

図 1 :

- 健康人 5 例、SSc 患者 3 例、SLE 患者 4 例、皮膚筋炎患者 4 例の皮膚組織における VEGF mRNA の発現に関してリアルタイム PCR 法により解析した。GAPDH で正常化した VEGF の相対的レベルを、健康人のレベル (1.0) と比較して示した。* $p < 0.05$ 。
- 培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞内 VEGF 蛋白の発現に関して免疫プロット法により解析した。各細胞は TGF β 投与有無の条件下にて 24 時間培養したものである。
- 培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞内 VEGF 蛋白の発現に関して ELISA 法により解析した。培養正常皮膚線維芽細胞のレベル (1.0) と比較して示した。* $p < 0.05$ 。
- 培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞内 VEGF mRNA の発現に関してリアルタイム PCR 法により解析した。GAPDH で正常化した VEGF の相対的レベルを、NF1 のレベル (1.0) と比較して示した。* $p < 0.05$ 。

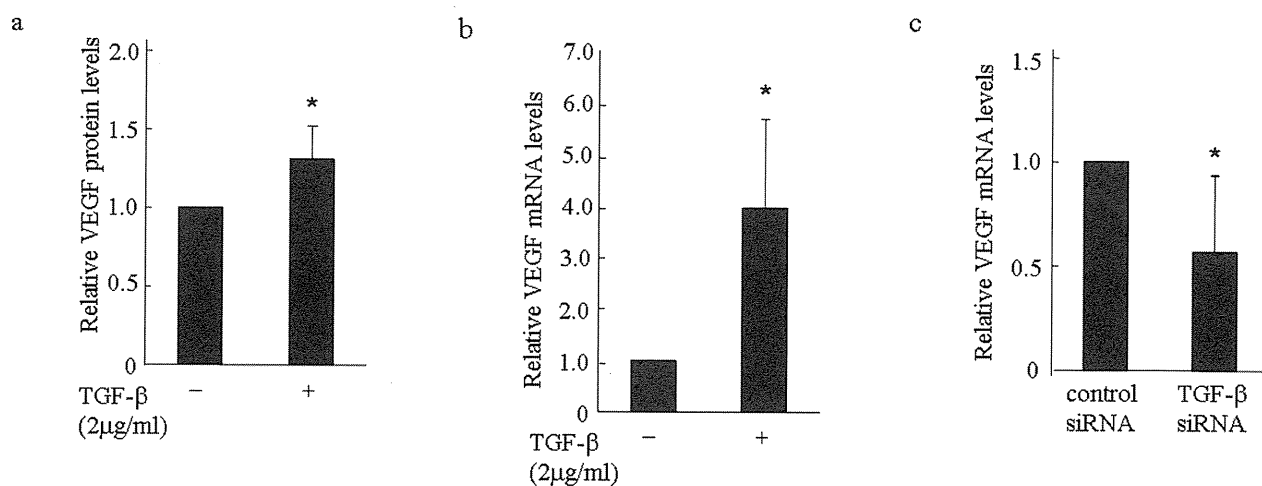


図 2 :

- 培養正常皮膚線維芽細胞内 VEGF 蛋白の発現に関して ELISA 法により解析した。各細胞は TGF β 投与有無の条件下にて 24 時間培養したものである。TGF- β 刺激なしのレベル (1.0) と比較して示した。* $p < 0.05$ 。
- 培養正常皮膚線維芽細胞内 VEGF mRNA の発現に関してリアルタイム PCR 法により解析した。各細胞は TGF- β 投与有無の条件下にて 24 時間培養したものである。TGF- β 刺激なしのレベル (1.0) と比較して示した。* $p < 0.05$ 。
- 培養強皮症皮膚線維芽細胞に対して、control siRNA および TGF- β siRNA を導入して VEGF mRNA の発現に関してリアルタイム PCR 法により解析した。control siRNA のレベル (1.0) と比較して示した。* $p < 0.05$ 。

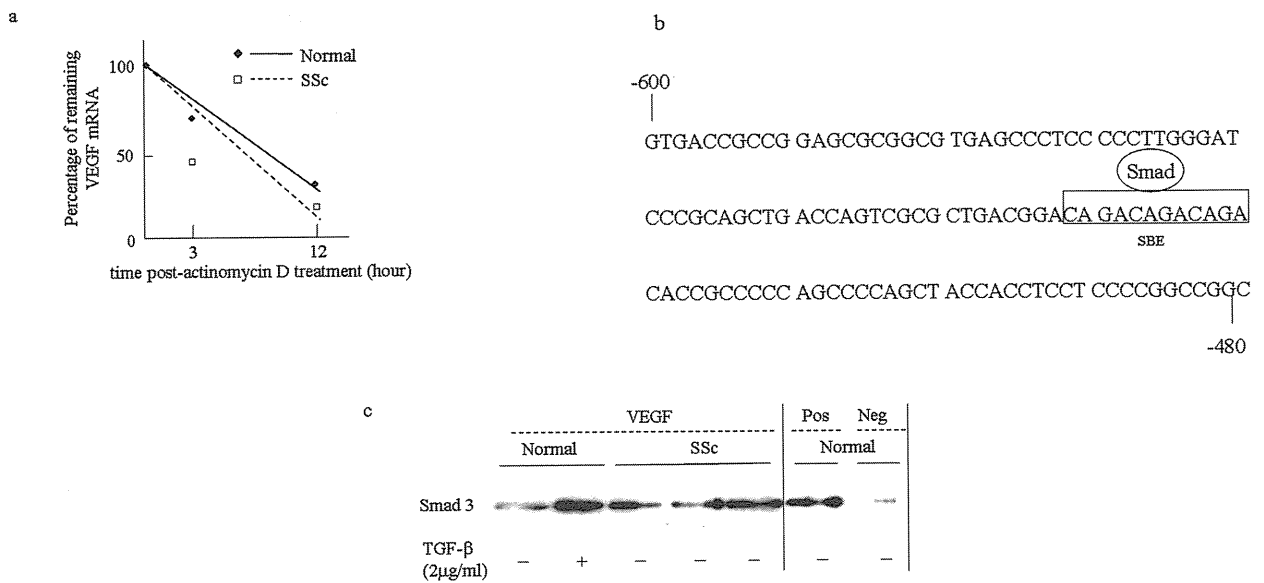


図 3 :

- a. アクチノマイシン D 2.5 μ g/ml 投与 (3、12 時間) 有無における培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞内 VEGF mRNA の発現をリアルタイム PCR 法により解析した。GAPDH で正常化した VEGF の相対的レベルを、投与無しのレベル (1.0) と比較して示した。
- b. VEGF 遺伝子プロモーター領域における SBE の位置に関して -600~-480 bp を示す。
- c. 培養正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞において VEGF プロモーター領域に結合する Smad3 蛋白の発現に関して DNA affinity precipitation assay により解析した。各細胞は TGF β 投与有無の条件下にて 1 時間培養したものである。

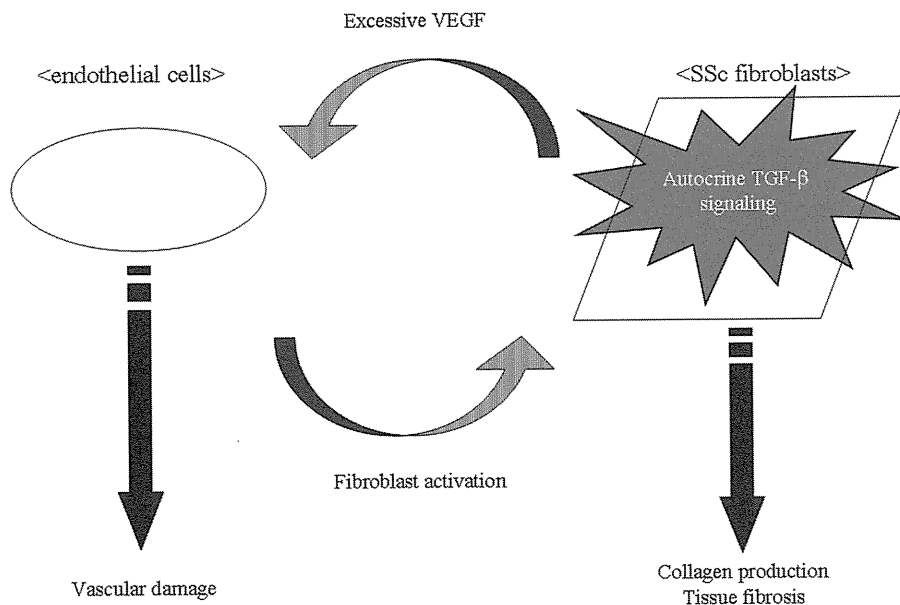


図 4 : SF における VEGF 発現調節に関する強皮症の病態を示す略図

強皮症の末梢血管障害における MFG-E8 の関与

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
協力者 茂木精一郎 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学 助教
協力者 服部友保 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学 助教
協力者 荻野幸子 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学

