

析により、Versican は MCP-1 と結合して単球遊走を促進することが示された。MCP-1 と Versican は単球のゴルジ体内で共存していた。したがって、末梢血単球が Versican に結合した形で MCP-1 を分泌することにより、病変局所での MCP-1 の蓄積と末梢血単球の遊走をさらに促進し、単球遊走の増幅ループが形成される可能性がある。MCP-1 が線維化病態を誘起する機序としてこれまで、①線維芽細胞を直接的に活性化させ、細胞外マトリックスの産生を促進する、②TGF- $\beta$  や PDGF などのサイトカインを介し間接的に線維芽細胞を活性化させる、③IL-4 産生 T 細胞を誘導し、Th2 病態を形成する、という3つのプロセスが報告されている<sup>8, 9, 10</sup>。さらに、局所への浸潤した単球そのものが線維化に関与する可能性も示されている。その機序として、末梢血単球自身が細胞外マトリックスを産生し直接線維化を誘導するプロセスと、細胞成長因子・サイトカイン・ケモカインなどの MCP-1 を含めた線維化促進因子を産生することで線維芽細胞を刺激し、間接的に線維化を引き起こす可能性が考えられている。

## E. 結論

強皮症末梢血単球は健康人と異なるフェノタイプを有し、線維化病態に関与する可能性が示唆された。

## F. 文献

1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007; 117: 557-67.
2. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and

MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 1999; 117(1): 159-65.

3. Moore BB, Paine R 3rd, Christensen PJ, et al. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol.* 2001; 167(8): 4368-77.
4. Sakai N, Wada T, Furuichi K, et al. MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *J Leukoc Biol.* 2006; 79: 555-63.
5. 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.
6. Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004; 94(9): 1158-67.
7. Hirose J, Kawashima H, Yoshie O, et al. Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses. *J Biol Chem.* 2001; 276(7): 5228-34.
8. Yamamoto T, Nishioka K. Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2003; 121(3): 510-6.
9. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem.* 1996; 271(30): 17779-84.
10. Distler JH, Jünger A, Caretto D, et al. Monocyte

chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(1): 214-25.

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Kawai M, Masuda A, and Kuwana M. A CD40-CD154 interaction in tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(11): 3562-3573.
2. Hoshi M, Yasuoka H, and Kuwana M. Estrogen receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008; 26(5): 914-917.
3. 桑名正隆: 強皮症患者のケアにおける現状と問題点-診断基準、病型分類、活動性の評価、臓器障害の評価について、*リウマチ科* 39(4): 281-288, 2008.
4. 桑名正隆: 膠原病の難治性病態-新しい考え方と新規治療法への応用: 強皮症の血管病変における血管内皮前駆細胞の役割とスタチン、*リウマチ科* 39(5): 393-399, 2008.
5. 桑名正隆: 強皮症の臨床における抗 RNA ポリメラーゼ抗体の有用性、*リウマチ科* 40(3): 239-245, 2008.

### 学会発表

1. 星野香菜、佐藤隆司、桑名正隆: 強皮症における HGF 及びその受容体の一塩基多型解析、第 52 回日本リウマチ学会総会 (札幌)、2008. 4.

2. 増田絢子、山口由衣、岡崎有佳、佐藤隆司、桑名正隆: 強皮症末梢血単球のフェノタイプ解析、第 52 回日本リウマチ学会総会 (札幌)、2008. 4.
3. Kuwana M: Circulating endothelial cell progenitors in scleroderma. The 10th International Workshop for Scleroderma Research (Cambridge). 2008. 8.
4. Kuwana M: Insufficient repair as a mechanism for scleroderma vasculopathy. 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (Yokohama). 2008. 9.
5. Hoshino K, Satoh T, Kuwana M: Hepatocyte growth factor promoter gene polymorphism controls severity of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis. The 72th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Francisco). 2008. 10.
6. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Ota Y, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara M: Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis. The 72th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Francisco). 2008. 10.
7. 増田絢子、安岡秀剛、山口由衣、佐藤隆司、桑名正隆: Fibrogenic gene expression profiles in circulating monocytes from patients with systemic sclerosis (SSc). 第 38 回日本免疫学会総会 (京都)、2008. 12.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

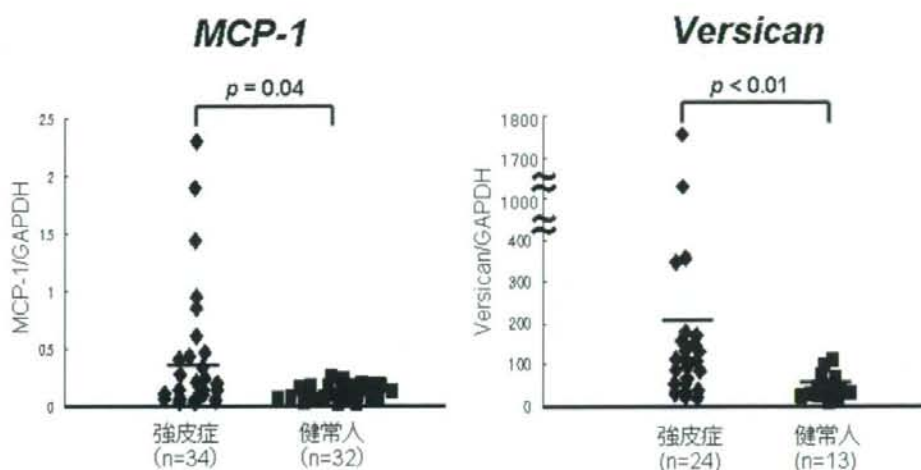


図1. 定量的PCR法によるスクリーニング

候補遺伝子の mRNA 発現レベルを定量的PCR法で解析した。結果、強皮症でMCP-1 ( $0.39 \pm 0.54$  vs  $0.11 \pm 0.07$ ) およびVersican ( $219.9 \pm 376.5$  vs  $46.2 \pm 31.1$ ) が高発現していた。

