

強皮症における血管内皮前駆細胞の *in vivo* 血管形成能の検討

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

研究要旨

全身性強皮症 (SSc) 患者にみられる末梢循環障害に血管内皮前駆細胞 (EPC) の異常による脈管形成不全の関与が示されている。我々は以前、血管内皮分化に特化した“真の EPC” とされる CD34+ CD133+ VEGFR2+ 細胞が SSc 患者末梢血中で減少し、その分化能も障害されていることを *in vitro* の実験系で報告した。そこで、本年度は腫瘍血管新生マウスモデルを用いた *in vivo* の実験系により SSc 患者における EPC の分化能をさらに詳細に検討した。磁気ビーズを用いて分離した CD133+ 細胞をマウス大腸癌細胞株と共に SCID マウスの皮下に移植すると腫瘍塊が形成されたが、腫瘍塊のサイズは健常人に比べて SSc 患者由来 CD133+ 細胞移植で有意に小さかった ($P=0.02$)。新生された腫瘍血管数も健常人に比べて SSc 患者由来 CD133+ 細胞移植で有意に少なかった ($P=0.03$)。さらに、ヒト CD31 陽性血管内皮細胞を取り込んだ血管腔の割合も健常人に比べて強皮症患者由来 CD133+ 細胞移植では少なかった ($P=0.03$)。CD133+ 細胞移植による脈管形成は VEGFR2+ 細胞の除去により消失したことから、CD133+ 細胞分画中の EPC により新生血管が形成されたことが確認された。以上より、SSc 患者では CD34+CD133+VEGFR2+EPC に血管内皮への分化能障害がみられ、それによる血管形成・修復不全が特徴的な血管病変の形成に関わることが確認された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は、皮膚および内臓諸臓器の線維化に加え、末梢循環障害を特徴とする。組織学的には爪床毛細血管の無血管領域や四肢の末梢動脈の側副血行路形成不全がみられ、虚血に対する血管の形成障害がみられる。成人における血管の修復・形成には血管新生 (angiogenesis) と脈管形成 (vasculogenesis) の 2 つの過程が存在する。血管新生では、既存の成熟血管内皮細胞が増殖、遊走することで近傍の血管形成や損傷血管の修復を誘導する。一方、脈管形成では、骨髄から動員された血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) が末梢血中に動員され、損傷血管などの

局所で成熟血管内皮細胞へと分化することで血管形成や損傷血管の修復を誘導する¹⁾。近年、EPC は単一の細胞でなく、少なくとも 3 つの機能的に異なる細胞を包括する多様な細胞集団であることが示された²⁾。Colony-forming unit-endothelial cells (CFU-EC) は血管新生因子存在下の培養でコロニーを形成する CD45+ 血球系細胞で、それ自身が血管内皮に分化する能力はほとんどなく、血管新生因子産生などを介して脈管形成を促進する。したがって、この細胞は厳密には EPC ではない。一方、単球系 EPC または circulating angiogenic cells (CAC) は CD45+ CD14+ 単球由来で、分化効率は低いものの血管内皮以外にも壁細胞や線維芽細胞など血管を構成する細

胞群への分化能を有し、さらに血管新生因子産生などを介して脈管形成を促進する。さらに、endothelial colony-forming cells (ECFC) または循環血管内皮前駆細胞 (CEP) は CD45-CD14- の非血球細胞で、血管内皮分化に特化した前駆細胞である。“真の EPC” とされ、CD34+CD133+VEGFR2+ の特徴的なフェノタイプを示す。これら EPC は *in vivo* で協調的に働いて血管形成や修復を促している。

我々は SSc 患者で CD34+CD133+VEGFR2+ の真の EPC が末梢血中で減少し、その分化能も障害されていることを *in vitro* の実験系で報告した³⁾。また、SSc 患者では単球系 EPC が増えており、高い血管新生促進能を有するが、それ自身が血管内皮に分化する脈管形成能が障害されていることを明らかにした⁴⁾。その後、他の研究グループからも SSc 患者における真の EPC 数に関する報告が次々にされ、その増減に関しては一定の結果が得られていない。その理由として、各々の報告で EPC の定義や測定法が異なることが挙げられる。ただし、EPC の分化能が障害されていれば数の増減に関係なく脈管形成の低下をきたすはずである。そこで、本年度は SSc 末梢血中の CD34+CD133+VEGFR2+EPC の血管内皮への分化能を *in vivo* の実験系で追究することを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

アメリカリウマチ学会の分類基準を満たす SSc 患者 16 例 (男女 3 : 13、50.7±14.4 歳) を対象とした。9 例が dcSSc、7 例が lcSSc であった。また、対照として健康人 11 例 (男女 3 : 8、51.6±10.1 歳) を用いた。いずれの症例も喫煙、高血圧、脂質異常症など虚血性心疾患のリスク因子を有していなかつ

た。

2. 末梢血 CD133+ 細胞の分離

末梢血から単核球を比重遠心法で分離し、Fc 受容体 blocking reagent (Miltenyi Biotech) 処理後に磁気ビーズを用いた磁気細胞分離システム法を用いて CD133+ 細胞を濃縮した。また、同時に CD133 単核球分画も採取した。得られた CD133- 細胞分画中の CD133+ 細胞比率は 35% 以上、CD133- 細胞分画中の比率は 0.1% 未満であった。

一部の実験では、CD133+ 細胞から APC 標識マウス抗ヒト VEGFR2 抗体 (89106, R&D systems)、続いて磁気ビーズ結合抗 APC 抗体を用いて VEGFR2+ 細胞を取り除いた。CD133+VEGFR2- 細胞分画中の VEGFR2+ 細胞は 1% 未満であった。

3. 腫瘍血管新生マウスモデル⁴⁾

マウス大腸癌細胞株 CT26 (2.5×10^5) を CD133+ 細胞または CD133- 細胞分画 (2.5×10^3) と混和し、同系の重症免疫不全 (SCID) マウス (C.B-17/SCID、オリエンタル酵母) の背部皮下に移植した。対照として同一マウス体側皮下に CT26 のみを移植した。14 日後に腫瘍塊を摘出し、以下の検討に用いた。腫瘍塊の体積は、長短軸 (mm) を計測し、 $0.5 \times \text{長軸} \times (\text{短軸})^2$ で求めた。腫瘍塊のサイズは CT26 のみ移植後に形成された腫瘍塊の体積を基準として表した。すなわち、CD133+ 細胞または CD133- 細胞分画と CT26 を同時移植後に形成された腫瘍塊の体積を CT26 のみ移植後に形成された腫瘍塊の体積で除して求めた。

腫瘍塊の一部は 10% ホルマリンで固定後にパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。赤血球を含む管腔構造を血管腔とし、 0.25 mm^2 あたりの血管腔数を数え、CT26 のみ移植後に形成された腫瘍塊における血管腔数を基準とし

