

## 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

分担研究者：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

研究協力者：川口鎮司、深澤千賀子 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター

研究協力者：岡田 純、近藤啓文 北里大学医学部内科

### 研究要旨

肺高血圧症(PH)は、混合性結合組織病(MCTD)の合併症の一つであり、生命予後を決定する非常に重要な病態である。しかし、その発症の機序は、明かではない。血管拡張因子である一酸化窒素(NO)は、MCTDあるいは強皮症(SSc)患者において血清中で増加している。これらの疾患では、レイノー現象などの末梢循環不全が高頻度に認められる。しかし、肺高血圧症を合併した症例では、NOの増加が認められない。このNO産生の違いが、NO合成酵素であるinducible NO synthase (NOS-2)の遺伝子多型によるかどうかを検討した。その結果、転写調節領域と考えられる部位に2ヶ所の遺伝子多型が存在し、肺高血圧症患者群(N = 13)と肺高血圧症非合併膠原病群(N = 23)および健常人(N = 30)にて発現頻度に偏りが見られた。この2ヶ所の遺伝子多型はNOS-2の転写活性に関与していた。以上よりNOS-2の遺伝子多型が、NOS-2の転写調節を介して、PHの発症に関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

肺高血圧症(PH)は、混合性結合組織病(MCTD)の生命予後を決定する重要な病態である。我々は、レイノー現象を有するMCTDでは、血管の異常収縮・攣縮が生じており、その病態にエンドセリン-1が重要な働きをしていることを報告した<sup>1)</sup>。現在は、エンドセリン受容体拮抗薬がこの病態に有効であることがわかってきており、エンドセリン-1の病態形成におよぼす重要性が示唆されている<sup>2)</sup>。同様に、PH合併MCTD患者でも、血漿中エンドセリン-1濃度が著明に高値であった。一方、血管拡張因子である一酸化窒素(NO)は、エンドセリン-1により誘導されることがわかっている。つまり、エンドセリン-1により血管収縮が生じるとその刺激がNO合成酵素(NOS-2)の誘導を介してNO産生を増加させる。この結果に一致して、レイノー現象を有するMCTD患者では、NOの血清中での上昇が認められた<sup>1)</sup>。しかし、我々の結果では、PHを併発した症例においては、エンドセリン-1の亢進にもかかわらず、血清中NO濃度は、健常人と差が認められなかった<sup>3)</sup>。この結果は、PH患者ではエンドセリン-1によるNOS-2を介したNO合成過程に異常がある可能性を示唆していると我々は考えた。そこで、NOS-2の

遺伝子多型がこの異常に関与していると仮説をたて、NOS-2の転写調節領域の遺伝子配列を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 対象患者

MCTD患者17例と強皮症(SSc)患者24例および健常人30例を対象とした。東京女子医大と北里大学の倫理委員会の承認を経て、informed consentを行い、患者より末梢血を採血し、genomic DNAを抽出した。

#### 2) 肺高血圧症患者の診断

心臓超音波検査にて、RVSP (right ventricular systolic pressure)が、35 mmHg以上で、重度の肺線維症や心疾患による2次性のPHが否定された症例とした。

#### 3) 塩基配列決定

NOS2遺伝子の転写開始部位を+1とし、-100から-2500の塩基配列を決定するため、-100から-2500までの部位をPCR法にて増幅し、直接シーケンス法にて塩基配列を決定した。

#### 4) NOS2遺伝子の転写活性の測定

-1030に1塩基配列多型(SNP)を見いだしたので、-1030がG/Tを含む、-1557から+58をPCRで増幅しルシフェラーゼ発現ベクター pGL3 (Promega)に組み込んだ。また、NOS2遺伝子の-2400近傍に、-CCTTT-繰り返しが見られ、その繰り返し回数に違いが認められた(VNTR)。そのため、CCTTT配列を8, 12, 16回繰り返す配列を有するDNAを鋳型としPCRでその前後の配列を増幅して、pGL3ベクターの上流に組み込んだ(図1)。6種類のpGL3ベクターとインサートなしのpGL3ベクターを正常皮膚線維芽細胞にTransFast (Promega)を用いて遺伝子導入し、40時間後に1 ng/mlのIL-1 $\beta$ (R & D)を培養上清に添加し、48時間後のルシフェラーゼ活性をキットで測定した(Promega)。遺伝子導入の効率を、同時にRenillaのルシフェラーゼ発現ベクターphRL-TK (Promega)を遺伝子導入し、そのルシフェラーゼ活性にて評価した。

### C. 研究結果

#### 1) 対象患者群

対象となった患者群にて、PHの有無を検索し、MCTDにて9例のSScにて4例のPH合併例があった。

#### 2) 遺伝子多型の検討

全例のシーケンスの結果、-1030にG/TのSNPが認められ、さらに、-2.4 kbに-CCTTT-の5塩基の繰り返し配列が認められ、その繰り返し回数に、ばらつきがみられた(VNTR)。そこで、それらの配列をPH合併例と非合併例にて比較検討した。図2に示すように、-1030のSNPには、PH合併例と健常人では、genotype G/Gの頻度に有意な差がみられた。MCTDとSScに分けた詳細な結果を表1に示した。今回の結果では、PHの合併例と非合併例との比較において、G/G発現頻度に有意な差はみられなかった。しかし、MCTDにおいてのみ、allele Gの頻度は、PH合併例で非合併例と比較し、有意に高かった。さらに、CCTTTのrepeatの回数は、PH合併例にて少ない傾向があった(表2)。

11回以下と12回以上にてグループ分けをして $\chi^2$ 乗検定を用いて有意差を検討すると、PH合併例と非合併例の間およびPH合併例と健常人の間に有意差がみられた( $p < 0.05$ )。

#### 3) NOS2遺伝子の転写活性の検討

作成した6種類のルシフェラーゼベクターとコントロールのpGL3を線維芽細胞に遺伝子導入し、IL-1 $\beta$ によるNOS2の転写活性を測定した。図3に示すように、CCTTT repeatの回数が多いほうが転写活性は高く、さらに、-1030のSNPは、T alleleにて転写活性が高い傾向を示した。

### D. 考察

今回我々は、NOS2遺伝子の転写調節領域に遺伝子多型が存在し、その多型の頻度が、PH合併のMCTDあるいはSSc患者では、健常人と有意に異なっていることが明らかとなった。MCTDおよびSSc患者のPH非合併例と合併例との比較も同様におこなった。遺伝子多型が出現する頻度に、PH非合併例では健常人と同様の傾向が認められたが、PH合併例との間に有意な差は認められなかった。この結果からは、これらの遺伝子多型の偏りは、PHによるものではなく、MCTDあるいはSScの疾患による可能性も示唆される。今回PH非合併例とした患者群の中に、今後PHを新たに発症してくる症例が混在している可能性は十分にあり、その症例を除外するか、症例数を増やして検討する必要がある。

我々は、これまで、MCTDとSScに合併したPH症例では、NOの血清中での上昇がみられないことを報告してきた<sup>3)</sup>。MCTDやSScの症例では、病初期には、血清NO代謝産物が上昇することが認められている<sup>3)</sup>。この反応は、炎症性のサイトカインによるNOS-2の誘導も考えられるが、多くの部分は、エンドセリン-1の過剰産生に対する生体の負のフィードバックと我々は考えている。つまり、血管収縮にかかわるエンドセリン-1の作用に拮抗するためにNO合成が促進されている可能性を考えている。しかし、PH合併例では、PH発症早期から、NO産生の亢進が認められない。つまり、PH合併例では、血管拡張因子の誘導に異常があり、それが、病態に重要であると推定している。

今回、明らかとなったNOS2の遺伝子多型が、転写調節に関与しているかどうか機能的な解析を行った。5'-flanking regionの約-30 bpの領域に典型的なTATA配列があることより、TBPおよびRNA polymerase IIなどの複合体による転写調節が、その近傍にあるpromoter領域に結合するDNA結合因子とともに進行することが予測される。そのため、その領域を含め、今回同定したSNPを含めた-1557から+58の領域とCCTTTをその上流に組み込んだルシフェラーゼベク

ターにて解析した。CCTTTの繰り返しが少なくなるほど転写活性は低下したことより、PH合併のMCTDおよびSScでは、NOS2遺伝子の転写が誘導されにくくなっていることが示唆された。また、-1030 bpのSNPは、CCTTT repeatが8, 16回の場合、T alleleの場合、より転写活性が高いことが示されたが、repeatが12回の時には、差が見られなかった。

### E. 結論

PHの発症には、NOS2遺伝子の多型が関与していることが推定された。その遺伝子多型は、転写活性に影響を与えることが示唆された。遺伝子多型によるNOS-2の産生低下がPHの病態に重要である可能性があり、今後さらに、症例を増やし、検討するとともに、この遺伝子多型を有するPH非合併患者で、PHの発症がみられるかをprospectiveに検討する方針である。

### F. 文献

1. 原まさ子, 高木香恵, 川口鎮司. MCTDの血管病変におけるET-1, NOの関与. 厚生省特定疾患 皮膚・結合組織疾患調査研究班 混合性結合組織病分科会 平成10年度 研究報告書 36-37, 1999
2. Humbert M, Cabane J. Successful treatment of systemic sclerosis digital ulcers and pulmonary arterial hypertension with endothelin receptor antagonist bosentan. *Rheumatology*. 42:191-193, 2003
3. 原まさ子, 川口鎮司. 混合性結合組織病に併発する肺高血圧症発症機序の検討. 血管作動因子発現の解析. 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 平成13年度 研究報告書 56-59, 2002
4. Takagi T, Kawaguchi Y, Hara M, Sugiura T, Harigai M, Kamatani N. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin Exp Immunol* 134: 538-544, 2003

表1. NOS2遺伝子多型

	G/G	G/T	T/T
MCTD (N = 9)	8	1	0
PH 合併			
SSc (N = 4)	4	0	0
MCTD (N = 8)	4	3	1
PH 非合併			
SSc (N = 20)	15	5	0

表2. CCTTT繰り返し配列による遺伝子多型

Rpeat, n	PH 合併, n (%)	PH 非合併, n (%)	健常人, n (%)
8	2 (15)	0	0
9	1 (8)	0	1 (3)
10	3 (23)	3 (11)	3 (9)
11	3 (23)	6 (22)	5 (17)
12	2 (15)	9 (32)	7 (23)
13	0	4 (14)	5 (17)
14	2 (15)	4 (14)	5 (17)
15	0	2 (7)	2 (7)
16	0	0	2 (7)

