

あるが<sup>7</sup>、今回我々は同様の手法を用いて転写因子 KLF5 が SSc の疾患感受性遺伝子の一つである可能性を見出した。SSc 患者の皮膚線維化において、TGF- $\beta$  signaling の活性化と CTGF 遺伝子の発現亢進は極めて重要であるが<sup>6,7</sup>、それぞれ Fli1 遺伝子の恒常的発現低下と KLF5 遺伝子の発現低下により誘導が可能である。実際に *Klf5*<sup>+/-</sup>; *Fli1*<sup>+/-</sup> マウスにおいて SSc に非常に類似した皮膚硬化が再現できたことから、この2つの転写因子の発現異常が SSc の線維化の病態に深く関与していることが明らかとなった。

当初、*Klf5*<sup>+/-</sup>; *Fli1*<sup>+/-</sup> マウスは SSc の皮膚線維化モデルとなる可能性を考えて作成されたが、驚いたことに、同マウスは SSc の主要3病態の全てを再現し、更に「免疫異常→血管障害→皮膚線維化→肺線維化」のように SSc における経時的な病態の変化・進展をも再現することができた。この結果は、SSc においてはエピジェネティック制御による遺伝子の発現異常が線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫担当細胞を個別に活性化し、*in vivo* においてそれらが複雑に相互作用することによって本症の病態が形成されていることを示唆している。この結果は、これらの遺伝子の発現異常を是正することにより、SSc の病態を幅広く修飾できる可能性を示唆している。

我々は既に、ボセンタンおよびメシル酸イマチニブが転写因子 Fli1 の発現を亢進させる作用を有していることを報告している<sup>32</sup>。実際にこれらの薬剤は、SSc の血管病変に対して疾患修飾作用を示す可能性が示唆されている<sup>33,34</sup>。これらの薬剤に代表されるように、今回同定された2つの転写因子の発現異常を是正できる薬剤は、SSc の新規治療薬となる可能性が考えられる。今後、*Klf5*<sup>+/-</sup>; *Fli1*<sup>+/-</sup> マウスを用いて SSc の病態理解と新規治療薬の開発が進むことが期待される。

## F. 文 献

1. Asano, Y., Bujor, A.M. & Trojanowska, M. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* **59**, 153–162 (2010).
2. Wang, Y., Fan, P.S. & Kahaleh, B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **54**, 2271–2279 (2006).
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. Nakerakanti, S.S., Kapanadze, B., Yamasaki, M., Markiewicz, M. & Trojanowska, M. Fli1 and Ets1 have distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program. *J Biol Chem* **281**, 25259–25269 (2006).
5. Asano, Y. & Trojanowska, M. Phosphorylation of Fli1 at threonine 312 by protein kinase C delta promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* **29**, 1882–1894 (2009).
6. Mori, T., *et al.* Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* **181**, 153–159 (1999).
7. Wang, Q., *et al.* Cooperative interaction of CTGF and TGF- $\beta$  in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* **4**, 4 (2011).
8. Takeda, N., *et al.* Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest* **120**, 254–265 (2010).
9. Fujiu, K., Manabe, I. & Nagai, R. Renal collecting

- duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest* **121**, 3425–3441 (2011).
10. Whitfield, M.L., *et al.* Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12319–12324 (2003).
  11. Shindo, T., *et al.* Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med* **8**, 856–863 (2002).
  12. Spyropoulos, D.D., *et al.* Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* **20**, 5643–5652 (2000).
  13. Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M. & Tamaki, K. Increased expression levels of integrin alphavbeta5 on scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol* **164**, 1275–1292 (2004).
  14. Ihn, H. & Tamaki, K. Competition analysis of the human alpha2 (I)collagen promoter using synthetic oligonucleotides. *J Invest Dermatol* **114**, 1011–1016 (2000).
  15. Nishimura, S., *et al.* In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest* **118**, 710–721 (2008).
  16. Huber, L.C., *et al.* Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum* **56**, 2755–2764 (2007).
  17. Jüngel, A., Distler, J.H., Gay, S. & Distler, O. Epigenetic modifications: novel therapeutic strategies for systemic sclerosis? *Expert Rev Clin Immunol* **7**, 475–480 (2011).
  18. Wang, Y., Fan, P.S. & Kahaleh, B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **54**, 2271–2279 (2006).
  19. Van Beek, J.P., Kennedy, L., Rockel, J.S., Bernier, S.M. & Leask, A. The induction of CCN2 by TGF-beta1 involves Ets-1. *Arthritis Res Ther* **8**, R36 (2006).
  20. Asano, Y., *et al.* Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol* **29**, 425–434 (2009).
  21. Distler, J., Gay, S. & Distler, O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **45 Suppl 3**, iii26–27 (2006).
  22. Manetti, M., Guiducci, S., Ibba-Manneschi, L. & Matucci-Cerinic, M. Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J Cell Mol Med* **14**, 1241–1254 (2010).
  23. Gabrielli, A., Avvedimento, E.V. & Krieg, T. Scleroderma. *N Engl J Med* **360**, 1989–2003 (2009).
  24. Bouros, D., *et al.* Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 1581–1586 (2002).
  25. Hsu, E., *et al.* Lung tissues in patients with systemic sclerosis have gene expression patterns unique to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* **63**, 783–794 (2011).
  26. Lafyatis, R., O'Hara, C., Feghali-Bostwick, C.A. & Matteson, E. B cell infiltration in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* **56**, 3167–3168 (2007).
  27. Barr, T.A., *et al.* B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* **209**, 1001–1010 (2012).

28. Hasegawa, M., *et al.* Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* **25**, 308-313 (1998).
29. Khan, K., *et al.* Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **71**, 1235-1242 (2012).
30. Giacomelli, R., *et al.* Peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic sclerosis produce increased amounts of interleukin 6, but not transforming growth factor beta 1. *J Rheumatol* **23**, 291-296 (1996).
31. Hasegawa, M., Sato, S., Ihn, H. & Takehara, K. Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 612-617 (1999).
32. Bujor, A.M., Asano, Y., Haines, P., Lafyatis, R. & Trojanowska, M. The c-Abl tyrosine kinase controls protein kinase C $\delta$ -induced Fli-1 phosphorylation in human dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* **63**, 1729-1737 (2011).
33. 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* **70**, 32-38 (2011).
34. Spiera, R.F., *et al.* Imatinib mesylate (Gleevec) in the treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis: results of a 1-year, phase IIa, single-arm, open-label clinical trial. *Ann Rheum Dis* **70**, 1003-1009 (2011).

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

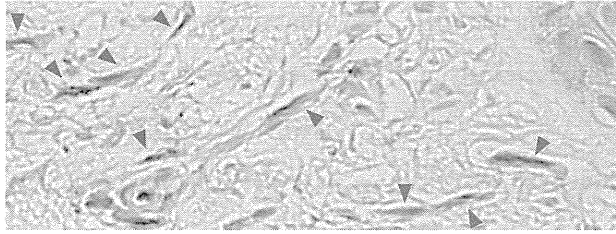
### 2. 学会発表

The spontaneous development of dermal fibrosis in mice with double heterozygous deficiency of *Klf5* and *Fli1*. Oral. **2013 ACR (American College of Rheumatology)** meeting.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

a 正常皮膚線維芽細胞



SSc 皮膚線維芽細胞

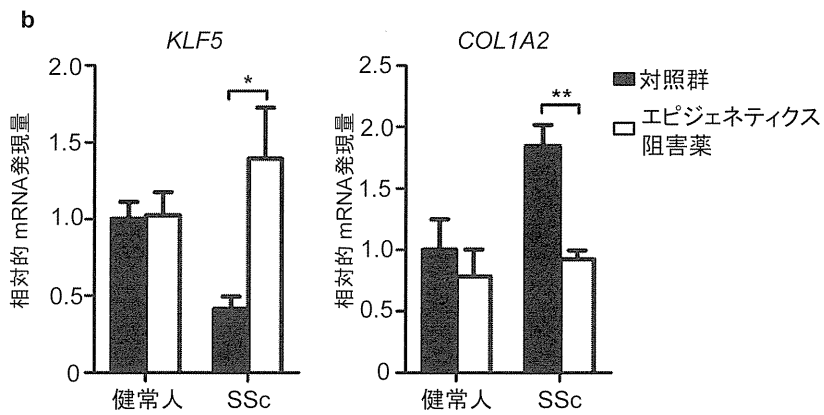
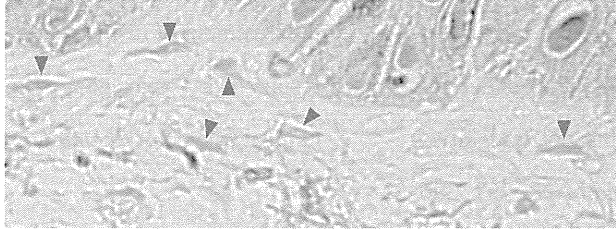


