

19. Reunanen N, Li SP, Ahonen M, Foschi M, Han J, Kahari VM.: Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem.* 2002, 277:32360-8.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

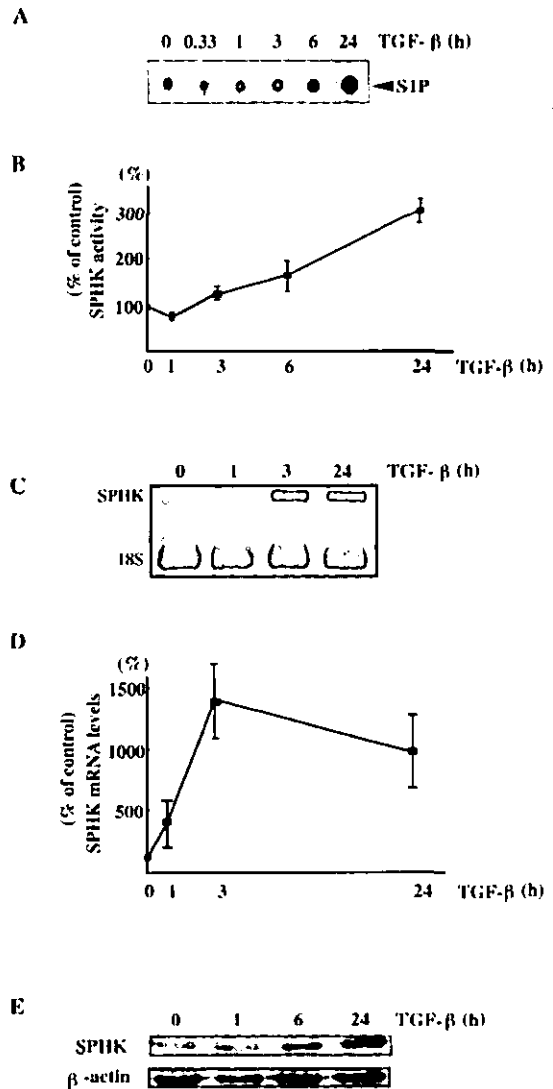


Fig. 1 : A. sphingosine kinase 活性の測定。培養ヒト皮膚線維芽細胞に TGF- β (2.5 ng / mL) 添加後、細胞層を回収。in vitro sphingosine kinase assay を行った。

B. sphingosine kinase 活性の相対的变化。グラフは平均値 \pm SE をプロットした。n=5。

C. sphingosine kinase mRNA の発現。培養ヒト皮膚線維芽細胞に TGF- β (2.5 ng / mL) 添加し、RT-PCR 法にて SphK-1 mRNA を検出。PCR 産物のサイズは SphK-1 は 1492-bp、18S rRNA は 488-bp。

D. sphingosine kinase mRNA の発現の相対的变化。グラフは平均値 \pm SE をプロットした。n=4。

E. sphingosine kinase 蛋白の発現。培養ヒト皮膚線維芽細胞に TGF- β (2.5 ng / mL) 添加し、SphK-1 蛋白を western blot 法にて検出した。

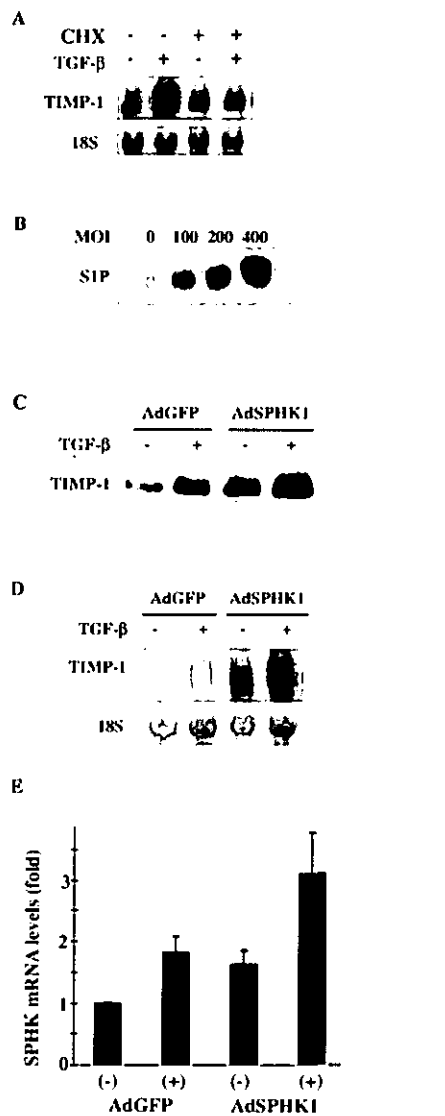


Fig. 2 : A. シクロヘキサミド (CHX) 添加による TGF- β 刺激後の TIMP-1 mRNA の発現への影響。培養ヒト皮膚線維芽細胞に TGF- β (2.5 ng / mL) および / または CHX (20 μ g / mL) を添加し 24 時間培養後、細胞層を回収。TIMP-1 mRNA を northern blot 法にて検出した。B. SphK-1 遺伝子組み込みアデノウイルス感染線維芽細胞の SphK 活性。培養ヒト皮膚線維芽細胞に図に示した濃度 (MOI) の SphK-1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを感染させ、24 時間インキュベート後、回収。 *in vitro* sphingosine kinase assay の結果を示した。C. TGF- β 刺激による SphK-1 遺伝子組み込みアデノウイルス感染細胞における TIMP-1 蛋白の発現変化。SphK-1 遺伝子を組み込んだウイルスとコントロールウイルスをそれぞれ MOI100 で培養ヒト皮膚線維芽細胞に感染させ、24 時間後に TGF- β (2.5 ng / mL) を添加し、48 時間後に培養上清を回収。western blot 法にて TIMP-1 蛋白を検出した。D. TGF- β 刺激による SphK-1 遺伝子組み込みアデノウイルス感染細胞における TIMP-1 mRNA の発現変化。SphK-1 遺伝子を組み込んだウイルスとコントロールウイルスをそれぞれ MOI100 で培養ヒト皮膚線維芽細胞に感染させ、24 時間後に TGF- β (2.5 ng / mL) を添加し、24 時間後に細胞層を回収。Northern blot 法にて TIMP-1 mRNA を検出した。E. TGF- β 刺激による SphK-1 遺伝子組み込みアデノウイルス感染細胞における TIMP-1 mRNA の発現の相対的变化。TIMP-1 mRNA を定量化し平均値 \pm SE をグラフで示した。n=3。

