

服を開始した。プレドニソロンに関しては、投与1ヶ月後より漸減を行い、3-4ヶ月後には、10 mg/日以下の内服量にした。副作用が生じた場合、および、皮膚硬化などの臨床症状の悪化により他の治療薬への変更や追加療法を行った場合は、研究中止とした。

C. 研究結果

RPSScの基準を満たした24症例が研究に組み込まれた。表1に患者の背景を示す。全例がびまん性皮膚硬化型全身性強皮症であった。図1に示すように、12ヶ月までは、全例、観察を継続できた。その間のMRSSは、治療開始時と比較して有意 ($P < 0.0001$) に低下した (図2)。12ヶ月から24ヶ月の間に6症例が脱落となった。その理由は、2例が皮膚硬化の進行のためイムノグロブリン大量療法を行った。また、間質性肺病変の悪化、心病変の悪化、腎症状の新規合併がそれぞれ1例ずつに発症した。1例は外来での追跡不可能となった。1例の追跡不可能症例を除いた23症例では、24ヶ月まで、有意に皮膚硬化が改善した。脱落例では、脱落時のMRSSを24ヶ月のデータとして記載した。

臨床症状として、肺高血圧症、間質性肺病変、心病変、消化器病変、筋病変を皮膚症状と同様に観察したところ、間質性肺病変と筋病変では改善がみられた (表2)。副作用として、1例に点滴静注療法終了後すぐに低Na血症が生じ、SIADHと診断された。経過観察で改善した。

D. 考察

シクロホスファミド点滴静注療法 (IVCY) は、全身性強皮症における皮膚硬化に有効であった。また、今回用いた投与量では重篤な副作用はみられなかった。同時に認められた全身性強皮症に合併した症状

においては、間質性肺病変は改善傾向を示した。また、筋炎症状は、全例で改善した。一方、肺高血圧症、心病変、消化器病変は、改善が認められなかった。さらに、新規に1症例では、高レニン血症を伴う強皮症腎症が発症した。線維化病変には有効性が認められたが、血管病変に関して有効性は示さなかった。

皮膚硬化がゆっくりと進行する症例に比較して、RPSScでは内臓病変の合併が多いことが我々の研究で明らかとなっている¹⁾。皮膚硬化が急速に進行する徴候は、内臓病変の出現を予測している可能性がある。その点からは、今回の症例群では、新たな内臓病変の出現は1例のみであった。しかしながら、2例で間質性肺病変の悪化が認められた。この治療では、間質性肺病変の抑制効果は少ないと考えられる。

我々の以前の報告では、1ヶ月間隔で行うIVCYによる間質性肺病変への有効性が認められており²⁾、その時に同時に皮膚硬化への有効性も認められた。その時の治療方法は、IVCYを2回以上6回以下で施行したが、今回は、それよりは少ない2回だけの治療で行っている。この少量においても、早期に治療を行えば、24ヶ月まで9割の症例で皮膚硬化に対しては有効性が認められた。

E. 結論

全身性強皮症に伴う皮膚硬化に関して、急速に進行する症例では関節拘縮や皮膚潰瘍が高頻度に認められる。早期の段階で、IVCY間欠療法を2回行うことにより、皮膚症状の悪化が抑制できることが示された。このIVCY少量の治療方法では、副作用の危険性は少ないと考えられることより、RPSScの症例では、IVCY療法とプレドニソロン内服治療の併

用療法が有用と考えられる。

F. 文献

1. Nishimagi E, Kawaguchi Y, Tanaka E, Hara M, Kamatani N. Classification of systemic sclerosis in the Japanese population based on rapid progression of skin thickening. *Mod Rheumatol* 14: 216-221, 2004
2. Tochimoto A, Kawaguchi Y, Hara M, Tateishi M, Fukasawa C, Takagi K, et al. Efficacy and

safety of intravenous cyclophosphamide pulse therapy with oral prednisolone in the treatment of interstitial lung disease with systemic sclerosis: four-year follow-up. *Modern Rheumatol* in press

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出題・登録状況

なし

表 1. Clinical profile of 24 patients with rapidly progressive systemic sclerosis

Characteristics	Value
Age, mean (range) years	53.0 (26-79)
Female, number (%)	22 (91.7)
MRSS, mean (range)	24.8 (15-39)
Anti nuclear antibody, number (%)	23 (95.8)
Anti topoisomerase-I antibody, number (%)	8 (33.3)
Anti centromere antibody, number (%)	3 (12.5)
Anti U1-snRNP antibody, number (%)	5 (20.8)

MRSS: Modified Rodnan's total skin score

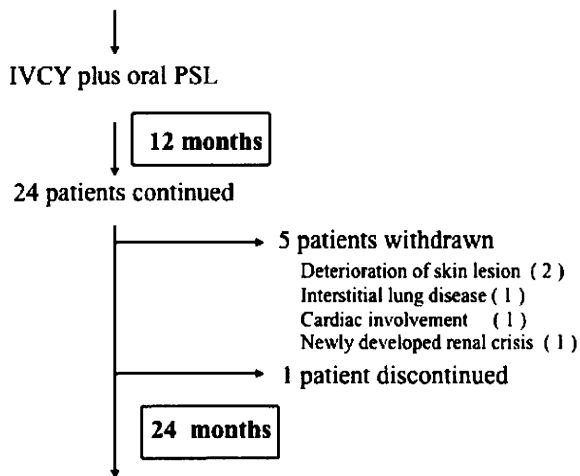
表 2. Changes in frequencies of organ involvements developed before treatment

	0 M (n=24)	12 M (n=24)	24 M (n=18)	Patients withdrawn (n=6)
Pulmonary hypertension	2	2	1	1
Interstitial lung disease	16	14	10	4
Cardiac involvement	4	3	0	1
Intestinal involvement	4	4	3	1
Muscular involvement	6	0*	0*	0

Frequencies were evaluated by Fisher's exact test. M: month

*: P<0.05 compared to 0 month

24 RPSSc patients enrolled



18 patients completed the study

図 1 : 観察症例の経過

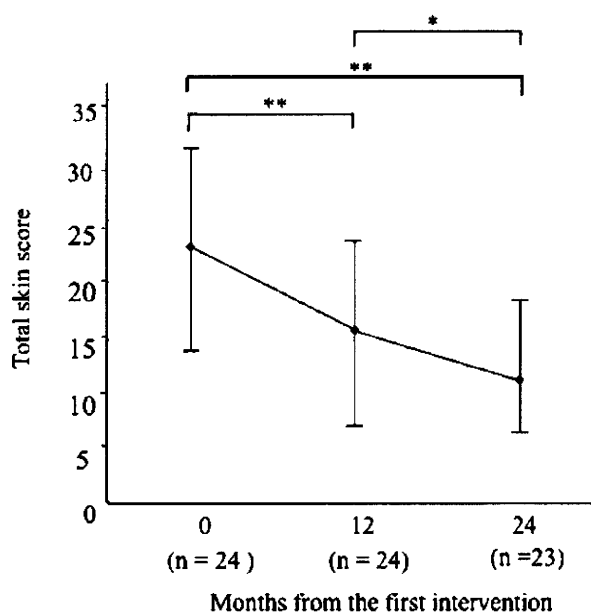


図 2 : スキンスコアによる皮膚硬化の推移

* P<0.01, ** P<0.001

全身性強皮症に対するシルデナフィルの有効性

研究分担者	川口 鎮司	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター	准教授
協力者	片岡さゆり	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター	
協力者	高木 香恵	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター	
協力者	深澤千賀子	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター	
協力者	栃本 明子	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター	
協力者	大田ゆう子	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター	

