

評価した (図 3)。THT 開始後より、一時的に痛みの強い時もあったが、全体としては痛みの程度は減少していることが分かる。6 月 15 日に Thiersch 植皮術を施行して以降は、さらに痛みが少なくなり 6 月下旬にはほとんどなくなった。処置の際に伴う痛みは、通常の採血時の穿刺の痛みがある他は、ほとんどなかった。また、THT の欠点といわれている悪臭も問題とならなかった。

#### D. 考察

THT では、1 回目の処置で 30%程度の壊死組織の除去が期待でき、6 回～9 回の施行で 75～80%程度の範囲で肉芽増殖が認められるとされている。THT は、安価で、処置時の痛みが少ない優れた方法であるが、従来までの方法では適応となる部位にかなりの制限があった。角田ら<sup>3)</sup>は、糖尿病による足背潰瘍に対して、血液をガーゼに染みこませ湿布のように行うことで問題を解決した。今回われわれが工夫した密封方法は、確実に血液と接触すること、部位を選ばずに行えるようになったという点で非常に優れた方法であると考えられる。

#### E. 文献

- (1) Triquet B. et al: *Dermatology*, 189: 418-420, 1994.
- (2) 山野雅弘、永井 隆: 難治性潰瘍に対する Topical Haemotherapy. *皮膚臨床* 39: 1542-1543, 1997.
- (3) 角田孝彦 ほか: 局所血液滴下療法が

有効であった糖尿病性足背潰瘍の 1 例. *西日皮膚* 66: 5: 435-438.

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
  - 1) 岩山美智子、杉浦一充、室 慶直、富田靖: 難治性潰瘍に対する Topical Hemotherapy の工夫とその効果. 第 255 回東海地方会 (名古屋). 2005.12
  - 2) 岩山美智子、杉浦一充、室 慶直、富田靖: 難治性潰瘍に対する Topical Hemotherapy の工夫とその効果. 第 9 回強皮症研究会議合同会議 (東京) 2006.1

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

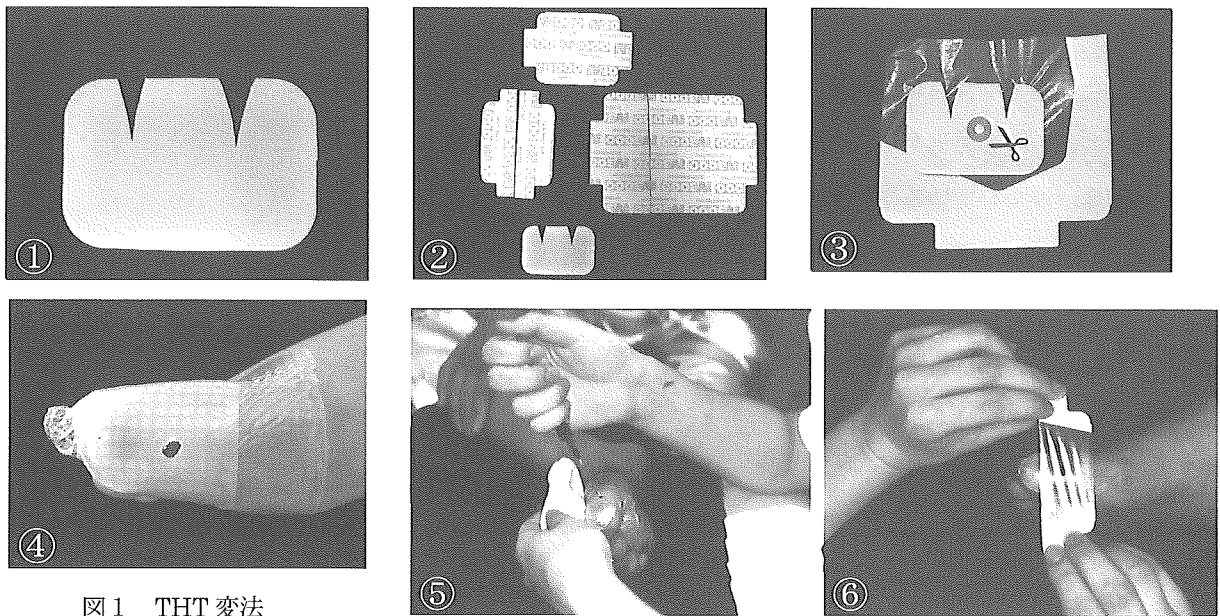


図1 THT 変法

- ①コムフィール®を趾の形に合うようにカットする
- ②テガダーム®を必要な枚数カットする
- ③コムフィール®とテガダーム®を合わせて3mm孔あける
- ④潰瘍面を覆う
- ⑤20G留置針の外筒をつけ3mm孔よりヘパリン化血液を注入する
- ⑥テガダーム®で覆う

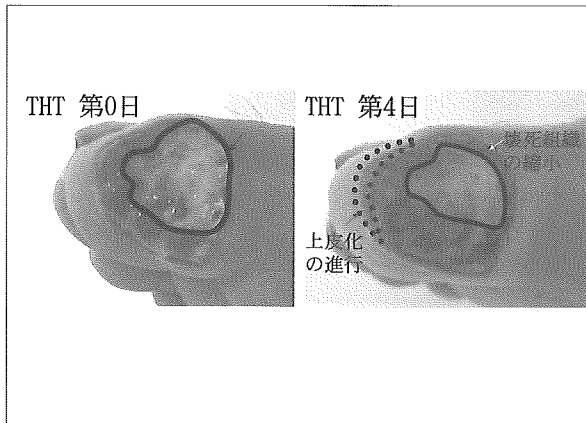


図2 左:THT 第0日 右:THT 第4日

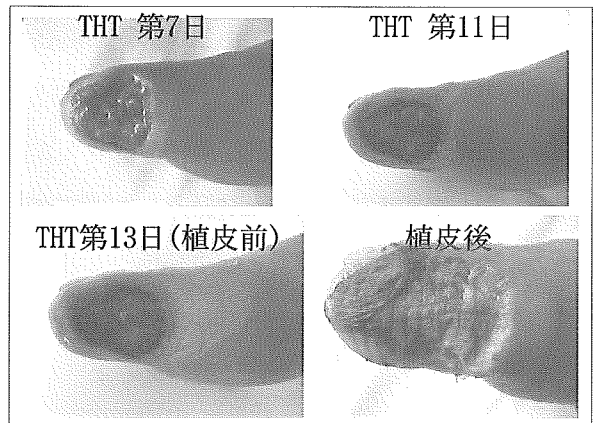


図3 THT 経過

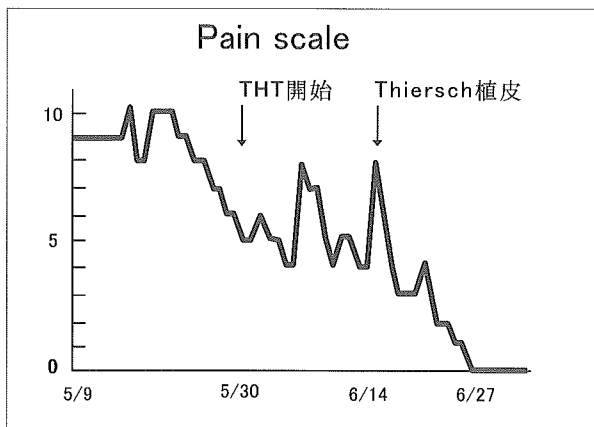


図4 Pain scale (max: 10 min: 0)

厚生労働科学研究費助成金（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指尖潰瘍・壊死（皮膚潰瘍含）の治療経験

