

定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は長崎大学動物実験規則を遵守し行った。

C. 研究結果

1) 組織学的評価

TSK マウスでは野生型マウスと比較して皮下結合織の厚さが9.1倍となるが、NaHS投与により69%薄くなった(図1 A, B; $p < 0.01$)。しかし、野生型マウスよりは依然として有意に肥厚していた($p < 0.01$)。NaHS投与は野生型マウスの皮下結合織の厚さには影響を及ぼさなかった。

2) 生化学的評価

皮膚の線維化の指標となるコラーゲン量についてヒドロキシプロリン量を定量することにより評価した。TSK マウスでは野生型と比較してヒドロキシプロリン量が3.8倍($p < 0.0001$)となり、NaHS投与により38%減少した(図2; $p < 0.05$)。

3) 血清学的評価

TSK マウスにおいてNaHS投与により、IgM型抗ss-DNA抗体は有意に減少した(図3; $p < 0.05$)が、抗トポイソメラーゼI抗体とIgM型抗ds-DNA抗体量は変化がなかった。

4) 抗酸化酵素の発現

HO-1mRNAの発現はTSK マウスにおいては野生型マウスと比較して減少していた($p < 0.05$)が、NaHS投与により有意に増加し、野生型マウスと同水準となった(図4; $p < 0.01$)。このNaHS投与によるHO-1発現の増加は野生型マウスにおいても認められた($p < 0.05$)。

5) TSK マウス由来線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響

COL1A2の発現は50 μ MのNaHSで処理すると

有意差を持って減少した(図5; $p < 0.05$)。1 μ M、10 μ M処理では減少はするものの有意な差を認めなかった。

D. 考案

本研究によりH₂Sの供与体であるNaHSの投与により、TSKマウスの皮膚硬化が改善し、一部の抗体ではあるが、自己抗体の産生が抑制されることが明らかとなった。

本研究ではTSKマウスにおいて増加していたIgM型抗ss-DNA抗体の発現がNaHS投与により減少した。しかしながら抗トポイソメラーゼI抗体やIgM型抗ds-DNA抗体量には影響がなかった。硫化水素が自己抗体産生に及ぼす影響として、MRL/lprマウスにおいてループス腎炎が改善するとともにIgG型抗ds-DNA抗体が減少するという報告がある¹¹⁾。しかし、硫化水素の自己抗体産生に及ぼす影響は明らかにされていない。本研究の結果結果から硫化水素は部分的にはあるが自己抗体産生に関与していると考えた。

TSKマウスの皮膚において抗酸化作用を示すHO-1が減少していることが報告されている¹⁰⁾。本研究ではNaHS投与によりこの減少したHO-1の発現が回復することが示された。HO-1欠損が線維化を増強するとする報告はある¹²⁾が、HO-1が皮膚線維化に関わる詳細なメカニズムは明らかになっていない。

さらにNaHS投与によりTSKマウス由来線維芽細胞によるCOL1A2の発現が抑制された。活性酸素種は心筋の線維化を促進することが知られており¹³⁾、NaHSはコラーゲン量を減少させることが知られている¹⁴⁾。これらのことから、NaHSが直接コラーゲン産生を抑制する可能性、活性酸素種を除去

することにより TSK マウスにおける皮膚線維化を阻害している可能性が考えられる。また前述のごとく抗酸化酵素 HO-1 の発現増強を介して線維化を阻害している可能性も考えられる。

E. 結 論

NaHS の投与により TSK マウスの皮膚硬化は改善した。このことから H₂S が SSc の治療に有用である可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Herrick AL, Rieley F, Schofield D, Hollis S, Braganza JM, Jayson MI: Micronutrient antioxidant status in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1994; 21: 1477-83.
2. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, et al.: Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma: fibroblast phenotype by the constitutive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2653-64.
3. Simonini G, Pignone A, Generini S, Falcini F, Cerinic MM: Emerging potentials for an antioxidant therapy as a new approach to the treatment of systemic sclerosis. *Toxicology* 2000; 155: 1-15.
4. Stipanuk MH, Beck PW: Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 1982; 206: 267-277.
5. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, et al.: Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 756-763.
6. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, et al.: The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem* 2004; 90: 765-768.
7. Qingyou Z, Junbao D, Weijin Z, Hui Y, Chaoshu T, Chunyu Z: Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 30-37.
8. Szabó C.: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 917-935.
9. Green MC, Sweet HO, Bunker LE: Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 1976; 82: 493-512.
10. Dooley A, Low SY, Holmes A, Kidane AG, Abraham DJ, Black CM, et al.: Nitric oxide synthase expression and activity in the tight-skin mouse model of fibrosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 272-280.
11. Takeda Y, Takeno M, Iwasaki M, Kobayashi H, Kirino Y, Ueda A, et al.: Chemical induction of HO-1 suppresses lupus nephritis by reducing local iNOS expression and synthesis of anti-dsDNA antibody. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 237-244.

