

く、と考えられる。

汎発性強皮症の病因として、主に線維化、免疫異常、血管障害などのファクターが挙げられている。このうち、線維化は主にI型コラーゲンの転写レベルでの増加が原因で、この増加にはTGF-beta1が誘導するシグナル、特にSmadの系が関与していると考えられている。さらには、同様にTGF-betaの作用により線維芽細胞から分泌されるMMPの減少とTIMPの増加が報告されていることから、本症における線維化の機序には、コラーゲンの産生が増加し、分解能が低下しているという、2つの要素が存在すると考えられる。線維化の改善を目的としてコラーゲンの量を減少させるためには、この2つの要素を是正する必要があると考えられる。

分解能を復元するためにはMMPを増加させる、あるいはTIMPを減少させる必要があるが、MMP、特にMMP-1を誘導するサイトカインとして、今回我々はhepatocyte growth factor (HGF)に着目した。HGFは当初hepatocyteに対し増殖作用を持つ成長因子として見いだされたが、その後の研究により様々な細胞に多彩な作用を及ぼすことが判明している。レセプターであるc-metを介して作用を発揮することが知られているが、これは上皮系の細胞に多く発現しているとされているものの線維芽細胞などの間葉系細胞にもわずかながら発現が確認されている。

HGFの肝硬変に対する線維化改善効果はよく知られており(1)、以来様々な線維化病変に対する作用が検討されているが、動物モデルでの検討が主体で、in vitroでのメカニ

ズムの検討には未だ乏しい。しかし、HGFの線維化改善のメカニズムの一つが、MMPの誘導作用ではないかと推測されている。

今回我々はHGFの作用を正常及び汎発性強皮症由来線維芽細胞で比較し、その作用のメカニズムをコラーゲンの産生系および分解系の双方の面からin vitroで検討しようと考えた。

B. 研究方法

1) 対象

diffuse cutaneous type の強皮症患者 5名の前腕由来の皮膚線維芽細胞および正常人 5名由来の皮膚線維芽細胞を使用した。

2) 免疫プロット法

培養細胞の上清をポリアクリルアミドゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗I型collagen抗体、抗MMP-1抗体、抗TIMP-1抗体、抗TIMP-2抗体、抗c-met抗体および抗beta-actin抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて発色させた。

3) ノーザンプロット法

guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法を用いて抽出したRNAを1%アガロースゲルに泳動し、ナイロン膜に転写した。膜をcDNAプローブと反応させ、フィルムに露光した。

4) chloramphenicol acetyltransferase (CAT)法

subconfluent の状態の線維芽細胞に、FuGENE6 (Roche) を用いて transient transfection を行った。pSV-beta-galactosidase vector を用いて、導入効率を補正した。細胞抽出液に butyl-CoA と [¹⁴C]-chloramphenicol を加え、Butylated chloramphenicol を抽出し、液体シンチレーションにてカウントした。

C. 研究結果

1) 正常および強皮症皮膚線維芽細胞における HGF の I 型コラーゲン発現に対する作用

はじめに、培養上清中に蓄積される I 型コラーゲンの量が HGF 刺激により変化するかどうかを免疫プロット法にて検討した。正常の線維芽細胞では HGF はコラーゲン発現に影響しないが、強皮症線維芽細胞では培養液中に分泌された I 型コラーゲンは HGF 刺激により、量依存性に減少した(図 1a)。

一方、ノーザン・プロット法による検討では alpha2(I)コラーゲン mRNA 量は両細胞ともに HGF 刺激によって有意ではないものわずかに増加し、蛋白発現との乖離が認められた(図 1b)。同様に CAT 法を用いて alpha2(I)コラーゲン遺伝子プロモーター活性を測定したところ、両細胞とも HGF 刺激によりわずかに上昇した(図 1c)。

以上の結果より、HGF は正常細胞においても強皮症細胞においても、コラーゲン産生そのものに対して有意な作用を及ぼさないものの、強皮症細胞においては分解能を強く誘導することで培養液中のコラーゲン蓄積量を減少させていると考えられた。

2) 正常および強皮症皮膚線維芽細胞における HGF の MMP/TIMP 発現に対する作用

上記の分解能誘導のメカニズムを検討するため、HGF 刺激による MMP-1 や TIMP-1, TIMP-2 の発現量の変化を両細胞で比較した。正常、強皮症線維芽細胞ともに培養液中に分泌された MMP-1 は HGF 刺激により、24 時間あるいは 72 時間の時点で増加するが、TIMP-1 および TIMP-2 の発現に変化はみられなかった(図 2a)

HGF は MMP-1 遺伝子プロモーター活性誘導作用をも示した(図 2b)ことから、HGF の MMP-1 誘導作用は転写レベルであることが確認されたが、加えて強皮症細胞では無刺激下における basal な MMP-1 のレベルは減少しているが、HGF 刺激により正常細胞を上回る増加率を示した。

そこで、再び蛋白レベルで MMP-1 の発現量を両細胞で比較したところ、強皮症細胞では HGF 無刺激の basal な MMP-1 のレベルは減少しているものの、HGF 刺激によりこれが逆転した(図 2c)。以上の結果より強皮症細胞では HGF に対する反応性が亢進していると考えられた。

3) 正常および強皮症皮膚線維芽細胞における c-met 発現量の比較

このような正常・強皮症細胞間における MMP-1 の HGF に対する反応性の違いについてさらに検討するため、HGF のレセプターである c-met の発現量を両細胞で比較した。C-met は alpha と beta の 2 つの subunit

により構成されていることが知られているが、両者とも強皮症細胞では発現が亢進していた(図 3a)。強皮症細胞における HGF に対する反応性の亢進はレセプターの発現亢進が原因となっている可能性が考えられた。

さらに、強皮症細胞における c-met 発現亢進の機序を検討した。正常線維芽細胞では c-met の発現量は TGF-beta1 刺激で時間依存的に増加する(図 3b)。逆に、TGF-beta1 の antisense oligo の添加によりその作用を中和することで、強皮症線維芽細胞の c-met の発現量が減少した(図 3c)。以上により、強皮症線維芽細胞では autocrine TGF-beta シグナリング 2) の存在により HGF receptor が強発現しているため、HGF に対する反応性が亢進しているのではないかと考えられた。