図1：KLF5の発現は epigenetic 制御により全身性強皮症（SSc）の皮膚線維芽細胞（fibroblasts）では減少している。  
 (a) ヒト皮膚組織の KLF5 染色。赤い矢印が皮膚線維芽細胞（dermal fibroblasts）を示している。(b) 培養皮膚線維芽細胞を2つの epigenetic inhibitors (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza, 5  $\mu$ M と trichostatin A, 2  $\mu$ M) で48時間処理した。KLF5 と COL1A2 の mRNA レベルを測定した。データは mean  $\pm$  s.e.m で示した。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01。Two-tailed unpaired t-test。

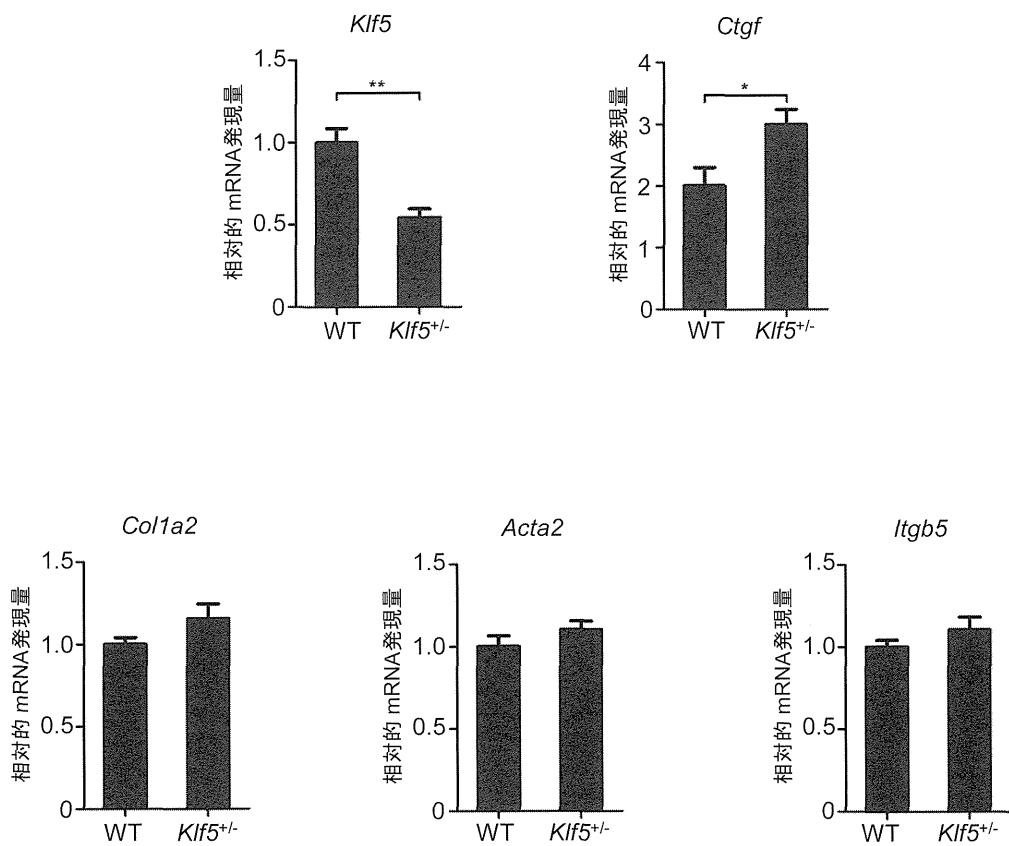


図 2 : *Klf5*<sup>+/-</sup> マウスから採取した培養皮膚線維芽細胞では、線維化を亢進する分子の中で、CTGF の mRNA レベルのみ野生型マウスと比較して上昇していた。

*Klf5*, *Ctgf*, *Col1 a2*, *Acta2* ( $\alpha$ -smooth muscle actin), *Itgb5* (integrin  $\beta$ 5) の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR を用いて測定した。n=4。データは mean  $\pm$  s.e.m.。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01。Two-tailed unpaired t-test。

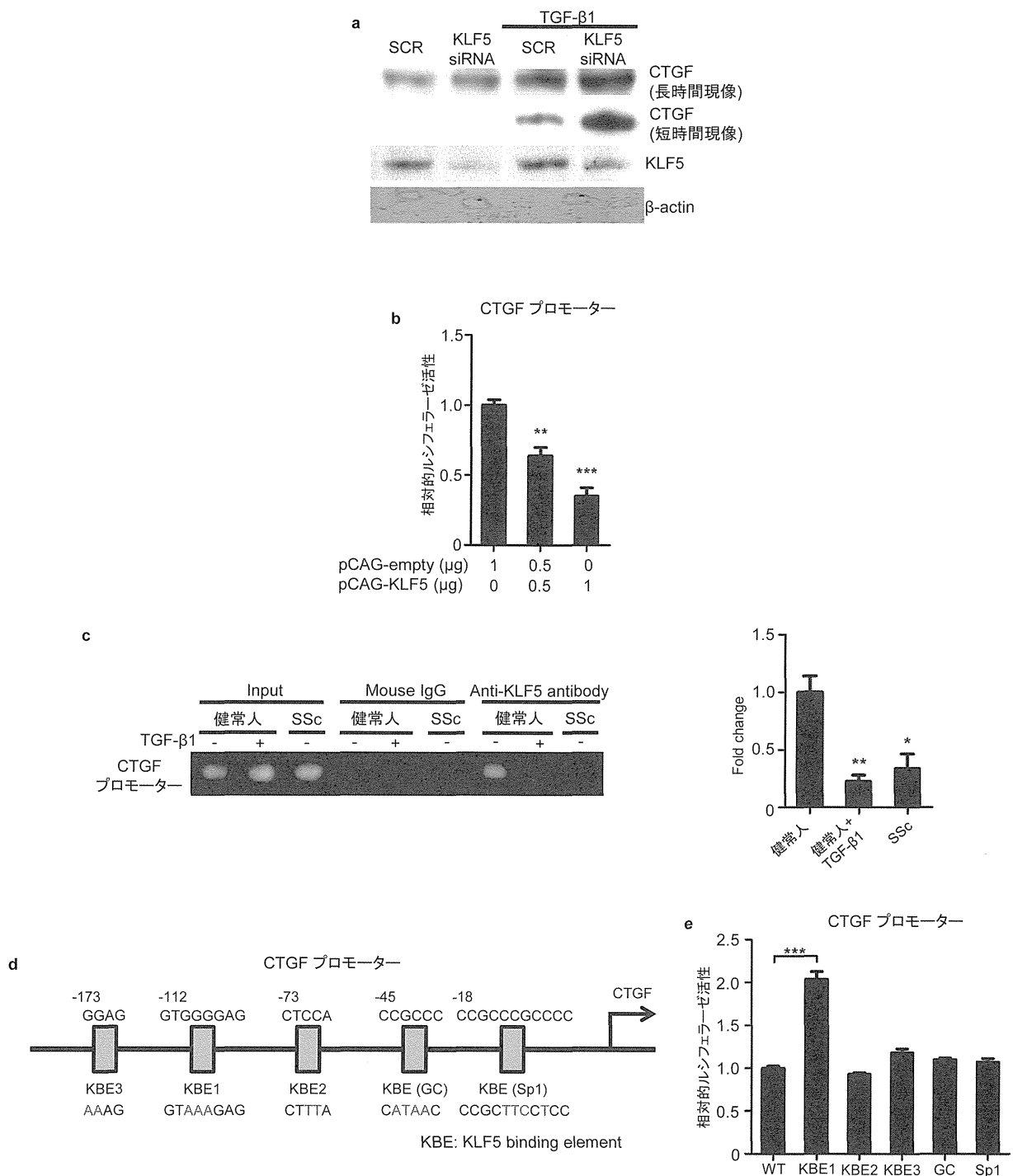


図3: KLF5はCTGF遺伝子の転写抑制因子である。

(a) ヒト包皮線維芽細胞に対して scrambled control RNA (SCR) または KLF5 siRNA をトランスフェクションして24時間培養し、その後に血清飢餓状態で TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml) にて24時間刺激した。KLF5とCTGFのタンパク発現量を測定した。(b) ヒト包皮線維芽細胞に対してCTGFプロモーターベクターとKLF5過剰発現ベクターをトランスフェクションし、30時間後にプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで測定した。(c) ヒト皮膚線維芽細胞に対してクロマチン免疫沈降法を用い、CTGFプロモーター上でのKLF5の結合の有無を調べた。Inputを陽性コントロール、マウスIgGを陰性コントロールとして用いた。定量的リアルタイムPCRにより結合量を定量化し、Inputで補正したグラフを下に示す。 $n=4$ 。(d) CTGFプロモーター上のKLF5が結合する可能性のある部位を示す。変異させた配列は赤字で示す。KBE, KLF5-binding element。(e) 変異したCTGFプロモーターベクターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。グラフのデータは3回独立した実験を繰り返して得られた3つの値の  $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$  \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。Two-tailed unpaired t-test。

