

- bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma lung disease, An imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory lipid mediators, *Arthritis Rheum*, 52, 3783-3791, 2005.
3. Wu SH, Wu XH, Lu C, Dong L, Chen ZO : Lipoxin A<sub>4</sub> inhibits proliferation of human lung fibroblasts induced by connective tissue growth factor, *Am J Res Cell Mol Biol*, 34,65-72,2006.
  4. Kowal-Bielecka O, Dister O, Neidhart M, Kunzler P, Rathage J, Nawara M, Carossino A, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S.Evidence of 5-lipoxygenase overexpression in the skin of patients with systemic sclerosis : a newly identified pathway to skin inflammation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*.44, 1865-1875, 2001.
  5. Ando,M, Murakami Y, Kojima F, Endo H, Kitasato H, Hashimoto A, Kobayashi H, Majima M, Kondo H, Hayashi I, Retrovillary Introduced Prostaglandin D2 synthase suppresses lung injury induced by bleomycin, *Am.J.Repir,Mol.Biol*.28,582-591,2003.
- 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

### Effect of 15-LOX cell in BLM-induced interstitial pneumonitis

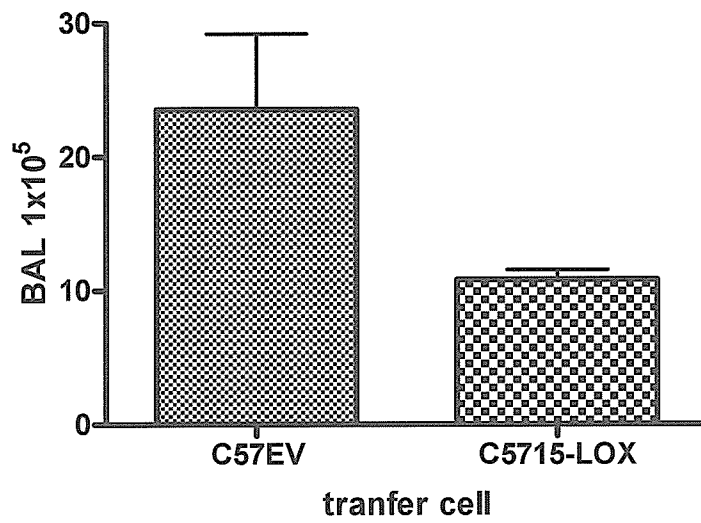
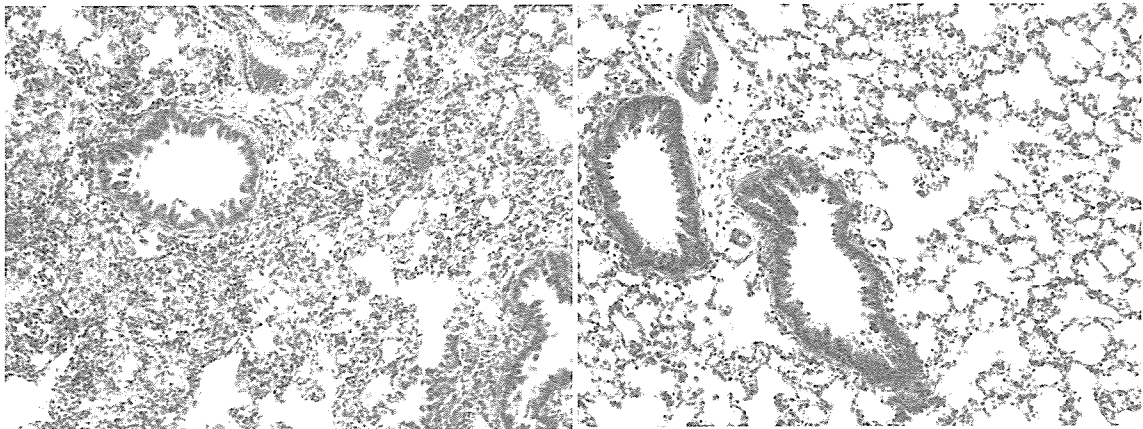


図1 15-LOX細胞移植によるブレオマイシン投与間質性肺炎の治療効果  
気管支肺胞洗浄による細胞数の変化  
C57 EV, C57 15LOX

### Effect of 15-LOX cells in Bleomycin-induced interstitial pneumonitis of mice



**EV-Cells**

**5-LOX Cells**

図2 ブレオマイシン投与28日後の組織変化

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

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化は創傷治癒を遅延させる：  
創傷治癒遅延モデルの検討

研究協力者 山本俊幸 東京医大皮膚科

## 研究要旨

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化を利用して、創傷治癒の検討を行った。ヌードマウスの背部に対称性にブレオマイシンと PBS を皮内注射した後、パンチで穴を開け、創の大きさを経時的に測定した。その結果、ブレオマイシン処理部では、コントロールに比較して創の上皮化が有意に遷延した。これは、創傷治癒遅延モデルになる可能性が示唆され、強皮症に伴う難治性潰瘍の病態解析ならびに治療薬の評価・開発に有用なことが期待される。

## A. 研究目的

強皮症を始めとする膠原病にはしばしば難治性の深い潰瘍がみられ、患者の QOL も妨げられている。われわれは、これまでにブレオマイシンの局所投与によりマウスに皮膚硬化を誘導し、強皮症モデルとして報告してきた。今回、このモデルを応用して、創傷治癒遅延モデルを作製した。

## B. 研究方法

剃毛の影響をなくすため、ヌードマウス（4 週令、雌）を使用した。なお、ヌードマウスにおいても、ブレオマイシン処理により皮膚硬化が誘導されることは既に報告している（1）。マウスの背部に対称性に 2 箇所、ブレオマイシン（500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）およびコントロールの PBS を 100  $\mu\text{l}$  ずつ、週 5 日間、計 5 週間皮内注射した。その後 8mm パンチで穴を開け、創の長径、短径を計測した。途中で病変部を生検し、ホルマリン固定ならびに  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

## C. 研究結果

創の短径、および面積を示す。Day 3, Day 7, Day 10 いずれにおいても、PBS 処理群には比較して、ブレオマイシン処理群では有意に創の上皮化が遅延して見られた（図 1、2）。

## D. 考察

今回の検討で、ブレオマイシンによって誘導された皮膚硬化病変は、創傷治癒が遅延することが確認された。この機序については未だ不明であるが、これまで、ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルにおいて、アポトーシスが亢進していること、活性酸素が関与していること、様々な cytokine, growth factor, chemokine が複雑なネットワークを形成していることを報告してきた。