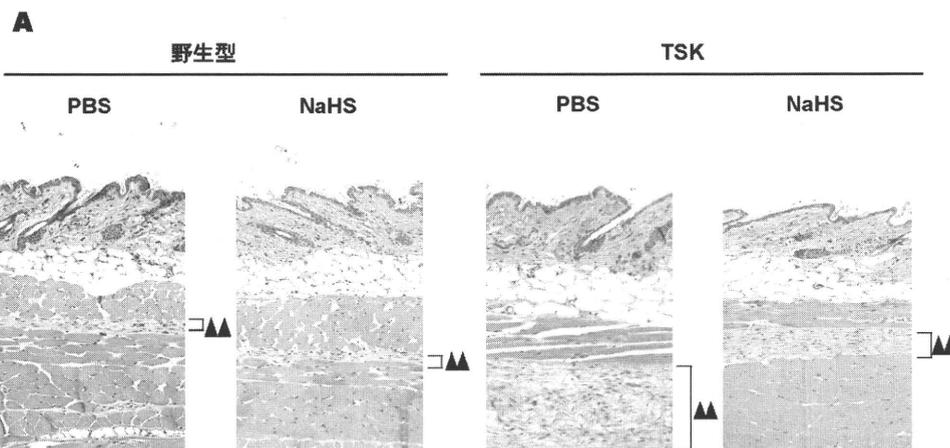
12. Kie JH, Kapturczak MH, Traylor A, Agarwal A, Hill-Kapturczak N: Heme oxygenase-1 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1681-1691.
13. Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Yao L, et al.: Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 230-238.
14. Shi YX, Chen Y, Zhu YZ, Huang GY, Moore PK, Huang SH, et al.: Chronic sodium hydrosulfide treatment decreases medial thickening of intramyocardial coronary arterioles, interstitial fibrosis, and ROS production in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2093-2100.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. 2009 ACR 73th/ARHP 44th Annual Scientific Meeting
 2. 第37回日本臨床免疫学会総会
 3. 日本研究皮膚科学会第34回年次学術大会・総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



B 皮下結合組織層の厚さ

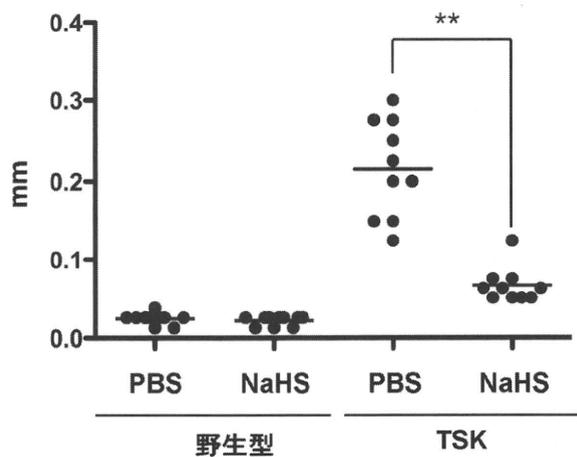


図1：NaHS投与群、非投与群におけるTSKマウス、コントロールマウスの皮下結合組織層厚の変化 (** p<0.01、▲▲皮下結合組織層)

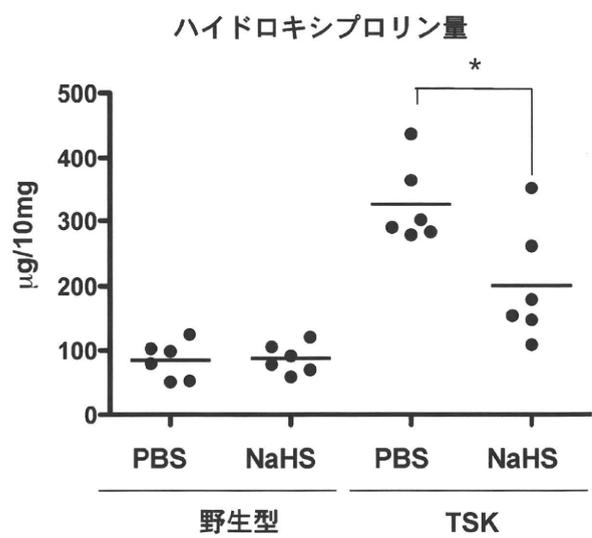


図2：NaHS投与群、非投与群におけるTSKマウス、コントロールマウスの皮膚10mgあたりのハイドロキシプロリン量の変化 (* p<0.05)

