

5分遠心しバッフィーコートを採取した。Isogen reagent kit(日本ジーン)を用いRNAを分離した。Total RNAよりRAV2 reverse transcriptase(Takara)によりcDNAを作成した。Real Time Quantitative PCRはPlatelet type12-LOX(sense:5'-GCCAGGTATCTGGAGGGGATG-3', antisense:5'-GGCACCATGCTCTGGCTGGGC-3'), 15-LOX(sense:5'-CCGGATTTCTGGTGTGGTTC-3', antisense:5'-ACTAGCGCAGCAGGAAGGTGA-3') GAPDH(sense:5'-ACCAGCCCAGCACAAG-3', antisense:5'-TTCAAGGGGTCTACATGGCAACTG-3')によりReal-time quantitative PCR Kit(qPCR Mastermix for Syber Green I)を用い行った。解析はABI Prism 7700 Sequence Detection Systemによりおこなった。各mRNAレベルはGAPDHをコントロールとして健常人を1として標準化して表現した。

## C. 結果

1. 強皮症、関節リウマチ、健常人血漿におけるLXA<sub>4</sub>、12-(S)-HETE、15-(S)-HETE、LTB<sub>4</sub>(図1)  
LXA<sub>4</sub>はSSc(n=32)3.39±1.79、RA(n=20)0.75±0.35、Normal(n=20)0.766±0.296 ng/ml(P<0.001, Kruskal-Wallis Test), 12-(S)-HETEはSSc10.76±3.22、RA 4.08±1.22、Normal 3.77±1.26ng/ml(P<0.01)。15-(S)HETE SSc2.07±1.18、RA 3.76±1.82、Normal 2.39±0.98ng/ml(P<0.05), LTB<sub>4</sub> SSc 46.5±31.0、RA140.7±155.4、Normal26.4±24.4pg/ml(P<0.01)。以上よりSScはRAと比較して12-(S)-HETEが高値、LXA<sub>4</sub>が結果として高く、一方RAではLTB<sub>4</sub>や15-(S)-HETEが有位に高くSScは低いことが示された。  
末梢血中の12-LOXmRNA発現量

SScは健常人と比較し平均4.7倍の発現が強く、一方15-LOX、LXA<sub>4</sub>受容体ALXの発現に差はなかったがってSScの末梢血のLXA<sub>4</sub>過剰はPlatelet type12 LOX発現により惹起されていると考えられた。

dcSScとlcSScにおけるLXA<sub>4</sub>

dcSSc 4.09±1.6、lcSSc1.86±0.85ng/mlとdcSScと高く単位時間あたりの皮膚硬化増加の高い症例に高い傾向が認められた。

## D. 考察

SScの病態におけるリポキシゲナーゼの関与は肺病変におけるLipoxin A<sub>4</sub>の低値が肺内炎症の持続に関与すると報告されている。しかし全身的なLipoxinの産生に関する報告はない。近年重症気管支喘息やCystic fibrosisにおいて気管支肺胞洗浄液において低下していることが報告され病態形成に関与していると考えられている。しかし全身的な産生量について報告はない<sup>1)</sup>。今回SSc患者の血漿中LXA<sub>4</sub>は健常人やRA患者より高値であった。LXA<sub>4</sub>は12/15-LOXと5-LOXの各酵素を介するTranscellular synthesisを生じる。12-(S)-HETEが高い値を呈し15-(S)-HETE、LTB<sub>4</sub>はむしろSScよりRAで低いことが検出された。以上より12-LOXが過剰に発現してLXA<sub>4</sub>が過剰になっていると考えられた。

12-LOX、12-HETE産生過剰は悪性腫瘍増殖に関連し、治療の標的として報告されている。肺癌、前立腺癌、乳癌細胞の増殖と関係し腫瘍細胞の12-LOXの発現量と転移、予後と関係が報告されている<sup>4)</sup>。腫瘍細胞Cell cycleおよび12-HETEを介する血管新生促進効果が想定されている。また12-(S)-HETEは単球からのサイトカイン産生促

進も有している。12-LOX と 15-LOX のバランスが腫瘍増殖に関与していると報告されている。

強皮症の皮膚硬化病変との関連性については不明である。全身性皮膚硬化型が限局型より高い値を示しておりまた皮膚硬化の進展例に高い傾向がある。

12-LOX は腫瘍増殖、転移との関連が示唆されている。漢方薬オウゴンの主成分、Retinoid Baicalein は 12-LOX 抑制を介して前立腺癌の آپトーシスを惹起し、また VEGF 産生を抑制する。12-LOX を抑制が皮膚硬化進展に関する抑制効果について検討する必要がある。

## E. 結論

SSc末梢血中の Lipoxygenase は特殊なパターンを呈し血小板タイプ 12-LOX が過剰に発現しており血中 12-(S)-HETE が多く、LXA<sub>4</sub>が多い、他の疾患にみられないパターンを呈している。12-LOX は悪性腫瘍の増殖に関係し治療標的として検討されており SSc の病態形成に関係している可能性があり今後治療標的としての検討が必要である。

## F. 参考文献

1. Chang Nan, Arita Makoto, Sherhan CN, Anti-inflammatory circuitry: Lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids, 73, 163-177, 2005.
2. Kowal-Bielecka O, Kowal K, Distler O, Rojewska J, Bodzenta-Lukaszyk A, Michel BA, Gay RE, Gay S, Sierkowski S, Cyclooxygenase-and Lipoxygenase-derived eicosanoids in 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. Kowal-Bielecka O, Distler 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.
4. Pidgeon, GP., Lysaght, J., Krishnamoorthy, S., Reynolds, JV., O'Byrne, K., Nie D, Honn KV.: Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival, Cancer Metastasis Rev, 503-524, 2007.
5. Yamamoto, S., Katsukawa, M., Nakano A, et al.: Arachidonate 12-lipoxygenases with reference to their selective inhibitors, Biochem Biophys Res Commun, 338, 122-127, 2005.