4) 強皮症線維芽細胞における HGF のコラーゲン蓄積量低下作用への MMP の関与の検討

最後に、強皮症線維芽細胞における HGF のコラーゲン発現抑制作用が MMP を介することを確認するため、GM1489 や EDTA など MMP 阻害剤を HGF とともに加えると、前述のような強皮症細胞におけるコラーゲンの減少は見られなかった(図 4)。よって、HGF によるコラーゲンの蓄積量減少作用は MMP を介する、ということが確認された。

D. 考案

強皮症線維芽細胞では autocrine TGF-beta シグナリングの影響によりコラーゲン発現量も増加するが、HGF receptor が強発

現するため、HGF に対する感受性が高まり、MMP-1 の増加率が高く、産生/分解のバランスが崩れてコラーゲン蓄積量を減少させることができるのではないかと考えられ、一種の negative feedback で有る可能性があると思われる。

現時点で有る程度の規模の trial によって皮膚硬化に有効とされている治療としては、ステロイド、メトトレキサート、シクロスポリンなどがある。これらの薬剤は主に病初期に投与され、また全身投与により様々な副作用があることが知られている。一方、HGF が MMP を介した作用を有するとすると、理論上 chronic stage の線維化にも効果がある可能性があり、また線維化病変にのみ作用するとすれば全身投与しても副作用が少ない可能性もある、と考えられた。

E. 結論

HGF は汎発性強皮症の病変部においてのみ MMP を介したコラーゲン蓄積抑制作用を有する可能性があり、全く新たな治療戦略として有望と考えられる。今後、さらなる検討が必要と考えられる。

F. 文献

1. Matusuda Y, Matsumoto K, Ichida T, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal dysfunction in rats. *J Biochem* 1995, 118: 643-649

2. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith. E., LeRoy C, Trojanowska M: Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. J Invest Dermatol 1998, 110: 47-51

G. 研究発表

- 1.論文発表 なし
- 2.学会発表 H17 年度強皮症研究会議

H. 知的所有権の出願・登録状況 なし

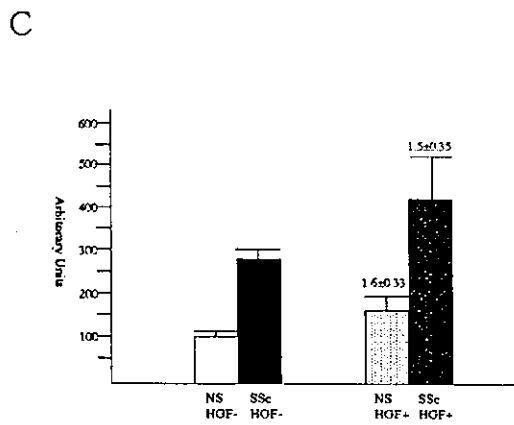
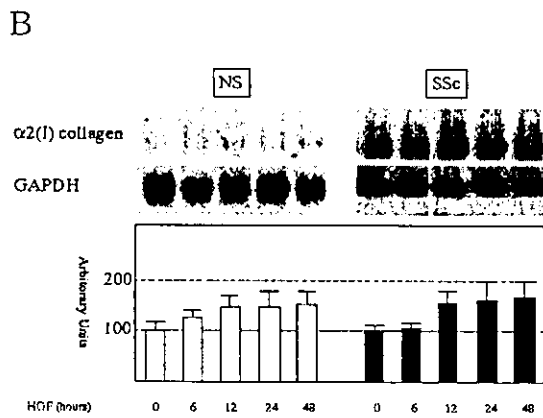
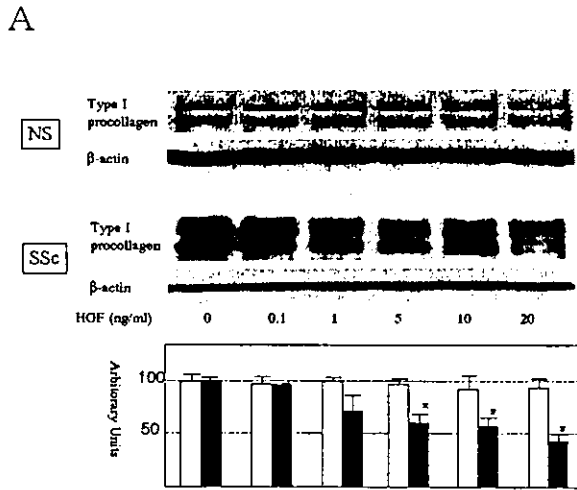


図 1: 正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞における HGF の I 型コラーゲン発現に及ぼす影響
a:免疫プロット法による type I コラーゲン蛋白の検出。
b:ノーザン・プロット法による alpha2(I)コラーゲン mRNA の検出。
c:CAT 法による alpha2(I)コラーゲン遺伝子転写活性の測定。

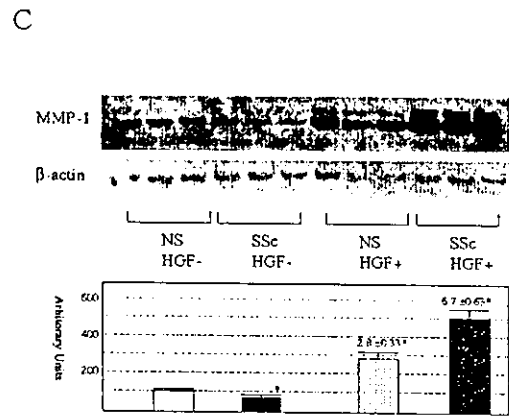
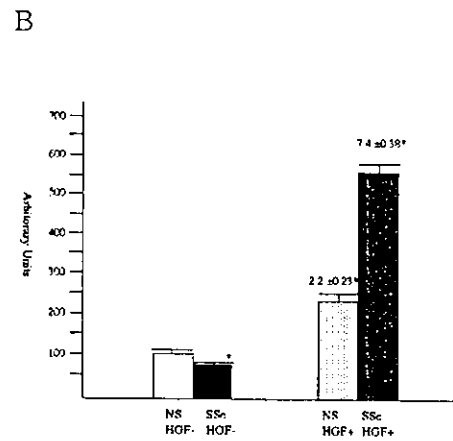
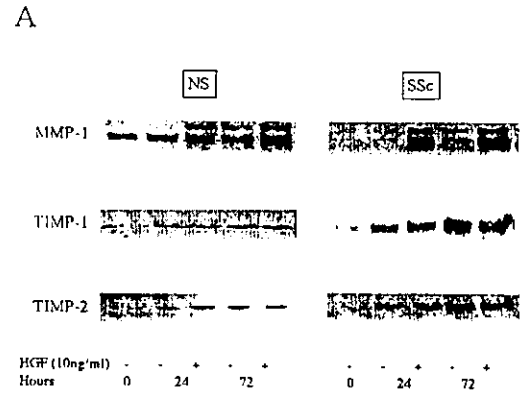


