

# 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	<b>長谷川稔</b>	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	<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>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>梶名正隆</b>	慶応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
研究協力者	<b>田中住明</b>	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	<b>藤本 学</b>	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
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
協力者	<b>竹原和彦</b>	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が間質性肺炎あり) 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、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 繊維芽細胞	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, CD4+T, DC)	増加

RHEUMATOLOGY

Rheumatology 2012;51:129-133  
doi:10.1093/rheumatology/ker033  
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	<0.001
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. R<sup>2</sup> (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	8.54	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, (-) → 2.32. R<sup>2</sup> = 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。

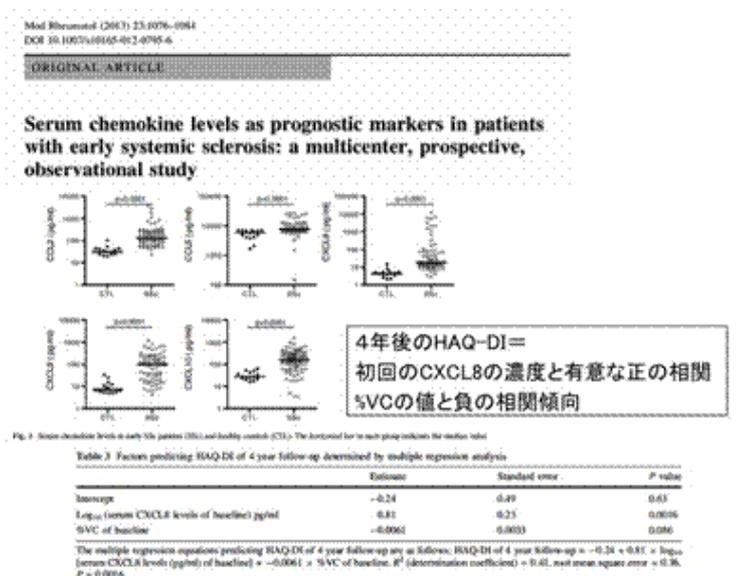
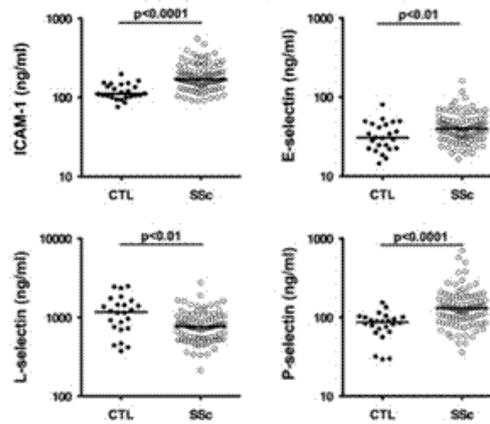


図2 ケモカインの血中濃度がその後の症状の予測に有用かどうかを検討して第2報として報告した。

**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	0.42	0.13	0.0001
Log <sub>10</sub> (serum ICAM-1 levels of baseline) (ng/ml)	-40.1	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 + 0.42 x %VC of baseline + 40.1 x log<sub>10</sub>(serum ICAM-1 levels (ng/ml) of baseline).

R<sup>2</sup> (determination coefficient) = 0.73, root mean square error = 12.1, p < 0.001.

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 <sub>10</sub> (serum P-selectin levels of baseline) (ng/ml)	2.22	0.94	0.028
%VC of baseline	-0.0005	0.0038	0.017
HAQ-DI of baseline	0.28	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 x log<sub>10</sub>(serum P-selectin levels (ng/ml) of baseline) + 0.0005 x %VC of

baseline + 0.28 x HAQ-DI of baseline. R<sup>2</sup> (determination coefficient) = 0.41, root mean square error

= 0.365, 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が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。

### 強皮症患者における各ケモカインの血清中濃度

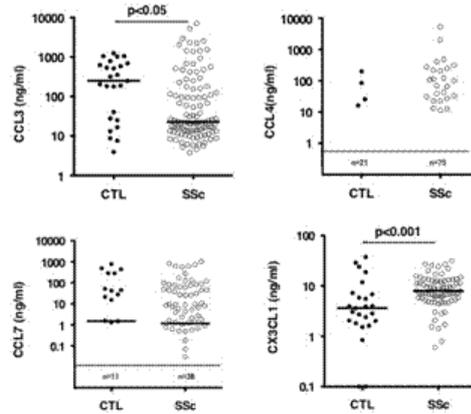


図5 第2報で報告した以外のケモカインの血中濃度を測定し、SSc患者と健常人で比較したもの。横線は中央値を示す。

### 4年間の臨床症状とケモカインの血中濃度の推移

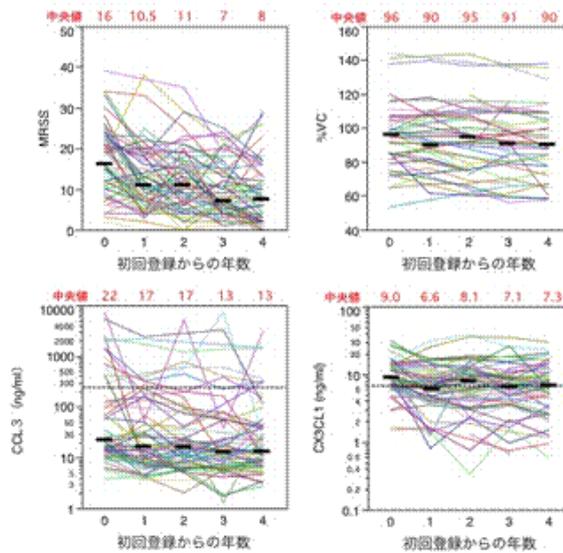


図6 4年間のMRSSや%VCの変動と、CCL3、CX3CL1の変化をグラフに示す。長い点線は健常人の中央値を、短い横線は強皮症患者の各時点での中央値を示す。

## 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	住田準一	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	宮崎美穂	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/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。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。

### 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委員会で承認された計画 (P2012010-11X) に基づいて、実施した。

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、 $375\text{mg}/\text{m}^2$  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 ;  $375\text{mg}/\text{m}^2$  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 500mg 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、 $375\text{mg}/\text{m}^2$  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

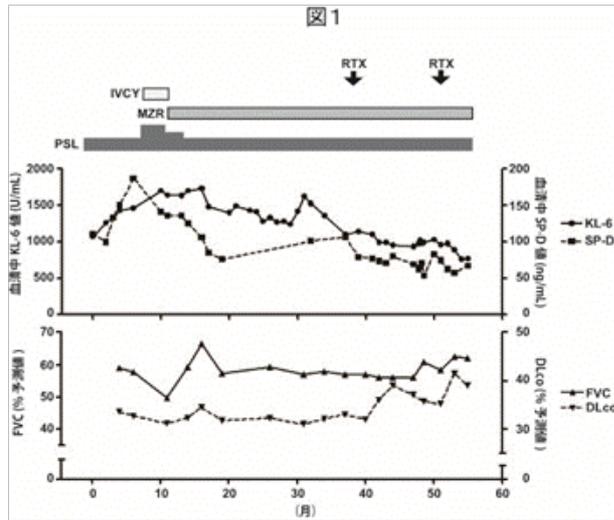


図 1：治療経過中の間質性肺疾患パラメータの推移

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.

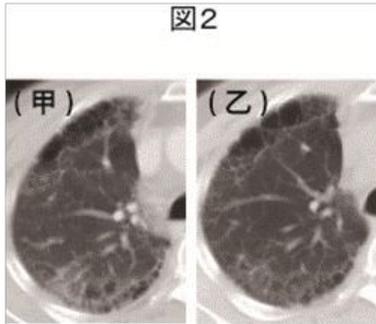


図 2： rituximab 治療直前(甲)と治療半年後(乙)の胸部 CT 画像。

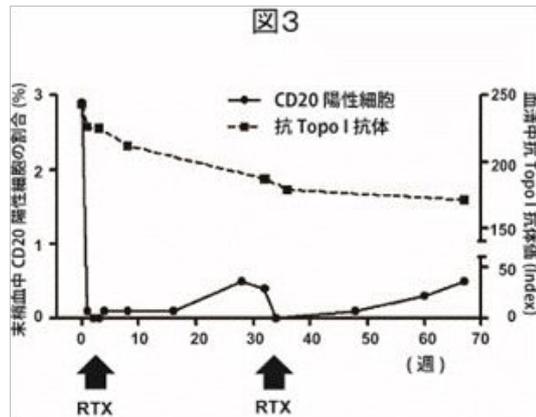


図 3： rituximab 投与後の末梢血中 CD20 陽性白血球の割合と血清中抗トポイソメラーゼ I 抗体値。Topo I, topoisomerase I; RTX, rituximab.

## 強皮症肺高血圧に PDE 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)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回入退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 指潰瘍出現。9月心エコー - 上推定肺動脈圧 68 mm Hg と肺高血圧を認め入院加療となった。身長 158 cm、体重 58 kg、血圧 106/70、MRSS11、左第 指尖陥凹性癬痕、左第 指潰瘍を認めた。前胸部毛細血管拡張を認めた。心音左第 音亢進。心エコー上推定肺動脈 68mmHg、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 53mmHg、肺動脈楔入圧 10mmHg、PVR440 dyne/sec/cm<sup>3</sup>、限局皮膚硬化型強皮症 肺動脈性肺高血圧と診断した。O<sub>2</sub> 2L/min、Berapurost120 μg、Bosentan 250mg、Sildenafil30 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 Lasix10 mgから 20 mg/日併用を行うも効果効果が乏しく PDE 阻害薬 Orprinone 1 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 BNP500pg/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 3kgの体重減少があり BNP も最大 960pg/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 68mmHg、WHO 機能分類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 BNP420pg/ml であった。Bosentan250 mgまで漸増し劇的な ADL 改善を示し O<sub>2</sub> 2 L /min 投与し独歩にて退院に至った。退院時 BNP20 から 30pg/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 Bosentan125 mgに減量し Sildenafil40 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 Bosentan250 mg、Sildenafil40 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 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、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酵素需要増加、不整脈誘発作用などの欠点がある。PDE 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 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PDE 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となった。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、PDE 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。PDE 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 PDE 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

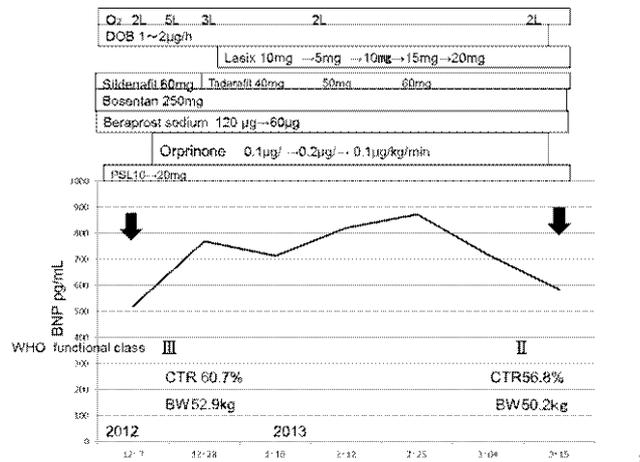


図 1 . 症例 1 の経過表

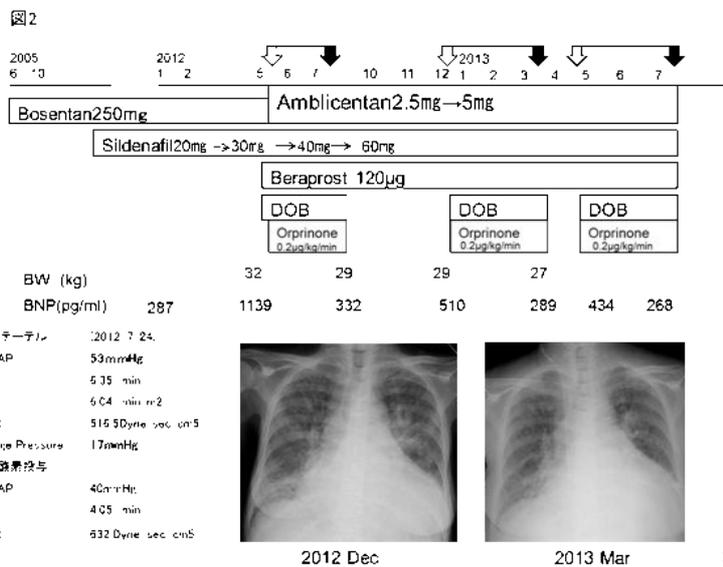


図 2 . 症例 2 の経過表

### 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 . PDE 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。SSc 72 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 PGI<sub>2</sub> 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 6.9 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 <sup>13</sup>C 標識化合物を用いた吸収呼吸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 SSc 74 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。

<sup>13</sup>C 中性混合脂肪酸 (クロレラ工業より提供)

200mg を空腹時経口摂取後 30 分毎 200ml 呼吸回収用アルミバックに呼吸を回収した。8 時間後計 16 回回収した。呼気中の  $^{13}\text{C}\text{O}_2$  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  $^{13}\text{C}$  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℃ 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 BMI 18.7 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 H<sub>2</sub> 阻害薬を服用していた。HAQ-DI は有意に悪かった (MUST 2 以上平均 0.86、MUST 0 平均 0.12)。また MUST 2 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  $^{13}\text{C}$  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  $^{13}\text{C}$  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 H<sub>2</sub> 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。MUST 2 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  $^{13}\text{C}$  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。MUST 1 以内の症例 10 例において酢酸呼気試験及び呼気中 H<sub>2</sub> 増加による腸内細菌増殖は検出できなかった。2 症例は MUST 2 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<sup>13</sup>C 脂肪酸、酢酸呼吸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 patients. 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

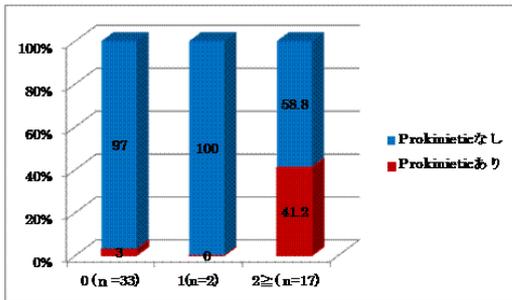


図1 (A) MUSTによる層別化 Prokinetic drugs 使用の有無 P=0.027

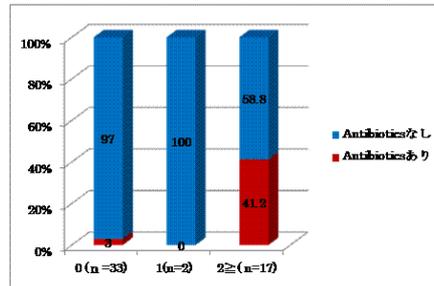


図1 (B) MUSTによる層別化 Antibiotics 使用の有無 P=0.028

MUST score と関連する因子の解析 重回帰分析

次数	変数名	$\beta$	SE( $\beta$ )	std $\beta$	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	$\alpha$ 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

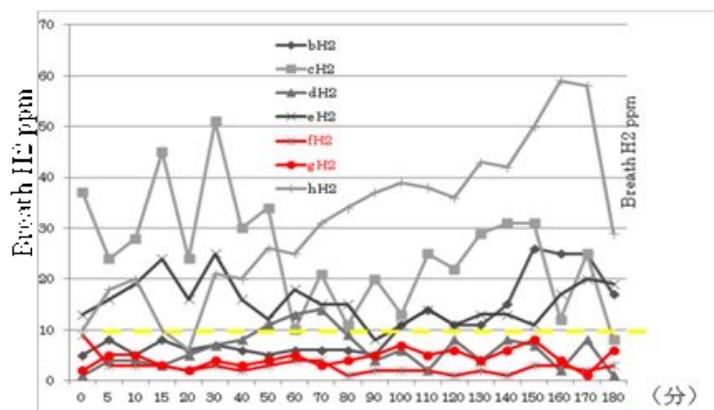


図3 ラクトース負荷呼気中 H<sub>2</sub> 濃度の検討 (e h 症例偽性腸閉塞症例)

## 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に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*<sup>+/+</sup>マウスおよび血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失 [*Fli1*<sup>-/-</sup>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*<sup>-/-</sup>ECKO マウス (*Fli1*<sup>fllox/fllox</sup>;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刀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 3000pU/mL の dispase II (エーディア社) を入れた MEM に浸し、4℃ で 24 時間静置した。表皮と真皮を剥離し、真皮を 1mg/mL の終濃度にした Collagenase type I (Invitrogen) を入れた MEM 溶液に浸し、剪刀で細かく組織を刻み、37℃ 90 分培養インキュベーターで静置した。融解物をピペティングし、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 μL 及び MACS buffer (0.5%BSA 2M EDTA in PBS) 90 μL 入れ、4℃ 15 分静置した。その後、3000g の速さで 10 分間遠心し、上清を吸った。さらに MACS buffer を 3mL 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 3mL で洗った。カラムにトラップされている細胞を MACS buffer 3mL 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℃ 5%CO<sub>2</sub>、95%Air の条件のもと、EBM-2 bullet kit (Lonza 社) に 2mM 濃度の L-グルタミンと 50mg/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

24well plate において、1well あたり HDMECs を 6 × 10<sup>4</sup> 個まき、75ng の scrambled RNA と

Fli1 siRNA, PKC- siRNA, c-Abl siRNA(Santa Cruz)をそれぞれ 100  $\mu$ L の培養液に入れ、終濃度を 10nM とした。そこに Hiperfect Transfection Reagent (QIAGEN) を 3  $\mu$ 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 1mg 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 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 の phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、1% TritonX-100 in 50mM, Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 3mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 10ug/ml leupeptin, pepstatin, aprotinin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5uL 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

10cm dish に血管内皮細胞をまき、 $2 \times 10^6$  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 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 ECK0 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、6mm 切片を作成した。Fli1 および -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- の発現に及ぼす影響

HDMECs を ET-1 で刺激すると、c-Abl と PKC- の発現が亢進し、PKC- 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- 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- 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- がリン酸化されて核内へと移行し、最終的に PKC- 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- 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- 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- - 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- - 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- 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 - 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*<sup>+/-</sup>マウスの血管障害に及ぼす影響

*Fli1*<sup>+/-</sup>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*<sup>+/-</sup> 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

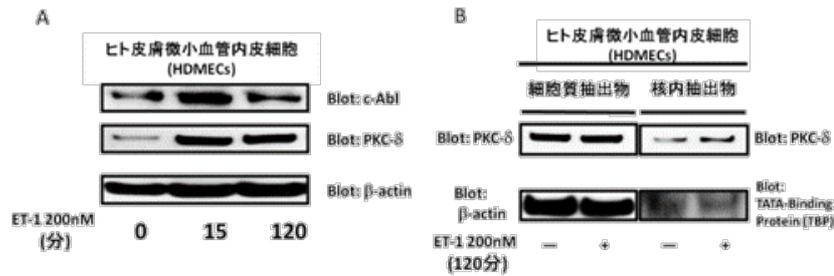
Akamata K, Asano Y, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Trojanowska M, Sato S. Bosentan improves vascular abnormalities in endothelial cell-specific Fli1 knockout mice by increasing the DNA

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

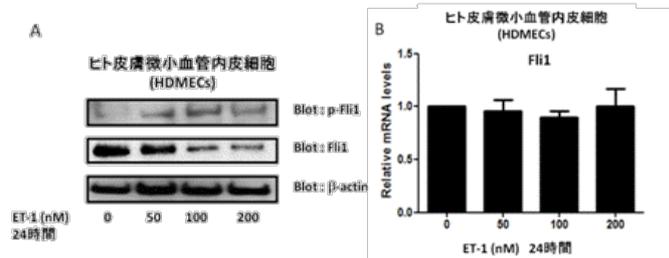
なし

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



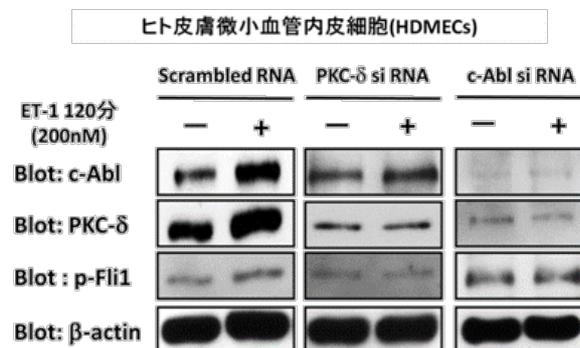
- A. HDMECs を ET-1 存在下で培養すると、c-Abl と PKC-δ の発現が亢進した。
- B. HDMECs を ET-1 存在下で培養すると、PKC-δ の核内移行が亢進した。

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。

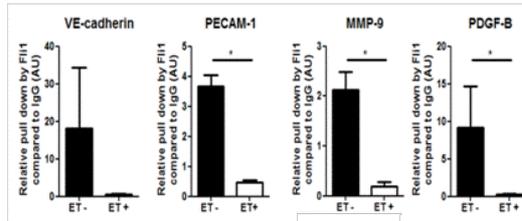
図3. c-AblおよびPKC-δの遺伝子サイレンシングがHDMECsにおけるET-1の作用に及ぼす影響



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。

図4. HDMECsにおいて、ET-1がFli1のDNA結合能に及ぼす影響

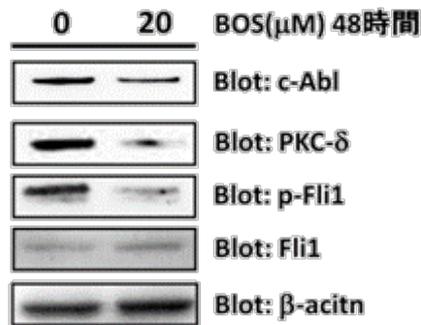
ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HDMECs)を用いたクロマチン免疫沈降法



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。

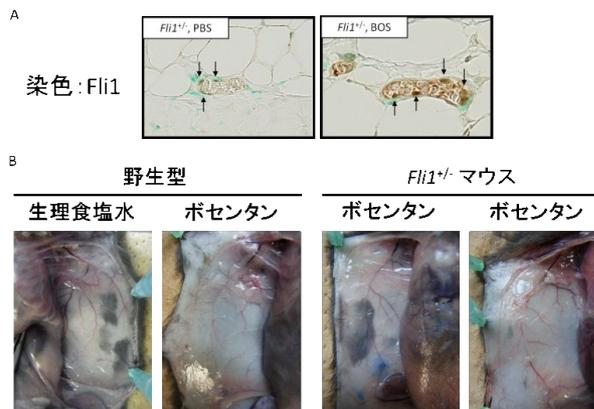
図5. HDMECsにおけるc-Abl- PKC- $\delta$ -Fli1 pathwayにボセンタンが及ぼす影響

ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HDMECs)



ボセンタン存在下で HDMECs を 48 時間培養し、c-Abl, PKC- $\delta$ , 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プロット法で検討した。

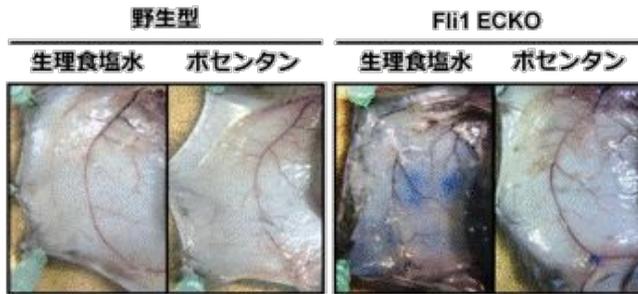
図6. ボセンタンが *Fli1*<sup>-/-</sup> マウスの血管障害に及ぼす影響



A. *Fli1*<sup>-/-</sup> マウスの皮膚微小血管内皮細胞における Fli1 蛋白の発現量を、ボセンタン投与群と PBS 投与群で免疫染色により比較した。

B. 同様の条件のマウスにおいて、Evans blue dye を尾静脈から投与し、皮膚の血管透過性について評価した。

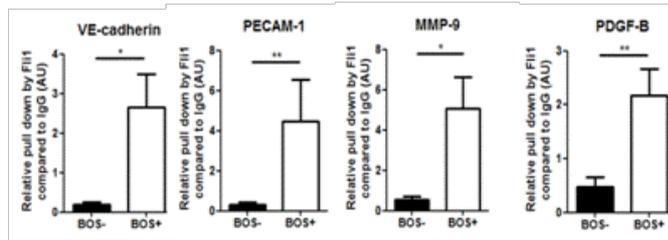
図7.ボセンタンが*Fli1*ECKOマウスの血管障害に及ぼす影響



ボセンタンあるいはPBSを投与した*Fli1*ECKOマウスにおいて、Evans blue dyeを尾静脈から投与し、皮膚の血管透過性について評価した。

図8.ボセンタンが*Fli1*ECKOマウスの血管障害に及ぼす影響

*Fli1*ECKOマウスから得られたマウス微小皮膚血管内皮細胞(MDMECs)を用いたクロマチン免疫沈降法



*Fli1*ECKOマウス由来の皮膚血管内皮細胞をボセンタン存在下で培養し、*Fli1*のDNA結合能についてクロマチン免疫沈降法で検討した。

# プ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～

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

協力者 **大橋威信** 福島県立医科大学医学部皮膚科 助手

## 研究要旨

リゾホスファチジン酸 (LPA) は 6 種類以上の特異的な G 蛋白質共役型受容体を介した多彩な機能を発揮する生理活性脂質である。近年、LPA<sub>1</sub> は強皮症における皮膚硬化の形成に関与していることが明らかにされた。今回我々は、プレオマイシン誘導性強皮症モデルマウスを持用いて、LPA 阻害薬 Ki16425 の治療効果を検討した。Ki16425 はプレオマイシンと同時投与において、皮膚硬化および肺の線維化を抑制した。LPA 阻害薬は強皮症に有用な治療薬である可能性が示唆された。

## A. 研究目的

我々は、これまでにプレオマイシンの局所投与によりマウスに皮膚硬化を誘導し、強皮症モデルとして報告してきた。今回、このモデルを用いて LPA 阻害薬を投与し、プレオマイシン誘導性皮膚硬化および肺線維化に与える影響について検討した。

## B. 研究方法

C3H/HeJ マウス (6 週令、雌) の背部にプレオマイシン (250 μg/ml) を 100 μl 皮内注射し、Ki16425 (Santa Cruz Biotechnology) の濃度を 1mg/kg、10mg/kg となるように調節し、同日内に同部位に 100 μl 皮内注射した。週 3 回 (月・水・金) を 4 週間投与した。その後、背部を 8mm パンチでプレオマイシン注射部位の皮膚および肺組織を採取し、ホルマリ

ン固定ならびに - 80 °C で冷結保存した。標本は HE、Masson trichrome、Toluidin blue 染色を施行した。また Sircol Collagen Assay kit (Bioolor) を用いて、真皮内および肺組織内コラーゲンの定量を行った。マウス MIP-1、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  について、背部皮膚組織を用いて RNA 抽出と Realtime RT-PCR を行った。

## C. 研究結果

プレオマイシンによる皮膚硬化の誘導は Ki16425 によって抑制され、HE 染色像でみられる真皮膠原線維の膨化・肥厚は有意に抑制されてみられた。さらに、真皮厚、肥満細胞数、皮膚に含有されるコラーゲン量はいずれも有意に減少してみられた。背部皮膚病変部における collagen 1 (I)、MIP-1、IFN-

mRNA 発現量は Ki16425 投与により有意に減少してみられた。TNF- $\alpha$  では有意な変化は認めなかった。

肺病変においても Ki16425 により線維化は抑制されてみえた。肺に含有されるコラーゲン量も有意に減少していた。

Ki16425 の皮膚および肺での効果は 1mg/kg/day、10mg/kg/day いずれの群においても同様の効果を示した。

#### D. 考案

前回までの検討で BLM 投与により誘導された皮膚硬化および肺線維化は、LPA<sub>1</sub> および LPA<sub>3</sub> 阻害薬である Ki16425 の同日内投与で抑制されることが確認された。Ki16425 の投与する濃度としては、1mg/kg/day、10mg/kg/day とともに皮膚硬化および肺線維化抑制の程度には有意差は見られず、低濃度の Ki16425 によっても線維化は抑制されることがわかった。

今回我々の検討では、Ki16425 投与によってマクロファージや Th1 細胞からのサイトカイン過剰産生を抑制することがわかった。Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  は線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を抑制する。LPA<sub>1</sub> 受容体はヒト強皮症皮膚線維芽細胞にも発現しており、その感受性が亢進していることが報告されている<sup>1)</sup>。Ki16425 は皮膚線維芽細胞に直接作用し、抗線維化作用を示していることが示唆された。また、肥満細胞やマクロファージ、T 細胞など他の細胞に LPA が直接作用しているか、今後検討が必要である。

#### E. 結論

LPA<sub>1</sub> 阻害薬である Ki16425 は BLM 誘導性強皮症モデルマウスにおける線維化を改善させることが示唆された。現在、Ki16425 の抗線維化の機序について TGF- $\beta$ 、CTGFなどを始めとする fibrogenic cytokine の発現レベルを現在検討中である。

#### F. 文献

1. Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, et al: LPA<sub>1</sub> receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1781: 582-587

#### 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

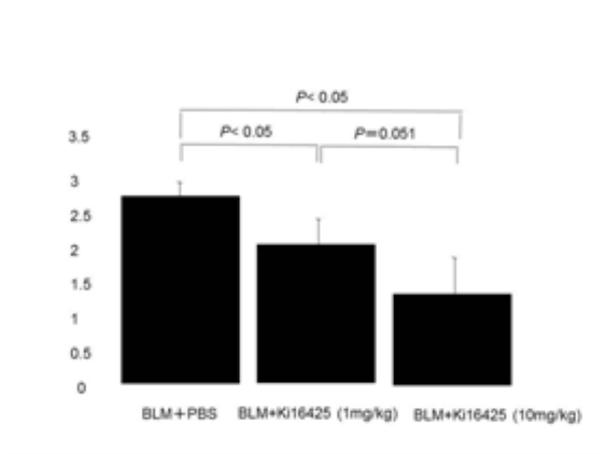


图 1 : MIP-1 mRNA 定量

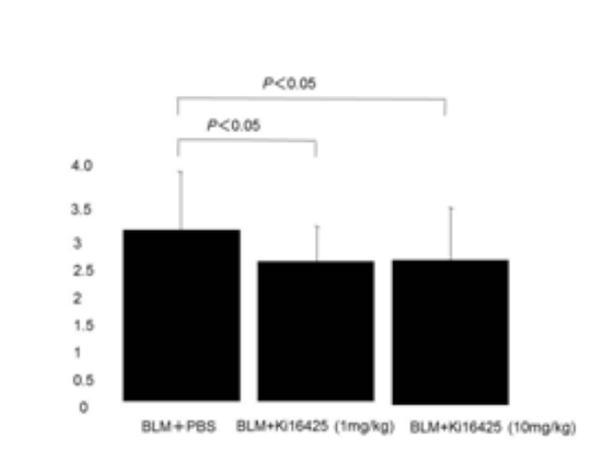


图 2 : IFN-γ mRNA 定量

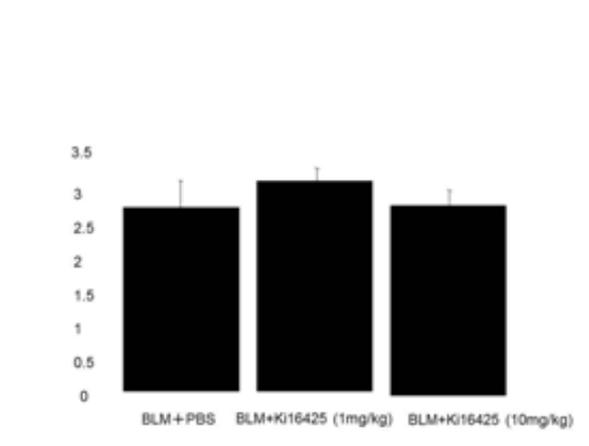


图 3 : TNF-α mRNA 定量

## 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

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
協力者	<b>遠山哲夫</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	<b>市村洋平</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	<b>高橋岳浩</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	<b>谷口隆志</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	<b>野田真史</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	<b>赤股 要</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	<b>門野岳史</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	准教授
協力者	<b>首藤絨一</b>	財団法人乙卯研究所理事	所長

### 研究要旨

Am80 は日本で開発された合成レチノイドで、急性前骨髄性白血病の治療薬として臨床使用されている薬剤である。近年 Am80 の持つ免疫調節作用が、各種疾患モデルを用いた検討により明らかにされている。今回我々はブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症モデルマウスを用いて、Am80 が全身性強皮症の線維化と免疫異常の病態に及ぼす影響について検討した。BLM 誘発強皮症モデルマウスでは、Am80 投与によりコントロール群と比較して皮膚線維化が有意に抑制された。また、Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける TGF- $\beta$ 1、CTGF やその他線維化を促進する各種サイトカインの産生を抑制し、皮膚における肥満細胞、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を抑制した。ヒト皮膚線維芽細胞において、Am80 は COL1A2 遺伝子の mRNA の発現を抑制し、MMP1 遺伝子の mRNA の発現を亢進させることで、I 型コラーゲン蛋白の発現量を抑制している可能性が示唆された。免疫細胞においては、BLM 誘発強皮症モデルマウスの末梢リンパ節から回収したリンパ球を解析したところ、Am80 投与群で CD4 陽性 T 細胞における IL-4、IL-17A、IFN- $\gamma$  の産生が抑制されていた。血管内皮細胞では、線維化を促す細胞接着分子である ICAM-1 の発現が Am80 により抑制された。以上より、全身性強皮症の病態において重要な役割を果たしていると考えられている線維芽細胞・免疫細胞・血管内皮細胞のそれぞれにおいて、Am80 は線維化を抑制するフェノタイプを誘導し、強力な抗線維化作用を発揮すると考えられた。今回の検討結果から、Am80 は全身性強皮症の新たな疾患修飾薬となりうる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

全身性強皮症は血管障害と線維化を特徴とする原因不明の自己免疫疾患である。強皮症患者の病変部皮膚では、炎症や血管障害により線維芽細胞が恒常的に活性化され、細胞外マトリックスの産生亢進と分解遅延を引き起こし、結果的に細胞外マトリックスが過剰に沈着する<sup>1)</sup>。

Am80 は合成レチノイドの1つであり、レチノイド受容体と結合し、レチノイン酸様作用を発揮するが、レチノイン酸や他のレチノイドと異なり、レチノイン酸受容体 (RAR) と結合するが、RAR には結合しないという特徴がある。<sup>2)</sup>そのため RAR の活性化を介する基底細胞増殖作用や炎症惹起作用を有しないと考えられている。近年 Am80 はコラーゲン誘発関節炎モデルや実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルにおいて抗炎症作用を発揮することが示された<sup>3) 4)</sup>。また、Am80 には Th17 や regulatory T cell (Treg) の分化を抑制し、Th1 の分化を促進する作用があるという報告<sup>5)</sup>や、動脈硬化モデルマウスにおいてマクロファージから産生される IL-6 を Am80 が抑制するという報告があり<sup>6)</sup>、Am80 の持つ免疫調節作用に注目が集まっている。今回我々は Am80 の持つ免疫調節作用が強皮症の病態形成を妨げ、新規治療薬の候補となる可能性を仮説として提唱し、BLM 誘発強皮症モデルマウスを用いて検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) マウス

本研究では C57BL/6 マウスを用いて作成し

た BLM 誘発強皮症モデルマウスを使用した。本研究には 6 週齢のマウスを用いた。BLM 誘発強皮症モデルマウスはブレオマイシン (BLM) (Nippon Kayaku Co. Ltd) をリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) に 1mg/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛したそれぞれのマウスの背部皮膚へ 4 週間にわたり 27 ゲージの注射針で 200 µg を連日皮下投与することで作成した。コントロールとして PBS のみを BLM と同様の方法でそれぞれマウスに投与した。解析にはそれぞれ 5-8 匹のマウスを用いた。いずれの研究も東京大学動物実験規則を遵守して行った。

### 2) Am80 の投与

Am80 (the Research Foundation ITSUU Laboratory, Tokyo, Japan) をマウス飼料 MF (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) に 50mg Am80 in 5kg MF の割合で混ぜ、約 1mg/kg/day の容量で経口投与した。コントロール群では通常の MF を投与した。

### 3) 病理組織学的検討

4 週間の Am80 の投与が終了した BLM 誘発強皮症モデルマウスから背部皮膚を採取し、一部をパラフィン包埋し、6 µm 切片を作成した。ヘマトキシリン&エオジン染色を行い、一検体中 10 箇所をランダムに選び、真皮の厚さを測定した。トルイジンブルー染色、抗マウス CD4 抗体 (BD PharMingen)、抗マウス CD8 抗体 (BD PharMingen)、抗マウス F4/80 抗体 (Serotec Inc.) を用いて免疫染色を行い、それぞれ陽性細胞数を 400 倍の倍率で一検体中 10 箇所をランダムに選び測定し、その平均値を求めた。以上の測定および検討はマウス病理に精通し

た2人の検者が盲検し、結果を平均した。また、抗 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 抗体 (BD PharMingen) 染色を行い、皮膚血管内皮細胞における染色を評価した。

#### 4) 皮膚のハイドロキシプロリン測定

ハイドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれるアミノ酸で、その量はコラーゲン量を反映する。背部皮膚検体を6mmパンチにて採取し、Total Collagen kit (QuickZyme Biosciences, Leiden, The Netherlands) を用いて測定した。

