

を開始した。このときの血中濃度は症例1と同様に内服後3時間値を1-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ と設定した。併せてプレドニゾロンの減量を徐々に行った。維持療法開始後、18ヶ月間で胸部HRCT、呼吸機能検査、KL-6、SP-Dなどの血液検査上、シクロホスファミドパルス療法終了後よりもさらなる間質性肺炎の改善を認めた。プレドニゾロンは現在6 mg/dayまで減量できた。経過を通して現在までに、MZRによる副作用は認めていない。

#### D. 考案

近年、シクロホスファミドパルス療法はSSc合併間質性肺炎に対する有効な治療法として注目されるようになってきた。しかし、シクロホスファミドパルス療法は単独ではその効果が治療開始後2年程で失われるため治療後の維持療法が必要とされ、維持療法として副作用の少ない、有効な治療法の開発が課題の1つとして挙げられる。今回、我々はMZR 150 mgの単回内服療法をシクロホスファミドパルス療法後の維持療法として用いた。症例1では維持療法開始後から現在までの6ヶ月間、症例2では18ヶ月間において、間質性肺炎の再燃および副作用の発現を認めなかった。

1971年に日本で開発された免疫抑制剤であるMZRは、*Eupenicillium brefeldianum*の培養液から発見されたイミダゾール系核酸関連物質である<sup>4,5)</sup>。現在までに腎移植における拒否反応の抑制、ループス腎炎、慢性関節リウマチ、原発性糸球体疾患起因性ネフローゼ症候群に対して承認、使用されている<sup>6)</sup>。慢性関節リウマチに対してMZRは1992年に治療薬として承認された。慢性関節リウマチに対するMZRの特徴として、朝の手のこわばり、腫脹関節数、疼痛関節数の改善、ならびに臨床検査でのリ

ウマトイド因子の陰性化など免疫学的な改善は認められるものの、CRPや赤沈値の改善などの抗炎症作用は認められないと報告された<sup>7)</sup>。その臨床試験での治療効果は、MZR 150 mg分3投与では、やや改善以上の改善率は45.9%であったと報告されている<sup>8,9)</sup>。また、ループス腎炎においてもMZRは尿蛋白減少効果、再燃抑制効果ならびにステロイド減量効果があると報告されているが、従来の1日150 mg分3投与では十分な治療効果が認められない症例も散見された<sup>10)</sup>。In vitroでのMZRによるリンパ球の増殖抑制効果を同種抗原刺激でのリンパ球増殖で検討した研究によると、MZRは濃度依存的にリンパ球の増殖を抑制し、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で52.6%抑制すると報告されている<sup>11)</sup>。また、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のMZR血中濃度は、150 mgの単回内服投与3時間後に得られ、100 mgの分2投与と150 mgの分3投与ではいずれも1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の血中濃度しか得られないとする報告がある<sup>12,13)</sup>。実際、ループス腎炎および関節リウマチにおいてMZR 150 mg単回内服投与とし、血中濃度を1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上としたところ、治療効果が高まったとする報告がある<sup>13,14)</sup>。今回の我々の症例では維持療法で用いたMZRの投与方法を150 mg単回内服投与とし、血中濃度を内服後3時間値で1-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。その結果、症例1では6ヶ月間間質性肺炎の再燃を認めず、症例2では維持療法の18ヶ月でさらなる改善を認めた。このように、MZR 150 mg/mlの単回内服投与はSSc合併間質性肺炎のシクロホスファミドパルス後の維持療法として有用であることが示された。

細胞の核酸合成にはde novo経路とsalvage経路があり、リンパ球は主にde novo経路に依存している。MZRは細胞内に取り込まれると、アデノシンキナーゼによりリン酸化され活性体となり、de novo

経路の律速酵素である IMP デヒドロゲナーゼを特異的に競合阻害する。その結果、リンパ球では細胞内のグアノシヌクレオチド濃度が低下し、増殖が抑制され免疫抑制作用を示す。リンパ球以外の細胞では salvage 経路も利用できるため MZR の影響が少なく、他の免疫抑制剤に比べ肝障害や骨髄抑制の発現が少なく、比較的 안전한免疫抑制剤として考えられている<sup>4,5,15,16)</sup>。川上らの報告によると、関節リウマチ、全身性ループスエリテマトーデス、血管炎、成人発症 Still 病、混合性結合織病の計 59 例において MZR 150 mg 単回内服投与を行ったところ、副作用発現はわずか 1 例に軽度の皮疹の出現を認めたのみであった<sup>17)</sup>。今回検討した 2 例においても、MZR 内服開始から現在まで副作用の発現を認めなかった。このことから、MZR は副作用発現の少ない、安全に使用できる免疫抑制剤と考えられた。

以上の結果から、さらなる症例の蓄積が必要であるものの、SSc 合併間質性肺炎におけるシクロホスファミドパルス療法後の維持療法として、MZR 150 mg 単回内服投与は有効で、かつ副作用発現の少ない治療法である可能性が示唆された。

## E. 結 論

SSc 合併間質性肺炎におけるシクロホスファミドパルス療法後の維持療法として、内服 3 時間後の血中濃度を 1-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  へ設定した MZR 150 mg 単回内服投与は有効である可能性が示された。年、

## F. 文 献

1. D'Angelo WA, et al. Am J Med 1969; 46: 428.

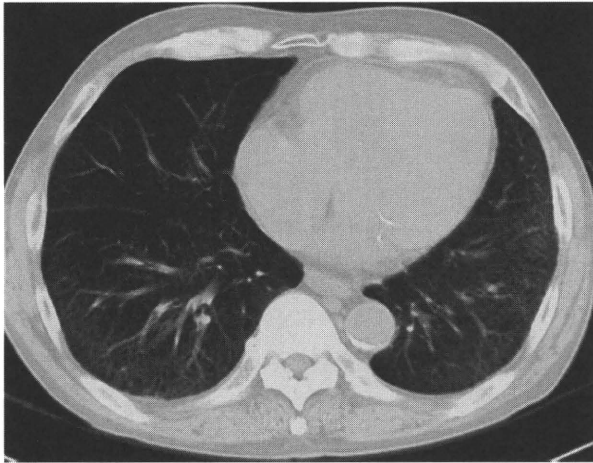
2. Berezne A, et al. Ann N Y Acad Sci 2007; 1110: 271.
3. Steen VD, et al. Arthritis Rheum 1998; 41: 1613.
4. Mizuno K, et al. J Antibio 1974; 27: 775.
5. Sakaguchi K, et al. Cancer Res 1975; 35: 1643.
6. 免疫抑制薬の選び方と使い方 2000; 南江堂.
7. 鈴木昭夫ら。Progress in Medicine 1997; 17: 139.
8. 柏崎禎夫ら。炎症 1996; 16: 269.
9. 近藤啓文ら。炎症 1998; 18: 61.
10. Yumura W, et al. Clin Nephrol 2005; 64: 28.
11. Sonda K, et al. Transplant Proc 1996; 28: 3643.
12. 湯村和子ら。腎と透析 1999; 47: 5.
13. 膠原病・血管炎の腎障害 up to date 1999; 東京医学社.
14. 志田純一ら。九州リウマチ 2006; 26: 9
15. Koyama H, et al. Biochem Pharmacol 1983; 32: 3547.
16. Kusumi T, et al. Cell Biochemistry and Function 1988; 7: 201.
17. 川上純ら。Pharma Medica 2008; 26: 111

## G. 研究発表

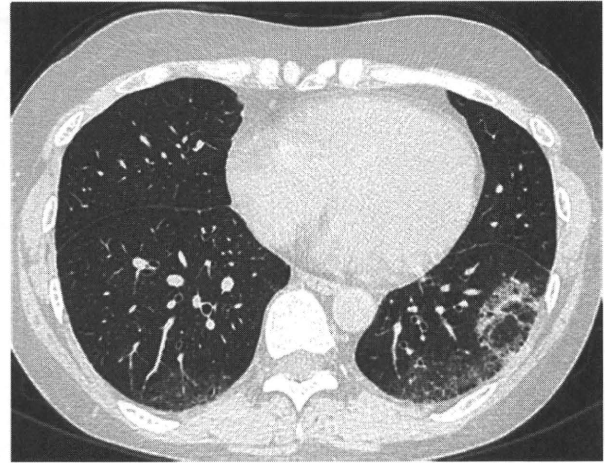
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

