

図1. FKBP38 と EBPI1 の結合能

正常線維芽細胞に pcDNA4 ベクターを用いて、FKBP38 あるいは IL-1 α を遺伝子導入した。この時、N 末に、Xpress のタグが付くように作成されている。遺伝子導入線維芽細胞の細胞内抽出液を回収し、抗 EBPI1 抗体にて免疫沈降を行った。その後、抗 Xpress 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

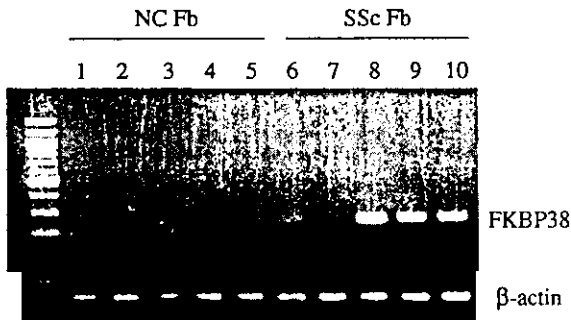


図2. FKBP38 の mRNA の解析

レーン 1-5 は、正常線維芽細胞、レーン 6、7 は、IL-1 α の産生がみられない強皮症線維芽細胞、レーン 8-9 は、IL-1 α の発現している強皮症線維芽細胞。

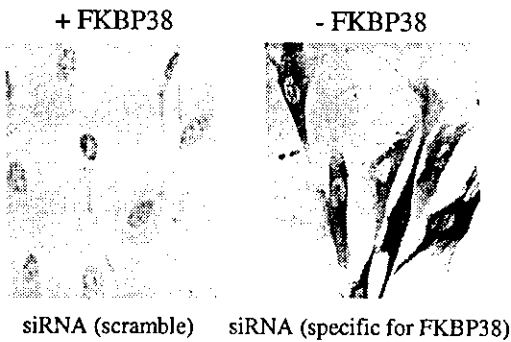


図3. FKBP38 抑制強皮症線維芽細胞での EBPI1 の細胞内局在

強皮症線維芽細胞にて、siRNA 法を用いて、FKBP38 を抑制した。その結果、抗 EBPI1 抗体を用いた免疫染色法にて、核内に集積していた EBPI1 は、細胞内にもみ認められるようになった。

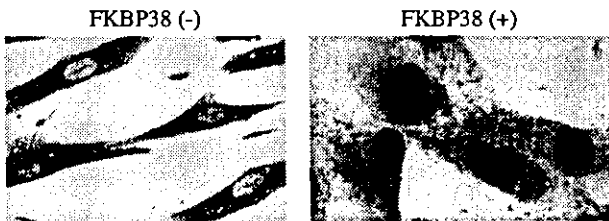


図4. FKBP38 導入正常線維芽細胞での EBPI1 の細胞内局在

正常線維芽細胞に、FKBP38 を組み込んだ pcDNA4 を用いて、FKBP38 の強制発現細胞を作成した。その結果、抗 EBPI1 抗体を用いた免疫染色法にて、EBPI1 の核内移行が確認された。

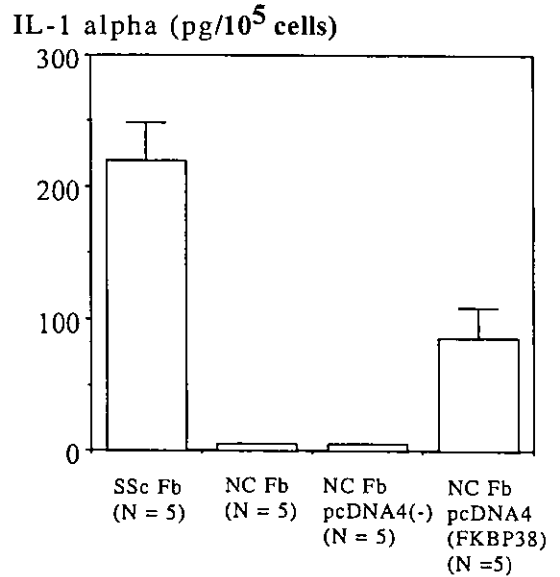


図5. 線維芽細胞内 IL-1 α の産生量

強皮症(SSc)および正常(NC)線維芽細胞(Fb)をもちいて、10%FBS 加 DMEM 培地で、継代後、48時間培養した細胞内 IL-1 α 量を、ELISA (R & D) にて測定した。

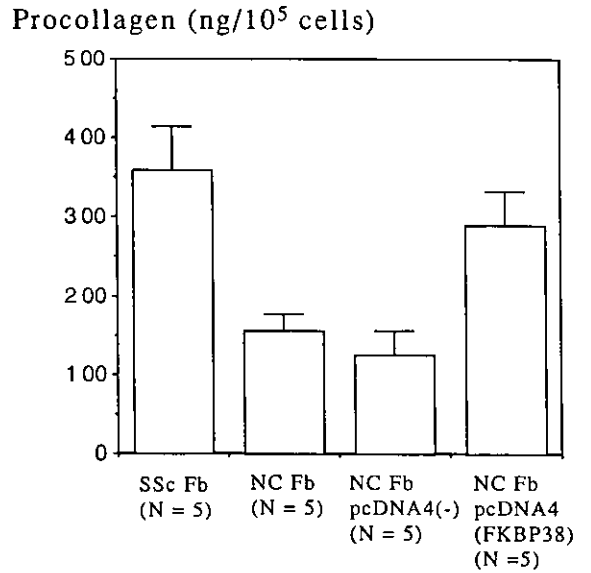


図6. 培養上清中プロコラーゲンの産生量

強皮症(SSc)および正常(NC)線維芽細胞(Fb)をもちいて、10%FBS 加 DMEM 培地で、継代後、72時間培養した上清中プロコラーゲン量を、ELISA (Takara) にて測定した。

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

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
協力者 早川郁子 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

全身性強皮症では線維化に対する自己抗体の役割は不明である。今回、我々は全身性強皮症患者血清中に、コラーゲン分解に関与する matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) に対する自己抗体を見出した。抗 MMP-1 抗体は皮膚硬化、肺線維症、腎の血管抵抗の程度とそれぞれ関連した。さらに抗 MMP-1 抗体は MMP-1 の酵素活性を阻害した。以上より、抗 MMP-1 抗体は MMP-1 の活性を阻害することによって、線維化の進展に関与する自己抗体である可能性が示された。

A. 研究目的

組織における、コラーゲンなどの細胞外基質の量は、細胞外基質の合成と分解との間のバランスによって決定される。分解の過程は matrix metalloproteinase (MMP) と呼ばれる分解酵素によって制御されることが明らかとなっている¹。これら MMP の活性はさらに tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) によって抑制され、MMP と TIMP の間の活性レベルのバランスによって細胞外基質の適切な量が維持されていると考えられている。

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) の皮膚では 1 型および 3 型コラーゲンの増加が認められ²、その原因として SSc 由来線維芽細胞では MMP-1 の活性が低下していること³、

さらに、TIMP-1, 2, 3 の発現が亢進していることが過去に報告され^{4,5}、MMP-1 や TIMP の活性制御が SSc の病態に関与していることが示唆されている。

SSc は全身性自己免疫を特徴とする疾患であるが、抗セントロメア抗体や抗トポイソメラーゼ I 抗体といった SSc 特異的な自己抗体と線維化との関連性は全く不明といわざるを得ない。そこで、全身性自己免疫と線維化を結びつけるために、SSc では MMP-1 に対する自己抗体が産生され、この自己抗体が MMP-1 のコラーゲン分解酵素としての活性を抑制することによって、コラーゲン分解が低下し、その結果コラーゲンの異常な蓄積が生じるという仮説を想定した。今回の検討で