研究協力者	佐々木哲雄	国際医療福祉大学熱海病院皮膚科学教授
協力者	池澤善郎	横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学教授
協力者	高橋一夫	横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学準教授
協力者	石ヶ坪良明	横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科学教授
協力者	小林 弘	横浜市立大学医学部病態免疫制御内科学助手
協力者	内田敬久	横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学大学院生
協力者	山口由衣	横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学大学院生
協力者	小野田雅仁	横浜市立大学医学部皮膚科学助手
協力者	近藤 恵	横浜市立大学医学部皮膚科学

平成17年冬期に7例の全身性強皮症における指尖潰瘍・壊死の治療に携わり、通常の局所治療に留まらず、自家骨髄単核球を用いた血管新生療法を3例に試み若干の知見を得た。1) 早期に積極的にデブリドマン (debridement) を試みることの必要性が示唆された。2) 難治例では、積極的に血管造影を施行し血管病変を評価する必要性が示唆された。3) 漫然と局所処置をして時を失ってしまうことなく、血管新生療法を試みた結果、最終的に潰瘍が閉鎖するに至った。潰瘍・壊死に対する一般的な治療指針はなく、各施設の創意工夫でなされているのが現状と推察されるが、十分な局所対応をしても難治な症例は希ながら存在し、そのような症例に対して intensive な治療の一つとして血管新生療法があると位置づけたい。より安価で平易な方法に改良されることが望まれる。

## A. はじめに

全身性強皮症における指尖潰瘍の治療は時に難渋し、疼痛の極めて強い症例にあっては患者のQOLは著しく低下する。指尖潰瘍・壊死（皮膚潰瘍含）は特に冬期に多いが、難治性で1年中治らない例も存在する。重症例では黒色化して壊死となる。指尖壊疽は皮膚硬化の範囲の狭い Limited type においてむしろ多く観察されるため注意を要する。指尖潰瘍・壊疽の治療に対するストラテジーは一定のプロトコールがあるわけではなく、各施設の創意工夫でなされているのが現状と推察される。我々は、指尖潰瘍・壊疽に対しては、早期に積極的にデブリドマンとプロスタンディン製剤の点滴投与の併用にて改善をはかり、通常これら局所・全身治療で軽快しない例では、血管病変

の評価をし、時に血管新生療法を施行することによって、極めて難治な潰瘍・壊死の治療を試みた。計7例の治療経過を通して、若干の知見をまとめてみる。

## B. 対象症例と治療法

今回の対象症例を表1に示す。7例の平均年齢は64歳で全例女性であった。臨床型は1例のみ Diffuse type で6例が Limited type であった。発症からの経過年数は平均15年で、抗核抗体は全例陽性、うち5例が抗セントロメア抗体陽性だった。血管性病変の危険因子としての、喫煙歴は1例で認められ、高血圧3例、糖尿病・高脂血症例は認められなかった。レイノー現象を全例で認めた。

局所処置の実際は、図1に示すように、局麻剤を使用してdigital blockを施行した後、セッシとはさみで鈍的に壊死物質を切除し、消毒洗浄し、ポピオンヨード配合クリーム等で数日感染対策をし、その後アルプロスタジルアルファデクス軟膏やブクラデシンナトリウム軟膏で連日局所処置を施行した。不良壊死物質が残存する場合はデブリドマンを繰り返した。また同時にリポPGE1製剤の静脈内投与を3週間行った。各症例の経過を図2にまとめた。

通常の局所対応でなかなか潰瘍が縮小せず、疼痛の取れない症例に対しては、血管造影を施行し、さらに血管新生療法を試みた。血管新生療法の手順を図3に示した。

症例1では右中指指尖部に強い疼痛を伴う黒色壊死を認める。デブリドマン開始時に黒色壊死下層より排膿を認め、培養ではStenotrophomonas maltophilia 1+が検出された。経過良好で4週ではほぼ略治した。

症例2は、症例1とほぼ同様なケースで3-4週ではほぼ略治した(経過の写真割愛)。

症例3は病変が3指にわたっていた。1回目のデブリドマンで黒色壊死を切除した。この頃には疼痛がかなり軽快した。2回目のデブリドマンで露出した骨をけずり、3回目のデブリドマンで仕上げをした。潰瘍閉鎖まで12週を要した。

症例4は外観上それほど壊死が目立たなかったが、疼痛が著明であった。同様にデブリドマンしたところ爪下に感染を認め、潰瘍化していた。細菌培養ではEnterococcus faecalis 1+、Serratia marcescens 1+、Proteus mirabilis 1+が検出された。

症例5は毎冬、指尖潰瘍を起こしていたが、今回は壊疽化した。2回のデブリドマンとリポPGE1製剤の全身投与を8週続けた(途中2週間休薬)が、潰瘍が残存した。このため血管造影を施行した(図4)。第2指の固有指動脈の途絶を認めた(矢印で示す)。このため、血管新生療法を試みた。するとその後、ゆっくりと上皮化がすすみ、3週間後に潰瘍は閉鎖した(図7)。

症例6は症例1や症例2と同様なケースと思われるが、デブリドマンを1回施行し、3週間で上皮化した。その間、本人の同意が得られたため、血管造影(図5、矢印は壊疽部)および血管新生療法を施行した。移植後に上皮化のスピードが速くなった印象はある。

症例7は右足底の皮膚潰瘍の症例であるが、夏期より生じており、難治と考え入院皮膚科管理の下でデブリドマンと局所の外用処置を施行したが8週間施行しても上皮化しなかった。動脈硬化性の変化も考慮し血管造影を施行した。その結果、腓骨動脈の狭小化、前脛骨動脈・後脛骨動脈の強度狭窄、足背・足底動脈の閉塞の所見が認められた。これらの所見は動脈硬化性より末梢の部位であり、強皮症に起因する変化と判断された(図6)。局所外用処置では治癒は難しいと考え、血管新生療法を施行した。更に16週目に上皮化をみた(図8)。

## C. 考案

強皮症の指尖潰瘍に対する治療ストラテジーは一定した見解がないように思われる。今回の7症例の治療経験から早期デブリドマンの必要性、難治なケースでの血管造影の必要性、血管新生療法の有用性につき、若干の知見を得た。

まず、デブリドマンの時期であるが、数日から数週PGE1製剤を全身投与して、経過をみることもあるかと思われるが、壊死の下層に感染があった例が2例あり、早期に壊死物質を除く必要性を強く感じる。特に臨床的に発赤が明らかでない時にはデブリドマンが遅れがちになることに注意を要する。感染の起因菌は2例のみからでは有意なことは言えないが、弱毒菌であったことも臨床症状が弱かったことと関連するかもしれない。

通常の局所処置ではなかなか上皮化しない例では、末梢血管の途絶が高率に認められた。従来より、強皮症の血管病変は固有指動脈中心におかされると解釈されてきた。しかし、Taylor MHや石川らの報告にもあるように中動脈領域での閉塞例の報告も散見される。このため膠原病における血管

病変は指趾などの小動脈に集中するだけでなく、前腕および下腿などの中動脈にも及んでいることが知られるようになった。今回造影を3例に試みたが、少ないながら固有指動脈や前腕下腿の中動脈の病変が存在し、これまでの報告と一致していた。特に、難治な潰瘍を有する症例では、固有指動脈のほぼ完全な途絶が認められ、いくら時間をかけても上皮化は望めないと考えられる症例を経験した。従来ならば早晩、指切断に追い込まれてしまう症例と思われるが、今回我々は、血管新生療法を施行し、わずかながら新生血管を確認できた。血管新生療法の原理は血液疾患領域におえる自家骨髄移植と同じであるが全麻のリスクや高価であるなどデメリットも少なくない。しかし、世の中の再生医療の流れからみて、一つの治療選択肢になりうると思われる。改善点をあげると、より簡易的に（末梢血でできるなど）、安価に施行できるようになることが望まれる。

