

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

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 伸一

平成26年（2014年）3月

【目 次】

I. 総括研究報告

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

研究代表者 佐藤伸一（東京大学医学部附属病院皮膚科）

II. 分担研究報告

1. 本邦の強皮症早期重症例の経過に関する多施設共同研究

—これまでの検討のまとめ—

研究協力者 長谷川稔（福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学）

研究分担者 浅野善英, 石川治, 尹浩信, 遠藤平仁, 川口鎮司, 桑名正隆, 後藤大輔,
高橋裕樹, 藤本学

研究協力者 田中住明

協力者 竹原和彦

研究代表者 佐藤伸一

2. 全身性強皮症に伴う間質性肺疾患に対する rituximab の使用経験

研究分担者 浅野善英（東京大学医学部附属病院皮膚科）

協力者 住田隼一, 青笹尚彦, 遠山哲夫, 赤股要, 宮崎美幾, 谷口隆志, 高橋岳浩,
市村洋平, 野田真史, 玉城善史郎, 桑野嘉弘, 築場広一

研究代表者 佐藤伸一

3. 強皮症肺高血圧に PDE 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）

協力者 楠芳恵, 川合眞一

4. 強皮症消化管障害における治療介入基準の検討

研究分担者 遠藤平仁（東邦大学医学部医学科内科学講座膠原病学分野）

協力者 楠芳恵, 川合眞一

5. ボセンタンが血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスの 血管障害に及ぼす影響についての検討

研究分担者 浅野善英（東京大学医学部附属病院皮膚科）

協力者 赤股要, 野田真史, 谷口隆志, 高橋岳浩, 市村洋平, 遠山哲夫,
Maria Trojanowska

研究代表者 佐藤伸一

6. 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）

協力者 大橋威信

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

16. **全身性強皮症(SSc)の新規自己抗体:抗 RuvBL1/2 抗体の臨床的意義**
研究分担者 桑名正隆 (慶應義塾大学医学部リウマチ内科)
藤本学
研究協力者 長谷川稔
協力者 加治賢三, Noreen Fertig, Thomas A. Medsger, 佐藤隆司, 星野香奈,
濱口儒人, Mary Lucas, Andrew Schnure, 竹原和彦
研究代表者 佐藤伸一
17. **抗 RNA ポリメラーゼ 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)
研究協力者 小寺雅也
協力者 濱口儒人, 臼田俊和, 竹原和彦
研究代表者 佐藤伸一
18. **強皮症に対する運動負荷心エコーと血行動態の解析**
研究分担者 波多野将 (東京大学医学部附属病院循環器内科)
浅野善英
協力者 稲葉俊郎, 牧尚孝, 村岡洋典, 皆月準, 今村輝彦, 矢尾厚史, 絹川弘一郎,
小室一成, 住田隼一, 青笹尚彦, 玉城善史郎, 高橋岳浩, 遠山哲夫,
市村洋平, 谷口隆志
研究代表者 佐藤伸一
19. **強皮症の血行動態と予後危険因子の解析**
研究分担者 波多野将 (東京大学医学部附属病院循環器内科)
浅野善英
協力者 稲葉俊郎, 牧尚孝, 村岡洋典, 皆月準, 今村輝彦, 矢尾厚史, 絹川弘一郎,
小室一成, 住田隼一, 青笹尚彦, 玉城善史郎, 高橋岳浩, 遠山哲夫,
市村洋平, 谷口隆志
研究代表者 佐藤伸一
20. **全身性強皮症に合併する肺動脈性肺高血圧症の診断時血行動態と長期生命予後の関係に関する研究**
研究協力者 田中住明 (北里大学医学部膠原病・感染内科学)
協力者 松枝佑, 荘信博, 和田達彦, 廣畑俊成
21. **リウマチ膠原病外来受診例における肺動脈性肺高血圧症(PAH)リスク因子の評価**
研究分担者 桑名正隆 (慶應義塾大学医学部リウマチ内科)
協力者 白井悠一郎, 安岡秀剛, 増井健一
22. **びまん皮膚硬化型全身性強皮症とIRF2多型の関連**
研究協力者 土屋尚之 (筑波大学医学医療系分子遺伝疫学)
長谷川稔
研究分担者 藤本学
協力者 川崎綾, 古川宏, 當間重人, 住田孝之, 竹原和彦
研究代表者 佐藤伸一

23. 指尖部皮膚潰瘍を生じた全身性強皮症のまとめ

研究分担者 石川治 (群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学)
協力者 土岐清香, 茂木精一郎

24. シェーグレン症候群先行全身性強皮症の臨床的特徴の検討

研究分担者 高橋裕樹 (札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座)
協力者 山本元久, 鈴木知佐子

25. 全身性強皮症に対する手指のリハビリテーション-長期経過の検討-

研究協力者 麦井直樹 (金沢大学医学部附属病院リハビリテーション部)
長谷川稔
研究分担者 藤本学
協力者 大畠幸恵, 濱口儒人, 松下貴史, 竹原和彦

26. 色素レーザーが有効であった毛細血管拡張症を伴った全身性強皮症の1例

研究分担者 尹浩信 (熊本大学大学院皮膚病態治療再建学)
協力者 牧野貴充, 神人正寿, 梶原一亨

27. 全身性強皮症における血清 Flt-3 リガンド濃度の検討

研究分担者 尹浩信 (熊本大学大学院皮膚病態治療再建学)
協力者 中村香代

28. エクソーム解析による全身性強皮症原因変異の網羅的探索

研究分担者 岡晃 (東海大学総合医学研究所)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

強皮症における病因解明と根治的治療法の開発

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

A. 研究目的

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

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

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

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

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

B. 研究方法

1. 基礎研究

(1) SSc 主要病態の発症メカニズムの解析

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

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

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

て、線維化におけるアペリンの役割について検討した。

(2) SSc 病態の一元化モデルの作成

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

(3) 疾患感受性遺伝子同定プロジェクト

SSc の疾患感受性遺伝子の同定のため、重症型 SSc 7 例における全ゲノムにおけるエクソン配列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。また、SSc を対象に IRF2 遺伝子多型について解析した。

2. 臨床研究

(1) SSc の活動性や予後と関連するバイオマーカーの抽出

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

(2) SSc 病態への既存薬の有効性の検討

既存薬を用いて、各種 SSc 病態への有効性をパイロット的に検討した。

(3) その他の臨床研究

SSc の各種臨床症状、検査所見の間での相関解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子研究、臨床データの集積などに当たっ

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

C. 研究結果と考察

1. 基礎研究

(1) SSc 主要病態の発症メカニズムの解析

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

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

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

3 つの SSc コホートにおける抗 RuvBL1/2 抗体陽性率は 1~2% であったが、SSc に特異的であった。陽性例は筋炎の重複が 60% を占め、びま

ん皮膚硬化型が 70% を占めた。筋炎重複症候群と関連する抗 Ku 抗体、抗 PM-Scl 抗体と比べると、抗 RuvBL1/2 抗体陽性例は高齢発症で男性に多く、びまん皮膚硬化型が高率であった。以上から、抗 RuvBL1/2 抗体の臨床的意義が明らかとなった(藤本)。

Am80 は急性前骨髄球性白血病治療薬として承認されている合成レチノイドで、近年ループス腎炎や血管炎など各種膠原病に対する有用性が臨床試験や動物実験により示唆されている。Am80 は、ブレオマイシン誘発 SSc モデルマウスにおいて、その皮膚硬化を有意に改善し、新規治療薬となる可能性が示唆された(浅野)。

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

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

(2) Fli1 による SSc 病態の一元化モデルの作成

Fli1ヘテロ欠損マウスでは、SScに特徴的な線

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

そこで、各種臓器で線維化を制御する転写因子である KLF5 に注目した。まず、Fli1、KLF5 共に SSc 由来線維芽細胞では epigenetic 制御によりその発現が抑制されていることを見いだした。そこで、KLF5、Fli1 を遺伝的にヘテロ欠損させた KLF5、Fli1 ダブルヘテロ欠損マウスを作成し解析した。その結果、KLF5、Fli1 ダブルヘテロ欠損マウスは、SSc の主要三病態(線維化・血管障害・免疫異常)を自然発症した(浅野)。

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

(3) 疾患感受性遺伝子同定プロジェクト

重症型 SSc7 例における全ゲノムシーケンス解析によって、SSc の疾患感受性遺伝子として、COL16A1、HIVEP3、TIE1、POLR3B、GBP6、ABCA3、GCKR、D2HGDH、NHSL1、TAS2R40、CAPRIN2、METTL20、ZNF592、ABCA3、JPH3、ZC3H18、FAM38A、TXNDC2、

SALL3 の 18 遺伝子を新規に同定した。そのうち、病態との関連性が想定される COL16A1、HIVEP3、TIE1、POLR3B、GBP6、ABCA3 の 6 遺伝子を今後の解析対象と決定した(岡)。

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

2. 臨床研究

(1) SSc の活動性や予後と関連するバイオマーカーの抽出

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

(2) 既存薬の SSc 病態への有効性の検討

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

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

(3) その他の臨床研究

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

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

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

動脈硬化性病変の二次発症の予測血清マーカーとして酸化LDL(MDA-LDL)が注目されている。そこで、MDA-LDL値とSSc患者の臨床症状との相関について検討したところ、SSc患者では、MDA-LDL 高 値 例 が 多 く、SSc における MDA-LDL / LDL-C比は、全身性エリテマトーデスと比較して高値であった。%DLcoとは負の相関関係、収縮期右室圧、KL-6、SP-Dは正の相関関係が見られた(小寺)。

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

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

D. 結 論

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

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

研究協力者	長谷川稔	福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学 教授
研究分担者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
研究分担者	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授
研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 教授
研究分担者	遠藤平仁	東邦大学医学部医学科 内科学講座膠原病学分野 准教授
研究分担者	川口鎮司	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 臨床教授
研究分担者	梶名正隆	慶応義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
研究分担者	後藤大輔	筑波大学医学医療系 (筑波大学附属病院・茨城県地域臨床教育センター) 准教授
研究分担者	高橋裕樹	札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座 准教授
研究協力者	田中住明	北里大学医学部膠原病・感染内科学 診療准教授
研究分担者	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
研究代表者	佐藤伸一	東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
協力者	竹原和彦	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授

研究要旨

厚生労働省の強皮症研究班と強皮症研究の有志らにより成る強皮症研究会議では、本邦における全身性強皮症 (SSc)、特に臨床上問題となる発症早期の重症例 (皮膚硬化がびまん性が間質性肺炎あり) 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 線維芽細胞	IL-1βが促進	CCR1 (単球, T, NK, DC, 好中球) CCR2 (単球, T, NK) CCR3 (好酸球, 好塩基球, T)	増加
CX3CL1 (Fractalkine)	血管内皮細胞, 上皮細胞	TNF-α, LPSが促進	CX3CR1 (単球, 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. R² (determination coefficient) = 0.63; Root mean square error = 4.73; P < 0.0001.

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

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

	Estimate	Standard error	P-value
Intercept	10.94	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. R² = 0.70; Root mean square error = 12.00; P < 0.0001.

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

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

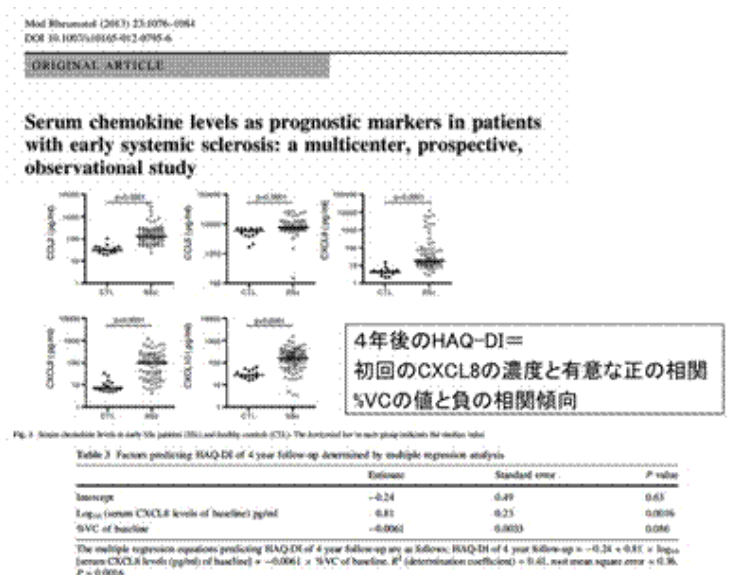
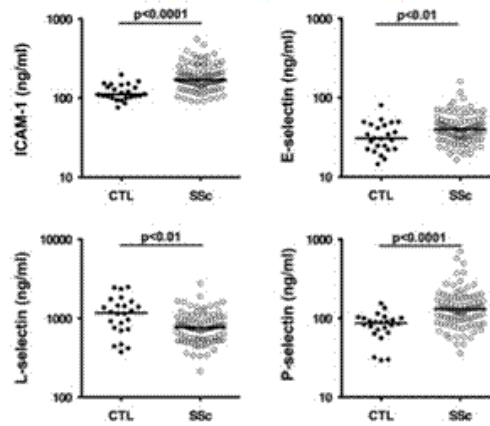


図2 ケモカインの血中濃度がその後の症状の予測に有用かどうかを検討して第2報として報告した。

**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 ₁₀ (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 log₁₀(serum ICAM-1 levels (ng/ml) of baseline).

R² (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 ₁₀ (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 log₁₀(serum P-selectin levels (ng/ml) of baseline) + 0.0005 x %VC of

baseline + 0.28 x HAQ-DI of baseline. R² (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

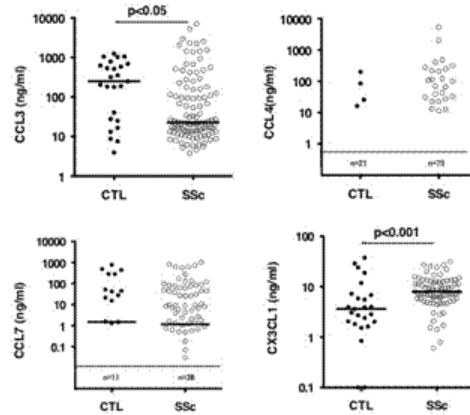


図5 第2報で報告した以外のケモカインの血中濃度を測定し、SSc患者と健常人で比較したもの。横線は中央値を示す。

4年間の臨床症状とケモカインの血中濃度の推移

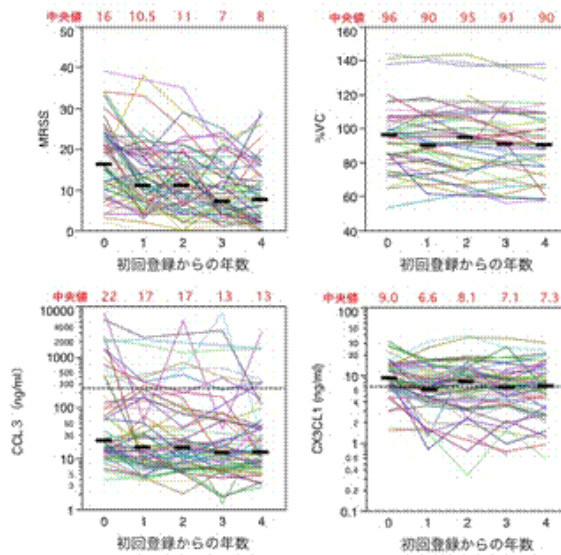


図6 4年間のMRSSや%VCの変動と、CCL3、CX3CL1の変化をグラフに示す。長い点線は健常人の中央値を、短い横線は強皮症患者の各時点での中央値を示す。

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/m² 週 1 回を 4 週連続投与、6 か月間隔で計 2 クール) を行った。rituximab 投与後、乾性咳嗽の軽減、呼吸機能改善、血清中 KL-6・SP-D 値の低下、及び CT 画像所見の明らかな改善を認めた。皮膚硬化の改善も認め、血清中抗トポイソメラーゼ I 抗体の抗体価は緩徐に低下した。rituximab の適切な投与間隔についても若干の考察を行った。

A. 研究目的

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

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

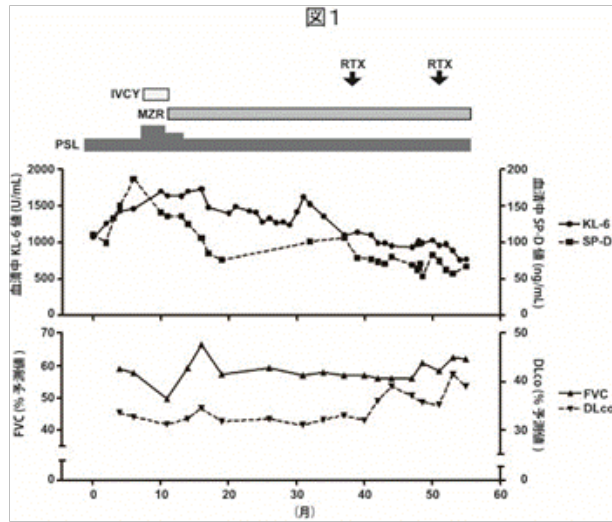


図 1：治療経過中の間質性肺疾患パラメータの推移

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.

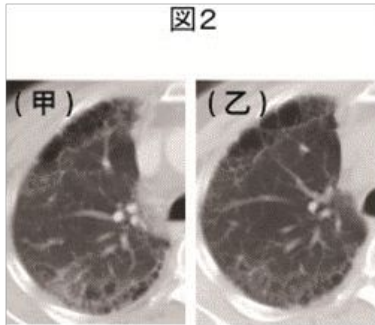


図 2：rituximab 治療直前(甲)と治療半年後(乙)の胸部 CT 画像。

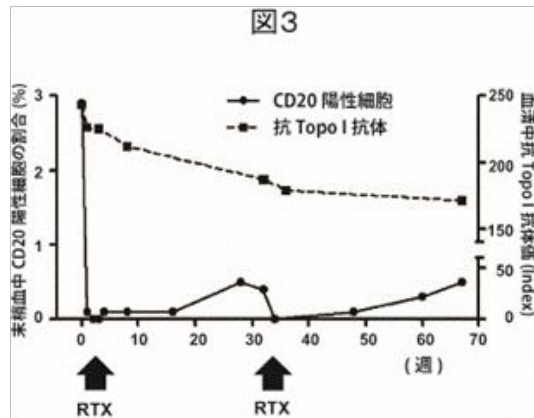


図 3：rituximab 投与後の末梢血中 CD20 陽性白血球の割合と血清中抗トポイソメラーゼ I 抗体値。Topo I, topoisomerase I; RTX, rituximab.

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 **川合真一** 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 指尖陥凹性癍痕、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/cm³、限局皮膚硬化型強皮症 肺動脈性肺高血圧と診断した。O₂ 2L/min、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 O₂ 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 阻害薬は経口ピモバ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

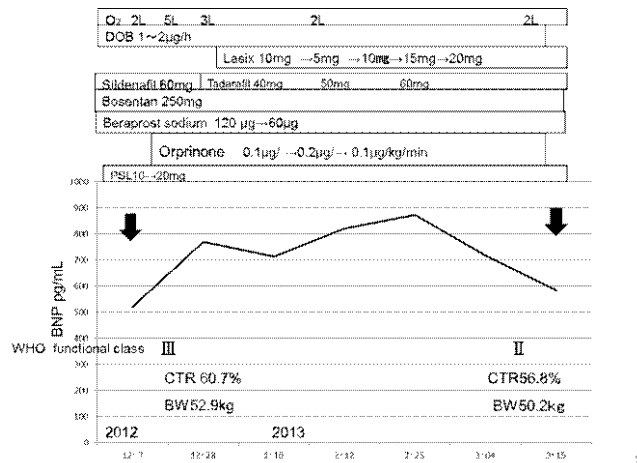


図1. 症例1の経過表

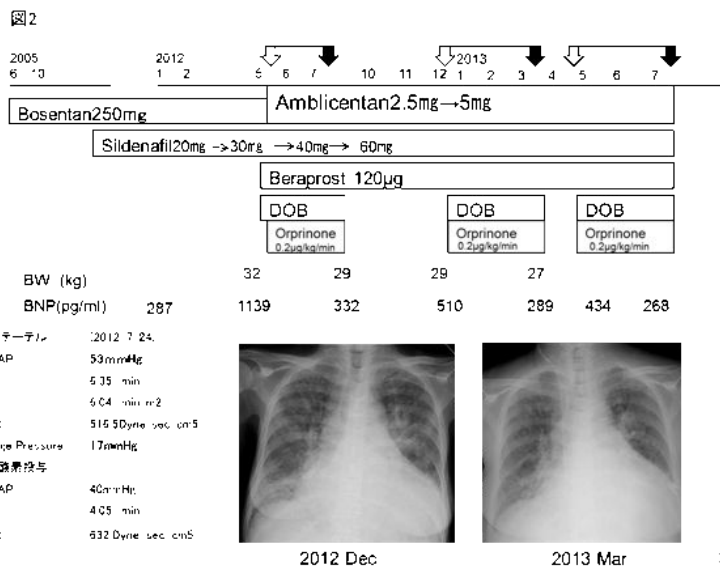


図2. 症例2の経過表

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 PGI₂ 製剤投与であった。また血清学的指標は FGF19 値が関連を認め治療介入 Cut off 値は 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 ¹³C 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。

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

D. 考察

強皮症腸管障害はその治療、予防法は確立していない。強皮症は体重減少、栄養障害を認める。MUST はイギリスの協会から報告された栄養障害評価、対応に関するアルゴリズムである。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}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 H₂ 増加による腸内細菌増殖は検出できなかった。2 症例は 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¹³C 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

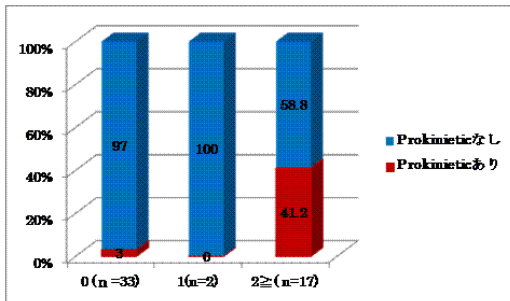


図1 (A) MUSTによる層別化 Prokinetic drugs 使用の有無 P=0.027

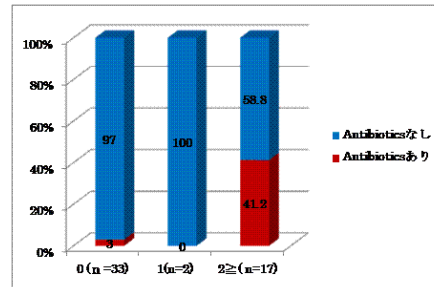


図1 (B) MUSTによる層別化 Antibiotics 使用の有無 P=0.028

MUST score と関連する因子の解析 重回帰分析

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

図2 MUSTとの関連因子の解析 重回帰分析

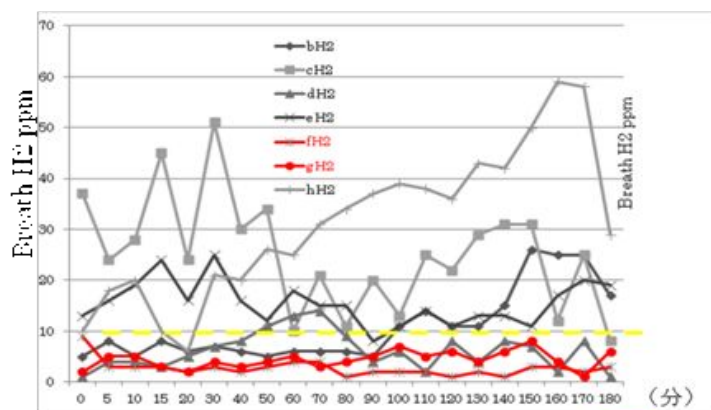


図3 ラクトース負荷呼気中 H₂ 濃度の検討 (e h 症例偽性腸閉塞症例)

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*^{+/+}マウスおよび血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失 [*Fli1*^{-/-}ECKO] マウス) [4] を用いて検討を行った。

B. 研究方法

1) 強皮症血管障害モデルマウス

強皮症血管障害モデルマウスである *Fli1*^{-/-}ECKO マウス (*Fli1*^{fllox/fllox};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%CO₂、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 × 10⁴ 個まき、75ng の scrambled RNA と

Fli1 siRNA, PKC- siRNA, c-Abl siRNA(Santa Cruz)をそれぞれ 100 μ L の培養液に入れ、終濃度を 10nM とした。そこに Hiperfect Transfection Reagent (QIAGEN) を 3 μ L 混合し、室温で 10 分間放置した。その後、この混合物を培養細胞上に静かに滴下し、24 時間培養した。

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

血管内皮細胞を回収し、total RNA は RNeasy mini kit (QIAGEN) にて抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて 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 MgCl₂, 1mM CaCl₂, 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、 2×10^6 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*^{+/-}マウスの血管障害に及ぼす影響

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

7) ボセンタンが *Fli1* ECKO マウスの血管障害に及ぼす影響

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

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

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

D. 考案

SSc の病態は未だ不明であるが、その発症には遺伝因子の他に環境因子も非常に重要であると考えられている。SSc 患者の病変部皮膚および SSc 皮膚線維芽細胞ではエピジェネティック制御を介して転写因子 Fli1 の発現が恒常的に抑制されていることから、Fli1 は

本症の病態における環境因子の影響を反映した疾病因子の一つと考えられている。Fli1 の発現低下は *in vivo* において線維芽細胞と血管内皮細胞の恒常的な活性化を誘導するが、Fli1 ECKO マウスにおいて SSc の血管障害に特徴的な血管の構造異常と機能異常が再現できることから、特に SSc の血管障害の病態においては Fli1 の発現異常が果たす役割は大きいことが示唆される。

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

E. 結論

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

F. 文献

1. Korn JH, et al. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3985-93.
2. Matucci-Cerinic M, et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:32-8.
3. Guiducci S, et al. Bosentan fosters microvascular de-remodelling in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2012;31:1723-5.
4. Asano et al. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol.* 2010;176:1983-98

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

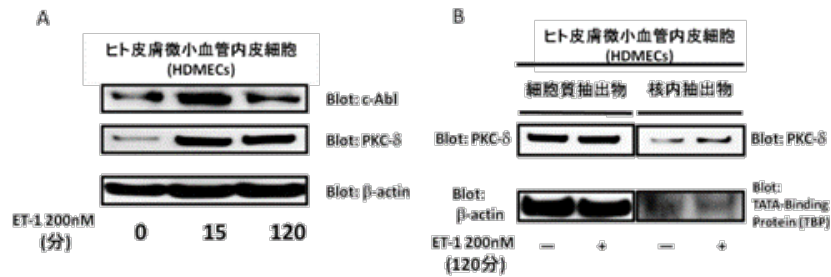
Akamata K, Asano Y, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Trojanowska M, Sato S. Bosentan improves vascular abnormalities in endothelial cell-specific Fli1 knockout mice by increasing the DNA

binding ability of Fli1 - a possible mechanism explaining the effect of bosentan on scleroderma vasculopathy. ACR/ARHP Scientific Meeting 13, October 25-30, 2013 SanDiego

H. 知的財産権の出願・登録状況

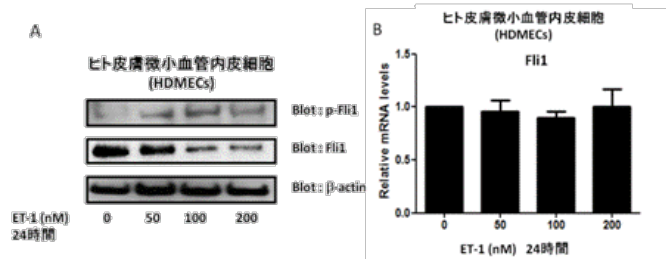
なし

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



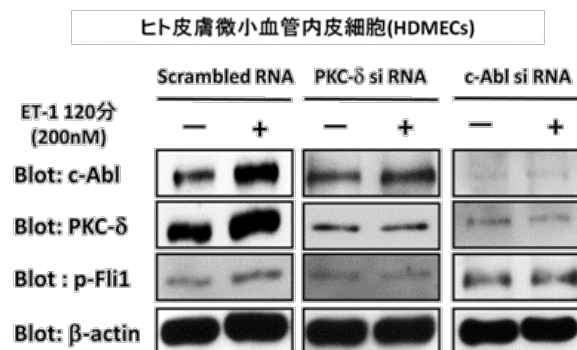
- A. HDMECs を ET-1 存在下で培養すると、c-Abl と PKC-δ の発現が亢進した。
- B. HDMECs を ET-1 存在下で培養すると、PKC-δ の核内移行が亢進した。

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



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

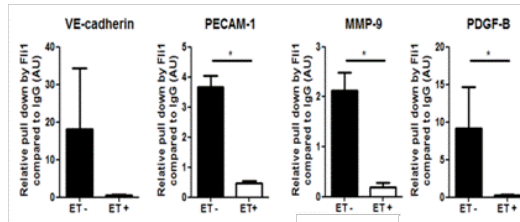
図3. c-AblおよびPKC-δの遺伝子サイレンシングがHDMECsにおけるET-1の作用に及ぼす影響



HDMECs を c-Abl siRNA, PKC-δ siRNA, scrambled non-silencing RNA でそれぞれ処理し、ET-1 刺激後に c-Abl と PKC-δ の発現量および Fli1 のリン酸化の程度について免疫プロット法で検討した。

図4. HDMECsにおいて、ET-1がFli1のDNA結合能に及ぼす影響

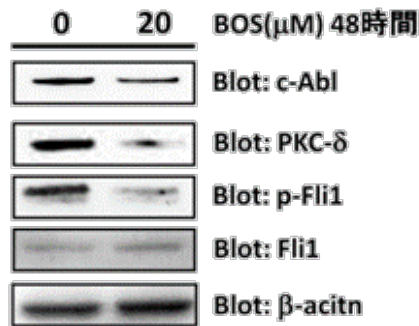
ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HDMECs)を用いたクロマチン免疫沈降法



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。

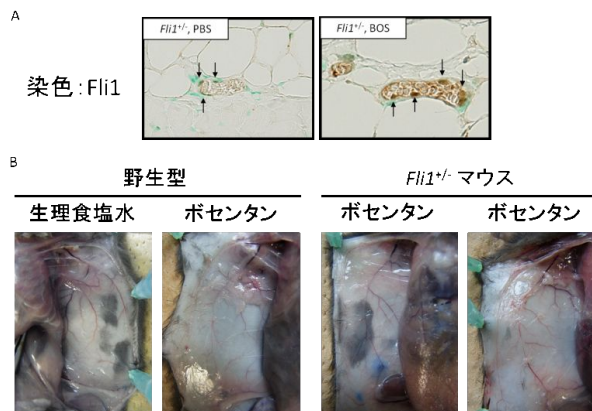
図5. HDMECsにおけるc-Abl- PKC- δ -Fli1 pathwayにボセンタンが及ぼす影響

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- δ , Fli1 の蛋白発現量および Fli1 のリン酸化の程度について免疫プロット法で検討した。

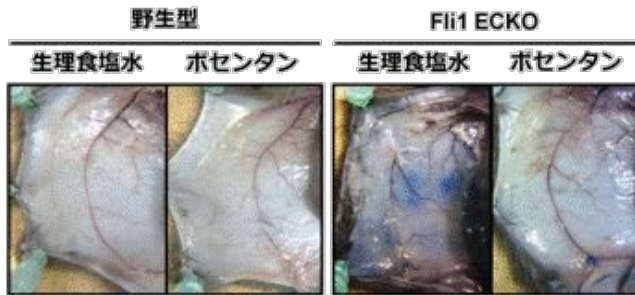
図6. ボセンタンがFli1^{-/-}マウスの血管障害に及ぼす影響



A. Fli1^{-/-}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。

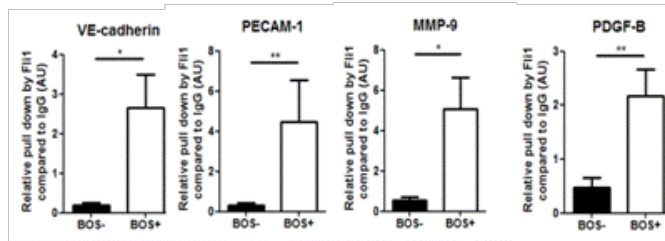
図7.ボセンタンが*Fli1*ECKOマウスの血管障害に及ぼす影響



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、LPA₁ 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- γ 、TNF- α 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- α 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、LPA₁ および LPA₃ 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- γ は線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を抑制する。LPA₁ 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¹⁾。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

LPA₁ 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- β 、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: LPA₁ 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

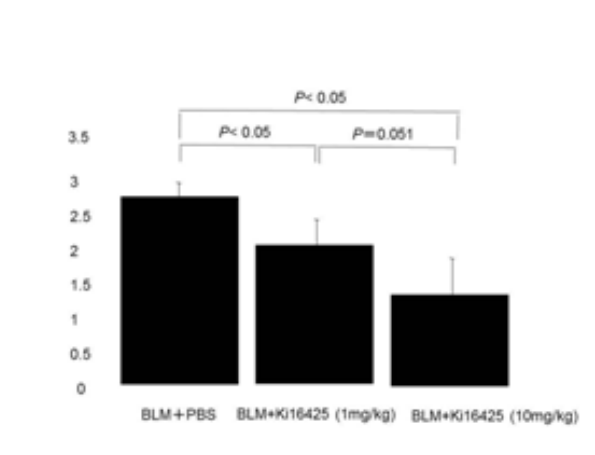


图 1 : MIP-1 mRNA 定量

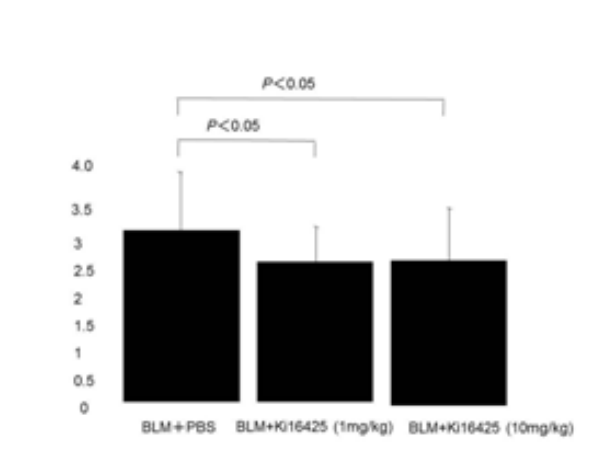


图 2 : IFN-γ mRNA 定量

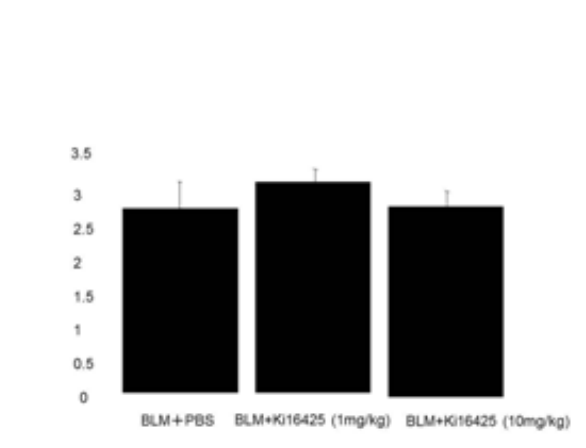


图 3 : TNF-α mRNA 定量

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	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	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	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	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	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	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	赤股 要	東京大学医学部附属病院皮膚科	大学院生
協力者	門野岳史	東京大学医学部附属病院皮膚科	准教授
協力者	首藤紘一	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- β 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- γ 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¹⁾。

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。²⁾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^{3) 4)}。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⁵⁾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⁶⁾、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)- γ 、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、抗生剤、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、CO₂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、CO₂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 μ 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 μ g/ml の brefeldin A (GolgiStop; BD Pharmingen) 存在下で 10 ng/ml の PMA と 1 μ 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- γ (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 は皮膚におけるハイ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 β 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 β 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 β 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 α 、IFN γ 、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 γ 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 γ 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 α 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- β 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。^{7) 8) 9)} 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- β 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- β 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-1¹⁰⁾、TNF- α ¹¹⁾、IFN- γ 、IL-4¹²⁾、IL-17、IL-10¹³⁾ 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^{14) 15)}。BLM 誘発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¹⁶⁾。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^{17) 18)}。そこで Am80 が BLM 誘発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- γ 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-1¹⁹⁾ 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

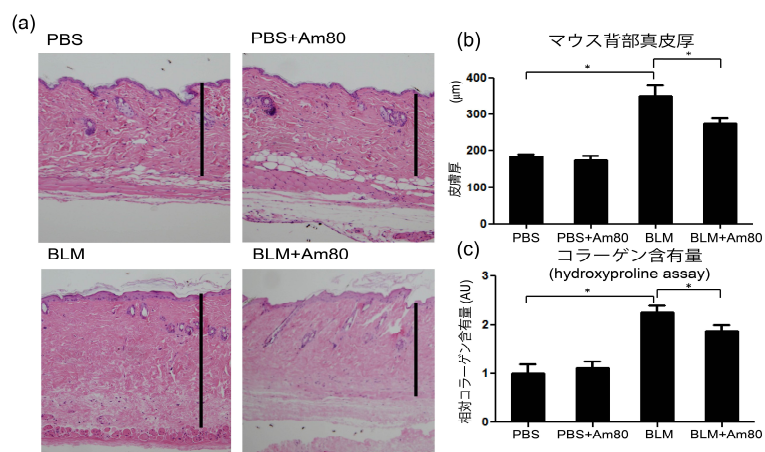


図 1 : (a)(b)BLM 投与後の皮膚組織像(HE 染色)および真皮の厚さに関する検討。

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)。

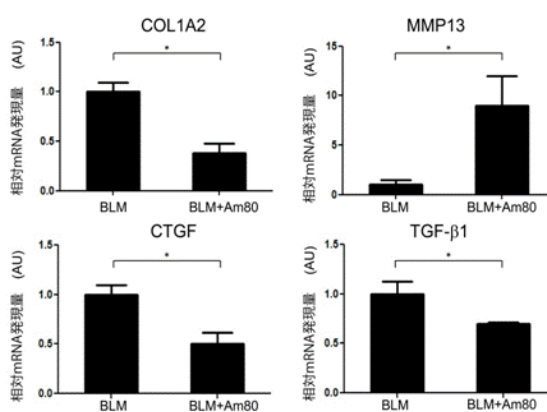


図 2 : BLM 誘導強皮症モデルマウスの皮膚における線維化に関連する各種遺伝子の mRNA の発現量に関する検討。

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)。

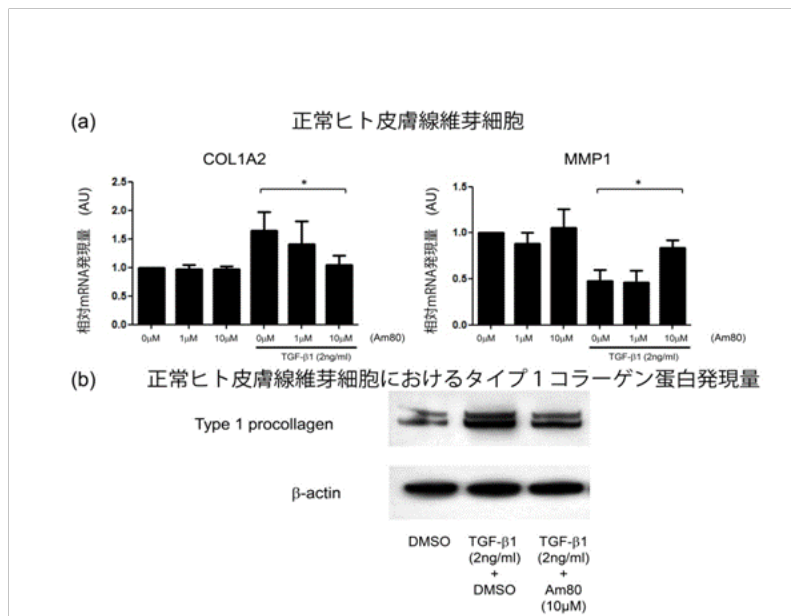


図3 : (a) TGF-β1 刺激で活性化した正常ヒト皮膚線維芽細胞における COL1A2、MMP1 遺伝子の mRNA の発現量に関する検討。

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。

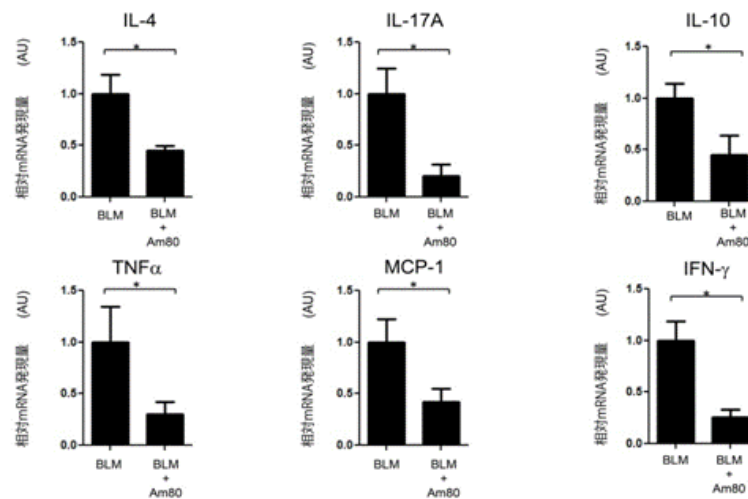


図4 : BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚におけるサイトカイン・ケモカインの発現異常に対する Am80 の作用に関する検討。

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)。

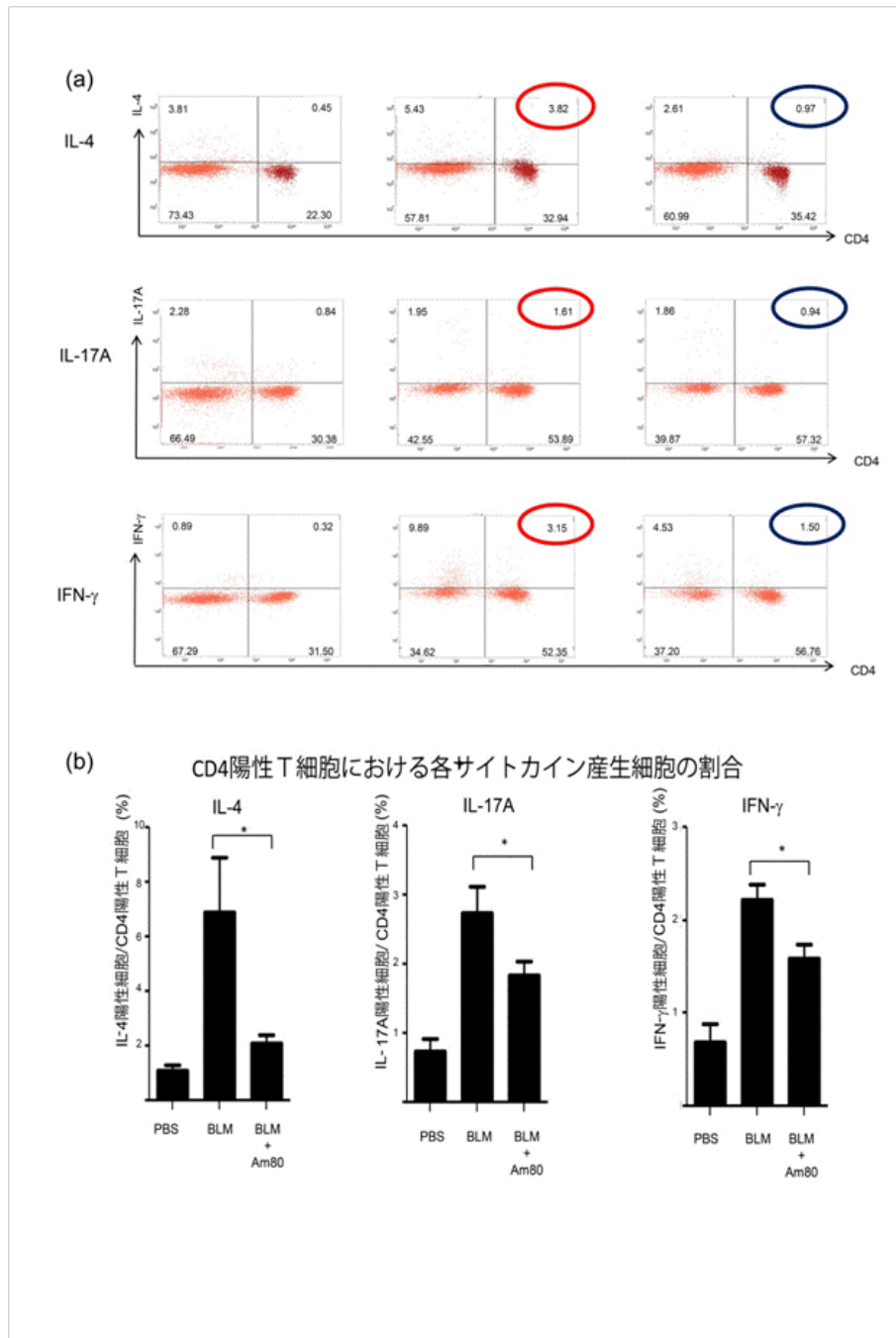


図 5 : (a)(b) CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカイン産生に対する Am80 の作用。

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)。

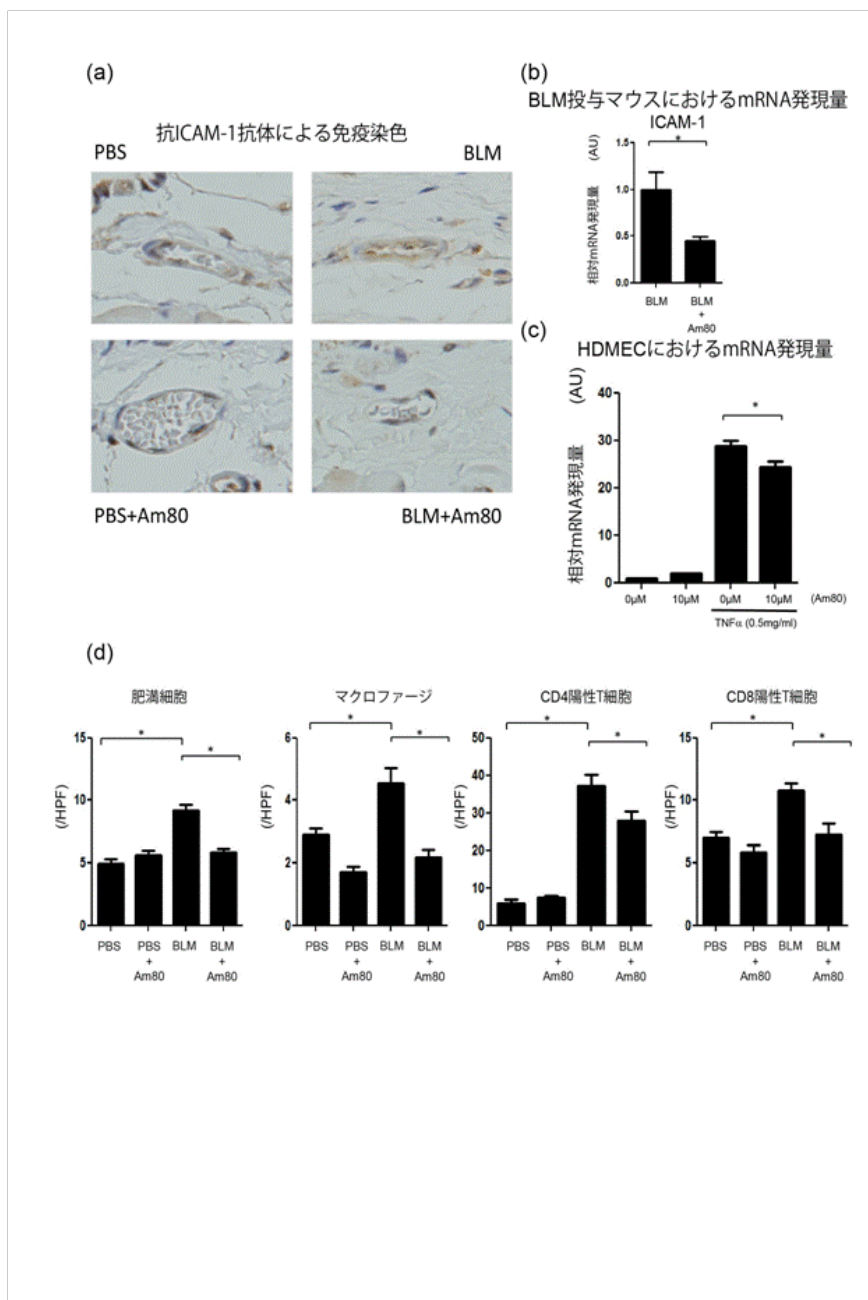


図6：(a)皮膚血管内皮細胞におけるICAM-1蛋白の発現量に関する検討。

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 μ 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 μ 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- β 1 (T) 投与群、TGF- β 1 + シルデナフィル 1 μ M (T+S1) 投与群、TGF- β 1 + シルデナフィル 10 μ M (T+S10) 投与群、TGF- β 1 + シルデナフィル 100 μ M (T+S100) 投与群に分け、それぞれの濃度の薬剤を添加し、TGF- β 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- β 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- β 1 単独投与群に比べ、TGF- β 1 + シルデナフィル 100 μ 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- β 1 + シルデナフィル 100 μ 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- β 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 μ M、10 μ M では十分な効果を示さなかったが、100 μ 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 μ M 未満と考えられており、100 μ 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- β 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- β 1 単独投与群に比べ、TGF- β 1+シルデナフィル 100 μ 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- β 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