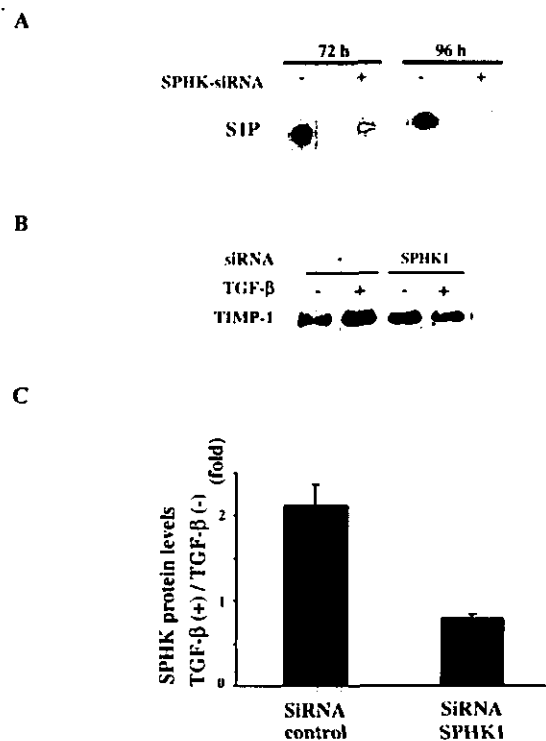
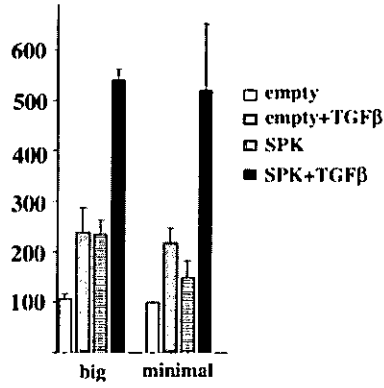


Fig. 3 : A. SphK1 に対する si-RNA による SphK 活性の変化。SphK-1-siRNA (200 nM) およびコントロール siRNA を培養ヒト皮膚線維芽細胞にトランスフェクションし、72 時間及び 96 時間培養後回収し、SphK 活性を *in vitro* sphingosine kinase assay にて測定した。B. TGF- β 刺激後の SphK-1-siRNA トランスフェクション細胞における TIMP-1 蛋白発現の変化。培養ヒト皮膚線維芽細胞に SphK1-siRNA (200 nM) およびコントロール siRNA をトランスフェクションし、48 時間インキュベート後、TGF- β (2.5 ng / mL) を加えて更に 48 時間インキュベート後、培養上清中の TIMP-1 蛋白を western blot 法にて検出した。C. TGF- β 刺激後の SphK-1-siRNA トランスフェクション細胞における TIMP-1 蛋白発現の相対的变化。TIMP-1 蛋白を定量化し平均値 \pm SE をグラフで示した。n=4。

A



B

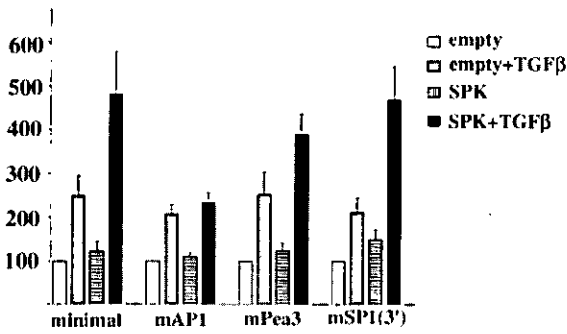


Fig. 4 : A. TGF-β刺激後の SphK-1 遺伝子一過性発現による TIMP-1 プロモーター活性の変化。-736 to +95 (big) ないし -102 to +95 (minimal) TIMP-1 プロモーターと CAT レポーター遺伝子を組み込んだプラスミド (0.9 μg) と SphK1 発現ベクターないし空ベクター (0.1 μg) を cotransfection し、翌日 2.5 ng / mL の TGF-βを加え、翌日 CAT 活性を測定した。平均値±SE をグラフで示した。n=4。

B. TGF-β刺激後の SphK-1 遺伝子一過性発現による AP-1, Pea3, Sp1 結合領域変異 TIMP-1 プロモーター活性の変化。-102 to +95 (minimal) TIMP-1 プロモーター及び AP-1, Pea3, Sp1 結合領域を変異させた minimal TIMP-1 プロモーターを用いて、(A)と同様の検討を行った。平均値±SE をグラフで示した。n=4。

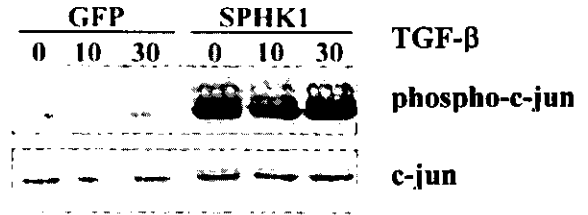


Fig. 5 : TGF-β刺激後の SphK-1 遺伝子組み込みアデノウイルス感染細胞における c-Jun およびリン酸化 c-Jun 蛋白の発現の変化。SphK 遺伝子を組み込んだウイルスとコントロールウイルスをそれぞれ MOI 100 で培養ヒト皮膚線維芽細胞に感染させ、24 時間後に TGF-β (2.5 ng / mL) を添加し細胞層を回収後、western blot 法にて phospho-c-Jun および c-Jun 蛋白を検出した。

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

血清KL-6,SP-D,SP-Aを組み合わせた強皮症関連間質性肺炎
の病態分類

研究協力者 安井正英 金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学講師
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
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

間質性肺炎の血清マーカー（KL-6,SP-D,SP-A）を組み合わせて評価することで、強皮症に合併した間質性肺炎（SSc-IP）の病態分類が可能であるかどうか検討を行った。SSc44名を胸部CTおよび気管支肺胞洗浄液(BALF)細胞所見により、IPをタイプ分類(normal, UIP, cNSIP, fNSIP)し、各マーカー値をカットオフ値で除した補正值を用いて比較検討した。マーカー別に比較すると、KL-6およびSP-Dに関してはいずれのIPもnormalより有意に高値であった。SP-Aでは、fNSIPのみnormalより高値であった。IP間の比較では、すべてのマーカーがcNSIPに比べfNSIPで有意に高値を認めた。マーカーの上昇パターンは、cNSIPではSP-D>KL-6=SP-A、UIPおよびfNSIPではSP-D=KL-6>SP-Aであった。

A. 研究目的

強皮症（SSc）において、間質性肺炎（IP）は、合併率が高かつ重要な予後規定子となっている¹。近年SSc-IPは均一ではなく、病理学的にいくつかのタイプに分類されることが報告されている。しかし、病理学的診断のためには手術侵襲と極めて専門的な病理医の判断が必要である。したがって、病理学的診断に基づいて治療方針を決定することは、日常臨床は大変困難である。

一方、近年II型肺胞上皮細胞より産生され肺特異性の高いKL-6、サーファクタントプロテイン-D（SP-D）およびサーファク

タントプロテイン-A（SP-A）が臨床応用され、各種間質性肺疾患の診断・治療に応用されている。SSc-IPに関しても、これらの血清マーカーが有用な指標となることが報告されている。これらのマーカーは、産生細胞は類似しているが、それぞれの相関は弱く異なる病態を反映していることが推測される。しかし、SSc-IPを含め間質性肺疾患におけるマーカーを組み合わせた検討はほとんど行われていない。もし、血清マーカーを測定するだけでIPの病態を把握できれば、簡便で客観的な指標となり、広く一般臨床に応用することが可能となる。以上

より、本研究では、血清マーカーを組み合わせることにより、SSc-IPの病態分類が可能かどうか検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象患者

金沢大学医学部附属病院皮膚科において入院精査が行われたSSc患者の内、胸部CT、気管支肺胞洗浄液（BALF）細胞所見および血清KL-6, SP-D, SP-Aが検討できた42例（男性7例、女性35例、平均年齢55歳）を対象とした。

2) IPのtype分類

胸部CT上、陰影がないか胸膜直下にわずかに認めるものはnormal、蜂窩肺があるものはUIP、スリガラス影が主体で牽引性気管支拡張所見がないものをcNSIP、あるものをfNSIPと分類した。

