

令和元年6月18日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09909

研究課題名(和文) 強皮症難治性臓器病変克服に向けた発症前治療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of the therapeutic target in the early phase of development of systemic sclerosis related organ involvement

研究代表者

白井 悠一郎 (Shirai, Yuichiro)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70528801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：強皮症患者において臓器病変発症・進展の初期に標的となる分子の同定を行うことを目的とした。強皮症患者は、血管病変が進展するにつれ有意に血中PTX3濃度が上昇し、重症虚血肢例で最も高値であった。PTX3濃度上昇が血管病変発症前から先行し、次いで血管内皮前駆細胞数が低下し、血管病変発症後に血管新生因子FGF2が上昇していた。PTX3が血管病変発症初期のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではPTX3が強皮症血管病変の最も初期から変動する分子の一つであることが明らかになった。強皮症血管病変は難治性であり、血管拡張薬を投与しても指肢切断を余儀なくされる場合も少なくない。その場合、本人のQOLだけでなく、医療費や介護負担など社会的コストもかかる。PTX3を標的とした治療法を開発することで、進展度を軽減できる可能性を秘めており、さらに血管生物学の進歩の一助にもなりうる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate to identify the target protein at the early developing phase of organ involvement in patients of systemic sclerosis. Plasma PTX3 level was significantly increased in the order of stage of vascular involvement and highest in critical limb ischemia patients. Elevation of PTX3 level preceded the development of vascular involvement and subsequently the number of endothelial progenitor cells in peripheral circulation decreased resulting in elevation of angiogenic factors FGF2 level after development. It was suggested that PTX3 can be a biomarker in the early phrase of vascular involvement.

研究分野：膠原病内科学

キーワード：強皮症 血管病変

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

強皮症(systemic sclerosis:SSc)は、末梢循環障害と諸臓器の線維化と自己免疫の3つを特徴とする全身性疾患である。特に、微小血管の内腔狭窄を基盤とした多彩な難治性の臓器病変を来すが、中でも間質性肺疾患や血管病変(末梢循環障害や肺動脈性肺高血圧症)は、機序が不明で根治的治療法がなく、すでに進行・完成した時点では不可逆的である。SSc 発症数年以内に臓器病変が出現、進展しやすいことから、進行してからではなく、臓器病変発症・進展の初期に標的となる分子の同定を行うことが望まれる。

我々は、これまで強皮症の血管病変形成機序における血管内皮前駆細胞や液性因子 pentraxin 3 (PTX3)の役割に関する基礎的検討を行ってきた。しかし、血管病変として包括した機序の一端は明らかにしたもの、血管病変なし、手指潰瘍、虚血肢と経時的に進展していく過程で関与する因子までは検討できていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、SSc の血管病変進展に関わる因子を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 対象

2013年の米国リウマチ学会/欧州リウマチ会議の分類基準を満たすSSc患者96例(男性8例、女性88例)、年齢・性別をマッチさせた健常人19例(男性4例、女性15例)を対象とした。

2. 臨床評価項目

対象患者の研究登録時から病歴、身体所見、検査所見を取り、2019年3月までの末梢血管病変(手指潰瘍、重症虚血肢)の新規発症を追跡した。臨床情報のうち、年齢、性別、病型、非レイノー症状発症からの罹病期間、レイノー症状発症からの罹病期間、スキンスコア、SSc関連臓器病変を収集した。また、治療内容、動脈硬化の危険因子(高血圧、脂質異常症、糖尿病、喫煙歴)も収集した。

3. SSc関連自己抗体

間接免疫抗体法や免疫沈降法にて、抗セントロメア抗体、抗topoisomerase I抗体、抗RNA polymerase III抗体、抗U1 RNP抗体、抗U3 RNP抗体、抗Th/To抗体の検出を行った。

4. 末梢血検体採取

研究登録時にヘパリン使用下で末梢血を採取し、血漿、血清、単核球に分離した。血漿・血清は使用時まで-80℃で保存し、単核球は血管内皮前駆細胞(Endothelial progenitor cells; EPC)の分離に用いた。

