

MODIFICATION OF CLINICAL FEATURES BY CHANGE OF ANTI-U1RNP ANTIBODY TITER.

Okada J¹, Tamama K¹, Ishikawa A¹, Okano T² and Kondo H¹
Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine¹
Clinical Immunology, Kitasato University School of Allied Health Sciences²

Anti-U1RNP antibody is a characteristic autoantibody specifically found in patients with MCTD, but its relation to pathogenesis of anti-U1RNP antibody has not been known. To clarify the characteristics of anti-U1RNP antibody, we analyzed the cases who have lost anti-U1RNP antibody during observation period. Furthermore, we examined the relationship between the disappearance of anti-U1RNP antibody and clinical features .

We examined the patients who visited our rheumatology clinic and selected the cases according to below criteria. 1) at first visit patients was confirmed to have anti-U1RNP antibody, 2) during observation period, disappearance of anti-U1RNP antibody was determined by the method of ELISA and DID (negative group). The 17 cases were found to satisfy this criteria. Control cases were also selected to match at the age of onset and observation period who continued to keep anti-U1RNP antibody (control group).

In negative group, there were SLE 8 cases, MCTD 4 cases, SSc 2 cases, UCTD 2 cases, and APS 1 cases. Age at onset was 33.3 ± 12.3 y/o in negative group, and observation period was 13.5 ± 6.8 y/o. Raynaud phenomenon was found in 9 cases at first visit in negative group, and 3 out of 9 cases showed Raynaud phenomenon at end of observation. However 4 cases had kept to develop Raynaud phenomenon who had also anti-centromere antibody (ACA). In negative group, high frequency of arthritis (47%), fever (50%) and lymphadenopathy (53%) were found at first visit, and most of them had disappeared at the end of observation period. During course, various new autoantibodies were found in negative group such as anti-SSA (5 → 8 cases), ANCA (1 → 2), ACA (0 → 4), antiphospholipid antibody (2 → 6). As compared with control group, there was low frequency of Raynaud phenomenon and high frequency of anti-DNA antibody in negative group. It is suggested that there is close relationship between existence of anti-U1RNP antibody and clinical features.

4. MCTD に併発する肺高血圧症発症機序の検討 —血管作動性因子発現の解析

分担研究者 : 原 まさ子
研究協力者 : 川口 鎮司
所属施設 : 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター

研究要旨

抗U1-RNP抗体陽性のMCTDは、他の膠原病に比較し肺高血圧症(PH)が高頻度に合併すると報告されている。PHは、MCTDの予後を決定する重要な臓器病変であるが、その病態形成の機序は明らかにされていない。近年、血管の収縮に作用するエンドセリン(ET)の産生異常が、PHの病態に関与しているとする報告がなされた。昨年の我々の研究にて、肺動脈由来血管内皮細胞は、種々のサイトカイン・成長因子により、ETの産生を増加させた。患者の血漿中にてET-1が上昇している病態に病変局所のサイトカイン産生が関与している可能性が推定された。そこで、今回、ET-1の転写調節に関与する遺伝子領域を決定し、そこに結合する転写調節因子の同定を行った。GATA-2 およびAP-1の関与が推定され、PH合併MCTD患者の病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

MCTDでは、肺高血圧症(PH)が他の膠原病に比べ高頻度に合併し、予後を決定する重要な因子と考えられている。MCTD以外の膠原病においても、抗U1-RNP抗体陽性の患者群では陰性の患者群に比較し、高頻度にPHを合併するとされている。そのため、抗U1-RNP抗体を誘導する機序がPH発症に関与しているか、抗U1-RNP抗体自身がPH発症に関与している可能性が種々検討されている。しかし、抗U1-RNP抗体陽性患者にてPH発症頻度が高くなる免疫学的機序は分かっていない。

MCTDに合併するPHは、病理学的には、肺動脈、細小動脈の内膜、中膜の肥厚により、血管内腔の狭小化が生じている。内膜、中膜の肥厚には種々のサイトカイン、成長因子の関与が考えられている。近年、血管の収縮・拡張に作用するエンドセリン(ET)・一酸化窒素(NO)の産生異常が、血管の狭窄を介し、PHの病態に関与しているとする複数の報告がなされている^{1) 2)}。我々は、強力な血管収縮因子であるエンドセリン(ET)-1濃度を測定しMCTD患者では健常人と比較し、有意に高値を示し、PHの病態に関与している

可能性を示唆した³⁾。そこで、今回、ET-1の転写レベルでの調節を詳細に検討する目的で、prepro ET-1遺伝子の転写調節部位を決定した。

B. 方法

正常ヒト肺動脈由来血管内皮細胞を血管内皮細胞用無血清培地を用いて培養した(Biowhittakar社)。ET-1の転写開始部位の塩基を+1とし、5'非転写領域の種々の長さの遺伝子(-177から+33)をPCR法にて作成した。塩基配列はすべてdirect sequence法にて確認した。その遺伝子をプロモーターレスのルシフェラーゼベクター(pXP2)のマルチクローニングサイトに制限酵素を用い組み込んだ。それぞれのベクターを-177pLucから-70pLucと命名した(図1)。また、転写活性を詳細に検討する目的で、遺伝子変異(mutagenesis)をsite-directed mutagenesis kitを用い行った。これらのベクターをlipofection法を用い、正常ヒト肺動脈由来血管内皮細胞に遺伝子導入した。非刺激およびサイトカイン存在下でのルシフェラーゼ活性を測定した。

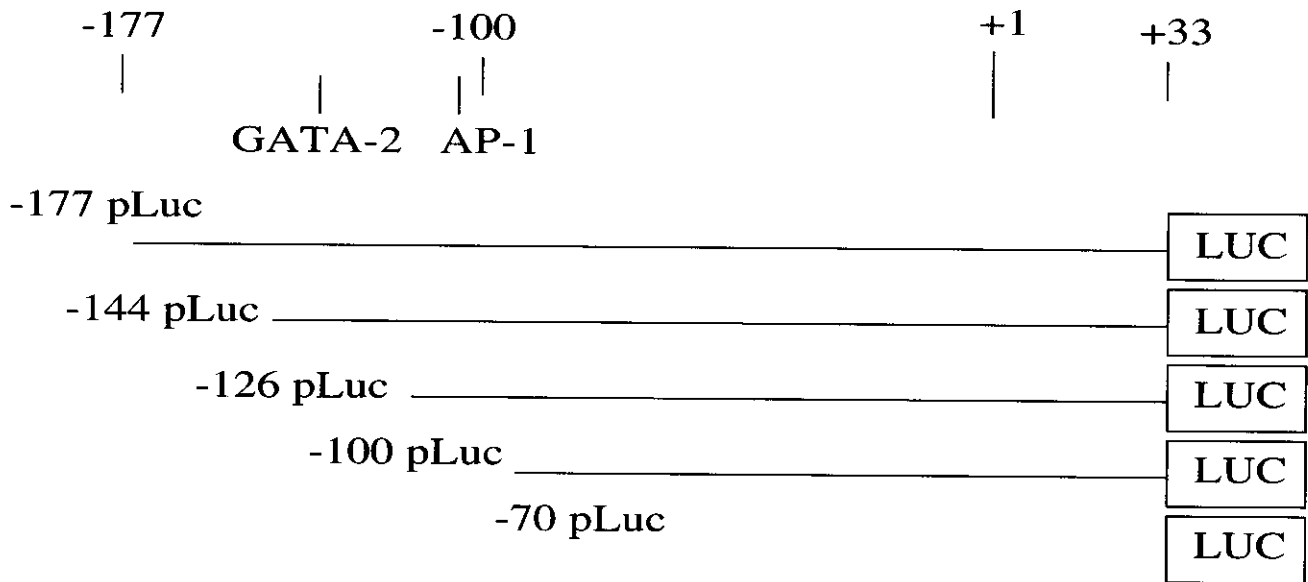


図1 ET-1の5'非転写領域と作成したルシフェラーゼベクター

C. 結果成果

図2に示すように、-144 から -100 の部位に deletion をかけた系でルシフェラーゼ活性が低下し、転写活性に重要な部位がそこに存在することがわかった。今回の結果には示さなかったが、5'-UTR 領域の-3000 から-200 までの検討も行ったが、転写活性に影響を与える部位は認められなかった。-144 から -100 までの間を既存の転写因子結合部位とのホモロジー検索を行い、GATA-2 および AP-1 結合部位が存在することが明らかとなった。そこで、次に、図3に示すようにその転写因子結合部位の遺伝子変異を作成してルシフェラーゼ活性を測定した。図4に示すように、-144pLuc ベクターを用い、GATA-2, AP-1 の単独の変異をもったもの(-144pLuc.mutGATA-2, -144pLuc.mutAP-1) と、両方の変異を同時にもったもの(-144pLuc.mutGATA-2/AP-1) を作成した。ともに変異を作成した時に、ルシフェラーゼ活性が低下し、preproET-1 の転写に両方の転写因子が重要な役割を果たしていることが分った。

