

平成21年 3月 6日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790792

研究課題名 (和文) 強皮症における抗酸化酵素 peroxiredoxin I に対する自己抗体の解析

研究課題名 (英文) Autoantibody against peroxiredoxin I, an antioxidant enzyme, in patients with systemic sclerosis

研究代表者

岩田 洋平 (IWATA YOHEI)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60437861

研究成果の概要：

Peroxiredoxin I (Prx I) に対する自己抗体は、全身性強皮症患者では有意に上昇していた。抗 Prx I 抗体が陽性であった患者は肺線維症、心臓疾患がより高率であり、抗 Prx I 抗体は酸化ストレスの血清マーカーと正の相関を示した。また、抗 Prx I 抗体は Prx I の酵素活性を抑制した。以上のことから、抗 Prx I 抗体は全身性強皮症における酸化ストレスと相関し、疾患重症度を反映する有用なマーカーであ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	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

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

近年、全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) 患者では酸化ストレスが増加していることが明らかとなった。さらに酸化ストレスと血管障害や線維化との関連性を示唆する報告も多く、酸化ストレスは SSc の病態に重要な役割を果たしていると考えられている。抗酸化酵素は、生体において酸化ストレスに対する重要な防御機構として働いているため、その破綻は酸化ストレスの増加につながる。したがって、生体内に抗酸化酵素に対す

る自己抗体が存在し酵素活性が抑制されると酸化ストレス過剰状態に陥りやすくなる。peroxiredoxin I (Prx I) は、近年発見された抗酸化酵素で、様々な臓器で同定され細胞内に高い濃度で含まれることが判明した。さらに、全身性自己免疫疾患患者の 33% に抗 Prx I 抗体が検出されることも報告された。しかしながら、SSc 患者における抗 Prx I 抗体についての研究は皆無である。

## 2. 研究の目的

本研究は SSc における抗 Prx I 抗体の陽性頻度および臨床的意義について検討した初の研究である。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象患者：

対象患者は SSc 70 例（女性 61 例、男性 9 例）であり、年齢は  $50 \pm 16$  歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 30 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 40 例であった。lSSc と dSSc の罹病期間はそれぞれ  $8.3 \pm 9.3$  年、 $3.0 \pm 2.9$  年であった。初診時ステロイド、D-ペニシラミン、他の免疫抑制剤にて治療されていた患者は除外した。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 32 例、抗セントロメア抗体陽性例が 23 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 2 例、抗 U3RNP 抗体陽性例が 1 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 7 例、抗 Th/To 抗体陽性例が 1 例であった。残りの 4 例では抗核抗体は陰性であった。23 例の健常人をコントロールとして用いた。

### (2) ELISA：

ELISA プレートに human recombinant Prx I (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を  $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  で  $4^\circ\text{C}$ 、overnight コートし 2% BSA (bovine serum albumin) + 1% gelatin 加 TBS (Tris-buffered saline) でブロッキングを行った。血清を各ウェルに加えて室温で 90 分反応させた後 ALP (alkaline phosphatase) 標識した 2 次抗体を加え、PNPP (p-nitrophenyl phosphate) を基質として発色させ 405 nm で吸光度 (optical density; OD) を測定した。

### (3) 免疫ブロット法：

Prx I (Sigma-Aldrich) を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後、ELISA 法で IgG 型抗 Prx I 抗体陽性であった SSc 患者、陰性であった SSc 患者および健常人それぞれの血清を一晩反応させた。ALP 標識した 2 次抗体を加えてから BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indrolyl phosphate) と NBT (nitro blue tetrazolium) を用いて発色させた。

### (4) 抗 Prx I 抗体による Prx I 抑制試験：

抗 Prx I 抗体陽性の SSc 患者、陰性の SSc 患者、健常人それぞれの血清より IgG を抽出した。一定量の Prx I に抽出した IgG を反応させた後、Prx I の酵素活性を thioredoxin reductase system を応用し測定した。

## 4. 研究成果

### (1) SSc における抗 Prx I 抗体の陽性頻度：

SSc 患者において IgG 型の抗 Prx I 抗体の OD 値は健常人と比較し有意に上昇していた (図 1)。また、lSSc と dSSc の両群間に有意な差は認めなかった。対照的に IgM 型の抗 Prx I 抗体の OD 値は健常人と有意差を認めなかった。

