

2) ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase; HDAC)

最近注目されているタンパク質の翻訳後修飾としてアセチル化・脱アセチル化があげられる。真核生物の染色体 DNA はクロマチンとよばれる高次構造を呈しており、クロマチンはヒストンタンパク質から形成されるヒストンオクタマーに、DNA が巻き付いた構造をとっている。近年、転写誘導に際してヒストン修飾によるクロマチンの構造変化が重要な役割を果たすことが知られてきている [5]。転写の促進に関しては、転写コアクチベータのヒストンアセチル化酵素 (histone acetylase transferase; HAT) 活性により周囲のヒストンがアセチル化され、これを誘因としてクロマチンのリモデリングが起り転写因子と RNA ポリメラーゼによる転写が開始される。一方、転写の抑制としては脱アセチル化を触媒するヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase; HDAC) がある。細胞の内部では通常、クロマチンは脱アセチル化状態に保たれており、転写の促進が必要な時にのみアセチル化されると考えられている。つまり、DNA とヒストンの複合体は転写に対して阻害的に働き、転写が不活性化している部分ではヌクレオソームの DNA への結合が密となり転写因子の結合を阻害し、転写が活性化している染色体部位ではヌクレオソームが緩んだり、ヒストンが解離していることになる。

3) ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase inhibitor; HDAC inhibitor)

この転写を調節する HDAC に対する阻害剤が HDAC inhibitor であり、その代表的なものがトリコスタチン A (trichostatin A; TSA) である。TSA は細胞周期停止作用や細胞分化、そして細胞のア

ポトーシスを増強する作用がある。そのため、近年、抗がん作用をもつ薬物として研究が行われている。さらに興味深いことに TSA は抗炎症作用、抗線維化作用を持つと考えられており、肝線維症や放射線照射による皮膚の線維化防止に対しての効果が期待されている薬物である [6, 7]。

そこで、SSc において皮膚の線維化が HDAC inhibitor で抑制できるかどうかを SSc のモデルマウスである TSK/+マウスに TSA を投与することにより、皮膚硬化の改善を確認し、線維化に関するコラーゲンや細胞外マトリクスの産生や各種サイトカイン、接着分子などの発現を検討した。

B. 研究方法

1) マウス

SSc のモデルマウスとして TSK/+マウス、コントロールとして C57BL/6 マウスを用いた。

2-a) TSA の投与

3~4 週齢のマウスの背部に、マウス一匹あたり、0.5 µg/g/day の DMSO に溶解した TSA を週 5 日、4 週間皮下注射する。対照として C57BL/6 マウスにも同様のスケジュールで皮下注射を行う。また、試薬の対照として、DMSO のみを TSK/+マウス、C57BL/6 マウスに同様のスケジュールで皮下注射する。

2-b) 組織学的評価

皮膚組織は 4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン包埋する。6µm の厚さのセクションを作り、ヘマトキシリン&エオジン染色を行う。TSK/+マウスの皮膚硬化・肥厚は真皮の線維化によるものではなく、皮下の粗な結合組織層の肥厚による。従って皮膚の厚さは、この皮下結合組織の

厚さを測定することによって評価する。また、TSA 投与後一ヶ月におけるマウス皮膚でのサイトカイン、細胞成長因子の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて定量的に解析する。検討する項目としては、①線維芽細胞から産生される細胞外マトリクスであるコラーゲンなど、②線維芽細胞から膠原線維の産生を増強する IL-4、IL-6、IL-13 などを測定する。細胞成長因子として basic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β 、connective tissue growth factor などについて測定する。

2-c) 血清学的評価

TSA は遺伝子の転写に影響を与える可能性があり、全身的な影響を検討するために、線維芽細胞からの膠原線維の産生に影響を与えるサイトカインである血清中 IL-4、IL-6 などを ELISA キット(R&D 社)を用いて測定する。TSK/+マウスで発現が高いトポイソメラーゼ I 抗体の発現を MESACUP-2 テスト Sc1-70 キット(MBL 社)をモデルファイして測定する。具体的には、このキットはヒト抗体測定用のため、二次抗体がマウス IgG を認識するように HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体(Southern Biotechnology 社)とキットにあらかじめ含まれている二次抗体を置換して測定を行う。

2-d) 線維芽細胞の培養・ストック

6 週齢の TSK/+マウスおよび C57BL/6 マウスから皮膚線維芽細胞を培養し、予め至適濃度を設定しておいた TSA を DMEM 培地へ加え刺激を与える。刺激後 24 時間後に細胞を回収し、細胞から全 RNA を QIAGEN RNeasy spin column を用いて回収する。RNA 量を定量後、リアルタイム

PCRを行い、膠原線維産生に関わる因子について検討を行い、TSA の関与を解析する。

C. 研究結果

1) 組織学的評価

TSA 投与前後で、皮下組織厚は減少し、TSK/+マウスにおける皮膚硬化に TSA が有効であることが確認できた(図 1)。さらに、TSA 投与群と非投与群におけるコラーゲンを含む各種 mRNA の発現を検討したところ、COL1A、FGF、IL-4、IL-6 などの mRNA 発現が有意に抑制されていた(図 2)。

2) 血清学的評価

抗トポイソメラーゼ I 抗体や IL-4、IL-6 などのサイトカインは TSA 投与前後で変化は認められなかった。

3) 線維芽細胞の各種 mRNA 発現における TSA の影響

TSK/+マウスから培養した皮膚線維芽細胞を TSA で刺激し、各種 mRNA の発現を検討した。

D. 考案

今回、TSK/+マウスに TSA を投与することにより皮膚硬化の改善と、皮膚硬化に関連する mRNA の発現抑制が確認できた。これまで、われわれは SSc 患者血清中の抗 HDAC 自己抗体を測定し全身性エリテマトーデス患者や皮膚筋炎患者そして健康人との比較を行った。当初、SSc では SSc の自己免疫異常により HDAC-3 に対する自己抗体発現が増加しているとの仮説を立てていたが、予想に反して SSc 血清中では、他膠原病疾患・健康人と比較して抗 HDAC-3 自己抗体は有意に低く、免疫プロットでも同様の結果を得た。さらに、HDAC-3 活性を検討したところ、対照群

