

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	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	西島千博	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助手
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)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- γ 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- γ 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- γ 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^{1,2}。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- γ 、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

白血球細胞 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 DiOC₁₈ 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 患者で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- γ 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³。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^{4,5}、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- γ 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⁶。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

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

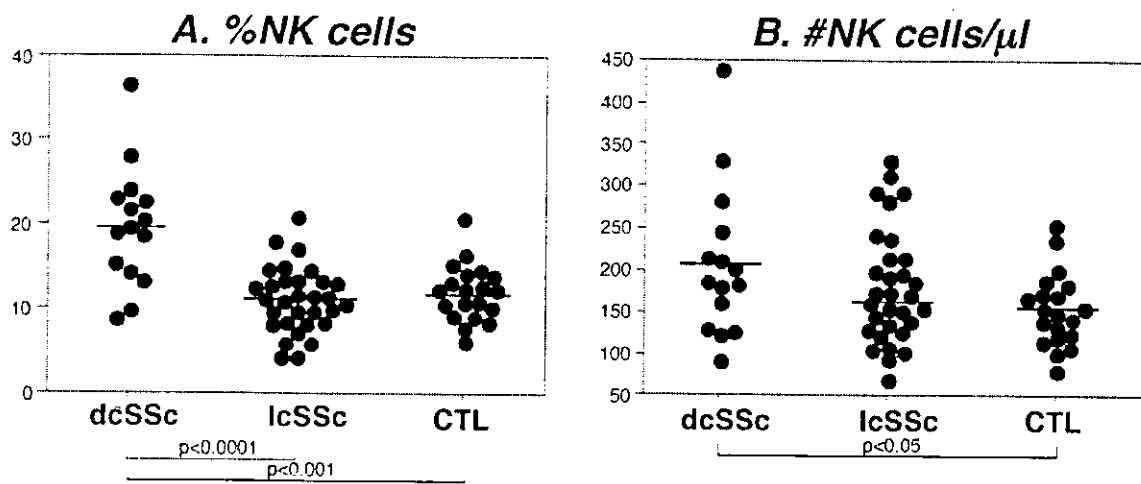


図 1 フローサイトメトリーにて、NK 細胞表面マーカーである CD56、CD16 を用いて二重染色して解析した。

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。

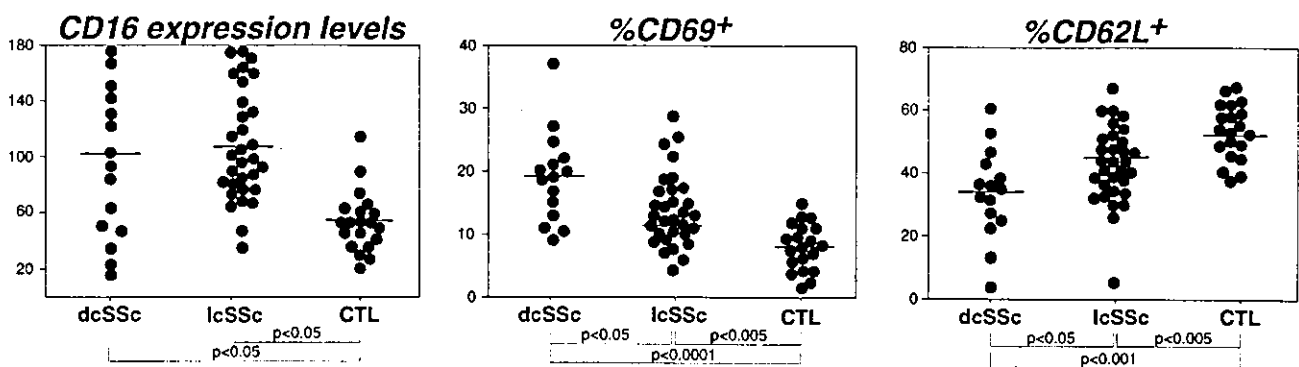


図 2 フローサイトメトリーにて NK 細胞の CD16, CD69 (early activation marker), CD62L (L-selectin) 発現レベルおよび発現率を解析した。

