

与前1年間のそれぞれの潰瘍の治癒に要した期間を1とし、ボセンタン投与後の指尖潰瘍の治癒期間と比較した。いずれの検討においても、全患者に対してインフォームドコンセントを行い、患者情報の管理を含め十分に倫理面へ配慮した。

C. 研究結果

今回検討した全例において、ボセンタンの投与後は投与前と比し指尖潰瘍の改善を認めた。新規指尖潰瘍の発症数はボセンタンの投与によって有意に約80%減少した ($p < 0.05$; 図1)。全7症例のうち、5症例にはボセンタン投与後に新規指尖潰瘍は発症しなかった。指尖潰瘍の治癒に要した期間に関しても同様に、ボセンタン投与後は投与前と比較し、有意に約50%治療期間の短縮を認めた。7症例中2例において、経過中軽度の肝機能障害と血小板減少を認めたため、一旦ボセンタンの投与を中止した。ボセンタン投与中止後、新規指尖潰瘍の発症、既存指尖潰瘍の増悪を認めたため、肝機能障害、血小板減少が改善した後に、少量よりボセンタンを再開したところ、速やかな指尖潰瘍の改善を認めた。

D. 考案

今回の検討において、既に報告されているようにボセンタンは新規指尖潰瘍の発症を有意に抑制した。加えて、今回の検討においては、ボセンタンの投与によって指尖潰瘍の治癒期間の短縮も認められた。

先に行われた randomized controlled study である RAPIDS-1 と比し、今回得られた結果はより、ボセンタンの有効性を示すものであったが、今回の検討においては様々な制限が存在する。第一に症例数が少なく、また年齢と病状をはじめとする背景を一致させた対照も今回の検討では用いていない。第二

に新規指尖潰瘍の数と、指尖潰瘍の治癒期間を記録するにあたって、同一の患者における、ボセンタンの投与前後と比較したため、潰瘍の計測期間こそ、投与前後1年間と等しいものの、年度によって気温の変化を認めることから、厳密な比較が出来ていない可能性がある。しかしながら、今回検討した全ての SSc 患者においてボセンタンは新規指尖潰瘍の発症を抑制し、また、各々の症例における指尖潰瘍の状態は、ボセンタン投与後で明らかに改善を認めた。

以上のことから、ボセンタンは指尖潰瘍に対する有効な治療薬となる可能性が示唆された。

E. 結論

ボセンタンは SSc の指尖潰瘍の発生を抑制し、指尖潰瘍の治癒を促す薬剤であることが示唆された。SSc の指尖潰瘍に対する有効な新規治療薬の一つとなりうる可能性が示唆された。

F. 文献

1. Hachulla E, Clerson P, Launay D, Lambert M, Morell-Dubois S, Queyrel V, et al. Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. *J Rheumatol.* 2007; 34 (12): 2423-30.
2. Mouthon L, Guillevin L, Humbert M. Pulmonary arterial hypertension: an autoimmune disease? *Eur Respir J.* 2005; 26 (6): 986-8.
3. Denton CP, Black CM. Targeted therapy comes of age in scleroderma. *Trends Immunol.* 2005; 26 (11): 596-602.
4. Clozel M. Endothelin receptor antagonists: current status and perspectives. *J Cardiovasc*

Pharmacol. 2000; 35 (4 Suppl 2): S65-S8.

5. Rubin LJ, Roux S. Bosentan: a dual endothelin receptor antagonist. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002; 11 (7): 991-1002.
6. Morelli S, Ferri C, Poletti E, Bellini C, Gualdi GF, Pittoni V, et al. Plasma endothelin-1 levels, pulmonary hypertension, and lung fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Am J Med*. 1995; 99 (3): 255-60.
7. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, et al. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J Rheumatol*. 1994; 21 (10): 1838-44.
8. Korn JH, Mayes M, Matucci Cerinic M, Rainisio M, Pope J, Hachulla E, et al. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum*. 2004; 50 (12): 3985-93.

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

表 1. 患者背景

症例	投与開始時期	最大投与量 (mg/day)	自己抗体	皮膚硬化
1	2006年2月	187.5	topo I	diffuse
2	2006年2月	187.5	CENP	diffuse
3	2006年11月	125	topo I	diffuse
4	2007年1月	187.5	不明	diffuse
5	2007年7月	187.5	topo I	diffuse
6	2007年11月	125	CENP	limited
7	2007年11月	187.5	topo I	diffuse

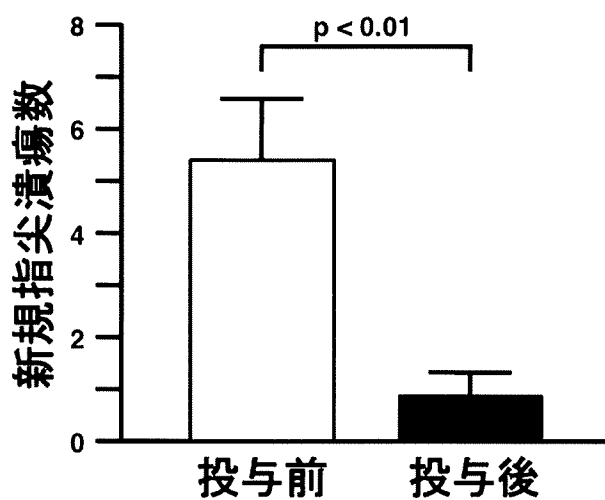


図 1：ボセンタン投与前後における、新規指尖潰瘍数を示した。

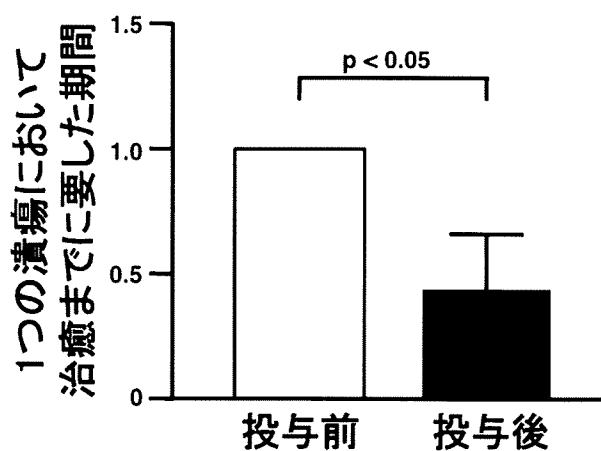


図 2：ボセンタン投与前後における、指尖潰瘍の治癒にかかる期間を示した。

全身性強皮症の指尖潰瘍に対するボセンタン投与例の検討

研究分担者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学 教授
協力者 永井弥生 群馬大学医学部附属病院皮膚科 講師
協力者 長谷川道子 群馬大学医学部附属病院皮膚科 助教