## D.文献

- 1) Taylor MH, McFadden JA, Bolster MB, Silver RM. Ulnar artery involvement in systemic sclerosis (scleroderma). J Rheumatol. 29 102-6, 2002
- 2) Keberle M, Tony HP, Jahns R, Hau M, Haerten R, Jenett M. Assessment of microvascular changes in Raynaud's phenomenon and connective tissue disease using colour doppler ultrasound. Rheumatology 39:1206-13, 2000
- 3) 石川治他：皮膚潰瘍を有する全身性強皮症における患肢動脈造影所見、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15年度）241-244、2004

## E.発表

なし

表1、患者背景

症例	年齢・性	臨床型	経過年数	ANA (type)	特異自己抗体	喫煙	高血圧	糖尿病/ 高脂血症	レイノー現象
①	62/F	lcSSc	10	1280(D.Spe)	セントロ7	-	+	-	+
②	53/F	lcSSc	12	40(Spe)	SSA	-	-	-	+
③	76/F	lcSSc	32	1280(Spe)	RNP, SSA	-	+	-	+
④	80/F	lcSSc	8	640(D.Spe)	セントロ7	-	-	-	+
⑤	52/F	dcSSc	18	1280(D.Spe)	セントロ7	-	-	-	+
⑥	50/F	lcSSc	4	640(D.Spe)	セントロ7,SSA+	-	-	-	+
⑦	73/F	lcSSc	21	1280(D.Spe)	セントロ7	-	+	-	+
Ave.	64		15			1/7	3/7	0/7	7/7

図1



図1. 局所処置の実際：局麻剤を使用してdigital blockを施行した後、セッシンとはさみで鈍的に壊死物質を切除する。

図2-a、症例①

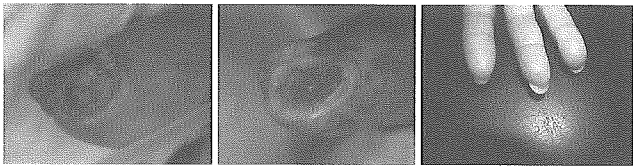
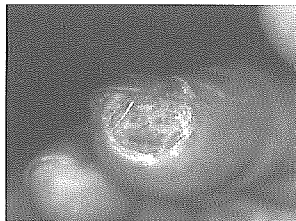


図2-d、症例⑤

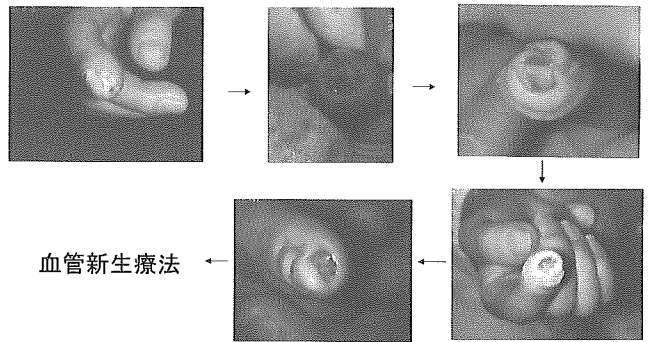


図2-b、症例③

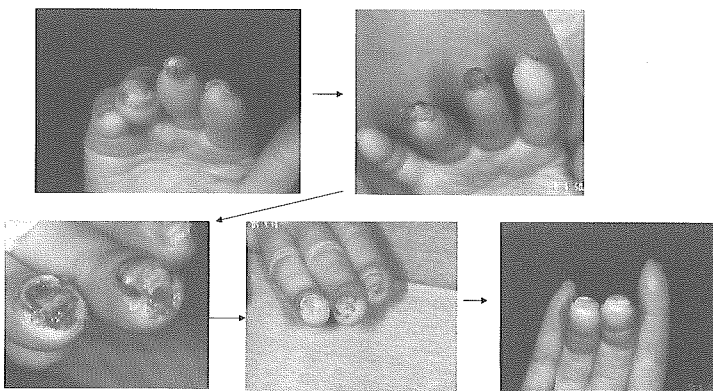


図2-e、症例⑥

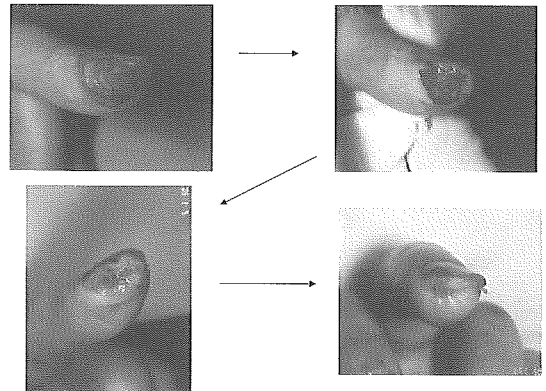


図2-c、症例④

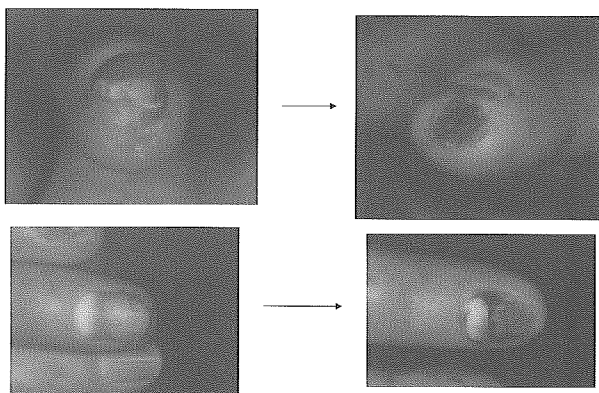


図2-f、症例⑦

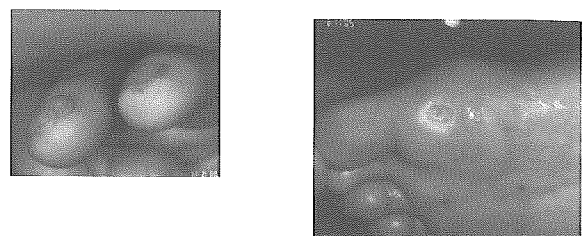


図2. 各症例の経過を示す。症例1の創培養で *Stenotrophomonas maltophilia* 1+を検出。症例4の創培養で *Enterococcus faecalis* 1+、*Serratia marcescens* 1+、*Proteus mirabilis* 1+を検出。

## 表2、治療経過のまとめ

症例	年齢・性	臨床型	潰瘍部位	治療	上皮化までの期間	血管造影所見
①	62/F	lcSSc	右、第3指	入院、伝達麻酔、デブリ、リホ PGE1	3W	ND
②	53/F	lcSSc	右、第3指	入院、伝達麻酔、デブリ、リホ PGE1	4W	ND
③	76/F	UC	右、第2,3,4指	入院、伝達麻酔、デブリ、リホ PGE1	12W	ND
④	80/F	lcSSc	右、第2,3,4指	入院、伝達麻酔、デブリ、リホ PGE1	4W	ND
⑤	52/F	dcSSc	右、第2指	入院、伝達麻酔、デブリ、リホ PGE1	12W	固有指動脈
⑥	50/F	lcSSc	左、第3指	入院、伝達麻酔、デブリ、リホ PGE1	3W	固有指動脈
⑦	73/F	lcSSc	右、足底	入院、伝達麻酔、デブリ、リホ PGE1	上皮化せず	足底動脈、後脛骨動脈

## 図3. 血管新生療法の手順

### 1. 骨髄採取(約1時間)

全身麻酔後患者を伏臥位とし、2人の術者が両側腸骨稜内側より骨髄液を吸引。1回あたり3ml程度吸引し、3~5回引いたら外側へ移動して新たに穿刺。片側3~4箇所穿刺。

