

201324032A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 伸一

平成26年(2014年)3月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 伸一

平成26年(2014年)3月

【目 次】

I. 総括研究報告

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

II. 分担研究報告

1. 本邦の強皮症早期重症例の経過に関する多施設共同研究
—これまでの検討のまとめ—…………… 7
研究協力者 長谷川稔（福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学）
研究分担者 浅野善英, 石川 治, 尹 浩信, 遠藤平仁, 川口鎮司, 桑名正隆, 後藤大輔,
高橋裕樹, 藤本 学
研究協力者 田中住明
協力者 竹原和彦
研究代表者 佐藤伸一
2. 全身性強皮症に伴う間質性肺疾患に対する rituximab の使用経験…………… 14
研究分担者 浅野善英（東京大学医学部附属病院皮膚科）
協力者 住田隼一, 青笹尚彦, 遠山哲夫, 赤股 要, 宮寄美幾, 谷口隆志, 高橋岳浩,
市村洋平, 野田真史, 玉城善史郎, 桑野嘉弘, 築場広一
研究代表者 佐藤伸一
3. 強皮症肺高血圧に PDE III 阻害薬の併用が有用であった 2 症例…………… 18
研究分担者 遠藤平仁（東邦大学医学部医学科内科学講座膠原病学分野）
協力者 楠 芳恵, 川合眞一
4. 強皮症消化管障害における治療介入基準の検討…………… 22
研究分担者 遠藤平仁（東邦大学医学部医学科内科学講座膠原病学分野）
協力者 楠 芳恵, 川合眞一
5. ボセンタンが血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスの
血管障害に及ぼす影響についての検討…………… 26
研究分担者 浅野善英（東京大学医学部附属病院皮膚科）
協力者 赤股 要, 野田真史, 谷口隆志, 高橋岳浩, 市村洋平, 遠山哲夫,
Maria Trojanowska
研究代表者 佐藤伸一
6. ブレオマイシン誘導性皮膚硬化モデルマウスにおける
リゾホスファチジン酸阻害薬の効果についての検討～第 2 報～…………… 34
研究分担者 山本俊幸（福島県立医科大学医学部皮膚科）
協力者 大橋威信

7. ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの線維化と免疫異常の病態に対してレチノイド Am80 が及ぼす影響についての検討…………… 37
 研究分担者 浅野善英（東京大学医学部附属病院皮膚科）
 協力者 遠山哲夫，市村洋平，高橋岳浩，谷口隆志，野田真史，赤股 要，門野岳史，
 首藤紘一
 研究代表者 佐藤伸一
8. TGF- β 1 刺激下におけるシルデナフィルの抗線維化作用に関する検討…………… 48
 研究分担者 川口鎮司（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター）
 協力者 樋口智昭，高木香恵，栃本明子，大田ゆう子
9. 強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの抑制性制御…………… 53
 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）
 協力者 横山洋子，茂木精一郎
10. マウス皮膚硬化型慢性 GVHD モデルにおける制御性 B 細胞の役割についての検討…………… 58
 研究分担者 藤本 学（筑波大学医学医療系皮膚科）
 研究協力者 長谷川稔
 研究者 松下貴史，濱口儒人，竹原和彦
 研究代表者 佐藤伸一
11. 全身性強皮症の皮膚線維化における IL-20 の関与の検討…………… 63
 研究分担者 尹 浩信（熊本大学大学院皮膚病態治療再建学）
 協力者 工藤英郎，神人正寿
12. 強皮症患者における毛髪中 microRNA 発現の検討…………… 81
 研究分担者 尹 浩信（熊本大学大学院皮膚病態治療再建学）
 協力者 王 中志
13. 全身性強皮症に類似する線維化，血管障害，免疫異常を呈した KLF5, Fli1 ダブルヘテロ欠損マウスの解析…………… 87
 研究分担者 浅野善英（東京大学医学部附属病院皮膚科）
 協力者 野田真史，西村 智，藤生克仁，真鍋一郎，遠山哲夫，高橋岳浩，
 市村洋平，谷口隆志，赤股 要，鶴田大輔，Maria Trojanowska，永井良三
 研究代表者 佐藤伸一
14. 全身性強皮症患者における酸化 LDL と臨床症状との相関の検討…………… 105
 研究協力者 小寺雅也（社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科）
 協力者 白田俊和，稲葉由季，稲坂 優，菅原京子，伊藤有美，浦田 透
15. 間質性肺炎合併全身性強皮症における CD161 陽性 V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析…………… 109
 研究分担者 後藤大輔（筑波大学医学医療系
 （筑波大学附属病院・茨城県地域臨床教育センター））
 協力者 瀬川誠司，近藤裕也，松本 功，住田孝之