て表した。

腫瘍塊の一部は凍結切片（8 mm 厚）とし、免疫染色に使用した。ラット抗マウス CD31 抗体（MEC 13.3、BD Bioscience）、FITC 標識マウス抗ヒト CD31 抗体（P2B1、Millipore）を 1 次染色に使用し、続いて AlexFluor[®] 488 標識抗 FITC 抗体、AlexFluor[®] 568 標識抗ラット IgG 抗体（Invitrogen）を二次抗体に使用した。また、核の対比染色には TO-PRO3（Invitrogen）を使用した。共焦点レーザー顕微鏡（Olympus）を用いて、ランダムに選んだ 10～20 視野における血管腔数を観察し、その中におけるヒト CD31 陽性血管内皮細胞を含む血管腔の割合を求めた。

4. 統計学的検討

2 群間の分布は Mann-Whitney U-test を用いて検定した。

（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全ての患者に対して研究内容を説明し、文書による同意を得た。

C. 研究結果

CD133+ 細胞または CD133- 細胞を CT26 と共に SCID マウスの皮下に移植すると腫瘍塊が形成され、その体積は CT26 のみを移植した場合に比べて増大した。CD133+ 細胞の移植では腫瘍塊のサイズは顕著に増大したが、健常人に比べて強皮症患者では有意に小さかった (5.3 ± 2.7 vs 2.9 ± 0.9 , $P=0.02$)。一方、CD133- 細胞の移植では CT26 のみの移植に比べて腫瘍塊の体積増加はわずかで、腫瘍塊のサイズは強皮症患者と健常人で差がなかった (1.8 ± 0.6 vs 1.5 ± 0.8 , $P>0.05$)。

移植により形成された新生腫瘍血管数は CD133+

細胞の移植により著明に増加した。ただし、健常人由来 CD133+ 細胞の移植に比べて強皮症患者由来の CD133+ 細胞分画の移植では新生血管数が有意に少なかった (4.2 ± 2.6 vs 2.4 ± 1.1 , $P=0.03$)。移植したヒト細胞が血管内皮細胞へと分化して血管形成に貢献したことを確認するため、血管腔を構成する血管内皮細胞がヒト由来であるかをヒト CD31 に特異的な抗体を用いて検討した。その結果、健常人由来 CD133+ 細胞の移植では $23.8 \pm 7.8\%$ の血管腔がヒト CD31 陽性血管内皮細胞を取り込んでいたが、強皮症患者由来 CD133+ 細胞の移植ではヒト血管内皮細胞を取り込んだ血管腔はわずか $14.5 \pm 8.4\%$ であった ($P=0.03$)。

以上より、移植された CD133+ 細胞が腫瘍塊中で血管内皮へと分化することで脈管形成に貢献し、腫瘍の発育を促していることが確認された。また、強皮症患者由来 CD133+ 細胞ではその能力が障害されていた。今回観察された脈管形成が CD133+ 細胞分画中の EPC によるかを検討するため、CD133+ 分画から EPC に特異的な VEGFR2 を発現する細胞を除去した。その結果、CD133+VEGFR2- 細胞を移植後の形成された腫瘍塊のサイズは CD133+ 細胞移植に比べて小さくなり、CT26 単独移植時のサイズとほぼ同等になった。したがって、腫瘍内でみられた脈管形成は EPC によることが確認された。

D. 考案

今回の検討により、SSc 患者由来の CD34+ CD133+VEGFR2+EPC は *in vivo* で脈管形成能が低下していることが示された。強皮症患者では EPC による脈管形成が障害され、その結果として血管形成・修復不全が存在し、血管病変の形成に関わっていることが確認された。

ヒト末梢血中の CD34+CD133+VEGFR2+EPC 数はきわめて少なく（末梢血単核球 10^5 あたり 1 個程度）、技術的な困難さからその機能的な解析はほとんど行われていない。我々は以前、CD133+ 細胞分画から付着性を有する細胞を取りだし、血管新生因子存在下で培養することにより血管内皮細胞への分化能を vWF 発現により検討した。その結果、血管内皮細胞への分化効率が健常人の 75% に対して SSc 患者では 18% に低下していた。しかし、この結果は人為的な培養条件下での実験で、血管内皮として vWF の発現しか確認していない。そこで、今回、腫瘍増大時に形成される強い血管新生・脈管形成環境下で EPC を移植することで、血管内皮への分化を血流のある血管形成を捉えることで評価できる我々が確立した *in vivo* 実験系を用いた。ただし、末梢血中の EPC がきわめて少ないために移植に用いることは不可能で、その代わりに CD133+ 細胞を使用した。CD133+ 細胞分画中の EPC が脈管形成能を有することは確認したが、移植細胞に含まれる EPC 数はサンプル間で異なる可能性がある。そのため、今回 SSc 患者でみられた CD133+ 細胞における脈管形成能の低下は単に移植細胞中の CD34+CD133+VEGFR2+EPC 数の減少を反映している可能性もある。ただし、CD34+CD133+ 細胞数は健常人に比べて SSc 患者で少ないものの、その中における VEGFR2+ 細胞数の比率は健常人と SSc 患者で差がなかった³⁾。今後、個々の検体における結果を CD133+ 細胞に占める VEGFR2+ 細胞の比率で補正することを予定している。

E. 結論

SSc 患者では CD34+CD133+VEGFR2+ の“真の EPC”に血管内皮への分化能障害がみられた。した

がって、EPC 異常による血管形成・修復不全が特徴的な血管病変の形成に関わることが確認された。

F. 文献

- 1) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-8.
- 2) Prater DN, Case J, Ingram DA, et al. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia* 2007; 21: 1141-9.
- 3) Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, et al. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* 2004; 364: 603-10.
- 4) Yamaguchi Y, Okazaki Y, Seta N, et al. Enhanced angiogenic potency of monocytic endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R205.

G. 研究発表

1. 論文発表
Furuya Y, Okazaki Y, Kaji K, Sato S, Takehara K, Kuwana M. Mobilization of endothelial progenitor cells by intravenous cyclophosphamide in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Aug 19.
Yamaguchi Y, Okazaki Y, Seta N, Satoh T, Takahashi K, Ikezawa Z, Kuwana M. Enhanced angiogenic potency of monocytic endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2010 Nov 4; 12(6): R205.