D. 考察

肺動脈由来の血管内皮細胞を用いエンドセリンの転写に関与する因子の同定を行った。GATA-2 および AP-1 が転写亢進に関与することがわかり、この転写因子の制御異常がET-1の産生亢進を介して、PHの病

態形成に関与する可能性があると考えた。一方、転写因子の異常に関わらず、肺高血圧症患者のエンドセリン遺伝子での遺伝子多型の存在が転写亢進に関与している可能性も考えられる。この点に関しては、今後患者の genomic DNA を詳細に検討する必要がある。

MCTDに合併する肺高血圧症の発症機序は不明であるが、病理学的には原発性肺高血圧症の組織所見と類似している。末梢肺動脈の内膜、中膜の増殖がみられ、血管内腔の狭小化が病態形成に関与している。近年、肺高血圧症の患者にて、血漿中エンドセリン濃度が上昇していることが報告され⁴⁾、また、肺高血圧症のモデル動物でも、肺動脈中のエンドセリン濃度は高値であった⁵⁾。エンドセリンは、血管収縮と血管内皮細胞/血管平滑筋細胞の増殖に働くことされ、高血圧や動脈硬化にも関与するとされている⁶⁾。これらのことは、肺高血圧症の病態形成にエンドセリンが関与している可能性を示唆している。しかし、肺高血圧症患者にてエンドセリンの発現が亢進している機序は不明である。我々は今回、エンドセリンの発現に関与する転写因子を明らかにしたことにより、それらの因子が肺高血圧症患者にて増加しているかどうかを今後検討する方針である。

一方、血管拡張因子である一酸化窒素 (NO) が肺高血圧症患者にて低下しているとする報告がある。昨年、我々は、エンドセリン、NO が特定のサイトカイ

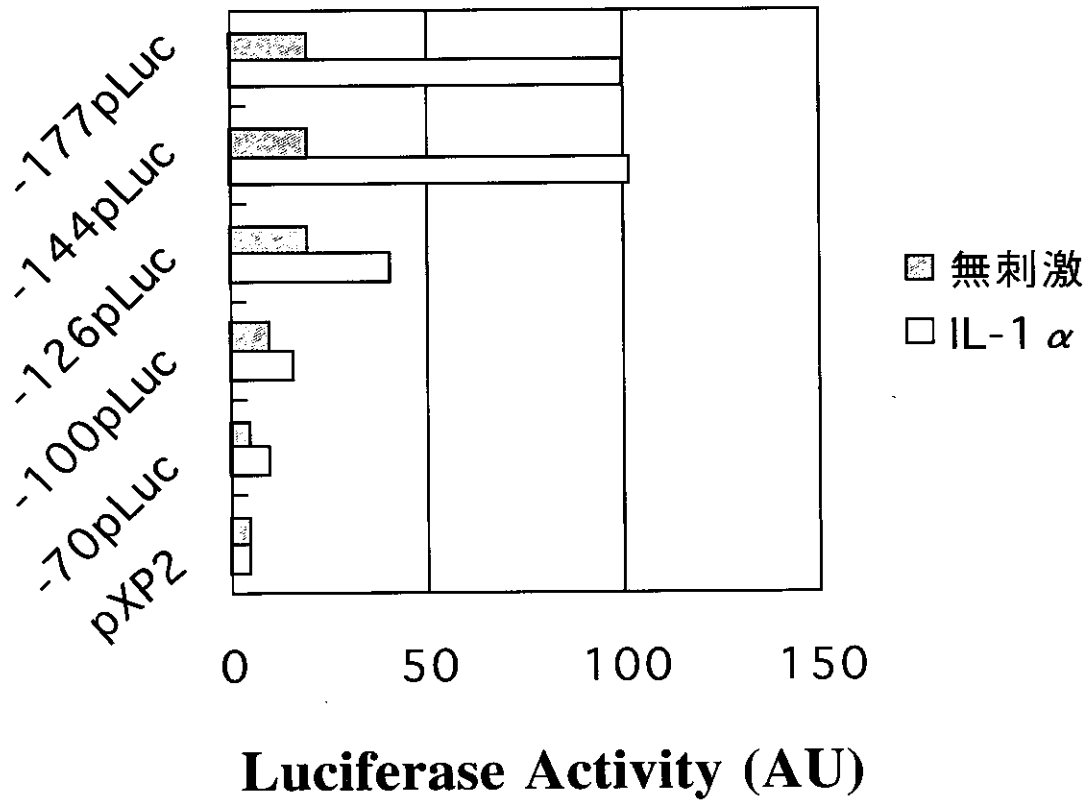


図2 種々のET-1の5'非転写領域の転写活性
種々のルシフェラーゼベクターを肺動脈由来の血管内皮細胞に遺伝子導入し
そのルシフェラーゼ活性を測定した。

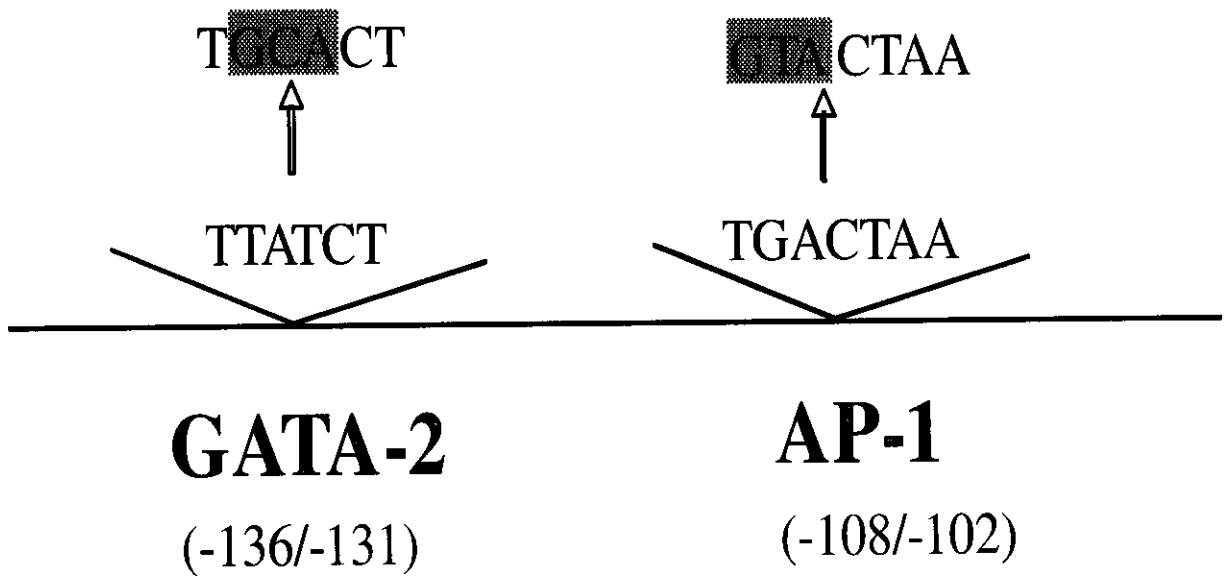


図3 ET-1の5'非転写領域にあるGATA-2およびAP-1の遺伝子変異
GATA-2およびAP-1の転写活性を検討するため、その遺伝子変異を図に示
したように作成した。