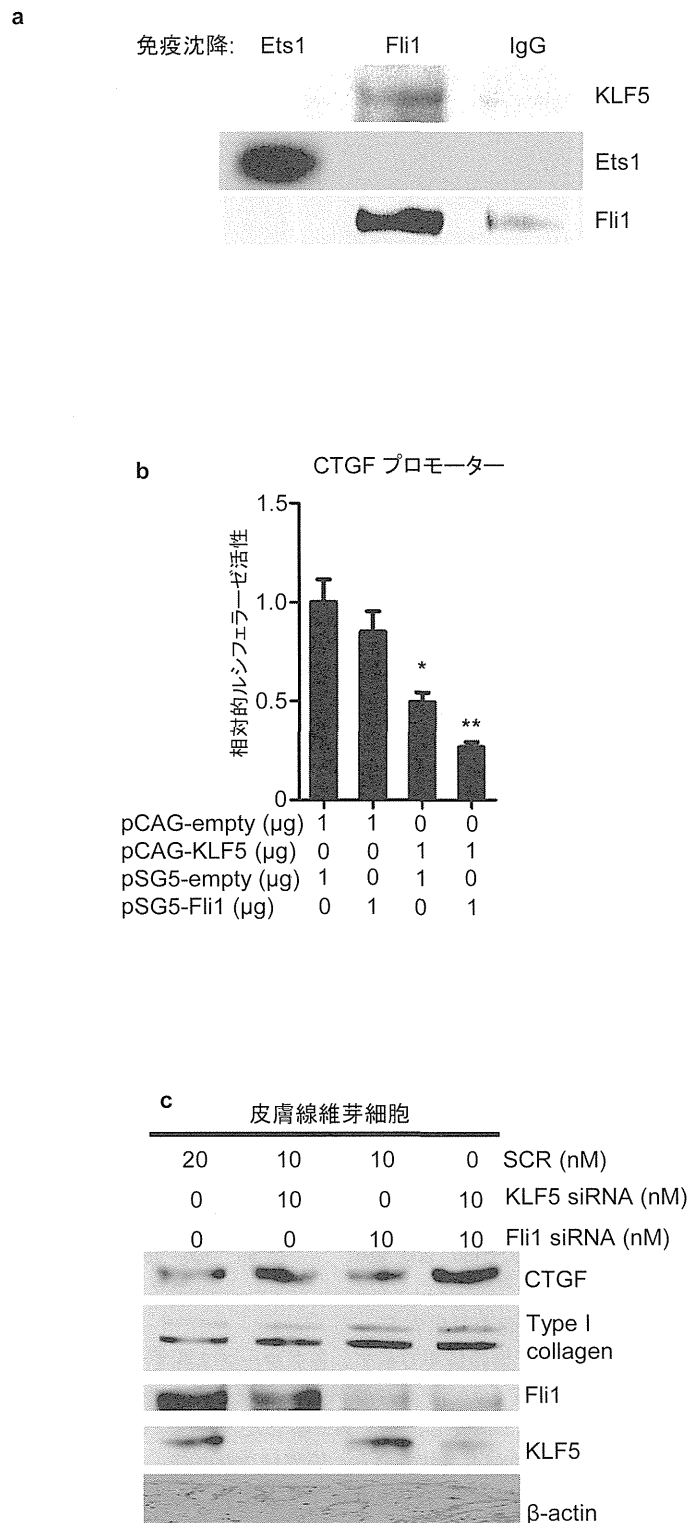


図4: KLF5 と Fli1 は共同して CTGF 遺伝子の転写を抑制する。

(a) 核内抽出物を抗 Ets1 抗体、抗 Fli1 抗体で免疫沈降させ、得られたタンパクをプロットした。陰性コントロールとしてウサギ IgG を用いた。(b) ヒト包皮線維芽細胞に対して KLF5 過剰発現ベクターと Fli1 過剰発現ベクターを同時にトランスフェクションし、30 時間後にプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで測定した。(c) ヒト包皮線維芽細胞に対して scrambled control RNA (SCR)、KLF5 siRNA、Fli1 siRNA をトランスフェクションして 48 時間培養し、その後 24 時間血清飢餓状態にして CTGF と COL1A2 のタンパク発現量を測定した。グラフのデータは 3 回独立した実験を繰り返して得られた 3 つの値の mean ± s.e.m. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Two-tailed unpaired t-test。