から抽出した IgG では HDAC-3 活性は抑制できたが、SSc 患者血清から分離した IgG ではその活性は抑制できなかった。これらの結果から、SSc 患者ではその免疫異常により健康人では正常に産生される HDAC に対する自己抗体産生が行われず、それが、病態に関与している可能性が考えられた。すなわち、健康群では抗 HDAC-3 抗体産生が認められたことから、血清中の抗 HDAC-3 抗体は病態を抑制する protective な働きを持つ自己抗体である可能性を考えた [8]。従って、HDAC に対する自己抗体が低い SSc では HDAC の活性が亢進しており、その結果、遺伝子転写を抑制するヒストンアセチル化とヒストン脱アセチル化に異常をきたし、それが SSc の線維化を引き起こしている可能性が考えられる。今回、HDAC 阻害剤である TSA で皮膚硬化の改善が得られたことは、これらの仮説を支持するものと考えられる。

E. 結論

TSA の投与により TSK/+マウスの皮膚硬化は改善し、線維芽細胞からのコラーゲン産生抑制が関与していることが示唆された。TSA が SSc の治療薬となりうる可能性が示唆された。

F. 文献

1. 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; 45: 815-8.
2. Ogawa F, Shimizu K, Hara T, Muroi E, Hasegawa M, Takehara K, et al.: Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26: 659-62.
3. LeRoy EC: Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 1974; 54: 880-9.
4. Krieg T, Perlish JS, Mauch C, Fleischmajer R: Collagen synthesis by scleroderma fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 460: 375-86.
5. Huang L: Targeting histone deacetylases for the treatment of cancer and inflammatory diseases. *J Cell Physiol* 2006; 209: 611-6.
6. Niki T, Rombouts K, De Bleser P, De Smet K, Rogiers V, Schuppan D, et al.: A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology* 1999; 29: 858-67.
7. Chung YL, Lee MY, Wang AJ, Yao LF: A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mol Ther* 2003; 8: 707-17.
8. Kuwatsuka Y, Ogawa F, Iwata Y, Komura K, Muroi E, Hara T, et al.: Decreased levels of autoantibody against histone deacetylase 3 in

patients with systemic sclerosis.

