

小血管障害などが考えられており、これらが複雑に関連して多彩な病像が形成されていると考えられている(2-4)。

CD26は766個のアミノ酸からなる110KDの2型の膜糖蛋白であり、dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) とよばれるペプチド酵素活性を有する特異な分子である。DPP IVはセリンプロテアーゼとして、特定の構造、N末端がalanine または proline または hydroxy proline である構造をもつペプチド鎖をN末端から2つ目のアミノ酸のC末端側のペプチド結合を切断する(5,6)。実際にCD26は多くの機能を有しており、T細胞を中心とした免疫反応の活性化に重要な役割を持つことが知られ(7,8)、フィブロネクチンやコラーゲン結合部位を有し、細胞外マトリックスと相互作用を起こすことが知られている(9)。さらにCD26は上述の exopeptidase としての働き以外にも alanine または proline または hydroxy proline を多数有する数種のコラーゲンをその部分で分解する endopeptidase としての機能を持つことも報告されている(10-12)。

CD26は膜型以外にも可溶型としても存在し、DPP IV酵素活性をはじめとして膜型と同様な性質を有するとされる(13)。

膠原病に関しては全身性ループスエリテマトーデスや関節リウマチにおいて血清中可溶性 CD26 濃度との病勢との関連が指摘されている。

そこで、今回我々は、全身性強皮症患者における血中可溶性 CD26 濃度と臨床および検査所見との関連性について検討を加えた。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象は1994年から2005年までに当科を受診した American College of Rheumatology の基準を満たす全身性強皮症患者 56例について検討した(14)。測定した血清は経口ステロイドや免疫抑制剤などの治療の既往がない患者の初診時のものを用いた。男性8例、女性48例で平均年齢 54.6 (±15) 歳であった。Leroy の分類により、limited cutaneous SSc (lc SSc) と diffuse cutaneous SSc (dc SSc) に分類し(15)、各々30例と26例であった。コントロールとしては年齢、性別を適合させた健常人26例(女性21例、男性5例 平均年齢 50.4 歳)の血清を用いた。初診時における modified Rodnan total skin score (mTSS) を含めた臨床、検査所見の測定も施行した。内蔵疾患に関しては Steen の定義を一部改変したものを用いた(16)。肺に関しては胸部X線あるいは高解像度CTを用いて両側肺底部の線維化所見にて評価した。肺高血圧に関しては心エコーを用い、肺動脈血圧>35mmHgを基準とした。食道病変に関してはバリウムを用いたX線検査や胃食道内視鏡検査にて食道下部の蠕動低下や食道の逆流性食道炎の所見を評価した。心疾患に関しては不整脈などの心電図異常や心エコーでの心機能異常にて評価した。腎疾患は高血圧を伴う場合を含めた腎機能低下の既往にて評価した。関節疾患においては多発関節痛や関節炎の有無で判断した。さらに肺活量 (VC) と肺拡散能 (DLco) 呼吸機能検査も施行した。各々80%未満と70%未満を低下していると評価した。

抗核抗体に関しては Hep-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法を用いた。さらに特異抗核抗体に関しては抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 U1-RNP 抗体、抗セントロメア抗体、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体を ELISA 法にて検出した。

血中可溶性 CD26 濃度の測定は Bender MedSystem (Vienna, Austria) 社の sandwich ELISA kit を用いた。cut off は健常コントロールの mean - 2 SD とし、これ以下を低値群とした。また、統計として Mann-Whitney's U-test、chi-square test あるいは Fisher's exact test を用いた。

C. 結果

健常コントロール群において血清中可溶性 CD26 濃度は年齢、性別との相関はみられなかった。健常コントロールの濃度は 182 ± 29 ng/ml ($135-243$ ng/ml) であり (図 1)、平均 - 2 SD である 124 ng/ml 未満を有意な低値とした。

全身強皮症患者における血清中可溶性 CD26 濃度は、 144 ± 50 ng/ml ($50-279$ ng/ml) であり、 $P < 0.001$ で有意に低下しており、56 例中 20 例が低値群に分類された (図 1)。さらに全身性強皮症を dcSSc と lcSSc に分けると、血清中可溶性 CD26 濃度は dcSSc 群で 126 ± 40 ng/ml ($50-214$ ng/ml)、lcSSc 群で 160 ± 53 ng/ml ($51-279$ ng/ml) で dcSSc 群の血清中可溶性 CD26 濃度は有意に低下していた (図 2)。全身性強皮症患者を低値群と正常値群に分類し、臨床所見、検査所見に対する相関を検討した (表 1)。年齢、性別、罹患年数や食道疾患、心疾患、関節疾患の割合に有意差なかった。また、低値群と正常値群では肺線維症

の罹患率に統計的有意差は見られなかったが、低値群の方が正常値群に比較して罹患している割合が高かった ($P = 0.091$)。肺活量に関しては低値群では $\%VC < 80\%$ の患者の割合が正常値群に比較して有意に高値であった (20% vs 3.3% , $P < 0.05$)。以上のことから血清中可溶性 CD26 濃度は肺線維化の病態との関連が推測された。

これらに加えて、低値群では sublingual frenulum や cutaneous telangiectasia の罹患率割合が正常値群よりも有意に高かった (各々 82% vs 35% $P < 0.05$, 63% vs 29% $P < 0.05$)。逆に digital pitting scar に関しては、低値群は正常値群に比較して割合が有意に低かった (26% vs 56% , $P < 0.05$)。

D. 考案

CD26 は種々の機能を有する膜糖蛋白であり、メモリー T 細胞やナチュラルキラー T 細胞、B 細胞マクロファージなどの白血球以外にも上皮細胞や種々の内皮細胞、特に線維芽細胞表面に発現している (5, 17)。CD26 は DPP IV 酵素活性以外にも T 細胞を中心とした免疫反応を活性化する以外にも、細胞外マトリックス、特にコラーゲン代謝に作用することなどが報告されている。また、可溶性 CD26 は細胞表面上から切り離され膜型と同様の働きをされると考えられている (18)。

CD26 はこれまでに多発性硬化症、サルコイドーシス、バセドウ氏病、橋本病などの様々な疾患との関連性が指摘されている。(19-22)。膠原病に関しては全身性ループスエリテマトーデスや関節リウマチにおいて血

