

# 山岡俊文 論文内容の要旨

主 論 文

Autoantibody against a Protease Domain of Caspase-8

in Patients with Systemic Sclerosis

(全身性強皮症患者における caspase-8 に対する自己抗体の検討)

山岡俊文、小川文秀、室井栄治、原肇秀、小村一浩、岩田洋平、竹中基、清水和宏、  
長谷川稔、藤本学、佐藤伸一

原稿 19 枚、Table 1 個、Figure 3 個

2008.5.16 に *Clinical and Experimental Rheumatology* より accept の E メールを  
受理しています (別紙採用通知を添付)。現在は publish 待ちの状態です。

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 博士課程医療科学 専攻  
(主任指導教員：佐藤伸一教授)

## 緒 言

全身性強皮症 (systemic sclerosis ; SSc) は皮膚および肺、腎、消化管、心をはじめとする内臓諸臓器を系統的に侵す慢性疾患であり、膠原病に分類される。SSc は膠原線維の増生、血管病変、自己免疫といった 3 つの病態よりなる。なかでも自己抗体はその 90% 以上に検出される。自己抗体の種類と臨床像が密接に相関するため、SSc の発症に関与していると考えられる。Caspase はシステインプロテアーゼの一種であり、アポトーシスと密接に関連している。その中で caspase-8 はアポトーシスが誘導されると早期より活性化されることが知られている。SSc 患者においてレイノー症状は初発症状として最も多く、毛細血管は虚血再灌流を繰り返しておりアポトーシスを生じやすい環境にあると考えられる。そのため caspase の initiator である caspase-8 に対する自己抗体が早期より産生される可能性がある。そこで今回の研究では、SSc において caspase-8 に対する自己抗体が産生されているのか、また産生されているのであれば臨床的な相関はあるのか、さらには自己抗体自体に caspase-8 の活性を抑制しうる機能的活性はあるのかについて検討を行った。

## 対象と方法

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。

SScの病型としては、limited cutaneous SSc (lSSc) が30例(罹病期間;  $8.3 \pm 9.3$ 年)、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が40例(罹病期間;  $3.0 \pm 2.9$ 年)であった。全身性エリテマトーデス systemic lupus erythematosus (SLE) 20例、皮膚筋炎 dermatomyositis (DM) 20例を疾患コントロールとして、22例の健常人をコントロールとして用いた。

抗 caspase-8 抗体は、ELISA法と免疫ブロット法を用いて検出した。ELISA法については、まずプレートに recombinant human caspase-8 を  $1 \mu\text{g/ml}$  の濃度で  $4^\circ\text{C}$ 、一晚コートした。各ウェルに 1:100 で希釈した血清を加えて室温で 90 分反応させた後、alkaline phosphatase を標識した二次抗体を加え、発色させ吸光度を測定した。

免疫ブロット法については、recombinant human caspase-8 を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後、ELISA法にて IgG 型抗 caspase-8 抗体が高値(健常人の平均値+2SD)であった SSc 患者、SLE 患者、DM 患者および健常人の血清と一晚反応させ、alkaline phosphatase を標識した二次抗体を加え発色させた。

抗 caspase-8 抗体が実際に caspase-8 の活性を抑制しうるかどうかについて検討するため caspase-8 活性の抑制試験を行った。まず IgG 型抗 caspase-8 抗体高値の SSc 患者、健常人の血清より IgG を精製し、recombinant human caspase-8 と反応させた。Caspase-8 の活性は p-nitroanilide-labeled IETD が Caspase-8 によって切断されると発色することを利用し測定した。

## 結 果

ELISA法にて、IgG型抗caspase-8抗体価はlSSc、dSSc、SLE、DMともに健常人と比べ有意に上昇していたことが明らかとなり、さらにlSScがdSScに比べ有意に上昇していた。対照的にIgM型抗caspase-8抗体価は健常人と比べ有意差を認めなかった。健常人の平均値+2SDの吸光度をカットオフ値とすると、SSc全体では31% (22/70)、SLEでは55% (11/20)、DMでは20% (7/35)、健常人では0% (0/22) がIgG型抗caspase-8抗体高値であった。

SScにおいて、IgG型抗caspase-8抗体との臨床的相関について解析したところ、IgG型抗caspase-8抗体高値であったSSc患者では、低値であったSSc患者と比較して男性が少なく、CRPが低値という相関があった。

さらに免疫ブロット法において、ELISA法でIgG型抗caspase-8抗体が高値であったSSc、SLE、DM患者血清はrecombinant human caspase-8と反応し濃いバンドを認めた。一方健常人血清でも薄いながらバンドを認め、健常人でも存在する自己抗体であることが明らかとなった。

Caspase-8活性の抑制試験では、IgG型抗caspase-8抗体高値のSSc患者より精製したIgGは健常人血清より精製したIgGと比べ有意にcaspase-8の活性を抑制した。以上より、IgG型抗caspase-8抗体はcaspase-8の活性を抑制しうることを示された。

## 考 察

今回の研究では、IgG型抗caspase-8抗体価は軽症型であるlSScが重症型であるdSScに比べ有意に上昇していた。さらに抗体価が高値であるSSc患者ではCRPが低値となる臨床的相関を認めた。このことは抗caspase-8抗体がSScにおける軽症型の新たな血清学的指標となりうる可能性を示唆していた。一方、健常人血清からも低力価ながらIgG型抗caspase-8抗体が検出された。これは生理的に生じるアポトーシスを

反映している可能性が考えられた。さらにレイノー症状で初発する SSc においては、毛細血管は虚血再還流を繰り返しフリーラジカルが産生されやすい環境にあり、それにより血管内皮細胞は容易にアポトーシスを生じ、健常人と比べ高力価になると考えられた。抑制試験にて caspase-8 の活性が抑制されることを確認したが、caspase-8 は細胞内に存在しており、一般に自己抗体が細胞膜を通過して細胞内に入り、対応する自己抗体と反応するという可能性は低いことから、IgG 型抗 caspase-8 抗体が細胞内で caspase-8 の活性を実際に抑制し、SSc の病態形成に関与しているかどうかは不明である。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。