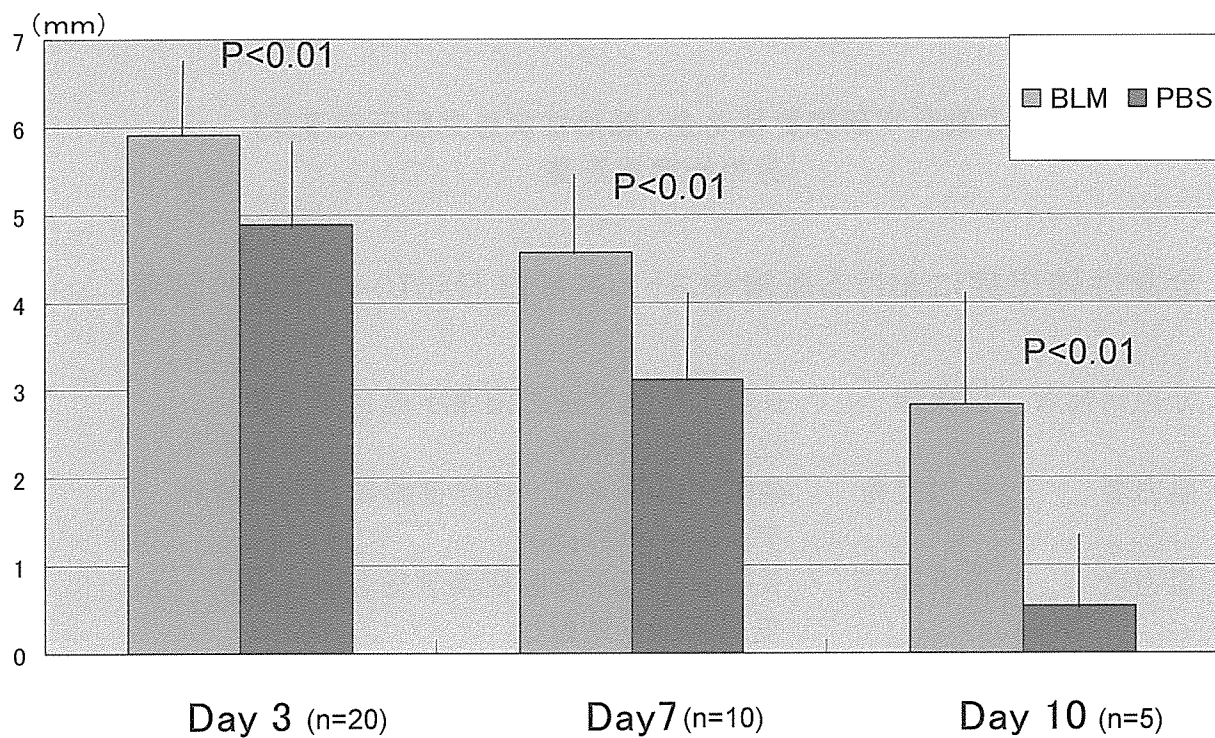
また近年、創傷治癒において、 $\beta$ -catenin/ c-myc の経路が活性化されると、keratinocyte の migration が抑制され、創傷治癒が遅れる可能性が示唆されている。これらについてさらに検討していく予定である。

## E. 結論

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルを用いて、創傷治癒遅延モデルを作製した。今後、創傷治癒のメカニズムの解析、および新しい治療薬の評価手段として有用になることが期待される。

## F. 文献

1. Yamamoto, T., and Nishioka, K. 2004. Animal model of sclerotic skin. IV: Evaluation of bleomycin-induced skin sclerosis in nude mice. *Arch Dermatol Res* 295: 453.



Mann-Whitney u-test

図 1 : マウスの背部にパンチで穴を開けた後の、創の短径の経時的変化。

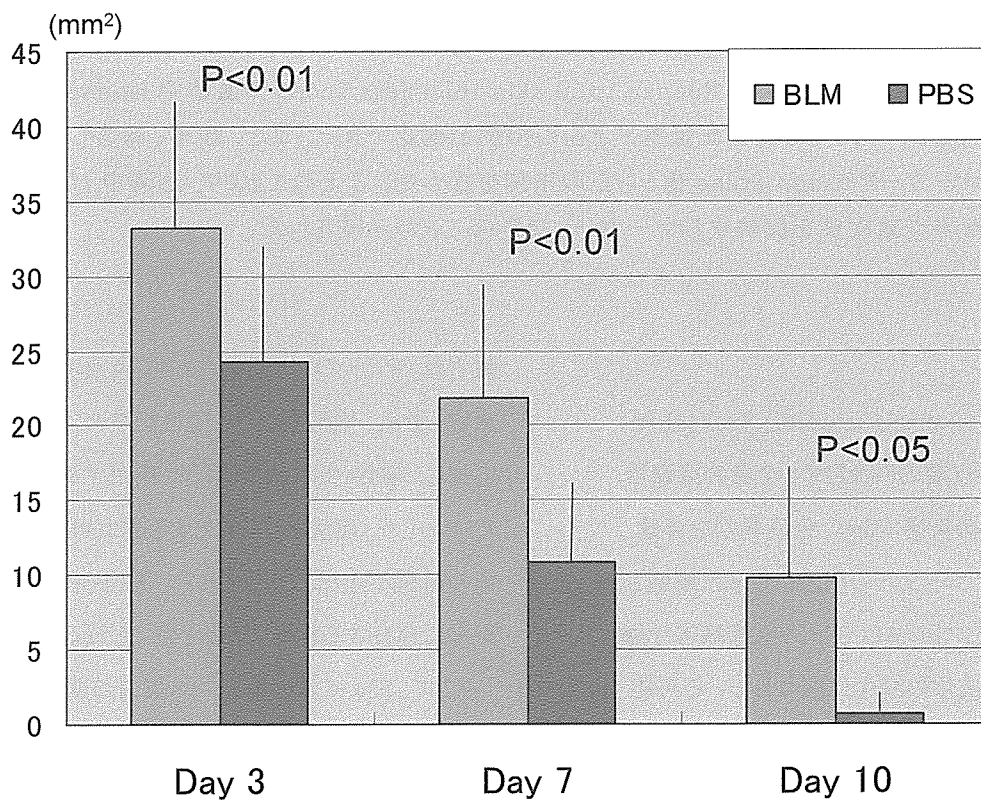


図 2 : 創の経時的変化 (面積)。

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ストレス蛋白 Hsp70 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	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
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

研究要旨

血清中 Hsp70 値は全身強皮症患者(SSc)において健常人と比較して有意に高値を示していた。Limited cutaneous SSc と diffuse cutaneous SSc では血清中 Hsp70 に有意な差は認めなかった。また、臨床症状との相関では、肺線維症を有する患者群で有意に、また手指の屈曲拘縮を有する群で有意に Hsp70 は高値を示し、Rodnan total skin thickness score や血清中 monocyte chemotactic protein - 1、そして腎血管抵抗と正の相関が確認できた。また、昨年、報告した血清中酸化ストレスマーカー8-isoprostane 値とも正の相関を認めた。以上のことより、血清中 Hsp70 は SSc の細胞障害や重症度を反映するマーカーとなりう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)。

Hsp70 はストレスタンパク質と呼ばれる分子シャペロンのひとつであり細胞障害に伴って発現が増

強する。サイトゾルに通常存在し、生体が外傷、感染、虚血、低酸素などを受けた場合に発現が増強し、細胞・生体に保護的に作用する(3)。SSc ではレイノー症状をはじめとする虚血再灌流や末梢の循環不全などが認められ、虚血・低酸素状態が常に存在する状態であると考えられる。

そこで、SSc におけるストレス蛋白の関与を検討するために血清中 Hsp70 値を測定し、臨床的相関を含めて検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象患者はSSc 47例(女性40例、男性7例)であり、年齢は $49.0 \pm 17.1$ 歳であった。病型別ではlimited cutaneous SSc (lSSc)が22例、diffuse cutaneous SSc (dSSc)が26例であった。lSScとdSScの罹病期間はそれぞれ、 $10.3 \pm 10.1$ 年、 $3.2 \pm 3.1$ 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22例、抗セントロメア抗体陽性例が17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5例、Th/To抗体陽性例が1例、残り1例は抗核抗体陰性であった。30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。

