

表 1. 強皮症患者における血清 IL-17A 濃度と臨床症状・検査所見との相関

	Patients with elevated IL-17A levels (n=9)	Patients with normal IL-17A levels (n=11)
Mean age at onset (years)	56.3	60.5
Duration of disease (years)	5.3	3.9
Type (diffuse:limited)	3:6	7:4
CLINICAL FEATURES		
Pitting scars/ulcers	77.8	45.5
Nailfold bleeding	44.4	54.5
Raynaud' s phenomenon	77.8	81.8
Telangiectasia	33.3	9.1
Contracture of phalanges	33.3	63.6
Calcinosis	0	9.1
Diffuse pigmentation	0	36.4
Short SF	44.4	63.6
Sicca symptoms	11.1	27.3
ORGAN INVOLVEMENT		
Pulmonary fibrosis		
Mean %VC	94.2	93.5
Mean %DLco	83.8	78.1
Pulmonary hypertension	0	0
Oesophagus	0	27.3
Heart	22.2	18.2
Kidney	0	0
Joint	22.2	0
Thrombosis	0	0
ANA SPECIFICITY		
Anti-topo I	55.6	36.4
Anticentromere	33.3	18.2
Anti-U1 RNP	33.3	9.1

表2. PCR アレイの結果

Symbol	Name	Fold change
<u>Gene name</u>	<u>Up-regulated genes by IL-17A</u>	
ITGB2	Integrin, beta 2	58.32
MMP16	Matrix metalloproteinase 16	21.5
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	6.76
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	5.68
ITGA8	Integrin, alpha 8	3.35
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	3.26
ITGA4	Integrin, alpha 4	2.28
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	2.21
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	2.08
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	2.04
COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1	2.01
<u>Gene name</u>	<u>Down-regulated genes by IL-17A</u>	
ITGA2	Integrin, alpha 2	0.04
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	0.11
ITGAM	Integrin, alpha M	0.24
ITGA5	Integrin, alpha 5	0.25
SELP	Selectin P	0.29
ITGB3	Integrin, beta 3	0.3
LAMB3	Laminin, beta 3	0.34
ITGB4	Integrin, beta 4	0.39
ITGAL	Integrin, alpha L	0.41
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.42
ITGA3	Integrin, alpha 3	0.43
CTGF	Connective tissue growth factor	0.44
VTN	Vitronectin	0.44
ITGA6	Integrin, alpha 6	0.48
<u>Gene name</u>	<u>Up-regulated genes by IL-17F</u>	
MMP12	Matrix metalloproteinase 12	224.1
MMP16	Matrix metalloproteinase 16	93.57
ITGB2	Integrin, beta 2	39.07
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	38.27
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	19
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	11.54
ITGA5	Integrin, alpha 5	6.36
COL6A2	Collagen, type VI, alpha 2	5.42
ECM1	Extracellular matrix protein 1	2.96
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	2.94
ITGA7	Integrin, alpha 7	2.6

表2. PCR アレイの結果 (続き)

Symbol	Name	Fold change
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	2.55
MMP3	Matrix metalloproteinase 3	2.19
NCAM1	Neural cell adhesin molecule 1	2.07
ITGA4	Integrin, alpha 7	2.01
Gene name	<u>Down-regulated genes by IL-17F</u>	
ITGAM	Integrin, alpha M	0.01
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	0.01
CTNND2	Catenin (cadherin-associated protein) , delta 2	0.01
VTN	Vitronectin	0.01
ADAMTS8	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8	0.04
MMP7	Matrix metalloproteinase 7	0.06
ADAMTS13	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 13	0.06
MMP10	Matrix metalloproteinase 10	0.07
SELP	Selectin P	0.07
MMP13	Matrix metalloproteinase 13	0.08
SELE	Selectin E	0.08
LAMA1	Laminin, alpha 1	0.11
HAS1	Hyaluronan synthase 1	0.12
MMP15	Matrix metalloproteinase 15	0.13
ITGAL	Integrin, alpha L	0.14
MMP8	Matrix metalloproteinase 8	0.15
ITGB3	Integrin, beta 3	0.19
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesin molecule 1	0.21
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.23
MMP11	Matrix metalloproteinase 11	0.29
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	0.31
LAMA3	Laminin, alpha 3	0.32
CNTN1	Contactin 1	0.36
ITGA3	Integrin, alpha 3	0.37
ITGB4	Integrin, beta 4	0.38

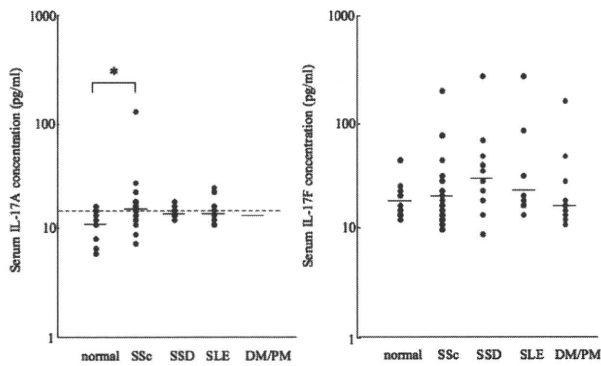


図1：強皮症患者における血清 IL-17A および 17F 濃度

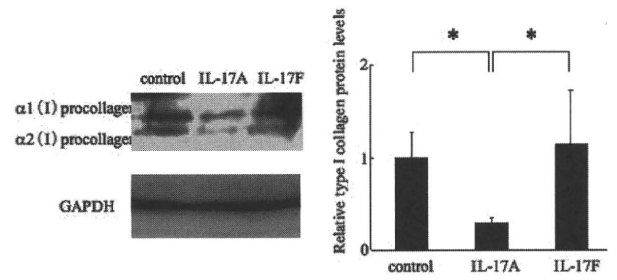


図3：正常皮膚由来線維芽細胞における IL-17 の I 型コラーゲン発現に対する作用

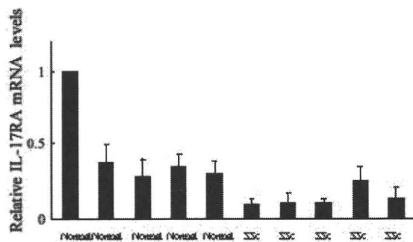
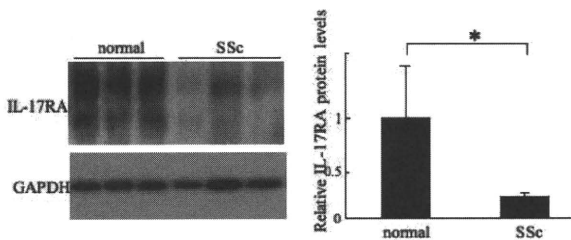


