

Table 1. 女性強皮症患者における血清可溶性 VEGFR2 濃度と臨床症状・検査所見との相関

	Serum sKDR		Logistic regression analysis
	Patients with elevated sKDR levels (n = 24)	Patients with normal sKDR levels (n = 8)	
Age at the serum sampling (mean year, interquartile range)	55.5, 44.25–67.25	63.8, 61.25–68.75	0.341
Age at onset (mean year, interquartile range)	45.3, 34–60	57.8, 50.5–64.25	0.213
Duration of disease (year) (mean year, interquartile range)	8.4, 6.8–9.3	3.8, 3.3–3.8	0.151
Type (diffuse: limited)	7:17**	7:1	0.003
m-TSS (point)	6.9**	16.3	0.003
<b>A. CLINICAL FEATURES</b>			
Pitting scars/ulcers	54.1	75.0	0.616
Nailfold bleeding	57.9	66.7	0.683
Raynaud's phenomenon	100	100	
Telangiectasia	37.5*	0	0.042
Contracture of phalanges	90.5	100	0.580
Calcinosis	10.0	0	0.718
Diffuse pigmentation	7.1	37.5	0.133
Short SF	33.3	60.0	0.491
Sicca symptoms	21.1	37.5	0.360
<b>B. ORGAN INVOLVEMENT</b>			
Pulmonary fibrosis	21.7**	87.5	0.001
Mean %VC (%)	99.9*	79.6	0.033
Mean %DLco (%)	81.4	68.6	0.104
Pulmonary hypertension	28.2	30.9	0.547
Oesophagus	21.1	37.5	0.319
Heart	20.8	14.3	0.572
Kidney	0	0	
Joint	33.3	12.5	0.271
Thrombosis		0	0
<b>C. ANA SPECIFICITY</b>			
Anti-topoI	25.0	50.0	0.079
Anticentromere	54.2*	12.5	0.029
Anti-U1 RNP	16.7	25.0	0.405

Table 2. 女性 dcSSc 患者における血清可溶性 VEGFR2 濃度と臨床症状・検査所見との相関

	Serum sKDR		Logistic regression analysis
	Patients with elevated sKDR levels (n = 7)	Patients with normal sKDR levels (n = 7)	
m-TSS (point)	17.6	18.3	0.870
<b>D. CLINICAL FEATURES</b>			
Telangiectasia	71.4**	0	0.002
<b>E. ORGAN INVOLVEMENT</b>			
Pulmonary fibrosis	28.6**	100	0.002
Mean %VC (%)	101.4	79.6	0.102
<b>F. ANA SPECIFICITY</b>			
Anti-topoI	42.9	57.1	0.626
Anticentromere	57.1	14.3	0.109
Anti-U1 RNP	0	28.6	0.147

# 全身性強皮症における 血清 vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) 値の検討

研究分担者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚機能病態学分野 教授  
協力者 本多教稔 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚機能病態学分野 大学院生  
協力者 神人正寿 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚機能病態学分野 講師  
協力者 梶原一亨 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚機能病態学分野 大学院生  
協力者 牧野貴充 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚機能病態学分野 大学院生

## 研究要旨

全身性強皮症 (SSc) 患者 10 例、正常対照群 3 例を対象として、皮膚の Vascular Endothelial Growth Factor-D (VEGF-D) および VEGF3 型レセプター (VEGFR3 または Flt4) の mRNA の発現を検討した。SSc 患者で VEGF-D と VEGFR3 の mRNA が有意に上昇していた。次に SSc 患者 44 例、正常対照群 15 例を対象として、血清 VEGF-D 値を測定した。強皮症患者群と対照群に有意差は見られなかった。血清濃度高値を示す患者群では潰瘍を有する率が高かった。

## A. 研究目的

全身性強皮症 (SSc) は線維化、免疫異常、血管障害を特徴とする多臓器障害である。微小循環障害により、レイノー症状、指尖虫喰状癬痕、皮膚潰瘍、爪上皮出血点、肺高血圧症等を呈し、本症患者の quality of life に深くかかわる病態である。Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) は内皮細胞より分泌され、血管やリンパ管の増生の重要な因子である。VEGF family の一つである VEGF-A は血管新生や血管病変のマーカーとして知られている<sup>1)</sup>。SSc での VEGF-A の関与はすでに検討されている。VEGF-A およびその受容体である VEGFR2 の発現は SSc の皮膚病変部において増加しており、その病態に関与していると考えられている<sup>2)</sup>。

VEGF-C と VEGF-D はリンパ管新生を刺激する

成長因子として知られている<sup>1)</sup>。また、VEGF-C および VEGF-D は悪性腫瘍のリンパ節転移に関与しているとの報告もある<sup>3)</sup>。SSc においては血清 VEGF-C が正常対照例に比べ有意に上昇しているという報告があるが、VEGF-D に関しては調べた限り検討されていない<sup>4)</sup>。

そこで我々は SSc 患者における血清 VEGF-D の濃度をし、リンパ管異常が本病態に関与している可能性を検討した。

## 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 44 例、SLE 患者 10 例、強皮症関連病態患者 (SSD) 10 例 および正常人 15 例を対象とした。SSc 患者のうち、

8例が男性、36例が女性であり、diffuse type (dcSSc) が18例、limited type (lcSSc) が26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) 皮膚組織の D2-40 染色

D2-40 染色はSSc患者病変部および正常人皮膚のパラフィン切片 (5  $\mu\text{m}$ ) を用いて行った。

## 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-D、VEGFR3 はタカラバイオ株式会社より、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。

## 4) ELISA 法

血清 VEGF-D 値の測定には ELISA kit (R&D) を使用した。VEGF-D 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 VEGF-D 濃度を算出した。

## C. 研究結果

### 1) 皮膚組織中のリンパ管数

まず、SSc患者での皮膚でリンパ管の変化を検討した。SSc患者3例、正常対照群3例の皮膚組織を D2-40 で染色した (図1)。SSc患者、正常対照群それぞれを 400 倍・5 視野におけるリンパ管の数を比較した。その結果、図2に示すように強皮症で有意にリンパ管の数が減少していた (図2)。

