

1. Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T: Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 186:1677-1687, 1997
2. Shi FD, Wang HB, Li H, Hong S, Taniguchi M, Link H, Van Kaer L, Ljunggren HG: Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol* 1:245-251, 2000
3. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW: Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , and interferon- γ levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 35:67-72, 1992
4. Seaman WE: Natural killer cells and natural killer T cells. *Arthritis Rheum* 43:1204-1217, 2000
5. Suzuki J, Morimoto S, Amano H, Tokano Y, Takasaki Y, Hashimoto H: Serum levels of interleukin 15 in patients with rheumatic diseases. *J Rheumatol* 28:2389-2391, 2001
6. Rininsland FH, Helms T, Asaad RJ, Boehm BO, Tary-Lehmann M: Granzyme B ELISPOT assay for ex vivo measurements of T cell immunity. *J Immunol Methods* 240:143-155, 2000

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

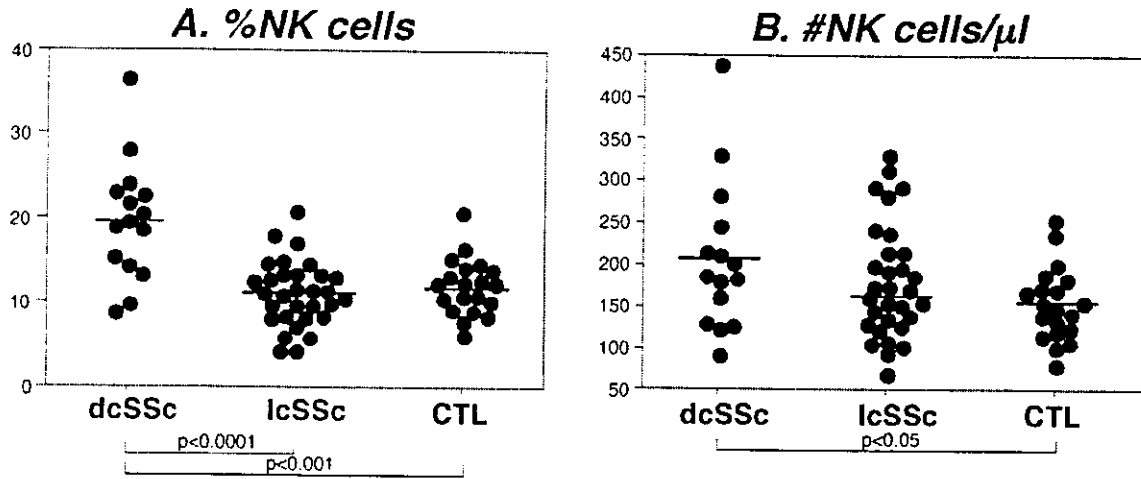


図 1 フローサイトメトリーにて、NK 細胞表面マーカーである CD56、CD16 を用いて二重染色して解析した。
 A) 患者及び健常人末梢血リンパ球中の NK 細胞の比率。
 B) 患者及び健常人末梢血の NK 細胞の絶対数。

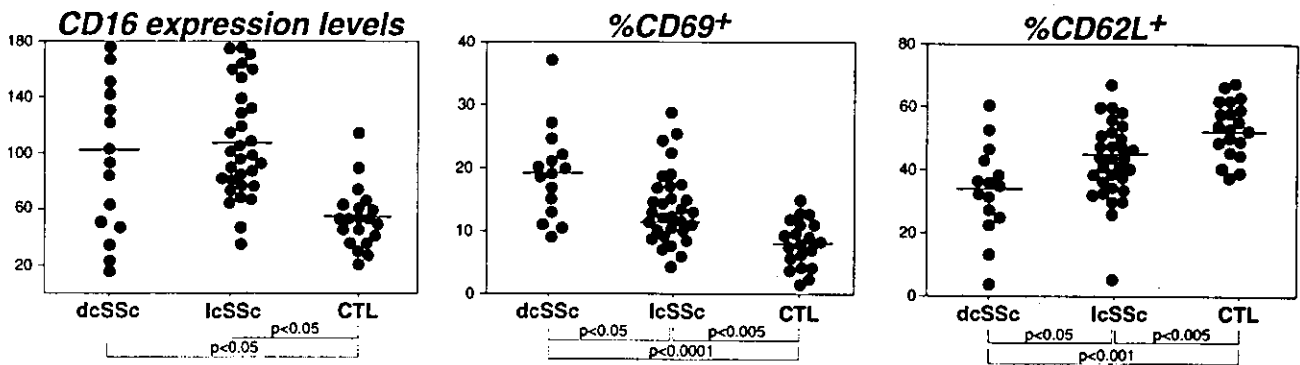


図 2 フローサイトメトリーにて NK 細胞の CD16、CD69 (early activation marker)、CD62L (L-selectin) 発現レベルおよび発現率を解析した。

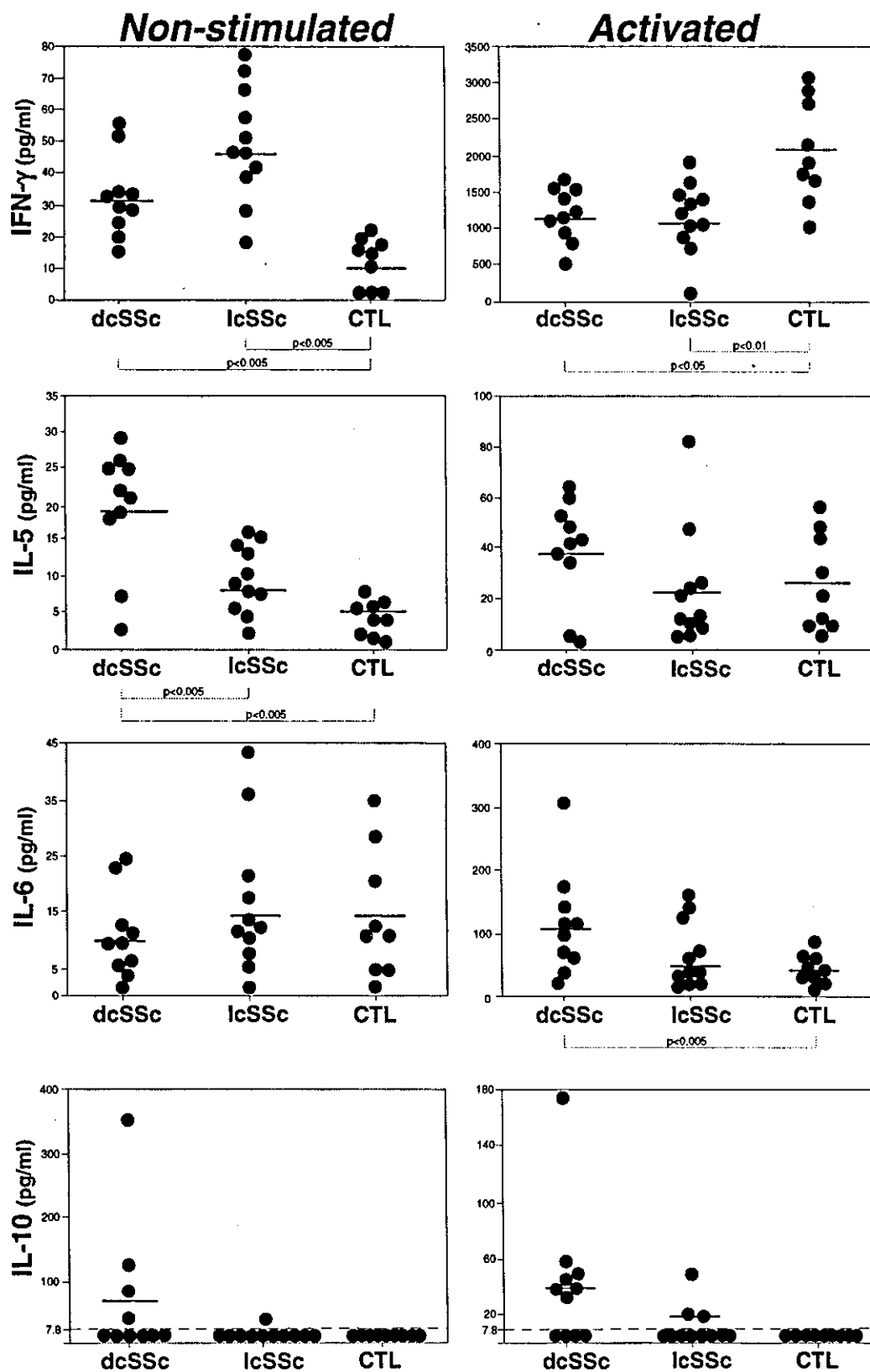


図 3 強皮症患者および健康人由来 NK 細胞のサイトカイン産生。PMA および ionomycin にて刺激、または無刺激で培養し、ELISA にて上清の IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-10 を測定した。

