

**厚生労働科学研究費補助金**

**難治性疾患克服研究事業**

**強皮症における病因解明と根治的治療法の開発**

**平成14年度～平成16年度**

**総合研究報告書**

**主任研究者 竹原 和彦**

**平成17年（2005年）3月**

# 【目 次】

## 班員名簿

### I. 総括研究報告

- 強皮症における病因解明と根治的治療法の開発 ..... 1  
主任研究者 竹原和彦（金沢大学皮膚科）

### II. 分担研究報告

1. 全身性強皮症における血液中 B 細胞ホメオスターシスの異常 ..... 7  
分担研究者 佐藤伸一（金沢大学皮膚科）  
分担研究者 藤本 学  
協力者 長谷川 稔  
主任研究者 竹原和彦
2. 強皮症動物モデルである Tight-skin マウスにおける B リンパ球シグナル伝達異常  
の解析 ..... 16  
分担研究者 藤本 学（国立国際医療センター研究所再生医学）  
分担研究者 佐藤伸一  
協力者 大河内仁志, 浅野典子
3. 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 ..... 24  
分担研究者 佐藤伸一（長崎大学皮膚科）  
協力者 長谷川 稔, Thomas F.Tedder  
主任研究者 竹原和彦
4. 全身性強皮症における B 細胞機能分子多型の検討 ..... 31  
研究協力者 土屋尚之（東京大学人類遺伝学）  
協力者 黒木喜美子, 人見祐基, 徳永勝士  
分担研究者 藤本 学, 佐藤伸一  
主任研究者 竹原和彦
5. 日本人全身性硬化症患者におけるマイクロキメリズムの定量解析と HLA 解析  
との相関 ..... 39  
分担研究者 村田秀行（筑波大学内科）  
協力者 後藤大輔

6. 全身性強皮症におけるサイトカインの経時的解析…………… 45  
 分担研究者 佐藤伸一（長崎大学皮膚科）  
 協力者 松下貴史, 長谷川 稔, 濱口儒人  
 主任研究者 竹原和彦
7. 全身性強皮症における NK 細胞の機能と活性化…………… 52  
 分担研究者 佐藤伸一（長崎大学皮膚科）  
 協力者 堀川真由香, 長谷川 稔, 松下貴史, 西島千博  
 主任研究者 竹原和彦
8. 強皮症における血管内皮前駆細胞異常…………… 58  
 分担研究者 桑名正隆（慶應義塾大学先端医科学研究所）  
 協力者 岡崎有佳
9. 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…………… 63  
 分担研究者 桑名正隆  
 協力者 岡崎良佳, 鎗木淳一
10. 皮膚線維化における CTGF の役割…………… 68  
 分担研究者 佐藤伸一（金沢大学皮膚科）  
 協力者 中條園子, 金原拓郎, 白崎文朗, 川原 繁  
 研究協力者 稲垣 豊  
 主任研究者 竹原和彦
11. 全身性強皮症皮膚線維芽細胞における TGF $\beta$  受容体の発現量についての解析…………… 74  
 分担研究者 尹 浩信（東京大学皮膚科）  
 協力者 久保正英, 玉置邦彦
12. 強皮症皮膚線維芽細胞における Smad7 の発現量とその意義…………… 80  
 分担研究者 尹 浩信（東京大学皮膚科）  
 協力者 浅野善英, 山根謙一, 玉置邦彦
13. 強皮症 (SSc) 線維芽細胞における IL-1 $\alpha$  転写調節因子の解析…………… 88  
 分担研究者 川口鎮司（東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター）  
 協力者 原 まさ子