研究要旨

2006年4月より2009年12月の間に全身性強皮症の指尖潰瘍に対してボセンタンを投与した5例について検討した。投与時の年齢は28歳から71歳、強皮症診断から内服開始までの期間は平均9.5年であった。男性1例、女性4例、limited cutaneous type 1例、diffuse cutaneous type 4例である。71歳女性例は単発の手指壊疽にて発症し、ボセンタン内服を3年半にわたって継続しているが、潰瘍のみでなくレイノー症状の再発もみられない。単発の手指壊疽を生じた男性例は内服中止後に再発したため内服を再開し、その後経過良好である。多発性の小潰瘍を生じた3例では、手指の疼痛が速やかに改善し、内服開始以降は潰瘍の新生はみられない。指尖潰瘍に対するボセンタンの有効性はすでに知られているが、長期的な効果についての報告は少なく今後の検討が望まれる。

A. はじめに

レイノー症状をはじめとする末梢循環障害は強皮症の主要な症状であり、繰り返す指尖潰瘍およびそれに伴う疼痛は患者のQOLを大きく低下させる。ボセンタンは肺高血圧症治療薬であり、唯一のエンドセリン受容体拮抗薬であるが、強い末梢血管拡張作用を有しており、肺高血圧のみならず強皮症の指尖潰瘍に対しての有効性が報告されている。すでに海外では多くの国で保険適応となり、広く使用されている。今回、当科にて指尖潰瘍の治療目的にボセンタンを投与した5例につき検討した。

B. 対象

1) 診断からの期間と病型 (表1)

2006年4月より2009年12月に当科にて全身性強皮症の指尖潰瘍に対してボセンタンを投与した5

例である。いずれも疼痛コントロールが困難であったことが投与の大きな理由である。投与時の年齢は28歳から71歳で平均48.4歳、強皮症診断から内服開始までの期間は0~22年で平均9.5年であった。男性1例、女性4例、limited cutaneous systemic sclerosis (lcSSc) 1例、diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) 4例である。男性例はgeneralized morphea (GM)-like systemic sclerosisであった。

2) 内臓病変と自己抗体 (表1)

明らかな肺高血圧を有する症例はなかった。2例は心エコー上推定右室圧35~40 mmHgであったが自覚症状はなく、定期的に経過観察中である。2例は軽度の肺線維症を有していたが自覚症状はない。全例で逆流性食道炎はみられた。抗核抗体は全例陽性、うち抗セントロメア抗体陽性2例、抗Topo-1抗体陽性2例であった。

C. 方 法

1) 投与量と期間 (表2)

1例はボセンタン62.5 mgより、4例は31.25 mgより開始し、3~4週後に増量、現在は2例で62.5 mg、3例は125 mg内服を継続中である。内服期間は3か月から3年7か月である。

2) 検査

開始時には週1回血算、肝機能検査を行った。これまで副反応はみられていない。

3) その他の治療 (表2)

全例でボセンタン開始前よりベラプロストナトリウムを内服していた。3例で抗血小板剤、バイアスピリンも併用していた。2例はボセンタン開始時、大型の潰瘍、壊疽を生じたため入院の上で連日Lipo-PGE1投与、高気圧酸素療法も併用した。1例は潰瘍部に感染を合併していたため、入院して抗生剤点滴投与を行った。

D. 結 果 (表2)

その他の治療を併用した例では本剤の単独の効果を判定することは困難であったが、本剤の内服を継続することにより、潰瘍治癒後にも再燃なく、疼痛、レイノー症状ともみられていない。症例3~5の3例は多発する小潰瘍であり、ボセンタン内服開始後3~4週には疼痛は改善した。全例で内服開始2か月後には潰瘍は治癒しており、現在まで再発はない。

E. 症 例

症例を供覧する。

症例1 71歳女性。1996年頃(初診10年前)よりレイノー症状が出現、3年前より頻回となった。2006年1月より左中指が暗紅色調となり疼痛が出現、その後壊疽となった。当科紹介され受診、lcSScと診

断した。入院後、左中指尖端は壊疽となった。連日のLipo PGE1点滴投与とともに高気圧酸素療法を行い、潰瘍は治癒した(図1a-1c)。その後3年7か月にわたってボセンタン62.5mg内服継続中であるが、潰瘍の再発はなく、レイノー症状もみられない。
症例2 27歳男性。手指のこわばりにて発症、その後、体幹の色素沈着に気づいた。2006年12月当科紹介受診、GM-like SScと診断した。

プレドニゾロン20mg投与にて皮膚硬化は改善したが、2007年1月に指尖潰瘍が出現した。Lipo PGE1点滴投与にて治癒するも2007年夏に再発し、ボセンタン内服開始し改善傾向にあったが倦怠感のため中止した。2009年夏より再度手指潰瘍が再燃し、疼痛も増強したため、ボセンタン内服再開後に入院した。Lipo PGE1点滴投与、高気圧酸素療法を併せて行い潰瘍は徐々に改善、2か月後には治癒した。2009年冬季まで疼痛の再燃はない(図2a、2b)。

症例3 41歳女性。1994年(20歳時)よりレイノー症状あり。2007年(39歳時)当科初診、dcSScと診断した。手指の小潰瘍は出没を繰り返していた。2008年冬より手指の疼痛が増強し、潰瘍も悪化したため、外来にてLipo PGE1点滴投与を行ったが肝機能障害のため中止した。2009年5月よりボセンタン内服を開始したところ、内服開始3週間より疼痛はほぼ消失し、2か月後には潰瘍は治癒した(図3a、3b)。

E. 考 案

指尖潰瘍発症の危険因子としては早期からのレイノー症状発症、血沈亢進、抗Topo-1抗体陽性および肺高血症が挙げられており¹⁾、指尖潰瘍と肺高血症両者の発症には関連性が指摘されている。指尖潰瘍に対するボセンタンの効果についての大規模臨床試験としては2報の報告があり、いずれもボセンタ

ンは潰瘍の治癒促進効果ではなく、潰瘍新生の抑制効果があるという結果を示している^{2,3)}。臨床的にはボセンタンの指尖潰瘍およびレイノー症状に対する有効性は多数報告されており、すでに海外では、強皮症における指尖潰瘍の一般的治療の選択肢の一つとなっている⁴⁾。長期投与の効果については Tsifetaki ら⁵⁾ および Garcfa ら⁶⁾ がそれぞれ 3 年、2 年の経過観察における有効性および安全性を示しているが、まだ報告が少ない。

自験例では、症例 1 はボセンタン内服を 3 年 7 か月にわたって継続している。当初、壊疽と強い末梢循環障害症状を呈したが、潰瘍治癒後もレイノー症状は全くみられていない。症例 2 では潰瘍再発後に他の治療とともにボセンタン投与を再開、その後、冬季に至っても疼痛はみられず経過良好である。症例 3~5 は多発する小潰瘍を有していたが、いずれも比較的速やかに疼痛が改善し、潰瘍治癒後も再燃はみられていない。ボセンタンは潰瘍の悪化時には他の治療と併用により、また持続する潰瘍、疼痛に対しては疼痛抑制と長期的な予防効果も期待して使用しうる薬剤と思われた。