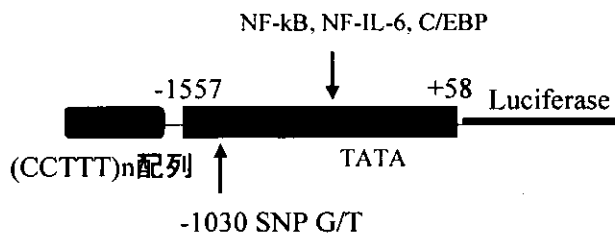


図1. ルシフェラーゼ・レポーター・ベクター  
ルシフェラーゼ遺伝子上流にNOS2遺伝子の-1557から+58までを初めに組み込み、その後、CCTTT繰り返し配列を、さらに上流に組み込む。

頻度 (%)

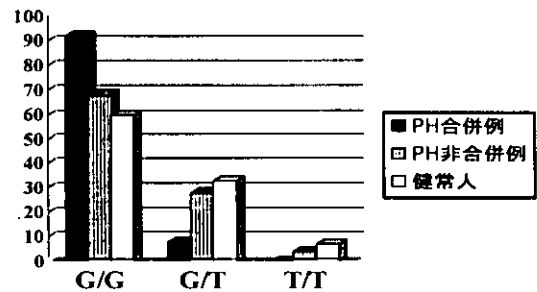


図2. NOS2遺伝子の-1030 bpにみられるSNPの頻度

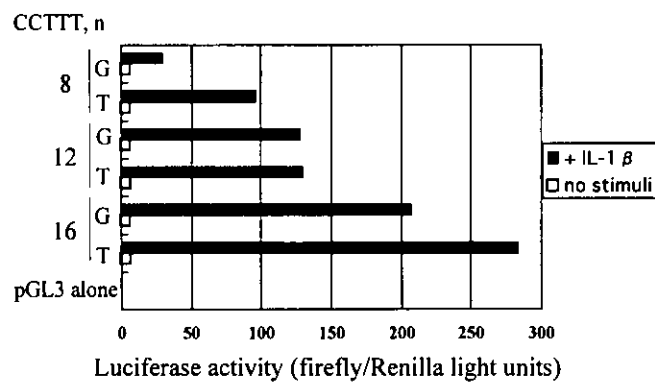


図3. 転写活性におよぼすNOS2の遺伝子多型の影響

## Association of *NOS2* gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary arterial hypertension with collagen diseases

Masako Hara<sup>1)</sup>, Chikako Fukasawa<sup>1)</sup>, Yasushi Kawaguchi<sup>1)</sup>,  
Jun Okada<sup>2)</sup>, Hirobumi Kondo<sup>2)</sup>

Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University<sup>1)</sup>  
Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine<sup>2)</sup>

To determine the gene polymorphisms of *NOS2* in patients with pulmonary arterial hypertension (PH) complicated with collagen diseases including MCTD and systemic sclerosis (SSc), we analyzed the sequence of *NOS2* between -100 and -2500 bp from the transcription start site. We found two gene polymorphisms; one was single nucleotide polymorphism at -1030 bp, and another was variable numbers of tandem repeat (CCTTT) around -2.4 kb. There was a significant difference in the frequency of G/G genotype between PH and healthy donors, however, no significant difference was detected in patients with collagen diseases in the presence and absence of PH. The numbers of repeat (CCTTT) were significantly smaller in PH than those in non-PH. Luciferase assay revealed that those gene polymorphisms might be associated with the transcription activity of *NOS2* gene. Our findings suggest that *NOS2* gene polymorphisms may be involved in the pathogenesis of PH complicated with MCTD or SSc.

## 抗 PGI<sub>2</sub>-synthase 抗体の血管内皮細胞活性に及ぼす影響

分担研究者：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助教授

研究協力者：奈良浩之，高橋裕子，箕田清次 自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学部門

### 研究要旨

膠原病血清中には血管内皮細胞(EC)表面上に存在するPGI<sub>2</sub>-synthase(S)に対する抗体が存在することを確認している。今回精製したIgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体がECからのPGI<sub>2</sub>産生を抑制するか否か、ECを活性化するか否かを検討した。IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体陽性SLE血清からPGI<sub>2</sub>-S114～123番目アミノ酸残基合成ペプチドカラムを用いてIgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体を精製した。精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体のPGI<sub>2</sub>-Sへの結合を合成ペプチドを抗原としたELISA及びECを用いたimmunoblotにて確認した。ヒト臍帯静脈由来のlive ECに精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体を反応させてELISAにてECへの結合及びEC表面上接着分子(ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1)発現の程度を、培養上清中に産生されたPGI<sub>2</sub>代謝産物である6-keto-PGF1 $\alpha$ 濃度及びcytokine(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8)濃度を測定した。精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体はlive ECに結合し、2時間培養では有意にPGI<sub>2</sub>産生を増強した。cytokineに関してはIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ の産生を認めず、IL-6, IL-8の産生は濃度依存性に増強した。EC表面上接着分子の発現も軽度増強した。膠原病症例血清中に存在する抗PGI<sub>2</sub>-S抗体は抗血管内皮細胞抗体としてのEC活性とPGI<sub>2</sub>産生刺激の両方を持っている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

最近、原発性肺高血圧症(PPH)の発症・進展に肺動脈血管内皮細胞(EC)表面上のプロスタサイクリン合成酵素(PGI<sub>2</sub>-S)発現の低下、PGI<sub>2</sub>産生低下が関連している可能性が報告されている<sup>1)</sup>。昨年度我々は膠原病に伴うPH症例の肺組織を用いて、PGI<sub>2</sub>-S発現の程度を検討したが、PPHとは異なり肺動脈EC表面上のPGI<sub>2</sub>-S発現低下を認めなかった<sup>2)</sup>。むしろ小動脈レベルにおいて二次的にPGI<sub>2</sub>-S発現が増強している可能性が示唆された<sup>2)</sup>。その傾向は混合性結合組織病(MCTD)症例において強く認められ、PPHの発症機序と異なっている可能性が示唆された<sup>2)</sup>。更に全身性エリテマトーデス(SLE)及びMCTD症例血清中にIgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体が存在することをPGI<sub>2</sub>-S114～123番目アミノ酸残基配列[(C)HYSPSDEKAR]合成ペプチド-OVAを固相化抗原としたELISAにて確認している。

今回、IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体陽性PH合併SLE症例・PH非合併SLE症例血清よりIgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体を精製し、ECからのPGI<sub>2</sub>産生、cytokine分泌及びECの接着分子発現に及ぼす影響を検討した。

### B. 研究方法

1. 精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体：抗PGI<sub>2</sub>-S抗体陽性SLE症例2例(TT:PH有り, AH:PH無し)血清よりPGI<sub>2</sub>-

S114～123番目アミノ酸残基配列[(C)HYSPSDEKAR]合成ペプチドカラムを用いてIgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体を精製した。これらの抗体はELISAにてPGI<sub>2</sub>-S114～123番目アミノ酸残基配列[(C)HYSPSDEKAR]合成ペプチドに結合し、ヒト臍帯静脈由来EC(HUVEC)の免疫プロットにて分子量52kD付近にバンドを形成することを確認している。

2. 陽性及び陰性コントロール：SLE症例(AH:PH無し)血清より精製したIgG抗リポソームP蛋白抗体(抗P抗体)及びrecombinant IL-1 $\beta$ (rIL-1 $\beta$ )を陽性コントロールとして、正常人血清から精製したIgGを陰性コントロールとして用いた。

2. 精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体のECへの結合：2継代目のHUVECを5% gelatin前処置96穴平底plateに10<sup>5</sup>cells/wellずつ播種した。2日後HUVECが平底全体にconfluentでmonolayerとなった段階で、培養液を除き、異なる濃度の抗PGI<sub>2</sub>-S抗体(最大IgG濃度：40 $\mu$ g/ml)を添加し、37 $^{\circ}$ C2時間培養した。培養終了後の方法は、以前報告した方法を用いて行った<sup>3)</sup>。陽性コントロールとして抗P抗体を、陰性コントロールとして正常人IgGを用いた。

3. 精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体のECからのPGI<sub>2</sub>産生、cytokine分泌及びECの接着分子発現に及ぼす影響：2継代目のHUVECを5%gelatin前処置96穴平底plate

に $10^5$ cells/wellずつ播種した。2日後HUVECが平底全体にconfluentでmonolayerとなった段階で異なる濃度の抗PGI<sub>2</sub>-S抗体(最大IgG濃度:40 μg/ml)を添加し、37℃種々の時間培養した。培養終了後、培養上清を回収した。培養上清回収後の接着分子(ELAM-1, ICAM-1及びVCAM-1)発現は以前報告した方法を用いて行った<sup>3)</sup>。

回収した培養上清を-30℃で保存し、後日培養上清中のPGI<sub>2</sub>の代謝産物である6-keto-PGF1 α濃度、IL-1 β, TNF- α, IL-6, IL-8濃度を各々のELISA kitを用いて測定した。陽性コントロールとして抗P抗体, rIL-1 βを、陰性コントロールとして正常人IgGを用いた。

### C. 研究結果

1. 精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体のECへの結合 (Fig.1.): 正常人IgGはECにほとんど結合しなかったが、SLE症例2例から精製した抗PGI<sub>2</sub>-S抗体は濃度依存性にECに結合した。抗P抗体も同様にECに結合した。

2. 精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体によるECからのPGI<sub>2</sub>産生に及ぼす影響: IgG濃度の異なる抗PGI<sub>2</sub>-S抗体、抗P抗体、正常人IgGをECに反応させ2時間37℃培養し、培養上清中に分泌されたPGI<sub>2</sub>の代謝産物である6-keto-PGF1 α濃度を検討した。Fig.2.に示すように正常人IgGは培養液のみとほとんど差を認めなかったが、抗PGI<sub>2</sub>-S抗体、抗P抗体はIgG濃度依存性にECからのPGI<sub>2</sub>産生を刺激した。

次に時間経過によるPGI<sub>2</sub>産生を検討した。精製IgG濃度は40 μg/mlを用いた。Fig.3.に示すように培養2時間目位までは抗PGI<sub>2</sub>-S抗体、抗P抗体によるPGI<sub>2</sub>産生は培養液のみ、正常人IgGに比べて有意に増加していたが、4時間以上の長時間ではほとんど差を認めなくなった。

