

産生を抑制するとの報告がある(8)。しかしながら IL-10 が皮膚硬化の程度と正の相関関係を示すとの報告もある(9)。我々の結果および過去の報告より Th2 サイトカインは病初期に上昇し SSc の皮膚線維化に寄与しているものと考えられる。

MCP-1 は単球の遊走活性をもつケモカインだが T 細胞の Th2 分化にも関与しており Th2 ケモカインとして知られている。ブレオマイシン誘発性強皮症モデルマウスでは MCP-1 mRNA の発現が亢進しており、抗 MCP-1 抗体を投与すると皮膚硬化を抑制する(10)。我々の結果では、血清中 MCP-1 濃度は全経過で健常人よりも有意に上昇しており、経過とともに低下する傾向にあった。また、SSc 患者皮膚において MCP-1 mRNA は late-stage よりも early-stage により多く発現していた。よって、MCP-1 は炎症性細胞を皮膚に浸潤させ Th2 偏倚とし SSc の病態形成に関与しているものと考えられた。

TGF- $\beta$  1 は SSc の線維化の中心的な役割をはたしている成長因子で、Th1 反応を抑制することにより Th2 分化に寄与している(11)。我々の結果では、MCP-1 と同様に血清 TGF- $\beta$  1 濃度は全経過で健常人よりも有意に上昇しており、経過とともに低下する傾向にあった。また、SSc 患者皮膚において TGF- $\beta$  1 mRNA は late-stage よりも early-stage により多く発現していた。よって、TGF- $\beta$  1 は SSc において繊維芽細胞から膠原線維の産生および、Th2 への偏倚を介して皮膚硬化に寄与していると考えられる。

IL-12 は naive T 細胞を Th1 へ分化させ

る強力な Th1 サイトカインである。Th2 サイトカインとは逆に IL-12 は経過中、皮膚硬化の改善とともに上昇する傾向にあった。さらに、SSc 患者皮膚において IL-12 mRNA は early-stage では発現されず late-stage のみに発現していた。Th2 サイトカインは一般的に繊維芽細胞からの膠原線維の産生を増強するが、IL-12 は Th2 サイトカインを抑制することによってその効果を発揮している可能性がある。また、IL-12 は TGF- $\beta$  の産生を抑制することより(12)、SSc 患者皮膚において皮膚硬化を減少させる可能性も考えられる。最近の報告では Tsk マウスに IL-12 を過剰発現させると皮膚硬化の改善がみられる(13)。以上より病初期の SSc では Th2 優位であるが、経過に伴い皮膚硬化の改善とともに Th1 優位となることが示された。

## E. 結 論

Th2 優位のサイトカインバランスを Th1 へ傾けるような治療法が SSc に有効である可能性が示唆された。また、経時的な IL-12 の測定が疾患活動性や予後を反映する指標となりうることがわかった。

## F. 文 献

1. Black C, Dieppe P, Huskisson T, Hart FD. Regressive systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1986;45:384-8.
2. Chizzolini C. T lymphocyte and fibroblast interactions: the case of skin involvement in systemic

- sclerosis and other examples.  
Springer Semin Immunopathol  
1999;21:431-50.
3. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992;35:67-72.
  4. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997;24:328-32.
  5. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998;25:308-13.
  6. Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, Nagaoka T, Hamaguchi Y, Nishijima C, et al. Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000;27:2838-42.
  7. Gillery P, Fertin C, Nicolas JF, Chastang F, Kalis B, Banchereau J, et al. Interleukin-4 stimulates collagen gene expression in human fibroblast monolayer cultures. Potential role in fibrosis. *FEBS Lett* 1992;302:231-4.
  8. Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994;94:2489-92.
  9. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2001;27:140-6.
  10. Yamamoto T, Nishioka K. Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol* 2003;121:510-6.
  11. Maeda H, Shiraishi A. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol* 1996;156:73-8.
  12. Marth T, Strober W, Seder RA, Kelsall BL. Regulation of transforming growth factor-beta production by interleukin-12. *Eur*

J Immunol 1997;27:1213-20.

13. Tsuji-Yamada J, Nakazawa M, Takahashi K, Iijima K, Hattori S, Okuda K, et al. Effect of IL-12 encoding plasmid administration on tight-skin mouse. Biochem Biophys Res Commun 2001;280:707-12.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

松下貴史、佐藤伸一、長谷川稔、濱口儒人、竹原和彦 全身性強皮症患者血清中におけるサイトカインの経時的解析 第55回日本皮膚科学会中部支部学会、金沢、平成16年9月12日