5. 血中PTX3、Fibroblast growth factor-2(FGF2)、Angiopoietin-like 3(ANGPTL3)濃度の測定

血漿PTX3濃度、血清FGF2濃度、血漿ANGPTL3濃度を、各検体2回ずつELISAキットを用いて測定した(各Perseus Proteomics社、R&D Systems社、R&D Systems社)。

6. 末梢血中EPC数定量

末梢血1ml中のCD34⁺CD133⁺CD309⁺細胞数をフローサイトメトリーによって定量化した。

7. 統計学的解析

連続変数の2群間の比較にはMann-Whitney U testまたはWilcoxon testを用いた。複数群間の比較にはKruskal Wallis testを用いた。

4. 研究成果

1. SSc患者の血中PTX3・FGF2濃度

本研究の対象であるSSc患者96例と年齢・性別をマッチさせた健常人19例の血漿PTX3濃度および血清FGF2濃度を測定したところ、いずれも強皮症患者の方が有意に上昇した($P < 0.001$, < 0.001)。SSc患者の中では、びまん皮膚硬化型と限局皮膚硬化型の2つの病型でPTX3濃度とFGF2濃度にそれぞれ有意差は認められなかった。

2. SSc関連血管病変と血中PTX3・FGF2濃度との関連

SSc患者のうち、血管病変が観察期間内に見られなかった群は60例、検体採取時に血管病変なく、採取後に手指潰瘍を発症した群が13例、検体採取時に手指潰瘍発症中の群が13例、重症虚血肢(壊疽)まで進行した群が10例であった。

健常人と強皮症・血管病変なし()の血漿 PTX3 濃度および血清 FGF2 濃度を比較したところ、いずれも強皮症・血管病変なし群で有意に上昇していた($P < 0.001$, $P = 0.002$)。血管病変なし()と血管病変あり()の血漿 PTX3 濃度および血清 FGF2 濃度を測定したところ、PTX3 濃度、FGF2 濃度とも血管病変あり群で有意に上昇していた($P = 0.003$, 0.032)。

さらに PTX3 濃度を群間で比較すると、血管病変なし群と比較して、重症虚血下肢群では有意に上昇していた($P = 0.001$)。手指潰瘍群とは差は認められなかった。また、血管病変が進展するにつれて、PTX3 濃度はわずかな差ずつではあるが全体的な傾向として有意に上昇していた($P < 0.001$) (図 1)。同様に、FGF2 濃度を群間で比較すると、血管病変なし群と比較して、重症虚血下肢群では上昇する傾向にあった($P = 0.086$)。従って、血管病変の発症前からわずかずつながら PTX3 濃度が上昇し、重症虚血肢という最重症状態になって PTX3 濃度が顕著に上昇することから、病態形成早期からの PTX3 の関与が示唆された。

3. 同一患者での手指潰瘍発症前と発症後での血中 PTX3・FGF2 濃度の経時的変化

2 での解析は患者集団が異なること、血管病変のステージが異なることから、同一患者での経時的変化も検討する必要があった。そこで、将来血管病変発症群のうち、手指潰瘍発症後にも 2 回目の検体を採取しえた 9 例と、血管病変なし群のうち経時的に 2 回目の検体を採取しえた 28 例で、血中 PTX3・FGF2 濃度を前後で比較した。PTX3 濃度は、どちらの群も前後で有意な変化は見られなかった。しかし、FGF2 濃度は、血管病変なし群で変化なかったものの、手指潰瘍発症群では発症後に有意に FGF2 濃度が上昇していた($P = 0.036$) (図 3)。従って、血管病変が発症してからその修復のために FGF2 濃度が後から上昇している可能性が示唆された。