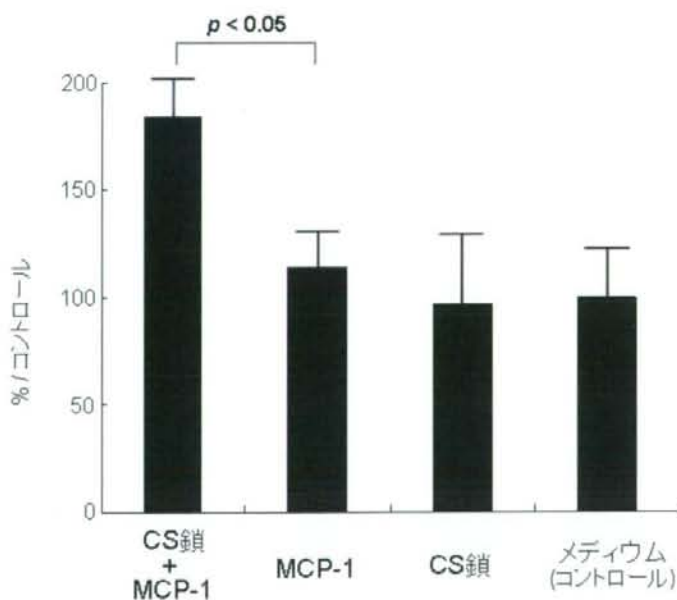


図2. CS鎖に結合したMCP-1による遊走活性の検討

CS鎖に結合したMCP-1が単球遊走に与える影響を追究するため、健常人単球を用いたMigration assayで検討した。結果、CS鎖はMCP-1の拡散を防止し、CS鎖に結合したMCP-1は単球遊走に関与した。

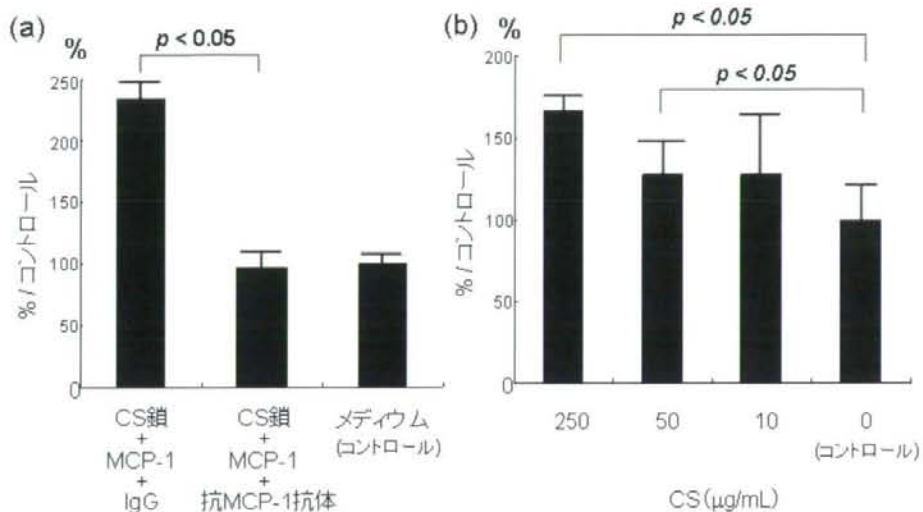


図3. 中和抗体を用いた確認試験およびCS鎖濃度と遊走活性の検討

a) MCP-1に対する中和抗体を用い、CS鎖に結合したMCP-1の単球遊走活性が抑制されるか、検討した。異なる4人の健常人単球を用いた。その結果、MCP-1を中和することで、遊走活性は抑制された(234.1 ± 18.3 vs 97.4 ± 13.5)。b) コートしたCS鎖の量がMCP-1の単球遊走活性に影響を与えるか、検討した。異なる3人の健常人単球を用いた。その結果、MCP-1の遊走活性は、コートするCS鎖の量に依存して増強された。

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

CTGF 遺伝子多型と強皮症発症との関与

研究分担者	川口鎮司	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター准教授
研究分担者	桑名正隆	慶応義塾大学内科学准教授
研究分担者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科准教授
研究協力者	土屋尚之	筑波大学生命システム医学専攻教授
研究協力者	長谷川稔	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科講師
研究代表者	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	大田ゆう子	東京女子大学附属膠原病リウマチ痛風センター医員
協力者	高木香恵	東京女子大学附属膠原病リウマチ痛風センター助教
協力者	栃本明子	東京女子大学附属膠原病リウマチ痛風センター助教
協力者	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	伊東郁恵	筑波大学生命システム医学専攻医員

研究趣旨

全身性強皮症(SSc)は、多臓器の線維化を主症状とする原因不明の自己免疫疾患である。SSc では線維芽細胞からのコラーゲンの過剰産生が認められ、その過剰な産生に connective tissue growth factor(CTGF)が重要な働きをしていることが報告されている。今回の研究では、日本人のSScにおいて、CTGF 遺伝子が疾患感受性遺伝子となりうるかどうかを検討した。SSc 395 名を対象に、翻訳開始部位から-945 の single nucleotide polymorphism (SNP, rs6918698) G/C を検討した。SSc 患者における G allele の頻度は健常人に比べて有意に高かった(P = 0.00028, odds ratio 1.5, 95% CI 1.2-1.9)。臨床的特徴および自己抗体との関連としては、diffuse cutaneous type および間質性肺病変のある患者、抗 topoisomerase I 抗体を有している患者において G allele の頻度が有意に高い結果であった。Genotype の解析においても allele と同様の結果が得られた。以上の結果より、CTGF 遺伝子は、日本人において、SSc の疾患感受性遺伝子であり、-945 SNP の G allele は、線維化病変の危険因子となる可能性が示された。

A. 研究目的

全身性強皮症(SSc)は、皮膚硬化、間質性肺病変、消化管蠕動障害、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリアーゼ、心筋障害などで特徴付けられる原因不明の結合組織疾患である[1]。自己抗体や遺

伝子変異が臨床症状を反映するという報告もある。

Connective tissue growth factor (CTGF)は、線維化に関与する成長因子である TGF- $\beta$  により産生され[2]、強皮症患者の線維芽細胞、皮膚、

血液中で増加している[3-6]。また、CTGF は線維芽細胞による細胞外マトリックスの産生や肉芽形成を調整している。

2007年にFonsecaらは英国の強皮症患者においてCTGF遺伝子の翻訳開始部位から-945のsingle nucleotide polymorphism (SNP, rs6918698)が強皮症発症と関連していると報告した[7]。また、そのSNPがCTGF遺伝子のプロモーター領域に存在し、CTGF遺伝子の転写活性に重要な役割をはたすことを発見した。

