

201128185A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業
強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 伸一

平成24年（2012年）3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業
強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 伸一

平成24年（2012年）3月

【目次】

班員名簿

I. 総括研究報告

- 強皮症における病因解明と根治的治療法の開発…………… 1
研究代表者 佐藤伸一（東京大学医学部附属病院 皮膚科）

II. 分担研究報告

1. 本邦の強皮症早期重症例の経過に関する多施設共同研究—予後の指標の検索—…………… 5
研究協力者 長谷川稔（金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学(皮膚科)）
研究分担者 浅野善英, 石川 治, 尹 浩信, 遠藤平仁, 川口鎮司, 桑名正隆
後藤大輔, 高橋裕樹, 藤本 学
研究協力者 小川文秀, 田中住明
協力者 竹原和彦
研究代表者 佐藤伸一
2. 強皮症に伴う間質性肺疾患の自然経過の検討…………… 12
研究分担者 桑名正隆（慶應義塾大学医学部リウマチ内科）
3. 全身性強皮症に伴う早期 PAH の診断方法…………… 19
研究分担者 川口鎮司（東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病）
協力者 高木香恵, 大田ゆう子, 栃本明子
4. 強皮症に対する運動負荷心エコーの血行動態評価を含めた有用性の検討…………… 24
研究分担者 波多野将（東京大学医学部附属病院 循環器内科）
研究分担者 浅野善英
協力者 稲葉俊郎, 牧 尚孝, 今村輝彦, 志賀太郎, 八尾厚史, 絹川弘一郎
永井良三, 住田隼一, 高橋岳浩, 遠山哲夫, 市村洋平, 谷口隆志
玉城善史郎
研究代表者 佐藤伸一
5. 全身性強皮症に伴う肺高血圧症（SSc-PH）の血行動態的特徴…………… 31
研究分担者 波多野将（東京大学医学部附属病院 循環器内科）
研究分担者 浅野善英
協力者 稲葉俊郎, 牧 尚孝, 八尾厚史, 絹川弘一郎, 平田恭信, 永井良三
市村洋平, 高橋岳浩, 遠山哲夫
研究代表者 佐藤伸一
6. 強皮症の肺病変の評価における 6 分間歩行後の前額部経皮的…………… 37
末梢酸素飽和度測定の有用性の検討 第 2 報
研究協力者 麦井直樹（金沢大学附属病院リハビリテーション部）
研究協力者 長谷川稔

研究分担者 藤本学
協力者 井上克己, 染矢富士子, 八幡徹太郎, 堀江翔, 竹原和彦
研究代表者 佐藤伸一

7. ブレオマイシン誘導性の皮膚硬化形成に IL-17A が関与している…………… 42
研究代表者 長谷川稔 (金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学(皮膚科))
協力者 岡本芳伸, 松下貴史, 濱口儒人, 竹原和彦
研究分担者 藤本 学
8. ブレオマイシン誘導性皮膚硬化における Sunitinib の効果について ～第2報～…………… 48
研究分担者 山本俊幸 (福島県立医科大学医学部 皮膚科)
研究協力者 大橋威信
9. マウス sclerodermatous chronic graft-versus-host disease モデルにおける IL-6 阻害療法の効果について…………… 50
研究分担者 藤本 学 (金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学(皮膚科))
研究協力者 長谷川稔
協力者 Le Huu Doanh, 松下貴史, 竹原和彦
研究代表者 佐藤伸一
10. 血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスにおける創傷治癒異常についての検討…………… 55
研究分担者 浅野善英 (東京大学医学部附属病院 皮膚科)
研究協力者 Maria Trojanowska Professor, Arthritis Center
研究代表者 佐藤伸一
11. 強皮症の線維化病態における Notch シグナルの関与…………… 62
研究分担者 川口鎮司 (東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病)
協力者 高木香恵, 深澤千賀子, 栃本明子, 大田ゆう子
12. 全身性强皮症の皮膚線維化における microRNA-196a の関与の検討…………… 67
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学)
協力者 本多教稔, 神人正寿, 牧野貴充, 牧野勝成, 岡本芳伸, 長谷川稔
研究分担者 藤本 学
13. 全身性强皮症における discoidin domain receptor 2 (DDR2) の機能の検討…………… 80
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学)
協力者 牧野雄成, 神人正寿
14. 全身性强皮症の皮膚線維化に対する細胞老化の関与…………… 88
研究協力者 小川文秀 (長崎大学病院皮膚科・アレルギー科)
研究代表者 佐藤伸一
15. ボセンタンが強皮症皮膚線維芽細胞に対して抗線維化作用を示す分子メカニズムについての検討…………… 91
研究分担者 浅野善英 (東京大学医学部附属病院 皮膚科)

