することとした。

V2 分子が選択的スプライシングにより、フレームシフトを起こし、終止コドンが移動することにより、C 末の 33 アミノ酸が V2 分子に特異的なアミノ酸配列を呈している。この特異的なアミノ酸配列の中から 14 アミノ酸を選択してペプチドを合成し、これを抗原として 2 週間毎に計 8 週間にわたりウサギに免疫を行った。

上記の方法により作製した抗体が、合成したペプチド抗原に反応することは確認したが、V2 蛋白全体に対する反応を、免疫ブロット法にて検討した。完全型 CD1d, V1, V2 の各変異型 CD1d 分子の発現が抗 Flag 抗体により確認された同じメンブレンに対して、今回作製したポリクローナル抗体でブロッティングした。その結果、V2 蛋白全体に対しても反応を認め、かつ、他の完全型 CD1d 蛋白や V2 蛋白には、反応を示さないことが確認された(図 2)。

3) 血清可溶性 CD1d 量の測定

2) で作製した抗 V2 ポリクローナル抗体を用いて、血清中の可溶性 CD1d 蛋白量を

ELISA 法により測定するシステムを確立した。

この方法を用いて、強皮症患者 31 名と健康人 34 名とで、血清中の可溶性 CD1d の蛋白量に差があるか否かを検討した。その結果、強皮症患者群において健康人と比較し、血清中に可溶性 CD1d が有意に多く存在することが明らかとなった(図 3)。

D. 考 察

強皮症をはじめとした自己免疫疾患患者において NKT 細胞が減少していることは以前より、数多く報告されているが、その原因に関しては不明のままである。その手がかりの一つとして、当教室において幾つかの変異型 CD1d を見出し、研究を進めている。以前行った実験から、自己免疫疾患において可溶性 CD1d (V2) に関しては、健康人との間で mRNA の発現量に差が認められた⁷⁾ため、本研究では可溶性 CD1d 分子に注目して実験を行った。

まず、クローニングし、発現ベクターを作製し、実際の蛋白発現を見たところ、可溶性 CD1d は蛋白として発現し、さらに、予想通り可溶性分子として細胞外に分泌されることも確認された。これにより、蛋白として可溶性 CD1d が生体内に存在し、さらに、可溶性分子として抗原提示細胞外に分泌され、血液、組織中に存在する可能性が示唆された。

この結果を受けて、血清中の可溶性 CD1d を ELISA 法にて測定すべく、抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体の作製を試みたところ、可溶性 CD1d に特異的なポリクローナル抗体の作製に成功し、ELISA 法での測定方法を確

立しつある。

この方法にて、強皮症患者と健常人の血清可溶性 CD1d 蛋白量を測定したところ、有意に強皮症患者血清にて可溶性 CD1d が増えていた。この結果から、少なくとも強皮症患者においては、血清可溶性 CD1d が増加することにより、NKT 細胞が減少している可能性を示唆していると思われる。すなわち、血清中の可溶性 CD1d が単独、あるいは何らかのほかの分子と共に、NKT 細胞の増殖を抑制していると考えられる。

ただし、残念ながら今回は、強皮症患者のさらなる詳細な検討は行っていない。今後は、自己抗体の発現の有無や、症状 (diffuse 型か limited 型か) の違いによる、可溶性 CD1d の発現の差異に関しても検討する必要があると考える。

可溶性 CD1d に関しても、まだこれから確認すべき点も多く残されている。具体的には、実際に可溶性 CD1d 分子が NKT 細胞に結合し、何らかの作用を及ぼしているのか、また、抗原は完全型 CD1d 分子と同様に α ガラクトシルセラミドなどの糖脂質であるのか等々であり、今後さらなる研究を進めることが必要であると考えられる。それにより、NKT 細胞数のコントロールすることで、強皮症をはじめとする自己免疫疾患の治療も可能となると考えられる。

E. 結 論

強皮症患者において、NKT 細胞が減少している原因として、可溶性 CD1d の血中濃度の上昇が関与している可能性が示唆された。可溶性 CD1d を介した NKT 細胞に対する増

殖刺激のメカニズムを解析することで、今後 NKT 細胞減少による強皮症発症のメカニズムが明らかとなるとともに、治療法の手がかりとなることも期待される。

F. 文 献

1. Bendelac, A. et al.: Mouse CD1-specific NK1 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 535, 1997
2. Mieza, M.A. et al.: Selective reduction of V α 24⁺ NKT cells associated with disease development in autoimmune-prone mice. *J. Immunol.* 156:4035, 1996
3. Sumida, T. et al.: Selective reduction of T cells bearing invariant V α 24J α Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J. Exp. Med.* 182:1163, 1995
4. Kojo, S. et al.: Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18⁺, BV11⁺ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 44:1127, 2001
5. Illes, Z. et al.: Differential expression of natural killer T cell V α 24J α Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Immunol.* 164:4375, 2000
6. Yanagihara, Y. et al.: Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood of

patients with rheumatoid arthritis (RA).

Clin. Exp. Immunol. 118:131, 1999

7. Kojo, S. et al.: Low expression levels of soluble CD1d gene in patients with Rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 30: 2524, 2003