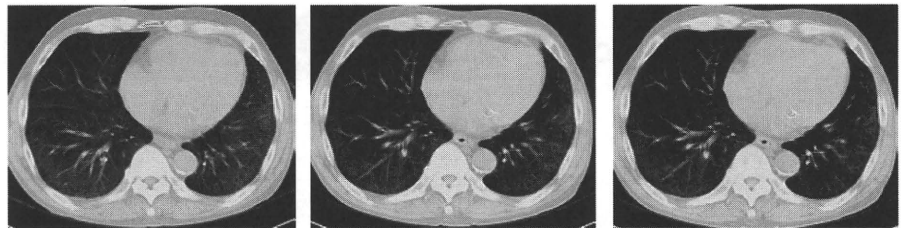


症例1



症例2

図1：症例1と症例2の胸部HRCT



Modified Rodnan TSS	12	6	4
%VC (%)	98.2	112.3	123.6
%DLco (%)	54.6	63.2	67
KL-6 (U/ml)	570	508	452
SP-D (ng/ml)	122	94	72



Cyclophosphamide pulse  
(IBW x 15 mg/dose/month)

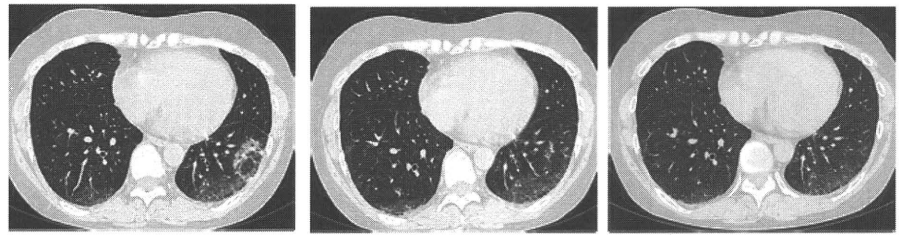
6ヶ月

MZR 150 mg/day  
単回投与後2時間値  
1-2 µg/ml

PSL (mg/day)



図2：症例1の治療経過



<b>Modified Rodnan TSS</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	<b>5</b>
<b>%VC (%)</b>	<b>94.1</b>	<b>99.5</b>	<b>102.2</b>
<b>%DLco (%)</b>	<b>54.5</b>	<b>66.5</b>	<b>75.9</b>
<b>KL-6 (U/ml)</b>	<b>584</b>	<b>516</b>	<b>484</b>
<b>SP-D (ng/ml)</b>	<b>165</b>	<b>124</b>	<b>102</b>



**Cyclophosphamide pulse (IBW x 15 mg/dose/month)**

**18ヶ月**

**MZR 150 mg/day**  
**単回投与後2時間値 1-2 µg/ml**



図3：症例2の治療経過

## ブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症 (SSc) マウスモデルにおける 細胞接着分子の役割に関する検討

研究代表者 佐藤伸一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授  
協力者 吉崎 歩 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 医員  
協力者 築場広一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 助教  
協力者 岩田洋平 社会保険中京病院皮膚科 医員  
協力者 小村一浩 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 助教  
研究分担者 小川文秀 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 講師

### 研究要旨

細胞接着分子である L-selectin、ICAM-1、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 を欠損したマウスを用いて BLM 誘発 SSc モデルを作製し、皮膚および肺の線維化における接着分子の役割を検討した。L-selectin、ICAM-1 およびその両者のノックアウトマウスでは皮膚、肺への炎症細胞浸潤、線維化ともに野生型マウスに比べ有意に抑制されており、PSGL-1、P-selectin、E-selectin ノックアウトマウスおよび抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin ノックアウトマウスでは有意に亢進していた。皮膚、肺、血清中のサイトカイン産生において、L-selectin、ICAM-1 およびその両者のノックアウトマウスでは Th1 偏倚を認め、PSGL-1、P-selectin、E-selectin ノックアウトマウスおよび抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin ノックアウトマウスでは Th2、Th17 偏倚を認めた。L-selectin、ICAM-1 およびその両者のノックアウトマウスでは Th2 細胞と Th17 細胞の減少と Th1 細胞の増加が、P-selectin、E-selectin ノックアウトマウスでは Th1 細胞の減少と Th2、Th17 細胞の増加が、PSGL-1 ノックアウトマウスと抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin ノックアウトマウスでは Th1、Th2 細胞の減少と Th17 細胞の増加が気管支肺胞洗浄液中で認められた。野生型脾臓抽出 T 細胞を用いたリンパ球 subset の検討では、Th1 細胞で PSGL-1 の高発現と LFA-1 の低発現が、Th2 細胞と Th17 細胞で LFA-1 の高発現と PSGL-1 の低発現が認められた。このことから、BLM 誘発 SSc モデルにおいて、これらの細胞接着分子は、Th バランスを制御することで皮膚および肺の線維化に関与していることが示唆された。

### A. 研究目的

強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は免疫学的異常を背景に、皮膚硬化と内臓諸臓器の線維化を主徴とする疾患で、病因は未だ明らかにされていない<sup>1)</sup>。SSc 患者皮膚には CD4<sup>+</sup> T 細胞の浸潤を認め、サイトカイン産生を介して線維化に寄与しているものと

考えられている<sup>2)</sup>。Th2 サイトカインのひとつであるインターロイキン (interleukin; IL)-4 や Th17 サイトカインのひとつである IL-17 は SSc 患者由来線維芽細胞を刺激し膠原線維の産生を増強する<sup>3-7)</sup>。さらに SSc 患者血清中の IL-4 と IL-17 の増加が報告されており、Th2、Th17 サイトカインは SSc の皮

膚硬化および肺線維化に密接に関与していると考えられている<sup>3-6,8)</sup>。

ブレオマイシン (BLM) 誘発 SSc モデルは皮膚硬化、肺線維症、サイトカイン産生、SSc 特異的自己抗体産生を認め、SSc をよく模倣したモデルと考えられている<sup>9)</sup>。加えて、SSc 患者と同様に皮膚および肺における炎症細胞浸潤を認める<sup>9)</sup>。近年、炎症細胞の組織への浸潤は、白血球に発現する L-selectin、lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) と、血管内皮細胞に発現する intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、E-selectin、P-selectin を介して行われることが広く知られるようになってきた<sup>10)</sup>。それに伴い、疾患動物モデルにおける細胞接着分子の役割に関しても多数報告されている。Tight-skin マウスを用いた研究では、L-selectin、ICAM-1 のノックアウトは皮膚への炎症細胞浸潤を抑制し、線維化を改善する<sup>11)</sup>。同様に L-selectin と ICAM-1 のノックアウトは BLM 誘発肺臓炎モデルの肺線維症を改善させ、arthus reaction モデルでは反応の減弱をもたらす<sup>12-14)</sup>。抗体を用いた E-selectin、P-selectin、PSGL-1 の阻害では arthus reaction を減弱させ、E-selectin、P-selectin、L-selectin、ICAM-1 のノックアウトでも同様に arthus reaction の減弱を認める<sup>15,16)</sup>。このように細胞接着分子の阻害、もしくはノックアウトは炎症反応を抑制するという報告がある一方で、BLM 誘発肺臓炎のモデルでは E-selectin と P-selectin のノックアウトは肺線維症を増悪させるという報告もある<sup>17)</sup>。つまり、細胞接着分子と炎症の関与はモデルによって様々であり、BLM 誘発 SSc モデルに関しては未だ検討されていない。

今回我々は、L-selectin、ICAM-1、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 のノックアウトマウスを用いて

BLM 誘発 SSc モデルを作製し、細胞接着分子の線維化に果たす役割を検討した。

## B. 研究方法

### 1) マウス

C57BL/6 を背景とする L-selectin ノックアウト (<sup>-/-</sup>) マウス、ICAM-1<sup>-/-</sup> マウス、P-selectin<sup>-/-</sup> マウス、E-selectin<sup>-/-</sup> マウス、PSGL-1<sup>-/-</sup> マウスおよび E-selectin マウス<sup>-/-</sup> に抗 P-selectin 抗体を投与したマウスと野生型 C57BL/6 マウスを用いた。本研究には 6 週齢のマウスを用いた。BLM (Nippon Kayaku Co. Ltd., Tokyo) をリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) に 1 mg/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛したそれぞれのマウスの背部皮膚へ 4 週間にわたり 27 ゲージの注射針で 300  $\mu$ g を連日皮下投与した<sup>18)</sup>。コントロールとして PBS のみを BLM と同様の方法でそれぞれのマウスに投与した。以下の解析にはそれぞれ最低 6 匹のマウスを用いた。

### 2) 組織病理学的検討

4 週間の BLM および PBS 投与が終了したマウスから背部皮膚と肺を採取し、一部をパラフィン包埋し、6  $\mu$ m 切片を作製した。ヘマトキシリン & エオジン染色とヴァンギーソン染色を行い、皮膚に関しては一検体中 10 箇所をランダムに選び、表皮、真皮、皮下脂肪織の厚さを測定した。肺に関しては左中葉のランダムに選ばれた部分を 100 倍の拡大率で観察し、線維化の程度を Aschcroft らの提唱するスコア法で評価した<sup>19)</sup>。トルイジンブルー染色を行い、肥満細胞の数を 400 倍の拡大率で一検体中 10 箇所をランダムに選び測定した。抗マウス F4/80 抗体 (Serotec Inc., Oxford, UK)、抗マウス CD3 抗体 (BD PharMingen, San Diego, CA, USA)、抗マウス B220 抗体 (BD PharMingen) を用いて免疫染色を

