

## 皮膚, 内臓硬化における線維化の機構

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/3689">http://hdl.handle.net/2297/3689</a>

皮膚、内臓硬化における線維化の機構

竹原 和彦

要 旨

皮膚と内臓硬化の両者を同時に来す代表的な疾患として全身性強皮症を取り上げ、皮膚および内臓諸臓器の線維化の機構について最近の知見について概説した。

全身性強皮症の発症機構として様々な機序が考えられているが、免疫異常，コラーゲン代謝異常，血管異常，細胞成長因子・サイトカイン異常などが複雑に関与していると考えられている。近年出産歴のある，女性例では胎児由来の血液幹細胞が超“chronic GVHD”を誘導し本症が発症をすすとする“microchimerism仮説”が注目されている。また我々は，TGF- $\beta$ が線維化を誘導し，CTGFが線維化を維持するという二段階線維化を誘導し，CTGFが線維化を維持するという二段階線維化仮説を提唱しており，この説についても詳しく紹介したい。 [日内会誌 90：145～150，2001]

**Key words**：強皮症，線維化，TGF- $\beta$ ，CTGF，microchimerism

はじめに

全身性強皮症は皮膚硬化を主徴とし，皮膚以外にも肺，食道，腎，心などの内臓諸臓器にも線維化を来す系統的疾患で，いわゆる膠原病の1つとして分類される。本症の病因は未だ不明であるが，本症の病因の解明および根治的治療法の確立は急務であり，我が国においては歴代の厚生省強皮症調査研究班を中心に，精力的な研究が積み重ねられている。

強皮症の病因に対するアプローチはきわめて多方面より試みられているが，その代表的なものとしては以下の領域に大別される。

①免疫異常：本症患者の90%は抗核抗体陽性であり，本症に特異的な抗核抗体の存在が知られている<sup>1)</sup>。

②コラーゲン代謝：患者病変部由来線維芽細胞におけるコラーゲン合成の亢進が知られてお

り，その機序についても詳細な検討が重ねられてきている<sup>2)</sup>。

③血管障害：本症患者の大部分はレイノー現象などの末梢血管障害を有しており，本症を血管障害を基盤とした疾患であるとの考えも有力である。

④細胞成長因子・サイトカイン異常：細胞成長因子ならびにサイトカインに関する研究は近年飛躍的に進歩し，本症においても各種細胞成長因子・サイトカイン異常とコラーゲン代謝異常の関連が注目されている。本稿では紙面の制約もあるので，最新のトピックスとして①の免疫異常の観点より“microchimerism仮説”を，④の細胞成長因子・サイトカイン異常の観点より我々の提唱する“二段階線維化仮説”を紹介したい。

1. Microchimerism

1) Microchimerismとは

近年，分子生物学的手法の進歩により，多く

たけはら かずひこ：金沢大学皮膚科

の妊婦において胎児由来の血球細胞が末梢血に検出されることが明らかにされ、最長出産後27年後まで胎児由来の細胞が母体内で生存していることが報告された。また、これらの細胞はCD34, CD38陽性の幹細胞的性格を持つことも明らかにされた。以上の所見より、胎児由来の血球細胞が免疫機構を破壊させ、ある種の慢性移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) を引き起こすことによって自己免疫疾患の発症が誘導されるのではないかとの仮説が提唱され<sup>3)</sup>、膠原病研究者の間で注目を集めている。従来より、ほとんどの膠原病において圧倒的に女性の発症率が高いことが知られていたが、そのメカニズムについては明らかにされていなかった。この「Microchimerism仮説」は、女性における膠原病の発症率の高さをも説明しようものと考えられ、膠原病研究のbreakthroughとして期待を集めている。

## 2) 強皮症とGVHD

以前より慢性GVHD患者の一部に強皮症類似の皮膚硬化がみられることがあり、強皮症とGVHDの類似性について注目が集められてきた。表1に両者を対比した。

Microchimerism仮説が提唱された後は、強皮症に特に関心が集められ、1998年には2つのグループより強皮症とMicrochimerismに関する研究が報告された<sup>4,5)</sup>。以下にその2つの研究を紹介する。