血清中可溶性 CD26 濃度が健常コントロール群に比較して低下しており、さらに各々の病勢と逆相関していると報告されている。これらの疾患の活動性に関連して血清中可溶性 CD26 値が低下している理由については様々な推察がなされている。炎症により CD26 の細胞表面からの切断が抑制されたり、抗 CD26 抗体の増加により可溶性 CD26 の除去率が上昇したり、あるいは可溶性 CD26 のマクロファージの取り込みが促進されることで、CD80 や CD26 などを含む分子との相互作用にてよって T 細胞による免疫反応が賦活化し病勢を悪化させるなどの理由が考えられている (13, 17)。全身性強皮症においても、可溶性 CD26 が減少している理由のひとつにこれらのような免疫異常が関連している可能性も考えられる。

一方、全身性強皮症患者由来の培養線維芽細胞において、健常人由来の細胞と比較して細胞表面の CD26 の発現量が低下し、それによりコラーゲンやフィブロネクチンをはじめとした細胞外マトリックスとの相互作用が抑制されて分解が低下し、コラーゲンの過剰な蓄積がおこると考えられている (23)。さらに CD26 は DPPIV 酵素活性によって、alanine または proline または hydroxy proline を有する種々のサイトカインやホルモンに対して、N 末端側から 2 つ目のアミノ酸のペプチド結合を切断する exopeptidase としての働き (24) が有名であるが、コラーゲンは alanine または proline をその内部に多数有しており、これらの部分に対して endopeptidase として働き分解するという機能を持つことも報告されている (9, 12)

これらのことから血清中可溶性 CD26 が皮膚や肺や他の内蔵の線維化に参与している可能性が示唆され、今回のわれわれの結果、すなわち血清中可溶性 CD26 濃度が強皮症患者の皮膚硬化や肺線維症、舌小帯短縮と逆相関しているという結果に合致していると考えられる。

以上のことから、全身性強皮症の病態形成において、コラーゲン代謝や免疫の異常に血清中の可溶性 CD26 の関与している可能性が推測された。

E. 結論

血清中可溶性 CD26 値は全身性強皮症の皮膚硬化や肺線維症の病勢との関連が推測された。

F. 文献

1. LeRoy EC, Black CM, Fleischmajer R, Jablonska S, Kreig T, Medsger T et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
2. Pearson JD. The endothelium: its role in scleroderma. *Ann Rheum Dis* 1991;50:866-71.
3. Korn JH. Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1991;3:947-52.
4. LeRoy EC. A brief overview of the pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis). *Ann Rheum Dis* 1992;51:286-8.

5. De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpe S: CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* 1999, 20:367-375
6. Hegen M, Niedobitek G, Klein CE, Stein H, Fleischer B. The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. *J Immunol* 1990;144:2908-14.
7. Morimoto C, Schlossman SF: The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol Rev* 1998, 161:55-70
8. Reinhold D, Kahne T, Steinbrecher A, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Brocke S: The role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) enzymatic activity in T cell activation and autoimmunity. *Biol Chem* 2002, 383:1133-1138
9. Hanski, C., Huhle, T., Gossrau, R. and Reutter, W.: Direct evidence for the binding of rat liver DPP IV to collagen in vitro. *Exp Cell Res.* 1988 ;178:64-72.
10. Kenny, A. J., Booth, A. G., George, S. G., Ingram, J., Kershaw, D., Wood, E. J. and Young, A. R.: Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase. *Biochem J.* 1976 ;157:169-82.
11. Lojda, Z., Smidova, J., Barth, A. and Ueberberg, H. : Are-Z-Arg-Gly-Phe-Phe-Leu-MNA and Z-Arg-Gly-Phe-Phe-Pro-MNA suitable substrates for the demonstration of cathepsin D activity? *Histochemistry.* 1988;88:505-12.
12. Bermpohl, F., K. Løster, W. Reutter, and O. Baum. : Rat dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) exhibits endopeptidase activity with specificity for denaturated fibrillar collagens. 1988; *FEBS Lett.* 428:152-156.
13. Kobayashi H, Hosono O, Mimori T, Kawasaki H, Dang NH, Tanaka H, Morimoto C: Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002, 29:1858-1866
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, Krieg T, Black C, Medsger TA Jr, Fleischmajer R, Rowell N, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subset, and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
16. Steen VD, Powell DL, Medsger TA Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988;31:196-203.
17. Busso N, Wagtmann N, Herling C,

- Chobaz-Peclat V, Bischof-Delaloye A, So A, Grouzmann E: Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. *Am J Pathol* 2005, 166:433-442.
18. Cordero OJ, Salgado FJ, Mera-Varela A, Nogueira M: Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2001, 21:69-74
19. Hafler, D. A., Fox, D. A., Manning, M. E., Schlossman, S. F., Reinherz, E. L. & Weiner, H. L. In vivo activated T lymphocytes in the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1985;312:1405-11.
20. Eguchi, K., Y. Ueki, C. Shimomura, T. Otsubo, H. Nakao, K. Migita, A. Kawakami, M. Matsunaga, H. Tezuka, N. Ishikawa, et al. Increment in the Tal₁ cells in the peripheral blood and thyroid tissue of patients with Graves' disease. *J. Immunol.* 1989. 142:4233-4240.
21. Wahlstrom J, Berlin M, Skold CM, Wigzell H, Eklund A, Grunewald J. Phenotypic analysis of lymphocytes and monocytes/macrophages in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Thorax.* 1999;54:339-46.
22. Canonica GW, Bagnasco M, Corte G, Ferrini S, Ferrini O, Giordano G. Circulating T lymphocytes in Hashimoto's disease: imbalance of subsets and presence of activated cells. *Clin Immunol Immunopathol.* 1982;23:616-25.
23. Bou-Gharios G, Osman J, Atherton A, Monaghan P, Vancheeswaran R, Black C, Olsen I. Expression of ectopeptidases in scleroderma. *Ann Rheum Dis.* 1995 ;54:111-6.
24. Mentlein, R. Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett.* 1988;234:251-6.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

F. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

图1

Serum soluble CD26 level (SSc vs control)

