

は間質性肺疾患のみならず、しばしば多臓器に障害を生じるため、これがSSc-PAHやILD-PHの予後が不良である原因となっていることが推測されるが、血行動態的にもSSc-PAHやILD-PHは強皮症以外の原因によって生じる肺動脈性肺高血圧症(nonSSc-PAH)とは異なっている可能性があり、その血行動態的な違いが予後にも影響を与えている可能性があるのではないかと考えられる。

そこで今回は、SSc-PAH及びILD-PHの両者を含めた強皮症患者に合併する肺高血圧症(Scleroderma-related PH:SSc-PH)と、nonSSc-PAHの初回右心カテーテルの結果を比較し、両者の血行動態的な差を検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

2005年以降当院で初めて右心カテーテルを施行した境界域以上の肺高血圧症(平均肺動脈圧21mmHg以上)の患者連続52名。

2) 方法

対象患者の右心カテーテルの結果、及び血液検査所見、呼吸機能検査、心エコー所見につき、SSc-PH群及びnonSSc-PAHに分けて比較検討を行った。また、SSc-PH群については、SSc-PAH群及びILD-PH群に分けてサブグループ解析を行った。

ここで、ILD-PHは「全肺気量(TLC)が予測値の60%未満」もしくは「 $60\% \leq \text{TLC} < 70\%$ かつCT上中等度以上の肺の線維化を認める」により定義した。

C. 研究結果

1) 患者背景

対象患者52名のうち、SSc-PHは26名(SSc-PAH13名及びILD-PH12名)、nonSSc-PAHは26名であった。nonSSc-PAH患者の基礎疾患は表1に示した

通りである。両群の患者背景としては、SSc-PHの方が有意に年齢が高く(65 ± 11 歳 vs 51 ± 16 歳, $p=0.001$)、有意にDLCOが高かった($48.6 \pm 16.4\%$ vs $63.6 \pm 19.7\%$, $p=0.02$) (表1)。

2) 血行動態の比較

SSc-PHの方がnonSSc-PAHに比して有意に平均肺動脈圧は低く(29.9 ± 8.6 mmHg vs 40.7 ± 14.4 mmHg, $p=0.002$)、1回拍出係数が少なかった(28.2 ± 6.8 mL/min/m² vs 32.7 ± 7.7 mL/min/m², $p=0.03$) (表2)。

3) SSc-PAHとILD-PHの比較

SSc-PAHではDiffuse typeとLimited typeがほぼ半数ずつであったのに対し、ILD-PHはDiffuse typeに多く認められた。自己抗体ではILD-PHではtopoisomerase-I陽性例が多かったのに対し、SSc-PAHではcentromere陽性例が多かった(表3)。

血行動態ではILD-PHの方で有意に心拍数が多かったが(83 ± 15 bpm vs 70 ± 9 bpm, $p=0.01$)、その他のパラメーターには有意差は認めなかった(表4)。

4) 予後の比較

SSc-PH群では有意にnonSSc-PAH群に比して予後が不良であった(図1)。SSc-PAH群とILD-PH群の間に予後の差は認めなかった(図2)。

D. 考察

今回の研究において、SSc-PHはnonSSc-PAHよりも平均肺動脈圧がより低い段階で初回のカテーテル検査を受けていることが分かった。これは、強皮症の患者では無症状であっても半年~1年おきに心エコーや運動負荷試験などによるスクリーニングを行っているために、nonSSc-PAHの患者よりも早期に肺高血圧症を発見することができているものと推測された。しかしながら、両者の初回カテーテル時の肺血管抵抗に有意差はなく、1回拍出係数はむしろ

SSc-PH 群で有意に低かった。肺血管抵抗と 1 回拍出係数の関係をグラフにしてみると、図 3 の通り同じ肺血管抵抗では SSc-PH の方が 1 回拍出係数が低下していることが分かる。すなわち、SSc-PH の患者では nonSSc-PAH の患者に比してより早期から心拍出量の低下が起こってしまうことが示唆される。肺高血圧症患者において心拍出量の低下が予後不良の予測因子であることは既に報告されていることであり³⁾、肺高血圧症の早期から心拍出量の低下が起こってしまうことが、SSc-PH が nonSSc-PAH に比して予後不良であることの一因となっているものと考えられる。また、治療開始後に心拍出量の増加を得られない患者は SSc-PAH 患者の中でも特に予後不良との報告もあり²⁾、心拍出量の低下した SSc-PAH の患者は肺動脈圧の上昇が軽度であったとしても治療の対象とするべきと考えられる。

SSc-PAH において早期から心拍出量の低下が起こってしまう原因は未だ明らかではないが、強皮症患者においては右室機能の低下が起っていることが推測されている⁴⁾。強皮症患者においては心機能が正常であっても、右室中隔から心筋生検を行うと既に心筋の繊維化が起っているとの報告もあり⁵⁾、このことが右室機能の低下を招き、肺血管抵抗の上昇が軽度であっても著しい心拍出量の低下につながってしまう一因となっているのではないかと推測される。

一方、今回の研究では SSc-PAH と ILD-PH の間では、ILD-PH 患者の方で心拍数が上昇している以外には血行動態的にも予後的にも有意差は認められなかった。過去には ILD-PH は SSc-PAH よりもさらに予後不良であることが報告されているが⁶⁾、今回の研究では症例数が少なかったことから差が出なかったものと思われる。これについては今後さらに症例数を重ねて検討を続けていきたい。

E. 結 論

Scleroderma-related PH の患者は nonSSc-PAH の患者に比し肺血管抵抗の低い、より早期の段階から 1 回拍出量が低下する。心拍出量は肺高血圧症の重要な予後規定因子であるため、Scleroderma-related PH の患者では心拍出量を増加させるための治療が特に重要と思われる。

F. 文 献

- 1) Mathai SC et al. Pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Expert Rev Respir Med.* 2011 Apr; 5(2): 267-79.
- 2) Launay D et al. Long-term outcome of systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension treated with bosentan as first-line monotherapy followed or not by the addition of prostanoids or sildenafil. *Rheumatology.* 2010 Mar; 49(3): 490-500.
- 3) Miura Y et al. Identification of new prognostic factors of pulmonary hypertension. *Circ J.* 2010 Sep; 74(9): 1965-71.
- 4) Vonk Noordegraaf A, Naeije R. Right ventricular function in scleroderma-related pulmonary hypertension. Right ventricular function in scleroderma-related pulmonary hypertension. *Rheumatology.* 2008 Oct; 47 Suppl 5: v42-3.
- 5) Fernandes F et al. Cardiac remodeling in patients with systemic sclerosis with no signs or symptoms of heart failure: an endomyocardial biopsy study. *J Card Fail.* 2003 Aug; 9(4): 311-7.
- 6) Mathai SC et al. Survival in pulmonary hypertension associated with the scleroderma spectrum of diseases: impact of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* 2009 Feb; 60(2): 569-77.

G. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

厚生労働省「強皮症における病因解明と根治的
治療法の開発」研究班 2010 年度班会議・第 14
回強皮症研究会議合同会議

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 患者背景

	Scleroderma-related PH	nonSSc-PAH	p-value
Subject	26	26	
Age, years	65 ± 11	51 ± 16	0.001
Female, n (%)	23 (88)	20 (77)	NS
Etiology, n (%)	SSc-PAH 13 (50) ILD-PH 13 (50)	IPAH/ FPAH 5 (19) Connective tissue disease other than SSc 12 (46) Congenital heart disease 5 (19) Portal hypertension 2 (8) PVOD 2(8)	
Body surface area, m ²	1.47 ± 0.15	1.52 ± 0.17	NS
SpO ₂ , %	93.1 ± 6.3	92.9 ± 5.6	NS
Hemoglobin, g/dl	11.5 ± 1.9	12.4 ± 1.7	0.07
eGFR, mL/min/1.73m ²	70.7 ± 26.4	73.2 ± 32.6	NS
DLCO, %	48.6 ± 16.4	63.6 ± 19.7	0.02
BNP, pg/ml	303 ± 409	177 ± 159	NS
Left ventricular ejection fraction, %	69 ± 9	67 ± 12	NS

eGFR : estimated glomerular filtration rate, DLCO : diffusion capacity of the lung for carbon monoxide

表 2. 血行動態の比較

	Scleroderma-Related PH	nonSSc-PAH	p-value
HR, bpm	77 ± 13	73 ± 13	NS
sBP, mmHg	125 ± 20	115 ± 20	0.09
RAP, mmHg	4.8 ± 3.1	4.5 ± 2.4	NS
RVEDP, mmHg	8.2 ± 3.2	7.7 ± 2.9	NS
mPAP, mmHg	29.9 ± 8.6	40.7 ± 14.4	0.002
PCWP, mmHg	7.9 ± 3.1	7.6 ± 2.8	NS
CI, L/min/m ²	2.12 ± 0.52	2.35 ± 0.61	NS
SVI, mL/min/m ²	28.2 ± 6.8	32.7 ± 7.7	0.03
PVR, dyne·sec/cm ⁵	672 ± 405	851 ± 637	NS
SVR, dyne·sec/cm ⁵	2274 ± 835	1888 ± 673	0.07

HR : heart rate, sBP : systolic blood pressure, RAP : right atrial pressure
RVEDP : right ventricular end-diastolic pressure, mPAP : mean pulmonary arterial pressure
PCWP : pulmonary capillary wedge pressure, CI : cardiac index, SVI : stroke volume index
PVR : pulmonary vascular resistance, SVR : systemic vascular resistance

表 3. 患者背景 SSc-PAH vs. ILD-PH

	SSc-PAH	ILD-PH	p-value
Subject	13	13	
Age, years	68 ± 11	62 ± 11	NS
Female, n (%)	12 (92)	11 (85)	NS
Diffuse : Limited	6 : 7	12 : 1	0.01
autoantibody			
Topo- I	2	10	0.002
RNP	1	4	NS
Centromere	7	0	0.001
Body surface area, m ²	1.45 ± 0.13	1.49 ± 0.18	NS
SpO ₂ , %	94.2 ± 3.6	91.9 ± 8.2	NS
Hemoglobin, g/dl	12.0 ± 1.9	11.0 ± 1.8	NS
eGFR, mL/min/1.73m ²	68.6 ± 16.7	72.9 ± 34.1	NS
DLCO, %	50.3 ± 17.2	46.4 ± 16.0	NS
BNP, pg/ml	178 ± 162	428 ± 537	NS
Left ventricular ejection fraction, %	71 ± 8	66 ± 10	NS

Topo- I : topoisomerase- I , eGFR : estimated glomerular filtration rate,
DLCO : diffusion capacity of the lung for carbon monoxide

表 4. 血行動態の比較 SSc-PAH vs. ILD-PH

	SSc-PAH	ILD-PH	p-value
HR, bpm	70 ± 9	83 ± 15	0.01
sBP, mmHg	118 ± 19	131 ± 20	NS
RAP, mmHg	4.7 ± 2.7	4.8 ± 3.5	NS
RVEDP, mmHg	7.2 ± 2.5	9.3 ± 3.6	0.09
mPAP, mmHg	30.4 ± 9.2	29.4 ± 8.3	NS
PCWP, mmHg	7.0 ± 3.2	8.8 ± 2.8	NS
CI, L/min/m ²	2.02 ± 0.39	2.22 ± 0.62	NS
SVI, mL/min/m ²	29.2 ± 6.8	27.2 ± 6.9	NS
PVR, dyne·sec/cm ⁵	713 ± 446	631 ± 372	NS
SVR, dyne·sec/cm ⁵	2343 ± 850	2204 ± 848	NS

HR : heart rate, sBP : systolic blood pressure, RAP : right atrial pressure
RVEDP : right ventricular end-diastolic pressure
mPAP : mean pulmonary arterial pressure

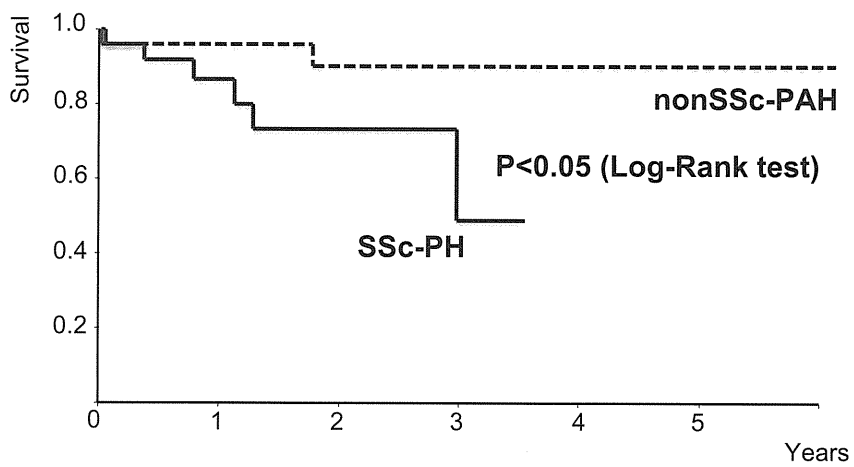


図 1 : Kaplan-Meier Estimates of Survival SSc-PH vs. nonSSc-PAH

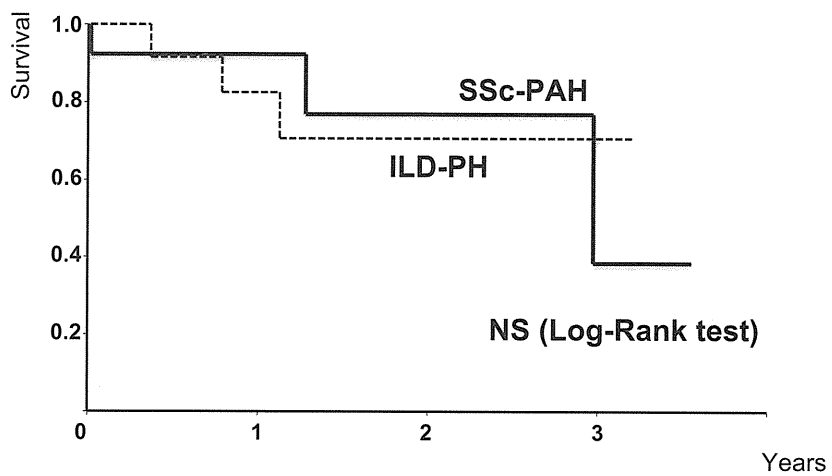


図 2 : Kaplan-Meier Estimates of Survival SSc-PAH vs. ILD-PH

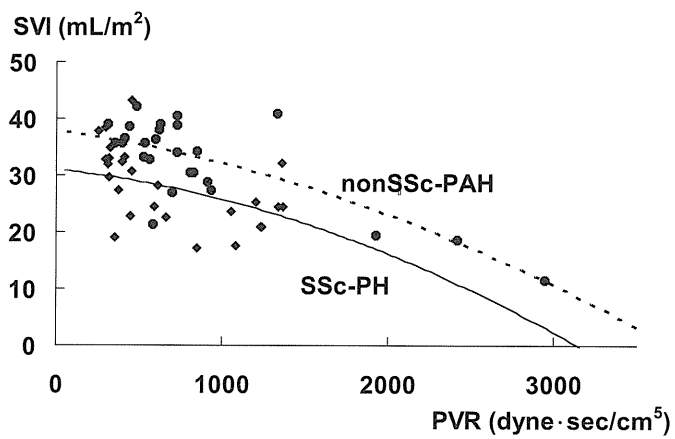


図 3 : 肺血管抵抗 (PVR) と 1 回拍出係数 (SVI) の相関 SSc-PH vs. nonSSc-PAH

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	金沢大学医学部附属病院リハビリテーション部
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	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	井上克己	金沢大学医学部リハビリテーション科学領域 准教授
協力者	染矢富士子	金沢大学医学部リハビリテーション科学領域 教授
協力者	八幡徹太郎	金沢大学医学部附属病院リハビリテーション部
協力者	堀江 翔	金沢大学医学部附属病院リハビリテーション部
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
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