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

自己免疫疾患患者における可溶性 CD1d 分子アイソフォームとNKT細胞反応性の解析

後藤大輔、香城諭、松本功、堤明人、

住田孝之 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

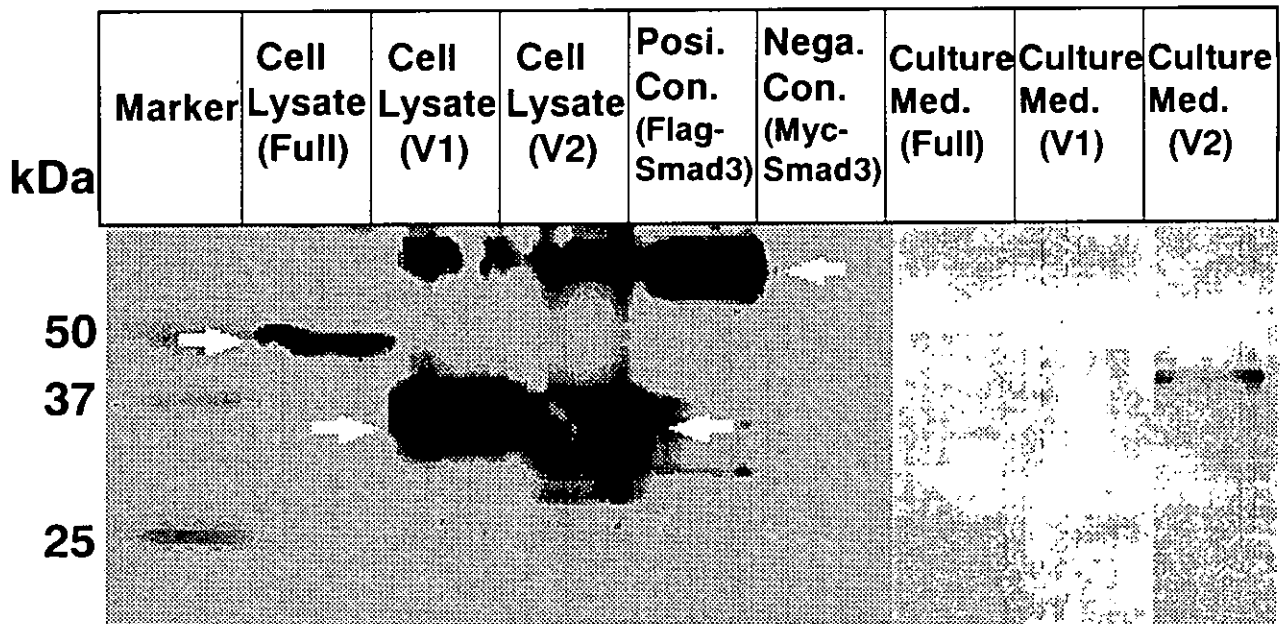


図 1：免疫ブロット法による変異型 CD1d 分子の発現の確認。Cos1 細胞に完全型 CD1d と変異型 CD1d の Flag タグ付きの発現ベクターを形質導入し、その発現を細胞溶解液 (cell lysate) と培養上清 (culture medium) に分けて確認した。抗 Flag 抗体を蛋白検出のために使用した。

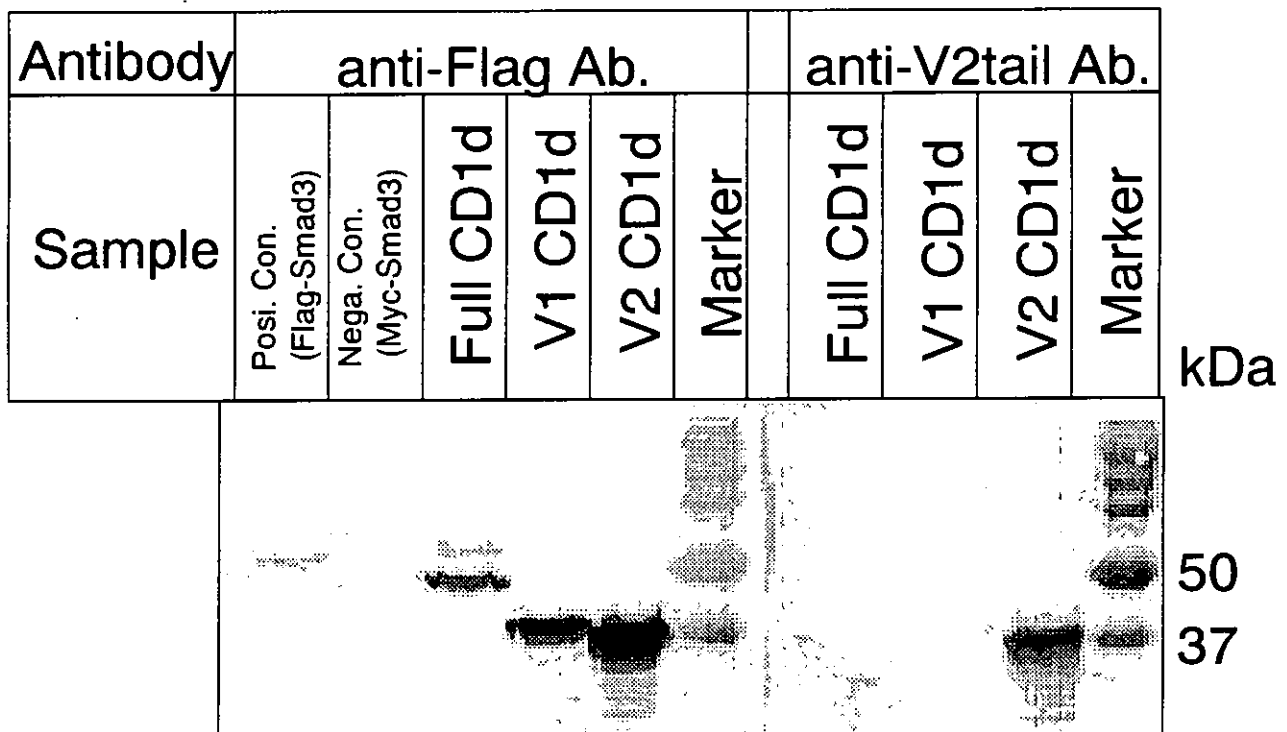


図 2：免疫ブロット法による抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体の検証。左半分はコントロール実験で、抗 Flag 抗体で各 CD1d 分子が発現していることを確認している。