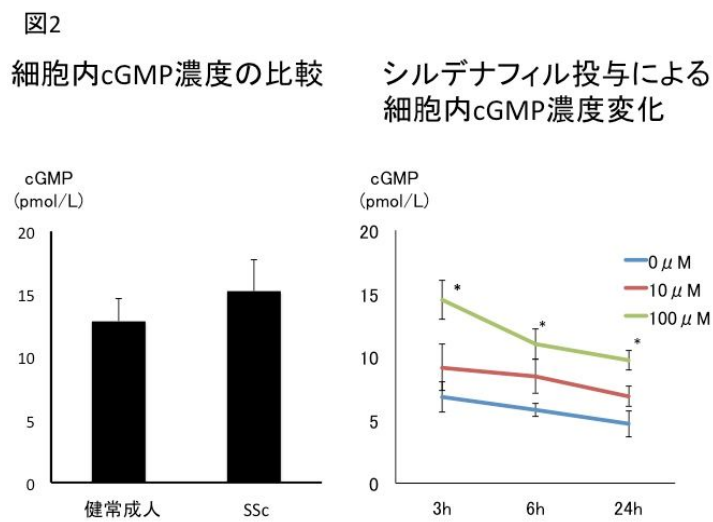


図2: (左) 通常時の正常成人皮膚線維芽細胞と強皮症由来皮膚線維芽細胞の細胞内 cGMP 濃度
(右) シルデナフィル投与による細胞内 cGMP 濃度の変化

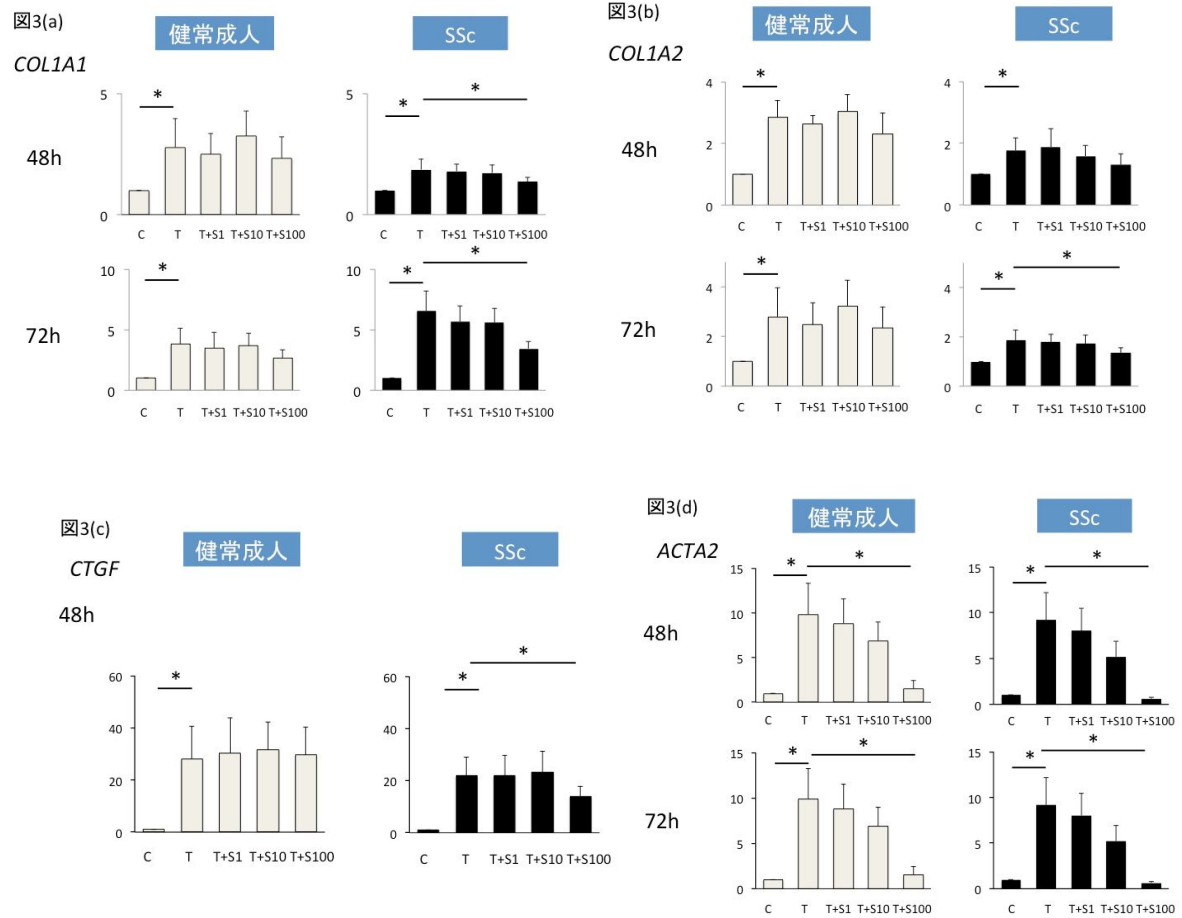


図 3: TGF-1 刺激下におけるシルデナフィルの各種 mRNA 発現量に対する効果

(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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 刺激によるアペリンの発現量を検討したところ、TGF- β 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- β 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- β 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- β 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- 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。

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- β 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- β シグナルの亢進による可能性が示唆された。また、TGF- β 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- β 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- β 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- 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- 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- β 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- β 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- β 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- β 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 γ / β -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

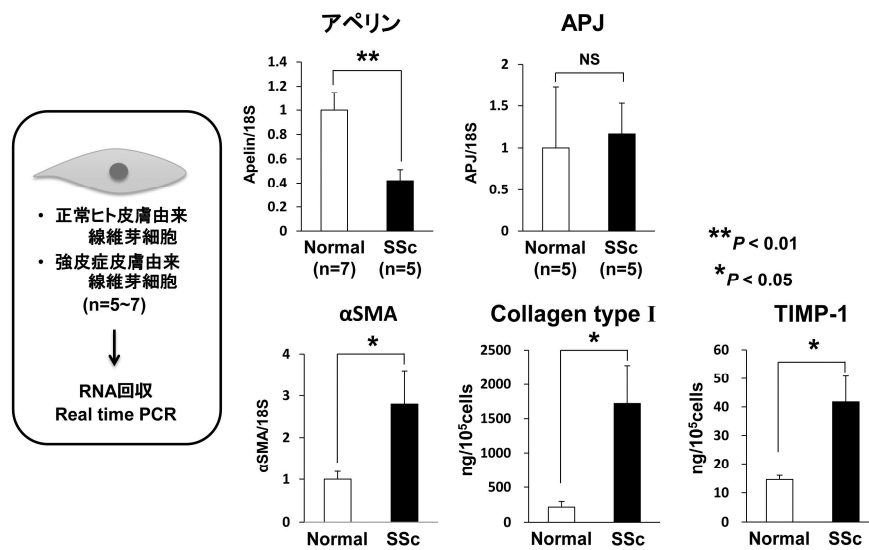


図1：強皮症と正常ヒト皮膚由来線維芽細胞のアペリン/APJ 発現量の比較
強皮症由来線維芽細胞のアペリン発現量は正常由来線維芽細胞と比べて低下している。

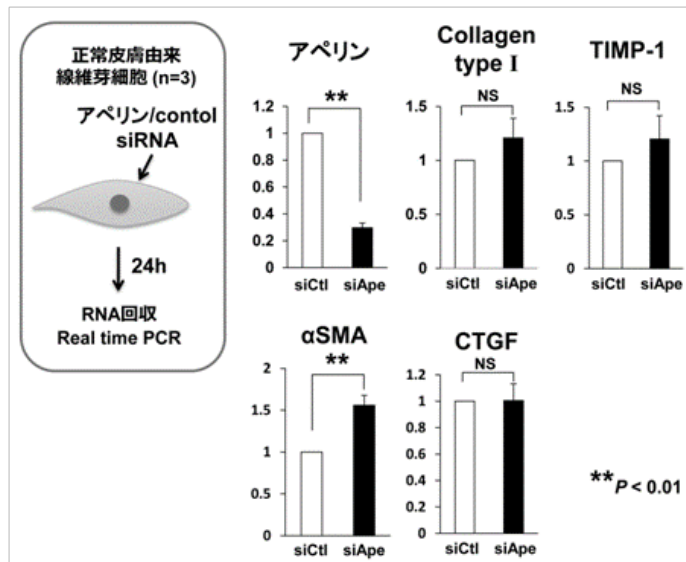


図 2 : アペリン siRNA による正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響
 siRNA によるアペリンの発現抑制によって、線維芽細胞の SMA の発現が亢進した。

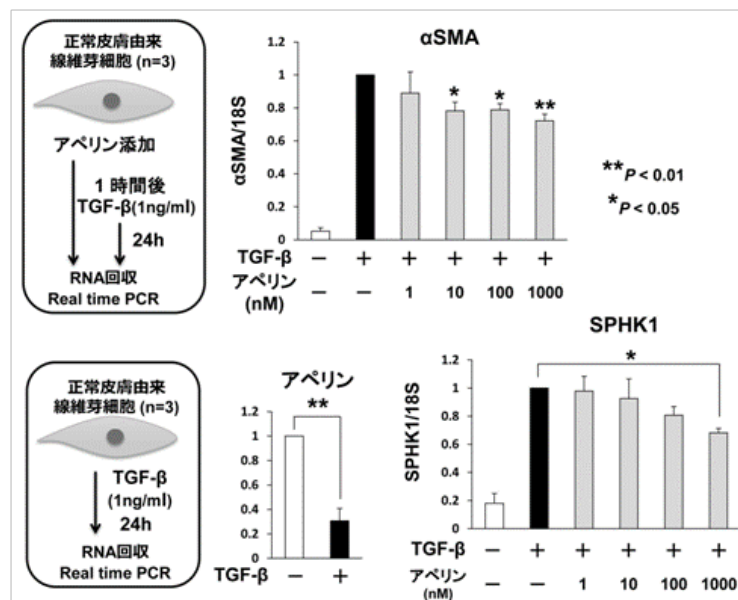


図 3 : アペリン添加による正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維化への影響
 アペリンは、TGF-β 刺激による SMA, 1 型コラーゲン, TIMP-1 の発現亢進に対して、SPHK1 の発現制御を介して抑制的に働いている可能性が示唆された。

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^{high}CD5⁺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^d) マウスの骨髄を BALB/c (H-2^d) 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(10x10⁶細胞)と脾臓細胞(10x10⁶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<1cm², スコア 2= 皮膚病変 1-2cm², スコア 3= 皮膚病変 2-5cm², スコア 4= 皮膚病変 5-10cm², スコア 5= 皮膚病変 10-15cm², スコア 6= 皮膚病変 15-20cm², スコア 7= 皮膚病変>20cm²。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^{hi}CD5⁺ B 細胞)と他の B 細胞(CD1d^{lo}CD5⁻ 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^{hi}CD5⁺ 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^{hi}CD5⁺ 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⁺CD24^{hi}CD38^{hi} または CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ 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

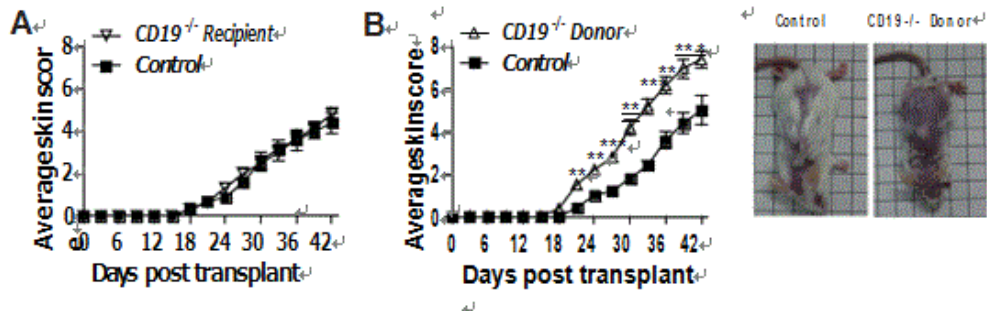


図 1: CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD

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

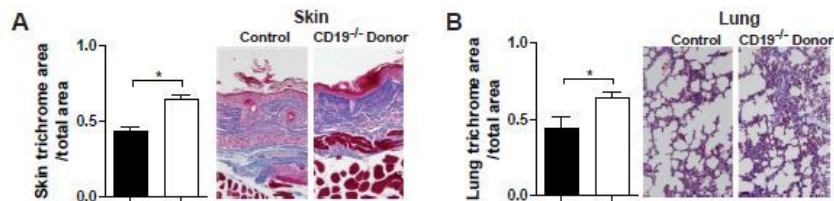


図 2: ドナーCD19 欠損マウスにおける皮膚および肺の線維化

(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

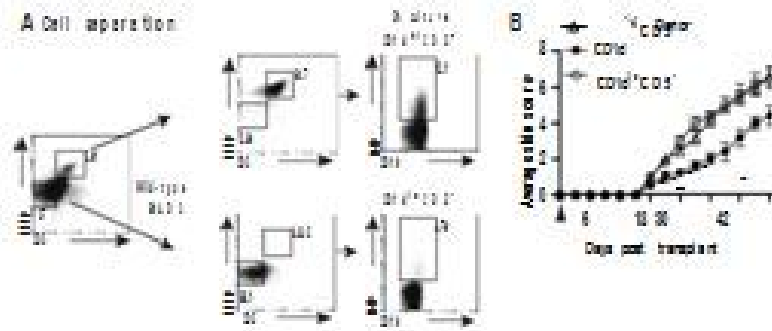


図 3: CD1d^{hi}CD5⁺制御性 B 細胞の移植実験

(A)CD1d^{hi}CD5⁺B 細胞と CD1d^{lo}CD5⁺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^{hi}CD5⁺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^{hi}CD5⁺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^{lo}CD5⁺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- β 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¹⁻⁴。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CO₂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⁶。

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⁵。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(I)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⁷。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(I)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⁸。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⁸。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

おける CAT 活性を比色分析した⁹。siRNA のリベラ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%CO₂ 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¹⁰。

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^{11,12}。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¹³⁻¹⁵。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⁶。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- β 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^{16,17}、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¹⁸。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¹⁹⁻²¹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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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⁷。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⁷。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^{22,23}。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- β シグナル伝達²⁴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²⁵。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^{26,27}。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²⁸。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- β 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- β /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 β promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor β . *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 α 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- β 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 β (TGF- β) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF- β . *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- β /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

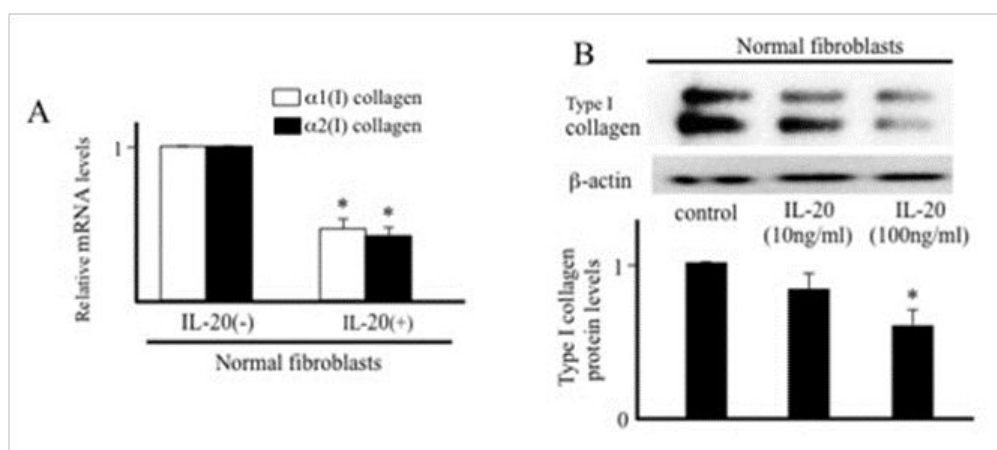


図1 正常皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン発現に対するIL-20の効果

(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、免疫プ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 β -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)。* $P < 0.05$

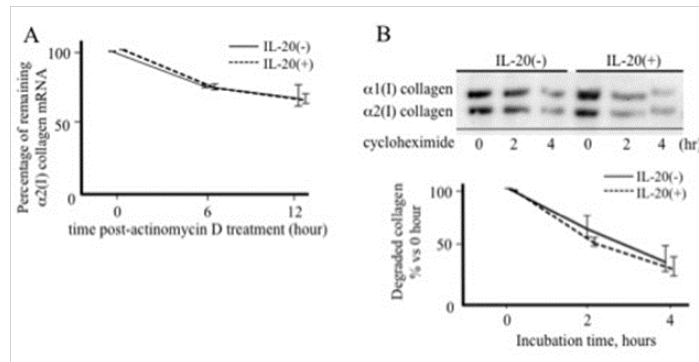


図2 IL-20 刺激の有無による I 型コラーゲンの mRNA およびタンパクの半減期

(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 μ 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 μ 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)。

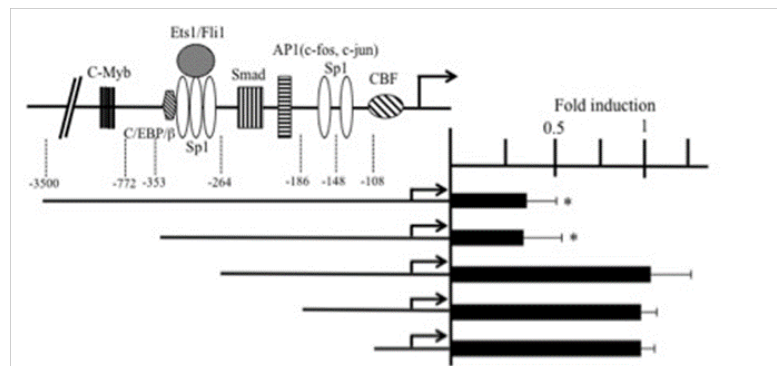


図3 CATアッセイ

$\alpha 2(I)$ 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

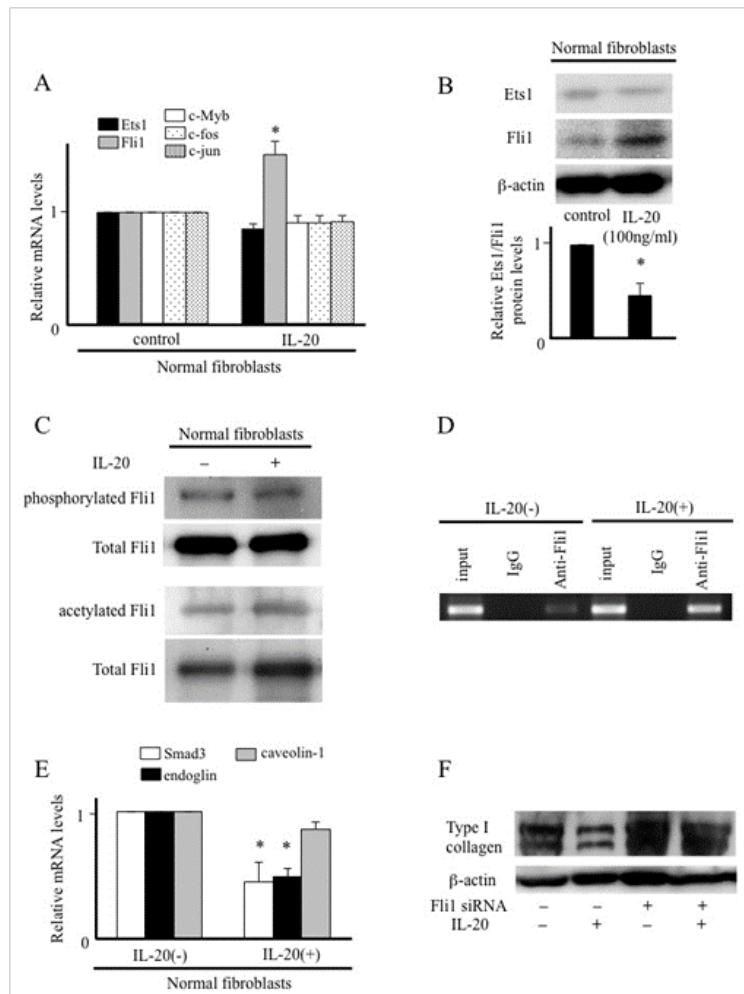


図4 IL-20がFli1発現に及ぼす影響

(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。

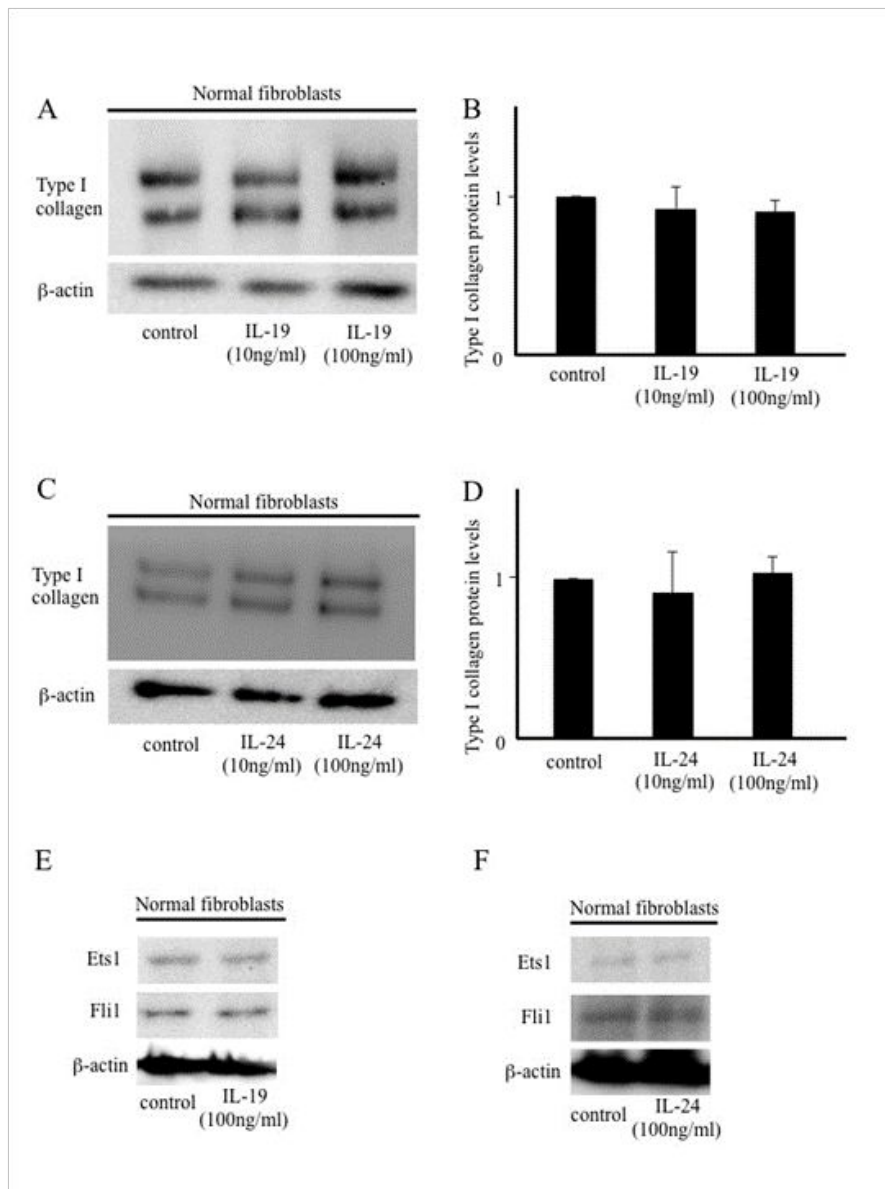


図5 正常皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン発現に対するIL-19およびIL-24の効果

(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。

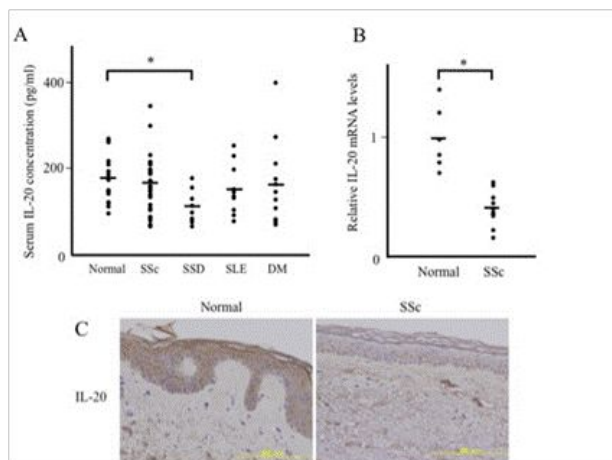


図6 リウマチ性疾患患者の血清および皮膚組織における IL-20 濃度

(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。

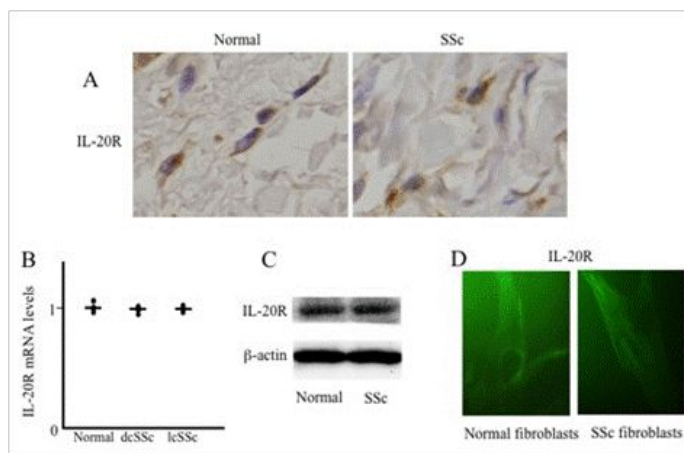


図7 線維芽細胞における IL-20 受容体の発現

(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。

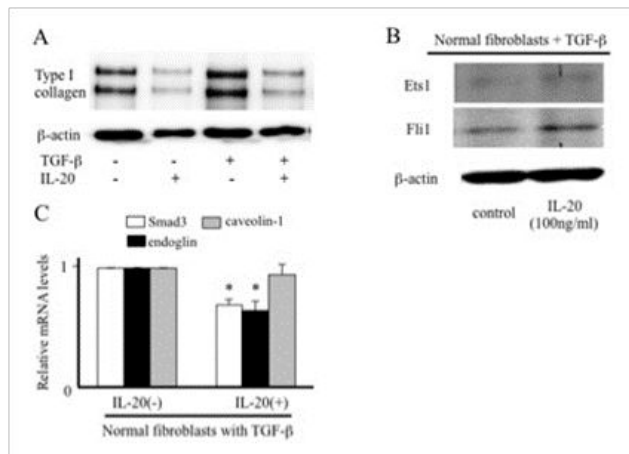


図 8 TGF-β 刺激した正常線維芽細胞における I 型コラーゲン発現に対する IL-20 の効果

(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

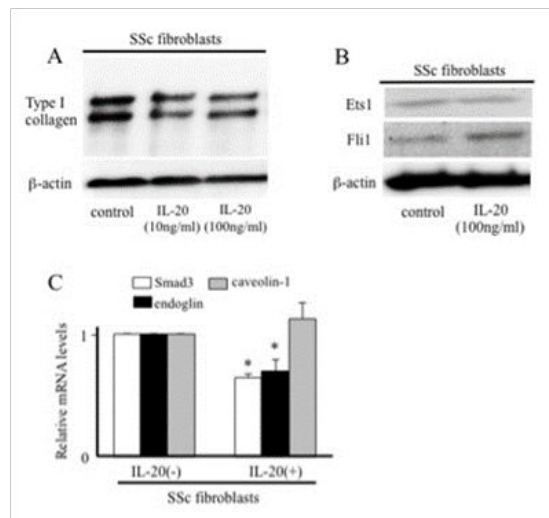


図 9 SSc 線維芽細胞における I 型コラーゲン発現に対する IL-20 の効果

(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

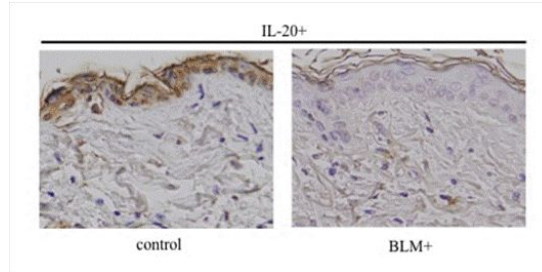


図 10 IL-20 によるマウスの皮膚パラフィン切片の免疫染色。(左)が PBS を投与された野生型マウス、(右)がブレオマイシンを投与されたマウス。倍率×200 (n=5)。5つの独立した実験のうち代表的なものを示した。

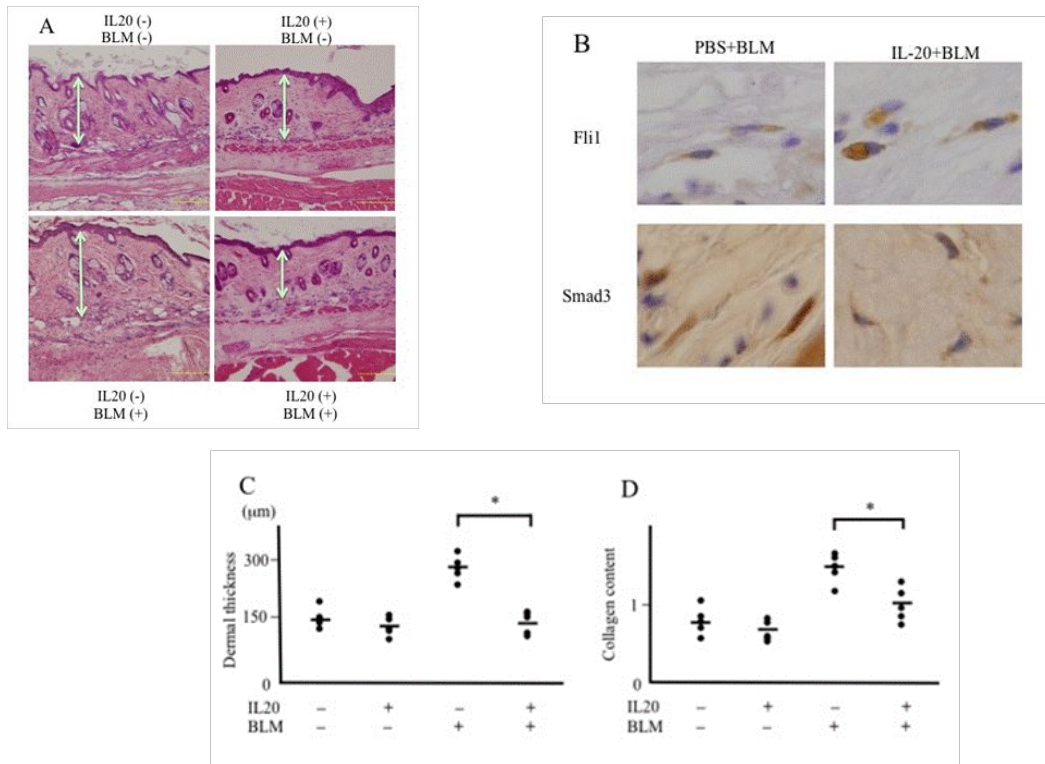


図 11 ブレオマイシン誘発皮膚線維化モデルマウスに対する IL-20 の効果

(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

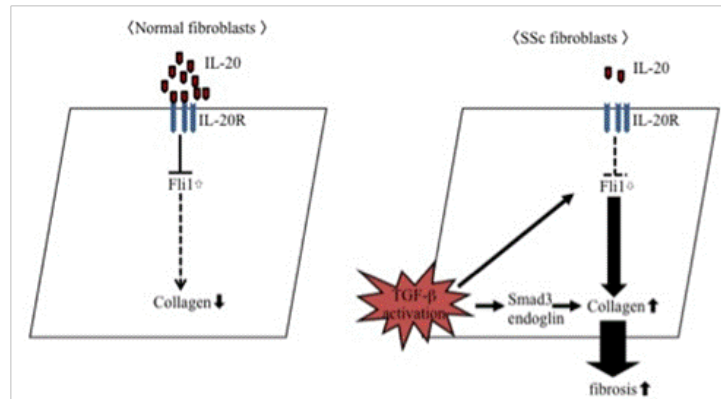


表1. 細胞外マトリックス関連遺伝子のPCRアレイの結果

Symbol	Name	Fold change
<u>Up-regulated genes by IL-20</u>		
THBS2	thrombospondin 2	113.77
TGIF1	TGF β -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, α 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, α	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 $1/2^{\Delta Ct}$ （それぞれのmRNAの ΔCt -コントロールのmRNAの ΔCt ）を示す。 ΔCt 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
Clinical features		
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
Organ involvement		
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
ANA specificity		
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 μl に対し C. elegans miR-39 (5 fmol/μl, Takara Bio Inc) を 5 μl 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 μl の Isogen (Nippon Gene) に溶かして、C. elegans miR-39 (5 fmol/μl) を 5 μl 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- β -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

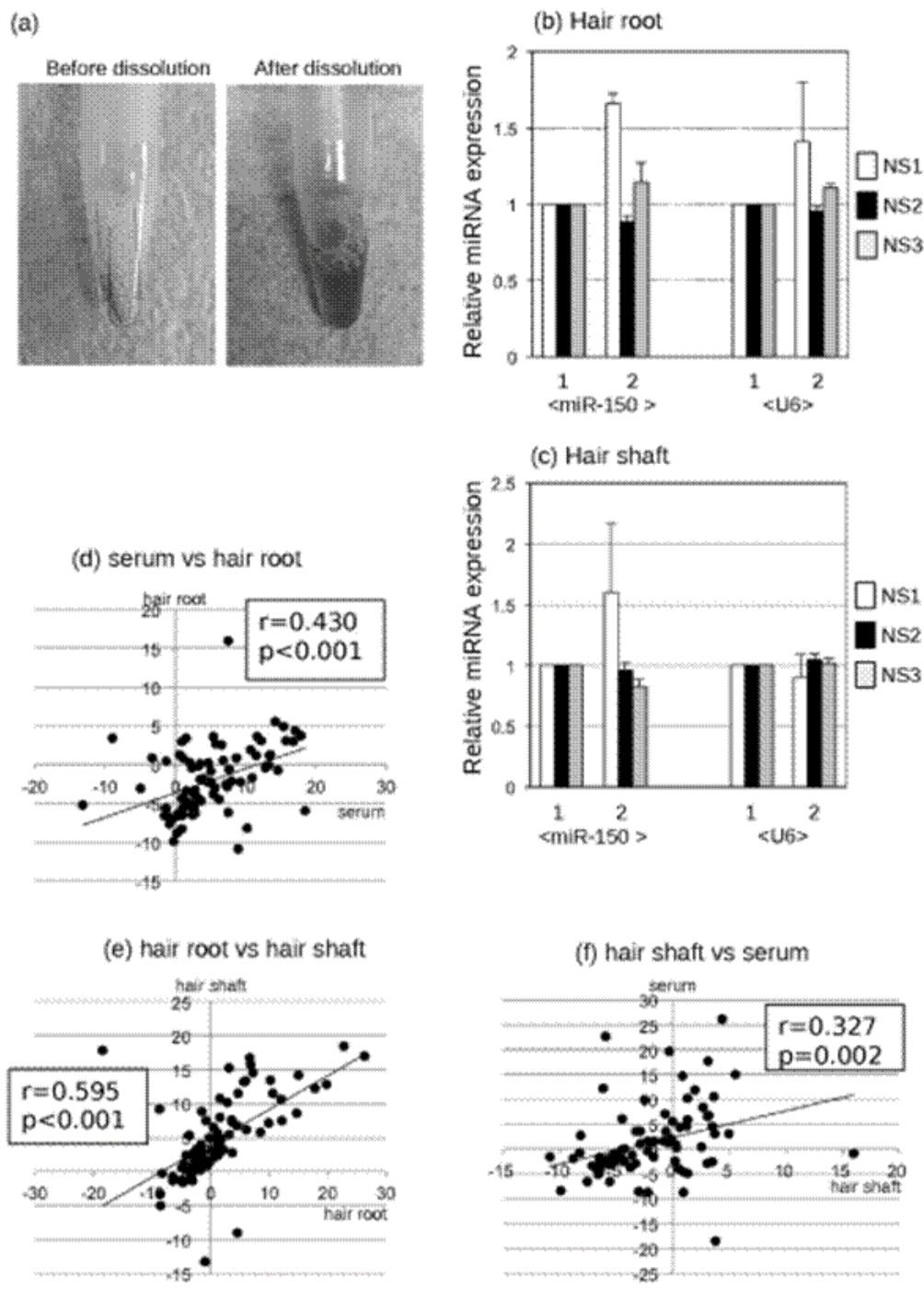


図 1:

(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。

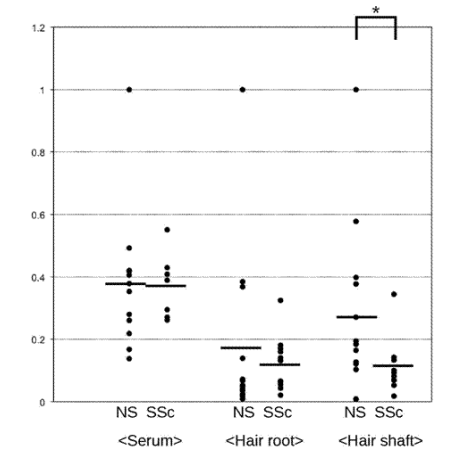


図 2: 正常人 13 例と強皮症患者 10 例の血清および毛根と毛髪より miRNA を抽出し real-time PCR にて miR-196a の発現量を解析した。横線は平均を示す。* p<0.05

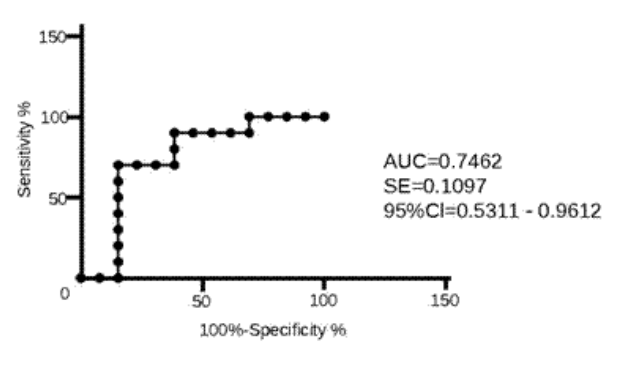


図 3: 毛髪 miR-196a の ROC 曲線。

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^{-/-}; Fli1^{-/-}*)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¹。また、線維芽細胞における Fli1 遺伝子の発現低下は、TGF- β 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²、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³⁻⁵。

Fli1^{-/-} 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- β 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- β 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^{6,7}。重要なことに、

Fli1^{-/-} 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⁸、腎尿細管細胞においては線維化を抑制する⁹。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¹⁰。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- β 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^{-/-}; Fli1^{-/-} 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^{-/-} 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¹¹。*Fli1^{-/-}* マウスは過去に報告されているものを用いた¹²。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¹³と核内抽出物¹⁴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1 μ g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¹⁵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 \pm 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¹⁶⁻¹⁸。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*^{-/-} 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*^{-/-} 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、 α -SMA、integrin- α 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- β 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- β 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)^{4,19}。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*^{-/-};*Fli1*^{+/-} 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*^{-/-};*Fli1*^{+/-} マウス) を作成した。*Klf5*^{-/-};*Fli1*^{+/-} 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*^{-/-};*Fli1*^{+/-} 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*^{-/-};*Fli1*^{+/-} 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*^{-/-};*Fli1*^{+/-} 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^{-/-};Fli1^{+/-}* 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^{-/-};Fli1^{+/-}* 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^{-/-};Fli1^{+/-}*: 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^{-/-};Fli1^{+/-}* 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^{-/-}*: 平均 75.4 nm; レンジ 19.4-157.5 nm; *Fli1^{+/-}*: 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 fibrillogenesis²⁰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^{-/-};Fli1^{+/-}* 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²¹が生じる。*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* 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^{-/-};Fli1^{+/-}* 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^{-/-};Fli1^{+/-}* 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^{22,23}を示すことが明らかとなった。

***Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* 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^{-/-};Fli1^{+/-}* 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²⁴。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 α -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²⁵。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²⁶。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²⁷、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^{25,28-31}。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、 α -SMA、CTGFの発現が増加する²⁹。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⁷、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^{6,7}、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^{-/-}; Fli1^{+/-}* 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^{-/-}; Fli1^{+/-}* 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³²。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^{33,34}。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^{-/-}; Fli1^{+/-}* 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

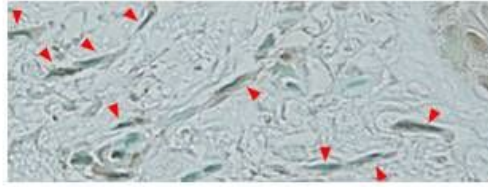
2. 学会発表

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

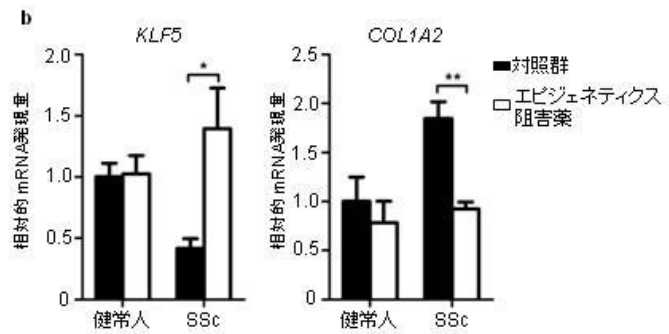
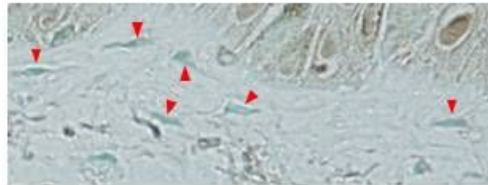


図1: KLF5の発現は epigenetic 制御により全身性強皮症 (SSc) の皮膚線維芽細胞 (fibroblasts) では減少している。

(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 μ M と trichostatin A, 2 μ M) で48時間処理した。KLF5 と COL1A2 の mRNA レベルを測定した。データは mean \pm s.e.m で示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Two-tailed unpaired t-test。

図2

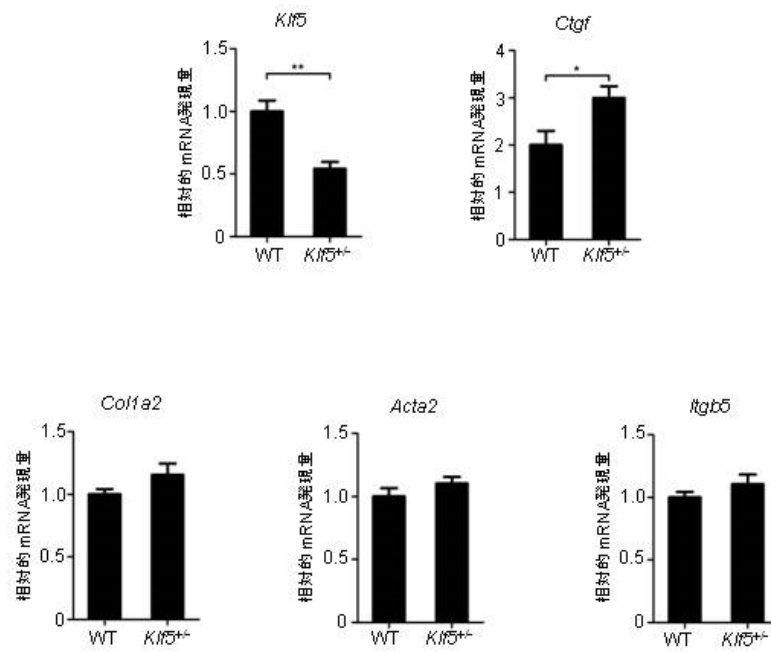


図 2 : *Klf5*^{-/-} マウスから採取した培養皮膚線維芽細胞では、線維化を亢進する分子の中で、CTGF の mRNA レベルのみ野生型マウスと比較して上昇していた。

Klf5, *Ctgf*, *Col1a2*, *Acta2* (α -smooth muscle actin), *Itgb5* (integrin β 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

