

(rheumatoid arthritis, RA)を主要な対象として、候補遺伝子の多型スクリーニングと関連解析により、疾患感受性遺伝子の検出を試み、CD19をはじめとする多数のB細胞機能分子につき、新規多型や疾患との関連を報告してきた(4,5)。

SScの発症に遺伝素因が存在することが、発症率の集団差(6)、家系内集積性(7)などの情報から強く示唆されている。以上の背景から、われわれは昨年度の当研究班において、CD19多型とSScとの関連を検討し、プロモーター領域の単一塩基多型-499G>Tと強皮症との関連を報告した。本年度は、SScの臨床病型との関連、CD19発現強度との関連を検討した。

また、B細胞の抑制シグナル伝達分子であるCD22、CD72多型とSScの関連についても検討した。

B. 研究方法

本研究への試料提供の同意が得られた金沢大学附属病院皮膚科受診中のSSc患者および健常対照者について、CD19遺伝子プロモーター領域のSNP-499G>Tの遺伝子型を決定し、臨床病型との関連を χ^2 検定により検討した。また、40例のSSc患者(G/G遺伝子型15例、G/T遺伝子型23例、T/T遺伝子型2例)の末梢血単核球を、phycoerythrin標識抗CD19抗体とFITC標識抗CD27抗体により二重染色し、フロー・サイトメトリーにより、ナイーブ(CD19⁺CD27⁻)およびメモリー(CD19⁺CD27^{med})B細胞のCD19発現強度を測定し、遺伝子型との関連をStudent's t-testを用いて検討した。

また、われわれが過去に報告したCD22多型(8)のうち、マイナーアレル頻度が3%以上である3個所の多型部位の遺伝子型を決定し、SScとの関連を検討

した。さらに、CD72多型のスクリーニングを施行し、SScとの関連を検討した。

本研究は、金沢大学及び東京大学の研究倫理審査委員会に承認を得た研究計画に基づき、インフォームド・コンセントを得て施行した。

C. 研究結果

CD19-499Tの関連は、lcSSc群、抗セントロメア抗体陽性群に顕著に認められ、統計学的有意差に到達した。dcSSc群、抗トポイソメラーゼI抗体陽性群においても-499Tアレル陽性率の増加傾向は認められたが、統計学的有意差には到達しなかった(表1)。

末梢血B細胞表面におけるCD19発現強度と遺伝子型との関連を検討したところ、-499Tアレル陽性患者では、陰性患者と比較して、ナイーブB細胞、メモリーB細胞いずれにおいても、約19%のCD19発現強度の増強が認められた。患者40例中17例は低用量のステロイド(プレドニン 2-15mg/day)を服用していたが、ステロイド使用量とCD19発現強度に有意な相関は認められなかった(図1)。

CD22には、マイナーアレル頻度3%以上のSNPが3個所存在し、これらについて関連研究を施行したところ、exon 13に位置する同義置換(c.2304C>A)のA/A遺伝子型がSSc群のみに6例(4.8%)に認められた(P=0.025)。興味深いことに、これら6例のすべてがlcSScであった(lcSSc vs 対照群 P=0.007)(表2)。

CD72には10個所の変異が検出され、うち、4個所が多型に相当する頻度のものであった。これら4個所は、日本人集団では、2種の主要ハプロタイプを構成して存在していた。これらのうち、第8イントロンの13塩基の反復配列数(1回あるいは2回)による多型をタグ多型として解析したところ、強皮症群でヘテロ接合体が多い結果が観察された(表3)。

D. 考案

昨年度の研究班において報告した CD19 -499T アリルとの関連は、臨床病型別の検討により、抗セントロメア抗体陽性の、lcSSc においてより顕著に認められることが明らかになった。また、-499T アリル陽性者において、ナイーブ、メモリーいずれのB細胞においても CD19 発現強度の増強が認められた。このことから、過去に報告された SSc における CD19 発現増強の一つの要因は、CD19 遺伝子自体の多型であることが強く示唆された。

また、抑制性シグナル伝達分子である CD22 多型が、CD19 同様、lcSSc に関連する可能性が示唆された。本多型はアミノ酸置換を伴わない多型であり、また、CD22 のアミノ酸置換を伴う、頻度の高い多型には関連が認められなかったため、今後、この多型を含むハプロタイプが CD22 発現量に影響する可能性を検討する必要がある。また、CD19 同様、この多型が lcSSc と関連する可能性が示されたことは、lcSSc の病因・病態にB細胞が深く寄与する可能性を示唆するものと考えられる。この点についても、今後、一層の検討が必要と思われる。

一方、CD72 多型については、新たに見出されたスプライシング・アイソフォームとの関連と、SLE 疾患感受性における *FCGR2B* 多型の関連の修飾因子であることが見出された(9)。強皮症群においては、ヘテロ接合体が多く、遺伝子型頻度の解析において有意差が検出されたが、いずれのホモ接合体ともに対照群より低頻度であり、検体数が少ないためのバイアスである可能性が高いと考えられた。

E. 結論

CD19 プロモーター領域の -499G>T 多型が

CD19 発現強度の増強を介して、特に抗セントロメア抗体陽性の lcSSc 感受性に関連することが示唆された。また、CD22 と lcSSc の関連の可能性も示唆された。

F. 文献

1. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000; 165: 6635-6643.
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* 2004;50:1918-1927.
3. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, Nagaoka T, Takehara K, Tedder TF, Sato S. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002, 109: 1453-1462.
4. Tsuchiya N, Ohashi J, Tokunaga K. Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders. *Immunol Rev* 2002, 190: 169-181.
5. Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hagiwara K, Kano H, Takazoe M, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K: Polymorphisms of human *CD19* gene: Possible association with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun* 2002, 3 Suppl 1:S21-30.
6. Silman AJ. Scleroderma. In *Epidemiology of the*

Rheumatic Diseases (second edition), Edited by Silman AJ and Hochberg MC. Oxford University Press, Oxford, 2001: 141-162.

7. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001; 44, 1359-1362.
8. Hatta Y, Tsuchiya N, Matsushita M, Shiota M, Hagiwara K, Tokunaga K: Identification of the gene variations in human *CD22*. *Immunogenetics* 1999, 49: 280-286.
9. Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Siriboonrit U, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K. *CD72* polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with *FCGR2B*. *Hum Mol Genet* 2004, 13: 2907-2917.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K. Association of Fcy receptor IIA, but not of IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A family-based association study in Caucasians. *Arthritis Rheum* 2004, 50:671-673.
2. Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno NH, Kobata T, Takahashi K, Tokunaga K. Crucial role of inhibitor of DNA

binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *J Immunol* 2004, 173:5801-5809.

3. Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Siriboonrit U, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K. *CD72* polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with *FCGR2B*. *Hum Mol Genet* 2004, 13: 2907-2917.
4. Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S. Association of functional *CD19* polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 4002-4007.

2. 学会発表

1. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、深沢徹、松多邦雄、Betty P. Tsao, 橋本博史、徳永勝士: ヒト *CD72* 遺伝子の多型解析と、全身性エリテマトーデスおよび関節リウマチとの関連の検討。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p175. 2004年4月15日~17日、岡山。
2. 黒木喜美子、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、十字猛夫、橋本博史、徳永勝士: 白血球免疫グロブリン様受容体 *LILRA1(LIR6)* 遺伝子多型と日本人 *SLE* との関連。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p175. 2004年4月15日~17日、岡山。
3. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、徳永勝士: *APRIL* 遺伝子多型と関節リウマチ、

全身性エリテマトーデスとの関連の検討。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p181. 2004年4月15日～17日、岡山。

4. 申栄吉、櫻井大祐、土屋尚之、川崎綾、小端哲二、徳永勝士:ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞における BlyS(BAFF)発現。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p284. 2004年4月15日～17日、岡山。

5. 櫻井大祐、土屋尚之、山口晃弘、小端哲二、徳永勝士:VEGF 誘導性血管内皮細胞活性化および血管新生誘導における ID 遺伝子の役割。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p299. 2004年4月15日～17日、岡山。

6. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、京極千恵子、大橋順、鈴木毅、深沢徹、Bejrachandra S, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, 橋本博史、本田善一郎、徳永勝士:SLE感受性におけるヒト CD72 遺伝子多型およびヒト FcγR2B 遺伝子多型の遺伝子間相互作用。日本人類遺伝学会第49回大会抄録集 p107(2004年10月12日～15日)。

7. 土屋尚之、黒木喜美子、村上善則、藤本学、Tedder TF, 徳永勝士、竹原和彦、佐藤伸一:CD19の機能的多型と全身性強皮症との関連。日本人類遺伝学会第49回大会抄録集 p148(2004年10月12日～15日)。

8. Tsuchiya N, Kuroki K, Murakami Y, Fujimoto M, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S: Association of functional *CD19* promoter polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S125, 2004.

9. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Matsuta K, Murakami Y, Hashimoto H, Tokunaga K. APRIL

(TNFSF13) polymorphisms: in systemic lupus erythematosus: Independent confirmation of association with susceptibility and new association with clinical characteristics. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S120, 2004. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S203, 2004.

10. Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K: Epistatic interaction between *CD72* and *FCGR2B* polymorphisms in conferring susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S120, 2004.

11. Kusaoi M, Fukazawa T, Hirashima M, Morita Y, Morita T, Tsuchiya N, Tokunaga K, Inoko H, Hashimoto H: Genomic screening with high density microsatellite markers for systemic lupus erythematosus on chromosome 1. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S121, 2004.

12. 申栄吉、土屋尚之、櫻井大祐、長谷英徳、津野寛和、高橋孝喜、小端哲二、徳永勝士. 血管内皮細胞および血管平滑筋細胞における BAFF(BLyS)発現。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p162), 2004.

13. 黒木喜美子、土屋尚之、白石充典、ラズバラリンド、山下由美、小池隆夫、神田大輔、徳永勝士、前仲勝実. 関節リウマチ(RA)関連 Leukocyte Immunoglobulin-like receptor (LIR) 1 ハプロタイプ の構造・発現解析。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p162); 2004.

14. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士. APRIL(TNFSF13)遺伝子多型とSLE発症および

病態との関連の解析。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p279), 2004.

15. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、鈴木毅、深沢徹、Bejrachandra S, Chandadnayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, 橋本博史、本田善一郎、徳永勝士. SLE 感受性におけるヒト CD72 遺伝子多型およびヒト FCGR2B 遺伝子多型の遺伝子間相互作用。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p279), 2004

16. 土屋尚之、黒木喜美子、藤本学、Tedder TF, 徳永勝士、佐藤伸一. ヒト CD19 多型と強皮症との関連。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p284), 2004.

17. 草生真規雄、深沢徹、平島美賀、守田優子、頭

山尚子、土屋尚之、徳永勝士、猪子英俊、橋本博史. 高密度のマイクロサテライトマーカーを用いた1番染色体における全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子の解析。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p256).

18. 黒木喜美子、白石充典、ラズバラリンド、土屋尚之、徳永勝士、神田大輔、前仲勝実. 関節リウマチ(RA)関連 Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor (LIR) 1 ハプロタイプの構造・発現解析。第27回日本分子生物学会(抄録集 p995, 3PB-407), 2004.

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし。

表1 CD19-499T アリルとの関連は、抗セントロメア抗体陽性、限局性皮膚硬化型強皮症群に、より顕著に認められる。

	n	-499T 陽性率 n (%)	オッズ比 (95%信頼区間)	P
強皮症群全体	134	71 (53.0)	2.18 (1.31-3.86)	0.003
限局性皮膚硬化型	82	48 (58.5)	2.82 (1.54-5.17)	0.0008
広汎性皮膚硬化型	52	23 (44.2)	1.59 (0.79-3.17)	NS
抗セントロメア抗体陽性	61	34 (55.7)	2.51 (1.31-4.85)	0.006
抗トポソメラーゼ I 抗体陽性	37	17 (45.9)	1.70 (0.79-3.68)	NS
健常対照群	96	32 (33.3)	-	-

各群における-499T アリル陽性率を健常対照群と比較した。

表2 強皮症における CD22 多型

SNP	強皮症群全体		限局性皮膚硬化型		広汎性皮膚硬化型		健常対照群	
IVS11-14C>T (intron 11)								
T/T	9	(7.1)	3	(3.8)	6	(12.8)	8	(8.8)
C/T	56	(44.4)	36	(45.6)	20	(42.6)	40	(44.0)
C/C	61	(48.5)	40	(50.6)	21	(44.6)	43	(47.2)
c.2234G>A(G745D) (exon 13)								
A/A	2	(1.6)	1	(1.3)	1	(2.1)	0	(0)
A/G	29	(23.0)	20	(25.3)	9	(19.1)	31	(33.3)
G/G	95	(75.4)	58	(73.4)	37	(78.8)	62	(66.7)
c.2304C>A(P768P) (exon 13)*								
A/A	6	(4.8)	6	(7.6)	0	(0)	0	(0)
A/C	25	(19.8)	15	(19.0)	10	(21.3)	18	(19.4)
C/C	95	(75.4)	58	(73.4)	37	(78.7)	75	(80.6)