16. 全身性強皮症 (SSc) の新規自己抗体：抗 RuvBL1/2 抗体の臨床的意義…………… 116
 研究分担者 桑名正隆 (慶應義塾大学医学部リウマチ内科)
 藤本 学
 研究協力者 長谷川稔
 協力者 加治賢三, Noreen Fertig, Thomas A. Medsger, 佐藤隆司, 星野香奈,
 濱口儒人, Mary Lucas, Andrew Schnure, 竹原和彦
 研究代表者 佐藤伸一
17. 抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体陽性全身性強皮症患者における
 強皮症腎クリーゼの関連因子の検討…………… 122
 研究分担者 藤本 学 (筑波大学医学医療系皮膚科)
 研究協力者 小寺雅也
 協力者 濱口儒人, 臼田俊和, 竹原和彦
 研究代表者 佐藤伸一
18. 強皮症に対する運動負荷心エコーと血行動態の解析…………… 127
 研究分担者 波多野将 (東京大学医学部附属病院循環器内科)
 浅野善英
 協力者 稲葉俊郎, 牧 尚孝, 村岡洋典, 皆月 準, 今村輝彦, 矢尾厚史,
 絹川弘一郎, 小室一成, 住田隼一, 青笹尚彦, 玉城善史郎, 高橋岳浩,
 遠山哲夫, 市村洋平, 谷口隆志
 研究代表者 佐藤伸一
19. 強皮症の血行動態と予後危険因子の解析…………… 138
 研究分担者 波多野将 (東京大学医学部附属病院循環器内科)
 浅野善英
 協力者 稲葉俊郎, 牧 尚孝, 村岡洋典, 皆月 準, 今村輝彦, 矢尾厚史,
 絹川弘一郎, 小室一成, 住田隼一, 青笹尚彦, 玉城善史郎, 高橋岳浩,
 遠山哲夫, 市村洋平, 谷口隆志
 研究代表者 佐藤伸一
20. 全身性強皮症に合併する肺動脈性肺高血圧症の診断時血行動態と
 長期生命予後の関係に関する研究…………… 165
 研究協力者 田中住明 (北里大学医学部膠原病・感染内科学)
 協力者 松枝 佑, 荘 信博, 和田達彦, 廣畑俊成
21. リウマチ膠原病外来受診例における肺動脈性肺高血圧症 (PAH)
 リスク因子の評価…………… 169
 研究分担者 桑名正隆 (慶應義塾大学医学部リウマチ内科)
 協力者 白井悠一郎, 安岡秀剛, 増井健一
22. びまん皮膚硬化型全身性強皮症と IRF 2 多型の関連…………… 176
 研究協力者 土屋尚之 (筑波大学医学医療系分子遺伝疫学)
 長谷川稔
 研究分担者 藤本 学
 協力者 川崎 綾, 古川 宏, 當間重人, 住田孝之, 竹原和彦
 研究代表者 佐藤伸一

23. 指尖部皮膚潰瘍を生じた全身性強皮症のまとめ	180
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)	
協力者 土岐清香, 茂木精一郎	
24. シェーグレン症候群先行全身性強皮症の臨床的特徴の検討	186
研究分担者 高橋裕樹 (札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座)	
協力者 山本元久, 鈴木知佐子	
25. 全身性強皮症に対する手指のリハビリテーション—長期経過の検討—	190
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)	
長谷川稔	
研究分担者 藤本 学	
協力者 大島幸恵, 濱口儒人, 松下貴史, 竹原和彦	
26. 色素レーザーが有効であった毛細血管拡張症を伴った全身性強皮症の1例	195
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院皮膚病態治療再建学)	
協力者 牧野貴充, 神人正寿, 梶原一亨	
27. 全身性強皮症における血清 Flt-3 リガンド濃度の検討	198
研究分担者 尹 浩信 (熊本大学大学院皮膚病態治療再建学)	
協力者 中村香代	
28. エクソーム解析による全身性強皮症原因変異の網羅的探索	203
研究分担者 岡 晃 (東海大学総合医学研究所)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	205

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発班
班員名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	佐藤 伸一	東京大学医学部附属病院皮膚科	教 授
研究分担者	浅野 善英	東京大学医学部附属病院皮膚科	講 師
	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学	教 授
	尹 浩信	熊本大学大学院皮膚病態治療再建学	教 授
	遠藤 平仁	東邦大学医学部医学科内科学講座膠原病学分野	准 教 授
	岡 晃	東海大学総合医学研究所	講 師
	川口 鎮司	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター	臨 床 教 授
	桑名 正隆	慶應義塾大学医学部リウマチ内科	准 教 授
	後藤 大輔	筑波大学 医学医療系 (筑波大学附属病院・茨城県地域臨床教育 センター)	准 教 授
	高橋 裕樹	札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座	准 教 授
	波多野 将	東京大学医学部附属病院循環器内科	助 教
	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科	教 授
山本 俊幸	福島県立医科大学医学部皮膚科	教 授	
研究協力者	土屋 尚之	筑波大学医学医療系分子遺伝疫学	教 授
	長谷川 稔	福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学	教 授
	田中 住明	北里大学医学部膠原病・感染内科学	診療准教授
	小寺 雅也	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	部 長
	麦井 直樹	金沢大学医学部付属病院リハビリテーション部	作業療法士

I. 総括研究報告

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

研究代表者	佐藤伸一	東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
研究分担者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
研究分担者	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授
研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 教授
研究分担者	遠藤平仁	東邦大学医学部医学科内科学講座膠原病学分野 准教授
研究分担者	岡 晃	東海大学総合医学研究所 講師
研究分担者	川口鎮司	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 臨床教授
研究分担者	桑名正隆	慶應義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
研究分担者	後藤大輔	筑波大学医学医療系 (筑波大学附属病院・茨城県地域臨床教育センター) 准教授
研究分担者	高橋裕樹	札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座 准教授
研究分担者	波多野将	東京大学医学部附属病院循環器内科 助教
研究分担者	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
研究分担者	山本俊幸	福島県立医科大学医学部皮膚科 教授

A. 研究目的

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

そこで、本研究では、一元化病態仮説を提示するために、①各主要病態についてさらに深く解析し、それによって主要病態間の関連性についての手がかりをつかむ、② Fli1 という転写因子に注目し、Fli1