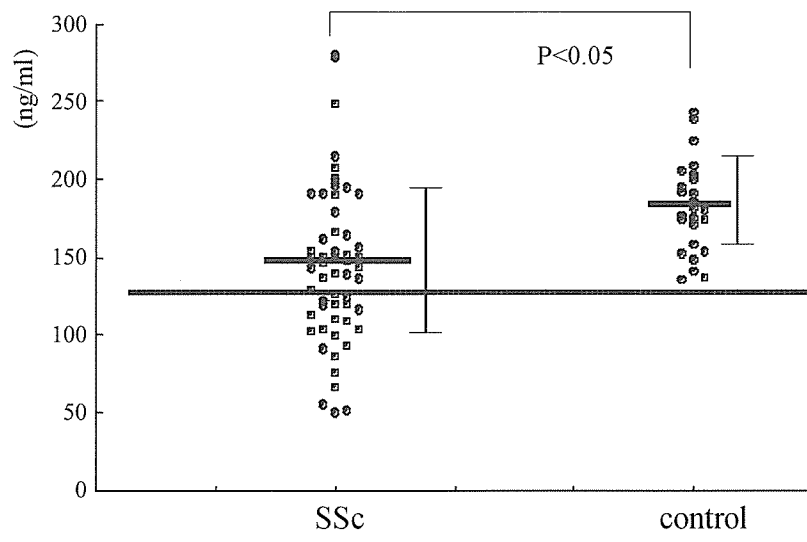


图2

Serum soluble CD26 level (dcSSc vs lcSSc)

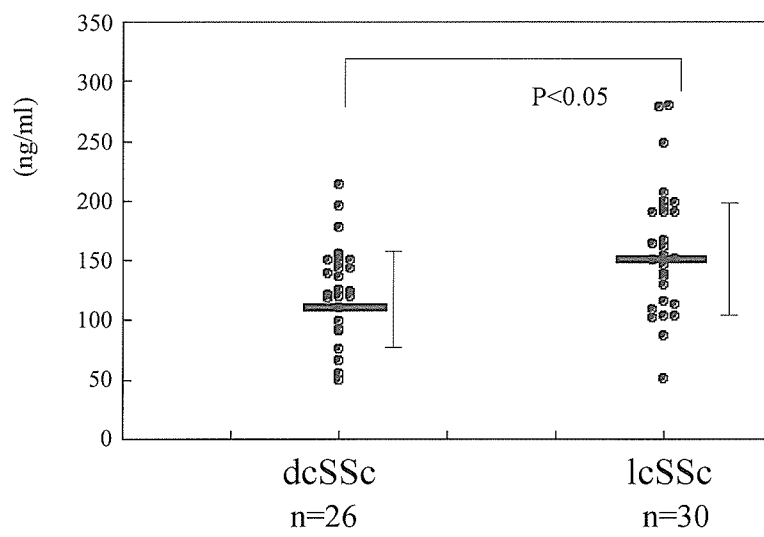


表1

Clinical and laboratory features

	Patients with lower sCD26 levels(n=20)	Patients with normal sCD26 levels(n=36)
M/F	4/16	4/32
Age,years (mean±SD)	57±13	53±17
Disease duration, years (mean±SD)	6.8±11.6	6.7±7.3
No.(%)with		
Lung fibrosis	13(65%)	14(41%)
Esophageal involvement	8(50%)	11(37%)
Heart involvement	2(13%)	4(14%)
Joint involvement	6(30%)	5(19%)
Reduced % VC (<80%)	4(20%) *	1(3%)
Reduced % DLco (<80%)	9(56%)	8(34%)
Digital pitting scar	5(26%) *	19(59%)
telangiectasia	10(63%) *	8(29%)
Short sublingual frenulum	14(82%) *	14(45%)
Nail fold bleeding	9(69%)	12(52%)
Phalangeal contracture	11(61%)	17(57%)
Anti-Topo I anitibody	8(40%)	11(31%)
Anti-centromere anitibody	5(25%)	12(33%)
Anti-U1RNP anitibody	2(10%)	4(11%)

* P<0.05 versus patients with normal CD26level

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 IL-17 値と臨床症状の検討

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	長谷川稔	金沢大学医学部附属病院皮膚科講師
協力者	村田真希	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
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

血清中 Interleukin 17 (IL-17)は全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc)で有意に上昇することが報告されており、病態への関与が注目されている。今回、健常人と比較してSSc、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) で有意に血清 IL-17 値が上昇していた。SScにおいて血清 IL-17 値が正常であった群は皮膚硬化の程度が強く、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性率が高いという結果であった。また、発症時期に関わらず血清 IL-17 値は上昇を認めた。以上より SScにおいてTh17細胞も病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

SSc患者の90%以上に自己抗体が検出され、T細胞やB細胞の異常活性化を認めることより免疫系の活性がSScの病態形成に関与しているとされる。Naïve細胞は往來、Th1細胞とTh2細胞のサブセットに分化すると考えられていたが、最近、IL-17を産生するT細胞(Th17細胞)の存在が明らかになり、自己免疫による組織障害の誘導で重大な役割を果たすことが示されている^{1,2}。また、SScの主要な症状の一つである膠原線維の増生は過剰発現された種々のサイトカインによると考えられているが、中でも、TGF- β が中心的な役割を果たしていると考えられる³。TGF- β は皮膚硬化のみで

なく、それ以前の炎症にも関与することが示唆されている。さらに、自己免疫を抑制し、組織障害を防ぐ役割を果たすCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞調節性(Treg)T細胞の重要な分化因子でもある^{4,5}。一方Th17細胞は炎症時に誘導されるIL-6がTGF- β が誘発するTreg細胞の産生を阻害し、結果的にIL-6とTGF- β が協働しTh17細胞の分化を誘導するとされる^{6,7}。

Th17細胞は線維芽細胞を刺激し炎症性サイトカインであるIL-6やIL-8を分泌させ、接着因子であるICAM-1の発現を増加させることが示されている。また、内皮細胞からもIL-6を分泌させることも報告されている⁸。最近、

強皮症初期において IL-17 の上昇が報告された⁹。そこで、今回 SSc における血清中 IL-17 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 59 例（女性 47 例、男性 12 例）であり、年齢は 49 ± 15 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 31 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 28 例であった。lSSc と dSSc の罹病期間はそれぞれ 7.6 ± 9.0 年、 2.8 ± 3.2 年であった。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 24 例、抗セントロメア抗体陽性例が 18 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 3 例、対応抗原不明が 12 例であった。10 例の SLE 患者および 10 例の健常人をコントロールとして用いた。