はこの仮説を検証した。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は SSc 57 例（女性 51 例、男性 6 例）であり、年齢は 44 ± 16 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (ISSc) が 33 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 24 例であった。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 23 例、抗セントロメア抗体陽性例が 24 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 3 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 1 例、抗 U3RNP 抗体が 1 例、残り 5 例は抗核抗体は陽性であったが、特異抗体は検出されなかった。

2) ELISA

MMP-1 に対する自己抗体は ELISA 法にて検出した。96 穴のマイクロタイタープレートを $1 \mu\text{g/ml}$ のヒトレコンビナント MMP-1 (Techne Corp., Minneapolis, MN) でコートし、2%のウシ血清アルブミンと 1%のゼラチンにてブロッキングした後、100 倍に希釈した血清と室温で、90 分間反応させた。検出にはアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgM あるいは IgG 抗体を用いた。自己抗体の相対レベルを患者血清と健常人血清の間で直接比較する目的で、それぞれプールした血清を log インターバルで希釈し ($1:10-1:10^5$)、吸光度に対して希釈度数 (log スケール) をプロットすることによって、自己抗体の相対レベルを測定した。最大吸光度の 50%となる血清の希釈度数を求め、これを仮の U/ml とした。

3) 免疫ブロット法

ヒトレコンビナント MMP-1 ($0.1 \mu\text{g/レーン}$) を 10-20%グラジエントゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は 50 倍に希釈した血清と一晚反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いて発色させた。

4) MMP-1 コラゲナーゼ活性の測定

ヒト protein G を表面に結合させたマグネット・ビーズを用いて、血清から IgG を分離精製した。MMP-1 コラゲナーゼ活性はキット (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) を用いて測定した。*P*-aminophenylmercuric acetate によって活性化させた MMP-1 4.5 ng と、 $40 \mu\text{g}$ の精製 IgG とを 20 分間、室温で反応させた。MMP-1 の酵素活性はビオチン化されたウシコラーゲンを基質として用いて測定した。MMP-1 によって分解されたコラーゲン断片はビオチン結合性 96 穴マイクロタイタープレートに移し、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体によって検出した。

C. 研究結果

1) ELISA による抗 MMP-1 抗体

MMP-1 に対する自己抗体のレベルは、ヒトレコンビナント MMP-1 を抗原に用いた ELISA によって測定した (図 1)。dSSc における IgG 型抗 MMP-1 抗体価は、ISSc、SLE、皮膚筋炎、健常人と比較して有意に高値であった。ISSc でも、dSSc ほどではないものの、抗体価は健常人と比較して有意に高値であった。一方、IgM 型抗 MMP-1 抗体は ISSc では健常人と比較して有意差は認められなかった

が、dSSc では有意に高値を示した。このように、SSc、特に dSSc で抗 MMP-1 抗体価が上昇していた。

ELISA による IgG 型抗 MMP-1 抗体の陽性率を、健常人の平均値+2SD をカット・オフ値として算出した (表 1)。抗 MMP-1 抗体は dSSc で 75%に検出されたが、ISSc では 15%と低率であった。SLE、皮膚筋炎、健常人では数%の陽性率であった。

2) 抗 MMP-1 抗体と臨床症状との相関

次に臨床症状との相関を検討した (図 2)。IgG 型抗 MMP-1 抗体価は modified Rodnan total skin thickness score と正の相関を示した。腎臓間動脈の血管抵抗の指標である、腎ドプラー・エコー法による pulsatility index 値も抗 MMP-1 抗体価と正の相関が認められた。さらに、肺線維症の重症度を表す%DLco および%VC とは負の相関が認められた。従って、IgG 型抗 MMP-1 抗体は皮膚硬化、血管抵抗、肺線維症の程度と直接相関していることが明らかとなった。

3) 免疫プロット法による抗 MMP-1 抗体の検出

抗 MMP-1 抗体の存在を確認するため、ヒトレコンビナント MMP-1 を抗原に用いた免疫プロット法を行った (図 3)。金コロイドによる蛋白染色では、約 52kDa の MMP-1 によるバンドが認められた (レーン 1)。ELISA にて抗 MMP-1 抗体が陽性であった SSc 血清は、すべて MMP-1 との反応性が観察された (レーン 2-4)。ELISA にて抗 MMP-1 抗体が陰性であったが、抗トポイソメラーゼ I 抗体が陽性であった SSc 血清では、MMP-1 と

の反応性は認められなかった (レーン 5)。健常人血清では、MMP-1 のバンドはみられなかった (レーン 6)。このように、SSc における抗 MMP-1 抗体の存在は免疫プロット法にて確認された。

4) 抗 MMP-1 抗体による MMP-1 酵素活性の抑制

抗 MMP-1 抗体が MMP-1 のコラゲナーゼ活性を抑制するかどうかを検討した (図 4)。患者血清より IgG を分離して、それを MMP-1 と反応させた後、MMP-1 の活性をビオチン化したコラーゲンを基質として測定した。健常人血清では MMP-1 活性の抑制は認められなかったが、SSc 患者血清は有意に MMP-1 活性を抑制した。ELISA にて抗 MMP-1 抗体が陰性であり、抗トポイソメラーゼ I 抗体など他の自己抗体が陽性であった SSc 血清では MMP-1 活性の抑制は認められなかったことから、この抑制は抗 MMP-1 抗体以外の他の自己抗体によるものではないと考えられた。このように、SSc 由来の抗 MMP-1 抗体は、実際に MMP-1 の酵素活性を抑制することが示された。

D. 考 案

今回の検討では、ELISA で IgG 型抗 MMP-1 抗体は SSc、特に dSSc で有意に高値であり、皮膚、肺、血管の線維化の程度と相関していた。さらに、抗 MMP-1 抗体は SLE や皮膚筋炎には検出されなかったことから、SSc に特異的であると考えられた。IgG 型抗 MMP-1 抗体の存在は免疫プロット法にて確認された。また、IgG 型抗 MMP-1 抗体は MMP-1 の

コラゲナーゼ活性を抑制した。以上より、抗 MMP-1 抗体は MMP-1 のコラゲナーゼ活性を抑制し、細胞外基質のターン・オーバーを減少させることによって、線維化の進展に寄与している可能性が示唆された。

抗核抗体は SSc の 90%以上の患者で検出されることから、自己抗体の存在は SSc の大きな特徴の一つである。加えて、抗トポイソメラーゼ I 抗体力価が SSc の疾患活動性や重症度と相関することも報告されている⁶。しかしながら、SSc における自己抗原は一般的に細胞分裂に必須の核内成分であり、これら自己抗原に対する抗体は SSc の組織障害に関与していないと考えられていることから、全身性自己免疫と、皮膚硬化や内臓の線維化といった SSc の病態との関連性については不明である。今回の検討では全身性自己免疫は抗 MMP-1 抗体産生を介して線維化の進展と関連することが示唆された。同様に、疾患の発病において病原性自己抗体が重要な役割を担っていることが、全身性自己免疫のマウスモデルで明らかにされてきた。つまり、ヒト関節リウマチのモデルである、K/BxN マウス由来の自己抗体を健常マウスに投与するだけで、関節炎を誘導しうることが報告された⁷。さらに、我々は最近ヒト SSc のモデルである tight-skin マウスで、自己抗体を除去すると、皮膚硬化も減弱することを見出した⁸。このように、本研究により抗 MMP-1 抗体は、SSc の発症における全身性自己免疫の役割を理解するための鍵となる可能性が示された。

