

強皮症患者における各ケモカインの血清中濃度

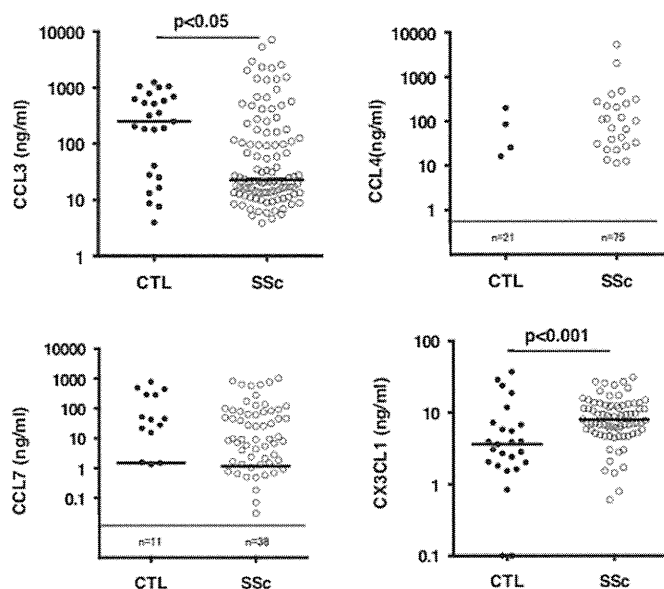


図5：第2報で報告した以外のケモカインの血中濃度を測定し、SSc患者と健常人で比較したもの。横線は中央値を示す。

4年間の臨床症状とケモカインの血中濃度の推移

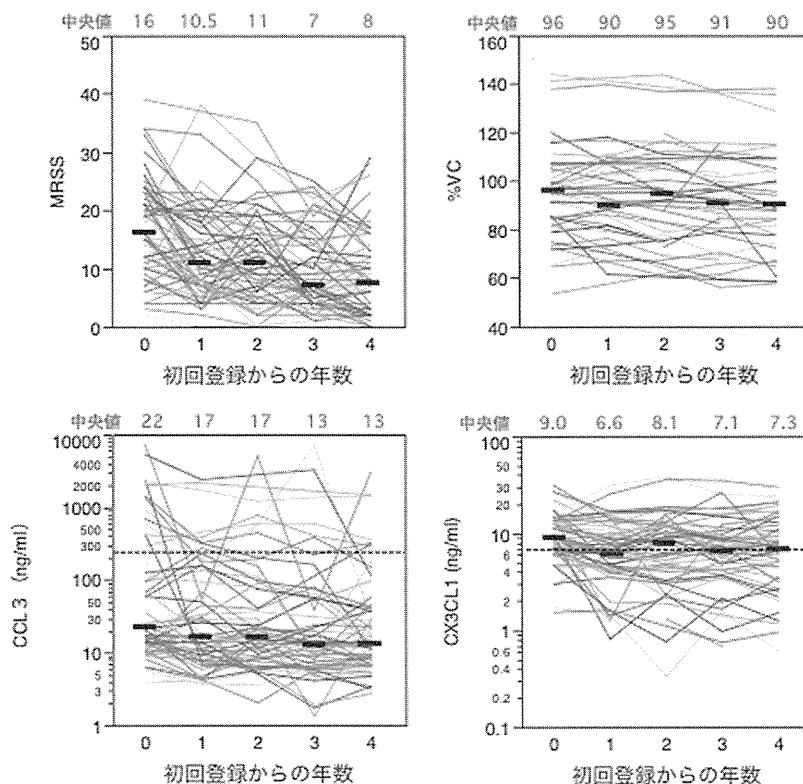


図6：4年間のMRSSや%VCの変動と、CCL3、CX3CL1の変化をグラフに示す。長い点線は健常人の中央値を、短い横線は強皮症患者の各時点での中央値を示す。

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

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
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	青笹尚彦	東京大学医学部附属病院皮膚科 助教
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	赤股 要	東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
協力者	宮壽美幾	東京大学医学部附属病院皮膚科 病院診療医
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	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	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	玉城善史郎	東京大学医学部附属病院皮膚科 助教
協力者	桑野嘉弘	東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
協力者	築場広一	東京慈恵会医科大学付属病院皮膚科

研究要旨

現在、全身性強皮症に合併した間質性肺疾患に対して、cyclophosphamide が標準的治療として用いられているが、治療抵抗性を示す症例も多く、新規治療法の確立が望まれている。これまでの研究により、B細胞の異常な活性化が、全身性強皮症およびそれに合併する間質性肺疾患の病態に関与している可能性が示されている。そこで、ヒト/マウスキメラ型抗 CD20 抗体である rituximab を用いた B 細胞除去療法が全身性強皮症の新規治療薬として期待されている。今回、我々は、間質性肺疾患を合併した全身性強皮症の 49 歳女性に対して、rituximab 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。rituximab 投与後、乾性咳嗽の軽減、呼吸機能改善、血清中 KL-6・SP-D 値の低下、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。rituximab の適切な投与間隔についても若干の考察を行った。

A. 研究目的

全身性強皮症に伴う間質性肺疾患に対して、rituximab による自主臨床試験を行い、その効果を検討する。

委員会で承認された計画（P2012010-11X）に基づいて、実施した。

B. 研究方法

(1) 方法

本研究は、東京大学医学部附属病院倫理試験審査

間質性肺疾患を合併しており、シクロホスファミド大量静注療法（intravenous cyclophosphamide; IVCY）に対してアレルギー症状を呈した全身性強皮症の 49 歳女性に対して、375 mg/m² の量の rituximab を 1 週間おきに 4 回点滴投与し、6ヶ月の後、さらに同様に 4 回の投与を行った。なお、本症例は、抗トポ

イソメラーゼ I 抗体陽性、抗 U1RNP 抗体陽性であり、全身性エリテマトーデスも合併していた。

(2) 評価項目

- ・呼吸機能検査による % 肺活量 (%VC) と肺拡散能 (%DLCO) を時系列で比較する。
- ・CT 検査画像を時系列に比較することで間質性肺炎の活動性を評価する。
- ・血清中の KL-6 (シアル化糖鎖抗原)、SP-D (サーファクタントプロテイン D) の変化を時系列で比較検討する。

C. 研究結果

図 1 に示すように、本症例では、IVCY を実施したところ、治療前に上昇傾向を示していた血清中の KL-6 と SP-D は、治療後には低下傾向となった。また、呼吸機能検査についても、それまで、悪化傾向を示していた %VC と %DLco は、ともに IVCY 治療後に改善傾向となった。しかしながら、本症例は、IVCY 投与を重ねるに従い、発熱や倦怠感といった症状がみられ、その程度も投与回数を重ねるたびに増悪したため、エンドキサンに対する 1 型アレルギーを疑い、中止とした。IVCY 治療後、自覚症状、血清 KL-6 値と血清 SP-D 値の上昇、呼吸機能の低下などがみられ、間質性肺疾患の増悪が疑われたため、rituximab 投与を実施することとした。

図 1 に示すように、rituximab 2 クール投与 (1 クール ; 375 mg/m² 週 1 回を 4 週連続投与、6 か月間隔) により、血清 KL-6 値と血清 SP-D 値の低下、呼吸機能の改善がみられた。特に、%DLco については、治療前の 30% から治療後最高 42% まで 12% の改善がみられた。自覚症状に関しても、咳の回数が軽減した。図 2 に示すように、胸部 CT 画像でも rituximab 投与半年後、投与直前と比較して、すりガラス様陰影の範囲縮小がみられた。

図 1 の時系列データを詳細に検討してみると、rituximab 投与後にみられた改善効果は、投与後約半年経過すると、減弱する傾向がみられた。図 3 に示すように、同時期の末梢血中の CD20 陽性細胞の割合を調べてみると、rituximab の depletion 効果の持続期間が約半年であることが分かり、rituximab の改善効果持続期間と一致していた。また、図 3 に示したように、rituximab 投与後に、血清抗トポイソメラーゼ I 抗体価は緩徐に低下傾向となった。

