

## D. 考案

抗核抗体を検出は自己免疫疾患において代表的な疾患標識マーカーであり、特に特異抗体についてはより鋭敏に疾患の識別、診断、治療、予後などを推定できるため、必要不可欠な検査である。

全身性強皮症においては95%以上に抗核抗体が検出され、その自己抗体の検出がされているが、代表的なマーカーである、抗 Topo-I 抗体、抗セントロメア抗体、抗 RNA ポリメラーゼ抗体<sup>6)</sup>、抗 U3RNP 抗体<sup>7)</sup>、抗 Th/To 抗体<sup>8)</sup> などを集計しても70%ほどに留まっている。

今回検出した抗 RuvBL1/L2 抗体は核内に存在する抗原であり、抗核抗体の一つである。抗体陽性例の臨床的解析をすると diffuse 型に多く、間質性肺炎を高率に合併し、CK の上昇を伴い、高率に心筋障害を伴うという新しいサブセットであることは間違えない。疾患別分布を見てみると全身性強皮症のみに見出され、その他、皮膚筋炎/多発性筋炎、全身性エリテマトーデス、特発性間質性肺炎、正常人では検出されず、全身性強皮症の新しい疾患標識マーカーである可能性がある。

1998年 Makino ら<sup>9)</sup> も抗 RuvBL1 抗体について報告しており、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎/多発性筋炎、関節リウマチ、自己免疫性肝炎に検出している。全身性強皮症においての検討はないが、もしかすると自己免疫疾患に幅広く検出される自己抗体の可能性もある。より多数の症例数を検討する必要がある。

## E. 結論

全身性強皮症において新規抗核抗体である抗 RuvBL1/L2 抗体について報告いたしました。抗体陽性例は全身性強皮症のみに見出され、SLE、DM/PM、

IPF、正常人では陰性であった。抗体陽性例 11 例を検討すると 7 例が diffuse 型全身性強皮症で 8 例に間質性肺炎の合併があり、5 例に心筋障害の合併が認められた。また 7 例の 64% に CK の上昇が認められた。抗 RuvBL1/L2 抗体は全身性強皮症に見出された新規自己抗体であり、高率に間質性肺炎を合併し、心筋障害および CK 上昇を伴う diffuse 型全身性強皮症と相関する可能性があった。

## F. 文献

1. Steen VD.: Semin Arthritis Rheum. 2005 Aug; 35 (1): 35-42.
2. Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Komura K, Kaji K, Kondo M, Nishijima C, Hayakawa I, Ogawa F, Kuwana M, Takehara K, Sato S.: Br J Dermatol. 2008 Mar; 158 (3): 487-95. Epub 2008 Jan 17.
3. RVB1/RVB2: running rings around molecular biology.: Jha S, Dutta A.: Mol Cell. 2009 Jun 12; 34 (5): 521-33. Review.
4. Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex.: Puri T, Wendler P, Sigala B, Saibil H, Tsaneva IR.: J Mol Biol. 2007 Feb 9; 366(1): 179-92. Epub 2006 Nov 11
5. Human TIP49b/RUVBL2 gene: genomic structure, expression pattern, physical link to the human CGB/LHB gene cluster on chromosome 19q13.3.: Parfait B, Giovangrandi Y, Asheuer M, Laurendeau I, Olivi M, Vodovar N, Vidaud D, Vidaud M, Bièche I.: Ann Genet. 2000 Apr-Jun; 43 (2): 69-74.
6. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Hom-

- ma M.: Arthritis Rheum. 1994 Jan; 37 (1): 75-83.
7. Isolated pulmonary hypertension in systemic sclerosis with diffuse cutaneous involvement: association with serum anti-U3RNP antibody.: Sacks DG, Okano Y, Steen VD, Curtiss E, Shapiro LS, Medsger TA Jr.: J Rheumatol. 1996 Apr; 23 (4): 639-42
8. Kuwana M, Kimura K, Hirakata M, Kawakami Y, Ikeda Y. Ann Rheum Dis. 2002 Sep; 61 (9): 842-6.
9. TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human.: Makino Y, Mimori T, Koike C, Kanemaki M,

Kurokawa Y, Inoue S, Kishimoto T, Tamura T.: Biochem Biophys Res Commun. 1998 Apr 28; 245 (3): 819-23

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  1. 第4回日本・豪州合同皮膚科学会
  2. 第60回日本皮膚科学会中部支部学術大会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

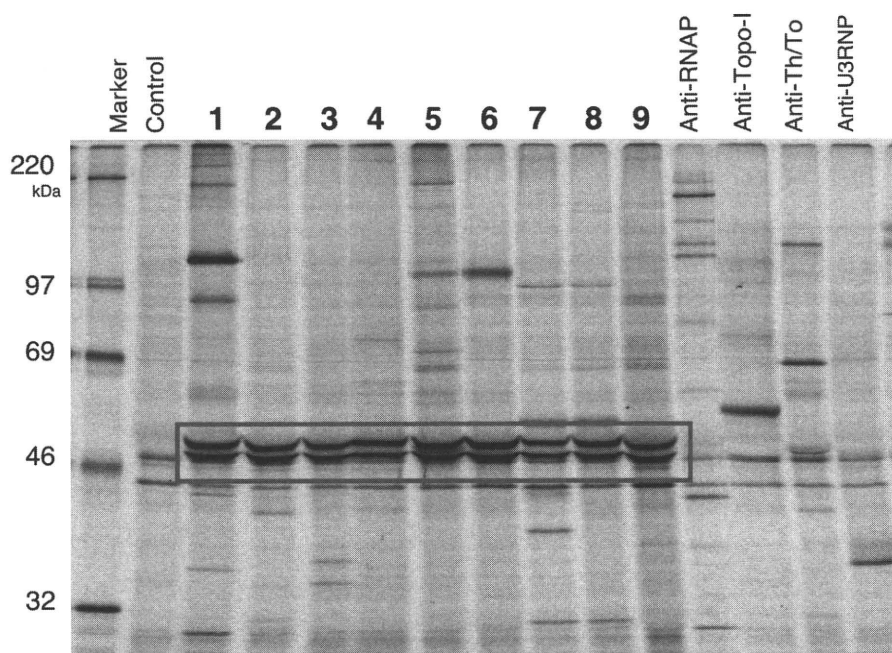


図1 : protein-IPP

K562 培養細胞を 35S で標識させ、抗原として用いた。SDS-PAGE で電気泳動を行い、オートラジオグラフィーで解析。1 から 9 にかけて 50 kDa に沈降する 2 つのバンドを見出した。