に基づいた一元化病態仮説が可能かどうかを検討する、③ Fli1 のみで SSc の病態を再現できない場合には、Fli1 に他の分子を加えることによって、SSc の病態をほぼ完全に再現する一元化モデルを作成する、④一元化病態仮説の中心となる分子の同定のために、疾患感受性遺伝子を検索する、などといったアプローチをとる。この SSc の疾患感受性遺伝子の検索のため、SSc 重症例について全ゲノムにおけるエクソンの配列を解析する。SSc の疾患感受性遺伝子が同定されれば、新たな病態モデルが作成できるだけではなく、病態のさらなる理解や、治療の新たなターゲットも同定できることが期待される。

SSc 治療の進歩により、ある程度の有効性を示す薬剤が同定されてきた。しかし、進行した症例では有効性は低くなるだけではなく、副作用のためむしろ有害である場合もある。同様の考え方は国際的にも最近強調されつつある。従って、早期診断・早期

治療が既存の治療法の有効性を高める最も効果的な方法である。この観点から、昨年度は早期診断基準案を作成したが、それと共に早期診断に関連する臓器病変の評価法の確立、予後予測因子の抽出などを旨とする。さらに、2002年に開始された重症型SSc早期例の登録・経過観察事業を継続し、活動性や予後と関連するバイオマーカー同定などの解析を続ける。これにより早期診断された症例のうち早期治療を行うべき症例の抽出が可能となることが期待される。

B. 研究方法

1. 基礎研究

(1) SSc 主要病態の発症メカニズムの解析

SScの病態における制御性B細胞の役割を検討するため、制御性B細胞を遺伝的に欠くCD19欠損マウスを使用し、SScのマウスモデルである皮膚硬化型慢性GVHDを誘導し、解析した。また、SScにおけるIL-20の関与を検討するために、正常およびSSc由来線維芽細胞をIL-20で刺激しI型コラーゲン蛋白の発現を定量した。

毛髪中にもmicroRNAが安定して存在することから、SSc患者および健常人を対象として、毛根・毛髪と血清からmicroRNAを抽出し、real-time PCRを用いてmiR-196aの発現量を解析した。また、抗RuvBL1/2抗体の臨床的意義をSSc1051例と対照疾患290例を用いて検討した。

Am80がSScの病態に及ぼす影響について、ブレオマイシン誘発SScモデルマウスを用いて検討した。さらに、TGF- β 1刺激下におけるシルデナフィルの作用を、正常人及びSSc由来皮膚線維芽細胞を用いてin vitroで検討した。また、正常およびSSc患者由来の皮膚線維芽細胞を用いて、線維化におけるアペリンの役割について検討した。

(2) SSc 病態の一元化モデルの作成

Fli1ヘテロ欠損マウスは、皮膚硬化を自然発症せず、SScの症状を完全に再現できないことが明らかとなったため、Fli1に加えて、各種臓器で線維化を制御する転写因子であるKLF5に注目し、KLF5、Fli1ダブルヘテロ欠損マウスを作成し解析を行った。また、ボセンタンが血管内皮細胞特異的Fli1欠失マウスの血管障害に及ぼす影響についても検討を行った。

(3) 疾患感受性遺伝子同定プロジェクト

SScの疾患感受性遺伝子の同定のため、重症型SSc7例における全ゲノムにおけるエクソン配列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。また、SScを対象にIRF2遺伝子多型について解析した。

2. 臨床研究

(1) SScの活動性や予後と関連するバイオマーカーの抽出

2002年から重症型SSc早期例の登録事業を行い、毎年臨床データおよび血清を集積・保存している。このデータベースから、SScの活動性や予後を反映するバイオマーカーを同定するために解析を行った。

(2) SSc 病態への既存薬の有効性の検討

既存薬を用いて、各種SSc病態への有効性をパイロット的に検討した。

(3) その他の臨床研究

SScの各種臨床症状、検査所見の間での相関解析を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果と考察

1. 基礎研究

(1) SSc 主要病態の発症メカニズムの解析

制御性 B 細胞を遺伝的に欠く CD19 欠損マウスに、SSc のマウスモデルである皮膚硬化型慢性 GVHD を誘導すると、CD19 欠損マウスは野生型マウスと比べ、より重症の皮膚硬化型慢性 GVHD を発症した。以上より、制御性 B 細胞が SSc の病態に抑制的に働く可能性が示唆された (藤本)。

様々なリウマチ性疾患の病態に関与していると考えられている IL-20 の SSc における関与について解析を行ったところ、正常皮膚培養線維芽細胞において、IL-20 刺激により I 型コラーゲン蛋白の発現が減少し、さらに SSc 患者由来皮膚組織中では IL-20 の発現が低下していることを見出した。従って、IL-20 が SSc の線維化に関与している可能性が示された (尹)。

様々な疾患において血清中 microRNA のバイオマーカーとしての有用性が示されている。最近、毛髪中にも microRNA が安定して存在することが報告されたことから、SSc における毛髪中の miR-196 a の発現量を調べたところ、SSc 患者では毛髪中の miR-196 a 発現が有意に減少していた (尹)。

3 つの SSc コホートにおける抗 RuvBL1/2 抗体陽性率は 1~2% であったが、SSc に特異的であった。陽性例は筋炎の重複が 60% を占め、びまん皮膚硬化型が 70% を占めた。筋炎重複症候群と関連する抗 Ku 抗体、抗 PM-Scl 抗体と比べると、抗 RuvBL1/2 抗体陽性例は高齢発症で男性に多く、びまん皮膚硬化型が高率であった。以上から、抗 RuvBL1/2 抗体の臨床的意義が明らかとなった (藤本)。

Am80 は急性前骨髄球性白血病治療薬として承認されている合成レチノイドで、近年ループス腎炎や

血管炎など各種膠原病に対する有用性が臨床試験や動物実験により示唆されている。Am80 は、ブレオマイシン誘発 SSc モデルマウスにおいて、その皮膚硬化を有意に改善し、新規治療薬となる可能性が示唆された (浅野)。