皮膚硬化に関しては、modified Rodnan total skin thickness scores で評価したところ、rituximab 治療前が 12 点であったが、治療後には 8 点に軽減していた。

D. 考案

全身性強皮症の生命予後に特に関わる因子として間質性肺疾患が挙げられる。近年、prednisolone 内服 + cyclophosphamide の内服あるいは静注パルス療法の有用性が示され (1)、現在は標準治療として広く行われている。しかしながらそれによっても十分な効果を得られないこともあり、さらなる治療法の開発が望まれている。間質性肺炎の正確な機序は未だ不明であるが、全身性強皮症においては、白血球の一種である B 細胞の異常が示唆されている (2)。今回のわれわれの結果は、B 細胞を除去することで効果を発揮する rituximab が全身性強皮症に合併した間質性肺疾患の治療として有用である可能性を示唆している。

海外では 2008 年以降において、既存の治療法に対して抵抗性であった全身性強皮症合併間質性肺疾患に対して rituximab を使用して、改善効果がみられたとの報告が見られるようになった。具体的には、prednisolone 内服 + cyclophosphamide パルス療法 8 コース施行にても増悪を止められなかった進行性の強皮症合併間質性肺炎を有する患者に対して、

rituximab 500 mg を 2 週間の間隔で計 2 回投与したところ、呼吸機能の改善、CT にて間質影の著明改善を認めた例が報告されている (3)。また、別の報告では、14 人の全身性強皮症患者を対象として、現在受けている prednisolone などの内服加療を継続したまま、8 人に rituximab 投与する一方で、6 人を投与しない群としてランダムに割り付けし、rituximab を投与する群には、375 mg/m² の量の rituximab を 1 週間おきに 4 回点滴投与し、6ヶ月の後、さらに同様に 4 回の投与を行い、両グループを比較した研究がある。この研究では、治療を開始してから 1 年後における両グループでの呼吸機能検査で、rituximab 投与を受けなかった患者群については、平均で、肺活量は 5.0%、拡散能は 7.5% の悪化を認めたのに対して、rituximab を投与した患者のグループでは平均の肺活量で 10%、拡散能は 20% の改善を認め、rituximab の有用性が示唆された (4)。

rituximab の投与量、方法、間隔については、既報告によって違いが見られるが、今回の我々の詳細な時系列データの検討からは、半年間隔での投与が適当だと考えられる。また、今回の投与方法により、血清抗トポイソメラーゼ I 抗体価の値は緩徐に低下傾向を示した。血清中抗トポイソメラーゼ I 抗体価は、全身性強皮症の重症度と関連するという報告があり、皮膚硬化の程度とも相関するとされている (5)。したがって全身性強皮症患者に対する rituximab 投与は、間質性肺疾患のみならず、本症例で見られたごとく皮膚硬化の改善等、他の症状の改善をもたらすことが予想される。

rituximab の有用性を示す報告がある一方で、現在、

強皮症の間質性肺炎に対して rituximab は保険収載されておらず、従って日本では日常診療で用いられていない。既存の治療に反応せず進行した間質性肺炎に対する新たな治療法を確立することは、臨床上必要とされており、またその意義は極めて高い。我々の施設では、rituximab の有用性を明らかにするために、引き続き、自主臨床試験を行い、症例の蓄積を行っていく予定としている。

E. 結 論

全身性強皮症に合併した間質性肺疾患に対して、rituximab が有効である可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Taskin DP, et al. *New Engl J Med.* 2006; 354: 2655-2666.
2. Sato S, et al. *J Immunol.* 2000; 165: 6635-6643.
3. Yoo WH. *Rheumatol Int.* 2012; 32: 795-798.
4. Daoussis D, et al: *Rheumatology.* 2010; 49: 271-280.
5. Volpe A, et al: *Rheumatol Int.* 2009; 29: 1073-1079.

G. 研究発表

1. 論文発表
投稿準備中
2. 学会発表
第 37 回皮膚脈管・膠原病研究会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

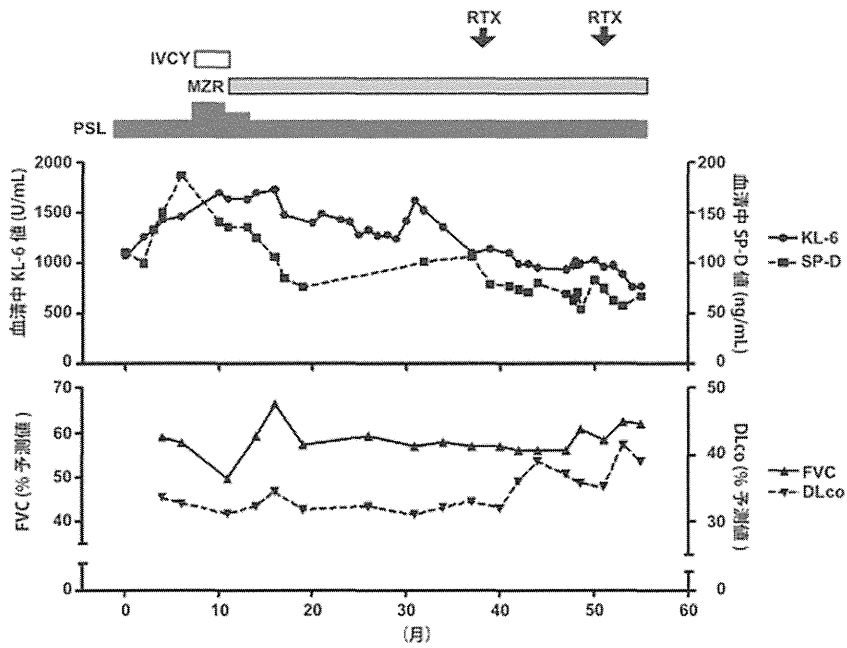


図1：治療経過中の間質性肺疾患パラメータの推移
 上段：血清中KL-6値とSP-D値。下段：呼吸機能検査FVC (% predicted) 値とDLco (% predicted) 値。KL-6, Krebs von den Lungen-6; SP-D, surfactant protein D; FVC, forced vital capacity; DLco, diffusing capacity for carbon monoxide.

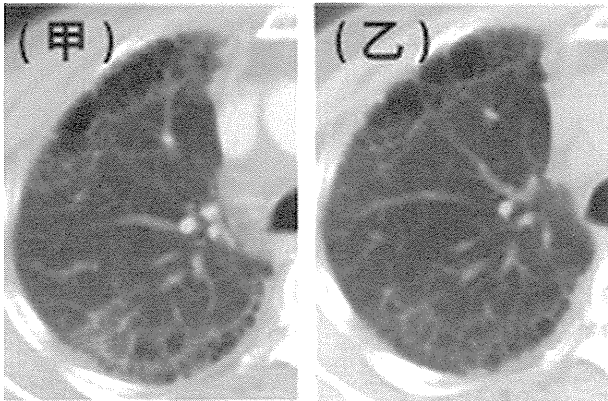


図2：rituximab治療直前(甲)と治療半年後(乙)の胸部CT画像。

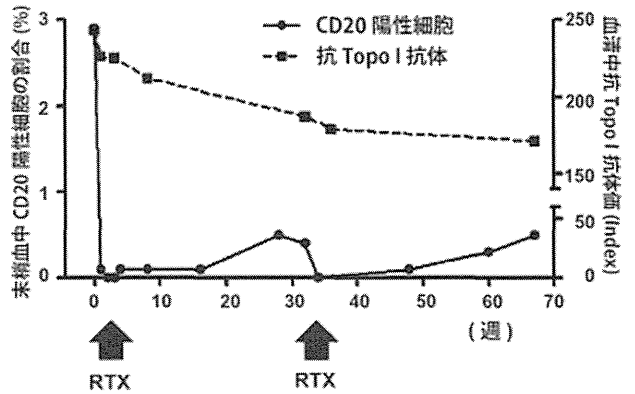


図3：rituximab投与後の末梢血中CD20陽性白血球の割合と血清中抗トポイソメラーゼI抗体値。Topo I, topoisomerase I; RTX, rituximab.