14. 全身性強皮症では matrix metalloproteinase-1 に対する自己抗体がコラーゲンの分解を抑制する ..... 93  
分担研究者 佐藤伸一 (金沢大学皮膚科)  
協力者 早川郁子, 長谷川 稔  
主任研究者 竹原和彦
15. 全身性強皮症における抗 MMP-3 抗体 ..... 100  
分担研究者 佐藤伸一 (長崎大学皮膚科)  
協力者 西島千博, 松下貴史, 長谷川 稔  
主任研究者 竹原和彦
16. 抗 RNA ポリメラーゼ III (RNAPIII) 抗体 ELISA の有用性の検討 ..... 110  
分担研究者 桑名正隆 (慶應義塾大学先端医科学研究所)  
協力者 田中庸子, 岡野 裕
17. 全身性強皮症における phosphatidylserine-prothrombin 複合体に対する自己抗体の検討 ..... 115  
分担研究者 佐藤伸一 (金沢大学皮膚科)  
協力者 長谷川 稔, 山崎雅英  
主任研究者 竹原和彦
18. 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 ..... 119  
分担研究者 佐藤伸一 (金沢大学皮膚科)  
協力者 築場広一, 長谷川 稔  
主任研究者 竹原和彦
19. 全身性強皮症における肺線維症と血清 KL-6 値の経時的変化に関する研究 ..... 128  
分担研究者 佐藤伸一 (金沢大学皮膚科)  
協力者 築場広一, 濱口儒人, 長谷川 稔  
主任研究者 竹原和彦
20. 気管支肺胞洗浄液細胞所見による強皮症関連間質性肺炎の病態解析 ..... 138  
研究協力者 安井正英 (金沢大学呼吸器内科)  
分担研究者 佐藤伸一  
主任研究者 竹原和彦

21. 全身性強皮症に合併した間質性肺炎に対するシクロフォスファミドパルス療法…… 146  
 分担研究者 佐藤伸一（金沢大学皮膚科）  
 協力者 小村一浩, 築場広一, 長谷川 稔  
 研究協力者 安井正英  
 主任研究者 竹原和彦
22. 強皮症に合併する間質性肺病変に対するシクロホスファミド（CY）静注療法の治療効果の検討…………… 153  
 分担研究者 川口鎮司（東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター）  
 協力者 栃本明子, 高木香恵, 立石睦人, 原まさ子
22. 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…………… 160  
 分担研究者 佐藤伸一（長崎大学皮膚科）  
 協力者 白崎文朗, 早川郁子, 長谷川 稔  
 主任研究者 竹原和彦
24. 汎発性強皮症における免疫グロブリン大量療法について…………… 166  
 分担研究者 尹 浩信（東京大学皮膚科）  
 協力者 山根謙一, 浅野善英, 神人正寿, 玉置邦彦
25. 全身性強皮症における消化管通過障害の核医学的機能評価…………… 170  
 研究協力者 中嶋憲一（金沢大学核医学）  
 協力者 河野匡哉
26. 日本人強皮症における HAQ の経時的変化の解析…………… 176  
 分担研究者 桑名正隆（慶應義塾大学先端医科学）  
 分担研究者 佐藤伸一, 石川 治, 尹 浩信, 近藤啓文, 川口鎮司, 三崎義堅, 後藤大輔  
 協力者 安田 泉, 藤咲 淳  
 主任研究者 竹原和彦
27. 呼吸器合併症を呈した全身性強皮症のリハビリテーションの確立に関する研究  
 ー日常生活動作が改善した2例を通じてー…………… 182  
 研究協力者 麦井直樹（金沢大学作業療法部）  
 分担研究者 佐藤伸一  
 協力者 塩谷真美, 西 悦子, 染矢富士子  
 主任研究者 竹原和彦

28. 全身性強皮症患者の関節可動域制限に対するリハビリテーション…………… 189  
研究協力者 麦井直樹（金沢大学リハビリテーション部）  
分担研究者 佐藤伸一  
協力者 長谷川 稔, 生田宗博, 田村芽衣子, 沢崎詩織  
主任研究者 竹原和彦

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

強皮症に関する調査研究班（強皮症における病因解明と根治的治療法の開発）

班 員 名 簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
主任研究者	竹原 和彦	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学 (皮膚科学)	教 授
分担研究者	宮園 浩平	東京大学大学院医学系研究科分子病理学	教 授
	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学	教 授
	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
	佐々木哲雄	国際医療福祉大学附属熱海病院皮膚科	教 授
	室 慶直	名古屋大学大学院医学系研究科皮膚結合組織病態学	助教授
	尹 浩信	東京大学医学部附属病院皮膚科	講 師
	遠藤 平仁	北里大学医学部内科	講 師
	川口 鎮司	東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター	講 師
	桑名 正隆	慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞組織情報研究部門	専任講師
	藤本 学	東京大学医学部附属病院皮膚科	助 手
	後藤 大輔	筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫学	講 師
研究協力者	稲垣 豊	東海大学医学部地域・環境保健系地域保健学	助教授
	大塚 勤	獨協医科大学皮膚科学	助教授
	土屋 尚之	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室	助教授
	中嶋 憲一	金沢大学医学部附属病院核医学診療科	講 師
	安井 正英	金沢大学医学部附属病院呼吸器内科（第三内科）	講 師
	山崎 雅英	金沢大学医学部附属病院血液内科（第三内科）	助 手
	山本 俊幸	東京医科歯科大学附属病院皮膚科	講 師
	麦井 直樹	金沢大学医学部附属病院リハビリテーション部	作業療法士

