

図 1：皮膚病理組織像

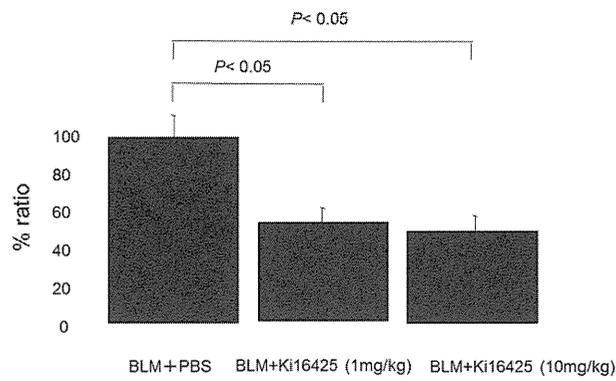


図 2：真皮膠原線維厚

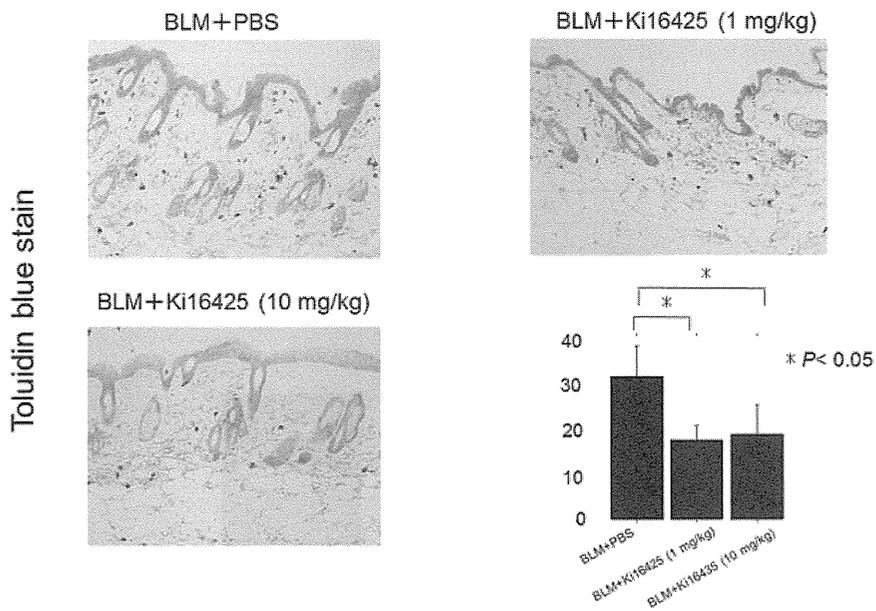


図 3：真皮内に浸潤した肥満細胞数

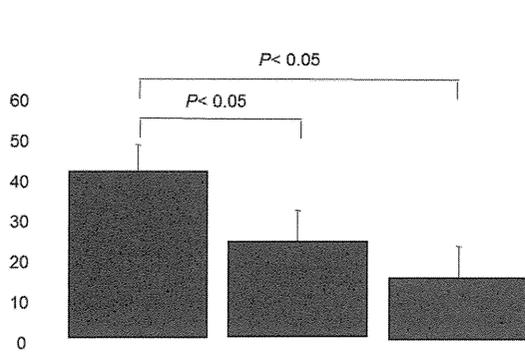


図4：コラーゲン含有量（皮膚）

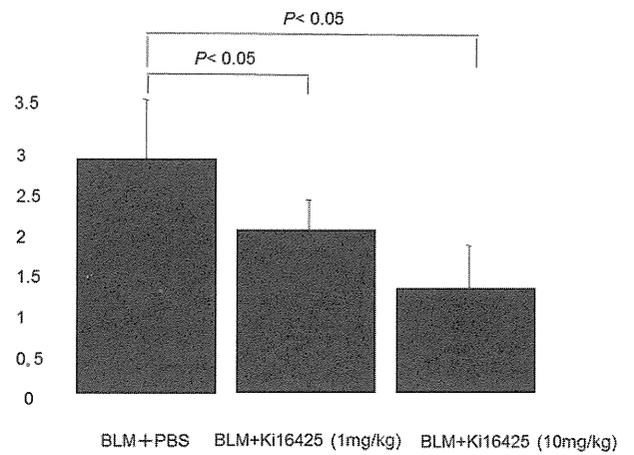


図5：collagen $\alpha 1$ (I) mRNA 定量

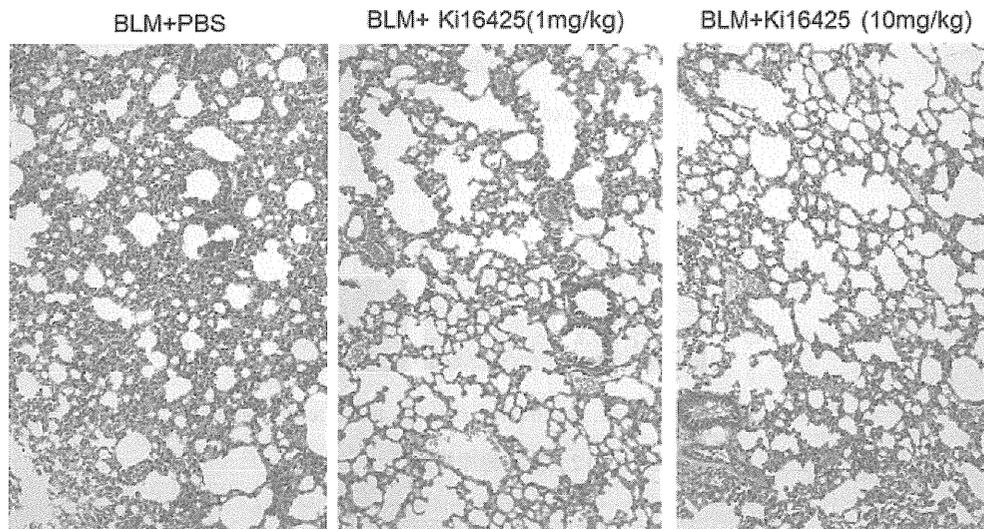


図6：肺病理組織像

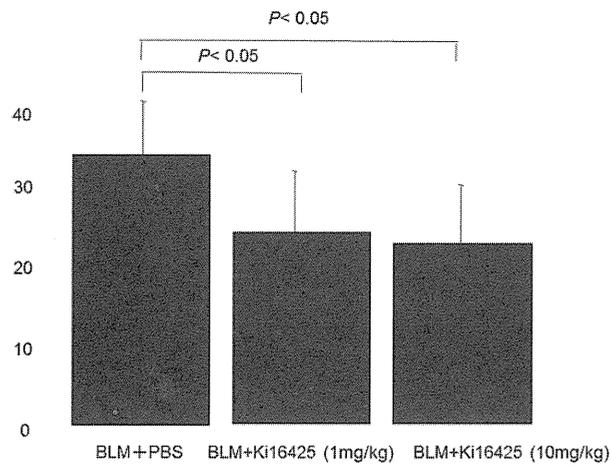


図7：コラーゲン含有量（肺）

マウス sclerodermatous chronic graft-versus-host disease モデルにおける FTY720 の治療効果についての検討

研究分担者	藤本 学	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 准教授
研究協力者	長谷川稔	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 講師
協力者	Le Huu Doan	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 大学院生
協力者	松下貴史	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 助教
協力者	濱口儒人	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 講師
協力者	竹原和彦	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 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