- 協力者 赤股 要
研究代表者 佐藤伸一
16. アトルバスタチンの皮膚線維芽細胞におよぼす影響…………… 97
研究分担者 川口鎮司（東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病）
協力者 大田ゆう子，高木香恵，栃本明子
17. サリドマイドによる全身性強皮症患者由来真皮線維芽細胞への影響…………… 102
研究分担者 石川 治（群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学）
協力者 上原顕仁，横山洋子，安部正敏
研究代表者 佐藤伸一
18. 全身性強皮症患者皮膚線維芽細胞における vascular endothelial growth factor (VEGF) の
発現調節…………… 107
研究分担者 尹 浩信（熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学）
協力者 梶原一亨，神人正寿，本多教稔，牧野雄成，牧野貴充
19. 強皮症の末梢血管障害における MFG-E8 の関与…………… 114
研究分担者 石川 治（群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学）
協力者 茂木精一郎，服部友保，荻野幸子
20. 全身性強皮症とユビキチン結合酵素 UBE2L3 遺伝子多型の関連…………… 121
研究協力者 土屋尚之（筑波大学医学医療系 分子遺伝疫学）
協力者 長谷部成美，川崎 綾，伊東郁恵，川本 学
研究協力者 長谷川稔
研究分担者 藤本 学，川口鎮司
協力者 古川 宏，當間重人，住田孝之，竹原和彦
研究代表者 佐藤伸一
21. 全身性強皮症患者における CD161 陽性 V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の解析…………… 126
研究分担者 後藤大輔（筑波大学大学院 人間総合科学研究科 膠原病リウマチアレルギー内科）
協力者 瀬川誠司，堀越正信，松本 功，住田孝之
22. 全身性強皮症患者における血清 Ang2 濃度の臨床的意義について…………… 131
研究分担者 浅野善英（東京大学医学部附属病院 皮膚科）
協力者 高橋岳浩，市村洋平，遠山哲夫，谷口隆志，青笹尚彦，赤股 要，住田隼一
研究代表者 佐藤伸一
23. 全身性強皮症の病態におけるアディポネクチンの役割および血清中アディポネクチン濃度
の臨床的意義についての検討…………… 137
研究代表者 佐藤伸一（東京大学医学部附属病院 皮膚科）
研究分担者 浅野善英
協力者 住田隼一，増井友里，築場広一，玉城善史郎，高橋岳浩，赤股 要
青笹尚彦，谷口隆志，野田真史，市村洋平，遠山哲夫

24. 全身性強皮症消化管障害における FGF19 測定の意義……………	144
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)	
協力者 楠 芳恵, 山本竜大, 川合眞一	
25. 全身性強皮症に合併した肺動脈性肺高血圧症の血行動態に関する研究……………	147
研究協力者 田中住明 (北里大学 医学部膠原病・感染内科学)	
協力者 和田達彦, 小川英佑, 広畑俊成	
26. 全身性強皮症患者における皮膚潰瘍発生の危険因子の検討……………	151
研究分担者 藤本 学 (金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学(皮膚科))	
研究協力者 長谷川稔, 水野美幸, 石井貴之, 松下貴史, 濱口儒人, 竹原和彦	
研究代表者 佐藤伸一	
27. CK 上昇を呈する全身性強皮症症例の臨床的特徴の検討……………	157
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)	
協力者 山本元久, 鈴木知佐子	
28. 当科における全身性強皮症と関節リウマチ合併例の検討……………	162
研究分担者 石川 治 (群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学)	
協力者 服部友保, 永井弥生, 田中摂子,	
研究代表者 佐藤伸一	
29. 非典型的経過をたどった強皮症腎クリーゼに関する検討……………	167
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)	
協力者 楠 芳恵, 川合眞一	
30. 間質性肺病変、皮膚硬化に対しシクロフォスファミド大量静注療法が奏功した全身性強皮症の 1 例……………	172
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学)	
協力者 牧野貴充, 神人正寿, 梶原一亨, 牧野雄成, 本多教稔	
31. 著明な皮膚硬化に対して、複数回の大量免疫グロブリン静注療法 (IVIg) が有効である抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体陽性全身性強皮症……………	176
研究協力者 小寺雅也 (社会保険中京病院皮膚科)	
協力者 白田俊和, 関谷徳子, 大城宏治, 岩田洋平, 山岡俊文	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	181

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発班 班員名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
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
研究分担者	浅野 善英	東京大学医学部附属病院 皮膚科	講師
	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学	教授
	尹 浩信	熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学	教授
	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
	川口 鎮司	東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病	臨床教授
	桑名 正隆	慶應義塾大学医学部リウマチ内科	准教授
	後藤 大輔	筑波大学大学院 人間総合科学研究科 膠原病リウマチアレルギー ー内科	准教授
	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
	波多野 将	東京大学医学部附属病院 循環器内科	助教
	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学(皮膚科)	准教授
山本 俊幸	福島県立医科大学医学部 皮膚科	教授	
研究協力者	小川 文秀	長崎大学病院皮膚科・アレルギー科	講師
	土屋 尚之	筑波大学医学医療系 分子遺伝疫学	教授
	田中 住明	北里大学 医学部膠原病・感染内科学	診療准教授
	長谷川 稔	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学(皮膚科)	講師
	小寺 雅也	社会保険中京病院皮膚科	医長
	麦井 直樹	金沢大学附属病院リハビリテーション部	作業療法士

I. 総括研究報告

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

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病態学 教授
研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学 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	川口鎮司	東京女子医科大学附属病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病 臨床教授
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	後藤大輔	筑波大学大学院 人間総合科学研究科 膠原病リウマチアレルギー内科 准教授
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	波多野将	東京大学医学部附属病院 循環器内科 助教
研究分担者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学 (皮膚科) 准教授
研究分担者	山本俊幸	福島県立医科大学医学部 皮膚科 教授