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

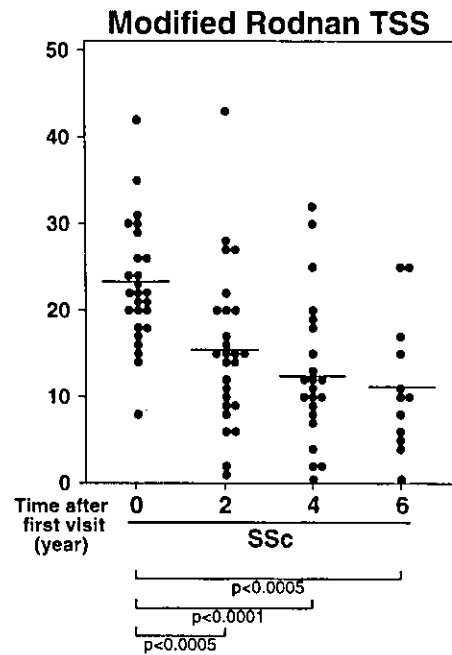


図1：皮膚硬化の経時的変化。皮膚硬化は modified Rodnan TSS にて評価した。

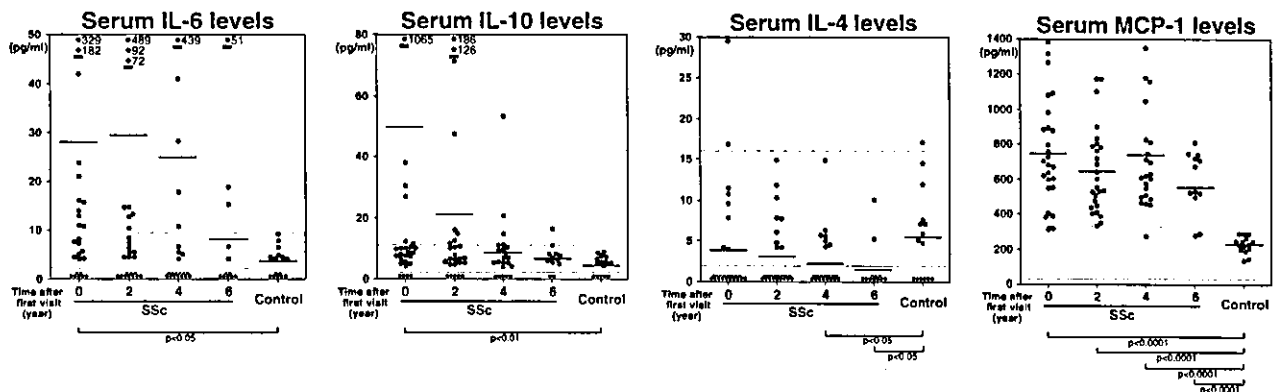


図2：Th2 サイトカインの経時的変化。点線は健常人の平均値+2SDに設定したカットオフ値

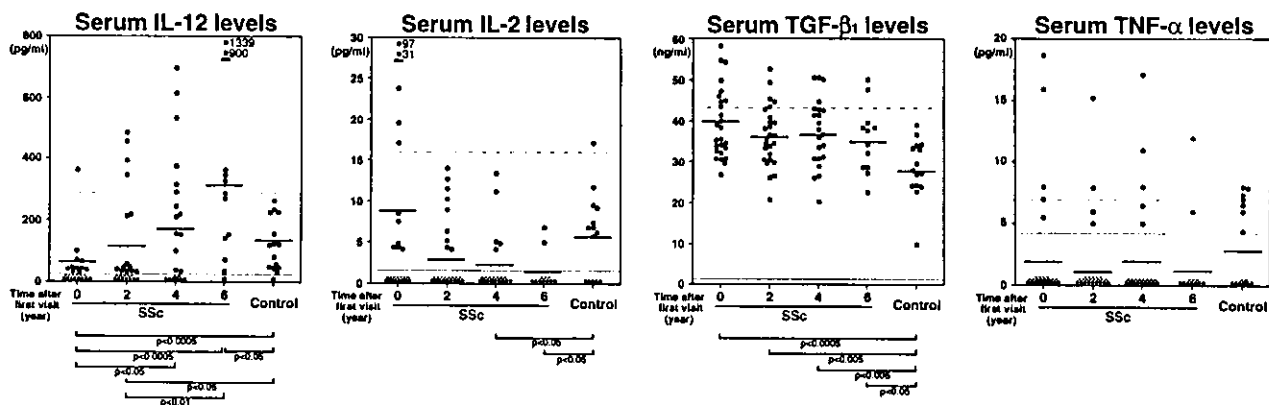


図 3: Th1 サイトカインおよび TGF-β1 と TNF-α の経時的変化。点線は健常人の平均値 +2SD に設定したカットオフ値

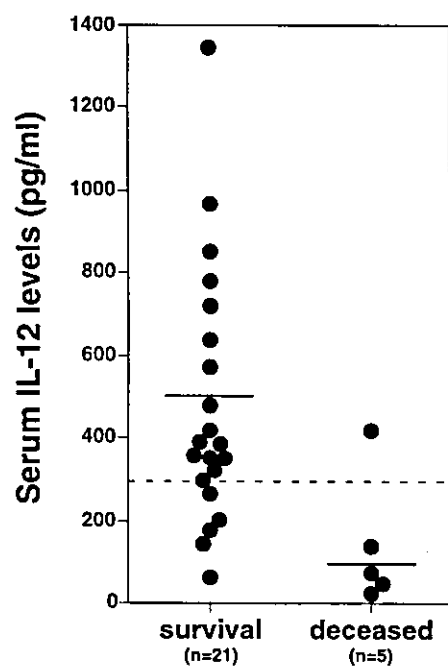


図 4: 血清 IL-12 濃度と死亡例の関係。個々の経過中の血清 IL-12 濃度の最大値を抽出し生存例と原病死した症例で解析した。点線は健常人の平均値 +2SD に設定したカットオフ値

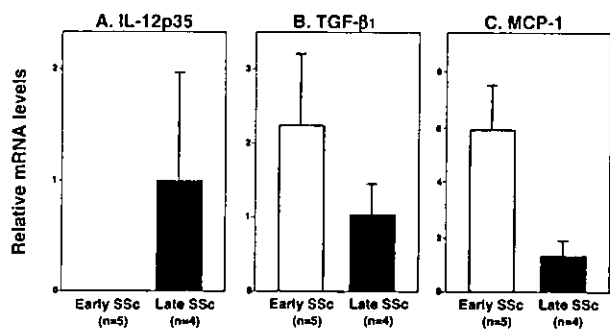


図 6: IL-12、TGF-β1、および MCP-1 の dSSc 患者皮膚での mRNA 発現量。各サイトカイン mRNA は real-time RT-PCR にて定量した。

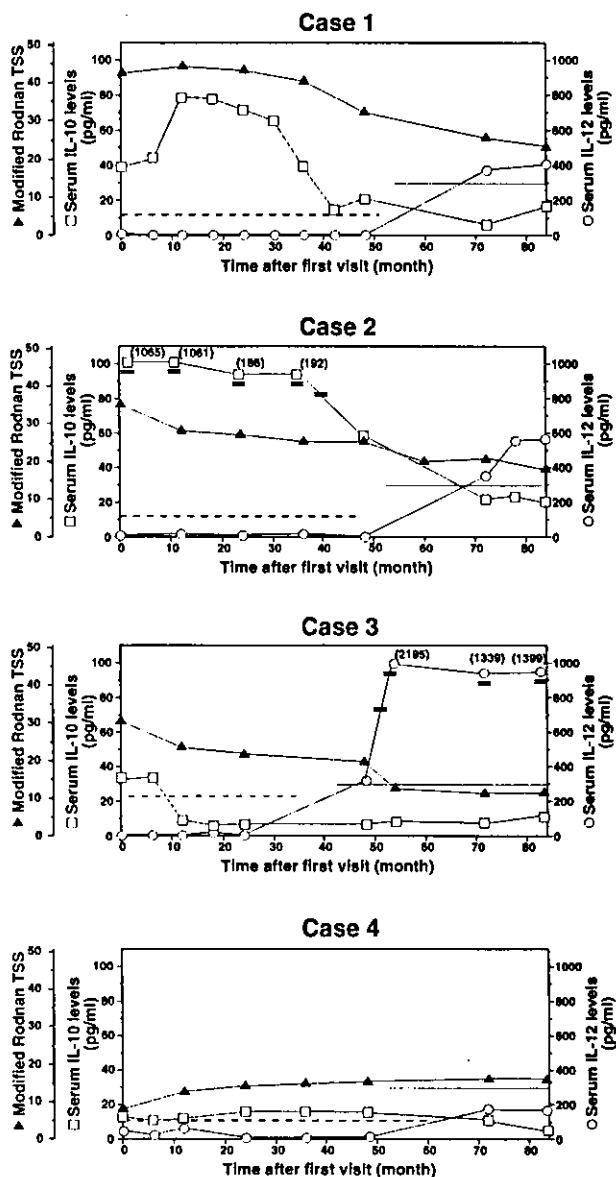


図 5: 皮膚硬化および血清 IL-10,12 濃度の代表例での経時的変化。点線および細線は健常人の平均値 +2SD に設定した血清 IL-10 と IL12 濃度のカットオフ値