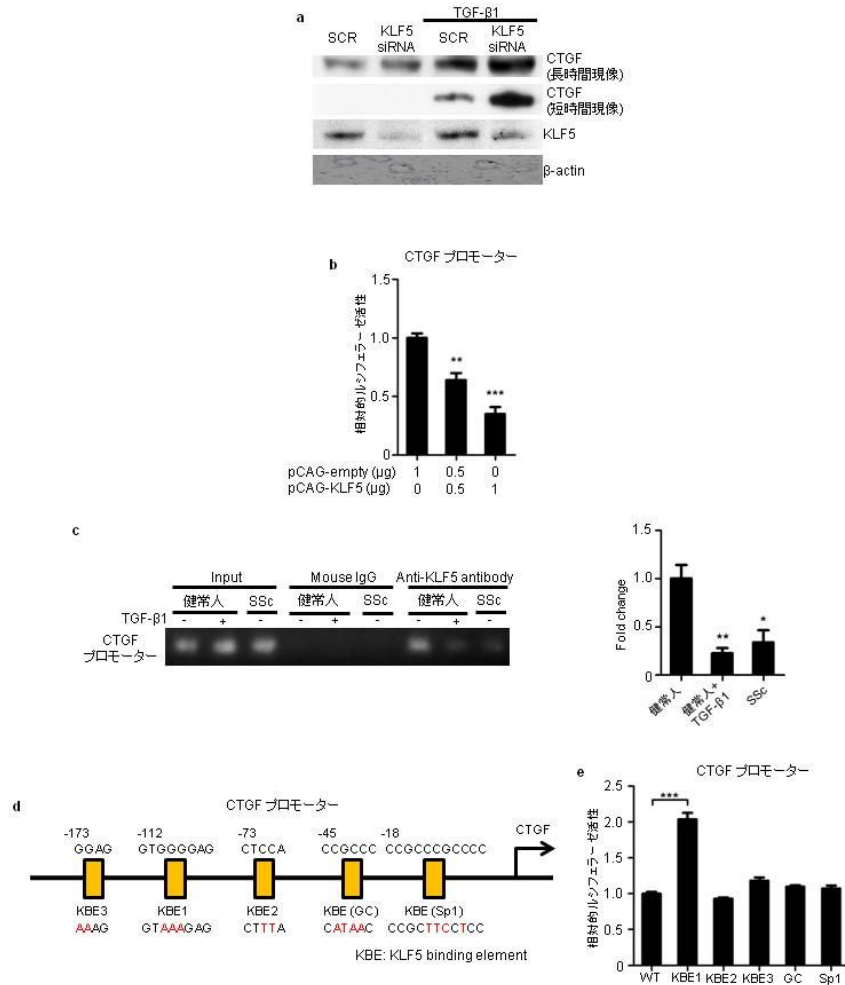


図3 : KLF5 は CTGF 遺伝子の転写抑制因子である。

(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

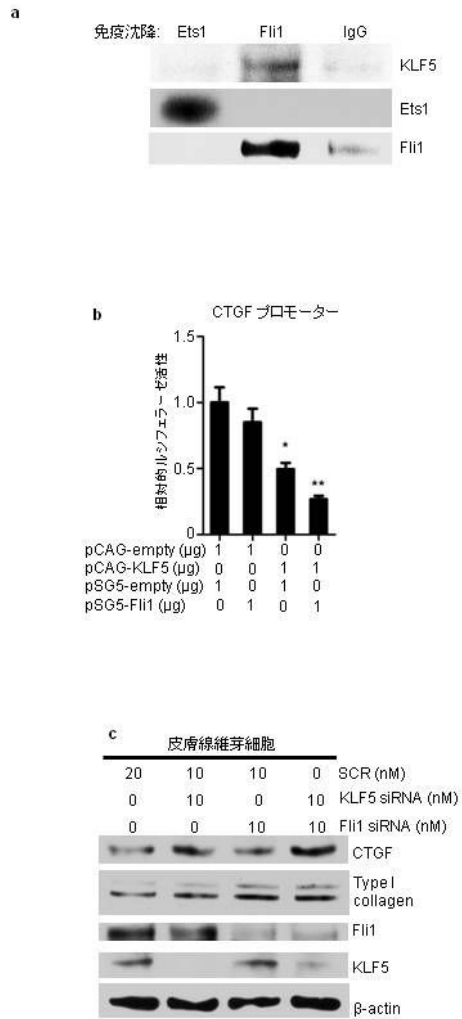


図4 : KLF5 と Fli1 は共同して CTGF 遺伝子の転写を抑制する。

(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

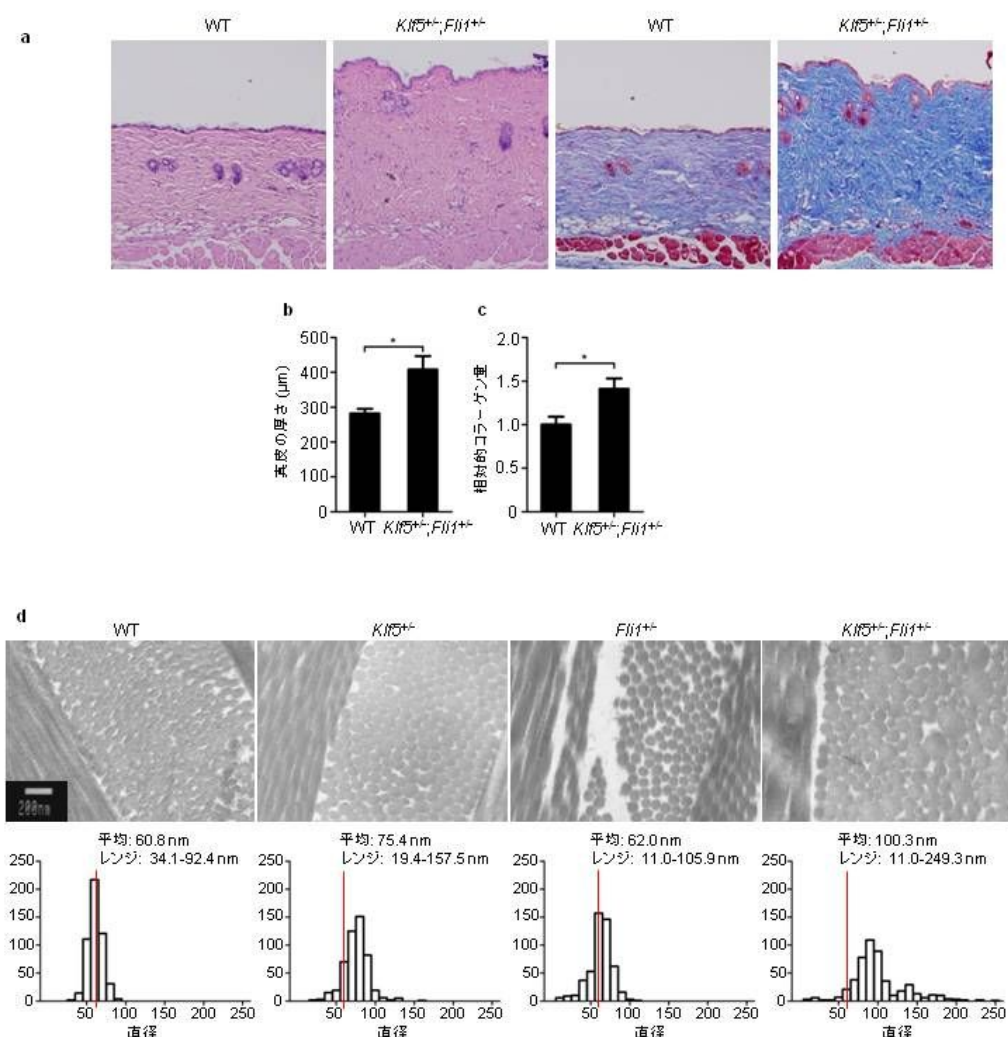


図5 : *Klf5^{-/-}; Fli1^{-/-}* マウスは自然に皮膚線維化を発症する。

(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面像と横断面像が示されている。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

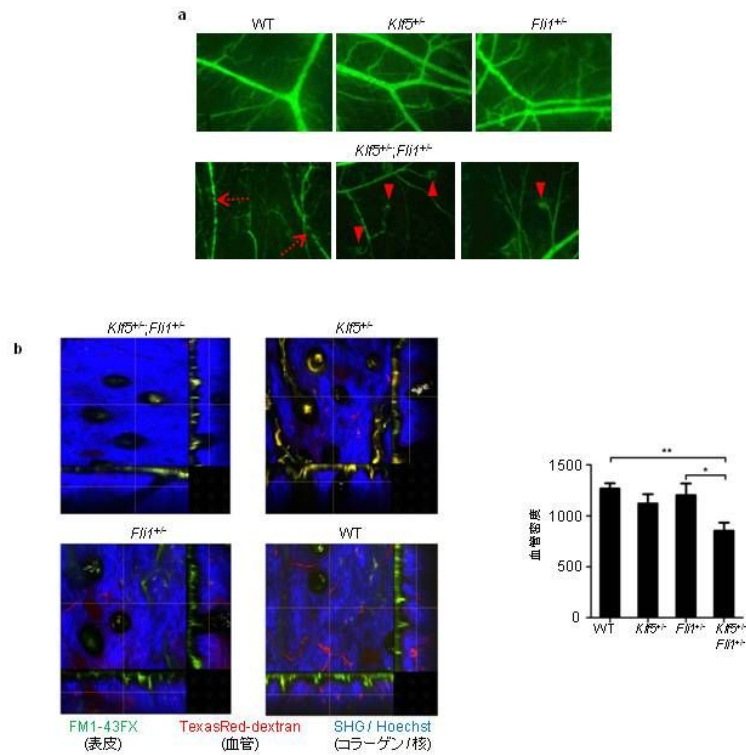


図6: *Klf5*^{-/-}; *Fli1*^{-/-} マウス皮膚は血管障害を示す。

(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*^{-/-}; *Fli1*^{-/-} 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 \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。one-way ANOVA with Bonferroni correction。

図7

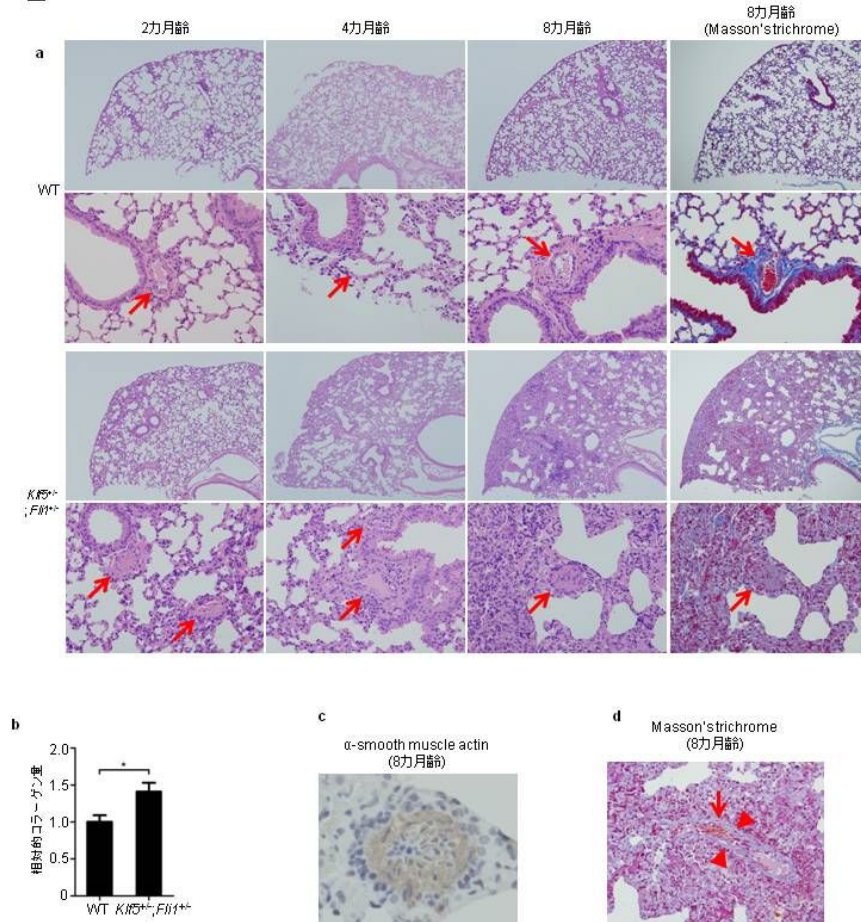


図7: *Klf5*^{-/-}; *Fli1*^{-/-} マウスはSSc患者の間質性肺炎に類似した肺病変を示す。

(a) 野生型 (WT) マウスと *Klf5*^{-/-}; *Fli1*^{-/-} 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*^{-/-}; *Fli1*^{-/-} 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*^{-/-}; *Fli1*^{-/-} 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

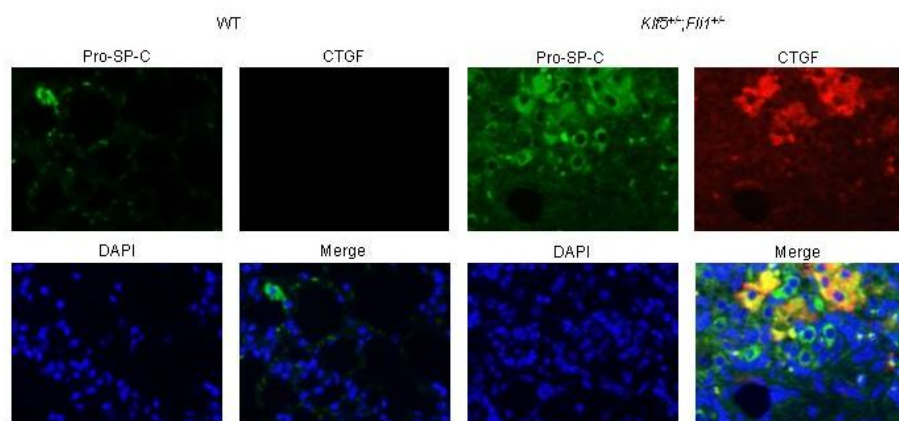


図8 : *Klf5^{-/-};Fli1^{-/-}* マウスの2型肺胞上皮細胞ではconnective tissue growth factor (CTGF) の発現量が大きく増加している。

野生型 (WT) マウスと *Klf5^{-/-};Fli1^{-/-}* 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

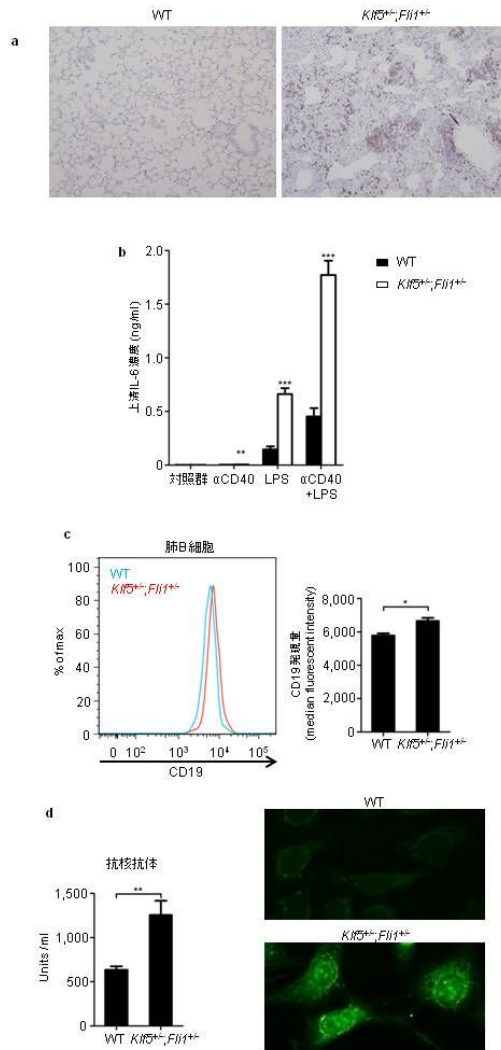


図9: *Klf5^{-/-}; Fli1^{-/-}* マウスでのB細胞活性化と自己抗体産生。

(a) 8カ月齢の野生型 (WT) マウスと *Klf5^{-/-}; Fli1^{-/-}* 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	小寺雅也	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	部長
協力者	白田俊和	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	部長
協力者	稲葉由季	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	
協力者	稲坂 優	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	
協力者	菅原京子	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	
協力者	伊藤有美	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	
協力者	浦田 透	社会保険中京病院膠原病リウマチセンター/皮膚科	

研究要旨

動脈硬化性病変の二次発症の予測血清マーカーとして酸化 LDL (MDA-LDL) が注目されている。RA、SLE 患者で MDA-LDL 高値であることが報告されているが、SSc 患者における報告はない。MDA-LDL 値と SSc 患者の臨床症状との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¹⁾。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²⁾。

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³⁾。

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⁴⁾。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⁵⁾。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 ± 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

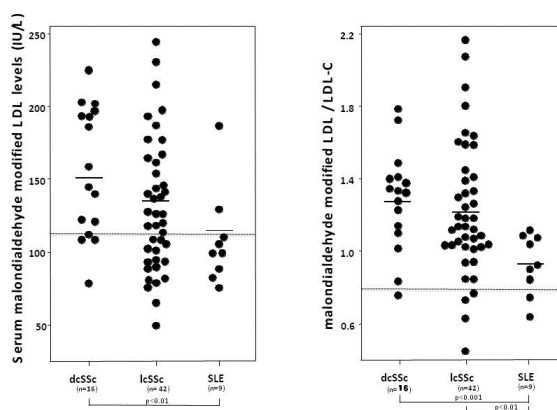


図1
Kodera.M

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

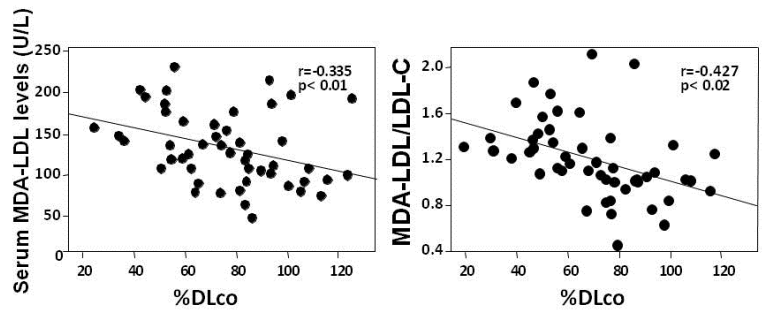


図2
Kodera.M

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

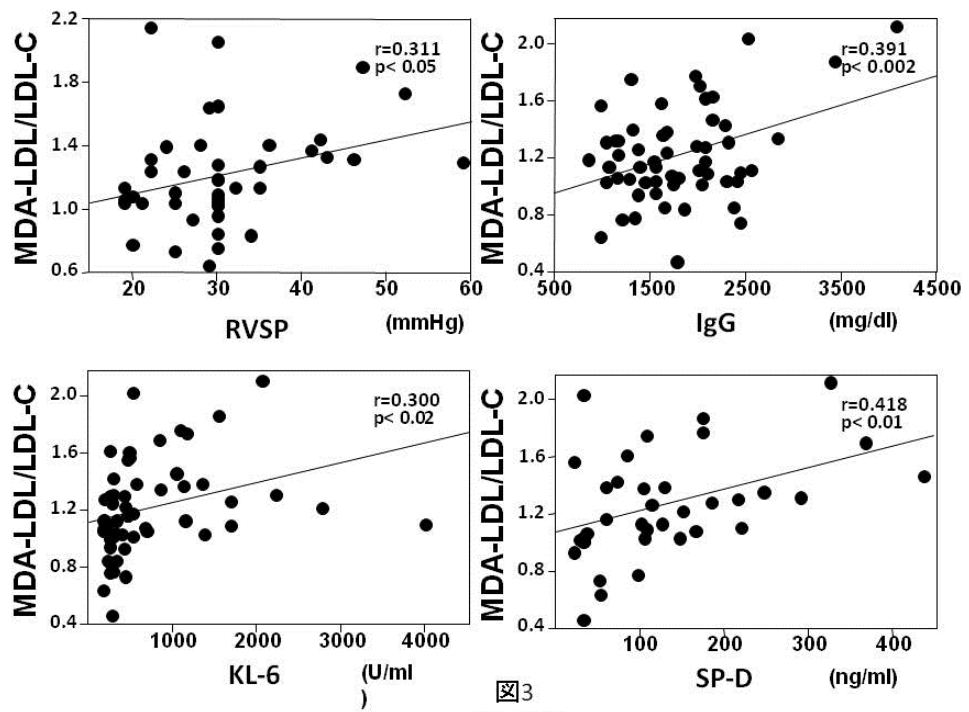


図3
Kodera M

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	後藤大輔	筑波大学医学医療系 (筑波大学附属病院・茨城県地域臨床教育 センター)	准教授
協力者	瀬川誠司	筑波大学医学医療系 内科	膠原病・リウマチ・アレルギー 助教
協力者	近藤裕也	筑波大学医学医療系 内科	膠原病・リウマチ・アレルギー 講師
協力者	松本 功	筑波大学医学医療系 内科	膠原病・リウマチ・アレルギー 准教授
協力者	住田孝之	筑波大学医学医療系 内科	膠原病・リウマチ・アレルギー 教授

研究要旨

間質性肺炎(IP)は、全身性強皮症(SSc)患者において重篤な合併症の1つである。これまでに我々は、CD161を発現した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なりがたく、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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞株を抗 TCR V δ 1 抗体で 72 時間刺激後、培養上清中の CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 及び IFN- γ 、IL-4、TNF- α 、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- γ 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- γ 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- γ 、CCL3、抗 IFN- γ 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 δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞株を抗 TCR V δ 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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 1 陽性細胞を単離し、細胞株を作製した (図 1)。CD161 陽性 V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞株を抗 TCR V δ 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 δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞株では、健常人由来細胞株に比べて IFN- γ 産生量が著名に減弱していた (図 2)。

2) IFN- γ 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- γ 、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- γ 受容体 (IFN- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 、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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 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 δ 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. V δ 1 T lymphocytes producing IFN-g and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* 2009; 113:6611-6618.
5. Catellani S, Poggi A, Bruzzone A, Dadati P, Ravetti JL, Gobbi M, Zocchi MR. Expansion of Vdelta1 T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins. *Blood* 2007; 109:2078-2085.
6. Hasegawa M, Takehara K. Potential immunologic targets for treating fibrosis in systemic sclerosis: a review focused on leukocytes and cytokines. *Semin Arthritis Rheum* 2012; epub ahead of print.
7. Ishida Y, Kimura A, Kondo T, Hayashi T, Ueno M, Takakura N, Matsushima K, Mukaida N. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. *Am J Pathol* 2007; 170:843-854.
8. Bolster MB, Ludwicka A, Sutherland SE, Strange C, Silver RM. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1997; 40:743-751.
9. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte 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. *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 δ 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+ NKT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonia. 15th 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

77th 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

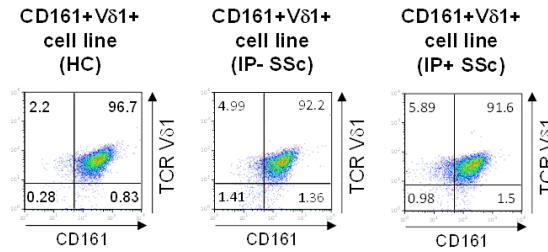


図1： HC、IP 非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞株の作製 PBMCs より樹立した CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞を、抗 CD161 抗体、抗体 TCR Vδ1 抗体を用いて解析した。

図2

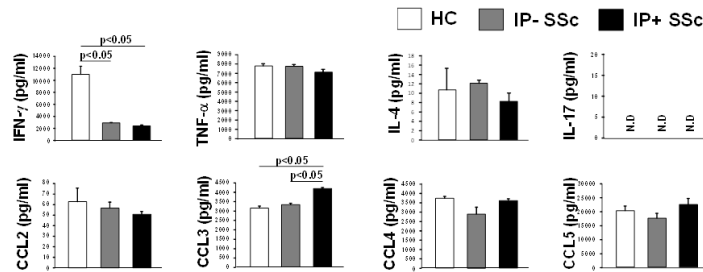


図2： HC、IP 非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞株からの IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-17、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 産生量の解析 CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞株を抗 TCR Vδ1 抗体を用いて 72 時間刺激後、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン産生量を解析した。

図3

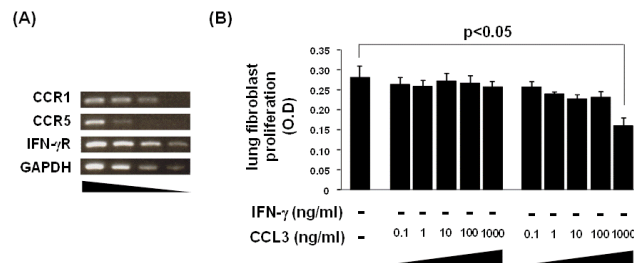


図3： (A) WI-38 肺線維芽細胞株における CCR1、CCR5、IFN-γR mRNA 発現解析 (B) IFN-γおよび CCL3 共培養下での WI-38 肺線維芽細胞株増殖能の解析 WI-38 肺線維芽細胞を IFN-γ、CCL3 で 24 時間刺激後、BrdU 測定 kit を用いて細胞増殖能を測定した。

図4

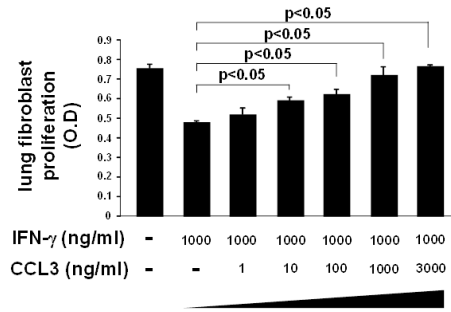


図4：IFN- γ 、CCL3 共培養下での WI-38 肺線維芽細胞株増殖能の解析

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5

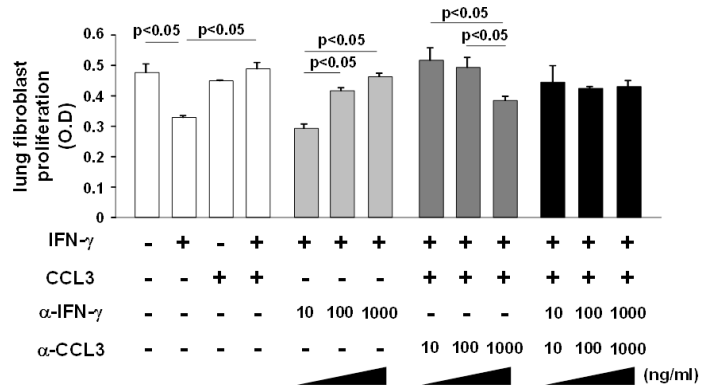


図5：IFN- γ 、CCL3、抗 IFN- γ 抗体、抗 CCL3 抗体共培養下での WI-38 肺線維芽細胞株増殖能の解析

WI-38 肺線維芽細胞を IFN- γ 、CCL3、抗 IFN- γ 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

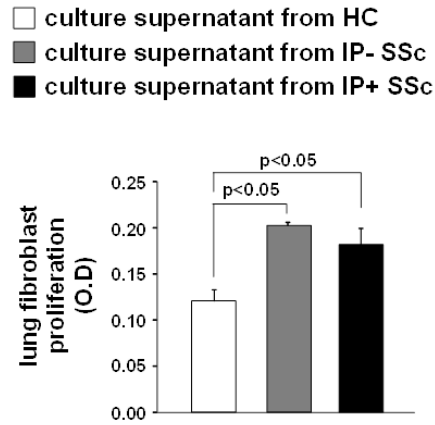


図6: HC、IP 非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞株培養上清を用いた WI-38 肺線維芽細胞増殖能の解析

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

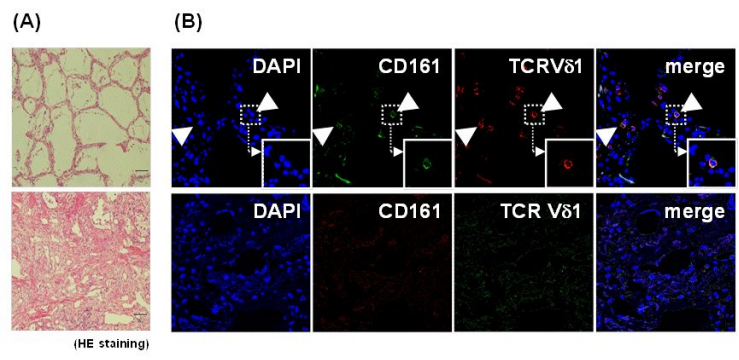


図7: (A) IP 合併 SSc 患者由来肺組織を用いた HE 染色 (B) IP 合併 SSc 患者由来肺組織を用いた CD161 陽性 Vδ1 陽性γδT 細胞の染色

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 抗体の臨床的意義

研究分担者	桑名正隆	慶応義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
研究分担者	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
協力者	加治賢三	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	佐藤雅司	慶応義塾大学医学部リウマチ内科
協力者	星野香菜	慶応義塾大学医学部リウマチ内科
協力者	濱口隼人	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	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	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	佐藤伸一	東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
協力者	竹原和彦	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授

研究要旨

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^{1),2)}。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^{3),4)}。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%⁵⁾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プ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(図 3)。

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

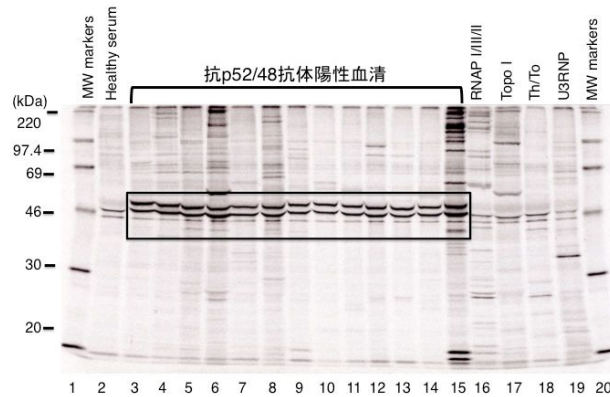


図 1 : 免疫沈降法

K562 培養細胞を用いた免疫沈降法。³⁵S 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。

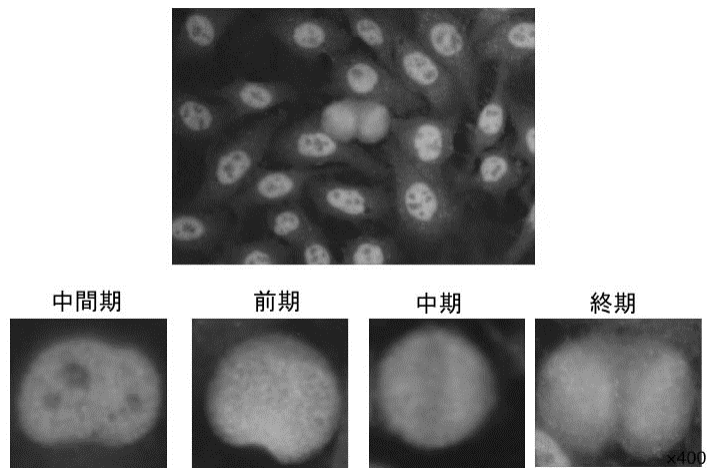


図 2 : HEp-2 細胞を用いた蛍光抗体法間接法 (抗核抗体)

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。

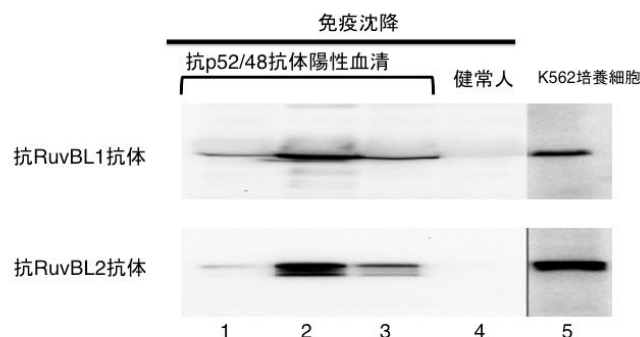


図3：免疫プロット法

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 ± 71.2 vs 141.6 ± 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¹。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²。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 抗体陽性患者を対象を絞り、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³。

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²。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⁴。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⁵。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⁶、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⁷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 RNAPIII 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 RNAPIII 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

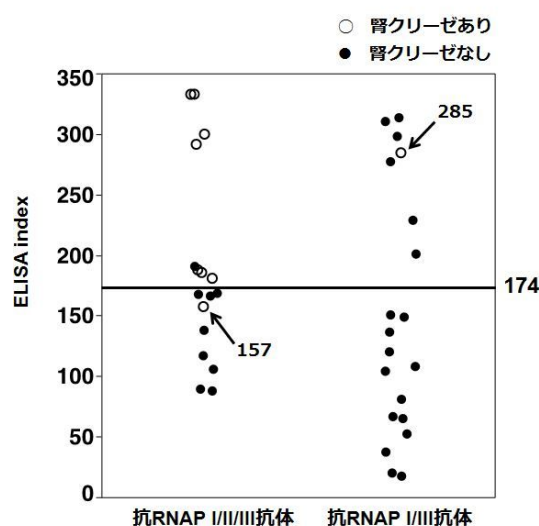


図1

図1: 抗 RNAP III 抗体と抗 RNAP III 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	波多野将	東京大学医学部附属病院循環器内科	助教
研究分担者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科	講師
協力者	稲葉俊郎	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	牧 尚孝	東京大学医学部附属病院循環器内科	特任臨床医
協力者	村岡洋典	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	皆月 準	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	今村輝彦	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	八尾厚史	東京大学保健センター	講師
協力者	綱川弘一郎	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	小室一成	東京大学医学部附属病院循環器内科	教授
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	玉城善史郎	東京大学医学部附属病院皮膚科	助教
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	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	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
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

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/m²) = CI / 心拍数 (HR : heart rate) で計算した。肺血管抵抗 (PVR : pulmonary vascular resistance) (dyne · sec⁻¹ · cm⁻⁵) = 80 × (mPAP - mPCWP) / CO で求め、全身血管抵抗 (systemic vascular resistance : SVR) ((dyne · sec⁻¹ · cm⁻⁵) は 80 × (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) (g · m/m²) は、StVI × (mBP - mPCWP) × 0.0136 (平均値 45-75 (g · m/m²))、右室 1 回仕事係数 (RVSWI : right ventricular stroke work index) (g · m/m²) は、StVI × (mPAP - mRAP) × 0.0136 (平均値 10-15 (g · m/m²)) 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 (SvO₂、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·sec/cm⁵(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±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±10.2 mmHg、CI: 2.58±0.49 L/min/m²、PVR: 478±213 dyne·sec/cm⁵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

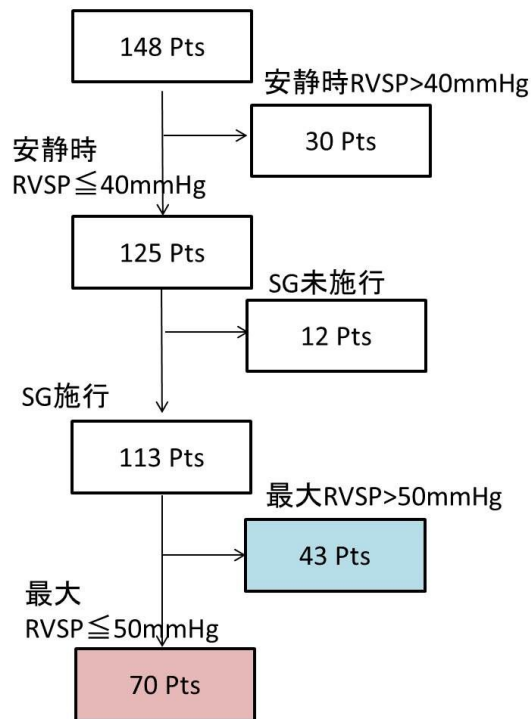


図 1：対象患者

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。

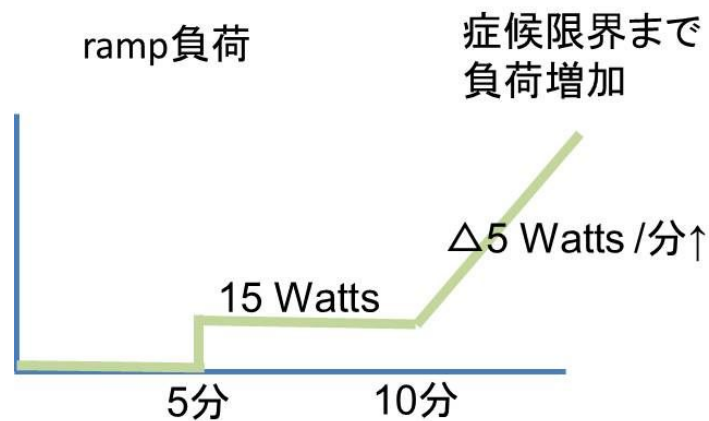


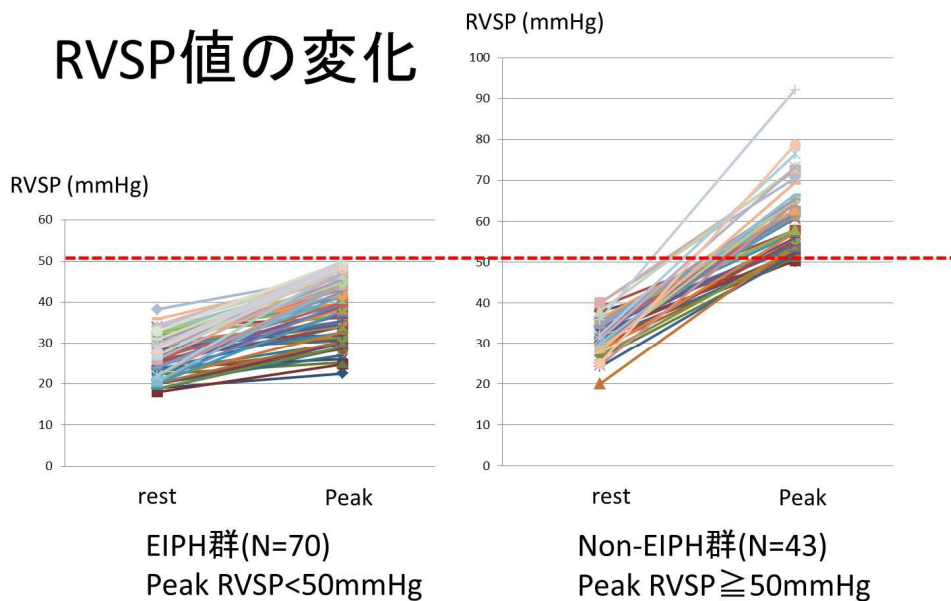
図 2：ramp 負荷の様子

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 ²)	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⁴⁾

(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 ²)	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 ²)	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 ²)	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 ²)	3.0 ± 0.6	2.9 ± 0.5	NS
F-PVR (dynec·sec·cm ⁻⁵)	126 ± 54	158 ± 55	0.0023
F-SVR (dynec·sec·cm ⁻⁵)	1652 ± 504	1899 ± 532	0.0108
PAC (ml/mmHg)	4.3 ± 1.2	3.5 ± 1.3	0.0002
LVSWI (g·m/m ²)	44 ± 12	40 ± 9	0.0218
RVSWI (g·m/m ²)	5 ± 1	5 ± 2	0.0426

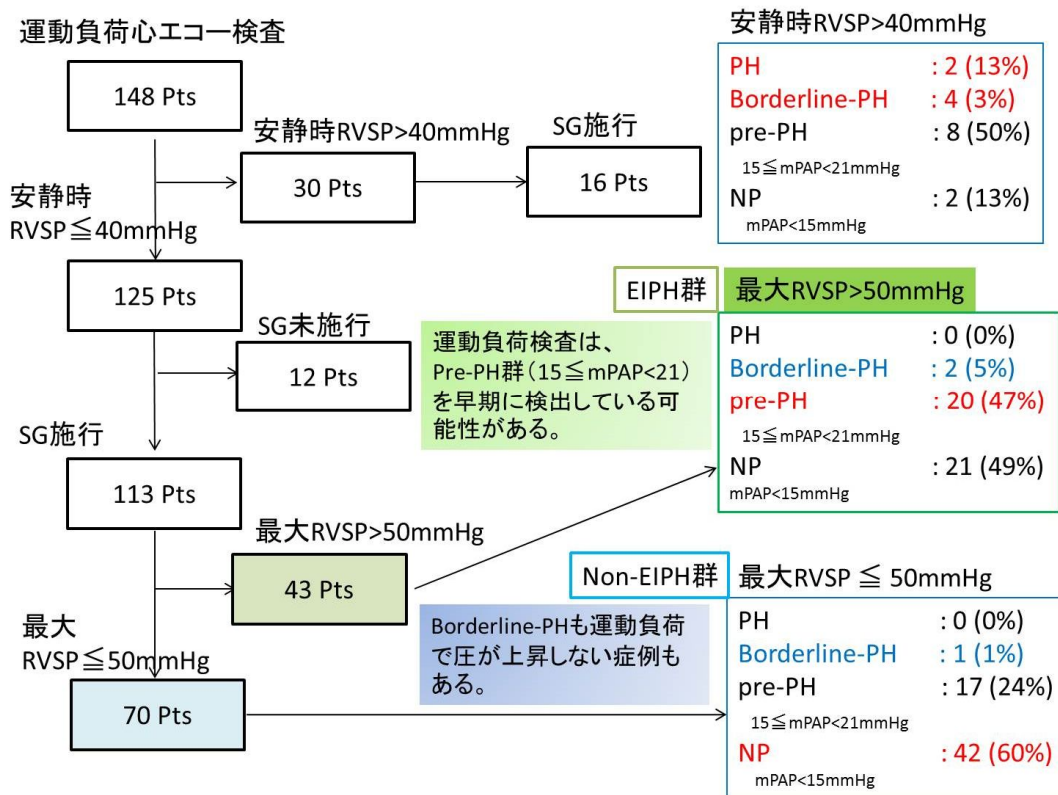


図4：安静時RVSP ≤ 50mmHgの群、EIPH群、non-EIPH群の右心カテの結果

強皮症の血行動態と予後危険因子の解析

研究分担者	波多野将	東京大学医学部附属病院循環器内科	助教
研究分担者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科	講師
協力者	稲葉俊郎	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	牧 尚孝	東京大学医学部附属病院循環器内科	特任臨床医
協力者	村岡洋典	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	皆月 準	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	今村輝彦	東京大学医学部附属病院循環器内科	大学院生
協力者	八尾厚史	東京大学保健センター	講師
協力者	綱川弘一郎	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	小室一成	東京大学医学部附属病院循環器内科	教授
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	玉城善史郎	東京大学医学部附属病院皮膚科	助教
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	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	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
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

強皮症における心機能を右心カテテル検査で評価し、生命予後を解析した。178例の強皮症(SSc)患者の右心カテテルの結果より平均肺動脈圧(mPAP)に応じて4群に分類し、4群間での血液検査、心エコー検査、呼吸機能検査、心肺機能検査、血行動態の比較と生存率との解析を行った。4群は以下の通り分類した。(1)NP群(正常圧群:normal pressure): mPAP < 15mmHg、(2)pre-PH群: 15 < mPAP < 21mmHg、(3)border-PH群: 21 < mPAP < 25 mmHg、(4)PH群: mPAP ≥ 25mmHg。

血行動態の解析からは、(1)NP群(mPAP<15mmHg)において、既に肺血管抵抗(PVR)は増加し、心係数(CI)は正常下限まで低下していた。BNP値も軽度の上昇を始め、最大酸素摂取量(peak-V02)も低値だった。SScと診断された時点で既に肺動脈障害や心筋障害が出現し始めていることを示唆する所見だった。(2)Pre-PH群(15mmHg < mPAP < 21mmHg)ではCIは正常値以下に低下しており、肺動脈コンプライアンス(PAC)(一回拍出量/(肺動脈収縮期圧-肺動脈拡張期圧))が著明に低下し始めていた。心エコーでのE/A比の低下からは拡張能障害の出現を示唆していた。生命予後は良好だった。(3)border-PH群(21mmHg < mPAP < 25mmHg)から生命予後は

悪化し、SSc は PH 前段階から全身状態が悪化してくることを示唆していた。(4) PH 群 (mPAP 25mmHg) では心拍出係数 (StVI) はさらに低下し、動脈血酸素飽和度 (SaO₂) 低下による低酸素血症や右室拡張末期圧 (RV-EDP) 上昇を認め、低心拍出状態による右心不全を呈していた。また、多彩な死因を認めており心肺疾患以外の要素も悪化因子であると思われた。自覚症状が軽度の WHO class の段階でも生命予後は不良であり、自覚症状に惑わされず早期から多くの診療科に渡る包括的なケアが重要であると思われた。Cox 比例ハザード解析では肺動脈コンプラインスが 2.23ml/mmHg 以上の群ではハザード比 (HR) :31.1 倍と著明に高値であり、右心カテによる生命予後推定の重要な指標になると考えられた。PH 診断の感度、特異度の検討も行った。ROC 曲線からは RVSP 43mmHg により PH 診断は感度 89%、特異度 84%であり、borderline-PH 診断には感度 77%、特異度 90%が推奨された。ただ、本研究により borderline-PH 群から生命予後悪化を認めていることを考えると感度を高くすることが求められる。RVSP 30mmHg により borderline-PH 診断は感度 100%、特異度 34%、RVSP 35mmHg により PH 診断は感度 100%、特異度 58%となるため、ESC/ERS の推奨基準の RVSP 50mmHg よりも早期の段階で、PH や borderline-PH 診断を総合的に判断し右心カテーテルによる確定診断を行う必要があると思われた。

A. 研究目的

強皮症 (SSc : Systemic sclerosis) に伴う肺高血圧症 (PH : pulmonary hypertension) は予後不良であることが知られているが、その前段階においては不明な点が多い。また、各検査値と SSc の生命予後との関係も不明である。当院入院中の SSc 症例に右心カテーテルで血行動態解析を行い、SSc が PH へ進行していくそれぞれの段階での血行動態の特徴と生命予後との関連を明らかにすることを目的にした。

B. 研究方法

<対象>

2007 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右心カテーテル検査 (RHC : right heart catheterization) 未施行の SSc 患者 178 症例 (平均年齢 59 ± 14 歳、

男性 15 例、女性 163 例) を対象に、RHC を施行した。前医などで PH 治療薬が既に導入されている症例に関しては、血行動態に影響を与えるため解析対象からは除外した。入院時には血液検査、呼吸機能検査、経胸壁心エコー検査 (TTE : transthoracic echocardiography) 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と RHC による血行動態の比較解析を行った。対象患者の特徴は表 1 に示した。mPAP に応じて 4 群に分類しているが (図 1)、それぞれの群の分類に関しては右心カテーテルの項で述べる。

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。

<呼吸機能検査>

入院時には全例で血液検査、TTE、呼吸機能検査を施行した。間質性肺疾患（ILD：Interstitial Lung Disease）の診断には2012年 Lancet 誌での基準を用いた[1]。高分解能胸部CTにて間質の線維化病変が20%以下の場合にはlimited ILD、間質の線維化病変が20%以上の場合にはExtensive ILDと診断し、線維化の程度が中等度で判断に困る場合には、呼吸機能検査での努力性肺活量（FVC：Forced Vital Capacity）により、%FVC:70%以上をlimited ILD、%FVC:70%未満をExtensive ILDと診断する。

<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[2]。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。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）。最大酸素摂取量（peak-VO₂（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-VO₂（ml/kg/min））を求めた。

<右心カテーテル>

178人のSSc患者に右心カテーテル検査を施行した。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。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。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/m²）= CI / 心拍数（HR：heart rate）で計算した。肺血管抵抗（PVR：pulmonary vascular resistance）（dyne · sec⁻¹ · cm⁻⁵）= 80 ×（mPAP - mPCWP）/ CO で求め、全身血管抵抗（systemic vascular resistance：SVR）（dyne · sec⁻¹ · cm⁻⁵）は80 ×（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中で肺動脈圧を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。PACと同様に、大動脈コンプライアンス（AOC：Aortic compliance）も、一回拍出量（StV）/（体血圧収縮期圧（sBP：systolic BP）- 体血圧拡張期圧（dBP：diastolic BP））と定

義して求めた。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、 $\text{StVI} \times (\text{mBP} - \text{mPCWP}) \times 0.0136$ (平均値 45-75 ($\text{g} \cdot \text{m}/\text{m}^2$))、右室 1 回仕事係数 (RVSP : right ventricular stroke work index) ($\text{g} \cdot \text{m}/\text{m}^2$) は、 $\text{StVI} \times (\text{mPAP} - \text{mRAP}) \times 0.0136$ (平均値 10-15 ($\text{g} \cdot \text{m}/\text{m}^2$)) として計算した。