### 2) ELISA

血清中Hsp70値はELISAキット(Stressgen, Victoria, Canada)を用いて測定した。

## C. 研究結果

### 1) SScにおける血清中Hsp70値

dSSc、lSSc患者における血清中Hsp70値は健常人と比較して有意に上昇していた( $p < 0.001$ ) (図1)。一方、dSSc患者とlSSc患者においては有意な差は認められなかった。

### 2) SScにおける血清中Hsp70値と臨床所見との相関

初診時における血清中Hsp70値と臨床所見と関連を検討すると、血清中Hsp70値は肺線維症のある群で高値を示し( $p < 0.05$ )、また、手指関節の拘縮のある群で有意に高値を示した( $p < 0.05$ ) (図2)。さらに、Hsp70値と他の臨床所見、検査所見との相関を検討したところ、modified Rodnan total skin thickness score (m Rodnan TSS)と正の相関が認められ( $r = 0.32$ ,  $p < 0.05$ )、また血清中のまた単球の活性化因子であるmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)値とも正の相関が確認できた( $r = 0.438$ ,  $p < 0.05$ ) (図3)。以上のことから、Hsp70は皮膚硬化と関連している可能性が示唆された。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Hsp70値を比較すると、正の相関が有意に認められた( $r = 0.39$ ,  $p < 0.05$ ) (図3)。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、Hsp70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CRP値とHsp70は正の相関を示した。

### 3) SScにおける血清中Hsp70値と酸化ストレスとの関連

昨年度に報告した酸化ストレスのマーカーとしての有用性が期待される血清中8-isoprostane値とHsp70値を比較したところ、SSc患者血清中Hsp70は血清中8-isoprostane値と正の相関が確認され( $r = 0.38$ ,  $p < 0.01$ )、Hsp70はSScにおける酸化ストレスとの関連も示唆された(図3)。

## D. 考案

今回の研究で SSc 患者血清中 Hsp70 値が健康人と比較し有意に上昇していることが確認できた。Hsp70 を含む heat shock protein は免疫応答にも深く関与し、抗原提示細胞におけるクロスプレゼンテーション機構でも重要な役割を果たし免疫反応の調節役としても働いているとされる(4)。さらには、Hsp60, Hsp70, Hsp90 を含む様々な Hsp は自己免疫疾患にて検出されることが報告されており(5)、今回、SSc で血清中 Hsp70 が有意に高値を示したのも Hsp70 の自己免疫応答への関与を示唆するものであると考えられる。

本研究において血清中 Hsp70 は PI 値との相関より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していると考えられている。レイノー症状はその特徴的な症状であるが、手指のみならず冠動脈や腎でも発生するといわれている(6)。レイノー症状により引き起こされた虚血再灌流は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(7, 8)。Hsp70 はアンギオテンシン投与によるラット高血圧モデルで腎での発現が増強することが報告されており(9)、また、ラットの虚血再灌流モデルにおいてもエリスロポエチン投与が Hsp70 を誘導して腎保護作用を持つとの報告もある(10)。これらのことより、SSc での Hsp70 の発現は、虚血再灌流や酸化ストレスによる血管障害への生体の防御反応として産生されている可能性が考えられる。

また、今回、m Rodnan TSS が Hsp70 値と正の相関を示し、Hsp70 値と皮膚硬化との関連が考えられたが、同時に Hsp70 は血清中 MCP-1 との正の相関も示していた。松下らは、SSc において

Th1、Th2 のサイトカインプロファイルと皮膚硬化に関しての検討を行い、MCP-1 を含む Th2 サイトカインは皮膚硬化の強い SSc の発症初期には高値を示し、萎縮期に入ると Th2 サイトカインが減少し、逆に Th1 サイトカインが誘導されることを報告している(11)。この結果も Hsp70 が皮膚硬化と関連が深いことを示唆するものと思われる。

一方、肺の障害に関しては、血清中 Hsp70 値は肺線維症を有する群で高値を示していた。これまでも Hsp 産生と肺障害の関連は多数報告されており、TNF- $\alpha$ / actinomycin D 投与による肺上皮と線維芽細胞のアポトーシスは carbon monoxide 投与で誘導された Hsp70 で抑制されるとの報告や(12)、急性の肺障害では Hsp70 の inducible form である Hsp72 が増加しており急性肺障害のマーカーとして有用であることが示唆されている報告などが存在する(13)。

さらに、酸化ストレスと Hsp70 値に注目すると、SSc の酸化ストレスでは nitric oxide (NO) が重要な役割を果たしていることが考えられている。その中には、レイノー症状後の虚血再灌流状態で産生された 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があり(7, 8)、また、Hsp70 は腎臓や心臓などで NO の産生ともに増加しており、この Hsp70 の増加が NO の合成阻害剤である N-nitro-L-arginine で阻害されることにより、Hsp70 の産生に NO が深く関与していることを示唆している報告もある(14)。さらに、SSc における酸化ストレスのマーカーであることが示唆されている 8-isoprostane 値(15)と Hsp70 の相関が認められたことから SSc 患者血清中の Hsp70 は SSc における酸化ストレスに重要な役割を果たしていることが考えられた。

## E. 結論

SSc 患者血清中の Hsp70 は増加しており、肺線維症、皮膚硬化、腎血管障害との相関が認められた。また、酸化ストレスのマーカーや炎症所見との相関も確認できた。

以上のことより、Hsp70 は SSc の細胞障害や病勢を反映する有用なマーカーとなる可能性が示唆された。

## 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 Aug;21(8):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 Nov;44(11):2653-64.
3. 鶴島雅子. 【臓器障害におけるストレス蛋白の役割】 熱ショック蛋白誘導の活性化マクロファージに与える影響. *ICUとCCU(0389-1194)*; 2006. p. 337-43.
4. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*. 2003 Aug 9;362(9382):469-76.
5. Winfield J, Jarjour W. Stress proteins in autoimmunity. *Adv Exp Med Biol*. 1994;347:99-113.
6. 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 Jan;53(1):1-46.
7. 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 Jan;16(1):18-22.
8. Suematsu M, Wakabayashi Y, Ishimura Y. Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc Res*. 1996 Oct;32(4):679-86.
9. Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui Si S, Mori I, Tang SS, et al. Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II. *Hypertension*. 2002 Jan;39(1):122-8.
10. Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Faseb J*. 2003 Sep;17(12):1754-5.
11. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin



- sclerosis. *J Rheumatol.* 2006 Feb;33(2):275-84.
12. Kim HP, Wang X, Zhang J, Suh GY, Benjamin IJ, Ryter SW, et al. Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide: involvement of p38 beta MAPK and heat shock factor-1. *J Immunol.* 2005 Aug 15;175(4):2622-9.
13. Ganter MT, Ware LB, Howard M, Roux J, Gartland B, Matthay MA, et al. Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Sep;291(3):L354-61.
14. Malyshev I, Manukhina EB, Mikoyan VD, Kubrina LN, Vanin AF. Nitric oxide is involved in heat-induced HSP70 accumulation. *FEBS Lett.* 1995 Aug 21;370(3):159-62.
15. Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Hasegawa M, Takehara K, et al. Serum levels

of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2006 Jan 31.