図2：皮膚由来線維芽細胞における IL-17 レセプターの発現

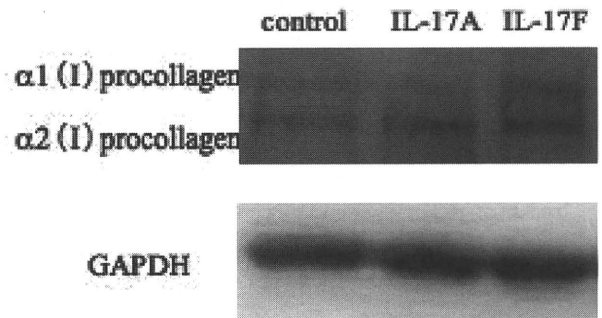


図4：強皮症皮膚由来線維芽細胞における IL-17 の I 型コラーゲン発現に対する作用

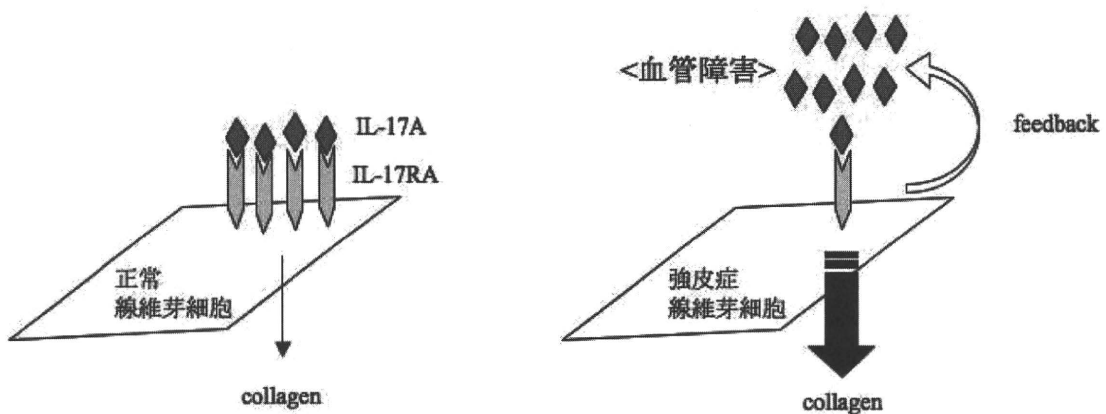


図5：強皮症における IL-17 シグナル

CCL13は全身性強皮症の診断に有用な血清学的マーカーである

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

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 80 例の血清 CCL13 値を ELISA にて測定し経時的に検討した。全身性強皮症の CCL 値は健常人、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、アトピー性皮膚炎と比較して高値をしめした。diffuse 型、limited 型との間に有意差はみられなかった。以上から CCL13 は全身性強皮症の診断に有用な血清学的マーカーになり得ると考えられた。

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^{1,2)}。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 CCL13 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 80 例 (女性 68 例、男性 12 例) であり、年齢は 10-74 歳 (平均 50 歳) であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 32 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 48 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 34 例、抗セントロメア抗体陽性例が 27 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 6 例、抗 U1-RNP 抗体陽性

例が 3 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 8 例であった。コントロールとして健常人 50 例、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 患者 20 例、皮膚筋炎 (dermatomyositis: DM) 患者 20 例、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) 患者 29 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 CCL13 値は市販されている ELISA キットを用いて測定した (CCL13 kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)。

C. 研究結果

1. 初診時における血清 CCL13 値

我々はまず初診時における血清 CCL13 値について検討した (図 1)。SSc における血清 CCL13 値は、健常人と比較して有意に高値であった。SLE、DM、AD における CCL13 値は健常人と比べて有意差はみられなかった。SSc のサブタイプ別では血清

CCL13 値は dSSc、ISSc とともに健常人と比較して有意に高値であった。dSSc、ISSc との間に有意差はみられなかった。

2. SSc における血清 CCL13 値と臨床症状との相関

健常人における CCL13 の平均値 +2SD をカットオフ値 (34.7 pg/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)。CCL13 値は SSc 患者において 95% (76/80) で上昇していた。CCL13 上昇群と非上昇群との間に臨床症状、検査所見に関して有意差はみられなかった。以上より SSc において血清 CCL13 値は臨床症状にかかわらず特異的に高値を示すと考えられた。

D. 考案

SSc において血清 CCL13 値が検討されたのは今回の我々の研究が初めてである。CCL13 値は健常人に比べて SSc で有意に高値を示しており、dSSc、ISSc 間で有意差はみられなかった。また SLE、DM、AD では健常人と有意差はみられなかった。以上より CCL13 は SSc において病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

SSc の病因は未だ不明であるが、近年になり酸化ストレスが関与していると推測されている³⁾。レイノー現象は大部分の SSc において初発症状としてみられる。レイノー現象は虚血・再灌流障害を誘導することにより活性酸素を生成し、結果として血管内皮細胞の障害を引き起こすと考えられる^{4,5)}。また活性酸素は線維芽細胞の増殖を促し線維化を促進する⁶⁾。興味深いことに、CCL13 は活性酸素の生成を誘導することが知られている⁷⁾。さらに dSSc および ISSc において血中の活性酸素が増加していると報告されている^{8,9)}。今回の研究で血清 CCL13 が SSc において特異的に高値を示し、さらに ISSc、dSSc と

もに上昇がみられたことから、CCL13 が活性酸素の生成を促進することにより SSc の発症および病態形成に関与している可能性が示唆される。

E. 結論

血清 CCL13 値は SSc で特異的に上昇がみられるため、SSc に特異的な血清マーカーが存在しない現在、血清 CCL13 値の測定は SSc の診断に有用と考えられた。

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. Murrell DF. A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 78-85.
4. Suemitsu M, Wakabayashi Y, Ishimura Y, et al. A new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 679-86.
5. Butler AR, Flitney FW, Williams DL, et al. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 18-22.
6. Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990; 265: 659-65.
7. Petering H, Hochstetter R, Kimmig D, et al. De-

tection of MCP-4 in dermal fibroblasts and its activation of the respiratory burst in human eosinophils. *J Immunol* 1998; 160: 555-8.

8. Shimizu K, Ogawa F, Akiyama Y, et al. Increased serum levels of N^ε-(hexanol) lysine, a new marker of oxidative stress, in systemic sclerosis. *I Rheumatol* 2008; 35: 2214-19.

9. Ogawa F, Shimizu K, Hara T, et al. Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2008; 26: 659-62.

F, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S: CCL13 is a promising diagnostic marker for systemic sclerosis, *Br J Dermatol*, 2010; 62; 332-36.