# I. 総括研究報告



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書（3年間のまとめ）

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

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
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	宮園浩平	東京大学大学院医学系研究科分子病理学教授
分担研究者	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学教授
分担研究者	佐々木哲雄	国際医療福祉大学附属熱海病院皮膚科教授
分担研究者	室 慶直	名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚結合組織病態学助教授
分担研究者	尹 浩信	東京大学医学部附属病院皮膚科講師
分担研究者	遠藤平仁	北里大学医学部内科講師
分担研究者	川口鎮司	東京女子医科大学附属病院 膠原病リウマチ痛風センター講師
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細胞組織 情報研究部門専任講師
分担研究者	藤本 学	東京大学医学部附属病院皮膚科助手
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臨床免疫学助手

A. 研究目的

強皮症は、その病名の示すごとく「皮膚硬化」を主徴とし、更には肺、消化管、心、腎などの全身諸臓器に線維化をきたす全身疾患であり、その成因は未だ不明の点が多く、根治的治療法の確立はみていない。本研究班においては

- 1) 免疫異常、血管障害、サイトカイン及びコラーゲン代謝異常の3つを関連づける一元的病因仮説の完成。
- 2) 臓器別の重症度分類及び重症度に応じた治療指針案の作成。
- 3) 強皮症疾患モデルマウスの確立とそれを用いた新規治療薬のスク

リーニング。

- 4) 致命的病態である活動性間質性肺炎及び肺高血圧症の既存薬による治療法の確立。
- 5) 日本人における本症の臨床経過の海外データとの違いを明らかにするために、早期重症例の経時的臨床データの多施設共同データバンクを設け、データの今後10年以上にわたる集積の開始。
- 6) 本症の重症度に検出される抗RNAポリメラーゼ抗体測定法の確立と普及。
- 7) 患者啓発のためのリーフレットやインターネットによる情報公開、E-mailによる患者相談、強皮症専

門医ネットワークの整備など患者サービスの充実、を主たる活動とした。

## B. 研究方法

8) 一元的病因仮説の完成を目指して幅広く基礎領域からも研究者を集め、更には新たに見いだされた B 細胞異常に関しては、遺伝子解析の基礎研究も研究協力者として班研究に参加した。

9) 臓器別の重症度分類及び治療指針案については、各臓器ごとにエキスパートを担当者とし、3年間で計5回の検討会を繰り返して最終試案とした。

10) サイトカイン注入による皮膚線維化モデルの確立を目指し、自然発症強皮症モデルマウスである TSK マウスについてもヒトの強皮症との類似性を検討した。

11) 活動性間質性肺炎に対しては、シクロフォスファミドパルス療法の有効性を、肺高血圧症に対しては、クエン酸シルディナフィルの有効性を複数（内科及び皮膚科）の施設で検討した。

12) 発症早期重症例のデータを金沢大学皮膚科内事務局にて年度ごとに集計した。

13) 抗 RNA ポリメラーゼ抗体測定 ELISA キットの確立を目指し

た。

14) 患者啓発のためのリーフレットを作成し、医療機関及び患者個人に無料配布した。更にインターネットのホームページにて情報公開し、e-mail による患者相談を受け付けた。

(倫理面への配慮)

遺伝子研究、患者データ集積、実験的治療などの遂行については各施設の倫理委員会で承認を得た後、患者への十分なインフォームドコンセントの元に行なった。

## C. 研究結果及び考察

1) 病因仮説について得られた主たる研究を列挙する。

- ・本症における B 細胞異常 (CD19 の発現の亢進、ナイーブ B 細胞の活性化) を世界に先駆けて見いだした (佐藤班員)。

- ・ B 細胞機能調節分子である CD 19 のプロモーター領域の -4999G >T 多型が本症感受性に関連することを見いだした (土屋研究協力者)。

- ・ 強皮症における血管内皮前駆細胞の減少と分化障害を見いだした (桑名班員)。

- ・ 本症の線維化における TGF- $\beta$

と CTGF の作用機序について明らかにし、2 段階皮膚線維化仮説を J Rheumatology 誌に総説として発表した (竹原主任研究者)。

・本症由来の培養皮膚細胞線維芽細胞における TGF- $\beta$  レセプターの発現亢進及び Smad シグナルの異常を明らかにした (尹班員)。

・本症の Th1/Th2 バランスは初期には Th2 が優位で、進行期へは Th1 が優位になるが、Th1 が優位にならない例では予後不良であることが示された (竹原主任研究者)。