研究要旨

シルデナフィルは、ホスホジエステラーゼ5阻害薬（PDE5I）であり、肺動脈性肺高血圧症（PAH）の治療薬である。全身性強皮症に合併したPAHおよび指尖部潰瘍に対してPDE5Iを用いて治療を行った。PAHの治療目的で用いた1症例と難治性で治療抵抗性の指尖部潰瘍の2症例に関して、シルデナフィルは有効であった。PAHだけでなく、全身性強皮症に伴うレイノー現象や指尖部潰瘍に関して有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は、線維化を主症状とする疾患であるが、血管病変も高頻度に認められる。ほぼ全例で、末梢循環不全によるレイノー現象を併発する。末梢循環不全が重症となれば、指尖部に潰瘍が多発するようになる。また、PAHの合併も10%程度に認められる。これらの血管病変に関しては、プロスタグランジン製剤が治療に用いられていたが、治療抵抗性の症例がみられる。近年、PAHの治療薬としてPDE5Iが開発され、その有効性が報告されている。一酸化窒素（NO）は、血管平滑筋細胞に働き、cGMPを誘導する。このcGMPにより血管の弛緩が生じる。PDE5は、血管平滑筋細胞内で合成されたcGMPを分解する酵素である。この分解をPDE5Iにより阻害することは、細胞内cGMP濃度を維持することができ、結果として、血管の拡張に働く。PDE5は、肺

動脈における血管平滑筋細胞に特異性が高いことにより、肺動脈性肺高血圧症の治療薬として開発された。しかしながら、肺血管にのみ作用するわけではなく、末梢血管に対する作用も報告され、特に、全身性強皮症における指尖部潰瘍やレイノー現象に対する治療効果が近年多数報告されるようになった。今回、1例のPAH症例、2例の難治性指尖部潰瘍に対してシルデナフィルを用いたので、その治療反応性と安全性を報告する。

B. 研究方法

PAHの合併症例に対してシルデナフィルを投与し、PAHへの効果と安全性、および、レイノー現象や指尖部潰瘍への効果を検討する。PAHの評価に関しては、心臓超音波検査、WHO機能分類、血清NT-proBNP濃度、6分間歩行距離（6MWD）を用

いた。レイノー現象には Raynaud's condition score (RCS) を指尖部潰瘍の数を計測した。

C. 研究結果

1) PAH に対する効果

2009年発症の全身性強皮症の66歳の女性。抗セントロメア抗体、抗SSA抗体、抗SSB抗体陽性で限局皮膚型であった。労作時息切れが生じ、心臓ドップラー超音波検査にて、推定右室収縮期圧が75.6 mmHgと高値であった。また%DLco 39.9%と低下、血清NT-proBNPは458 pg/mlと上昇していた。これらの所見から、PAHの合併を疑い、右心カテーテル検査を行った。その結果、平均肺動脈圧は41.7 mmHg、肺動脈楔入圧は7 mmHgであった。また、肺血流シンチグラフィーを行い肺塞栓症の存在は否定された。以上より、PAHと診断した。すでに、レイノー現象に対してベラプロストが投与されていたため、シルデナフィルを60 mg/日で投与を開始した。表1に示すように、治療開始後、3ヶ月でRVSP、NT-proBNP、6MWD、WHO機能分類のすべての項目において改善が認められた。

2) 指尖部潰瘍に対する効果

難治性の指尖部潰瘍を有する全身性強皮症2症例に対する効果を検討した。1症例は、抗UI-RNP抗体陽性でPAHの合併のため、すでにベラプロストとボセンタンが投与されていた。2種類の血管拡張作用を有する薬剤による治療にもかかわらず、指尖部皮膚潰瘍は増加していた。そこで、シルデナフィルの60 mg/日の併用を行った。もう1症例は、抗UI-RNP抗体、抗セントロメア抗体、抗ミトコンドリア抗体のすべてが陽性である全身性強皮症の症例で、軽度のPAHと無症候性の原発性胆汁性肝硬変を有していた。そのため、肝機能障害の危険性があ

るボセンタンの投与は行わず、シルデナフィルの投与を行った。当初は、40 mg/日で開始した。表2に示すように、両症例ともRCSは改善した。また、表3に示すように、指尖部潰瘍の数も減少し、その後、指尖部潰瘍の再発は認められていない。

D. 考察

シルデナフィルは、特発性PAHだけでなく、膠原病に伴うPAHに対しても有効性と安全性が報告されている¹⁾。一方、海外では、全身性強皮症に伴う指尖部潰瘍に対しての効果も期待されている^{2,3)}。新規のPAHの症例に対してシルデナフィルを用いて治療を行ったが、著明なPAHの評価項目の改善が認められた。現在、治療開始後1年が経過しているが、悪化の徴候は認められていない。また、PAHの治療はすでに行われていた2症例に関して、新規に生じる指尖部潰瘍を治療する目的で、シルデナフィルを投与したところ、2症例でRCSの改善と潰瘍の治癒効果が認められた。

この3症例に共通したことは、シルデナフィルの投与後、数日で手指の冷感の改善が認められたことである。これは、シルデナフィルの末梢循環に対する効果が早期から現れることを示していると考えられる。また、顔面紅潮、頭痛、低血圧などの血管拡張作用に伴う副作用は認められなかった。それ以外にも検査値所見の変動などの副作用も認められなかった。

E. 結論

全身性強皮症に伴うPAHおよび指尖部潰瘍という血管病変に対して、シルデナフィルの効果を検討した。3症例に対する経験であり、症例を積み重ねる必要があるが、効果および安全性の面においても有用な治療方法である可能性が示唆された。

F. 文献

1. Badesch DB, Hill NS, Burgess G, Rubin LJ, Barst RJ, Galie N, et al. Sildenafil for pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. J Rheumatol 2007;34:2417-22
2. Colglazier CL, Sutej PG, O'Rourke KS. Severe refractory fingertip ulcerations in a patient with scleroderma: successful treatment with sildenafil. J Rheumatol 2005;32:2440-2
3. Brueckner CS, Becker MO, Kroencke T, Huscher

D, Scherer HU, Worm M, et al. Effect of sildenafil on digital ulcers in systemic sclerosis: analysis from a single center pilot study. Ann Rheum Dis 2010;69:1475-8

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出題・登録状況

なし

表1. PAH合併SSc1症例に対するシルデナフィルの効果

	治療前	治療後
RVSP (mmHg)	75.6	43.6
NT-proBNP (pg/ml)	458	161
6MWD (m)	435	560
WHO 機能分類	II	I