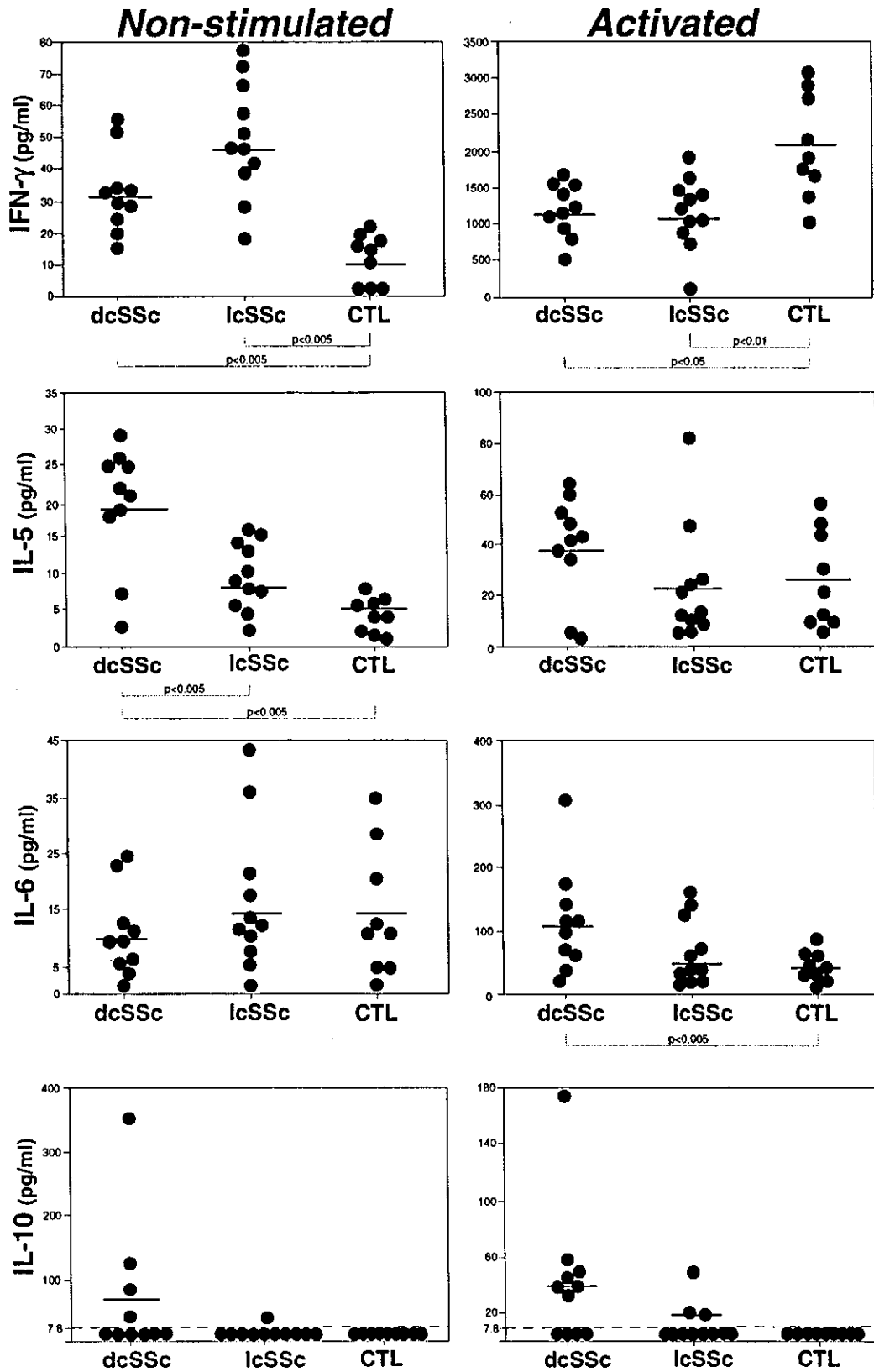


図 3 強皮症患者および健康人由来 NK 細胞のサイトカイン産生。PMA および ionomycin にて刺激、または無刺激で培養し、ELISA にて上清の IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-10 を測定した。

