

- 6. Yanaba K, et al. Immunity 28, 639–650. 2008
- 7. Matsushita T, et al. J Clin Invest 118: 3420–30. 2008;
- 8. Matsushita T, et al. J Immunol. 85: 2240–52. 2010

- なし
- 2. 学会発表
- なし

G. 研究発表

- 1. 論文発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

- なし

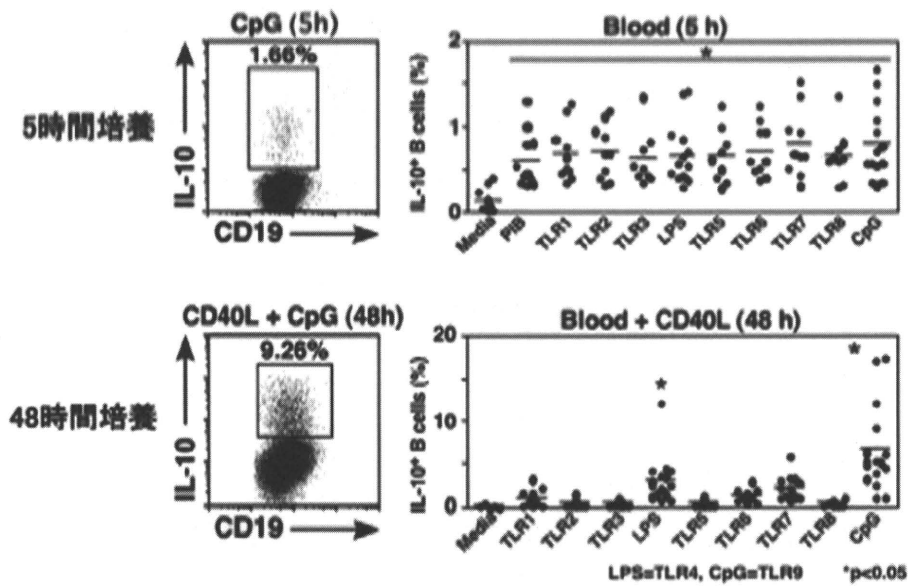


図1：制御性 B 細胞の刺激条件の検討

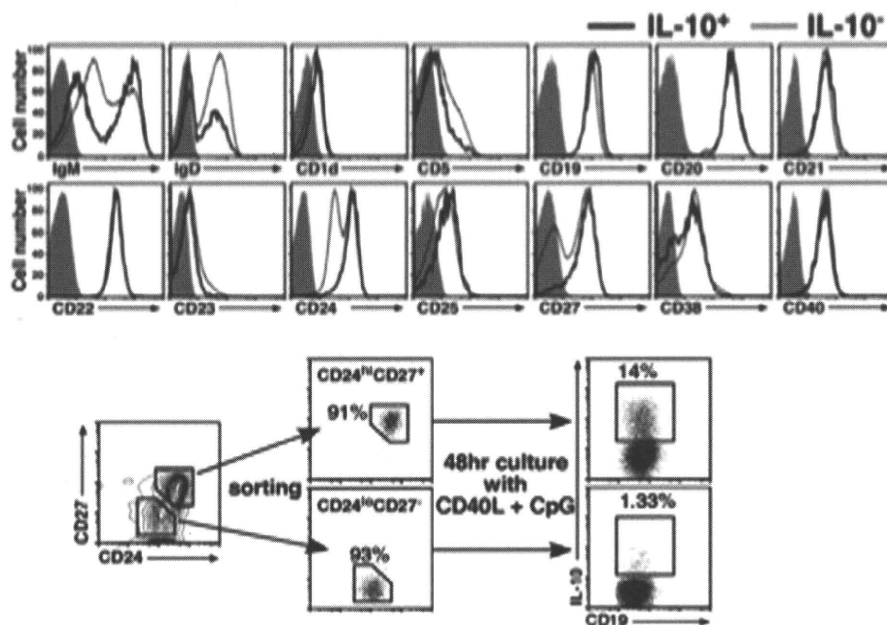


図 2：制御性 B 細胞のフェノタイプの同定

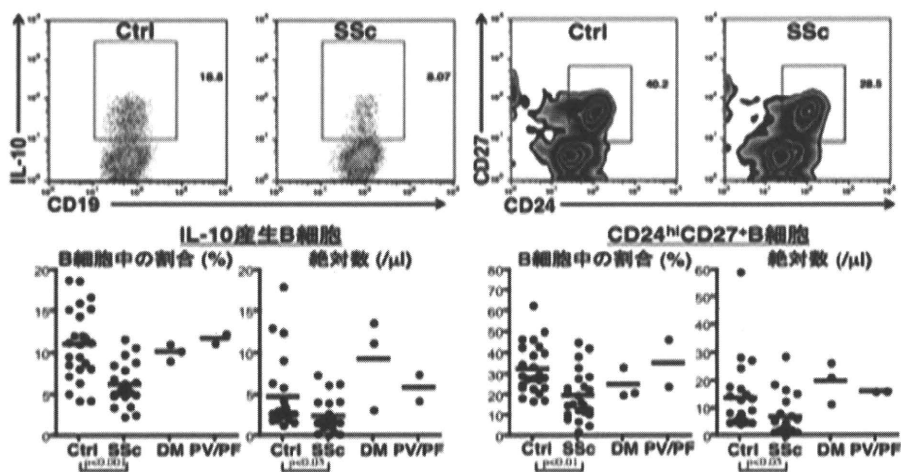


図 3：全身性強皮症における制御性 B 細胞

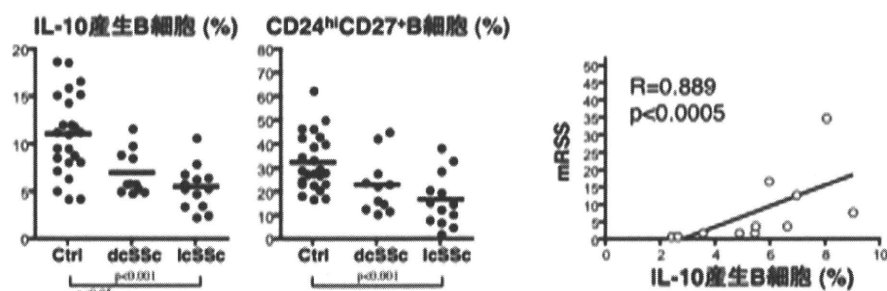


図 4：制御性 B 細胞と皮膚硬化との相関

TGF- β /Smads シグナルを抑制する 新規低分子化合物の強皮症モデルに対する治療効果の検討

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
協力者	松下幸世	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者	堀川真由香	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者	白崎文朗	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者	東 清史	住友化学生物環境科学研究所
協力者	富ヶ原祥隆	住友化学生物環境科学研究所
協力者	金子秀雄	住友化学生物環境科学研究所
分担研究者	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	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

研究要旨

山椒の抽出液中にヒト皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子の発現を抑制する成分(サンショール)を同定し、サンショールを含む活性化化合物をリード化合物とし、種々構造最適化を行い、新規低分子化合物 HSc025 を見出した。そこで、HSc025 のヒト皮膚線維芽細胞に対する作用機序を検討した。また、本薬剤内服の tight skin mouse (TSK/+マウス) の皮膚硬化、ブレオマイシン誘導性肺線維症への効果を検討した。ヒトの皮膚線維芽細胞をあらかじめ HSc025 と反応させた場合、Smad 依存性のプロモーターの活性化を用量依存的に抑制した。HSc025 は、TGF- β 誘導性のコラーゲンやファイブロネクチンの発現を *in vitro* で有意に抑制した。しかし、HSc025 は TGF- β で誘導された Smad3 のリン酸化には直接影響を及ぼさず、Y-box protein 1 の核内への移行を促進することにより、Smad 依存性のコラーゲンの転写を抑制している可能性が示唆された。HSc025 の内服は、TSK/+マウスの皮膚硬化やブレオマイシン誘導性肺線維症の線維化を有意に抑制した。これらの結果から、TGF- β /Smad のシグナルを抑制する新規低分子化合物である HSc025 が、皮膚や肺の線維化を抑制することが示された。HSc025 内服治療が、全身性强皮症に対する治療法として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