3) KL-6, SP-D, SP-Aの測定

KL-6は、エイテストKL-6を用いELISA法にて測定を行った。SP-Dは、SP-Dキット「ヤマサ」EIAを用いて測定を行った。SP-Aは、SP-Aキット（国際試薬）および専用測定器を用いて測定を行った。各マーカーのカットオフ値（KL-6：500 IU/ml, SP-D：110 ng/ml, SP-A：44 ng/ml）で除した値を補正マーカー値として解析に用いた。

4) 気管支肺胞洗浄液細胞所見の解析

BALFは、気管支鏡先端をIPの存在する区域気管支に挿入し、生理的食塩水50mlを注入・吸引する操作を計3回行い回収した。各フラクションごとに回収したBALFに関して、細胞数を求め、サイトスピン標本を作

製後ギムザ染色を行なった。各フラクションごとの標本を光学顕微鏡1000倍下に300個カウントし、細胞比率を算出した。フラクション3を肺泡領域のBALF細胞所見として解析に用いた。

C. 研究結果

1) IP type間のBALF細胞所見の比較（図1）

BALF中リンパ比率では、cNSIPが他の3 typeよりも有意に高値を認めた。また、BALF中好中球比率においては、UIPおよびfNSIPがnormalより有意に高値であったが、IP間には差が認められなかった。

2) IP type間の各血清マーカー補正值の比較（図2）

KL-6およびSP-Dについては、normalに比較しいずれのIP typeでも有意に高値を認めた。一方、SP-AではfNSIPのみがnormalより高値を認めた。IP type間の比較では、すべてのマーカーでfNSIPがcNSIPより高値を認めた。さらに、SP-AではfNSIPがUIPより有意に高値を認めた。

3) IP type別の血清マーカー補正值の比較（図3）

Normalにおいては、すべてのマーカーがカットオフ値以下であり、ほぼ同等のレベルであった。UIPおよびfNSIPにおいては、KL-6とSP-Dが同等のレベルに上昇し、SP-Aは低い反応がみられた。一方、cNSIPに関しては、SP-Dのみが上昇し、KL-6およびSP-Aはカットオフレベルでほぼ同等であった。

4) 血清マーカー補正值の組み合わせとIP type別の分布 (図4)

各2つずつマーカーを組み合わせると関連を検討したが、いずれの組み合わせも有意な相関関係は認められなかった。

D. 考案

SSc-IPを含め、様々な間質性肺疾患においてKL-6, SP-D, SP-Aに関する検討が行なわれ、その臨床的有用性が報告されている。しかし、各マーカーの上昇パターンを組み合わせると評価した報告はないため、今回の検討はSSc-IPのみならずILDの新たな解析方法といえる。

KL-6は膜貫通型の糖蛋白であり、血中に流出するためにはII型肺胞上皮細胞表面からプロテアーゼ等により切断される必要がある。一方、SP-DとSP-Aはリン脂質と結合した分泌型蛋白であり、各種II肺胞上皮細胞の活性化に伴い分泌されるため、軽度の刺激でも出現しやすい。また、SP-DとSP-Aは構造の違いのみならず免疫学的な働きも異なることが判明してきている。今回の検討においても、KL-6, SP-DおよびSP-Aに関して、各マーカーどうしの相関関係は弱く、この点からも3つのマーカーは異なる病態を反映していると考えられる。現在保険上は同時に検討できないことになっているが、3者の違いを明確にし、臨床的意義を明らかにしていくことでこの点が改正されることが望まれる。

次に、各マーカーごとにIP type間の差を検討したが、いずれのマーカーにおいても

fNSIPが最も高値を認めた。今回は呼吸機能や画像上のIPの拡がりによる補正をしていない、したがって、fNSIPに含まれる症例が広範なIPを有していたためにすべてのマーカーが高値を認めた可能性が考えられる。今後IPの拡がりを加味した解析を行い、fNSIPにおいてマーカーが上昇しやすいかどうかを確認する必要がある。

各マーカーの上昇パターンcNSIPではSP-DがKL-6、SP-Aより上昇するパターンであった。一方、UIPおよびfNSIPに関しては、マーカーの上昇パターンには差が認められなかった。特発性間質性肺炎(IIP)においては、cryptogenic organizing pneumonia (以前のBOOP)の場合、SP-DがKL-6よりも上昇することが最近判明してきている。また、IIPにおいてcNSIPは予後がよく、一方fNSIPはUIPと同様に治療反応性の乏しく予後不良であることが報告されている。血清マーカーの点からは、SSc-IPのcNSIPもCOPと類似のパターンとなる。IIPにおいてCOPとcNSIPはステロイド治療が有効であり、予後の面からも共通している。したがって、血清マーカーの上昇パターンも類似していることは、治療反応性や予後も血清マーカーから予測できる可能性が考えられ、今後の重要な検討課題といえる。

病理組織を除き、画像、BALF細胞所見および血清マーカーを用いてSSc-IPを分類する方法を図4に示す。まず胸部CT上蜂窩肺がみられればUIPに分類する。蜂窩肺がないものはNSIPとなり、BALF中リンパ球比率が上昇し、血清マーカー上SP-D>KL-6のパタ

ーンであればcNSIP, BALF中リンパ球比率が正常で, SP-D=KL-6のパターンであればfNSIPと分類できる. この分類法であれば, 一般の施設においても簡単に分類可能となる. ただし, 病理学的整合性やこの分類法が臨床的予後や治療反応性を判断することに妥当であるかどうかを今後検証する必要がある. さらに, 経過をみる上で, 血清マーカーの変動をいかに解釈し, 治療法の選択に反映させていくかも重要であると考え

E. 結 論

血清マーカー (KL-6,SP-D,SP-A) を組み合わせて評価することにより, SSc-IPが病態分類される可能性が示唆された.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録

なし

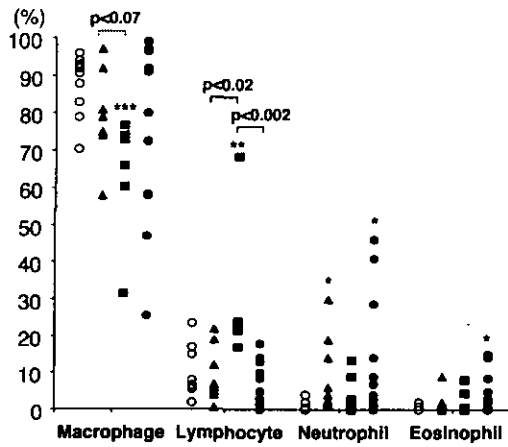


図1 IP type間のBALF細胞所見の比較

○ Normal ▲ UIP ■ cNSIP ● fNSIP *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs normal