2. 学会発表

岡崎有佳、佐藤隆司、安岡秀剛、竹内 勤、桑名正隆：強皮症における循環血管内皮前駆細胞 (EPC) 数の再検討. 第 54 回日本リウマチ学会総

会 (神戸), 2010. 4.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

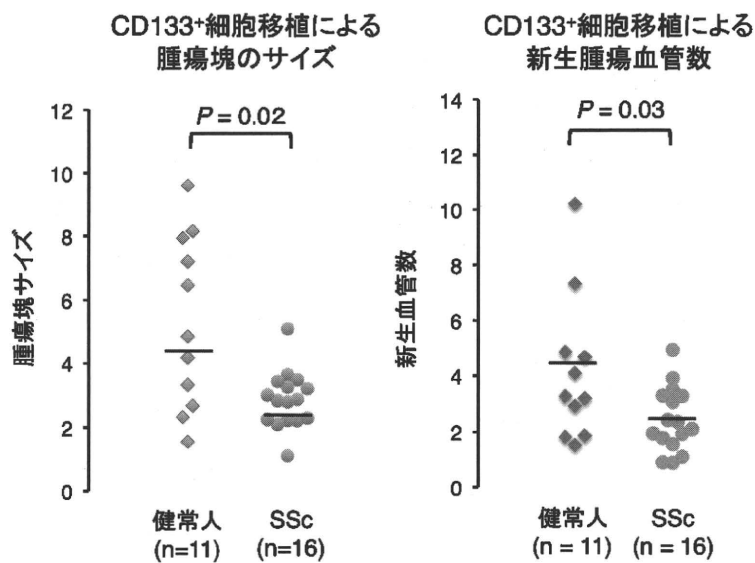


図 1 : CD133+ 細胞と大腸癌細胞株の同時移植により形成された腫瘍塊のサイズと新生腫瘍血管数。腫瘍塊のサイズおよび血管数は CD133+ 細胞と CT26 を同時移植後のデータを CT26 のみ移植後のデータで除して求めた。

IL-2/18 誘導間質性肺炎モデルマウスにおける NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析

研究分担者	住田孝之	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授
協力者	瀬川誠司	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 大学院生
協力者	吉賀洋平	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 研究生
協力者	堀越正信	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 大学院生
協力者	後藤大輔	茨城県立中央病院膠原病リウマチ科 准教授
協力者	松本 功	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 准教授

研究要旨

全身性強皮症において、間質性肺炎による死亡の割合が増加していることから、現在、解決すべき最も重要な病態の一つとなっている。今回、IL-2 と IL-18 によって誘導されるヒト間質性肺炎の初期像に類似した細胞浸潤性の間質性肺炎マウスモデルを用いて、間質性肺炎の病態解明を試みた。その結果、このモデルで増殖することが知られている NK 細胞と同様に、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞も増加していることが明らかとなった。間質性肺炎の病態解明の鍵を握る細胞として、我々はこの NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞に着目し、更に解析を行うこととした。その結果、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が 1) 細胞表面には IL-2 受容体と IL-18 受容体のいずれも多く発現し、IL-2 + IL-18 刺激により増殖能が高まるとともに、IFN- γ が高産生されること、2) T 細胞受容体 (TCR) δ 鎖欠損マウスでは IL-2 + IL-18 誘導間質性肺炎の病態が軽減すること、3) NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の移入により、IL-2 + IL-18 投与後の肺において NK 細胞が有意に増加し、IFN- γ mRNA 発現が増加すること、が明らかとなった。以上の結果より、IL-2 と IL-18 誘導間質性肺炎マウスモデルにおいて、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞は炎症を惹起する細胞集団である可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は、いまだに難治性の疾患であることに変わりがなく、他の膠原病疾患の多くがステロイドを初めとした免疫抑制療法が有効であるのとは対照的に、決定的な有効治療がないのが問題となっている。皮膚の硬化病変もさることながら、予後を左右する内臓病変が問題

となるが、特に最近、強皮症患者の死因の中で間質性肺炎が占める割合が顕著に増えてきている¹⁾。従って、強皮症患者の予後を改善する為には、間質性肺炎の病態を明らかとし、その治療法を検討することが最も重要なことであると考えられる。

これまでの報告では、ブレオマイシン等の薬剤誘導性の間質性肺炎モデルを用いた研究が多く行われ

ているが、これは誘導後、肺組織に直ぐに線維化を認めるモデルである。しかし、通常ヒトの間質性肺炎では、活動期では細胞浸潤が盛んであり、線維化はどちらかと言えば終末像となる。そこで、ヒトの活動期の間質性肺炎像に近い IL-2 と IL-18 にて誘導される肺の間質に細胞浸潤が誘導されるモデル²⁾を用いて、間質性肺炎の病態を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

1) IL-2 と IL-18 による間質性肺炎の誘導

C57BL/6 マウス、4 週令の雌（日本チャールス・リバー株式会社、横浜）を用いて、既に論文にて報告されている方法²⁾にて、リコンビナントヒト IL-2 を 50,000U/日とリコンビナントマウス IL-18 を 1 μ g/日投与し、間質性肺炎の誘導を行った。コントロールとして、PBS 200 μ l/日を投与した群を用いた。

なお、C57BL/6 バックグラウンドの TCR δ 鎖欠損マウス (TCR δ $-/-$)³⁾ は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研バイオリソースセンターから提供していただいた。

2) 細胞染色と解析

脾細胞や肺から得られたリンパ球は以前の報告⁴⁻⁶⁾を参考に細胞を回収し、以下のモノクローナル抗体を用いて染色を行った。fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-TCR $\gamma\delta$ (GL3)、phycoerythrin (PE)-及び allophycocyanin (APC)-conjugated anti-NK1.1 (PK136)、APC-conjugated anti-TCR β (H57-597)、PerCP-conjugated anti-CD3 ϵ (145-2C11)、APC-conjugated anti-CD4 (GK1.5) と PE/Cy7 conjugated anti-CD8 (53-6.7) mAbs は BioLegend (San Diego, CA) から購入。PE-conjugated anti-IL-2 receptor β (R β)、anti-IL-18 R β mAbs

は R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入。染色した細胞は FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) で測定し、データ解析には FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) を用いた。

3) NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞と NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞の選別

NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞と NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞を選択的に回収する為に、組織から回収したリンパ球を TCR $\gamma\delta$ + isolation kit (Miltenyi Biotec KK, Auburn, CA) を用いて濃縮した細胞群を作り、抗 NK1.1 抗体と抗 TCR δ 抗体 (BioLegend, San Diego, CA) でそれらを染色し FACS Vantage (Becton Dickinson, Mountain View, CA) にて選別を行った。純度は、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞 > 93%、NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞 > 92%であった。

4) 細胞純化と $\gamma\delta$ T 細胞の移入

脾細胞から前述の方法で NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞を回収した。PBS にて洗浄した後、細胞数 2×10^6 /ml で PBS 中に再浮遊させた。細胞数 2×10^5 (100 ml) を tail vein より移入した。移入後 24 時間で間質性肺炎誘導実験に用いた。

5) 統計解析

統計解析には統計解析ソフト (Stat View 5.0, SAS Institute, NC) を使用した。2 群間の有意差の検定は Student-t 検定を使用した。多群間の比較には一元配置分散分析法 (one-way ANOVA) と Dannett 検定を用いた。P 値が 0.05 未満の場合に有意差有りと判断した。

なお、本研究を行うにあたり、「動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「筑波大学動物実験取扱規定」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議)」に従って動物実験計画

書を提出し、筑波大学の動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の IL-2/IL-18 受容体発現

先ず初めに、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が IL-2 や IL-18 に反応しうる細胞集団であるか否かを確認する為に、細胞表面の IL-2R β と IL-18R β の発現の確認を行った。その結果、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞と NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞のいずれも IL-2R β と IL-18R β を発現しているが、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の方がより多くの受容体を発現していることが分かった (図 1)。