↓  
RPMI培地500mlにヘパリン5000単位(5ml)を添加しその中に細胞を浮遊させておく。コレクションキットを使用。

↓  
250mlほど採取できた段階で有核細胞数を測定。この段階で $5 \times 10^9$ とる

↓  
500ml採取した段階で再度有核細胞数を測定。この段階で $10 \times 10^9$ あれば終了。

### 2. 単核球分離(約2時間)

コレクションキットを閉じて輸血部へ運搬

↓  
クリーンベンチ内でSPECT趾用のBAGへ骨髄液を移す。

↓  
SPECTRAで精製開始GAMBRO社製のCOBESpectra血液成分分離装置にて行う。操作はGAMBRO社オペレーターに一任。

↓  
精製後の段階での単核球数とCD34細胞数の測定(0.5mlを生食で1/10に希釈し、1ml採取末血管と4mlヘパリン管)

↓  
最終的に細胞浮遊液25ml(細胞数 $7-10 \times 10^8$ 個)とし手術室へ。

### 3. 細胞移植(約1時間)

26G, 1mlのシリンジ約50本を用意。針をはずして、エア-0.1mlついで細胞浮遊液0.5mlずつとり、針を下向きにして立てておく。ついで、患肢の前腕(あるいは下腿)および手(あるいは足部)全体にむらなく、2.5cm画の格子状に筋注する。

## 図4、症例⑤、血管造影所見、治療前後、患指(右第2指)

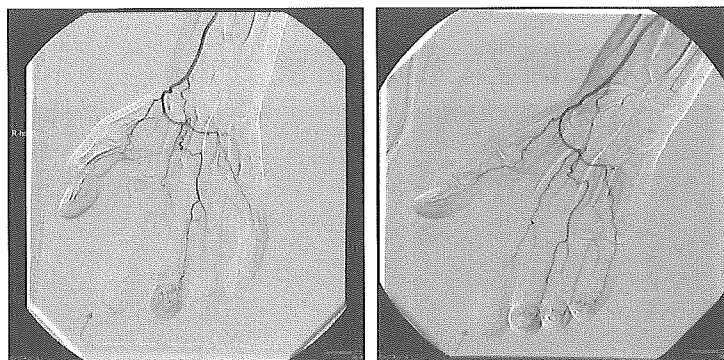


図5、症例⑥、血管造影所見、治療前のみ、患指(右第2指)

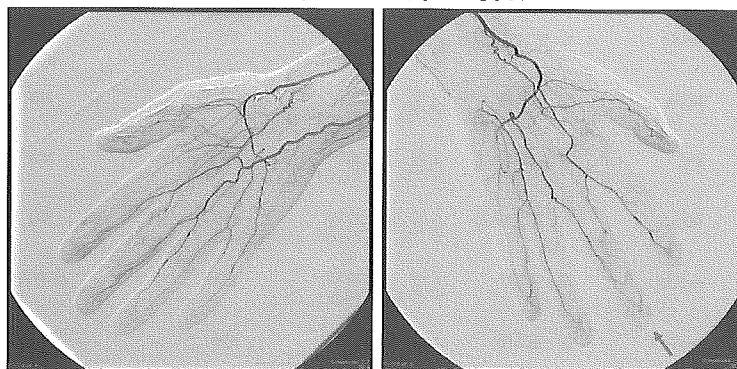


図6、症例⑦、治療前のみ、患部(右足底)

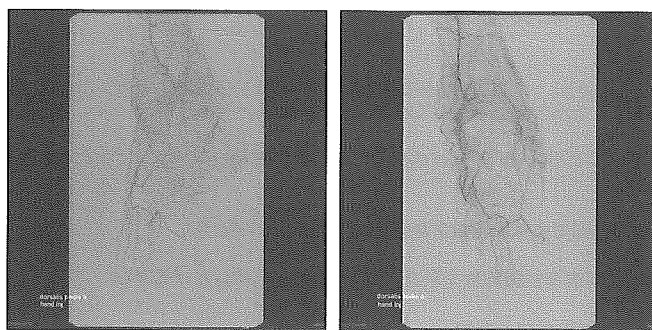


図7、症例⑤、移植後

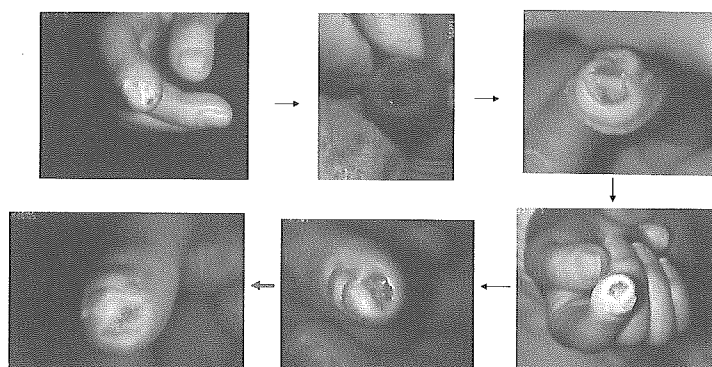
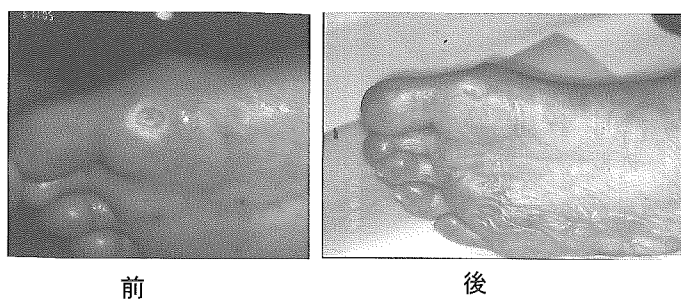


図8、症例⑦、移植前後





## 全身性強皮症患者血清中の可溶性 CD40 値の検討

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	長谷川稔	金沢大学医学部附属病院皮膚科講師
協力者	小村一浩	金沢大学医学部附属病院皮膚科助手
協力者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授

### 研究要旨

全身性強皮症患者血清中可溶性の CD40 濃度を全身性強皮症患者 49 例で検討した。可溶性 CD40 は全身性強皮症患者では全身性エリテマトーデス患者や健常人とくらべて有意に上昇していた。特に limited 型の全身性強皮症患者では diffuse 型全身性強皮症患者に比べて有意に上昇が認められ、特に limited 型強皮症の病態に CD40 が関与している可能性が示された。

### A. 研究目的

CD40/CD40 リガンドの系は免疫反応において重要な役割を担っている。CD40 は 50kD の I 型膜タンパクで、TNF 受容体スーパーファミリーに属する。CD40 は B 細胞や抗原提示細胞に発現していることが知られているが、線維芽細胞や血管内皮細胞にもその発現が認められている。

CD40 系の異常は、種々の自己免疫疾患において報告されている。全身性強皮症のほか、全身性エリテマトーデス、関節リウマチなどにおいて血中の可溶性 CD40 リガンドの上昇が報告されている [1-4]。また、全身性エリテマトーデスでは CD40 リガンドに対する自己抗体が存在することが近年桑名らにより示されている [5]。このように CD40/CD40 リガンド

の系は自己免疫疾患の惹起・進展に重要な役割を担っていると考えられ、治療のターゲットとしての有力な候補となる。

全身性強皮症は、諸臓器の線維性硬化性変化を主徴とする疾患であるが、抗核抗体、特に抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 RNA ポリメラーゼ抗体、抗セントロメア抗体など疾患特異性の高い自己抗体の存在は、自己免疫異常が病態に深く関与していることを示唆している。また、B 細胞の異常な活性化やナイーブ B 細胞の増加、メモリー B 細胞の活性化など、種々の B 細胞の異常が認められることが知られており [6]、CD40 の自己免疫異常における関与も考えられる。実際に全身性強皮症患者では T 細胞における CD40 リガンドの発現増強が報告されている [7]。さらに、全身性強皮症