#### 5) 皮膚における各種遺伝子の mRNA 発現量の検討

各マウス皮膚より RNeasy spin column (Qiagen inc.)を用いて mRNA を抽出し、2(1)collagen (COL1A2)、matrix metalloproteinase (MMP) 13、connective tissue growth factor (CTGF)、tumor growth factor (TGF)-1、Interferon (IFN)- $\gamma$ 、tumor necrosis factor (TNF)、interleukin (IL)-4、IL-17A、IL-10、ICAM-1 の発現量を定量的 real-time PCR で測定した。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に用いた。

#### 6) 細胞培養

正常ヒト皮膚線維芽細胞は強皮症患者と年齢、性別がほぼ一致した健常人の前腕皮膚から単離、培養した。これらの検体の採取は被験者の同意および施設の承認を得た上で行った。皮膚線維芽細胞培養には10%牛胎児血清、抗生物質、抗真菌剤を添加した変法イーグル培地を使用した。室温 37℃、CO<sub>2</sub>濃度 5%に保持したインキュベーター内で単層培養し、3~7

回継代した細胞を使用した。

ヒト皮膚血管内皮細胞 (HDMECs) 培養は Lonza Ltd. (Baxel, Switzerland) より購入し、EGM BulletKit を用いて室温 37℃、CO<sub>2</sub>濃度 5%に保持したインキュベーター内で単層培養し、2~4 回継代した細胞を使用した。

#### 7) 免疫プロットティング

培養皮膚線維芽細胞から whole cell lysate を作成し、各 15  $\mu$ g の検体を 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。ニトロセルロース膜を 1 次抗体と反応させた後、horse-radish peroxidase と結合した二次抗体と反応させ、enhanced chemiluminescence で発光させた。

#### 8) 培養細胞における各種遺伝子の mRNA 発現量の検討

培養細胞から Trizol RNA Isolation Reagents (Life technologies)を用いて全 RNA を抽出した。cDNA の合成には ReverTra Ace qPCR MasterMix (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用した。定量的 real-time PCR には THUNDERBIRD qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いた。

#### 9) intracellular cytokine staining

前述と同様の方法で BLM、Am80 を 7 日間投与したマウスを作成し、翌日腋窩リンパ節、鼠径リンパ節を採取した。リンパ節からリンパ球を回収し、1  $\mu$ g/ml の brefeldin A (GolgiStop; BD Pharmingen) 存在下で 10 ng/ml の PMA と 1  $\mu$ g/ml の ionomycin (Sigma-Aldrich)にて 4 時間刺激した。その後細胞を FACS buffer (1% ウシ胎児血清含有 PBS)により洗浄し、細胞表面を CD4 にて染色

した。サンプルを fixative/permeabilization buffer (BD Pharmingen) にて処理し、anti-IL-4(11B11), anti-IL-17A(TC11.18H10) and anti-IFN- $\gamma$  (XMG1.2; all from BioLegend) にて染色を行った。細胞を洗浄後、FACS Verse flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) にて解析を行った。

#### 10) 統計学的解析

2 郡間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。p<0.05 を有意とした。

なお、患者検体の取り扱いには、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。

### C. 研究結果

#### 1) Am80 は BLM による皮膚硬化を減弱する

BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、Am80 は皮膚硬化を有意に抑制した。同様に、Am80 は皮膚におけるヒドロキシプロリン産生量も有意に抑制した。(図1)。

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、Am80 は COL1A2 遺伝子の mRNA の発現量を抑制し、MMP13 遺伝子の mRNA の発現量を亢進させた。また、TGF  $\beta$  1、CTGF 遺伝子の mRNA の発現量は Am80 により抑制された(図2)。

#### 2) 皮膚線維芽細胞において Am80 は抗線維化作用を示す

TGF  $\beta$  1 にて刺激した正常ヒト皮膚線維芽細胞において、Am80 は COL1A2 遺伝子の mRNA の発現量を抑制し、MMP13 遺伝子の mRNA 発現量を亢進させた。また、TGF  $\beta$  1 にて刺激した正常皮膚線維芽細胞において、Am80 は I 型コラーゲン蛋白の発現量を抑制した(図3)。

#### 3) Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮

膚において、各種サイトカインの発現量を調節することにより皮膚硬化の減弱に寄与する

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚におけるサイトカインの発現量について検討したところ、Am80 投与により TNF  $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、MCP-1、ICAM-1、IL-4、IL-17A、IL-10 の mRNA の発現量が有意に抑制された(図4、6)。

#### 4) Am80 は CD4 陽性 T 細胞からの IL-4、IL17A、IFN $\gamma$ の産生を抑制する

末梢リンパ節から回収した細胞を FACS にて解析した。Am80 投与によって、IL-4 産生 CD4 陽性 T 細胞、IL-17A 産生 CD4 陽性 T 細胞、IFN  $\gamma$  産生 CD4 陽性 T 細胞の CD4 陽性 T 細胞全体に対する割合は低下した(図5)。

#### 5) Am80 は皮膚血管内皮細胞における ICAM-1 発現を抑制する

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において抗 ICAM-1 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、BLM 投与群で皮膚微小血管内皮細胞における ICAM-1 蛋白の発現量がコントロール群に比して亢進していた。また、この発現亢進は Am80 投与で抑制された(図6) また、HDMECs では TNF  $\alpha$  によって ICAM-1 遺伝子の mRNA の発現量が亢進したが、その効果は Am80 投与により有意に抑制された(図6)。

#### 6) Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚における炎症細胞の浸潤を抑制する

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚にはコントロール群と比較して、肥満細胞、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の浸潤が亢進していたが、Am80 はこれらの炎症細胞の浸潤を抑制した(図6)。

## D. 考案

急性前骨髄性白血病治療薬であるレチノイド Am80 は、細胞の分化、増殖に作用するだけでなく、その免疫調節作用も近年注目されている。コラーゲン誘発関節炎モデルに対してレチノイン酸は有効性がなかったのに対し、Am80 は有効性が認められたという報告もあるように、レチノイン酸やその他のレチノイドと異なる作用を持つ可能性が示唆されている。しかしながら、自己免疫疾患の一つである全身性強皮症に対する Am80 の効果に関しては、現在まで検討されていない。今回の我々の研究では、Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスが呈する皮膚硬化、免疫異常を抑制する効果を示した。また皮膚線維芽細胞を用いて Am80 が抗線維化作用を持つことを示した。これにより Am80 は直接線維芽細胞に作用するとともに、免疫学的な異常を改善することで強皮症モデルマウスに見られる線維化を抑制することが示唆された。

皮膚線維芽細胞において、Am80 は COL1A2 遺伝子の mRNA の発現を抑制すると同時に、MMP1 遺伝子の mRNA の発現を亢進させた。その詳細な機序は不明であるが、複数の線維化関連遺伝子の発現を修飾して抗線維化作用を発揮していることから、線維化関連の重要な転写因子に対して作用してその効果を発揮している可能性が示唆される。今後、その詳細に機序に関して検討予定である。

強皮症においては TGF- $\beta$ 1 や CTGF といった線維化を促進する成長因子の発現亢進が皮膚硬化の一因と考えられている。<sup>7) 8) 9)</sup> Am80 は BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、

これらの mRNA の発現量を抑制した。強皮症の皮膚において肥満細胞が重要な TGF- $\beta$ 1 の産生源であることが知られているが、BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて Am80 投与で皮膚における肥満細胞の浸潤が抑制されることが示された。Am80 がこれらの作用を介して CTGF、TGF- $\beta$ 1 の産生を抑制することが、皮膚硬化を抑制する一つの要因となる可能性が示唆された。

次に強皮症の病態に重要と考えられているサイトカインおよび免疫細胞について検討した。強皮症において、MCP-1<sup>10)</sup>、TNF- $\alpha$ <sup>11)</sup>、IFN- $\gamma$ 、IL-4<sup>12)</sup>、IL-17、IL-10<sup>13)</sup> はその病態への関与が指摘されており、患者血清、または病変皮膚におけるこれらサイトカイン濃度が上昇していると言われている<sup>14) 15)</sup>。BLM 誘導強皮症モデルマウス皮膚において、Am80 はこれらサイトカインの mRNA の発現量を抑制した。T 細胞は強皮症の病態において重要な働きをされると考えられている。初期の炎症期には Th2 優位な状態となり、IL-4、IL-13 といったサイトカイン産生が亢進して皮膚線維化が促されるが、萎縮期になると Th1 優位の状態となり、皮膚硬化が減弱する要因の一つとして作用すると考えられている<sup>16)</sup>。BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいても Th2 関連のサイトカインが上昇することが報告されている。また、近年 IL-17A と SSc の病態との関連が示唆されている<sup>17) 18)</sup>。そこで Am80 が BLM 誘導強皮症モデルマウスのリンパ節由来の T 細胞を用いて検討したところ、CD4 陽性 T 細胞において IL-4、IL-17A、IFN- $\gamma$  の産生が抑制されており、その抑制は特に IL-4 に対して強く働い

ていることが明らかとなった。このことより Am80 は T 細胞を Th2、TH17 から Th1 優位にシフトさせ、それにより皮膚硬化を減弱する可能性があることが示唆された。

血管内皮細胞における細胞接着分子の発現に関しても、Am80 投与により線維化を促す細胞接着因子と考えられている ICAM-1<sup>19)</sup> 20) の発現が抑制された。HDMECs において TNF 依存性に誘導された ICAM-1 遺伝子の発現が、Am80 により有意に抑制されたことから、TNF

など炎症性サイトカインの発現抑制を介した間接的な作用のみでなく、Am80 が直接的に皮膚血管内皮細胞に作用して ICAM-1 産生を抑制している可能性が示唆された。Am80 による ICAM-1 発現抑制は、皮膚における肥満細胞、マクロファージといった炎症細胞の浸潤の抑制の一因となっていると考えられ、皮膚硬化の抑制に寄与している可能性が考えられた。

今回我々は BLM 誘導強皮症モデルマウスを用いて、レチノイド Am80 が強皮症の皮膚硬化と免疫異常に及ぼす影響を検討した。Am80 は皮膚線維芽細胞に直接作用し、抗線維化作用を示すのみならず、免疫異常や血管内皮細胞の異常を改善することで、間接的に抗線維化作用を示している可能性が示唆された。今後はマクロファージなど他の免疫担当細胞についての検討や、他の強皮症モデルマウスを用いた検討を行う予定である。

## E. 結論

Am80 投与によって、BLM 誘導強皮症モデルマウスにおいて、線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞それぞれで線維化を抑制するフェ

ノタイプを呈し、線維化が抑制されることが示唆された。

## F. 文献

1. Asano Y. Future treatments in systemic sclerosis. *The Journal of dermatology*. 2010;37:54-70.
2. Miwako I, Kagechika H. Tamibarotene. *Drugs of today*. 2007;43:563-8.
3. Nagai H, Matsuura S, Bouda K, Takaoka Y, Wang T, Niwa S, et al. Effect of Am-80, a synthetic derivative of retinoid, on experimental arthritis in mice. *Pharmacology*. 1999;58:101-12.
4. Klemann C, Raveney BJ, Klemann AK, Ozawa T, von Horsten S, Shudo K, et al. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology*. 2009;174:2234-45.
5. Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Murakami Y, Ishido M, Miyasaka N, et al. The effect of synthetic retinoid, Am80, on T helper cell development and antibody production in murine collagen-induced arthritis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*.

- 2010;20:244-51.
6. Takeda N, Manabe I, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Kagechika H, et al. Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:1177-83.
  7. Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Co-localization of transforming growth factor beta 2 with alpha 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86:917-22.
  8. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *The Journal of rheumatology*. 2000;27:149-54.
  9. Takehara K. Growth regulation of skin fibroblasts. *Journal of dermatological science*. 2000;24 Suppl 1:S70-7.
  10. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clinical and experimental immunology*. 1999;117:159-65.
  11. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis. *The Journal of rheumatology*. 1997;24:663-5.
  12. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1997;24:328-32.
  13. 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. *Journal of dermatological science.* 2001;27:140-6.
14. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, et al. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PLoS one.* 2009;4:e5903.
  15. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L, et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis research & therapy.* 2009;11:R147.
  16. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *The Journal of rheumatology.* 2006;33:275-84.
  17. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism.* 2012;64:3726-35.
  18. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *Journal of immunology.* 2012;188:3573-83.
  19. Matsushita Y, Hasegawa M, Matsushita T, Fujimoto M, Horikawa M, Fujita T, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *Journal of immunology.* 2007;179:698-707.
  20. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, et al. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *Journal of immunology.* 2010;185:2502-15.
- G. 研究発表**
1. 論文発表  
なし
  2. 学会発表  
Tetsuo Toyama, Yoshihide Asano,

Shinichi Sato, Takafumi Kadono et al.:  
 Synthetic retinoid Am80 ameliorates  
 dermal fibrosis and immune  
 abnormalities of bleomycin-treated  
 mice  
 第 4 1 回日本臨床免疫学会総会 2013.10

H. 知的財産権の出願・登録状況  
 なし

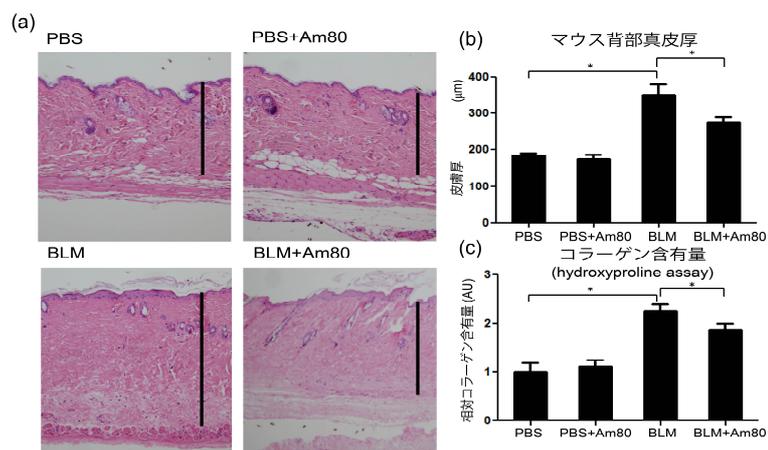


図 1 : (a)(b)BLM 投与後の皮膚組織像(HE 染色)および真皮の厚さに関する検討。

Am80 投与群で BLM による皮膚線維化が有意に減弱した (\*P<0.05)。

(c) BLM 投与後のヒドロキシプロリン量の検討。

Am80 投与群で有意に低下していた (\*P<0.05)。

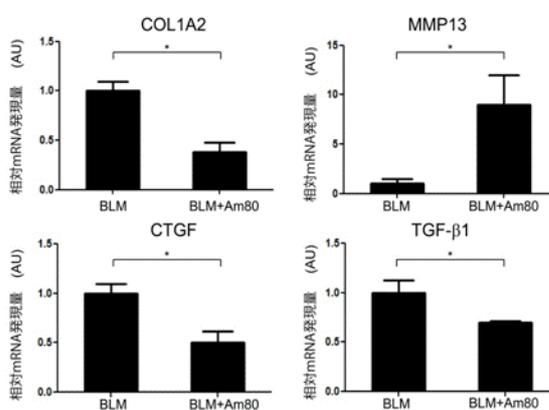


図 2 : BLM 誘導強皮症モデルマウスの皮膚における線維化に関連する各種遺伝子の mRNA の発現量に関する検討。

Am80 投与により COL1A2 遺伝子の mRNA 発現量は低下し、MMP13 遺伝子の mRNA 発現量は亢進した。

CTGF 遺伝子、TGF-β1 遺伝子の mRNA の発現量は Am80 投与で抑制された (\*P<0.05)。

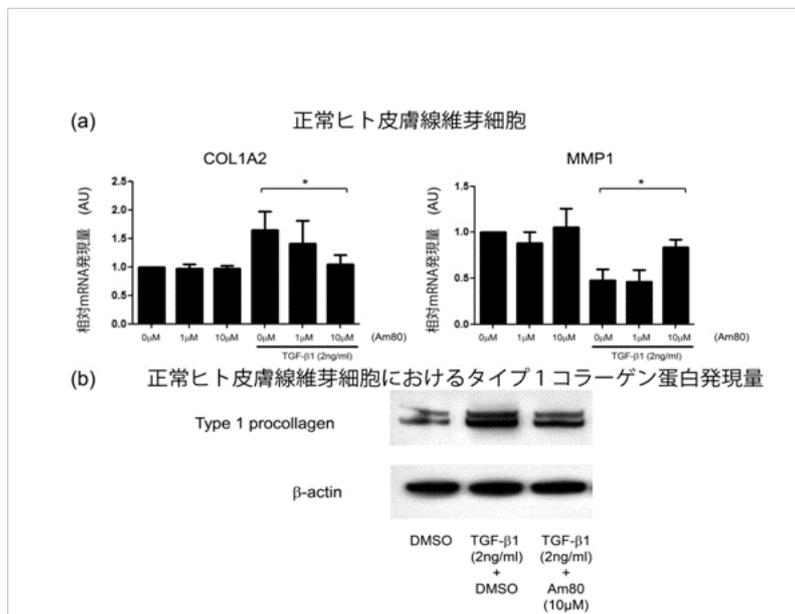


図3 : (a) TGF-β1 刺激で活性化した正常ヒト皮膚線維芽細胞における COL1A2、MMP1 遺伝子の mRNA の発現量に関する検討。

Am80 により、COL1A2 遺伝子の mRNA 発現量は用量依存性に抑制され、MMP1 遺伝子の mRNA の発現量は用量依存的に亢進した (\*P<0.05)。

(b) I 型コラーゲン蛋白の発現量に関する検討。

I 型コラーゲン蛋白の発現量は Am80 で抑制された。

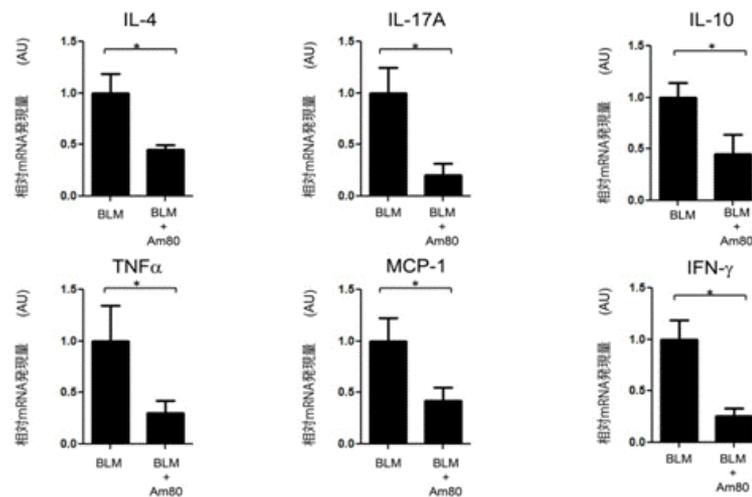


図4 : BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚におけるサイトカイン・ケモカインの発現異常に対する Am80 の作用に関する検討。

IL-4, IL-17A, IL-10、IFN-γ、TNF-α、MCP-1 について検討したところ Am80 によりその発現が抑制された (\*P<0.05)。

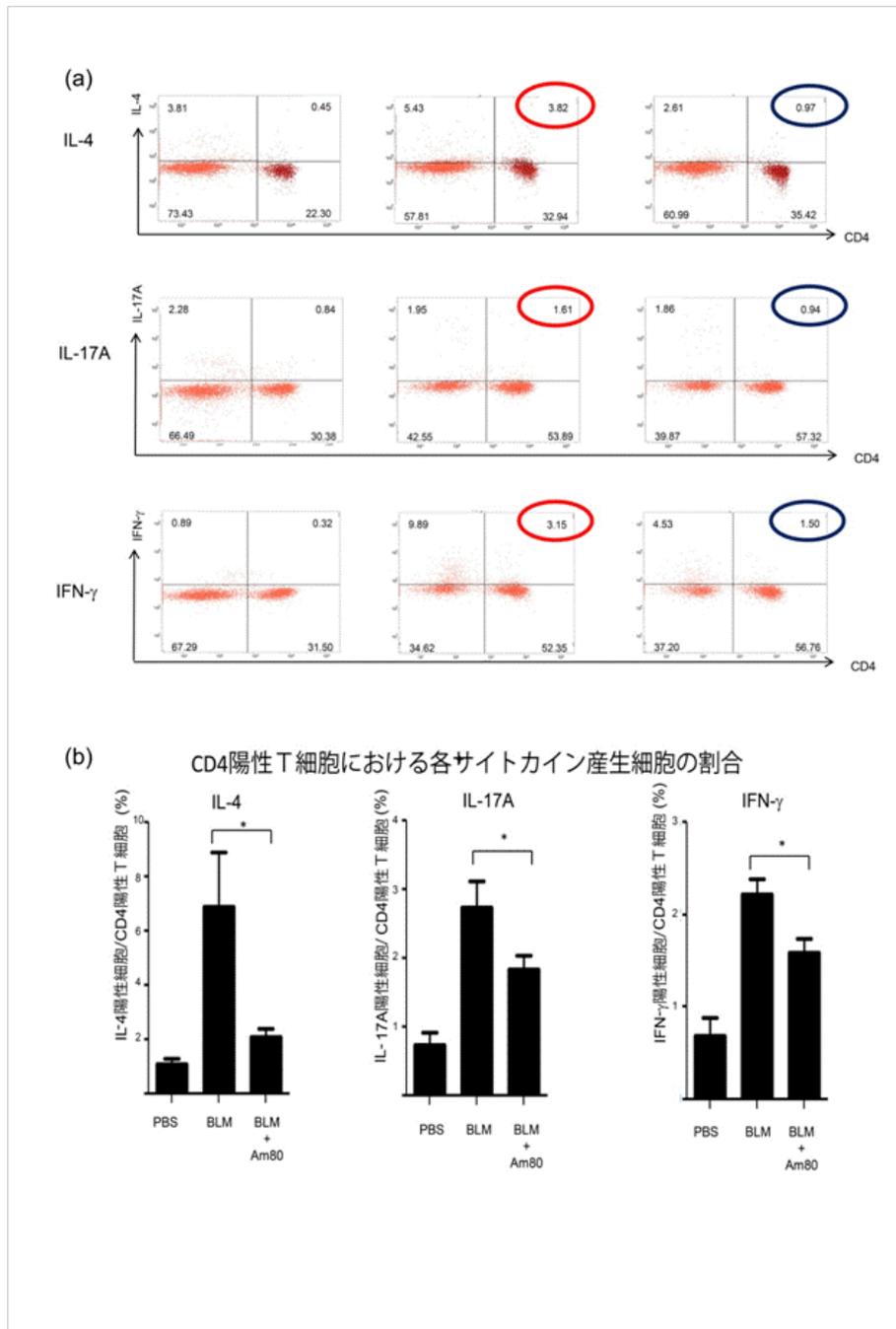


図 5 : (a)(b) CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカイン産生に対する Am80 の作用。

BLM 投与開始後、7 日目に末梢リンパ節からリンパ球を回収した後、CD4 と各種サイトカインをそれぞれ細胞表面免疫染色、細胞内免疫染色し、FACS を用いて解析した。Am80 投与により、CD4 陽性 T 細胞における IL-4、IL-17A、IFN-γ 産生細胞の割合は減少した (\*P<0.05)。

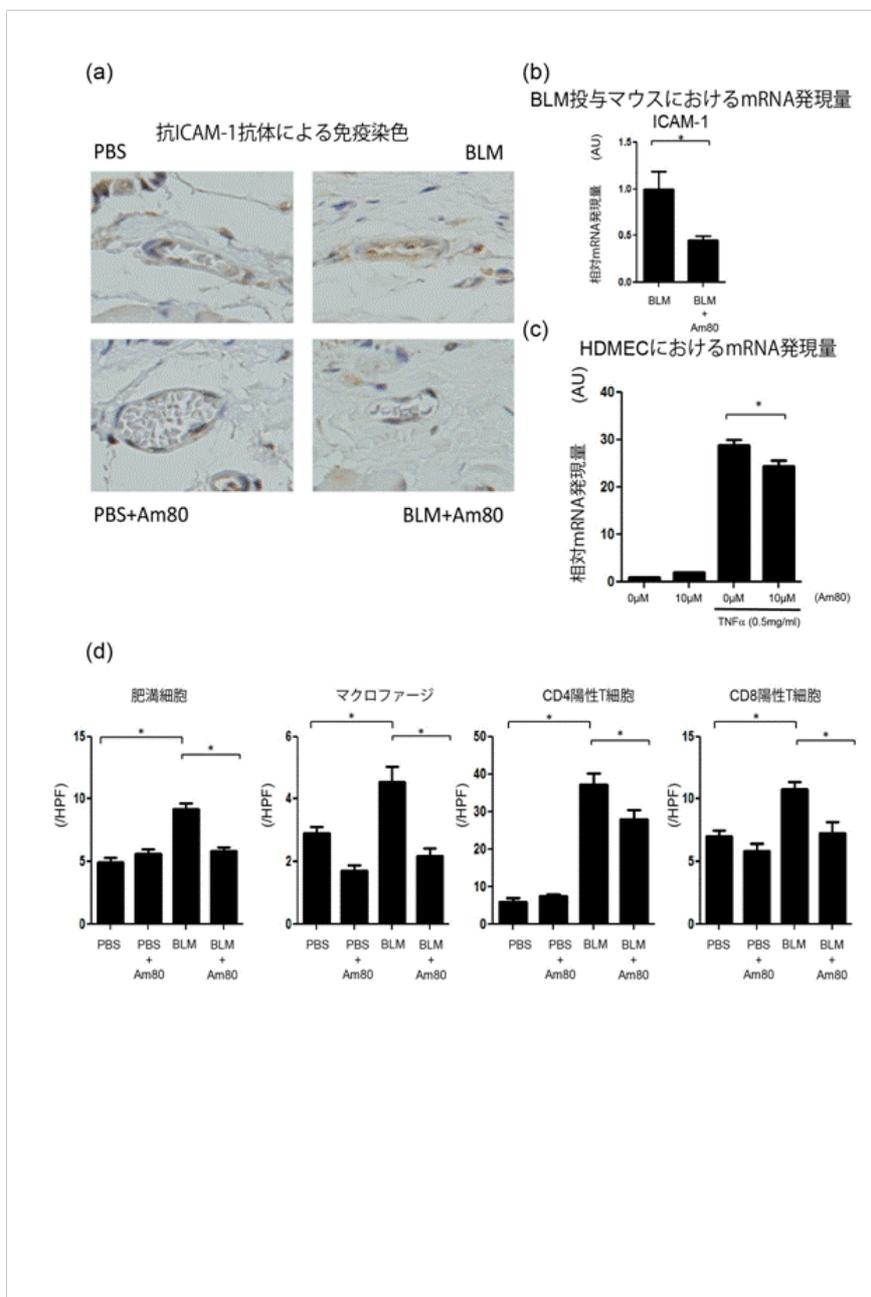


図6：(a)皮膚血管内皮細胞におけるICAM-1蛋白の発現量に関する検討。

Am80は、BLM誘発強皮症モデルマウスの皮膚血管内皮細胞におけるICAM-1発現を抑制した。

(b) BLM誘発強皮症モデルマウスの皮膚におけるICAM-1遺伝子のmRNAの発現量に関する検討。

Am80投与でICAM-1遺伝子のmRNAの発現量が抑制された(\* $P < 0.05$ )。

(c) TNF刺激で活性化したヒト皮膚血管内皮細胞に対するAm80の作用に関する検討。

Am80投与でICAM-1遺伝子のmRNAの発現量は抑制された(\* $P < 0.05$ )。

(d) BLM1週間投与したマウス皮膚における炎症細胞浸潤数の計測。

Am80投与により肥満細胞、マクロファージ、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞の皮膚への浸潤が抑制された(\* $P < 0.05$ )。

## TGF- 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

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
協力者	樋口智昭	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター	臨床修練生
協力者	高木香恵	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター	講師
協力者	板本明子	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター	助教
協力者	大田ゆう子	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター	助教

### 研究要旨

種々の疾患モデルにおいて、sGC-cGMP 経路の増強が線維化を抑制すると報告されており、cGMP 分解抑制作用を有する PDE5 阻害薬は、全身性強皮症の線維化病変を改善する可能性がある。今回我々は、TGF- 1 刺激下におけるシルデナフィルの作用に関し、正常成人及び強皮症由来皮膚線維芽細胞を用いて *in vitro* で検討を行った。免疫細胞染色で皮膚線維芽細胞での PDE1A 及び PDE5A の発現を確認した。細胞内 cGMP 濃度は EIA キットを用いて測定した。皮膚線維芽細胞に対し、TGF- 1 刺激下で種々の濃度のシルデナフィルを添加した。total RNA を回収し、quantitative real time PCR 法で mRNA 発現を評価した。強皮症由来皮膚線維芽細胞では TGF- 1 単独投与群に比べ、TGF- 1+シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で有意に *COL1A1*, *COL1A2*, *CTGF* 発現の抑制が認められた。一方正常皮膚線維芽細胞群でも同様の傾向が認められたが、有意差は認めなかった。*ACTA2* については、正常皮膚線維芽細胞、強皮症由来皮膚線維芽細胞、両者ともに、TGF- 1+シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で著明に発現が減少した。シルデナフィルは、TGF- 1 刺激で活性化された皮膚線維芽細胞の線維化作用を抑制し、さらに、強皮症由来皮膚線維芽細胞でより強い効果が認められた。

### A. 研究目的

活性化した線維芽細胞による過剰なコラーゲン産生及び細胞外マトリックス調節異常は、全身性強皮症の線維化における病態形成において重要な役割を有する。

近年、sGC-cGMP 経路の増強が血管平滑筋弛緩作用のみならず、抗線維化作用を有する可能性が示唆されている。そこで我々は、cGMP 分解抑制作用を有する PDE5 阻害薬にも同様の効果があると考え、TGF- 1 刺激下にお

けるシルデナフィルの作用に関し、正常成人及び強皮症由来皮膚線維芽細胞を用いて *in vitro* で検討を行った。

### B. 研究方法

全身性強皮症患者より採取した皮膚生検検体から分離した皮膚線維芽細胞及び、購入した正常成人皮膚線維芽細胞を用いた。採取した検体の研究目的での使用に関しては、患者から文章で同意を得た。

免疫細胞染色で皮膚線維芽細胞での PDE1A 及び PDE5A の発現を確認した。細胞内 cGMP 量は EIA キットを用いて測定した。10% Fetal bovine serum (FBS) を添加した Dulbecco 's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて皮膚線維芽細胞を培養し、subconfluent に達した後、無血清培地で 24 時間培養した。正常皮膚線維芽細胞と強皮症由来皮膚線維芽細胞を control (C) 群、TGF- $\beta$ 1 (T) 投与群、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 1  $\mu$ M (T+S1) 投与群、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 10  $\mu$ M (T+S10) 投与群、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 100  $\mu$ M (T+S100) 投与群に分け、それぞれの濃度の薬剤を添加し、TGF- $\beta$ 1 により活性化した皮膚線維芽細胞に対するシルデナフィルの効果について検討を行った。

TGF- $\beta$ 1 添加 48 時間、72 時間後に皮膚線維芽細胞より total RNA を抽出し、逆転写後 quantitative real time RT-PCR 法を用いて *GAPDH* を control とし、*COL1A1*、*COL1A2*、*CTGF*、*ACTA* mRNA の発現解析を行った。

統計学的解析は、分散分析法 (ANOVA) 及び Student 's *t* 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## C. 研究結果

図 1 に示す通り、皮膚線維芽細胞の PDE1A 及び PDE5A の発現が認められた。正常皮膚線維芽細胞と強皮症由来皮膚線維芽細胞両群の細胞内 cGMP 濃度の比較を行ったが、有意差はなかった。また、シルデナフィル添加により、用量依存的に細胞内 cGMP 濃度が上昇した (図 2)。研究方法で示した各群の *COL1A1*、*COL1A2*、

*CTGF*、*ACTA2* 発現量の比較を行った (図 3)。強皮症由来皮膚線維芽細胞では TGF- $\beta$ 1 単独投与群に比べ、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で有意に *COL1A1*、*COL1A2*、*CTGF* 発現抑制が認められた。一方正常皮膚線維芽細胞でも同様の傾向が認められたが、有意差はなかった。*ACTA2* については、正常皮膚線維芽細胞、強皮症由来皮膚線維芽細胞、両者ともに、TGF- $\beta$ 1 + シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で著明に発現が減少した。

## D. 考案

全身性強皮症における、sGC-cGMP 経路の増強による抗線維化作用については、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 刺激薬である BAY 41-2272 を用いた報告がある [1]。cGMP が下流に存在する PKG を活性化し、活性化 PKG によるさまざまなシグナル伝達系抑制が機序として推察されている [2] が、その詳細なメカニズムについては明らかでない。細胞内 cGMP 濃度上昇が持続することにより、抗線維化作用を示すのではないかと考えられるが、sGC-cGMP 経路は繊細な活性調節機構を有しており、活性化 PKG はネガティブフィードバック作用により、cGMP の分解酵素である PDE5 の活性を上昇させ、増加した細胞内 cGMP 濃度は分解される。そのため、PDE5 活性を阻害することが、細胞内 cGMP 濃度上昇を持続させる上で最も有効ではないかと推察している。

PDE5 阻害薬であるシルデナフィルは、種々の疾患モデルにおいて抗線維化作用を有することが報告されている。はじめに我々は、免疫細胞染色で皮膚線維芽細胞が PDE1A、PDE5A

両者ともに陽性であることを確認したが、シルデナフィルは PDE5A 阻害作用だけでなく、わずかではあるが PDE1A 阻害作用も有するため、*in vitro* では両者に対する効果があるのではないかと考えられた。すなわち、PDE5A は cGMP 分解作用のみを有するが、PDE1A は cGMP、cAMP 両者の分解作用を有するため、シルデナフィルは細胞内 cGMP、cAMP 濃度をともに上昇させる可能性がある。シルデナフィルの用量依存的な細胞内 cGMP 濃度上昇効果は確認したが、cAMP 濃度上昇効果があるのか、また、そもそも細胞内 cGMP 濃度上昇が抗線維化作用を有するかどうかについては、過去の報告はあるが[3]、一定した見解がないため、今後の課題である。

TGF- $\beta$  1 で刺激した皮膚線維芽細胞に対するシルデナフィルの抗線維化作用を、正常成人皮膚線維芽細胞及び強皮症由来皮膚線維芽細胞を用いて検討したところ、シルデナフィル 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M では十分な効果を示さなかったが、100  $\mu$ M で COL1A1、COL1A2、CTGF、ACTA2 の有意な発現低下が認められた。シルデナフィルを 100 mg/日内服した場合の血中濃度が 1  $\mu$ M 未満と考えられており、100  $\mu$ M に達する投与量を連日投与するというのは現実的ではないが、Drug Delivery System(DDS)の応用等で効率的に病変部の薬剤濃度を上げることができれば、強皮症でみられる線維化、血行障害両者を改善することによる、相加相乗効果が期待できる。今回の検討では、強皮症由来皮膚線維芽細胞は正常成人皮膚線維芽細胞に比べ、より強いシルデナフィルの抗線維化作用が認められた。ベースラインの細胞内

cGMP 濃度が強皮症由来皮膚線維芽細胞で低いことが理由として考えられたが、差を認めなかった。別の理由として、細胞内 cGMP 濃度上昇効果が健常成人に比べ強皮症で強いのではないかということが考えられるが、今後の検討が必要である。

## E. 結 論

TGF- $\beta$  1 刺激下におけるシルデナフィルの作用に関し、正常成人及び強皮症由来皮膚線維芽細胞を用いて *in vitro* で検討を行った。皮膚線維芽細胞での PDE1A 及び PDE5A の発現を確認した。強皮症由来皮膚線維芽細胞では TGF- $\beta$  1 単独投与群に比べ、TGF- $\beta$  1+シルデナフィル 100  $\mu$ M 投与群で有意に COL1A1、COL1A2、CTGF、ACTA2 発現が抑制された。一方正常皮膚線維芽細胞群でも同様の傾向があったが、有意差を認めなかった。シルデナフィルは TGF- $\beta$  1 刺激で活性化された皮膚線維芽細胞の線維化作用を抑制し、さらに、強皮症群でより強い効果が認められた。

## F. 文 献

1. Beyer C, Reich N, Schindler SC, Akhmetshina A, Dees C, Tomcik M, Hirth-Dietrich C, et al.: Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 1019-26
2. Takimoto E. Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ J* 2012; 76: 1819-25
3. Stratton R, Shiwen X, Martini G, Holmes

A, Leask A, Haberberger T, et al.  
Iloprost suppresses connective tissue  
growth factor production in  
fibroblasts and in the skin of  
scleroderma patients.  
J Clin Invest 2001; 108: 241-50

## **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: 皮膚線維芽細胞における PDE1A 及び PDE5A の発現

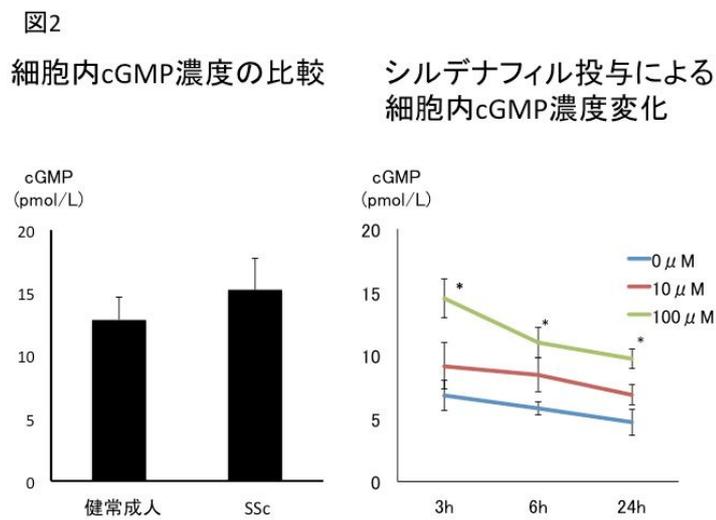


図2: (左) 通常時の正常成人皮膚線維芽細胞と強皮症由来皮膚線維芽細胞の細胞内 cGMP 濃度  
(右) シルденаフィル投与による細胞内 cGMP 濃度の変化