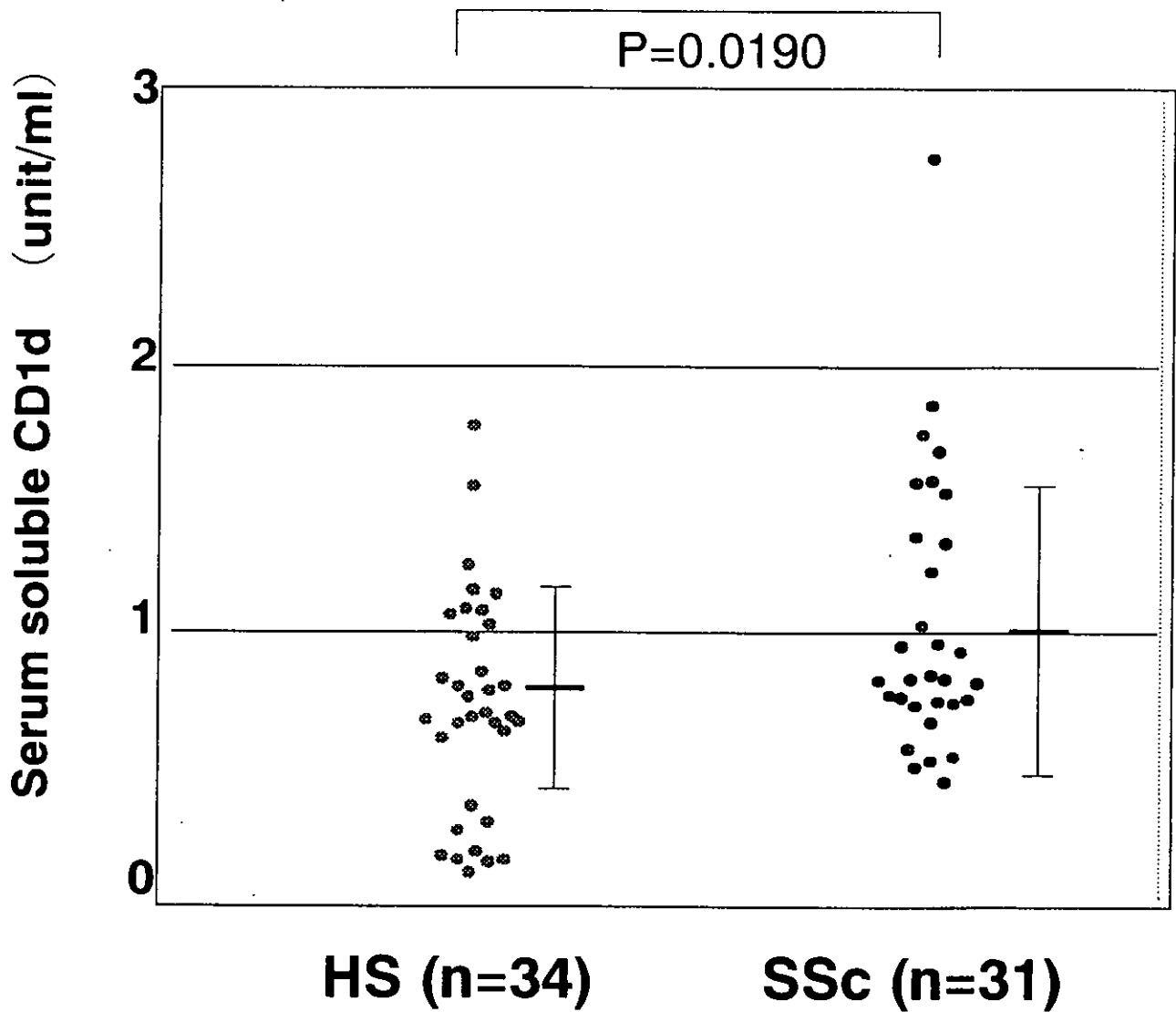


図 3：健常人と強皮症患者での血清中可溶性 CD1d 蛋白の発現量の比較。作製した抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体と抗 CD1d モノクローナル抗体とのサンドイッチ ELISA 法にて、測定した。特定の健常人の血清中可溶性 CD1d 測定時の ELISA での吸光度を、仮の unit/ml とした。図中の各棒は中央の横棒が平均、上下の横棒は標準偏差を示す。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

抗セントロメア抗体測定における抗 CENP-A 抗体 ELISA と
市販抗 CENP-B 抗体 ELISA の有用性

分担研究者	室 慶直	名古屋大学皮膚科学教室助教授
協力者	杉浦一充	名古屋大学皮膚科学教室助手
協力者	富田 靖	名古屋大学皮膚科学教室教授

研究要旨

軽症型強皮症の疾患マーカー抗体として代表的な抗セントロメア抗体（anti-centromere antibody；以下 ACA）の検出法は、その主要対応抗原である CENP-B 蛋白を利用した ELISA が主流となっている。市販検査キットで検出できない ACA を、我々の確立した CENP-A の部分長合成ペプチドを利用した ELISA で検出することが可能であるかを主に調べる目的で、上記 2 種の検査法による結果を比較検討した。殆どの ACA 陽性血清は市販検査キットで陽性を示したが一部の血清は偽陰性を示し、CENP-A の ELISA を併用することで検出が可能となることが示唆された。今後、特異性を含め両検査法をさらに検討することによって、より精度の高い検査キットの開発が可能である。

A. 研究目的

抗セントロメア抗体（anti-centromere antibody；以下 ACA）は軽症型の全身性強皮症（以下 SSc）の疾患マーカー抗体として有名な抗核抗体である。その検出方法としては培養細胞を用いた間接蛍光抗体法（indirect immunofluorescence、以下 IIF）における散在斑紋型（discrete speckled pattern）として同定され、また近年では対応抗原のひとつである CENP-B の主要エピトープである同蛋白のカルボキシル末端のリコンビナント蛋白を用いた ELISA 法により検出が可能となっている。しかし、前者の検出法においては、全ての discrete speckled pattern と判定される血清が ACA

