

平成21年3月6日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19591316
研究課題名(和文) 全身性強皮症における抗酸化修復酵素 MsrA に対する自己抗体の解析と治療の検討
研究課題名(英文) Analysis of autoantibody against one of the antioxidant repair enzymes, methionine sulfoxide reductase A (MSRA) and treatments, in systemic sclerosis
研究代表者
小川 文秀 (OGAWA FUMIHIDE)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：10333519

研究成果の概要：

全身性強皮症患者では抗 MsrA 自己抗体が健常人と比較して有意に高値を示していた。しかし、サブタイプ間では有意差は認めなかった。抗 MsrA 自己抗体値と臨床症状などとの相関を検討したところ、心疾患のある群、肺線維症のある群、そして total antioxidant power が低下している群で抗 MsrA 自己抗体は高値を示していた。さらに、呼吸機能検査の%VC、%DLco と抗 MsrA 自己抗体は負の相関を認めた。腎血管抵抗と抗 MsrA 自己抗体は正の相関が確認できた。酸化ストレスマーカーであり、強皮症の重症度と相関する 8-isoprostane、Hsp70 との比較でも正の相関が認められた。また、強皮症患者血清中の抗 MsrA 自己抗体は MsrA の活性を抑制した。以上のことから、抗 MsrA 自己抗体は、強皮症患者血清中に存在し、強皮症の病態、および重症度と相関している可能性が示唆され、強皮症における酸化ストレスの関与を改めて示した。ブレオマイシン誘発性の強皮症マウスモデルにフリーラジカル消去剤であるエダラボンを投与したところ皮膚硬化が改善し、強皮症の治療薬となり得る可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(systemic sclerosis;SSc)は皮膚および内臓諸臓器の線維化を特徴とする膠原病であり、全身性免疫疾患に分類されている。国の特定疾患(いわゆる難病)に指定されており、国民の健康を侵す重大な疾患で

ある。重症型の10年生存率は約60%とされており、新規治療法の開発が急務である。

近年、SScにおいて病態形成の重要な原因として酸化ストレスが注目されている。SScでは80%以上の症例でその血管病変としてレイノー症状を伴うことが知られている。レイ

ノー症状に伴う虚血再灌流で活性酸素が合成され、合成された活性酸素は SSc 患者血管内皮細胞で認められるアポトーシスを誘導することによって SSc の主要症状である血管病変の発生に関与していることが示唆されている。さらに SSc では線維化が生じる前に血管周囲性の T 細胞やマクロファージを中心とした炎症細胞浸潤が認められ、これら炎症細胞がサイトカインや細胞成長因子などを放出して線維化を誘導していると考えられる。我々は、SSc 患者血清中で酸化ストレスマーカーである 8-isoprostane を測定し、SSc の病態と深く関与している可能性を報告してきた (Ogawa F et al. *Rheumatology* 2006;45:815-818)。しかしながら、体内での恒常性の維持という面から考えると、酸化ストレスに対する抗酸化という観点からの検討も必要であると考えられる。Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) は酸化還元酵素であり、抗酸化酵素として生体機能の維持に重要な役割を果たしていることが示唆されている。研究代表者は、皮膚においても MsrA が強く発現していることを見だし、紫外線の曝露により皮膚への MsrA の発現が増強することを確認した。同様に、培養皮膚表皮細胞でも酸化ストレスである H₂O₂ 刺激や紫外線刺激にて抗酸化酵素である MsrA の発現が皮膚で増強することを世界に先駆けて報告した (Ogawa F et al. *J Invest Dermatol.* 2006; 126:1129-34)。

このように抗酸化酵素である MsrA は皮膚での発現が認められることから、酸化ストレスに常に暴露され皮膚硬化を主症状とする SSc に深く関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

SSc において、MsrA、抗 MsrA 自己抗体を含めた各種抗酸化酵素、酸化マーカーの動態を総合的に解析し SSc の病態を明らかにすることである。SSc 患者血清中では酸化ストレスマーカー、8-isoprostane は著明な高値を示しており、SSc での酸化・抗酸化機構の破綻が考えられる。そのため、SSc 患者血清中に、皮膚での発現が確認されている MsrA に対する自己抗体の存在の有無を検討し、臨床症状との相関や予後との関連、マーカー同士の相関について総合的に解析を行う。また、ブレオマイシンを連日投与して作成した SSc のモデルマウスを作成する。さらに抗酸化剤を投与することにより皮膚硬化の変化を検討し、SSc に対する有効な治療の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