研究要旨

我々はこれまでに、分泌蛋白質 MFG-E8 が血管周皮細胞や間葉系幹細胞から分泌され、血管内皮細胞や血管周皮細胞表面上のインテグリンと結合し、血管新生を促進させることを明らかにした。この他にも、線維化や自己免疫性疾患との関与など様々な機能制御が報告されている。しかし、強皮症の病態における MFG-E8 の役割は未だ検討されていない。そこで、今回我々は、強皮症の病態（血管障害、線維化）における MFG-E8 の関与について検討を行った。正常人と強皮症患者由来線維芽細胞における MFG-E8 発現量を比較したところ、強皮症患者由来細胞で MFG-E8 の発現（mRNA、蛋白）が低下していた。正常人皮膚の免疫染色にて、MFG-E8 は特に血管周囲（中でも α SMA+細胞）に強く発現していた。また、線維芽細胞と細胞外基質にも染色がみられた。強皮症皮膚では正常皮膚と比べて、線維芽細胞や細胞外基質での MFG-E8 の発現が低下していた。また、一部の血管では、血管周囲の MFG-E8 の発現が低下していた。siRNA 法による MFG-E8 のノックダウンによって、ヒト間葉系幹細胞の細胞運動と管腔様構造形成能が抑制された。以上より、MFG-E8 が強皮症の血管障害の一部に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

分泌蛋白質 MFG-E8 は、N 末端に 2 つの上皮成長因子様ドメイン（E1、E2）を持ち、E2 ドメインにはインテグリンとの結合に重要な RGD 配列を含む。MFG-E8 は、この RGD 配列を介して、インテグリン $\alpha v\beta 3/5$ と結合する。一方、C 末端には第 5、8 凝固因子と相同性をもつドメイン（C1、C2）を有する。MFG-E8 は、アポトーシス細胞貪食の制御、血管新生や線維化、そして自己免疫性疾患との関与など様々な機能制御が報告されている。血管新生の制御に関しては、MFG-E8 が血管内皮細胞の VEGF 受容体シグナルを亢進させる¹⁾ という報告のほかに、我々はこれまでに、悪性黒色腫において、血管周皮細胞（ペリサイト）が MFG-E8 の主要な産生細胞で

あること、そして、MFG-E8 はインテグリン $\alpha v\beta 3/5$ との結合を介してペリサイトの PDGF 受容体シグナルを亢進させ、腫瘍血管新生を亢進させることを報告している^{2,3)}。線維化の制御に関しては、MFG-E8 KO マウスでブレオマイシン誘導性肺線維化が亢進することが報告されている⁴⁾。MFG-E8 KO マウスは、加齢に伴い、ANA の上昇、糸球体腎炎（免疫複合体沈着、蛋白尿）をきたすこと⁵⁾ や、SLE 患者では、正常人と比べて、血清 MFG-E8 値が高いこと⁶⁾ などが報告されており、その発現異常が自己免疫疾患の病態に関与している可能性が示唆される。以上より、MFG-E8 は、血管新生、皮膚線維化、自己免疫疾患に関与することが示唆される。しかし、強皮症の病態における MFG-E8 の役割は未だ検討されて

いない。そこで、今回我々は、強皮症の病態（血管障害、線維化）における MFG-E8 の関与について検討を行った。

B. 研究方法

1) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞は dcSSC 患者の同意を得た上で前腕から採取した。正常皮膚線維芽細胞は、健康人の同意を得た上で前腕より採取した。線維芽細胞は 10% 牛胎児血清含有 DMEM 培地にて培養し、3-7 継代目の細胞を実験に用いた。

2) 蛋白量の評価は Western blot 法を用いて、mRNA 量は real time PCR 法を用いて検索した。

3) 免疫染色

パラフィン包埋組織と凍結組織から 5 μ m 切片を作製し、免疫染色を行った。MFG-E8 の染色は、マウス抗ヒト MFG-E8 抗体 (R&D) を用いた（参考文献 2 を参照）。

4) siRNA 法

コントロールの siRNA と MFG-E8 siRNA を線維芽細胞にトランスフェクションし、24 時間後に血清を含まない培地に変更し、その 24 時間後に実験を行った。詳しくは、参考文献 2、3 を参照。

5) 細胞運動の評価

Transwell を用いて、ヒト間葉系幹細胞の細胞運動について検討を行った。siRNA 法によって MFG-E8 をノックダウンさせたヒト間葉系幹細胞を用いて、PDGF 刺激による migration assay を行った（参考文献 2 を参照）。

6) 管腔様構造形成能の評価

ヒト間葉系幹細胞とヒト血管内皮細胞 (HUVEC) によるマトリゲル内の共培養を行った。MFG-E8 の影響を調べるために、ヒト間葉系幹細胞と血管内皮細胞の MFG-E8 を siRNA 法によってノックダウンさ

せ、その管腔様構造形成能を比較した。

7) TGF- β 刺激による皮膚線維芽細胞の反応における MFG-E8 の役割

siRNA 法によってヒト線維芽細胞の MFG-E8 をノックダウンさせたのちに、血清を含まない培地に変更し、24 時間後に TGF β で刺激、さらに 24 時間後に 1 型コラーゲン、MMP-1、2、TIMP-1、CTGF の mRNA 量を real time PCR 法で測定した。

C. 研究結果

1) 正常人と強皮症皮膚線維芽細胞における MFG-E8 の発現

正常人 5 人と diffuse cutaneous type の強皮症患者 4 人から採取し培養した線維芽細胞における MFG-E8 の発現について検討を行った。リアルタイム PCR 法にて MFG-E8 の mRNA 量の検討を行ったところ、正常人由来線維芽細胞と比べて、強皮症由来線維芽細胞の MFG-E8 mRNA 量が低下していた。また、MFG-E8 蛋白量も低下していた（図 1）。

2) 正常皮膚における MFG-E8 の局在、発現

次に、正常皮膚における MFG-E8 の局在、発現量について免疫染色による検討を行った。パラフィン包埋組織の免疫染色では、真皮の細胞外基質に MFG-E8 の染色がみられ、また血管周囲に強く染色がみられた（図 2 左）。凍結組織を用いた免疫染色でも、線維芽細胞や細胞外基質に MFG-E8 の染色がみられた。また、MFG-E8 は、CD31 陽性血管内皮細胞よりも、その周りに局在する α SMA 陽性細胞であるペリサイトや血管平滑筋細胞に発現がみられた（図 2 右）。これらの結果より、正常皮膚では、線維芽細胞より分泌された MFG-E8 は周囲の細胞外基質に沈着することが示唆された。また、MFG-E8 は血管周囲に強く染色され、特にペリサイトや血管平滑筋細胞から産生、分泌される可能性が示唆された。

3) 正常人と強皮症皮膚における MFG-E8 の局在、発現

次に、正常皮膚と強皮症皮膚における MFG-E8 の局在、発現量について比較を行った。パラフィン包埋組織染色において、強皮症皮膚では正常皮膚と比べて、線維芽細胞や細胞外基質での MFG-E8 の発現が低下していた (図 3 左)。また、凍結組織を用いた免疫染色で詳細な検討を行ったところ、強皮症皮膚では正常皮膚と比べて、線維芽細胞や細胞外基質での MFG-E8 の発現が低下していた。また、強皮症皮膚において、一部の血管では、血管周囲の MFG-E8 の発現が少ないのがみられた (図 3 右)。これらの結果より、正常皮膚では、線維芽細胞より分泌された MFG-E8 は周囲の細胞外基質に沈着し、強皮症皮膚では、その発現、分泌が低下している可能性が示唆された。

4) ヒト間葉系幹細胞の細胞運動、管腔様構造形成能における MFG-E8 の役割

次に、ヒト皮膚の血管障害、血管新生制御における MFG-E8 の役割について、*in vitro* で検討を行った。近年、ヒト皮膚においてペリサイトは間葉系幹細胞 (MSC) としての能力を有することが報告されている⁷⁾ ことから、我々はヒト間葉系幹細胞を用いて検討を行った。まず、ヒト間葉系幹細胞の細胞運動について検討を行った。siRNA 法によって MFG-E8 をノックダウンさせたヒト間葉系幹細胞を用いて、PDGF 刺激による migration assay を行った。コントロールの siRNA と比べて、MFG-E8 をノックダウンさせた細胞で細胞運動が抑制された。そして、ノックダウンした細胞に、リコンビナント MFG-E8 を加えることによって、細胞運動が亢進した (図 4)。

次にヒト間葉系幹細胞と血管内皮細胞 (HUVEC) の共培養による管腔様構造形成能について検討を行った。コントロールの siRNA と比べて、MFG-E8 の

ノックダウンによって、管腔様構造の形成が抑制された。そして、ノックダウンした細胞にリコンビナント MFG-E8 を加えることによって、管腔様構造の形成が亢進した (図 5)。