2. 学会発表

Yanaba K, Yoshizaki A, Muroi E, Sato S: CCL13 is a promising diagnostic marker for systemic sclerosis. Concurrent Oral session "Clinical Research and Therapeutics" The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2010/12/4 和歌山県立文化会館 (和歌山市)

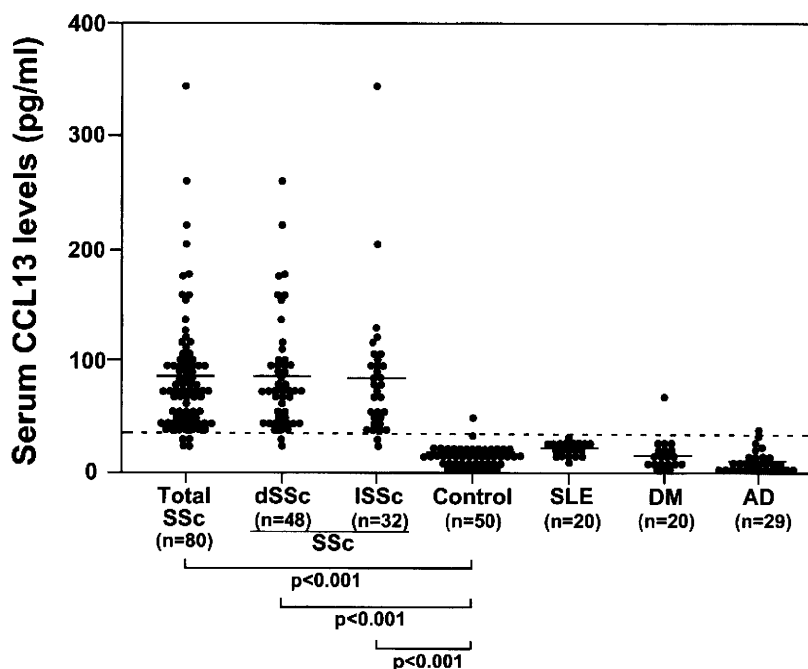
G. 研究発表

1. 論文発表

Yanaba K, Yoshizaki A, Muroi E, Hara T, Ogawa

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



図：dSSc、ISSc、全身性エリテマトーデス（SLE）、皮膚筋炎（DM）、アトピー性皮膚炎（AD）、健常人（Control）における血清 CCL13 値。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 CCL13 levels.

	Elevated CCL13 n=76	Normal CCL13 n=4
Age at onset, yrs, mean \pm SD	47 \pm 15	37 \pm 14
Male : Female	11: 65	1: 3
Duration, yrs, mean \pm SD	4.2 \pm 5.7	4.9 \pm 3.7
TSS, points, mean \pm SD	13.4 \pm 9.3	12.3 \pm 7.9
Clinical features %		
dSSc	61	50
ISSc	39	50
Pitting scars/ulcers	30	50
Contracture of phalanges	41	0
Diffuse pigmentation	46	75
Telangiectasia	38	75
Organ involvement %		
Pulmonary fibrosis	58	25
Decreased %VC	23	25
Decreased %DLco	60	50
Pulmonary hypertension	15	0
Esophagus	69	50
Heart	11	0
Kidney	2	0
Joint	14	50
Muscle	11	0
Laboratory findings %		
Anti-topoisomerase I Ab	42	25
Anticentromere Ab	37	25
Increased IgG	25	25
Elevated ESR	47	25
Elevated CRP	17	25

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 CCL13 levels.

全身性強皮症患者における血清中 secretory leukocyte protease inhibitor 濃度の臨床的意義

研究分担者 浅野善英 東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
協力者 青笹尚彦 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 赤股 要 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者 玉城善史郎 東京大学医学部附属病院皮膚科 助教
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

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) は serine protease 活性を有する多機能蛋白である。今回、我々は全身性強皮症患者 58 例で血清中の SLPI 濃度を ELISA にて測定した。

その結果、SLPI は肺線維症を有する患者群で有意に高値であった。さらに、SLPI 高値群では、%DLco と %VC は有意に低下しており、血清中 SLPI 濃度と %DLco は負の相関を示した。その一方で、血清中 SLPI 濃度は、血清中 SP-D 濃度と正の相関を示した。また、血清中 SLPI、SP-D、KL-6 濃度は、全身性強皮症患者の肺線維症の診断において、同等の感度と特異度を示した。経時的な血清 SLPI 濃度の測定からは、血清 SLPI 濃度は肺線維症の病勢と関連して変動し、血清中 SLPI 濃度と SP-D 濃度は関連して変動することを示唆した。以上の結果から、SLPI は全身性強皮症患者における肺線維症の血清マーカーとして有用であることが示された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (SSc) は皮膚および肺、心、腎、消化管などの内臓諸臓器の線維化を主徴とする系統疾患である。今回我々が着目した SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) は、種々の protease に対する拮抗作用、抗菌活性、抗炎症作用などを有する多機能蛋白質である¹⁾。肺、涙腺、性腺、皮膚などの分泌細胞から分泌される²⁾。そして、肺炎、COPD、ARDS などの肺疾患において上昇することが示されている³⁾。

今回、我々は SSc における肺疾患との関与を検討することを目的とし、SSc 患者血清中の SLPI 濃度

を測定し、臨床症状との関連を検討した。また、従来から用いられている肺線維症 (PF) の血清マーカーである SP-D⁴⁾、KL-6⁵⁾ とも比較、検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は SSc 58 例 (56 人女性、2 人男性) で、SSc の病型は、diffuse cutaneous SSc (dcSSc) 30 人、limited cutaneous SSc (lcSSc) 28 人であった。16 人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、患者から文章による同意を得た。

2) SLPI 濃度の測定

ELISA 法により、血清 SLPI (R&D systems, Minneapolis MN, USA) 濃度を測定した。

3) 血清 SLPI 濃度と臨床症状の相関

SSc 患者を血清 SLPI 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。

C. 研究結果

1) SSc における血清 SLPI 値

dcSSc で肺線維症 (PF) を有する患者群では平均 43.1 ± 18.4 ng/ml、dcSSc で PF を持たない患者群の平均 24.6 ± 11.3 ng/ml、健常人 30.9 ± 3.76 ng/ml と比較して有意に SLPI 濃度が高値であった。また、lcSSc で PF を有する患者群は平均 39.8 ± 10.3 ng/ml であり、健常人と比較して有意に SLPI 値が高値であった。一方、PF を持たない dcSSc、lcSSc は共に健常人と比較して有意差はみられなかった (図 1)。