図 2: 正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞における HGF の MMP/TIMP 発現に及ぼす影響
a:免疫プロット法による MMP-1, TIMP-1 および TIMP-2 蛋白の検出。
b:CAT 法による MMP-1 遺伝子転写活性の測定。
c:免疫プロット法による、正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞における HGF の MMP-1 蛋白発現に及ぼす影響の比較。

A

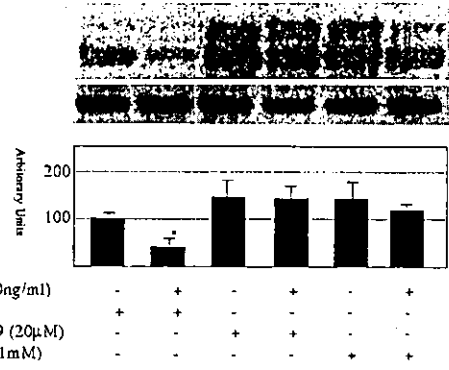
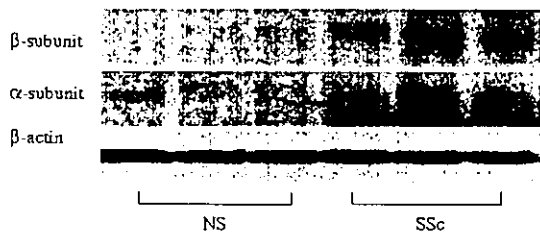
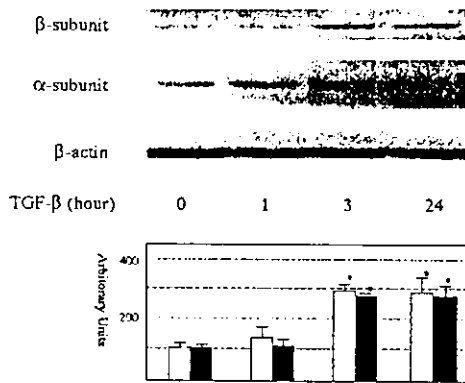


図4:強皮症皮膚線維芽細胞における HGF の作用に対する MMP inhibitor の影響

B



C

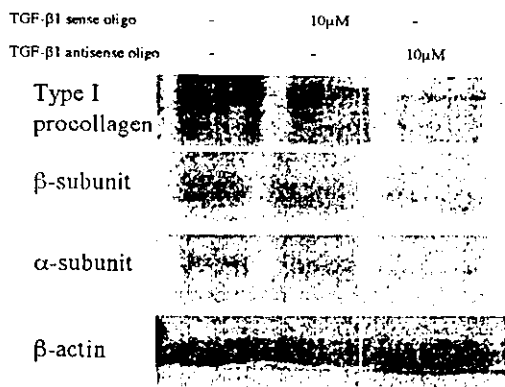


図3:正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞における c-met 発現量の比較

a:免疫プロット法による正常および強皮症由来皮膚線維芽細胞における c-met 蛋白の比較。

b:免疫プロット法による正常皮膚線維芽細胞における c-met 発現に対する TGF-beta1 の影響。

c:免疫プロット法による強皮症由来皮膚線維芽細胞における c-met 発現に対する TGF-beta1 antisense oligonucleotide の影響。

MMP-13 発現細胞の分化誘導による臓器線維症の治療戦略

研究協力者 稲垣 豊 東海大学医学部基盤診療学系助教授
協力者 東山礼一 東海大学大学院医学研究科大学院生
協力者 岡崎 勲 東海大学医学部基盤診療学系教授
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

臓器線維症は、その部位と原因とにかかわらず、組織にコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスが過剰に沈着し、臓器の機能障害をきたした病態である。肝線維症の終末像である肝硬変症は、これまで進行性かつ不可逆性と考えられてきたが、最近ではその原因を除去することで正常肝に近い状態にまで改善することが臨床的にも実証された。我々は、四塩化炭素投与による実験的肝硬変症からの回復期に、コラーゲン線維を分解する MMP-13 が一過性に発現することを見出した。GFP transgenic mouse を用いた骨髄移植実験では、この時期に一致して多数の骨髄由来細胞が肝内に浸潤増殖し、線維束周囲に認められた。この骨髄由来細胞を MMP-13 産生細胞へと分化誘導することで肝線維症治療に応用すべく、その発現形質について解析を行っている。

A. 研究目的

強皮症は、全身の諸臓器にコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの異常沈着をきたす原因不明の疾患である。コラーゲンは、細胞外マトリックスの主要成分として、組織・臓器形態の保持のみならず組織修復や創傷治癒においても重要なはたらきを演じているが、その産生調節機構が破綻をきたすと過剰なコラーゲンの沈着をもたらし、皮膚・肺・腎・肝・脾など諸臓器の線維化を引き起こす。これら諸臓器の線維化は各種感染症のほか、臓器障害性の化学物質への曝露や手術後の瘢痕などによりもたらされ、線維化がさらに臓

器障害をきたすという悪循環を形成する。近年はかつて救命しえなかった重篤な急性疾患が救命できるようになり、一方で慢性疾患の治療管理が向上したこともあり、臓器線維症の患者は増加傾向にある。それはすなわち、強皮症や特発性間質性肺炎などの原因不明の難病、急性心筋梗塞後の心臓線維症、ウイルス性ならびにアルコール性肝硬変、慢性糸球体腎炎・糖尿病性腎症による腎臓の線維化、塵肺などの肺線維症、さらには動脈の粥状硬化症などであり、その総数はがん患者をはるかに凌ぐ。

我々のこれまでの研究により、実験的肝線

維症の回復過程において、コラーゲン線維を分解するコラゲナーゼ (MMP-13) が一過性に発現し¹⁾、その産生細胞の一部が Musashi-1 陽性の骨髄由来の幹細胞であることが明らかになった²⁾。本研究は、マウスに移植された骨髄由来細胞が MMP-13 産生細胞へと分化する過程を詳細に観察し、肝線維症の回復過程における骨髄幹細胞の役割を明らかにすることで、臓器線維症に対する治療法を確立することを目指すものである。