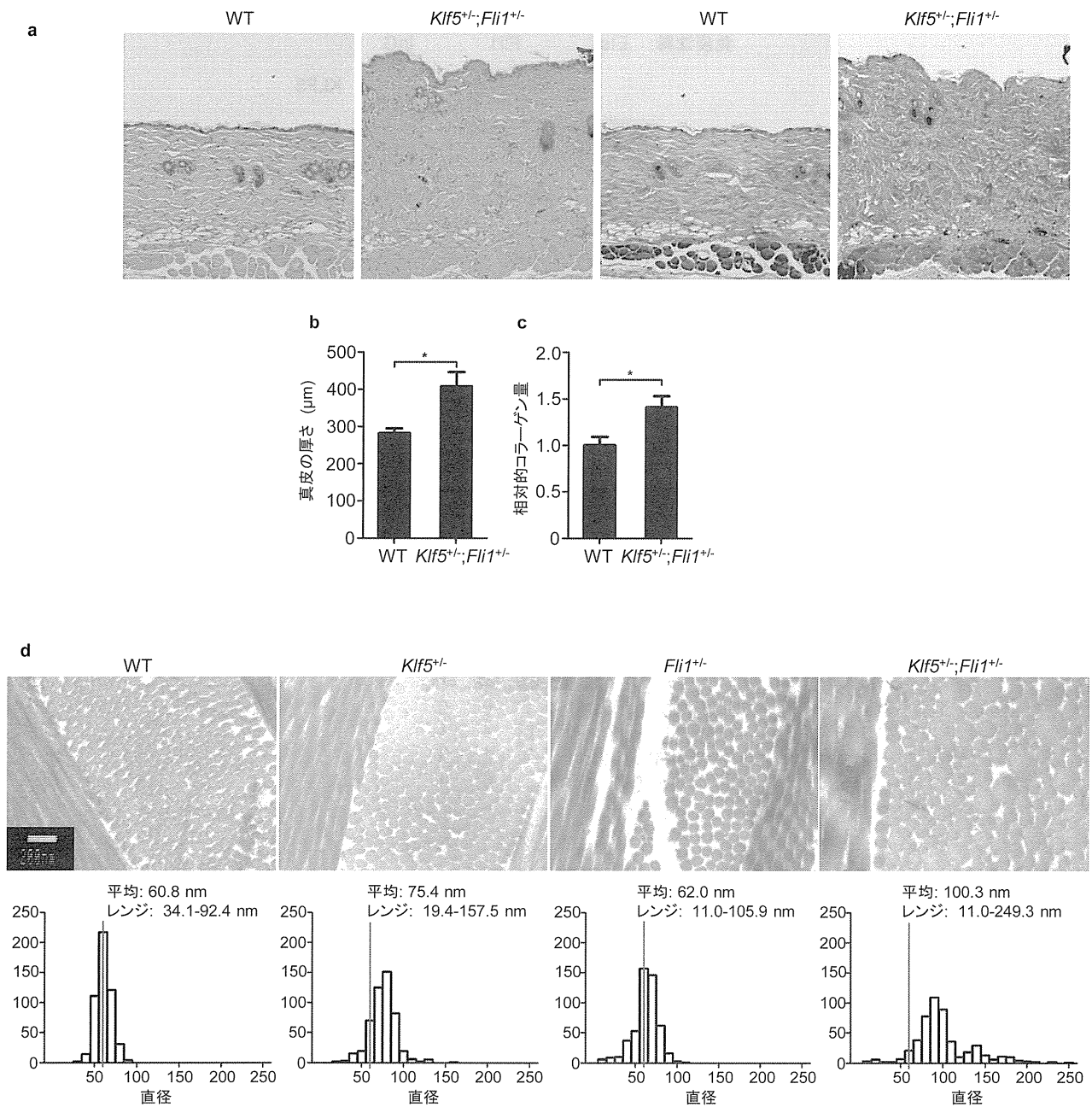


図5: *Klf5<sup>+/-</sup>; Fli1<sup>+/-</sup>* マウスは自然に皮膚線維化を発症する。

(a) 3カ月齢雄マウスの背部皮膚の写真を100倍の倍率で示す。各グループ7匹ずつからの代表的な写真を示す。右の写真はMasson's trichrome染色。(b) 真皮の厚さを示す。 $n=7$ 。雌マウスでも実験を行い、同様の結果が得られた。(c) 皮膚組織中のコラーゲン含有量をtotal collagen assayを用いて測定し、相対値で示した。 $n=8$ 。(d) 透過型電子顕微鏡でマウス背部皮膚を観察した。コラーゲン細線維の縦断像と横断像が示されている。倍率は20000倍。径の平均、レンジ、径ごとの頻度はそれぞれのグループで500本の細線維で細小径を測定した結果である。ヒストグラムの赤い線は野生型マウスで最も高い頻度で見られた径を示している。データはmean  $\pm$  s.e.m. \* $P < 0.05$ 。Two-tailed Mann-Whitney U test。



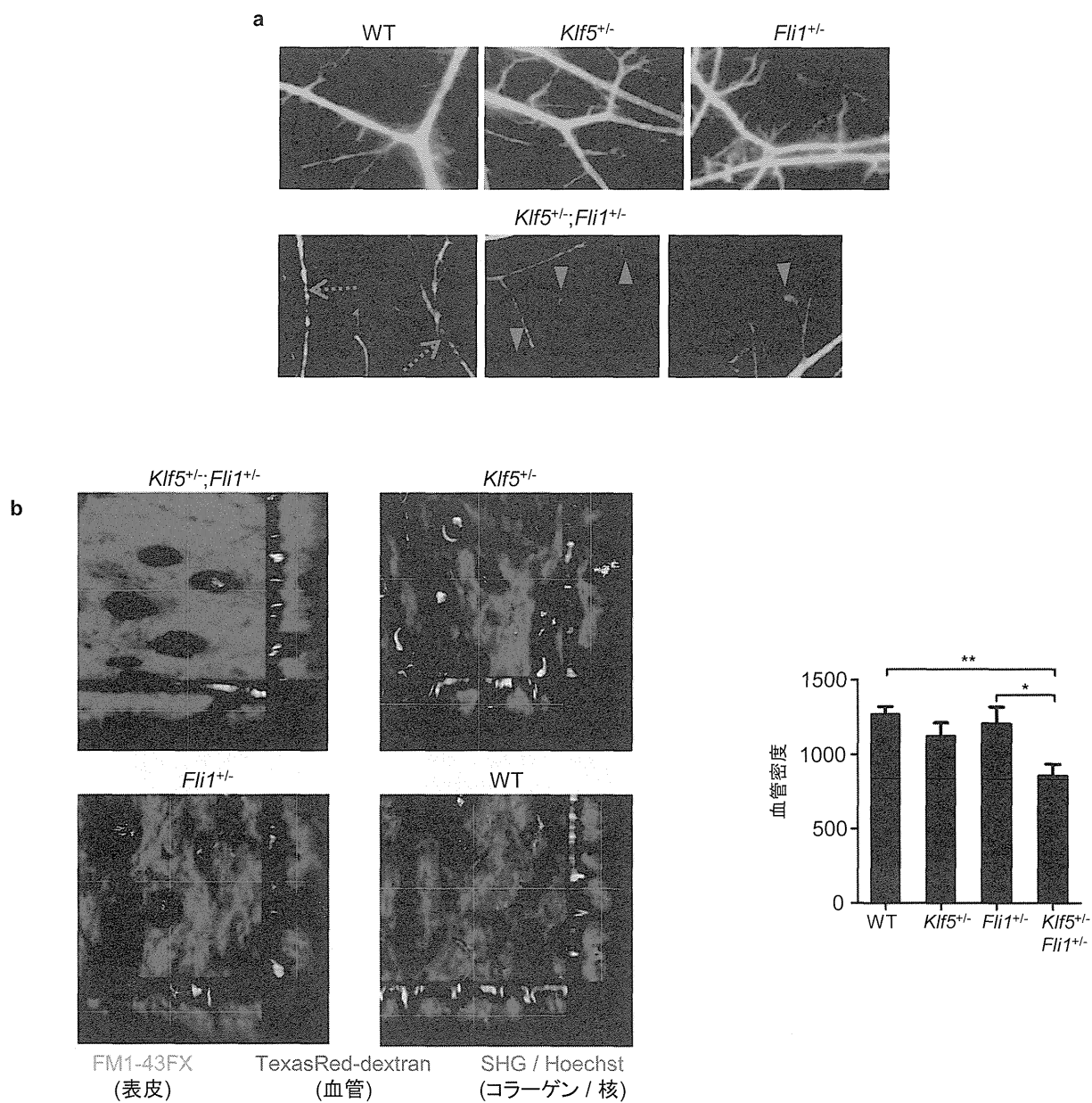


図6: *Klf5*<sup>+/-</sup>; *Fli1*<sup>+/-</sup> マウス皮膚は血管障害を示す。

(a) 皮膚血管は尾静脈から FITC- デキストランを注射する事で描出された。*Klf5*<sup>+/-</sup>; *Fli1*<sup>+/-</sup> マウスは血管の狭窄 (矢印)、異常な血管構造 (矢印頭) を示した。 $n=3$  の中で代表的な写真を示す。(c) 生体イメージングで4カ月齢マウスの皮膚組織を観察した。それぞれのグループにおいて左上の写真が一定の深さでの横断像であり、その右下に位置する写真が縦断像である。血管の密度を測定した。それぞれのグループで4匹ずつ、計  $n=20$  の視野で測定した。データは mean ± s.e.m. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ . one-way ANOVA with Bonferroni correction.