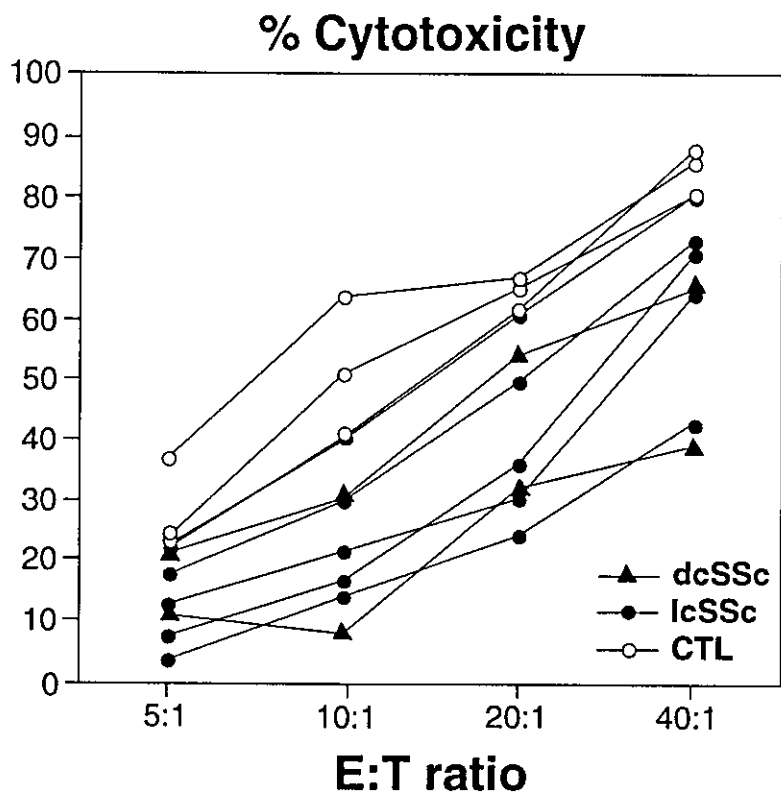


図4 強皮症患者および健康人由来 NK 細胞の K562 に対する natural cytotoxicity を 5:1, 10:1, 20:1, および 40:1 の Effector:Target 比率 (E:T ratio) でフローサイトメトリーを用いて解析した。

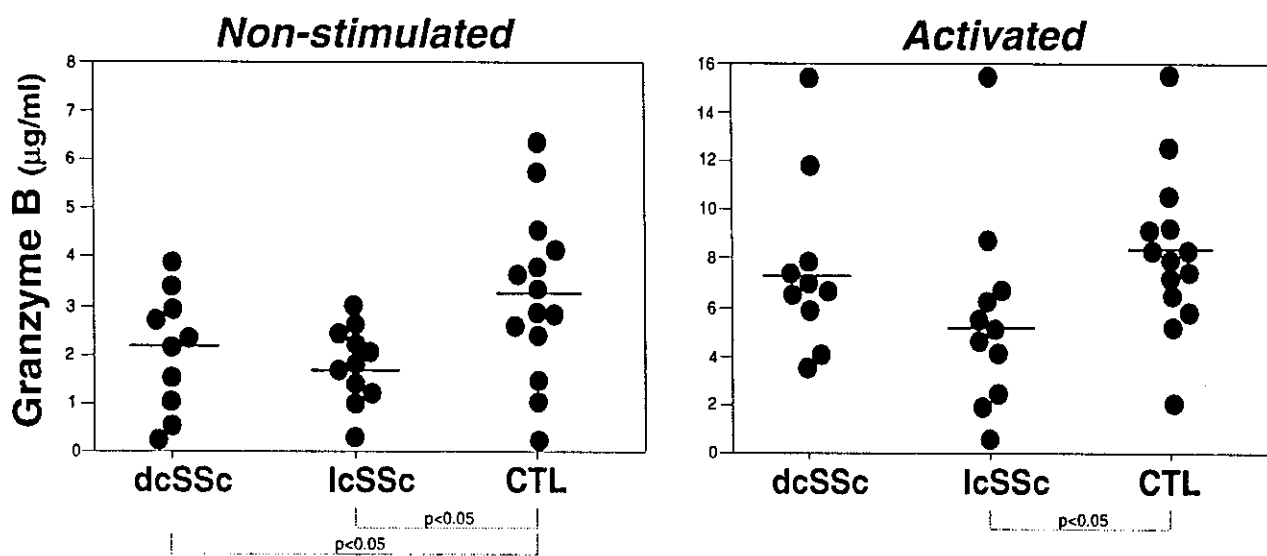


図5 強皮症患者および健康人由来 NK 細胞から放出される granzyme B を ELISA にて測定した。

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

Fas, FasL 欠損マウスを用いた、
ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルの検討

研究協力者 山本俊幸 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科講師
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教授

研究要旨

我々はこれまで、ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルマウスの皮膚病変部において、アポトーシスが亢進してみられること、Fas/FasL の発現の増強、および抗 FasL 中和抗体による皮膚硬化の抑制効果を報告してきた。今回さらに検討を進め、Fas/FasL 欠損マウスである、lpr, gld マウスを用いて皮膚硬化の誘導が抑制されうるかを調べた。コントロールのブレオマイシン処理群に比較し、どちらも組織学的に皮膚硬化の抑制がみられた。

A. 研究目的

近年アポトーシスが種々の自己免疫疾患の発症に関与することが示唆されており、強皮症においても、アポトーシスが関与するいくつかの報告がある。1, 2) ブレオマイシンは *in vitro* においてアポトーシスを誘導する薬剤である。3) 皮膚硬化発症の病態は未だ不明であるが、われわれはこれまでに、ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルにおいてアポトーシスが誘導されること、それは皮膚硬化の誘導と並行してみられること、Fas/FasL を介する経路が関与し、

FasL の中和抗体で皮膚硬化の発症が部分的に抑制されることなどを報告した。今回、機能的な Fas, FasL を欠損するマウスにおいて、ブレオマイシンの局所投与による皮膚硬化の誘導が抑制されうるかについて検討した。

B. 研究方法

C3H マウス(6週令、雌)の背部に 1 mg/ml のブレオマイシン(日本化薬)を 100 μ l ずつ隔日で4T 間皮下注して皮膚硬化を誘導した。C3H-lpr (Fas 欠損マウス), C3H-gld (FasL

欠損マウス) (いずれも6週令、雌) は、三協ラボサービスより購入した。TUNEL assay は、In situ cell death detection kit (Roche Diagnostics)、DNA fragmentation の検出は apoptosis ladder kit (Roche Diagnostics) によった。皮膚に含有されるコラーゲン量は、8-mm パンチバイオプシー中に含まれる量を Sircol Collagen assay kit (Biocolor) を用いて測定した。Caspase の活性は、caspase colorimetric protease assay kit (MBL) を用いた。

C. 研究結果

皮膚病変部における TUNEL 陽性細胞は、1 週目から浸潤単核球にみられ、3 週目では浸潤単核球およびケラチノサイトに多数みられた。また毛包、脂腺細胞にも陽性となったが、血管内皮細胞や線維芽細胞には陽性所見はみられなかった。病変部皮膚の DNA 電気泳動では、DNA fragmentation は3、4 週目で著にみられた (図1)。免疫化学染色では、Fas はブレオマイシン処理後1 週目から4 週目の皮膚において浸潤細胞や線維芽細胞に発現がみられた。FasL は2-3 週目に浸潤細胞に発現が増強し、3-4 週目に線維芽細胞に陽性所見がみられてきた。皮膚全体における Fas, FasL の mRNA 発現を RT-PCR 法を

用いて検討したところ、Fas はブレオマイシン処理後比較的恒常的に発現がみられたが、FasL は3 週目に mRNA の発現が増強されてみられた (図2)。Fas/FasL のアポトーシス経路の下流にあり、アポトーシスの実行犯とされる caspase-3 の発現と活性の検討では、蛋白、遺伝子レベルでの caspase-3 の発現の誘導と、活性の亢進が認められた (図3)。ブレオマイシンの局注と同時に FasL の中和抗体(0.2mg/ml)の静注を繰り返すと、皮膚硬化の抑制がみられ、同時に DNA fragmentation もブロックされてみられた (図4)。また、TUNEL 陽性細胞数、caspase-3 の活性も有意に抑制されてみられた。

次に、Fas, FasL を欠損した *lpr*, *gld* マウスにおける検討では、ブレオマイシン局注後4 週目の病理組織 HE 染色像では、WT に比較し、*lpr*, *gld* マウスともに膠原線維の膨化肥厚の程度は減弱し、組織学的な皮膚硬化の誘導は抑制されてみられた (図5)。皮膚における Collagen 含有量の測定は、*lpr*, *gld* マウスいずれにおいても有意に低下してみられた (図6)。病変部皮膚に浸潤する細胞のうち TUNEL 陽性のものはやはり、*lpr*, *gld* マウスいずれにおいても有意に減少してみられた (図7)。