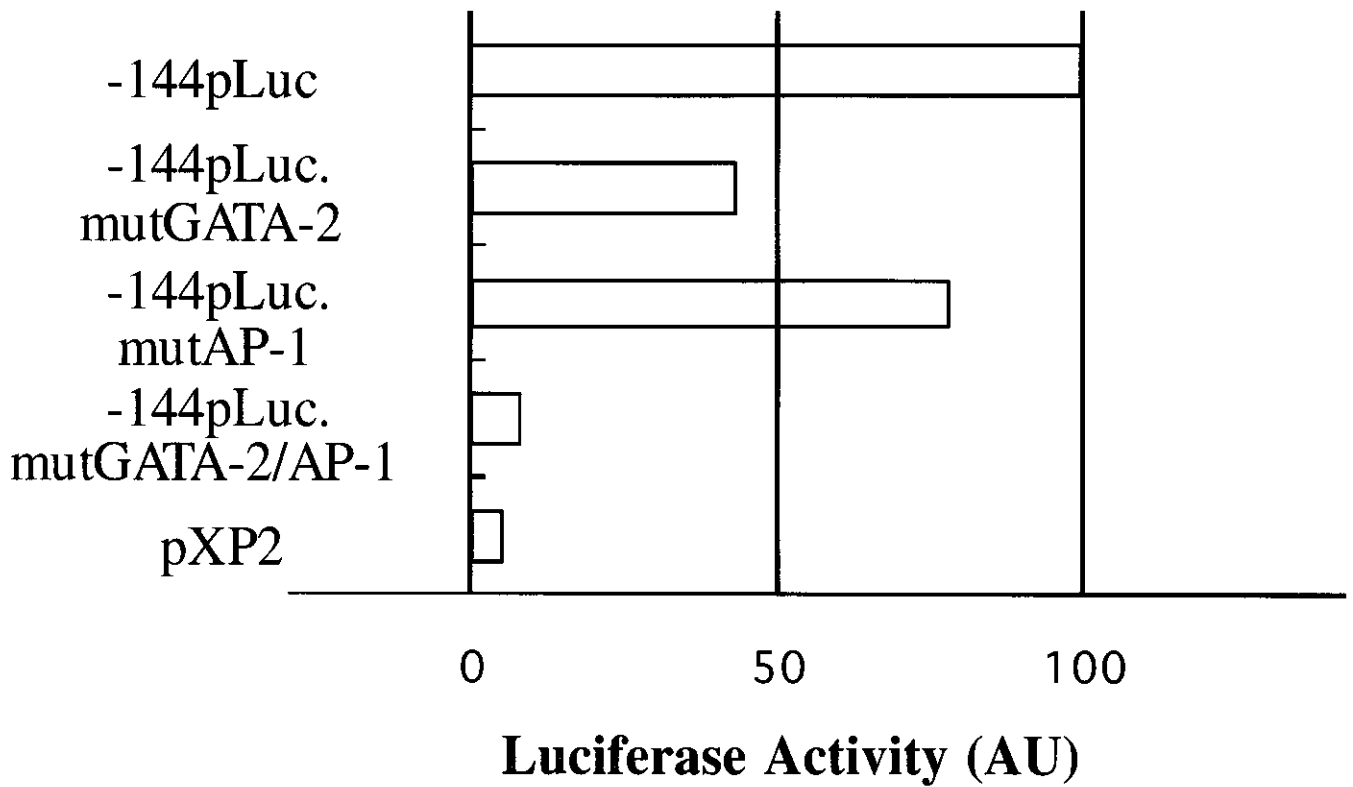


図4 転写活性におよぼす GATA-2 および AP-1 の影響

種々の遺伝子変異を有するルシフェラーゼベクターを肺動脈由来血管内皮細胞に遺伝子導入しそのルシフェラーゼ活性を測定した。

-144Luc ベクターを用い、図3に示したように遺伝子変異を作成する。

-144Luc.mut.GATA-2: GATA-2にのみ変異を作成

-144Luc.mut.AP-1: AP-1にのみ変異を作成

-144Luc.mutGATA-2/AP-1: GATA-2およびAP-1ともに変異を作成

pXP 2: プロモーターレスのベクター

ンによって血管内皮細胞から誘導されることを報告した⁷⁾。エンドセリンが増加している病変局所では NO 合成酵素 (NOS) が誘導され、NO の産生が亢進していることが予測される。しかし、原発性肺高血圧症では、NO 産生が低下していると報告されている⁸⁾。そこで、肺高血圧症を合併したMCTD 患者より、genomic DNA を抽出し、NO の産生を調節する NO 合成酵素の遺伝子多型を検討し、その転写活性におよぼす影響も検討する予定である。

リン産生亢進に関与していることが示唆された。その転写因子の詳細な検討および患者遺伝子多型の検索が重要と考えられた。

E. 結論

エンドセリンの転写調節に関与する遺伝子領域を決定した。この部位に結合する転写因子の制御が、エンドセ

文 献

1. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease. *Ann Intern Med* 114: 464-9, 1991.
2. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 333: 214-21, 1995.
3. 原まさ子、高木香恵、川口鎮司。MCTDの血管病変におけるET-1、NOの関与 厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究会 混合性結合組織病分科会 平成10年度 研究報告書 36-37, 1999
4. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 329: 1967-8, 1993
5. Ivy DD, LeCras TD, Horan MP, Abman SH. Increased lung preproET-1 and decreased ETB-receptor gene expression in fetal pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 274: L535-41, 1998
6. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-15, 1988.
7. 原まさ子、川口鎮司、高木香恵。MCTDにおける肺高血圧症の研究 厚生省特定疾患 混合性結合組織病に関する研究班 平成11年度研究報告書 31-34, 2000
8. Frasch HF, Marshall C, Marshall BE. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 276: L304-10, 1999

ANALYSIS OF VASOCONSTRICTIVE FACTOR CONTRIBUTING TO THE VASCULAR ABNORMALITY IN PULMONARY HYPERTENSION OF MCTD

Masako Hara, and Yasushi Kawaguchi
Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University

Pulmonary hypertension (PH) complicated with MCTD is thought to result from an increase in vascular tone or an abnormal proliferation of smooth muscle cells in the wall of small pulmonary arteries. Endothelin (ET)-1 is a potent vasoconstrictor peptide with cell-mitogenic property. It was reported that plasma ET-1 was elevated in PH and that ET-1 might play an important role in the abnormal vascular tone of PH. However, few studies concerning the regulation of ET-1 production were performed. We determined the cis-element of preproET-1 gene in pulmonary artery-derived endothelial cells. It was revealed that two nuclear factors (GATA-2, AP-1) were involved in the transcriptional activity of preproET-1. These nuclear factors might contribute to the immunopathogenesis in PH with MCTD.

5. 肺高血圧症に及ぼすステロイド剤の影響に関する組織化学的検討

分担研究者 : 吉田 俊治¹
研究協力者 : 片山 雅夫¹、竹田 洋祐¹、鳥飼 勝隆¹、笠原 正男²
所属施設 : ¹藤田保健衛生大学感染症リウマチ内科
²藤田保健衛生大学病理学

研究要旨

【目的】肺高血圧症(PH)モデルラットを用い、ステロイド治療効果を免疫組織学的に検討した。【方法】モノクロタリン(MCT)を皮下投与したラットに、メチルプレドニゾロンを週3日間30mg/kgで腹腔内投与した治療群(P群)と非治療群(C群)で右室重量比(右室/左室+中隔)と肺組織のHE染色、さらにendothelin-1、VEGF、TNF- α などについて免疫組織染色を行い検討した。【結果】右室重量比は第5週でP群(36.7 \pm 13.6)はC群(41.0 \pm 9.1)に比し低い傾向がみられた。両群ともにPHに特徴的な病理学的変化がみられたが、P群ではC群よりも肺動脈中膜の肥厚及び細胞増殖、血管周囲の滲出が軽度であった。肺動脈周囲を中心にVEGFの染色性の亢進がみられたがP群ではC群に比して軽度であった。【結論】ステロイド大量投与により、MCTによるPHの進行を抑制できる可能性が示唆され、諸因子、特にVEGFの関与が推測された。

A. 研究目的

肺高血圧症(PH)は混合性結合組織病(MCTD)をはじめとする膠原病でしばしばみられ、重篤かつ予後不良な合併症の一つである。膠原病に合併するPHには、WHOの分類で原発性肺高血圧症(PPH)と同じく肺動脈血管病変に基づく一群があることが知られている。この膠原病のPPH様PHに対する治療にはPPHに対すると同様に抗凝固薬、抗血小板薬、血管拡張薬、プロスタグランジン薬などが用いられ、さらに免疫抑制薬や副腎皮質ステロイド薬(ステロイド)などの免疫療法の有用性を示唆する報告がみられる。

当教室でも、これまでに16例のPH合併膠原病患者を臨床的に解析し、ステロイド多量投与がPHの治療に有効であることを報告してきた¹⁾。当教室での成績以外にもいくつかステロイド薬の治療効果について報告があるが、未だ充分な根拠に根ざした、確立された報告とはいえない²⁾³⁾⁴⁾。

そこで、膠原病合併PHに対するステロイド薬の治療有効性の根拠を得るために、PPH類似のPHを誘発することが知られているモノクロタリン(MCT)を投与

したラットを用い、ステロイド療法の治療効果について免疫組織学的に検討した。

B. 研究方法

10週齢のWistar系雄性ラット(280~300g)にMCT(60 mg/kg)を皮下投与し、それを2群にわけ治療群(P群)にはメチルプレドニゾロン(体重当たり30mg/kg、腹腔内)を週3回投与し、非治療群(C群)にはビークルを投与した。またMCT非投与群を正常群とした。第2週に各群ラットを2匹ずつ、第5週に3匹ずつ屠殺し、心臓を摘出した。心耳を取り除き、右心室と左心室+中隔とに切り分け、PHの指標である右心肥大の程度を右室重量比(右室/左室+中隔)で求めた。ラットの解剖の際、麻酔をかけるなど動物愛護上の配慮を行った。

また、肺に関しては、左右上葉、下葉をそれぞれ二分し、各々ホルマリン固定と凍結保存とにし、HE染色およびエラスチカ・ファンギーソン染色をして病理組織学的検討を行った。ニコン社製リアルタイム画像処理解析装置ルーゼックスFS(Luzex-FS)により、

外弾性板で仕切られた全血管床面積に占める、外弾性板と内弾性板で囲まれた中膜の面積の割合を中膜面積比として求めた。この中膜面積比を中膜肥厚の指標とし、これに対するステロイド薬治療の影響について比較検討を行った。