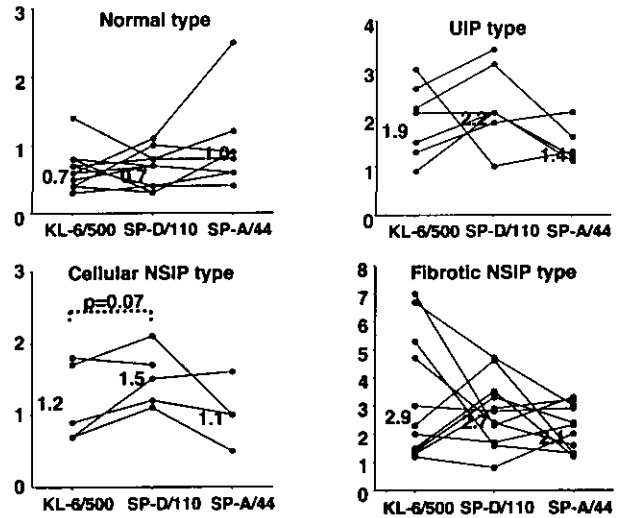


図4 IP type別の血清マーカーの比較

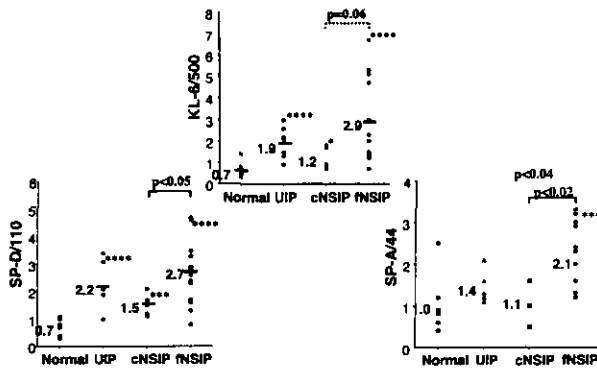


図2 マーカー別IP type間の比較

*p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs normal

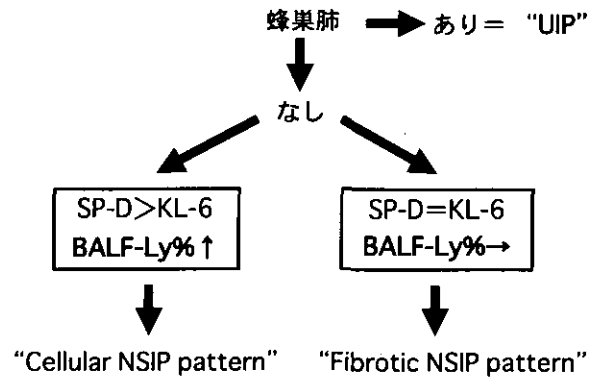


図5 胸部CTと血清マーカーを用いたSSc-IPの分類

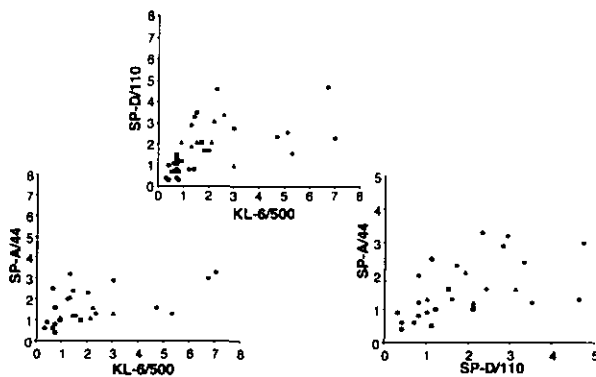


図3 血清マーカーの組み合わせとIP type

○ Normal ▲ UIP ■ cNSIP ● fNSIP

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

全身性強皮症における肺線維症の臨床評価における
血清 SP-D, KL-6 値の比較的研究

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
協力者 築場広一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学特別研究生
協力者 長谷川稔 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症 42 例を対象として、血清 SP-D 値と KL-6 値を ELISA 法で測定し、比較検討した。初診時における血清 SP-D 値、KL-6 値は共に全身性強皮症において高値であり、特に肺線維症を合併した群においてより高値を示した。SP-D 値は KL-6 値に比して%DLco、%VC とより強い相関を示した。更に SP-D 値は KL-6 値より感度が高い反面、特異度では劣る傾向が見られた。経時的には、SP-D 値は KL-6 値より鋭敏に肺線維症の活動を反映する傾向が見られた。以上より、全身性強皮症において SP-D と KL-6 を併せて経時的に測定することにより、肺線維症をより正確に評価できると考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) には、約半数以上において肺線維症 (pulmonary fibrosis: PF) を合併し、また死因として最も高率であるため、その評価は臨床的に極めて重要である。PF を評価する方法としては気管支肺泡洗浄、高解像度 CT (high resolution computed tomography: HRCT) 等が用いられているが、簡便性、侵襲において問題がある。よって簡便で非侵襲的かつ鋭敏な血清学的指標が確立されれば、SSc における PF の活動性を把握していく上で大きな助けになると考えられる。

SP-D は主にⅡ型肺胞上皮細胞、クララ細胞より分泌される肺サーファクタント特異的アポ蛋白である¹。SP-D は特発性間質性肺炎、肺胞蛋白症、膠原病に伴う間質性肺炎等の間質性肺疾患の患者血清中で増加していることが知られている^{2,3}。更に SSc においては血清 SP-D 値の上昇が PF の存在と相関していると報告されている⁴。

KL-6 は Kohno らによって同定された糖蛋白抗原であり、主にⅡ型肺胞上皮細胞、呼吸細気管支上皮細胞に発現している⁵。KL-6 はまた特発性間質性肺炎、過敏性肺臓炎、放射線肺臓炎、膠原病に伴う間質性肺炎

等の間質性肺疾患の患者血清中で増加していることが見いだされており、これらの疾患の診断上有用な血清学的指標と考えられている⁶⁻⁸。最近の研究では、血清 KL-6 値は PF を伴う SSc 患者で、PF を伴わない SSc 患者に比べて有意に上昇していることが示されている⁹。更に急速な KL-6 値の上昇が PF の発症、増悪と相関していることが報告されている¹⁰。

このように血清 SP-D、KL-6 値は間質性肺疾患において上昇することが多々報告されているものの SP-D と KL-6 を同時に測定し検討した報告は少ない。今回の研究では SSc 患者において血清 SP-D、KL-6 値が PF とそれぞれどのように相関しており、両者にどのような違いがあるかを検討した。

B. 研究方法

1. 対象患者

対象患者は SSc 42 例（女性 36 例、男性 6 例）であり、年齢は 49 ± 18 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 14 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 28 例であった。自己抗体別では抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 27 例、抗セントロメア抗体陽性例が 11 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 3 例、自己抗体陰性例 1 例であった。コントロールとして健常人 30 例、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 患者 20 例について検討した。経時的検討では、SSc 6 例からの 83 検体を用いてレトロスペクティブに行った。観察期間は 2.9 ± 1.5 年であった。

2 ELISA

血清 SP-D 値は市販されている ELISA キットを用いて測定した (SP-D kit, Yamasa, Chiba, Japan)。カットオフ値は 110ng/ml である。血清 KL-6 値は市販されている ELISA キットを用いて検出した (Eitest KL-6, Eisai, Tokyo, Japan)。カットオフ値は 500U/ml である。

C. 研究結果

1. 初診時における血清 SP-D、KL-6 値

我々はまず初診時における血清 SP-D、KL-6 値について検討した (図 1)。SSc における血清 SP-D 値は、健常人、SLE と比較して有意に高値であった。PF を伴う SSc では、PF を伴わない SSc に比べて有意に高値を示した。PF を伴わない SSc、SLE と健常人との間には有意差は見られなかった。さらに SP-D 値は %VC、%DLco と有意に逆相関していた (図 2)。血清 SP-D 値での SSc 患者における PF 診断の感度は 91% (21/23) であり、特異度は 88% (21/24) であった。