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 MCP-3/CCL7 値は  
皮膚硬化、肺線維症の重症度と相関する

分担研究者 佐藤伸一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学教授

協力者 築場広一 東京慈恵会医科大学皮膚科学助手

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（SSc）69例を対象として血清 MCP-3 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 MCP-3 値は正常群と比較して高く、特に diffuse 型で高値を示した。また MCP-3 値は皮膚硬化や肺線維症の重症度と有為な相関が見られた。さらに経時的には広範囲にわたる皮膚硬化が持続した症例や、肺線維症が増悪した症例で上昇が見られた。以上から MCP-3 は SSc の皮膚硬化において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

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、さらに単核球浸潤の程度と皮膚線維化との間に相関が見られる<sup>1,2</sup>。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。

Monocyte chemoattractant protein 3 (MCP-3) は CC ケモカインに属し、monocyte、活性化 T 細胞、好酸球、好塩基球に対し強力な遊走能を示す<sup>3,4</sup>。早期の SSc 患者の皮膚における浸潤単核球に著明な MCP-3 の発現が見られるとの報告があり、SSc の病態形成

において MCP-3 が大きく関与している可能性が示唆されている<sup>5</sup>。今回我々は SSc 患者における血清 MCP-3 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 69 例（女性 59 例、男性 10 例）であり、年齢は 2-77 歳（平均 51 歳）であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 33 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 36 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 41 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 6 例、特異抗体陰性例が 1 例であった。コントロールとして健常人 28 例、

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 患者 22 例について検討した。経時的検討では、dSSc 36 例からの 147 検体を用いてレトロスペクティブに行った。

## 2. ELISA

血清 MCP-3 値は市販されている ELISA キットを用いて測定した (MCP-3 kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)。

## C. 研究結果

### 1. 初診時における血清 MCP-3 値

我々はまず初診時における血清 MCP-3 値について検討した (図 1)。SSc における血清 MCP-3 値は、健常人と比較して有意に高値であった。SSc のサブタイプ別では血清 dSSc において、ISSc、健常人と比較して有意に高値であった。ISSc と健常人との間には有意差は見られなかった。

### 2. SSc における血清 MCP-3 値と臨床症状との相関

健常人における MCP-3 の平均値+2SD をカットオフ値 (5.96U/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)。MCP-3 値は SSc 患者において 25% (17/69) で上昇していた。MCP-3 上昇群では非上昇群に比べて有意に肺線維症の合併が高く、%VC の低下も見られた。SSc において血清 MCP-3 値と modified Rodnan Total skin score (TSS) との相関を調べたところ有意に正の相関が見られた (図 2)。さらに MCP-3 値と%VC、%DLco との相関を調べたところ、両者と有意に負の相関が見られた (図 2)。以上より SSc において血清 MCP-3 値は皮膚

硬化の程度および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 MCP-3 値の経時的変化

血清 MCP-3 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、36 例の SSc 患者から採取した血清 147 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)。臨床症状の特徴および MCP-3 値の変動から SSc 患者を 4 群に分けた。第 1 群は 4 例からなり、重度の肺線維症を合併するとともに経過中に MCP-3 値の上昇が見られた。第 2 群は 5 例からなり、広範囲にわたる皮膚硬化を伴うとともに経過中に MCP-3 値の上昇が見られた。第 3 群は 9 例からなり、初診時に MCP-3 高値を示したものの、経過中に減少する傾向が見られた。第 4 群は残りの 18 例からなり、MCP-3 値は初診時とほぼ同値で推移した。

第 1 群はすべての症例が重度の肺線維症を合併した (図 3A)。Case 1 は初診時 MCP-3 低値を示し、軽度の肺線維症を伴っていた。6 ヶ月後に肺線維症の急性増悪とともに MCP-3 値も上昇した。3 年後になって肺線維症の進行は止まったものの MCP-3 値は依然として高値を示していた。6 年後になって肺線維症に伴う二次性肺高血圧症によって死亡した。Case 2 は初診時 MCP-3 正常値を示し、軽度の肺線維症を伴っていた。4 ヶ月後になって肺線維症の急性増悪とともに MCP-3 値が急激に上昇した。1 年後になり胸部 CT における間質陰陰が増強するとともに呼吸機能の悪化も見られたためステロイドパルス療法を施行したが肺線維症の悪化は止まず、

MCP-3 値も高値を維持していた。3年後に右心不全にて死亡した。Case 3 は初診時、肺線維症は見られなかった。2ヶ月後になり胸部 CT 上スリガラス陰影が出現するとともに MCP-3 値も上昇した。呼吸機能の悪化が進行したため8ヶ月後より肺線維症に対してシクロフォスファミドパルス療法 (750-1,000 mg/month)を開始したところ MCP-3 値の低下とともに呼吸機能の悪化も停止した。Case 4 は初診時に軽度の MCP-3 高値と胸部 CT 上の間質陰影を認めた。皮膚硬化も TSS 21 と高度であったためプレドニゾン 30 mg/day による治療を開始した。8ヶ月後になり皮膚硬化は TSS 11 と著明に改善していたが、胸部 CT における間質陰影が拡大していた。14ヶ月後になってさらに肺線維症は増悪しており MCP-3 も上昇を続けていた。以上から MCP-3 値の上昇は肺線維症の増悪と関連していると考えられた。

第2群は5例からなり、MCP-3 値は初診から1年以内に上昇しその後は経過を通じて高値を維持していた (図 3B)。肺に関しては軽度の活動性を伴わない肺線維症を認めるのみであったが、皮膚硬化は高度であり経過を通じて大きな改善は見られなかった (初診時 TSS 27±8、最終評価時 TSS 24±8)。以上より MCP-3 の上昇とその後の高値維持は広範囲にわたる皮膚硬化を反映すると考えられた。

第3群は9例あり、MCP-3 値は初診時に高値を示したものの経過中に著明に減少した (図 3C)。9例中4例に肺線維症の増悪が見られたためシクロフォスファミドパルス療法が行われた (Cases 5-8)。いずれにおいても

効果が見られ MCP-3 値もそれに伴って減少した。残りの5例はいずれも肺線維症の増悪は見られず、また皮膚硬化も比較的軽度で経過中に進行を認めなかった (初診時 TSS 13±7、最終評価時 TSS 12±7)。以上より MCP-3 値の減少は肺線維症の改善、または安定した臨床経過を反映すると考えられた。