そこで、今回我々は日本人において同様のCTGF遺伝子多型と強皮症発症の関連について検討した。また、臨床症状、自己抗体との関連についても併せて検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象患者はSSc 395人、関節リウマチ(RA) 115人、健常人 269名である。全ての患者は日本人である。SSc、RAはアメリカリウマチ学会の定める分類基準により診断した。SScの平均年齢は43歳、病型別ではdiffuse cutaneous SSc(dsSSc)が183人、limited cutaneous SSc(lcSSc)が212人であった。臨床症状としては、皮膚硬化、間質性肺病変(ILD)、肺動脈性肺高血圧症(PAH)、強皮症腎クリーゼ(SRC)、指尖潰瘍(DU)を、自己抗体については抗トポイソメラーゼI抗体(Topo I)、抗セントロメア抗体(CENP)、抗U1-RNP抗体(U1RNP)を調べた。詳細は表1に記載した。

### 2) 遺伝子タイピング

CTGF遺伝子の-945SNP(rs6918698)をTaqMan SNP Genotyping Assay kit (Applied Biosystem)を用いて検討した。

### 3) 統計

-945SNPのalleleおよびgenotype頻度と病態との関連の解析方法としては、Fisher正確検定を用いた。

## C. 研究結果

### 1) CTGF遺伝子の-945SNPと強皮症発症の関連 (表2)

強皮症患者におけるG alleleの頻度は健常人に比べて有意に高かった( $P = 0.00028$ , odds ratio 1.5, 95% CI 1.2-1.9)。また、genotypeについては、強皮症患者と健常人において有意に異なっていた( $P = 0.00018$ )。

### 2) CTGF遺伝子の-945SNPと臨床症状の関連 (表3)

線維化と血管内皮障害は強皮症の主な病態である。このSNPがどちらの病態と関連しているかを評価するために臨床症状と-945SNPの関連性を検討した。Alleleおよびgenotypeの頻度は共にdsSScとILDに有意な相関が認められた。逆にPAHとDUにおいてはこのSNPとの弱い相関が認められた。SRCにおいてはこのSNPとの相関は認められなかったが、SRCを合併したSScの人数は非常に少なかった。Bonferroni補正を行うと、dsSScとILDのみで有意な相関がみとめられた。

### 3) CTGF遺伝子の-945SNPと自己抗体の関連 (表3)

このSNPのG alleleの頻度はTopo I、U1RNPを有するSScにおいて有意に高かった( $P = 0.00011$ , odds ratio 1.8, 95% CI 1.4-2.5)および $P = 0.010$ , odds ratio 1.8, 95% CI 1.2-2.8)。Bonferroni補正を行うとTopo Iのみが残った。

## D. 考案

今回の研究で、我々は *CTGF* 遺伝子のプロモーター領域に存在する-945SNP が日本人においても疾患感受性遺伝子となりうることを明らかにした。以前の報告では、この SNP の G allele と Topo I および CENP の間に相関が認められたが、我々の研究では CENP とこの SNP の間には相関は認められなかった。自己抗体は HLA や人種に関係することが既に報告されている。我々の結果と Fonseca らの結果に相違がみられた理由としては、我々の研究における対象は日本人であるのに対し、Fonseca らの研究対象はイギリスの白人であることが考えられた。また、アメリカ人の強皮症患者 1311 人(白人 994 人、アフリカ系アメリカ人 150、ラテン系アメリカ人 167 人)を対象とした *CTGF* 遺伝子の-945SNP の研究では、我々や Fonseca らの研究結果とは異なり、*CTGF* 遺伝子の-945SNP は SSc の疾患感受性遺伝子であることは証明されなかった[8]。多くの遺伝子関連の研究において、ヨーロッパ人、北アメリカ人、日本人において相違が見られることが既に報告されており[9-11]、*CTGF* 遺伝子においても同様に人種の差による結果と考えられた。

ILD と dcSSc は Topo I 陽性強皮症において頻度の高い合併症である。Fonseca らの研究結果と同様に ILD では-945SNP の G allele との有意な相関が認められた。さらに dcSSc における P 値は SSc 全体に比して小さく、lcSSc では、-945SNP との相関は認められなかった。一方、PAH や DU といった血管内皮障害を示唆する病態と-945SNP との相関は非常に弱かった。以上より、*CTGF* 遺伝子の-945SNP は線維化の良いマーカーとなりうるが、血管内皮障害のマーカーとはならないと考えられた。Fonseca らによれば

-945SNP において G allele の場合は C allele に比して *CTGF* 遺伝子の転写活性が上昇していると報告されている。*CTGF* は線維芽細胞におけるコラーゲン産生や組織におけるコラーゲンの蓄積に重要な役割をになっていることから我々の臨床症状と-945SNP との関連性は妥当であり信頼できる結果といえる。以上のことから *CTGF* 遺伝子の-945SNP は SSc だけでなく特発性間質性肺病変、巣状糸球体硬化症や肝硬変といった線維化疾患の疾患感受性遺伝子となりうる可能性が推察された。

ILD は dcSSc に合併する頻度が高く、lcSSc への合併頻度は低い。今回の研究では、ILD を合併した lcSSc40 人において *CTGF* 遺伝子の-945SNP の G allele との有意な相関が認められた。また、ILD を合併した lcSSc は健常人に比して遺伝子型が有意に異なっていた。以上の結果から *CTGF* 遺伝子の-945SNP における G allele および G/G genotype は皮膚硬化とは無関係に ILD の危険因子となりうると思われた。

*CTGF* 遺伝子の-945SNP は日本人における SSc の疾患感受性遺伝子であり、皮膚硬化や ILD といった組織の線維化の指標となりうると思われた。

## E. 結論

*CTGF* 遺伝子は、日本人において、SSc の疾患感受性遺伝子であり、-945 SNP の G allele は、線維化病変の危険因子となる可能性が示された。

## F. 文献

1. Medsger TA Jr. Systemic sclerosis (scleroderma): clinical aspects. In: Koopman WJ, ed., *Arthritis and allied conditions*, 14th ed.

- Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 2001:1590-624.
2. Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, *et al.* Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 2005; **203**: 447-56.
  3. Xiao R, Liu FY, Luo JY, Yang XJ, Wen HQ, Su YW, *et al.* Effect of small interfering RNA on the expression of connective tissue growth factor and type I and III collagen in skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2006;**155**:1145-53.
  4. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Highland KB, Hant F, Nietert PJ, Singleton CB, *et al.* Down-regulation of collagen and connective tissue growth factor expression with hepatocyte growth factor in lung fibroblasts from white scleroderma patients via two signaling pathways. *Arthritis Rheum* 2007;**56**:3468-77.
  5. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, *et al.* Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1995;**105**:280-4.
  6. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, *et al.* 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* 2000;**27**: 149-54.
  7. Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M, Sestini P, Renzoni EA, Holmes AM, *et al.* A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2007;**357**:1210-20.
  8. Gourh P, Mayes MD, Arnett FC. CTGF polymorphism associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2008;**358**:308-9; author reply 9.
  9. Lagan AL, Pantelidis P, Renzoni EA. Single-nucleotide polymorphisms in the SPARC gene are not associated with susceptibility to scleroderma. *Rheumatology* 2005;**44**:197-201.
  10. Wipff J, Allanore Y, Kahan A. Lack of association between the protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 (PTPN22)\*620W allele and systemic sclerosis in the French Caucasian population. *Ann Rheum Dis* 2006;**65**:1230-2.
  11. Zhou X, Tan FK, Reveille JD. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:2990-9.
- G. 学会発表  
第106回日本内科学会総会にて発表予定
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



表 1. Age, gender, and clinical features of patients with systemic sclerosis or rheumatoid arthritis and healthy controls

	SSc (n = 395)	RA (n = 115)	HC (n = 269)
Age, years, median (range)	43 (8-77)	63 (25-84)	40 (27-71)
Gender, female:male	353:42	98:17	180:89
Clinical features, no. (%)			
dcSSc	183 (46)	0	0
ILD	188 (48)	8 (7)	0
PAH	36 (9)	0	0
SRC	5 (1)	0	0
DU	91 (23)	0	0
Autoantibody, no. (%)			
anti-topo I	122 (31)	ND	ND
CENP	114 (29)	ND	ND
anti-U1RNP	48 (12)	ND	ND

anti-topo I, anti-topoisomerase I antibody; anti-U1RNP, anti-U1RNP antibody; CENP, anti-centromere antibody; dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis; DU, digital ulcer; HC, healthy controls; ILD, interstitial lung disease; ND, not determined; PAH, pulmonary arterial hypertension; RA, rheumatoid arthritis; SRC, scleroderma renal crisis; SSC, systemic sclerosis.

表 2. Distribution of alleles and genotypes of the single nucleotide polymorphism at -945 G/C

Variable	Allele, n (%)			OR (95% CI)	Genotype, n (%)			P
	G	C	P		GG	GC	CC	
SSc (n = 395)	435 (55)	355 (45)	0.00028	1.5 (1.2-1.9)	126 (32)	183 (46)	86 (22)	0.0018
RA (n = 115)	104 (45)	126 (55)	NS		24 (21)	56 (49)	35 (30)	NS
HC (n = 269)	241 (45)	297 (55)			58 (22)	125 (46)	86 (32)	

P values were estimated by the Fisher exact test compared with HC.

CI, confidence interval; HC, healthy controls; NS, not significant; OR, odds ratio; RA, rheumatoid arthritis; SSc, systemic sclerosis.

表 3. Association of the single nucleotide polymorphism at -945 G/C with clinical features and autoantibodies

Variable	No	Allele, n (%)			OR (95% CI)	Genotype, n (%)			P
		G	C	P		GG	GC	CC	
dcSSc	183	222 (61)	144 (39)	0.000003	1.9 (1.5-2.5)	72 (39)	78 (43)	33 (18)	0.00004
lcSSc	212	213 (50)	211 (50)	NS		54 (25)	105 (50)	53 (25)	NS
ILD	188	232 (62)	144 (38)	0.0000006	2.0 (1.5-2.6)	73 (39)	86 (46)	29 (15)	0.00000 6
PAH	36	40 (56)	32 (44)	NS		8 (22)	24 (67)	4 (11)	0.018
SRC	5	6 (60)	4 (40)	NS		2 (40)	2 (40)	1 (20)	NS
DU	91	100 (55)	82 (45)	0.02	1.5 (1.1-2.1)	29 (32)	42 (46)	20 (22)	NS
topo I	122	146 (60)	98 (40)	0.00011	1.8 (1.4-2.5)	49 (40)	48 (39)	25 (21)	0.00058
CENP	114	118 (52)	110 (48)	NS		27 (24)	64 (56)	23 (20)	NS
U1RNP	48	57 (59)	39 (41)	0.010	1.8 (1.2-2.8)	17 (35)	23 (48)	8 (17)	0.039
HC	269	241 (45)	297 (55)			58 (22)	125 (46)	86 (32)	

P values were estimated by the Fisher exact test compared with HC.

CENP, anti-centromere antibody; CI, confidence interval; dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis; DU, digital ulcer; HC, healthy controls; ILD, interstitial lung disease; lcSSc, limited cutaneous systemic sclerosis; NS, not significant; OR, odds ratio; PAH, pulmonary arterial hypertension; SRC, scleroderma renal crisis; topo I, anti-topoisomerase I antibody; U1RNP, anti-U1RNP antibody.

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

## 全身性強皮症と interferon regulatory factor 5 (*IRF5*)領域遺伝子多型の 関連

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教授
協力者	伊東郁恵	筑波大学医学群医療科学類学生
研究分担者	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	川崎 綾	筑波大学大学院人間総合科学研究科研究員
研究協力者	長谷川稔	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
研究分担者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学准教授
協力者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
研究代表者	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	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