研究要旨

6分間歩行テストにおける歩行距離は全身性強皮症（SSc）の肺高血圧症の重症度の評価に有用であることはよく知られている。我々は、少数例の検討において、前額部での経皮的末梢酸素飽和度（SpO₂）の測定が全身性強皮症（SSc）の間質性肺炎や肺高血圧症の評価に有用な可能性があることを平成20年度の厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）分担研究報告書の中で報告した。今回、強皮症117例を対象に6分間歩行を実施し、SpO₂値の測定の有用性について検討を行った。SpO₂の低下は、%DLcoの低下の他、KL-6やSP-Dの上昇と多変量解析において有意な相関を示した。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、間質性肺炎の重症度の指標としても有用である可能性が示唆された。

A. はじめに

6分間歩行テストは全身性強皮症（SSc）に伴う肺高血圧症の病態の変化を示す有用な評価として使用されている^[1,2]。また、呼吸機能検査の一環として、広く用いられている検査^[3,4]である。しかし、SScに伴う間質性肺炎の評価には必ずしも使用されていない。また、患者の運動能力に左右されることがあり、運動能力の高い患者は呼吸症状がみられていても、ある程度の距離が歩行できてしまう場面を経験する。

経皮的末梢酸素飽和度（SpO₂）は通常指先で測定されるが、SScでは寒冷刺激のみならず、歩行時にもレイノー現象が出たり、手指などの末端への血流

が低下しやすく、実際の値よりも小さく出てしまうことが少なくない。このため、SScにおいては前額部での測定が用いられている^[5]。しかしながら、これまでに、SScにおいて前額部で6分間歩行後のSpO₂値を検討した報告はみられない。

我々は、少数例の検討ではあるが、前額部での経皮的末梢酸素飽和度（SpO₂）の測定が、間質性肺炎や肺高血圧症の評価に有用な可能性があることを、平成20年度の厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）分担研究報告書の中で報告^[6,7]した。今回は、より多くの全身性強皮症において、6分間歩行時の前額部SpO₂値測定が、強皮症の肺病変に有用かどうか、統計学的に解析を行った。

B. 研究方法

1) 研究方法

今回の研究は、金沢大学医学倫理委員会に承認を得たうえで (No812)、観察研究として行われた。

2) 対象患者

2007年6月より作業療法に処方されたSSc患者117例(女性95例、男性22例)を対象とした。平均年齢は 57.7 ± 12.9 歳、罹病期間は平均 7.8 ± 8.8 年で皮膚硬化の程度を示すModified Rodnan total skin thickness score (MRSS)は平均 10.7 ± 9.6 点であった。病型分類の内訳は、diffuse cutaneous SSc (dcSSc)が61例、limited cutaneous SSc (lcSSc)が55例であった。抗核抗体別では、抗トポイソメラーゼI抗体 (Topo-I)陽性が53例、抗セントロメア抗体 (ACA)陽性が29例、抗RNAポリメラーゼI/III抗体 (RNAP)陽性が11例、上記の3つの抗体とも陰性が24例であった。

肺病変に関しては、高解像度CTにより両側性に背側優位の間質影が認められた間質性肺炎ありの症例は55例、ドップラー心臓エコーで推定右室収縮期圧 (RVsysP)が45 mmHg以上の肺高血圧症あり(心臓カテーテルは一部の症例でしかされていないため、疑い例を含む)の症例は17例であった。

3) 測定方法

対象となった症例の初診時および治療開始前後に6分間歩行を実施し、歩行距離を測定した。また、測定時に息切れの自覚症状として修正Borgスケール、SpO₂、脈拍を測定した。測定は6分間歩行テストに慣れた1人の作業療法士がすべて行った。SpO₂値の測定には、前額面に装着する反射式センサーであるNONIN社製パームサット(スター・プロダクト株式会社)を用いた(図1)。

呼吸機能として%肺活量(%VC)、%肺拡散能(%DLco)を、間質性肺炎の活動性を示す血清マー

カーとしてKL-6とSP-Dを、また肺高血圧の指標としてRVsysPのそれぞれと、6分間歩行距離の関連性について検討した。さらに、年齢、性別、病型、罹病期間、MRSS、抗核抗体、6分間歩行距離、さらに投薬治療として、プレドニゾロン、シクロフォスファミド、シクロスポリン、プロスタグランディンI₂、エンドセリン受容体拮抗薬、PDE-5阻害薬の使用の有無について検討した。

4) 検討方法

① まず、Villalba WOらの方法^[8]と同様に、開始時SpO₂値より終了時SpO₂値が4%以上低下した群(SpO₂低下群)とSpO₂値の4%以上の低下がみられない群(SpO₂正常群)の間で各種臨床所見との関連性を比較した。続いて、重回帰分析にて② SpO₂値と各種臨床所見、③ 6分間歩行距離と各種臨床所見との関連性を多重比較にて検討した。

5) 統計解析

統計解析は統計ソフトJMPにて、単変量の解析および重回帰分析を行った。

C. 結果

① SpO₂値と各種臨床所見との関連性：単変量の解析による検討

表1に解析結果を示す。SpO₂低下群では、正常群よりも有意に、6分間歩行距離が短く、高率に間質性肺炎を有し、%VCや%DLcoが低下し、KL-6やSP-Dが上昇していた。また、RVsysPが高値で、プレドニゾロンやエンドセリン受容体拮抗薬を高率に投与されていた。

② 重回帰分析によるSpO₂値と各種臨床所見の関連性の検討

SpO₂値を規定する重回帰式は次のように算出された。

$$\text{SpO}_2 \text{ 値} = 86.6 + 0.17 * \%DLco + -0.0013 * \text{KL-6}$$

+ -0.0095 * SP-D

(R2 乗 = 0.48, %DLco : p < 0.0001, KL-6 : p = 0.0147, SP-D : p = 0.0187) (図 2)。

この式で示されたように、SpO₂ 値は %DLco と正の相関、SP-D, KL-6 と負の相関が認められた。

③ 重回帰分析による 6 分間歩行距離と各種臨床所見の関連性の検討

6 分間歩行距離を規定する重回帰式は次のように算出された。

6 分間歩行距離 = 571.6 + 0.97 * %DLco + 0.79 * %VC + -1.21 * RVsysP + -2.71 * 年齢 + 性別 (女性 - 32.7, 男性 + 32.7)

(R2 乗 = 0.39, %DLco : p = 0.0837, %VC : p = 0.071, RVsysP : p = 0.0873, 年齢 : p < 0.0001, 性別 : p = 0.0017)

式で示されたように、6 分間歩行距離は年齢と負の相関がみられ、男性が長く、%DLco、%VC と正の相関、RVsysP と負の相関が認められた。特に年齢、性別に左右される傾向がうかがわれた。

D. 考 察

SSc では、間質性肺炎や肺高血圧症の進行は生命予後に大きく関与し、QOL 低下の一因となっている。できるだけ早期に治療介入し、その症状の経過を客観的に判断することは大変重要である。6 分間歩行テストは SSc に合併する肺高血圧症の経時的変化の有用な指標として、また治療効果の評価に広く使用されている^[1,2]。また、中等度から重症の呼吸器疾患や心疾患の治療効果の判定に用いられている^[9]。しかし、テスト自体は歩行距離であり、性別や年齢など体力による影響は大きく、その標準も年齢や性別で分けられている。そのうえ、軽症患者には適しているとは言いがたい。しかし、間質性肺炎や肺高血圧症といった症状のある患者では、運動負荷によ

り SpO₂ 値が低下することは知られており、評価としても使用されている^[10,11]。Villalba らは^[7]、SSc110 例を対象に 6 分間歩行後の SpO₂ 値を指腹部で測定して各種臨床所見の関連性を求めたところ、%VC と正の相関、年齢や推定肺動脈収縮期圧と負の相関、呼吸困難感 (NYHA 分類)、抗 Topo- I 抗体、胸部画像所見のみられる症例で低下がみられたと報告している。我々は、SSc の末梢循環障害の影響を受けやすい手指でなく、前額部で測定し、間質性肺炎の活動性の指標としての SP-D や KL-6 との相関も検討した。

