

図4：A. CA-PKC- δ を正常皮膚線維芽細胞に一過性強発現するとI型コラーゲンの発現が亢進した。イマチニブはこの効果を軽度ではあるが有意に抑制した。このイマチニブの効果は、Egr-1の発現を抑制するためと考えられた。B. TGF- β signalingのc-Ablを介する non-canonical pathwayには“c-Abl-ERK-EGR-1 pathway”と“c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway”の2つがある。

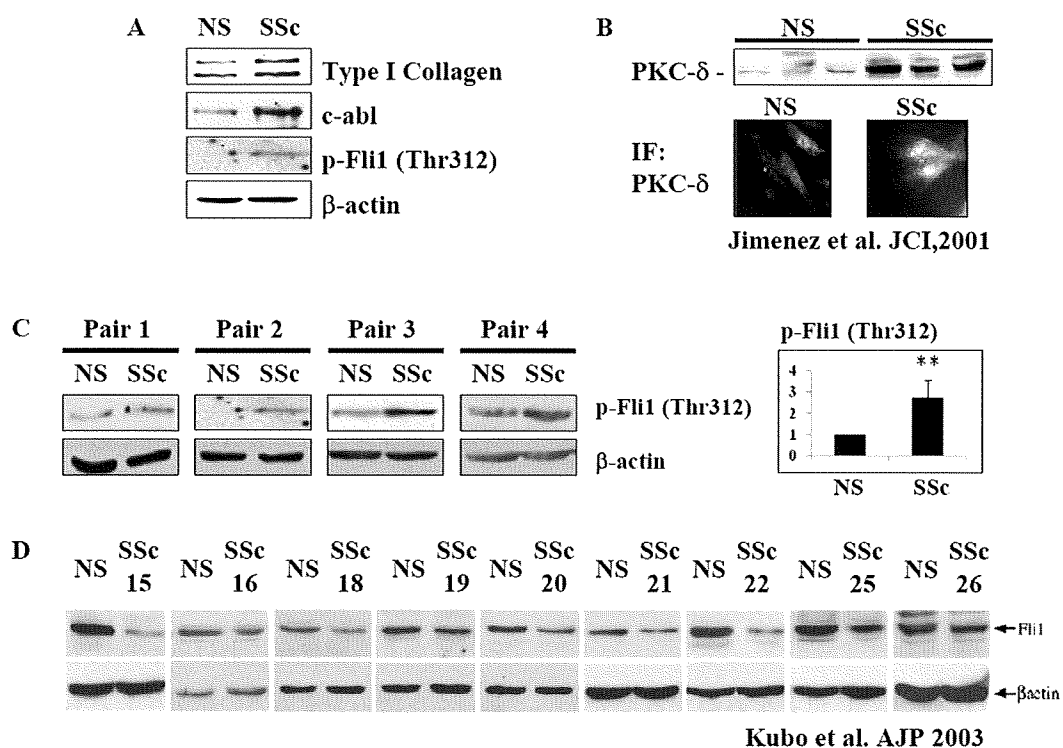


図5：強皮症皮膚線維芽細胞では“c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway”が恒常的に活性化されている。A. 強皮症皮膚線維芽細胞ではc-Ablの発現が亢進し、Fli1のリン酸化が亢進していた。B. 強皮症皮膚線維芽細胞ではPKC- δ の発現が著明に亢進し、特に核内に多く発現していた（文献13からの抜粋）。C. 強皮症皮膚線維芽細胞ではFli1のリン酸化が亢進していた。D. 強皮症皮膚線維芽細胞ではFli1蛋白の発現量が低下していた（文献10からの抜粋）。

ガドリニウムによる皮膚線維化・石灰化誘導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 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

研究要旨

ガドリニウム造影剤を腎不全患者、特に透析患者に投与すると、全身諸臓器の線維化・石灰化をきたす腎性全身性線維症 (Nephrogenic systemic fibrosis: NSF) を発症することが知られている。昨年の本会議で我々は高リン濃度の培地中においてガドリニウム (Gd) が MC3T3-E1 (マウス前骨芽細胞) の骨分化を誘導することを報告した。皮膚石灰化病変を形成する起源となる細胞の候補としてヒト皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞 (HAMSC) およびヒト真皮由来線維芽細胞 (HDF) を考え、これらの細胞について同様の検討を行ったところ、Gd は HAMSC、HDF の骨分化も誘導することが明らかになった。また、通常培地中においては Gd は骨分化を誘導せず、細胞増殖作用を示すことより、線維化病変の形成には Gd の細胞増殖作用が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

腎性全身性線維症 (nephrogenic systemic fibrosis: NSF) は、2000 年に提唱された疾患概念で、皮膚、筋肉、横隔膜、心臓、肝臓、肺など、全身諸臓器の線維化を特徴とする疾患である¹⁾。高度の腎機能不全患者にガドリニウム造影剤を使用することにより、高率に NSF が発症することが判っているが²⁾、その詳細なメカニズムについては未だ明らかにされていない。

最近、我々の教室で NSF 患者を診察する機会を得たが、高度の皮膚の硬化と関節の拘縮、更に著明な皮膚・皮下の石灰化をきたしており、その QOL は著しく損なわれていた³⁾。NSF は線維化をおこす疾患として広く知られているが、自験例以外にも石灰化病変の合併は多数報告されている^{4,5)}。全身性強

皮症でもしばしば皮膚や軟部組織に石灰化が生じることがあり、また陰茎の線維化を特徴とする Peyronie's disease でも 15~25% に石灰化を伴うことが知られていることから⁶⁾、皮膚線維化と石灰化には共通した発症メカニズムが存在することが示唆される。

石灰化形成機序については、これまで組織の変性過程に起こる受動的なカルシウム結晶の沈着と考えられており、強皮症における石灰沈着も血行障害に基づく皮膚の栄養障害の結果生じるものと考えられてきた。しかしながら、近年、特に血管石灰化の研究から、幹細胞や血管平滑筋細胞の骨芽細胞への能動的な形質転換 (分化) が石灰化形成の病態の中心にあることが明らかになってきた^{7,8)}。また、肺や腎臓の線維化では TGF- β を介した上皮系細胞から筋

線維芽細胞に形質転換するメカニズム (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) が存在することが明らかになっており、皮膚線維化についても線維化を形成する細胞の起源について、近年盛んに研究が進められている。NSFにおける線維化形成機序に関しては、病変部に存在する紡錘形細胞がCD34陽性のコラーゲン産生細胞であることから、組織に沈着したガドリニウム (Gd) が末梢血中を循環する fibrocyte を病変部に誘導することにより線維化を形成しているのではないかとしている報告がある^{9,10)}。これらの知見は、石灰化・線維化はいずれも何らかの因子により分化能をもつ細胞が能動的に形質転換 (分化) をすることが病態の中心にあることを指し示しており、NSF では Gd が石灰化 (骨分化)・線維化の方向に細胞の分化を誘導している可能性が示唆される。

この仮説を証明するために、骨芽細胞に分化し得る形質をもつ細胞 (MC3T3-E1: 前骨芽細胞) を用いて、Gd が骨分化を誘導しうるか否かを検討したところ、Gd は MC3T3-E1 の骨分化を強力に誘導することが明らかになった。そこで今回我々は、ヒトの皮膚石灰化病変を形成する細胞の候補として皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞と皮膚真皮由来線維芽細胞を考え、Gd のこれらの細胞の骨分化誘導に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

MC3T3-E1 (前骨芽細胞) は理研より、ヒト皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞 (HAMSC) は DS フェーマより購入した。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。

2) Alizarin Red 染色 (石灰化染色)