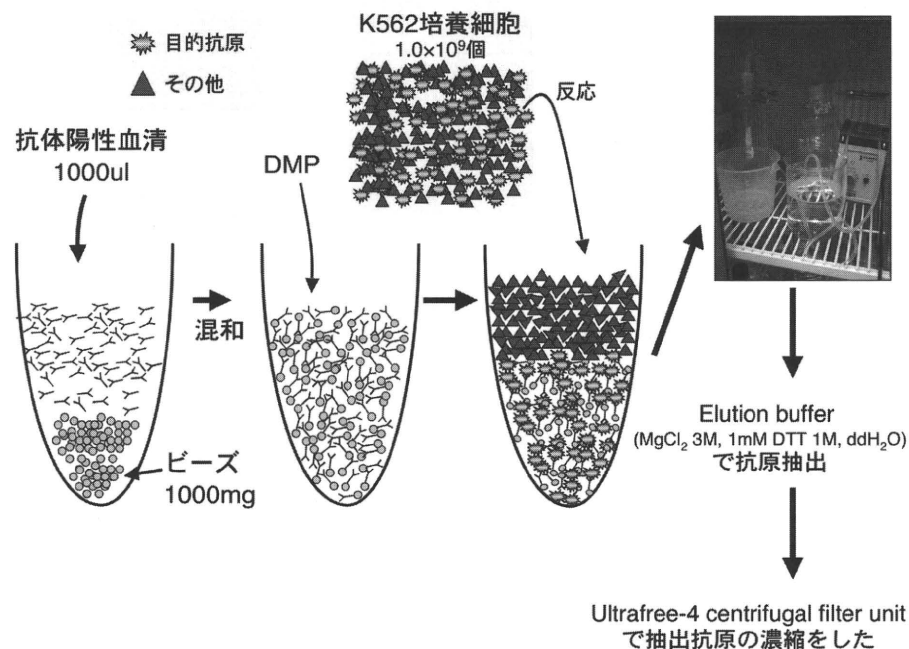


図 2：抗原特定実験の概略

患者血清 1000ul と protein A sepharose ビーズを反応させ、DMP で架橋させた後、 $1.0 \times 10^9$  個の K562 培養細胞と反応させた。洗浄し、elution buffer で精製し、フィルターで抽出抗原を濃縮させた。

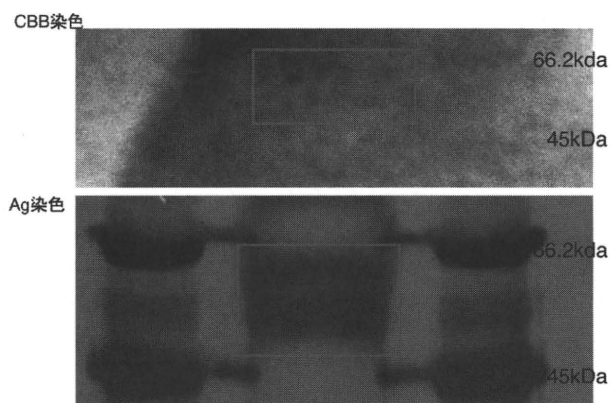
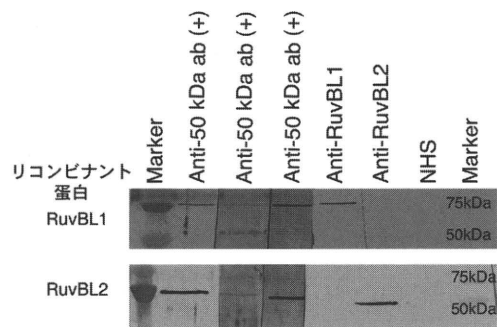


図 3：クマシーブルー (CBB) 染色および銀 (Ag) 染色

クマシーブルー染色および銀染色において 50 kDa 付近に 2 本のバンドを見出した。



NHS: normal human control

図 4：Western blotting 法

RuvBL1 および RuvBL2 のリコンビナント蛋白を用い、電気泳動を行った。一次抗体には患者血清および anti-RuvBL1-IgG2a、anti-RuvBL2-IgG1、正常人血清を用いた。2次抗体は anti-human AP conjugated IgG Fc を用い AP 染色を行った。

表 1：抗 RuvBL1/L2 抗体陽性全身性強皮症の臨床的特徴

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
年齢	81	55	60	63	79	57	34	62	47	65	59
性別	女	男	男	女	女	男	女	女	女	男	男
臨床診断	lcSSc	lcSSc	dcSSc	dcSSc	dcSSc	dcSSc	dcSSc	dcSSc	lcSSc	dcSSc	lcSSc
Total skin score	13	8	11	27	33	23	9	22	4	ND	6
レイノー現象	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pitting scar	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
皮膚潰瘍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
間質性肺炎	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
肺高血圧症	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
心筋障害	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
抗核抗体	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
倍率（染色型）	×320 (DC)	×640 (Sp)	×160 (Sp)	×640 (Sp)	×640 (Sp)	×320 (Sp)	×1280 (Sp)	×640 (Sp)	×1280 (H,Sp)	×640 (Sp)	×320 (Sp,Cyto)
他の自己抗体	centromere	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CK 上昇	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-

## 循環血中血管内皮前駆細胞（EPC）定量法の標準化

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 岡崎有佳 慶應義塾大学医学部大学院 大学院生  
協力者 佐藤隆司 慶應義塾大学医学部特別研究 助教  
協力者 安岡秀剛 慶應義塾大学医学部内科 助教

### 研究要旨

強皮症（SSc）患者にみられる特徴的な末梢循環障害の病態に血管内皮前駆細胞（EPC）の異常による脈管形成不全の関与が示されている。しかし、SScにおける循環血中 EPC の増減に関してこれまで一定した結果が得られていない。その原因のひとつとして EPC 測定法の違いが考えられ、その点を解消するためにヨーロッパ強皮症研究グループ（EUSTAR）が EPC 測定の推奨を提唱した。そこで、本推奨に合致する 2 つの測定法を用いて SSc、健常人検体を同時に解析し、測定法の違いによる影響を検討した。その結果、異なる方法で EPC 分画を濃縮しても、フローサイトメトリーにより得られた EPC 数は相関することが示された。ただし、EPC 数をフローサイトメトリーのイベントではなく、末梢血の容積あたりで表すことが必要であることが示された。