E. 結 論

SSc で産生される、抗 MMP-1 抗体は MMP-1 の酵素活性を阻害したことから、実際に MMP-1 を抑制し、コラーゲン分解が低下した結果、組織にコラーゲンの異常沈着がおこる可能性が示唆された。このように、抗 MMP-1 抗体の存在は従来不明であった全身性自己免疫と線維化を結びつけるモデルとなりうる可能性があり、今後同様の視点からの研究が期待される。

F. 文 献

1. Nagase H, Woessner JF, Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999, 274:21491-21494
2. Jimenez SA, Hitraya E, Varga J: Pathogenesis of scleroderma: collagen. *Rheum Dis Clin Nor Am* 1996, 22:647-674
3. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y: Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994, 103:359-363
4. Kikuchi K, Kadono T, Furue M, Tamaki K: Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997, 108:281-284
5. Mattila L, Airola K, Ahonen M, Hietarinta M, Black C, Saarialho-Kere U, Kahari VM: Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998, 110:416-421

6. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K: Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels by ELISA in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2001, 40:1135-1140
7. Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, Maurice M, Simmons B, Brenner M, Mathis D, Benoist C: How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* 2002, 3:360-365
8. 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

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*, in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 1. ELISA による抗 MMP-1 抗体の頻度

	Anti-MMP-1 Ab		
	IgG	IgM	IgG or IgM
SSc (n=57)	23 (40)	13 (23)	28 (49)
ISSc (n=33)	5 (15)	6 (18)	10 (30)
dSSc (n=24)	18 (75)	7 (29)	18 (75)
SLE (n=19)	1 (5)	2 (11)	3 (16)
DM (n=16)	1 (5)	1 (6)	2 (13)
Normal (n=30)	1 (3)	0	1 (3)

数値は陽性数 (%) を表す。

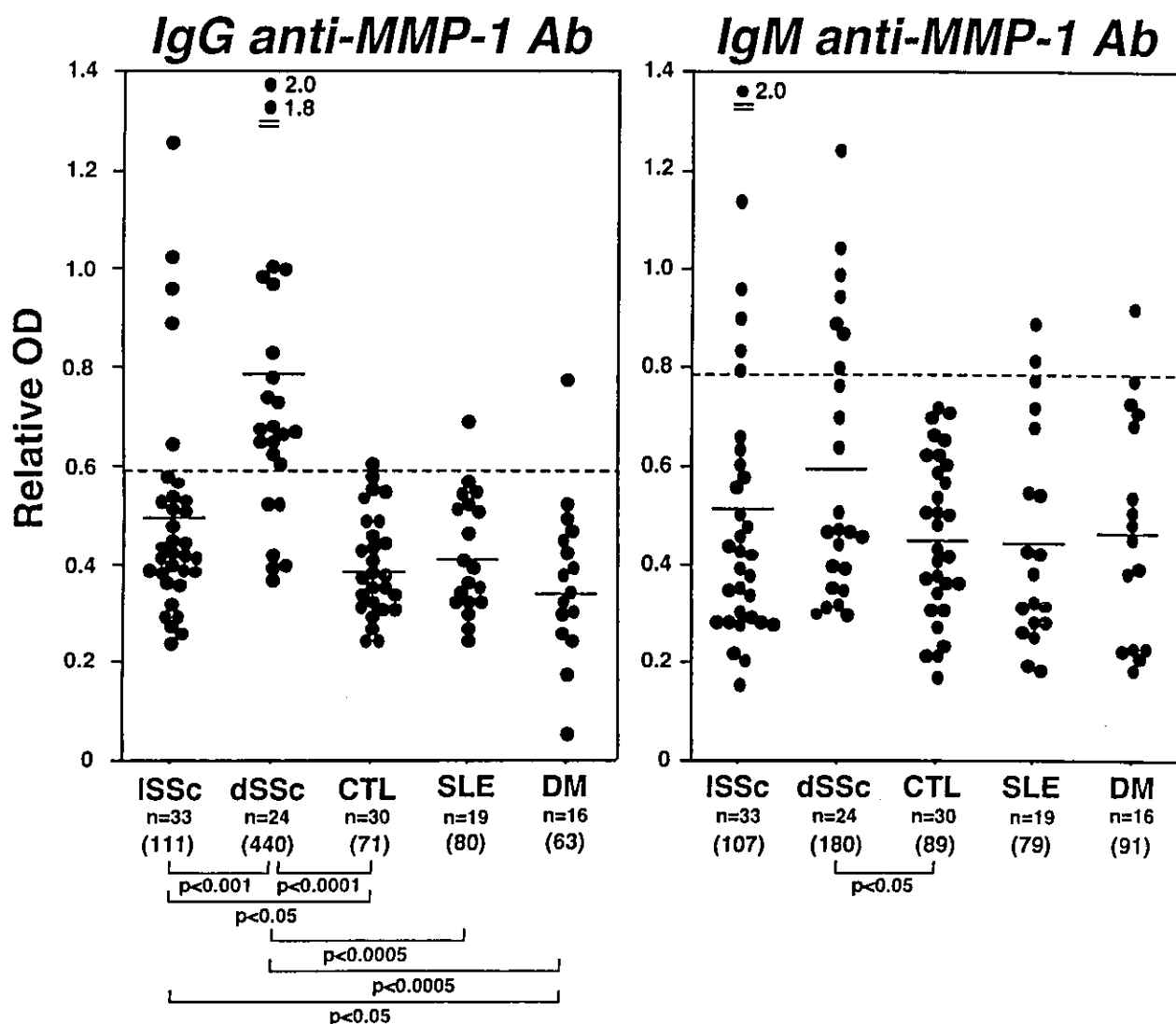


図 1 : ELISA による抗 MMP-1 抗体の力価。波線は健常人の平均値+2SD のカット・オフ値を示す。括弧にくくった数字は ELISA にて最大吸光度の 50% を示す、プールした血清の希釈度数 (仮の U/ml) を表し、患者と健常人の抗体価を直接の比較するために測定した。