24 well plate ないし 96 well plate に細胞を播種し、増殖培地中で 24 時間培養後、目的とする濃度の $GdCl_3$ を添加した通常の増殖培地 (NM) ないし骨分化誘導培地 (OM) で培養した。NM の組成は α MEM + 10% FBS であり、OM の組成は NM + 10 mM β -glycerophosphate + 50 mM ascorbate-2-phosphate である。培地交換は週 2 回行ない、1 週間~3 週間培養した。培養液を除去後、PBS で 1 回洗浄、冷 70% エタノールを加え、4°C で 1 時間固定した。蒸留水で 3 回洗浄後、40 mM Alizarin Red S (pH4.2, in deionized water) を 500 μ l 加え、緩やかに振盪しながら 15 分間染色した。蒸留水で 5 回洗浄、PBS で 1 回洗浄した後、写真撮影した。色素の定量は、10% cetylpyridium choloride (pH 7.0, in 10 mM sodium phosphate) を 500 μ l 加え、15 分間緩やかに振盪後、吸光度 (562 nm) を測定した。

3) cell proliferation assay

96 well plate に細胞を播種し、24 時間培養後、目的とする濃度の $GdCl_3$ (SIGMA) を添加し、目的とする時間培養した後、CellTiter96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega) により細胞増殖能を測定した。

4) I 型コラーゲン ELISA 法

培養上清中の I 型コラーゲン量をエーシーバイオテクノロジー社のヒトコラーゲンタイプ 1 ELISA キットを用いて測定した。

5) 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、GAPDH (内部標準) の mRNA 発現量を定量した。

6) Oil Red 染色 (脂肪染色)

AMSC およびヒト皮下脂肪組織由来脂肪前駆細胞を 96 well plate に播種。脂肪細胞増殖培地中 (Lonza 社、Preadipocyte Growth Media) でコンフルエントまで培養後、目的の濃度の GdCl₃ を加えた脂肪誘導培地 (Lonza 社、Adipocyte Differentiation Medium) で 7 日間ないし 14 日間培養 (培地交換は週 1 回) 後、プライマリーセル社のリピットアッセイキットを使用して Oil Red 染色を行なった。

培養液を除去後、PBS で 1 回洗浄、10% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬) 100 μ l を加え、室温で一晩固定。固定後、精製水で洗浄した後、調整したオイルレッド O 液を 100 μ l ずつ加え、室温で静置。15 分後オイルレッド O 液を除去し、精製水で 3 回洗浄した後、乾燥して写真撮影した。脂肪滴の定量は、乾燥させたウェル内に抽出液を 100 μ l 加えて色素を溶出させ、吸光度 (540 nm) を測定した。

(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) ガドリニウムの前骨芽細胞 (MC3T3-E1) の骨分

化と細胞増殖に及ぼす影響について

ガドリニウム (Gd) の MC3T3-E1 の骨分化に及ぼす影響を Alizarin red 染色を用いて検討したところ、骨分化誘導培地 (OM: osteogenic medium) 中において、Gd は 0.1 μ M ~ 10 μ M の濃度で容量依存性に骨分化誘導を促進していたが、100 μ M では骨分化が誘導されなかった。通常の増殖培地 (NM: normal medium) では Gd を添加しても骨分化は誘導されなかった。

Gd の細胞増殖に及ぼす影響を CellTiter96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega) を用いて検討した。Gd は NM、OM いずれの培地中でも、0.01 μ M ~ 10 μ M の濃度では MC3T3-E1 の細胞増殖に影響を与えなかったが、100 μ M で有意に細胞増殖を促進していた (図 1)。

以上の結果より、Gd は MC3T3-E1 の骨分化を強力に誘導することが明らかになった。また、100 μ M の Gd が骨分化を誘導しない原因として、100 μ M の濃度では細胞を分化ではなく増殖の方向に誘導するためではないかと考えた。

2) ガドリニウムのヒト皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞 (HAMSC) の骨分化と細胞増殖に及ぼす影響について

Gd のヒト皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞 (HAM-SC) の骨分化に及ぼす影響を Alizarin red 染色を用いて検討した。その結果、Gd は OM 中において 10、100 μ M の濃度で用量依存性に骨分化を促進していた。次に、Gd の細胞増殖に及ぼす影響を CellTiter96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega) を用いて検討した。その結果、Gd は NM 中において 10、100 μ M で細胞増殖を有意に促進していた。

3) ガドリニウムのヒト真皮由来線維芽細胞の細胞

増殖と骨分化に及ぼす影響について

Gd のヒト真皮由来線維芽細胞 (HDF) の骨分化に及ぼす影響を Alizarin red 染色を用いて検討した。その結果、2 週間培養した時点では骨分化の誘導はみられなかったが、3 週間培養を続けたところ、Gd は OM 中において 10,100 μM の濃度で用量依存性に骨分化を促進していた。次に、Gd の細胞増殖に及ぼす影響を CellTiter96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega) を用いて検討した。その結果、Gd は NM 中において 10,100 μM で細胞増殖を有意に促進していた。

4) ガドリニウムのヒト真皮由来線維芽細胞の I 型コラーゲン蛋白産生、mRNA 発現に及ぼす影響について

NSF における線維化のメカニズムを明らかにするために、Gd のヒト真皮由来線維芽細胞の I 型コラーゲン産生に及ぼす影響について検討したところ、Gd は容量依存性に培養上清中の I 型コラーゲン量を増加させた。次に、この I 型コラーゲン量の増加が mRNA 発現の増強によるものか否かを知るために、リアルタイム PCR 法にて I 型コラーゲン mRNA 発現量を測定したところ、Gd は I 型コラーゲン mRNA を有意に抑制していた。Gd による線維化病変では、一つ一つの細胞のコラーゲン産生が増加しているのではなく、Gd による細胞増殖作用の結果として総コラーゲン量が増加しているのではないかと考えられた。これは、NSF 患者の皮膚で紡錘形細胞が増加しているという臨床所見とも合致する。I 型コラーゲン mRNA 発現の抑制については、negative feedback 機構によるものではないかと考えている。

5) ガドリニウムのヒト皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の I 型コラーゲン蛋白産生、mRNA 発現に及ぼ

す影響について

先の実験と同様の検討を HAMSC においても行ったところ、Gd は容量依存性に培養上清中の I 型コラーゲン量を増加させ、I 型コラーゲン mRNA 発現を抑制していたが、その影響は HDF に及ぼす影響に比べて少なかった。

D. 考察

ガドリニウム (Gd) はヒト皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞 (HAMSC) 及びヒト真皮線維芽細胞 (HDF) に対しても、細胞増殖促進作用や骨分化誘導作用を示すことが明らかになった。これは、組織に沈着した Gd が直接的に HAMSC や HDF に作用し、線維化や石灰化を引き起こしている可能性を示唆する。さらに、通常の増殖培地中においては細胞増殖作用を示すが、高リン酸状態である骨分化誘導培地中においては骨分化を誘導することから、血中 (組織内) リン濃度が高い時に石灰化病変が生じてくる可能性が示唆された。

さらに今回の検討からは、皮膚においては間葉系幹細胞のみならず、真皮由来線維芽細胞も石灰化病変を形成する細胞の起源に成りうることが示された。今回使用した線維芽細胞は、ヒトの皮膚から explant culture 法で初代培養したものである。モノクローナルな細胞集団ではなく、様々なフェノタイプを持った細胞集団であり、もともと皮膚に存在する間葉系幹細胞が混じている可能性もある。しかしながら、培養系における骨分化の様子をみると、脂肪由来間葉系幹細胞が 2 週間の培養で骨分化しているのに対し、線維芽細胞では 2 週間では全く骨分化してくる細胞は観察されず、3 週間培養したところで一斉に骨分化してくる様子が観察された。この結果は線維芽細胞内に存在する間葉系幹細胞様の細胞が