第4群は18例あり、いずれも初診時から経過中に MCP-3 値の大きな変動を認めなかった (図 3D)。うち10例は初診時から一貫して MCP-3 高値を示していた。これらの症例は皮膚比較的軽度の皮膚硬化を示し、経過中に改善するかもしくは安定して推移した (初診時 TSS 17±5、最終評価時 TSS 12±5)。

10例中4例には肺線維症は見られず、5例には軽度で活動性の乏しい肺線維症のみが見られた。1例は初診時既に活動性の強い肺線維症が見られた。シクロフォスファミドパルス療法を行ったものの効果が見られなかったため、プレドニゾンおよびシクロスポリンの併用療法を行ったところ肺線維症の進行は停止した。MCP-3 値が低値で安定していた8例は経過中に皮膚硬化の改善が見られた (初診時 TSS 14±7、最終評価時 TSS 8±5)。1例に初診時に活動性の強い肺線維症が見られたが、シクロフォスファミドパルス療法に反応し軽快した。以上から初診時の MCP-3 値に関わらず、安定した MCP-3 値は皮膚硬化の安定もしくは軽快と関連していると考えられた。しかし肺線維症に関しては MCP-3 高値安定は治療抵抗性を表す場合もあると考えられる。

## D. 考案

SSc において血清 MCP-3 値が検討されたのは今回の我々の研究が初めてである。MCP-3 値は ISSc、健常人に比べ dSSc において有意に上昇していた。MCP-3 値は皮膚硬化の程度、肺線維症の合併、呼吸機能の低下と相関が見られた。経時的には肺線維症の増悪や広範囲にわたる皮膚硬化が長期にわたって持続した症例で上昇が見られた。また肺線維症がシクロフォスファミドパルス療法によって改善した例では MCP-3 値が低下する傾向が見られた。以上より MCP-3 は SSc における線維化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また MCP-3 値の変動は SSc の活動性を反映すると考えられた。

今回の研究では皮膚硬化の程度と MCP-3 との相関が見られた。MCP-3 は monocyte や T 細胞に対する走化性を有しており、SSc の初期病変に見られる単核球浸潤と関連していると推測される。さらに MCP-3 によるコラーゲン産生が抗 TGF- $\beta$ 抗体によって一部抑制されたとの報告もある<sup>5</sup>。TGF- $\beta$  はマクロファージやリンパ球などの炎症細胞から産生され、コラーゲンの産生に重要な役割を担っていると考えられている<sup>6,7</sup>。以上より MCP-3 は SSc における線維化のカスケードにおいて TGF- $\beta$ の上流に位置し線維化に重要な役割を果たしていると考えられる。

MCP-3 は肺線維症の合併、重症度と相関し、経時的には肺線維症の増悪に伴って上昇する傾向が見られた。肺線維症患者における MCP-3 の役割について検討した報告はごくわずかではあるが、マウスのブレオマ

イシンおよび放射線誘導肺線維症モデルにおいては MCP-3 の高発現が観察されている<sup>8,9</sup>。また SSc に合併した肺線維症の肺組織にはマクロファージの浸潤が見られることから<sup>10</sup>、肺での線維化においても MCP-3 が関与している可能性がある。

## E. 結論

血清 MCP-3 値は SSc の重症度、活動性を反映すると考えられた。さらに MCP-3 に対する抑制療法が SSc の早期の皮膚硬化、肺線維症に対して有効である可能性が示唆された。

## F. 文献

1. Fleischmajer R et al. Cellular infiltrates of scleroderma skin. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 975-84.
2. Roumm AD et al. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 645-53.
3. Van Damme J et al. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* 1992; 176: 59-65.
4. Minty A et al. Monoclonal cloning of the MCP-3 chemokine gene and regulation of its expression. *Eur Cytokine Netw* 1993; 4: 99-110.
5. Ong VH et al. Monocyte chemoattractant protein 3 as a mediator of fibrosis:



- Overexpression in systemic sclerosis and the type I tight-skin mouse. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1979-91.
6. Assoian RK et al. Expression and secretion of type  $\beta$  transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6020-4.
7. Raghov R et al. Transforming growth factor- $\beta$  increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranslationally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 1987; 79: 1285-8.
8. Kaminski N et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1778-83.
9. Johnston CJ et al. Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families. *Radiat Res* 2002; 157: 1778-83.
10. Rossi GA et al. Evidence for chronic inflammation as a component of the interstitial lung disease associated with progressive systemic sclerosis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 612-7.
- 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

表 1. Clinical and laboratory data in patients with systemic sclerosis. Values are percentages.

	Raised MCP-3 n=17	Normal MCP-3 n=52
Age at onset, yrs, mean $\pm$ SD	53 $\pm$ 15	51 $\pm$ 17
Male : Female	4 : 13	6 : 46
Duration, yrs, mean $\pm$ SD	2.6 $\pm$ 2.4	4.7 $\pm$ 5.1
Clinical features		
Contracture of phalanges	88	40
Pitting scars	47	37
Organ involvement		
Lung	88*	35
Decreased %VC	47*	19
Decreased %DLco	76	52
Esophagus	71	65
Heart	24	15
Joint	29	25
Muscle	12	17
Laboratory findings		
Anti-topoisomerase I antibody	82*	38
Anticentromere antibody	6*	54
Increased IgG	41	23
Elevated ESR	35	23
Elevated CRP	0	15

VC, vital capacity; DLco, diffuse capacity for carbon monoxide; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein.

\* p < 0.05, versus SSc patients with normal MCP-3 levels.

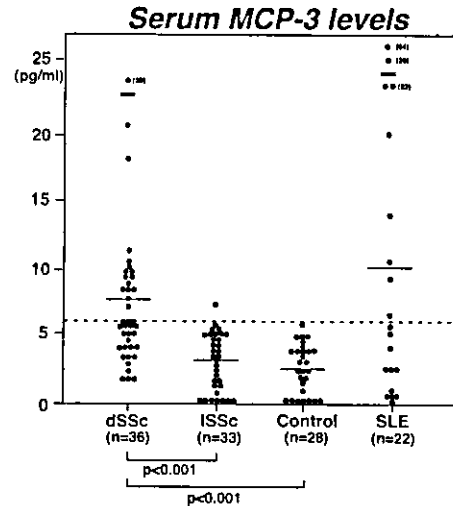


図 1. dSSc、ISSc、全身性エリテマトーデス (SLE)、健常人(CTL)における血清 MCP-3 値。破線はカットオフ値 (健常人群の平均+2SD) を示す。