## G. 研究発表

Ogawa F, Shimizu K, Hara T, Muroi E, Hasegawa M, Takehara K, Sato S: Serum levels of Hsp70, a chaperon for protecting against cellular injury, are evaluated in patients with systemic sclerosis: Association with fibrosis and vascular damage. 2005 ACR 69th/ARHP 40th Annual Scientific Meeting (November 10-15, 2006, Washington, DC)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## Serum Hsp70 Levels in SSc

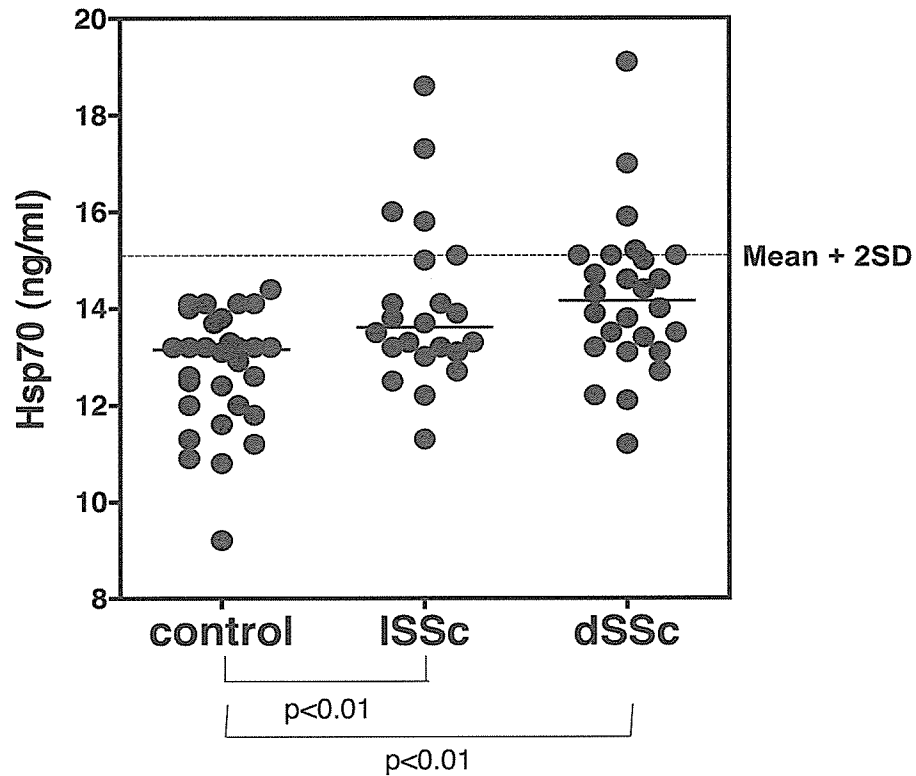


図1： dSSc, lSScおよび健常人(control)における血清中Hsp70値。点線は健常人の平均値 + 2SDに設定したカットオフ値を表す。

## Clinical Correlation of Hsp70 Levels in SSc

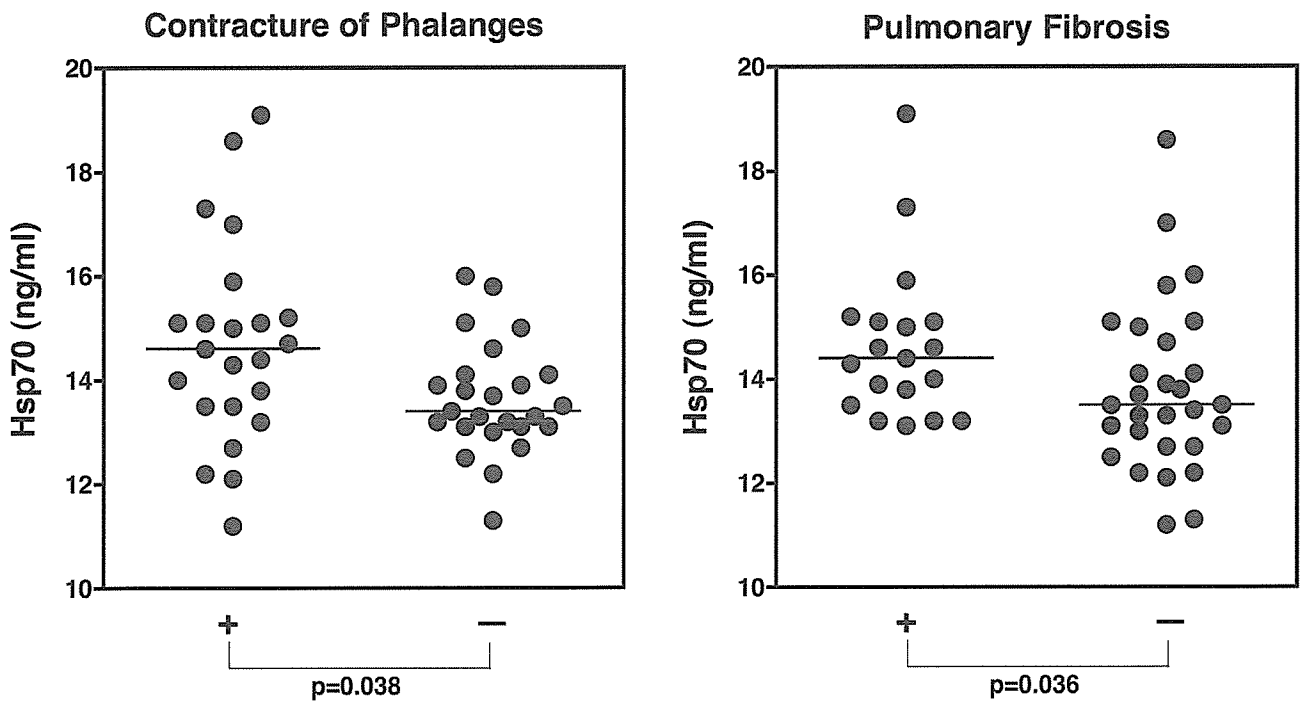


図2： 手指拘縮、肺線維症の有無でSSc症例を分割したときの血清中Hsp70値の比較。

# Clinical Correlation of Hsp70 Levels in SSc

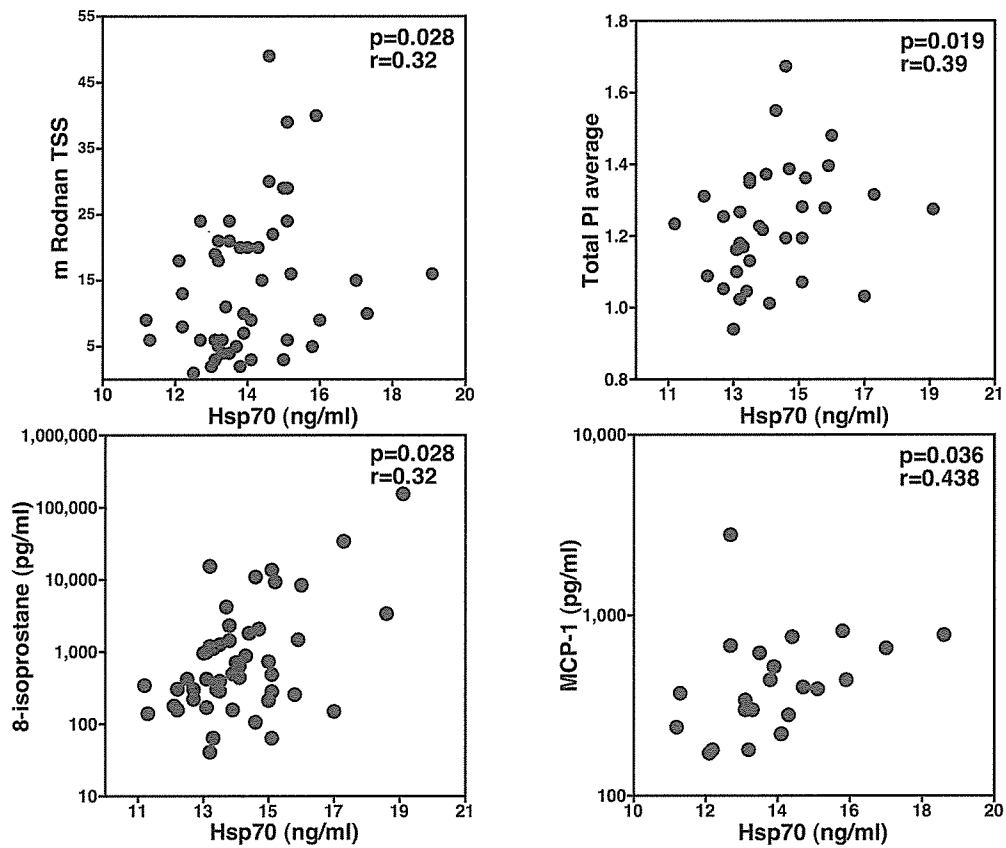


図3: SScにおける血清中Hsp70値とmodified Rodnan total skin thickness score (m Rodnan TSS), 腎血管抵抗平均値 (Total PI average), 血清中8-isoprostane 値、血清中MCP-1との相関。

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 Peroxiredoxin I 抗体の陽性頻度と

その臨床的意義について

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	岩田洋平	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	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

抗酸化酵素である Peroxiredoxin I (Prx I) に対する自己抗体は、健常人と比較し全身性強皮症患者では有意に上昇しており、33%が陽性を示した。抗 Prx I 抗体が陽性であった全身性強皮症患者は罹病期間がより長く、肺線維症、%VC および%DLco の低下、心臓疾患、抗トポイソメラーゼ I 抗体、血清ガンマグロブリン値の上昇、血沈亢進がより高率に認められた。さらに、抗 Prx I 抗体は酸化ストレスの血清マーカーである 8-isoprostane 値および腎血管抵抗の指標である pulsatility index と正の相関を示した。また、抗 Prx I 抗体は Prx I の酵素活性を抑制した。以上のことから、抗 Prx I 抗体は全身性強皮症における酸化ストレスと相関し、疾患重症度を反映する有用なマーカーである可能性が示唆された。さらに抗 Prx I 抗体は、Prx I の酵素活性を抑制することで酸化ストレスを上昇させ、SSc の病態に関与している可能性が推測された。

A. 研究目的

近年、全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) 患者では酸化ストレスが増加していることが明らかとなった。さらに酸化ストレスと血管障害や線維化との関連性を示唆する報告も多く (1)、酸化ストレスは SSc の病態に重要な役割を果たしていると考えられている (2)。抗酸化酵素は、生体において酸化ストレスに対する重要な防御機構として働いているため、その破綻は酸化ストレスの増加につながる。従って、生体内に抗酸化酵素に対する自己

抗体が存在し、酵素活性を抑制すると酸化ストレス過剰状態に陥りやすくなる。peroxiredoxin I (Prx I) は、近年発見された抗酸化酵素で、様々な臓器で同定され細胞内に高い濃度で含まれることが判明した (3 - 5)。さらに、全身性自己免疫疾患患者の 33% に抗 Prx I 抗体が検出されることも報告され注目されている (6)。しかし、SSc 患者においては抗 Prx I 抗体を検討した研究は皆無である。従って、SSc における抗 Prx I 抗体の陽性率と臨床的意義、中和活性の有無について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象患者は SSc 70 例 (女性 61 例、男性 9 例) であり、年齢は  $50 \pm 16$  歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 30 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 40 例であった。