2) ELISA

血清中 IL-17 値は ELISA キット (Duoset ELISA Development System, R&D systemis, Minneapolis, USA) を用いて測定した。

C. 研究結果

1) SSc における血清中 IL-17 値

SSc、SLE 患者における血清中 IL-17 値は、健常人と比較して有意に上昇していた(図 1)。dSSc 患者と lSSc 患者の血清中 IL-17 値濃度は同程度であった。

健常人の平均値 + 2SD (2.4 pg/ml) をカットオフ値とすると、SSc 全体では 85% (50/59) で血清中 IL-17 値が上昇していた。

2) SSc における血清中 IL-17 値と罹病期間の

検討

SSc 患者を初診時における罹病期間で 4 つに分類した。いずれの期間でも血清中 IL-17 値は上昇していた。

3) SSc における血清中 IL-17 値と臨床所見との相関

初診時における血清中 IL-17 値と臨床所見との相関を表 1 に示す。血清中 IL-17 値が正常であった SSc 患者では、血清中 IL-17 値が高値であった SSc 患者と比較して、modified Rodnan total skin thickness score (modified Rodnan TSS)、ELISA 法による抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性率が有意に上昇していた (表 1)。

D. 考案

Th17 細胞は IL-6 と TGF- β によって Naïve 細胞から分化し自己免疫による組織障害を誘導すると考えられている。また、組織障害を防ぐ役割を果たす Treg 細胞の分化も TGF- β 、IL-6 に依存する。IL-6 が Naïve 細胞の Treg 細胞への分化を阻害し、Th17 細胞を分化誘導することで組織障害を促進すると考えられている。TGF- β 阻害により、Th17 細胞への分化が抑制され、慢性炎症が軽快することも報告されている¹⁰。

IL-17 は全身性強皮症のほか、リウマチ性関節炎、乾癬、および多発性硬化症などの慢性炎症性疾患に関連して高値であることが報告されている^{11 12 13 14}。一方、粘膜においては、Th17 細胞は保護的な役割を果たす可能性が報告されている¹⁰。

今回の研究では血清中 IL-17 値の平均値は

dsSSc 患者と lcSSc 患者で有意さは認めなかったが、血清中 IL-17 値が正常値である群では TSS が高値で、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性率が上昇していた。

E. 結 論

IL-17 の機能的な意義については不明であるが、IL-17 は SSc の免疫学的異常に関与していることが示唆された。

F. 文 献

- 1 Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1123-32.
- 2 Park H, Li Z, Yang XO et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1133-41.
- 3 Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; **24**: 677-88.
- 4 Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 531-62.
- 5 Chen W, Jin W, Hardegen N et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; **198**: 1875-86.
- 6 Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 1998; **16**: 249-84.
- 7 Bettelli E, Carrier Y, Gao W et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; **441**: 235-8.
- 8 Yao Z, Painter SL, Fanslow WC et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995; **155**: 5483-6.
- 9 Kurasawa K, Hirose K, Sano H et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; **43**: 2455-63.
- 10 Veldhoen M, Stockinger B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol* 2006; **27**: 358-61.
- 11 Albanesi C, Scarponi C, Cavani A et al. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; **115**: 81-7.
- 12 Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 2000;

- 164: 6621-32.
- 13 Kotake S, Udagawa N, Takahashi N et al.
IL-17 in synovial fluids from patients
with rheumatoid arthritis is a potent
stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin
Invest* 1999; **103**: 1345-52.
- 14 Chabaud M, Durand JM, Buchs N et al.
Human interleukin-17: A T cell-derived
proinflammatory cytokine produced by
the rheumatoid synovium. *Arthritis
Rheum* 1999; **42**: 963-70.