## 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

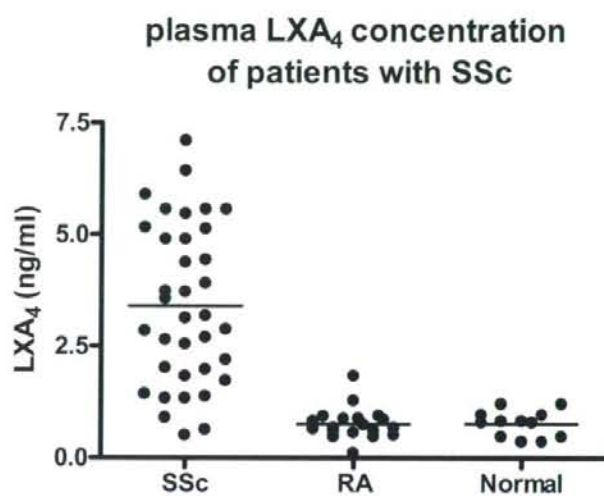


図1.血漿 LXA<sub>4</sub> 濃度 SSc、RA、健常人の比較

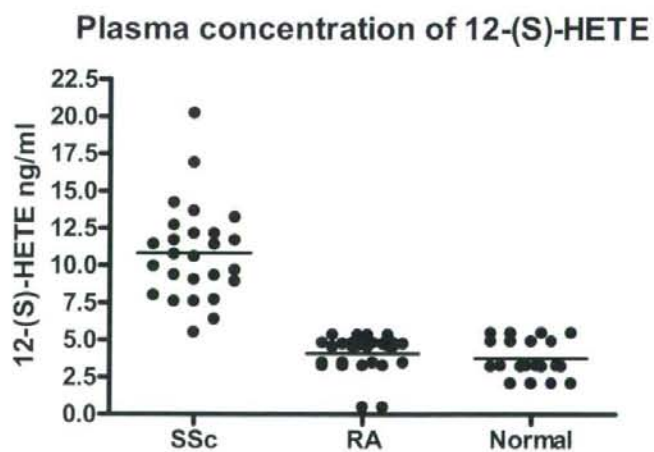


図2.血漿 12-(S)-HETE 濃度の比較

### 15-(S)-HETE in patients with SSc

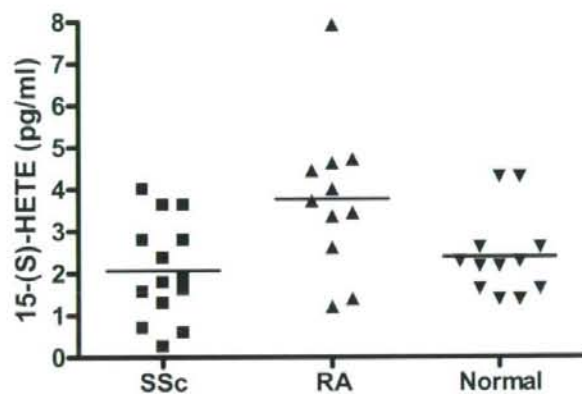


図3.血漿 15-(S)-HETE 濃度の比較

## 全身性強皮症(SSc)における血清 Pentraxin3 (PTX3)値と 臨床症状の検討

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 岩田洋平 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学

協力者 吉崎 歩 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学

### 研究要旨

Pentraxin3 (PTX3)は、long-PTX スーパーファミリーに属する蛋白で、炎症や血管障害のマーカーとして知られている。全身性強皮症(Systemic sclerosis; SSc)患者において血清 PTX3 値を測定したところ、健康人に比較して有意に高値を示した。免疫染色では、PTX3 は血管内皮細胞および線維芽細胞に発現しており、SSc 患者では健康人に比較して発現が亢進していた。臨床症状との相関を検討したところ、血清 PTX3 は皮膚硬化や肺線維症の重症度、血清 IgG 値や血沈と相関を認めた。さらに血清ヒアルロン酸濃度や酸化ストレスマーカーである 8-isoprostane との相関も認められた。SSc 患者の線維芽細胞は、ヒアルロン酸刺激により健康人と比較して有意に PTX3 の産生が亢進した。以上の結果から、血清 PTX3 値は SSc の重症度を示す有用なマーカーである可能性が示唆された。さらに、SSc 患者における PTX3 の上昇は、酸化ストレスの亢進とそれに伴う細胞外マトリックスからのヒアルロン酸の増加、ヒアルロン酸により刺激された線維芽細胞からの PTX3 産生亢進といった機序が考えられ、酸化ストレスによる SSc の病態形成への関与を考える上で PTX3 は重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

### A. 研究目的

全身性強皮症(systemic sclerosis; SSc)は、血管障害、細胞外マトリックスの過剰産生、全身の線維化を引き起こす疾患で、免疫異常を背景に有する[1]。SSc の病因は未だ不明であるが、酸化ストレス、微小血管障害、免疫異常が重要な役割を果たすことが示唆されている[2, 3]。Pentraxin3 (PTX3)は、long-pentraxin スーパーファミリーに属する蛋白で、炎症局所において血管内皮細胞や線維芽細胞などから産生され、補体系の活性化調節作用やアポ

トーシスに陥った細胞に結合し樹状細胞への抗原提示を抑制するなど、炎症や免疫系に重要な役割を果たすことが知られている[4]。血清 PTX3 は、血管炎症候群や関節リウマチにおいて上昇しており、重症度と相関することが報告されている[5, 6]。SSc においては、線維芽細胞が PTX3 を過剰産生しているという報告がなされている[7]が、PTX3 と臨床症状との関連は不明であった。したがって、SSc における血清 PTX3 値を測定し、臨床的意義について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象患者は SSc 91 例（女性 81 例、男性 10 例）であり、年齢は  $47 \pm 16$  歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 46 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 45 例であった。lSSc と dSSc の罹病期間はそれぞれ  $8.5 \pm 9.5$  年、 $3.1 \pm 2.5$  年であった。初診時ステロイド、D-ペニシリン、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 36 例、抗セントロメア抗体陽性例が 38 例、抗 UIRNP 抗体陽性例が 4 例、抗 U3RNP 抗体陽性例が 2 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 9 例であった。残りの 2 例では抗核抗体は陰性であった。20 例の健常人をコントロールとして用いた。

### 2) ELISA

血清 PTX3 の測定は、ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。

### 3) PTX3 免疫染色

パラフィン包埋した皮膚組織を薄切し、一次抗体としてウサギ抗ヒト PTX3 抗体を  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させた。二次抗体はビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いた。HRP 標識したアビジンを反応させた後、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride と過酸化水素を用いて発色させた。

### 4) 線維芽細胞からの PTX3 産生

インフォームドコンセントを得た上で、SSc および健常人の線維芽細胞を培養し、コンフルエントとなった状態で、LPS やヒアルロン酸で 24 時間刺激し

た。培養上清を回収し、ELISA 法を用いて PTX3 の濃度を測定した。

## C. 研究結果

### 1) SSc 患者における血清 PTX3 値

SSc 患者において血清 PTX3 値は健常人と比較し有意に上昇していた ( $p < 0.05$ , 図 1A)。また、病型別では、dSSc と lSSc との両群間にも有意差を認められた ( $p < 0.05$ )。