2) 臓器別の重症度分類及び重症度に応じた治療指針案を作成し、リーフレットとして広く関係者に配付し、インターネットのホームページでも公開した (班全体プロジェクト)。

3) 3 つの強皮症疾患モデルが確立された。

・サイトカイン (TGF- $\beta$  及び CTGF) 注入皮膚硬化モデルマウスの確立 (竹原主任研究者)。

・自然発症 TSK マウスにおける CD19 のシグナル伝達異常 (佐藤班員)。

・ブレオマイシン注入皮膚硬化マウスにおける TGF- $\beta$  シグナルの異常 (山本研究協力員)。

4) 活動性間質性肺炎に対してはシクロフォスファミドパルス療法が、肺高血圧症に対してはクエン酸シル

ディナフィル内服療法が有用であることが、皮膚科、内科の複数の施設より報告された (竹原主任研究者、川口班員、桑名班員)。

5) 重症型の全身性強皮症の長期経過を解析するため、多施設共同 9 施設より初年度 31 例、次年度 29 例、3 年次 33 例の登録があり、詳細なデータの蓄積が開始された (班全体プロジェクト)。

6) 抗 RNA ポリメラーゼ抗体測定キットが完成し、その特異度、感度について十分に検討され、米国では我が国に先駆けて市販された (桑名班員)。

7) 患者啓発のためのリーフレット「強皮症がわかる」が 2004 年 3 月完成し、広く患者に配付されている。また強皮症研究会議との合同で年間約 300 件の e-mail による患者相談に応じ、全国にネットワークされている専門医へ紹介するシステムを整備した (班全体プロジェクト)。

#### D. 評価

##### 1) 達成度について

一元的病因仮説の完成については未だ不十分なものの、B 細胞異常や血管内皮前駆細胞異常など、これまでに全く知られなかった側面も明らかにされた。問題として 3 年以内での達成には更なる時間を要し、限界

があったが、次期研究班において達成しうる段階まで到達した。その他の項目についてもほぼ予定通り目標を達成しえた。特に難治性疾患である活動性間質性肺炎及び肺高血圧症に対しては既存の治療薬により、有効な治療が見いだされた。新規治療薬のスクリーニングについては *in vitro* の段階で留まったものもあったが、抗 CD20 抗体による TSK マウスの線維化の抑制については良好な結果が得られた。

#### 2)研究成果の学術的、国際的、社会的意義について

学術的、国際的意義を裏付けるデータとして 2004 年 Pub Med line で “Systemic Sclerosis” を Keyword として検索すると世界中より 340 件の論文がヒットし、そのうち本研究班で行われたものが 33 編(うち主任研究者によるもの 17 編)であり、我が国の研究班の成果は世界をリードしていると言える。また、桑名班員の特許による抗 RNA ポリメラーゼ抗体判定 ELISA キットが米国で市販されたことも我が国の研究が海外に対しても社会的意義を与えたことを意味している。

更に本研究班では、患者に対する直接的な啓発、相談などをリーフレット作成、インターネットのホームページでの情報公開、年間約 100 件

の患者相談と専門医の紹介など、直接的に社会に向けての活動を重ねてきた。

#### 3)今後の展望について

抗 RNA ポリメラーゼ抗体測定保険収載に向けて、日本人のデータ解析を行なうことが急務である。また、活動性間質性肺炎や肺高血圧症に対する治療についても可能な限り、海外の組織とタイアップし、EBM の質を高めていきたい。その他、根本的治療薬の開発に向けて更なる努力が必要とされる。

#### 4)研究内容の効率性について

稀少疾患であり、進行が比較的緩徐な疾患であることを考慮すると 3 年間ではほぼ予定の効率性が得られたと評価される。

### E. 結論

一元的病因論の完成及び根治的治療法の確立という 2 大テーマは残されたが、3 年間という期間で目的としたプロジェクトはほぼ達成され、それ以外にも班員より多くの新知見が得られたことは評価していただきたい。また、本研究班では患者に対する社会的活動にも十分力を注ぎ、成果を得たと考えている。