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

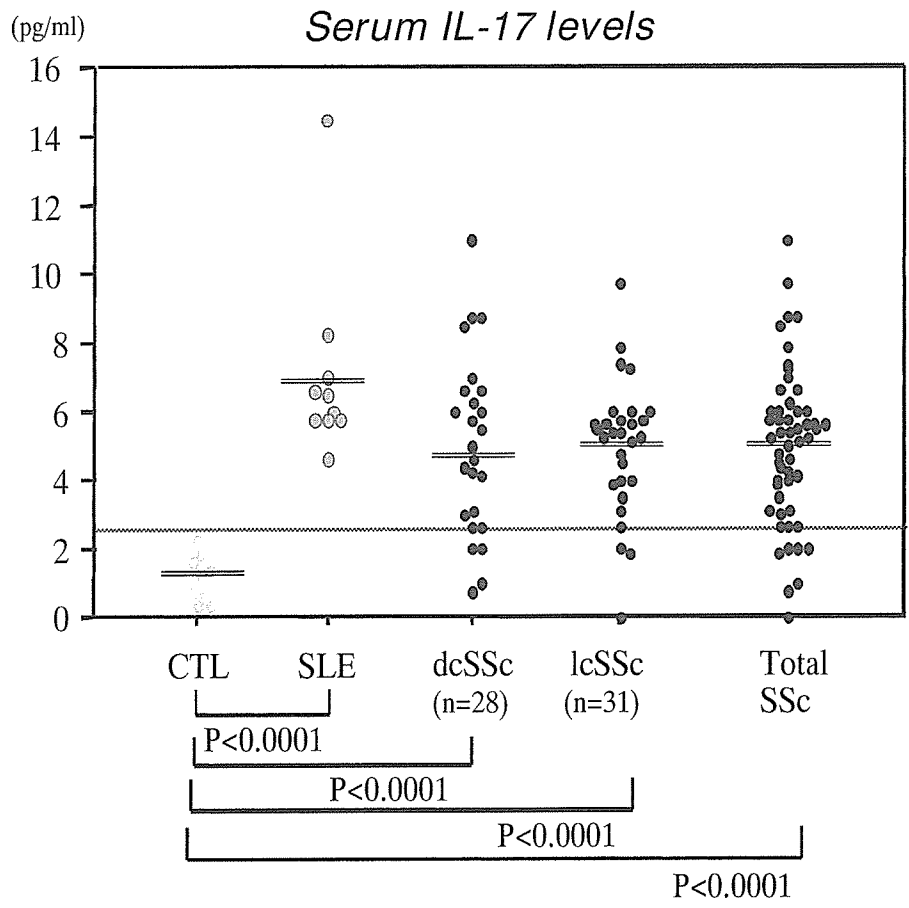


図1： dSSc、lSSc、SLE、および健常人（Control）における血清中IL-17値。点線は健常人の平均値 + 2SDに設定したカットオフ値を表す。

表 1. SSc における血清中 IL-17 値と臨床所見との相関

	IL-17 高値例 (n = 50)	IL-17 正常例 (n = 9)
性 (男性 : 女性)	8 : 42	4 : 5
臨床所見		
TSS	10.8 ± 11*	20.2 ± 12
指尖部虫喰状癬痕	39	44
爪上皮出血点	74	78
臓器病変		
肺	42	78
%VC の低下	13	30
%DLco の低下	61	70
肺高血圧症	8	22
食道	46	44
心	16	0
腎	2	0
関節	38	44
筋肉	6	0
血清学的所見		
抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性率	35*	78
抗セントロメア抗体陽性率	38	11
抗 RNP 抗体陽性率	4	22

表中の数字は特に示さない限り%を表す。

*p<0.05、(血清中 IL-17 値が正常の 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

全身性強皮症における B 細胞機能分子多型の検討

研究協力者	土屋尚之	筑波大学大学院人間総合科学研究科 社会環境医学専攻社会健康医学分野教授
分担研究者	長谷川稔	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科講師
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
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教授
協力者	江原幸和	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野
協力者	徳永勝士	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野教授
協力者	松下正毅	湧永製薬バイオ事業開発部
協力者	宮城 徹	湧永製薬バイオ事業開発部
協力者	岡 孝紀	湧永製薬バイオ事業開発部
協力者	柏瀬貢一	東京都赤十字血液センター
協力者	佐竹正博	東京都赤十字血液センター
協力者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科助教授

研究要旨

全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)の病態における IL-10 の関与が報告されている。今回われわれは、IL-10 プロモーター -1082A>G, -819T>C, -592A>C および IL-10 受容体β鎖(IL-10R2, *IL10RB*) c.238A>G の遺伝子型を迅速簡便に決定しうる蛍光ビーズ法を用い、関連研究を施行した。IL-10 プロモーターは、GCC, ACC, ATA 3 種のハプロタイプとして存在し、強皮症発症との有意な関連は検出されなかったが、ACC ハプロタイプのホモ接合体に、スキン・スコアが低い傾向が観察された。*IL10RB* 多型では、広汎性皮膚硬化型強皮症(dcSSc)群においてのみ、G/G 遺伝子型が顕著に増加していた。以上の結果から、IL-10 および IL-10R 多型が皮膚硬化に関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

われわれはこれまで、B 細胞機能分子多型と強皮症の疾患感受性や臨床病型との関連の解析から、

CD19 (1)、CD22 (2)多型が全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)、特に限局性皮膚硬化型強皮症(limited cutaneous SSc、lcSSc)に関連するこ

とを報告してきた。

IL-10は、Th1 サイトカインに抑制的に働く一方、B 細胞に対しては促進的に作用する。SSc における IL-10 の役割については、広汎性皮膚硬化型強皮症 (dcSSc)における血清 IL-10 の上昇(3)、血清 IL-10 と皮膚硬化、肺線維症、筋炎合併との関連(4)、血清 IL-10 は初期 (皮膚硬化進行期) に高値をとり、徐々に低下する(5)などの臨床的な知見から、IL-10 が線維化において促進的に働くことを支持する知見が多い一方で、抑制的に働く可能性を示した報告も存在する。

IL10 遺伝子(1q31-q32)のプロモーター領域には、7個所の SNP、2個所のマイクロサテライト多型が知られ、疾患との関連も多数検討されている。SSc に関しては、dcSSc における *IL10* プロモーター (-1082/-819/-592) GCC ハプロタイプの減少(6)や、-3575, -2763SNP における遺伝子型と強皮症の関連(7)が報告されているが、まだ検討は十分でなく、最もよく研究されている-1082, -819, -592 の SNP によって構成されるハプロタイプについて、日本人 SSc との関連研究は報告されていない。

IL-10 受容体は、IL-10 と親和性の高い IL-10R1 と、これらと三分子複合体を構成し、シグナル伝達において重要な IL-10R2 (IL-10 受容体β鎖) からなる。IL-10R2 は、IL-10 以外にも、IL-22, IL-26, IFN-λ受容体の構成要素としても機能する。最近、IL-10R2 遺伝子(*IL10RB*)のアミノ酸置換を伴う多型 c. 238A>G (Lys47Glu)が、造血細胞移植後の急性 GVHD の重症度と関連することが報告された(8)。

われわれは今回、*IL10* -1082, -819, -592 および *IL10RB* c. 238 の遺伝子型を迅速簡便に決定しうる蛍光ビーズ法を用い、これらの多型と SSc との関連を検討した。

B. 研究方法

金沢大学附属病院皮膚科受診中の SSc 患者、金沢および東京において研究に参加した健常対照者について、蛍光ビーズ法を用い、*IL10*-1082, -819, -592 および *IL10RB* c. 238 の遺伝子型を決定し、発症や臨床病型との関連を χ^2 検定により検討した。また、各遺伝子型におけるスキン・スコアの差を、t 検定を用いて検討した。

本研究は、金沢大学及び東京大学の研究倫理審査委員会に承認を得た研究計画に基づき、インフォームド・コンセントを得て施行した。

C. 研究結果

IL10 プロモーター -1082, -819, -592 は、3種類のハプロタイプ GCC, ACC, ATA を形成して存在した。SSc および健常対照群のあいだに、ハプロタイプ、ディプロタイプ頻度の有意差は検出されなかった。また、SSc 群を dcSSc, lcSSc に分けて解析しても、有意差は観察されなかった(表1)。

しかし、SSc 群をディプロタイプ別に5群にわけ、それぞれのスキン・スコアを比較すると、ACC/ACC 群においてスキン・スコアが低い傾向が観察され、ATA/ACC, ATA/ATA 群との間には有意差が検出された(それぞれ、 $P=0.0006$, 0.0018) (図1)。

