

MCTDにおける抗内皮細胞抗体の検討

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 吉田秀雄 藤田保健衛生大学医学部リウマチ感染症内科 講師
玉熊桂子 藤田保健衛生大学医学部リウマチ感染症内科 研究生

研究要旨

【目的】混合結合組織病(MCTD)の重要な合併病態である肺高血圧症(PH)に及ぼす抗内皮細胞抗体の関与について種々の検討、報告がなされている。我々は、特に細胞表面に結合する抗体は病態との関連が深いと考え、その検出・解析を試みた。【対象】PHありMCTD患者血清5例、PHなしMCTD患者血清5例。【方法】HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)、HPAEC (human pulmonary artery endothelial cells)を用いて、免疫細胞化学的間接蛍光抗体法をおこない細胞表面に結合する抗体の染色の差異やpatternを検討した。更に、HPAECのmembrane fractionを超遠心法により抽出し二次元電気泳動法へ展開し、免疫染色にてspotsの検討を試みた。【結果】免疫細胞化学的間接蛍光抗体法は、HUVECではPHありMCTD患者血清とPHなしMCTD患者血清では染色パターン之差は明らかでなかった。しかし、HPAECではPHありMCTD患者血清で細胞表面上に強い顆粒状やドット状の染色像が見られた。二次元電気泳動法では、PHありMCTD患者血清に50kDa~100kDaに幾つかのドットと強い線状の反応が確認できた。

A. 研究目的

膠原病の一つである混合結合組織病(MCTD)では、時に肺高血圧症(Pulmonary Hypertension; PH)を伴う。重篤かつ予後不良な合併症で最大の死因にもなっている。病理学的には原発性肺高血圧症(PPH)と同じく肺動脈血管病変で、病理学的には肺動脈、細小動脈の内膜・中膜が肥厚し狭窄化を生じている。内膜・中膜の肥厚には、血管収縮作用や血管平滑筋の増殖作用をもつエンドセリン(ET)や炎症性サイトカインであるtumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin6 (IL-6)がPHの病態に関与するとの報告がなされている。また、近年では骨形成因子(bone morphogenetic protein; BMP) II-type receptor(BMPR-II)の遺伝子変異が高率に見られることが報告された^{1)~3)}。しかし、膠原病性PHの発症機序は未だ不明で、これらの治療法の確立や病態の解明がMCTDの予後改善につながると考えられる。今回、MCTDのPHあり患者に特徴的な抗内皮細胞抗体(AECA)を検出することを目的とし、

MCTDでPHあり患者群とPHなし患者群で免疫細胞化学的間接蛍光抗体法、二次元電気泳動法、Western blot法にて検討した。

B. 研究方法

1) 細胞染色

HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)(CAMBREX社)、HPAEC(human pulmonary artery) (CAMBREX社)を37degC、5%CO₂の環境下で培養させた後、細胞のdamageが低いと推奨されているコラゲナーゼで剥離した。生細胞の状態では操作はすべて氷上でおこなった。2% normal bovine serumでブロック後、患者血清で反応させAlexa 546抗ヒトIgGで発光させた。すべての反応後に細胞を固定しDAPI核染色をおこなった。

2) 二次元電気泳動法とWestern blot法

HPAECを1)と同様に培養した。その後、membrane fractionとcytosol fractionとに分離する操作として55,000rpm x 120分の超遠心法によりmembrane

fractionを抽出・分離した。membrane fractionのサンプルには、膜成分の可溶化を高めるためSB3-20界面活性剤を微量添加させ、pH3-10 gelの一次元電気泳動を経て、ExcelGel™ SDS Gradient 8-18 (Amersham Biosciences)二次元電気泳動法をおこなない泳動展開した。その後、ニトロセルロース膜に転写し抗原抗体反応をおこなった。100倍希釈の患者血清を2時間反応させ、2次抗体はアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体を用いBCIP/NBT発色させた。

C. 研究結果

1) 免疫細胞化学的間接蛍光抗体法

図1、2に染色結果を示す。図1のHUVECでは、上段のPHありMCTD患者と下段のPHなしMCTD患者で細胞表面上に顆粒状の染色像が認められ、染色パターンは明らかなでなかった。

図2のHPAECでは、PHありMCTD患者で細胞表面上に強い顆粒状やドット状の染色像が見られた。

2) 二次元電気泳動法とWestern blot法

結果を図3に示す。上段のPHありMCTD患者で幾つか点在したスポットと、線状の強い反応(矢印)が認められた。下段のPHなしMCTDは、2~5個の弱いスポットが見られたのみであった。

