

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業

混合性結合組織病に関する研究班

—混合性結合組織病の病態、治療と関連する遺伝的因子、自己抗体の研究—

平成14年度 研究報告書

主任研究者 近藤 啓文

平成15(2003)年3月

目 次

[I] 主任研究者報告

平成 14 年度総括報告	1
近藤 啓文 (北里大学医学部内科)	

[II] 分担研究者報告

1. 抗 U1RNP 抗体陽性症例の臨床経過に関するプロスペクティブ多施設共同研究-2 近藤 啓文 (北里大学医学部内科)	7
2. U1RNP 蛋白核酸複合体による樹状細胞内核酸受容体刺激の可能性 三崎 義堅 (東京大学医学部付属病院アレルギーリウマチ内科)	10
3. 膠原病患者における抗 U1RNP/Sm 抗体の IgG サブクラスに関する研究 三森 経世 (京都大学大学院医学研究科臨床免疫学)	13
4. U1 RNP70-Kd 蛋白と U1 RNA の結合により生じる立体構造を認識する抗 U1 RNP 抗体の臨床的意義の検討 高崎 芳成 (順天堂大学膠原病内科)	18
5. 膠原病患者末梢血単核細胞による抗 U1-RNP 抗体産生と免疫抑制剤添加の影響について 青塚 新一 (国立国際医療センター研究所臨床免疫研究室)	22
6. MCTD におけるリンパ節腫脹および自己抗体産生に関わるシグナル伝達機構 岡本 尚 (名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学)	28
7. 自己抗原 RNP-A 遺伝子の SNP 解析とその対象となる日本人健常人 DNA バンクの必要性 大久保光夫 (埼玉医大総合医療センター輸血・細胞治療部)	34
8. 抗 RNP 抗体陽性患者におけるマンノース結合レクチン遺伝子多型 堤 明人 (筑波大学臨床医学系)	38
9. MCTD における肺高血圧症(PH)の合併頻度および治療指針案の検証 吉田 俊治 (藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科)	41
10. 抗 U1RNP 抗体陽性例における BMPR2 遺伝子の変異と抗 BMPR2 抗体に関する検討 岡田 純 (北里大学医学部内科)	44
11. 肺高血圧症 (PH) 肺における骨形成因子 II 型レセプター(BMPR-II)の発現に ついての組織化学的検討 吉田 俊治 (藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科)	48
12. 膠原病合併肺高血圧症患者における一酸化窒素合成酵素の遺伝子多型 原 まさ子 (東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター)	52
13. 膠原病に伴う肺高血圧症症例における肺動脈血管内皮細胞表面上のプロスタ サイクリン合成酵素発現の検討 吉尾 卓 (自治医科大学アレルギーリウマチ科)	55
14. 肺高血圧症におけるプロスタグランジン (PG) の役割 北里 英郎 (北里大学医学部微生物)	61
15. 肺高血圧症を合併した混合性結合組織病患者の臨床免疫学的特徴 諏訪 昭 (慶應義塾大学医学部内科)	67

[III] 平成 14 年度業績目録

1. 雑誌	73
2. 単行本	80

[IV] 平成 14 年度班会議プログラム

[V] 平成 14 年度分担研究者名簿

**Annual Report of the Ministry of Health and Welfare,
Mixed Connective Tissue Disease Research Committee**

Contents

1. MULTICENTER PROSPECTIVE STUDY OF CASES WITH ANTI-U1RNP ANTIBODY ALONE Hirobumi Kondo (Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine)	9
2. INTRACELLULAR DLIVERY OF U1RNP COMPLEX STIMULATES DENDRITIC CELLS, IMPLICATING THE PRESENCE OF INTRACELLULAR RECEPTOR FOR U1RNP Yoshikata Misaki (Department of Allergy and Rheumatology, University of Tokyo School of Medicine)	12
3. DETECTION OF IgG SUBCLASS REACTIVE WITH U1RNP PARTICLES IN SERA FROM PATIENTS WITH RHEUMATIC DISEASES Tsuneyo Mimori (Department of Rheumatology and Clinical Immunology Kyoto University Graduate School of Medicine)	17
4. CLINICAL SIGNIFICANCE OF ANTI-U1 RNP ANTIBODIES RECOGNIZING THE CONFROMATION-STRUCTURE ON U1 RNA/70-KD PROTEIN COMPLEX Yoshinari Takasaki (Department of Internal Medicine and Rheumatology, Juntendo University School of Medicine)	21
5. SPONTANEOUS PRODUCTION OF AUTOANTIBODIES AGAINSTU1-RIBONUCLEOPROTEIN AND SS-A BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM PATIENTS WITH CONNECTIVE TISSUE DISEASE : EFFECTS OF MIZORIBIN ON THEIR PRODUCTIONS Shinichi Aotsuka (Division of Clinical Immunology, Clinical Research Institute, International Medical Center of Japan)	27
6. SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY LEADING TO AUTOANTIBODY PRODUCTION AND LYMPHADENOPATHY IN PATIENTS WITH MCTD Takashi Okamoto (Department of molecular and Cellular Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences)	33
7. ANALYSIS OF U1-snRNP-A GENE SNP IN PATIENTS WITH ANTI-RNP-A AUTOANTIBODY COMPARED WITH JAPANESE HEALTHY DONOR DNA BANK Mitsuo Okubo (Transfusion Medicine and Cell Therapy, Saitama Medical Center, Saitama Medical School)	37
8. POLYMORPHISMS OF THE MANNOSE BINDING LECTIN GENE IN PATIENTS POSITIVE FOR ANTI-RNP ANTIBODIES Akito Tsutsumi (Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba)	40
9. CLINICAL RESEARCH PROJECT ON A SURVEY OF THE OCCURRENCE OF PULMONARY HYPERTENSION (PH) IN PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE (MCTD) AND VERIFICATION OF THE VALIDITY OF PRELIMINARY REVISED THERAPEUTIC GUIDELINE FOR PH IN PATIENTS WITH MCTD Shunji Yoshida (Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine)	43

10. STUDY OF BMPR2 GENE AND ANTI-BMPR2 ANTIBODY IN PATIENTS WITH ANTI-U1RNP ANTIBODY Jun Okada (Department of Internal Medicine, Department of Microbiology* Kitasato University School of Medicine)	47
11. HISTOCHEMICAL STUDY ON THE EXPRESSION OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN RECEPTOR ON THE LUNG OF PULMONARY HYPERTENSION Shunji Yoshida (Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine)	51
12. Correlation of the human inducible nitric oxide synthase gene to pulmonary hypertension complicated with collagen diseases Masako Hara (Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University)	54
13. EXPRESSION OF PROSTACYCLIN SYNTHASE IN LUNGS OF PATIENTS WITH COLLAGEN-DISEASE-RELATED PULMONARY HYPERTENSION Taku Yoshio (Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Department of Medicine, Jichi Medical School)	60
14. THE ROLE OF PROSTAGLANDIN (PG) IN PULMONARY HYPERTENSION Hidero Kitasato (Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine)	66
15. CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF JAPANESE PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASES ASSOCIATED WITH PULMONARY HYPERTENSION Akira Suwa (Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine)	72

[I]

主任研究者報告

混合性結合組織病の病態、治療と関連する遺伝的因子、自己抗体の研究

主任研究者 : 近藤 啓文
所属施設 : 北里大学医学部内科

研究要旨

混合性結合組織病 (MCTD : mixed connective tissue disease) は抗 U1RNP 抗体を必須の自己抗体とする疾患であるが、その疾患特異性は必ずしも高くない。その臨床的意義と MCTD との関連をプロスペクティブに明らかにするために、平成 11 年度より班のプロジェクト研究として抗体陽性無治療例 114 症例を登録してきた。本年度は新しい研究課題による 3 年間の研究の初年度にあたるが、本研究はそのまま継続し、既登録症例の経過観察と共に新たに 30 例を登録した。臨床症状、検査所見、自己抗体、HLA の DNA タイピングを含むデータベースを作成し、抗 U1RNP 抗体単独陽性症例と他の抗体併存例を比較して経過を観察している。観察期間が不十分で両群の差異は明らかではないが、今後プロスペクティブに症例の経過を見ることにより、MCTD の疾患概念の確立と診断基準の見直しにエビデンスを与えるものと考えられる。

本抗体の産生機序とその制御の解明は MCTD の根本的な治療法の開発につながる。各個研究として異なった方向から行なわれた。U1RNA/U1-A 複合体を樹状細胞内に導入すると細胞が活性化されることが明らかになり、抗体産生機序に関連する可能性が示された (三崎)。膠原病患者の抗 U1RNP/Sm 抗体の IgG サブクラスが解析され、サブクラスの出現パターンには規則性があり、Th1 反応が主であることを示した (三森)。U1RNP70-Kd 蛋白と U1RNA の結合により生じる立体構造を認識する新しい抗 U1RNP 抗体が MCTD に見出された (高崎)。患者単核細胞における抗 U1RNP 抗体産生を検討したところ、抗体陽性患者の細胞は有意に抗体を産生した (青塚)。マンノース結合レクチン (MBL) の遺伝子多型を抗 U1RNP 抗体陽性者で検索され、MBL 遺伝子多型と血中 MBL 濃度には関連が見られたが、病態との関連は明らかではなかった (堤)。

肺高血圧症 (PH) は MCTD に合併頻度が高く、予後を決定する最も重要な臓器病変である。臨床研究として、新しい班プロジェクト研究が発足した (吉田)。プロスペクティブ研究として MCTD における PH の頻度を明らかにし、前年度班で提唱した治療ガイドライン (案) の検証を目的とした研究である。今後の成果が期待される。近年、原発性 PH 患者で、骨形成因子の II 型レセプター (BMPR-II) の遺伝子変異が高率であることが判明した。そこで MCTD を含む膠原病合併 PH についてこの点の検討が行なわれた。岡田は抗 U1RNP 抗体陽性例について、PH の有無で BMPR-II の遺伝子変異を比較したが、変異は認められなかった。一方、BMPR-II に対する抗体を測定したところ、MCTD 患者で高頻度に検出された。吉田は PPH モデルラットでは BMPR-II の発現が肺動脈血管内皮細胞で低下していることを認めた。以上の成績は膠原病合併 PH では BMPR-II の変異は見られなかったが、PH の発生との関連は示唆された。

原は膠原病合併 PH 例における一酸化窒素の合成酵素 (NOS) の遺伝子多型を解析し、PH 合併例では遺伝子多型の頻度が高いことを示した。北里は PH におけるプロスタグランジン (PG) の役割をモデル動物で明らかにすることを試みた。PGD 合成酵素 (PGDS) を発現する線維芽細胞をモノクローリン誘発 PH ラットに投与し、PGDS の発現と PH の抑制を明らかにした。

MCTD を含む膠原病に合併する PH の治療薬として持続静注プロスタサイクリン製剤 (フローラン) の治験が終了し、データが解析されている。さらに、膠原病合併 PH を含む PH でエンドセリンレセプター拮抗薬の治験が行なわれた。いずれも欧米で PH に対して有効であるとの成績があり、効果が期待される。

分担研究者

三崎 義堅
東京大学医学部附属病院内科
講師
三森 経世
京都大学大学院医学研究科臨床免疫学
教授
高崎 芳成
順天堂大学医学部膠原病内科
助教授
岡田 純
北里大学医学部内科
助教授
原 まさ子
東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター
教授
吉田 俊治
藤田保健衛生大学医学部感染症リウマチ内科
教授
大久保 光夫
埼玉医科大学総合医療センター輸血部・細胞治療
講師
青塚 新一
国立国際医療センター研究所
部長
吉尾 卓
自治医科大学アレルギーリウマチ科
講師

堤 明人
筑波大学医学専門学群膠原病リウマチアレルギー内科
講師
諏訪 昭
慶応義塾大学内科学教室リウマチ研究室
助手
岡本 尚
名古屋市立大学医学部分子医学研究所
教授
北里 英郎
北里大学医学部微生物学教室
講師

研究協力者

塩沢 和子
(財) 甲南病院加古川病院内科
内科部長
山田 秀祐
聖マリアンナ医科大学リウマチ膠原病アレルギー内科
助教授
多田 芳史
佐賀医科大学内科
助手
岡野 哲郎
北里大学医療衛生学部臨床免疫学
講師

A. 研究目的

混合性結合組織病 (MCTD) は平成13年度までの調査研究により、特徴的な臨床所見と抗U1RNP抗体とに密接な関連があること、主な死因としての肺高血圧症 (PH) の病態の解明が進展し、治療法の確立が重要であることが明らかになった。本研究班はMCTDの診断基準の根拠を持った改訂、関連する自己免疫機序と遺伝子の解析、PHの病態の解明と治療ガイドラインの検証を主目的に研究を行う。

1) 抗U1RNP抗体陽性患者のプロスペクティブ研究: 既に登録した本抗体陽性無治療例の経過観察と今年度新たに患者を登録し臨床経過を明らかにする。MCTD

の疾患概念の明確化を試み、3年後に得られた知見に基づきMCTD診断基準を改訂する。

2) 抗U1RNP抗体の産生機序の解明: 本症は自己抗体を発現する疾患であり、自然免疫系を介する自己免疫誘導、抗体サブクラスの解析、抗原をコードする遺伝子解析など新しい免疫学的手法を用いて、その産生機序の解明を試みる。これらの研究によりU1RNPに対する免疫反応を制御する新しい治療法への応用が期待される。

3) MCTD関連遺伝子解析: 患者からインフォームド・コンセントを得て採取されたDNAを用いて、MCTDの病態、とくにPHと関連する遺伝子多型を検索し、そ

の病因的意義を検討する。

4) MCTDにおけるPHの病態と治療：新しく班のプロスペクティブ研究プロジェクトを立ち上げ、PHの頻度、早期診断、治療ガイドライン（案）の検証を行い、死亡率の高いPHの治療法を確立して患者の予後の改善に貢献する。

B. 研究方法

1) 抗U1RNP抗体陽性無治療例のデータベース：班プロジェクト研究

分担研究者、及び研究協力者3名の合計14施設において、新たに見出した抗U1RNP抗体陽性無治療患者を登録し、その臨床所見、HLA抗原などをデータベース化した。単独陽性例と他の抗核抗体併存例に分けて臨床経過を追跡する。尚、HLA検索で残ったDNAは、新たに同意を得た上で保管し遺伝子研究に供する。

2) 抗U1RNP抗体の産生機序の研究

- (1) 樹状細胞を用いた研究。
- (2) ELISAによる抗体のIgGサブクラスの分布。
- (3) 立体構造を認識する新しい抗U1RNP抗体の検索。
- (4) 単核細胞における抗U1RNP抗体産生。
- (5) 細胞内シグナル伝達系の検索

3) MCTDの抗体、病態と関連する遺伝子変異の解析

- (1) RNP-A蛋白をコードする遺伝子解析
- (2) マンノース結合レクチン (MBL) の遺伝子変異
- (3) 骨形成因子のII型レセプター (BMPR-II) の遺伝子変異
- (4) 一酸化窒素の合成酵素 (NOS) の遺伝子多型

4) MCTDの肺高血圧症の臨床病態と治療研究：

- (1) 班プロスペクティブ研究としてMCTDにおけるPHの頻度と治療調査
- (2) 抗BMPR-II抗体の検索。
- (3) モノクローリン誘発ラットにおけるBMPR-IIの発現。
- (4) PGD合成酵素 (PGDS) を発現する線維芽細胞をモノクローリン誘発ラットに投与しPGの役割を解析。
- (5) PH患者肺動脈内皮細胞のPGI₂合成酵素の発現
- (6) PH症例の頻度と臨床像
- (7) 持続静注プロスタサイクリン製剤の開発、免疫療法の有効性の評価。

倫理面への配慮：患者からインフォームド・コンセントを得て採血などを行う。HLA抗原検査のため採取したDNAを遺伝子解析のために使用するに当たり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準じ、各施設の倫理委員会の承認をえて、同意を再取得して使用する。動物実験に関しては、動物の保護及び管理に関する法律などに留意し、実験動物に苦痛・恐怖を与えないように配慮する。

C. 研究結果

1) 抗U1RNP抗体陽性無治療例の経過：MCTDは抗U1RNP抗体を必須の自己抗体とする疾患であるが、その臨床的意義とMCTDとの関連をプロスペクティブに明らかにするために、平成11年度より班のプロジェクト研究として抗体陽性無治療例114症例を登録してきた。本年度は登録症例の経過観察と共に新たに30例を登録した。臨床症状、検査所見、自己抗体、HLAのDNAタイピングを含むデータベースを作成した。抗U1RNP抗体単独陽性症例と他の抗体併存例に分けて経過を比較して観察した。登録時では単独群と比べ併存群に関節炎、リンパ節腫脹、タンパク尿などSLEコンポーネントの頻度が有意に高く、MCTD診断基準合致例がむしろ多かった。今後プロスペクティブに症例の経過を見ることにより、MCTDの疾患概念の確立と診断基準の見直しにエヴィデンスが与えられると考える。

2) 抗U1RNP抗体の産生機序：本抗体の産生機序とその制御の解明はMCTDの根本的な治療法の開発につながる。研究班では各個研究で異なった方向から行なわれた。U1RNA/U1-A複合体が樹状細胞内に導入するとU1RNA単独、U1-Aとは異なり細胞が活性化されることが明らかになり、抗体産生機序に関連する可能性が示された（三崎）。膠原病患者の抗U1RNP/Sm抗体のIgGサブクラスが解析され、サブクラスの出現パターンには規則性があり、U1RNP特異構成蛋白に対する自己抗体のうち、IgG1では抗C抗体、IgG3では抗70K抗体が抗Dにおける同じサブクラスの産生と相関した。以上より、三森は抗U1RNP及び抗Sm抗体のIgGサブクラスはTh1反応が主であることを示した。高崎はU1RNP70-Kd蛋白とU1RNAの結合により生じる立体構造を認識する抗U1RNP抗体をMCTD186例中13例に見出した。この抗体陽性例はSLE様病態が著明であることが明らかになった。患者

単核細胞における抗U1RNP抗体産生を検討したところ、抗体陽性患者からの細胞は有意に抗体を産生した。その培養系に免疫抑制薬ミゾリピンを添加すると抗体産生が抑制され、臨床効果を予測できる可能性が示唆された(青塚)。岡本は細胞内シグナル伝達系の異常とリンパ節腫脹、自己抗体産生との間に密接な関連を示した。

3) MCTDと関連する遺伝子変異の解析：堤は自己免疫疾患との関連が示唆されているマンノース結合レクチン(MBL)の遺伝子多型を抗U1RNP抗体陽性者でコドン54について検索した。MBL遺伝子多型と血中MBL濃度には関連が見られたが、病態との関連は明らかではなかった。このような遺伝子多型の検討では日本人健常人における頻度が必要で、RNP-A遺伝子のSNPを解析している大久保からその検討があった。

PHに関連する研究としては、近年、原発性PH患者で、骨形成因子のII型レセプター(BMPR-II)の遺伝子変異が高率であることが判明し、MCTDを含む膠原病合併PHについて解析が行われた。岡田は抗U1RNP抗体陽性例について、PH合併例と非合併例でBMPR-IIの遺伝子変異を比較して解析した。PPHで報告がある変異部位には検索した限り変異が見られなかった。一方、BMPR-IIに対する抗体を測定したところ、MCTD患者で高頻度に検出され、その意義が注目される。吉田はPPHモデル動物であるモノクローリン誘発ラットではBMPR-IIの発現が肺動脈血管内皮細胞で低下していることを認め、PH発症に対する関与を示唆した。

原は膠原病合併PH例における血管拡張因子である一酸化窒素の合成酵素(NOS)の遺伝子多型を解析した。PH合併例では遺伝子多型の頻度が高いことを示し、NO濃度の低下にかかわる可能性を示唆した。

4) MCTDの肺高血圧症の臨床病態と治療研究:MCTDで頻度が高く予後を決定する病態であるPHのプロジェクト研究が新たに発足した(吉田)。班内プロスペクティブ研究としてMCTDにおけるPHの頻度を診断の手引きを用いて明らかにし、早期診断や前年度班で提唱した治療ガイドライン(案)の検証を目的とした研究である。成果が期待される。

吉尾はMCTDを含む膠原病合併PHの剖検例で肺動脈血管内皮細胞上のPGI₂合成酵素の発現をPH非合併例と比較したが、有意な差は見られなかった。北里はPHにおけるプロスタグランジン(PG)の役割をモデ

ル動物で明らかにし、cell therapyを試みた。すなわち、PGD合成酵素(PGDS)を発現する線維芽細胞をモノクローリン誘発PHラットに投与し、PGDSの発現とPHの抑制を明らかにした。その機序としてエンドセリン受容体Aの抑制の関与を示唆した。

PH合併MCTDの臨床像の解析では、MCTDのPH合併率は18%で、その臨床像の特徴は皮膚硬化範囲が広いなど強皮症病変と蛋白尿、低補体血症などSLEの所見を併せ持つ点であった(諏訪)。

MCTDを含む膠原病に合併するPHの治療に持続静注プロスタサイクリン製剤(フローラン)の治験が行われた。班としてこれに協力し、データを集積する段階になった。さらにエンドセリンレセプター拮抗薬の治験も行われている。

D. 考察

MCTDはわが国では頻度が高く、特定疾患として確立した疾患単位である。しかし、疾患の定義には議論があるのも事実である。本研究班の第一の研究課題である抗U1RNP抗体陽性無治療例のプロスペクティブ研究は単独陽性群と他の抗体併存群の差異を明らかにし、MCTDは単独陽性疾患とすべきか現行の診断基準のように他の抗核抗体(抗DNA抗体や抗Sm抗体)の併存を含めるかの議論に決着をつけることが期待できる。両群に明らかな差異が認められれば、そのエビデンスに基づいてMCTDの疾患概念が確立すると考えられ、現行の診断基準の改訂にもつながる。本年度は新たな症例登録の追加が行われ、データベースとしても充実したものになった。

抗U1RNP抗体の産生機序に関する研究では新しい観点からのアプローチがみられたが、解明するところまでには至っていない。しかし、本症を含む自己免疫疾患の根本的治療を目標にするならば、本研究での成果が必要である。産生機序の解明がその制御につながるからである。

MCTDを含む自己免疫疾患の病因、病態の解明には遺伝子変異、遺伝子多型からの研究が重要である。しかし、変異部位が認められても、その病態形成における意義がなければ意味がない。MCTDに関連する遺伝子変異についての本年度の研究でも、変異の存在は示唆されたが、病態形成に未だ決定的なものはない。PPHで変異があるとされているBMPR-IIについても膠原病PHでは変異が認められなかった。症例数が少

ない疾患なので班としてDNAを保管し、分担研究者の研究に提供できるように環境の整備を行った。主任研究者の属する北里大学医学部では倫理委員会で承認が得られたが、他の研究者でも同様の研究ができるように環境整備がなされる必要がある。健常者コントロールについても同様で、今年共同で利用できるための一歩がはかられた。

MCTDの最も重要な臓器病変であるPHについての病態の研究からPGI₂、NO、エンドセリン1が重要であることを班としても明らかにしてきた。この点に関しては治療薬としてPGI₂製剤エボプロステノール、エンドセリンレセプター拮抗薬ボセンタンが開発され、その有効性が示されている。わが国におけるこれらの治療薬開発に協力を行っている。

MCTD合併PH治療ガイドライン(案)を平成13年度に発表したが、この検証を行うための班プロジェクト研究を新たに立ち上げた。プロスペクティブに症例を追跡することで、PHの早期診断と治療結果についてのエビデンスが期待される。

E. 結論

- 1) 抗U1RNP抗体陽性患者のデータベースの充実とプロスペクティブ研究に進展をみた。経過を追跡することによりMCTDの疾患概念の確立と診断基準の改訂に結実させる。
- 2) 抗U1RNP抗体の多様性をIgGサブクラスや立体構造を認識する新しい抗体の研究から明らかになった。
- 3) 抗U1RNP抗体あるいはMCTDの重要な臓器病変であるPHに関連する遺伝子変異の解析が進展した。
- 4) 膠原病合併PHの病態と治療に関してモデル動物、治療研究で進展がみられた。

F. 健康危機管理情報

MCTDに関連する情報はなかった。

G. 知的所有権の取得状況

なし

[Ⅱ]

分担研究者報告

1. 抗U1RNP抗体陽性症例の臨床経過に関するプロスペクティブ多施設共同研究-2

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

研究要旨

【目的】抗U1RNP抗体単独陽性例について、1999年よりその自然歴を多施設でプロスペクティブ研究を行ってきたが、更に期間を延長し症例を増やすことで、抗U1RNP抗体陽性例の臨床像とMCTDとの関連を明らかにする。

【方法】MCTD班の構成施設で1999年1月より2001年3月間に初診した患者のうち抗U1RNP抗体陽性症例を117例の追跡調査を行うと同時に、新たに追加症例も加え更に症例数を増やす。登録された症例の臨床症状、検査成績、予後を追跡調査する。抗U1RNP抗体単独陽性を対象とし、抗U1RNP抗体陽性でかつ抗DNA抗体または抗Sm抗体陽性例を対照として検討する。

【結果・結語】2001年3月末日まで、117例が登録されたが、その内プロトコールが回収された解析可能症例は103例であった。疾患別内訳は、MCTD41例、SLE 25、SSc 7、UCTD15、Σφορρεν症候群 7、RA 7、Overlap症候群1例であった。初診時の年齢は 40.7 ± 15.2 であった。初発症状レイノー現象が45例と最も多かった。抗U1RNP抗体単独陽性群は、66例で、対象となる抗DNA抗体または抗Sm抗体陽性例は37例であった。以上の結果より、更に症例数を増やし、より長期間の経過観察により、抗U1RNP抗体単独陽性例の病像を明らかにすることが重要と考えられた。

A. 研究目的

MCTDの疾患概念をより明確にするには、MCTD中心的な自己抗体である抗U1RNP抗体陽性例の自然歴を対照試験用いて行うことが重要である。しかし、いままで、Retrospectiveの検討しかなく、MCTDの疾患概念は欧米では広く認知されているとは言い難い。本研究班において、U1RNP抗体陽性例の自然歴をプロジェクト研究として実施してきた（MCTDにともなう臓器病変の出現の過程を明らかにすることを目的に、多施設共同研究により、抗U1RNP抗体単独陽性例の臨床症状、検査成績、予後検討、対照として、疾患特異性抗核抗体の共存を認める症例を用いる）。本研究班が3年間の継続が決定したことを受けて、本projectも3年間延長し、症例の自然歴の追跡調査をより症例数を増加させ、統計的に十分な検証できるようにする。ま

た、この結果をMCTDの診断基準の検証にも利用する予定である。この研究を通して本抗体単独陽性がMCTDの疾患形成に関与するかを明らかにする。

B. 研究方法

MCTD班の前3年間のプロスペクティブを更に継続するとともに、さらに症例数を増やす。新たに登録期間を2002年1月から12月までの間に各施設を受診した患者の追加登録を行う。対象とする患者の条件は前回と同じとする。すなわち、対象施設を初診した患者のうち抗U1RNP抗体が陽性症例を全例登録し、除外条件として、初診前1年以上の間ステロイド薬および免疫抑制薬服用歴のある患者とした。登録：上記条件を満たした患者について、調査票に従って、症状、検査、治療歴を記入し登録する。同時に登録時に採血し、

抗U1RNP抗体の性状を免疫沈降法で確認し、HLA DR/DQをDNAタイピングにて確認する。登録された症例の臨床症状、検査成績、予後を調査票に基づき追跡調査を1年ごとに調査する。HLA DR/DQの検索にあたっては、各施設の倫理委員会での承認を得て、患者からの同意を文書にて取得する。

C. 研究結果

2001年3月末日まで、117例が登録されたが、その内プロトコルが回収された解析可能症例は103例であった。疾患別内訳は、MCTD41例、SLE 25、SSc7、UCTD14、Sjogren症候群7、RA7、Overlap症候群1例であった。初診時の年齢は40.7 ± 15.2であった。初発症状レイノー現象が45例と最も多かった。抗U1RNP抗体単独陽性群は、66例で、対象となる抗DNA抗体または抗Sm抗体陽性例は37例であった(表1)。2001年の新たな登録症例は、現在まで約30例が確認されており、現在、症例を回収中である。また、追跡調査の結果も本年度で3年になるため、その結果を解析する予定である。

D. 考察

MCTD班3年間の多施設プロスペクティブ研究調査で⁵⁾、抗U1RNP抗体陽性例数は目標の100症例を達成した。しかし、本研究の目的の一つである自然歴の研究には、平均観察期間がまだ、2年未満と短いため、3年間の研究の継続により長期間の追跡調査が可能となった。また、統計的な解析が可能にするため、新たな症例の追加を決め、より確実の解析が行えることが期待される。

中間の臨床症状の解析では、抗U1RNP抗体単独陽性例は、MCTDの疾患概念に一致した臨床症状を有することを確認できた。本研究では、対照として、抗U1RNP抗体非単独例すなわち抗U1RNP抗体以外に抗DNA抗体、抗Sm抗体、抗topoisomerase I抗体等を有する症例としたが、単独例に比し症例数が半分と少ないことが明らかとなった。新たな症例30例以上が期待されるため、症例数は150例以上となることが想定される、臨床像HLAの統計解析も可能と考えられ、今後の成果が期待される。

今後、登録された症例の追跡調査を行い、抗U1RNP抗体単独陽性例のプロスペクティブ研究を完成させる。

文献

1. Smolen JS, and Steiner G. Mixed connective tissue disease: to be or not to be? *Arthritis Rheum*, 41:768-77, 1998.
2. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, et al. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 43:76-84, 1999.
3. Frandsen PB, Kriegbaum NJ, Ullman S, et al. Follow-up of 151 patients with high-titer U1RNP antibodies. *Clin Rheumatol*, 15:254-60, 1996.
4. Hoffman RW, Sharp GC, Deutscher SL. Analysis of anti-U1RNP antibodies in patients with connective tissue disease. Association with HLA and clinical manifestations of disease. *Arthritis Rheum*, 38:1837-44, 1995.
5. 近藤 啓文, 岡田 純: 抗U1RNP抗体陽性症例の臨床経過に関するプロスペクティブ多施設共同研究. 平成11年度厚生省MCTD班研究報告書, 5-8, 2000.

疾患名	症例数	頻度(%)	初診時年齢
MCTD	41	42	48.5±12.5
SLE	25	25	30.0±11.3
UCTD	15	15	45.2±16.2
SSc	7	7	57.9±12.6
SJS	7	7	55.7±12.8
RA	7	7	34.6±13.1
Overlap*	1	1	32
合計	103	103	40.7±15.2

表1. 対象症例の背景と疾患

MULTICENTER PROSPECTIVE STUDY OF CASES WITH ANTI-U1RNP ANTIBODY ALONE

Okada J and Kondo

Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine
1-15-1, Kitasato, Sagami-hara 228-8555 JAPAN

Disease associated with anti-U1RNP antibody was not well defined. To clarify the clinical entity and natural course of MCTD and, we conducted a multi-center prospective clinical study in patients with anti-U1RNP antibody.

To obtain the data for the statistic analysis, the entry period was extended until the end of 2002. In addition, a questionnaire is used to identify any illness developed during follow-up period. All patients with anti-U1RNP antibody were entered to this study. We intended to evaluate anti-nuclear antibody profiles using immunoprecipitation methods at time of start. HLA-DR and HLA-DQ loci were measured by PCR methods.

One hundred seventeen cases were entered before end of 2001. By the end of 2002, more than 30 new cases will be expected for entry. One hundred three clinical records were received. Diagnosis of those cases was MCTD (41 cases), SLE (25), SSc (7), Sjögren syndrome (7), UCTD (14), RA 7 and others (1). Age at first visit was 40.7±15.9 y/o. Group of anti-U1RNP antibody alone was 38 cases and control group of patients who were positive for anti-dsDNA antibody or antiSm antibody, was 21 cases.

To clarify the clinical features of patients with anti-U1RNP antibody, we need to complete this prospective study and analyze the data.

2. U1RNP 蛋白核酸複合体による樹状細胞内核酸受容体刺激の可能性

分担研究者：三崎 義堅

研究協力者：山本 一彦

所属施設：東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科

研究要旨

目的；免疫複合体は、Fcレセプターを介してMCTDなどの膠原病の病態形成に関与しているが、その複合体中の自己抗原がその反応を修飾する可能性がある。そこで、U1RNPが細胞刺激活性を持つ可能性について検討した。方法と結果；U1RNA/U1-A複合体をラテックスビーズを用いて、樹状細胞内に導入すると、IL6産生が増強した。U1RNA単独、U1-A/ビーズでは増強しない。考察；Toll-Like receptor (TLR) 3は長鎖二本鎖RNAを特異的に認識するとされ、本来一本鎖であるU1RNAに反応する可能性は少ないと考えられるが、核酸蛋白複合体形成により、構造変化あるいは安定化すると、反応性を獲得し、病態形成に関与する可能性がある。細胞内に取り込まれたヌクレオソームDNA複合体を認識するとされるTLR9との発現分布の違いなどが、SLEとMCTDとの病態との違いに繋がる可能性が示唆される。

A. 研究目的

混合性結合組織病 (MCTD) と診断し得ない膠原病症例でも、抗U1RNP抗体陽性例においては、関節炎、レイノー症候群、手指腫脹、筋炎などMCTDに類似した症状が有意に高く、抗U1RNP抗体症候群ともいべき病態が存在するのではないかと推察されている(1, 2)。MCTDと類縁ではあるが、異なる疾患カテゴリーである全身性エリテマトーデスは、抗DNA抗体の存在を特徴としている。従って、SLEで生じる免疫複合体はDNAヌクレオソーム複合体を主体として含むことになる。これに対してMCTDのそれはRNA蛋白複合体ということになる。

近年外来微生物病原体特有の分子パターンを認識するToll-Like receptor (TLR) が注目を集めている。その中で核酸を認識するTLR3は2本鎖RNAを、TLR9はCpGDNAを認識することが知られている(3)。最近、リウマトイド因子活性を持つ抗原レセプターを発現するB細胞が、おそらく死細胞由来ヌクレオソームを抗DNA抗体存在下にとりこんで増殖する事が報告された(4)。これは、TLR9依存性と考えられている。

このことから、自己抗原(上記の場合DNA/ヌクレオソーム)が、細胞に摂取される形式によっては、細胞を刺激する活性があり、この活性が病態形成に関与する可能性がでてきた。自己抗原と自己抗体からなる免疫複合体は、Fcレセプターを介してMCTDなどの膠原病病態形成に深く関与しているが、細胞に摂取された免疫複合体中の自己抗原が、上述のように細胞を刺激する可能性がある。

そこで、U1RNPにも、細胞への摂取の経路によっては、同様に細胞刺激活性を持ち、そしてその刺激する機構と細胞集団の違いが、DNA関連抗原への反応を特徴とするSLEと、RNAに対する反応を特徴とするMCTDという、異なる病態像を造りだしている可能性について検討することとした。

B. 研究方法

大腸菌にて発現させ、精製したU1Aリコンビナント蛋白をカラムにてendotoxinを除去した。このリコンビナントU1Aをラテックスビーズに吸着させ、さらにin vitroで転写したU1RNAと結合させ、U1RNA/

U1-A 複合体を作成した。

樹状細胞は、マウス脾臓より、MACSを用いてCD11c positive selectionにて精製した。樹状細胞刺激24時間後の上清IL6はELISAにて測定した。

マウス飼育とその実験方法については、東京大学医学部動物実験施設が定める指針に基づいて行った。

C. 研究結果

U1RNA、U1A 蛋白、ビーズに結合していないU1RNA/U1-A複合体のそれぞれ単独では脾臓由来樹状細胞からのIL6産生は増強されなかった。ところが、U1Aをラテックスビーズ結合型とし、さらにU1RNAと会合させた、ビーズ結合U1RNA/U1-A複合体は、IL6産生を増強した(図)。U1RNAを結合しないU1A蛋白結合ビーズにはこの刺激活性はみられないので、

この活性はU1RNAとの複合体形成によって生じると考えられる。また、細胞外からのU1RNA/U1-A複合体添加ではこの活性増強は観察されないので、樹状細胞内への効率的な取り込みで初めて、IL6産生を促進していると考えられた。

細胞へのRNA応答の主体はTLR3だと考えられている。しかし、TLR3は長鎖二本鎖RNAを特異的に認識するとされ、本来一本鎖であるU1RNAに反応する可能性は少ないと考えられるが、核酸蛋白複合体を形成し、構造変化あるいは安定化すると、反応性を獲得し、病態形成に関与する可能性が考えられる。或いは、細胞内でのみ、有効な活性だとすると例えば、この応答がPKRを介している可能性も今後検討する必要がある。

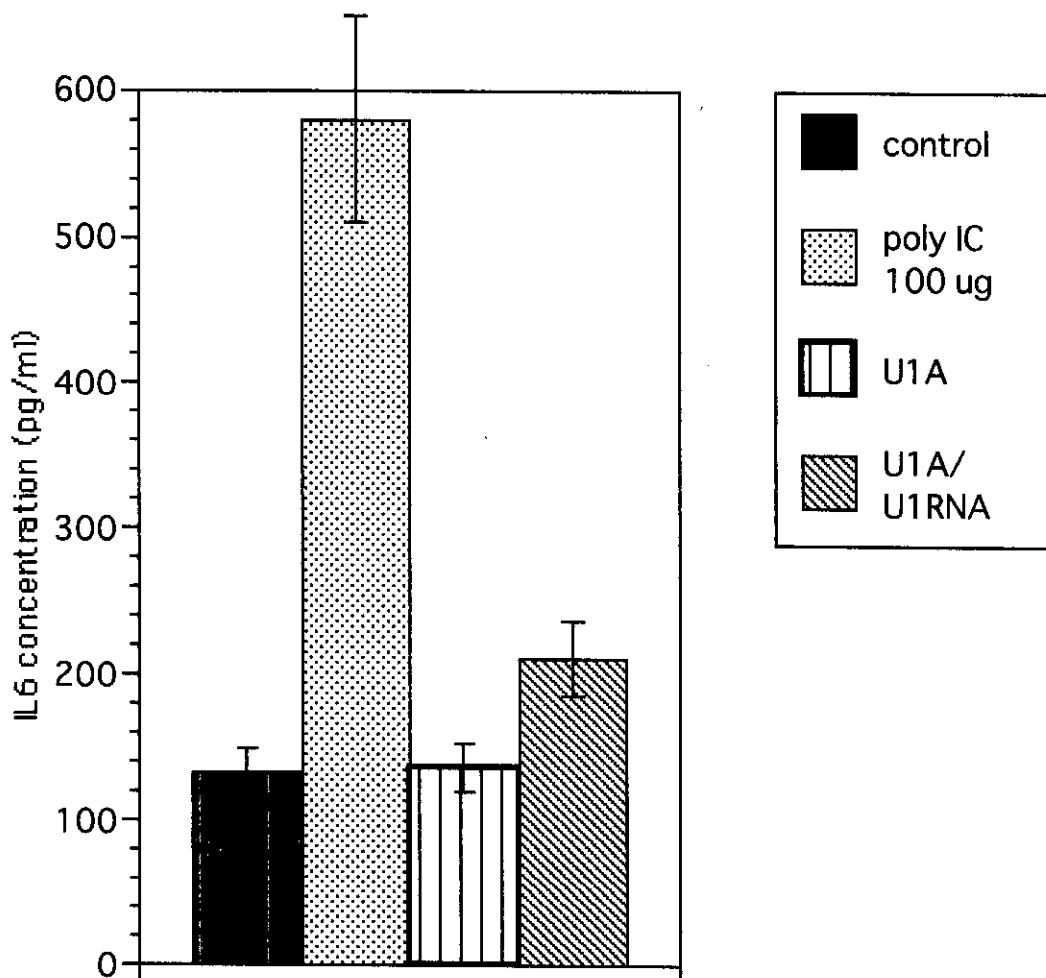


図1. U1A/U1RNA complex enhanced the IL-6 production by dendritic cells

文献

1. Hoffman RW, Sharp GC. Is anti-U1-RNP autoantibody positive connective tissue disease genetically distinct? *J Rheumatol* 22:586-9, 1995.
2. 岡田純、近藤啓文. 抗U1RNP抗体陽性症例の臨床経過に関するプロスペクティブ施設共同研究3年間のまとめ. 混合性結合組織病に関する研究班. 平成13年度研究報告書 p7-11, 平成14年3月
3. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413:732-8, 2001.
4. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*. 416:603-7, 2002.

INTRACELLULAR DLIVERY OF U1RNP COMPLEX STIMULATES DENDRITIC CELLS, IMPLICATING THE PRESENCE OF INTRACELLULAR RECEPTOR FOR U1RNP.

Yoshikata Misaki, Kazuhiko Yamamoto.

Department of Allergy and Rheumatology, University of Tokyo School of Medicine.

Although it has been known that immune complexes contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases, it remained elusive how the quality and sorts of antigens are related to the variety of immune complexes mediated inflammation. In order to investigate the possibility that the U1RNA-RNP complexes, the target of anti-U1RNP autoantibodies, can act as a stimulating agent, splenic dendritic cells were stimulated with U1RNA/U1A complex, which is formed with in vitro transcribed U1RNA and latex-beads bound U1A recombinant protein. The complex induced a significantly enhanced IL-6 production in dendritic cells whereas neither latex-beads bound U1A nor unbound U1RNA/U1A did not. Since it has been demonstrated that DNA/nucleosome complex ingested by B cell receptor promotes B cell growth via Toll-like receptor 9, intracellular delivery of U1RNP complex might stimulate dendritic cells via TLR3 pathway. The differential stimulating activity between DNA/nucleosome and U1RNP might be involved in MCTD pathogenesis different from that of SLE.

3. 膠原病患者における抗U1RNP/Sm抗体のIgGサブクラスに関する研究

分担研究者：三森 経世

研究協力者：藤井 隆夫、井村 嘉孝

所属施設：京都大学大学院 医学研究科 臨床免疫学

研究要旨

ELISAにより、抗U1RNP抗体または抗Sm抗体陽性膠原病患者血清中のU1RNP特異構成蛋白(70K、A、C)とSm抗原(B'、D)に対する自己抗体IgGサブクラスを調べた。主要サブクラスは抗70K抗体、抗B'抗体でIgG2、抗A抗体、抗D抗体でIgG2およびIgG3であった。また抗C抗体はIgG1が高頻度であった。抗D抗体はIgG3、IgG2、IgG1、IgG4の順に高頻度で、サブクラスの出現パターンに規則性があった。またU1RNP特異構成蛋白に対する自己抗体のうち、IgG1では抗C抗体、IgG3では抗70K抗体が、抗D抗体における同じサブクラスの産生と相関した。以上より、抗U1RNPおよび抗Sm抗体のIgGサブクラスはTh1反応が主で、一部のIgGサブクラスでは両抗体の産生が相関することが示唆された。今後IgGサブクラスの出現パターンと臨床特徴あるいは疾患活動性の関連を追求する必要がある。

A. 研究目的

抗U1RNP抗体および抗Sm抗体は混合性結合組織病(以下MCTD)や全身性エリテマトーデス(以下SLE)患者で高頻度に見いだされる代表的な抗核抗体である。特にMCTD患者では血清中抗U1RNP抗体高力価陽性はその特徴であり、本研究班においてもその産生機序の解明に関しさまざまなアプローチが試され、MCTD患者診療に有用な情報が提供されてきた。一方抗Sm抗体はSLEの疾患標識抗体で、抗U1RNP抗体に比べて陽性頻度は低いもののSLEにきわめて特異性が高い。興味深いことに抗Sm抗体陽性患者ではほとんどすべての場合抗U1RNP抗体が陽性で、両抗体の産生はお互いに関連する可能性が示唆される。

抗U1RNP抗体および抗Sm抗体の検出には以前より二重免疫拡散法、免疫プロット法、免疫沈降法、ELISAなどが利用される。RNA免疫沈降法では、抗U1RNP抗体はU1RNPのみを沈降し、抗Sm抗体はU1、U2、U4/6、U5RNPを沈降する¹⁾。免疫プロット法による反応性から、抗Sm抗体はU1、U2、U4/6、U5RNPに共通のB'/BおよびD蛋白を認識するのに対し、抗U1RNP抗体はU1RNPに固有の70K、A、C蛋白を認識することも知られている。しかし抗Sm抗体陽性血清が同時に抗U1RNP抗体も有する、す

なわち抗B'/B・D抗体と抗70K・A・C抗体と共存するメカニズムについては十分に解明されていない。

近年、他の疾患標識抗核抗体あるいは病態に直接関与する自己抗体においてELISAにより測定された一部のIgGサブクラスと疾患活動性または病態との関連が報告されている²⁾⁻⁷⁾。しかし、現在まで抗U1RNP/Sm抗体の各構成蛋白に対する自己抗体のIgGサブクラスに関する報告はなく、精製RNP蛋白を用いたELISAあるいは免疫プロット法などによる定性的な報告があるのみである⁸⁾⁻¹¹⁾。そこで今回われわれは、抗U1RNP抗体あるいは抗Sm抗体陽性膠原病患者血清中を用い、U1RNPを構成する各蛋白成分(70K、A、B'、C、D)を固相化したELISAによってそれぞれの蛋白を認識するIgGサブクラスの陽性パターンおよびその反応性の相関を調べることを目的とした。

B. 研究方法

当院通院中のリウマチ・膠原病患者血清において、同意を得た上で採血され、RNA免疫沈降法により抗U1RNP抗体陽性あるいは抗Sm抗体陽性と判断された80血清を対象とした。それら血清中の抗U1RNP抗体と抗Sm抗体をMBL(医学微生物学研究所)のELISA(Mesacup^R-2テストRNP、Mesacup^RSmテスト)に

より測定した。ELISAにおいていずれかが陽性であった場合、70K、A、B'、Cの全長精製ペプチド抗原を固相化したELISAプレート(MBLにて作製)および精製Sm抗原を固相化したELISAプレート(Mesacup^R Smテスト)を用い、ビオチン化抗ヒトIgGサブクラス抗体を二次抗体とし、avidin-alkaline phosphatase (Sigma社)と反応させた後、pNPP (p-nitrophenyl phosphate, Sigma社)を基質としてELISAリーダー(BioRad社)でOD_{405nm}値を測定した。なお精製Sm抗原はB'/B抗原とD抗原を含むが、抗B'/B抗体の力価は抗D抗体の力価に比べるときわめて低いため、精製Sm抗原を用いた場合には抗D抗体を測定しうるものと考えた。また抗核抗体陰性健康人から採取した11血清を同時に測定し、その平均値+2SD以上を陽性と判断した。それぞれの蛋白において、反応するIgGの主要サブクラス(major subclass)を明らかにした。またそれぞれの蛋白に反応するIgGサブクラスOD₄₀₅値間の相関を調べた。さらに抗U1RNP抗体と抗Sm抗体との関連を明らかにする目的で抗70K、抗A、抗B'、抗C抗体と抗D抗体のIgGサブクラスOD_{405nm}値の相関を検討した。

C. 研究結果

RNA免疫沈降法により抗U1RNP抗体または抗Sm抗体陽性と診断された血清80例をELISAにより再スクリーニングしたところ、抗U1RNP抗体単独陽性が46例(58%)、抗Sm抗体単独陽性が2例(3%)、抗U1RNP/Sm抗体陽性が14例(18%)であった。

次にU1RNPに特異的な構成蛋白に対する抗体(IgG)のサブクラスを検討した。抗70K抗体はIgG2が主要サブクラス(71%)であった。OD_{405nm}値では、IgG1とIgG2との間に相関が見られた(相関係数 $r = 0.63$)が、他のサブクラス間に有意な相関はなかった。抗A抗体については、IgG2とIgG3が主要サブクラス(86%)と考えられた。しかしこれらの主要サブクラス間に有意な相関はなく($r = 0.32$)、IgG2とIgG4($r = 0.70$)、IgG1とIgG2($r = 0.55$)、IgG1とIgG4($r = 0.53$)、IgG1とIgG3($r = 0.53$)に有意な相関があった。抗C抗体は抗70Kあるいは抗A抗体に比べると陽性頻度は低く、IgG1が主要サブクラス(13%)と考えられたが、各サブクラス間に相関は見いだされなかった。なおこれらの抗体において、IgGサブクラスの出現パターンに明らかな規則性はなかった。

次にSm抗原に対する抗体であるが、抗B'抗体では

IgG2(31%)が主要サブクラスであった。しかしその出現パターンに一定の傾向はなく、各サブクラス間の相関もなかった。一方抗D抗体に関してはIgG3(26%)とIgG2(24%)が主要サブクラスであった。特に抗D抗体陽性血清の全例でIgG3型抗D抗体が陽性であった。またIgG3(26%)>IgG2(24%)>IgG1(19%)>IgG4(8.1%)の順に高頻度でこの順に抗体産生が誘導されている可能性が示唆された(図1A)。また図には示していないが、陽性サブクラスが多いほど抗Sm抗体価は高い傾向にあった。なお頻度の高いIgG1、IgG2、IgG3は互いにOD_{405nm}値の相関を認めたが、IgG4は他のサブクラスと相関がなかった(図1B)。

次に各U1RNP特異構成蛋白に対する抗体と抗D抗体との関連を調べた(図2)。抗70K抗体ではIgG3、抗A抗体ではIgG2、抗C抗体ではIgG1において同じサブクラスの抗D抗体の検出頻度が高かった。各IgGサブクラスにおいて、各U1RNP特異構成蛋白に対する抗体と抗D抗体のOD_{405nm}値の相関を調べると、IgG1では抗C抗体と抗D抗体に($r = 0.42$)、IgG3では抗70K抗体と抗D抗体に($r = 0.44$)相関が認められた。またIgG2において抗B'抗体と抗D抗体のOD_{405nm}値に比較的強い相関が認められた($r = 0.56$)。

D. 考察

今回の抗体測定にはELISAを使用した。抗Sm抗体陽性血清ではほとんどの場合(88%)、抗U1RNP抗体も陽性であった。したがって抗B'/B・D抗体が陽性の場合、抗[70K・A・C・U1RNA複合体]抗体も陽性である。そこで今回われわれはELISAを用いてU1RNPに特異的な構成蛋白(70K、A、C)およびSm抗原(B'、D)に反応するIgGサブクラスを測定した。

現在まで抗U1RNP抗体の主要サブクラスは、IgG1であり(免疫プロット法、精製RNP抗原を用いたELISA)、IgG2あるいはIgG4はまれと報告されている⁸⁾⁻¹⁰⁾。また抗Sm抗体も主要サブクラスはIgG1とIgG2とする報告(免疫プロット法)⁸⁾とIgG1(精製Sm抗原を用いたELISA)⁹⁾¹¹⁾がある。われわれがMBLのELISAを用いて測定した結果では抗U1RNP抗体はIgG2あるいはIgG3が多く、IgG4はまれであった。また抗Sm抗体はIgG3が多い傾向にあった。

今回それぞれのU1RNP特異構成蛋白およびSm抗原について反応するサブクラスを調べたところIgG1が主要サブクラスであったのは抗C抗体のみで、抗B'抗体ではIgG1が陽性と判断される血清は認めなかった。抗70K抗体、抗A抗体、抗D抗体についてはむしろIgG2あるいはIgG3が高頻度であり、全血清で測定した結果と一致していた。このように過去の報告と異なる理由として、測定法の違い、また同じELISAであっても固相化されている抗原の違いによると考えられる。高崎らはELISAによる抗U1RNP抗体の測定に関し、U1RNAを固相化抗原に含めることにより、70K蛋白と新たな構造エピトープが形成され、二重免疫拡散法など他の方法で陰性であった症例においても検出が可能となることを報告しており¹²⁾、今回使用したELISAは今まで報告された固相化抗原に比してもより高感度で、特にMCTD患者における抗U1RNP抗体の測定に有用であると考えられた。

U1RNPに特異的な構成蛋白に対する自己免疫反応が、Sm抗原に対する反応へと広がっていくか否かについては不明であるが、IgGサブクラスごとに検討すると、併存しやすい抗体が存在した。すなわちIgG1では抗C抗体と抗D抗体が、IgG2では抗B'抗体と抗D抗体が、IgG3では抗70K抗体あるいは抗B'抗体と抗D抗体である。しかしOD_{405nm}値は相関していないものも認められた。U1RNP特異構成蛋白およびSm抗原について反応するIgGサブクラスとして一番相関が高いと考えられたのはIgG3における抗70K抗体と抗D抗体であり、抗70K抗体が高力価陽性は抗Sm抗体出現の危険因子と考えられた。なお抗Sm抗体の対応抗原はB'/BとD蛋白であるが、特にIgG2において、抗B'抗体と抗D抗体のOD_{405nm}値は相関した。

ヒトIgGサブクラスの産生調節については未だ不明の点が多いが、IgG1、IgG2、IgG3についてはTh1反応で、IgG4はTh2反応であるとする報告が多い¹³⁾⁻¹⁵⁾。われわれの検討でも抗70K抗体でIgG1とIgG2の、抗D抗体でIgG1-IgG2-IgG3の関連を認めており、これらについてはTh1サイトカインであるIFN γ が関与している可能性がある。しかし一方で抗A抗体のようにIgG4とIgG1およびIgG4とIgG2の関連を認めた抗体があり、抗70K抗体や抗D抗体とは産生機序が異なると推測される。

近年、他の自己抗体においてIgGサブクラスの詳細な検討が行われている。IgG2型の抗カルジオリピン抗

体陽性患者で動脈血栓症が高頻度²⁾、抗b2-GPI抗体はIgG2あるいはIgG3型が高頻度で静脈血栓症や子宮内胎児死亡と関連³⁾、あるいはMPO-ANCAはIgG1型が多い⁴⁾など病態と直接関連する自己抗体の主要IgGサブクラスが同定され、かつ全血清でなく一部のサブクラスIgG自己抗体が病態の予測に役立つ可能性が示唆されている。またSLEでは、IgG3型の抗ヌクレオソーム抗体が疾患活動性と並行する⁵⁾、IgG2型の抗nucleohistone抗体とIgG1型の抗dsDNA抗体がループス腎炎の再燃に関与する⁶⁾など疾患活動性の指標として有用とする報告もある。一方で母親がもつ抗SSA/SSB抗体のIgGサブクラスと新生児のcongenital heart blockの発症率とは関連がないとする報告⁷⁾もある。抗U1RNP抗体あるいは抗Sm抗体は従来から疾患活動性とは必ずしも相関しないと考えられてきた。またMCTDやSLEの病態における直接的な関与も不明な点が多い。来年度以降、その疾患(診断)、病態、さらには疾患活動性とIgGサブクラスの関連を明らかにすることを考えている。またHLAとの関連も含め産生機序について有用な情報が得られる可能性も考慮し、より多くの血清でスクリーニングを行いたいと考えている。

文献

1. 三森 経世：主要疾患の歴史．混合性結合組織病．日本内科学会雑誌 2002；91：2676-82.
2. Sammaritano LR, Ng S, Sobel R, et al. Anticardiolipin IgG subclasses: association of IgG2 with arterial and/or venous thrombosis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1998-2006.
3. Samarkos M, Davies KA, Gordon C, et al. IgG subclass distribution of antibodies against β 2-GPI and cardiolipin in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, and their clinical associations. *Rheumatology* 2001; 40: 1026-32.
4. Manolova I, Dancheva M, Halacheva K. Predominance of IgG1 and IgG3 subclasses of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2002; 21: 227-33.
5. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, et al. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: Antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 76-84.
6. Bijl M, Dijkstra H, Oost WW, et al. IgG subclass distribution of autoantibodies differs between renal and extra-renal relapses in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2002; 41: 62-7.
7. Tseng CE, Caldwell K, Feit S, et al. Subclass distribution of maternal and neonatal anti-Ro (SSA) and La (SSB) antibodies in congenital heart block. *J Rheumatol* 1996; 23: 925-32.