D. 考案

皮膚硬化の発症に与える病態は未だ十分には解明されていない。われわれはブレオマイシンの頻回局所投与によりマウスに誘導した皮膚硬化病変部において、皮膚硬化の誘導に並行してアポトーシスが誘導されること、そのシグナルとして Fas/FasL を介する経路が重要な役割を果たす可能性が示唆された B ブレオマイシンは *in vitro* においてアポトーシスを誘導する薬剤であるが、ブレオマイシンの皮下投与により *in vivo* においてもアポトーシスを誘導した。しかし TUNEL 陽性細胞は大部分が病変部皮膚に浸潤する炎症細胞であり、血管内皮細胞や線維芽細胞はむしろみられなかった。アポトーシスの誘導が、皮膚硬化の発症にどのように結びつくかはまだ不明だが、ブレオマイシンにより誘導された TGF- β がマクロファージを始めとする炎症細胞にアポトーシスを誘導する可能性、caspase が IL-1 β や TNF といった proinflammatory cytokine を誘導し炎症を増強する、過剰なアポトーシス細胞が処理しきれなくなり壊死に陥りそこから炎症が増強する流れ、などの機序が推測される。今回、Fas, FasL を欠損したマウスを

図の説明

用いて Fas/FasL の pathway を遮断することによっても、完全にブレオマイシンによる皮膚硬化の誘導が抑制されたわけではない。今回示さなかったが、p53 もこのモデルで発現が upregulate されていることを確認しており、p53 あるいは granzyme などを介するアポトーシス pathway も関わっているかもしれない。引き続き検討していく予定である。

E. 文献

- 1) Jelaska A, Korn JH: Role of apoptosis and transforming growth factor β 1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 43: 2230-2239, 2000
- 2) Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL: Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 44: 1667-1676, 2001
- 3) Hamilton RF Jr, Li L, Felder TB, Holian A: Bleomycin induces apoptosis in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 269: L318-325, 1995

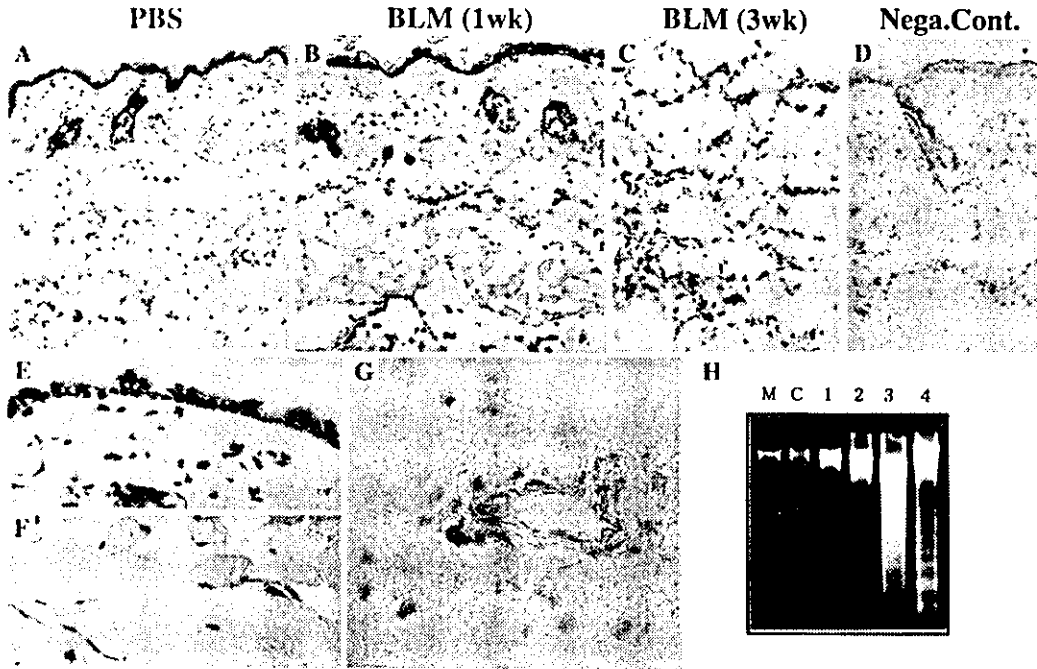


図1: TUNEL 染色(A-F)と DNA 電気泳動。(A) PBS 処理、(B)プレオマイシン処理1週目、(C-G) プレオマイシン処理後3週目。(H) C: control, 1-4 はそれぞれ各週を表す。