2) IL-2+IL-18 に対する NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の反応

IL-2R β と IL-18R β を多く発現している NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が、IL-2 と IL-18 を投与することにより、NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞と比較して増殖反応をみたところ、サイトカイン受容体を多く発現している NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の方が 96 時間後に有意に増殖反応が高いことが判明した ($p < 0.05$) (図 2)。

そして、IL-2 と IL-18 による刺激により NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞がどのようなサイトカイン産生を示すのか解析したところ、NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞と比較して IFN- γ 産生量が有意に多いことが明らかとなった ($p < 0.05$)。TNF- α 産生も多い傾向は認められたが、有意差は無かった (図 3)。

3) T 細胞受容体 (TCR) δ 鎖欠損マウスでの間質性肺炎の誘導

TCR δ 鎖欠損マウスを用いて、IL-2/IL-18 誘導間質性肺炎の重症度を C57BL/6 マウスと比較した。その結果、重症度の指標の一つである肺組織内での NK 細胞浸潤の割合を比較したところ、TCR δ 鎖欠損マウスで有意に NK 細胞浸潤が減少していた ($p < 0.05$) (図 4A)。

また同時に、本モデルにおいて間質性肺炎の重症度に相関する肺組織内の IFN- γ 量を測定し比較したところ、これも TCR δ 鎖欠損マウスで有意に低下していた ($p < 0.005$) (図 4B)。

4) NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞移入による間質性肺炎の誘導

NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞自体に間質性肺炎を誘導する能力が有るか否かを確認する為に、TCR δ 鎖欠損マウスに NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞を移入した後、IL-2 と IL-18 で間質性肺炎を誘導した。その結果、TCR δ 鎖欠損マウスに NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞を移入しない群と比較して、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞を移入した群で有意に肺組織内への NK 細胞浸潤が増えた ($p < 0.05$) (図 5A)。また TCR δ 鎖欠損マウスに細胞を移入しない群と比較して、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞を移入した群で有意に肺組織内の IFN- γ mRNA 産生が増加していた ($p < 0.05$) (図 5B)。

D. 考案

IL-2/IL-18 誘導間質性肺炎では、肺への NK 細胞の浸潤と IFN- γ の増加が病態形成に関与していると言われている²⁾。しかし、我々は NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞も病態悪化とともに増加してくることを見出した。従って、間質性肺炎初期に、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞も病態形成に関与している可能性が考えられた。

本研究に用いた IL-2/IL-18 誘導間質性肺炎はヒトの間質性肺炎の初期活動期の像に似たモデルであり、活動性間質性肺炎像と捉えることができる。NK 細胞に加えて NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞も肺組織で増えている理由は、単に IL-2、IL-18 それぞれの受容体を高発現しているということも考えられるが、肝臓では NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が PBS 投与群でも多く存在するが、IL-2 と IL-18 を投与しても肝臓の NK1.1 陽

性 $\gamma\delta$ T細胞は増えない(データ未提示)。そのことから、肺にのみ集積するNK細胞が産生するIFN- γ 等によりNK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞が増殖し、増殖したNK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞が産生するTNF- α がNK細胞を増殖させ、さらにIFN- γ を産生するようになる。といった相乗効果が働いている可能性が考えられる。

NK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞はIFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-13、TNF- α の産生能を有する細胞群であることが報告されている^{7,8)}。本研究でもIL-2とIL-18との刺激によりNK1.1陰性 $\gamma\delta$ T細胞より多くのIFN- γ が産生され、TNF- α も産生能が高い傾向に有ることを示した。そして、これらのサイトカイン産生により、肺での炎症が惹起されている可能性が示唆される。

更に今回は、TCR δ 鎖欠損マウスを用いて、NK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の非存在下では間質性肺炎の重症度が低下し、NK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞を移入することで間質性肺炎の重症度が増すことを示した。TCR δ 鎖欠損マウスにNK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞を移入した実験では、C57BL/6マウスで誘導した時と同程度の間質性肺炎は再現されないが、これはTCR δ 鎖欠損マウスがNK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞だけを除去したマウスモデルではなく、他の幾つかの細胞集団も存在しないことや、移入する細胞数等の問題が有るかもしれない。ただ、今回の結果から、NK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞が間質性肺炎の重症化に重要な細胞集団である可能性が十分に示唆された。

ヒトにおいてNK1.1はCD161に相当するが、これまでにCD161陽性 $\gamma\delta$ T細胞がHIV感染患者⁹⁾や多発性硬化症患者¹⁰⁾の末梢血で増えているという報告がある。しかしながら、間質性肺炎患者での報告は未だ無い。従って、今後、間質性肺炎患者におけるCD161陽性 $\gamma\delta$ T細胞の研究が間質性肺炎を理解し、新たな治療を考える上で重要と考える。

E. 結 論

IL-2/IL-18誘導間質性肺炎モデルにおいて、IFN- γ を産生するNK1.1陽性 $\gamma\delta$ T細胞が肺に集積し、間質性肺炎の病態に関与していることが示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Akashi N, Matsumoto I, Tanaka Y, Inoue A, Yamamoto K, Tanaka Y, Umeda N, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sekiguchi K, Sumida T.: Comparative suppressive effect in models of autoimmune arthritis by tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib. *Modern Rheumatology*. in press
2. Hikami K, Kawasaki A, Ito I, Koga M, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Tsutsumi A, Kusaoi M, Takasaki Y, Hashimoto H, Arinami T, Sumida T, Tsuchiya N.: Association of a functional polymorphism in the 3' untranslated region of SPI1 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. in press
3. Tsuboi H, Wakamatsu E, Iizuka M, Nakamura Y, Sugihara M, Suzuki T, Ogishima H, Hayashi T, Goto D, Ito S, Matsumoto I, Sumida T.: Importance of serine727 phosphorylated STAT1 in IFN γ -induced signaling and apoptosis of human salivary gland cells. *International Journal of Rheumatic Diseases*. in press
4. Horikoshi M, Suzuki T, Sugihara M, Kondo Y, Tsuboi H, Uehara T, Hama M, Takase K, Ohno S, Ishigatsubo Y, Yoshida Y, Sagawa A, Ikeda K, Ota T, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Comparison of low-field dedicated extremity magnetic resonance imaging with articular ultrasonography