lSSc と dSSc の罹病期間はそれぞれ  $8.3 \pm 9.3$  年、 $3.0 \pm 2.9$  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 32 例、抗セントロメア抗体陽性例が 23 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 7 例、抗 Th/To 抗体陽性例が 1 例であった。残りの 4 例では抗核抗体は陰性であった。23 例の健常人をコントロールとして用いた。

### 2) ELISA

ELISA プレートに human recombinant Prx I (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を  $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  で  $4^\circ\text{C}$ 、overnight コートし 2% BSA (bovine serum albumin) + 1% gelatin 加 TBS (Tris-buffered saline) でブロッキングを行った。血清を各ウェルに加えて室温で 90 分反応させた後 ALP (alkaline phosphatase) 標識した 2 次抗体を加え、PNPP (p-nitrophenyl phosphate) を基質として発色させ 405 nm で吸光度 (optical density; OD) を測定した。

### 3) 免疫ブロット法

Prx I (Sigma-Aldrich) を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後、ELISA 法で IgG 型抗 Prx I 抗体陽性であった SSc 患者、陰性であった

SSc 患者および健常人それぞれの血清を一晩反応させた。ALP 標識した 2 次抗体を加えてから BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indrolyl phosphate) と NBT (nitro blue tetrazolium) を用いて発色させた。

### 4) 抗 Prx I 抗体の Prx I 抑制アッセイ

抗 Prx I 抗体陽性の SSc 患者、陰性の SSc 患者、コントロールそれぞれの血清より IgG を抽出した。Prx I の酵素活性は、一定量の Prx I に抽出した IgG を反応させた後に  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、thioredoxin、thioredoxin reductase (LabFrontier, Seoul, Korea)、NADPH (Sigma-Aldrich) を介した thioredoxin reductase system を応用し測定した (7)。

## C. 研究結果

### 1) SSc における抗 Prx I 抗体

SSc 患者において IgG 型の抗 Prx I 抗体の OD 値は健常人と比較し有意に上昇していた (図 1)。また、lSSc と dSSc の両群間に有意な差は認めなかった。対照的に IgM 型の抗 Prx I 抗体の OD 値は健常人と有意差を認めなかった。

健常人の平均値 + 2SD の OD 値 (IgG 型抗 Prx I 抗体 = 0.537、IgM 型抗 Prx I 抗体 = 0.687) をカットオフ値とすると、SSc 全体では 33% (23/70) が IgG 型抗 Prx I 抗体陽性であった。対照的に健常人では一例のみ陽性を示したのみであった。このように、IgG 型抗 Prx I 抗体は SSc で有意に上昇していることが明らかとなった。

### 2) SSc における抗 Prx I 抗体と臨床所見との相関

IgG 型抗 Prx I 抗体と臨床所見との相関を表 1 に示す。抗 Prx I 抗体が陽性であった SSc 患者で

は、陰性であった SSc 患者と比較して、罹病期間がより長く、肺線維症、心臓疾患、抗トポイソメラーゼ I 抗体、血清ガンマグロブリン値の上昇、血沈亢進がより高率に認められた。さらに、抗 Prx I 抗体は %DLco、%VC、酸化ストレスの血清マーカーである 8-isoprostane 値および腎血管抵抗の指標である pulsatility index と正の相関を示した (図 2)。

### 3) 免疫プロット法

ELISA 法で IgG 型抗 Prx I 抗体が陽性であった SSc 患者血清は、Prx I と反応し 25kDa にバンドを認めた。対照的に IgG 抗 Prx I 抗体陰性 SSc 患者、健常人ではバンドは認められなかった (図 3)。このことから、IgG 抗 Prx I 抗体の存在が免疫プロット法により確認された。