### A. 研究目的

強皮症（systemic sclerosis; SSc）は、皮膚および内臓諸臓器の線維化に加え、末梢循環障害を特徴とする<sup>1)</sup>。組織学的には爪床毛細血管の無血管領域や四肢の末梢動脈の側副血行路形成不全がみられ、虚血に対する血管の形成障害がみられる。成人における血管の修復・形成には、血管新生（angiogenesis）と脈管形成（vasculogenesis）の 2 つの過程が存在する。血管新生では、既存の成熟血管内皮細胞が増殖、遊走することで近傍の血管形成や損傷血管の修復を誘導する。一方、脈管形成では、骨髄から動員された血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell; EPC）が末梢血中に動員され、損傷血管などの局所で成熟血管内皮細胞へと分化することで血管形

成や損傷血管の修復を誘導する<sup>2)</sup>。我々は、SSc 患者において EPC の主要なサブセットである CD34+ CD133+ VEGFR2+ 細胞が末梢血中で減少し、その分化能も障害されていることを報告した<sup>3)</sup>。その後、他の研究グループから SSc 患者における EPC 数に関する報告がされているが、その増減に関しては一定の結果が得られていないのが現状である。その理由の一つとして、各々の報告で EPC 測定法が異なることが挙げられる。その点を解消するため、ヨーロッパ強皮症研究グループ（EUSTAR）により EPC 測定に関する推奨が提唱された<sup>4)</sup>。フローサイトメトリーによる測定では、① CD34、CD133、VEGFR2 の 3 つのマーカーに加えて、7-AAD など細胞生存マーカーを組み合わせることで、②できる限り多くのイ

イベントを取り込むこと、③非特異的反応の原因となる Fc 受容体をブロックすること、④フローサイトメトリーに熟練した研究者が解析すること、の4点が挙げられている。また、末梢血中の EPC 数がきわめて少ないことから、末梢血を直接解析するより、フローサイトメトリーで解析する前に何らかの手法を用いて EPC を濃縮することが勧められている。従来我々の方法では、①で明記されている細胞生存マーカーを用いていなかったが、他の項目は満たしていた<sup>3)</sup>。また、EPC 濃縮法として、我々は磁気ビーズを用いた CD34+ 細胞の分離を用いているが<sup>3)</sup>、Avouac らはロゼット法を用いて Lin- 細胞を分離している<sup>5)</sup>。そこで、これら EPC 測定法の違いによる影響を検討するため、SSc および健常人の同一サンプルを用いた side-by-side の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 対象

アメリカリウマチ学会の分類基準を満たす SSc 患者 10 例 (diffuse 型、limited 型各 5 例) を対象とした。いずれの症例も喫煙、高血圧、脂質異常症など虚血性心疾患のリスク因子を有していなかった。また、対照として健常人 10 例を用いた。

### 2. EPC の定量

EPC の定量は以下の 2 つの方法で行った。

#### 1) 磁気細胞分離システム (MACS) 法<sup>3)</sup>

末梢血から末梢血単核球を比重遠心法で分離し、Fc 受容体 blocking reagent (Miltenyi Biotech) 処理後に磁気ビーズを用いた MACS システムを用いて CD34+ 細胞を濃縮した。FITC 標識抗 CD34 抗体 (AC136, Miltenyi Biotech)、PE 標識抗 CD133 抗体 (AC133/2, Miltenyi Biotech)、APC 標識抗 VEGFR2 抗体 (AC133/2, R&D systems) を用いて染色し

た後に FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いて CD34+CD133+VEGFR2+ 細胞を検出した。スキャッター解析でリンパ球領域にゲートをかけることで死細胞を除去し、Flow-count ビーズ (Beckman Coulter) を用いて末梢血 1 mL あたりの数として定量化した。また、EUSTAR による推奨を満たすため、7-AAD (Beckman Coulter) 染色による死細胞除去を加えた解析も行った。

#### 2) ロゼット法<sup>5)</sup>

各種細胞表面マーカーに対する抗体カクテル RosetteSep (StemCell Technologies) を末梢血と混和し、比重遠心法を用いて Lin- 細胞を分離した。Fc 受容体 blocking reagent で処理後に、上記と同様にフローサイトメトリーにより CD34+CD133+VEGFR2+7-AAD- 細胞を検出した。EPC 数は Lin- 細胞を取り込んだ  $10^6$  イベントあたりの絶対数として表した。また、同時に MACS 法と同様に Flow-count ビーズを用いて末梢血 1 mL あたりの数として定量化する解析も行った。なお、本法は EUSTAR による推奨に合致している。

### 3. Lin- 細胞分画中の細胞成分の検討

RosetteSep を用いて分離した Lin- 細胞分画を APC 標識抗 CD3 抗体 (UCHT-1)、PE 標識抗 CD14 抗体 (RMO2)、PE 標識抗 CD41 抗体 (P2)、FITC 標識抗 glycoporphin A 抗体 (11E4B7.6, Beckman Coulter)、FITC 標識抗 CD19 抗体 (SJ25-C1, Becton Dickinson) を用いて染色し、フローサイトメトリーにより表面マーカーの発現を調べた。死細胞は 7-AAD 染色により除外した。

### 4. 統計学的検討

2 群間の比較には Mann-Whitney U-test、相関解析には直線回帰分析を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は学内の倫理委員会で承認され、検体採取に当たっては全ての患者に対して研究内容を説明し、文書による同意を得た。

### C. 研究結果

SSc患者10例と健常人10例を対象に、MACS法、ロゼット法の2つの方法を用いて同時に末梢血中のEPC数を測定した。MACS法では7-AAD-細胞にゲートをかけることで、ロゼット法と共にEUSTARのより推奨された4項目全てを満たした。図1に細胞分離後のフローサイトメトリーでの解析結果の例を示す。いずれの方法でも、スキャッター分析と7-AAD染色により死細胞を除去し、CD34、CD133、VEGFR2全てが陽性となる細胞群をEPCとして検出することができた。

2つの方法で得られたEPC数の相関を検討すると(図2)、MACS法により得られた結果とロゼット法でLin-細胞 $10^6$ 個あたりの絶対数として得られた結果は全く相関しなかった( $r=0.08$ )。一方、ロゼット法の結果をFlow-countビーズを用いて1mLあたりの絶対数として表すと、MACS法による1mLあたりの絶対数とよく相関した( $r=0.65$ 、 $p=0.002$ )。実際に、ロゼット法での解析結果をLin-細胞 $10^6$ 個あたりの絶対数、1mLあたりの絶対数で表すと、両者に有意な相関は得られなかった( $r=0.41$ )。その原因を検討するため、ロゼット法を用いて分離したLin-細胞分画に含まれる末梢血細胞をフローサイトメトリーにより調べた。その結果、Lin-細胞分画に含まれる細胞の90%以上がCD41+血小板またはglycophorin A+赤血球で、2%未満のCD3+T細胞、CD14+単球、CD19+B細胞も含んでおり、これらマーカーがすべて陰性のLin-細胞はわずか