Autoimmunity 2008: 1.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

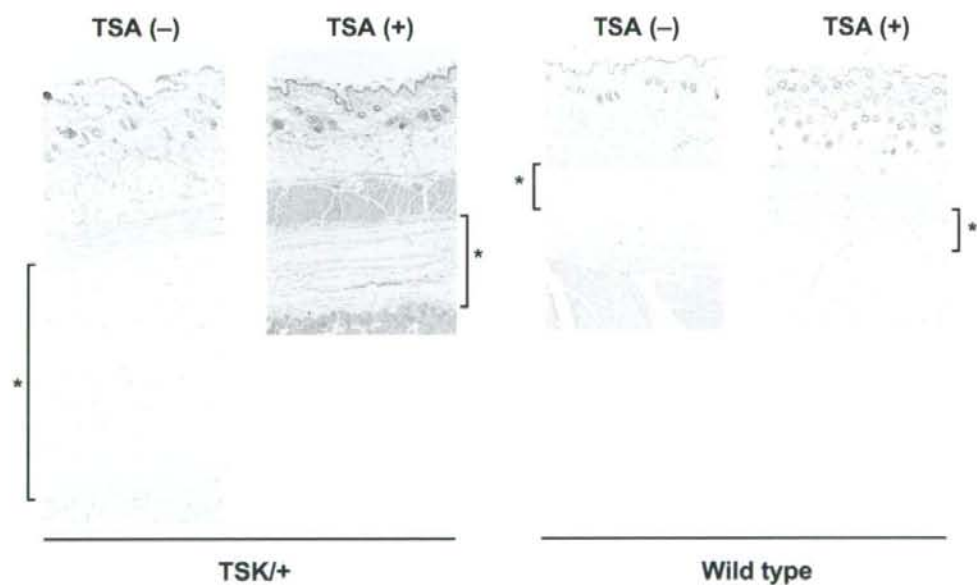


図 1: TSA 投与群、非投与群における TSK/+マウス、コントロールマウスの皮膚厚の変化

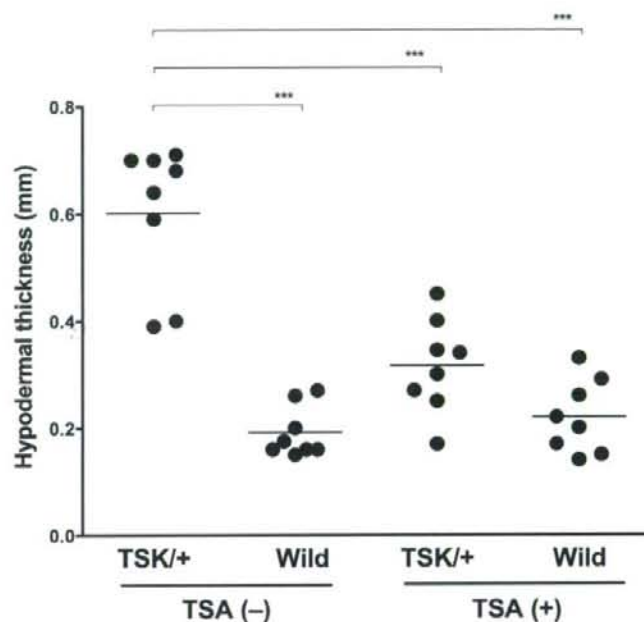


図 2: TSA 投与群により、TSK/+マウスの皮下組織厚は有意に減少している

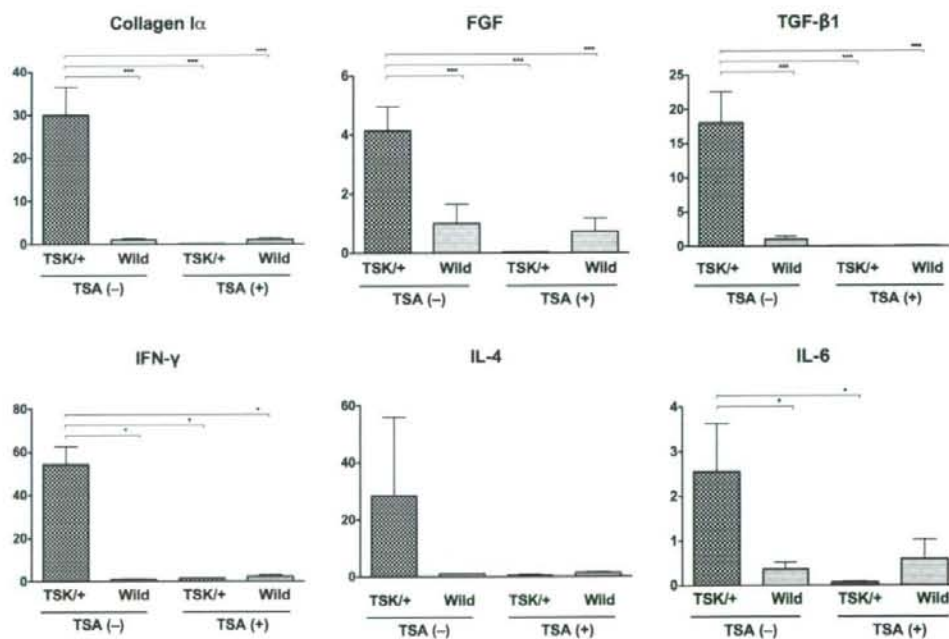


図 3: TSA 投与群、非投与群のマウス背部皮膚からのコラーゲンおよび各種サイトカインの mRNA 発現

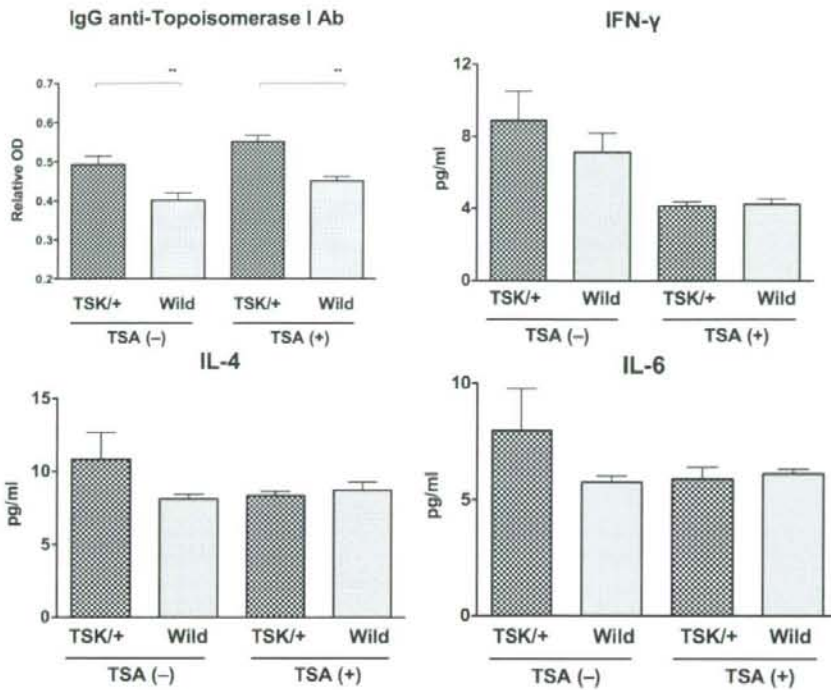


図 4: TSA 投与群、非投与群における血清中抗トポイソメラーゼ I 抗体、およびサイトカイン値

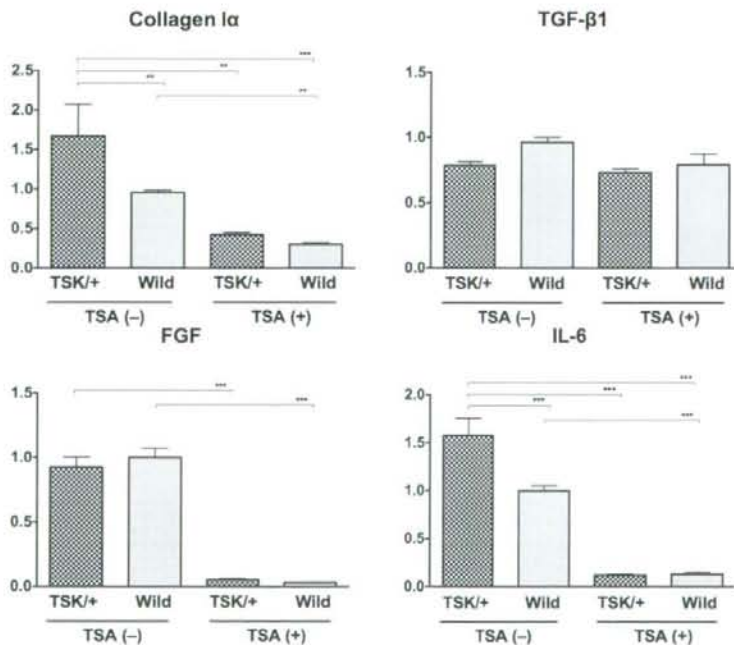


図 5: TSK/+マウス、コントロールマウス背部から採取した培養皮膚線維芽細胞を TSA で刺激し、コラーゲンおよび各種サイトカインの mRNA 発現を検討した

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

全身性強皮症患者の指尖部潰瘍に対するボセンタン治療

分担研究者	川口 鎮司	東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター准教授
協力者	大田 ゆう子	東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター医員
協力者	高木 香恵	東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター助教
協力者	栃本 明子	東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター助教
協力者	原 まさ子	東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター教授

研究要旨

全身性強皮症は、皮膚の線維化と手指、足趾の末梢循環不全を主症状とする原因不明の疾患である。末梢循環不全には末梢に存在する細小動脈の異常収縮が病態形成に関与している。この異常収縮を引き起こす因子として、エンドセリン-1がよく知られている。肺高血圧症の治療薬として開発されたエンドセリン受容体拮抗薬(ボセンタン)が末梢循環不全に関しても有用であることが報告されている(1-7)。今回の研究では、12例の手指、足趾に皮膚潰瘍が認められた全身性強皮症の症例にボセンタンを用い、新規の皮膚潰瘍の発症抑制に効果があることが示唆された。全身性強皮症の末梢循環不全に対して新規の治療方法としてボセンタンは有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症の難治性病変のひとつに手指、足趾の皮膚潰瘍がある。末梢循環障害の結果生じることが推測されており、従来の治療としては、プロスタグランジン製剤を含む、血管拡張薬が用いられてきた。しかしながら、冬期には、皮膚潰瘍の発症を押さえることが困難な症例がしばしば存在する。エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンは、当初、肺動脈性肺高血圧症の治療薬として開発された。全身性強皮症のレイノー現象や皮膚潰瘍の症例にて血漿のエンドセリン-1が増加していることが報告されていた。エンドセリン-1は、強力な血管収縮因子として知られており、レ

イノー現象や皮膚潰瘍の病態に重要な働きをする因子と考えられてきた。そこで、このエンドセリン-1の作用を抑制するエンドセリン受容体拮抗薬、ボセンタンは、皮膚潰瘍に有効であることが推測された。すでに、欧米では、ボセンタンの有効性を示唆する報告が見られる。そこで、今回、我々は、皮膚潰瘍のある全身性強皮症患者にボセンタンを投与し、皮膚潰瘍の新規発症の頻度を検討した。同時に、レイノー現象の程度をRaynaud Condition Scoreにて測定した。