B. 研究方法

GFP トランスジェニックマウス (C57BL/6 由来) の骨髄より 5×10^6 個の骨髄細胞を採取し、9.5Gy の致死性 X 線照射をした同系マウスに経静脈的に移植した。このレシピエントマウスに、移植 3 ヶ月後より 25% 四塩化炭素 (1mg/kg 体重) を 3 日毎に計 30 回皮下投与した。一部のマウスには、四塩化炭素最終投与前の 7 日間、100 μ g/kg 体重の G-CSF を連日皮下投与した。

四塩化炭素最終投与から 2 日、5 日、9 日に肝臓を摘出し、Mallory-Azan 染色により線維化の程度を評価した。この線維化の進展過程と投与中止後の回復過程において、移植された GFP マウス由来の骨髄細胞が肝内へ浸潤・増殖する動態を、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。また、RT-PCR 法により肝組織中の MMP-13 発現を検討するとともに、CD45 抗体・Ov-6 抗体・AFP 抗体・Albumin 抗体・MMP-13 抗体を用いた免疫蛍光染色を行なって、GFP 発現とともに共焦点レーザー顕微鏡による観察でその発現と分布を検討した。

C. 研究結果

四塩化炭素計 30 回の投与により、肝小葉構造の改築と結節形成を伴う肝硬変への進展が確認された。最終投与後 2 日目には、GFP 陽性の骨髄由来細胞は線維束に沿って分布し、線維化の程度にともなって多く認められた (図)。G-CSF 投与群では非投与群と比較して GFP 陽性細胞が多く認められた。5 日目ないし 9 日目になると、著明な線維吸収がみられ、これに伴って GFP 陽性細胞も減少した (図)。

肝線維化の改善過程において、肝内には MMP-13 mRNA の発現が確認され、2 日目および 5 日目の線維束周囲には MMP-13 の発現が認められた。GFP 陽性細胞は CD45 陽性の血球系細胞のほか、Ov-6 陽性の小型細胞 (Oval 細胞) や、多数の間葉系細胞へと分化していた。また、ごく少数ながら AFP 陽性細胞や Albumin 陽性細胞も認められ、肝細胞系への分化あるいは肝細胞との Fusion の存在が示唆された。

D. 考案

これまで再生医学の領域では、骨髄細胞の移植、または組織幹細胞の分化誘導による臓器再生が多数試みられているが、肝線維化の改善におけるこれらの細胞の役割についてはなお不明な点が多い。本研究では、MMP-13 の発現に着目して肝線維化改善過程における骨髄由来細胞の肝内動態を解析し、さらに G-CSF を用いた骨髄細胞の動員・分化誘導による線維症治療の可能性を追求するものである。骨髄由来細胞は肝線維化の強さに応じて数多く出現しており、G-CSF 投与により骨髄由来細胞

胞の動員が増強された。また、骨髄由来細胞は形態学的にさまざまな細胞に分化し、線維束周囲に MMP-13 の発現が認められたことから肝線維化改善に寄与すると考えられた。本研究により、幹細胞を増殖させ、さらに MMP-13 産生細胞へと分化誘導する有効な方法が開発されれば、幹細胞を外来的に移植せずとも自家骨髄幹細胞を線維化組織に動員することで、非侵略的な線維症治療に結びつくことが期待される。

本研究は肝硬変を一つの疾患モデルとしながら臓器線維症の進展・回復過程を包括的に研究するものである。当面は肝硬変モデルを用いて研究を進めるが、骨髄細胞の動員と分化誘導により肝線維症の改善がみられれば、強皮症や特発性肺線維症など全身諸臓器にみられる難治性の線維症にも広く応用可能であり、その貢献は計り知れない。

E. 結 論

骨髄由来細胞の線維化組織への動員と、MMP-13 産生細胞への分化誘導に基づく、臓器線維症治療の全く新しい概念と治療戦略とを提唱した。

F. 文 献

- 1) Tetsu Watanabe, Maki Niioka, Shigenari Hozawa, Kaori Kameyama, Tatsuhiko Hayashi, Masao Arai, Akiko Ishikawa, Katsuya Maruyama and Isao Okazaki: Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 33: 224-235, 2000
 - 2) Tetsu Watanabe, Maki Niioka, Shigenari Hozawa, Yoshihiko Sugioka, Masao Arai, Katsuya Maruyama, Hideyuki Okano and Isao Okazaki: Stem cells expressing matrix metalloproteinase-13 mRNA appear during regression reversal of hepatic cirrhosis. Okazaki I, Ninomiya Y, Friedman SL and Tanikawa K (Eds), *Extracellular Matrix and the Liver -Approach to Gene Therapy*, Academic Press, New York, 2003, 361-388
- ## G. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Yoshihiko Sugioka, Tetsu Watanabe, Yutaka Inagaki, Miwa Kushida, Maki Niioka, Hitoshi Endo, Reiichi Higashiyama and Isao Okazaki: c-JUN NH2-terminal kinase pathway is involved in constitutive matrix metalloproteinase-1 expression in a hepatocellular carcinoma-derived cell line. *Int J Cancer* 109: 867-874, 2004
 - 2) 岡崎 勲、渡辺 哲、稲垣 豊: 肝線維化のメカニズムと新たな治療アプローチ. *Hepatoday* 6: 3-5, 2004
 - 3) 稲垣 豊、岡崎 勲: 肝線維化の分子機構とその制御. *医学のあゆみ* 211: 1069-1072, 2004
 - 4) Sonoko Chujo, Fumiaki Shirasaki, Shigeru Kawara, Yutaka Inagaki,

Takuro Kinbara, Masaharu Takigawa and Kazuhiko Takehara: Connective tissue growth factor causes persistent pro α 2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor- β in a mouse fibrosis model. J Cell Physiol 2005 (in press)