()内に%を示す。

*c.2304 AA 対 (AC + CC)の比較において、強皮症群全体と健常対照群間に P=0.025, 限局性皮膚硬化型強皮症群と健常対照群間に P=0.007 の有意差が検出された。

表3 強皮症における CD72 第8イントロン多型の検討

アリル	強皮症群全体		限局性皮膚硬化型		広汎性皮膚硬化型		健常対照群	
IVS8VNTR								
*1/*1	28	(21.4)	21	(26.6)	7	(13.5)	32	(33.0)
*1/*2	82	(62.6)	47	(59.5)	35	(67.3)	40	(41.2)
*2/*2	21	(16.0)	11	(13.9)	10	(19.2)	25	(25.8)

第8イントロンに存在する13塩基 (AGGGACTCAGAGC) の反復回数が1回であるアリル(*1)と2回であるアリル(*2)を、CD72 全長を含むハプロタイプのタグとしてタイピングした。強皮症群におけるヘテロ接合体の増加が認められたが、いずれのホモ接合体も健常者群より低頻度であり、検体数が少ないためのバイアスである可能性が高いと考えられた。

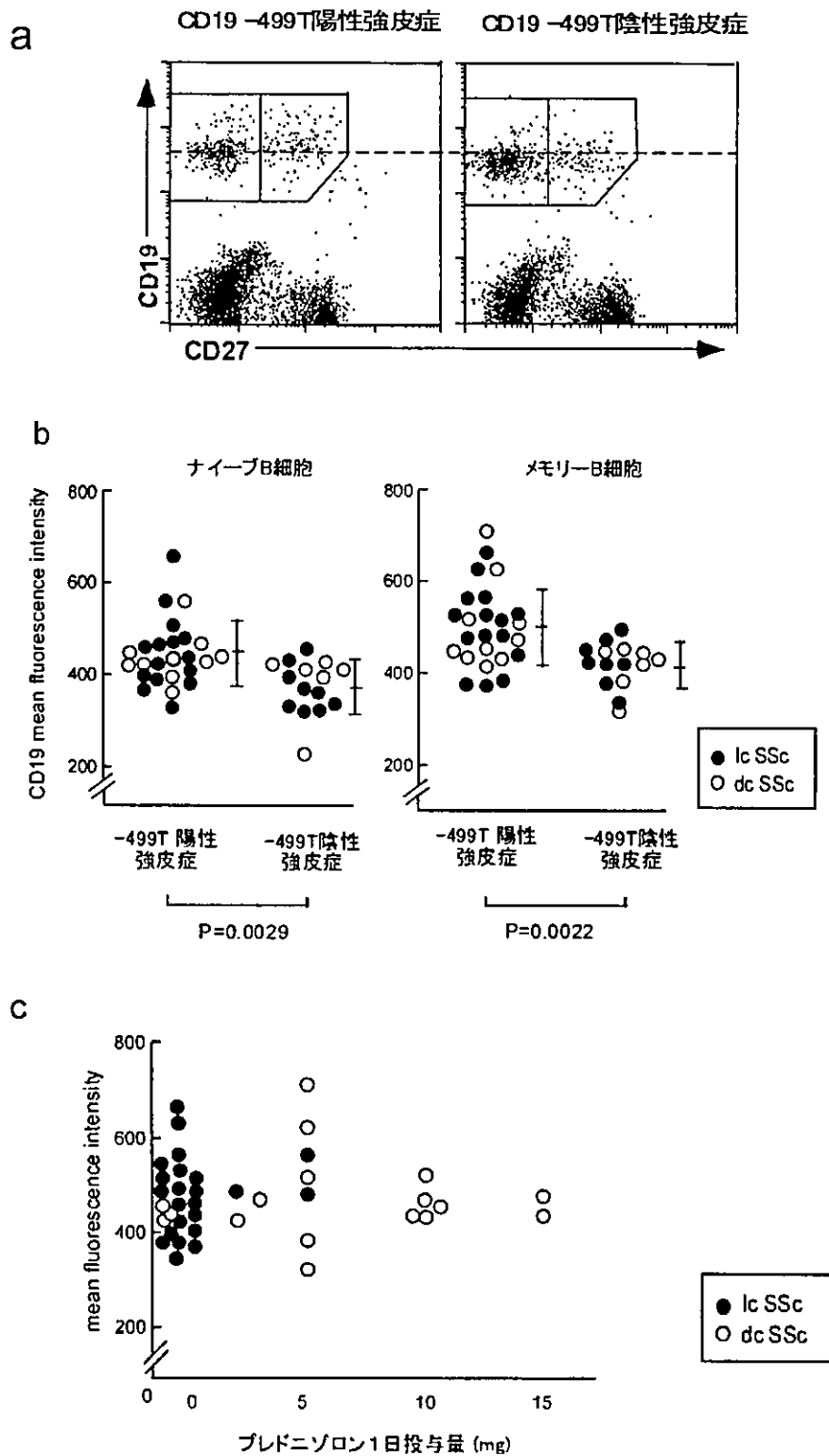


図1 CD19-499G>T遺伝子型と強皮症患者末梢血B細胞表面のCD19発現強度との関連

(a) 典型的な2症例のフローサイトメトリプロファイル。CD19⁺CD27⁺分画がナイーブ、CD19⁺CD27^{med}がメモリーB細胞に相当する。(b) -499T陽性強皮症患者25例、-499陰性強皮症患者15例における末梢血B細胞CD19発現強度。ナイーブB細胞、メモリーB細胞のいずれにおいても、-499T陽性群においてCD19発現強度が有意に増強していた。(c) B細胞におけるCD19発現強度とステロイド投与量との間に有意な相関は認められなかった($r=0.22$, $P=0.90$)。lcSSc: 限局性皮膚硬化型強皮症、dcSSc: 広汎性皮膚硬化型強皮症。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