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、全身性強皮症 (SSc) の病因に重要な役割を果たしている。今回我々は、SSc のモデルマウスである皮膚硬化型慢性 GVHD (Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease, Scl-cGVHD) において、S1P の阻害剤である FTY720 の有効性について検討した。その結果、FTY720 の投与にて Scl-cGVHD の重症度および線維化は抑制された。また、FTY720 の投与にて脾臓制御性 T 細胞と制御性 B 細胞の増加が認められ、皮膚への免疫細胞の浸潤の抑制がみとめられた。さらに、皮膚における MCP-1、MIP-1、RANTES、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-17A 及び TGF- β 1 の mRNA の発現の減少が FTY720 の投与にて認められた。これらの結果より、ヒトでの Scl-cGVHD および SSc の治療において FTY720 の有効性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (Systemic sclerosis, SSc) は皮膚および内臓諸臓器の線維化を来す膠原病で、その原因は未だ不明である。SSc 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⁽¹⁾。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、SSc のモデルマウスとして有用である。

S1P とその受容体である S1P1 受容体の相互作用はリンパ球のホーミング、特に二次リンパ系組織からリンパ管への移出に必須である⁽²⁻⁴⁾。近年、S1P と S1P1 受容体が SSc の発症に重要であるとの報告がなされている。SSc 患者において、血清 S1P レベ

ルが増加することや、SSc 患者の線維芽細胞において、S1P1 受容体と S1P2 受容体の発現低下ならびに S1P3 受容体の発現増加が報告されている⁽⁵⁻⁷⁾。フィンゴリモド (FTY720) は生体内にて速やかにリン酸化され FTY720-P となり S1P 受容体アゴニストとして作用し、その結果リンパ球状の S1P1 受容体の内在化を誘導することでリンパ球の再循環を制御し免疫抑制作用を発揮する⁽⁸⁾。今回、我々はマウス Scl-cGVHD モデルにおける S1P 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 週の 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マウスから骨髓細胞(10×10⁶細胞)と脾臓細胞(10×10⁶細胞)を採取し、レシピエントマウスに骨髓移植し、Scl-GVHDを誘導した。

2. FTY720による治療

FTY720は1 mg/kgを経口にて投与した。short-term, early-treatment groupはday 0からday 20まで投与、full-term, early-treatment groupはday 0からday 42まで投与、delayed-treatment groupはday 22からday 42まで投与した。Control groupは蒸留水を投与した。

3. 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10-15cm²、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。

4. 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。

5. 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. FTY720のScl-GVHDに対する効果

FTY720のshort-term, early-treatment group, early-treatment groupおよびdelayed-treatment groupいずれ

においてもScl-cGVHDの抑制効果が認められた(p<0.05)。early-treatment groupにおいて抑制効果はより強力であった(図1)。

2. FTY720の制御性T細胞、制御性B細胞に対する効果

FTY720投与にて制御性T細胞、制御性B細胞の増加が認められた(制御性T細胞、p<0.005、制御性B細胞、p<0.05、図2A-D)

3. FTY720の血清S1P、E-Selectinに対する効果

血清S1P、sE-selectin、sICAM-1、sVCAM-1濃度はScl-cGVHDにおいて有意に上昇していた。FTY720投与にて血清S1P、sE-selectin濃度が有意に減少したが、血清sICAM-1、sVCAM-1濃度は不変であった(図2E-F)。

4. FTY720による皮膚免疫細胞浸潤に対する影響

FTY720投与にてScl-cGVHD皮膚へ浸潤するCD4+T cells、CD8+T cells、B220+B cells、CD11b+ monocyte/macrophages、CD11c+dendritic cellsが有意に減少した(p<0.05、図3A-B)。

5. FTY720によるサイトカイン/ケモカインに対する影響

FTY720投与にてScl-cGVHD皮膚のCCL2 MCP-1、MIP-1、RANTES mRNA発現が有意に減少した(p<0.01)。さらにFTY720投与にてScl-cGVHD皮膚のTNF-α、IFN-γ、IL-6、IL-10、IL-17A及びTGF-β1のmRNAの発現が有意に抑制された(p<0.05、図3C)。

D. 考案

FTY720は、リンパ節やバイエル板にリンパ球を蓄積させることによって、循環リンパ球を減少させて、炎症部位へのリンパ球の浸潤を抑制することで免疫抑制作用を発揮している。さらに、ヒトの多発性硬化症において、保険適応を有する薬剤である。本研究にて、FTY720はScl-cGVHD皮膚への免疫

担当細胞の浸潤を抑制し、サイトカインならびにケモカインの発現低下を促すことにより Scl-cGVHD の発症を抑制していることが明らかとなった。また、血清 S1P、SE-セレクチン濃度は Scl-cGVHD で上昇していたが、FTY720 投与にて S1P と SE-セレクチンの低下が認められた。以上より、FTY720 は Scl-cGVHD の血管障害を抑制する作用が確認された。このように、FTY720 は Scl-cGVHD の発症において、免疫担当細胞の浸潤抑制と血管障害の抑制を介して作用していることが明らかとなった。

E. 結論

FTY720 は、Scl-cGVHD において血管損傷や皮膚への免疫担当細胞の浸潤を減らし、免疫応答を抑制した。FTY720 はヒトでの Scl-cGVHD ならびに SSc 患者の有効な治療薬となる可能性が示唆された。

F. 文献

1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 557-67.
2. Sawicka E, Dubois G, Jarai G, Edwards M, Thomas M, Nicholls A, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 differentially affects the sequestration of CD4+/CD25+T-regulatory cells and enhances their functional activity. *J Immunol* 2005; 175(12): 7973-80.
3. Cinamon G, Matloubian M, Lesneski MJ, Xu Y, Low C, Lu T, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol* 2004; 5(7): 713-20.

4. Fujino M, Funeshima N, Kitazawa Y, Kimura H, Amemiya H, Suzuki S, et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305(1): 70-7.
5. Tokumura A, Carbone LD, Yoshioka Y, Morishige J, Kikuchi M, Postlethwaite A, et al. Elevated serum levels of arachidonoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in systemic sclerosis. *Int J Med Sci* 2009; 6(4): 168-76.
6. Bu S, Asano Y, Bujor A, Highland K, Hant F, Trojanowska M. Dihydrosphingosine 1-phosphate has a potent antifibrotic effect in scleroderma fibroblasts via normalization of phosphatase and tensin homolog levels. *Arthritis Rheum* 2010; 62(7): 2117-26.
7. Pattanaik D, Postlethwaite AE. A role for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Discov Med* 2010; 10(51): 161-7.
8. Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(10): 753-63.

