

Nodular Scleroderma における、CTGF, HSP47 の発現の検討

研究協力者 山本俊幸 東京医科大学附属病院皮膚科助教授

研究要旨

Nodular scleroderma は、皮内の結節を呈する比較的まれな強皮症の subtype である。本症の3例(男性2、女性1)に対し、CTGF および HSP47 の発現を検討した。免疫組織学的検討および in situ hybridization では、CTGF は病変部線維芽細胞に強く発現がみられたが、健常皮膚では発現がみられなかった。また HSP47 も同様に病変部皮膚の線維芽細胞に強く発現がみられ、CTGF, HSP47 が nodular scleroderma の病態に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

Nodular scleroderma は、強皮症の1つの variant で、通常 diffuse type の Systemic sclerosis (SSc)の経過中に、体幹、四肢に、淡褐色ないし茶褐色調の皮内結節が散発、又は多発してくる。海外では keloidal scleroderma と呼ばれることもあるが、本邦での報告をみると、組織学的には膠原線維の膨化、肥厚が著しく、ケロイドではなく皮膚硬化の所見を呈してくる場合がほとんどである。

Connective tissue growth factor (CTGF) は、強皮症をはじめとする線維性皮膚疾患の発症に重要なもので、Heat shock protein 47 (HSP47)も最近、線維化に関与する分子として注目されている。今回われわれは、3例の nodular scleroderma に対して、CTGF および HSP47 の発現を検討した。

B. 研究方法

1) 症例

Nodular scleroderma の3例(男性2、女性1)の内訳を表1に示す。全例 diffuse type の SSc で、経過中に前胸部、上腕、背部、項部に結節病変が出現してきた。結節病変部を生検し、ホルマリン固定ならびに -80℃で凍結保存した。

2) 方法

パラフィン包埋切片を用いて CTGF, HSP47 (抗体はいずれも Santa Cruz 社より購入)の発現を免疫組織学的に検討した。また、凍結切片を用いて、CTGF の Non-R1 in situ hybridization を行った。

C. 研究結果

結節病変の組織を示す (図 1)。HE 染色では真皮中層から下層にかけて膠原線維の膨化、肥厚があり、CTGF の免疫染色では、線維芽細胞に陽性所見がみられる。コントロールの健常皮膚では、ごく弱い陽性ないし陰性であった。CTGF の ISH では、antisense probe を用いたものでは CTGF transcript が nodular scleroderma 病変部の線維芽細胞と思われる細胞に強く染まってみられた (図 2)。結節病変を生じた患者の前腕部における CTGF の mRNA および蛋白の発現を示す (図 3)。いずれも発現がみられるが、結節部位と比較して、染色程度の強弱を定量することはできなかった。HSP47 の免疫染色では、健常皮膚ではごく弱い反応ないし陰性であるのに対し、nodular scleroderma 病変部では線維芽細胞に HSP47 の強い発現がみられた (図 4)。

D. 考察

Nodular scleroderma の英文報告をまとめると、汎発性強皮症に伴ったものが最も多く 11 例、モルフェアに伴ったものが 7 例に対し、強皮症と無関係に生じた例も 1 例みられた (1)。部位は、体幹や四肢に多くみられた。

組織はいくつかのバリエーションがあり、強皮症の所見を呈するもの、肥厚性癬痕ケロイドの所見を呈するもの、両方の所見が同一組織にみられるもの、時間の経過で変化してくるもの、に分けられる。本邦では強皮症の組織像を呈する例がほとんどであるのに対し、ケロイドの組織を呈す

るケースは海外に多く、これは人種間の差であると考えられる。

今回の検討で、nodular scleroderma の発症にも CTGF が重要な役割を果たす可能性が示唆された。Sato ら (2) は、diffuse scleroderma において血清 CTGF のレベルが上昇していることを報告しており、diffuse scleroderma で nodular scleroderma を生じてくるケースは、血清中の CTGF レベルがさらに亢進しているかもしれない。また、結節病変を形成する trigger についてもさらに検討が必要と思われる。

E. 結論

Nodular scleroderma の病態においても、CTGF、HSP47 が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

F. 文献

1. Yamamoto, T., Sawada, Y., Katayama, K., and Nishioka, K. 2005. Nodular scleroderma: Increased expression of connective tissue growth factor. *Dermatology* 211: 218.
2. Sato, S., Nagaoka, T., Hasegawa, M., Tamatani, T., Nakanishi, T., Takigawa, M., and Takehara, K. 2000. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: Association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J. Rheumatol.* 27: 149.

表 1 Patient characteristics

Patient	Age (yr) / Sex	Sites	Type of scleroderma	ANA
1 1:160	29/ M	upper arm, chest	dSSc	
2 1:2560	34/ M	chest	dSSc	
3 1:1280	60/ F	back nape	dSSc	