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は皮膚および肺、腎、消化管、心をはじめとする内臓諸臓器を系統的に侵す慢性疾患であり、膠原病に分類される。SSc は 1) 膠原線維の増生 (皮膚硬化、肺線維症)、2) 血管病変 (レイノー症状、指尖部虫喰状癬痕・潰瘍、肺高血圧症、SSc 腎クリーゼ)、3) 自己免疫 (自己抗体) といった 3 つの病態よりなる。しかし、①各主要病態がどのような機序で起こるのか、②各主要病態の間にはどのような因果関係が存在するのかについては未だ不明といわざるを得ない。従って、現時点ではこの 3 つの病態を統一的に説明する一元化された病態仮説は見いだされていない。

そこで、本研究では、一元化病態仮説を提示するために、①各主要病態についてさらに深く解析する。そして、それによって主要病態間の関連性についての手がかりをつかむ、② Fli1 という転写因子に注目し、Fli1 に基づいた一元化病態仮説が可能かどうかを検討する、③一元化病態仮説の中心となる分子の同定のために、疾患感受性遺伝子を検索する、などといったアプローチをとる。

SSc 治療の進歩により、ある程度の有効性を示す薬剤が同定されてきた。しかし、進行した症例では有効性は低くなるだけではなく、副作用のためむしろ有害である場合もある。同様の考え方は国際的にも最近強調されつつある。従って、早期診断・早期治療が既存の治療法の有効性を高める最も効果的な方法である。この観点から、早期診断基準案を作成するとともに、早期診断に関連する臓器病変の評価法の確立、予後予測因子の抽出などを旨とする。さらに、2002 年に開始された重症型 SSc 早期例の登録・経過観察事業を継続し、さらに活動性や予後と関連する因子などの解析を続ける。これにより早期診断された症例のうち早期治療を行うべき症例の抽出が可能となることが期待される。

B. 研究方法と研究結果

1. 基礎研究

(1) SSc 主要病態の発症メカニズムの解析

健常者、SSc 患者の皮膚線維芽細胞において Notch1、2、3 とそのリガンドである DLL1、DLL4、JAG1 の発現を解析した。また、SSc における mi-

croRNA の関与を明らかにするため、正常及び SSc 由来皮膚線維芽細胞より microRNA を抽出しアレイで網羅的に比較した。さらに、びまん皮膚硬化型 SSc 5 例の皮膚線維芽細胞に、アトロバスタチンを添加し、培養上清を採取後、培養上清中のコラーゲン量、IL-6 濃度を ELISA kit を用いて測定した。

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルに対して、sunitinib を 3 週間経口投与し、あるいは IL-17 を欠損させて、その効果を解析した。また、別の動物モデルである SSc 様慢性 GVHD モデルにおいて抗 IL-6R 抗体を投与し、その効果について検討した。

また、ELISA を用いて、血清中アンジオポエチン-2 およびアディポネクチン濃度の臨床的意義について解析した。

(2) Fli1 による SSc 病態の一元化モデルの作成

血管内皮細胞特異的 Fli1 欠損マウスが著明な創傷治癒遅延を示すことに着目し、その機序について解析を行った。また、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンは、SSc 由来肺線維芽細胞に対して強力な抗線維化作用を示すことから、SSc 由来皮膚線維芽細胞におけるボセンタンの抗線維化作用の分子メカニズムについて Fli1 との関連性を中心に検討を行った。

(3) 疾患感受性遺伝子同定プロジェクト

UBE2L3 はユビキチン結合酵素をコードする遺伝子であり、その遺伝子多型と SSc との関連を解析した。

2. 臨床研究

(1) 早期診断のシステム開発

SSc で見られる臓器病変について、早期診断や予後予測に関連する臨床研究を行った。

(2) SSc の活動性、予後予測因子の抽出

2002 年から重症型 SSc 早期例の登録事業を行い、毎年臨床データおよび血清を集積・保存している。

このデータベースから、SSc の活動性や予後を反映する分子を同定するために解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子研究、臨床データの集積などに当たっては、各施設の倫理委員会で承認を得た後、患者への十分なインフォームドコンセントの元に行った。また、動物実験に当たっては、各施設の承認を得るとともに、快適な環境下での飼育や安楽死に十分配慮した。

C. 結論

1. 基礎研究

(1) SSc 主要病態の発症メカニズムの解析

線維化病態との関連性が報告されている Notch シグナルについて、健常者、SSc 患者の皮膚線維芽細胞にはともに Notch1、2、3 とそのリガンドである DLL1、DLL4、JAG1 の発現を認め、Notch1、3 発現量は mRNA、蛋白ともに健常者皮膚線維芽細胞のほうが SSc 患者より高かった。従って、Notch シグナルの SSc 線維化への関与が示唆された (川口)。

さらに、SSc における microRNA の関与を明らかにするため、正常及び SSc 由来皮膚線維芽細胞より microRNA を抽出しアレイで網羅的に比較した結果、microRNA196a の発現が SSc 由来皮膚線維芽細胞で減少していることを見だし、microRNA196a が線維化に関与している可能性が明らかとなった (尹)。

SSc 由来皮膚線維芽細胞におけるアトロバスタチンの作用について検討したところ、アトロバスタチンは、濃度依存的に線維芽細胞の産生するコラーゲン、IL-6 を有意に抑制した。従って、SSc 皮膚線維芽細胞においてアトロバスタチンが抗線維化作用を有することが示唆された (川口)。