### F. 研究発表

#### 1) 国内

口頭発表 302 件  
 原著論文 63 件  
 その他（総説，著書など） 183 件

主な国内論文発表

- 1.小村一浩、築場広一、長谷川稔、佐藤伸一、竹原和彦、安井正英、全身性強皮症に合併した間質性肺炎に対するシクロホスファミドパルス療法. 日皮会誌：2004. 印刷中
- 2.長谷川 稔，佐藤伸一，竹原和彦，強皮症の発症とサイトカイン. 臨床免疫：37(6).633-638. 2002

主な国内学会発表

- 1.小村一浩，築場広一，長谷川 稔，佐藤伸一，竹原和彦，安井正英. 全身性強皮症に合併した間質性肺炎に対するシクロホスファミドパルス療法. 第 103 回日本皮膚科学会総会. 2004 年 4 月
2. 早川郁子，平野貴士，大石直人，越後岳士，白崎文朗，長谷川 稔，佐藤伸一，山崎雅英，竹原和彦，全身性強皮症に伴う原発性肺高血圧症に対してクエン酸シルデナフィル(バイアグラ錠<sup>®</sup>)を投与した 2 例. 第 55 回日本皮膚科学会中部支部学術大会. 2004 年 9 月

2) 海外

口頭発表 28 件  
 原著論文 167 件  
 その他（総説，著書など） 19 件

主な海外論文発表

1. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. Lancet. 14; 364(9434). 603-610.2004.
2. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis:expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. Arthritis Rheum. 50(6). 1919-1927. 2004.
3. Takehara K. Treatment pf early diffuse cutaneous systemic sclerosis patients in Japan by low-dose corticosteroids for skin involvement. Clin Exp Rheumatol. 3(Sup). S87-S89. 2004.
4. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation

of TGF- $\beta$  signaling in scleroderma fibroblasts.

J Clin Invest. 113. 253-264. 2003

5. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, Nabaoka T, Takehara K, Tedder TF, Sato S.

CD 19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse.

J Clin Invest. 109(11). 1453-1462. 2002.

#### 主な海外発表

1. Nishijima C, Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis.

American College of Rheumatology / Association of Rheumatology Health Professionals (ACR 68th /ARHP 39th) Annual Scientific Meeting. Oct. 2004.

2. Sato S.

Scleroderma:altered B

lymphocyte function and systemic autoimmunity.

International Investigative Dermatology 2003. April 2003.

3. Sato S.

Scleroderma: Diagnosis and Treatment.

The 13th Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology. Oct. 2003.

4. Sato S.

B lymphocyte abnormalities in scleroderma.

20th World Congress of Dermatology. July. 2002.

5. Takehara K.

Two step fibrosis hypothesis by TGF- $\beta$  and CTGF in scleroderma.

20th World Congress of Dermatology. July. 2002.

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

- |                        |    |
|------------------------|----|
| 1. 特許取得                | 1件 |
| (RNAポリメラーゼ ELISA・桑名班員) |    |
| 2. 実用新案登録              | 0件 |
| 3. その他                 | 0件 |

## II. 分担研究報告

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液中B細胞ホメオスターシスの異常

分担研究者 佐藤伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授  
分担研究者 藤本 学 国立国際医療センター研究所  
細胞組織再生医学研究部室長  
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（SSc）では血液中ナイーブB細胞が増加し、一方、メモリーB細胞や形質細胞前駆細胞は減少していた。SSc 由来メモリーB細胞では CD19、CD80、CD86 の発現が増強し、慢性的な活性化が示唆された。さらに、SSc 由来メモリーB細胞では CD95 発現増強とアポトーシスの亢進が認められたが、免疫グロブリンの産生は増強していた。このように、SSc では血液中B細胞サブセットの数と機能に内在性の異常が認められた。

A. 研究目的

T細胞では CD45RO がメモリーT細胞のマーカーとしてよく知られているが、最近、CD27 がB細胞におけるメモリー細胞の表面マーカーとして報告された<sup>1-3)</sup>。CD27 はメモリーB細胞の他、大部分のT細胞にも発現する tumor necrosis factor 受容体ファミリーに属する分子である<sup>2)</sup>。CD27 はT細胞上の CD70 と結合すると、B細胞内ヘシグナルを伝達し、形質細胞への分化を誘導する。末梢血液を CD19 と CD27 で二重染色すると、CD27 陰性のナイーブB細胞、CD27 を中程度発現（CD27<sup>med</sup>）するメモリーB細胞、および CD27 を高発現（CD27<sup>hi</sup>）するプラズマブラスト即ち形質細胞前駆細胞が区別できる。