我々の検討では、Villalba らと同様に SpO₂ 値 94 前後で群分けした単変量の解析だけでなく、SpO₂ 値を規定する臨床所見を多重比較検討を行って求めたところ、間質性肺炎や肺高血圧によって低下する %DLco に加え、間質性肺炎の活動性や重症度の血清学的指標と考えられている SP-D、KL-6 との関連性が高かった。肺高血圧を有する症例が少なかったせいかもしれないが、SpO₂ 値が肺高血圧の評価に有用かどうかは良くわからず、肺高血圧の評価としては歩行距離の方が有用なようである。一方で、間質性肺炎の重症度の評価には、歩行距離よりも SpO₂ 値が有用と考えられた。今後、個々の症例で治療前後など経時的な変動を追跡する予定である。

さらにリハビリテーションの観点からは、SpO₂ 値測定によりこれまでは、運動後の SpO₂ 値低下などについてリスク管理をしながら実施することにより ADL を向上することができる^[12,13,14]。今後はリハビリテーションの効果の指標としても活用の範囲を広げていきたい。

E. 結 論

6 分間歩行後の前額部での SpO₂ 測定が SSc における間質性肺炎の重症度や活動性の指標となる可能

性が示唆された。今後、経時的な測定の有用性についても検討したい。

F. 文献

- 1) Ahmadi-Simab K. et al: Bosentan for severe pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis with interstitial lung disease. *Eur J Clin Invest*, 36 Suppl 3, 44-48, 2006
- 2) Wells A.U. et al: Pulmonary complications: one of the most challenging complications of systemic sclerosis. *Rheumatology* 48, iii40-iii44, 2009
- 3) Chetta A et al: Relationship between outcome measures of six-minute walk test and baseline lung function in patients with interstitial lung disease. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 18, 170-175, 2001
- 4) Carter R et al: 6-minute walk work for assessment of functional capacity in patients with COPD. *Chest* 123, 1408-1415, 2003
- 5) Beretta L et al: Validity of the Saint George's Respiratory Questionnaire in the evaluation of the health-related quality of life in patients with interstitial lung disease secondary to systemic sclerosis. *Rheumatology* 46, 296-301, 2007
- 6) 麦井直樹、他：全身性強皮症患者の6分間歩行テストの検討。総合リハ 38、571-576、2010
- 7) 麦井直樹、他：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末梢酸素飽和度の有用性の検討。平成20年度総括・分担研究報告書：209 - 218、2008
- 8) Villalba WO et al：Six-minute walk test for the evaluation of pulmonary disease severity in scleroderma patients. *CHEST* 131, 217-223, 2007
- 9) 日本呼吸管理学会呼吸リハビリテーションガイ

ドライン作成委員会 他編：呼吸リハビリテーションマニュアル。資料編、6分間歩行試験。76-79、照林社、2004

- 10) Pimenta SP et al: Desaturation – distance ratio: a new concept for a functional assessment of interstitial lung diseases. *CLINICAL SCIENCE* 65, 841-846, 2010
- 11) Lama VN et al: Prognostic value of desaturation during a 6-minute walk test in idiopathic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 168, 1084-1090, 2003
- 12) 麦井直樹、他：間質性肺炎を伴った全身性強皮症のリハビリテーション、総合リハ 30、563-566、2002
- 13) 麦井直樹、他：呼吸器合併症を呈した全身性強皮症のリハビリテーション確立に関する研究—日常生活動作が改善した2例を通じて—、平成14年度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」分担研究報告書、2003
- 14) Mugii N et al: Reduced Hypoxia Risk in a Systemic Sclerosis Patient with Interstitial Lung Disease after Long-Term Pulmonary Rehabilitation. *Clinical Medicine Insights: Case Reports* 4, 53-56, 2011

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 1. SpO₂ 低下と各種臨床所見との関連性

	SpO ₂ 正常群 (n = 65)	SpO ₂ 低下群 (n = 52)	p value
年齢	56.1 ± 13.7	59.7 ± 11.6	ns
性別 (男性 : 女性)	10 : 55	12 : 40	ns
病型 (dc-SSc:lc-SSc)	30 : 34	31 : 21	ns
罹病期間 (月)	6.2 ± 7.4	9.9 ± 10.0	ns
MRSS	11.3 ± 10.5	9.7 ± 8.1	ns
6 分間歩行距離 (m)	500.7 ± 87.8	444.1 ± 111.2	p = 0.004
臨床症状・所見			
ILD あり	27.7%	71.2%	p < 0.0001
%VC	104.0 ± 19.3	79.8 ± 17.7	p < 0.0001
%DLco	67.2 ± 15.3	42.1 ± 12.1	p < 0.0001
SP-D (ng/ml)	110.6 ± 84.8	228.5 ± 155.6	p < 0.0001
KL-6 (U/ml)	561.2 ± 844.5	1311.8 ± 1060.6	p = 0.0007
PAH あり (RVsysP ≥ 45mmHg)	9.2%	30.8%	p = 0.004
RVsysP (mmHg)	30.6 ± 9.9	38.8 ± 18.1	p = 0.0066
自己抗体			
Topoisomerase-I	40.0%	51.9%	ns
Centromere	32.3%	15.4%	ns
RNA-P	10.8%	7.7%	ns
薬物療法			
プレドニゾロン	27.7%	61.5%	p = 0.0003
シクロフォスファミド	9.2%	21.2%	ns
シクロスポリン	0.0%	5.8%	ns
プロスタグランディン I ₂	49.2%	48.1%	ns
エンドセリン受容体拮抗薬	1.5%	11.5%	p = 0.0434
PDE-5 阻害薬	0.0%	3.8%	ns



図 1 : SpO₂ 測定部位
 パルスオキシメーター (NONIN 社製パームサット) の反射式センサーを前額部に装着している

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

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
協力者	岡本芳伸	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	松下貴史	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）助教
協力者	濱口儒人	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	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

研究要旨

全身性強皮症におけるサイトカインネットワークを明らかにするために、ヘルパーT細胞（Th）1、2、17の代表的なサイトカインである interferon (IFN)- γ 、interleukin (IL)-4、IL-17A のブレオマイシン誘導性皮膚硬化における役割を検討した。Interferon (IFN)- γ 、IL-4、IL-17 A のそれぞれの欠損マウスにおいて、ブレオマイシンを連日 28 日間皮内注射して皮膚硬化を誘導したところ、IL-17 A 欠損マウスでのみ白血球の浸潤が減少し、皮膚硬化が減弱した。Transforming growth factor (TGF)- β 1、connective tissue growth factor (CTGF)、intercellular adhesion molecule-1 の発現は、IL-17A 欠損マウスでは野生型マウスよりも有意に低下していた。ブレオマイシンの連日皮内注射は、野生型マウスの皮膚や脾臓 T 細胞での IL-17A の発現を促進した。さらに、皮膚由来の培養線維芽細胞株にリコンビナント IL-17A を添加すると、TGF- β 1 や CTGF の発現とコラーゲンの産生が増加した。これらの結果から、IFN- γ や IL-4 よりも、IL-17A が直接または TGF- β 1 や CTGF の誘導を介してブレオマイシン誘導性皮膚硬化の形成に関与していると考えられた。IL-17A が強皮症の治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

以前より、線維化を呈する疾患では、全身性強皮症を含めてヘルパーT細胞（Th）1よりもTh2サイトカインが線維化に関与すると考えられてきた。しかし、最近の研究で強皮症患者の末梢血中ではTh17細胞が増加しており、Th17細胞から産生されるinterleukin (IL)-17Aをはじめとするサイトカインが炎症や線維化に関与している可能性が示唆されている^(1,2)。また、強皮症患者の血清中ではIL-17Aが増加しており、末梢血リンパ球や病変部皮膚においてIL-17Aの発現亢進が認められている^(3,4)。