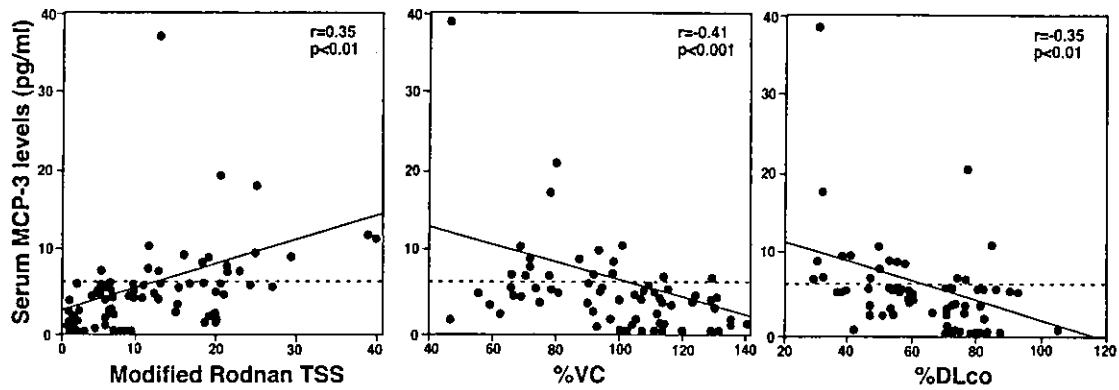


図 2. 血清 MCP-3 値と modified Rodnan total skin score (TSS)、%VC、%DLco との相関。破線はカットオフ値 (健常人群の平均+2SD) を示す。

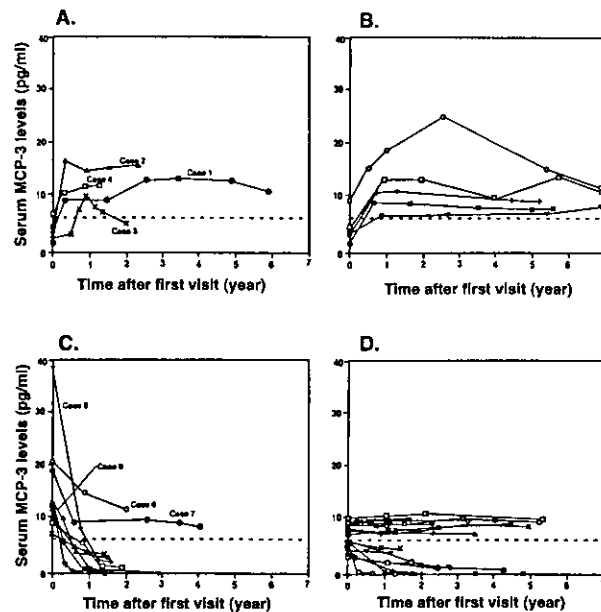


図 3. 36 例の dSSc における血清 MCP-3 値の計時的変化。臨床症状の特徴および MCP-3 値の変動から 4 群に分類してある。破線はカットオフ値 (健常人群の平均+2SD) を示す。

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

強皮症患者における CD1d アイソフォームと  
NKT 細胞反応性の解析

分担研究者 後藤大輔 筑波大学大学院人間総合科学研究科  
先端応用医学専攻臨床免疫学講師  
協力者 松本 功 筑波大学大学院人間総合科学研究科  
先端応用医学専攻臨床免疫学講師  
伊藤 聡 筑波大学大学院人間総合科学研究科  
先端応用医学専攻臨床免疫学講師  
堤 明人 筑波大学大学院人間総合科学研究科  
先端応用医学専攻臨床免疫学助教授  
住田孝之 筑波大学大学院人間総合科学研究科  
先端応用医学専攻臨床免疫学教授

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 は蛋白として発現しうる分子であり、予想通り細胞外へと分泌される可溶性の分子であった。健常人および強皮症患者、それぞれの末梢血単核球での CD1d アイソフォームの発現量を測定するため、mRNA の発現を定量 PCR 法にて測定したところ、強皮症患者の可溶性 CD1d の発現が有意に増加していた。さらに抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体を作製し、これを用いて CD1d アイソフォームの血清中の蛋白発現量を ELISA 法にて測定を行った。この手法により、強皮症患者血清において蛋白としての可溶性 CD1d 量も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 上のグリコリピット

抗原を認識することも特徴とされている細胞群である<sup>1</sup>。

NKT 細胞はまた、自己免疫病モデルマウス<sup>2</sup>や強皮症をはじめとする自己免疫病患者<sup>3-6</sup>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（アイソフォーム）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<sup>7</sup>。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) 定量 PCR 法

末梢血単核球から抽出した mRNA を用いて cDNA を作製し、これらを鋳型として以前の報告<sup>7</sup>を参照し、定量 PCR を行った。測定は ABI Prism 7300 (Applied Biosystems Japan K.K.) を使用し、数値は 3 回測定したものの平均値とした。定量値の標準化のためにグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の発現量も同時に測定した。

### 2) 免疫プロット法

ヒトリコンピナント 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。

### 3) 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  $\mu\text{g/ml}$  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。

#### 4) 対象患者

対象は可溶性 CD1d の mRNA 量の測定と血清中の蛋白発現量の測定に分けて行い、それぞれ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 12 名、31 名とボランティアとして参加した健常人 14 名、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、免疫プロット法により、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プ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) 末梢血単核球での可溶性 CD1dmRNA 量

の測定

末梢血単核球を用いて、可溶性 CD1d の mRNA 発現を、定量 PCR 法を用いて測定した。

その結果、強皮症患者での可溶性 CD1d の mRNA 発現は、健常人と比較して有意に ( $P=0.0117$ ) 増加していることが明らかとなった (図 2)。

#### 3) 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、免疫プ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プロットした。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 3)。

#### 4) 血清可溶性 CD1d 量の測定

3) 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 名と健常人 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常人と比較し、血清中に可溶性 CD1d が有意に ( $P=0.0190$ ) 多く存在することが明らかとなった (図 4)。

#### 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、健常人との間で mRNA の発現量に差が認められたため、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、まず末梢血単核球での可溶性 CD1d の発現量の差違を健常人と強

皮症患者にて定量 PCR 法にて検討した。その結果、強皮症患者において可溶性 CD1d の mRNA 発現が有意に増加していると言う結果が得られた。このデータに関しては、今後さらに測定法の改良と検体数の増加により、信頼度を増していくことが必要と考えている。

次に、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おいて可溶性 CD1d が増えていた。

以上の可溶性 CD1d の mRNA の発現と血清中の蛋白量の解析結果から、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が示唆されている。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、どのような作用（サイトカインの調節など）を及ぼしているのか。また、抗原は完全型 CD1d 分子と同様に  $\alpha$  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。

最近では NKT 細胞に関する研究も盛んに行われており、今まで生体内でのリガンドは不明とされていたが、2004 年に初めて isoglobotrihexosylceramide(iGb3) が生体内で免疫系の調節も含めた作用を持つリガンドとして報告<sup>8</sup>されている。そうした情報も加味しつつ、今後可溶性 CD1d 分子に関する本研究のさらなる成果により、NKT 細胞を制御することで、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  $V\alpha 24+$  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  $V\alpha 24J\alpha Q$  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  $V\alpha 24J\alpha Q$  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
8. Dapeng Z. et al.: Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells. *Science* 306: 1786, 2004

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 自己免疫疾患患者における 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、吉賀洋平、松本功、  
伊藤聡、堤明人、住田孝之

第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、  
2004

2) Low Expression of Soluble CD1d in  
Patients with Rheumatoid Arthritis.