3. IL-1 βによるECからのPGI<sub>2</sub>産生に及ぼす影響: rIL-1 β濃度を変えて、時間経過によるPGI<sub>2</sub>産生を検討した。rIL-1 β濃度を増やすに連れて、PGI<sub>2</sub>産生は増加し、長時間培養でも同様の結果を得た(Fig. not shown)。

4. 精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体のECからのcytokine分泌に及ぼす影響(Fig.4., Fig.5.): 抗PGI<sub>2</sub>-S抗体及び抗P抗体によるECからのIL-1 β, TNF- α産生に関しては種々の時間経過においても特に正常人IgGあるいは培養液のみのそれとは特に差を認めず、これらの抗体がECからのIL-1 βやTNF- α産生を刺激している事

実をつかむことは出来なかった (Fig. not shown)。

24時間培養にてIL-1 β(5U/ml)によるECからのIL-6産生は326pg/10<sup>5</sup>cells, IL-8産生は1880pg/10<sup>5</sup>cellsと著明に増加した。正常人IgGによるIL-6産生あるいはIL-8産生は何れのIgG濃度においても培養液のみと特に差を認めなかったが、2種類の抗PGI<sub>2</sub>-S抗体は抗P抗体と同様にECからのIL-6産生及びIL-8産生をIgG濃度依存性に増加させた。

次に培養液のみ、IgG濃度40 μg/mlによる正常人IgG、抗PGI<sub>2</sub>-S抗体、抗P抗体、そしてrIL-1 β(5U/ml)によるECからのIL-6産生及びIL-8産生を時間経過にて検討した (Fig. not shown)。rIL-1 βは時間経過と共に著明にIL-6産生及びIL-8産生を増加させた。正常人IgGによるIL-6産生及びIL-8産生は培養液のみのそれとほとんど差を認めなかったが、2種類の抗PGI<sub>2</sub>-S抗体は抗P抗体と同様にIL-6産生及びIL-8産生は培養液のみあるいは正常人IgGに比べて有意に時間経過と共に増加させた。

5. 精製IgG抗PGI<sub>2</sub>-S抗体によるECの接着分子発現に及ぼす影響: 2種類の抗PGI<sub>2</sub>-S抗体は抗P抗体と同様にELAM-1は4時間を、VCAM-1は8時間をピークとする、ICAM-1は時間経過と共に増加して行く、正常人IgGあるいは培養液のみのそれに比べて軽度増強した発現を認めた。rIL-1 β (5U/ml) に関してもはELAM-1は4時間を、VCAM-1は8時間をピークとする、ICAM-1は時間経過と共に増加して行く著明な発現を認めた (Fig. not shown)。

そこで異なるIgG濃度を用いて4時間培養によるEC表面上のELAM-1, 8時間培養によるVCAM-1, 24時間培養によるICAM-1発現を検討した(Fig. Not shown)。全ての発現においてrIL-1 β(5U/ml)は著明に増強させた。正常人IgGに関しては何れのIgG濃度においても培養液のみのそれと特に差を認めなかった。2種類の抗PGI<sub>2</sub>-S抗体は抗P抗体と同様にIgG濃度依存性に何れの発現においても軽度増強させた。

### D. 考察

今回の検討により、IL-1 βはECからのPGI<sub>2</sub>産生を著明に増加させた。膠原病に伴うPHにおいては血中のIL-6濃度増加が報告されている。更に昨年度の我々の検討では膠原病に伴うPH症例の肺組織ではPPHとは異なり肺動脈EC表面上のPGI<sub>2</sub>-S発現低下を認めなかった。むしろ小動脈レベルにおいて二次的にPGI<sub>2</sub>-S発現が増強している可能性が示唆された。膠原病に伴

うPHの発症・進展時期にIL-1が関与していることも推測され、ECからのPGI<sub>2</sub>産生も増加し、PHの増悪を抑制している可能性が推測された。

膠原病症例血清中の抗PGI<sub>2</sub>-S抗体が*in vivo*において肺動脈EC表面上に発現しているPGI<sub>2</sub>-Sに結合することによりECからのcytokine分泌、接着分子発現を増強し、更に好中球、単球、リンパ球などの炎症細胞がECに接着し、活性化され、血管壁への浸潤が促進される。このような経過で肺動脈の血管内皮細胞障害、血管炎が出現し、更にPHの出現につながる事が推測された。

しかし、今回の検討では抗PGI<sub>2</sub>-S抗体は短時間の培養ではECからのPGI<sub>2</sub>産生を増加させ、特にPGI<sub>2</sub>産生を抑制しなかった。先程も述べた様に膠原病に伴うPH症例の肺組織ではPPHとは異なり肺動脈EC表面上のPGI<sub>2</sub>-S発現低下を認めず、むしろ小動脈レベルにおいて二次的にPGI<sub>2</sub>-S発現が増強している可能性が示唆されている。この増強しているPGI<sub>2</sub>-Sに抗PGI<sub>2</sub>-S抗体が結合することにより、抗PGI<sub>2</sub>-S抗体はEC活性化によりPHの発症・進展に関与している可能性と同時に、PHの増悪を軽減する方向に働くPGI<sub>2</sub>産生を増加させている可能性も推測された。

抗PGI<sub>2</sub>-S抗体そして抗P抗体によるPGI<sub>2</sub>産生増加の機序として、一つ目としては抗PGI<sub>2</sub>-S抗体がPGI<sub>2</sub>-Sに結合し、そして抗P抗体は交差反応性にPGI<sub>2</sub>-Sに結合し、agonistとしてPGI<sub>2</sub>産生を刺激している可能性が推測された。二つ目としてはこれらの抗血管内皮細胞抗体がEC表面上に結合することにより、アラキドン酸カスケードが活性化され、結果としてPGI<sub>2</sub>産生が増加した可能性が推測された。

### 文 献

1. Tudor RM, Cool CD, Geraci MW, et al: Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1925-32,1999.
2. 吉尾卓、奈良浩之、箕田清次：膠原病に伴う肺高血圧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。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、治療と抗U1RNP抗体に関する研究-平成14年度研究報告書 pp55-60, 2003.
3. 吉尾卓、奈良浩之、箕田清次：モノクローナル抗トロンボモジュリン抗体の血管内皮細胞に及ぼす影響。厚生省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、治療と抗U1RNP抗体に関する研究-平成12年度研究報告書 pp62-65, 2001.

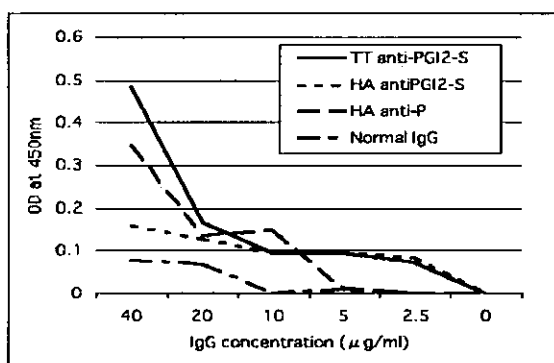


Fig1. IgG anti-PGI<sub>2</sub>-S の EC への結合

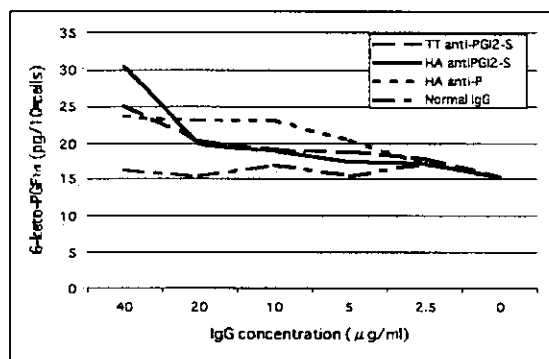


Fig2. IgG anti-PGI<sub>2</sub>-S による EC からの PGI<sub>2</sub> 産生

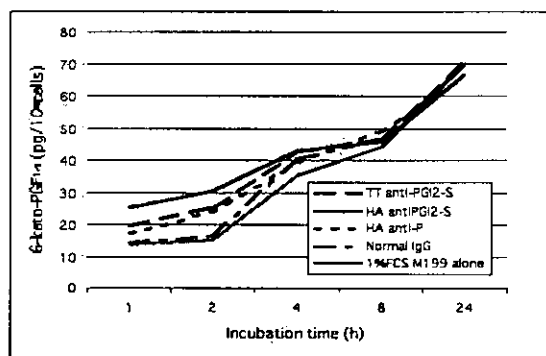


Fig3. IgG anti-PGI<sub>2</sub>-S による時間経過による EC から PGI<sub>2</sub> 産生

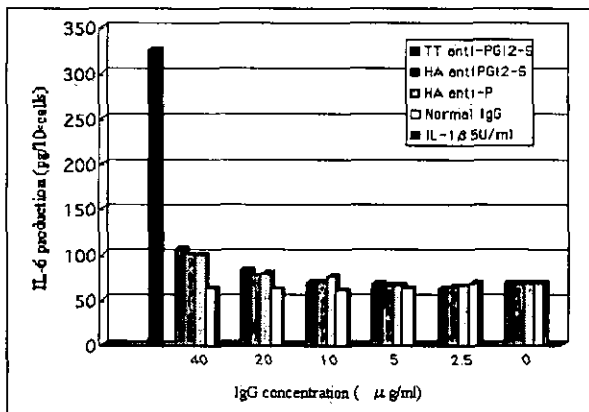


Fig4. 24時間培養による cytokine(IL-6)産生

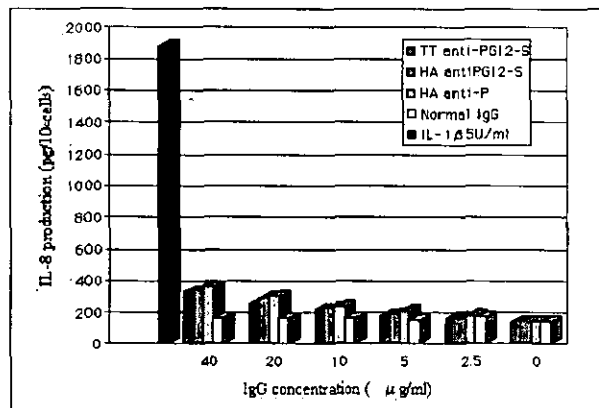


Fig5. 24時間培養による cytokine(IL-8)産生

## 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

Taku Yoshio, Hiroyuki Nara, Yuko Takahashi, and Seiji Minota

Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Department of Medicine,  
Jichi Medical School