強皮症の動物モデルとして現在最も使用されているのはブレオマイシン（BLM）誘導性強皮症モデル

である。その機序はよくわかっていないが、これまでの報告で、代表的なTh1サイトカインであるリコンビナントinterferon (IFN)- γ の全身投与は皮膚硬化を軽減させ、IFN- γ 欠損マウスでは肺線維症が抑制されることが報告されている。代表的なTh2サイトカインであるIL-4欠損マウスでは、BLM誘導性肺線維症への影響は認められないとの報告がある。しかし、BLM誘導性の皮膚硬化に関して、IFN- γ 、IL-4、IL-17Aの欠損マウスでの検討の報告はみられない。

本研究では、Th1、Th2、Th17のそれぞれ代表的なサイトカインであるIFN- γ 、IL-4、IL-17AのBLM誘導性皮膚硬化における役割を検討した。

B. 研究方法

1) マウス

IFN- γ 、IL-4、IL-17A の欠損マウスは、東京大学医科学研究所の岩倉洋一郎教授より、供与いただいた。少なくとも C57BL/6 野生型マウスと 8 回以上バッククロスしたものをを用い、コントロールとしては Jackson Laboratory から購入した C57BL/6 野生型マウスを用いた。

2) BLM 投与

それぞれの系統のマウスにおいて、300 μ l の BLM を背部に 4 週間連日皮内注射投与して皮膚硬化を誘導した。

3) 皮膚の炎症や線維化の評価

注射した局所の皮膚を、H & E、Masson's trichrome、Van Gieson 染色などを行い、線維化の程度を評価した。また、 α -SMA 染色により、myofibroblast の数を算定した。また、CD3 陽性 T 細胞、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 陽性好中球、F4/80 陽性マクロファージの皮膚への浸潤細胞数は、それぞれの抗原に対する抗体を用いた免疫組織科学的に解析した。組織中や培養上清中のコラーゲン量は、Sirius red と Fast green のコラーゲンへの結合性を利用したコラーゲン定量法、または Silcol assay により測定した。

4) サイトカインなどの測定

皮膚、脾臓 T 細胞、培養皮膚線維芽細胞における各種サイトカイン、ケモカイン、接着分子の mRNA の発現量は、real time PCR により測定した。また、皮膚組織抽出液中のサイトカインの濃度は、総蛋白量を揃えたうえで、サイトカインの ELISA により測定した。

5) Th17 細胞の検出

抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を固相化した培養プレートに、脾臓から磁石ビーズを用いて抽出した CD4 陽性 T 細胞を加え、37 度で 48 時間培養した。培

養細胞内の IL-17A を抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて IL-17A 産生 Th 細胞 (Th17 細胞) を検出した。

6) 培養細胞での検討

マウスの皮膚由来線維芽細胞株 (NIH3T6) に IL-17A と陽性コントロールとして TGF- β 1 を添加して 24 時間培養した。培養上清中のコラーゲン量と線維芽細胞におけるサイトカインの発現を前述の方法で測定した。

C. 研究結果

1) IL-17A の欠損は BLM 誘導性の皮膚の炎症や線維化を軽減させた

BLM を 28 日間連日皮内注射したところ、IFN- γ や IL-4 の欠損マウスでは野生型マウスと差がみられなかったが、IL-17A 欠損マウスでは有意な真皮の厚さの減少がみられた (図 1)。このため、IL-17A 欠損マウスに焦点を絞って、その機序を検討した。組織での皮膚の厚さの所見と一致して、IL-17A 欠損マウスでは、Van Gieson 染色陽性の真皮の範囲、 α -SMA 陽性細胞数、組織中のコラーゲンの含有量が野生型マウスに比べてそれぞれ有意に減少していた (図 2)。また、IL-17A 欠損マウスでは、CD3 陽性 T 細胞、MPO 陽性好中球、F4/80 陽性マクロファージの局所皮膚への浸潤が、経過中に減少していた (図 3)。

2) IL-17A 欠損マウスでは、皮膚での TGF- β 1 や CTGF の発現が低下していた

次に、BLM 誘導性皮膚硬化の過程において、IL-17A 欠損マウスにおける各種サイトカイン、接着分子、ケモカインなどの局所皮膚での発現が、野生型マウスと差があるかどうかを検討した。IL-17A 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて TGF- β 1、CTGF の mRNA の発現が著明に低下していた (図 4A)。ま

た、ICAM-1 の mRNA の発現も有意に低下していたが、CXCL2、CCL2、CCL3 などのケモカインの発現は変わらなかった (図 4B)。

3) BLM 投与は、皮膚や脾臓 T 細胞における IL-17A の発現を誘導した

BLM の投与が IL-17A の発現に影響するかどうかを検討した。BLM の連日投与は、脾臓 T 細胞における IFN- γ 、IL-6、IL-17A、TGF- β 1 の mRNA の発現を有意に上昇させ、特に IL-17A の上昇は顕著であった (図 5A)。また、BLM の投与は、野生型マウスの皮膚抽出液中における IL-17A の量を有意に増加させた (図 5B)。さらに、BLM 投与により、脾臓での IL-17A 産生 Th 細胞、すなわち Th17 細胞が有意に増加した (図 5C)。

4) IL-17A は、in vitro で線維芽細胞からのコラーゲン産生と TGF- β 1 や CTGF の発現を促進した

IL-17A の皮膚線維化への関与を in vitro でも確認するために、リコンビナント IL-17A を培養皮膚線維芽細胞株に添加したところ、濃度依存性にコラーゲン産生の亢進がみられた (図 6A)。また、TGF- β 1 の作用には及ばなかったが、線維芽細胞における TGF- β 1 や CTGF の mRNA の発現を有意に促進させた (図 6B)。

D. 考案

本研究では、IL-17A が BLM 誘導性強皮症モデルにおける皮膚硬化の形成に重要な役割を果たすことが示された。IFN- γ 、IL-4、IL-17A のそれぞれの欠損マウスにおいて、IL-17A 欠損マウスだけが、皮膚硬化が軽減した。また、IL-17A の欠損により、経過中の TGF- β 1、CTGF、ICAM-1 の発現亢進が抑制された。野生型マウスにおいて、連日の BLM の連日皮内注射は、同部の皮膚や脾臓における IL-17A の発現を促進させた。さらに、培養皮膚線維芽細胞株にリ

コンビナントの IL-17A を添加すると、TGF- β 1、CTGF の発現やコラーゲンの産生が亢進した。

IL-17A がどのように BLM 誘導性皮膚硬化に関与するか検討した。野生型マウスに IL-17A を連日皮内注射すると、脾臓 T 細胞における IFN- γ 、IL-6、IL-17A、TGF- β 1 の発現が亢進し、特に IL-17A の上昇が顕著であった。また、野生型マウスに BLM を投与すると皮膚における IL-17A の発現が上昇し、脾臓における IL-17A 発現 Th 細胞、すなわち Th17 細胞が増加した。このことから、BLM によって誘導された IL-17A は、他の炎症性あるいは線維化誘導性のサイトカインとともに、BLM 誘導性皮膚硬化に関与しているものと考えられた。

IL-17A は、線維芽細胞の増殖を促すことが知られているが、線維芽細胞からの直接のコラーゲン産生誘導作用は認められていない。そこで、IL-17A は他のサイトカインを介して、線維化に関与している可能性がある。そこで、IL-17A 欠損マウスにおいて、BLM 誘導性皮膚硬化の過程におけるサイトカインの皮膚での発現を野生型マウスと比較した。すると、IL-17A の欠損により、TGF- β 1、CTGF、ICAM-1 の発現が抑制された。TGF- β は、線維化の中心的な役割を果たすサイトカインであり、特に線維化の誘導に重要であり、CTGF は線維化の維持に必要と考えられている⁽⁵⁾。また、ICAM-1 も BLM 誘導性皮膚硬化⁽⁶⁾ やタイトスキンマウスの皮膚硬化⁽⁷⁾ に重要と考えられている接着分子であり、BLM により最初に誘導される炎症にも関与している可能性がある。

また、in vitro の検討で、リコンビナントの IL-17A は培養皮膚線維芽細胞からの TGF- β 1、CTGF の発現を亢進させ、おそらくはその結果としてコラーゲン産生を亢進させた。IL-17A が TGF- β やコラーゲン産生を誘導する機序は、これまでの検討でも報告されている^(2,6) が、CTGF の発現に直接関与するのか、

コラーゲン産生に直接作用するかどうかについては、さらなる検討が必要と考えている。

最近の報告で、BLM誘導性肺線維症においても、IL-17AがTGF- β 1産生を介して重要な役割を果たすことが示されている⁽²⁾。このような知見と今回の結果から、IL-17Aが強皮症の病態に大きく関与している可能性が考えられた。

E. 結論

ヒトに対するIL-17Aの中和抗体は、他の自己免疫疾患や炎症性疾患に対して臨床試験が開始されているが、強皮症患者においてもその効果の検証が必要と考えられた。

F. 文献

1. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, et al. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFN-gamma distinguishes SSc phenotypes. PLoS One. 2009; 4(6): e5903.
2. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. J Exp Med. 2010 Mar 15; 207(3): 535-52.
3. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis

Rheum. 2000 Nov; 43(11): 2455-63.

4. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? J Dermatol Sci. 2008 Jun; 50(3): 240-2.
5. Takehara K. Hypothesis: pathogenesis of systemic sclerosis. J Rheumatol. 2003 Apr; 30(4): 755-9.
6. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogasawara A, Akiyama Y, et al. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. J Immunol. 2010 Aug 15; 185(4): 2502-15.
7. Matsushita Y, Hasegawa M, Matsushita T, Fujimoto M, Horikawa M, Fujita T, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. J Immunol. 2007 Jul 1; 179(1): 698-707.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
Critical roles of Interleukin 17A in the development of bleomycin-induced skin fibrosis
第36回日本研究皮膚科学会（京都）2011.12

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

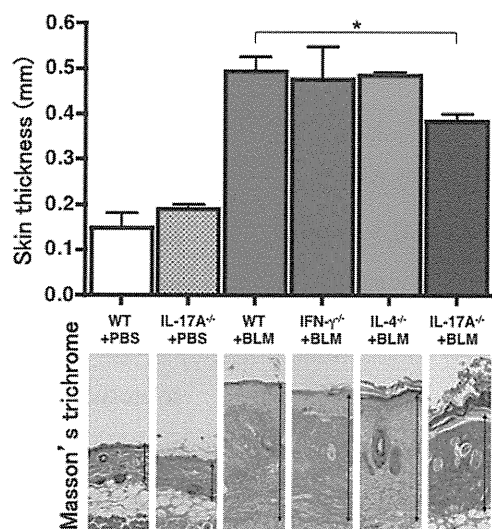


図1：プレオマイシン（BLM）を4週間連日皮内注射した後の、各系統における皮膚の厚さ（mean + SEM）。代表的な Masson's trichrome 染色の組織写真も示す。* $p < 0.05$ 。各系統 $n = 10$ 。

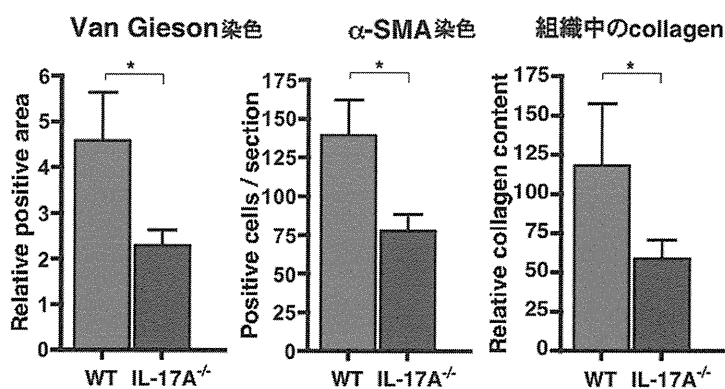


図2：IL-17A 欠損マウスと野生型マウスにおける BLM 注射皮膚での Van Gieson 染色陽性の範囲、 α -SMA 陽性細胞数、および皮膚組織中のコラーゲン含有量。各系統 $n = 10$ 。

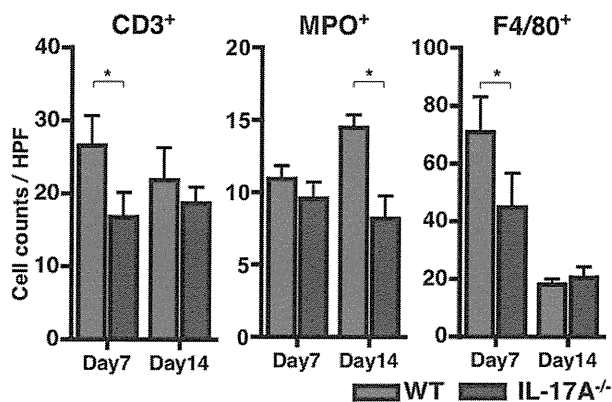


図3：IL-17A 欠損マウスと野生型マウスにおける BLM 注射皮膚での CD3、MPO、F4/80 の陽性細胞数。

* $p < 0.05$ 。各系統 $n = 10$ 。

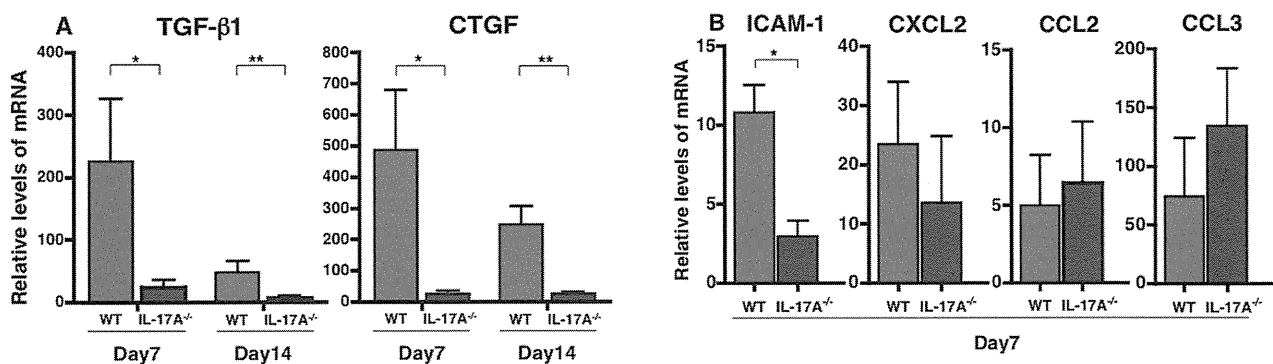


図4：IL-17A欠損マウスと野生型マウスにおけるA) 各種サイトカイン、B) 接着分子、ケモカインのmRNAの発現量。
* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。各系統 $n = 5$ 。

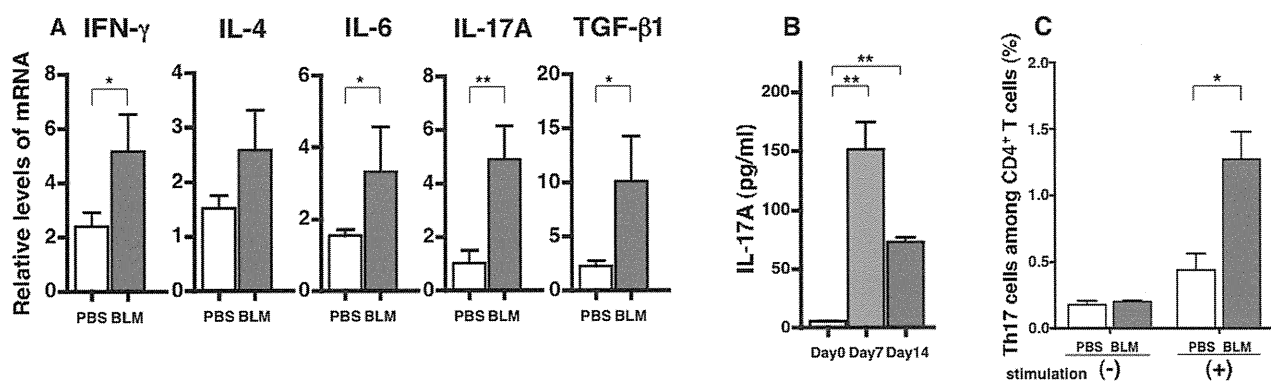


図5：A) 野生型マウスにおけるBLM連日皮内投与における皮膚や脾臓T細胞での検討。A) 脾臓CD4⁺T細胞での各サイトカインのmRNAの発現。B) 局所皮膚組織抽出液におけるIL-17Aの含有量。C) 脾臓CD4⁺T細胞におけるTh17細胞の頻度。
* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。各系統 $n = 5$ 。