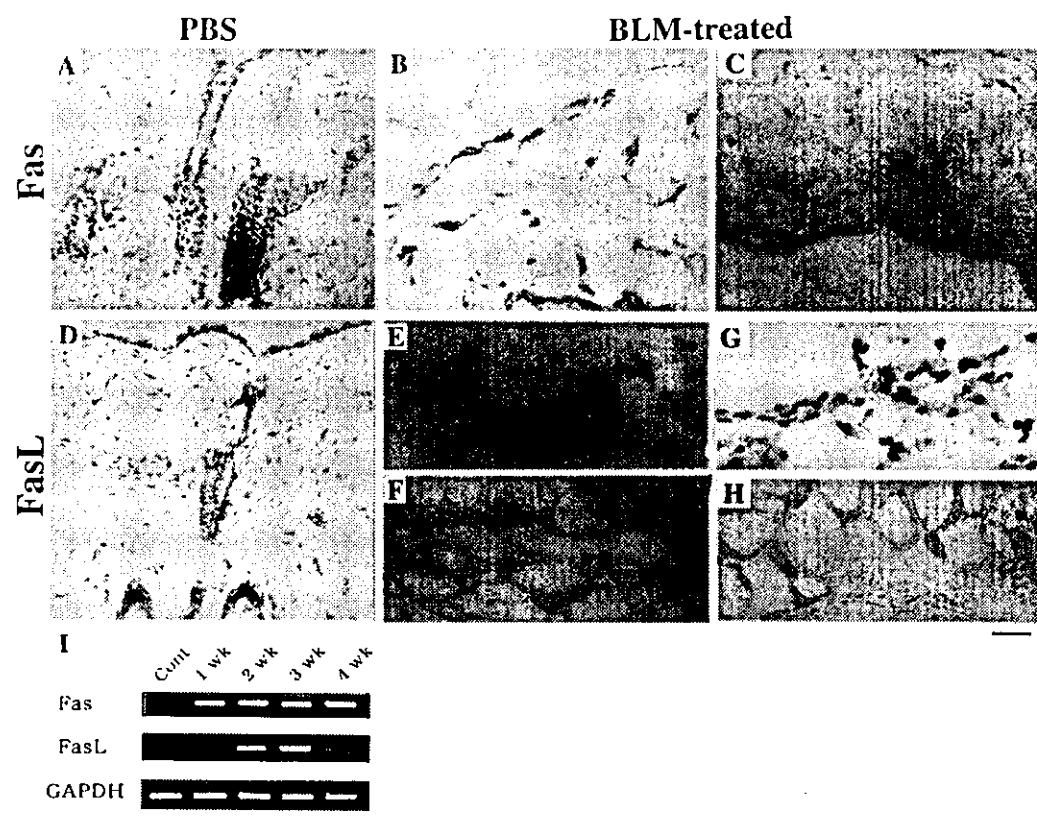


図2: 病変部皮膚における Fas, FasL の免疫組織学的発現 (A-H)と RT-PCR (I)。

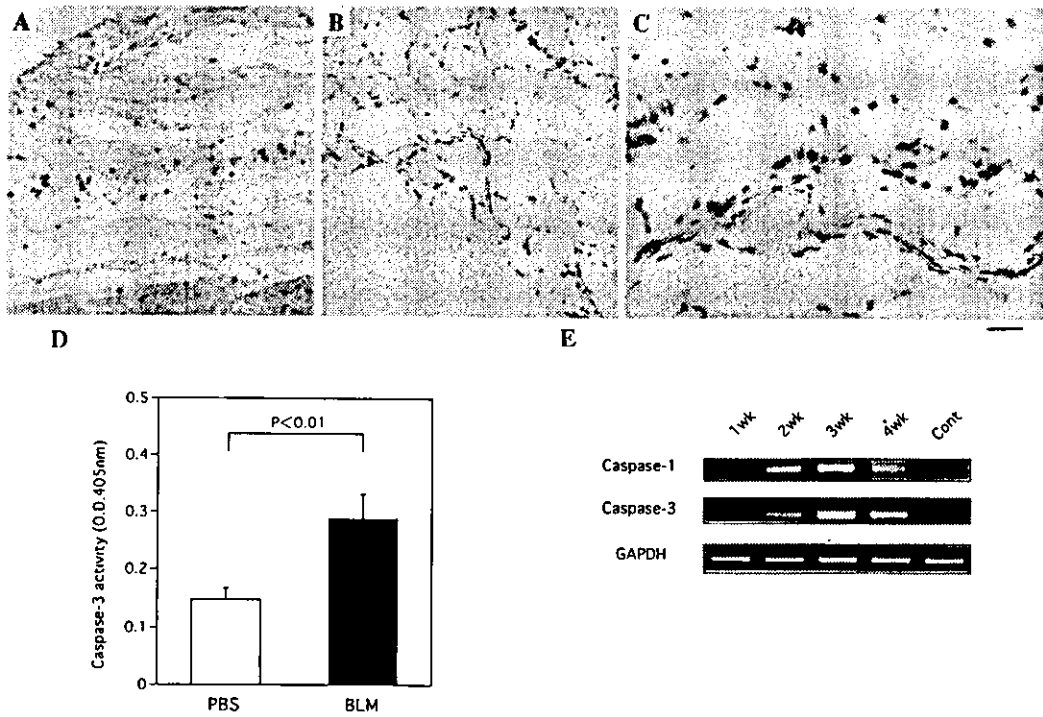


図3 : Caspase-3 の免疫組織学的発現 (A-C)、活性 (D)、RT-PCR (E)。(A) PBS 処理、(B, C) プレオマイシン処理3週目。

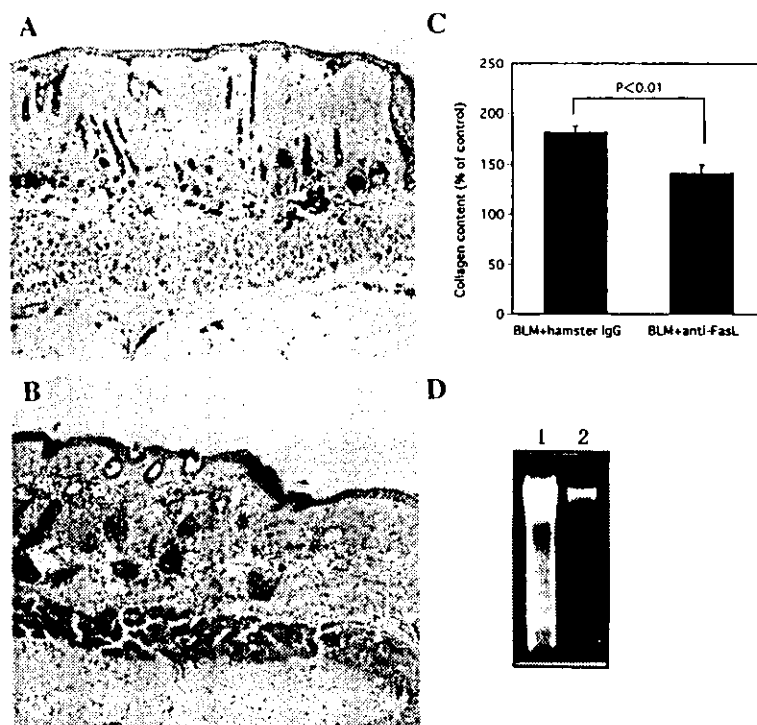


図4 : 抗 FasL の中和抗体投与後の、病理組織像 (A, B)、コラーゲン含有量 (C)、DNA fragmentation の比較 (D, 1: プレオマイシンと control IgG による処理後、2: プレオマイシンと抗 FasL 抗体処理後)。

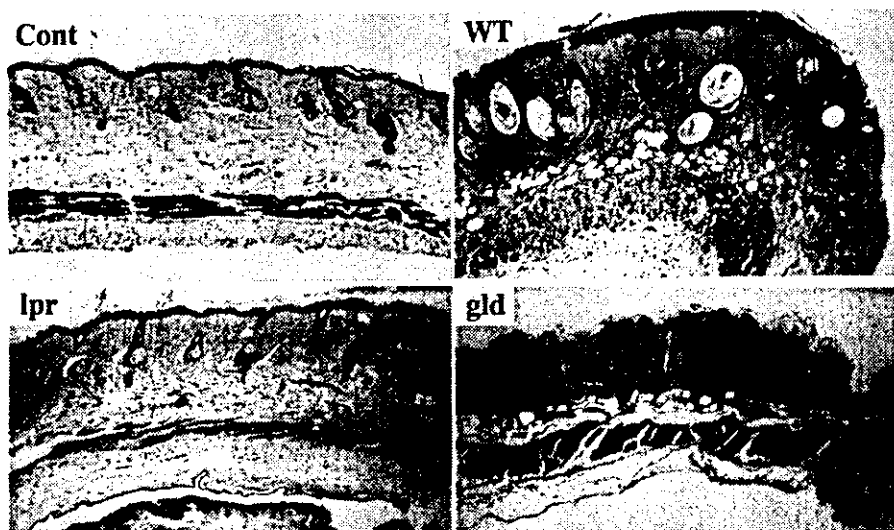


図5 : WT, lpr, gld マウスにおける組織学的皮膚硬化の評価。

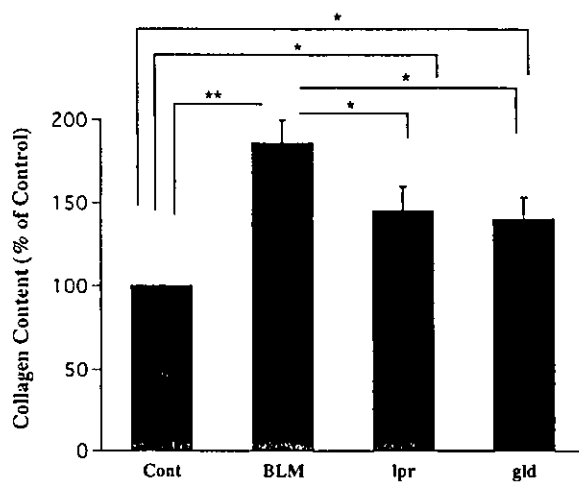


図6 : コラーゲン含有量の比較。*P < 0.05, **P < 0.01

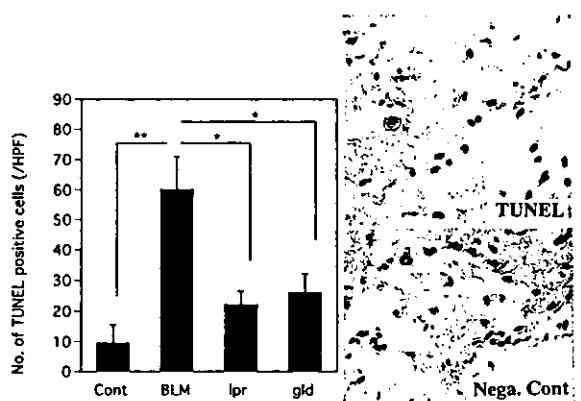


図7 : TUNEL 陽性細胞数。*P < 0.05, **P < 0.01

Tight-skin mouse における、抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法の 有用性の検討

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	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	Thomas F. Tedder,	Professor, Dept of Immunol, Duke University
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

全身性強皮症の動物モデルである tight-skin mouse (TSK) において、抗マウス CD20 抗体による B 細胞除去療法の有用性を検討した。新生児より抗 CD20 抗体を投与したマウスでは、生後 8 週での皮膚硬化が軽減しており（～43%）、自己抗体の産生は全くみられなかった。少ない抗体量で投与して B 細胞除去が不完全な場合には、皮膚硬化や自己抗体産生の抑制は軽度であった。一方、生後 8 週のすでに皮膚硬化や自己抗体の産生がみられる TSK では、B 細胞を除去しても皮膚硬化や自己免疫の改善はみられなかった。皮膚硬化の進行期にある 3 週齢の TSK マウスで、皮膚におけるサイトカイン mRNA の発現を検討したところ、TSK では野性型マウスに比べて Th1 型のサイトカインよりも Th2 型のサイトカインの発現が亢進していたが、B 細胞除去はこれらのサイトカインのバランス異常の修正に働いた。このように、抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法は、症状の出現前に開始することによりサイトカインの発現を調整し、皮膚硬化や自己免疫を抑制した。このことは、全身性強皮症の治療において、B 細胞が重要なターゲットであることを示唆するものと考えられた。

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。これまでに我々は、SSc 患者の末梢血 B 細胞では、B 細胞の主要な調節分子である CD19 の発現が上昇していることを報告した（文献 1）。また、tight-skin mouse (TSK) は成長とともに SSc と同様の抗核抗体が検出され、皮膚から皮下にかけての硬化が出現する SSc の動物モデルであるが、このマウスにおいて CD19 の発現をなくした場合に皮膚硬化が有意に減少（～36%）し、自己抗体の産生が完全に抑制されることを報告した（文献 2）。