### 2) 皮膚組織中の VEGF-D、VEGFR3 mRNA 濃度

次に、SSc患者において皮膚局所での VEGF-D および VEGFR3 の発現を検討した。SSc患者10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、SSc患者では皮膚組織中の VEGF-D および VEGFR3 mRNA の発現が有意に上昇していることがわかった (図3)。

### 3) 血清 VEGF-D 値

図4に示す通り、血清 VEGF-D 値は dcSSc患者では平均  $737.9 \pm 357.0$  pg/ml、lcSSc患者では  $759.6 \pm 462.6$  pg/ml、SLE患者では  $715.7 \pm 439.1$  pg/ml、SSD患者では  $720.31 \pm 492.0$  pg/ml、正常対照群では  $836.6 \pm 537.8$  pg/ml と各群の間に有意な差は認めなかった。

### 4) SSc患者における血清 VEGF-D 濃度と臨床所見および検査所見との相関

Table 1 に SSc患者における血清 VEGF-D 濃度と臨床所見および検査所見のまとめを示す。SSc患者44例中血清濃度の上位22例を上昇群、下位22例を非上昇群と分けたところ、2群に  $\chi^2$  test にて血清 VEGF-D 濃度上昇例で皮膚潰瘍が有意に増加していた。その他の臨床所見と相関は認めなかった。

## D. 考案

本研究では、我々は3つの知見を得た。

1) 皮膚組織のリンパ管の数を比較した結果強皮症で有意にリンパ管の数が減少していた。

2) 皮膚での VEGF-D および VEGFR3 の mRNA レベルは強皮症群で有意に上昇していた。

SSc 皮膚においてリンパ管数が減少しているが VEGF-D 及び VEGFR3 の mRNA が上昇していることについて以下の2つの可能性が考えられる。SSc 皮膚で VEGF-A および VEGFR2 の発現が増加しており、それが血管の正常な形態形成を阻害しているが<sup>5)</sup>、リンパ管においても同様に VEGFD および VEGFR3 の発現が増加しているためリンパ管形成に阻害をきたし、SSc 皮膚でリンパ管が減少している可能性がある。また、リンパ管が減少しているため、リンパ管新生のため VEGF-D および VEGFR3 の mRNA レベルが上昇している可能性も考えられる。

3) 血清 VEGF-D 値の上昇例は潰瘍が有意に増加していた。

原因として、皮膚リンパ管の異常が潰瘍形成の一因である可能性が考えられた。また、創傷治癒過程において fibroblast や内皮細胞から VEGF-D がより多く産生されている可能性が考えられる<sup>6)</sup>。

## E. 結 論

血清中あるいは局所の VEGF-D および VEGFR3 シグナルは強皮症の病態に関与している可能性が考えられた。

## F. 文 献

1. Marc G Achen, Steven A Stacker : The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol* 1998; 79: 255-65.

2. 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.

3. Jingyu D, Han L, Dan S, Yi P, Baogui W, Yuhong G: Vascular endothelial growth factor-D is correlated with hepatic metastasis from gastric cancer after radical gastrectomy. *Surgery* 2009; 146: 896-905.

4. S. Chitale S, Al-Mowallad A F, Wang Q, Kumar S, Herrick A : High circulating levels of VEGF-C suggest abnormal lymphangiogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008; 47: 1727-8.

5. 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.

6. S. Trompezinski S, Berthier-Vergens O, Denis A, Schmitt D, Viac J : Comparative expression of vascular endothelial growth factor family members, VEGF-B, -C and-D, by normal human keratinocytes and fibroblasts. *Exp Dermatol* 2004; 13: 98-105