- in patients with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology*. in press
5. Hayashi T, Ito S, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: Elevated level of serum cystatin-C concentration is a useful predictor for myelosuppression induced by methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology*. in press
 6. Kawasaki A, Ito I, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T and Tsuchiya N: Association of TNFAIP3 polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Epub May 27. 2010
 7. Kawasaki A, Ito S, Furukawa H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Kusaoi M, Ohashi J, Graham R R, Matsuta K, Behrens T W, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N: Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population : a case-control association study. *Arthritis Res. Ther.* 12: R174, 2010
 8. Iizuka M, Wakamatsu E, Tsuboi H, Nakamura Y, Hayashi T, Matsui M, Goto D, Ito S, Matsumoto I, Sumida T: Pathogenic role of immune response to M3 muscarinic acetylcholine receptor in Sjogren's syndrome-like sialoadenitis. *J. Autoimmunity.* 35 (4): 383-389, 2010
 9. Shen N, Fu Q, Deng Y, Qian X, Zhao J, Kaufman KM, Wu YL, Yu CY, Tang Y, Chen JY, Yang W, Wong M, Kawasaki A, Tsuchiya N, Sumida T, Kawaguchi Y, Howe HS, Mok MY, Bang SY, Liu FL, Chang DM, Takasaki Y, Hashimoto H, Harley JB, Guthridge JM, Grossman JM, Cantor RM, Song YW, Bae SC, Chen S, Hahn BH, Lau YL, Tsao BP: Gender Specific Association of X-linked TLR7 with Male Systemic Lupus Erythematosus. *PNAS* 107(36): 15838-15843, 2010
 10. Doki K, Homma M, Hori T, Tomita T, Hasegawa Y, Ito S, Fukunaga K, Kaneko M, Chiba S, Sumida T, Ohkohchi N, Kohda Y.: Difference in blood tacrolimus concentration between ACMIA and MEIA in samples with low haematocrit values. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 62(9): 1185-1188, 2010
 11. Chen Q, Muramoto K, Masaaki N, Ding Y, Yang H, Mackey M, Li W, Inoue Y, Ackermann K, Shiota H, Matsumoto I, Spyvee M, Schiller S, Sumida T, Gusovsky F, Lamphier M.: A novel antagonist of the prostaglandin E(2) EP(4) receptor inhibits Th1 differentiation and Th17 expansion and is orally active in arthritis models. *Br J Pharmacol.* 160(2): 292-310, 2010
 12. Tsuboi H, Matsumoto I, Wakamatsu E, Nakamura Y, Iizuka M, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T: New epitopes and function of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 162: 53-61, 2010
 13. Ogishima H, Ito S, Tsutsumi A, Sugihara M, Goto D, Matsumoto I, Obata-Yasuoka M, Hamada H, Yoshikawa H, Takahashi H, Murashima A, Sumida T.: High dose unfractionated heparin therapy in a pregnant patient with antiphospholipid syndrome: a case report. *International Journal of Rheumatic Diseases* 13(3): e32-e35, 2010

14. Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Nakamura Y, Matsumoto I: Functional role of M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) reactive T cells and anti-M3R autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Autoimmunity Reviews*. 9: 615-617, 2010
 15. Suzuki T, Ito S, Handa S, Kose K, Okamoto Y, Minami M, Sugihara M, Horikoshi M, Tsuboi H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: New low-field extremity MRI, compactScan: comparison with whole body 1.5 tesla conventional MRI. *Mod. Rheumatol*. 20(4): 331-336, 2010
 16. Tashiro T, Nakagawa R, Inoue S, Omori-Miyake M, Chiba T, Fujii S, Shimizu K, Mori K, Yoshiga Y, Sumida T, Watarai H, Taniguchi M: Induction of Th1-biased cytokine production by α -carbaGalCer, a neoglycolipid ligand for natural killer T cells. *Int. Immunol*. 22(4): 319-328, 2010
 17. Umeda N, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: A patient with rheumatoid arthritis who had a normal delivery under etanercept treatment. *Intern. Med*. 49: 187-189, 2010
 18. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Ito S, Sumida T: Inhibition of transforming growth factor- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease in mice. *Clin. Exp. Immunol*. 160: 394-402, 2010
 19. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Kondo Y, Sugihara M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Takasaki Y, Hashimoto H, Matsuta K, Sumida T, Tsuchiya N: Replication of association between FAM167A (C8orf13)-BLK region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Ann. Rheum. Dis*. 69: 936-937, 2010
 20. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, Tsutsumi A, Hayashi T, Uchida K, Usui J, Yamagata K, Sumida T: Laser Microdissection-based Analysis of Cytokine Balance in the Kidneys of Patients with Lupus Nephritis. *Clin. Exp. Immunol*. 159(1): 1-10, 2010
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

全身性強皮症患者における制御性 B 細胞の解析

研究分担者 藤本 学 金沢大学医薬保健研究域医学系血管新生・結合組織代謝学（皮膚科）
准教授
協力者 松下貴史 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 助教
研究協力者 長谷川稔 金沢大学医学部附属病院皮膚科 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 東京大学医学部附属病院皮膚科 教授

研究要旨

制御性 B 細胞は IL-10 産生を介して過剰な免疫反応や炎症を抑制する。これまでは自己免疫疾患モデルマウスを用いて制御性 B 細胞の機能解析が進められてきた。今回、ヒトでの制御性 B 細胞の測定法を開発し、強皮症患者と健常人の末梢血中の制御性 B 細胞を測定したところ、強皮症患者では制御性 B 細胞が有意に減少していた。以上より、制御性 B 細胞の異常が強皮症の病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は抗核抗体に代表される自己免疫現象を背景に、皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管病変によって特徴づけられる膠原病である。これまでに全身性強皮症患者の病態には B 細胞の活性化や分化の異常が示されている¹⁾。また、B 細胞の強力な活性化因子である血清 BAFF 濃度が全身性強皮症患者において上昇しており、皮膚硬化の重症度と相関していることが示されている²⁾。さらに、全身性強皮症の動物モデルマウスである Tight skin (Tsk) マウスの皮膚硬化の進展には B 細胞の異常活性化が重要であり³⁾、抗 CD20 抗体による発症早期からの B 細胞除去療法が、Tsk マウスの皮膚硬化を有意に抑制することが示されている⁴⁾。以上より、全身性強皮症患者ならびに強皮症モデルマウスの病態および線維化において B 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。自己免疫疾患

における B 細胞の重要性は、関節リウマチ患者においてリツキサン[®]（抗 CD20 抗体）による B 細胞除去療法が予想以上の治療効果を挙げたことから、全世界で脚光を浴びるようになった。B 細胞は長らく抗体産生能ばかりが注目されていたが、抗体産生のみならず抗原提示能、サイトカイン産生、T-B 細胞相互作用を介して免疫反応を促進することが示され、自己免疫疾患における B 細胞の重要性が飛躍的に高まることとなった。その後、自己免疫疾患に対する B 細胞除去療法の適応疾患は急速に拡大され、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、皮膚筋炎、天疱瘡、ANCA 関連血管炎、特発性血小板減少性紫斑病など枚挙に暇がない。さらに近年、全身性強皮症に対する B 細胞除去療が複数報告され、治療効果が認められたとの報告も散見される。しかしながら、B 細胞除去療法が自己免疫疾患に対して必ずしも有益でない症例も報告されており、リツキサン[®] 投与後