全身性强皮症 (systemic sclerosis ; SSc) は、皮膚や内臓の線維化により特徴づけられる膠原病である。その病因は不明であるが、線維化に中心的な役

割を果たすと考えられているメディエーターは transforming growth factor (TGF)- β である。TGF- β は Smads のリン酸化と核内移行を誘導し、細胞外基質蛋白遺伝子の転写を活性化させる。このため、

TGF- β やそのシグナルが、SSc の治療のターゲットとして注目されている。

これまでに、薬用植物から見つかったいくつかの抽出物が、様々な臓器の線維化を抑制することが知られている。例えば、植物アルカロイドのひとつである halofuginone は、TGF- β /Smad のシグナルを抑制してコラーゲン産生を抑制する¹⁾。我々は以前に、interferon- γ /Y-box binding protein 1 (YB-1) シグナルが2つの機序でコラーゲン遺伝子の発現を抑制することを報告した²⁾。ひとつは、IFN- γ によって YB-1 が核内に移行すると、YB-1 が *COL1A2* の近位プロモーター領域にある IFN- γ response element (IgRE) と結合することにより、*COL1A2* の転写を抑制するものである。もうひとつは、YB-1 が Smad3 と co-activator p300 との結合を物理的に妨害して TGF- β /Smad3 シグナルを核内で阻害することにより、*COL1A2* の転写を抑制するというものである。

我々（協力者の東ら）は、山椒の抽出液中にヒト皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子の発現を抑制する成分（サンシオール）を同定し、サンシオールを含む活性化合物をリード化合物とし、種々構造最適化を行い、新規低分子化合物 HSc025 を見出した。そこで、HSc025 のヒト皮膚線維芽細胞に対する作用機序を検討した。また、本薬剤内服の tight skin mouse (TSK/+マウス)³⁾ の皮膚硬化、ブレオマイシン誘導性肺線維症⁴⁾ への効果を検討した。

B. C. 方法と結果

HSc025 は YB-1 の活性化と核内移行を介してコラーゲン遺伝子の発現を抑制する

これまでの検討から、YB-1 は IgRE を介して *COL1A2* のプロモーターの活性化を抑制することが示されている²⁾。我々は、約 150 種の薬用植物抽

出物から、IgRE を含むコラーゲンプロモーターのプラスミドの活性を抑制するが、IgRE を欠くプラスミドには影響しない抽出物を cell-based reporter assay によりスクリーニングした。その結果、3 種の抽出物が見つかり、そのうちのひとつである山椒抽出物からサンシオールを活性成分として同定し、サンシオール含む活性化合物をリード化合物とし、種々構造最適化を行い、内服に適した新規低分子化合物 HSc025 を見出した。なお、サンシオールの化学構造は、Smad3 の活性化抑制物質である halofuginone とは全く異なっていた（図 1）。ヒトの皮膚線維芽細胞 (Clontech, Palo Alto, CA) を HSc025 で前処理すると、-342COL-Luc や -161COL-Luc の活性は有意に抑制されたが、IgRE を欠く -124COL-Luc には影響を与えなかった（図 2A）。次に、HSc 025 に対する核内での YB-1 の相対量についての影響を western blotting で検討したところ、HSc025 の用量依存的に核内の YB-1 の量は増加した（図 2B）。さらに、siRNA により YB-1 の発現を抑制したところ、HSc025 による *COL1A2* のプロモーター活性の抑制効果がみられなくなった（図 2C）。これらの結果から、HSc025 が YB-1 の核内への移行を促進することにより、*COL1A2* の転写を抑制していることが示唆された。

HSc025 は Smad のリン酸化抑制を介さずに TGF- β によるコラーゲン発現を阻害する

HSc025 が、TGF- β /Smad シグナルを機能的に抑制するかどうかを確認するために、ヒト皮膚線維芽細胞に -342COL-Luc や SBE₄TATA-Luc をトランスフェクトし、HSc025 とさまざまな濃度でインキュベートして TGF- β によるコラーゲンのプロモーターや Smad を介した転写の活性化への影響を検討したところ、HSc025 は濃度依存的にこれらの転

写活性を抑制した (図 3)。また、HSc025 のヒト皮膚線維芽細胞における *COL1A2* や fibronectin の遺伝子の発現への影響を調べたところ、TGF- β により上昇したこれらの遺伝子発現を HSc025 は濃度依存的に抑制した (図 4A)。また、これと一致して、コラーゲン産生の評価として測定した TGF- β による培養液中のハイドロキシプロリン量の増加も有意に抑制された (図 4B)。

Halofuginone は、TGF- β の刺激後に、Smad3 のリン酸化やその後の核内移行を阻害することが知られている¹⁾。HSc025 も Smad3 に影響するかどうかを検討した。ヒト線維芽細胞の核蛋白を用いた western blotting では、TGF- β によって核内へのリン酸化 Smad3 の増加がみられた (図 5A)。Halofuginone や activin receptor-like kinase 5 抑制剤の SB431542 は有意にそれを抑制したが、HSc025 は抑制しなかった。これを Smad3 の免疫蛍光染色でも確認した (図 5B)。Halofuginone や SB431542 は TGF- β による Smad3 の核内移行を抑制したが、HSc025 は抑制しなかった。このことから、HSc025 は Smad3 のリン酸化や核内移行の抑制を介さずに TGF- β によるコラーゲンの発現を阻害するものと考えられた。HSc025 の内服は、マウスモデルにおいて線維化を抑制する

以上より、ヒトの皮膚線維芽細胞において、HSc025 は YB-1 の核内移行を促進することにより、*COL1A2* の転写を抑制しているものと考えられた (図 6)。これらの結果を踏まえて、マウスの強皮症モデルである TSK/+マウスに生後 4 週より 14 日間連日 HSc025 を内服させて、皮膚硬化への影響をみた。なお、マウスのすべての実験は、金沢大学で承認されたプロトコールに基づいて施行した。比較のために、TSK/+マウスで線維化抑制効果が知ら

れている halofuginone^{1,5)} を腹腔内注射した群も設けた。TSK/+マウスの皮膚にみられる皮下結合組織の肥厚やハイドロキシプロリンの増加は、HSc025 の投与により、halofuginone より劣るものの、コントロールに比べて有意に抑制された (図 7)。これまでに、プレオマイシン誘導性の肺線維症モデルにおける halofuginone の効果については、線維化に有効であったという報告⁶⁾ と、有効ではなかったとする報告⁷⁾ がみられる。プレオマイシン誘導性の肺線維症モデルでは、halofuginone 投与群では Ashcroft スコア⁸⁾ の有意な低下はみられなかったが、HSc025 を内服することにより、有意な低下が認められた。ハイドロキシプロリン量については、HSc025 は halofuginone と同程度に低下させた (図 8)。なお、HSc025 の内服による明らかな副作用は確認されなかった。このように、HSc025 の内服は、皮膚や肺の線維化モデルに有意な効果を示した。

D. 考 案

HSc025 が YB-1 の核内移行を促進する機序は明らかではないが、*in vitro* の検討では、HSc025 が Smad 依存性の細胞外基質蛋白遺伝子の転写活性化を抑制することが示唆された。なお、HSc025 は、リン酸化した Smad3 の核内での量に影響しなかったことから、Smad3 のリン酸化や核内移行には影響しないものと考えられる。これらの結果は、HSc025 が YB-1 を介して、核内での TGF- β /Smad3 シグナルを阻害する可能性を示している。我々や他のグループのこれまでの研究から、IFN- γ は、転写因子 STAT-1 α や YB-1 が Smad3-p300 の相互作用を阻害することにより間接的に TGF- β /Smads シグナルを阻害することが知られている^{2,9)}。さらに私たちは、casein kinase II 依存性のシグナルが、IFN- γ を