これらの結果より、MFG-E8 は、ヒト間葉系幹細胞の細胞運動と管腔様構造形成能を促進させることが示唆された。

5) TGF- β 刺激による正常皮膚由来線維芽細胞の 1 型コラーゲン、MMP-1、-2、TIMP-1、CTGF 産生能における MFG-E8 の関与

線維化における MFG-E8 の関与について検討を行った。siRNA 法によってヒト線維芽細胞の MFG-E8 をノックダウンさせたのちに、血清を含まない培地に変更して、24 時間後に TGF β で刺激し、さらに 24 時間後に 1 型コラーゲン、MMP-1、-2、TIMP-1、CTGF の mRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。ヒト線維芽細胞において、MFG-E8 をノックダウンしても、TGF- β 刺激による 1 型コラーゲン、MMP-1、-2、TIMP-1、CTGF 産生能には明らかな差はみられなかった (図 6)。

D. 考 案

我々は、分泌蛋白質 MFG-E8 が、マウスの腫瘍や網膜において、血管新生を亢進させることを明らかにしており^{2,3)}、MFG-E8 が血管新生、血管障害に重要な役割を担うことが示唆される。

これまでに、マウスの正常皮膚や腫瘍内において、MFG-E8 が血管周囲、特に血管周皮細胞や血管平滑筋細胞に強く発現していることを明らかにしているが、今回、正常人皮膚の免疫染色においても、MFG-E8 は特に血管周囲 (中でも α SMA + 細胞) に強く発現していた。強皮症皮膚では、真皮の血管周囲の MFG-E8 の発現が低下していた。これらの結果より、MFG-E8 が強皮症の血管障害の機序の一部に関与す

る可能性が示唆される。

また、in vitro でも血管障害、血管新生における MFG-E8 の役割を検討し、MFG-E8 が、ヒト間葉系幹細胞の細胞運動と管腔用構造形成能を亢進させることを示し、ヒト MFG-E8 の発現異常が血管障害に関与する可能性が示唆された。

正常皮膚において、線維芽細胞と細胞外基質に MFG-E8 の染色がみられた。また、免疫染色と培養線維芽細胞を用いた検討より、正常線維芽細胞と比べて、強皮症由来皮膚線維芽細胞の MFG-E8 発現量が低下していたことから、強皮症皮膚では、線維芽細胞からの MFG-E8 の発現、分泌が低下していると考えられた。過去に MFG-E8 KO マウスでブレオマイシン誘導性肺線維化が亢進することが報告されており 4)、線維芽細胞からの MFG-E8 産生、分泌低下が線維化に関与する可能性が考えられた。しかし、ヒト線維芽細胞において、TGF- β 刺激による 1 型コラーゲン、MMP-1、-2、TIMP-1、CTGF 産生能における MFG-E8 の影響はみられなかった。線維化における MFG-E8 の役割については未だ不明であり、更なる検討が必要である。

E. 結 論

今回の検討により、分泌蛋白質 MFG-E8 が強皮症の血管障害の一部に関与する可能性が示唆された。線維化における MFG-E8 の役割については未だ不明であり、更なる検討が必要である。

F. 文 献

1. Silvestre JS, et al. Lactoadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med.* 2005; 11:

499–506.

2. Motegi S, et al. Pericyte-derived MFG-E8 regulates pathologic angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 2024–2034.
3. Motegi S, et al. Potentiation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Signaling Mediated by Integrin-Associated MFG-E8. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 2653-2664.
4. Atabai K, et al. Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages. *J Clin Invest.* 2009; 119: 3713–3722.
5. Hanayama R, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science.* 2004; 304: 1147–1150.
6. Yamaguchi H, et al. Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol.* 2008; 83: 1300-1307.
7. Crisan M, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008; 3: 301-313.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

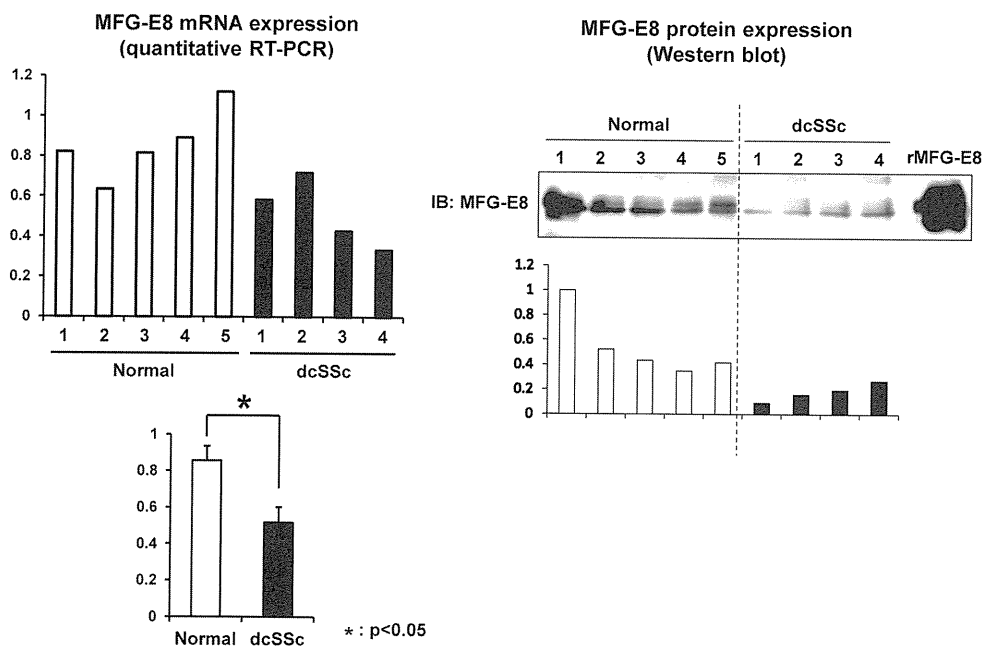


図 1：正常人と強皮症皮膚線維芽細胞における MFG-E8 の発現

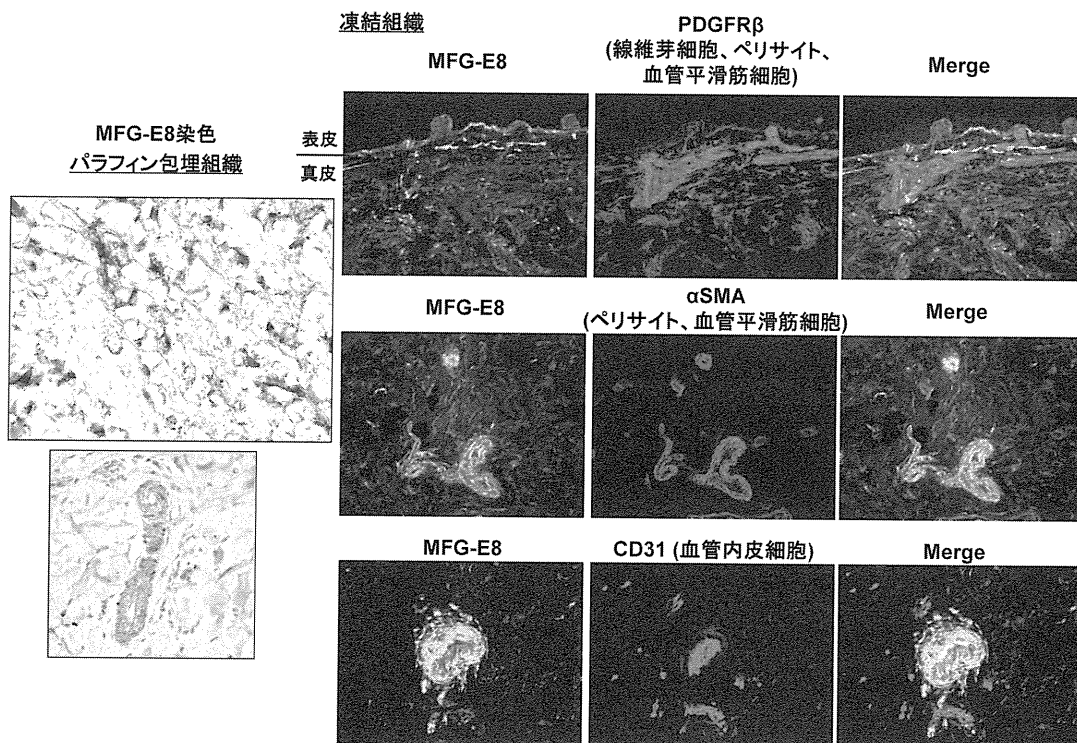


図 2：正常皮膚における MFG-E8 の局在、発現
 パラフィン包埋組織(左)、凍結組織(右)を用いた免疫染色で、正常ヒト皮膚における MFG-E8 の発現、局在について検討を行った。