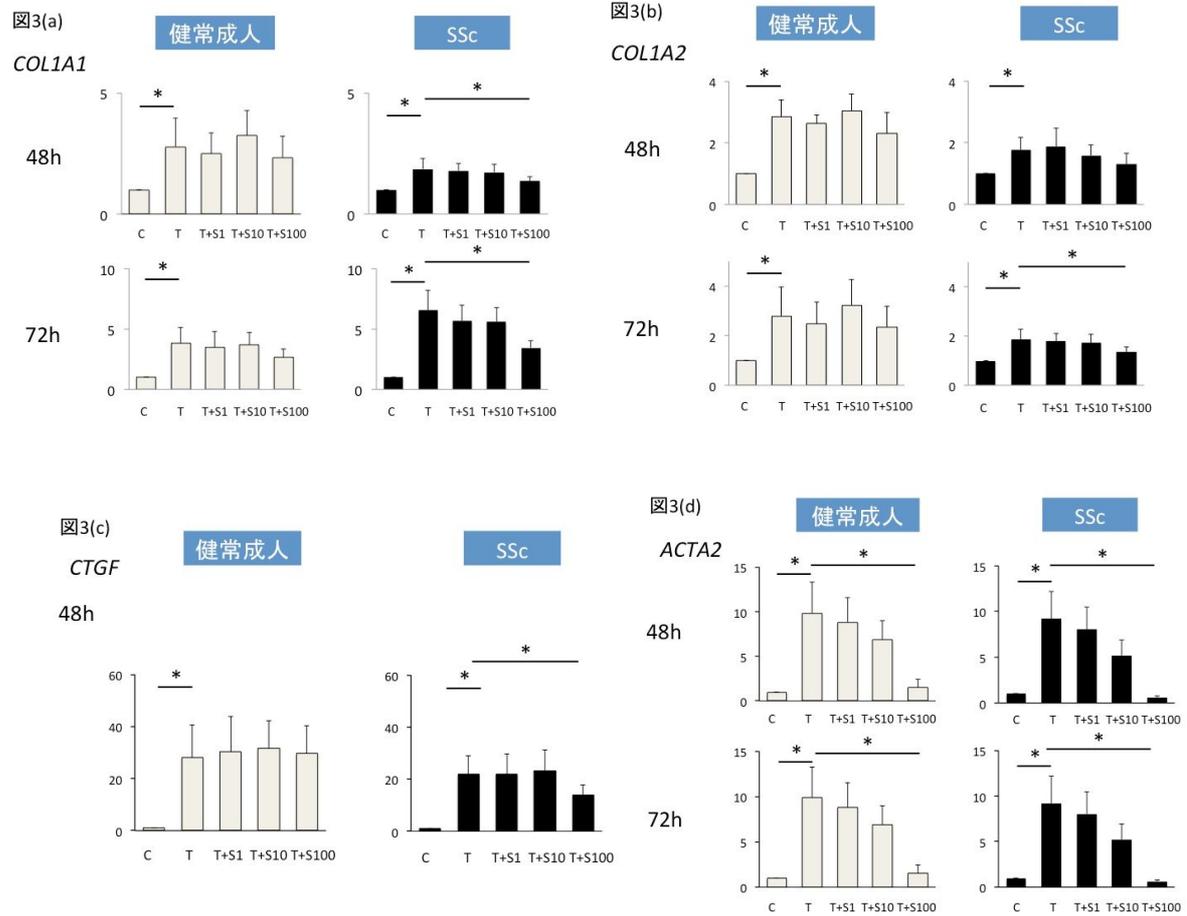


図 3:TGF- 1 刺激下におけるシルデナフィルの各種 mRNA 発現量に対する効果

(a) COL1A1 (b) COL1A2 (c) CTGF (d) ACTA2

## 強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの抑制性制御

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 **横山洋子** 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

### 研究要旨

アペリンは、主に血管新生、心機能、脂肪細胞機能などを制御する分子として知られていたが、近年、線維化への関与も報告されている。強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの役割を解明することを目的として検討した。強皮症由来線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下していた。アペリンの発現は TGF- $\beta$  刺激によって抑制されることも明らかにし、強皮症由来線維芽細胞におけるアペリンの発現低下は TGF- $\beta$  シグナルの亢進による可能性が示唆された。次に、アペリンの線維化への影響をみるため、アペリンの発現を抑制する方法とアペリンを添加する2種類の方法によって検討した。その結果、siRNA法によるアペリンの発現抑制は、正常ヒト線維芽細胞の SMA の発現を亢進させた。一方、TGF- $\beta$  刺激による SMA, 1型コラーゲン, TIMP-1, SPHK1 の発現亢進はアペリンの添加によって抑制された。これらの結果より、アペリンは、TGF- $\beta$  刺激による SMA, 1型コラーゲン, TIMP-1, SPHK1 の発現亢進に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

アペリンは、主に血管内皮細胞、脂肪細胞から産生され、受容体である APJ に結合し、下流にシグナルを伝えて、主に血管新生、心臓機能、脂肪細胞機能などを制御する。APJ は、広く発現しているが、特に血管内皮細胞、平滑筋細胞に多く発現している。アペリンによる血管新生、血管機能の制御については、血管内皮細胞や周皮細胞から分泌されたアペリンが、血管内皮細胞上の APJ に結合し、血管径を拡大させ、血流量を増大させることが明らかとなっている。胎生期アペリントランスジェニックマウスでは血管径が拡大し、胎生期のアペリン K0 マウスでは血管径と血流量の低下が見られた[1,2]。

アペリンと肺高血圧症についても知られており、肺高血圧症患者の肺血管内皮細胞におけるアペリンの発現は低下しており、アペリンの低下によって、microRNA が抑制され、FGF2 や FGF レセプター-1 の発現が亢進し、血管平滑筋細胞や内皮細胞の増殖が起こるという報告[3]や、アペリン K0 マウスでは低酸素誘導性の肺高血圧症が増悪し[4]、肺高血圧症患者の血清中アペリンが低下している等の報告[5]がある。これらの結果から、アペリンの発現低下が肺高血圧症の病態（血管平滑筋細胞と内皮細胞の増殖亢進）に関与していると考えられる。

アペリンと線維化に関しては、アペリン K0 マウスでは血管狭窄によって誘導される心臓

の線維化が野生型と比べて亢進するという結果から アペリンが線維化を抑制するという報告[6,7]と、肝臓の線維化が亢進するという相反する報告[8]がある。アペリンと強皮症については、強皮症患者の血清中アペリンは、正常人と比べて差はないが、早期の強皮症患者の血清中アペリンは高値であり、発症から10年以上経過した患者においては、肺高血圧症や皮膚潰瘍といった血管病変を有する患者の血清中アペリンは血管病変がない患者に比べると高いとの報告がある[9]。しかし強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの役割は明らかになっていない。そこで、強皮症の皮膚線維化におけるアペリンの役割を解明することを目的に検討した。

## 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5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康人7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と蛋白量の評価

mRNA量の評価はreal time PCR法を、蛋白量はELISA法を用いて測定した。

### 3) siRNA法

対象siRNAないしアペリンsiRNAを線維芽細胞にトランスフェクションし、24時間後に実験を行った。

## C. 研究結果

### 強皮症と正常ヒト皮膚由来線維芽細胞のアペリン/APJ発現量の比較 (図1)

はじめに、強皮症と正常ヒト由来皮膚線維芽細胞を培養し、アペリンとAPJの発現量を比較した。強皮症では、正常に比べ、アペリンの発現が有意に低下していた。APJには有意な発現変化はなかった。また、線維化に参与するSMA、1型コラーゲン、TIMP-1の産生量を定量し、強皮症由来線維芽細胞でいずれの産生量も増加していることを確認した。

### アペリン siRNAによる正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響 (図2)

次に、強皮症線維芽細胞でみられたアペリンの発現低下が線維化に参与しているかどうか検討するために、RNAi法によってアペリンの発現を抑制して、線維化への影響について検討した。

まず、正常ヒト皮膚由来線維芽細胞において、siRNA法でアペリンの産生が8割程度抑制されることを確認した。アペリンの発現抑制により、SMAの発現が有意に亢進した。1型コラーゲンとTIMP-1の発現も亢進する傾向が見られた。CTGFの発現に変化はみられなかった。これらの結果より、アペリンはSMAの発現を抑制する可能性が示唆された。

### アペリン添加による正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響 (図3)

アペリンがSMAの発現を抑制するかどうかをさらに検討するために、線維芽細胞にアペリンを添加してその抑制効果について検討

した。アペリンを添加してから 1 時間後に TGF- $\beta$  で刺激し、SMA の発現量をリアルタイム PCR で解析した。その結果、TGF- $\beta$  刺激によって亢進した SMA の発現量は、アペリンの添加によって、濃度依存性に抑制された。また、TGF- $\beta$  刺激によって亢進した 1 型コラーゲンと TIMP-1 の発現量も、アペリンの添加によって、濃度依存性に抑制された。

次に、TGF- $\beta$  刺激によるアペリンの発現量を検討したところ、TGF- $\beta$  刺激によって、アペリンの発現量が有意に低下した。

これらの結果より、TGF- $\beta$  刺激によってアペリン産生は低下し、アペリンの添加によって、SMA の発現が抑制される可能性が示唆された。

次に、TGF- $\beta$  はスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) を介して SMA や TIMP-1 を誘導することが報告されていることから [10,11]、SPHK1 の発現についても検討した。その結果、TGF- $\beta$  刺激によって亢進した SPHK1 の発現は、アペリンの添加によって濃度依存性に抑制された。これらの結果より、アペリンは、TGF- $\beta$  刺激による SMA, 1 型コラーゲン, TIMP-1 の発現亢進に対して、SPHK1 の発現制御を介して抑制的に働いている可能性が示唆された。

## D. 考案

アペリンが心臓の線維化を亢進させることや、肺高血圧症の血管周囲の線維化に関与することが報告されているが、皮膚における線維化における役割は明らかになっていない。今回、我々は強皮症患者皮膚線維芽細胞を用いて検討を開始した。その結果、強皮症由来

線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下していた。一方、APJ の発現量には変化なかった。アペリンの発現は TGF- $\beta$  刺激によって抑制されることを明らかにしたことから、強皮症由来線維芽細胞におけるアペリンの発現低下は TGF- $\beta$  シグナルの亢進による可能性が示唆された。また、TGF- $\beta$  シグナルの亢進によるアペリンの抑制が、皮膚の線維化だけではなく、強皮症の血管異常や肺高血圧症と関連する可能性も示唆される。

アペリンの線維化への抑制性制御を解明するために、正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。アペリンの線維化への影響をみるために、アペリンの発現を抑制する方法とアペリンを添加する 2 種類の方法によって検討した。その結果、siRNA 法によるアペリンの発現抑制によって、正常ヒト線維芽細胞の SMA の発現が亢進し、1 型コラーゲンと TIMP-1 の発現は増加傾向がみられた。また、TGF- $\beta$  刺激による SMA, 1 型コラーゲン, TIMP-1 の発現亢進は、アペリンの添加によって抑制された。さらに、TGF- $\beta$  刺激による SPHK1 の発現亢進は、アペリンの添加によって抑制された。これらの結果より、アペリンは、TGF- $\beta$  刺激による SMA, 1 型コラーゲン, TIMP-1 の発現亢進に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。また、その機序には SPHK1 の発現制御を介している可能性が示唆された。

今回の研究によって、アペリンが、TGF- $\beta$  刺激による SMA, 1 型コラーゲン, TIMP-1 の発現亢進に対して抑制的に働くことを明らかにした。一方、アペリンの発現は TGF- $\beta$  シ

グナルによって抑制されることも示した。これらの結果より、アペリン/APJ シグナルと TGF- $\beta$  シグナルは互いに抑制しあう可能性が示唆された。

## E. 結論

今回の研究によって、アペリンが、TGF- $\beta$  刺激による線維化に対して抑制的に働くこと、アペリンの発現は TGF- $\beta$  シグナルによって抑制されることを明らかにした。強皮症由来線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下していたことから、強皮症の皮膚線維化の機序の一部にアペリンが関連する可能性が示唆された。

## F. 文献

1. Kidoya H, et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 2008; 27: 522-34.
2. Kidoya H et al. Biology of the apelin-APJ axis in vascular formation. *J Biochem.* 2012; 152: 125-31.
3. Kim J et al. An endothelial apelin-FGF link mediated by miR-424 and miR-503 is disrupted in pulmonary arterial hypertension. *Nat Med.* 2013 Jan;19(1):74-82.
4. Chandra SM et al. Disruption of the apelin-APJ system worsens hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 814-20.
5. Alastalo TP, et al. Disruption of PPAR  $\gamma$  /  $\beta$ -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *J Clin Invest.* 2011; 121: 3735-46.
6. Kuba K, et al. Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res.* 2007; 101: e32-42.
7. Sato T, et al. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *J Clin Invest.* 2013; 123: 5203-11.
8. Melgar-Lesmes P et al. Hypoxia and proinflammatory factors upregulate apelin receptor expression in human stellate cells and hepatocytes. *Gut.* 2011; 60: 1404-11.
9. Aozasa N, et al. Serum apelin levels: clinical association with vascular involvements in patients with systemic sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013; 27: 37-42.
10. Yamanaka M, et al. Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 53994-4001.
11. Kono Y, et al. Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by

TGF-beta1. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007; 37:395-404.

2. 学会発表  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

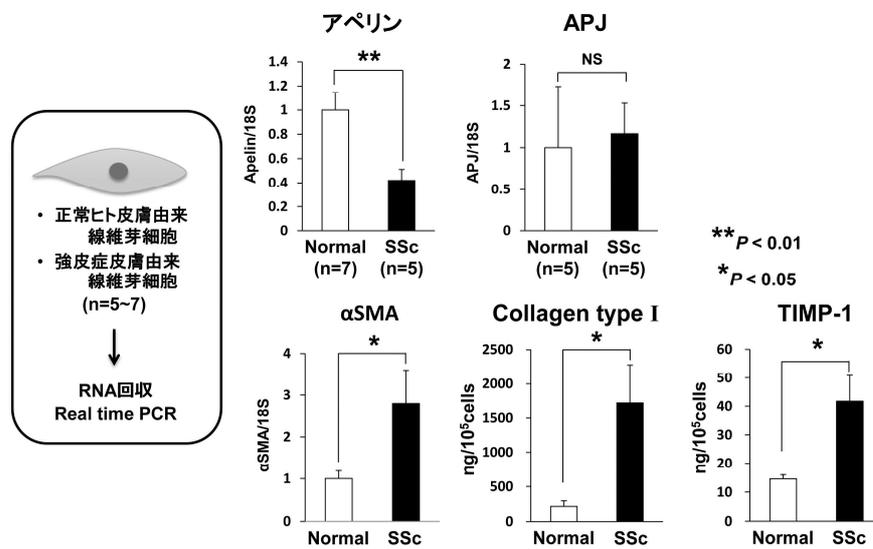


図1：強皮症と正常ヒト皮膚由来線維芽細胞のアペリン/APJ 発現量の比較  
強皮症由来線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下している。

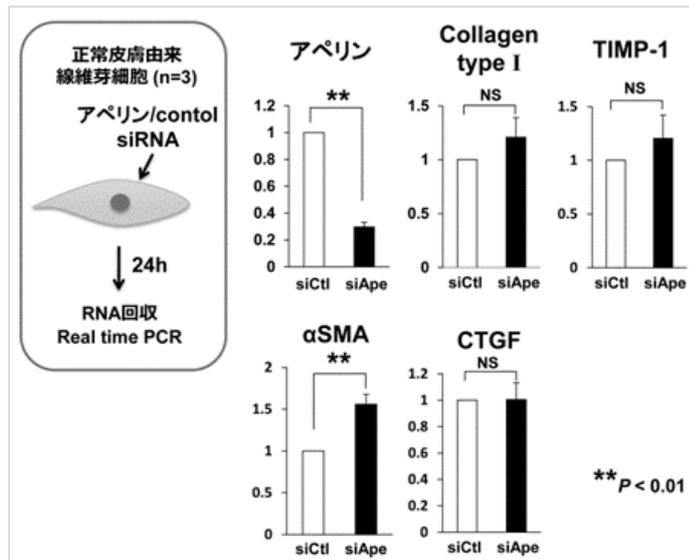


図 2 : アペリン siRNA による正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響  
 siRNA によるアペリンの発現抑制によって、線維芽細胞の SMA の発現が亢進した。

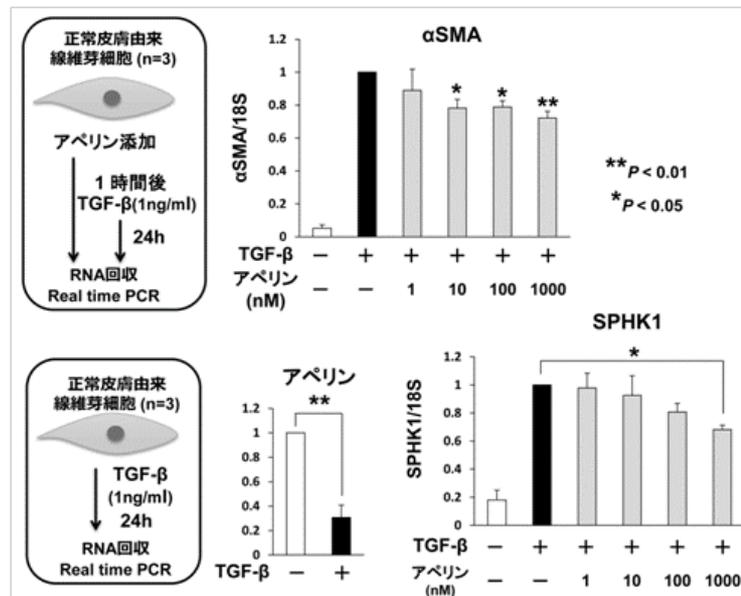


図 3 : アペリン添加による正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響  
 アペリンは、TGF-β 刺激による SMA, 1 型コラーゲン, TIMP-1 の発現亢進に対して、SPHK1 の発現制御を介して抑制的に働いている可能性が示唆された。

# 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

研究分担者 **藤本 学** 筑波大学医学医療系皮膚科 教授  
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  
協力者 **松下貴史** 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 講師  
協力者 **濱口備人** 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 准教授  
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

制御性 B 細胞は IL-10 産生を介して免疫反応を抑制する。今回、強皮症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、強皮症のマウスモデルである皮膚硬化型慢性 GVHD を誘導した。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 細胞が強皮症の病態に抑制的に働く可能性が示唆された。

## A. 研究目的

全身性強皮症は抗核抗体に代表される自己免疫現象を背景に、皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管病変によって特徴づけられる膠原病である。これまでに全身性強皮症患者の病態には B 細胞の活性化や分化の異常が示されている（文献 1）。また、B 細胞の強力な活性化因子である血清 BAFF 濃度が全身性強皮症患者において上昇しており、皮膚硬化の重症度と相関していることが示されている（文献 2）。さらに、全身性強皮症の動物モデルマウスである Tight skin(Tsk)マウスの皮膚硬化の進展には B 細胞の異常活性化が重要であり（文献 3）、抗 CD20 抗体による発症早期からの B 細胞除去療法が、Tsk マウスの皮膚硬化を有意に抑制することが示されている（文

献 4）。以上より、全身性強皮症患者ならびに強皮症モデルマウスの病態および線維化において B 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。自己免疫疾患における B 細胞の重要性は、関節リウマチ患者においてリツキサン®（抗 CD20 抗体）による B 細胞除去療法が予想以上の治療効果を挙げたことから、全世界で脚光を浴びるようになった。B 細胞は長らく抗体産生能ばかりが目立っていたが、抗体産生のみならず抗原提示能、サイトカイン産生、T-B 細胞相互作用を介して免疫反応を促進することが示され、自己免疫疾患における B 細胞の重要性が飛躍的に高まることとなった。その後、自己免疫疾患に対する B 細胞除去療法の適応疾患は急速に拡大され、全身性エリテマトーデス、多発性硬

化症、皮膚筋炎、天疱瘡、ANCA 関連血管炎、特発性血小板減少性紫斑病など枚挙に暇がない。さらに近年、全身性強皮症に対する B 細胞除去療が複数報告され、治療効果が認められたとの報告も散見される。しかしながら、B 細胞除去療法が自己免疫疾患に対して必ずしも有益でない症例も報告されており、リツキサン®投与後に多発性硬化症の再発が誘導された症例や尋常性乾癬を発症した症例などが存在する。この理由としては、B 細胞が自己免疫や炎症を促進する作用だけではなく、抑制する作用も併せ持っているため、B 細胞除去療法により自己免疫現象を増悪させた可能性が考えられる。この相反する B 細胞集団は、“悪玉”と“善玉” B 細胞の概念で理解されている。“悪玉” B 細胞は effector B 細胞と呼ばれ、T 細胞の活性化作用をもち、自己免疫や炎症を促進する働きがある。一方、“善玉” B 細胞は制御性 B 細胞と呼ばれ自己免疫や炎症を抑制する働きがある(文献 5)。制御性 B 細胞は IL-10 を特異的に産生する B 細胞亜集団と定義され、IL-10 の産生により過剰な免疫反応や炎症を抑制する。近年、IL-10 産生制御性 B 細胞が CD1d<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup>の表現型を有し(文献 6)炎症反応および自己免疫反応の抑制に非常に重要であることが示されている(文献 7, 8)。この制御性 B 細胞を制御する分子として CD19 が重要であり、CD19 を遺伝的に欠損したマウスでは制御性 B 細胞が欠損しているため炎症反応や自己免疫反応の増悪が認められる。

全身性強皮症は皮膚硬化型慢性 GVHD (Sclerodermatous chronic

graft-versus-host disease, Scl-cGVHD)との共通点が知られている(文献 9)。B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスの骨髄を BALB/c (H-2<sup>d</sup>) マウスに移植することにより皮膚硬化型慢性 GVHD を誘導することができ、強皮症のモデルマウスとして有用である。

今回、我々は CD19 欠損マウスを使用し、強皮症モデルマウスにおける制御性 B 細胞の役割を検討し。

## B. 研究方法

### 1. マウス

レシピエントとして、BALB/c (H-2d)マウスないしは CD19 欠損 BALB/c (H-2d)マウスを使用した。ドナーとして、B10.D2 (H-2d)マウスないしは CD19 欠損 B10.D2 (H-2d)マウスを使用した。

### 2. Scl-GVHD モデル

B10.D2 マウスから骨髄細胞(10x10<sup>6</sup>細胞)と脾臓細胞(10x10<sup>6</sup>細胞)を採取し、800 cGy 照射された BALB/c (H-2d)マウスに骨髄移植し、皮膚硬化型慢性 GVHD を誘導した。

### 3. GVHD スキンスコア

以下のスコアリングシステムを用いた。

スコア 0=正常、スコア 1= 皮膚病変<1cm<sup>2</sup>, スコア 2= 皮膚病変 1-2cm<sup>2</sup>, スコア 3= 皮膚病変 2-5cm<sup>2</sup>, スコア 4= 皮膚病変 5-10cm<sup>2</sup>, スコア 5= 皮膚病変 10-15cm<sup>2</sup>, スコア 6= 皮膚病変 15-20cm<sup>2</sup>, スコア 7= 皮膚病変>20cm<sup>2</sup>。尻尾の皮膚病変は 0.4、耳や手足の皮膚病変を 0.3 とし、すべての合計点で示した。

### 4. 病理組織学的検討

皮膚病変は H&E 染色、Masson 's trichrome

染色にて評価した。病理組織学的スコアは epidermal morphology, dermal fibrosis, inflammation, subdermal fat, skin appendage number をそれぞれ 0-2 で評価した。

## 5. 統計

全てのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で示した。有意差検定は Student's t test を使用した。

## C. 研究結果

### 1. CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD

CD19 欠損マウスは遺伝的に IL-10 産生制御性 B 細胞を欠損しているため制御性 B 細胞の解析に有用である。CD19 欠損 B10.D2 マウス(ドナーマウス)および CD19 欠損 BALB/c マウス(レシピエントマウス)を作製し、皮膚硬化型慢性 GVHD モデルを誘導して制御性 B 細胞の役割を解析した。CD19 欠損 B10.D2 マウスの骨髄および脾臓を、放射線照射された BALB/c マウスに移入したところ(ドナー由来の制御性 B 細胞だけが欠損している)コントロール群に較べより重症の皮膚硬化型慢性 GVHD を発症した(図 1)。一方、B10.D2 マウスの骨髄および脾臓を、放射線照射された CD19 欠損 BALB/c マウスに移入した場合は(レシピエント由来の制御性 B 細胞だけが欠損している)コントロール群と較べ有意差がなかった。以上の結果より、皮膚硬化型慢性 GVHD マウスの抑制機序においてドナー由来の制御性 B 細胞が重要であることが示された。

### 2. CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD の病理組織学的検討

コントロール群と CD19 欠損ドナー群の皮膚硬化型慢性 GVHD の背部皮膚および肺での線維化を組織学的に検討したところ CD19 欠損ドナー群では IL-10 産生制御性 B 細胞が存在しないため炎症反応および線維化の抑制作用が減弱し、より高度な線維化が認められた(図 2)。

### 3. 制御性 B 細胞移入による CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD に対する効果

CD19 欠損 B10.D2 マウスをドナーとして使用(ドナー由来の制御性 B 細胞だけが欠損している)した皮膚硬化型慢性 GVHD マウスに制御性 B 細胞(CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> B 細胞)と他の B 細胞(CD1d<sup>lo</sup>CD5<sup>-</sup> B 細胞)をそれぞれ骨髄移植と同日に移植したところ、制御性 B 細胞(CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> B 細胞)を移植した群では皮膚硬化型慢性 GVHD の改善効果が認められた(図 3)。しかしながら、骨髄移植後 21 日目に制御性 B 細胞(CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> B 細胞)を移植しても、皮膚硬化型慢性 GVHD の改善効果は認めなかった。以上の結果より、制御性 B 細胞は皮膚硬化型慢性 GVHD の発症早期において抑制効果を有していること、さらには慢性 GVHD に対する制御性 B 細胞を用いた治療の可能性が示された。

## D. 考案

皮膚硬化型慢性 GVHD マウスモデルの実験から、制御性 B 細胞は強皮症病態において抑制的に働くことが明らかとなった。

ヒトでの制御性 B 細胞の研究も進んでおり、ヒトの IL-10 産生性 regulatory B 細胞は CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> または CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> と報告されている。近年、全身性強皮症に対する

B 細胞を標的とした抗体療法が注目されており、rituximab 以外にも種々の抗 CD20 抗体、抗 CD22 抗体 (epratuzumab)、抗 BAFF 抗体 (belimumab) が使用され始めている。今後、全身性強皮症の治療として B 細胞除去療法が行われることが予想されるが、制御性 B 細胞の存在にも留意する必要があると思われる。

## E. 結 論

制御性 B 細胞は強皮症モデルマウスにおいて抑制的に働くことが示された。

## F. 文 献

1. Sato S, et al. Arthritis Rheum 50:1918-27,2004
2. Matsushita T, et al. Arthritis Rheum 54: 192-201, 2006
3. Saito E, et al. J Clin Invest 109:1453-62,2002
4. Hasegawa M, et al. Am J Pathol. 169(3): 954-966. 2006
5. DiLillo DJ, et al. Ann N Y Acad Sci.1183:38-57. 2010
6. Yanaba K, et al. Immunity 28, 639-650. 2008
7. Matsushita T, et al. J Clin Invest 118:3420-30. 2008;
8. Matsushita T, et al. J Immunol. 85:2240-52. 2010
9. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. J Clin Invest 2007;117(3):557-67.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Le Huu, D., Matsushita, T., Jin, G., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Takehara, K., Tedder, T.F., and Fujimoto, M. 2013. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. Blood 121:3274-3283.

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

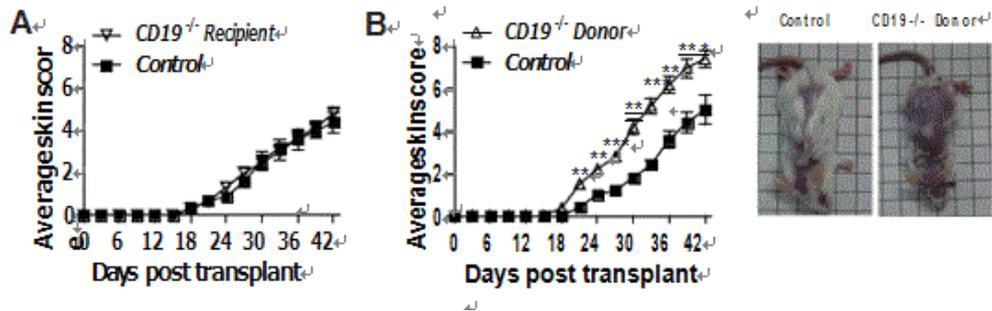


図 1: CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD

(A) レシピエント由来の制御性 B 細胞が欠損(CD19<sup>-/-</sup> recipient)。(B) ドナー由来の制御性 B 細胞が欠損(CD19<sup>-/-</sup> donor)。 \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

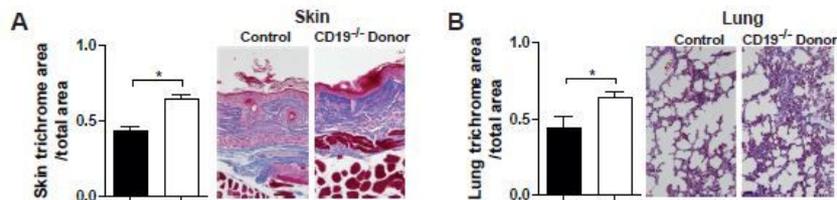


図 2: ドナーCD19 欠損マウスにおける皮膚および肺の線維化

(A,B) ドナーCD19 欠損マウスとコントロールマウスの皮膚および肺を骨髄移植後 42 日後に採取し、trichome 染色にて線維化の程度を評価した。\*p<0.05

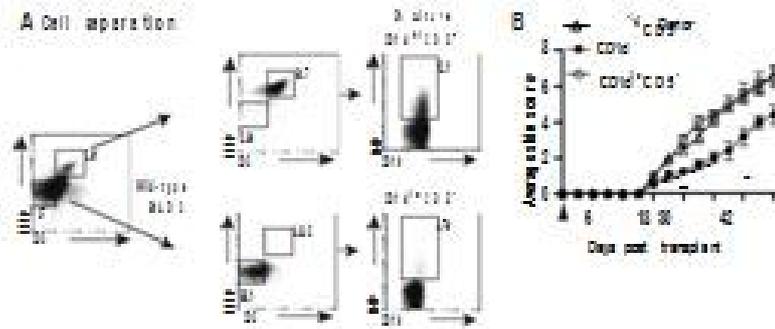


図 3: CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>制御性 B 細胞の移植実験

(A)CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>B 細胞と CD1d<sup>lo</sup>CD5<sup>-</sup>B 細胞を FACS でソーティング。5 時間培養後に IL-10 の産生を測定すると、CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>B 細胞群のみで IL-10 の産生が認められた。  
(B) ドナーCD19 欠損マウスに CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>B 細胞を移植すると皮膚硬化型慢性 GVHD の改善がみられた。一方、CD1d<sup>lo</sup>CD5<sup>-</sup>B 細胞を移植しても改善効果は認められなかった。\*p<0.05

# 全身性強皮症の皮膚線維化における IL-20 の関与の検討

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

協力者 **工藤英郎** 熊本大学大学院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病態治療再建学 講師

## 研究要旨

インターロイキン (IL) -20 は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が、全身性強皮症 (Systemic sclerosis; SSc) における役割はこれまで検討されていない。我々は、培養皮膚線維芽細胞において IL-20 刺激により I 型コラーゲン蛋白発現が減少していることを見出した。この機序として、IL-20 は Fli1 発現亢進を介して I 型コラーゲン遺伝子転写を低下させると同時に、Smad3 や endoglin の発現低下を引き起こし、SSc 皮膚線維芽細胞における TGF- $\beta$  の作用を抑制する可能性が示唆された。一方、IL-19 や IL-24 はコラーゲン発現に影響を与えなかった。また、マウスモデルでは IL-20 投与によってプレオマイシン誘発性皮膚線維化を改善させることができた。IL-20 投与は SSc の新しい治療につながる可能性がある。

## A. 研究目的

IL-20 は IL-10 ファミリーに属するサイトカインであり、主に単球やケラチノサイトなどに発現し、様々なリウマチ性疾患の病態形成に関与している<sup>1-4</sup>。しかし、細胞外マトリックス発現調節や SSc の表現型への寄与については未だ解明されていない。本研究では、培養皮膚線維芽細胞における IL-20 の I 型コラーゲン発現への影響について検討した。また、健常者および SSc 患者において血清および皮膚組織における IL-20 発現を比較した。さらに SSc で見られる細胞外マトリックス調節異常に対する IL-20 シグナル伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 患者背景

血清試料は 33 人の SSc 患者 (男性 5 人、女

性 28 人; 年齢 24-85 歳 (平均 58.4 歳)) より取得した。内訳は、dcSSc は 13 人、lcSSc は 20 人であった。健常群 15 名は年齢および性別一致する者を選択した。10 名の全身性エリテマトーデス患者、12 名の皮膚筋炎患者からも血清を採取した。皮膚生検は非露光部の体幹もしくは前腕より行った。検体取得に際して、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、署名を得た。

### 2) 細胞培養

SSc 皮膚線維芽細胞の取得は発症 2 年以内の dcSSc 患者の前腕から施行した。健常成人の皮膚については手術の際に不要となった植皮片を利用した。検体採取に際しては、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、署名を得た。初代培養は 10% ウシ血清、抗生剤、抗真菌剤を加えた Eagle 培養液で

37、5%のCO<sub>2</sub>濃度、培養器内で個別にシャーレ上で培養を行った。フラスコ内で単層培養にて維持し、3-7回継代した細胞を用いた。

3) タンパク量の評価は免疫ブロット法を用いて、mRNA量の評価はリアルタイムPCR法を用いて確認した。

#### 4) 免疫沈降法

培養皮膚線維芽細胞をPBSで洗浄後、回収し、Pierce IP lysis buffer(Thermo, Rockford, IL), Halt phosphatase inhibitor cocktail (Thermo), Protease Inhibitor Cocktail®(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を加え、タンパクを抽出した。細胞溶解液に control IgG と protein G-Sepharose (GE Healthcare, Waukesha, WI)を加えてプレクリアを行い、monoclonal mouse Fli1 antibody (BD Bioscience, San Jose, CA)と protein G-Sepharose beads を加え、4℃でローテーションさせながら一晩反応させた。Pierce IP lysis buffer で洗浄後、アガロースに結合したタンパクを sample buffer で95℃熱処理を行い抽出し、免疫ブロット法にて検出した。1次抗体はそれぞれ polyclonal rabbit antiphospho-Fli1 antibody (東京大学皮膚科浅野善英先生より提供)と anti-acetylated lysine antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)を使用した。転写膜はストリッピングを行い、rabbit polyclonal anti-Fli1 antibody (Santa Cruz Biotechnology)にて再反応を行なった<sup>6</sup>。

#### 5) クロマチン免疫沈降法

EpiQuik ChIP kit (Epigentek, Farmingdale, NY)を用いてプロトコールに従って実験を行なった<sup>5</sup>。培養皮膚線維芽細胞をトリプシンにて

回収し、1%ホルムアルデヒドで10分間固定を行い、架橋されているDNAを超音波処理装置にて剪断した。DNAの断片をIgG isotope control antibody または polyclonal anti-Fli1 antibody にて免疫沈降を行い、回収したサンプルを 2(1)コラーゲン遺伝子のプライマー (forward, 5'-CTGGACAGCTCCTGCTTTGAT-3' reverse, 5'-CTTCAAGGGGAACTCTGACTC-3')を用いてPCRにて増幅させ、エチジウムブロマイド入りのアガロースゲルで電気泳動を行なった。

#### 6) プレオマイシン誘発性強皮症モデルマウスの作成

プレオマイシン(日本化薬)をPBCにて1mg/mlになるよう希釈し、BALB/cマウスの剃毛した背部皮内にプレオマイシン300μgもしくはPBSを4週間連日注射した<sup>7</sup>。注射最終日の翌日に背部皮膚を採取後、10%ホルマリン固定し、パラフィン包埋した。

#### 7) プラスミド構築、一過性形質導入、CATアッセイ

完全長のヒト 2(1)コラーゲン遺伝子と5'の欠失したシリーズにそれぞれクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)を連結させプラスミドを構築した<sup>8</sup>。CATアッセイのため、培養線維芽細胞にLipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)を導入試薬として構築したプラスミドを形質導入した<sup>8</sup>。導入効率のわずかな変動を補正する目的で、pSV-galactosidase vector (Promega, Madison, WI)を全ての反応に含ませた。48時間インキュベートさせた後、細胞を回収し、CAT-ELISA (Roche, Mannheim, Germany)にて細胞溶解物に