介した YB-1 の核内移行を制御する可能性を報告している。一方、YB-1 の細胞内貯留に重要なアンカープロテインの存在を指摘する報告もある。HSc025 が YB-1 の核内移行を活性化する詳細な機序については、現在検討中である。

本研究で、HSc025 は、問題となる副作用もみられず、2つのマウス線維化モデルにおいて、線維化を抑制した。TSK/+マウスの皮膚硬化に対する効果は、halofuginone より劣ったものの、コントロールに比べて有意な効果を示した。一方、ブレオマイシン誘導性肺線維症に対する効果は、HSc025 は halofuginone よりも大きな効果を示した。このことは、HSc025 が Halofuginone に比べて皮膚よりも肺によく効くことを必ずしも示しているとは限らない。TSK/+マウスは Fibrillin-1 遺伝子の変異による遺伝的な線維化モデルであり、ブレオマイシンは化学物質により誘導される線維化モデルである。前者は炎症細胞浸潤が乏しく、後者は炎症細胞の浸潤を伴う点でも異なる。今回の結果が、皮膚と肺の臓器の違いによるものか、遺伝子異常による先天的なモデルと化学物質により誘導される炎症の強いモデルとの間の違いによるものかは、現時点ではわからない。この点を明らかにするために、現在ブレオマイシンにより誘導される皮膚の線維化における HSc025 の効果についても検討している。いずれにしても、Halofuginone に比べて内服が可能な HSc025 は、その安全性と併せて、臨床応用しやすい薬と考えられる。

E. 結 論

新規化合物である HSc025 は、ヒトの皮膚線維芽細胞において、TGF- β /Smad のシグナルを、Smad3 のリン酸化や核内移行を阻害することなく、YB-1 の核内移行を促進することにより抑制する可能性が示

された。また、HSc025 が強皮症の動物モデルにおいて、線維化を有意に抑制することが示された。HSc025 は、SSc の治療薬として期待できる薬と考えられた。

F. 文 献

1. McGaha TL, Phelps RG, Spiera H, Bona C. Halofuginone, an inhibitor of type-I collagen synthesis and skin sclerosis, blocks transforming-growth-factor-beta-mediated Smad3 activation in fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 461-70.
2. Higashi K, Inagaki Y, Fujimori K, Nakao A, Kaneko H, Nakatsuka I. Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J Biol Chem* 2003; 278: 43470-9.
3. 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.
4. Fleischman RW, Baker JR, Thompson GR et al. Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. *Thorax* 1971; 26: 675-82.
5. Pines M, Snyder D, Yarkoni S, Nagler A. Halofuginone to treat fibrosis in chronic graft-versus-host disease and scleroderma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 417-25.
6. Nagler A, Firman N, Feferman R, Cotev S, Pines M, Shoshan S. Reduction in pulmonary fibrosis in vivo by halofuginone. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1082-6.
7. Tzurel A, Segel MJ, Or R, Goldstein RH, Breuer

R. Halofuginone does not reduce fibrosis in bleomycin-induced lung injury. *Life Sci* 2002; 71: 1599-606.

8. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988; 41: 467-70.
9. Feng XH, Zhang Y, Wu RY, Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev* 1998; 12: 2153-63.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M et al. A novel inhibitor of Smad-dependent transcrip-

tional activation suppresses tissue fibrosis in mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3465-75.

2. 学会発表

1. Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M, Higashi K, Tomigahara Y, et al. A novel inhibitor of Smad-dependent transcriptional activation suppresses tissue fibrosis in model mice of systemic sclerosis. American Association of Immunologists, Seattle, USA, 2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況

東と富ヶ原は、HSc025 やその類縁体に関して物質及び用途（抗線維化製剤）としての特許を有している。

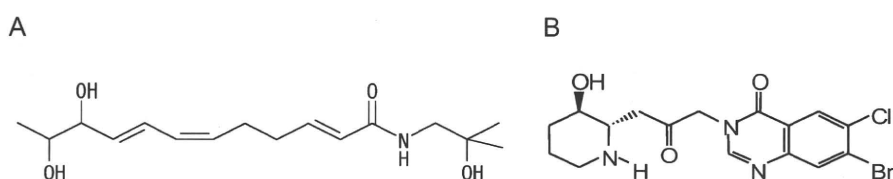


図1：A. サンショールと B. halofuginone の化学構造

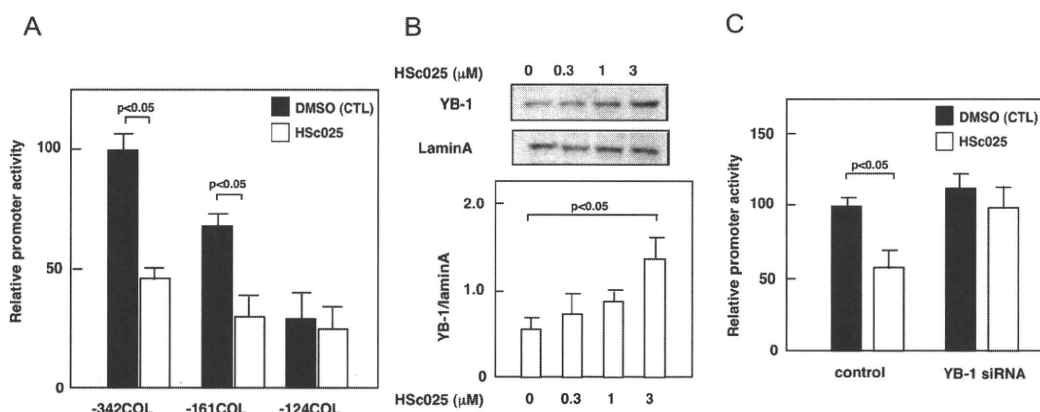


図2：HSc025 は YB-1 の核内への移行を促進して *COL1A2* の転写を低下させる

A. ヒトの線維芽細胞を HSc025 とインキュベートしたところ、-342COL と -161COL の luciferase 活性は有意に抑制されたが、YB-1 の結合部位である IgRE を欠く -124COL には影響がみられなかった。