ブレオマイシン皮膚硬化モデルにおいて、sunitinib は、皮膚硬化を抑制したが、肺線維症を改善する効果は認められなかった (山本)。

また、同モデルに IL-17 を欠損させると、皮膚の炎症や硬化が軽減した。IL-17 の欠損により、ブレオマイシン投与中の皮膚における TGF- β と CTGF の発現が低下した。さらに、培養皮膚線維芽細胞への IL-17 の添加は、コラーゲン産生を促進した。IL-17 が線維化誘導に関与していることが示唆された（長谷川）。SSc 様慢性 GVHD モデルにおいて、抗 IL-6R 抗体の投与は重症度を有意に抑制し、その効果は制御性 T 細胞を介するものであることが示唆された（藤本）。

血清中アンジオポエチン -2 およびアディポネクチン濃度の臨床的意義を検討したところ、アンジオポエチン -2 は肺線維症の活動性と、アディポネクチンは皮膚硬化および肺線維症の活動性と相関していることが明らかとなった（浅野）。

(2) Fli1 による SSc 病態の一元化モデルの作成

転写因子 Fli1 による一元化モデルの作成については、これまでに、血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスでは SSc に伴う血管障害の病理組織学的な特徴（血管周皮細胞の恒常的活性化、細動脈の狭窄、毛細血管拡張）を再現できることを報告してきたが、今回は、同マウスが著明な創傷治癒遅延を示すことに着目し、SSc に伴う血管障害が創傷治癒遅延を引き起こしている機序を明らかにした（浅野）。

さらに、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンは、SSc 由来肺線維芽細胞に対して強力な抗線維化作用を示すが、その作用は Fli1 を介していることを明らかにした。従って、Fli1 をターゲットとした治療法の候補薬剤としてボセンタンを同定しえた（浅野）。

(3) 疾患感受性遺伝子同定プロジェクト

UBE2L3 について、SSc 群全体では有意な関連は見られなかったものの、rs2298428 T/T 遺伝子型頻度が、びまん皮膚硬化型 SSc 群、間質性肺病変合併群

で有意に増加し、T アリル頻度が、抗 topoisomerase I 抗体陽性群に有意に増加していた（土屋）。

2. 臨床研究

(1) 早期診断のシステム開発

早期診断のシステム開発のために、早期診断基準案を作成するとともに、早期診断や予後予測に関連する臨床研究を行った。

SSc に伴う間質性肺疾患と診断された 50 例の経時的な肺機能の推移を履歴的に調べたところ、末期肺病変を予測する診断時所見としてびまん皮膚硬化型、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性、労作時息切れ、KL-6 上昇、%FVC 低下、%DLco 低下が抽出された。多変量解析では診断時の労作時息切れと KL-6 上昇が末期肺病変への進展を予測する独立した危険因子として同定された（桑名）。

SSc 40 症例に対して運動負荷心エコー、右心カテを施行した。運動負荷で右室圧 20 mmHg 以上の上昇を認めたのは 13 例あり、それらは呼吸機能で拡散障害があり、間質性肺炎の合併、心拍出量の低下、肺動脈圧の上昇を認める症例、のいずれかであり、早期の肺高血圧診断を含め SSc の隠れた病態進行をスクリーニングできる可能性が示唆された（波多野）

SSc 117 例を対象に 6 分間歩行を実施し、歩行距離と SpO₂ の低下について検討を行った結果、6 分間歩行は歩行距離が肺高血圧症の指標となるだけでなく、SpO₂ の低下に着目すれば、間質性肺炎の活動性の指標として有用であることが示唆された。また、肺高血圧症や間質性肺炎の早期診断に役立つ可能性も考えられた（麦井）。

SSc 181 例において、肢端潰瘍発生に関与する危険因子について検討した。初診時あるいは経過中に肢端潰瘍を 34 例に認めた。Logistic 回帰分析にて、肢端潰瘍発生と指尖陥凹性癬痕の存在、%VC 低下に有意な相関を認めた（藤本）。

小腸で合成されホルモン様作用を示す FGF のサブタイプである FGF19 の SSc 患者における血清中濃度は、健常人と比較して有意に低値を示し、特に腸管障害を伴う SSc は低値であり日内変動もなく脂肪酸呼気試験の結果と相関していた。従って、FGF19 測定は SSc 消化管病変の診断に有用であることが示された（遠藤）。

(2) SSc の活動性、予後予測因子の抽出

重症型の SSc 早期例の登録および経過観察プロジェクトにおいて、MCP-1、MIG、IP-10、IL-8 が皮

膚硬化の変化と相関があることを明らかにした（長谷川）。

D. 結 論

以上の研究成果より、SSc の主要病態、特に線維化が起こるメカニズムの解明、SSc の一元化病態仮説の確立において進歩が見られた。また、早期診断に関連する臓器病変の評価法の確立、予後予測因子の抽出などにおいても成果が得られた。