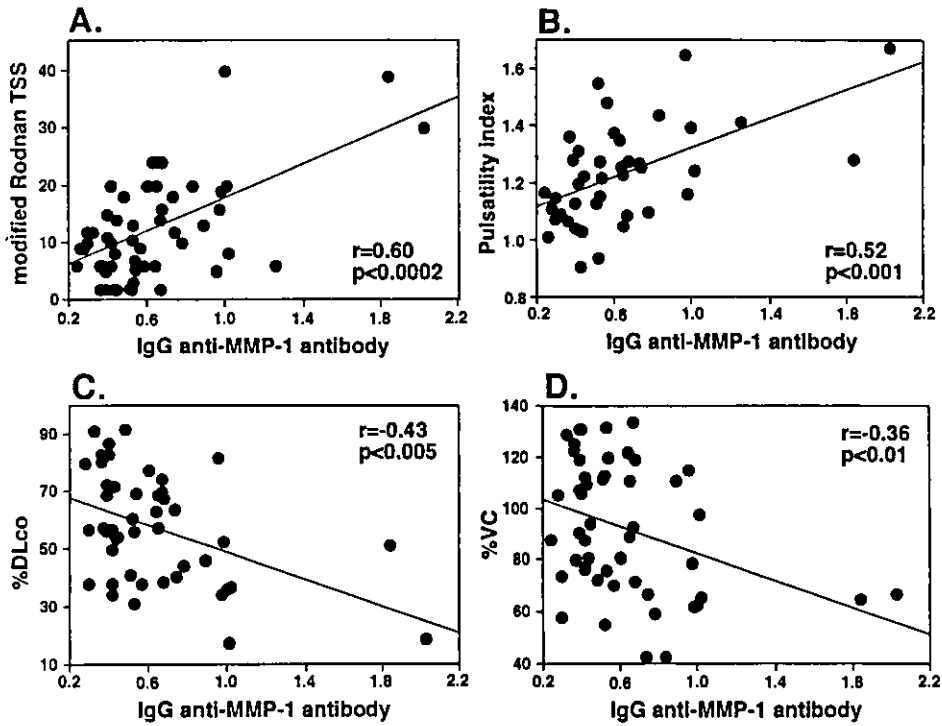


図 2 : IgG 型抗 MMP-1 抗体と皮膚 (A)、腎血管 (B)、肺 (C、D) の線維化の程度との相関。

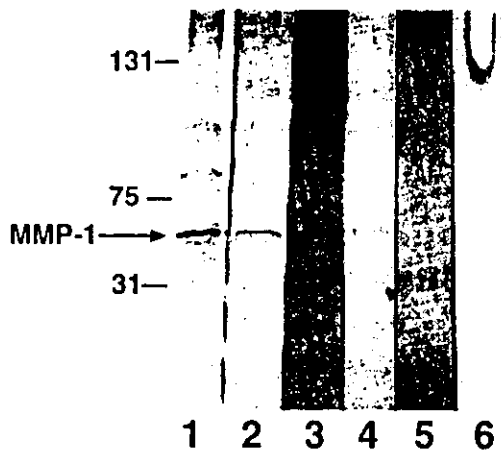


図 3:免疫ブロット法による IgG 型抗 MMP-1 抗体の検出。レーン1は金コロイド染色による MMP-1、レーン 2-4 は ELISAにてIgG型抗MMP-1抗体が陽性であった SSc 患者血清、レーン 5 は ELISAにてIgG型抗MMP-1抗体が陰性であるも、抗トポイソメラーゼ I抗体は陽性であった SSc 患者血清、レーン 6 は健康人由来血清。

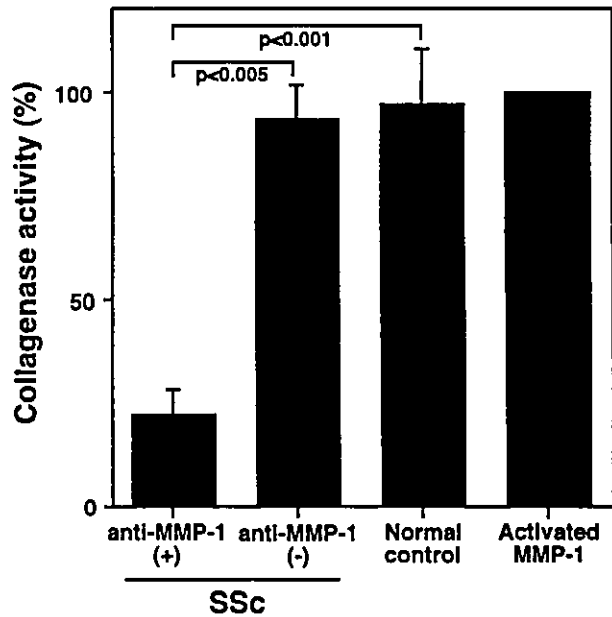


図 4: 抗 MMP-1 抗体による、MMP-1 コラゲナーゼ活性の抑制。

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抗 MMP-3 抗体

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 皮膚病態学分野教授
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
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
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

ヒト組み換え MMP-3 を抗原として用いた ELISA 法では IgG 型抗 MMP-3 抗体は、SSc 患者で有意に高値を示したが、SLE 患者および DM 患者では高値を示さなかった。また、IgG 型抗 MMP-3 抗体および IgM 型抗 MMP-3 抗体は dSSc で ISSc に比較して有意に高値であった。IgG 型あるいは IgM 型抗 MMP-3 抗体は SSc 患者の 52% で陽性であり、病型別には、dSSc 患者では 71% に陽性、ISSc 患者では 33% に陽性であった。その他、SLE では 23%、DM では 21%、健常人では 8% に陽性であった。また、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、皮膚・肺・腎臓の血管における線維化の程度と、IgM 型抗 MMP-3 抗体価は皮膚硬化の程度と相関した。IgG 型抗 MMP-3 抗体が検出された患者血清を用いて、MMP-3 を抗原とした免疫ブロット法を施行し、抗 MMP-3 抗体の存在が確認された。また、IgG 型が陽性をした SSc 患者血清から抽出した IgG は、MMP-3 活性を阻害した。RT-PCR 法で、SSc 患者皮膚における MMP-3 の発現を測定したが、陽性率および発現量とも、健常人、抗 MMP-3 抗体陽性 SSc 患者、抗 MMP-3 抗体陰性 SSc 患者で有意差を認めなかった。以上により、抗 MMP-3 抗体が MMP-3 活性を阻害することによって ECM のターンオーバーが減少し、線維化に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症(SSc)は、皮膚、肺臓、腎臓、食道、心臓など多臓器に線維化を来す、自己免疫疾患である。SSc では、I 型 III 型コラーゲンを中心とした細胞質外マトリックス(extracellular matrix: ECM)の過剰集積が認められる(1-3)。V 型 VI 型 VII 型コラーゲン、

フィブロネクチン、グルコサミノグリカン、デコリンの発現が、SSc の組織中あるいは培養線維芽細胞で発現が亢進していることも報告されている(4-6)。マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metallo proteinase:MMP)は Zn を活性部位にもつエンドペプチダーゼであり、細胞質外

マトリックス(extracellular matrix:ECM)の分解に中心的役割を担っている。MMP-1 は I,II,III,VII,VIII,X,XI 型コラーゲンのほかフィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ピトロネクチンを分解する。MMP-3 (ストロメライシン-1) は、III,IV,V,VII,IX 型コラーゲン、デコリン、エラスチン、フィブリリン、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ピトロネクチン、オステオネクチン、pro-MMP-1, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13 を含む、さらに広範囲の基質を分解することができる(8)。MMP-3 は線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージに発現している。MMP は生成された後細胞内から細胞質外へプロエンザイムとして分泌され、プラスミンなどのプロテアーゼにより分解されて活性型に変換される(8)。MMP の活性は、TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinases)により特異的に 1:1 で結合して阻害される(9)。MMP の不活化が SSc において重要な役割を担っている可能性がある(10)。

自己免疫は SSc の中心的特徴のひとつであり、90%以上の SSc 患者に自己抗体が検出される(11)。自己抗体の病因への関与は不明であるが、自己抗体と組織障害の関連は指摘されてきている。すなわち、抗 topoisomerase-I 抗体の抗体価は、SSc の病勢や活動性と相関することが報告されている(12)。さらに、SSc モデルマウスであるタイトスキムマウスでは、自己抗体産生の除去により、皮膚の線維化抑制が認められた(13)。

また、SSc 患者に抗 MMP-1 抗体が検出され、当抗体は MMP-1 の酵素活性を阻害したことを報告した(10)。しかし、V 型コラーゲン、デコリン、オステオネクチン、エラスチン、フィブリリンのような、SSc に関連した線維化に必要な ECM は、MMP-3 では分解されるが、MMP-1 では分解されない。そこで、MMP-3 に対する自己抗体が産生されている可能性があるという仮説を立て、抗 MMP-3 抗体の陽性率および抗体価について、臨床症状との相関、抗体の機能について評価した。