全身性強皮症発症における interferon regulatory factor 5 (*IRF5*)遺伝子の役割を検討する目的で、2つの独立な日本人患者対照群を用いて、関連研究を施行した。第1セットでは、これまでに全身性エリテマトーデスなどとの関連が報告された *IRF5* 遺伝子内および近傍の単一塩基多型7個所につき関連解析を施行し、*IRF5* の約 5kb 下流に位置する rs2280714 およびそれと連鎖不平衡にあり、3' 非翻訳領域に位置する rs10954213 に関連あるいはその傾向が検出された。第2セットではこれら2個所について関連研究を施行したところ、同様の傾向が観察され、統合すると、rs2280714 において有意な関連が検出され(アリル頻度の比較において、 $P=0.0018$ 、オッズ比 1.41、95%信頼区間 1.14-1.75)、rs10954213 は rs2280714 との連鎖不平衡による二次的関連であることが示唆された。rs2280714 の関連は抗 topoisomerase I 抗体陽性群、広汎性皮膚硬化型強皮症群において顕著であった。GENEVAR データベースを用いた発現解析により、rs2280714 のリスク遺伝子型は、隣接する *TNPO3* 遺伝子よりも、*IRF5* 遺伝子の発現と良く相関することが示唆された。以上の結果から、*IRF5* 高発現と関連する SNP が全身性強皮症の疾患感受性と関連することが示された。

### A. 研究目的

近年、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)をはじめとする各種自己免疫疾患における type I interferon (IFN)パルスウェイの果

たす役割が注目されている。全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)においても、末梢血発現プロファイルにおける IFN signature が報告され、SSc と type I IFN の関連が示唆された(1)。一方、

SLE、関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)をはじめとする各種疾患において、interferon regulatory factor 5 (*IRF5*)多型の関連が報告され(2)、原因的な意義を有することが明らかになった。

*IRF5*は主として免疫系の細胞に構成的に発現し、type I IFNや炎症性サイトカイン誘導に関与する転写因子である。*IRF5*には少なくとも3個所の機能的多型が存在する。第1イントロン内に存在する単一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP) rs2004640は、5' splicing donor siteを形成し、exon 1Bを含む splicing isoformの発現に関わり、exon 6には10アミノ酸のinsertion/deletionが存在する。さらに、exon 9に存在する3'非翻訳領域(3' untranslated region, 3'UTR)に位置するrs10954213はpoly A signalを置換し、*IRF5*のmRNAレベルに直接影響する。

われわれは、日本人集団における*IRF5*とSLEとの関連を検討し、日本人集団ではヨーロッパ集団とはハプロタイプ構造が異なること、ヨーロッパ集団とは異なるSNP(rs41298401)がSLEと関連することを報告した(3)。さらに、これら以外にもいくつかの多型が原因的として報告されている。

最近の研究により、*IRF5*は関節リウマチ、原発性シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎との関連が報告されていることから、*IRF5*はさまざまな自己免疫疾患の疾患感受性に関連していることが示唆される。以上の背景から、SScの疾患感受性においても、*IRF5*多型が関与する可能性が考えられたため、本研究では日本人SScと*IRF5*との関連研究を施行した。

## B. 研究方法

### <対象>

SSc患者281名(男27名および女254名、年

齢:43.0±12.8歳[平均値±標準偏差])、健常者477名(男228名および女249名、34.1±11.3歳)を解析対象とするケース・コントロール関連解析を行った。ケース・コントロール群は、金沢大学および筑波大学の共同研究による患者106名・健常者290名(第1セット)と、東京女子医大膠原病リウマチ痛風センターの患者175名・健常者187名(第2セット)から構成されている。これまでに*IRF5*多型との関連の報告のあるSLEおよびシェーグレン症候群を合併したSSc症例は、解析対象から除外した。

### <遺伝子型決定>

対象者の末梢血からゲノムDNAを抽出し、直接塩基配列決定法およびリアルタイムPCRを用いたTaqMan genotyping assayにより、過去の研究により、疾患感受性や機能的変化との関連が報告された7個所のSNPについて、患者、健常者の遺伝子型を決定した。

### <遺伝子型とmRNA量の関連の検討>

rs2280714遺伝子型と*IRF5*、transportin 3(TNPO3)のmRNA発現レベルとの関連はHapMapデータベース(<http://www.hapmap.org/index.html>)と、HapMapドナーより樹立されたB細胞株の発現プロファイルが登録されているWellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/humgen/genevar/>)のGENEVARデータベースを利用し、HapMapドナーの遺伝子型とmRNAレベルとの関連を、回帰分析により検討した。

### <統計解析>

ケース・コントロール関連解析ではカイ二乗検定、Fisherの正確確率検定法を用いた。rs10954213とrs2280714の調整は、ロジスティック回帰分析を用いた。ハプロタイプ頻度の推定と、並べ替え検定を用いたハプロタイプの関連解析は、Haploviewソフト

トウェアを使用して施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、筑波大学、金沢大学、東京女子医大における倫理委員会において審議され、承認を受けた研究計画に従い、遺伝子解析に関する研究参加者のインフォームド・コンセントを得、匿名化した試料を用いて施行されたため、研究の施行に倫理面の問題はないと判断された。

### C. 研究結果

HapMap データベースより定法に則って選択される tagSNP は、先行研究において疾患感受性との関連が報告された SNP の多くを補足し得ないため、まず、第一セットについて、先行研究において SLE との関連が報告されている rs729302A>C、rs6953165C>G、rs2004640G>T、rs41298401C>G、rs3807306C>A、rs10954213G>A、rs2280714A>G の遺伝子タイピングを行った。-4001C>A は rs6973165 と、rs11770589 は rs10954213 と、それぞれ完全な連鎖不平衡にあり、exon 6 insertion/deletion も日本人集団においては rs10954213 と強い連鎖不平衡の関係にあるため ( $r^2=0.98$ ,  $D'=0.99$ )、解析対象から除外した。

図 1 に第1セットの健常者 290 名の遺伝子型に基づく *IRF5* SNP の連鎖不平衡プロットを示す。第1セットでは、アレル頻度の比較において、rs2280714 A アレルと SSc との関連の傾向が観察され ( $P=0.057$ , odds ratio [OR] = 1.36, 95% confidence interval [CI]: 0.99-1.87) (図 1)、優性モデルにおいては ([A/A+A/G] と G/G の比較)、有意差に到達した ( $P=0.02$ , OR=2.04, 95%CI: 1.12-3.71)。また、poly A signal を置換することにより、直接機能的影響を有する rs10954213 においても、関連の傾向が観察

された (アレル 頻度 :  $P=0.08$ 、OR=1.32、95%CI: 0.96-1.80)。

これらを確認する目的で、独立な第 2 セットにおいて、これらの 2SNPs について関連解析を行った。第 2 セットにおいては、rs2280714 の関連は、アレル 頻度においても有意差に到達し ( $P=0.013$ 、OR=1.45、95%CI: 1.08-1.95)、rs10954213 の関連傾向も再現された ( $P=0.080$ 、OR =1.30、95%CI: 1.08-1.74)。