健常人の平均値 + 2SD の OD 値 (IgG 型抗 Prx I 抗体 = 0.537, IgM 型抗 Prx I 抗体 = 0.687) をカットオフ値とすると、SSc 全体では 33% (23/70) が IgG 型抗 Prx I 抗体陽性であった。対照的に健常人では一例のみ陽性を示したのみであった。このように、IgG 型抗 Prx I 抗体は SSc で有意に上昇していることが明らかとなった。

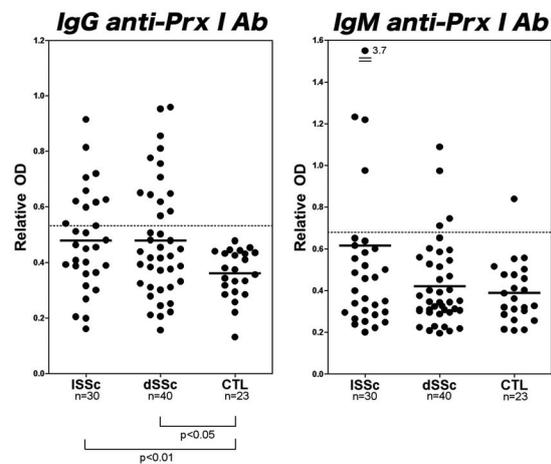


図 1: ELISA 法によって測定した lSSc、dSSc、および健常人 (CTL) における IgG、IgM 型抗 Prx I 抗体。点線は健常人の平均値 + 2SD に設定したカットオフ値を示す。

### (2) SSc における抗 Prx I 抗体と臨床所見との相関：

IgG 型抗 Prx I 抗体と臨床所見との相関を表 1 に示す。抗 Prx I 抗体が陽性であった SSc 患者では、罹病期間が長く、肺線維症、心臓疾患、抗トポイソメラーゼ I 抗体、血清ガンマグロブリン値の上昇、血沈亢進がより高率に認められた。さらに、抗 Prx I 抗体は %DLco、%VC、酸化ストレスの血清マーカーである 8-isoprostane 値および腎血管抵抗の指標である pulsatility index と正の相関を示した (図 2)。

表1 SScにおけるIgG型抗Prx I抗体と臨床所見との相関

	陽性例 n=23	陰性例 n=47
性 (男性/女性)	2/21	7/40
年齢 (年、mean±SD)	48 ± 19	45 ± 15
	8.1 ±	3.8 ±
罹病期間 (年、mean±SD)	9.3*	4.8
病型 (dSSc/ISSc)	13/10	27/20
臨床所見：		
Modified Rodnan TSS (mean±SD)	15.7 ± 9.3	12.9 ± 10.3
指尖部虫喰状瘰癧	36	42
びまん性色素沈着	64	50
手指屈曲拘縮	55	42
臓器病変：		
肺		
肺線維症	68*	34
%VCの低下	59*	20
%DLcoの低下	95**	61
肺高血圧症	16	13
食道	50	53
心	36**	6
腎	5	2
関節	18	21
筋肉	14	21
検査所見		
抗トポイソメラーゼ I 抗体	67*	38
抗セントロメア抗体	32	33
IgG (mg/dl、mean±SD)	1917 ± 542**	1606 ± 545
IgA (mg/dl、mean±SD)	387 ± 189*	287 ± 100
IgM (mg/dl、mean±SD)	249 ± 166*	172 ± 78
血沈 (mm/h、mean±SD)	23.3 ± 16.7*	15.1 ± 11.9

表中の数字は特に示さない限り%を示す。

TSS = total skin thickness score

p<0.05、\*\* p<0.01 (IgG型抗Prx I抗体が陰性のSSc患者に対して)

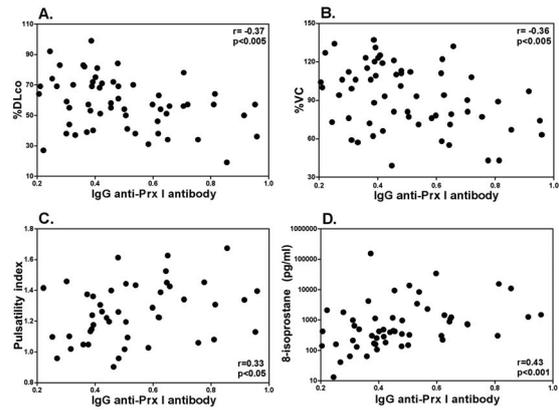


図2: SScにおける抗Prx I抗体値と、%DLco (A)、%VC (B)、pulsatility index (C)、および8-isoprostane値 (D)との相関。