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

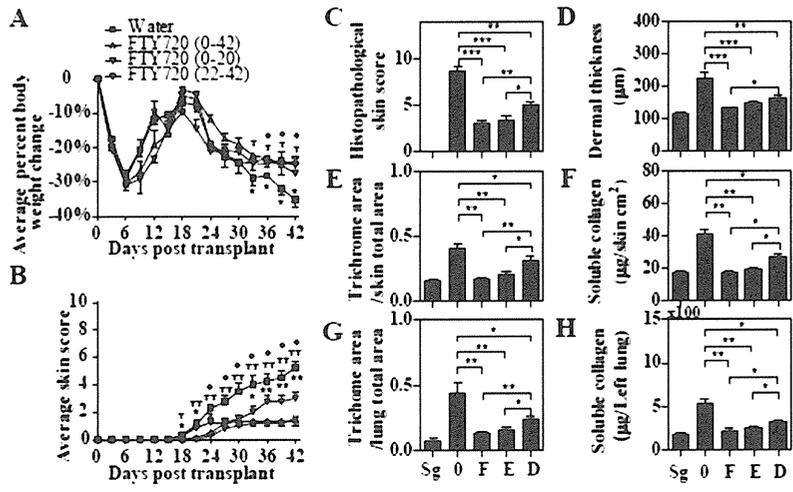


図1：Scl-GVHDに対するFTY720の効果
 (A-B) 体重変動ならびにスキンスコア。
 (C-H) 移植42日後における病理組織スコアならびに線維化スコア (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

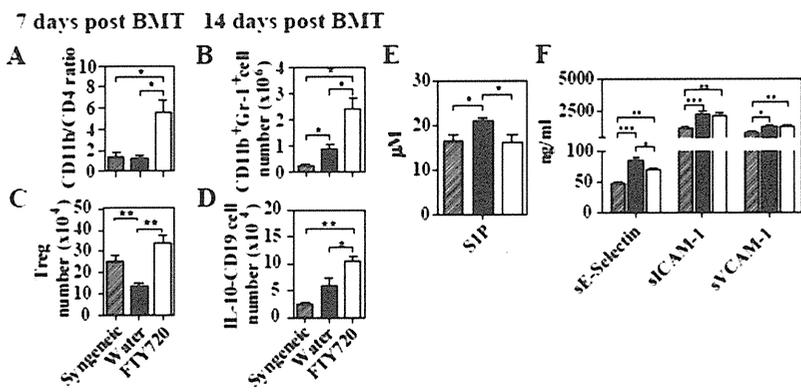


図2：制御性T細胞、制御性B細胞ならびに血清S1P、E-Selectinに対するFTY720の効果
 (A-D) 脾臓CD11b/CD4比、CD11b+Gr-1+細胞、制御性T細胞、制御性B細胞。
 (E-F) 血清S1P、sE-selectin、sICAM-1、sVCAM-1濃度 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

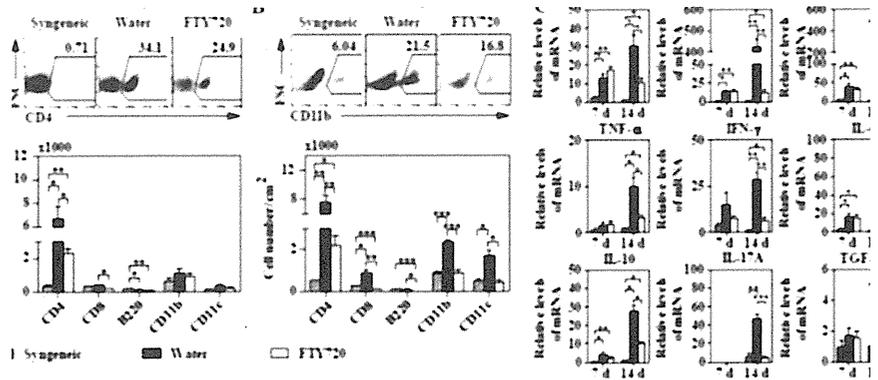


図3：皮膚免疫細胞浸潤、サイトカイン/ケモカインに対するFTY720の効果
 (A-B) 皮膚組織中の免疫担当細胞数。
 (C) サイトカイン/ケモカイン mRNA 発現 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

全身性強皮症 (SSc) 皮膚における 精巣抗原 PHET の異所性発現と自己抗体産生の関連

研究分担者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部リウマチ学・膠原病学・臨床免疫学 准教授
協力者 安岡秀剛 慶應義塾大学医学部リウマチ学・膠原病学・臨床免疫学 助教

研究要旨

これまでわれわれは PHET (JNK interacting protein 4 の splice variant) に対する自己抗体が SSc 血清中に特異的に検出されることを報告してきた。本年度は抗 PHET 自己抗体の産生機序を追究するため、同一 SSc 例で病変部皮膚での PHET 発現と血清中の抗 PHET 自己抗体産生を検討した。対象は SSc 5 例、モルフェア 6 例、ケロイド 1 例および健常人 2 例。PHET タンパクの検出のため、PHET 固有のエクソンをコードするペプチドを合成し、ウサギに 5 回免疫し抗 PHET ポリクローナル抗体を作成した。病変部皮膚における PHET の発現は作成した抗 PHET ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学で検出したところ、5 例全例の真皮線維芽細胞および血管内皮細胞に PHET の発現を認めたが、モルフィア、ケロイド、健常人では線維芽細胞における発現を認めなかった。リコンビナント PHET 断片を発現させた大腸菌溶解物を抗原とした免疫プロットにより抗 PHET 自己抗体を検討すると、SSc 5 例中 4 例で抗 PHET 自己抗体が検出された。以上より、SSc 病変部皮膚線維芽細胞における PHET の異所性発現が PHET に対する自己抗体産生を誘導するトリガーとなることが示された。

A. 研究目的

我々は protein highly expressed in testis (PHET) に対する自己抗体が SSc 患者の 8% で特異的に検出されることを報告した^[1]。PHET は 17 番染色体上に存在する 38 のエクソンの組み合わせで構成される遺伝子にコードされる JNK interacting protein 4 (JIP4) の splice variant の一つで、固有のエクソン #8 を持つ点が特徴的である (図 1A)。また PHET の発現は、正常組織では特に精巣で高い。一方、SSc では病変部皮膚由来の培養線維芽細胞で高発現していたことから^[1]、本来精巣で発現している PHET が病変部線維芽細胞で異所性に発現されることにより、免疫系に提示され、抗 PHET 自己抗体産生を誘導した可能性が考えられる。しかし、これまで PHET の発現について SSc 病変部を含めたヒト組織で検討した報告はない。そこで我々は今回 PHET 固有のエ

クソンを特異的に認識するポリクローナル抗体を作成し、PHET の *in situ* での発現を精巣および皮膚組織で検討した。また同一症例で抗 PHET 自己抗体を検出することにより、抗体産生機序を追究することを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

1980 年にアメリカリウマチ協会が作成した分類予備基準を満たす SSc 5 例。対照としてモルフェア 6 例、ケロイド 1 例、健常人 2 例を用いた。皮膚組織は、熊本大学皮膚科尹浩信先生より SSc 3 例、慶應義塾大学皮膚科西川武二先生よりその他の提供を受けた。精巣腫瘍由来の健常精巣組織は防衛医科大学泌尿器科伊藤敬一先生より提供を受けた。

2. 皮膚組織における PHET 発現の検出

ウサギを PHET 固有のエクソン由来のペプチド (VSNSPEPQKAVEQE) で 5 回免疫し、得られた血清を抗 PHET ポリクローナル抗体として用いた。コントロール抗体として免疫前のウサギ血清を用いた。反応性は免疫プロットおよび精巣組織を用いた免疫組織化学で確認した。

3. 免疫組織化学 (IHC)

IHC は、上記症例由来の皮膚および精巣組織切片を脱パラフィン後、10 mM クエン酸溶液 (pH6.0) を用いて抗原賦活化し、3% 過酸化水素水で内因性のペルオキシダーゼを失活後、4% ヤギ血清でブロックした。一次抗体として抗 PHET ポリクローナル抗体およびコントロール抗体を 1:100 に希釈し、室温で 1 時間反応させた。その後ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (Vector) と反応させた後、avidin biotin complex (ABC) 法 (Vector) で horseradish peroxidase (HRP) 標識し、3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Vector) を基質として用い、発色した。核染は Vector Hematoxylin QS (Vector) を用い、封入した。