Daisuke Goto, Kojo S, Matsumoto I, Ito S,  
Tsutsumi A, Sumida T.

ACR 68<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, San  
Antonio (Texas), USA, 2004

3) 自己免疫疾患患者における可溶性 CD1d  
遺伝子の発現に関する検討

後藤大輔、香城諭、松本功、伊藤聡、堤明人、  
住田孝之

第 48 回日本リウマチ学会総会、岡山、 2004

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



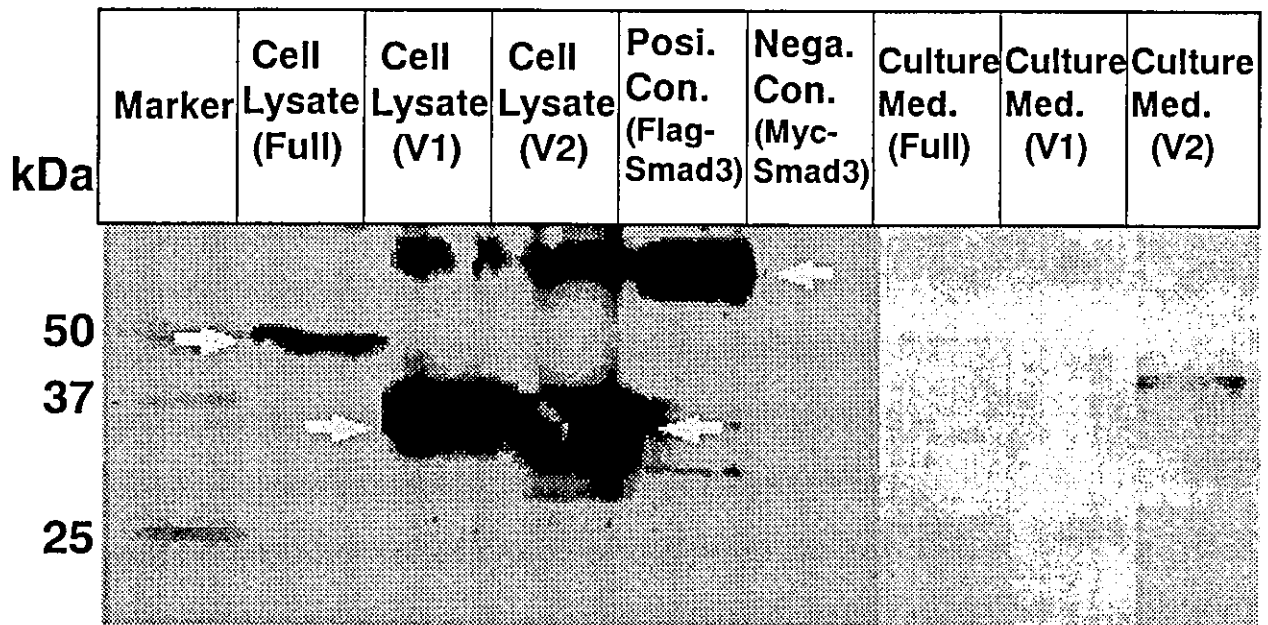


図 1：免疫ブロット法による変異型 CD1d 分子の発現の確認。Cos1 細胞に完全型 CD1d と変異型 CD1d の Flag タグ付きの発現ベクターを形質導入し、その発現を細胞溶解液 (cell lysate) と培養上清 (culture medium) に分けて確認した。抗 Flag 抗体を蛋白検出のために使用した。

### The expression of soluble CD1d (mRNA)

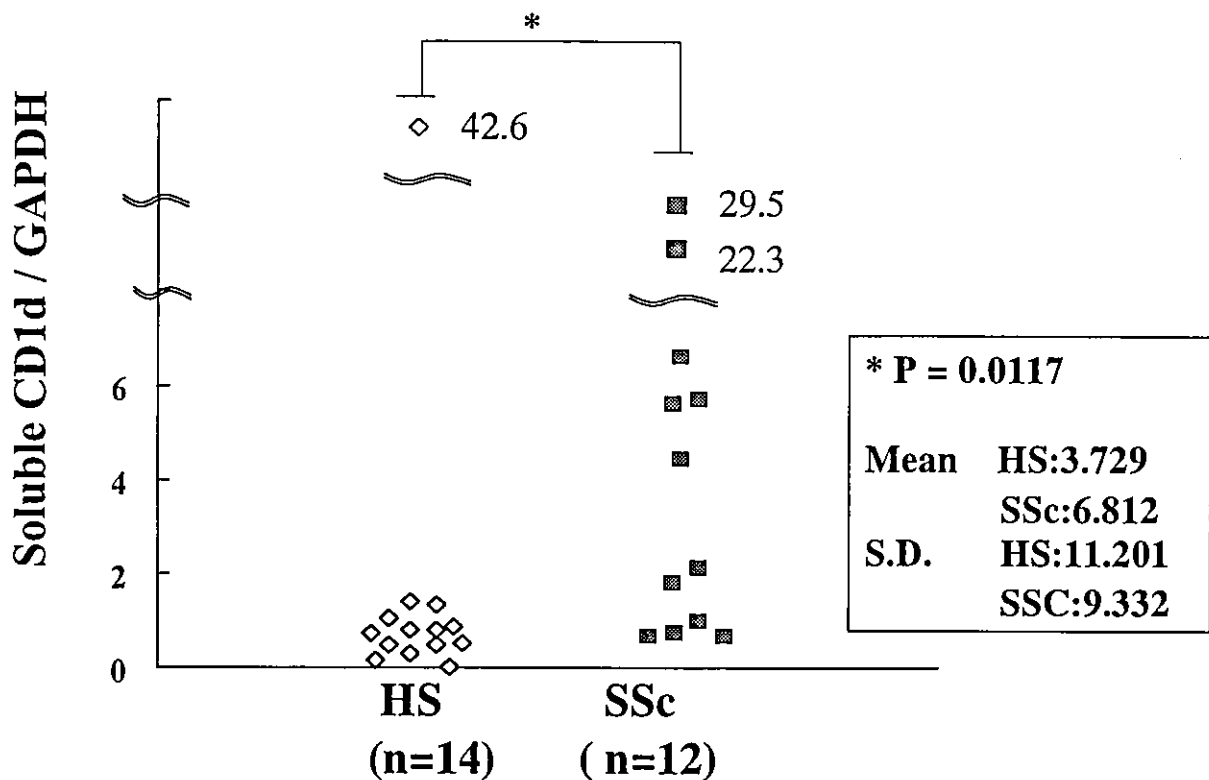


図 2：定量 PCR 法を用いた健常人と強皮症患者での末梢血単核球での可溶性 CD1d-mRNA の発現量の比較。GAPDH-mRNA の発現量で標準化し、定量を行った。それぞれの平均値 (mean) と標準偏差 (S.D.) は図に示す通りである。