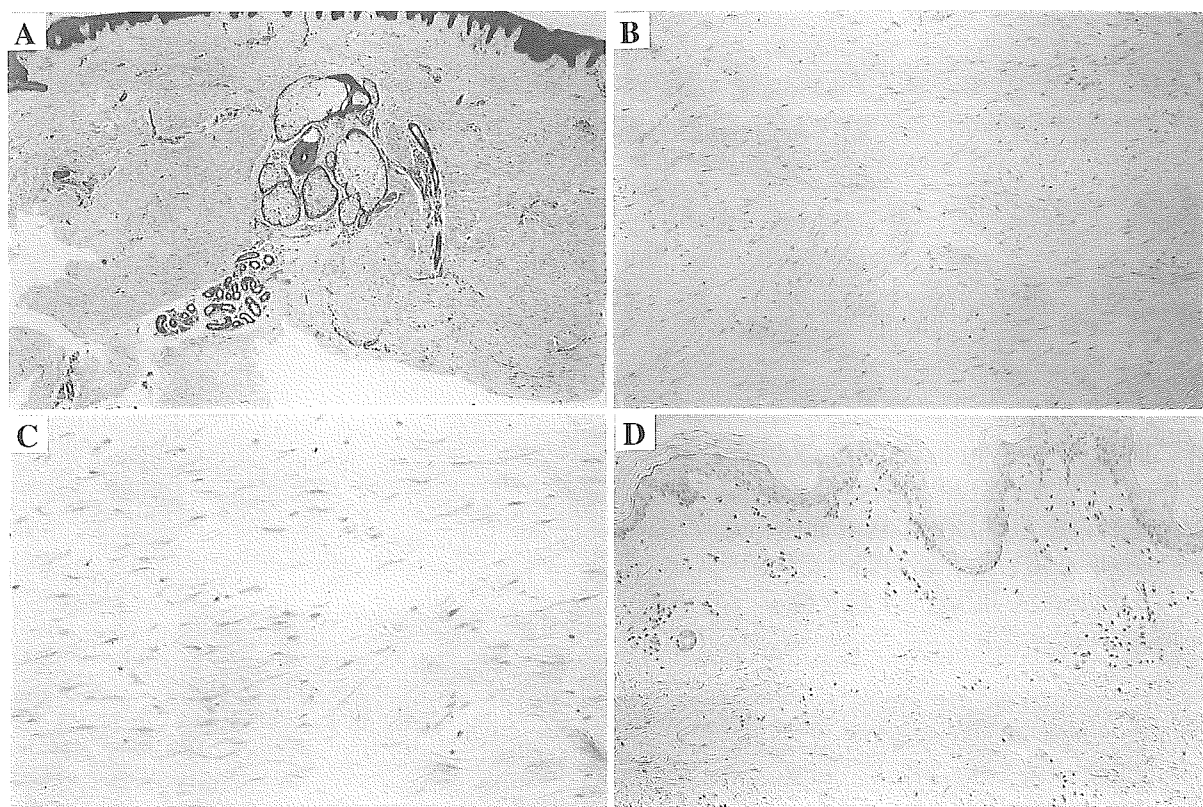


図 1 : (A) 結節部の HE 染色。(B, C) 抗 CTGF 抗体を用いた免疫染色像。(D) コントロールの、健常皮膚における CTGF の発現。

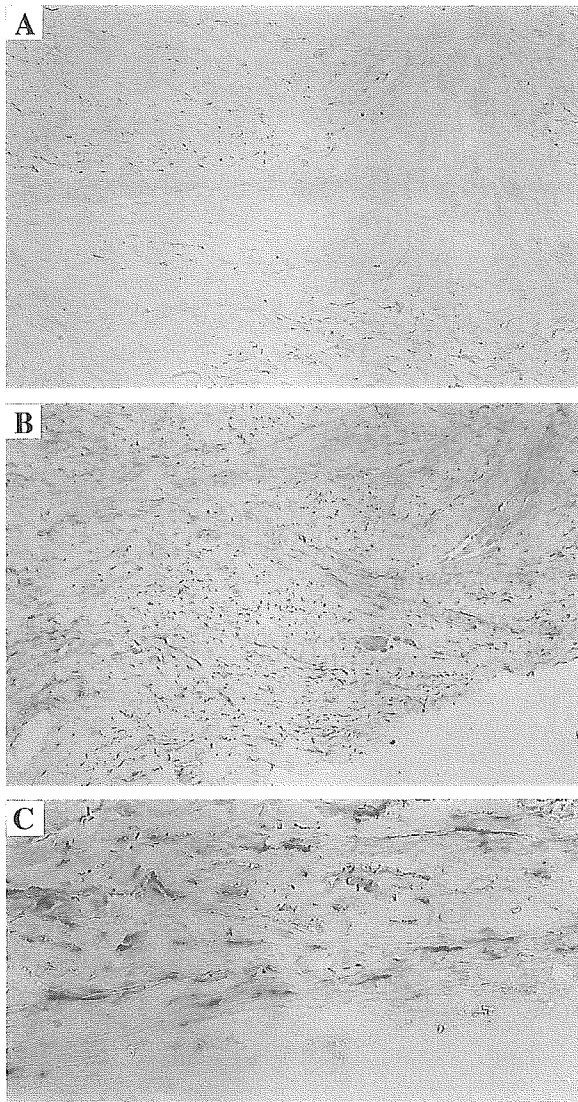


図 2 : CTGF の in situ hybridization。
 (A) コントロールの CTGF sense probe
 を用いたもの。(B) CTGF antisense
 probe を用いた、結節部の CTGF
 transcript の発現。(C) 拡大像。

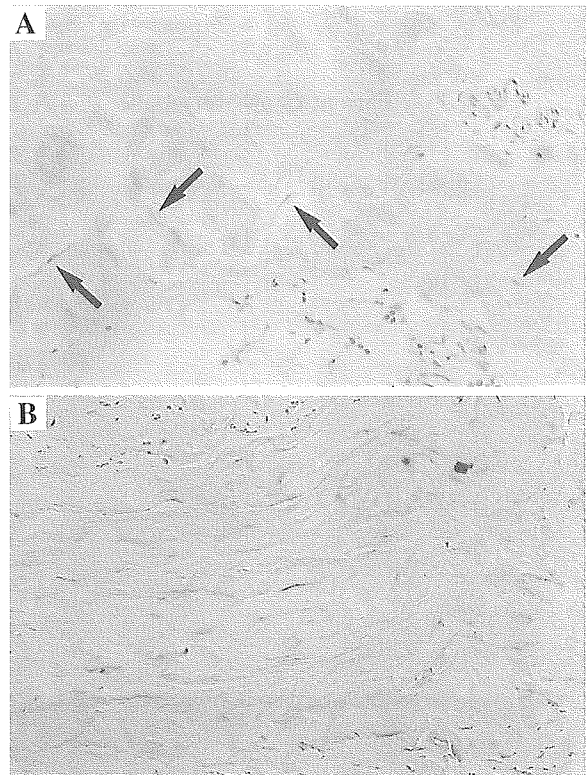
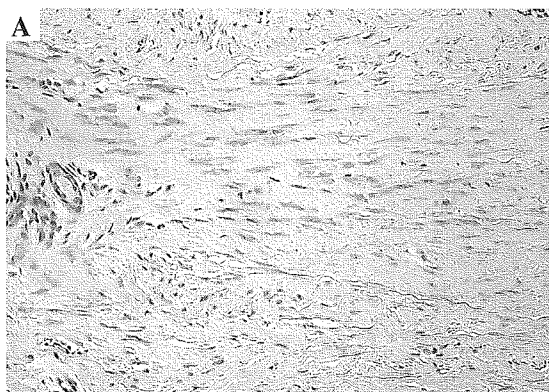