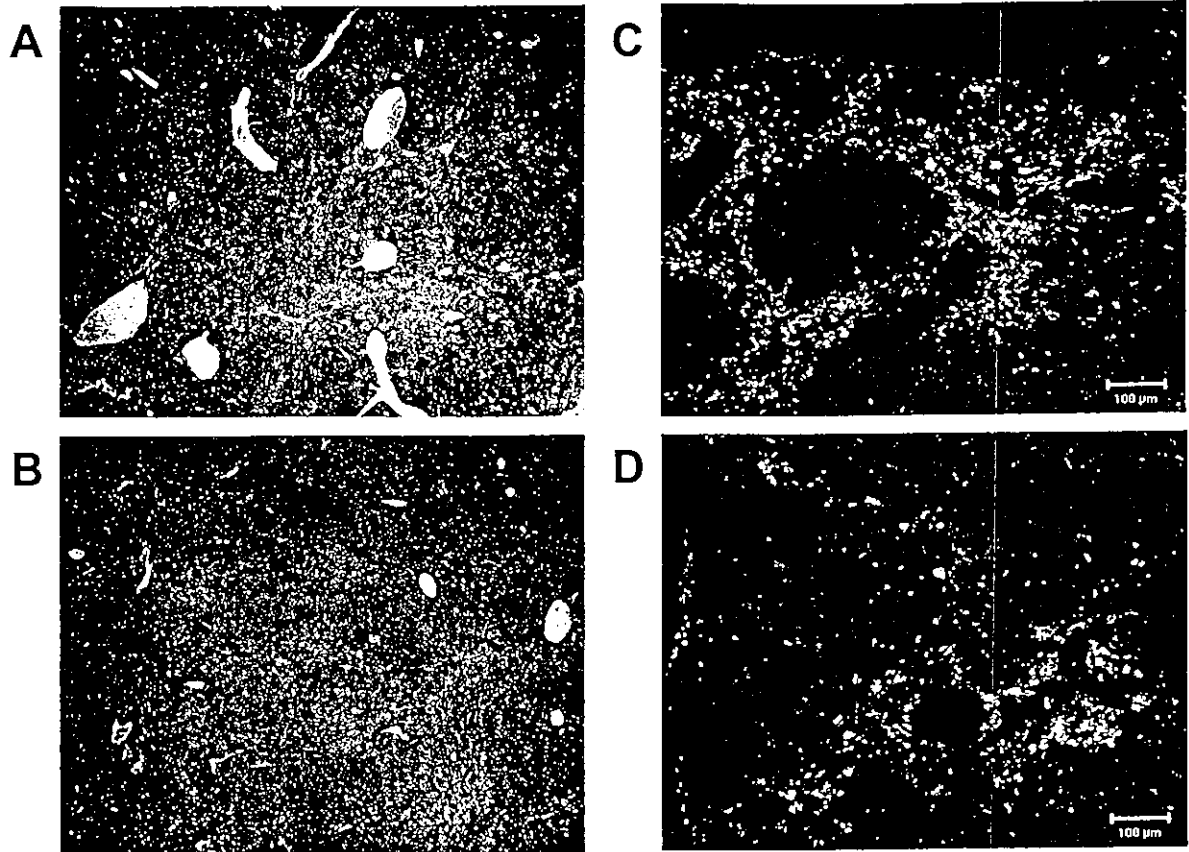
2. 学会発表

- 1) Yutaka Inagaki: Transcriptional regulation of type I collagen genes by TGF- β 1 and acetaldehyde. FASEB Experimental Biology 2004: Liver Pathobiology, Molecular and Cellular Basis of Fibrotic Liver Disease, 2004. 4. 19, Washington DC, USA
- 2) 稲垣 豊、池田一雄、渡辺 哲、岡崎 勲: 組織特異的エンハンサーを用いた肝線維症の治療戦略. 第40回日本肝臓学会総会、2004年6月3日、浦安
- 3) Yutaka Inagaki, Miwa Kushida, Johbu Itoh, Reiichi Higashiyama, Tetsu

Watanabe, Isao Okazaki, Kiyoshi Higashi and Kazuo Ikeda: Cell type-specific intervention of TGF- β /Smad signaling down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2004. 11. 1, Boston, USA

- 4) 稲垣 豊、櫛田美和、渡辺 哲、岡崎 勲、汐田剛史、池田一雄: Hepatocyte Growth Factor によるコラーゲン遺伝子転写の抑制機序. 第18回肝類洞壁細胞研究会、2004年11月27日、大阪
- 5) 稲垣 豊: Fibrosisのメカニズムと治療. 第16回中ノ島リウマチセミナー、2004年12月12日、大阪

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし



図：四塩化炭素投与後の肝線維化改善過程における骨髄由来細胞の動態

四塩化炭素を計 30 回にわたって皮下投与した後、2 日目 (A, C) ならびに 5 日目 (B, D) の肝組織における線維化の程度と骨髄由来の GFP 陽性細胞の分布とを、それぞれ Mallory-Azan 染色 (A, B) と共焦点レーザー顕微鏡 (C, D) とを用いて観察した。

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

強皮症に対するスタチン療法の循環血管内皮前駆細胞に対する効果

分担研究者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所講師
協力者 岡崎有佳 慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター特別研究助手
協力者 鍋木淳一 東京電力病院内科科長

研究要旨

近年、成人における血管の修復に骨髄由来の循環血管内皮前駆細胞（CEP）が重要な役割を果たすことが示された。昨年度、我々は強皮症患者には末梢血中 CEP の減少と成熟障害が存在し、末梢血管病変と関与することを明らかにした。そこで、本年度は骨髄から末梢への CEP の動員を誘導する作用が知られているスタチン系薬剤（アトルバスタチン）を強皮症患者に 12 週間投与し、CEP 数および末梢循環障害の程度を経時的に調べる前向きオープン試験を行った。現時点で 14 例のエントリーがあり、8 例が終了、5 例が進行中である。1 例は総コレステロール値が 120mg/dl 未満となったため 8 週で投与を中止した。中間集計では、アトルバスタチン投与により CEP の増加、bFGF と可溶性 VCAM-1 の減少、レイノー状態スコアの改善を認めた。強皮症の末梢循環障害に対してスタチン系薬剤が有効な治療法となる可能性が示されたが、多数例を対象とした長期投与試験による確認が必要と考えられた。