## 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

・D2-40

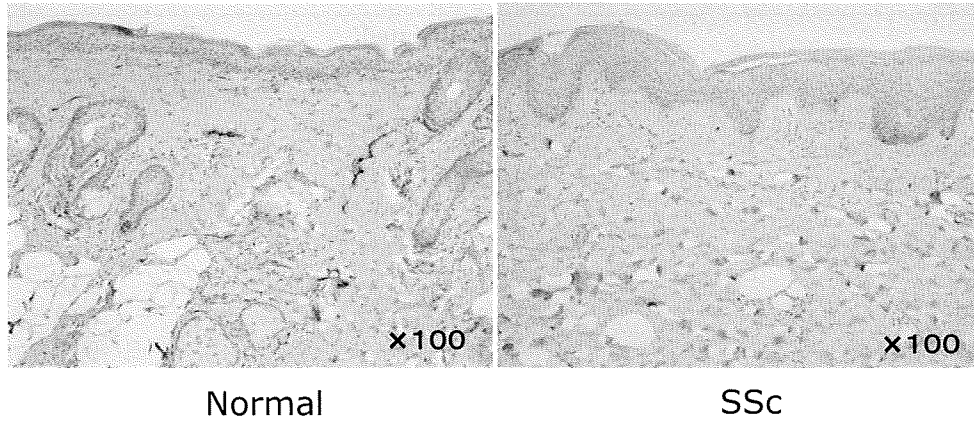


図1：SSc患者、正常人における皮膚組織のD2-40染色

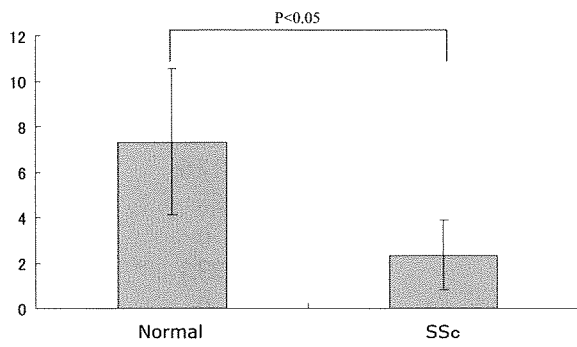


図2：SSc患者、正常人におけるリンパ管数の比較

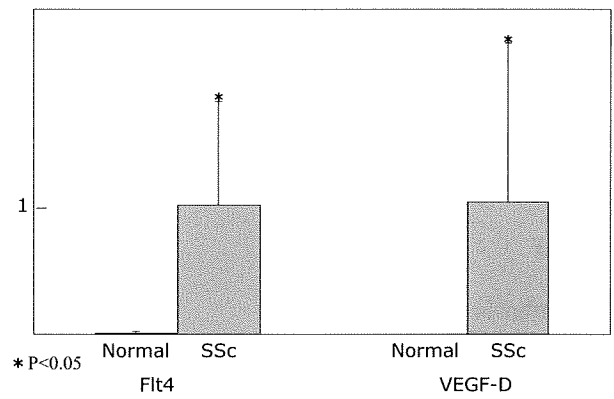


図3：GAPDH濃度により補正した平均 VEGF-D および VEGFR3 濃度

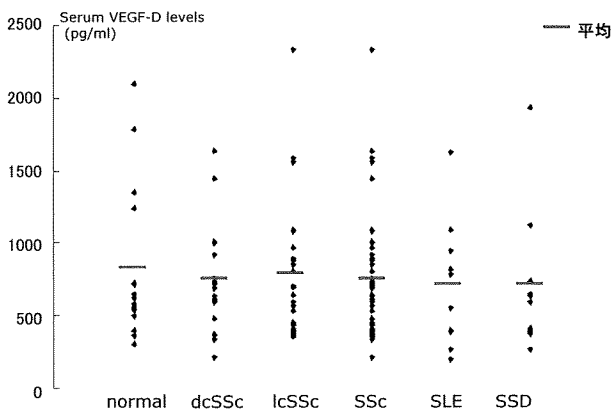


図4：SSc患者、SLE患者、SSD患者、および正常人における血清 VEGF-D 値

Table 1. 強皮症患者における血清 VEGF-D 濃度と臨床症状・検査所見との相関

Serum VEGF-D		
	Patients with elevated VEGF-D levels (n = 22)	Patients with normal VEGF-D levels (n = 22)
Mean age at onset (years)	52.5	49.9
Duration of disease (year)	7.19	6.12
Type (diffuse: limited)	10:12	8:14
m-TSS (point)	11.8	9.15
<b>CLINICAL FEATURES</b>		
Ulcers	47.1*	15.8
Nailfold bleeding	56.3	63.2
Raynoud's phenomenon	94.4	94.7
Telangiectagia	36.8	13.3
Contracture of phalanges	94.1	83.3
Calcinosis	10	0
Diffuse pigmentation	36.4	20
Short SF	75	73.3
Sicca symptoms	53.5	63.6
<b>ORGAN INVOLVEMENT</b>		
Pulmonary fibrosis	31.6	47.6
Mean %VC (%)	96.1	99.4
Mean %DLco (%)	79.3	89.7
Pulmonary hypertension	57.9	61.9
Oesophagus	30	17.6
Heart	33.3	25
Kidney	0	0
Joint	70	33.3
Thrombosis	0	0
<b>ANA SPECIFICITY</b>		
Anti-topoI	20	22.7
Anticentromere	70	22.7
Anti-U1 RNP	15	9

# 全身性強皮症における血清 CXCL16 値は皮膚硬化の重症度と相関する

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 築場広一 東京慈恵会医科大学皮膚科学 助教

## 研究要旨

全身性強皮症 89 例の血清 CXCL16 値を ELISA にて測定し経時的に検討した。全身性強皮症の CXCL16 値は健常人、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎と比較して高く、特に diffuse 型で高値を示した。また CXCL16 値は皮膚硬化の程度と有意な相関が見られた。以上から CXCL16 は全身性強皮症の線維化に重要な役割を果たしていると考えられた。

## A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) は全身性自己免疫を背景にして皮膚や肺などの線維化と血管障害を引き起こす。その病因は不明であるが、SSc における皮膚や肺の病変部には単核球をはじめとした炎症細胞浸潤がみられており、さらに単核球浸潤の程度と皮膚線維化との間に相関が見られる<sup>1,2)</sup>。これらの細胞が産生するサイトカインや成長因子が病態へ関与している可能性がある。今回我々は SSc 患者における血清 CXCL16 値を測定し、その病態への関与を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象患者

対象患者は SSc 89 例 (女性 76 例、男性 13 例) であり、年齢は 9-76 歳 (平均 47 歳) であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 37 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 52 例であった。自己抗体別では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 30 例、抗 RNA ポ

リメラーゼ抗体陽性例が 9 例、抗 U1-RNP 抗体陽性例が 2 例、抗 U3-RNP 抗体陽性例が 1 例、抗 Th/To 抗体陽性例が 1 例、特異抗体陰性例が 10 例であった。コントロールとして健常人 42 例、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 患者 30 例、皮膚筋炎 (dermatomyositis: DM) 患者 25 例について検討した。本研究を行うにあたり、全ての患者からインフォームドコンセントを得た上で施行した。

### 2. ELISA

血清 CXCL16 値は市販されている ELISA キットを用いて測定した (CXCL16 kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)。

## C. 研究結果

### 1. 初診時における血清 CXCL16 値

我々はまず初診時における血清 CXCL16 値について検討した (図 1)。SSc における血清 CXCL16 値は、健常人と比較して有意に高値であった。SLE、DM における CXCL16 値も健常人に比べて高値を

示していた。SScのサブタイプ別では血清dSScにおいて、ISSc、健常人と比較して有意に高値であった。ISScは健常人と比べて有意にCXCL16値の高値を示していた。

## 2. SScにおける血清CXCL16値と臨床症状との相関

健常人におけるCXCL16の平均値+2SDをカットオフ値(3.19 ng/ml)とし、上昇群と非上昇群での臨床症状との相関を検討した(表)。CXCL16値はSSc患者において38%(34/89)で上昇していた。CXCL16上昇群では非上昇群に比べて有意にdSScの割合が高く、逆にISScである割合が低かった。この結果と一致して、CXCL16上昇群では非上昇群に比べて有意にmodified Rodnan total skin score(TSS)が高値を示していた。さらにCXCL16値とTSSとの相関を調べたところ有意に正の相関が見られた(図2)。以上よりSScにおいて血清CXCL16値は皮膚硬化の程度と相関することが分かった。

## D. 考案

SScにおいて血清CXCL16値が検討されたのは今回の我々の研究が初めてである。CXCL16値はISSc、健常人に比べdSScにおいて有意に上昇していた。CXCL16値は皮膚硬化の重症度と相関が見られた。以上よりCXCL16はSScにおける線維化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