図 3 : 結節を生じた SSc 患者前腕部皮
 膚における、CTGF mRNA (A)および蛋
 白 (B) の発現。

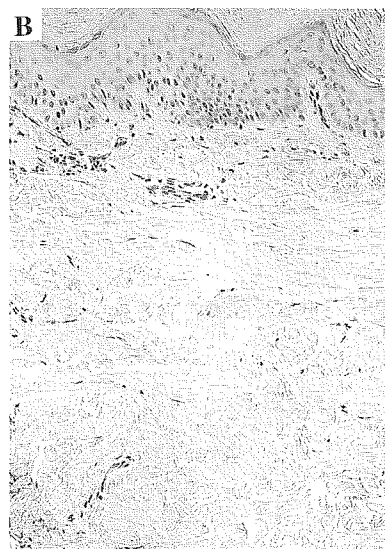


図 4 : HSP 47 の免疫染色像。
 (A) nodular scleroderma 病変部。
 (B) 健常皮膚。

全身性強皮症身皮膚における各種 virus DNA についての検討

研究協力者 大塚 勤 獨協医科大学越谷病院皮膚科助教授

協力者 山崎雙次 獨協医科大学皮膚科教授

研究要旨

以前よりウイルスが全身性強皮症（SSc）の発症に関与している可能性が指摘されてきた。そこで、正常人、SSc、SLE、皮膚筋炎、morphea および GVHD 患者皮膚における EB virus, cytomegalovirus, human parvovirus (HPV)HPV B19 および human herpes virus-6 (HHV6) DNA の出現率について検討した。Genome DNA を皮膚組織から抽出し、PCR にて HPV B19 DNA を検出した。その結果、EB virus DNA は検出されなかった。Cytomegalovirus DNA は正常人と比較して有意差がなかった。HPV B19 DNA の検出率(50/97, 51.5%) は正常人の出現率(53/97, 54.6%) と比較して有意に上昇していた(P<0.02)。また、HPV-6 DNA の検出率(27/29, 93.1%)も正常人の出現率(37/52, 71.2%) と比較して有意に上昇していた(P<0.05)。以上の結果より、HPV B19 および HHV-6 DNA は SSc の皮膚病変の形成に関与している可能性が指摘された。

A. 研究目的

全身性強皮症(SSc)を含めた自己免疫疾患の原因は不明であるが、その発症には遺伝的因子、免疫学的因子および環境因子が関与していることが指摘されている¹。各種ウイルスがそれらの trigger の一つである可能性が指摘されているが、SSc についてもウイルスの関与が想定されてきた。EB virus や cytomegalovirus は SSc 皮膚組織で活性化されていることが報告されている²。HBV B19 はリウマチ患者の関節液中の75%にみいだされる³ことより慢性関節リウマチの原因ウイルスである可能性が指摘されている。近年 SSc においても HBV B19 の関与が指摘されている

^{4,5}。そこで、SSc 皮膚組織において EB virus, cytomegalovirus, HPV B19 および HHV-6 DNA の検出を試みた。

B. 研究方法

1) 対象

97例の正常人（年齢24-74歳、平均55.3歳）および全身性強皮症患者48例（31-75歳、平均52.2歳）について検討した。他の疾患患者としては、16例のSLE患者、8例の皮膚筋炎患者、6例のmorphea患者および8例のGVHD患者についても検討した。

2) polymerase chain reaction (PCR)
被検者の皮膚組織から total DNA を抽出し、

PCRを施行した。10% DMSO, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.5 mM MgCl₂, 50 pM primerireaction, and 2.5 U of Taq polymeraseを含む50 µl volのsolutionを作成し、1µgのtemplate DNAを加えた。EB virus DNAについてのPCRは文献上のprimer⁶を用いて、94°C, 1 min, 57°C, 2 minおよび72°C, 2minを40 cycles 施行した。Cytomegalovirus DNAについてのPCRは、文献上のprimer⁷を用いて、94°C, 30sec, 60°C, 30 sec, 72°C, 30 secを35 cycles 施行した。Parvovirus B19についての最初および二回目のPCRは、それぞれの文献上のprimer⁸を用いて、94°C, 30sec, 55°C, 1 min, 72°C, 90 secを35 cycles 施行した。最初のPCR productの一部を用いて二回目のPCRを行った⁸。HHV-6についてのPCRは94°C, 1min, 62°C, 2 min, 72°C5 minを35 cycles 施行した。

3) 統計的検討

χ 二乗検定を用いて出現率の検定を行った。

C. 研究結果

1) 正常人および各種疾患における皮膚組織よりのEB virus DNAの検出

正常人および各疾患における皮膚組織よりDNAを抽出し、PCRを施行した。PCR産物(図1)では、NK cell lymphomaにおいて109bpのbandが検出された。正常人、全身性強皮症および他の疾患においていずれにもEB virus DNAは検出されなかった。

2) 正常人および各種疾患における皮膚組織よりのcytomegalovirus DNAの

検出

正常人および各疾患における皮膚組織よりDNAを抽出し、PCRを施行した。PCR産物(図2)では、149bpのbandが検出された。全身性強皮症におけるcytomegalovirus DNAの検出率(4/47, 8.5%)は正常人のもの(5/97, 5.1%)と比較して有意差がなかった(表1)。

3) 正常人および各種疾患における皮膚組織よりのParvovirus B19 DNAの検出

正常人および各疾患における皮膚組織よりDNAを抽出し、PCRを施行した。第1回目のPCR産物では、284bpのbandが検出され、さらに第2回目のPCR産物(図3)では103bpのbandが検出されParvovirus B19に特異的なDNAと考えられた。第2回目のPCR後の全身性強皮症におけるParvovirus B19 DNAの検出率(36/48, 75.0%)は正常人のもの(53/97, 54.6%)と比較して有意に上昇していた(表2)。他疾患における検出率は正常人と比較して有意差を認めなかった。

4) 正常人および各種疾患における皮膚組織よりのHHV-6 DNAの検出

正常人および各疾患における皮膚組織よりDNAを抽出し、PCRを施行した。PCR産物(図4)では、603bpのbandが検出された。第2回目のPCR後の全身性強皮症におけるHHV-6 DNAの検出率(27/29, 93.1%)は正常人のもの(37/52, 71.2%)と比較して有意に上昇していた。他疾患における検出率は正常人と比較して有意差を認めなかった。

D. 考案

今回の検討では、以前より関与の可能性が指摘されていた EB virus DNA は検出されなかった。また、SSc の血管病変形成への関与¹¹ が指摘されている cytomegalovirus の出現率は正常人と有意差がなかった。これと対照的に、HPV B19 および HHV-6 DNA の出現率が正常人と比較して高かった。近年 SSc においては Parvovirus B19 の関与が指摘されている^{4,5}。Ferri らは持続感染のマーカーである NS1 が SSc 血清中に高頻度にみられると報告している⁹。さらに、SSc 患者の骨髓中に高頻度に Parvovirus B19 DNA が検出されたとの報告もある¹⁰。SSc 皮膚組織においては線維化がみられるが、Parvovirus B19 が線維化をもたらした可能性が指摘される。また、HHV-6 は各種免疫学的疾患への関与が想定されているが¹²、今回の結果はその関与も示唆している。以上の結果より、これら2種の virus は、SSc の皮膚病変形成の trigger である可能性が示唆された。