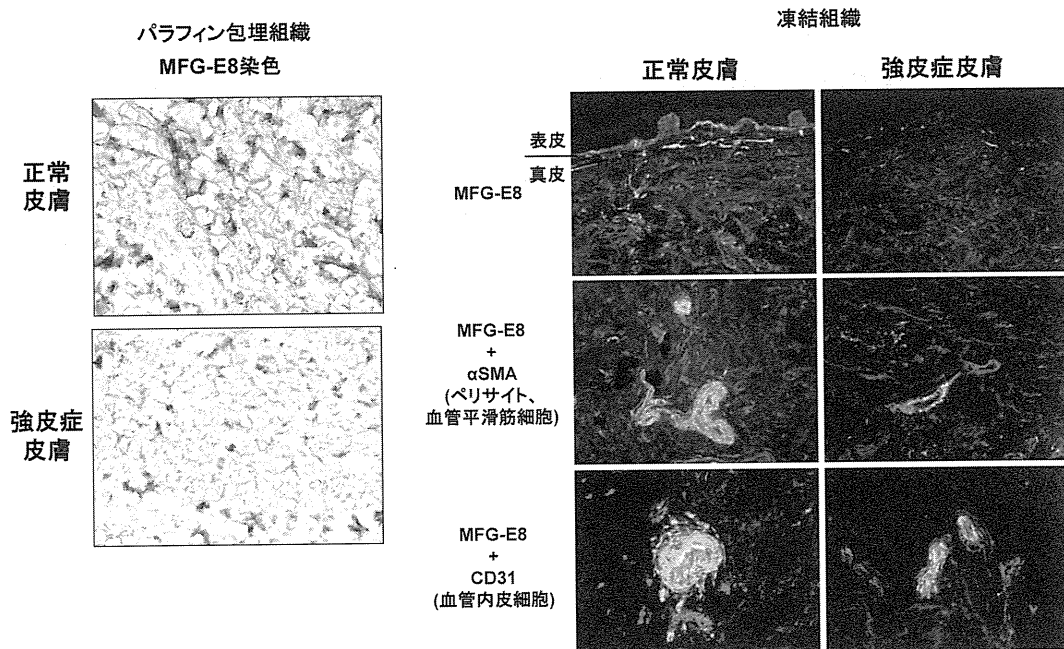


図3：正常人と強皮症皮膚における MFG-E8 の局在、発現
 パラフィン包埋組織（左）、凍結組織（右）を用いた免疫染色で、正常ヒト皮膚と強皮症皮膚における MFG-E8 の発現、局在について比較検討を行った。

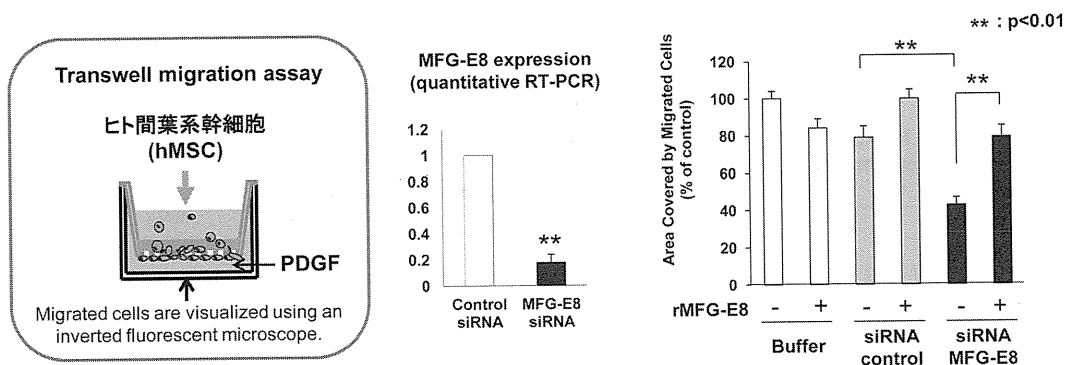


図4：ヒト間葉系幹細胞の細胞運動における MFG-E8 の役割
 siRNA 法によって MFG-E8 をノックダウンさせたヒト間葉系幹細胞を用いて、PDGF 刺激による migration assay を行った。

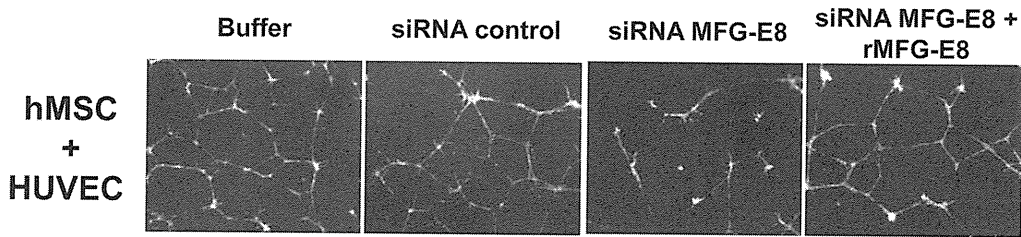


図5：ヒト間葉系幹細胞の管腔様構造形成能における MFG-E8 の役割
 siRNA 法によって MFG-E8 をノックダウンさせたヒト間葉系幹細胞と血管内皮細胞（HUVEC）の共培養による管腔様構造形成能について検討を行った。

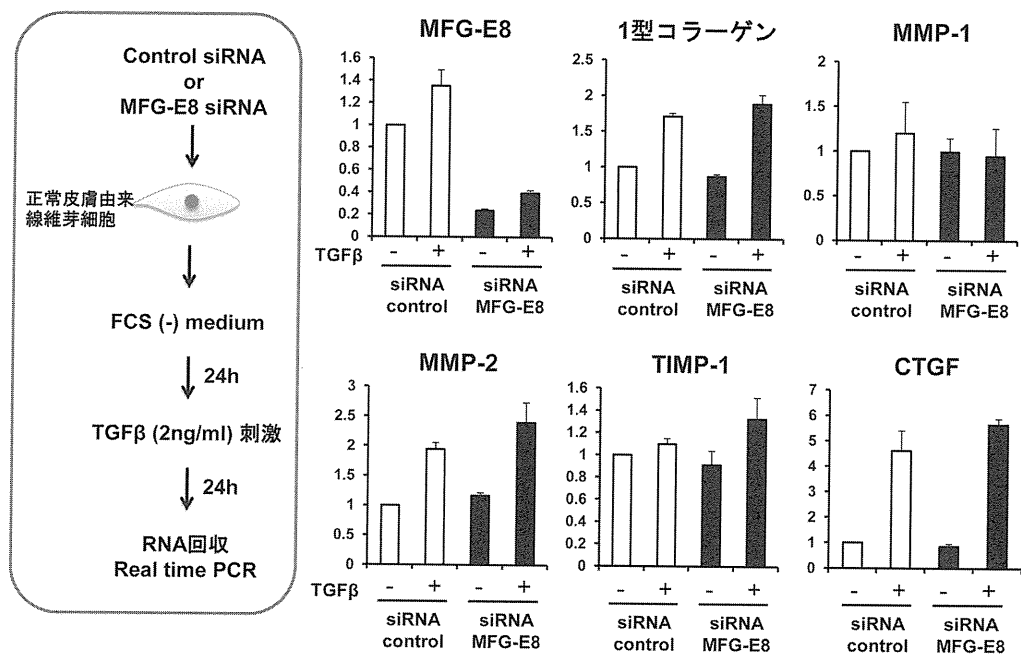


図6：TGF-β 刺激による正常皮膚由来線維芽細胞の1型コラーゲン、MMP-1、-2、TIMP-1、CTGF 産生能における MFG-E8 の関与
 siRNA 法によってヒト線維芽細胞の MFG-E8 をノックダウンさせたのちに、TGFβ 刺激し、24 時間後に1型コラーゲン、MMP-1、-2、TIMP-1、CTGF の mRNA 量をリアルタイムPCR法で測定した。

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

| | | |
|-------|-------|------------------------------------|
| 研究協力者 | 土屋尚之 | 筑波大学医学医療系 分子遺伝疫学 教授 |
| 協力者 | 長谷部成美 | 筑波大学医学医療系 分子遺伝疫学 大学院生 |
| 協力者 | 川崎 綾 | 筑波大学医学医療系 分子遺伝疫学 研究員 |
| 協力者 | 伊東郁恵 | 筑波大学医学医療系 分子遺伝疫学 大学院生 |
| 協力者 | 川本 学 | 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博士 研究員 |
| 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 | 古川 宏 | 国立病院機構相模原病院臨床研究センター室長 |
| 協力者 | 當間重人 | 国立病院機構相模原病院臨床研究センター部長 |
| 協力者 | 住田孝之 | 筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）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 |

研究要旨

われわれはこれまでに、全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus, SLE）、関節リウマチ（rheumatoid arthritis, RA）の疾患感受性遺伝子である *IRF5*、*STAT4*、*BLK* が全身性強皮症（systemic sclerosis, SSc）の疾患感受性とも関連することを報告してきた。本研究では、近年、国外において SLE、RA との関連が見いだされたユビキチン結合酵素 *UBE2L3* と SSc との関連を検討した。SSc 全体では有意な関連が検出されなかったものの、rs131654T/T 遺伝子型が、びまん皮膚硬化型（diffuse cutaneous, dc）SSc 群（ $P=0.0069$ 、オッズ比 [odds ratio, OR] 1.58、95% 信頼区間 [confidence interval, CI] 1.13-2.20）、抗 topoisomerase I 抗体（ATA）陽性群（ $P=0.0042$ 、OR 1.79、95%CI 1.20-2.68）に有意に増加し、これと連鎖不平衡にある rs2298428T/T も、dcSSc 群（ $P=0.010$ 、OR 1.74、95%CI 1.14-2.64）に有意な増加を認めた。*UBE2L3* と SSc との関連の報告はこれまでになく、本研究により、*UBE2L3* も SLE、RA、SSc に共通の疾患感受性遺伝子であることが、初めて示唆された。