CXCL16は表皮角化細胞や真皮血管周囲に浸潤した単核球での発現が確認されており、さらにCXCL16の表皮角化細胞における発現はToll-like receptor(TLR)2、3の刺激により亢進することが報告されている<sup>3)</sup>。興味深いことに、TLR2、4を刺激することが知られているヒアルロン酸の血清中での値はSScにおいて高値を示すことが報告されている<sup>4)</sup>。それゆえに、血清中でのSScにおける

CXCL16値の上昇はヒアルロン酸値の上昇に起因している可能性がある。さらには、CXCL16のリガンドであるCXCR6は真皮乳頭層の血管周囲に浸潤している活性化T細胞に強い発現が見られる<sup>5)</sup>。このことから、SScの病態において、TLRを介した刺激によりCXCL16の表皮角化細胞における産生が亢進し、皮膚に活性化したT細胞の浸潤が誘導され、結果として皮膚硬化が生じる可能性がある。

## E. 結論

血清CXCL16値はSScにおける皮膚硬化の重症度を反映すると考えられた。さらにCXCL16に対する抑制療法がSScの早期の皮膚硬化に対して有効である可能性が示唆された。

## F. 文献

1. Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JRT, et al. Cellular infiltrates of scleroderma skin. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 975-84.
2. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA Jr, et al. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 645-53.
3. Toyama M, Sayama K, Komatsuzawa H, et al. CXCL16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. *Int Immunol* 2007; 19: 1095-102.
4. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, et al. Clinical significance of serum hyaluronan levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J Rheumatol* 2008; 35: 1825-9.
5. Scholoz F, Schulte A, Adamski F, et al. Consti-



tutive expression and regulated release of the transmembrane chemokine CXCL16 in human and murine skin. J Invest Dermatol 2007; 127: 1444-55.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yanaba K, Muroi E, Yoshizaki A, Hara T, Ogasawa F, Yozaki M, Hasegawa M, Fujimoto M,

Takehara K, Sato S: Serum CXCL16 levels correlate with the extent of skin sclerosis in patients with systemic sclerosis, J Rheumatology, 36; 1917-23, 2009.

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

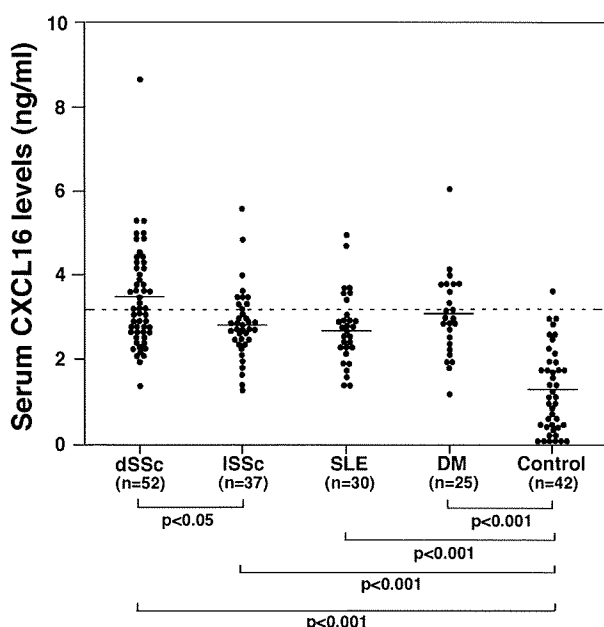


図1：dSSc、ISSc、全身性エリテマトーデス（SLE）、皮膚筋炎（DM）、健常人（CTL）における血清CXCL16値。破線はカットオフ値（健常人群の平均+2SD）を示す。

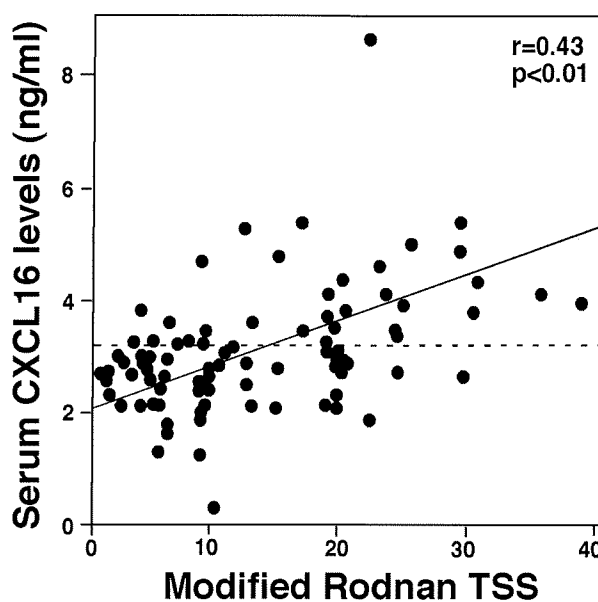


図2：血清CXCL16値と modified Rodnan total skin score (TSS) との相関。破線はカットオフ値（健常人群の平均+2SD）を示す。

表. Clinical and laboratory of in patients with SSc showing elevated serum CXCL16 levels.

	Elevated CXCL16 n = 34	Normal CXCL16 n = 55
Age at onset, yrs, mean $\pm$ SD	49 $\pm$ 13	45 $\pm$ 17
Male : Female	10: 24**	3: 52
Duration, yrs, mean $\pm$ SD	3.3 $\pm$ 5.0	3.5 $\pm$ 6.6
TSS, points, mean $\pm$ SD	16.6 $\pm$ 10.6**	10.6 $\pm$ 7.2
Clinical features %		
dSSc	73**	48
lSSc	26**	52
Pitting scars/ulcers	29	35
Contracture of phalanges	44	39
Diffuse pigmentation	50	44
Telangiectasia	30	44
Calcinosis	6	8
Organ involvement %		
Pulmonary fibrosis	41	52
Decreased %VC	25	19
Decreased %DLco	66	58
Pulmonary hypertension	10	13
Esophagus	58	72
Heart	6	13
Kidney	2	0
Joint	12	22
Muscle	9	22
Laboratory findings %		
Anti-topo I Ab	47	37
Anticentromere Ab	24*	41
Anti-RNAP Ab	18*	6
Increased IgG	27	31
Elevated ESR	47	45
Elevated CRP	6	14

ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein.

Unless noted otherwise, values are percentages. Patient numbers are given in parentheses.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus SSc patients with normal serum CXCL16 levels.