E. 結論

全身性強皮症の皮膚組織においては parvovirus B19 , HHV-6 の潜伏感染率が高く、それが皮膚病変形成に関与している可能性が指摘された。

F. 文献

1. Molina V, Shoenfeld Y. Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. *Autoimmunity* 2005; 38: 235-45.
2. Vaughan JH, Shaw PX, Nguyen MD, Medsger TA Jr, Wright TM, Metcalf JS, Leroy EC. Evidence of activation of 2 herpesviruses, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus, in systemic sclerosis and normal skins. *J Rheumatol* 2000; 27: 821-3.
3. Saal JG, Stendie M, Einsele H, Muller CA, Fritz P, Zacher J. Persistence of B19 parvovirus in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1992; 12: 147-51.
4. Ferri C, Longombardo G, Azzi A, Zakrzewska K. Parvovirus B19 and systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 267-8.
5. Altschuler EL. The historical record is consistent with the recent finding of parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 228.
6. Iwatsuki K, Ohtsuka M, Harada Han G, Kaneko F. Clinicopathologic manifestations of Epstein-Barr virus-associated cutaneous lymphoproliferative disorders. *Arch Dermatol*, 133: 1081-1086, 1997.
7. Nokta MA, Holland F, De Gruttola V, Emery VC, Jacobson MA, Griffiths P, Pollard RB, Feinberg JE. Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction profiles in individuals with advanced human immunodeficiency virus infection: relationship to CMV disease.

- J Infect Dis* 2002; 185: 1717-1722.
8. Takahashi Y, Murai C, Ishii T, Sugamura K, Sasaki T. Human parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. *Int Rev Immunol* 1998; 17: 309-21.
 9. Ferri C, Longombardo G, Azzi A, Zakrzewska K. Parvovirus B19 and systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 267-8.
 10. Kurtzman GJ, Ozawa K, Cohen B *et al.* Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection. *N Engl J Med* 1987; 317: 287-94.
 11. Pandey JP, LeRoy EC. Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 10-15.
 12. Saito I, Nishimura S, Kudo I, Fox RI, Moro I. Detection of Epstein-Barr virus and human herpes virus type 6 in saliva from patients with lymphoproliferative diseases by the polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 1991; 36: 779-84.

G. 研究発表

1. 論文

Ohtsuka T, Yamazaki S. Altered prevalence of human parvovirus B19 component genes in

systemic sclerosis skin tissue. *Br J Dermatol* 2005; 152: 1078-1080.

Ohtsuka T, Yamazaki S. Prevalence of human parvovirus B19 component NS1 gene in patients with Henoch-Shoenlein purpura and hypersensitivity vasculitis. *Br J Dermatol* 2005; 152: 1080-1081.

Ohtsuka T, Yamazaki S. The involvement of immunoglobulin E isotype switch in scleroderma skin tissue. *J Dermatol Sci* 2005; 39, 97-104.

Hashikabe M, Ohtsuka T, Yamazaki S. Quantitative echographic analysis of photochemotherapy on systemic sclerosis skin. *Arch Dermatol Res* 2005; 296: 522-527

2. 学会発表

Ohtsuka T, Yamazaki S. 全身性強皮症における人 parvovirus B19 DNA の検討。平成 17 年 4 月 22-24 日 第 104 回日本皮膚科学会総会、横浜

Ohtsuka T, Yamazaki S. Alteration of human parvovirus B19 component gene in systemic sclerosis skin tissue. May 4-7, 2005, 66th Annual Meeting of the Society of Investigative Dermatology, St. Louis, MO, USA.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Table 1 The prevalence of parvovirus B19 component gene in skin tissues of normal subjects, patients with systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, and dermatomyositis

Subjects	Total number	Cytomegalovirus DNA positive	Percentage
Normal controls	97	5	5.1%
Systemic sclerosis	47	4	8.5%
Systemic lupus erythematosus	16	1	6.3%
Dermatomyositis	8	0	0%
Total	168	8	4.8%

Table 2 The prevalence of parvovirus B19 DNA from skin tissues in normal subjects, patients with systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, dermatomyositis, morphea and graft-versus host disease after second polymerase chain reaction

Subjects	Total number	Parvovirus B19 positive number	Percentage
Normal controls	n=97	53(50)#	54.6%(51.5%)#
Systemic sclerosis		n=48	36 75.0%*(**)
Systemic lupus erythematosus	n=16	9	56.3%
Dermatomyositis	n=20	14	70.0%
Morphea	n=6	2	33.3%
Graft-versus-host disease	n=8	4(3)	50.0%(37.5%)
Total	n=193	118(114)	61.1%(59.1%)

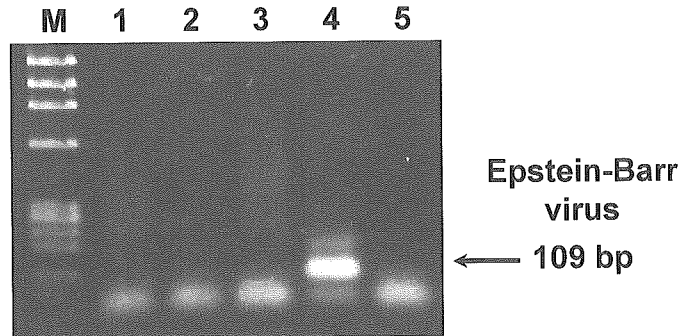
#: The number in the parentheses was the positive numbers and occurrence rates of parvovirus B19 DNA after first polymerase chain reaction, *: P<0.02 vs. normal controls (chi-square analysis), **: P<0.01 vs. normal controls (chi-square analysis).

Table 3 The prevalence of human herpes virus-6 DNA in skin tissues of normal subjects, patients with systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, dermatomyositis, morphea and graft-versus host disease

Subjects	Total number	human herpes virus-6 positive number	Percentage
Normal controls	n=52	37#	71.2%#
Systemic sclerosis		n=29	27 93.1%*
Systemic lupus erythematosus	n=16	15	93.8%
Dermatomyositis	n=8	6	75.0%
Morphea	n=5	4	80.0%
Graft-versus-host disease	n=8	7	87.5%

#: The numbers were the positive numbers and occurrence rates of human herpes virus-6 DNA, *: P<0.05 vs. normal controls (chi-square analysis with Yates' correction).