B.研究方法

1) 対象患者

対象患者は ACR の診断基準(14)を満たす SSc 58 例(女性 54 例、男性 4 例)であり、年齢は 51 ± 15 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 30 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 28 例(15)であった。lSSc と dSSc の罹病期間はそれぞれ 9.7 ± 10.0 年、 5.2 ± 6.8 であった。初診時ステロイド、D-ペニシラミン、他の免疫抑制剤にて治療されていた患者は除外した。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 24 例、抗セントロメア抗体陽性例が 24 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 4 例、抗 Th/To 抗体陽性例が 2 例、抗核抗体陽性であるものの対応抗原不明が 4 例であった。ACR 診断基準(16)を満たす SLE 患者のうち SLEDA(17)により活動性ありとした 22 例、Bohan&Peter 診断基準(18,19)を満たす皮膚筋炎(DM)患者および 24 例の健常人をコントロールとして用いた。

2) ELISA

血清中抗 MMP-3 抗体は、ELISA 法にて検出した。96 穴のマイクロタイタープレートを $1\mu\text{g/ml}$ のヒトリコンビナント MMP-3 (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN) でコートし、2%のウシ血清アルブミンと 1%のゼラチンにてブロッキングした後、100 倍に希釈した血清と室温で 90 分反応させた。検出にはアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgM あるいは IgG 抗体を用い、吸光度を測定した。

3) 免疫プロット法

ヒトリコンビナント MMP-3 ($0.1\mu\text{g/}$ レーン)を 10-20%グラディエントゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は 50 倍に希釈した血清と一晩反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いて発色させた。

4) MMP-3 活性阻害試験

ヒト protein G を表面に結合させたマグネットビーズを用いて、血清から IgG を分離精製した。MMP-3 活性は、stromelysin (MMP-3) 活性測定キット (ヤガイ) を用いた。60ng の MMP-3 を、 $40\mu\text{g}$ の精製した IgG とを 20°C で 20 分反応させた。MMP-3 の酵素活性は蛍光標識されたアセチルカゼインの、MMP-3 による酵素分解による分解産物量で評価した。

5) RT-PCR による MMP-3 の mRNA 発現量の評価

発症早期の dSSc 患者の皮膚病変部位における、MMP-3 mRNA 発現量を real time RT-PCR 法により調べた。そのうち 5 例は

抗 MMP-3 抗体が陽性であり、5 例は陰性であった。また、健常人 6 例についても

>評価した。前腕伸側より施行した生検組織は生検後即時凍結し、 -80°C で保存した。

凍結組織から mRNA を Quiagen RNeasy spin column (Quiagen Ltd, Crawly, UK) を用いて抽出し、逆転写反応にて cDNA を合成した。ABI プリズム 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) にて real time PCR を施行した。GAPDH を内在遺伝子とし、MMP-3 mRNA の相対量を算出した。

6) 抗 MMP-1 抗体と抗 MMP-3 抗体の交叉反応について

抗 MMP-3 抗体が陽性で、抗 MMP-1 抗体が陰性の患者 5 例の血清 $40\mu\text{l}$ より、IgG を抽出した。同じく、抗 MMP-3 抗体が陰性で抗 MMP-1 抗体が陽性の患者 5 名からも血清 $40\mu\text{l}$ より IgG を抽出した。抽出した IgG は、それぞれ $5\mu\text{g}$ のヒトリコンビナント MMP-1, MMP-3 と 30 分間室温で反応させた。抗 MMP-3 抗体および抗 MMP-1 抗体に価を、ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

1) ELISA による抗 MMP-3 抗体

MMP-3 に対する自己抗体のレベルは、ヒトリコンビナント MMP-3 を抗原に用いた ELISA によって測定した (図 1)。SSc 患者全体では、IgG 型抗 MMP-3 抗体は、SLE 患者 ($P < 0.0005$)、DM 患者 ($P < 0.05$)、健常人 ($P < 0.0001$) と比較して有意に高値を示した。IgM 型抗 MMP-3 抗体は、健常人 ($P = 0.054$) に比較すると高い傾向を示したが

SLE、DM 患者とは有意差を示さなかった。病型別には、dSSc では、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、ISSc ($P < 0.001$)、SLE ($P < 0.0001$)、DM ($P < 0.0001$)、健常人 ($P < 0.0001$)と比較して有意に高値を示した。IgM 型抗 MMP-3 抗体価は、dSSc において ISSc ($P < 0.05$)、健常人 ($P < 0.05$)に比較して有意に高値を示した。ISSc では、健常人 ($P < 0.0001$)、SLE ($P < 0.0001$)に比較して有意に高値を示したが、IgM 型抗 MMP-3 抗体価は高値を示さなかった。IgG 型抗 MMP-3 抗体価と、IgM 型抗 MMP-3 抗体価は、正の相関 ($r=0.288$, $P < 0.005$)を示した。しかし、IgG 型および IgM 型抗 MMP-3 抗体価は、抗トポイソメラーゼ I 抗体価、抗セントロメア抗体価との相関は認められなかった。以上により、IgG 型抗 MMP-3 抗体は、SSc で上昇しており、SLE や DM など他の膠原病では上昇していないことが明らかとなった。

2) 抗 MMP-3 抗体と臨床症状との相関

健常人の吸光度の平均 $+ 2s.d.$ (IgG 型抗 MMP-3 抗体価 0.536、IgM 型抗 MMP-3 抗体価 0.498) を高値とした (図 1)。IgG 型あるいは IgM 型抗 MMP-3 抗体は、SSc 全体の 52% に陽性を示した。また、dSSc の 71%、ISSc 患者の 33% に陽性であった (表 1) 一方、健常人では 2 例のみ (8%) に陽性であった。

抗 MMP-3 抗体価と皮膚硬化、腎血管障害、肺線維症の程度との相関を検討した。IgG 型抗 MMP-3 抗体価 ($P < 0.001$, 図 2a) および IgM 型抗 MMP-3 抗体価 ($P < 0.01$, 図 2b) は、modified Rodnan TSS と正の相関を示した。

同様に、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、ドップラーエコー法による腎血管抵抗の指標である、葉間動脈における pulsatility index 値と正の相関 $P < 0.05$, 図 2c) を示した。さらに、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、%VC 値と負の相関 ($P < 0.05$, 図 2d) を示した。以上により、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、皮膚、肺、腎血管における線維化の程度と相関することが明らかとなった。

3) 免疫プロット法による抗 MMP-1 抗体の検出

抗 MMP-3 抗体の存在を確認するため、ヒトトリコンビナント MMP-3 を抗原に用いた免疫プロット法を行った。(図 3) 金コロイドによる蛋白染色では、約 52kDa の MMP-3 によるバンドが認められた (レーン 1)。ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陽性であった SSc 血清は、すべて MMP-3 との反応性が観察された (レーン 2 - 5)。抗トポイソメラーゼ I 抗体あるいは抗セントロメア抗体が陽性あるが、ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陰性の SSc 血清では、MMP-3 との反応性は認められなかった (レーン 6)。健常人血清では、MMP-3 のバンドは認められなかった。以上により、SSc における抗 MMP-3 抗体の存在は免疫プロット法にても確認された。

4) 抗 MMP-3 抗体による MMP-3 酵素活性の抑制

抗 MMP-3 抗体が、MMP-3 の酵素活性を抑制しうるかそうかを検討した (図 4)。患者血清より IgG を分離して、それを MMP-3

と反応させた後、MMP-3 の活性を、MMP-3 によって分解された基質量を測定することにより測定した。健常人血清では、MMP 活性は抑制されなかった。それに対して、ELISA において IgG 型抗 MMP-3 抗体が陽性の SSc 患者血清は、MMP-3 の活性を 26%と有意に抑制した($P<0.0005$)。ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陰性であり、抗トポイソメラーゼ I 抗体など他の自己抗体が陽性 SSc 血清では、MMP-3 活性の抑制は認められなかったことから、この抑制は抗 MMP-3 抗体以外の自己抗体によるものではないと考えられた。このように、SSc 由来の抗 MMP-3 抗体は、実際に MMP-3 の酵素活性を抑制することが示された。