RVSP：心臓ドップラー超音波検査による推定右室収縮期圧

6MWD：6分間歩行距離

表2. シルデナフィル治療による強皮症2症例のRCS

	治療開始時	開始後		
		1か月	2か月	3か月
症例1	6	1	1	1
症例2	7	6	4	3

RCS: Raynaud's Condition Score

表3. シルデナフィル治療による強皮症2症例の指尖部潰瘍の数

	治療開始時	開始後		
		1か月	2か月	3か月
症例1	3	1	0	0
症例2	2	1	0	0

RCS: Raynaud's Condition Score

強皮症に伴う末期間質性肺疾患に対するボセンタンの有効性

研究分担者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部内科 准教授

協力者 古屋善章 慶應義塾大学医学部内科 助教

研究要旨

間質性肺疾患による末期肺病変（%VC < 55%又は在宅酸素療法導入）を有する全身性強皮症5例（diffuse型が4例）にエンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンを投与するオープン試験を実施中である。平均24.6ヶ月（18～31ヶ月）経過観察し、低血圧、軽度の血小板減少を認めたが、中止に至る重篤な有害事象は認めていない。全例でエントリー時の%VCが2年間に渡って維持されたが、一部の症例でHRCTスコアの悪化やドプラーエコーによる収縮期肺動脈圧の上昇を認めた。1例が呼吸器感染症で死亡し、過去対照群に比べて累積生存率に有意差はなかった。ボセンタンが末期肺病変を有する強皮症患者の肺機能を維持する可能性が示された。

A. 研究目的

エンドセリン（ET）にはET-1、-2、-3の3種類があり、血管内皮や肺・腎・脳・胎盤など様々な組織で産生され、その受容体は2種類（ETR-A、-B）知られている。ETR-Aは主に平滑筋細胞に存在し、ETR-Bは平滑筋細胞の他、線維芽細胞や血管内皮細胞に存在する。ETは強力な血管収縮物質として同定されたが、近年では線維化を促進する作用が報告されている¹⁻²⁾。

このことから、肺動脈性肺高血圧症の治療薬として承認されたET受容体拮抗薬のボセンタンが、線維化病態を改善する可能性が期待され、臨床試験「BUILD-1」にて肺高血圧症を伴わない特発性肺線維症に対する有効性が検証された。主要評価項目の6分間歩行試験では統計学的に有意な改善を認めなかったが、生検でUIPが確定診断された症例に限定したサブ解析では、偽薬群に比べてボセンタン群で有意に死亡、病勢悪化などのイベントの減少が示され

た³⁾。したがって、難治性病態の一つである強皮症の間質性肺病変に対するボセンタンの効果が期待される。本研究では免疫抑制薬の適応がない末期肺病変を有する強皮症患者を対象としたボセンタンの有効性と安全性を前向きオープン試験により検証した。

B. 研究方法

1. 対象

アメリカリウマチ学会（ACR）の分類基準4）を満たす成人強皮症5例を対象とした。エントリー基準は、HRCT所見上でNSIP/UIPパターンの間質性肺病変、末期肺病変（%VC < 55又は在宅酸素療法導入）の両者を満たすこととした。全患者に対して研究内容を説明し同意を得た。また、過去に当院で加療した末期肺病変を有する強皮症患者17例を抽出し対照群とした。

2. 試験プロトコール

偽薬投与群を設定しない前向きオープン試験とし

た。ボセンタン（商品名：トラクリア）125 mg（2錠）を朝夕に分けて1ヶ月間投与し、肝機能障害や血球減少等の有害事象がなければ、250mg（4錠）に増量し継続した。投薬開始時と以後6ヶ月おきに以下の項目を評価した（①肺機能検査、②皮膚潰瘍などの所見と質問紙（Raynaud condition scoreとVAS）による末梢循環障害の評価、③皮膚硬化（スキンスコア）、④質問紙（HAQ、VAS、AIMS2（tension、mood））によるQOL評価、⑤心エコー（収縮期肺動脈圧の推定等））。さらに、1年おきに胸部HRCTを施行した。

HRCT所見はGoldinらが提唱した方法4）に基づき、左右そして上肺野（肺尖部～大動脈弓）・中肺野（大動脈弓～下肺静脈）・下肺野（下肺静脈～肺底部）に分け、any GGO・PF（Pulmonary Fibrosis）・HC（Honeycomb Cysts）の各所見をそれぞれスコア化した。スコアは、各肺野に占める病変部の割合をもとに0（病変なし）、1（1～25%）、2（25～50%）、3（50～75%）、4（75～100%）の5段階で評価した。

3. 統計学的解析

治療前後のパラメータの変化は、複数の場合 repeated measures analysis of variance を、2点間の場合には paired t 検定を用いて検定した。また、ボセンタン群と対照群の累積生存率を Kaplan-Meier 法により算出、ログランク検定で比較した。

C. 研究結果

対象となった強皮症症例は、罹病期間が平均10年と長い症例が多く、5例中4例が抗 topo-isomerase 1 抗体陽性の Diffuse 型であった。対照群と比較するとエントリー時の %VC が有意に低く、肺高血圧症の合併が多い傾向があった（表1）。平均24.6ヶ月

（18～31ヶ月）の観察期間で全例が投薬を継続したが、1例は血小板減少、他の1例は低血圧により増量が困難で125 mg/日の服薬とした。他に肝機能障害など重篤な有害事象は認めなかった。

ボセンタン群では、2年の観察期間中に %VC の悪化がなく、1年間に %VC が5%を超えて低下する肺機能低下例を1例も認めなかった。一方、対照群17例中、1年後に %VC を測定した6例では、3例が肺機能低下例であった（図1）。また、HRCT 所見のスコアでは、PF は5例中2例で、HC は5例中3例で悪化を認めた（図2）。ドップラー心エコーによる推定収縮期肺動脈圧は5例中3例で不変もしくは改善したが、悪化した2例ではベラプロストやシルデナフィルの併用を要した。皮膚硬化並びに質問紙によるQOLや末梢循環障害の評価では一定の傾向は得られなかった。皮膚潰瘍が年間を通じて認めた1例で、ボセンタン開始前後2年間の毎月の評価時の総潰瘍数と新規発生数を比較したところ、総潰瘍数は 4.2 ± 2.4 から 3.3 ± 2.3 ($p=0.25$)、新規発生数は 1.8 ± 1.8 から 1.6 ± 1.5 ($p=0.7$) と減少傾向がみられた。31ヶ月までの累積生存率を図3に示す。ボセンタン群の1例が18ヶ月後に呼吸器感染症のため死亡した。対照群では6例が死亡し、死因はすべて肺疾患に基づく感染症や気胸などであった。両群間で累積生存率に差はなかった ($p=0.48$)。

D. 考案

現時点で強皮症の間質性肺病変に対して大規模臨床試験で有効性が示された治療薬はシクロホスファミドのみだが、その適応は肺機能が保たれた症例に限定されている。一方、すでに末期肺病変まで進行した症例に対しては、在宅酸素療法など対症療法を行うのみで有効な治療法が存在しない。本研究では、