II. 分担研究報告

本邦の強皮症早期重症例の経過に関する多施設共同研究 —予後の指標の検索—

研究協力者	長谷川稔	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学（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病態学 教授
研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学 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
研究協力者	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病院膠原病リウマチ痛風センター膠原病 臨床教授
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	後藤大輔	筑波大学大学院人間総合科学研究科膠原病リウマチアレルギー内科 准教授
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
研究協力者	田中住明	北里大学 医学部膠原病・感染内科学診療 准教授
研究分担者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学（皮膚科）准教授
協力者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科血管新生・結合組織代謝学（皮膚科）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。今回は、初回登録時から4年後まで、5回欠かさずに臨床データと血清を採取できた39例に限定して解析した。5種類の代表的なケモカインの血中濃度をCytometric Beads Arrayを用いて測定し、それらが症状の変化を予測する因子として有用かどうかを検討した。SScでは、IP-10, MCP-1, MIG, IL-8が初回から4年後まで健常コントロールよりも高値で推移したが、RANTESは健常人と差がみられなかった。各時点でのそれぞれのケモカイン濃度とその時点やその後の臨床症状の重症度との相関を単変量解析で検討したところ、初回のIL-8の濃度は1年後や2年後のmodified Rodnan total skin thickness score（MRSS）と相関し、1年後のIL-8の濃度は、2年後や3年後のMRSSと有意な相関がみられた。また、初回のIL-8は4年後までの毎回のHAQ-DIと有意な相関を示した。この傾向を多変量解析で確認したところ、初回のIL-8濃度は4年後のMRSSやHAQ-DIを有意に規定する因子として抽出された。このことから、血清中のIL-8の濃度は、皮膚硬化や身体的機能障害の予後の予測に役立つ可能性が考えられた。しかし、今回の検討ではまだ症例数が少ないため、皮膚硬化や間質性肺炎などの内臓病変の予後を明らかにするためには、より多くの症例で、長期の経過における検討が必要と考えられた。

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を区別したり、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各施設で登録し、以後それらの症例を1年ごとに経過追跡した。今回は2011年3月31日までに初回登録から4年後までの5回欠かさず臨床データと血清を採取できた症例に限って、血清中のケモカインの測定を試みたので報告する。

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、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した。

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②重症例（diffuse cutaneous SSc (dcSSc)、または抗 topoisomerase I 抗体陽性、間質性肺炎、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年ごとに経過登録と血清採取保存を行った。今回は初回登録から4年後までの5回欠かさず臨床データと血清を採取できた39症例において検討した。患者群と性別、年齢の分布が近似した健常人15例からも血清を採取した。

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、MRSS、本研究班で日本人強皮症用に改良された health assessment questionnaire-disability index (HAQ-DI)、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、その他の免疫抑制剤の有無。

3) 血清中のケモカイン濃度の測定

米国 Becton Dickinson 社の Cytometric Beads Array を用いて、血清中の 5 種類のケモカイン (IP-10, MCP-1, MIG, RANTES, IL-8) の濃度を測定した。

4) 統計的解析

統計ソフト JMP[®]7 を用いて、2 群間の単変量解析は Spearman の順位相関係数で算出した。また、4 年後などの症状と予後予測因子との相関は、多変量解析の重回帰分析を行った。p 値が 0.05 未満のときに、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

39 例のプロフィールは、男性 12 例、女性 27 例、登録時の年齢は中央値が 52.5±14.5 (平均±SD) 歳、罹病期間が 26.1±26.5 ヶ月、MRSS が 17.0±8.9 点であった。自己抗体は抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性が 25 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性が 5 例、抗セントロメア抗体陽性が 3 例であった。CT で間質性肺疾患 (ILD) が 30 例にみられ、肺高血圧を疑う所見 (心エコーで右室収縮期圧が 35mmHg 以上) が 4 例に認められた。%VC は 95.8±20.6 で、HAQ-DI は 0.29±0.42 であった。関節病変は 13 例に、指尖潰瘍は 1 例にみられた。初回登録時点でプレドニゾン内服中が 33 例で、シクロフォスファミドパルス療法の既往または施行中が 5 例であった。

2) 4 年間の臨床経過 (図 1)

経過中に 2 例が新たに PSL の内服を開始したため、経過中に 35 例が PSL の内服を行っていた。PSL の内服量の中央値は、初回が 12.5 mg/日で、1 年後は 10 mg/日まで低下、4 年後では 6 mg/日であった。

サイクロフォスファミドパルス療法は 8 例、その他の免疫抑制剤は 4 例で投与されていた。

皮膚硬化の変動を MRSS で評価した場合、MRSS の中央値は初回が 17 点、1 年後には 11 点まで低下したが、その後はほぼ横ばいで、2 年後が 11 点、3 年後が 8 点、4 年後は 9 点であった。ILD の悪化の指標として、%VC の低下がよく知られているが、%VC の中央値は初回が 95.8%、1 年後が 88.0%、2 年後が 94.7%、3 年後が 91.3%、4 年後が 90.2% と、横ばいであった (図 1C)。%DLco の中央値も、初回が 69.7%、1 年後が 67.6%、2 年後が 68.8%、3 年後が 67.4%、4 年後が 62.9% と、横ばいからやや低下であった (図 1C)。経過中に 3 例で新たに ILD が認められ、2 例で腎クリーゼがみられた。また、11 例では経過中に指尖潰瘍が出現した。

3) ケモカインの血清中濃度の変動

図 2 は、個々の症例における、各ケモカイン濃度の経過中の変動を示す。短い太い横線とグラフの上部に記載した数値は各時点での中央値を示し、参考までに健常人の中央値を長い点線の横線で示した。RANTES 以外の 4 つのケモカインは、これまでの報告と同様に、健常人よりも高値を示した。個々の症例で、経過中にかなり変動はみられるものの、中央値についてはどのケモカインも著明な変動はみられなかった。各時点でのケモカインの変動 (初回登録時を基準とした増減) と臨床症状の変化 (例えば、初回の MRSS を基準とした MRSS の増減) には、有意な相関のみられるものはなかった。すなわち、ケモカインの変動と臨床データの変動が相関するものは見つからなかった。