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

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

協力者 楠 芳恵 川崎市立川崎病院リウマチ膠原病センター 部長

協力者 川合眞一 東邦大学医学部医学科内科学講座膠原病学分野 教授

研究要旨

全身性強皮症 (SSC) の肺高血圧合併症例において難治性心不全合併症例において肺血管拡張薬プロスタサイクリン、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ (PDE) V 阻害薬の併用療法に加えカテコールアミンの併用を行ったが離脱困難症例に強心作用と血管拡張作用を有する PDE III 阻害薬併用投与を行い心不全状態から離脱、ADL の改善を示した 2 症例を経験した。症例 1: 64 歳女性。肺高血圧 強皮症罹病期間 3 年の症例、ベラプロスト、ボセンタン、シルデナフィル投与症中に肺高血圧に伴う心不全に対しドブタミン (DOB) に PDE III 阻害薬オルプリノン併用し心不全からの離脱が可能であった。症例 2: 65 歳女性。7 年の症例、ベラプロスト、ボセンタン、シルデナフィルの併用投与で病態が安定していた。心不全が悪化し以後 3 回入院を繰り返したがカテコールアミン、利尿剤により心不全からの離脱困難であり PDE III 阻害薬併用により心不全からの離脱が可能になり退院にいたった。

A. 研究目的

強皮症に合併した肺高血圧は予後の悪い合併症である。肺血管拡張薬 (プロスタサイクリン製剤、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ V 阻害薬) の開発により予後は改善したが特発性肺高血圧症よりも予後が悪い。強皮症は多臓器障害であり間質性肺炎、心筋障害による左室機能障害など肺高血圧病態を悪化させる要素が存在する。強皮症肺高血圧症は肺高血圧に伴う難治性心不全を悪化させ予後を左右する。強皮症に合併した心不全からの離脱及び循環動態からの回復はしばしば困難である。

PDE III 阻害薬は心不全の治療薬は心筋収縮能を増強すなわち強心剤として作用、かつ末梢系の平滑筋を弛緩させ血管拡張作用を示すことで、うっ血を速やかに解除する作用する。しかし肺高血圧症において合併した心不全の治療に PDE III 阻害薬の併用はより短期間かつ有用な心不全からの離脱手法になる

か検討された報告はない。今回肺動脈性肺高血圧を合併した強皮症の心不全治療に PDE III 阻害薬を併用し病態の安定を確認し得た 2 症例について検討した。

B. 研究方法

肺高血圧合併強皮症 2 症例の臨床経過について検討した。

C. 研究結果

症例 1.

64 歳女性。1999 年レイノー現象が出現。2007 年近医受診し限局皮膚硬化型強皮症と診断し本院転院。抗セントロメア抗体陽性、2009 年 5 月手指潰瘍出現した。2011 年初めより歩行時呼吸困難出現。右第 II 指潰瘍出現。9 月心エコー上推定肺動脈圧 68mm Hg と肺高血圧を認め入院加療となった。身長 158cm、

体重 58 kg、血圧 106/70、MRSS11、左第 V 指尖陥凹性癬痕、左第 II 指潰瘍を認めた。前胸部毛細血管拡張を認めた。心音左第 II 音亢進。

心エコー上推定肺動脈 68 mmHg、右室拡張を認め心室中隔の左室への偏移を認めた。

右心カテーテル上推定肺動脈圧 53 mmHg、肺動脈楔入圧 10 mmHg、PVR440 dyne/sec/cm³、限局皮膚硬化型強皮症 肺動脈性肺高血圧と診断した。O₂ 2L/min、Berapurost 120 μg、Bosentan 250 mg、Sildenafil 30 mg を併用し退院した。退院後 4 か月後労作時呼吸困難が悪化した。心不全の診断にて Dobutamine (DOB) 1 から 5 μg/kg/min、

及び利尿薬投与 Lasix 10 mg から 20 mg/日併用を行うも効果効果が乏しく PDE III 阻害薬 Orprinone1 から 0.1 から 0.2 μg/kg/min 併用した。利尿効果及び心不全状態からの回復を認め第 75 病日に退院した。しかし 6 か月後呼吸困難が再び出現 BNP500 pg/ml と上昇し DOB 及び利尿薬 Lasix 併用を行うも効果なく Orprinone を併用しまた Sildenafil から Tadalafil 96 日後退院に至った。CTR60.7% から 56.8% まで回復また 3 kg の体重減少があり BNP も最大 960 pg/mL から 360 pg/mL に低下し第 99 病日独歩にて退院に至った。2 度の入院の際 Orprinone の併用が有用と考えられた。

症例 2.

65 歳女性。10 年前からレイノー現象があり数年前前から咳嗽も認めていた。2004 年初めより徐々に息切れがあり 2005 年独歩困難な状態で本院受診し限局皮膚硬化型強皮症と診断。検査上推定肺動脈圧 68 mmHg、WHO 機能分類 IV の肺高血圧と診断した。ベラプロスト 120 μg 投与するも効果なく BNP420 pg/ml であった。Bosentan 250 mg まで漸増し劇的な ADL 改善を示し O₂ 2L/min 投与し独歩にて退院に至った。退院時 BNP20 から 30 pg/min まで改善。以

後外来にて経過観察をしていたが 2007 年肝機能障害があり Bosentan 125 mg に減量し Sildenafil 40 mg を併用した。2012 年 1 月呼吸困難増悪にて入院。心不全増悪を認めた入院 Bosentan 250 mg、Sildenafil 40 mg 増量にて退院したが 3 か月後呼吸困難増悪、心不全と診断 Bosentan から Ambrisentan5 mg への変更。DOB 及び PDE III 阻害薬 Orprinone の併用により以後 2 回の入院を各 91 日、80 日長期治療を必要としたが独歩にて退院した。

D. 考案

強皮症肺高血圧の予後は肺血管拡張薬の開発により改善したが根本治療は無く予後の悪い合併症である。全身性強皮症の診療ガイドラインにおいて提示されているように WHO 機能分類に基づき肺動脈拡張薬を複数併用することが推奨されている。そのことにより予後は改善したが間質性肺炎、心筋障害、肺静脈病変 PVOD などの複合的な要因が病態に関与し薬物療法の投薬量も徐々に増量が必要になる。病態として心不全状態に陥り強心薬、利尿薬により心不全の治療を併用する必要がある。しかしカテコールアミン等強心薬は長期使用に伴う耐性。β 受容体ダウンレギュレーション、離脱困難、血管拡張作用が弱く心筋酸素需要増加、不整脈誘発作用などの欠点がある。PDE III 阻害薬は血管拡張作用を有する強心薬であり心拍数、心筋酸素消費量を増加させず肺動脈圧低下作用を有する。古くから治療抵抗性心不全症例に適応が承認されている。培養実験において肺動脈拡張作用や動物実験において肺高血圧モデルにおいて肺動脈血管抵抗を濃度依存性に低下させることや高濃度では肺動脈圧低下作用が確認されている。今回の 2 症例は心臓カテーテル検査で肺高血圧と診断、プロスタサイクリン製剤、エンドセリン受容体拮抗薬、PDE V 阻害薬を併用し症例 2

はベラプロストとボセンタンを併用後、肝機能障害のためボセンタンを減量しシルデナフィル併用にて7年間安定した病状を呈していた。しかし効果が減弱し難治性心不全に対してPDEⅢ阻害薬Orprinoneを末梢から持続併用し心不全の軽減を認め独歩にて退院が可能な状態になった。しかし3回の入退院を繰り返し同様な治療の併用が必要であった。症例1は、プロスタサイクリン製剤、エンドセリン受容体拮抗薬、PDEⅤ阻害薬を併用が必要な症例であったが心不全状態が悪化し当初利尿剤と強心剤のみで回復困難であったが、DOBとともにOrprinoneの併用療法を行い心不全からの離脱が可能であった。しかし2回の長期入院を必要とした。PDEⅢ阻害薬は経口ピモペンタンがあるが慢性心不全に対する有用性が確認されていない。

E. 結 論

強皮症肺高血圧症の難治性急性心不全からの離脱に強心薬とPDEⅢ阻害薬の末梢からの持続投与による加療は肺動脈血管拡張薬増量追加に併用すべき治療選択肢の一つである。

F. 文 献

1. Kakura H, Miyahara K, Amitani S, Sohara H, Koga M, Sakamoto H, Misumi K, Miura N. Hemodynamic effects of intravenous administration of olprinone hydrochloride on experimental pulmonary hypertension. *Arzneimittelforschung*. 2000; 50: 515-9.
2. Givertz MM, Hare JM, Loh E, Gauthier DF, Colucci

WS. Effect of bolus milrinone on hemodynamic variables and pulmonary vascular resistance in patients with severe left ventricular dysfunction: a rapid test for reversibility of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 28: 1775-80.