ボセンタンの副作用として最も注意を要するのは肝機能障害である。しかし、トランズアミンナーゼは正常上限の 3 倍程度までは経過観察可能であり、肝障害が出現しても減量や休薬後に再開可能な例もあるとされている。したがって、方針としては、少量からの開始、定期的な肝機能検査と容量調節にて長期継続を目指すべきであろう。自験例では半錠 31.25 mg より投与開始し、効果の得られた量にて継続とした。実際には 62.5 mg ないし 125 mg 内服にて継続している。肺高血圧に対しては通常 250 mg まで増量しうるが、指尖潰瘍に対しては比較的少量でコントロールしうる可能性もあり、適切な容量の検討も

必要と思われた。

F. 文 献

1. Sunderkotter S, Herrgott I, Bruckner C, Moizadsh P, Pfeiffer C, Gerb C, et al. Comparison of patients with and without digital ulcers in systemic sclerosis: detection of possible risk factors. *Br J Dermatol* 2009; 160: 835-843.
2. Korn JH, Mayes M, Matucci-Cernic M, et al. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3985-3993.
3. Selbold JR, Matucci-Cernic M, Denton CP et al. Bosentan reduces the number of new digital ulcers in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008; 65 (Suppl. II): 90.
4. Steen V, Denton CP, Pope JE, Matucci-Cernic M. Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatol* 2009; 48: iii19-iii24.
5. Tsifetaki N, Botzoris V, Alamanos Y, Argyriou E, Zioga A, Dragosos AA. Bosentan for digital ulcers in patients with systemic sclerosis: a prospective 3-year followup study. *J Rheumatol* 2009; 36: 1550-1551
6. Garcfa PLP, Rodriguez RS, Valero Exposito M et al. Long-term experience of bosentan for treating ulcers and healed ulcers in systemic sclerosis. *Rheumatol* 2008; 47: 464-466.

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

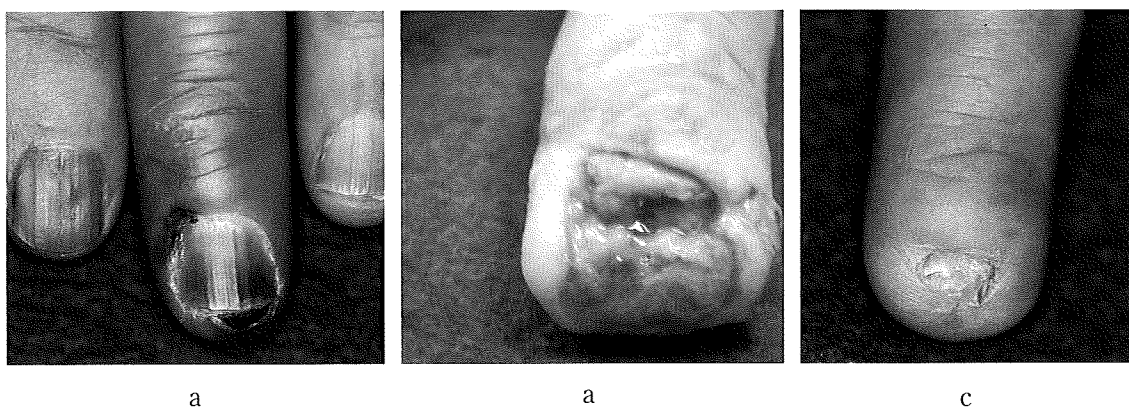


図1：症例1

- 1a 入院時：左中指末節は黒色調
- 1b 次第に壊死となったためデブリドマン
- 1c 約3か月の加療で上皮化

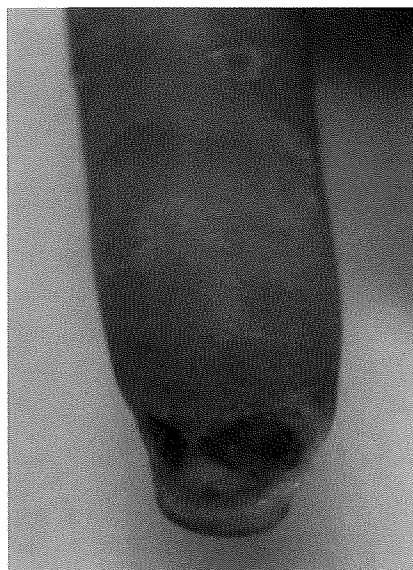


図2：症例2

2a ボセンタン開始時

2b 内服6週。デブリドマン後

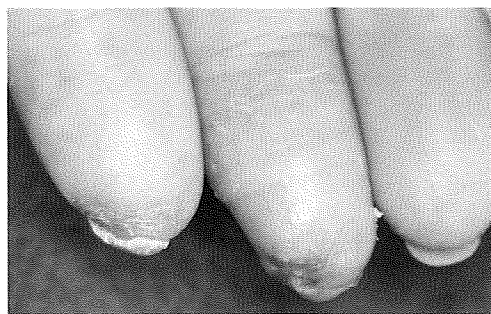


図3：症例5

3a ボセンタン内服開始時

3b 内服2か月後

表1. 診断からの期間・病型、内臓病変と自己抗体

症例	強皮症 診断時 年齢/性	内服開始時 の年齢	強皮症診断 からの期間 (年)	病型	肺高血圧	肺線維症	逆流性食道炎	自己抗体
1	71F	71	0	lc	—	—	あり	セントロメア
2	26M	28	2	dc (GM)	—	—	あり	Topo-1, RNP
3	21F	43	22	dc	—	あり	あり	Topo-1
4	42F	59	17	dc	—	あり	あり	RNP, SS-A
5	35F	41	6	dc	—	—	あり	セントロメア RNP

表2. 潰瘍と治療効果

	潰瘍/壊疽	潰瘍発症	潰瘍の状態	ボセンタン		内服開始時の その他の治療	入院・外来	疼痛に対する 効果 (VAS)
		からの期間 (年)		維持量	内服期間			
1	単発壊疽	0	発症時のみ	62.5mg	3.5Y	Lipo PGE1 高気圧酸素療法	入院	0
2	単発潰瘍 壊疽	1	最初冬季のみ 再発は夏	125mg	2M+3M	LipoPGE1 高気圧酸素療法 (再発時)	入院	2
3	多発小潰瘍	5	通年性	125mg	3M	LipoPGE1 抗生剤	入院	右手6 左手0
4	多発小潰瘍	10	通年性	62.5mg	3M	なし	外来	5
5	多発小潰瘍	4	通年性	125mg	8M	なし	外来	0

VAS: visual analog scale

全身性強皮症に見出された新規抗核抗体：抗 RuvBL1/RuvBL2 抗体

研究分担者	桑名正隆	慶應義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
協力者	加治賢三	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 助教
協力者	佐藤隆司	慶應義塾大学医学部内科特別研究 助教
協力者	星野香菜	慶應義塾大学医学部内科 大学院生
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	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 講師
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	小川文秀	長崎大学医学部・歯学部附属病院皮膚科・アレルギー科 講師
研究代表者	佐藤伸一	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 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