では、免疫細胞以外の線維芽細胞においても CD40 が過剰に発現していることが報告されている [8]。このように全身性強皮症では CDE40/CD40 リガンドの系が自己免疫や線維化の多様な側面からその病態に関与している可能性がある。

今回、われわれは全身性強皮症患者血清中の可溶性 CD40 を測定し、その臨床的意義を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 患者

全身性強皮症患者 49 例、全身性エリテマトーデス 15 例、健常人 26 例を対象とした。全身性強皮症患者の病型は diffuse 型 27 例、limited 型 22 例であった。全身性強皮症および全身性エリテマトーデス患者は全例アメリカリウマチ学会の診断基準を満たしていた。全身性強皮症患者では発症からの期間は 2.2 +/- 3.4 年であった。

### 2) ELISA

血清中の可溶性 CD40 値の測定には、Medsystems Diagnostics 社からの ELISA kit を使用し、そのプロトコールにしたがって測定した。

## C. 研究結果

血清中の可溶性エンドグリン値を全身性強皮症、全身性エリテマトーデス、健常人と比較したところ、全身性強皮症では全身性エリテマトーデスおよび健常人にくらべ有意に高値を示した (図 1)。また、limited 型全身性

強皮症と diffuse 型全身性強皮症の間の比較では、limited 型全身性強皮症患者で有意に高値であった (図 1)。

健常人の平均 + 2SD (34.1 ng/ml) をカットオフ値とし、それ以上を高値例と判定したところ、全身性強皮症 49 例のうち 39 例 (80%) が高値例となった。可溶性 CD40 の上昇は limited 型の 95%、diffuse 型の 66% に認められた。

上記の結果に一致して、可溶性 CD40 値は初診時の total skin thickness score と負の相関が認められた (図 2)。またびまん性色素沈着の頻度も可溶性 CD40 上昇例では正常例にくらべて有意に低頻度であった ( $p < 0.05$ )。一方、抗トポイソメラーゼ I 抗体や抗セントロメア抗体の抗体価とは有意な相関は認められなかった。また、血中の可溶性 CD40 リガンドの値との比較においても有意な相関は認められなかった。

次に、可溶性 CD40 の経時的な変化を 16 例の全身性強皮症患者において検討した。Diffuse 型全身性強皮症患者 8 例のうち 6 例で可溶性 CD40 が初診時高値であり、その後の経過中にはその値に大きな変動は認められないうか、わずかに低下傾向を示した (図 3)。残り 2 例では初診時可溶性 CD40 は正常範囲内であった。一方、limited 型の全身性強皮症患者では 7 例全例に可溶性 CD40 値の上昇が初診時認められ、このうち 5 例ではその経過中に徐々にさらなる上昇が認められた。残り 2 例では経過中に大きな変動は認められなかった。

## D. 考案

全身性強皮症は周知のように diffuse 型と limited 型の 2 型に分類される。Diffuse 型は比較的急速な広範囲の皮膚硬化を呈し、肺をはじめとする諸臓器の線維化を伴い、血清学的には抗トポイソメラーゼ I 抗体などがマーカーとなる。一方、limited 型は皮膚硬化の範囲も狭く進行も緩徐で、肺線維症なども低頻度であり、血清学的には抗セントロメア抗体が陽性となる例が多い。Limited 型は diffuse 型に比べて一般に軽症型であるといえるが、その病態は必ずしも同一とはいえず、limited 型にみられるが diffuse 型にはみられないような病態も一部に存在する。本研究では、全身性強皮症患者血清中の可溶性 CD40 値を検討した。可溶性 CD40 は、limited 型全身性強皮症患者群において、全身性エリテマトーデス患者、健常人、さらに diffuse 型全身性強皮症患者に比べて上昇が認められた。また、total skin thickness score ととも負の相関が認められた。このように、可溶性 CD40 は全身性強皮症の limited 型で上昇が顕著である傾向があり、limited 型の病態に関与している可能性が考えられた。

可溶性 CD40 値がどのような機序で limited 型でより上昇するのかは不明である。B 細胞では活性化に伴って CD40 が放出されることが知られており、limited 型全身性強皮症では B 細胞をはじめとする免疫系の活性化亢進が存在するのかもしれない。また、CD40 は全身性強皮症で血管内皮細胞や線維芽細胞に発現の増強が認められることから、これらの活性化を示している可能性も考えられる。また、

可溶性 CD40 は膜型 CD40 と競合して T 細胞と線維芽細胞や血管内皮細胞の相互作用を抑制することも考えられ、病態の進行に抑制的に作用している可能性も考えられる。今後、本症における CD40/CD40 リガンドの系の関与をさらに検討し、その病態における機序を明らかにしていくことが重要であると考えられた。

## E. 結論

- 全身性強皮症患者では血清中可溶性 CD40 値が上昇していた。
- Limited 型患者でより高値であり、皮膚硬化の程度と負の相関が認められた。
- 可溶性 CD40 リガンドとは相関していなかった。
- 経時的検討では limited 型の患者では徐々に上昇する傾向が認められた。
- 全身性強皮症患者でみられた sCD40 上昇は、本症における CD40/CD40L 系の異常および病態への関与を示唆しており、今後本症の治療におけるターゲットとなる可能性が示唆された。

## F. 文献

1. Koshy M, Berger D, Crow MK: Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J Clin Invest* 1996;98:826-837.
2. Komura K, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Elevated circulating CD40L concentrations in patients with systemic sclerosis.

- J Rheumatol 2004;31:514-519.
3. Vakkalanka RK, Woo C, Kirou KA, Koshy M, Berger D, Crow MK: Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. Arthritis Rheum 1999;42:871-881.
  4. Tamura N, Kobayashi S, Kato K, Bando H, Haruta K, Oyanagi M, Kuriyama M, Kipps TJ, Hashimoto H: Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis. J Rheumatol 2001;28:2583-2590.
  5. Nakamura M, Tanaka Y, Satoh T, Kawai M, Hirakata M, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M: Autoantibody to CD40 ligand in systemic lupus erythematosus: association with thrombocytopenia but not thromboembolism. Rheumatology (Oxford) 2005.
  6. Fujimoto M, Sato S: B lymphocytes and systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol 2005;17:746-751.
  7. Valentini G, Romano MF, Naclerio C, Bisogni R, Lamberti A, Turco MC, Venuta S: Increased expression of CD40 ligand in activated CD4+ T lymphocytes of systemic sclerosis patients. J Autoimmun 2000;15:61-66.
  8. Fukasawa C, Kawaguchi Y, Harigai M,

Sugiura T, Takagi K, Kawamoto M, Hara M, Kamatani N: Increased CD40 expression in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis (SSc): role of CD40-CD154 in the phenotype of SSc fibroblasts. Eur J Immunol 2003;33:2792-2800.