3. Botha P, Parry G, Dark JH, Macgowan GA. Acute hemodynamic effects of intravenous sildenafil citrate in congestive heart failure: comparison of phosphodiesterase type-3 and -5 inhibition. *J Heart Lung Transplant*. 2009; 28(7): 676-82.
4. Chen EP, Bittner HB, Davis RD Jr, Van Trigt P 3rd. Milrinone improves pulmonary hemodynamics and right ventricular function in chronic pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg*. 1997; 63: 814-21.
5. Chen EP, Bittner HB, Davis RD Jr, Van Trigt P 3rd. Milrinone improves pulmonary Hemodynamics and right ventricular function in chronic pulmonary hypertension. *Ann Thorac Sugery*. 1997; 63(3): 814-21.

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

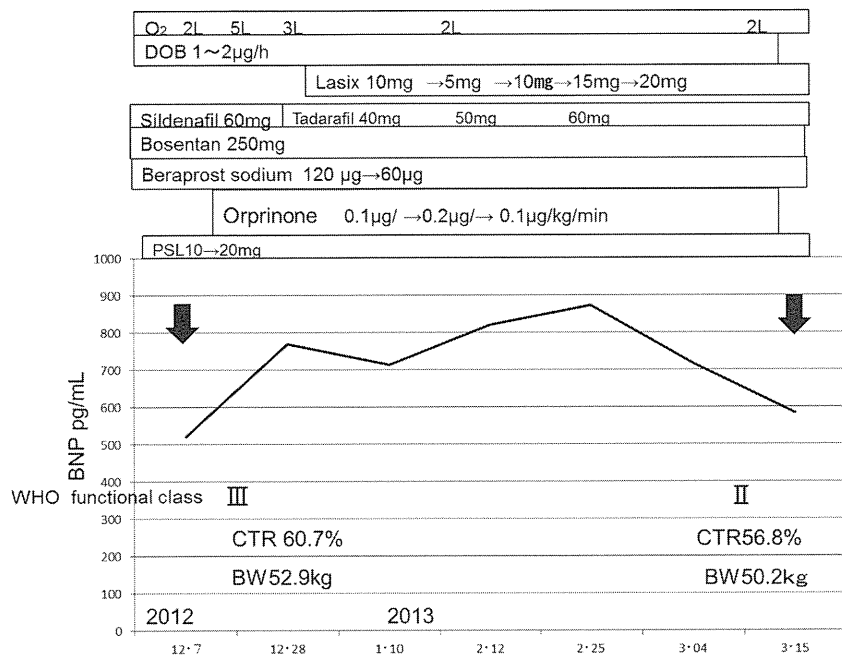


図1：症例1の経過表

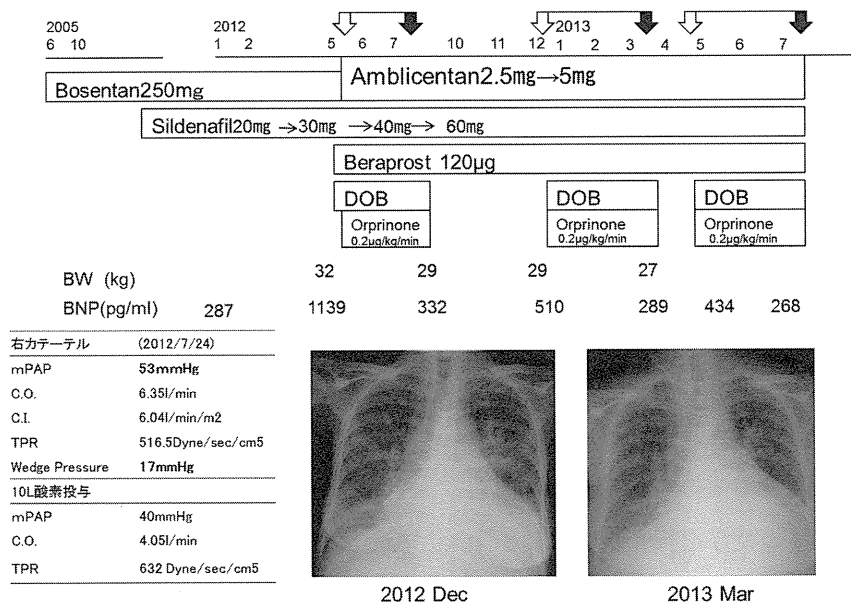


図2：症例2の経過表

PDEⅢ阻害薬の薬理効果

薬理効果

- ▼血管拡張作用を有する強心薬
 - 心拍数、心筋酸素消費量を増加させない
 - 肺動脈圧低下作用
- ▼β受容体を介さない
- ▼末梢から持続点滴

適応病態

- ▼左心機能不全による低心拍出量状態
- ▼肺うっ血
- ▼収縮期血圧維持(>100mmHg)
- ▼カテコラミン製剤抵抗症例

図3：PDEⅢ阻害薬の薬理効果

強皮症消化管障害における治療介入基準の検討

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

協力者 楠 芳恵 川崎市立川崎病院リウマチ膠原病センター 部長

協力者 川合眞一 東邦大学医学部医学科内科学講座膠原病学分野 教授

研究要旨

全身性強皮症（SSC）は重篤な消化管特に腸管病変を合併し患者 QOL 予後を低下させる。しかし腸管病変の早期診断および治療に関する確立したガイドラインは不十分である。SSC72 症例を調査し 55 例は血清学的指標との関連につき指標として Malnutrition Universal Scoring Tool（MUST）を用いて治療介入を行い 7 症例は管理が必要なスコア 2 以上を呈しており薬物療法を行った。スコア 2 以上において多変量解析において関連を認めた因子は低血清尿酸、腸管病変、血管病変に対し PGI2 製剤投与であった。また血清学的指標は FGF19 値が関連を認め治療介入 Cut off 値は 69 pg/ml（健常値 128 pg/ml<）であった。また FGF19 値は抗菌薬の内服が関連を認めました。75 例中 4 症例は消化管病変のため中心静脈療法を必要とした。2 症例は離脱しえたが 1 症例は死亡し 1 症例は継続した IVH 療法を必要とした。

A. 研究目的

SSC の約 30% に自覚症状を伴う腸管病変を合併する。頻度は少ないが在宅中心静脈栄養法の導入を必要とする重症な腸管病変を合併する。重症腸管病変は現在でも根本療法がなく患者の QOL を著しく低下させる。治療法は腸内細菌の制御のため抗菌薬の投与、腸管蠕動促進薬の投与を行うが効果は不十分であり、また自覚症状や単純レントゲン写真の腸管ガス像以外に評価方法がなく、機能特に栄養吸収障害については便中脂肪定量など繰り返し施行困難な検査が多い。安定同位体 ^{13}C 標識化合物を用いた吸収呼気試験や血清学的指標が提示されているが治療の介入の指標として適切か、またその基準値は明らかではない。今回欧米で汎用されている栄養管理に関する指標 MUST（Malnutrition Universal Scoring Tool）を中心として治療介入を考案が可能かを検討した。また既存の指標との関係および消化管機能改善薬、抗菌薬投与、消化管病変発症以前の免疫抑制