4. SSc 患者血清中の抗 PHET 自己抗体の検出

図 1A に黒いバーで示すエクソン 7 から 12 までの PHET 断片 (204 アミノ酸) および JIP4 断片 (190 アミノ酸) を大腸菌を用いてリコンビナント maltose binding protein (MBP) 融合タンパクとして発現させた。Sodium dodecyl sulfate (SDS)・2-mercaptoethanol (2-ME) 存在下で可溶化させた大腸菌菌体成分を抗原として免疫プロットに用いた。抗原をポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、患者血清 (1:250 に希釈し、事前に MBP 発現大腸菌溶解物と反応させ抗大腸菌・MBP 抗体を吸収したもの) と反応させた。その後アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体と反応させ、nitro-blue tetrazolium chrolide/5-bromo-

4-chloro-3'-indolylphosphatase p-Toluidine salt (NBT/BCIP) を基質として用い、発色した。

(倫理面への配慮)

本研究内容は学内の倫理委員会で承認され、すべての症例で事前に文書によるインフォームドコンセントを取得した。

C. 研究結果

1. 作成した抗 PHET ポリクローナル抗体の反応性の検討

PHET 固有のエクソン由来のペプチドでウサギを 5 回免疫して作成した抗 PHET ポリクローナル抗体が PHET を特異的に認識するかを免疫プロットで検討した。抗 PHET ポリクローナル抗体は PHET 固有のエクソン #8 を持たない JIP4 断片を認識しなかったのに対し、PHET 断片を認識した (図 1B)。以上より、作成した抗 PHET ポリクローナル抗体は PHET を特異的に認識することが確認された。この抗体を用いて、精巣組織で IHC を施行したところ、健常部の精巣実質に染色を認め、精管内の精子の様々な分化段階の細胞にも染色が認められた。同時に精巣中隔の線維芽細胞にも染色が認められた。

2. 抗 PHET ポリクローナル抗体を用いた皮膚組織における PHET の発現の検討

IHC を用いて皮膚組織における PHET 発現を検討した。SSc 5 例全例で真皮線維芽細胞に PHET 発現の発現を認めた。一方モルフィア、ケロイド、健常人では真皮線維芽細胞における発現を認めなかった。SSc、モルフィア、ケロイド由来の血管内皮細胞にも PHET の発現を認めたが、SSc では他疾患に比べて発現レベルが高かった (表 1)。表皮や血管平滑筋にびまん性に淡い染色を認めたが、全例で同様であり、非特異的と考えられた。

3. 抗 PHET 自己抗体の検出

皮膚組織で PHET の発現を認めた SSc 5 例を対象に、リコンビナント PHET 断片を大腸菌で発現させた溶解物を抗原とした免疫プロットを行った。その結果、抗 PHET 自己抗体は 4 例で検出された (表 2)。

D. 考 案

以前の検討で PHET は SSc 病変部皮膚由来の培養線維芽細胞で高発現していたが、本研究により PHET が実際に SSc 病変部皮膚で発現していることが確認された。本来 PHET は精巣特異抗原で、健常男性では免疫系から隔離された抗原である^[2]ことから、男性では解剖学的に、女性では本来発現がないために免疫に暴露されることがない。このため、SSc では PHET が異所性に病変部皮膚、特に線維芽細胞や血管内皮細胞で発現されることにより、免疫系からは“異物”として認識され、自己抗体産生が誘導される可能性が考えられた。ただし、皮膚線維芽細胞で PHET の発現を確認した SSc 5 例中 1 例で抗 PHET 自己抗体は陰性で、有意な産生を認めなかった。この結果は抗 PHET 抗体の産生において PHET の異所性発現は必要ではあるが、他の要因も必要ことが推察された。他の要因としては抗原提示細胞内での抗原プロセッシングや、抗原提示にかかわる様々な要因 (HLA など) の関与が推察される。しかし今回は少数例での検討であり、今後のさらなる検討が必要である。

PHET などエクソン #8 を含む JIP4 の variant は精巣に特異的に検出される^[3]。一方、エクソン #8 を含まない variant については精巣で発現するものの、比較的ユビキタスな発現パターンを示す^[4]。したがってエクソン #8 の存在が精巣での発現の特異性を規定している可能性があり、その発現が SSc 病変部皮膚でみられることは興味深い。

ちなみに JIP4 は JNK binding domain を持ち、p38MAPK、JNK と結合し、シグナルの活性化に関与していることから^[3,5]、PHET も細胞内シグナルの調整に関わり、線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックスの産生誘導にも関与している可能性がある。

これまでの検討では、抗 PHET 自己抗体は SSc の 8% で検出され、diffuse cutaneous SSc (dcSSc) と関連していた。今回の検討では 5 例中 4 例と高率に抗 PHET 自己抗体が検出されたが、dcSSc が多く、症例数が少なかつたためと考えられる。

E. 結 論

精巣抗原 PHET は SSc 病変部皮膚の線維芽細胞や血管内皮細胞で異所性に発現し、抗 PHET 自己抗体産生を誘導する可能性が示された。

F. 文 献

1. Yasuoka H, Ihn H, Medsger TA Jr, Hirakata M, Kawakami Y, Ikeda Y, et al. A novel protein highly expressed in testis is overexpressed in systemic sclerosis fibroblasts and targeted by autoantibody. *J Immunol* 2003; 171: 6883-90
2. Kawakami Y. New cancer therapy by immunomanipulation development of immunotherapy for human melanoma as a model system. *Cornea* 2000; 19: S2-6.
3. Jagadish N, Rana R, Selvi R, Mishra D, Garg M, Yadav S, et al. Characterization of a novel human sperm-associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein. *Biochem J* 2005; 389: 73-82.
4. Iwanaga A, Wang G, Gantulga D, Sato T, Baljinnyan T, Shimizu K, et al. Ablation of the scaffold protein JLP causes reduced fertility in male mice. *Trans-*

genic Res 2008; 17: 1045-58.

- Kelkar N, Standen CL, Davis RJ. Role of JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Mol Cell Biol 2005; 25: 2733-43.

G. 研究発表

1. 論文発表

桑名正隆：自己抗体研究の新たな展開；全身性強皮症：抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体測定. 分子リウマチ治療 5(3): 153-156, 2012.

2. 学会発表

桑名正隆：教育研修講演；強皮症の治療—実践

的アプローチ. 第 23 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会 (宇部). 2012. 10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 各症例の皮膚組織における真皮での PHET の発現のまとめ

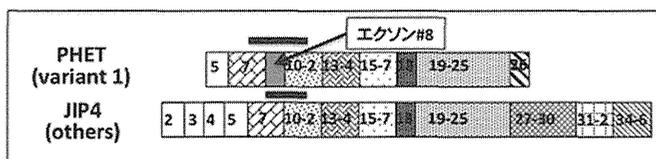
	SSc					Morphea						Keloid	Control	
	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#1	#1	#2
Fibroblasts	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
Endothelial cells	++	+	++	+	+	±	±	±	±	±	-	±	-	-

表 2. 皮膚組織を検討した強皮症 (SSc) 5 例の臨床特徴と抗 PHET 抗体

Age/Sex	Subset	Disease duration	SSc-specific autoantibodies	Anti-PHET autoantibodies	IHC PHET-fibro	IHC PHET-endo
52/M	Diffuse	7 months	-	-	++	++
23/F	Diffuse	6 years	Topo I	+	++	+
39/F	Limited	5 years	-	+	+	++
49/F	Diffuse	18 years	Topo I	+	+	+
66/F	Diffuse	1 years	U1RNP	+	+	+