B. 研究方法

東京女子医大膠原病リウマチ痛風センターに通

院中の全身性強皮症患者のうち、手指または足趾に皮膚潰瘍が生じた 11 症例を対象とした。全例に併用薬として、ベラプロストを 60-120 $\mu\text{g}/$ 日の投与が行われた。新規の皮膚潰瘍の数を検討するため、診察時から2ヶ月前までさかのぼって、その2ヶ月間で発症した皮膚潰瘍の数を記録した。レイノー現象の評価には、Raynaud Condition Score (RCS) を用いて評価した。

C. 研究結果

表1には、患者の背景を示す。最終の評価は、2008年12月または2009年1月に行った。ボセンタン投与後、3年間の経過を観察できた症例は2症例、2年間観察症例は6例、1年間観察症例は3例であった。それぞれの観察期間に分けて、新規の皮膚潰瘍の数と RCS の点数を評価した(図1から図6)。全症例に関して、新規に生じる皮膚潰瘍の数は減少した。RCS に関しては、ボセンタン投与前に比較して全例で減少していた。全例1年間の観察が終了しているため、治療前と1年間経過後の新規潰瘍と RCS の検討を行ったところ、新規潰瘍の発現数は、 3.7 ± 1.6 から 0.9 ± 1.0 まで有意 ($P < 0.001$) に低下し、RCS は、 8.0 ± 1.3 から 4.5 ± 1.0 まで有意 ($P < 0.001$) に減少した。

D. 考案

全身性強皮症に伴うレイノー現象や皮膚の潰瘍に関しては、環境因子が強く関連していることは明らかであり、日本では気温の低下する冬期に悪化する。そこで、冬期の3ヶ月間での臨床症状と比較しなければ、薬剤の評価は難しい。そこで、今回の検討では、ボセンタン治療を開始する

前の冬期の臨床症状とボセンタン投与後の冬期の臨床症状を比較した。今回の検討では、1年以上の経過がおえた11例にて評価した。ボセンタン投与により、11例とも新規の皮膚潰瘍とレイノー現象の臨床症状に関して著明に改善した。しかしながら、2年、3年の経過では、治療開始前と比較して、明らかな改善を認めない症例が認められた。ボセンタンの長期での治療効果の検討が必要であることが示唆された。今後、さらに長期の観察を行い、長期での治療成績を検討する予定である。

E. 結論

全身性強皮症の難治性皮膚潰瘍に対して、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンの効果を検討した。1年後の評価では、新規の皮膚潰瘍およびレイノー現象ともに改善が認められた。

F. 文献

1. Ferreira ME, Scheinberg MA. Successful treatment with bosentan of non-digital skin ulcers in severe scleroderma. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1784-5.
2. Matucci-Cerinic M, Seibold JR. Digital ulcers and outcomes assessment in scleroderma. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:v46-7.
3. Garcia de la Pena-Lefebvre P, Rodriguez Rubio S, Valero Exposito M, et al. Long-term experience of bosentan for treating ulcers and healed ulcers in systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:464-6.
4. Chamaillard M, Heliot-Hosten I, Constans J,

- Taïeb A. Bosentan as a rescue therapy in scleroderma refractory digital ulcers. Arch Dermatol 2007;143:125-6.
5. Snyder MJ, Jacobs MR, Grau RG, Wilkes DS, Knox KS. Resolution of severe digital ulceration during a course of Bosentan therapy. Ann Intern Med 2005;142:802-3.
6. Varga J. New hope for systemic sclerosis patients with digital ulcers. Curr Rheumatol Rep 2005;7:127-8
7. Korn JH, Mayes M, Matucci Cerinic M, Rainisio M, Pope J, Hachulla E, Rich E, Carpentier P, Molitor J, Seibold JR, Hsu V, Guillevin L, Chatterjee S, Peter HH, Coppock J, Herrick A, Merkel PA, Simms R, Denton CP, Furst D, Nguyen N, Gaitonde M, Black C. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. Arthritis Rheum 2004 ;50:3985-93

表1 患者背景

	投与開始	最大投与量 (mg/日)	臨床症状	自己抗体	皮膚硬化
1	2006年1月	125	DU, PH, ILD	topo	diffuse
2	2006年4月	125	DU, ILD	topo	diffuse
3	2007年1月	250	DU, PAH	CENP	diffuse
4	2007年3月	125	DU	RNP	diffuse
5	2007年3月	125	DU	CENP	limited
6	2007年3月	125	DU	topo, SSA	diffuse
7	2007年4月	250	DU, GIT	RNP, topo	diffuse
8	2007年8月	125	DU, PAH	topo	diffuse
9	2007年10月	187.5	DU, ILD	topo	diffuse
10	2007年11月	187.5	DU	CENP	limited
11	2007年12月	250	DU	RNP, CENP, SSA	limited

DU: 指尖部潰瘍、PAH:肺動脈性肺高血圧症、GIT:腸管病変、ILD:間質性肺病変
diffuse:びまん性皮膚型、limited:限局性皮膚型
topo:抗 topoisomerase I 抗体、CENP:抗セントロメア抗体、RNP:抗 U1-RNP 抗体、SSA:抗 SSA 抗体