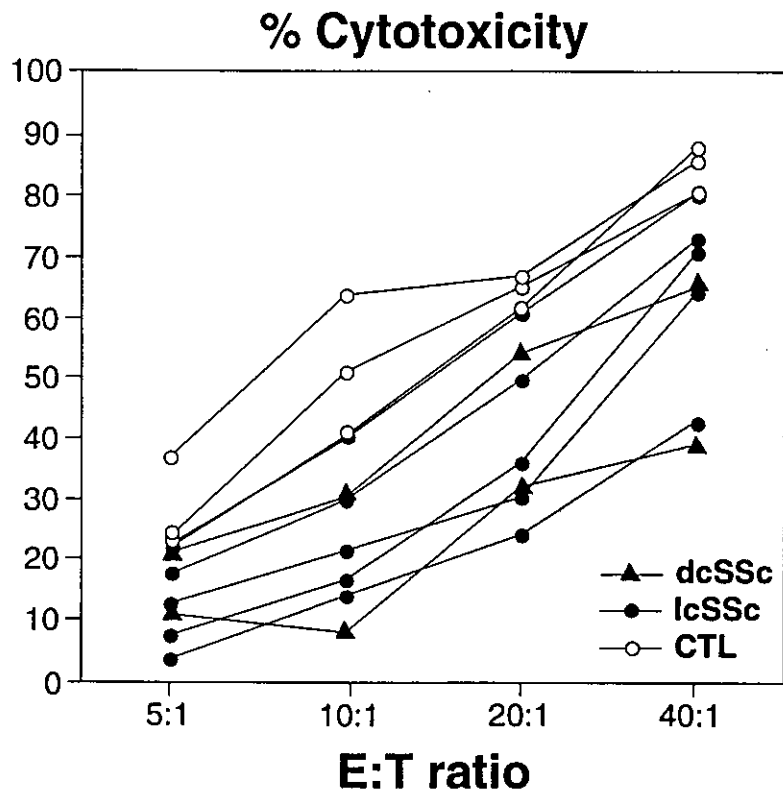


図4 強皮症患者および健康人由来 NK 細胞の K562 に対する natural cytotoxicity を 5:1, 10:1, 20:1, および 40:1 の Effector:Target 比率 (E:T ratio) でフローサイトメトリーを用いて解析した。

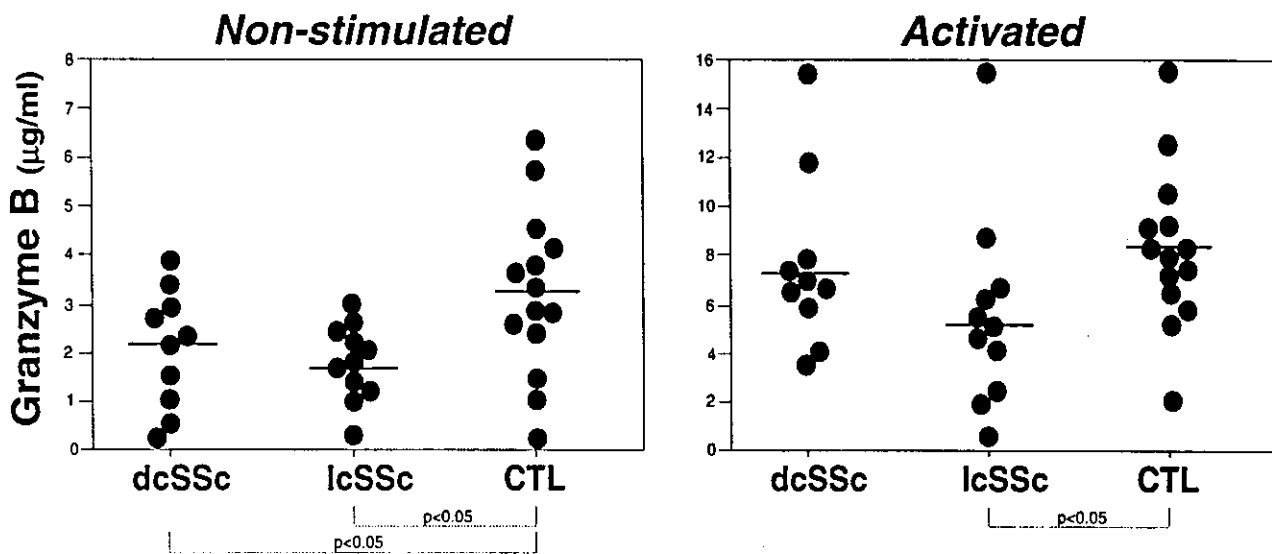


図5 強皮症患者および健康人由来 NK 細胞から放出される granzyme B を ELISA にて測定した。

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

強皮症における血管内皮前駆細胞異常

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

研究要旨

近年、成人における血管新生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。そこで、強皮症、関節リウマチ、健常人を対象として CEP を定量化したところ、強皮症で他の 2 群に比べて有意に減少していた。一方、強皮症では循環血中の VEGF などの血管新生因子はむしろ増加し、CEP の成熟血管内皮細胞への分化能が健常人に比べて著しく低下していた。以上より、強皮症では CEP の減少と成熟障害が存在し、末梢血管病変との関与が考えられた。

A. 研究目的

強皮症（SSc）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新生減少の 2 つの特徴を有する。これまで、SSc における血管傷害を誘導する病態として炎症、虚血-再還流、凝固線溶系の異常に基づく血管内皮傷害が考えられてきたが¹⁾、その詳細なメカニズムは明らかでない。