2) SSc 患者における血清 SLPI 値と臨床所見および検査所見との相関

表 1 に示す通り、カットオフ値を 38.4 ng/ml (健常人の平均 $+2SD$) とし、SSc 患者の血清 SLPI 値と臨床所見および検査所見との相関をみた。解析には Fisher's exact test を用いた。肺線維症を有する患者の割合、%VC と %DLco が低下している割合が、SLPI 高値群で有意に高かった。さらに、SLPI 濃度は %DLco と有意に逆相関していることが判明した (図 2a)。

以上より、SLPI は PF の重症度と相関していることが示唆された。

3) SLPI、SP-D、KL-6 値の比較

SLPI は SP-D と有意に正の相関を示したが、KL-6 とは相関しなかった (図 2b)。また、本症例における PF に対する感度と特異度を計算したところ、

SLPI (感度 62%、特異度 72%)、SP-D (感度 73%、特異度 80%)、KL-6 (感度 64%、特異度 83%) と近い値を示した。

また、初診時 PF (-) であったが、経過中に PF を発症した患者 7 人の検討を行った。そのうち、SLPI 高値が 4 人おり、そのうち 3 人は SP-D、KL-6 は共に正常範囲内であった。一方、SLPI 正常範囲内の患者が 3 人おり、そのうち、SP-D 高値が 1 人、KL-6 高値が 3 人いた。

以上より SLPI は SSc において、SP-D、KL-6 に近い感度と特異度を有し、三者を組み合わせることで将来の PF の発症を予測できることを示唆した。

4) SLPI、SP-D 値の経時的解析

PF を有する SSc 患者 3 例において SLPI、SP-D 値を経時的に測定し、PF の病勢との関連を解析した。その結果、PF の病勢に相関して SLPI、SP-D 値は共に上昇し、加療に伴い低下する傾向がみられた (図 3)。

D. 考案

本研究で、dcSSc、lcSSc 患者共に、PF を有する群で SLPI が有意に上昇していることが確認された。%VC と %DLco が低下している割合は SLPI 上昇群で有意に高値であった。また、SLPI は SP-D と正の相関を示した。さらに、経時的な解析によって、SLPI は病勢と相関していることを示唆した。これらの結果は SLPI が SSc において、PF の重症度や活性と相関していることを示唆する。さらに、PF を将来発症する SSc の患者群で SP-D、KL-6 が正常範囲内であっても SLPI が上昇しうることがあることは、SP-D、KL-6 に加えて SLPI を測定することの重要性を示唆していると考えられる。

SLPI は SP-D とは有意な相関を有したが、KL-6

とは明らかな相関を示さなかった。SP-Dは、Ⅱ型肺胞上皮細胞、クララ細胞から分泌され、線維化よりも、肺肺炎を反映すると考えられている。一方、KL-6は、Ⅱ型肺胞上皮細胞、呼吸細気管支上皮細胞から分泌されるが、特に再生Ⅱ型肺胞上皮細胞から分泌される。その為、線維化を反映するといわれている。SP-Dと相関が強いSLPIは、肺肺炎と相関する可能性が考えられる。また、SLPIは%DLcoと%VC、中でも%DLcoと有意な負の相関を示した。肺線維症においては、発症初期に%DLcoが低下し、遅れて%VCが低下する。そのため、SLPIの上昇は、肺線維症の初期を反映している可能性が考えられる。SP-Dも同様に肺線維症の初期を反映しているため、この両者に正の相関が得られたのではないかと考えている。

E. 結論

SScにおいて、SLPIは肺線維症の有用な血清マーカーの候補、発症予測因子になりうると思った。

F. 文献

1. Weldon S, Taggart CC: Innate host defense functions of secretory leukoprotease inhibitor. *Exp Lung Res.* 2007; 33: 485-91.
2. Sallenave JM: The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease. *Respir Res.* 2000; 1: 87-92

3. Kida K, Mizuuchi T, Takeyama K, Hiratsuka T, Jinno S, Hosoda K, Imaizumi A, Suzuki Y: Serum secretory leukoprotease inhibitor levels to diagnose pneumonia in the elderly. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1426-9
4. Yamane K, Ihn H, Kubo M, Yazawa N, Kikuchi K, Soma Y, Tamaki K: Serum levels of KL-6 as a useful marker for evaluating pulmonary fibrosis in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 930-4
5. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Fujimoto M, Tamaki K: Clinical significance of surfactant protein D as a serum marker for evaluating pulmonary fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1363-9

G. 研究発表

1. 論文発表

Aozasa N, Asano Y, Akamata K, Noda S, Masui Y, Tamaki Z, Kadono T, Sato S. Clinical significance of serum levels of secretory leukocyte protease inhibitor in patients with systemic sclerosis. submitted

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

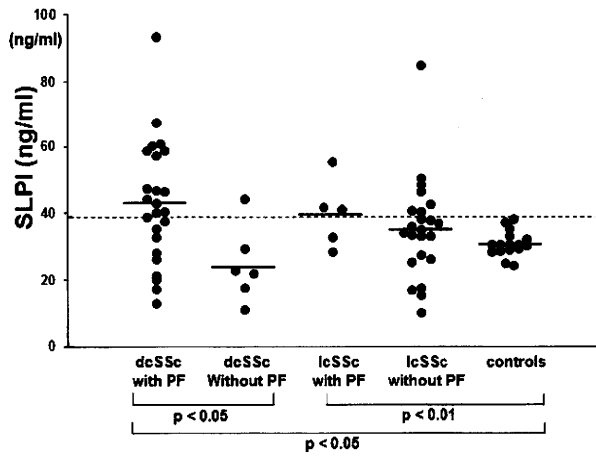


図1：ELISA 法により測定した dcSSc、lcSSc および健常コントロール群における血清 SLPI 濃度。PF は肺線維症を示す。点線は健常人の平均値 +2SD に設定した cut off 値を示す。