における CAT 活性を比色分析した<sup>9</sup>。siRNA のリボース法での形質導入では、siRNA は導入試薬である Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) と混和し、培養液中の線維芽細胞に反応させた後、細胞をシャーレに播種し、48 時間、37℃、5%CO<sub>2</sub> でインキュベートした。Fli1 に対する siRNA とコントロール siRNA は Dharmacon (Rockford, IL) より購入した。

#### 8) 免疫蛍光顕微鏡検査法

培養皮膚線維芽細胞を four-well LAB TEK chambers (Nunc, Naperville, IL) 上でサブコンフルエントになるまで増殖させた。4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定を行い、PBS で洗浄後、1% BSA/PBS (pH7.3) でブロッキングを行なった。1 次抗体は IL-20R を 2 次抗体は the donkey anti-goat IgG-FITC (ともに Santa Cruz Biotechnology) を用いて行なった。蛍光を可視化するため Zeiss の蛍光顕微鏡を使用した<sup>10</sup>。

#### 9) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

血清 IL-20 濃度は、ELISA kit (Human IL-20 Immunoassay, R&D Systems) を用いて測定を行なった<sup>11,12</sup>。IL-20 抗体がプレコートされたマイクロタイターウェル内に、IL-20 のペルオキシダーゼ標識抗体に続いて、患者血清を一定分量加えた。発色は過酸化水素とテトラメチルベンジジンペルオキシダーゼを用いて 450nm における吸光度を測定した。波長補正は 540nm で行なった。各サンプル中の IL-20 濃度は標準曲線からの補正值により求めた。

#### 10) 免疫染色

4 μm 薄切したパラフィン包埋組織にキシレンを用いて脱パラフィン、アルコールを用いて脱水した。抗原賦活化液 pH9 (ニチレイ) にて

10 分間、121℃にてオートクレーブ処理を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性阻害のために、5%ヤギ血清にて常温で 20 分間静置した後に、1 次抗体を 0.5%ウシ血清アルブミン溶液で希釈し、4℃で一晩反応させた。1 次抗体の濃度は IL-20(1:100), IL-20R(1:100), Fli1(1:50), Smad3(1:50)とした。PBS で洗浄後、HRP 標識した 2 次抗体 (Nichirei, Tokyo, Japan) を滴下し、1 時間反応させた。PBS 洗浄後、HRP の基質である diaminobenzidine (Dojin, Kumamoto, Japan) を反応させ、シグナルを検出し、Mayer's hematoxylin で核染色を行なった。標本は光学顕微鏡 (Olympus BX50; Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。

#### 11) 統計学的分析

バーグラフで表示された結果は、少なくとも 3 回の独立した実験データの平均±SE に基づくものである。統計解析には統計解析ソフト Statcel3 (OMS) を用いた。独立した 2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を使用した。臨床所見や検査所見の比較には Fisher's exact probability test を使用した。P<0.05 を統計学的な有意差と判断した。

## C. 研究結果

1) 培養線維芽細胞において IL-20 が細胞外マトリックス関連遺伝子の発現に及ぼす効果

まず、細胞外マトリックスの発現に対する IL-20 の効果について調べるために、84 の細胞外マトリックス関連遺伝子を含むキットを用いて PCR アレイを行なった。サンプルとしては 3 系統の独立した健常人の皮膚組織から作成した培養線維芽細胞を用いた。24 時間の無血

清培地による処理を行なった後、IL-20(100ng/ml)で12時間刺激を行なった群と非刺激群をそれぞれ分け、全RNAの回収を行なった。3名のサンプルを同量ずつ混合し、刺激群と非刺激群でPCR反応を行い、Ct法にて比較を行なった。結果は16 fold change以上のもののみを示す(表1)。この中でも、我々はヒト 2(1)コラーゲン遺伝子の発現がIL-20刺激により(0.03-fold)減少していることに着目した。定量的リアルタイムPCR法にて 1(1)と 2(1)コラーゲンの両方で特異的なプライマーを用いて、サンプル数を(n=7)増やして行なったところ、PCRアレイの結果と一致して、1(1)と 2(1)コラーゲンのmRNAは、IL-20刺激により、ともに発現が有意に低下した(図1A)。さらに免疫プロット法ではI型コラーゲンのタンパク産生はIL-20刺激により濃度依存性に減少し、その差は有意であった(図1B)。次にIL-20によるI型コラーゲンの発現低下は、転写レベルまたは翻訳レベルで行なわれるかどうか判断するために、コラーゲンmRNAの安定性を検証した。mRNAの定常状態レベルは遺伝子の転写またはmRNAの安定性のレベルによって制御されるため、線維芽細胞にRNA合成阻害剤であるアクチノマイシンDを加えることによって、IL-20存在下でも非存在下でもde novo mRNAの合成はブロックされる。アクチノマイシンD処置後のI型コラーゲンmRNAの減少率に2群間で有意差は認められなかった(図2A)。同様にde novo タンパク合成およびタンパク分解酵素の発現時にシクロヘキシミドでブロックしたところ、IL-20刺激はコラーゲンタンパクの半減期にほとんど影響を与えなかった(図2B)。このようにコラーゲ

ンのmRNAやタンパクの安定性に対するIL-20の効果は明らかでなく、むしろタンパク質分解酵素はコラーゲン発現に対するIL-20の効果に關与する可能性は低いと考えられた。したがって、IL-20はコラーゲンのmRNAやタンパクの安定性には影響せず、転写レベルに影響を与えていると考えた。次にIL-20によるヒト 2(1)コラーゲン遺伝子プロモーターの応答領域を明らかにするために、正常線維芽細胞におけるIL-20の存在下または非存在下でCATレポーター遺伝子に連結されたプロモーターの5'末端欠失変異体の活性を比較した。全長の塩基対-3500~+58bpのconstruct、および-353~+58bpのconstructではともにIL-20刺激により、非刺激群と比較してプロモーター活性の低下を認めた(0.3-fold)。一方、さらに短い-264~+58bpのconstructではIL-20刺激による変化が認められなかった。このためIL-20に対する応答領域は-353~-264bpの間に存在することが示された(図3)。IL-20に対する応答領域(-353~-264bp)にはSp1, Etsファミリー転写因子(Ets1, Fli1など)およびCCAAT/エンハンサー結合タンパク(C/EBP)の結合部位が含まれている。PCRアレイの結果によるとSp1とC/EBPの発現はIL-20による影響はほとんど受けなかった。リアルタイムPCRではIL-20はFli1のmRNA発現を誘導することを示したが、Ets1の変化は有意ではなかった(図4A)。さらに、Fli1のタンパク発現もIL-20刺激により増加した(図4B)。Fli1はEts1と結合部位を共有する。加えてFli1はin vitroの過剰発現系においてEts1と競合して 2(1)コラーゲンのプロモーター活性を阻害することによって、Ets1とFli1のバランスは

コラーゲン発現をコントロールすると考えられている<sup>13-15</sup>。我々はEts1とFli1タンパク発現の比率はIL-20刺激により有意に減少することを突き止めた。また、過去の文献によると、Fli1タンパクの安定性や転写活性は、リン酸化やアセチル化といった翻訳後修飾により厳密に制御されていると考えられている<sup>6</sup>。しかし、IL-20はFli1のリン酸化やアセチル化を変化させなかった(図4C)。ただし、IL-20はクロマチン免疫沈降法においてはコラーゲンプロモーター上のFli1活性を増加させた(図4D)。これらの結果は、IL-20がリン酸化やアセチル化を変化させることなく、直接Fli1 mRNAレベルの誘導を通じてFli1タンパクを増加させることを示している。一方で、我々はリアルタイムPCRによって、その他のヒト 2(I)コラーゲンプロモーター関連の転写因子のmRNA発現を調べた。c-Myb, c-fosおよびc-junの発現はIL-20による影響を受けなかった(図4A)。Caveolin-1はPCRアレイではIL-20によって発現低下したが、サンプル数を増やすとその差は有意ではなくなった(n=7, 図4E)。Smad3とendoglinといったTGF- $\beta$ シグナル伝達の媒介物はアレイの結果と一致し、IL-20によってmRNAの発現は減少した(図4E)。しかしながら、Smad3やendoglinは無刺激下ではコラーゲンの転写に影響を及ぼさないことが示されており<sup>16,17</sup>、これらの減少では正常線維芽細胞においてIL-20により 2(I)コラーゲン発現が低下することを説明できない。従って、IL-20はFli1の発現を介してI型コラーゲンの転写を減少させていると考えた。我々の仮説と一致して、IL-20のコラーゲン転写活性抑制効果はFli1 siRNAの一過性形質導入によって抑制

された(図4F)。はじめに記載したようにIL-20, IL-19およびIL-24はそれぞれ異なる機能を持つものの、受容体を共有している<sup>18</sup>。我々はIL-19, IL-24についてもin vitroでコラーゲン発現を調節するかどうかを調べた。免疫プロット法にてIL-19およびIL-24刺激を加えた正常線維芽細胞は無刺激の細胞と比較してI型コラーゲン発現に有意な変化はなかった(図5A-D)。またEts1とFli1の比率についても同様に免疫プロット法にて検証したが、特に有意な変化はなかった(図5E,F)。従って、IL-20受容体に関連するサイトカインのうち、Fli1発現亢進を介してコラーゲンの発現低下を引き起こすのはIL-20に特異的である可能性が高いと考えた。

## 2) 強皮症患者血清と皮膚組織における IL-20 の発現

次に、我々はELISA法によってSSc患者における血清IL-20濃度を測定した。コントロールとして年齢と性別の合致した健常人と、比較のため全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus; SLE)や皮膚筋炎(Dermatomyositis; DM)などのリウマチ性疾患患者の血清サンプルも同時に測定した。図6Aに示すように、平均血清IL-20濃度は健常人と比較して各種リウマチ性疾患にてやや減少を認めたが、有意差はなかった。一方で、SScの診断基準は満たさないが、将来的にSScへと進行する可能性が高い<sup>19-21</sup>と言われているSSD患者では有意に血清IL-20濃度の低下を認めた。表2はSSc患者の臨床症状および検査所見と血清IL-20濃度との関連を示している。IL-20減少群(健常人の平均値以下)では正常群と比較

して食道病変の有病率 (52.9 対 12.5%、 $P < 0.05$ ) が有意に高かった。Modified Rodnan's total skin thickness score (MRSS) もわずかとはいえ、IL-20 減少群で上昇した。しかし対照的に、IL-20 mRNA 発現は SSc 患者の皮膚組織で健常人と比較して有意に減少していた (図 6B)。さらにパラフィン包埋皮膚切片を用いて免疫組織化学染色を行なったところ、正常皮膚では表皮に IL-20 の発現が強く検出されたが、SSc の萎縮性表皮においてはほとんど検出されなかった (図 6C)。このように血清 IL-20 濃度は SSc の前駆症状の段階で減少しているのに対し、SSc 皮膚組織における IL-20 発現は恒常的に減少している。また、IL-20 受容体が皮膚線維芽細胞に発現しているという報告は過去にはなかったが、*in vivo* での免疫染色において、正常皮膚と SSc 皮膚組織では同程度に紡錘形の細胞に IL-20 受容体タンパク発現が認められた (図 7A)。また、パラフィン包埋切片より抽出した全 RNA を用いてリアルタイム PCR 法を行なったところ、正常皮膚と SSc 皮膚組織では IL-20 受容体発現は同程度であり (図 7B) *in vitro* で培養線維芽細胞を用いての免疫プロット法 (図 7C) と蛍光免疫顕微鏡検査 (図 7D) では、どちらも IL-20 受容体発現は正常と SSc を比べて明らかな差はなかった。まとめると、IL-20 は I 型コラーゲン発現に対して抑制的に働き、SSc 皮膚組織で IL-20 発現低下が起こっていることはコラーゲンの過剰な蓄積と線維化に寄与していると考えられる。

3) TGF- $\beta$  刺激した正常線維芽細胞と SSc 線維芽細胞における I 型コラーゲン発現に対する IL-20 の効果

次に TGF- $\beta$  刺激した正常線維芽細胞において IL-20 が I 型コラーゲン発現に及ぼす影響について検証した。外因性の IL-20 は I 型コラーゲン発現を減少させるとともに、IL-20 存在下では TGF- $\beta$  はコラーゲン発現を誘導することができない (図 8A)。つまり、IL-20 は TGF- $\beta$  の作用を抑制するだけでなく、I 型のコラーゲン発現を減少させる 2 つの効果を発揮していると考えられる。予想通り TGF- $\beta$  存在下で IL-20 によって Fli1 タンパク質の発現は増加し (図 8B)、一方で Smad3 や endoglin の発現が有意に減少した (図 8C)。IL-20 は Fli1 の誘導を介しコラーゲン転写を減少させ、一方で Smad3 や endoglin を発現低下させて、TGF- $\beta$  の効果を抑制しているかもしれない。SSc の線維芽細胞においても、TGF- $\beta$  刺激した正常線維芽細胞と同様にコラーゲンタンパク発現の減少 (図 9A) や Fli1 タンパク発現の誘導 (図 9B)、Smad3 や endoglin の減少 (図 9C) が観察された。

4) プレオマイシンによる皮膚線維化モデルマウスに対する IL-20 の効果

マウスの皮膚にプレオマイシンを注射することによって誘導される線維化は SSc のマウスモデルとして使用されている<sup>7</sup>。図 10 ではヒトの免疫染色と同様に、マウスにおいてもコントロールマウスでは表皮に IL-20 の発現が強く見られるのに対し、プレオマイシンマウスでは表皮の IL-20 発現は減少していた。炎症細胞や血管内皮細胞における IL-20 発現の差はコントロールマウスとプレオマイシンマウスを比較してもわずか、あるいは同等であった。従って、我々は IL-20 を補充することによって SSc の線維化を改善させることができるかどうかプレ

オマイシンマウスモデルで検証することにした。実験方法に記載したように、プレオマイシン(300 µg)またはコントロールとしてPBSをマウスの背部の皮膚に局所的に週6回注射した。同時に週1回はPBSまたはIL-20(3.5 µg)を注射した。プレオマイシンを投与しなかった群ではIL-20はわずかに皮膚の厚さを低減させたが、統計学的に有意ではなかった。IL-20を投与しなかったプレオマイシン投与群では肥厚したコラーゲン線維束は著明に増加したが、IL-20投与群ではプレオマイシンにより誘発された皮膚肥厚を改善させた(図11A)。パラフィン包埋したマウスの皮膚切片を用いた免疫組織化学染色では、*in vitro*の結果と一致して、線維芽細胞様紡錘形細胞においてSmad3の発現はプレオマイシンマウスで減少した一方で、Fli1の発現は増加した(図11B)。また、皮膚の厚さを測定したところ、IL-20によってプレオマイシン誘発性の皮膚肥厚は統計学的に有意に改善することが示された(図11C)。また、プレオマイシン投与群では皮膚組織切片のコラーゲン含有量はIL-20によって統計学的に有意に減少していた(図11D)。このように、IL-20の投与はプレオマイシンによって誘発される線維化を改善させることが示された。

#### D. 考案

皮膚において、IL-20はケラチノサイトの増殖を誘導することは知られているが、真皮の線維芽細胞への影響は未だに調べられていない。我々の研究では、2(I)コラーゲン mRNAの発現は転写レベルにおいてIL-20により減少するが、それは正常線維芽細胞においてFli1タン

パク発現の誘導を介して生ずることを明らかにした。本研究では、1(I)コラーゲンの調節機構については明らかにしなかった。しかし、

1と2は協調して働くことが知られており、我々は同様のメカニズムでIL-20刺激により1(I)コラーゲン発現低下が生じたのかもしれないと考えた<sup>7</sup>。また、SSD患者では健常人と比べて血清IL-20濃度が統計学的に有意に低下していた。前述したように、SSDはSScの前駆症状の段階であり、SScの線維化は不可逆であるため、早期診断と慎重なフォローアップが必要とされる。このためSSDの概念は有用である。血清IL-20濃度は、健常人とSSD患者を区別する上で有用である可能性がある。一般的にSSD患者では線維化が生じていないが、本研究における症例では血管障害に関連づけられる顕著な臨床症状を示していた(表3)。血管新生におけるIL-20の役割に関する報告がいくつかあることを考えると、SSD患者における血清IL-20濃度の減少は血管障害の病因と結びつき、線維化を誘導している可能性があることを示唆している<sup>22,23</sup>。しかし、本研究に含まれるSSD患者の全てが将来的にSScへと進展することが確立されている訳ではない。このため、SSDからSScへと進展した患者の血清IL-20濃度に関する経時的研究を行なうことが将来的に必要である。我々はIL-20の発現がSScの表皮において減少していることを明らかにした。IL-20を媒介とするSScの線維化仮説モデルを図12に示す。SScの皮膚におけるIL-20の発現減少はFli1の発現低下を誘導し、SScの線維芽細胞を活性化させ、コラーゲンの過剰発現を促す可能性がある。Fli1はSSc線維芽細胞において恒常

的に発現が低下していることが報告されており、それはおそらく TGF- $\beta$  シグナル伝達<sup>24</sup>および IL-20 減少により Fli1 の発現低下を増強させていると考えられている。外因性の IL-20 を投与することは Fli1 発現量の回復と Smad3 および endoglin の抑制を介して、効果的にコラーゲンの発現を減少させると考えられた。また、SSc では表皮萎縮が知られており、これはケラチノサイトの増殖因子である IL-20 が減少することが関与しているかもしれないと考えた。一方、乾癬においては IL-20 が表皮において過剰発現し、特徴的なケラチノサイトの増殖および表皮肥厚につながると考えられている<sup>25</sup>。これは乾癬の皮膚が慢性炎症にも関わらず真皮の線維化から保護されている理由を説明するかもしれない。我々はマウスモデルにおける IL-20 の補充によってプレオマイシン誘発性線維化を改善させることができた。このモデルは SSc の線維化に対する IL-20 による治療の有効性を示すものである。現状ではステロイド、シクロフォスファミドおよびメトトレキサートが SSc の重度の皮膚線維化に対する第一選択薬として考えられている<sup>26,27</sup>。しかし、従来行なわれているこれらの治療法は限定的な効果しか持っておらず、さらに多くの場合、様々な重大な副作用を伴う<sup>28</sup>。IL-20 による線維化調節機構を明らかにすることは、この病気のよりよい理解と新しい治療法につながる可能性がある。しかしながら、in vivo および in vitro の間で生じた実験結果における潜在的な矛盾については考えておく必要がある。例えば、更なる研究としてマウスの線維芽細胞における IL-20 受容体の機能および発現を検討する必要

があり、同様に in vitro で Fli1 siRNA がコラーゲンに対する IL-20 の阻害効果を抑制するといった結果は、in vivo においても Fli1 ノックアウトマウスにおいてプレオマイシン誘発性皮膚線維化に対する IL-20 の効果がどうなるか検証する必要があると考える。

## E. 結論

IL-20 は、Fli1 発現亢進を介してコラーゲン転写を抑制すると同時に Smad3 や endoglin の発現低下を引き起こし、SSc 線維芽細胞における TGF- $\beta$  の作用を抑制する。また、SSc 皮膚における IL-20 の減少は血管障害や線維化に寄与すると考えられる。我々はマウスモデルにおいて IL-20 の投与によってプレオマイシン誘発性皮膚線維化を改善させた。IL-20 投与は強皮症の新しい治療につながる可能性がある。生体内において IL-20 やその受容体の機能や発現を今後、さらに検討していく必要がある。

## F. 文献

1. Hsu YH, Li HH, Hsieh MY et al.: Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:2722-33
2. Li HH, Cheng HH, Sun KH et al.: Interleukin-20 targets renal mesangial cells and is associated with lupus nephritis. *Clin Immunol* 2008;129:277-85
3. Wei CC, Chang MS.: A novel transcript of mouse interleukin-20 receptor acts on glomerular mesangial cells as an

- aggravating factor in lupus nephritis. *Genes Immun* 2008;9:668-79
4. Sa SM, Valdez PA, Wu J et al.: The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol* 2007;178:2229-40
  5. Noda S, Asano Y, Akamata K et al.: Constitutive activation of c-Abl/protein kinase C- $\beta$ /Fli1 pathway in dermal fibroblasts derived from patients with localized scleroderma. *Br J Dermatol* 2012;167:1098-105
  6. Asano Y, Trojanowska M.: Phosphorylation of Fli1 at threonine 312 by protein kinase C $\beta$  promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor  $\beta$ . *Mol Cell Biol* 2009;29:1882-94
  7. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I et al.: Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112:456-62
  8. Ihn H, Ohnishi K, Tamaki T et al.: Transcriptional regulation of the human  $\alpha$ 2(I) collagen gene. Combined action of upstream stimulatory and inhibitory cis-acting elements. *J Biol Chem* 1996;271:26717-23
  9. Filippova M, Song H, Connolly JL et al.: The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:21730-9
  10. Asano Y, Ihn H, Yamane K et al.: Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF- $\beta$  signaling in scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 2004;113:253-64
  11. Jinnin M, Makino T, Kajihara I et al.: Serum levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2010;162:751-8
  12. Wolk K, Witte E, Warszawska K et al.: The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol*. 2009;39:3570-81
  13. Czuwara-Ladykowska J, Shirasaki F, Jackers P et al.: Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001;276:20839-48
  14. Czuwara-Ladykowska J, Sementchenko VI, Watson DK et al.: Ets1 is an effector of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF- $\beta$ . *J Biol Chem* 2002;277:20399-408

15. Jinnin M, Ihn H, Yamane K et al.: 2(I) collagen gene regulation by protein kinase C signaling in human dermal fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1337-51
16. Asano Y, Ihn H, Yamane K et al.: Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in 2(I) collagen gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *J Immunol* 2004;172:7123-35
17. Morris E, Chrobak I, Bujor A et al.: Endoglin promotes TGF- $\beta$ /Smad1 signaling in scleroderma fibroblasts. *J Cell Physiol* 2011;226:3340-8
18. Wegenka UM.: IL-20: biological functions mediated through two types of receptor complexes. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:353-63
19. Maricq HR, McGregor AR, Diat F et al.: Major clinical diagnoses found among patients with Raynaud phenomenon from the general population. *J Rheumatol* 1990;17:1171-6
20. Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE et al.: Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum* 1989;32:998-1006
21. Ihn H, Sato S, Tamaki T et al.: Clinical evaluation of scleroderma spectrum disorders using a points system. *Arch Dermatol Res* 1992;284:391-5
22. Hsieh MY, Chen WY, Jiang MJ et al.: Interleukin-20 promotes angiogenesis in a direct and indirect manner. *Genes Immun* 2006;7:234-42
23. Heuzé-Vourc'h N, Liu M, Dalwadi H et al.: IL-20, an anti-angiogenic cytokine that inhibits COX-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:470-5
24. Asano Y, Markiewicz M, Kubo M et al.: Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol* 2009;29:425-34
25. Blumberg H, Conklin D, Xu WF et al.: Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 2001;104:9-19
26. Apras S, Ertenli I, Ozbalkan Z et al.: Effects of oral cyclophosphamide and prednisolone therapy on the endothelial functions and clinical findings in patients with early diffuse systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2256-61
27. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR et al.: A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001;44:1351-8
28. Hausteil UF.: Systemic sclerosis-scleroderma. *Dermatol Online J* 2002;8:3

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kudo H, Jinnin M, Asano H et al.: Decreased IL-20 expression in scleroderma skin contributes to cutaneous fibrosis.

Arthritis & Rheumatism, in press

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

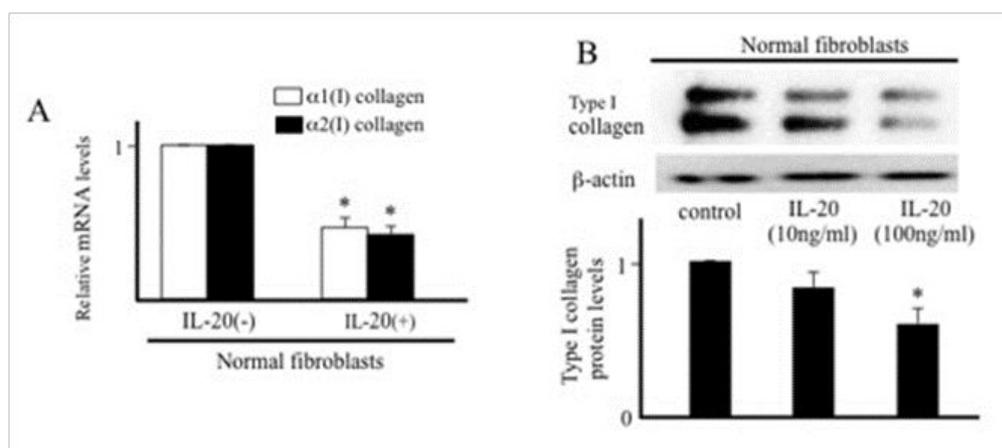


図1 正常皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン発現に対するIL-20の効果

(A) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)存在下と非存在下で12時間培養した。1(I)および2(I)コラーゲンのmRNA発現量をリアルタイムPCR法によって比較した(n=7)。\* $P < 0.05$

(B) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)存在下と非存在下で24時間培養した。細胞溶解液からタンパクを抽出し、免疫ブロット法を行なった。I型コラーゲンのタンパク発現量はデンシトリーによってバンドを定量化し、同じサンプル中の $\beta$ -アクチン発現量にて補正を行なった。バーグラフは非刺激の線維芽細胞のサンプル(1.0)に対しての相対値を示した(n=3)。\* $P < 0.05$

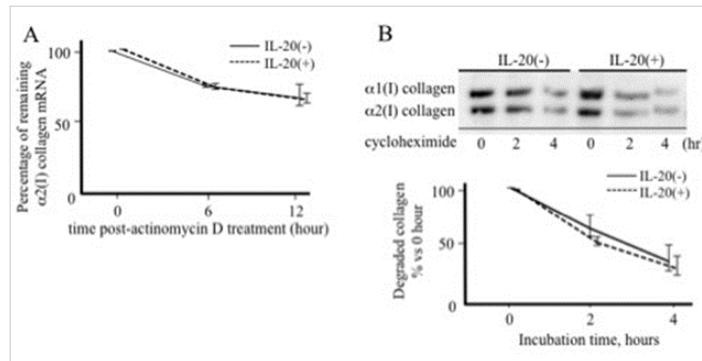


図2 IL-20 刺激の有無による I 型コラーゲンの mRNA およびタンパクの半減期

(A) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)存在下と非存在下で12時間培養し、アクチノマイシンD(2.5  $\mu$ g/ml)を作用させた。反応後、6時間、12時間のタイミングで全RNAを回収し、 $\alpha 2(I)$ コラーゲンのmRNA発現量をリアルタイムPCR法によって比較した(n=3)。

(B) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)存在下と非存在下で24時間培養し、シクロヘキシミド(10  $\mu$ g/ml)を作用させた。反応後、2時間、4時間のタイミングでタンパクを回収し、I型コラーゲンタンパク発現を免疫ブロット法にて評価した。グラフは、デンシトメリーによってバンドを定量化し、0時間後の数値を100とし、2時間後、4時間後の数値を相対評価したものである。実線はIL-20非刺激群、破線はIL-20刺激群をそれぞれ示した(n=3)。

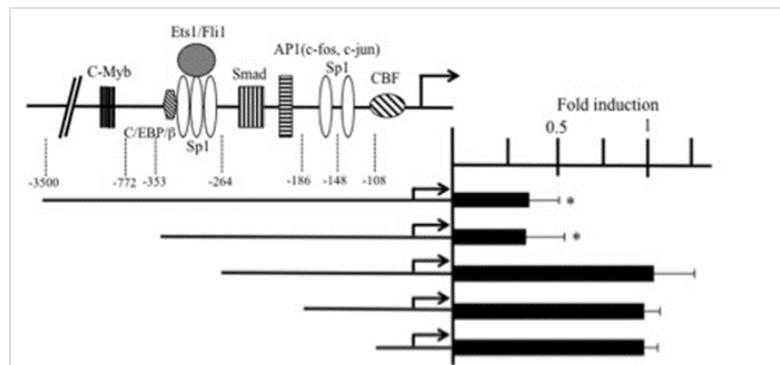


図3 CATアッセイ

$\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーターconstructを正常線維芽細胞に一過性形質導入後、IL-20(100ng/ml)の存在下、非存在下で24時間培養した。バーグラフはIL-20非刺激群(1.0)に対するIL-20刺激群のCATの活動性を相対評価で示した(n=3)。

\*P<0.05

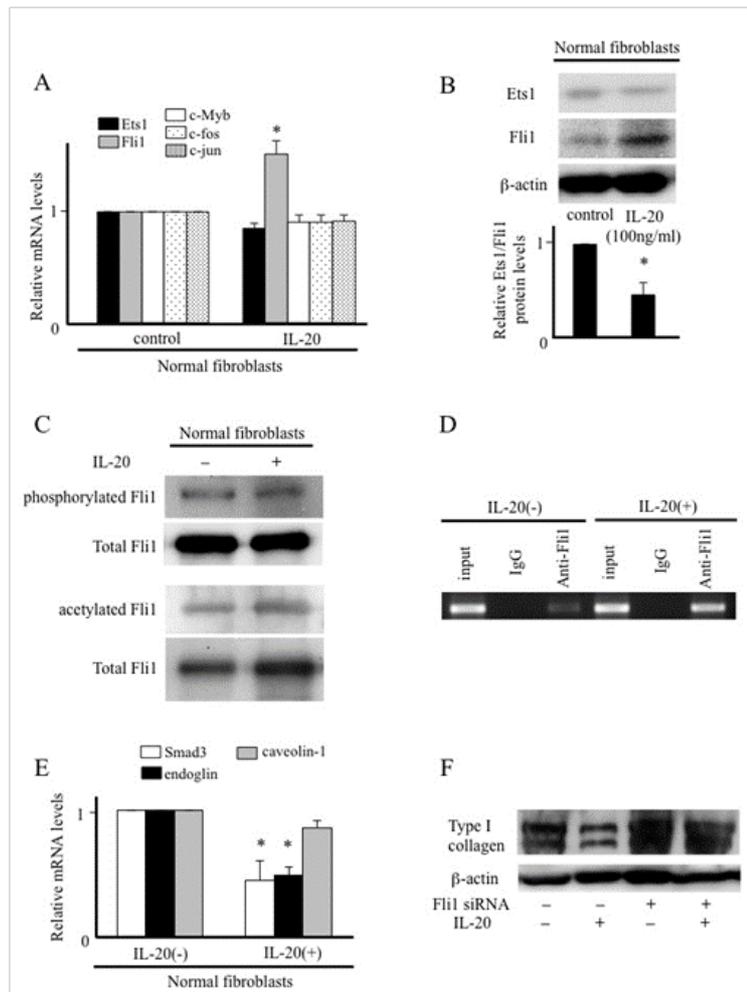


図4 IL-20がFli1発現に及ぼす影響

(A) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)存在下と非存在下で12時間培養した。mRNA発現量はリアルタイムPCR法を用いて比較した(n=7)。\*P<0.05

(B) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)存在下と非存在下で24時間培養した。Ets1, Fli1の抗体にて免疫プロット法を行なった。図1Bと同じ手法でバンドを定量化し、Ets1とFli1のタンパク発現の比率をバーグラフに示した(n=3)。\*P<0.05

(C) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)存在下と非存在下で24時間培養した。抗Fli1抗体を用いて細胞溶解物を免疫沈降し、免疫プロット法にて Fli1のリン酸化およびアセチル化の程度を測定した(n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(D) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)存在下と非存在下で12時間培養した。細胞DNAを剪断し、クロマチン(入力DNA)を抗Fli1抗体もしくはIgGアイソタイプ対照抗体で免疫沈降を行なった。沈降物を 2(I)コラーゲン遺伝子プロモーターのプライマーを用いてPCRで増幅させ、アガロースゲル電気泳動にて検出した(n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(E) 図2Aと同じ手法でSmad3, endoglinおよびcaveolin-1のmRNA発現量を測定した(n=7)。\*P<0.05

(F) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、Fli1 siRNA存在下と非存在下でIL-20(100ng/ml)にて12時間培養した。I型コラーゲン発現を免疫プロット法にて測定した(n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

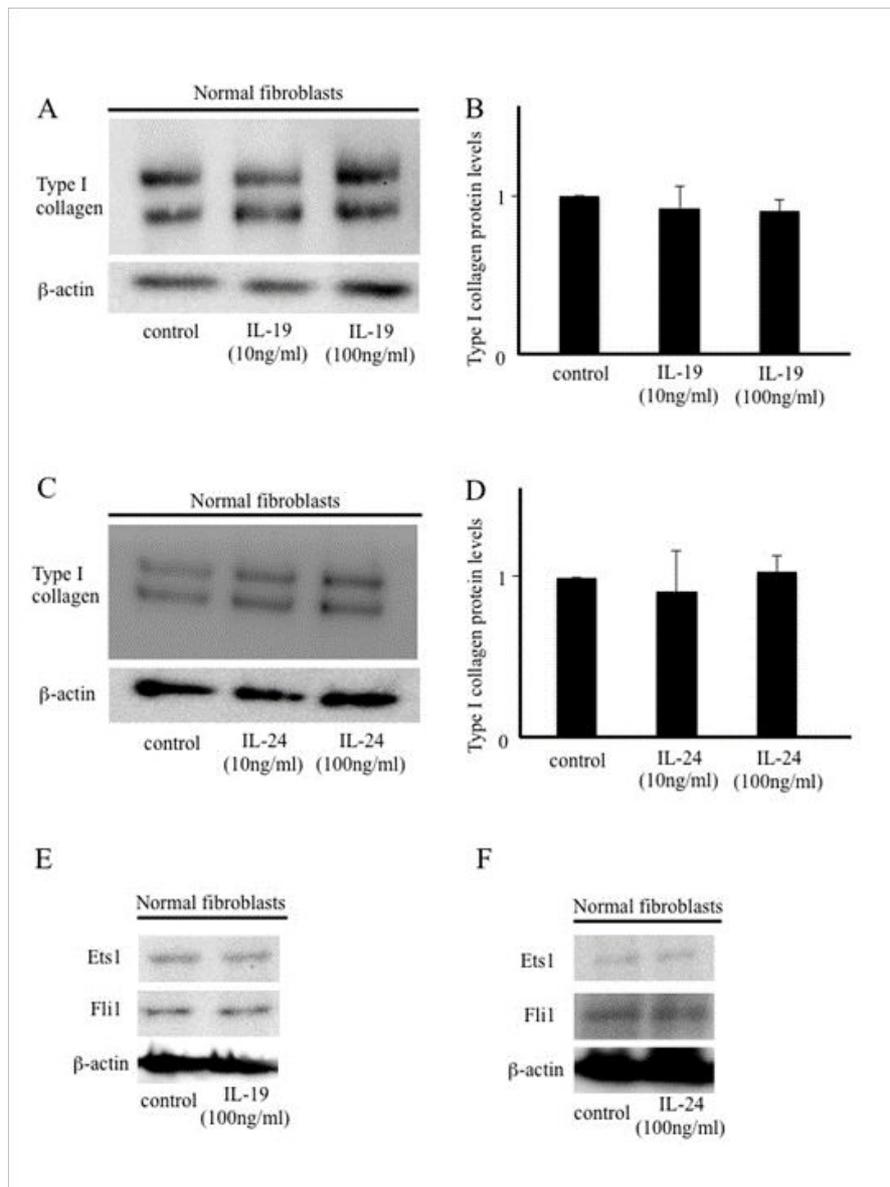


図5 正常皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン発現に対するIL-19およびIL-24の効果

(A-D) 正常線維芽細胞を24時間無血清処理し、IL-19およびIL-24(ともに100ng/ml)存在下と非存在下で24時間培養した。I型コラーゲンおよびβ-アクチンの抗体にて免疫プロット法を行なった。図1Bと同じ手法にてバンドを定量化し、バーグラフに示した (n=3)。

(E,F) Ets1, Fli1のタンパク発現量は免疫プロット法にて測定した。

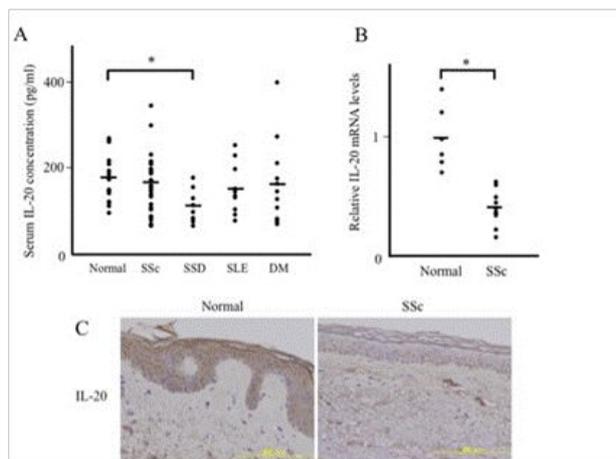


図6 リウマチ性疾患患者の血清および皮膚組織における IL-20 濃度

(A) ELISA 法による血清 IL-20 濃度測定。血清サンプルは SSc(n=33), SSD(n=9), SLE(n=10), DM(n=12)および健康人(n=15)より採取した。バーは各群の平均値を示した。\*P<0.05

(B) 全 RNA を SSc 患者 12 名と健康人 6 名の皮膚組織から抽出した。IL-20 mRNA の発現をリアルタイム PCR によって分析した。\*P<0.05