行い、それぞれマクロファージ、T細胞、B細胞の数を400倍の拡大率で一検体中10箇所をランダムに選び測定した。以上の測定および検討はマウス病理に精通した2人の検者が盲検し、結果を平均した。

### 3) 皮膚および肺組織中のヒドロキシプロリン測定

ヒドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれるアミノ酸で、その量はコラーゲン量を反映する。従って、皮膚および肺における線維化を評価するため、それぞれ Matsushita ら<sup>11)</sup>、Schrier ら<sup>20)</sup>の方法に準じ組織中のヒドロキシプロリン量を測定した。

### 4) 気管支肺胞洗浄液 (BAL) の採取

4週間のBLM及びPBS投与後に、生食1回1mlで肺を軽くマッサージしながら洗浄して洗浄液を回収した。同様の操作を3回繰り返した。BALの回収量は1検体当たり2.5mlであった。回収したBALは細胞数の測定と細胞分画の評価に用いた。細胞数はBurger-Turk算定板を用い算定した。細胞分画の評価はまず、細胞沈殿法により細胞標本を作成し、May-Giemsa染色と、マクロファージに対して抗マウスF4/80抗体 (Serotec Inc.)、T細胞に対して抗マウスCD3抗体 (BD PharMingen)、B細胞に対して抗マウスB220抗体 (BD PharMingen) を用いて免疫染色を行い検討した。細胞分画は任意に選定した視野で、計200個の細胞を算定して検討した。好中球の同定は形態学的に行った。

### 5) 血清中のサイトカインの検討

BLMおよびPBS投与が終了したマウスより血清を採取し、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、Interferon (IFN)- $\gamma$ 、tumor growth factor (TGF)- $\beta$ 1、および tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (Biosource International Inc., Camarillo, CA, USA) の濃度をELISAキットにより測定した。それぞれの検体は duplicate

で測定し、平均値を解析に使用した。

### 6) 皮膚および肺におけるサイトカインの発現量の検討

各マウス皮膚および肺より RNeasy spin column (Qiagen Inc., Crawley, UK) を用いて mRNA を抽出し、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$  の発現量を real time RT-PCR にて測定した。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

### 7) マウス皮膚線維芽細胞に対する IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-17 刺激効果の検討

マウス背部皮膚より~らの方法に準じて線維芽細胞を抽出、培養した。線維芽細胞を12時間 serum free とした後、IL-4 (10 ng/ml)、IFN- $\gamma$  (10 ng/ml)、IL-17 (50 ng/ml) で24時間刺激した (R&D systems, Minneapolis, MN)。刺激後に mRNA を抽出し、COL1A2 と TGF- $\beta$ 1 の発現量を real time RT-PCR にて定量した。Proliferation assay では刺激後に BrdU (10  $\mu$ M) を加え、24時間培養後 ELISA にて BrdU の取り込みを評価することで検討した。

### 8) $\gamma$ グロブリンの検討

BLM および PBS 投与が終了したマウスより血清を採取し、血清 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA の濃度を ELISA キットにて検討した (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA)。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

### 9) 自己抗体の検討

血清中の自己抗体を、MBL社製 (Medical & Biological Laboratories Co., Nagoya) のヒト抗 topo I 抗体、抗 U1-RNP 抗体、抗二本鎖 (double-stranded) DNA 抗体測定 ELISA キットを用いて抗体価を測定した。このとき2次抗体として抗マウス Ig 抗体

を使用した。抗 CENP B 抗体 (Funakoshi Co., Tokyo)、抗ヒストン抗体 (Funakoshi Co.)、抗一本鎖 (single-stranded; ss) DNA 抗体 (Shibayagi Inc., Gunma)、リウマトイド因子 (RF; Shibayagi Inc.) の測定も ELISA キットを用いて行った。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

#### 10) BAL 中の T 細胞サブセットの検討

BAL から得られた細胞を細胞表面の CD4 と intracellular IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-17 をそれぞれの抗体 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) を用いて染色することで Th1、Th2、Th17 細胞の T 細胞サブセットをフローサイトメトリーにて検討した。

#### 11) Th 細胞における LFA-1 および PSGL-1 発現の検討

6 週齢の野生型マウスから得られた脾臓より CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit (Miltenyi Biotec., Bergisch Gladbach, Germany) を用い CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離した後、Th1、Th2、Th17 condition で培養し、それぞれのサブセットを得た<sup>21)</sup>。抗 LFA-1 抗体、抗 PSGL-1 抗体を用いて細胞表面の LFA-1 および PSGL-1 発現をフローサイトメトリーにて検討した (BD Bioscience)。

#### 12) 統計学的検討

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。p<0.05 を有意とした。

### C. 研究結果

BLM 投与野生型マウスでは、PBS 投与野生型マウスと比べて 2.3 倍の真皮肥厚を認めた (p<0.01)。この BLM による真皮肥厚は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは野生型マウスと比べてそれぞれ 16%、26%、47% 抑制されてい

た (p<0.05)。一方 P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスでは、野生型マウスと比べそれぞれ 14%、16%、30%、31% 真皮肥厚の増加を認めた (p<0.05、図 1A)。皮膚組織中のヒドロキシプロリン量に関しても真皮肥厚を反映して同様の変化を示した (p<0.05、図 1B)。肺に関しても皮膚と同様に BLM 投与野生型マウスでは PBS 投与野生型マウスと比べ著しい線維化とヒドロキシプロリンの増加を認め (p<0.01)、その線維化とヒドロキシプロリン量は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスで有意に抑制されており (p<0.05)、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスでは有意に亢進していた (p<0.05、図 2A、B)。皮膚および肺への炎症細胞浸潤数は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて減少しており、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスでは増加していた (p<0.05、図 1C、2C)。

BLM 投与野生型マウスでは PBS 投与野生型マウスと比べ、血清、皮膚、肺組織中の有意な IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$  の上昇を認めた (p<0.01)。これらの BLM によるサイトカインの増加は Th2 サイトカインである IL-4 と、Th17 サイトカインである IL-17 においては L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは抑制されており (p<0.05)、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスでは亢進していた (p<0.05)。一方 Th1 サイトカイン



である IFN- $\gamma$  の産生量は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは増加しており ( $p < 0.05$ )、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスでは減少していた ( $p < 0.05$ 、図 3)。

IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-17 による野生型線維芽細胞の刺激では、IL-4 および IL-17 により線維芽細胞の増殖亢進が、IFN- $\gamma$  により増殖抑制が認められた ( $p < 0.01$ )。コラーゲン産生を反映する COL1A2 と TGF- $\beta$ 1 に関しても同様に IL-4 および IL-17 刺激で産生亢進が認められ、IFN- $\gamma$  刺激で産生抑制が認められた ( $p < 0.01$ 、図 4)。

血清中の  $\gamma$  グロブリン量の検討では BLM 投与野生型マウスでは PBS 投与野生型マウスと比べて産生量の増加が認められ ( $p < 0.01$ )、この BLM による産生増加は L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは抑制され、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスでは亢進していた ( $p < 0.05$ 、図 5)。

自己抗体の検討では、BLM 投与野生型マウスにおいては、PBS 投与野生型マウスに比べ IgM 型抗 topoisomerase I 抗体、抗 U1-RNP 抗体、抗 ssDNA 抗体、抗 histone 抗体、IgG 型抗 topoisomerase I 抗体、抗 histone 抗体、RF の増加を認めた ( $p < 0.05$ )。BLM 投与 L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスにおいては、これらの自己抗体の増加は著しく抑制されており、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスでは著明に亢進していた ( $p < 0.05$ 、図 6)。

BAL 中の T 細胞サブセットにおける検討では

BLM 投与野生型マウスでは PBS 投与野生型マウスと比べて Th1、Th2、Th17 細胞の顕著な増加を認めた ( $p < 0.001$ )。BLM 投与 L-selectin、ICAM-1、およびその両者のノックアウトマウスでは BLM 投与野生型マウスと比べて Th1 細胞の増加と、Th2 細胞、Th17 細胞の減少が認められ、P-selectin、E-selectin ノックアウトマウスでは Th1 細胞の減少と Th2 細胞、Th17 細胞の増加が認められた ( $p < 0.05$ )。PSGL-1 ノックアウトマウスと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスにおいては、Th1 細胞と Th2 細胞の減少が認められ、Th17 細胞の増加が認められた ( $p < 0.05$ 、図 7)。