従来は、成人における血管新生や傷害血管修復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、成人における血管新生や血管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明らかにされた²⁾。CEP は末梢血単核球の 0.01%未満ときわめて少数存在する細胞で、その検出が困難であったが、最近特徴的な表面マーカー（CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺）により同定できることが報告された³⁾。SSc 患者では爪

末梢血管の無血管領域や血管造影における四肢末梢血管の狭窄、減少がみられ、虚血に対する血管新生の障害が存在する。そのため、我々は SSc 患者で CEP による血管新生の障害が存在する可能性を考えた。その点を検証するため、CEP の絶対数および成熟血管内皮への分化能を評価する測定系を確立し、SSc 患者における血管新生を解析した。

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 SSc 患者 11 例を対象とした。対象として性、年齢、動脈硬化の危険因子を一致させた関節リウマチ（RA）11 例、健常人 11 例を用いた。

2. CEP の定量

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⁺細胞における CD34、VEGFR2、CD133 の三重染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺細胞の割合を求め、FlowCount マイクロビーズ (Beckman-Coulter, Hiialeah, FL, USA) を用いて定量化した。CEP の数は末梢血 20ml あたりの絶対数で表した。

3. 循環血管新生因子濃度の測定

血漿中の VEGF、血清中の bFGF、HGF の濃度は市販の ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) により測定した。

4. CEP 分化能の測定

末梢血単核球から MACS ビーズを用いて分離した CD133⁺細胞を CD133⁻細胞と 1:50 の比率で混ぜ、フィブロネクチン上で VEGF、bFGF、EGF などの血管新生因子を含む EBM-2 培地 (Clonetics, San Diego, CA, USA) で 5 日間培養した。付着細胞をパラホルムアルデヒドで固定後、抗 CD45 抗体と抗 VEGFR2 または抗 vWF 抗体で蛍光二重染色した。共焦点蛍光顕微鏡で観察し、CD45⁻VEGFR2⁺細胞 (CEP と成熟血管内皮細胞の総和) における CD45⁻vWF⁺細胞 (成熟血管内皮細胞) の比率を CEP の分化率とした。

5. 統計学的解析

3 群間の比較は one-way ANOVA (平均±標準偏差) または Kruskal-Wallis test (中央値) を用いて行い、有意差が得られれば Dunnett test または Wilcoxon rank sum test を用いて各群間の検定を行った。

C. 研究結果

MACS でのソーティング後のフローサイトメトリーにより CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺の CEP を同定する検出系を確立した (図 1A)。RA や

健常人では CEP を細胞集団として検出できたが、SSc ではきわめて少数の CEP しか検出できなかった。20ml あたりの CEP の絶対数を定量化して 3 群間で比較すると、SSc で RA、健常人に比べて有意に少なかった (274 vs 1154, 1074; $P<0.001$) (図 1B)。CEP の数は SSc の病型 (diffuse vs limited)、発症からの期間とは関連しなかったが、指尖陥凹性瘢痕ありの例はなしの例に比べて CEP 数が有意に少なかった (204 vs 403, $P<0.03$)。CEP 数が最も少ない症例は難治性の四肢指尖潰瘍を繰り返し、最終的に壊疽のため左足趾を切断した。CEP における成熟血管内皮細胞のマーカーを調べると vWF は陰性で、CD146 と VE-cadherin は弱く細胞質に発現し、成熟血管内皮細胞とは異なっていた。ただし、SSc と健常人におけるこれらマーカーの発現に差はなかった。

CEP の骨髄からの動員には各種血管新生因子が重要な役割を果たすことが知られている⁵⁾。SSc における CEP 減少の原因として血管新生因子産生低下の可能性を調べるため、循環中の VEGF、bFGF、HGF 濃度を測定した。その結果、VEGF、bFGF、HGF のいずれも SSc で健常人より高く、RA と同等の結果であった (34.5 pg/ml vs 10.0, 76.0; 33.0 pg/ml vs 9.0, 24.0; 1330 pg/ml vs 741, 1337; いずれも $P<0.001$)。

予備実験の結果から、CEP を in vitro の各種血管新生因子存在下で培養すると vWF および CD146 の発現が上昇することが明らかとなった。そこで、vWF 発現を成熟血管内皮細胞のマーカーとして in vitro における CEP の分化能を SSc と健常人で評価した。その結果、SSc における分化率は $15.3\pm 7.2\%$ で、健常人の $74.5\pm 16.6\%$ に比べて有意に低下していた ($P<0.001$)。