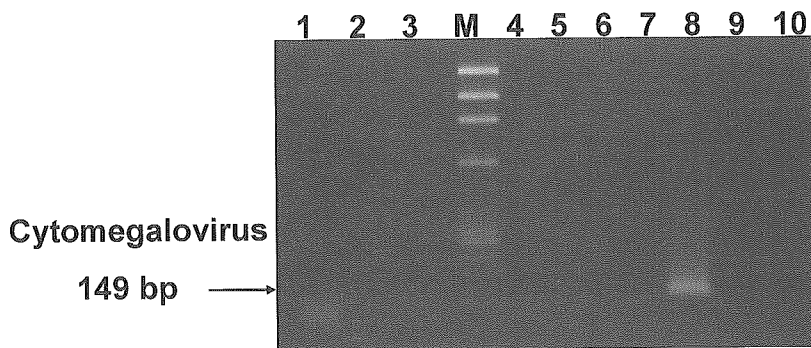
Figure 1. The result of polymerase chain reaction for the detection of Epstein-Barr virus DNA in cutaneous malignant lymphoma



M: molecular weight marker, lane 1-5: patients with malignant lymphoma of the skin, positive peaks (109bp) for Epstein-Barr virus DNA was detected in lane 4, but not in others.

Figure 1 The result of polymerase chain reaction for the detection of Epstein-Barr virus DNA in cutaneous malignant lymphoma. M: molecular weight marker, lane 1-5: patients with malignant lymphoma of the skin, positive peaks (109bp) for Epstein-Barr virus DNA was detected in lane 4, but not in others.

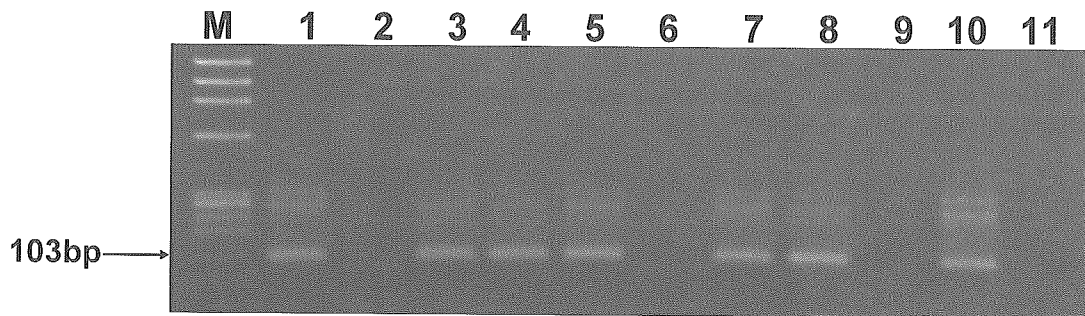
Figure 2. The result of polymerase chain reaction for the detection of cytomegalovirus DNA in skin tissues



M: molecular weight marker, lane 1-3: normal controls, lane 4-10: patients with systemic sclerosis, positive peaks (149bp) for cytomegalovirus DNA was detected in lane 8, but not in others.

Figure 2 The result of polymerase chain reaction for the detection of cytomegalovirus DNA in skin tissues. M: molecular weight marker, lane 1-3: normal controls, lane 4-10: patients with systemic sclerosis, positive peaks (149bp) for cytomegalovirus DNA was detected in lane 8, but not in others.

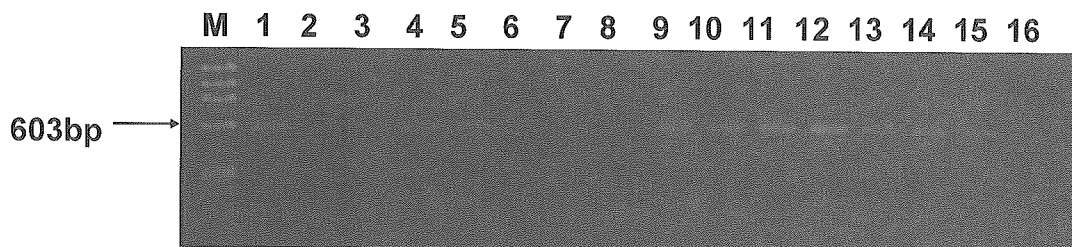
Figure 3. The result of polymerase chain reaction with second primer set for the detection of human parvovirus B19 DNA in skin tissues



M: molecular weight marker, lane 1-6: normal controls, lane 7-11: patients with systemic sclerosis, positive peaks (103bp) for human parvovirus B19 DNA's were detected in lane 1, 3, 4, 5, 7, 8 and 10.

Figure 3 The result of polymerase chain reaction with second parvovirus B19 DNA detecting primers. Some of the lane showed 103-bp parvovirus B19 DNA fragment, but not in others. The results of parvovirus B19 DNA positive fragment showed the same results as those of first polymerase chain reaction with first parvovirus B19 DNA detecting primers in these samples, respectively.

Figure 4. The result of polymerase chain reaction for the detection of human herpes virus-6 DNA in skin tissues



M: molecular weight marker, lane 1-6: normal controls, lane 7-11: patients with systemic sclerosis, positive peaks (603bp) for human herpes virus-6 DNA's were detected in lane 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14 and 15.

Figure 4 The result of polymerase chain reaction for the detection of human herpes virus-6 DNA. M: molecular weight marker, lane 1-8: normal controls, lane 9-16: patients with systemic sclerosis, positive peaks (603bp) for human herpes virus-6 DNA' s were detected in lane 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14 and 15.

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

全身性強皮症における血清中酸化ストレスマーカー8-isoprostane 値の臨床的意義

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	小川文秀	長崎大学医学部・歯学部附属病院 皮膚科・アレルギー科 講師
協力者	清水和宏	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚病態学 助教授
協力者	室井栄治	長崎大学医学部・歯学部附属病院 皮膚科・アレルギー科 医員
協力者	原 肇秀	長崎大学医学部・歯学部附属病院 皮膚科・アレルギー科 医員

研究要旨

血清中 8-isoprostane は健常人と比較して、diffuse cutaneous systemic sclerosis (dSSc)、limited cutaneous SSc (lSSc)では著明に上昇していた。8-isoprostane は呼吸機能との関連が認められ、%VC、%DLco と負の相関を示した。また血管抵抗との関連も観察され、腎血管抵抗(PI)と正の相関を確認した。血液検査では血清中 IgG、抗ガラクトース欠損 IgG との正の相関が認められた。さらに、死亡群と生存群とで比較したところ、死亡群では有意に 8-isoprostane 値の上昇が認められた。以上のことより、血清中 8-isoprostane は SSc の疾患活動性および重症度と相関し、8-isoprostane が SSc の酸化ストレスを示す有用なマーカーであることと酸化ストレスが SSc の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc)は線維化や血管障害が皮膚のみならず、全身の諸臓器に出現する結合織疾患であり、免疫異常を背景に持つ。しかしながら SSc の病因はいまだ解明されておらず、酸化ストレスは SSc