4) 各時点でのケモカインの濃度のその後の臨床所見との相関

そこで、次に各測定時点でのケモカインの濃度とその後の MRSS との相関を単変量解析で検定した。

表1~3のrは相関係数、pは有意差を示します。初回のIL-8の濃度は、1年後や2年後のMRSSと有意な相関を示した。また、1年後のIL-8の濃度は、2年後や3年後のMRSSと有意に相関を示した。4年後のIL-8の濃度は4年後のMRSSと有意に相関した。初回のMCP-1の濃度は1年後のMRSSの値と、1年後のMCP-1の濃度は3年後のMRSSの値と相関した。他のケモカインは、どの時点においてもMRSSと相関がみられなかった。さらに、初回のIL-8の濃度は、初回から4年後までのどの時点のHAQ-DIとも有意な相関がみられた。しかしながら、1年後以降のIL-8は、その後のHAQ-DIと何ら相関がみられなかった。他のケモカインは、どの時点においてもHAQ-DIと相関がみられなかった。ケモカインと%VC、%DLcoとの相関も検討したが、相関のみられるものはなかった。

5) 重回帰分析による予測マーカーとしての検討

このように、単変量解析では、IL-8濃度、特に初回のIL-8濃度は、その後のMRSSやHAQ-DIと相関する傾向がみられ、初期のMCP-1濃度もその後のMRSSと一部で相関する傾向がみられた。次にこれを確認するために多変量解析を行った。各時点でのケモカインの濃度と前述の多くの臨床所見の中から、4年後のMRSS、HAQ-DI、%VC、%DLco検査値を規定する因子を抽出して、重回帰式を算出した。4年後のMRSSを規定する因子として抽出されたのは、初回のMRSSと初回のIL-8濃度で、これらは4年後のMRSSと正の相関を示した（それぞれ $p < 0.0001$ と $p < 0.02$ ）。4年後のMRSSを規定する重回帰式 = $-0.53 + 0.55 \times$ 初回のMRSS + $0.0011 \times$ 初回のIL-8濃度として求められた（予測値 $p < 0.0001$, $R^2 = 0.42$, RMSE = 6.3905）。また、4年後のHAQ-DIを規定する因子として、正の相関を示すものとして初回のIL-8濃度（ $p = 0.001$ ）、負の相関を示すものと

して初回の%VC（ $p = 0.013$ ）、また有意ではないが正の相関を示すものとして初回のHAQ-DI（ $p = 0.13$ ）が抽出されました。4年後のHAQ-DIを規定する重回帰式 = $0.94 + 0.0001 \times$ 初回のIL-8濃度 + $-0.0072 \times$ 初回の%VC + $0.24 \times$ 初回のHAQ-DIとして求められた（予測値 $p < 0.0001$, $R^2 = 0.52$, RMSE = 0.3161）。なお、4年後の%VCや%DLcoを規定するケモカインは認められなかった。

6) 代表的な症例におけるIL-8濃度の変動と臨床の経過

重回帰分析の結果に合致する、代表的な症例を示す。症例は54歳の女性。抗トポイソメラーゼI抗体が陽性で、ILDを有していた。初回のMRSSが19点で、IL-8は著明な高値を示していた。初回のIL-8の上昇を反映してか、1年後にはMRSSが38点まで上昇した。初回登録時前後に開始されたプレドニンとメソトレキセートの内服の影響もあってか、1年後にはIL-8は正常値近くまで下がった。その後もMRSSは少しずつ22点まで低下してきたが、3年後にはIL-8が再び上昇し、翌年の4年後にはMRSSは26点と少し増加した。HAQ-DIも初回に比べて高値で推移した。

D. 考案

初回の登録から4年後までの5回、欠かさず臨床データや血清を追跡できた早期重症例39例において、血清中の5種類のケモカイン（IP-10、MCP-1、MIG、RANTES、IL-8）を測定した。SSc患者では、初回登録時から4年後までに個々の症例ではかなり変動がみられたものの、中央値としては目立った変動を示さなかった。RANTESはSSc群と健常人との間に中央値の差がみられなかったものの、他の4種類のケモカインはSSc群が経過中終始高値を示した。これまでの報告でも、RANTESは健常人と差が

なく、他の4つのケモカインは、SScで上昇していると報告されていることから、今回の結果もそれに合致するものと考えられた。活動性を反映するバイオマーカーとしては、各ケモカインの変動が臨床所見の変動と相関する必要があるが、そのようなケモカインは今回の検討では見出せなかった。

そこで、各時点でのケモカインの濃度と、その時点やそれ以降での臨床所見との相関を、まずは単変量解析で検討した。そうしたところ、早期のIL-8の濃度は、その後のMRSSやHAQ-DIと有意に相関し、早期のMCP-1濃度も一部でその後のMRSSとの有意な相関を示した。単変量解析の結果を踏まえて、多変量解析により4年後の臨床所見を規定する因子を抽出して、重回帰式を求めた。4年後のMRSSは、初回のMRSSと初回のIL-8濃度で規定された。また、4年後のHAQ-DIは、初回のIL-8濃度、初回の%VC(負の相関)、および初回のHAQ-DIで規定された。他のケモカインの濃度については、多変量解析ではMRSSやHAQ-DIとの相関がみられなかった。4年後の%VCや%DLcoなどの他の臨床所見を予測するケモカインは抽出されなかった。IL-8の濃度に関して、このように初回の濃度はその後の予測に有用な可能性が示唆された。一方で、IL-8が発症早期に関与するためか、あるいは治療の影響のせい、1年後以降の濃度は予測マーカーとして有意な相関を示さなかった。