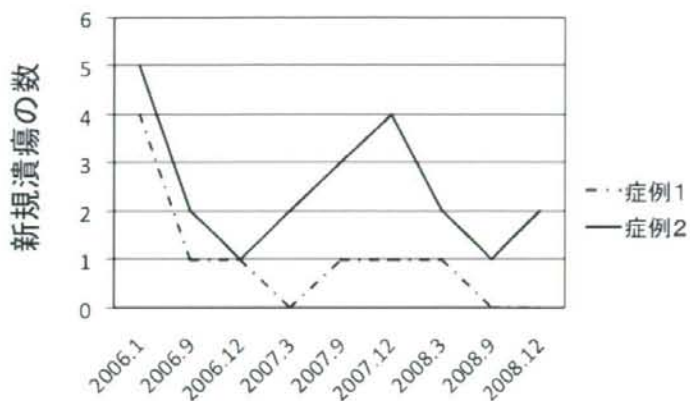


図1 3年間のボセンタンの新規皮膚潰瘍発現数に対する効果

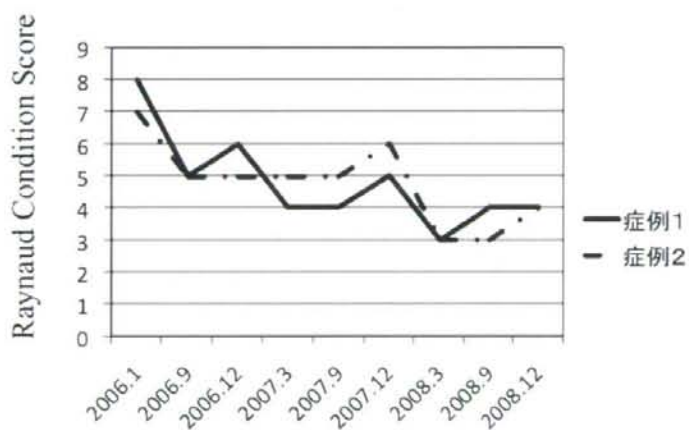


図2 3年間のボセンタンのRaynaud Condition Scoreにおよぼす効果

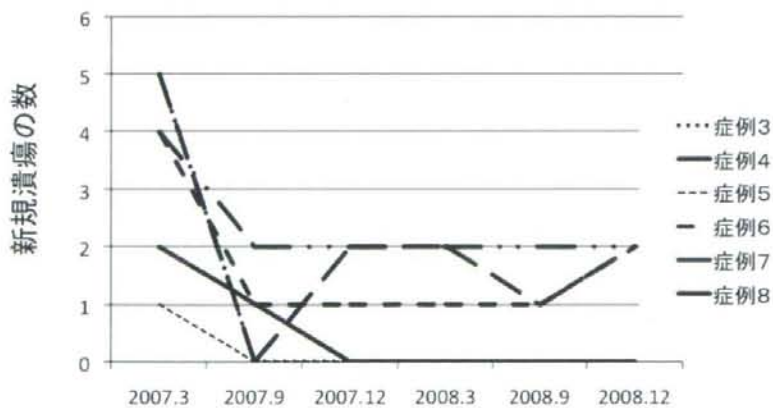


図3 2年間のボセンタンの新規皮膚潰瘍発現数に対する効果

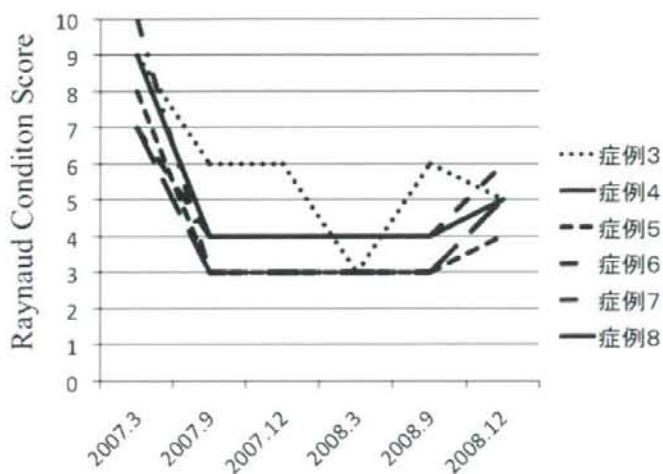


図4 2年間のボセンタンのRaynaud Condition Scoreにおよぼす効果

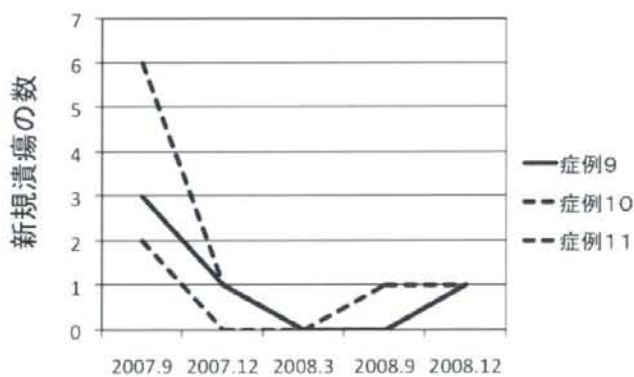


図5 1年間のボセンタンの新規皮膚潰瘍発現数に対する効果

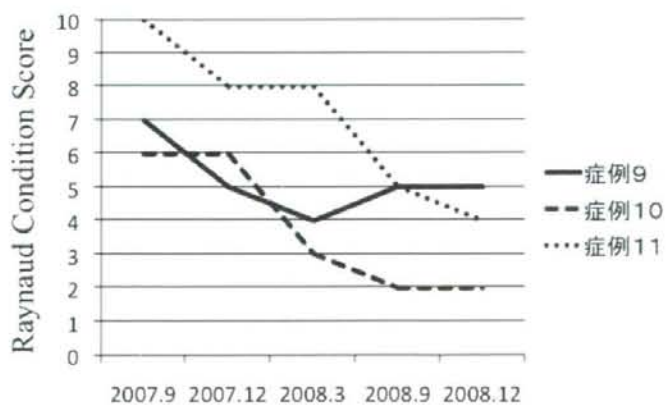


図6 1年間のボセンタンのRaynaud Condition Scoreにおよぼす効果

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

高圧酸素療法が有効であった全身性強皮症に伴う指趾潰瘍の 4 例

研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院皮膚機能病態学教授
協力者	青井 淳	熊本大学大学院皮膚機能病態学大学院生
協力者	牧野貴充	熊本大学大学院皮膚機能病態学大学院生
協力者	永廣利恵	熊本大学皮膚科・形成再建科医員
協力者	吉野雄一郎	熊本大学皮膚科・形成再建科助教

研究要旨

全身性強皮症の合併症の一つである指趾潰瘍は末梢循環障害がその原因とされる。著しい疼痛を伴いADLの低下を招くだけでなく、感染症の併発などにより生命予後に関わることがある。我々は指趾潰瘍に対して高圧酸素療法を行い良好な結果を得た。従来の循環改善薬の全身的投与やbFGFなどの局所投与と併用することで、より良い効果を得る可能性をしめすものと考えた。

A.研究目的

全身性強皮症の合併症の一つである指趾潰瘍は末梢循環障害がその原因とされる。著しい疼痛を伴いADLの低下を招くだけでなく、感染症の併発などにより生命予後に関わることがある。指趾潰瘍に対しては局所的には適切なデブリドマン、プロスタグランジン製剤やbFGFなどの外用療法、全身的には血管拡張薬を中心とする循環改善薬による治療が行われてきた。しかし、治療に抵抗性で効果が得られない潰瘍に遭遇することもしばしばある。

2006年にMarkusらによって全身性強皮症による指趾潰瘍について高圧酸素療法が有用であることが報告された(1)。これまで日本国内では、高圧酸素療法は糖尿病や慢性動脈閉塞症などによって生じた皮膚潰瘍や壊疽に対する補助療法として用いられており、全身性強皮症による指趾潰瘍については、我々