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 との相関

分担研究者 村田秀行 筑波大学臨床医学系内科膠原病リウマチアレルギー講師
協力者 後藤大輔 筑波大学臨床医学系内科膠原病リウマチアレルギー助手

研究要旨

全身性硬化症(systemic sclerosis: SSc)の発症に、母体中に存続している胎児細胞による GVHD 様反応、すなわち、胎児性マイクロキメリズムの関与が考えられ、またその存続に母児の HLA が関与している可能性が報告されている。今回、Y 染色体特異的配列 DYZ1 の定量 PCR 法を用いた胎児性マイクロキメリズムの定量解析を行い、男児出産歴を有する日本人健常人女性に比べ、男児出産歴を有する日本人 SSc 患者では、男性 DNA が量的に多いことが判明した。また、HLA に関しては、HLADRB1 については、胎児性マイクロキメリズムの存続と HLA との相関はみられなかった。以上より、胎児細胞の数が、すなわち胎児性マイクロキメリズムの量が、日本人 SSc 患者の発症に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性硬化症 (systemic sclerosis: SSc) は、皮膚の腫脹・硬化を来し、臓器病変も起こし得る原因不明の自己免疫疾患である。この疾患が出産年齢以後の女性に多いこと、慢性の移植片対宿主拒絶病 (graft versus host disease: GVHD) と臨床的および病理組織学的に類似性があること、胎児幹細胞が出産後何年間も母体循環中に存在する知見より、近年、SSc の発症機構について、母体中に存続している胎児細胞による GVHD 様反応という胎児性マイクロキメリズム説が提唱されている¹。現在、世界中のいくつかの施設で、SSc の末梢血中^{2,3}または病変皮膚³における胎児性マイクロキメリズムの存在が検討されている。我々

は、日本人 SSc 患者末梢血での検討を行った。すなわち、男児出産歴を有する日本人 SSc 患者を対象として、Y 染色体特異的配列 DYZ1 をマーカーとした nested PCR 法により、対照の男児出産歴を有する日本人健常人女性群との間で、胎児性マイクロキメリズムの存続は、頻度的には差がないことを報告した⁴。

そこで、本研究では SSc の発症機構をさらに解明するために、定量 PCR 法により胎児性マイクロキメリズムの定量解析を行った。

SSc と HLA との関係に関しては、SSc 家系での HLA 研究にて、SSc の発症と、HLA class I とは相関はみられなかったが、class II の DRB1 とは相関がみられることが報告されている²。また SSc 患者胎児性マイクロキメリズ

ムの存続と母児の HLA-DQA1*0501 との相関がみられる報告がある⁵。日本人 SSc と HLA の関係では、抗トポイソメラーゼ 1 抗体陽性 SSc 患者と HLA-DRB1*1502、DQB1*0601 と⁶、抗セントロメア抗体陽性 SSc 患者と HLA-DRB1*0101、DQB1*0501 とに相関がみられることが報告されている⁷。そこで、本研究では、日本人 SSc 患者胎児性マイクロキメリズムの存続と患者の HLA-DR との関連を検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は、筑波大学附属病院膠原病リウマチアレルギー内科受診中で、ACR 診断基準を満たす男児出産歴を持つ SSc 女性患者 28 名であった。このうち病型分類では、diffuse cutaneous type が 15 名、limited cutaneous type が 13 名で、自己抗体の分類では、抗トポイソメラーゼ 1 抗体陽性が 7 名、抗セントロメア抗体陽性が 9 名、抗 U1-RNP 抗体陽性が 3 名であった。また対照として男児出産歴を持つ健常人女性 13 名、未出産健常人女性 12 名について検討した。

2) 男性 DNA の定量 PCR

Y 染色体特異的 DYZ1 領域に、primer および定量 PCR 用の TaqMan probe を設計した。まず SSc 患者、健常人女性から採取した末梢血 2ml より genomic DNA を抽出する。次に genomic DNA に対して、DYZ1 特異的な primer と probe を用い、ABI 7700 sequence detector にて定量 PCR を施行した。標準曲線作成のため、一人の健常人男性末梢血中の genomic DNA を用い、また internal control として GAPDH を用いた。

3) HLA typing

Dynal ReLI SSO HLA-DRB kit (Dynal Biotech) による PCR-SSOP (sequence-specific oligonucleotide probes) typing 法を用いて、HLA-DR の解析を行った。

4) 倫理面への配慮

血液提供患者、血液提供健常人全員に、研究の目的と意義を十分に説明し、同意を得て、インフォームド・コンセントを行った。また得られた結果を研究の目的以外には使用せず、本人及びその家族、血縁者その他関係者の人権及び利益の取扱いについて十分に配慮した。

C. 研究結果

1) 胎児性マイクロキメリズムの定量解析

一人の健常人男性末梢血中の genomic DNA 10ng 中の Y 染色体特異的配列の量を基準値として便宜上 10^7U とした時の各サンプルでの末梢血中の同配列の相対量を用いると、男児出産歴を有する健常人女性では、 $1.6 \pm 2.5U$ であるのに対して、男児出産歴を有する SSc 患者女性群では、 $13.1 \pm 31.8U$ と健常人女性に比量的に多い傾向にあった (図 1)。

2) 胎児性マイクロキメリズムの存続と HLA-DRB1 との関係

HLA-DRB1*1502 は、男児出産歴を有する SSc 患者群では、胎児性マイクロキメリズムの存続あり例で 12 例中 3 例 (25%)、存続なし例で 15 例中 3 例 (20%) と両者に差はみられなかった (表 1、3)。男児出産歴を有する健常人女性群では、存続あり例で 5 例中 1 例 (20%)、存続なし例で 8 例中 2 例 (25%) であった (表 2、3)。また、HLA-DRB1*0101 は、男児出産歴を有する SSc 患者群で、胎児性マイクロキメリズムの存続あり例で 12 例中 1 例 (8%)、存続なし例で 15 例中 2 例 (13%)

と両者に差はみられなかった (表 1、3)。男児出産歴を有する健常人女性群では、存続あり例で 5 例中 0 例 (0%)、存続なし例で 8 例中 0 例 (0%) であった (表 2、3)。以上より、少例数ではあるが、日本人 SSc 患者において、胎児性マイクロキメリズムの存続と HLA-DR との相関はみられなかった。