血行動態で求められた mPAP に応じて SSc を 4 群に分類した (図 1)。

(1) NP 群 (正常圧群 : normal pressure) :
mPAP < 15mmHg

(2) pre-PH 群 : 15 ≤ mPAP < 21mmHg

(3) border-PH 群 : 21 ≤ mPAP < 25 mmHg

(4) PH 群 : mPAP ≥ 25mmHg

それぞれの群間において、TTE、呼吸機能、CPX、血行動態などを比較し、生命予後との比較解析を行った。

< TTE による PH のスクリーニング >

現在の SSc-PH スクリーニングは、TTE で求めた三尖弁逆流の圧較差 (TR pressure gradient : TR-PG) から推定 RVSP 値 ($= (\text{TR-PG})^2 + 10$ (mmHg)) を求め、推定 RVSP 値が肺動脈収縮期圧とも近似できることを利用して行っている。今回 178 症例の SSc の RHC により全例の mPAP 値の測定をしたため、PH や borderline PH 診断のための TR-PG の感度、特異度を ROC カーブから算出して求めた。

< 統計解析 >

データは平均 ± 標準偏差 (mean ± SD) で表

現した。4 群間の比較は、Bartlett 検定により各群の分散は不均一であったため、ノンパラメトリック法である Kruskal-Wallis 検定によって行った。単変量解析、多変量 Cox 比例ハザード多変量解析、ROC カーブの作成、Kaplan-Meier 法による生存率曲線 (ログランク検定) 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

< 4 群間の患者背景の比較 >

mPAP に応じて分類した 4 群間の患者背景を (表 1) に示した。年齢は pre-PH 群と PH 群が有意差を持って高値であった。血液検査では PH 群が腎機能と貧血の有意な悪化を認めていた。BNP、CRP は pre-PH 群と PH 群において有意差を持って高値だった。BNP は NP 群においてすでに正常値 (<20 (pg/ml)) より軽度上昇していた。WHO 分類では、PH 群は class III、border-PH 群は class II、pre-PH 群と NP 群は class I が多い傾向にあった。ILD は、軽症の Limited ILD は有意差を持って border-PH 群に多く、重症の extensive ILD は有意差を持って pre-PH 群、border-PH 群、PH 群で多かった。

< 4 群間の心エコー検査、心肺機能検査、呼吸機能検査の比較 >

4 群間の心エコー検査、心肺機能検査、呼吸機能検査の比較を (表 2) に示した。E/A 比は、pre-PH 群、border-PH 群、PH 群で有意に低下

していた。E/e' に関しては、border-PH 群、PH 群で有意に増加していた。

CPX においては、全身の筋力低下や強い呼吸不全により全例には施行できなかった。NP 群は全 78 例中 75 例 (96%)、pre-PH 群は全 64 例中 42 例 (66%)、border-PH 群は全 17 例中 9 例 (53%)、PH 群は全 19 例中 5 例 (26%) の実施率だった。peak-V_{O2} は、pre-PH 群、border-PH 群、PH 群で有意に低下していた。

呼吸機能においては、%DLCO は pre-PH 群、border-PH 群、PG 群において有意に低下していた。それ以外の指標 (%VC, %FEV_{1.0}, %VC/%DLCO) は border-PH 群、PH 群において有意に低下していた。各群への進行に応じて段階的に増悪傾向にあった。

< 4 群間の血行動態の比較 >

4 群間の血行動態の比較を(表 3)に示した。HR、mean RAP、RVSP、RVEDP(right ventricular end-diastolic pressure : 右室拡張末期圧) は pre-PH 群の段階から有意に上昇していた。mean PCWP も pre-PH 群より有意に増加していたが 15mmHg を越えることはなかった。肺動脈血液ガスである SvO₂(混合静脈血)は pre-PH 群より有意に低下し、動脈血液ガスである SaO₂ は PH 群で有意に低下していた。

心係数 (CI) は NP 群で正常値下限であり、Pre-PH 群で正常値を下回り低下していた。一回拍出係数 (StVI) は pre-PH 群から border-PH、PH 群と病態の進行に応じて有意に低下していた。肺血管抵抗 (PVR) は NP 群の時点で既に正常値より高値であり、pre-PH、border-PH、PH 群と病態の進行に合わせて増加していた。

全身血管抵抗 (SVR) は PH 群のみで有意に増加していたが、PVR/SVR × 100 では pre-PH 群の段階から有意に低下していた。肺動脈コンプライアンス (PAC) は、NP 群に比べて pre-PH 群の段階で著明に低下し、border-PH 群、PH 群と段階的に有意な低下を認めていた。左室 1 回仕事係数 (LVSWI) は border-PH 群、PH 群で有意に増加しており、右室 1 回仕事係数 (RVSWI) と LVSWI/RVSWI は pre-PH 群、border-PH 群、PH 群にて有意に増加していた。

< 4 群間の死因、生存率の比較 >

SSc178 症例を平均 641 ± 430 日間追跡した。フォローアップ中に合計 14 症例の死亡を認めた。NP 群、pre-PH 群、border-PH 群、PH 群、4 群それぞれの死因を(表 4)に示した。

Kaplan-Meier 法により全 SSc (178 症例) の予後を解析した(図 2)。1 年生存率、2 年生存率、3 年生存率、4 年生存率はそれぞれ 96%、95%、93%、63%であり、全 SSc で見ると 4 年目から著明に予後不良であった。NP 群、pre-PH 群、border-PH 群、PH 群、4 群それぞれの生存曲線で予後を比較した(図 3)。border-PH 群と PH 群の予後不良により全 SSc の予後を悪化させていることが判明した。

次に、mPAP に応じた 2 群間での生存曲線の比較を、Cox 比例ハザードモデルで解析した(図 4、図 5、図 6)。21mmHg を境界とし、mPAP ≥ 21mmHg (border-PH 群 + PH 群) と mPAP < 21mmHg (NP 群 + pre-PH 群) とで比較すると、mPAP ≥ 21mmHg の群で有意に予後の悪化を認めていた(ハザード比: 29.208, 95%CI 3.6628-232.913, P < 0.00001)(図 5)。PH 群

(mPAP 25mmHg)とそれ以外の群との比較ではPH群で有意に予後の悪化を認めていた(ハザード比: 8.332, 95%CI 2.547-27.257, P=0.0004)(図6)。PH群(mPAP 25mmHg)よりも早期のborder-PH群(mPAP 21mmHg)がハザード比は高く、従来はSScはPH群のみが治療対象とされていたことを考えると、今後の日常診療において重要な知見であると思われる。

<WHO分類による生存率の比較>

自覚症状の程度を示すWHO分類により生存曲線を比較した(図7)(図8)。自覚症状が軽度のWHO class 群から予後悪化を認めていた。

<各パラメータの死亡のカットオフ値>

ROC曲線で死亡の有無により検査値のカットオフ値を求め、感度、特異度、オッズ比と共に(表7)の左側に示した。そのカットオフ値により全死亡に関連したリスク因子を単変量Cox比例ハザードモデルで解析し、(表5)の右側に示した。

血行動態ではmPAP 21 (/min)にてハザード比 29.2(95%CI 3.663-232.913, P=0.0014)、PVR 295 (/min)にてハザード比 12.3(95%CI 2.570 - 58.505, P=0.0011)、PAC 2.23 (ml/mmHg)にてハザード比 31.1(95%CI 4.027-140.805, P=0.001)と有意に高値であった。その他の検査所見と比べて、血行動態はハザード比が高いパラメータを多く認めた。

<単変量、多変量Cox比例ハザード解析>

単変量モデルで死亡と有意に関連したパラメータである年齢、eGFR、BNP、CRP、ExtensiveILDの有無、mRAP、PVRなどを多変量Coxハザード回帰モデルにおいて解析した。BNP(ハザード比: 6.7, 95% CI 1.4455-30.90, P=0.0146)、PVR(ハザード比: 9.7, 95% CI 1.191-79.54, P=0.0337)、extensiveILDの存在(ハザード比: 4.8, 95% CI 1.022-22.75, P=0.0469)は独立した予後規定因子であった(表6)。

<カットオフ値によるCox比例ハザード解析と箱ひげ図>

死亡に関連したカットオフ値による各パラメータでの単変量Cox比例ハザード解析での生存曲線と、各群間での箱ひげ図とカットオフ値との関係を視覚的に分かりやすいように図示した(図9-23)。

<TTEによるRVSP値から求めたPH診断の感度と特異度>

PH群とnon-PH群でのTTEによるRVSP値の分布を(図24(A))に示した。TTEによるRVSP値と血行動態で求めたsystolic PAPやmean PAPとの関係を(図24(B)(C))に示した。TTEによるRVSP値はsystolic PAP、mean PAPいずれも有意に相関していたが、収縮期圧であるsystolic PAPよりも($r=0.454$, $p=0.0001$)、平均値であるmean PAPの方がより強い相関関係にあった($r=0.778$, $p=0.0001$)。

TTEのRVSP値によるPH、borderline-PH診断の感度・特異度をROC曲線(図24(D))か

ら求め、(表7)に示した。ROC 曲線からは PH 診断には RVSP 43mmHg もしくは RVSP 53mmHg のカットオフ値が推奨された。それぞれ感度 89%, 特異度 84%と、感度 78%, 特異度 95%であった。Border-PH 診断には RVSP 40mmHg もしくは RVSP 43mmHg のカットオフ値が推奨された。それぞれ感度 83%, 特異度 82%と、感度 77%, 特異度 90%の検出率だった。RVSP 値により検出できる NP 群、pre-PH 群、border-PH 群、PH 群との関係性を視覚的に(図25)に示した。

D. 考 案

今回の研究で、我々は世界で初めて SSc-PH の初期段階である $mPAP < 21\text{mmHg}$ の血行動態の特徴を示し、血行動態パラメータと生命予後との関係性を包括的に報告した。

血行動態の解析からは、NP 群($mPAP < 15\text{mmHg}$)において、既に PVR は増加し、CI は正常下限まで低下していた(表3)。BNP 値も軽度の上昇を始め、peak-VO₂ も低値だった(表1, 表2)。SSc と診断された時点で既に肺動脈障害や心筋障害が出現し始めていることを示唆する所見だった。Pre-PH 群($15\text{mmHg} < mPAP < 21\text{mmHg}$)においては、生命予後は良好であることが明らかになったが(図3) CI は正常値以下に低下しており、PAC 値が著明に低下し始めていた(表3)。心エコーでの E/A 比の低下からは拡張能障害の出現を示唆していた(表2)。border-PH 群($21\text{mmHg} < mPAP < 25\text{mmHg}$)から著明に予後が悪化しており、SSc に関してはより早期に全身状態が悪化してくることを示唆していた。PH 群($mPAP \geq 25\text{mmHg}$)では

StVI はさらに低下し、SaO₂ 低下での低酸素血症が出現し、RV-EDP 上昇を認め低心拍出状態による右心不全を呈していた。また、SSc の死因は多様であり(表4) 必ずしも心疾患による死亡だけが予後不良の原因ではないことも明らかとなった。SSc は $mPAP$ 上昇と平行して多臓器に渡り全身疾患が増悪していた。自覚症状が軽度である WHO class 1 でも予後不良であることを考えると(図7, 図8) 自覚症状に惑わされず様々な診療科に渡る注意深い包括的なケアが重要であると思われた。SSc は全身性疾患であり PH 治療薬や心不全治療だけでは予後改善を果たせるか不明な点も多いが、院外 CPA など原因不明の突然死も含まれており、循環器内科としては不整脈死を含めた心臓性突然死に関する注意や全身管理が重要であると思われた。また、ROC 曲線から求めたそれぞれの検査でのカットオフ値、単変量や多変量 Cox 比例ハザード解析で求められたハザード比、 $mPAP$ で分類した各群におけるパラメータの分布、TTE の RVSP 値によるスクリーニング基準などは、実臨床においても極めて重要な指標を提案することができたと考えている。

< $mPAP$ に応じた 4 群比較の特徴 >

基礎疾患に関する 4 群間の比較では、年齢は pre-PH 群と PH 群が有意に高齢であったが、体格差は有意差を認めなかった。腎機能(eGFR)、貧血(Hb)、炎症反応(CRP)は $mPAP$ の上昇に応じて悪化する傾向にあり、SSc が全身疾患であることを示唆していた。BNP(正常値 20 pg/ml) は NP 群で既に 31 ± 21

(pg/ml)と正常値より増加しており、SScの診断がついた時点で心負荷が存在していることを示唆していた。BNPは全SScの平均でも 99 ± 203 (pg/ml)と高値であり、左心系の圧上昇が軽度であることを考えると、主に右室の圧負荷によるBNP増加を反映していると思われる。BNP 79.3 (pg/ml)でハザード比 12.4 ($p < 0.001$) という指標は外来診療において重要な指標になりうると思われる。

また、dcSScなどSScのタイプ、診断からの年数、自己抗体の有無などは生命予後に寄与していなかった。

WHO分類で見ると、全体的に自覚症状は軽度の症例が多く、臨床的にも早期発見が遅れやすいことと矛盾しない所見だった(図8)。WHO class 1とclass 2でもハザード比 14.7 ($P=0.0145$)となることは注目すべき特徴であると思われる(図7)。SScは全身疾患に伴いADLが低下していることも、自覚症状がマスクされやすい原因であるため、軽度の自覚症状の出現には積極的に問診で注意を払うべきである。

軽度の肺障害であるlimited ILDはどの群にも存在しており生命予後に影響していなかったが、重度の肺障害であるextensive ILDはborder-PH群やPH群でより高頻度に合併しており、多変量Coxハザード解析でも独立予後規定因子であった。この知見も日常診療と矛盾しない所見であった。胸部CTで見られる間質の線維化病変が少なくとも20%以上である症例では、ILDもGroup 3のPHとして予後悪化に寄与していると思われる。実際、呼吸機能検査を見ても(表2)、PH病態の進行に依

じて段階的に呼吸機能は悪化傾向にあった。

TTEの所見からは、E/A比(正常所見:1-2、E/A比1以下は拡張能障害を示唆)はpre-PH群から有意に低下、E/e'(正常所見:6-8、8以上の上昇は拡張能障害を示唆[3, 4])はborder-PH群から有意に増加しており、収縮能を示す左室のEFは一貫して不変であることを考えると、pre-PH群の段階から左室拡張能障害が出現し始めていることを示唆していると思われる。SSc患者の心臓MRIで心筋の線維化沈着を確認している報告や[5]、剖検例で冠動脈周囲へのびまん性の線維化沈着を確認している報告[6]もあり、SScに特有の病態が早期から拡張能障害を起こす原因になっている可能性があり、注目すべき所見であると思われる。

CPXは全例に施行できなかったが(図13)、SScでは全身の皮膚硬化や皮膚潰瘍などにより運動ができずにADLが低下してしまう症例も多い。全身の筋力低下も生命予後の悪化因子であると思われる。CPXのpeak-V02値の基準に関しては、健常者42例の解析により健常者のpeak V02が 32.4 ± 7.1 (ml/kg/min)であったのに比べて、心疾患患者106例の解析によりNYHA class 1では 25.1 ± 4.8 (ml/kg/min)、NYHA class 2では 21.1 ± 4.7 (ml/kg/min)、NYHA class 3では 16.9 ± 2.7 (ml/kg/min)と報告されており[7]、心不全が重症になるほどpeak-V02は低下しており、重要な予後規定因子であると考えられている。peak-V02 < 14 (ml/kg/min)の生命予後が極めて悪いことから米国では心臓移植の判定基準の一つとしてpeak-V02 < 14 (ml/kg/min)の

値が用いられているほどである[8]。その数値と比較すると、NP 群や pre-PH 群の初期病態でも peak-VO₂:18.8 ± 3.7、16.8 ± 4.0 (ml/kg/min)と低値であり、SSc の早期からの全身障害が出現していることを示唆していた。border-PH 群(9/17 症例)では peak-VO₂:14.3 ± 3.7 (ml/kg/min)と心臓移植待機患者に近い運動耐用能低下であり、少数施行できた PH 群(5/19 症例)に限っても peak-VO₂:10.0 ± 1.6 (ml/kg/min)と極めて低値であった。このことは、SSc の心ポンプ機能の障害だけではなく末梢循環障害(低酸素血症、チアノーゼ、微小循環障害など)も含めた全身状態を反映していると思われた。

RHC による血行動態解析からは様々な注目すべき知見が得られた。CI の正常値が 2.5-4.2 (l/min/m²)、StVI の正常値が 30-60 (ml/beats/m²)、PVR の正常値が 50-120 (dyne · sec⁻¹ · cm⁻⁵)であることを考えると、NP 群において CI:2.6 ± 0.5 (l/min/m²)、StVI:40 ± 7、PVR:128 ± 53 (dyne · sec⁻¹ · cm⁻⁵)であるのは、既に正常値下限を呈していると思われた。皮膚所見が出現して SSc の診断が行われた時には、肺動脈や心筋障害が出現し始めていることを示唆していた。BNP の軽度の上昇もそのことを支持している。

pre-PH 群からは HR、mean RAP、RVSP、RVEDP が有意に上昇し始めていた。実際、1 心拍につき心室筋が必要とするエネルギー量を反映している 1 回仕事係数を求めると、右室の 1 回仕事係数 (RVSWI: 正常値 10-15 (g · m/m²)) は NP 群から pre-PH 群で軽度だが有意な増加

を認めている。RVSWI のみではなく左室の 1 回仕事係数 (LVSWI: 正常値 45-75 (g · m/m²)) も正常値より低値であるのは、何らかの心筋障害により両心室とも低いエネルギー量で全身に血液を送らざるを得ない状態であると思われる。PH の進行が進むにつれて、有意に右室の仕事量が増加していることから、SSc においてはより右心系に大きな負荷がかかっていることを示唆していると思われた。左心負荷を表す mPCWP が pre-PH 群からごく軽度増加するもその後はあまり変化がないことを考えると、pre-PH 群から呈する拡張能障害により左房圧が上昇していることを示唆する。今回の圧データからは SSc 単独では Group 3 のような左室収縮能障害は呈しにくいと思われた。

肺動脈への肺血流の流れやすさ、肺動脈の柔軟性の指標として肺動脈コンプライアンス (PAC)を求めたところ、NP 群に比べて pre-PH 群の段階で著明に低下し、border-PH 群、PH 群と有意に段階的に低下していた。それに比べ、大動脈への血流の流れやすさの指標としての大動脈コンプライアンス (AOC)は、いずれの群も有意差を認めなかった。ROC 曲線で死亡有無によるカットオフ値を求めて Cox 比例ハザード解析したところ、血行動態の中では PAC がハザード比 31.1 (p=0.001)と最も高値であったことは新しい知見である(表 5)(図 23)。従来の報告では SSc-PH の独立予後規定因子として mRAP、PVR、CI、StVI など様々な血行動態パラメータが指摘されているが[9]、今回の報告では CI 1.91 (L/min)でもハザード比 3.8 (p=0.0199)であり、有意差は認める

ものの PAC に比べてハザード比は低値だった。この原因は、従来の報告では SSc-PH のみを対象にして予後解析をしている報告しかないため、PH 群という単一グループの中では CI が予後規定因子として働いていたということであり、今回の報告のように全ての SSc を対象にして検討してみると、pre-PH 群の段階で CI は正常値より低下しており、SSc では CI が全体的に低値であることが、今回の解析では予後因子としては大きく差が出なかったと考えられる。PAC は、CI、PA 圧の脈圧差、HR などを総合的に捉えている指標であり、少なくとも SSc においては重要な予後指標になりうると考えられる。ただ、mPAP も mPAP 21 (mmHg) でハザード比 29.2 ($p=0.0014$) と PAC に続き高いハザード比を認めており、実臨床では血行動態の mPAP や RVSP 値 (RVSP 35 (mmHg) にてハザード比 26.5, $p=0.0019$) を参考にしながら予後予測や治療目標を考えるのは簡便な指標になると思われた。

< SSc の予後の特徴 >

現在のガイドラインでは PH の診断基準として mPAP 25mmHg という基準が使用されているが、今回の報告では SSc-PH は mPAP 21mmHg で著明な予後不良を認めていた。今後、少なくとも SSc-PH に関しては border-PH (mPAP 21mmHg) の段階から積極的な治療介入の対象になる可能性がある。

そもそも、PH の診断基準として mPAP 25mmHg が使われている基準の根拠は 1958 年の Paul Wood による報告 (Royal Brompton 病院、イギリス) に遡る [10]。60 人の健常人に

RHC を施行し、PAP (systolic /diastolic/mean) : 8/2/(4) - 28/14/ (19) (mmHg) と分布しており、PAP は 30/15/(20) mmHg を越えることがなかった。この報告により健常人は mPAP 20mmHg であると考えられ、そこに 5 mmHg の安全域を設けて、PH の診断基準として mPAP 25mmHg を使用している [11]。もちろん、IPAH などの純粋な肺動脈障害を主因とする病態において、この基準が予後や血行動態とよく関連するため、臨床的に広く使われているが、今回の報告のように多臓器に渡る全身疾患である SSc-PH に関しては、mPAP の基準を見直す必要もあると思われた。

今回の研究では SSc は自覚症状に乏しい重症例が多く存在することも判明したことも注目すべき所見である (図 7, 8)。WHO class と WHO class との比較でもハザード比 14.7 ($p=0.0145$) と高値であり、WHO class と WHO class との比較でもハザード比 30.5 ($p=0.002$) と著明な予後悪化を認めている。SSc の診療においては、本人の自覚症状に惑わされないように注意して、RHC による血行動態評価を積極的に行うことで mPAP や PAC の指標 (表 7) を参考にし、積極的な予後評価をしていくことが重要であると思われた。今後、非侵襲的な検査と予後との組み合わせにより、より侵襲性の低い評価方法で予後や治療方針の予測が立てることができるよう知見を積み重ねていく必要がある。血行動態評価を施行できない場合でも、(図 9 - 23) で示した分布図を見ながら、今現在どのような状態にいるのかを全ての指標において丁寧に評

価していくことが、予後改善につながる可能性があると思われる。

<SSc-PHのスクリーニング>

TTEによるRVSP値はsystolic PAPよりも($r=0.454$, $p=0.0001$) mean PAPの方がより相関関係にあった($r=0.778$, $p=0.0001$)。このことは、mean PAPの基準を使っているPH診断のスクリーニング検査が、TTEのRVSP値で行われていたこととも矛盾していない。RVSP値は収縮期圧の予測値ではあるが、実際にはmPAPとより強く相関していることは実臨床で頭に入れておく必要がある。

ROC曲線での検討から、PH診断にはRVSP 43mmHgもしくはRVSP 53mmHg、Border-PH診断にはRVSP 40mmHgもしくはRVSP 43mmHgのカットオフ値を推奨した(表7)。ただ、PH群もborder-PH群も予後不良であることを考えると、見落としを防ぐために感度を100%とするためには(図25) PH群ではRVSP 38mmHgにてスクリーニングをすると感度100%、特異度71%となる。ただ、border-PHにおいてはRVSP 32mmHgにてスクリーニングをすると感度100%、特異度47%となるため、偽陽性は多くなる。実際には上記で示したその他の検査を総合的に加味しながら症例に応じてRVSP値のスクリーニング基準を決めていくべきであると考えられる。

SScにおいてはborder-PH群から極めて予後不良であることが今回の研究でも明らかになったため、最低でもRVSP 40mmHg(感度83%、特異度82%)を採用すべきであると考えられる。そのことを考えると、ESC/ERSのガイド

ライン[12]で提唱しているRVSP 50mmHgの基準ではPH群もborder-PH群も見落としが多く(図25)スクリーニング検査としてのRVSP値の基準の見直しが必要であると思われる。

<SScの病態進行の特徴>

考察の冒頭で記したように、mPAPの進行に応じて血行動態は悪化していた。従来の代表的パラメータ(CI、PVR、peak-V02)により病態の進行との関係性を示すと(図26) NP群の段階でCI、PVR、peak-V02はいずれも正常下限に位置しており、世界で初めての報告となる知見である。

SScの病態進行とmPAPとの関係を(図27)に示した。SScに特徴的な症状が出現すると皮膚科医やアレルギーリウマチ内科医に紹介され、その後SScの診断が下される。循環器内科医に紹介されるのは、TTEでのRVSP値が上昇してからであり、従来のRVSP値スクリーニング基準を使うと、かなり病態が進行してしまっていることが本研究により明らかになった。本研究では従来のPH群よりも早期のBorder-PH群から予後不良であることが明らかになったため、border-PH群から積極的なスクリーニングをするべきである。従来のRVSP値の基準ではPH群の見落としだけではなくborder-PH群の見落としも多いと言わざるを得ない。SScの皮膚症状が出現し始めたときには、既にその他の臓器に障害が起き始めていると考えべきである。正常圧群であっても、BNP、peak-V02、CI、StVI、PVRの増悪を認めていることを考えると、SScの診断がついた時点で循環器内科や呼吸器内科も積

極的に診療に關与していく必要がある。Border-PH 群から様々な原因により死亡率が増加しており、多変量解析で独立した予後規定因子であった、BNP、PVR、extensive ILDなどを指標としながら治療介入の時期などを考えていく必要がある。今回の研究により、SScはgroup 1 PAHの要素だけではなく、group 2 左心疾患に伴うPHや、group 3 肺疾患に伴うPHが混合した病態であることを示唆していると思われる。今後は運動負荷検査などの知見を増やして早期発見を計りながら、予後改善をはかる治療法やタイミングを丁寧に積み上げていく必要があると思われる。

<研究の限界>

NP群とborder-PH群とは年齢が有意に若かった。ベースラインの年齢に有意差がないほど、より正確な血行動態や予後評価ができると思われる。ただ、border-PH群が有意に若年層であったにも関わらず、著明に予後不良であったことは注目すべき点であると思われる。

また、今回の生存率のフォローに関しては、PH治療薬や心不全治療薬などの治療介入が統一されていないという限界点もある。実際、PH群においては全例PH治療薬を開始しており、border-PH群に関してはその後PHへと進行した症例に限ってPH治療薬を開始している。ただ、PH治療薬を開始しているにも関わらず予後不良であったことを考えると、未治療の自然歴では更に予後不良となっていた可能性もあり、その事を考慮して生命予後を見ていく必要はある。

E. 結 論

PHの前段階を示すと思われるSScの初期段階での詳細な血行動態による心機能評価と予後との関係性を報告した。SScはNP群からCI低下やPVR上昇を認めており、pre-PH群からは心拡張能障害を示唆する所見も認めていた。mPAPが低値の極めて早期から肺動脈や心機能障害が起きていることを示唆していた。生命予後解析ではmPAP 21mmHgのborder-PH群から著明に予後不良であることが明らかとなり、血行動態の指標が予後予測にも非常に有用であることも示した。今後のSSc診療において重要な知見が多数含まれていると思われる。

F. 文 献

1. Fischer, A. and R. du Bois. Interstitial lung disease in connective tissue disorders. *Lancet* 380; 689-98, 2012.
2. Gibbons, R.J., G.J. Balady, J.W. Beasley, J.T. Bricker, W.F. Duvernoy, V.F. Froelicher, D.B. Mark, T.H. Marwick, B.D. McCallister, P.D. Thompson, Jr., W.L. Winters, F.G. Yanowitz, J.L. Ritchie, M.D. Cheitlin, K.A. Eagle, T.J. Gardner, A. Garson, Jr., R.P. Lewis, R.A. O'Rourke, and T.J. Ryan. ACC/AHA Guidelines for Exercise Testing. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Exercise Testing). *J Am Coll Cardiol* 30; 260-311,

- 1997.
3. Ommen, S.R., R.A. Nishimura, C.P. Appleton, F.A. Miller, J.K. Oh, M.M. Redfield, and A.J. Tajik. Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation* 102; 1788-94, 2000.
 4. Daimon, M., H. Watanabe, Y. Abe, K. Hirata, T. Hozumi, K. Ishii, H. Ito, K. Iwakura, C. Izumi, M. Matsuzaki, S. Minagoe, H. Abe, K. Murata, S. Nakatani, K. Negishi, K. Yoshida, K. Tanabe, N. Tanaka, K. Tokai, and J. Yoshikawa. Normal values of echocardiographic parameters in relation to age in a healthy Japanese population: the JAMP study. *Circ J* 72; 1859-66, 2008.
 5. Tzelepis, G.E., N.L. Kelekis, S.C. Plastiras, P. Mitseas, N. Economopoulos, C. Kampolis, E.J. Gialafos, I. Moyssakis, and H.M. Moutsopoulos. Pattern and distribution of myocardial fibrosis in systemic sclerosis: a delayed enhanced magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum* 56; 3827-36, 2007.
 6. Bulkley, B.H. and W.C. Roberts. Atherosclerotic narrowing of the left main coronary artery. A necropsy analysis of 152 patients with fatal coronary heart disease and varying degrees of left main narrowing. *Circulation* 53; 823-8, 1976.
 7. Koike, A., M. Hiroe, H. Adachi, T. Yajima, A. Nogami, H. Ito, T. Takamoto, K. Taniguchi, and F. Marumo. Anaerobic metabolism as an indicator of aerobic function during exercise in cardiac patients. *J Am Coll Cardiol* 20; 120-6, 1992.
 8. Mancini, D.M., H. Eisen, W. Kusmaul, R. Mull, L.H. Edmunds, Jr., and J.R. Wilson. Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* 83; 778-86, 1991.
 9. Campo, A., S.C. Mathai, J. Le Pavec, A.L. Zaiman, L.K. Hummers, D. Boyce, T. Houston, H.C. Champion, N. Lechtzin, F.M. Wigley, R.E. Girgis, and P.M. Hassoun. Hemodynamic predictors of survival in scleroderma-related pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 182; 252-60, 2010.
 10. Wood, P. Pulmonary hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor. *Br Heart J* 20; 557-70, 1958.
 11. Rich, S., D.R. Dantzker, S.M. Ayres, E.H. Bergofsky, B.H. Brundage, K.M. Detre, A.P. Fishman, R.M. Goldring, B.M. Groves, S.K. Koerner, and et al.

Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. Ann Intern Med 107; 216-23, 1987.

12. Galie, N., M.M. Hoeper, M. Humbert, A. Torbicki, J.L. Vachiery, J.A. Barbera, M. Beghetti, P. Corris, S. Gaine, J.S. Gibbs, M.A. Gomez-Sanchez, G. Jondeau, W. Klepetko, C. Opitz, A. Peacock, L. Rubin, M. Zellweger, and G. Simonneau. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Heart J 30; 2493-537, 2009.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

2012年11月6日 2012 AHA Los Angeles Hemodynamic Complications in Systemic Sclerosis Patients with Various Stages of Pulmonary Arterial Hypertension (Best Abstract Award)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. SSc4群の基礎疾患

	NP (n=78)	Pre-PH (n=64)	Border-PH (n=17)	PH (n=19)	ALL (n=178)
年齢(歳)	53.1 ± 14.2	63.3 ± 12.8 **	59.9 ± 11	69 ± 9 **	54 ± 14
女性	69 (88%)	59 (92%)	17 (100%)	13 (68%)	163 (92%)
BMI	20.9 ± 3.2	21.0 ± 3.4	21.5 ± 3.9	2.04 ± 3.2	21 ± 3.3
BSA	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2
creatinine (mg/dl)	0.61 ± 0.13	0.68 ± 0.26	0.70 ± 0.32	0.89 ± 0.47 **	0.67 ± 0.26
eGFR (ml · min ⁻¹ · 1.72m ⁻²)	85.3 ± 16.8	77.6 ± 26.2	74.6 ± 23.3	64.1 ± 30.3 **	79 ± 24
Hb (mg/dl)	12.2 ± 1.4	11.5 ± 1.4 **	11.4 ± 1.7	11.0 ± 2.0 **	12.0 ± 1.6
BNP (pg/ml)	31 ± 21	76 ± 90 **	118 ± 156	436 ± 456 **	99 ± 203
CRP (mg/dl)	0.07 ± 0.09	0.33 ± 0.52 **	0.60 ± 0.59 **	1.1 ± 1.7 **	0.3 ± 0.7
WHO class					
I	70 (90%)	50 (78%)	3 (18%)	0 (0%)	123 (69%)
II	8 (10%)	11 (17%)	14 (82%)	5 (26%)	33 (19%)
III	0 (0%)	3 (5%)	0 (0%)	14 (74%)	17 (10%)
IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
症状出現からの年数(年)	6 ± 7	10 ± 10	20 ± 11 **	16 ± 13 *	10 ± 10
SScのタイプ					
lcSSc	48 (62%)	39 (61%)	6 (35%)	10 (53%)	103 (58%)
ILDの有無					
ILD (limited)	24 (31%)	31 (48%)	15 (88%)**	3 (16%)	73 (41%)
ILD (Extensive)	5 (6%)	21 (33%)**	11 (65%)**	14 (74%)**	51 (29%)
自己抗体					
抗核抗体	68 (87%)	60 (94%)	17 (100%)	19 (100%)	167 (94%)
抗セントロメア抗体	24 (31%)	24 (38%)	5 (29%)	4 (21%)	59 (33%)
抗Scl-70抗体	30 (38%)	27 (42%)	10 (59%)	5 (26%)	73 (41%)
抗U1-RNP抗体	10 (13%)	5 (8%)	3 (18%)	6 (32%)	24 (13%)
内服薬					
エンドセリン受容体拮抗薬	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ベラプロスト	21 (27%)	21 (33%)	11 (65%)*	12 (63%)*	65 (37%)
Ca受容体拮抗薬	3 (4%)	12 (19%)	2 (12%)	6 (32%)*	23 (13%)
ワルファリン	2 (3%)	2 (3%)	1 (6%)	1 (5%)	6 (3%)
ARB/ACE阻害剤	5 (6%)	15 (23%)	3 (18%)	6 (32%)	29 (16%)
スタチン	0 (0%)	3 (5%)	1 (6%)	1 (5%)	5 (3%)
ステロイド	8 (10%)	22 (34%)**	5 (29%)	5 (26%)	40 (22%)
サルボグレラート塩酸塩	2 (3%)	15 (23%)**	1 (6%)	1 (5%)	19 (11%)

(Kruskal-Wallis検定. *p<0.05, **p<0.01)

BMI : body-mass index, BSA : body surface area, eGFR : estimated glomerular filtration rate, BNP : brain natriuretic peptide, CRP : C-reactive protein, ILD : interstitial lung disease, ARB : angiotensin receptor blocker, ACE : angiotensin conversion enzyme

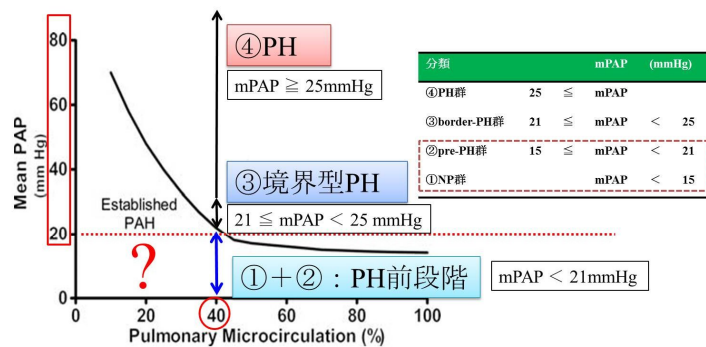


図1. 肺循環とmPAPの関係

Edmund M.T. Lau et al, Eur Heart J. 2011 Oct;32(20):2489-98. より改変

肺循環の約60%が障害(= 正常の肺循環が40%)されて初めて安静時のmPAPが著明に上昇する。

表2. SSc 4群の心エコー、心肺機能検査、呼吸機能検査

	NP (n=78)	Pre-PH (n=64)	Border-PH (n=17)	PH (n=19)	ALL (n=178)
TTE					
TR-PG (mmHg)	21 ± 6	26 ± 8 **	36 ± 10 **	57 ± 19 **	28 ± 14
EF (%)	71 ± 5.8	69 ± 8.2	71 ± 7.9	66 ± 8	70 ± 7
TR					
mild	17 (22%)	15 (23%)	5 (29%)	2 (11%)	39 (22%)
moderate	0 (0%)	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1%)
severe	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	1 (1%)
E/A	1.27 ± 0.5	0.96 ± 0.39 **	1.08 ± 0.51	1.0 ± 0.5 **	1.1 ± 0.4
E'	10.3 ± 2.8	9.2 ± 2.8	8.5 ± 4.1 *	7.6 ± 2.8*	9.6 ± 2.9
E/e'	7.3 ± 2.4	8.5 ± 3.4	10.4 ± 4.2 *	10.9 ± 6.2 *	1.1 ± 0.4
CPX					
最大心拍数 (/min)	137 ± 23	132 ± 17	135 ± 21	134 ± 23	135 ± 21
最大ワット数 (watt)	70 ± 23	53 ± 17 **	57 ± 18 *	22 ± 8 **	63 ± 23
AT-VO ₂ (ml/kg/min)	13.5 ± 2.5	12.8 ± 1.8	11.9 ± 1.5	(/)	13.1 ± 2.3
Peak-VO ₂ (ml/kg/min)	18.8 ± 3.7	16.8 ± 4.0 *	14.3 ± 3.7 **	10.0 ± 1.6 **	17.3 ± 4.3
呼吸機能					
%VC	98.5 ± 19.8	89.5 ± 20.0	79.8 ± 22.4*	70 ± 21 **	90.5 ± 22
%FEV 1.0	95.9 ± 19.3	89.5 ± 18.9	77.4 ± 18.9**	75 ± 20**	90 ± 20
%DLCO	89.1 ± 16.3	5.4 ± 20.9 **	54.1 ± 14.7 **	46.6 ± 17.7 **	77 ± 23
%VC/%DLCO	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.5	1.7 ± 0.9 **	1.7 ± 0.7 **	1.3 ± 0.5

(Kruskal-Wallis検定. *p<0.05, **p<0.01)

TTE : transthoracic echocardiography, TR-PG : tricuspid regurgitation - pressure gradient, EF : ejection fraction, CPX : cardiopulmonary exercise testing, VC : vital capacity, FEV : forced expiratory volume, DLCO : diffusing capacity of lung for carbon monoxide

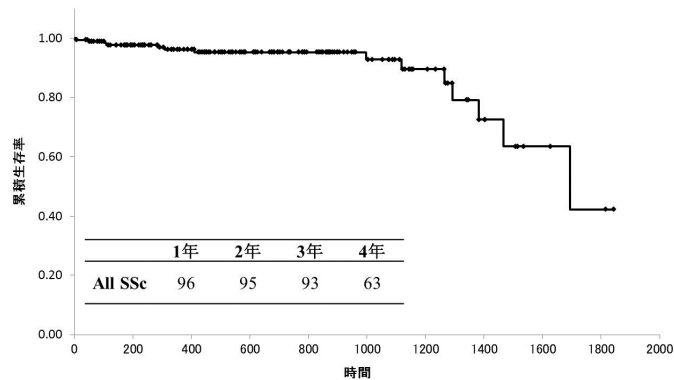


図2. 生存曲線 全SSc症例

Kaplan-Meier 法により全 SSc (178 症例) の予後を解析した。平均追跡期間は 641 ± 430 日、合計 14 症例の死亡を認めた。1 年生存率、2 年生存率、3 年生存率、4 年生存率はそれぞれ 96%、95%、93%、63%であり、4 年目から著明に予後不良であった。

表3. SSc 4群の血行動態

	NP (n=78)	Pre-PH (n=64)	Border-PH (n=17)	PH (n=19)	All (n=178)
RHC					
HR (/min)	65 ± 9	72 ± 13 **	72 ± 13 *	82 ± 12 **	70 ± 12
BP (mmHg)					
systolic	112 ± 18)	130 ± 19	126 ± 18	123 ± 19	121 ± 20
diastolic	67 ± 9	70 ± 12	67 ± 13	71 ± 14	67 ± 11
mean	82 ± 12	82 ± 13	82 ± 13	87 ± 11	86 ± 13
mena RAP (mmHg)	3 ± 2	4 ± 2 *	4 ± 2	6 ± 3 **	4 ± 2
RVSP (mmHg)	24 ± 4	30 ± 4 **	37 ± 4 **	55 ± 13 **	31 ± 11
RVEDP (mmHg)	5 ± 2	7 ± 2 *	6 ± 2	9 ± 4 **	7 ± 3
PAP (mmHg)					
systolic	21 ± 3	28 ± 3 **	36 ± 4 **	55 ± 12 **	29 ± 11
diastolic	7 ± 2	10 ± 2 **	13 ± 4 **	21 ± 5 **	10 ± 5
mean	12 ± 2	17 ± 2 *	22 ± 1 **	34 ± 6 **	17 ± 7
mean PCWP (mmHg)	6 ± 2	8 ± 2 **	8 ± 3 *	9 ± 3 **	8 ± 2
SaO ₂ (%)	97 ± 4	96 ± 2	96 ± 4	91 ± 7 **	96 ± 3
SvO ₂ (%)	74 ± 4	70 ± 6 **	68 ± 5 *	58 ± 10 **	70 ± 7
CO(F) (ml/min)	3.9 ± 1.0	3.6 ± 0.9	3.6 ± 0.8	3.3 ± 1.3 **	3.7 ± 1.0
CI(F) (ml/min/m ²)	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	2.3 ± 0.4	2.2 ± 0.7 *	2.4 ± 0.5
1回拍出係数 (ml/beats/m ²)	40 ± 7	35 ± 7 **	33 ± 6 **	27 ± 7 **	36 ± 8
肺血管抵抗 (dyne · sec ⁻¹ · cm ⁻⁵)	128 ± 53	197 ± 86 **	321 ± 78 *	698 ± 356 **	232 ± 216
全身血管抵抗 (dyne · sec ⁻¹ · cm ⁻⁵)	1703 ± 506	2029 ± 569 *	1866 ± 647	2250 ± 825 *	1900 ± 606
PVR/SVR × 100	7.5 ± 2.3	9.6 ± 2.8 **	18.3 ± 5.1 **	30.7 ± 10.9 **	11.8 ± 8.5
肺動脈コンプライアンス (ml/mmHg)	4.4 ± 1.3	3.0 ± 0.9 **	2.3 ± 0.7 **	1.3 ± 0.5 **	3.3 ± 1.5
大動脈コンプライアンス (ml/mmHg)	1.50 ± 0.58	1.0 ± 0.5	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.5	1.2 ± 0.6
肺動脈/大動脈コンプライアンス比	3.2 ± 1.1	3.4 ± 1.1	2.8 ± 1.1 *	1.6 ± 0.6 *	3.0 ± 1.2
左室1回仕事係数 (g · m/m ²)	41 ± 9	39 ± 10	33 ± 7 *	28 ± 6 **	38 ± 10
右室1回仕事係数 (g · m/m ²)	5 ± 1	6 ± 1 **	8 ± 2 **	10 ± 2 **	6 ± 2
左室/右室1回仕事係数比	8.5 ± 2.0	6.7 ± 1.3 **	4.2 ± 0.79 **	2.9 ± 0.86 **	6.8 ± 2.5

(Kruskal-Wallis検定. *p<0.05, **p<0.01)

RHC : right heart catheterization, HR : heart rate, BP : blood pressure, RAP : right atrial pressure, RVSP : right ventricle systolic pressure, RVEDP : right ventricle end-diastolic pressure, PAP : pulmonary artery pressure, PCWP : pulmonary capillary wedge pressure, SaO₂ : oxygen saturation, SvO₂ : mixed vein saturation, CO : cardiac output, CI : cardiac index

表4. SSc 4群の死因

	NP (n=78)	Pre-PH (n=64)	Border-PH (n=17)	PH (n=19)
追跡期間(日)	587 ± 314	617 ± 409	947 ± 520	754 ± 643
死亡症例	0	1	4	9
死因(年齢、性別)		多臓器不全 (71F)	CPA (69F) CPA (73F) ILD, 肺癌 (64M) 慢性硬膜下血腫 (64F)	CPA (68F) 右心不全(67M) 不安定狭心症(79M) 喀血、CPA(73F) ILD, 呼吸不全(56F) ILD, 肺癌(61M) 肺癌(54M) 誤嚥性肺炎(73F) 敗血症性ショック(66F)