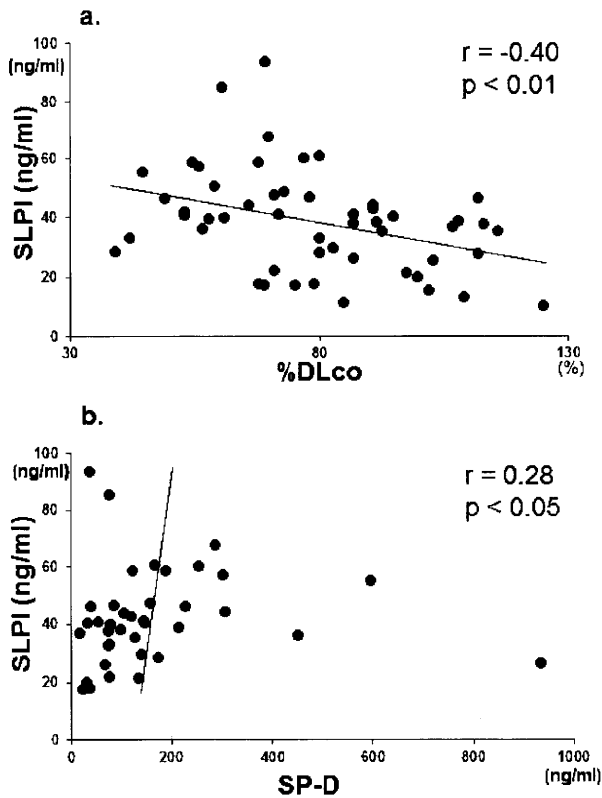


図2：a) ELISA 法により測定した血清 SLPI 濃度と %DLco との相関関係
b) 血清 SLPI 濃度と血清 SP-D 濃度との相関関係

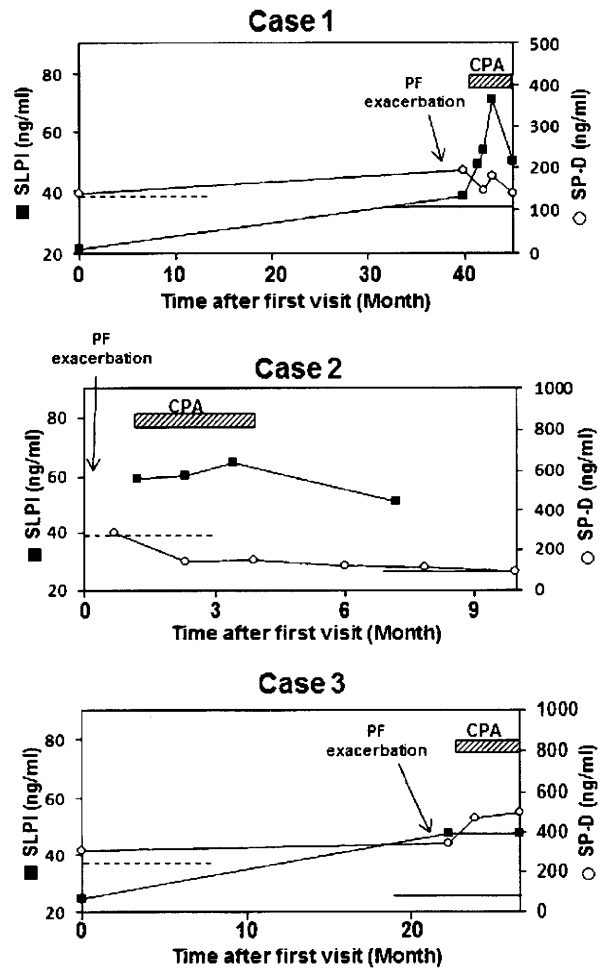


図3：SSc 患者における、血清 SLPI, SP-D 濃度の経時的な変化。破線は健常人の平均値 +2SD に設定した SLPI の cut off 値を示す。直線は SP-D の cut off 値を示す。CPA はシクロフォスファミドの経静脈的投与を示す。

表 1. 全身性強皮症患者における血清 SLPI 濃度と臨床症状・検査所見との相関

	Patients with elevated SLPI levels (n = 26)	Patients with normal SLPI levels (n = 32)
Sex, no. male:no. female	0:26	2:30
Age, mean years	60.8 ± 12.6	54.8 ± 16.3
Disease duration, mean years	11.5 ± 13.1	6.2 ± 7.0
Skin sclerosis (dcSSc:lcSSc)	16:10	14:18
Clinical features, %		
Pitting scars/ulcers	42	32
Pigmentation	48	52
Calcinosis	22	10
Telangiectasia	68	37
Nailfold bleeding	63	68
Organ involvements, %		
Esophagus	35	55
Lung	69*	34
Decreased %DLco	73**	31
Decreased %VC	24*	4
Pulmonary hypertension	20	4
Heart	12	0
Kidney	19	7
Muscle	5	4
Joint	44	43
Sicca symptoms	33	31
ANA specificity, %		
Anti-Topo I	42	28
ACA	35	41
Anti-U1 RNP	19	9
Laboratory findings, %		
Elevated ESR	57	72
Increased CRP	14	8

* p < 0.05, ** p < 0.01 vs. SSc patients with normal SLPI levels.

CTGF 長期サイレンシングによる全身性強皮症由来真皮線維芽細胞への影響

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 横山洋子 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学

協力者 安部正敏 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 講師

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

全身性強皮症において皮膚の線維化に関与すると考えられている connective tissue growth factor (CTGF) の長期間サイレンシングによる治療を想定し、健常人および強皮症患者由来の線維芽細胞にどのような影響をおよぼすかについて検討した。健常人および強皮症患者由来の真皮線維芽細胞に CTGF 特異的 siRNA を 1~3 回トランスフェクションし、細胞増殖能および matrix metalloproteinase (MMP)-1 の産生量を比較検討した。トランスフェクションを繰り返すに従って CTGF サイレncing 線維芽細胞の細胞数は減少し、これは強皮症由来線維芽細胞で顕著であった。また CTGFsiRNA を 3 回トランスフェクションした強皮症由来の CTGF サイレncing 線維芽細胞は mock および健常人由来線維芽細胞に比較し増殖が低下する傾向が見られた。DNA マイクロアレイ解析では、CTGF サイレncing により、強皮症由来線維芽細胞で cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) と cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, kip1) に発現の変化がみられたため、タンパクレベルで確認したところ、強皮症由来の CTGF サイレncing 細胞は健常人のそれに比べ、CDK2 は減少、p27 は若干の増加となり細胞増殖抑制の方向に働いていることが示唆された。リコンビナント CTGF を添加しても CTGF サイレncing 細胞の増殖能の回復はみられなかった。MMP-1 の産生量は強皮症由来 CTGF サイレncing 線維芽細胞でトランスフェクションを繰り返すことにより、より多くの MMP-1 を産生していた。以上のことより、全身性強皮症の皮膚硬化部位への CTGFsiRNA の局所導入が可能になれば、細胞の増殖抑制と MMP-1 の産生亢進によって皮膚硬化が改善する可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症の線維化の機序は竹原らにより 2 段階仮説が提唱されている¹⁾。すなわち、TGF- β が線維芽細胞を刺激し、その後誘導される CTGF がさらなるコラーゲンの過剰産生を促し、線維化を維持させるという考えである。CTGF はコラーゲン産生を促進するが、その他の細胞外基質関連蛋白に対する作用は明らかではない。