B. HSc025 による核内における YB-1 の量の変化を評価したところ、HSc025 の用量依存的に YB-1 の核内量は増加した。

C. YB-1 を siRNA によってノックダウンした細胞では、HSc025 とインキュベートしても、*COL1A2* の転写抑制効果はみられなかった。

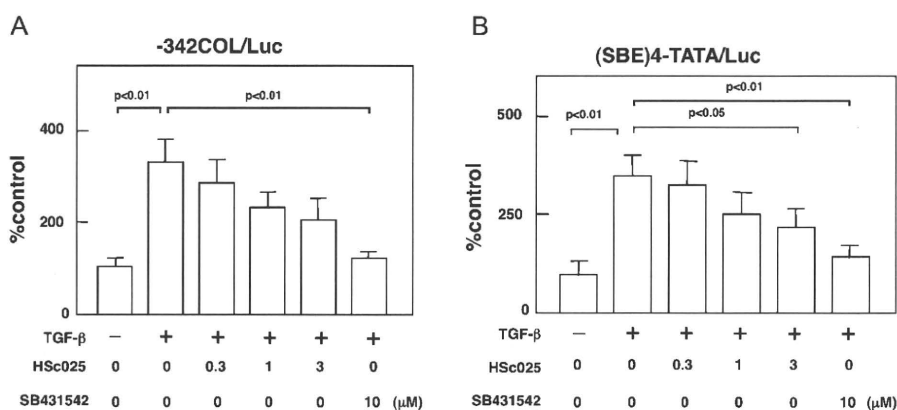


図3：HSc025 は、ヒト線維芽細胞において、TGF- β /Smad シグナルを抑制する

A. ヒト皮膚線維芽細胞を種々の濃度の HSc025 とインキュベートすることにより、TGF- β により上昇したコラーゲンのプロモーター活性は用量依存的に抑制された。

B. HSc025 は TGF- β により誘導された Smad binding elements の転写活性を用量依存的に抑制した。

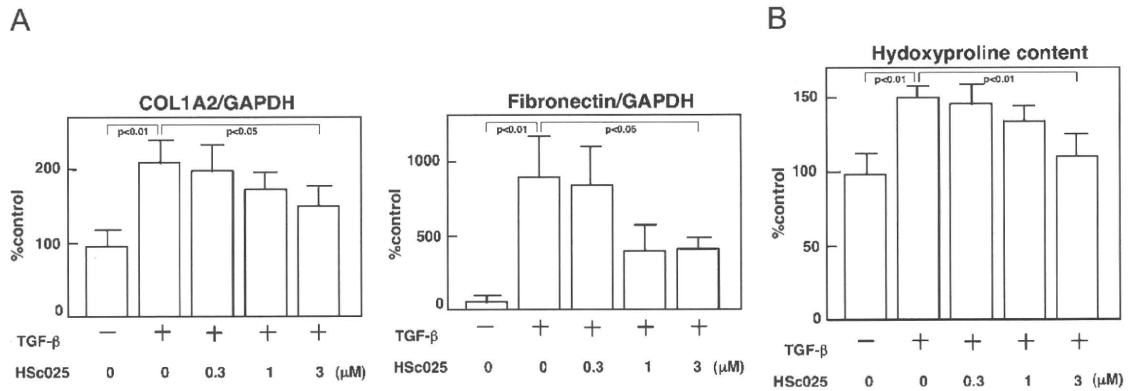


図4：HSc025は、ヒト線維芽細胞において、TGF-βで誘導されるコラーゲンの産生を抑制する
 A. HSc025のヒト皮膚線維芽細胞におけるCOL1A2やfibronectinの遺伝子の発現への影響を調べたところ、HSc025は3μMにおいて、TGF-βにより上昇したこれらの遺伝子発現を有意に抑制した。
 B. コラーゲン産生の評価として測定したTGF-βによる培養液中のヒドロキシプロリン量の増加も有意に抑制された。

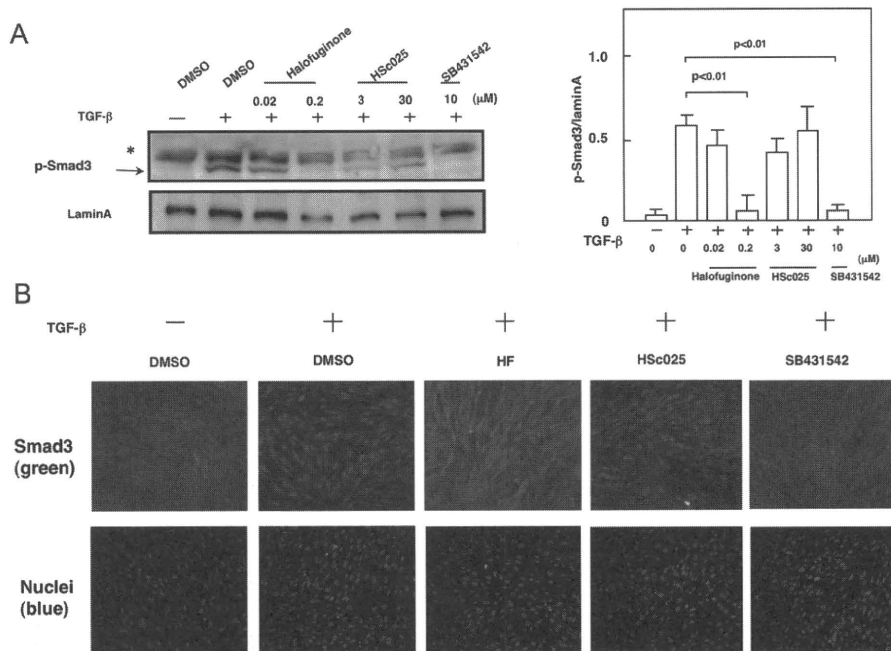
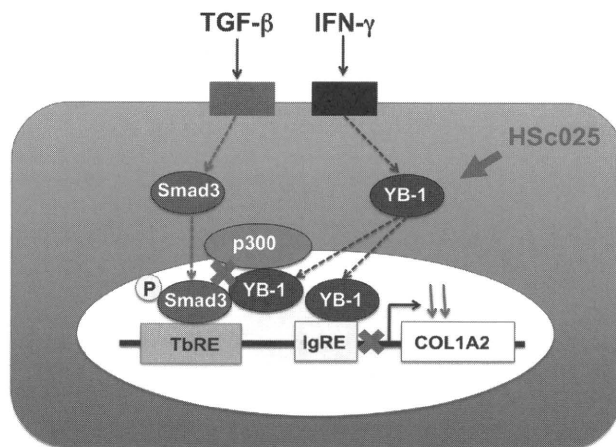


図5：HSc025は、TGF-βで誘導されるSmad3のリン酸化及び核内移行に影響を与えない
 A. TGF-βで誘導されるSmad3のリン酸化に対し、HSc025は影響を与えなかった。
 B. TGF-βで誘導されるリン酸化Smad3の核内移行に対し、HSc025は影響を与えなかった。



YB-1:Y-box protein 1, TbRE:TGF- β response element, IgRE:IFN- γ response element

図6：HSc025は、YB-1の核内移行を促進することで、TGF- β 誘導性のコラーゲン発現を抑制する。これまでに、IFN- γ がCOL1A2の転写を抑制する機序として、2つの経路が考えられている。ひとつは、IFN- γ によってYB-1が核内に移行すると、YB-1がCOL1A2の近位プロモーター領域にあるIFN- γ response elementと結合することにより、COL1A2の転写を抑制するものである。もうひとつは、YB-1がSmad3とco-activator p300との結合を物理的に妨害してTGF- β /Smad3シグナルを核内で阻害することにより、COL1A2の転写を抑制するというものである。今回の検討から、ヒトの皮膚線維芽細胞において、HSc025はYB-1の核内移行を促進することにより、COL1A2の転写を抑制しているものと考えられた。