A. 研究目的

強皮症では皮膚および内臓諸臓器の線維化に加えてレイノー現象、指尖潰瘍などの末梢循環障害を高率に認める。強皮症に伴う血管病変は病理学的に小動脈レベル以下の動脈における内腔狭窄と血管数減少の 2 つの特徴を有する。従来、成人における傷害血管の修復や血管新生は近傍の成熟血管内皮細胞の増殖と移動により誘導されると考えられてきた。近年、成人におけるこの過程に骨髄由来の循環血管内皮前駆細胞（CEP）が重要な役割を果たすことが明らかにされた¹⁾。CEP は末梢血単核球にきわめて少数しか存在しないため、その検出が困難であった。昨年度、我々は CEP に特徴的な表面マーカー

（CD34+VEGFR2+CD133+）を用いて定量化するアッセイ系を確立し、強皮症患者末梢血中で CEP の減少と成熟障害が存在することを報告した²⁾。この結果に基づき、CEP の異常が強皮症の末梢血管病変を誘導するという仮説を提唱し、CEP 数の増加あるいは成熟能の改善が強皮症の末梢循環障害に対する新たな治療となる可能性を考えた。そこで、本年度は骨髄から末梢への CEP の動員を促進する作用が知られているスタチン系薬剤（アトルバスタチン）³⁾を強皮症患者に 12 週間投与し、CEP の増加および末梢循環障害の改善がみられるかを検討する前向きオープン試験を行った。

B. 研究方法

1. 対象

アメリカリウマチ学会 (ACR) の分類基準⁴⁾を満たす成人強皮症患者 14 例を対象とした。強皮症の病型、罹病期間、血清総コレステロール値は問わず、文書による同意が得られた患者のみをエントリーした。

2. 試験プロトコール

偽薬投与群を設定しないオープン前向き試験とした。強皮症に対して疾患修飾作用を有する可能性がある薬剤 (副腎皮質ステロイド、D-ペニシラミン、プシラミン、シクロフォスファミド) および血管拡張作用を有する薬剤 (Ca 拮抗薬、プロスタサイクリン製剤、ビタミン E、血小板凝集抑制薬など) の投与を過去 6 ヶ月間変更していない強皮症患者にアトルバスタチン (商品名リピトール) 10mg 朝 1 回を 12 週間投与した。投与開始日、投与期間中 (4、8、12 週)、投与終了後に以下の検討を行った。①末梢血 20ml あたりの CD34⁺細胞数および CEP 数、②血漿中血管新生因子 (VEGF、bFGF)、③血清中血管内皮障害マーカー (可溶性 VCAM-1)、④アンケート調査によるレイノー状態スコア

(Raynaud condition score: RCS)、⑤血清肝機能 (AST、ALT、ALP) および CK 値。筋痛、脱力、皮疹などの副作用の可能性のある症状の出現、あるいは総コレステロール値が 120mg/dl 未満となった時点で投与を中止することとした。なお、本研究計画は慶應義塾大学医学部倫理委員会での承認を受けた。

2. CEP の定量²⁾

末梢血 20ml より単核球を分離し、MACS ビーズ (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD34⁺細胞を分離した。CD34、VEGFR2、CD133 に対するモノクロー

ナル抗体を用いて CD34⁺細胞を三重染色した。CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺細胞の割合をフローサイトメトリーにより求め、FlowCount マイクロビーズ (Beckman-Coulter, Hialeah, FL, USA) を用いて定量化した。CEP 数は末梢血 20ml あたりの絶対数で表した。

3. 循環液性因子濃度の測定

血漿 VEGF、bFGF および血清可溶性 VCAM-1 濃度は市販の ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) により測定した。

4. 統計学的解析

経時的なパラメータの変化は repeated measures ANOVA (平均±標準偏差) を用いて検討し、有意差 (P < 0.05) が得られれば Bonferroni correction を用いて投与前値に対して有意なポイントを検定した。

C. 研究結果

14 例の強皮症患者 (7 例が diffuse 型) をエントリーし、2005 年 1 月 10 日現在、8 例がプロトコール終了、5 例が進行中である。1 例で 8 週時に総コレステロール値が 120mg/dl 未満となったためアトルバスタチンの投与を中止した。全例で投与期間中に筋症状、皮疹、肝機能障害、CK 上昇は観察されなかった。表 1 にアトルバスタチン投与前、投与中、中止後の各種パラメータの推移を示す。総コレステロール値は投与期間中に有意に減少した。CD34⁺細胞および CEP はアトルバスタチン投与期間中に増加し、中止により減少した、特に、CEP の変動は顕著で、投与中止により投与前の数に戻った。ただし、健常人の CEP 数の平均 (1081/20ml 末梢血) まで増加した症例はなかった。全ての症例で投与期間中に CEP の増加がみられたが、4 週

をピークに徐々に減少したり、4、8、12 週と漸増する症例があり、反応パターンは多様であった。末梢血中の血管新生因子の推移を調べると、投与期間中に VEGF はわずかに上昇し、bFGF は有意に減少した。また、血管内皮障害・活性化マーカー可溶性 VCAM-1 はアトルバスタチン投与により減少し、中止後も低値を維持した。同様に、RCS も投与期間中に減少し、中止後も低値であった。

D. 考案

現時点では中間集計だが、アトルバスタチン投与により強皮症患者末梢血で CEP が増加し、中止により減少することが確認された。また、アトルバスタチン投与中は bFGF および可溶性 VCAM-1 が減少し、レイノー現象の程度（回数、持続時間および強さ）を反映する RCS も改善した。血管内皮が傷害されると、それを修復するために損傷部位から VEGF、bFGF などの血管新生因子が産生され、骨髄から CEP が動員される⁵⁾。強皮症患者では VEGF や bFGF など血管新生因子が高値であるにもかかわらず CEP の絶対数が少ない。このことは、骨髄での CEP の分化、放出障害の存在を示唆する。スタチン系薬剤は CEP の幹細胞レベルでの分化、増殖を促進する作用が報告されており⁶⁾、今回の検討から CEP の異常が存在する強皮症においてもある程度の効果を発揮することが示された。CEP が骨髄から動員されれば、末梢における血管新生因子過剰産生が抑制されることが予測され、今回の bFGF の推移はこの仮説と一致した。また、血管内皮傷害・活性化の程度を反映する可溶性 VCAM-1 は減少し、CEP の動員により血管内皮の修復が促進された可能性がある。ただし、スタチン系薬剤は抗凝固作用や抗炎症作用など

の多面性作用 (pleiotropic effect) を有することが知られ、これら血中因子の推移が CEP の増加による二次的な変化かは明らかでない。

強皮症の末梢循環傷害に対して現在おもに血管拡張薬が用いられているが、満足のいく臨床効果は得られていない。今後のさらなる検討が必要だが、骨髄から CEP を誘導することが強皮症の末梢血管病変の治療につながる可能性が考えられた。

E. 結論

スタチン系薬剤が CEP の誘導を介して強皮症の末梢血管病変に対して有効な可能性が示された。今度、多数例を対象とした長期投与試験により臨床効果の確認が必要と考えられた。

F. 文献

1. Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34⁺ bone marrow cells. *Blood* 2000; 95: 581-5.
2. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, et al. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* 2004; 364: 603-10.
3. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885-90.
4. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
5. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone

marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat Med 1999; 5: 434-8.

6. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway. J Clin Invest 2001; 108: 391-7.

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, et al. Defective

vasculogenesis in systemic sclerosis. Lancet 2004; 364: 603-10.

2. 学会発表

桑名正隆：強皮症における世界の最新治療。第55回日本皮膚科学会中部支部学術大会(金沢). 2004. 9.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1. アトルバスタチン投与前後に於ける各種パラメータの推移

	投与前 (n = 14)	4週 (n = 14)	8週 (n = 14)	12週 (n = 11)	中止後 (n = 9)	P†
総コレステロール (mg/dl)	204 ± 35	154 ± 25**	155 ± 24**	163 ± 26**	200 ± 29	< 0.0001
CD34 ⁺ 細胞 (20mL末梢血あたり)	7806 ± 4964	10457 ± 7343	11172 ± 7342	16639 ± 14387**	9918 ± 5213	0.03
CEP (20mL末梢血あたり)	133 ± 95	300 ± 184**	284 ± 117**	339 ± 212**	120 ± 65	< 0.0001
VEGF (pg/ml)	32.9 ± 7.3	39.6 ± 12.0*	36.9 ± 7.7	33.9 ± 7.7	30.0 ± 4.1	0.04
BFGF (pg/ml)	15.8 ± 3.5	11.8 ± 3.7**	12.3 ± 3.7**	12.5 ± 4.5**	15.4 ± 4.3	0.0004
可溶性VCAM-1 (ng/ml)	597 ± 242	541 ± 241**	497 ± 219**	516 ± 215**	550 ± 242**	< 0.0001
RCS	4.6 ± 1.6	4.0 ± 1.8*	4.1 ± 2.4	2.7 ± 1.3**	3.5 ± 2.3**	< 0.0001

*P < 0.05, **P < 0.01 (Bonferroni correction による)

†Repeated measures ANOVA による。

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

全身性強皮症に伴う肺高血圧症に対する
クエン酸シルデナフィルの有効性の検討

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 白崎文朗 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
早川郁子 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
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

全身性強皮症には肺高血圧症の合併が約6%に認められる。多くの症例で、種々の治療にかかわらず数年以内に死亡するので、全身性強皮症の予後不良因子の一つと考えられている。勃起不全治療薬クエン酸シルデナフィルは、肺動脈の平滑筋細胞に多く分布しているホスホジエステラーゼ5型を特異的に阻害し cGMP の分解を抑制することにより、大動脈圧に影響を及ぼさずに肺動脈圧のみを低下させる薬剤と考えられている。そこで今回我々は、2例の全身性強皮症女性患者に合併した原発性肺高血圧症に対し、本剤の有効性と安全性に関する検討を行った。その結果、半年後の6分間歩行距離と自覚症状の改善、および収縮期右室圧の低下がみられ、副作用は認めなかった。したがって、クエン酸シルデナフィルは全身性強皮症に伴う肺高血圧症の治療薬として有用であると考えられる。

A. 研究目的

全身性強皮症（systemic sclerosis ; SSc）には、一次性および肺線維症に続発する二次性肺高血圧症（pulmonary hypertension ; PH）の合併が約6%に認められる¹。その頻度は高くないが、多くの症例で、種々の治療にかかわらず、労作時息切れを自覚してから数年以内に死亡するので、全身性強皮症の予後不良因子の一つと考えられている^{1,2}。SScに伴う PH の病因は明確にされていないが、

血管内皮細胞の障害、肺泡低酸素に伴う血管攣縮、エンドセリン1などの血管収縮物質の産生亢進や線維化による血管内腔の狭小化などが関与していると考えられている³。

クエン酸シルデナフィル（シルデナフィル、商品名バイアグラ）はホスホジエステラーゼ5型（phosphodiesterase type 5 ; PDE5）を阻害し cGMP の分解を抑制することにより陰茎血管を拡張するため、勃起不全の治療薬として認可されている（図1）。しかし、

PDE5 は陰茎血管以外に肺血管にも多く分布しているので⁴、シルデナフィル投与が肺血管を拡張し、PH に有効であることが期待されている。実際、シルデナフィル1回投与により肺血管抵抗の低下や動脈血酸素分圧の増加がみられ、大動脈圧には影響を及ぼさないことが報告されている^{5,6}。また、シルデナフィルを PH 患者に5か月間連日投与した最近の報告では、肺動脈圧の低下と6分間歩行距離の増加がみられたが、有意な副作用は認められていない⁷。

そこで今回我々は、2例の SSc 女性患者に合併した原発性 PH に対し、本剤の有効性と安全性に関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象患者

金沢大学医学部附属病院皮膚科通院中の、ACR の診断基準を満たす SSc 患者で、表に示す適格基準を満たし、除外基準を満たさない2例に対し、当院倫理委員会の承認を受け、文書による同意を得て本試験を行った。

症例1は56歳女性。13年前 Raynaud現象で初発し、抗セントリオール抗体が陽性。初診時の modified Rodnan total skin thickness score (mTSS) は2点で、右手指の屈曲制限、爪上皮出血点、指尖潰瘍を認めた(図2)。胸部CTでは肺線維症を認めず、呼吸機能検査では%VCは81.2%と正常、%DLcoは33.4%と低下していた。ベラプロストナトリウム1日180mgとワーファリンカリウムを内服していたが、収縮期右室圧は69mmHgで、NYHA心機能分類はIII、すな