a) SSc 患者データベースの再構築とアップデート

研究代表者の施設では、膠原病外来を開設

し、多くの SSc 患者が通院している。まず、SSc の臨床症状と血液学的なサンプルの解析のために本研究に必要な SSc 患者の血清をストックし、データベース化しておく必要がある。後に得られた血中の 8-isoprostane や total antioxidant power などの酸化ストレス・マーカーのデータ、MsrA や Cu/Zn SOD、カタラーゼなどの抗酸化マーカーのデータとのデータ結果と SSc 患者血清中のその他のデータそして臨床的な相関を検討するために、まず通院中の患者の臨床症状、各種検査所見、過去および現在の治療について詳細なデータベースを作成する。データベースの項目は SSc 患者の年齢、性別、発症時期から始まり、SSc で認められる臨床症状であるレイノー症状、皮膚硬化を判定量的に評価する指標である modified Rodnan total skin thickness score、内臓病変合併 (肺線維症、肺高血圧症、腎クリーゼ、関節炎、心病変、筋病変など)、各種検査データ (呼吸機能、抗核抗体、自己抗体の種類、免疫グロブリン等)、後々の解析で必要と思われるデータを網羅する。

b) SSc 患者血清における酸化ストレスマーカーの測定と臨床症状・その他の検査データとの相関

得られた SSc 患者データベースを基に SSc 患者血清を用いて 8-isoprostane、total antioxidant power, protein carbonyl などの各種酸化ストレス・マーカーを ELISA キット (8-isoprostane (Cayman 社製), Total Antioxidant Power Colorimetric Microplate Assay Kit (Oxford Biomedical Research 社製), Protein carbonyl assay kit (Cayman 社製)) を用いて測定し、臨床症状および検査所見、予後との相関を調べる。さらに、酸化ストレス・マーカー間の相関についても解析する。

c) SSc 患者血清における抗酸化酵素 MsrA に対する自己抗体の測定

SSc 患者より採取した血清を用いて抗 MsrA 抗体の測定を行う。ELISA についてはまず、96 穴のマイクロタイタープレートを 5μg/ml の濃度で MsrA (Jena Bioscience 社) を 4°C、一晩、humid chamber 内でコートする。洗浄後、2% のウシ血清アルブミンと 1% ゼラチンを含む Tris-buffered saline (TBS) で 1 時間、37°C でブロッキングを行う。血清は 1% ウシ血清アルブミンを含む TBS で 100 倍希釈したものをウェルに 100μl 加え、20 で 90 分間、humid chamber 内で反応させる。Tween-20 を含む TBS で 4 回洗浄した後、1000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG、あるいは IgM 抗体 (Cappel 社) をウェルに 100μl 加え、20°C で 1

時間、humid chamber 内で反応させる。Tween-20 を含む TBS で 4 回洗浄した後、p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich 社製) で発色させ、405 nm における吸光度をプレートリーダー (当教室にて所有) にて測定する。健常人の吸光度の平均値+2SD 以上を陽性と判定する。吸光度は相対的な値であり、疾患群間の正確な比較のためには以下の方法で、仮の U/ml を算出する。つまり、各群において患者より 10 μ l ずつの血清をとり混合する。こうして混合した血清を 1:10 から 1:105 まで段階的に希釈する。この希釈系列について上記の要領で ELISA を行い、得られたデータを吸光度対希釈 (log scale) にプロットする。最大吸光度の 50% となる血清の希釈濃度を算出し、これを仮の U/ml とし、各群間の比較 (具体的には何倍抗体価が上昇しているかなど) に供する。

d) 臨床との関連の解析

前述した患者データベースを用いて、抗体の存在の有無・抗体価と各種臨床症状および臨床検査所見との関連について統計学的に解析する。

e) 免疫ブロット法による解析

ELISA 法によって検出された抗 MsrA 抗体の確認のためにさらに免疫ブロットによる解析を行う。さらに、ELISA 法では、自己抗原の高次構造が維持されているため、その高次構造に反応するような自己抗体を検出することが可能であるが、そのような自己抗体が自己抗原の一次構造にも反応しうるかどうかを検討するためにも免疫ブロット法 (抗原の一次構造に反応する抗体を検出する) を行う。免疫ブロット法については、まず精製 MsrA (Jena Bioscience 社) を dithiothreitol および sodium dodecyl sulfate (SDS) 存在下で還元・変性させる。その後 MsrA 0.6 μ g/レーン、10-20% グラジエント SDS-polyacrylamide のスラブゲルに電気泳動する。次いで、タンパク質をゲルからニトロセルロース膜へ semi-dry 法にて転写する。転写されたニトロセルロース膜をレーン毎に短冊に切り分け、5% non-fat dry milk 加 TBS にて室温、30 分間ローター上で反応させ、ブロッキングを行う。5% non-fat dry milk 加 TBS にて 50 倍希釈した血清をニトロセルロース膜と室温、一晚、ローター上で反応させる。5% non-fat dry milk 加 TBS にて 4 回洗浄後、5% non-fat dry milk 加 TBS にて 1000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Cappel 社製) と室温で、90 分間ローター上で反応させる。TBS で 4 回洗浄した後、p-NBT および BCIP (Sigma-Aldrich 社製) にて発色させる。