種々の疾患モデルにおいて、sGC-cGMP 経路が線維化を抑制することが報告されており、cGMP 分解抑制作用を有する PDE5 阻害薬は、SSc の線維化病変を改善する可能性が考えられる。TGF- β 1 刺激下におけるシルデナフィルの作用について、正常人及び SSc 由来皮膚線維芽細胞を用いて in vitro で検討したところ、シルデナフィルは抗線維化作用を示し、さらに、SSc 群でより強い効果が認められたことから、シルデナフィルが線維化に対する新規治療薬となりうる可能性が示唆された (川口)。

アペリンは、主に血管新生を制御する分子として知られている。正常および SSc 患者由来の皮膚線維芽細胞を用いて、線維化におけるアペリンの役割について検討したところ、アペリンは皮膚線維芽細胞の線維化に対して抑制的に働くことを明らかとなった。以上より、アペリンが SSc の線維化に関与する可能性が示唆された (石川)。

(2) Fli1 による SSc 病態の一元化モデルの作成

Fli1 ヘテロ欠損マウスでは、SSc に特徴的な線維芽細胞と血管内皮細胞の活性化を再現できるものの、皮膚硬化を自然発症しないため、SSc の症状を完全に再現できないことが明らかとなった。つまり、SSc の発症には、Fli1 の発現異常に加えて他の疾患感受性遺伝子の発現異常が同時に存在する必要があると考えられた。

そこで、各種臓器で線維化を制御する転写因子である KLF5 に注目した。まず、Fli1、KLF5 共に SSc 由来線維芽細胞では epigenetic 制御によりその発現が抑制されていることを見いだした。そこで、

KLF5、Fli1 を遺伝的にヘテロ欠損させた KLF5、Fli1 ダブルヘテロ欠損マウスを作成し解析した。その結果、KLF5、Fli1 ダブルヘテロ欠損マウスは、SSc の主要三病態（線維化・血管障害・免疫異常）を自然発症した（浅野）。

ボセンタンは SSc に伴う指尖潰瘍の新規発症を抑制する効果があるが、その詳細な機序は十分には明らかにされていない。血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスは、SSc の血管障害に特徴的とされる病理組織学的変化や血管の機能異常を再現することができる。そこで、ボセンタンが同マウスの血管障害に及ぼす影響について検討を行ったところ、ボセンタンは同マウスの血管障害を有意に改善した。以上より、ボセンタンは、Fli1 による血管異常を改善する薬理作用を有することが示された（浅野）。

(3) 疾患感受性遺伝子同定プロジェクト

重症型 SSc7 例における全ゲノムシーケンス解析によって、SSc の疾患感受性遺伝子として、COL16A1、HIVEP3、TIE1、POLR3B、GBP6、ABCA3、GCKR、D2HGDH、NHSL1、TAS2R40、CAPRIN2、METTL20、ZNF592、ABCA3、JPH3、ZC3H18、FAM38A、TXNDC2、SALL3 の 18 遺伝子を新規に同定した。そのうち、病態との関連性が想定される COL16A1、HIVEP3、TIE1、POLR3B、GBP6、ABCA3 の 6 遺伝子を今後の解析対象と決定した（岡）。

全身性エリテマトーデス、SSc を始めとする各種膠原病において type I IFN signature が注目されている。そこで、IRF2 遺伝子の SLE 関連多型と SSc との関連を検討したところ、びまん皮膚硬化型 SSc、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 SSc において有意な関連が検出され、IRF2 が SSc の新たな疾患感受性遺伝子であることが示された（土屋）。

2. 臨床研究

(1) SSc の活動性や予後と関連するバイオマーカーの抽出

フラクタルカインは SSc で健常人よりも高値を呈したものの、有意な上昇はみられず、MIP-1 α 、MCP-3 は SSc と健常人との間で有意差は認められなかった。MIP-1 β は SSc、健常人共にほとんどの症例で検出されなかった。5 年後までの経過においても、その後の症状と有意な相関を示すものは認められなかった（長谷川）。

(2) 既存薬の SSc 病態への有効性の検討

SSc に伴う間質性肺疾患に対して、リツキシマブによる自主臨床試験（1クール；375 mg/m² 週 1 回を 4 週連続投与、6 か月間隔で計 2クール）を行った。自覚症状、呼吸機能、血清中 KL-6・SP-D 値、及び CT 画像所見の明らかな改善を認めた。皮膚硬化の改善も認め、血清中抗トポイソメラーゼ I 抗体の抗体価は緩徐に低下した。以上より、リツキシマブは SSc の新規治療薬となり得る可能性が示唆された（浅野）。

SSc に伴う肺高血圧症に合併した難治性心不全に対して肺血管拡張薬と PDE III 阻害薬オルブリン持続の併用投与を行ったところ、心機能障害合併肺高血圧症において心不全から離脱が可能であった。肺高血圧症症例の心不全に PDE III 阻害薬併用が有用であることが示唆された（遠藤）。

(3) その他の臨床研究

抗 RNA ポリメラーゼ III（RNA III）抗体陽性 SSc 患者 37 例について、腎クリーゼ発症と関連する因子について検討した。37 例中 9 例（24%）に腎クリーゼを生じた。腎クリーゼを生じた群では生じなかった群に比べ、抗 RNAP II 抗体を高率に共存し、抗 RNAP III 抗体の ELISA index 値が高値だった。以上より、これら 2 つの因子は腎クリーゼ発症と相関