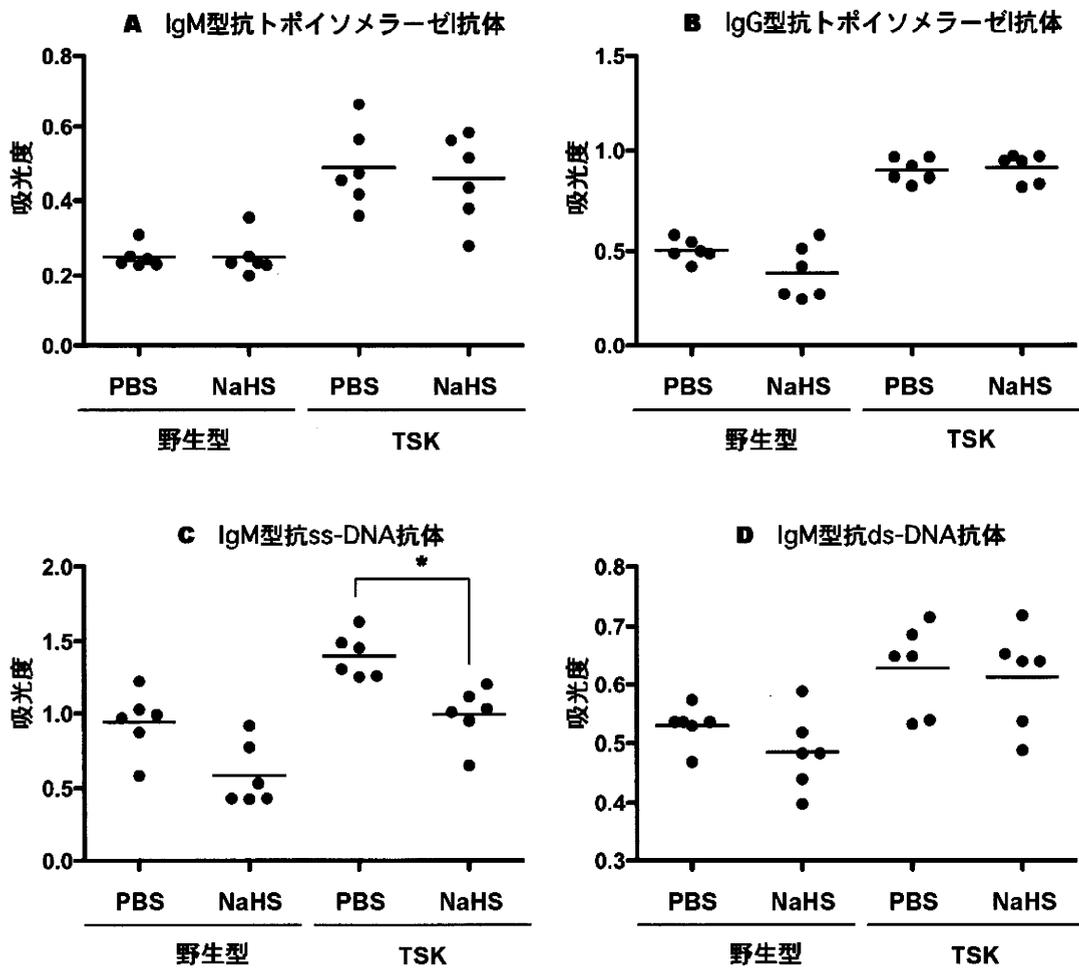


図3：NaHS投与群、非投与群におけるTSKマウス、コントロールマウスの血清中自己抗体量の変化 (* $p < 0.05$)

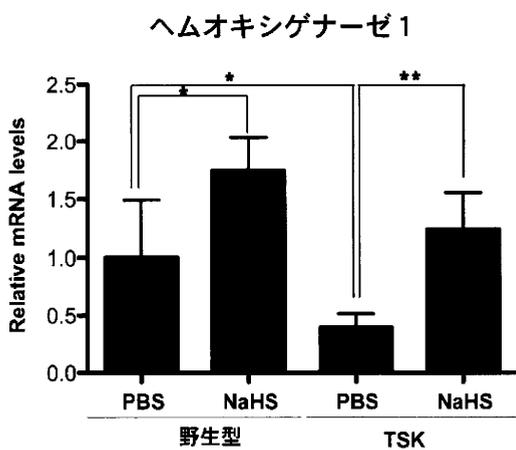


図4：NaHS投与群、非投与群におけるTSKマウス、コントロールマウスの皮膚HO-1mRNA発現量の変化 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

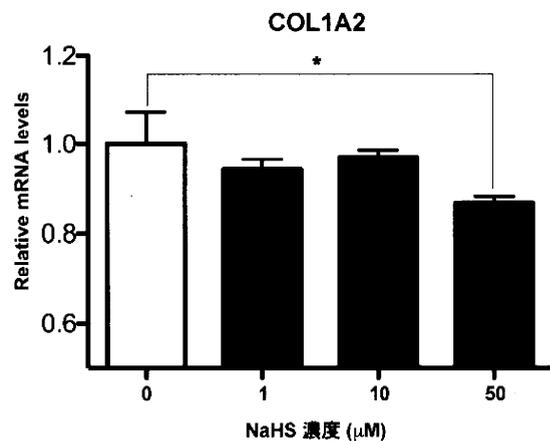


図5：TSKマウス由来皮膚線維芽細胞のCOL1A2発現に及ぼすNaHSの効果 (* $p < 0.05$)

汎発性強皮症患者の皮膚硬化および 微小血管障害に対するメシル酸イマチニブの効果

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
研究分担者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科 助教
協力者	玉城善史郎	東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科 助教
協力者	川嶋智彦	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	富田 学	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	宮寄美幾	東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科
協力者	谷口隆志	東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科
協力者	蘆田龍一	東京警察病院皮膚科
協力者	波多野将	東京大学大学院医学研究科・医学部循環器内科
協力者	八尾厚史	東京大学大学院医学研究科・医学部循環器内科
協力者	志賀太郎	東京大学大学院医学研究科・医学部循環器内科
協力者	絹川弘一郎	東京大学大学院医学研究科・医学部循環器内科

研究要旨

メシル酸イマチニブは、チロシンキナーゼ阻害薬として知られており、Bcr-Abl、C-Kit、PDGF 受容体、c-Abl のチロシンキナーゼ活性を抑制するがん分子標的治療薬である。汎発性強皮症患者 3 例に対して、合併する肺動脈性肺高血圧に対してメシル酸イマチニブ (100 mg/day) を投与し、皮膚硬化ならびに微小血管障害に対する効果について検討した。皮膚硬化に関しては全例において mTSS の低下や 3 例中 2 例において手指屈曲拘縮の軽減がみられ、1 例においては間接可動域の拡大もみられた。微小血管障害に関しても、3 例中 2 例で NFB の消失がみられた。メシル酸イマチニブは抗線維化作用や血管のリモデリング作用が示唆されており、今後汎発性強皮症の様々な線維化病態、血管障害に対する有効な薬剤となりうると期待される。

A. 研究目的

汎発性強皮症は線維化や血管障害が皮膚および全身の諸臓器にみられる疾患である。病因はまだまだ解明されていないが、免疫異常、コラーゲンの代謝異常、微小血管障害が複合的に絡み合っていると考えられる。汎発性強皮症の皮膚症状としては、Rayn-

aud 現象、手指を含めた全身の皮膚硬化、手指屈曲拘縮、爪上皮出血点 (NFB) などがみられ、その他、pitting scar や毛細血管拡張、calcinosis などがみられることが多い。また、内臓病変としては、肺線維症をはじめとして、肺高血圧症、強皮症腎クリーゼ、逆流性食道炎や腸蠕動運動の低下などがあげられる。