## 汎発性強皮症における血清 soluble CD163 濃度の検討

研究分担者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学部皮膚病態治療再建学 教授  
協力者 中山若菜 熊本大学大学院生命科学部皮膚病態治療再建学 医員  
協力者 神人正寿 熊本大学大学院生命科学部皮膚病態治療再建学 講師  
協力者 牧野貴充 熊本大学大学院生命科学部皮膚病態治療再建学 大学院生  
協力者 梶原一亨 熊本大学大学院生命科学部皮膚病態治療再建学 大学院生

### 研究要旨

汎発性強皮症 (SSc) 患者 43 例、レイノー患者 5 例、正常対照群 12 例を対象として、血清可溶性 CD163 濃度を測定した。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発症から初診までの期間が有意に短く、肺拡散能が有意に低く、右室収縮期圧が高値を取る傾向を認めた。

### A. 研究目的

汎発性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は、血管障害や免疫異常、炎症などにより線維芽細胞の活性化を引き起こし、主にコラーゲンなどの細胞外基質の代謝に異常をきたす結合組織疾患である。しかしながら、SSc の病因は未だ解明されていない。SSc 患者の血清中では IL-4、IL-10、および IL-13 が増加しており、マクロファージの活性化も報告されている。マクロファージは M1 マクロファージと M2 マクロファージに分類される。M1 マクロファージは INF- $\gamma$  などの刺激により分化し、主に IL-12、IL-23、IL-10 を発現しており、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインを産生している。M2 マクロファージは主に組織中に存在し、IL-4、IL-10、IL-13 などの刺激により単球から分化する。抗炎症サイトカインであり、線維化誘導因子である TGF- $\beta$  や IL-10、MMP9 を産生する<sup>1)</sup>。さらに M2 マクロファージは CD163、CD204、および CD206 を発現し、血管新生や創傷治癒に関与している<sup>2)</sup>。CD163 は膜結合蛋白

であり、M2 マクロファージの分化抗原の一つと考えられている。その機能としてはヘモグロビン/ハプトグロビン複合体に特異的に結合し、マクロファージ内に取り込み、ヘムを鉄とビリルビンへ変換することが知られているが、これまで強皮症など線維化疾患への関与の有無は不明である。CD163 は血清中では可溶性の形態をとっていることが証明されており、可溶性 CD163 は膜結合型 CD163 から切断されて血清中に分泌されるため、可溶性 CD163 の血中濃度は膜結合型 CD163 の発現量を反映していると考えられる<sup>3)</sup>。今回我々は、SSc 患者における可溶性 CD163 の血中濃度を測定し、臨床症状および検査所見などの相関を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 対象患者

熊本大学病院皮膚科を受診した SSc 患者 43 例、強皮症関連病態患者 (SSD) 5 例および正常人 12 例を対象とした。SSc 患者のうち、7 例が男性、36 例

が女性であり、diffuse type (dcSSc) が 23 例、limited 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。

## 2) ELISA 法

血清可溶性 CD163 値の測定には ELISA kit (R&D) を使用した。抗可溶性 CD163 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 CD163 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。

## C. 研究結果

### 1) 血清可溶性 CD163 値

図 1 に示す通り、血清可溶性 CD163 値は SSc 患者では平均 85.71 ng/ml、lcSSc 患者では 78.88 ng/ml、dcSSc 患者では 93.56 ng/ml、SSD 患者では 74.76 ng/ml、正常対照群では 57.79 ng/ml と SSc 患者で有意に高値であった。

### 2) SSc 患者における血清可溶性 CD163 濃度と臨床所見および検査所見との相関

Table 1 に SSc 患者における血清可溶性 CD163 濃度と臨床所見および検査所見のまとめを示す。Fisher's exact probability test や student's-t test で血清可溶性 CD163 濃度上昇例では、発症から初診までの期間が有意に短く、肺拡散能が有意に低下し、右室収縮期圧が高値を取る傾向を認めた。以上より、血清可溶性 CD163 濃度上昇例では、より重症である可

能性があり、肺高血圧症を認める症例が多いと考えられた。

## D. 考案

今回の研究で SSc 患者の血清可溶性 CD163 値が健常人と比較して有意に上昇していることが確認できた。

CD163 は、M2 マクロファージ上の膜結合型と血清中可溶性の両方の形態で検出され、どちらの形態が生物学的機能を持っているのかは明らかになっていない。また、可溶性 CD163 が膜結合型のデコイとなる可能性がある。しかし、これまで SSc 患者ではマクロファージの活性化が報告されており、今回の結果からも、特に本症に合併する肺高血圧症の病態に CD163、および M2 マクロファージが関与している可能性が示唆された。この結果は、肺高血圧症の発症に、マクロファージが関与している<sup>4,5)</sup>という過去の報告を裏付けている。CD163/M2 マクロファージを抑制することで肺高血圧症の新しい治療につながる可能性があると考えられる。

さらに、可溶性 CD163 を経時的に測定することにより肺高血圧症のマーカーとなりえると考えられる。

## E. 結論

血清可溶性 CD163 は SSc 患者において上昇し特に、肺高血圧症の病態に関与している可能性が示唆された。

## F. 文献

1. Raes G et al. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 2007, 19: 454-9
2. 池田栄二：慢性関節リウマチ滑膜における血管

新生因子. 病理と臨床 17(7) : 1999、706-710

3. T.H. Sulahian, Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids, J Immunol. Methods 252 (2001) 25-31.
4. 谷野功典：モノクロタリン (monocrotaline) 誘発肺高血圧動物モデル. 日本臨床 59(6) : 2001-6、1076-80
5. 森崎裕子：肺動脈高血圧症の遺伝子異常と発症のメカニズム. 分子心血管病 9(4) : 2008、247-54