### 4) 抗 Prx I 抗体の Prx I 抑制アッセイ

抗 Prx I 抗体陰性 SSc 患者より抽出した IgG は Prx I の酵素活性を抑制しなかった。対照的に、抗 Prx I 抗体陽性 SSc 患者より抽出した IgG は、有意に (平均 59%) Prx I の酵素活性を抑制した (図 4)。このことから、IgG 型抗 Prx I 抗体は Prx I の酵素活性を抑制することが示唆された。

## D. 考案

今回の検討で SSc 患者では、健常人と比較し IgG 型抗 Prx I 抗体が有意に高値を示すことが明らかとなった。また、この自己抗体は SSc 患者における肺線維症の重症度、腎血管障害の程度、心臓病変と相関していた。さらに高ガンマグロブリン血症、血沈の亢進とも相関を認めた。このことから、抗 Prx I 抗体は SSc の重症度と関連していることが示唆された。

一方、ISSc と dSSc の間に抗 Prx I 抗体の値に有意差は認めず、modified Rodnan total skin thickness score (modified Rodnan TSS) との相関も認められなかった。このように抗 Prx I 抗体は肺線維症の重症度と相関するが、皮膚硬化とは相関しなかった。この解離の原因は不明だが、dSSc では modified Rodnan TSS は発症早期に急激に増加し時間の経過とともに低下してくること (8, 9)、抗 Prx I 抗体陽性 SSc 患者は陰性 SSc 患者と比較し罹病期間がより長いことを考え合わせると抗 Prx I 抗体は進行中の皮膚硬化ではなく、臓器における酸化ストレスの蓄積を反映していることが推測される。このことから、抗 Prx I 抗体は SSc の病期を推測するマーカーではなく、酸化ストレスの蓄積と内臓病変の重症度を推測するマーカーと考えられた。

抗 Prx I 抗体陽性 SSc 患者より抽出した IgG は Prx I の酵素活性を抑制した。対照的に、抗 Prx I 抗体陰性 SSc 患者および健常人より抽出した IgG は Prx I の酵素活性を抑制しなかった。さらに、抗 Prx I 抗体は酸化ストレスのマーカーである 8-isoprostane 値とも正の相関を認めた。これらの結果は、抗 Prx I 抗体が Prx I の活性を抑制することで酸化ストレスの増加に関与している可能性を示唆している。しかしながら、Prx I は細胞質内に存在し (10, 11) 生理的な条件下では細胞外に分泌されないため、抗 Prx I 抗体が SSc の病態形成に関与しているかどうかについては未だ不明である。

SSc 患者において観察される、Raynaud 現象に代表される組織の虚血および再灌流は活性酸素の産生を促進する (12)。血管内皮細胞は抗酸化酵素の一種であるカタラーゼを欠如するため活性酸素により障害を受けやすく (13)、その結果内

膜の肥厚や線維化をきたす。また、傷害された血管内皮細胞からの核蛋白が曝露されることで、自己免疫反応が誘発され、自己抗体の産生や炎症反応をきたしうる (14)。Prx I は血管内皮細胞に豊富に含まれ、増殖中の細胞において過剰発現されている。さらに、肺サルコイドーシスにおいて Prx I の過剰発現が (15)、肺癌患者では血清中の抗 Prx I 抗体および Prx I が検出されている (16)。今回抗 Prx I 抗体がより長い罹病期間、肺線維症の重症度と相関していたことを考え合わせると、抗 Prx I 抗体は長期間の酸化ストレスによる血管内皮細胞障害の結果 cryptic epitope が曝露され、二次的に産生されている可能性が考えられた。

## E. 結論

IgG 型抗 Prx I 抗体は酸化ストレス過剰状態と相関しており、SSc の重症度に対する有用なマーカーである可能性が示唆された。

## F. 文献

- Ogawa F., Shimizu K., Muroi E., Hara T., Hasegawa M., Takehara K., Sato S. Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 815-8.
- Murrell D.F. A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:78-85.
- Rhee S.G., Chae H.Z., Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1543-52.
- Chae H.Z., Robison K., Poole L.B., Church G., Storz G., Rhee S.G. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7017-21.
- Chae H.Z., Chung S.J., Rhee S.G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 1994;269:27670-8.
- Karasawa R., Ozaki S., Nishioka K., Kato T. Autoantibodies to peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases. *Microbiol Immunol* 2005;49:57-65.
- Kim J.A., Park S., Kim K., Rhee S.G., Kang S.W. Activity assay of mammalian 2-cys peroxiredoxins using yeast thioredoxin reductase system. *Anal Biochem* 2005; 338: 216-23.
- Clements P.J. Systemic sclerosis (scleroderma) and related disorders: clinical aspects. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 2000;14:1-16.
- Mayes M.D., O'Donnell D., Rothfield N.F., Csuka M.E. Minocycline is not effective in systemic sclerosis: results of an open-label multicenter trial. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 553-7.
- Immenschuh S., Baumgart-Vogt E. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 768-77.

11. Masutani H., Ueda S., Yodoi J. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ* 2005;12 Suppl 1:991-8.
12. Simonini G., Pignone A., Generini S., Falcini F., Cerinic M.M. Emerging potentials for an antioxidant therapy as a new approach to the treatment of systemic sclerosis. *Toxicology* 2000;155:1-15.
13. Shingu M., Yoshioka K., Nobunaga M., Yoshida K. Human vascular smooth muscle cells and endothelial cells lack catalase activity and are susceptible to hydrogen peroxide. *Inflammation* 1985;9:309-20.
14. Peng S.L., Fatenejad S., Craft J. Scleroderma: a disease related to damaged proteins? *Nat Med* 1997;3:276-8.
15. Kinnula V.L., Lehtonen S., Kaarteenaho-Wiik R., Lakari E., Paakko P., Kang S.W., Rhee S.G., Soini Y. Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 2002;57:157-64.
16. Chang J.W., Lee S.H., Jeong J.Y., Chae H.Z., Kim Y.C., Park Z.Y., Yoo Y.J. Peroxiredoxin-I is an autoimmunogenic tumor antigen in non-small cell lung cancer. *FEBS Lett* 2005; 579: 2873-7.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Y. Iwata, F. Ogawa, K. Komura, E. Muroi, T. Hara, K. Shimizu, M. Hasegawa, M. Fujimoto, Y. Tomita, and S. Sato: Autoantibody against Peroxiredoxin I, an Antioxidant Enzyme, in Patients with Systemic Sclerosis: Possible Association with Oxidative Stress. *Rheumatology* 投稿中