骨分化するのではなく、間葉系幹細胞よりも分化しにくい（分化に時間のかかる）細胞が骨分化することを示しているのではないかと考えた。また、骨分化の仕方も、線維芽細胞内にパラパラ存在する細胞が骨分化しているのではなく、細胞濃度の濃い辺縁の細胞から一斉に骨分化しており、我々が線維芽細胞として培養している細胞の大多数の細胞が骨分化しうることを示しているものと考えた。

E. 結論

組織に沈着したガドリニウムは間葉系幹細胞や線維芽細胞に直接的に作用して線維化や石灰化を誘導しうることが明らかになった。さらに石灰化病変はガドリニウムが沈着した部位のリン濃度が高い場合に生じやすい可能性が示唆された。

また、全身性強皮症をはじめとする NSF 以外の疾患で生じる皮膚石灰化病変も、間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞の能動的な形質転換（骨分化）により形成されている可能性も示唆される。ガドリニウムによる石灰化病変形成のメカニズムを更に掘り下げていくことは、全身性強皮症の石灰化病変形成のメカニズムを知るためにも非常に重要ではないかと思われる。

F. 文献

1. Cowper SE, Robin HS, Steinberg SM, Su LD, Gupta S, Leboit PE. Scleromyxoedema-like cutaneous diseases in renal-dialysis patients. *Lancet* 2000; 356: 1000-1001.
2. Grobner T. Gadolinium:specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1104-8.
3. Nagai Y, Hasegawa M, Shinmi K, Kishi C, Tsumishima Y, Endo K, Okabe K, Suzuki K, Ishikawa O. Nephrogenic systemic fibrosis with multiple calcification and osseous metaplasia. *Acta Derm Venereol.* 2008; 88: 597-600.
4. Edsall L, English J, Teague M, Patterson JW. Calciphylaxis and metastatic calcification associated with nephrogenic fibrosing dermopathy. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 247-253.
5. Ruiz-Genao D, Pascual-Lopez M, Fraga S, Aragues M, Garcia-Diez A. Osseous metaplasia in the setting of nephrogenic fibrosing dermopathy. *J Cutan Pathol* 2005; 32: 172-175.
6. Vernet D, Nolazco G, Cantini L, Magee TR, Qian A, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Evidence that osteogenic progenitor cells in the human tunica albuginea may originate from stem cells: implications for peyronie disease. *Biol Reprod.* 2005; 73: 1199-210.
7. Radhika Vattikuti and Dwight A. Towler Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E686-E696, 2004;
8. Veerle Persy and Patrick D' Haese Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends in Molecular Medicine.* 2009; 15: 405-416.
9. Ortonne N, Lipsker D, Chantrel F, Boehm N, Grosshans E, Cribier B. Presence of CD45RO1 CD341 cells with collagen synthesis activity in nephrogenic fibrosing dermopathy; a new pathogenic hypothesis. *Br J Dermatol* 2004;150:1050-2.

10. Bucala R. Circulating fibrocytes: cellular basis for NSF. J Am Coll Radiol. 2008; 5: 36-9.

2. 学会発表

1. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. December 4-6, 2009; Fukuoka; P04-08

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

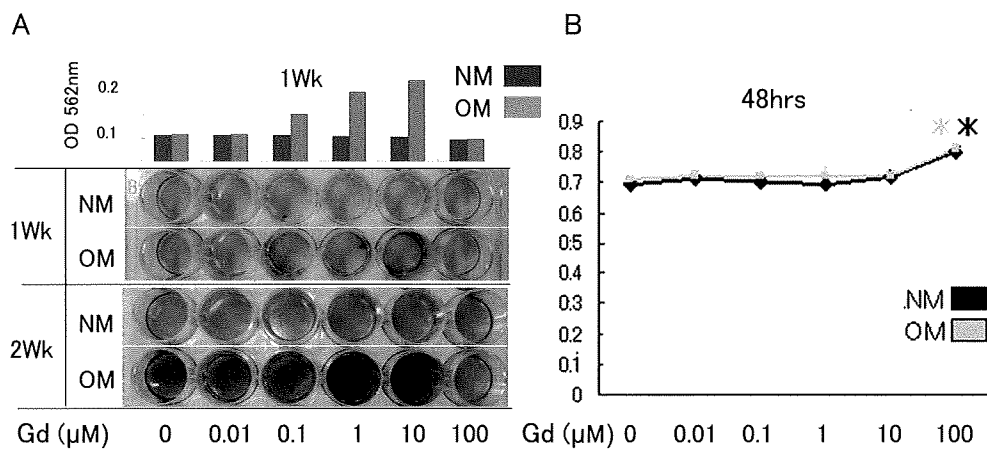


図1：Gdの前骨芽細胞（MC3T3-E1）の骨分化／細胞増殖に及ぼす影響

A. Alizarin Red 染色（石灰化染色） B. cell proliferation assay (MTS 法)

NM (normal media; 通常増殖培地)、OM (osteogenic media; 骨分化誘導培地)