5) SSc 病変部皮膚における MMP mRNA の発現について

これまでの報告では、早期 SSc 患者の培養線維が細胞は MMP mRNA 発現が亢進していることが報告されている(6)。一方で、他の報告では SSc の皮膚線維芽細胞では、MMP-3 を含むコラゲナーゼ活性が低下しているとも報告されている(20)。そこで、SSc 病変部皮膚における MMP-3 発現を評価するため、RT-PCR によって皮膚の MMP-3 mRNA 発現量を測定した(図 4)。MMP-3 mRNA 量は、抗 MMP-3 抗体陽性の発症早期 dSSc 患者の 40% (2/5) に、抗 MMP-3 抗体陰性の発症早期 dSSc 患者の 40%(2/5) に認められた。同様の結果 50%(3/6)は、健常人皮膚においても認められた。さらに、MMP-3 mRNA 発現量は、dSSc 病変部皮膚 (6.7 ± 14.5)と健常人皮膚(30.5 ± 46.9)の間に

有意差は認められなかった。また、発症早期 dSSc 患者皮膚においては、抗 MMP-3 抗体が陽性(11.1 ± 20.2)と陰性(2.4 ± 4.2)患者の間に、MMP-3 mRNA 発現量の有意差は認められなかった。よって、抗 MMP-3 抗体の有無にかかわらず、SSc の病変部皮膚の MMP-3 mRNA 発現は、正常であることが明らかとなった。

6) 抗 MMP-3 抗体と抗 MMP-1 抗体の交叉反応について

IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、IgG 型抗 MMP-1 抗体価と正の相関を示した($P<0.001$, 図 6)。同様の相関は、IgM 型抗 MMP-3 抗体価と IgM 型抗 MMP-1 抗体価の間にも認められた($P<0.0001$)。しかし、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、血清から抽出した IgG を MMP-1 と反応させた後(吸光度 0.89 ± 0.27)でも、反応前(0.90 ± 0.19)と比較して有意な低下は認められなかった。また MMP-3 と反応させた後では有意な低下(0.58 ± 0.29)を認めた。同様に、IgG 型抗 MMP-1 抗体価は、IgG を MMP-3 と反応させた後(0.98 ± 0.15)でも、反応前(0.97 ± 0.12)と比較して有意な低下は認められなかった。また MMP-1 と反応させた後では有意な低下(0.59 ± 0.20)を認めた。以上により、抗 MMP-3 抗体と抗 MMP-1 抗体は交叉反応をしないことが明らかになった。

D. 考 案

当研究では、抗 MMP-3 抗体が SSc 患者の約 50%に、特に重症型である dSSc 患者では約 70%に検出された。さらに、IgG 型および IgM 型抗 MMP-3 抗体価は、dSSc で ISSc に比較して高値を示した。また、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、皮膚、肺、腎血管における線維化の程度と相関していた。抗 MMP-3 抗体は免疫ブロット法で確認した。以上により、抗 MMP-3 抗体は、SSc の重症度の指標になる可能性があると考えられる。

SSc で認められる自己抗体の対応抗原は細胞分裂に必須の細胞内分子である。しかも、これらの自己抗体が細胞内に侵入するという根拠はほとんどない。従って、SSc では自己抗体は組織障害を引き起こして病態に直接関与することは考えにくい。我々は抗 MMP-1 抗体が、ECM の分解を減らすことで SSc における ECM 蓄積に関与している可能性を指摘した(10)。しかし、V 型コラーゲン、デコリン、オステオネクチン、エラスチン、フィブリリン増加は、抗 MMP-1 抗体のみでは説明できない。本研究では、SSc 血中の IgG 型抗 MMP-3 抗体は、これらの ECM を分解可能な MMP-3 の酵素活性を阻害することが確認された。抗 MMP-3 抗体価は抗 MMP-1 抗体価と正の相関を示したが、交叉反応は示さなかったことから、抗 MMP-3 抗体と抗 MMP-1 抗体はそれぞれ独立した自己抗体であるといえる。MMP-1 と、MMP-3 は、それぞれ異なる ECM を分解することから、この二つの自己抗体は SSc の線維化に協調して関与している可能性がある。総合的に考え

て、本研究の結果から、抗 MMP-3 抗体は、MMP-3 の MMP-3 の活性を阻害することにより ECM のターンオーバーを減らすことにより線維化に関与している可能性が示唆された。

E. 結 論

本研究により抗 MMP-3 抗体は、SSc の発症における SSc の発症における全身性自己免疫の役割を理解するための鍵となる可能性が示された。

F. 文 献

1. Jimenez SA, Hittaya E, Varga J. Pathogenesis of scleroderma. Collagen. Rheum Dis Clin North Am 1996; 22:647-74.
2. Lovell CR, Nicholls AC, Duance VC, Bailey AJ. Characterization of dermal collagen in systemic sclerosis. Br J Dermatol 1979; 100:359-69.
3. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. J Clin Invest 1974; 54:880-9.
4. Peltonen J, Kahari L, Uitto J, Jimenez SA. Increased expression of type VI collagen genes in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1990;

- 33:1829-35.
5. Xu WD, Leroy EC, Smith EA. Fibronectin release by systemic sclerosis and normal dermal fibroblasts in response to TGF-beta. *J Rheumatol* 1991; 18:241-6.
 6. Kuroda K, Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289:567-72.
 7. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516.
 8. Eeckhout Y, Vaes G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J* 1977; 166:21-31.
 9. Apte SS, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* 1995; 270:14313-8.
 10. Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2003; 120:542-7.
 11. Okano Y. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22:709-35.
 12. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K. Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:1135-40.
 13. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002; 109:1453-62.
 14. 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.
 15. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger Jr TA, Rowell N, Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification,

- subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988; 15:202-5.
16. Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25:1271-7.
17. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH, theCommitteeonPrognosisStudiesin SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. Arthritis Rheum 1992; 35:630-40.
18. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). N Engl J Med 1975; 292:344-8.
19. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). N Engl J Med 1975; 292:403-7.
20. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. J Invest Dermatol 1994; 103:359-63.

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, Komura K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S: Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with

systemic sclerosis. Clin Exp Immunol 138:357-363,2004.

2. 学会発表

Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. 2004 ACR/ARHP annual scientific meeting, San Antonio, Texas. October 16-21, 2004

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Table 1. 膠原病および健常人における抗 MMP-3 抗体陽性率^a.