現在、世界的に自己免疫疾患の病態には B 細胞が重要であることが大変注目されている（文献 3）。

関節リウマチのモデルである K/BxN マウスの B 細胞から関節炎を惹起する自己抗体が産生されることが報告された（文献 4）。また、関節リウマチの患者に対して抗 CD20 抗体投与により B 細胞を抑制した際の有効例が報告されている（文献 5）。全身性エリテマトーデスにおいても、欧米では抗 CD20 抗体治療の臨床治験が始まっている（文献 6）。しかしながら、SSc では B 細胞をターゲットとした治療の試みについての報告はみられない。

CD20 は B 細胞に特異的に発現する蛋白分子であるが、最近、内田及び Tedder らはマウスの CD20 に対する特異的なモノクローナル抗体を作成した（文献 7）。この抗体は、投与量に依存して B 細胞を消失させることが可能である。このため、我々はまず SSc の動物モデルである TSK において抗 CD20 抗体を投与し、その有用性と作用機序について検討した。

B. 研究方法

1) マウスへの抗 CD20 抗体投与

生後3日の新生児の TSK マウス (C57/BL バックグラウンド) と野性型 C57/BL6 マウスに 10 または 20 μg の抗マウス CD20 モノクローナル抗体 (MB20-11、文献7) またはアイソタイプの一一致したコントロールモノクローナル抗体 (CTL Ab) を皮下注射した。2週間ごとに同量の抗体の皮下注射を繰り返した。

一方、皮膚硬化や自己抗体の産生がみられる生後8週の TSK マウスと野性型マウスでも同様に 20 μg の抗マウス CD20 抗体を投与した。

2) 皮膚硬化の組織学的な検討

新生児からの投与群では生後8週目に、生後8週からの投与群では生後16週目にマウスを殺して、背部の同一部位の皮膚から皮下を一塊に採取し、HE染色を施行した。

3) ハイドロキシプロリンの測定

皮膚におけるコラーゲン量を定量的に測定するために、マウスを殺した際に採取した皮膚におけるハイドロキシプロリンの量を前述 (文献2) のように測定した。

4) 自己抗体の測定

殺す前に採取した血清中の抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 ss-DNA 抗体、リウマトイド因子を前述 (文献2) のように ELISA にて測定した。

5) 免疫グロブリンの測定

血清中の各アイソタイプの免疫グロブリンの量を前述 (文献2) のように ELISA にて測定した。

6) サイトカインの発現

新生児より投与開始したマウスの一部は、生後3週の時点で殺して、皮膚を採取、凍結し、各サイトカインの mRNA の発現量を real time RT-PCR にて測定した。

C. 研究成果

1) 抗 CD20 抗体による B 細胞除去

生後3日から 10 μg または 20 μg の抗 CD20 抗体を2週間ごとに皮下注射し、生後8週目に解析した。20 μg の抗 CD20 抗体を投与した場合には、いずれのマウスの血液、脾臓、末梢リンパ節でも92%以上 B 細胞が除去されたが、10 μg 投与群で

は91%までしか除去されなかった。

生後8週より 20 μg の抗 CD20 抗体を2週間ごとに皮下注射した生後16週の野性型または TSK では各臓器において94%以上の B 細胞が除去された。

2) 皮膚硬化への効果

生後3日より 20 μg の抗 CD20 抗体を2週間ごとに投与した TSK では CTL Ab を投与した TSK に比べて、生後8週の時点で皮膚から皮下にかけての厚さが組織切片上で~43%減少していた (図1A, B)。10 μg の抗体を投与した TSK では、生後8週の時点で皮膚から皮下にかけての厚さが25%減少していた (図1B)。野性型では、抗体の投与によって皮膚から皮下の厚さに有意な変化はみられなかった (図1A, B)。一方、皮膚硬化が確立した生後8週より抗 CD20 抗体投与を開始した TSK や野性型では、生後16週の時点で CTL Ab を投与した群と有意な差を認めなかった (図1B)。コラーゲンの量を反映するハイドロキシプロリンの量も、組織標本での皮膚から皮下の厚さを反映して、TSK にみられた増加は抗 CD20 抗体の新生児からの投与によって、容量依存性に減少がみられたが、生後8週から投与した場合には有意な影響がみられなかった (図1C)。

3) 自己抗体の産生への影響

新生児期より CTL Ab を投与した TSK マウスでは、生後8週にて IgG 型および IgM 型の抗 topoisomerase I 抗体、IgM 型の抗 ss-DNA 抗体、リウマトイド因子などの自己抗体が CTL Ab を投与した野性型マウスよりも有意に高値を示した。IgG 型の抗 ss-DNA 抗体は両群間に有意な差を認めなかった。抗 CD20 抗体を投与した TSK では容量依存性にこれらの自己抗体の産生低下が認められた (図2A)。しかし、生後8週より抗 CD20 抗体を投与した場合には、生後16週の時点で TSK にみられる自己抗体の産生に有意な影響がみられなかった (図2B)。

3) 免疫グロブリンの産生

新生児期より抗 CD20 抗体を投与した TSK では、CTL Ab を投与した TSK よりも、血清中の各 isotype の免疫グロブリンの濃度が容量依存性に低下していた (図3A)。しかし、生後8週より抗 CD20 抗体を投与した場合には、生後16週の時点で CTL Ab を投与した TSK と比べて免疫グロブリンの産生量

に有意な差がみられなかった (図 3 B)。

5) 皮膚でのサイトカインの発現

TSK における皮膚硬化の進行過程での皮膚での各種サイトカインの発現を調べるために、3 週齢の TSK の凍結皮膚における各種サイトカインの mRNA の発現を real-time RT-PCR にて検討した (図 5)。CTL Ab を投与した TSK では野性型に比べて IL-6 や IL-10 の発現が有意に亢進していた。逆に、TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 の有意な発現低下が認められた。しかしながら、生後 3 日より 20 μ g の抗 CD20 抗体を 2 週間ごとに皮下注射した TSK では、IL-6 や IL-10 の発現亢進が野性型に近い程度まで抑制され、逆に TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 の発現低下は野性型に近い程度まで増加が認められた。

D. 考案

今回の検討で、まだ皮膚硬化や自己免疫のみられない新生児期より抗 CD20 抗体を投与して末梢の B 細胞を十分に除去した場合には、皮膚硬化の進行が 43% まで抑制され、自己抗体の産生が完全に抑制された。一方で、皮膚硬化や自己抗体が出現した大人の TSK では、抗 CD20 抗体による症状の有意な改善がみられなかった。皮膚硬化の進行過程にある若い TSK では IL-6 や IL-10 などの Th2 型のサイトカインの発現が亢進、IFN- γ や IL-2 などの Th1 型のサイトカインや TNF- α が低下していたが、抗 CD20 抗体の投与によりこのようなサイトカインの偏りが是正される傾向がみられた。

本研究において、B 細胞が TSK において皮膚硬化の病態形成に重要な役割を有していることが示された。TSK において、皮膚硬化の出現前より B 細胞を除去することにより、43% まで皮膚から皮下の厚さが軽減され、コラーゲン量を反映するハイドロキシプロリンも皮膚において減少していた。抗体が少なく B 細胞除去が不完全な場合には、皮膚硬化の軽減が少なかったことから、B 細胞の数が皮膚硬化に密接に関連しているものと考えられた。我々は以前に、TSK において B 細胞の中心的な制御因子である CD19 の発現をなくした場合に、36% まで皮膚硬化が減少することを報告した (文献 2)。CD19 は B 細胞の機能に大きな影響を与えるが、B 細胞自体をなくすことで、今回の検討では皮膚硬化がより軽減したものと考えられる。しかしながら、一旦

皮膚硬化が成立した TSK では、B 細胞を除去しても皮膚硬化の有意な軽減は認められなかった。一旦線維化が生じると、現在はこれを軽減することはいかなる薬剤においても一般に困難であり、本治療法も例外ではなかった。

また、B 細胞が TSK における自己免疫の発症に大変重要であることが確認された。自己抗体の産生がみられる前から B 細胞を除去した場合には、その後の抗 topoisomerase I 抗体、抗 ss-DNA 抗体、リウマトイド因子などの自己抗体の産生は全く認められなかった。これらの結果は、TSK において CD19 の発現をなくして B 細胞の機能を低下させた我々の以前の検討と類似していた (文献 2)。近年、B 細胞は種々の自己免疫疾患において、病態に重要な役割を果たしていると考えられており (文献 3-6)、我々の結果はこれらを裏付けるものと考えられる。一旦、自己免疫の発症した大人の TSK では抗 CD20 抗体治療 2 ヶ月後の時点で自己抗体の明らかな低下はみられなかった。通常、これらの自己抗体は long-lived plasma cell により産生されると考えられている。しかし、long-lived plasma cell は CD20 を発現しないものとされ、このために抗 CD20 抗体治療によっても残存して、抗体を産生し続けるものと考えられる。一方、新生児期より抗体を投与した場合には、long-lived plasma cell に分化する前の B 細胞が消失するために、自己抗体を産生する long-lived plasma cell が残存しないのではないかと考えられる。また、TSK では成長とともに免疫グロブリンの産生が増加するが、この病態も B 細胞の異常によることがわかった。新生児から B 細胞をなくすことにより、TSK にみられる産生増加が有意に抑制された。免疫グロブリンの産生増加がみられる大人の TSK に投与した場合には、有意な影響がみられなかった。免疫グロブリンの産生においても、long-lived plasma cell が主要な働きを有しているものと考えられる。