CPA : cardiopulmonary arrest

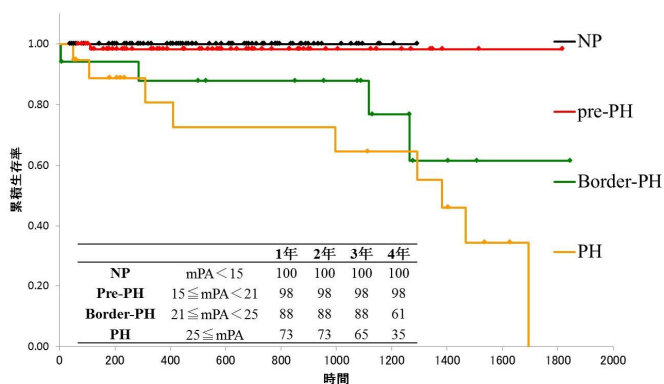


図3. 生存曲線 SSc4群

NP 群、pre-PH 群に比べて、border-PH 群と PH 群において著明に予後が悪化していた。

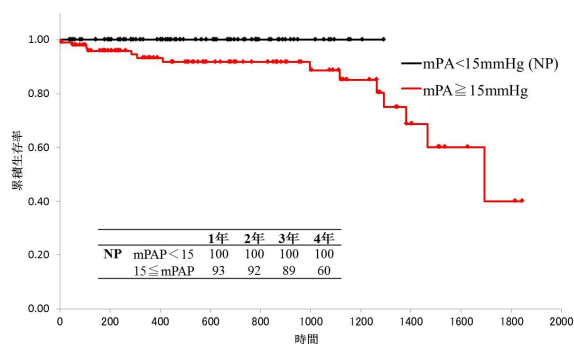


図4. 生存曲線 NP群とそれ以外の群

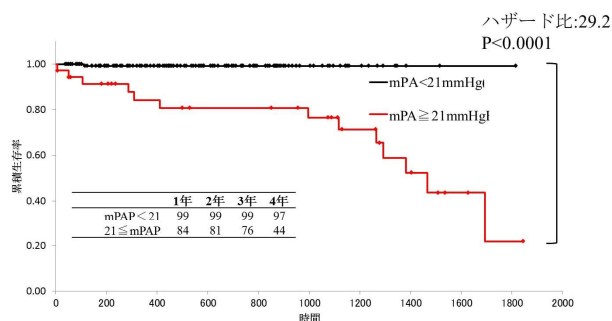


図5. 生存曲線 Border-PH群とそれ以外の群

mPAP 21mmHg の群で有意に予後の悪化を認めていた (ハザード比: 29.208, 95%CI 3.6628-232.913, P<0.00001)。

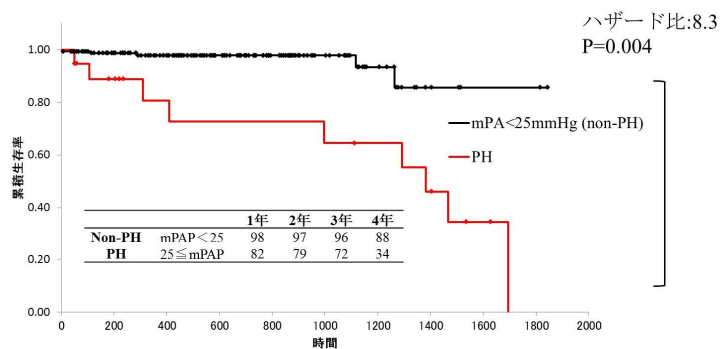


図6. 生存曲線 PH群とそれ以外の群

mPAP ≥ 25mmHg の群で有意に予後の悪化を認めていた (ハザード比: 8.332, 95%CI 2.547-27.257, P=0.0004)。

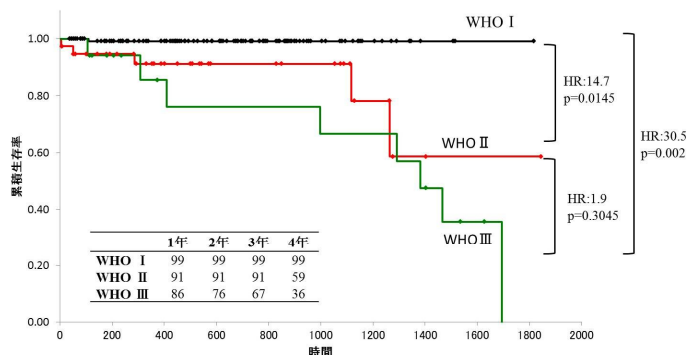


図7. 生存曲線 WHO分類での3群

自覚症状の進行と予後不良とが関係していた。

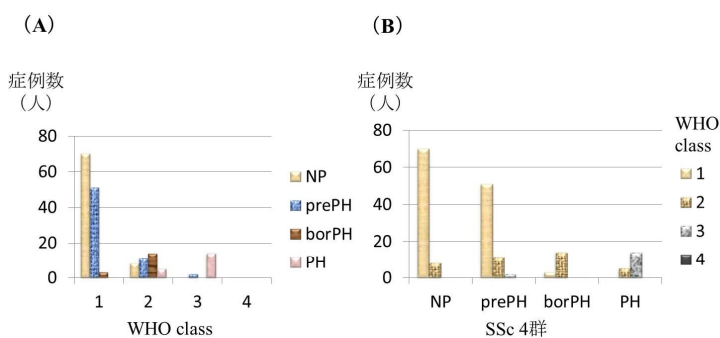


図8. WHO分類とSSc4群の分布

(A) はWHO 分類による各群の症例数、(B) はSSc の4 群それぞれにおけるWHO 分類の分布を示した。

表5. 各パラメータの死亡のカットオフ値、単変量Cox比例ハザード解析

変数	ROC曲線				単変量Cox比例ハザード解析		
	カットオフ値	感度	特異度	オッズ比	ハザード比	95% CI	p
年齢(歳)	64	0.79	0.60	5.5	4.2	1.174-15.365	0.0275 *
男性					3.3	0.987-10.734	0.0526
BMI	18.7	0.93	0.25	4.2	5.0	0.646-38.118	0.1236
BSA	1.72	0.21	0.89	2.2	2.3	0.627-8.385	0.2099
eGFR (ml・min ⁻¹ ・1.72m ⁻²)	62	0.64	0.81	7.7	4.4	1.404-13.857	0.0111 *
Hb (mg/dl)	10.2	0.50	0.86	6.1	4.5	1.493-13.422	0.0075**
BNP (pg/ml)	79.3	0.85	0.83	26.3	12.4	2.692-57.132	0.0012**
CRP (mg/dl)	0.51	0.64	0.88	13.6	6.5	2.101-20.148	0.0012**
dcSSc					2.6	0.848-7.684	0.0955
Durations from symptom	6	0.79	0.55	4.5	2.0	0.528-7.623	0.3069
WHO 1 vs 2					14.7	1.702-126.52	0.0145*
WHO 1 vs 3					30.5	3.561-264.84	0.002**
WHO 2 vs 3					1.9	0.568-6.129	0.3045
抗セントロメア抗体+					0.2	0.026-1.516	0.1186
Scl-70+					1.1	0.391-3.277	0.819
UI-RNP+					1.6	0.448-5.966	0.4571
TTE							
TR-PG (mmHg)	36	0.77	0.85	18.6	5.1	1.208-21.21	0.0265*
EF (%)	71	0.77	0.44	2.7	1.9	0.588-6.299	0.279
E/A	1.17	0.46	0.62	1.3	2.5	0.693-9.067	0.161
CPX							
peakVO ₂ (ml/kg/min)	10.5	0.67	0.94	31.8	1.1	0.060-19.875	0.9508
Respiratory function test							
limited ILD					1.0	0.340 3.137	0.9486
Extensive ILD					8.5	1.804-39.65	0.0068**
%VC	64.9	0.77	0.88	25.4	10.6	2.815-40.22	0.0005**
%FEV _{1.0}	83.3	0.92	0.63	20.3	6.3	1.389-28.52	0.017 *
%DLCO	50.1	0.80	0.92	44.6	10.3	1.852-57.29	0.0077**
%VC/%DLCO	1.78	0.60	0.94	22.1	4.1	0.940-18.08	0.0605
RHC							
HR (/min)	77	0.79	0.81	15.6	11.8	3.289-42.52	0.002**
mBP (mmHg)	85	0.64	0.50	1.8	1.3	0.435-4.144	0.6083
mRAP (mmHg)	10	0.14	0.98	8.9	6.3	1.324-29.48	0.0207*
RVEDP (mmHg)	8	0.57	0.71	3.2	3.3	1.064-10.12	0.0386*
RVSP (mmHg)	35	0.93	0.83	65.5	26.5	3.351-209.89	0.0019**
mPAP (mmHg)	21	0.93	0.86	79.1	29.2	3.663-232.91	0.0014**
mPCWP (mmHg)	11	0.29	0.89	3.2	2.4	0.743-8.049	0.1413
PVR (dyne・sec ⁻¹ ・cm ⁻⁵)	295	0.86	0.85	34.8	12.3	2.570-58.51	0.0017**
SVR(dyne・sec ⁻¹ ・cm ⁻⁵)	2110	0.57	0.71	3.3	1.8	0.613-5.408	0.2803
PVR/SVR×100	15.7	0.86	0.90	51.9	13.5	2.823-64.99	0.0011**
SaO ₂ (%)	93	0.50	0.90	8.6	4.2	1.433-12.34	0.0089**
SvO ₂ (%)	66.7	0.79	0.81	15.7	6.2	1.572-24.18	0.0091**
CI (ml/min)	1.91	0.57	0.89	10.8	3.8	1.234-11.59	0.0199 *
SfVI (ml/min/m ²)	24.6	0.57	0.94	20.4	6.5	2.160-19.81	0.0009**
PAC (ml/mmHg)	2.23	0.93	0.83	63.1	31.1	4.027-140.81	0.001**
AOC (ml/mmHg)	1.08	0.71	0.54	3.0	2.3	0.725-7.550	0.1549
PAC/AOC (ml/mmHg)	2.06	0.71	0.87	16.9	8.4	2.498-28.225	0.0006**
LVSWI (ml/mmHg/m ²)	26.7	0.64	0.92	20.8	6.2	1.915-20.326	0.0024**
RVSWI (ml/mmHg/m ²)	7	0.86	0.80	24.6	10.7	2.230-49.831	0.0025**
LVSWI/RVSWI	4.7	0.86	0.87	38.5	13.6	2.8526-65.22	0.0011**

(*p<0.05, **p<0.01)

表6. 多変量Cox比例ハザード解析

	ハザード比	95% CI	p
Age	1.7810	0.398-7.974	0.3553
eGFR	0.6064	0.158-2.331	0.4665
BNP	6.7058	1.455-30.90	0.0146 *
CRP	0.8896	0.182-4.356	0.8852
Extensive ILD	4.8213	1.022-22.75	0.0469 *
mRAP	1.0532	0.185-5.984	0.9533
PVR	9.734	1.191-79.54	0.0337 *

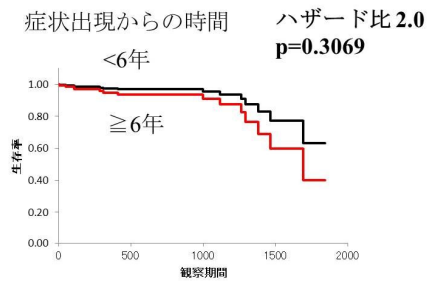
(*p<0.05)
 eGFR : estimated glomerular filtration rate, BNP : brain natriuretic peptide, CRP : C-reactive protein, ILD : interstitial lung disease, mRAP : mean right atrial pressure, PVR : pulmonary vascular resistance

表7. TTEのRVSP値とPH、border-PH診断の感度・特異度

RVSP (TTE)	PH (mPAP ≥ 25mmHg)		borderline-PH (mPAP ≥ 21mmHg)	
	感度	特異度	感度	特異度
25	100	10	25	100
30	100	31	30	100
35	100	58	35	91
40	94	77	40	83
43	89	84	43	77
45	83	86	45	71
50	78	92	50	60
53	78	95	55	46
55	72	97	60	37
60	61	99	65	17
65	56	100		

ESC/ERSガイドラインでの推奨基準 (RVSP ≥ 50mmHg)

(A)



(B)

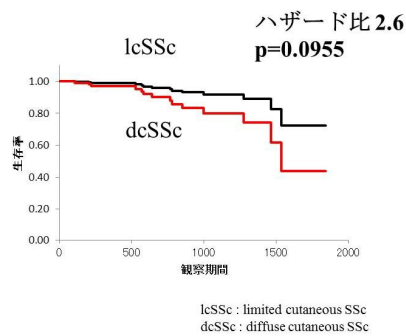


図9. Cox比例ハザード解析
 (症状発現からの年数、SScのタイプ)

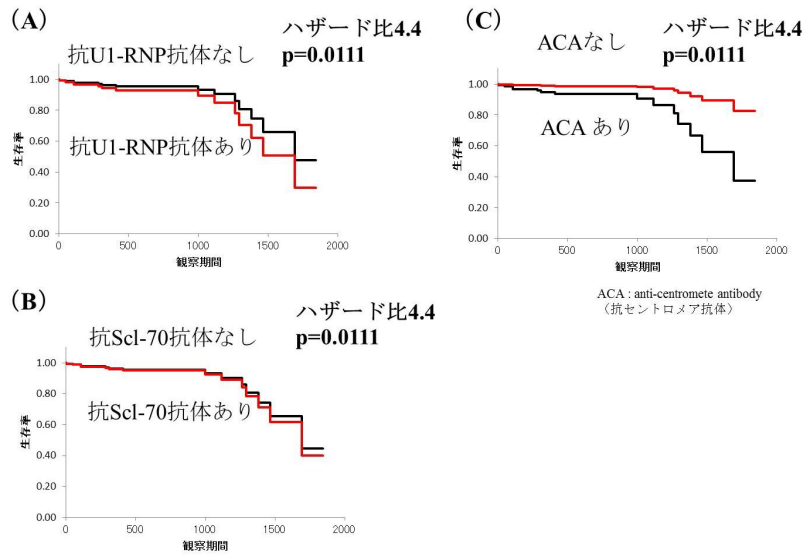


図10. Cox比例ハザード解析
(自己抗体：抗U1-RNP抗体、抗Scl-70抗体、抗セントロメア抗体)

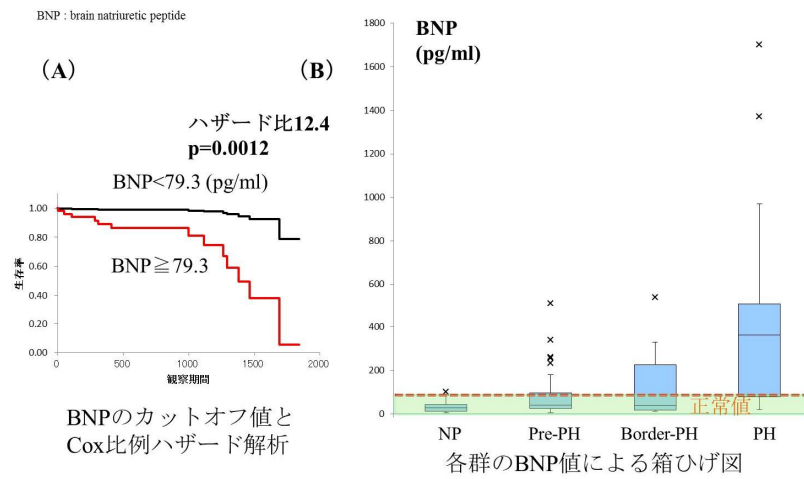


図11. BNPのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

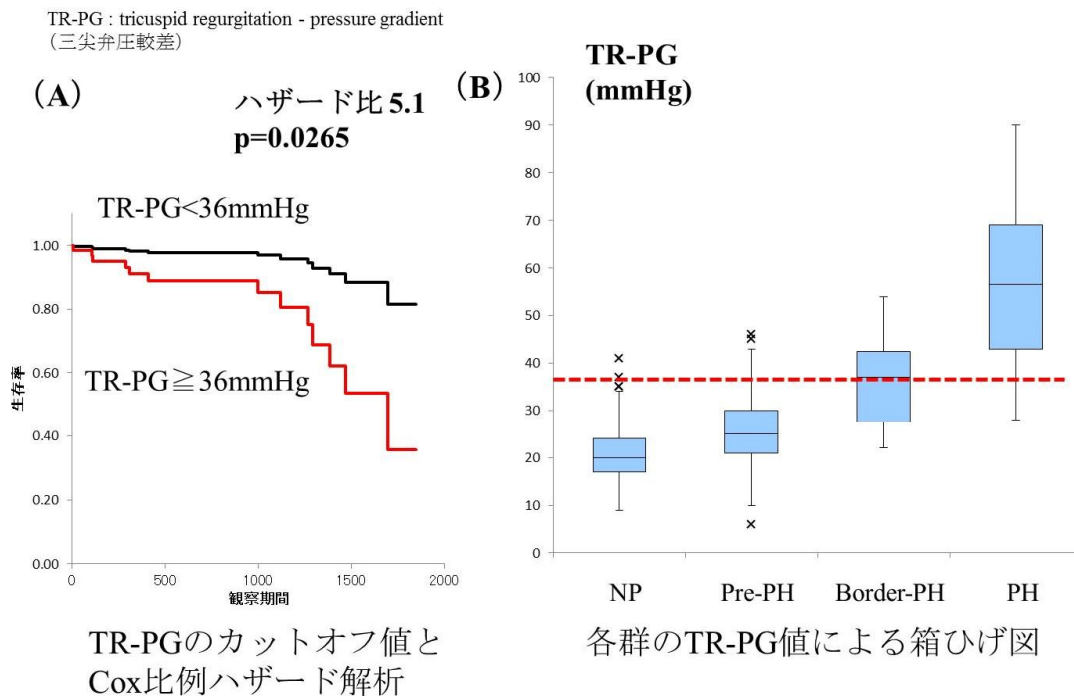


図12. TR-PGのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

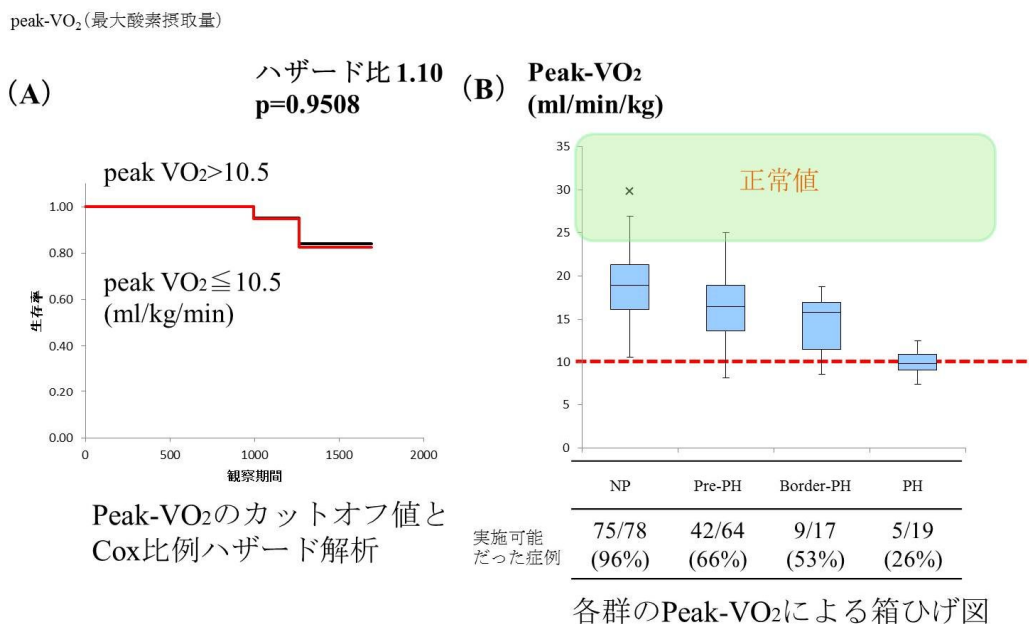


図13. Peak-VO₂のCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

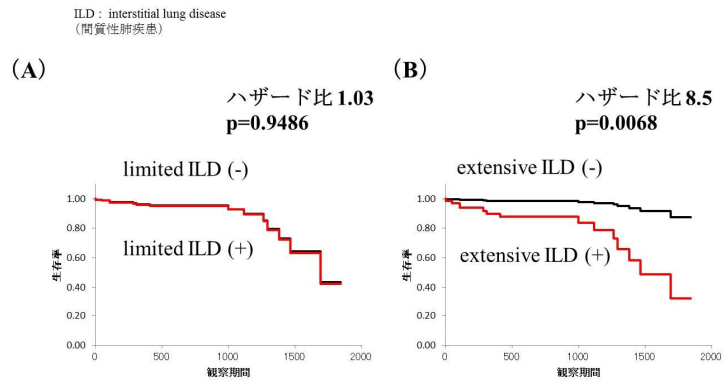


図14. Cox比例ハザード解析 (limited ILD, extensive ILD)

ILD 軽症 (CT での間質線維化が 20%以下) では生命予後に影響を与えないが、ILD 中等度以上では生命予後に影響しており、Group 3 PH の関与も考えられる。

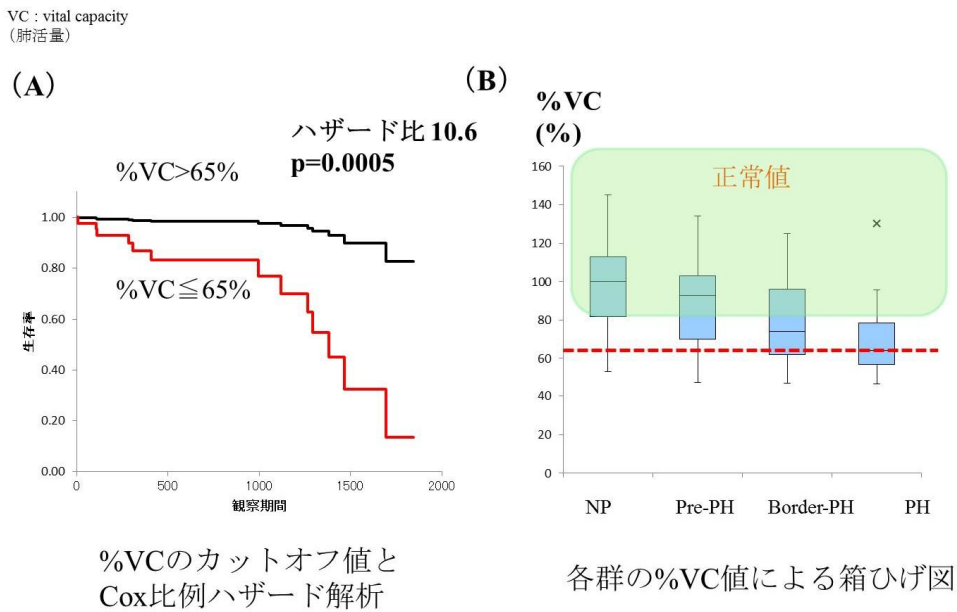


図15. %VCのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

DLCO : diffusing capacity of lung for carbon monoxide
(一酸化炭素肺拡散能)

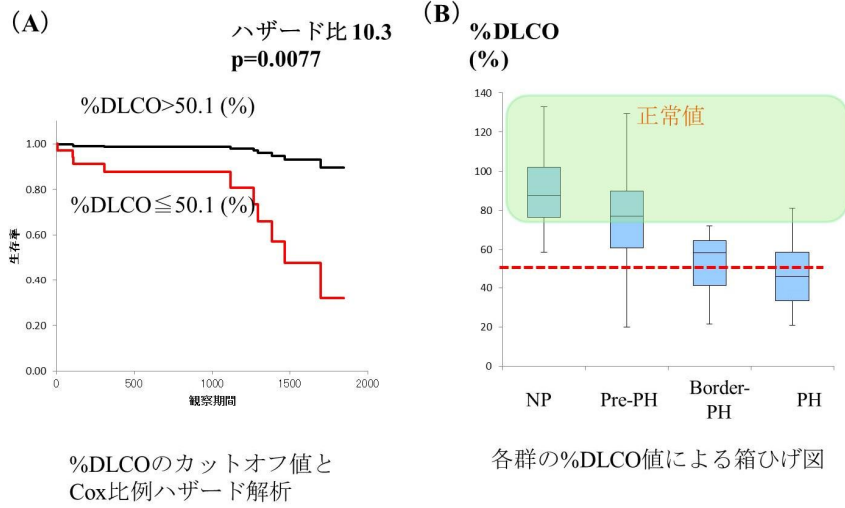


図16. %DLCOのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

%VC : % vital capacity (% 肺活量)
%DLCO : % diffusing capacity of lung for carbon monoxide (% 一酸化炭素肺拡散能)

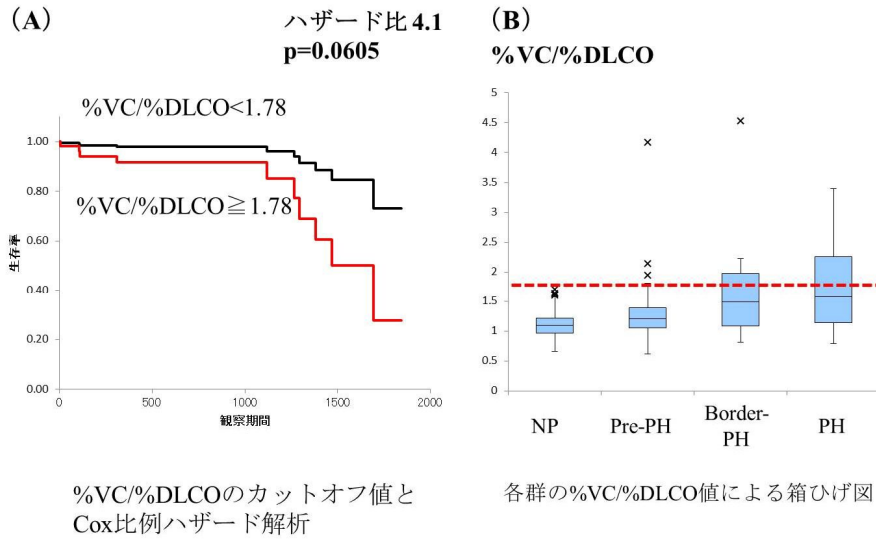


図17. %VC/%DLCOのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

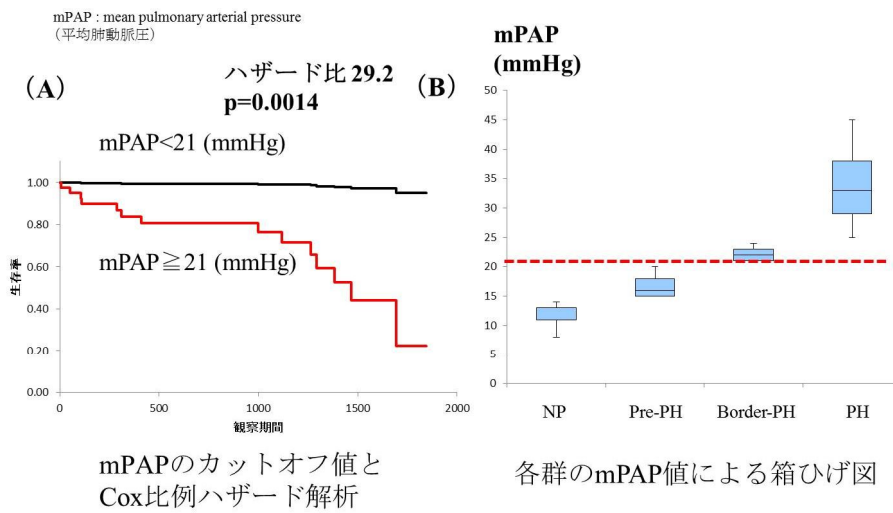


図18. mPAPのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

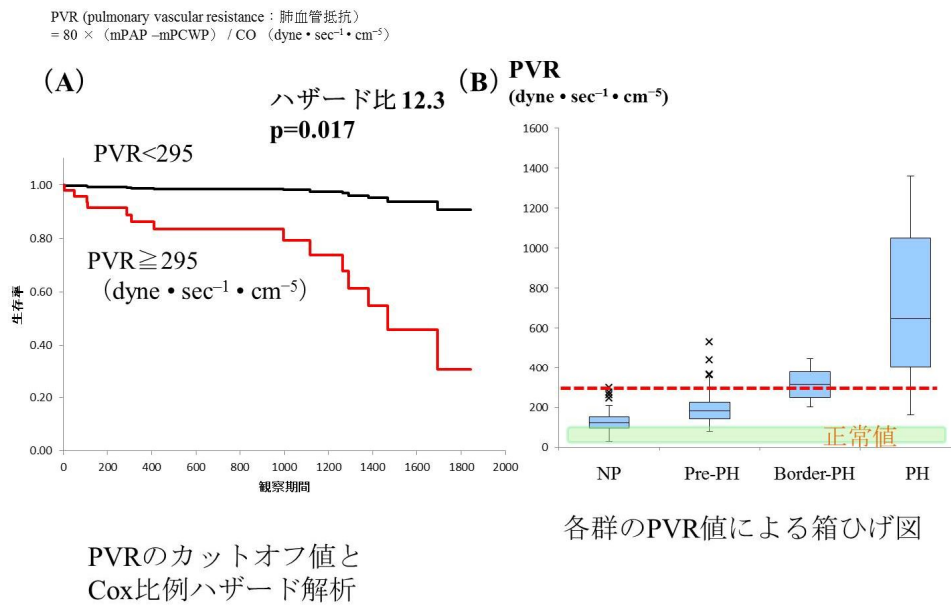


図19. PVRのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

SaO₂ : oxygen saturation
(動脈血酸素飽和度)

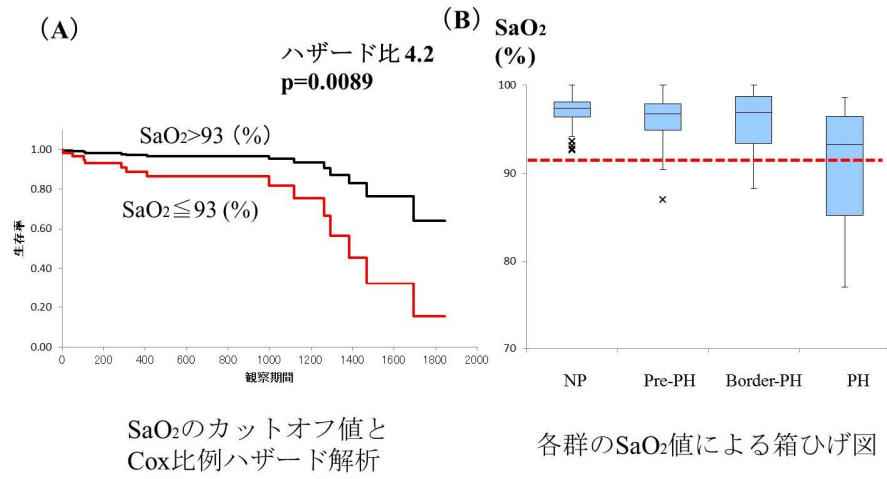


図20. SaO₂のCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

CI : cardiac index (心係数)
=CO(心拍出量) (L/min) / BSA(体表面積)
(正常値 : 2.5-5.0 (ml/min/m²))

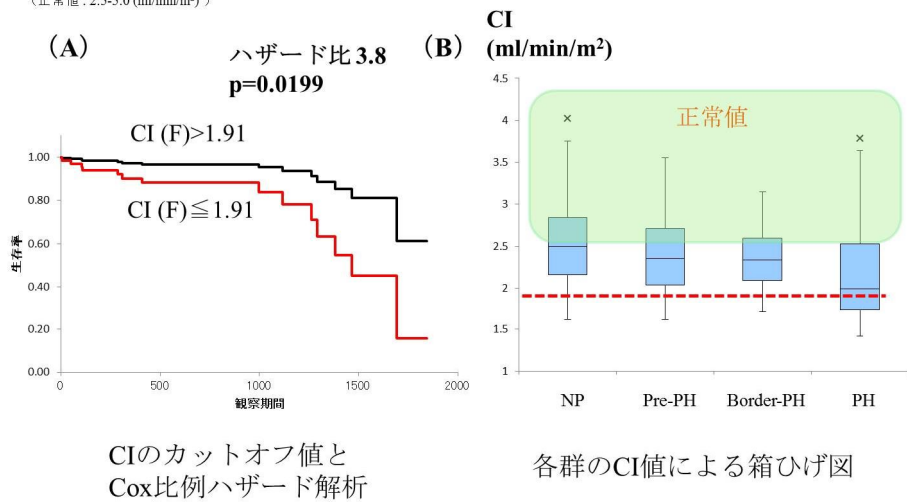


図21. CIのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

StVI : stroke volume index (一回拍出係数)
 = C(心係数)/HR(心拍数) (ml/beats/m²)
 (正常値: 40-70 (ml/beats/m²))

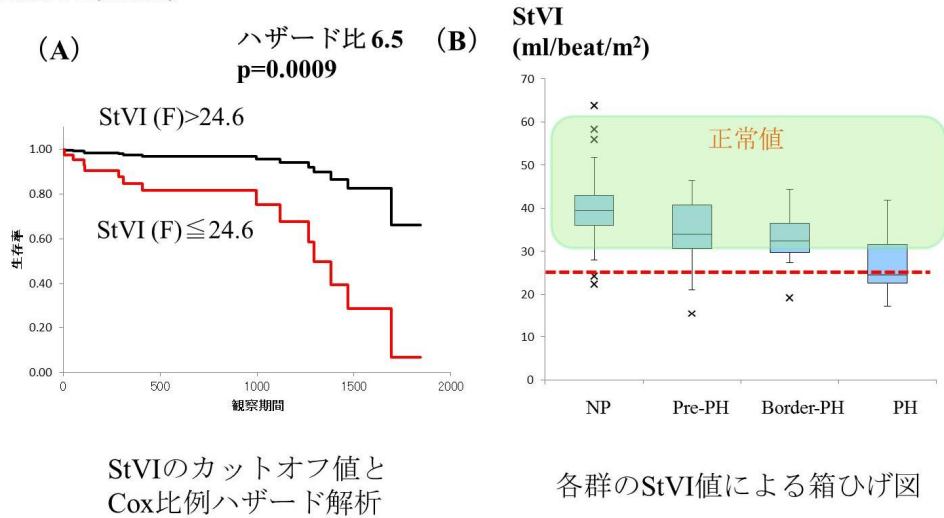


図22. StVIのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

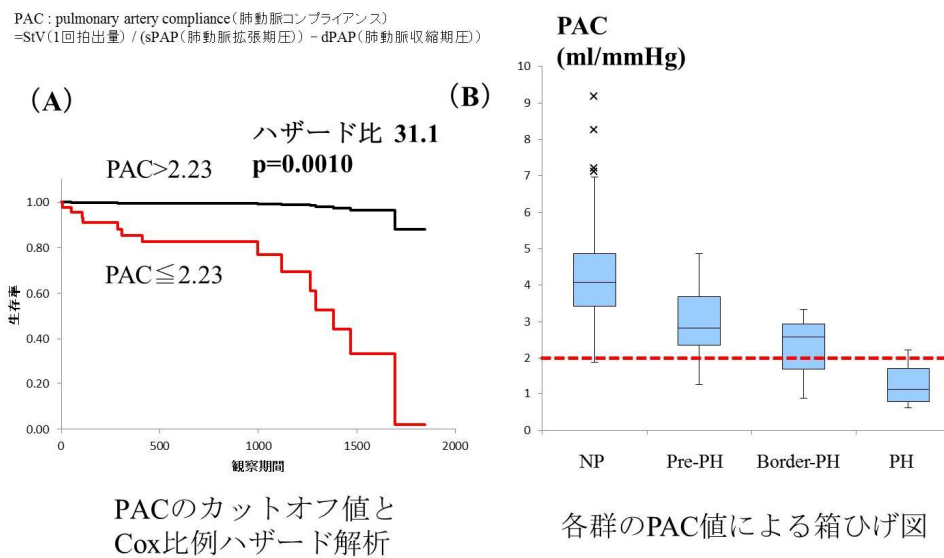
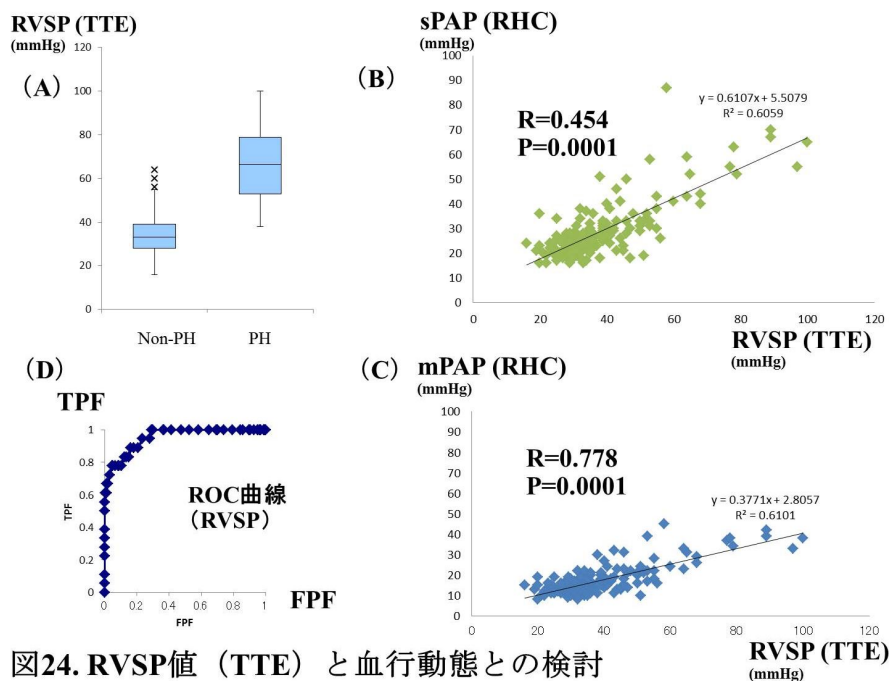
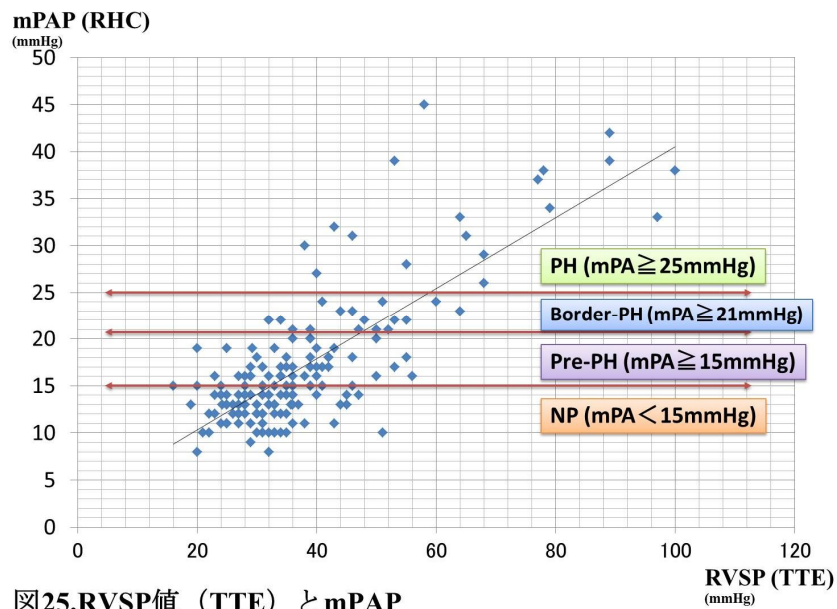


図23. PACのCox比例ハザード解析、各群の箱ひげ図

様々な血行動態パラメータの中で、この指標が最も生命予後から見たハザード比が大きいことが分かった。



(A)にはnon-PH群とPH群とで心エコーによるRVSPの分布の違いを示した。(B)では心エコーによるRVSPと右心カテでのsystolic PAPの関係($r=0.454$, $p=0.0001$)を、(C)では心エコーによるRVSPと右心カテでのmean PAPの関係($r=0.778$, $p=0.0001$)を示した。両者とも有意に相関しているが、mean PAPの方がより強い相関関係にあった。(D)にはROC曲線による心エコーでのRVSP値とPH診断の精度を示した。



横軸に心エコーでのRVSP値を、縦軸に右心カテでのmPAP値を示した。RVSP値が低値でもborder-PHを呈している症例も多く、このような分布を見ながらRVSPのスクリーニング基準を決定する必要がある。

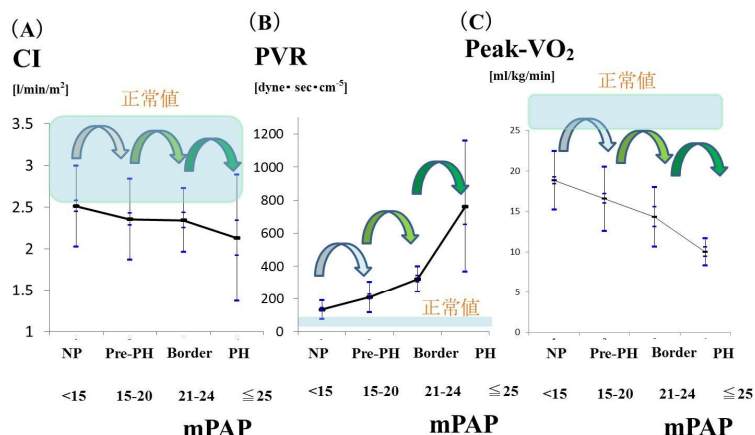


図26.代表的パラメータ (CI、PVR、peak-VO2)と病態の進行

横軸に mPAP による PH の進行を表し、縦軸をそれぞれ (A) CI、(B) PVR、(C) peak-VO2 として、代表的パラメータと PH 進行の関係性を示した。NP 群より CI は正常値下限 PVR は正常値上限であり、peak-VO2 は著明に低値。いずれの指標も PH 病態の進行に応じて段階的に悪化していた。

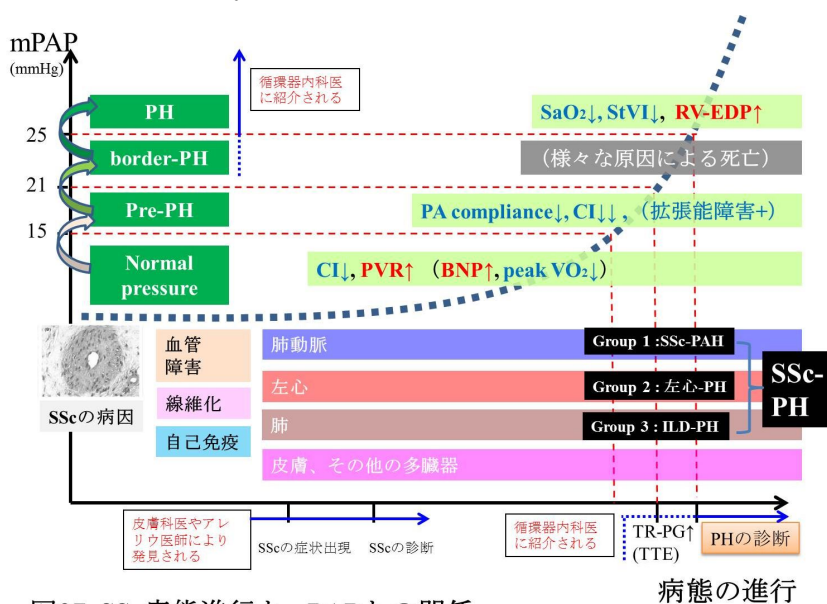


図27. SSc病態進行と mPAP との関係

横軸に病態の進行を、縦軸に mPAP を示して、今回の研究の結果を模式的に示した。SSc の症状が出現し、SSc の診断がついた時点で皮膚科医やアレルギー・リウマチ内科医によりフォローされるが、循環器内科に紹介となるのは心エコーでの RVSP 値が高値になってからである。その段階では、NP 群や pre-PH 群、時には border-PH 群よりも進行が進んだ PH 群になって初めて発見されることが多い。その前の段階で、肺動脈や心機能が様々な程度に障害を受けていることが明らかになった。様々な原因による死亡が起きていること、呼吸機能なども PH の進行に応じて段階的に進んでいることを考え合わせると、SSc 患者では group 1 PAH、group 2 左心疾患による PH、group 3 肺疾患 (特に ILD) による PH などが、様々な割合で混合していると思われる。より早期から多診療科にまたがる包括的なケアが必要であることを示唆している。

全身性強皮症に合併する肺動脈性肺高血圧症の診断時血行動態と長期生命予後の関係に関する研究

研究協力者 **田中住明** 北里大学医学部膠原病・感染内科学 診療准教授
協力者 **松枝 佑** 北里大学医学部膠原病・感染内科学 助教
協力者 **荘 信博** 北里大学医学部膠原病・感染内科学 助教
協力者 **和田達彦** 北里大学医学部膠原病・感染内科学 助教
協力者 **廣畑俊成** 北里大学医学部膠原病・感染内科学 教授

研究要旨

当院で診断治療をした全身性強皮症(SSc)患者で診断時に右心カテーテルを施行し、肺動脈性肺高血圧症(PAH)の基準を満たした54例の右心カテーテルデータを分析した。diastolic PAP-PCWP (mmHg)、PCWP (mmHg)、換気機能障害が生命予後に及ぼす影響をコックス比例ハザード解析で検討し、diastolic PAP - PCWP の死亡ハザード比は1.11 ($p=0.06$)であった。心拍出量と肺血管抵抗および換気機能障害に加え、diastolic PAP - PCWP は強皮症合併 PAH の予後に関連すると推測された。

A. 研究目的

この班研究において、全身性強皮症(SSc: Systemic Sclerosis)に合併するPAHの右心カテーテルデータをほかの膠原病合併PAHと比較する事により、肺動脈楔入圧(PCWP)の高値も長期生存予後の予後不良因子の一つであることを示した。この事は、SScに合併する肺高血圧症では、前毛細血管肺高血圧のみならず後毛細血管性肺高血圧症、すなわち左心室心筋疾患もその病態形成に関与している事を示唆しているのではないかと結論した。その後、第5回WHO World Symposiumにおいて、右心カテーテルデータの新たなパラメータの扱いが提唱された。

本研究では、これまで膠原病合併PAHと診断し治療した症例の右心カテーテルデータを、これらのパラメータで解析し、その特徴を解

析した。

B. 研究方法

1980年から2013年12月までに北里大学病院 膠原病・感染内科にて診断治療をしたSSc合併PAH患者69名のうち、右心カテーテル検査を診断評価された54名を対象とした。PAHの診断は、右心カテーテルデータに基づき、第4回WHO World Symposiumの診断基準にしたがった。診断時における血栓塞栓症の鑑別診断は、肺血流シンチグラム肺動脈の造影CT検査により行われた。右心カテーテルデータおよび換気機能障害の有無の長期生命予後に及ぼす影響を、コックスハザード法を用いて解析した。

本研究は後ろ向き観察研究であり、介入は行わない。本学の倫理委員会で承認を受けて

いる。

C. 研究結果

1. 患者背景

PAH 診断時年齢は、 52 ± 12 歳で、女性が 50 例を占めた。びまん皮膚硬化型が 40 例で、WHO 機能分類は I、II、III、IV 度で、それぞれ 9 例、19 例、18 例、8 例だった。換気機能障害は 25 例に認められ、そのうち 13 例は重度の換気機能障害であった。診断時の右心カテーターデータは、表 1 に示した。

2. 観察経過およびその間の治療

観察期間は 0.3 から 34.6 年であった。その間の死亡数は 20 例であった。PAH の治療戦略は、PAH 治療薬を用いた肺血管拡張療法が一律に取られており、カルシウムチャンネル拮抗薬 16 例、ベラプロスト 38 例、ボセンタン 14 例、アンプリセンタン 1 例、シルデナフィル 10 例、タダラフィル 1 例、エポプロステノール持続静注 2 例で使用された(併用療法あり)。支持療法として、利尿薬は全例も使用され、ワルファリン 24 例、在宅酸素療法は 13 例で施行された。大量ステロイドおよびシクロフォスファミドは 13 例で投与された。

3. 長期生命予後と右心カテーターデータ

生存時間分析により、75%生存期間、中央値および 25%生存期間は、それぞれ 3.1 年、7.6 年、11.4 年であった。

コックスハザード解析により死亡ハザードを求めた。各々を PAH 診断時年齢で調節し、単変量解析にて得た結果を表 2 に示す。心拍出量(CO)の低下および肺血管抵抗(PVR)の増加は予後不良因子である事が確認された。d

PAP(拡張期は肺動脈圧)-PCWP の死亡ハザード比(HR)は 1.100 ($p=0.062$)と、予後に関わる傾向が認められた。また、換気機能障害の存在は 1.92 ($p=0.04$)と予後を規定した。

D. 考案

PAH の長期予後を予測する右心カテーターで得られるパラメータとしては、これまで PVR や CO について報告されている。強皮症に合併する PAH では、それらのパラメータのうち CO が特異性および混合性結合組織病などのほかの膠原病に合併する PAH と比較して低値を取る傾向が報告されている。最近の WHO World Symposium において、dPAP-PCWP(正常上限は 7mmHg)を全毛細血管性肺高血圧症の指標として用いる事提唱した。SSc に合併する PAH を対象とした本件等においても、dPAP-PCWP は 15.9mmHg と高値を示した。SSc に合併する肺高血圧症には PAH の病態、左心疾患に伴う後毛細血管性肺高血圧症の病態、そして間質性肺病変に伴う低酸素血症に伴う病態などが複合的に関与する事が推定されており、本班研究においてもそれを示した。本検討においても換気機能障害の存在が予後増悪因子である事が確認できた。PCWP については、今回の検討では前回報告した結果と比較して PCWP の予後に対する関与は弱く統計的な有意差は顕著ではなかった。この要因には、今回は症例数が少なくモデルのパワーが低かった事、そして PCWP が高値を取りやすい SSc に限った検討であった事などが推測される。

E. 結論

SSc に合併する PAH の治療において、これらのパラメータは役立つものと考えられた。さらに、SSc に合併する肺高血圧症に拡張して応用できるかを検討する必要もある。

F. 文献

1. 田中住明、和田達彦、小川英佑、廣畑俊成. 全身性強皮症に合併した肺動脈性肺高血圧症の血行動態に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 平成 23 年度分担研究報告書 2011.