健常人の平均値 + 2SD ( $1.44 \text{ ng/ml}$ ) をカットオフ値とすると、SSc 全体では 42% (38/70) で PTX3 値の上昇が認められた。対照的に健常人では一例のみ上昇を示したのみであった。このように、血清 PTX3 は SSc で有意に上昇していることが明らかとなった。

### 2) 皮膚における PTX3 の発現

SSc 患者の皮膚組織では、PTX3 は血管内皮細胞および線維芽細胞発現し、健常人に比べて亢進していることが明らかとなった (図 1B-G)。

### 3) 血清 PTX3 と臨床症状との相関

健常人の平均 + 2SD をカットオフ値として、PTX3 高値群、正常群にわけて臨床所見との相関を検討したところ、血清 PTX3 値が高値な SSc 患者では、皮膚硬化の範囲が広範囲で、肺線維症、心臓合併症の頻度が高かった (それぞれ、 $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ; 表 1)。この結果と一致して、肺線維症、心臓合併性、指尖部虫喰い状瘻痕/潰瘍を有する SSc 患者では血清 PTX3 は高値であった (それぞれ、 $p < 0.0005$ ,  $p < 0.005$ ,  $p < 0.05$ ; 図 2)。

次に血清 PTX3 値と各種検査値との相関を検討した。血清 PTX3 は modified Rodnan TSS と正の相

間( $r=0.34$ ,  $p<0.005$ ;図 3A)を示し、%VC、%DLco と負の相関( $r=-0.44$ ,  $p<0.0001$ ; 図 3B、 $r=-0.3$ ,  $p<0.005$ ;図 3C)を示したことから、皮膚硬化の範囲および肺線維症の重症度と相関することが明らかとなった。また、血清ヒアルロン酸濃度( $r=0.41$ ,  $p<0.0001$ ;図 3D)、酸化ストレスマーカーである血清 8-isoprostane[8] ( $r=0.31$ ,  $p<0.005$ ;図 3E)、血清 IgG ( $r=0.43$ ,  $p<0.0001$ ; 図 3F)、IgA ( $r=0.30$ ,  $p<0.005$ )、血沈( $r=0.37$ ,  $p<0.01$ )とも正の相関を示した。以上の結果より、PTX3 は皮膚硬化の範囲、肺線維症の頻度と重症度、心臓合併症や指尖部虫喰い状瘡痕/潰瘍の頻度、血清 IgG、血沈、ヒアルロン酸、8-isoprostane と相関があることが示された。

#### 4) SSc 患者線維芽細胞からの PTX3 産生

無刺激状態において、SSc 患者由来の線維芽細胞は健康人由来の線維芽細胞と比べて有意に高値の PTX3 を産生していた。さらに、線維芽細胞を LPS および内在性 TLR4 リガンドとして知られる低分子量のヒアルロン酸で刺激すると、線維芽細胞からの PTX3 産生は健康人、SSc 患者ともに上昇したが、SSc 患者由来の線維芽細胞でより著明であった。

## D. 考案

今回の検討で SSc 患者では、健康人と比較し血清 PTX3 が有意に高値を示すことが明らかとなった。また、血清 PTX3 値は皮膚硬化の程度および肺線維症の重症度と相関を認めた。これと一致して、SSc 患者の皮膚では健康人と比較し、PTX3 の発現亢進が認められた。さらに、PTX3 は心臓合併症の頻度と相関し、指尖部虫喰い状瘡痕/潰瘍を有

する患者では PTX3 値が高値を示した。このことから、PTX3 は皮膚や肺の線維化だけでなく、血管障害とも相関することが示唆された。以上の結果より、血清 PTX3 値は、SSc の重症度を示す有用なマーカーである可能性が示唆された。

今回の研究では、血清 PTX3 値は酸化ストレスマーカーである 8-isoprostane 値と相関を示しており、酸化ストレスとの関連が示唆された。SSc における酸化ストレスは Raynaud 症状に代表される虚血・再灌流を反映していると思われるが、これらにより障害された血管内皮細胞から PTX3 が産生されることが考えられる。一方、酸化ストレスは細胞外マトリクスから内在性の TLR4 のリガンドとして知られるヒアルロン酸を増加させ、炎症を惹起する可能性が報告されている[9]。SSc においては、我々は皮膚硬化部においてヒアルロン酸が増加し、血清ヒアルロン酸濃度は疾患重症度と相関することを報告してきた[10]。そこで、SSc 患者より線維芽細胞を培養し低分子量のヒアルロン酸で刺激したところ、PTX3 の産生が著明に増加した。これらの結果より、SSc における PTX3 の上昇は、障害された血管内皮細胞からの産生および、ヒアルロン酸により刺激された線維芽細胞からの過剰産生という2つの機序が考えられた。

虚血・再灌流による組織障害では、活性化した白血球(特に好中球)が浸潤し TNF- $\alpha$  などの炎症性メディエーターを産生することが知られる[11]。PTX3 トランスジェニックマウスでは、この虚血・再灌流モデルにおいて炎症反応が亢進し、生存率が低下することが報告されている[11]。これらの結果より、TNF- $\alpha$ /PTX3 ループが生体内で炎症反応を増幅している可能性が示唆されている[11]。今回の研究では血清 PTX3 値は血清 IgG 値や血

沈との相関を認めた。以上のことから、PTX3はSScの特徴的なイベントである虚血・再灌流による炎症を増幅することで病態に関与している可能性が示唆された。

PTX3はC1qに結合し、補体系を活性化することが知られている[12]。SScでは、補体系の異常活性化および血管内皮細胞への免疫複合体の沈着が認められておりその病態への関与が示唆されている[13, 14]。さらに、PTX3はbasic fibroblast growth factorと選択的に結合し、その血管新生作用を抑制することがin vivoおよびin vitroで報告されている[15]。したがって、SScにおいてPTX3は補体系を介した炎症を増幅したり、血管新生を抑制することで病態形成に関与している可能性が示唆された。

## E. 結論

血清PTX3値はSScの重症度を示す有用なマーカーである可能性が示唆された。さらに、SSc患者におけるPTX3の上昇は、酸化ストレスの亢進とそれに伴う細胞外マトリックスからのヒアルロン酸の増加、ヒアルロン酸により刺激された線維芽細胞からのPTX3産生亢進といった機序が考えられ、酸化ストレスによるSScの病態形成への関与を考える上でPTX3は重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

## F. 文献

1. Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2003;120:542-7.