であるとは限らず、また後者の ELISA 法においては常にカットオフ値の設定による偽陽性、偽陰性が問題となる。ACA の検出方法として最も信頼のおける方法は分裂期染色体固定標本を用いた IIF であるが、多検体の解析には検査効率が悪いという欠点がある。

我々は ACA の主要エピトープとして、CENP-B のカルボキシル末端部分の他に CENP-A のアミノ末端部分の比較的短いアミノ酸残基数からなるペプチドが主要エピトープになっていることを報告し、エピトープ部分の合成ペプチドを利用した ELISA が抗セントロメア抗体の検出に応用可能であることを示した^{1,2}。今回は市販の抗

CENP-B 抗体の ELISA キットと我々の開発した抗 CENP-A 抗体の ELISA の結果について比較検討を試みた。

B. 研究方法

1) 対象血清

血清は名古屋大学皮膚科血清銀行より IIF にて discrete speckled pattern を呈し、分裂期染色体の染色像により ACA と判断された 70 例を対象とした。

2) ELISA

抗 CENP-B 抗体の測定は MBL 社（名古屋）の ELISA キット (MESACUP-2 テスト CENP-B)³ を使用し、添付のプロトコール通り行った。抗 CENP-A 抗体の測定は既報の通り主要エピトープを構成する 2 種の合成ペプチド（キャリア蛋白として牛血清アルブミンを使用）を、今回は同一量混合したものを抗原とし、2 次抗体には抗ヒト IgG 抗体のほかに IgM あるいは IgA に対する抗体（いずれも Dako, Denmark を使用）も用いて行った。IgM および IgA クラスの抗体測定系においても既報の IgG クラス抗体の場合と同様に牛血清アルブミンに対する反応性を差し引いて、ACA 陰性の健常人血清 30 例の平均+2SD をカットオフ値とした。

C. 研究結果

1) 市販 ELISA キットによる抗 CENP-B 抗体

70 例の ACA のうち、67 例が陽性、2 例が陰性、1 例が(±)となった。陰性例のうち 1 例は HeLa 細胞蛋白抽出液を用いたイムノプロット法⁴において CENP-B に対する弱い反応が確認されたが、他の 1 例と(±)の 1 例は CENP-B に対する反応は確認されなかった。

2) ハウスメイド ELISA による抗 CENP-A 抗体

70 例の ACA のうち、IgG クラス抗体では 65 例が陽性、IgM クラス抗体では 38 例が陽性、IgA クラス抗体では 47 例が陽性であった。IgG クラス抗体陰性の 5 例は他の 2 種のイムノグロブリンクラスにおいても陰性であった。つまり抗 CENP-A 抗体の検出は IgG クラス抗体の検出で十分であった。

3) 抗 CENP-A 抗体と抗 CENP-B 抗体の比較

抗 CENP-B 抗体が陽性であった 67 例中、63 例は抗 CENP-A 抗体も陽性であった。抗 CENP-B 抗体が陰性であった 2 例はいずれも抗 CENP-A 抗体が陽性で、イムノプロット法においても CENP-A に対する反応が確認された。抗 CENP-B 抗体が(±)であった 1 例は抗 CENP-A 抗体は陰性で、イムノプロット法において CENP-A、B、C に対する反応はいずれも認められなかった。

D. 考案

ACA の対応抗原蛋白は染色体セントロメアに存在する蛋白、CENP-A、B、C、D、E、F、G がこれまでに報告されているが、CENP-D、E、G に関しては抗原蛋白遺伝子がいまだ同定されていなかったり、追試確認がされていない。また CENP-F は細胞周期依存性のセントロメア蛋白であり、SSc に見られる ACA が通常認識する CENP-A、B、C とは分子量も、細胞周期を通じた細胞内局在も明らかに異なることから、抗 CENP-F 抗体と ACA は IIF で容易に鑑別が可能である。

今日、多種の自己抗体の測定が ELISA で検出されるようになっており、ACA の場合、対応抗原が複数存在することが問題となるが、最も主要なエピトープである CENP-B

のカルボキシル末端部分蛋白を抗原として用いることで、ほぼ全例の ACA を検出できるとされている。しかし ELISA において偽陽性、偽陰性は常に生じ得る問題となっている。これを克服する手段として、たとえば今回使用した MBL 社の ELISA キットでは (±) という結果の範囲を設け、他法による確認を推奨している。抗 CENP-B 抗体測定キットを用いて陰性と判断された 2 例はいずれも抗 CENP-A 抗体 ELISA を併用することで ACA であることが判明し、偽陰性から陽性と判定できた。抗 CENP-B 抗体が (±) の 1 例は抗 CENP-A 抗体も陰性であったが、イムノブロット法においていずれの CENP との反応がみられず、~200kDa 付近に反応性を認めたのみであった。本血清は軽症型 SSc 患者のもので、新規のセントロメア抗原を認識している可能性がある。今回の CENP-A、B に対する反応性の結果を図にまとめると図 1 のようになった。

E. 結 論

我々のこれまでの研究でも示されているように ACA の対応抗原蛋白には数種あり、それぞれに認識するエピトープ部分が複数存在する。その中でも我々も同定している殆どの ACA が認識するエピトープとなっている CENP-B のカルボキシル末端部分を用いた市販キットの有用性が確認された。そして ELISA による抗 CENP-A 抗体測定の併用が市販キットにおいても検出できない ACA を検出可能とすることが示唆された。今後、両方法を用いての特異性の検討も必要とされる。