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし



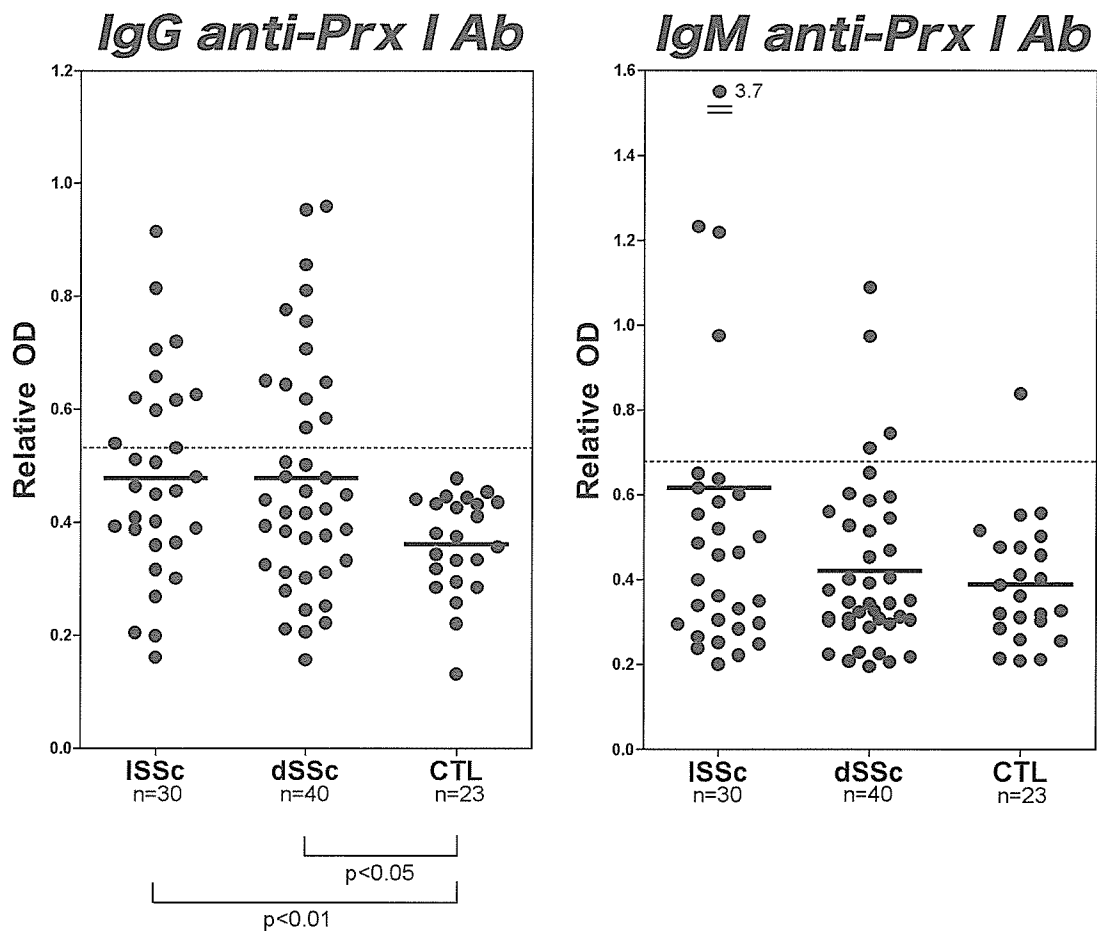


図1: ELISA法によって測定したISSc、dSSc、および健常人(CTL)におけるIgG、IgM型抗Prx I抗体。点線は健常人の平均値 + 2SDに設定したカットオフ値を示す。

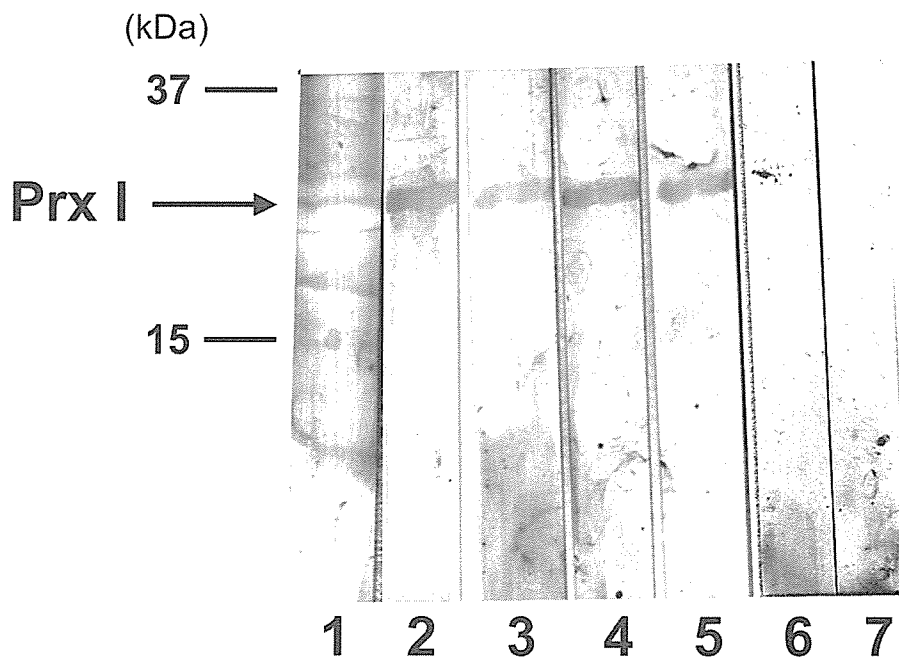


図2: 免疫ブロット法を用いたSSc患者における抗Prx I抗体の検出。レーン1:コロイド金染色したPrx I。レーン2-5:ELISA法でIgG型抗Prx I抗体が陽性であったSSc患者血清。レーン6:ELISA法でIgG型抗Prx I抗体が陰性であったSSc患者血清。レーン7:健常人の血清。分子量マーカー(kDa)を左側に示す。

