

図1. ANG-1 cDNA 解析プライマー位置

C. 研究結果

RA2遺伝子であるANG-1遺伝子変異は269Glyを伴う3塩基GGT挿入変異体であった。末梢血のANG-1 mRNAを定量するとその発現はRAで有意に低下しており(p<0.01)、in vitro遺伝子発現系でみると、この変異型遺伝子を導入した場合にはヒト血管内皮の遊走が有意に促進されることが判明した(東北大佐藤研と共同研究)。本遺伝子のマウス対応型は、自己免疫自然発症MRL/lprマウスの疾患遺伝子としても見出されており(愛媛大能勢研との共同研究)、ANG-1の遺伝子多型の種を超えての影響が推定された。

ANG-1 mRNAのスプライスバリエーションについては、現在までの解析結果では、私どものこれまでの報告通り、これまでRAにおいて有意に増加が認められていた269Gly挿入型変異(mtと記載)が、MCTDにおいても4/12(33.3%)に認められた。また、ヘテロ変異型は4/12(33.3%)であり、正常型と考えられる269Gly欠失型変異は4/12(33.3%)に認められた(表1)。

ANG-1遺伝子多型が実際にMCTDの症状・所見にどのように関わるかに関して、私どもは関節滑膜においてANG-1のシグナルが伝達され得るかについて細胞内シグナル経路について検索した。その結果、ヒト関節滑膜にはAng-1のリガンドTie-2が発現しており、ヒト滑膜細胞においてTie-2を介するAng-1シグナルはPI3Kinase(PDK/Akt)経路およびMAPkinase(MEK/ERK)経路の両経路をへて伝達されることが見出された。

表1. ANG-1 mRNAの269Gly欠損型変異の頻度

	N	Gly欠損 ホモ (+/+)	ヘテロ (Mt/+)	Gly挿入 ホモ (mt/mt)
対照	59	7 (11.9%)	46 (78.0%)	6 (10.1%)
RA	13	6 (46.2%)	3 (23.0%)	4 (30.8%)
MCTD	12	4 (33.3%)	4 (33.3%)	4 (33.3%)

D. 考察

ANG-1遺伝子変異の分子作用機構については、現在のところ遺伝子変異が血管新生を促進するとする予備的結果しか得られていないが、今回の研究では、なぜMCTDにはSLE等よりも関節炎が進行性であるのかについて、解答が用意される可能性が提示された。すなわち、ヒト関節滑膜にはAng-1分子のリガンドTie-2が在って、このリガンドから実際に分子内シグナルが伝達されていた。さらに、ANG-1 mRNAのスプライシングを検討した結果では、RAと類似して血管新生促進型の変異遺伝子保有例が多く認められた。このことは、MCTDにおいては遺伝素因として、血管新生が促進される傾向にあることが示唆される。今後さらに、見出された3つの疾患遺伝子の病態への寄与を臨床的および分子生物学的に解明すると共に、多因子遺伝の遺伝様式を解明してゆく必要があると思われる。

E. 結論

MCTDの遺伝素因に関わる要素として、RAの疾患遺伝子の一つANG-1遺伝子多型について、mRNAスプライシングを手掛りに検索したところ、血管新生促進型の変異遺伝子多型がMCTDに集積している傾向が認められた。ヒト関節滑膜にはAng-1シグナルを伝達する特異的受容体Tie-2が存在し、Tie-2を介するAng-1シグナルはPI3Kinase(PDK/Akt)経路およびMAPkinase(MEK/ERK)経路の両経路をへて伝達され、しかもこの両経路がそれぞれ独立に作動することが見出された。

F. 健康危険情報

研究結果からは健康に害となる情報は得られていない。

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

国際出願 PCT/JP03/00089

慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、そのタンパク質、それらを利用した慢性関節リウマチの発症可能性の判定方法および判定キット、並びに、慢性関節リウマチの治療方法及び治療薬剤

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

分担研究者：高崎芳成 順天堂大学医学部膠原病内科助教授
研究協力者：松下雅和、山田浩史、縄田益之、池田圭吾、松平 蘭、
金田和彦、橋本博史 順天堂大学医学部膠原病内科

研究要旨

MCTDは全身性エリテマトーデス(SLE)、強皮症(SSc)および多発性筋炎(PM)の臨床症状を併せ持ち、抗U1 RNP抗体陽性を特徴とする疾患で、骨破壊や変形を伴わない関節炎が60-70%の症例に認められると報告された。しかし、その後多くの研究者により、30%以上の頻度で関節リウマチ(RA)と同様の骨破壊性関節炎が認められる事が明らかにされ、RAも本症を構成する一つのエレメントと考えられるようになった。一方、最近、RAに高い感度で特異的に検出される自己抗体として抗CCP（環状シトルリン化抗原）抗体が報告され、本抗体は発症前、もしくは早期のRA患者にでも検出されことからそのRAにおける高い診断的意義が注目されている。しかし、MCTDのRA様病変との関連性についてはは明らかにされておらず、我々は、自験例を対象とし、本抗体のMCTDにおける診断的意義について検討を加えた。その結果、RA患者では85%の症例に検出されたのに対し、MCTDでは9%でのみ陽性で、8例のRAの診断基準を満たす症例の抗CCP抗体陽性率も50%と有意に低率となっていた。MCTD患者におけるRAの診断基準を満たす症例は、ほぼ全例がSLEとSScの重複群で、骨破壊性の病変も主として手に認められ、通常のRAとは異なる病態を有することが示唆された。また、抗CCP抗体陽性でRAの診断基準を満たさない一群は、重複してMCTD以外の膠原病の診断基準を満たさず、全例がシェーグレン症候群(SjS)を合併していた。以上の結果から、抗CCP抗体はMCTDでもRA様の骨破壊性関節炎と相関を有し、その診断に有用ではあるものの、SjSとの相関も示唆され、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARDs）の投与を行う場合には慎重に考慮する必要があることが示された。

A. 研究目的

MCTDは、RAに次ぐ高い頻度で骨破壊性の関節炎を認める膠原病として知られている¹⁾。一方、抗CCP抗体はRAに対して高い感度と特異性を有する自己抗体として報告されたが、MCTDにおける関節炎との関連性については検討されていない。そこで今回、我々は自験MCTD患者を対象とし、抗CCP抗体のMCTDにおける臨床的意義について検討を加えた。

B. 対象および研究方法

1)対象

自験MCTD86例、RA96例、SLE42例、SSc23例、PM/皮膚筋炎(DM)21例、およびSjS17例を対象とした。

2)方法

抗CCP抗体の測定はvan Venrooijらによって開発されたsecond generation anti-CCP ELISA system (DIASSTAT Anti-CCP ELISA test purchased from Axis-Shield, Dundee, UK)を用いて行った²⁾。血清を100倍に稀釈し、その後、添付の手引きに従って検査を実施した。optimal cut-off value (4.5 U/ml)はoperating characteristic curveに基づいて決定した。

C. 研究結果

1)各種膠原病における抗CCP抗体の検出率

抗CCP抗体は、RAの85%に検出され、MCTDの9%、SLEの14%、SScの13%、PM/DMの14%、およびSjSの18%に比較し、有意に高率となっていた(図1)。また、RAの診断基準を満たす8例における検出率は50%で、

これも RA に比較して有意に低率となっていた ($p < 0.001$)。

2) 抗 CCP 抗体陽性 MCTD 患者の臨床的特徴

抗 CCP 抗体陽性 MCTD 患者数は 8 例と限られていたが、朝のこわばり、持続性関節炎、対称性関節炎、関節変形、および x-線上的骨びらんなどの所見は抗体陰性群に比較して有意に高率で、さらに SSc 様病変の出現率が高い傾向にあるのに加え、乾燥症候群が有意に高率に認められていた (表 1、 $p < 0.05$)。一方、RA の診断基準を満たす 8 例の臨床的特徴を検討すると (データは示していない)、抗 CCP 抗体の出現率とともに (50% vs 5%、 $p < 0.05$)、広汎型皮膚硬化の出現率が陰性群に比較して有意に高率となっていることが示された (75% vs 24%、 $p < 0.001$)。

3) RA の診断基準を満たす症例と抗 CCP 抗体陽性 MCTD 患者の疾患スペクトラム

RA の診断基準を満たす 8 例と抗 CCP 抗体陽性で RA の診断基準を満たさない 4 例の MCTD 患者の疾患のスペクトラムを検討すると、表 2 に示すように前者では RA に加え SLE および SSc の診断基準をほぼ全例が同時に満たし、後者ではこのような重複症候群は認めず、SjS の診断基準を全例が満たしていることが注目された。