F. 文 献

1. Sugiura K, Tomita Y, Muro Y: Functional structure and autoimmunity of human centromere. *Recent Res Devel Biophys Biochem* 2003, 3:657-670
2. Muro Y, Azuma N, Onouchi H, Kunimatsu M, Tomita Y, Sasaki M, Sugimoto K: Autoepitopes on autoantigen CENP-A are restricted to the N-terminal region, which has no homology with histone H3. *Clin Exp Immunol* 2000, 120:218-223
3. 宮脇昌二、浅沼浩子: MESACUP-2 テスト CENP-B, 同 Scl-70 ならびに同 Jo-1 による抗セントロメア抗体, 抗 Scl-70 抗体, 抗 Jo-1 抗体の測定. *医学と薬学* 2001, 45:129-135
4. Muro Y, Sugimoto K, Okazaki T, Ohashi M: The heterogeneity of anticentromere antibodies in immunoblotting analysis. *J Rheumatol* 1990, 17: 1042-1047

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

抗セントロメア抗体 70

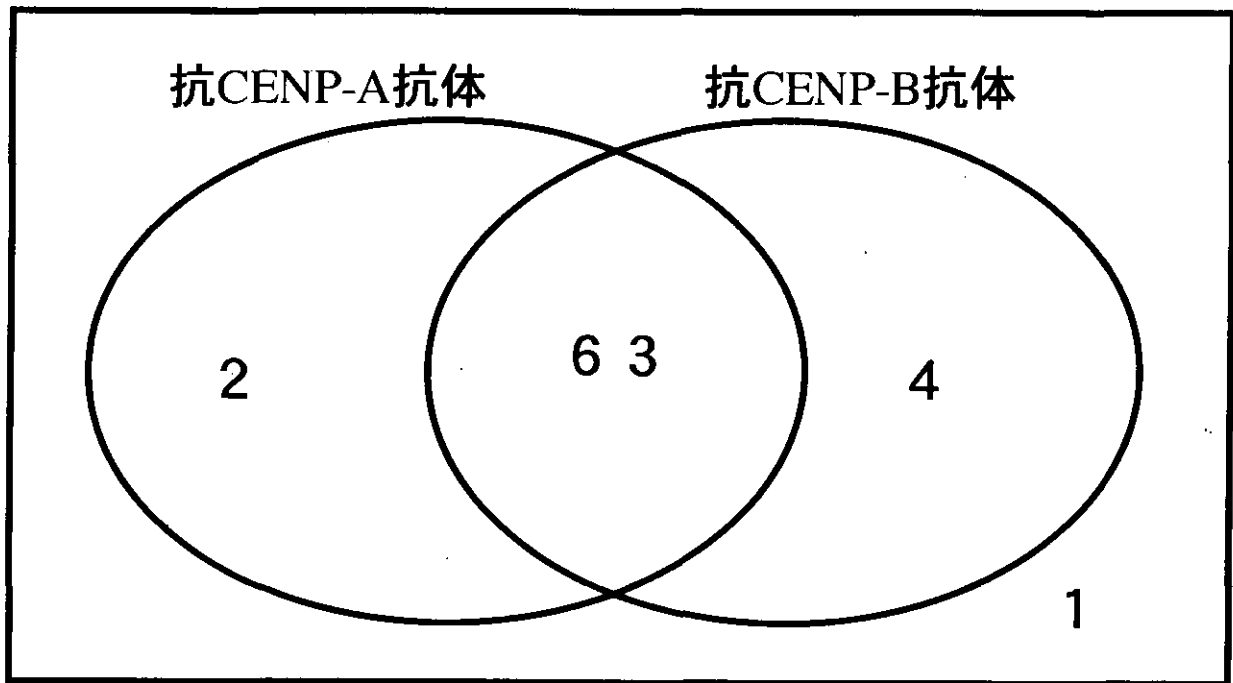


図. 1 各抗体の反応関係。数字は陽性症例の数。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

PPAR γ を標的とする強皮症様マウスモデル治療の試み

分担研究者 遠藤平仁 北里大学医学部内科学・講師
協力者 河野 静 北里大学医学部内科大学院生
協力者 橋本 篤 北里大学医学部内科大学院生
協力者 村上洋介 北里大学医学部微生物大学院生
協力者 北里英郎 北里大学医学部微生物学・講師
協力者 林 泉 北里大学医学部薬理学・助教授

研究要旨

PPAR γ は細胞核内受容体であり細胞分化、転写因子抑制、アポトーシスに関与し生体内で重要な役割をはたしている。プロスタグランジン D2 (PGD2) の代謝物である 15deoxy $\Delta^{12,14}$ PGJ $_2$ (PGJ $_2$)は PPAR γ のリガンドになり抗炎症効果を示すことが報告されている。ブレオマイシン投与マウス皮膚硬化強皮症様モデルを用い PGJ $_2$ の PPAR γ を介する治療効果について検討した。PGJ $_2$ は皮膚線維性硬化を部分的に抑制した。また線維化誘導因子 TGF β や CTGF mRNA 誘導も抑制した。PGJ $_2$ はブレオマイシンによる血漿ヒスタミンの誘導を抑制した。PGD2 の合成酵素 (PGDS) cDNA 導入レトロウイルス感染線維芽細胞を皮内に移植すると皮膚線維性硬化及びヒスタミンの誘導は抑制された。以上より PGJ $_2$ 及び PGDS 細胞は PPAR γ を介してマウス強皮症様皮膚硬化モデルの線維化病変を抑制した。PPAR γ リガンドは全身性強皮症の新たな治療法に結びつく可能性がある。

A. 研究目的

Peroxisome Proliferator activated-receptor γ (PPAR γ) は核内受容体であり線維芽細胞から脂肪細胞への細胞分化や転写因子抑制によるサイトカイン産生抑制、アポトーシスの制御などに関連する。PPAR γ リガンドの一つとして生体内プロスタグランジン PGD $_2$ (PGD $_2$) の非酵素性代謝物 15deoxy 12,14 Δ PGJ $_2$ が作用する。全身性強皮症線維化モデルを用い