- Murrell DF. A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:78-85.
- Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 2005;26:587-95.
- Presta M, Camozzi M, Salvatori G, Rusnati M. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *J Cell Mol Med* 2007;11:723-38.
- Fazzini F, Peri G, Doni A, Dell'Antonio G, Dal Cin E, Bozzolo E, et al. PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. *Arthritis Rheum* 2001;44:2841-50.
- Luchetti MM, Piccinini G, Mantovani A, Peri G, Matteucci C, Pomponio G, et al. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 2000;119:196-202.
- Luchetti MM, Sambo P, Majlingova P, Svegliati Baroni S, Peri G, Paroncini P, et al. Scleroderma fibroblasts constitutively express the long pentraxin PTX3. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:S66-72.
- 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.
- Mendoza G, Alvarez AI, Pulido MM, Molina AJ, Merino G, Real R, et al. Inhibitory effects of different antioxidants on hyaluronan



depolymerization. *Carbohydr Res* 2007;342:96-102.

10. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Hara T, Ogawa F, Muroi E, et al. Clinical significance of serum hyaluronan levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J Rheumatol* 2008;35:1825-9.

11. Souza DG, Soares AC, Pinho V, Torloni H, Reis LF, Teixeira MM, et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol* 2002;160:1755-65.

12. Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, Salvatori G, Kishore U, Schwaeble WJ, et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol* 2003;33:465-73.

13. Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, Shimada K, Tohma S, Nakamura H, et al. Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: complement C3f-des-arginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2007;56:2018-30.

14. Arason GJ, Geirsson AJ, Kolka R, Vikingsdottir T, Valdimarsson H. Deficiency of complement-dependent prevention of immune precipitation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:257-60.

15. Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, Bottazzi B, Peri G, Indraccolo S, et al. Selective recognition of

fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood* 2004;104:92-9.

## 研究発表

### 1. 論文発表

Iwata Y, Yoshizaki A, Ogawa F, Komura K, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S: Increased Serum Pentraxin3 in Patients with Systemic Sclerosis, *J Rheumatol*, in press.

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

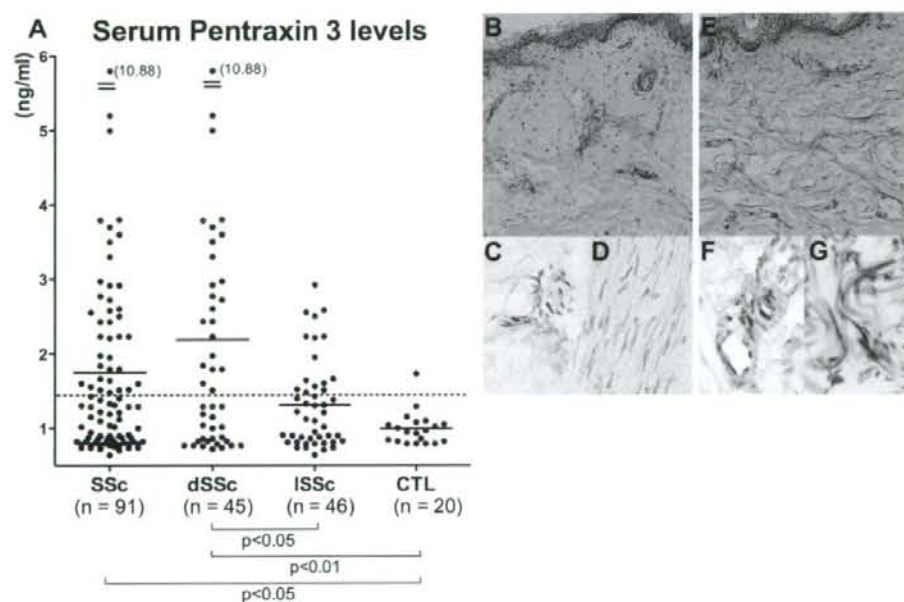


図1: (A) ELISA 法によって測定した ISSc、dSSc、および健常人 (CTL) における血清 PTX3 値。点線は健常人の平均値+2SD に設定したカットオフ値を示す。(B-D) 健常人および (E-G) SSc 患者の皮膚における PTX3 染色。(C, F)血管内皮細胞、(D, G)線維芽細胞。(B, E:100 倍、C, D, F, G:400 倍)