D. 考案

以前われわれが Y 染色体特異的配列 DYZ1 をマーカーとした nested PCR 法を用いた日本人 SSc 患者末梢血の検討では、Y 染色体特異的配列を男児出産歴を有する日本人 SSc 女性患者 13 例中 7 例、61.5% に検出し得たが、男児出産を有する健常人女性でも、12 例中 6 例、50% に同配列を検出し、両群に有意な差は認めなかった。よって、胎児性マイクロキメリズムの存続は、男児出産歴を有する SSc 女性患者、男児出産歴を有する健常人女性ともに認められ、両群間に頻度的には差がみられなかった。これら胎児性マイクロキメリズム陽性例に対する、定量 PCR 法による胎児性マイクロキメリズム定量解析では、少数例であるが、男児出産歴を有する SSc 女性患者では、胎児細胞の数の増加がみられた⁸。そこで、今回の検討では、より多くの例について、定量 PCR 法による胎児性マイクロキメリズム定量解析を施行した。その結果、胎児由来 DNA 量は、男児出産歴を有する健常人女性 ($1.6 \pm 2.5U$) に比べ、男児出産歴を有する SSc 患者 ($13.1 \pm 31.8U$) に多くみられた。すなわち胎児細胞数、すなわち胎児性マイクロキメリズムの量が SSc 患者に多い傾向にあった。仮に、この系で未出産健常人女性の量の平均 +3SD 以上を陽性と判定すると、男児出産歴を有する健常人女性 13 例中 5 例、38.4% が陽

性であるのに対して、男児出産歴を有する SSc 患者では、28 例中 13 例、46.4% が陽性であり、両群間に頻度的には差がみられなかった。以上より、胎児性マイクロキメリズムの量が、日本人 SSc 患者の発症に関与する可能性が示唆された。

HLA と胎児性マイクロキメリズムの存続に関しては、日本人 SSc 患者において、抗トポイソメラーゼ 1 抗体例、抗セントロメア抗体陽性例との相関がそれぞれ報告されている、HLA-DR B1*1502 と DRB1*0101 に関して検討したが、胎児性マイクロキメリズムの存続とは明らかな相関はみられなかった。今回の SSc 患者群で特定の HLA について検討する場合、例数が極めて少なくなるため、今後さらに例数を増やす必要がある。

E. 結論

日本人 SSc 患者の発症に、胎児性マイクロキメリズムが関与している可能性が示され、特に、胎児細胞の数、すなわち胎児性マイクロキメリズムの量が、SSc の発症に関わっている可能性が示唆された。

F. 文献

- 1) Nelson JL. : Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: Is some autoimmune disease auto- alloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis Rheum* 1996, 39:191-4
- 2) Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW. : Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in

- scleroderma. Lancet 1998, 351: 559-62 .
- 3) Artlett CM, Smith JB & Jimenez SA. : Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. N Engl J Med 1998, 338:1186-91
 - 4) Murata H, Nakauchi H, Sumida T. : Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. Lancet 1999, 354: 220
 - 5) Lambert NC, Evans PC, Hashizumi TL, Maloney S, Gooley T, Furst DE, Nelson JL.: Cutting Edge: Persistent fetal microchimerism in T lymphocytes is associated with HLA-DQA1*0501: Implications in autoimmunity. J Immunol 2000, 164: 5545-48
 - 6) Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Inoko H, Tsuji K.: The HLA-DR and DQ genes control the autoimmune response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis (scleroderma). J Clin Invest 1993,92:1296-301
 - 7) Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Inoko H.: HLA class II genes associated with anticentromere antibody in Japanese patients with systemic sclerosis Ann Rheum Dis 1995,54:983-7
 - 8) Murata H, Sumida T.: Quantitative analysis of fetal microchimerism in Japanese women with systemic sclerosis. Mod. Rheumatol. 2001,11:259-260

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 SSc患者におけるHLA-DRB1

Microchimerism		HLA-DRB1		Microchimerism		HLA-DRB1	
SSc 1	+	1302	0802	SSc14	-	1502	14A
SSc 2	+	1302	0803	SSc15	-	1602	1602
SSc 3	+	1201	0803	SSc16	-	14A	1302
SSc 4	+	1502	4B	SSc17	-	1101	1201
SSc 5	+	1502	4B	SSc18	-	0101	4D
SSc 6	+	14A	1301	SSc19	-	1501	0901
SSc 7	+	4D	4B,4C,4D	SSc20	-	4D	0901
SSc 8	+	1602	0802	SSc21	-	1501	0802
SSc 9	+	-	-	SSc22	-	1602	0901
SSc10	+	14B	0401	SSc23	-	1502	0401
SSc11	+	1501	0901	SSc24	-	0101	14A
SSc12	+	4D	1502	SSc25	-	1501	1501
SSc13	+	0101	4B	SSc26	-	0901	0901
				SSc27	-	0901	1502
				SSc28	-	1302	1202

4B: 0403, 0406, 0407 4C: 0404 4D: 0405, 0410 14A: 1401, 1407 14B: 1402, 1406

表2 健常人女性におけるHLA-DRB1

Microchimerism		HLA-DRB1		Microchimerism		HLA-DRB1	
Healthy 1	+	1501	1502	Healthy 6	-	1502	1101
Healthy 2	+	14A	0901	Healthy 7	-	1302	1101
Healthy 3	+	1501	4B	Healthy 8	-	0405	1202
Healthy 4	+	4D	1302	Healthy 9	-	4B	4D
Healthy 5	+	0901	1302	Healthy10	-	0802	0803
				Healthy11	-	0802	1502
				Healthy12	-	4D	14B
				Healthy13	-	4D	0803

4B: 0403, 0406, 0407 4D: 0405, 0410 14A: 1401, 1407 14B: 1402, 1406

表3 SSc患者におけ胎児性マイクロキメリズム存続と HLA-DRB1 *0101,*1502の関係

DRB1	patients with SSc microchimerism		Healthy women microchimerism	
	(+)	(-)	(+)	(-)
0101	8 (1/12)	13 (2/15)	0 (0/5)	0 (2/8)
1502	25 (3/12)	20 (3/15)	23 (3/13)	25 (2/8)