D. 考案

SSc 患者では末梢血中の CEP の減少と血管新生因子に対する分化障害が存在した。また、CEP の著明な減少を伴う症例では血管病変の程度が強いことも示された。これらの結果は SSc で CEP を介した血管新生、傷害血管修復の障害が存在することを示唆する。従来、血管内皮傷害により SSc の血管病変が誘導されると考えられてきたが、今研究成果から血管内皮傷害に加えて修復不全も病態に関与することが明らかにされた。

血管内皮が機械的あるいは代謝障害により傷害されると、血管壁内部が露出し、血栓や出血など重篤な合併症をきたす可能性がある。それを防ぐためには、血管内皮欠損部分の迅速な修復が必要である。そのため、損傷部位から VEGF 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⁾。SSc 患者では CEP の絶対数が少なく、また血管新生因子に対する CEP の反応性も低下していることから、血管新生因子濃度の高値が持続しても血管内皮の修復が十分が行われない。そのため、損傷部位に血小板の付着や炎症細胞の浸潤が起これ、癒痕化がすすみ、血管内腔の狭小化につながると推測される。現時点で SSc における CEP 異常のメカニズムは明らかでないが、循環中の CEP が何らかの機序で破壊されるか、骨髄での幹細胞からの分化障害のいずれかの可能性が考えられる。

現在 SSc の血管病変に対する治療として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。本研究結果から骨髄より CEP を誘導することが SSc の血管病変の治療につながる可能性が考えられる。スタチン薬⁶⁾や G-CSF などの成長因子³⁾が CEP の動員を促進することが報告されており、SSc に対する有効

性が期待され、今後の検討が待たれる。

E. 結論

SSc では CEP の減少と成熟障害が存在し、末梢血管病変との関与が考えられた。

F. 文献

1. LeRoy EC. Systemic sclerosis: A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 675-94.
2. 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.
3. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-8.
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. 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.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, et al. Impaired function of circulating endothelial precursors in patients with systemic sclerosis: Implication for pathogenesis of microvascular damage. The 67th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Orlando). 2003. 10.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