SSc における血清 KL-6 値は、健常人、SLE と比較して有意に高値であった。PF を伴う SSc では、PF を伴わない SSc に比べて有意に高値を示した。PF を伴わない SSc、SLE と健常人の間には有意差は見られなかった。さらに、KL-6 値は %VC、%DLco と有意に逆相関していた (図 2)。また、血清 KL-6 値は SP-D 値と正の相関が見られた。血清 KL-6 値での SSc 患者における PF の診断の感度は 39% (9/23) であり、特異度は 100% (9/9) であった。このように、血清 SP-D、

KL-6 値の上昇は SSc における PF の存在を示唆しており、さらに重症度とも相関していることが分かった。加えて、SP-D は KL-6 に比べてより感度が高い反面、KL-6 は SP-D より特異度が高いことが分かった。これらの結果から、血清 SP-D、KL-6 を同時に測定することにより SSc における PF をより正確に評価できるものと考えられた。

2. SSc における血清 SP-D 値と KL-6 値の臨床的および血清学的相関

血清 SP-D、KL-6 値と SSc の臨床症状、血清学的変化との相関を調べるために、SSc 42 例を以下の 3 群に分けた (表)。最初の群は SP-D、KL-6 が共に正常値であった群であり、18 例がこれに含まれた (A)。次は SP-D は高値を示したものの KL-6 は正常値であった群であり、15 例がこれに含まれた (B)。最後に SP-D、KL-6 共に上昇していた群であり、9 例がこれに含まれた (C)。SP-D は正常値を示しながら KL-6 が上昇していた例はこの研究の対象からは見られなかった。PF は A 群に比べ B、C 群で有意に高率に合併していた。同様に %VC、%DLco の低下は A 群に比べ B、C 群で有意に高率に観察された。さらに、B、C 群では A 群より抗トポイソメラーゼ抗体陽性例が有意に多く存在していた。B、C 群間には有意な相違は見られなかったものの、PF や肺機能障害の合併において C 群が B 群より高率となる傾向がみられた。

3. 血清 SP-D、KL-6 値の経時的検討

血清 SP-D、KL-6 値が PF の発症や増悪と相関しているかどうかを検討するために、6 例の SSc 患者から採取した血清 83 検体を

用いてレトロスペクティブに経時的検討を行った (図 4)。

症例 1 は初診時、SP-D 256ng/ml と上昇していたが KL-6 は 55U/ml と正常値を示しており、胸部 CT にて PF は認められず呼吸機能も正常であった。皮膚硬化に対しプレドニゾン 20mg/日による治療を開始したが 6 か月後に KL-6 値が 956U/ml と急激に上昇すると共に、胸部 CT 上で両下肺野にスリガラス状陰影、網状陰影が出現した。その間 SP-D は初診時から大きな変化を見せず 250-300ng/ml で推移していた。呼吸機能は %VC 56、%DLco 39 と著明に低下していた。その後 PF の進行は止まったが、SP-D、KL-6 共に高値を維持していた。初診から 5 年後になって SP-D は徐々に低下し始め、KL-6 も SP-D にやや遅れながら低下し始めた。

症例 2 は初診時には軽度の KL-6 高値 (554U/ml) と SP-D の著明な上昇を示していた (210ng/ml)。胸部 CT 上では軽度の PF を認めた。当初皮膚硬化に対してプレドニゾン 15mg/日による治療を行っていたが、4 か月後に KL-6 値が 1,463U/ml と急激に上昇すると共に、胸部 CT で両中下肺野にかけてスリガラス状陰影と共に網状陰影が出現したため PF の亜急性増悪と考えた。SP-D は 205ng/ml とほぼ初診時のままの値であった。ステロイドパルス療法を行ったところ SP-D はやや低下し、KL-6 もやや安定したかに見えたが PF の進行は止まらず、初診から 32 か月後に死亡した。

症例 3 は、初診時には SP-D が 139ng/ml

とやや高値を示していたものの KL-6 は 368U/ml と正常値であり、胸部 CT にても異常陰影は見られなかった。皮膚硬化に対し、プレドニゾン 20mg/日による治療を開始したが、初診から 2 か月後に突如 KL-6 が 886U/ml に、SP-D も 198ng/ml と上昇し、胸部 CT では両下肺野にスリガラス状陰影が出現した。初診から 8 か月後には SP-D 236ng/ml、KL-6 1,311U/ml と更に上昇し、胸部 CT 上スリガラス陰影はさらに増悪したため、シクロフォスファミドパルス療法を 6 クール施行したところパルス療法中は SP-D、KL-6 共に横ばいとなり呼吸機能の悪化も止まった。しかしながら、パルス療法が終了すると共に再び両値の上昇が見られた。

症例 4 は初診時すでに SP-D 233ng/ml、KL-6 908U/ml と高値を示していた。胸部 CT では両下肺野に網状陰影が存在し呼吸機能の低下も見られた。PF の増悪を防ぐためにプレドニゾンを 30mg/ml に増加すると共に、計 6 クールのシクロフォスファミドパルス療法を施行した。パルス療法の間、呼吸機能は安定し、胸部 CT 上も PF の進行は見られなかった。KL-6 はほぼ初診時と同じ値で推移していたが、SP-D は初診時より低値を示していた。

症例 5 は初診時 SP-D 231ng/ml、KL-6 930U/ml と上昇していた。胸部 CT では両下肺野にスリガラス様陰影、網状陰影が見られ、%DLco も軽度低下していた。初診 1 ヶ月後より PF に対してシクロフォスファミドパルス療法を開始したところ 2 ヶ月後には SP-D が低下し始め、SP-D より 3 ヶ月ほど

遅れて KL-6 も低下した。合計 6 クールのパルス療法を施行したところ、CT 上間質影の改善が見られた。

症例 6 では、初診時 SP-D 186ng/ml、KL-6 1009U/ml と著明な高値を示していた。胸部 CT では両下肺野スリガラス陰影、網状陰影を認め、呼吸機能も低下していた。その後空咳、呼吸困難が増悪したため、PF の増悪を考えシクロフォスファミドパルス療法を開始した。計 3 クール行うも CT 上の間質影の増加、呼吸器症状の増悪がさらに進行を見せると同時に SP-D、KL-6 の上昇も続いた。この症例に対してシクロフォスファミドパルス療法は無効と考えステロイドパルス療法を行うと共にシクロスポリンの投与を開始したところ SP-D、KL-6 共に減少すると共に呼吸器症状の改善、CT 上のスリガラス陰影の改善が見られた。以上より、血清 SP-D、KL-6 値は SSc における PF を反映すると共に、SP-D は KL-6 に比してやや早く変化を見せると考えられた。

D. 考案

今回の研究では、血清 SP-D、KL-6 値が SSc、特に PF を伴う SSc において高値を示していた。SP-D、KL-6 値は PF の合併を反映し、呼吸機能低下と関連していた。さらに SP-D 値は KL-6 値と強い正の相関を示した。SP-D は KL-6 より鋭敏に PF を反映する反面、KL-6 は SP-D より高い特異度を示した。これらの結果から、SP-D、KL-6 は共に SSc に伴う PF の合併と重症度を反映すると考えられた。さらに SP-D は感度の高い

PF の血清学的指標になりうるが、偽陽性に注意する必要がある、一方 KL-6 は PF の特異的な指標であるが、偽陰性に注意する必要があると考えられた。以上より、血清 SP-D、KL-6 値を同時に測定することで、どちらか一方を測定するよりより正確に PF を評価できると考えられた。