ボセンタン使用の末期肺病変に対する安全性が示された。一方で有効性については、% VC を2年間に渡って維持したが、HRCT 所見や肺高血圧の悪化を認める症例もあり、自然経過を大きく変えない可能性もある。しかし、ボセンタン群はエントリー時% VC が対照群に比べ有意に低く、残存する肺機能が少ない症例が多いことを考慮する必要がある。したがって、今後は症例数を増やすとともに長期成績につき、更なる検討を行う意義がある。

E. 結 論

ET 受容体拮抗薬ボセンタンが、末期肺病変を有する強皮症患者の肺機能の維持に有効である可能性が示された。

F. 文 献

1. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, et al: Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphorinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2004; 15: 2707-19.
2. Morelli S, Ferri C, Di Francesco L, et al: Plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis influence of pulmonary or systemic arterial hypertension. *Ann Rheum Dis*. 1995; 54: 730-4.
3. King TE Jr, Behr J, Brown KK, et al: BUILD-1 : a randomized placebo-controlled trial of bosentan

in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177: 75-81.

4. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1980; 23: 581-90.
5. Jonathan GG, David AL, Dlane CS, et al: High-resolution CT scan findings in patients with symptomatic scleroderma-related interstitial lung disease. *Chest*. 2008; 134: 358-367
6. Korn JH, Mayes M, Cerinic MM, et al: Digital ulcers in systemic sclerosis. Prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum*. 2004; 50: 3985-93.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
古屋善章、岡崎有佳、桑名正隆：強皮症に伴う末期肺病変に対するボセンタンの効果. 第52回 日本リウマチ学会総会（札幌）. 2008. 4.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 患者背景

	ボセンタン群 (n=5)	対照群 (n=17)	p
病型 (diffuse : limited)	4 : 1	15 : 2	1.00
女性の割合 (%)	40	77	0.27
年齢* (歳) at baseline	49 ± 15	53 ± 10	0.51
罹病期間* (年) at baseline	10 ± 9	7 ± 4	0.36
抗 topoisomerase I 抗体	4	14	1.00
抗 Th/To 抗体	1	0	0.23
抗 UIRNP 抗体	0	2	1.00
%VC* at baseline	41 ± 12	51 ± 6	0.02
肺高血圧症** の合併 (%)	80	29	0.12

mean ± S.D. ** 推定収縮期肺動脈圧 ≥ 40 mmHg

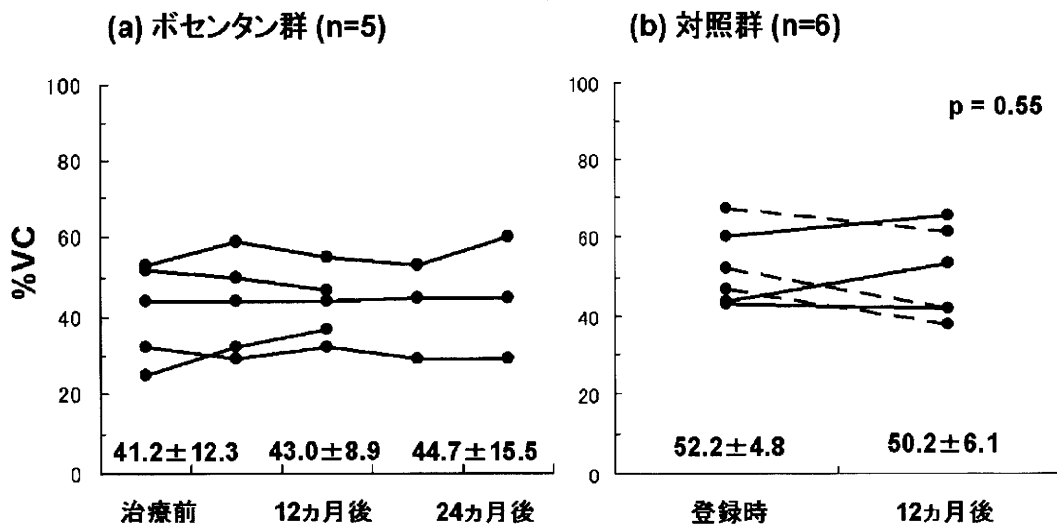


図1: %VCの推移 (a) ボセンタン群 (n=5) (b) 対照群 (n=6)。図の中の数は、それぞれの%VCを平均 ± 標準偏差で示したもの。1年間に%VCが5%を超えて低下する肺機能低下例を点線で記した。

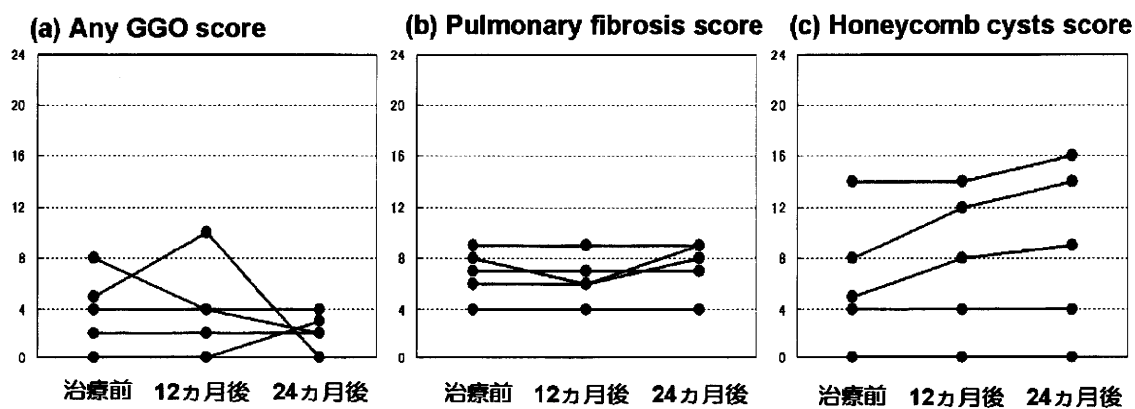


図2：HRCTの推移。ボセンタン開始後12ヵ月ごとに施行したHRCTの所見を、GGO・Pulmonary fibrosis・Honeycomb cystsにつき肺野ごとにスコア化し、各症例のスコアの合計を算出した。