4. SSc 関連血管病変と末梢血中の血管内皮前駆細胞(EPC)数との関連

SSc では、循環血液中の EPC (CD34+CD133+CD309+細胞)による脈管形成が障害され、血管病変形成に寄与すること、および PTX3 が EPC 成熟分化を阻害することが知られている。そこで、今回の SSc 症例のうち EPC を同時測定しえた 40 例を群間で比較した。手指潰瘍群と重症虚血肢群では EPC 数の低下が見られたが、測定数が少ないためか血管病変なし群とは有意差は得られなかった(図 4)。一方、血管病変将来発症群では低下がなかったため、EPC 数は血管病変発症から前もって低下するのではないことが確認された。

5. SSc 関連重症虚血肢と脂質異常

2 の検討で、重症虚血肢において特に PTX3 濃度が上昇していることが明らかになった。重症虚血肢は動脈硬化と関連することが知られているが、SSc でも同様かどうかを検討するため、LDL 値と HDL 値を前述の 4 群で比較した(図 5、図 6)。LDL は、血管病変なし群と比較して重症虚血肢群で有意に低下していた($P = 0.011$)。一方、HDL は群間で差は見られなかった。動脈硬化性の重症虚血肢とは相反して、SSc 固有の病態により LDL が低下していることが示唆された。また、LDL 値、HDL 値と PTX3 濃度、FGF 濃度のそれぞれで 4 つの相関関係を検討した。LDL 値と PTX3 濃度は逆相関の傾向にあったが、有意ではなかった($P = 0.077$)。他も有意な相関は見られなかった。

6. SSc 関連血管病変と ANGPTL3 濃度との関連

SSc 関連重症虚血肢で LDL が低下していることから、ANGPTL3 に着目した。ANGPTL3 は HDL、TG の代謝を制御しており、発現が低下すると低 HDL 血症になる(Santulli G. Front Endocrinol 2014)。また、ANGPTL3 のホモ遺伝子変異は家族性低脂血症に見られ、TG、HDL-C、LDL-C が低下することも報告されている。そこで、低 HDL-C 血症、低 LDL-C 血症の原因のひとつとして ANGPTL3 の関与を想定した(Xu YX, et al. Atherosclerosis 2018)。また、ANGPTL3 は血管新生作用も知られている。そこで、前述の 4 群で血漿 ANGPTL3 濃度を測定したが、群間で有意差は得られなかった(図 7)。従って、SSc 関連重症虚血肢において脂質と血管新生の両方が低下していることをリンクさせる知見は本研究では得られなかった。

7. まとめ

今回の検討で、PTX3 濃度上昇が血管病変発症前から先行すること、次いで EPC 数の低下が見られること、発症後に血管新生因子 FGF2 が上昇することが見出された。すなわち、PTX3 が強皮症血管病変の最も初期から変動する分子の一つであることが明らかになった。

また、最重症病変である重症虚血肢は PTX3 濃度上昇だけでなく LDL 低下が見られた。これは従来の動脈硬化性の知見とは相反するものである。その機序の解明のために ANGPTL3 の関与について検討したが、特に関連は見られなかった。今後も血管新生低下と脂質低下との関連する分子について追究していく必要がある。

以上より、PTX3 は、血管病変発症初期のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。PTX3 が有望な治療標的となる可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yuichiro Shirai, Yuka Okazaki, Masataka Kuwana. Clinical characteristics of critical limb ischemia in systemic sclerosis. 5th systemic sclerosis world congress. 2018.2 (Bordaux)

白井悠一郎、竹内勤、桑名正隆. 強皮症における重症虚血肢の臨床特徴. 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2017 年 4 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8 桁):