次に、第 1 セットと第 2 セットの結果を DerSimonian-Laird 法により統合すると、rs2280714 (アレル 頻度 :  $P=0.0018$ 、OR=1.41、95%CI: 1.14-1.75)、rs10954213 (アレル頻度 :  $P=0.015$ 、OR=1.31、95%CI: 1.05-1.62) いずれにおいても有意な関連が確認された。

rs2280714 と rs10954213 の間には連鎖不平衡が見られたため ( $r^2=0.769$ )、この 2 つの SNPs のどちらが原因的であるかを、ロジスティック回帰分析を用いて検討した。rs10954213 で調整した場合にも rs2280714 には統計学的有意差が検出された ( $P=0.018$ )。一方、rs2280714 で調整した場合には、rs10954213 の関連は消失した ( $P=0.339$ )。以上の結果から、rs10954213 の関連は、rs22804213 との連鎖不平衡による二次的な関連である可能性が支持された。

次に rs2280714 遺伝子型と臨床病型との関連について検討した (表 1)。rs2280714 遺伝子型は、dcSSc、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性群で関連が観察されたものの、lcSSc、抗セントロメア抗体陽性群では関連は観察されなかった。

rs2280714 は *IRF5* よりも *TNPO3* に近い場所に位置しているため、いずれの遺伝子の発現にも影響を及ぼす可能性がある。そこで、HapMap データ

ベースと GENEVAR データベースを利用し、遺伝子型と mRNA レベルとの関連を検討した(図 2)。rs2280714 遺伝子型は、IRF5 の mRNA レベルの発現量と強い関連が認められたのに対し( $r^2=0.447$ 、 $P=1.02 \times 10^{-12}$ 、slope = 0.51)、TNPO3 mRNA レベルとは弱い関連が検出されたのみであった( $r^2=0.056$ 、 $P=0.025$ 、slope = -0.071)。

#### D. 考案

今回の研究により、*IRF5* 下流の SNP rs2280714 と SSc の関連が検出された。臨床病型別の解析では、dcSSc および抗トポイメラーゼ I 抗体陽性群において、顕著な関連が認められた。さらに、リスクアレルである A アレルは、*IRF5* mRNA レベルの上昇と関連していた。ごく最近、フランスのグループが、*IRF5* intron 1 rs2004640 と SSc との関連を報告した(6)。彼らはこの1個所のみを解析しかしていないため、本研究との関連 SNP の違いが集団差によるものか否かについては今後の検討が必要であるが、これらの結果から、ほかのリウマチ性疾患と同様、SSc においても、*IRF5* が遺伝素因に関連することが明らかにされた。本研究は、SSc の病因論に新たな知見を提供するものと考えられる。

抗トポイメラーゼ I 抗体を含む血清が、正常な末梢血単核球から IFN $\alpha$  を誘導するとの報告がみられるが、今回の結果において、*IRF5* 多型は dcSSc と抗トポイメラーゼ I 抗体陽性群において強い関連が観察されたことから、*IRF5* は抗トポイメラーゼ I 抗体の産生に関わっている可能性も考えられる(4)。

Type I IFN 治療により、SSc を発症した多発性硬化症の症例が報告されているが(5)、本研究は、*IRF5* の過剰発現が SSc において重要な役割を果

たしている可能性を示すのみならず、type I IFN が SSc の病因となる可能性を支持している。もし、この仮説が正しければ、type I IFN が SSc 治療の分子標的になる可能性が提唱される。

今後、SSc と *IRF5* の関連の分子機構の解明が必要である。

#### E. 結論

全身性強皮症の疾患感受性と *IRF5* 高発現と関連する遺伝子多型との関連が示された。

#### F. 文献

- 1) Tan FK, Zhou X, Mayes MD, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis. *Rheumatology* 2006; 45: 694-702.
- 2) Kyogoku C, Tsuchiya N. A compass that points to lupus: genetic studies on type I interferon pathway. *Genes Immun*. 2007;8:445-55.
- 3) Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, et al. Association of *IRF5* polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Support for a crucial role of intron I polymorphisms. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 826-34.
- 4) Kim D, Peck A, Santer D, et al. Induction of interferon- $\alpha$  by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I. Association of higher interferon- $\alpha$  activity with lung fibrosis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2163-73.
- 5) Hügle T, Gratzl S, Daikeler T, et al. Sclerosing skin disorders in association with multiple sclerosis. Coincidence, underlying autoimmune pathology or

interferon induced? *Ann Rheum Dis.* 2009;68: 47-50.

6) Dieudé P, Guedj M, Wipff J, et al. Association between the *IRF5* rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: A new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2008;60:225-233.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Miyashita R, Hikami K, Kusaoi M, Tokunaga K, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Tsuchiya N. Association of *IRF5* polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Support for a crucial role of intron 1 polymorphisms *Arthritis Rheum* 2008;58: 826-834.
2. Hikami K, Ehara Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita M, Oka T, Takehara K, Sato S, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of IL-10 receptor 2 (*IL10RB*) SNP with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;373: 403-407.
3. Kawaguchi Y, Ota Y, Kawamoto M, Ito I, Tsuchiya N, Sugiura T, Katsumata Y, Soejima M, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kuwana M, Yamanaka H, Hara M. Association study of a polymorphism of the CTGF gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis* published online 3 Dec 2008; doi:10.1136/ard.2008.100586