A. 研究目的

われわれはこれまでに、全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus, SLE）あるいは関節リウマチ（rheumatoid arthritis, RA）の疾患感受性遺伝子として報告された *IRF5*、*STAT4*、*BLK* が、全身性強皮症（systemic sclerosis, SSc）の疾患感受性とも関連することを報告してきた⁽¹⁻³⁾。

ユビキチン結合酵素をコードする *UBE2L3* 領域の一塩基多型（single nucleotide polymorphism, SNP）と

SLE との関連が、ヨーロッパ系集団⁽⁴⁾および中国⁽⁵⁾におけるゲノムワイド関連研究（genome-wide association study, GWAS）により報告され、その後、RA との関連も報告されている⁽⁶⁾。全身性自己免疫疾患における遺伝因子の共通性を考慮すると、*UBE2L3* も SSc の有力な候補遺伝子と考えられる。

本研究では、日本人集団における *UBE2L3* と SSc との関連を解析した。

B. 研究方法

日本人 SSc 391 名、健常対照者 1010 名を対象としたケース・コントロール関連解析を行った。

UBE2L3 遺伝子は、一つの連鎖不平衡ブロックに含まれるため、中国人集団において SLE との関連が報告されている⁽³⁾、それぞれ *UBE2L3* 上流および下流に位置する 2 個所の SNP、rs131654 と rs2298428 を解析対象とし、TaqMan 法を用いて遺伝子型を決定し、関連解析を施行した。False Discovery Rate を 0.05 とし、多重比較の補正を行い、有意水準を 0.0125 と設定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、筑波大学、東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター、金沢大学、国立病院機構相模原病院における倫理委員会において審議され、承認を受けた研究計画に従い、遺伝子解析に関する研究参加者のインフォームドコンセントを得、匿名化した試料を用いて施行されたため、研究の施行に倫理面の問題は無いと判断された。

C. 研究結果

関連解析の結果を表 1 に示す。rs131654 については、SSc 全体では有意な関連は検出されなかったものの、T/T 遺伝子型が、びまん皮膚硬化型 SSc (diffuse cutaneous SSc, dcSSc) 群 ($P=0.0069$ 、オッズ比 [odds ratio, OR] 1.58、95% 信頼区間 [confidence interval, CI] 1.13-2.20) および抗 topoisomerase I 抗体 (ATA) 陽性群 ($P=0.0042$ 、OR 1.79、95%CI 1.20-2.68) において、有意に増加していた。また、統計学的有意差には到達しなかったものの、間質性肺病変 (interstitial lung disease, ILD) 合併例においても、関連傾向が検出された。一方、限局皮膚硬化型 SSc (limited cutaneous SSc, lcSSc) 群、抗セントロメア抗体 (ACA) 陽性群では、関連傾向は認められなかった。

また、rs2298428 においても、SSc 全体では関連が認められなかったものの、dcSSc との統計学的に有意な関連が検出され ($P=0.010$ 、OR 1.74、95%CI 1.14-2.64)、ATA 陽性群、ILD 合併群においても、関連傾向が検出された。一方、lcSSc 群、ACA 陽性群には、関連傾向は検出されなかった。

これら 2 個所の SNP は連鎖不平衡にあり ($D'=0.94$ 、 $r^2=0.44$)、いずれかの関連が一義的である可能性が考えられたため、ロジスティック回帰分析によりその可能性を検討したが、いずれにより調整した場合も他方の関連には有意差が検出されなかったため、いずれかが第一義的であると結論することはできなかった。

D. 考案

本研究により、*UBE2L3* と SSc サブセットとの関連が、国内外を通じて初めて示唆された。*STAT4*、*IRF5*、*BLK* 等同様、*UBE2L3* も SLE、RA、SSc に共通する病因形成経路に関連することが強く示唆された。

UBE2L3 はユビキチン結合酵素をコードし、リスク遺伝子型は、*UBE2L3* 発現上昇と関連するとの報告がある⁽⁷⁾ものの、現時点では、SSc の分子機構において果たす役割は不明である。TRAF6、RIP などのユビキチン化の修飾により NF- κ B 経路の制御に関与する A20 をコードする *TNFAIP3*、A20 と結合する ABIN をコードする *TNIP1* 遺伝子が、いずれも、SLE や RA と関連する^(8,9)のみならず、SSc とも関連し、特に dcSSc、ATA 陽性群においてその関連が顕著であることが報告されている^(10,11)。*UBE2L3* は、NF- κ B の precursor である p105 のユビキチン化に関与することが示唆されており⁽¹²⁾、この経路を介して、自己免疫疾患の発症に関与する可能性が示唆される。

E. 結 論

UBE2L3 領域の SNP と dcSSc、ATA 陽性 SSc との関連が初めて示された。*UBE2L3* も、*IRF5*、*STAT4*、*BLK* 同様、日本人集団において、SLE、RA および dcSSc に共通の疾患感受性遺伝子であることが示唆された。

F. 文 献

1. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Hikami K, et al. Association of a functional polymorphism in the *IRF5* region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1845-1850.
2. Tsuchiya N, Kawasaki A, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kawaguchi Y, et al. Association of *STAT4* polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1375-1376.
3. Ito I, Kawaguchi K, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Kawamoto M, et al. Association of the *FA-M167A-BLK* region with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 890-895.
4. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) , Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in *ITGAM*, *PXK*, *KIAA1542* and other loci. *Nat Genet* 2008; 40: 204-210.
5. Han JW, Zheng HF, Cui Y, Sun LD, Ye DQ, Hu Z, et al. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2009; 41: 1234-1237.
6. Orozco G, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Morgan AW, Wilson AG, et al. Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 463-468.
7. Fransen K, Visschedijk MC, van Sommeren S, Fu JY, Franke L, Festen EA, et al. Analysis of SNPs with an effect on gene expression identifies *UBE2L3* and *BCL3* as potential new risk genes for Crohn's disease. *Hum Mol Genet.* 2010; 19: 3482-3488.
8. Kawasaki A, Ito I, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, et al. Association of *TNFAIP3* polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *J Biomed Biotechnol* 2010; doi: 10.1155/2010/207578
9. Kawasaki A, Ito S, Furukawa H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, et al. Association of *TNFAIP3* interacting protein 1, *TNIP1* with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R174.
10. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Riemekasten G, Matucci-Cerinic M, et al. Association of the *TNFAIP3* rs5029939 variant with systemic sclerosis in the European Caucasian population. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1958-1964.
11. Allanore Y, Saad M, Dieudé P, Avouac J, Distler JH, Amouyel P, et al. Genome-wide scan identifies *TNIP1*, *PSORS1C1*, and *RHOB* as novel risk loci for systemic sclerosis. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002091.
12. Moynihan TP, Cole CG, Dunham I, O'Neil L, Markham AF, Robinson PA. Fine-mapping, genomic organization, and transcript analysis of the human ubiquitin-conjugating enzyme gene *UBE2L3*. *Genomics* 1998; 51: 124-127.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furuya T, Koga M, Hikami K, Kawasaki A, Tsuchiya N. Effects of APRIL (TNFSF13) polymorphisms and splicing isoforms on the secretion of soluble APRIL. *Mod Rheumatol* online first, October 10, 2011; doi: 10.1007/s10165-011-0539-z
2. Koga M, Kawasaki A, Ito I, Furuya T, Ohashi J, Kyogoku C, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. Cumulative association of eight susceptibility genes with systemic lupus erythematosus in a Japanese female population. *J Hum Genet* 2011; 56(7), 503-507.
3. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. TLR7 single-nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region and intron 2 independently contribute to systemic lupus erythematosus in Japanese women: a case-control association study. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(2): R41.
4. Hikami K, Kawasaki A, Ito I, Koga M, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Tsutsumi A, Kusaoi M, Takasaki Y, Hashimoto H, Arinami T, Sumida T, Tsuchiya N. Association of a functional polymorphism in the 3' untranslated region of SPI1 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 755-763.
5. 土屋尚之：全身性強皮症の疾患感受性遺伝子にはどのようなものがあるか。皮膚科臨床アセット7「皮膚科膠原病のすべて」(古江増隆、佐藤伸一編) 中山書店、東京、pp. 161-165, 2011
6. 土屋尚之：全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子にはどのようなものがあるか。皮膚科