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

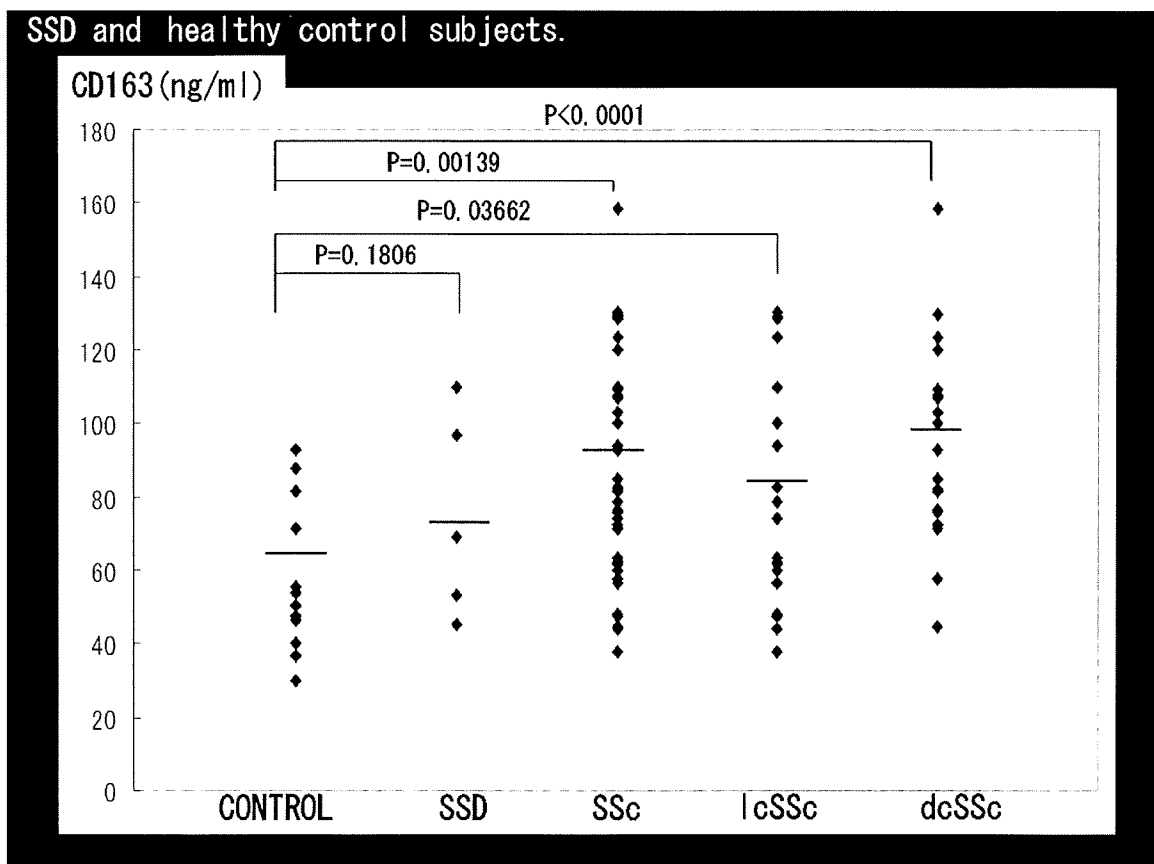


図1：SSc患者、SSD患者、および正常人における血清可溶性CD163値

表 1. 強皮症患者における、血清可溶性 CD163 濃度と臨床症状・検査所見との検討

	Serum CD163	
	Patients with elevated sCD163 levels (n = 8)	Patients with normal sCD163 levels (n = 35)
Age at the serum sampling (mean year)	66.9	55.0
Age at onset (mean year)	65.0	44.8
Duration of disease (month) (mean month)	23.6*	88.1
Type (diffuse : limited)	4 : 3	16 : 19
m-TSS (point)	11.7	11.2
A. CLINICAL FEATURES		
Pitting scars/ulcers	60.0	38.2
Nailfold bleeding	50.0	53.6
Raynoud's phenomenon	100	87.9
Telangiectagia	33.0	23.3
Contracture of phalanges	100.0	85.7
Calcinosis	33.3	0
Diffuse pigmentation	100	22.7
Short SF	75.0	75.0
Sicca symptoms	60.0	52.4
B. ORGAN INVOLVEMENT		
Pulmonary fibrosis	28.6	37.5
Mean % VC (%)	94.9	102.8
Mean % DL <sub>CO</sub> (%)	73.2*	86.6
Pulmonary hypertension	71.4	28.6
Oesophagus	14.3	24.1
Heart	57.2	26.5
Kidney	0	0
Joint	60.0	52.6
Thrombosis	0	0
C. ANA SPECIFICITY		
Anti-topol	25.0	32.2
Anticentromere	62.5	46.4
Anti-U1 RNP	37.5	14.3

## 全身性強皮症患者血清における血管新生因子の検討

分担研究者 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 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

### 研究要旨

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。Angiogenin、Angiopoietin-1 および Angiopoietin-2 は血管構造の恒常性維持に重要であり、主に脈管形成・血管新生に関与している。しかし、SScにおいてこれらの血管新生因子の役割を検討した報告は少ない。SSc 患者 53 例で血清中の Angiogenin、Angiopoietin-1 および Angiopoietin-2 濃度を測定したところ、Angiogenin は SSc 患者の 23% 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、Angiogenin 高値群は高いスキンスコアを有し、Angiogenin 濃度とスキンスコアは正の相関を示したが、肺線維症を有する頻度は Angiogenin 正常群と同じだった。発症早期群とそれ以外の群における検討では、血清 Angiogenin 濃度は発症早期群で有意に高値だった。以上の結果から、Angiogenin は発症早期の皮膚の線維化に関与している可能性が示唆された。Angiopoietin-1 も Angiogenin と同様 diffuse 型では limited 型に比べ有意に高値だったが、特定の臨床症状とは相関していなかった。一方、Angiopoietin-2 は SSc 患者では上昇していなかった。以上の結果から、Angiogenin は SSc の早期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 Angiogenin の関与が異なっている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

Angiopoietin は、造血幹細胞および血管内皮細胞に発現している Tie2 受容体（受容体型チロシンキナーゼ）のリガンドとして同定された。現在までに 4 種類の Angiogenin が同定されている。Angiogenin-1 は血管周囲の細胞壁や一部の間葉系細胞に発現しているが、Angiogenin-2 は血管新生部位の血管内皮細胞と間葉系細胞に局限して発現している<sup>1)</sup>。一方、Angiogenin は 183 アミノ酸から構成されるタ