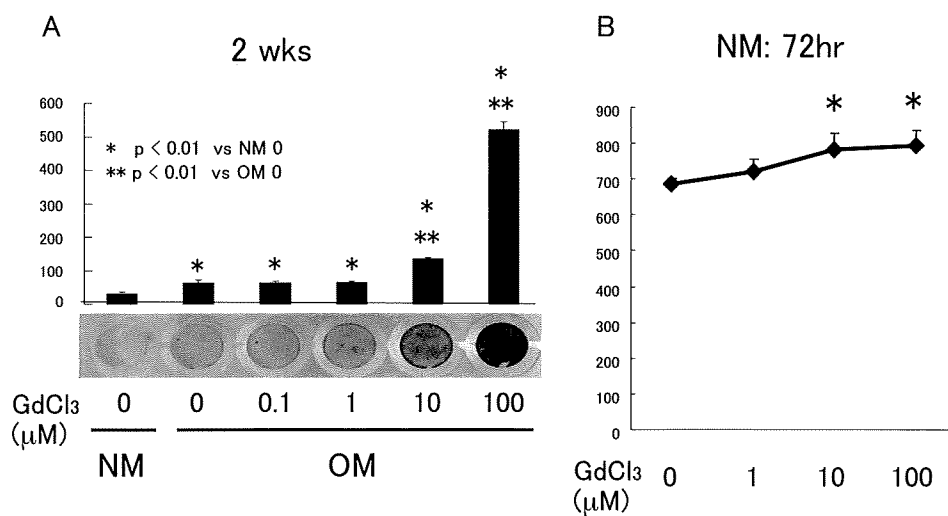


図2：Gdの脂肪組織由来間葉系幹細胞に及ぼす影響

A. Alizarin Red 染色（石灰化染色） B. cell proliferation assay (MTS 法)

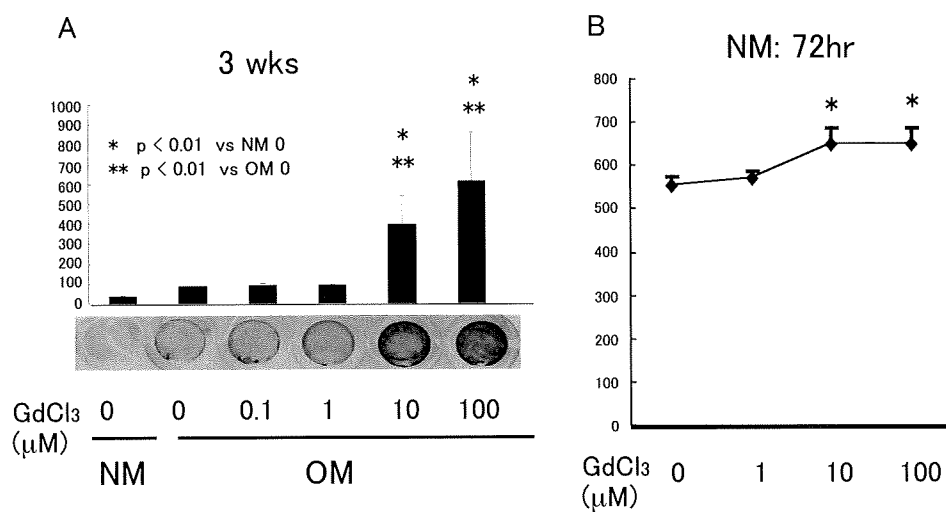


図3：Gdのヒト皮膚由来線維芽細胞に及ぼす影響

A. Alizarin Red 染色（石灰化染色） B. cell proliferation assay（MTS法）

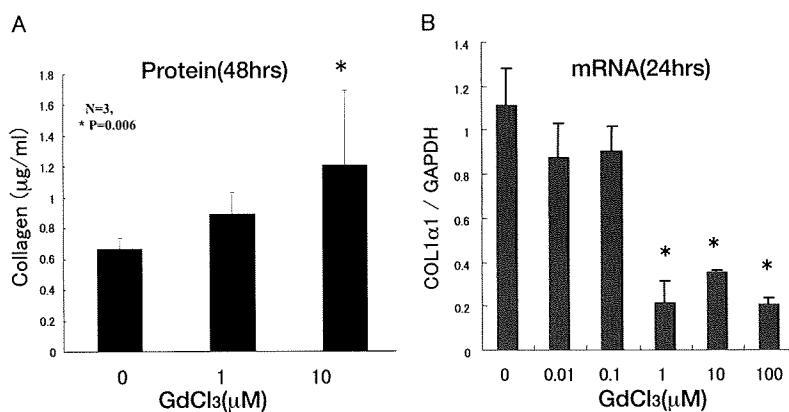


図4：Gdがヒト皮膚由来線維芽細胞の1型コラーゲン蛋白産生、mRNA発現に及ぼす影響

A. 蛋白レベル B. mRNAレベル

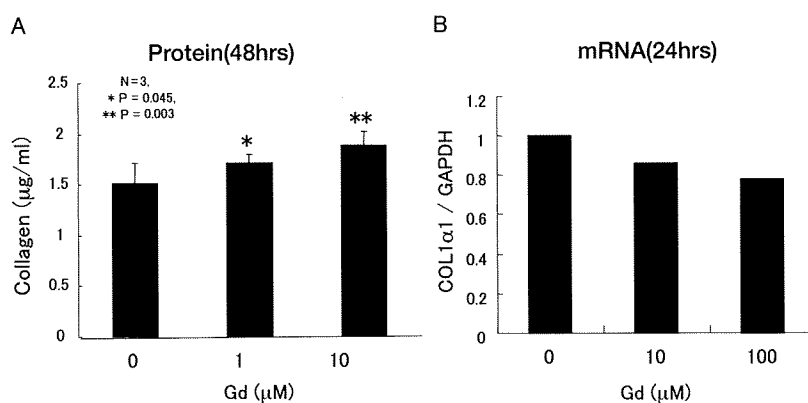


図5：Gdが脂肪組織由来間葉系幹細胞の1型コラーゲン蛋白産生、mRNA発現に及ぼす影響

A. 蛋白レベル B. mRNAレベル

全身性強皮症と *FAM167A (C8orf13)-BLK* および *STAT4* 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
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 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
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
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 伊東郁恵 筑波大学大学院人間総合科学研究科 大学院生
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
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
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

近年、ヨーロッパ系集団におけるゲノムワイド関連研究により、*FAM167A (C8orf13)-B lymphoid tyrosine kinase (BLK)* 領域および *STAT4* と全身性エリテマトーデス (SLE) との関連が報告され、われわれはいずれについても日本人集団における SLE の関連を確認した。最近、*IRF5*、*PTPN22* など、複数の自己免疫疾患に共通に関連する遺伝子が次々に報告されていることから、これらの領域も全身性強皮症 (SSc) の疾患感受性に関連している可能性を考え、検討した。*FAM167A-BLK* 領域については、日本人 SSc 患者 309 例、健常対照者 769 例を対象に、16 個の tagSNP について関連解析を施行した。一次スクリーニングでは、8 個の SNP において $P < 0.05$ の関連が検出され、うち、*FAM167A* と *BLK* の遺伝子間領域に位置し、SLE と関連する rs13277113 A アリルがもっとも強い関連を示し、並べ替え検定による多重比較の補正後も、統計学的有意性が保たれた (Permutated $P = 0.024$)。また、ロジスティック回帰分析の結果、関連の検出された SNP は rs13277113 によりすべて調整された。そこで、rs13277113 につき、全例のタイピングを施行し、関連を検討したところ、アリル頻度の比較において、 $P = 6.1 \times 10^{-4}$ 、オッズ比 [OR] 1.61 (95% 信頼区間 [CI] 1.24-2.11) の関連が検出された。*STAT4* に関しては、SSc 282 例、健常対照者 590 例を対象に、SLE、関節リウマチ (RA) との関連を示す rs7574865 の関連を検討したところ、SSc においても T アリルの有意な関連が検出された ($P = 0.0046$, OR 1.35, 95%CI 1.10-1.66)。この関連は、限局性皮膚硬化型 (lc) SSc 群、抗セントロメア抗体陽性群において顕著であった。以上の結果、*FAM167A-BLK* 領域および *STAT4* は、SSc の疾患感受性にも寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

2008年に、ヨーロッパ系集団における2つのゲノムワイド関連研究により、染色体上の8p23.1に位置する *FAM167A* (C8orf13)-*B lymphoid tyrosine kinase* (*BLK*) 領域多型と全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) との関連が報告された^{1,2)}。われわれは日本人集団においてSLEとこの領域の関連を確認するとともに、日本人集団においては、リスク遺伝子型頻度、オッズ比ともに、ヨーロッパ系集団よりも高いことを報告した³⁾。さらに、北米のゲノムワイド関連研究において、この領域が関節リウマチ (RA) 感受性遺伝子領域として報告され⁴⁾、われわれも平行して日本人集団において解析し、関連を報告した⁵⁾。

SLE、RAと関連の報告されているSNP rs13277113は *FAM167* と *BLK* の遺伝子間領域に位置しており、リスク遺伝子型ではmRNAレベルでの *BLK* の発現低下、*FAM167A* の発現上昇と関連することが報告されている。*FAM167A* はユビキタスに発現する機能未知の遺伝子で、*BLK* は *LYN*、*HCK*、*LCK* と相同性を有する、Src family tyrosine kinase をコードする遺伝子であるが、機能は十分解明されていない。

また、ヨーロッパ系集団において、*STAT4* と関節リウマチ (RA) および SLE との関連が報告され⁶⁾、われわれ⁷⁾ および Kobayashi ら⁸⁾ により、日本人集団においても、SLE および RA と関連することが確認された。

最近の研究により、*IRF5*、*PTPN22* など、複数のリウマチ性疾患、自己免疫疾患に共通に関連する遺伝子が存在することが明らかになってきた。以上の背景から、SScの疾患感受性においても *FAM167A-BLK* 領域および *STAT4* 多が関連している可能性