4) 抗 CCP 抗体価と臨床経過

抗 CCP 抗体陽性例と陰性例における抗 CCP 抗体価と臨床経過を図 2 および 3 に示す。図 3 の抗 CCP 抗体陽性例は 1978 年 5 月 16 日に当院を受診、その際 SLE を疑われ、両手関節に関節炎を認めていたものの、骨びらん等、RA の定型的な x-線所見は認めなかった。抗 CCP 抗体は 1980 年 7 月に陽性が確認されているが、1981 年には骨破壊性の関節炎が図 2B に示すように確認された。その後、腎炎などを併発しステロイド薬を投与されているが抗 CCP 抗体は陰性化せず、図 2C に示すように DMARDs による治療にかかわらず増悪を示している。

一方、図 3 の抗 CCP 抗体陰性例は 1982 年 10 月 1 日に当院を受診、全経過を通して抗 CCP 抗体は検出されていない。受診時の診断は MCTD で RA 様の変化は認めていなかったが、1984 年には定型的な骨破壊性関節炎が確認され (図 3B)、種々の DMARDs の治療に抵抗を示し、図 3C に示すように進行した。

D. 考察

RA は骨破壊と関節の変形をもたらす原因不明の慢性関節炎を主徴する疾患であるが、MCTD の病態を形成する一つの要素として考えられている¹⁾。抗 CCP 抗体は最近新たに発見された自己抗体であるが、その検出に用いられる環状の合成ペプチドのアミノ酸配列は、RA に特異的な抗体として報告された抗核膜周囲抗体や抗ケラチン抗体の対応抗原として同定されたフィラグリンのアルギニンがシトルリン化されたアミノ酸配列に基づいている²⁾。第一世代の抗 CCP 抗体測定 ELISA はフィラグリンの配列と同一のものであるが、今回用いた第二世代の ELISA では無作為に配列を変更したペプチドのなかから最も RA に対して特異性と感度の高いものを選択し、抗原源として用いられている³⁾。この意味で、真の抗 CCP 抗体の対応抗原は不明であるが、Serra らはフィブリンが一連の抗シトルリン化抗原抗体の対応抗原である可能性を指摘している³⁾。

RA における抗 CCP 抗体の臨床的意義に関する報告は多数認められ、80% 以上の感度と 90% 以上の特異性が確認され、リウマトイド因子を凌ぐ疾患標識抗体であることが示されている²⁾。我々はこの点に着目し、MCTD の RA 様関節炎における意義について検討を加えたが、その陽性率は RA に比較して有意に低く、半数が陰性になっていた。従来より SSc と SLE の重複例では骨破壊性の関節炎が出現することは報告されていたが¹⁾、我々の症例における RA 診断基準を満たす群も SSc と SLE の重複例で、これらの病態における関節炎には定型的な RA とは異なる病態が存在していることも示唆された。このことは長年に渡って抗 CCP 抗体が陰性にもかかわらず、強い骨破壊を有す症例がいることから示唆される。また、MCTD ではしばしばステロイド薬が治療に用いられ、その修飾を受けて抗 CCP 抗体が陰性化している可能性も考えられたが、経過を追った症例ではステロイド薬の治療に抵抗して高い抗体価が維持されていたことが示された。

一方、RA の診断基準を満たさない群にも抗 CCP 抗体が検出されたが、これらの患者群では SjS が全例に認められ、確定診断を満たす複数の膠原病の重複が認められない特徴が示された。最近、抗 CCP 抗体と SjS の相関を示唆する報告もされ⁴⁾、自験 SjS でも 18% と比較的高い頻度で検出されたことから MCTD 患者群でも SjS との関連において本抗体が検出された可能性も否定できない。

E. 結論

抗CCP抗体はMCTDにおいてもRA様病変と強い相関を認め、診断に有用と考えられたが、SjSを有する非重複群でも本抗体が検出されることから本抗体陽性群に対するDMARDsの使用に関しては十分その点に留意することが求められる。

文献

1. Halla JT, Hardin JG: Clinical features of the arthritis of mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 21: 497-503,1978.
2. van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H: Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 60: 383-8,2002
3. Vincent C, de Keyser F, Masson-Bessière C, Sebbag M, Veys EM, Serre G. Anti perinuclear factor compared with the so called 'antikeratin' antibodies and antibodies to human epidermis filaggrin, in the diagnosis of arthritides. *Ann Rheum Dis* 58:42-8, 1999
4. Mignot-Grootenberg S, Cohen-Solal J, Desmoulins F, Aucouturier F, Goetz J, Nicaise-Roland P, et al. 15% prevalence of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 48 9 suppl: S569, 2003