5%未満であった。

MACS法において7-AAD処理の有無で検討を行ったところ、7-AAD処理を加えるとEPC数は処理なしの場合に比べて60%程度に減少したが、両者は強く相関した(図2、 $r=0.96$ 、 $P < 0.001$ )。したがって、7-AAD処理により非特異的反応が抑制されたが、従来法<sup>3)</sup>との乖離はわずかであった。

最後にMACS法(7-AAD処理あり、7-AAD処理なし)、ロゼット法(Lin-細胞 $10^6$ 個あたりの数として解析、1mLあたりの数として解析)で測定したEPC数をSScと健常人で比較した(図3)。MACS法では、7-AAD処理の有無にかかわらずSScで健常人より有意に少なかった( $p=0.01$ 、 $0.0007$ )。一方、ロゼット法では、Lin-細胞 $10^6$ 個あたりの数として表すとSScと健常人でEPC数に差がなかったが( $p=0.5$ )、Flow-countビーズを用いて1mLあたりの数として定量化するとSScで有意に減少していた( $p=0.001$ )。

### D. 考案

末梢血中のEPC数はきわめて少なく(末梢血単核球 $10^5$ あたり1個程度)、またEPCに特異的な細胞表面マーカーがまだ同定されていない。そのため、EPC定量の標準化には解決すべき課題が残されている。これまでのSSc患者を対象としたEPC数の測定結果が一致しない理由は測定法の違いによることは明白である。その点で、EUSTARによりEPC測定の推奨が提唱された意義は大きい。末梢中に含まれるEPCはごく少数のため、フローサイトメトリーによる全血の直接解析は困難である。そのため、フローサイトメトリー解析の前にEPCを含む分画を濃縮する必要がある。その手法として、我々が報告したMACS法とAvouacらによるロゼット法があ

る。いずれの方法を用いても分離過程で目的とする EPC のロスが生じ、また回収率には個体差があるため定量性に影響を及ぼす。しかし、今回の検討では、いずれの方法を用いても Flow-count ビーズを用いて 1mL あたりの数として EPC を定量化するとほぼ同様の EPC 数が得られた。ただし、Avouac らの原著にしたがって EPC を Lin-細胞  $10^6$  個あたりの数として表すと、正確性を欠いた。その原因として、EPC 数の基になっている Lin-細胞分画に赤血球や血小板が多数混入していることが明らかとなった。したがって、EPC 数の定量化をフローサイトメトリーのイベントではなく、末梢血の容積あたりで表す方が検体間のばらつきの影響が少ないと考えられる。

今回の検討では、EUSTAR の推奨に合致した MACS 法、ロゼット法いずれを用いても SSc で健常人に比べて EPC 数が少なかった。今後は、測定法を標準化した上で、複数の施設で様々な背景因子を有する SSc 患者を対象とした検討を行い、EPC 数の増減について結論を得ることが必要である。

## E. 結 論

EUSTAR の推奨に合致した 2 つの方法により測定した EPC 数はよく相関したことから、EPC 測定の標準化が可能と考えられる。ただし、再現性の高い結果を得るためには、EPC 数を末梢血の容積あたりで表すことが望ましいことが示された。

## F. 文 献

1. LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am.* 1996; 22: 675-94.
2. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells

responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85: 221-8.

3. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, et al. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet.* 2004; 364: 603-610.
4. Distler JH, Allanore Y, Avouac J, et al.; EULAR Scleroderma Trials and Research group. EULAR Scleroderma Trials and Research group statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 163-8.
5. Avouac J, Juin F, Wipff J, et al. Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67: 1455-60.

## G. 研究発表

1. 論文発表  
1. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J. Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol.* 2009; 19: 530-5.
2. 学会発表  
1. 岡崎有佳、佐藤隆司、安岡秀剛、桑名正隆：循環血管内皮前駆細胞（CEP）を定量化する測定法の検証。第 53 回日本リウマチ学会総会（東京）。2009. 4.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



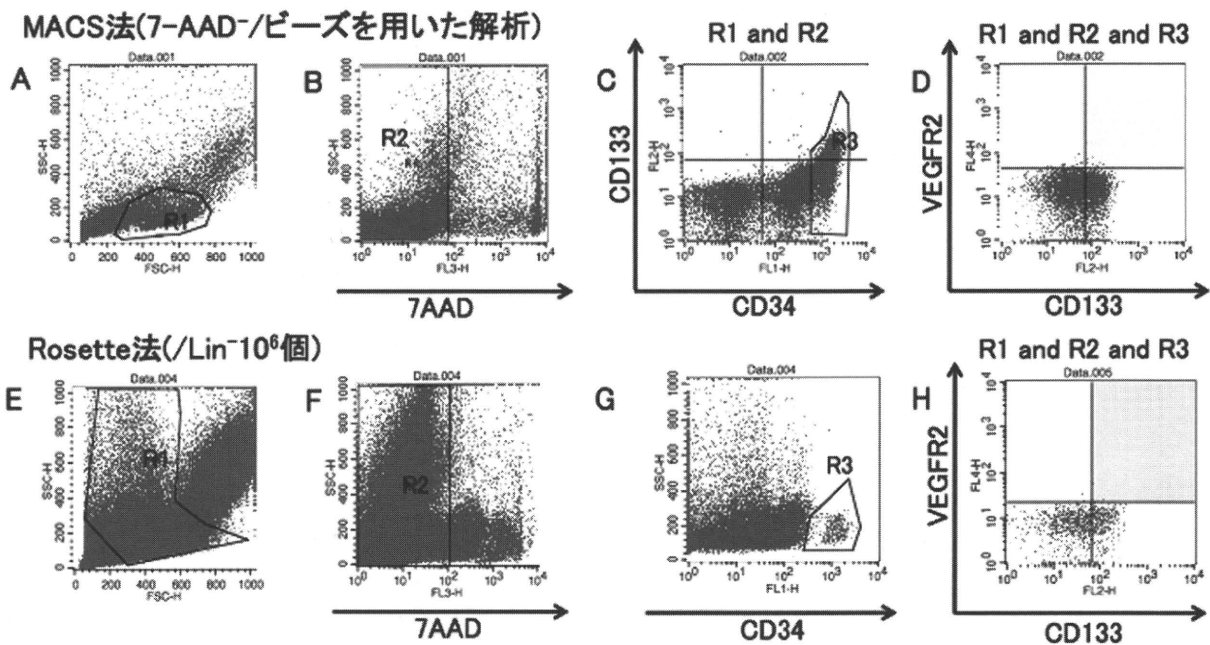


図1：FACSによるEPCの検出。MACS法、ロゼット法を用いて分離した細胞集団をフローサイトメトリーにより解析した。CD34+細胞集団にゲートを掛けた後、CD133、VEGFR2で展開した。EPCはCD34+CD133+VEGFR2+細胞として検出された。