の血管障害や線維化そして抗核抗体の産生に関与している可能性が示唆されている(1, 2)。

現在まで、多くの SSc における酸化ストレスの役割は nitric oxide (NO) に焦点が置かれ研究されてきた。しかしながら、SSc におけ

る NO の役割については相反する報告が多数存在し、一定の見解が得られていない(3)。例えば、血清中の NO が上昇しているという報告と低下している報告が存在し(4-7)、また、NO の病理学的、病因学的役割についても様々な矛盾する報告が存在する。NO は血管拡張作用があるため SSc における末梢の虚血を改善させるといった報告(8)がある一方で、レイノー症状の後の虚血再灌流状態で生成された NO がヒドロキシラジカルを合成し、組織障害に働くといった研究(9, 10)などである。

そこで SSc における酸化ストレスの関与を検討するためにマーカーとして 8-isoprostane を用いた。8-isoprostane はエイコサノイドの一種であり、組織内のリン脂質が活性酸素により酸化され生じる物質である(11)。生化学的に安定した物質であるために酸化ストレスを評価する有用なマーカーであると考えられている。実際に喫煙者(12)、心疾患(13)、呼吸器疾患で正常人と比較して上昇が認められることが報告されている。そこで、今回、SSc における血清中 8-isoprostane 値とその臨床的相関について検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は SSc 57 例(女性 48 例、男性 9 例)であり、年齢は 49.5 ± 17.3 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (ISSc) が 25 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 32 例であった。ISSc と dSSc の罹病期間はそれぞれ、 9.1 ± 9.9 年、 3.1 ± 3.0 年であった。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 25 例、抗セントロメア抗体陽性例が 19 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 2 例、抗 U3RNP 抗体陽性例が 1 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 6 例、Th/To 抗体陽性例が 1 例、残り 3 例は抗核抗体陰性であった。32 例の健常人をコントロールとして用いた。

臨床評価は皮膚症状をはじめ、各種血液検査、呼吸機能検査(%VC, %DLco)、カラードップラー法による腎血管抵抗 (Pulsatility index; PI) なども測定した。

また、血清 8-isoprostane 値と予後の相関に着いても検討した。

2) ELISA

血清中 8-isoprostane 値は ELISA キット (Cayman, MI) を用いて測定した。

C. 研究結果

1) SSc における血清中 8-isoprostane 値

dSSc、ISSc 患者における血清中 8-isoprostane 値は健常人と比較して 75 倍もの高値で有意に上昇していた (図 1)。一方、dSSc 患者と ISSc 患者においては有意な差は認められなかった。驚くべきことに 99% の SSc 患者の 8-isoprostane 値は健常人の平均 + 3SD 値よりも高値であった。このように、ほとんどの SSc 患者が健常人よりも高値を示したため、8-isoprostane 値で SSc 患者を健常人と区別することが可能ではないかと思われた。

2) SScにおける血清中 8-isoprostane 値と臨床所見との相関

初診時における血清中 8-isoprostane 値と臨床所見との相関では、%VC ($r = -0.42, p < 0.01$)、%DLco ($r = -0.0049, p < 0.01$) のように呼吸機能と負の相関が認められた (図 2)。また、腎血管抵抗をカラードップラー法にて評価した PI 値と血清中 8-isoprostane 値を比較すると、正の相関が有意に認められた ($r = 0.53, p < 0.01$) (図 2)。このことより、血管病変との相関が示唆された。しかしながら、8-isoprostane 値と皮膚潰瘍との相関などは確認できなかった。

また、血清中の IgG 値 ($r = 0.43, p < 0.001$)、IgA 値 ($r = 0.44, p < 0.001$) と正の相関を示し、抗ガラクトース欠損 IgG 抗体値とも正の相関を示した ($r = 0.60, p < 0.001$) (図 3)。これは、上昇している 8-isoprostane 値が何らかの免疫異常に関与している可能性を示唆するものである。

3) SScにおける血清中 8-isoprostane 値が予後に与える影響

SSc 患者の生存群と死亡群とで血清 8-isoprostane 値の比較を行うと、死亡群では有意に 8-isoprostane 値が高かった ($p < 0.01$) (図 4)。生存群でも高値を示す症例があるが、これはその症例の予後を示唆する可能性が考えられる。

D. 考案

今回の研究で SSc 患者血清中で 8-isoprostane 値が健常人の 75 倍と著明に上昇しており、

SSc では酸化ストレスが増強されていることが示唆される。以前の研究で SSc の尿中 (14)、BAL 洗浄液中での 8-isoprostane を測定した報告(15)があるが、それらはコントロールと比較してせいぜい 2-4 倍の上昇であった。また、今回、健常人はほとんど 8-isoprostane 値の上昇が認められず、dSSc と ISSc では差がなかったことを考えると 8-isoprostane は健常人と SSc 患者を鑑別できる有用なマーカーである可能性がある。さらには血清 8-isoprostane 値は肺の線維化や血管障害とも相関した。以上のことから、8-isoprostane は SSc の重症度、酸化障害の程度を評価するマーカーとしても有用であると考えられる。

本研究において血清中 8-isoprostane 値は腎血管障害と相関すると報告したが、血管内皮細胞の障害は SSc において中心的な役割を果たすといわれている。その最も特徴的なものは血管の攣縮によって引き起こされる手指のレイノー症状であるが、レイノー症状は手指のみならず、冠動脈や腎臓においても発生する(16)といわれている。そしてレイノー症状による虚血再灌流が活性酸素の発生を引き起こし、血管内皮細胞の障害を起こすと報告されている(9, 10)。また、8-isoprostane 自体が血管収縮作用を持つために、血小板凝集を引き起こし、血管内皮への単球の接着を促し、血管閉塞、炎症、さらに血管の攣縮を引き起こすことになると考えられる。このように過剰な酸化ストレスが SSc の血管障害に重要な役割を果たしていることが示唆される。

今回は 8-isoprostane 値が呼吸機能低下と相

関した。我々の報告と異なり以前の報告では肺線維症を伴う SSc 患者の BAL 中の 8-isoprostane は呼吸機能とは相関は認められていない(15)が、著者らは呼吸機能検査は以前の肺の状態の蓄積を示しており、8-isoprostane は現在の状態を表しているためこのような不一致が認められたのだろうと推測している。BAL 中で検討した論文では 8-isoprostane 値は健常人の 4.5 倍であったのに対して、我々の血清中 8-isoprostane 値は健常人の 75 倍という高値を示したのは、我々の場合は以前の肺の障害を含む内臓諸臓器の障害を反映した結果であろうと考えられる。

レイノー症状による虚血再灌流障害により生じた活性酸素は自己抗原の分断を引き起こし、エピトープの露出、自己抗体の産生を引き起こすと考えられてきた(17)。しかし、今回の検討では抗セントロメア抗体や抗トポイソメラーゼ抗体値と 8-isoprostane 値との相関は認められなかった。それにも関わらず、血清中の抗ガラクトース欠損 IgG 抗体、IgG や IgA との相関が認められたのは、SSc において酸化ストレスが何らかの自己抗体産生や液性免疫に関与している可能性を示唆するものといえよう。