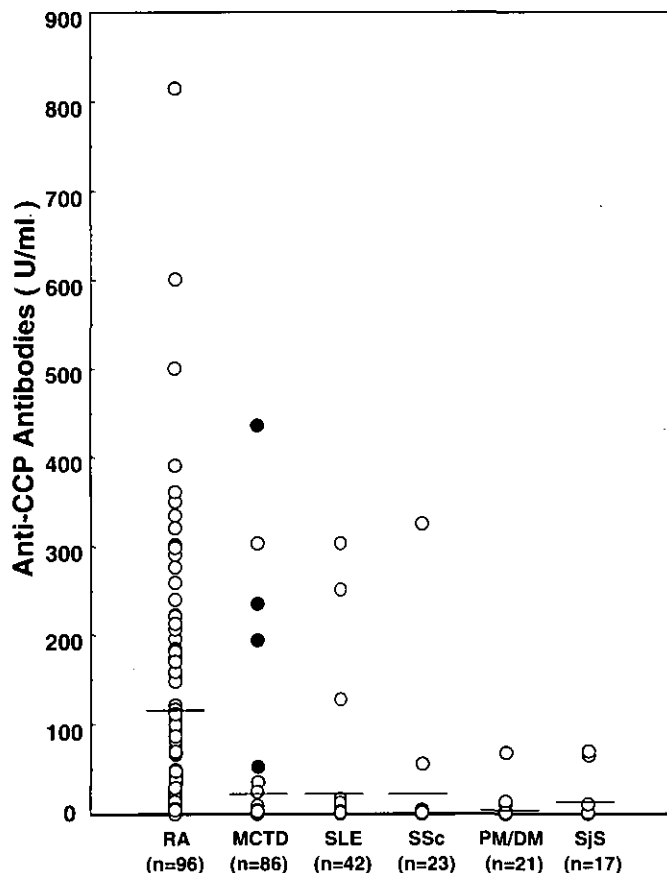


図1 各種膠原病における抗CCP抗体

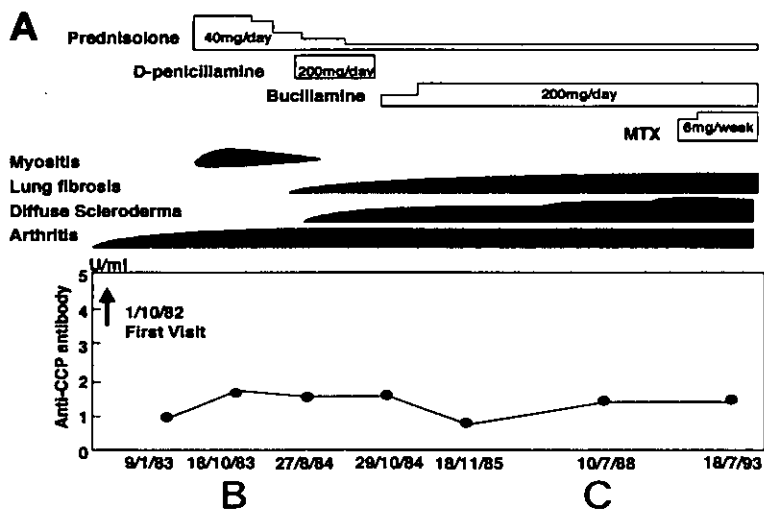


図1. 症例1 経過表

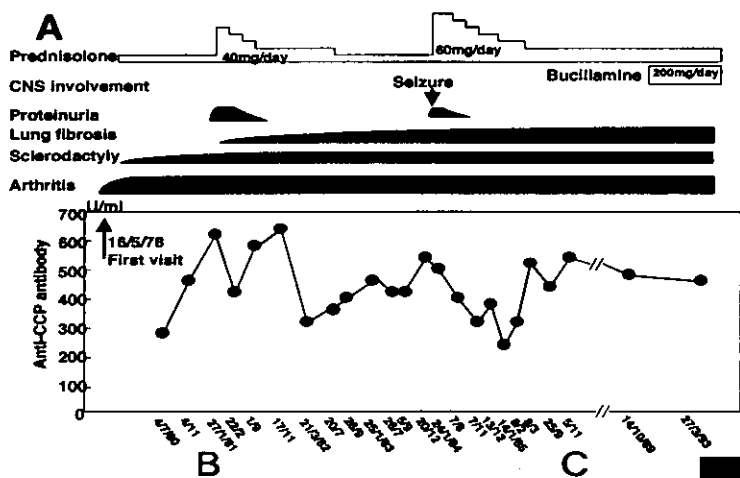


図2. 症例2 経過表

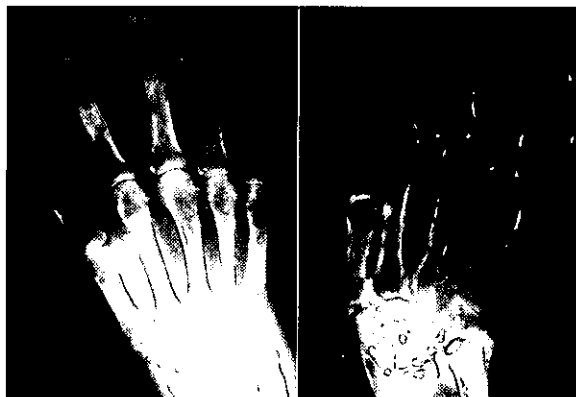


Table 1. Clinical characteristics of MCTD patients with anti-CCP antibodies

Clinical features	Patients	
	with anti-CCP Abs	without anti-CCP Abs
	(n=8)	(n=78)
Raynaud' phenomenon	100 %	100 %
Swollen fingers/hand	100	100
Joint involvement		
Morning stiffness	100 [†]	8
Arthralgia	100	99
Arthritis	100	95
Persistent arthritis (> 6weeks)	63 [†]	8
Symmetric arthritis	63 [†]	5
Deformity	50 [†]	3
Erosion (bone radiography)	63 [†]	5
Photosensitivity	0	11
Malar rash	0	14
Alopecia	13	6
Pleuritis	0	8
Pericarditis	13	5
Lymphadenopathy	50	33
CNS involvement	13	3
Proteinuria	38	51
Hemolytic anemia	13	3
Leukopenia	75	65
Thrombocytopenia	0	16
Muscle weakness	63	45
Myalgia	75	58
Sclerodactyly	50	62
Diffuse scleroderma	50	28
Digitā ulcer	50	28
Dilatation of esophagus	13	14
Lung fibrosis/Interstitial pneumonitis	63	33
Pulmonary hypertension	13	3
Sicca complex	88 [‡]	21
Hyper gammaglobulinemia	88	90
Anti-dsDNA Ab	75	68
Anti-Sm Ab	25	24
Anti-SS-A/Ro Ab	50	21
Anti-SS-B/La Ab	13	0
Hypocomplementemia (CH50 <25)	13	24
Rheumatoid factor	88	67

Abs : antibodies, CNS: central nervus system, CK: creatine kinase, VC: vital capacity, Dlco: Diffusion level of carbon monoxide, dsDNA: double stranded DNA, Ab: antibody.

[†] P <0.001, [‡] P <0.05

Table 2. Disease spectrum of 8 MCTD patients who fulfilled criteria for RA, and 4 anti-CCP positive MCTD patients who did not fulfill criteria for RA

Patient	Anti-CCP antibody	Diseases Spectrum
8 MCTD patients		
who fulfilled the criteria		
Patient 1	-	RA + SLE +SSc
Patient 2	+	RA + SLE +SSc
Patient 3	+	RA + SLE +SSc + SjS
Patient 4	-	RA + SLE +SSc +PM
Patient 5	-	RA + SSc + SjS
Patient 6	+	RA + SLE +SSc +SjS
Patient 7	+	RA + SLE +SSc +SjS
Patient 8	-	RA + SLE + SSc + PM
4 MCTD patients		
who did not fulfill the criteria		
Patient 9	+	SSc + SjS
Patient 10	+	SLE + SjS
Patient 11	+	SjS
Patient 12	+	SjS

ANTI-CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE ANTIBODIES IN PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASES

Yoshinari Takasaki, Masakazu Matsushita, Hirofumi Yamada, Masuyuki Nawata, Keigo Ikeda, Ran Matsudaira, Kazuhiko Kaneda, and Hiroshi Hashimoto

Department of Internal Medicine and Rheumatology, Juntendo University School of Medicine

Objective. To assess the clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies in patients with mixed connective tissue disease (MCTD).

Methods. Eighty-six serum samples from MCTD patients, 96 from rheumatoid arthritis (RA) patients, 42 from systemic lupus erythematosus (SLE) patients, 23 from systemic sclerosis (SSc) patients, 21 from polymyositis/dermatomyositis (PM/DM) patients, and 17 with Sjögren's syndrome (SjS) patients were tested for anti-CCP antibodies using the DIASTAT Anti-CCP ELISA.

Results. Among 96 patients with RA, anti-CCP antibodies were detected in 85%, and the frequency was significantly higher than in MCTD, SLE, SSc, PM/DM or SjS (9%, 14%, 13%, 14% and 18%, respectively; $P < 0.0001$). Among 8 MCTD patients who fulfilled the diagnostic criteria for RA, only 50% had anti-CCP antibodies and the prevalence was significantly lower than in RA ($p < 0.01$), although their titers were high. All 8 patients who fulfilled the criteria for RA had overlap of SLE and SSc, whereas the 4 anti-CCP positive patients who did not fulfill the criteria for RA had SjS without overlapping features of SLE and SSc, and their antibody titers were low. Longitudinal studies showed the severe joints destruction occurred in parallel with the increase of anti-CCP antibodies.

Conclusion. These results suggested that we must consider the initial therapy for RA when MCTD patients with overlap syndrome of SLE and SSc have the high titer of antibodies to CCP, but careful differential diagnosis is required if patients with SjS and the low titer of anti-CCP antibodies lack overlapping of SLE and SSc.

混合性結合組織病における肺高血圧症の合併頻度調査

分担研究者：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
研究協力者：深谷修作 藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科
研究協力者：岡田 純、近藤啓文 北里大学医学部内科

研究要旨

【目的】混合性結合組織病（MCTD）には高率に肺高血圧症（PH）を合併することが知られている。しかし、その頻度については報告により大きく異なり、正確な合併頻度は明らかでない。そこで、正確な合併頻度を明らかにすることを第1の目的とした。また、肺機能検査や肺血流シンチグラフィにより、MCTDに合併したPHの病因・病態を検討することを第2の目的とした。【方法】本研究班の臨床系の班員が所属する医療施設を受診した全例のMCTD患者を対象とした。平成15年9月中旬から11月中旬までの2ヶ月間を調査期間とした。調査項目は、PHに特徴的な臨床症状の有無、胸部X線写真、心電図、心エコー検査、肺機能検査、肺血流シンチグラム、右心カテーテル検査とした。【結果】199例に調査が行われた。心エコー検査施行例169例中38例（22.5%）にPHの合併を認めた。PHに特異的な臨床所見を認めた症例で高率にPHを合併していた（ $p=0.0001$ ）。しかし、PH合併例の64.1%はこれらの所見を認めなかった。また、これらの所見を認めた症例では認めなかった症例に比し、推定肺動脈（PA）圧は有意に高値であった（ $p<0.0001$ ）。さらに、これらの所見の陽性項目数と推定PA圧とは正相関を認めた（ $p=0.0002$ ）。肺機能検査施行例は25例しかなく、十分な検討はできなかった。肺血流シンチグラフィ施行例も18例しかなく、十分な検討はできなかったが、外科的治療の対象となる慢性マクロ血栓症を示す所見を呈した症例はなかった。【結語】1. MCTDのPH合併率は22.5%であった。2. PH合併のスクリーニングには心エコー検査が必要と考えられた。3. MCTDに合併したPHの病因・病態を検討するには肺機能検査や肺血流シンチグラフィ施行例を増やす必要がある。

A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）では高率に肺高血圧症（PH）の合併を認めることが知られている。しかし、合併率の報告は1施設の少数例での検討であったり、多施設多数例での検討であってもPHの診断が主治医の判断によるもので、PHの検索が十分になされていないものであった。そこで、PHを示唆する臨床症状や胸部X線所見、心電図所見だけでなく、少なくとも心エコー検査まで行ってPHの合併について判断し、正確なPH合併率を明らかにすることを第1の目的とした。

また、PHには前毛細血管性や後毛細血管性PH、慢性マクロ血栓症によるPH、慢性ミクロ血栓症によるPHがある。MCTDに合併するPHの多くは前毛細血管性PHと考えられているが明らかではない。また、慢性マクロ血栓症によるPHは、外科的治療が第1選択であり、それにより完治せうる可能性がある。したがっ