メシル酸イマチニブは近年、慢性骨髄性白血病における骨髄の線維化を抑制したという報告¹⁾、線維芽細胞において TGF- β により活性化された c-Abl に対してそのリン酸化を抑制したという報告²⁾、TSK-1 モデルマウスにおいて c-Abl、PDGF 受容体のリン酸化抑制により、抗線維化作用がみられたという報告³⁾、また、特発性肺動脈性肺高血圧患者に投与した際に、血管のリモデリング作用にその有用性が認められたとの報告がみられ⁴⁾、汎発性強皮症の皮膚硬化や微小血管障害などに有効と考えられる。

今回、我々は合併する肺動脈性肺高血圧に対してメシル酸イマチニブ (100 mg/day) を投与した汎発性強皮症患者 3 例における皮膚硬化ならびに微小血管障害に対する効果について検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は汎発性強皮症 3 例。

全例において肺高血圧症を合併しており、肺高血圧症に対して患者本人および家族に対して説明を行い、同意を得たうえで、メシル酸イマチニブ 100 mg/day 投与を行った。

2) 評価方法

メシル酸イマチニブ内服前、内服 3 カ月、6 か月後 (症例 2 のみ内服 1 ヶ月後も含む) における、modified Rodnan's total skin thickness score (mTSS)、関節可動域、Raynaud 現象、NFB、手指屈曲拘縮の経時的変化を測定し、メシル酸イマチニブ内服による汎発性強皮症患者の皮膚硬化および微小血管障害に対する効果を評価した。

C. 研究結果

メシル酸イマチニブ 100mg/day 内服後 6 か月に

て、全例において mTSS の減少、Raynaud 現象の消失がみられた。さらに 3 例中 2 例において NFB の消失、手指屈曲拘縮の軽減がみられた。また、3 例中 1 例において、関節可動域の拡大もみられた。

D. 考案

今回の症例検討により、メシル酸イマチニブが汎発性強皮症の皮膚硬化ならびに微小血管障害に対して今後、有効な治療薬となりえる可能性が示唆された。これまでのメシル酸イマチニブの汎発性強皮症に対する効果を検討した症例報告においては、皮膚硬化、肺線維症、肺高血圧症、手指潰瘍に対するものであった⁵⁻⁹⁾ が、今回我々の症例においては、さらに、Raynaud 現象や NFB についてもメシル酸イマチニブの効果がみられたことが特徴的であると考えられた。メシル酸イマチニブの汎発性強皮症への作用として、c-Abl や PDGF 受容体のリン酸化を抑制することによって、抗線維化作用や血管のリモデリングを促すことが考えられている^{2,3)}。それにより皮膚硬化、手指屈曲拘縮、肺線維症や消化管機能障害、肺高血圧、NFB、Raynaud 現象の症状の改善や強皮症腎の予防などに有効な薬剤となりうる可能性が示唆される。しかしながら、症例によって、効果の違いや、効果不十分あるいは無効である場合もあると考えられる。その原因の一つとして、 α 1-Acid Glycoprotein (AGP) という急性期反応蛋白があげられる。AGP はイマチニブに結合し、その作用を阻害するといわれており、汎発性強皮症患者において、健常人と比較して AGP の有意な上昇がみられたとの報告もあり¹⁰⁾、汎発性強皮症患者において、イマチニブの無効例においては AGP がイマチニブの効果を阻害している可能性が考えられる。しかし、エリスロマイシン、クラリスロマイシン添加にて AGP

のイマチニブ阻害作用は抑制されるという報告¹¹⁾もみられ、エリスロマイシンあるいはクラリスロマイシンの併用により、無効例などにおいても効果が十分期待できる可能性があり、これらの薬剤の併用療法も検討する価値があると考えられた。

E. 結論

メシル酸イマチニブは汎発性強皮症患者の皮膚硬化およびRaynaud症状やNFBなどの微小血管障害に対して効果がみられ、今後有用な薬剤となりえると考えられた。また、今後、エリスロマイシンやクラリスロマイシンなどとの併用療法も検討する必要があると考えられた。

F. 文献

1. Beham-Schmid C, Apfelbeck U, Sill H, Tsybrovsky O, Höfler G, Haas OA, Linkesch W: Treatment of chronic myelogenous leukemia with the tyrosine kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. *Blood*. 2002; 99: 381-3.
2. Wilkes MC, Leof EB: Transforming growth factor beta activation of c-Abl is independent of receptor internalization and regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and PAK2 in mesenchymal cultures. *J Biol Chem*. 2006; 281: 27846-54
3. Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Busch N, Zwerina J, Schett G, Distler O, Distler JH: Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 219-24.
4. Souza R, Sitbon O, Parent F, Simonneau G, Humbert M: Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2006; 61: 736
5. Sabnani I, Zucker MJ, Rosenstein ED, Baran DA, Arroyo LH, Tsang P, Zubair M, Rivera V: A novel therapeutic approach to the treatment of scleroderma-associated pulmonary complications: safety and efficacy of combination therapy with imatinib and cyclophosphamide. *Rheumatology*. 2009; 48: 49-52
6. Ten Freyhaus H, Dumitrescu D, Bovenschulte H, Erdmann E, Rosenkranz S: Significant improvement of right ventricular function by imatinib mesylate in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Clin Res Cardiol*. 2009; 98: 265-7.
7. Sfikakis PP, Gorgoulis VG, Katsiari CG, Evangelou K, Kostopoulos C, Black CM. Imatinib for the treatment of refractory, diffuse systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2008; 47: 735-7.
8. Chung L, Fiorentino DF, Benbarak MJ, Adler AS, Mariano MM, Paniagua RT, Milano A, Molecular framework for response to imatinib mesylate in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 584-91.
9. Kameda H: Imatinib. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2009; 32 (2) : 77-84.
10. Kucharz EJ, Grucka-Mamczar E, Mamczar A, Brzezinska-Wcislo L: Acute-phase proteins in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2000; 19: 165-6.
11. Azuma M, Nishioka Y, Aono Y, Inayama M,

Makino H, Kishi J, Shono M, Kinoshita K, Uehara H, Ogushi F, Izumi K, Sone S: Role of alpha1-acid glycoprotein in therapeutic antifibrotic effects of imatinib with macrolides in mice. Am J Respir Crit Care Med. 2007; 176: 1243-50.