療法、中心静脈栄養について有用性と導入基準について検討した。

B. 研究方法

対象は 2011 年 4 月から 2013 年 10 月まで 24 週以上観察しえた SSC74 例につき後ろ向きに観察した。また文書にて同意を取得し血清を保存した。診療録から連結可能匿名化に臨床情報を得て消化管病変の有無につき解析した。また MUST に基づきスコア化した。スコア 2 以上を腸管病変ありと判断した。

^{13}C 中性混合脂肪酸（クロレラ工業より提供）200 mg を空腹時経口摂取後 30 分毎 200ML 呼気回収用アルミバックに呼気を回収した。8 時間後計 16 回回収した。呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ の含量を赤外線分光光度計（大塚製薬）にて測定し服用前の呼気中の値をコントロールとして、30 分ごとプロットし画描された曲面下面積を測定し 3、6、8 時間後累積 ^{13}C 回収率を測定した。

血清 FGF19 は同意書を文書にて取得の後残余血清検体を -20°C で保存した。FGF-19 及び FGF23 は ELISA Kit (R & D systems, Ltd, USA) を用いて測定した。

C. 研究結果

74 症例経過観察が可能であった 55 症例中 MUST 2 以上であった症例は 7 症例であった。平均 BMI18.7 と低下し、摂食障害ステップも 3 例で陽性であり平均スコアは 4.23 であった。MUST 2 以上の症例は 42% が身体所見、XP の下部消化管病変を呈し 88% の症例は PPI や H2 阻害薬を服用していた。HAQ - DI は有意に悪かった (MUST2 以上平均 0.86、MUST0 平均 0.12)。また MUST2 以上の症例は消化管機能改善薬 42%、抗菌薬は 41% 服用していた。また血清 FGF19 は MUST2 以上 pg/ml, MUST0 pg/ml, to と有意に低かった。一方血清 FGF23 は差がなかった。重回帰分析において MUST スコアと関連性を認められた因子は下部消化管病変の存在、低尿酸値、ベラプロストを使用した血管病変をい有すること、抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体陽性が認められた。しかし血清アルブミン、総コレステロール値は関連性を認めなかった。

自覚症状のない段階でラクツロース負荷 ^{13}C - 酢酸呼気試験を行った。消化器症状のある 12 症例に施行しその後 PROkinetic drug とサイクリック抗菌薬療法をおこなった。2 症例が IVH 療法を必要としたがスクリーニングとしての ^{13}C 酢酸吸収呼気試験の結果とラクツロース負荷による腸内細菌増殖による呼気中 H2 増加は認められなかった。この検査において予測できなかった。

D. 考察

強皮症腸管障害はその治療、予防法は確立してい

ない。強皮症は体重減少、栄養障害を認める。MUST はイギリスの協会から報告された栄養障害評価、対応に関するアルゴリズムである。MUST2 以上が治療対象になる。カナダの検討では強皮症の 18% が該当する。今回の検討では 12% の症例がこの判定に該当したが少数例であり本邦での比率は不明である。血清 FGF19 の低下と特定物質吸収、そして腸内細菌過剰増殖が診断上有用であった。体重減少や食事摂取困難の自覚症状が MUST である。MUST は他の指標と同等な有用性を認めた。SSC の腸管病変の診断に ^{13}C 脂肪酸、酢酸呼気試験は安全かつ簡易な検査であり 治療効果の判定に有用であった。早期診断に有用なのか、自覚症状出現以前に腸内細菌過剰増殖が存在すれば早期介入が可能である。MUST1 以内の症例 10 例において酢酸呼気試験及び呼気中 H2 増加による腸内細菌増殖は検出できなかった。2 症例は MUST2 以上の治療介入が必要な状態に変化し中心静脈栄養を適応した。消化管機能改善薬と抗菌薬投与、栄養サポートを発症以前に行ったが効果は限定的であり進行を抑制出来ていない。治療は対症療法であり少なくとも自然経過を抑制する効果はないと考えられた。進行する重症例の既存治療の効果は軽微であり新たな治療法の開発が望まれる。

E. 結果

SSC の腸管病変の診断に ^{13}C 脂肪酸、酢酸呼気試験は安全かつ簡易な検査であり 治療効果の判定に有用であった。消化管機能改善薬と抗菌薬投与、栄養サポートを発症以前に行ったが効果は限定的であり進行を抑制出来ていない。治療は対症療法であり少なくとも自然経過を抑制する効果はないと考えられた。進行する重症例の既存治療の効果は軽微であり新たな治療法の開発が望まれる。

F. 文献

1. 遠藤平仁：消化管の線維化はどのような疾患でありどのような意味をもつのか？：分子消化器病学、2006.3、210-214.
2. Harrison E, Herrick AL, McLaughlin JT, Lal S. Malnutrition in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2012; 51: 1747-56.
3. Baron M, Hudson M, Steele R; Canadian Scleroderma Research Group. Malnutrition is common in systemic sclerosis: results from the Canadian scleroderma research group database. J Rheumatol. 2009; 36: 2737-43.
4. Murtaugh MA, Frech TM. Nutritional status and gastrointestinal symptoms in systemic sclerosis pa-

tients. Clin Nutr. 2013, 32: 130-5.

5. Urita, Y., Hike, K., Torii, N. et al.: Efficacy of lactulose plus 13C-acetate breath test in the diagnosis of gastrointestinal motility disorders, J Gastroenterol, 2002, 37, 442-448.

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

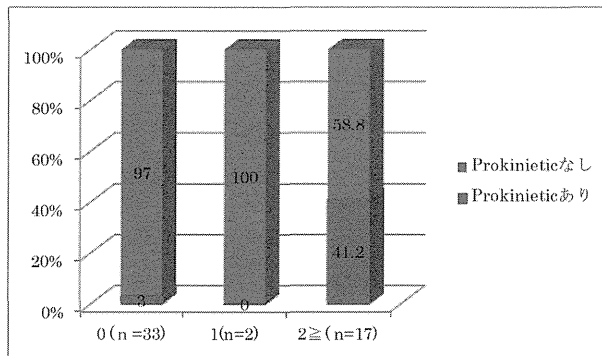


図1：(A) MUSTによる層別化 Prokinetic drugs 使用の有無
P=0.027

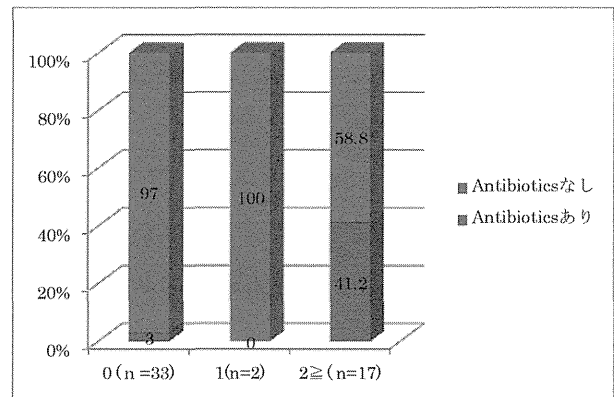


図1：(B) MUSTによる層別化 Antibiotics 使用の有無
P=0.028

MUST score と関連する因子の解析 重回帰分析

次数	変数名	β	SE(β)	std β	t値	df	P
0		22.1737	3.72896				
1	F	-0.3709	0.56685	-0.0553	0.65434	18	0.52116
2	Age	-0.0178	0.01191	-0.1133	1.49049	18	0.15341
3	Uric acid	-0.5659	0.11921	-0.3698	4.74712	18	0.00016
5	Beraprost	-1.5000	0.34865	-0.2977	4.30228	18	0.00043
6	Lower GI	1.31057	0.36070	0.3193	3.63341	18	0.00190
7	Cr	1.29185	0.65396	0.1760	1.97542	18	0.06376
8	antiRNAPolab	1.78571	0.69534	0.2217	2.56812	18	0.01935
9	α Klotho	-0.1778	0.08774	-0.1449	2.02658	18	0.05778