### (3) 免疫ブロット法：

ELISA法でIgG型抗Prx I抗体が陽性であったSSc患者血清は、Prx Iと反応し25kDaにバンドを認めた(図3)。このことから、IgG抗Prx I抗体の存在が免疫ブロット法により確認された。

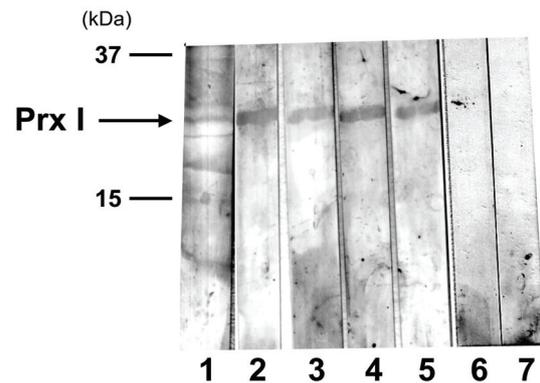


図3: 免疫ブロット法を用いたSSc患者における抗Prx I抗体の検出。レーン1: コロイド金染色したPrx I。レーン2-5: ELISA法でIgG型抗Prx I抗体が陽性であったSSc患者血清。レーン6: ELISA法でIgG型抗Prx I抗体が陰性であったSSc患者血清。レーン7: 健常人の血清。分子量マーカー(kDa)を左側に示す。

### (4) 抗Prx I抗体によるPrx I抑制試験：

抗Prx I抗体陰性SSc患者より抽出したIgGはPrx Iの酵素活性を抑制しなかった。対照的に、抗Prx I抗体陽性SSc患者より抽出したIgGは、有意に(平均59%)Prx Iの酵素活性を抑制した(図4)。このことから、IgG型抗Prx I抗体はPrx Iの酵素活性を抑制することが示唆された。

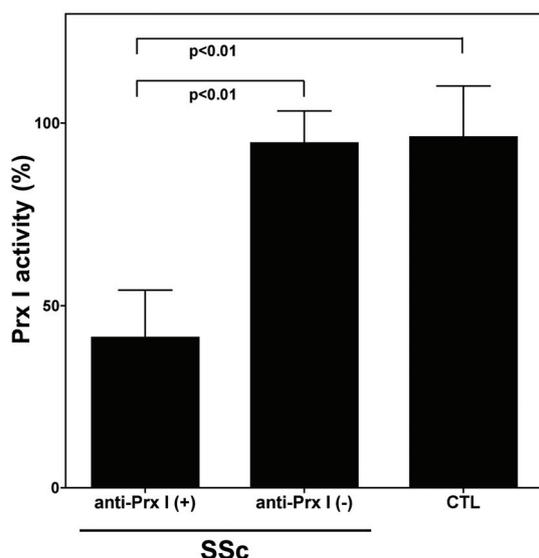


図4: IgG型抗Prx I抗体によるPrx I酵素活性の抑制。ELISA法でIgG型抗Prx I抗体が陽性であったSSc患者[anti-Prx I (+)]、IgG型抗Prx I抗体が陰性であったSSc患者[anti-Prx I (-)]、および健常人[CTL]それぞれの血清よりIgGを抽出し、Prx Iと反応させたときの酵素活性を比較した。それぞれの活性はIgGを反応させていないPrx I酵素活性を100%と定義したときのパーセンテージにより表す。

#### 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 1 件)

1. Iwata Y, Ogawa F, Komura K, Muroi E, Hara T, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tomita Y, Sato S: Autoantibody against peroxiredoxin I, an antioxidant enzyme, in patients with systemic sclerosis: possible association with oxidative stress. *Rheumatology (Oxford)* 46(5): 790-795, 2007.

[学会発表] (計 1 件)

1. Iwata Y: Autoantibody against peroxiredoxin I, an antioxidant enzyme, in patients with systemic sclerosis: possible association with oxidative stress. American College of Rheumatology, 2007 Annual Scientific Meeting, 2007/11/10, Boston, USA

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩田 洋平 (IWATA YOHEI)