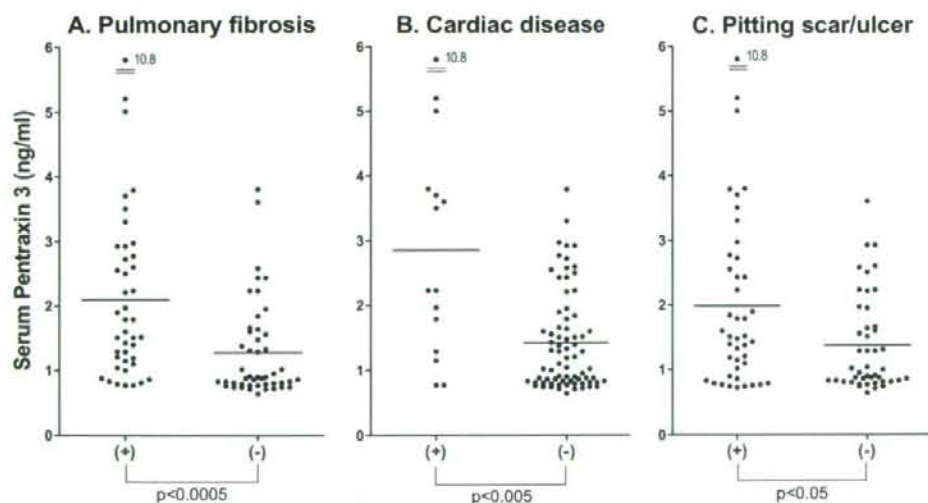


図2: 肺線維症(A)、心臓合併症(B)、指尖部虫喰い状癬痕/潰瘍(C)の有無により SSc 患者を群別したときの血清 PTX3 値の比較。

表 1. SSc における血清 PTX3 と臨床所見との相関

	PTX3 高値 n=38	PTX3 正常 n=53
性 (男性/女性)	5/33	5/48
年齢 (年、mean ± SD)	48 ± 16	46 ± 14
罹病期間 (年、mean ± SD)	5.5 ± 6.7	5.8 ± 7.3
病型 (dSSc/ISSc)	23/15	22/31
臨床所見:		
Modified Rodnan TSS (mean ± SD)	17.3 ± 8.6*	10.8 ± 6.1
指尖部虫喰状癬痕	58	40
びまん性色素沈着	53	49
手指屈曲拘縮	58*	26
臓器病変:		
肺		
肺線維症	63**	34
%VC の低下	83.7 ± 23.8*	99.5 ± 22.0
%DLco の低下	52.6 ± 15.8*	65.5 ± 16.2
肺高血圧症	13	8
食道		
心	74	68
腎	29*	9
腎	3	4
関節	21	21
筋肉	13	19
検査所見:		
抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性	53*	30
抗 RNP 抗体	8	6
抗セントロメア抗体	32	48
血清 IgG 値 (mg/dl、mean ± SD)	1895 ± 603**	1522 ± 441
血清 IgA 値 (mg/dl、mean ± SD)	365 ± 163*	286 ± 110
血清 IgM 値 (mg/dl、mean ± SD)	198 ± 107	211 ± 140
CRP (mg/dl、mean ± SD)	0.21 ± 0.35	0.25 ± 0.43
血沈 (mm/h、mean ± SD)	20.8 ± 11.6*	14.8 ± 15.3

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 (血清 PTX3 が正常の SSc 患者に対して)

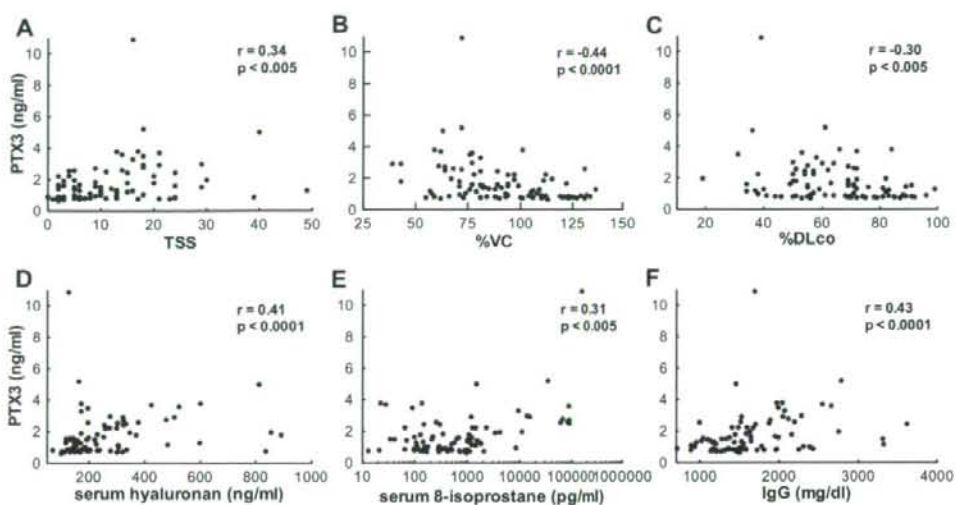


図3: SSc患者における、血清PTX3の値とmodified Rodnan total skin thickness score (TSS; A)、%VC (B)、%DLco (C)、血清ヒアルロン酸濃度 (HA; D)、血清8-isoprostane値(E)、および血清IgG値(F)との相関。

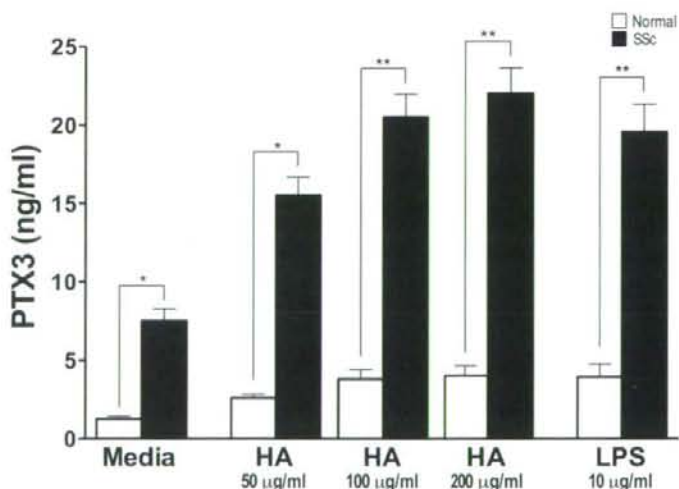


図4: 健常人 (n=6) および SSc 患者 (n=6) の線維芽細胞からの PTX3 産生。LPS (10  $\mu$ g/ml)、低分子量のヒアルロン酸 (HA; 50, 100, 200  $\mu$ g/ml) で線維芽細胞を 24 時間刺激した後に培養上清中の PTX3 濃度を ELISA 法を用いて測定した。ヒストグラムは平均値  $\pm$  SEM を示す。\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01

## 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

## 全身性強皮症患者血清における血管新生因子の検討

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	濱口 儒人	金沢大学附属病院皮膚科講師
研究協力者	長谷川 稔	金沢大学附属病院皮膚科講師
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	長崎大学大学院医薬学総合研究科皮膚病態学教授

### 研究要旨

血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelium growth factor: VEGF)をはじめとする血管新生因子は全身性強皮症(SSc)の病態形成に関与していると考えられている。胎盤増殖因子(Placenta growth factor: PIGF)はVEGFファミリーに属し、脈管形成・血管新生に関与している。PIGFの受容体にはVEGF receptor (VEGFR)-1とVEGFR-2の2つがあり、それぞれに可溶型が存在する(sVEGFR-1とsVEGFR-2)。SSc患者53例で血清中のPIGF、sVEGFR-1およびsVEGFR-2濃度を測定したところ、PIGFはSSc患者の64%で上昇しており、diffuse型ではlimited型に比べ有意に高値だった。また、PIGF高値群は高いスキンスコアを有し、手指の屈曲拘縮、色素沈着を高率に合併していたが、肺線維症を有する頻度はPIGF正常群と同じだった。経時的な検討では、血清PIGF濃度が経過とともに低下した群では、同時にスキンスコアも低下したが、血清PIGF濃度に変化がなかったかあるいは上昇した群では、スキンスコアの低下は認めなかった。一方、PIGFの可溶型受容体であるsVEGFR-1とsVEGFR-2はSSc患者では上昇していなかった。以上の結果から、PIGFはSScの皮膚硬化において重要な役割を果たしていること、皮膚硬化と肺の線維化ではPIGFの関与が異なっている可能性が示唆された。さらに、血清PIGF濃度は皮膚硬化の改善を反映するマーカーとなり得る可能性があると考えられた。