研究要旨

全身性強皮症 300 例中 11 例 (3.7%) に 50kDa 付近の 2 つのバンドを免疫沈降する新規自己抗体を見出した。対応抗原の精製と質量分析により DNA 修復や転写に関わる核蛋白 RuvBL1/RuvBL2 を同定。本抗体は全身性強皮症に特異的で、陽性 7 例が diffuse 型、8 例に間質性肺炎、5 例に心筋障害、7 例に血清 CK 上昇を認めた。

A. 研究目的

膠原病診断において抗核抗体の測定は有用なツールであることは既知の事実である。全身性強皮症において約 95% 以上に抗核抗体が陽性であるが、対応抗原の特定、つまり特異抗体については 70% にとどまっている^{1,2)}。特異抗体別により臨床症状、合併症などを推測できるだけでなく、予後的因子の推測や治療戦略を考える上でも非常に有用であり、特異抗体の検出は急務である。

B. 研究方法

我々は全身性強皮症、以下 SSc、300 例を対象として新規自己抗体の検出をすべく K562 培養細胞を

基質とした免疫沈降法を施行しました。疾患対象として全身性エリテマトーデス、以下 SLE、60 例、皮膚筋炎、多発性筋炎、以下 DM/PM、100 例、特発性間質性肺炎、以下 IPF、80 例、正常人 50 例を用いました。血清および臨書情報に関しては患者より文書による同意を得た。

C. 研究結果

1) 免疫沈降法での検出

全身性強皮症において既知の自己抗体が検出されなかった症例を並べて免疫沈降したところ 3 と 9 にあるように 50kDa 付近に濃く染まる例が 2 例認められた。詳細に検討したところ、全部で 11 例に同様

なバンドが検出されました。この抗体はすべて2つのバンドを有しており、片方のみ陽性例は認められませんでした(図1)。同抗体陽性例ではすべて抗核抗体は陽性で、speckled patternを呈した。免疫沈降法で同一のバンドに沈降し、抗核抗体も陽性であり、染色型も同一であることから、これらは同一の自己抗体であると考え、その抗原を検出するべく抗原特定実験を行った。

2) 抗原特定実験

具体的には免疫沈降法と同じく患者血清1000 ulとビーズ1000 mgを混和し、DMPでIgGとビーズを架橋させ、大量のK562培養細胞と反応させました。K562培養細胞とビーズ結合IgGを反応させた後、洗浄し、protein assayを行い十分精製した後、elution bufferで抗原抽出を行い、フィルターで抗原蛋白を濃縮させた(図2)。最終的に100ul抽出でき、これを抗原としてSDS-PAGEで電気泳動し、クマシーブルー染色および銀染色を行なった。クマシーブルー染色、銀染色でも50kDa付近に2つのバンドが影出されたため、上下のバンドをそれぞれ切り出し、液体クロマトグラフィー、質量分析法を行いました(図3)。

3) LC-MS 解析

得られた蛋白をトリプシン消化し、質量分析計により得られたペプチドの質量および質量分析内でアルゴンガスと衝突させることにより得られたフラグメントイオンのスペクトルをデータベース検索することにより蛋白を同定致した。結果、上のバンドは検出されなかったが、下のバンドでRuvBL1が検出されました。得られたアミノ酸配列の総数のうち、8%がRuvBL1をコードしていた。RuvBL1は49 kDaの蛋白でATPase associated activities with various cellular activities: AAA+と言われるスー

パーファミリーに属する蛋白であり分子シャペロンの一つである。RuvBについては核内に局在し、DNAの修復に関連すると考えられている。RuvBL1は6量体で存在する蛋白でRuvBL2と複合体を作り12量体になることが分かっている^{3,4)}。またRuvBL1とRuvBL2はWalker AおよびB領域、Sensor IおよびII、アルギニン鎖など共通する領域を持ち2つの蛋白の相同性は43%⁵⁾ある。分子量はRuvBL1が49 kDaでRuvBL2が48 kDaであり、遺伝子座としてRuvBL1は3番染色体長腕でRuvBL2は19番染色体長腕に存在する。免疫沈降法において近接するバンドが2本あることやRuvBL1とRuvBL2の分子量、蛋白の相同性やその構造などを考慮するとRuvBL2の自己抗体も存在するのではないかと考えウェスタンブロットリング法で確認実験を施行した。

4) Western-blotting 法

RuvBL1およびRuvBL2のリコンビナント蛋白を用い、ウェスタンブロットリング法を施行すると、抗体陽性例ではRuvBL1、RuvBL2のリコンビナント蛋白で反応し、正常人では陰性でありました。したがって同抗体は抗RuvBL1/L2抗体と判明した(図4)。

5) 抗RuvBL1/L2抗体陽性例の臨床的検討(表1)

抗RuvBL1/L2抗体陽性例11例の臨床的特徴であるが、11例中7例、64%がdiffuse型で、間質性肺炎の合併は8例の73%であった。心筋障害については、5例の45%に認められ、CKの上昇は7例の64%に陽性であった。

また抗RuvBL1/L2抗体の疾患別分布を見ると、全身性強皮症のみに見出され、全体の3.7%に同抗体が陽性でした。その他、SLE、DM/PM、IPF、正常人では抗体は陰性であった。

D. 考 案

抗核抗体を検出は自己免疫疾患において代表的な疾患標識マーカーであり、特に特異抗体についてはより鋭敏に疾患の識別、診断、治療、予後などを推定できるため、必要不可欠な検査である。

全身性強皮症においては95%以上に抗核抗体が検出され、その自己抗体の検出がされているが、代表的なマーカーである、抗 Topo-I 抗体、抗セントロメア抗体、抗 RNA ポリメラーゼ抗体⁶⁾、抗 U3RNP 抗体⁷⁾、抗 Th/To 抗体⁸⁾ などを集計しても70%ほどに留まっている。

今回検出した抗 RuvBL1/L2 抗体は核内に存在する抗原であり、抗核抗体の一つである。抗体陽性例の臨床的解析をすると diffuse 型に多く、間質性肺炎を高率に合併し、CK の上昇を伴い、高率に心筋障害を伴うという新しいサブセットであることは間違えない。疾患別分布を見てみると全身性強皮症のみに見出され、その他、皮膚筋炎/多発性筋炎、全身性エリテマトーデス、特発性間質性肺炎、正常人では検出されず、全身性強皮症の新しい疾患標識マーカーである可能性がある。

1998年 Makino ら⁹⁾ も抗 RuvBL1 抗体について報告しており、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎/多発性筋炎、関節リウマチ、自己免疫性肝炎に検出している。全身性強皮症における検討はないが、もしかすると自己免疫疾患に幅広く検出される自己抗体の可能性もある。より多数の症例数を検討する必要がある。