## 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

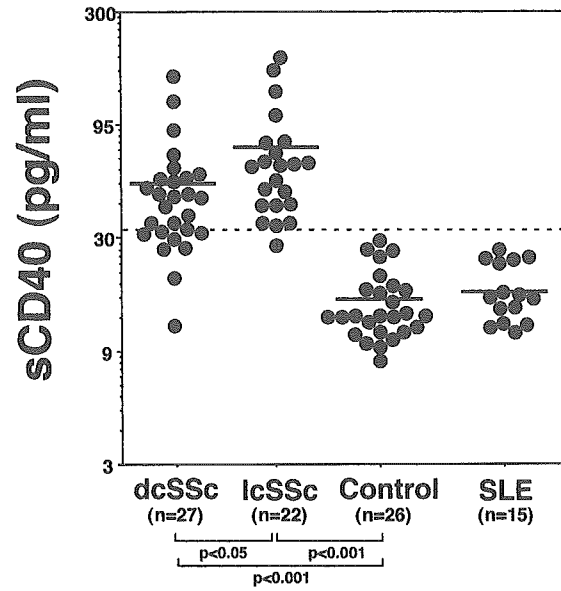


図1 全身性強皮症患者血清中の可溶性 CD40 濃度

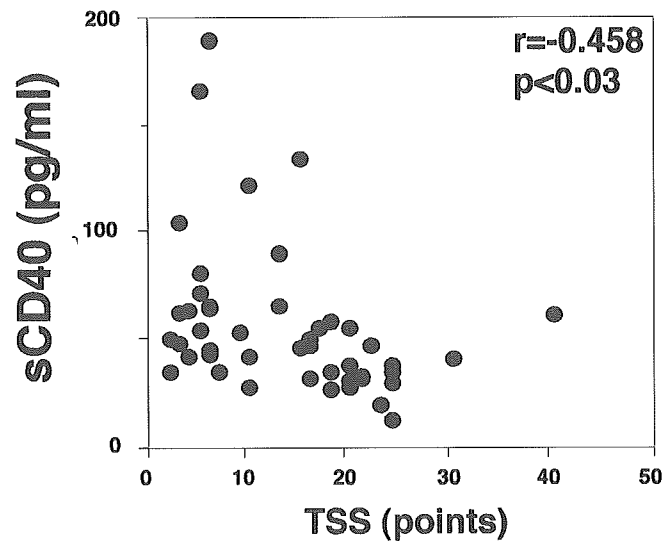


図2 全身性強皮症患者血清における可溶性 CD40 濃度と Total skin thickness score の相関

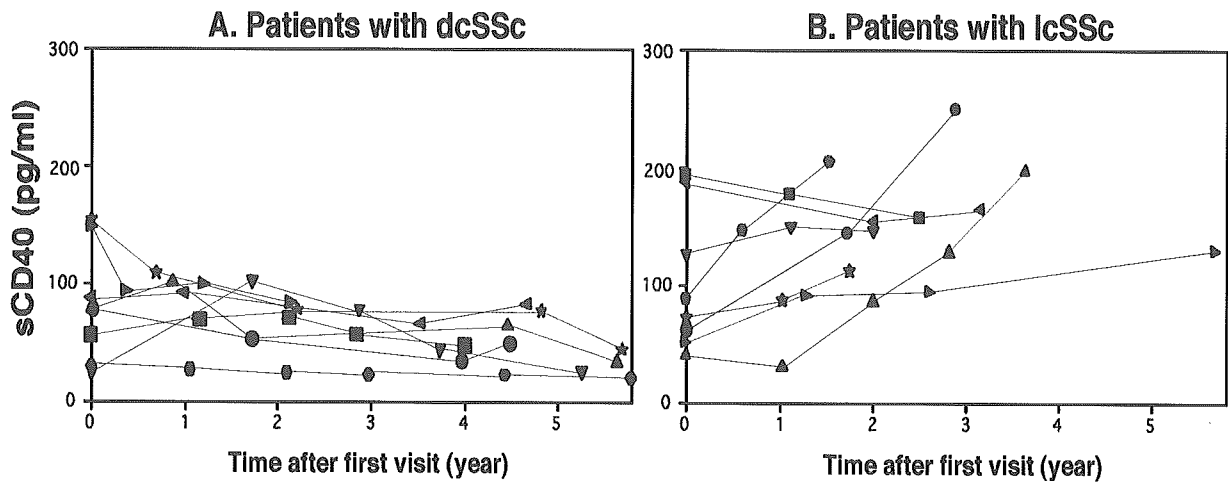


図3 全身性強皮症患者血清中の可溶性 CD40 濃度の経時的検討

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

CD40-CD154 シグナル阻害による線維化抑制効果

分担研究者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部内科助教授  
協力者 河合正孝 慶應義塾大学医学部眼科助手

研究要旨

病的線維化組織の線維芽細胞が発現する CD40 と浸潤細胞が一過性に発現する CD154 の結合により導入されるシグナルに着目し、その線維化病態に及ぼす作用を追究した。アデノウイルスベクターを用いて CD40 を強制発現させた培養ヒト線維芽細胞に可溶性 CD154 による刺激を加えると細胞増殖が誘導され、mRNA および蛋白レベルで IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1, ICAM-1 の発現が増強された。さらに、ブレオマイシン投与により誘導したマウス皮膚線維化モデルでは、線維化組織中の線維芽細胞における CD40、マスト細胞における CD154 の発現が検出された。マウスにブレオマイシンとともに抗 CD154 抗体を投与すると、コントロール抗体投与群に比べて組織学的な真皮膠原線維、ヒドロキシプロリンの増加が抑制された。以上の結果から、線維芽細胞における CD40 を介したシグナルは線維化誘導に重要な役割を果たす可能性が考えられた。すでに CD40-CD154 シグナルを標的とした分子標的療法が臨床試験段階にあることから、それらの抗線維化療法への応用が期待される。

A. 研究目的

強皮症患者にみられる皮膚や肺間質などの線維化病態に対して効果が証明された治療法は現時点でない。線維化にかかわる液性因子として TGF- $\beta$  が知られているが、病的線維化の誘導には TGF- $\beta$  単独では不十分で、他の因子の存在が必要と考えられている。病的な線維化組織では線維芽細胞増殖と細胞外マトリックスの蓄積に加えて T 細胞を中心とした炎症性細胞浸潤を伴う。これら浸潤細胞は液性因子産生や細胞間接着を介して線維芽細胞の活性化に寄与すると考えられてきたが、その詳細は明らかでない。特に、局所の線維芽細胞と浸潤するリンパ球との直接的な細胞接着による相互作用に関する知見は少ない。これまでに強皮症、肺線維症、造血幹細胞移植後の

慢性移植片対宿主病などの線維化疾患における病理組織学的検討が行われ、病変部の線維芽細胞が本来は発現しない HLA クラス II、CD40、ICAM-1 分子など炎症細胞上にリガンドが存在する分子を発現することが示されている<sup>1)</sup>。そこで、病的プロセスにより線維芽細胞上に発現誘導されたこれら分子を介したシグナルが線維芽細胞の活性化にかかわる可能性を想定した。今回、線維芽細胞が発現する CD40 と活性化 CD4 陽性 T 細胞やマスト細胞が発現する CD154 の結合により導入されるシグナルに着目し、その線維芽細胞に及ぼす作用を追究した。

B. 研究方法

1. 培養線維芽細胞における CD40 発現誘導

Stratagene 社 (La Jolla, CA) の AdEasy™ Adenoviral Vector System を用いてヒト CD40 の全長 cDNA を組み込んだアデノウイルスベクター (CD40-AdV) を作製した。また、インサートを挿入していないコントロールベクター (Control-AdV) も同時に作成し、対照として用いた。生検により得られた健常人皮膚から樹立したヒト線維芽細胞の一次培養株は 10% 仔牛胎児血清添加 DMEM 中で培養し、CD40-AdV または Control-AdV を感染させ (100MOI) で CD40 を強制発現させた。感染効率はフローサイトメトリーによる GFP および PE 標識抗 CD40 抗体 (IMMUNOTECH, Marseille, France) による染色後の CD40 蛋白の発現により確認した。