(C) IL-20 による皮膚パラフィン切片の免疫染色。(左)が健康人、(右)が SSc 患者。倍率×200 (n=3)。

3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

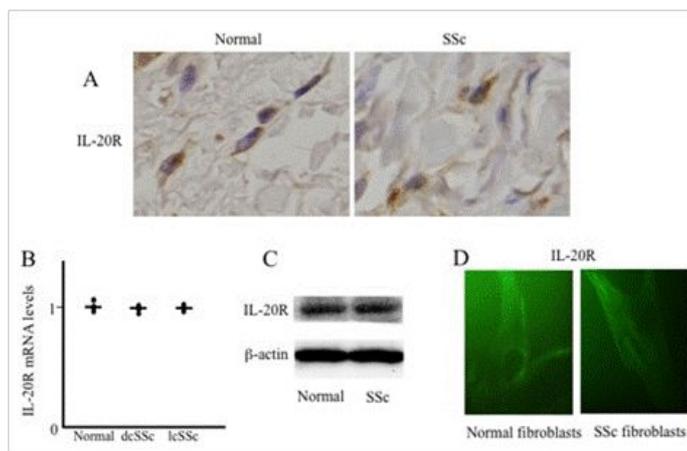


図7 線維芽細胞における IL-20 受容体の発現

(A) IL-20 受容体による皮膚パラフィン切片の免疫染色。(左)が健康人、(右)が SSc 患者。倍率×400 (n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(B) 全 RNA を SSc 患者 12 名と健康人 6 名の皮膚組織から抽出した。IL-20 受容体の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法によって分析した。

(C) 正常線維芽細胞と SSc 線維芽細胞の溶解物からタンパクを回収し、IL-20 受容体の抗体を用いて免疫プロット法を行なった。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(D) 正常線維芽細胞と SSc 線維芽細胞において IL-20 受容体の抗体を用いて免疫蛍光顕微鏡検査を行なった。倍率×1000 (n=3)。3つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

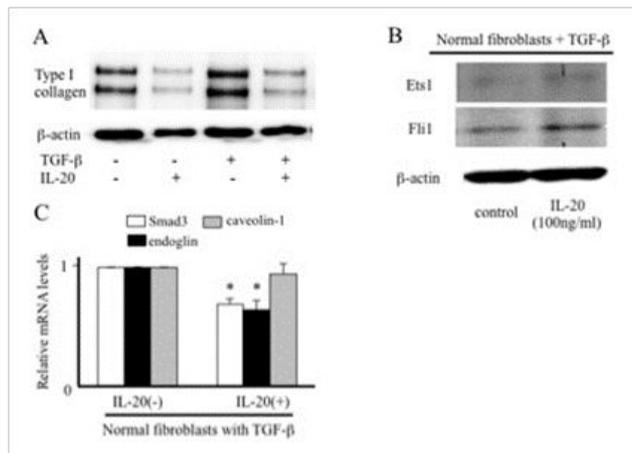


図 8 TGF-β 刺激した正常線維芽細胞における I 型コラーゲン発現に対する IL-20 の効果

(A) 正常線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)および/または TGF-β (2ng/ml)で 24 時間培養した。I 型コラーゲンの発現を免疫プロット法にて測定した(n=3)。3 つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(B) 正常線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、TGF-β (2ng/ml)存在下で IL-20(100ng/ml)を加えて 24 時間培養した。Ets1, Fli1 の発現を免疫プロット法にて測定した(n=3)。3 つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(C) 正常線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、TGF-β (2ng/ml)存在下で IL-20(100ng/ml)で 12 時間培養した。Smad3, endoglin およびcaveolin-1 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で比較した(n=7)。\*P<0.05

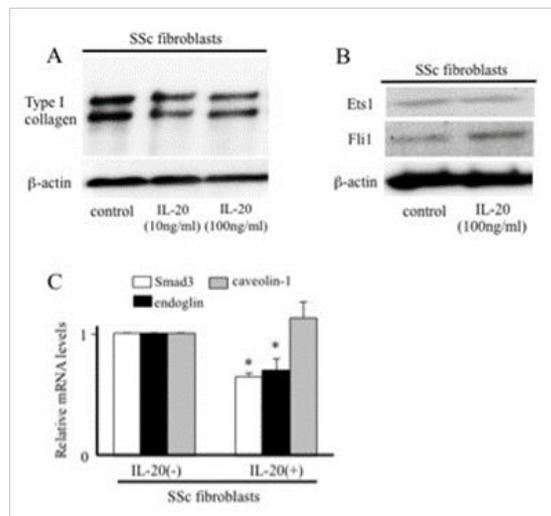


図 9 SSc 線維芽細胞における I 型コラーゲン発現に対する IL-20 の効果

(A) SSc 線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)で 24 時間培養した。I 型コラーゲンの発現を免疫プロット法にて測定した(n=3)。3 つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(B) SSc 線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)で 24 時間培養した。Ets1, Fli1 の発現を免疫プロット法にて測定した(n=3)。3 つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(C) SSc 線維芽細胞を 24 時間無血清処理し、IL-20(100ng/ml)で 12 時間培養した。Smad3, endoglin および caveolin-1 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で比較した(n=7)。\*P<0.05

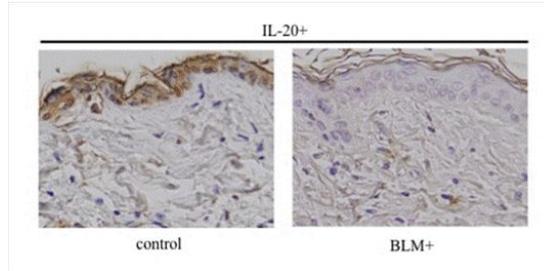


図 10 IL-20 によるマウスの皮膚パラフィン切片の免疫染色。(左)が PBS を投与された野生型マウス、(右)がブレオマイシンを投与されたマウス。倍率×200 (n=5)。5つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

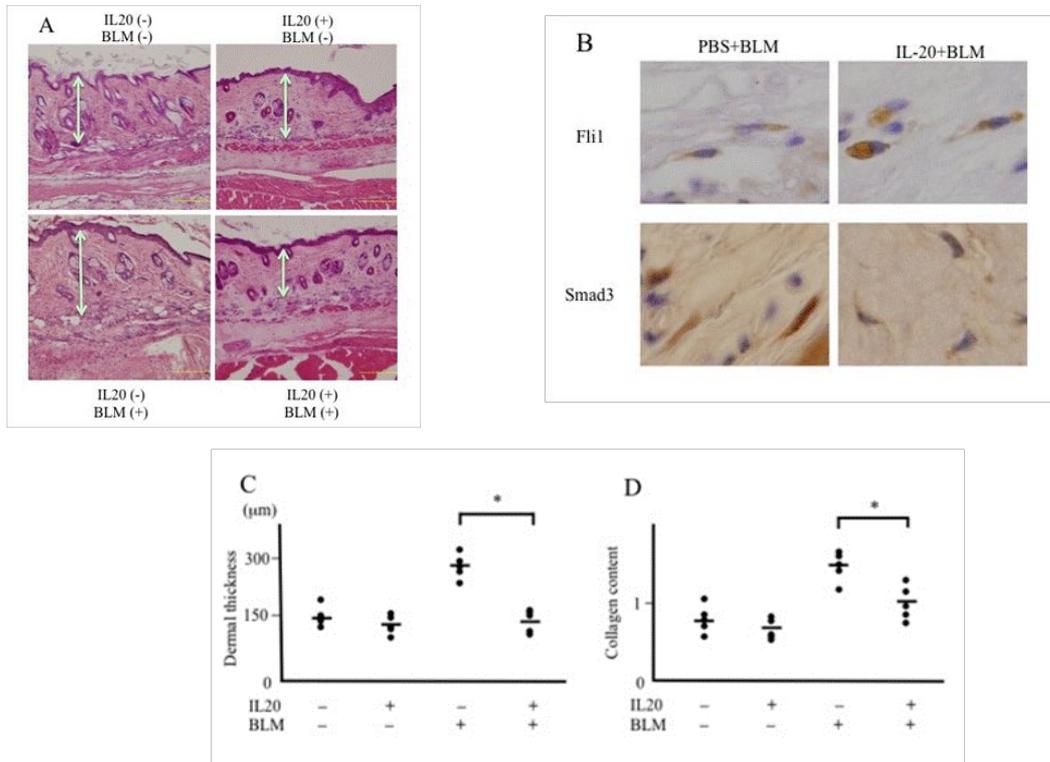


図 11 ブレオマイシン誘発皮膚線維化モデルマウスに対する IL-20 の効果

(A) マウスの皮膚パラフィン切片の H-E 染色。(左上)が PBS のみを投与された野生型マウス、(右上)が IL-20 と PBS を投与された野生型マウス。(左下)がブレオマイシンと PBS を投与されたマウス。(右下)が IL-20 とブレオマイシンを投与されたマウス。スケールバーは 0.1mm。それぞれ 5つのサンプルのうち代表的な結果を示した。

(B) マウスの皮膚パラフィン切片を用いた Fli1 (上段)、Smad3 (下段) による免疫染色。

(左)がブレオマイシン+PBS、(右)がブレオマイシン + IL-20 をそれぞれ投与されたマウス。倍率×400 (n=5)。5つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

(C) 図 11A における皮膚の厚さの測定値。バーは各群の平均値を示した(n=5)。\*P<0.05

(D) 図 11A における皮膚切片でのコラーゲン含有量(n=5)。バーは各群の平均値を示している。\*P<0.05

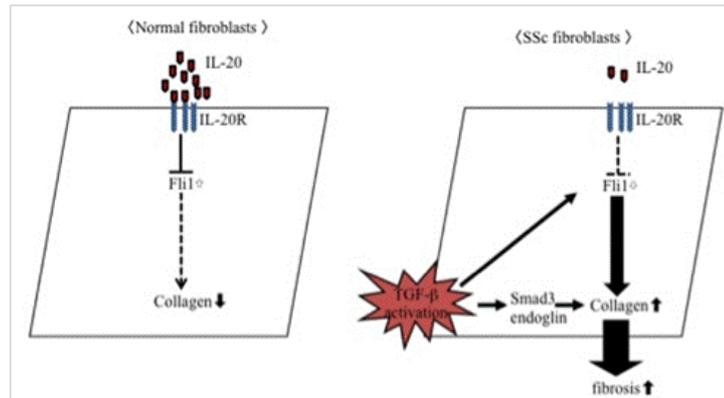


表1. 細胞外マトリックス関連遺伝子のPCRアレイの結果

Symbol	Name	Fold change
<u>Up-regulated genes by IL-20</u>		
THBS2	thrombospondin 2	113.77
TGIF1	TGF $\beta$ -induced factor homeobox 1	57.28
MMP9	matrix metalloproteinase 9	33.13
<u>Down-regulated genes by IL-20</u>		
MMP3	matrix metalloproteinase 3	0.02
SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1	0.02
SMAD3	SMAD family member 3	0.02
DCN	decorin	0.03
PLAU	plasminogen activator, urokinase	0.03
LOX	lysyl oxidase	0.03
COL1A2	collagen, type I, $\alpha$ 2	0.03
ENG	endoglin	0.05
CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	0.05
IL5	interleukin 5	0.06
FASLG	Fas ligand	0.06
IL10	interleukin 10	0.06
IL1A	interleukin 1, $\alpha$	0.06

独立した3人の健常人の皮膚線維芽細胞からのmRNAを同量混合し、IL-20刺激群と非刺激群に分け、mRNAの発現プロファイルをPCRアレイにて評価した。倍率変化は $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ （それぞれのmRNAの $\Delta Ct$ -コントロールのmRNAの $\Delta Ct$ ）を示す。 $\Delta Ct$ 値はそれぞれのmRNAのCt値-house keeping遺伝子のCt値で算出。遺伝子は増加または減少したもののうちIL-20刺激により16倍以上変化があったもののみを表示。

表2. SSc患者の臨床症状および検査所見と血清IL-20濃度との関連

	Patients with normal IL-20 levels (n=16)	Patients with reduced IL-20 levels (n=17)
Mean age at onset (y)	54.9	62.3
Mean duration of disease (y)	61.6	71.4
Type (diffuse:limited)	5:11	8:9
MRSS (point)	10.2	13.1
<b>Clinical features</b>		
Pitting scars	50.0	41.2
Ulcers	31.3	23.5
Nailfold bleeding	43.8	58.8
Raynaud's phenomenon	93.8	94.1
Telangiectasia	18.8	11.8
Contracture of phalanges	68.8	76.5
Calcinosis	0	5.9
Diffuse pigmentation	12.5	35.3
Short SF	43.8	52.9
Sicca symptoms	31.3	35.3
<b>Organ involvement</b>		
Pulmonary fibrosis		
Mean per cent VC	99.0	94.6
Mean per cent DLo	79.8	79.8
Pulmonary hypertension	43.8	58.8
Esophagus	12.5	52.9*
Heart	25.0	35.3
Kidney	12.5	0
Joint	18.8	35.3
Thrombosis	0	0
<b>ANA specificity</b>		
Anti-topo I	31.3	23.5
Anti-centromere	56.3	41.2
Anti-U1 RNP	18.8	11.8

値は全てパーセンテージを示す。

\*P<0.05 versus patients with normal IL-20 levels using Fisher's exact probability test.

表3 SSc患者の臨床学的特徴

patient No.	Sex/age	skin sclerosis	pulmonary changes	ANA	Raynaud phenomenon	NFB	point
1	F/47	-	-	Topo-I	-	-	5
2	F/48	swollen	-	others	Triphasic	-	5
3	F/45	-	-	Topo-I	-	-	5
4	F/57	swollen	-	others	Triphasic	1 or 2 fingers	6
5	F/68	-	-	U1-RNP	Triphasic	-	6
6	F/80	-	-	ACA	Triphasic	1 or 2 fingers	7
7	F/58	swollen	-	ACA	Triphasic	1 or 2 fingers	8
8	F/62	-	+, VC ≥ 80%	ACA	Triphasic	-	8
9	F/75	-	+, VC ≥ 80%	ACA	Triphasic	-	8

## 強皮症患者における毛髪中 microRNA 発現の検討

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

協力者 王 中志 熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 研究員

### 研究要旨

様々な疾患において血清 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事が報告された。我々は全身性強皮症患者 11 例および正常対照群 13 例を対象として、毛根・毛髪と血清から microRNA を抽出し、real-time PCR を用いて miR-196a の発現量を調べた。強皮症患者では毛髪中の miR-196a 発現が有意に減少していた。

### A. 研究目的

microRNA (miRNA) は、ターゲットとなる mRNA の発現を制御する小分子 non-coding RNA で、遺伝子発現・発生・細胞増殖・分化・アポトーシスなど、種々の細胞機能において重要な役割を果たすことが知られている。また様々な疾患において miRNA の発現パターンがバイオマーカーとして有用であることに注目が集まっている。最近、毛髪中にも miRNA が安定して存在する事が報告された (Lefkowitz et al . PLoS One 2011)。しかしながら、強皮症における毛髪中 miRNA 発現に関する報告は少ない。そこで我々は強皮症における毛髪 miRNA のバイオマーカーとしての有用性の検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1) 対象

血清および毛根と毛髪は熊本大学病院皮膚科を受診した全身性強皮症患者 11 例および正常人 13 例から採取し、直ちに - 80 に保存

した。強皮症患者は全例が American College of Rheumatology の強皮症診断基準を満たしていた。本研究は、Declaration of Helsinki に基づき、倫理委員会の審査を経て、患者および正常人の同意を得て行った。

#### 2) 血清 miRNA の抽出

血清 100  $\mu$ l に対し *C. elegans* miR-39 (5 fmol/ $\mu$ l, Takara Bio Inc) を 5  $\mu$ l 加え抽出率の補正に使用した。miRNeasy Mini kit (Qiagen) と miRNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) を使い、プロトコールに従って血清 miRNA の抽出を行った。

#### 3) 毛根 miRNA の抽出

一本の毛根を水とエタノールで洗浄し、800  $\mu$ l の Isogen (Nippon Gene) に溶かして、*C. elegans* miR-39 (5 fmol/ $\mu$ l) を 5  $\mu$ l を加え、プロトコールに従って毛根 miRNA の抽出を行った。

#### 4) 毛髪 miRNA の抽出

miRNeasy RNA isolation kit®, mirVana™ miRNA Isolation Kit® (Ambion), Isogen®お

および Isohair® (Nippon Gene) + Isogen® の 4 種類の方法を用い、プロトコールに従って毛髪 miRNA の抽出を行った。

(4)については、毛髪を水とエタノールで洗浄し、Isohair kit に含まれる enzyme solution と lysis solution で溶解して、Isogen を用い、プロトコールに従って毛髪 miRNA の抽出を行った。

#### 5) real-time PCR による解析

血清および毛根と毛髪から抽出した miRNA は Mir-X miRNA First Strand Synthesis (Takara) を用いて一本鎖 cDNA に合成し、リアルタイム PCR 法にて相対定量を行った。

#### 6) miRNA PCR array analysis

正常人の血清および毛根と毛髪から miRNA を抽出し、miScript II RT kit (Qiagen) を用いて cDNA に合成し、96-well miScript miRNA PCR array (Qiagen)を用いて PCR Array 解析を行った。

## C. 研究結果

### 1) 毛根と毛髪からの miRNA 抽出方法の比較

まず、毛根は Isogen を用いて 4 で一晩 incubate することにより溶解することが出来た。抽出した RNA を鋳型にして miRNA-150 と U6 のプライマーを用いて real-time PCR を行ったところ増幅がみられた (表 1)。Negative control として手術に使用するナイロン糸を用いたが、miRNA は検出されなかった。

一方、毛髪は miRNeasy RNA isolation kit®, mirVana miRNA Isolation Kit®, Isogen® として Isohair® + Isogen®による方法を比較し、Isohai と Isogen を用いて毛髪 1-10 本(約

5cm)を溶解し(図 1-a)、十分な miRNA を抽出することが出来た(表 2)。毛髪の量を増やすごとに miR-150 と U6 の Ct 値が小さくなる、つまりこれらの抽出量が増加していると考えられた。

### 2) 毛根と毛髪 miRNA 発現の再現性

三人の正常人で、頭の二ヶ所から毛根と毛髪を採取してデータの再現性を調べた。miR-150 と U6 発現の同一人由来の 2 サンプル間の違いは 2 倍以内に治まっていたので、再現性があると判断した (図 1 -b,c)。

### 3) 血清・毛根・毛髪 miRNA 発現量の相関

正常人 10 人の血清および毛根と毛髪の miRNA を等量で混合し 88 種類の miRNA を PCR アレイで解析した (表 3)。血清および毛根と毛髪の miRNA 発現を比較したところ、基本的に 3 者に強い相関は無かったため、独立したマーカーとして機能する可能性が考えられた(図 1 -d,e,f)。

### 4) 強皮症患者における毛根・毛髪 miR-196a 発現

以上の予備実験を経て、毛髪と毛根の miRNA の臨床的な意義を調べた。miR-196a はコラーゲンを target とする miRNA で、強皮症の皮膚や線維細胞では減少しコラーゲン増加の一因になっていると考えられているが、血清では減少していないため疾患マーカーとしては使用できない (Honda N, et al. J Immunol 2012)。

我々は正常人と強皮症患者の血清および毛根と毛髪での miR-196a 発現を比較した。過去の報告通り血清では正常と強皮症で差は無かったが、強皮症の毛根では少し減少して、毛髪では有意に減少した (図 2)。毛髪の

miR-196a 濃度で ROC 曲線を作成したところ、曲線下面積は0.75 となり0.7 を超えているため、正常人と強皮症患者を区別するマーカーとして感度と特異度のバランスがよく、診断マーカーとして有用であることが示された(図3)。

#### D. 考案

強皮症患者では血管の狭小化がみられるため、時に頻回の採血が困難である。毛髪は血液に比べより簡便に採取できるため、強皮症患者で毛の miRNA 発現量が疾患マーカーとなればより非侵襲的に診断や病勢の評価を行うことが出来ると考えられる。

何故皮膚で減少している miR-196a が血清や毛根では減少しておらず毛髪でまた減少しているのかについては不明であるが、一つの仮説として血清・毛根でもごくわずかに miR-196a が減少しているが、そのような血清・毛根由来の小さな変化が毛がのびるに従って積分されて、毛髪では大きな変化が見やすくなっている可能性があると考えている。

そのため、毛髪 miRNA は感染症などの急性疾患よりも強皮症のような慢性疾患においてより有用な疾患マーカーとなり得ると考える。

#### E. 結論

我々の研究により毛根や毛髪から効率的に miRNA が抽出できる事が分かり、毛髪中の miR-196a は強皮症の診断マーカーになる可能性がある事が示された。

#### F. 文献

1. Honda N, et al. TGF- $\beta$ -mediated downregulation of microRNA-196a contributes to the constitutive upregulated type I collagen expression in scleroderma dermal fibroblasts. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3323-31.
2. Lefkowitz GK et al.: The post-apoptotic fate of RNAs identified through high-throughput sequencing of human hair. *PLoS One*. 2011;6(11):e27603.

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
Detection of hair-microRNAs as the novel potent biomarker: evaluation of the usefulness for the diagnosis of scleroderma.  
Wang Z, Jinnin M, Kudo H, Inoue K, Nakayama W, Honda N, Makino K, Kajihara I, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H. *J Dermatol Sci*. 2013 Nov;72(2):134-41.
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

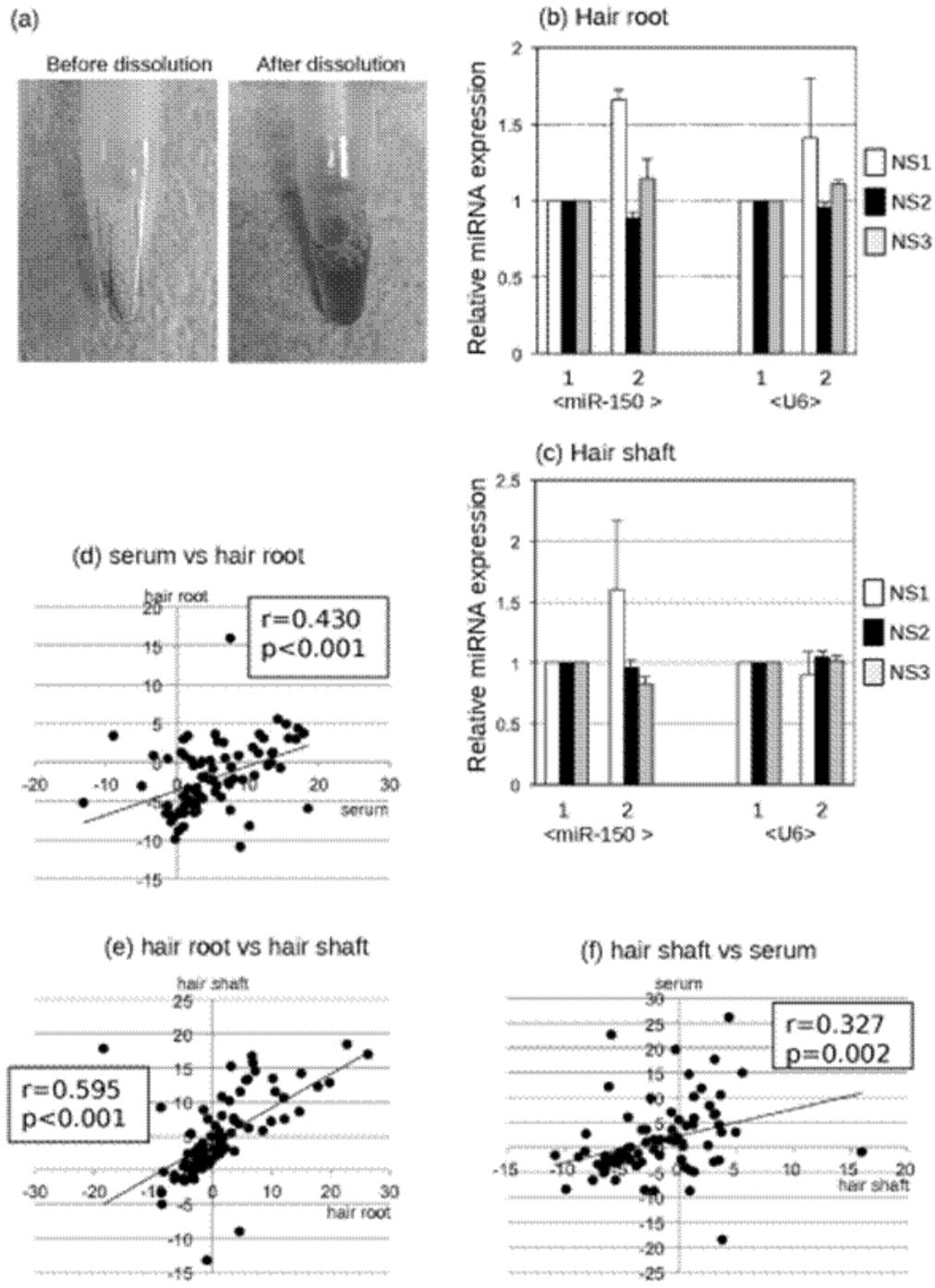


図 1:

(a) Isohair kit を用いた毛髪の溶解前と溶解後

(b,c) 毛根と毛髪の miRNA 発現の再現性。正常人 3 例 (NS1 -3) の頭部の二ヶ所から毛根および毛髪を採取して miR-150 と U6 発現を real-time PCR で解析した。

(d,e,f) 血清・毛根・毛髪 miRNA の発現量の相関。

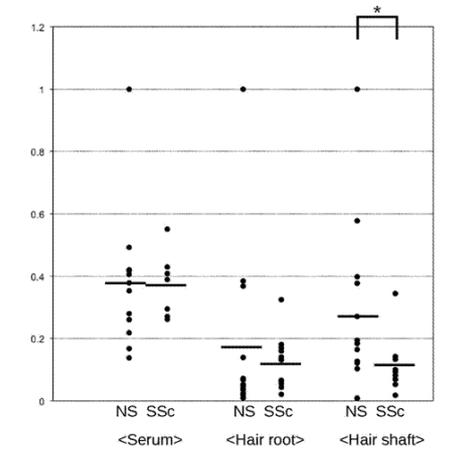


図 2: 正常人 13 例と強皮症患者 10 例の血清および毛根と毛髪より miRNA を抽出し real-time PCR にて miR-196a の発現量を解析した。横線は平均を示す。\* p<0.05

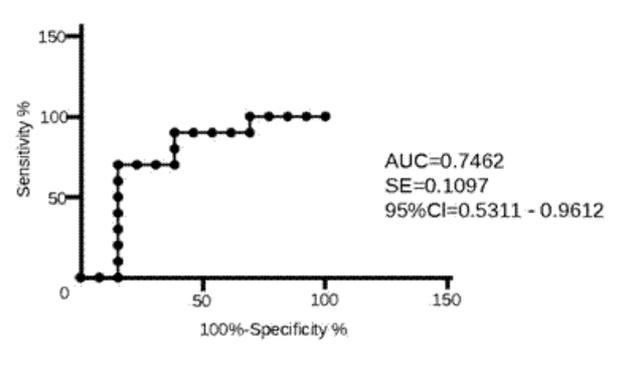


図 3: 毛髪 miR-196a の ROC 曲線。

表 1. 正常人の毛根からの miRNA 抽出

		miR-150	U6
Isogen®	a hair root	31.54	19.16
	surgical nylon suture	-	-
	blank	-	-

表 2. 正常人の毛髪からの miRNA 抽出

Ct	miR-150	U6
hair shafts (one piece)	33.28	26.73
hair shafts (five piece)	28.60	22.34
hair shafts (ten piece)	27.88	21.98
surgical nylon sutures	-	-
blank	-	-

表 3. PCR Array の結果

miRNA name	serum	hair root	hair shaft	miRNA name	serum	hair root	hair shaft
let-7a	-6.71	0.08	-3.82	miR-133a	5.54	14.20	15.04
let-7c	-3.34	1.49	-2.82	miR-133b	1.25	13.48	10.24
miR-1	3.78	17.79	-18.4	miR-134	1.95	10.67	11.99
miR-7	-0.67	7.62	3.60	miR-141	3.02	0.90	-2.78
miR-9	3.08	12.23	17.77	miR-143	-2.56	7.10	9.93
miR-10a	-0.38	12.81	19.79	miR-145	-2.90	7.32	3.64
miR-10b	-0.08	13.23	5.67	miR-146a	-4.48	6.15	6.06
miR-15a	-3.24	2.79	3.65	miR-148a	-4.32	0.93	-2.55
miR-15b	-4.97	1.50	-2.06	miR-150	-8.13	10.22	2.79
miR-16	-8.84	0.20	-1.85	miR-155	1.24	13.37	5.91
miR-17	-5.22	-13.22	-1.00	miR-184	3.44	-9.02	4.53
miR-17*	0.60	6.81	4.47	miR-191	-6.30	2.73	-2.93
miR-18a	-4.30	3.30	0.12	miR-192	-2.16	7.98	1.53
miR-19a	-6.35	0.77	-2.06	miR-193a-5p	-2.27	5.00	-0.32
miR-19b	-6.48	1.06	-1.75	miR-195	-8.26	0.86	-0.63
miR-20a	-7.13	-0.58	-3.35	miR-196a	2.54	6.57	0.5
miR-21	-6.58	0.79	-2.78	miR-200a	3.44	1.51	-2.55
miR-22	-5.63	1.01	-1.93	miR-200b	0.92	1.06	-4.45
miR-23a	-7.60	-0.81	-6.53	miR-200c	1.25	0.53	-4.93
miR-24	-6.54	-1.55	-4.80	miR-203	0.92	-3.34	-8.60
miR-25	-6.52	2.43	-4.25	miR-204	15.94	7.54	-0.85
miR-26a	-6.60	-1.29	-5.04	miR-205	-3.02	-4.96	-8.53
miR-26b	-6.36	-1.28	-3.27	miR-206	3.03	16.74	6.60
miR-27a	-5.64	-1.39	-6.53	miR-208a	4.36	17.03	26.26
miR-29a	-5.22	2.51	-1.58	miR-210	-0.19	3.28	2.08
miR-30d	-5.45	2.05	-2.97	miR-211	-0.40	2.36	1.23
miR-30e	-5.22	1.59	-0.93	miR-214	1.17	11.46	4.61
miR-31	0.47	-1.29	-3.91	miR-215	-0.75	14.51	7.16
miR-34a	0.30	1.98	0.24	miR-221	-4.95	2.21	-1.35
miR-92a	-9.92	-0.32	-8.34	miR-222	-3.67	2.59	-1.27

miR-93	-5.49	2.62	-2.23	miR-223	-10.86	8.84	-1.51
miR-96	3.68	5.41	3.12	miR-224	0.16	3.43	-2.44
miR-100	-1.91	3.44	1.24	miR-296-5p	2.68	5.76	8.45
miR-103a	-4.58	1.27	-0.20	miR-372	3.14	15.75	6.80
miR-106b	-6.33	0.27	-2.62	miR-373	4.94	15.31	3.11
miR-107	0.27	4.61	0.95	miR-374a	-2.94	5.65	1.09
miR-122	-5.95	18.48	22.71	miR-375	-3.78	5.34	-3.71
miR-124	-2.27	9.26	-8.72	miR-376c	0.84	8.65	14.69
miR-125b	-5.65	-1.41	-3.04	miR-423-5p	-4.62	3.62	-1.72
miR-126	-6.20	7.47	12.21	miR-499-5p	3.59	11.58	10.55
miR-128	-2.23	4.58	1.68	miR-574-3p	-1.75	3.97	-1.61

## 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

- 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 **西村 智** 自治医科大学分子病態研究部 教授
- 協力者 **藤生克仁** 東京大学医学部附属病院循環器内科 特任助教
- 協力者 **真鍋一郎** 東京大学医学部附属病院循環器内科 講師
- 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 **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 **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 **赤股 要** 東京大学医学部附属病院皮膚科 大学院生
- 協力者 **鶴田大輔** 大阪市立大学皮膚科 教授
- 協力者 **Maria Trojanowska** Arthritis Center, Boston University School of Medicine  
Professor
- 協力者 **永井良三** 自治医科大学 学長
- 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の病因はいまだ不明であり、その多様な病態を一元的に説明し得る仮説は現時点では存在しない。SScを発症する上で最も強い危険因子は家族歴とされているが、患者の家族内で個々の家族構成員がSScに罹患する危険性は1%未満にとどまる。こうした事実より、SScは多因子疾患であり、その発症には遺伝因子のみならず、環境因子が深く関与していると考えられている。環境因子の影響により誘導される遺伝情報の変化の一つとしてエピジェネティック制御が挙げられるが、我々はSSc皮膚線維芽細胞においてエピジェネティック制御を介して発現が強力に抑制されている2つの転写因子(Friend leukemia virus integration 1 [Fli1]とKrüppel-like factor 5 [KLF5])に注目し、これらの転写因子の二重ヘテロ欠損(*Klf5<sup>-/-</sup>; Fli1<sup>-/-</sup>*)マウスを作成することにより、SScの主要3病態(免疫異常・血管障害・線維化)の全てを再現できる新規モデルマウスの作成に成功した。同マウスの病態の詳細を解析することにより、SScの病態解明・新規治療の開発が期待される。

## A. 研究目的

転写因子 Fli1 は、皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲン遺伝子の強力な転写抑制因子として機能している<sup>1</sup>。また、線維芽細胞における Fli1 遺伝子の発現低下は、TGF- $\beta$  signaling の活性化を模倣した遺伝子の発現変化を誘導する。全身性強皮症 (SSc) 患者由来の皮膚線維芽細胞では Fli1 遺伝子の発現が epigenetic 制御を介して恒常的に低下していることが知られており<sup>2</sup>、この異常が同細胞の恒常的な活性化に深く関与している可能性が示唆されている<sup>3-5</sup>。

*Fli1*<sup>-/-</sup> マウスの皮膚では、I 型コラーゲンの発現量が mRNA レベルおよび蛋白レベルで亢進しており、Fli1 遺伝子の発現低下は皮膚線維芽細胞の活性化を *in vivo* で誘導しうることが明らかにされている。しかしながら、同マウスの皮膚では真皮の肥厚は認められない。つまり、同マウスの皮膚では、過剰産生されたコラーゲンを皮膚組織へ蓄積させ、線維化を確立する重要な因子が欠損している可能性が示唆される。

TGF- $\beta$  signaling の活性化は線維化反応において極めて重要な役割を果たしているが、*in vivo* において組織の線維化を誘導するには、TGF- $\beta$  signaling の活性化に加えて connective tissue growth factor (CTGF) の発現亢進が不可欠である<sup>6,7</sup>。重要なことに、

*Fli1*<sup>-/-</sup> マウスの皮膚では、CTGF 遺伝子の発現量には変化がないことが明らかにされている。つまり、Fli1 遺伝子の恒常的発現低下に加え、CTGF 遺伝子の恒常的発現亢進が生じれば、*in vivo* において自然に皮膚線維化が誘導できる可能性が示唆される。

KLF5 は諸臓器での線維化反応を制御する重要な転写因子で、心筋線維芽細胞においては線維化反応を誘導し<sup>8</sup>、腎尿細管細胞においては線維化を抑制する<sup>9</sup>。皮膚線維化における KLF5 の役割に関してはこれまで明らかにされていなかったが、SSc 患者の病変部皮膚を用いた DNA アレイ解析により、KLF5 の発現低下が示されている<sup>10</sup>。そこで我々は KLF5 が皮膚線維化に及ぼす影響に注目して検討を行ったところ、正常皮膚線維芽細胞において KLF5 は CTGF 遺伝子の強力な転写抑制因子として機能しており、その発現低下により CTGF 遺伝子の発現が著明に亢進することが明らかとなった。つまり、Fli1 遺伝子の恒常的な発現低下により TGF- $\beta$  signaling の部分的な活性化が生じ、KLF5 遺伝子の恒常的な発現低下により CTGF 遺伝子の発現亢進を誘導できるため、理論的にはこの 2 つの転写因子の発現を同時に抑制することで、*in vivo* において線維化反応を誘導できる可能性が示唆される。

本研究では、上記の仮説を証明することを目的として、*Klf5*<sup>-/-</sup>; *Fli1*<sup>-/-</sup> マウスを作成し、

SSc の主要病態が再現できるかどうかについて検討を行った。

## B. 研究方法

### 患者と皮膚線維芽細胞培養

ヒト皮膚検体は発症から 2 年以内のびまん性皮膚硬化型 SSc (diffuse cutaneous SSc: dcSSc) 患者 8 人 (7 人は抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性、1 人は抗核抗体陰性) の前腕伸側遠位 1/3 から採取した。いずれの患者も臨床所見と組織学的所見に基づいて診断され、ほかの膠原病は合併していなかった。コントロール群の検体は年齢、性別、部位がほぼ合致した 8 人の健常人から採取した。研究は東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を得た上で、また被験者全員から書面上の同意を得た上で行った。線維芽細胞は上記の皮膚検体から同時に採取し、10%ウシ胎児血清を加えた minimal essential medium を用いて培養した。すべての培養線維芽細胞を用いた実験では継代数が 3~6 のものを用いた。

### 動物モデル

*Klf5<sup>-/-</sup>* マウスは東京大学循環器内科の藤生克仁先生、真鍋一郎先生、永井良三先生から提供していただいた<sup>11</sup>。*Fli1<sup>-/-</sup>* マウスは過去に報告されているものを用いた<sup>12</sup>。タイトスキ (Tsk/+) マウスは Jackson Laboratory か