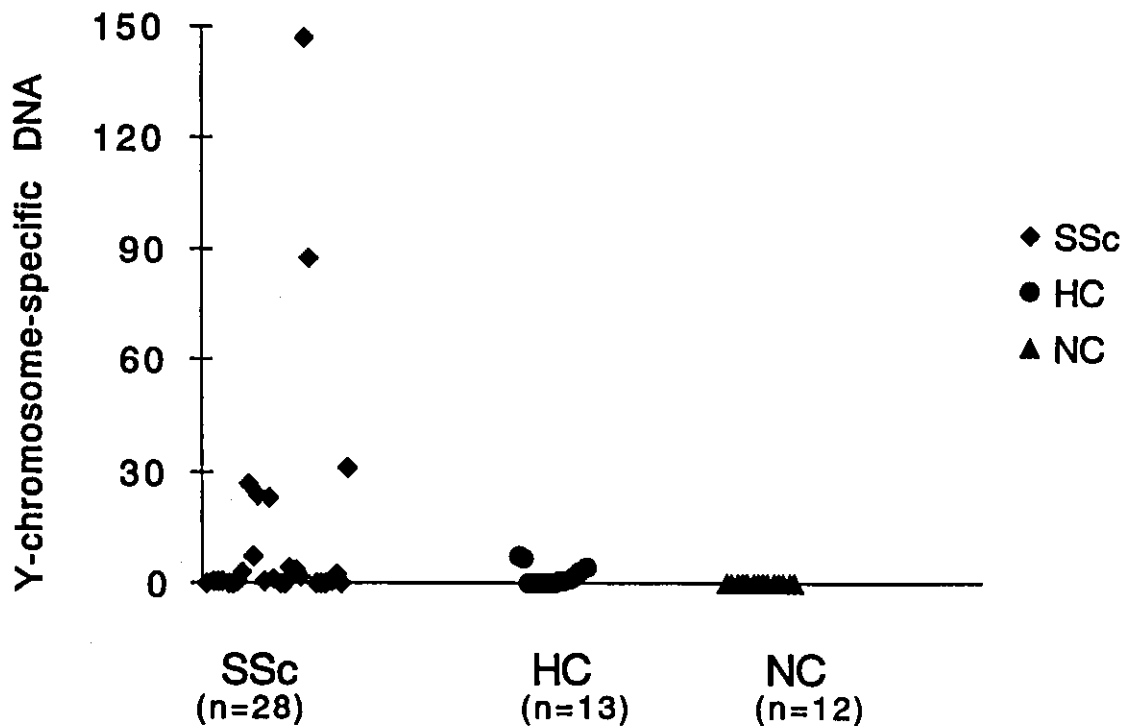


図1：男性DNAの定量解析

男児出産歴を有するSSc患者(SSc)、男児出産歴を有する健常人女性(HC)、未出産健常人女性(NC)末梢血中の男性DNA量。縦軸は、一人の健常人男性末梢血中の genomicDNA10ng中のY染色体特異的配列の量を基準値として便宜上 10^7 とした時の各サンプルでの末梢血中の同配列の相対量を示す。

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サイトカインの経時的解析

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 松下貴史 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
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 濱口儒人 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
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（systemic sclerosis; SSc）は発症後数年以内に皮膚硬化や内臓病変が進行するものの、それ以降は活動性が低下し、皮膚硬化も自然に改善することが明らかにされてきた。これまで SSc におけるサイトカインの検討は数多く報告されているが、すべて初診時など 1 時点での解析で、上記の自然経過との関連性を検討した報告はない。今回我々は、SSc 患者の保存血清中のサイトカイン濃度を経時的に測定した。SSc の自然経過と一致して、スキン・スコアは病初期の 23 ± 7 から 6 年経過時には 11 ± 8 に低下した。同様に、TGF- β 、IL-4、IL-6、IL-10、MCP-1 の濃度は経過とともに低下した。対照的に、IL-12 の濃度は経過とともに上昇した。さらに、原病死した 5 例では IL-12 濃度が生存例と比較して有意に低値であった。このように自然経過により皮膚硬化が軽快するのと並行して、Th2 サイトカインである IL-4、IL-6、IL-10 の低下および Th1 サイトカインである IL-12 の上昇が認められた。以上より、経時的な IL-12 の測定は疾患活動性や予後を反映する指標となりうることを示された。

A. 研究目的

全身性強皮症（systemic sclerosis; SSc）は皮膚硬化が肘・膝関節より末梢に留まる Limited cutaneous SSc と肘・膝関節を超えて近位皮膚硬化をみとめる Diffuse cutaneous SSc (dSSc) の 2 つの病型に分類される。皮膚硬化が高度である dSSc は発症後数年以内に皮膚硬化や内臓病変が進行するものの、それ以降は活動性が低下し、皮膚

硬化も自然に改善することが近年明らかにされてきた(1)。

SSc の病因は解明されていないものの、その発症に免疫異常が重要であることがわかっている。Naive T 細胞は適切な刺激により Th1 ないし Th2 に分化し、前者は IFN- γ 、IL-2 を、後者は IL-4、5、6、10 を産生する。SSc 患者皮膚には CD4 陽性 T 細胞の浸潤を認め、サイトカイン産生を介して線維化

に寄与しているものと考えられている(2)。

これまで SSc の患者血清中では IL-4、6、10、13 等の Th2 サイトカインが上昇していると報告されている(3-5)。しかしながら、SSc の患者血清中で Th1 サイトカインである IL-12 が上昇しているとの報告もあり(6)、SSc において Th1、Th2 いずれが優位であるかははっきりと解っていない。また、これらのサイトカインの解析はすべて 1 時点での解析であり前述した自然経過との関連性を検討した報告はない。そこで、今回 dSSc 患者血清を用いて ELISA にてサイトカインの経時的解析を行った。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象は dSSc 患者 26 例で当科初診までの罹病期間は 3 年以内の早期例の症例に限った。初診時年齢は 48 ± 20 歳であった。罹病期間は 2.1 ± 1.0 年であった。これらの患者は 4.9 ± 1.9 (2.0-8.0) 年間フォローアップされた。自己抗体は抗トポイソメラーゼ I 抗体 20 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体 4 例、抗セントロメア抗体 2 例であった。またコントロールとして健常人 15 例の血清を使用した。初診時 5 例の dSSc 患者で少量のステロイド (プレドニゾン 5-20 mg/日) が投与されており、経過中さらに 18 例に少量のステロイドが投与された。また、初診時 8 例の dSSc 患者で少量の D-ペニシラミン (100-300 mg/日) が投与されており、経過中にさらに 5 例に少量の D-ペニシラミンが投与された。初診時、および経過中に他の免疫抑制剤にて治

療された患者はいなかった。

2) ELISA

血清サイトカイン濃度を ELISA キットを用いて測定した。

3) 皮膚でのサイトカインの発現

発症 3 年以内と発症 6 年以上の dSSc 患者および健常人の皮膚より mRNA を抽出し、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. 研究結果

1) Th2 サイトカインの経時的変化。

発症 3 年以内の dSSc 患者血清を初診時、2 年経過時、4 年経過時、6 年経過時で解析した。最初に、modified Rodnan TSS の経時的変化を図 1 に示す。初診時の modified Rodnan TSS は 2 年経過時には 35%減少し ($p < 0.0005$)、4 年経過時には 48%減少 ($p < 0.0001$)、6 年経過時に 52%減少した ($p < 0.0005$)。dSSc 患者血清 IL-6、IL-10 濃度は初診時、健常人よりも 9~12 倍上昇していたが (それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$: 図 2)、経過と共に減少した。dSSc 患者血清 IL-4 濃度は初診時、健常人と同レベルであったが、4 年および 6 年経過時には健常人よりも低値となった ($p < 0.05$: 図 2)。dSSc 患者血清 MCP-1 濃度は全経過で健常人より有意に上昇しており ($p < 0.0001$: 図 2)、血清 MCP-1 濃度は経過と共に減少する傾向であった。よって、dcSSc において Th2 サイトカインは皮膚硬化の改善と共に減少することが示さ

れた。

2) Th1 サイトカインの経時的変化。

Th2 サイトカインとは対照的に dSSc 患者血清 IL-12 濃度は初診時、健常人よりも有意に低値であった ($p < 0.0005$: 図 3)。しかし、経過と共に dSSc 患者血清 IL-12 濃度は徐々に上昇し、4 年経過時には 7.8 倍、6 年経過時には 15.3 倍に上昇した (それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.0005$: 図 3)。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ところ、生存例で有意に高値であった ($p < 0.05$: 図 4)。dSSc 患者血清 IL-2 濃度は経過と共に減少する傾向にあった (図 3)。よって、血清 IL-12 濃度は皮膚硬化の改善に伴い上昇し、経過中に血清 IL-12 濃度の上昇が認められない症例は予後不良であることが示された。

3) その他のサイトカインの経時的変化。

血清 TGF- β 1 濃度は全経過中で健常人と比べ有意に上昇しており、経過と共に減少する傾向にあった (図 3)。血清 TNF- α 濃度に傾向は認めなかった (図 3)。

4) 代表例での経時的変化

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を示す (図 5)。症例 1 は罹病期間 3 年の dSSc 患者で初診後 3 年経過時まで血清 IL-10 濃度の上昇を認めていたが皮膚硬化の改善と共に血清 IL-10 濃度が減少し、それと交叉するように血清 IL-12 濃度が上昇した。同様の傾向が症例 2, 3 (症例 2

は罹病期間 2 年、症例 3 は罹病期間 1 年の dSSc 患者) でも認めた。一方、症例 4 (罹病期間 0.2 年の dSSc 患者) では皮膚硬化の改善なく、また血清 IL-12 濃度の上昇も認めなかった。よって、個々の症例でも血清 IL-12 濃度は皮膚硬化と血清 IL-10 濃度の減少に伴い上昇することが示された。

5) dSSc 患者皮膚でのサイトカイン mRNA 発現量。

dSSc 患者皮膚の early-stage と late-stage での各サイトカイン mRNA を real-time RT-PCR にて定量した。IL-12p35 mRNA は発症 3 年以内の early-stage の dSSc 患者では検出されなかったが、発症 6 年以上経過した late-stage の dSSc 患者で検出された。TGF- β 1 と MCP-1 mRNA は early-stage の dSSc 患者で高発現されており、late-stage ではともに発現が低下していた。よって、SSc 患者皮膚局所においても経過とともに TGF- β 1 と MCP-1 の発現減弱、IL-12 の発現亢進を認めた。

D. 考 案

一般に early-stage に上昇していた Th2 サイトカインは経過中、皮膚硬化の改善とともに減少する傾向にあった。IL-4 は SSc 患者由来線維芽細胞を刺激し膠原線維の産生を増強する(7)。また、IL-6 も SSc 患者由来線維芽細胞において用量依存性に膠原線維の産生を増強する。さらに early-stage の SSc 患者血清中の IL-6 の上昇が報告されている(5)。一方、IL-10 は in vitro で膠原線維の

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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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 I 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