We have confirmed the presence of IgG antibodies against PGI<sub>2</sub>-synthase on endothelial surface (anti-PGI<sub>2</sub>-S) in the sera of patients with collagen diseases. We investigated whether purified IgG anti-PGI<sub>2</sub>-S derived from 2 patients with SLE with positive for IgG anti-PGI<sub>2</sub>-S could stimulate PGI<sub>2</sub> release from endothelial cells (EC) and activate EC. IgG anti-PGI<sub>2</sub>-S were purified from sera using the column coupled with synthetic peptide corresponding to amino acids 114-123 of the human PGI<sub>2</sub>-S. These purified IgG anti-PGI<sub>2</sub>-S reacted with synthetic peptide corresponding to amino acids 114-123 of the human PGI<sub>2</sub>-S by ELISA and the band of human PGI<sub>2</sub>-S protein (52kD) by immunoblotting using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Purified IgG antiribosomal P protein antibodies (anti-P) from 1 SLE patient from whom IgG anti-PGI<sub>2</sub>-S was purified, recombinant interleukin-1b (rIL-1b) and purified IgG from normal control were used as positive and negative control, respectively. Two anti-PGI<sub>2</sub>-S bound to EC monolayers in a IgG-dose-dependent in the same way as 1 anti-P but normal IgG did not. Two anti-PGI<sub>2</sub>-Sand 1 anti-P augmented PGI<sub>2</sub> production from EC by 2hs in a IgG-dose-dependent manner but 1 normal IgG did not. But the quantity of PGI<sub>2</sub> production by these antibodies did not significantly differ from those by 1 normal IgG or medium alone beyond 4h incubation. In addition, rIL-1b largely augmented PGI<sub>2</sub> production from EC in a dose- and time-dependent manner. Two anti-PGI<sub>2</sub>-Sand 1 anti-P augmented IL-6 and IL-8 secretion from EC in a IgG-dose- and time-dependent manner in the same way as rIL-1b, but did not IL-1b or TNF-α secretion. One normal IgG was without effect. Two anti-PGI<sub>2</sub>-Sand 1 anti-P up-regulated the expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 on EC monolayers in a IgG-dose-dependent manner and in the same time course as rIL-1b, but the degree of up-regulation by these antibodies was much less than that by rIL-1b. These results suggested the possibility that anti-PGI<sub>2</sub>-S in patients with collagen-disease-related PH might bind EC surface of pulmonary arteries, on which PGI<sub>2</sub>-S exist, and induce cytokine secretion and adhesion molecule expression, facilitating leukocyte recruitment. Such events on pulmonary arteries might lead to vascular damage and vasculitis, resulting in PH. On the other hand anti-PGI<sub>2</sub>-S might stimulate PGI<sub>2</sub> production from pulmonary arteries, resulting in the suppression of vascular damage and vasculitis.



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

## 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

分担研究者：北里英郎 北里大学医学部微生物講師

研究協力者：林 泉 北里大学医学部薬理学

研究協力者：村上洋介 北里大学医学部微生物

研究協力者：遠藤平仁、橋本篤、河野静、岡田純、

高山陽子、近藤啓文 北里大学医学部内科

### 研究要旨

モノクロタリン誘発肺高血圧症ラット(MCTPHラット)においてProstaglandin (PG) D<sub>2</sub>の生合成酵素であるprostaglandin D synthase (PGDS)遺伝子を導入したマウス線維芽細胞(C57-HPGDS)による細胞療法を行った。その結果、右心室の肺動脈圧や湿重量の低下など極めて有効であることを示したが、今回さらに、MCTPHラットにおいて肺病理組織切片を調べたところ肺動脈狭窄の著しい改善が見られた。また、C57-HPGDS細胞導入より、肺においてはinducible NOS(iNOS)、肺動脈の収縮に関するendothelin (ET-1)の発現が抑制された。右心室においてはET-1の受容体の一つであり、ET-1の排出に関するET<sub>B</sub>の発現を亢進させることがわかった。以上のことが複合的に作用し、MCTPHラットにおけるC57-HPGDSによる細胞療法の有効性と作用機序を明らかにした。

### A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)における肺高血圧症(PH)の合併率は高くまた予後不良である。また、治療法としては、血管拡張作用が認められているプロスタサイクリンや血管収縮に関与するエンドセリン受容体Aの拮抗薬などが用いられているが、いずれも非常に高価であり、不安定であるために、有効な治療法は確立されていない。本研究では、近年、その抗炎症効果が注目されているPGD<sub>2</sub>および既に臨床応用されているPGI<sub>2</sub>を用いた細胞療法を実験動物モデルで行い、将来の臨床応用への基礎としたい。

### B. 研究方法

Prostaglandin (PG)D<sub>2</sub>発現C57マウス線維芽細胞(C57-HPGDS)は、レトロウイルスベクターによりPGD<sub>2</sub>生合成酵素遺伝子であるヒトprostaglandin D synthase (HPGDS)を導入し作成した(文献1)。ラットPGI<sub>2</sub>生合成酵素であるラットprostaglandin I synthase (RPGIS)遺伝子は、ラット肺cDNA library (Takara, Kyoto)より、T7 promoter primer: 5'TTGGATCCTAATACGACTCACTATAGGG 3'および3' end PGIS primer:5'TTAAGCTTGG

AGGCCCCAGATGAGTGTAGTGT 3'を用いてpBluescript vector (Stratagene, CA)にUA cloning kit (Qiagen, Tokyo)を用いてクローニングした。塩基配列を確認後、レトロウイルスベクター、pLXSN (Clontech, Tokyo)にクローニングし、ラット腎細胞であるNRK細胞に感染し、NRK-RPGISを作成した。コントロールとしては、レトロウイルスベクターだけを導入したNRK-EVを作成した。NRK-RPHISの発現確認実験として、PGISの発現をラットPGIS primer F: 5' CTCACGGAAGCCATGTATACCAACCTG 3'およびB:5'GCCCCGGGCCTGCATGTCCTCTGATAC 3'を用いてRT-PCR法にて確認した。さらに、PGI<sub>2</sub>の安定誘導体である6-keto-PGF1- $\alpha$ の蛋白量をELISA kit (Cayman Chemical, MI)により、5mMのアラキドン酸 (Cayman Chemical) を添加、非添加の条件で測定した。対照としては、NRK-EVを用いた。

モノクロタリン誘発肺高血圧症(MCTPH)ラットは、文献(2)に従いSD系6週齢雄性ラットの頸部にモノクロタリン60mg/kgを単回皮下注射し、同時に2.5x10<sup>5</sup>個のC57-HPGDSを尾静脈より注入した。コントロールとしては、同数個の細胞を用いたC57-EVによる細胞療法を行った。HPGDSの発現量の移行を確認する

ために、3, 7, 19 日後に肺を摘出し、TRIZOL (Invitrogen, CA) を用いて RNA を抽出し、HPGDS primer F:5' TGGGCAGAGAAAAAGCAAGATGT 3', B:5' GTTAGCGACGGCAGGAATGG 3' を用いて RT-PCR 法により発現を確認した。さらに、19 日目の右心室、肺より同様に RNA を抽出し、エンドセリン(ET-1)、およびその A 受容体(ET<sub>A</sub>)、B 受容体(ET<sub>B</sub>) に関して発現を RT-PCR 法にて検討した。プライマーは、rat ET<sub>A</sub> F:5' CGCCATTG AAATTGTCTCCAT 3', B:5' TGCTCGCCCTTGTATTCGA3', ET<sub>B</sub> F:5' TGGCCATTTGGAGCTGAGAT 3', B:5' TCCAAGAAGCAACAGCTCGAT 3', ET-1 F:5' CCATGCTGGCTGGGATCTTA 3', B:5' TGCTACCAGCGGATGCAAA 3' を使用した。また、コントロールとして、GAPDH F:5' TTGGATCCGTCAGTGCCGGCCTCGTCTCATAG 3', B:5' TTC TCGAGGACCCTTTTGGCACCACCCTTCAG 3' を用いた。全ての PCR 反応は、94°C 15 分、1 cycle, 94°C 1 分、58°C 2 分、72°C 2 分 20 cycles 施行した。

ヒト血管内皮細胞(HPAEC)は、旭化成より購入し、PGD<sub>2</sub> の非酵素的変換物である cyclopentenone 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$  PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>, Cayman Chemical) を 1, 3, 5  $\mu$  M の濃度で添加した。PPAR  $\gamma$  のリガンドとしてのコントロールとしては、25mM Troglitazone を用いた。RNA を RNAasy Mini kit (Qiagen, Tokyo) を用いて抽出し、Sybr Green 法による real time PCR kit (Qiagen) を用いて ABI Prism7700 (Applied Biosystems, Tokyo) により RNA の定量化を行った。

Primer としては、human ET<sub>B</sub> receptor F:5' CCAATATCTTGATCGCCAGCTT 3', B:5' ACGGAGGCTTTCTGTATGAAAGG3', ET-1 F:5' CTTCTGCCACCTGGACATCAT 3', B:5' TTGGCTAGCACATTGGCATCT 3' を用いた。Internal control primer としては、GAPDH primer F:5' CCAGGGCGGGAGGGACTTC 3', B:5' TGAGGGGGAGGGGGAGGTTTCTGC 3' を用いて補正を行った。

19 日目の肺に関しては、文献(3)の方法に従って、凍結切片を作成し、抗 iNOS 抗体 (Upstate, NY)、抗ニトロソグアノジン抗体 (Dojindo, Kumamoto)、陰性コントロールとして mouse IgG (ABC kit, Vector Lab., CA) と反応させた。二次抗体としては、ビオチン標識した goat anti-mouse IgG (ABC kit) を用いた。ABC 法 (ABC kit) にて発色後、Hematoxylin にて

counterstaining を行った。肺動脈肥厚は、Hematoxylin Eosin (HE) した連続切片の画像解析を行った。組織の解析は、光学顕微鏡 (BX50, Olympus) を用いて行い、画像イメージは、デジタルカメラ (PDMC 1e/OL, Polaroid) にて撮影し、SCION Image (Scion Corp) を用いて定量化した。