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
なし

汎発性強皮症に伴う難治性皮膚潰瘍に対する当科でのボセンタン使用経験

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
研究分担者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科・皮膚光線レーザー科 講師
協力者	谷口隆志	東京大学医学部附属病院皮膚科・皮膚光線レーザー科 助教
協力者	市村洋平	東京大学医学部附属病院皮膚科・皮膚光線レーザー科 助教
協力者	高橋岳浩	東京大学医学部附属病院皮膚科・皮膚光線レーザー科 助教
協力者	遠山哲夫	東京大学医学部附属病院皮膚科・皮膚光線レーザー科
協力者	杉田美樹	同愛記念病院皮膚科
協力者	青笹尚彦	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	赤股 要	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	川嶋智彦	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	富田 学	帝京大学医学部附属病院皮膚科 助教
協力者	玉城善史郎	東京大学医学部附属病院皮膚科・皮膚光線レーザー科 助教
協力者	宮寄美幾	東京大学医学部附属病院皮膚科・皮膚光線レーザー科
協力者	波多野将	東京大学大学院医学研究科・医学部循環器内科 助教

研究要旨

汎発性強皮症における、種々の治療に対して抵抗性する難治性潰瘍に対してボセンタンの投与を行った。指尖部、指尖部以外と様々な部位に位置する難治性潰瘍を有する汎発性強皮症患者 15 例に対してボセンタンを投与した。また、MR angiography (MRA) をボセンタン開始前後で撮影した 5 例の血管病変についてもボセンタン投与前後で比較を行った。貧血、肝機能障害などの副作用が見られる症例が 4 例あったが、内服量の調整にて内服継続は可能であった。ボセンタンが有用と考えられる潰瘍として、抗セントロメア抗体以外の特異抗体を有する指尖部潰瘍と周囲にチアノーゼを伴う指尖部以外の潰瘍が挙げられた。MRA にてボセンタン内服開始後に血管の狭窄、末梢循環の改善が見られており、ボセンタンは汎発性強皮症の macrovascular involvement を改善する作用がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

汎発性強皮症の合併症の一つであるし仙部潰瘍は末梢循環不全が原因とされている¹⁻³⁾。エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンは、肺高血圧症の治療薬として開発されたが、強皮症に伴う指尖部皮膚潰瘍の新規発症を抑制する効果が報告されている^{4,5)}。

しかしながら、指尖部以外に生じた難治性皮膚潰瘍に対するボセンタンの有用性については不明である。今回我々は、強皮症に伴う様々な難治性皮膚潰瘍に対してボセンタンを投与し、その有用性について検討した。また、ボセンタンが有用な症例の臨床的な特徴についても検討した。

B. 研究方法

東京大学医学部附属病院皮膚科・皮膚光線レーザー科に通院中の汎発性強皮症患者のうち、既存の治療にて難治な潰瘍を生じた15例を対象とした。投与後の末梢循環障害所見並びに投与の契機となった潰瘍の改善・治癒の有無について検討した。

ボセンタンは125 mg/日より開始し、貧血、肝機能障害などの副作用が許容範囲内であれば4週後に250 mg/日に増量した。

いずれの検討においても、全患者に対してインフォームドコンセントを行い、患者情報の管理を含め十分に倫理面に配慮した。

C. 研究結果

結果を示す(表1~3)。指尖部潰瘍では8人中4人、指尖部以外の潰瘍では7人中5人に潰瘍の縮小が見られた。指尖部潰瘍を有する抗セントロメア抗体陽性患者ではボセンタン内服にて改善が見られなかった。

指尖部以外の潰瘍については、潰瘍周囲にチアノーゼを伴っている患者では改善が見られたが、周囲にチアノーゼを伴わない潰瘍では潰瘍の改善は見られなかった。チアノーゼを有する患者ではチアノーゼの改善が見られた。MRAを施行した5例全てにおいて治療前は足背動脈、尺骨動脈、手掌動脈弓動脈などの動脈に狭窄が見られ、macrovascular involvementが見られた。ボセンタン開始1ヶ月後のMRAにて5例中4例では狭窄の改善、末梢循環の改善が見られた。改善の見られなかった1例においては撮影時間が不十分であり、撮影時間が十分であれば末梢循環の改善が確認できた可能性がある。15人中4例にて副作用がみられた。3例でHb 1 g/dl程度の低下、1例で肝酵素の上昇が見られたが、内