IHC: immunohistochemistry, Topo I: anti-topoisomerase I antibody, U1RNP: anti-U1RNP antibody, PHET-fibro: PHET expression in fibroblasts, PHET-endo: PHET expression in endothelial cells

A



B

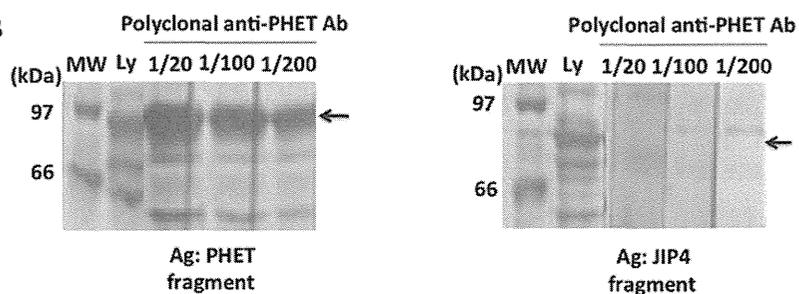


図1：抗 PHET ポリクローナル抗体によるリコンビナント PHET 断片および PHET 固有のエクソンを持たない JIP4 断片の検出。A. PHET および JIP4 のエクソン構成。黒いバーで示す遺伝子にコードされる PHET および JIP 断片タンパクを大腸菌で発現させ、大腸菌溶解物を抗原として用いた。B. 免疫プロットによる抗 PHET ポリクローナル抗体によるリコンビナント PHET および JIP4 断片の検出。分子量マーカー (MW) およびリコンビナント断片を発現させた大腸菌溶解物 (Ly) はアミドブラックで染色した。図左の数値は分子量 (kDa) を示す。3-5 レーン目は免疫プロットの結果を示す。3-5 レーン頭の数字は抗体の希釈倍率を示す。

間質性肺炎合併全身性強皮症患者における CD161 陽性 Vδ1 陽性 γδT 細胞の解析

研究分担者 後藤大輔 筑波大学医学医療系内科膠原病・リウマチ・アレルギー 准教授
協力者 瀬川誠司 筑波大学医学医療系内科膠原病・リウマチ・アレルギー 助教
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 筑波大学医学医療系内科膠原病・リウマチ・アレルギー 准教授
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

研究要旨

間質性肺炎 (IP) 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。これまでに我々は、CD161 を発現した Vδ1 陽性細胞 γδT 細胞 (CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞) に着目した解析を行い、これらの細胞が SSc に合併した IP 病態への関与を示唆する結果を得ている。今回我々は、CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞の機能解析を行った。まず、サイトカイン産生能を解析した結果、CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞は CD161 陰性 Vδ1 陽性細胞に比べて、高い IFN-γ 産生能を示した。次に、健常人由来 CD161 陰性 Vδ1 陽性及び CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞では、CD161 陰性 Vδ1 陽性細胞に比べて CCL3、CCL4 遺伝子発現が著名に亢進していた。一方で、健常人、IP 非合併 SSc 及び IP 合併 SSc 患者末梢血単核球由来 CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞での CCL3、CCL4 mRNA 発現量に著大な違いは確認されなかった。CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞株を用いた T 細胞受容体刺激によるケモカイン・サイトカイン産生を検討した結果、IP 合併 SSc 患者では、健常人及び IP 非合併 SSc 患者に比べて CCL3 産生が著名に増大していた。さらに、SSc 患者由来 CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞株では健常人由来細胞株に比べて、IFN-γ 産生が減弱していた。以上の結果から、IP 合併 SSc 患者では、CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞の機能不全による線維化関連因子産生亢進を介して、IP 病態への関与す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、SSc 患者の死因の中で間質性肺炎 (interstitial pneumonia; IP) が占める割合が顕著に増えてきている^[1]。従って、SSc 患者の予後を改善する為には、IP 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 IP の初期像に類似したモデルマウスを用いて、NK1.1 陽性 γδT 細胞が IP 増悪に関与することを報告してきた^[2]。さらに、マウス NK1.1 陽性 γδT 細胞に相当するヒト CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞が、SSc 患者における IP 病態への関与を示唆する結果を報告した。しかしながら、CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞の機能については不明であった。そこで本研究は、CD161 陽性 Vδ1 陽性細胞の機能に着目し、SSc、IP

病態におけるこれらの細胞の関与を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) サイトカイン産生能の解析

健常人、IP 非合併 SSc および IP 合併 SSc 患者より末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) を Ficoll-Paque (GE Healthcare, UK) を用いた密度勾配遠心分離法により得た。得られた PBMCs は、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma, St Louis, MO)+ionomycin (Sigma)+GolgiStop (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) 存在下、6 時間培養を行った。培養後の細胞は、以下のモノクローナル抗体を用いて染色を行った。Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD161、fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-IFN- γ 、anti-IL-4、anti-IL-17 mAbs は Biolegend (San Diego, CA) から購入。Anti-TCR V δ 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) で解析した。データ解析には FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) を用いた。

2) CD161 陰性 V δ 1 陽性細胞と CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞の単離

健常人 (n=3)、IP 非合併 SSc 患者 (n=4) および IP 合併 SSc 患者 (n=4) より PBMCs を得た。得られた PBMCs は、anti-CD161 mAbs (Biolegend) と anti-TCR V δ 1 mAbs (Thermo Scientific) で染色後、MoFlo cytometer (Beckmann Coulter, Brea, CA) を用いて選別を行った。純度は、CD161 陰性 V δ 1 陽性細胞>99%、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞>99%であった。

3) マイクロアレイの実施

健常人 (n=3) 由来 PBMCs より、CD161 陰性 V δ 1

陽性細胞、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞を得た。得られた細胞からの mRNA 抽出には、RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いた。Ovation Pico WTA System (NuGEN, San Carlos, CA) を用いて、cDNA を増幅後、SurePrintG3 Human GE (Agilent, Santa Clara, CA) を使用して hybridization を実施した。得られた結果は、GeneSpring GX (Agilent) を用いて解析した。

4) 定量 PCR の実施

健常人、IP 非合併 SSc および IP 合併 SSc 患者より得られた、CD161 陰性 V δ 1 陽性細胞、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞を用いて、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 及び CD161 mRNA 発現量を定量 PCR で解析した。

5) CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞株の樹立

健常人 (n=1)、IP 非合併 SSc 患者 (n=1) および IP 合併 SSc 患者 (n=1) 由来 PBMCs より、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞を単離後、interleukin-2 (IL-2)、phytohemagglutinin (PHA) と feeder 細胞 (X 線照射アロ PBMCs) と共培養し、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞株を樹立した。

6) ケモカイン産生の検討

健常人、IP 非合併 SSc 患者及び IP 合併 SSc 患者より樹立した CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞株を抗 TCR V δ 1 抗体で刺激後、培養上清中の CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 及び IFN- γ 産生量を測定した。測定には FlowCytomix (ebioscience, San Diego, CA)、FACS Calibur flow cytometer を使用した。

7) 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。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人、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) サイトカイン産生能の解析

PMA+ionomycin 刺激後のサイトカイン産生能解析の結果、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞は CD161 陰性 V δ 1 陰性細胞に比べて、IFN- γ 産生能が高いことが分かった (図 1)。IL-4、IL-17 産生能には著名な差は認められなかった。健常人、IP 非合併 SSc、IP 合併 SSc 患者で同様の結果であった。しかしながら、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞の IFN- γ 産生能は、健常人、IP 非合併 SSc、IP 合併 SSc 患者で有意な差は認められなかった (図 2)。