また、ラット腹腔動脈より血液を採取し、血中のエンドセリン-1(ET-1)濃度を、ELISA法で測定した。さらに、ET-1、vascular endothelial cell growth factor(VEGF)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)など血管作働性因子や増殖因子、その他各種サイトカインなどに対するステロイド薬の影響について免疫組織染色法を用いて検討した(表1)。

C. 研究結果

1) PHの指標である右室重量比は、MCT投与後第2週でP群およびC群両群間に差はなかった。しかし、第5週ではP群(36.7 ± 13.6)はC群(41.0 ± 9.1)に比し低い傾向がみられた。C群の1匹は第4週末に死亡した。

2) 腹腔動脈から採取した血漿中のET-1濃度の測定では、ET-1濃度と右室重量比(右室/左室+中隔)の間には正の相関がみられた。MCTで亢進したET-1に対するステロイド治療の影響では、第2週では、正常群(3.4pg/ml , $n=1$)、P群($2.4 \pm 0.8\text{pg/ml}$, $n=2$)、C群($3.2 \pm 0.6\text{pg/ml}$, $n=2$)の3群間でET-1濃度に明らかな差はなかった。しかし、第5週では、正常群($3.0 \pm 0.3\text{pg/ml}$, $n=3$)に比してP群($5.4 \pm 3.5\text{pg/ml}$, $n=3$)およびC群($6.5 \pm 4.2\text{pg/ml}$, $n=2$)で高値となった。さらにP群ではC群に比し低値の傾向がみられステロイド治療の影響が示唆された。

3) 肺の病理組織学的変化は、第2週のHE染色の検討ではMCTを投与したP群、C群ともにPHに特徴的な変化である著明な中膜の肥厚と中膜細胞数の増加がみられた。しかし、中膜の肥厚および細胞数の増加の程度は、P群でC群に比し軽度の傾向であった。また、血管周囲の滲出、血管周囲の細胞浸潤もMCT投与群で顕著にみられたが、P群ではC群に比し軽度の傾向があり、ステロイド治療による効果と考えられた(図1a)。

第5週では、第2週の所見に加えて、C群では全周囲性に内膜、内弾性板、外弾性板等の肥厚がみられた。血管周囲の浸出も強く、PPHあるいは膠原病に合併するPHでみられるplexiform lesionもみられた。P群においては、これらの所見がいずれも軽度であった。

また、P群においては、血管の肥厚、非肥厚部の混在がありステロイド治療の影響が示唆された(図1b)。

4) 各群の1ラットにつき外径50~150 μm の筋性肺動脈を無作為に4血管ずつ選択して中膜面積比を測定した。第2週では、正常群 0.468 ± 0.103 ($n=12$)、C群 0.645 ± 0.102 ($n=8$)、P群 0.569 ± 0.122 ($n=12$)で、ラット数が少ないため有意差はみられなかったが、P群では、C群に比し中膜面積比が低値である傾向がみられた。ステロイド治療がMCT誘発の肺動脈平滑筋細胞増殖に何らかの抑制作用がある可能性が考えられた。

5) MCT誘発PHラットを用いて、ET-1、エンドセリン受容体サブタイプAおよびB(ETR-A、B)、VEGF、TNF- α に対する抗体を用いて肺免疫組織化学的検討を行い、ステロイド治療の影響について比較検討した。抗ET-1抗体、抗ETR-A、B抗体、抗TNF- α 抗体の肺免疫組織染色ではP群、C群の間で明らかな差はみられなかった。抗VEGF抗体による肺免疫組織染色では、MCT投与により肺動脈周囲を中心にVEGFの染色性の亢進がみられたが、P群ではC群に比して同部の染色性が軽度であった(図2)。正常ウサギIgGを一次抗体とした対照群では染色がみられず、抗VEGF抗体が特異的に肺動脈周囲に結合したものと考えられた。

D. 考察

MCT誘発PHラットは、PPHの動物モデルとされているが、膠原病にみられるPHと発症機序が必ずしも同一ではないとも考えられる。しかし、膠原病合併PH動物モデルはない。膠原病合併PHの症例にステロイド投与が有効との報告がみられるので、それを検証するためにMCT誘発PHラットを用いて、PHの発症機序、増悪機序に対する免疫抑制療法、なかでもステロイド治療に対する効果を検討した。

MCTは植物アルカロイドの一種で、皮下投与すると肺動脈炎および肺臓炎を生じ、肺高血圧症を発症してくることが知られている。これまでの報告では、ラットの肺動脈圧は2週間後から有意に上昇し始めることが知られている。本実験では肺組織学的検討でMCT投与ラットでは第2週にはすでに肺動脈中膜の肥厚が著明に出現していた。ステロイド治療の効果については、中膜の肥厚および細胞数の増加、血管周囲の滲出、血管周囲の細胞浸潤が、P群で軽度の傾向があり、治療による効果と考えられた。中膜面積比の検

表1 肺免疫組織染色法に用いた抗体

Anti-Endothelin-1 (Phoenix Pharmaceuticals社)

Anti-Endothelin Receptor A (Biogenesis社)

Anti-Endothelin Receptor B (Biogenesis社)

Anti-TNF- α (Endogen社)

Anti-VEGF (NeoMarkers社)

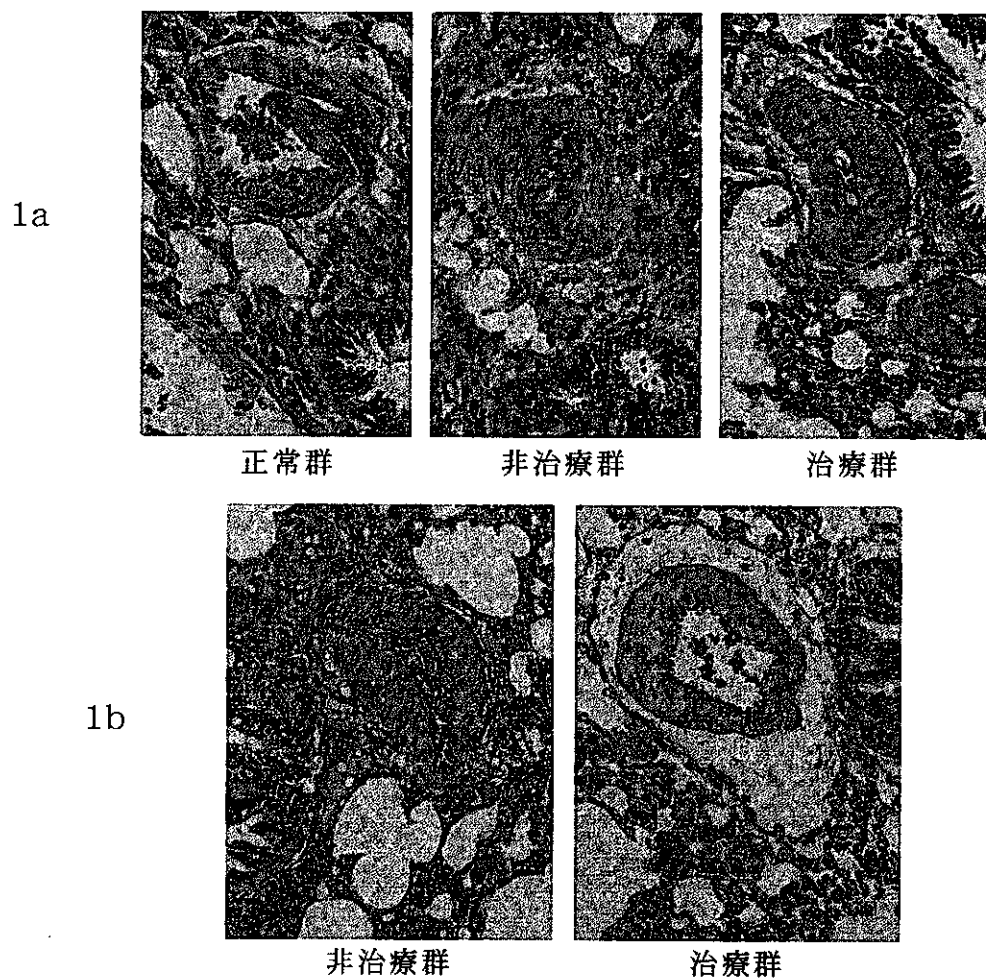


図1. ステロイド治療の効果 (HE染色) — 第2週(1a) および第5週(1b)