ら購入した。すべての実験は東京大学医学系研究科の動物倫理規定に従って行った。麻酔にはエチルエーテルの吸入を用い、エチルエーテルによる吸入麻酔を深くすることで安楽死を行った。プレオマイシンを用いた皮膚線維化誘発モデルでは、6 週齢の雌マウスの背部皮膚に対してプレオマイシンを隔日で 3 週間皮下投与した。

### 免疫染色法

ヒトとマウスの検体はホルマリンで固定してからパラフィンで包埋し、切片を作り、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて染色した。皮膚の厚さや細胞数は無作為に選んだ少なくとも 5 視野で 2 人の検者 (S.N., Y.A) で測定し、それぞれのサンプルで平均を算出した。

### 免疫プロット

Confluent となった培養皮膚線維芽細胞を血清飢餓状態で 24 時間培養し、全細胞抽出物<sup>13</sup>と核内抽出物<sup>14</sup>を用意した。皮膚と肺の組織は RIPA バッファー (Santa Cruz) 中で鉗子を用いて小さく刻み、遠心し、上清を抽出した。そうして得られた検体を sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて電気泳動し、chemiluminescent

techniques (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)を用いてバンドを検出した。

### RNAの抽出と定量的リアルタイムPCR

肺や皮膚組織、培養細胞から1µgのRNAをQiagenのRNeasy Mini Kitを用いて抽出し、iScript cDNA Synthesis Kits (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いてcDNAに逆転写した。定量的リアルタイムPCRはSYBR Green PCR Master Mix (Life technologies)を用い、ABI prism 7000 (Life technologies)で測定した。いずれの検体も triplicates としてその平均を値として用いた。18S rRNAをリファレンス遺伝子として用いた。mRNA発現量の測定後にMelt curveを測定し、各プライマーから予想される単一の増幅産物が生成していることを確認した。

### 生体分子イメージング

マウス生体内での皮膚における血管構造や血行動態を検索するため、我々は過去の報告<sup>15</sup>を改良した方法で多光子顕微鏡を用いた。マウスはウレタン (1.5 g/kg)で麻酔し、倒立顕微鏡 (Nikon, Eclipse Ti, Tokyo, Japan)を用いて観察した。Texas-Red-dextran (25 mg/kg, 70 kDa, Invitrogen, San Diego, D1830) と Hoechst 33342 (10 mg/kg,

Invitrogen, H1399)を尾静脈に注射し、それぞれ血管と細胞の核を可視化した。組織はTi:sapphire laser (Visio II, Coherent, Santa Clara, CA)を用いて860 nmの波長で励起し、Nikon A1R-MP systemを用いて撮影した。写真はNIS-Elements software (Nikon)を用いて解析した。

### 統計解析

統計解析には GraphPad Prism 5 を用いた。統計学的な有意差は 2 群間であれば Mann-Whitney U test を用いて、多群間であれば one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test を用いて解析した。正規分布に沿う場合には two-tailed t-test を用いた。P < 0.05 を統計学的に有意と考えた。値は平均値 ± s.e.m で表記した。

## C. 研究結果

### SSc患者の皮膚線維芽細胞ではepigenetic制御によりKLF5の発現が抑制されている

免疫染色により、SSc患者の皮膚組織ならびに皮膚線維芽細胞では健常人の組織や細胞に比べてKLF5の発現が抑制されていることが明らかとなった(図1a)。SScにおけるECMの過剰産生はepigenetic制御による影響を強く受けていることが知られている<sup>16-18</sup>。そこで、培養皮膚線維芽細胞を

5-aza-2'-deoxycytidine (DNA メチル化阻害薬) と trichostatin A (ヒストン脱アセチル化阻害薬) で処理したところ、SSc 皮膚線維芽細胞における KLF5 遺伝子の mRNA の発現量は正常皮膚線維芽細胞と同等のレベルにまで亢進し、一方、COL1A2 遺伝子の mRNA の発現量は正常皮膚線維芽細胞と同等のレベルにまで抑制された (図 1b)。以上のことから、エピジェネティック制御が SSc 皮膚線維芽細胞における KLF5 遺伝子の発現低下に関与している可能性が示唆された。

#### KLF5 は CTGF 遺伝子の転写抑制因子である

皮膚線維化における KLF5 の機能を解析するため、野生型マウスと *Klf5*<sup>-/-</sup> マウスから皮膚線維芽細胞を採取して培養し、各種線維化関連遺伝子の mRNA の発現量を定量的リアルタイム PCR 法で解析した。すると、CTGF の発現が *Klf5*<sup>-/-</sup> 皮膚線維芽細胞では野生型皮膚線維芽細胞に比較して 50% 上昇していた (図 2)。一方で、I 型コラーゲン、 $\alpha$ -SMA、integrin- $\alpha$ 5 といった他の線維化マーカーの発現量には両群の間で差は認められなかった。次に、ヒト包皮線維芽細胞に対して siRNA を用いて KLF5 遺伝子の発現を抑制したところ、同様に CTGF 蛋白の発現量は、定常状態、TGF- $\beta$ 1 刺激下のいずれの場合においても顕著に亢進した (図 3a)。さらに、KLF5 の発現

ベクターを CTGF 遺伝子プロモーターとともにヒト包皮線維芽細胞に対しトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイでプロモーター活性を測定したところ、KLF5 の用量依存性に最大 65%、CTGF 遺伝子のプロモーター活性が減少した (図 3b)。

次に、KLF5 と CTGF 遺伝子プロモーターの相互作用を調べるため、培養正常皮膚線維芽細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。すると、KLF5 は CTGF 遺伝子プロモーター領域に結合し、SSc 皮膚線維芽細胞や TGF- $\beta$ 1 刺激下の正常皮膚線維芽細胞では無刺激の正常皮膚線維芽細胞に比較してその結合量が減少していた (図 3c)。さらに、CTGF 遺伝子プロモーター上の KLF5 結合部位を特定するため、KLF5 が結合する可能性のある部位を検索し、それぞれの部位に Mutagenesis 法を用いて変異を導入した (図 3d)。それぞれの変異プロモーターをヒト包皮線維芽細胞にトランスフェクションしたところ、KBE1 (KLF5 binding site 1; 転写開始点から -112 ~ -105 bp) に変異を加えた場合にのみプロモーター活性が 2 倍に上昇したため、KBE1 に KLF5 が結合し、CTGF 遺伝子の転写抑制因子として働いている可能性が示唆された (図 3e)。

**KLF5 と Fli1 は共同して CTGF の転写活性を抑制する**

Ets 転写因子ファミリーに属する Ets1 と Fli1 はいずれも CTGF 遺伝子プロモーター上の KBE1 近傍に結合することが過去に報告されている(転写開始点から -126 ~ -77 bp)<sup>4,19</sup>。そこで、我々は KLF5 と Ets1 または Fli1 との間における物理的相互作用の有無を検討するため、正常皮膚線維芽細胞を用いて免疫沈降法を行った。すると、KLF5 と Fli1 は核内で複合体を形成していることが明らかとなったが、KLF5 と Ets1 の間に物理的相互作用は観察されなかった(図 4a)。次に、KLF5 と Fli1 が機能的にも共同して CTGF 遺伝子プロモーター活性を制御しているかどうかを検討するため、ヒト包皮線維芽細胞に対して KLF5 発現ベクターと Fli1 発現ベクターを同時にトランスフェクションして検討を行った。すると、Fli1 単独では CTGF 遺伝子プロモーター活性はわずかに減少するとどまったが、Fli1 と KLF5 が同時に作用すると転写抑制効果は相乗的に亢進した(図 4b)。同様に、ヒト包皮線維芽細胞に対して siRNA を用いて KLF5 と Fli1 の発現を同時に低下させると、CTGF 蛋白の発現量が相乗的に増加した(図 4c)。一方、I 型コラーゲン蛋白の発現量については、Fli1 siRNA により発現が上昇したが、KLF5 siRNA では発現量に変化は見られなかった。

#### ***Klf5*<sup>-/-</sup>;*Fli1*<sup>+/-</sup> マウスは皮膚線維化を自然発**

#### **症する**

過去の報告と我々のこれまでの研究で得られた知見を考慮すると、Fli1 遺伝子の恒常的な発現抑制により TGF- signaling が部分的に活性化し、KLF5 遺伝子の恒常的な発現低下により CTGF 遺伝子の発現が亢進するため、理論的にはこの 2 つの転写因子の発現を同時に低下させることで、線維化反応を誘導できると考えられる。一方、SSc 患者の皮膚線維芽細胞では epigenetic 制御により Fli1、KLF5 ともに発現が減少しているが、完全に消失しているわけではない。この状況をマウスで再現するため、KLF5 と Fli1 のダブルヘテロ欠損マウス (*Klf5*<sup>-/-</sup>;*Fli1*<sup>+/-</sup> マウス) を作成した。*Klf5*<sup>-/-</sup>;*Fli1*<sup>+/-</sup> マウスの生殖能力は保たれ、明らかな生存率の低下はなく、外見上の異常を示すことはなかった。皮膚線維化について組織を採取して観察したところ、2 カ月齢では真皮の厚さと皮膚中のコラーゲン含有量に野生型マウスと *Klf5*<sup>-/-</sup>;*Fli1*<sup>+/-</sup> マウスの間で差は明らかでなかった。ところが、3 カ月齢の *Klf5*<sup>-/-</sup>;*Fli1*<sup>+/-</sup> マウスでは野生型マウスに比較すると、真皮が 45% 肥厚し、コラーゲン線維は組織学的により密に配列していた(図 5a,b)。さらに、*Klf5*<sup>-/-</sup>;*Fli1*<sup>+/-</sup> マウスの皮膚ではコラーゲン含有量が増加していた(図 5c)。

### ***Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスの真皮では SSc に類似したコラーゲン細線維の異常がみられる**

2 カ月齢の *Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウス皮膚を透過型電子顕微鏡で観察したところ、肥大化したコラーゲン細線維が縦断像でみられ、また細線維の直径におけるばらつきが増加している所見が横断像で観察された (野生型: 平均 60.8 nm; レンジ 34.1-92.4 nm; *Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>*: 平均 100.3 nm; レンジ 11.0-249.3 nm; 図 5d)。重要なことに、SSc 患者皮膚における細線維の異常と同様、*Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスの皮膚では太いコラーゲン細線維が細いコラーゲン細線維と混在していた。一方で、KLF5 のヘテロ欠損単独では細線維の直径がわずかに増加するにとどまり、Fli1 のヘテロ欠損単独では径の小さな細線維が出現するのみであった (*Klf5<sup>-/-</sup>*: 平均 75.4 nm; レンジ 19.4-157.5 nm; *Fli1<sup>+/-</sup>*: 平均 62.0 nm; レンジ 11.0-105.9 nm)。これらの結果から、コラーゲン細線維の形成を制御する過程である fibrillogenesis<sup>20</sup>に関わる酵素の発現が KLF5 と Fli1 のダブルヘテロ欠損により変化している可能性が示唆された。

### ***Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスにおける皮膚血管障害**

SSc 患者では微小血管の構造異常<sup>21</sup>が生じる。*Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスでは視診による血管拡張は明らかでないものの、FITC-デキスト

ランを尾静脈から注射してから背部皮膚を採取し、血管構造を蛍光顕微鏡で観察すると、1 カ月齢という早い段階から血管の虫食い状狭窄と分枝状の血管構造が観察された (図 6a)。さらに、生体分子イメージングを多光子顕微鏡で行い、*Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスでは真皮コラーゲンの密度が高く、真皮血管の密度が減少していることを同定した (図 6b)。以上のことから、*Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスは皮膚において SSc 患者に類似した血管の構造異常<sup>22,23</sup>を示すことが明らかとなった。

### ***Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスは SSc 患者の間質性肺疾患に類似した線維化と血管病変を自然発症する**

SSc 患者では高頻度で間質性肺疾患や肺高血圧をはじめとした肺病変が観察されるため、*Klf5<sup>-/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスの肺組織を検討した。すると、胸膜側の肺辺縁を中心に軽度の肺胞隔壁肥厚が 2 カ月齢でみられた (図 7a)。さらに、4 カ月齢では肺胞構造の破壊とコラーゲン含有量の上昇が確認された (図 7b)。そして、8 カ月齢ではヒトの間質性肺疾患で SSc 患者に多いとされている亜型の non-specific interstitial pneumonia (NSIP) に類似した組織像を示した<sup>24</sup>。NSIP に特徴的なびまん性の肺胞隔壁肥厚と散在するリンパ球浸潤がみられたが、ヒトの特発性間質性肺疾患に多いと

されている usual interstitial pneumonia (UIP)で高頻度に観察される蜂窩肺はほとんど出現しなかった。また、大型の2型肺胞上皮細胞が増加していたが、UIPに特徴的な fibroblastic foci は観察されなかった。さらに、8カ月齢の肺組織では肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension; PAH) の存在を示唆するような細動脈の強い狭窄と  $\alpha$ -SMA陽性細胞増殖による顕著な血管壁肥厚を認めた (図 7c)。UIPに特徴的な動脈の plexiform lesions はみられなかったが、隔壁間の細静脈には内膜の肥厚と局所的な内腔狭窄、血管周囲のリンパ球浸潤を認め、肺静脈閉塞性疾患 (pulmonary veno-occlusive disease; PVOD) を示唆する所見であった (図 7d)。これらの線維化、血管病変はヒトの間質性肺疾患と同様、いずれも中心の気管支側ではなく、辺縁の胸膜側に症状が強かった。SSc患者の肺組織に置いても皮膚と同様 CTGF の発現が亢進していることが報告されている<sup>25</sup>。2型肺胞上皮細胞のマーカーである pro-surfactant protein C と CTGF で蛍光二重染色を行うと、 $Klf5^{-/-}; Fli1^{+/+}$  マウスでは2型肺胞上皮細胞が顕著に増加し、そのうちの多くが CTGF を発現していたため、CTGF が主に2型肺胞上皮細胞から産生されていると予想された (図 8)。これらの結果は、 $Klf5^{-/-}; Fli1^{+/+}$  マウスでは月齢とともに増悪

する肺病変を発症し、その組織学的特徴はSSc患者の間質性肺疾患にきわめて類似し、2型肺胞上皮細胞からの CTGF 過剰産生が発症に関与している可能性が明らかとなった。

### **$Klf5^{-/-}; Fli1^{+/+}$ マウスではB細胞が活性化し、自己抗体産生が観察される**

8カ月齢の肺組織ではB細胞のリンパ濾胞様の構造と間質におけるびまん性の浸潤がみられ (図 9a)、その所見はSSc患者における間質性肺疾患のB細胞浸潤に類似していた<sup>26</sup>。B細胞はIL-6を産生する細胞の一つであることが知られており<sup>27</sup>、IL-6の発現はSSc患者の皮膚、血清、末梢血単核球、培養皮膚・肺線維芽細胞において増加していることが過去に報告されている<sup>25,28-31</sup>。そして、IL-6を加えると培養線維芽細胞において、I型コラーゲン、 $\alpha$ -SMA、CTGFの発現が増加する<sup>29</sup>。我々がB細胞の機能を解析したところ、 $Klf5^{-/-}; Fli1^{+/+}$  マウスの脾臓から取り出したB細胞は、lipopolysaccharide (LPS)または抗CD40抗体の刺激に対して野生型マウスに比較すると約3倍もの量のIL-6を産生した (図 9b)。また、 $Klf5^{-/-}; Fli1^{+/+}$  マウスのB細胞ではCD19の発現が肺では15%上昇していた (図 9c)。さらに、 $Klf5^{-/-}; Fli1^{+/+}$  マウスでは抗核抗体の産生が認められた (図 9d)。以上より、 $Klf5^{-/-}; Fli1^{+/+}$  マウスではB細胞が活性化し、

活性化した B 細胞が自己抗体を産生している可能性が示唆された。

## D. 考案

SSc の疾患感受性遺伝子については GWAS などにより解析が進められてきたが、本症の発症に関与する環境因子の影響に関しては、化学物質により誘導される強皮症類似病態から一定の知見が得られているのみで、その詳細は未だ不明である。SSc の発症機序においては、遺伝子に加えて環境因子の影響が非常に大きいと考えられているが、患者由来の細胞を用いてエピジェネティック制御で発現が変化している遺伝子を同定することにより、環境因子の影響を受けている疾患感受性遺伝子の候補を同定することが可能である。転写因子 *Fli1* は SSc 皮膚線維芽細胞におけるエピジェネティック制御に注目することにより特定された疾患感受性遺伝子の一つであるが<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- 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- 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 TGFbeta1 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 -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

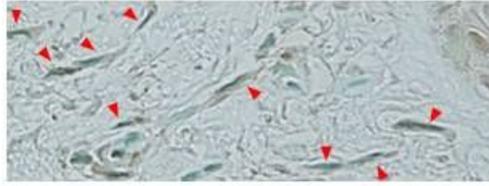
2. 学会発表

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

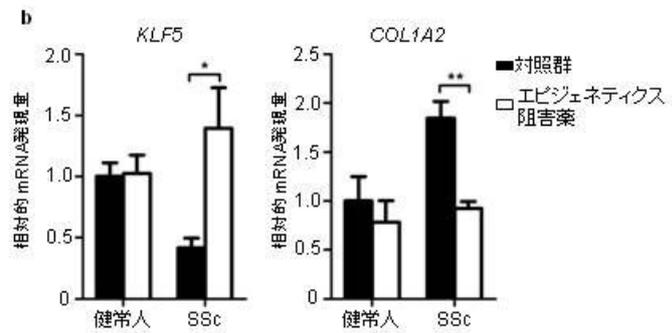


図1: KLF5の発現は epigenetic 制御により全身性強皮症 (SSc) の皮膚線維芽細胞 (fibroblasts) では減少している。

(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 μM と trichostatin A, 2 μM) 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 ± s.e.m で示した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

Two-tailed unpaired t-test。

図2

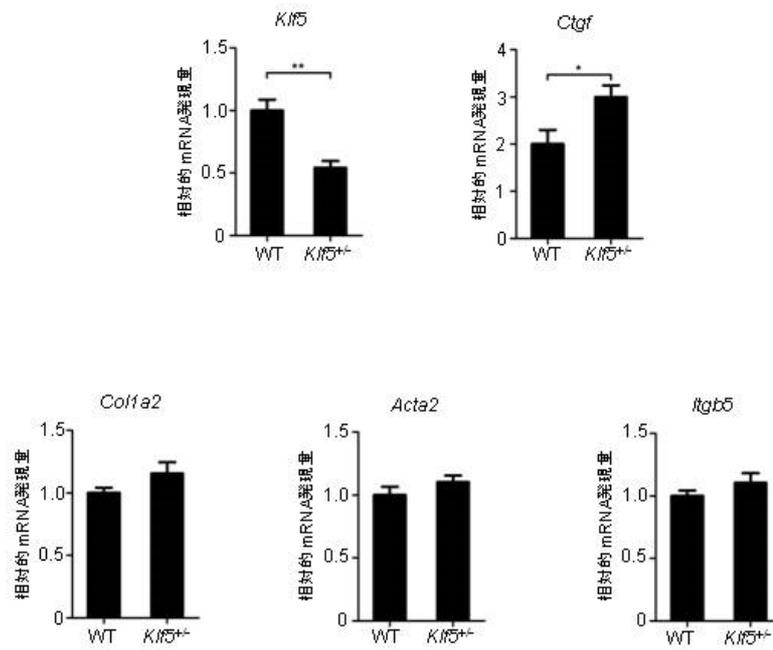


図 2 : *Klf5*<sup>-/-</sup> マウスから採取した培養皮膚線維芽細胞では、線維化を亢進する分子の中で、CTGF の mRNA レベルのみ野生型マウスと比較して上昇していた。

*Klf5*, *Ctgf*, *Col1a2*, *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

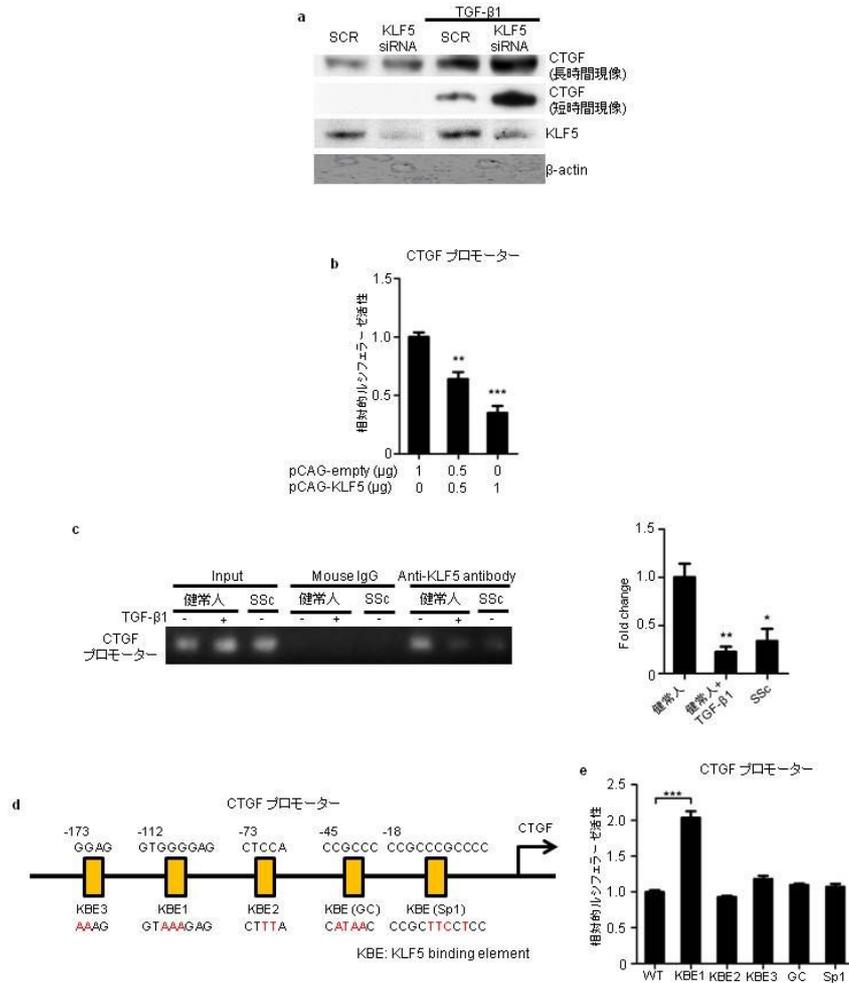


図3 : KLF5 は CTGF 遺伝子の転写抑制因子である。

(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-β1 (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 mean ± s.e.m. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001。Two-tailed unpaired t-test。

図4

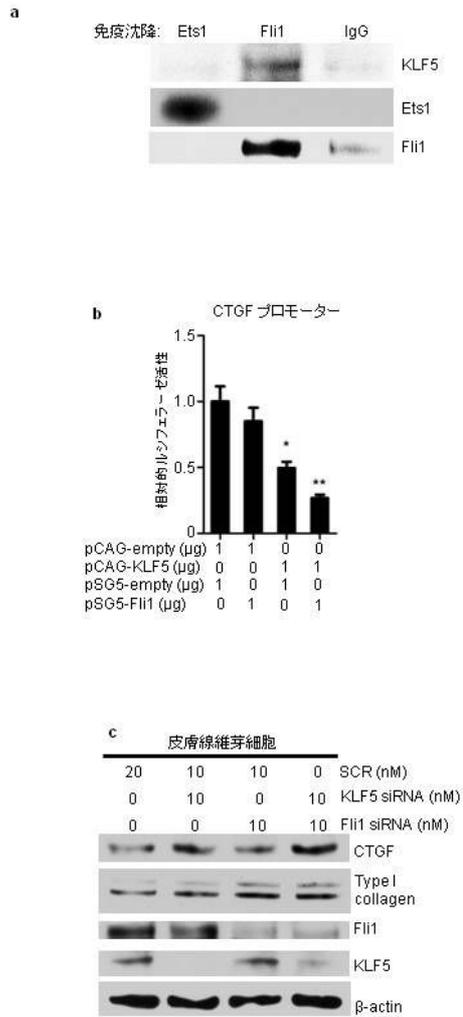


図4 : KLF5 と Fli1 は共同して CTGF 遺伝子の転写を抑制する。

(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

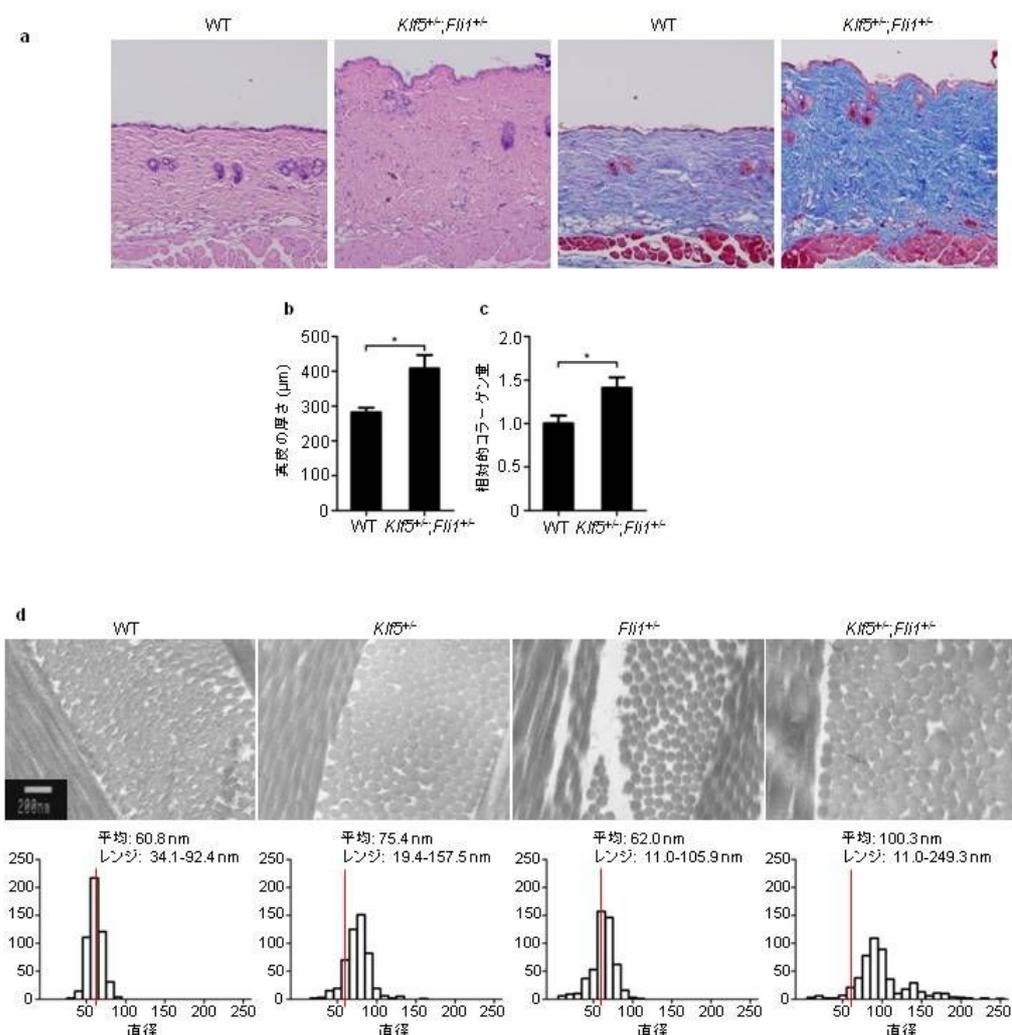


図5 : *Klf5<sup>-/-</sup>; Fli1<sup>-/-</sup>* マウスは自然に皮膚線維化を発症する。

(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

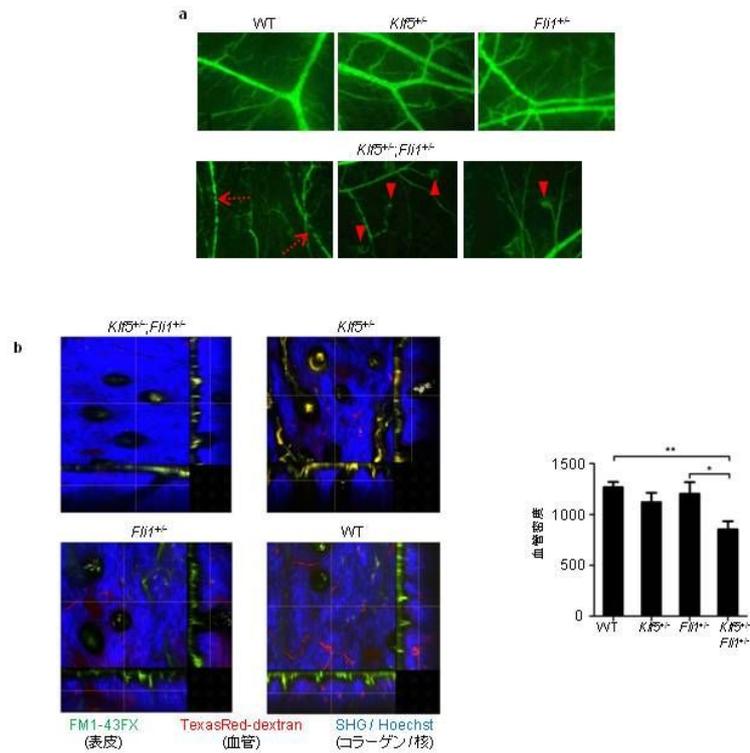


図6: *Klf5*<sup>-/-</sup>; *Fli1*<sup>-/-</sup> マウス皮膚は血管障害を示す。

(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、その右と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

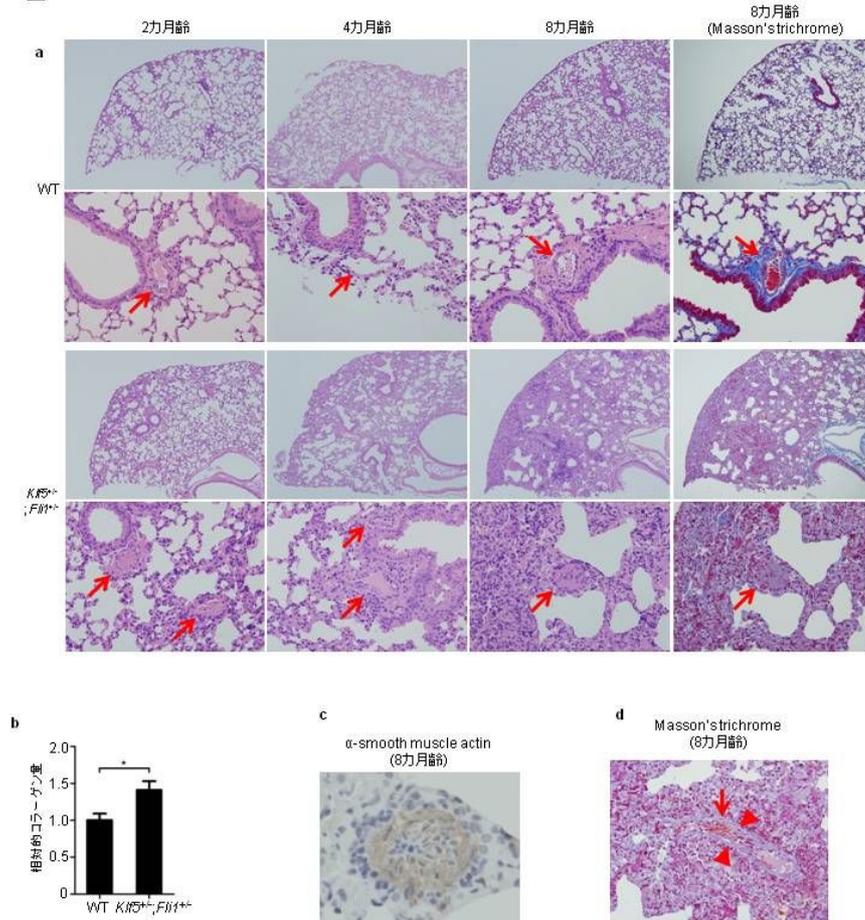


図7: *Klf5*<sup>-/-</sup>; *Fli1*<sup>-/-</sup> マウスはSSc患者の間質性肺炎に類似した肺病変を示す。

(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倍の両方で示す。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

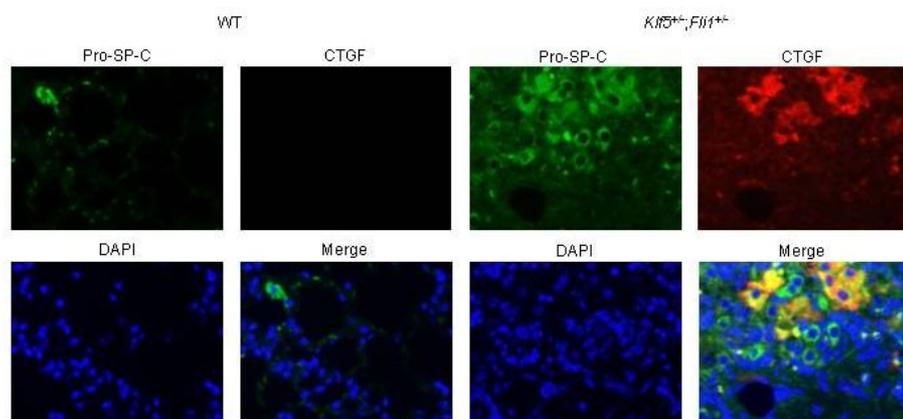


図8 : *Klf5<sup>+/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスの2型肺胞上皮細胞ではconnective tissue growth factor (CTGF) の発現量が大きく増加している。

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

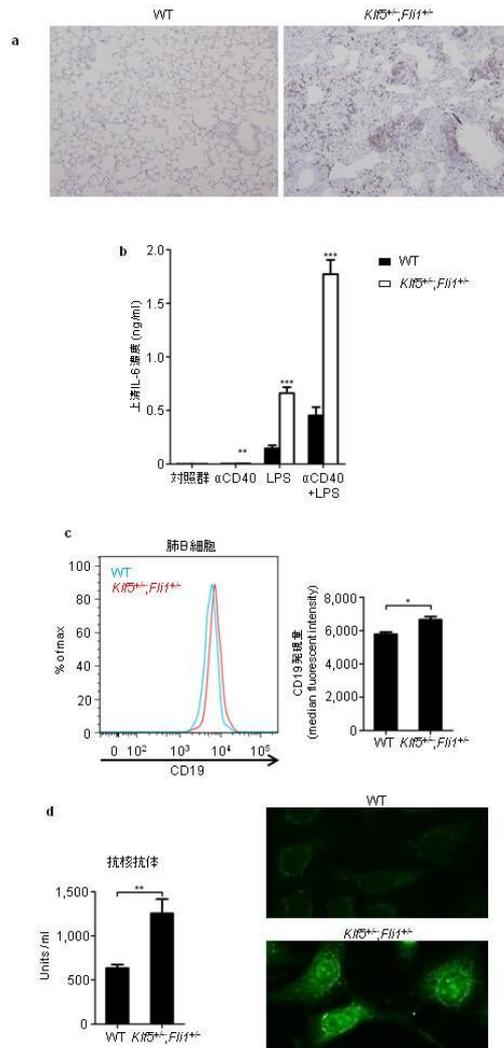


図9: *Klf5<sup>-/-</sup>; Fli1<sup>-/-</sup>* マウスでのB細胞活性化と自己抗体産生。

(a) 8カ月齢の野生型 (WT) マウスと *Klf5<sup>-/-</sup>; Fli1<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 (αCD40) 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 ± 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 と臨床症状との関連の検討

研究協力者	<b>小寺雅也</b>	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	<b>白田俊和</b>	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	<b>稲葉由季</b>	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	<b>稲坂 優</b>	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	<b>菅原京子</b>	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	<b>伊藤有美</b>	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	<b>浦田 透</b>	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関連について検討した。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 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 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關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 との關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關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 との關連について図 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關連關係が有意に見られた。その關連は、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 比はいずれも正の關連が見られた(図 3)。上記基準値を上回る例を MDA-LDL 上昇群とした場合、臨床像との關連を検討したところ、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 比は正の關連があり、免疫反應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 比は正の關連があり、強皮症における間質性肺病変の進行に酸化 LDL が關与している可能性がある。%DLco と酸化 LDL の負の關連、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關与している可能性、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

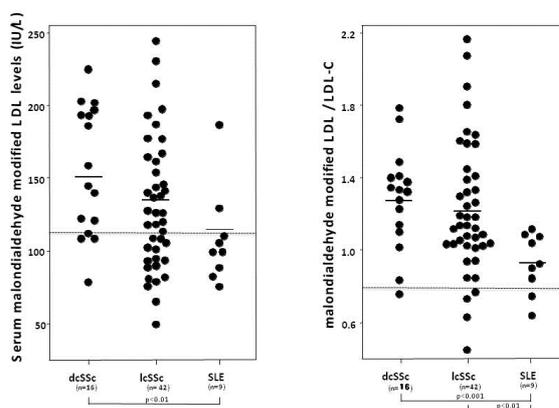


図1  
Kodera.M

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

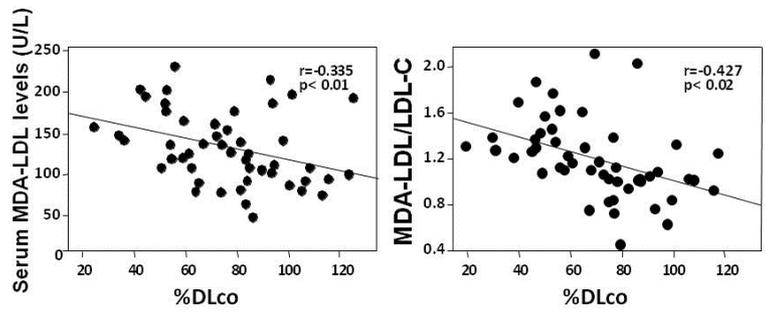


図2  
Kodera.M

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

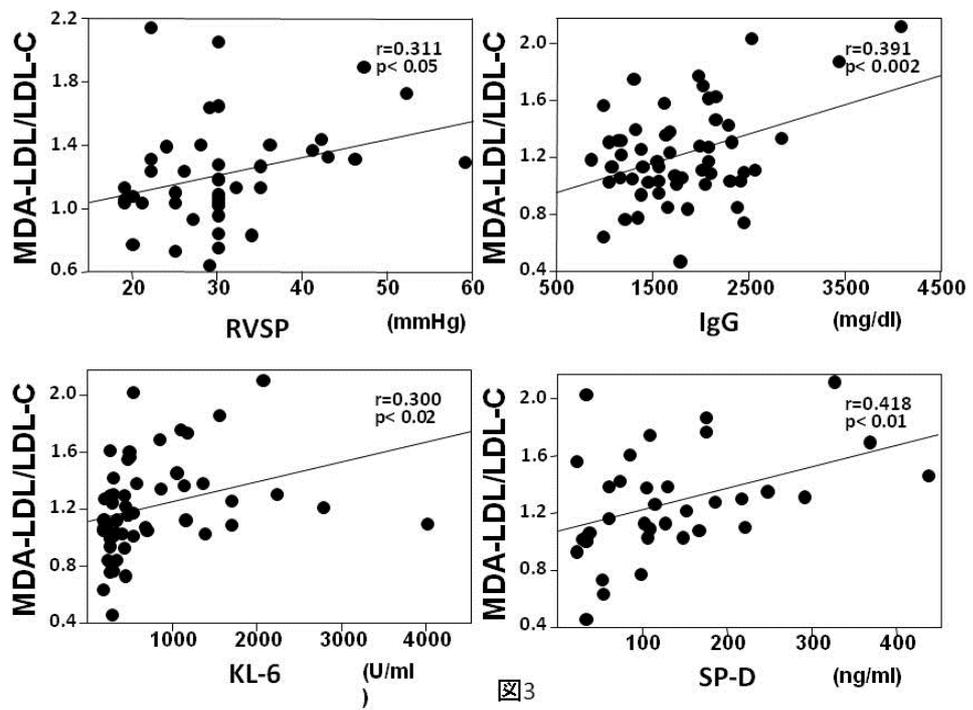


図3  
Kodera M

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 Vδ1 陽性γδT 細胞の機能解析

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
協力者	<b>瀬川誠司</b>	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	<b>近藤裕也</b>	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	<b>松本 功</b>	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	<b>住田孝之</b>	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Vδ1陽性細胞γδT細胞(CD161陽性Vδ1陽性γδT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Vδ1陽性γδT細胞の線維芽細胞増殖能に対する解析を行った。CD161陽性Vδ1陽性γδT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、健康人及び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Vδ1陽性γδT細胞株では健康人由来細胞株に比べて、IFN-γ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-γ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Vδ1陽性γδT細胞株培養上清は、健康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Vδ1陽性γδT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γδT細胞に相当する細胞として、ヒトCD161陽性Vδ1陽性γδT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 患者および健康人由来 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

健康人(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

健康人、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' -TTTGGTGTCATCACCAGCAT, 3' -GCCTGAAACAGCTTCCACTC; CCR5, 5' -GGCAAA GACAGAAGCCTCCA, 3' -AACCTTCTGCAACACCAACC; IFN- $\gamma$ R, 5' -GGCAGCATCGCTTTAAACTC, 3' -GGAG GTGGGGGCTTTTATTA; GAPDH, 5' -GAAGGTGAAGGTC GGAGTC, 3' -GAAGATGGTGATGGGATTTTC

### 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 患者および健康人由来 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ありと判断した。

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、健常人由来細胞株に比べて IFN- $\gamma$ 産生量が著名に減弱していた (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 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. Vδ1 T lymphocytes producing IFN-γ 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 Vδ1 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 chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α) and MIP-1β) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1α may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:159-165.
10. Atamas SP. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci* 2002; 72:631-643.
11. Jimenez SA and Christner PJ. Murine animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14:671-680.