G. 研究発表

1. 論文発表

田中住明. 我が国における肺高血圧症の最新治療の現状 膠原病性肺高血圧症の標準的治療の現状. Therapeutic Research 2013. 34(9) 1213-1215

田中住明、**荘 信博**. 【肺高血圧症の最新治療戦略】膠原病に伴う肺高血圧症 治療の開始時期とゴール. Circulation 3(10) 2013, 44-52

田中住明. 【リウマチ・膠原病における重要臓器障害と難治性病態-病態と治療の進歩】トピックス 難治性の病態 肺高血圧症. 日本内科学会雑誌 2013. 102(8) 2613-2620

Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, Inoue K, Ishikawa O, Kawaguchi Y, Kuwana M, Muro Y, Ogawa F, Sasaki T, Takahashi H, **Tanaka S**,

Takehara K, Sato S. Serum chemokine levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicenter, prospective, observational study. Mod Rheumatol. 2013. 23(6):1076-1084

2. 学会発表

田中住明. 長期治療成績から考察する膠原病性肺動脈性肺高血圧症の治療戦略. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 22 回国際リウマチシンポジウム 2013. 4 (京都) (同抄録集 711)

田中住明. 膠原病性肺高血圧症治療における免疫抑制薬・肺動脈性肺高血圧症治療薬の使用のポイント. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 22 回国際リウマチシンポジウム 2013. 4 (京都) (同抄録集 724)

田中住明, 小川英佑, 和田達彦, 永井立夫, 廣畑俊成. シンポジウム 1 膠原病関連 PAH の治療戦略「膠原病関連 PAH の治療戦略」についての現状. 第 2 回日本肺循環学会学術総会 2013. 6 (東京)

田中住明, 松枝祐, 荘信博, 原亮祐, 和田達彦, 廣畑俊成. シンポジウム 3 膠原病に伴う肺高血圧症の特殊性と最新知見「肺高血圧症臨床分類における膠原病合併肺高血圧症の特殊性」第 1 回日本肺高血圧症学会学術総会 2013. 10 (横浜)

Tanaka S, Arinuma Y, Wada T, Nagai T, Okada J and Hirohata S. Left Ventricular Dysfunction Reflected By Higher Serum Brain Natriuretic Peptide

Accounts For Poorer Prognosis of
Pulmonary Arterial Hypertension
Associated with Systemic Sclerosis.
77th ACR/ARHP Annual Scientific
Meeting 2013.10(San Diego)

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 特記事項
なし

表1. PAH診断時の右心カテーテル検査結果(n=54)

項目	値
CO (L/min)	4.71 ± 1.54
mPAP (mmHg)	33.66 ± 9.14
sPAP	55.67 ± 14.81
dPAP	21.51 ± 7.30
PCWP	7.82 ± 4.19
mPAP-PCWP	28.13 ± 10.03
dPAP-PCWP	15.92 ± 8.18
PVR (mmHg・L ⁻¹ ・min)	7.17 ± 3.89

表2. 死亡ハザード比の単変量解析

要因	死亡HR	95%CI	p
CO (L/min)	0.384	0.450 - 0.960	0.026
mPAP (mmHg)	1.025	0.972 - 1.080	0.357
PCWP	1.091	0.899 - 1.308	0.365
dPAP-PCWP	1.100	0.986 - 1.234	0.062
PVR (mmHg・L ⁻¹ ・min)	1.157	1.022 - 1.302	0.023
換気機能障害	1.926	1.031 - 3.706	0.040

リウマチ膠原病外来受診例における肺動脈性肺高血圧症（PAH） リスク因子の評価

研究分担者 **桑名正隆** 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
協力者 **白井悠一郎** 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 特任助教
協力者 **安岡秀剛** 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 助教
協力者 **増井健一** 防衛医科大学麻酔科 講師

研究要旨

全身性強皮症（SSc）をはじめとした膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症（PAH）は予後不良の難治性病態で、定期的スクリーニングによる早期発見・治療の重要性が強調されている。しかし、全ての膠原病患者でスクリーニングを実施することは現実的に困難なため、PAH リスクに応じた対応が望まれる。そこで、リウマチ性疾患が疑われる例を対象とした自己抗体データベースを用いて PAH リスクの層別化を試みた。6,162 例を対象として臨床診断、レイノー現象、PAH、自己抗体を履歴的に調べ、多重ロジスティック回帰分析により PAH リスクを説明する独立因子を求めた。71 例（1.2%）が経過中に PAH と診断され、基礎疾患は SSc27 例、混合性結合組織病（MCTD）17 例、全身性エリテマトーデス（SLE）16 例、原発性シェーグレン症候群（pSS）7 例、関節リウマチ 3 例、皮膚筋炎 1 例であった。自己抗体では抗 SSA 抗体が 51%と最も高率で、抗 U1RNP 抗体が 44%、抗セントロメア抗体 34%に検出された。多変量解析では、PAH リスクの説明変数として抗セントロメア抗体陽性 SSc、MCTD、抗 U1RNP 抗体陽性 SLE、抗セントロメア抗体陰性 SSc、抗 SSA 抗体陽性の SSc、MCTD、SLE 以外のリウマチ性疾患、抗 U1RNP 抗体陰性 SLE の 6 項目が抽出され、これら項目で PAH の 99%を説明可能であった。以上より、PAH リスクの高い SSc、特に抗セントロメア抗体陽性例と MCTD は毎年のスクリーニングを実施すべきであることが確認された。今後、PAH リスクに基づいた効率よい PAH スクリーニングプログラムの作成が望まれる。

A. 研究目的

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は全身性強皮症（SSc）をはじめとした膠原病における難治性病態の一つである。近年、複数の肺血管拡張薬が使用可能になり、運動耐容能や血行動態の改善、生命予後の延長効果が得られている。しかし、膠原病に伴う PAH は特発性 PAH と比べると予後改善効果が限定的なことが報告され、さらなる予後改善のためには早期発見、

治療介入の重要性が指摘されている。膠原病患者の多くはすでに医療機関に通院中である利点を生かし、心エコーを用いた積極的な PAH スクリーニングが推奨されている。欧州心臓病学会（ESC）/欧州呼吸器学会（ERS）のガイドラインによると、SSc では自覚症状の有無に関わらず年 1 回の定期的なスクリーニングが推奨されている。また、多施設前向きコホート（DETECT）の結果から、罹病期間 3 年以

上かつ DLCO60%未満の SSc を対象とした臨床所見、心電図、肺機能検査、血中 NT-proBNP を組み合わせたスクリーニングアルゴリズムが提唱されている [1]

わが国では膠原病に伴う PAH の基礎疾患として SSc だけでなく、混合性結合組織病 (MCTD)、全身性エリテマトーデス (SLE) の頻度が高いことが示されている [2]。また、原発性シェーグレン症候群 (pSS) や関節リウマチ (RA) も頻度は少ないながらも PAH を発症する。これら全ての膠原病患者で心エコーや肺機能検査などのスクリーニングを毎年実施することは現実的に困難で、医療経済的にも大きな負担になる。そこで、膠原病患者における PAH リスクを層別化することで、リスクに応じたスクリーニングプログラムの作成が急務である。

膠原病診療では自己抗体の検出が診断、病型分類、予後の予測に有用である。これまで PAH との関連が報告されている自己抗体として抗セントロメア抗体 [3]、抗 U1RNP 抗体 [4]、抗 Th/To 抗体 [5]、抗 U3RNP 抗体 [6] が知られている。そこで、診断や自己抗体など一般診療で簡単に入手できる情報を用いて PAH リスク評価ができれば、効率よいスクリーニングプログラムの作成に寄与するはずである。我々の施設では、これまで長年に渡って膠原病を含めたリウマチ性疾患が疑われる症例の詳細な自己抗体解析を行ってきた。本年度は、そのデータベースを用いて PAH リスクの層別化を試みた。

B. 研究方法

1. 対象

1996 年から 2008 年に慶應義塾大学リウマチ内科研究室にリウマチ性疾患が疑われて自己抗体検査の依頼のあった 11,987 血清の当該患者のうち、(1)観察期間が 3 年以上、(2)臨床診断を含めた詳細な臨床情報が入手可能、(3)特発性/遺伝性 PAH の除外、の 3 項目を全て満たした 6,162 例を対象とした。

2. 臨床情報

全例で診療録をもとに最終的な臨床診断、レイノー現象と PAH の有無を履歴的に調べた。臨床診断の分類/診断基準への合致率は RA [7] で 96%、SLE [8] で 99%、SSc [9] で 90%、PM/DM [10] で 85%、MCTD [11] で 100%、pSS [12] で 76%であった。2012 年 12 月の時点の臨床情報を収集した。

PAH は、(1)右心カテーテル検査で安静時平均肺動脈圧 25mmHg 以上かつ肺動脈楔入圧 15mmHg 以下、(2)努力肺活量 70%以上、(3)換気血流シンチグラムで区域に一致した欠損像がない、の 3 項目を全て満たした例とした [13]

3. 自己抗体検査

全例で RNA 免疫沈降法、間接蛍光抗体法、二重免疫拡散法を行い、特異自己抗体を同定した。自己抗体として U1RNP、Sm、SSA、SSB、U3RNP、Th/To、SRP、アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS)、高分子量スミア、リボソーム、セントロメア、トポイソメラーゼ /ScI-70 を記録した。

3. 統計学的解析

各臨床所見の有無で 2 群にわけ、PAH の頻

度をカイ二乗検定で比較した。さらに、単変量解析で統計学的に有意差のあった項目を組み合わせた多重ロジスティック回帰分析を行い、PAH リスクを説明する独立因子を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究は学内倫理委員会で承認済みで、患者本人に対して研究内容を説明し、文書による同意を取った。

C. 研究結果

対象とした 6,162 例の基礎疾患を表 1 に示す。RA の 1,974 例が最も多く、次いで pSS、SLE、SSc の順であった。リウマチ性疾患疑い例を対象としているため、最終診断がベーチェット病、自己免疫性肝炎/原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、臓器特異的自己免疫疾患、その他膠原病以外の各種リウマチ性疾患も含まれていた。また、間質性肺疾患、レイノー現象、抗核抗体陽性のみで、最終観察時点で診断を確定できない例もそれぞれ 107 例、177 例、332 例含まれていた。全例における平均観察期間は 7.6 年 (標準偏差 5.6 年) であった。

6,162 例中 71 例 (1.2%) が経過中に PAH と診断された。基礎疾患は SSc が 27 例、MCTD が 17 例、SLE が 16 例、pSS が 7 例、RA が 3 例、DM が 1 例であった。各疾患別の PAH 発症率を図 1 に示す。MCTD が 9.0% で最も高く、次いで SSc が 6.1%、SLE が 2.0% であった。PAH71 例における自己抗体の頻度を調べると、抗 SSA 抗体が 51% と最も高率で、抗 U1RNP 抗体が 44%、抗セントロメア抗体 34% であった。単変量解析で PAH と関連する臨床所見を調べると、女

性 ($P < 0.0001$ 、オッズ比 8.0)、レイノー現象 ($P < 0.0001$ 、オッズ比 10.5)、MCTD ($P < 0.0001$ 、オッズ比 10.8)、SSc ($P < 0.0001$ 、オッズ比 8.4)、SLE ($P = 0.01$ 、オッズ比 2.0)、抗セントロメア抗体 ($P < 0.0001$ 、オッズ比 10.7)、抗 U1RNP 抗体 ($P < 0.0001$ 、オッズ比 6.6)、抗 Sm 抗体 ($P < 0.0001$ 、オッズ比 5.2)、抗 SSA 抗体 ($P < 0.0001$ 、オッズ比 4.5)、抗 SSB 抗体 ($P < 0.0001$ 、オッズ比 4.8)、抗 Th/To 抗体 ($P = 0.005$ 、オッズ比 4.9) が抽出された。一方、RA は PAH と負の相関を示した ($P < 0.0001$ 、オッズ比 0.09)。

単変量解析で得られた臨床所見を説明変数として PAH リスクを説明する独立因子を多重ロジスティック回帰分析により検索した。MCTD と抗 U1RNP 抗体、抗 SSA 抗体と抗 SSB 抗体などお互いに関連する臨床所見を含むことから、臨床診断と自己抗体を組み合わせることで診療に活用しやすい独立因子の組み合わせを検討した。その結果、PAH リスクの説明変数として抗セントロメア抗体陽性 SSc、MCTD、抗 U1RNP 抗体陽性 SLE、抗セントロメア抗体陰性 SSc、抗 SSA 抗体陽性の SSc、MCTD、SLE 以外のリウマチ性疾患、抗 U1RNP 抗体陰性 SLE の 6 項目が抽出された (図 2)。これら 6 項目で PAH を発症した 71 例のうち 70 例の説明が可能であった。

今回の検討では、PAH を発症した例は膠原病の確定診断例に限られたので、RA、pSS、SLE、SSc、PM/DM、MCTD、オーバーラップ症候群 4,678 例に限定した解析も行った。その結果は全例を対象とした解析と同じで、抗セントロメア抗体陽性 SSc (オッズ比 379)、MCTD (オッズ

比261) 抗U1RNP抗体陽性SLE(オッズ比98)、抗セントロメア抗体陰性SSc(オッズ比67)、抗SSA抗体陽性のSSc、MCTD、SLE以外(オッズ比42)、抗U1RNP抗体陰性SLE(オッズ比28)の6項目でPAHリスクの説明が可能であった。

D. 考案

膠原病に伴うPAHのさらなる予後改善にスクリーニングが有用とされる。しかし、膠原病患者におけるPAHの併発頻度は決して高くなく、今回の検討でもリウマチ性疾患が疑われた症例のわずか1.2%、膠原病の確定診断例に限っても1.5%に過ぎなかった。そのため、PAHスクリーニングを全ての膠原病患者で繰り返し実施することは現実的でなく、費用対効果や患者への侵襲度を考慮すると、その有用性について懸念を示さざるを得ない。欧米では膠原病に伴うPAHの基礎疾患として70%以上を占めるSScに限定したスクリーニングを推奨しているのが現状である[1]

今回の検討でも、日本人におけるPAHの基礎疾患は既報と同様にSSc、MCTD、SLEの3疾患であった[2]。この点はSScが大半を占める欧米と大きく異なり、日本独自のスクリーニングプログラムの立ち上げが必要で、対象をSScだけでなくMCTDやSLEにも広げることが求められる。ただし、今回の検討では膠原病以外のリウマチ性疾患や自己免疫疾患、間質性肺疾患、レイノー現象、抗核抗体陽性のみで診断確定に至らない例でのPAH発症はなく、膠原病確定診断例のみをスクリーニング対象とすることが妥当である。

今回、診断と自己抗体を組み合わせることによって膠原病の中でPAHリスクの高い6つのサブセットを同定することができた。最もリスクが高いサブセットは抗セントロメア抗体陽性SScで、次いでMCTDの順であった。SScの中でも、抗セントロメア抗体の有無で層別化することによりPAHリスクが5.6倍異なるサブセットに分類することができた。また、SLEでは抗U1RNP抗体の有無によりPAHリスクが3.5倍異なっていた。興味深いことに、SSc、MCTD、SLE以外でPAHを発症したpSS、RA、DM11例のうち10例で抗SSA抗体が検出され、SSc、MCTD、SLE以外のPAHリスク因子として抽出された。

今回の結果から、PAHリスクに基づいたスクリーニングの優先度が示された。SSc、特に抗セントロメア抗体陽性例とMCTDはPAHリスクが高く、積極的に毎年のスクリーニングを行うべきである。SLEでは抗U1RNP抗体陽性例は可能な範囲で定期的なスクリーニングの実施が好ましいが、抗U1RNP抗体陰性例では診断時、活動性上昇時、息切れを自覚した際のスクリーニングで十分かもしれない。このようなリスク層別化による効率よいPAHスクリーニングプログラムの作成が望まれるが、多施設前向き研究での検証が必要である。

E. 結論

リウマチ性疾患が疑われた症例では、診断と自己抗体を組み合わせることによってPAHリスクの層別化が可能であった。PAHリスクの高い抗セントロメア抗体陽性SScとMCTDでは毎年のスクリーニングを実施すべきだが、それ以

外では PAH リスクに基づいたスクリーニングの適応や間隔の調整が可能である。

F. 文 献

1. Coghlan JG, Denton CP, Grünig E, Bonderman D, Distler O, Khanna D, et al.: Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis*. In press.
2. Shirai Y, Yasuoka H, Okano Y, Takeuchi T, Satoh T, Kuwana M: Clinical characteristics and survival of Japanese patients with connective tissue disease and pulmonary arterial hypertension: a single-center cohort. *Rheumatology (Oxford)*. 2012; 51: 1846-54.
3. Fischer A, Bull TM, Steen VD: Practical approach to screening for scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012; 64: 303-10.
4. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M: Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1994; 37: 75-83.
5. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA Jr: A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum*. 2003; 48: 203-9.
6. Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, Oddis CV, Medsger TA Jr: Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 1112-8.
7. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31: 315-24.
8. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982; 25: 1271-7.
9. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1980; 23: 581-90.
10. Bohan A, Peter JB: Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1975; 292: 344-7.
11. Kasukawa R, Tojo T, Miyawaki S: Preliminary diagnostic criteria for classification of mixed connective tissue disease. In: Kasukawa R, Sharp GC,

editors. Mixed connective tissue disease and antinuclear antibodies. Amsterdam; Elsevier, 1987, p. 41-7.

12. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al.: Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 554-8.
13. Hoyer MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, et al.: Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62: D42-50.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda A, Yasuoka H, Satoh T, Okazaki Y, Yamaguchi Y, Kuwana M: Versican is upregulated in circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and amplifies a CCL2-mediated pathogenic loop. *Arthritis Res Ther*. 2013; 15(4): R74.
2. Kuwana M, Watanabe H, Matsuoka N, Sugiyama N: Pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease: meta-analysis of clinical trials. *BMJ Open*. 2013; 3: e003113.
3. Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Satoh T, Kuwana M: Intravenous epoprostenol treatment of patients with connective tissue disease and pulmonary arterial

hypertension at a single center. *Mod Rheumatol*. 2013; 23(6): 1211-20.

4. Kaji K, Noreen F, Medsger TA Jr, Satoh T, Hoshino K, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Lucas M, Schnure A, Ogawa F, Sato S, Takehara K, Fujimoto M, Kuwana M: Autoantibodies to RuvBL1 and RuvBL2: a novel systemic sclerosis-related antibody associated with diffuse cutaneous and skeletal muscle involvement. *Arthritis Care Res*. In press.
5. Kuwana M, Okazaki Y: Impaired in vivo neovascularization capacity of endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. In press.

2. 学会発表

1. 桑名正隆: SScの新規治療. 第57回日本リウマチ学会総会(京都). 2013. 4.
2. 桑名正隆: 全身性強皮症の早期診断と治療. 第57回日本リウマチ学会総会(京都). 2013. 4.
3. 桑名正隆: 膠原病におけるPH診療の現状と問題点. 第1回日本肺高血圧学会学術集会(東京). 2013. 10.
4. 桑名正隆: 膠原病性肺高血圧症治療の実践. 第1回日本肺高血圧学会学術集会(東京). 2013. 10.
5. Kuwana M, Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Masui K: Utility of autoantibody testing for predicting risk of pulmonary arterial hypertension: a retrospective analysis in routine autoantibody laboratory. The 77th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Diego). 2013. 10.
6. 桑名正隆: 強皮症の難治性病態とその対

策. 第 24 回日本リウマチ学会関東支部学
術集会 (東京). 2013. 12.

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

表 1. 対象症例の臨床診断

臨床診断名	症例数 (%)
関節リウマチ (RA)	1,974 (32.0%)
原発性シェーグレン症候群 (pSS)	841 (13.6%)
全身性エリテマトーデス (SLE)	785 (12.7%)
強皮症 (SSc)	440 (7.1%)
多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM)	313 (5.1%)
混合性結合組織病 (MCTD)	189 (3.1%)
血管炎症候群	116 (1.9%)
オーバーラップ症候群	20 (0.3%)
未分類結合組織疾患 (UCTD)	9 (0.1%)
ベーチェット病	142 (2.3%)
原発性抗リン脂質抗体症候群 (PAPS)	93 (1.5%)
自己免疫性肝炎/原発性胆汁性肝硬変 (AIH/PBC)	110 (1.8%)
炎症性腸疾患 (IBD)	36 (0.6%)
臓器特異的自己免疫疾患 (ITP、AIHA、MG、MS、NMO など)	71 (1.2%)
上記以外のリウマチ性疾患 (PMR、AOSD、AS、PsA、痛風、SAPHO など)	274 (4.4%)
他の疾患 (アミロイドーシス、AA、パージャナー病、CVID、ALS など)	133 (2.2%)
間質性肺疾患のみ	107 (1.7%)
レイノー現象のみ	177 (2.9%)
抗核抗体陽性	332 (5.4%)

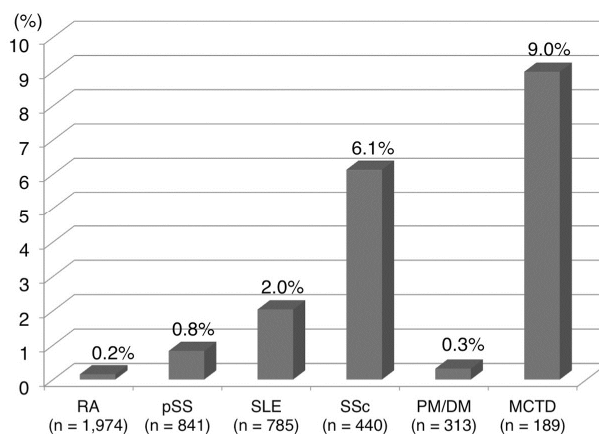


図 1. 疾患別の PAH の頻度

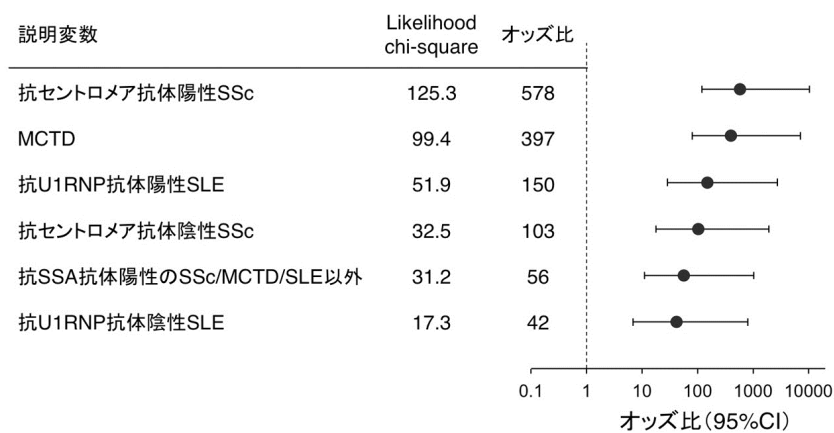


図 2. 全例 (6,162 例) を対象とした PAH リスクを説明する独立因子。

多重ロジスティック回帰分析を用いて PAH と関連する独立因子を同定した。6 つの説明変数で PAH71 例中 70 例を説明できた。

びまん皮膚硬化型全身性強皮症と *IRF2* 多型の関連

研究協力者	土屋尚之	筑波大学医学医療系分子遺伝疫学 教授
協力者	川崎 綾	筑波大学医学医療系分子遺伝疫学 特任助教
研究協力者	長谷川稔	福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学 教授
研究分担者	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
協力者	古川 宏	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長
協力者	菅間重人	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 部長
協力者	住田孝之	筑波大学医学医療系内科 (膠原病・リウマチ・アレルギー) 教授
研究代表者	佐藤伸一	東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
協力者	竹原和彦	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授

研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)を始めとする各種膠原病におけるトランスクリプトーム解析により、type I interferon (IFN) signature が注目されている。さらに、type I IFN 経路に関連する *IRF5*、*STAT4* などの遺伝子多型は、SLE、関節リウマチ(RA)、全身性強皮症(SSc)を始めとする複数の免疫疾患における主要な疾患感受性遺伝子として確立している。われわれは最近、type I IFN 経路において抑制的に、一方、Th1 誘導に対しては促進的に機能すると報告されている interferon regulatory factor 2 (*IRF2*)遺伝子多型と SLE との関連を見いだした。本研究では、SLE と関連する *IRF2* 多型と SSc との関連を検討した。SLE と同じリスクアレルが、びまん皮膚硬化型(dc)SSc 群、抗 topoisomerase 1 抗体陽性群、間質性肺疾患合併群において有意に関連することが見いだされた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)を始めとする各種膠原病におけるトランスクリプトーム解析において、type I interferon (IFN) に誘導される遺伝子群の発現亢進、すなわち type I IFN signature が注目されている。全身性強皮症(SSc)においても、末梢血を用いたトランスクリプトーム解析において、type I IFN signature が報告されている[1,2]。一方、肺線維症を合併した SSc の肺由来線維芽

細胞では、逆に IFN 誘導遺伝子群が強く抑制されていたとの報告もある[3]。このことから、SSc における遺伝子発現プロファイルは、臨床病型別、組織別に、さらなる詳細な検討を要すると考えられる。

一方、ゲノム多型解析では、type I IFN 経路に関連し、SLE や RA における主要な疾患感受性遺伝子である *IRF5*、*STAT4* などの遺伝子多型が、SSc とも関連することが、われわれを含む複数の研究者により、確立している

[4,5]。

Interferon regulatory factor (IRF)遺伝子群は、type I IFNあるいはIFN誘導遺伝子群の発現誘導に關与する転写因子であり、*IRF5*をはじめ、*IRF7*、*IRF8*多型と膠原病との關連が報告されている。IRFファミリーのなかで、*IRF2*は、type I IFN経路において抑制的に機能する[6]。一方、Th1誘導に対しては促進的に機能すると報告されている[7]。*IRF2*多型は、アトピー性皮膚炎等との關連の報告は見られるものの[8,9]、膠原病との關連研究の報告はない。われわれは最近、系統的な候補遺伝子解析により、*IRF2*多型とSLEとの關連を見いだした[10]。本研究では、膠原病の遺伝的背景の共通性を考慮し、SScと*IRF2*多型との關連を検討した。

B. 研究方法

金沢大学皮膚科、国立病院機構相模原病院通院中のSSc患者267例と、金沢大学、筑波大学、国立病院機構相模原病院にて研究参加の同意を得た健常者およびヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲を受けた健常者DNAあわせて842例を対象に、SLEにおいて關連が検出された*IRF2*のイントロンに位置し、互いに連鎖不平衡にある一塩基多型(SNP)rs66801661、rs62339994の遺伝子型をTaqMan SNP genotyping assayにより決定し、關連研究を施行した。有意水準は0.05とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、筑波大学、金沢大学、国立病院機構相模原病院における倫理委員会において審

議され、承認を受けた研究計画に従い、遺伝子解析に關する参加者のインフォームドコンセントを得、匿名化した試料を用いて施行されたため、研究の施行に倫理面の問題はないと判断された。

C. 研究結果

關連研究の結果を表1、表2に示す。rs66801661においては、dcSSc群(アリルモデルP=0.020、オッズ比[OR] 1.74、95%信頼区間[CI] 1.09-2.78)、抗topoisomerase 1抗体陽性群(P=0.0022、OR 2.21、95%CI 1.33-3.68)、間質性肺炎陽性群(P=0.012、OR 1.82、95%CI 1.14-2.91)において有意な關連が検出された(表1)。

また、rs62339994においては、抗topoisomerase 1抗体陽性群(P=0.0045、OR 1.89、95%CI 1.22-2.94)、間質性肺炎陽性群(P=0.010、OR 1.67、95%CI 1.13-2.46)において有意差に到達した。いずれのリスクアリルも、SLEにおけるリスクアリルと同じであった。

D. 考案

本研究により、われわれがSLEとの關連を見いだした*IRF2*のリスクアリルが、SScの疾患感受性とも關連することが示唆された。

rs66801661、rs62339994は、*IRF2*遺伝子領域より選択した46個所tag SNPを用いたSLEとの關連研究により、最も強い關連を見いだしたrs13146124の周辺を次世代シーケンサーを用いたリシーケンズ解析することにより、機能的影響が想定されるSLE關連SNP

として見いだされた多型部位である[10]。われわれはさらに、互いに連鎖不平衡にあるこれら2個所のSNPにより構成されるハプロタイプがIRF2転写活性に関連し、リスクハプロタイプはIRF2の発現上昇に関連することを示唆する知見を得ている[10]。

IRF2はtype I IFN産生に抑制的に、Th1分化に促進的に作用すると報告されている[5,6]。今回、dcSSc、抗topoisomerase 1抗体陽性群、間質性肺炎合併群においてIRF2発現亢進と関連するアリルに有意な関連が検出されたことは、皮膚硬化や肺線維症にtype I IFNが抑制的に、あるいはTh1が促進的に寄与している可能性を示唆する。この知見は、SLEやSScの末梢血トランスクリプトーム解析においてtype I IFN signatureが報告されていることと一見矛盾するものである。すべてのSLEやSScにおいてtype I IFN signatureが見られるわけではなく、type I IFN signature陰性の患者群において、*IRF2*多型が寄与している可能性も考えられる。一方、肺線維症合併SScから単離した線維芽細胞のトランスクリプトーム解析において、顕著なIFN誘導遺伝子群の発現低下が見られることも報告されており[3]、今回の研究成果は、これと整合性を持つ知見である。今後、臨床病型にわたるさらなる解析や、組織特異的な多型の影響の解析が必要と考えられる。

また、今回、*IRF2*多型とSScとの関連を示唆する知見が得られたのは、国内外を通じて初の成果であることから、現在、replication studyを進めている。

E. 結 論

SLEと関連する*IRF2*イントロン1領域のSNPが、dcSSc、topoisomerase I陽性群、肺線維症合併SSc群において有意な関連を示すことが見いだされた。

F. 文 献

1. Tan FK, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotropism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology* 2006;45:694-702.
2. Higgs BW, et al., Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 2029-2036.
3. Lindahl GE, et al., Microarray profiling reveals suppressed interferon stimulated gene program in fibroblasts from scleroderma-associated interstitial lung disease. *Resp Res* 2013; 14: 80
4. Ito I, et al. Association of a functional polymorphism in the *IRF5* region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2009;60:1845-1850.
5. Tsuchiya N, et al. Association of *STAT4* polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis*

- 2009; 68: 1375-1376.
6. Savitsky D, et al. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol Immunother* 2010, 59:489-510.
 7. Lohoff M, Mak TW. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005, 5:125-135.
 8. Gao PS, et al. Genetic variants in interferon regulatory factor 2 (IRF2) are associated with atopic dermatitis and eczema herpeticum. *J Invest Dermatol* 2012, 132:650-657.
 9. Nishio Y, et al. Mutation and association analysis of the interferon regulatory factor 2 gene (IRF2) with atopic dermatitis. *J Hum Genet* 2001;46:664-667.
 10. Kawasaki A, et al. Association of functional polymorphisms in *IRF2* with systemic lupus erythematosus In a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2013; 65, S65-S67.
- positive vasculitis in a Japanese population. *Genes Immun* 2013; 14, 527- 529.
2. Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T. *PLD4* as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2013;65(2):472-480.

2. 学会発表

1. Kawasaki A, Furukawa H, Nishida N, Warabi E, Kondo Y, Ito S, Matsumoto I, Kusaoi M, Suda A, Nagaoka S, Setoguchi K, Nagai T, Hirohata S, Tokunaga K, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tohma S, Tsuchiya N. Association of functional polymorphisms In *IRF2* with systemic lupus erythematosus (SLE) In a Japanese Population. 2013 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Oct 26-30, 2013, San Diego, USA.
2. 川崎綾、古川宏、西田奈央、蕨栄治、近藤裕也、伊藤聡、松本功、草生真規雄、須田昭子、長岡章平、瀬戸口京吾、永井立夫、廣畑俊成、徳永勝士、高崎芳成、橋本博史、住田孝之、當間重人、土屋尚之：*IRF2* 機能的多型と全身性エリテマトーデスの関連。第58回日本人類遺伝学会、平成25年11月20日～23日、仙台。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawasaki A, Inoue N, Ajimi C, Sada K, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Sumida T, Tohma S, Miyasaka N, Matsuo S, Ozaki S, Hashimoto H, Makino H, Harigai M, Tsuchiya N. Association of *IRF5* polymorphism with MPO-ANCA

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 *IRF2* rs66801661 と全身性強皮症の関連

	遺伝子型頻度 (%)			Total	リスクア リル頻度	アリルモデル	
	G/G	A/G	A/A			OR (95% CI)	P
SSc	221 (82.8)	44 (16.5)	2 (0.7)	267	9.0	1.32 (0.93-1.88)	0.117
dcSSc	78 (78.0)	21 (21.0)	1 (1.0)	100	11.5	1.74 (1.09-2.78)	0.020
lcSSc	139 (85.3)	23 (14.1)	1 (0.6)	163	7.7	1.11 (0.71-1.74)	0.64
ATA+	48 (71.6)	19 (28.4)	0 (0)	67	14.2	2.21 (1.33-3.68)	0.0022
ACA+	109 (86.5)	16 (12.7)	1 (0.8)	126	7.1	1.03 (0.62-1.72)	0.41
ILD	73 (76.0)	23 (24.0)	0 (0.0)	96	12.0	1.82 (1.14-2.91)	0.012
健常対照群	727 (86.3)	113 (13.4)	2 (0.2)	842	6.9	referent	

OR: オッズ比、CI: 信頼区間、ATA: 抗 topoisomerase I 抗体、ACA: 抗 centromere 抗体、ILD: 間質性肺障害

表2 *IRF2* rs62339994 と全身性強皮症の関連

	遺伝子型頻度(%)			Total	リスクア リル頻度	アリルモデル	
	G/G	A/G	A/A			OR (95% CI)	P
SSc	198 (74.2)	66 (24.7)	3 (1.1)	267	13.5	1.17 (0.88-1.56)	0.288
dcSSc	69 (69.0)	29 (29.0)	2 (2.0)	100	16.5	1.48 (0.99-2.21)	0.053
lcSSc	125 (76.7)	37 (22.7)	1 (0.6)	163	12.0	1.02 (0.71-1.47)	0.916
ATA+	42 (62.7)	23 (34.3)	2 (3.0)	67	20.1	1.89 (1.22-2.94)	0.0045
ACA+	100 (79.4)	25 (19.8)	1 (0.8)	126	10.9	0.90 (0.59-1.03)	0.630
ILD	63 (65.6)	31 (32.3)	2 (2.1)	96	18.2	1.67 (1.13-2.48)	0.010
健常対照群	658 (78.1)	170 (20.2)	14 (1.7)	842	11.8	referent	

OR: オッズ比、CI: 信頼区間、ATA: 抗 topoisomerase I 抗体、ACA: 抗 centromere 抗体、ILD: 間質性肺障害

指尖部皮膚潰瘍を生じた全身性強皮症のまとめ

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 **土岐清香** 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 助教
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

指尖部皮膚潰瘍を生じた強皮症の臨床的特徴、心疾患や脂質異常、動脈硬化との関連性について検討した。2006年から現在までに当科通院加療中の全身性強皮症患者(254例)を対象に、指尖部皮膚潰瘍を生じた症例(45例)について検討した。指尖部皮膚潰瘍を伴う全身性強皮症患者は、潰瘍のない強皮症患者と比べて、男性の割合が高い、diffuse cutaneous typeが多い、皮膚硬化が強い、抗トポイソメラーゼⅠ抗体陽性例が多いという特徴があった。また、間質性肺炎合併例が多くみられるという特徴もみられた。これらの結果は、欧米で行われたいくつかの同様の研究結果と一致した。また、心病変との関連性についても検討したところ、指尖部皮膚潰瘍を伴う強皮症では、肺高血圧症以外の心疾患を有する症例が多く、BNP値が高かった。しかし、指尖部皮膚潰瘍の有無で患者群を分けて比較したが、脂質異常症、頸動脈病変(動脈硬化、狭窄)といったアテローム性動脈硬化との関連性はみられなかった。

A. 研究目的

全身性強皮症は、皮膚および内蔵臓器の線維化、血管障害、免疫異常を特徴とする全身性疾患であり、これら3つの病態が複雑に関連して様々な症状を呈する。手指や足趾は、皮膚線維化や末梢血流低下による循環障害を来しやすい、軽微な外傷によって皮膚潰瘍を生じる。強皮症にともなう指尖部皮膚潰瘍は、難治な症例が多く、細菌感染を起こした場合には、潰瘍が拡大し骨髄炎や関節炎を伴い、指趾切断に至る可能性もある[1]。今回、指尖部皮膚潰瘍を生じた強皮症の臨床的特徴、心疾患や脂質異常、動脈硬化との関連性について検討した。

B. 研究方法

2006年から現在までに当科で通院加療中の全身性強皮症患者(254例)を対象に、指尖部皮膚潰瘍を生じた症例(45例)について検討した。なお、臨床データの研究目的での使用については、初診時に患者から文書で同意を得ている。

統計学的解析には Pearson のカイ2乗検定または Mann-Whitney のU検定を用いた。

C. 研究結果

年齢、性別について (図1)

平均年齢は60歳から66歳で両群に差はみられなかった。性別は、全症例と指尖部潰瘍なしでは男性が10%、女性が80%程度であったが、指尖部潰瘍ありでは、男性が20%、女

性が80%であり、指尖部皮膚潰瘍を生じた強皮症は、指尖部潰瘍を生じない強皮症と比べて、男性例の割合が高い傾向がみられた。

強皮症の病型について（図2）

全症例では limited cutaneous type は 69.3%、diffuse cutaneous type は 30.7%であった。指尖部潰瘍なしでは、全症例とほぼ同じく、limited cutaneous type は 73.7%、diffuse cutaneous type は 26.3%であった。一方、指尖部潰瘍がある症例では、limited cutaneous type が 51.1%、diffuse cutaneous type が 48.9%であった。この結果より、指尖部皮膚潰瘍を生じた強皮症は、潰瘍を生じない症例と比べて、diffuse cutaneous type の割合が高いことが明らかとなった。

皮膚硬化について（図3）

皮膚の硬化度をスコア化できる modified Rodnan Total Skin Score (mRSS)を用いて検討した。その結果、潰瘍を生じた強皮症は、潰瘍のない強皮症と比べて、mRSS が有意に高く、皮膚硬化が強くみられることが分かった。この結果は、前項の結果を裏付けるものである。

自己抗体について（図4）

抗トポイソメラーゼⅠ抗体陽性例は、潰瘍なしの群では20%であったが、潰瘍ありの群では35.6%と有意に多くみられた。一方、抗RNP抗体や抗セントロメア抗体陽性例は、両群で明らかな差はみられなかった。抗RNAポ

リメラーゼ抗体陽性例は、潰瘍なしの群と比べて、潰瘍ありの群で多い傾向がみられた。

合併症について（図5）

間質性肺炎は全症例では44%にみられた。潰瘍なし群では40%であったが、潰瘍あり群では60.5%と有意に増加していた。肺高血圧症については、全症例では10%に合併がみられた。両群においても約10%に肺高血圧症の合併がみられ、明らかな違いは見られなかった。

心疾患とBNP値について（図6）

肺高血圧症を除いた、弁膜症、伝導障害、心筋障害、狭心症、心筋梗塞などの心疾患の有無を検討した。潰瘍がない群では、心疾患は14.8%に合併していたが、潰瘍がある群では、約2倍弱の26.7%にみられた。次に血清BNP値について検討した。肺高血圧症を含めた全症例では、血清BNP値は潰瘍なし群に比べて、潰瘍がある群で高い傾向が見られた。また、肺高血圧症を除いた症例では、血清BNP値は潰瘍なし群に比べて、潰瘍がある群で有意に上昇していた。

これらの結果より、指尖部皮膚潰瘍を生じた強皮症は、潰瘍を生じない強皮症と比べて血清BNP値が高い症例が多く、肺高血圧症以外の心疾患を有する割合が高いことが分かった。

脂質異常症および頸動脈病変（動脈硬化・狭窄）について（図7）

強皮症では健常人と比べて内膜中膜複合体

(IMT)が増加し、アテローム性動脈硬化のリスクが高いという報告[2, 3]や、末梢動脈疾患(PAD)患者では、健常人と比較して、脂質異常症が多く、高率に頸動脈病変(狭窄)を合併すること[4]が知られている。そこで、指尖部潰瘍を生じた強皮症患者における脂質異常症、頸動脈病変について、頸動脈エコーを用いて検討した。

血中総コレステロールとトリグリセリドの値に関しては、両群間で明らかな差はみられなかった。(総コレステロール:潰瘍なし群 200.8 ± 3 mg/dl, 潰瘍あり群 186.7 ± 5.7 mg/dl, トリグリセリド:潰瘍なし群 147.1 ± 6.5 mg/dl, 潰瘍あり群 139.8 ± 14.4 mg/dl)

次に、頸動脈エコーにて、動脈壁の厚さとして、平均内膜中膜複合体:mean IMT、最大内膜中膜複合体:Max IMTを測定した。また、プラーク量も検討した。その結果、両群ともに動脈壁の明らかな肥厚はみられず、プラーク量にも差はみられなかった。また、今回検討を行った強皮症患者の平均IMT値は、本邦における健常人の平均IMT値の基準値内であった。また、本邦では、プラークスコアが1.1~5.0を軽度動脈硬化, 5.1~10.0を中等度動脈硬化, 10.1以上を高度動脈硬化と評価している。強皮症患者では軽度動脈硬化を示しており、年齢相当と考えられた。このように、強皮症患者において、指尖部皮膚潰瘍と脂質異常、頸動脈病変(硬化、狭窄)との関連はみられなかった。また、強皮症患者の血中脂質値や動脈硬化は健常人と同程度であり、強皮症患者でアテローム性動脈硬化のリスクが高いということもなかった。

治療について

プロスタグランジン製剤内服が40例、抗血小板薬内服が27例、プロスタグランジン製剤点滴が21例、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタン内服が12例あった。これらの薬剤を組み合わせ併用して治療を行った。

D. 考案

指尖部皮膚潰瘍を伴う全身性強皮症は、潰瘍を生じない強皮症と比べて以下の特徴が見られた。

- 1、男性の割合が高い。
- 2、diffuse cutaneous type SScが多い。
- 3、皮膚硬化が強い症例が多い。
- 4、抗トポイソメラーゼI抗体陽性例が多い。
- 5、間質性肺炎合併例が多い。

これらの結果は、欧米で行われたいくつかの同様の臨床研究の結果と一致した[5-8]。

また、今回は心臓病変との関連性についても検討したが、指尖部皮膚潰瘍を伴う強皮症では、肺高血圧症以外の心疾患を有する症例が多く、BNP値が高いことが分かった。

また、強皮症では健常人と比べてIMTが増加し、アテローム性動脈硬化のリスクが高いという報告[2, 3]や、末梢動脈疾患(PAD)患者では、健常人と比較して脂質異常症が多く、高率に頸動脈病変(狭窄)を合併すること[4]から、強皮症患者の指尖部皮膚潰瘍と脂質異常症、頸動脈病変(動脈硬化、狭窄)といったアテローム性動脈硬化との関連性について検討したが明らかな関連性はなかった。また、強皮症患者でアテローム性動脈硬化のリスクが高いということもなかった。

E. 結 論

当科に受診した強皮症患者の統計学的解析によって、指尖部皮膚潰瘍を呈する全身性強皮症患者の特徴や傾向を明らかにした。

F. 文 献

1. 茂木 精一郎、石川 治：強皮症 病態・診断・治療の進歩 レイノー現象と指尖部循環障害の治療の進歩．リウマチ科 2012； 48： 394-9
2. Au K, et al. Atherosclerosis in systemic sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 2078-90
3. Bartoli F, et al. Flow-mediated vasodilation and carotid intima-media thickness in systemic sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1108: 283-90
4. Araki Y, et al. Prevalence and risk factors for cerebral infarction and carotid artery stenosis in peripheral arterial disease. *Artherosclerosis.* 2012; 223: 473-7
5. Tiev KP, et al. Clinical features of scleroderma patients with or without prior or current ischemic digital ulcers: post-hoc analysis of a nationwide multicenter cohort (ItinérAIR-Sclérodemie). *J Rheumatol.* 2009; 36: 1470-6
6. Alivernini S, et al. Skin ulcers in systemic sclerosis: determinants of presence and predictive factors of

healing. *J Am Acad Dermatol.* 2009; 60: 426-35

7. Khimdas S, et al. Associations with digital ulcers in a large cohort of systemic sclerosis: results from the Canadian Scleroderma Research Group registry. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011; 63: 142-9
8. Denton CP, et al. Demographic, clinical and antibody characteristics of patients with digital ulcers in systemic sclerosis: data from the DUO Registry. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71: 718-21

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

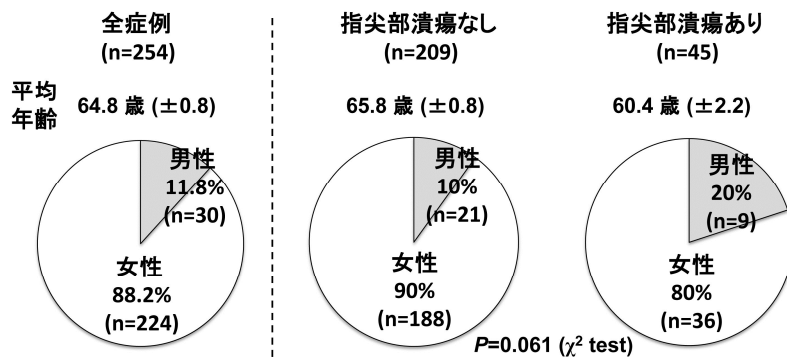


図 1：年齢、性別について

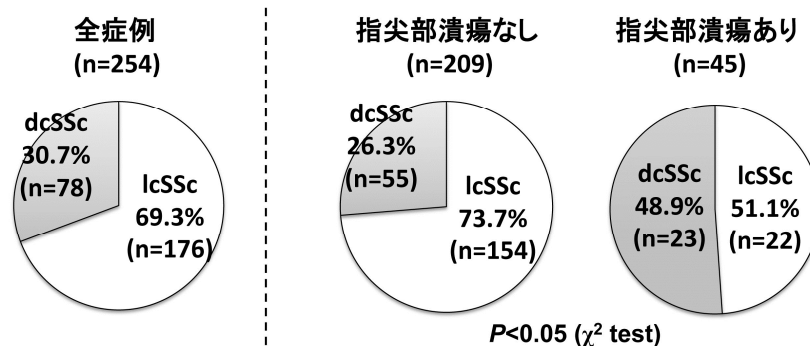


図 2：強皮症の病型について

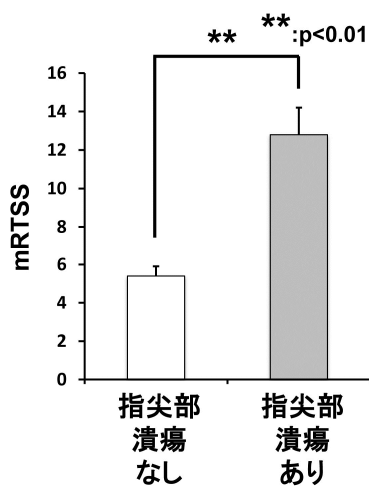
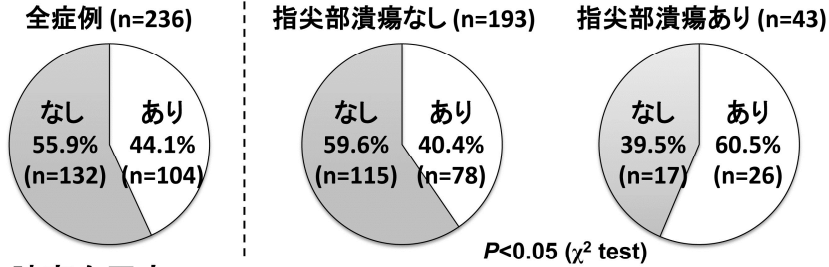


図 3：皮膚硬化について

	指尖部潰瘍なし	指尖部潰瘍あり	P値 (χ^2 test)
抗トポイソメラーゼI抗体	20.1% (42例)	35.6% (16例)	$p=0.025$
抗RNP抗体	13.4% (28例)	15.6% (7例)	$p=0.703$
抗セントロメア抗体	41.6% (87例)	37.8% (17例)	$p=0.634$
抗RNAポリメラーゼ抗体	2.4% (5例)	6.7% (3例)	$p=0.136$