この CD27 を用いて、様々な膠原病で末梢血液中のB細胞サブセットの異常が解析されつつある。全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus; SLE）では CD27<sup>hi</sup> CD38<sup>+</sup>のプラズマブラストの増加が認められ、その増加は疾患活動性と相関することが報告されている<sup>4-6)</sup>。また、シェーグレン症候群ではメモリーB細胞の減少が報告されている<sup>7,8)</sup>。このように、各種膠原病ではそれぞれ固有のB細胞ホメオスターシスの異常がみいだされてきた。

全身性強皮症（systemic sclerosis; SSc）は高 $\gamma$ -グロブリン血症や自己抗体産生を特徴とするが、そのB細胞の表現型や機能の異常に関してはほとんど解析されていない。そこで、今回末梢血液中のB細胞サブセットや



機能の異常を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象患者は SSc 41 例（女性 39 例、男性 2 例）であり、年齢は  $47 \pm 13$  歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (ISSc) が 19 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 22 例であった。15 例の dSSc と 2 例の ISSc 患者には、少量のステロイド内服（平均 8.9 mg/日）が行われていた。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 12 例、抗セントロメア抗体陽性例が 18 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 3 例、抗 U3RNP 抗体陽性例が 3 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 3 例、Th/To 抗体が 1 例、残り 1 例では抗核抗体は陰性であった。18 例の SLE 患者および 18 例の健常人をコントロールとして用いた。

### 2) フローサイトメトリー

PE 標識抗 CD19 抗体 (B4, Beckman Coulter Inc., Miami, FL) と FITC 標識抗 CD27 抗体 (M-T271, BD PharMingen, San Diego, CA) を用いて 2 重染色を行った。活性化マーカーの解析には、peridinin chlorophyll protein 標識抗 CD19 抗体 (Leu-12, BD PharMingen)、FITC 標識抗 CD27 抗体 (M-T271, BD PharMingen)、PE 標識抗 CD80 抗体 (MAB104, Beckman Coulter, Inc.)、抗 CD86 抗体 (Ansell, Bayport, MN) あるいは抗 CD95 抗体 (UB2, Beckman Coulter, Inc.) を用いた 3 重染色を行った。

ヘパリン存在下で全血を採取し、4℃にて上記抗体と 20 分間反応させた。赤血球は Coulter Whole Blood Immuno-Lyse キット (Beckman Coulter, Inc.) にて溶解した。染色した細胞は FACScan flow cytometer (BD PharMingen) にて解析した。CD95 発現の解析には 15 例の SSc 患者 (ISSc 11 例、dSSc 4 例) および 14 例の健常人、CD80、CD86 発現解析には 11 例の SSc 患者 (ISSc 8 例、dSSc 3 例) および 9 例の健常人を用いた。これらの患者にはステロイド、免疫抑制剤、D-ペニシラミンの投与はなかった。

### 3) B細胞アポトーシスの検出

早期のアポトーシスはアネキシン V による染色で検出した (BD PharMingen)。末梢血単核球を分離し、10% 仔牛血清を含んだ RPMI 1640 で 37℃、5 あるいは 24 時間培養した。回収した細胞は PE 標識アネキシン V、peridinin chlorophyll protein 標識抗 CD19 抗体 (Leu-12, BD PharMingen)、FITC 標識抗 CD27 抗体 (M-T271, BD PharMingen) にて 3 重染色を行った。対象は無治療の 6 例の SSc 患者 (ISSc 3 例、dSSc 3 例) および 6 例の健常人とした。

### 4) IgD<sup>-</sup>メモリーB細胞の分離

IgD<sup>-</sup>B細胞は B cell negative isolation キット (Dynal Inc., Lake Success, NY) および抗 IgD 抗体 (IA6-2, BD PharMingen) にて単離した。IgD<sup>-</sup>B細胞は CD27<sup>+</sup>メモリーB細胞の約 70% を占め、IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>、IgG<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>、および IgA<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>メモリーB細胞を含むが、IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>メモリーB細胞は含まない<sup>1)</sup>。