していると考えられた（藤本）。

178 例の SSc 患者に右心カテーテルを行い生存率との解析を行った。Cox 比例ハザード解析によるハザード比 (HR) では、肺動脈コンプライアンス (一回拍出量/(肺動脈収縮期圧-肺動脈拡張期圧)) ≤ 2.23 ml/mmHg 以上の群では HR : 31.1 倍と著明高値であり、予後推定の重要な指標になると考えられた (波多野)。

自己抗体検査を実施した 6162 例を対象とし、多重ロジスティック解析により肺動脈性肺高血圧症発症リスクを同定した。抗セントロメア抗体陽性 SSc のリスクが最も高く、混合性結合組織病、抗 U1RNP 抗体陽性全身性エリテマトーデス、抗セントロメア抗体陰性 SSc、全身性エリテマトーデス/混合性結合組織病/SSc 以外の抗 SSA 抗体陽性例、抗 U1RNP 抗体陰性 SLE を加えた 6 変数で肺動脈性肺高血圧症リスクを説明可能であった (桑名)。

動脈硬化性病変の二次発症の予測血清マーカーとして酸化 LDL (MDA-LDL) が注目されている。そこで、MDA-LDL 値と SSc 患者の臨床症状との相関について検討したところ、SSc 患者では、MDA-LDL 高値例が多く、SSc における MDA-LDL/LDL-C 比は、全身性エリテマトーデスと比較して高値であった。%DLco とは負の相関関係、収縮期右室圧、

KL-6、SP-D は正の相関関係が見られた (小寺)。

SSc 患者で診断時に右心カテーテルを施行し、肺動脈性肺高血圧症の基準を満たした 54 例を対象とし、diastolic PAP-PCWP (mmHg)、PCWP (mmHg)、換気機能障害が生命予後に及ぼす影響を比例ハザード解析した。diastolic PAP-PCWP の死亡ハザード比は 1.11 ($p=0.06$) であり、diastolic PAP-PCWP は SSc 合併肺動脈性肺高血圧症の予後に関連すると推測された (田中)。

1997 年 6 月から 2006 年 8 月までにリハビリテーションを処方され、2013 年 8 月まで、7~10 年と長期経過を追うことができた 33 例について、手指 ROM と HAQ-DI の結果を検討した。長期経過は概ね良好であったが、皮膚硬化再燃、皮膚潰瘍合併が阻害因子となっていることが明らかとなった (麦井)。

D. 結 論

以上の研究成果より、Fli1 と KLF5 による SSc の一元化モデルが確立された。全ゲノムシーケンス解析において、SSc の疾患感受性遺伝子が新規に同定された。さらに、SSc の主要病態、特に線維化が起こるメカニズムの解明において進歩が見られた。また、既存薬で SSc に有効性のある薬剤が複数同定された。

II. 分担研究報告

本邦の強皮症早期重症例の経過に関する多施設共同研究 —これまでの検討のまとめ—

研究協力者	長谷川稔	福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学 教授
研究分担者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
研究分担者	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授
研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 教授
研究分担者	遠藤平仁	東邦大学医学部医学科 内科学講座膠原病学分野 准教授
研究分担者	川口鎮司	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 臨床教授
研究分担者	桑名正隆	慶応義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
研究分担者	後藤大輔	筑波大学医学医療系 (筑波大学附属病院・茨城県地域臨床教育センター) 准教授
研究分担者	高橋裕樹	札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座 准教授
研究協力者	田中住明	北里大学医学部膠原病・感染内科学 診療准教授
研究分担者	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科 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
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

研究要旨

厚生労働省の強皮症研究班と強皮症研究の有志らにより成る強皮症研究会議では、本邦における全身性強皮症（SSc）、特に臨床上問題となる発症早期の重症例（皮膚硬化がびまん性か間質性肺炎あり）の経過を把握し、病勢や予後の指標となるマーカーを明らかにするために、多施設患者登録システムによる調査を2002年1月より開始しており、101例が登録されている。第1報としては、初回の臨床症状や検査所見のうち、3年後の modified Rodnan total skin thickness score（MRSS）は、初回のMRSSと正の相関、開口距離と有負の相関を示すことを報告した。第2報では、強皮症で血清中での増加が報告されているサイトカインであるCCL2、CCL5、CXCL8、CXCL9、CXCL10を測定し、4年後の health assessment questionnaire-disability index（HAQ-DI）の値は、初回のCXCL8の濃度と正の相関を示すことを報告した。第3報では、代表的な接着分子であるICAM-1、E-selectin、L-selectin、P-selectinを測定し、4年後の%VCは初回の%VCと正の相関、ICAM-1の濃度と負の相関を示すこと、4年後のHAQ-DIは初回のP-selectin濃度と正の相関がみられることを報告した。今回新たに、4つのケモカイン（CCL3、CCL4、CCL7、CX3CL1）を測定したところ、CCL3は強皮症で健常人より有意に低下、CX3CL1は強皮症で健常人より有意な上昇がみられた。しかし、いずれのケモカインもその後の臨床症状や検査結果と有意な相関はみられなかった。このように、これまでの検討から、いくつかの臨床所見やケモカイン、接着分子の濃度が、日本人の全身性強皮症の臨床症状の予測に有用と考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis, SSc) は皮膚および内臓臓器の線維化によって特徴づけられる自己免疫疾患である。その原因はいまだ不明であり、症状の進行を予測するマーカーなども確立されていない。また、本症には人種差がみられ、海外での知見が日本人に必ずしも当てはまらない。SSc は比較的稀な病気であるため、一つの臨床研究機関では研究の成果を得るために必要な数が集まらない。そこで、多数の臨床研究機関で共同して研究を行い、日本人 SSc の症状の進行の予測に有用なマーカーを検索することとした。

