

## 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	<b>佐藤伸一</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
研究分担者	<b>浅野善英</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
研究分担者	<b>石川 治</b>	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授
研究分担者	<b>尹 浩信</b>	熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 教授
研究分担者	<b>遠藤平仁</b>	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	<b>岡 晃</b>	東海大学総合医学研究所 講師
研究分担者	<b>川口鎮司</b>	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	<b>桑名正隆</b>	慶應義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
研究分担者	<b>後藤大輔</b>	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	<b>高橋裕樹</b>	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	<b>波多野将</b>	東京大学医学部附属病院循環器内科 助教
研究分担者	<b>藤本 学</b>	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
研究分担者	<b>山本俊幸</b>	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、指尖部虫喰状癒痕・潰瘍、肺高血圧症、SSc 腎クリエーゼ)、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、各主要病態がどのような機序で起こるのか、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、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、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、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、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目指す。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、プレオマイシン誘発 SSc モデルマウスを用いて検討した。さらに、TGF- $\beta$ 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 SSc 7 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-196a の発現量を調べたところ、SSc 患者では毛髪中の miR-196a 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- $\beta$ 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、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 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/m<sup>2</sup>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 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 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 (RNA )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 抗体を高率に共存し、抗RNAP 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関連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、肺動脈コンプラインス(一回拍出量/ (肺動脈収縮期圧 肺動脈拡張期圧)) 2.23ml/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。全ゲノムシークエンス解析において、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。