IL-8は、マクロファージ、上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞などから産生され、好中球の遊走や活性化に作用して、炎症において中心的な役割を果たすケモカインである。これまでの報告では、特に発症早期のSSc患者の皮膚で、IL-8の発現亢進が認められている²⁾。また、SSc由来の線維芽細胞では、IL-8の産生能が亢進している³⁾。さらに、SSc患者では、血清中や気管支肺胞洗浄液中での増加が報告さ

れている^{4,5)}。強皮症の肺病変や気管支肺胞液中で発現が亢進しており、肺のマクロファージや線維芽細胞からの産生が亢進しているとの報告もある^{6,7)}。今回の結果は、これまでの報告とともに、SScの病態にIL-8が関与していることを示唆するものと思われる。

本研究の一番の問題点としては、症例数が少ないことである。今後の課題として、症例を増やし、4年間の検討から指標として有用と思われるものについては、長期にフォローアップしてその有用性を検討する必要がある。

E. 結論

今回の検討で、血清中のIL-8濃度の測定がSScの皮膚硬化や身体的機能障害の予後の予測に役立つ可能性が示唆された。今後、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. Hasegawa M, Sato S. The roles of chemokines in leukocyte recruitment and fibrosis in systemic sclerosis. *Front Biosci.* 2008; 13: 3637-3647
2. Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. *Pathobiology.* 1993; 61: 239-246
3. Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, et al. Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J. Rheumatol.* 1998; 25: 296-301
4. Furuse S, H. Fujii Y, Kaburagi M. et al. Serum concentrations of the CXC chemokines interleukin 8 and growth-regulated oncogene-alpha are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2003; 30: 1524-1528.

5. Bolster MB, A. Ludwicka SE, Sutherland C. et al. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40, 746-751.
6. Pantelidis PA, Southcott M, Black CM, et al. Up-regulation of IL-8 secretion by alveolar macrophages from patients with fibrosing alveolitis: a subpopulation analysis. *Clin Exp Immunol.* 1997; 108, 95-104.
7. Ludwicka-Bradley A, Tourkina E, Suzuki S, et al. Thrombin upregulates interleukin-8 in lung fibro-

blasts via cleavage of proteolytically activated receptor-I and protein kinase C-gamma activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22, 235-243.

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

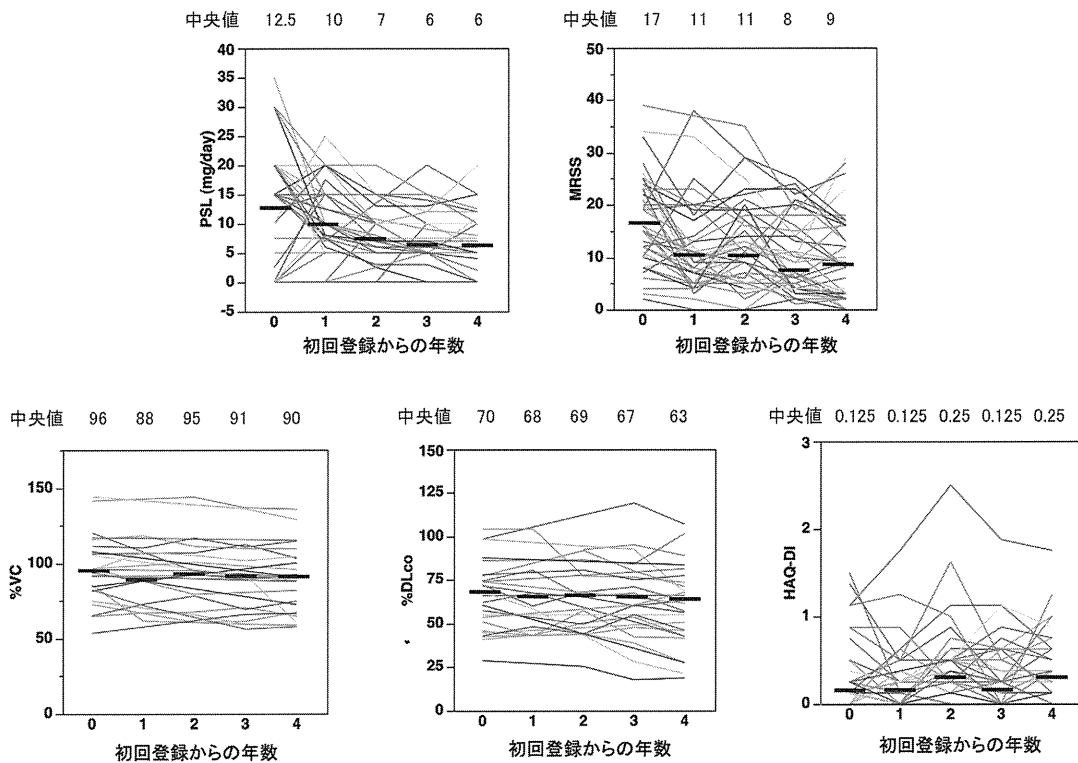


図1：4年間の全症例の臨床所見の経過。PSLの内服量、MRSS、%VC、%DLco、HAQ-DIの経時的な変化。短い横線は中央値を示す。PSL; prednisolone, MRSS; modified Rodnan total skin thickness score, HAQ-DI; health assessment questionnaire-disability index。