IL10RB 多型の検討では、dcSSc 群において、A/A 遺伝子型が有意に増加していた(東京対照群との比較: オッズ比 2.6, 95%信頼区間 1.48-4.62, $P=0.0009$, 金沢対照群との比較: オッズ比 3.8, 95%信頼区間 1.75-8.23, $P=0.0007$) (表2)。

D. 考案

IL10 -1082, -819, -592 により形成されるハプロタイプのプロモーター活性については、これまで

に多数の報告が存在するものの、一定した見解は得られておらず、今後、血清や mRNA 量の検討が必要である。

*IL10RB*c.238A>G は、細胞外領域に位置する Lys 47 を Glu に置換する非同義置換であるが、この機能的意義や、*IL10RB* 遺伝子内および周辺の多型との連鎖不平衡については、全く解析されておらず、今後の解析が必要である。また、IL-10R2 は、IL-10 以外にも、IL-22, IL-26, IFN- λ などの受容体の構成要素となるため、SSc におけるこれらの寄与も検討する必要がある。

本研究において、*IL10* 多型がスキン・スコアと、*IL10RB* 多型が dcSSc と関連が検出されたことは、IL-10 が何らかの形で線維化に関与することを支持する知見と考えられる。

E. 結論

IL10RB 多型と dcSSc、*IL10* プロモーター多型がスキン・スコアとの関連が見出された。SSc の発症や臨床経過の遺伝的決定因子として、ならびに、線維化の治療における分子標的としての IL-10 の役割に、今後注目する必要があると考えられた。

F. 文献

1. Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S. Association of functional *CD19* polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50: 4002- 4007, 2004.
2. Hitomi Y, Tsuchiya N, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga K, Sato S. Association of human CD22 gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis. *Tissue Antigens* (in press)
3. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 24: 328-332, 1997.
4. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 27: 140-146, 2001.
5. 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* 33:275-284, 2006.
6. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, Madhok R. Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 42:1295-1298, 2003.
7. Hudson LL, Rocca KM, Kuwana M, Pandey JP. Interleukin-10 genotypes are associated with systemic sclerosis and influence disease - associated autoimmune responses. *Genes Immun* 6: 274-278, 2005.
8. Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Grogan B, Chen PJ, Zhao LP, Hansen JA. Genetic variation in the IL-10 pathway modulates severity of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation: synergism between IL-10 genotype of patient and IL-10 receptor beta genotype of donor. *Blood*

106: 3995-4001, 2005.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuchiya N, Honda Z, Tokunaga K. Role of B cell inhibitory receptor polymorphisms for systemic lupus erythematosus: a negative times a negative makes a positive. *J Hum Genet* 51:741-750, 2006.
2. Hitomi Y, Tsuchiya N, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga K, Sato S. Association of human *CD22* gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis. *Tissue Antigens* (in press)
3. Tsuchiya N, Kyogoku C, Miyashita R, Kuroki K. Diversity of human immune system multigene families and its implication in the genetic background of rheumatic diseases. *Curr Med Chem* (in press)
4. Kawasaki A, Tsuchiya N, Ohashi J, Murakami Y, Fukazawa T, Kusaoi M, Matsuta K, Hashimoto H, Tokunaga K. Role of *APRIL* (*TNFSF13*) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology* (in press)

2. 学会発表

1. 人見祐基、土屋尚之、長谷川稔、藤本学、竹原和彦、佐藤伸一、徳永勝士：ヒト CD22 遺伝子多型と全身性強皮症との関連。第 50 回日本リウマチ学会、2006 年 4 月 23 日～26 日、長崎 (抄録集 p218)。

2. 土屋尚之：ヒト免疫系多重遺伝子ファミリーにおける copy number polymorphism と疾患感受性。日本進化学会 2006 年大会シンポジウム「多重遺伝子ファミリーの進化：遺伝子の生成と消滅のダイナミズム」。2006 年 8 月 29 日～31 日、東京 (要旨集 p45)
3. 江原幸和、松下正毅、土屋尚之、柏瀬貢一、宮城徹、松多邦雄、草生真規雄、深沢徹、橋本博史、高崎芳成、佐竹正博、岡孝紀、徳永勝士：蛍光ビーズ法を用いた新規タイピングシステムによる IL-10 遺伝子プロモーター多型とリウマチ性疾患との関連の検討。日本組織適合性学会。2006 年 9 月 24～26 日、東京。
4. 土屋尚之：遺伝子解析に基づくリウマチ・膠原病の病因・病態解析。日本人類遺伝学会シンポジウム。2006 年 10 月 17～20 日、米子。(抄録集 p100)
5. 江原幸和、松下正毅、土屋尚之、柏瀬貢一、宮城徹、松多邦雄、草生真規雄、深沢徹、橋本博史、高崎芳成、佐竹正博、岡孝紀、徳永勝士：蛍光ビーズ法を用いた新規タイピングシステムによる IL-10 遺伝子プロモーター多型とリウマチ性疾患との関連の検討。日本人類遺伝学会。2006 年 10 月 17～20 日、米子。(抄録集 p155)
6. 江原幸和、土屋尚之、松多邦雄、橋本博史、高崎芳成、徳永勝士：蛍光ビーズ法を用いた新規タイピングシステムによる IL-10 遺伝子プロモーター多型とリウマチ性疾患との関連の検討。2006 年日本免疫学会総会、2006 年 12 月 11～13 日、大阪(抄録集 p286)