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

## 2. 学会発表

- 1) 瀬川 誠司, 後藤 大輔, 堀越 正信, 松本 功, 住田 孝之: 間質性肺炎合併強皮症患者における TCR V $\delta$ 1+ NKT 細胞の解析、第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2013 年
- 2) Segawa S, Goto D, Horikoshi M, Matsumoto I, Sumida T. The regulatory role of TCR V 1<sup>+</sup> NKT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonia. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2013
- 3) Segawa S, Goto D, Horikoshi M, Kondo Y, Umeda N, Hagiwara S, Yokosawa M, Hirota T, Miki H, Tsuboi H, Ogishima H, Suzuki T, Matsumoto I, Sumida T. Involvement of TCR V delta1+ NKT cells in systemic sclerosis: association with interstitial pneumonia. ACR

77<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, 2013

- 4) Segawa S, Goto D, Horikoshi M, Matsumoto I, Sumida T. Involvement of TCR V delta1+ NKT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonia. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1

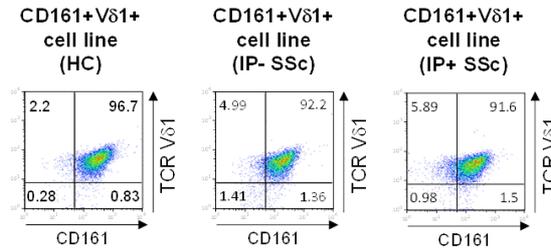


図1： HC、IP 非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞株の作製 PBMCs より樹立した CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞を、抗 CD161 抗体、抗体 TCR Vδ1 抗体を用いて解析した。

図2

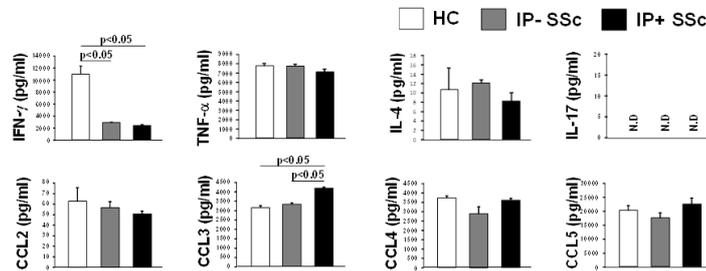


図2： HC、IP 非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞株からの IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-17、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 産生量の解析 CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞株を抗 TCR Vδ1 抗体を用いて 72 時間刺激後、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン産生量を解析した。

図3

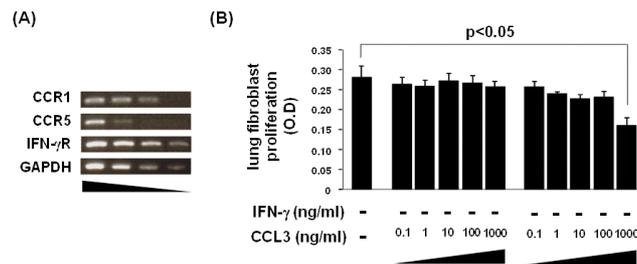


図3： (A) WI-38 肺線維芽細胞株における CCR1、CCR5、IFN-γR mRNA 発現解析 (B) IFN-γおよび CCL3 共培養下での WI-38 肺線維芽細胞株増殖能の解析 WI-38 肺線維芽細胞を IFN-γ、CCL3 で 24 時間刺激後、BrdU 測定 kit を用いて細胞増殖能を測定した。

図4

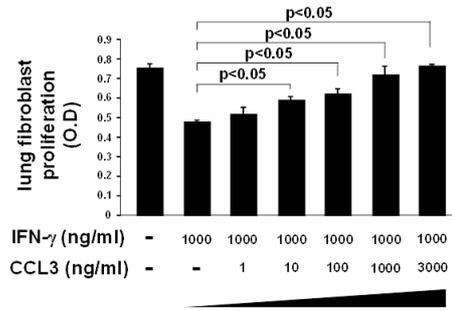


図4：IFN- $\gamma$ 、CCL3 共培養下での WI-38 肺線維芽細胞株増殖能の解析

WI-38 肺線維芽細胞を IFN- $\gamma$ 、CCL3 で 24 時間刺激後、BrdU 測定 kit を用いて細胞増殖能を測定した。

図5

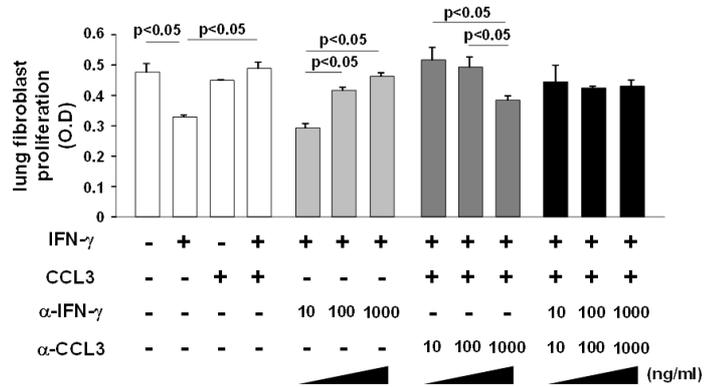


図5：IFN- $\gamma$ 、CCL3、抗 IFN- $\gamma$ 抗体、抗 CCL3 抗体共培養下での WI-38 肺線維芽細胞株増殖能の解析

WI-38 肺線維芽細胞を IFN- $\gamma$ 、CCL3、抗 IFN- $\gamma$ 抗体、抗 CCL3 抗体で 24 時間刺激後、BrdU 測定 kit を用いて細胞増殖能を測定した。

図6

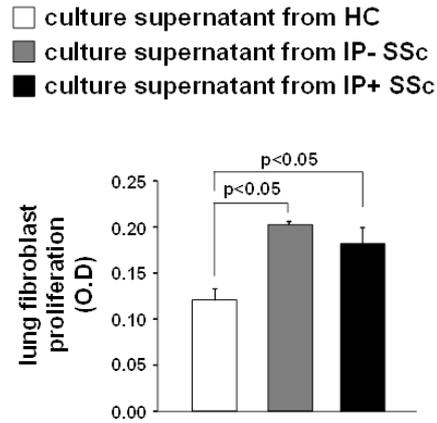


図6: HC、IP 非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性 $\gamma$  $\delta$ T 細胞株培養上清を用いた WI-38 肺線維芽細胞増殖能の解析

WI-38 肺線維芽細胞を各細胞培養上清で 24 時間刺激後、BrdU 測定 kit を用いて細胞増殖能を測定した。

図7

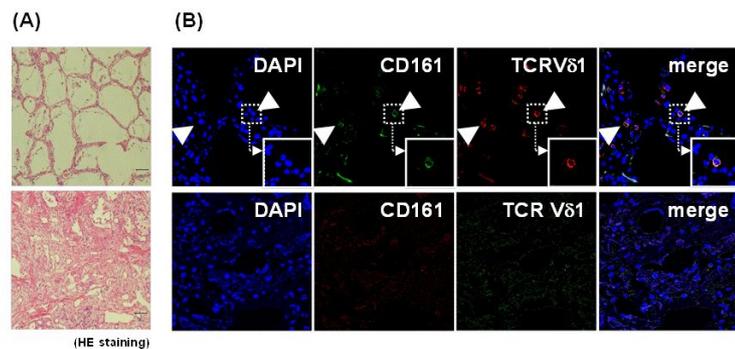


図7: (A) IP 合併 SSc 患者由来肺組織を用いた HE 染色 (B) IP 合併 SSc 患者由来肺組織を用いた CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性 $\gamma$  $\delta$ T 細胞の染色

IP 合併 SSc 患者由来肺組織を用いて、HE 染色および蛍光免疫染色を行った。矢印は染色部位を示す。

## 全身性強皮症（SSc）の新規自己抗体：抗 RuvBL1/2 抗体<sup>1)</sup>の臨床的意義

研究分担者	<b>桑名正隆</b>	慶応義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
研究分担者	<b>藤本 学</b>	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
協力者	<b>加治賢三</b>	金沢大学皮膚科、小松市民病院皮膚科
協力者	Noreen Fertig	ピッツバーグ大学リウマチ内科
協力者	Thomas A. Medsger	ピッツバーグ大学リウマチ内科
協力者	<b>佐藤雅司</b>	慶応義塾大学医学部リウマチ内科
協力者	<b>星野香菜</b>	慶応義塾大学医学部リウマチ内科
協力者	<b>濱口隼人</b>	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 准教授
研究協力者	<b>長谷川稔</b>	福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学 教授
協力者	Mary Lucas	ピッツバーグ大学リウマチ内科
協力者	Andrew Schnure	ピッツバーグ大学リウマチ内科
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
協力者	<b>竹原和彦</b>	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授

### 研究要旨

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。3 つの SSc コホートにおける同抗体陽性率は 1~2% だったが、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。

### A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) は膠原病の一つの疾患で皮膚および諸臓器の線維化と末梢血管病変が特徴的な疾患である。SSc の病院はまだはっきりしていないが、自己免疫現象が病態生理に強く関わっていると考えられている。膠原病診断において抗核抗体の測定は有用なツールであることは既知の事実である。全身性強皮症において約 95% 以上に抗核抗体が陽性であるが、対応抗原の特

定、つまり特異抗体については 80% にとどまっている<sup>1),2)</sup>。特異抗体別により臨床症状、合併症などを推測できるだけでなく、予後的因子の推測や治療戦略を考える上でも非常に有用であり、特異抗体の検出は急務である。

2009 年に当研究班で SSc に特異的に陽性となる抗 RuvBL1/2 抗体について報告した。今回金沢大、慶応大学、ピッツバーグ大学の 3 施設において臨床的解析をおこなった。

## B. 研究方法

2009年に報告した抗 RuvBL1/2 抗体の臨床的解析を行うため、SSc 患者をそれぞれ金沢大学 316 例、慶応大学 272 例、ピッツバーグ大学 463 例で解析を行った。対象疾患として金沢大学より全身性エリテマトーデス、以下 SLE、60 例、皮膚筋炎、多発性筋炎、以下 DM/PM、100 例、特発性間質性肺炎、以下 IPF、80 例、関節リウマチ、以下 RA、30 例、自己免疫性肝炎、以下 AIH 20 例、正常人 50 例を用いた。血清および臨床情報に関して患者より文章による同意を得た。

## C. 研究結果

### 1) 免疫沈降法での検出

全身性強皮症において既知の自己抗体が検出されなかった症例を並べて免疫沈降したところ 50kDa 付近に濃く染まる例が数例認められた。この抗体(抗 p52/48 抗体)はすべて 2 つのバンドを有しており、片方のみ陽性例は認められませんでした(図 1)。蛍光抗体法間接法では、抗 p52/48 抗体陽性血清はすべて speckled pattern を呈しており、その力価は 160 倍~1280 倍と幅がありました。染色は分裂前期に染まり、その後中期の染色体エリアが薄くなる特徴がありました。免疫沈降法で同一のバンドに沈降し、抗核抗体も陽性であり、染色型も同一であることから、これらは同一の自己抗体であると考え、その抗原を検出するべく抗原特定実験を行った。

### 2) 抗原特定実験

具体的には免疫沈降法と同じく患者血清 1000ul とビーズ 1000mg を混和し、DMP で IgG

とビーズを架橋させ、大量の K562 培養細胞と反応させました。K562 培養細胞とビーズ結合 IgG を反応させた後、洗浄し、protein assay を行い十分精製した後、elution buffer で抗原抽出を行い、フィルターで抗原蛋白を濃縮させた(図 2)。最終的に 100ul 抽出でき、これを抗原として SDS-PAGE で電気泳動し、クマシーブルー染色および銀染色を行なった。クマシーブルー染色、銀染色でも 50kDa 付近に 2 つのバンドが影出されたため、上下のバンドをそれぞれ切り出し、液体クロマトグラフィー、質量分析法を行いました(図 2)。

### 3) 結果

上のバンドは検出されなかったが、下のバンドで RuvBL1 が検出されました。得られたアミノ酸配列の総数のうち、8%が RuvBL1 をコードしていた。RuvBL1 は 49kDa の蛋白で ATPase associated activities with various cellular activities: AAA+と言われるスーパーファミリーに属する蛋白であり分子シャペロンの一つである。RuvB については核内に局在し、DNA の修復に関連すると考えられている。RuvBL1 は 6 量体で存在する蛋白で RuvBL2 と複合体を作り 12 量体になることが分かっている<sup>3),4)</sup>。また RuvBL1 と RuvBL2 は Walker A および B 領域、Sensor I および II、アルギニン鎖など共通する領域を持ち 2 つの蛋白の相同性は 43%<sup>5)</sup>ある。分子量は RuvBL1 が 49kDa で RuvBL2 が 48kDa であり、遺伝子座として RuvBL1 は 3 番染色体長腕で RuvBL2 は 19 番染色体長腕に存在する。免疫沈降法において近接するバンドが 2 本あることや RuvBL1 と RuvBL2 の分子量、蛋白の相同性やその構造な

ど考慮すると RuvBL2 の自己抗体も存在するのではないかと考えウェスタンブロッティング法で確認実験を施行した。

#### 4) IP-western blotting 法

抗 p52/48 抗体陽性 SSc3 人の血清を用い K562 の lysate と免疫沈降を行い、抗原を抽出し、抗 RuvBL1 モノクローナル抗体、抗 RuvBL2 モノクローナル抗体を用い免疫ブロットを行ったところ抗 p52/48 抗体は共に RuvBL1 と RuvBL2 に反応しました。従ってこの自己抗体は抗 RuvBL1/2 抗体と判明した<sup>[図 3]</sup>。

#### 5) 抗 RuvBL1/2 抗体の疾患別分布

金沢大学のデータベースを用い、抗 RuvBL1/2 抗体の疾患分布を調べると SSc に 1.9%陽性になり、他の自己免疫疾患 (PM/DM, SLE, RA) や特発性間質性肺炎、自己免疫性肝炎、一般健常人では陽性にならう、SSc に特異的に陽性であった。各施設 (金沢大、慶応大、ピッツバーグ大) の抗 RuvBL1/2 抗体の陽性率は 1.9% (6/316)、1.5% (4/272)、1.1% (4/463) とともに低率であった。

#### 6) 抗 RuvBL1/2 抗体陽性 SSc の臨床的特徴 (表 1)

抗 RuvBL1/2 抗体の臨床的特徴を調べるため、日本とピッツバーグ大学とで比較検討しました。日本においては抗 RuvBL1/2 抗体陽性例が少ないため金沢大と慶応大を合算いたしました。日本においては高齢発症で男性に多い結果でしたがピッツバーグ大ではその傾向はありませんでした。抗体陽性例において 2 つのコホートとも SSc overlap 約 60% を占め、また病型としてはびまん皮膚硬化型が多く、

diffuse 型のオーバーラップが共に優位に多い傾向に有りました。

臓器病変においては、抗体陽性例では骨格筋病変が日本、ピッツバーグともに約 60% と高率に合併した。末梢循環病変はピッツバーグ大では少ない傾向であったが、日本ではその傾向はなく、また心病変は日本においては高率に合併したが、ピッツバーグ大では有意差はなかった。

#### 6) 筋炎重複症候群関連自己抗体 (抗 PM-Sc1 抗体、抗 Ku 抗体) との比較 (表 2)

抗 RuvBL1/2 抗体は筋炎を高率に合併することから筋炎重複症候群に関連する抗 PM-Sc1 抗体、抗 Ku 抗体と比較検討を行った。これら 3 つの自己抗体の臨床的評価をするために金沢大、慶応大、ピッツバーグ大を合算したデータで解析を行いました。抗 RuvBL1/2 抗体陽性例は比較的高齢発症で、女性に多い傾向に有りました。また臨床病型ではびまん皮膚硬化型が優位であり、びまん皮膚硬化型でオーバーラップが高率に有りました。

## D. 考案

我々は全身性強皮症患者の中で 1 から 2% の率で陽性となる新しい自己抗体である抗 RuvBL1/2 抗体を見いだした。抗 RuvBL1/2 抗体は全身性強皮症のみに検出され、その他の膠原病、自己免疫疾患では検出されないことから、強皮症特異抗体の一つであると考えられた。抗 RuvBL1/2 抗体陽性全身性強皮症の臨床的特徴としてはびまん皮膚硬化型が多く、筋炎を高率に合併した。人種差はなく、日本、欧米ともに同じ傾向であり、それ故、抗

RuvBL1/2 抗体は抗 PM-Scl 抗体、抗 Ku 抗体と同じく筋炎合併の全身性強皮症の疾患標識抗体の一つに含めるべきである。さらにこれら3つの自己抗体で比較すると、抗 RuvBL1/2 抗体は男性に多く、高齢発症であり、びまん皮膚硬化型であるという特徴を有した。

## E. 結論

全身性強皮症に関連した新規自己抗体である抗 RuvBL1/2 抗体を見いだした。抗 RuvBL1/2 抗体はびまん皮膚硬化型で筋炎を合併する SSc-overlap の疾患標識マーカーの一つである。

## F. 文献

- 1) Steen VD.: Semin Arthritis Rheum. 2005 Aug;35(1):35-42.
- 2) Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Komura K, Kaji K, Kondo M, Nishijima C, Hayakawa I, Ogawa F, Kuwana M, Takehara K, Sato S.: Br J Dermatol. 2008 Mar;158(3): 487-95. Epub 2008 Jan 17.
- 3) RVB1/RVB2: running rings around molecular biology.: Jha S, Dutta A.: Mol Cell. 2009 Jun 12;34(5): 521-33. Review.
- 4) Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex.: Puri T, Wendler P, Sigala B, Saibil H, Tsaneva IR.: J Mol Biol. 2007 Feb 9;366(1): 179-92. Epub 2006 Nov 11
- 5) Human TIP49b/RUVBL2 gene: genomic structure, expression pattern, physical link to the human CGB/LHB gene cluster on

chromosome 19q13.3.: Parfait B, Giovangrandi Y, Asheuer M, Laurendeau I, Olivi M, Vodovar N, Vidaud D, Vidaud M, Bièche I.: Ann Genet. 2000 Apr-Jun;43(2): 69-74.

## G. 研究発表

1. 論文発表  
Arthritis Care Res (Hoboken). 2013 Sep 10. [Epub ahead of print]
2. 学会発表  
2013年アメリカリウマチ学会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

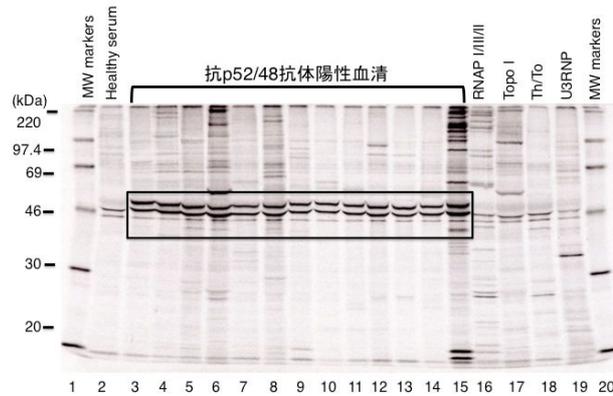


図 1 : 免疫沈降法

K562 培養細胞を用いた免疫沈降法。<sup>35</sup>S メチオニンで標識した K562 培養細胞抽出液を抗原として患者血清の IgG 結合プロテイン A セファロース粒子と反応させ、電気泳動し、SDS-PAGE で分画後にオートラジオグラフィーで分析した。Lane3~15 は 52kDa と 48kDa に沈降し、他の自己抗体は違う沈降パターンを呈した。

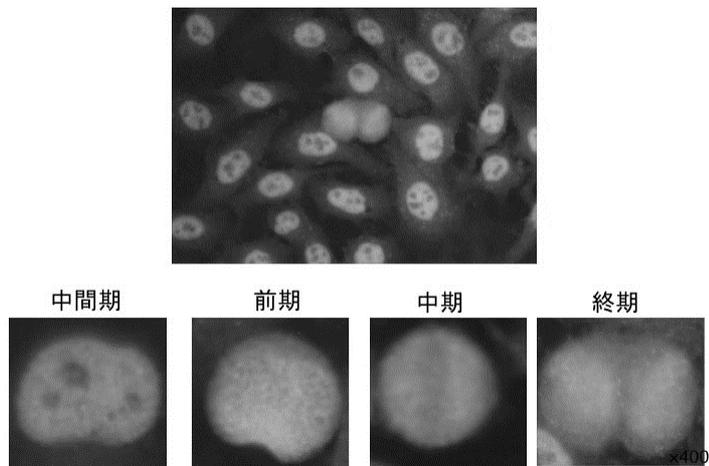


図 2 : HEp-2 細胞を用いた蛍光抗体法間接法 (抗核抗体)

抗 p52/48 抗体陽性血清はすべて speckled pattern に染色され、その力価は 160 倍~1280 倍であった。

染色は分裂前期に染まり、その後、分裂中期の染色体エリアが薄くなる特徴を有した。

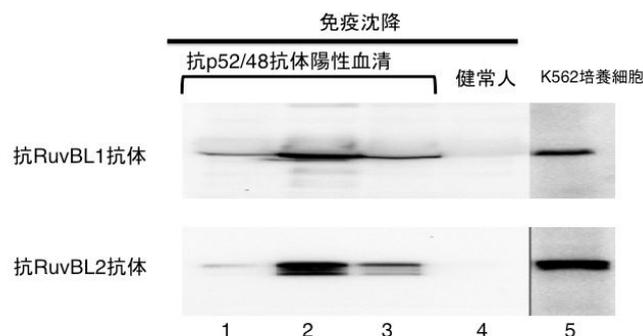


図3：免疫プロット法

抗 p52/48 抗体陽性血清、健康人血清を用い、K562 培養細胞を基質とした免疫沈降を行い、抗原を抽出し、抗 RuvBL1 モノクローナル抗体、抗 RuvBL2 モノクローナル抗体を用い、プロットを行った。抗 p52/48 抗体陽性例(3 例)はすべて抗 RuvBL1 抗体、抗 RuvBL2 抗体に反応し、患者血清は反応しなかった。故に抗 p52/48 抗体の抗原は RuvBL1 と RuvBL2 と同定した。

表 1：抗 RuvBL1/2 抗体の臨床的特徴

抗 RuvBL1/2 抗体	日本 (金沢大+廣徳大)			ピッツバーグ大		
	陰性 (n = 578)	陽性 (n = 10)	P	陰性 (n = 458)	陽性 (n = 27)	P
発症年齢(年)	44.9 ± 14.1	58.1 ± 12.1	0.008	44.0 ± 15.5	46.0 ± 15.1	0.5
性別：男性	91 (16)	5 (50)	0.01	104 (23)	10 (37)	0.1
病型分類						
dcSSc	173 (31)	2 (20)	<0.00001	215 (47)	8 (30)	<0.00001
lcSSc	348 (60)	2 (20)		207 (45)	3 (11)	
SSc in overlap	57 (10)	6 (60)		36 (8)	16 (59)	
皮膚病型						
びまん皮膚硬化型	195 (34)	7 (70)	0.04	226 (49)	18 (67)	0.08
Diffuse within overlap	17 (57)	5/6 (83)	0.01	11/36 (31)	10/16 (63)	0.04
Maximum mRSS, mean ± SD						
びまん皮膚硬化型	20.0 ± 7.4	20.7 ± 7.5	0.8	26.5 ± 12.0	20.0 ± 8.4	0.02
限局皮膚硬化型	4.4 ± 3.3	6.0 ± 3.9	0.2	4.5 ± 3.8	7.6 ± 8.7	0.03
臓器病変						
末梢循環病変	534 (92)	10 (100)	0.8	449 (98)	22 (81)	<0.00001
骨格筋	66 (11)	6 (60)	0.00003	64 (14)	16 (59)	<0.00001
上部消化管	315 (54)	6 (60)	0.7	239/310 (77)	17/18 (94)	0.08
間質性肺炎	284 (49)	7 (70)	0.3	157/374 (42)	11/22 (50)	0.3
肺高血圧症	42 (7)	1 (10)	0.8	56/285 (20)	2/13 (22)	0.8
心臓	57 (10)	5 (50)	0.0003	70/353 (20)	5/23 (22)	0.8
腎臓 (renal crisis)	17 (3)	0	0.7	50 (11)	1 (4)	0.4

+

表2: 抗 RuvBL1/2 抗体、抗 PM-Scl 抗体、抗 Ku 抗体との比較検討。

	抗 RuvBL1/2 抗体 (n = 37)	抗 PM-Scl 抗体 (n = 76)	抗 Ku 抗体 (n = 44)	Overall P
発症年齢(年)	59.3 ± 14.4	37.6 ± 17.7	38.4 ± 15.5	0.0001
性別: 男性	15 (41)	8 (16)	8 (18)	0.002
病型分類				
dcSSc	13 (35)	12 (16)	15 (34)	
lcSSc	5 (14)	28 (37)	10 (23)	0.01
SSc in overlap	19 (51)	36 (47)	19 (43)	
臨床病型				
びまん皮膚硬化型	25 (68)	22 (29)	20 (45)	0.0004
Diffuse within overlap	12/19 (63)	10/36 (28)	5/19 (26)	0.02
皮膚筋炎の皮疹	4 (11)	24 (32)	6 (14)	0.01
臓器病変 (%)				
末梢循環病変	32 (86)	68 (91)	40 (91)	0.8
骨格筋	21 (57)	39 (51)	22 (50)	0.7
上部消化管	23/28 (82)	24/46 (52)	29/40 (73)	0.04
心臓	10/33 (30)	6/54 (11)	8/40 (20)	0.08

## 抗 RNA ポリメラーゼ 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

研究分担者 **藤本 学** 筑波大学医学医療系皮膚科 教授  
協力者 **濱口 儒人** 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 准教授  
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 **竹原 和彦** 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授  
研究代表者 **佐藤 伸一** 東京大学医学部付属病院皮膚科 教授

### 研究要旨

抗 RNA ポリメラーゼ 抗体 (抗 RNAP 抗体) 陽性全身性強皮症患者 37 例について、強皮症腎クリーゼ (腎クリーゼ) 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 抗体の ELISA index 値が高値だった ( $250.4 \pm 71.2$  vs  $141.6 \pm 84.2$ ,  $p = 0.0013$ )。Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では、抗 RNAP 抗体陽性 (オッズ比 14.0, 95%信頼区間 2.2 - 279.7) と抗 RNAP 抗体の ELISA index が 174 以上 (オッズ比 8.8, 95%信頼区間 1.1 - 197.5) の 2 項目が腎クリーゼ発症と関連する独立した因子だった。以上より、これら 2 つの因子は腎クリーゼの発症を予測する臨床上有用な指標であると考えられた。

### 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) は皮膚および全身の諸臓器に線維化をきたす。抗核抗体が高率に検出されることから自己免疫疾患に位置づけられる<sup>1</sup>。SSc では複数の疾患特異的自己抗体が検出されるが、これらの自己抗体は特徴的な臨床像と関連しているため、SSc 特異的自己抗体を検出することは、経過や予後の推測に重要である。代表的な SSc 特異的自己抗体として、抗トポイソメラーゼ 抗体、抗セントロメア抗体、抗 RNA ポリメラーゼ 抗体 (抗 RNAP 抗体) などが知られている。

SSc でみられる臓器合併症のうち、生命予後を規定する重要な合併症に強皮症腎クリーゼ (腎クリーゼ) がある。腎クリーゼと関連する因子は複数あるが、抗 RNAP 抗体は最も相關する因子として知られている<sup>2</sup>。しかし、抗 RNAP 抗体陽性 SSc 患者のうち、腎クリーゼを発症するのは 20~40%であり、半数以上の症例では腎クリーゼを発症しない。したがって、抗 RNAP 抗体陽性 SSc 患者において、腎クリーゼを合併する群と合併しない群では臨床症状あるいは血清免疫学的反応に相違があることが推測されるが、これまでのところそのような因子は明らかではない。

そこで今回われわれは、抗 RNAP 抗体陽性

SSc 患者において、腎クリーゼと関連する因子について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象患者は 1995 年から 2012 年までに金沢大学皮膚科と社会保険中京病院皮膚科を受診した SSc 患者 583 例とした。

### 2) 抗 RNAP 抗体の検出

まず抗 RNAP 抗体の有無を ELISA 法 (MBL 社製) によりスクリーニングした。ELISA 法で抗 RNAP 抗体が陽性だった症例は全例、免疫沈降法にてサブクラスを解析した。ELISA 法と免疫沈降法の両者が陽性だった症例を抗 RNAP 抗体陽性とした。

### 3) 腎クリーゼと関連する因子の検討

SSc 患者 583 例について、抗 RNAP 抗体の有無による腎クリーゼの有無を検討した。次に、抗 RNAP 抗体陽性患者に対象を絞り、腎クリーゼと関連する因子について検討した。

### 4) 統計学的検討

2 群間の比較には Fisher の正確検定あるいは Mann-Whitney 's U test を用いた。発症年齢やスキンスコア、臓器病変と腎クリーゼの相関についてロジスティック単回帰分析を行い、複数の項目について Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った。連続変数は名義変数に変更してから解析した。

## C. 研究結果

### 1) 抗 RNAP 抗体の頻度と腎クリーゼ発症率

SSc 患者 583 例について抗 RNAP 抗体の有無を ELISA 法によりスクリーニングしたところ、37 例 (6.9%) で陽性だった。ELISA 法で抗 RNAP 抗体が陽性だった 37 例について抗体のサブクラスを免疫沈降法で検討したところ、抗 RNAP 単独陽性が 1 例、抗 RNAP / 抗体陽性が 19 例、抗 RNAP / / 陽性が 17 例だった。抗 RNAP 抗体陽性例と陰性例で腎クリーゼの発症率を比較したところ、抗 RNAP 抗体陽性群は 9 例 (24%) で腎クリーゼを発症したのに対し、陰性群は 8 例 (1%) のみ腎クリーゼを発症した (オッズ比 21.6、95%信頼区間 7.8 - 60.3、 $p < 0.00001$ )。したがって、これまでの報告と同様、抗 RNAP 抗体は腎クリーゼと関連していた。

### 2) 腎クリーゼの有無による比較

次に、抗 RNAP 抗体陽性患者 37 例について、腎クリーゼの有無による比較を行った (表 1)。腎クリーゼの有無による発症年齢、罹病期間、観察期間、病型分類、スキンスコア、最大ステロイド内服量に有意差はみられなかった。しかし、腎クリーゼを生じた群では生じなかった群に比べ、抗 RNAP 抗体の ELISA の index 値が有意に高値だった ( $p = 0.0013$ )。

### 3) 腎クリーゼ発症に關与する因子についての多変量解析

腎クリーゼ発症に關与する因子について Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析により検討した。単変量解析により有意差が

みられた抗 RNAP 抗体の存在、抗 RNAP 抗体の ELISA index 値 174 以上の 2 項目に加え、これまでに腎クリーゼとの相関が報告されているスキンスコア (スキンスコア 12 以上) と最大ステロイド投与量 (30mg/日以上) の 2 項目を加えた 4 項目について検討した (表 2)。抗 RNAP 抗体陽性はオッズ比 14.0 (9%信頼区間 2.2 - 279.7、 $p = 0.0004$ )、抗 RNAP 抗体の ELISA index 値 174 以上はオッズ比 8.8 (95%信頼区間 1.1 - 197.5、 $p = 0.045$ ) であり、腎クリーゼ発症に対する独立した関連因子だった。一方、スキンスコアと最大ステロイド投与量とは相関が見られなかった。

#### 4) 抗 RNAP 抗体の有無による ELISA index 値の検討

抗 RNAP 抗体の有無による腎クリーゼの有無と ELISA index 値の関係を図 1 に示す。抗 RNAP / / 抗体陽性群では ELISA index 値が 174 以上の症例 8 例中 7 例で腎クリーゼを生じた。ELISA index 値が 174 以下の症例で腎クリーゼを生じたのは抗 RNAP / / 抗体陽性の 1 例で、その index 値は 157 だった。抗 RNAP / 抗体で腎クリーゼを生じたのは ELISA index 値が 285 の 1 例のみだった。

## D. 考 案

抗 RNAP 抗体の対応抗原には RNAP 、 、 の 3 つのサブユニットがある。抗 RNAP 抗体陽性 SSc 患者の大多数は、 / / あるいは / / に対する抗体を有している。SSc 患者において抗 RNAP 抗体が単独で検出されることは極めて低く、通常は抗 Topo 抗体と共

存する。あるいは、抗 RNAP 抗体単独陽性はときに SLE 患者で見られる。抗 RNAP / / 抗体あるいは抗 RNAP / 抗体は SSc に特異的である<sup>3</sup>。