が調べた限りでは報告がなかった。

我々は全身性強皮症に伴う指趾潰瘍の4例に対して高圧酸素療法を行い良好な結果を得たので報告する。

B.研究方法

対象は熊本大学附属病院皮膚科・形成再建科にて入院加療を受けた方で、全身性強皮症と診断され、指趾潰瘍を生じ種々の治療に抵抗性のある症例とした。全例が過去に高圧酸素療法の経験が無い症例とした。4例の患者の背景を表1に示す。創部についてはデブリドマンを含めた適切な皮膚科的処置を行うことを基本とし、症例2については骨髄炎を合併していたので局所麻酔下に趾切断術を経過中に施行した。

高圧酸素療法のプロトコールは、加圧に15分、2絶対気圧(atmosphere absolute:ATA)で1時間、空気加圧酸素マスク呼吸方式、減

圧に 15 分、1 日 1 回施行した。施行に先立ち画像評価など含めた呼吸器疾患の有無の確認、耳鼻科医による耳管を中心とした検診を行ったうえで日本での火災事故の頻度、高気圧障害および酸素中毒の危険性について十分な説明を行い患者の同意を得た。

評価は原則として治療開始時、2 週間後、4 週間後に自覚症状について痛みについては visual analogue scale (VAS) を用いて行い、レイノー現象の頻度なども参考にした。また、創部の状態についてもあわせて評価をおこなった。

C. 研究結果

1) 治療経過

症例 1 において、加圧中に耳痛・耳閉感があり、鼓膜切開を施行した。その後は症状消失し、必要時適宜再切開を行うことで再燃を認めなかった。その他の症例では有意な副反応は認めなかった。

2) 自覚症状

すべての症例において、高圧酸素療法の開始により疼痛の軽減をみとめ、VAS は表 1 に示すように全例で半分以下に減少した。また、症例 1 については高圧酸素療法の開始によりレイノー現象が消失、中止により再燃、再開により消失がみられた。その他の症例ではレイノー現象の頻度については変化を認めなかった。

3) 臨床所見

適切なデブリドマンを行ったことで一時的に潰瘍面積は拡大したが、すべての症例において開始から 4 週間後には、良好な肉芽形成、上皮化による潰瘍面の縮小をみとめた。

4) 総合評価

臨床的な潰瘍の縮小だけではなく、自覚症状の軽快により ADL の改善がみられた。

D. 考案

高圧酸素療法の適応は多岐にわたり、さまざまな疾患の治療に用いられてきた。しかし、その効果における作用機序は不明とされている。

Jennifer らの総説 (2) によれば、図 1 に示す創傷治癒の過程である inflammatory phase、proliferative phase、epithelialisation and remodeling phase いずれにおいても酸素分子が不可欠であり、高圧酸素療法は多量の溶解型酸素の供給などにより、その効果を示すとされている。

全身性強皮症に伴う指趾潰瘍に対して高圧酸素療法を施行した報告はこれまであまりみられないが、従来の循環改善薬の全身的投与や bFGF などの局所投与などの治療法に併せ、適切な皮膚科的な処置を行うことで、お互いにその効果を増強しうるもの考えた。

E. 結論

高圧酸素療法は、従来の治療法に抵抗性の全身性強皮症による指趾潰瘍に対し、比較的速やかな効果が得られる点など補助療法として有用であると考えた。導入するにあたり症例の評価が必要であるが、今回は慎重な対応により重大な副作用なども認めなかった。

今後の症例の蓄積によって、その効果についての客観的な評価が必要と考える。

F. 文献

1. MARKUS MY, BELL MJ, EVANS AW: Ischemic Scleroderma Wounds Successfully Treated with Hyperbaric

Oxygen Therapy. J Rheumatol 33:1694-6, 2006

2. Jennifer AT, Sean McElwain DL, et al.: The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A

review. Wound Rep Reg 16:321-30, 2008

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 1

Result	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
age	64	74	30	54
sex	female	female	female	female
occupation	nurse	homemaker	Clerk	homemaker
Site of skin tightneing	Mostly hands	Bilateral upper and lower extremities	Mostly hands	Bilateral upper and lower extremities, chest
Scleroderma manifestation	Gastric reflux/esophagitis, raynaud's phenomenon, interstitial pneumonia	Gastric reflux/esophagitis, raynaud's phenomenon, interstitial pneumonia	Gastric reflux/esophagitis, raynaud's phenomenon,	Gastric reflux/esophagitis, raynaud's phenomenon, interstitial pneumonia
Co-morbid illness	PBC	APS, MR	SLE	Polyposis coli
serology	Anti-Centromere Ab positive	Anti-Scl 70 Ab positive	Anti-Scl 70 Ab positive, anti-Sm positive	ANA positive(homo/spec)
Lung pathology	interstitial pneumonia	interstitial pneumonia	none	interstitial pneumonia
Ulcer location	Hand: rt. 4 th , lt. 2 nd	Foot: rt. 1 st	Hand: lt. 3 rd	Hand: rt. 3 rd , lt. 3 rd
Local treatments	Debridement, PGE1, bFGF	Debridement, PGE1, bFGF	Debridement, PGE1, bFGF	Debridement, PGE1, bFGF
Systemic treatments	PGI2, PGE2, sarpogrelate, beraprost, argatroban, anti biotics	PGI2, PGE2, sarpogrelate, beraprost, argatroban,	PGI2, PGE2, sarpogrelate, aberaprost, rगतroban,	PGI2, PGE2, sarpogrelate, beraprost, argatroban
Targeted lesions	Hand: rt. 4 th , lt. 2 nd	Foot: rt. 1 st	Hand: lt. 3 rd	Hand: rt. 3 rd , lt. 3 rd
VAS/Outcome	8 → 3/resolved	8 → 4/remission	9 → 3/remission	8 → 3/resolved
Absolute pressure of HBO	2ATA	2ATA	2ATA	2ATA
Duration of initial dive	60min.	60min.	60min.	60min.
Duration of susequent dives	60min.	60min.	60min.	60min.
Total number of dives	47	47	15	10