を検討した。

B. 研究方法

〈*FAM167A-BLK* 領域〉

SSc患者309名、健常者769名を対象とするケース・コントロール関連解析を行った。SLEを合併したSSc症例は、解析対象から除外した。

一次スクリーニングとして、*FAM167A-BLK* 領域から HapMap phase II データに基づき、日本人集団における r^2 が0.8以上、マイナーアレル頻度0.1以上という基準で16個のtag SNPを選択し、TaqMan genotyping assayにより遺伝子型を決定し、SSc患者124例、健常対照者412例について関連解析を施行した。

一次スクリーニングの結果に基づき、rs13277113について、さらにSSc患者185例、健常対照者357例の遺伝子型決定を行い、関連を検討した。臨床病型と抗核抗体陽性群についての関連解析も施行した。〈*STAT4*〉

SLEおよびRAと関連する第3イントロンのSNP rs7574865について、SSc 282例、健常対照者590例を対象に、上記同様に関連研究を施行した。(倫理面への配慮)

本研究は、筑波大学、金沢大学及び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、遺伝子型解析に関する研究参加者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

〈*FAM167A-BLK* 領域〉

図1にSSc患者124例、健常対照者412例を対象

とした一次スクリーニングの結果と、健常対照者の遺伝子型に基づく連鎖不平衡プロットを示す。*FAM167A* と *BLK* 遺伝子間領域に位置し、SLE、RA とも関連する SNP rs13277113、およびこれと強い連鎖不平衡にある 7 個の SNP により形成されるピークが観察された。ロジスティック回帰分析を施行した結果、rs13277113 により、ほかのすべての SNP の関連は調整された。また、並べ替え検定による多重比較の補正後も、rs13277113 の関連は統計学的に有意であった (Permutated $P=0.024$)。

そこで、rs13277113 についてさらに検体数を増やし、合計、SSc 患者 309 例、健常対照者 769 例で検討したところ、アリル頻度の比較において、 $P=6.1 \times 10^{-4}$ 、オッズ比 (OR) 1.61 (95% 信頼区間 [CI] 1.24-2.11) の関連が検出された (表 1)。リスクアリルは A アリルで、SLE、RA と共通であり、mRNA レベルでの *BLK* 発現低下、*FAM167A* 発現上昇と関連するアリルであった。

次に rs13277113 の遺伝子型と dcSSc、lcSSc の 2 つの臨床病型に分けて関連解析を施行した結果、いずれの病型においても関連が観察された (表 1)。また、自己抗体のパターンにより、抗トポイソメラーゼ抗体陽性群、抗セントロメア抗体陽性群、抗 RNP 抗体陽性群に分けて関連解析を施行した結果、いずれの群においても健常対照群と比較して統計学的に有意な関連が観察された。

〈STAT4〉

SSc においても、rs7574865 T アリルの有意な関連が検出された ($P=0.0046$ 、OR 1.35、95%CI 1.10-1.66)。臨床病型別の解析では、lcSSc 群、抗セントロメア抗体陽性群において有意な関連が検出された (表 2)。

D. 考案

今回の研究により、いずれもヨーロッパ系集団、日本人集団の両方において SLE、RA との関連が確認されている *FAM167A* と *BLK* の遺伝子間領域 SNP rs13277113 と *STAT4* intron 3 SNP rs7574865 が、SSc とも関連することが見出された。われわれの研究と相前後して、ヨーロッパ系集団においても、それぞれの遺伝子と強皮症との関連が報告され^{6,7)}、いずれの遺伝子も、集団を超えた、複数のリウマチ性疾患に共通の疾患感受性遺伝子であることが明らかになった。

FAM167A-BLK 領域に位置する rs13277113 A アリルは、mRNA レベルでの *BLK* 発現低下、*FAM167A* 発現上昇と関連する^{1,3)}。日本人では、臨床病型、自己抗体パターンに関係なく強い関連が認められた。北米とスペイン集団を対象とした関連研究では、北米集団のみで関連が検出され、抗セントロメア抗体陽性群でもっとも強い関連が検出されている⁶⁾。われわれは、SLE と本領域との先行研究において、rs13277113 のリスク遺伝子型 A/A の一般集団中における頻度は、ヨーロッパ系集団と比較して、日本人集団において顕著に高いことを報告するとともに、SLE 発症における遺伝子の寄与は、日本人集団においてヨーロッパ系集団よりも高いことを報告した³⁾。本研究と北米、スペイン集団における関連の違いは、集団を超えて共通の多型部位が疾患に関連する場合であっても、その寄与は、集団の遺伝的背景により異なることを示しているのではないかと考えられる。

今回の結果において、rs13277113 リスクアリルは抗核抗体陽性群において強い関連が観察され、また、SLE における研究においても、抗 dsDNA 抗体陽性群でより顕著な関連が観察されており、今回の

FAM167A-BLK 領域多型と SSc の関連から、*BLK* 発現低下と *FAM167A* 発現上昇が抗核抗体の産生に関わっている可能性が示唆される。

STAT4 については、日本人同様、ヨーロッパ系集団においても、関連は lcSSc において認められ、dcSSc では認められないと報告されている⁷⁾。関連の分子機序は未解明である。

今後、これらの遺伝子の分子機能の解明とともに、SSc の特異性を決定する因子を見出す必要があると考えられる。

E. 結論

日本人集団において SLE、RA 同様、SSc においても、*FAM167A-BLK* 領域および *STAT4* 多型が発症に関連することが明らかになった。

F. 文献

1. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with *C8orf13-BLK* and *ITGAM-ITGAX*. *N Engl J Med* 2008; 358: 900-9.
2. The International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) , Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in *ITGAM*, *PXK*, *KIAA1542* and other loci. *Nat Genet* 2008; 40: 204-10.
3. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, et al. Replication of the association between the *C8orf13-BLK* region and sys-

temic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 553-8.

4. Gregerson PK, Amos CI, Lee AT, Lu Yue, Remmers EF, Kastner DL et al. REL, encoding a member of the NF- κ B family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2009; 41: 820-3.
5. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Kondo Y, Sugihara M, Horikoshi M, et al. Replication of the association between the *FAM167A (C8orf13)-BLK* region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* published online 9 Sep 2009; doi: 10. 1136/ard. 2009. 118760.
6. Gourh P, Agarwal SK, Martin E, Divecha D, Rueda B, Bunting H, et al. Association of the *C8orf13-BLK* region with systemic sclerosis in North-American and European populations. *J Autoimmun* 2009; doi: 10. 1016/j. jaut. 2009. 08. 014.
7. Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suárez H et al. The *STAT4* gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 2071-2077.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Hikami K, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N. Association of a functional polymorphism in the *IRF5* region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2009; 60:

1845-1850.

2. Tsuchiya N, Kawasaki A, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Hara M, Sato S. Association of *STAT4* polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1375-1376.

3. Ito I, Kawaguchi K, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N. Association of *FAM167A (C8orf13)-BLK* region with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* in press.