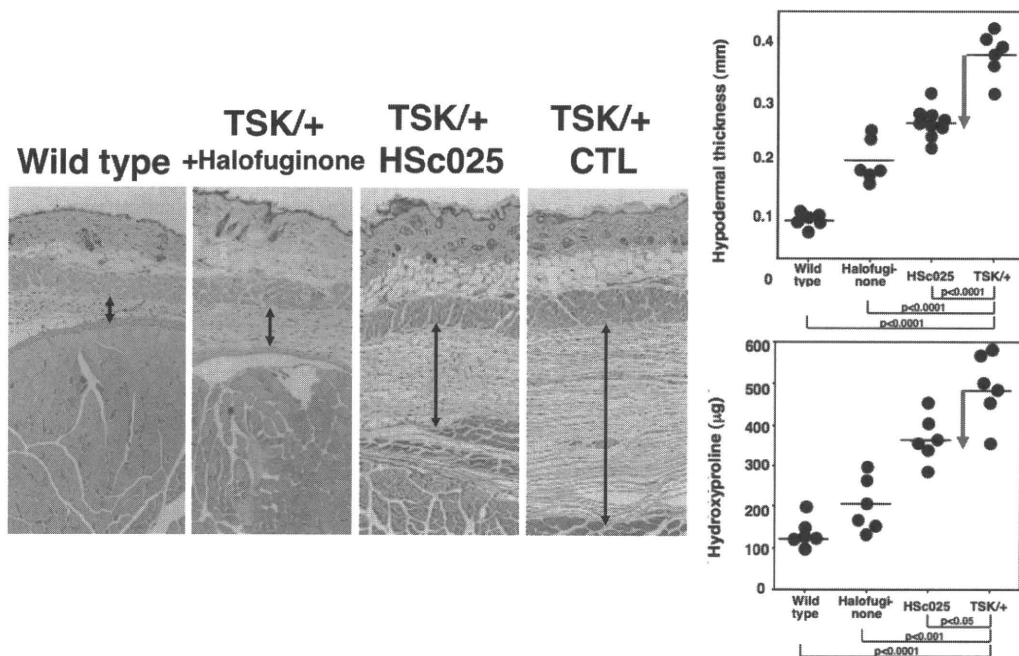
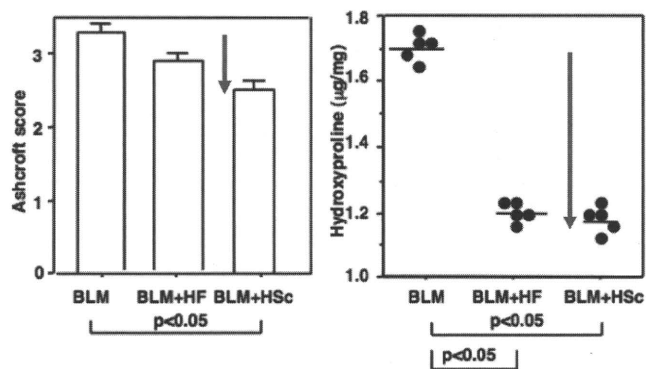
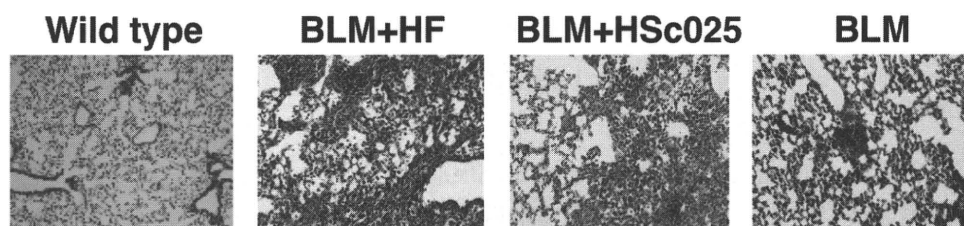


図7：HSc025はTSK/+による皮膚硬化を抑制した

TSK/+マウスに、生後4週より14日間連日HSc025を内服させて、皮膚硬化への影響をみた。比較のために、線維化抑制効果が知られているhalofuginoneを腹腔内注射した群も設けた。TSK/+マウスの皮膚にみられる皮下結合組織の肥厚やヒドロキシプロリンの増加は、HSc025の投与により、halofuginoneより劣るものの、コントロールに比べて有意に抑制された。



BLM: bleomycin, HF: halofuginone

図 8 : HSc025 はブレオマイシン誘導性の肺線維症を抑制した

ブレオマイシン誘導性の肺線維症モデルでは、halofuginone 投与群では Ashcroft スコアの有意な低下はみられなかったが、HSc025 を内服することにより有意な低下が認められた。ハイドロキシプロリン量については、HSc025 は halofuginone と同程度に低下させた。

強皮症早期重症例の長期経過観察 —中間報告—

研究協力者	長谷川稔	金沢大学医学部附属病院皮膚科 講師
研究分担者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
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
研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚科病態治療再建学 教授
研究分担者	遠藤平仁	東邦大学医療センター大森病院リウマチ膠原病センター 准教授
研究分担者	小川文秀	長崎大学病院皮膚科・アレルギー科 講師
研究分担者	川口鎮司	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 准教授
研究分担者	桑名正隆	慶応義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
研究分担者	住田孝之	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾病制御医学専攻臨床免疫学 教授
研究分担者	高橋裕樹	札幌医科大学医学部第一内科臨床免疫学 准教授
研究分担者	田中住明	北里大学病院 膠原病・リウマチ・感染内科 講師
研究分担者	藤本 学	金沢大学医薬保健研究域医学系血管新生・結合組織代謝学（皮膚科）准教授
協力者	後藤大輔	茨城県立中央病院膠原病リウマチ科 准教授
協力者	佐々木哲雄	国際医療福祉大学附属熱海病院皮膚科 教授
協力者	室 慶直	名古屋大学大学院医学系研究科皮膚結合組織病態学 准教授
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

厚生労働省の強皮症研究班と強皮症研究の有志らにより成る強皮症研究会議では、本邦における全身性強皮症（SSc）、特に臨床上問題となる発症早期の重症例の経過を把握し、病勢や予後の指標となるマーカーを明らかにするために、多施設患者登録システムによる調査を2002年1月より開始している。初回登録時から、1年ごとに臨床所見の登録と血清の採取を行った。血清を用いてのマーカーの検討は次回以降に行うこととし、今回はまず3年後まで経過を追えた87例に関して、臨床症状や検査所見の経過を解析した。他に6例が3年以内に死亡していた（2例は心筋症、4例は合併症）。初回登録時において、女性が74%、平均年齢は47歳、平均罹病期間は28ヶ月であった。抗トポイソメラーゼI抗体陽性者が64.5%、平均のmodified Rodnan total skin thickness score（MRSS）は18点、間質性肺炎を有する症例は69.4%で、平均の%VCは94.6であった。MRSSは初回登録から1年後までに最も減少傾向がみられ、その後は3年後までゆっくりと減少傾向がみられた。%VCは3年後まで大きな変動はみられなかった。3年後のMRSSを規定する因子を重回帰分析で調べたところ、初回登録時のデータのうち、MRSSや男性例と正の相関を示し、ステロイド内服ありで低下の傾向を示した。一方、3年後の%VCは、初回登録時データの中で%DLcoと正の相関、pitting scarありで低下の傾向を示した。日本人強皮症における、皮膚硬化や間質性肺炎悪化の予測因子が抽出されたが、今後さらに症例や追跡期間を延ばして確認する必要があると思われる。

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、硬化性病変によって特徴づけられる自己免疫疾患である。その原因はいまだ不明であり、皮膚や内臓の病変が発症後どのように進行するのか、ある特定の治療が有効であるのかどうかなどについても、まだよく分かっていない。また、本症には人種差がみられ、海外での知見が日本人に当てはまるとは限らない。これらを明らかにするには、SScの臨床症状、検査成績、自然経過、予後、治療の反応性などを発症早期から長期に記録をとって解析する必要がある。強皮症は比較的稀な病気であるため、一つの臨床研究機関では研究の成果を得るために必要な数が集まらない。そこで、多数の臨床研究機関で共同して行うことにした。この研究によってSScの経過が明らかになれば、ある特定の方に、病気がその後どのように進行するかを詳しく説明することができるようになり、不必要な不安を取り除くことが可能になると思われる。さらに、病気の進行を予測することによって、積極的治療の必要な症例とそうでない症例の判断に役立ったり、早期治療が可能となる。

そこで、特に予後や治療の選択が問題となる発症早期重症例患者を対象として、2002年1月以降に受診した症例を登録し、以後それらの症例に関して1年ごとに経過を追跡した。今回は2010年12月31日までに3年以上経過観察が可能であった症例において、臨床症状や検査所見の変化、症状悪化の予測因子の抽出を試みた。

B. 研究方法

1) 登録施設

金沢大学医学部附属病院、北里大学病院、熊本大

学医学部附属病院、群馬大学医学部附属病院、慶應義塾大学病院、国際医療福祉大学附属熱海病院、札幌医科大学附属病院、筑波大学医学部附属病院、東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター、東京大学医学部附属病院、長崎大学医学部附属病院、名古屋大学医学部附属病院を受診した患者を対象とした。各施設において、倫理委員会の承認を受け、登録開始時には十分な説明を行い同意を得たうえで施行した。各施設の登録データは名前が特定できないように暗号化したうえで、金沢大学大学院医学系研究科に送付され、そこでまとめて解析することとなった。