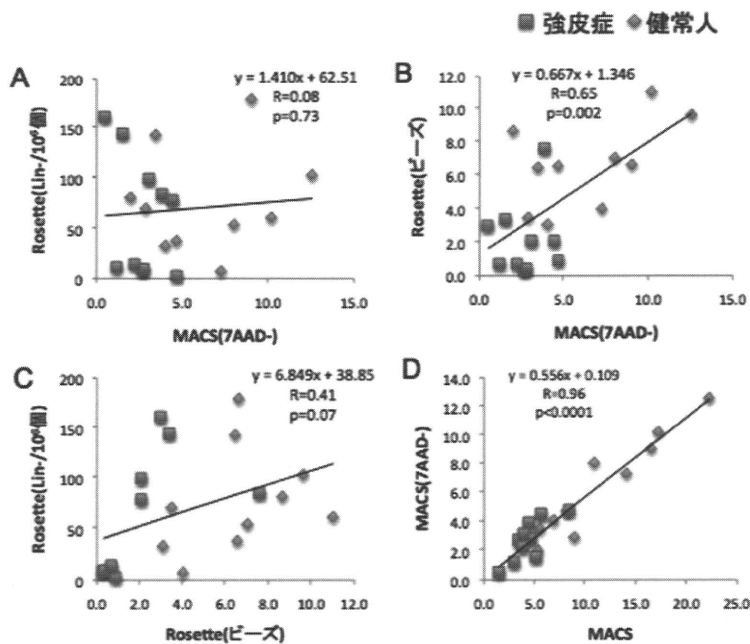


図2：MACS法とロゼット法で測定した末梢血EPC数の相関関係。MACS法では7-AAD処理ありと7-AAD処理なしで解析し、末梢血1mlあたりの数として表した。ロゼット法ではLin-細胞 $10^6$ 個あたりの数、1mLあたりの数として表した。

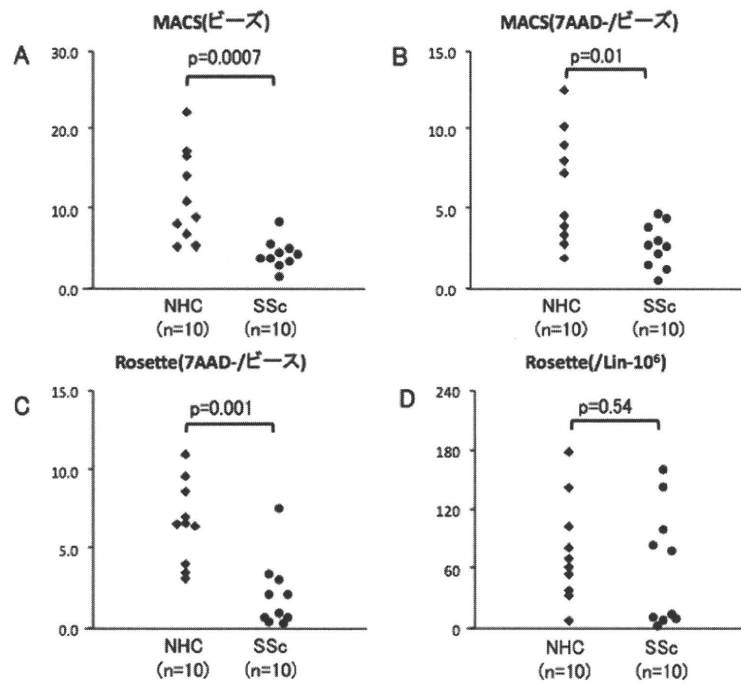


図3：MACS法とロゼット法で測定したEPC数の健常人（NHC）とSScにおける絶対数の比較。

# 強皮症に伴う間質性肺疾患に対する経口シクロホスファミド療法

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 安岡秀剛 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 助教

## 研究要旨

強皮症 (SSc) 患者の死因として最も多い間質性肺疾患 (ILD) の治療薬としてシクロホスファミド (CYC) の有用性が示されている。米国で実施された偽薬対照二重盲検ランダム化比較試験 (SLS) で経口 CYC の 1 年間の投与が拘束性換気障害の悪化を抑止することが示されている。そこで、SLS のエントリー基準である発症 7 年未満、労作時息切れがあり、CYC の効果予測因子である中等度拘束性換気障害または HRCT 上線維化所見を有する SSc-ILD 症例 5 例に対して経口 CYC を投与し、前向きに肺機能、HRCT、安全性を追跡した。3 例で 12 ヶ月の CYC 療法を完遂したが、無月経、ILD 急性増悪のため 2 例で CYC 投与を中止した。無月経は他の生殖可能年齢女性 2 例でもみられた。CYC 投与前後で肺機能の推移を調べると、5 例中 4 例で %FVC、%TLC、%DLco の改善を認めた。一方、肺機能の改善に比して HRCT 上の変化に乏しかった。以上、無月経など重篤な副作用のリスクがあるものの、中等度拘束性換気障害または HRCT 上線維化所見を有する SSc-ILD 例では経口 CYC 療法を積極的に導入すべきと考えられる。

## A. 研究目的

我が国における強皮症 (SSc) 患者の死因として最も多い臓器病変は間質性肺疾患 (ILD) である。腎タリーゼや肺動脈性肺高血圧症に対する治療薬の進歩により、難治性病態として ILD の重要性が増している。ILD の治療薬として古くからシクロホスファミド (CYC) の有用性が示され、EULAR の治療レコメンデーションにも強く推奨される治療薬として記載されている<sup>1)</sup>。履歴的研究により ILD が CYC による拘束性換気障害の進行を抑制することが示されてきたが<sup>2)</sup>、それを検証するため米国で偽薬対照二重盲検ランダム化比較試験が実施された (Scleroderma Lung Study; SLS)<sup>3)</sup>。この試験では 145 例を CYC 群 (1-2 mg/kg) と偽薬群に分けて 1 年間観察