特に予後や治療の選択が問題となる発症早期重症例患者を対象として、2002 年 1 月以降に受診した症例を各施設で登録し、以後それらの症例を 1 年ごとに経過追跡した。これまでに、第 1 報として臨床症状や検査結果の中から有用な項目を検討して報告した。第 2 報としては、ケモカインの中で有用なマーカーがあるかどうかを解析して報告した。第 3 報としては、接着分子の中で有用なマーカーの有無を解析した。さらに今回は、以前に検討しなかった 4 つのケモカインについて検討を追加した (表 1)。これら 4 回の検討をまとめて報告する。

B. 研究方法

1) 登録施設

金沢大学附属病院、北里大学病院、熊本大学医学部附属病院、群馬大学医学部附属病院、慶應義塾大学病院、札幌医科大学附属病院、筑波大学医学部附属病院、東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター、東京大学医学部附属病院、長崎大学医学部附属病院を受診した患者を対象とした。各施設において、倫理委員会の承認を受け、登録開始時には十分な説明を行い同意を得たうえで施行した。各施設

の登録データは名前が特定できないように暗号化したうえで、金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学教室に送付され、そこでまとめて解析した。

2) 対象

ここでいう早期重症例とは、①早期例 (初発症状から 5 年以内または皮膚硬化出現から 3 年以内) であり、かつ②重症例 (diffuse cutaneous SSc (dcSSc) または間質性肺炎 (ILD) を有する limited cutaneous SSc (lcSSc)) と定義した。2002 年 1 月以降に受診した症例を対象として、その後は 1 年ごとに経過登録と血清採取保存を行った。

登録した項目の中で、今回解析に用いたのは以下の項目である：性別、登録時の年齢、発症年齢、罹病期間、modified Rodnan total skin thickness score (MRSS)、本研究班で日本人強皮症用に改良された health assessment questionnaire-disability index (HAQ-DI)、抗トポイソメラーゼ I 抗体の有無、抗セントロメア抗体の有無、腱摩擦音の有無、開口距離、手の伸展距離、手指の屈曲距離、指尖潰瘍の有無、pitting scar の有無、爪かく部出血点の有無、間質性肺炎の有無 (HRCT による)、右室収縮期圧 (ドップラー心エコーによる)、治療を要する不整脈の有無、上部消化管病変の有無、下部消化管病変の有無、腎クリーゼの有無、関節病変の有無、筋病変の有無、%VC 値、%DLco 値、血清 KL-6 値上昇の有無、血清 SP-D 値上昇の有無、ステロイド内服の有無、サイクロフォスファミド投与の有無、その他の免疫抑制剤の有無。

今回は、101 例に関して、初回登録時の血清を用いて検討した。患者群と性別、年齢の分布が近似した健常人 24 例からも血清を採取した。また、初回登録から 4 年後までの 5 回欠かさず臨床データと血清を採取できた 61 症例においては経時的に検討した。

3) 血清中の接着分子の濃度の測定

Becton Dickinson 社の Cytometric Beads Array (CCL2、CCL5、CXCL8、CXCL9、CXCL10) または R&D 社の ELISA システム (ICAM-1、E-selectin、L-selectin、P-selectin、CCL3、CCL4、CCL7、CX3CL1) を用いて、血清中の接着分子やケモカインの濃度を測定した。

4) 統計的解析

統計ソフト JMP® を用いて解析した。ケモカインや接着分子の濃度が正規分布を示さなかったため、対数に変換してから相関を解析した。2 群間の差は Student 検定、2 群間の相関は単変量解析は Pearson の相関係数にて算出した。また、4 年後などの症状と予後予測因子との相関は、多変量解析の重回帰分析を行った。p 値が 0.05 未満のときに、有意差があると判断した。

C. 研究成果

1) 第 1 報：初回の臨床症状や検査所見が 3 年後の症状の予測に有用かどうかについての検討 (図 1) (文献 1)

多変量解析の結果 ($R^2=0.63$ 、 $RMSE=4.73$ 、 $p<0.0001$) から、3 年後の MRSS と相関するものとして、初回の MRSS と有意な正の相関 ($p<0.001$) を示した以外に、開口距離と有意な負の相関 ($p<0.01$) を示した。また、赤沈と正の相関傾向 ($p=0.17$) がみられた。

また、多変量解析 ($R^2=0.70$ 、 $RMSE=12.00$ 、 $p<0.0001$) にて、3 年後の %VC は、初回の %VC と有意な正の相関 ($p<0.0001$) を示した以外に、抗 topoisomerase I 抗体陽性の症例で低下傾向 ($p=0.19$) が認められた。

2) 第 2 報：初回のケモカイン濃度が 4 年後の症状の予測に有用かどうかについての検討 (図 2) (文献 2)

初回の CCL2、CCL5、CXCL8、CXCL9、CXCL10 は、いずれも SSc では健常人よりも有意に高値を示した。

多変量解析の結果 ($R^2=0.41$ 、 $RMSE=0.36$ 、 $p=0.0016$) から、4 年後の HAQ-DI と相関するものとして、初回の CXCL8 は有意な正の相関 ($p=0.0016$) を示し、%VC は負の相関傾向 ($p=0.086$) を示した。

3) 第 3 報：初回の接着分子濃度が 4 年後の症状の予測に有用かどうかについての検討 (文献 3)

初回の ICAM-1、E-selectin、L-selectin、P-selectin は、いずれも SSc では健常人よりも有意に高値を示した (図 3)。多変量解析の結果 ($R^2=0.73$ 、 $RMSE=12.1$ 、 $p<0.0001$) から、4 年後の %VC は、初回の %VC と有意な正の相関 ($p<0.0001$) を示し、ICAM-1 の濃度と有意な負の相関傾向 ($p=0.015$) を示した (図 4)。