2. 学会発表

1. 土屋尚之：リウマチ・膠原病の遺伝子解析：第16回大阪リウマチカンファレンス特別講演、2009年4月11日、大阪。

2. 大田ゆう子、川口鎮司、伊東郁恵、土屋尚之、桑名正隆、佐藤伸一、竹原和彦、山中寿、原まさ子：全身性強皮症発症とCTGF遺伝子多型の関連。第106回日本内科学会講演会、2009年4月11日、東京。（日本内科学会雑誌 2009; 98Suppl、201）

3. 土屋尚之：リウマチ性疾患の遺伝的背景 - 共通性と異質性。第53回日本リウマチ学会総会シンポジウム、2009年4月24日、東京。（リウマチ学会 2009 プログラム抄録集 p120）。

4. 川崎綾、伊東郁恵、林太智、川口鎮司、長谷川稔、後藤大輔、松本功、伊藤聡、堤明人、川本学、藤本学、竹原和彦、佐藤伸一、原まさ子、高崎芳成、橋本博史、住田孝之、土屋尚之：*STAT4*

多型と全身性エリテマトーデスおよび全身性強皮症の関連。第53回日本リウマチ学会総会、2009年4月23日、東京。（リウマチ学会 2009 プログラム抄録集 p332）。

5. 土屋尚之：膠原病の疾患関連遺伝子解析（特別講演）。第5回生物学的製剤治療研究会。2009年7月2日、横浜。

6. 伊東郁恵、川口鎮司、川崎綾、長谷川稔、大橋順、川本学、藤本学、竹原和彦、原まさ子、佐藤伸一、土屋尚之：*C8orf13-BLK*領域遺伝子多型と全身性強皮症との関連。第54回日本人類遺伝学会。2009年9月24日～26日、東京。

7. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N. Association of *FAM167A (C8orf13)-BLK* region with systemic sclerosis. 2009 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 17-22, 2009, Philadelphia.

8. 伊東郁恵、川崎綾、大橋順、伊藤聡、近藤裕也、杉原誠人、堀越正信、林太智、後藤大輔、松本功、堤明人、川口鎮司、川本学、長谷川稔、竹原和彦、松多邦雄、原まさ子、佐藤伸一、住田孝之、土屋尚之：関節リウマチ、全身性強皮症と*FAM167A (C8orf13)-BLK*領域遺伝子多型の関連。第37回日本臨床免疫学会、平成21年11月13日～15日、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

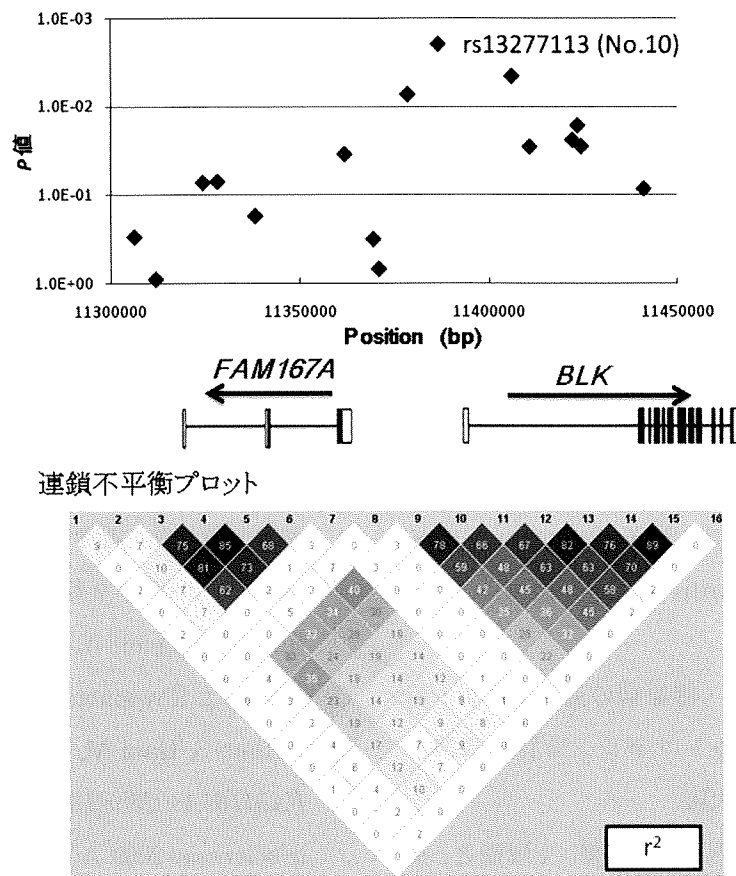


図1：一次スクリーニングにおける患者対照群における *FAM167A-BLK* 領域 16SNPs の関連解析の結果と連鎖不平衡プロット。

上にアレル頻度を用いて施行したカイ二乗検定により算出した 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。rs13277113 SNP (No.10) において、もっとも強い関連が検出された。

表 1. *FAM167A-BLK* 領域 SNP rs13277113 と全身性強皮症との関連解析

	n	遺伝子型 n (%)			A アレル 頻度	アレル頻度の関連解析	
		A/A	A/G	G/G		オッズ比 (95% 信頼区間)	P 値
SSc	309	179 (58)	107 (35)	23 (7)	0.75	1.45 (1.17-1.79)	6.1×10^{-4}
dcSSc	158	93 (59)	54 (34)	11 (7)	0.76	1.50 (1.14-1.98)	0.0041
lcSSc	151	86 (57)	53 (35)	12 (8)	0.75	1.39 (1.05-1.84)	0.021
ATA +*	100	60 (60)	32 (32)	8 (8)	0.76	1.51 (1.07-2.12)	0.018
ACA +**	95	60 (63)	31 (33)	4 (4)	0.79	1.84 (1.28-2.65)	9.8×10^{-4}
anti-RNP Ab +***	22	16 (73)	5 (23)	1 (5)	0.84	2.52 (1.14-5.53)	0.022
健常対照者	769	354 (46)	334 (43)	81 (11)	0.68		

臨床病型、自己抗体パターンに関係なく強い関連が認められた。

* ATA+：抗トポイソメラーゼ抗体陽性群

** ACA+：抗セントロメア抗体陽性群

*** anti-RNP Ab：抗 RNP 抗体陽性群

表 2. *STAT4* SNP rs7574865 と全身性強皮症との関連

	n	遺伝子型 n (%)			T アリル 頻度	アリル頻度の関連解析	
		G/G	T/G	T/T		オッズ比 (95% 信頼区間)	P 値
SSc	282	105 (37)	123 (44)	54 (19)	0.41	1.35 (1.10-1.66)	0.0046
dcSSc	142	58 (41)	56 (39)	28 (20)	0.39	1.26 (0.97-1.65)	0.084
lcSSc	140	47 (34)	67 (48)	26 (19)	0.43	1.44 (1.10-1.87)	0.0075
anti-topo I +*	88	39 (44)	34 (39)	15 (17)	0.36	1.11 (0.80-1.54)	0.53
ACA +**	87	23 (26)	49 (56)	15 (17)	0.45	1.62 (1.17-2.22)	0.0033
健常対照者	590	255 (43)	269 (46)	66 (11)	0.34		

lcSSc、ACA 陽性群に有意な関連が認められた。

* ATA + : 抗トポイソメラーゼ抗体陽性群

** ACA + : 抗セントロメア抗体陽性群

汎発性強皮症における血清 soluble VEGF2 型レセプター濃度の検討

研究分担者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野 教授
協力者 神人正寿 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野 講師

研究要旨

汎発性強皮症 (SSc) 患者 42 例、正常対照群 22 例を対象として、血清可溶性 VEGF2 型レセプター濃度を測定した。男性では患者群と対照群に差は見られなかったが、女性においては患者群で有意な血清濃度の上昇を認めた。血清濃度高値を示す患者群では limited cutaneous SSc が多く、肺線維症を伴わず毛細血管拡張を有する率が高かった。

A. 研究目的

汎発性強皮症の病因として、主に線維化、免疫異常、血管障害などのファクターが挙げられている。このうち血管障害はレイノー症状や爪上皮出血点、血管拡張、皮膚潰瘍、肺高血圧症を呈し、本症患者の quality of life に深くかかわる病態である。それらの共通の特徴は血管構造の維持の異常による血管の欠損と制御不能な再生であるが¹⁾、本症における血管障害の病態は不明であり今後明らかにする必要がある。