E. 結 論

SSc は多大な酸化ストレスを受けており、8-isoprostane 値はそれを反映する。また、8-isoprostane は SSc を鑑別するのに役立つ、SSc の重症度、病勢を反映する有用なマーカーであると考えられる。

F. 文 献

1. Herrick AL, Rieley F, Schofield D, Hollis S, Braganza JM, Jayson MI. Micronutrient antioxidant status in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1994;21:1477-83.
2. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, et al. Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2653-64.
3. Matucci Cerinic M, Kahaleh MB. Beauty and the beast. The nitric oxide paradox in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41:843-7.
4. Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998;25:314-7.
5. Mazzone A, Cusa C, Bucci L, Vezzoli M, Ghio S, Buggia I, et al. The effects of iloprost infusion on microcirculation is independent of nitric oxide metabolites and endothelin-1 in chronic peripheral ischaemia. *Eur J Clin Invest* 1999;29:1-5.
6. Andersen GN, Caidahl K, Kazzam E, Petersson AS, Waldenstrom A, Mincheva-Nilsson L, et al. Correlation between increased nitric oxide production

- and markers of endothelial activation in systemic sclerosis: findings with the soluble adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum* 2000;43:1085-93.
7. Sud A, Khullar M, Wanchu A, Bamberg P. Increased nitric oxide production in patients with systemic sclerosis. *Nitric Oxide* 2000;4:615-9.
 8. Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *Faseb J* 1989;3:31-6.
 9. Butler AR, Flitney FW, Williams DL. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:18-22.
 10. Suematsu M, Wakabayashi Y, Ishimura Y. Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc Res* 1996;32:679-86.
 11. Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996;51:1-9.
 12. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995;332:1198-203.
 13. Iuliano L, Pratico D, Greco C, Mangieri E, Scibilia G, FitzGerald GA, et al. Angioplasty increases coronary sinus F2-isoprostane formation: evidence for in vivo oxidative stress during PTCA. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:76-80.
 14. Stein CM, Tanner SB, Awad JA, Roberts LJ, 2nd, Morrow JD. Evidence of free radical-mediated injury (isoprostane overproduction) in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1996; 39:1146-50.
 15. Montuschi P, Ciabattini G, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Kharitonov SA, et al. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1524-7.
 16. Cannon PJ, Hassar M, Case DB, Casarella WJ, Sommers SC, LeRoy EC. The relationship of hypertension and renal failure in scleroderma (progressive systemic sclerosis) to structural and functional abnormalities of the renal cortical circulation. *Medicine (Baltimore)* 1974;53:1-46.
 17. Peng SL, Fatenejad S, Craft J. Scleroderma: a disease related to damaged proteins? *Nat Med* 1997;3:276-8.

G. 研究発表

Ogawa F, Shimizu K, Takehara K*, Sato S (Nagasaki Univ,* Kanazawa Univ) : Serum levels of 8-isoprostane, a biomarker of oxidative stress, are evaluated in patients with systemic

sclerosis. 2005 ACR 69th/ARHP 40th Annual Scientific Meeting San Diego Convention Center (San Diego, USA) (2005/11/12-2005/11/17)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

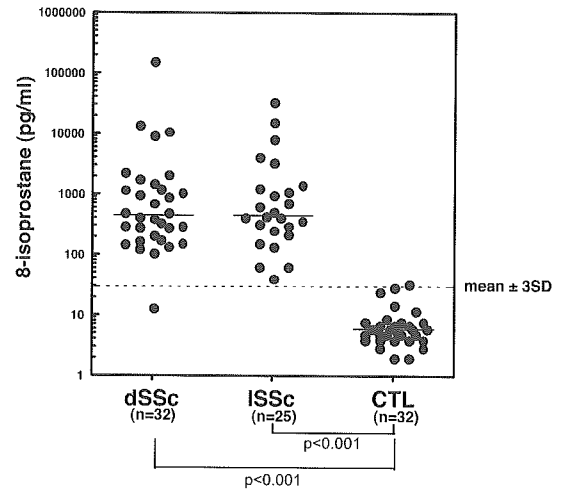


図1 : dSSc、ISScおよび健常人(control)における血清中 8-isoprostane 値。点線は健常人の平均値 + 3SD に設定したカットオフ値を表す。