#### 5) IgD<sup>-</sup>メモリーB細胞によるIgG産生

精製したIgD<sup>-</sup>メモリーB細胞を0%仔牛血清を含んだRPMI 1640で37℃、8日間培養した。IgD<sup>-</sup>メモリーB細胞は0.01% *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC)とIL-2 (50 U/ml)あるいは抗CD40抗体(1 µg/ml; mAb89, Beckman Coulter, Inc.)とIL-10 (50 ng/ml)で刺激した。培養上清中のIgG濃度はELISAにて測定した。対象は無治療の6例のSSc患者 (ISSc 3例、dSSc 3例) および6例の健常人とした。

### C. 研究結果

#### 1) SScにおけるB細胞頻度と絶対数 (図1)

ステロイド内服によるB細胞ホメオスタシスに対する影響を評価するために、SSc患者は3群に分類された。すなわち、7例の無治療dSSc患者、17例の無治療ISSc患者、17例の少量ステロイド内服SSc患者 (dSSc 15例、ISSc 2例) に分類した。無治療のdSSc、ISSc患者のB細胞頻度および絶対数は健常人に比べ有意に増加していた。dSScとISScの間に差はなかった。ステロイド内服は無治療患者と比較して、B細胞頻度および絶対数を有意に減少させた。SLE患者ではB細胞の頻度は正常であったが、リンパ球減少によってB細胞数も有意に減少していた。このように、SScではB細胞数が軽度増加していた。

#### 2) SScにおける各B細胞サブセットの頻度と絶対数 (図2、3)

無治療のdSSc、ISSc患者のCD27<sup>hi</sup>ナイーブB細胞の頻度および絶対数は、健常人より有意に増加していた。ステロイド内服は無治

療患者と比較して、ナイーブB細胞頻度には影響を与えなかったが、絶対数を有意に減少させた。SLE患者ではナイーブB細胞の頻度は正常であったが、B細胞数減少によってナイーブB細胞数は有意に減少していた。

ナイーブB細胞とは対照的に、無治療のdSSc、ISSc患者のCD27<sup>med</sup>メモリーB細胞の頻度および絶対数は、健常人より有意に減少していた。ステロイド内服によっても、無治療患者と比較して、メモリーB細胞頻度は減少したままであったが、絶対数はさらに減少した。SLE患者ではメモリーB細胞の頻度は正常であったが、メモリーB細胞数は有意に減少していた。

メモリーB細胞と同様に、無治療のdSSc、ISSc患者のCD27<sup>hi</sup>プラズマプラストの頻度および絶対数は、健常人より有意に減少していた。ステロイド内服によって、無治療患者と比較して、プラズマプラスト頻度は有意に増加したが、その絶対数は減少したままであった。SLE患者ではプラズマプラストの頻度は健常人と比較して有意に増加していたが、プラズマプラスト数は減少したままであった。無治療のISSc患者と無治療のdSSc患者の間には、各B細胞サブセットの頻度、絶対数について有意な差は認められなかった。このように、SScではナイーブB細胞の頻度が増加しており、一方メモリーB細胞やプラズマプラストの頻度は減少していた。

#### 3) B細胞サブセット上のCD19発現量の解析 (図2、4)

CD19はB細胞受容体からのシグナルを増強するシグナル伝達分子である<sup>9)</sup>。以前

に SSc 由来 B 細胞上の CD19 発現量は増加しており、同程度に CD19 の発現量を増加させた CD19 トランスジェニックマウスでは、様々な自己抗体の産生がみられることが報告されている<sup>10)</sup>。さらに、SSc のモデルマウスでも CD19 の、自己免疫と皮膚硬化への関与が示唆されている<sup>11)</sup>。そこで、各 B 細胞サブセットにおける CD19 発現量を解析した。

治療の有無に拘わらず、dSSc、ISSc 患者のナイーブ B 細胞およびメモリー B 細胞上の CD19 発現量は、健常人より有意に増加していた。対照的に、SLE 患者ではナイーブ B 細胞およびメモリー B 細胞上の CD19 発現量は有意に低下していた。プラズマブラスト上の CD19 発現量は、ナイーブ B 細胞およびメモリー B 細胞と比較して減少していたが、その発現量は無治療の dSSc 患者、無治療の ISSc 患者、ステロイド治療を受けている SSc 患者、SLE 患者の間で有意な差はなかった。さらに、各群において、メモリー B 細胞における CD19 発現量は、ナイーブ B 細胞と比較して、10~15%増加していた。このように、SSc ではメモリー B 細胞でも CD19 発現量が亢進していた。