### C. 研究結果

#### 1. C57-HPGDS 導入の肺における PGDS 発現の経時的変化

モノクロタリン投与後、3, 7, 19 日目に肺を摘出し、RNA 抽出後、RT-PCR 法にて HPGDS の発現を C57-HPGDS, C57-EV 導入群で比較した。その結果、Fig. 1 に示すよう、3, 7 日目で C57-HPGDS 導入 MCTPH ラットで明確に発現していた HPGDS が 19 日目では、バンドがやや不明瞭となる傾向が見られた。

#### 2. C57-HPGDS および 15d-PGJ<sub>2</sub> による ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>, ET-1 の発現の変化

MCTPH rat においては C57-HPGDS 導入により、右心室における ET<sub>B</sub> の発現が向上し、肺において MCT により上昇した ET-1 が減少していた (Fig. 2A)。

また、HPAEC 細胞に 15d-PGJ<sub>2</sub> を加えたところ濃度依存的に ET<sub>B</sub> の転写を亢進し (Fig. 2B)、ET-1 に関してはややその転写を抑制する傾向が見られた (Fig. 2C)。

#### 3. C57-HPGDS 導入による MCTPH ラットにおける肺動脈狭窄の改善

肺動脈の肥厚を C57-HPGDS 投与群と C57-EV 群で比較した (Fig. 3)。その結果、C57-EV 投与群では、コントロールであるモノクロタリンで誘発していない正常な肺 (Fig. 3A) と比較して、血管内皮細胞が破壊され血管平滑筋細胞が増殖することによる肺動脈の狭窄が見られるが (Fig. 3B)、C57-HPGDS 投与群では、血管内皮細胞が維持され血管平滑筋細胞の増殖が抑制されることにより肺動脈の狭窄が抑制されていた (Fig. 3C)。これらを SCION Image を用いて数値化し、定量化したところ、C57-HPGDS 導入群は C57-EV 群と比較して有意に肺動脈の肥厚を抑制していることが判明した (Fig. 3D)。

#### 4. C57-HPGDS 導入による肺における iNOS 発現の抑制

肺における iNOS の発現を C57-HPGDS 投与群と C57-EV 投与群で比較した (Fig. 4)。その結果、C57-EV 投与群 (Fig. 4A) では、肺動脈の狭窄 (a)、浸潤単核球、気管上皮細胞における iNOS の発現がみられた (b, c)。

一方、C57-HPGDS投与群 (Fig.4B)では、肺動脈狭窄の抑制(a')、細胞浸潤の抑制 (b')や気管上皮細胞におけるiNOS発現の抑制が見られた(c')。このiNOSの発現抑制効果は、SCION Image を用いた解析により有意なものであることが、判明した (Fig.4C)。

#### 5. ラット腎細胞(NRK)細胞におけるRPGISの発現

作成した二つのNRK-RPGIS細胞株、NRK-RPGISBu1, NRK-RPGISCI3, 対照であるNRK-EVにおけるRPGISの発現をRT-PCR法にて確認した。その結果、NRK-RPGISBu1, NRK-RPGISCI3では、陽性コントロールであるpLXSN-RPGIS DNAを鋳型とした際と同様に1.4kbにバンドが見られたが、NRK-EVでは、バンドは検出されなかった (Fig. 5A)。

NRK-RPGISBu1とNRK-EVを用いてPGI<sub>2</sub>の安定誘導体である6-keto-PG1 $\alpha$ の産生をELISA法にて検討した。その結果、アラキドン酸を添加したところ、約800pg/mlの産生をNRK-RPGISで確認した (Fig. 5B)。

#### D. 考察

今年度の研究において、MCTPHラットを用いた肺高血圧症モデルにおいてC57-HPGDSの導入により劇的な肺動脈狭窄の改善が見られた (Fig.3)。このことは、前年度の研究でC57-HPGDSの導入により右心室圧の上昇、右心室湿重量の増加が抑制されていたことと極めて相関している。また、肺において血管平滑筋を増殖させ肺動脈の狭窄に大きく関与しているET-1の発現が抑制され、右心室においてはET-1のクリアランスに関与し、血管内皮細胞に存在すると考えられるET<sub>B</sub>の発現が上昇していた (Fig.2A)。このことは、ヒト肺動脈由来血管内皮細胞においてPGD<sub>2</sub>の非酵素的変換物である15d-PGJ<sub>2</sub>を加えた結果が裏付けている (Fig.2B, 2C)。しかしながら、前年度に報告したヒト肺動脈由来血管平滑筋細胞(HPAEC)におけるET-1による血管収縮に関与しているET<sub>A</sub>の15d-PGJ<sub>2</sub>による発現抑制は、MCTPHラットモデルにおいては、見出されなかった。今後、ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>抗体を用いた免疫染色法により詳細な検討を加える予定である。

また、あらたにC57-HPGDSの細胞療法によりiNOSの発現が低下したことは (Fig. 4)、rat血管平滑筋細胞において、PGD<sub>2</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub>により顕著にiNOSの発現が低下した報告 (文献4)とよく相関している。し

かしながら、MCTPHラットにおけるNO産生の意義には、不明瞭な点が多く今後、検討を加えたい。

肺におけるHPGDSの発現は、MCT投与後3,7,19日と移行するにしたがって発現が不明瞭となっているが、これは注入したC57-HPGDSがクリアランスされている可能性を示した (Fig.1)。

NRK-RPGISに関しては、同様にMCTPH ratを用いて作用機序の検討を行う予定である。

#### 文献

1. Murakami Y, Akahoshi T, Hayashi I, Endo H, Hashimoto A, Kono S, Kondo H, Kawai S, Inoue M, Kitasato H: Inhibition of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation by retrovirally transfected prostaglandin D synthase. *Arthritis & Rheum* 48:2931-41, 2003.
2. 吉田俊治: 肺高血圧症に及ぼすステロイド剤の影響に関する組織化学的検討. 厚生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12年度 研究報告書 23-27, 2001.
3. Hashimoto A, Endo H, Hayashi I, Murakami Y, Kitasato H, Kono S, Matsui T, Tanaka S, Nishimura A, Urabe K, Itoman M, Kondo H: Differential expression of leukotriene B<sub>4</sub> receptor subtypes (BLT1 and BLT2) in human synovial tissues and synovial fluid leukocytes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheum* 30:1712-18, 2003.
4. Nagoshi H, Uehara Y, Kanai F, Maeda S, Ogura T, Goto A, Toyo-oka T, Esumi H, Shimizu T, Omata M: Prostaglandin D<sub>2</sub> inhibits inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 82:204-9, 1998.

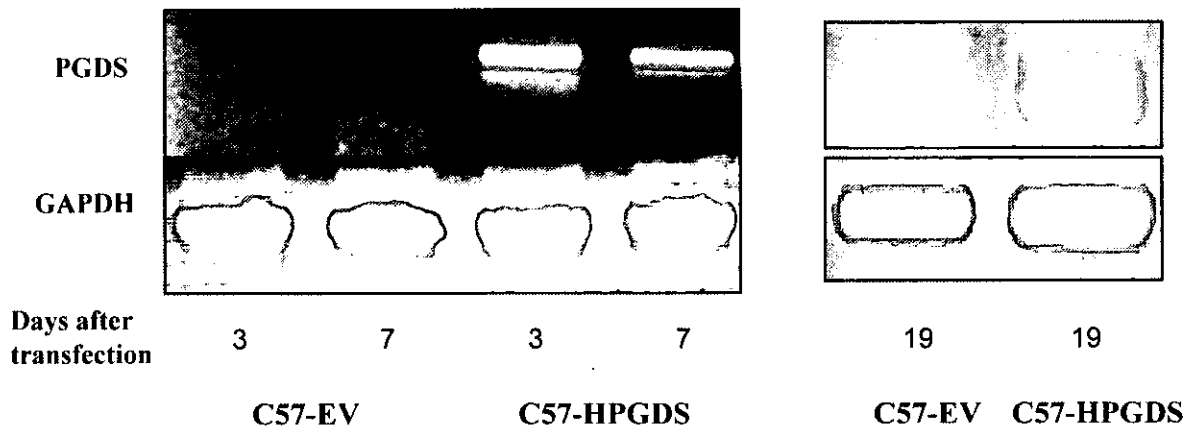


Fig.1 Expression of PGDS mRNA in lungs of rat intravenously administered PGDS-expressing fibroblasts