2) 遺伝子発現解析

健常人末梢血由来細胞を用いたマイクロアレイの結果、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞で CD161 陰性 V δ 1 陽性細胞に比べて発現が高い遺伝子として 192 遺伝子を見出した。その中でも、線維化関連遺伝子と考えられている CCL3 発現が著名に亢進していた (図 3A)。CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞では、CCL4 発現も CCL3 同様に著名に亢進していたが、CCL5 発現には著名な差は認められなかった (図 3B)。また、IP 病態への関与が数多く報告のある CCL2 発現は CD161 陰性 V δ 1 陽性、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞共に低値であった。

3) 健常人、IP 非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来細胞におけるケモカイン mRNA 発現

健常人および IP 非合併 SSc 患者末梢血由来 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞では、CD161 陰性 V δ 1 陽性細胞に比べて CCL3 および CCL4 mRNA 発現が亢進していた (図 4)。一方で、IP 合併 SSc 患者末梢血由来 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞では、CD161 陰性 V δ 1 陽性細胞に比べて、CCL4 及び CCL5 mRNA 発

現亢進していた (図 4)。しかしながら、健常人、IP 非合併 SSc、IP 合併 SSc 患者末梢血由来 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞の間で、各ケモカイン mRNA 発現量に著名な差は認められなかった (図 5)。

4) CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞株を用いたケモカイン・サイトカイン産生の検討

in vitro での解析を目的に、健常人、IP 非合併 SSc、IP 合併 SSc 患者末梢血由来 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞を単離し、細胞株を作製した (図 6)。CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞株を抗 TCR V δ 1 抗体刺激した結果、IP 合併 SSc 患者由来細胞株では、健常人、IP 非合併 SSc 患者由来細胞株に比べて、CCL3 産生量が亢進していた。一方で、CCL2、CCL4、CCL5 産生量には各群で差を認めなかった (図 7A)。さらに、IP 非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞株では、健常人に比べて IFN- γ 産生量が著名に減弱していた (図 7B)。

D. 考案

現在までの我々の検討から、末梢血中にごく少数存在する CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞が、SSc に合併した IP 病態への関与を示唆する結果が得られた。しかしながら、この細胞の SSc および IP 病態への関与は不明であった。

SSc における IP 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^[3]。また、 $\gamma\delta$ T 細胞は様々なサイトカイン・ケモカインを産生することが知られている^[4,5]。遺伝子発現解析の結果、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞は CCL3 発現が著名に亢進していることが明らかとなった。CCL3 は CCR1、CCR5 に結合するケモカインの一つであり、単球、T 細胞等から産生され、種々の細胞遊走、炎症性サイトカイン産生を誘導することが知られている^[6]。現在までに、

bleomycin 誘導 IP マウスモデルでは、CCL3 欠損あるいは CCR5 欠損マウスで病態が軽減すること^[7]、IP 合併 SSc 患者では IP 非合併 SSc 患者に比べて、血清中および気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 中の CCL3 濃度が有意に高値であること^[8,9] が報告されている。これらのことから、CCL3 は、SSc 及び IP 病態増悪作用を有すると考えられている。今回の研究結果から、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞は、TCR 刺激に対する CCL3 産生能が著名に亢進していることが明らかとなり、これらの細胞が炎症増悪に関与している可能性が示唆された。

一方で、線維芽細胞増殖抑制因子として、Th1 サイトカインの一つである IFN- γ が報告されている^[10,11]。本研究より、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞が CD161 陰性 V δ 1 陽性細胞に比べてポリクローナルな刺激に対する IFN- γ 産生能が高いことが明らかとなった。興味深いことに、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞株を用いて *in vitro* での TCR 刺激に対する IFN- γ 産生を検討した結果、IP 合併 SSc 患者由来細胞株では健常人、IP 非合併 SSc 患者由来細胞株に比べて IFN- γ 産生能が減弱していることも明らかとなった。

本研究の結果より、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞では、線維化促進因子である CCL3 産生が亢進しており、線維化抑制因子である IFN- γ 産生が低下していることが明らかとなった。この結果から、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞は、線維化促進・抑制因子の産生能を有するが、IP 合併 SSc 患者では、何らかの原因により両者のバランスが崩れ、炎症促進的に作用していると考えられる。また、IP 非合併 SSc 患者においても CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞は IFN- γ 産生能の減弱が認められることから、これらの細胞が IFN- γ 産生を介して SSc 病態に関

与している可能性が示唆された。

今後は、PBMCs だけでなく、BALF、肺組織等を用いた炎症局所での解析を行うことで、SSc および IP 病態における CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞の役割が明らかになることが期待される。

E. 結 論

全身性強皮症患者では CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞の機能不全による線維化関連因子産生の亢進を介して、間質性肺炎病態に関与してい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. Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, Battaglia F, Ferrara A, Setti M, Murdaca G, Zocchi MR. V δ 1 T lymphocytes producing IFN- γ and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* 2009; 113: 6611-6618.
5. Catellani S, Poggi A, Bruzzone A, Dadati P, Ravetti JL, Gobbi M, Zocchi MR. Expansion of Vdelta1 T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins. *Blood* 2007; 109: 2078-2085.

6. Hasegawa M, Takehara K. Potential immunologic targets for treating fibrosis in systemic sclerosis: a review focused on leukocytes and cytokines. *Semin Arthritis Rheum* 2012; epub ahead of print.
7. Ishida Y, Kimura A, Kondo T, Hayashi T, Ueno M, Takakura N, Matsushima K, Mukaida N. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. *Am J Pathol* 2007; 170: 843-854.
8. Bolster MB, Ludwicka A, Sutherland SE, Strange C, Silver RM. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 743-751.
9. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 159-165.
10. Atamas SP. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci* 2002; 72: 631-643.
11. Jimenez SA and Christner PJ. Murine animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 671-680.

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, 堀越 正信, 松本 功, 住田 孝之: 間質性肺炎合併膠原病患者における CD161+Vδ1+γδT 細胞の解析, 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集 2012 年
2. 瀬川 誠司, 後藤 大輔, 堀越 正信, 松本 功, 住田 孝之: 間質性肺炎合併膠原病患者における CD161+Vδ1+γδT 細胞の解析, 第 40 回日本臨床免疫学会総会 2012 年
3. Seiji Segawa, Daisuke Goto, Masanbu Horikoshi, Shinya Hagiwara, Naoto Umeda, Hiroshi Ogishima, Yuya Kondo, Hiroshi Tsuboi, Makoto Sugihara, Taichi Hayashi, Yusuke Chino, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida: The role of TCR Vδ1+NKT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonitis. Annual Scientific meeting on the ACR, 2012
4. Seiji Segawa, Daisuke Goto, Masanobu Horikoshi, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida: The role of TCR Vdelta1+NKT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonitis. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