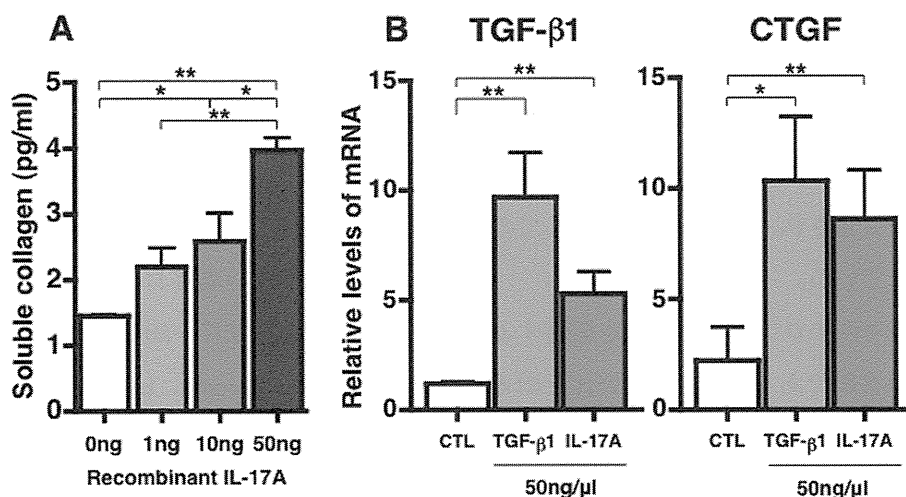


図6：培養皮膚線維芽細胞株にIL-17Aを添加した際のA) コラーゲン産生量とB) TGF-β1とCTGFのmRNAの発現。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。各実験は4回施行。

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～

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

研究協力者 大橋威信 福島県立医科大学医学部 皮膚科 大学院生

研究要旨

ブレオマイシン誘導性皮膚硬化に対する分子生物薬 sunitinib の効果検討を行った。C3H/HeJ マウスの背部に、ブレオマイシン (250 $\mu\text{g/ml}$) を皮内注射すると同時に、sunitinib (4 mg/kg/day、40 mg/kg/day) を3週間 (週5回) 経口投与した。観察期間内では sunitinib は tolerable であり、皮膚硬化の誘導は、病理組織学的に抑制されてみられた。真皮厚、病変部に浸潤する肥満細胞数、皮膚のコラーゲン含有量も有意に抑制されてみられた。一方、肺線維症に対しては、予測された抗線維化効果はみられず、Sunitinib 4 mg/kg、40 mg/kg 投与群のいずれにおいても肺線維化病変はコントロールとほぼ同程度の病理学所見を呈し、肺胞壁の浮腫を伴う肥厚、炎症細胞浸潤も残存してみられた。

皮膚硬化には抑制効果がみられるものの、肺線維化には効果がみられなかった理由については、皮膚と肺組織の、ブレオマイシンに対する感受性の違いが推測された。

A. 研究目的

われわれは、これまでにブレオマイシンの局所投与によりマウスに皮膚硬化を誘導し、強皮症モデルとして報告してきた。このモデルを用いて様々な治療薬の線維化抑制効果が報告されている。近年、imatinib を始めとする幾つかの生物製剤がヒト強皮症および強皮症モデルマウスにおいて皮膚硬化を抑制したとの報告が散見され、新たな治療薬としての可能性が期待されている。

Sunitinib は、種々のチロシンキナーゼを阻害するマルチキナーゼ阻害剤であり、VEGF 受容体を始め、PDGF 受容体、KIT などのリン酸化を抑え活性化を抑制する。これまで、このモデルに sunitinib を全身投与し、ブレオマイシン誘導性皮膚硬化に対する抑制効果を報告した。今回、肺病変に対する影響を検討した。

B. 研究方法

C3H/HeJ マウス (6 週令、雌) (n=5) の背部に、ブレオマイシン (250 $\mu\text{g/ml}$) およびコントロールの PBS を 100 μl ずつ、週 5 日間、計 3 週間皮内注射した。同時に、sunitinib (Pfizer 社より供与) を生食に溶解し、4 mg/kg および 40 mg/kg の投与量になるよう調整し、経口ゾンデ針を用いて週 5 回、3 週間経口投与した。その後 8mm パンチでブレオマイシン注射部位の皮膚および肺組織を採取し、ホルマリン固定ならびに -80°C で凍結保存した。標本は HE、Masson trichrome、toluidin blue 染色を試行した。また collagen 測定キットを用いて皮膚に含有されるコラーゲン量を測定した。

C. 研究結果

ブレオマイシンによる皮膚硬化の誘導は Sunitinib によって抑制され、HE 染色像でみられる真皮膠原

線維の膨化・肥厚は有意に抑制されてみられた。さらに、真皮厚、肥満細胞数、皮膚に含有されるコラーゲン量はいずれも有意に減少してみられた。

Sunitinib 4 mg/kg、40 mg/kg のいずれの群においても肺線維化病変はコントロールとほぼ同程度の病理学所見を呈し、肺胞壁の浮腫を伴う肥厚、炎症細胞浸潤も残存してみられた (図 1)。

また、肺組織からの抽出液を用いてコラーゲン量を測定したが、やはり有意な変化はみられなかった。

D. 考 察

前回までの検討で、ブレオマイシンによって誘導された皮膚硬化病変は、sunitinib を同時に全身投与することによって抑制されることが確認された。

今年度は、皮膚硬化の抑制メカニズムに関して皮膚組織における TGF- β 、CTGF などをはじめとする

fibrogenic cytokine の発現レベルを検討する予定であったが、震災の影響で実験が滞ってしまい、現在再開に向けているところである。

さて、肺組織の検討では、残念ながら予測された抗線維化効果はみられず、皮膚硬化には抑制効果がみられるものの、肺線維化には効果がみられなかった理由については、皮膚と肺組織の、ブレオマイシンに対する感受性の違いが推測される。