ンパク質で強力な血管新生作用し、しばしば悪性腫瘍組織中に検出され、悪性腫瘍の転移に深く関与していることが報告されている<sup>2)</sup>。

一方、関節リウマチをはじめとする膠原病においても、これらの血管新生因子がその病態形成に関与していることが報告されている<sup>3)</sup>。しかしながら、これまでの血管新生因子のリウマチ性疾患における役割についての報告の多くは VEGF に関するものであり、VEGF 以外の血管新生因子に関する検討とし

ては、関節リウマチの滑膜病変における血管新生には angiopoietin-Tie システムが重要とする報告がある<sup>4)</sup>。

全身性強皮症 (Systemic sclerosis: SSc) は皮膚および内臓諸臓器に線維化が生じることが特徴であるが、血流不全を背景とした循環障害による指尖潰瘍も代表的な症状である。SSc では血管新生が不十分で脈管新生も欠如していることが報告されており、血管新生因子が重要な役割を担っていると考えられている<sup>5)</sup>。しかし、SSc において血清中の Angiogenin、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2 濃度を測定した報告はない。

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 Angiogenin、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2 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) Angiogenin、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2 の測定

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

### 3) 血清 Angiogenin 濃度と臨床症状の相関

SSc 患者を血清 Angiogenin 濃度により高値群と正常群に分類し、臨床症状や臨床検査成績を比較した。また、発症 2 年以内を基準に患者を早期群とそれ以外に分類し、血清 Angiogenin 濃度を比較した。

### 4) 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 Angiogenin、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2 濃度

血清 Angiogenin 濃度は、dSSc 患者群 (平均 399 ng/ml [range 188-682]) では lSSc 患者群 (平均 288 ng/ml [range 115-546])、SLE 患者群 (平均 282 ng/ml [range 154-501])、コントロール群 (median 304 ng/ml [range 185-438]) と比較して有意に上昇していた (図 1)。血清 Angiopoietin-1 濃度も Angiogenin と同様、dSSc 患者群 (平均 39 ng/ml [range 9-72]) では lSSc 患者群 (平均 31 ng/ml [range 14-55])、SLE 患者群 (平均 29 ng/ml [range 17-48])、コントロール群 (median 28 ng/ml [range 3-52]) と比較して有意に上昇していた (図 1)。一方、Angiopoietin-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 (図 1)。

### 2) 血清 Angiogenin 濃度と臨床症状

SSc 患者を血清 Angiogenin 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



Angiogenin 濃度は 23% (53 例中 12 例) で上昇していた。dSSc 患者では 36% (28 例中 10 例)、ISSc 患者では 9% (23 例中 2 例) で上昇していた。Angiogenin 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、血清 Angiogenin 濃度とスキン・スコアは正の相関を示した (図 2)。臓器症状との関連では、Angiogenin 高値群では筋症状を示す頻度が高かったが、皮膚硬化とは異なり肺線維症の頻度は高値群と正常群で差はなかった。Angiogenin 高値群では抗セントロメア抗体陽性例は認めなかった。一方、患者群を発症 2 年以内の早期例とそれ以外の群に分類して Angiogenin 濃度を検討したところ、発症早期群 (平均 568 ng/ml [range 454-682]) ではそれ以外の群 (平均 287 ng/ml [range 115-430]) に比べ有意に高値だった (図 3)。これらの結果から、Angiogenin は皮膚の線維化に関連していることが示唆された。

### 3) 血清 Angiopoietin-1 濃度と臨床症状

SSc 患者を血清 Angiopoietin-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 Angiopoietin-1 濃度が上昇していたのは 4% (53 例中 3 例) のみで、dSSc 患者では 7% (28 例中 2 例)、ISSc 患者では 4% (23 例中 1 例) だった。Angiopoietin-1 高値群と正常群で臨床症状に差は認めなかった。

## D. 考 案

今回の研究で、dSSc 患者において血清 Angiogenin 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。Angiogenin を含む血管新生因子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、関節リウマチをはじめとする自己免疫疾患にお

いてもこれらの因子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 Angiogenin 濃度が有意に高値を示したのも、Angiogenin の dSSc への関与を示唆するものであると考えられる。

血清 Angiogenin 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。Angiogenin 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有する傾向があった。しかし、Angiogenin 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、患者を発症 2 年以内の早期群とそれ以外の群に分けて検討したところ、血清 Angiogenin 濃度は発症早期群で高値を示した。このことは、Angiogenin は早期の皮膚の線維化に深く関与してい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 Angiogenin の役割が異なっていることが考えられた。

Angiogenin と同様、Angiopoietin-1 も dSSc では ISSc、SLE より高値であった。しかし、Angiopoietin-1 はスキンスコアと相関せず、肺線維症とも関連はなかった。一方、Angiopoietin-2 は SSc では上昇していなかった。Angiopoietin-1 と -2 の比 (Ang-1/Angi-2) は dSSc と ISSc で差はなく、皮膚硬化を含め特定の臓器症状との相関もなかった。これらの結果から、Angiopoietin は -1 と -2 で強皮症の病態形成における役割が異なっている可能性が示唆された。

関節リウマチにおいて、関節腔内に存在する線維芽細胞が Angiogenin の産生源であることが報告されており、浸潤しているマクロファージがその生成に関与している可能性がある<sup>6)</sup>。SSc でも皮膚の線維

化にマクロファージが重要な役割を果たしていると考えられており、SScでも関節リウマチと同様の機序が働いている可能性があるが、本研究ではAngiogeninの皮膚線維芽細胞への直接的な影響は検討できていないため、今後さらなる検討が必要である。

## E. 結 論

SScにおいて、Angiogeninは初期の皮膚硬化に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。

## F. 文 献

1. Morisada T, Kubota Y, Urano T et al. Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothelium* 2006; 13: 71-9.
2. Bertolini F, Paolucci M, Peccatori F et al. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1999; 106: 504-9.
3. Maruotti N, Cantatore FP, Crivellato E et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histology and histopathology* 2006; 21: 557-66.

4. Takahara K, Iioka T, Furukawa K et al. Auto-crine/paracrine role of the angiopoietin-1 and -2/Tie2 system in cell proliferation and chemotaxis of cultured fibroblastic synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Hum Pathol* 2004; 35: 150-8.
5. Distler JH, Gay S, Distler O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45 Suppl 3: iii26-7.
6. Liote F, Champy R, Moenner M et al. Elevated angiogenin levels in synovial fluid from patients with inflammatory arthritis and secretion of angiogenin by cultured synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 163-8.