全身性強皮症治療における CTGF をターゲットとした RNAi 法の治療応用への可能性については、強皮症患者由来の培養細胞の CTGF を RNAi 法によりノックアウトすることでコラーゲン産生が低下したという報告が 2006 年になされた²⁾。さらに 2010 年に当教室の石渕らは、健常人由来真皮線維芽細胞と強皮症患者由来真皮線維芽細胞の CTGF を RNAi 法によりサイレンシングし、TGF- β で刺激を

行ったところ、強皮症患者由来線維芽細胞のみで MMP-1 の mRNA 発現およびタンパク産生が増加したことを報告した³⁾。そこで今回、我々は RNAi 法により CTGF をターゲットとして長期間の発現抑制を図り、CTGF サイレンシングが細胞外基質代謝を含めた真皮線維芽細胞へ及ぼす影響を調べることで将来の強皮症治療への応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

健康人 3 名および全身性強皮症患者 3 名について、患者の同意を得た上で皮膚を採取し、explant culture 法にて真皮由来線維芽細胞を得た。線維芽細胞は 10% 牛胎児血清含有 DMEM 培地にて継代し、実験には継代 3~6 代目のものを供した。

2) CTGF サイレンシング

CTGF サイレンシングは RNAi 法を用いた。siRNA は石渕らの報告³⁾と同様の配列のものを用いた。線維芽細胞を 6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1×10^5 個播種し、トランスフェクションにはリポフェクタミン 2000 (invitrogen) を使用し、1 回目のトランスフェクション後、72 時間後に線維芽細胞をサブカルチャーし、さらに 72 時間培養した。2 回目のトランスフェクションは計 144 時間後に行い、同様に 72 時間後に再びサブカルチャーを行って、さらに 72 時間培養した。3 回目のトランスフェクションも同様に 2 回目施行後 144 時間で行った。72 時間後にサブカルチャーを行い、さらに 72 時間 (計 144 時間後) 培養を続けた。サイレンシングの確認は各トランスフェクション後 72 時間と 144 時間の細胞抽出液 10~20 μg を電気泳動し、抗 CTGF 抗体 (Santa Cruz) を用いたウエスタンブロット法により行った。

3) 細胞増殖能と細胞増殖関連蛋白の発現

線維芽細胞に CTGFsiRNA を 3 回トランスフェクションし、72 時間後のサブカルチャー時に 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1×10^4 個播種し、68 時間後に MTS 試薬を添加して 2 時間、4 時間後の吸光度を測定した。さらに一方で、リコンビナント CTGF (PeproTech) と MTS 試薬を各ウェルに添加し、4 時間後の吸光度を測定した。なお、MTS 試薬添加の 24 時間前に無血清培地に交換した。細胞増殖関連蛋白の発現は、DNA マイクロアレイ解析で CTGF サイレンシングにより発現に変化のあった cyclin -dependent kinase 2 (CDK2) と cyclin -dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1) について、CTGFsiRNA を 3 回トランスフェクションし 72 時間後の細胞抽出液をウエスタンブロット法にて検出した。抗体はいずれも Santa Cruz 社のものを用いた。検出されたバンドは 1 次元電気泳動画像解析ソフトウェア Basic Quantifier (リライオン) を用いて定量した。

4) MMP-1 定量

MMP-1 産生は、トランスフェクション 1 回と 3 回後 72 時間の培養上清を回収し、ELISA キット (Daiichi fine chemical) にて定量した。培養上清の回収と同時に各ウェルの細胞数を測定し、細胞数あたりのタンパク量を算出した。

5) DNA マイクロアレイ解析

トランスフェクション 1 回後の mock および CTGF サイレンシング線維芽細胞から抽出した RNA を用い 2 色法による DNA マイクロアレイ解析を行った。

C. 研究結果

1) RNAi 法による CTGF サイレンシング

BLAST 検索を用いて CTGF に特異的に作製した siRNA のトランスフェクションにより、CTGF が著明にサイレンシングされていた (図 1)。

2) CTGF 長期サイレンシングの細胞数への影響

CTGFsiRNA のトランスフェクションから 72 時間後のサブカルチャーを各ウェル毎に 1:2 で行ったところ、トランスフェクションを繰り返すに従って CTGF サイレンシング線維芽細胞の細胞数が減少し、これは強皮症由来線維芽細胞で顕著であった (図 2-a)。トランスフェクション後のサブカルチャーをすべてのウェルの細胞数を揃えて播種し、トランスフェクションの 72 時間後、144 時間後の細胞数を測定した結果も同様に、強皮症由来の CTGF サイレンシング線維芽細胞でトランスフェクションを繰り返すに従い、細胞数が減少した (図 2-b)。

3) CTGF 長期サイレンシングの増殖能への影響

CTGFsiRNA を 3 回トランスフェクションした線維芽細胞をサブカルチャーし、MTS 法により増殖能を検討した。MTS 試薬添加後、2 時間から 4 時間の増殖能は、グラフの傾きから強皮症由来の CTGF サイレンシング線維芽細胞で低い傾向が見られた (図 3)。また、リコンビナント CTGF を添加し、CTGF サイレンシング細胞の増殖能が回復するかを検討したが、健常人由来および強皮症由来線維芽細胞ともに、CTGF の濃度にかかわらず、CTGF を添加しない細胞と同程度の増殖能であった (図 4)。

4) CTGF 長期サイレンシングによる細胞増殖関連蛋白への影響

DNA マイクロアレイ解析では、CTGF サイレンシングにより強皮症由来線維芽細胞のみ変動を示した細胞増殖関連遺伝子は、cyclin-dependent kinase

2 (CDK2) と cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27,kip1) で、前者は発現が減少、後者は発現が増加していた。そこでトランスフェクションを 3 回おこなった線維芽細胞において、CDK2 と p27 のタンパクレベルでの発現をウエスタンブロット法にて確認したところ、強皮症由来の CTGF サイレンシング細胞は、健常人のそれに比べ、CDK2 は減少、p27 は若干の増加を示しており、細胞増殖抑制の方向に働いていることが示唆された (図 5)。

5) CTGF 長期サイレンシングによる MMP-1 産生への影響

トランスフェクション 1 回と 3 回後、72 時間の培養上清中の MMP-1 は、健常人由来の CTGF サイレンシング線維芽細胞に比べ、強皮症由来 CTGF サイレンシング線維芽細胞で産生量が多く、強皮症由来 CTGF サイレンシング線維芽細胞では、トランスフェクションを繰り返すことでより多くの MMP-1 を産生していた (図 6)。