ELISA で IgG 型抗 MsrA 抗体が陽性とな

った SSc 患者、ELISA で IgG 型抗 MsrA 抗体が陰性であるが、抗セントロメア抗体、抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 U1RNP 抗体などの特異自己抗体が陽性であった SSc 患者、ELISA で IgG 型抗 MsrA 抗体が陽性となった SLE 患者、健常人コントロールを対象にして施行する。

f) MsrA 活性アッセイ

SSc 患者血清中に抗 MsrA 抗体が存在していた場合、それが本当に MsrA 活性を阻害するかどうかを検討する必要がある。まず、血清より IgG を以下の方法にて精製する。すなわち、洗浄した Dynabeads protein G に血清 20 μ l を加え 30 分間、ローター上で反応させる。その後 0.1M citrate (pH3.1) を加えて結合した IgG を回収し、最終的に 1M Tris-HCl pH 9.0 を加え中和する。最終の IgG 濃度は spectrophotometer にて測定する。MsrA 活性は thioredoxin (TRX), thioredoxin reductase 存在下で NADPH の吸光度を測定することによって行う。0.2~1 μ M の MsrA を、血清から精製した IgG 60 mg と 90 分間、30°C で反応させ、次いで生理学的な TRX システム (5 μ M TRX, 87 nM TRX reductase, 200 μ M NADPH) に基質である Met-SO を加えたものと反応させる。MsrA 酵素活性は NADPH の 340nm での吸光度の低下で測定する。ELISA で IgG 型抗 MsrA 抗体が陽性である SSc 患者、ELISA で IgG 型抗 MsrA 抗体が陰性の SSc 患者、健常人コントロールを対象にして施行する。

g) 抗酸化ストレス薬のブレオマイシン誘発強皮症モデルに対する有効性の検討

フリーラジカル消去剤であるエダラボン (三菱ウェルファーマ株式会社よりすでに供与) の皮膚投与を行い皮膚硬化への効果を検討する。モデルマウスは 6 週齢のマウスに 4 週間ブレオマイシンを連日皮下投与し作成する。エダラボンについては、10 mg/kg をブレオマイシン投与と同時に投与する。投与群・対照群それぞれ 10 匹ずつのマウスを用いる。投与後、4 週間後に皮膚のサンプリングを行う。比較群も同様にサンプリングを行う。マウスは、エーテル麻酔後、背部皮膚を剃毛し、6mmパンチバイオプシーにて生検を行う。生検組織はパラフォルムアルデヒド固定、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン&エオジン染色する組織と、免疫組織学的検討のために包埋後 -80°C にて保存するものを作成する。

h) 統計解析

統計解析については、2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を用い、多群間の検定には Bonferroni ' s test を用いる。頻度の検

定には Fisher の直接確率計算法、2 変数の間の相関には Spearman ' s rank correlation coefficient を用いる。

4. 研究成果

全身性強皮症患者では抗 MsrA 自己抗体が健常人と比較して有意に高値を示していた。しかし、サブタイプである限局型皮膚全身性強皮症とびまん型皮膚全身性強皮症との間では有意差は認めなかった。全身性強皮症で認められた抗 MsrA 自己抗体値と臨床症状などとの相関を検討したところ、心疾患のある群、肺線維症のある群、そして total antioxidant power が低下している群で抗 MsrA 自己抗体は高値を示していた。さらに、他の臨床症データとの相関を検討したところ、呼吸機能検査の%VC、%DLco と抗 MsrA 自己抗体は負の相関を認めることができた。さらに、腎血管抵抗をカラードプラー法であらわした pulsatility index と抗 MsrA 自己抗体は正の相関が確認できた。さらに、全身性強皮症の酸化ストレスマーカーであり、強皮症の重症度と相関する 8-isoprostane、Hsp70 との比較でも正の相関が認められた。また、強皮症患者血清中の抗 MsrA 自己抗体は MsrA の活性を抑制した。以上のことから、抗 MsrA 自己抗体は、強皮症患者血清中に存在し、強皮症の病態、および重症度と相関している可能性が示唆された。この結果、酸化ストレスは改めて全身性強皮症の病態に深く関与していることが明らかとなった。現在、この結果を英文雑誌に投稿中である。また、ブレオマイシン誘発性の強皮症マウスモデルにフリーラジカル消去剤であるエダラボンを投与したところ皮膚硬化が改善し、強皮症の治療薬となり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

現在、投稿中である。

[学会発表] (計 3 件)

1. Ogawa F: Autoantibody against one of the antioxidant repair enzymes, methionine sulfoxide reductase A (MSRA), in systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis and vascular damage. The International Investigative Dermatology 2008 2008/5/14, Kyoto, Japan.
2. 小川文秀: 全身性強皮症(SSc)における抗酸化修復酵素 Methionine sulfoxide reductase(MsrA) の自己抗体の発現と臨床的意義. 厚生労働省「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」研究班・第 11 回強皮症研究会議合同会議、

2008/01/19, 東京

3. Ogawa F: Autoantibody against one of the antioxidant repair enzymes, methionine sulfoxide reductase A (MSRA), in systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis and vascular damage. American College of Rheumatology 2007 Annual Meeting, 2007/11/8, Boston, USA.

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 文秀 (OGAWA FUMIHIDE)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：10333519

(2) 研究分担者

清水 和宏 (SHIMIZU KAZUHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80170968

佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20215792