て、PHの原因として慢性マクロ血栓症を検討することは不可欠と考えられる。そこで、MCTD例、特にPH合併例において肺機能検査や肺血流シンチグラフィを施行し、PHの病因を検討することを第2の目的とした。

B. 研究方法

調査期間は平成15年9月中旬から11月中旬までの2ヶ月間とした。対象は上記調査期間中に、本研究班の臨床系班員が所属する医療機関を受診したMCTD患者の全例とした。MCTD PH診断の手引き¹⁾に記載されている①労作時の息切れ、②胸骨左縁収縮期性拍動、③第II肺動脈（PA）音の亢進、④胸部X線写真でのPA本幹部の拡大または左第2弓突出、⑤心電図での右室肥大または右室負荷所見、の6項目を必須の調査項目とした。⑥心臓超音波検査での推定PA圧と⑦右心カテーテルでの平均PA圧はどちらかまたは両方を求めた。①か

ら⑦の何れかに陽性所見を認める場合は、⑧肺機能検査(%DLCO、%1秒率、TLC、%VC)と⑨肺血流シンチグラムを調査項目に加えた。陽性所見を認めなかった場合でも⑧、⑨の回答は妨げないこととした。また、MCTD以外に診断可能な膠原病についても回答を求めた。各医療機関に調査用紙を送付し、平成16年1月17日を回答期限とし、調査票を回収した。

PH合併の有無の判定はこれらの調査項目からMCTD PH診断の手引きに準拠して行い、MCTDにおけるPHの合併率をもとめた。①から⑤の項目とPH合併の有無、PA圧との相関を検討した。また、MCTD以外の診断可能な膠原病の存在とPH合併の有無との関連も検討した。

PHの病因の検討のため、肺機能検査結果とPHの有無およびPA圧、肺血流シンチグラムにおける慢性マクロ血栓症を示唆する所見の有無、肺血流シンチグラム所見とPHの有無との関連を検討した。

推計学的検討は、合併率の差の検定には χ^2 検定、平均値の差の検定にはt検定、相関の検定には回帰分析、Spearmanの順位相関を用いた。

C. 結果

199例の回答が得られた。PH合併例は39例(19.6%)であった。MCTD以外の診断可能な膠原病とPH合併の有無とは関連を認めなかった。次に、研究方法で述べた①から⑤のPHの合併を示唆する臨床症状・所見を少なくとも1つ以上認めたか否かでPH合併頻度の差を検討した。これらの症状・所見を認めたのは31例で、14例(45.2%)にPHが合併していた。認めなかった165例ではPHの合併は25例(15.2%)であり、これらの症状・所見を認めた症例でPHの合併は有意に高頻度であった($p=0.0001$)。しかし、PH合併例39例中25例(64.1%)で、これらの症状・所見を認めなかった。心エコー検査施行例に限定して検討したところPHの合併は169例中38例(22.5%)であった(表1)。

次に、PH合併例においてPH合併を示唆する臨床症状・所見と心エコー検査による推定PA圧との関連を検討した。これらの症状・所見を認めた群の推定PA圧平均値は 52.6 ± 14.2 mmHgで認めなかった群の 35.8 ± 4.9 mmHgに比し有意に高値であった($p<0.0001$) (図1)。また、これらの症状・所見5項目中の陽性項目数は推定PA圧と正相関を認めた($p=0.0002$) (図2)。

最後に、MCTDに合併するPHの病因・病態を検討するため、肺機能検査所見、肺血流シンチグラム所見とPH

合併の有無、推定PA圧との関連を調べた。肺機能検査施行例は25例と少数で十分な検討ではないが、肺機能検査所見とPH合併の有無、推定PA圧との関連は見いだせなかった。しかし、PH合併例において、%DLCOと%VCの比は 0.657 ± 0.187 でしかも全例1.0以下であった。PH非合併例でのそれは 0.850 ± 0.333 であった。また、肺血流シンチグラフィも18例に施行されていただけで十分な検討ではないが、18例中14例にPHを認め、このうち2例に肺血流シンチグラム所見の異常を認めた。なお、慢性マクロ血栓症を示唆する異常を呈した症例はなかった。

D. 考察

MCTD患者では高率(22.5%)にPHの合併を認めた。この合併率は以前の厚生労働省MCTD研究班の報告²⁾に比し高率であった。この理由として、以前の報告ではPH合併の判定は主治医に委ねられており、PH合併を示唆する臨床症状・所見を認めない症例には心エコー検査が施行されておらず、PHの合併が見逃されていた可能性が考えられる。今回の調査でPH合併例のうち、これらの症状・所見を認めなかった症例を除くと以前の報告と同程度(7.5%)の合併率となることもこの可能性を支持する。注目すべきはPH合併例の64.1%が、これらの症状・所見を認めなかったことである。心エコー検査未施行の状態(換言すれば、PHの合併を示唆する臨床症状・所見を認めないというだけで)PH合併を否定することはできないと考えられた。MCTDに合併するPHのスクリーニングには、WHO原発性PHワールド・シンポジウム(1998年)で提唱された「強皮症スペクトラムの疾患ではPHの徴候のあるなしに関わらず、心エコー検査を毎年実施することが推奨される」を実践することが必要である。さらに、MCTDに合併したPHの(自然)経過を正しく知るためにも、積極的にPHの検索を行い、軽症PH例を継続的に観察していく必要がある。

しかし、PH合併を示唆する臨床症状・所見はPHと無関係なのだろうか。そこで、PH合併例でこれらの症状・所見の有無、5項目中の陽性項目数と推定PA圧との関連を検討した。これらの症状・所見を認めた群では認めなかった群に比し推定PA圧は有意に高値で($p<0.0001$)、陽性項目数と推定PA圧とも有意な正相関を認めた($p=0.0002$)。すなわち、これらの症状・所見はPHの程度(PA圧)を推測するには有用な指標と考えられた。

PH合併の有無や推定PA圧と肺機能検査所見との関連は見いだせなかった。しかし、肺線維症や他の原因により生じる拡散障害の指標である%DLCOと、主に肺線維症の程度の反映と考えられる%VCとの比は、PHを合併した症例では合併していない症例に比し低値の傾向を認め、合併例では全例1.0以下であった。すなわち、PH合併例では仮に肺線維症を合併していたとしても、線維化の程度に比し%DLCOがより低下しており、MCTDに合併するPHは主に前毛細血管性であるとする従来の考えを支持するものであった。肺血流シンチグラムは施行例が少なく、症例数を増やして検討する必要がある。

E. 結論

1. MCTDのPH合併率は22.5%であった。
2. PH合併のスクリーニングには心エコー検査が必要である。
3. MCTDに合併したPHの病因・病態を検討するには肺機能検査や肺血流シンチシンチグラフィ施行例を増やす必要がある。

文献

1. 厚生省結合組織病調査研究班：混合性結合組織病の肺高血圧症診断の手引き. リウマチ31:159-166, 1991
2. 鳥飼勝隆, 深谷修作, 国枝武義ほか：混合性結合組織病患者における肺高血圧症の合併率調査. 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:24-27, 1999

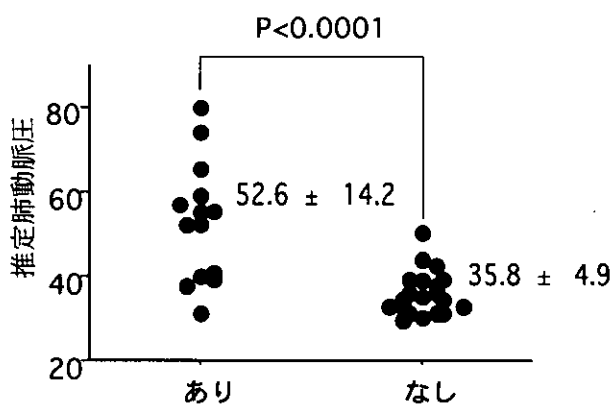
表1. PHを示唆する臨床症状・所見の有無とPHの有無 右の表は心エコー検査施行例に限定

	臨床症状・所見の有無		
	あり	なし	計
PHあり	14	25	39
PHなし	17	140	157
計	31	165	196

P=0.0001

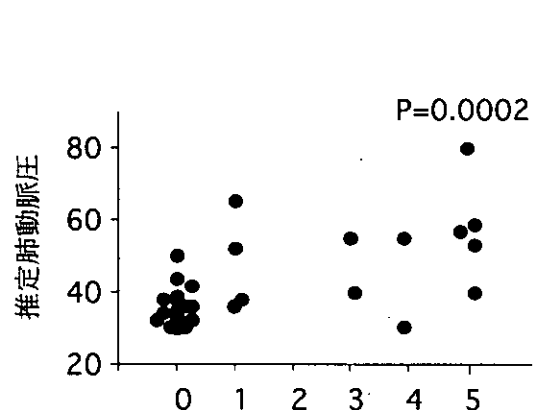
	臨床症状・所見の有無		
	あり	なし	計
PHあり	14	24	38
PHなし	16	140	131
計	30	115	169

P=0.0005



PH合併を示唆する臨床症状・所見の有無

図1. 臨床症状などの有無と推定肺動脈圧



臨床症状などの陽性項目数

図2. 臨床症状などの陽性項目数と肺動脈圧

THE PREVALENCE OF PULMONARY HYPERTENSION IN PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE

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

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

Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine²⁾

Mixed connective tissue disease (MCTD) is frequently complicated by pulmonary hypertension (PH), but its reported prevalence has differed widely. The purpose of this project was twofold: (1) to accurately determine the prevalence of PH in patients with MCTD and (2) to analyze the pathophysiology of PH with MCTD using the pulmonary function test and pulmonary flow scintigraphy.