Th1、Th2、および Th17 細胞へ分化させた野生型脾臓 T 細胞における検討では、Th1 細胞では ICAM-1 と結合して細胞浸潤に関与する LFA-1 の発現抑制と、主に P-selectin や E-selectin と結合して細胞浸潤に関与する PSGL-1 の発現亢進が、Th2 細胞と Th17 細胞では LFA-1 の発現亢進と PSGL-1 の発現抑制が Th0 細胞と比較して認められた ( $p < 0.01$ )。Th2 細胞と Th17 細胞を比べると、Th17 細胞で LFA-1 の高発現と、PSGL-1 の低発現を認めた ( $p < 0.01$ 、図 8)。

## D. 考案

白血球と血管内皮細胞における細胞接着分子の発現は、炎症局所における白血球の浸潤と極めて密接に関り、炎症反応において重要な役割を果たすことが知られている (22-24)。自己免疫疾患においても、細胞接着分子の関わりが示唆されており<sup>25)</sup>、SSc の病態形成にも大きな役割を果たしていることが考えられる。今回の検討では、BLM 誘発 SSc モデルで L-selectin、ICAM-1 を欠損させると BLM によって誘導された SSc 患者と共通の特徴である皮膚硬化

と肺線維症の改善を認め、皮膚および肺への炎症細胞浸潤の減少、皮膚、肺、血清中の Th2 サイトカインである IL-4 と、Th17 サイトカインである IL-17 の産生抑制、血清中の $\gamma$ グロブリンと自己抗体の産生抑制を認めた。BAL における T 細胞サブセットの検討では、L-selectin、ICAM-1 の欠損で Th1 細胞の増加を認め、Th2 細胞と Th17 細胞の減少を認めた。一方、P-selectin、E-selectin、PSGL-1 の欠損では BLM によって誘導される皮膚硬化と肺線維症の増悪、炎症細胞浸潤の増加、IL-4 と IL-17 の産生亢進、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  の産生抑制および $\gamma$ グロブリンと自己抗体の産生増加を認めた。BAL における T 細胞サブセットは Th1 細胞の減少と Th2 細胞および Th17 細胞の増加を認めた。このように細胞接着分子は SSc の病態形成に大きな役割を果たすことが示唆された。

SSc において血清中の増加が認められる IL-4 などの Th2 サイトカインは、線維芽細胞の増殖亢進とコラーゲン産生増加を来とし、線維化に対して大きな役割を果たすことが知られている<sup>26,27)</sup>。また、近年 Th17 サイトカインである IL-17 も線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を亢進させ、SSc において皮膚および肺の線維化を亢進させることが報告されている<sup>8)</sup>。一方 Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  は線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を抑制することが報告されている<sup>4)</sup>。今回の検討においても、L-selectin、ICAM-1 ノックアウトマウスでは IL-4 と IL-17 の産生低下に一致して線維化の改善が認められ、E-selectin、P-selectin、PSGL-1 ノックアウトマウスでは IL-4 と IL-17 の増加および IFN- $\gamma$  の低下に一致して線維化の増悪が認められた。実際に野生型マウスから得られた線維芽細胞における IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-17 による刺激効果を検討したところ、IL-4 と IL-17 刺

激で線維芽細胞の増殖亢進とコラーゲン産生亢進が認められ、IFN- $\gamma$  刺激で線維芽細胞の増殖およびコラーゲン産生抑制が認められた。このことから、L-selectin、ICAM-1、E-selectin、P-selectin、PSGL-1 はサイトカイン産生を制御することで BLM 誘発 SSc モデルの線維化に関与することが示唆された。

BLM 誘発 SSc モデルでは、BLM による血管内皮細胞のアポトーシスと、ヒアルロン酸や High-mobility group 1 box protein などの内在性 TLR リガンドが組織障害の結果誘導され、これにより B 細胞表面に発現する CD19 を介して B 細胞の活性化がおこり、SSc 患者に特異的に検出される抗 topo I 抗体をはじめとする様々な自己抗体と、高 $\gamma$ グロブリン血症が誘導されることが知られている<sup>9)</sup>。今回の検討では L-selectin、ICAM-1 およびその両者のノックアウトで BLM によって誘導された $\gamma$ グロブリンと自己抗体の産生は抑制されており、E-selectin、P-selectin、PSGL-1 ノックアウトで亢進していた。これらの結果は前述したそれぞれのノックアウトマウスにおける Th2 サイトカイン産生とも一致しており、 $\gamma$ グロブリンと自己抗体の産生量は Th2 バランスを反映すると考えられた。

細胞接着分子は白血球が炎症局所へ浸潤する際に重要な役割を果たすが、その機能は白血球表面に発現する L-selectin、LFA-1、PSGL-1 と血管内皮細胞表面に発現する ICAM-1、E-selectin、P-selectin、Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1) の interaction によって発現される。L-selectin (CD62L) はほとんど全ての白血球に発現しており、血管内皮細胞上に発現する GlyCAM-1 と結合する<sup>28)</sup>。L-selectin は炎症細胞浸潤の最初のステップである capture に重要と考えられており、L-selectin は GlyCAM-1 と結合した後に matrix metallo-

proteinase によって切断される<sup>29-31)</sup>。この L-selectin の切断により炎症細胞浸潤の次のステップである rolling が効率的に行われ、LFA-1 の活性化が誘導されることにより、LFA-1 と ICAM-1 による firm adhesion および組織への浸潤が進行する<sup>32)</sup>。E-selectin (CD62E) は転写制御によって誘導される細胞接着分子であり、血管内皮細胞の活性化数時間後に細胞表面に発現する<sup>33)</sup>。一方 P-selectin (CD62P) は血管内皮細胞では Weibel-Parade 体に存在し、刺激後数分で細胞表面に移動する。加えて P-selectin は活性化血小板にも存在する<sup>34)</sup>。PSGL-1 は造血系細胞表面に広く発現しており、E-selectin (CD62E)、P-selectin (CD62P) と主に結合し、capture および rolling に大きく関与することが知られている<sup>34-36)</sup>。これに加えて最近の知見では、これらの細胞接着分子は T 細胞サブセットの浸潤を制御することが知られている。Th1 細胞は PSGL-1 を強発現しており E-selectin、P-selectin と機能的に結合して浸潤を促し<sup>34,36)</sup>、さらに P-selectin と E-selectin の発現は Th2 細胞および Th17 細胞の浸潤には必須ではないかもしくは抑制すると報告されている<sup>37,38)</sup>。一方、LFA-1 は ICAM-1 を介して Th2 細胞と Th17 細胞の浸潤を促進し、また Th0 細胞から Th2 および Th17 細胞への分化を促進することが報告されており<sup>39,40)</sup>、これらの作用は L-selectin によって LFA-1 の活性が上昇されることにより強められるとされる<sup>41,42)</sup>。つまり、PSGL-1 と E-selectin、P-selectin の結合は Th1 細胞の浸潤に必要であり、Th2 細胞および Th17 細胞の浸潤には関与しないか抑制に関わり、L-selectin、LFA-1、ICAM-1 は Th2 細胞および Th17 細胞の浸潤に必要であり、Th1 細胞に関しては影響が少ないと考えられる。しかしながら、PSGL-1 は Th2 細胞の浸潤を促進させるという報告<sup>43)</sup>、L-selectin は Th2

細胞よりもむしろ Th1 細胞に強く発現しており Th1 細胞の浸潤を促進するという報告<sup>44)</sup>、さらには ICAM-1 を介した刺激は IL-12 や IFN- $\gamma$  の存在下で、すでに Th2 細胞へ分化した T 細胞から IFN- $\gamma$  産生などの Th1 型の反応を誘導するという報告がみられ<sup>32)</sup>、どの細胞接着因子がどの T 細胞サブセットの浸潤に優位に関わるかは未だ明らかではない。今回の我々の検討では BAL 中の T 細胞サブセットは L-selectin と ICAM-1 のノックアウトで Th1 細胞の増加と Th2 細胞、Th17 細胞の減少が認められ、L-selectin と ICAM-1 の両者のノックアウトではその差はさらに顕著となった。また、E-selectin と P-selectin のノックアウトでは BAL 中の Th2 細胞および Th17 細胞の増加が認められ、Th1 細胞の減少を認めた。さらに PSGL-1 ノックアウトと E-selectin ノックアウトマウスに抗 P-selectin 抗体を用いて E-selectin と P-selectin の両者を阻害したところ、BAL 中の Th17 細胞の増加と Th1 細胞および Th2 細胞の減少を来した。さらに T 細胞サブセットの組織浸潤における細胞接着分子の役割をさらに明らかにするため、野生型脾臓抽出 CD4<sup>+</sup> T 細胞を Th1、Th2、Th17 細胞へ分化させて行った、細胞表面の LFA-1 および PSGL-1 の検討では、Th1 細胞で PSGL-1 の強発現を認め、Th2 および Th17 細胞では LFA-1 の強発現を認めた。Th1 細胞における LFA-1 発現と Th2 および Th17 細胞における PSGL-1 の発現は Th0 細胞に比べ有意に抑制されていた。このことから BLM 誘発 SSc モデルにおいて、L-selectin、ICAM-1 は Th2 細胞および Th17 細胞の LFA-1 を介して浸潤促進に関わっており、PSGL-1、E-selectin、P-selectin は Th1 細胞の PSGL-1 を介して浸潤を促進させることが示唆された。E-selectin と P-selectin はどちらか一方が機能を失った場合、のこりの一方