本研究において、B 細胞除去が TSK マウスの皮膚におけるサイトカインの発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。TSK の皮膚硬化の進行時期には、IL-6 や IL-10 といった Th2 型のサイトカインの mRNA の発現亢進が認められ、一方で TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 などの Th1 型のサイトカインの発現が低下していた。すなわち、TSK では野性型に比べてサイ

トカインの発現が Th1 よりも Th2 よりに傾いていた。しかしながら、B 細胞除去した TSK では、IL-6 や IL-10 などの発現亢進と TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 の発現低下が野性型に近いレベルまで是正された。このことから、TSK において、B 細胞は皮膚におけるサイトカインの発現異常を介して皮膚硬化の病態に関与している可能性が考えられ、B 細胞を除去することで TSK にみられるサイトカインのバランス異常が是正される可能性が示唆された。今後、そのメカニズムの更なる検討が必要と思われる。

以上のように、抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法は、TSK の発症前から投与することにより、皮膚硬化、自己免疫の出現を抑制することが可能であった。また、B 細胞除去は TSK の皮膚にみられるサイトカインの発現を調節することにより、皮膚硬化の進行を阻止している可能性が示唆された。

E. 結論

発症早期からの B 細胞除去療法が、SSc の治療戦略としても有用である可能性が考えられた。

F. 文献

1. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, et al: Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000, 165:6635-43.
2. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, et al: CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002, 109:1453-62.
3. Martin F, Chan AC. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* 2004, 20:517-27.
4. Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, et al. From systemic T cell self-reactivity to

organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*. 1999, 10:451-61.

5. De Vita S, Zaja F, Sacco S, et al. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2029-33.
6. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, et al. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2580-9.
7. Uchida J, Y Lee, M, Hasegawa M, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol.* 2004;16:119-29.
8. Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 2004;199:1659-69.

G. 研究発表

1. 学会発表

長谷川 稔、佐藤伸一、濱口儒人、内田純二、Thomas Tedder. 抗 CD20 抗体による治療は tight-skin mouse における皮膚硬化と自己免疫の出現を抑制する。第 34 回 日本免疫学会総会・学術大会。平成 16 年 12 月、札幌。

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

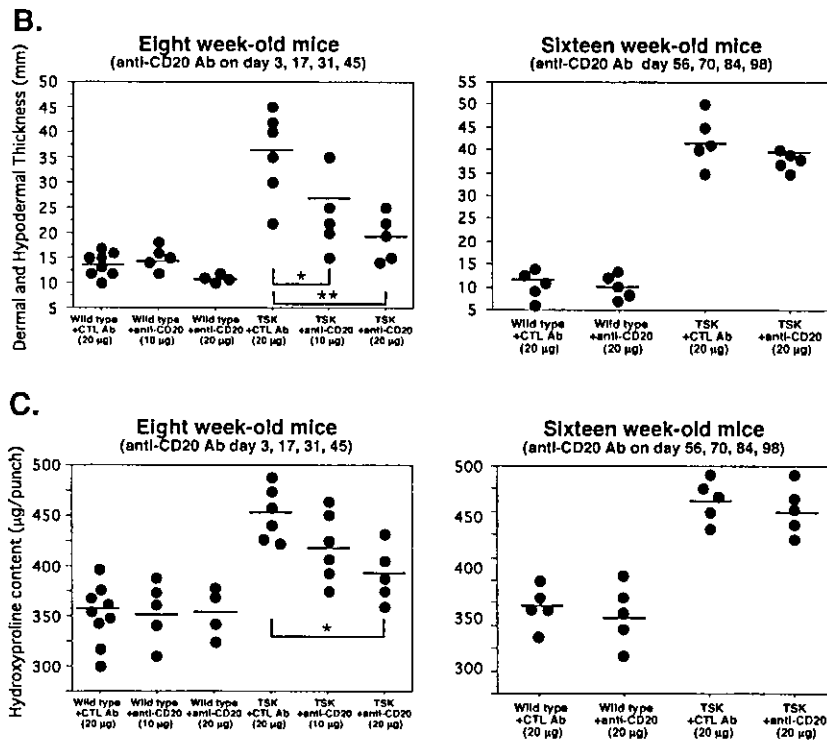
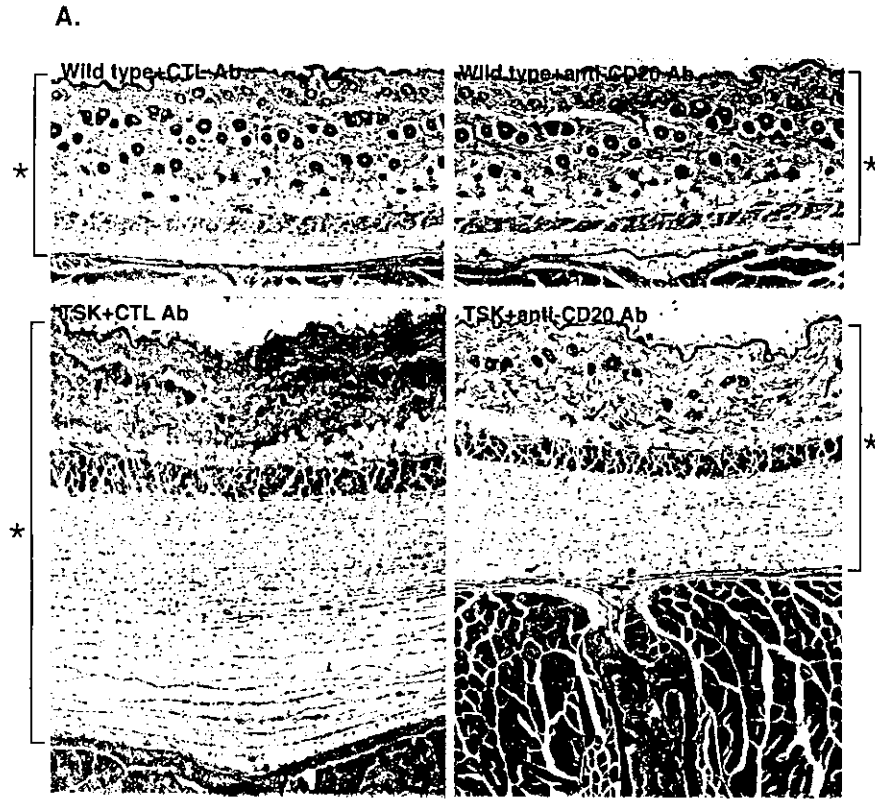


図1 生後3日より抗 CD20 抗体または CTL Ab を投与した生後8週の野性型または TSK の背中の皮膚における皮膚の線維化 (A~C) と生後8週より抗体を投与した生後16週での皮膚の線維化 (B,C)。A) 代表的な組織標本 (HE 染色、 $\times 40$)。*は皮膚から皮下にかけての厚さを示す。B)各検体における皮膚から皮下にかけての厚さ。C)各検体における皮膚でのヒドロキシプロリンの含有量。