The subjects were all MCTD patients who visited the hospitals of the members of the Research Committee for MCTD during 2 months between mid-September and mid-November, 2003. The parameters investigated were the following diagnostic criteria of PH in patients with MCTD as developed by the former Research Committee for MCTD: clinical symptoms characteristic of PH, chest X-ray, electrocardiography, echocardiography, pulmonary function tests, pulmonary flow scintigraphy, and the right cardiac catheterization test.

Data were collected from 199 patients. Of 169 patients in whom echocardiography was performed, 38 patients (22.5%) had PH. The patients with clinical features characteristic of PH exhibited a significantly higher frequency of PH ($p=0.0001$). However, 64.1% of PH patients did not present any characteristic clinical features. The patients that did present clinical features had significantly higher calculated pulmonary artery pressure (PAP) than those without ($p=0.0001$), and the number of such clinical features was positively correlated with PAP ($p=0.0002$). Pulmonary function tests were performed in only 25 patients, so these data could not be analyzed statistically. Pulmonary flow scintigraphy was performed in 18 patients, and chronic macrothromboembolism was not found among these patients.

We found that (1) 22.5% of MCTD patients had PH, (2) echocardiography was needed for the screening of PH, and (3) pulmonary function tests and pulmonary flow scintigraphy were required for analyzing the pathophysiology of PH complicated by MCTD.

Bone morphogenetic protein-II (BMP-II)と膠原病の肺高血圧症

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：石川 章、近藤啓文 北里大学医学部内科

研究要旨

目的：原発性肺高血圧症(PPH)に BMPR-II の遺伝的異常が存在することが証明されたが、PPH だけでなく、2 次性 PH においても angiotensin-1 の増加と BMPRII の異常が関与すること報告されている。そこで、BMPR-II の機能障害があるとすれば、血中の BMP-II がどのような状態であるを明らかにする必要がある。BMP は骨形成因子だけでなく、種々の組織の形成を制御する因子として作用している。そこで、血清中の BMP と膠原病に基づく PH との関係を検討した。

方法・対象：膠原病患者血清を用いて、BMP-II を ELISA にて測定し、その基礎疾患、臨床像、肺高血圧症との関連を検討した。健常人血清 26 例、PM-DM, SSc, MCTD, および PH を合併した膠原病 (28 例) を対象にした。

結果：健常人 26 例の血清 BMP-II の平均は 2.0 ± 4.6 pg/ml であった。健常人の平均プラス 5SD である 25.1 以上を BMP-II 上昇と判定した。SSc では 77.5 ± 66.8 : 12/15 80% 陽性) であった。PM-DM では 69.3 ± 54.8 : 12/16 75% 陽性であったが、MCTD では、 78.5 ± 46.3 : 17/17 100% 陽性と全例で上昇していた。PH 群では 103.3 ± 53.1 と最も高値を示し、全例上昇しており、PM-DM 群に比べると有意に高値であった ($p=0.02$)。そこで、BMP-II レベルと肺動脈圧との関係を検討した。肺動脈圧 (収縮期) と血清 BMP-II との関連を検討した。BMP-II 高値が PA 圧も高い傾向 ($R^2=0.198, p=0.01$) がみられら。

結語：PH には BMPRII の異常が関与することが推測されているが、その対応するリガンドである BMP-II の上昇が PH 例に見られた。これが、BMPR-II の機能異常によるために 2 次的に起きた現象かを明らかにすることが重要と考えられた。

A. 研究目的

原発性肺高血圧症(PPH)に bone morphogenetic protein receptor (BMPR)-II の遺伝的異常が存在することが証明された¹⁻³⁾。BMPRII の異常は、bone morphogenetic protein(BMP)-II を介した細胞内シグナル伝達の障害を来し、肺血平滑筋細胞の増殖により肺高血圧が生じることが推測されている^{2, 3)}。一方、PPH だけでなく、2 次性 PH においても angiotensin-1 の増加と BMPR-II の異常が関与すること報告されている⁴⁾。我々も、MCTD 関連の肺高血圧症で、抗 BMPR-II 抗体が存在することを報告してきた⁵⁾。今回は、PH 症例の BMPR-II の機能障害があるとすれば、血中の BMP-II がどのような状態であるかを明らかにする。BMP は骨形成因子だけでなく、種々の組織の形成を制御する因子として作用している。そこで、血清中の BMP と膠原病に発症した PH との関係を検討した。

B. 研究方法

患者血清中の BMP-II を ELISA にて測定した。健常人平均プラス 5SD 以上を BMP-II の上昇と判定した。BMP-II の ELISA は R&D Systems Inc のキットを使用し、 -30°C の保存しておいた血清を用いた。対象とした疾患は、健常人血清 26 例、PM-DM, SSc, MCTD, SLE, および PH を合併した膠原病 (28 例) を対象とした。肺高血圧症に関しては、ドップラー心臓超音波検査または右心カテーテルにて、PA 圧を確認できた症例を対象とした。

C. 研究結果

健常人 26 例の血清 BMP-II の平均は 2.0 ± 4.6 pg/ml であった。健常人の平均プラス 5SD である 25.1 以上を BMP-II 上昇と判定した。SSc では 77.5 ± 66.8 : 12/15 80% 陽性) であった。PM-DM では 69.3 ± 54.8 : 12/16 75% 陽性、SLE で、 51.2 ± 34.8 であったが、MCTD

では、 $78.5 \pm 46.3:17/17$ 100%陽性と全例で上昇していた(図1)。各群間では有意差がなかった、MCTDで多い傾向が見られた。一方、膠原病でPHを伴う症例を抽出し、これをPH群として検討した。PH群では、BMP-IIの平均値は 103.3 ± 53.1 と最も高値を示し、全例上昇しており、PM-DM群、SLE群に比べると有意に高値であった($p=0.02$, $p=0.008$) (図2)。

そこで、BMP-IIレベルと肺動脈圧との関係を検討した。心臓超音波検査、または右心カテーテルで得られた収縮期肺動脈圧と血清BMP-IIとの関連を検討した。BMP-II高値時にPA圧も高い傾向($R^2=0.198$, $p=0.01$)がみられた(図3)。

D. 考察

本研究では、肺高血圧症の発症に関連したBMPRII分子のlegandであるBMP-IIが膠原病のPHに関連しているかを明らかにすることを目的とし検討した。BMP-IIは骨形成因子で、通常は骨折などで上昇する。しかし、BMP-IIには骨形成以外にも種々の生理作用があることが明らかにされている。膠原病のPH症例でBMPRIIが何らかの障害がある場合には、BMP-IIの反応性も変化する可能性や、膠原病のPHでは何らかの理由で、血清BMP-IIが過剰に産生され、BMPRIIの異常を補間している可能性推測される。今回の結果は、膠原病各種疾患では、BMP-IIの上昇例が多く、特にMCTD Sscでは平均値が高かった。これらの疾患はレイノー現象など血管病変を有する疾患である。一方、肺高血圧症合併膠原病では、BMP-II値が他の膠原病よりも高値であった。しかも、収縮期PH圧との関連をみると有意の正の相関がみられたことは、BMP-IIの上昇が肺高血圧症を反映している可能性が推測された。

一方、最近、家族性PPHのおよび一部散発性のPPHの発症に、BMPRII遺伝子異常が存在することが報告され、BMPRIIの機能障害がPHに関連することが注目された¹⁻³⁾。さらに、BMPRII遺伝子異常は、家族性のPPHだけではなく、散発性のPPH患者にもBMPRII分子の変異がみとめられることが報告された⁶⁾。BMPRIIに対応するリガンドであるBMP-IIは、骨形成蛋白の一つで、その中でも異所性に骨組織を誘導する生理活性物質として作用する物質として知られていた。BMPRIIは血管にも存在し、BMP-IIのシグナルを受け、BMPRII分子を介した細胞内伝達により、肺動脈の平滑筋細胞の増殖を抑制することが知られている⁷⁾。BMPRII分子に変異が存在し、肺動脈上のBMPRII分子が正常に機