	Anti-MMP-3 Ab		
	IgG	IgM	IgG or IgM
SSc (n=58)	25 (43)	12 (21)	30 (52)
ISSc (n=30)	8 (27)	2 (7)	10 (33)
dSSc (n=28)	17 (61)	10 (36)	20 (71)
SLE (n=22)	4 (18)	4 (18)	5 (23)
DM (n=14)	2 (14)	2 (14)	3 (21)
Normal (n=24)	2 (8)	0	2 (8)

^a 数値は、ヒトリコンピナント MMP-3 を用いた ELISA 法による、抗 MMP-3 抗体陽性患者数 (%) を示す

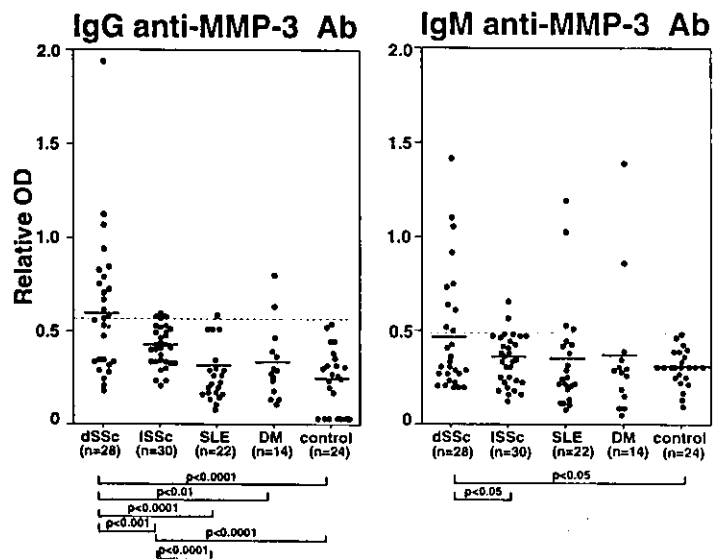


図 1: dSSc, ISSc, SLE, DM, および健常人 (Control) における血清中抗 MMP-3 抗体値。点線は健常人の平均値 + 2SD に設定したカットオフ値を表す。

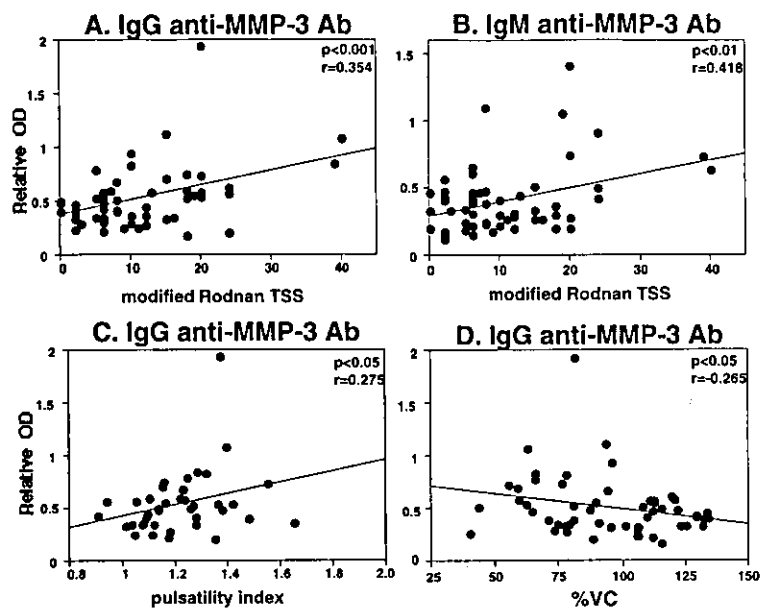


図 2: SSc における、IgG 型(A)および IgM 型(B)抗 MMP-3 抗体価と modified Rodnan total skin thickness score (modified Rodnan TSS) との関連。IgG 型抗 MMP-3 抗体価と Pulsatility index (C), %VC (D) との関連。

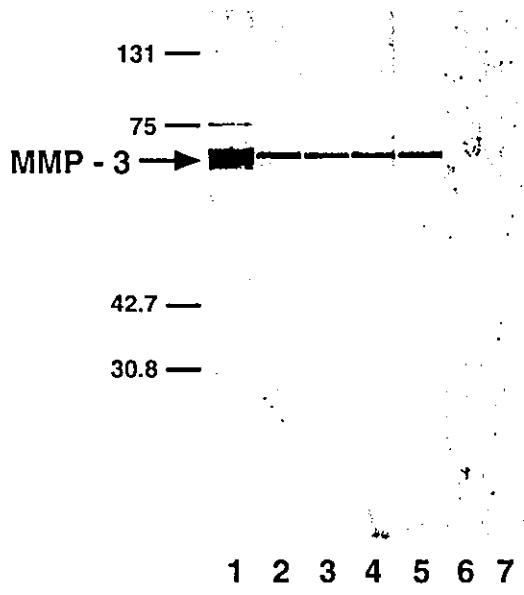


図 3： ヒトリコンピナント MMP-3 を抗原とした免疫プロット法。金コロイドによる MMP-3 によるバンド (レーン1)、ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陽性であった SSc 血清 (レーン2-5)、抗トポイソメラーゼ I 抗体あるいは抗セントロメア抗体が陽性であるが、ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陰性の SSc 血清 (レーン6)、健康人血清 (レーン7)。

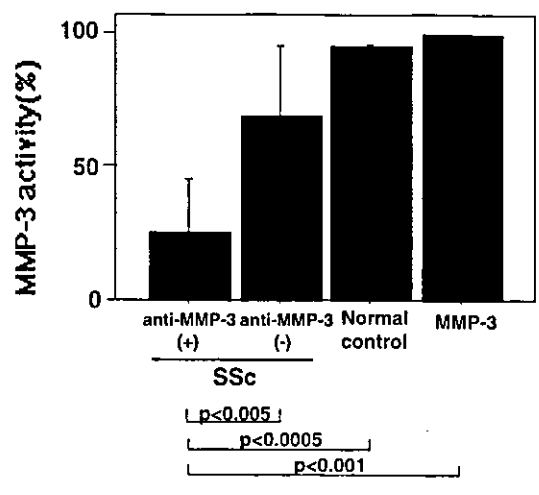


図 4： SSc 患者血清中の抗 MMP-3 抗体による、MMP-3 活性阻害。

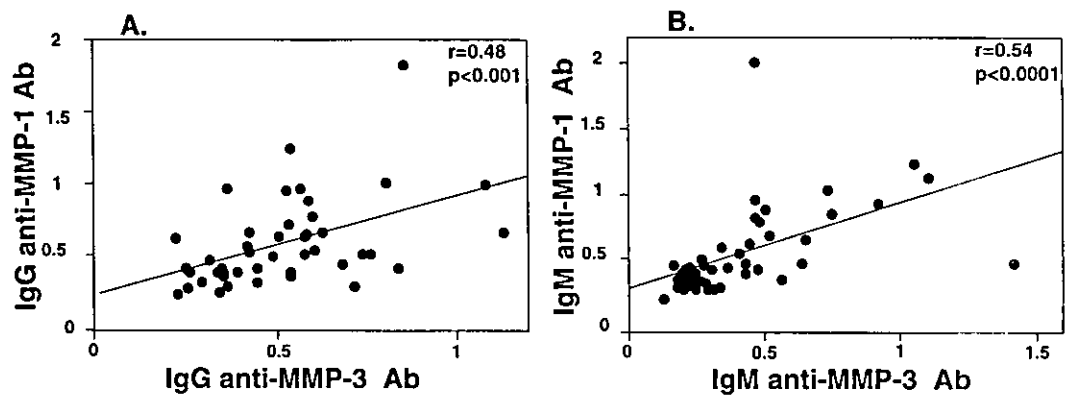


図 5： 病変部皮膚における MMP-3 mRNA の発現。real-time RT-PCR にて MMP-3 mRNA 発現量を評価した。

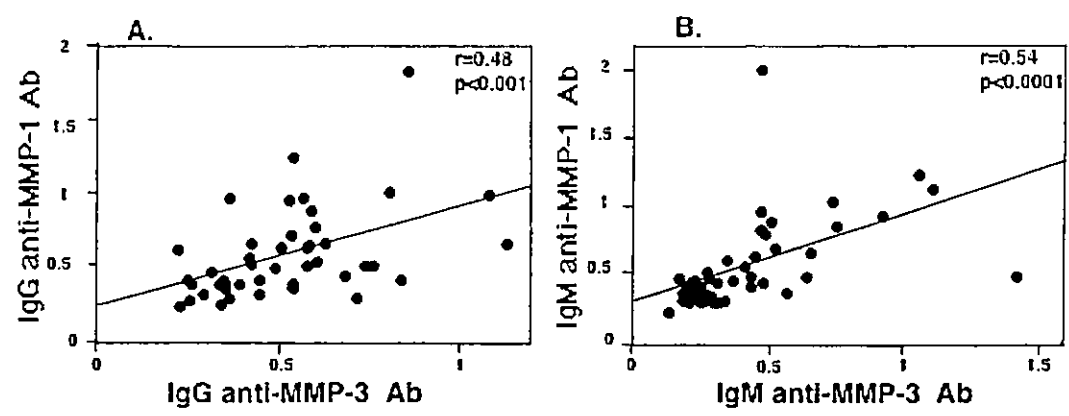


図 6： IgG 型(A)および IgM 型(B)抗 MMP-1 抗体と抗 MMP-3 抗体の相関。抗体価はそれぞれヒトリコンピナント MMP-1, MMP-3 を用いた ELISA 法により測定した。