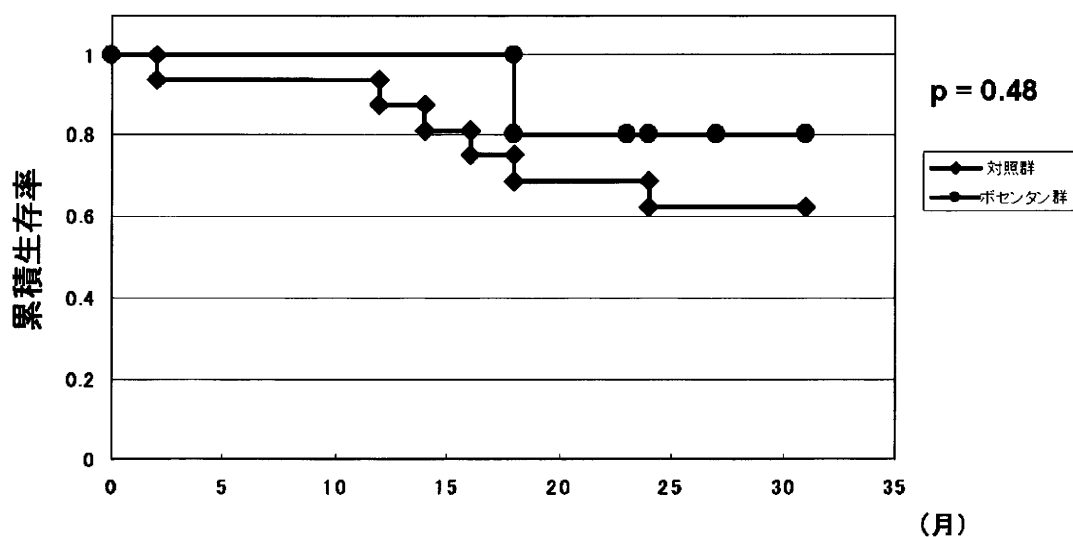


図3：ボセンタン群と対照群の累積生存率。31ヶ月の時点で対照群と比べて有意差はなかった ($p=0.48$)。

強皮症末梢血単球のフェノタイプ解析

研究分担者	桑名正隆	慶應義塾大学医学部内科	准教授
協力者	増田絢子	慶應義塾大学医学部内科	大学院生
協力者	安岡秀剛	慶應義塾大学医学部内科	助教
協力者	山口由衣	横浜市立大学大学院環境免疫皮膚科学	助教
協力者	岡崎有佳	慶應義塾大学医学部内科	大学院生
協力者	佐藤隆司	慶應義塾大学医学部内科特別研究	助教

研究要旨

強皮症は過剰な線維化を特徴とする疾患であるが、その機序にはいまだ不明な点が多い。近年、様々な線維化病態への末梢血単球の関与が示されている。そこで、本研究では単球の強皮症病態への関与を追究することを目的とした。末梢血単球における遺伝子発現プロファイルを用いて網羅的に解析した結果、強皮症で高発現する遺伝子として MCP-1 および Versican が抽出された。これら遺伝子の発現レベルを定量的 PCR 法を用いて強皮症および健常人で比較すると、強皮症で有意に高いことが確認された。免疫染色による解析では単球細胞質で Versican と MCP-1 は共在していた。末梢血単球を用いた In vitro の実験系で Versican が MCP-1 と結合することで単球の遊走を促進することが示された。したがって、強皮症では末梢血単球で Versican と MCP-1 の発現が亢進し、病変局所での MCP-1 の濃度勾配が形成され、末梢血単球のさらなる遊走と MCP-1 を介した線維化プロセスが促進される可能性が考えられた。

A. 研究目的

強皮症は皮膚および内臓諸臓器における過剰な線維化を特徴とする疾患である。組織学的特徴として、発症早期には血管周囲を主体とした単球、リンパ球の浸潤が認められ、進行期には細胞外マトリックスの沈着による過剰な線維化が認められる¹⁾。しかし、その原因や機序にはいまだ不明な点が多い。

近年、線維化の病因として、炎症性細胞由来の細胞成長因子・サイトカイン・ケモカインが線維芽細胞を刺激し、線維化を促進する可能性が指摘されている。線維化を誘導することが知られる液性因子として TGF- β 、PDGF、IL-1、IL-6、MCP-1 などが挙

げられるが、末梢血単球はこれら線維化促進因子を産生する細胞の一つである。強皮症患者の皮膚に浸潤した単核細胞（特に活性化マクロファージ）は TGF- β 、PDGF を発現し、単球を遊走するケモカインの MCP-1 は肺や皮膚などの強皮症の病変局所で増加し²⁾、その受容体である CCR2 をノックアウトしたマウスではプレオマイシン投与に伴う線維化が抑制される³⁾。また、末梢血単球が MCP-1/CCR2 の刺激により I 型コラーゲンを産生するという報告があり、末梢血単球が細胞外マトリックスを産生して直接線維化を引き起こす可能性も指摘されている⁴⁾。

しかし、強皮症病態における末梢血単球の寄与は

いまだ明らかでない。そこで、本研究では末梢血単球の強皮症病態への関与を追究した。

B. 研究方法

1. 対象

文書によるインフォームドコンセントにより本研究内容に承諾を得た、アメリカリウマチ学会 (ACR) の分類基準⁵⁾ を満たす強皮症患者 36 例 (男女比 4 : 32, 55.3 ± 15.9 歳) を対象とし、健常人 32 例をコントロールとした。強皮症患者 22 例 (61.6%) は diffuse 型、全例でレイノー現象を認め、22 例 (61.6%) で間質性肺炎を認めた。

2. 梢血単球の網羅的な遺伝子発現解析

強皮症患者 10 例 (男女比 2 : 8, 46.4 ± 13.2 歳、全例 diffuse 型) を対象とし、コントロールとして健常人 10 例を用いた。末梢血 20 mL から分離した末梢血単核球 (PBMC) より、MACS ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて CD14 陽性単球を分取した。CD14 陽性単球より全 RNA を抽出し、同量の全 RNA を総量が 3-5 μg になるよう各 5 例分ずつをまとめ、それぞれ Group1 (NHC-1, SSc-1) および Group2 (NHC-2, SSc-2) と 2 群作成した。それぞれ 3 種類の Oligo GEArray[®] System (SuperArray) とハイブリダイズさせ、合計 330 遺伝子について、強皮症と健常人で発現が異なる候補遺伝子をスクリーニングした (Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecule, Human Endothelial Cell Biology, Human Chemokine and Receptors)。各種遺伝子の発現量は GAPDH 発現量で補正し、候補遺伝子の選択基準は強皮症患者と健常人の間で発現比が 1.5 倍以上異なる遺伝子とした。

網羅的解析によるスクリーニングで抽出された候補遺伝子は、さらに定量的 PCR 法による確認を行っ

た。CD14 陽性単球より全 RNA を抽出し、逆転写酵素により作成した cDNA および TaqMan[®] Gene Expressions Assays の TaqMan プローブ (Versican ; Hs00171642, MCP-1 ; Hs00234140, Applied Biosystems) を用いた。各遺伝子の発現量は GAPDH 発現量で補正して比較した。

3. 末梢血単球中の Versican・MCP-1 の局在解析

CD14 陽性単球を RPMI1640 で懸濁し、BD Bio-Coat[™] Poly-D-Lysine Cellware (BD Biosciences) の各ウェルに 10^5 細胞ずつ分注した。37°C、5% CO₂ の条件下で 2 時間培養した後、冷アセトンで固定し、5% BSA/PBS で 30 分間ブロッキングした。それぞれマウス抗ヒトゴルジ体モノクローナル抗体 (Molecular Probes) またはウサギ抗ヒト MCP-1 ポリクローナル抗体 (Abcam)、およびヤギ抗ヒト Versican モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) と反応させ、さらに Alexa Fluor[®] 488 標識抗マウス抗体または Alexa Fluor[®] 488 標識抗ウサギ抗体、および Alexa Fluor[®] 568 標識抗ヤギ抗体 (Molecular Probes) と反応させた。また、核の対比染色には To-Pro-3 (Molecular Probes) を使用した。共焦点レーザー顕微鏡で観察し、末梢血単球における MCP-1 および Versican の局在を解析した。