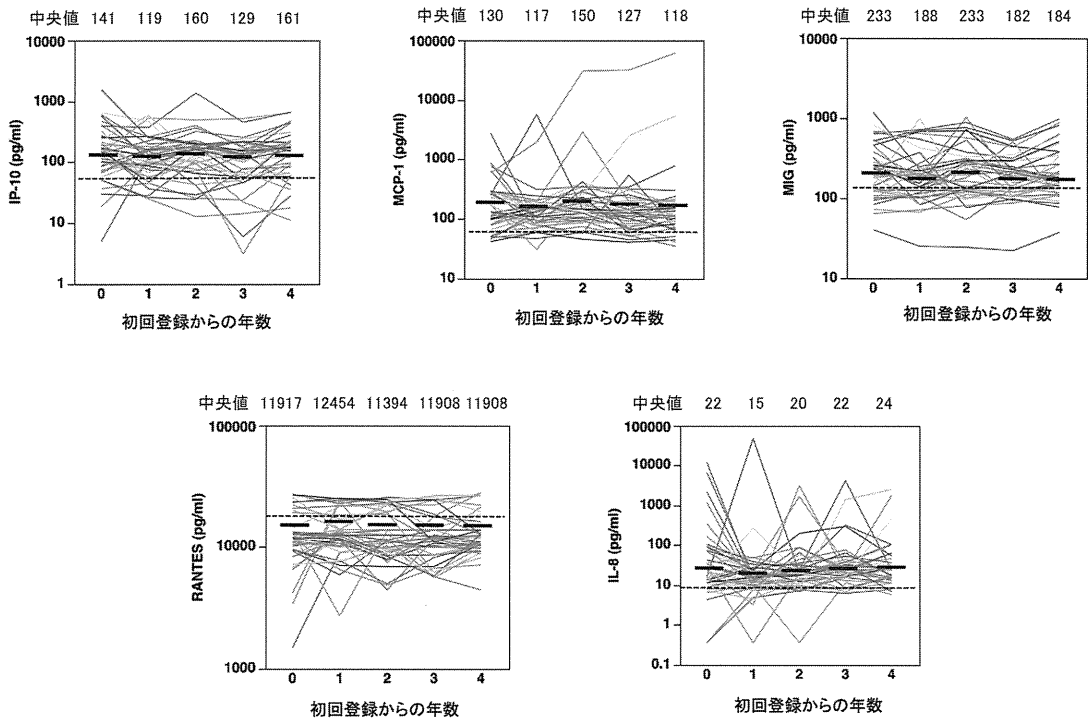


図 2：経過中の全症例の血清中ケモカインの変動。短い横線は中央値を、長い点線は健常人の中央値を示す。

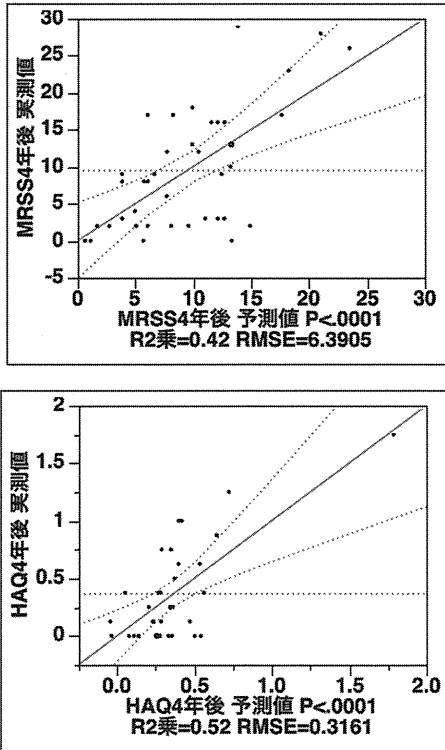
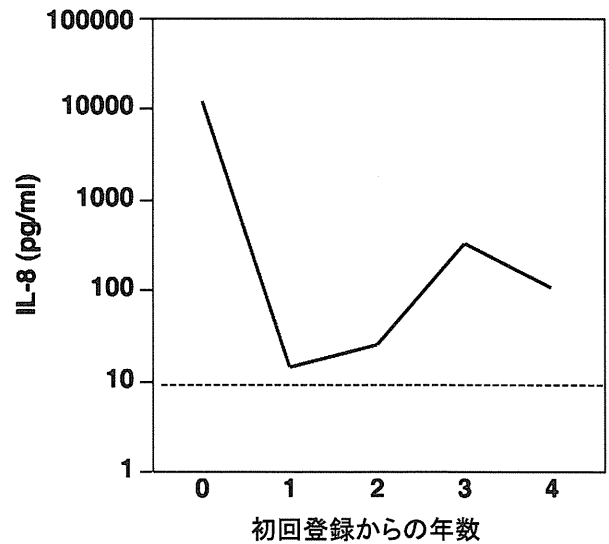


図 3：初回登録時の因子から4年後のMRSSとHAQ-DIを予測する重回帰式のあてはまり具合を示す予測値と実測値のプロット。



MRSS	19	38	29	22	26
HAQ-DI	1.125	1.75	2.5	1.875	1.75
PSL (mg/d)	12.5	15	15	14	12
MTX (mg/w)	6	0	0	0	6

図 4：血清 IL-8 濃度と MRSS や HAQ-DI の経時的な変動 (代表的症例)。MTX; methotrexate。