2) 対象

ここでいう早期重症例とは、①早期例(初発症状から5年以内または皮膚硬化出現から3年以内)であり、かつ②diffuse cutaneous SSc (dcSSc)、または抗topoisomerase I抗体陽性、間質性肺炎、または急速な皮膚硬化のいずれかを有するlimited cutaneous SSc (lcSSc)であるものと定義した。2002年1月以降に受診した症例を対象として、その後は1年ごとに経過登録を行った。登録した項目の中で、今回解析に用いたのは以下の項目である。

性別、登録時の年齢、発症年齢、罹病期間、modified Rodnan total skin thickness score (MRSS)、本研究班で日本人強皮症用に改良されたhealth assessment questionnaire (HAQ)¹⁾、抗トポイソメラーゼI抗体の有無、抗セントロメア抗体の有無、腱摩擦音の有無、開口距離、手の伸展距離、手指の屈曲距離、指尖潰瘍の有無、pitting scarの有無、爪かく部出血点の有無、間質性肺炎の有無(HRCTによる)、右室収縮期圧(ドップラー心エコーによる)、治療を要する不整脈の有無、上部消化管病変の有無、下部消化管病変の有無、腎クリーゼの有無、関節病変

の有無、筋病変の有無、%VC 値、%DLco 値、血清 KL-6 値上昇の有無、血清 SP-D 値上昇の有無、ステロイド内服の有無、サイクロフォスファミド投与の有無。

3) 統計的解析

統計ソフト JMP[®]7 を用いて、重回帰分析を行った。p<0.05 のときに、有意差があると判断した。

C. 研究成果

1) 初回登録時のプロフィール

登録された症例は 197 例で、3 年後まで経過を追えたものが 87 例、5 年後までが 39 例であった (図 1)。血清マーカーの解析については次回以降に行うこととし、今回はまず 3 年以上経過を追えた 87 例に関して解析した。なお、これ以外に 6 例が 3 年以内に死亡した。このうち 2 例は強皮症に関連した心筋障害によるもので、そのうち 1 例では肺高血圧症を、もう 1 例では心嚢液貯留を伴っていた。また、SSc との関連は不明であるが、敗血症と血栓性血小板減少性紫斑病で 1 例ずつ死亡していた。ANCA 関連の肺胞出血と子宮癌での死亡が 1 例ずつにみられた。

87 例のプロフィールは、男性 23 例、女性 64 例、登録時の年齢が 47 ± 16 (平均 \pm SD) 歳、罹病期間が 28 ± 27 ヶ月、modified Rodnan total skin thickness score (MRSS) が 18 ± 9 点で、HAQ-DI は 0.27 ± 0.44 あった (図 2)。自己抗体は抗トポイソメラーゼ I 抗体が 64.5%、抗セントロメア抗体陽性が 8% で陽性であった。間質性肺炎が 69.4% にみられ、右室圧上昇が 13.8% に認められた。治療を要する不整脈は 1.1%、上部消化管症状は 40.2%、下部消化管症状は 3.4%、関節病変は 25.6%、筋病変は 11.5% に認められたが、1 年前から登録までの期間に腎クリーゼを有していた症例はなかった。指尖潰瘍は 2.2% に

認められた。%VC は 94.6 ± 20.7 で、%DLco は 68.2 ± 19.8 であった。

2) 3 年間の経過

皮膚硬化の変動を MRSS で評価した場合、登録時の 17.7 ± 9.5 点から 1 年後には 13.3 ± 8.9 点まで低下した (図 3)。その後の低下は緩徐であり、2 年後が 13.0 ± 9.1 点、3 年後は 11.5 ± 8.1 点であった。間質性肺炎の悪化の指標として %VC の低下が知られているが、%VC は初回が 94.6 ± 20.7 、1 年後が 90.0 ± 23.4 、2 年後が 93.8 ± 21.0 、3 年後が 91.0 ± 20.4 点と、経過中に大きな変動はみられなかった (図 3)。%DLco も初回が 68.2 ± 19.8 、1 年後が 66.5 ± 19.6 、2 年後が 65.8 ± 19.5 、3 年後が 67.3 ± 24.2 点と、有意な変化はみられなかった。

CT で間質性肺炎を認める症例や右室収縮期圧の上昇を認める症例の割合は、ほとんど変わらなかった (図 4)。指尖潰瘍を認める症例は、初回登録時の 2.2% に比べて、1 年後以降では 10% 前後と増加がみられた。逆に、爪かく部出血点の割合は、初回の 66.7% であったのが序々に減少し、3 年後には 43.7% まで減少した。初回登録前後 (登録直後に開始を含む) にプレドニゾロン内服中の症例は 64% であったが、1 年後以降は 80% 以上の症例が内服していた。サイクロフォスファミドにて治療中の割合は、初回登録時には 13% (全例がステロイドを併用) で、その後有意な変化はみられなかった。グラフには示さないが、2 例が経過中に腎クリーゼを生じた。

4) 皮膚硬化の変動を予測する因子

次に、初回の臨床所見から 3 年後の皮膚硬化の程度、すなわち MRSS を予測出来る因子がないか、初回登録時の項目のうち、3 年後の MRSS と個々で比較的相関の高い抽出項目に関して、最小 2 乗法にて重回帰分析を行った。その結果から有意な項目を抽

出し、さらにステップワイズ法にて R^2 (決定係数) のあてはまりのよい項目を決定し、3年後の MRSS を規定する重回帰式を次のように算出した (図5)。

3年後の MRSS=11.62+0.44*初回の MRSS+初回のステロイド内服の有無 (“あり”→-3.29、“なし”→3.29)+性別 (“女性”→-1.59、“男性”→1.59)+-0.12*初回の開口距離 (mm) ($R^2=0.37$ 、初回の MRSS : $p<0.0001$ 、初回のステロイド内服の有無 : $p=0.002$ 、性別 : $p=0.11$ 、開口距離 : $p=0.08$)。この結果から、3年後の MRSS に影響する因子として、初回登録時のデータの中で最も関連するのは MRSS で、次いでステロイド内服により低下する傾向がみられた。また、男性例で高い傾向がみられ、開口距離と相関する傾向がみられた。

同様の方法で間質性肺炎の重症度の指標として、3年後の %VC を予測する因子を検討した (図6)。3年後の %VC=70.3+0.33*初回の %DLco+pitting scar (“あり”→-8.73、“なし”→8.73)+SP-D 上昇 (“あり”→-5.14、“なし”→5.14)+性別 (“女性”→4.68、“男性”→-4.68) ($R^2=0.49$ 、初回の %DLco : $p=0.004$ 、pitting scar : $p=0.01$ 、SP-D 上昇 : $p=0.11$ 、性別 : $p=0.13$)。このように、3年後の %VC に影響する因子として、初回登録時のデータの中で最も関連するのは、pitting scar のある症例で低下するというものであった。次いで %DLco (初回の %VC とは有意な相関なし) と有意に相関し、他に SP-D 上昇例や男性で低下する傾向がみられた。なお、3年後の %DLco は、個々の症例であまり変動がないのか、初回のデータの中では %DLco のみと強く相関した。

D. 考案

3年間経過を追跡できた日本人強皮症の早期重症例 87 例に関して、臨床症状や検査データの推移、3

年後の皮膚硬化や間質性肺炎の重症度を予測する指標を検討した。

3年後までの経過の中で、MRSS は最初の1年間に平均で4点以上の低下がみられ、その後は緩徐な低下がみられたのみであった。この傾向は、2008年に我々が単一施設 (金沢大学) より報告²⁾したものと同一傾向であった。1年目に低下が大きい理由はわからないが、以前の金沢大学での検討では、ステロイドの投与量が1年後までが1番多く、その影響があるものと考えられた。残念ながら、今回の検討では、全症例のステロイドの投与量は把握できなかった。%VC や %DLco は、3年後まで横ばいかわずかに低下する傾向がみられた。これも、以前の金沢大学での検討結果と類似していた。今回の参加施設では、間質性肺炎の悪化傾向がみられた場合には速やかにサイクロフォスファミドパルス療法などの免疫抑制薬の併用を施行しているようであり、このため初回登録以後に悪化する症例が少なかった可能性がある。もうひとつの可能性としては、もともとILDの病勢が落ち着いていた症例が多かったものと思われる。実際に、間質性肺炎を有する症例の頻度は経過中にほとんど増えておらず、間質性肺炎は発症早期に出現することが多く、出現するとすれば、専門施設にかかる時点ですでに確認されることが多いようである。