図2：MUST との関連因子の解析 重回帰分析

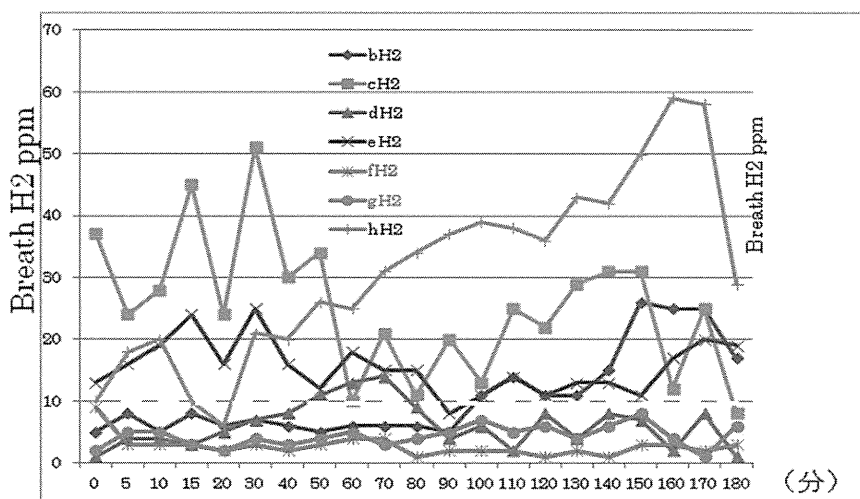


図3：ラクツロース負荷呼気中 H₂ 濃度の検討 (eh 症例偽性腸閉塞症例)

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

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	赤股 要	東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
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	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	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	Maria Trojanowska	Arthritis Center, Boston University School of Medicine Professor
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) は血管障害と皮膚および内臓諸臓器の線維化を特徴とする膠原病で、その発症には免疫異常の関与が示唆されている。SSc の病態はいまだ不明であり確立された治療法は存在しないが、近年エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンが本症に伴う指尖潰瘍の新規発症を有意に抑制することが2つの良質な無作為化二重盲検試験により明らかとなった。我々は過去の報告において、転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下が SSc の線維化と血管障害の病態に深く関与していること、およびボセンタンは強皮症皮膚線維芽細胞において転写因子 Fli1 の発現および DNA 結合能を亢進させることにより強力な抗線維化作用を示すことを明らかにした。以上の結果は、血管内皮細胞においてもボセンタンは転写因子 Fli1 に作用してその転写活性を回復させ、SSc の血管障害に対して疾患修飾作用を示している可能性を示唆している。以上の仮説に基づき検討を行ったところ、ボセンタンは血管内皮細胞において転写因子 Fli1 の転写活性を回復させること、および強皮症血管障害モデルマウス (血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失マウス) に認められる血管の機能異常を回復させる作用があることが明らかとなった。以上より、ボセンタンが SSc の血管障害に対して疾患修飾作用を示す機序に転写因子 Fli1 が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 (SSc) は血管障害と皮膚および内臓諸臓器の線維化を特徴とする膠原病で、その発症には免疫異常の関与が示唆されている。SSc の病態はいまだ不明であり、全ての患者に一定の治療効果を示す確立された治療法は存在しないが、近年エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンが本症に伴う指尖潰瘍の新規発症を有意に抑制する効果がある

(約 30%) ことが2つの良質な無作為化二重盲検試験により明らかとなった[1, 2]。また、同薬は SSc 患者に特徴的に見られる後爪郭部毛細血管の構造異常を改善させる作用があることも報告されている[3]。以上の結果は、ボセンタンが SSc の血管障害に対して疾患修飾作用を示している可能性を示唆している。

我々は過去の報告において、転写因子 Fli1 の恒

常的な発現低下がSScの線維化と血管障害の病態に深く関与していること、およびボセンタンは強皮症皮膚線維芽細胞において転写因子Fli1の発現およびDNA結合能を亢進させることにより強力な抗線維化作用を示すことを明らかにした。以上の結果は、血管内皮細胞においてもボセンタンは転写因子Fli1に作用してその転写活性を回復させ、SScの血管障害に対して疾患修飾作用を示している可能性を示唆している。

そこで今回我々は、この仮説を証明するために、培養皮膚微小血管内皮細胞 (HDMECs) および強皮症血管障害モデルマウス (Fli1^{+/-}マウスおよび血管内皮細胞特異的Fli1欠失[Fli1 ECKO]マウス) [4] を用いて検討を行った。

B. 研究方法

1) 強皮症血管障害モデルマウス

強皮症血管障害モデルマウスであるFli1 ECKOマウス (Fli1 flox/flox; Tie2-Cre) は Boston University School of Medicine, Arthritis Center の Maria Trojanowska 氏より供与を受けた。

2) HDMECs の培養

ヒト皮膚微小血管内皮細胞は HMVEC-dBI Neo をタカラバイオより購入した。マウスの血管内皮細胞は以下のように得たものを使用した。すなわち、新生胎児の皮膚を剪刃と鑷子をもちいて分離し、皮膚のシートを70% EtOHとPBSで洗浄し、終濃度3000 pU/mLのdispase II (エーディア社)を入れたMEMに浸し、4°Cで24時間静置した。表皮と真皮を剥離し、真皮を1 mg/mLの終濃度にしたCollagenase type I (Invitrogen)を入れたMEM溶液に浸し、剪刃で細かく組織を刻み、37°C 90分培養インキュベーターで静置した。融解物をピペッティングし、十分に溶かしたのちに、1500回転5分室温で遠心

した。上清を吸い、CD31 microbeads 10 μ L 及び MACS buffer (0.5%BSA 2M EDTA in PBS) 90 μ L 入れ、4°C 15分静置した。その後、3000 gの速さで10分間遠心し、上清を吸った。さらにMACS bufferを3 mL入れ、攪拌した。この溶液をMACS用カラムLS (Myltenyi Biotech社)に通し、さらに3回カラムをMACS buffer 3 mLで洗った。カラムにトラップされている細胞をMACS buffer 3 mLで勢いよく押し出し、CD31陽性細胞を回収した。回収した細胞はヒト皮膚微小血管内皮細胞、と同様37°C 5%CO₂,95%Airの条件のもと、EBM-2 bullet kit (Lonza社)に2 mM濃度のL-グルタミンと50 mg/mLゲンタシンを添加したものをを用いて培養した。

3) RNA 干渉

24 well plateにおいて、1 wellあたりHDMECsを 6×10^4 個まき、75 ngのscrambled RNAとFli1 siRNA, PKC- δ siRNA, c-Abl siRNA (Santa Cruz)をそれぞれ100 μ Lの培養液に入れ、終濃度を10 nMとした。そこにHiperfect Transfection Reagent (QIAGEN)を3 μ L混合し、室温で10分間放置した。その後、この混合物を培養細胞上に静かに滴下し、24時間培養した。

4) RNA 抽出及び quantitative real-time RT-PCR

血管内皮細胞を回収し、total RNAはRNeasy mini kit (QIAGEN)にて抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO)を用いて1 mgのtotal RNAを逆転写した後に、Step one real time PCR system (Applied Biosystems)にてquantitative real-time RT-PCRを施行した。結果は18S ribosomal RNA及びmouse GAPDHを用いてmRNAを標準化した。ターゲットとなる転写産物の相対発現量を $\Delta\Delta$ Ct methodにて算出した。