服の増量なしもしくは、減量にて内服継続可能であった。

D. 考案

強皮症患者では、指動脈、手掌・足底動脈弓などの動脈の狭窄、いわゆる macrovascular involvement を呈する事が報告されている⁶⁾。今回われわれがMRAを施行した全ての症例においても足背動脈や手掌動脈弓に狭窄が見られ、macrovascular involvementが見られた。ボセンタン開始後のMRAにて狭窄の改善、末梢循環の改善が見られたことから、ボセンタンには汎発性強皮症における macrovascular involvement を改善する作用がある可能性が示唆される。指尖部潰瘍でボセンタン無効患者は抗セントロメア抗体陽性患者であった。そのような潰瘍では、潰瘍周囲のチアノーゼは改善するものの、潰瘍自体の治癒傾向は見られなかった。つまり、抗Topoisomerase-I抗体陽性患者と抗セントロメア抗体陽性患者では指尖部潰瘍の形成機序に何らかの違いがある可能性があり、その違いがボセンタンの臨床効果の差になっている可能性がある。

E. 結論

抗セントロメア抗体陽性患者の指尖部潰瘍にはボセンタンは抵抗性であった。チアノーゼを伴う指尖部以外の潰瘍にはボセンタンは有用であった。ボセンタンは汎発性強皮症の macrovascular involvement の改善に作用する可能性が示唆された。

F. 文献

1. Hachulla E, Clerson P, Launay D, Lambert M, Morell-Dubis S, Queyrel V, et al. Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis :

- single-center retrospective longitudinal study. *J Rheumatol.* 2007; 34(12): 2423-30
2. Mouthon L, Guillevin L, Humbert M. Pulmonary arterial hypertension: an autoimmune disease? *Eur Respir J.* 2005; 26(6): 986-8
 3. Denton CP, Black CM. Targeted therapy comes of age in scleroderma. *Trends immunol.* 2005; 26(11): 596-602
 4. Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, Mayes MD, Hsu VM, Carpentier P, et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70(1): 32-8.
 5. Korn J, Mayes M, Matucci Cerinic M, Rainisio M, Pope J, Hachulla E, et al. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(12): 3985-93.
 6. Hasegawa M, Nagai Y, Tamura A, Ishikawa O. Arteriographic evaluation of vascular changes of the extremities in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* 2006; 155(6): 1159-64.
- 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

表 1. 指尖部潰瘍を持つ患者のプロフィールとボセンタンの効果

症例	内服時の年齢 / 性	自己抗体	潰瘍の位置	潰瘍周囲のチアノーゼの有無	潰瘍の改善
1	66F	Topo-I	右 2 趾尖部	+	+
2	50F	Topo-I	右 2,3,4, 指尖部 左 2,5 指尖部	+	+
3	69F	Topo-I SS-A	両 2 指尖部	+	-
4	59F	centromere	右 1,3 指指尖部 左 4,5 指尖部	+	-
5	71F	centromere	左 1 趾尖部	+	-
6	80F	centromere	右 1 趾爪周囲	+	-
7	66F	centromere	左 4 趾尖部	+	-
8	50F	UI-RNP	右 2 趾尖部 右 5 指尖部	+	+

表 2. 指尖部以外の潰瘍を持つ患者のプロフィールとボセンタンの効果

症例	内服時の年齢 / 性	自己抗体	潰瘍の位置	潰瘍周囲のチアノーゼの有無	潰瘍の改善
9	69F	Topo-I SS-A	両踵	-	-
10	49F	Topo-I	左踵	+	+
11	54F	Topo-I	右踵	+	+
12	80F	centromere	左足趾	+	+
13	62F	UI-RNP	両外果	-	-
14	45F	UI-RNP	左踵	+	+
15	45F	UI-RNP	両踵	+	+

表 3. ボセンタンの効果の MRA での評価

症例	内服時の年齢 / 性	自己抗体	潰瘍の部位	潰瘍の改善	MRA 上の血管障害の改善
2	50F	Topo-I	右 2,3,4, 指尖部 左 2,5 指尖部	+	+
5	71F	centromere	左 1 趾尖部	-	+
6	80F	centromere	右 1 趾爪周囲	-	+
7	66F	centromere	左 4 趾尖部	-	+
10	49F	Topo-I	左踵	+	-

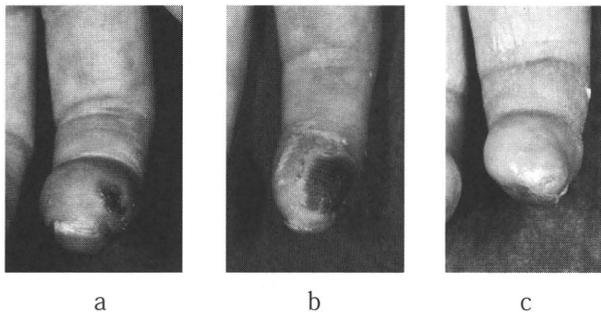


图 1

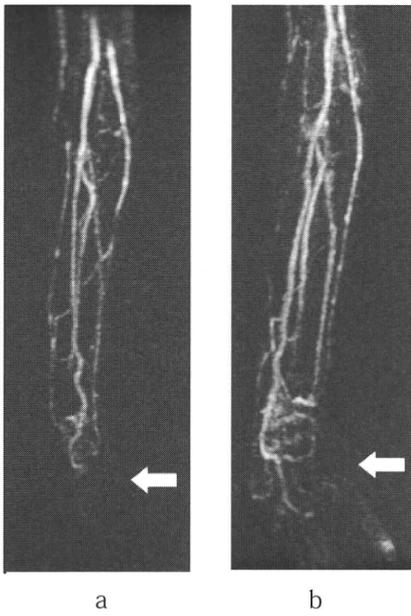
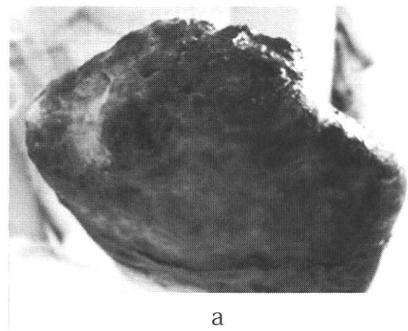
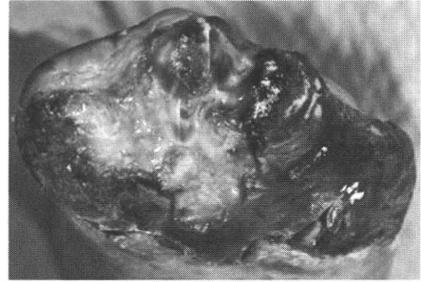