### A. 研究目的

血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor: VEGF)と胎盤増殖因子(Placenta growth factor: PIGF)は、VEGFファミリーに属する糖タンパク質で、脈管形成や血管新生に関与する。

VEGFとPIGFの受容体として、VEGF receptor (VEGFR)-1とVEGFR-2の2つがある。この2つの

受容体は類似した構造を有しているが、VEGFR-1はVEGFとPIGFのどちらにも結合するのに対し、VEGFR-2はVEGFとのみ結合する。VEGFR-1とVEGFR-2にはどちらも可溶型が存在し(sVEGFR-1とsVEGFR-2)、いずれも生物学的活性を有している。しかし、その機能は同一ではなく、例えばVEGFとPIGFのヘテロダイマーは

sVEGFR-2 と結合するが、PlGF のホモダイマーは sVEGFR-2 と結合しない。

これまで、血管新生因子のリウマチ性疾患における役割について多数の報告があるが、その多くは VEGF に関するものである。関節リウマチでは、血清 VEGF 濃度と画像学的に評価した関節破壊度が相関しており、VEGF は関節破壊に関与していると考えられている。また、関節リウマチ患者の滑液中には VEGF と PlGF のヘテロダイマーが検出され、PlGF は関節リウマチ患者の末梢血単核球からの VEGF 産生を誘導した<sup>1)</sup>。一方、SSc では初期に血清 VEGF 濃度が上昇すると報告されているが、その作用は抗線維化と考えられている<sup>2)</sup>。しかし、SSc において血清中の PlGF、sVEGFR-1、sVEGFR-2 濃度を測定した報告はなく、これら血管新生因子の病態における役割については明らかにされていない。

そこで、本研究では SSc における血管新生因子の関与を検討することを目的とし、SSc 患者血清中の PlGF、sVEGFR-1、sVEGFR-2 濃度を測定し、臨床症状との関連を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象患者は SSc 53 例(女性 42 例、男性 11 例)で、平均年齢は 44 歳、平均罹病期間は 4.2 年だった。SSc の病型では、diffuse cutaneous SSc (dcSSc) 28 例(女性 19 例、男性 9 例)、limited cutaneous SSc (lSSc) 25 例(女性 23 例、男性 2 例)だった。自己抗体は、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 23 例、抗セントロメア抗体陽性例が 11 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 5 例だった。10 例の全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)

を疾患コントロールとして、15 例の健常人を健常コントロールとして用いた。血清の提供に関して、患者から文書による同意を得た。

### 2) PlGF、sVEGFR-1、sVEGFR-2 の測定

ELISA 法により、血清 PlGF、sVEGFR-1、sVEGFR-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 濃度を測定した。

### 3) 経時的な血清 PlGF 濃度の測定

経時的に血清を採取した SSc 患者 39 例につき、血清 PlGF 濃度の経時的な変化を検討した。同時にスキンスコアも測定し、血清 PlGF 濃度の変化との相関について検討した。

### 3) 統計学的検討

2 群間の比較には Mann-Whitney's U test を、多群間の比較には Bonferroni's test を用いた。また、必要に応じ、Fisher's exact probability test を使用した。

## C. 研究結果

### 1) SSc における血清 PlGF、sVEGFR-1、sVEGFR-2 濃度

血清 PlGF 濃度は、dSSc 患者群(平均 19 pg/ml [range 11-40])では lSSc 患者群(平均 14 pg/ml [range 9-24])、コントロール群(median 11 pg/ml [range 9-15])と比較して有意に上昇していた(図 1)。一方、血清 sVEGFR-1、sVEGFR-2 濃度は、dSSc 患者群、lSSc 患者群とコントロール群で差を認めなかった。

### 2) 血清 PlGF 濃度と臨床症状

SSc 患者を血清 P/GF 濃度により高値群と正常群に分類し、臨床症状を比較した(表 1)。血清 P/GF 濃度は 64%(53 例中 34 例)で上昇していた。dSSc 患者では 89%(28 例中 25 例)、ISSc 患者では 43%(23 例中 10 例)で上昇していた。P/GF 高値群では、dSSc の割合が高く、高いスキン・スコア(modified Rodnan total skin thickness score)を有していた。また、P/GF 高値群では、手指の屈曲拘縮と色素沈着を高率に伴っていた。しかし、P/GF 高値群と正常群で肺線維症の合併率に差はなかった。血清 IgG 濃度は、P/GF 高値群で有意に上昇していた。これらの結果から、P/GF が皮膚の線維化に深く関連していることが示唆された。

### 3) 血清 sVEGFR-1 濃度と臨床症状

SSc 患者を血清 sVEGFR-1 濃度により高値群と正常群に分類し、臨床症状を比較した。血清 sVEGFR-1 濃度は 11%(53 例中 6 例)で上昇し、dSSc 患者では 14%(28 例中 4 例)、ISSc 患者では 9%(23 例中 2 例)で上昇していた。sVEGFR-1 高値群では正常群に比べ、高率に筋病変を有していた(50% vs 18%)。血清 sVEGFR-1 濃度が上昇していた 6 例のうち 5 例は抗トポイソメラーゼ抗体が陽性だったが、血清 sVEGFR-1 濃度と抗トポイソメラーゼ抗体価とは関連していなかった。血清 sVEGFR-1 は皮膚および肺の線維化とは関連していなかった。

### 4) 血清 P/GF 濃度の経時的な変化

53 例中 39 例から経時的(初診時と 6~12 ヶ月後)に血清を採取し、血清 P/GF 濃度を測定した。39 例中 20 例で血清 P/GF 濃度は低下していた。同時にスキンスコアも測定したところ、初診時の 14

から 6 へ有意に低下し、血清 P/GF 濃度の低下と相関していた(図 2)。一方、経過中に血清 P/GF 濃度が上昇あるいは変化しなかった 15 例では、スキンスコアの低下は認めなかった(初診時 13、最終観察時 9)。

## D. 考案

今回の研究で、dSSc 患者において血清 P/GF 濃度が、ISSc 患者、健常人と比較し有意に上昇していることが確認できた。P/GF を含む VEGF ファミリーは免疫応答にも関与し、免疫反応の調整役としても働いていることが報告されている。さらに、RAをはじめとする自己免疫疾患において、VEGF ファミリーが病態の形成に関与している可能性が報告されており、今回の研究で、dSSc 患者において血清 P/GF 濃度が有意に高値を示したのも、P/GF の dSSc への関与を示唆するものであると考えられる。

