

## 強皮症の皮膚線維化におけるノルエピネフリンの関与

研究分担者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授  
協力者 上原顕仁 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学  
協力者 山田和哉 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学  
協力者 内山明彦 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学  
協力者 荻野幸子 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学  
協力者 茂木精一郎 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 講師  
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

強皮症の皮膚線維化におけるノルエピネフリンの役割は明らかになっていない。そこで、今回我々は、強皮症の皮膚線維化におけるノルエピネフリンの役割を解明することを目的とし、健常人及び強皮症患者由来の皮膚線維芽細胞を用いて検討をした。

mRNA 量とタンパク量のいずれにおいても、ノルエピネフリン刺激によって正常および強皮症由来から、濃度依存性に IL-6 の産生がみられ、強皮症由来線維芽細胞では、正常由来線維芽細胞に比べて多いことがわかった。ノルエピネフリン刺激によって、 $\beta 1$  受容体の mRNA 発現量は変化がなかったが、 $\beta 2$  受容体の mRNA 発現量は増加した。ノルエピネフリン刺激による線維芽細胞からの IL-6 産生の一部は、アドレナリン受容体  $\beta$  を介することが示唆された。強皮症由来線維芽細胞において、ノルエピネフリン刺激による IL-6 産生は、エンドセリン-1 刺激によって相加効果を示した。正常、強皮症由来線維芽細胞の増殖能はノルエピネフリン刺激で亢進し、強皮症由来線維芽細胞の増殖は、正常由来線維芽細胞より亢進していた。Western blot 法ではノルエピネフリン刺激によって正常、強皮症由来線維芽細胞ともに ERK のリン酸化の亢進がみられ、強皮症由来では正常と比べて、亢進していた。

以上の結果より、ノルエピネフリンが線維芽細胞に作用して、IL-6 産生の増加や、増殖能の増加を引き起こすことを明らかにした。ノルエピネフリンが IL-6 産生を介して、線維化を誘導することが示唆された。

### A. 研究目的

レイノー現象は、寒冷刺激や精神的ストレスによって、指趾の小動脈が攣縮し、一過性収縮が起こり、末端部が一過性に虚血になる、いわゆる虚血再還流が生じる現象である。

原因は未だ明らかになっていないが、その一つに、寒冷刺激やストレスによって、末梢神経から放出されるノルエピネフリンが、血管平滑筋細胞の  $\alpha$  アドレナリン受容体と結合し、血管の収縮を引き起こす

ことが考えられている。

これまでに、強皮症の血管障害とノルエピネフリンとの関係については知られているが、強皮症の皮膚線維化におけるノルエピネフリンの役割は明らかになっていない。そこで、本研究では強皮症の皮膚線維化におけるノルエピネフリンの役割を解明することを目的とした。

我々は、皮膚の線維化に関わる因子として IL-6 に注目した。IL-6 は、強皮症の皮膚硬化や病勢を反映

するといわれており、強皮症患者の血清、皮膚組織における IL-6 発現量は、正常人より増加しており、特に早期の強皮症で上昇している<sup>1)</sup>。また、培養線維芽細胞では、強皮症由来線維芽細胞は、正常由来線維芽細胞より IL-6 の発現が多く、IL-6 は線維芽細胞の分化、増殖を誘導し、線維化を亢進させると考えられている<sup>2)</sup>。

線維芽細胞からの IL-6 産生を誘導するものとして、IL-1、PDGF、TNF- $\alpha$  や、CD154 と CD40 の結合が知られている<sup>3)</sup>。

また、IL-6 は血管内皮細胞のアポトーシスを誘導し、強皮症の血管障害に関与することも知られている<sup>4)</sup>。

## B. 研究方法

### 1) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞は diffuse cutaneous type の強皮症患者 3 人の同意を得たうえで前腕から採取した。正常皮膚線維芽細胞は健常人 3 人の同意を得たうえ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、実験に用いた。

2) mRNA 量の評価は real time PCR 法を用いて、タンパク量は ELISA 法と Western blot 法を用いて、増殖能は細胞数測定によって検索した。

## C. 研究結果

### 1) ノルエピネフリン刺激による正常、強皮症患者由来線維芽細胞の IL-6 産生

正常人と強皮症患者皮膚由来線維芽細胞をノルエピネフリンで刺激し、IL-6 の発現を比較した。

まず、ノルエピネフリンを 0、0.1、1、10  $\mu$ M の濃度で 1 時間刺激し、刺激後に mRNA 量を real time PCR 法で、上清のタンパク量を ELISA 法で測定し、発現を比較した。その結果、mRNA 量とタンパク量

のいずれにおいても、ノルエピネフリン刺激によって正常および強皮症由来線維芽細胞から、濃度依存性に IL-6 の産生増加がみられた。そして、強皮症由来線維芽細胞からのノルエピネフリン刺激による IL-6 産生は、正常由来線維芽細胞に比べて多かった。

次に、ノルエピネフリンを 10  $\mu$ M の濃度で刺激し、経時的に IL-6 の発現を比較した。その結果、mRNA レベルにおいては、刺激 1 時間後をピークに IL-6 の発現亢進がみられた。蛋白レベルでは、時間依存性に IL-6 の産生上昇がみられた。そして、強皮症由来線維芽細胞からの IL-6 産生は、正常由来線維芽細胞に比べて多いことがわかった (図 1)。

### 2) 正常、強皮症患者由来線維芽細胞のアドレナリン受容体の発現

次に、ノルエピネフリンの受容体である、アドレナリン受容体の mRNA 発現量について real time PCR 法にて検討を行った。

ノルエピネフリン刺激によって  $\beta$ 1 受容体の mRNA 発現量は変化がなかったが、 $\beta$ 2 受容体の mRNA 発現量は増加した。しかし、正常と強皮症由来線維芽細胞における発現量の違いは見られなかった。

次に、ノルエピネフリン刺激による IL-6 産生が  $\beta$  受容体を介しているのかどうかを検討するために、 $\beta$  受容体のプロモーターであるプロプラノロールで前処理し、ノルエピネフリン刺激を行った。その結果、正常と強皮症皮膚由来線維芽細胞において、ノルエピネフリン刺激による IL-6 の mRNA 発現がプロプラノロール処理によって抑制された。

この結果より、ノルエピネフリン刺激による線維芽細胞からの IL-6 産生の一部は、アドレナリン受容体  $\beta$  を介することが示唆された (図 2)。

### 3) ノルエピネフリン刺激による線維芽細胞からの IL-6 産生におけるエンドセリン-1 の影響

次に、強皮症の皮膚線維化に関与するエンドセリン-1の影響について検討をした。

強皮症由来線維芽細胞にて、ノルエピネフリン単独刺激でIL-6のmRNA発現亢進がみられ、エンドセリン-1単独刺激によっても、IL-6のmRNA発現亢進がみられた。さらにノルエピネフリンとエンドセリン-1の両方の刺激によって、さらにIL-6のmRNA発現が亢進した。

この結果より、強皮症由来線維芽細胞において、ノルエピネフリン刺激によるIL-6産生は、エンドセリン-1刺激によって相加効果を示すことが示唆された(図3)。

4) ノルエピネフリン刺激による正常、強皮症患者由来線維芽細胞の増殖能

次にノルエピネフリン刺激による線維芽細胞の増殖能について検討をした。

ノルエピネフリン刺激48時間後に細胞数を測定した。その結果、正常および強皮症由来線維芽細胞の増殖能はノルエピネフリン刺激で亢進し、強皮症由来のものは、正常由来のものより亢進していた(図4)。

5) ノルエピネフリン刺激による正常、強皮症患者由来線維芽細胞の細胞内シグナル変化

最後にノルエピネフリン刺激による細胞内シグナル変化について検討をした。

ノルエピネフリン刺激1時間後にタンパクを回収し、Western blot法を行った。その結果、ノルエピネフリン刺激によって正常および強皮症由来線維芽細胞ともにERKリン酸化の亢進がみられた。また、強皮症由来線維芽細胞におけるERKのリン酸化は、正常と比べて亢進している傾向が見られた。