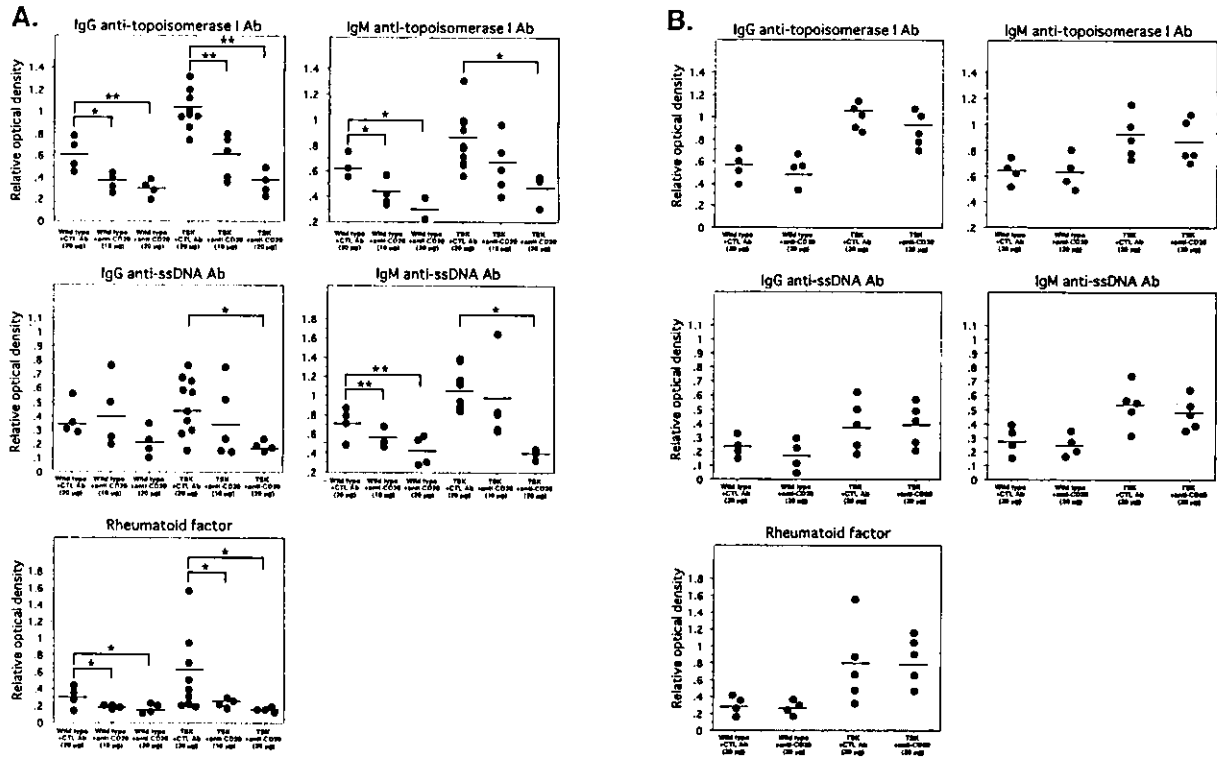


図2 野性型またはTSKにCTL Abまたは抗CD20抗体を投与した際の血清中の抗topoisomerase I抗体、抗ss-DNA抗体、リウマトイド因子をELISAにて測定したもの。

A) 生後3日より抗体を投与した生後8週のマウス。B) 生後8週より抗体を投与した生後16週のマウス。
*p<0.05, **p<0.01。

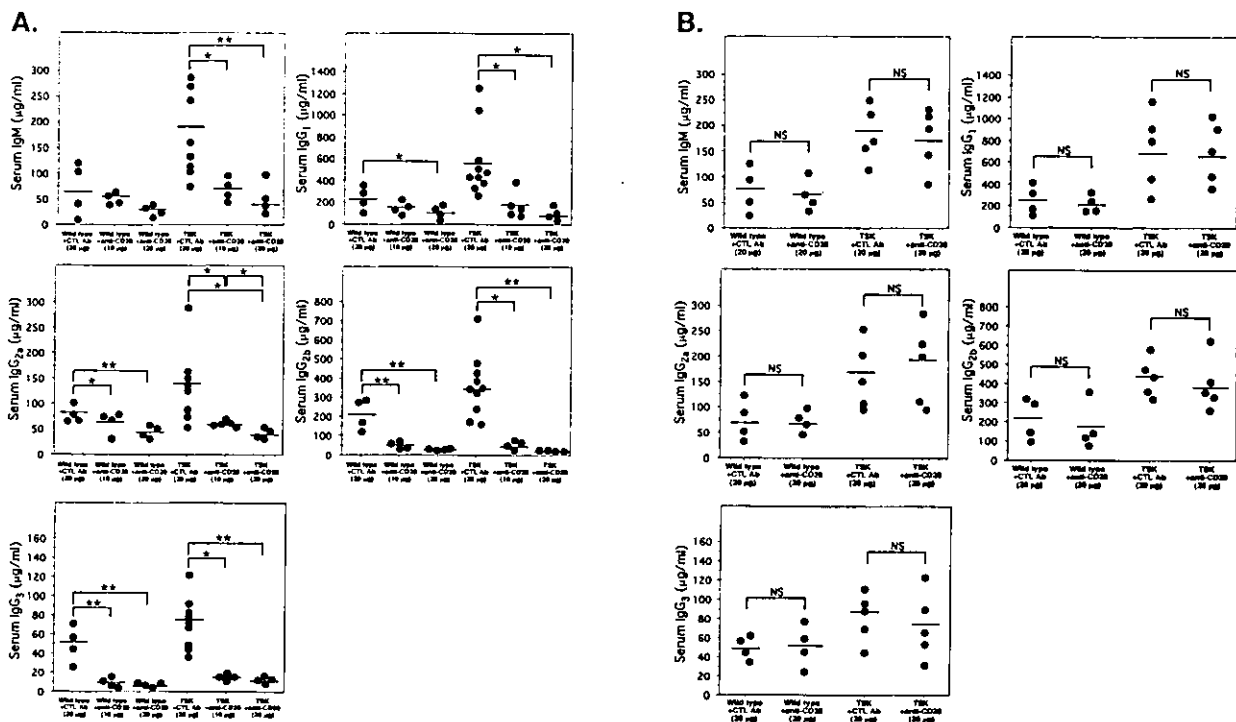


図3 野性型またはTSKにCTL Abまたは抗CD20抗体を投与した際の血清中の各アイソタイプの免疫グロブリンをELISAにて測定したもの。

A) 生後3日より抗体を投与した生後8週のマウス。B) 生後8週より抗体を投与した生後16週のマウス。
*p<0.05, **p<0.01。

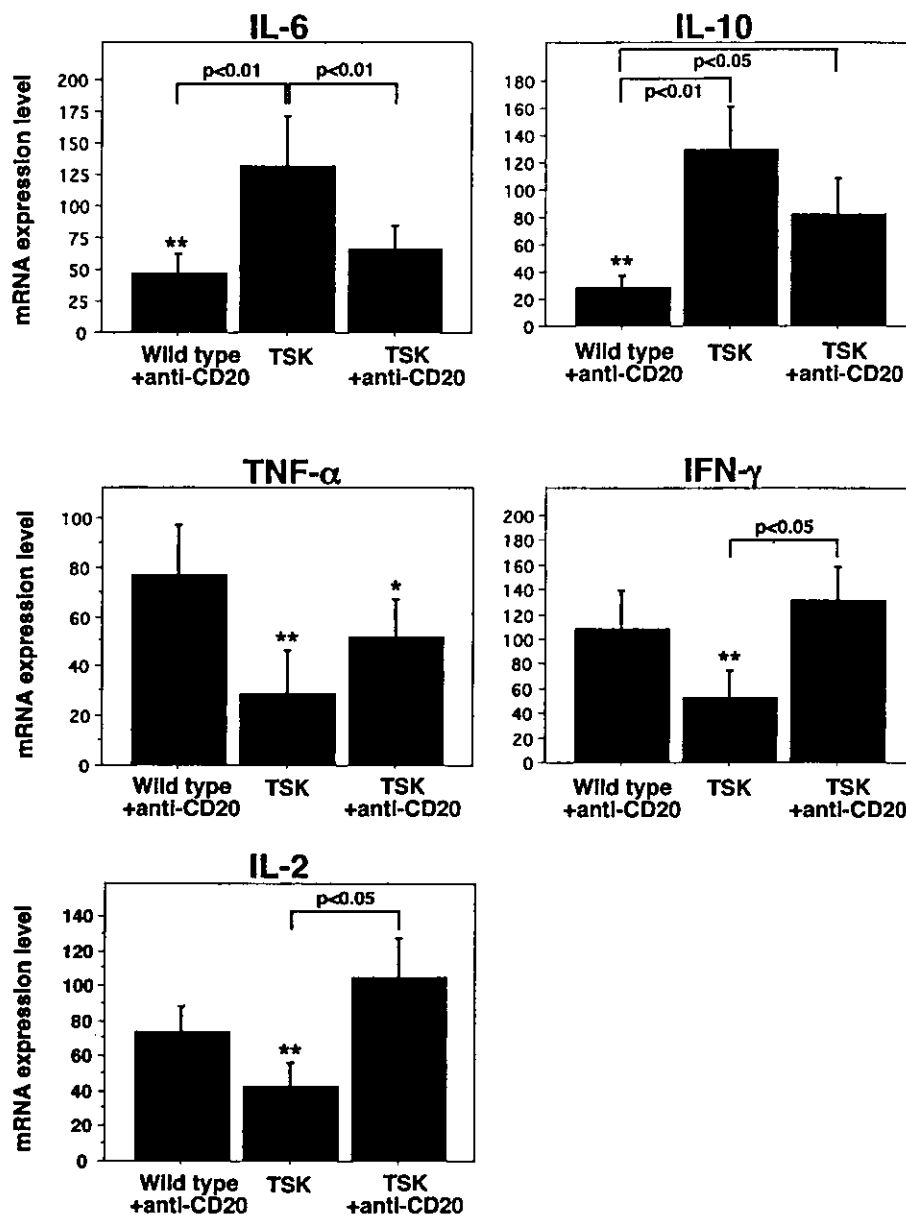


図4 生後3日より抗CD20抗体またはCTL Abを投与した3週齢の野性型またはTSKの背中の皮膚におけるIL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , 及びIL-2のmRNAの発現。mRNAはreal-time RT-PCRにて測定し、CTL Abを投与した野性型を基準にして、それに対する%を平均値+SEMで示した。*p<0.05, **p<0.01。