血清 P/GF 濃度は dSSc では上昇していたが、ISSc では上昇していなかった。P/GF 高値群ではスキンスコアが高く、手指の屈曲拘縮や色素沈着など、dSSc でみられる皮膚症状を高率に有していた。しかし、P/GF 高値群と正常群では肺線維症の頻度に差はなかった。また、経時的な変化を検討したところ、血清 P/GF 濃度の低下は皮膚硬化の改善と相関していた。このことは、P/GF は皮膚の線維化に深く関与していることを示唆するとともに、皮膚硬化の改善の指標となる可能性が考えられた。一方で、肺線維症の頻度に差がなかったことから、皮膚の線維化と肺の線維化では病態の形成における P/GF の役割が異なっていることが考えられた。

P/GF は局所にマクロファージを誘導し、マクロファージからの VEGF 産生を誘導して血管新生を促進することで創傷治癒に重要な役割を果たしてい

ることが報告されている。PGFの発現を欠損したマウスでは創傷治癒は遷延し<sup>3</sup>、一方、角化細胞にのみPGFを過剰発現したマウスでは、創傷治癒は促進していた<sup>4</sup>。さらに、PGFは線維芽細胞を創傷局所に誘導した。したがって、線維化におけるPGFの役割を直接的に証明した報告はないものの、PGFはコラーゲンの合成機構に関与している可能性が高いと考えられる。

SSc患者でみられる血管異常として、毛細血管密度の減少と血管閉塞がある。SSc患者では骨髄由来の血管内皮前駆細胞が顕著に減少しており、末梢血管の修復が十分でないことが血管障害をもたらすと考えられている<sup>5</sup>。PGFはVEGFR-1を発現している造血系前駆細胞を骨髄から動員することで、骨髄抑制からの早期の造血回復に関与していた<sup>6</sup>。また、PGFは顆粒球増殖因子と協調して血液中の造血前駆細胞を増加させた<sup>7</sup>。したがって、dSScでPGFが増加していたのは、血管障害を修復するための造血前駆細胞を増加させるために代償的に増加していたのかもしれない。

サイトカインはSScの病態に深く関与していると考えられている。角化細胞におけるPGFのmRNA発現は、epidermal growth factorやtransforming growth factorなどの細胞成長因子やIL-6、IL-1 $\alpha$ 、tumor necrosis factor- $\alpha$ などの炎症性サイトカインによって増強した。一方、PGFは末梢血単核球におけるIL-1 $\beta$ 、IL-8、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1のmRNA発現を増強した。なかでもMCP-1はSScの病態形成に重要であると考えられている。SSc患者から培養した線維芽細胞はMCP-1を産生することで単核球の誘導を促進し、SScの初期に見られる細胞浸潤に関与していると考えられている<sup>8</sup>。また、SScでは血清中のMCP-1

濃度が上昇していることも報告されている<sup>9</sup>。したがって、PGFはdSScにおいてMCP-1の産生を通して病態に関与している可能性が考えられる。

sVEGFR-1とsVEGFR-2はともに生物学的活性を有し、血管新生に深く関与しているが、炎症などの免疫反応に関する役割についての報告は少ない。関節リウマチでは、関節破壊の進行と血清中のsVEGF-1濃度が相関していた<sup>10</sup>。一方、マウスの関節炎モデルで、sVEGF-1を投与することで関節における血管新生を抑制し、関節破壊の程度が軽減した<sup>11</sup>。肺の線維化モデルでは、sVEGF-1を投与することで肺の炎症と線維化の両方が抑制された<sup>12</sup>。これらの結果から、sVEGF-1はVEGFやPlGFと結合することで病的な血管新生を抑制している可能性がある。しかし、今回の研究では、血清中のsVEGFR-1とsVEGFR-2濃度はdSSc患者群、ISSc患者群ともコントロール群と比較し上昇していなかった。これは、PGFがsVEGFR-1とsVEGFR-2を介さずに直接的にマクロファージや線維芽細胞に作用していることを示しているのかもしれない。

## E. 結論

SScにおいて、PGFは皮膚硬化に大きく関与している可能性が示唆された。また、皮膚の線維化と肺の線維化では関与している因子が異なる可能性が示唆された。また、PGFは、皮膚硬化の改善度と相関するマーカーとなり得る可能性があると考えられた。

## F. 文献

- 1 Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ *et al*. Placenta growth factor (PlGF) induces



- vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin Exp Immunol* 2000; **119**: 182-8.
- 2 Distler JH, Gay S, Distler O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; **45 Suppl 3**: iii26-7.
  - 3 Carmeliet P, Moons L, Luttun A *et al*. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine* 2001; **7**: 575-83.
  - 4 Failla CM, Odorisio T, Cianfarani F *et al*. Placenta growth factor is induced in human keratinocytes during wound healing. *The Journal of investigative dermatology* 2000; **115**: 388-95.
  - 5 Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H *et al*. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* 2004; **364**: 603-10.
  - 6 Hattori K, Heissig B, Wu Y *et al*. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature medicine* 2002; **8**: 841-9.
  - 7 Carlo-Stella C, Di Nicola M, Longoni P *et al*. Placental growth factor-1 potentiates hematopoietic progenitor cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor in mice and nonhuman primates. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007; **25**: 252-61.
  - 8 Distler O, Pap T, Kowal-Bielecka O *et al*. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis. *Arthritis Rheum* 2001; **44**: 2665-78.
  - 9 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**: 159-65.
  - 10 Clavel G, Bessis N, Lemeiter D *et al*. Angiogenesis markers (VEGF, soluble receptor of VEGF and angiopoietin-1) in very early arthritis and their association with inflammation and joint destruction. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2007; **124**: 158-64.
  - 11 Afuwape AO, Feldmann M, Paleolog EM. Adenoviral delivery of soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) abrogates disease activity in murine collagen-induced arthritis. *Gene therapy* 2003; **10**: 1950-60.
  - 12 Hamada N, Kuwano K, Yamada M *et al*. Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *J Immunol* 2005; **175**: 1224-31.
- 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