## D. 考案

これまでに、寒冷刺激やストレスにより誘導され

るノルエピネフリンが血管平滑筋に作用して血管収縮をおこすことによって、レイノー現象を生じることが知られていた。今回の研究によって、ノルエピネフリンが線維芽細胞に作用して、IL-6産生の増加や増殖能の亢進を引き起こすことを明らかにした。また、IL-6はIL-6レセプターと複合体を形成し、線維芽細胞からのコラーゲン産生を亢進させることが知られており、ノルエピネフリンがIL-6産生を介して、線維化を誘導することが示唆された。さらに、IL-6は血管内皮細胞のアポトーシスを誘導することが知られており、ノルエピネフリン刺激によるIL-6の産生が、末梢血管障害にも関与する可能性も考えられる。

今回の結果より、寒冷を防ぐことが末梢血管障害の予防だけではなく、皮膚硬化の予防にもつながること、強皮症の皮膚硬化が寒冷刺激を受けやすい四肢末端より始まる原因としてこれらの機序が関与する可能性が示唆された。

## E. 結論

今回の研究によって、ノルエピネフリンが線維芽細胞に作用して、IL-6産生の増加や増殖能の亢進を引き起こすことを明らかにした。ノルエピネフリンがIL-6産生を介して強皮症の線維化を誘導する可能性が示唆された。

## F. 文献

1. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Der Sci* 2001; 27: 140-6.
2. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured

from affected skin sites of patients with scleroderma.  
J Rheumatol 1992; 19: 1207-11.

Rheum Dis 2011; 70: 366-372.

3. Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K.  
Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. J Rheumatol 1998; 25: 296-301.
4. Barnes TC, Spiller DG, Anderson ME, Edwards SW, Moots RJ. Endothelial activation and apoptosis mediated by neutrophil-dependent interleukin 6 trans-signaling: a novel target for systemic sclerosis? Ann

## 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

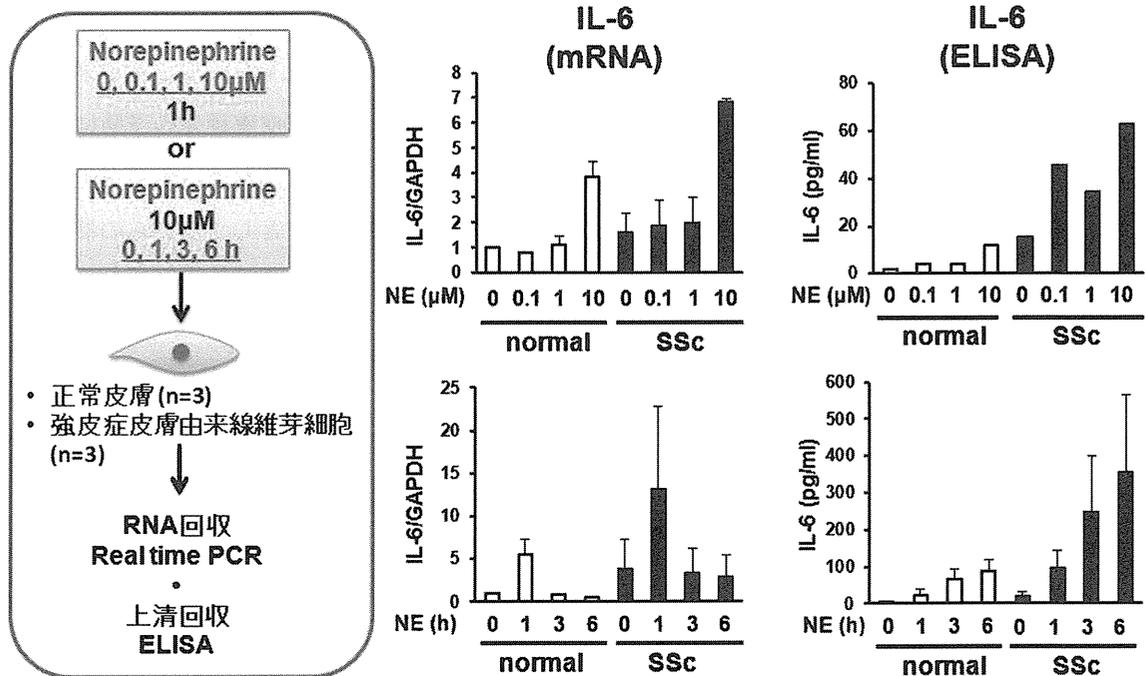


図1：ノルエピネフリン刺激による正常および強皮症患者由来線維芽細胞のIL-6産生  
ノルエピネフリンを0, 0.1, 1, 10 uMの濃度で1時間刺激し、刺激後にIL-6mRNA量をreal time PCR法で、上清のタンパク量をELISA法で測定した。

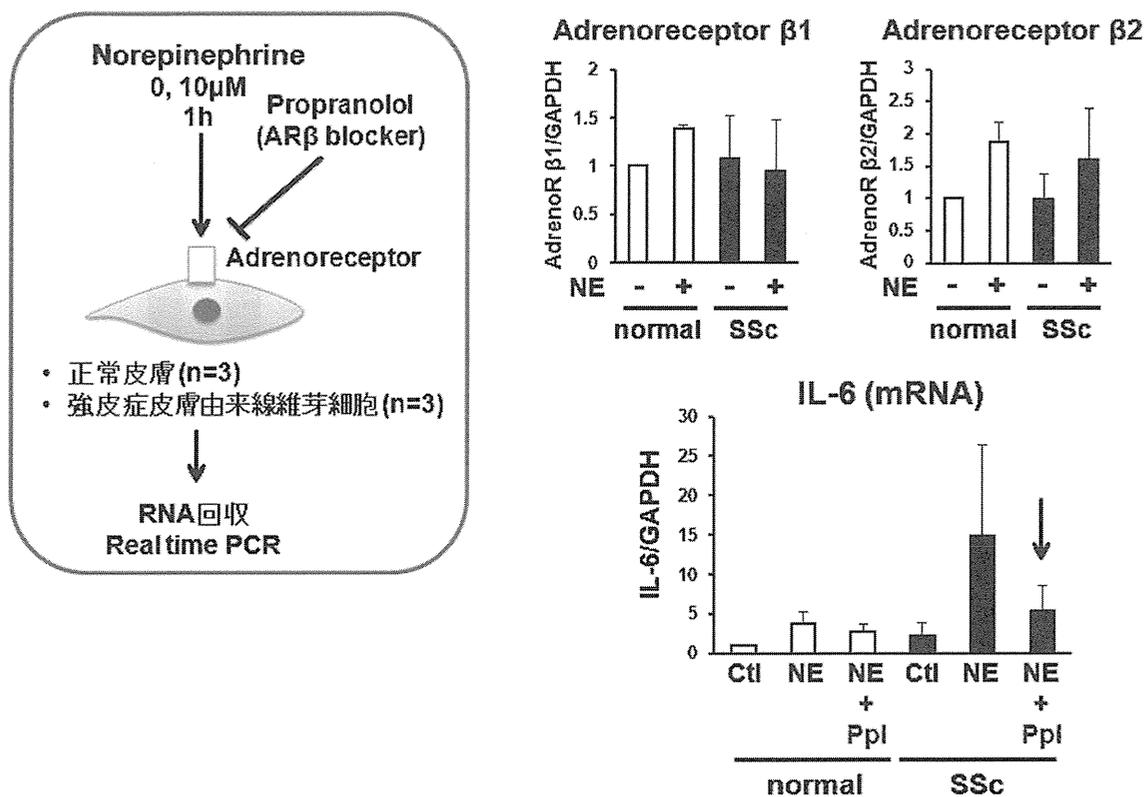


図2：正常および強皮症患者由来線維芽細胞のアドレナリン受容体の発現  
ノルエピネフリン刺激後のアドレナリン受容体  $\beta$ 1、 $\beta$ 2 の mRNA 発現量を real time PCR 法にて測定した。また、プロプラノロールで前処理した後にノルエピネフリン刺激を行い、IL-6mRNA 量を real time PCR 法にて測定した。