が欠損した接着分子を補って PSGL-1 と結合して働くことが知られており<sup>45-47)</sup>、E-selectin と P-selectin の両者の阻害では単独のノックアウトで認められた Th1 細胞の浸潤抑制のみならず Th2 細胞の浸潤も抑制されたことから、これらの細胞接着分子は Th2 細胞の浸潤促進にも関わっていることが示唆された。

今回の検討から BLM 誘発 SSc モデルにおいて細胞接着分子は、Th バランスを制御することにより密接に線維化の形成、自己抗体産生に関与していることが示され、今後さらなる研究によって治療への応用が期待される。

## E. 結 論

BLM 誘発 SSc モデルにおいて誘導される皮膚および肺の線維化、Th2 および Th17 サイトカイン産生、γグロブリン産生、自己抗体産生は L-selectin、ICAM-1、E-selectin、P-selectin、PSGL-1 によって制御されていた。これらの細胞接着分子は Th 細胞バランスを変化させることによって病態に深く関わっている可能性が示された。

## F. 文 献

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger Jr TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-205.
2. Chizzolini C. T lymphocyte and fibroblast interactions: the case of skin involvement in systemic sclerosis and other examples. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21 (4): 431-450.
3. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic

sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J. Rheumatol.* 2006; 33(2): 275-284.

4. Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, Nagaoka T, Hamaguchi Y, Nishijima C, et al. Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis.[In Process Citation]. *J. Rheumatol.* 2000; 27(12): 2838-42.
5. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6): oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 1998; 25: 308-313.
6. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4): IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 1997; 24(2): 328-32.
7. Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2(12): 679-685.
8. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(11): 2455-2463.
9. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol* 2008; 172(6): 1650-1663.
10. Sato S. [Role of cell adhesion molecules in wound healing]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai*

- Kaishi 2001; 24(3): 98-111.
11. Matsushita Y, Hasegawa M, Matsushita T, Fujimoto M, Horikawa M, Fujita T, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Immunol* 2007; 179(1): 698-707.
  12. Hamaguchi Y, Nishizawa Y, Yasui M, Hasegawa M, Kaburagi Y, Komura K, et al. Intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin regulate bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2002; 161(5): 1607-1618.
  13. Komura K, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Saito E, Kaburagi Y, Yanaba K, et al. Ultraviolet light exposure suppresses contact hypersensitivity by abrogating endothelial intercellular adhesion molecule-1 up-regulation at the elicitation site. *J Immunol* 2003; 171(6): 2855-2862.
  14. Shimada Y, Hasegawa M, Kaburagi Y, Hamaguchi Y, Komura K, Saito E, et al. L-selectin or icam-1 deficiency reduces an immediate-type hypersensitivity response by preventing mast cell recruitment in repeated elicitation of contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 2003; 170(8): 4325-4334.
  15. Yanaba K, Komura K, Horikawa M, Matsushita Y, Takehara K, Sato S. P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for the development of cutaneous vasculitis induced by immune complex deposition. *J Leukoc Biol* 2004; 76(2): 374-382.
  16. Yanaba K, Kaburagi Y, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. Relative contributions of selectins and intercellular adhesion molecule-1 to tissue injury induced by immune complex deposition. *Am J Pathol* 2003; 162(5): 1463-73.
  17. Horikawa M, Fujimoto M, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Kawasuji A, et al. E- and P-selectins synergistically inhibit bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2006; 169(3): 740-749.
  18. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112(4): 456-462.
  19. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988; 41(4): 467-70.
  20. Schrier DJ, Phan SH, McGarry BM. The effects of the nude(nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127(5): 614-7.
  21. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007; 445(7129): 766-770.
  22. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 738-746.
  23. Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75-81.
  24. Hubner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fassler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated

- mice. *Cytokine* 1996; 8: 548-556.
25. McMurray RW. Adhesion molecules in autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 25 (4): 215-233.
  26. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$  levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1992; 35(1): 67-72.
  27. Giacomelli R, Cipriani P, Lattanzio R, Di Franco M, Locanto M, Parzanese I, et al. Circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with systemic sclerosis (SSc) and correlate with serological and clinical features of the disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 108(1): 42-46.
  28. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 1995; 9: 866-873.
  29. Migaki GI, Kahn J, Kishimoto TK. Mutational analysis of the membrane-proximal cleavage site of L-selectin: Relaxed sequence specificity surrounding the cleavage site. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 549-557.
  30. Chen A, Engel P, Tedder TF. Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 519-530.
  31. Walcheck B, Kahn J, Fisher JM, Wang BB, Fisk RS, Payan DG, et al. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 1996; 380: 720-723.
  32. Radhakrishnan S, Wiehagen KR, Pulko V, Van Keulen V, Faubion WA, Knutson KL, et al. Induction of a Th1 response from Th2-polarized T cells by activated dendritic cells: dependence on TCR: peptide-MHC interaction, ICAM-1, IL-12, and IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 2007; 178(6): 3583-3592.
  33. Borges E, Tietz W, Steegmaier M, Moll T, Hallmann R, Hamann A, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 573-578.
  34. Hirata T, Merrill-Skoloff G, Aab M, Yang J, Furie BC, Furie B. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J Exp Med* 2000; 192(11): 1669-1676.
  35. Clark JG, Mandac-Dy JB, Dixon AE, Madtes DK, Burkhart KM, Harlan JM, et al. Trafficking of Th1 cells to lung: a role for selectins and a P-selectin glycoprotein-1-independent ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30(2): 220-227.
  36. Borges E, Tietz W, Steegmaier M, Moll T, Hallmann R, Hamann A, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J Exp Med* 1997; 185(3): 573-578.
  37. Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, et al. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997;

- 385(6611): 81-83.
38. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005; 22(3): 285-294.
  39. Lee SH, Prince JE, Rais M, Kheradmand F, Balantyne CM, Weitz-Schmidt G, et al. Developmental control of integrin expression regulates Th2 effector homing. *J Immunol* 2008; 180(7): 4656-4667.
  40. Wang Y, Kai H, Chang F, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, et al. A critical role of LFA-1 in the development of Th17 cells and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353(4): 857-862.
  41. Hwang ST, Singer MS, Giblin PA, Yednock TA, Bacon KB, Simon SI, et al. GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates  $\alpha 2$  integrins on naive peripheral lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1343-1348.
  42. Gopalan PK, Smith CW, Lu HF, Berg EL, McIntire LV, Simon SI. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 in shear flow can be activated through L-selectin. *J. Immunol.* 1997; 158: 367-375.
  43. Mangan PR, O'Quinn D, Harrington L, Bonder CS, Kubes P, Kucik DF, et al. Both Th1 and Th2 cells require P-selectin glycoprotein ligand-1 for optimal rolling on inflamed endothelium. *Am J Pathol* 2005; 167(6): 1661-1675.
  44. Savage ND, Harris SH, Rossi AG, De Silva B, Howie SE, Layton GT, et al. Inhibition of TCR-mediated shedding of L-selectin(CD62L) on human and mouse CD4+ T cells by metalloproteinase inhibition: analysis of the regulation of Th1/Th2 function. *Eur J Immunol* 2002; 32(10): 2905-2914.
  45. Labow MA, Norton CR, Rumberger JM, Lombard-Gillooly KM, Shuster DJ, Hubbard J, et al. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity* 1994; 1: 709-720.
  46. Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, et al. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 2329-2336.
  47. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 1996; 84: 563-574.