これまでに腎クリーゼと関連する複数の因子が報告されている<sup>2</sup>。例えば、4 年以下の罹病期間、急速な皮膚硬化の進行、新たな心病変の出現、抗 RNAP 抗体の存在などである。Steen らは、敗血症や脱水、心不全による腎血流低下が腎クリーゼの契機となると報告している。遺伝的要因として、HLA-DRB1\*0407 と\*1304 の関与が指摘されている<sup>4</sup>。本研究では、抗 RNAP / 抗体に抗 RNAP 抗体が共存することが腎クリーゼと関連していることが示された。Harvey らは、統計学的有意差はなかったものの、抗 RNAP / 抗体陽性群は陰性群に比較し、腎クリーゼを高率に発症したと報告している<sup>5</sup>。また、本研究では抗 RNAP 抗体の ELISA index 値 174 以上が腎クリーゼと関連していることが示された。したがって、抗 RNAP 抗体の存在に加え、ELISA index 値も腎クリーゼの発症を予測する上で有用なマーカーであると考えられた。

ステロイド内服が腎クリーゼ発症と関連するという報告がある。ステロイドを 1 日 15mg 以上内服している群では内服していない群に比べ腎クリーゼの発症が有意に高かったとする報告<sup>6</sup>、1 日 30mg 以上の内服群では正常血圧腎クリーゼが有意に観察されたとする報告<sup>7</sup>がある。本研究では、ステロイド内服と腎クリーゼの発症に有意な相関はみられなかった。その理由として、本研究で対象となった抗 RNAP 抗体陽性患者のほとんどが腎クリーゼ

の有無にかかわらずステロイドを内服していたことが挙げられる。しかし、ステロイド内服が全体的な腎クリーゼ発症の頻度を上昇させている可能性は否定できない。もともと本邦では欧米に比べ腎クリーゼの発症頻度は少ないことが報告されている。ステロイド投与が腎クリーゼ発症に及ぼす影響についてはさらなる検討が必要である。

## E. 結論

抗 RNAP 抗体が腎クリーゼと関連していることはよく知られているが、本研究ではそれ以外の因子として、抗 RNAP 抗体の存在と抗 RNAP 抗体の ELISA index 値 174 以上が腎クリーゼ発症と関連する独立した因子であることが示された。したがって、これらの因子は腎クリーゼの発症を予測する上で臨床上有用な指標となると考えられる、しかし、抗 RNAP 抗体の検出は煩雑な手技を要する免疫沈降法が唯一の手段である。ELISA 法など抗 RNAP 抗体を検出するための簡便な検査法の開発が望まれる。

## F. 文献

1. Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, et al. The clinical relevance of serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* 2008;158:487-495.
2. Steen VD, Medsger TA, Jr., Osial TA, Jr., Ziegler GL, Shapiro AP, Rodnan GP. Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *Am J Med.* 1984;76:779-786.
3. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* 1993;91:1399-1404.
4. Nguyen B, Mayes MD, Arnett FC, et al. HLA-DRB1\*0407 and \*1304 are risk factors for scleroderma renal crisis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:530-534.
5. Harvey GR, Butts S, Rands AL, Patel Y, McHugh NJ. Clinical and serological associations with anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1999;117:395-402.
6. Steen VD, Medsger TA, Jr. Case-control study of corticosteroids and other drugs that either precipitate or protect from the development of scleroderma renal crisis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1613-1619.
7. Helfrich DJ, Banner B, Steen VD, Medsger TA, Jr. Normotensive renal failure in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1989;32:1128-1134.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 1. 抗 RNAP III 抗体陽性全身性強皮症患者の臨床的特徴

	腎クリーゼあり (n = 9)	腎クリーゼなし (n = 28)	P
発症年齢 (年)	54 ± 16	55 ± 13	0.86
罹病期間 (年)	1.8 ± 1.1	2.0 ± 1.8	0.76
観察期間 (年)	4.4 ± 2.8	7.8 ± 6.2	0.12
病型分類 (dcSSc/lcSSc)	9/0	22/6	0.30
スキンスコア	21 ± 11	17 ± 11	0.28
最大ステロイド内服量 (mg/day)	26 ± 15	19 ± 11	0.16
抗 RNAP III 抗体の ELISA index 値	250.4 ± 71.2	141.6 ± 84.2	0.0013

特に記載のない限り、数値は平均 ± 標準偏差で表示。

表 2. 腎クリーゼ発症に対する Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析

	オッズ比 (95% 信頼区間)	P
スキンスコアが 12 以上	1.5 (0.09-2.4)	0.73
ステロイド最大投与量が 30mg/日以上	1.9 (0.4-11.1)	0.40
抗 RNAP II 抗体陽性	14.0 (2.2-279.7)	0.0004
抗 RNAP III 抗体の ELISA index 値が 174 以上	8.8 (1.1-197.5)	0.045

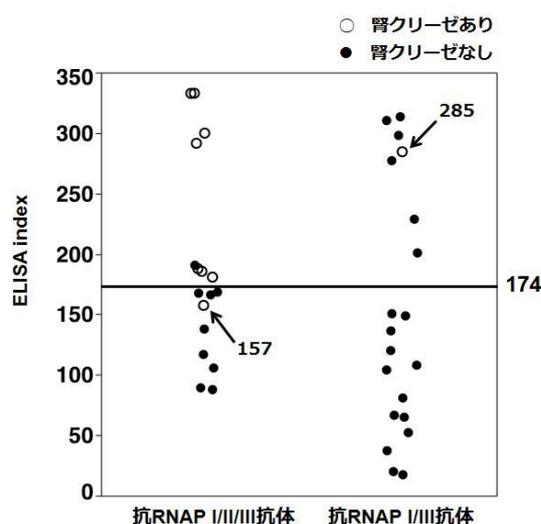


図1

図1: 抗 RNAP III 抗体と抗 RNAP II 抗体における腎クリーゼ発症と抗 RNAP III 抗体の ELISA index 値の検討

## 強皮症に対する運動負荷心エコーと血行動態の解析

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>浅野善英</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	講師
協力者	<b>稲葉俊郎</b>	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	<b>牧 尚孝</b>	東京大学医学部附属病院循環器内科	特任臨床医
協力者	<b>村岡洋典</b>	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	<b>皆月 準</b>	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	<b>今村輝彦</b>	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	<b>八尾厚史</b>	東京大学保健センター	講師
協力者	<b>綱川弘一郎</b>	東京大学医学部附属病院重症心不全治療開発講座	特任教授
協力者	<b>小室一成</b>	東京大学医学部附属病院循環器内科	教授
協力者	<b>住田準一</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	助教
協力者	<b>青笹尚彦</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	助教
協力者	<b>玉城善史郎</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	助教
協力者	<b>高橋岳浩</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	<b>遠山哲夫</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	<b>市村洋平</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	<b>谷口隆志</b>	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
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

### 研究要旨

強皮症 (SSc) は肺高血圧症 (PH) を合併しやすく予後不良である。PH 早期発見のために運動負荷心エコー検査が行われており、運動負荷による肺高血圧を呈する症例は運動誘発性肺高血圧症 (EIPH : exercise-induced pulmonary hypertension) として知られているが、どのような症例で右室圧の上昇が起きるか、EIPH の特徴は明らかになっていない。今回の研究では、運動負荷により右室圧が上昇する群にどのような特徴があるかを比較検討した。2010 年から 2013 年にかけて、強皮症患者 148 症例に運動負荷心エコー検査を行った。その中で、心エコーで安静時の右室収縮期圧 (RVSP) > 40mmHg の症例は除外した。その中で、SG 未施行の 12 例を除外し、安静時 RVSP 40mmHg である強皮症 113 症例を解析対象とした。運動負荷により最大 RVSP > 50mmHg となった群 (43 例 : EIPH 群) と最大 RVSP 50mmHg であった群 (70 例 : non-EIPH 群) の 2 群間において、比較検討した。EIPH 群は、小柄な高齢者で、呼吸機能障害を認め (ILD 合併)、拡張能障害 (BNP 高値)、全身疾患の合併 (運動耐用能低下、炎症マーカー高値)、安静時と運動時の体血圧高値 (動脈コンプライアンス不良) などを認めており、肺動脈病変以外の病態でも RVSP が上昇しうることを示唆された。また、血行動態の解析では EIPH 群において主要な指標が総じ

て悪化傾向を認めていた。また、平均肺動脈圧 (mPAP) に注目すると EIPH 群は mPAP 15 - 20mmHg の群を多く検出しており、血行動態異常が出現し始めている時期に、境界型 PH を呈する前の段階を早期に検出している可能性が示唆された。PH 合併のリスクが高い SSc 症例においては、安静時心エコーに加えて運動負荷心エコーを追加することで、PH の除外診断や SSc の初期の心機能障害を検出する点において有用であると思われる。

## A. 研究目的

肺高血圧症 (PH : Pulmonary hypertension) は予後不良な疾患であることが知られている。強皮症 (SSc : Systemic sclerosis) には 8-10% と高い割合で PH が合併すると報告されており、PH 合併が独立した生命予後規定因子と言われている [1][2][3]。PH の早期診断の必要性が求められており、運動負荷心エコー検査が行われており、運動負荷により肺高血圧を呈する症例は運動誘発性肺高血圧症 (EIPH : exercise-induced pulmonary hypertension) として知られているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。今回、安静時の心エコー検査で右室収縮期圧 (RVSP : right ventricular systolic pressure) が低値の強皮症症例に対して運動負荷検査を行い、EIPH の特徴を比較検討した。

## B. 研究方法

### <対象>

2010 年から 2013 年にかけて東京大学医学部附属病院に入院した SSc 148 症例に対して運動負荷心エコー検査を行った。本研究では安静時は RVSP は低値だが運動負荷により RVSP が上昇する症例を検討することが目的なため、安静時の RVSP > 40mmHg の症例は除外した。その中で、右心カテーテル検査 (RHC : right

heart catheterization) 未施行の 12 例を除外し、安静時 RVSP 40mmHg である SSc 113 症例を解析対象とした。運動負荷により最大 RVSP > 50mmHg となった群 (43 例 : EIPH 群) と最大 RVSP 50mmHg であった群 (70 例 : non-EIPH 群) の 2 群に分類した。(図 1) にそのフローチャートを記した。入院時には血液検査、経胸壁心エコー検査 (TTE : transthoracic echocardiography)、呼吸機能検査、心肺運動負荷試験 (CPX : cardiopulmonary exercise testing) を施行し、それぞれの検査データを 2 群間で比較解析を行った。対象患者 (N=113) の特徴は表 1 に示した。

この研究は最新版のヘルシンキ宣言や治験審査に準拠して施行した。すべての患者には informed consent を得て検査を行った。

### <心肺運動負荷試験>

ACC/AHA のガイドラインを参考にして CPX の絶対禁忌、相対禁忌を決定した [4]。CPX は自転車エルゴメータ (心エコー用エルゴメータ - 750EC ; ロード社, オランダ) を用いた。5 分間の安静の後に, 20watts (W) 4 分間の warm-up を施行。その後に ramp 負荷 10W/分を行い、1 分毎に負荷を増加させて症候限界を最大値 (peak) 値とした (図 2)。呼気ガス分

析はエアロモニタ AE-300S (ミナト医科学株式会社, 大阪, 日本) を用いて breath by breath 法で測定した。負荷中は毎分連続的に血圧測定を行い、心拍数や四肢誘導心電図も同時に記録した (ML-5000, フクダ電子, 東京, 日本)。運動負荷中に、狭心症症状、失神、虚血性 ST 変化、重篤な不整脈が出現した症例は認めなかった。酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2$  (ml/kg/min))、二酸化炭素排出量 ( $\dot{V}CO_2$  (L/min))、換気当量 (VE (L/min)) を負荷運動中、連続的に計測した。最大酸素摂取量 (peak- $\dot{V}O_2$  (ml/kg/min)) は症候限界時の最大値の 30 秒平均により求めた。嫌気閾値 (AT : anaerobic threshold) は V-slope 法を用いて決定し、嫌気閾値代謝酸素摂取量 (AT- $\dot{V}O_2$  (ml/kg/min)) を求めた。運動負荷中に連続的に心エコー検査を行った。安静時、AT 時、peak 時にも連続的に三尖弁逆流の圧較差 (TR pressure gradient: TR-PG) を計測し、その値から推定 RVSP 値 ( $= (TR-PG)^2 + 10$  (mmHg)) により算出して求めた。

#### < 右心カテーテル >

心臓カテーテル検査室内にて 5 分以上の安静で血行動態が安定したことを確認し、7 フレンチサイズの Swan-Ganz カテーテル (日本光電、東京、日本) を鼠径静脈か内頸静脈より挿入した。右房圧 (RAP : right atrial pressure)、右室圧 (RVP : right ventricular pressure)、肺動脈楔入圧 (PCWP)、肺動脈圧 (PAP) の順番で血行動態測定を行った。圧データは mmHg で表示した。Fick 法での心拍出量 (CO : cardiac output) や心拍出係数 (CI : cardiac index) を計算するために肺動脈と大

腿動脈から血液ガスを採取した。今回の症例には左 右、右 左シャントなど先天性シャント疾患を合併した症例は認めなかった。血圧 (BP : blood pressure) は非観血式に測定した。Fick 法による  $CO$  (L/min) = 酸素消費量 (ml/min) / (動脈血酸素含量 - 混合静脈血酸素含量) (ml/L)、 $CI = CO$  / 体表面積 (BSA : body surface area)、一回拍出係数 (StVI : stroke volume index) (ml/beats/m<sup>2</sup>) =  $CI$  / 心拍数 (HR : heart rate) で計算した。肺血管抵抗 (PVR : pulmonary vascular resistance) ( $\text{dyne} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^{-5}$ ) =  $80 \times (mPAP - mPCWP) / CO$  で求め、全身血管抵抗 (systemic vascular resistance : SVR) ( $\text{dyne} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^{-5}$ ) は  $80 \times (mBP - mRAP) / CO$  にて計算した。また、肺動脈コンプライアンス (PAC : pulmonary artery compliance) (ml/mmHg) は一回拍出量 (StV : stroke volume) / (肺動脈収縮期圧 (sPAP : systolic PAP) - 肺動脈拡張期圧 (dPAP : diastolic PAP)) にて計算した。PAC は収縮期と拡張期の間で肺動脈圧を 1mmHg 上昇させるのに必要な一回拍出量を表現しており、肺動脈への血流の流れやすさを示す指標となる。また、左室 1 回仕事係数 (LVSWI : left ventricular stroke work index) ( $\text{g} \cdot \text{m} / \text{m}^2$ ) は、 $StVI \times (mBP - mPCWP) \times 0.0136$  (平均値 45-75 ( $\text{g} \cdot \text{m} / \text{m}^2$ ))、右室 1 回仕事係数 (RVSWI : right ventricular stroke work index) ( $\text{g} \cdot \text{m} / \text{m}^2$ ) は、 $StVI \times (mPAP - mRAP) \times 0.0136$  (平均値 10-15 ( $\text{g} \cdot \text{m} / \text{m}^2$ )) として計算した。

<統計解析>

データは平均±標準偏差 (mean ± SD) で表現した。2 群間の比較は対応のない student の t 検定を用いた。統計ソフトは Dr.SPSS for Windows 11.0.1 J (Statistical Software Package, Chicago, USA) を使用した。P 値<0.05 を統計学的に有意差ありと判断した。

## C. 研究結果

<2 群間の血液検査、自己抗体、内服薬の比較>

Non-EIPH 群と EIPH 群の RVSP 上昇の様子は (図 3) に記した。(表 2) に示した通り、EIPH 群では有意差を持って年齢が高く、体表面積が小さかった。ILD の合併頻度も有意に高く、KL-6 も高値であり、BNP も有意差を持って高値だった。全身の炎症反応を示す CRP に有意に高値だった。自己抗体は内服薬には有意差を認めなかった。

<2 群間の心エコー、呼吸機能検査の比較>

(表 3) に示した通り、EIPH 群では有意に E/A 比低値であり、拡張能障害を示唆していた。ただ、e' や E/e' 比は有意差を認めなかった。EIPH 群で左房径は有意に拡大していた。呼吸機能検査では、%VC, %TLC, %DLCO は有意に悪化していた。

<2 群間の CPX、運動負荷心エコー>

(表 4) に示した通り、EIPH 群では安静時、AT 時、peak 時の RVSP 値は高値だった。最大 Watt 数は有意に低く、peak-V02 が有意に低値であったこともあわせ、運動耐用能の低下を

示唆していた。また、安静時の体血圧も有意に高値であり、peak 時も同様であった。ただ、心拍数や酸素飽和度に関しては有意差を認めなかった。

<2 群間の右心カテーテル検査>

(表 5) に示した通り、EIPH 群では主要な血行動態パラメータは有意に悪化していた。具体的には、安静時の収縮期血圧、右室収縮期圧 (RVSP)、右室拡張期圧 (RVEDP)、肺動脈圧 (PAP)、肺動脈楔入圧 (mPCWP)、混合静脈血の酸素飽和度 (SvO<sub>2</sub>、Fick 法での心拍出量 (CO)、一回心拍出係数 (StVI)、肺血管抵抗 (PVR)、体血管抵抗 (SVR)、肺動脈コンプライアンス (PAC) (肺動脈の硬さ：肺動脈圧を 1mmHg 上昇するのに必要な一回拍出量)、左室、右室仕事係数 (SWI) などが有意に悪化していた。

## D. 考案

安静時 RVSP 40mmHg の強皮症患者 113 症例に運動負荷を行い、最大 RVSP が 50mmHg 以上に上昇する群 (EIPH 群) の特徴を検討した。EIPH 群では小柄な高齢者で、呼吸機能障害 (ILD 合併)、拡張能障害 (BNP 高値)、全身疾患の合併 (運動耐用能低下、炎症マーカー高値)、安静時と運動時の体血圧高値 (動脈コンプライアンス不良) の症例では運動時の右室圧が上昇しやすいことが明らかとなった。また、血行動態では EIPH 群においてほぼ全てのパラメータで悪化を認めており、SSc における初期の血行動態異常を示す群を、運動負荷で検出している可能性が高いと思われた。い

づれにせよ、運動負荷により右室圧が上昇するのは、純粹に肺動脈の障害により起こるわけではなく、年齢、左室拡張能、呼吸機能(ILDの合併など)、体血圧などの因子も関与しており、SScが全身疾患であることを考えるとSSc-PHの予後が不良であることも、そのような全身疾患が様々に影響している可能性も示唆された。

(図4)に示した通り、それぞれの右心カテーテル検査(RHC)によるPH( $mPA \geq 25mmHg$ )やborderline-PH( $21 mPA < 25mmHg$ )の診断を示した。安静時RVSPが40mmHg以上ある群は今回の解析からは除外しているが、その群の中で16例のRHC施行群を検討すると、PHは2例(13%)、borderline-PHは4例(3%)の診断であった。安静時RVSP 40mmHgだったが、最大RVSP 50mmHgとなったEIPH群を検討すると、PHは0例(0%)、borderline-PHは2例(5%)の診断であった。また、 $15 mPA < 21mmHg$ の群をpre-PH群、 $mPA < 15mmHg$ の群をNP群(normal pressure: 正常圧群)とすると、pre-PH群は20例(47%)、NP群は21例(49%)であった。Non-EIPH群はPHは0例(0%)、borderline-PHは1例(1%)、pre-PH群は17例(24%)、NP群は42例(60%)であり、EIPH群はpre-PH群と呼べる、borderline-PHの前段階の病態を多く犬種rつしているのではないかと思われた。結果的にはSScにおけるPH群の絶対数が少ないので正確な評価はできないが、運動負荷によりEIPH群としてborderline-PHを2例(5%)検出できていた。ただ、Non-EIPH群の中にborderline-PHは1例(1%)含まれており、

この症例は運動負荷検査では検出することができなかったことが課題として残った。今後は症例を重ねて、どのような症例が運動負荷でも検出できないのかを検討していく必要がある。

ヨーロッパの多施設研究(EUSTAR)では、今回の報告と同様にSScのEIPHを検討している[5]。安静時RVSPが40mmHg以下のSSc164例の中で運動時最大RVSPが50mmHg以上に上昇するSScは69例(42%)存在し、そのような患者でPVRが240 dyne $\cdot$ sec/cm<sup>5</sup>(3WU)以上になる症例は11%と少なく、高齢、ILDの存在、右室と左室の拡張能障害が有意に多く、今回の報告を裏付けるような報告であった。

膠原病に伴うPAHのイギリスのコホート研究(U.K. CTD-PAH Registry 2001-2006, N=484)によると[6]、EIPHは42例存在し、そのうち5例(12%)がfollow up中に死亡している。4例はPHもしくは右心不全死であった。また、8例(19%)がフォローアップ中(平均837 $\pm$ 477日後)にPHを発症していた。PH発症時の血行動態はmPAP: 35.2 $\pm$ 10.2 mmHg、CI: 2.58 $\pm$ 0.49 L/min/m<sup>2</sup>、PVR: 478 $\pm$ 213 dyne $\cdot$ sec/cm<sup>5</sup>であり、EIPH群は注意深いフォローアップが重要であることを示唆していた。

また、Kovacsらの報告では、borderline-PHをSSc患者の多くは1年以内に安静時及び運動時の肺動脈圧が上昇するため、10人のborderline-PH患者に12か月の観察期間の後、6か月間Bosentanを投与した報告がある[7]。Bosentan投与により運動負荷での圧上昇を抑制し安静時PVRの低下を認めていた。BosentanなどのPH治療薬は病状進行を抑制

するのに効果的である可能性があることも考えると、今回のような運動負荷検査によるPH前段階の状態評価は非常に重要であると思われる。今後も症例を積み重ねながら注意深くフォローアップを行っていくことが重要であると思われた。

## E. 結論

強皮症で運動負荷による右室圧が上昇する症例は、呼吸機能、左室拡張能障害、全身疾患などを反映しており、血行動態の悪化を早期に検出している可能性がある。

## F. 文献

1. Pope JE, Lee P, Baron M, Dunne J, Smith D, Docherty PS, Bookman A, Abu-Hakima M. Prevalence of elevated pulmonary artery pressure measured by echocardiography in a multicenter study of patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2005; 32: 1273.
2. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, Kahan A, Cabane J, Francès C, Launay D, Mouthon L, Allanore Y, Tiev KP, Clerson P, de Groote P, Humbert M. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum.* 2005 Dec; 52(12): 3792-800.
3. Phung S, Strange G, Chung LP, Leong J, Dalton B, Roddy J, Deague J, Playford D, Musk M, Gabbay E. Prevalence of pulmonary arterial hypertension in an Australian scleroderma population: screening allows for earlier diagnosis. *Intern Med J.* 2009 Oct;39(10):682-91.
4. 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
5. Gargani L, Pignone A, Agoston G, Moreo A, Capati E, Badano LP, Doveri M, Bazzichi L, Costantino MF, Pavellini A, Pieri F, Musca F, Muraru D, Epis O, Bruschi E, De Chiara B, Perfetto F, Mori F, Parodi O, Sicari R, Bombardieri S, Varga A, Cerinic MM, Bossone E, Picano E. Clinical and echocardiographic correlations of exercise-induced pulmonary hypertension in systemic sclerosis: a multicenter study. *Am Heart J.* 2013 Feb;165(2):200-7.
6. Condliffe R, Kiely DG, Peacock AJ, Corris PA, Gibbs JS, Vrapai F, Das C, Elliot CA, Johnson M, DeSoyza J, Torpy C, Goldsmith K, Hodgkins D, Hughes RJ, Pepke-Zaba J, Coghlan JG. Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era. *Am J Respir Crit Care*

Med. 2009 Jan 15;179(2):151-7.

7. Kovacs G, Maier R, Aberer E, Brodmann M, Graninger W, Kqiku X, Scheidl S, Tröster N, Hesse C, Rubin L, Olschewski H. Pulmonary arterial hypertension therapy may be safe and effective in patients with systemic sclerosis and borderline pulmonary artery pressure. Arthritis Rheum. 2012 Apr;64(4):1257-62.

## 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

強皮症：運動負荷心エコー検査

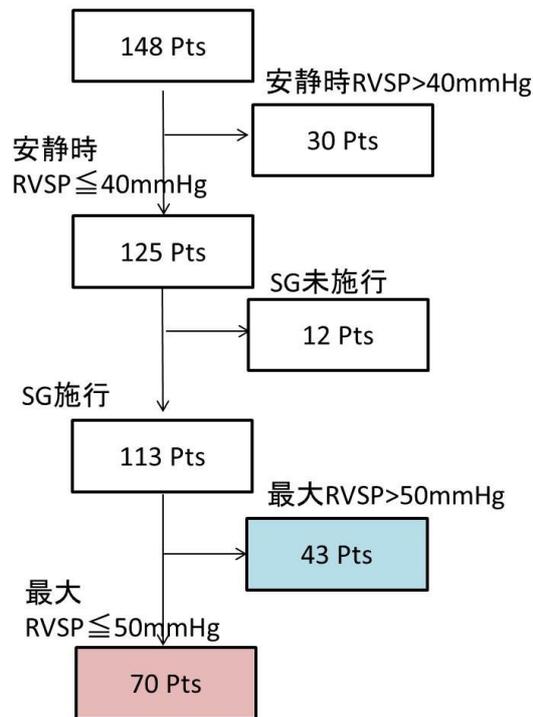


図 1：対象患者

強皮症患者において運動負荷心エコーを 148 例に施行しており、その中から安静時右室圧（RVSP）> 40mmHg は今回の研究からは除外した。残り 125 例の中で SG を施行した 113 例を、運動負荷により RVSP > 50mmHg へと上昇した群と RVSP ≤ 50mmHg 群の 2 群に分類して比較解析した。



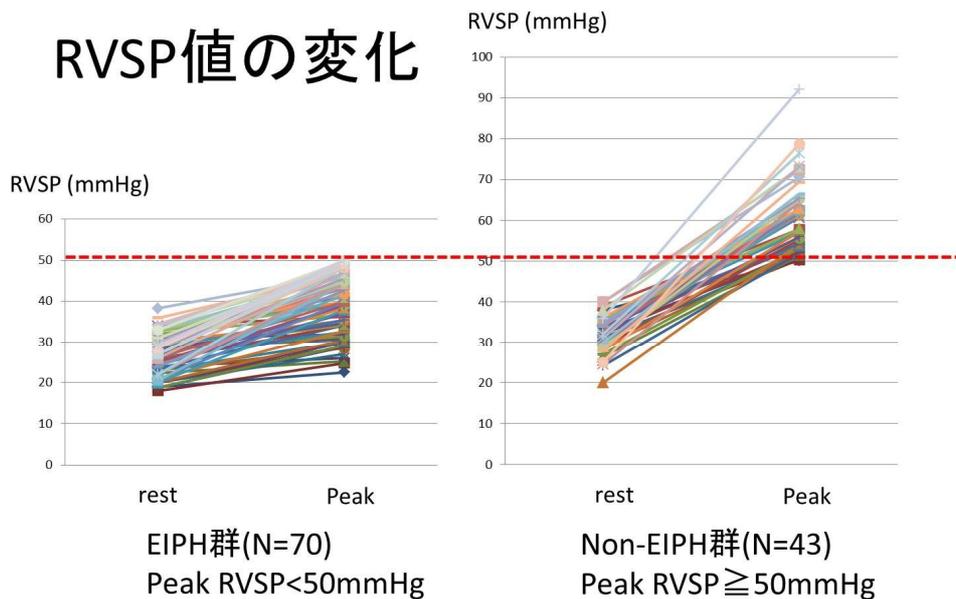
図 2：ramp 負荷の様子

心肺機能検査（CPX）は仰臥位での自転車エルゴメータを用い、5 分間の安静の後に、6 分後から 20watts（W）で 4 分間の warm-up を施行。10 分後から ramp 負荷（10W/分）開始として、1 分毎に負荷を増加させて症候限界を最大値（peak）値とした。

表 1 患者背景

	(N=113)		(N=113)
年齢 (歳)	56±13 (26-80)	抗核抗体	105 (93%)
Male, n (%)	8 (7%)	抗セントロメア抗体	40 (35%)
dcSSc	44 (39%)	抗topo-1抗体	47 (42%)
症状年数 (年)	7±8 (0-36)	抗U1-RNP抗体	16 (14%)
ILD	37 (33%)	Beraprost	41 (36%)
BNP (pg/ml)	38±33	Bosentan	10 (9%)
KL-6 (mg/dl)	523±533	Ambrisentan	0 (0%)
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	86±18	Sildenafil	2 (2%)
Hb (mg/dl)	12.4±1.4	Tadalafil	0 (0%)
CRP (mg/dl)	0.17±0.35	steroid	40 (35%)
		ACEI/ARB	19 (17%)
		CCB	8 (7%)
		statin	13 (12%)
		warfarin	4 (4%)

## RVSP値の変化



EIPH=運動誘発性肺高血圧症 (exercise-induced pulmonary hypertension)

図 3 : EIPH 群と non-EIPH 群の RVSP 値の変化

表2 患者背景<sup>4)</sup>

(血液検査、自己抗体、内服薬)

	Peak RVSP ≤ 50mmHg (N=70)	Peak RVSP > 50mmHg (N=43)	P
年齢(歳)	51 ± 12	63 ± 9	<0.0001
男性, n (%)	6 (9%)	2 (5%)	NS
dcSSc	24 (34%)	20 (47%)	NS
BSA (m <sup>2</sup> )	1.53 ± 0.15	1.47 ± 0.14	0.0234
症状年数(年)	7 ± 8	6 ± 9	NS
ILD	18 (26%)	19 (44%)	0.0155
BNP (pg/ml)	33 ± 31	45 ± 34	<0.0001
KL-6 (mg/dl)	433 ± 463	674 ± 611	0.0116
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	88 ± 18	84 ± 19	NS
Hb (mg/dl)	12.5 ± 1.4	12.2 ± 1.4	NS
CRP (mg/dl)	0.10 ± 0.13	0.27 ± 0.53	0.0029
抗核抗体	63 (90%)	42 (98%)	NS
抗セントロメア抗体	27 (39%)	13 (30%)	NS
抗topo-1抗体	29 (41%)	18 (42%)	NS
抗U1-RNP抗体	8 (11%)	8 (19%)	NS
Beraprost	25 (36%)	16 (37%)	NS
Bosentan	5 (7%)	5 (12%)	NS
Ambrisentan	0 (0%)	0 (0%)	NS
Sildenafil	2 (3%)	0 (0%)	NS
Tadalafil	0 (0%)	0 (0%)	NS
steroid	25 (36%)	15 (35%)	NS
ACEI/ARB	11 (16%)	8 (19%)	NS
CCB	6 (9%)	2 (5%)	NS
statin	7 (10%)	6 (14%)	NS
warfarin	2 (3%)	2 (5%)	NS

表3 心エコー、呼吸機能検査

	Peak RVSP ≤ 50mmHg (N=70)	Peak RVSP > 50mmHg (N=43)	p
EF (%)	70 ± 7	69 ± 6	NS
E/A	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0.3	0.0021
E'	11.6 ± 12.8	9.5 ± 2.2	NS
E/e'	7.8 ± 3.0	7.9 ± 3.0	NS
TAPSE (mm)	20.1 ± 3.7	19.5 ± 4.3	NS
左房径 (mm)	34 ± 6	36 ± 8	0.03
%VC	99 ± 18	92 ± 20	0.0264
%FEV 1.0	96 ± 17	93 ± 22	NS
%TLC	99 ± 15	90 ± 17	0.0097
%DLCO	89 ± 17	82 ± 19	0.0287
%VC/%DLCO	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	NS

表4 心肺機能検査(CPX)、運動負荷エコー

	Peak RVSP ≤ 50mmHg (N=70)	Peak RVSP > 50mmHg (N=43)	p
Pre RVSP (mmHg)	27.5 ± 5.1	32.0 ± 4.4	<0.0001
AT RVSP (mmHg)	35.1 ± 8.2	51.5 ± 9.6	<0.0001
peak RVSP (mmHg)	39.1 ± 7.5	61.0 ± 8.9	<0.0001
ΔRVSP (peak-pre) (mmHg)	11.7 ± 6.2	28.9 ± 9.2	<0.001
Max Watt (watt)	71 ± 22	57 ± 14	<0.001
Pre BPs (mmHg)	108 ± 19	118 ± 23	0.0018
Peak BPs (mmHg)	160 ± 29	173 ± 32	0.0109
Pre HR (/min)	72 ± 11	73 ± 9	NS
Peak HR (/min)	132 ± 18	131 ± 21	NS
Pre-SpO2 (%)	95 ± 4	95 ± 3	NS
Peak-SpO2 (%)	93 ± 5	92 ± 5	NS
rest-VO2 (ml/kg/min)	4.8 ± 0.9	5.0 ± 0.8	NS
AT-VO2 (ml/kg/min)	13.1 ± 2.1	12.8 ± 1.9	NS
Peak-VO2 (ml/kg/min)	18.6 ± 3.8	17.3 ± 3.4	0.0139
% AT-VO2	81 ± 13	81 ± 12	NS
% Peak-VO2	76 ± 16	72 ± 15	0.0425

表5 右心カテーテル検査

	Peak RVSP ≤ 50mmHg (N=70)	Peak RVSP > 50mmHg (N=43)	p
HR (/min)	67 ± 9	68 ± 11	NS
BPs (mmHg)	116 ± 20	124 ± 23	0.0249
BPd (mmHg)	69 ± 11	68 ± 12	NS
BPm (mmHg)	87 ± 22	87 ± 14	NS
mRAP (mmHg)	3 ± 2	4 ± 2	NS
RVSP (mmHg)	26 ± 4	27 ± 5	0.0069
RV-EDP (mmHg)	6 ± 2	7 ± 2	0.0255
PAPs (mmHg)	23 ± 4	25 ± 4	0.0001
PAPd (mmHg)	8 ± 2	9 ± 3	0.0061
PAPm (mmHg)	13 ± 3	15 ± 3	0.0001
mPCWP (mmHg)	7 ± 2	8 ± 3	0.0153
SpO2 (%)	97 ± 4	96 ± 2	NS
SvO2 (%)	74 ± 5	71 ± 11	0.0195
Fick-CO (ml/min)	4.1 ± 1.0	3.7 ± 0.8	0.0103
Fick-CI (ml/min/m <sup>2</sup> )	2.9 ± 2.3	2.4 ± 0.4	NS
Fick-StVI	40 ± 7	37 ± 7	0.0090
Thermo-CO (ml/min)	4.6 ± 1.1	4.3 ± 0.8	0.0366
Thermo-CI (ml/min/m <sup>2</sup> )	3.0 ± 0.6	2.9 ± 0.5	NS
F-PVR (dynec·sec·cm <sup>-5</sup> )	126 ± 54	158 ± 55	0.0023
F-SVR (dynec·sec·cm <sup>-5</sup> )	1652 ± 504	1899 ± 532	0.0108
PAC (ml/mmHg)	4.3 ± 1.2	3.5 ± 1.3	0.0002
LVSWI (g·m/m <sup>2</sup> )	44 ± 12	40 ± 9	0.0218
RVSWI (g·m/m <sup>2</sup> )	5 ± 1	5 ± 2	0.0426

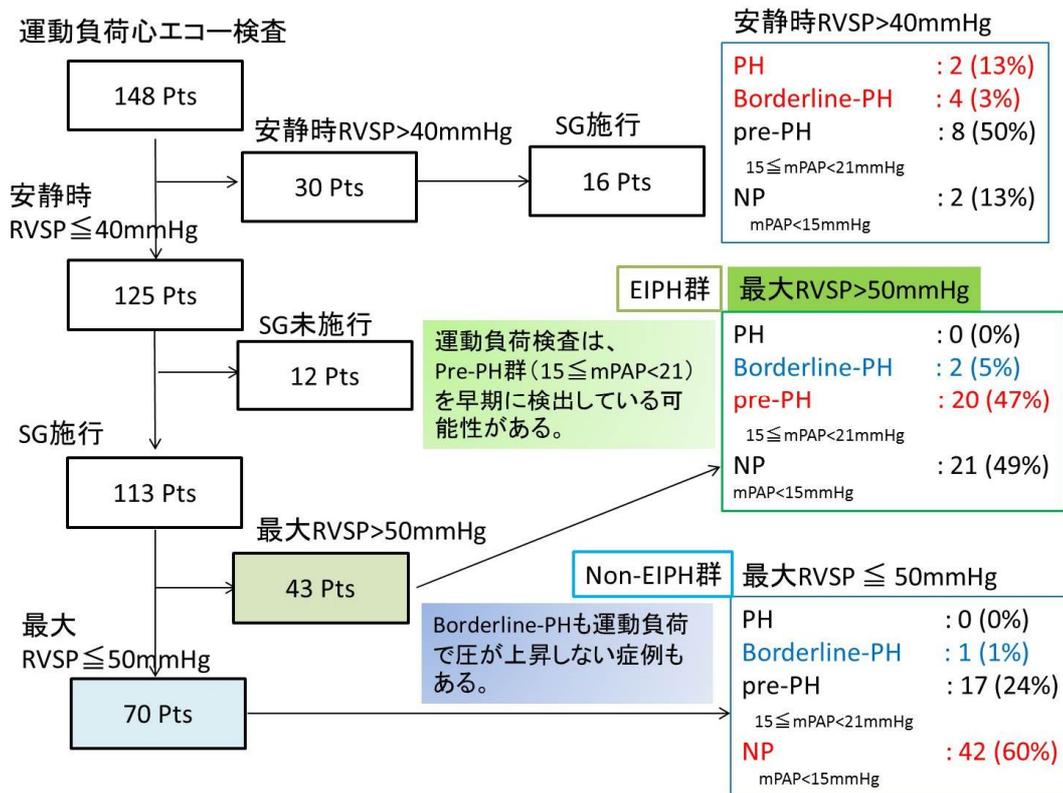


図4：安静時RVSP ≤ 50mmHgの群、EIPH群、non-EIPH群の右心カテの結果