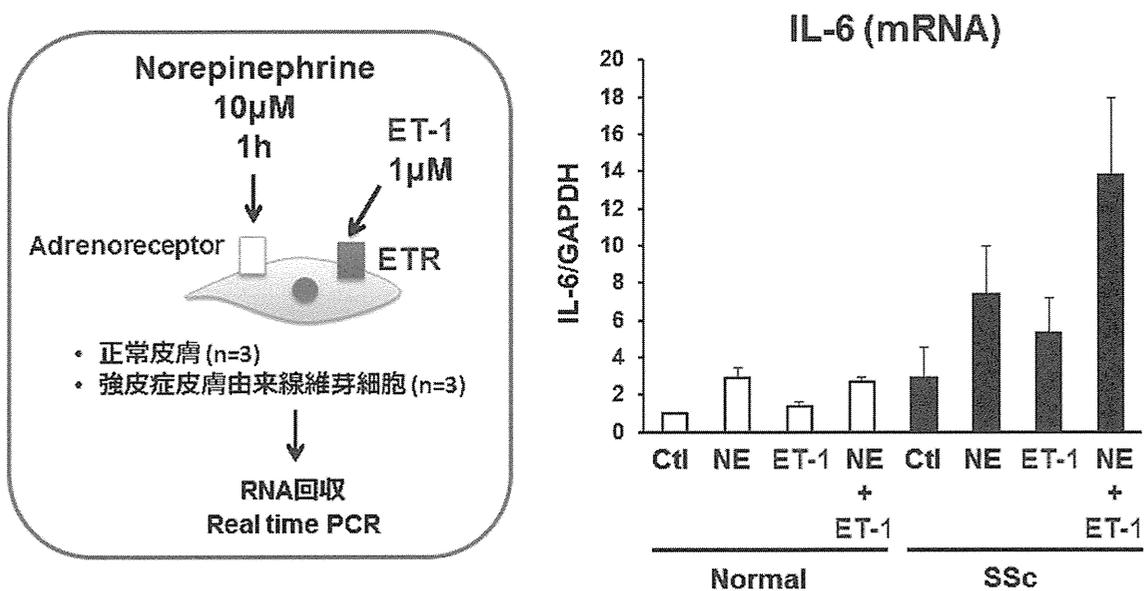


図3：ノルエピネフリン刺激による線維芽細胞からの IL-6 産生におけるエンドセリン-1 の影響  
ノルエピネフリンとエンドセリン-1 のいずれか一方もしくは両者による刺激後の IL-6mRNA 量を real time PCR 法にて測定した。

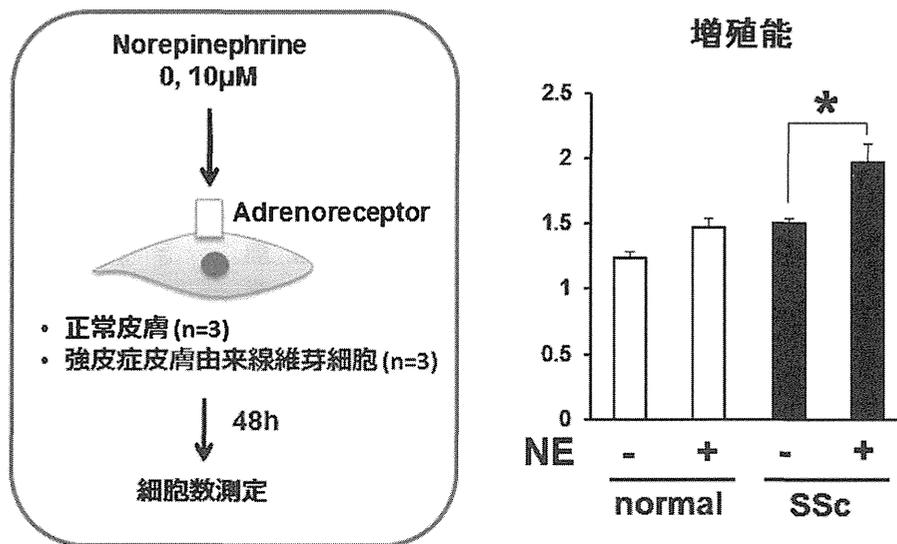


図4：ノルエピネフリン刺激による正常、強皮症患者由来線維芽細胞の増殖能  
ノルエピネフリン刺激、48時間後に細胞数を測定した。

## シルデナフィルの抗線維化作用に関する研究

研究分担者 川口鎮司 東京女子医科大学リウマチ科・膠原病学 臨床教授  
協力者 樋口智昭 東京女子医科大学リウマチ科・膠原病学 研究生  
協力者 大田ゆう子 東京女子医科大学リウマチ科・膠原病学 医員

### 研究要旨

全身性強皮症の皮膚硬化の治療方法は、いまだに確立されていない。一方、難治性皮膚潰瘍は、線維化と同様に全身性強皮症の重要な臨床症状である。この病態に対しても確立した治療方法は無いが、近年、ホスホジエステラーゼ (PDE) 5 阻害薬であるシルデナフィルが、従来の治療方法に比較して有用性が高いことが報告されてきている。PDE5 阻害薬は、血管の拡張作用を有することから、肺動脈性肺高血圧症の治療薬としてだけでなく、海外では、皮膚潰瘍の治療薬として用いられるようになってきた。さらに、最近になり、腎臓や心臓病変の研究分野では、PDE5 阻害薬の抗線維化作用の可能性が報告された。そこで、今回、我々は、PDE5 阻害薬であるシルデナフィルの皮膚線維芽細胞に対する作用を検討した。全身性強皮症患者より樹立した皮膚線維芽細胞に対して、100  $\mu$ M シルデナフィル添加群では、細胞内 cGMP が増加した。また、それに伴い、コラーゲン産生が抑制された。シルデナフィルは、全身性強皮症に対して、血管拡張薬としてだけでなく、線維化治療薬としても有用である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

全身性強皮症 (SSc) は、線維化と血管傷害を主症状とする原因不明の結合組織疾患である。線維化の機序を解明し、新たな治療戦略を確立することがこの研究班の目的であるが、まだ、新規の治療方法はみつかっていない。近年、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の治療薬として開発されたホスホジエステラーゼ (PDE) 5 阻害薬は、PAH の治療薬として有用であるばかりでなく<sup>(1)</sup>、SSc に伴う末梢循環不全にも有用であるとする報告がみられる<sup>(2)</sup>。末梢循環不全の結果、冬期に手指、あるいは足趾の皮膚潰瘍が生じ、SSc 治療において、線維化と同様、難治性の病態である。この皮膚潰瘍に PDE5 阻害薬が有用であり、今後、研究がすすめられる。一方、血管拡張作用以外に、PDE5 阻害薬には、抗線維化作用が推測されている。近年、心血管系、糸球体腎炎に対

する PDE5 阻害薬の有効性を示唆する論文が見られるようになった<sup>(3-5)</sup>。PDE5 阻害薬は、細胞内の cGMP を分解する PDE5 を抑制することにより、細胞内 cGMP の濃度を維持することができる。この cGMP が血管平滑筋細胞では弛緩を誘導し、血管の拡張を引き起こす。一方、cGMP の増加が線維芽細胞に対して、どのような作用をおよぼすかは不明である。今回の研究では、皮膚由来の線維芽細胞を用いて、cGMP 増加と抗線維化作用に関して検討する。

### B. 研究方法

#### 1) 線維芽細胞の培養

SSc の診断は、厚労省の研究班の基準を用いた。5 症例の SSc 患者より、同意のもと、皮膚生検を行い、皮膚線維芽細胞を培養した。5 例の患者は全例が女性で、びまん皮膚硬化型の症例が 4 例、限局皮膚硬

化型の症例が1例であった。詳細は表1に示す。皮膚線維芽細胞の培養には、10%FBS添加のDMEM培地を用いた。今回の培養研究には、PDE5阻害薬としてシルデナフィルを用いた。また、直接に細胞内cGMPを増加させる可溶性guanylate cyclase agonistとして、BAY-412272を用いた。

## 2) 細胞内cGMPの定量

SSc線維芽細胞を24時間培養し、その後、種々の濃度でシルデナフィルおよびBAY-412272を添加する。3時間、6時間、24時間にて細胞抽出液を作成する。cGMPの測定には、CGMP EIAキット(Cayman Chemical)を用いた。

## 3) IL-6およびコラーゲンのmRNAの定量

線維芽細胞の遺伝子発現の定量として、IL-6およびCOL1A1、COL1A2に特異的なTaqMan probeを購入し、real-time RT-PCR法を用いた。線維芽細胞をシルデナフィル(100  $\mu$ M)またはBAY-412272(100  $\mu$ M)にて24時間あるいは48時間培養し、細胞からRNAを抽出し定量を行った。