D. 考察

全身性強皮症にみられる病的線維化は、細胞外基質の産生と分解の均衡が崩れることによりもたらされると考えられている。その原因は TGF- β をはじめ様々な増殖因子が考えられるが、機序としては TGF- β が線維化を誘導し、CTGF が線維化を維持するという考えは広く知られている。実際、強皮症の病変部および血清中の CTGF が亢進していることが明らかとなっており^{4,5)}、これらを考え合わせると全身性強皮症においては、TGF- β よりもむしろ CTGF を抑制する方が治療のターゲットになる可能性が考えられる。Ishibuchi らは RNAi 法を用いた CTGF のサイレンシングによって、強皮症患者由来線維芽細胞で MMP-1 の mRNA 発現およびタンパ

ク産生が増加したとし、全身性強皮症治療への可能性を示唆した³⁾。今回、我々はCTGFを長期間サイレンシングすることによる効果を検討したが、強皮症由来線維芽細胞で長期サイレンシングによって、MMP-1の産生が増加することが明らかになり、全身性強皮症治療への可能性を示す結果を得た。また、CTGF長期サイレンシングによって、健常部由来線維芽細胞に比べ強皮症由来線維芽細胞ではCDK2の発現減少とp27の発現増加によると考えられる細胞増殖の抑制がみられ、MMP-1産生の亢進と合わせて、全身性強皮症の皮膚硬化部へのRNAi法の応用に効果が期待できると考えた。

E. 結論

全身性強皮症の皮膚硬化部位へのCTGFsiRNAの局所的な導入が可能になれば、細胞の増殖抑制とMMP-1の産生亢進によって皮膚硬化が改善する可能性が示唆された。

F. 文献

1. Takehara K: Hypothesis: pathogenesis of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003; 30: 755-9.
2. Xiao R, Liu FY, Luo JY, Yang XJ, Wen HQ, Su YW, et al: Effect of small interfering RNA on the expression of connective tissue growth factor and type I and III collagen in skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2006; 155: 1145-53.

3. Ishibuchi H, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O: Induction of matrix metalloproteinase-1 by small interfering RNA targeting connective tissue growth factor in dermal fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Exp Dermatol* 2010; 19: e111-6.
4. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, Takehara K: Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 280-4.
5. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K: Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 149-54.

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

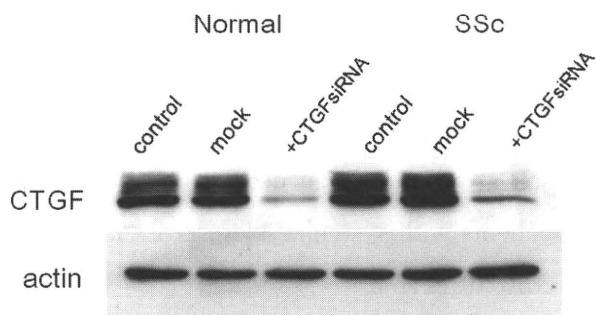


図1：CTGF 特異的 siRNA による CTGF サイレンシング効果。siRNA 配列：5'-AAUCGGAAUCCUGUCGAUUAGTT-3'

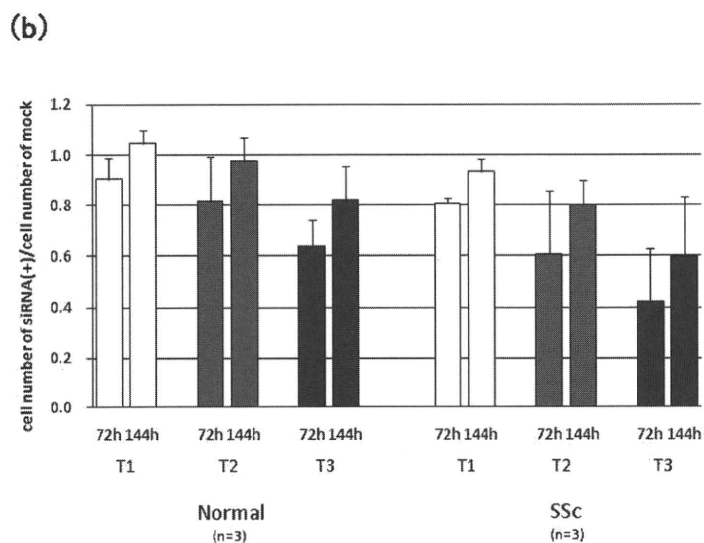
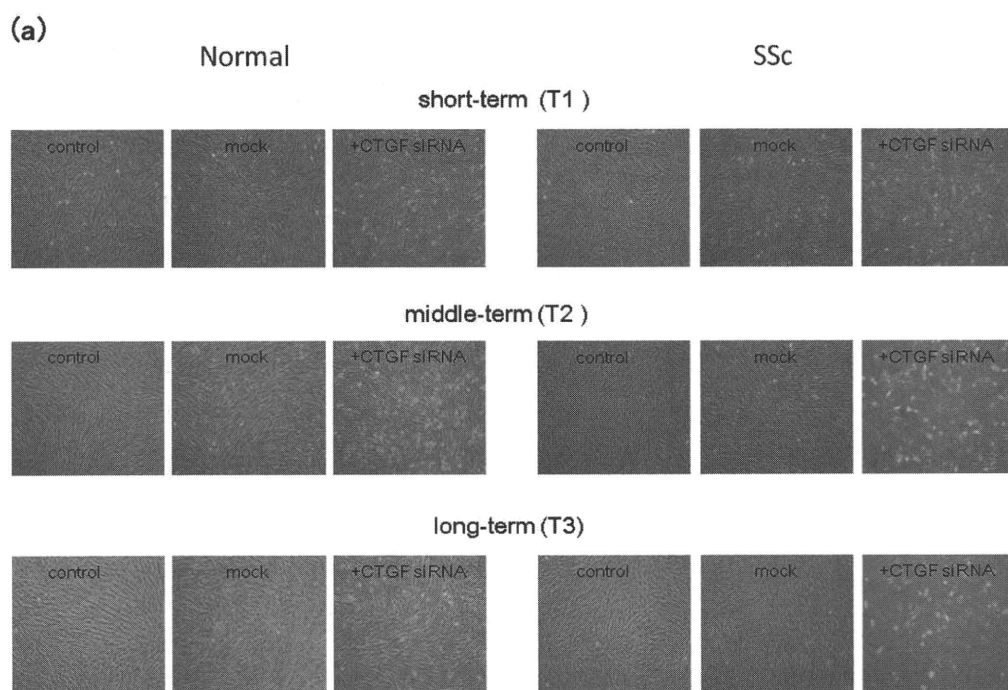