臨床アセット7「皮膚科膠原病のすべて」(古江増隆、佐藤伸一編) 中山書店、東京、pp. 63-67, 2011

7. 土屋尚之：ANCA 関連血管炎の遺伝因子。リウマチ科 2011; 46(4): 421-426.
 8. 土屋尚之：関節リウマチにおける疾患抵抗性 HLA-DRB1 アリル。リウマチ科 2011; 45(1): 62-67.
- ### 2. 学会発表
1. 土屋尚之、伊東郁恵、近藤裕也、林太智、松本功、住田孝之、伊藤聡、草生真樹雄、高崎芳成、橋本博史、瀬戸口京吾、永井立夫、廣畑俊成、古川宏、當間重人：MTMR6-C8orf12 領域と FAM167A-BLK 領域は、日本人集団において、独立に SLE に関連する。第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 23 年 7 月 17 日～20 日、神戸。
 2. 土屋尚之、伊東郁恵、古川宏、當間重人、小林茂人、橋本博史、山田秀裕、尾崎承一、宮坂信之、針谷正祥、槇野博史：日本人集団における ANCA 関連血管炎と BLK との関連。第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 23 年 7 月 17 日～20 日、神戸。
 3. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. An association study of IRF7 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 23 年 7 月 17 日～20 日、神戸。
 4. 古川宏、松井利浩、中山久徳、島田浩太、池中達央、小宮明子、高岡宏和、二見秀一、土屋尚之、當間重人。SLE 不一致一卵性双生児例のゲノム・エピゲノム解析。第 55 回日本リウマチ学

会総会・学術集会、平成 23 年 7 月 17 日～20 日、**H. 知的財産権の出願・登録状況**
 神戸 該当なし

表 1. UBE2L3 多型と全身性強皮症の関連

| | 遺伝子型頻度 ^{*1} | | | Total | リスクアリル頻度 ^{*2} | OR (95% CI) | P |
|---------------------|----------------------|------------|------------|-------|------------------------|------------------|--------|
| | T/T | T/G | G/G | | | | |
| rs131654 | | | | | | | |
| SSc | 118 (30.2) | 174 (44.5) | 99 (25.3) | 391 | 52.4 | 1.28 (0.99-1.66) | 0.061 |
| dcSSc*4 | 65 (34.8) | 70 (37.4) | 52 (27.8) | 187 | 53.5 | 1.58 (1.13-2.20) | 0.0069 |
| lcSSc*4 | 53 (26.4) | 102 (50.8) | 46 (22.9) | 201 | 51.7 | 1.06 (0.75-1.50) | 0.74 |
| ATA+ | 43 (37.7) | 42 (36.8) | 29 (25.4) | 115 | 56.1 | 1.79 (1.20-2.68) | 0.0042 |
| ACA+ | 35 (28.7) | 66 (54.1) | 21 (17.2) | 122 | 55.7 | 1.19 (0.79-1.81) | 0.41 |
| ILD | 56 (31.6) | 77 (43.5) | 44 (24.9) | 177 | 53.4 | 1.37 (0.97-1.94) | 0.074 |
| 健常対照群 ^{*5} | 255 (25.3) | 517 (51.2) | 238 (23.6) | 1010 | 50.8 | referent | |
| rs2298428 | | | | | | | |
| SSc | 56 (14.3) | 177 (45.3) | 158 (40.4) | 391 | 37.0 | 1.35 (0.96-1.91) | 0.084 |
| dcSSc*4 | 33 (17.7) | 78 (41.7) | 76 (40.6) | 187 | 38.5 | 1.74 (1.14-2.64) | 0.010 |
| lcSSc*4 | 23 (11.4) | 97 (48.3) | 81 (40.3) | 201 | 35.6 | 1.05 (0.65-1.69) | 0.85 |
| ATA+ | 20 (17.5) | 56 (49.1) | 38 (33.3) | 114 | 42.1 | 1.72 (1.03-2.89) | 0.039 |
| ACA+ | 18 (14.8) | 61 (50.0) | 43 (35.3) | 122 | 39.8 | 1.40 (0.82-2.40) | 0.22 |
| ILD | 29 (16.4) | 81 (45.8) | 67 (37.9) | 177 | 39.3 | 1.59 (1.02-2.47) | 0.040 |
| 健常対照群 ^{*5} | 111 (11.0) | 468 (46.3) | 431 (42.7) | 1010 | 34.2 | referent | |

*1 () 内は % を示す。*2 いずれの SNP についても、T アリルがリスク遺伝子型である。*3 T/T 遺伝子型と T/G + G/G 遺伝子型を χ^2 検定により比較した。False Discovery Rate < 0.05 から、有意水準を P < 0.0125 とした。OR: オッズ比、95% CI: 95% 信頼区間、ATA: 抗 topoisomerase I 抗体、ACA: 抗セントロメア抗体、ILD: 間質性肺病変

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

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
協力者 瀬川誠司 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 臨床免疫学 大学院生
協力者 堀越正信 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 臨床免疫学 大学院生
協力者 松本 功 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
協力者 住田孝之 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 教授

研究要旨

間質性肺炎は、全身性強皮症 (SSc) 患者において重篤な合併症の 1 つである。昨年度までに我々は、IL-2 + IL-18 誘導性間質性肺炎モデルマウスにおいて、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が病態に関与する可能性を示唆する結果を報告している。今回、我々は、マウス NK1.1 のヒト相同分子として知られる CD161 陽性のヒト $\gamma\delta$ T 細胞に着目し、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞が膠原病合併間質性肺炎に及ぼす影響に関する研究を行った。健常人 (HC) と、間質性肺炎を合併することの多い関節リウマチ (RA)、多発性筋炎 / 皮膚筋炎 (PM/DM)、SSc の患者由来 PBMC 中の CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞の比率、間質性肺炎病態との関連を検討した。その結果、間質性肺炎非合併 SSc 患者では HC および間質性肺炎陽性 SSc 患者に比べて、PBMC 中の CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞割合が有意に増加していた。さらに、間質性肺炎陽性 SSc 患者において、血清 KL-6 値と PBMC 中 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞割合との相関を解析したところ、両者の間に有意な負の相関を認めた。一方で、RA、PM/DM 患者では、PBMC 中 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞割合に著明な差は認められず、間質性肺炎病態との関与も認められなかった。以上の結果から、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞は SSc に合併した間質性肺炎病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は、いまだに難治性の疾患であることに変わりがなく、他の膠原病疾患の多くがステロイドを初めとした免疫抑制療法が有効であるのとは対照的に、決定的な有効治療がないのが問題となっている。皮膚の硬化病変もさることながら、予後を左右する内臓病変が問題となるが、特に最近、強皮症患者の死因の中で間質性肺炎が占める割合が顕著に増えてきている^[1]。従って、強皮症患者の予後を改善する為には、間質性肺炎の病態を明らかとし、その治療法を検討することが最も重要なことであると考えられる。

我々は、IL-2 と IL-18 によって誘導されるヒト間

質性肺炎の初期像に類似したモデルマウスを用いて、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が間質性肺炎の増悪に関与することを報告してきた^[2]。一方、ヒト間質性肺炎病態における $\gamma\delta$ T 細胞の役割に関する解析は十分には行われてはいない。ヒト $\gamma\delta$ T 細胞は、TCR-V δ 鎖の違いにより、V δ 1 陽性細胞、V δ 2 陽性細胞に分けられる。特に、V δ 1 陽性細胞は SSc の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられている^[3]。また、マウスの NK1.1 はヒトでは CD161 に相当することが報告されているものの、CD161 を発現した $\gamma\delta$ T 細胞と SSc および、間質性肺炎病態での関与は不明である。そこで我々は、V δ 1 陽性細胞に着目し、CD161 発現細胞の割合、さらに間質性肺炎病態との関連を

解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象

対象患者は、強皮症 (SSc) 34 例 (男女 6 : 28、 55.6 ± 12.9 歳)、関節リウマチ (RA) 17 例 (男女 3 : 14、 62.4 ± 10.5 歳)、多発性筋炎 / 皮膚筋炎 (PM/DM) 14 例 (男女 4 : 10、 52.9 ± 10.0 歳) を用いた。また、健常人 (HC) 22 例 (男女 5 : 17、 42.9 ± 1.88 歳) をコントロールとして用いた。

2) 末梢血単核球の分離

健常人および患者由来の末梢血単核球 (PBMC) は、Ficoll-Paque (GE Healthcare, UK) を用いた密度勾配遠心分離法により得た。

3) 細胞染色と解析

血液より得られた PBMC は、以下のモノクローナル抗体を用いて染色を行った。PerCP-conjugated anti-CD3 (UCHT1)、phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD161 (HP-3G10)、Dylight 649-conjugated anti-mouse IgG1 κ mAbs は BioLegend (San Diego, CA) から購入。Anti-TCR V δ 1 (TS-1) mAbs は Thermo Scientific (Waltham, MA) から購入。染色した細胞は FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) で測定し、データ解析には FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) を用いた。

4) 統計解析

統計解析には統計解析ソフト (SPSS Statistics, IBM, NY) を使用した。2 群間の有意差の検定は Mann-Whitney U test を使用した。2 変量数間の相関検定は Spearman's rank correlation を使用した。P 値が 0.05 未満の場合に有意差有りと判断した。

なお、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すべての健常者、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