Nelsonらは、男児出産歴のある女性、16例の正常コントロール、17例の強皮症患者において、PCR法によって末梢血よりY染色体に特異的な塩基配列の増幅を試みた。その結果、正常人では16ml中の末梢血に平均0.38個の男性DNAを有する細胞を認めたのに対して、強皮症患者では平均11.1個と、胎児由来細胞の有意な増加を認めた。なお、最も若い男児の出産後の年数は、正常コントロールで平均15.4年、強皮症患者で平均18.5年であった。また患者又は正常コントロールと男児間とのHLA適合性を調べ、HLA

表1. 全身性強皮症と慢性GVHDの対比

	全身性強皮症	慢性GVHD
皮膚硬化	++	+
扁平苔癬様皮疹	-	++
筋炎	+	+
シェーグレン症候群	++	++
消化管病変	++	++
肺病変	++	++
腎病変	+	±
レイノー現象	++	±
抗核抗体	++	+
疾患特異抗核抗体	++	-

class IIの適合率が患者でより高いことを示している。すなわち、HLAの合致率が高い方がより胎児由来の幹細胞が拒絶されることなく長期生存することが推論されている<sup>2)</sup>。

次いでArtlettらは、女性強皮症患者の皮膚病変においてY染色体に特異的な塩基配列を有する細胞の浸潤を*in situ* hybridization法にて証明した。更にNelsonらと同様に末梢血においても、Y染色体の塩基配列を患者群で69例中32例、46%に証明したのに対して、正常コントロールでは25例中1例、4%であったと報告している<sup>5)</sup>。

## 3) Microchimerism仮説に対する反論

Microchimerism仮説は強皮症研究者に大きなインパクトを与えたが、既に数多くの反論が寄せられている。そのいくつかを以下に紹介したい。

(1) 強皮症と慢性GVHDに類似性はあるものの、その病態は完全には一致しない。特に皮膚硬化の分布、進展様式が全く異なる。また、強皮症患者に認められる特異抗核抗体は慢性GVHDでは検出されない。

(2) 元来、GVHDは末梢血中の免疫担当細胞の大部分がAllo由来の細胞で置き換えられた状態で発症するが、Nelsonらの研究で示された細胞数は16ml中最大61個である。

(3) PCR法は非特異的配列を認識することが稀ではなく、PCR法のみでは完全に胎児由来の

細胞を証明したとはいいい難い。

(4) 小児発症や男性例の強皮症については Microchimerism 仮説では説明できない。(但し、母親由来の幹細胞が胎児例で生存しているのではないかと仮説もある。)

(5) 強皮症患者末梢血中にみられる胎児由来細胞数の増加が正しいとしても、それは疾患の原因ではなく、患者末梢血中における種々のサイトカインレベルの上昇による増加を結果として反映しているのに過ぎないのではないか。

なお、Nelsonらの論文が発表された同じ号の Lancet 誌に、“Scleroderma: chimerism, the blind man, and the scientist” なるタイトルで痛烈な批判が述べられている。さらに、同じく Nelsonらのグループより T細胞, B細胞, NK細胞の分画ごとの解析では正常人と強皮症との間で明らかな差を認めなかったことも新たに報告された<sup>6)</sup>。

#### 4) Microchimerism 仮説の今後

Microchimerism 仮説を主張するグループよりも強皮症そのものをある種の慢性GVHDとする考え方から、発症の引き金としての免疫寛容破綻すなわち自己免疫現象の誘導に Microchimerism が関与しているのではないかとする考え方にシフトをしているようである。今後の検証が期待される。また、強皮症以外の膠原病における研究も待たれるところである。

## 2. 二段階線維化仮説

1989年 LeRoyらにより、本症の病因仮説として “transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 仮説” が提唱され<sup>7)</sup>、にわかに本症と TGF- $\beta$  の関連について注目が集まった。当時、TGF- $\beta$  は皮膚線維芽細胞によるコラーゲン合成促進、血管内皮細胞の増殖抑制作用を有する<sup>8)</sup>などの生理活性が知られており、これらの生理活性をもつ TGF- $\beta$  は、本症の病態を単一の因子で説明するうえで有力な候補であると考えられた。その後

の研究では、本症への TGF- $\beta$  への関与を肯定するものと否定するものが混在しており、今日的には病初期を通じて TGF- $\beta$  が活性化しているのではないとの見解が有力である。

我々は、CTGF (connective tissue growth factor, 結合組織成長因子) という比較的最近発見された細胞成長因子が、TGF- $\beta$  とともに強皮症の発症に関与しているのではないかと考え、「二段階線維化仮説」を提唱している。以下にこの仮説とその根拠となったデータを示したい。

#### 1) CTGF とは

従来より種々の血管由来の血管内皮細胞はその培養上清中に、線維芽細胞や平滑筋細胞などの間葉系細胞に対して PDGF とほぼ同様の生理活性物質を有する蛋白質を放出することが知られていた。この生理活性がヒト PDGF に対する抗血清によって中和され、またこれらの血管内皮細胞由来の PDGF A鎖または PDGF B鎖 (cis) の遺伝子を表現していたことより、血管内皮細胞由来の PDGF 類似物質は血小板由来の PDGF と同一のものであろうと長く信じられてきた。

しかしながら Bradhamらは、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の培養上清を抗ヒト PDGF 抗体をプローブとした免疫プロット法にて検討したところ、36kdの位置にバンドが得られ、これは血小板由来 PDGF の A鎖もしくは B鎖より構成されるダイマー (30~32kd) より大きく、還元状態でも 38kd のバンドがみられることよりモノマーと考えられた。彼はさらに  $\lambda$ gt11 をベクターとするヒト臍帯静脈血管内皮細胞の cDNA ライブラリーを用い、抗ヒト PDGF 抗体でスクリーニングすることによって上記の物質のクローニングに成功し CTGF と名付けた<sup>9)</sup>。

CTGF cDNA の塩基配列より予測される CTGF のアミノ酸配列によれば CTGF は 349 個のアミノ酸からなり、N 末端に分泌蛋白質であることを示す疎水性の高いリーダー配列がみら

表2. 各種皮膚線維化疾患における病変部 CTGF mRNA の発現

	CTGF mRNA (+)	陽性率
全身性強皮症 【組織学的皮膚硬化 (+)】	12/12	100%
全身性強皮症 【組織学的皮膚硬化 (-)】	0/4	0%
限局性強皮症	8/9	89%
ケロイド	5/6	83%
正常コントロール	0/5	0%

れ、CTGFが培養上清中に見出される事実に一致する。N-糖鎖結合部位が存在すると予測される部位が2カ所(28および225番目のアスパラギン)にみられる。39個という多数のシステイン残基をもち、分子内で多数のS-S結合を作っているものと思われ、還元状態と非還元状態で泳動度が異なるのはこのためであろう。CTGFcDNAとPDGFのA鎖もしくはB鎖のcDNAとの相同性は40%であった。

CTGFは前述のごとくヒト臍帯静脈血管内皮

細胞によって産生され、分泌される。また、ヒト包皮線維芽細胞がTGFβ刺激下でPDGF様蛋白質を分泌することがSomaらによって報告されている<sup>10)</sup>、Igarashiらはこの物質がCTGFであることを明らかにした<sup>11)</sup>。ヒト包皮線維芽細胞はPDGF、EGF、acidicおよびbasic FGFならびにTGFβによってその増殖が促進されるが、TGFβによる<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みの上昇は他の細胞成長因子と異なり36時間後にpeakをむかえ、その作用は自らが産生したCTGFを介するautocrine systemを介するものと考えられた。また、CTGFのmRNAはTGFβ刺激によってのみその発現が見られ、他の細胞成長因子によっては制御されていないことも明らかにされている。

2) CTGFmRNAは強皮症硬化期に一致して病変部で発現されている

我々は、*in situ* hybridization法にて表2に示すごとく、強皮症の皮膚硬化の有無と完全に一致してCTGFmRNAが発現されることを報告し

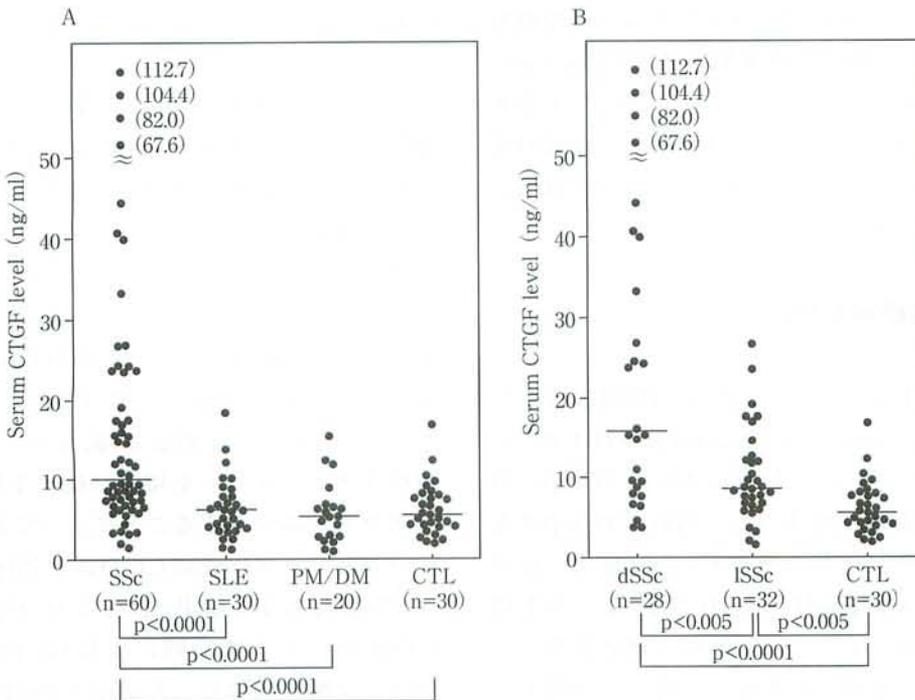


図1. 各種膠原病およびdSSc, ISScにおける血中CTGF値

表3. 新生マウスにおけるサイトカイン注入と線維化の誘導 (1)

サイトカイン (day0 ~ day7)	線維化		
	day3	day7	day14
PBS	-	-	-
TGF- $\beta$ 1	+	-	-
TGF- $\beta$ 2	++	-	-
TGF- $\beta$ 3	+	-	-
CTGF	±	-	-
TGF- $\beta$ 3 + CTGF	++	++	++

サイトカインは day0 ~ day7 まで連日皮下に注入した。

(TGF- $\beta$ 5; 800ng, CTGF: 400ng)

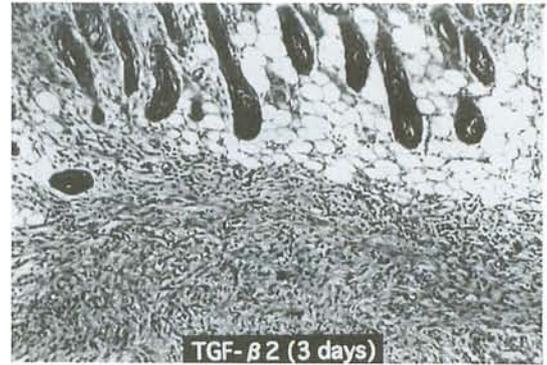


図2. TGF- $\beta$ により誘導された新生マウスの線維化  
TGF- $\beta$ を新生マウス皮下に3日間連日投与すると、図に示したように線維化を伴った肉芽組織が誘導される。この変化は $\beta$ 2> $\beta$ 3> $\beta$ 1の順であった。しかし、7日間連日注入後にはこれらの変化はほぼ消失し、不可逆的な線維化の誘導にはbasic-FGFまたはCTGFの共同作用が必要であった。

ている<sup>12)</sup>。すなわち、presclerotic stageやatrophic stageの病変部ではCTGF mRNAの発現は全く見られず、硬化を伴うstageではその程度に一致してCTGF mRNAの発現が観察された。

3) 血中CTGF濃度は強皮症患者で上昇しており、その値は皮膚硬化や肺線維症と一致する我々はELISA法にて血中CTGF濃度を測定し、その結果を報告しているが<sup>13)</sup>、図1A, Bに示すように、強皮症患者血中CTGF濃度は正常人コントロール, SLE, 皮膚筋炎・多発性筋炎に比して有意に高値であった。また、より重症型のdiffuse cutaneous型で軽症型のlimited cutaneous型に比してより高値であった。更にCTGF高値例では、肺線維症の合併が高率にみられた。更に、一般に硬化が進行する発症後1~3年の時期において特に血中CTGFの上昇が観察された。

4) 皮膚線維化モデルマウスにおいて、TGF- $\beta$ が皮膚線維化を誘導し、CTGFが線維化を維持する

我々は、新生マウスの皮下にサイトカインを注入し線維化を誘導する実験モデルの確立を試み、継続的な皮膚線維化のモデルマウスの作成に成功した<sup>14, 15)</sup>。TGF- $\beta$ のみの注入では $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3のいずれのアイソフォームを用いても誘導される線維化は一過性であったが、TGF- $\beta$ とCTGFを同時注入することによりその変化は継

表4. 新生マウスにおけるサイトカイン注入と線維化の誘導 (2)

サイトカイン		線維化		
day0 ~ 3	day4 ~ 7	day3	day7	day10
PBS	PBS	-	-	-
TGF- $\beta$	CTGF	+	++	++
CTGF	TGF- $\beta$	±	+	-

続的なものとなった(表3)(図2)。更にTGF- $\beta$ を最初の3日間注入し、次にCTGFを4日間投与することにより不可逆的な線維化が認められたが、その逆、すなわちCTGFを先に投与し、TGF- $\beta$ を後に投与してもTGF- $\beta$ 単独と比較して有意な変化はみられなかった(表4)。

以上のことより、我々の皮膚線維化モデルマウスにおいては、TGF- $\beta$ が皮膚線維化を誘導し、CTGFが線維化を維持することが示された。

#### 5) 強皮症における二段階線維化仮説

以上、示した強皮症患者及び皮膚線維化モデルマウスにおいて観察された事実より、我々は図3に示す病因仮説を提唱している。CTGFはTGF- $\beta$ によって一旦は誘導されるが、その後は何らかの機構が働き消失する。しかしながら、強皮症においては一旦誘導されたCTGFが持続

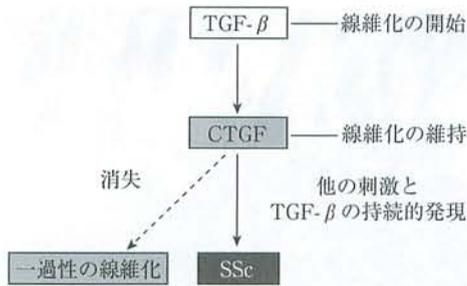


図3. 全身強皮症 (SSc) における線維化の二段階仮説

的に発現，作用するために不可逆的線維化が維持されるものと考えている。

### 3. 今後の展望

Microchimerism仮説については，現在多くの強皮症研究グループによって追加研究が重ねられており，その真の意義については近く明らかにされよう。

我々の二段階線維化仮説に基づけばCTGF蛋白の恒常的な作用を制御することが本症の治療法開発に結びつくことが期待され，現在我々は各種モノクロナル抗体やCTGFアンチセンスをマウス線維化モデルに応用し，検討を重ねている。

#### 文 献

- 1) 竹原和彦：全身性強皮症と自己抗体，診断と治療 85：545, 1993.
- 2) 竹原和彦：全身性強皮症の発症機構，診断，治療，現代医療 31：783, 1999.
- 3) Nelson JL: Maternal-fetal immunology and autoimmune disease. Is some autoimmune disease autoalloimmune or allo-autoimmune?. Arthritis Rheum 39:191-194, 1996.
- 4) Nelson JL, et al: Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. Lancet 351: 559-562, 1998.

- 5) Artlett CM, et al: Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. N Eng J Med 338: 1186-1191, 1998.
- 6) Evans PC, et al: Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. Blood 93:2033-2037, 1999.
- 7) LeRoy EC, et al: A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis: is transforming growth factor  $\beta$  the answer?. Arthritis Rheum 32: 817-825, 1989.
- 8) Takehara K, et al: TGF- $\beta$  inhibition of endothelial cell proliferation: alteration of EGF binding and EGF-induced growth-regulatory (competence) gene expression. Cell 49: 415-422, 1987.
- 9) Bradham DM, et al: Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. J Cell Biol 114: 1285-1294, 1991.
- 10) Soma Y, Grotendorst GR: TGF- $\beta$  stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. J Cell Physiol 140: 246-253, 1989.
- 11) Igarashi A, et al: Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. Mol Biol Cell 4: 637-645, 1993.
- 12) Igarashi A, et al: Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. J Invest Dermatol 105: 280-284, 1995.
- 13) Sato S, 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. J Rheumatol 27: 149-154, 2000.
- 14) Shinozaki M, et al: Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by transforming growth factor  $\beta$ -Simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis. Biochem Biophys Res Commun 237: 292-297, 1997.
- 15) 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.