わち軽度の身体活動でも息切れが出現する状態であった。

症例2は59歳女性。10年前 Raynaud現象、手指腫脹で初発し、抗核抗体は陰性であった。初診時のmTSSは5点で、手指にチアノーゼ、爪上皮出血点、指尖陥凹性癬痕を、顔面や胸部には毛細血管拡張を認めた(図3)。胸部CTでは軽度の肺線維症を認め、呼吸機能検査では%VCは118.6%と正常、%DLcoは37.7%と低下していた。ベラプロストナトリウム1日180mg、ワーファリンカリウムとカルシウム拮抗剤を内服していたが、収縮期右室圧は90mmHgで、NYHA心機能分類はIIIであった。

2) 薬剤投与方法

シルデナフィル 25mg を朝食後1回内服し、血圧低下、ほてり、頭痛等の血管拡張に伴う副作用がないか確認した。これらの症状がなければ翌日より1日50mgを朝夕食後2回に分けて内服し、6ヶ月間継続した。3か月後の評価日において、推定肺動脈圧の改善がみられない場合は、1日75mg(毎食後内服)まで増量可能とした。なお、本試験開始時にすでに投与されている薬剤は、血管拡張作用のある薬剤も含めてすべて継続としたが、本試験開始後の薬剤追加は緊急時以外不可とした。

3) 評価方法

投与前、投与3か月後、投与6ヶ月後に6分間歩行距離、心ドップラーエコー検査、呼吸機能検査を行い評価した。また投与前と投与6か月後に心臓カテーテル検査を施行し右室圧、肺動脈圧、心拍出量を比較した。また、

投与1, 2, 4週後および2, 3, 4, 5, 6か月後に採血、検尿、胸部レントゲン、心電図検査および血圧と体重測定を行い、副作用の発現がないかを検討した。

C. 研究結果

図4に示すように、6分間歩行距離は症例1では投与前260mから半年後302m、症例2では200mから410mまで延長した。症例1では症例2に比較し、延長した距離は短い、身体的負担を自覚的に評価する修正Borgスケールは著明に改善した。

半年後の心臓カテーテル検査は症例1でシルデナフィル内服6時間後に、症例2では2時間後に行った(図5)。収縮期右室圧は症例1では69から62と10%低下、症例2では90から67と26%低下し、平均肺動脈圧は症例1では46から39と15%低下、症例2では58から37と35%低下した。心拍出量は症例1では1.5%、症例2では7.5%増加した。心エコーにおける推定収縮期右室圧でもほぼ同様の結果が得られた。

2症例とも、本剤投与後に有害事象の出現はなく、大動脈圧の変化も認めなかった。

D. 考案

シルデナフィルのPHへの応用は、Altzら⁸が新生児PHのNO吸入療法からの離脱に、またPrasadら⁹が成人の原発性PHの治療に用いたのが最初である。その後、SScに伴う原発性PHやSScの肺線維症に伴って生じた続発性PHに対しても試みられ、良好な結果が報告されている^{5, 10, 11}。最近の原発性PH

に対するプラセボを対照とした6週間の2重盲検クロスオーバー試験の結果は、トレッドミルを用いて測定した運動時間、心係数(cardiac index)および自覚症状が有意に改善し、有意差はなかったが収縮期肺動脈圧の低下を認めた¹²。今回我々がシルデナフィルを投与したlimited SScの2例においても、それまでのベラプロストナトリウムやワーファリンカリウムによる治療にPHは抵抗性であったが、本試験開始2週間後には、自覚症状や6分間歩行距離の改善を、半年後の心臓カテーテル検査では平均肺動脈圧の低下と心拍出量の増加を認め、これまでの報告に一致する結果であった。

シルデナフィルを50mg内服した場合、約15分後から肺動脈拡張作用が出現し、45~60分後にはその作用は最大に達し⁵、その半減期は4時間ほどであると考えられている。また、シルデナフィル投与後の肺動脈圧を経時的に観察すると、シルデナフィル25mg投与時に最も肺動脈圧は低下し、50mgや100mgに増量しても、それ以上の肺動脈圧低下はみられなかったと報告されている¹³。したがって、今回の試験では1回25mg、1日2回の内服であったが、シルデナフィルの薬物動態を考えれば、PH増悪時には1回投与量を増加させるのではなく、投与回数を1日3~5回に増やすことが重要であると思われる。実際に、症例1は6か月の試験終了後もシルデナフィルの投与を継続していたが、投与開始9か月目頃より推定収縮期右室圧が上昇したため、シルデナフィルを1日2回内服から1日3回の内服へと増量し、自覚症状

と収縮期右室圧の改善をみている。PH は長期的には進行性であることが多いため、このような増量が必要になる可能性があると思われる。また、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンとの併用が難治性の PH 治療に有効であると最近報告された¹⁴ので、PH 増悪例には今後ボセンタンとの併用も考えられる。

安全性に関しては、頭痛、四肢のしびれ、腹部不快感などが報告されている¹²が、いずれもシルデナフィルを中止するほど重篤なものではなかった。しかし、今後長期間内服時の安全性に関して注意深く検討する必要があると思われる。

E. 結 論

今回の試験の結果、シルデナフィルは SSc に伴う PH に対して、有効で安全な薬剤であることが確認できた。また、本研究班の分担研究員が所属する慶応大学リウマチ内科でも、シルデナフィルを MCTD に伴った原発性 PH に使用し、肺動脈圧の低下と NYHA 心機能分類の改善を認めた経験があるとのコメントを頂いている。今後、シルデナフィルを SSc に伴う PH 治療薬として保険適応を取得するために、他施設共同試験を本研究班で行うべきであると考えられる。

F. 文 献

1.Sacks DG, Okano Y, Steen VD, Curtiss E, Shapiro LS, Medsger TA, Jr. Isolated pulmonary hypertension in systemic sclerosis with diffuse cutaneous

involvement: association with serum anti-U3RNP antibody. *J Rheumatol* 1996;23:639-42.

2.Kawut SM, Taichman DB, Archer-Chicko CL, Palevsky HI, Kimmel SE. Hemodynamics and survival in patients with pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis. *Chest* 2003;123:344-50.

3.Coghlan JG, Mukerjee D. The heart and pulmonary vasculature in scleroderma: clinical features and pathobiology. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:495-9.

4.Rabe KF, Tenor H, Dent G, Schudt C, Nakashima M, Magnussen H.

Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. *Am J Physiol* 1994;266:L536-43.

5.Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F et al. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:895-900.

6.Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002;105:2398-403.

7.Stiebellehner L, Petkov V, Vonbank K et al. Long-term treatment with oral