## C. 研究結果

1) 強皮症由来の線維芽細胞において、細胞内cGMPは測定することは可能であった。強皮症由来の細胞以外に健常人由来の細胞においても細胞内cGMP濃度を測定したが、強皮症由来線維芽細胞と有意な差は認められなかった。強皮症由来線維芽細胞を用いて行った結果を、図1に示す。検討した時間の中では、実験開始後、3時間がcGMP濃度のpeakであり、その後、24時間にかけて減少した。しかしながら、100  $\mu$ Mシルデナフィル添加群では、非添加群に比較し有意に細胞内cGMPは増加していた(図1A)。直接cGMP濃度を増加させるBAY-412272の添加においても同様の結果が得られた(図1B)。

2) コラーゲン type I の mRNA 発現に対するシルデナフィルの効果

コラーゲン type I の遺伝子は、COL1A1 と COL1A2 により構成されている。そのため、それら2種類のmRNAを定量した。その結果、図2に示すように、各々100  $\mu$ MのシルデナフィルおよびBAY-412272の48時間の培養により、COL1A1(図2A)、COL1A2(図2B)は、非添加群のコントロール(control)と比較し、有意に低下した。

3) IL-6 の mRNA 発現に対するシルデナフィルの効果

シルデナフィルまたはBAY-412272を100  $\mu$ Mずつ培養上清に添加し、24時間後の細胞からRNAを抽出して、IL-6 mRNAを定量した。シルデナフィルでは、有意な増加が認められた。一方、BAY-412272では、不変であった(図3)。

## D. 考察

細胞内cGMPの増加は、コラーゲン産生には抑制として機能することが明らかとなった。どのような機序でコラーゲン産生に関わっているかは不明である。SScも含め、臓器の線維化に関わる重要な因子として、TGF- $\beta$ が知られている。すでに、細胞内cGMPは、TGF- $\beta$ シグナル伝達を抑制することが血管平滑筋細胞を用いた研究で明らかとなっている<sup>(3)</sup>。また、実験的糸球体腎炎のモデルラットの研究でも、PDE5阻害薬がTGF- $\beta$ 抑制を介し抗線維化作用を有することが示された<sup>(4)</sup>。今回の我々の検討においても、TGF- $\beta$ の産生を検討したが、シルデナフィルおよびBAY-412272によるTGF- $\beta$  mRNAに対する作用は確認できなかった。さらに、線維化を誘導するサイトカインの一つであるIL-6に対する作用を検討した結果、予想と反して、シルデナフィルは、強皮症線維芽細胞のIL-6 mRNAを亢進さ

せた。細胞内 cGMP をシルデナフィルよりも強力に増加させる BAY-412272 では、この現象は認められなかった。このことより、cGMP 増加により IL-6 が誘導されるのでは無く、PDE5 阻害薬による cGMP を介さない系が存在し、その系により IL-6 増加が認められる可能性がある。さらに、その作用は、PDE5 阻害薬すべてに共通なのか、シルデナフィルに特異的なのかを調べる目的で、現在、タダラフィルにおいても同様の研究を行っている。

SSc では、約 10% に PAH を合併し、また、同程度には指尖部潰瘍を引き起こすとされている。このような血管病変に対して、細胞内 cGMP 増加により血管拡張を誘導する PDE5 阻害薬は有用な治療方法と考える。さらに、抗線維化効果が期待できれば、SSc に対する 2 つの病態に共通の有用な治療戦略となる可能性があり、今後、さらに検討を続ける方針である。

## E. 結 論

シルデナフィルにより、線維芽細胞の細胞内 cGMP 濃度を高値に維持することが可能であった。その cGMP により、線維芽細胞が産生するコラーゲンは減少することが確認できた。PDE5 阻害薬は、SSc における血管病変ばかりでなく、線維化病変に対しても有用な治療薬となる可能性が示された。

## F. 文 献

1. Badesch DB, et al. Sildenafil for pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. *J Rheumatol* 2007; 34: 2417-2422
2. Brueckner CS, et al. Effects of sildenafil on digital ulcers in systemic sclerosis: analysis from a single center pilot study. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1475-1478
3. Gong K, et al. cGMP inhibits TGF- $\beta$  signaling by sequestering Smad3 with cytosolic  $\beta$ 2-tubulin in pulmonary smooth muscle cells. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 1794-1803
4. Hohenstein B, et al. PDE-5 inhibition impedes TSP-1 expression, TGF- $\beta$  activation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 3427-3436
5. Li P, et al. Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor  $\beta$ -induced Smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts. *Circ Res* 2008; 102: 185-192

## G. 研究発表

なし

## H. 知的財産権の出題・登録状況

なし

表 1. 患者背景

強皮症患者	5名
性別	全例女性
病型 (びばん/限局)	4:1
年齢 中央値	47歳
平均罹病期間	7.8年
自己抗体の頻度	
抗 Scl-70 抗体	3例
抗 U1-RNP 抗体	1例
抗 RNAPolymeraseIII 抗体	1例