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

抗 RNA ポリメラーゼ III (RNAPIII) 抗体 ELISA の有用性の検討

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 田中庸子 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所研究員
協力者 岡野 裕 岡野内科医院

研究要旨

抗 RNA ポリメラーゼ (RNAP) I/III 抗体の検出は強皮症の診断や病型分類に有用である。我々は抗 RNAP III 抗体により認識される主要なエピトープ部位をコードするリコンビナント蛋白を用いた酵素免疫測定法 (ELISA) を開発した。本年度は抗 RNAPIII 抗体 ELISA の有用性を検討するため、抗 RNAPI/III 抗体陽性 120 例を含む強皮症 534 例を対象として ELISA により抗 RNAPIII 抗体を測定した。その結果、特異度 99%、感度 91%、陽性適中度 96%、陰性適中度 97%と良好であった。免疫沈降法で抗 RNAPI/III 抗体が陰性の疾患対照 192 例および健常人 48 例における偽陽性率はわずか 1%であった。抗 RNAPI/III 抗体陽性例を ELISA による抗体価が高値と低値の 2 群に分けたところ、高値群は低値群に比べてスキンスコアの最高値が高く、腱摩擦音の陽性頻度が高かった。経時的な抗 RNAPIII 抗体価の検討では、抗体価はスキンスコアと相関し、上昇時期に強皮症腎を併発する傾向が見られた。以上より、我々が開発した ELISA は免疫沈降法に代わる正確な抗 RNAPIII 抗体検出法であり、定量的な結果は疾患重症度や強皮症腎の予測に有用な可能性が示された。

A. 研究目的

強皮症患者血清中にはトポイソメラーゼ I やセントロメアなど重要な生物活性を持つ核蛋白に対する自己抗体が高頻度に検出される。これら自己抗体は強皮症の診断に有用であるのみならず、病型分類や予後の予測にも用いられている¹⁾。我々は 1993 年に複数の RNA ポリメラーゼ (RNAP) を同時に認識する自己抗体が強皮症患者血清中に特異的に検出されることを報告した²⁾。強皮症患者血清中には RNAP I と RNAP III を同時に認識する抗体 (抗 RNAP I/III 抗体) が検出される。抗 RNAP I/III 抗体は強皮症に特異性がきわめて高く、急速に皮膚硬化が進行

する diffuse 型に高頻度に検出される。特に同抗体陽性例は強皮症腎を高率に併発する。強皮症腎は適切な治療が早期に開始されないと腎不全、悪性高血圧を併発して予後が悪い。日本人強皮症患者における抗 RNAP I/III 抗体の陽性頻度は 5%程度と少ないが、欧米の白人強皮症患者での頻度は約 20%と高い³⁾。したがって、抗 RNAP I/III 抗体は強皮症の診断、病型分類、治療方針の決定に際してきわめて有用な自己抗体である。しかし、大量のアイソトープと培養細胞を用いる煩雑な免疫沈降法が唯一の検出法であったため、一般検査室での抗 RNAP I/III 抗体の検出は困難であった。そこで、我々は抗

RNAPI/III 抗体により高頻度に認識されるエピトープを RNAPIII サブユニット上に同定し、同部位を発現するリコンビナント蛋白を抗原とした酵素免疫測定法 (ELISA) を開発した⁴⁾。本研究では様々な民族背景を有する多数の強皮症患者血清を用いて抗 RNAPIII 抗体 ELISA の臨床検査として有用性を検討した。さらに、ELISA による抗体価が抗 RNAPI/III 抗体陽性例の臨床症状と関連するかどうかを調べた。

B. 研究方法

1) 対象

アメリカリウマチ学会による分類予備基準⁵⁾を満たす強皮症患者 534 例を対象とした。265 例は慶應義塾大学、196 例は米国サウスカロライナ大学、73 例は米国ピッツバーグ大学から提供を受けた。慶應義塾大学とピッツバーグ大学の強皮症患者では、臨床症状に関するデータの入手が可能であった。また、対照として全身性エリテマトーデス (SLE) 82 例、多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) 24 例、関節リウマチ (RA) 54 例、原発性シェーグレン症候群 (p-SS) 32 例の疾患対照血清および健常人 48 例の血清を用いた。患者血清の使用については各施設での倫理委員会で承認を受け、文書による同意を得た上で採取した。

1) 抗 RNAPI/III 抗体の同定

患者血清中の抗 RNAPI/III 抗体同定のため、HeLa 細胞の可溶性細胞抽出物を抗原とした蛋白の免疫沈降法を行った²⁾。RNAP I の高分子サブユニット (190-kD と 126-kDa 蛋白) と RNAP III の高分子サブユニット (155-kDa と 138-kDa 蛋白) のすべてを沈降した血清を抗 RNAPI/III 抗体陽性とした。

3) 抗 RNAPIII 抗体 ELISA

ELISA による抗 RNAPIII 抗体の検出は既報に従った⁴⁾。全ての検体は 2 ウェルで測定し、その平均を求めた。抗 RNAP I/III 抗体高力価陽性血清の希釈系列による標準曲線から各検体の吸光度を unit に換算し、4.15 unit をカットオフとした。

1) 統計学的解析

2 群間の頻度および平均値はカイ二乗検定、Student t-test により比較した。

C. 研究結果

1) 強皮症における免疫沈降法と ELISA の比較

免疫沈降法により、強皮症 534 例中 120 例 (22%) で抗 RNAPI/III 抗体が陽性であった。ELISA により測定した抗 RNAPIII 抗体の結果を免疫沈降法と比較すると、特異度 99%、感度 91%、陽性適中度 96%、陰性適中度 97% と良好な結果が得られた (表 1)。

2) 対照疾患における特異度

抗 RNAPIII 抗体 ELISA が強皮症の診断に有用かを検討するため、免疫沈降法で抗 RNAPI/III 抗体が陰性の疾患対照 192 例および健常人 48 例の血清を用いて ELISA を行った。その結果、RA 2 例と p-SS 1 例の計 3 例 (1%) で偽陽性結果が得られた。これら血清の反応はいずれも弱く、カットオフをわずかに越えた値 (<5.0 unit) であった。

3) 抗 RNAPIII 抗体価と臨床症状

抗 RNAPI/III 抗体陽性 90 例を ELISA による抗体価により高値、低値の 2 群に分類した。境界値は抗 RNAPI/III 抗体陽性全例の抗 RNAPIII 抗体価の平均 (15.2 unit) とした。高値群 32 例では低値群 58 例に比べてスキンスコアの最高値が高く (23.8 ± 8.3 vs 18.3 ± 8.5 , $P=0.005$)、腱摩擦音の頻度が高かった (88% vs 53%、