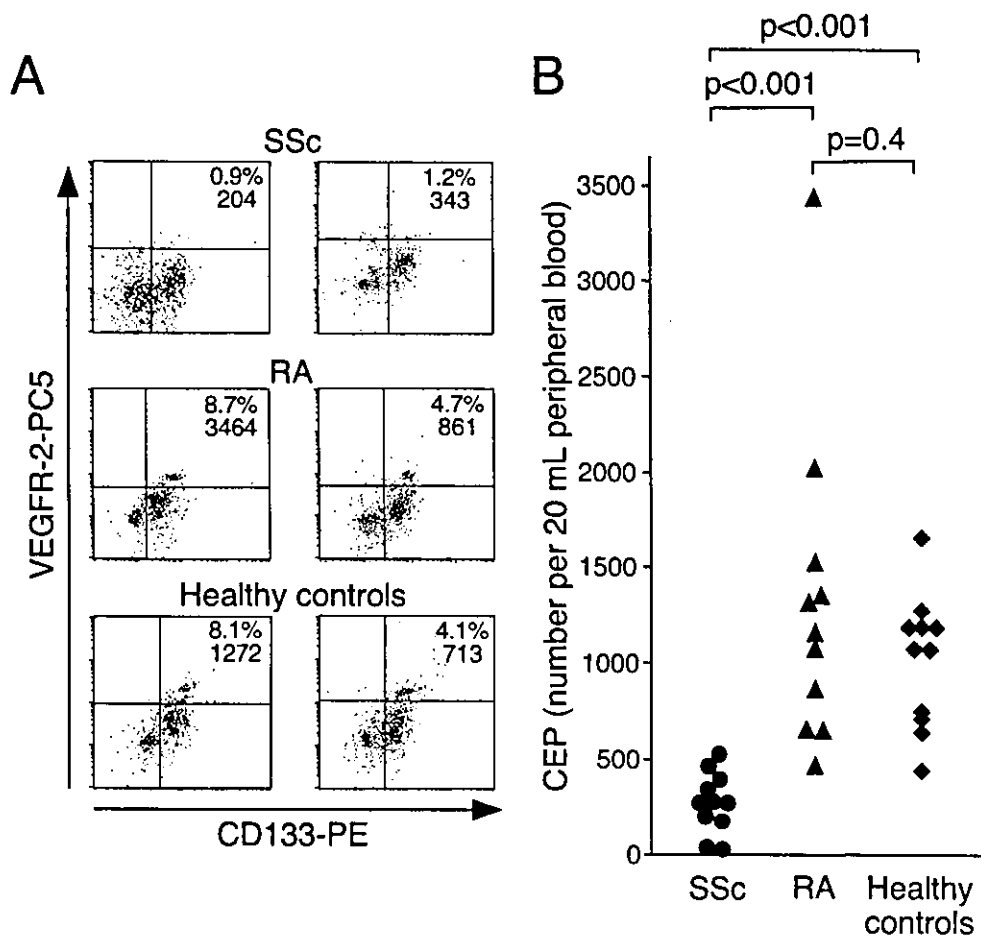


図 1. 末梢血中の CEP の検出および定量化。A. MACS によりソートした CD34⁺細胞を用いた CEP の検出。CD34⁺細胞を抗 CD34、抗 VEGFR2、抗 CD133 抗体により三重染色し、CD34⁺細胞にゲートをかけて VEGFR2 と CD133 の発現を調べた。B. SSc、RA、健常人における末梢血 20ml あたりの CEP の絶対数の比較。

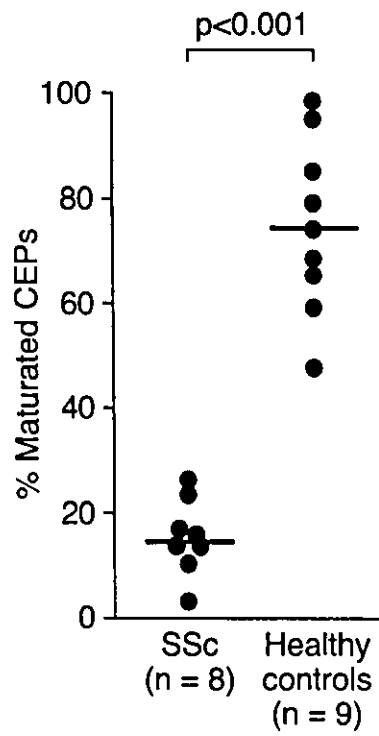


図 2. in vitro における分化誘導処理による CEP の分化能の解析。SSc および健康人由来の CD133⁺ 細胞を各種血管新生因子存在下で 5 日間培養し、CD45⁻VEGFR2⁺細胞における CD45⁻vWF⁺細胞の比率により CEP の分化率を調べた。

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 鏑木淳一 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お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

皮膚線維化における CTGF の役割

分担研究者	佐藤伸一	金沢大学院医学系研究科皮膚科学助教授
協力者	中條園子	金沢大学院医学系研究科皮膚科学医員
協力者	金原拓郎	金沢大学院医学系研究科皮膚科学医員
協力者	白崎文朗	金沢大学院医学系研究科皮膚科学助手
協力者	川原 繁	国立金沢病院皮膚科医長
研究協力者	稲垣 豊	東海大学医学部地域保健学部門助教授
主任研究者	竹原和彦	金沢大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究主旨

コラーゲン合成を促進する代表的なサイトカインとして、transforming growth factor-beta(TGF- β)が知られているが、近年 connective tissue growth factor(CTGF)も線維化に関与する因子として注目されている。今回我々は、新生マウスの皮下に TGF- β 、CTGF を注入して線維化を誘導する実験モデルを作製し、I型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖をコードする pro $\alpha 2$ (I)コラーゲン遺伝子の転写活性を測定した。TGF- β のみの注入で転写活性は4日目をピークに低下したが、TGF- β 3日間注入後 CTGF を4日間注入すると転写活性は5日目以降も高値を示した。皮膚線維化の機序として、TGF- β が皮膚線維化を誘導し CTGF が線維化を維持することが示唆された。また、この線維化の機序に肥満細胞、マクロファージが関与していると考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症は、皮膚や肺、心、腎、消化管などに広範な線維化や血管障害をきたす結合組織疾患のひとつである。線維化はコラーゲンをはじめとする細胞外基質が異常蓄積した状態である。強皮症における線維化の機序は未だ不明であるが、これまで様々な研究がなされ、血管内皮細胞、血小板、浸潤細胞などから分泌されるサイトカインが、線維芽細胞を増殖させ、細胞外基質の産生を亢進させることにより線維化が生じると

考えられている¹。

TGF- β は、繊維芽細胞に作用してコラーゲン合成を促進することから、強皮症の発症に関わる重要な細胞増殖因子としてこれまで注目されてきた²。さらに近年では、TGF- β の下流でその作用を仲介することからCTGFも線維化に関与する因子として注目されている。

CTGFは、TGF- β の刺激により選択的に線維芽細胞から分泌され、線維芽細胞の増殖とコラーゲンの産生を亢進させる因子と考えられている

^{3,4}。全身性強皮症において、皮膚硬化部に組織学的硬化と関連した CTGF mRNA の発現がみられる⁵ことや、患者血清中の CTGF 濃度が疾患の重症度に相関して上昇している⁶ことが報告されている。