4. 末梢血単球の機能的解析

プレートにコートした CS 鎖 (CS-B、生化学工業) に結合した MCP-1 が CD14 陽性単球の遊走を促進するかを Migration Assay で検討した。

CS 鎖を Carbonate buffer (Na₂CO₃ 15 mM、NaHCO₃ 10 mM) で希釈し、Costar Transwell[®] (Coring) の下層に 4°C で 24 時間以上かけてコートした。結合しなかった CS 鎖を洗浄した後、PBS で 50 ng/mL に希釈したりコンビナント ヒト MCP-1 (R&D Systems) を添加し、37°C で 2 時間インキュベートさせ

た。CS鎖に結合しなかったMCP-1はPBSで5回洗浄した後、1%BSA添加RPMI 1640を600 μ Lずつ分注し、上層に健常人由来のCD14陽性単球を 3×10^5 細胞ずつ分注して2時間培養した。遊走率は下層へ移動した細胞数を計算版によりカウントし、分注した総細胞数における割合(%)として算出した。さらにCS鎖およびMCP-1を添加していないコントロールでの遊走率を100%として換算し、それぞれ比較した。また、一部の実験でCS鎖にMCP-1を結合させた後に抗ヒトMCP-1抗体(R&D Systems)もしくはネガティブコントロールマウスIgG1(Dako)を加えて室温30分間で反応させた。さらにコートするCS鎖の量が異なる3種類のプレート(10 μ g/mL、50 μ g/mL、250 μ g/mL)を作成し、それぞれのMCP-1による遊走率を比較した。

3. 統計学的解析

2群間の比較はMann-Whitney U-testを用いて検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

1. 末梢血単球の網羅的な遺伝子発現解析

健常人および強皮症患者単球由来のCD14陽性末梢血単球よりmRNAを抽出し、健常人と強皮症で発現レベルに差のある候補遺伝子をDNAアレイによるスクリーニングにより選択した。その結果、8種類の遺伝子(Type I collagen、Versican、Selectin-L、MCP-1、IL-8、MMP2、CCR1、CCRL2)が強皮症単球で高発現する候補遺伝子として抽出された。これら8種類の候補遺伝子について、さらに強皮症34例と健常人32例で定量的PCR法を用いてmRNA発現レベルを比較した結果、強皮症単球で高発現する遺伝子としてMCP-1($p=0.04$)およびVersican($p < 0.01$)が同定された(図1)。また、

Versicanに含まれる4種類のsplice variantごとのmRNA発現レベル解析の結果、Versican-0($p=0.02$)、Versican-1($p=0.03$)が強皮症末梢血単球で高発現していた。

2. 末梢血単球中のVersican・MCP-1の局在解析

末梢血単球中におけるMCP-1およびVersicanの局在を明らかにするために免疫染色を行った。その結果、MCP-1およびVersicanは局在が一致し、ゴルジ体に偏在していた。この結果は強皮症と健常人で差はなかった。

3. 末梢血単球を用いた機能的解析

CS鎖に結合したMCP-1が単球遊走に与える影響を追及するため、健常人単球を用いたMigration assayで検討した。その結果、MCP-1のみを添加したプレートではみられなかった遊走活性が、CS鎖をコートすることで確認された(図2)。さらに、CS鎖に結合したMCP-1による遊走活性は、MCP-1に対する中和抗体で抑制された(図3-a)。また、CS鎖の濃度が異なる条件での遊走活性を比較したところ、濃度依存的に増強された(図3-b)。

D. 考案

今回の解析より、強皮症患者の末梢血単球に高発現する遺伝子としてMCP-1およびVersicanが同定された。したがって強皮症末梢血単球は健常人と異なるフェノタイプを有していた。

Versicanはコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一種で、コアタンパクとCS鎖から構成される。コアタンパクの長さおよびCS鎖の本数により、4種類のsplice variantが存在する⁶⁾。Versicanには、ヒアルロン酸、I型コラーゲンなどと結合する細胞外マトリックスとしての機能およびCS鎖を介したケモカイン貯蔵体としての機能という2つの作用が

考えられている^{6,7)}。本研究の解析では強皮症で Versican-0、Versican-1 が高発現していたが、これらはいずれもコアタンパクが長く、多くの CS 鎖をもつことから、ケモカインやサイトカインと結合する能力が高いと考えられる。実際、CS 鎖を用いた In vitro での機能的解析により、Versican は MCP-1 と結合して単球遊走を促進することが示された。MCP-1 と Versican は単球のゴルジ体内で共存していた。したがって、末梢血単球が Versican に結合した形で MCP-1 を分泌することにより、病変局所での MCP-1 の蓄積と末梢血単球の遊走をさらに促進し、単球遊走の増幅ループが形成される可能性がある。MCP-1 が線維化病態を誘起する機序としてこれまで、①線維芽細胞を直接的に活性化させ、細胞外マトリックスの産生を促進する、② TGF- β や PDGF などのサイトカインを介し間接的に線維芽細胞を活性化させる、③ IL-4 産生 T 細胞を誘導し、Th2 病態を形成する、という 3 つのプロセスが報告されている^{8,9,10)}。さらに、局所への浸潤した単球そのものが線維化に関与する可能性も示されている。その機序として、末梢血単球自身が細胞外マトリックスを産生し直接線維化を誘導するプロセスと、細胞成長因子・サイトカイン・ケモカインなどの MCP-1 を含めた線維化促進因子を産生することで線維芽細胞を刺激し、間接的に線維化を引き起こす可能性が考えられている。

E. 結論

強皮症末梢血単球は健常人と異なるフェノタイプを有し、線維化病態に関与する可能性が示唆された。

F. 文献

1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a proto-

typic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007; 117: 557-67.

2. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 1999; 117 (1): 159-65.
3. Moore BB, Paine R 3rd, Christensen PJ, et al. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol.* 2001; 167 (8): 4368-77.
4. Sakai N, Wada T, Furuichi K, et al. MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *J Leukoc Biol.* 2006; 79: 555-63.
5. Subcommittee for scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1980; 23: 581.
6. Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004; 94(9): 1158-67.
7. Hirose J, Kawashima H, Yoshie O, et al. Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses. *J Biol Chem.* 2001; 276(7): 5228-34.
8. Yamamoto T, Nishioka K. Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2003; 121(3): 510-6.

9. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem*. 1996; 271(30): 17779-84.
10. Distler JH, Jünger A, Caretto D, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(1): 214-25.
2. 増田絢子、山口由衣、岡崎有佳、佐藤隆司、桑名正隆: 強皮症末梢血単球のフェノタイプ解析. 第52回日本リウマチ学会総会 (札幌). 2008. 4.
3. Kuwana M: Circulating endothelial cell progenitors in scleroderma. The 10th International Workshop for Scleroderma Research (Cambridge). 2008. 8.
4. Kuwana M: Insufficient repair as a mechanism for scleroderma vasculopathy. 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (Yokohama). 2008. 9.
5. Hoshino K, Satoh T, Kuwana M: Hepatocyte growth factor promoter gene polymorphism controls severity of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis. The 72th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Francisco). 2008. 10.
6. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Ota Y, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara M: Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis. The 72th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Francisco). 2008. 10.
7. 増田絢子、安岡秀剛、山口由衣、佐藤隆司、桑名正隆: Fibrogenic gene expression profiles in circulating monocytes from patients with systemic sclerosis (SSc). 第38回日本免疫学会総会 (京都). 2008. 12.

G. 研究発表

論文発表

1. Kawai M, Masuda A, and Kuwana M. A CD40-CD154 interaction in tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(11): 3562-3573.
2. Hoshi M, Yasuoka H, and Kuwana M. Estrogen receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol*. 2008; 26(5): 914-917.
3. 桑名正隆: 強皮症患者のケアにおける現状と問題点-診断基準、病型分類、活動性の評価、臓器障害の評価について-. *リウマチ科* 39(4): 281-288, 2008.
4. 桑名正隆: 膠原病の難治性病態-新しい考え方と新規治療法への応用; 強皮症の血管病変における血管内皮前駆細胞の役割とスタチン. *リウマチ科* 39(5): 393-399, 2008.
5. 桑名正隆: 強皮症の臨床における抗RNAポリメラーゼ抗体の有用性. *リウマチ科* 40(3): 239-245, 2008.

学会発表

1. 星野香菜、佐藤隆司、桑名正隆: 強皮症におけるHGF及びその受容体の一塩基多型解析. 第52回日本リウマチ学会総会 (札幌). 2008. 4.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

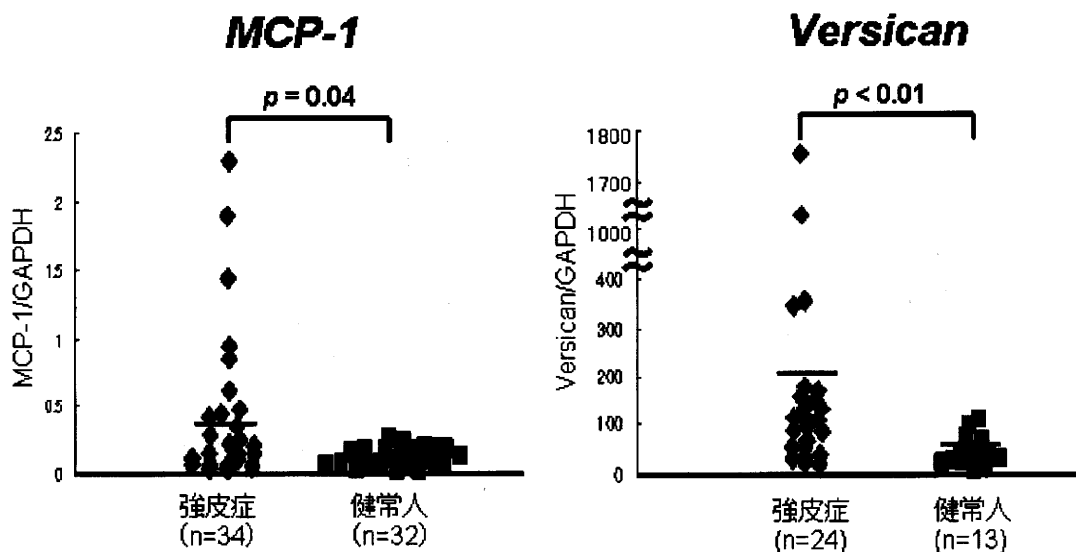


図1：定量的PCR法によるスクリーニング
候補遺伝子の mRNA 発現レベルを定量的PCR法で解析した。結果、強皮症で MCP-1 (0.39 ± 0.54 vs 0.11 ± 0.07) および Versican (219.9 ± 376.5 vs 46.2 ± 31.1) が高発現していた。

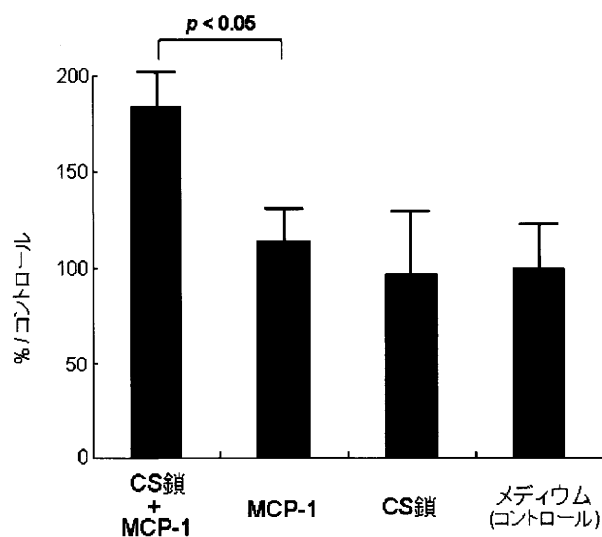


図2：CS鎖に結合したMCP-1による遊走活性の検討
CS鎖に結合したMCP-1が単球遊走に与える影響を追究するため、健常人単球を用いた Migration assay で検討した。結果、CS鎖はMCP-1の拡散を防止し、CS鎖に結合したMCP-1は単球遊走に参与した。