図2：CTGF 長期サイレンシングの細胞数への影響。(a) CTGFsiRNA トランスフェクション1回 (T1) ~3回 (T3) 後、72時間培養した線維芽細胞 (x50)。サブカルチャーは各ウェル1:2で行った。(b) CTGFsiRNA トランスフェクション1回 (T1) ~3回 (T3) 後、72時間および144時間培養したCTGFサイレンシング線維芽細胞数を mock 細胞数との比で表した (平均値 ± SD)。サブカルチャーは各ウェル同数を播種した。

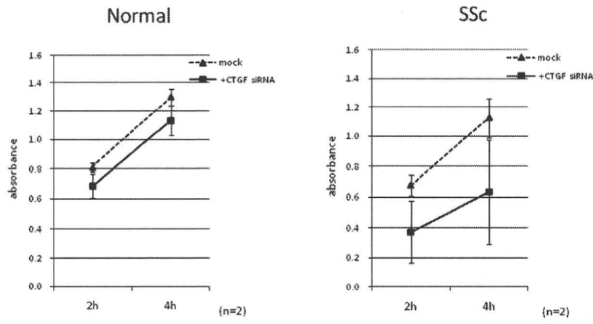


図3: CTGF長期サイレンシングの増殖能への影響。siRNA トランスフェクション3回後、サブカルチャーした線維芽細胞にリコンビナントCTGFを添加し、2、4時間後の細胞増殖能をMTS法にて測定。490nmの吸光度で示した。平均値±SD。

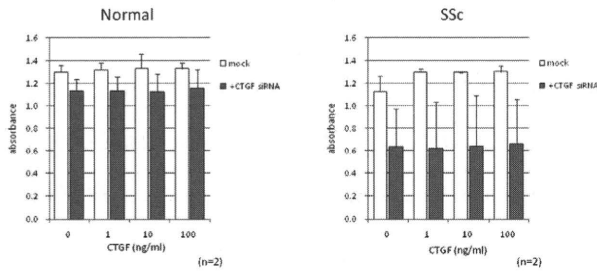


図4: リコンビナントCTGF添加によるCTGF長期サイレンシング線維芽細胞の増殖への影響。siRNA トランスフェクション3回後、サブカルチャーした線維芽細胞にリコンビナントCTGFを添加し、4時間後の細胞増殖能をMTS法にて測定。490nmの吸光度で示した。平均値±SD。

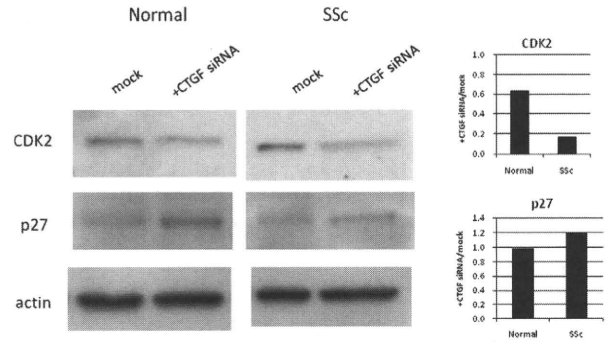


図5: CTGF長期サイレンシングによる細胞増殖関連タンパクへの影響。siRNA トランスフェクション3回後、72時間培養した線維芽細胞のCDK2とp27発現をウエスタンブロット法で確認した。検出されたバンドを定量し、アクチンで補正後、mockとの比をグラフに示した。

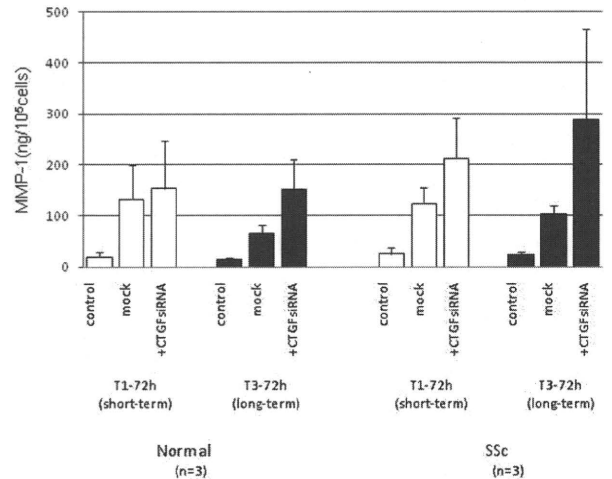


図6: CTGF長期サイレンシングによるMMP-1産生への影響。トランスフェクション1回(T1)、3回(T3)後、72時間培養した培養上清を用いELISA法にて定量した。グラフは線維芽細胞数 10^5 個あたりのMMP-1量で示した。平均値±SD。

全身性強皮症の病態における Thrombospondin-2 (TSP-2) の関与の検討

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 教授
研究協力者	梶原一亨	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 講師
研究協力者	本多教稔	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
研究協力者	牧野貴充	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 助手
研究協力者	岡本芳伸	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 大学院生
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
研究協力者	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

研究要旨

Thrombospondin (TSP) family は細胞外マトリックスのひとつであり、TSP-1 から TSP-5 までの5種のサブタイプを有している。TSP-1 および TSP-5 は、強皮症皮膚線維芽細胞において強発現を有しており、血清中で増加していることが報告されている。今回、TSP-2 に関して検討したところ、皮膚線維芽細胞内において合成は低下している一方で、細胞外および患者血清中では増加していた。また皮膚線維芽細胞において TSP-2 は I 型コラーゲン合成を促進していた。以上より、強皮症の病態において、TSP-2 の分解低下が起因となり線維化が亢進されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

TSP-2 は、細胞外マトリックス調節や血管新生に関与することが示唆されており、創傷治癒過程において TSP-2 の過剰発現が認められている¹⁾。また TSP-2 null mice において、真皮のコラーゲン線維は異常な形態を示す²⁾。さらに TSP-2 は血管内皮細胞の増殖を阻害する³⁾。しかし、強皮症の病態と TSP-2 の発現および役割に関する検討は未だなされていない。今回、我々は強皮症皮膚線維芽細胞における TSP-2 の発現および役割を検討することにて、強皮症の病態を検討した。

B. 研究方法

1) 患者背景

血清試料は 33 人の強皮症患者（男性 6 人、女性 27 人；年齢 24-87 歳（平均 60.1 歳））より取得した。内訳は、dcSSc は 14 人、lcSSc は 19 人であった。健常群の血清試料 14 人の内訳は年齢および性別が伴うものを選択した。皮膚生検は非露光部の体幹もしくは前腕より行った。検体取得に際して、熊本大学大学院生命科学研究部倫理委員会より承諾された文書にて説明し同意、署名を得た。

2) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞の取得は発症 2 年以内の