SP-D は 43kDa の肺サーファクタント特異的アポ蛋白である¹。血清 SP-D 値の上昇は肺胞上皮の破壊と血中への流入によって引き起こされるため、肺胞上皮の障害の程度を反映しているものと考えられる。一方 KL-6 は 200kDa と、SP-D に比べると大きいムチン様糖脂質である³。KL-6 は間質性肺疾患における再生、増殖したⅡ型肺胞上皮細胞において、正常のⅡ型肺胞上皮細胞よりも強く発現していたと報告されている^{5,6}。更に気管支肺胞洗浄液中の KL-6 値は間質性肺疾患において上昇しており、気管支肺胞洗浄液中の KL-6 値は血清 KL-6 値と有意に相関していた^{6,7}。これらの結果から、間質性肺疾患では増殖した再生Ⅱ型肺胞上皮細胞が大量の KL-6 を産生し、それが血液中に流入することによって血清 KL-6 値の上昇を引き起こしていると考えられる。以上より、血清 SP-D 値の上昇は肺胞上皮の破壊を反映し、一方血清 KL-6 値の上昇は肺胞の再生と増殖を反映していると推測される。さらに SP-D は KL-6 より小型なため KL-6 より容易に漏出するものと考えられる。本研究で経時的検討を行った 2 例（症例 1、3）は初診時すでに PF を伴っており、SP-D は高値を示していた。当初 KL-6 は正常値であったが、数ヶ

月後になり KL-6 は上昇し始めた。症例 2 では KL-6 は SP-D より数ヶ月遅れて上昇する傾向が見られた。さらに症例 1、5、6 では KL-6 は SP-D より数ヶ月遅れて減少した。これらの結果から、SP-D は KL-6 より鋭敏に PF の活動性を反映すると考えられた。

E. 結論

血清 SP-D、KL-6 値は SSc において PF の重症度と共に活動性を反映しており、両者を同時に測定し経過観察していくことにより PF をより正確に評価できると考えられた。血清 SP-D、KL-6 値の測定は非常に簡便であり非侵襲的であることから、発症早期の SSc において定期的に測定し PF の評価を行っていくことが重要であると考えられた。

F. 文献

1. Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 646-78.
2. Nagae H, Takahashi H, Kuroki Y, Honda Y, Nagata A, Ogasawara Y, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using F(ab')₂ fragment for the detection of human pulmonary surfactant protein D in sera. *Clin Chim Acta* 1997; 266: 157-71.
3. Ihn H, Asano Y, Kubo M, Yamane K, Jinnin M, Yazawa N, et al. Clinical significance of serum surfactant protein

- D (SP-D) in patients with polymyositis/dermatomyositis: correlation with interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 1268-72.
4. Takahashi H, Kuroki Y, Tanaka H, Saito T, Kurokawa K, Chiba H, et al. Serum levels of surfactant protein A and D are useful biomarkers for interstitial lung disease in patients with progressive systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 258-63.
 5. Kohno N, Akiyama M, Kyoizumi S, Hakoda M, Kobuke K, Yamakido M: Detection of soluble tumor-associated antigens in sera and effusions using novel monoclonal antibodies, KL-3 and KL-6, against lung adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 1988; 18: 203-16.
 6. Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonia activity: sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest* 1989; 96:68-73.
 7. Kobayashi J, Kitamura S. KL-6: a serum marker for interstitial pneumonia. *Chest* 1995; 108: 311-5.
 8. Hamada H, Kohno N, Akiyama M, Hiwada K. Monitoring of serum KL-6 antigen in a patients with radiation pneumonia. *Chest* 1992; 101: 858-860.
 9. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Nishijima C, Takehara K. Elevated serum KL-6 levels in patients with systemic sclerosis: association with the severity of pulmonary fibrosis. *Dermatology* 2000; 200: 196-201.
 10. Yanaba K, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum KL-6 levels in patients with systemic sclerosis: association with the activity of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21: 429-36.

G. 研究発表

1. 論文発表

Yanaba K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S: Comparative study of serum surfactant protein-D and KL-6 levels in patients with systemic sclerosis as markers for monitoring the activity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol*, in press.

2. 学会発表

第 67 回日本皮膚科学会東京支部学術大会
「全身性強皮症における肺線維症の臨床評価
における血清 SP-D, KL-6 値の比較的研究」
平成 15 年 2 月 15 日

H. 知的所有権の出願、登録状況

なし

表 . Correlation of serum SP-D and KL-6 levels with clinical and serologic features in patients with SSc*

	Patients with normal SP-D and normal KL-6 (n = 18)	Patients with elevated SP-D and normal KL-6 (n = 15)	Patients with elevated SP-D and elevated KL-6 (n = 9)
Sex (male: female)	2:16	4:11	0:9
Age (mean years)	44	52	53
Disease duration (mean years)	4.4	4.1	3.7
Organ involvement (%)			
Pulmonary fibrosis	11	80‡	100‡
Decreased %VC	6	53†	67‡
Decreased %DLco	28	87†	100‡
Esophagus	67	60	78
Heart	0	37	11
Kidney	0	7	11
Joint	28	33	0
Muscle	22	27	11
Laboratory findings (%)			
Elevated ESR	17	27	44
Elevated CRP	11	13	22
ANA specificity (%)			
Anti-topo I	33	87†	89†
ACA	56	7†	0†

*Patients were grouped into the following 3 groups: SSc patients with normal KL-6 and SP-D levels, those with normal KL-6 and elevated SP-D levels, and those with elevated KL-6 and SP-D levels.

Unless noted otherwise, values are percentages.

ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; ANA, antinuclear Abs; Anti-topo I, anti-topoisomerase I Ab; ACA, anticentromere Ab.

† p < 0.01 versus patients with normal SP-D and normal KL-6 levels.

‡ p < 0.001 versus patients with normal SP-D and normal KL-6 levels.

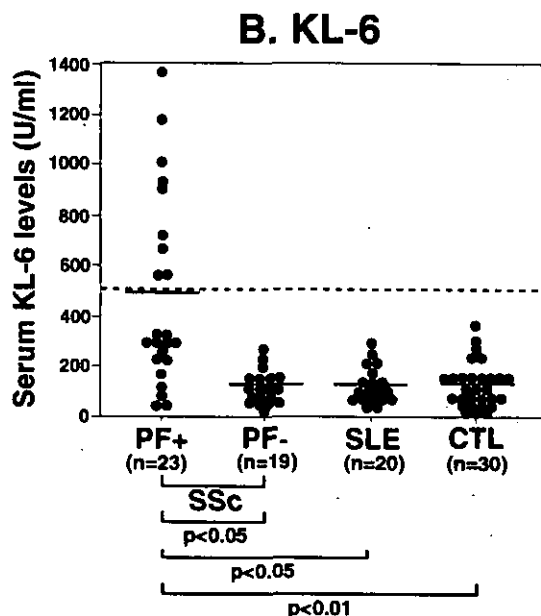
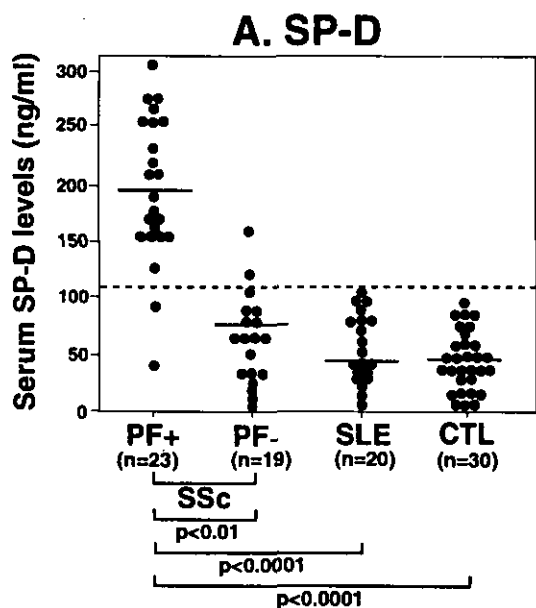