1) PBMC 中 V δ 1 陽性細胞の比率に関する解析

HC、RA、PM/DM、SSc 患者 PBMC 中の V δ 1 陽性細胞の割合を解析した結果、いずれの群間でも有意な差は認められなかった (図 1)。次に、間質性肺炎合併の有無に分けて解析したところ、間質性肺炎陰性 SSc 患者において HC に比べて、PBMC 中の V δ 1 陽性細胞割合の有意な増加を認めた ($p < 0.05$) (図 2)。

2) V δ 1 陽性細胞における CD161 陽性細胞の比率に関する解析

HC、RA、PM/DM、SSc 患者 PBMC 中の V δ 1 陽性細胞上の CD161 発現率を解析した。その結果、SSc において HC に比べて PBMC 中 V δ 1 陽性細胞上の CD161 発現率の有意な上昇を認めた ($p < 0.05$) (図 3)。次に、間質性肺炎合併の有無に分けて解析したところ、間質性肺炎陰性 SSc 患者では HC および間質性肺炎陽性 SSc 患者に比べて、PBMC 中 V δ 1 陽性細胞上の CD161 発現率の有意な上昇を認めた ($p < 0.005$, $p < 0.01$) (図 4)。さらに、PBMC 中の CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞割合の解析でも同様の結果が得られた ($p < 0.005$, $p < 0.05$) (図 5)。

3) 血清 KL-6 値と血中 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞比率との相関

間質性肺炎合併 SSc、間質性肺炎合併 PM/DM 患者での血清 KL-6 値と PBMC 中 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞割合との相関を解析した。その結果、間質性肺炎合併 SSc 患者では、血清 KL-6 値と PBMC 中 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞比率との間に、有意な負の相関を認めた ($p < 0.05$) (図 6c)。また、血清 KL-6 値と PBMC 中 V δ 1 陽性細胞、CD161 陰性 V δ 1 陽性細胞割合との間に、有意な相関は確認出来なかった (図 6a, 6b)。間質性肺炎合併 PM/DM 患者においては、血清 KL-6 値といずれの V δ 1 陽性細胞割合につ

いて、有意な相関は認められなかった（データ未掲載）。

D. 考 案

SScにおける間質性肺炎合併の有無による病態の違いには、主にサイトカイン・ケモカイン等の液性因子の関与が報告されてきた^[4]。今回、我々の研究より、CD161陽性V δ 1陽性細胞がSScにおける間質性肺炎病態に関与する可能性が示唆された。

現在までに、SScの血中ではV δ 1陽性細胞が増加することが報告されていたが、CD161との関連については不明であった。今回の研究結果より、間質性肺炎非合併SSc患者では、間質性肺炎合併SSc、HCに比べて血中CD161陽性V δ 1陽性細胞比率が有意に増加することが明らかとなった。また、間質性肺炎合併SSc患者では、CD161陽性V δ 1陽性細胞比率自体は健常人と同程度なのに対し、血中KL-6値との間に有意な負の相関を認めた。興味深いことに、これらの結果は、SScと同様に間質性肺炎合併頻度の高い自己免疫疾患であるRA、PM/DM患者では認められなかった。これらのことから、CD161陽性V δ 1陽性細胞は、SScの病態と何らかの関与が有るものと考えられる。しかしながら、HC、間質性肺炎非合併SSc、間質性肺炎合併SScについて、血中CD161陽性V δ 1陽性細胞比率に差が生じる理由に関して、詳細な機構は不明であるが、次のような事柄が考えられる。

① SScにおけるCD161陽性V δ 1陽性細胞の増加：現在までに、SSc患者の血中または皮膚硬化組織においてV δ 1陽性細胞の増加が報告されてきた^[5]。この理由の一つとして、特定の抗原認識によるモノクローナルなV δ 1陽性細胞の増加が考えられている^[6]。しかしながら、SScにおいて、V δ 1陽性細胞がどのような抗原を認識しているのかは未だ

に不明である。間質性肺炎非合併SSc患者では、HC、間質性肺炎合併SSc患者に比べて、血中V δ 1陽性細胞比率の増加が認められるものの、CD161陰性V δ 1陽性細胞比率には差が見られない。このことから、CD161陽性V δ 1陽性細胞が顕著に増加していることが考えられる。しかしながら、CD161陽性V δ 1陽性細胞が間質性肺炎非合併SSc患者のみで増加するとは考え難く、間質性肺炎合併SSc患者においてもある時期には血中CD161陽性V δ 1陽性細胞が増加するものと考えられる。

② 肺病変局所への細胞遊走：マウスでの検討より、 $\gamma\delta$ T細胞が炎症組織に遊走し、炎症惹起や創傷治癒といった働きをすることが報告されてきた^[7]。ヒトにおいても、V δ 2陽性細胞において、同様の報告がなされた^[8]。しかしながら、V δ 1陽性細胞ではそのような報告はなされていない。今回の研究より、間質性肺炎合併SSc患者では、血中KL-6値とPBMC中CD161陽性V δ 1陽性細胞比率の間に、有意な負の相関が有ることが分かった。この結果から、間質性肺炎が合併している場合、末梢血中で増加したCD161陽性V δ 1陽性細胞が炎症部位である肺組織へと遊走している可能性も考えられるが、詳細は不明である。

今後は、PBMCだけでなく、気管支肺胞洗浄液、肺組織等を用いた解析、および細胞自身の持つ機能解析を行うことで、SSc病態におけるCD161陽性V δ 1陽性細胞の理解が深まることが考えられる。

E. 結 論

CD161陽性V δ 1陽性細胞は全身性強皮症に合併した間質性肺炎病態に関与する可能性が示唆される。

F. 文 献

1) Steen VD, Medsger TA. : Change in cause of death in

- systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 940-944
- 2) Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Horikoshi M, Sugihara M, Hayashi T et al. : Involvement of NK 1.1-positive $\gamma\delta$ T cells in interleukin-18 plus interleukin-2-induced interstitial lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45: 659-666
- 3) Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin E. : The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2008; 38: 132-160
- 4) Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11: R111
- 5) Giacomelli R, Matucci-Cerinic M, Cipriani P, Ghersetich I, Lattanzio R, Pavan A et al. : Circulating V δ 1 + T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 327-334
- 6) Yurovsky VV, Sutton PA, Schulze DH, Wigley FM, Wise RA, Howard RF et al. : Expansion of selected V δ 1 + $\gamma\delta$ T-cells in systemic sclerosis patients. *J Immunol* 1994; 153: 881-891
- 7) Simonian PL, Wehrmann F, Roark CL, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. : $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J Exp Med* 2010; 207: 2239-2253
- 8) Laggner U, Meglio PD, Perera GK, Hundhausen C, Lacy KE, Ali N et al. : Identification of a Novel Pro-inflammatory Human Skin-Homing V γ 9V δ 2 T Cell Subset with a Potential Role in Psoriasis. *J Immunol* 2011; 187: 2783-2793

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 瀬川 誠司, 後藤 大輔, 吉賀 洋平, 堀越 正信, 松本 功, 住田 孝之 : IL-2 + IL-18 誘導性間質性肺炎モデルにおける NK1.1 + $\gamma\delta$ T 細胞の解析、第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2011 年
- 2) 瀬川 誠司, 後藤 大輔, 吉賀 洋平, 堀越 正信, 松本 功, 住田 孝之 : 間質性肺炎マウスモデルにおける T 細胞の機能解析、千葉大学 - 筑波大学カンファレンス、2011 年
- 3) Seiji Segawa, Daisuke Goto, Masanbu Horikoshi, Naoto Umeda, Hiroshi Ogishima, Yuya Kondo, Hiroshi Tsuboi, Makoto Sugihara, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida : The role of V δ 1 + gdNKT cells in autoimmune diseases patients with interstitial pneumonitis. The 4th East Asian Group of Rheumatology, 2011
- 4) Seiji Segawa, Daisuke Goto, Masanobu Horikoshi, Naoto Umeda, Hiroshi Ogishima, Yuya Kondo, Hiroto Tsuboi, Makoto Sugihara, Takeshi Suzuki, Taichi Hayashi, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida: The role of V delta1 + gamma-delta NKT cells in autoimmune diseases patients with interstitial pneumonitis. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