能しないと、平滑筋の増殖を来し、肺高血圧症が生じる。

我々も、膠原病に関連したPHにおいて、BMPRIIを障害する因子がないかを明らかにするため、BMPRIIタンパクに対する自己抗体の検索を行い、PHを伴うMCTD症例に抗BMPRII抗体が存在することを明らかにした⁸⁾。2次性PH症例で、肺組織に恒常的に表現されているangiopoietin-1のmRNAレベルと肺動脈圧とはよく相関することを明らかにした。angiopoietin-1は肺血管内皮細胞中のBMPRI1AのmRNAやタンパクレベルでの完全な抑制を生じる⁴⁾。TIE2受容体のリン酸化もangiopoietin-1同様、肺動脈圧とよく相関する⁴⁾。BMPは、血管内皮細胞上のBMPRI1およびBMPRIIの活性化とheterodimerizationが生じ、細胞内伝達経路の活性化が起こるとされている。すなわち、2次性PH症例でもangiopoietin-1が上昇し、BMPRIIからのシグナル伝達に障害を生じ、肺高血圧を来す機序が存在することが示唆された。

E. 結語

これらの現象から、血中のBMP-IIの上昇は、PHの原因よりは、BMPRIIの障害が起こり、その補間するようにBMP-IIが上昇している可能性も推測される。PHにおける血中BMP-IIとBMPRIIの障害と関連を今後明確にする必要があると考えられる。

文献

1. Nichols WC, Koller DL, Slovis B, et al. Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. *Nat Genet* 1997; 15:277-80
2. Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* 2000;67:737-44
3. Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, et al. Heterozygous germline mutations in BMPRI2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet* 2000;26:81-4
4. Du L, Sullivan CC, Chu D, et al. Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2003;348:500-9

5. 岡田 純, 石川 章, 近藤啓文 北里英郎. 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. 厚生省特定疾患混合性結合組織病2003;平成14年度研究報告書:11-14
6. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding

BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. J Med Genet 2000;37:741-5

7. De Caestecker M, Meyrick B. Bone morphogenetic proteins, genetics and the pathophysiology of primary pulmonary hypertension. Respir Res 2001;2: 193-7

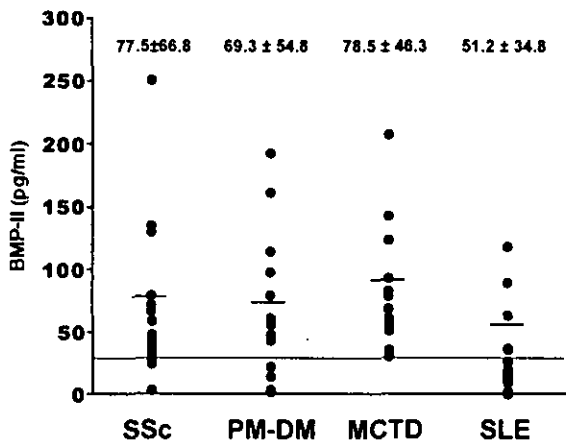


Figure 1. Serum Bone Morphogenetic Protein II in Patients with CTD

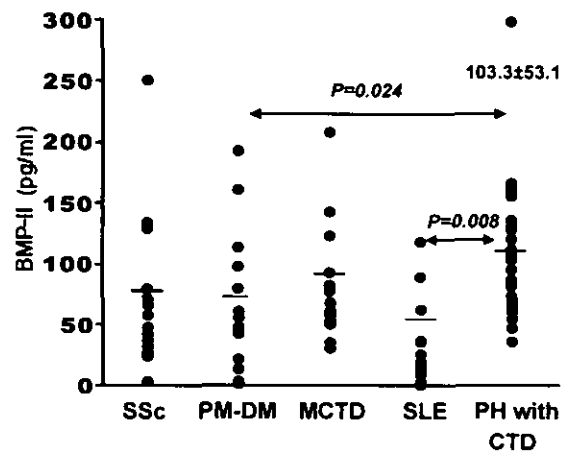


Figure 2. Serum BMP-II in Patients with CTD and PH

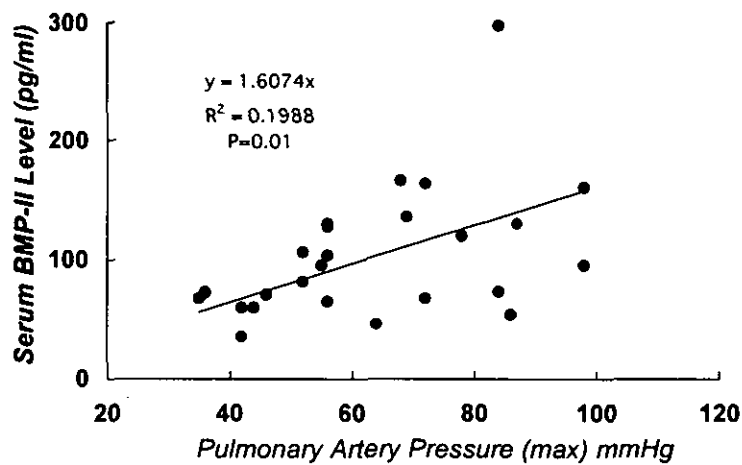


Figure 3. Serum BMP-II in Patients with PH and Systolic PAP

BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-II AND PULMONARY HYPERTENSION IN CONNECTIVE TISSUE DISEASES.

Jun Okada , Akira Ishikawa , and Hirobumi Kondo

Kitasato University School of Medicine
1-15-1 Kitasato Sagamihara 228 JAPAN

Objective: Genetic abnormality of BMPR-II related to development of primary pulmonary hypertension (PPH) was reported. Not only in PPH, but also in secondary PH, the abnormality of angiotensin-1 and BMPR-II were suspected. If some disorders of BMPR-II exist, BMP-II function which is the counter part of BMPR-II, will be supposed to be affected. BMP-II has multiple functions as well as bone formation. Therefore, we investigated the relation between serum BMP-II level and pulmonary hypertension in patients with connective tissue diseases.

Methods and Patients : We measured the serum level of BMP-II in patients and normal individuals using ELISA kit. Serum from 26 normal individuals, 15 SSc, 16 PM-DM, 17 MCTD, 15 SLE and CTD with PH were examined.

Results: Average of BMP-II level of normal individuals was 2.0 ± 4.6 pg/ml. The abnormal elevation was defined as more than $5SD + \text{mean}$ of normal individuals (25.2 pg/ml). The mean level of BMP-II in each group was 77.5 ± 66.9 pg/ml 12/15 80% in SSc, 69.3 ± 54.8 12/16 75% in PM-DM, 78.5 ± 46.3 : 17/17 100% in MCTD, and 51.2 ± 34.8 in SLE. In the group of PH with connective tissue diseases, was elevated in 103.3 ± 53.1 pg/ml significantly compared to the levels of PM-DM ($p=0.02$) and SLE ($p=0.008$). Next, we examined the relationship between the serum level of BMP-II and systolic pressure of PA. There was a significant relationship between these two parameters ($R^2=0.198$, $p=0.01$).

Conclusion; It is suspected that BMP-II elevation was related to PH in patients with CTD.

膠原病性肺高血圧症における骨形成因子（BMP）およびBMP II型レセプター（BMPR-II）に対する自己抗体の検索

分担研究者：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
研究協力者：片山雅夫、玉熊桂子 藤田保健衛生大学医学部リウマチ感染症内科

研究要旨

目的；原発性肺高血圧症（primary pulmonary hypertension; PPH）患者で骨形成因子（bone morphogenetic protein; BMP）II型レセプター（BMPR-II）の高率な遺伝子変異と同患者の肺でのBMPR-IIの発現低下が報告されている。また、PPH様モデルであるモノクロタリン（MCT）誘発肺高血圧症（PH）ラットの肺動脈血管内皮細胞でのBMPR-IIの発現の低下を前年度の研究で報告した。そこで、本研究では膠原病性PH患者における抗BMP、BMPR-II抗体の有無および同抗体の臨床的意義について検討することを目的とした。対象及び方法；方法は培養ヒト肺動脈血管内皮細胞（HPAEC）およびヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を抗原に用いWestern blot法で行った。対象はMCTD35例、全身性エリテマトーデス（SLE）38例、シェーグレン症候群（SS）12例、強皮症（SSc）6例、その他の膠原病13例とした。結果；HPAECおよびHUVECでBMPおよびBMPR-IIの発現を確認した。HUVECを用いた抗BMPR-II抗体の検討で各疾患における抗BMPR-II抗体の陽性率はMCTD、SLEでそれぞれ42.9%（15例/35例）、23.7%（9例/38例）と高率に認められた。しかし、PHの有無で抗BMPR-II抗体陽性率に差はなかった。抗BMPR-II抗体陽性率は抗RNP抗体陽性患者で32.9%（23例/70例）と陰性患者の14.7%（5例/34例）に比して高率であった（ $p < 0.05$ ）。結語；抗BMPR-II抗体はMCTDに高率に認められ、抗RNP抗体との関連が示唆された。