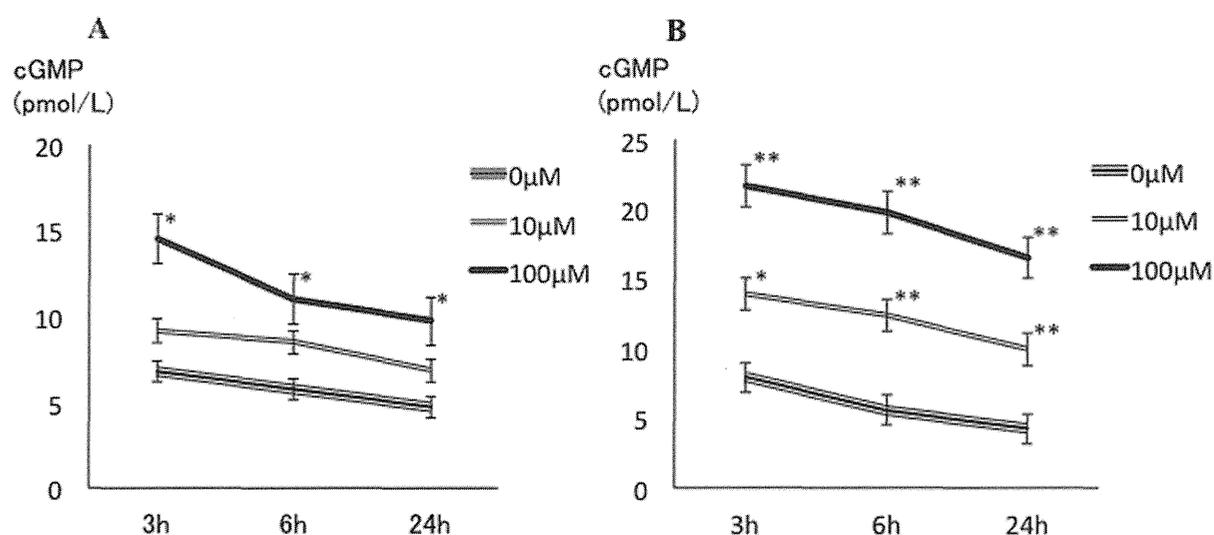


図 1: シルデナフィルおよび BAY-412272 の細胞内 cGMP におよぼす影響

A. シルデナフィルを 0-100 μM の濃度で培養上清中に添加し、3 時間、6 時間、24 時間後の細胞内 cGMP 濃度を EIA キットを用いて測定した。

B. BAY-412272 を 0-100 μM の濃度で培養上清中に添加し、3 時間、6 時間、24 時間後の細胞内 cGMP 濃度を EIA キットを用いて測定した。

\*: P<0.05; \*\*: P<0.01

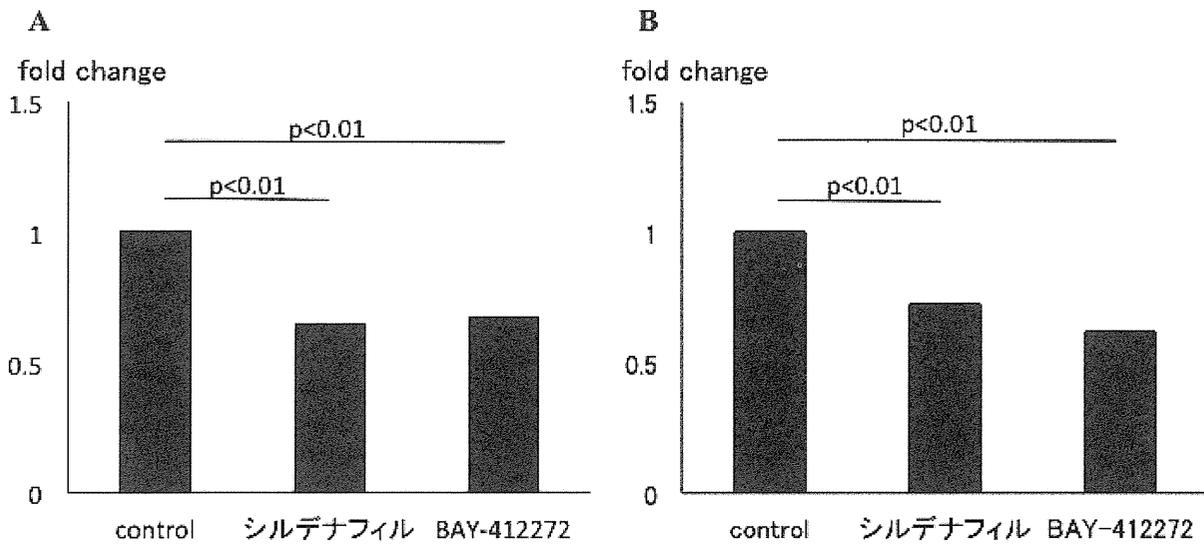


図2：Real-time PCR 法による COL1A1 と COL1A2 mRNA 発現の検討

A. シルデナフィルあるいは BAY-412272 をそれぞれ 100  $\mu$ M 添加し、24 時間培養後の COL1A1 mRNA を定量した。

B. シルデナフィルあるいは BAY-412272 をそれぞれ 100  $\mu$ M 添加し、24 時間培養後の COL1A2 mRNA を定量した。

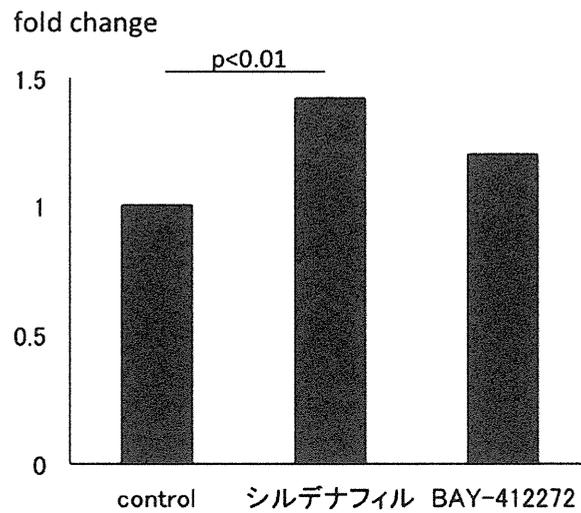


図3：Real-time PCR 法による IL-6 mRNA 発現の検討

シルデナフィルあるいは BAY-412272 をそれぞれ 100  $\mu$ M 添加し、24 時間培養後の IL-6 mRNA を定量した。

## 全身性強皮症の病変部皮膚における Cathepsin V の発現異常とその意義

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	野田真史	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
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	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	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	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	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	青笹尚彦	東京大学医学部附属病院皮膚科	助教
協力者	住田隼一	東京大学医学部附属病院皮膚科	助教
協力者	築場広一	東京大学医学部附属病院皮膚科	特任講師
協力者	栗野嘉弘	東京大学医学部附属病院皮膚科	講師
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

cathepsin はセリンプロテアーゼの一群であり、線維化や血管新生への関与が報告されているが、全身性強皮症 (SSc) におけるその役割はいまだ不明である。今回我々は SSc の病態における cathepsin V (CTSV) の役割を解明するため、本症における血清 CTSV 値、皮膚における CTSV の発現異常とその機序について検討した。SSc 患者群では、病型に関わらず dcSSc と lcSSc で共に血清 CTSV 値は健常人に比較して低下していた。病型別の検討では、lcSSc で血清 CTSV 値が減少している群では、右室収縮期圧が上昇している頻度が有意に高かった。一方、dcSSc では、罹病期間 1 年未満の例では全例で健常人の最低値よりも血清 CTSV 値が低下していた。また、罹病期間 1 年以上の dcSSc 患者では、血清 CTSV 値が相対的に低い群において proliferative obliterative vasculopathy を伴う頻度が高かった。皮膚組織中における CTSV の発現量については、dcSSc の皮膚線維芽細胞、SSc 全体の血管内皮細胞において、健常人と比較して低下していた。さらに、培養した皮膚線維芽細胞と皮膚血管内皮細胞を Fli1 siRNA で処理したところ、いずれの細胞においても CTSV の mRNA の発現量は有意に減少した。以上より、皮膚線維芽細胞と皮膚血管内皮細胞における CTSV の発現低下が SSc における線維化と血管障害の病態に関与している可能性、およびその異常には転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下が関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

cathepsin はセリンプロテアーゼの一群であり、細胞内外で多様な機能を持つ。cathepsin は 11 の構成因子からなり、ヒトでは cathepsin B、C、F、H、K、L、O、S、V、W、X が知られている。中でも、cathepsin V (CTSV) は強力な血管新生抑制因子であるエ

ンドスタチンとアンジオスタチンをそれぞれ XVIII 型コラーゲン、プラスミノゲンから産生する作用があり、血管新生を制御する因子の一つとして機能している。一方、ヒト CTSV と相同性のある cathepsin L が欠失したマウスでは心筋の線維化が起こることが報告されており、マウス cathepsin L によ

るコラーゲン分解作用が消失することが原因ではないかと推測されている。<sup>1</sup> このように、CTSVは線維化と血管障害の病態に関与している可能性が示唆されているが、全身性強皮症（SSc）の病態においてCTSVが果たしている役割については過去に検討されていない。今回我々はSScの病態におけるCTSVの役割を解明するため、本症における血清CTSV値、皮膚におけるCTSVの発現異常とその機序について検討した。

## B. 研究方法

### 1) ELISA法による血清CTSV値の測定

ELISA kit (R & D Systems) を用いて51名のSSc患者（女性49名と男性2名、dcSSc 28名とlcSSc 23名）と18名の健常人（女性17名と男性1名）において血清CTSV値を測定した。SSc患者の年齢の中央値は59歳（51-66.5; 25-75 percentile）、罹病期間の中央値は2.5年（1.4-9.5）であり、健常人では年齢の中央値が55歳（51-59）であった。

### 2) 免疫組織学的検討

皮膚線維芽細胞、皮膚血管内皮細胞におけるCTSVの発現を調べるため、6名のSSc患者（dcSSc 3例とlcSSc 3例）と6名の健常人から採取した皮膚組織を用いて免疫染色を行った。

### 3) 定量的RT-PCR

ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト皮膚血管内皮細胞（HDMEC）をFli1 siRNAで処理し、CTSV mRNAの発現量を定量的RT-PCRで測定した。

### 4) 統計学的解析

血清CTSV値の多重比較法としてはKruskal-Wallis testとSteel-Dwass testを用いた。各種臨床症状と血清CTSV値の関係については、頻度はFisher's exact test、相関はSpearman's rank correlation coefficientを用いた。培養細胞におけるCTSVの発現量の比

較についてはPaired t-testを用いた。いずれも $P < 0.05$ を有意とした。

なお臨床データの研究目的での使用については、患者から文書で同意を得ている。

## C. 研究結果

### 1) SSc患者の血清CTSV値と臨床症状との相関

図1に示すように、dcSSc患者（113.8[102.1-158.1] ng/ml）およびlcSSc患者（100.7[94.4-119.5] ng/ml）において、血清CTSV値は健常人（165.6[153.9-183.1] ng/ml）と比較して有意に低下していた（ $P < 0.05$ ）。