## 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

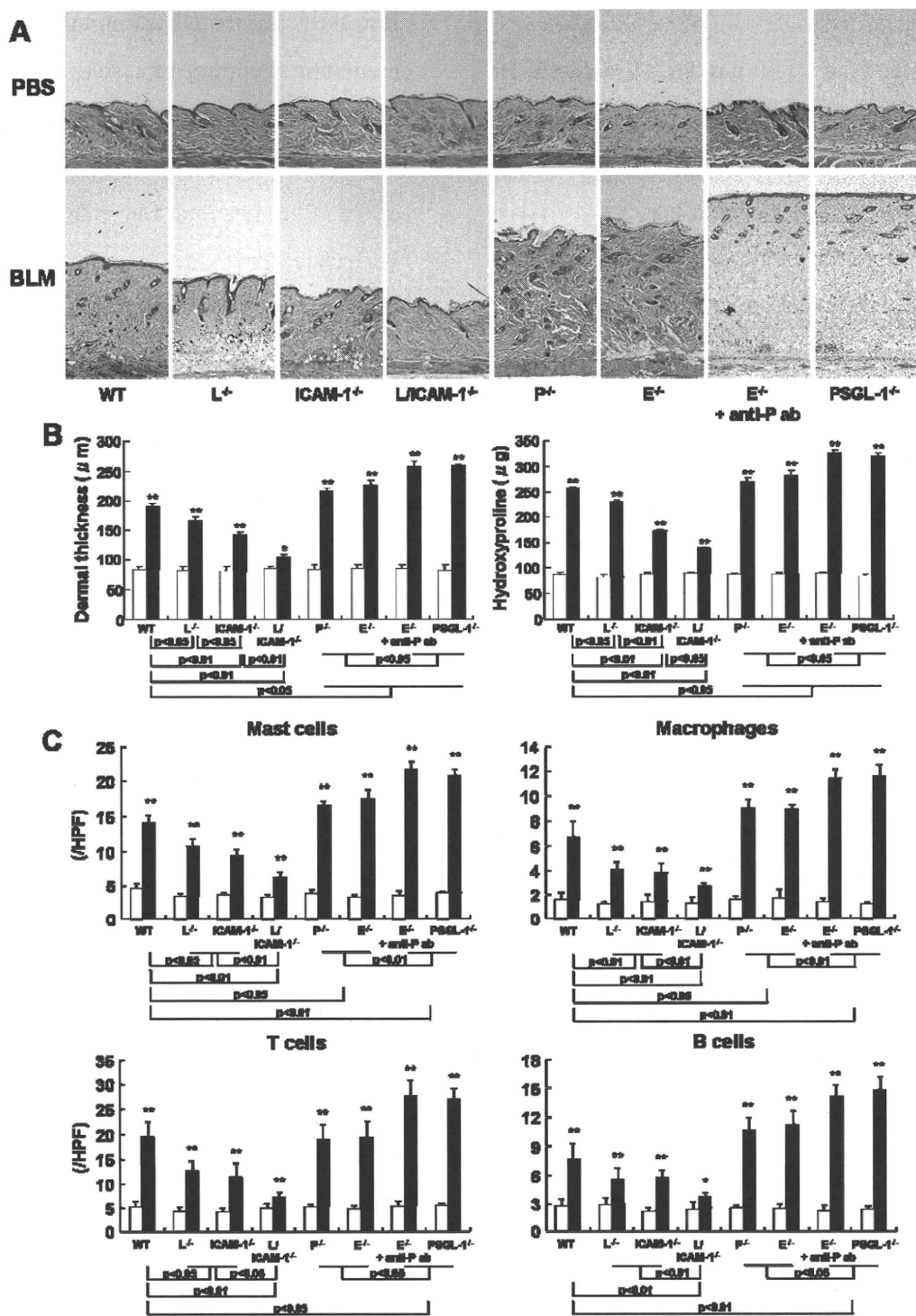


図1：皮膚の線維化を組織病理学的に示した (A)。真皮の厚さとハイドロキシプロリン産生量 (B)、炎症細胞浸潤数 (C) を示した。白の棒グラフはPBS投与群を、黒の棒グラフはBLM投与群を表す。WTは野生型マウスを、L<sup>-/-</sup>はL-selectinノックアウトマウスを、ICAM-1<sup>-/-</sup>はICAM-1ノックアウトマウスを、L/ICAM-1<sup>-/-</sup>はL-selectinとICAM-1の両者のノックアウトマウスを、E<sup>-/-</sup>はE-selectinノックアウトマウスを、P<sup>-/-</sup>はP-selectinノックアウトマウスを、E<sup>-/-</sup> + anti-P abはE-selectinノックアウトマウスに抗P-selectin抗体を投与したマウスを、PSGL-1<sup>-/-</sup>はPSGL-1ノックアウトマウスをそれぞれ表す。それぞれのPBS投与群と比べて\*p<0.05、\*\*p<0.01を表す。



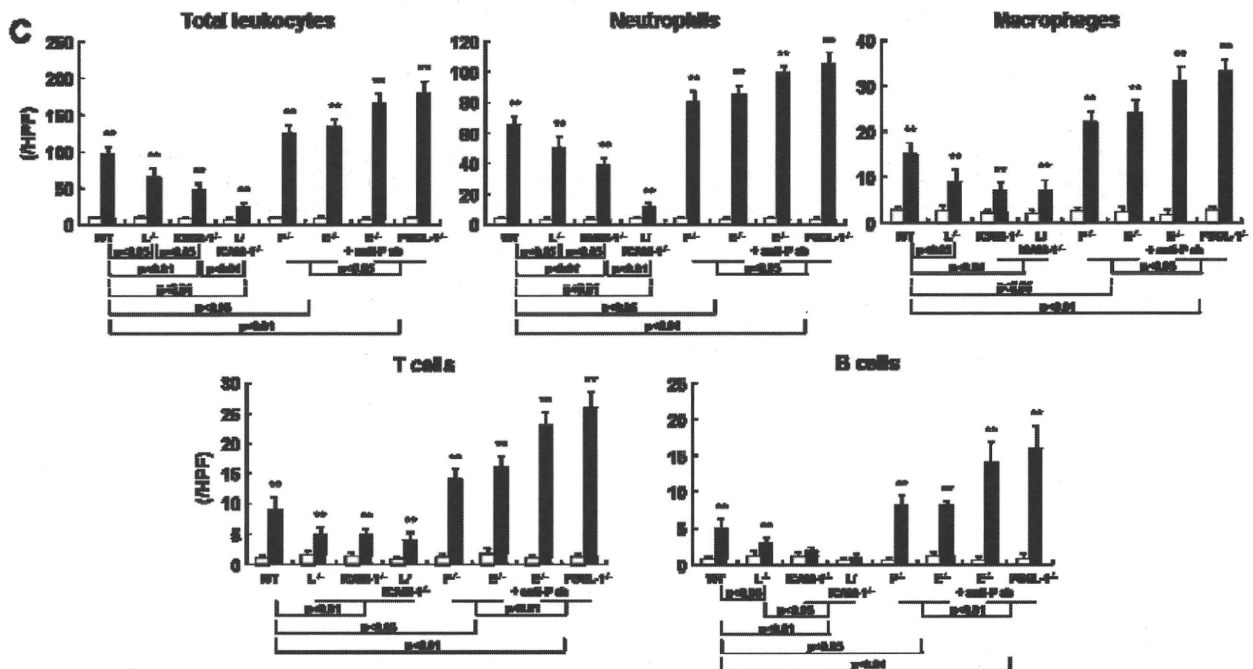
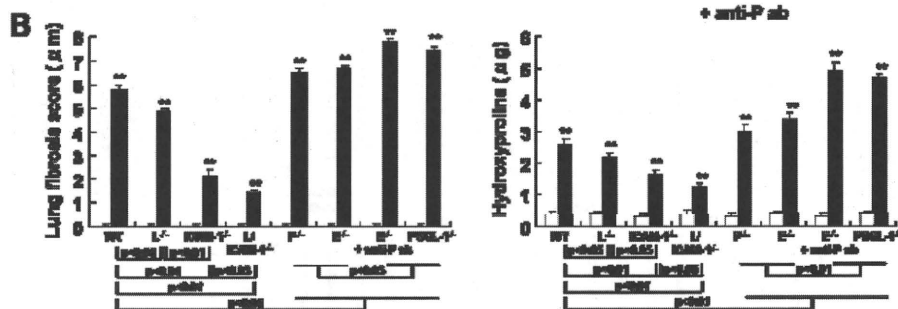
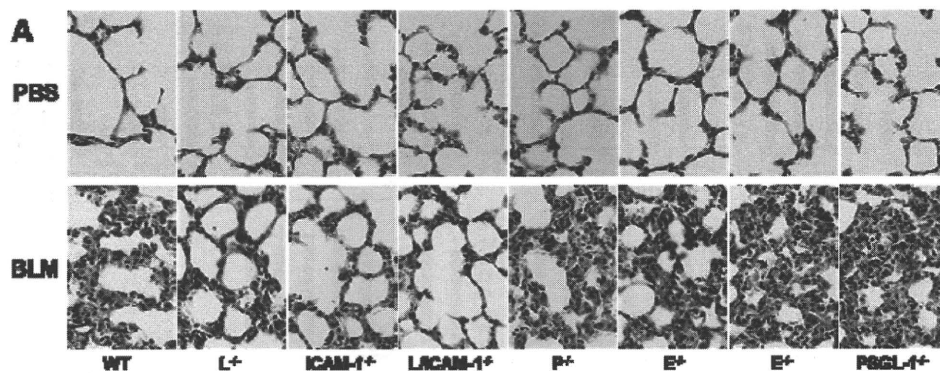