A. 研究目的

肺高血圧症（PH）は混合性結合組織病（MCTD）の予後を左右する重要な合併症であるが、その発症機序は未だ不明である。MCTDや他の膠原病に合併するPHの多くは、原発性PH（PPH）と同様に肺動脈血管病変に基づくものであることが知られている。病理学的には、肺動脈、細小動脈の内膜、中膜の肥厚と内腔の狭小化が特徴である。この内膜、中膜の肥厚には種々のサイトカインや増殖因子の関与が考えられているが、未だ不明である。

最近、家族性（familial）あるいは散発性（sporadic）PPH患者で骨形成因子（bone morphogenetic protein; BMP）II型レセプター（BMPR-II）の遺伝子変異が高率にみられることが報告された¹⁻⁴。これによりBMPのシグナルに異常が起きることによって疾患が生じてくると考えられている。

また、移植のため摘除されたPPH患者の肺を用いた組織化学的検討で、健常人肺に比してPPH患者の肺血

管（主に血管内皮細胞）におけるBMPR-IIの発現の低下が報告された。続発性PH患者の肺組織においても、軽度だがBMPR-IIの発現の低下がみられた³。

これまでの当教室における研究でPPH類似のPHモデルであるモノクロタリン（MCT）誘発PHラット（MCT/PHラット）を用いて、MCT/PHラットのPHに肺動脈血管内皮細胞におけるBMPR-IIの発現低下が関与している可能性について報告した⁵。

しかし、BMPR-IIの膠原病性PHへの関与は明らかでない。BMPR-II遺伝子異常はPPHの家族例では50～60%、散発例では25%にとどまる。また、膠原病性PHでは遺伝子異常はみられていない。膠原病性PHの原因として、BMP・BMPR-II系の関わりとしては、抗BMP抗体、抗BMPR-II抗体など膠原病性PH患者の血清中の自己抗体、血清因子がBMPのBMPR-IIへの結合を阻害する、あるいはBMPのSmad4、Smad2などのシグナル異常などが考えられる。

そこで、本研究では膠原病性PH患者における抗

BMP、BMPR-II抗体の有無および同抗体の臨床的意義について検討することを目的とした。

B. 研究方法

BMP、BMPR-IIの発現の検索のため、培養ヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC) およびヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を抗原に用いてWestern blot法を行った。抗原の調製は、HPAEC、HUVECを各々の培養用培地を用いて培養し、増殖した細胞を回収、洗浄後、一定量の細胞をPBSに浮遊させ、超音波で破碎し遠心を行い、上清を全抽出物として抗原として使用。また、細胞膜抽出法によって膜抗原を抽出したものを各々の細胞膜抽出抗原として使用した。これらの調製抗原におけるBMPおよびBMPR-IIの発現を確認するため、一次抗体としてSanta Cruz Biotechnology社製Goat抗BMPR-II抗体、Rabbit抗BMP抗体を用いた。

対象はMCTD35例、全身性エリテマトーデス (SLE) 38例、シェーグレン症候群 (SS) 12例、強皮症 (SSc) 6例、その他の膠原病13例とした。

これらの症例についてHUVEC全抽出抗原を用いてWestern blot法を行い抗BMPR-II抗体の有無と臨床的所見、特にPHや自己抗体との関わりについての検討を行った。

C. 結果

図1にHPAEC、HUVECそれぞれの全抽出抗原および膜抽出抗原を抗原としたWestern blotの結果を示す。BMPは図左側lane 1のHPAEC全抽出抗原で65kDのバンドがみられたが、同膜抗原では同バンドは検出されなかった (lane 2)。HUVECでも同様であった (lane 3、4)。図右側のBMPR-IIの発現についてはHPAEC、HUVECそれぞれの全抽出抗原、同膜抗原のいずれでも同様に34kDのバンドが検出された。

そこで、まず、抗BMPR-II抗体の有無についてPH合併膠原病患者およびPH非合併MCTD患者血清を用いて検討した (図2)。PH合併膠原病患者8例中3例に同抗体が検出された (lane 1、6、8)。MCTD患者でも陽性患者がみられた (右側 lane 5)。

各疾患における抗BMPR-II抗体の陽性率はMCTD 15例/35例 (42.9%)、SLE 9例/38例 (23.7%)、SS 0例/12例 (0%)、SSc 1例/6例 (16.7%)、その他の膠原病3例/13例 (23.1%) であり、群間で有意差を認めた ($p < 0.05$)。同抗体はMCTD、SLEで高頻

度に出現がみられた。

PHの有無については抗BMPR-II抗体陽性率PH合併例ではTotal 4例/11例 (36.4%)、その内訳はMCTD 3例/8例 (37.5%)、SLE 1例/2例 (50%)、SSc 0例/1例 (0%) であった。PH非合併例ではTotal 24例/93例 (25.8%)、内訳はMCTD 12例/27例 (44.4%)、SLE 8例/36例 (22.2%)、SS 0例/12例 (0%)、SSc 1例/5例 (20%)、その他の膠原病3例/13例 (23.1%) であった。PHの有無は主治医判断によったものであるがPHの有無で抗BMPR-II抗体の陽性率に差は認めなかった。

臨床および検査所見、超音波心ドプラー法などを用いたMCTDのPH診断の手引きを用いて検討できたMCTD患者14例におけるPHの有無と抗BMPR-II抗体の関係では、PH合併例では2例/7例 (28.6%)、PH非合併例では4例/7例 (57.1%) で抗BMPR-II抗体が陽性であった。PHの有無で抗BMPR-II抗体の陽性率に有意な差はなく、むしろPH非合併例に陽性率が高い傾向がみられた。

そこで、今回検討した症例はMCTD始め、各疾患における抗RNP抗体陽性者数がMCTDで35例すべて、SLEでは39例中25例、SS 12例中1例、SSc6例中4例、その他では13例中5例、計104例中70例と抗RNP抗体陽性者が多くを占めていることから、抗RNP抗体の有無と抗BMPR-II抗体との関連について検討した。抗BMPR-II抗体の陽性率は抗RNP抗体陽性患者で23例/70例 (32.9%) と抗RNP抗体陰性患者5例/34例 (14.7%) に比し有意に高率であり ($p < 0.05$)、抗BMPR-II抗体と抗RNP抗体の関連が認められた。

D. 考察

PPH患者でBMPR-II遺伝子変異が高率にみられるものの、BMPR-II遺伝子異常がないPPH患者もおり、PPHの原因としてBMPR-II遺伝子だけでは説明がつかない。また、PPH患者で肺でのBMPの受容体であるBMPR-IIの発現が健常肺組織での発現に比して低下しているとの報告がある。このこともBMPとその受容体であるBMPR-IIの結合とそれに続くシグナル異常がPPHの発生に関与している可能性を示すものである。最近の報告でBMPシグナル異常がPH発生に関与している可能性が示唆されているが、未だ解明されていない⁶⁾。BMPはTGF- β (transforming growth factor β) スーパーファミリーに属する因子である。TGF- β は細胞増殖抑制作用を持つことが知られている。BMPは

BMPR-IIに結合すると、BMPR-IIとBMPR-Iの複合体が形成され、BMPR-Iの活性化が起こり、シグナル伝達が行われる。PPHでBMPR-IIの遺伝子変異が高率にみられたことから、この遺伝子異常がBMP・BMPR-II系のシグナル異常を来し、肺動脈構成細胞である血管内皮細胞や平滑筋細胞の増殖制御の破綻につながり、PHの発生に関与している可能性が考えられる。

前年度の研究で、PPH類似のPHモデルであるMCT/PHラット肺では正常ラット肺組織に比べて、肺動脈血管内皮細胞におけるBMPR-IIの発現の低下が組織化学的検討で示された。この結果により、MCT/PHラットにおいてもBMPR-IIの発現の低下がPHに関与している可能性が示唆された。

膠原病性PHの原因は未だ明らかでないが、BMP・BMPR-II系の異常がPHの原因である可能性が考えられる。しかし、膠原病性PHでは、BMPR-II遺伝子異常はこれまでのところみつかっていない。膠原病性PHにおいては、別の原因、例えばこれらのBMPやBMPR-IIに対する自己抗体、あるいは何らかの自己抗体や血清因子、特にMCTDの特徴的抗体である抗RNP抗体などがBMP・BMPR-II系の正常な働き、シグナル伝達に異常を発生させている可能性が考えられる。