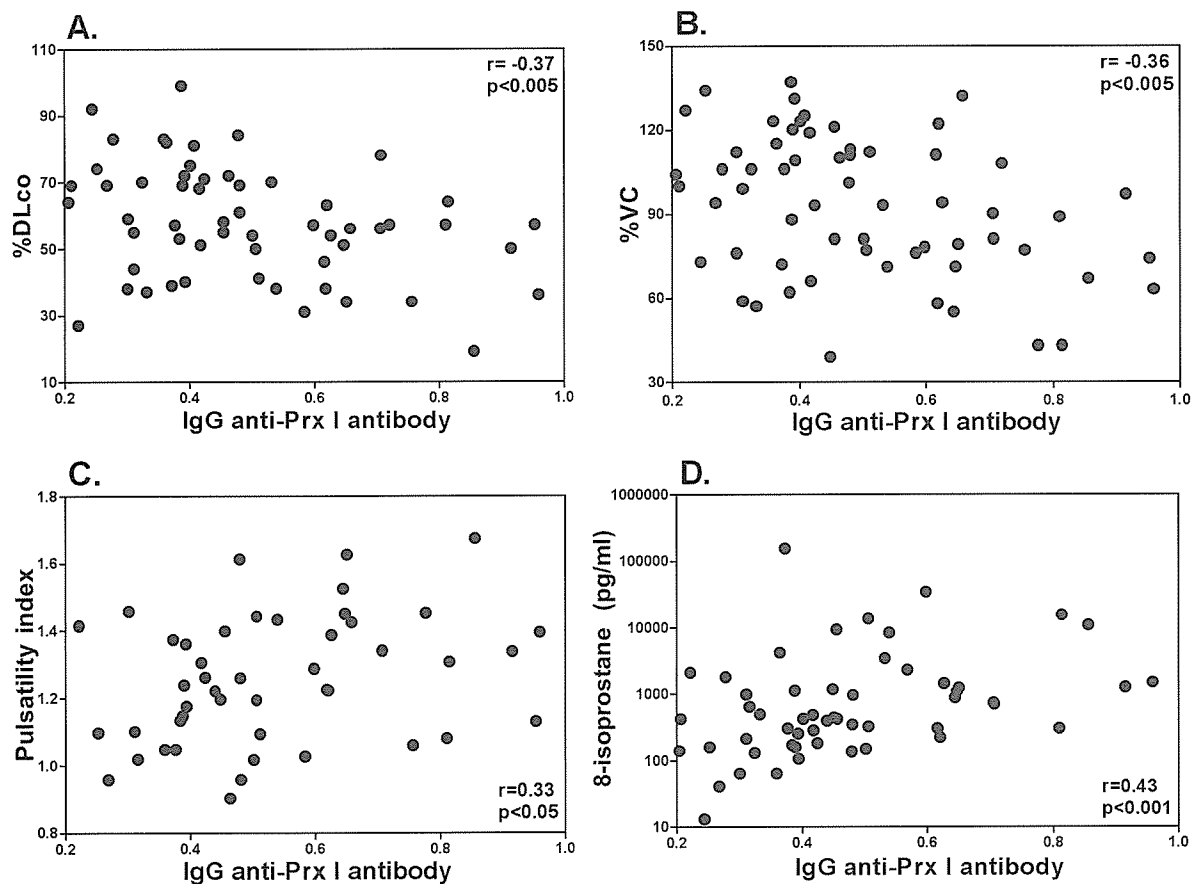


図3: SScにおける抗Prx I抗体の値と %DLco (A), %VC (B), pulsatility index (C), および血清8-isoprostane値 (D) との相関。

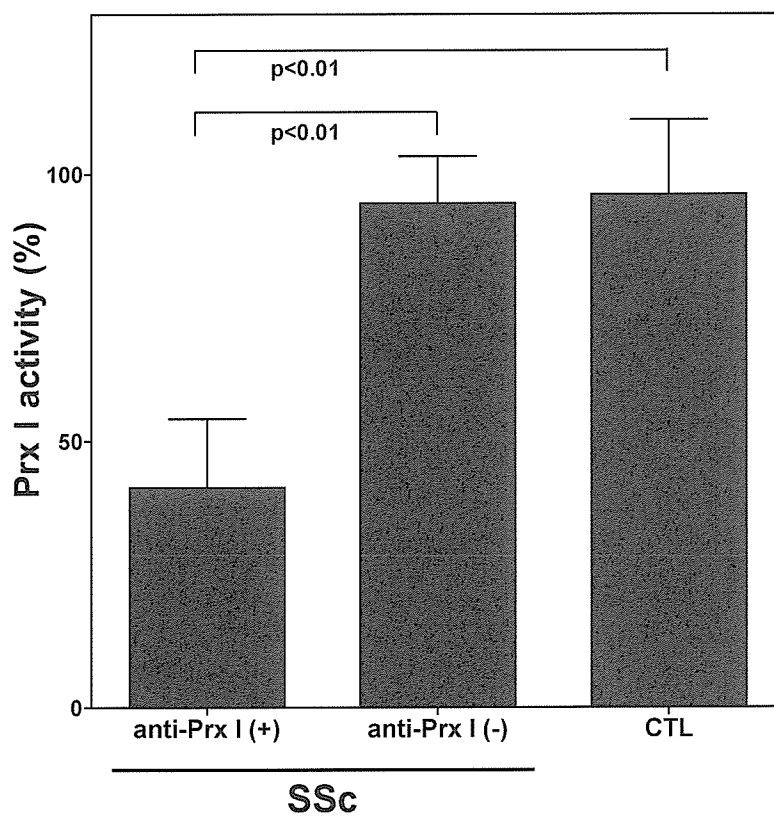


図4: IgG型抗Prx I抗体によるPrx I酵素活性の抑制。ELISA法でIgG型抗Prx I抗体が陽性であったSSc患者 [anti-Prx I(+)], IgG型抗Prx I抗体が陰性であったSSc患者 [anti-Prx I(-)], および健常人 [CTL] それぞれの血清よりIgGを抽出し、Prx Iと反応させたときの酵素活性を比較した。それぞれの活性はIgGを反応させていないPrx I酵素活性を100%と定義したときのパーセンテージにより表す。

表 1. SSc における IgG 型抗 Prx I 抗体と臨床所見との相関

	IgG 型抗 Prx I 抗体	IgG 型抗 Prx I 抗体
	陽性例 n=23	陰性例 n=47
性 (男性/女性)	2/21	7/40
年齢 (年、mean ± SD)	48 ± 19	45 ± 15
罹病期間 (年、mean ± SD)	8.1 ± 9.3*	3.8 ± 4.8
病型 (dSSc/lSSc)	13/10	27/20
臨床所見：		
Modified Rodnan TSS (mean ± SD)	15.7 ± 9.3	12.9 ± 10.3
指尖部虫喰状癬痕	36	42
びまん性色素沈着	64	50
手指屈曲拘縮	55	42
臓器病変：		
肺		
肺線維症	68*	34
%VC の低下	59*	20
%DLco の低下	95**	61
肺高血圧症	16	13
食道	50	53
心	36**	6
腎	5	2
関節	18	21
筋肉	14	21
検査所見		
抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性	67*	38
抗セントロメア抗体	32	33
血清 IgG 値 (mg/dl、mean ± SD)	1917 ± 542**	1606 ± 545
血清 IgA 値 (mg/dl、mean ± SD)	387 ± 189*	287 ± 100
血清 IgM 値 (mg/dl、mean ± SD)	249 ± 166*	172 ± 78
血沈 (mm/h、mean ± SD)	23.3 ± 16.7*	15.1 ± 11.9

表中の数字は特に示さない限り%を示す。

TSS = total skin thickness score

p<0.05、\*\* p<0.01 (IgG 型抗 Prx I 抗体が陰性の SSc 患者に対して)

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

汎発性強皮症における血清中可溶性 CD26 濃度について

研究協力者	矢澤徳仁	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
協力者	玉城善史郎	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 大学院生
協力者	久保正英	国際医療福祉大学三田病院皮膚科講師
協力者	蘆田龍一	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学助手
協力者	多田弥生	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学助手
協力者	富田 学	東京大学大学院 医学系研究科皮膚科学 大学院生
協力者	玉置邦彦	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症の病因は不明であるが、免疫異常、コラーゲンの代謝異常、微小血管障害などが考えられている。CD26 は dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) とよばれる特異なプロテアーゼ活性を有する膜蛋白で、可溶性の存在も知られており、これらはコラーゲンなどの細胞外マトリックスの分解や、T 細胞を中心とした種々の免疫反応に関与しているとされる。今回、当科を受診した 56 例の全身性強皮症患者を対象に、血清中の可溶性 CD26 濃度を ELISA 法にて測定し、臨床症状や検査所見との関連性を検討した。全身性強皮症患者の血清中可溶性 CD26 濃度は、健常人に比較して有意に低下していた。さらに血清中可溶性 CD26 濃度は皮膚硬化の範囲や肺線維症の罹患率や呼吸機能検査に対して逆相関がみられた。以上のことから血清中可溶性 CD26 濃度は全身性強皮症の線維化を含めた、病態に関与している可能性が推測された。

A. 研究目的

全身性強皮症は、皮膚および肺、心、腎、消化管などの内蔵諸臓器の線維化を主徴とする疾患で、肺線維症や肺高血圧、腸蠕動の低下、心筋障害など多様な内蔵病変を伴う(1)。

病因は、未だ不明であるが、自己抗体の産生や T 細胞、B 細胞の異常な活性化などに起因する免疫異常、TGF- $\beta$  シグナリングの過剰反応を中心としたコラーゲンの代謝異常に伴う細胞外マトリックスの過剰沈着や最近では微