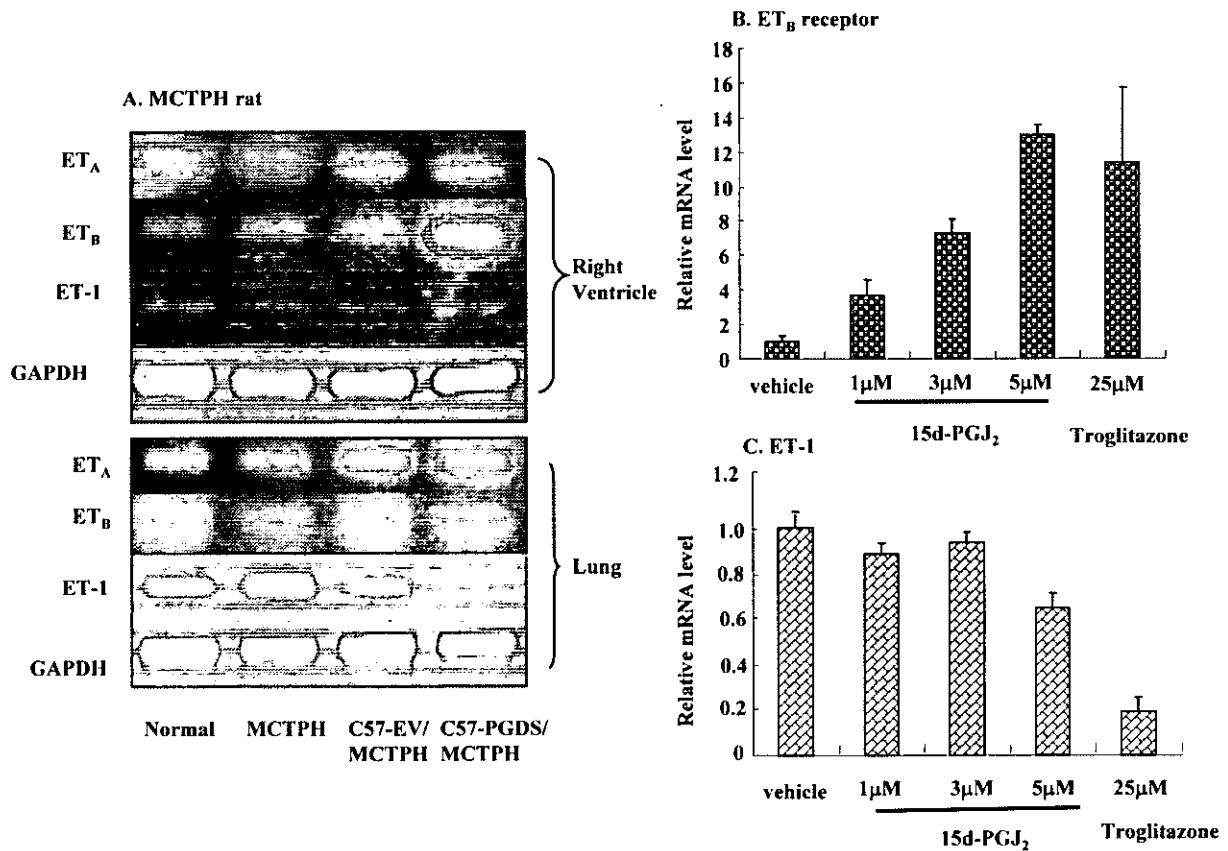
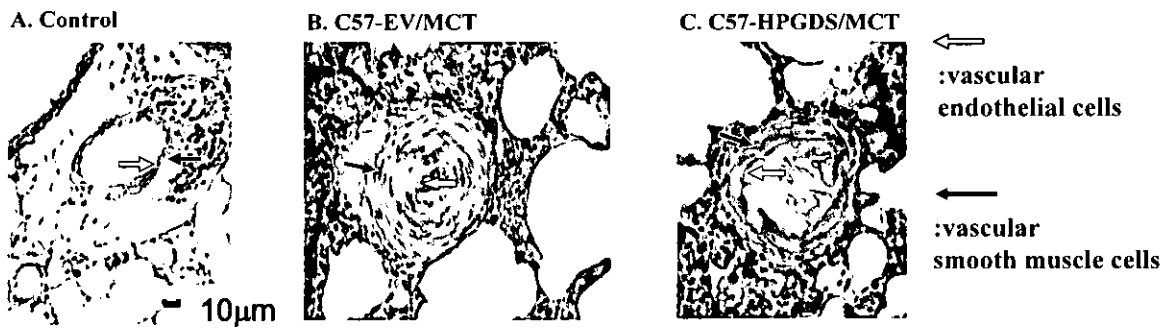


Fig.2 Expression of ET, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> on right ventricle and lung in MCTPH rat



D. Thickness of pulmonary artery

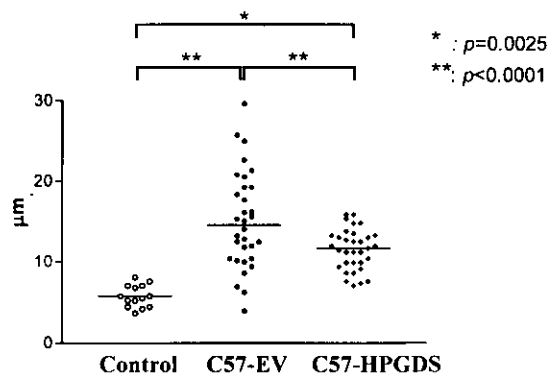


Fig.3 Effect of C57-HPGDS on pulmonary artery

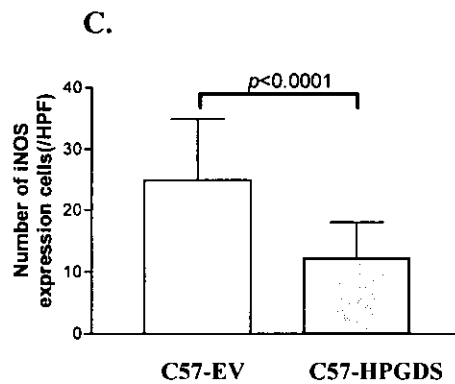


Fig.4 Effect of PGDS on *iNOS* Expression in MCTPH rat

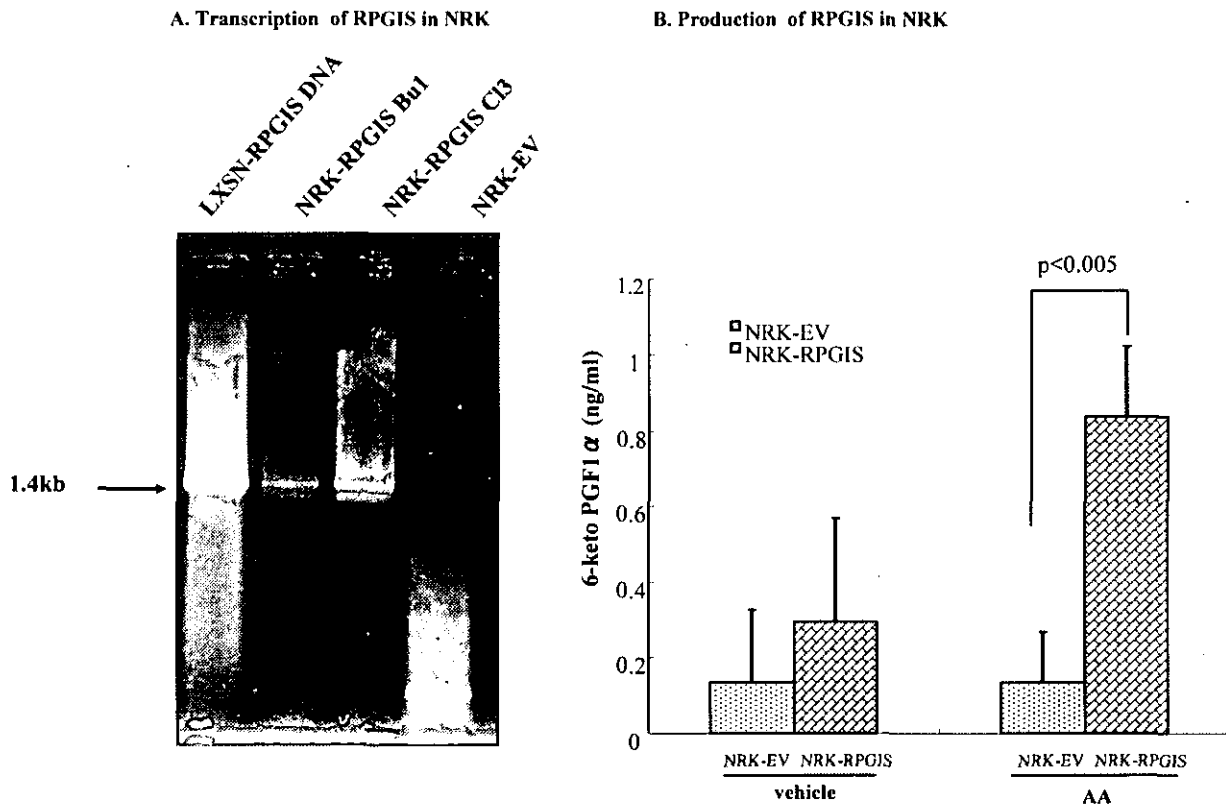


Fig.5 Expression of RPGIS in NRK-RPGIS

## ROLE OF PROSTAGLANDIN D<sub>2</sub> AND I<sub>2</sub> IN PULMONARY HYPERTENSION

Hidero Kitasato<sup>1</sup>, Izumi Hayashi<sup>2</sup>, Hirahito Endo<sup>3</sup>, Murakami Yousuke<sup>1</sup>,  
Atsushi Hashimoto<sup>3</sup>, Shizuka Kono<sup>3</sup>, Jun Okada<sup>3</sup>,  
Yoko Takayama<sup>3</sup>, Hirobumi Kondo<sup>3</sup>

Department of Microbiology<sup>1</sup>, Department of Pharmacology<sup>2</sup>,  
Division of Rheumatology<sup>3</sup>, Department of Internal Medicine,  
Kitasato University School Medicine

We have previously reported that inoculation of C57-HPGDS expressing human prostaglandin (PG) D synthase which can introduce enzymatic synthesis of PGD<sub>2</sub>, caused improvement of wet weight and pressure of right ventricular inoculation, in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension (MCT-PH) rat.

In this study, we have found that inoculation of C57-HGDS could prevent the arcetration of pulmonary artery of MCTPH rat via suppression and enhancement of ET-1 and its receptor ET<sub>B</sub> transcripts, respectively. In addition, the expression of inducible NOS (iNOS) also suppressed by C57-HPGDS in lung. In vitro experiments using human vascular smooth muscle cells showed 15d-PGJ<sub>2</sub> which is metabolite of PGD<sub>2</sub>, suppressed and enhanced ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>, respectively.