(2)研究協力者

なし

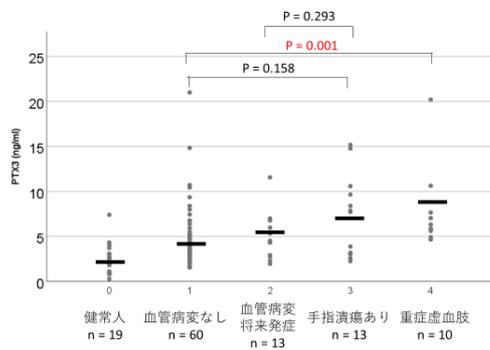


図1 SSc関連血管病変と血中PTX3濃度との関連

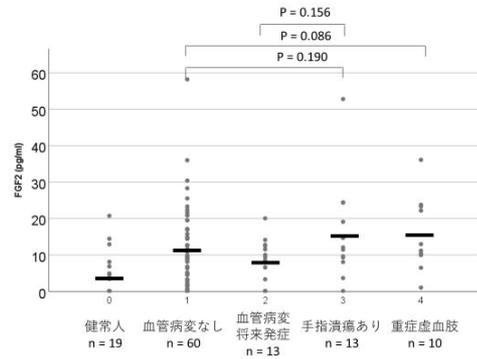


図2 SSc関連血管病変と血中FGF2濃度との関連

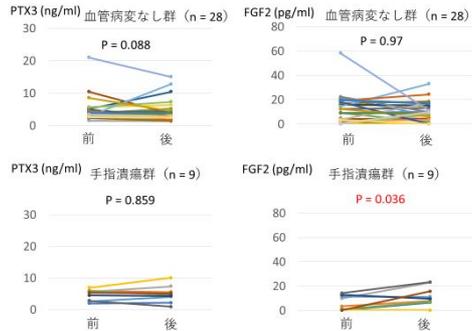


図3 手指潰瘍発症前と発症後での血中PTX3・FGF2濃度の経時的変化

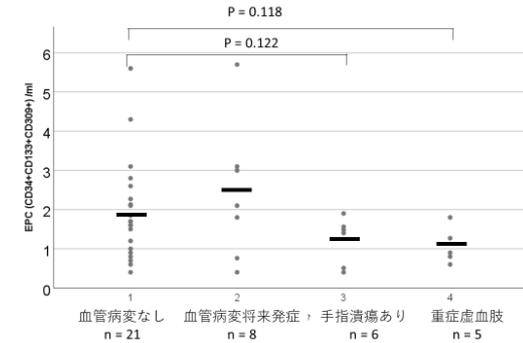


図4 SSc関連血管病変と末梢血中の血管内皮前駆細胞 (EPC) 数との関連

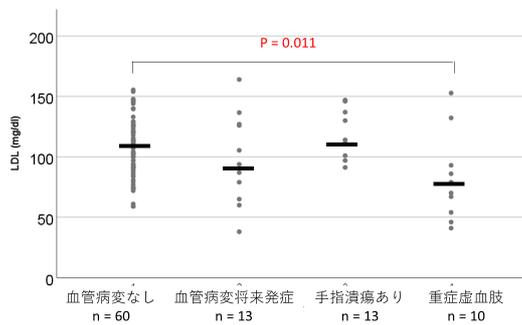


図5 SSc関連重症虚血肢とLDL値との関連

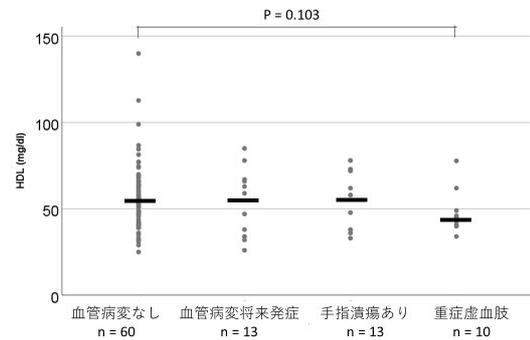


図6 SSc関連重症虚血肢とHDL値との関連

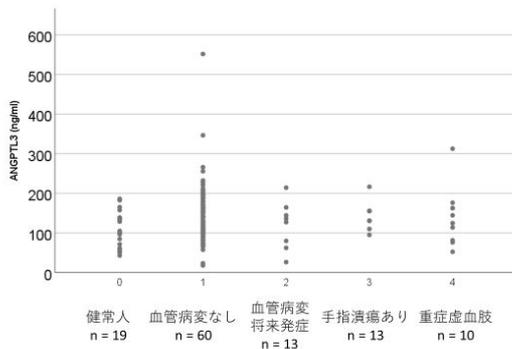


図7 SSc関連血管病変とANGPTL3濃度との関連