図2：肺の線維化を組織病理学的に示した (A)。真皮の厚さとヒドロキシプロリン産生量 (B)、炎症細胞浸潤数 (C) を示した。それぞれの PBS 投与群と比べて \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  を表す。

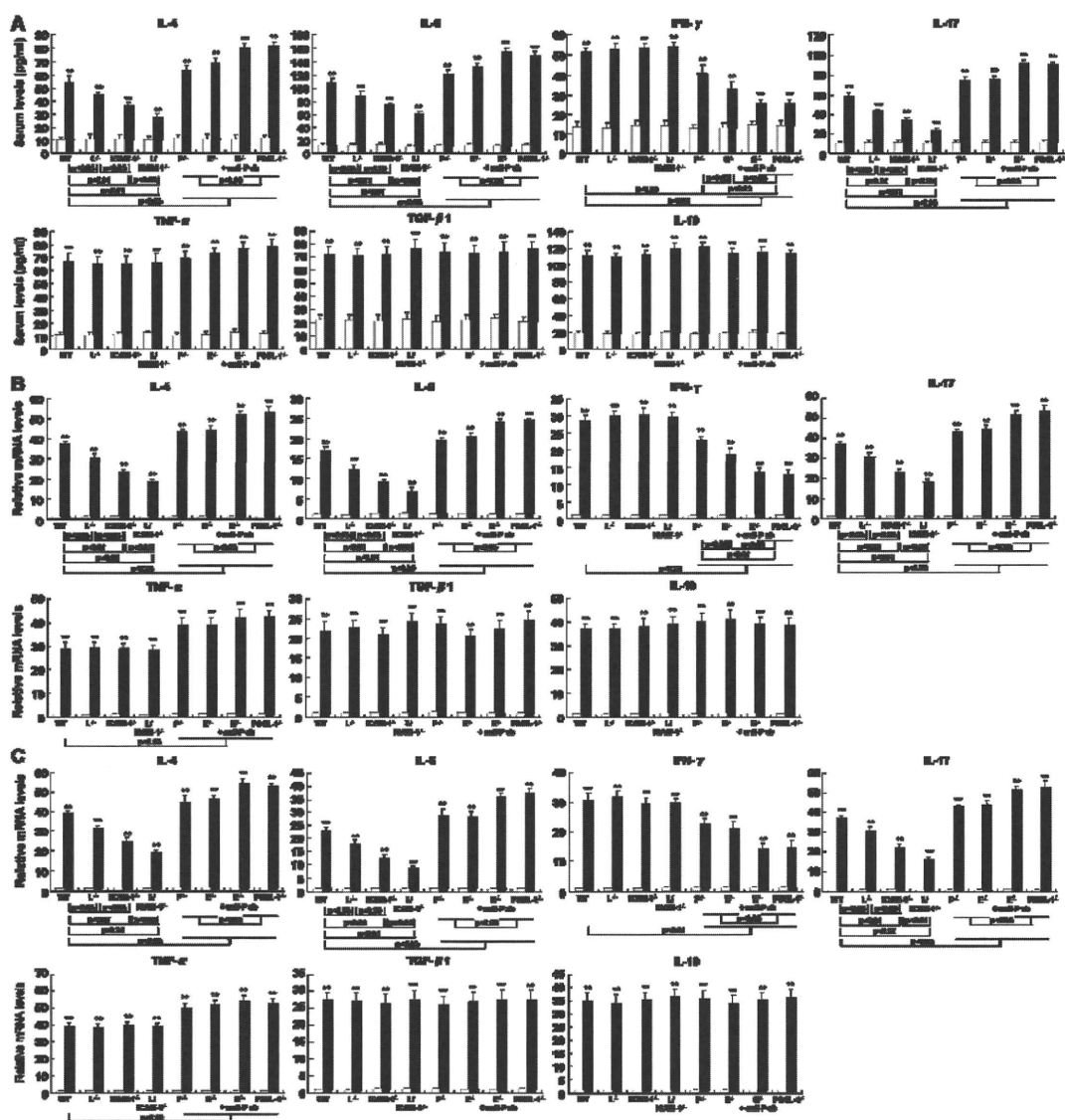


図3：血清中のサイトカイン濃度 (A) と皮膚 (B)、肺 (C) における mRNA の発現量を示した。それぞれの PBS 投与群と比べて \*\* $p < 0.01$  を表す。

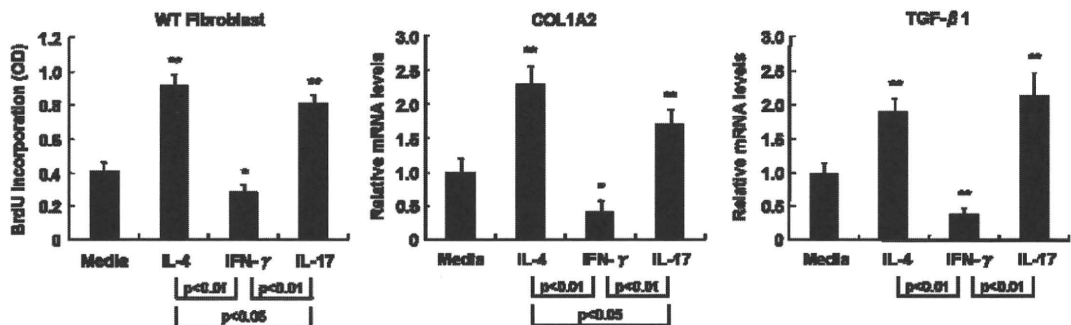


図4：IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-17 で線維芽細胞を刺激したときの proliferation assay と COL1A2、TGF- $\beta$ 1 の発現量を示した。Proliferation assay は BrdU の取り込みを ELISA にて評価することで行った。Media は無刺激を表す。無刺激群と比べて \* $p < 0.05$  を表す。