多変量解析の結果 ($R^2=0.41$ 、 $RMSE=0.345$ 、 $p=0.001$) から、4 年後の HAQ-DI と相関するものとして、初回の P-selectin と有意な正の相関 ($p=0.028$) を示し、%VC と負の相関傾向 ($p=0.057$)、HAQ-DI と有意な相関傾向 ($p=0.100$) を示した (図 4)。

4) 第 4 報 (今回)：初回のケモカイン濃度 (第 2 報で検討した以外のケモカイン) が 4 年後の症状の予測に有用かどうかについての検討

SSc では健常人よりも、初回の CCL3 が有意に低下し、CX3CL1 は有意に上昇していた (図 5)。CCL4 は、健常人の 16%、SSc の 26% に検出されたに過ぎず、両群間に有意な差はみられなかった。CCL7 は、健常人の 56%、SSc の 62% で検出され、両群間に差はみられなかった。

4年間のMRSSと%VCの変動、およびCCL3とCX3CL1の変動を図6に示した。経過中にこれらの値は、いずれも徐々に低下する傾向が認められた。

単変量や多変量解析にて、初回やその後のこれらのケモカインの濃度は、4年後までの臨床症状と有意な相関が認められなかった。

D. 考案

今回の第4報を含めて、これまでの報告をまとめてみた。臨床症状の重症度の指標として、皮膚硬化についてはMRSS、呼吸機能(間質性肺疾患による)については%VC、身体機能低下についてはHAQ-DIを用いた。これらの重症度の年ごとの変化率を予測するマーカーが検出できれば最も有用であるが、どの検討でもそれは見つからなかった。しかし、その後の症状の重症度を予測する因子はいくつか抽出することができた。

前回までの3報の報告から、開口距離が低下すると、その後のMRSSが有意に上昇することが明らかとなった。また、初回のICAM-1の濃度が高いとその後の%VCが有意に低下することが明らかとなった。また、抗topoisomerase I抗体陽性例では、その後の%VCが低下しやすい傾向がみられた。さらに、初回のCXCL8やP-selectinの濃度が高いと、その後のHAQ-DIが有意に上昇することがわかった。

今回は、これまでSSc患者の血清中で上昇が報告されているCCL3、CCL4、CCL7、CX3CL1について、その後の症状の予測に有用かどうかを新たに検討した。CX3CL1はこれまでの報告と同様にSScで健常人より上昇がみられたものの、CCL3についてはこれまでの報告と異なり、SScでは健常人よりむしろ低下していた。また、CCL4やCCL7についても、これまでの報告と異なり、SScと健常人との

間で有意な差がみられなかった。また、これらのケモカインの中で、その時点やその後の臨床症状と有意に相関するものはみられなかった。

E. 結論

これまでの一連の検討から、日本人SScにおいて、その後の症状の予測に有用と思われる臨床所見、および血清中のケモカインや接着分子などが明らかとなった。今後は、さらに症例を増やし、経過を追うことにより、その有用性を確認する必要がある。

F. 文献

1. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, et al. Investigation of prognostic factors for skin sclerosis and lung function in Japanese patients with early systemic sclerosis: a multicentre prospective observational study. *Rheumatology (Oxford)*. 2012; 51(1): 129-33.
2. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, et al. Serum chemokine levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicenter, prospective, observational study. *Mod Rheumatol*. 2013; 23(6): 1076-84.
3. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, et al. Serum adhesion molecule levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicentre, prospective, observational study. *PLOS One*. In press.

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 1. 今回測定したケモカイン

	主な発現細胞	発現に影響する因子	受容体とその発現細胞	強皮症患者での血中濃度の既報告
CCL3 (MIP-1α)	単球 マクロファージ	IL-1やIFNが促進 IL-4, 10, 13が抑制	CCR1 (B細胞を除く白血球) CCR5 (単球, Th1, NK, DC)	増加
CCL4 (MIP-1β)	単球 マクロファージ	LPSが促進	CCR5 (単球, Th1, NK, DC)	増加
CCL7 (MCP-3)	単球 マクロファージ 線維芽細胞	IL-1βが促進	CCR1 (単球, T, NK, DC, 好中球) CCR2 (単球, T, NK) CCR3 (好酸球, 好塩基球, T)	増加
CX3CL1 (Fractalkine)	血管内皮細胞、 上皮細胞	TNF-α, LPSが促進	CX3CR1 (単球, CD8+T, DC)	増加

RHEUMATOLOGY

Rheumatology 2012;51:129-133
doi:10.1093/rheumatology/ker333
Advance Access publication 9 November 2011

Concise report

Investigation of prognostic factors for skin sclerosis and lung function in Japanese patients with early systemic sclerosis: a multicentre prospective observational study

TABLE 2 Factors predicting MRSS at the third year determined by multiple regression analysis

	Estimate	Standard error	P-value
Intercept	17.11	4.88	<0.01
MRSS at the first visit	0.35	0.089	<0.001
Maximal oral aperture	-0.26	0.075	<0.01
ESR	0.042	0.043	0.17

The multiple regression equations predicting MRSS at the third year are as follows; MRSS at the third year = 17.11 + 0.35 × MRSS at the first visit + -0.26 × maximal oral aperture + 0.042 × ESR. R² (determination coefficient) = 0.63; Root mean square error = 4.73; P < 0.0001.