图 2



a

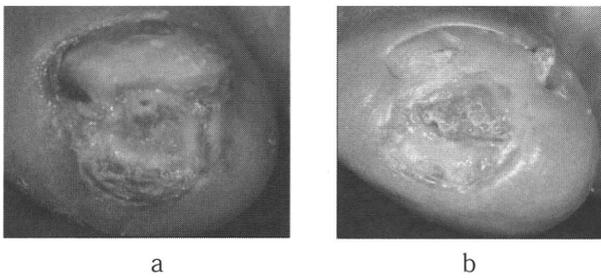


b



c

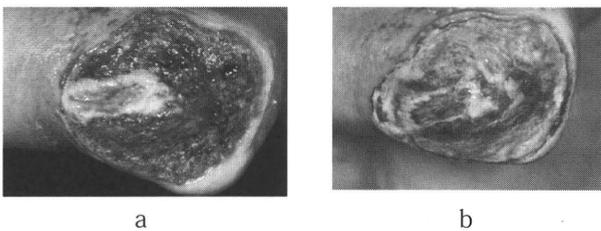
图 5



a

b

图 3



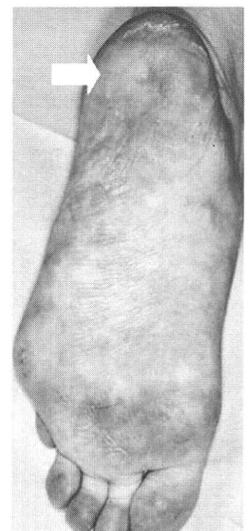
a

b

图 4



a



b

图 6

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 年に当教室の石淵らは、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

健常人 3 名および全身性强皮症患者 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 時間でいった。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 μ g 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 サーチを用いて 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⁴⁵⁾、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

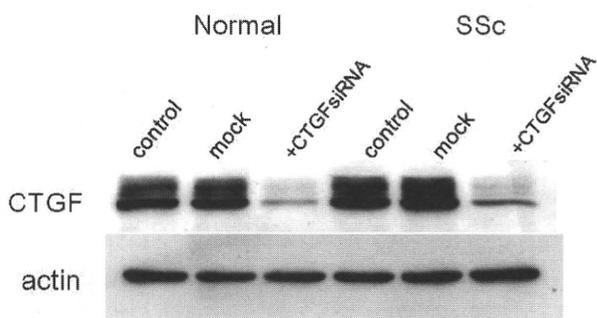


図1: CTGF 特異的 siRNA による CTGF サイレンシング効果。siRNA 配列: 5'-AAUCGGAAUCCU-GUCGAUUAGTT-3'

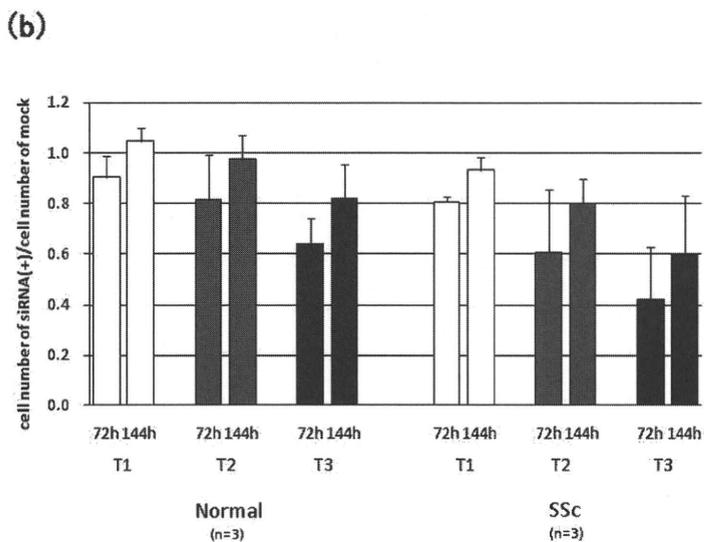
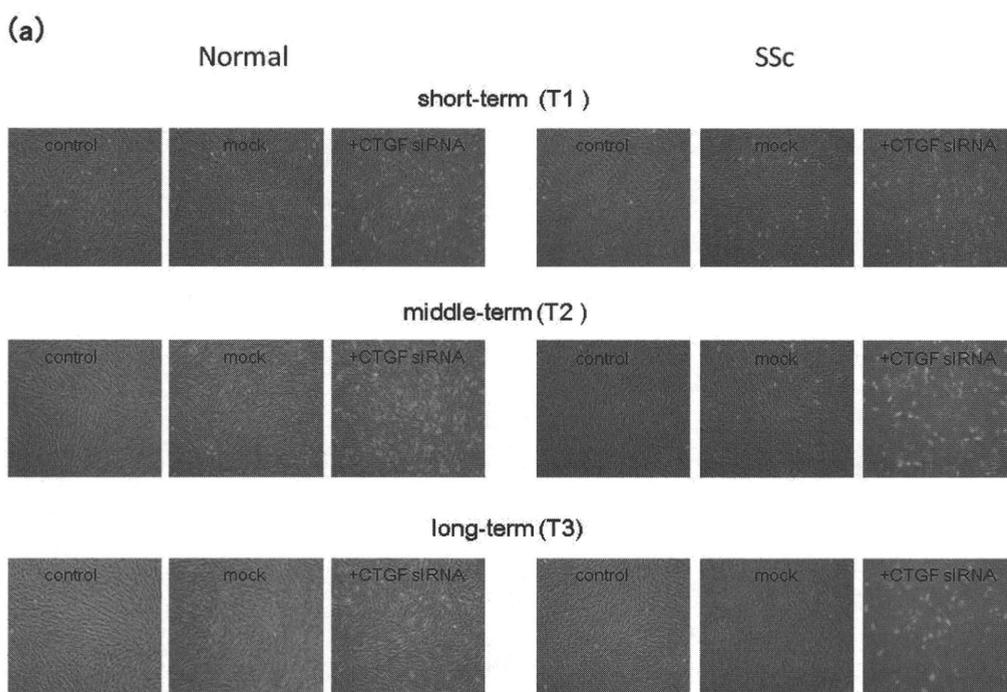