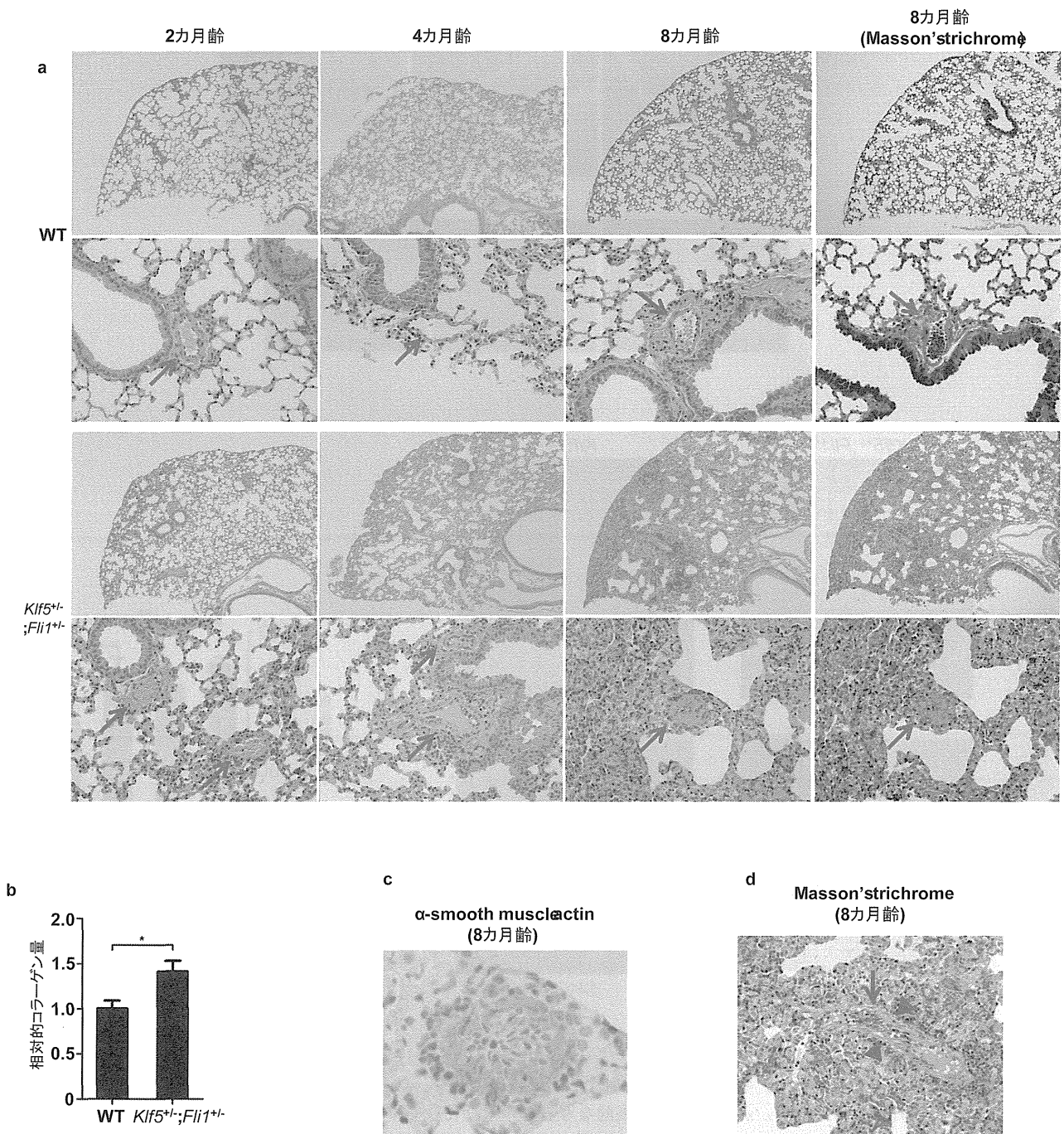


図7: *Klf5*<sup>+/-</sup>; *Fli1*<sup>+/-</sup> マウスは SSc 患者の間質性肺炎に類似した肺病変を示す。  
 (a) 野生型 (WT) マウスと *Klf5*<sup>+/-</sup>; *Fli1*<sup>+/-</sup> マウスの肺組織を 2, 4, 8 カ月齢で示す。倍率は 40 倍と 400 倍の両者で示す。左 3 列のパネルは hematoxylin and eosin 染色、右 1 列のパネルは Masson's trichrome staining の代表的な写真を示している。矢印は気管支細動脈である。それぞれの時点で、7 匹のマウスの組織を調べた。(b) total collagen assay で測定したコラーゲン含有量の相対値を示す。n=4。(c) 8 カ月齢の *Klf5*<sup>+/-</sup>; *Fli1*<sup>+/-</sup> マウスにおける肺組織の狭窄した細動脈を示す。α-SMA 染色。倍率は 400 倍。(d) 8 カ月齢の *Klf5*<sup>+/-</sup>; *Fli1*<sup>+/-</sup> マウスにおける隔壁間の細静脈を示す。Masson's trichrome 染色の結果を示す。内膜は線維化し、血管周囲にリンパ球の浸潤がみられる。矢印頭は内腔の狭窄を示す。矢印は赤血球の鬱滞を示す。データは mean ± s.e.m. \*P<0.05。Two-tailed Mann-Whitney U test。

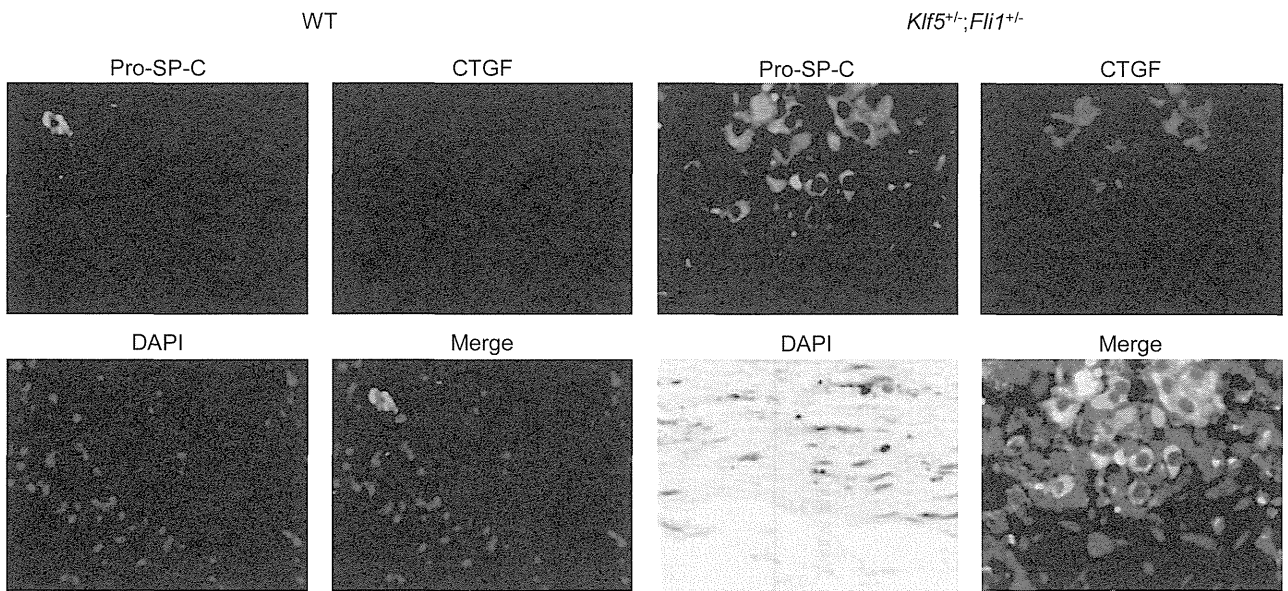


図 8 : *Klf5<sup>+/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスの 2 型肺胞上皮細胞では connective tissue growth factor (CTGF) の発現量が大きく増加している。野生型 (WT) マウスと *Klf5<sup>+/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスにおいて 2 型肺胞上皮細胞のマーカーである pro-surfactant protein C (pro-SP-C) と CTGF で二重染色を行った。Pro-SP-C は FITC (緑)、CTGF は Alexa Flour 555 (赤)、核を 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 青) で染色した。