E. 結 論

全身性強皮症において新規抗核抗体である抗 RuvBL1/L2 抗体について報告いたしました。抗体陽性例は全身性強皮症のみに見出され、SLE、DM/PM、

IPF、正常人では陰性であった。抗体陽性例 11 例を検討すると 7 例が diffuse 型全身性強皮症で 8 例に間質性肺炎の合併があり、5 例に心筋障害の合併が認められた。また 7 例の 64% に CK の上昇が認められた。抗 RuvBL1/L2 抗体は全身性強皮症に見出された新規自己抗体であり、高率に間質性肺炎を合併し、心筋障害および CK 上昇を伴う diffuse 型全身性強皮症と関連する可能性があった。

F. 文 献

1. Steen VD: Semin Arthritis Rheum. 2005 Aug; 35 (1): 35-42.
2. Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Komura K, Kaji K, Kondo M, Nishijima C, Hayakawa I, Ogawa F, Kuwana M, Takehara K, Sato S.: Br J Dermatol. 2008 Mar; 158 (3): 487-95. Epub 2008 Jan 17.
3. RuvBL1/RuvBL2: running rings around molecular biology.: Jha S, Dutta A.: Mol Cell. 2009 Jun 12; 34 (5): 521-33. Review.
4. Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex.: Puri T, Wendler P, Sigala B, Saibil H, Tsaneva IR.: J Mol Biol. 2007 Feb 9; 366(1): 179-92. Epub 2006 Nov 11
5. Human TIP49b/RuvBL2 gene: genomic structure, expression pattern, physical link to the human CGB/LHB gene cluster on chromosome 19q13.3.: Parfait B, Giovannardi Y, Asheuer M, Laurendeau I, Olivi M, Vodovar N, Vidaud D, Vidaud M, Bièche I.: Ann Genet. 2000 Apr-Jun; 43 (2): 69-74.
6. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Hom-

ma M.: Arthritis Rheum. 1994 Jan; 37 (1): 75-83.

7. Isolated pulmonary hypertension in systemic sclerosis with diffuse cutaneous involvement: association with serum anti-U3RNP antibody.: Sacks DG, Okano Y, Steen VD, Curtiss E, Shapiro LS, Medsger TA Jr.: J Rheumatol. 1996 Apr; 23 (4): 639-42
8. Kuwana M, Kimura K, Hirakata M, Kawakami Y, Ikeda Y. Ann Rheum Dis. 2002 Sep; 61 (9): 842-6.
9. TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human.: Makino Y, Mimori T, Koike C, Kanemaki M,

Kurokawa Y, Inoue S, Kishimoto T, Tamura T.: Biochem Biophys Res Commun. 1998 Apr 28; 245 (3): 819-23

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. 第4回日本・豪州合同皮膚科学会
 2. 第60回日本皮膚科学会中部支部学術大会

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

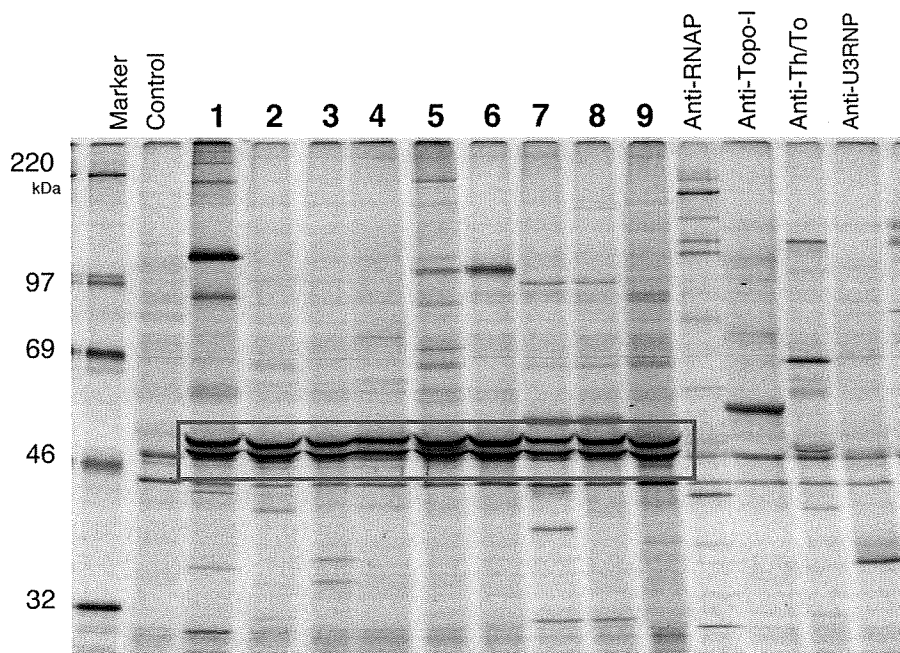


図1 : protein-IPP

K562 培養細胞を 35S で標識させ、抗原として用いた。SDS-PAGE で電気泳動を行い、オートラジオグラフィーで解析。1 から 9 にかけて 50 kDa に沈降する 2 つのバンドを見出した。

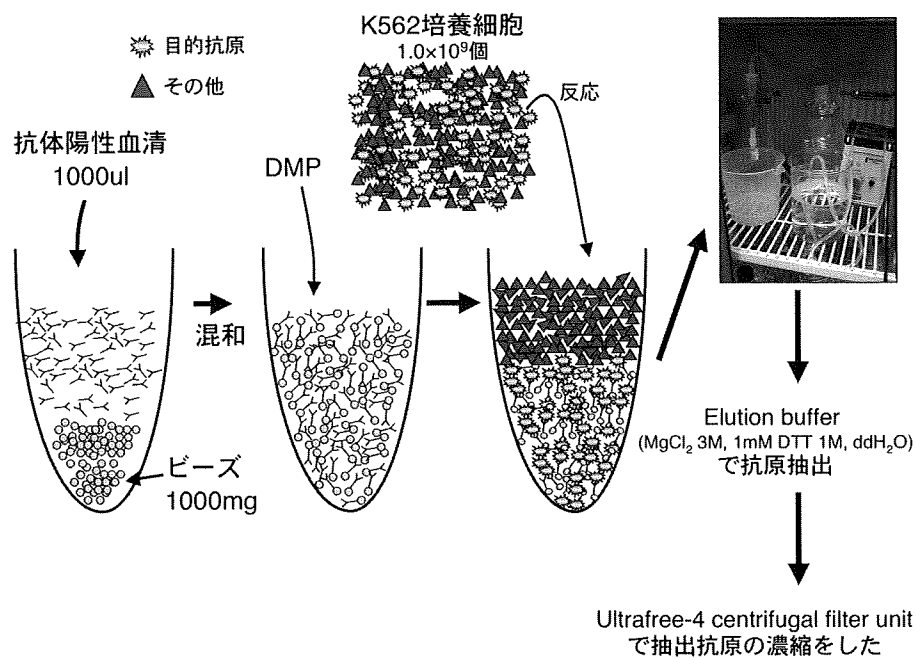


図 2：抗原特定実験の概略

患者血清 1000ul と protein A sepharose ビーズを反応させ、DMP で架橋させた後、 1.0×10^9 個の K562 培養細胞と反応させた。洗浄し、elution buffer で精製し、フィルターで抽出抗原を濃縮させた。