そこで、今回、HPAEC、HUVECそれぞれの全抽出抗原および膜抽出抗原を抗原としたWestern blotを行い、BMPおよびBMPR-IIの検出を行った。BMPはHPAEC、HUVECいずれにも発現があったが、膜抽出抗原中にはほとんどみられず、膜蛋白には発現が極めて少ないか、発現していない可能性が考えられた。一方、BMPR-IIはHPAEC、HUVECそれぞれの全抽出抗原、同膜抗原のいずれでも同様に34kDのバンドが検出され、膜に発現があることは、BMPR-IIが受容体として膜に存在することに合致した。

抗BMPR-II抗体と疾患との関わりについては、同抗体はMCTD (42.9%)あるいはSLE (23.7%)に高率に認められたが、一方SS (0%)では一例も認めず、疾患による陽性率に差がみられた。

抗BMPR-II抗体とPHとの関連については、同抗体陽性率はPH合併例で非合併例に比しやや高率であったが有意な差はなかった。PH合併例の症例が少ないため、今後さらに検討が必要と考えるが、MCTDは合併例、非合併例ともに同抗体が高率に陽性であった。MCTDではPHの合併率が他の膠原病に比して高率であることが知られており、潜在的PHあるいは将来の

PHの発症の可能性など、抗BMPR-II抗体の意義についてさらに検討が必要であろう。

さらに、今回の研究で抗BMPR-II抗体の有無と抗RNP抗体の有無の間に有意な関連を認めたことは、抗RNP抗体陽性を特徴とするMCTDにおけるPH発症機序の解明につながる可能性もあり、今後さらなる研究が必要である。

E. 結論

1. 抗BMPR-II抗体はMCTDとSLEで高率にみられた。
2. 抗BMPR-II抗体陽性率は肺高血圧症 (PH)の有無で差がなかった。
3. 抗BMPR-II抗体は抗RNP抗体陽性患者で抗RNP抗体陰性患者に比して高率にみられた。

文 献

1. The International PPH Consortium, Lane KB, Machado RD, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF- β receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet* 26: 81-84, 2000
2. Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* 67: 737-44, 2000
3. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 105: 1672-78, 2002
4. Thomson JR, Machado RD, Pauciuolo MW, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF- β family. *J Med Genet* 37: 741-45, 2000
5. 吉田俊治, 片山雅夫, 玉熊柱子, 高橋久英. 肺高血圧症 (PH) 肺における骨形成因子 (BMPR-II) の発現についての組織化学的検討. 厚生労働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平成14年度研究報告書. 48-51, 2003
6. Du L, Sullivan CC, Chu D et al. Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 348: 500-9, 2003

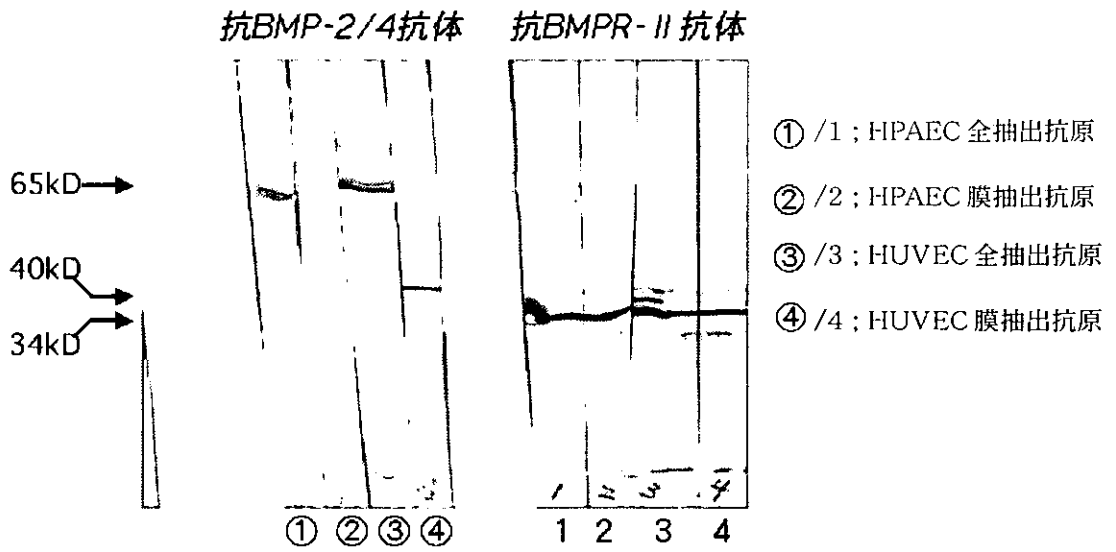


図1. HPAEC および HUVEC 抽出抗原における BMP、BMPR-II の発現

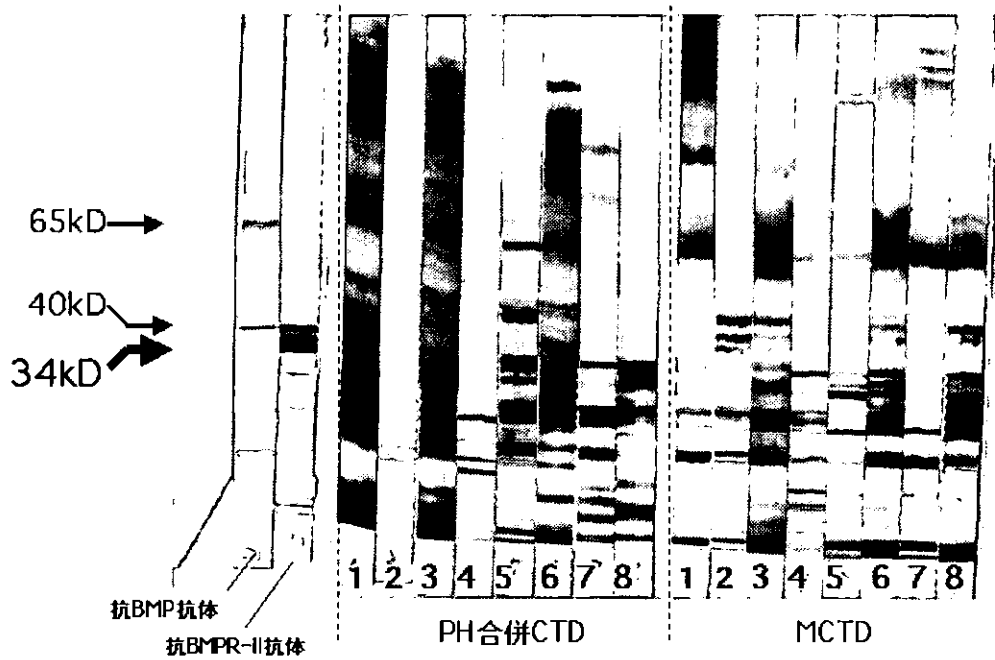


図2. HUVEC 全細胞抽出抗原を用いた抗 BMPR-II 抗体の検出 (Western blotting)

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

Shunji Yoshida, Masao Katayama, and Keiko Tamakuma

Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine

Heterozygous germ-line mutations of the gene encoding type II bone morphogenetic protein (BMP) receptor (BMPR-II) and a marked reduction of BMPR-II expression in the lungs have been found in many patients with primary pulmonary hypertension (PH). We reported in 2003 that the expression of BMPR-II in endothelial cells of pulmonary arteries was reduced in the lungs of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension compared with that in normal rats. To clarify a clinical role of the BMP and BMPR-II system in PH associated with connective tissue diseases (CTD), we investigated antibodies to BMP and BMPR-II and the clinical relationship between these antibodies and clinical manifestations, especially PH.

Antibodies to BMP and BMPR-II were detected by Western blotting with human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). We investigated 35 patients with mixed connective tissue diseases (MCTD), 38 with systemic lupus erythematosus (SLE), 12 with Sjögren's syndrome, 6 with systemic sclerosis and 13 with other CTD.

BMPR-II was expressed in HPAEC and HUVEC. The frequencies of anti-BMPR-II antibodies in patients with MCTD and SLE [42.9% (15/35) and 23.7% (9/38), respectively] were higher than those in other patients. There was no relationship between anti-BMPR-II antibodies and PH. The frequency of anti-BMPR-II antibodies in patients with anti-RNP antibodies was significantly higher than in those without anti-RNP antibodies [32.9% (23/70) versus 14.7% (5/34), respectively; $p < 0.05$].

Anti-BMPR-II antibodies were preferentially seen in patients with MCTD, and are possibly associated with anti-RNP antibodies.