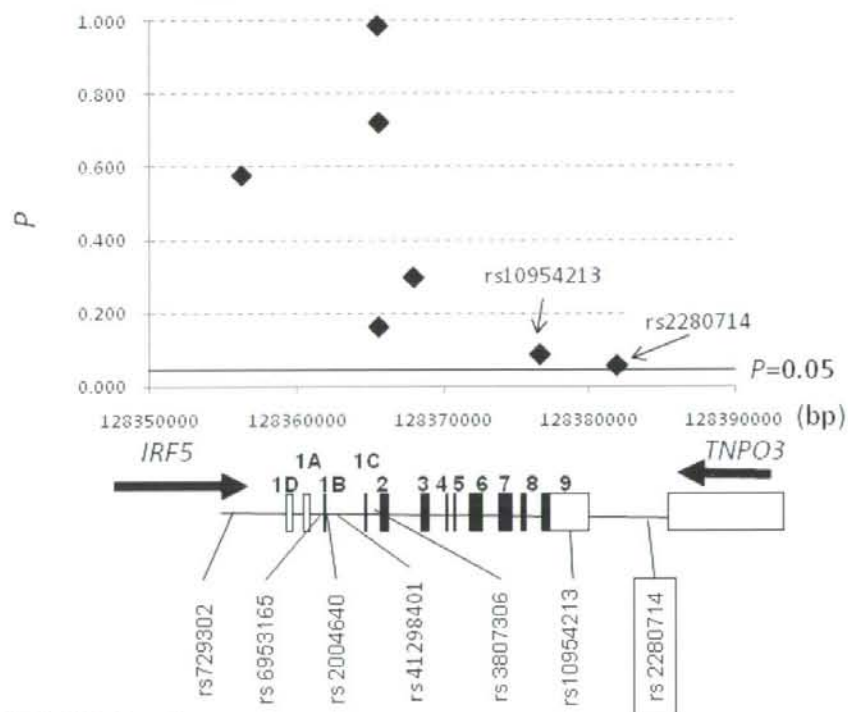
### 2. 学会発表

1. 氷上光輝、長谷川稔、松下正毅、藤本学、竹原和彦、佐藤伸一、土屋尚之:全身性強皮症と *IL10RB* 遺伝子多型の関連。第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、札幌、2008年4月20日-23日。
2. 伊東郁恵、川崎綾、長谷川稔、氷上光輝、藤本学、竹原和彦、佐藤伸一、土屋尚之:全身性強皮症と *IRF5* 領域遺伝子多型の関連。第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、札幌、2008年4月20日-23日。
3. Hikami K, Ehara Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita M, Oka T, Takehara K, Sato S, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of interleukin-10 receptor 2 gene (*IL10RB*) polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis. 2008 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 27, 2008, San Francisco. (*Arthritis Rheum* 2008;58(Suppl), S591.)
4. Ito I, Kawasaki A, Hikami K, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Tsuchiya N. A single nucleotide polymorphism associated with expression of interferon regulatory factor 5 (IRF5) is a genetic risk factor for systemic sclerosis. 2008 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 27, 2008, San Francisco. (*Arthritis Rheum* 2008;58(Suppl), S590.)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

### 第一セットにおける関連解析



### 連鎖不平衡プロット

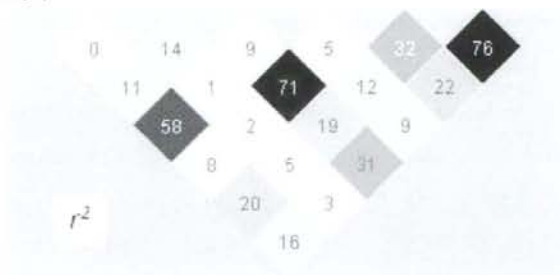


図1 第1セットの患者対照群における *IRF5* 領域 7 SNPs の関連解析の結果。

上にアレル頻度を用いて計算した  $P$  値を、下に日本人健常対照群に基づいて作成した連鎖不平衡プロットを示す。矢印は *IRF5* および *TNPO3* それぞれの転写の方向性を示す。*TNPO3* は、もつとも 3' 側の exon のみを示す。



表 1 rs2280714 と全身性強皮症との関連解析

	パネル	A アリル頻度	アリル頻度の関連解析	
			オッズ比 (95% 信頼区間)	<i>P</i>
SSc	第1セット	0.58	1.36(0.99-1.87)	0.057
	第2セット	0.60	1.45(1.08-1.95)	0.013
	統合		1.41(1.14-1.75)	0.0018
dcSSc	第1セット	0.58	1.34(0.82-2.18)	0.240
	第2セット	0.66	1.86(1.31-2.63)	4.92E-04
	統合		1.65(1.22-2.24)	0.0013
lcSSc	第1セット	0.59	1.37(0.94-2.00)	0.098
	第2セット	0.51	1.03(0.70-1.51)	0.899
	統合		1.19(0.90-1.59)	0.230
anti-topo I +	第1セット	0.56	1.24(0.69-2.25)	0.473
	第2セット	0.65	1.80(1.19-2.74)	0.0054
	統合		1.59(1.13-2.25)	0.0084
anti-centromere +	第1セット	0.58	1.36(0.90-2.07)	0.148
	第2セット	0.53	1.08(0.66-1.76)	0.771
	統合		1.23(0.90-1.70)	0.198
controls	第1セット	0.49		
	第2セット	0.49		

第1セット、第2セットおよびこれらの結果を DerSimonian-Laird 法により統合した結果を示す。SNP rs2280714 の A アリル頻度が、特に dcSSc 群、抗 topoisomerase I 抗体陽性群において、有意に増加していた。