PPAR γ リガンドとしての PGJ $_2$ が線維化現象を抑制し将来的な治療に結びつくかについて検討した。

B. 研究方法

強皮症様マウスモデル： C3H オスマウス 6 週の剃毛背部皮内にブレオマイシン 30 μ g/ml 生食 1 日 1 回 30 日間皮下投与を行った。皮膚組織変化を HE 染色と真皮の厚さを計測及び免疫染色による膠原線維の同定、トルイジーンブルー染色により肥満

細胞の同定及び皮膚組織中のヒドロキシプロリン量の計測、皮膚組織の TGF β 、CTGF、MMCP-4 mRNA 発現を RT-PCR により検討した。血漿ヒスタミンを測定した。PGJ2 投与：PGJ2 は 1 日 2 回ブレオマイシン投与部位に 30ng 皮内投与を行った。PGD 合成酵素 cDNA 導入細胞移植：レトロウイルスベクターに cDNA を導入しパッケージング細胞を作成。培養上清を C57 胎児線維芽細胞株に添加しレトロウイルスを感染させた PGDS 細胞とした。PGDS 細胞は PGD2 を持続的に産生し PGD2 は PGJ2 に非酵素的に分解生成されることを確認した。PGDS 細胞 5×10^6 細胞を皮内に投与した。24 時間後より 1 日 1 回ブレオマイシン皮下投与 3 週間を行い組織変化、ヒドロキシプロリン含量、肥満細胞数、血漿ヒスタミン活性を測定した。

C. 研究結果

ブレオマイシン投与モデル：皮膚組織はブレオマイシン投与により 2 週後より有意な皮膚の肥厚硬化を認め 4 週後皮膚は生食のみ投与のコントロール mm に対して mm と 2 倍の真皮の厚さを認めまた免疫染色による膠原線維の増加、RT-PCR による Collagen I α mRNA の発現増加を確認した。皮膚中のヒドロキシプロリン含量も増加しまた TGF β 1、CTGF、MMCP-4 mRNA が増加した。またトルイジンブルー染色により皮膚真皮内肥満細胞が増加し投与開始 2 週目に最大となり並行し血漿ヒスタミン値が増加した。PGJ2 投与により皮膚硬化肥厚及びヒドロキシプロリン含量は有意に低下を示した。また皮膚の TGF β 1、CTGF mRNA、MMCP-4 mRNA の発現も低下を示し

た。血漿ヒスタミン量の有意に低下を示した。皮膚組織中のトルイジンブルー染色陽性肥満細胞数は減少せず脱顆粒肥満細胞数の減少を認めた。PGDS 細胞および EV 細胞移植皮膚にブレオマイシンを投与した。2 週後皮膚組織中の移植細胞は *In Situ* hybridization を用いて同定した。皮膚中のヒドロキシプロリン含量及び皮膚の肥厚は有意に抑制された。また血漿ヒスタミン値も減少を示した。

D. 考察

PPAR γ は PGD2 代謝物 PGJ2 や糖尿病血糖改善薬チアゾリジン誘導体トログリタゾンあるいは NSAID をリガンドとする核内受容体であり細胞分化、抗炎症作用、細胞アポトーシスに参与する。近年、関節炎や癌転移などの治療に PPAR γ を標的にして治療を行うことが動物実験で試みられている。特に PGJ2 は他のリガンドと比較して微量で生物学的作用を示すため副作用の恐れがないため将来的な臨床応用の可能性がある。PPAR γ は線維芽細胞を脂肪細胞に分化誘導、細胞アポトーシスあるいは転写因子 NF- κ B の抑制により様々な炎症性サイトカイン合成を制御する。強皮症の皮膚、内臓進行性線維化を生ずるがこの線維芽細胞増殖線維化、炎症病変、血管病変の形成抑制に PPAR γ リガンドが有効ではないかと想定し実験をおこなった。線維化モデルとして短期間に線維化病変を惹起できるブレオマイシン投与モデルを採用した。PGJ2 30ng 1 日 2 回の投与により線維化病変は有意に抑制されたがその効果は部分的であった。線維化に参与するサイトカイン TGF β 1、CTGF の低下また肥満細胞に発現する線維化に参与するマウスキマーゼ

の発現を抑制した。また他の炎症性サイトカインも低下した。近年 TGF β からのシグナル *smd3* に PGJ2 が抑制することが報告されている。またこのモデルでは皮膚の肥満細胞の浸潤増加と血中ヒスタミン増加が観察されるが PGJ2 は血中ヒスタミンを著明に低下させた。しかし肥満細胞の浸潤数は低下させず活性化、脱顆粒に影響を及ぼすものと想定された。肥満細胞は PGD2 の主要な産生細胞であるが PGJ2 は培養細胞における検討から IgE の FcR I への結合後の活性化を抑制することが報告されている。PGD2 の代謝物 PGJ2 は肥満細胞の PPAR γ を介しフィードバック機構による肥満細胞抑制機序により抑制していると考えられた。PGJ2 は頻回投与を必要としその刺激が結果をかえている可能性が高い。将来の遺伝子治療を想定した場合を考え PPAR γ リガンドを持続的に合成する細胞 PGDS 細胞移植による治療を試みた。プレオマイシン投与肺線維症モデルにおいて PGDS 細胞静脈注射により有効であったことを報告している。同様に皮膚内投与でも有効であり PGDS 細胞からの PGJ2 合成が PPAR γ を介して線維化抑制作用を示したと考えられた。

E. 結論

強皮症皮膚硬化の PPAR γ を標的とする治療法の可能性が示唆された。

F. 文献

1. Yamamoto, T et. al : Animal Model of Sclerotic Skin. I: local injections of bleomycin induce Sclerotic skin mimicking Scleroderma. J. Invest Dermatol, 456-462, 1997