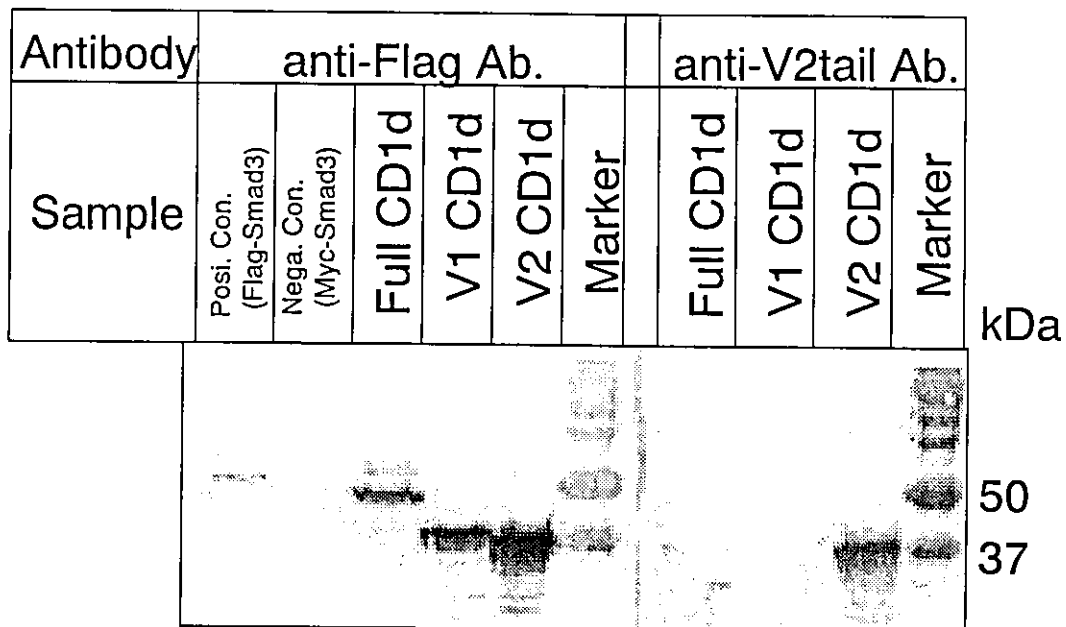


図 3 : 免疫ブロット法による抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体の検証。左半分はコントロール実験で、抗 Flag 抗体で各 CD1d 分子が発現していることを確認している。

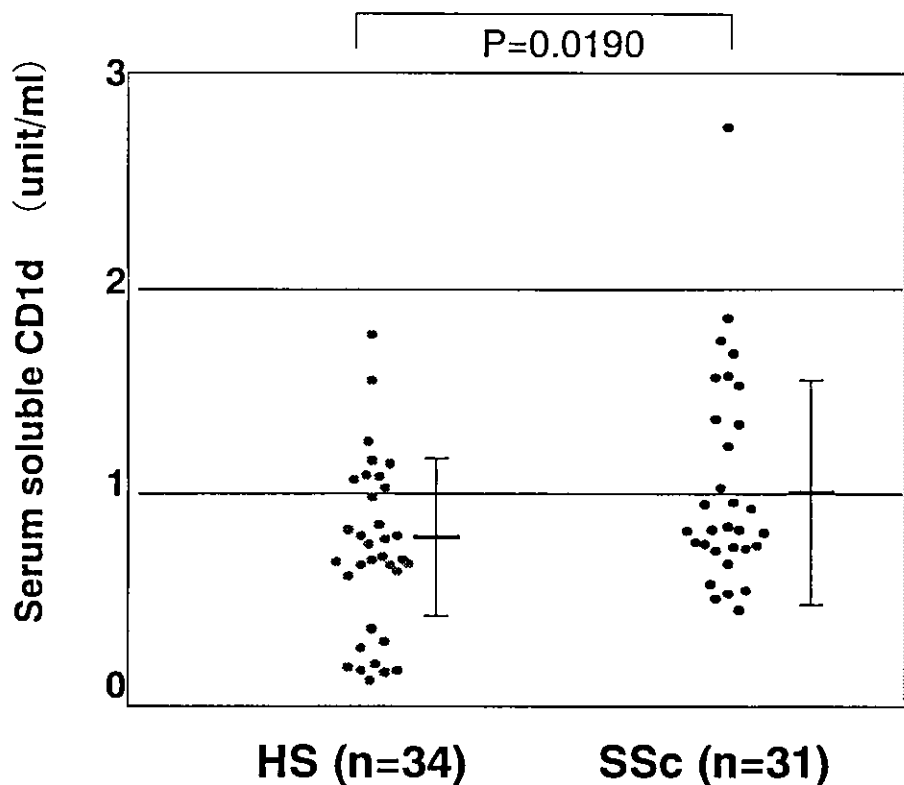


図 4 : 健常人と強皮症患者での血清中可溶性 CD1d 蛋白の発現量の比較。作製した抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体と抗 CD1d モノクローナル抗体とのサンドイッチ ELISA 法にて、測定した。特定の健常人の血清中可溶性 CD1d 測定時の ELISA での吸光度を、仮の unit/ml とした。図中の各棒は中央の横棒が平均、上下の横棒は標準偏差を示す。