3年後のMRSS =
初回のMRSSと有意な正の相関
赤沈と正の相関傾向
開口距離と有意な負の相関

TABLE 3 Factors predicting %VC at the third year determined by multiple regression analysis

	Estimate	Standard error	P-value
Intercept	10.94	6.54	0.20
%VC at the first visit	0.85	0.09	<0.0001
Anti-topo I Ab (+)	-2.32	1.64	0.19

The multiple regression equations predicting %VC at the third year are as follows; %VC at the third year = 10.94 + 0.85 × %VC at the first visit + anti-topo I Ab (+) × -2.32, t = -2.32, R² = 0.70; Root mean square error = 12.00; P < 0.0001.

3年後の%VC =
初回の%VCと有意な正の相関
抗topo I抗体の存在と負の相関傾向

図 1: 初回の臨床所見の中で、その後の症状を予測できる指標がないかを検討して第 1 報として報告した。

Mod Rheumatol (2013) 23:1076-1084
DOI 10.1007/s10165-012-0795-6

ORIGINAL ARTICLE

Serum chemokine levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicenter, prospective, observational study

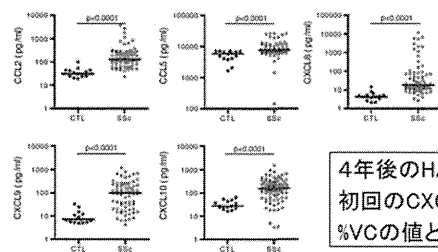


Fig. 1 Serum chemokine levels in early SSc patients (SSc) and healthy controls (CTL). The horizontal bar in each group indicates the median value

Table 3 Factors predicting HAQ-DI of 4 year follow-up determined by multiple regression analysis

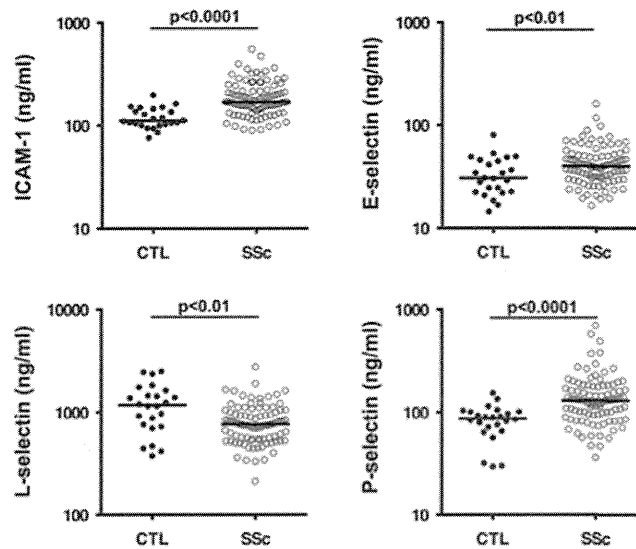
	Estimate	Standard error	P value
Intercept	-0.24	0.49	0.63
Log ₁₀ (serum CXCL8 levels of baseline) pg/ml	0.81	0.23	0.0016
%VC of baseline	-0.0061	0.0033	0.086

The multiple regression equations predicting HAQ-DI of 4 year follow-up are as follows; HAQ-DI of 4 year follow-up = -0.24 + 0.81 × log₁₀ [serum CXCL8 levels (pg/ml) of baseline] + -0.0061 × %VC of baseline. R² (determination coefficient) = 0.41, root mean square error = 0.36, P = 0.0016

4年後のHAQ-DI =
初回のCXCL8の濃度と有意な正の相関
%VCの値と負の相関傾向

図 2: ケモカインの血中濃度がその後の症状の予測に有用かどうかを検討して第 2 報として報告した。

in patients with early systemic sclerosis:
a multicentre, prospective, observational study



in patients with early systemic sclerosis:
a multicentre, prospective, observational study

Table 5. Factors predicting %VC of 4 year follow-up determined by multiple regression analysis

	Estimate	Standard error	P value
Intercept	230.2	83.4	0.012
%VC of baseline	0.62	0.13	0.0001
Log ₁₀ (serum ICAM-1 levels of baseline) ng/ml	-60.1	22.7	0.015

The multiple regression equations predicting %VC of 4 year follow-up are as follows; %VC of 4 year

follow-up = $230.2 + 0.62 \times \%VC \text{ of baseline} + -60.1 \times \log_{10}(\text{serum ICAM-1 levels (ng/ml) of baseline})$.

R^2 (determination coefficient) = 0.73, root mean square error = 12.1, $p < 0.0001$

4年後の%VC =
初回の%VCと有意な正の相関
ICAM-1の濃度と有意な負の相関

Table 6. Factors predicting HAQ-DI of 4 year follow-up determined by multiple regression analysis

	Estimate	Standard error	P value
Intercept	-2.75	1.62	0.099
Log ₁₀ (serum P-selectin levels of baseline) ng/ml	2.22	0.96	0.028
%VC of baseline	-0.0060	0.0030	0.057
HAQ-DI of baseline	0.29	0.17	0.100

The multiple regression equations predicting HAQ-DI of 4 year follow-up are as follows; HAQ-DI of 4

year follow-up = $-2.75 + 2.22 \times \log_{10}(\text{serum P-selectin levels (ng/ml) of baseline}) + -0.0060 \times \%VC \text{ of}$

baseline + $0.29 \times \text{HAQ-DI of baseline}$. R^2 (determination coefficient) = 0.41, root mean square error

= 0.345, $p < 0.001$

4年後のHAQ-DI =
P-selectinと有意な正の相関
%VCと負の相関傾向
初回のHAQ-DIと正の相関傾向

図 3, 4 : 接着分子の血中濃度とその後の症状の予測に有用かどうかを検討して第 3 報として報告中である。横線は中央値を示す。