図 4：自己抗体について

間質性肺炎



肺高血圧症

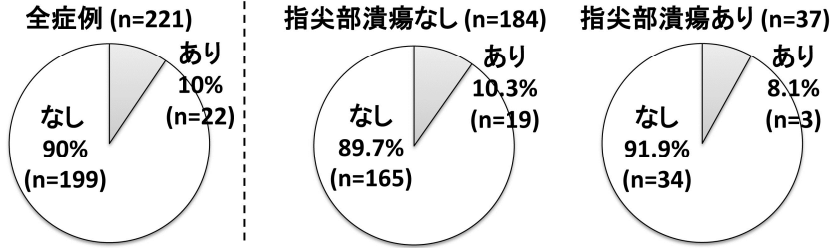


図 5 : 合併症について

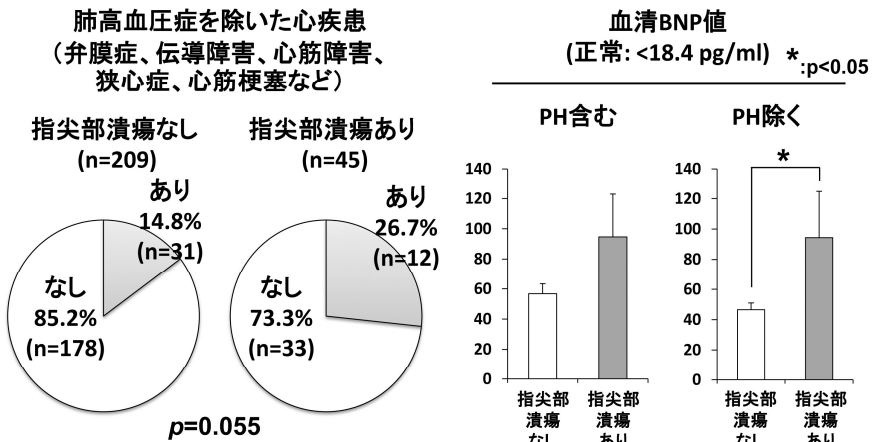


図 6 : 心疾患と血中 BNP 値について

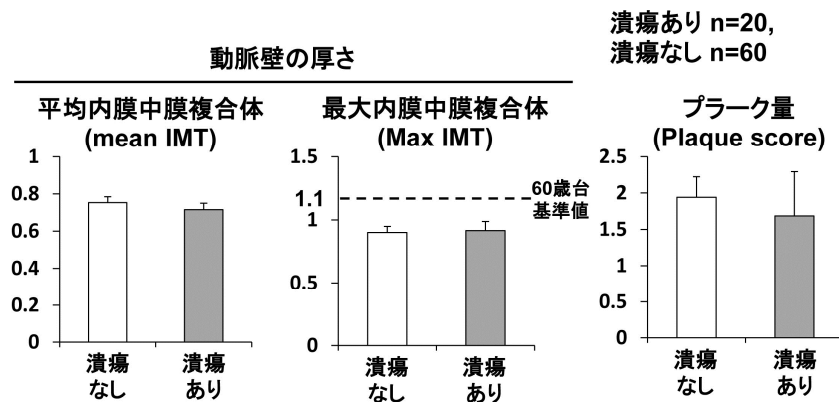


図 7 : 頸動脈病変 (動脈硬化・狭窄) について

シェーグレン症候群先行全身性強皮症の臨床的特徴の検討

研究分担者 **高橋裕樹** 札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座 准教授
協力者 **山本元久** 札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座 助教
協力者 **鈴木知佐子** 札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座

研究要旨

当院通院中で、抗セントロメア抗体（ACA）陽性のシェーグレン症候群（SS）から全身性強皮症（SSc）と診断された7例（SS先行例）とSSc診断からの期間が同程度のSSを合併していないACA陽性SSc 15例（SSc単独例）を登録し、臨床的特徴について後ろ向きに解析した。SSc診断からの観察期間は、SS先行例で中央値6.2年、SSc単独例で中央値7年であった。両群とも全例女性で、すべてlimited型であった。SS先行例でレイノー現象出現からの期間が有意に短かったが、臓器障害や自己抗体陽性率に差はみられなかった。今回の検討では、ACA陽性SSの経過中にSScと診断された症例と、SS非合併ACA陽性SScでは、臨床像に明らかな差はみられなかった。

A. 研究目的

全身性強皮症（SSc）の疾患特異抗体の一つである抗セントロメア抗体（ACA）は、シェーグレン症候群（SS）の数%程度においても陽性となり [1, 2], ACA陽性SSの約20%が経過中にSScを発症すると報告されている [3]。

我々は、平成24年度の「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」において、レイノー現象を呈し、かつ、皮膚硬化のないACA陽性例の長期経過中にSScと診断されたのは、全例、ACA陽性SSであったことを報告した。

そこで、今回、ACA陽性SSからSScと診断された、これらの症例の臨床的特徴を明らかにするために検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象患者

2013年12月時点で札幌医科大学付属病院

に通院中の、厚生労働省の強皮症診断基準（竹原班，2003年）を満たすACA陽性SSc症例のうち、ACA陽性SSからSScと診断された（SS先行例）7例と、これらの症例とSSc診断からの観察期間を合わせて抽出したSS非合併のSSc（SSc単独例）15例を対象とした。なお、SS先行例は、全例、1997年の厚生労働省SS診断基準を満たしていた。

対象症例は全例女性で、2013年12月の登録時年齢は中央値64.5歳（四分位範囲：57-68歳）[範囲：46-77歳]、全例limited型で、レイノー現象（RP）陽性であった。

2) 臨床的因子の解析

SS先行例7例とSSc単独例15例について、SSc発症・RP出現・RP以外の症状出現から最終観察時までの期間、自己抗体の種類、臨床症状、臓器障害の有無などの臨床的因子との

関連について、後ろ向きにデータを収集し、統計学的解析を行った。中央値の比較には Mann-Whitney's U test を、分割表分析の検定には Fisher's exact test を用い、 $p < 0.05$ の時に有意差ありと判定した。

なお臨床データの研究目的での使用については、解析時に患者から同意を得た。

C. 研究結果

SS 先行例と SSc 単独例の比較(表 1)では、SSc 診断時年齢は SS 先行例で中央値 58 歳(四分位範囲: 49-65 歳)[範囲: 45-70 歳]、SSc 単独例で中央値 55 歳(四分位範囲: 50-62 歳)[範囲: 41-71 歳]で有意差はなかった。今回の検討では、SSc 診断からの観察期間が同程度の症例を抽出しており、SSc と診断されてからの観察期間は SS 先行例で中央値 6.2 年(四分位範囲: 1.3-7.6 年)[範囲: 0.9-7.7 年]、SSc 単独例で中央値 7 年(四分位範囲: 6-9.4 年)[範囲: 4-10.8 年]であった。SS 先行例における SS 診断から SSc 診断までの期間は中央値 6.8 年(四分位範囲: 2.4-15.1 年)[範囲: 0.8-18.5 年]であった。RP 出現から最終観察時までの期間は、SS 先行例で中央値 5.9 年(四分位範囲: 2.4-15.8 年)[範囲: 1.1-22.9 年]、SSc 単独例で中央値 11.9 年(四分位範囲: 9.9-20.9 年)[範囲: 7.2-39.9 年]と、SS 先行例で有意に短く($p = 0.037$)、SS 先行例では SSc 単独例よりも RP の出現が遅いことが示された。また、RP 以外の SSc 関連症状(今回の検討では主に関節症状)出現から最終観察時までの期間に有意差はみられなかった。SS 先行例 7 例中 4 例

(57.1%)は RP よりも関節症状が先行していた。

両群で抗核抗体力価、ACA 抗体価に有意差はなく、両群ともに抗 topoisomerase- 抗体、抗 RNA polymerase 抗体、抗 U1-RNP 抗体陽性例はいなかった。抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体の陽性率にも有意差はなく、SS 先行例ではそれぞれ 2 例(28.6%)、1 例(14.3%)のみが陽性、SSc 単独例ではすべて陰性であった。その他の自己抗体や検査値、末梢血管障害を反映する皮膚潰瘍、pitting scar、爪床部出血の有無についても有意差はなかった。両群とも関節症状は高頻度にみられ、有意差はみられなかった(SS 先行例 71.4% vs SSc 単独例 86.7%, $p = 0.56$)。

SSc に関連した臓器障害のうち、逆流性食道炎は SSc 単独例に多くみられたが、統計学的有意差はなかった(SS 先行例 14.3% vs SSc 単独例 33.3%, $p = 0.62$)。間質性肺炎、肺高血圧症、腎クレーゼ、心病変については、SSc 単独例で間質性肺炎、心病変(不整脈)を 1 例ずつ認めたのみで、両群とも重篤な臓器障害はみられなかった。ステロイド治療は各群 1 例で行われており、いずれも関節痛に対する少量ステロイド投与であった。SS、SSc 以外の自己免疫疾患の合併は、SS 先行例で 2 例(28.6%、いずれも自己免疫性肝炎)、SSc 単独例で 4 例(26.7%、サルコイドーシス 1 例、橋本病 2 例、原発性胆汁肝硬変 1 例)に認められ、統計学的有意差はなかった。

D. 考案

SSc においては約 70%の症例に眼・口腔の乾

燥症状が認められるものの、唾液腺へのリンパ球浸潤で特徴づけられる SS の合併は 14%のみと報告されている [4]。また、SS を合併した SSc 症例の臨床的特徴として、ACA 陽性、limited 型が多く、SSc 単独例と比べて肺線維症など重篤な臓器障害が少ないことが報告されている [5, 6]。

今回の検討では、ACA 陽性 SSc 症例のうち SS 先行例と SSc 単独例における臓器障害の有無を比較したところ、SSc 単独例で各 1 例ずつに肺線維症、肺高血圧症が認められた以外は、両群ともに重篤な臓器障害は認められず、統計学的有意差もみられなかった。症例数が少ないうに、今回の検討では SS 先行 7 例における SSc 診断からの観察期間が中央値 6.2 年と短く、対照群の SSc 単独例も SSc 診断からの観察期間が 10 年以下の症例を抽出したため、特に SSc 単独例においては観察期間が短いために臓器障害が少なかった可能性が考えられる。また、Hashimoto らによる日本人 SSc 405 例の検討 [7] では、ACA 単独陽性例は肺病変、心病変、肺高血圧症のリスクが有意に低く、腎クリーゼ症例は 1 例もいなかったことが示されており、今回の検討で臓器障害の有無に差がみられなかったのは、日本では臓器障害の少ない ACA 陽性例に対象を限局したことも一因として考えられる。

SSc、特に limited 型の症例の大部分では、皮膚硬化や SSc 関連症状の数～十数年前に RP が先行して出現するとされており、今回の検討においても SSc 単独例の 93.3%は RP が先行していたが、SS 先行例においては半数以上の症例で RP よりも関節症状が先行し、SSc 単独

例と比べて RP 出現からの期間が有意に短かった。SS 先行例における早期からの関節症状は、SS に伴う症状をみている可能性が高いと思われるが、一方で、Baldini らは ACA 陽性の SSc・SS 重複例では ACA 陽性 SSc 例と比べ爪郭毛細血管異常が少ないことを報告しており [6]、今回、SS 先行例で RP 出現時期が遅かったことは、SS 合併 SSc 症例では末梢血管障害が軽度であることを反映していたのかもしれない。しかし、今回の検討では、キャピラロスコープやダーモスコピーによる爪郭毛細血管異常については評価しておらず、さらに、両群で皮膚潰瘍、pitting scar、爪床部出血の陽性率に有意差はみられなかった。

今回の検討では、ACA 陽性 SS から SSc を発症した症例と、SS 非合併の ACA 陽性 SSc 症例の臨床的特徴に有意差は認められず、少なくとも SS 先行例において重篤な臓器障害はみられなかったことから、ACA 陽性 SS のフォローにおいてより積極的な臓器障害のスクリーニングは不要であることが示唆された。しかし、症例数が少なく、かつ、後ろ向き解析であるため、結果の解釈には注意が必要である。今後、症例数を増やし、かつ、前向き試験を中心とした検討が必要と思われる。

E. 結 論

ACA 陽性 SS の経過中に SSc と診断された症例と、SS 非合併の ACA 陽性 SSc では、臨床像に明らかな差違はみられなかった。

F. 文 献

1. Salliot C, Gottenberg JE, Bengoufa D, et

- al: Anticentromere antibodies identify patients with Sjögren's syndrome and autoimmune overlap syndrome. *J Rheumatol* 2007; 34: 2253-2258.
2. Ramos-Casals M, Nardi N, Brito-Zeron P, et al. Atypical autoantibodies in patients with primary Sjögren syndrome: clinical characteristics and follow-up of 82 cases. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 35: 312-321.
 3. Bournia VK, Diamanti KD, Vlachoyiannopoulos PG, et al. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R47.
 4. Avouac J, Sordet C, Depinay C, et al. Systemic sclerosis-associated Sjögren's syndrome and relationship to the limited cutaneous subtype: results of a prospective study of sicca syndrome in 133 consecutive patients. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2243-2249.
 5. Salliot C, Mouthon L, Ardizzone M, et al. Sjögren's syndrome is associated with and not secondary to systemic sclerosis. *Rheumatology* 2007; 46: 321-326.
 6. Baldini C, Mosca M, Della Rossa A, et al. Overlap of ACA-positive systemic sclerosis and Sjögren's syndrome: a distinct clinical entity with mild organ involvement but at high risk of lymphoma. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31: 272-80.
 7. Hashimoto A, Endo H, Kondo H, et al. Clinical features of 405 Japanese patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* 2012; 22: 272-279.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
なし
 2. 学会発表
第 22 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 . 2013 年 9 月 13 日 , 大阪 .
- 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
なし

表 1 . SS 先行例と SSc 単独例における臨床的因子の比較

	SS 先行例 (n=7)	SSc 単独例 (n=15)	p
SSc 診断時年齢	58 歳 (45-70) *	55 歳 (41-71) *	0.70
SSc 診断からの期間	6.2 年 (0.9-7.7) *	7 年 (4-10.8) *	0.10
SS から SSc 診断までの期間	6.8 年 (0.8-18.5) *	-	-
RP からの期間	5.9 年 (1.1-22.9) *	11.9 年 (7.2-39.9) *	0.037
RP 以外の症状出現からの期間	7.7 年 (0.9-27.9) *	9.8 年 (4-11.9) *	0.94
ANA 力価	2560 × (320-5120) *	2560 × (640-5120) *	1.00
ACA 抗体価	153.5 (102-187) *	164.5 (89.2-204) *	0.67
抗 topoisomerase- 抗体	0 例/6 例	0 例	-
抗 RNA polymerase 抗体	0 例/4 例	0 例/12 例	-
抗 U1-RNP 抗体	0 例/4 例	0 例/13 例	-
抗 SS-A 抗体	2 例 (28.6%)	0 例/14 例	0.10
抗 SS-B 抗体	1 例 (14.3%)	0 例/3 例	1.00
RF	2 例 (28.6%)	2 例/14 例 (14.3%)	0.57
抗 DNA 抗体	0 例/6 例	0 例/7 例	-
抗 TG 抗体	0 例/6 例	3 例/10 例 (30%)	0.25
IgG (mg/dl)	1017 (878-1581) *	1065 (777-1519) *	0.79
低補体血症	0 例	0 例/13 例	-
CRP 陽性	0 例	0 例	-
KL-6 (U/ml)	256 (137-475)	187 (134-592)	0.15
皮下石灰化	1 例 (14.3%)	2 例 (13.3%)	1.00
毛細血管拡張	1 例 (14.3%)	2 例 (13.3%)	1.00
皮膚潰瘍	0 例	1 例 (6.7%)	1.00
pitting scar	0 例	2 例 (13.3%)	1.00
爪床部出血	3 例 (42.9%)	5 例 (33.3%)	1.00
関節症状	5 例 (71.4%)	13 例 (86.7%)	0.56
CK 上昇	0 例	2 例 (13.3%)	1.00
間質性肺炎	0 例	1 例 (6.7%)	1.00
肺高血圧症	0 例	0 例	-
逆流性食道炎	1 例 (14.3%)	5 例 (33.3%)	0.62
腎クリーゼ	0 例	0 例	-
心病変	0 例	1 例 (6.7%)	1.00
PSL 治療	1 例 (14.3%)	1 例 (6.7%)	1.00
自己免疫性疾患合併	2 例 (28.6%)	4 例 (26.7%)	1.00

* 中央値 (範囲)

RP : レイノー現象, ANA : 抗核抗体, ACA : 抗セントロメア抗体, RF : リウマチ因子, 抗 TG 抗体 : 抗サイログロブリン抗体

全身性強皮症に対する手指のリハビリテーション

－ 長期経過の検討 －

研究協力者 **斐井直樹** 金沢大学医学部附属病院リハビリテーション部 作業療法士
研究協力者 **長谷川稔** 福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学 教授
研究分担者 **藤本 学** 筑波大学医学医療系皮膚科 教授
協力者 **大島幸恵** 金沢大学医学部附属病院リハビリテーション部
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 **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 **竹原和彦** 金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授

研究要旨

強皮症(SSc)患者は皮膚硬化や皮膚潰瘍などにより手指機能の低下がみられる。我々は、SScに対する手指のリハビリテーションの効果を報告してきた。今回は長期経過を評価できた症例についてまとめ、SScに対する手指のリハビリテーションの長期的効果とその特徴を示す。結果、手指ROMは初診時に比べ、1ヵ月・1年・3年・5年・8年と有意に改善を示した。しかし一部の症例で5年以降低下を示した。臨床所見との関連では、機能低下は、経過中の皮膚潰瘍や関節炎、初診時MRSSの関連が示された。手指のリハビリテーションは、長期的にもおおむね効果はあるが、経過中の皮膚潰瘍や関節炎を有する症例では悪化も起こりうることを示された。

A. 研究目的

我々は、SScに対する手指のリハビリテーションの効果を1ヵ月、1年、3年と報告してきた(1-3)。手指関節可動域(ROM)は1ヵ月という短期でも、1年、3年という中期的にも改善がみられた。今回の目的は7~10年と長期経過を評価できた症例についてまとめ、SScに対する手指のリハビリテーションの長期的効果とその特徴を示すことである。併せて、皮膚硬化のピークを過ぎた症例でも機能低下は起こるかを検討した。

B. 研究方法

1) 対象
1997年1月から2006年12月までに処方されたSSc患者のうち長期経過を評価できた患者32例を対象とした。性別は女性27例、男性5例、平均年齢は45.2歳。病型はdcSSc24例、lcSSc8例、平均罹病期間は平均4.7年であった。抗核抗体の内訳は、抗Topo-抗体17例、抗RNAP抗体5例、ACA抗体6例、その他4例となっていた。32例中26例でステロイドによる治療が行われていた。また25例は薬物治療前からリハビリテーションを開始した。

調査にあたっては大学の倫理委員会の承認

を得た (No.960)。

2) リハビリテーションプログラム (4)

当院 SSc 手指プログラムを期間中に実施した。

手指のリハビリテーションは、関節可動域の維持や改善の目的でストレッチ運動を行った (1-3)。入院中はリハビリテーション室にて作業療法士が実施した (図 1)。退院後は自主トレーニングとして実施させた (図 2)。ストレッチ運動は以下の点に十分に注意して指導した。また説明の記したパンフレットも手渡した。

注意点: 毎日継続する。1 指ごとに行う。

各々屈曲方向、伸展方向ともに最大のところで、1 回 10 秒間を 3～5 回繰り返す。④目的の関節をゆっくりと反対側の upper limb で動かす。痛みが強いとき、潰瘍の箇所は無理をしない。

3) 効果判定

効果判定として、左右すべての手指において手指他動 ROM を測定した。測定時期に目的の関節が皮膚潰瘍で測定できない場合は、治療後に測定した。今回の測定時期は、初診時、1 ヶ月後、1 年後、3 年後、5 年後、8 年後 (7～10 年の平均) の 6 ポイントとした。

測定した 10 指のうち、左右中指の MP 関節屈曲、PIP 関節屈曲伸展 DIP 関節屈曲伸展の総和: Total passive ROM として値を算出した。さらに改善したか、悪化したかを明確に示すために ROM 改善率 (8 年後 初回 / 初回 × 100%) を求めた。すなわち ROM 改善率が正の数値なら改善、負の数値なら悪化を示す。また能力評価として、初回と最終に HAQ を

行った。さらに効果の要因について、各種臨床所見等 (経過中の皮膚潰瘍、経過中の関節炎、初診時の MRSS や罹病期間、年齢、性別、抗核抗体) と検討した。

4) 統計解析:

ROM と HAQ は対応のある T 検定を、手指機能改善の因子については多変量解析を JMP8 Genomics を用いて行った。

C. 研究結果

1) 手指機能の変化

初診時から 8 年後までの手指機能の変化 (Total passive ROM の平均値) を図 3 に示す。ROM は初診時と比較して、1 ヶ月後、1 年後、3 年後、5 年後、8 年後のすべての時点で有意な改善がみられた。その一方で 3 年後と 8 年後においては、有意な低下を示した。HAQ に関しては、8 年後は初診時と比較して有意差はみられないものの、平均 0.71 から 0.55 へと改善傾向がみられた。MRSS に関しては、8 年後は初診時と比較して平均 18.1 から 10.2 へと有意な改善がみられた。

2) ROM 改善率と臨床症状の関係

ROM 改善率と臨床症状の関係を図 4 に示す。多くの症例は改善を示したが、皮膚潰瘍を有する症例の一部、特に皮膚潰瘍の再燃を合併し、PIP 関節背側に生じた皮膚潰瘍の悪化のため手指伸筋腱の断裂による屈曲拘縮を起こした 3 症例は大きく悪化していた。

3) ROM 改善率と皮膚潰瘍との関係

皮膚潰瘍の有無による ROM 改善率を図 5 に示す。皮膚潰瘍のあり群では、ROM 改善率は悪化、皮膚潰瘍のなし群では、ROM 改善率は

改善という結果であった。しかし前述したように、PIP 関節背側に生じた皮膚潰瘍の悪化のため手指伸筋腱の断裂による屈曲拘縮を起こした 3 症例を除いた場合は、皮膚潰瘍のあり群でも、ROM 改善率は改善という結果となった。

4) 手指機能 (ROM) 悪化の要因

手指機能改善の有無でのロジスティック重回帰、さらに、手指機能の改善率についての重回帰分析を行った。その結果どちらにおいても、経過中の皮膚潰瘍や関節炎、初診時の MRSS との関連性が示された。

D. 考 案

強皮症にみられる機能障害の長期経過に関しては、Poole J らが強皮症 60 例 (ISSc : 20 例, dSSc : 40 例, 罹病期間 : 5~47 年, 平均 14.4 年) の手指機能の 5 年経過を調査 (HAQ-DI は 1 年目が 0.73, 5 年目が 0.81 と有意差はないものの悪化傾向, 手指機能はピンチ力の改善以外はほとんど変化なしという結果であった (5))。今回我々は平均 8 年の経過をみたが、罹病期間は平均 4.7 年と早期例が多かった。HAQ-DI は有意差はないものの、若干の改善傾向にあった。そして手指機能に関して ROM は 3 年目まで改善、その後 5 年目、8 年目と改善例が多いが、一部で悪化例もみられるといったふうに 2 分することが示された。

長期経過においても、多くの症例は良好な結果を示した。しかしながら、3 年以降の 5 年、8 年では機能低下例が存在。機能低下は、経過中の皮膚潰瘍や関節炎、初診時 MRSS の関与が示された。

今回の初診時罹病期間は Topo- 抗体が平均 4.5 年 (1.0~23 年)、RNAP 抗体が平均 4.0 年 (0.5~17 年) であった。LeRoy らの皮膚硬化の自然経過 (6) を考慮した場合、最終評価時点では、一般的に皮膚硬化はピークを越えていることが予測される。したがって皮膚硬化による ROM 制限に関しては改善が予測される。しかし強皮症の手指 ROM 制限は皮膚潰瘍のみに関連したものではなく、経過中の皮膚潰瘍や関節炎を有する症例では、5 年以降の時期においても機能低下に注意することが示された。

E. 結 論

SSc 患者 32 例を対象に手指のリハビリテーションの長期経過をみた。

手指 ROM は初診時に比べ、1 ヶ月・1 年・3 年・5 年・8 年と有意に改善を示した。

抗核抗体別では、Topo- 抗体の一部において低下がみられ、皮膚潰瘍や皮膚硬化の再燃の関与が示唆された。

SSc 患者の手指のリハビリテーションでは、長期的にもおおむね効果はあるが、注意を要する症状が存在する。

F. 文 献

1) Mugii N, Hasegawa M et al: The Efficacy of self-administered stretching for finger joint motion in Japanese patients with systemic sclerosis, The Journal of Rheumatology 2006; 33: 1586- 1592.

2) 麦井直樹, 他: 全身性強皮症患者の手指拘縮に対するストレッチングの効果, 総合リハ

2001; 29 : 933 - 936.

3) 麦井直樹, 他: 全身性強皮症における手指ストレッチの効果-関節可動域と HAQ による検討-, 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 強皮症における病因解明と根治的治療法の開発 平成 17 年度総括・分担研究報告書 2006 : 239 - 244.

4) 麦井直樹: 強皮症のリハビリテーション, リウマチ科 2012; 48 : 434 - 441.

5) Poole JL et al : A five-year followup of hand function and activities of daily living in systemic sclerosis (scleroderma) , J hand therapy 2004; 17: 407 - 411.

6) LeRoy EC et al. Scleroderma (systemic sclerosis) : classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988; 15: 202-204.

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

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



図 1 : 全身性強皮症に対する手指のストレッチ
リハビリテーション室にて作業療法士が実施

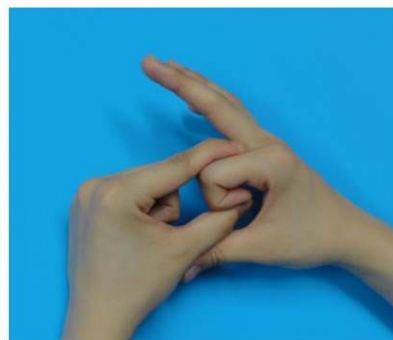


図 2 : 全身性強皮症に対する手指のストレッチ
自主トレーニング, 右示指の PIP, DIP 関節
の屈曲

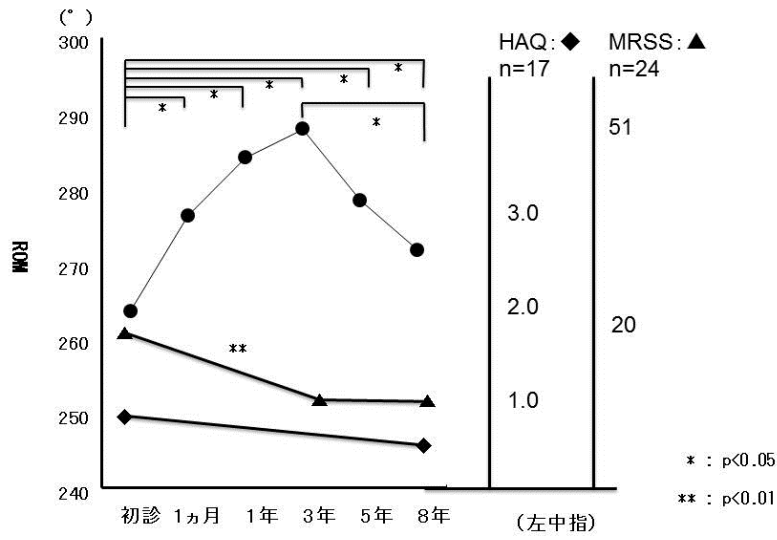


図 3 初診時から8年までの手指機能の変化

平均値を黒丸，HAQ を四角，MRSS を三角で示した。

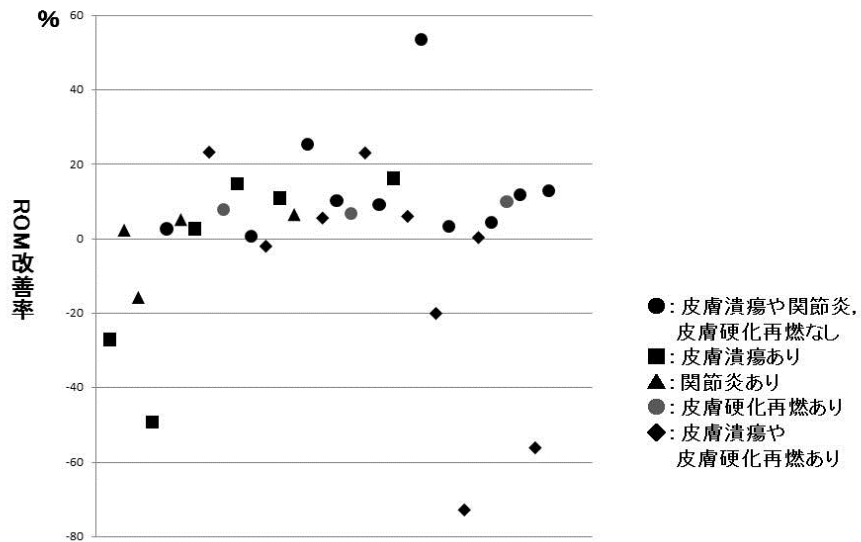


図 4 : ROM 改善率と臨床症状の関係
各症例の ROM 改善率をプロットした。

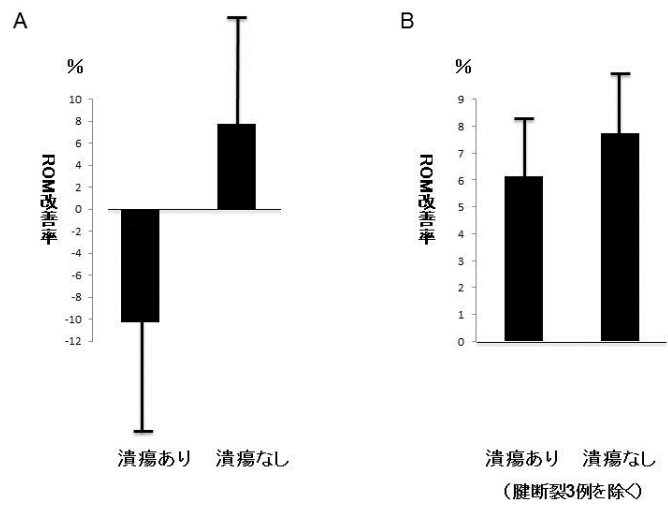


図5：ROM改善率と皮膚潰瘍との関係
 Aは全例，Bは皮膚潰瘍ありで腱断裂3例を除く

色素レーザーが有効であった毛細血管拡張症を伴った 全身性強皮症の1例

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 **牧野貴充** 熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 助教
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
協力者 **梶原一亨** 熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 特任助教

研究要旨

症例、31歳女性。8年前、手指の皮膚硬化が出現、抗トポイソメラーゼ抗体陽性のびまん性皮膚硬化型全身性強皮症と診断した。皮膚硬化に対しプレドニゾロン 25mg/day 内服を開始、間質性肺炎に対しシクロフォスファミド静注療法を施行した。顔面の毛細血管拡張症に対し、V beam®、6msec、9.0J/cm²にて2回施行し改善を認めた。V beam®は波長 595nm のフラッシュランプ励起式パルスダイレーザーであり、単純性血管腫、莓状血管腫、毛細血管拡張症に保険適応がある。

A. 研究目的

全身性強皮症 (SSc) は皮膚をはじめとし肺や腎臓、心臓などの多臓器が障害される系統的疾患であり、その病態として、血管障害、線維化、自己免疫が考えられている。毛細血管拡張症は血管異常に基づいて発生していると考えられている [1]。毛細血管拡張は顔面や手掌に多く、特に女性患者の QOL を低下させている [2]。今回我々は、SSc に伴う、毛細血管拡張に対し色素レーザー照射を行い、有効性を確認した。

B. 研究方法

症例報告。31歳女性。

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：膠原病なし。

現病歴：8年前より手指の皮膚硬化が出現。

徐々に上腕、体幹へ皮膚硬化が拡大し、びま

ん皮膚硬化型 SSc と診断。抗トポイソメラーゼ抗体陽性。皮膚硬化に対しプレドニゾロン 25mg/day 内服を開始し、皮膚硬化の改善を認めた。3年前より間質性肺炎の増悪を認め、シクロフォスファミド静注療法 6回を施行し、症状の改善を認めた。顔面の毛細血管拡張症に対し、治療希望があり、色素レーザー治療を計画した。

臨床検査所見：WBC 7800 /ul (Neut 76.2%, Lymp 15.2%, Mono 5.7%, Eosin 2.8%, Baso 0.1%), Hb 12.0 g/dl, Plt 27.3 万/ul, BUN 10.5 mg/dl, Crea 0.66 mg/dl, AST 18 U/l, ALT 12 U/l, LDH 145 U/l, CK 53 U/l, ミオグロビン 21.8 ng/ml, CRP 0.01 mg/dl, KL-6 334 U/ml, SP-D 102.3 ng/ml, 抗トポイソメラーゼ (Scl-70) 抗体 16.0 倍 (+), 抗セントロメア抗体 (-), 抗 RNA ポリメラーゼ 抗体 (-), 抗 U1 RNP 抗体 (-), RF (-), 抗

ds-DNA 抗体 (-), 抗 SS-A 抗体 (-), 抗 SS-B 抗体 (-)
色素レーザー機器として、V beam® (キャンデラ社) を使用した。V beam® はフラッシュランプ励起式パルスダイレーザーで、波長は 595nm、パルス幅は 0.45-40msec で調節可能な機器である。本邦では単純性血管腫、莓状血管腫、毛細血管拡張症に対し保険適応となっている。色素レーザー治療により期待される効果および副作用や照射後の遮光、外用処置について、また検体や臨床検査値、患者情報の管理、研究への利用について、十分な説明と文書での同意を得た。

C. 研究結果

左右頬部、下顎部にくも状血管腫様の毛細血管拡張を認めた。治療前に V beam®, 6 msec, 8.0, 8.5, 9.0 J/cm² の出力でテスト照射を行い、副作用や照射時の痛みの有無を確認した。びらんや紫斑が生じないことを確認後に、V beam®, 6 msec, 9.0 J/cm² で 1 回目の照射を行った。照射後約 10 日間の局所の発赤を生じたが、ベタメタゾン吉草酸エステル軟膏 0.12% の外用にて徐々に消退した。1 回の照射では毛細血管拡張は不変であった。3 か月後の照射予定であったが、本人の希望で 5 か月後に同条件で 2 回目の照射を行った。同様にびらんや紫斑は生じず、発赤のみを生じた。治療開始から 11 か月後に毛細血管拡張の改善を認めた。

D. 考案

SSc に伴う毛細血管拡張症は、血管障害を

反映した皮膚症状と考えられている。好発部位は顔面、手掌であり、びまん皮膚硬化型 SSc では顔面の斑状、くも状血管腫様の毛細血管拡張が多く、限局皮膚硬化型 SSc では手掌、口唇、舌の鮮紅色から紫紅色の斑状毛細血管拡張症がみられる。治療に関しては海外では色素レーザー[3]のほかに、Intensed pulsed light (IPL) の有効性が報告されている[4]。本邦では色素レーザー[5]、IPL のほかにロングパルス Nd:YAG レーザー[6]の有効性が報告されている。

また Halachmi らは色素レーザー治療において、特発性の毛細血管拡張症と比較し、SSc 合併例では難治性であり、治療回数が多いと報告しており(特発性; 平均 1.90 回、SSc; 平均 3.92 回) また、その原因として病理組織学的に毛細血管内皮の肥厚が観察されている[7]。本症例では色素レーザーの 2 回照射で改善を認めたが、従来治療との優位性については症例数を蓄積し検討する必要がある。

E. 結論

全身性強皮症に伴う毛細血管拡張症に対し、色素レーザー治療は有効であった。治療回数や改善度については、今後症例を集積し解析することが重要であると思われる。

F. 文献

1. Walker JG, Stirling J, Beroukas D, Dharmapatni K, Haynes DR, Smith MD, Ahern MJ, Roberts-Thomson PJ: Histopathological and ultrastructural features of dermal telangiectasias in

- systemic sclerosis. Pathology 2005;37:220-225.
2. Ennis H, Herrick AL, Cassidy C, Griffiths CE, Richards HL: A pilot study of body image dissatisfaction and the psychological impact of systemic sclerosis-related telangiectases. Clin Exp Rheumatol 2013;31:12-17.
 3. Ciatti S, Varga J, Greenbaum SS: The 585 nm flashlamp-pumped pulsed dye laser for the treatment of telangiectases in patients with scleroderma. J Am Acad Dermatol 1996;35:487-488.
 4. Murray AK, Moore TL, Richards H, Ennis H, Griffiths CE, Herrick AL: Pilot study of intense pulsed light for the treatment of systemic sclerosis-related telangiectases. Br J Dermatol 2012;167:563-569.
 5. 大城 貴史ら：皮膚良性血管病変治療用レーザー装置 Vbeam について.日本レーザー医学会誌 2011;32:164-168
 6. 加藤 篤衛ら：1064nm Nd:YAG レーザーによる顔面および下肢の皮膚血管拡張症の治療効果. Aesthetic Dermatology 2010;20:374-382
 7. Halachmi S, Israeli H, Ben-Amitai D, Lapidot M: Treatment of the skin manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia with pulsed dye laser. Lasers Med Sci 2013

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
第 31 回美容皮膚科学会

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
なし



図 1 : 頬部に毛細血管の拡張と蛇行を認める。



図 2 : 1 回目治療後 (治療開始 5 か月後)。



図 3 : 2 回目治療後 (治療開始 11 か月後) 頬部の毛細血管拡張の縮小、一部消失を認める。

全身性強皮症における血清 Flt-3 リガンド濃度の検討

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 中村 喬代 熊本大学大学院皮膚病態治療再建学 大学院生

研究要旨

Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt-3) は血管新生や血球の分化を制御するレセプターである。全身性強皮症患者 36 例および正常人 12 例を対象として血清 Flt-3 リガンド(Flt3L)濃度を ELISA 法にて測定したところ、患者群において有意な血清濃度の上昇を認めた。また、血清濃度高値を示す患者群では Nailfold bleeding を有する頻度が有意に低かった。血管病変との関連について若干の考察を加えて報告する。

A. 研究目的

免疫異常、血管障害は全身性強皮症をはじめとする様々な膠原病の根幹をなすファクターと考えられている [1,2]。このうち血管障害はレイノー症状や、Nailfold bleeding (NFB)、血管拡張、皮膚潰瘍を呈し、本症患者の quality of life に深くかかわる病態である。それらの共通の特徴は血管構造の維持の異常による血管の欠損と制御不能な再生であるが [3]、本症における血管障害の病態は不明であり今後明らかにする必要がある。

Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt-3) は CD135 としても知られるサイトカインレセプターである。造血幹細胞や骨髄前駆細胞の細胞膜上に発現し、血管形成や血球分化におけるシグナル伝達機構に関与している。例えば、悪性腫瘍における血管新生を誘導したり [4]、B 細胞の分化に寄与する [5] という報告がある。このことより、Flt-3 は本症においても、血管障害や免疫異常に関与している可能性がある。

一方、Flt-3 リガンド (Flt3L) は血清中に約 30kDa の糖タンパクとして存在している。これまでに血液疾患では血清 Flt3L 濃度の検討の報告はある [6,7] が、本症との関連性を記したものはない。血清 Flt3L 濃度は本症において診断あるいは病勢のマーカーとなる可能性がある。

B. 研究方法

1) 対象

熊本大学病院皮膚科を受診した SSc 患者 36 例、強皮症関連病態患者 (SSD) 10 例および正常人 12 例を対象とした。SSc 患者のうち、diffuse type (dcSSc) が 13 例、limited type (lcSSc) が 23 例で、全例が American College of Rheumatology の強皮症診断基準を満たしていた。臨床所見および検査所見は血清の採取時に得たものを使用した。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) ELISA 法

血清FL濃度の測定には ELISA kit (R&D)を使用した。抗FLモノクローナル抗体が被覆されたプレートに血清を加えて反応させ、さらに酵素標識抗体溶液を加えて反応させた。酵素基質溶液を加えて発色させ、450nmにおける吸光度を測定、標準曲線を作成し検体中のFlt3L濃度を算出した。

3) 解析方法

解析はマン-ホイットニー検定にて行い、P値が0.05以下のものを有意とした。

C. 研究結果

1) 血清 Flt3L 濃度

血清FL濃度の結果を図1に示す。SSc患者では、正常人に比較して有意に高値を示した(平均 144.7 ± 60.9 対 平均 94.4 ± 21.0 pg/ml、 $p=0.00760$)。dcSSc患者とlcSSc患者とでは有意な差はみられなかった(平均 139.8 ± 69.1 対 平均 147.6 ± 57.3 pg/ml、 $p=0.71756$)。

SSD患者と正常人を比較すると、SSD患者で有意な上昇を認めた(平均 157.7 ± 65.9 対 94.4 ± 21.0 pg/ml、 $p=0.00494$)。

カットオフ値を 136.4 pg/ml (正常人平均 $\pm 2SD$) とすると、すべての正常人はカットオフ値以下となり、SSc患者の38.9%、SSD患者の30%で血清FL濃度の上昇が見られた。

2) SSc患者における血清TL濃度と臨床所見および検査所見との相関

表2にSSc患者における血清FL濃度と臨床所見および検査所見のまとめを表2に示す。血清FL濃度が上昇している群では、正常血清

Flt3L濃度の群に比較してNFBを有する頻度が有意に低かった(26.7 対 63.6% , $p<0.02718$)。pitting scar や毛細血管拡張といったその他の血管障害の頻度に有意な差は認めなかった。

D. 考案

本研究では、我々は下記の知見を得た。SSc患者およびSSD患者の血清FL濃度は正常人よりも有意に高値を示した。また、SSc患者のうち、NFBを有する群は有しない群に対してFL濃度が有意に低下していた。NFBはSScにおける早期病変であり、SSDの診断の主要な因子である。SSD患者におけるFL濃度の上昇とNFBを有するSSc患者における低下から、早期の血管イベントによるネガティブフィードバックの結果、血清FL濃度が低下した可能性が考えられる。

E. 結論

血清Flt3L濃度は本症の血管障害の指標となることが示唆された。本症における血管病変の機序は不明であるが、Flt3Lの役割を明らかにすることにより新しい治療法の開発に役立つ可能性がある。

F. 文献

- 1 Lyons R, Narain S, Nichols C, Satoh M, ReevesWH. (2005) Effective use of autoantibody tests in the diagnosis of systemic autoimmune disease. Ann N Y Acad Sci 1050:217-22
- 2 Szekanecz Z, Koch AE (2008) Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'. Arthritis Res Ther 10:224
- 3 Mulligan-Kehoe MJ, Simons M (2008)

Vascular disease in scleroderma: angiogenesis and vascular repair. Rheum Dis Clin North Am 34; 73-79

- 4 Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, et al (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. Cancer Res, 64; 7099-7109
- 5 Li LX, Goetz CA, Katerndahl CD, Sakaguchi N, Farrar MA (2010) A Flt3- and Ras-dependent pathway primes B cell development by inducing a state of IL-7 responsiveness. J Immunol 184: 1728-1736
- 6 Papadaki HA, Damianaki A, Pontikoglou C et al. (2006) Increased levels of soluble flt-3 ligand in serum and long-term bone marrow culture supernatants in patients with chronic idiopathic neutropenia. Br J Haematol 132;637-639
- 7 Tobon GJ, Renaudineau Y, Hillion S, et al (2010) The Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, a mediator of B cell survival, is also a marker of lymphoma in primary Sjögren's syndrome.

Arthritis Rheum 62: 3447-3456

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

H24 年度強皮症研究会議

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

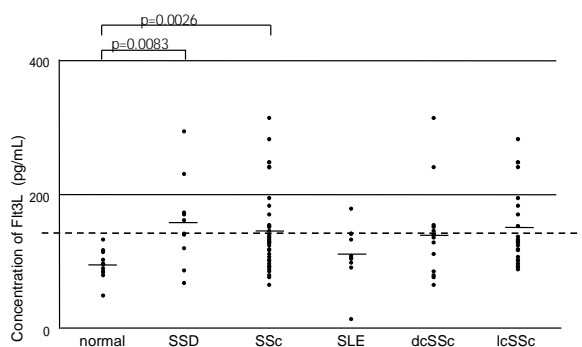


図 1 : SSc 患者、SSD 患者、正常人における血清 Flt3L 濃度

表 1 : SSc 患者 36 名の臨床症状・検査所見のまとめ

Table 1. Summary of clinical/serological features in patients with systemic sclerosis (SSc, n=36)

Age at the time of serum sampling	62.2
(mean years)	
Duration of disease (mean months)	75.0
Type (diffuse:limited)	13:23
m-TSS	11.0
CLINICAL FEATURES	
Pitting scars	43.8
Ulcers	32.0
Nailfold bleeding	48.7
Raynoud's phenomenon	90.3
Telangiectagia	23.1
Contracture of phalanges	85.7
Calcinosis	5.9
Diffuse pigmentation	28.6
Short SF	75.0
Sicca symptoms	53.9
ORGAN INVOLVEMENT	
Pulmonary fibrosis	37.1
Mean %VC (%)	101.4
Mean %DLCO (%)	87.0
Pulmonary hypertension	28.1
Oesophagus	20.6
Heart	29.4
Kidney	0.0
Joint	57.9
Thrombosis	0.0
ANA SPECIFICITY	
Anti-topol	27.8
Anti-centromere	38.9
Anti-U1 RNP	16.7
Anti-SS-A	30.6

Unless indicated, values are percentages.

m-TSS, modified Rodnan's total skin thickness score; SF, sublingual frenulum;

VC, vital capacity; DLco, diffusion capacity for carbon monooxidase;

ANA, antinuclear antibodies; Anti-topol, anti-topoisomerase I antibody;

Anti-centromere, anti-centromere antibodies; Anti-U1 RNP, anti-U1 RNP antibodies; Anti-SS-A, anti-SS-A antibodies.

表 2 : SSc 患者における FL 濃度と臨床症状・検査所見の比較

Table 2. Correlation of serum Flt-3 ligand levels with clinical/serological features in patients

with systemic sclerosis (SSc, n=36)

	Serum Flt-3 ligand	
	Patients with elevated Flt-3 levels (n=14)	Patients with normal Flt-3 levels (n=22)
Age at the time of serum sampling (mean years)	64.9	60.3
Duration of disease (mean months)	58.2	86.6
Type (diffuse:limited)	6:8	7:15
m-TSS	11.6	10.5
CLINICAL FEATURES		
Pitting scars	50.0	40.0
Ulcers	20.0	40.0
Nailfold bleeding	26.7*	63.6
Raynaud's phenomenon	100.0	84.2
Telangiectasia	18.2	26.7
Contracture of phalanges	100.0	77.8
Calcinosis	0.0	10.0
Diffuse pigmentation	42.9	21.4
Short SF	85.7	70.6
Sicca symptoms	45.5	60.0
ORGAN INVOLVEMENT		
Pulmonary fibrosis	37.1	38.1
Mean %VC (%)	103.0	101.0
Mean %DLCO (%)	85.1	88.4
Pulmonary hypertension	27.0	29.0
Oesophagus	35.7	10.0
Heart	28.6	30.0
Kidney	0.0	0.0
Joint	71.4	50.0
Thrombosis	0.0	0.0
ANA SPECIFICITY		
Anti-topol	21.4	31.8
Anti-centromere	50.0	31.8
Anti-U1 RNP	21.4	13.6
Anti-SS-A	57.1	13.6

Unless indicated, values are percentages.

m-TSS, modified Rodnan's total skin thickness score; SF, sublingual frenulum; VC, vital capacity; DLco, diffusion capacity for carbon monoxidase; ANA, antinuclear antibodies; Anti-topol, anti-topoisomerase I antibody; Anti-centromere, anti-centromere antibodies; Anti-U1 RNP, anti-U1 RNP antibodies; Anti-SS-A, anti-SS-A antibodies.