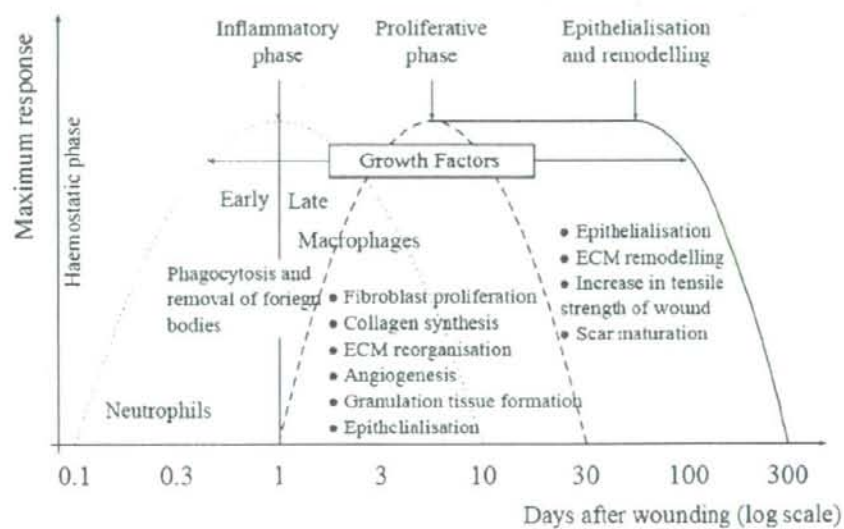


图 1

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

IL-2/18 誘導間質性肺炎の病態解明と
TGF- β シグナル制御による治療効果の検討

研究分担者	後藤大輔	筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻臨床免疫学講師
協力者	瀬川誠司	筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻臨床免疫学大学院生
	吉賀洋平	筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻臨床免疫学大学院生
	林 太智	筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻臨床免疫学講師
	松本 功	筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻臨床免疫学准教授
	伊藤 聡	筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻臨床免疫学准教授
	住田孝之	筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻臨床免疫学教授

研究要旨

全身性強皮症が難治性の疾患であり続ける中で、強皮症に合併する様々な臓器病変が問題となっている。中でも、間質性肺炎は患者の予後を左右する病態であり、強皮症患者における間質性肺炎による死亡率が増加していることから、解決すべき最も重要な病態の一つとなっている。今回我々は、IL-2 と IL-18 によって誘導されるヒト間質性肺炎の初期像に類似した細胞浸潤生の間質性肺炎モデルを用いて、間質性肺炎で最も注目されているサイトカインの一つである TGF- β シグナルを中心に、その病態の解析と治療法を検討する目的で研究を行った。TGF- β シグナルを制御する為、ALK5 阻害薬を投与方法と、シグナル伝達分子である Smad3 のノックアウトマウスを用いる方法との二通りの手法を用いた。その結果、いずれの方法でも TGF- β シグナルを抑制することにより IL-2/IL-18 誘導間質性肺炎モデルの間質性肺炎の組織像の改善を認めた。炎症細胞の増殖抑制作用でも知られている TGF- β シグナルが、抑制されることにより間質性肺炎モデルの肺組織でリンパ球浸潤が抑制される理由としては、肺内での MCP-1、MIP-1 α 、IP-10

などのケモカインの抑制によるものである可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性硬化症（強皮症）はいまだに難治性の疾患であることに変わりがなく、他の膠原病疾患の多くがステロイドを初めとした免疫抑制療法が有効であるのとは対照的に、決定的な有効治療がないのが問題となっている。皮膚の硬化病変もさることながら、予後を左右する内臓病変が問題となるが、特に最近、強皮症患者の死因の中で間質性肺炎が占める割合が顕著に増えてきている[1]。従って、強皮症患者の予後を改善する為には、間質性肺炎の病態を明らかとし、その治療法を検討することが最も重要なことであると考えられる。

これまでの報告では、プレオマイシン等の薬剤誘導性の間質性肺炎モデルを用いた研究が多く行われているが、これは誘導後、肺組織に直ぐに線維化を認めるモデルである。しかし、通常ヒトの間質性肺炎では、活動期では細胞浸潤が盛んであり、線維化はどちらかと言えば終末像となる。そこで、ヒトの活動期の間質性肺炎像に近い IL-2 と IL-18 にて誘導される肺の間質に細胞浸潤が誘導されるモデル[2]を用いることとした。このモデルを使用し、強皮症や間質性肺炎の病態において最も重要なサイトカインの一つである TGF- β [3]を中心に、細胞浸潤が盛んな活動期の間質性肺炎の病態解明と治療法の検討を行うこととした。

B. 研究方法

1) IL-2 と IL-18 による間質性肺炎の誘導

野生型として C57BL/6 マウス、4 週令の雌（日本チャールス・リバー株式会社、横浜）を用いて、既に論文にて報告されている方法[2]にて、リコンビナントヒト IL-2 を 50,000U/日とリコンビナントマウス IL-18 を 1 μ g/日投与し、間質性肺炎の誘導を行った。誘導は 3 日間で終了として評価を行った。また C57BL/6 系の Smad3 ノックアウト (Smad3KO) マウス[4]も同様に誘導を行った。

2) ALK-5 阻害薬の投与

ALK-5 阻害薬として SB-431542 (Tocris Bioscience, MO) を用いた。DMSO に溶解し、10mg/kg の量を 2 回/日で腹腔内投与を行った。本来、SB-431542 は低分子化合物であり経口投与が可能であるが、確実な投与方法として今回は腹腔内投与とした。

3) 肺組織の染色

IL-2 と IL-18 にて間質性肺炎誘導 3 日後に、肺組織を採取し、ホルマリン固定後、パラフィン切片として HE 染色を行った。

4) サイトカイン、ケモカインの RT-PCR

肺組織や脾臓細胞でのサイトカインやケモカインの発現をみるために、肺組織全体あるいは脾臓から得られた単核球より、mRNA を抽出し、cDNA を作製した。これらに対して、各種サイトカイン (IL-1 β , IL-6, PDGF A, PDGF B) とケモカイン (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXC1, CXC10) に対する PCR を行った。

なお、本研究を行うにあたり、「動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「筑波大学動物実験取扱規定」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議）」に従って動物実験計画書を提出し、筑波大学の動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) ALK-5 阻害薬の間質性肺炎に対する効果

IL-2 と IL-18 による細胞浸潤性の間質性肺炎が誘導されることが確認出来た。（図 1）これに対して、ALK-5 阻害薬である SB-341542 の投与を検討した。

しかし SB-341542 そのものを生体内へ投与した報告がほとんどないことから、マウスの腹腔内への投与予備実験を施行したところ、10mg/kg の量を 2 回/日まで特に生体異常を認めなかった。

これにより、SB-341542 を 10mg/kg で 2 回/日腹腔内投与により、IL-2 と IL-18 により誘導される細胞浸潤性の間質性肺炎にどのような影響を及ぼすのかを組織にて確認した。その結果、SB-341542 投与により肺の間質への細胞浸潤像の改善を認めた。（図 1）