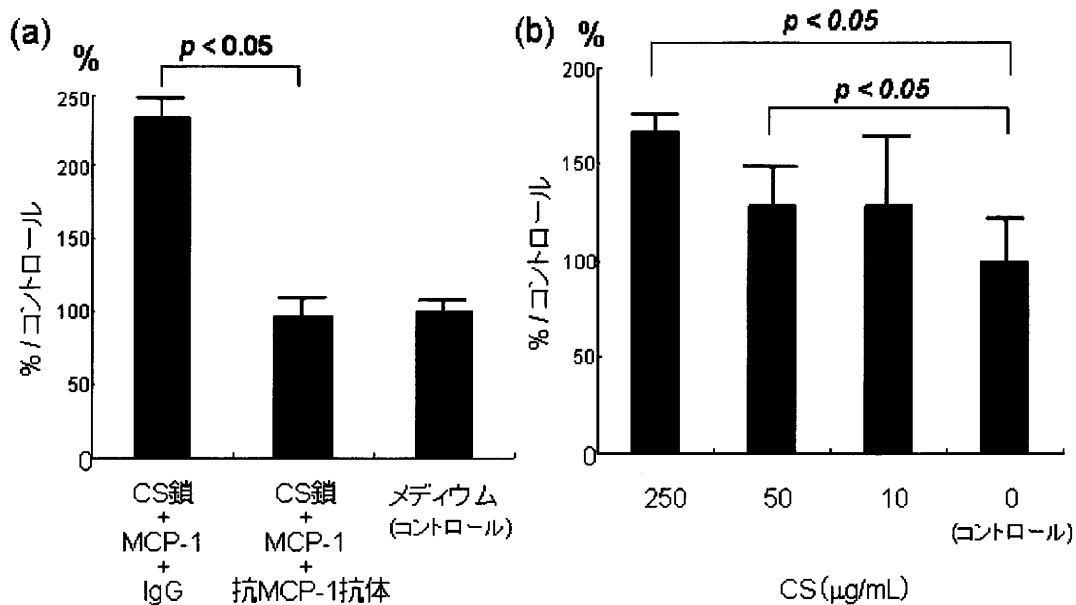


図3：中和抗体を用いた確認試験およびCS鎖濃度と遊走活性の検討

a) MCP-1 に対する中和抗体を用い、CS鎖に結合したMCP-1の単球遊走活性が抑制されるか、検討した。異なる4人の健常人単球を用いた。その結果、MCP-1を中和することで、遊走活性は抑制された (234.1 ± 18.3 vs 97.4 ± 13.5)。b) コートしたCS鎖の量がMCP-1の単球遊走活性に影響を与えるか、検討した。異なる3人の健常人単球を用いた。その結果、MCP-1の遊走活性は、コートするCS鎖の量に依存して増強された。

全身性強皮症に見出された新規抗核抗体：抗 RuvBL1/RuvBL2 抗体

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
協力者	加治賢三	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 助教
協力者	佐藤隆司	慶應義塾大学医学部内科特別研究 助教
協力者	星野香菜	慶應義塾大学医学部内科 大学院生
研究分担者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 准教授
協力者	濱口儒人	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 講師
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
研究分担者	小川文秀	長崎大学医学部・歯学部附属病院皮膚科・アレルギー科 講師
研究代表者	佐藤伸一	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授
協力者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

研究要旨

全身性強皮症 300 例中 11 例 (3.7%) に 50kDa 付近の 2 つのバンドを免疫沈降する新規自己抗体を見出した。対応抗原の精製と質量分析により DNA 修復や転写に関わる核蛋白 RuvBL1/RuvBL2 を同定。本抗体は全身性強皮症に特異的で、陽性 7 例が diffuse 型、8 例に間質性肺炎、5 例に心筋障害、7 例に血清 CK 上昇を認めた。

A. 研究目的

膠原病診断において抗核抗体の測定は有用なツールであることは既知の事実である。全身性強皮症において約 95% 以上に抗核抗体が陽性であるが、対応抗原の特定、つまり特異抗体については 70% にとどまっている^{1,2)}。特異抗体別により臨床症状、合併症などを推測できるだけでなく、予後的因子の推測や治療戦略を考える上でも非常に有用であり、特異抗体の検出は急務である。

B. 研究方法

我々は全身性強皮症、以下 SSc、300 例を対象として新規自己抗体の検出をすべく K562 培養細胞を

基質とした免疫沈降法を施行しました。疾患対象として全身性エリテマトーデス、以下 SLE、60 例、皮膚筋炎、多発性筋炎、以下 DM/PM、100 例、特発性間質性肺炎、以下 IPF、80 例、正常人 50 例を用いました。血清および臨書情報に関しては患者より文書による同意を得た。

C. 研究結果

1) 免疫沈降法での検出

全身性強皮症において既知の自己抗体が検出されなかった症例を並べて免疫沈降したところ 3 と 9 にあるように 50kDa 付近に濃く染まる例が 2 例認められた。詳細に検討したところ、全部で 11 例に同様

なバンドが検出されました。この抗体はすべて2つのバンドを有しており、片方のみ陽性例は認められませんでした(図1)。同抗体陽性例ではすべて抗核抗体は陽性で、speckled patternを呈した。免疫沈降法で同一のバンドに沈降し、抗核抗体も陽性であり、染色型も同一であることから、これらは同一の自己抗体であると考え、その抗原を検出するべく抗原特定実験を行った。

2) 抗原特定実験

具体的には免疫沈降法と同じく患者血清1000 ulとビーズ1000 mgを混和し、DMPでIgGとビーズを架橋させ、大量のK562培養細胞と反応させました。K562培養細胞とビーズ結合IgGを反応させた後、洗浄し、protein assayを行い十分精製した後、elution bufferで抗原抽出を行い、フィルターで抗原蛋白を濃縮させた(図2)。最終的に100ul抽出でき、これを抗原としてSDS-PAGEで電気泳動し、クマシーブルー染色および銀染色を行なった。クマシーブルー染色、銀染色でも50kDa付近に2つのバンドが影出されたため、上下のバンドをそれぞれ切り出し、液体クロマトグラフィー、質量分析法を行いました(図3)。

3) LC-MS解析

得られた蛋白をトリプシン消化し、質量分析計により得られたペプチドの質量および質量分析内でアルゴンガスと衝突させることにより得られたフラグメントイオンのスペクトルをデータベース検索することにより蛋白を同定致した。結果、上のバンドは検出されなかったが、下のバンドでRuvBL1が検出されました。得られたアミノ酸配列の総数のうち、8%がRuvBL1をコードしていた。RuvBL1は49 kDaの蛋白でATPase associated activities with various cellular activities: AAA+と言われるスー

パーファミリーに属する蛋白であり分子シャペロンの一つである。RuvBについては核内に局在し、DNAの修復に関連すると考えられている。RuvBL1は6量体で存在する蛋白でRuvBL2と複合体を作り12量体になることが分かっている^{3,4)}。またRuvBL1とRuvBL2はWalker AおよびB領域、Senser IおよびII、アルギニン鎖など共通する領域を持ち2つの蛋白の相同性は43%⁵⁾ある。分子量はRuvBL1が49 kDaでRuvBL2が48 kDaであり、遺伝子座としてRuvBL1は3番染色体長腕でRuvBL2は19番染色体長腕に存在する。免疫沈降法において近接するバンドが2本あることやRuvBL1とRuvBL2の分子量、蛋白の相同性やその構造など考慮するとRuvBL2の自己抗体も存在するのではないかと考えウェスタンブロットティング法で確認実験を施行した。

4) Western-blotting法

RuvBL1およびRuvBL2のリコンビナント蛋白を用い、ウェスタンブロットティング法を施行すると、抗体陽性例ではRuvBL1、RuvBL2のリコンビナント蛋白で反応し、正常人では陰性でありました。したがって同抗体は抗RuvBL1/L2抗体と判明した(図4)。

5) 抗RuvBL1/L2抗体陽性例の臨床的検討(表1)

抗RuvBL1/L2抗体陽性例11例の臨床的特徴であるが、11例中7例、64%がdiffuse型で、間質性肺炎の合併は8例の73%であった。心筋障害については、5例の45%に認められ、CKの上昇は7例の64%に陽性あった。

また抗RuvBL1/L2抗体の疾患別分布を見ると、全身性強皮症のみに見出され、全体の3.7%に同抗体が陽性でした。その他、SLE、DM/PM、IPF、正常人では抗体は陰性であった。