した。その結果、CYC 群では偽薬群に比べて有意に %FVC の低下を抑制した (補正した差 2.53%)。また、CYC 群では %TLC、dyspnea index、HAQ-DI の有意な改善も認め、びまん皮膚硬化型 SSc (dcSSc) ではスキンスコアが CYC 群で偽薬群に比べて有意に低下した。しかし、血球減少、悪心・嘔吐、血尿などの副作用は CYC 群で有意に高頻度であり、SLS 登録症例の試験終了後の経過を調べた調査では CYC により得られた %FVC 改善効果は CYC 中止 1 年後には消失していた<sup>4)</sup>。SLS のサブ解析では、CYC が効果を示す臨床所見として中等度の拘束性換気障害 (%FVC < 70%) または HRCT 上の牽引性気管支拡張などの線維化所見が抽出された<sup>3)</sup>。一方、従来 SSc に伴う ILD で活動性所見とされてきた

HRCT 上のスリガラス影や気管支肺胞洗浄液中の好中球、好酸球、リンパ球分画の増加は CYC の有効性予測とならないことが示された<sup>5,6)</sup>。同時期に英国で実施された CYC 間欠静注療法のランダム化前向き比較試験では、CYC 群が対照群に比べて1年後の %FVC を改善する傾向がみられた<sup>7)</sup>。CYC 群と対照群における1年後の %FVC の差は 4.19% と経口 CYC を用いた SLS より大きかった。統計学的有意差は得られなかった理由のひとつに症例数が 45 例と少なかったことが挙げられている。ただし、本試験のエントリー症例の %FVC が 81% と高く、SLS の 68% に比べて拘束性換気障害が軽度の症例を対象としていたため、組み入れ症例が異なっていた点が指摘されている。CYC は SSc-ILD の拘束性換気障害の進行を抑制する効果はあるものの、その効果は顕著でなく、不可逆性の生殖機能障害や発癌（膀胱癌、造血器腫瘍）など重篤な副作用のリスクを上昇させる。したがって、その使用については risk-benefit のバランスを考慮することが必要である。

我が国では CYC は経口よりも間欠的静注療法が広く用いられている。経静脈的投与はびまん性増殖性ループス腎炎で慢性病変の進行を抑制する効果が示された投与法に準じて行われる。間欠的静注では経口に比べて CYC 総投与量を削減でき、短期的に強力な免疫抑制効果が期待できる。しかし、高用量の CYC が短時間で投与されるために不可逆性の生殖機能障害や膀胱癌誘発のリスクが上昇する可能性も指摘されている。SSc-ILD に対する高いエビデンスを有する CYC 投与法は SLS で示された経口投与であるにもかかわらず、我が国における経口 CYC の有用性に関する報告はこれまでない。そこで、今回我々は SLS のエントリー基準である発症7年未満、労作時息切れありを満たし、CYC の効果予測因

子である中等度拘束性換気障害または HRCT 上線維化所見を有する SSc-ILD 症例に対して経口 CYC を投与し、前向きに肺機能、HRCT、安全性を追跡した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

慶應義塾大学病院通院中の SSc 患者のうち、2008 年以降に ILD に対して経口 CYC を開始した 5 例を対象とした (TM、WN、HS、IA、IK)。全例がアメリカリウマチ学会の分類基準を満たした。男性 1 例、女性 4 例で、SSc 診断時の年齢は 32-76 歳、CYC 投与までの罹病期間は 22-72 ヶ月であった。dcSSc 2 例、lcSSc 3 例で、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 3 例、抗 U1RNP 抗体陽性 1 例、既知の SSc 関連自己抗体陰性 2 例であった。全例が経口 PGI2 製剤、プロトンポンプ阻害薬を服用していたが、1 例 (IA) が筋炎に対して PSL 15 mg、1 例 (IK) が関節炎 (滑膜炎・腱炎) に対して PSL 25 mg を服用していた。

### 2. ILD 評価法

CYC 開始前と投与終了時に肺機能検査 (FVC、TLC、DLco)、HRCT を実施し、血清 KL-6 を測定した。HRCT 所見はスリガラス影 (GGO)、肺線維化 (PF)、蜂窩・囊胞変化 (HC) に分類し、Goldin らの方法に従ってスコア化した (最大 24)<sup>8)</sup>。また、Goh ら<sup>9)</sup> の ILD staging を用いて extensive と limited に分類した。

(倫理面への配慮)

本研究は学内の倫理委員会で承認され、患者本人に対して研究内容を説明し、文書による同意を得た。

## C. 研究結果

CYC 開始前の評価では、%FVC は 57-85%、%TLC

は47-79%で、1例を除いて拘束性換気障害を認めた。%DLcoは21-55%と全例で高度の拡散能低下を伴っていたが、肺高血圧症併発例はなかった。ただし、1例（IK）は境界域の肺高血圧症（平均肺動脈圧21 mmHg）のためボゼンタンを服用していた。HRCT上、4例（TM、WN、HS、IK）はNSIPパターン、1例（IK）はUIPパターンを呈していた。HRCTスコアでは、GGOが1-11、PFが4-9、HCが0-6に分布しており、全例が構造改変を伴う線維化病変を有していた。肺機能とHRCT所見による staging では4例（TM、HS、IA、IK）がextensive、拘束性換気障害を認めなかった1例（WN）がlimitedであった。血清KL-6は384-3800 I/MLに分布し、1例（TM）を除き基準値を超えていた。

CYCは4例で50 mgから開始し、男性IK例（体重68 kg）では1ヶ月後に75 mgまで増量した。高齢女性TM（73歳、体重39 kg）では25 mgから開始し、1ヶ月後に50 mgに増量した。PSLを未使用の3例中2例（WN、HS）ではCYCと同時にPSL20 mgを開始し、1年以内に漸減中止した。高齢女性TMはCYC単独治療とした。CYC開始時にPSLを服用していた2例（IA、IK）はCYC併用後にPSLを漸減した。