◇ CD161- Vδ1+ cells ◆ CD161+ Vδ1+ cells

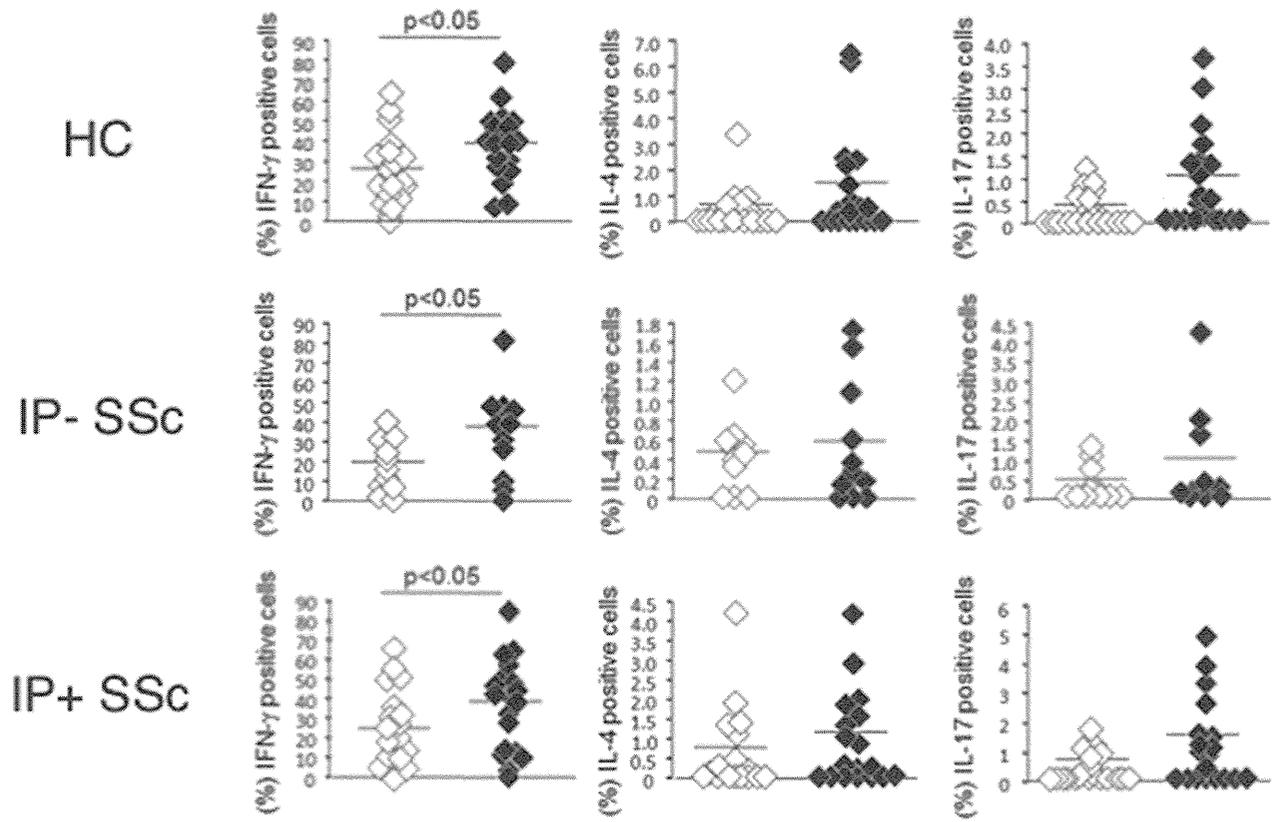


図1：健常人（HC）、IP非合併SSc（IP-SSc）、IP合併SSc（IP+SSc）由来CD161陰性、CD161陽性Vδ1陽性細胞からのサイトカイン産生能の解析
平均値を長い横線で示した。

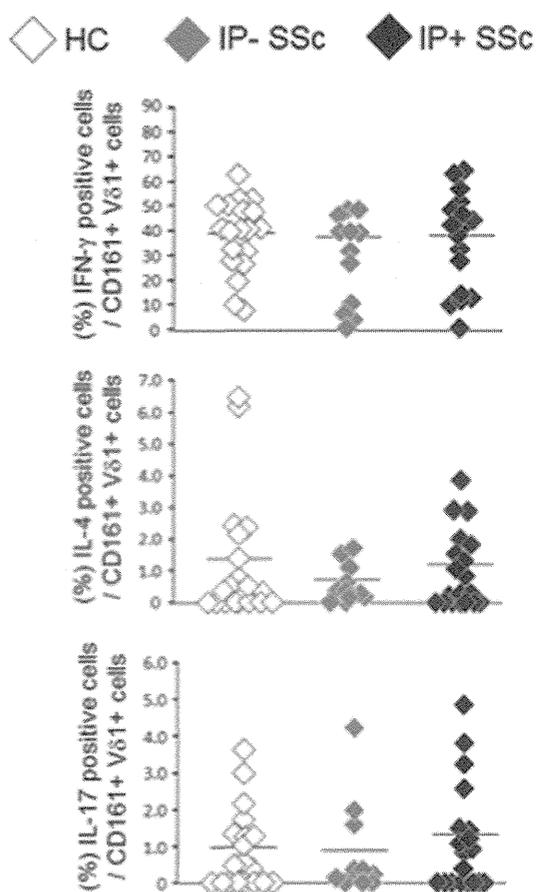


図2：CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞からのサイトカイン産生能の比較
平均値を長い横線で示した。

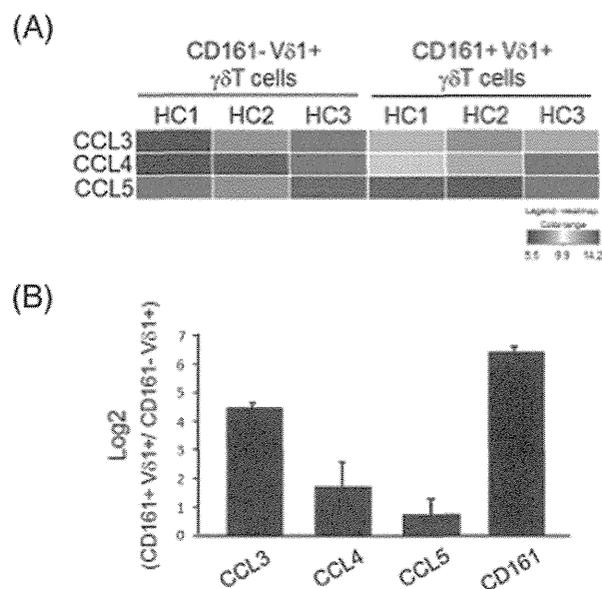


図3：(A)健康人 (HC1, HC2, HC3) 由来 CD161 陰性 V δ 1 陽性、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞における CCL3, CCL4, CCL5 遺伝子発現の heat map (B)CD161 陰性 V δ 1 陽性細胞に対する CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞の CCL3, CCL4, CCL5, CD161 遺伝子発現割合の比較