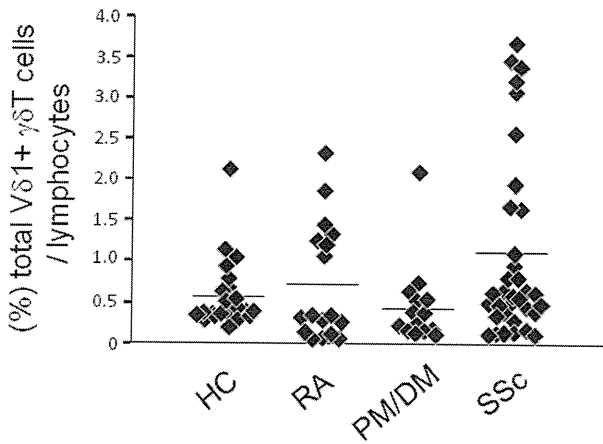


図1：PBMC中のVδ1陽性細胞比率(%)
平均値を長い横線で示した。

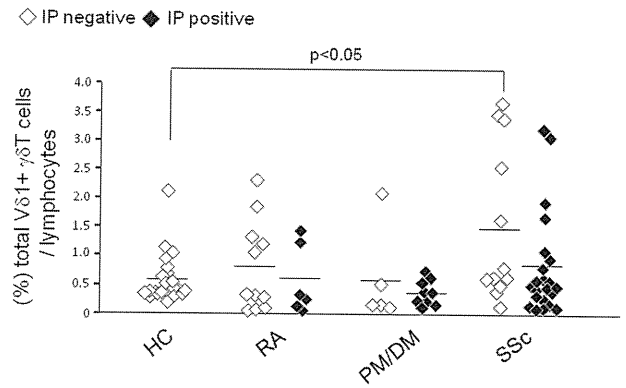


図2：間質性肺炎(IP)の有無によるPBMC中のVδ1陽性細胞比率(%)
平均値を長い横線で示した。

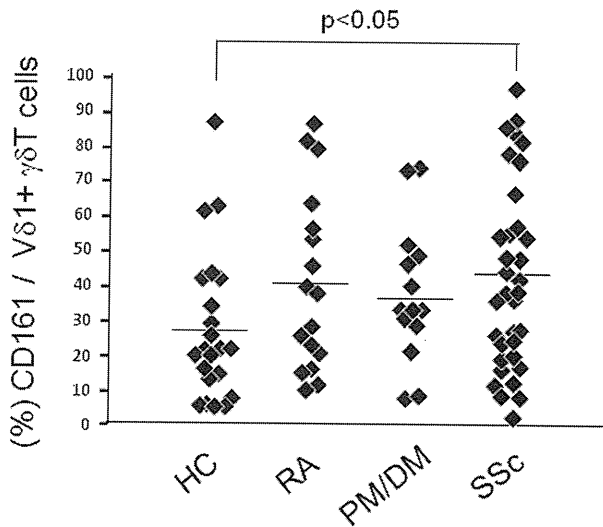


図3：PBMC中のVδ1陽性細胞上のCD161発現率(%)
平均値を長い横線で示した。

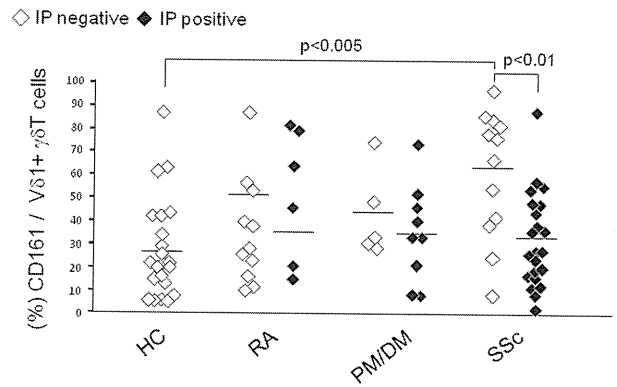


図4：IPの有無によるPBMC中のVδ1陽性細胞上のCD161発現率(%)
平均値を長い横線で示した。

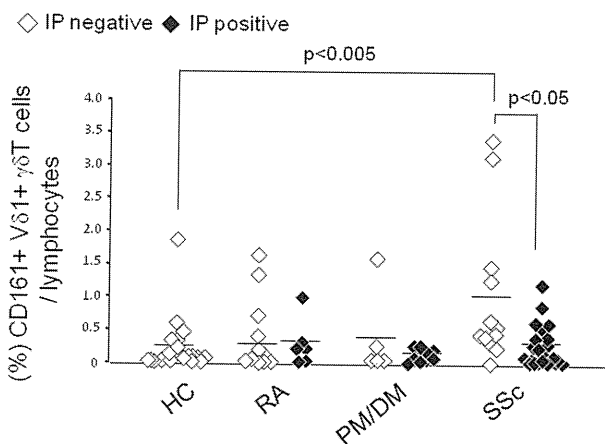


図5：IPの有無によるPBMC中のCD161陽性Vδ1陽性細胞の比率(%)
平均値を長い横線で示した。

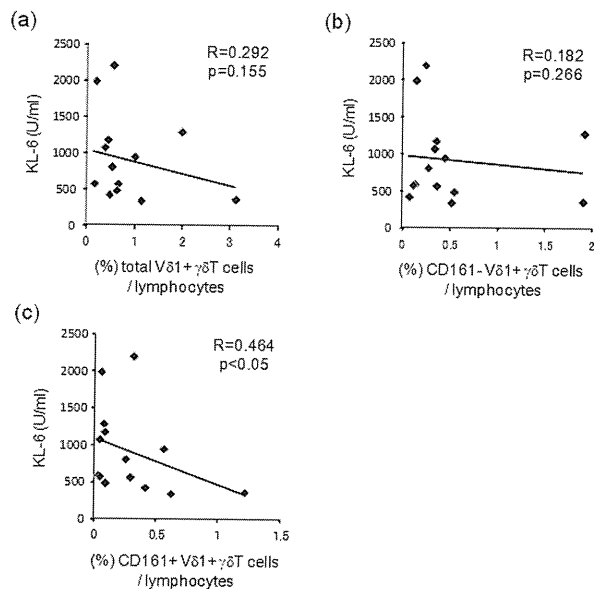


図6：a 血清中KL-6値とPBMC中のtotal Vδ1陽性細胞の比率。b 血清中KL-6値とPBMC中のCD161陰性Vδ1陽性細胞の比率。c 血清中KL-6値とPBMC中のCD161陽性Vδ1陽性細胞の比率

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

| | | |
|-------|------|----------------------|
| 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 |
| 協力者 | 高橋岳浩 | 東京大学医学部附属病院 皮膚科 大学院生 |
| 協力者 | 市村洋平 | 東京大学医学部附属病院 皮膚科 大学院生 |
| 協力者 | 遠山哲夫 | 東京大学医学部附属病院 皮膚科 大学院生 |
| 協力者 | 谷口隆志 | 東京大学医学部附属病院 皮膚科 大学院生 |
| 協力者 | 青笹尚彦 | 東京大学医学部附属病院 皮膚科 |
| 協力者 | 赤股 要 | 東京大学医学部附属病院 皮膚科 大学院生 |
| 協力者 | 住田隼一 | 東京大学医学部附属病院 皮膚科 助教 |
| 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 (SSc) に合併した間質性肺病変 (SSc-ILD) に対してシクロホスファミドパルス (IVCY) 療法を施行した7名の患者、および、健常人コントロール20名の血清中の Angiopoietin-2 (Ang2) 濃度の測定を行った。患者群においては、IVCY 療法中の時系列で測定し、その変化について各症例での IVCY の治療効果と併せて検討した。まず、IVCY 療法開始前の患者群と健常コントロール群の比較では、患者群で Ang2 濃度が高い傾向にあった (1811.00 ± 729.37 vs. 1526.51 ± 403.61 pg/ml, $p=0.19$)。次に、患者群において、IVCY 療法施行前と、施行後の Ang2 濃度について比較を行ったところ、施行後の Ang2 濃度は有意な低下を示した (1058.43 ± 398.69 pg/ml, $p=0.0089$)。さらに、IVCY 療法初期 (初回パルス後) の Ang2 の動態が、各症例における IVCY 療法に対する反応性、有効性を反映するものであることが示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (SSc) は血管障害および皮膚・内臓諸臓器の線維化によって特徴づけられる全身性の自己免疫疾患である¹⁾。血管内皮細胞の活性化、傷害、および血管の形態学的変化に特徴づけられる血管障害が線維化に先行することが示唆されており、先行諸研究によって血管新生の異常が SSc における血管障害の主因の一つであることが示されている^{2,3)}。Angiopoietin-2 (Ang2) は血管内皮細胞特異的なチロシンキナーゼ Tie2 受容体のリガンドであり、同じ Tie2 受容体のリガンドである Angiopoietin-1 (Ang1) と共に、微小環境に応じて血管安定性の維持、血管新生の調節に重要な役割を果たしていると

される^{4,5)}。Ang2 は VEGF の存在下では、血管内皮細胞の増殖、遊走、血管の発芽を促すのに対して、VEGF 抑制下では内皮細胞のアポトーシスあるいは血管の退縮を促す⁶⁾。血管の安定性および血管新生過程の制御における Angiopoietin の重要な役割を反映して、血清 Ang2 濃度は乳がんなどの腫瘍の進展、あるいは、Crohn 病、潰瘍性大腸炎、SLE など、血管障害の関与が示唆される諸疾患において上昇していることが示されている⁷⁻¹¹⁾。また SSc 患者においては、1) 血清 Ang1 濃度は健常人と比較して有意に低下している一方、Ang2 濃度は有意に上昇している 2) 血清 Ang2 濃度は MRSS、EScSG の疾患活動性スコア、血沈、CRP 値と正の相関を、%DLco とは負の