次に、dcSSc患者とlcSSc患者のそれぞれをCTSV低下群とCTSV正常群に分類し（健常人の平均値-2SDがカットオフ値）、臨床症状との関連について検討した。lcSSc患者においては、CTSV減少群（ $n=12$ ）はCTSV正常群（ $n=11$ ）と比較して、有意にRVSPが上昇（35 mmHg以上）している頻度が高かった（75% vs 18%,  $P < 0.05$ ; 表1）。一方、dcSSc患者においては、CTSV減少群（ $n=8$ ）とCTSV正常群（ $n=20$ ）では臨床所見に明らかな差異はみられなかった（表2）。

dcSSc患者では、罹病期間と共に病態が大きく変化することが知られている。そこで、次にdcSSc患者をKurodaらの報告<sup>2</sup>に準じて罹病期間1年未満、1-6年、6年以上の3群に分けて解析を行った。図2に示すように、罹病期間1年未満の症例では血清CTSV値は全例で健常人の最低値を下回っていた。また、罹病期間1年未満の症例の平均+2SDをカットオフ値として、罹病期間が1年以上のdcSSc患者をCTSV値が低値に留まる症例と高値を示す症例の2群に分けて解析したところ、血清CTSV値減少群（ $n=10$ ）では血清CTSV値上昇群に比較してproliferative obliterative vasculopathy（指尖部潰瘍、

RVSP 上昇、強皮症腎クリーゼのいずれか) を伴う頻度が有意に高かった (80% vs 20%,  $P < 0.05$ ; 表 3)。

## 2) 皮膚組織中における CTSV の発現量についての検討

次に、皮膚組織中の CTSV の発現量について、免疫組織染色で検討した (表 4)。血管における CTSV の発現量は、SSc 患者では健常人に比較して低下していた。また、線維芽細胞での CTSV の発現量は、dcSSc 患者では健常人に比較して低下していた。興味深いことに、健常人の表皮では顆粒層と角層に CTSV の発現が限局していたのに対して、SSc 患者の表皮では CTSV が基底層から角層までびまん性に染色された (図 3)。

## 3) Fli1 の発現低下が皮膚線維芽細胞と皮膚血管内皮細胞における CTSV の発現に及ぼす影響

SSc 患者では転写因子 Fli1 の発現が恒常的に低下しており、その異常が線維芽細胞と血管内皮細胞の恒常的な活性化に関与している可能性が示唆されている。<sup>3,4</sup> そこで、Fli1 の発現低下が CTSV の発現異常に関与している可能性について、培養細胞を用いて検討した。図 4 に示すように、ヒト皮膚線維芽細胞と HDMEC を Fli1 siRNA で処理したところ、いずれの細胞においても Fli1 遺伝子の mRNA の発現量は約 40% 程度まで低下し、CTSV の発現量も約 40% 程度まで低下した。

## D. 考案

SSc 患者では、血清 CTSV 値は健常人と比較して有意に低下していた。特に罹病期間 1 年未満の dcSSc 患者では血清 CTSV 値は一様に低下しており、全例が健常人の最低値よりも低い値を示した。さらに、早期 dcSSc 患者の皮膚組織中では、線維芽細胞における CTSV の発現量は健常人に比較して顕著に低下していた。過去の報告において、ヒト CTSV

と相同性のある Cathepsin L が欠失したマウスでは心筋の線維化が起こるとされており、Cathepsin L によるコラーゲン分解作用が消失することが原因ではないかと推測されている。<sup>1</sup> よって、今回の検討結果により、初期の dcSSc における皮膚線維化の過程に、CTSV の発現低下による細胞外基質の分解低下が関与している可能性が示唆された。

一方、血清 CTSV 値が相対的に低い罹病期間 1 年以上の dcSSc 患者では proliferative obliterative vasculopathy による病変を伴う頻度が有意に高く、血清 CTSV 値が低い lcSSc 患者では RVSP が上昇している頻度が有意に高かった。また、SSc 患者の皮膚組織中の血管では、健常人と比較して CTSV の発現は顕著に低下していた。CTSV は強力な血管新生抑制因子であるエンドスタチンとアンジオスタチンをそれぞれ XVIII 型コラーゲン、プラスミノゲンから産生する作用がある。したがって、SSc の皮膚血管内皮細胞における恒常的な CTSV 発現低下はエンドスタチンとアンジオスタチンの産生を低下させることにより、proliferative obliterative vasculopathy の病態形成に関与している可能性が示唆された。

皮膚組織の免疫染色では表皮における CTSV の分布が変化していることが明らかとなった。過去にも Aden らにより SSc 患者の表皮ではケラチン 14、ケラチン 6、ケラチン 16 の発現異常があることが指摘されている。<sup>5</sup> そのため、CTSV の表皮における発現異常は SSc 患者における表皮の形質変化と関連している可能性が示唆された。

我々はこれまでに、SSc 患者では転写因子 Fli1 の発現が恒常的に低下しており、この異常が本症の皮膚線維化と血管障害の発症に関与している可能性について明らかにしてきた。<sup>4</sup> そこで、Fli1 遺伝子の発現低下がヒト皮膚線維芽細胞とヒト皮膚血管内皮細胞における CTSV の発現に及ぼす影響を検討し

たところ、どちらの細胞においても Fli1 siRNA は CTSV の発現を有意に抑制した。以上の結果から、CTSV 遺伝子は Fli1 の発現低下によって発現量が変化する遺伝子の一つとして、SSc の病態形成に参与している可能性が示唆された。

## E. 結 論

SSc 患者の皮膚線維芽細胞と皮膚血管内皮細胞では、転写因子 Fli1 の発現低下によりに CTSV 遺伝子の発現が抑制されており、この異常は本症の線維化と血管障害の病態に参与している可能性が示唆された。

## F. 文 献

1. Spira, D., et al. Cell type-specific functions of the lysosomal protease cathepsin L in the heart. *J Biol Chem* 282, 37045-37052 (2007).
2. Kuroda, K. & Shinkai, H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 289, 567-572 (1997).
3. Kubo, M., et al. Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol* 163, 571-581 (2003).
4. Asano, Y., Bujor, A.M. & Trojanowska, M. The im-

pact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 59, 153-162 (2010).

5. Aden, N., et al. Epithelial cells promote fibroblast activation via IL-1alpha in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 130, 2191-2200 (2010).

## G. 研究発表

1. 論文発表  
Decreased cathepsin V expression due to Fli1 deficiency contributes to the development of dermal fibrosis and proliferative vasculopathy in systemic sclerosis. Noda S, Asano Y, Takahashi T, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S. *Rheumatology (Oxford)*. In press.
2. 学会発表  
Decreased cathepsin V expression due to Fli1 deficiency contributes to the development of dermal fibrosis and proliferative vasculopathy in systemic sclerosis. 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, Washington DC. Poster.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

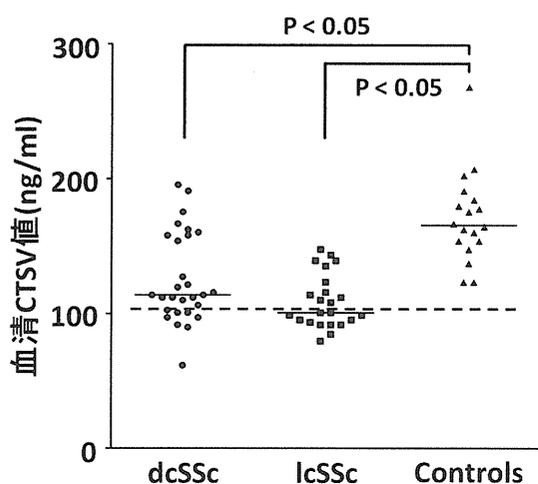


図1：dcSSc患者、lcSSc患者、健常人における血清 CTSV 値  
実線は中央値を、点線はカットオフ値（健常人の平均血清 CTSV 値 -2SD）を示す。