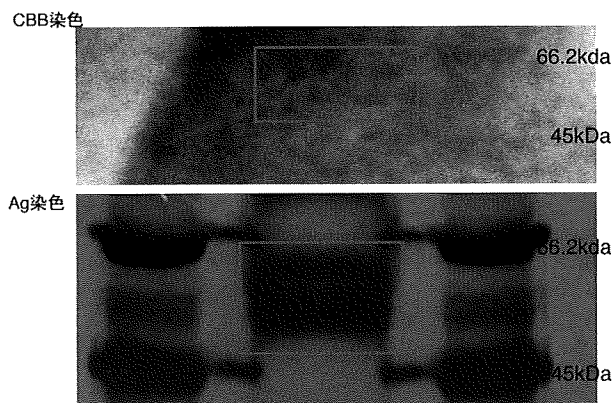
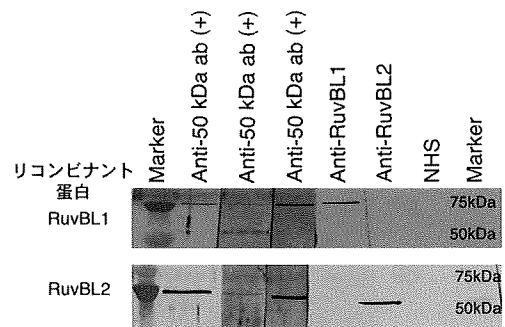


図 3：クマシーブルー (CBB) 染色および銀 (Ag) 染色
 クマシーブルー染色および銀染色において 50 kDa 付近に 2 本のバンドを見出した。



NHS: normal human control

図 4：Western blotting 法

RuvBL1 および RuvBL2 のリコンビナント蛋白を用い、電気泳動を行った。一次抗体には患者血清および anti-RuvBL1-IgG2a、anti-RuvBL2-IgG1、正常人血清を用いた。2次抗体は anti-human AP conjugated IgG Fc を用い AP 染色を行った。

表 1：抗 RuvBL1/L2 抗体陽性全身性強皮症の臨床的特徴

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
年齢	81	55	60	63	79	57	34	62	47	65	59
性別	女	男	男	女	女	男	女	女	女	男	男
臨床診断	lcSSc	lcSSc	dcSSc	dcSSc	dcSSc	dcSSc	dcSSc	dcSSc	lcSSc	dcSSc	lcSSc
Total skin score	13	8	11	27	33	23	9	22	4	ND	6
レイノー現象	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pitting scar	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
皮膚潰瘍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
間質性肺炎	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
肺高血圧症	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
心筋障害	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
抗核抗体	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
倍率（染色型）	×320 (DC)	×640 (Sp)	×160 (Sp)	×640 (Sp)	×640 (Sp)	×320 (Sp)	×1280 (Sp)	×640 (Sp)	×1280 (H,Sp)	×640 (Sp)	×320 (Sp,Cyto)
他の自己抗体	centromere	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CK 上昇	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-

強皮症患者における抗トポイソメラーゼ I 抗体はいつから産生されるか？

研究分担者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部内科 准教授

協力者 鍋木淳一 新赤坂クリニック

研究要旨

強皮症 (SSc) 患者血清中に特異的に検出される抗トポイソメラーゼ I (トポ I) 抗体の産生機序はいまだ明らかでない。SSc 発症前後におけるトポ I に対する免疫応答の推移を明らかにするため、SSc 発症前に採取した血清が入手できた抗トポ I 抗体陽性びまん皮膚硬化型 SSc (dcSSc) 8 例を対象として、抗トポ I 抗体の出現時期および病初期のトポ I に対する免疫応答を検討した。発症 4-70ヶ月前に採取した 12 血清は全て抗核抗体陽性であったが、抗トポ I 抗体は検出されなかった。一方、発症後 1-18ヶ月の診断時には全例が抗トポ I 抗体陽性となっていた。発症前後の経時的サンプルを用いた検討では、IgM 抗トポ I 抗体が IgG 抗トポ I 抗体に先行して出現し、IgG 抗体価の上昇に伴ってエピソード反応性が拡大した。また、末梢血トポ I 反応性 CD4+T 細胞は発症 1 年以内に 7-25 倍に増えた。以上より、抗トポ I 抗体は SSc 発症とほぼ同時に T 細胞依存性に産生されることが明らかとなった。

A. 研究目的

強皮症 (systemic sclerosis; SSc) 患者血清中には高率に生命機能に必須な核蛋白に対する自己抗体が検出される。自己抗体の対応抗原として DNA トポイソメラーゼ I (トポ I)、RNA ポリメラーゼ III、セントロメアなどが知られており、各々の SSc 関連抗核抗体は特定の病型や臨床症状と関連する。例えば、抗トポ I 抗体陽性例はびまん皮膚硬化型 SSc (dcSSc)、間質性肺疾患の頻度が高く、抗セントロメア抗体陽性例の多くは限局皮膚硬化型 SSc (lcSSc) で内臓病変は少ない。そのため、SSc 関連抗核抗体の検出は診断、病型分類、臓器障害や予後の予測に有用である¹⁾。一方、SSc 関連抗核抗体が SSc 患者に特異的に産生される機序はいまだ明らかでない。抗トポ I 抗体産生がトポ I を認識する CD4+T 細胞

の活性化により誘導されることが示されているが²⁾、免疫応答を誘導する trigger については不明である。抗トポ I 抗体の産生機序を解明するためには、SSc 発症前後におけるトポ I に対する免疫応答の追究が役立つと考えられる。そこで、SSc 発症前に採取した血清が入手できた抗トポ I 抗体陽性 dcSSc を対象とし、抗トポ I 抗体の出現時期および病初期のトポ I に対する免疫応答を検討した。

B. 研究方法

1. 対象

慶應義塾大学リウマチ内科の SSc 患者データベースに登録されている抗トポ I 抗体陽性 dcSSc 93 例のうち、SSc 発症前に採取した血清が入手できた 8 例を対象とした。全例がアメリカリウマチ学会の

分類基準を満たした。男性1例、女性7例で、SSc 診断時の年齢は 59.4 ± 11.1 歳であった。なお、SSc 発症はレイノー現象以外の症状（手指腫脹、爪上皮変化、皮膚のつっぱり感など）の出現時期とした。

2. 自己抗体

抗核抗体は HEp-2 細胞を基質とした間接抗体法で検出した。³⁵S 標識細胞抽出液を抗原とした免疫沈降法で抗トポ I 抗体をはじめとした各種抗核抗体を検出した。