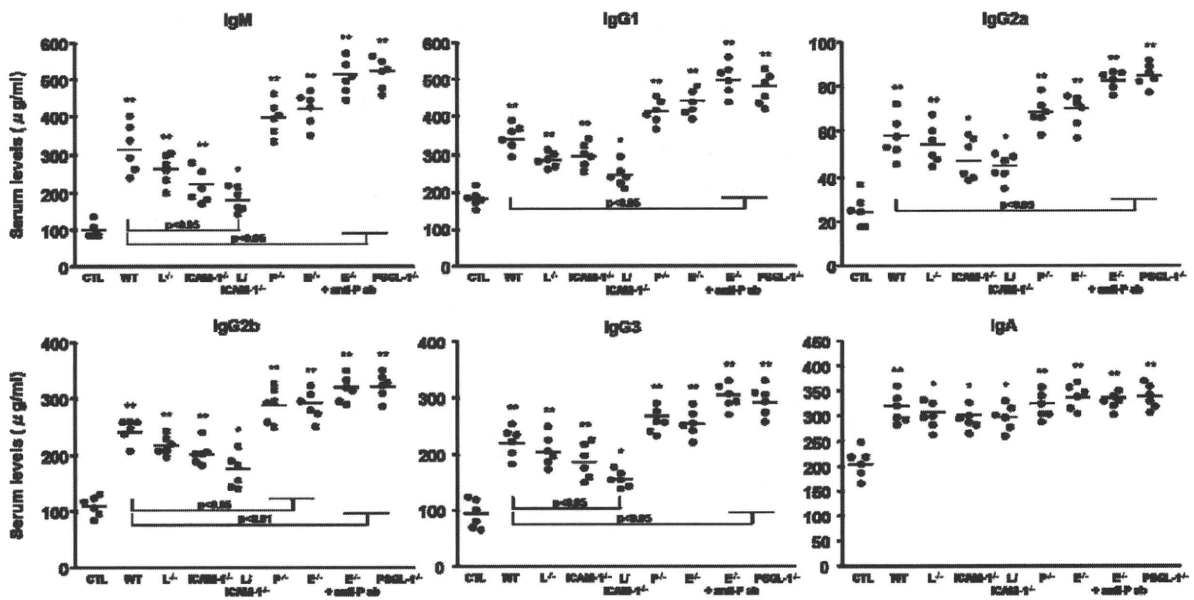


図5：血清中のγグロブリンの濃度を示した。CTLはPBS投与野生型マウスを表す。CTLと比べて\*p<0.05、\*\*p<0.01を表す。

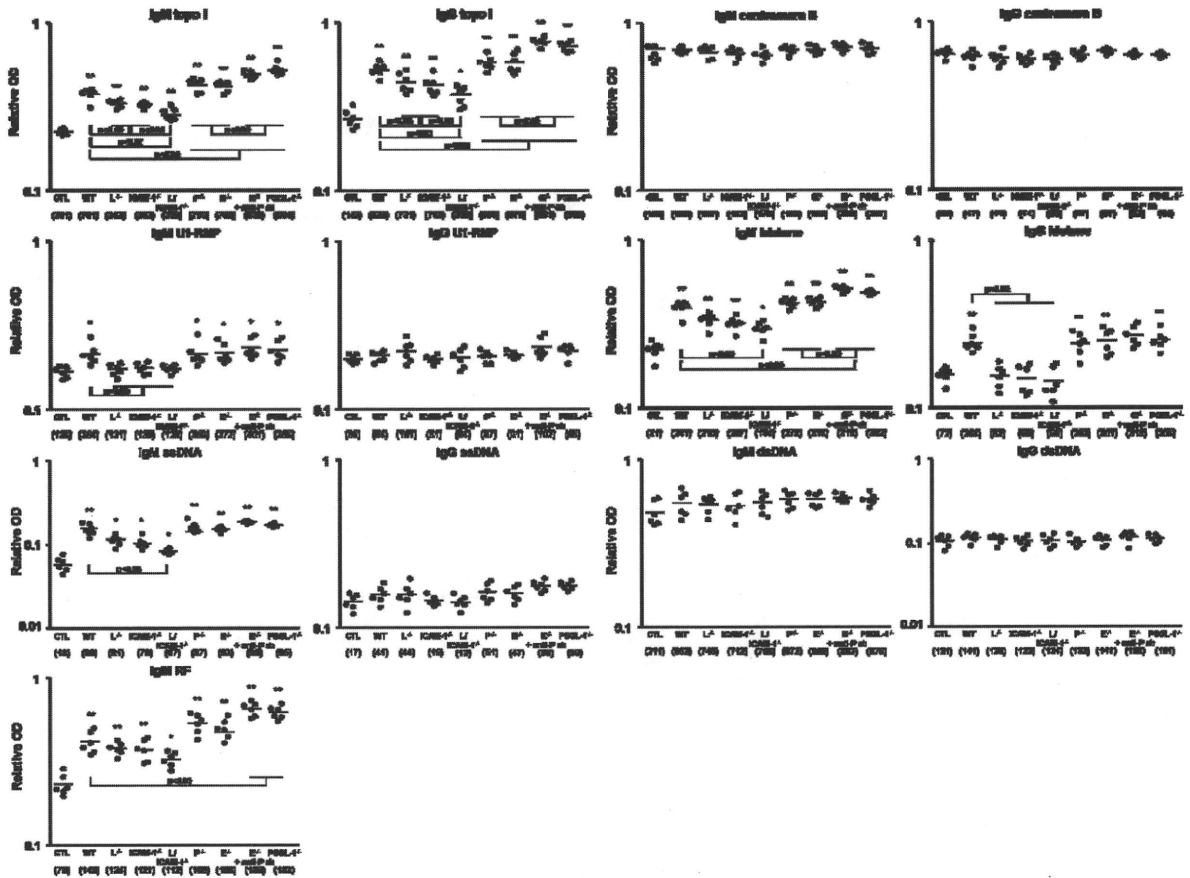


図6：血清中の自己抗体量を示した。CTLと比べて\*p<0.05、\*\*p<0.01を表す。

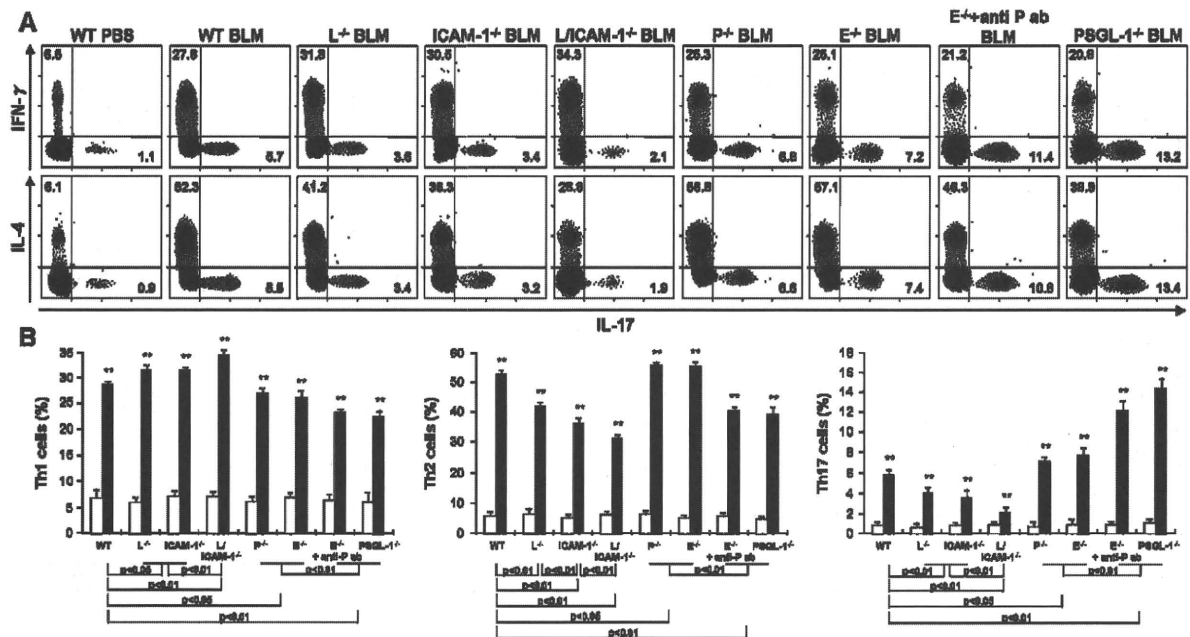


図7: BAL中のT細胞サブセットのpopulation (A)と平均値 (B)を示した。それぞれの群において10匹のマウスを用いた。PBS投与群と比べて\*\* $p < 0.001$ を表す。

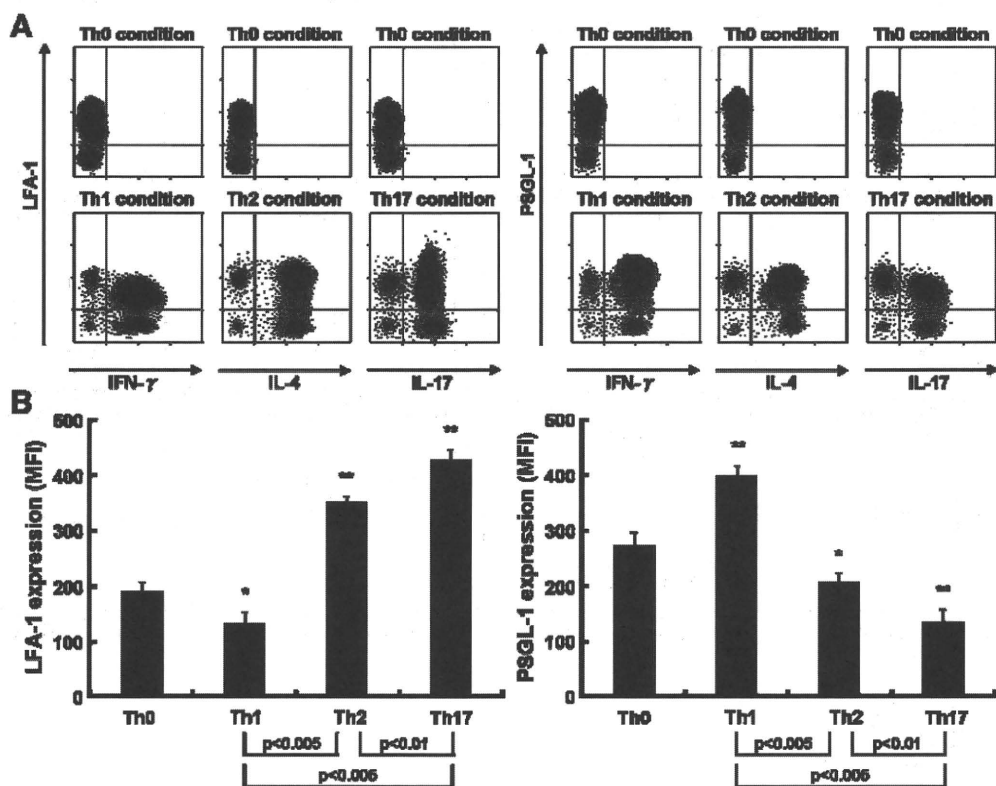


図8: 野生型マウスから得られた線維芽細胞をTh1、Th2、Th17 conditionで培養してそれぞれのサブセットへ分化させ、LFA-1とPSGL-1の発現を示した。それぞれのpopulation (A)と発現量の相対値をmean fluorescence intensity (MFI)にて示した (B)。Th0細胞と比べて\* $p < 0.01$ 、\*\* $p < 0.001$ を表す。