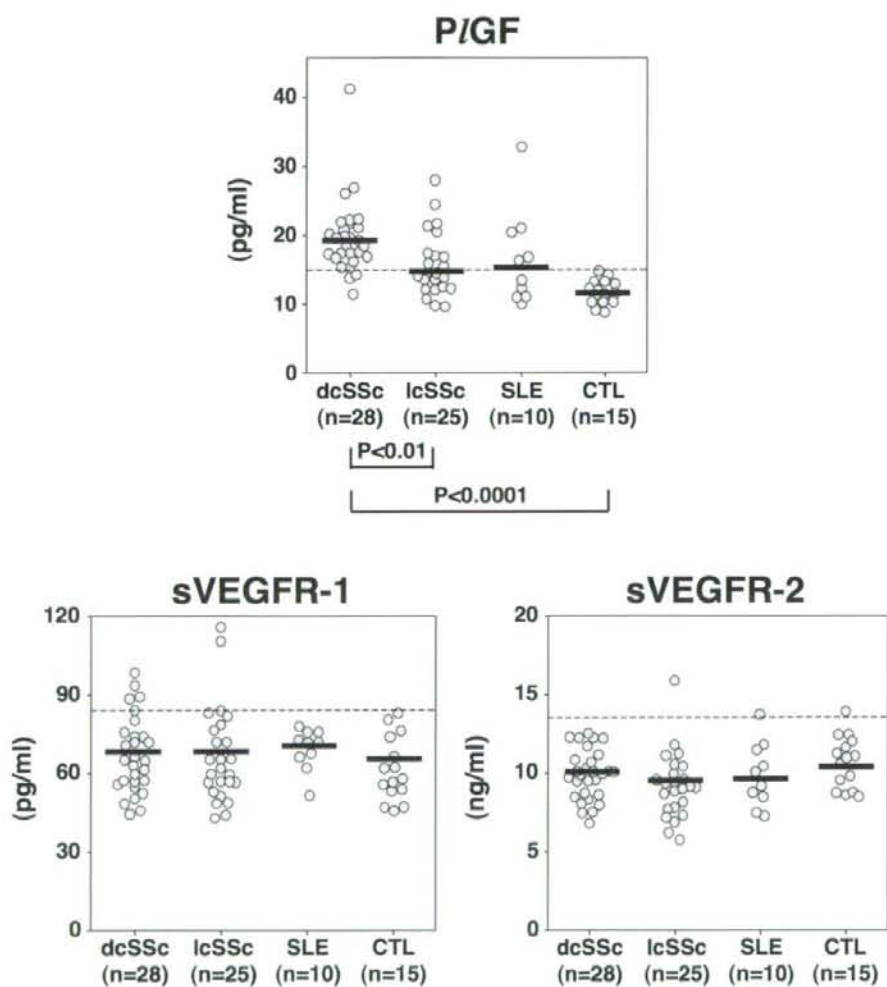


図 1: ELISA 法により測定した dcSSc、lcSSc、SLE および健常コントロール群(CTL)における血清 P/IGF、sVEGFR-1、sVEGFR-2 濃度。点線は健常人の平均値+2SD に設定したカットオフ値を示す。

表 1. SSc における血清 P/GF 濃度と臨床所見との相関\*

	血清 P/GF 濃度 上昇群 (n = 34)	血清 P/GF 濃度 正常群 (n = 19)
発症年齢, 年, mean ± SD	45 (13-73)	44 (14-76)
性別 (女性/男性)	26/8	16/3
罹病期間, 年, mean ± SD	3.4 (0.2-29)	5.6 (0.2-33)
病型, (dSSc/lSSc)	24/10 ‡	6/13
modified Rodnan TSS の平均値 (range)	19 (1-41) ‡	9 (1-23)
臨床所見		
指尖部虫喰い状癬痕・潰瘍	41	21
手指屈曲拘縮	50 ‡	21
びまん性色素沈着	68 ‡	26
毛細血管拡張	29	53
臓器病変		
肺		
肺線維症	52	53
%VC の低下	18	22
%DLco の低下	62	72
肺高血圧症	3	17
食道	47	53
心	6	5
腎	3	0
関節	21	16
筋肉	18	21
検査所果		
抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性	38	53
抗セントロメア抗体陽性	26	16
赤沈の亢進	58	32
CRP の上昇	22	11
血清 IgG 値, 平均 (range) mg/ml	1781 (821-5350) †	1583 (907-2890)
血清 IgA 値, 平均 (range) mg/ml	268 (134-559)	255 (128-393)
血清 IgM 値, 平均 (range) mg/ml	178 (59-425)	187 (50-478)

\*特に記載のない限り、表中の数字は%を示す。

TSS, total skin thickness score; VC, vital capacity; DLco, diffusing capacity for carbon monoxide.

† p < 0.05 (血清 P/GF 濃度が正常の患者群に対して)

‡ p < 0.01 (血清 P/GF 濃度が正常の患者群に対して)

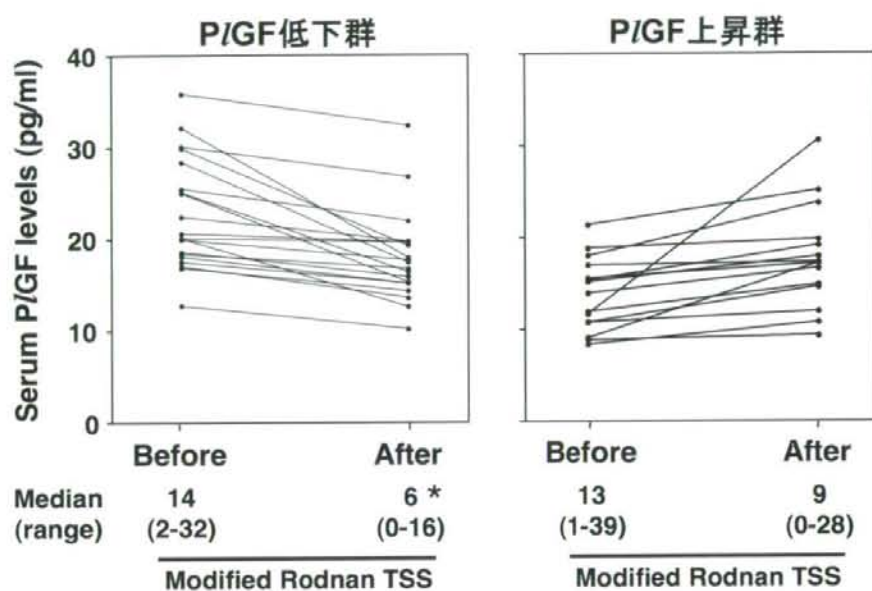


図2: ELISA法により測定した血清P/GF濃度の経時的な変化とスキンスコアの相関関係。太線は各群の平均値の推移を示す。\* p<0.05。