5) Western blotting

皮膚線維芽細胞及び血管内皮細胞を4°Cのphos-

phate buffered saline (PBS) で洗浄し、1%TritonX-100 in 50 mM, Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 ug/ml leupeptin, pepstatin, aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、5 uL Protease Inhibitor Cocktail set III, EDTA-free (Calbiochem 社) よりなる lysis buffer にて溶解した。不溶分画は 20,000G、15 分遠心にて除去した。蛋白濃度測定試薬 (Bio-Rad 社) を用いて補正を行ったうえで、細胞溶解液を 10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。その後、ニトロセルロース膜を特異抗体と反応させた。Horseradish peroxidase (ICN/CAPPEL 社) と結合した二次抗体と反応させたのち、SuperSignal West chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) で発光し、X-Ray フィルム (Amersham Biosciences 社) に感光させた。その後、個々に得られたバンドの濃度を scanning densitometry (ImageJ, NIH) で定量化し、比較した。

6) Chromatin Immuno Precipitation (ChIP) Assay

10 cm dish に血管内皮細胞をまき、 2×10^6 個になったところで無血清培地で飢餓状態にし、刺激を加えた後に回収した。Epi Quik Chromatin Immunoprecipitation Kit (Epigentek 社) を用いて検体の精製をし、ChIP 用にデザインされたプライマーを用いて quantitative real-time RT-PCR を行い、ターゲットとなる転写産物の相対発現量を $\Delta\Delta$ Ct method にて算出した。

7) 組織学的評価

4 週間連日ボセンタンを投与した WT, Fli1 +/- 及び Fli1 ECKO マウスから最終投与日の翌日に背部皮膚を採取し、パラフィン包埋し、6 mm 切片を作成した。Fli1 および α -SMA 染色を行い、比較検討した。

8) 血管透過性試験

4 週間連日ボセンタンを投与した各マウスの尾静

脈に 0.5% に濃度調整した Evans blue dye を注入し、30 分後に安楽死させ、皮膚の血管よりの色素の漏れ出しを肉眼にて観察した。

9) 統計学的解析

各々、統計学的な有意差はカイ 2 乗検定や Mann-Whitney の U 検定を用いて検討した。

10) 倫理面への配慮

これら動物実験は文部科学省の定める、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針に基づいて行われた。また、本研究協力者は東京大学の定める動物実験講習を受講し、講習修了証を得ている。さらに、動物実験委員会にて承認を受けている。

C. 研究結果

1) ET-1 が HDMECs における c-Abl と PKC- δ の発現に及ぼす影響

HDMECs を ET-1 で刺激すると、c-Abl と PKC- δ の発現が亢進し、PKC- δ の核内移行が亢進した (図 1A, B)。以上の結果から、線維芽細胞と同様に、血管内皮細胞においても ET-1 刺激により c-Abl と PKC- δ が活性化されることが明らかとなった。

2) HDMECs において、ET-1 が Fli1 の発現量および Fli1 のリン酸化に及ぼす影響

HDMECs を ET-1 で刺激すると、Fli1 のリン酸化は亢進したが、Fli1 の総蛋白量は減少した (図 2A)。一方、Fli1 遺伝子の mRNA の発現量には変化は見られなかった (図 2B)。以上の結果から、線維芽細胞と同様に、血管内皮細胞においても ET-1 刺激により Fli1 がリン酸化されること、および転写を介さずにプロテオソーム経路を介して蛋白が分解されることによって発現量が減少している可能性が示唆された。

3) c-Abl および PKC- δ の遺伝子サイレンシングが

HDMECs における ET-1 の作用に及ぼす影響

正常皮膚線維芽細胞においては、ET-1 刺激により c-Abl が活性化され、次に c-Abl によって PKC- δ がリン酸化されて核内へと移行し、最終的に PKC- δ によって Fli1 がリン酸化される。リン酸化された Fli1 は DNA 結合能を失い、速やかにプロテアソーム経路によって分解される。HDMECs において RNA 干渉法を用いて検討したところ、PKC- δ siRNA は、ET-1 が c-Abl の発現に及ぼす効果には影響を与えなかったが、ET-1 依存性の Fli1 のリン酸化は完全に抑制した。一方、c-Abl siRNA は、ET-1 が PKC- δ と Fli1 のリン酸化に及ぼす影響をほぼ完全に抑制した (図 3)。以上より、血管内皮細胞においても、ET-1 刺激は “c-Abl - PKC- δ - Fli1 pathway” を活性化することが明らかとなった。

4) HDMECs において、ET-1 が Fli1 の DNA 結合能に及ぼす影響

我々は過去の報告において、血管内皮細胞における転写因子 Fli1 の標的遺伝子として、VE-cadherin, PECAM-1, MMP-9, PDGF-B を同定している。ET-1 刺激により血管内皮細胞における Fli1 の DNA 結合能が変化するか否かを、これらの遺伝子を対象としてクロマチン免疫沈降法で検討した。ET-1 刺激は Fli1 の標的遺伝子のプロモーター領域への結合を有意に減少させた (図 4)。

5) HDMECs における “c-Abl - PKC- δ - Fli1 pathway” にボセンタンが及ぼす影響

HDMECs をボセンタン存在下で培養したところ、c-Abl と PKC- δ の発現および Fli1 のリン酸化は抑制され、Fli1 の総蛋白量は亢進した (図 5)。以上の結果から、HDMECs では ET-1 の autocrine 作用によって “c-Abl-PKC- δ -Fli1 pathway” が恒常的に活性化されており、ボセンタンはこの経路を強力に抑制することが明らかとなった。

6) ボセンタンが *Fli1*^{+/-} マウスの血管障害に及ぼす影響

Fli1^{+/-} マウスにボセンタンを 4 週間投与すると、皮膚の微小血管内皮細胞における Fli1 蛋白の発現量が顕著に亢進した (図 6A)。また、ボセンタン投与後の *Fli1*^{+/-} マウスでは、血管透過性の異常が改善した (図 6B)。

7) ボセンタンが Fli1 ECKO マウスの血管障害に及ぼす影響

Fli1 ECKO マウスにボセンタンを 4 週間投与すると、血管透過性の異常が改善した (図 7)。

8) *Fli1* ECKO マウス由来の皮膚微小血管内皮細胞に、ボセンタンが及ぼす影響の検討

Fli1 ECKO マウス由来の皮膚微小血管内皮細胞では、Fli1 遺伝子の発現量が顕著に抑制されている (50-80%)。同細胞をボセンタン存在下で培養したところ、Fli1 の標的遺伝子への結合は亢進した (図 8)。

D. 考案

SSc の病態は未だ不明であるが、その発症には遺伝因子の他に環境因子も非常に重要であると考えられている。SSc 患者の病変部皮膚および SSc 皮膚線維芽細胞ではエピジェネティック制御を介して転写因子 Fli1 の発現が恒常的に抑制されていることから、Fli1 は本症の病態における環境因子の影響を反映した疾病因子の一つと考えられている。Fli1 の発現低下は *in vivo* において線維芽細胞と血管内皮細胞の恒常的な活性化を誘導するが、Fli1 ECKO マウスにおいて SSc の血管障害に特徴的な血管の構造異常と機能異常が再現できることから、特に SSc の血管障害の病態においては Fli1 の発現異常が果たす役割は大きいことが示唆される。

今回の検討結果から、ボセンタンは血管内皮細胞

において、転写を介することなく蛋白分解を抑制することにより Fli1 蛋白の発現を亢進させる作用があることが明らかとなった。そして、*in vivo* においてもこの作用は発揮され、Fli1 依存性の血管障害はボセンタンの作用によってほぼ完全に改善されることが示された。SSc では Fli1 はエピジェネティック制御により強力にその発現が抑制されているが、今回の検討結果はそのような状況下にあってもボセンタンは蛋白分解を抑制することによって Fli1 の発現を亢進させることが可能であることを示している。各種薬剤の中でボセンタンが SSc の血管障害に対して一線を画するような疾患修飾作用を示す背景には、同薬が SSc の疾病因子の一つである Fli1 の発現異常を是正する作用を有しているためである可能性が示唆された。

E. 結 論

ボセンタンは血管内皮細胞における転写因子 Fli1 の発現異常を是正することにより、SSc の血管障害に対して疾患修飾作用を示している可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Korn JH, et al. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3985-93.