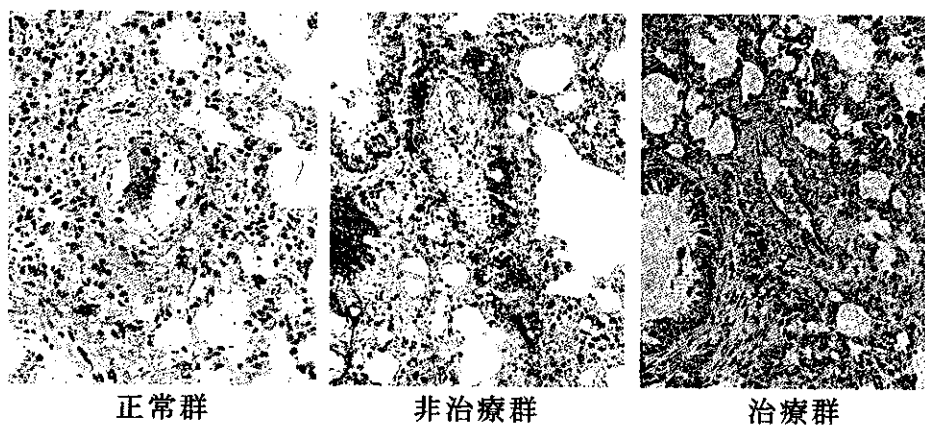


図2. 抗VEGF抗体による免疫染色 (第2週)
— ステロイド治療による影響

討では、ラット数が少なく有意ではなかったが、P群で低値の傾向がみられ、ステロイド治療がMCT誘発の肺動脈平滑筋細胞の増殖に何らかの抑制作用がある可能性が考えられた。

肺の免疫組織化学的検討で種々の血管作働性因子、血管増殖因子、サイトカインなどがPHの発症、進展に関与していることが考えられている。それらの中で、ET-1や同受容体であるETR-A、Bについては、これまでの研究でPHとの関連を示唆する結果を得ている⁵⁾。しかし、今回の条件下では、P群とC群の間でET-1やETR-A、Bの染色性に明らかな相違は認めなかった。また、代表的な炎症性サイトカインで血管新生にも関与するTNF- α についても同様に差は認められなかった。これらの中で、血管内皮細胞特異的増殖因子であるVEGFに対する抗体を用いた肺免疫組織染色による検討では、肺動脈血管周囲に染色性の亢進がみられ、VEGFがMCTによるPHの発症に関与している可能性が示唆された。VEGFの染色性はステロイド投与により抑制されていた。肺動脈中膜の肥厚の抑制傾向と合わせて、ステロイドがPHの抑制に有効であり、その一部にVEGFの抑制が関与している可能性が考えられた。

当教室のこれまでの検討で、培養ヒト肺動脈構成細胞に及ぼすPH合併膠原病患者の末梢血単核球(MNC)の影響の検討で、PH合併膠原病患者のMNC培養上清中に、正常ヒト肺動脈内皮細胞由来培養細胞(PAEC)および同肺動脈平滑筋細胞由来培養細胞(PASMC)の増殖を促進する因子が分泌され、その一つがインターロイキン(IL)-1 β である可能性が示された⁷⁾。

また、血管内皮細胞特異的増殖因子としてVEGFが知られている。PPHあるいは膠原病に合併するPHでは中膜および内膜の著明な増殖がみられ、特徴的所見としてplexiform lesionがみられる。これは、新生血管の過剰増殖を示す所見で、その原因として、血管内皮細胞を増殖させる因子の関与が推測され、VEGFもその候補の一つである。VEGFは血管新生促進因子の中で中心的な存在で、主に血管周囲の細胞で産生されて、パラクリン的に血管内皮細胞に特異的に作用することが知られている。

これまでに、platelet activating factor(PAF)およびplatelet-derived growth factor(PDGF)で刺激されたヒト肺線維芽細胞や肺血管平滑筋細胞におけるVEGFの遺伝子レベルでの発現亢進がステロイドにより抑制されたとの報告がある⁸⁾。また、半月体形成性腎炎患者で

血清中VEGF濃度の上昇がみられ、ステロイド治療後に同濃度が低下したとの報告がある。彼らはステロイドによるVEGFの低下が臨床的効果につながったと推定している⁷⁾。前者は、ステロイドによるVEGF産生の抑制効果をin vitroでみたもので、後者はステロイドによるVEGF産生の抑制と臨床的改善を示したもので、いずれもステロイドの治療効果を示唆している。我々のこれまでの研究結果と合わせて、ステロイドによりVEGFの産生を抑えることが、PHの発症や進展の抑制につながる可能性が示された。さらに、詳細な機序の解明が必要である。

E. 結論

以上より、MCT誘発PHラットを用いた肺免疫組織染色で、PHの発症には諸因子の中、特にVEGFの関与が推測された。また、ステロイド投与により、PHの進行を抑制できる可能性が示された。

文 献

1. 鳥飼勝隆, 見山仁美, 水谷昭衛 他: 膠原病合併PHの治療に関する研究. 厚生省特定疾患調査研究重点研究事業, 混合性結合組織病に関する研究班平成11年度研究報告書, 2000; 191-195.
2. Sanchez O, Humbert M, Sitborn O, Simonneau G: Treatment of pulmonary hypertension secondary to connective tissue diseases. *Thorax* 1999;54: 273-277.
3. Alpert MA, Mukerji V et al: Pharmacotherapy of chronic pulmonary arterial hypertension: Value and limitations Part 2: Secondary pulmonary hypertension. *Angiology* 1994; 45(9): 755-761.
4. 粕川禮司: 膠原病の肺高血圧症. *リウマチ* 1991; 31(4):430-439.
5. 鳥飼勝隆, 国枝武義, 吉田俊治 他: 膠原病における肺高血圧症の検討. 厚生省特定疾患調査研究重点研究事業, 特定疾患に伴う肺高血圧症の発症機序の解明と内科的治療指針確立を目指す診療科横断的研究平成10年度研究報告書, 1999; 20-22.
6. Nauck M, Roth M, Tamm M, et al: Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology* 1997; 16(4):398-406.
7. Nitta K, Uchida K, Kimata N, et al: Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in human crescentic glomerulonephritis. *Clinical Nephrology* 1999; 52(2):76-82.

HISTOCHEMICAL STUDY ON THE EFFECT OF CORTICOSTEROIDS ON THE PULMONARY HYPERTENSION

Shunji Yoshida¹⁾, Masao Katayama¹⁾, Yosuke Takeda¹⁾, Katsutaka Torikai¹⁾,
and Masao Kasahara²⁾

Department of Internal Medicine¹⁾, and Department of Pathology²⁾, Fujita Health University School of Medicine

Objective: To evaluate the efficacy of corticosteroids on pulmonary hypertension(PH), we examined the effect of administering corticosteroids on the extent of monocrotaline(MCT)-induced PH using immunohistochemical staining.

Methods: After an s.c. injection of 60mg/kg MCT, 10 male Wistar rats of 10 weeks of age were divided into 2 groups, one group treated with high doses of methylprednisolone (mPSL; 30mg/kg, 3days per week, intra peritoneally) and the other not. Right ventricle / left ventricle plus septum weight ratios (RV/LV+S) were used as an index of the development of PH. Immunohistochemical staining was performed for the sections of the lung using antibodies to cytokines and growth factors including endothelin-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), and tumor necrosis factor- α (TNF- α).

Results: RV/LV+S was tended to be decrement in rats with mPSL ($36.7 \pm 13.6\%$) compared with those without ($41.0 \pm 9.1\%$) on the fifth week. Pathologically medial thickening and cell proliferation, and perivascular exudate in pulmonary arteries and arterioles were less severe in lungs in rats with corticosteroids compared with those without treatment. Immunohistochemical staining revealed that immunoreactivities of anti-VEGF antibodies were increased in lungs especially around pulmonary arteries in rats treated with MCT but were less in the rats treated with corticosteroids compared with those without treatment.

Conclusions: It is suggested that corticosteroids pulse therapy might be effective on the treatment of MCT-induced PH in a rat possibly through the inhibitory effect on VEGF.

6. 膠原病 4 疾患における肺高血圧症の治療状況に関する全国疫学調査

分担研究者 : 吉田 俊治¹、岡田 純²、近藤 啓文²
研究協力者 : 深谷 修作¹
所属施設 : ¹藤田保健衛生大学感染症リウマチ内科
²北里大学医学部内科

研究要旨

日本国内の肺高血圧(PH)合併膠原病の治療の状況を把握するため、前期のMCTD班(東條班)での膠原病 4 疾患における PH の頻度に関する全国疫学一次調査を利用した。この中で PH 合併症例を対象として、治療に重点を置いた 2 次調査票を送付した。一次調査における全膠原病患者 17,793 例中、294 例(MCTD 1,651 例中 83 例、SSc 3,778 例中 107 例、SLE 9,015 例中 85 例、PM/DM 3,349 例中 19 例)が PH 合併と記載されていた。このうち回収できた 145 例を解析対象とした。各種薬物療法の内、ステロイド薬は 108 例、免疫抑制薬は 26 例に使用されていた。ステロイド薬使用群は非使用群に比し、また免疫抑制薬使用群は非使用群に比し、PH 発症年齢が有意に若年であった。またステロイド薬投与と治療の短期的有効性とは有意の相関を認めた。以上より、膠原病に合併する PH に対して免疫療法の有効性が示唆された。

A. 研究目的

今期の MCTD 班の重要な目標である MCTD 合併 PH の治療方針決定の一助にするため、昨年、班内の PH 合併 MCTD の治療状況を調査した。そこで得られた結果の妥当性を検討するために、平成 10 年度の全国疫学調査で抽出された患者の治療状況について調査することを目的とした。また昨年と同様、免疫療法の状況についても詳しく調査した。

B. 研究方法

1. 対象

一次調査の対象症例は、前回の MCTD 班(東條班)で平成 9 年 1 月から 12 月までに MCTD、全身性エリテマトーデス(SLE)、強皮症(SSc)、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)として受診した患者である。調査法は郵送法で、膠原病 4 疾患の患者数、その中の PH 患者数の記載を求めた。この中で PH 合併を記載されている症例を対象として、治療に重点を置いた 2 次調査票を送付した。

2. 調査方法

主な調査項目は、膠原病及び PH の発症年齢と症状、PH 診断の方法・日時・肺動脈圧、治療薬(ステロイド薬、免疫抑制薬、血管拡張薬、在宅酸素療法など)、治療前後の肺動脈圧・短期的有効性、最終転帰・死因などである。平成 12 年 8 月末日を締め切りとし、未回収分は、追加依頼などして回収に努めた。

3. 統計学的方法

Statview を用いて、t 検定及び χ^2 検定を用いて検討した。

4. 倫理面への配慮

主治医による retrospective study のため研究対象者に対する不利益や危険性はない。また得られた調査票の管理を厳重にすると共に、コンピュータ入力の際は、患者名を入力せず、プライバシーの保護に留意した。

C. 研究結果

1. 解析症例

平成10年度の全国疫学1次調査において4,314診療科に調査書類を郵送し、1,694診療科から調査票が返送されてきた。その結果、全膠原病患者17,793例中PH合併例は294例(1.7%)であった(平成10年度研究報告書作成以降に回収した症例も含まれるため、同報告書の数字と若干異なる部分がある)。その内訳は、MCTD 1,651例中83例(5.02%)、SLE 9,015例中82例(0.90%)、SSc 3,778例中100例(2.64%)、PM/DM 3,349例中19例(0.56%)であった。294例の主治医に2次調査票を送付し、平成13年1月26日現在145例を回収した。その内訳は、MCTD 83例中40例、SLE 85例中40例、SSc 107例中46例、PM/DM 19例中19例であった。

2. 各種薬物療法の頻度

145例における各種薬物療法の頻度を表1に示す。複数回答が可能であり、実際多くの患者が複数の薬物を使用されていた。原発性PHに使用される薬剤のほかに、ステロイド薬が74%、免疫抑制薬が18%に使用されていた。また在宅酸素療法を30%の患者が受けていた。

3. ステロイド薬使用と関連するPH関連指標

ステロイド薬使用の有無や最大投与量と関連するPH関連指標を検討した。PH発症年齢がステロイド薬使用群で有意に若年であった(使用群の平均±標準偏差45.5±16.3才、非使用群58.0±13.0才、 $p=0.0012$) (図1)。またステロイド薬投与と治療の短期的有効性について χ^2 検定を行うと有意($p=0.0065$)にステロイド薬投与群に短期的有効性が多く見られた。しかし昨年度の班員施設での調査において有意に見られたステロイド薬使用群での高率の肺動脈圧改善度、ステロイド薬最大投与量とPA圧改善度との間の有意の正の相関は、今回の調査では見られなかった。

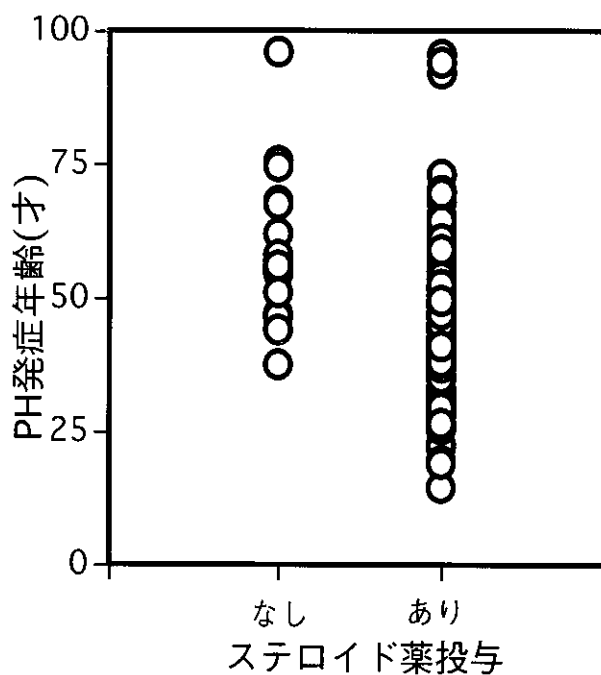
4. 免疫抑制薬使用と関連するPH関連指標

免疫抑制薬についてもステロイド薬と同様の検討を行った。PH発症年齢が免疫抑制薬使用群で有意に若年であった(使用群の平均±標準偏差41.2±12.9才、非使用群50.9±16.5才、 $p=0.011$)。しかし昨年度の班員施設での調査において有意に見られた免疫抑制薬使用群での高率の肺動脈圧改善度は、今回の調査では見られなかった。

1. Ca拮抗薬	65例 (45%)
2. ACE阻害薬	26例 (18%)
3. PG製剤	
経口PGI2	87例 (60%)
静注PGE1	39例 (27%)
4. ステロイド薬	108例 (74%)
パルス療法	46例 (32%)
5. 免疫抑制薬	26例 (18%)
6. ワ-ファリン/ヘパリン	42例 (29%)
7. 抗血小板薬	55例 (38%)
8. 在宅酸素療法	44例 (30%)

表1 各種薬物療法の頻度

図1 ステロイド薬とPH発症年齢との関係



文 献

1. 東條 毅、秋谷久美子、鳥飼勝隆、他. 膠原病四疾患における肺高血圧症の頻度に関する全国疫学調査. 厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班混合性結合組織病分科会平成10年度研究報告書 1999;3-6.
2. 吉田俊治、片山雅夫、見山仁美、大島久二、鳥飼勝隆: 肺高血圧症に対するステロイド剤の影響に関する検討. 厚生省特定疾患混合性結合組織病に関する研究班平成11年度研究報告書 2000: 15-17.
3. 吉田俊治、片山雅夫、竹田洋祐、鳥飼勝隆、笠原正男: 肺高血圧症に及ぼすステロイド剤の影響に関する組織化学的検討. 厚生省特定疾患混合性結合組織病に関する研究班平成12年度研究報告書 2001: 17-21.

D. 考察

PH合併膠原病の治療状況について、全国疫学2次調査を行った。その結果は、昨年度の班員施設のPH合併膠原病の治療の現況についての調査結果を大部分、裏付けるものであった。すなわち、通常の原因性PHで使用されるような血管拡張薬や抗凝固薬、抗血小板薬のほかにステロイド薬や免疫抑制薬などのいわゆる免疫療法が半数以上の症例に投与されていた。そしてステロイド薬使用群および免疫抑制薬使用群ではPH発症年齢が若年であった。この点は昨年度の班内調査と同様であり、この意味する点は不明であるが、PH若年発症者に免疫療法を行うべき他の臓器障害が多いのかもしれない。この点については、今回の1次調査、2次調査とも他の臓器障害についての情報を求めておらず、今後の研究に待ちたい。またステロイド薬投与群に短期的有効例が有意に多く見られた。もちろんこれらの免疫療法の大部分は、PHそのものに向けられて投与されたものではなく、それぞれの膠原病のPH以外の臓器障害に対して投与されたものと思われる。しかもPHに対するその他の治療薬が大部分の症例で併用されているため、PHそのものに対する免疫療法薬の作用については今回の検討では確定できない。しかしながら日本でも海外でも膠原病合併PHに対して免疫療法薬を使用して良好な効果の得られた報告が散見されること²、PHモデル動物に対してステロイド薬がPHの進行を抑制する可能性があること³、などから免疫療法が膠原病合併PHに対して有効な症例が少なからず存在することが想定される。今後、どのような症例が免疫療法に向いているのかを、調査し、膠原病合併PHの治療指針の一つに組み入れたい。

E. 結論

全国疫学2次調査での肺高血圧(PH)合併膠原病145例の治療状況を調査した。ステロイド薬使用群および免疫抑制薬使用群はそれぞれ非使用群に比し、PH発症年齢が有意に若年であった。またステロイド薬投与群に短期的有効例が有意に多く見られた。以上より、膠原病に合併するPHに対して免疫療法の有効性が示唆された。

A NATIONWIDE SURVEY ON THE TREATMENT OF MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE (MCTD) WITH PULMONARY HYPERTENSION (PH)

Shunji Yoshida¹⁾, Jun Okada²⁾, Hirobumi Kondo²⁾, and Shusaku Fukaya¹⁾

Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine¹⁾

Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine²⁾

To clarify the modality of the treatment of MCTD with PH, 294 PH patients with connective tissue diseases were extracted from the nationwide survey which the previous Research Committee (headed by Doctor Takeshi Tojo) had gathered information in 1999. The new questionnaire for these PH patients with connective tissue diseases were sent to the attending physicians in 2000, collected and analyzed statistically. The questionnaire from 145 patients were collected so far, 108 were given the steroid hormone and 26 immunosuppressants. The onset age of PH was younger statistically in patients with steroid than those without. The steroid administration was statistically correlated with the short-term therapeutic efficacy. These data may suggest the usefulness of the immunotherapy for PH with connective tissue diseases.

7. 抗U1RNP抗体陽性例における肺高血圧症の発症頻度と その臨床像に関する研究

分担研究者 : 岡田 純
研究協力者 : 玉真 桂子、石川 章、近藤 啓文
所属施設 : 北里大学医学部内科

研究要旨

肺高血圧症 (PH) はMCTDなどの膠原病における予後不良の合併症である。今回、我々は、抗U1RNP抗体陽性例におけるPHについて検討したので報告する。平成12年に当院膠原病内科を通院中の抗U1RNP抗体陽性例を対象(MCTD 40例、SLE 38例、SSc 9例、UCTD 8例、Overlap症候群3例、その他6例)に、ドップラー心臓超音波検査を104名に施行した。PHの診断は心臓超音波検査上、推定PA圧30mmhg以上の症例とした。男女比は6:98。PH測定時平均年齢は45.4±14.3歳であった。PHが認められた症例は、42例(40%)であったが、Swan-Ganzカテーテル検査などにより確認された確診PH例は15例(14%)であった。PHの合併は、MCTD 20例(50%)、SLE 8例(21%)、SSc 6例(67%)、UCTD 3例(38%)、Overlap症候群2例(67%)、その他3例(50%)に認められた。PHの合併例と非合併例を比較すると、臨床症状ではRaynaud現象が有意に高率に認められた。また、抗Sm抗体、抗SSA抗体がPH合併例で少ない傾向が認められた。肺線維症がPH合併例は40%と非合併症例の9%に比べ高率に認められた。抗U1RNP抗体陽性例ではPHが高率に認められ、基礎疾患ではMCTDに最も多く認められた。

A. 目的

MCTDはSLE、SSc、PMの臨床像を合わせ持ち、抗U1RNP抗体を持つ疾患として、1972年に提唱された当初は副腎皮質ステロイドに対する反応が良好であり、予後の良好なことが特徴として考えられていたが¹⁾、その後の研究により肺高血圧症の合併が多く、その予後は必ずしも良好ではないことが明らかにされてきた²⁻³⁾。

肺高血圧症と抗U1RNP抗体陽性との関連性が指摘され、膠原病の肺高血圧症の30%に抗U1RNP抗体を認めるとの報告もある⁴⁾が、その発症頻度、肺高血圧症を伴う症例の臨床像の詳細は明らかではない。そこで、本研究では抗U1RNP抗体陽性例にドップラー心エコーを行い、肺高血圧の頻度および臨床像を検討した。

B. 研究方法

2000年1月から12月の期間、当院膠原病内科を通院中の抗U1RNP抗体陽性例に、ドップラー心エコーを施行した104例を対象とした。104例の内訳は男女比、6対98。心臓超音波検査施行時の平均年齢は、45.4±14.3歳。104例の診断は、MCTD 40例、SLE 38例、SSc 9例、UCTD 8例、Overlap症候群3例、その他6例であった。方法は上記104例に対し、ドップラー心エコーを施行し、TRからの推定PA圧が30mmHg以上の症例を肺高血圧と診断した。心臓超音波検査上、右心系の負荷所見、PH patternを認める症例、または、Swan-Ganzカテーテルにより平均肺動脈圧が25mmHgと肺高血圧症が確認された症例を確診PH例とした。

C. 研究結果

肺高血圧症例の基礎疾患

対象症例のPHの頻度とその基礎疾患を表-1に示した。104例中42例(40%)と高率に肺高血圧症の合併を認めた。肺高血圧症合併例の内訳は、MCTD 20例(50%)、SLE 8例(21%)、SSc 6例(67%)、UCTD 3例(38%)、Overlap症候群2例(67%)、その他3例(50%)でMCTDが最も多くみられた。また、PH確定例は、15例(14%)で、MCTD 8例、SLE 2例、SSc 3例、Overlap症候群1例、その他1例であった。

臨床症状

104例を非PH群、PH群、確定PH群の3群に分け、その臨床像を比較検討した(表2)。臨床症状では、Raynaud現象が、PH症例で40/42例(95%)と非PH症例の45/62例(51%)に比べ、 $p=0.003$ と有意に高率であった。PH確定例も同様に14/15例(93%)と高率にみられたが、有意差は認められなかった。また、指ないし手指の腫脹(38%)、多関節炎(60%)、リンパ節腫脹(40%)、皮膚硬化(67%)もPH合併症例に多く認められる傾向が認められた。その他の臨床症状では、肺線維症が非PH症例の8/62例(9%)に対し、PH症例では17/42例(40%)、 $p=0.003$ と有意に多くみられた。PH確定例でも10/15例(67%)と有意に($p=0.001$)高率に認められた。また、SjSの合併も非PH症例で7/62例(11%)に対し、PH症例で17/42例(40%) $p<0.001$ と有意に多くみられた。PH確定例で7/15例(47%)と $p=0.0014$ と同様に有意に高率に認められた。

検査所見・自己抗体

非PH症例とPH合併症例の検査所見の比較(表3)では、白血球減少、血小板減少、尿蛋白、尿中細胞性円柱は、非PH症例とPH合併症例で差が認められなかった。筋原性酵素の上昇31%、筋電図異常17%、とがPH合併症例に多い傾向が認められた。

非PH症例とPH合併症例の自己抗体の比較では、抗SSB抗体、抗セントロメア抗体、抗Scl70抗体、ANCA、抗DNA抗体は非PH症例とPH合併症例でその頻度に差が認められなかったが、抗Sm抗体、抗SSA抗体は、非PH症例でやや少ない傾向が認められた。

肺動脈圧の分布

心エコーから得られた推定肺動脈圧の分布(図1)では、30 mmHg以上が42例で、PA圧35~40 mmHgの肺高血圧症例では、肺線維症の合併を多く認めた。肺線維症を認めた症例も、在宅酸素療法を要するような、重症

な肺線維症は認められなかった。

D. 考察

肺高血圧症はMCTDなどの膠原病における予後不良の合併症である。特にMCTDにおいては死亡原因として最も多く、MCTDの予後を左右する合併症である²⁻⁴⁾。また、肺高血圧症と抗U1RNP抗体陽性との関連性が指摘されているが、その発症頻度、肺高血圧症を伴う症例の臨床像の詳細は明らかではない。

我々は抗U1RNP抗体陽性例、104例について肺高血圧症の発症頻度、肺高血圧症合併症例の臨床像を検討した。抗U1RNP抗体陽性例では、42例(40%)と高率に肺高血圧症の合併を認め、抗U1RNP抗体と肺高血圧症との関連性が確認された。また、42例中MCTDは20例と最も多く認められた。臨床症状の検討では、肺高血圧症の合併症例で、Raynaud現象が有意に高率に認められ、その他に、指ないし手指の腫脹、多関節炎、リンパ節腫脹、皮膚硬化も肺高血圧合併症例に多く認められる傾向がみられた。

肺高血圧症は症状発現時には、病状が完成していることが多く、病因的治療は困難で対症療法が主となる。しかし、完成前の肺高血圧症に対してはステロイドなど、病因的治療が有効である可能性もあり、肺高血圧症の早期診断がMCTDの予後を改善させるために重要と考えられる。肺高血圧症合併MCTDと肺高血圧症非合併MCTDの比較で、抗U1RNP抗体の力価には差がないとの報告⁵⁾があり、肺高血圧症を早期より診断するためには、抗U1RNP抗体陽性例に対しては、早期よりドップラー心エコー等による肺高血圧症の検索が重要と考えられた。

表 1. 肺高血圧症例の基礎疾患

診断		PH	PH確定
MCTD	40例	20例 (50%)	8例 (20%)
SLE	38	8 (21)	2 (5)
SSc	9	6 (67)	3 (33)
UCTD	8	3 (38)	0
Overlap synd.	3	2 (67)	1 (33)
その他	6	3 (50)	1 (17)
合計	104	42 (40)	15 (14)