に多発性硬化症の再発が誘導された症例や尋常性乾癬を発症した症例などが存在する。この理由としては、B細胞が自己免疫や炎症を促進する作用だけでなく、抑制する作用も併せ持っているため、B細胞除去療法により自己免疫現象を増悪させた可能性が考えられる。この相反するB細胞集団は、“悪玉”と“善玉”B細胞の概念で理解されている。“悪玉”B細胞はeffector B細胞と呼ばれ、T細胞の活性化作用をもち、自己免疫や炎症を促進する働きがある。一方、“善玉”B細胞はregulatory B細胞と呼ばれ自己免疫や炎症を抑制する働きがある⁵⁾。これまで、多発性硬化症や全身性エリテマトーデスのモデルマウスにおいてeffector B細胞とregulatory B細胞の作用が詳細に解析されており、病早期のB細胞除去療法は病勢を悪化させ、反対に病後期のB細胞除去療法は病勢を抑制する効果が認められている。その治療効果はそれぞれの病期におけるeffector B細胞とregulatory B細胞のバランスによることが示された。さらに最近、B細胞除去療法の効果が有望視されていた全身性エリテマトーデスのPhase II/IIIの臨床試験が当初の治療目的に達せず失敗に終わったが、この原因としてregulatory B細胞の影響が推測される。今後、自己免疫性疾患に対するB細胞除去療法に当たってはRegulatory/Effector B細胞のバランスを考慮に入れること重要である。Regulatory B細胞はIL-10を特異的に産生するB細胞亜集団と定義され、IL-10の産生により過剰な免疫反応や炎症を抑制する。近年、IL-10産生regulatory B細胞がCD1d^{high}CD5⁺の表現型を有し⁶⁾炎症反応および自己免疫反応の抑制に非常に重要であることが示されている^{7,8)}。さらに、ヒトでもIL-10産生regulatory B細胞の存在が確認されており、さまざまな炎症性疾患や自己免疫疾患への関与が示唆され

ている。今後、全身性強皮症患者でもB細胞除去療法が行われることが予想されるが、全身性強皮症の病態ならびに線維化におけるregulatory B細胞の役割を充分熟知しておくことは必要不可欠である。さらに、将来的には全身性強皮症や線維化疾患に対するregulatory B細胞を用いた治療法の開発が望まれる。

B. 研究方法

(1) ヒトにおけるIL-10産生regulatory B細胞の測定法の開発

これまでの予備実験において、ヒトにおけるIL-10産生regulatory B細胞は、PBMCをCpG(TLR9)とCD40Lで48時間培養し、細胞内染色を行うことにより測定できることを確認している。この刺激条件を用い、IL-10産生B細胞とIL-10非産生B細胞の細胞表面マーカーを比較し、IL-10産生B細胞に特異的な表面マーカー(CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24など)を同定する。

(2) 全身性強皮症患者におけるregulatory B細胞の検討

全身性強皮症患者においてIL-10産生regulatory B細胞の絶対数および頻度を健常人と比較検討する。また(1)で同定されたフェノタイプの数(%)も解析する。

倫理面への配慮：患者からの血液サンプルの採取は、患者に研究の趣旨・内容を十分に説明のうえ同意を得られた方のみから行う。また得られた研究データによって人権侵害など不利益が起こらないよう、個人の特特定がなされないように配慮する。

C. 研究結果

(1) ヒトにおけるIL-10産生regulatory B細胞の測

定法の開発ならびにフェノタイプ同定

IL-10 産生性制御性 B 細胞の誘導には、CD40 シグナルと Toll like receptor の刺激が重要であることが明らかとなっているので、ヒトでも同様に CD40 刺激と各種 Toll like receptor にて刺激した。5 時間では約 0.7% の IL-10 産生 B 細胞を認めた。48 時間の培養ではより多くの IL-10 産生 B 細胞が認められ、CpG がもっとも効果が強く、IL-10 産生 B 細胞が約 8%、LPS がその次に効果が強く約 4% 認めた。よって制御性 B 細胞の測定には CD40L と CpG にて 48 時間培養が至適条件と判明した (図 1)。B 細胞の表面に発現している分子を解析し、CD24 と CD27 が IL-10 陽性と陰性で発現が大きく違っており、IL-10 産生 B 細胞は CD24^{high}CD27⁺ のフェノタイプを有していることが明らかとなった (図 2)。次に実際に CD24^{high}CD27⁺ の B 細胞が IL-10 を産生しているかを確認した。CD24^{high}CD27⁺ の分画と CD24^{lo}CD27⁻ の分画を FACS にて分離し 48 時間培養後の結果を図 2 下段に示したが、CD24^{high}CD27⁺ のポピュレーションが IL-10 を産生していることが確認された。

(2) 全身性強皮症患者における regulatory B 細胞の検討

健常人 24 人、全身性強皮症 24 人、皮膚筋炎 3 人、尋常性天疱瘡 / 落葉状天疱瘡、2 名の PBMC 中の IL-10 産生 B 細胞と CD24^{hi}CD27⁺B 細胞の頻度を解析した。結果は、IL-10 産生 B 細胞は健常人で平均 11%、強皮症は 6% と有意に減少していた (図 3)。一方、症例数が非常に少ないものの皮膚筋炎や天疱瘡では、ほぼ正常であった (図 3)。IL-10 産生 B 細胞と同様に CD24^{hi}CD27⁺B 細胞は健常人と比較して、全身性強皮症で有意に減少していた。次に皮膚硬化の重症度別に解析を行った。dcSSc の方がより

制御性 B 細胞が減少していることが予想されたが、結果は逆で、lcSSc の方がより減少している傾向に有った (図 4)。また、制御性 B 細胞と mRSS に正の相関を認めた。また、他の臓器病変との相関は認めなかった (図 4)。

D. 考案

制御性 B 細胞は免疫反応を抑制する作用を有することより、自己トレランスの維持に重要であることが推測される。本研究にて全身性強皮症では制御性 B 細胞が減少していることが判明した。制御性 B 細胞の減少により自己トレランスが破綻し、全身性強皮症の発症に関与した可能性が考えられる。しかしながら、制御性 B 細胞は重症度とは相関しておらず、制御正 B 細胞は発症後の病態促進作用への関与は少なく、その発症に深く関与している可能性が示唆された。

E. 結論

制御性 B 細胞は CD24^{hi}CD27⁺B 細胞の phenotype を有していた。

全身性強皮症患者では制御性 B 細胞の頻度が減少していた。

F. 文献

1. Sato S, et al. Arthritis Rheum 50: 1918-27, 2004
2. Matsushita T, et al. Arthritis Rheum 54: 192-201, 2006
3. Saito E, et al. J Clin Invest 109: 1453-62, 2002
4. Hasegawa M, et al. Am J Pathol. 169(3): 954-966. 2006
5. DiLillo DJ, et al. Ann N Y Acad Sci. 1183: 38-57. 2010

- 6. Yanaba K, et al. Immunity 28, 639-650. 2008
- 7. Matsushita T, et al. J Clin Invest 118: 3420-30. 2008;
- 8. Matsushita T, et al. J Immunol. 85: 2240-52. 2010