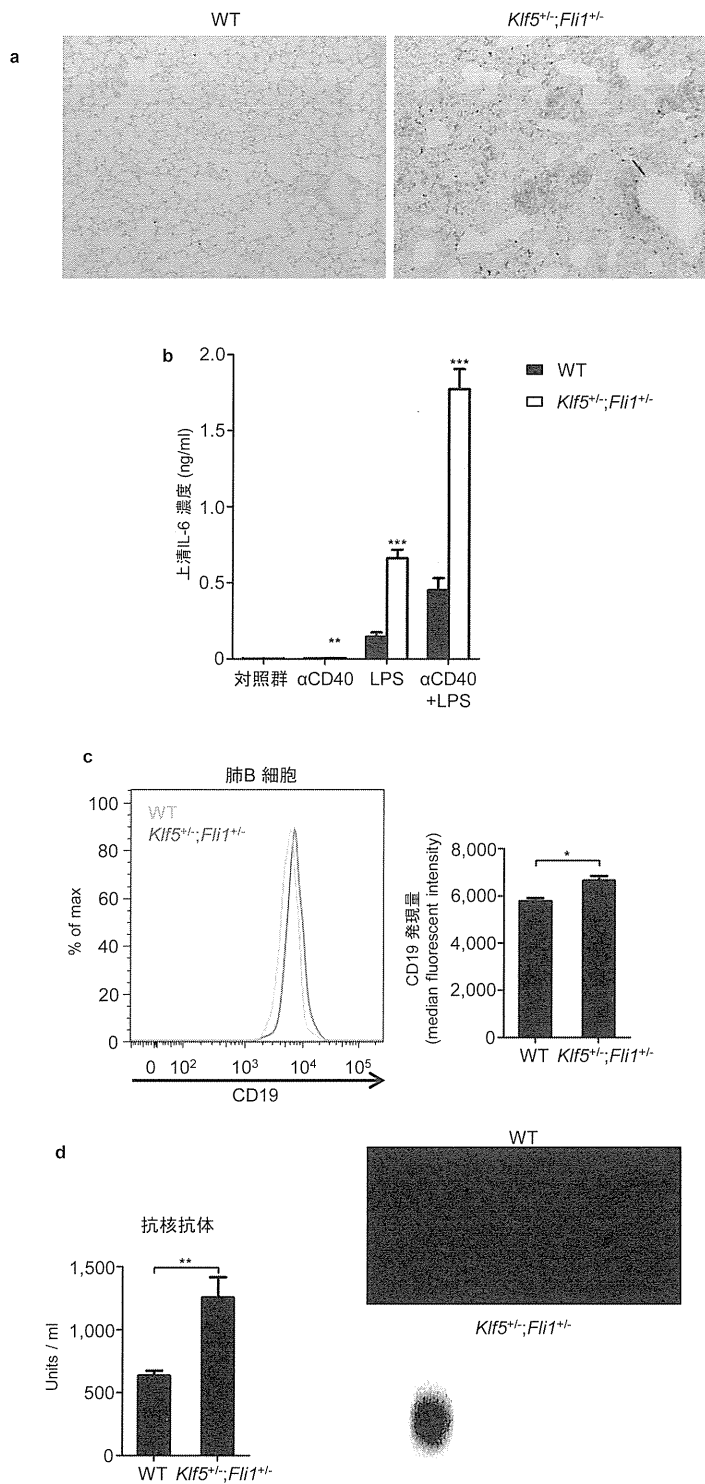


図9: *Klf5<sup>+/-</sup>; Flil<sup>+/-</sup>* マウスでのB細胞活性化と自己抗体産生。

(a) 8カ月齢の野生型 (WT) マウスと *Klf5<sup>+/-</sup>; Flil<sup>+/-</sup>* マウスでの代表的な肺組織。B細胞特異的な B220 染色の結果を示す。(b) B細胞は2カ月齢のマウスの脾臓から CD19 陽性細胞を MACS 磁気ビーズで採取した。その後、lipopolysaccharide (LPS) と抗 CD40 抗体 ( $\alpha$ CD40) で 48 時間刺激した。上清中の IL-6 の値を ELISA で測定した。それぞれのグループで 4 匹ずつのマウスから duplicate にして刺激を行った計 8 検体の値を示す。(c) 肺 B 細胞中の CD19 の発現量を Median fluorescent intensity で比較した。n=5。(d) マウス血清中の抗核抗体を ELISA (左) と Hep-2 細胞 (右) を用いて検出した。陽性例では核内に点状の染色がみられ、細胞質も淡く染まっていた。データは mean  $\pm$  s.e.m. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ 。Two-tailed Mann-Whitney U test。

## 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

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	部長
協力者	白田俊和	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	部長
協力者	稲葉由季	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	稲坂 優	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	菅原京子	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	伊藤有美	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	浦田 透	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	

### 研究要旨

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。RA、SLE 患者で MDA-LDL 高値であることが報告されているが、SSc 患者における報告はない。MDA-LDL 値と SSc 患者の臨床症状との相関について検討した。SSc 患者では、MDA-LDL 高値例が多く、MDA-LDL/LDL-C 比は、SSc は SLE 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。

### A. 研究目的

近年動脈硬化性病変の二次発症を予測する血清マーカーとして注目されている酸化 LDL について検討した。酸化 LDL とは酸化的変性を受けた LDL の総称であり、LDL の主要な蛋白であるアポ B を修飾したものである。

代表的な脂質過酸化産物としてマロンジアルデヒド (MDA) が同定されており、MDA によりアポ B が修飾を受けた LDL がマロンジアルデヒド修飾 LDL (MDA-LDL) と呼ばれている。酸化 LDL の臨床的意義としては、これまで経皮的冠動脈再建術 (PCI) 治療を行った糖尿病 (DM) 患者において、PCI 治療前の MDA-LDL 値と、PCI 治療後に発生した再狭窄群では非再狭窄群に比べ MDA-LDL が高値であり、MDA-LDL $\geq$ 110U/L 群では MDA-LDL $<$ 110U/L 群より、相対危険度 5.3 で再狭窄のリスクが高いと報告されている<sup>1)</sup>。さらに冠動脈疾患

(CAD) 既往歴のある DM 患者 4 年間の追跡調査では、MDA-LDL $\geq$ 110U/L 群では MDA-LDL $<$ 110U/L 群より、心イベント発症頻度が有意に高く、MDA-LDL 値は冠動脈疾患既往歴のある DM 患者において、冠動脈疾患に関する予後予測のマーカーとして有用と報告されている<sup>2)</sup>。

また、MDA-LDL 濃度は血清 LDL-C と正相関するため、LDL の酸化の程度を評価する際には、MDA-LDL/LDL 比を用いることが有用とも考えられている。MDA-LDL はその血中濃度から動脈硬化発症の直接原因でなく、血管内皮障害によってプラークから血中へリークする shedding antigens とも考えられている<sup>3)</sup>。

リウマチ性疾患と酸化 LDL については、関節リウマチ (RA) 患者で MDA-LDL 高値であり、特に冠動脈疾患 (CAD) を有する RA では、MDA-LDL 高値であり、非 RA CAD よりも高い<sup>4)</sup>。また、全身

性エリテマトーデス (SLE) 患者で MDA-LDL 高値であり、SLE 患者の動脈硬化性病変の病態形成に関与している可能性についての報告がある<sup>5)</sup>。しかし、SSc 患者と酸化 LDL との関連について検討した報告はこれまでなされていない。そこで今回我々は、SSc 患者における酸化 LDL 値とその臨床症状との関連について検討した。

## B. 研究方法

対象は SSc58 例で、疾患コントロールとして 10 名の SLE 患者血清を用いて検討した。SSc58 例の内訳は、男 10 例、女 48 例、dcSSc16 例、lcSSc42 例、平均年齢  $63.1 \pm 14.0$  歳であった。酸化 LDL の測定は、酸化 LDL ELISA kit (Sekisui Medical Co Japan) を用いてプロトコールに従って測定した。マロンジアルデヒド修飾 LDL (MDA-LDL) 基準値は、男：45 歳未満、女：55 歳未満は、 $46 \sim 82$  U/L であり、男：45 歳以上、女：55 歳以上は  $61 \sim 105$  U/L、LDL-コレステロールは  $< 140$  mg/dl と設定されている。本研究の施行に際して、患者に十分な説明を行い、同意を得た。

## C. 研究結果

SSc および SLE 患者における MDA-LDL 値、MDA-LDL/LDL 比について図 1 に示す。dcSSc 患者では SLE 患者に比較して、酸化 LDL が高値であった。また、MDA-LDL/LDL-C 比においては、dSSc および lSSc のいずれにおいても SLE と比較して高値であった。次に、MDA-LDL 値と MDA-LDL/LDL 比の %DLco との関連について図 2 に示す。%DLco と MDA-LDL および MDA-LDL/LDL-C 比のいずれにおいても負の相関関係が有意に見られた。その相関は、酸化 LDL/LDL-C 比の方がより強くみられた。さらに、心エコーによる収縮期右室圧、IgG、KL-6、

SP-D において、酸化 LDL/LDL-C 比はいずれも正の相関が見られた (図 3)。上記基準値を上回る例を MDA-LDL 上昇群とした場合、臨床像との相関を検討したところ、MDA-LDL 上昇群では、肺高血圧症合併例、抗セントロメア抗体陽性例が有意に多い結果となった。

## D. 考案

酸化 LDL は、強皮症患者においても高値例が多く、それは、強皮症患者の動脈硬化性病変を反映しているのかもしれない。IgG と酸化 LDL/LDL-C 比は正の相関があり、免疫反応の強さを反映している可能性がある。%DLco の低下や KL-6、SP-D と酸化 LDL/LDL-C 比は正の相関があり、強皮症における間質性肺病変の進行に酸化 LDL が関与している可能性がある。%DLco と酸化 LDL の負の相関、酸化 LDL 上昇群で肺高血圧症合併例が多いことから、酸化 LDL が肺高血圧症の病態の進行に関わっている可能性、または血管内皮障害の程度を表している可能性があるとも考えている。

## E. 結論

全身性強皮症における脂質代謝異常は、RA や SLE と比較するとあまり知られていない。しかし、脂質代謝異常の合併頻度は高く、その病態は不明な点がまだまだ多いのが現状である。

## F. 文献

1. Shigematsu S, et al. Increased incidence of coronary in-stent restenosis in type2 diabetic patients is related to elevated serum malondialdehyde-modified low-density lipoprotein. *Cir J* 2007; 71: 1697.
2. Tanaga K, et al. Increased circulating malondialdehyde-modified LDL levels in patients with coronary

artery disease and their association with peak sizes of LDL particles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2002; 22: 662.

3. Nakajima K, et al. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 36.
4. Wang J, et al. The level of malondialdehyde-modified LDL and LDL immune complexes in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 2009 Sep; 42(13-14): 1352
5. Damoiseaux J, et al. Cross-reactivity of IgM and IgG anticardiolipin antibodies with oxidized-low density

lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun; 1050: 163.