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

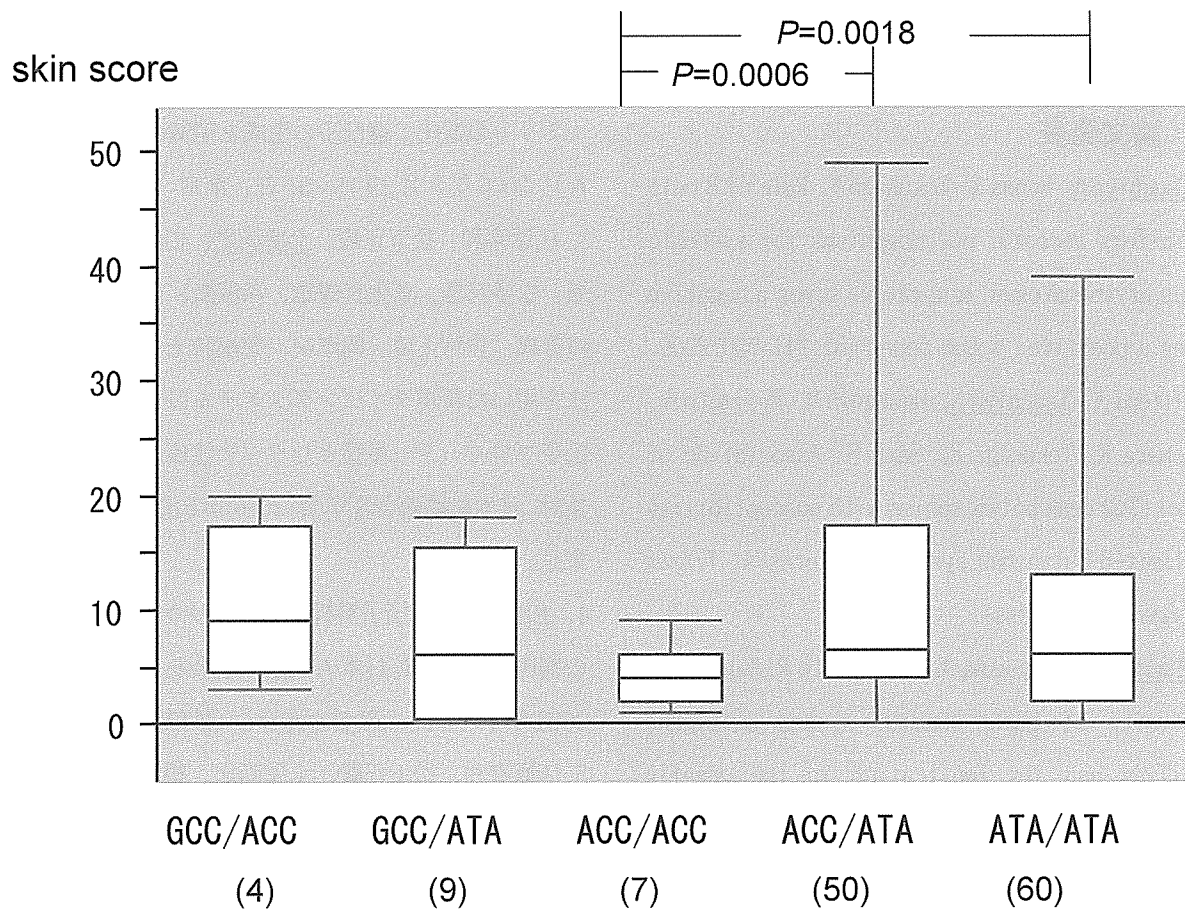


図1 *IL10* プロモーターディプロタイプ別スキン・スコア
 各群の患者数を()に示す。各群のスキン・スコアの平均値の差をWelch's t-testを用いて検定した。ACC/ACC群とACC/ATA, ATA/ATA群の差は、多重検定(10)の補正後も有意であった。

表1 強皮症における *IL10* プロモーター(-1082, -819, -592)ハプロタイプ

	SSc (n=133)		dcSSc (n=51)		lcSSc (n=82)		健常対照者 (金沢)(n=90)		健常対照者 (東京)(n=687)	
diplotype frequency										
GCC/GCC	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2	(0.3)
GCC/ACC	4	(3.0)	2	(3.9)	2	(2.4)	3	(3.3)	15	(2.2)
GCC/ATA	11	(8.3)	4	(7.8)	7	(8.5)	8	(8.9)	55	(8.0)
ACC/ACC	7	(5.3)	2	(3.9)	5	(6.1)	11	(12.2)	52	(7.6)
ACC/ATA	50	(37.6)	23	(45.1)	27	(32.9)	28	(31.1)	251	(36.5)
ATA/ATA	61	(45.9)	20	(39.2)	41	(50.0)	40	(44.4)	312	(45.4)
haplotype frequency										
GCC	15	(5.6)	6	(5.9)	9	(5.5)	11	(6.1)	74	(5.4)
ACC	68	(25.6)	29	(28.4)	39	(23.8)	53	(29.4)	370	(26.9)
ATA	183	(68.8)	67	(65.7)	116	(70.7)	116	(64.4)	930	(67.7)

()内に%を示す。有意な関連は検出されなかった。

表2 強皮症における *IL10RB* c.238A>G 遺伝子型

	SSc (n=133)		dcSSc (n=51)		lcSSc (n=82)		健常対照者 (金沢)(n=90)		健常対照者 (東京)(n=687)	
G/G	38	(28.6)	16	(31.4)	22	(26.8)	18	(20.0)	199	(29.0)
G/A	56	(42.1)	14	(27.5)	42	(51.2)	58	(64.4)	343	(49.9)
A/A	39	(29.3)	21	(41.1)	18	(22.0)	14	(15.6)	145	(21.1)