*p<0.05 versus patients with normal Flt-3 ligand levels using Fisher's exact probability test.

エクソーム解析による全身性強皮症原因変異の網羅的探索

研究分担者 岡 晃 東海大学総合医学研究所 講師

研究要旨

本研究は、強皮症の原因変異を直接同定する目的で、エクソン断片のキャプチャーならびに次世代シーケンサーを用いたリシーケンシングによるエクソーム解析を実施した。この解析により、見出された患者間で共有する極めて稀な 18 個の機能性変異の内、6 個の変異について全検体の遺伝子型を決定した。しかしながら、リスクの強い変異も見出されたものの、統計学的に有意な関連を示すものは認められなかった。すなわち患者間で一致する変異を探索する手法では、大きく強皮症発症に寄与するものが検出できたとはいえない。そこで次年度は、さらに稀、もしくは新規の変異を患者エクソームデータから抽出し、患者個体ごとの変異について種々の検討を行う予定である。

A. 研究目的

強皮症の原因遺伝子を探索する目的で、種々の遺伝学的な解析が実施されており、近年ではゲノムワイド関連解析 (GWAS) が行われているが、強皮症と関連があると報告された変異のオッズ比は、HLA 遺伝子を除くと 1.10-1.40 程度とあまりにも低く [1]、それが真実であったとしても、おそらく遺伝要因の数パーセントしか説明できないと考えられる。基本的にこの GWAS はそのマーカーのアリル頻度がコモンであるゆえに、基本的に高頻度の変異しか検出できない。しかしながら、有害な変異は人類進化の過程で、強い選択圧にさらされ、淘汰されるため、コモンな頻度で維持されることは極めて考えにくい [2]。さらに強皮症はその発症頻度が 1 万人に 1 人前後と比較的稀な疾患である。したがって、強皮症の原因変異はおそらく集団中で極めて稀な変異であると想定される。これを検出するに

は、遺伝的マーカーに依存するのではなく、直接ゲノム配列をリシーケンシングするしかない。

そこで本研究は、この強皮症原因変異を同定する目的で、エクソン断片のキャプチャーならびに次世代シーケンサーを用いたリシーケンシングによるエクソーム解析を行うものである。

B. 研究方法

2009 年 4 月～2011 年 3 月の間に、10 施設にて（長崎大学医学部歯学部附属病院・熊本大学医学部附属病院・筑波大学附属病院・慶應義塾大学病院・群馬大学附属病院・札幌医大病院・福島県立医大・東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター・東京大学医学部附属病院・金沢大学附属病院） 325 検体の抗トポイソメラーゼ 抗体陽性の全身性強皮症患者（日本人）ゲノム DNA を収集した。

この検体収集は各機関における倫理委員会の承認の元で実施されている。この検体の中から、さらに高度の皮膚硬化と治療抵抗性の間質性肺疾患を有している重症例を7検体厳選した。続いて、SureSelect Human All Exon 50 Mb Kit (Agilent)によりエクソン断片を濃縮および増幅し、Genome Analyzer IIx (Illumina)によりリシークエンシングを行った。

さらにエクソーム解析の結果を元に、任意に選抜した6個の変異について、325検体を対象に通常のサンガーシークエンシングにて遺伝子型を決定した。

C. 研究結果

昨年度までに一般集団中では極めて稀な、アミノ酸組成に変化をもたらす機能性変異で、且つ患者間で共有するヘテロ接合の変異の抽出を試みた結果、18個の変異見出された。今年度はこれら18個の内、機能的に関連が示唆される6個の変異を選抜し、患者325検体の遺伝子型を決定した。さらに2014年に新たに公開された日本人1,208検体のエクソームデータ(<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB>)をコントロールとし、関連解析を実施した。その結果、オッズ比が3.15ならびに2.74の比較的リスクの強い変異がそれぞれ1個ずつ観察され、その他の4個の変異のオッズ比は2以下であった(表1)。しかしながら統計学的に有意な関連は示されなかった。

D. 考案

エクソーム解析は遺伝的マーカーに依存せ

ず、全エクソンをリシークエンシングするため、稀な変異であっても、網羅的に直接同定することが可能である。一方、見出された変異が疾患発症に寄与しているか否かを判断するには家族例を用いて、その変異と疾患の共伝達を追跡することが最も効率的な方法の一つである。しかしながら日本人における家族例の収集は極めて困難であることから、孤発症例とコントロールを用いて、変異と疾患の関係を推定するしかない。そこで今回は、「強皮症の原因変異は集団中で極めて稀な変異であり、さらに複数の変異、複数の遺伝子が相互作用を及ぼすことにより発症に至る」という仮説たて、前述した変異のスクリーニングを実施した。しかしながら、オッズ比2以上の変異を2個検出したものの、統計学的に有意な関連は示されなかった(表1)。この原因として、数十個の遺伝子を選抜する候補遺伝子アプローチと異なり、今回の実験は約25,000個の遺伝子を対象としたものであるため、極めて稀な変異であっても、その共有が偶然の一致であったことが考えられる。もしくは疾患との関連は真実であって、患者検体を増加させなければ統計学的な関連が示されない程度のものかもしれない。

患者検体数の増加は見込めないため、少なくとも、エクソーム解析に用いた7個体中で一致する変異の探索は概ね失敗と判断し、異なる解析方法を試みなければならない。そこで次年度は個体ごとの変異を検討する。すなわち前述した日本人1,208検体の情報をコントロールとして、さらに稀、もしくは新規の変異を患者エクソームデータから抽出し、プ

ログラム VAAST (Genome Res. 21,1529-42, 2011) などにより、アミノ酸置換情報などを基に尤度比検定し、疾患候補遺伝子をランキングし、順次サンガーシークエンシングにより遺伝子型を同定し、患者集団での評価を行う予定である。

E. 結論

エクソーム解析により得られたデータから、患者間で一致する変異の探索する手法では、大きく強皮症発症に寄与するものが検出できたとは言い難い。そこで次年度は、さらに稀、もしくは新規の変異を患者エクソームデータから抽出し、患者個体ごとの変異について種々の検討を行う予定である。

F. 文献

1. Bossini-Castillo L, Martin JE, Broen J, et al.: A GWAS follow-up study reveals the association of the *IL12RB2* gene with systemic sclerosis in Caucasian populations. Hum Mol Genet. 2012 15;21(4):926-33.
2. Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Inoko H.: Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. J Dermatol. 2012;39(3):231-41.

G. 研究発表

1. 論文発表

- Oka A, Mabuchi T, Ikeda S, Terui T, Haida Y, Ozawa A, Yatsu K, Kulski JK,

Inoko H. IL12B and IL23R gene SNPs in Japanese psoriasis. Immunogenetics. 2013 Nov;65(11):823-8.

- Haida Y, Ikeda S, Takagi A, Komiyama E, Mabuchi T, Ozawa A, Kulski JK, Inoko H, Oka A. Association analysis of the HLA-C gene in Japanese Alopecia Areata. Immunogenetics. 2013 Jul;65(7):553-7.
- Mitsunaga S, Shimizu S, Okudaira Y, Oka A, Tanaka M, Kimura M, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Improved loop-mediated isothermal amplification for HLA-DRB1 genotyping using RecA and a restriction enzyme for enhanced amplification specificity. Immunogenetics. 2013 Jun;65(6):405-15.
- Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K, Morishima Y; Japan Marrow Donor Programme (JM DP). Microsatellite scanning of the immunogenome associates MAPK14 and ELTD1 with graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplantation. Immunogenetics. 2013 Jun;65(6):417-27.
- Ozaki Y, Suzuki S, Shigenari A, Okudaira Y, Kikkawa E, Oka A, Ota M, Mitsunaga S, Kulski JK, Inoko H, Shiina T. HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and

-DRB5 genotyping at a super-high resolution level by long range PCR and high-throughput sequencing. Tissue Antigens. 2014 Jan;83(1):10-6.

3. その他
なし

2. 学会発表
なし

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

表 1

Candidate	Chr	AA Change	Functional predictions				Frequency		OR	95% CI		P
			PolyPhen2	LRT	PhyloP	MutationTaster	Case	Control		Lower	Upper	
1	1	R421Q	Possibly damaging	Deleterious	Non	Non	0.0081	0.0064	1.27	0.36	3.76	0.586
2	1	G559S	Probably damaging	Deleterious	Conserved	Disease-causing	0.0124	0.0068	1.83	0.67	4.63	0.207
3	1	V413M	Possibly damaging	Neutral	Conserved	Disease-causing	0.0063	0.0023	2.74	0.54	12.8	0.125
4	1	M581V	Benign	Neutral	Non	Non	0.0124	0.0068	1.83	0.67	4.63	0.207
5	12	E200A	Benign	Deleterious	Conserved	Disease-causing	0.0325	0.0314	1.06	0.62	1.74	0.801
6	16	S976A	Possibly damaging	Deleterious	Conserved	Non	0.0047	0.0015	3.15	0.25	166	0.363

【書籍】

No.	著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
1	尹 浩信	混合性結合組織病	瀧川雅浩, 渡辺晋一	皮膚疾患最近の話題 2013-2014	南江堂	東京	2013	88
2	尹 浩信	皮膚科におけるステロイド 内服療法。	五十嵐敦之, 宮地良樹, 清水 宏	一冊で分かる最新皮膚科治療	文光堂	東京	2013	73-75
3	遠藤平仁	全身性硬化症(強皮症)	永井良三, 大田健編	今日の治療と看護	南江堂	東京	2013	877 - 879
4	遠藤平仁	全身性強皮症、混合性結合組織病、多発性筋炎、 皮膚筋炎	浦部晶夫, 大田健, 島田和幸, 菅野健太郎	今日の処方	南江堂	東京	2013	669 - 676
5	Shima Y, Kuwana M	Therapeutic potentials of interleukin-6 inhibition for systemic sclerosis.	Cutolo M	Novel Insights into Systemic Sclerosis Management	Future Science Group	London , UK	2013	doi: 10.2217/ EBO. 12.287
6	Kuwana M, Gabrielli A	Autoantibodies and autoimmunity	Hachulla E, Czirják L	Textbook on Systemic Sclerosis	BMJ	London , UK	2013	88-96
7	波多野 将	リウマチ・膠原病における 重要臓器障害と難治性病 態-病態と治療の進歩 トピ ックス 重要な臓器障害 心臓		日本内科学会雑誌 102 巻 10 号	日本内科学会	東京	2013	2543- 2548
8	波多野 将	肺高血圧症の支持療法 肺血管拡張薬投与下でも 支持療法は必要か	松原広己	Circulation3 巻 10 号	医学出版	東京	2013	14-21
9	波多野 将	運動負荷エコーを肺高血 圧症の診断に活かす	大門雅夫	心エコー 14(12)	文光堂	東京	2013	1172- 1178
10	波多野 将	その他の肺動脈性肺高血 圧症における最適治療	松原広己	Cardiovascular contemporary. 2013. vol 2, No.3.	メディシナトル	東京	2013	22-27
11	藤本 学	限局性強皮症	山口徹, 北原光夫, 福井次矢総編集	今日の治療指針 私 はこう治療している TODAY'S THERAPY 2013	医学書院	東京	2013	1049- 1050
12	藤本 学	全身性強皮症	瀧川雅浩, 渡辺晋一編 集	皮膚疾患最新の治療 2013-2014	南江堂	東京	2013	83
13	藤本 学	全身性強皮症に皮膚潰瘍 が生じる機序	古江増隆総編集	皮膚科臨床アセット 12 新しい創傷治療の すべて 褥瘡・熱傷・ 皮膚潰瘍のすべて	中山書店	東京	2013	176-177
14	長谷川稔	強皮症(誤診?) 好酸球 性筋膜炎(本当は)	宮地良樹編	皮膚科+フォトクリニッ クシリーズ 誤診され ている皮膚疾患	メディカルレビュ ー社	東京	2013	222-225

【雑誌】

No.	発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Takehara K, Ihn H, <u>Sato S</u>	A randomized, double-blind, placebo-controlled trial: intravenous immunoglobulin treatment in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis.	Clin Exp Rheumatol	31(2 Suppl 76)	151-156	2013
2	Noda S, Asano Y, Aozasa N, Akamata K, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, <u>Sato S</u>	Clinical significance of serum soluble Tie1 levels in patients with systemic sclerosis.	Arch Dermatol Res	305(4)	325-331	2013
3	Sumida H, Nakamura K, Yanagida K, Ohkawa R, Asano Y, Kadono T, Tamaki K, Igarashi K, Aoki J, <u>Sato S</u> , Ishii S, Shimizu T, Yatomi Y	Decrease in circulating autotaxin by oral administration of prednisolone.	Clin Chim Acta	415	74-80	2013
4	Yanaba K, Asano Y, Noda S, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, <u>Sato S</u>	Increased circulating fibrinogen-like protein 2 in patients with systemic sclerosis.	Clin Rheumatol	32(1)	43-47	2013
5	Yanaba K, Asano Y, Noda S, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, <u>Sato S</u>	Increased production of soluble inducible costimulator in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis.	Arch Dermatol Res	305(1)	17-23	2013
6	Noda S, Asano Y, Takahashi T, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, <u>Sato S</u>	A possible contribution of decreased cathepsin V expression caused by Fli deficiency to the development of dermal fibrosis and proliferative vasculopathy in systemic sclerosis.	Rheumatology	52(5)	790-799	2013
7	Takahashi T, Asano Y, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Noda S, Masui Y, Ichimura Y, Toyama T, Tamaki Z, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, <u>Sato S</u>	The dynamics of serum angiotensin-converting enzyme-2 levels correlates with the efficacy of intravenous cyclophosphamide pulse for interstitial lung disease associated with systemic sclerosis.	Mod Rheumatol	23(5)	884-890	2013
8	Shibata S, Tada Y, Asano Y, Yanaba K, Sugaya M, Kadono T, Kanda N, Watanabe S, <u>Sato S</u>	IL-27 activates Th1-mediated responses in imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions.	J Invest Dermatol	133(2)	479-488	2013
9	Masui Y, Asano Y, Takahashi T, Shibata S, Akamata K, Aozasa N, Noda S, Taniguchi T, Ichimura Y, Toyama T, Tamaki Z, Sumida H, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, <u>Sato S</u> , Kadono T	Clinical significance of monitoring serum adiponectin levels during intravenous pulse cyclophosphamide therapy in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis.	Mod Rheumatol	23(2)	323-329	2013
10	Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Aozasa N, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, <u>Sato S</u>	Serum levels of ADAM12-S: possible association with the initiation and progression of dermal fibrosis and interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis.	J Eur Acad Dermatol Venereol	27(6)	747-753	2013
11	Toyama T, Asano Y, Takahashi T, Aozasa N, Akamata K, Noda S, Taniguchi T, Ichimura Y, Sumida H, Tamaki Z, Masui Y, Tada Y, Sugaya M, <u>Sato S</u> , Kadono T	Clinical significance of serum retinol binding protein-4 levels in patients with systemic sclerosis.	J Eur Acad Dermatol Venereol	27(3)	337-344	2013

12	Aozasa N, Asano Y, Akamata K, Noda S, Masui Y, Yamada D, Tamaki Z, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S	Serum apelin levels: clinical association with vascular involvements in patients with systemic sclerosis.	J Eur Acad Dermatol Venereol	27(1)	37-42	2013
13	Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, Inoue K, Ishikawa O, Kawaguchi Y, Kuwana M, Ogawa F, Takahashi H, Tanaka S, Sato S , Takehara K	Serum chemokine levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicenter,prospective,observational study.	Mod Rheum	23(6)	1076-1084	2013
14	Kimura T, Sugaya M, Blauvelt A, Okochi H, Sato S	Delayed wound healing due to increased interleukin-10 expression in mice with lymphatic dysfunction.	J Leukoc Biol	94(1)	137-145	2013
15	Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Okochi H, Sato S	CXCR3 deficiency prolongs Th1-type contact hypersensitivity.	J Immunol	190(12)	6059-6070	2013
16	Kamata M, Tada Y, Mitsui A, Shibata A, Miyagaki T, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S	ICAM-1 deficiency exacerbates sarcoid-like granulomatosis induced by Propionibacterium acnes through impaired IL-10 production by regulatory T cells.	Am J Pathol	183(6)	1731-1739	2013
17	Shibata S, Asano Y, Sato S	Cutaneous polyarteritis nodosa localized to the arm receiving infusion of abatacept.	Eur J Dermatol	23(5)	738-739	2013
18	Yanaba K, Kamata M, Ishiura N, Shibata S, Asano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Tedder TF, Sato S	Regulatory B cells suppress imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation.	J Leukoc Biol	94(4)	563-573	2013
19	佐藤伸一	全身性強皮症の病態と治療	日本内科学会雑誌	102(5)	1226-1232	2013
20	佐藤伸一	全身性強皮症	最新医学	68	45(1237)-52(1244)	2013
21	佐藤伸一	リウマチ性疾患の皮膚症状・徴候	リウマチ科	50(3)	293-302	2013
22	Kamata M, Tada Y, Tatsuta A, Kawashima T, Shibata S, Mitsui H, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Kanda N, Watanabe S, Sato S	Cyclosporine A Inhibits Interleukin-12p40 and Interleukin-23 production by human monocyte cell line, THP-1 cells.	Clin Exp Dermatol		in press	2012
23	Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Ueda-Hayakawa I, Sato S , Takehara K, Fujimoto M	High incidence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis patients with anti-centriole autoantibodies.	Mod Rheumatol		[Epub ahead of point]	2013
24	Taniguchi T, Asano Y, Tamaki Z, Akamata K, Aozasa N, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sugita M, Sumida H, Kuwano Y, Miyazaki M, Yanaba K, Sato S	Histological features of localized scleroderma 'En coup de sabre': a study of 16 cases.	J Eur Acad Dermatol Venereol		[Epub ahead of point]	2013
25	Ichimura Y, Asano Y, Akamata K, Aozasa N, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S , Kadono T	Serum angiopoietin-like protein 3 levels: a possible correlation with progressive skin sclerosis, digital ulcers, and pulmonary vascular involvement in patients with systemic sclerosis.	Acta Derm-Venereol		[Epub ahead of point]	2013

26	Ichimura Y, Asano Y, Akamata K, Takahashi T, Noda S, Taniguchi T, Toyama T, Aozasa N, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S , Kadono T	Fli1 deficiency contributes to the suppression of endothelial CXCL5 expression in systemic sclerosis.	Arch Dermatol Res		[Epub ahead of point]	2013
27	Masui Y, Asano Y, Akamata K, Aozasa N, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S , Kadono T	Serum resistin levels: a possible correlation with pulmonary vascular involvement in patients with systemic sclerosis.	Rheumatol Int		[Epub ahead of point]	2013
28	Akamata K, Asano Y, Aozasa N, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S	Serum levels of mannose-binding lectin in systemic sclerosis: a possible contribution to the initiation of skin sclerosis in the diffuse cutaneous subtype.	Eur J Dermatol		in press	2013
29	Yanaba K, Asano Y, Akamata K, Noda S, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Toyama T, Ichimura Y, Sumida H, Kuwano Y, Miyazaki M, Sato S	Circulating galectin-1 concentrations in systemic sclerosis: potential contribution to digital vasculopathy.	Int J Rheum Dis		in press	2014
30	Sumida H, Asano Y, Hatano M, Aozasa N, Toyama T, Akamata K, Miyazaki M, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Noda S, Kuwano Y, Yanaba K, Sato S	Effect of ambrisentan on peripheral circulation in patients with systemic sclerosis.	Mod Rheumatol		in press	2014
31	Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, Inoue K, Ishikawa O, Kawaguchi Y, Kuwana M, Ogawa F, Takahashi H, Tanaka S, Sato S , Takehara K	Serum adhesion molecule levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicentre, prospective, observational study.	PLoS ONE		in press	2014
32	Asano Y , Trojanowska M	Fli1 represses transcription of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene by recruitment of the HDAC1/p300 complex.	PLoS One	8	e74930	2013
33	Masui Y, Asano Y , Shibata S, Noda S, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S, Kadono T	A possible contribution of visfatin to the resolution of skin sclerosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis via a direct anti-fibrotic effect on dermal fibroblasts and Th1 polarization of the immune response.	Rheumatology (Oxford)	52	1239-1244	2013
34	Motegi S, Hattori T, Tago O, Shimizu A, Ishikawa O	Systemic sclerosis associated with silicone breast implantation.	European journal of dermatology			2013
35	Motegi S, Yamada K, Shimizu A, Ishikawa O	Tumoral calcinosis in systemic sclerosis associated with multicentric Castleman's disease.	The Journal of dermatology	40(11)	938-939	2013
36	Motegi S, Ishikawa O	Methotrexate-induced Accelerated Nodulosis in a Patient with Rheumatoid Arthritis and Scleroderma.	Acta dermato-venereologica			2013
37	新井美帆, 茂木精一郎, 永井弥生, 石川 治	線状強皮症を伴った全身性強皮症の1例	臨床皮膚科	67(7)	497-500	2013
38	Honda N, Jinnin M, Kira-Etoh T, Makino K, Kajihara I, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Okamoto Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H	miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin $\beta 3$.	Am J Pathol	182	206-216	2013

39	Sakoguchi A, Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Makino K, Honda N, Nakayama W, Inoue K, Fukushima S, Ihn H	The miR-146a rs2910164G/C polymorphism is associated with telangiectasia in systemic sclerosis.	Clin Exp Dermatol	38	99-100	2013
40	Etoh M, Jinnin M, Makino K, Yamane K, Nakayama W, Aoi J, Honda N, Kajihara I, Makino T, Fukushima S, Ihn H	microRNA-7 down-regulation mediates excess collagen expression in localized scleroderma.	Arch Dermatol Res	305	9-15	2013
41	Kudo H, Jinnin M, Yamane K, Makino T, Kajihara I, Makino K, Honda N, Nakayama W, Fukushima S, Ihn H	Intravenous immunoglobulin treatment recovers the down-regulated levels of Th1 cytokines in the sera and skin of scleroderma patients.	J Dermatol Sci	69	77-80	2013
42	Makino K, Jinnin M, Aoi J, Hirano A, Kajihara I, Makino T, Sakai K, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H	Dicoidin domain receptor 2 -micro RNA 196a -mediated negative feedback against excess type I collagen expression is impaired in scleroderma dermal fibroblasts.	J Invest Dermatol	133	110-119	2013
43	Shimada S, Jinnin M, Ogata A, Makino T, Kajihara I, Makino K, Honda N, Nakayama W, Inoue K, Fukushima S, Ihn H	Serum miR-21 levels in patients with dermatomyositis.	Clin Exp Rheumatol	31	161-162	2013
44	Maekawa T, Jinnin M, Ohtsuki M, Ihn H	Serum levels of interleukin-1 in patients with systemic sclerosis.	J Dermatol	40	98-101	2013
45	Makino K, Jinnin M, Hirano A, Yamane K, Eto M, Kusano T, Honda N, Kajihara K, Makino T, Sakai K, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H	The down-regulation of microRNA let-7a contributes to the excessive expression of type I collagen in systemic and localized scleroderma.	J Immunol	190	3905-3915	2013
46	Inoue K, Jinnin M, Yamane K, Makino T, Kajihara I, Makino K, Honda N, Nakayama W, Fukushima S, Ihn H	Down-regulation of miR-223 contributes to the formation of Gottron's eruption in dermatomyositis via the induction of PKC ϵ .	Eur J Dermatol	23	160-167	2013
47	Oshikawa Y, Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Makino K, Honda N, Nakayama W, Inoue K, Fukushima S, Ihn H	Decreased miR-7 expression in the skin and sera of patients with dermatomyositis.	Acta Derm Venereol	93	273-276	2013
48	Koba S, Jinnin M, Inoue K, Nakayama W, Honda N, Makino K, Kajihara I, Makino T, Fukushima S, Ihn H	Expression analysis of multiple microRNAs in each patient with scleroderma.	Exp Dermatol	22	489-491	2013
49	Kajihara I, Jinnin M, Honda N, Makino K, Makino T, Masuguchi S, Sakai K, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H	Scleroderma dermal fibroblasts overexpress vascular endothelial growth factor due to autocrine transforming growth factor β signaling.	Mod Rheumatol	23	516-524	2013
50	Inoue K, Jinnin M, Hara Y, Makino K, Kajihara I, Makino T, Sakai K, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H	Serum levels of tenascin-C in collagen diseases.	J Dermatol	40	715-719	2013
51	伊 浩信	創傷・熱傷ガイドライン	Asahi Medical	42	71-73	2013
52	伊 浩信 , 藤本 学, 佐藤伸一	実地医科のための強皮症早期診断とガイドラインの考え方	マルホ皮膚科セミナー	224	4-12	2013
53	Takemoto R, Jinnin M, Wang Z, Kudo H, Inoue K, Nakayama W, Ichihara A, Igata T, Kajihara I, Fukushima S, Ihn H	Hair miR-29a levels are decreased in patients with scleroderma.	Exp Dermatol			in press

54	Kajihara I, Jinnin M, Yamada S, Ichihara A, Makino T, Igata T, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H	Successful treatment of skin fistulas in systemic sclerosis patients with the combination of topical negative pressure therapy and split-thickness skin grafting.	Mod Rheumatol				in press
55	Ohyoshi Y, Makino T, Nakayama W, Fukushima S, Inoue Y, Jinnin M, Ihn H	Serum levels of leptin receptor in patients with systemic sclerosis.	Rheumatol Int				in press
56	Okada Y, Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Makino K, Honda N, Nakayama W, Inoue K, Fukushima S, Ihn H	MIRSNP rs2910164 of miR-146a is associated with the muscle involvement in polymyositis/ dermatomyositis.	Int J Dermatol				in press
57	Wang Z, Jinnin M, Kudo H, Inoue K, Nakayama W, Honda N, Makino K, Kajihara I, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H	Detection of hair-microRNAs as the novel potent biomarker: Evaluation of the usefulness for the diagnosis of scleroderma.	J Dermatol Sci				in press
58	Miyashita A, Fukushima S, Makino T, Yoshino Y, Yamashita J, Honda N, Aoi J, Jinnin M, Ihn H	Lymphocytic inflammation with CD123 positive cells is a prognostic factor of lupus erythematosus profundus.	Acta Derm Venereol				in press
59	遠藤平仁	好酸球性筋膜炎の疫学診断と治療	リウマチ科	49(4)	443 - 447	2013	
60	遠藤平仁	関節リウマチにおけるステロイドと消炎鎮痛剤	PROGRESS IN MEDICINE	33	1937 - 1940	2013	
61	遠藤平仁	抗好中球細胞質抗体	内科	111(6)	1386	2013	
62	Oka A , Mabuchi T, Ikeda S, Terui T, Haida Y, Ozawa A, Yatsu K, Kulski JK, Inoko H	IL12B and IL23R gene SNPs in Japanese psoriasis.	Immunogenetics	65(11)	823-828	2013	
63	Haida Y, Ikeda S, Takagi A, Komiyama E, Mabuchi T, Ozawa A, Kulski JK, Inoko H, Oka A	Association analysis of the HLA-C gene in Japanese Alopecia Areata.	Immunogenetics	65(7)	553-557	2013	
64	Mitsunaga S, Shimizu S, Okudaira Y, Oka A , Tanaka M, Kimura M, Kulski JK, Inoue I, Inoko H	Improved loop-mediated isothermal amplification for HLA-DRB1 genotyping using RecA and a restriction enzyme for enhanced amplification specificity.	Immunogenetics	65(6)	405-415	2013	
65	Harkensee C, Oka A , Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K, Morishima Y; Japan Marrow Donor Programme (JMDP)	Microsatellite scanning of the immunogenome associates MAPK14 and ELTD1 with graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplantation.	Immunogenetics	65(6)	417-427	2013	
66	Ozaki Y, Suzuki S, Shigenari A, Okudaira Y, Kikkawa E, Oka A , Ota M, Mitsunaga S, Kulski JK, Inoko H, Shiina T	HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 genotyping at a super-high resolution level by long range PCR and high-throughput sequencing.	Tissue Antigens	83(1)	10-16	2014	
67	Ota Y, Kawaguchi Y , Takagi K, Ichida H, Gono T, Hanaoka M, Higuchi T, Yamanaka H	Ghrelin attenuates collagen production in lesional fibroblasts from patients with systemic sclerosis.	Clin Immunol	147	71-78	2013	
68	Katsumata Y, Kawaguchi Y , Baba S, Hattori S, Tahara K, Ito K, Iwasaki T, Yamaguchi N, Hattori H, Nagata K, Okamoto Y, Yamanaka H, Hara M	Serum antibodies against the 70k polypeptides of the U1 ribonucleoprotein complex are associated with psychiatric syndromes in systemic lupus erythematosus: a retrospective study.	Mod Rheumatol	23	71-80	2013	

69	Hanaoka M, Gono T, <u>Kawaguchi Y</u> , Uchida K, Koseki Y, Katsumata Y, Kaneko H, Takagi K, Ichida H, Nitta K, Yamanaka H	Urinary free light chain is a potential biomarker for ISN/RPS class III/IV lupus nephritis.	Rheumatology	52	2149-2157	2013
70	Terao C, Ohmura K, <u>Kawaguchi Y</u> , Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T	PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population.	Arthritis Rheum	65	472-480	2013
71	Suzuki T, Ikari K, <u>Kawaguchi Y</u> , Yano K, Iwamoto T, Kawamoto M, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S	Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility in Japanese rheumatoid arthritis patients.	Mod Rheumatol	23	200-202	2013
72	Masuda A, Yasuoka H, Satoh T, Okazaki Y, Yamaguchi Y, <u>Kuwana M</u>	Versican is upregulated in circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and amplifies a CCL2-mediated pathogenic loop.	Arthritis Res Ther	15(4)	R74	2013
73	<u>Kuwana M</u> , Watanabe H, Matsuoka N, Sugiyama N	Pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease: meta-analysis of clinical trials.	BMJ Open	3	e003113	2013
74	Seta N, Okazaki Y, Miyazaki H, Kato T, <u>Kuwana M</u>	Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 is required for the transformation of circulating monocytes into multipotential cells.	PLoS One	8(9)	e74246	2013
75	Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Satoh T, <u>Kuwana M</u>	Intravenous epoprostenol treatment of patients with connective tissue disease and pulmonary arterial hypertension at a single center.	Mod Rheumatol	23(6)	1211-1220	2013
76	白井悠一郎, <u>桑名正隆</u>	肺高血圧症制圧のための完全ガイド; 膠原病性肺高血圧症の治療も進歩し整理されてきました.	Heart View	17(7)	770-775	2013
77	<u>桑名正隆</u>	寛解を目指す膠原病診療; 全身性強皮症.	内科	112(1)	61-66	2013
78	<u>桑名正隆</u>	膠原病診療の最新情報 - 診断と治療のトピックス - ; 全身性硬化症(強皮症).	Mebio	30(10)	50-57	2013
79	<u>桑名正隆</u>	解説: 強皮症の病態における血管内皮前駆細胞の役割.	臨床免疫・アレルギー科	60(3)	351-356	2013
80	<u>桑名正隆</u>	多方面からの肺高血圧症へのアプローチ; 膠原病に伴う肺高血圧症.	呼吸と循環	61(12)	1117-1122	2013
81	<u>桑名正隆</u>	肺高血圧症 - 内科的治療の展開 - ; 膠原病性肺動脈性肺高血圧症.	循環器内科	74(6)	563-569	2013
82	Kaji K, Noreen F, Medsger TA Jr, Satoh T, Hoshino K, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Lucas M, Schnure A, Ogawa F, Sato S, Takehara K, Fujimoto M, <u>Kuwana M</u>	Autoantibodies to RuvBL1 and RuvBL2: a novel systemic sclerosis-related antibody associated with diffuse cutaneous and skeletal muscle involvement.	Arthritis Care Res			In press
83	<u>Kuwana M</u> , Okazaki Y	Impaired in vivo neovascularization capacity of endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis.	Arthritis Rheum			In press

84	桑名正隆	膠原病における免疫抑制薬の適応と 使い方; シクロホスファミド.	リウマチ科	51(1)		印刷中
85	Okazaki S, Nagoya S, Yamamoto M, Tateda K, <u>Takahashi H</u> , Yamashita T, Matsumoto H	High risk of osteonecrosis of the femoral head in autoimmune disease patients showing no immediate increase in hepatic enzyme under steroid therapy.	Rheumatol Int	33 (1)	51-55	2013
86	鈴木知佐子, 清水悠以, 田邊谷 徹也, 松井 美琴子, 山本元久, <u>高橋裕樹</u> , 篠村恭久, 齋藤正樹	Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome を合 併した全身性強皮症の一例.	臨床リウマチ	25 (1)	34-39	2013
87	Imamura T, Kinugawa K, Kato N, Kagami Y, Endo M, Kaneko N, Minatsuki S, Muraoka H, Inaba T, Maki H, <u>Hatano M</u> , Doi K, Yao A, Takazawa Y, Ono M, Kyo S, Komuro I	Successful treatment of hemodynamic compromise caused by antibody-mediated and cellular rejection in a recipient 12 years after heart transplantation.	Int Heart J	54(5)	328-331	2013
88	Imamura T, Kinugawa K, Ono M, Kagami Y, Endo M, Minatsuki S, Muraoka H, Kato N, Inaba T, Maki H, <u>Hatano M</u> , Yao A, Kyo S, Komuro I	Everolimus-incorporated immunosuppressant strategy improves renal dysfunction while maintaining low rejection rates after heart transplantation in Japanese patients.	Int Heart J	54(4)	222-227	2013
89	Imamura T, Kinugawa K, Kato N, Minatsuki S, Muraoka H, Inaba T, Maki H, Shiga T, <u>Hatano</u> <u>M</u> , Hosoya Y, Takahashi M, Yao A, Kyo S, Ono M, Komuro I	A case with recovery of response to tolvaptan associated with remission of acute kidney injury and increased urine osmolality	Int Heart J	54(2)	115-118	2013
90	Amiya E, Takata M, Watanabe M, Takahashi T, Asano Y, <u>Hatano M</u> , Ozeki A, Watanabe A, Kawarasaki S, Tamaki Z, Taniguchi T, Ichimura Y, Toyama T, Nagai R, Sato S, Komuro I	Presence of desaturated hemoglobin enhances the contribution of blood cells to flow-mediated dilation in subjects with systemic sclerosis.	Int J Cardiol	168(3)	3125- 3127	2013
91	Imamura T, Kinugawa K, <u>Hatano M</u> , Kato N, Minatsuki S, Muraoka H, Inaba T, Maki H, Kimura M, Kinoshita O, Shiga T, Yao A, Kyo S, Ono M, Komuro I	Acute pulmonary vasoreactivity test with sildenafil or nitric monoxide before left ventricular assist device implantation.	J Artif Organs	16(3)	389-392	2013
92	Imamura T, Kinugawa K, Kato N, Minatsuki S, Muraoka H, Inaba T, Maki H, Shiga T, <u>Hatano</u> <u>M</u> , Yao A, Kyo S, Ono M, Komuro I	Successful conversion from thiazide to tolvaptan in a patient with stage d heart failure and chronic kidney disease before heart transplantation.	Int Heart J	54(1)	48-50	2013
93	Imamura T, Kinugawa K, Minatsuki S, Muraoka H, Kato N, Inaba T, Maki H, Shiga T, <u>Hatano</u> <u>M</u> , Yao A, Kyo S, Komuro I	Urine osmolality estimated using urine urea nitrogen, sodium and creatinine can effectively predict response to tolvaptan in decompensated heart failure patients.	Circ J	77(5)	1208- 1213	2013
94	Kato N, Kinugawa K, Imamura T, Muraoka H, Minatsuki S, Inaba T, Maki H, Shiga T, <u>Hatano</u> <u>M</u> , Yao A, Komuro I, Nagai R	Trend of clinical outcome and surrogate markers during titration of -blocker in heart failure patients with reduced ejection fraction: relevance of achieved heart rate and -blocker dose.	Circ J	77(4)	1001- 1008	2013
95	Takahashi T, Asano Y, Amiya E, <u>Hatano M</u> , Tamaki Z, Takata M, Ozeki A, Watanabe A, Kawarasaki S, Taniguchi T, Ichimura Y, Toyama T, Watanabe M, Hirata Y, Nagai R, Komuro I, Sato S	Clinical correlation of brachial artery flow-mediated dilation in patients with systemic sclerosis.	Mod Rheumatol	24(1)	106-111	2014

96	Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M	Scl-cGVHD by promoting expansion of splenic regulatory cells and inhibiting immune cell infiltration into skin.	Arthritis Rheum	65(6)	1624-1635	2013
97	Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF, Fujimoto M	Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease.	Blood	121 (16)	3274-3283	2013
98	Hasegawa M, Imura-Kumada S, Matsushita T, Hamaguchi Y, Fujimoto M , Takehara K	Anti-topoisomerase I antibody levels as serum markers of skin sclerosis in systemic sclerosis.	J Dermatol	40(2)	89-93	2013
99	Arai M, Ikawa Y, Chujo S, Hamaguchi Y, Ishida W, Shirasaki F, Hasegawa M, Mukaida N, Fujimoto M , Takehara K	Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 regulate skin fibrosis in the mouse model of cytokine-induced systemic sclerosis.	J Dermatol Sci	69(3)	250-258	2013
100	Ueda-Hayakawa I, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Fujimoto M	Circulating / T cells in systemic sclerosis exhibit activated phenotype and enhance gene expression of proalpha2(I) collagen of fibroblasts.	J Dermatol Sci	69(1)	54-60	2013
101	Hasegawa M, Hatta Y, Matsushita T, Hamaguchi Y, Fujimoto M , Takehara K	Clinical and laboratory features dependent on age at onset in Japanese systemic sclerosis.	Mod Rheumatol	23(5)	913-919	2013
102	Hamaguchi Y, Fujimoto M , Matsushita T, kaji K, Komura K, Hasegawa M, Koderia M, Muroi E, Fujikawa K, Seishima M, Yamada H, Yamada R, Sato S, Takehara K, Kuwana M	Common and distinct clinical features in adult patients with anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies: heterogeneity within the syndrome.	Plos One	8(4)	e60442	2013
103	Hasegawa M, Fujimoto M , Matsushita T, Hamaguchi Y, Takehara K	Augmented ICOS expression in patients with early diffuse cutaneous systemic sclerosis.	Rheumatology	52(2)	242-251	2013
104	Matsushita T, Fujimoto M	Scleroderma: recent lessons from murine models and implication for future therapeutics.	Expert Rev Dermatol		in press	2013
105	Hatta Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Fujimoto M , Takehara K	The clinical characteristics of juvenile-onset systemic sclerosis in Japanese patients.	Mod Rheumatol		in press	2013
106	Yamamoto T	Increased levels of matrix metalloproteinase-3 in the sera and synovial fluids of patients with pustulotic arthro-osteitis associated with palmoplantar pustulosis: report of 2 cases.	Rheumatol Int	33	1911-1913	2013
107	Shiraishi T, Yamamoto T	Severe dyshidrotic eczema after intravenous immunoglobulin therapy for Kawasaki syndrome.	Pediatr Dermatol	30	e68-69	2013
108	Wakatsuki-Nakamura T, Kato Y, Sakurai, Yamamoto T	A case of severe erythrodermic psoriasis and IgA nephropathy.	Int J Dermatol	52	1579-1581	2013
109	Nomura E, Otsuka M, Yamamoto T	Anetodermic pilomatricoma: report of 3 cases	Int J Dermatol	52	735-738	2013
110	Hanami Y, Yamamoto T	Secondary amyloid deposition in a melanocytic naevus.	Int J Dermatol	52	1031-1032	2013

111	Miura T, <u>Yamamoto T</u>	Perforating pilomatricoma with anetodermic epidermis in an adolescent patient with lymphoma.	Pediatr Dermatol	30	e30-31	2013
112	Ohashi T, Kikuchi N, <u>Yamamoto T</u>	Unusual milia amyloidosis as initial signs of multiple myeloma-associated systemic amyloidosis.	Int J Dermatol	52	981-982	2013
113	<u>Yamamoto T</u>	Cutaneous necrobiotic conditions associated with RA: important extra-articular involvement.	Mod Rheumatol	23	617-622	2013
114	Miura T, <u>Yamamoto T</u>	Eruptive poromas following radiotherapy.	Am J Dermatopathol	35	615-617	2013
115	Nakamura-Wakatsuki T, <u>Yamamoto T</u>	Sarcoidosis presenting erythema nodosum-like lesions: report of two cases.	Our Dermatol Online	4	80-82	2013
116	Kikuchi N, <u>Yamamoto T</u>	Dental infection as a triggering factor in palmoplantar pustulosis.	Acta Derm Venereol	52	721-722	2013
117	Kikuchi N, Otsuka M, <u>Yamamoto T</u>	Acquired reactive perforating collagenosis: a rare association with dermatomyositis.	Acta Derm Venereol	52	735-736	2013
118	Oishi T, Hanami Y, Kato Y, Ohtsuka M, <u>Yamamoto T</u>	Staphylococcal scalded skin syndrome mimicking toxic epidermal necrolysis in a healthy adult.	Our DermatolOnline	4	347-348	2013
119	Wakatsuki-Nakamura T, <u>Yamamoto T</u>	Eruptive pigmented patches in a patient with HIV infection under HAART.	Our Dermatol Online	4	488-489	2013
120	Wakatsuki-Nakamura T, <u>Yamamoto T</u>	Periorbital necrobiotic xanthogranuloma without paraproteinaemia.	Our Dermatol Online	4	341-343	2013
121	<u>Yamamoto T</u>	Angiogenic and inflammatory properties in psoriatic arthritis.	ISRN Dermatology 2013		630-620	2013
122	Satoh M, <u>Yamamoto T</u>	Genital pyoderma gangrenosum: Report of 2 cases and published work review of Japanese cases.	J Dermatol	40	840-843	2013
123	Kato Y, <u>Yamamoto T</u>	Generalized pustular psoriasis triggered by infliximab in two patients with Crohn's disease.	J Dermatol	40	932-933	2013
124	Kato Y, Kawakami Y, <u>Yamamoto T</u>	Injection site reactions of adalimumab spreading on the trunk in a psoriatic arthritis patient.	J Dermatol	40	931-932	2013
125	<u>Yamamoto T</u>	Leser-Trelat sign: Current observations.	Exp Rev Dermatol	8	541-546	2013
126	<u>Yamamoto T</u>	Pustulotic arthro-osteitis associated with palmoplantar pustulosis.	J Dermatol	40	857-863	2013
127	Nakamura-Wakatsuki T, <u>Yamamoto T</u>	Cutaneous myxoid cyst on the sclerotic finger in a patient with diffuse systemic sclerosis.	Our Dermatol Online	4	506-507	2013
128	Kato Y, <u>Yamamoto T</u>	Dramatic effect of sunitinib with rapid but transient improvement for psoriasis in a patient with metastatic renal carcinoma.	J Dermatol	40	1069-1070	2013

129	<u>Yamamoto T</u> , Ueki H	Koebner phenomenon in rheumatoid arthritis.	J Genetic Synd Gene Ther	4	8	2013
130	<u>Yamamoto T</u>	Erlotinib-induced adverse cutaneous reactions.	The Open Allergy J	6	22-29	2013
131	Mori T, <u>Yamamoto T</u>	Vancomycin-induced linear IgA bullous dermatosis showing isomorphic response.	Our Dermatol Online	4 (Suppl 3);	619-620	2013
132	Hiraiwa T, Hanami Y, <u>Yamamoto T</u>	Hidradenitis suppurativa and multiple dermatofibromas in a patient with ulcerative colitis.	J Dermatol	40	1071-1072	2013
133	<u>Yamamoto T</u>	Postherpetic oral ulcers misdiagnosed as pemphigus in a patient with rheumatoid arthritis under bucillamine therapy.	Our Dermatol Online	4 (Suppl 3)	625-626	2013
134	<u>Yamamoto T</u>	Sweet's syndrome and erythema nodosum possibly induced by salazopirine.	Int J Dermatol		in press	
135	Ohashi T, Takenoshita H, <u>Yamamoto T</u>	Acantholysis in mammary Paget disease.	Am J Dermatopathol		in press	
136	Ohashi T, <u>Yamamoto T</u> , Okochi M	Keratoacanthoma with secondary ossification.	Int J Dermatol		in press	
137	Hiraiwa T, Rokkaku Y, <u>Yamamoto T</u>	Palmoplantar pustulosis with arthro-osteitis triggered by recurrent appendeal abscess 5 years after appendectomy.	Int J Dermatol		in press	
138	Ohtsuka M, Kikuchi N, <u>Yamamoto T</u> , Suzutani T, Nakanaga K, Suzuki K, Ishii N	Bruri ulcer caused by mycobacterium ulcerans subsp shinshuense: a rare case of familial concurrent occurrence and detection of insertion sequence 2404 in Japan.	Arch Dermatol		in press	
139	<u>Yamamoto T</u> , Furukawa H, Otsuka M	Amyloid deposition in disseminated superficial porokeratosis with inflammatory stages.	J Dermatol	40	1059-1060	2013
140	<u>Yamamoto T</u> , Hirano M, Momiyama M, Ueda K	Basaloid follicular hyperplasia in the overlying epidermis of pilomatricoma	Int J Dermatol (accepted)			
141	Kawasaki A, Inoue N, Ajimi C, Sada K, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Sumida T, Tohma S, Miyasaka N, Matsuo S, Ozaki S, Hashimoto H, Makino H, Harigai M, <u>Tsuchiya N</u>	Association of <i>IRF5</i> polymorphism with MPO-ANCA positive vasculitis in a Japanese population.	Genes Immun	14(8)	527-529	2013
142	Jin G, Hamaguchi Y, Matsushita T, <u>Hasegawa M</u> , Le Huu D, Ishiura N, Naka K, Hirao A, Takehara K, FujimotoM	B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells.	J Allergy Clin Immunol	131(6)	1674-1682	2013
143	三宅美帆, 和薬孝昌, 石井貴之, <u>長谷川稔</u> , 藤本学, 竹原和彦	著名な腹部膨満を呈し、偽性腸閉塞、腸管囊腫様気腫症を合併した全身性強皮症	皮膚病診療	35(10)	961-964	2013
144	岡本芳伸, 濱口儒人, <u>長谷川稔</u> , 竹原和彦	ボセンタン内服中に腹水貯留を認めた全身性強皮症	皮膚病診療	35(10)	973-976	2013
145	<u>田中住明</u>	我が国における肺高血圧症の最新治療の現状 膠原病性肺高血圧症の標準的治療の現状	Therapeutic Research	34(9)	1213-1215	2013

146	田中住明、荘 信博	【肺高血圧症の最新治療戦略】膠原病に伴う肺高血圧症 治療の開始時期とゴール.	Circulation	3(10)	44-52	2013
147	田中住明	【リウマチ・膠原病における重要臓器障害と難治性病態-病態と治療の進歩】トピックス 難治性の病態 肺高血圧症.	日本内科学会雑誌	102(8)	2613-2620	2013
148	Fujiko Someya, Naoki Mugij, Tetsutarou Yahata, Takao Nakagawa	Exercise capacity in relation to autoantibodies in systemic sclerosis patients.	Rheumatol Int	33	2913-2916	2013
149	Fujiko Someya, Naoki Mugij, Minoru Hasegawa, Tetsutarou Yahata, Takao Nakagawa	Predictors of Exercise-Induced Oxygen Desaturation in Systemic Sclerosis Patients With Interstitial Lung Disease.	RESPIRATORY CARE	59	75-80	2014