- なし
- 2. 学会発表
- なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 研究発表

- 1. 論文発表

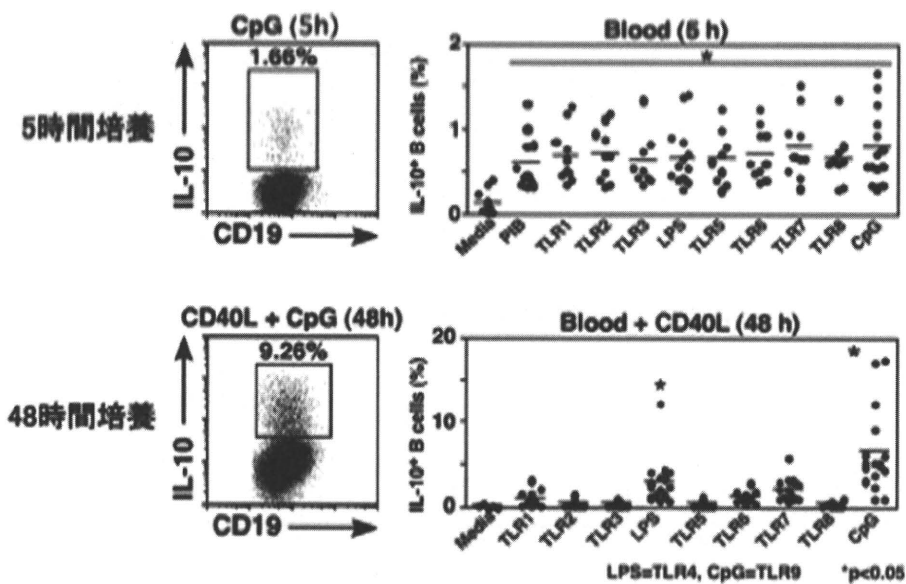


図1：制御性B細胞の刺激条件の検討

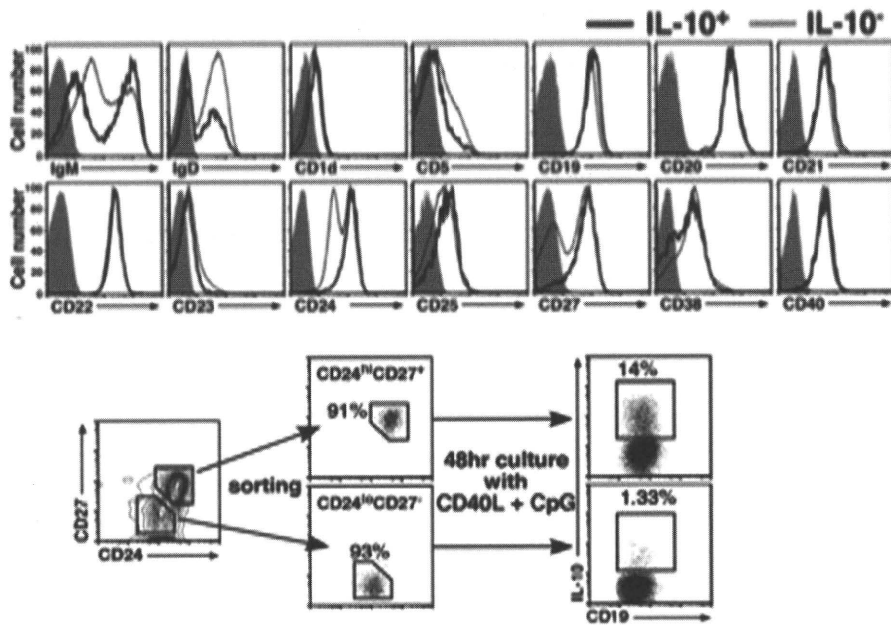


図 2：制御性 B 細胞のフェノタイプの同定

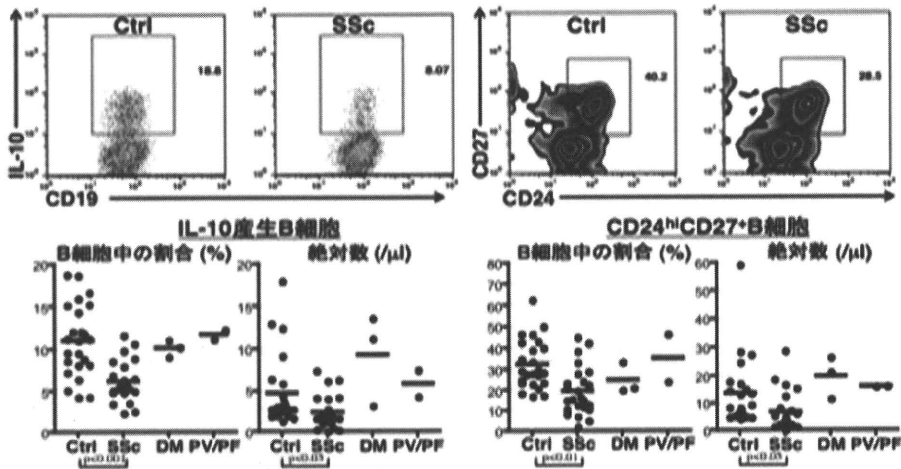


図 3：全身性強皮症における制御性 B 細胞

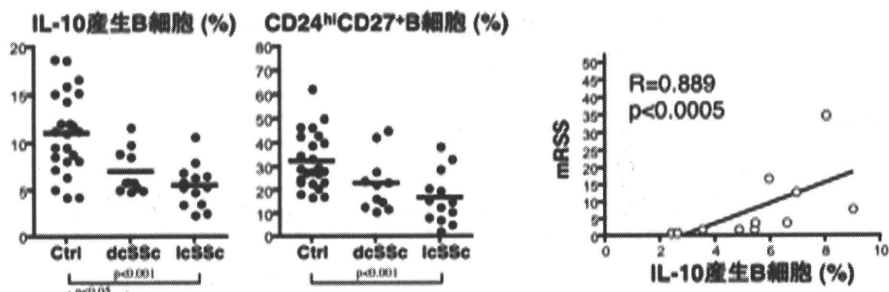


図 4：制御性 B 細胞と皮膚硬化との相関

強皮症の皮膚線維化における IL-17 signaling の関与

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 教授

協力者 中嶋泰治 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 大学院生

研究要旨

強皮症患者において血清 IL-17A および IL-17F 値を ELISA 法にて測定したところ、血清 IL-17A 値のみ患者群において上昇していた。一方、皮膚線維芽細胞は IL-17 受容体を発現していた。線維芽細胞における細胞外マトリックス発現に対する IL-17 の影響を PCR アレイなどを用いて解析し、本症の皮膚線維化において IL-17 signaling が関与している可能性について検討した。