5例中3例で12ヶ月のCYC療法を完遂し、アザチオプリン50 mgへスイッチした。有害事象のため2例（HS、IK）でCYC投与を中止した。HSは無月経のため8ヶ月でCYCを中止し、アザチオプリン50 mgにスイッチした。IKは3ヶ月後にILD急性増悪を認め、ステロイドパルス療法に引き続き高用量ステロイド（PSL70 mg）、シクロスポリンによる治療を行った。難治性関節炎に対して使用したエタネルセプトによる薬剤性肺傷害、ニューモシステイス肺炎が疑われたが、確定診断に至らずSSc-ILD悪化

も否定できなかった。有害事象として無月経が生殖可能年齢女性3例の全例（34、35、39歳）でみられ、発現時期は8、11、12ヶ月であり、うち2例は12ヶ月のCYC投与を完遂した。現時点で最長14ヶ月経過を追っているが、いずれの例も月経が再開していない。感染症、悪心・嘔吐、血球減少、出血性膀胱炎は経過中認めていない。

CYC投与前と中止時の肺機能、血清KL-6の推移を表1に示す。CYC服用期間は3例が12ヶ月、1例が8ヶ月、1例が3ヶ月（いずれも有害事象のため中止）であった。5例中4例で%FVC、%TLC、%DLcoの改善を認めたが、KL-6の変動には一定の傾向はなかった。ILD急性増悪をきたしたIKでは肺機能の悪化、KL-6の上昇を認めた。HRCTでは投与前後で大きな変化を認めなかったが、GGOは減少、PF、HCは不変の傾向がみられた（図1）。ただし、ILD急性増悪をきたしたIKでGGOスコア著増を認めた。1例（HS）で肺機能が改善していたにもかかわらず、PFスコアの悪化がみられた。全般的に肺機能の改善に比してHRCT上の変化に乏しかった。

CYCが皮膚硬化に及ぼす影響を検討するため、CYC投与前後のTSSの推移を調べた。dcSScの2例ではTSSの改善（20→13、5→3）を認めたが、いずれもステロイドを併用しておりCYCによる効果の評価は困難であった。dcSScの1例（WN）はCYC、PSL中止7ヶ月後に急速に皮膚硬化、関節可動域制限の悪化が出現した。

#### D. 考案

少数例のオープン試験による検討ではあるが、日本人SSc-ILDに対して経口CYCが肺機能を改善する効果が示された。ただし、HRCT所見での改善に乏しく、CYCの効果は進行を抑制したと考えるべき

なのかもしれない。一方、高率に無月経を認めたことから、経口投与でも生殖機能障害についてインフォームドコンセントと細心の注意が必要と考えられた。

CYCは細胞毒性の強いアルキル化剤であり、服用後は長期に渡って人体に影響が残り、膀胱癌や造血器腫瘍などの発癌のリスク上昇は生涯続くとされる。また、妊娠可能年齢の女性にとって不可逆的な生殖機能障害は重大な問題である。そのため、CYCの使用は可能な範囲で回避すべきで、予測される効果がリスクを上回る場合にのみ適応とするのが一般的な考え方である。SSc-ILDに対するCYC療法の有用性をシミュレーションしたMarkov decision analyticモデルでは、CYC投与による寿命延長効果は得られていない<sup>10)</sup>。そのため、CYCを使用する際に有効性の予測因子を考慮する必要がある。今回、SLSの結果に基づきSSc発症7年以内、自覚的な息切れ、中等度の拘束性換気障害(%FVC<70%)またはHRCT上の線維化所見を有する例にCYCを投与し、5例中4例で肺機能の改善効果が得られた。したがって、これら臨床所見はCYCの効果予測因子としてCYCの適応を判断する際に有用と考えられた。

SSc-ILDに対するCYC療法は経口と間欠的静注のいずれかを選択すべきかを判断するhead-to-headの臨床試験はない。エビデンスレベルの高さから経口が推奨されるが、間欠的静注療法の二重盲検試験は実施されていない。静脈投与では骨髄からの前駆細胞、幹細胞の動員効果が期待でき、付加的な作用も期待できる<sup>11)</sup>。一方、経口ではCYCのDNA複製阻害作用が長期に渡って続き、より強い効果が期待できる。安全性に関しては、一度に大量投与する静注で悪心・嘔吐、骨髄抑制、出血性膀胱炎の頻度は高くなる。ただし、通常は病院内の監視下で投与す

ることから大量の輸液、制吐剤の併用、メスナの併用により骨髄抑制以外のリスクの軽減が可能である。一方、経口では一日投与量は少ないものの、総投与量は3倍以上となる。また、飲水負荷は患者まかせとなり、我が国では経口メスナが使用できないことから出血性膀胱炎、膀胱癌のリスクはかえって上昇する可能性がある。発癌については総投与量、生殖機能障害は一回投与量に関連するとされるが、今回の検討では経口投与でも高率に無月経が生じた。現時点で経口と間欠的静注のいずれかを選択するかの判断は難しいが、SLSで示されたCYC効果予測因子を有する例では経口投与を選択すべきと思われる。

## E. 結 論

SSc発症7年以内、自覚的な息切れ、中等度の拘束性換気障害またはHRCT上線維化所見を有するSSc-ILDに対して経口CYCは拘束性換気障害を改善する効果が得られた。無月経など重篤な副作用のリスクがあるものの、risk-benefitバランスを十分考慮してmeritが上回ることが期待できる例では積極的にCYC療法を導入すべきと考えられる。

## F. 文 献

- 1) Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 620-8.
- 2) White B, Moore WC, Wigley FM et al. Cyclophosphamide is associated with pulmonary function and survival benefit in patients with scleroderma and alveolitis. *Ann Intern Med* 2000; 132: 947-54.
- 3) Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Cy-

- cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 2655-66.
- 4) Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Effects of 1-year treatment with cyclophosphamide on outcomes at 2 years in scleroderma lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 21026-34.
- 5) Goldin J, Elashoff R, Kim HJ, et al. Treatment of scleroderma-interstitial lung disease with cyclophosphamide is associated with less progressive fibrosis on serial thoracic high-resolution CT scan than placebo: findings from the scleroderma lung study. *Chest* 2009; 136: 1333-40.
- 6) Strange C, Bolster MB, Roth MD, et al. Bronchoalveolar lavage and response to cyclophosphamide in scleroderma interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 91-8.
- 7) Hoyles RK, Ellis RW, Wellsbury, et al. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of corticosteroids and intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine for the treatment of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3962-70.
- 8) Goldin JG, Lynch DA, Strollo DC, et al. High-resolution CT scan findings in patients with symptomatic scleroderma-related interstitial lung disease. *Chest* 2008; 134: 358-67.
- 9) Goh NS, Desai SR, Veeraraghavan S, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1248-54.
- 10) Khanna D, Furst DE, Clements PJ, et al. ral cyclophosphamide for active scleroderma lung disease: a decision analysis. *Med Decis Making* 2008; 28: 926-37.
- 11) Furuya Y, Okazaki Y, Kaji K, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells by intravenous cyclophosphamide in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2010; 49: 2375-80.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Furuya Y, Satoh T, Kuwana M. Interleukin-6 as a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Int J Rheumatol* 2010; 2010: 720305.
- 2) Furuya Y, Okazaki Y, Kaji K, Sato S, Takehara K, Kuwana M. Mobilization of endothelial progenitor cells by intravenous cyclophosphamide in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2010; 49: 2375-80.