図1. 肺線維症合併 SSc (PF+)、肺線維症非合併 SSc (PF-)、全身性エリテマトーデス (SLE)、健常人 (CTL) における血清 SP-D 値 (A) および KL-6 値 (B)。破線はカットオフ値 (SP-D: 110ng/ml、KL-6: 500U/ml) を示す。

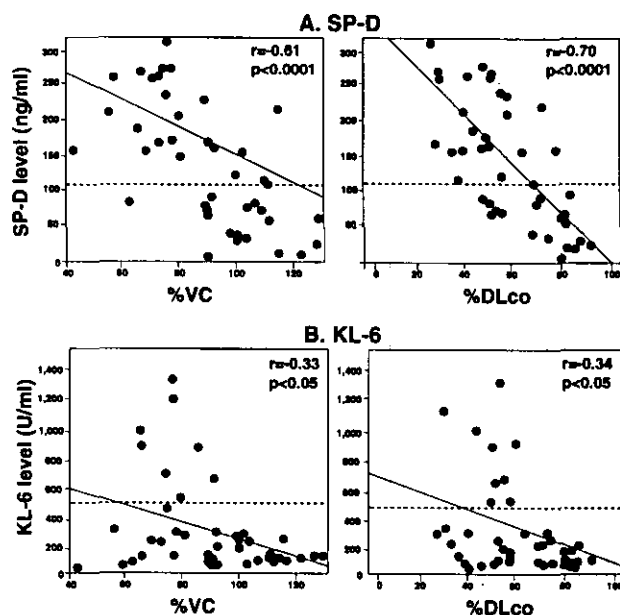


図2. 血清 SP-D 値 (A) および KL-6 値 (B) と%VC、%DLco との相関。破線はカットオフ値を示す。

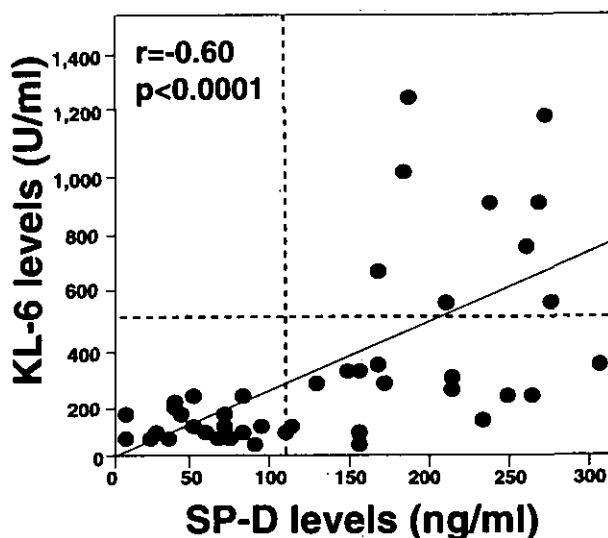


図3. 42例のSScにおける血清SP-D値とKL-6値の相関。破線はカットオフ値を示す。

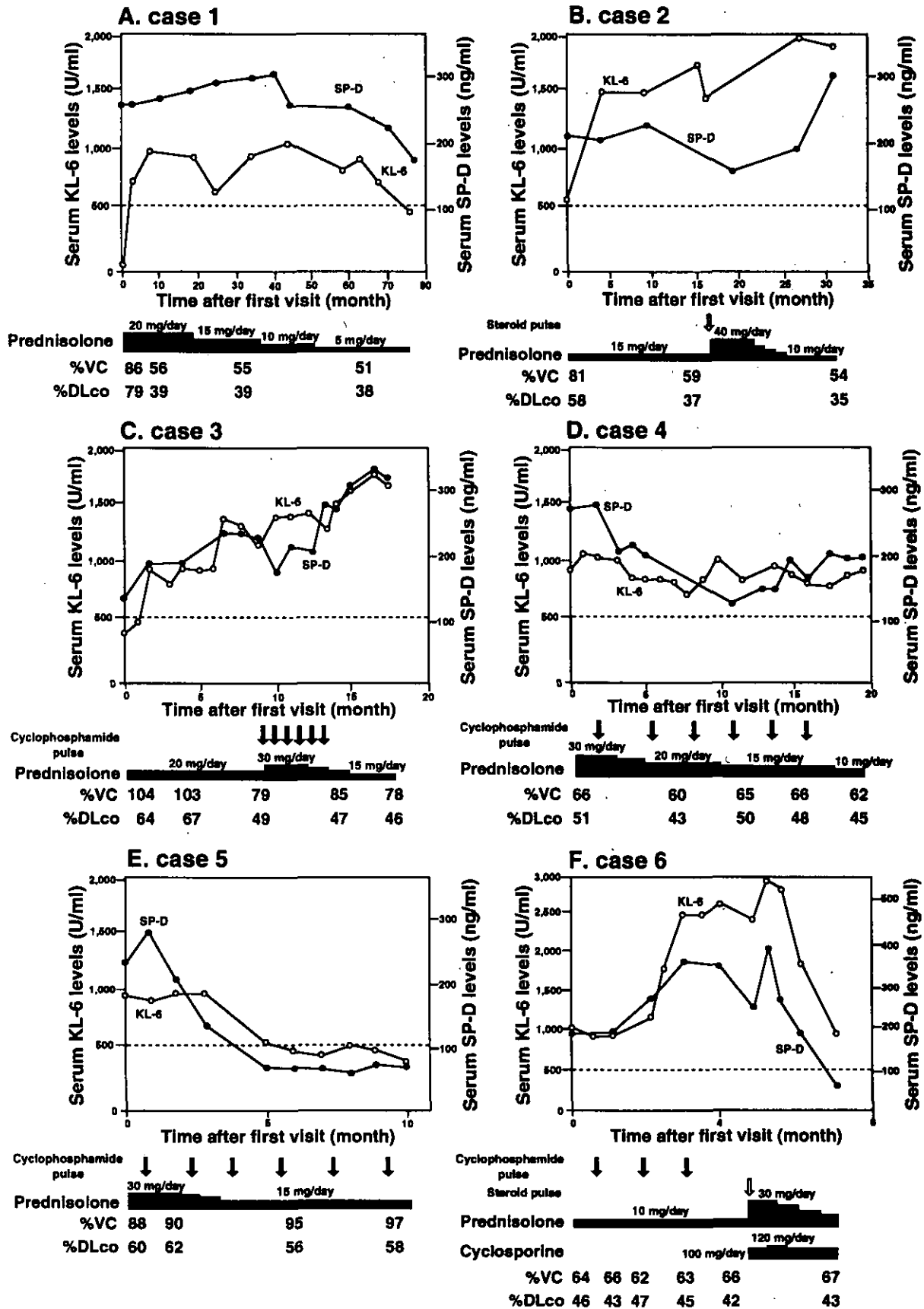


図4. 6例のSScにおける血清SP-D値及びKL-6値の経時的変化。黒点はSP-D値を、白点はKL-6値を示す。破線はカットオフ値を示す。

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

全身性強皮症において血清可溶性 PSGL-1 値は
肺線維症の合併と逆相関する

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
協力者 築場広一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学特別研究生
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) は、P-selectin の高親和性リガンドであり、可溶性 PSGL-1 (sPSGL-1) は PSGL-1 に対し拮抗的に働くことが知られている。全身性強皮症 (SSc) 65 例を対象として血清 sPSGL-1 値を ELISA 法にて測定し、経時的変化について検討した。初診時の sPSGL-1 値は正常群と比して高く、特に肺線維症 (PF) 非合併例で高値を示した。SSc における sPSGL-1 値は %VC と逆相関を呈した。経時的には、PF 非合併例において病初期に sPSGL-1 が高値を示したのに対し、PF 合併例では病初期から一貫して低値を示していた。以上より、sPSGL-1 は PF の合併に対して抵抗的に作用しており、治療に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