指尖潰瘍を有する症例は、初回登録時には約2%であったが、1年後以降は10%前後に増えた。罹病期間に伴った血管障害の進行という説明も可能かもしれないが、最初の1年での増加がそれには大きいように思われる。この理由はよくわからないが、ステロイド治療に伴う凝固の亢進や動脈硬化の促進などの影響でないか、今後検討が必要と思われる。一方で、爪かく部出血点は経過とともに減少傾向を示

した。爪かく部出血点は、通常 SSc の病勢の強い時期にみられることが知られており³⁾、経過とともに、あるいはステロイドなどの治療により、病勢が抑制された可能性がある。ただし、その確認には、キャピラリースコープを用いて、出血点以外の血管の変化を評価する必要があると思われる。

さて、本プロジェクトの主たる目的は、皮膚硬化や肺などの内臓病変の悪化を予測する因子を明らかにすることである。初回登録時の所見の中で、3年後の MRSS を予測する重回帰式を求めたところ、初回の MRSS と正の相関、ステロイド内服と負の相関を示した。また、男性例では高値を示し、開口距離と負の相関を示す傾向がみられた。初回の MRSS と相関するのは予想された結果だが、ステロイド内服と相関して MRSS が低下することが明らかとなった。他に相関は弱い、男性例で MRSS が高い傾向、MRSS が開口距離と負の相関を示す傾向がみられた。ステロイド治療に関しては腎クリーゼを誘発するという報告もあるが、3年間で腎クリーゼを生じたのは2例のみで、うち1例がステロイドを内服しており、明らかな関連はみられなかった。腱摩擦音との相関も予想されたが、施設によってその頻度に差がみられたことから、手技や判定にばらつきが生じて有意な相関が検出できなかった可能性はある。自己抗体との関連では、抗 RNA ポリメラーゼ抗体については、全施設では検索できなかったため解析できなかった。早期重症例に絞って解析している性格上、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が多く、抗セントロメア抗体陽性例が少なかったこともあるせいか、自己抗体との有意な関連はみられなかった。重回帰式の R^2 は十分に大きくなかったが、施設や症例によっては MRSS を測定した医師が、年によって異なっており、MRSS の判定自体にも多少ばらつきが

あった可能性は否定できない。

3年後の %VC に関しては、興味深いことに初回登録時の pitting scar の存在が %VC の低下と最もよく相関した。他に、初回登録時の %VC ではなく、%DLco が有意に相関を示した。他には、相関は弱いが SP-D の上昇例や男性例で %VC が低下する傾向がみられた。KL-6 の上昇、自己抗体、治療などとの関連はみられなかった。3年後の %DLco については、初回登録時のデータの中では %DLco のみで規定されてしまい、3年間あまり変動がなく、他の要因の影響を受けにくいものと思われた。日本人強皮症の特徴と一致して、今回の検討では肺高血圧を有する症例が少なかったが、肺高血圧を有する症例では %DLco が %VC に比べて顕著に低下することが知られているので、3年後の %VC や %DLco を予測する際に注意すべきと思われる。Pitting scar と %VC の低下との関連の理由はよくわからないが、皮膚と肺で臓器は異なっても、末梢に血流が届きにくいことが共通の要因になっているのかもしれない。

3年間の間に死亡した症例は6例であった。2例は強皮症に関連した心病変であり、ANCA 関連血管炎、TTP、敗血症、癌などの合併症で1例ずつ亡くなっていた。死亡例については数が少なく、今回は詳しい検討を行わなかったが、今後症例が増えるようであれば、その特徴や危険因子についても解析したい。

今後さらに3年この臨床研究を継続し、少なくとも5年以上の経過を追った症例に関して同様の解析を行って今回の知見を確認したい。また、これまでに集めた血清を用いて、各種のサイトカイン、ケモカイン、細胞成長因子、可溶性接着分子などを測定し、病勢や予後の指標となるものを特定したい。

E. 結論

今回の検討で、皮膚硬化の治療としてステロイド内服が有効であることが示唆された。また、pitting scar や%DLco の低下は、間質性肺炎によるその後の%VC の低下を示唆するものと思われた。今後、さらに症例の集積とより長期の経過追跡が必要と考えられた。

F. 文献

1. Kuwana M, Sato S, Kikuchi K, et al. Evaluation of functional disability using the health assessment questionnaire in Japanese patients with systemic sclerosis. J Rheumatol. 2003; 30: 1253-8.
2. Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, et al. Serum chemokine and cytokine levels as indicators of disease activity in patients with sys-

temic sclerosis. Clin Rheumatol. 2010 [Epub ahead of print].

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

謝辞

共著者に記載できなかったものの、各施設で本調査にご協力いただいた各先生方、統計解析についてご助言いただいた金沢大学大学院保健学の井上克己先生に深謝いたします。そして、各施設の登録票をデータ入力いただいた金沢大学皮膚科の林朋子さんと山田裕子さんに感謝いたします。