以前、我々は、新生マウスの皮下に TGF- β 、CTGF を注入して線維化を誘導する実験モデルの確立を試みた。TGF- β のみを注入すると、4 日目に肉芽が誘導されるが、8 日目にはこの肉芽は消失する^{7,8}。しかし、TGF- β を 3 日間注入し、次に CTGF を 4 日間注入すると線維化が形成された。また、CTGF のみを注入しても線維化はみられなかった。これより、CTGF は TGF- β により誘導された線維化を維持すると考えられた。

今回我々は、この CTGF による線維化の維持に、コラーゲン遺伝子の転写レベルが関与しているかどうか、また、浸潤細胞が関与しているかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 使用したマウス

I 型コラーゲンは、細胞外基質の主要成分であり、2 本の $\alpha 1$ 鎖と 1 本の $\alpha 2$ 鎖によって構成される。その I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子として螢の蛍光色素であるルシフェラーゼ遺伝子を結合させた融合遺伝子と、同じプロモーター領域に大腸菌の Lac Z 遺伝子を結合させた融合遺伝子を 2 種類組み込んだマウスを使用した。つまり、このマウス組織のルシフェラーゼ活性を測定することにより組織中の I 型コラーゲンの転写活性を測定することができ、また、LacZ 染色陽性細胞は I 型コラーゲン遺伝子を発現している線維芽細胞である

と同定できる。

2) 皮膚線維化モデルマウスの作製

予備実験によりあらかじめ至適用量を決定した上で、TGF- β 、CTGF を PBS に溶解して最終濃度が各々 40、20 ng/ μ l になるように調整し、新生マウスの項背部に連日 20 μ l、すなわち TGF- β 800 ng、CTGF 400 ng を皮下投与した。TGF- β 、CTGF 各々 3、7 日間の単独投与と、TGF- β を 3 日間投与した後 CTGF を 4 日間投与する連続投与を行った。また、PBS をコントロールとした。最終投与から 24 時間以内に組織を採取した。

3) コラーゲン量の測定

10 μ の切片を脱パラし、脱パラした切片の肉芽組織の部分をチューブに入れ、0.1% Fast Green と 0.1% Sirius red F3BA の染色液を加え反応させた。Fast Green は非コラーゲン組織、Sirius red F3BA はコラーゲン組織に吸着する。反応液に 0.1N NaOH:メタノール (1:1) を加え染みでできた抽出液の上清の吸光度を 540 nm と 605 nm で測定し、コラーゲン量を計算した。

4) real-time PCR

凍結標本切片の肉芽組織の部分より RNA を抽出し、DNA の合成を行った。ABI Prism 7000 Sequence Detector System (PE Applied Biosystems, Foster city, CA) を用いて、real-time PCR を行った。マウスの I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (COL1A2) のプライマーとして 5'-CAA CCC AGC GAA GAA CTC ATA-3' (forward)、5'-GCC ACC ATT GAT AGT CTC TCC TAA C-3' (reverse)、プローブとして 5'-CGC CCA GGC CAA GCA TGT C-3' を使用した。コントロール遺伝子として GAPDH を使い、 $\Delta \Delta$ CT 法により発現量比を算定した。

5)ルシフェラーゼ活性測定

肉芽組織を乳鉢ですりつぶした後細胞融解液で15分間溶かし、10000rpmで1分間遠心した。上清20 μ lに発光基質液100 μ lを添加しルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は1mgあたりの値で比較した。

6)X-gal 染色

凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで5分間固定しPBSで10分間 \times 2回洗浄した。4mMフェロシアンカリウム、4mMフェリシアンカリウム、2mM塩化マグネシウム、1mg/mlX-galで37 $^{\circ}$ C、48時間染色した。その後エオジンでカウンター染色し、PBSで10分間 \times 2回洗浄し封入した。

7)組織染色

パラフィン切片を用いて、肥満細胞とマクロファージについて染色を行った。肥満細胞はトルイジンブルー染色、マクロファージは抗マウスマクロファージ抗体(F4/80, clone A3-1, ACM, UK)を用いた免疫染色を行った。

C. 研究結果

1)コラーゲン量

Sirius redF3BAを用いて測定した肉芽組織中のコラーゲン量は、TGF- β 単独投与では、4日目に最も増加し8日目には減少した。TGF- β 、CTGF連続投与では、8日目に著明にコラーゲン量が増加していた(図1)。これらの結果は、組織学的所見とほぼ一致した。