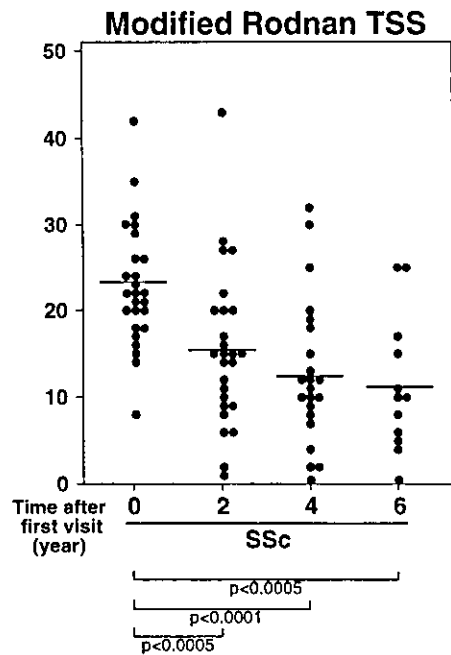


図 1： 皮膚硬化の経時的変化。皮膚硬化は modified Rodnan TSS にて評価した。

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

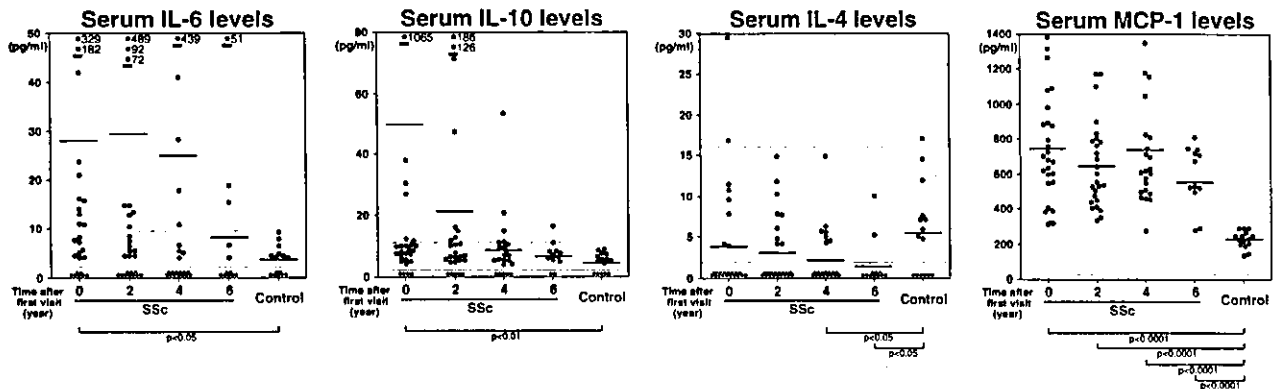


図 2： Th2 サイトカインの経時的変化。点線は健常人の平均値+2SD に設定したカットオフ値

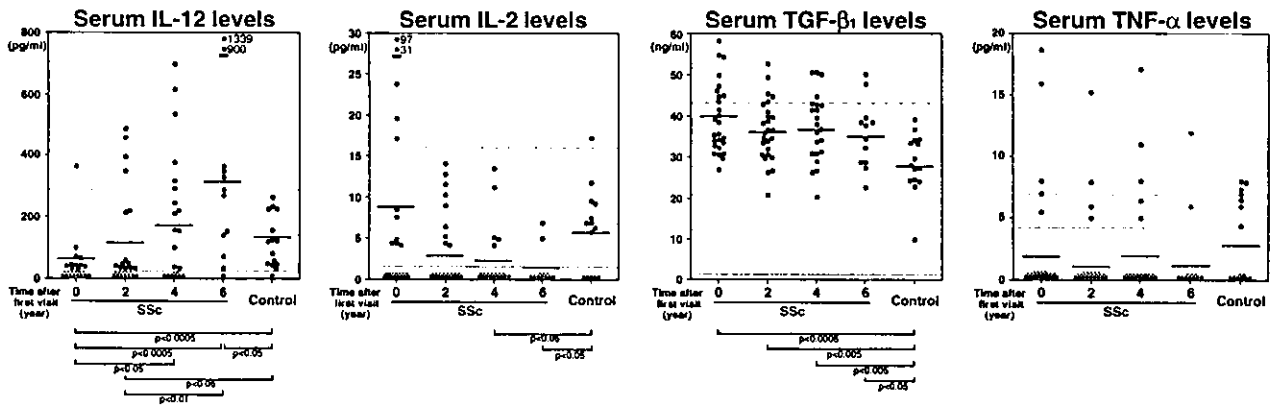


図 3: Th1 サイトカインおよび TGF- β 1 と TNF- α の経時的変化。点線は健常人の平均値 +2SD に設定したカットオフ値

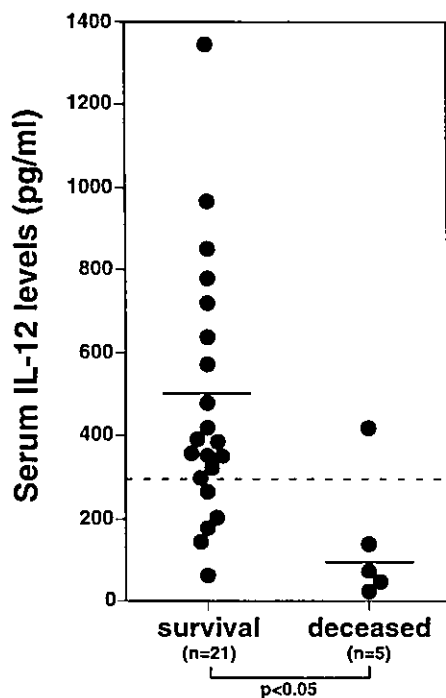


図 4: 血清 IL-12 濃度と死亡例の関係。個々の経過中の血清 IL-12 濃度の最大値を抽出し生存例と原病死した症例で解析した。点線は健常人の平均値 +2SD に設定したカットオフ値

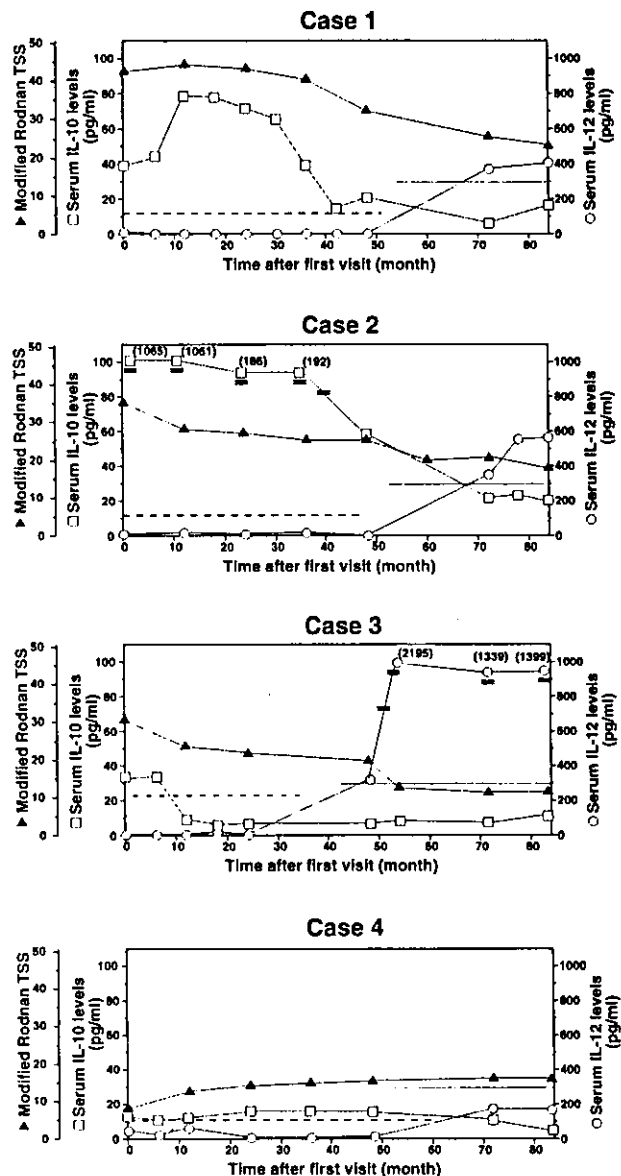


図 5: 皮膚硬化および血清 IL-10,12 濃度の代表例での経時的変化。点線および細線は健常人の平均値 +2SD に設定した血清 IL-10 と IL12 濃度のカットオフ値

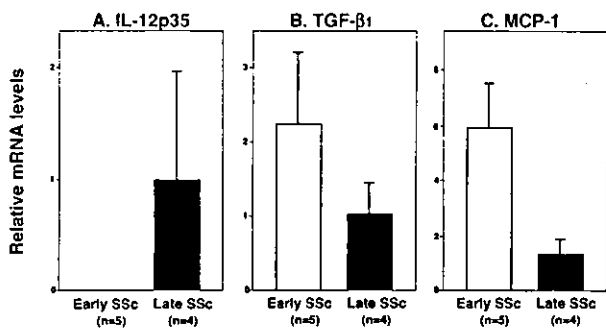


図 6: IL-12、TGF- β 1、および MCP-1 の dSSc 患者皮膚での mRNA 発現量。各サイトカイン mRNA は real-time RT-PCR にて定量した。