## 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

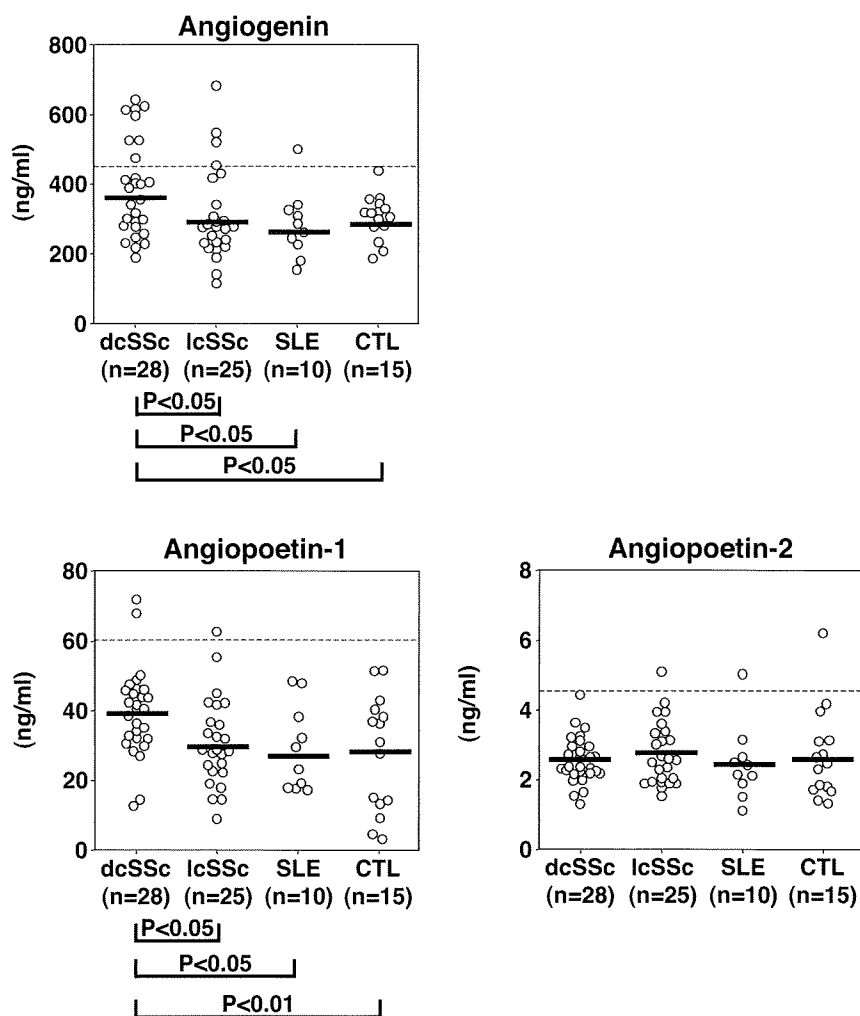


図1：ELISA 法により測定した dcSSc、lcSSc、SLE および健常コントロール群（CTL）における血清 Angiogenin、Angiopoietin-1 および Angiopoietin-2 濃度。点線は健常人の平均値 + 2SD に設定したカットオフ値を示す。

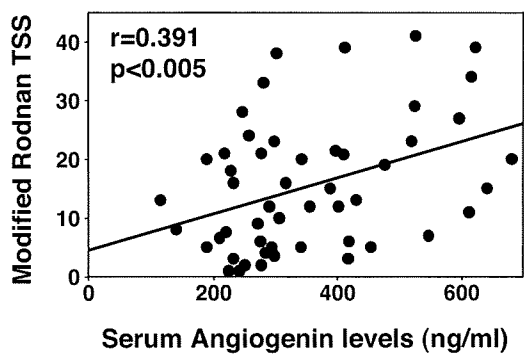


図2：ELISA 法により測定した血清 Angiogenin 濃度とスキンスコアの相関関係。

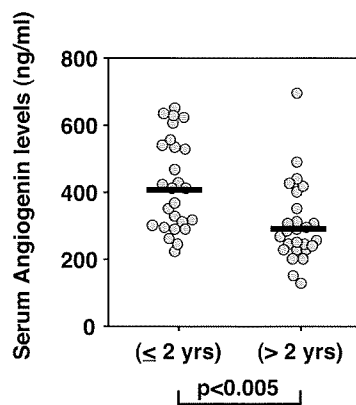


図3：SSc 患者を発症2年以内の群とそれ以外の群に分類した時の血清 Angiogenin 濃度の比較。

表 1. SSc における血清 Angiogenin 濃度と臨床所見との相関\*

	血清 Angiogenin 濃度 上昇群 (n=12)	血清 Angiogenin 濃度 正常群 (n=41)
発症年齢、年、mean ± SD	47 (15-62)	44 (13-76)
性別 (女性 / 男性)	8/4	33/7
罹病期間、年、mean ± SD	2.6 (0.4-13)	4.6 (0.2-33)
病型、(dSSc/ISSc)	10/2 †	20/21
modified Rodnan TSS の平均値 (range)	23 (5-41) ‡	13 (1-39)
臨床所見		
指尖部虫喰い状癒痕・潰瘍	33	34
手指屈曲拘縮	58	34
びまん性色素沈着	75	46
毛細血管拡張	33	37
臓器病変		
肺		
肺線維症	67	48
%VC の低下	25	18
%DLco の低下	75	63
肺高血圧症	0	10
食道	67 z 2	44
心	8	5
腎	8	0
関節	17	20
筋肉	42 †	12
検査所見		
抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性	42	44
抗セントロメア抗体陽性	0 †	29
赤沈の亢進	42	51
CRP の上昇	8	21
血清 IgG 値、平均 (range) mg/ml	1740 (821-3617)	1701 (907-5350)
血清 IgA 値、平均 (range) mg/ml	225 (134-295)	278 (128-559)
血清 IgM 値、平均 (range) mg/ml	180 (87-374)	181 (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 Angiogenin 濃度が正常の患者群に対して)

‡ p<0.01 (血清 Angiogenin 濃度が正常の患者群に対して)