抗トポ I 抗体はリコンビナントのトポ I 断片を抗原とした酵素免疫測定法 (ELISA) により測定した⁴⁾。また、5つのトポ I のリコンビナント部分断片（アミノ酸配列 1-93、43-224、209-386、363-563、541-765）を抗原とすることで、各断片に対する抗体を個別に測定した⁵⁾。2次抗体を変えることで IgG、IgM アイソタイプの抗トポ I 抗体をそれぞれ検出し、得られた結果は標準血清の希釈系列を用いて標準化し、ユニット表示とした。

3. トポ I 反応性 CD4+T 細胞頻度

磁気ビーズを用いて末梢血単核球から CD4+T 細胞を分離し、放射線照射後の末梢血単核球、主要な T 細胞エピトープを含むリコンビナント部分断片（アミノ酸配列 209-386）とともに 96 穴丸底プレートで培養した。CD4+T 細胞数を 0.3-1000 まで段階的に希釈し、それぞれを 96 ウェルに加えた。1週間後に ³H サイミジンを添加し、ハーベスト後にマイクロシンチレーションカウンターで放射活性を測定した。各希釈系列における T 細胞の増殖が検出されたウェルの割合から Poisson distribution formula に従って、CD4+T 細胞 10^4 あたりのトポ I 反応性 T 細胞を求めた⁶⁾。

（倫理面への配慮）

本研究は学内の倫理委員会で承認され、検体採取

に当たっては患者本人に対して研究内容を説明し、文書による同意を得ることを原則とした。

C. 研究結果

図1にSSc発症を起点として前後に採取された血清における抗核抗体、免疫沈降法による抗トポ I 抗体の測定結果を示す。抗トポ I 抗体陽性8例から得られたSSc発症から平均34.3ヶ月（7-70ヶ月）前の12血清を用いた。すべての血清は抗核抗体陽性で、その抗体価は40倍から2560倍であった。染色パターンとしては斑紋型が多く、一部で均質型が混在していた。しかし、高感度な免疫沈降法を用いても抗トポ I 抗体は陰性であった。1例（#324）で抗Ku抗体、1例（#336）で抗U1RNP抗体が検出されたが、残りの6例では免疫沈降法で既知の自己抗体は検出されなかった。一方、SSc発症後平均6.3ヶ月（1-18ヶ月）後の診断時に採取された血清はいずれも抗トポ I 抗体が陽性となっていた。したがって、抗トポ I 抗体はSSc発症前後の短期間に陽性化することが明らかとなった。

次に、SSc発症前後の経時的な血清が保存されていた2例について、抗トポ I 抗体のアイソタイプ、抗体価、エピトープ反応性の推移を詳細に検討した（図2、3）。#324は全身性エリテマトーデス症例（SLE）の母親で、SSc発症50ヶ月前に抗核抗体が40倍陽性であったが、特異自己抗体は検出されなかった。この時点ではレイノー現象を含むSSc関連所見を認めなかった。SSc発症6ヶ月前からレイノー現象が出現し、4ヶ月前には抗核抗体640倍、抗Ku抗体陽性であったが、抗トポ I 抗体は検出されなかった。SSc発症（両手指から手背の腫脹が出現）1ヶ月後の診断時には抗トポ I 抗体が陽性となっていた。その後1年間に皮膚硬化が急速に進展してmTSSが30

まで達し、間質性肺疾患も進行した。SSc 発症 1ヶ月の診断時は IgM 抗トポ I 抗体のみが検出されたが、3ヶ月後には IgG 抗トポ I 抗体が陽性となり、その後は高力価が持続した。#336 は SSc 発症の 4 年前にレイノー現象が出現し、2 年前に肝機能障害が指摘されたために肝生検を実施され、自己免疫性肝炎の診断で 15 mg/日のプレドニゾロンを開始された。両手指から手背の腫脹と指尖潰瘍が出現してから 2ヶ月後に SSc と診断された。その時点で抗核抗体陽性 (2560 倍)、免疫沈降法で抗トポ I 抗体、抗 U1RNP 抗体が陽性であった。SSc 発症 48、38、14ヶ月前の保存血清は全て抗核抗体陽性、抗 U1RNP 抗体陽性であったが、抗トポ I 抗体は陰性であった。SSc 診断時には IgG、IgM 抗トポ I 抗体がいずれも低力価陽性であったが、その後 IgM 抗トポ I 抗体の陰性化、IgG 抗トポ I 抗体価の上昇を認めた。

#324、#336 の経時的に採取された血清を用いて SSc 発症前後のトポ I 断片に対する反応性を検討した。いずれの症例も、SSc 発症後にまずトポ I のアミノ酸配列 363-563 に対する反応がみられ、その後にアミノ酸配列 209-386、541-765 に対する反応性が出現した。また、各断片に対する反応性は、IgM が先行し、それに遅れて IgG 型抗体価が上昇する傾向を認めた。

最後に、SSc 発症前後の末梢血中のトポ I 反応性 CD4+T 細胞の頻度を経時的に調べた。#324 では SSc 発症前に $0.54/10^4$ CD4+T 細胞であったトポ I 反応性 T 細胞が、発症後 1ヶ月に 1.80、4ヶ月に 3.52、18ヶ月に 3.95 と増加した。#336 でも、発症前に $0.21/10^4$ CD4+T 細胞であったトポ I 反応性 T 細胞が、発症後 2ヶ月に 2.11、9ヶ月に 5.40、37ヶ月に 3.76 と同様の経過を示し、発症 1 年以内に 7-25 倍まで増加していた。

D. 考 案

少数例の検討ではあるが、抗トポ I 抗体陽性 dcSSc において、抗トポ I 抗体は SSc 発症とほぼ同時期に出現することが明らかにされた。一方、抗核抗体は SSc 発症の数年前から陽性となっていた。抗トポ I 抗体が SSc 病初期に産生されると、IgM アイソタイプに引き続いて IgG アイソタイプの抗トポ I 抗体が出現し (isotype-switch)、経過とともに抗体価上昇、トポ I 分子上のエピトープに対する自己抗体反応性の拡大 (epitope-spreading) を認めた。また、末梢血中のトポ I に対する自己反応性 CD4+T 細胞は抗トポ I 抗体の出現とともに著明に増加したことから、SSc 発症早期にみられるトポ I に対する自己抗体応答は *de novo* の T 細胞依存性の抗体産生のプロセスに従っていた。