白血球が血中から炎症部位に遊走するプロセスは各種細胞接着分子により精妙に制御されている¹。細胞接着分子の中でも特に大きな役割を果たしているのが P-セレクチン、E-セレクチン、L-セレクチンからなるセレクチンファミリーである²。P-セレクチンは活性化された血管内皮細胞上に発現し、白血球上に発現する P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) と結合することにより、白血球の炎症局所への遊走を誘引する^{3,4}。PSGL-1 は E-, L-セレクチンとも結合するが、その親和性は P-セレクチンと比べると低いこ

とが分かっている^{5,6}。可溶性 PSGL-1 (soluble P-selectin glycoprotein ligand-1: sPSGL-1) は PSGL-1 のアンタゴニストとしてはたらき、血管内皮細胞上の P-セレクチンに結合することで PSGL-1 と P-セレクチンの結合を阻害し、炎症細胞の局所浸潤を減少させると考えられている^{5,6,7,8}。

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) は全身性自己免疫を背景にして皮膚や肺などの線維化と血管障害を引き起こす。その病因は不明であるが、SSc における皮膚や肺の病変部には単核球をはじめとした炎症細胞浸潤がみられており、これらの細胞が産生

するサイトカインや成長因子が病態へ関与している可能性がある。

今回我々は SSc 患者における血清 sPSGL-1 値を測定し、その病態への関与を検討した。

B. 研究方法

1. 対象患者

対象患者は SSc 65 例（女性 57 例、男性 8 例）であり、年齢は 2-72 歳（平均 45 歳）であった。病型別では limited cutaneous SSc (ISSc) が 34 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 31 例であった。自己抗体別では抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 28 例、抗セントロメア抗体陽性例が 21 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 3 例、その他が 13 例であった。コントロールとして健常人 30 例、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 患者 20 例、皮膚筋炎 (dermatomyositis: DM) 患者 20 例について検討した。経時的検討では、SSc 35 例からの 177 検体を用いてレトロスペクティブに行った。

2. ELISA

血清 sPSGL-1 値は市販されている ELISA キットを用いて測定した (sPSGL-1 kit, Bender MedSystems, Vienna, Austria)。

C. 研究結果

1. 初診時における血清 sPSGL-1 値

我々はまず初診時における血清 sPSGL-1 値について検討した (図 1)。SSc における血清 sPSGL-1 値は、健常人、SLE、DM と比較して有意に高値であった。血清 sPSGL-1 値

は、ISSc、dSSc においてともに、健常人、SLE、DM と比較して有意に高値であったが、ISSc、dSSc との間には有意差は見られなかった。

2. SSc における血清 sPSGL-1 値と臨床症状との相関

健常人における sPSGL-1 の平均値+2SD をカットオフ値 (18.4U/ml) とし、上昇群と非上昇群での臨床症状との相関を検討した (表)。sPSGL-1 値は SSc 患者において 42% (27/65) で上昇していた。sPSGL-1 上昇群では非上昇群に比べて有意に肺線維症の合併が低く、%VC の低下も少なかった。さらに SSc において血清 sPSGL-1 値と %VC、%DLco との相関を調べたところ、sPSGL-1 値は両者と有意に正の相関が見られた (図 2)。以上より SSc において血清 sPSGL-1 値は肺線維症の合併および重症度と相関することが分かった。

3. 血清 sPSGL-1 値の経時的変化

血清 sPSGL-1 値が臨床症状と相関しているかどうかを検討するために、35 例の SSc 患者から採取した血清 177 検体を用いてレトロスペクティブに経時的検討を行った (図 3)。肺線維症合併の有無により、SSc 患者を 2 群に分けた。肺線維症合併群は 11 例あり、うち 2 例で初診時に sPSGL-1 高値を示したが経過中正常値に転じた。4 例では経過中一時的に高値を示したがその後再び正常値となった。残りの 5 例では初診時から一貫して正常値のままであった。肺線維症非合併群は 24 例あり、17 例が初診時に sPSGL-1 高値を示し、そのうち 8 例が経過中一貫して高値を示していた。24 例中 5 例のみが初診時より一貫し

て sPSGL-1 正常値を示していた。以上から、SSc において病初期に sPSGL-1 値が高値を示した群では肺線維症の合併が減少すると考えられた。また経過中一貫して sPSGL-1 値が低値を示した群では、肺線維症の合併が増加すると思われた。

D. 考案

SSc において血清 sPSGL-1 値が検討されたのは今回の我々の研究が初めてである。sPSGL-1 値は健常人、SLE、DM に比べ SSc において有意に上昇していた。sPSGL-1 値は皮膚硬化の程度とは相関が見られなかった。sPSGL-1 上昇群では肺線維症の合併、呼吸機能異常は有意に低頻度であった。肺線維症非合併群では病初期に sPSGL-1 値が高値を示す一方、肺線維症合併群では経過中一貫して sPSGL-1 低値を示していた。以上から、sPSGL-1 の上昇は SSc における肺線維症の防御因子であることが推測された。

近年、組み換え DNA 合成技術による PSGL-1 (recombinant soluble PSGL-1: rPSGL-1) が開発された⁵。rPSGL-1 は P-, E-, L-セレクトリンに結合し、PSGL-1 のアンタゴニストとして働く^{6,7,8}。動物では、深部静脈血栓症、心筋虚血再灌流、腎虚血再灌流、肝虚血再灌流、動脈血栓症などにおいて有効性が示されている^{7,10-13}。これらの報告より、セレクトリンと PSGL-1 との結合をブロックし炎症細胞浸潤を阻害することはこれらの疾患の治療に有効な方法であると考えられる。今回の我々の研究にて肺線維症を伴わない SSc において病初期に sPSGL-1 が高値を示していた

ことより、sPSGL-1 の持続高値が肺線維症の出現、増悪を防いでいた可能性がある。このことから SSc の病初期における sPSGL-1 の持続投与が治療として有効な可能性が示唆された。

E. 結論

血清 sPSGL-1 値は SSc における肺線維症に対して抑制的に働いており、SSc における肺線維症の治療に有用である可能性が示唆された。

F. 文献

1. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1995; 57: 827-72.
2. McEver RP. Selectins. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 75-84.
3. Tedder TF, Li X, Steeber DA. The selectins and their ligands: adhesion molecules of the vasculature. *Adv Mol Cell Biol* 1999; 28: 65-111.
4. Patel KD, Moore KL, Nollert MU, McEver RP. Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow condition. *J Clin Invest* 1995; 96: 1887-96.
5. Sako D, Chang X-J, Barone KM et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993; 75: 1179-86.