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 経口CYC開始後の肺機能、血清KL-6の推移

症例	%FVC		%TLC		%DLco		KL-6 (U/mL)	
	投与前	中止時	投与前	中止時	投与前	中止時	投与前	中止時
TM	57%	70%	47%	51%	55%	58%	384	326
WN	85%	89%	78%	83%	44%	55%	548	718
HS <sup>1)</sup>	75%	87%	56%	64%	21%	29%	3800	3013
IA	57%	69%	50%	54%	29%	34%	1499	1192
IK <sup>2)</sup>	70%	64%	51%	46%	31%	20%	1810	2980

<sup>1)</sup> 8ヶ月で中止

<sup>2)</sup> 3ヶ月で中止

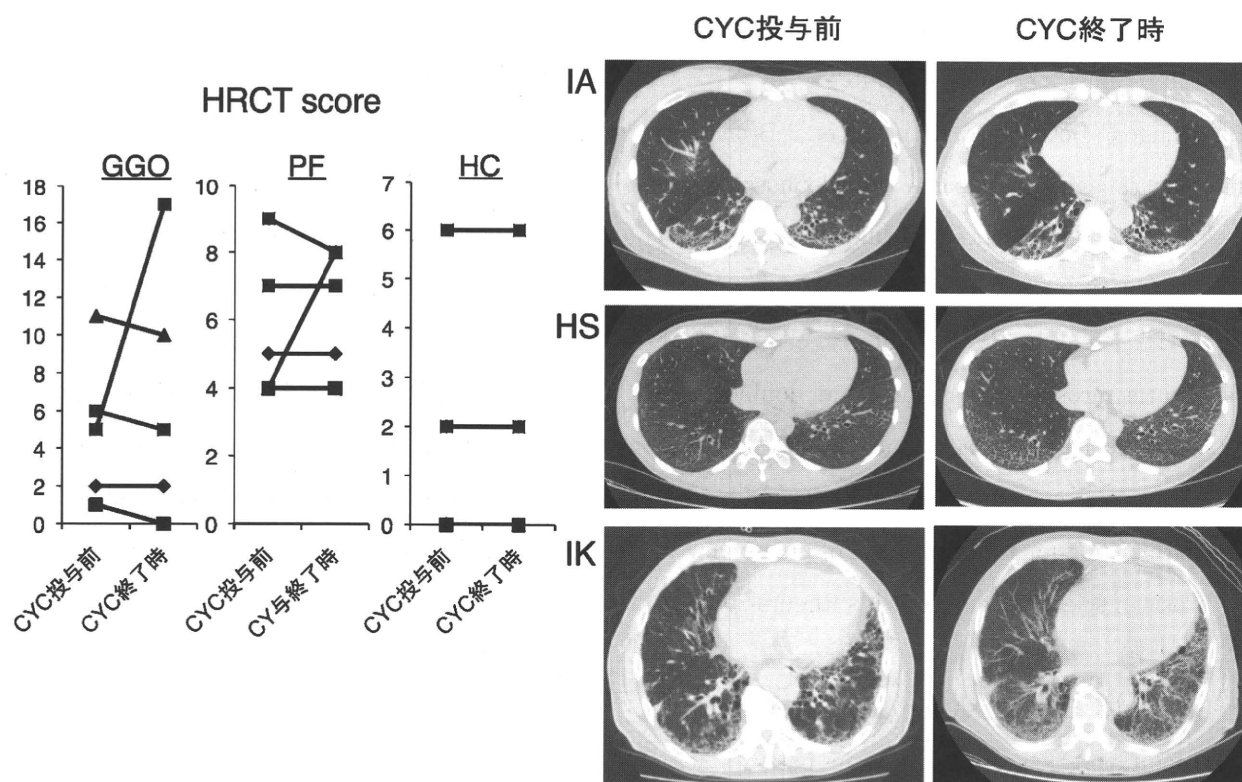


図1: CYC投与前後のHRCTスコアの推移

CYCを投与した5例のGGO、PF、HCスコアの変化を示す。右はIA、HS、IKの代表的なHRCT像を示す。IAではGGOの改善、HSはPFの拡大、IKはGGO出現による急性増悪が認められた。



# 強皮症における血管内皮前駆細胞の *in vivo* 血管形成能の検討

研究分担者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 准教授

## 研究要旨

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

## A. 研究目的

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

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

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

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

## B. 研究方法

### 1. 対象

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

た。

### 2. 末梢血 CD133+ 細胞の分離

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

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

### 3. 腫瘍血管新生マウスモデル<sup>4)</sup>

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

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

て表した。

腫瘍塊の一部は凍結切片（8 mm 厚）とし、免疫染色に使用した。ラット抗マウス CD31 抗体（MEC133, BD Bioscience）、FITC 標識マウス抗ヒト CD31 抗体（P2B1, Millipore）を 1 次染色に使用し、続いて AlexFluor<sup>®</sup> 488 標識抗 FITC 抗体、AlexFluor<sup>®</sup> 568 標識抗ラット IgG 抗体（Invitrogen）を二次抗体に使用した。また、核の対比染色には TO-PRO3（Invitrogen）を使用した。共焦点レーザー顕微鏡（Olympus）を用いて、ランダムに選んだ 10～20 視野における血管腔数を観察し、その中におけるヒト CD31 陽性血管内皮細胞を含む血管腔の割合を求めた。

#### 4. 統計学的検討

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

（倫理面への配慮）

本研究は学内の倫理委員会で承認され、検体採取に当たっては全ての患者に対して研究内容を説明し、文書による同意を得た。

### C. 研究結果

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

移植により形成された新生腫瘍血管数は CD133+

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

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

### D. 考案

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

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

## E. 結 論

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

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

## F. 文 献

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

## G. 研究発表

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