2) Smad3KO マウスでの間質性肺炎の誘導

IL-2 と IL-18 により誘導される細胞浸潤性の間質性肺炎を、TGF- β シグナルの伝達分子である Smad3 のノックアウトマウスにおいて行った。その結果、Smad3KO マウスにおいても間質性肺炎の細胞浸潤像の改善傾向が認められた。（図 2）

3) TGF- β 阻害によるサイトカイン、ケモカインの肺組織での発現

上記の TGF- β 阻害による細胞浸潤性の間質性肺炎の改善が、どのような機序で起こるのかを検討するため、肺組織でのサイトカイン、ケモカインの発現の検討を RT-PCR による mRNA 発現の半定量法にて行った。

ALK-5 阻害薬である SB-341542 の投与の有無による発現の変化の解析を行ったところ、間質性肺炎に関与すると言われている IL-6、IL-1 β 、PDGF A、PDGF B のサイトカインの変化は明らかでなかった（図 3）が、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β のケモカインは著減（図 4）しており、これらケモカインの変化により肺組織の改善が見られたと考えられる。

D. 考案

間質性肺炎の病態解明と治療に関して、最も注目されているサイトカインの一つが TGF- β である。その作用は主に細胞外マトリックスの造成と分解の抑制 [3] で説明されている。肺の線維化のモデルでしばしば用いられるブレオマイシン誘導性の間質性肺炎は、間質への細胞浸潤は認めず、直ぐに肺の線維化が生じる。この線維化に対して、TGF- β シグナルを抑制することで肺組織像（線維化）が改善したとの報告は幾つかある [3, 5, 6, 7]。

今回のモデルは線維化ではなく細胞浸潤を主体としたモデルであり、炎症細胞に対して TGF- β は一般的に抑制作用をもつことが知られている。しかし結果として、TGF- β シグナル抑制により肺組織での間質へのリンパ球浸

潤は抑制された。それは、ALK-5 阻害薬である SB-341542 を用いたときも、Smad3KO マウスで実験したときもほぼ同様であった。このような細胞浸潤主体の間質性肺炎モデルで、TGF- β シグナルの抑制により間質性肺炎像の改善が認められるのは驚きであった。

その理由を検討する為に、TGF- β シグナル抑制により肺組織（間質）での環境変化が起こるのではないかと考えた。間質性肺炎に関連するサイトカインの IL-1 β [8]、IL-6 [9]、血小板由来成長因子(PDGF) [10] の mRNA を半定量的に測定したが、TGF- β シグナル抑制前後の肺組織において特に有意な発現の変化は認められなかった。一方、間質性肺炎に関与すると言われているケモカインの MCP-1 (CCL2) [11]、MIP-1 α (CCL3) [12]をはじめ、その他の MIP-1 β (CCL4)、RANTES (CCL5)、IP-10 (CXCL10) は、TGF- β シグナル抑制後の肺組織において著しく発現が抑制されていることが明らかとなった。

以前の報告より肺組織へ浸潤している細胞のほとんどは NK 細胞であると言われており、NK 細胞を抑制することで IL-2 と IL-18 により誘導される細胞浸潤性間質性肺炎は軽快する。NK 細胞の成熟や肺組織への移動にはケモカインが重要な働きをしているとされている。MIP-1 α は単球、マクロファージ、リンパ球、好中球の遊走因子であり [13]、感染時の肺への NK 細胞の動員で重要である [14]。また、CXCR3 のケモカイン受容体を刺激する IP-10 も、傷害を受けた肺への NK 細胞の動員に重要な因子である [15] と言われている。さらに、MCP-1 も単球、マクロファージを肺内へ集積

させ、これらの細胞から様々な因子が放出されることで間質性肺炎が惹起されると考えられている [11]。

よってこれらの様々なケモカインが肺内で作用する事により、ヒトの活動性のある間質性肺炎像に類似したこのモデルにおいて、NK 細胞を中心とした細胞浸潤による肺障害が起こっており、TGF- β シグナルを抑制することでこれらのケモカインの産生を制御し、結果として細胞浸潤性間質性肺炎が軽快したと考えられる。

今後は更なるケモカインの発現パターンを検証し、間質性肺炎の発症メカニズムを明らかとするとともに、新たな治療戦略を検討したいと考えている。

E. 結論

TGF- β シグナルを抑制することにより、細胞浸潤性間質性肺炎モデルにおいて、肺内のケモカインの産生が抑制され、その結果、間質性肺炎像が改善する可能性が示唆された。

F. 文献

1. Steen VD, Medsger TA. : Change in cause of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:940-944
2. Okamoto M, Kato S, Oizumi K, Kinoshita M, Inoue Y, Hoshino K, et al.: Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice: a potential role for cytokines, chemokines, and natural killer cells

- in the pathogenesis of interstitial pneumonia. *Blood* 2002; 99: 1289-1298
3. Bartram U, Speer PC. : impact of basic research on tomorrow' s medicine: The role of transforming growth factor β in lung development and disease. *Chest* 2007; 125:754-765
 4. Yang X, Letterio JJ, Lechleider JR, Chen L, Hayman R, Gu H, et al.: Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β . *EMBO* 1999; 18: 1280-1291
 5. Leask A, Abraham DJ. : TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004; 18: 816-827
 6. Wang Q, Wang Y, Hyde DM, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Ryan ST, et al.: Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor beta soluble receptor in hamsters. *Thorax* 1999; 54:805-812
 7. Nakao A, Fujii M, Matsumoto R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, et al.: Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 1999; 104:5-11
 8. Maeda A, Hiyama K, Yamakido H, Ishioka S, Yamakido S.: Increased expression of platelet-derived growth factor A and insulin-like growth factor-1 in BAL cells during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chest* 1996; 109:780-786
 9. Jordana M, Richards C, Irving LB, Gauldie J.: Spontaneous in vitro release of alveolar-macrophage cytokines after the intratracheal instillation of bleomycin in rats: Characterization and kinetic studies. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:1135-1140
 10. Yoshida M, Sakuma J, Hayashi S, Abe K, Saito I, Harada S, et al.: A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor beta 1, or platelet-derived growth factor B gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:9570-9574.
 11. Zhang K, Gharaee-Kermani M, Jones ML, Warren JS, Phan SH.: Lung monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 1994; 153: 4733-4741
 12. Smith RE, Strieter RM, Phan SH, Lukacs NW, Huffnagle GB, Wilke CA, et al.: Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha in bleomycin-induced lung injury. *J Immunol.* 1994; 153:4704-4712
 13. Bernardini G, Sciumè G, Bosisio D, Morrone S, Sozzani S, Santoni A.: CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of