dcSSc vs 健常対照者(金沢) A/A vs (G/G+G/A): オッズ比 3.8, 95%信頼区間: 1.75-8.23, $P=0.0007$

dcSSc vs 健常対照群(東京) A/A vs (G/G+G/A): オッズ比 2.6, 95%信頼区間: 1.48-4.62., $P=0.0009$

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

ゲノムワイドなマイクロサテライトによる強皮症感受性遺伝子マッピング

分担研究者 猪子英俊 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

研究要旨

ゲノムワイドに複合遺伝性疾患の関連遺伝子を検出するには、マイクロサテライトのような多型性の高いマーカーを用いた方が、より効率的であると考えられる。また、マイクロサテライトは多型を生じるメカニズムがその繰り返し数に依存して単純であることから、迅速に多型マーカーの設定が可能であると期待される。そこで各種疾患の感受性遺伝子探索を目的として、マイクロサテライトを公開されたヒトゲノム配列上に設定することを試みた。そこでこれを実現するためにマイクロサテライトを効率的に検索する技術・方法を確立し、マイクロサテライトマーカー約3万個を収集することに成功した。一方、強皮症感受性遺伝子探索に先立ち、関連疾患である関節リウマチならびにSLE(systemic lupus erythematosus)を対象として、これらのマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな関連解析に着手した。この結果、特に関節リウマチでの解析が完了し、7個の感受性遺伝子を同定するに至った。これらの知見は自己免疫疾患ならびに膠原病としての強皮症を総合的に理解するために大きな資産となりうると考えられる。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA; rheumatoid arthritis) は、関節滑膜細胞の増殖、関節、軟骨、骨の破壊を伴う進行性の慢性炎症性疾患で、強皮症や全身性エリテマトーデスと共に代表的な自己免疫疾患である。全人口に占めるRA患者の割合は、世界中で0.5~1.0%程度であり1)、日本では70~100万人程度の患者数が想定されている2)。北アメリカ先住民族 (Native American) のように顕著に高い罹患率を示す民族3)や、逆にナイジェリア人のように例外的に罹患率が低い特殊な民族4)は存在するが、診断基準の違い等を考慮すると人種による発症頻度差は小さいと一般的には考えられる。

RA発症率は年齢と共に増加し、逆に60歳を超えると減少する5)。特に女性の場合には男性よりも発症頻度が2~3倍高く、年齢層では30~50歳で好発する傾向が認められる5)。しかし、RA発症は明確に性に連鎖するものではなく、このような性差は男性においてRA発症に対する何らかの抵抗反応が働いているこ

とに起因すると考えられており、その一つとして男性ホルモン (アンドロゲン) の影響が指摘されている6,7)。このように、女性ではRA発症に至るまでの危険因子蓄積の閾値が、男性よりも低いと考えられる5)。

RAの病態に関しては、昨今の分子生物学的手法の進歩によりサイトカインカスケード等の免疫学的側面をはじめとした理解が飛躍的に進んだが、根源的な病因に関しては、いくつかの状況証拠が得られてはいるものの未だ直接に全体像を解明するには至っていない。しかし、RAには遺伝性が存在することがこれまでの疫学データから示唆されている。一つは、家系内集積性、もう一つは、一卵性双生児における発症の一致率である。

疾患が遺伝性を持つならば、疾患を遺伝する家系内での発症率は、集団全体での発症率よりも高くなると期待される。RAにおける家系内発症率は8%程度であり、一般集団における発症率が約1%であることから、家系内集積性を図る指標である λ_R 値 (=家系内発症

率/一般集団での有病率)はおよそ8であると推定される8)。つまり、一般集団と比較すると家系内での発症率が8倍程度高いことを意味しており、これによってRA発症には遺伝的要因が関与することが示唆されている。また、対象とする疾患に遺伝性が無い場合、一卵性双生児と二卵性双生児における各ペアでの発症一致率(双生児が共に罹患する率)はほぼ同程度の低い値になるが、遺伝性が強まるほど両双生児における一致率が高くなり、特に一卵性双生児における一致率が高くなる。これまで、Aho 9)らやSilman18)らにより、一卵性双生児での発症一致率が二卵性双生児よりも4倍程度高いことが報告されており、遺伝的要因の関与を示唆するものである。また一方では、二卵性双生児において発症一致率が急速に低下することから、原因となる遺伝的要因、すなわちRA感受性遺伝子は染色体上に複数存在するとの予想もなされている。

このように遺伝的要因の関与が強く示唆されている関節リウマチの感受性遺伝子を同定する目的で、マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな遺伝的関連解析を行った。

関節リウマチは強皮症と同じく古典的膠原病に分類され、その症状も共通する部分が多い。したがって、続いて実施する強皮症の解析に対し、関節リウマチの感受性遺伝子の情報は極めて有用であると共に、自己免疫疾患ならびに膠原病としての強皮症の発症原因を総合的に解明できると考えられる。

B. 研究方法

患者および健常者それぞれ125検体を1つの解析セットとし、ゲノムワイドに配置した27,158個のマイクロサテライトマーカーを用いたPooled DNA typingによる3段階のスクリーニングを行った(図1)。1stスクリーニングでは全スーパーセットのマーカーについて遺伝的関連解析を行い、アレルの頻度差が統計学的に有意($P < 0.05$)であったマーカー(陽性マーカー)についてのみ、2ndスクリーニングを行った。さらに2ndスクリーニングにおいて陽性となったマーカーについて3rdスクリーニングを実施した。この3rdスク

リーニングでの陽性マーカーに対し、この3段階のスクリーニングで使用した全患者・健常者それぞれ375検体に対し、Individual typingを行った。これはPooled DNA typingでのアレル頻度はあくまでも推定であるため、この実験によって、このアレル頻度を確定する目的で実施した。続いてマイクロサテライトマーカーによる解析により見出された感受性遺伝子候補領域内のSNP情報をNCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)より選択・抽出した。多型マイクロサテライトマーカーによる実験で使用した患者および健常者を含むそれぞれ合計940検体を使用し、TaqMan法ならびに直接シーケンシング法によりSNPのgenotypeを決定した。TaqMan法はABI7900HT(Applied Biosystems)のシステムを用い、標準プロトコルで運用した。直接シーケンシング法はABI3700(Applied Biosystems)シーケンサーを用い、これも標準プロトコルを使用した。

マイクロサテライトマーカーならびにSNPマーカーの実験から得られるデータの統計解析は、マーカーの各アレル間の頻度を比較する2by2分割表、さらに1つの集団中で観察されるマーカー毎のアレル数を m とする2bym分割表を、それぞれperlにて書かれたプログラムにて作成し、さらにマルコフチェーン/モンテカルロシミュレーション法により、Fisher's exact testを実行することでP valueを求めた。SNPマーカーからのLD(Linkage Disequilibrium)ブロックの構築はD' valueの信頼区間を用いて行った。またこれには、各LDブロックにおけるハプロタイプの推定はEMならびにClarkアルゴリズムを採用し求めた。つまり推定されたハプロタイプ頻度に基づき、2,000回の再サンプリングをブートストラップ法により実施することで与えられた各ハプロタイプ頻度分布から95%信頼区間を算出した。

C. 研究結果ならびに考察

1stスクリーニングにより検出された陽性マーカーは全マイクロサテライトマーカー中2,847マーカーであった。2ndスクリーニングではこの2,847マーカー中372マーカーが陽性であった。さらに3rdスクリ