## 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

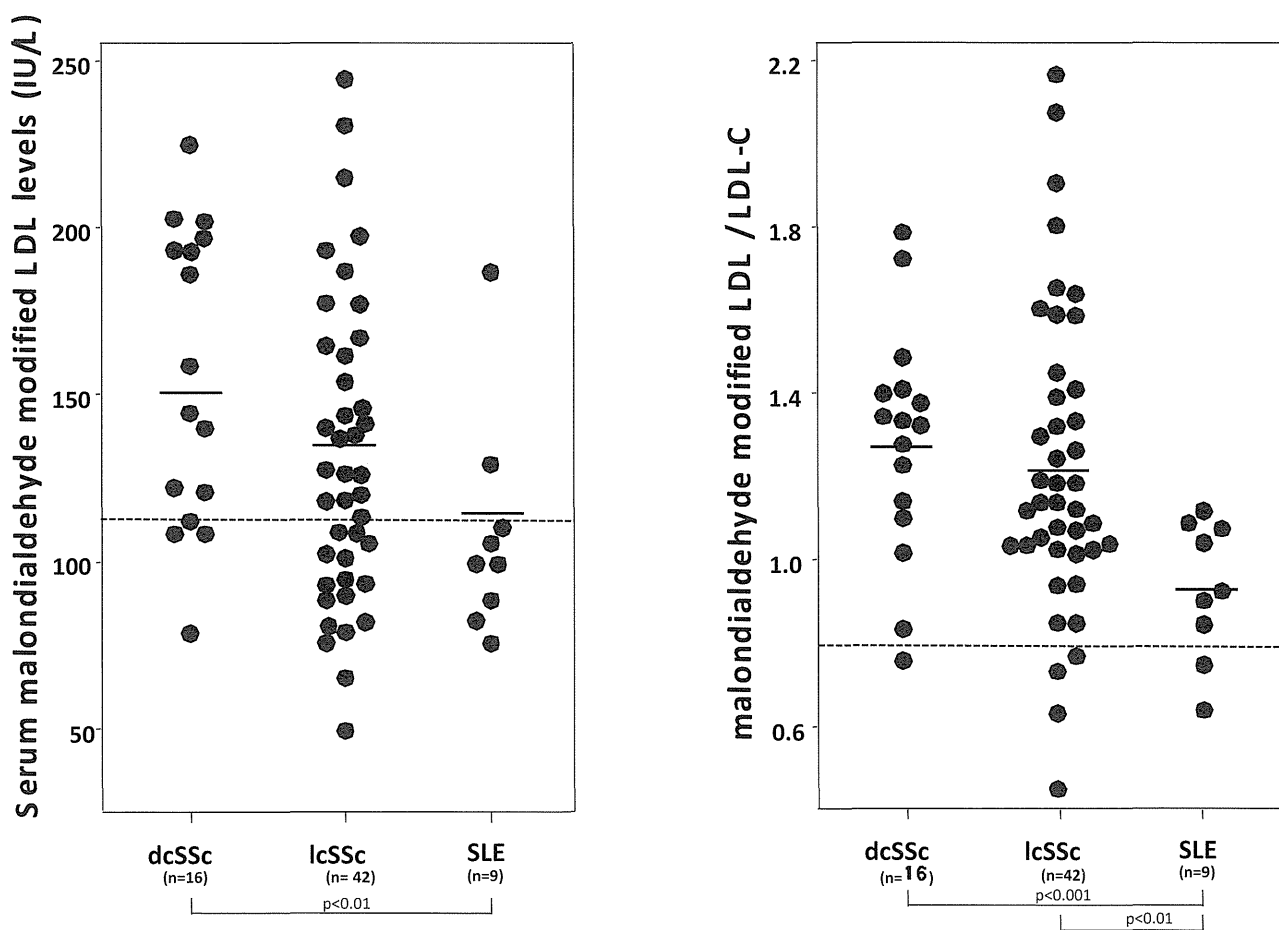


図1：lcSSc、dcSScおよびSLE患者におけるMDA-LDL値、MDA-LDL/LDL-C比

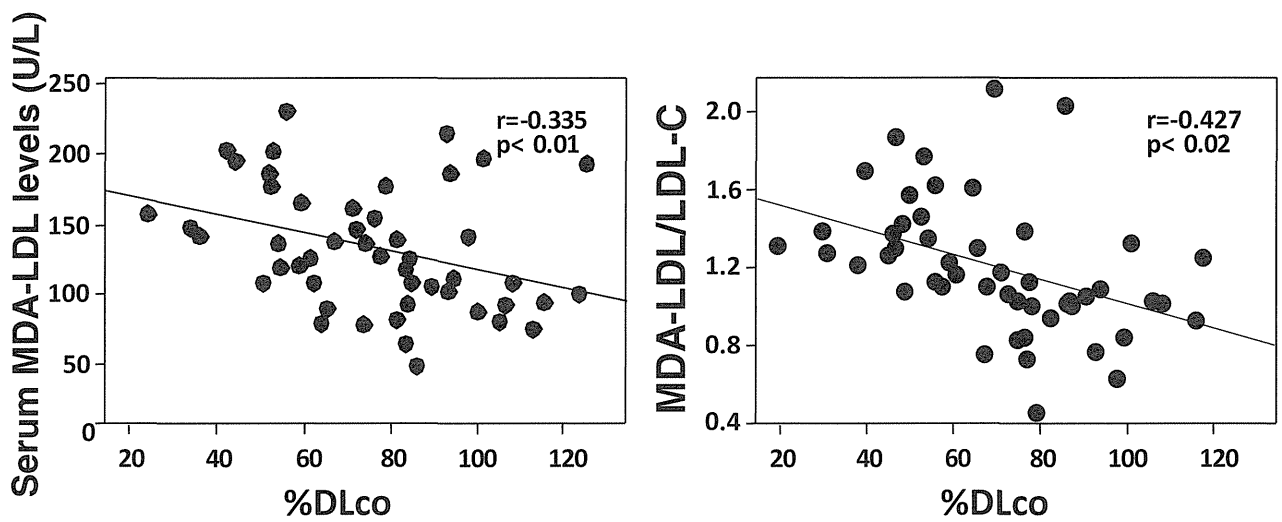


図2：SSc患者におけるMDA-LDL値およびMDA-LDL/LDL比の%DLcoとの相関

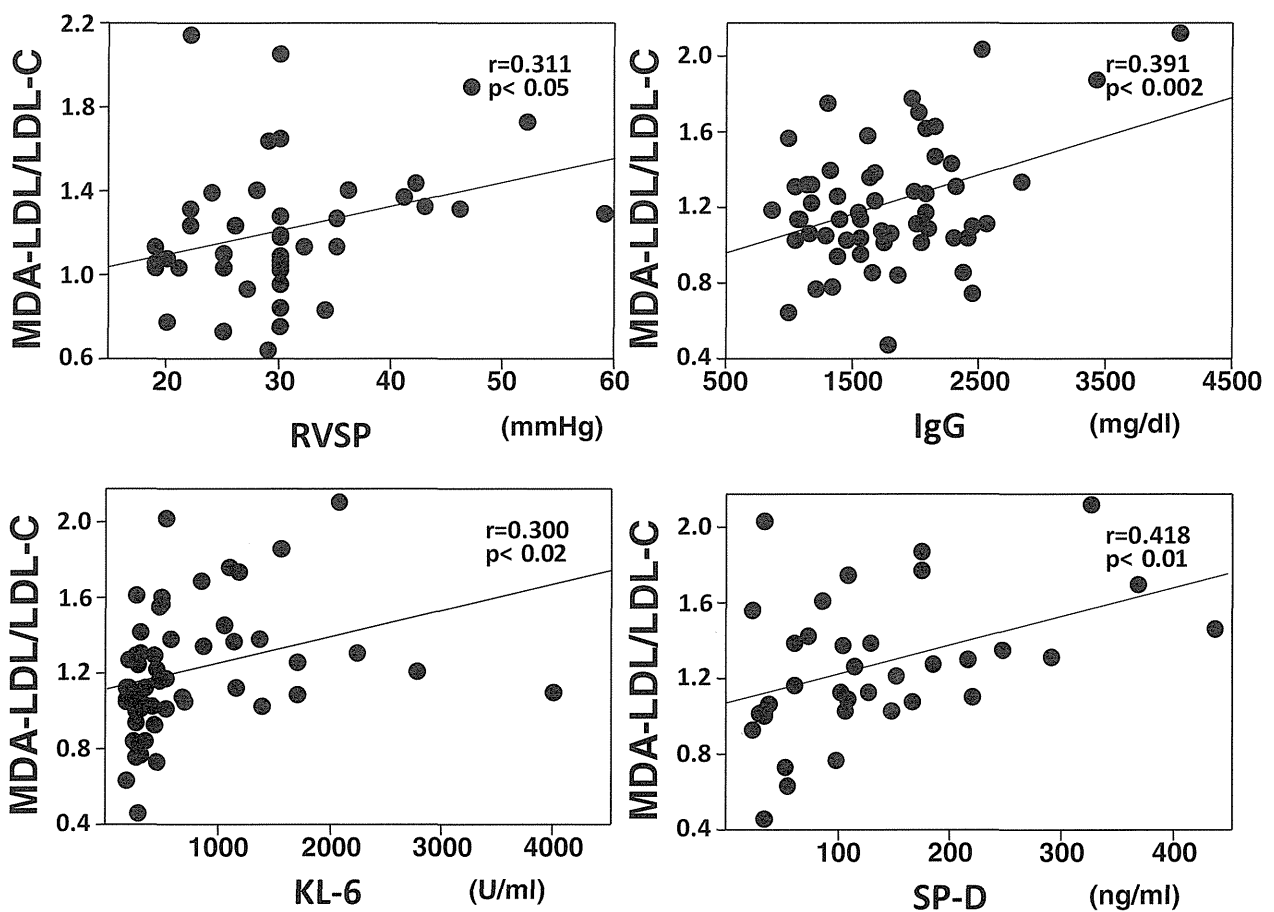


図3：心エコーによる収縮期右室圧、IgG、KL-6、およびSP-DとMDA-LDL/LDL-C比との相関



# 間質性肺炎合併全身性強皮症における CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析

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  
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 近藤裕也 筑波大学医学医療系内科 膠原病・リウマチ・アレルギー 講師  
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 V $\delta$ 1 陽性細胞  $\gamma\delta$ T 細胞 (CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 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 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞の線維芽細胞増殖能に対する解析を行った。CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 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 産生が著明に増大していた。さらに、SSc 患者由来 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株では健常人由来細胞株に比べて、IFN- $\gamma$  産生が減弱していた。In vitro での肺線維芽細胞株を用いた解析より、IFN- $\gamma$  と CCL3 濃度の違いにより線維芽細胞増殖能が異なることが確認された。T 細胞受容体刺激後の SSc 患者由来 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株培養上清は、健常人由来細胞株培養上清に比べて、肺線維芽細胞株増殖能を亢進した。以上の結果から、IP 合併 SSc 患者では、CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 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、SSc、IP 病態へ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  $\gamma\delta$ T 細胞が IP 増悪に関与することを報告してきた [2]。マウス NK1.1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞に相当する細胞として、ヒト CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞が知られている。我々は、末梢血を用いた解析および遺伝子発現解析の結果より、これらの細胞が、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 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞の線維芽細胞増殖能に対する機能については不明であった。そこで本研究は、IP 合併 SSc 患者、IP

非合併 SSc 患者および健常人由来 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞の線維芽細胞増殖能に対する関与を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 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 $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 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 $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株を樹立した。

### 2) ケモカイン・サイトカイン産生の検討

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 $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株を抗 TCR V $\delta$ 1 抗体で 72 時間刺激後、培養上清中の CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 及び IFN- $\gamma$ 、IL-4、TNF- $\alpha$ 、IL-17 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。

### 3) RNA 抽出と RT-PCR

ヒト胎児由来肺線維芽細胞株 (WI-38) より total RNA を抽出後、PCR 法にて CCR1、CCR5、IFN- $\gamma$ R1 mRNA 発現を以下の primer を用いて解析した。CCR1, 5'-TTTGGTGTGCATCACCAGCAT, 3'-GCCT-GAAACAGCTTCCACTC; CCR5, 5'-GGCAAAGACAGAAGCCTCCA, 3'-AACCTTCTGCAACACCAACC; IFN- $\gamma$ R, 5'-GGCAGCATCGCTTTAACTC, 3'-GGAGGTGGGGGCTTTTATTA; GAPDH, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, 3'-GAAGATGGT-GATGGGATTTC

### 4) 線維芽細胞増殖能の評価

WI-38 線維芽細胞増殖能に対する、IFN- $\gamma$ 、CCL3、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 CCL3 抗体の影響を検討した。さ

らに、SSc 患者および健常人由来 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株を抗 TCR V $\delta$ 1 抗体で刺激後、培養上清を回収した。得られた培養上清を用いて、WI-38 線維芽細胞株に対する増殖能を検討した。細胞増殖能の測定には BrdU 測定 kit (Roche, Basel, Schweiz) を使用した。