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

全身性強皮症における NK 細胞の機能と活性化

分担研究者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授
協力者	堀川真由香	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科大学院生
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
協力者	松下貴史	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科大学院生
協力者	西島千博	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科助手
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(SSc)におけるNK細胞の機能、活発化マーカーの発現およびサイトカインの産生を調べた。未刺激リンパ球中において、活性化マーカーであるCD69陽性のNK細胞の比率は健常人と比較して強皮症患者では有意に増加していた。L-selectinはリンパ球の活発化で発現を失うが、L-selectinを発現していないNK細胞の比率も正常人と比較してSSc患者では有意に増加していた。SSc患者からのNK細胞におけるCD16の発現は正常人と比較し有意に上昇していた。NK細胞のCD16発現レベルはサイトカインの産生能力に関連すると報告されており、未刺激のNK細胞によるIFN- $\gamma$ およびIL-5の産生はdiffuse cutaneous SSc (dSSc)患者において有意に増加していた。SSc患者ではNK細胞からのIFN- $\gamma$ 産生が増加しているにもかかわらず、未刺激NK細胞によるcytotoxicityは健常人と比較してSSc患者で有意に低下していた。全身性強皮症のNK細胞の異常が全身性強皮症の病因や病態と関連している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis, SSc) は皮膚および内臓諸臓器の線維化、硬化性病変によって特徴づけられる膠原病である。その原因はいまだ不明であるが、抗核抗体が検出されることから自己免疫疾患に位置づけられている。NK細胞は癌細胞やウイルスに感染した細胞を直接障害するとともに、IFN- $\gamma$ をはじめとするサイトカインの産生により免疫機能を制御する働きを持つことが知られている。最近ではNK細胞の異常が自己免疫疾患に関与していることが報告されている<sup>1,2</sup>。今回我々は全身性強皮症(SSc)の患者末梢血を用いてNK細胞の機能、活発化マーカーの発現、サイトカインの産生を調べた。

B. 研究方法

対象はSSc 46例で、そのうちわけはdiffuse cutaneous SSc (dSSc) 15例 limited cutaneous SSc

(lSSc) 31例で normal control として健常人 20例であった。

1) Flow cytometric analysis

SSc患者より採取した末梢血を、フローサイトメトリーにてNK細胞表面マーカーであるCD56、CD16、活性化マーカーであるCD62L、CD69、CD54、CD25、CD95を用いて二重染色して解析した。

2) NK cell isolation & Cytokine production

NK細胞のサイトカイン産生能を検討した。強皮症患者より末梢血を採取し、単核球を分離した後、磁気ビーズにてnegative selectionし、NK細胞を単離した。そのNK細胞をPMAおよびionomycinにて刺激したものと無刺激のものを培養し、24時間後に上清を回収し、ELISAにてIFN- $\gamma$ 、IL-5、IL-6、IL-10を測定した。

3) Natural cytotoxicity

NK細胞の機能異常を調べるために、慢性骨髄性

白血病細胞 K562 に対する natural cytotoxicity を 5:1, 10:1, 20:1, および 40:1 の effector:target 比率 (E:T ratio) で調べた。死んだ細胞に蛍光強度が強い propidium iodide (PI) と K562 に染まる DiOC<sub>18</sub> で染色したサンプルをフローサイトメーターにて、二重染色して解析した。

#### 4) Granzyme B production

NK 細胞が、標的細胞に結合すると、perforin が放出され細胞膜に孔が開けられ、さらに、granzyme B が標的細胞中に放出され核を断片化させて傷害することが知られている。従って、ELISA で NK 細胞から放出される granzyme B を測定した

### C. 研究成果

#### 1) Flow cytometric analysis

末梢血リンパ球中の NK 細胞の比率及び絶対数は健常人と比較して dSSc で有意に増加していた (図 1)。NK 細胞の表面マーカーである CD16 発現レベルは健常人と比べて dSSc 患者と ISSc 患者とともに有意に上昇していた (図 2)。early activation marker である CD69 の発現率は健常人と比べて dSSc 患者と ISSc 患者で有意に増加していた (図 2)。活性化すると低下する CD62L の発現率は健常人と比べて dSSc 患者と ISSc 患者で有意に低下していた (図 2)。CD54、CD25 および CD95 の発現率は健常人と患者の有意差は認められなかった。よって、SSc 患者 NK 細胞は健常人とくらべて有意に活性化していることがわかった。

#### 2) Cytokine production (図 3)

NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生量は無刺激では dSSc 患者と ISSc 患者で有意に増加していたが、PMA および ionomycin を添加したものは健常人と比べて dSSc 患者と ISSc 患者で有意に低下していた。IL-5 産生量は無刺激の NK 細胞で健常人と比べて dSSc 患者と ISSc 患者で有意に増加していたが、刺激すると健常人と同程度となった。IL-6 の産生量は無刺激の NK 細胞で有意差は認めず、刺激した NK 細胞では、健常人と比べて dSSc 患者で有意に増加していた。IL-10 の産生量にはいずれも有意差が認められなかった。

#### 3) Natural Cytotoxicity

K562 に対する cytotoxicity は、SSc 患者からの NK 細胞では全ての effector:target 比率して健常人と比

較し有意に低下しており、SSc 患者 NK 細胞は cytotoxicity が 10~20% 低下していた。

#### 4) Granzyme B Production

無刺激の NK 細胞から放出された granzyme B は健常人と比較して dSSc と ISSc 患者で有意に減少していたが、刺激した NK 細胞からの granzyme B は ISSc 患者で有意に減少していた。よって、SSc 患者 NK 細胞では granzyme B 産生能が低下していた。

### D. 考案

今回の検討で、SSc 患者 NK 細胞は健常人と比べ有意に増加していた。また、CD69 の発現が上昇していること、CD62L が減少していることより、SSc 患者 NK 細胞は健常人よりも活性化された状態であると考えられた。NK 細胞は活性化 IL-2, IL-15 や IL-18 などのサイトカインによって活性化や増殖が誘導される<sup>3</sup>。SSc 患者血清では IL-2 や IL-15 が増加しているとの報告があり<sup>45</sup>、これによって NK 細胞が活性化しているのかもしれない。さらに、無刺激の NK 細胞における IFN- $\gamma$  と IL-5 の産生量が SSc 患者で有意に増加していたが、PMA および ionomycin を添加したものは健常人と比べて dSSc 患者と ISSc 患者で低下及び同程度であった。この理由として、SSc 患者由来 NK 細胞は in vivo で常に活性化された状態であるために、活性化していない健常人の NK 細胞に比べて in vitro では刺激に反応しにくい可能性が考えられる。一方、K562 に対する cytotoxicity は SSc 患者からの NK 細胞は全ての effector:target 比率で健常人と比較し有意に低下していた。また、SSc 患者由来 NK 細胞の Granzyme B 産生量も健常人と比べて有意に低下していた。T 細胞や NK 細胞の cytotoxicity は GranzymeB の産生量と相関している事が報告されている<sup>6</sup>。したがって、SSc 患者の NK の cytotoxicity が低下していたのは Granzyme B の産生低下に関わると考えられた。

### E. 結論

以上より、SSc 患者の NK 細胞は、機能異常及びサイトカイン産生を介して病態形成に関与している事が示唆された。

### F. 文献