#### 4) メモリー B 細胞上の活性化マーカーの発現量の解析 (図 5)

SSc 由来メモリー B 細胞が in vivo で活性化されているかどうかを、CD80、CD86、CD95 などの活性化マーカーの発現量を検討することによって解析した。無治療の SSc 患者では、CD27<sup>+</sup> B 細胞 (CD27<sup>med</sup> メモリー B 細胞の約 95%を占める)における、CD80、

CD86、CD95 陽性細胞の頻度は、健常人と比較して有意に増加していた。対照的に CD23、CD62L、CD69、HLA-DR の発現量は正常であった。従って、SSc 由来メモリー B 細胞は in vivo で活性化していると考えられた。

#### 5) メモリー B 細胞のアポトーシス (図 6)

CD95 発現量は B 細胞の活性化とともに増加し、T 細胞上の FasL と結合することによって、B 細胞に CD95 を介するアポトーシス (activation-induced cell death) が誘導され、これは過剰な B 細胞活性化を抑制するために重要なフィードバック機構であることが知られている<sup>12)</sup>。SSc 由来メモリー B 細胞上の CD95 発現量が増加していたことから、SSc 由来メモリー B 細胞ではアポトーシスが亢進しており、その結果、血液中のメモリー B 細胞が減少した可能性が考えられた。そこで、無刺激下で SSc 由来メモリー B 細胞のアポトーシスが亢進しているかどうかを検討した。5 時間後のアポトーシスについては、SSc と健常人の間で差はなかったが、24 時間後では SSc 由来メモリー B 細胞でアポトーシスの頻度が有意に増加していた。従って、SSc 由来メモリー B 細胞ではアポトーシスが亢進していることが明らかとなった。

#### 6) メモリー B 細胞による IgG 産生 (図 7)

SSc では高  $\gamma$ -グロブリン血症はしばしば認められる免疫学的異常である<sup>13)</sup>。そこで、SSc ではメモリー B 細胞は減少しているものの、その IgG 産生能は亢進しているかどうかを解析した。SAC と IL-2、抗 CD40 抗体と IL-10 のいずれで刺激した場合でも

SSc 由来メモリーB細胞は健常人と比較してIgG 産生は増強していた。従って、SSc 由来メモリーB細胞はその数は減少していたものの、IgG 産生は亢進しているため、SSc では高 $\gamma$ -グロブリン血症を来すものと考えられた。

#### D. 考 案

以上の結果より SSc におけるB細胞サブセットおよびその機能異常を以下にまとめた。SSc ではメモリーB細胞は CD19 や活性化マーカーである CD80、CD86 の発現が増加し、慢性的に in vivo で活性化していた。さらに、メモリーB細胞による IgG 産生も亢進していた。このため、SSc ではメモリーB細胞やプラズマプラストが減少しているにも拘わらず、高 $\gamma$ -グロブリン血症が生じると考えられた。通常、B細胞が活性化すると、異常な活性化を抑制するため、CD95 の発現が増強しアポトーシスが誘導されることが知られている<sup>12)</sup>。同様に、SSc 由来B細胞でも CD95 の発現が増加し、その結果アポトーシスが強く誘導されていた。SSc で血液中のメモリーB細胞が減少していたのは、このアポトーシスが亢進しているためと考えられた。また、SSc ではメモリーB細胞とプラズマプラストが減少しているため、骨髄よりナイーブB細胞の供給が増加し、その結果ナイーブB細胞の増加が生じたものと考えられた。このように、SSc 由来B細胞ではそのホメオスタシスや機能に異常が認められることが明らかとなり、これは SSc においてB細胞が治療のターゲットとなりうる可能性を示唆し

ている。

#### E. 結 論

SSc には CD19 発現亢進に基づくと考えられる内在性のB細胞サブセットや機能の異常が存在しており、その病態形成にB細胞の関与が示唆された。

#### F. 文 献

1. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers. 1998. Human immunoglobulin (Ig)M<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* 188:1679.
2. Agematsu, K., S. Hokibara, H. Nagumo, and A. Komiyama. 2000. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol. Today* 21:204.
3. Tangye, S. G., Y. J. Liu, G. Aversa, J. H. Phillips, and J. E. de Vries. 1998. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* 188:1691.
4. Odendahl, M., A. Jacobi, A. Hansen, E. Feist, F. Hiepe, G. R. Burmester, P. E. Lipsky, A. Radbruch, and T. Dorner. 2000. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic