

り得られた。

同意を得た健常成人の末梢静脈血から比重遠心法により末梢血単核球(PBMC)を得、MACS Monocyte Isolation Kit II(ミルテニイバイオテック社)を用いて単球を分離した。

THP-1( $4 \times 10^5$ /ml)を抗リボソームP抗体あるいは対照ヒトIgG( $5 \mu\text{g/ml}$ )と共に24時間培養後、細胞および培養上清を回収した。単球は、IFN- $\gamma$  (1000 units/ml)の存在あるいは非存在下で、抗リボソームP抗体あるいは対照ヒトIgG( $5 \mu\text{g/ml}$ )と共に培養し、48時間培養後に細胞を回収し、5日間培養後に培養上清を回収した。一部の実験では、単球は、IFN- $\gamma$ の非存在下で、抗リボソームP抗体、同じ患者の抗リボソームP抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片あるいは対照ヒトIgG( $3 \mu\text{g/ml}$ )と共に培養し、5日間培養後に培養上清を回収した。

細胞表面上のリボソームP抗原の発現をフローサイトメトリーにて検討した。細胞を抗リボソームP抗体あるいは対照ヒトIgG( )と2%ヤギ血清を含むPBS液中で4°Cで30分反応させた。その後にFITC標識F(ab')<sub>2</sub>ヤギ抗ヒトIgG(カペル社)と4°Cで30分間反応させ、propidium iodide ( $50 \mu\text{g/ml}$ )を添加した後、EPICS XLフローサイトメーター(コールター社)を用いて染色パターンを解析した。propidium iodide陽性の死細胞を解析から除外した。一部の実験では、propidium iodideのかわりにPE標識したannexin V(バイオビジョン社)で染色した。

培養上清中のVEGF (vascular endothelial growth factor) は、Human VEGF ELISA Kit(バイオソース社)を用いて測定した。培養上清中のTNF $\alpha$ は、Human TNF $\alpha$  ELISA Kit(バイオソース社)を用いて測定した。培養上清中のIL-6は、MH60. BSF2を用いたバイオアッセイにより測定した。

総RNAはTRIzol試薬(インビトロジェン社)を用いて精製した。1 $\mu\text{g}$ のRNAより、オリゴdTプライマーを用いて、cDNAを合成した。TNF $\alpha$ およびIL-6のmRNAの定量は、LightCycler(ロシュ社)を用いて、SYBR Green染色にて

行った。内部標準として、 $\beta$ -actinを使用した。

#### (倫理面への配慮)

血液提供者に対しては、文書にてインフォームドコンセントを得た上でそのプライバシーが保護されるよう配慮する。

### C. 研究結果

フローサイトメトリーでの解析の結果、4名のSLE患者血清から精製した抗リボソームP抗体は、いずれもTHP-1と強い結合を示した。THP-1の表面上には、恒常的にリボソームP抗原の発現が認められることが明らかとなった。末梢血単球は活性化していない状態ではリボソームP抗原を発現していなかったが、IFN- $\gamma$  (1000 units/ml)の存在あるいは非存在下でプレートへの接着刺激後48時間以後においては、抗リボソームP抗体は単球の表面と有意の結合を示した。この結合は22残基の合成リボソームPペプチド ( $800 \mu\text{g/ml}$ )の添加によりほぼ完全に阻止された。annexin V陽性の細胞は、精製したばかりの単球では4.5%、平底プレート上で48時間培養後の単球で2%と非常に少数であった。annexin V陽性の単球表面上にリボソームP抗原の発現が認められた。一方、annexin V陰性の単球表面上には、休止期ではリボソームP抗原の発現が認められないが、培養により活性化するとリボソームP抗原の発現が認められた。

抗リボソームP抗体は対照IgGに比し、用量依存性にTHP-1からのVEGFの産生を増強した。さらに、6名のSLE患者から精製した抗リボソームP抗体について検討したところ、抗リボソームP抗体は対照IgGおよび抗リボソームP抗体を含まない患者IgG分画に比し、統計学的に有意にTHP-1からのVEGF産生を促進した。

抗リボソームP抗体は対照IgGに比し、IFN- $\gamma$  (1000 units/ml)の存在あるいは非存在下で、用量依存性に末梢血単球からのTNF $\alpha$ およびIL-6の産生を促進した。次に、複数の健常成人より分離した単球について検討したとこ

ろ、ある特定のSLE患者から精製した抗リボソームP抗体は対照IgGおよび抗リボソームP抗体を含まない同じ患者IgGに比し、IFN- $\gamma$ の存在あるいは非存在下で、統計学的に有意に単球からのTNF $\alpha$ およびIL-6産生を促進した。さらに、特定の健常成人より分離した単球に対して、8名のSLE患者から精製した抗リボソームP抗体について検討したところ、抗リボソームP抗体は対応する患者の抗リボソームP抗体を含まないIgG分画に比し、IFN- $\gamma$ の存在あるいは非存在下で、統計学的に有意に単球からのTNF $\alpha$ およびIL-6産生を促進した。

リアルタイムPCR法によりmRNAを定量した所、同様に抗リボソームP抗体は、IFN- $\gamma$ の存在あるいは非存在下で、統計学的に有意に単球のTNF $\alpha$ およびIL-6のmRNA発現を促進した。

抗リボソームP抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片は抗リボソームP抗体と同程度に活性化した末梢血単球からのTNF $\alpha$ およびIL-6の産生を増強した

#### D. 考察

ヒト単球系細胞は、休止期ではリボソームP抗原を表面に発現していないが、活性化に伴いリボソームP抗原を表面に発現することが明らかとなった。これはアポトーシスに伴った局在変化により細胞内リボソームP蛋白が細胞表面に出現する現象とは異なることが示唆された。抗リボソームP抗体と活性化した末梢血単球との結合は22残基の合成リボソームPペプチドに特異的であることが明らかとなった。活性化した単球が実際に全配列のリボソームP蛋白を表面に発現しているかどうか確かめるために、さらなる研究が必要であろう。

以前の報告によれば、PR-3 ANCA

(proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibodies)が単球からのIL-8の放出を促進する機序にはFc $\gamma$ 受容体の架橋が必要であることが明らかにされている。それとは対照的に、抗リボソームP抗体が活性化した末梢血単球からのTNF $\alpha$ およびIL-6の産生を増強する

機序には、Fc $\gamma$ 受容体の架橋を要さないことが示唆された。

CNSループスでは、脳脊髄液中のIg indexの増加やIL-6およびIFN- $\alpha$ の上昇などのCNS内での免疫異常が病態形成上重要な役割を果たすことが明らかにされている。血清中の抗リボソームP抗体とCNSループスとが有意に相関することが示されてきているが、髄液中では抗リボソームP抗体は認められない。したがって、抗リボソームP抗体が神経細胞に対して直接に作用している証拠はこれまでのところない。一方、TNF $\alpha$ およびIL-6は血管内皮細胞の表面に接着分子を誘導することが報告されている。抗リボソームP抗体は、活性化した単球と結合することにより、VEGF、TNF $\alpha$ およびIL-6などのサイトカインの産生を増強することにより、血管新生を促進し、血管透過性を亢進させ、さらに血管内皮細胞に接着分子を誘導することにより、CNS内への免疫担当細胞の侵入を容易にし、CNS内での免疫異常の発生に関与している可能性が考えられる。抗リボソームP抗体が認識するエピトープが血管内皮細胞の表面にも発現していることが報告されている。抗リボソームP抗体の血管内皮細胞の機能に対する直接の影響を検討することも有用であろう。

今回の研究では、抗リボソームP抗体の健常人由来の単球におよぼす影響を検討してきたが、SLE患者より分離した単球を用いたさらなる研究も必要となるであろう。

#### E. 結論

抗リボソームP抗体は活性化した単球系細胞からVEGF、TNF $\alpha$ およびIL-6の産生を増強することにより、SLEの様々な病態に影響を及ぼす可能性が示唆された。抗リボソームP抗体が単球系細胞に結合することにより生じる機能変化や、抗リボソームP抗体が血管内皮細胞と直接結合することにより生じる影響を今後さらに検討していくことが、CNSループス発症機序の解明の上でも重要であると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・Kikuchi H, Isshi K, Hirohata S. Inhibitory effects of bucillamine on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Int Immunopharm* 4: 119-126, 2004

・Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, et al. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization. *Arthritis Rheum* 50: 3888-3896, 2004.

・広畑俊成、菊地弘敏. <難治性病態の治療戦略> 腸管Behcet病 *内科* 93: 309-311, 2004.

・大島信治、広畑俊成. 成人発症Still病と肺病変 *呼吸器科* 5:242-246, 2004.

・広畑俊成. 抗リボソーム抗体と全身性エリテマトーデス *炎症と免疫* 12: 293-299, 2004.

・広畑俊成. 関節リウマチにおけるB細胞の関与 —抗原特異的B細胞活性化 医学のあゆみ 209: 796-800, 2004.

・広畑俊成、菊地弘敏. 中枢神経系に血管炎をきたす疾患 *リウマチ科* 31:447-451, 2004.

・広畑俊成. 膠原病の難治性病態 中枢神経病変 *日本臨床免疫学会会誌* 27:109-117, 2004.

### 2. 学会発表

・Hirohata S. Histopathology of central nervous system lesions of Behcet's Disease. XI International Congress on Behcet's Disease, Turkey, p.S131, 2004.

・Aramaki K, Arinuma Y, Kikuchi H, et al. Evaluation of the severity of Behcet's disease. XI International Congress on Behcet's Disease, Turkey, p.S87, 2004.

・Kikuchi H, Hirohata S. Histopathological analysis of intestinal involvement in Behcet's disease. The 11th APLAR Congress, Jeju, Korea, 2004.

・Aramaki K, Kikuchi H, Hoshino E, et al. Preliminary criteria for the evaluation of the severity of Behcet's disease. The 11th APLAR Congress, Jeju, Korea, 2004.

・Hirohata S, Yangida T, Kunugiza Y, et al. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: its possible role in synovial neovascularizations. 68th Annual Scientific Meeting, ACR, San Antonio, *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S1349, 2004.

・広畑俊成、柳田たみ子、南平昭豪、他. 関節リウマチ骨髄CD34+細胞からの血管内皮細胞の分化：関節滑膜増殖との関連 第25回日本炎症・再生医学会(東京)、p. 438、2004.

・柳田たみ子、橋本英雄、富田哲也、他. 関節リウマチ患者骨髄CD34陽性細胞からのfibroblast様細胞分化に対するbucillamineとmethotrexateの作用 第34回日本免疫学会総会・学術集会(札幌)、p. 168、2004.

・有沼良幸、荒巻芸、永井立夫、菊地弘敏、柳田たみ子、広畑俊成. ループス精神病患者血清中にはリボソームP蛋白のC末端22アミノ酸以外の抗原決定基に対する抗体が認められる 第34回日本免疫学会総会・学術集会(札幌)、p. 283、2004.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

膠原病に合併する間質性肺炎・肺線維症に対する新たな治療戦略の確立に関する実験的研究

分担研究者 土肥 眞（東京大学保健センター内科・助手）

**研究要旨** 本研究では、マウスブレオマイシン実験的肺線維症の系を対象とし、この系に interleukin (IL)-12あるいはIL-10を産生するプラスミドベクターを投与することによって、生体内で高濃度にそれらのサイトカインを発現させ、肺傷害や線維化に与える影響について検討した。その結果、Th1型サイトカインである IL-12は、線維化を促進した。次に、Th2型サイトカインである IL-10は、幅広い免疫調節・抑制用を有すると同時に、抗線維化作用を示す事が、線維芽細胞の系で認められている。IL-10産生プラスミドの投与は、肺の線維化を抑制した。さらに、IL-10は肺内でのTGF- $\beta$ の産生を抑制し、肺線維化を抑制した。抑制効果の程度は、プラスミドをブレオマイシン投与の前と後でそれぞれ導入した場合、ほぼ同等であった。免疫染色の結果、TGF- $\beta$ の産生細胞としては、肺胞マクロファージが考えられた。さらに、IL-10は、ブレオマイシンを投与したマウスより採取し培養した肺胞マクロファージならびにLPSで刺激したマクロファージ細胞株からのTGF- $\beta$ の産生を抑制した。以上より、IL-10は刺激を受けた肺胞マクロファージからのTGF- $\beta$ の産生を抑制することによって、肺線維化の程度を抑制する事が明らかになった。

**A. 研究目的**

全身性の自己免疫疾患である膠原病には、間質性肺炎・肺線維症が高い頻度で発症し、時として生命予後を決定する因子となる。一般的に膠原病に随伴する肺病変では、患者の肺内ではリンパ球を中心とする炎症性細胞がしばしば増加しており、何らかの免疫学的な機序により引き起こされる炎症が先行して病態形成に影響を及ぼし、その結果として肺の線維化に至ると考えられる。

一方、interleukin (IL)-12や interferon gamma (IFN- $\gamma$ )はTh 1型サイトカインとして、一方 IL-10はTh2型サイトカインとして、免疫学的な炎症の制御、修飾に預かっている事がひろく知られている。

本研究は、マウスのブレオマイシン

(Bleomycin: 以下Bleo) 惹起性肺線維症の実験系を用い、これに種々の炎症性あるいは抗炎症性サイトカインを産生するプラスミドベクターを投与する事によって、生体内に高濃

度のサイトカインを誘導発現させて、それにより肺の線維化形成がどのように修飾されるかについて検討する事を目的とする。

**B. 研究方法**

C57BL/6マウス（雄8週齢）を用いた。ペントバルビタールを用いて腹腔内麻酔後、気管切開を施行し、頸部気管より、Bleo溶液（0.1unit/50 $\mu$ l 生理食塩水:生食）を投与した。コントロールとして、同量（50 $\mu$ l）の生理食塩水を投与した。大腿部筋肉に、pCACGベクター（IFN- $\gamma$ , IL-12cDNAをそれぞれ含む）を100 $\mu$ gずつ、電気パルス刺激をかけて導入した。IL-10産生ベクター(pCACGIL-10)については100 $\mu$ gを、リンゲル液0.5mlに溶解し、尾静脈よ約5秒間で静脈注射した。陽性コントロールとして、1)プラスミドを含まないリンゲル液(Bleo-lac群)、2)サイトカインcDNAを含まないコントロールベクター(Bleo-cont V群)の2群を設定した。ベクターの投与は、筋肉内

投与群 (IFN- $\gamma$ , IL-12) ではBleo投与直後に、経静脈内投与(IL-10)ではBleo投与2日前(前投与群)あるいは投与翌日(後投与群)に実施した。投与14日目(d14)に、体重を測定した後に麻酔し、1)採血、2)気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF)、3)肺標本を採取した。血清は今後の解析のために凍結保存した。BALFは、分画算定のためのサイトスピン標本を作成すると共に、ヘモサイトメーターを用いて細胞数を計測した。IL-10投与実験群では、BALF上清を用いて、TGF- $\beta$ の総量(活性型と非活性型との総和)をELISA法にて測定した。左肺は線維化の指標であるhydroxyproline (Hyx. P)の測定に用いた。右肺はホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。さらに、IL-10投与実験群では、肺標本を用いて、活性型TGF- $\beta$ 1の免疫組織染色を行った。さらに、Bleoを投与したマウスより肺胞マクロファージを採取して培養し、TGF- $\beta$ の産生ならびにそれに及ぼすIL-10の効果について検討した(ex vivo)。マクロファージ細胞株である J774.1細胞をLPSで刺激し、TGF- $\beta$ の産生ならびにそれに及ぼすIL-10の効果についても検討した(in vitro)。

(倫理面への配慮)

マウスへの薬剤投与ならびに検体採取においては、十分な麻酔下を実施し、痛み刺激等を最小限にした。

## C. 研究結果

### 1. 体重変化

生食群に対して Bleo群ではいずれも低下傾向を示した。IL-12投与群では最も低下していた。Bleo-IL-10群とBleo-cont V群とで差は認められなかった。

### 2) BALF細胞所見

生食群と比べ、Bleo群ではいずれも総細胞数およびリンパ球数、好中球数が増加していた。特にIL-12投与群で最大の増加傾向を示した。細胞分画では、Bleo群ではいずれも好中球とリンパ球が増加していた。好中球の増加

は、IL-12群で最大であった。IL-10前投与群ではこれらの増加は有意に抑制されたが、後投与群では有意な抑制は認められなかった。

### 3) 肺内Hyx. P量

生食群と比べ、Bleo群ではいずれもHyx. P量が増加していた。IL-12投与群で増加は最大であった。Bleo-IL-10群では、この増加は前投与でも後投与でも有意に抑制された。

### 4) BALF TGF- $\beta$ 濃度

肺内Hyx. P量と同様の傾向が認められた。

### 5) TGF- $\beta$ の免疫組織染色

陽性コントロール群の肺では、活性型TGF- $\beta$ 1は、線維化を起こした間質と肺胞マクロファージとに強く発現していた。一方、Bleo-IL-10投与群では、この発現は強く抑制されていた。前投与でも後投与でも同様であった。

### 6) 肺胞マクロファージからのTGF- $\beta$ の産生

IL-10は ex vivoならびに in vitroのいずれの系でも抑制効果を示した。

## D. 考察

Th1型サイトカインである interleukin (IL)-12を生体に投与して、その効果を検討した所、IL-12の投与はブレオマイシンにより惹起される肺線維化を増悪させた。近年、肺線維化の過程における Th1/Th2バランスが重要視され、特に Th2型反応の関与が指摘されて来ている。しかし、我々の結果は、Th1型サイトカインを投与して Th1/Th2バランスを修復しても肺線維化は抑制出来ないことを示している。そこで、広く免疫調節作用を有するIL-10を投与してその効果を検討した所、肺線維化は有意に抑制された。その抑制機序として、肺胞マクロファージからのTGF- $\beta$ 産生を抑制する事を明らかにした。ブレオマイシン肺線維症のモデル系におけるIL-10の治療効果については、Hayashiらの報告がある。彼等はIL-10産生プラスミドをHVJリポソームとともに Bleo気管内投与の前に腹腔内投与し、炎症ならびに線維化に対する効果を確かめている(Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000)。

今回我々が用いたプラスミドの急速静脈内投与法は、数ng/mlオーダーの高い血中濃度を達成できる利点があり、これによって、より強くIL-10の活性を生体内で発揮できる。その結果、従来の報告と同様に前投与で効果を発揮したのみでBleo投与の後にベクターを投与した場合にも、同等の抑制効果を得る事が可能であったと考えられる。さらに、今回の検討で新たに、IL-10の高濃度生体内発現によって、線維化を促進する成長因子であるTGF- $\beta$ の、肺における産生が抑制される事が明らかとなった。肺におけるTGF- $\beta$ の産生細胞としては、間質の線維芽細胞の他に、肺泡マクロファージが考えられた。Ex vivo ならびにin vitroでの検討により、IL-10は刺激されたマクロファージからのTGF- $\beta$ の産生を抑制する事が確認された。

#### E. 結論

Th1型サイトカインである IL-12は、ブレオマイシン惹起性の肺傷害を増悪させた。一方、IL-10は、活性化された肺泡マクロファージか

らのTGF- $\beta$ 産生を抑制することによって、この実験的肺線維症において、線維化を抑制した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okunishi K, et al. A novel role of cysteinyl leukotrienes to promote dendritic cell activation in the antigen-induced immune response in the lung. *J Immunol* 173:6393-6402, 2004.

##### 2. 学会発表

中込一之、土肥眞、奥西勝秀、田中良一、山本一彦。実験的肺線維症モデルにおけるIL-10の治療効果に関する研究。第7回間質性肺炎細胞分子病態研究会（東京）抄録集 p.29.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## 皮膚筋炎／多発性筋炎の間質性肺炎に対するシクロホスファミド間歇大量療法の有用性に関する研究

分担研究者 山田 秀裕（聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科・助教授）

**研究要旨** 皮膚筋炎/多発性筋炎に合併する急性型間質性肺炎は予後不良の難治性疾患である。本研究は、教室で経験した129例の症例解析から、予後不良予測因子を明らかにし、日和見感染症対策が予後を左右する重大な要素であることを明らかにした。また、初期治療としてIVCY療法を受けた症例とシクロスポリンまたはアザチオプリンで治療された症例の長期予後調査を行い、対照比較研究を行った結果、IVCY療法の寛解導入、寛解維持に関する有用性を明らかにした。さらに、IVCYを対照としたタクロリムスの有用性を検討する前向き臨床試験プロトコールを作成した。

### A. 研究目的

皮膚筋炎/多発性筋炎に合併する急性型間質性肺炎は、短期的にも長期的にも予後不良の難治性疾患である。これまで、シクロスポリンの有効性を指示する成績が報告されてきたが、寛解導入率や長期的生命予後に対する効果は必ずしも満足するものではなかった。本研究では、シクロホスファミド間歇大量療法(IVCY)の成績を、過去に行われたシクロスポリンを含む他の免疫抑制薬の成績と比較検討して、その有用性を明らかにすることを目的とした。さらに、予後不良なDMの間質性肺炎に対する治療法とその予後に関するEBMを確立するため、IVCYとタクロリムス経口投与との有用性を比較する多施設共同無作為割付比較対照試験(RCT)を行う。

### B. 研究方法

過去10年間にPM47例、DM66例、amyopathic DM16例の計129例を経験し、間質性肺炎はPM21例(45%)、DM39例(59%)、ADM9例(56%)に合併していた。このうち、高分解能CTによる解析可能な症例を対象として、その予後調査を行った。さらに、皮膚筋炎/多発性筋炎に合併した急性型間質性肺炎の病歴調査(1999年まで)並びに前向きコホート調査(2000～2004年)の結果

をもとに、初期治療としてIVCY療法を受けた症例と他の免疫抑制薬の投与を受けた症例の長期臨床経過を比較した。さらに、その成績と文献的根拠とを総合して、EBM確立のためのランダム化比較対照前向き臨床試験プロトコールを作成した。

### C. 研究結果

間質性肺炎の臨床病型は急速進行性、亜急性、無症候性に分類された。無症候性を除く33例中9例は初期治療に反応せず、2ヶ月以内に死亡した。急性期治療に反応しない予後不良群は、全例DMであり急性発症で入院時低酸素血症を呈し、高分解能CT所見が広範な症例が有意に多く、これらの因子は多重ロジスティック回帰分析においても予後予測因子として抽出された。初期治療反応群の中で、ステロイド単独投与群の70%は2年以内に間質性肺炎の再燃がみられたのに対し、シクロホスファミド併用群では治療を中断した1例のみであった。また、間質性肺炎の急性増悪とカリニ肺炎などの日和見感染症との鑑別にHRCT所見が有用であった。長期生存例のうち在宅酸素療法に至った症例が2例あり、いずれも治療経過中にカリニ肺炎を合併していた。バクタの予防投与が行われた症例にはカリニ肺炎の合併がみられなかった。

次に、DM/PMに合併した急性型間質性肺炎に対し、初期治療としてIVCYを受けた症例は21例(6ADM, 12DM, 3PM)、シクロスポリン(CS)15例(4ADM, 8DM, 3PM)、アザチオプリン(AZ)6例(3DM, 3PM)であった。

治療開始時点における年齢、性、動脈血酸素分圧、肺機能はIVCY群とCS/AZ群との間に有意差がなかった。血清CK値とCK/LDH比はIVCY群で低い傾向が見られた。抗Jo-1抗体陽性率はIVCY群5例(25%)、CS/AZ群8例(40%)であった。

間質性肺炎による急性期死亡はIVCY群に1例、CS/AZ群に8例みられた。初期治療による寛解導入率は、IVCY群19例(90%)、CS群4例(26%)、AZ群4例(66%)であった。

副作用による治療中止例はそれぞれ3例みられた。間質性肺炎の増悪・再燃のために他の免疫抑制薬に変更した症例は、IVCY群に2例、CS/AZ群に5例見られた。

5年生存率はIVCY群(平均観察期間47ヶ月)が94%、CS/AZ群(38ヶ月)が52%であり、Kaplan-Mayerの生命表法分析で両群間に有意差が見られた(Log-rank test:  $p < 0.01$ ) (図1)。

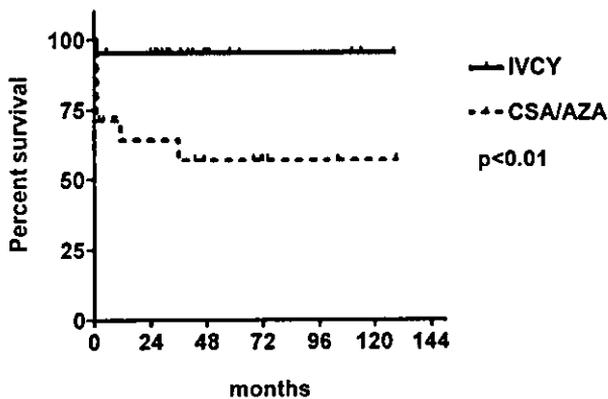


図1 生命表法による生存率の比較

間質性肺炎の増悪・再燃、または副作用のために他の免疫抑制薬に変更した症例は、CS/AZ群に多く見られ、初期治療継続率(寛解維持期間)をKaplan-Mayerの生命表法で比較するとIVCY群はCS/AZ群に比較して有意に高かった(Log-rank test:  $p < 0.002$ ) (図2)。

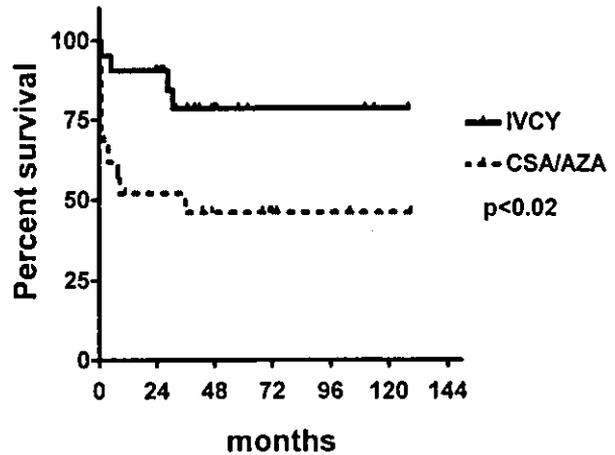


図2 生命表法による治療継続率の比較

また、図3に示すように、肺機能ならびにHRCT上の病変の広がり、IVCY群において有意に改善した。

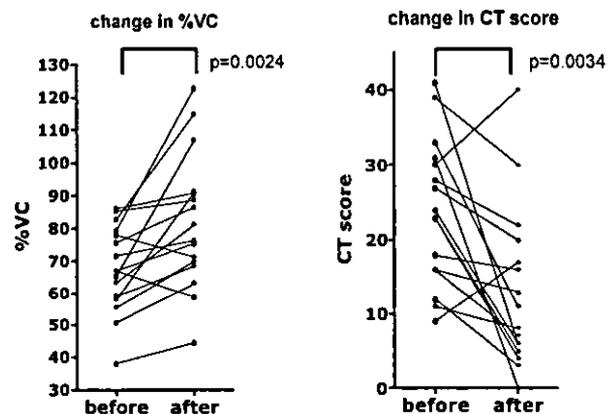


図3 IVCY群における治療前後の肺機能とHRCTスコアの変化

IVCY群において、完全寛解例が7例あり、そのうち6例はIVCYを10ヶ月以上継続していた。

以上の解析結果および文献的根拠をもとにして前向き臨床試験を以下のようにデザインした。対象患者は、amyopathic DMを含むDM患者で抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体が陰性の症候性間質性肺炎合併例とする。悪性腫瘍、感染症合併例は除外する。DM患者で治療開始時に酸素投与を必要とする重症例と、そうでない非重症例とに層別化して、二つの治

療群に無作為割り付けする。試験群はタクロリムス3mgを連日経口投与し、対照群はシクロホスファミドを間歇投与する。両群ともステロイド大量療法（PSL 1mg/kg、重症例はパルス療法可）を併用し、ステロイドは一定の割合で漸減する。シクロホスファミドは15mg/kgを3-4週間毎に6ヶ月間投与し、以後3ヶ月毎に計2年間継続投与する。治療開始時点より呼吸状態が悪化した場合、または間質性肺炎が再燃した場合は治療無効例と判定して他の治療法（タクロリムスはシクロホスファミドまたはアザチオプリン、シクロホスファミドはシクロスポリンまたはアザチオプリンに変更する。主要エンドポイントは死亡、再燃、2年後の肺機能（%VC）とする。日和見感染症対策として一定のプロトコルを定める。2群間の比較解析はintention-to-treat解析とし、1群40症例を目標とする。臨床試験は参加各施設の倫理委員会の承認のもと、患者から文書同意を得て行う。

#### D. 考察

Amyopathic DMを含むDMに合併した急性型間質性肺炎は、予後不良例が少なからずみられ、これまでにシクロスポリンとステロイド併用が多くの施設で試みられてきた。しかし、治療不応例のみならず、いったん改善しても再燃する例や副作用のために継続困難な例も多かった。これに対してIVCY療法は、初期治療反応性に加え、長期に寛解維持する点でCSやAZより優れていることが明らかとなった。今後、長期寛解維持療法として他の免疫抑制薬への切り替えなどに関するエビデンスを確立する必要があると考えられる。また、生物学的製剤を用いた新しい治療法の有用性を検討する上で、IVCY間歇大量療法を比較対照として臨床試験を行うべきものと考えられる。

世界的にPM/DMの間質性肺炎に対する確立した治療法はなく、前向き臨床試験は皆無である。多施設共同で前向き臨床試験を行わない限り、質の高いevidenceは得られない。本臨床試験プロトコルは、発症早期から強力な免疫抑制薬を用いることで、初回寛解率

のみならず、再発予防と長期的呼吸機能維持に対する効果を明らかにしようとするものであり、世界で初めての試みである。さらに、初期治療前の臨床情報の中から治療抵抗例、再燃例などの予後を予測する因子を見いだすことが出来る。

PM/DMの間質性肺炎のような稀少疾患を対象とする前向き臨床試験を我が国で遂行し、質の高いエビデンスを確立するためには、以下の作業が必要と考えられる。1) 現時点で多くの専門医が合意できる標準的治療法と診療プロトコルの作成、2) 標準的治療法を対照として試験的治療法のデザイン、3) 患者outcomeを中心とした評価方法とエンドポイントの設定、4) 全国的な診療ネットワークの形成と全患者の登録システムの確立。5) 予算の確保。今年度の研究は上記の1)～3)について試案を作成し研究班の合意を得る事を目指した。今後は、さらに多くの専門施設に参加を要請し、PM/DMの間質性肺炎の診療ネットワークの構築を目指す。かかる前向き臨床試験のもう一つの意義は、治療開始前に保存された血清などの患者試料を用いて、治療反応性や予後などを規定する因子の解析を可能にする。

#### E. 結論

1. DM/PMの急性型間質性肺炎に対する寛解導入療法としてIVCYはCS/AZAより優れていることが示唆された。
2. IVCYの継続は完全寛解の導入並びに再燃予防に有効である。
3. 寛解維持療法として、より安全性の高い治療法が必要である。
4. タクロリムスとIVCYとのランダム化比較試験を多施設共同で行うことにより、質の高いEBMの確立が期待される。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamasaki Y, H Yamada, M Yamasaki, M Ohkubo, K Azuma, S Matsuoka, Y Kurihara, M

Satoh, S Ozaki. Intravenous Cyclophosphamide for the Treatment of Progressive Interstitial Pneumonia in Patients with Polymyositis /Dermatomyositis.(submitted)

2) 山田秀裕、山前正臣、山崎宜興、大久保道子、東 浩平、鈴木 健小川仁史. 膠原病とその類縁疾患と肺 多発性筋炎・皮膚筋炎 呼吸器科 5:207-213, 2004.

3) Johkoh T, Muller NL, Colby TV, Ichikado K, Taniguchi H, Kondoh Y, Fujimoto K, Kinoshita M, Arakawa H, Yamada H, Suga M, Ando M, Koyama M, Nakamura H. Nonspecific Interstitial Pneumonia: Correlation between Thin-Section CT Findings and Pathologic Subgroups in 55 Patients. Radiology 225:199-204, 2002.

4) Arakawa H, Yamada H, Y. Kurihara, et al. Nonspecific Interstitial Pneumonia Associated With Polymyositis and Dermatomyositis. Chest 123:1096-103, 2003

3) Arakawa H, M. Yamasaki, Y. Kurihara, H. Yamada, Y. Nakajima. Methotrexate-Induced Pulmonary Injury: Serial CT findings. J Thorac Imaging 18:231-6, 2003.

4) 山前正臣、山田秀裕 間質性肺炎 三森経世編 リウマチ・膠原病診療チェックリスト p.67-71, 2004

5) Johkoh T, Muller NL, Colby TV, Ichikado K, Taniguchi H, Kondoh Y, Fujimoto K, Kinoshita M, Arakawa H, Yamada H, Suga M, Ando M, Koyama M, Nakamura H. Nonspecific Interstitial Pneumonia: Correlation between Thin-Section CT Findings and Pathologic Subgroups in 55 Patients. Radiology 225:199-204, 2002.

## 2. 学会発表

1) 野崎俊子、山田秀裕、大久保道子、山崎宜興、東 浩平、尾崎承一. 皮膚筋炎・多発性筋炎136名の長期生命予後の解析. 第48回日本リウマチ学会総会2004

2) K.Azuma, H.Yamada, Y.yamasaki, M.Ohkubo, M.Yamasaki, S.Ozaki. Efficacy and Safety of Intravenous Cyclophosphamide for the Treatment of Progressive Interstitial Lung Disease in 20 Patients with Inflammatory Myopathies.

European Congress of Rheumatology, 2004

3) K.Azuma, Y.Yamasaki, M.Yamasaki, M.Ohkubo, H.Yamada, S.Ozaki. Intravenous Cyclophosphamide for the Treatment of Interstitial Lung Disease Associated with Amyopathic Dermatomyositis, Dermatomyositis and Polymyositis:a Comparative Study with Cyclosporine and Azathioprine. American College of Rheumatology 68th Annual Meeting 2004.

4) Yamasaki M, H. Yamada, Y. Yamasaki, et al. Lung histopathological analysis is useful to predict the outcome of interstitial pneumonia in patients with polymyositis/ dermatomyositis. Arthritis Rheum 46:S488.

5) M.Yamasaki, H.Yamada, Y.Yamasaki, M.Ohkubo, S.Ozaki. Intralobular Distribution Pattern of Fibrosis Can Predict the Clinical Outcome of Polymyositis (PM) /Dermatomyositis(DM)-Associated NSIP. Annual European Congress of Rheumatology 2003.

6) Yoshioki Yamasaki, Hidehiro Yamada, Michiko Okubo, Masaomi Yamasaki, Nobuaki Hama, Shoichi Ozaki. Intravenous Cyclophosphamide for the Treatment of Progressive Interstitial Pneumonia in Patients With Polymyositis / Dermatomyositis. 99th International Conference of American Thoracic Society 2003.

7) Yamasaki M, H. Yamada, Y. Yamasaki, et al. Lung histopathological analysis is useful to predict the outcome of interstitial pneumonia in patients with polymyositis/ dermatomyositis. Arthritis Rheum 46:S488, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

### 膠原病性肺高血圧症の合併頻度・自然経過に関する研究

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・講師）

#### 研究要旨

【目的】膠原病（CTD）患者では高率に肺高血圧症（PH）を合併する。しかし、報告される合併率は大きく異なる。そこで、PHに特徴的な臨床症状や胸部X線写真、心電図所見だけでなく、心エコー検査までおこなってPHの合併について判断し、正確なPH合併率を求めることを第1の目的とした。また、この調査でPHに特徴的な臨床症状や胸部X線所見、心電図所見を認めず、肺動脈（PA）圧も比較的低い（軽症）PH症例が約半数を占めた。そこで、これらの症例を追跡調査し、CTDに合併したPHの自然経過を明らかにすることを第2の目的とした。さらに、PA圧やPA圧の変動とPHに特徴的な臨床症状や胸部X線写真所見、心電図所見との関連を明らかにすることを第3の目的とした。【方法】平成15年9月中旬から11月中旬に、本研究班の臨床系分担研究者が所属する医療機関を受診したCTD患者5例毎に1例を無作為に抽出し対象とした。また、追跡調査は平成15年度に抽出されたPH合併症例を対象に平成16年12月に行った。調査項目はいずれの調査も混合性結合組織病（MCTD）PH診断の手引きに記されている臨床症状の有無、胸部X線写真所見、心電図所見、心エコー検査所見とした。【結果】CTD患者におけるPH合併率は19.3%ときわめて高率であった。1年間の観察期間ではPHに特徴的な臨床症状や胸部X線写真所見、心電図所見の陽性項目数はほとんど変化がなく、変動を認めた症例においてもPA圧の変動と関連はなかった。また、PA圧が40mmHg以上の患者においてはPA圧が比較的大きく変動した症例があったが、40mmHg未満の患者においてはあまり変動を認めなかった。さらにPHに特徴的な臨床症状や胸部X線写真所見、心電図所見は、PA圧が40mmHg以上の患者において40mmHg未満の患者に比し、有意に高率に認めた。【結語】1. CTD患者では19.3%と高率にPHの合併を認めた。2. PH合併症例の約半数はPHの合併を示唆する臨床所見を呈しておらず、心エコーによる検索が必要である。3. PA圧の変動は主にPA圧40mmHg以上の患者で認めた。4. PA圧40mmHg以上の患者ではPHに由来する臨床所見を呈し且つPA圧の変動を認め、治療対象と考えられた。

#### A. 研究目的

膠原病（CTD）患者での肺高血圧症（PH）合併は高率であることが知られている。しかし、PHの合併率は報告によって大きく異なる。これはPHの検索方法が異なることがその一因と考えられる。そこで、混合性結合組織病（MCTD）PH診断の手引きに記されているPHに関連する臨床症状の有無、胸部X線写真、心電図所見だけでなく、心エコー検査まで行ってPHの合併を判断し、正確なPH合併率を求めることを第

1の目的とした。

また、上記目的の調査で肺動脈（PA）圧が比較的強く、PHに特徴的な臨床所見などを認めない症例（軽症例）が約半数を占めることが判明した。そこで、これらの症例、特に軽症例の自然経過を明らかにすることを第2の目的とした。

さらに、PA圧やPA圧の変動とPHに特徴的な臨床症状や胸部X線写真所見、心電図所見との関連を明らかにすることを第3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。本研究班の臨床系班員が所属する医療機関を受診したCTD患者の5例につき1例の割合で無作為に抽出し対象とした。MCTD PH診断の手引き<sup>1)</sup>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ⅡPA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5項目を必須の調査項目とした。⑥心エコー検査での推定PA圧、⑦右心カテーテルでの平均PA圧は可能な限り施行することとした。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。

また、追跡調査は平成15年度に抽出されたPH合併症例を対象に平成16年12月に行った。調査項目は平成15年度と同様とした。

## C. 研究結果

平成15年度の調査で548例の回答が得られ、全身性エリテマトーデス199例、全身性硬化症113例、多発性筋炎・皮膚筋炎66例、MCTD 50例、その他および不明120例であった。PH合併解析可能例数は536例でPH合併例数は42例

(7.8%)であった。心エコー検査施行例に限定すると192例中37例(19.3%)ときわめて高率であった<sup>2)</sup>。

心エコー検査施行例において、研究方法で述べた①から⑤のPH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。66例でこれらの症状・所見を認め、18例(27.3%)にPHが合併していた。認めなかった126例ではPHの合併は19例(15.1%)であり、これらの症状・所見を認めた症例でPHは高率に合併していた

( $p=0.04$ )<sup>2)</sup>。しかし、PH合併37例中19例(51.4%)で、これらの症状・所見を認めなかったことになる(表1)。

次に、PH合併例においてこれらの臨床症状・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 $49.0 \pm 17.4$ mmHgで認めなかった群の $32.9 \pm 3.8$ mmHgに比し有意に高値であった( $p=0.0004$ )<sup>2)</sup>。さらに、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( $p=0.0002$ )。また、これらの症状・所見を呈するPA圧のカットオフ値は、PA圧35mmHgが感度87.5%、特異度73.7%、正確度80.0%、40mmHgが感度56.3%、特異度94.7%、正確度77.1%であった(表2)。

平成16年度の追跡調査該当症例は42例で解析可能な回答を得たのは22例であった。

まず、PA圧の変動であるが、全体的には大きな変動を認めなかった。また、平成15年度40mmHg以上のPA圧を示した症例では7例中4例でPA圧の変化が10mmHg以上であったのに対し、40mmHg未満の症例では11例中2例のみで、40mmHg以上の症例でPA圧が変動しやすい傾向を認めた( $p=0.09$ )。

次にPHに特徴的な臨床所見(研究方法で述べたMCTD PH診断の手引きに記載されている①から⑤の項目)は、基本的にはほとんど変動を認めなかった。認める所見数が増加した症例は4例で、減少した症例も4例であった。具体的な項目、PA圧の推移は表3に示した。

## D. 考察

CTD患者では高率(19.3%)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<sup>3)</sup>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。今回の調査では、197例(35.9%)に心エコー検査が施行されていたことにより、PH合併率が以前の調査に比べやや高率となった可能性がある。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の合併率(4.0%)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51.4%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。WHO原発性PHワールド・シンポジウム（1998年）では「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、UCGを毎年実施することが推奨される」との意見が述べられているが、強皮症スペクトラムの疾患だけでなく、CTD患者でのPHスクリーニングには心エコー検査が必要と考えられた。さらに、CTD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とは無関係なのだろうか。そこで、PH合併例でMCTD PH診断の手引きに記載されている①労作時の息切れ、②胸骨左縁収縮期性拍動、③第II 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（ $p=0.0004$ ）、陽性項目数と推定PA圧とも有意な正相関を認めた（ $p=0.0002$ ）<sup>2)</sup>。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。また、これらのPH合併を示唆する臨床症状・所見は、PHに対する代償機転であったり、代償しきれなくなつて出現してくる所見と考えられる。したがって、これらの臨床所見を伴ったPHが治療対象とも考えられる。そこで、これらの臨床所見を呈するPA圧のカットオフ値の設定を試みた。その結果、カットオフ値をPA圧35mmHgに設定すると感度87.5%、特異度73.7%、正確度80.0%で、40mmHgに設定すると感度56.3%、特異度94.7%、正確度77.1%で、35mmHgに設定した時が最も良好であった。しかし、CTDには間質性肺炎や心膜炎などPH以外の要因でこれらの臨床所見を呈することもある。実際、今回の調査でもこれらの臨床

所見を有するにもかかわらずPHの合併を認めなかった症例が48例（72.8%）あり、特異度が高く、正確度も同等な40mmHgをカットオフ値として設定するのが適当と考えられた。

平成15年度の調査でPA圧が比較的低く、PHに特徴的な臨床所見などを認めない症例（軽症例）が多数見出された。それ以前の調査ではこれら軽症例の存在は認識されていなかったため、その自然経過などは全く不明であり、治療の必要性については判断する材料すらない。そこで、観察期間は1年と短い、その経過を把握するためPH合併症例を対象に追跡調査を行った。

平成15年度に40mmHg以上のPA圧を呈した症例では40mmHg未満の症例に比し、PA圧が変動しやすい傾向を認めた。平成15年度のPA圧が40mmHg以上の症例では2例が10mmHg以上の改善、2例が10mmHg以上の悪化を認めた。治療内容などは調査していないため、改善例における改善理由は不明であるが、PA圧40mmHg以上の症例では、種々の要因によりPA圧が変動しやすい可能性が示唆された。

PHに特徴的な臨床所見は1年間の観察期間ではほとんど変化を認めなかった。これはPA圧が比較的低く、PHに特徴的な臨床所見を認めない症例（軽症例）が多数含まれており、これらの症例でPA圧の変動がほとんど見られなかったことに由来する可能性がある。一方、平成15年度にPA圧が40mmHg以上で、今回PA圧が改善したあるいは増悪した症例いずれにおいても、これらの臨床所見は同様にほとんど変動を認めず、1年間の比較的短い観察期間ではPA圧が変動したとしても、PHに特徴的な臨床所見の陽性項目数はほとんど変化しないと判断された。しかし、PA圧とこれらの臨床所見の陽性項目数が正相関を認めたことを考えると、観察期間を十分に取れば、PA圧の変化とこれらの臨床所見の陽性項目数の変化が相関する可能性も考えられ、さらなる経過観察が必要と考えられた。

1年間の観察期間ではPA圧40mmHg以上の症例でPA圧の変動が認められやすいこと、PHに

特徴的な臨床所見を呈するPA圧のカットオフ値を40mmHgに設定しうることより、さらなる検討が必要ではあるが、PA圧40mmHg以上の症例が治療対象と考えられた。

#### E. 結論

1. CTDのPH合併率は19.3%であった。2. 無症候性のPH合併例があるため、PHのスクリーニングには心エコー検査が必要である。3. 1年間の観察期間ではPA圧40mmHg以上の症例でPA圧が変動する傾向を認めた。4. 1年間の観察期間ではPHに特徴的な臨床所見にほとんど変化を認めなかった。5. PHに特徴的な臨床所見を呈するPA圧のカットオフ値は40mmHgであった。6. 以上のことより、治療対象とすべきPHはPA圧40mmHg以上の症例と考えられた。

#### 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. 吉田俊治, 深谷修作：膠原病性肺高血圧症の頻度と病態の解析。厚生労働省科学研究費補助金免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 全身性自己免疫疾患における難治性病態の診断と治療法に関する研究平成15年度総括・分担研究報告書：40-43, 2004
3. 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

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 吉田俊治：再発性多発軟骨炎、日本リウマチ財団、リウマチ基本テキスト、日本リウマチ財団編、東京、459-462、2002.
2. 吉田俊治：肺高血圧症、狩野庄吾、中川武正編、アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療、先端医療技術研究所、東京、377-381、2003.
3. 吉田俊治：膠原病・アレルギー疾患にみられる浮腫。診断と治療、90:721-725, 2002.
4. 吉田俊治：免疫抑制薬。総合臨床、51:2229-2232, 2002.
5. 吉田俊治：側頭動脈炎。治療、84:1760-1764, 2002.
6. 吉田俊治：結節性多発動脈炎。リウマチ科、27(suppl.1): 726-734, 2002
7. 吉田俊治：診断の進歩 膠原病の診断基準の進歩。

医学のあゆみ別冊膠原病：1923, 2003.

8. 吉田俊治：MCTDに合併する肺高血圧症。リウマチ科31:600-605, 2004.

#### 2. 学会発表

1. 吉田俊治：関節リウマチに対する早期薬物療法的重要性。第32回日本臨床免疫学会総会ランチョン教育講演、東京、2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## ループス腎炎における流血中自己抗原(PCNA蛋白複合体)の病因的意義の検討

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 古幡 直子、山田 浩史、縄田 益之、池田 圭吾、松下 雅和、  
松平 蘭、金田 和彦、浅野 正直、橋本 博史  
（順天堂大学医学部膠原病内科）

### 研究要旨

我々は、全身性エリテマトーデス(SLE)患者にて、活動期にproliferating cell nuclear antigen(PCNA)陽性活性化単核球が出現し、その血清中にPCNAが検出されることを見いだした。また、PCNAがその細胞内機能に関連しながら種々の蛋白と結合して形成する蛋白複合体(PCNA蛋白複合体)を、モノクローナル抗体を用いて特異的に精製する方法を開発し、それに対する免疫応答を各種膠原病患者にて解析した結果、この複合体に対する免疫応答はSLE患者に特異的に認められ、流血中のPCNAおよびその複合体によって誘導されていることを明らかにした。さらに、この流血中の抗原は、抗体産生を誘導するばかりではなく、免疫複合体を形成し、SLEにおけるループス腎炎の病態に深く関与している可能性も示した。また、2D-ゲル電気泳動を用いてPCNA蛋白複合体の構成蛋白の成分解析を行い、その一つとしてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)が同定され、SLE患者自己抗体の認識する新たな自己抗原あることを明らかにした。さらに、抗GAPDH抗体の臨床的および病因的意義について検討した結果、GAPDHがPCNA蛋白複合体に対する免疫応答を誘導するピボットのの一つになっている可能性が示され、経時的に観察すると、その抗体価は流血抗原の出現に関連して上昇し、腎病変の病態形成に関与している可能性が示唆された。これらの一連の結果より流血中自己抗原は、抗体産生とともに腎炎などの病態形成に関与している可能性が示唆された。そこで、血漿交換療法による抗原除去療法の基礎的検討を加えた結果、流血中抗原を有効に除去できることが示された。

### A. 研究目的

SLE患者における自己抗体の産生と、免疫複合体の供給源としてループス腎炎の病態形成に関与していると考えられるPCNA蛋白複合体の構成成分、およびその免疫応答を解析し、抗体産生誘導のメカニズムならびに病因的意義について検討を加えた。また、血漿交換療法による抗原除去療法についての有用性も検討した。

### B. 対象および研究方法

- 1) 対象: アメリカリウマチ学会の診断基準を満たす自験膠原病患者を対象とした。
- 2) PCNA蛋白複合体は抗PCNAモノクローナル抗体(TOB7)を用いて精製した。

- 3) PCNA蛋白複合体の各構成成分に対する免疫応答は免疫プロット法(IB)にて解析した。
- 4) 流血中のPCNA蛋白複合体は二つの異なるモノクローナル抗体(TOB7, TO30)を用いたsandwich ELISA(sELISA)で検出した。
- 5) 2D-ゲル電気泳動でPCNA蛋白複合体の各成分を分離後、ion-pair chromatographyを用いて、構成成分の同定を行った。
- 6) 抗GAPDH抗体は精製ウサギGAPDHを抗原源としたELISAにて検出した。
- 7) 血漿交換療法（二重膜濾過法）による流血中抗原除去について検討した。

### C. 研究結果

#### 1) SLE患者のPCNA蛋白複合体に対する免疫応答

TOB7を用いたアフィニティーカラムでPCNA複合体を精製し(図1a: lane 1、PCNAに加え、lane 2から6のreplication protein A, DNA helicase II, Topoisomerase I, CDK5, p21などの蛋白が共存する)、IBにて76例のSLE患者の反応性を検討した結果、その37%が複合体の構成蛋白の少なくとも一つと反応し、さらに同一の血清が複数の蛋白と反応する傾向が認められた(図1b)。

#### 2) 流血中抗原とPCNA蛋白複合体への免疫応答

PCNA蛋白複合体の血中濃度とそれに対する免疫応答の関係を経時的に検討すると、抗原濃度の上昇に引き続いて複合体の構成成分に対する免疫応答の広がりが見られた(図2)。この事実からPCNA蛋白複合体への免疫応答では抗原提示が重要な役割を演じていることが示唆された。

#### 3) PCNA蛋白複合体の構成成分の解析

2D-ゲル電気泳動法およびion-pair chromatographyでPCNA蛋白複合体の構成蛋白の解析をした結果、分子量37 kDa、等電点8.5のGAPDHが同定された(データは示していない)。

#### 4) 各種膠原病患者における抗GAPDH抗体

抗GAPDH抗体をELISAにて検出したところ、SLE患者の47%で他疾患に比較して有意に高率に検出された。さらに流血中PCNA蛋白複合体との関係を検討したところ(図3)、SLE患者の流血中抗原陽性例では61%が抗GAPDH抗体陽性で(図3黒丸)、陰性群の31%(図3白丸)に対して高率となっていた。

#### 5) 流血中抗原と免疫複合体

症例KAにて流血中PCNAの濃度(破線)と抗PCNA抗体価(実線)および免疫複合体(最下段)の関係を検討すると、IBによる解析と同様に抗原濃度の上昇に引き続いてPCNA蛋白複合体の成分である抗PCNA抗体価の上昇が認められる一方、抗原の上昇する時期には同時に免疫複合体が上昇することが確認され、それに引き続き腎症の増悪が認められていた(図4)。

同様の検討を抗GAPDH抗体陽性例に於いて行くと、流血中PCNA複合体の流血中濃度の上昇に引き続き抗体価が上昇し、さらに腎症の増悪が認められていた(データは示していない)。

#### 6) 血漿交換療法と抗原除去

これまでの研究結果や抗GAPDH抗体と流血中抗原の関係は、血中抗原のPCNA蛋白複合体に対する免疫応答誘導における重要な役割を示唆する所見と考えられた。そこで、この抗原を血漿交換療法で除去可能かどうか実際の症例で検討した。症例TYは抗dsDNA抗体陰性であったが、腎症を発症した。その治療目的で実施した血漿交換療法の前後で血中PCNAを測定すると、実施後の患者血清では有意にPCNAの抗原濃度が低下し、蛋白尿も改善していた。

#### D. 考察

SLEでは患者末梢血に疾患活動性に相関しながらリンパ球を中心とする活性化細胞が出現することが知られている<sup>1)</sup>。これらの細胞はアポトーシスおよびネクローシスにより、流血中に細胞内抗原を放出し、“antigen driven”の形で自己抗体の産生に寄与している可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。実際、我々の検討では血清中に放出された抗原に引き続き抗体産生が誘導されることが示され、各構成蛋白に免疫応答が広がっていくことが明らかにされている。また、それと同時に免疫複合体の上昇と、それに関連して腎症の増悪が認められていた<sup>1-3)</sup>。これまでの検討ではこれら複合体に対するトレランスの破綻を導く機構が不明であった。しかし、我々の検討でGAPDHに対する自己抗体がSLEにて検出されることを明らか<sup>4)</sup>、経時的に観察すると腎炎の活動性と良く相関することが示された。抗GAPDH抗体は溶連菌感染症でも検出され、感染症後に引き起こされる腎症の責任分子であることも示唆されている<sup>5)</sup>。従って、我々の結果は、このSLE患者血清中における抗GAPDH抗体のループス腎炎の病態形成における意義を示唆する興味深い発見と考えられる。また、この抗体産生と免疫複合体の供給源となりう

る流血中抗原は血漿交換により除去可能であることが示され、今後、これらの抗原除去療法という概念を取り込んだ新たな治療の有用性も示唆された。

#### E. 結論

流血中の自己抗原はSLE患者活性化単核球より放出され、抗体の産生を誘導するとともに免疫複合体を形成することにより腎病変の増悪に関与している可能性が示唆された。また、ステロイド薬の治療は抗原の放出を促すことから、パルス療法などの後に、抗原を除去する血漿交換療法などを併用することがより治療効果を高め、難治性病態に陥る可能性のある腎炎をより効果的に治療できる可能性が示唆された。

#### F. 文献

- 1)Kogure T, Takasaki Y, Takeuchi K, et al:Autoimmune responses to proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes involved in cell proliferation are strongly associated with their structure and biologic function in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 46: 2946-56, 2002
- 2)高崎芳成, 山田浩史, 縄田益之, 他:流血中PCNA蛋白複合体と腎病変. 厚生労働科学研究 補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療等研究事業平成14年度研究報告書, 240-243, 2003
- 3)Kaneda K, Takasaki Y, Takeuchi K, et al: Autoimmune response to proteins of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) multiprotein complexes in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol* 31: 2142-2150, 2004
- 4)Takasaki Y, Kaneda K, Matsushita M, et al: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a novel autoantigen leading autoimmune responses to proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes in lupus

patients. *Int Immunol* 16: 1295-1304, 2004  
5)Yamakami K, Yoshizawa N, Wakabayashi K, et al: The potential role for nephritis-associated plasmin receptor in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Methods* 21: 185-197, 2000  
1295-1304, 2004

#### G. 健康危険情報

特記事項無し。

#### H. 研究発表

文献参照

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し。

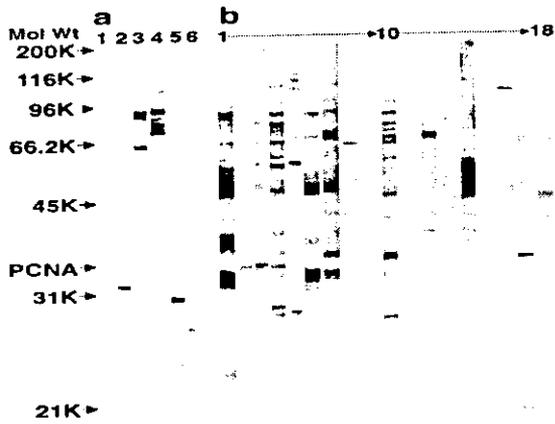


図1

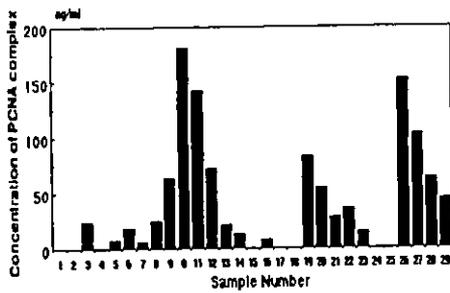
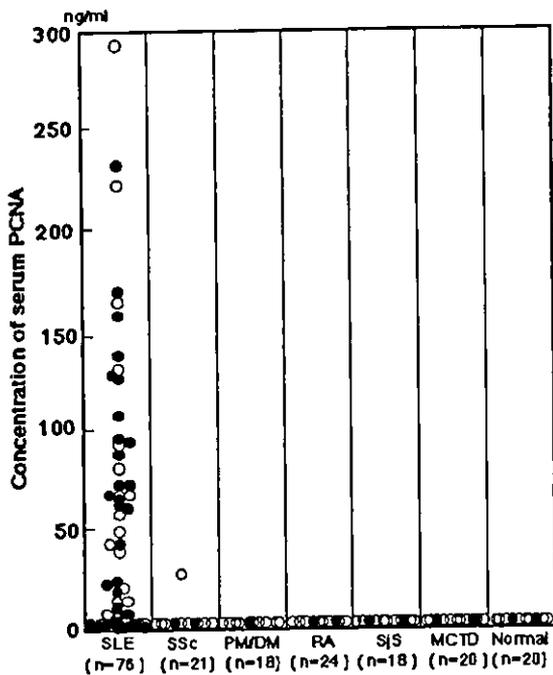


図2



図3



[Case K.A.]

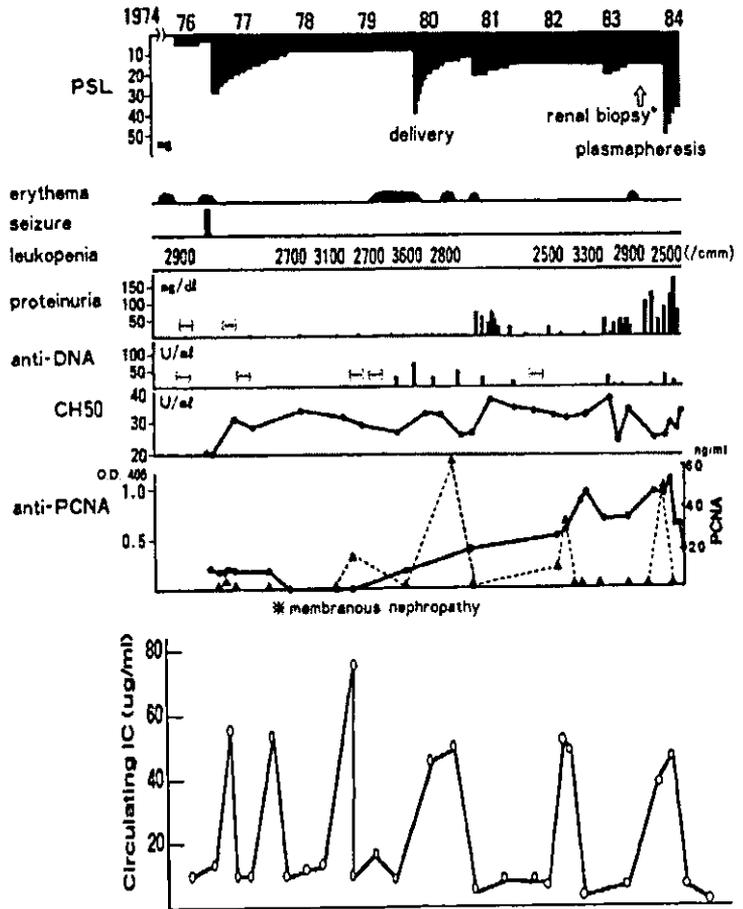


図4

[Case TY]

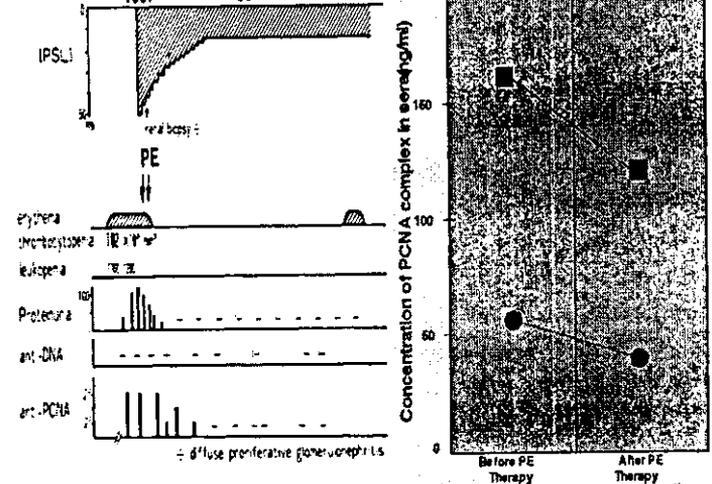


図5

## AA-アミロイドーシスの遺伝的要因、病態、治療に関する研究

分担研究者 寺井 千尋（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター・助教授）

### 研究要旨

続発性アミロイドーシス病態解明のため、発症危険因子である *SAA1.3* (*SAA1 $\gamma$* ) や *SAA1-13T* 変異がどのように関与するかを検討した。血中 *SAA* レベルを *SAA/CRP* 比で見ると、 $\beta\beta$  がもっとも高く、 $\alpha\alpha$ 、 $\gamma\gamma$  の順であった。一方、*SAA1-13T* を含むプロモーター・ハプロタイプは、プロモーター活性が亢進していた。*SAA-13T* は *SAA1 $\gamma$*  と強い連鎖にあり、*SAA1 $\gamma$*  mRNA が多く産生され発症につながる可能性が考えられた。しかし *allotype* により代謝が異なるため *SAA1 $\gamma$*  の血中レベルは *SAA1 $\beta$*  よりも低いと考えられた。

一方フィンランド人、トルコ人では *SAA1-13T* や *SAA1 $\gamma$*  は本症の危険因子ではなく、*SAA1.1* (*SAA1 $\alpha$* ) が危険因子であった。この人種差を説明するために、アミロイドの共沈着物質のアミロイドP蛋白 (SAP) につき検討した。SAP 遺伝子の5'上流-443T/Cの頻度は日本人と他の人種で逆転しており、またアミロイドーシス群では-443Tが多い傾向がみられた。日本人では-443Tは他人種より低頻度で、*SAA1 $\gamma$*  allele をもつアミロイドーシス患者ではむしろ頻度は低下していた。これよりSAP多型が特定の*SAA1* alleleと関連して続発性アミロイドーシスの発症に関与する可能性は否定的と考えられた。

### A. 研究目的

続発性AA-アミロイドーシスは長期間にわたり活動性の炎症性疾患が持続した患者の一部に発症する致命的な合併症である。本症の発症頻度には人種差、地域差があり、遺伝的要因が強く関与する。

我々は日本人の本症患者の遺伝子解析から、*SAA1.3* (*SAA1 $\gamma$* ) が発症の危険因子であることを確認し、さらに*SAA1*遺伝子のプロモーター領域を検討し3カ所のSNPsを発見し、そのうち-13Tが*SAA1 $\gamma$*  allele以上に強い危険因子(Odds比 33.3)であることを報告した。

本研究では、*SAA1 $\gamma$*  や *SAA1-13T* 変異がどのようなメカニズムでアミロイドーシス発症に関連するかを検討することを目的とした。

### B. 研究方法

(1) 蛋白レベルでの検討 ……-*SAA1* 遺伝子型別の *SAA* 血中濃度の検討-

*SAA1* 遺伝子型別にRA患者血清サンプルの

*SAA/CRP* 比を測定し、*SAA1* *allotype* の違いによる一定の炎症刺激に対する *SAA* の血中濃度の比較を試みた。

(2) mRNAレベルでの検討 -プロモーター領域遺伝子多型による転写活性の検討-

*SAA1* プロモーター領域のSNPs (-61 C/G, -13 C/T, -2 G/A) を含む領域を4種類のハプロタイプで増幅しルシフェラーゼアッセイを行った。

(3) 遺伝子レベルでの検討 -アミロイドーシス発症の人種差・地域差に関する検討-

フィンランド、トルコ、日本より得たアミロイドーシス群と対照群で、*SAA1* 遺伝子のプロモーター領域と exon 3 の5 SNPs (-61A/G, -13C/T, -2G/A, 2995T/C, 3010C/T) の多型を検討した。

(4) 蛋白相互作用レベルでの検討-共沈着蛋白アミロイドP (SAP) に関する検討-

続発性アミロイドーシス発症におけるSAPの関与を、SAP遺伝子多型解析により検討した。

### C. 研究結果

(1) *SAA1* 遺伝子型別のSAA血中濃度の検討  
SAA/CRP比は、 $\beta\beta$  ( $9.7 \pm 6.2$ )、 $\gamma\gamma$  ( $5.2 \pm 3.4$ )、 $\alpha\alpha$  ( $5.4 \pm 4.4$ ) で、 $\beta\beta$ の値は、 $\gamma\gamma$ に対し有意に高値であった。

(2) プロモーター領域多型による転写活性  
*SAA1*プロモーター・ハプロタイプはIL-1 $\beta$ とIL-6刺激によりルシフェラーゼ活性を示した。ハプロタイプ間に活性の差が認められ、*SAA1* $\alpha$ と連鎖不平衡にあるC-C-Gの活性を100%とするとG-C-Gが83%、G-C-Aが59%、C-T-Gが120%であった。このように-13Tをもち、*SAA1* $\gamma$ 遺伝子と連鎖するハプロタイプがもっとも高いプロモーター活性を示した。

(3) アミロイドーシス発症の人種差・地域差

*SAA1*遺伝子の-13Tおよび*SAA1.3* (*SAA1* $\gamma$ )は日本人ではアミロイドーシス発症の危険因子であったが、フィンランド人、トルコ人では危険因子ではなく、*SAA1.1* (*SAA1* $\alpha$ )がアミロイドーシス発症の危険因子であった。

(4) 共沈着蛋白SAPに関する検討  
SAPの3つのSNPsのうち、5'末端上流の-443T/C SNPに人種差がみられ、アミロイドーシス有無による差がみられたが有意ではなかった。

次に、*SAA1* 遺伝子型別に検討したが、*SAA1* $\gamma$ や*SAA1* $\alpha$ とは一定の傾向はなかった。

### D. 考察

日本人において*SAA1* $\gamma$ と*SAA1* -13Tが発症の危険因子であることは複数の追試により確認され確実である。しかし、フィンランド人やトルコ人の検討では危険因子ではなかった。一元的に考えれば、これらとは別に真の疾患遺伝子が存在し、人種により連鎖が異なると考えられる。しかし、米国白人患者でも-13Tが高率にみられ、フィンランド人やトルコ人が比較的特殊な集団と考えると、-13Tは共通の危険因子との考えも成立する。このためには欧米人の多数の患者での検討が必要である。一方、プロモーターハプロタイプを用いた

mRNAの検討では、C-T-Gでプロモーター活性の亢進がみられた。従って、-13Tは*SAA1* mRNA転写活性を亢進させ*SAA1*蛋白産生を増加させて、アミロイド沈着を生じる可能性が示唆される。これは血中SAA/CRP比の検討で*SAA1* $\beta$ がもっとも高値という結果と矛盾するが、血中濃度は産生と代謝から決定されるので、代謝の違いと考えられる。

*SAA1*のみでは人種差を説明できず、次にSAA沈着に影響する共沈着物質の関与を考えた。アミロイドP蛋白 (SAP) で沈着物の10-20%を占め、さらに近年本症治療における重要性が示された。そこで共沈着物質に人種差が存在し、その相互作用で人種ごとに危険因子となる*SAA1* allotypeが異なる可能性を考え、SAP遺伝子の検討を行った。SAPのSNPsのうち、5'上流-443T/C SNPに人種差を見だし、アミロイドーシス群で-443T alleleが多い傾向がみられた。しかし、日本人でのリスクである*SAA1* $\gamma$ や欧米人のリスクである*SAA1* $\alpha$ とは関連はなく、SAPが特定の*SAA1* alleleと関連して本症のリスクを増加させるとの仮説は否定された。

### E. 結論

*SAA1*-13Tは、SAA産生過剰から本症発症に関与する可能性がある。しかし、これだけでは本症発症頻度の人種差を説明できない。アミロイド共沈着物質のSAP多型の検討では、この説明はえられなかった。

### F. 健康危険情報

特記事項なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 寺井千尋：関節リウマチに伴うアミロイドーシス。今日の治療指針(多賀須幸男ら監修)、pp531-532、医学書院、東京、2002
- 2) 寺井千尋：アミロイドーシス。診断と治療 91:851-855, 2003
- 3) 寺井千尋：遺伝子多型と疾患感受性。炎症