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ando, M, Murakami Y, Kojima, F, Endo, H, Kobayashi, H, Hayashi I: Retrovirally interoduced prostaglandin D2 synthase suppresses lung injury induced by bleomycin, Am. J. Resp. Cell. Biol, 28, 582-591, 2003

2. Murakami, Y., Akahoshi, T, Hayashi, I, Endo, H, Kitasato, H: Inhibition of Monosodium Urate Monohydrate Crystal-induced Acute Inflammation by Retrovillary Transfected Prostaglandin D syntase, Arthritis Rheum, 48, 2931-2941, 2003

2. 学会発表

日本リウマチ学会、 2003年、 5月
日本炎症・再生学会 2003年、 11月

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

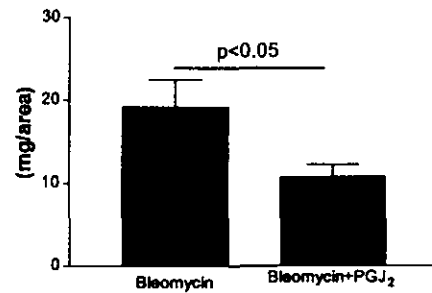
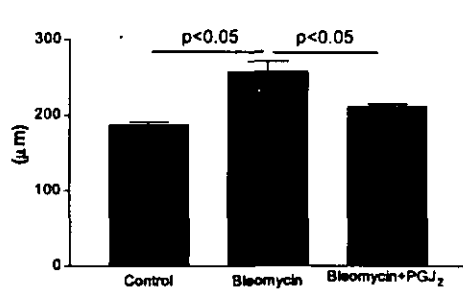


图 1 Skin Thickness

Serum hydroxyproline contents

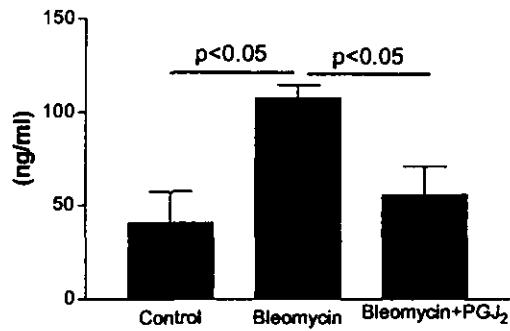


图 2 serum histamine

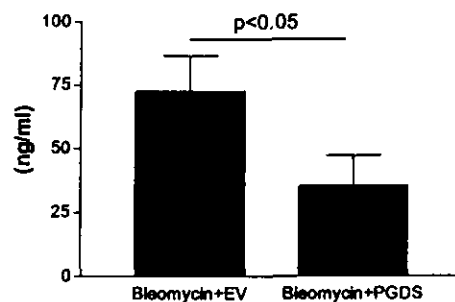
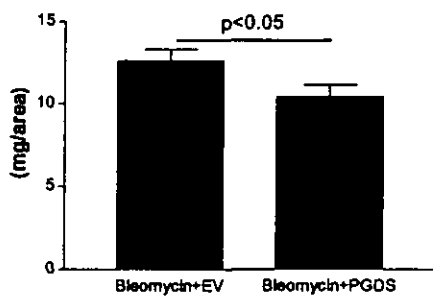


图 3 serum hydroxyproline contents

serum histamine

全身性強皮症患者血清中の可溶性エンドグリン値の検討

分担研究者 藤本 学 国立国際医療センター研究所細胞組織再生医学研究部室長

分担研究者 佐藤伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授

分担研究者 尹 浩信 東京大学医学部附属病院皮膚科講師

研究要旨

全身性強皮症患者血清中の血管内皮細胞や線維芽細胞に発現する TGF β 受容体であるエンドグリン (CD105)の可溶性の血清中濃度を全身性強皮症患者 70 例で検討した。可溶性エンドグリンは 70 例中 11 例 (16%) で上昇が認められた。このうち 10 例は抗セントロメア抗体陽性であり、抗セントロメア抗体陽性群の中では 50% が可溶性エンドグリン高値であった。エンドグリンは limited 型の強皮症に特異的に有意に上昇しており、limited 型特有の病態に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

全身性強皮症では、その病態に TGF- β 系の異常の存在が想定されている。エンドグリン (CD105) は血管内皮細胞に強く発現する 180 kDa のホモ二量体 I 型膜蛋白で、TGF- β 1 と TGF- β 3 に強い親和性を持ち、細胞内領域にはセリン/スレオニンキナーゼ活性をもたない III 型 TGF- β 受容体である。近年、エンドグリンは悪性腫瘍における血管新生においても重要な因子として注目されており¹、特に可溶性のエンドグリンは悪性腫瘍の転移のマーカーとなることが報告されている^{2,3}。エンドグリンは血管内皮細胞に強く発現する一方で、血球系前駆細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、マクロファージなどにも弱い発現することが報告されている。全身性強皮症患者由来の線維芽細胞ではエンドグリンの発現が著明に増強していることが示されており⁴、エンド

グリンの異常が強皮症の病態に関与している可能性が示唆される。

エンドグリンが遺伝性出血性毛細血管拡張症 (Hereditary hemorrhagic telangiectasia, Rendu-Osler-Weber 病) の責任遺伝子のひとつであることはよく知られている⁵。遺伝性出血性毛細血管拡張症は多発性毛細血管拡張とそれに伴う出血、肺高血圧を呈する常染色体優性遺伝性疾患である。遺伝性出血性毛細血管拡張症には 1 型と 2 型のふたつの病型があり、1 型の責任遺伝子がエンドグリン、2 型の責任遺伝子が ALK-1 である。ALK-1 もエンドグリンと同様に血管内皮細胞に特異的に発現する TGF- β 受容体であり、遺伝性出血性毛細血管拡張症は血管内皮細胞に特異的な発現を示す TGF- β 受容体の遺伝子変異により発現量が低下し、症状が出現すると考えられている。