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）

分担研究者：諏訪 昭 慶應義塾大学医学部内科助手  
研究協力者：野島崇樹、金子祐子、佐藤慎二、  
平形道人 慶應義塾大学医学部内科

研究要旨

肺高血圧症（PH）は混合性結合組織病（MCTD）において重要な予後決定因子として知られている。本研究では、膠原病重複例におけるPHの解析、重症PH合併MCTD例の解析およびPHの病因・病態と関連する自己免疫異常を追究した。

膠原病重複例をMCTDおよび重複症候群（OL）例基準に従い三群に分けたところ、前毛細血管性PH（iPH）合併率は、OL(+)MCTD、OL(-)MCTD、MCTD(-)OLの順に高く、MCTDとOL基準をともに満足することがiPHと関連する可能性が示された。MCTD 297例中PHは53例（18%）であり、重症PH（心エコー・ドプラー法でPAs 70mmHg以上または、右心カテーテル検査でPAm 50mmHg以上）は10例（3%）で全例がiPHであった。10例中SScを含むOLが6例、SScが3例であった。重症PH例は、非iPH例に比して、SScに特徴的な前腕を越える皮膚硬化、開口障害、舌小帯短縮、指尖部陥凹性癬痕、食道蠕動運動低下を高頻度に認めた。さらに、重症PH例は、肺線維症の頻度が高いものの線維化は軽度で、高度肺線維化が必ずしも重症PHと関連しないことが示された。また、重症PH例は軽／中等症PH例に比して、関節炎の頻度が高く、リンパ球減少の頻度が低かった。抗U1 RNP抗体陽性OL例ではiPHは26%と同抗体陰性例に比して高頻度で、抗U1 RNP抗体とPHの関連が明らかとなった。また、MCTD例においては、抗リボソーム抗体、ループス抗凝固因子、抗トポイソメラーゼI抗体、抗SS-A/Ro抗体陽性例でiPHの合併率が高く、多彩な自己免疫異常がPHと関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）における肺高血圧症（PH）の合併率は他の膠原病に比して高く、重要な予後決定因子として知られている<sup>1-5)</sup>。昨年度の研究において、膠原病に合併するPHの頻度、臨床免疫学的特徴、治療、予後について検討し、重複症状を示すMCTD、重複症候群（OL）例では、他疾患に比してPH合併率が高いこと、膠原病性PHでは前毛細血管性PH（iPH）が、後毛細血管性PH（cpPH）に比して高頻度であることなどを明らかとした<sup>6)</sup>。しかし、MCTD例には、OL基準を満足する症例も多く、その取り扱いが問題となる。また、予後不良な重症PH例の臨床特徴はなお不明で、その病因や有効な治療法は確立されていない。本研究では膠原病重複例におけるPHの解析、重症PH合併MCTD例の解析、およびPHの病因・病態と関連する

免疫異常の追究を目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

対象は、1962-2001年に当院内科を初診した膠原病患者2,102例で、その内訳は重複症候群（OL）148例、全身性エリテマトーデス（SLE）628例、強皮症（SSc）298例、多発性筋炎／皮膚筋炎（PM/DM）117例、関節リウマチ（RA）662例、原発性シェーグレン症候群（SjS）230例とした。そしてMCTD診断の手引き（厚生労働省（旧厚生省）MCTD班、1996年改訂）に合致するMCTD 297例とした。

2. 方法

PHの診断は、(1)心エコー・ドプラー法（UCG）による肺動脈収縮期圧（PAs）> 30 mmHg (2)右心カ

テーテル検査で肺動脈平均圧 (PAm) > 25 mmHg (3) 剖検時の組織所見、を用いた。また、UCGでPAs 70 mmHg 以上または、右心カテーテルでPAm 50mmHg 以上を示すものを、重症PHとした。PH患者を、心、肺、腎疾患に起因しないiPH群と、心、肺、腎疾患に起因するcpPH群に分類した。

層別化された各群における臨床症状・検査所見について、 $\chi^2$ 検定で検討した。

### 3. 倫理面への配慮

主治医によるretrospective studyのため研究対象者に対する不利益や危険性はない。また、得られた調査票の管理を厳重にし、プライバシーの保護に留意した。

## C. 研究結果

### 1. 膠原病重複例におけるPHの解析

MCTD 297例において他の膠原病の診断基準を満足する症例を調べた。278例が他の膠原病診断基準を満足し、その内訳では2つ以上の膠原病が診断されるOL(+)MCTDは120例で、一方、OLの診断がつかないOL(-)MCTD例は177例であった。また、OL 148例のうちMCTDの診断に至らないMCTD(-)OLは28例であった。

膠原病重複例におけるiPHの合併率を調べたところ、OL(-)MCTDの10%に比して、OL(+)MCTDは26%と、iPHは高頻度であった。一方、MCTD(-)OLでは11%であった(図1)。

ついで、iPH合併MCTDの臨床特徴を調べた。MCTDをOL基準で二群に分け、さらにiPH陽性例の臨床症状を解析した。iPH合併OL(+)MCTDでは、iPH合併OL(-)MCTDに比して、手指硬化、多関節炎、近位筋力低下、筋原性酵素上昇が高頻度であった。

### 2. 重症PH合併MCTD例の解析

MCTD 297例中PHは53例(18%)であった。その内訳は、cpPH 5例に対して、iPHが48例であった。重症PHは10例(3%)で、全例がiPHであった。10例中6例がSScを含むOL基準を満たし、3例がSSc基準を満たした。

重症PH合併MCTD例の臨床特徴を軽/中等症iPH例、または非PH例と比較した。重症PH例は、非iPH例に比して、前腕を越える皮膚硬化、開口障害、舌小帯短縮、指尖部陥凹性癬痕、食道蠕動運動低下など、SScに特徴的な所見を高頻度に認めた(図2)。

さらに、重症PH例は、非iPH例に比し、肺線維症の頻度が高かったが、上肺野におよぶ肺線維症の頻度

には差を認めなかった(図3)。また、重症PH例は、軽/中等症PH例に比して、関節炎の頻度が高く、リンパ球減少の頻度が低かった(図3)。

### 3. PHの病因・病態と関連する免疫異常の追究

抗U1 RNP抗体陽性OL例における、iPHの合併頻度を調べた。抗体陽性例では123例中32例(26%)と、陰性例の25例中2例(8%)に比して、高頻度であった(図4)。

つぎに、他の特異自己抗体の関与を追究するため、MCTD例において、併存自己抗体とiPHの関連を調べた。抗リボソーム抗体、ループス抗凝固因子、抗トポイソメラーゼI抗体、抗SS-A/Ro抗体陽性例では、iPHの合併率が高かった。抗U1 RNA抗体や抗U2 (U1/U2) RNP抗体陽性例では、30%を超えるiPH合併頻度を示した(表1)。

## D. 考察

本研究では、PHの病態の追究として膠原病重複例におけるPHの解析、重症PH合併MCTD例の解析、およびPHの病因・病態と関連する免疫異常の追究を行った。

昨年度の本研究において、膠原病におけるPHの頻度を検討したところ、膠原病2,102例におけるPH合併は7%であった。特に膠原病重複症状を示すMCTD、OL例では、MCTDでは18%、OLでは27%と、他の疾患に比して合併率は高かった<sup>6)</sup>。そこで、膠原病重複例をMCTDおよびOL基準に従い、三群に分けて、頻度および臨床特徴を検討した。膠原病重複例におけるiPHの合併率は、OL(+)MCTD、OL(-)MCTD、MCTD(-)OLの順に高く、MCTDとOLの基準をともに満足することがiPHと関連する可能性が示された。

昨年度の本研究において、PHの診断にあたり、従来の心臓カテーテル法に加え、UCGによる早期例を含めた多数例を検討することで、臨床免疫学的特徴を明らかとした<sup>6)</sup>。しかし一方で、軽症例のなかでいかなる症例が重症PHへ移行するかなど、PHの自然経過は不明な点も多い。そこで、本研究では、重症PH合併MCTDに着目し、その臨床特徴を解析した。重症PH合併MCTDは10例で、うち9例がSScの診断を満たしていた。臨床特徴の検討においても、重症PH例は、非iPH例に比して、前腕を越える皮膚硬化、開口障害、舌小帯短縮、指尖部陥凹性癬痕、食道蠕動運動低下など、SScに特徴的な所見が高頻度であり、こうした成績は、SScにおいてPHの合併が高頻度であるとする従来の報告



と合致し、SScとPHの病態が連関する可能性を示している<sup>5-9)</sup>。一方興味深いことに、MCTDでは肺線維症の合併が45%と高頻度であるにもかかわらず、軽/中等症PHを含めてもcpPHの併発は少なく、重症PH例はいずれもiPHであった。さらに、重症PH例では、肺線維症の頻度が高いものの、上肺野におよぶ肺線維症の頻度には差を認めなかった。これは、高度の肺線維化が必ずしも重症PHと関連しないことを示しており、重症PHの発症機序を考える上で示唆に富む成績と考えられた。

MCTDに合併するPHの病因は不明であるが、肺動脈血管病変に基づくものであることが推測されている。病理学的に、肺動脈、細小動脈の内膜、中膜の肥厚と内腔の狭小化を特徴とするが、種々のサイトカインや増殖因子などの液性因子がこの過程に関与する可能性も考えられている。膠原病においては自己細胞成分に対する多彩な自己抗体産生が特徴であり、これら自己抗体と膠原病の臨床症状、所見との密接な関連が明らかにされ、一部の自己抗体では、病因的意義も指摘されている<sup>10)</sup>。MCTDにおける高率なPHの合併は、MCTDに特徴的な抗U1 RNP抗体とPHの病態との間に関連がある可能性が示唆されるものの、詳細は不明であった。本研究では、OL例において抗U1 RNP抗体とPHの密接な関連が明らかとなった。また、抗U1 RNP抗体と併存しやすい抗U1 RNA抗体や抗U2 (U1/U2) RNP抗体陽性例でiPH合併は高頻度であり、U1 RNPまたはその関連分子に対する自己免疫応答がiPHの病態関わる可能性も考えられる。今後、他の膠原病においても抗U1 RNP抗体とPHの関連を検討することが必要と考える。さらに、他の特異自己抗体との関与を調べたところ、MCTD例において、抗リボソーム抗体、ループス抗凝固因子、抗トポイソメラーゼI抗体、抗SS-A/Ro抗体陽性例では、iPHの合併率が高く、多彩な自己免疫異常がPHと関連する可能性が示唆された。一方で、PHの発症と関連する未知の自己抗体や液性因子などが存在する可能性も考えられる。PHの病因・病態の追究は、今後の重要な課題である。

## E. 結論

PH合併MCTD例の臨床免疫学的特徴が明らかとなった。

## 文 献

1. Sullivan WD, Hurst DJ, Harmon CE et al. :A prospective evaluation emphasizing pulmonary involvement in patients with mixed connective tissue disease. *Medicine (Baltimore)* 63:92-107, 1984.
2. Burdt MA, Hoffman RW, Deutscher SL, Wang GS, Johnson JC, Sharp GC. :Long-term outcome in mixed connective tissue disease: longitudinal clinical and serologic findings. *Arthritis Rheum* 42:899-909, 1999.
3. 鳥飼勝隆, 深谷修作, 国枝武義, 東條 毅. :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.
4. Magliano M, Isenberg DA, and Hillson J. :Pulmonary hypertension in autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 46:1997-2009, 2002.
5. Yamane K, Ihn H, Asano Y, et al. :Clinical and laboratory features of scleroderma patients with pulmonary hypertension. *Rheumatology (Oxford)* 39:1269-1271, 2000.
6. 諏訪 昭, 野島崇樹, 平形道人. ;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. 厚生労働省特定疾患疾患対策研究事業 混合性結合組織病に関する研究班平成14年度総括・分担研究報告書 67-72, 2003.
7. Ungereer RG, Tashkin DP, Clements PJ, et al. :Prevalence and clinical correlates of pulmonary arterial hypertension in progressive systemic sclerosis. *Am J Med* 75:65-74, 1983.
8. Koh ET, Lee P, Gladman DD, Abu-Schakra M. :Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: an analysis of 17 patients. *Br J Rheumatol* 35:989-993, 1996.
9. Stupi AM, Steen VD, Owens GR, Barnes EL, Rodnan GP, Medsger TA Jr. :Pulmonary hypertension in the CREST syndrome variant of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 29:515-524, 1986.
10. 諏訪 昭: 自己抗体陽性. 診断と治療 92:241-246, 2004.