2. Matucci-Cerinic M, et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 32-8.
3. Guiducci S, et al. Bosentan fosters microvascular de-remodelling in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2012; 31: 1723-5.
4. Asano et al. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol.* 2010; 176: 1983-98

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

Akamata K, Asano Y, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Trojanowska M, Sato S. Bosentan improves vascular abnormalities in endothelial cell-specific Fli1 knockout mice by increasing the DNA binding ability of Fli1 - a possible mechanism explaining the effect of bosentan on scleroderma vasculopathy. ACR/ARHP Scientific Meeting 13, October 25-30, 2013 SanDiego

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

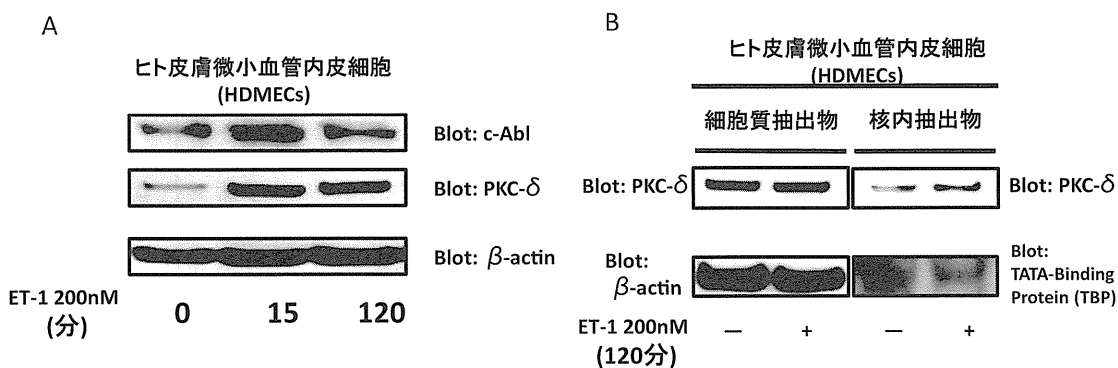


図1：ET-1がHDMECsにおけるc-AblとPKC- δ の発現に及ぼす影響
 A. HDMECsをET-1存在下で培養すると、c-AblとPKC- δ の発現が亢進した。
 B. HDMECsをET-1存在下で培養すると、PKC- δ の核内移行が亢進した。

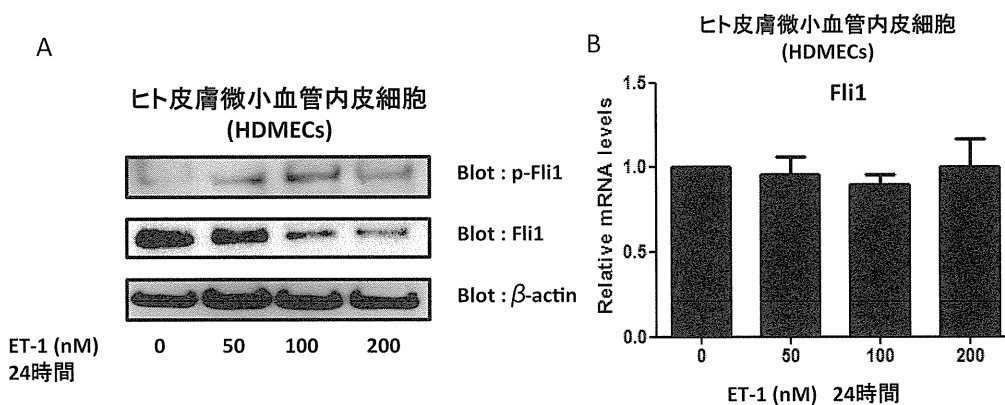


図2：HDMECsにおいて、ET-1がFli1の発現量およびFli1のリン酸化に及ぼす影響
 A. ET-1存在下でHDMECsを培養すると、Fli1のリン酸化は亢進したが、Fli1蛋白の総発現量は減少した。
 B. 同様の条件下において、Fli1遺伝子のmRNAの発現量には変化は見られなかった。

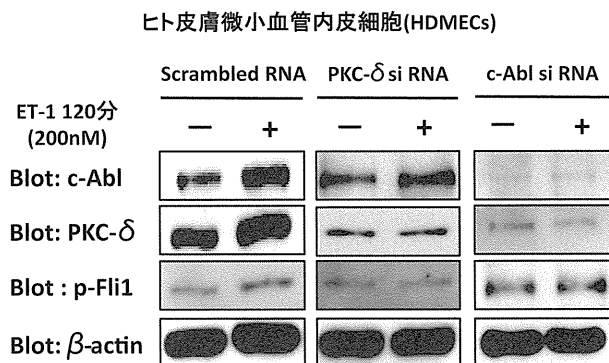


図3：c-AblおよびPKC- δ の遺伝子サイレンシングがHDMECsにおけるET-1の作用に及ぼす影響
 HDMECsをc-Abl siRNA, PKC- δ siRNA, scrambled non-silencing RNAでそれぞれ処理し、ET-1刺激後にc-AblとPKC- δ の発現量およびFli1のリン酸化の程度について免疫プロット法で検討した。

ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HDMECs)を用いたクロマチン免疫沈降法

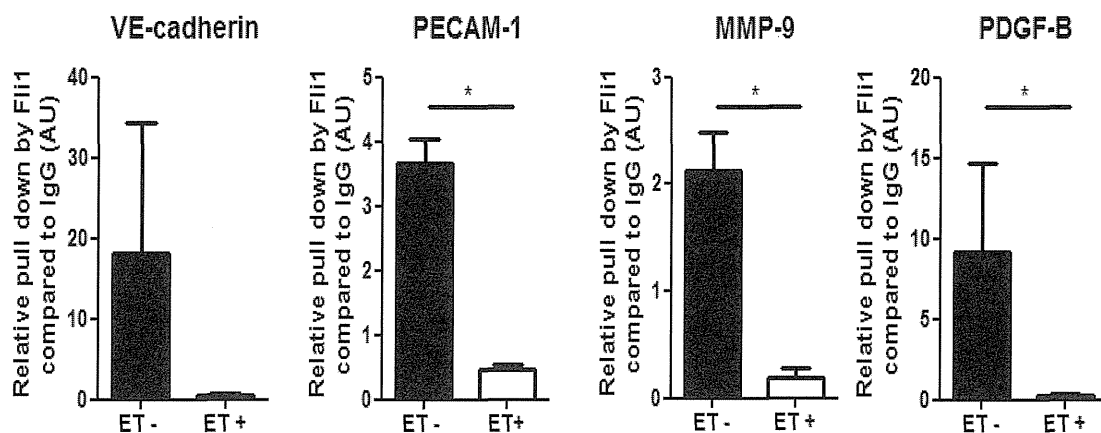


図4：HDMECsにおいて、ET-1がFli1のDNA結合能に及ぼす影響
HDMECSをET-1で刺激し、対象遺伝子のプロモーター領域へのFli1の結合量をクロマチン免疫沈降法で検討した。

ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HDMECs)

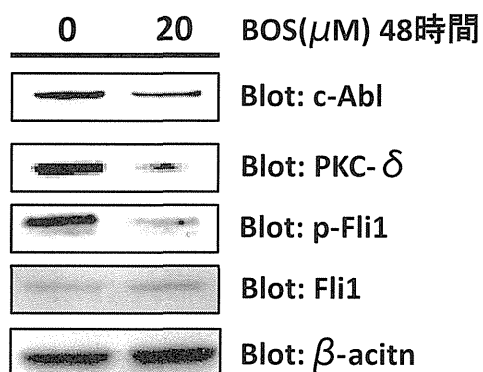


図5：HDMECsにおける“c-Abl - PKC- δ - Fli1 pathway”にボセンタンが及ぼす影響
ボセンタン存在下でHDMECSを48時間培養し、c-Abl, PKC- δ , Fli1の蛋白発現量およびFli1のリン酸化の程度について免疫ブロット法で検討した。