図2: CTGF 長期サイレンシングの細胞数への影響。(a) CTGFsiRNA トランスフェクション1回 (T1) ~3回 (T3) 後、72時間培養した線維芽細胞 (x50)。サブカルチャーは各ウェル 1:2 で行った。(b) CTGFsiRNA トランスフェクション1回 (T1) ~3回 (T3) 後、72時間および144時間培養したCTGFサイレンシング線維芽細胞数を mock 細胞数との比で表した (平均値 ± SD)。サブカルチャーは各ウェル同数を播種した。

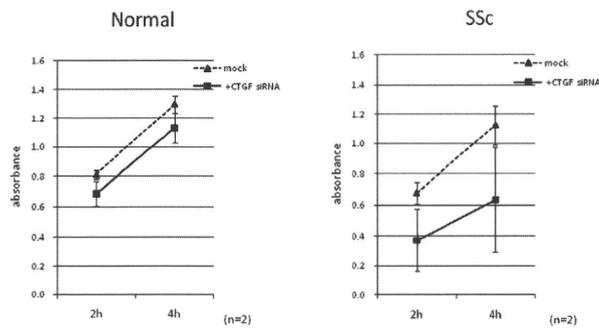


図3：CTGF長期サイレンシングの増殖能への影響。siRNA トランスフェクション3回後、サブカルチャーした線維芽細胞にリコンビナントCTGFを添加し、2、4時間後の細胞増殖能をMTS法にて測定。490nmの吸光度で示した。平均値±SD。

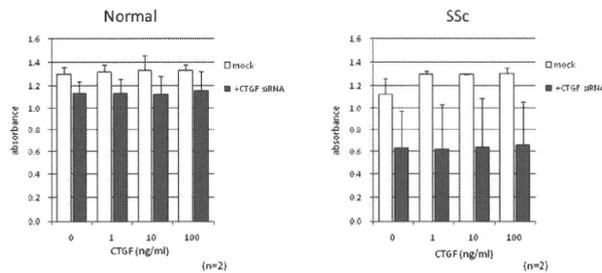


図4：リコンビナントCTGF添加によるCTGF長期サイレンシング線維芽細胞の増殖への影響。siRNA トランスフェクション3回後、サブカルチャーした線維芽細胞にリコンビナントCTGFを添加し、4時間後の細胞増殖能をMTS法にて測定。490nmの吸光度で示した。平均値±SD。

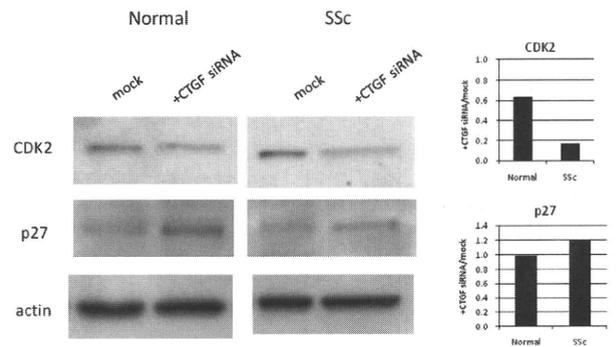


図5：CTGF長期サイレンシングによる細胞増殖関連タンパクへの影響。siRNA トランスフェクション3回後、72時間培養した線維芽細胞のCDK2とp27発現をウエスタンブロット法で確認した。検出されたバンドを定量し、アクチンで補正後、mockとの比をグラフに示した。

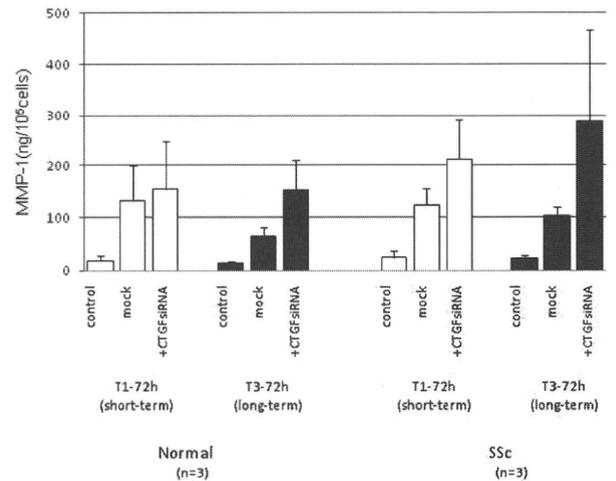


図6：CTGF長期サイレンシングによるMMP-1産生への影響。トランスフェクション1回(T1)、3回(T3)後、72時間培養した培養上清を用いELISA法にて定量した。グラフは線維芽細胞数 10^5 個あたりのMMP-1量で示した。平均値±SD。