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血清中可溶性 CTLA-4 値の上昇

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

分担研究者 藤本 学 東京大学医学部皮膚科助手

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

血清中 soluble cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4 (sCTLA-4)は健常人、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE)、limited cutaneous systemic sclerosis (lSSc)と比較して、diffuse cutaneous SSc(dSSc)では有意に上昇していた。sCTLA-4の上昇が認められた SSc 患者では、罹病期間がより短く、dSSc、指尖部虫喰状瘰癧、手指の屈曲拘縮、びまん性色素沈着、肺線維症、%VCの低下がより高率に認められた。さらに、sCTLA-4値は皮膚硬化の程度、血清 IgG 値、抗トポイソメラーゼ I抗体価と正の相関を示した。経時的変化を検討したところ、sCTLA-4 は 5 例の dSSc 患者で皮膚硬化の改善と平行して低下した。また、経過中 sCTLA-4 高値を持続していた dSSc 患者 6 例中 2 例では皮膚硬化の改善はみられなかったが、残りの 4 例では皮膚硬化の改善が認められた。以上より、sCTLA-4 は SSc の疾患活動性および重症度と相関し、sCTLA-4 が SSc の免疫学的異常と関連していることが示唆された。

A. 研究目的

T細胞の活性化には抗原提示細胞から少なくとも 2 種類のシグナルがT細胞に伝達されることが必要とされる (1)。一つはT細胞抗原受容体の架橋によるシグナルであり、もう一つはT細胞上の CD28 と抗原提示細胞上の B7.1 (CD80)と B7.2 (CD86)の相互作用によって生じるシグナルである。CD28 のホモログである cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4 (CTLA-4, CD152)は活性化T細胞に発現し B7.1 と B7.2 に対

して CD28 より強い親和性で結合する。CTLA-4 はホスファターゼである SHP-2などを介して負のシグナルを伝達することによって、CD3 や CD28 の下流のシグナルを抑制する (1, 2)。この抑制性の機能によって CTLA-4 はT細胞の活性化を抑制し、アポトーシスや免疫学的アナジーを誘導する (1-3)。さらに、CTLA-4 は活性化B細胞にも発現し、液性免疫反応に対して抑制的に働く (4)。

最近 CTLA-4 遺伝子において膜貫通部分を欠如する転写産物が見いだされ、soluble

CTLA-4 (sCTLA-4)の存在が明らかにされた(5)。sCTLA-4 分子には B7 分子との結合に必須のアミノ酸残基は保存されていることから、機能を保持した可溶性分子であるとされている(5)。血清中 sCTLA-4 値の上昇は、自己免疫性甲状腺疾患(6)、身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)(7)、重症筋無力症(8)などの自己免疫疾患で報告されている。全身性強皮症(systemic sclerosis; SSc)ではリンパ球の活性化の亢進が報告されているが、このことは CTLA-4 を含めた抑制性機能分子に何らかの異常が存在する可能性を示唆している。そこで、今回 SSc における血清中 sCTLA-4 値とその臨床的相関について検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は SSc 59 例(女性 52 例、男性 7 例)であり、年齢は 50 ± 17 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 32 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 27 例であった。lSSc と dSSc の罹病期間はそれぞれ 6.9 ± 8.0 年、 3.4 ± 5.6 年であった。初診時ステロイド、D-ペニシラミン、他の免疫抑制剤にて治療されていた患者は除外した。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 21 例、抗セントロメア抗体陽性例が 25 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 2 例、抗 U3RNP 抗体陽性例 13 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 6 例、抗核抗体陽性であるものの対応抗原不明が 1 例、残り 1 例では抗核抗体は陰性であった。23 例の SLE 患

者および 41 例の健常人をコントロールとして用いた。

sCTLA-4 の経時的変化の検討においては、経過中 4 回以上血清が採取できた患者を対象とした。対象患者は SSc 30 例(女性 27 例、男性 3 例)であり、年齢は 52 ± 17 歳であった。病型別では lSSc が 10 例、dSSc が 20 例であった。lSSc と dSSc の罹病期間はそれぞれ 6.5 ± 4.9 年、 2.2 ± 2.1 年であった。これらの患者は 4.8 ± 1.5 (2.1-7.0) 年間フォローアップされ、その間血清は 6.6 ± 2.0 (4-10) 回採取された。初診時ステロイド、D-ペニシラミン、他の免疫抑制剤にて治療されていた患者はいなかったが、経過中に 17 例の dSSc 患者は少量のステロイドが投与された(プレドニゾン 5-20 mg/日)。10 例の dSSc 患者では少量の D-ペニシラミン(100-300 mg/日)が経過中に投与された。経過中、lSSc 患者に対してはステロイド、D-ペニシラミンの投与は行われなかった。また、lSSc、dSSc いずれにおいても経過中他の免疫抑制剤による治療は行われなかった。

2) ELISA

血清中 sCTLA-4 値は ELISA キット (MedSystems Diagnostics, Vienna, Austria)を用いて測定した。

C. 研究結果

1) SSc における血清中 sCTLA-4 値

dSSc 患者における血清中 sCTLA-4 値は、健常人、lSSc 患者、SLE 患者と比較して有意に上昇していた(図 1)。対照的に、lSSc

患者における血清中 sCTLA-4 値は健常人と有意な差は認められなかった。SLE 患者では一部の症例で血清中 sCTLA-4 が高値を示したが、全体としては健常人と有意な差は認められなかった。さらに、SLE 患者ではステロイド治療の有無によって血清中 sCTLA-4 値に差はみられなかった。

健常人の平均値 + 2SD (26.5 ng/ml) をカットオフ値とすると、SSc 全体では 27% (16/59) で血清中 sCTLA-4 値が上昇していた。血清中 sCTLA-4 値は dSSc 患者の 56% (15/27) で増加しており、一方 ISSc 患者ではわずか 3% (1/32) で上昇しているにすぎなかった。SLE 患者では 13% (3/23) で血清中 sCTLA-4 値高値が認められた。対照的に、健常人では一例も血清中 sCTLA-4 値が上昇していなかった。このように血清中 sCTLA-4 値は dSSc で上昇していることが明らかとなった。

2) SSc における血清中 sCTLA-4 値と臨床所見との相関

初診時における血清中 sCTLA-4 値と臨床所見との相関を表 1 に示す。血清中 sCTLA-4 値が高値であった SSc 患者では、血清中 sCTLA-4 値が正常であった SSc 患者と比較して、罹病期間がより短く、dSSc、指尖部虫喰状癬痕、手指の屈曲拘縮、びまん性色素沈着、肺線維症、%VC の低下がより高率に認められた。さらに、血清中 sCTLA-4 値は modified Rodnan total skin thickness score (modified Rodnan TSS)、血清中 IgG 値、ELISA による抗トポイソメラーゼ I 抗

体力価と有意な正の相関を示した (図 2)。

3) SSc における血清中 sCTLA-4 値の経時的变化の検討

dSSc 患者 20 例中 11 例で、初診時血清中 sCTLA-4 値が高値であった。この 11 例中 5 例で血清中 sCTLA-4 値は 5.3 ± 1.7 年のフォローアップ期間中に低下した (図 3A)。これらの症例での初診時における罹病期間は 1.8 ± 1.0 年であった。最後に受診したときの血清中 sCTLA-4 値は、5 例中 4 例で正常範囲まで低下していた。皮膚硬化は全例で経過中改善した。経過中 3 例で少量のステロイドが、1 例で少量のステロイドと D-ペニシラミンが投与されていたが、残り 1 例ではステロイドも D-ペニシラミンも投与されなかった (図 3A の白丸)。

初診時血清中 sCTLA-4 値が高値であった dSSc 11 例中 6 例では 3.8 ± 1.5 年のフォローアップ期間中高値を持続した (図 3B)。これらの症例での初診時における罹病期間は 2.0 ± 1.5 年であった。経過中少量ステロイド単独の治療が 6 例中 2 例で開始され、2 例では少量のステロイドと D-ペニシラミンが開始された。残り 2 例ではステロイドも D-ペニシラミンも投与されなかった (図 3B の白丸)。このステロイドも D-ペニシラミンも投与されなかった 2 例では、皮膚硬化の改善は認められなかったが、残りの 4 例では皮膚硬化は経過中改善が認められた。

dSSc 20 例中 9 例では初診時血清中 sCTLA-4 値は正常であった (図 3C)。1 例だけが経過中一時的に血清中 sCTLA-4 値高