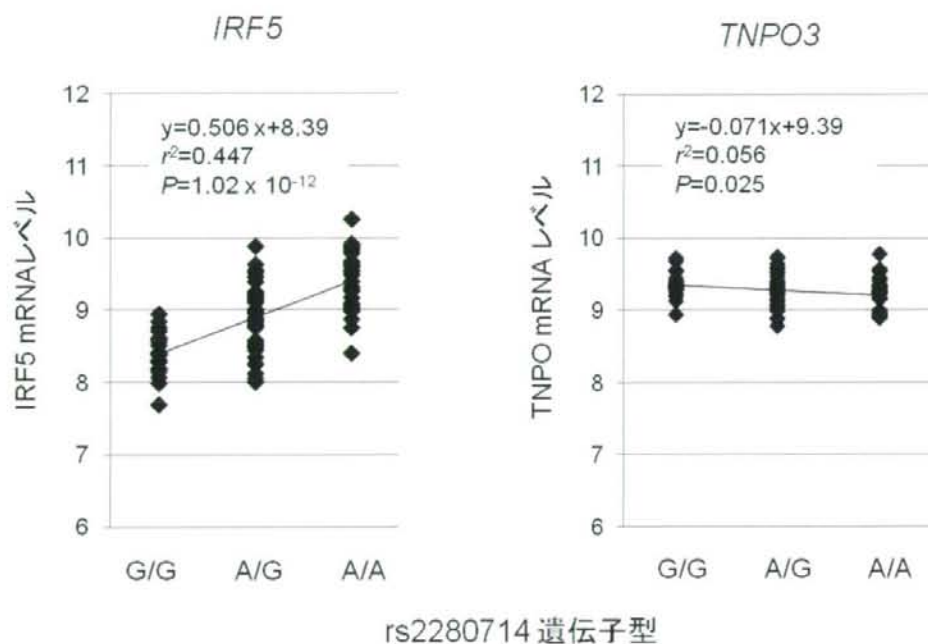


図2 SNP rs2280714 遺伝子型と IRF5, TNPO3 mRNA レベルとの関連。

HapMap ドナーの B 細胞株の mRNA 発現プロファイルデータベース(GENEVAR, <http://www.sanger.ac.uk/humgen/genevar/>)を用い、rs2280714 遺伝子型と IRF5 および TNPO3 mRNA レベルとの相関を回帰分析により検討した。IRF5 発現量との強い相関が検出されたのに対し、TNPO3 とは弱い相関のみが検出された。

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

タキサン製剤による皮膚硬化形成機序についての検討

研究分担者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学教授  
協力者 山中正義 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学助教  
協力者 岡田悦子 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学助教  
研究代表者 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

研究要旨

タキサン製剤 (TXT)による皮膚硬化形成機序について、皮膚線維芽細胞およびヒト末梢血由来単核球 (PBMC)を用いて検討した。TXTは線維芽細胞のI型コラーゲン発現・産生に影響を与えなかったが、TXTで刺激したPBMCの培養上清を線維芽細胞に添加したところ、I型コラーゲンの mRNA 発現は抑制された。TXTで刺激したPBMCの培養上清中のTNF- $\alpha$ 濃度をELISA法を用いて測定したところ、TNF- $\alpha$ 濃度の上昇が見られた。また、サイトカインアレイキットを用いてTXTで刺激したPBMCの培養上清中のサイトカイン、ケモカインについて検討したところ、IL-1ra、IL-13、IL-16、MIF濃度の上昇がみられた。これらのサイトカイン、ケモカインの働きは様々であるが、いずれも全身性強皮症患者の血清中で上昇しているとする報告のあるものであり、TXTによる皮膚硬化形成機序を明らかにすることは、全身性強皮症の病態解明にも役立つのではないかと考えられた。

A. 研究目的

タキサン製剤(TXT)は、微小管の蛋白重合を促進し、微小管の安定化・過剰形成を引き起こすことにより細胞分裂を阻害して抗腫瘍効果を示す。本邦でもドセタキセル(DTX)、パクリタキセル(PTX)が、1997年より保険適応となり、現在乳癌、非小細胞肺癌、胃癌、頭頸部癌、卵巣癌、食道癌、子宮体癌などに対し広く使用されている。タキサン製剤による強皮症様皮膚硬化は、1995年にBattafaranoらによって報告されて以降、国内外で複数の報告がある(1,2,3)。TXTは高頻度に生じる副作用として浮腫(DTXで

47%、PTXで21%)があるが、皮膚硬化は浮腫が数ヶ月続いた後に生じることが多い(投与後3~60ヶ月)。病初期に浮腫が生じ、その後皮膚硬化が生じてくるといった臨床像の変化は、全身性強皮症にも共通する所見であり、強皮症に共通した病態が存在する可能性が示唆される。TXTはマクロファージやリンパ球からの様々なサイトカイン、ケモカインを産生させることが報告されている(4)ことから、皮膚硬化病変の形成にも、これらのサイトカインやケモカインが線維芽細胞に働き線維化を誘導しているのではないかと考えられている。ところで、抗がん

剤による線維化といえはブレオマイシンが有名であり、皮膚線維化モデルマウスとしても広く使用されている(5, 6)。ブレオマイシンでは MCP-1 などの炎症性サイトカインの誘導に加えて、線維芽細胞の I 型コラーゲン発現を亢進するという機序もあると考えられている。そこで、今回我々は TXT のヒト皮膚線維芽細胞に及ぼす影響について検討することから実験を開始した。

## B. 研究方法

### 1) ヒト皮膚由来線維芽細胞、ヒト末梢血由来単核球の分離・培養の培養

ヒト真皮由来線維芽細胞は、当科にて患者の同意を得た上で生検時に得られた正常部皮膚を explant culture 法により初代培養したものを使用した。

ヒト末梢血由来単核球は、健康人ボランティアより同意を得た上で 1 回につき 20ml 採血した。抗凝固処理 (EDTA-2Na を使用) した血液から、LYMPHOPREP (AXS 社) を用いて末梢血単核球を分離した。

### 2) cell proliferation assay

96 well plate に MC3T3-E1 ないしヒト真皮由来線維芽細胞を播種し、24 時間培養後、目的とする濃度の  $GdCl_3$  を添加し、48 時間ないし 60 時間後に CellTiter96 AQueous one solution cell proliferation assay (Promega) により細胞増殖能を測定した。

### 3) リアルタイム PCR 法

培養細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて mRNA を抽出し、Random primer を用いた逆

転写反応にて cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を行なった。Applied Biosystems 社の 7300 Real time PCR System を用いた Taqman Gene Expression Assays にて、COL 1 A2、MMP-1、 $\alpha$ -SMA、GAPDH (内部標準) の mRNA 発現量を定量した。

### 4) ELISA, サイトカインアレイ

培養上清中の I 型コラーゲンの測定には、エーシーバイオテクノロジー社の ELISA キット (ヒトコラーゲンタイプ 1) を使用した。培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度の測定には、ENDOGEN 社の ELISA キットを使用した。サイトカインアレイは、R&D 社の Human Cytokine Antibody Array Kit を使用した。

(倫理面への配慮)

皮膚組織検体は診断確定のための生検時に患者から得たものを使用した。皮膚生検前に研究の使用目的、治療の成果には無関係であること、プライバシーの保護、を十分に説明しインフォームドコンセントを文書で得た。皮膚組織検体より初代培養して得た線維芽細胞は、患者名、カルテ番号を記載せず専用の番号で保存しており、カルテとの照合も不可能なシステムになっている。今回の研究は倫理面においても十分に配慮したものである。

## C. 研究結果

### 1) タキサン製剤によるヒト皮膚由来線維芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響

タキサン製剤によるヒト皮膚由来線維芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。パクリタキ