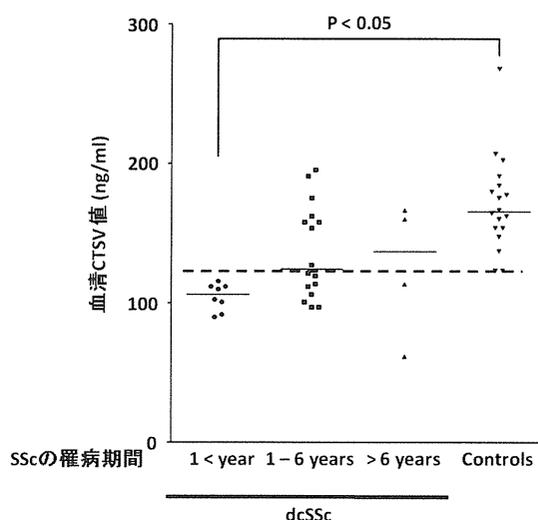


図2：dcSScにおける罹病期間と血清 CTSV 値  
実線は中央値を、点線はカットオフ値（罹病期間1年未満である dcSSc 患者の血清 CTSV 値の平均 +2SD）を示す。

表 1. lcSSc 患者における血清 CTSV 値と臨床的特徴の相関

臨床症状	lcSSc 全体	
	CTSV 値減少群 (n=12)	CTSV 値正常群 (n=11)
爪上皮出血点	55	64
Raynaud 現象	90	82
毛細血管拡張	63	22
指尖部潰瘍	9	29
RVSP 上昇	75#	18
強皮症腎クリーゼ	10	9

数値は % を示す。

カットオフ値は健常人の血清 CTSV 値の平均 -2SD

#P<0.05

表 2. dcSSc 患者における血清 CTSV 値と臨床的特徴の相関

臨床症状	dcSSc 全体	
	CTSV 値減少群 (n=8)	CTSV 値正常群 (n=20)
爪上皮出血	75	67
Raynaud 現象	88	83
血管拡張	40	44
指尖部潰瘍	43	11
RVSP 上昇	25	15
強皮症腎クリーゼ	0	10

数値は % を示す。

カットオフ値は健常人の血清 CTSV 値の平均 -2SD

表 3. 罹病期間 1 年以上の dcSSc 患者における血清 CTSV 値と臨床的特徴の相関

臨床症状	罹病期間 ≥ 1 年の dcSSc	
	CTSV 値減少群 (n=10)	CTSV 値上昇群 (n=10)
爪上皮出血	67	67
Raynaud 現象	90	78
血管拡張	29	63
指尖部潰瘍 *1	50	10
RVSP 上昇 *2	30	11
強皮症腎クリーゼ *3	20	0
Proliferative obliterative vasculopathy による病変 (*1、2、3 のいずれか)	80#	20

数値は % を示す。

カットオフ値は罹病期間 1 年未満である dcSSc 患者の血清 CTSV 値の平均 +2SD

#P<0.05

表 4. 皮膚組織での CTSV の発現

	年齢/性別	罹病期間 (年)	病型	線維芽細胞	血管内皮細胞
NS1	65F			+	+++
SSc1	61F	1	dcSSc	+/-	++
NS2	63F			+	+++
SSc2	64F	0.5	dcSSc	+	++
NS3	64M			++	+++
SSc3	59M	0.5	dcSSc	+/-	++
NS4	56F			+	+++
SSc4	52F	1	lcSSc	+	++
NS5	55F			+	+++
SSc5	51F	0.2	lcSSc	+	++
NS6	59F			+/-	+++
SSc6	58F	1	lcSSc	+/-	++

NS：健常人

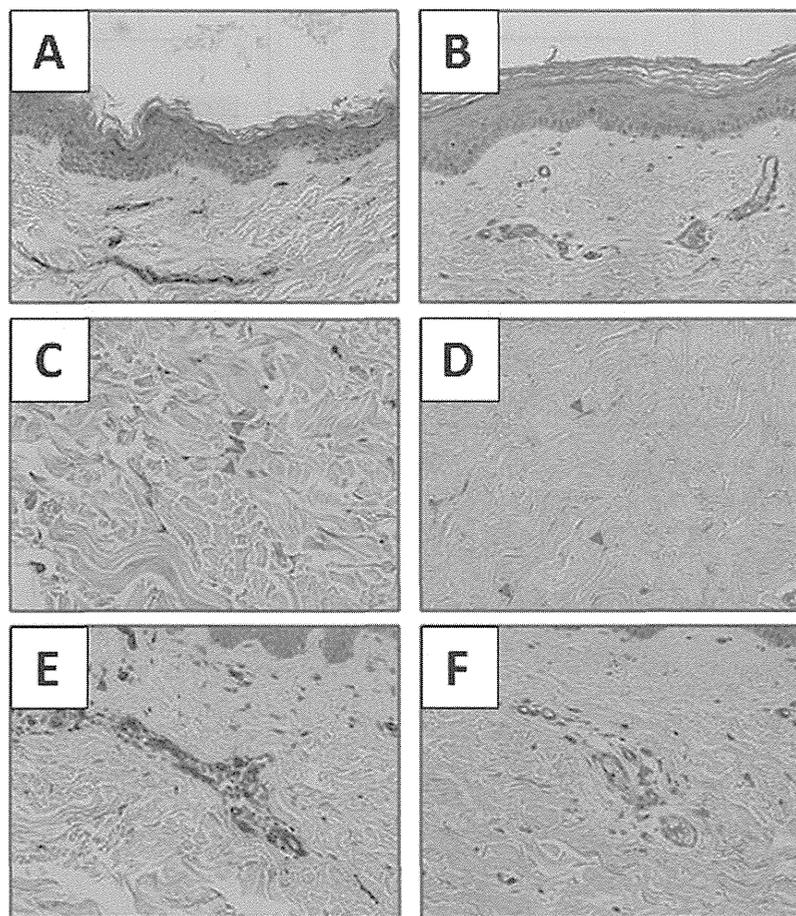


図 3：健常人および SSc 患者の皮膚組織における CTSV の発現  
 健常人 (A, C, E) と SSc 患者 (B, D, F) の皮膚組織を用いて、CTSV の免疫組織染色を行った。表皮 (A, B)、皮膚線維芽細胞 (C, D)、血管内皮細胞 (E, F) での発現を比較した。B, D では矢印が線維芽細胞を示す。

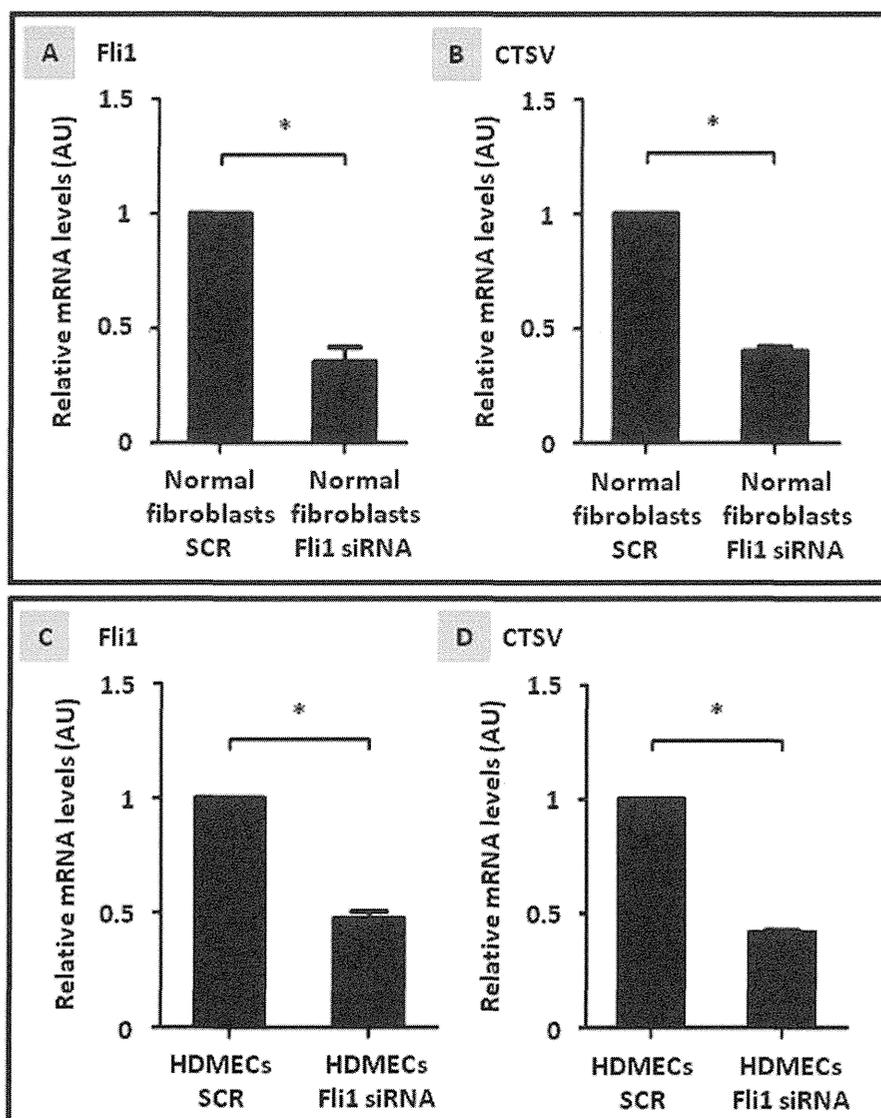


図4：Fli1 siRNA が皮膚線維芽細胞と HDMEC における CTSV の発現に及ぼす影響  
 皮膚線維芽細胞 (A、B) と HDMEC (C、D) を、control siRNA もしくは Fli siRNA で処理し、Fli1 (A、C) と CTSV (B、D) の mRNA の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。