遺伝性出血性毛細血管拡張症の皮膚、粘膜の毛細血管拡張は、limited 型の全身性強皮症にみられるそれと形態、分布ともに酷似している。したがって、エンドグリンの異常が全身性強皮症、特に limited 型において病態に関与している可能性が考えられる。そこで、全身性強皮症患者血清中の可溶性エンドグリン値を測定、検討した。

B. 研究方法

1) 患者

全身性強皮症患者 70 例、全身性エリテマトーデス 20 例、健常人 20 例を対象とした。全身性強皮症患者の病型は diffuse 型 39 例、limited 型 31 例であった。全身性強皮症および全身性エリテマトーデス患者は全例アメリカリウマチ学会の診断基準を満たしていた。

2) ELISA

血清中の可溶性エンドグリン値の測定には、R&D 社の ELISA kit を使用し、プロトコールにしたがって測定した。

C. 研究結果

血清中の可溶性エンドグリン値を全身性強皮症、全身性エリテマトーデス、健常人で比較したところ、全身性強皮症では 7.40 ± 2.21 U/ml、全身性エリテマトーデスでは 6.26 ± 1.74 U/ml、健常人では 6.22 ± 1.67 U/ml と全身性強皮症患者群で軽度の上昇を認めたが、有意差は認められなかった(図1)。健常人の平均 + 2SD をカットオフ値としそれ以上を高値例としたところ、全身性強皮症 70 例のうち 11 例が高値例となり、この 11 例は全例が limited 型であった。そこで、全身性

強皮症を diffuse 型と limited 型の 2 群に分けて解析したところ、limited 型強皮症群では diffuse 型強皮症群、全身性エリテマトーデス群、健常人の 3 群のいずれに対しても有意に高値であった(図 2)。

次に、可溶性エンドグリン高値を示した 11 例と可溶性エンドグリンが正常範囲内であった残りの 59 例の臨床症状を比較検討した。発症年齢、性別、罹病機関などに有意な差は認められなかったが、病型で可溶性エンドグリン高値群は 11 例全例が limited 型であるのに対し、正常群は limited 型が 59 例中 20 例(34%)であった。これと関連して、可溶性エンドグリン高値群では正常値群に比べて皮膚に毛細血管拡張を有する例(91% v.s. 53%, $p < 0.05$)、抗セントロメア抗体陽性例(91% v.s. 23%, $p < 0.05$)が有意に高頻度であった。一方、肺線維症や逆流性食道炎、腎症状の有無などには 2 群間で有意な差は認められなかった。

D. 考案

本研究では、全身性強皮症患者血清中の可溶性エンドグリン値を検討した。可溶性エンドグリンは、limited 型強皮症患者群が全身性エリテマトーデス患者、健常人に比べ有意に高値であり、一方 diffuse 型強皮症では上昇していなかった。有意な上昇を示した 11 例はすべて Limited 型であり、特に抗セントロメア抗体陽性例がそのほとんどであった。したがって、可溶性エンドグリンは全身性強皮症の limited 型で特異的に上昇しており、エンドグリンは limited 型特有の病態、例えば毛細血管拡張や肺線維症にともなわない肺高血圧などに関与している可能性が考えられた。

全身性強皮症は周知のように diffuse 型と limited 型の2型に分類される。Diffuse 型は比較的急速な広範囲の皮膚硬化を呈し、肺をはじめとする諸臓器の線維化を伴い、血清学的には抗トポイソメラーゼ I 抗体などがマーカーとなる。一方、limited 型は皮膚硬化の範囲も狭く進行も緩徐で、肺線維症なども低頻度であり、血清学的には抗セントロメア抗体が陽性となる例が多い。Limited 型は diffuse 型に比べて一般に軽症型であるといえるが、その病態は必ずしも同一とはいえず、limited 型にみられるが diffuse 型にはみられないような病態も一部に存在する。このような病変の代表例がCREST症候群型の皮膚毛細血管拡張や肺線維症をともなわない肺高血圧であるが、このような病態が遺伝性出血性毛細血管拡張症でも認められることは興味深い。

遺伝性出血性毛細血管拡張症は常染色体優性遺伝であり、遺伝子変異により生じた蛋白によってドミナントネガティブ効果を呈するのではなく発現量が半分に低下することだけで症状が出現すると考えられている。このようにエンドグリンの発現量は緻密に制御されており、わずかの発現量の異常が種々の病態を引き起こしうる事が想像される。可溶性エンドグリンの上昇が、limited 型強皮症の病態にどのように関与しているかは明らかではないが、可溶型の存在が膜型エンドグリンとリガンドとの結合性に影響を及ぼす可能性も考えられる。また、可溶型自体は病態に直接関与していなくとも、limited 型特有のエンドグリンないしTGF- β 系の異常を反映している可能性も考えられる。今後、さらにその分子メカニズムを検討していく予定である。

E. 結論

- 1 全身性強皮症患者における血中の可溶性エンドグリンは、limited型強皮症がSLE、健常人に比べ有意に高値であり、diffuse型では高値例は認められなかった。
- 2 有意な上昇を示した11例はすべてLimited型で、うち抗セントロメア抗体陽性例が10例であった。
- 3 エンドグリンはlimited型の強皮症に特異的に上昇しており、limited型特有の病態に関与している可能性が示された。
- 4 可溶性エンドグリンの上昇は血管内皮細胞などのエンドグリン発現上昇にともなうものと考えられるが、可溶型自体が毛細血管拡張の形成などに直接関与している可能性も考えられる。

F. 文献

1. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene*. 2003; 22:6557-6563
2. Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 2000;89:122-126
3. Calabro L, Fonsatti E, Bellomo G, Alonci A, Colizzi F, Sigalotti L, Altomonte M, Musolino C, Maio M. Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol*. 2003;194:171-175
4. Leask A, Abraham DJ, Finlay DR, Holmes A, Pennington D, Shi-Wen X, Chen Y, Venstrom K,