A. 研究目的

汎発性強皮症（以下 SSc）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。このうち線維化は主に I 型 collagen の転写レベルでの増加が原因で、この増加には TGF-beta1 が誘導するシグナル、特に Smad の系が関与していると考えられている。TGF-beta が receptor に結合すると、Smad2 および Smad3 を誘導し、Smad4 と複合体を形成して核内に移行する。この複合体は target 遺伝子に結合し、さらには Sp1 などの他の転写因子とも相互作用して転写活性を増強する。過去の報告においては、(i) SSc 患者皮膚由来線維芽細胞では、TGF-beta レセプターの強発現が見られる (ii) TGF-beta シグナルを中和抗体あるいはアンチセンスオリゴを用いて阻害した場合、alpha2(I) collagen 遺伝子の発現が抑制される (iii) Smad3 のリン酸化あるいは DNA 結合能が増加している (iv) alpha2(I) collagen 遺伝子の増加にもかかわらず TGF-beta に対する反応性は低下している。これらの結果をもとに、我々は SSc 由来線維芽細胞において autocrine TGF-beta signaling が存在しているのではないかという仮説を立てた¹⁻⁴⁾。

同様に、connective tissue growth factor(CTGF)、Interleukin (IL)-1、IL-6 や IL-7 も本症への関与が指摘されており、これらによって構成されるサイトカインネットワークが本症に特徴的な線維化、免疫異常、血管病変に寄与している可能性がある⁵⁻⁷⁾。

一方、IL-17 は Th17 より産生され炎症反応などに関与するサイトカインとして近年様々な疾患において注目されており、A~F の 6 種類の subtype のうち A がもっともよく知られているが最近では F についても研究が進んでいる。同様にレセプターについても RA~RE の 5 種類が存在することが知られているが、IL-17A および F は RA に結合することが知られている。

SSc においては、血清 IL-17A 濃度が上昇している事および SSc 患者皮膚由来線維芽細胞に IL-17A を強発現する事で細胞増殖や内皮細胞障害が誘導されるという報告があるが^{8,9)}、本症における IL-17F の関与、レセプターの発現、あるいは IL-17 の細胞外マトリックスに対する影響などは未だ調べられていない。今回、我々はこれらに注目し検討した。

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 20 例、強皮症関連病態患者 (SSD) 10 例および正常人 10 例を対象とした。SSc 患者のうち、5 例が男性、15 例が女性であり、diffuse type (dcSSc) が 10 例、limited type (lcSSc) が 10 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 IL-17A および IL-17F 濃度の測定には ELISA kit (R&D および Biolegend) を使用した。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、450nm における吸光度を測定、標準曲線を作成し検体中の IL-17 濃度を算出した。

3) 細胞培養

diffuse cutaneous type の SSc 患者 5 名の前腕由来の皮膚線維芽細胞および正常人 5 名由来の皮膚線維芽細胞を使用した。

4) 免疫プロット法

培養細胞の上清をポリアクリルアミドゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗 type I collagen 抗体などと反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて発色させた。

5) quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

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。プライマーは SA Bioscience あるいは Takara 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 を用いて算出し、GAPDH で補正した。

PCR アレイは RT² First Strand Kit (SABiosciences) および 96-well Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array (SA Biosciences) を用いて行った。

C. 研究結果

1) SSc 患者の血清 IL-17A および 17F 濃度

図 1 に示す通り、血清 IL-17A 濃度は正常人に比べ SSc 患者で有意に上昇しており、これは過去の報告通りであった^{8,9)}。一方、IL-17F 濃度は正常人や他の膠原病患者と比較しても有意な差はみられず、また個々の患者において IL-17A 濃度と 17F 濃度に相関は見られなかった。

また、SSc 患者において IL-17A 濃度と臨床症状との相関を調べたところ、IL-17A 上昇群では IL-17A 正常群と比べて pitting scar/ulcer の頻度が高い傾向が見られたが $p=0.19$ と有意差は見られなかった (表 1)。

2) SSc 患者皮膚由来線維芽細胞における IL-17 レセプター発現

続いて、IL-17A および 17F 共通のレセプターである IL-17RA について、SSc 患者での発現を調べた。

これまで皮膚線維芽細胞での IL-17RA 発現については確認されていなかったが、正常皮膚由来線維芽細胞と SSc 皮膚由来線維芽細胞で発現を比較したところ、SSc 患者で有意に発現が減少していることが免疫ブロット法にて判明した (図 2)。またこの減少は mRNA レベルである事が real-time PCR 法にて確認された (図 2)。

3) IL-17 のコラーゲン発現に対する影響

最後に、IL-17A および 17F の細胞外マトリックス発現に対する影響を調べた。

Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array (SA Biosciences) を用いて複数の細胞外マトリックス関連遺伝子の発現を網羅的に解析した。無刺激あるいは IL-17A、IL-17F 刺激を行った正常皮膚由来線維芽細胞で発現状況を比較したところ、コラーゲン遺伝子や matrix metalloproteinase および tissue inhibitor of metalloproteinase 遺伝子などの発現は IL-17A あるいは 17F 存在下でも有意な変化は見られなかった (表 2)。

しかし蛋白レベルにおいては、IL-17A は I 型コラーゲンの発現を有意に抑制した。一方、IL-17F にはそのような作用は見られなかった (図 3)。また SSc 皮膚由来線維芽細胞でも、レセプターの発現低下を反映してか IL-17A のコラーゲン発現抑制作用は見られなかった (図 4)。

D. 考 案

本研究で得られた結果を元に、我々は本症において図 5 にしめすようなモデルが存在する可能性を考える。

まず、SSc 線維芽細胞では IL-17 レセプターの発現が低下している。IL-17A がコラーゲン発現抑制作用を有することを考えると、IL-17 レセプター発現

低下に起因する IL-17 シグナルの抑制は本症においてコラーゲン発現の増強に寄与し、本症に特徴的な線維化を誘導している可能性がある。またレセプターの低下に対して、IL-17A が feedback mechanism によって増加している可能性があり、その増加した IL-17A により本症の血管障害が引き起こされると考えられる。

E. 結 論

IL-17 シグナルは SSc の病態に関与している可能性がある。今後の研究により、IL-17、特に 17A が治療のターゲットとなる可能性がある。

F. 文 献

1. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J. Clin. Invest.* 1974; 54: 880-9
2. Jimenez SA, Feldman G, Bashey RI, Bienkowski R, Rosenbloom J. Co-ordinate increase in the expression of type I and type III collagen genes in progressive systemic sclerosis. *Biochem. J.* 1986; 237: 837-843
3. Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Direct demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 187: 45-50
4. Hitraya EG, Jimenez SA. Transcriptional activation of the $\alpha 1(I)$ procollagen gene in systemic sclerosis dermal fibroblasts. Role of intronic sequences. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1347-1354

5. Takehara K. Pathogenesis of systemic sclerosis. J. Rheumatol. 2003; 30: 755-759
6. Kawaguchi Y. IL-1 *a* gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. Clin. Exp. Immunol. ; 1994; 97: 445-50
7. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS: Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. J Rheumatol 1992;19:1207-11
8. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Komura K, Sato S: Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? J Dermatol Sci. 2008; 50: 240-2
9. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai

H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I: Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2000; 43: 2455-63

G. 研究発表

1) 論文発表

Nakashima T, Jinnin M, Honda N, Kajihara I, Makino T, Masuguchi S, Fukushima S, Okamoto Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H: Impaired interleukin-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts: In submission

2) 学会発表

H23 年度強皮症研究会議

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし