

学位論文題名

Upregulated expression of tumor necrosis factor- $\alpha$   
converting enzyme in peripheral monocytes in  
patients with early systemic sclerosis

(早期強皮症患者由来末梢血単球におけるtumor necrosis factor- $\alpha$   
converting enzymeの発現亢進に関する研究)

学位論文内容の要旨

強皮症(systemic sclerosis: 以下 SSc)は、皮膚硬化を臨床的特徴とする原因不明の慢性炎症性疾患である。その病態として、炎症に引き続いておこる皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管障害等が想定されている。発症早期ではリンパ球、マクロファージなどの炎症性単核球の皮膚浸潤が起こり、これら炎症性細胞から産生されるサイトカイン、成長因子等が血管障害、線維芽細胞増殖、線維化を引き起こすと考えられている。血清学的検査においても、多くの症例で高ガンマグロブリン血症や抗核抗体、抗 Topoisomerase-I 抗体等の自己抗体が検出されることより、細胞性、液性免疫両者の異常が病態形成に関わっていると考えられている。

臨床的には、急速に皮膚硬化が進行する症例、肺線維症、心伝導障害、腎障害、消化管運動障害等の合併症を有する症例の生命予後、社会的予後は不良である。これまで、免疫抑制薬を含めてさまざまな治療法が試みられているが、現時点において有効性の認められた治療法は少ない。このように治療選択肢が少ない点、生命予後が不良である点、病態形成に免疫異常の関与が想定される点から急速に進行する強皮症早期例に対する自家末梢血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法 (autologous peripheral blood stem cell transplantation: 以下 APBSCT) の適応が検討されるようになった。これまでのところ、SSc を含めた自己免疫疾患に対する APBSCT は主に欧米で第 I、II 相試験が試みられ、その有効性が報告されてきている。当科においても本学医の倫理委員会へ同療法の申請を行い、インフォームド Consent および倫理委員会判定委員会の承認が得られた強皮症患者に対して同療法を施行した。施行後、従来の治療法では経験されない急速な皮膚病変の改善が観察された。このように急速な病態改善が得られたことから、治療前後の末梢血単核球における遺伝子発現状況を網羅的に検討することで、強皮症の病態に関わる因子を検討することを目的とした。

事前に文書による同意の得られた APBSCT 施行 SSc 患者 3 名、APBSCT を施行していない SSc 患者 20 名、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: 以下 RA) 患者 29 名、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: 以下 SLE) 患者 16 名、健常者コントロール 36 名より得た末梢血単核球を用いた。まず、cDNA アレイ法により網羅的遺伝子発現解析を行い、real-time PCR 法により mRNA 発現レベルの定量化を行った。末梢血単核球における蛋白レベルでの発現をフローサイトメトリー法 (Fluorescent-activated cell sorter: 以下 FACS) で検討し、各臨床病態との関連を評価した。統計学的検討は、StatView 5.0 を用いて行った。

cDNA アレイ法および real-time PCR 法を用いた検討から、SSc 特異的発現を示す候補遺伝子として、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) converting enzyme (以下 TACE)、monocyte chemoattractant protein-3 (以下 MCP-3)、macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  (以下 MIP-3 $\alpha$ )が抽出された。いずれも monocyte/macrophage においてその発現が報告されており、MCP-3、MIP-3 $\alpha$ はケモカインに属し、細胞遊走能に関与することが知られている。TACE は、TNF- $\alpha$ をはじめとするサイトカイン、受容体等の可溶化に関わっていることが報告されており、広く免疫システムに影響を与えることが予測されることより、TACE の発現状況について更に検討を加えた。FACS を用いた各末梢血単核球分画の検討では、TACE の発現は主に末梢血単球に認められた。各疾患別の発現を検討したところ、SSc 特に皮膚硬化発症 3 年以内の早期症例で末梢血単球における TACE の発現が有意に亢進していた。臨床症状との検討では、血清 C-reactive protein level、自己抗体の有無、心、肺、腎障害合併の有無等との相関は認められなかった。FACS を用いた TACE 発現と monocyte/macrophage の活性化の関連を CD68、CD69、CD71 の発現状況で検討した。その結果、monocyte/macrophage の成熟・活性化の状態を示す CD68 の発現レベルと有意な相関が認められた。これらの結果より、早期 SSc 患者由来末梢血単球における TACE 発現亢進は、単なる炎症症状を反映しているのではなく、特に SSc 発症早期の病態形成への関与が示唆される。

これまでのところ多くの報告において transforming growth factor- $\beta$  (以下 TGF- $\beta$ )の SSc の病態形成への関与が示唆されている。TACE は、膜結合型 TNF- $\alpha$ の可溶化に関与するが、可溶化 TNF- $\alpha$ は *in vitro* の検討で、皮膚線維芽細胞において TGF- $\beta$ と拮抗的、つまり、線維化抑制に働くことが報告されている。今回得られた結果は、現在想定されている病態と一見矛盾するが、TACE は、膜結合型 TNF- $\alpha$ の可溶化に加えて、TNF- $\alpha$ 受容体(TNF- $\alpha$  receptor: 以下 TNF-R)の切断(可溶化)を行うことが報告されている。TNF-R の切断に関与することで、皮膚線維芽細胞の線維化抑制作用を抑制し線維化を引き起こしている可能性が考えられる。発症早期 SSc 患者において、血清 TNF-R 濃度と SSc 重症度が相関するとの報告もあり、この仮説を支持するものと考えられる。

SSc は、有効性の証明された治療法がなく、その病態も不明な点が多い。発症早期 SSc 患者由来末梢血単球における TACE の発現亢進は、SSc の病態形成に関与している可能性があり、その解明により疾患特異的治療につながる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 宏  
副 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 島 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

## Upregulated expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ converting enzyme in peripheral monocytes in patients with early systemic sclerosis

(早期強皮症患者由来末梢血単球における tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzymeの発現亢進に関する研究)

強皮症(systemic sclerosis: 以下 SSc)は、皮膚硬化を臨床的特徴とする原因不明の慢性炎症性疾患である。その病態として、炎症に引き続いておこる皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管障害等が想定され、細胞性、液性免疫両者の異常が病態形成に関わっていると考えられている。臨床的には、急速に皮膚硬化が進行する症例、肺線維症、心伝導障害、腎障害、消化管運動障害等の合併症を有する症例の生命予後、社会的予後は不良である。これまでのところ有効性の証明された治療法はほとんど無いが、主に欧米より強皮症早期例に対する自家末梢血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法(autologous peripheral blood stem cell transplantation: 以下 APBSCT)の有用性が報告されてきている。当科においても本学医の倫理委員会へ同療法の申請を行い、インフォームドコンセントおよび倫理委員会判定委員会の承認が得られた SSc 患者に対して同療法を施行した。施行後、これまでの報告同様、急速な皮膚病変の改善が観察された。このように急速な病態改善が得られたことから、治療前後の末梢血単核球における遺伝子発現状況を網羅的に検討することで、強皮症の病態に関わる因子を検討することを目的とした。事前に文書による同意の得られた APBSCT 施行 SSc 患者 3 名、APBSCT を施行していない SSc 患者 20 名、関節リウマチ(rheumatoid arthritis: 以下 RA)患者 29 名、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: 以下 SLE)患者 16 名、健常者コントロール 36 名より得た末梢血単核球を用いた。まず、cDNA アレイ法により網羅的遺伝子発現解析を行い、real-time PCR 法により mRNA 発現レベルの定量化を行った。末梢血単核球における蛋白レベルでの発現をフローサイトメトリー法(Fluorescent-activated cell sorter: 以下 FACS)で検討し、各臨床病態との関連を評価した。統計学的検討は、StatView 5.0 を用いて行った。cDNA アレイ法および real-time PCR 法を用いた検討から、SSc 特異的発現を示す候補遺伝子として、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) converting enzyme (以下 TACE)、monocyte chemoattractant protein-3 (以下 MCP-3)、macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  (以下

MIP-3 $\alpha$ )が抽出された。これらの内、TACE は TNF- $\alpha$ をはじめとするサイトカイン、受容体等の可溶化に関わっていることが報告されており、広く免疫システムに影響を与えることが予測されることより、TACEの発現状況について更に検討を加えた。FACSを用いた各末梢血単核球分画の検討では、TACE の発現は主に末梢血単球に認められた。各疾患別の発現を検討したところ、SSc 特に皮膚硬化発症 3 年以内の早期症例で末梢血単球における TACE の発現が有意に亢進していた。臨床症状との検討では、血清 C-reactive protein level、自己抗体の有無、心、肺、腎障害合併の有無等との相関は認められなかった。FACS を用いた TACE 発現と monocyte/macrophage の活性化の関連を CD68、CD69、CD71 の発現状況で検討した。その結果、monocyte/macrophage の成熟・活性化の状態を示す CD68 の発現レベルと有意な相関が認められた。これらの結果より、早期 SSc 患者由来末梢血単球における TACE 発現亢進は、単なる炎症症状を反映しているのではなく、特に SSc 発症早期の病態形成への関与が示唆される。これまでのところ、TACE と強皮症の関係を示唆する報告は無いが、SSc 患者において TACE の基質である TNF- $\alpha$ 、TNF-R、CD40L、fractalkine、I-selectin 等の血中濃度上昇が報告されており病勢との関連も示唆されていることより TACE の SSc 病態形成への関与の可能性が考えられた。質疑応答では、副査 島山教授から、HSCT (hematopoietic stem cell transplantation) の分子、細胞レベルでの効果発現機序について、T-cell repertoire の改善の有無について、cDNA アレイにおいて遺伝子発現レベルが低下したのは GAPDH の発現亢進の可能性がないかについて、TACE 以外の興味を引く遺伝子の有無について、CD68 は LAMP (lysosomal associated membrane protein) に属し貪食能に関係するが今回認められた発現亢進は貪食能との関係を示唆するのか、マーカーとして使用したのかについて、FACS で TACE の発現亢進が認められているが患者血清において TNF- $\alpha$  の上昇は認められるのかについて、MCP-3、MIP-3 $\alpha$  の発現亢進も認められていたが、TACE の転写領域の相同性の有無について、細胞表面の TACE の発現を見ているが細胞質内への分布の有無について質問があった。次いで主査清水教授から、cDNA アレイの可能性について、皮膚組織での遺伝子発現と今回行った末梢血単核球での遺伝子発現との相関があるか否かについて、強皮症の病因論の 1 つとして microchimerism の機序が提唱されているが、末梢血幹細胞移植強皮症症例 3 例において男女の間での相違はなかったかについて、ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family は shedding に関わることが知られているが血中での働きについて質問があった。次いで副査小池教授から、TACE 発現レベルが末梢血幹細胞移植の適応を決める際のマーカーになりうるか否かについて、TACE transgenic mouse を作成した際に phenotype が見出せないときのアプローチについて質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

この論文は、SSc の病態形成に TACE が関与する可能性を示した点で高く評価され、本論文の成果から今後の SSc の病態解明と新しい治療開発が期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。