強制発現させた CD40 を介した細胞内へのシグナル伝達を評価するため、CD154 刺激後の I $\kappa$ B リン酸化を調べた。無血清培地 FGM-2 (CAMBREX, Walkersville, MD) 中で CD40-AdV を感染させ、2 日後に CD40 発現を確認した線維芽細胞を可溶性 CD154 (PeproTech, London, UK) (0.5  $\mu$ g/ml) により 10 分間刺激した。細胞回収後に SDS ポリアクリルアミド電気泳動により分画し、抗リン酸化 I $\kappa$ B 抗体または抗 I $\kappa$ B 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) をプローブとした免疫ブロットを行った。抗体の結合は LumiGLO® chemiluminescence detection system (Cell Signaling Technology) を用いて可視化した。

なお、ヒト検体は学内の倫理委員会で承認された文書によるインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

## 2. 培養線維芽細胞における CD154 刺激後の細胞増殖の評価

無血清培地中で培養線維芽細胞に CD40-AdV または Control-AdV を感染させ、2 日後に可溶性

CD154 (0.5  $\mu$ g/ml) を添加した。CD154 刺激後に  $^3$ H-サイミジン (1  $\mu$ Ci/ml) を添加し、72 時間の培養における  $^3$ H-サイミジンの取り込みにより細胞増殖能を評価した。また、一部の実験では可溶性 CD154 をマウス抗ヒト CD154 抗体またはマウスコントロール抗体と 30 分間、室温でプレインキュベートしたものをを用いた。

## 3. 培養線維芽細胞における CD154 刺激後の遺伝子発現変化の評価

無血清培地中で培養線維芽細胞に CD40-AdV または Control-AdV を感染させ、2 日後に可溶性 CD154 (0.5  $\mu$ g/ml) を添加した。刺激 3 時間後に細胞を回収し、トータル RNA を分離後に逆転写酵素により cDNA を作成した。cDNA (total RNA 50ng 相当) を用いた PCR により遺伝子発現を調べた。I 型および III 型コラーゲン、フィブロネクチン、PDGFR、HLA-DR、CTGF、IL-6、IL-8、RANTES、MCP-1、ICAM-1、Smad2、Smad4、Smad7、GAPDH 遺伝子の発現を検討した。各遺伝子の発現レベルは、アガロース電気泳動後のエチジウムブロミド染色によるバンドの強度により半定量的に評価した。さらに、I 型および III 型コラーゲン、IL-6、IL-8、ICAM-1、RANTES、MCP-1 遺伝子の発現については Taqman® real-time PCR を用いた定量的 PCR 法により調べた。各遺伝子の発現レベルは GAPDH の発現レベルにより補正した。

## 4. 培養線維芽細胞における CD154 刺激後の蛋白発現変化の評価

培養線維芽細胞に CD40-AdV または Control-AdV を感染させ、2 日後に培地を FGM-2 に換えた上で可溶性 CD154 (0.5  $\mu$ g/ml) を添加した。48 時間後に細胞および培養上清を回収した。線維芽細胞上の ICAM-1 の発現量は PE 標識抗



ICAM-1 抗体 (IMMUNOTECH, Marseille, France) を用いたフローサイトメトリー法により検討した。また、培養上清中の IL-6、IL-8、RANTES、MCP-1 の濃度は市販の ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて測定した。

#### 5. マウス皮膚線維化モデルにおける線維化病態の解析

山本らの方法<sup>2)</sup>に従って、C3H/He マウス(メス、6 週齢) (三共ラボ、東京) の背部に 100 mg のブレオマイシン (日本化薬、東京) を 3 週間連日投与することで皮膚線維化モデルを作成した。皮膚真皮層の線維化は HE およびマロリー染色による組織学検討により確認した。マスト細胞はトルイジン・ブルー染色による検出し、線維芽細胞とリンパ球、マスト細胞との接着は電子顕微鏡により評価した。線維化組織における CD40、CD154 の発現は抗 CD40 抗体、抗 CD154 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いた免疫染色により調べた。

#### 6. マウス皮膚線維化モデルに対する抗 CD154 抗体の線維化抑制効果の評価

C3H/He マウスへのブレオマイシン投与 1 週間前から、マウス腹腔内に 500  $\mu$ g/個体のハムスター抗 CD154 モノクローナル抗体 (MR1), コントロールのハムスター由来 IgG, リン酸緩衝液 (PBS) のみを隔日投与した 3 群を作成した。皮膚線維化の程度はマロリー染色した皮膚組織切片における皮膚全層および真皮層の厚みを NIH イメージにより計測し、真皮層の皮膚全層に占める比率を求めた。ヒドロキシプロリン量はブレオマイシン注入部位および対側の無処置部位における皮膚単位面積あたりのヒドロキシプロリン量を測定し、対側部位に対するブレオマイシン注入部位に

おける比として表した。

### C. 研究結果

#### 1. 培養ヒト線維芽細胞への CD40 の強制発現

GFP 発現を指標とすると、CD40-AdV および Control-AdV はほぼ 100%の効率で培養ヒト線維芽細胞に感染した。また、CD40 強制発現線維芽細胞では可溶性 CD154 刺激により I $\kappa$ B のリン酸化および総 I $\kappa$ B の減少が確認され、CD40 を介して細胞内にシグナルが伝達されることが確認された。

#### 2. *In vitro*において CD40 シグナルが線維芽細胞に与える効果

CD40 シグナルが線維芽細胞の増殖能に与える効果を調べた。可溶性 CD154 刺激により CD40 を強制発現させた CD40-AdV 感染線維芽細胞は細胞増殖が誘導されたが、この効果は Control-AdV 感染線維芽細胞ではみられなかった。可溶性 CD154 により誘導される細胞増殖は可溶性 CD154 を前もって抗 CD154 抗体と結合させるとほぼ完全に抑制された。

次に、CD40 シグナルが線維芽細胞における遺伝子発現プロファイルに及ぼす効果について、線維化病態に関連する候補遺伝子に絞って検討した (図 1)。CD40-AdV 感染線維芽細胞では可溶性 CD154 刺激 24 時間後に IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1, ICAM-1 の mRNA レベルが増強したが、他の遺伝子では再現性のある発現変化は観察されなかった。これら遺伝子の発現増強は刺激後 3 時間で観察され、48 時間まで持続した。一方、Control-AdV 感染線維芽細胞では CD154 刺激による遺伝子発現の変化はみられなかった。定量的 PCR による解析では、CD40 強制発現細胞に CD154 刺激を加えた場合にのみ IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1, ICAM-1

遺伝子の発現が上昇することが確認されたが、I および III 型コラーゲン遺伝子発現に対する影響はみられなかった。

遺伝子レベルでの発現亢進が蛋白レベルでもみられるかを検討した。まず、mRNA レベルでの発現亢進がみられた分泌蛋白 IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1 の産生を培養上清中に産生された蛋白濃度で検討した。培養線維芽細胞に CD40 を強制発現させることにより IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1 の分泌がやや上昇したが、CD154 刺激によりさらなる増強が認められた。また、膜蛋白 ICAM-1 の発現も同様に、CD40 の強制発現により軽度の発現が認められ、CD154 刺激によりさらに発現が増強された。

### 3. ブレオマイシン誘発皮膚線維化モデルにおける CD40-CD154 シグナルの役割

ブレオマイシンの連日投与によりマウス皮膚真皮の過剰な膠原線維の蓄積、それに伴う脂肪および筋層の減少が観察された。HE 染色、マロリー染色による経時的検討では、皮膚線維化は 1 週間後に出現し、その後ゆっくりと増加した。浸潤単核細胞やマスト細胞が 1-2 週間で増加し、その後は減少した。そこで、線維化が進行する 2 週間目にブレオマイシン投与皮膚組織における超微形態を電子顕微鏡により観察した。線維芽細胞の周囲には幼弱な抗原線維が顕著に増加し、活発な細胞外マトリックスの産生がみられた。また、線維芽細胞とリンパ球、マスト細胞との幼弱な接着構造が多数観察された。CD40 の発現は真皮の線維芽細胞と単核細胞、表皮細胞、血管内皮細胞にみられた。一方、CD154 はおもにマスト細胞に発現しており、また一部のリンパ球にも発現していた。