E. 結 論

肺はブレオマイシンに対する感受性が強いいため、ブレオマイシンで強く線維化を誘導してしまうと sunitinib の抑制効果が得られないのではと考えた。

実験条件を変えれば、肺に対しても抗線維化効果が得られるのかもしれない。

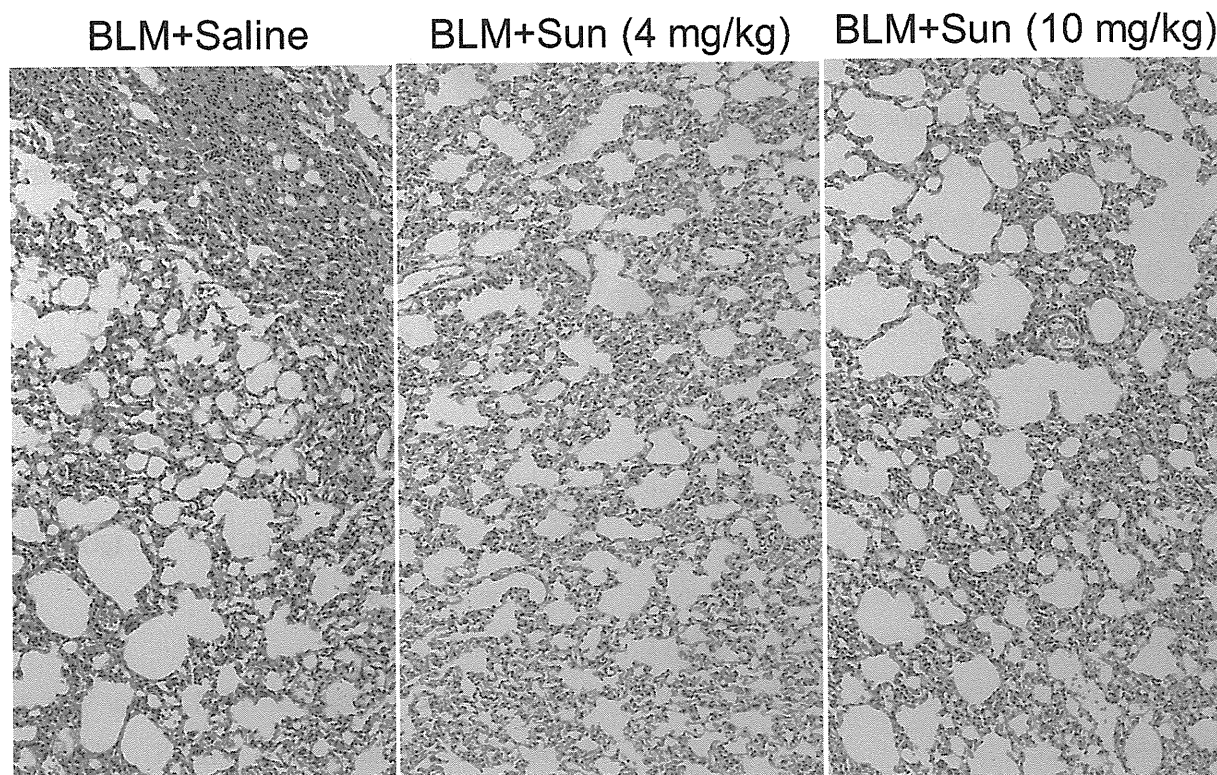


図 1：肺の病理組織学的所見。

マウス sclerodermatous chronic graft-versus-host disease モデル におけ IL-6 阻害療法の効果について

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
協力者	Le Huu Doanh	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）助教
協力者	松下貴史	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）助教
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

全身性強皮症ならびに皮膚硬化型慢性 GVHD (Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease, Scl-cGVHD) において、血清 IL-6 値の上昇が知られている。今回の検討で、抗 IL-6R 抗体の投与にて Scl-cGVHD の発症を抑制することが明らかとなった。しかしながら、抗 IL-6R 抗体の投与は、すでに発症した Scl-cGVHD に対する効果は認めなかった。IL-6 阻害療法は Scl-cGVHD ならびに全身性強皮症の有効な治療法となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (Systemic sclerosis, SSs) は皮膚および内臓諸臓器の線維化を来す膠原病で、その原因は未だ不明である。全身性強皮症は皮膚硬化型慢性 GVHD (Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease, Scl-cGVHD) との共通点が知られている。B10. D2 (H-2d) マウスの骨髄を BALB/c (H-2d) マウスに移植することにより Scl-cGVHD を誘導することができ、全身性強皮症のモデルマウスとして有用である。

IL-6 は Th1 および Th17 の分化誘導に重要なサイトカインである。また、全身性強皮症では血清 IL-6 濃度の上昇が報告されている。さらに、関節リウマチや特発性若年性関節炎の患者において抗 IL-6 受容体抗体の有効性が報告されている。今回、我々はマウス Scl-cGVHD モデルにおける IL-6 阻害療法の有効性を検討した。

B. 研究方法

1. Scl-GVHD モデル

800 cGy 照射された 8-12 週 of BALB/c (H-2d) マウスをレシピエントとして使用した。B10. D2 (H-2d) マウスをドナーとして使用した。まず B10. D2 マウスから骨髄細胞 (10×10^6 細胞) と脾臓細胞 (10×10^6 細胞) を採取し、レシピエントマウスに骨髄移植し、Scl-GVHD を誘導した。

2. サイトカイン測定

血清 IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70 濃度を Cytometric bead array にて測定した。

3. 抗体

抗 IL-6 受容体抗体 (MR16-1, ラット IgG1 モノクローナル rat IgG1) を使用した。

4. MR16-1 による治療

予防モデル: 骨髄移植当日に 2 mg/マウスの MR16-1 および control rat IgG を投与し、その後、毎週 0.5 mg/マウスを追加投与した。

治療モデル：骨髄移植後 25 日目に 2 mg/ マウスの MR16-1 および control rat IgG を投与し、その後、毎週 0.5 mg/ マウスを追加投与した。

5. GVHD スキンスコア

以下のスコアリングシステムを用いた。

スコア 0 = 正常, スコア 1 = 皮膚病変 < 1 cm², スコア 2 = 皮膚病変 1-2 cm², スコア 3 = 皮膚病変 2-5 cm², スコア 4 = 皮膚病変 5-10 cm², スコア 5 = 皮膚病変 10-15 cm², スコア 6 = 皮膚病変 15-20 cm², スコア 7 = 皮膚病変 > 20 cm². 尻尾の皮膚病変は 0.4、耳や手足の皮膚病変を 0.3 とし、すべての合計点で示した。

6. 病理組織学的検討

皮膚病変は H&E 染色、Masson's trichrome 染色にて評価した。病理組織学的スコアは epidermal morphology, dermal fibrosis, inflammation, subdermal fat, skin appendage number をそれぞれ 0-2 で評価した。

7. 統計

全てのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で示した。有意差検定は Student's t test を使用した。

C. 研究結果

1. Scl-cGVHD の発症にともない血清 IL-6 濃度が上昇

血清 IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70 濃度を骨髄移植後 7, 14, 21, 28, 35 日に Cytometric Bead Array (CBA) にて測定した。TNF- α , IFN- γ のピークは骨髄移植後 28 日であった。IL-6 濃度は移植後 35 日まで徐々に上昇した。

2. 抗 IL-6 受容体抗体の効果

抗 IL-6 受容体抗体の投与にて血清 IL-6 濃度の上昇を認めた。他のサイトカインに変化はみられなかった。

3. IL-6 阻害療法が Scl-cGVHD を抑制

移植直後からの MR16-1 の投与 (予防モデル) に

て Scl-cGVHD の体重減少および皮膚症状の改善が認められた。さらに病理組織学的にもコントロール投与群と比べ、MR16-1 投与群において有意に皮膚硬化の改善が認められた ($p < 0.05$)。しかしながら、骨髄移植後 25 日目以降に MR16-1 を投与 (治療モデル) しても効果は認めなかった。

4. IL-6 阻害療法により制御性 T 細胞が増加

コントロール投与群と比べ、MR16-1 投与群において有意に脾臓制御性 T 細胞の増加が認められた ($p = 0.03$)。

D. 考案

マウス Scl-cGVHD モデルでは骨髄移植 21 日以後に皮膚、腸管、肺、肝臓の線維化を来す。今回の検討では、Th1 サイトカインである TNF- α 、INF- γ は骨髄移植後 28 日をピークとして上昇を認めた。さらに IL-6 は移植後、徐々に上昇を認めた。Scl-cGVHD の発症後に IL-6 を阻害しても体重減少、皮膚硬化のいずれにおいても効果は認めなかったが、病早期に IL-6 阻害を行うと有意に体重減少、皮膚硬化を抑制することが可能であった。よって、IL-6 は Scl-cGVHD の発症早期において重要な役割を有していることが明らかとなった。

自己免疫性疾患の抑制機序として制御性 T 細胞の重要性が明らかとなっている。また、急性および慢性 GVHD においても同様である。IL-6 阻害により、制御性 T 細胞の増加が報告されており、今回の検討でも Scl-cGVHD モデルにおいて IL-6 阻害療法にて制御性 T 細胞の増加が確認された。この機序としては、ナイーブ T 細胞が IL-6 と TGF- β の存在下では Th17 に分化するのに対し、IL-6 非存在下では制御性 T 細胞へと分化するためと考えられる。