### 5) 肺組織を用いた蛍光免疫染色

IP 合併 SSc 患者由来肺組織よりパラフィン切片を作製し、CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞の検出を行った。染色には、抗 CD161 抗体 (Biolegend, San Diego, CA)、抗 TCR V $\delta$ 1 抗体 (Thermo scientific, Waltham, MA) を使用した。肺組織パラフィン切片は、IP 合併 SSc 患者の剖検検体より学内の所定の手続きを経て作製した。

### 6) 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) CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞株からのサイトカイン・ケモカイン産生能の解析

健常人、IP 非合併 SSc、IP 合併 SSc 患者末梢血由来 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性細胞を単離し、細胞株を作製した (図 1)。CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株を抗 TCR V $\delta$ 1 抗体により刺激した結果、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。(図 2)。さらに、IP 非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株では、

健康人由来細胞株に比べて IFN- $\gamma$  産生量が著明に減弱していた (図 2)。

## 2) IFN- $\gamma$ および CCL3 存在下における WI-38 線維芽細胞増殖能の解析

WI-38 線維芽細胞増殖能に対する IFN- $\gamma$ 、CCL3 の影響を解析するために、in vitro での検討を行った。初めに、WI-38 線維芽細胞に CCL3 受容体 (CCR1 および CCR5)、IFN- $\gamma$  受容体 (IFN- $\gamma$ R) が発現することを確認した (図 3-1)。WI-38 線維芽細胞増殖能は、IFN- $\gamma$  存在下では、有意に減少していた (図 3-2)。CCL3 は WI-38 線維芽細胞増殖能に影響を与えなかった。一方で、CCL3 共培養下では、IFN- $\gamma$  は WI-38 線維芽細胞増殖を抑制しなかった (図 4)。また、同様の結果は、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 CCL3 抗体を用いた検討でも確認された (図 5)。

## 3) CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞株培養上清を用いた WI-38 線維芽細胞増殖能の解析

SSc 患者由来細胞培養上清は、HC 由来細胞培養上清に比べて、WI-38 線維芽細胞増殖能が優位に亢進した (図 6)。IP 合併 SSc 患者由来、IP 非合併 SSc 患者由来培養上清では有意な差は確認出来なかった。

## 4) IP 合併 SSc 患者由来肺組織における CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の検出

IP 合併 SSc 患者由来肺組織を用いて免疫染色を行った。その結果、非線維化部位において、CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞が検出された (図 7A,7B)。一方で、線維化病態の形成部位では、CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞は検出出来なかった。

## D. 考案

現在までの我々の検討から、CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞は末梢血中にごく少数のみ存在すること、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。しかしながら、この細胞がどのように SSc および IP 病態へ関与しているかは不明であった。

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]。我々の CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株を用いた検討結果より、TCR 刺激後の IP 合併 SSc 患者由来細胞株では、健康人由来細胞株に比べて、CCL3 産生能亢進、IFN- $\gamma$  産生能低下が確認された。

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。一方で、IFN- $\gamma$  は Th1 サイトカインの一つであり、線維芽細胞増殖抑制因子として報告されている[10, 11]。

In vitro における線維芽細胞株を用いた検討の結果、IFN- $\gamma$  は細胞抑制能を示したが、CCL3 単独では細胞増殖能への影響は認められなかった。興味深いことに、CCL3 存在下では、IFN- $\gamma$  の線維芽細胞増殖抑制能は確認出来なかった。同様の結果は、各中和抗体を用いた検討でも認められた。これらの結果から、IFN- $\gamma$ 、CCL3 濃度の違いは、線維芽細胞増殖能へ影響を与えることが考えられた。実際に、

CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株培養上清を用いての、線維芽細胞増殖を解析した結果、SSc 患者由来細胞培養上清では、HC 由来細胞培養上清に比べて、WI-38 線維芽細胞増殖能が優位に亢進した。

IP 合併 SSc 患者肺組織を用いた検討より、CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞は、非線維化部位での存在が認められ、線維化部位では認められなかった。このことから、CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞は線維化病態形成前、あるいは病態形成初期において何らかの働きをしている可能性が考えられた。今後、疾患コントロールを用いた、詳細な検討を行う必要がある。

今回の我々の検討から、CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性細胞は、線維化促進・抑制因子の産生能を有するが、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、あるいは肺線維化モデルマウスを用いることで、SSc および IP 病態における CD161 陽性 V $\delta$ 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 $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 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, Ferrera A, Setti M, Murdaca G, Zocchi MR. V $\delta$ 1 T lymphocytes producing IFN- $\gamma$  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 chemotactic