膠原病発症と自己抗体出現の時期に関する検討はほとんどされていない。その理由は、発症前の血清の入手が困難なためである。2003 年に Arbuckle らは米国兵役血清バンクに保存されていた血清を用いて、SLE 患者 130 例の発症前の自己抗体分析を行った⁷⁾。その結果、抗核抗体は症状出現の 2-3 年前から陽性となり、特異性の高い抗二本鎖 DNA 抗体、抗 Sm 抗体はそれぞれ発症 1.2 年、0.5 年前に陽転した。この結果は、今回の dcSSc における抗トポ I 抗体とほぼ一致する。したがって、何らかの自己免疫をきたしやすい免疫素因 (遺伝あるいは環境要因) を基礎に、SSc 病態と関連する trigger が加わることで特異自己抗体産生が誘導されると考えられる。SSc の病態に伴って病変部でトポ I が高発現される、あるいはトポ I が構造修飾を受けることで、従来は生成されないトポ I 由来ペプチドが免疫系に曝露される可能性が提唱されているが、抗トポ I 抗体産生機序の解明にはさらなる検討が必要である。

E. 結 論

dcSScにおける抗トポ I 抗体はSSc発症とほぼ同時期に出現し、SSc病態と密接に関連していた。また、SSc発症早期にみられるトポ I に対する自己抗体産生はT細胞依存性の抗体産生プロセスに一致しており、抗トポ I 抗体産生には免疫系自身の異常より、特異的免疫応答を賦活化する抗原側の要因の貢献がより重要と考えられた。

F. 文 献

1. Okano Y. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am.* 1996; 22: 709-35.
2. Kuwana M, Medsger TA Jr, Wright TM. T cell proliferative response induced by DNA topoisomerase I in patients with systemic sclerosis and healthy donors. *J Clin Invest.* 1995; 96: 586-96.
3. Kuwana M, Medsger TA Jr, Wright TM. T-B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J Immunol.* 1995; 155: 2703-14.
4. Kuwana M, Medsger TA Jr, Wright TM. Detection of anti-DNA topoisomerase I antibody by an enzyme-linked immunosorbent assay using overlapping recombinant polypeptides. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 76: 266-78.
5. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, et al. Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I: clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1993; 36: 1406-13.
6. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, et al. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 1074-84.
7. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1526 - 33.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh T, Ishikawa O, Ihn H, Endo H, Kawaguchi Y, Sasaki T, Goto D, Takahashi K, Takahashi H, Misaki Y, Mimori T, Muro Y, Yazawa N, Sato S, Takehara K, Kuwana M. Clinical usefulness of anti-RNA polymerase III antibody measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rheumatology.* 2009; 48 (12): 1570-14.

2. 学会発表

1. Kuwana M, Kaburaki J: Anti-topoisomerase I antibody develops simultaneously with clinical onset of systemic sclerosis through de novo T cell-dependent process. The 73th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Philadelphia). 2009. 10.
2. Kuwana M, Satoh T, Sato S, Takehara K: Clinical usefulness of anti-RNA polymerase III antibody measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. The 73th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Philadelphia). 2009. 10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

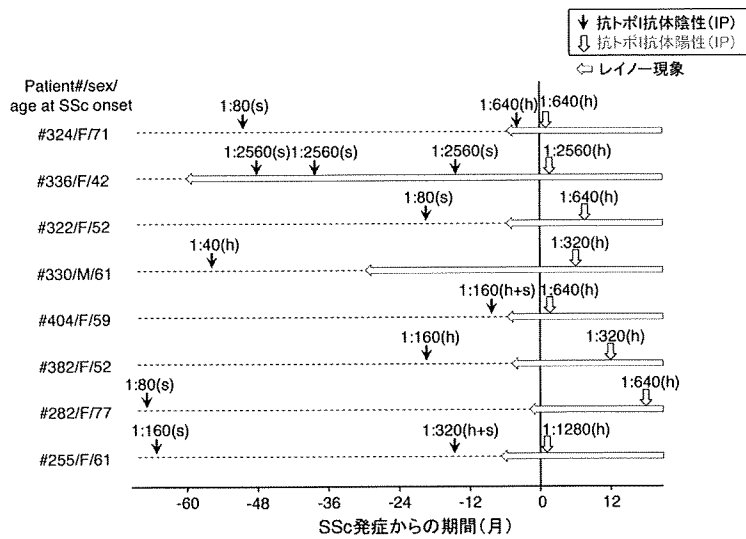


図1：SSc 発症前後の抗核抗体、抗トポ I 抗体の推移
 抗トポ I 抗体陽性 dcSSc 8 例から得られた SSc 発症前の 12 血清と発症後の 8 血清における抗核抗体、免疫沈降法による抗トポ I 抗体の測定結果を示す。SSc 発症はレイノー現象以外の SSc 関連症状の出現とした。

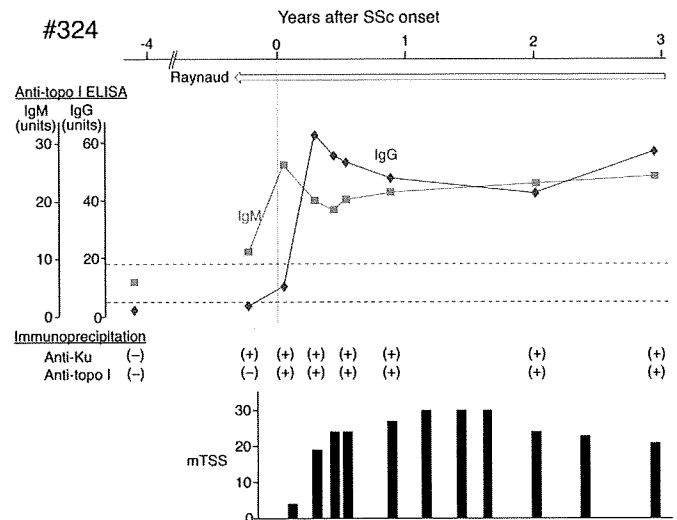


図2：抗トポ I 抗体陽性 dcSSc 例 #324 における経時的な IgM、IgG アイソタイプ抗トポ I 抗体の推移

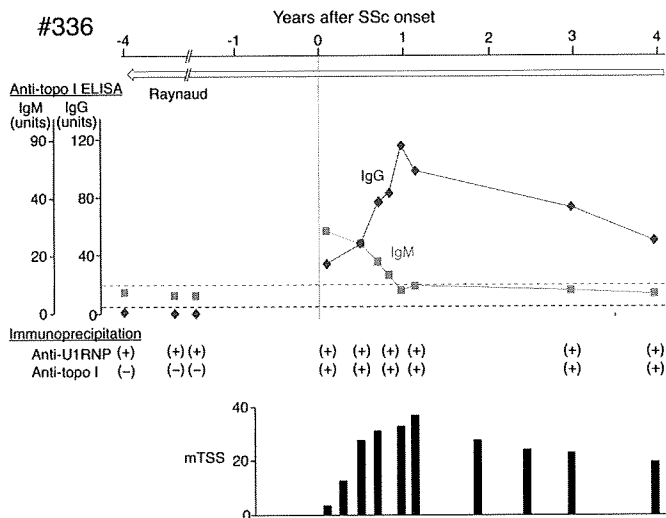


図3：抗トポ I 抗体陽性 dcSSc 例 #336 における経時的な IgM、IgG アイソタイプ抗トポ I 抗体の推移