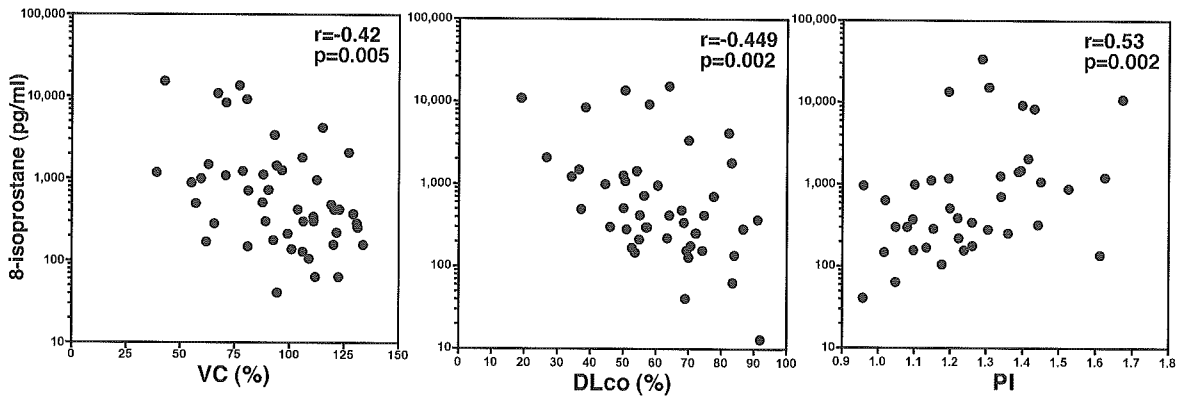


図2 : SScにおける血清中 8-isoprostane 値と%VC、%DLcoおよび腎血管抵抗 (PI) との相関。

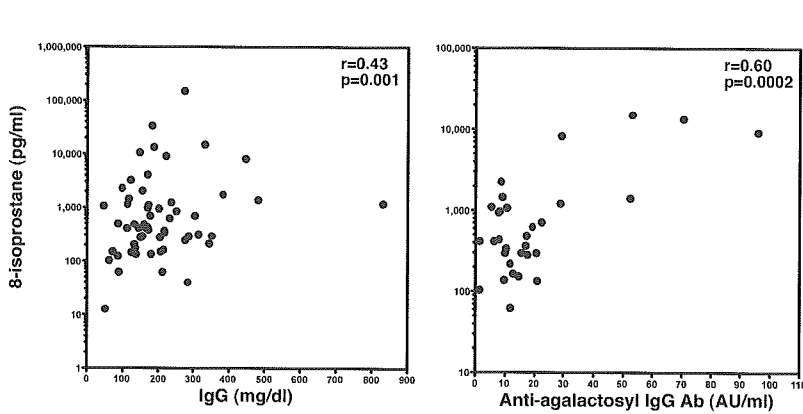


図3 : SScにおける血清中 8-isoprostane 値と血清中 IgG、抗ガラクトース欠損 IgG 抗体との相関

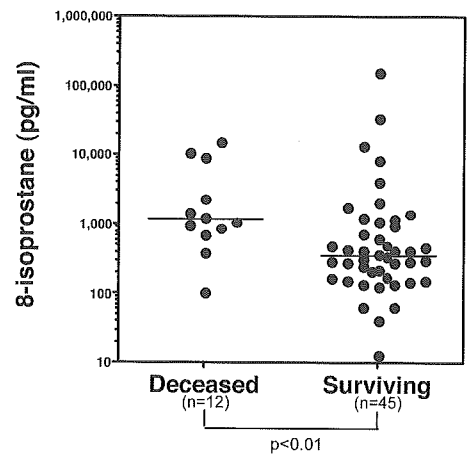


図4 : 生存群と死亡群における血清中 8-isoprostane 値の比較。

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

全身強皮症における血中 Nitrotyrosin 値の検討

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	清水和宏	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚病態学 助教授
協力者	小川文秀	長崎大学医学部・歯学部附属病院 皮膚科・アレルギー科 講師

研究要旨

強皮症(SSc)患者の血清において peroxynitrite(ONOO-)の最終産物である nitrotyrosine(NT)を測定し臨床所見との相関を検討した。同意取得後 25 人の limited cutaneous SSc (lSSc)、34 人の diffuse cutaneous SSc (dSSc)、27 人の正常人を対象として ELISA 法を用いて測定した。SSc 患者において血清 NT 値は正常人に比して有意に上昇しており%DLco と有意な逆相関を示していた。また NT 値の上昇が認められた SSc 患者では IgG、IgA、抗 agalactosyl IgG 抗体の上昇が高率に認められた。以上より ONOO-が SSc の臨床症状特に血管障害に重要な役割を果たしている可能性、SSc における免疫異常に関係している可能性が考えられた。

A. 研究目的

一酸化窒素(NO)はガス状のラジカルで、1991 年にその性状があきらかになってから種々の疾患における NO の役割が解明されてきている(1)。また SSc においても NO が病状においても重要な役割を果たしている事が明らかにされている(2)。NO は NO 合成酵素(NOS)により作られ、NOS は endothelial NOS, neuronal NOS, inducible NOS の3つの型に分けられる。eNOS, nNOS は恒常的に発現しており、iNOS は種々の刺激によって誘発される。NO は O₂ と反応し直ちに peroxynitrite (ONOO-)を

形成し、重篤な細胞毒性を示す。ONOO-はアミノ酸の窒化をおこし nitrotyrosine (NT)を最終産物として形成する。最近この NT に対する抗体が作られ ONOO-の作用の検討に利用されている(3)。

SSc においては硬化皮膚からの微小血管に iNOS の産生亢進、eNOS の発現減少と NT の集積が報告されているが(4)、血中 NT と SSc の臨床症状との関係を報告した論文は無い。SSc は原因不明の結合織系疾患でその予後は肺、心、腎などの内部臓器による影響をうける。最近 SSc 肺において肺胞 NO 濃度が%DLco

と負の相関を示すとの報告があり、SSc における肺病変の形成に NO が関与している可能性が示唆されている(5)。NO は O₂ 存在下に直ちに ONOO-となるが、この ONOO-により形成された NT は ONOO-により引き起こされた組織障害と密接に関係していると考えられている。一方血清 NT 値はループスの病勢と相関しマーカーとして有用との考えが報告されている(6)。よって今回 SSc における ONOO-による組織障害の関与を検討する目的で血清 NT 濃度を測定し、臨床症状との相関を検討した。

B. 研究方法

①対象：対象患者は 59 名の SSc 患者(女性 50 名、男性 9 名)であり平均年齢は 47±17 才であった。病型別では limited cutaneous SSc(ISSc)が 25 名、diffuse cutaneous SSc (dSSc) は 34 名であった。罹病期間は 5.1±7.4 年であった。自己抗体として抗セントロメア抗体陽性例が 17 名、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 21 名、抗 U3RNP 抗体陽性が 1 名、抗 U3RNP 抗体陽性 1 名、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性 4 名、抗 Th/To 抗体陽性 1 名、残り 1 名は抗核抗体陰性であった。年齢、性を合わせた健常人 27 名(男 4 名、女 23 名)が比較対象に用いられ平均年齢は 49±14 才であった。

②血清 NT 値測定。Hycult biotechnology 社の ELISA kit を使用し測定した。

③統計的処理： Mann-Whitney's U test 及び Spearman's rank test にて検討した。

C. 研究結果

1) SSc における血清 NT 値

血清 NT 値は SSc において健常人に比して有意に高値を示した。(Fig. 1, $p<0.001$)dSSc と ISSc の間には有意差は認められなかった。健常人の平均値+2SD をカットオフ値とすると全 SSc では 23%(11/47)に血清 NT 高値が確認された。更に dSSc では 28%(7/25)に、ISSc では 18%(4/22)に血清 NT 高値が確認されたが、健常人では一人もカットオフ値を超えていなかった。このように血清 NT 値は dSSc, ISSc どちらも高値を示していることが明らかになった。

2) SSc における血清 NT 値と臨床所見との相関

血清 NT 値は全 SSc 患者において%DLco と負の相関を示していた。(p<0.02, $r=-0.414$, Fig.2) 初診時における血清 NT 値と臨床所見との相関を表 1 に示す。血清 NT 値が高値であった SSc 患者では血清 NT が正常であった SSc 患者と比較して%DLco が有意に低値を示し、IgG、IgA、抗agalactosyl IgG 抗体(Fig.3) が有意に高値を示していた。

D. 考案

今回の研究により血清 NT 値は健常人と比較し有意に高値を示している事が明らかとなった。その上昇は dSSc, ISSc 両群ともに同様である事より NT 値は皮膚硬化の範囲とは相関しないと考えられる。血清中 NT 値は SSc 患者において%DLco と逆相関を示していたが、%VC や肺線維症とは相関を示していなかった。今回の対象患者には肺高血圧症の患者は含まれておらず、NT 値と肺高血圧症との関