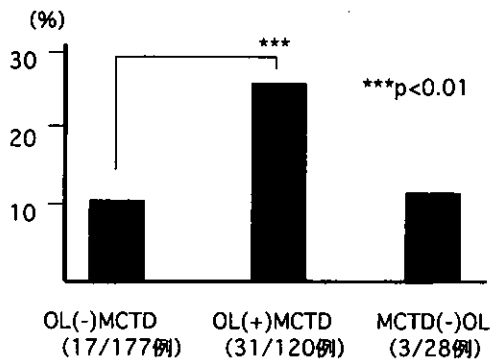


図1. 膠原病重複例におけるiPHの合併率

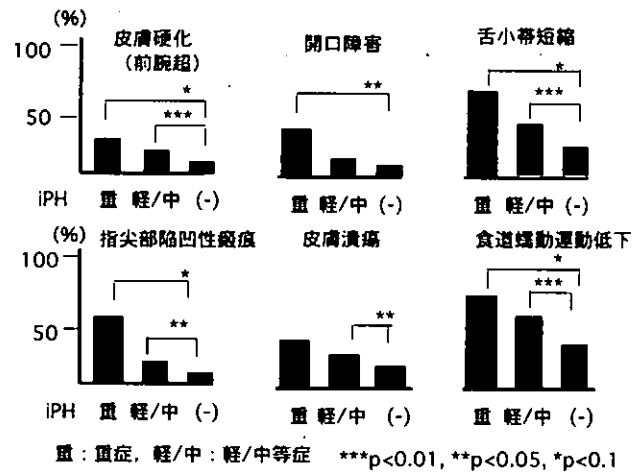


図2. 重症PH合併MCTD例の臨床特徴(1)

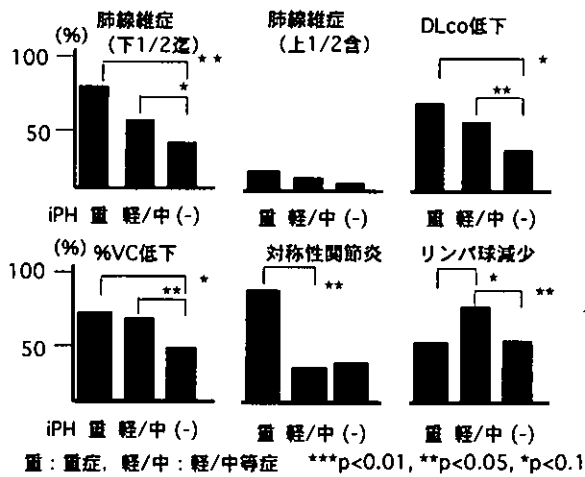


図3. 重症PH合併MCTD例の臨床特徴(2)

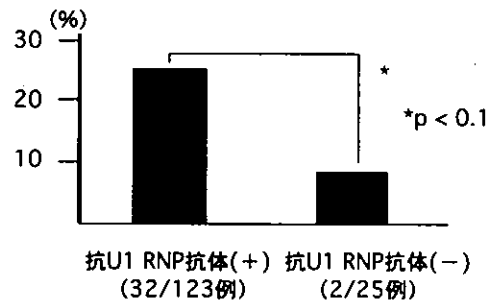


図4. 抗U1 RNP抗体陽性OL例におけるiPHの合併率

表1. MCTD例における自己抗体とiPHの合併率

	陽性	陰性
抗U1 RNA抗体	36% (5/14)	18% (6/34)
抗リボソーム抗体	33% (5/15)	15% (40/270) **
抗Ku抗体	33% (3/9)	16% (39/248)
抗U2 (U1/U2) RNP抗体	30% (3/10)	10% (20/175)
ループス抗凝固因子	29% (7/24)	11% (9/85) **
抗トポイソメラーゼI抗体	27% (7/26)	15% (39/260) *
抗SS-A/Ro抗体	21% (33/155)	11% (13/120) ***
抗SS-B/La抗体	21% (7/34)	15% (39/259)
抗Sm抗体	18% (24/131)	14% (22/162)
抗dsDNA抗体	17% (26/150)	16% (9/56)

\*\*\*p<0.01, \*\*p<0.05, \*p<0.1

## CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF JAPANESE PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASES ASSOCIATED WITH PULMONARY HYPERTENSION (II)

Akira Suwa, Takaki Nojima, Yuko Kaneko, Sinji Sato, and Michito Hirakata

Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Pulmonary hypertension (PH) is one of the important manifestations in patients with connective tissue diseases (CTD), especially mixed connective tissue diseases (MCTD). To clarify the clinical and immunological features for its poor prognosis associated with PH, we have encountered 2,102 consecutive new patients with CTD evaluated at our hospital during the period 1962-2001. Then, analysis of patients with overlapping features complicating with PH, analysis of patients with MCTD complicating with severe PH, and analysis of autoantibodies associated with PH were performed.

Patients with overlapping features were divided into three groups according to diagnostic criteria for MCTD and overlap syndrome (OL); OL(+)MCTD, OL(-)MCTD, and MCTD(-)OL. Isolated pulmonary hypertension (iPH) were most frequently found in OL(+)MCTD group, suggesting that the fulfilling the both criteria for MCTD and OL might be correlated with the high prevalence of iPH. Fifty three of 297 (18%) with MCTD developed PH (iPH : cpPH = 48:5). Ten cases of severe PH (defined as PAs  $\geq$  70mmHg by UCG or PAm  $\geq$  50mmHg by heart catheter examination) were identified. All of them were classified as iPH. Six cases were diagnosed as OL including SSc and 3 cases were diagnosed as SSc. When the clinical characteristics of patients with severe PH were compared with those of non-PH patients, proximal scleroderma, difficulty in opening mouth, traction of lips, pitting scar, and esophageal dysfunction were more common. Although pulmonary fibrosis was common in patients with severe PH, severe fibrosis was not associated with severe PH, indicating that severity of fibrosis may not correlate with severe PH. When the clinical characteristics of patients with severe PH were compared with those of mild to moderate PH patients, arthritis was more common and lymphopenia was less common. Anti-U1 RNP antibodies were associated with iPH in OL. Anti-ribosome antibodies, lupus anticoagulant, anti-topoisomerase I antibodies and anti-SS-A/Ro antibodies were associated with iPH in MCTD.

These results suggest that MCTD patients with PH may constitute clinically and immunologically characteristic features.

## 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

分担研究者：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助教授

研究協力者：釜田康行、奈良浩之、佐藤英智、簗田清次

自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学部門

### 研究要旨

症例は39歳女性。2002年12月よりレイノー症状および労作時呼吸困難が出現。2003年10月より労作時呼吸困難が増悪したため11月当科入院。入院後混合性結合組織病（MCTD）、シェーグレン症候群、肺高血圧症と診断。ステロイドパルス療法、後療法としてプレドニゾン50mg/日の投与を行った。治療開始4週間後の右心カテーテル検査にて、肺動脈圧は治療開始前に比べて約30%の低下を認めた。また治療開始前、右心カテーテル留置下でsildenafil負荷を行ったところ、服用後40分で肺動脈圧および肺血管抵抗の低下を認めた。さらにsildenafil負荷後に手指表面温度の上昇を認めた。以上の結果より、MCTD合併肺高血圧症の治療としてステロイド大量療法およびsildenafilが、レイノー症状の治療としてsildenafilが有効である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）は、臨床的特徴としてレイノー症状が高頻度に認められる<sup>1)</sup>。またMCTDでは膠原病の中で最も肺高血圧症を合併する頻度が高く、主要死因の第1位を占めている<sup>2)</sup>。しかしながら、その発症機序は解明されておらず、また治療法も確立されていない。今回われわれは、MCTD合併肺高血圧症およびレイノー症状に対して有効な治療方法を症例を通して検討することを目的とした。

### B. 研究方法

血管拡張薬が投与されていないMCTD合併肺高血圧症の患者に、ステロイドパルス療法（メチルプレドニゾン1g/日、3日間）を施行し、後療法としてプレドニゾン50mg/dayの経口投与を行った。ステロイド治療開始前と4週間後に肺動脈圧を含め病勢の評価を行った。また、同患者に対してステロイドによる治療開始前に、Swan-ganz catheterを留置し、肺動脈圧および右心系の圧を測定した。次いで、患者に詳細な説明を行い了解を得た上でsildenafil citrate 50mgを経口投与し、40分後に再度肺動脈圧および右心系の圧を測定した。さらにステロイドによる治療開始から4週間後、

thermogramにて両手手指の表面温度を測定した後、sildenafil citrate 50mgを経口投与し、60分後に再度両手手指の表面温度を測定した。

### C. 研究結果

[症例] 39歳女性

[主訴] 労作時呼吸困難。

[既往歴] 1996年4月特発性血小板減少性紫斑病（ITP）と診断され6月に脾臓摘出術施行。2002年5月よりITPに対しシクロスポリン100mg/日内服開始。

[現病歴] 2002年12月よりレイノー症状および労作時呼吸困難が出現。2003年7月頃より両手手指の腫脹が出現。10月頃より労作時呼吸困難が増悪したため近医受診。胸部X-Pにて心拡大および心エコーにて肺動脈圧の上昇（70mmHg）を認め、抗RNP抗体が陽性であったことからMCTDおよび肺高血圧症疑いにて当科入院となった。

[入院時現症] 身長153cm、体重54kg、意識清明、体温35.4度、血圧142/104mmHg、脈拍数86/分、整。結膜に貧血、黄疸の所見なく、表在リンパ節は触知しなかった。心音でⅡ音の亢進、LevineⅡ/Ⅵの収縮期雑音を聴取した。呼吸音に異常なく、腹部は平坦、軟、