血管新生を最も強く誘導するサイトカインの一つが血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF)-A である。VEGF-A は 2 つの受容体 (VEGF receptor1; VEGF R1 および VEGFR2) に結合することが知られている。腫瘍形成や他の病態における血管増生など異常血管新生が関与する状態において VEGF-A/VEGFR2 シグナルは血管内皮細胞の増殖、遊走、生存、接着を刺激すると考えられる²⁾。一方 VEGFR1 は VEGF-A に対する結合能が VEGFR2 より強く、VEGF-A の VEGFR2 への結合を阻害し血管内皮細胞を不活性化する。

本症の病変部皮膚では VEGF-A および VEGFR2 の発現が増加しており、VEGF-A/VEGFR2 シグナルの持続的・制御不能の活性化が逆に血管の正常な形態形成を阻害していると考えられており、VEGF-A/VEGFR2 の本症の病態への関与が疑われる^{3,4)}。そこで我々は本症患者血清中の可溶性 VEGFR2 濃度を測定した。膜結合蛋白である full-length VEGFR2 の splice variant である可溶性 VEGFR2 濃度は細胞外蛋白であり、血清中に分泌される。Full-length VEGFR2 と可溶性 VEGFR2 の転写は通常比例するため、血清 VEGFR2 濃度は full-length VEGFR2 の全身での発現量を反映していると思われる。よって血清 VEGFR2 濃度は本症において診断あるいは病勢のマーカーになりうると予想される。

B. 研究方法

1) 対象

熊本大学病院皮膚科を受診した SSc 患者 42 例、強皮症関連病態患者 (SSD) 10 例および正常人 22 例を対象とした。SSc 患者のうち、10 例が男性、32 例が女性であり、diffuse type (dcSSc) が 22 例、lim-

ited type (lcSSc) が20例で、全例が American College of Rheumatology の強皮症診断基準を満たしていた。臨床所見および検査所見は血清の採取時に得たものを使用した。本研究は、Declaration of Helsinkiに基づき、倫理委員会の審査を経て、患者および正常人の同意を得て行った。

また、皮膚組織はSSc患者病変部より採取し、直後にホルマリン固定しパラフィンにて包埋した。

2) ELISA 法

血清可溶性 VEGFR2 値の測定には ELISA kit (R&D) を使用した。抗可溶性 VEGFR2 モノクローナル抗体が被覆されたプレートに血清を加えて反応させ、さらに酵素標識抗体溶液を加えて反応させる。酵素基質溶液を加えて発色させ、450 nm における吸光度を測定、標準曲線を作成し検体中の可溶性 VEGFR2 濃度を算出した。正常人の血清濃度の平均 +3SD 以上を有意な上昇と見なした。

3) RNA 抽出と quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

SSc 患者の皮膚組織からの Total RNA の抽出には RNeasy FFPE キット (Qiagen) を用いた。cDNA の合成には PrimeScript RT reagent キット (Takara) を使用した。Quantitative real-time PCR には Takara Thermal Cycler Dice (TP800) と SYBR Premix ExtaqII (Takara) を用いた。VEGF-A、VEGFR1、VEGFR2 および GAPDH プライマーは SA Bioscience より購入した。PCR は denaturation は 95°C 5 秒、annealing は 60°C で 30 秒の条件下で 50 サイクル行った。各遺伝子の発現は standard curve method を用い、GAPDH で補正した。

C. 研究結果

1) 血清可溶性 VEGFR2 値

図1に示す通り、血清可溶性 VEGFR2 値は SSc 患者では平均 4087 ± 2970 pg/ml、SSD 患者では 2239 ± 1662 pg/ml、正常対照群では 2104 ± 1916 pg/ml と SSc 患者で高値であったが有意ではなかった。しかし女性においては、SSc 患者の血清可溶性 VEGFR2 値は SSD 患者および正常人よりも優位に高値を示した (図2)。興味深いことに、lcSSc 患者では dxSSc 患者よりも血清可溶性 VEGFR2 値が有意に上昇しており、lcSSc 患者と SSD 患者間でも有意な差が見られたが、正常人と SSD 患者間では有意差が見られなかった。カットオフ値を 2479.8 pg/ml (女性正常人平均 $\pm 3SD$) とすると、SSc 患者の 75%、SSD 患者の 40% で血清可溶性 VEGFR2 値の上昇が見られた。

2) 皮膚組織中の VEGFR2 mRNA 濃度

次に、女性 SSc 患者において皮膚での VEGFR2 発現が血清可溶性 VEGFR2 値の上昇の原因となるかを検討した。血清可溶性 VEGFR2 濃度上昇例3例と正常例3例の皮膚組織から total RNA を抽出し、real-time PCR を施行したところ、血清可溶性 VEGFR2 濃度上昇例では皮膚組織中の total VEGFR2 (可溶性および full-length) mRNA の発現が有意に上昇していることがわかった (図3、4)。VEGF-A もわずかに上昇していたが有意ではなかった。よって、女性 SSc 患者においては皮膚での total VEGFR2 発現が血清可溶性 VEGFR2 値の上昇の原因となること、血清可溶性 VEGFR2 値は皮膚での total VEGFR2 発現を反映していること、さらには本症における VEGFR2 発現の上昇は転写レベルであることが確認された。

3) 女性 SSc 患者における血清可溶性 VEGFR2 濃度と臨床所見および検査所見との相関

Table 1 に女性 SSc 患者における血清可溶性

VEGFR2 濃度と臨床所見および検査所見のまとめを示す。まず、logistic regression test では血清可溶性 VEGFR2 濃度は皮膚硬化範囲、m-TSS 値、毛細血管拡張、肺病変、%VC 値、セントロメア抗体の頻度と相関した。これらは Fisher's exact probability test や student's-t test でも有意差が見られ、前述の lcSSc において dcSSc よりも血清可溶性 VEGFR2 濃度が上昇している結果と矛盾しないと思われた。一方、血清可溶性 VEGFR2 濃度と性差との相関は見られなかった。以上より、血清可溶性 VEGFR2 濃度上昇例では線維化よりも血管拡張などの血管障害が強く、血清可溶性 VEGFR2 濃度は本症女性患者における血管障害のマーカーになりうると考えられた。

しかし、このような結果は単に血清可溶性 VEGFR2 濃度が lcSSc で上昇しているために見られている可能性がある。よって、次に女性 dcSSc 患者で同様の検討を行った (Table2)。その結果、血清可溶性 VEGFR2 濃度上昇例での毛細血管拡張の高頻度はより有意であった。肺病変は同様に低頻度であったが、セントロメア抗体の頻度、%VC 値については有意ではなかった。以上より、女性患者では血清可溶性 VEGFR2 濃度が微小血管障害の指標になることが確認された。

D. 考案

本研究では、我々は3つの知見を得た。

(1) 女性 SSc 患者の血清可溶性 VEGFR2 値は SSD 患者および正常人よりも有意に高値を示した。また、lcSSc 患者では dcSSc 患者よりも血清可溶性 VEGFR2 値が有意に上昇していた。何故女性患者のみで有意差が見られたかは不明であるが、本症患者の男女差についてはいくつかの報告がある^{5,6)}。我々の結果はそれを裏付けていると思われる。特記すべ

きこととして、lcSSc 患者と SSD 患者間でも血清濃度に有意な差が見られた。SSD と lcSSc の鑑別は特に病初期は困難なことがあるが、SSD は SSc に移行する病態であるため、SSD 患者で経時的に血清可溶性 VEGFR2 値を測定することで早期診断に役立つ可能性がある。