また、real-timePCRで測定した肉芽組織中のCOL1A2 mRNA発現量は、TGF- β 単独投与では4日目に最も増加し、8日目には減少した。それに対し、TGF- β /CTGF連続投与では、8日目にCOL1A2 mRNA発現量は増加していた(図2)。

これより、CTGFはTGF- β により誘導されたコラーゲン産生をin vivoで亢進することが示された。

2)コラーゲン遺伝子の転写活性

2、4、6、8日目に肉芽組織を採取しルシフェラーゼ活性を経時的に測定すると、TGF- β 単独投与では4日目にピークを示した。単独投与では、8日目にほぼ0となったのに対し、TGF- β /CTGF連続投与では、ルシフェラーゼ活性は8日目にも高値を維持した(図3)。すなわち、I型コラーゲン遺伝子の転写活性は、CTGFの投与により維持されたと考えられた。

肉芽組織の凍結切片を用いてX-gal染色によるLacZの検出を行い、陽性細胞数を400倍の視野で計測した。TGF- β 3日間投与群に比べ、TGF- β /CTGF連続投与群のX-gal陽性細胞数は有意に高値を示した(図4)。すなわち、CTGFによる線維化には、コラーゲン遺伝子が転写されている線維芽細胞の増加が関与していると考えられた。

3)浸潤細胞数の計測

トルイジンブルー染色にて肥満細胞数を計測すると、TGF- β 3日間投与群で有意に肥満細胞数が増加していた。8日目の肥満細胞数はTGF- β 群がほぼ0になったのに対し、TGF- β /CTGF連続投与群では増加していた(図5)。

F4/80抗体を用いた免疫染色にてマクロファージ数を計測したところ、TGF- β /CTGF連続投与群でマクロファージ数は有意に増加していた(図6)。

これより、肥満細胞やマクロファージの増加は、CTGFによる線維化に何らかの関連があると考えられた。

D. 考察

以前、我々は、TGF- β 単独投与により一過性の肉芽組織が誘導され、TGF- β にひき続き CTGF を投与すると肉芽組織は消失せずに線維化組織が形成されることを組織学的に示した。

今回の検討では、以前我々が作製した皮膚線維化モデルマウスにおける、TGF- β や CTGF 単独投与と TGF- β /CTGF 連続投与のコラーゲン量や COL1A2 の mRNA 発現量は組織学的所見と一致するものであった。つまり、TGF- β は、コラーゲン産生を一過性に誘導する作用があり、CTGF は誘導する作用は少ないが、誘導されたコラーゲン産生を亢進させる作用があると考えられた。

COL1A2 の転写活性は、TGF- β 単独投与では 4 日目をピークに低下し、8 日目にはほぼ 0 となるのに対し、TGF- β /CTGF 連続投与では高値が維持された。さらに、連続投与の 8 日目では COL1A2 遺伝子を発現する線維芽細胞数の増加を認め、CTGF は線維芽細胞数の増加により COL1A2 の転写活性を維持し、コラーゲン産生を亢進させると考えられた。

以上より、TGF- β が線維化を誘導し、CTGF が線維化を維持すると考えられたが、この線維化の機序をさらに検討するために浸潤細胞についての検討を行った。

これまで、肥満細胞やマクロファージが線維化組織で増加していることが報告されていること^{9,10}から、我々は組織染色によりこれらの細胞の検討を行った。TGF- β /CTGF 連続投与で、肥満細胞、マクロファージともに増加しており、CTGF による線維化の維持に関与していると考えられた。これらの細胞は様々なサイトカインやケモカイン

を放出することから、今後はこの皮膚線維化モデルにおいて、サイトカインやケモカインについてもさらに検討する必要があると思われた。

E. 結論

以上、皮膚線維化モデルマウスにおける実験結果より、我々は図 7 に示す強皮症における二段階線維化仮説を考えた。TGF- β は線維化を誘導し CTGF の産生を刺激する。正常部では、CTGF や炎症細胞は消失し線維化も消失するが、強皮症の皮膚硬化部では、CTGF の産生が増加し、線維芽細胞の増加、コラーゲン産生の促進により線維化は維持され、その過程に肥満細胞やマクロファージが関与していると考えられた。

F. 文献

1. Jimenez SA, Hitraya E, Varga J: Pathogenesis of scleroderma. *Collagen. Rheum Dis Clin North Am* 22:647-74, 1996
2. LeRoy EC, Smith EA, Kahaleh MB, Trojanowska M, Silver RM: A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. Is transforming growth factor beta the answer? *Arthritis Rheum* 32:817-25, 1989
3. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR: Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4:637-45, 1993
4. Takehara K: Growth regulation of skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 24 Suppl 1: S70-7, 2000
5. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn