

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

## 混合性結合組織病に関する研究

- 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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 近藤 啓文

平成 16 (2004) 年 3 月

## 目 次

[ I ] 総括研究報告	
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	1
近藤 啓文 (北里大学医学部内科)	
[ II ] 分担研究報告	
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	7
岡田 純 (北里大学医学部内科)	
2. U1RNP蛋白核酸複合体細胞内取り込みによる樹状細胞活性化に関する研究 ; U1RNP蛋白核酸複合体のアジュバント活性	11
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)	
3. 膠原病患者血清中のU1RNP各構成蛋白と反応するIgGサブクラスに関する研究	14
三森 経世 (京都大学大学院医学研究科臨床免疫学)	
4. 膠原病患者末梢血単核細胞による自己抗体産生と免疫抑制剤添加の影響について	18
青塚 新一 (国立国際医療センター研究所)	
5. 混合性結合組織病(MCTD)発症年齢の数理統計学的解析からの発症機構へのアプローチ	24
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)	
6. U1-snRNP・A遺伝子のSingle Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析	28
大久保光夫 (埼玉医大総合医療センター輸血・細胞治療部)	
7. 抗RNP抗体とマンノース結合レクチンの関連に関する研究	32
堤 明人 (筑波大学臨床医学系)	
8. MCTDにおけるアンギオポエチン1 (ANG-1)遺伝子の スプライスバリエーションに関する研究	35
塩沢和子 (甲南病院加古川病院リウマチ科)	
9. MCTDにおける抗CCP (環状シトルリン化抗原) 抗体の臨床的意義	37
高崎 芳成 (順天堂大学膠原病内科)	
10. 混合性結合組織病における肺高血圧症の合併頻度調査	43
吉田 俊治 (藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科)	
11. Bone morphogenetic protein-II (BMP-II)と膠原病の肺高血圧症	47
岡田 純 (北里大学医学部内科)	
12. 膠原病性肺高血圧症における骨形成因子 (BMP) および BMPII型レセプター(BMPRII)に対する自己抗体の検索	51
吉田 俊治 (藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科)	
13. 膠原病に伴う2次性肺高血圧症患者における疾患感受性遺伝子の検討	56
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)	
14. 抗PGI <sub>2</sub> -synthase抗体の血管内皮細胞活性に及ぼす影響	60
吉尾 卓 (自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学部門)	
15. 肺高血圧症におけるプロスタグランジンD <sub>2</sub> (PGD <sub>2</sub> ) およびI <sub>2</sub> (プロスタサイクリン) の役割	64
北里 英郎 (北里大学医学部微生物)	
16. 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に関する研究 (第二報)	70
諏訪 昭 (慶應義塾大学医学部内科)	
17. 肺高血圧症とレイノー症状に対してステロイドとシルデナフィル投与が有効であった 混合性結合組織病の1例	75
吉尾 卓 (自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学部門)	
[ III ] 研究成果の刊行に関する一覧表	79
[ IV ] 平成14年度班会議プログラム	91
[ V ] 平成14年度分担研究者名簿	93

Contents

1. MULTICENTER PROSPECTIVE STUDY OF CASES WITH ANTI-U1RNP ANTIBODY ALONE .....	10
Jun Okada (Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine)	
2. INTRACELLULAR DLIVERY OF U1RNP COMPLEX STIMULATES CYTOKINE PRODUCTION IN DENDRITIC CELLS .....	13
Yoshikata Misaki (Department of Allergy and Rheumatology, University of Tokyo School of Medicine)	
3. ASSOCIATION BETWEEN IgG SUBCLASSES REACTIVE WITH U1RNP PARTICLES AND DIEASE ACTIVITY IN SERA FROM PATIENTS WITH RHEUMATIC DISEASES .....	17
Tsuneyo Mimori (Department of Rheumatology and Clinical Immunology Kyoto University Graduate School of Medicine)	
4. SPONTANEOUS PRODUCTION OF AUTOANTIBODIES BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM PATIENTS WITH CONNECTIVE TISSUE DISEASE: EFFECT OF IMMUNOSUPPRESSANT ON THEIR PRODUCTIONS .....	23
Shinichi Aotsuka (Division of Clinical Immunology, Clinical Research Institute, International Medical Center of Japan)	
5. MATHEMATICAL APPROACHES TO THE PATHOGENESIS OF MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE BASED ON THE AGE DISTRIBUTION OF DISEASE ONSET .....	27
Takashi Okamoto (Department of Molecular and Cellular Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences)	
6. Single Nucleotide Polymorphism on U1-snrNP · A gene .....	31
Mitsuo Okubo (Transfusion Medicine & Cell Therapy, Saitama Medical School )	
7. ASSOCIATION BETWEEN ANTI-RNP ANTIBODIES AND MANNOSE BINDING LECTIN .....	34
Akito Tsutsumi ( Akito Tsutsumi (Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba)	
8. ANTI-CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE ANTIBODIES IN PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASES .....	42
Yoshinari Takasaki (Department of Internal Medicine and Rheumatology, Juntendo University School of Medicine)	
9. THE PREVALENCE OF PULMONARY HYPERTENSION IN PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE .....	46
Shunji Yoshida (Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine)	
10. BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-II AND PULMONARY HYPERTENSION IN CONNECTIVE TISSUE DISEASES .....	50
Jun Okada (Kitasato University School of Medicine 1-15-1 Kitasato Sagamihara 228 JAPAN)	
11. THE DETECTION OF AUTOANTIBODIES TO BONE MORPHOGENETIC PROTEIN (BMP) AND TYPE II BMP RECEPTOR (BMPR-II) IN PATIENTS WITH PULMONARY HYPERTENSION ASSOCIATED WITH CONNECTIVE TISSUE DISEASES .....	55
Shunji Yoshida (Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine)	

12. Association of NOS2 gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary arterial hypertension with collagen diseases .....	59
Masako Hara (Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University)	
13. ANTIBODIES AGAINST PROSTACYCLIN-SYNTHASE ON ENDOTHELIAL SURFACE IN PATIENTS WITH COLLAGEN DISEASES STIMULATE PGI <sub>2</sub> PRODUCTION FROM ENDOTHELIAL CELLS AND ACTIVATE ENDOTHELIAL CELLS .....	63
Taku Yoshio (Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Department of Medicine, Jichi Medical School)	
14. ROLE OF PROSTAGLANDIN D <sub>2</sub> AND I <sub>2</sub> IN PULMONARY HYPERTENSION .....	69
Hidero Kitasato (Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine)	
15. CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF JAPANESE PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASES ASSOCIATED WITH PULMONARY HYPERTENSION (II) .....	74
Akira Suwa (Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan)	
16. THE EFFECT OF STEROID AND SILDENAFIL THERAPY AGAINST PULMONARY HYPERTENSION AND RAYNAUD'S PHENOMENON IN A PATIENT WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE .....	77
Taku Yoshio (Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Department of Medicine, Jichi Medical School)	

[ I ]

# 總括研究報告

## 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 北里大学医学部内科診療教授

### 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144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2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44例を新たに登録した。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充実させた。本年度中で新規症例の登録を終了し、データの集積を行う。抗U1RNP抗体単独陽性症例と他の抗体併存例の臨床像と経過を比較してMCTDの疾患概念の確立、診断基準のエビデンスに基づく改正を行う。

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。各研究として異なった方向から行なわれた。U1RNAを樹状細胞内に導入すると細胞が活性化され、自己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抗体のIgGサブクラスが解析され、疾患活動性や肺高血圧との関連が示唆された（三森）。抗U1RNP抗体陽性患者単核細胞は血清抗体価と相関する抗体を産生した（宵塚）。

MCTDの発症過程を患者発症年齢分布の解析より求める研究から、症状が発現するまで1～2年間の潜伏期間をへて、およそ3段階の独立した事象（遺伝子変異など）が起こっていることが示唆された（岡本）。MCTDあるいは抗U1RNP抗体と関連する遺伝子異常の研究を班で構築したデータベースを用いて研究する体制を形成した。その結果、抗U1RNP抗体の主な抗原であるU1-snRNP・AのSNP解析で抗体陽性症例で有意に多いSNPが認められた（大久保）。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（堤）。関節リウマチ（RA）の疾患遺伝子であるアンギオポエチンI遺伝子のスプライスバリエーションについてMCTDで検索し、血管新生促進型変異が多くみられたとの報告があった（塩沢）。これらの所見より、本症の発症に遺伝子異常の関与が強く示唆された。

その他の自己抗体として抗CCP抗体陽性がMCTDで検討され、本抗体がMCTDのRA様の関節炎と関連することが明らかになった（高崎）。

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）。まず、MCTDにおける心エコー検査によるPHの頻度が22.5%であることが判明した。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。しかし、膠原病合併PHでは、昨年度の報告の通り遺伝子変異が認められなかった（岡田）。そこで、岡田はBMPR-IIとそれ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。吉田も別の方法で抗体を高率に検出した。以上、膠原病合併PHでもBMPR-IIの異常とPHとの関連が示唆された。原は膠原病合併PH例における一酸化窒素の合成酵素（NOS-2）の遺伝子多型を解析し、PH合併例では転写調節領域と考えられる二ヶ所に遺伝子多型が認められた。PHの発症に関与している可能性が示唆された。血管内皮細胞表面上に存在するPGI<sub>2</sub>-synthaseに対する抗体が検出されるが、その生物学的活性がin vitroの系で検討された（吉尾）。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）の治療が終了し、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療が行なわれた。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。

## 班の構成

### 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  
東京女子医科大学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リウマチ感染症内科 教授  
大久保 光夫  
埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部 講師  
冨塚 新一  
国立国際医療センター研究所 部長  
吉尾 卓  
自治医科大学内科学講座リウマチ-膠原病学部門 助教授

堤 明人  
筑波大学臨床医学系 助教授  
諏訪 昭  
慶應義塾大学医学部内科 助手  
岡本 尚  
名古屋市立大学医学研究科細胞分子生物学 教授  
北里 英郎  
北里大学医学部微生物 講師

### 研究協力者

塩沢 和子  
(財) 甲南病院加古川病院リウマチ科 副院長  
山田 秀祐  
聖マリアンナ医科大学リウマチ膠原病リウマチ-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、特徴的な臨床所見が抗U1RNP抗体と密接に関連すること、主な死因としての肺高血圧症 (PH) の病態の解明が進展し、治療法確立の重要性が示唆された。本研究班はMCTDの診断基準のエビデンスに基づいた改訂、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登録した症例を合わせて単独陽性群と他の抗核抗体陽性群を比較して臨床経過を明らかにする。それに臨床像とHLA抗原系の関連を加えてMCTDの疾患概念の明確化を試み、平成16年度にエビデンスに基づきMCTD診断基準を改訂する。

2) 抗U1RNP抗体の産生機序の解明: MCTDは抗U1RNP抗体を発現する疾患であり、本抗体が日本人

に高頻度であることがMCTDがわが国に多い理由であるとの仮説をたて、疫学調査、HLA抗原系の検索で明らかにしたい。抗U1RNP抗体の産生機序を数理統計学的発症モデル、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解明する。U1RNPに対する免疫反応を制御する新しい治療法の応用につながることを期待される。

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と関連する因子の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、治療ガイドラインの検証を行う。PHモデル動物を用いて細胞移入による治療実験を行い、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（各施設の倫理委員会承認の上）。

### 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 MCTD患者単核細胞における抗U1RNP抗体など自己抗体産生。
- ### 3) MCTDの自己抗体、病態と関連する遺伝子異常の研究
- ① 発症年齢の数理統計学的解析からの発症機構へのアプローチ
  - ② RNP-A蛋白をコードする遺伝子解析
  - ③ マンノース結合レクチン (MBL) の遺伝子変異
  - ④ アンジオポエチン1遺伝子のスプライスバリエーションの多型
  - ⑤ 抗CCP抗体の検索
- ### 4) MCTDの肺高血圧症の臨床病態と治療研究：
- ① 班プロジェクト研究としてMCTDにおけるPHの頻度と治療調査
  - ② 骨形成因子のII型レセプター (BMPR-II) とそれに対する抗体の検索
  - ③ 一酸化窒素の合成酵素 (NOS-2) の遺伝子多型
  - ④ PH患者肺動脈内皮細胞のPGI<sub>2</sub>合成酵素の発現
  - ⑤ 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。
  - ⑥ MCTD合併PH症例の自己抗体のパターンと臨床像
  - 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。

## 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144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44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抗体単独陽性症例は65%でMCTD、SScが多く、他の抗体併存例はSLEのコンポーネントが多かった。PHは16例に認められた。今年度をもって症例の登録を一時中断し、症例票の集積、プロスペクティブに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を3年次の目標とする。

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を樹状細胞内に導入するとIFN $\alpha$ 、INF $\beta$ の産生が非常に高まることが明らかになり、さらにIL-1、IL-6も軽度増加した。U1RNPがアジュバンド活性をもち自己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抗体の主な対応抗原（70K,A,B<sub>1</sub>,C）に対するIgGサブクラスが解析され、サブクラスの出現パターンと疾患活動性、肺高血圧との関連が検討された（三森）。疾患活動性の低下によってIgGサブクラスの一部は低下し、PHでは特徴的なIgGサブクラスのパターンが示された。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。抗U1RNP抗体と抗Sm抗体とに相関がみられた。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）。

3) MCTDの自己抗体、病態と関連する遺伝子異常：MCTD患者発症年齢分布の数理統計学的解析によりMCTDが遺伝子異常の蓄積に基づく発症過程を求める研究が岡本により行われた。MCTDの発症年齢分布はワイブル分布に近似し、症状が発現するまで1～2年間の潜伏期間をへて、およそ3段階の独立した事象（遺伝子変異など）が起こっていることが示唆された。大久保は抗U1RNP抗体の主な対応抗原であるU1-snRNP $\cdot$ A (RNPA) の遺伝子のSNPを抗体陽性者で解析した。抗体陽性者は第6 exon直前のSNPのminor alleleの頻度が有意に増加するなど、特定の遺伝子変異を有する限られた集団であることが示唆された。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抗体陽性膠原病患者でコドン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、MBL 遺伝子型、血中 MBL 濃度、抗 MBL 抗体と病態との関連は明らかではなかった。RA の疾患遺伝子であるアンギオポエチン I 遺伝子のスプライスバリエーションについて MCTD で検索したところ、血管新生促進型変異が多くみられたと報告された (塩沢)。病態との関連を考える上で興味深い成績である。

その他の自己抗体として RA に特徴的に出現する抗 CCP 抗体を MCTD で検討したところ、本抗体が MCTD の RA 様の関節炎と相関することが明らかになった (高崎)。しかし、本抗体は MCTD の Sjogren 症候群とも相関が認められた。

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疾患である。PH の班内調査プロジェクト研究が新たに発足した (吉田)。MCTD における PH 合併の有無を心エコー検査を用いて検討したところ、169 例中 38 例 (22.5%) に PH の合併を認めた。診断の手引きの PH 臨床症状を有したのは 31 例で、このうち 45.2% に PH を合併した。認めなかった 165 例の PH 合併頻度は 15.2% であった。臨床症状の有無と心エコー上の推定肺動脈圧では、有り群で有意に高かった。PH 合併のスクリーニングに心エコー検査の有用性が明らかになった。

PH の病態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 について解析が行なわれた。昨年度、岡田は抗 U1RNP 抗体陽性 PH 合併例に BMPR- II の遺伝子変異を検出できなかったが、BMPR- II に対する抗体を検出した。今年度は BMPR- II を測定したところ、PH 患者で PA 圧と相関した。吉田は岡田と別の測定法 (免疫プロット法) で同抗体が抗 U1RNP 抗体と相関することを見出した。膠原病 PH でも BMPR- II の機能異常が何らかの役割を持つことが示唆された。

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-2) の遺伝子多型を解析した。PH 合併例では転写調節領域と考えられる 2ヶ所の遺伝子多型が存在し、この多型が NOS-2 の転写調節を介して PH の発症に関与する可能性を示唆した。吉尾は血清中に血管内皮細胞表面上に存在する PGI<sub>2</sub>-synthase に対する抗体を検出し、その抗体が内皮細胞の活性化と PGI<sub>2</sub> 産生を刺激することを見出した。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 の発現と肺動脈の狭窄の改善を明らかにした。さらに、肺において iNOS, Endothelin-1 (ET-1) の発現が抑制され、ET<sub>B</sub> の発現の亢進が明らかになった。

PH 合併 MCTD の臨床像の解析では、297 例の MCTD における PH 合併率は 18% でであった。重症 PH 10 例の臨床像の特徴は肺線維症、皮膚硬化範囲が広いなど強皮症病変であった (諏訪)。MCTD 例においては抗リポゾーム抗体、ループス抗凝固因子など多彩な自己免疫異常がみられた。

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、まもなく使用可能になることが期待される。さらにエンドセリンレセプター拮抗薬の治験も終了した。吉尾は PH を合併した MCTD に大量ステロイドとシルデナフィルが有効であった 1 例を報告した。今後の膠原病合併 PH の新しい治療薬として期待される。

#### 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経過を含めて明らかにし、MCTD は抗 U1RNP 抗体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、追跡調査に進展がみられた。今年度で新規症例の登録は終了し、来年度にデータ解析を行う。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、抗体陽性患者で対応抗原の一つに SNP が有意に多かったことは、抗体産生に遺伝的背景の関与を示唆するものとして興味深い。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、本研究での成果が重要である。

MCTD 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。岡本らの数理統計学的検討でも遺伝的因子の関与を示唆している。しかし、有意な遺伝子多型が認められても、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として、アンジオポエチンI遺伝子のスプライスバリエーションについて血管新生促進型変異が多くみられたとの塩沢の報告、PH合併例でNOS-2の転写調節領域における遺伝子多型の証明（原）は病態の発症に関与する可能性を示唆した。MCTDは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についての病態研究からPGI<sub>2</sub>、NO、エンドセリンI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PGI<sub>2</sub>製剤エポプロステノール、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。北里はPHモデル動物をPGD合成酵素を発現する線維芽細胞を用いた cell therapy で治療することに成功した。新しい治療法の開発に寄与することが期待される。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えられることが期待される。

## 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がみられた。症例の経過を追跡することにより次年度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抗体の対応抗原に有意なSNPが認められ、抗体産生に遺伝的因子の関与が示唆された。
- 3) MCTDの重要、かつ高頻度にみられる臓器病変であるPHの発症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]

分担研究報告

## 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：岡田 純 北里大学医学部内科助教授  
研究協力者：近藤 啓文 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、その自然歴を多施設でプロスペクティブ研究を行い、抗U1RNP抗体陽性例の臨床像とMCTDとの関連を明らかにする。この結果に基づき、抗U1RNP抗体陽性例の臨床像とMCTDとの関連を明らかにすると共に、MCTDの診断基準を再検討する。

【方法】MCTD班の班員の施設で1999年1月より2003年12月の間に初診した患者のうち抗U1RNP抗体が陽性症例を全例登録する。ただし、初診前1年以上のステロイド薬、免疫抑制薬服用者は除外。登録と同時に、HLA DR抗原を測定する。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プロスペクティブ研究を行う

【結果・結語】2003年12月末までに登録された症例は188例で、その中で調査票が提出されたものが150例、HLAが測定されたものが、154例であった。143例の登録時年齢は $42.2 \pm 15.5$ 歳で、女性132、男性11例であった。登録時の診断は、MCTD 57、SLE 37、UCTD 17、SSc 11、RA 10、Sjögren's syndrome 7、Overlap syndrome 2、その他3例であった。抗U1RNP単独陽性は93例で、抗DNA抗体また抗Sm抗体の陽性の対照群は49例であった。脱落例15、PH疑診は16例認められた。

### A. 研究目的

抗U1RNP抗体単独陽性例について、その自然歴を多施設でプロスペクティブ研究を行い、抗U1RNP抗体陽性例の臨床像とMCTDとの関連を明らかにする。本研究班の継続に伴い、本project研究も継続して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。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と同時に、診断基準の見直しにも利用する。

### B. 研究方法

MCTD班の前3年間のプロスペクティブ研究を更に継続するとともに、症例数を増やす。登録期間を2003年12月までの間に各施設を受診した患者の追加登録を行った。対象とする患者の条件は変更しない。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、予後を追跡調査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

2003年12末日まで、188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143例であった。HLAが測定されたものが、140例であった。全例の平均観察期間は、 $1.85 \pm 0.89$  (0.1-6.3)年であった。疾患別内訳は、表1に示すように、MCTD 57、SLE

37, UCTD 17, SSc 11, RA 10, Sjögren's syndrome 7, Overlap syndrome 2, その他 3 例であった。抗 U1RNP 単独陽性は 93 例で、抗 DNA 抗体また抗 Sm 抗体の陽性の対照群は 49 例であった (表 2)。臨床症状の比較では、抗体単独陽性群に MCTD に特徴的な症状が多く見られた。主治医の診断では、抗 U1RNP 抗体単独陽性例では、MCTD や SSc が有意に多く、非単独陽性例では、SLE が多かったが、非単独例にも MCTD が 19% みられた (表 3)。これは、抗 Sm 抗体陽性や抗 DNA 抗体陽性例が非単独群に分類され SLE の臨床像を強く反映したためと考えられた。今後の診断基準の検証に抗 Sm 抗体の取り扱いが重要と考えられる。脱落例は 15 例、PH 疑診は 16 例認められた。さらに、追跡調査を今後行い、症例の診断に変化がないかを検討する。また、MCTD の診断基準の妥当性の検討にもこの症例を利用し、解析する。HLA のデータ解析により抗 U1RNP 抗体陽性例のなかで、MCTD が均一な集団となるかを明らかにする。

#### D. 考察

MCTD 班における 1999 年からの多施設プロスペクティブ研究調査で<sup>1)</sup>、抗 U1-RNP 抗体陽性例の登録患者数は 188 症例となった。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短い

ため、継続研究により長期間の追跡調査中である。

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く多くが SLE であることが明らかとなった。臨床像と 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。

#### E. 結論

追跡調査では脱落例も 15 例みられたが、症例数が 188 例に達したため、十分な臨床的な解析は可能と考えられる。また、MCTD の診断基準の妥当性の検討にもこの症例を利用し検討する。HLA のデータ解析により抗 U1RNP 抗体陽性例のなかで、MCTD が均一な集団となるかを明らかにする。

#### 文献

1. 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.

表 1. 抗 U1RNP 抗体陽性例の登録症例の疾患の内訳

疾患名	症例数	頻度 (%)	初診時年齢
MCTD	57	40%	45.6 ± 13.6
SLE	38	27%	30.2 ± 10.3
UCTD	16	11%	46.2 ± 18.9
SSc	12	8%	52.7 ± 11.3
Sjögren's syndrome	7	5%	56.4 ± 15.6
RA	10	7%	42.0 ± 17.3
Discoid lupus	1	1%	40
Overlap syndrome	2	1%	30.1 ± 1.5
合計	143	100	40.6 ± 16.1

表2 抗U1RNP抗体単独群と非単独群の臨床症状および検査の比較

	抗U1RNP抗体	
	単独(92)	非単独(52)
レイノー現象	84.6 %	50.0 %
指ないし手の腫脹	63.7	44.2
多発関節炎	53.8	55.8
リンパ節腫	17.6	36.5
顔面紅斑	13.2	32.7
心膜炎	2.2	11.5
胸膜炎	2.2	7.7
白血球減少	36.3	57.7
血小板減少	2.2	13.5
手指に限局した皮膚硬化	46.2	21.2
肺線維症	17.6	11.5
筋力低下	18.7	15.4
筋原性酵素上昇	18.7	15.4
日光過敏症	5.5	17.3
口・鼻潰瘍	2.2	17.3
尿蛋白	3.3	15.4
細胞性円柱	1.1	11.5
近位部の皮膚硬化	7.7	3.8
肺高血圧症(疑)	5.8	16.3
肺高血圧症	4.7	12.2
シェーグレン症候群	26.0	29.5
抗DNA抗体	0.0	76.9
抗CDL抗体	3.8	27.8
ループスアンチコアグラント	1.9	9.7
梅毒反応偽陽性	2.7	11.1
リウマチ因子	48.2	28.6
抗Sm抗体陽性	0.0	57.7
SSA抗体陽性	33.3	56.9
SSB抗体陽性	4.8	19.6
抗TOPOI陽性	0.0	10.3
抗Jo1抗体陽性	0.0	3.7
低補体血症	11.0	46.2

表3 抗U1RNP抗体陽性例における疾患特異的抗体との関係

	抗体単独陽性		抗体非単独陽性		p-value
	症例数	頻度(%)	症例数	頻度(%)	
MCTD	47	51.6	10	19.2	0.002
SLE	6	6.6	32	61.5	<0.001
UCTD	8	8.8	4	7.7	
SSc	15	16.5	1	1.9	0.017
Sjögren's syndrome	5	5.5	2	3.8	
RA	7	7.7	3	5.8	
Discoid lupus	1	1.1	0	0.0	
Overlap*	2	2.2	0	0.0	

\* Overlap syndrome. 抗体単独陽性群は抗U1RNP抗体単独陽性で、非単独群は抗DNA抗体、抗Sm抗体、抗Scl70抗体陽性例を非単独群とした

## MULTICENTER PROSPECTIVE STUDY OF CASES WITH ANTI-U1RNP ANTIBODY ALONE

Jun Okada , Hirobumi 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 eighty eight cases were entered before end of 2003. One hundred fifty clinical records were received. HLA analysis was performed in 154 patients. In this time 153 records were available to analyze clinical data. Diagnosis of those cases was MCTD (57 cases), SLE (37), SSc (17), Sjögren syndrome (7), UCTD (17), RA (10) and others (4). Age at first visit was 42.2±15.5 y/o. Group of anti-U1RNP antibody alone was 93 cases and control group of patients who were positive for anti-dsDNA antibody or antiSm antibody, was 49 cases.

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

U1RNP 蛋白核酸複合体細胞内取り込みによる樹状細胞活性化に関する研究；  
U1RNP 蛋白核酸複合体のアジュバント活性

分担研究者：三崎 義堅 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科講師

研究協力者：山本 一彦 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

U1RNPなどの自己抗原は、その細胞生物学的役割以上の機能をこれまで想像もされてこなかった。しかし、我々は昨年度、U1RNA/U1-A複合体が樹状細胞に対して、IL6産生を増強する事を発見した。こうした免疫系に対する意外な特性が、RNA蛋白複合体であるウィルスに対する防御免疫応答を構成している可能性から、IFN産生系への影響を検討した。マウス脾臓樹状細胞の細胞内にU1RNA或いは、U1Aと会合させた再構成U1RNPを樹状細胞細胞内に移入し、IFN $\alpha$ の産生を観察したところ、U1RNAだけでも約20倍の上昇が観察された。mRNA定量すると、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ ともU1RNA刺激でそれぞれ約2500倍、約40-50倍と顕著な増加を示した。以上から、U1RNPが樹状細胞内に取り込まれれば、細胞刺激活性を発揮し、自己抗原としての免疫系の認識及び自己抗体産生と病態への関与に繋がる可能性が考えられた。

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<sup>1, 2)</sup>。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蛋白複合体である。

U1RNPなどの自己抗原は、mRNAスプライシング関与という細胞生物学的役割以上の機能をこれまで想像もされてこなかった。我々は昨年度、U1RNA/U1-A複合体が樹状細胞に対して、IL6産生を増強する事から、U1RNPに免疫系を賦活する作用があることを発見した<sup>3)</sup>。こうした免疫系に対する意外な特性が、DNAヌクレオソームにも見出され、自己抗体出現という視点から注目され始めている。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<sup>4)</sup>。これは、近年外来微生物病原体特有の分子パターンを認識することで益々興味を持たれているToll-Like receptor（TLR）ファミリーに属するTLR9依存性と考えられている。このように核酸蛋白複合体に免疫賦活作用があるならば、目的論的にはウィルスに対する防御反応機構の一翼を担うはずだと考えられる。そこで、ウィルス感染を模倣して、細胞へのRNA蛋白複合体導入による、IFN産生への影響を中心に検討を進めた。

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と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。

U1RNA/U1-A複合体或いはU1RNA単独にてリポフェクションにて樹状細胞内に導入刺激し、刺激24時間後の上清IFN $\alpha$ をELISAにて測定した。また、刺激後の樹状細胞からRNAを調整し、QuantiTect Kit（QIAGEN社）とiCycler（Bio-Rad社）を用いて定量的



PCRを行いIFN  $\alpha$ 、IFN  $\beta$ 、IL-1、IL-6 mRNA量を測定した。

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

マウス脾臓樹状細胞の細胞内にU1RNA、U1Aと会合させた再構成U1RNPを樹状細胞細胞内に移入し、IFN $\alpha$ 蛋白質の産生を観察したところ、U1RNA 0.1  $\mu$ gの導入だけでも約20倍の上昇が観察された(図1)。mRNA定量すると、IFN  $\alpha$ 、IFN  $\beta$ ともU1RNA刺激でそれぞれ約2500倍、約40-50倍に顕著に増加を示した(図2、3)。これに対してIL-1、IL-6はmRNA量でも2倍くらいの増加に留まり、タイプI IFNの著明な産生亢進と比べて解離が観察された(図省略)。U1RNAほどではないが、control RNA (luciferase mRNA)にも同様の細胞刺激活性が認められた。

### D. 考察

これまで、生体細胞は長鎖二本鎖RNAにのみ認識でき、それはToll-Like receptor 3 あるいはPKRが担うとされてきており、一本鎖RNAに対する細胞反応の本研究が初めてである。しかし、ごく最近、細胞内に導入すると、長鎖dsRNAだけでなく、これまでIFN応答を引き起こさないと考えられてきたsiRNAもIFN応答を、少なくとも一部はPKR依存性に誘導することが報告された<sup>5-7)</sup>。従って、この一本鎖short RNAのアジュバント様活性も、細胞内導入で初めて観察される活性なので、同様にPKRを介した応答である可能性があり、今後検討する必要がある。

昨年度本研究室報告書でU1RNA/U1-A複合体の摂取により樹状細胞がIL6産生を増強する事を報告した。今年度のU1RNA単独解析の結果でも同様のIL-6産生増加が確認されたが、同時に解析したタイプI IFNの著明な産生亢進と比べると、明らかに解離があり、それぞれの産生に至る細胞内刺激伝達経路が異なる可能性が考えられる。TLR4とTLR3両者ともdsRNA刺激によるIRF3活性化の過程はMyd88非依存性にTICAM/TRIFを介するとされているが、同時にTLR4とTLR3ではIL-6産生亢進に関して解離がある可能性が指摘されている。本実験系はU1RNAが細胞内導入により始めて刺激活性を持つので、TLR3を介さない

と考えられるが、一部共通の機構を介する可能性もある。

### E. 結論

以上から、U1RNP自己抗原が、細胞に摂取されると、樹状細胞を刺激するアジュバント活性をもつ可能性をもつことが明らかになった。このU1RNAのアジュバント活性は、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、本来small一本鎖であっても反応性を獲得するのか、細胞内へに入るルートによるのかは現時点では不明である。こうした自己抗原の細胞刺激活性と、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も考えられる。

### 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多施設共同研究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- $\kappa$ B 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.
5. Diebold SS, Montoya M, Unger H, Alexopoulou L, Roy P, Haswell LE, Al-Shamkhani A, Flavell R, Borrow P, Reis e Sousa C. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*. 2003 Jul 17;424(6946):324-8.
6. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*. 2003 Sep;5(9): 834-9.
7. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*. 2003 Jul;34(3):263-4.

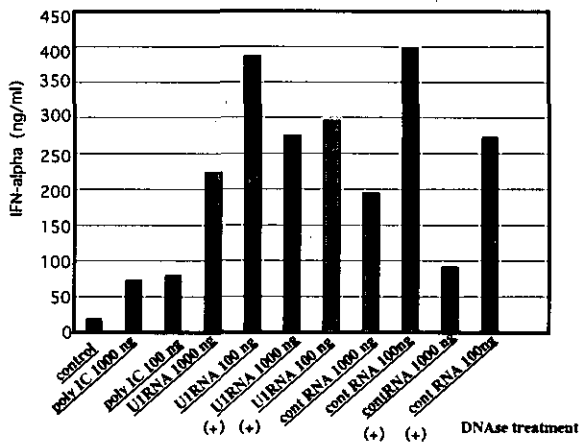


Figure 1. U1RNA increase IFN-alpha production in SPDC

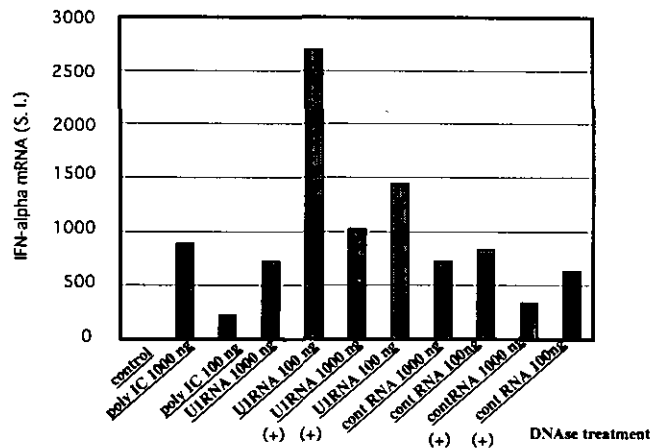


Figure 2. U1RNA increase the amount of IFN-alpha mRNA in SPDC

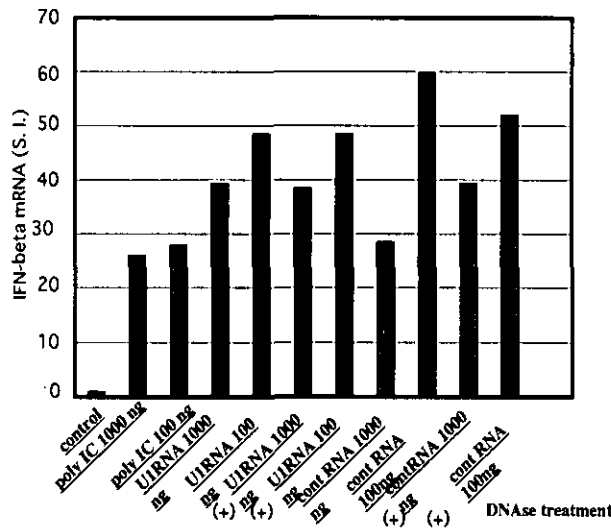


Figure 3. U1RNA increases the amount of IFN-beta mRNA in SPDC

## INTRACELLULAR DELIVERY OF U1RNP COMPLEX STIMULATES CYTOKINE PRODUCTION IN DENDRITIC CELLS.

Yoshikata Misaki, Kazuhiko Yamamoto.

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

Last year we found that U1RNP stimulates IL-6 production in dendritic cells (DC), suggesting that U1RNP has an adjuvant effect. Since U1RNP is a RNA/protein complex, the adjuvant effect of U1RNP may mimic viral infection. To explore this possibility, we analyzed Type I interferon production. When we introduced U1RNA into splenic DCs, DCs demonstrated vigorous enhancement of type I interferon production in protein level as well as mRNA level. Since it has been known that type I IFN is involved in antibody production, these results suggest that the ingestion of U1RNP by DCs as an immune complex, eg, contribute in autoantibody production and might be a critical step in the pathogenesis of MCTD.

## 膠原病患者血清中のU1RNP各構成蛋白と反応するIgGサブクラスに関する研究

分担研究者：三森 経世 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学教授

研究協力者：藤井 隆夫、藤田 義正 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学

### 研究要旨

抗U1RNP抗体陽性膠原病患者23例（SLE 15、MCTD 4、SSc 1、SLE + PM 1、SSc+PM 1、RA 1）の血清中におけるU1RNP構成蛋白（70K、A、B'、C）を認識するIgGサブクラスと疾患活動性および肺高血圧症（PH）との関連を調べた。SLEでは寛解後に多くの抗U1RNP抗体IgGサブクラスが有意に低下したが、IgG1/IgG2型の抗A抗体、IgG2/IgG3型の抗B'/B抗体の低下が著明であった。MCTDではIgG1型の抗A、抗C抗体が寛解後に低下した。PH症例（SLE、MCTD、SSc+PM各1例）は非PH症例に比し、急性期、寛解期ともにIgG3型の抗A抗体が高力価であった。またPH症例ではIgG1型の抗A抗体、IgG2型の抗C抗体が原疾患活動性と相関した。より多数例での検討が必要であるが、抗U1RNP抗体の一部のサブクラスは疾患活動性あるいはPHと関連する可能性がある。

### A. 研究目的

抗U1RNP抗体は混合性結合組織病（以下MCTD）の診断基準（厚生省MCTD調査研究班1996年改訂）に含まれ、全身性エリテマトーデス（以下SLE）でも高頻度に見いだされる代表的な抗核抗体である<sup>1)</sup>。本研究班においてもその反応性や産生機序に関しさまざまなアプローチが試されている。一方、臨床的には抗DNA抗体とは異なり抗U1RNP抗体価とその原疾患活動性とは必ずしも相関せず、その病因的意義も明らかではない。われわれは昨年度の本研究班で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を調べ、抗U1RNP抗体のIgGサブクラス反応性が各構成成分によって異なることを報告した。本年度は抗U1RNP抗体陽性患者において、各構成成分を認識するIgGサブクラスと疾患活動性との相関を検討するとともに、抗U1RNP抗体陽性患者で最も重要な合併症である肺高血圧症（PH）との関連を検討した。

### B. 研究方法

研究の同意を得た上で採血され、RNA免疫沈降法により抗U1RNP抗体陽性と判断された当院通院中のリウマチ・膠原病患者の23血清（SLE 15、MCTD 4、SSc 1、SLE + PM 1、SSc+PM 1、RA 1）を対象とした。それら血清中の抗U1RNP抗体をMBL（医学生

物学研究所）社のELISAキット（Mesacup<sup>R</sup>-2テストRNP）および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社にて作製）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<sub>405nm</sub>値を測定した。また抗核抗体陰性健康人から採取した11血清をコントロールとした。なお疾患活動性は、皮疹、血小板減少、CK値など原疾患に特異的な身体・検査所見を指標とした。また平均値の比較にはt検定を用いた。

### C. 研究結果

はじめに、Mesacup<sup>R</sup>-2テストRNPでSLE患者（16例）とMCTD患者（4例）の抗U1RNP抗体IgGサブクラスを測定した。SLEにおいては急性期（疾患活動期）に比し寛解期でIgG1とIgG2型が有意に減少していたが、MCTDでは有意な減少は認めなかった。次に、SLEの疾患活動性と各構成成分を認識するIgGサブクラスを調べたところ（図1）、抗U1RNP抗体で低下を認めたIgG1/IgG2型で抗A抗体の低下が著明であった。またSLEの中には抗Sm抗体陽性者が5名（31%）含まれていたが、抗B'/B抗体はIgG2/IgG3型が活動性と相関して低下した。なお抗70K抗体、抗C抗体においてもIgG1/IgG2型が低下していた。一方で、

MCTD 患者血清では寛解期に IgG1 型の抗 C 抗体が著明に低下した。なお昨年度の検討で、SLE と MCTD 間において主要 IgG サブクラスの相違が認められた抗 U1RNP 構成成分抗体があったが、今回の対象症例において同様の相違は急性期・寛解期ともに認められなかった。

今回の 23 例のうち PH 合併例は 3 例に認められた。MCTD、SLE、SSc+PM 各 1 例であり、血清を採取された時点での心臓超音波検査における推定（平均）肺動脈圧はそれぞれ 44、42、33 mmHg（原疾患急性期）および 29、43、29 mmHg（原疾患寛解期）であった。Mesacup<sup>®</sup>-2 テスト RNP では、IgG1 型の抗 U1RNP 抗体価が寛解期において低下していた。また各構成成分に対する抗 U1RNP 抗体を調べると、IgG1 型の抗 A 抗体と IgG2 型の抗 C 抗体のみが原疾患活動性と平行して低下していた（図 2）。なお、IgG1 型の抗 A 抗体は PH を合併していない 20 例でも同様の変動を認めたが、IgG2 型の抗 C 抗体は PH 非合併例の急性期と寛解期とで有意差がなかった。また IgG3 型の抗 A 抗体価は PH 合併の有無にかかわらず原疾患活動性との相関を認めなかったが、急性期と寛解期ともに PH 合併例が有意に高力価であった（図 2）。なお PH 合併 3 例を検討すると治療により PH が改善した MCTD 例と部分改善した SSc+PM 例において、IgG3 型の抗 70K 抗体、IgG1 型の抗 C 抗体が原疾患活動性と相関して低下していた。

#### D. 考察

抗 U1RNP 抗体は U1RNA、70K、A、B'/B、C、D、E、F、G を含む核酸と蛋白の複合体を認識する自己抗体である。近年、リコンビナント精製抗原を固相化した ELISA が開発されその測定はより容易となったが、免疫沈降法あるいは二重免疫拡散法との成績が必ずしも一致せず、混乱を招く場合がある。村上、高崎らは 70K、A、C 蛋白のみでなく、U1RNA を同時に固相化することにより ELISA の成績が二重免疫拡散法に近づくことを示し、各蛋白の反応性より RNA を加えることによって形成される構造エピトープの重要性を報告した<sup>2)</sup>。この結果 ELISA による抗 U1RNP 抗体の測定はより正確なものとなり、膠原病患者の診断における有用性は高まったと考えられる。しかし一方で、抗 U1RNP 抗体の構造エピトープは一カ所でないと考えられるため、数種類の反応性の異なる抗 U1RNP 抗体が検出されることとなり、数種類の蛋白や核酸を固相化した ELISA で測定した場合、疾患活動性との相関やそ

の病因的意義を詳細に検討することは困難である。そこでわれわれは U1RNP の構成蛋白（70K、A、B'、C）をそれぞれ固相化することにより、抗 U1RNP（複合体）抗体をより細分化し、さらにサブクラスに分けて検討することによって、原疾患の活動性や病態との関連を調べた。

SLE では抗 U1RNP（複合体）抗体（Mesacup<sup>®</sup>-2 テスト RNP）、抗 70K・A・C 抗体いずれにおいても IgG1 と IgG2 型を主に寛解期に低下した。したがって治療により各構成蛋白に対する反応性が低下したのみでなく、構造エピトープに対する反応性も低下したと考えられる。ただし、特に大量ステロイドによる治療に伴って全 IgG および各サブクラスが非特異的に低下した可能性もあるため、血清採取時の IgG サブクラス濃度を再度確認する必要がある。しかし、70K、A、C に対する反応性は必ずしも同じでなく（図 1）、非特異的な IgG サブクラス量の低下のみでは説明できない可能性もある。しかしながら一部の蛋白に対する反応性のみ特異的に低下する機序は不明である。症例数を増やし検討する必要があるが、各蛋白に対する抗体により T 細胞を含めた抗体産生の分泌刺激経路が異なる可能性がある。

肺高血圧症（PH）合併症例についても今回検討を加えた。少数例ではあるが、IgG3 型の抗 A 抗体が合併症例で有意に高く、PH の病態と関連している可能性が示唆された。また 2 例において IgG3 型の抗 70K 抗体、IgG1 型の抗 C 抗体が肺動脈圧と相関して低下しており、抗 U1RNP 抗体陽性患者の PH におけるマーカーとなる可能性もある。IgG3 と IgG1 はいずれも補体活性化能が強く Fc 部を介した他の細胞（好中球、マクロファージ、NK 細胞など）との結合性を有する。Alarcon-Segovia ら<sup>3)</sup>は、抗 RNP 抗体が Fc レセプターを通して生きたヒト単核球内に入り込む可能性を報告しているが、その詳細なメカニズムについては不明である。RNP 抗原が生きたヒト T 細胞表面上に結合し、その RNP 抗原を介して抗 U1RNP 抗体が細胞内に侵入する可能性を示唆する報告<sup>4)5)</sup>があるが、そのレセプター（4 量体）は同定されていない。大川らは抗 U1RNP 抗体や抗 dsDNA 抗体が末梢血単核球細胞の IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-6 の産生を刺激することを示し、特に抗 U1RNP 抗体は Fab 部のみでも IL-1 $\alpha$  産生の亢進を認めることを報告した<sup>6)</sup>。さらにヒト肺動脈内皮細胞（HPAEC）でも抗 U1RNP 抗体や抗 dsDNA 抗体が ICAM-1、ELAM-1、MHC class II などの発現を増強