(2) 血清可溶性 VEGFR2 値上昇例では皮膚組織での total KDR mRNA 濃度も上昇していた。よって女性患者においては硬化皮膚にて full-length および可溶性 VEGFR2 発現が上昇し、引き続いて血清中に可溶性 VEGFR2 が移行することが示唆される。VEGF-A もやや上昇傾向を示していたことから、本症患者において VEGF-A/VEGFR2 シグナルが活性化しており、病態に関与しているとする過去の報告を支持しているものと思われる。

(3) 女性患者での血清可溶性 VEGFR2 値上昇例では、血管病変が線維化病変よりも前面に出ていると考えられた。dcSSc と lcSSc はその病態の相違が報告されており、dcSSc では線維化病変が主体で、lcSSc では血管病変が主体であることという仮説も存在する⁷⁾。我々の結果はこれを裏付けていると考えられる。

E. 結論

血清可溶性 VEGFR2 値は特に女性患者において本症の診断および血管障害の指標となることが示唆された。本症における血管病変の機序は不明であるが、VEGF-A/VEGFR2 シグナルが大きく関与していると考えられる。

F. 文献

1. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M: Vascular Disease in Scleroderma: Angiogenesis and Vascul-

- lar Repair. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34: 73-9.
2. Shibuya M, Claesson-Welsh L: Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312: 549-60.
 3. Distler O, Distler JHW, Scheid A et al: Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 2004; 95: 109-16.
 4. Davies C, Jeziorska M, Freemont A et al: The differential expression of VEGF, VEGFR-2, and GLUT-1 proteins in disease subtypes of systemic sclerosis. *Hum Pathol* 2006; 37: 190-7.
 5. Hudson M, Thombs B, Baron M et al: Time to diagnosis in systemic sclerosis: is sex a factor? *Arthritis Rheum* 2009; 61: 274-8.
 6. Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O et al: Persistent down-regulation of Flil, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol* 2003; 163: 571-

81.

7. Campbell PM, LeRoy EC: Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Semin Arthritis Rheum* 1975; 4: 351-68.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Honda N, Makino K, Ogata A, Ihn H: Serum levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with systemic sclerosis. *Br. J. Dermatol.* In press.

2. 会発表

1. H22 年度強皮症研究会議

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

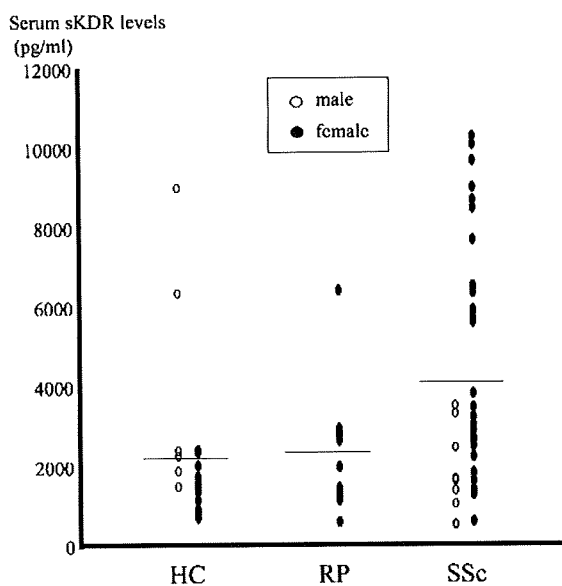


図1：SSc患者、SSD患者、および正常人における血清可溶性 VEGFR2 値。

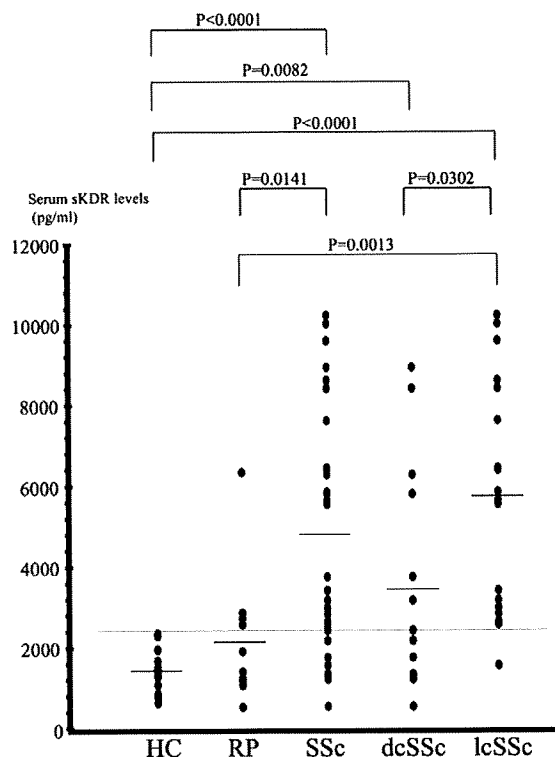


図2：女性 SSc 患者、SSD 患者、および正常人における血清可溶性 VEGFR2 値。

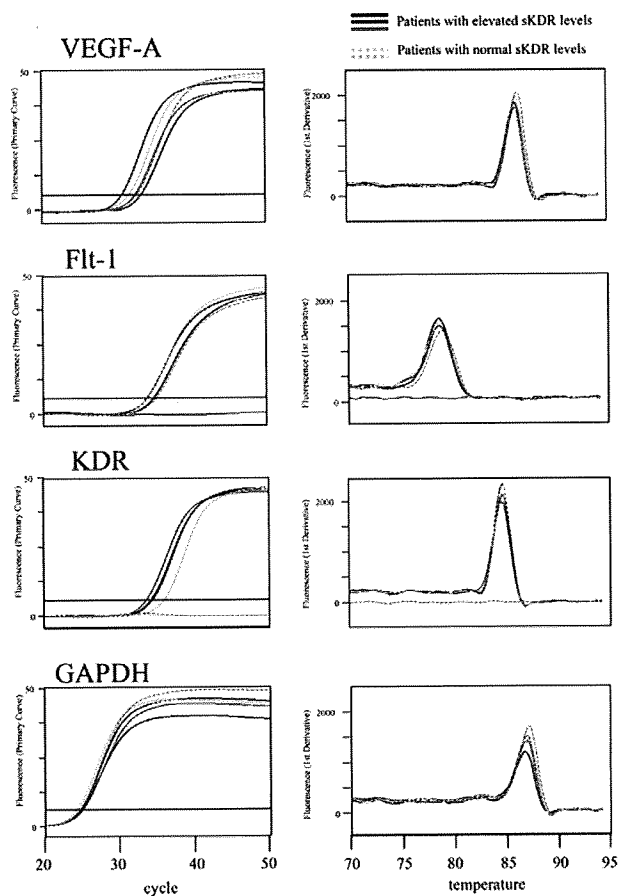


図3：quantitative real-time PCR の代表的な結果。

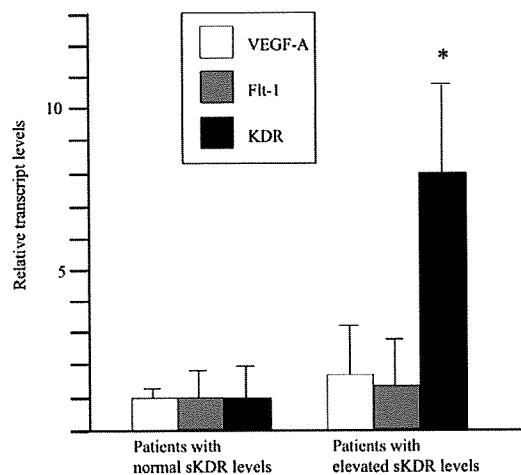


図4：GAPDH 濃度により補正した平均 VEGF-A、Flt-1 および KDR 濃度。