# 強皮症患者における血清 tenascin-C 濃度の意義

研究分担者 尹 浩信 熊本大学大学院皮膚科学（皮膚病態治療再建学）教授  
協力者 井上久仁子 熊本大学大学院皮膚科学（皮膚病態治療再建学）大学院生  
協力者 神人正寿 熊本大学大学院皮膚科学（皮膚病態治療再建学）講師

## 研究要旨

tenascin-C は細胞外マトリックスの一つで、創傷治癒等に関わる蛋白である。我々は、様々な膠原病患者血清中の tenascin-C 濃度を ELISA 法で測定した。全身性强皮症患者、強皮症関連病態患者および限局性强皮症患者で血清 tenascin-C 濃度の上昇を認め、特に全身性强皮症患者においては血清 tenascin-C 濃度とスキンスコア、指尖虫喰状癬痕、全身色素沈着、および肺線維症との関連を認めた。

## A. 研究目的

コラーゲン等の細胞外マトリックスの異常は、全身性强皮症（SSc）や他の膠原病で認められる。しかし、その病態や機序には不明なことが多い。Tenascin ファミリーは、細胞外マトリックスの一つであり、tenascin-C、-R、-X、-W で構成される。その中でも、tenascin-C は創傷治癒、発生、発癌等の際に発現することで知られる。皮膚疾患においては、アトピー性皮膚炎、ケロイド、悪性黒色腫等の病変で高発現していることが明らかになっている。強皮症の皮膚組織でも、tenascin-C が高発現していることが知られているが、皮膚病変のみでの報告が多い。今回、我々は、強皮症とその他の膠原病について、血清 tenascin-C 濃度を測定し、血清 tenascin-C 濃度が膠原病の指標になりうる可能性について検討した。

## B. 研究方法

血清は 33 名の SSc 患者、19 名の限局性强皮症（LSc）の患者、10 名の強皮症関連病態（scleroderma spectrum disorder SSD）の患者、12 名の皮膚筋炎（DM）患者、15 名の全身性エリテマトーデス（SLE）患者より採取した。SSc と SLE の患者は American

College of Rheumatology（ACR）の分類基準を満たしていた。LeRoy の分類に従って、SSc 患者を 14 名の diffuse cutaneous SSc（dcSSc）と、19 名の limited cutaneous SSc（lcSSc）に分類した。ACR の SSc の基準を満たさないが、将来 SSc を発症すると考えられる患者を、ポイント制診断基準<sup>11)</sup>に従って強皮症関連病態（SSD）と診断した。DM の診断は Bohan and Peter の診断基準に基づいて行った。

血清の採取に際して、ヘルシンキ宣言の精神を尊重し、熊本大学大学院生命科学研究部倫理委員会より承諾された文書にて説明し同意、署名を得て行った。Tenascin-C の血中濃度測定は、ELISA キット（IBL）を用いて行った。2 群間で平均値を比較する際には Mann-Whitney test を、発現率を比較する際には Fisher's exact probability test を用い、P 値 0.05 未満を有意差ありとした。

## C. 研究結果

33 名の強皮症患者、15 名の限局性强皮症患者、10 名の SSD 患者、12 名の DM 患者、10 名の SLE 患者、15 名の健常人の血清 tenascin-C 濃度を図 1 に示す。

SSc患者の血清 tenascin-C 濃度（平均値）は健常人より有意に高かった（ $40.54 \pm 33.70$  ng/ml vs  $13.62 \pm 8.22$  ng/ml、 $p < 0.0001$ ）。また、SSc患者を研究方法に示したように分類すると lcSSc 群、dcSSc 群共に健常人より上昇していた（ $46.86 \pm 5.56$  ng/ml vs  $13.62 \pm 8.22$  ng/ml、 $p < 0.0001$ ； $36.43 \pm 42.99$  ng/ml vs  $13.62 \pm 8.22$  ng/ml、 $p = 0.033$ ）。また、LSc 患者、SSD 患者群の血清 tenascin-C 濃度はともに健常人よりも上昇していた（ $39.11 \pm 36.80$  ng/ml vs  $13.62 \pm 8.22$  ng/ml、 $p = 0.002$ ； $43.38 \pm 47.55$  ng/ml vs  $13.62 \pm 8.22$  ng/ml  $p = 0.007$ ）。一方、DM 患者、SLE 患者では、健常人と比較し有意差は認められなかった。カットオフ値は、健常人の平均+2SD である  $30.06$  ng/ml に設定した。

表 1 に、SSc 患者の血清 tenascin-C 濃度と、臨床所見との関連について示す。血清 tenascin-C 濃度上昇群では、dcSSc 患者が lcSSc に比べて有意に多かった（diffuse : limited ; 14 : 6 vs 0 : 13  $p < 0.0001$ ）。また、強皮症スキンスコア（MRSS）は、血清 tenascin-C 濃度上昇群において有意に高かった（ $16.9$  vs  $2.8$   $p = 0.001$ ）。肺線維症、pitting scar/ulcer、びまん性色素沈着は、tenascin-C 濃度上昇群で有意に多く見られた（ $52.9\%$  vs  $7.7\%$ 、 $p = 0.0174$ ； $66.7\%$  vs  $16.7\%$   $p = 0.0106$ ； $53.8\%$  vs  $0\%$ 、 $p = 0.0436$ ）。

## D. 考案

SSc 患者の血清 tenascin-C 濃度は健常人と比較して上昇していることが明らかになった。また、強皮症患者において、dcSSc 患者の割合、MRSS、肺線維症、pitting scar/ulcers が tenascin-C 上昇群で多く見られたことより、tenascin-C が強皮症の病因において、線維化、血管障害に関わっている可能性が示唆された。また、SSD 患者と LSc 患者の血清 tenascin-C 濃度が健常人と比較し上昇していることも明らか

になった。一方、DM、SLE 患者では tenascin-C 濃度が上昇する傾向は認められなかった。SSc の線維化はしばしば不可逆性であり、早い段階で疾患を発見し治療する必要がある。その為、SSD の診断概念は重要であり、さらに確立され汎用されるべきであると考えられる。今回我々の研究により、低侵襲な血清 tenascin-C 濃度測定が、SSD 患者の診断に有用である可能性が示唆された。強皮症の線維化における tenascin-C の関与、病態について、さらなる検討が待たれる。

## E. 結論

SSc 患者の血清 tenascin-C 濃度は健常人と比較し有意に上昇しており、臨床症状と tenascin-C との間に関連が認められた。LSc、SSD 患者でも血清 tenascin-C 濃度の上昇が認められた。tenascin-C が SSc の線維化の病態に関与している可能性が示唆された。

## F. 文献

- 1 Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Hasegawa M, Takehara K, et al.: Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 815-8
- 2 Ihn H. Scleroderma, fibroblasts, signaling, and excessive extracellular matrix. *Curr Rheumatol Rep* 2005; 7: 156-62.
- 3 van de Loo FA, van den Berg WB. Immunocytokines: the long awaited therapeutic magic bullet in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 132.
- 4 Mochimaru H, Kawamoto M, Enomoto T et al. Transbronchial biopsy is clinically useful in classifying patients with interstitial pneumonia associated with polymyositis and dermatomyositis. *Respirology*