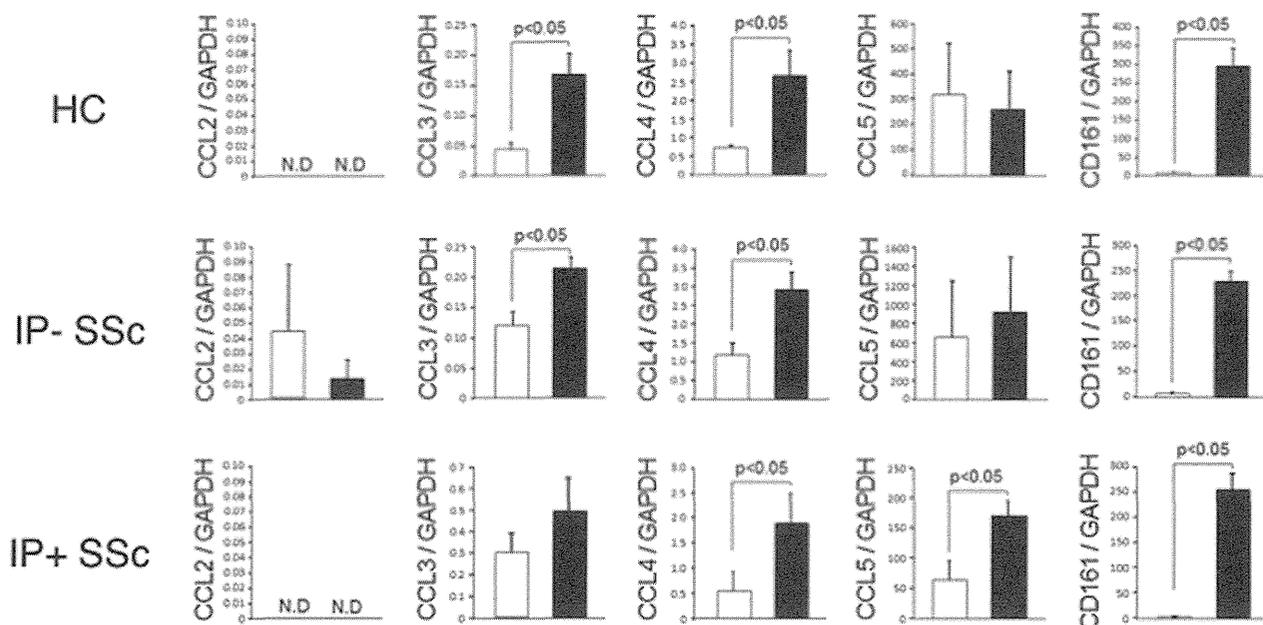


図4：HC、IP-SSc、IP+SSc 由来 CD161 陰性 V δ 1 陽性、CD161 陽性 V δ 1 陽性細胞での CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CD161 mRNA 発現解析

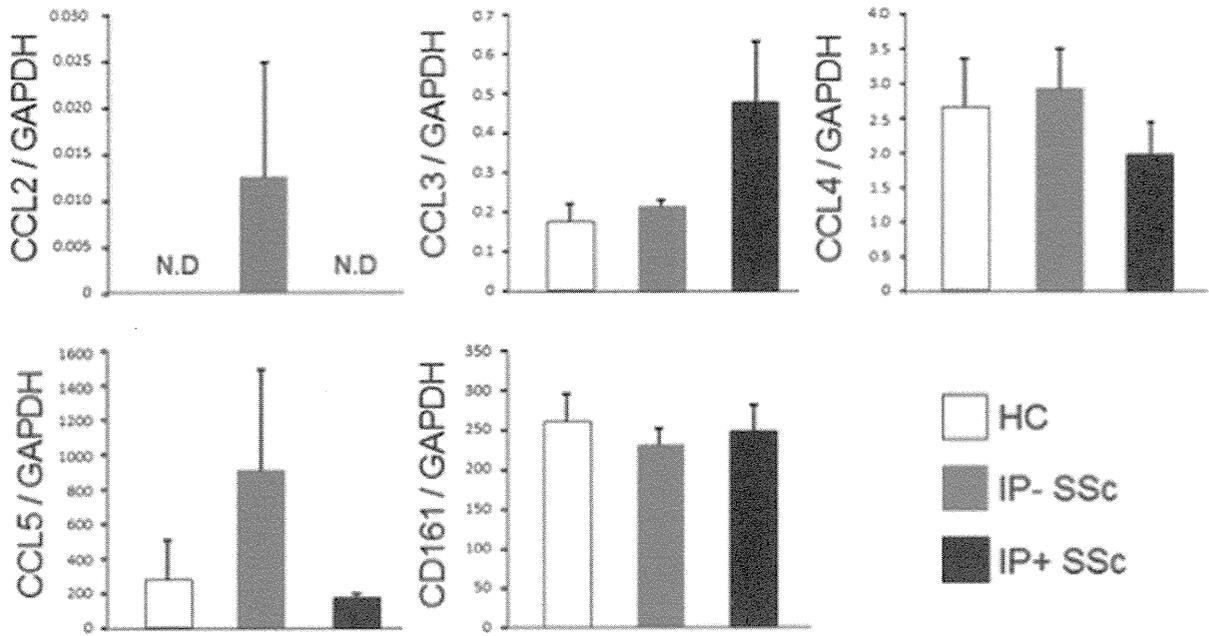


図5：HC、IP-SSc、IP+SSc由来CD161陽性Vδ1陽性細胞でのCCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CD161 mRNA発現比較

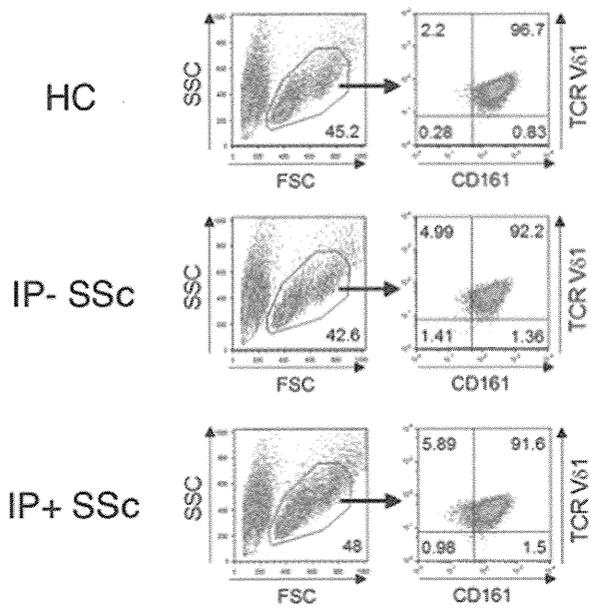
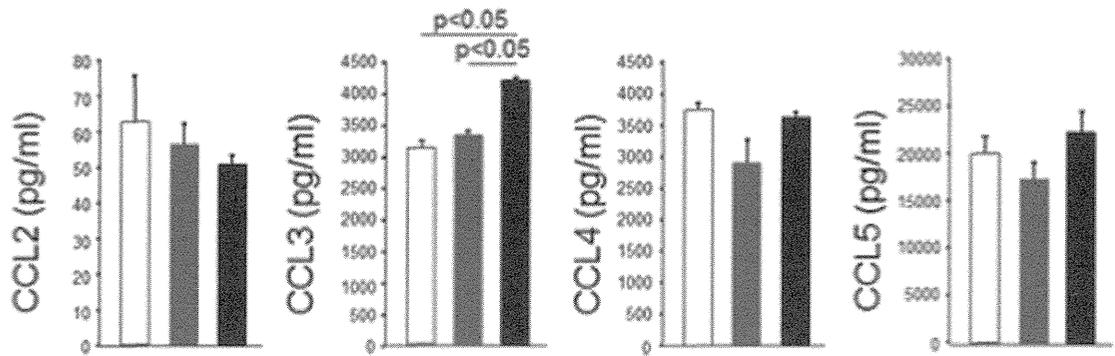


図6：HC、IP-SSc、IP+SSc由来CD161陽性Vδ1陽性細胞株の作製

(A) □ HC ■ IP-SSc ■ IP+SSc



(B) □ HC ■ IP-SSc ■ IP+SSc

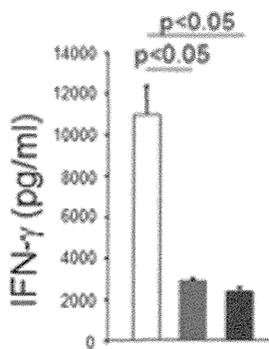


図7：(A)HC、IP-SSc、IP+SSc由来CD161陽性V δ 1陽性細胞株からのCCL2、CCL3、CCL4、CCL5産生量の解析 (B)HC、IP-SSc、IP+SSc由来CD161陽性V δ 1陽性細胞株からのIFN- γ 産生量の解析