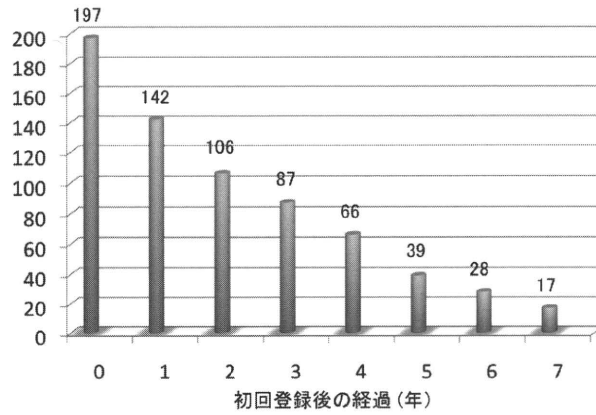


図1：これまでの登録症例数。197例の登録のうち、87例は少なくとも3年まで経過を追えており、今回はこの87例に関して解析した。

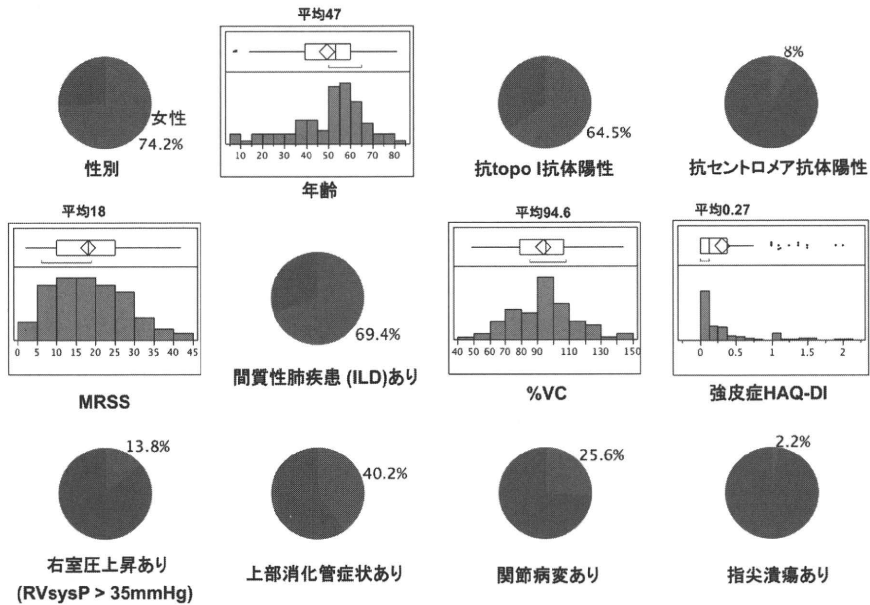


図2：初回登録時の87例の主要なプロフィールを示す。

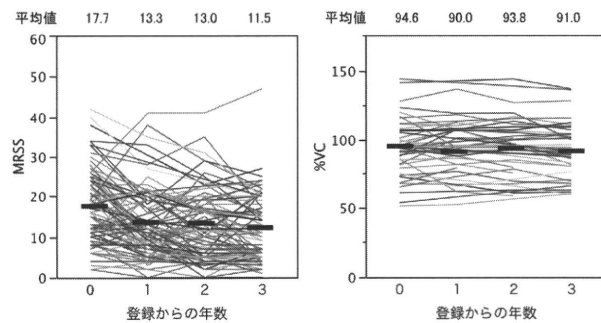


図3：3年間の全症例の経過。(A) MRSSの経時的な変化。(B) %VCの経時的な変化。短い太い横線は平均値を示す。

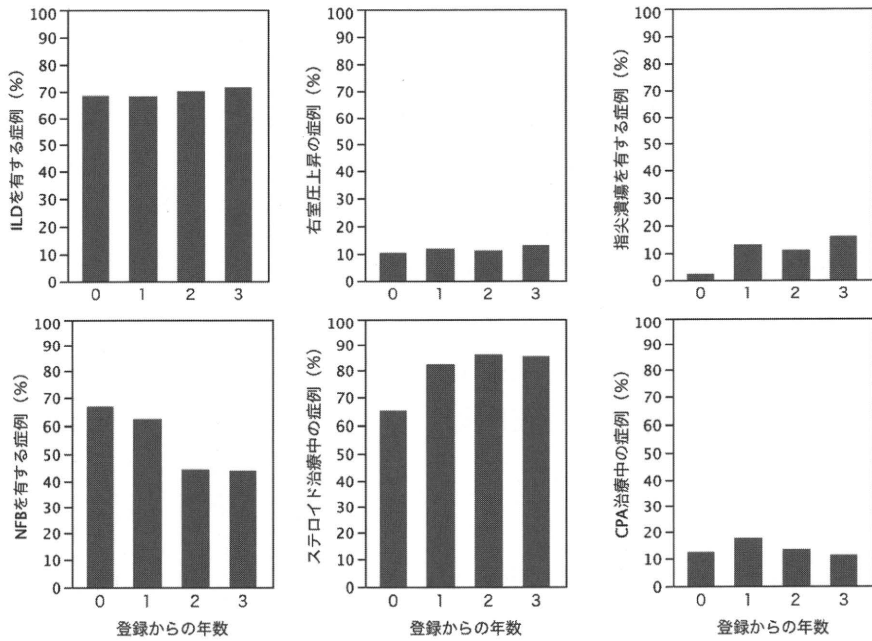


図4：3年間の臨床所見の頻度や治療内容の頻度の変化。

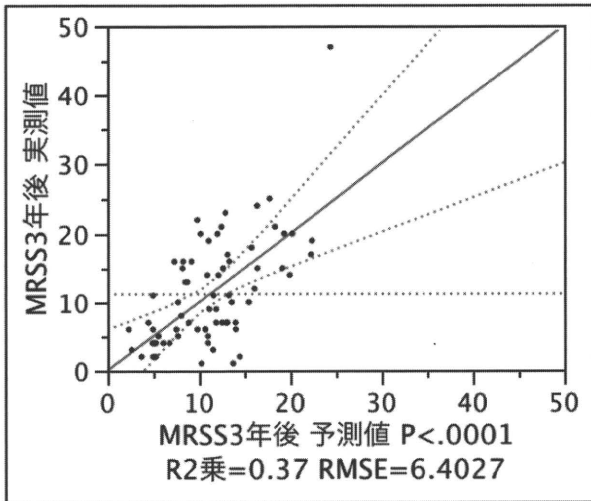


図5：初回登録時の因子から3年後のMRSSを予測する重回帰式のあてはまり具合を示す予測値と実測値のプロット。

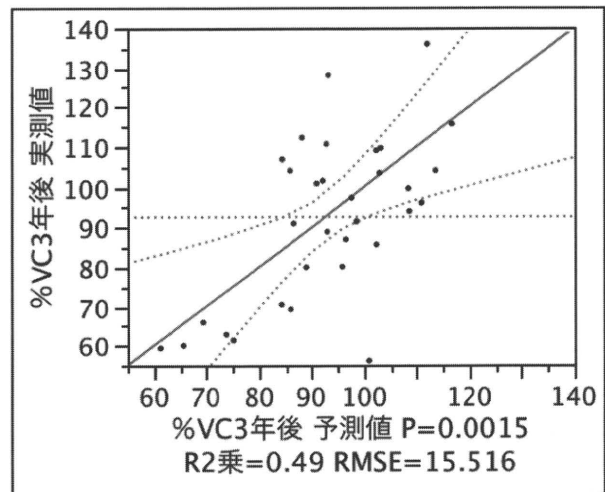


図6：初回登録時の因子から3年後の%VCを予測する重回帰式のあてはまり具合を示す予測値と実測値のプロット。

サイクロフォスファミドパルス療法後にシクロスポリンによる 後療法を要した活動性間質性肺炎合併全身性強皮症

研究協力者 小寺雅也 社会保険中京病院皮膚科 医長
協力者 白田俊和 社会保険中京病院皮膚科 部長
協力者 飯島亜由子 社会保険中京病院皮膚科
協力者 村瀬由美 社会保険中京病院皮膚科
協力者 加藤恵子 社会保険中京病院皮膚科
協力者 岩田洋平 社会保険中京病院皮膚科

研究要旨

活動性間質性肺炎を伴った全身性強皮症2例に対してサイクロフォスファミドパルス療法と後療法としてシクロスポリンを投与した。症例1は55歳男性、活動性間質性肺炎合併全身性強皮症に対し、ステロイド剤に加えサイクロフォスファミドパルス療法施行した。一旦小康得るも、3ヶ月後より間質性肺炎の再燃傾向を認めため、シクロスポリン内服を開始した。症例2は53歳男性、全身性エリテマトーデスと全身性強皮症のOverlap症候群。ステロイド、サイクロフォスファミド内服するも間質性肺炎は増悪し、サイクロフォスファミドパルス療法と後療法シクロスポリン投与した。間質性肺炎の安定化にシクロスポリンの併用を必要とした2例であった。サイクロフォスファミド間欠静注療法の後療法の必要性を考えさせられた。

A. 研究目的

全身性強皮症における活動性間質性肺炎に対して行われるサイクロフォスファミド間欠静注療法の後療法の必要性について

B. 研究方法

症例報告。全身性強皮症における活動性間質性肺炎に対してサイクロフォスファミドパルス療法と後療法としてシクロスポリンを投与する際、患者に対してその利点および危険性に関して十分な説明を行い、同意を得た。

C. 研究結果

症例(1): 55歳 男性

主 訴: 拡大傾向の皮膚硬化と咳嗽

家族歴: 既往歴: 特記すべきことなし

現病歴: 初診の5ヶ月前より乾性咳嗽が出現した。

3ヶ月前より全身倦怠感、レイノー症状、手指のむくみ感を自覚し、平成17年10月25日当科初診。皮膚硬化(m-TSS=8)、抗核抗体陽性、肺底部のごく軽度の間質性肺炎より全身性強皮症と診断した。初診より3ヶ月間で皮膚硬化が進行し、PSL 20mgより投与開始。8ヶ月後、乾性咳嗽の増悪、間質性肺炎血清マーカーの上昇、気管支肺胞洗浄液細胞分析、胸部CT所見、ガリウムシンチ所見より、活動性間質