PH: PA圧30mmHg以上

PH確定: 右心系の負荷所見やPH patternを認める症例やSwan-Ganzカテーテルにより

肺高血圧症が確認された症例

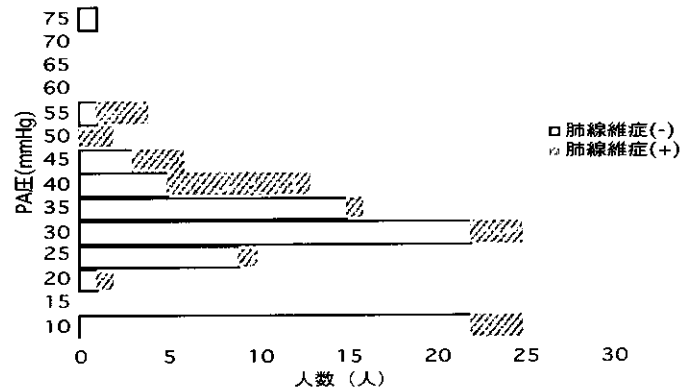


図 1. 肺動脈圧の分布

表 2. 臨床症状と肺高血圧症の関係

臨床症状	非PH		PH		PH確定	
	62例	(%)	42例	(%)	15例	(%)
Raynaud現象	45	73	40	95	14	93
指ないし手指の腫脹	17	27	16	38	4	27
多関節炎	33	53	25	60	8	53
リンパ節腫脹	29	47	17	40	7	47
顔面紅斑	14	23	9	21	1	7
心膜炎	8	13	3	7	2	13
胸膜炎	3	5	2	5	1	7
手指に局限した皮膚硬化	21	34	28	67	13	87
近位部の皮膚硬化	3	5	10	24	5	33
指尖癬痕	0		5	12	4	27
肺線維症	8	13	17	40	10	67
筋力低下	4	6	4	10	0	
精神神経症状	11	18	4	10	1	7
溶血性貧血	2	3	0		0	
SjS合併	7	11	17	40	7	47
食道運動障害	0		3	7	1	7
甲状腺疾患合併	3	5	7	14	4	27
三叉神経障害	3	5	4	10	1	7
無菌精髄膜炎	7	11	2	5	1	7

PH: PA圧30mmHg以上

PH確定: 右心系の負荷所見やPH patternを認める症例やSwanGanzカテーテルにより肺高血圧症が確認された症例

表 3. 検査所見と肺高血圧症との関係

検査所見	非PH		PH		PH確定	
	62例	(%)	42例	(%)	15例	(%)
白血球減少	38	61	19	45	5	33
血小板減少	18	29	11	26	5	33
尿蛋白	16	26	8	19	3	20
尿中細胞性円柱	10	16	2	5	2	13
筋原性酵素上昇	13	21	13	31	5	33
筋電図異常	2	3	7	17	3	20
抗Sm抗体	22	35	12	29	4	27
抗SSA抗体	28	45	16	38	5	33
抗SSB抗体	3	5	3	7	1	7
抗セントロマー抗体	2	3	4	10	1	7
抗Scl70抗体	1	2	0		0	
ANCA	0		2	5	2	13
抗DNA抗体	26	42	19	45	7	47

PH: PA圧30mmHg以上

PH確定: 右心系の負荷所見やPH patternを認める症例やSwanGanzカテーテルにより肺高血圧症が確認された症例

文 献

1. Sharp GC, Irvin WS, May CM, et al. Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective tissue disease, systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *N Engl J Med.* 1976 ;295, 1149-54.
2. 鳥飼勝隆、深谷修作、松本美富士、国枝武義、東條毅. 肺高血圧症を合併した混合性結合組織病患者の予後の検討. 厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班 混合性結合組織病分科会平成10年度研究報告書 1999, 20-23.
3. 東條毅、秋谷久美子、鳥飼勝隆、松本美富士 他. 混合性結合組織病 (MCTD) の生命予後調査. 厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班 混合性結合組織病分科会平成10年度研究報告書 1999, 7-9.
4. 近藤啓文、岡田純、湯原孝典、東條毅. 混合性結合組織病の臨床経過についてのプロジェクト研究 -MCTD と他の膠原病との比較-. 厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班 混合性結合組織病分科会平成10年度研究報告書 1999, 11-14.
5. Nishimaki T, Aotsuka S, Kondo H, Yamamoto K, Takasaki Y, Sumiya M and Yokohari R. Immunological Analysis of Pulmonary Hypertension in Connective Tissue Diseases. *J Rheumatol.* 1999;26, 2357-62.

THE FREQUENCY AND CLINICAL FEATURES OF PULMONARY HYPERTENSION IN PATIENTS WITH ANTI-U1RNP ANTIBODY

Okada J, Tamama K, Ishikawa A and Kondo H
Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine

Objective: Pulmonary hypertension is a major complication of mixed connective tissue disease. However, its prevalence was not known. We have attempted to determine the prevalence and early detection of PH in these disorders using noninvasive cardiopulmonary evaluation. **PATIENTS AND METHODS:** One-hundred four Japanese patients with anti-U1RNP antibody (MCTD 40cases, SLE 38, SSc 9, UCTD 8, Overlap syndrome 3, others 9). Between January and December 2000 we performed Doppler echocardiogram to detect PH in patients with anti-U1RNP antibody. The pulmonary artery systolic pressure was estimated by Doppler echocardiography.

RESULTS: The pulmonary artery pressure (PAP) was estimated by Doppler echocardiography in 104 patients. PH (PAP >30 mm Hg) was found in 42(37%) of 104 patients by the Doppler method. Fifteen cases were confirmed by right heart catheterization (mean PAP > 25 mm Hg) and/or clinical evaluations (definite PH group). PH were found among MCTD 20 cases, SLE 8, SSc6, UCTD 3, Overlap 2, other3. PH was significantly higher in patients with Raynaud phenomenon ($p= 0.02$), and in those with pulmonary fibrosis ($p= 0.007$).

CONCLUSIONS: These findings suggest that patients with anti-U1RNP antibody tended to develop PH.

8. 抗U1RNP抗体産生を刺激するTh1細胞と関連する病理所見 - MRL/Mp-Fas^{lpr}マウスにおける検討 -

分担研究者 : 三森 経世¹
研究協力者 : 藤井 隆夫²
所属施設 : ¹京都大学大学院医学研究科臨床免疫学
²慶應義塾大学医学部内科

研究要旨

抗U1RNP抗体陽性および抗dsDNA抗体陽性MRL/*lpr*マウス脾細胞からクローン化したrnp2 (V β 14) およびdna51 (V β 8.3) をMRL/Mp-Fas^{lpr}マウス (MRL/*lpr*マウス) に移入し、血清中の抗核抗体および皮膚・肺・腎組織所見を調べた。両細胞ともCD4陽性でIFN γ を分泌したが、同種B細胞との混合培養により、rnp2は抗U1RNP抗体を、dna51は抗dsDNA抗体の分泌を誘発し、特異性は異なると考えられた。rnp2移入群では、PBS群に比し血清中抗U1RNP抗体価の有意な上昇が12週齢から認められ、抗dsDNA抗体産生はむしろ抑制された。dna51移入群では18週齢から抗U1RNP抗体価が上昇したが、抗dsDNA抗体は12週齢時を除いてPBS群と同レベルであった。なおPBS群に比し、細胞移入群では肺・皮膚組織所見に差を認めなかったが、dna51移入群で腎糸球体障害が増悪し、rnp2移入群では間質性腎障害が増悪した。以上から、MRL/*lpr*マウスでは、抗U1RNP抗体の産生を刺激するTh1細胞が特定の病態とも関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

混合性結合組織病 (以下MCTD) は、抗U1RNP抗体の産生と多臓器の炎症を特徴とする自己免疫疾患である。自己免疫疾患における病態形成には、T細胞とB細胞が関与する。特に $\alpha\beta$ T細胞がB細胞を活性化し自己抗体の産生を刺激すると考えられるが、T細胞あるいは自己抗体が病態の形成に関与するかは不明である。また患者により臓器症状の出現様式や重症度は様々で、個別の臓器症状に特異的な免疫抑制療法は行われていない。そこでわれわれは、MCTDの病態形成に関与するT細胞依存性の臓器症状のみを特異的に抑制する、細胞レベルでのMCTD治療の追求を最終的な目標とした。

現在までにわれわれは、ヒトSLE類似の病態を呈する代表的なループスモデルであるMRL/Mp-Fas^{lpr}マウス (MRL/*lpr*マウス) の脾細胞から、*in vitro*で抗dsDNA抗体の産生を刺激しかつ*in vivo*でループス腎炎を増悪させる自己反応性T細胞 (dna51) のクローン

化に成功した。また放射線照射 (20Gy) により非活性化したdna51をMRL/*lpr*マウスに移入することで、抗dsDNA抗体産生および腎障害の抑制が認められた。これは臓器特異性自己免疫疾患である多発性硬化症の動物モデルであるEAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) で報告されているT細胞ワクチネーション¹⁾と類似の効果とも考えられる。すなわちSLEをはじめとする全身性の自己免疫疾患においても、T細胞依存性の臓器症状が存在すると考えられる。そこで今回、MCTD患者に高力価に認められる抗U1RNP抗体の産生に関与するT細胞が関与する病態をMRL/*lpr*マウスにおいて検討した。

B. 研究方法

1. マウス

MRL/*lpr*マウスは三協ラボサービス (浜松) から購入した。

2. 自己反応性T細胞のクローニング