### 4. 皮膚線維化モデルに対する抗 CD154 抗体の線維化抑制効果

ブレオマイシン誘発皮膚線維化モデルの線維化病態における CD40-CD154 相互作用の役割を検討するため、ブレオマイシン投与マウスに抗 CD154 抗体、コントロール IgG、PBS を隔日投与した 3 群を作成した。抗 CD154 抗体投与群ではコントロール IgG 群、PBS 群に比べて真皮膠原線維が少なく、皮下脂肪、筋層も残存していた。3 週目の皮膚真皮線維化の程度を 3 群間で比較すると、抗 CD154 抗体投与群で他の 2 群に比べて有意に少なかった (図 2A)。さらに、皮膚ヒドロキシプロリン量も抗 CD154 抗体投与群でコントロール IgG 群、PBS 群に比べて有意に少なかった (図 2B)。

## D. 考案

本研究では、CD154 を発現する CD4 陽性 T 細胞やマスト細胞が CD40-CD154 の結合を介して線維芽細胞の活性化、さらには病的線維化の誘導に関与する可能性を追究した。アデノウイルスベクターを用いて *in vitro* で CD40 を強制発現させたヒト線維芽細胞を用いた検討では、CD40 からの刺激により線維芽細胞の増殖と特定の分子の発現誘導がみられた。発現増強がみられた分子として線維芽細胞からの細胞外マトリックス産生を増強する作用が知られている IL-6, 末梢血からの炎症細胞や線維芽細胞前駆細胞を末梢組織に引き寄せるケモカイン (IL-8, RANTES, MCP-1), T 細胞との細胞接着を強める ICAM-1 が同定された。ブレオマイシンにより誘発されるマウス皮膚線維化モデルでは、線維化組織で CD40, CD154 に発現増強がみられ、線維化細胞の増殖、RANTES の発現増強が観察された。これら *in vivo* での所見は、*in vitro* で観察された線維芽細胞における

CD40 刺激結果と一致する。さらに、マウスモデルにおける皮膚線維化を抗 CD154 抗体が抑制したことは、CD40-CD154 シグナルが線維化誘導に重要な役割を果たしていることを示す。実際の線維化組織では TGF- $\beta$  や PDGF など他の刺激も同時に存在することから、CD40 を介したシグナルが他のシグナルと協調的に作用して病的線維化を誘導すると考えられる。すでに CD40-CD154 シグナルを標的とした分子標的療法（抗 CD154 抗体、抗 CD40 抗体、可溶性 CD40）が臨床試験段階にある<sup>3)</sup>。したがって、それらを抗線維化療法へと応用することは比較的容易である。現状で病的線維化を抑制する効果が実証された治療法がないことから、早急な検討が期待される。

## E. 結論

線維芽細胞と活性化 T 細胞またはマスト細胞の接着による CD40-CD154 シグナルは線維化誘導に重要な役割を果たすことが明らかとなった。CD40-CD154 シグナルを標的とした分子標的療法の抗線維化療法への応用が期待される。

## F. 文献

1. Ogawa Y, et al. Periductal area as the primary site for T-cell activation in lacrimal gland chronic graft-versus-host disease. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003;44:1888-1896.
2. Yamamoto T, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. J Invest Dermatol. 1999;112:456-462.
3. Dumont FJ. IDEC-131 IDEC/Eisai. Curr Opinion Invest Drugs. 2002;3:725-734.

## 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

桑名正隆：CD40-CD154 シグナル阻害による抗線維化剤、特許出願番号 2006-005422

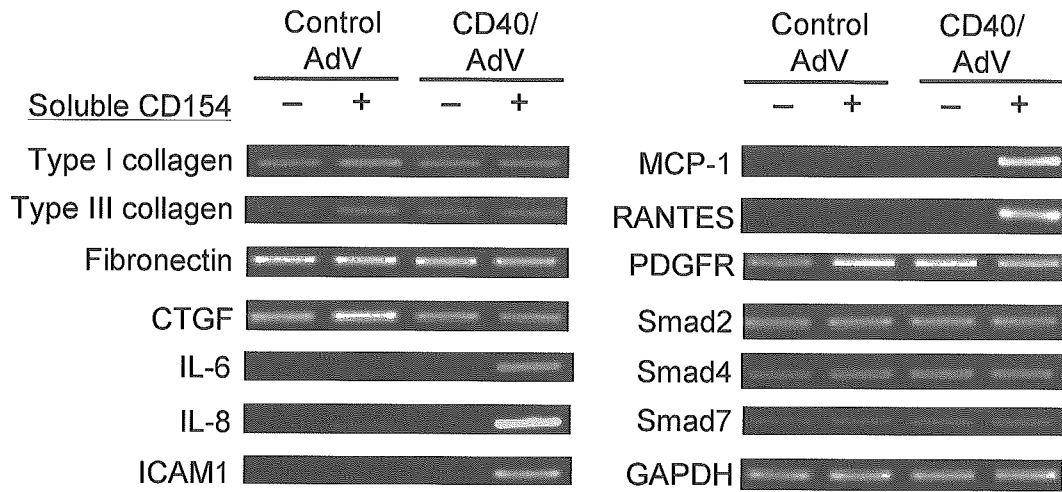
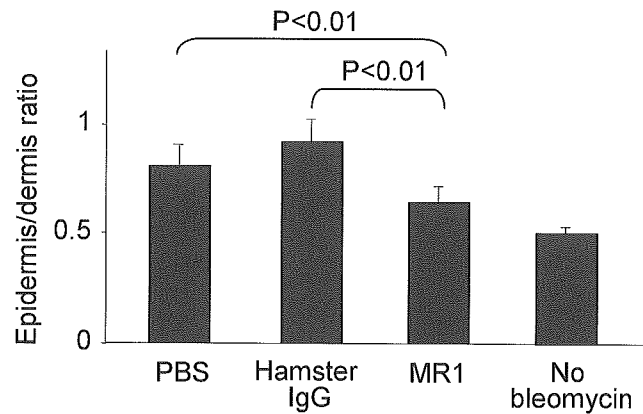


図 1. アデノウイルスベクターにより CD40 を強制発現させたヒト培養皮膚線維芽細胞における可溶性 CD154 刺激による遺伝子発現変化。

### A. Epidermis thickness



### B. Hydroxyproline

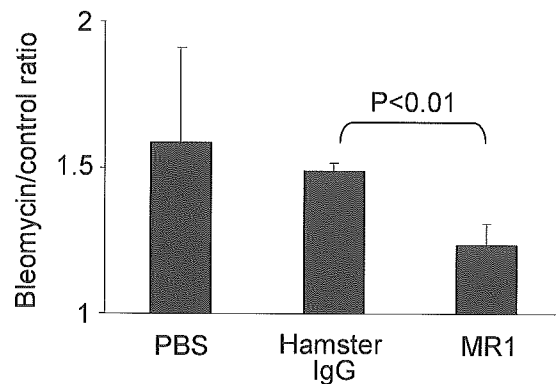


図 2. プレオマイシン誘発マウス皮膚硬化モデルにおける抗 CD154 抗体 (MR1) の線維化抑制効果。(A) 皮膚全層に占める真皮の割合、(B) プレオマイシン注入部位の対側部位に対する皮膚ヒドロキシプロリン量の比。