D. 考察

膠原病に合併するPHの発症機序は未だ不明である。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、この内膜・中膜の肥厚にはtumor necrosis factor- α 、IL-1 β 、IL-6などのサイトカインや補体、エンドセリン、細胞増殖因子などの血管内皮細胞障害因子の関与が考えられている。自己抗体も有力な候補の一つで、種々の膠原病や血管炎症候群で、AECAを認める多くの報告がある^{4)~6)}。AECAが、in vitroで補体や末梢血単核球の存在下で内皮細胞障害を誘発する報告⁷⁾や、NK細胞を介してアポトーシスを誘発する報告があり^{8)~11)}、AECAが内皮細胞障害を惹起している可能性が示されている。これらは、MCTDのPH発症機序を考える際に、AECAが病態のイニシエーションとなり得ることを示唆している

かもしれない。今回、我々は内皮細胞の表面に結合するAECAの検出、特に、PHを有する患者に特有のAECAの検出を試みた。HUVECを用いた免疫細胞化学的間接蛍光抗体法ではPHなしMCTD患者とPHありMCTD患者群で明らかな差は認めなかった。患者は全例で抗U1-RNP抗体が陽性で非特異的な細胞表面の染色が認められた可能性がある。しかし、HPAECでは、PHありMCTD患者群で強い染色像が認められた。HPAECはヒト肺動脈内皮細胞でPHの直接の標的細胞の可能性が高く、染色された抗体は病態と関係が深い可能性が考えられる。この抗体をさらに検討するため、二次元電気泳動法を行った。この際、MCTD患者に存在する抗U1-RNP抗体の影響と、細胞表面に結合する抗体を検出するため、抗原としてmembrane fractionのみを用いた。Western blot法によるニトロセルロース膜にはPHの有無に関係なく共通の数個のspotsが見られた。PHありMCTDのみに認められたスポットも数個検出された。また、PHありMCTDに分子量60kDa、pH3-7付近に特徴的な線状の染色が認められた。これらはMCTDのPH患者に特徴的に、また共通して認められるAECAの可能性が示唆された。今後は、LC/MS/MS等による質量分析装置を用いてタンパク同定を行い対応抗原の同定を行う必要がある。さらに、ELISA等にて多くの例で測定を行い、臨床的な検討を広く行う必要がある。

E. 結論

免疫細胞化学的間接蛍光抗体法でHPAECではPHありMCTD患者血清で細胞表面上に強い顆粒状やドット状の染色像が見られた。二次元電気泳動法では、50kDa~100kDaに幾つかのドットと強い線状の反応が確認できた。これらは、MCTDでPHの病態に特徴的なAECAの可能性が示唆された。

文献

1. The international PPH Consortium, Lane KB, Machado RD, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-B 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-2 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 2 bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 105: 1672-78, 2002
 4. Cines DB, et al. Presence of complement fixing anti-EC antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 73, 611-25, 1984
 5. Rosenbaum, J, et al. Measurement and characterization of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol* 72: 450-440, 1988
 6. Brasile, L, et al. Identification of an autoantibody to vascular EC-specific antigens in patients with systemic vasculitis. *Am J Med* 87: 74-84, 1989
 7. Bordron, J. et al. Pathogenicity of antiendothelial cell autoantibodies. In *Atherosclerosis and Autoimmunity* (Shoenfeld, Y., Harats, D. and Wiik, G., eds): 203-210, 2001
 8. Bordron, A, et al. The binding of some antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 101: 2029-2035, 1998
 9. Bordron, A, et al. Antiendothelial cell antibody binding makes negatively-charged phospholipids accessible to antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 41: 1738-1747, 1998
 10. Sgong, R. et al. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 43: 2550-62, 2000
 11. Worda, M. et al. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum* 48: 2605-2614, 2003

F.健康危険情報

該当なし。

G.研究発表

1. 論文発表

- 1.加藤賢一、吉田俊治.ステロイド剤の一般療法とパルス療法,臨床と研究 81(5):7-10, 2004
- 2.加藤浩二、大竹智子、浅野純一郎、西野 謙、吉田俊治 .関節リウマチの治療 ケア 全人的医療 ,日本臨床 63:641-643, 2005
- 3.鏑木淳一、桑名正隆、亀田秀人、竹内勤、岡田純、片山雅夫、吉田俊治 , 池田康夫. 抗リン脂質抗体症候群の診断における抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体測定の臨床的意義—多施設間成績—,臨床血液 46(1):19-21, 2005
- 4.高田裕子、吉田俊治.中毒・アレルギー・炎症性浮腫,日本臨床 63(1): 113-116, 2005
- 5.吉田秀雄、吉田俊治.関節リウマチ—成因研究から治療への新時代へ— III.関節リウマチの成因と病態生理 臨床症状 爪・皮膚病変,日本臨床 63(1): 225-228, 2005
- 6.鏑木淳一、桑名正隆、亀田秀人、竹内勤、岡田純、片山雅夫、吉田俊治、池田康夫. SLE・SLE 疑診例におけるループスアンチコアグulant測定の臨床的意義,日本醫事新報 4208:25-28, 2004
- 7.加藤賢一、高田裕子、吉田俊治.ミズリビンとミコフェノール酸モフェチル,特集 免疫抑制薬—基礎と臨床—. 最新医学 60(3): 379-382, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) なし

図1.HUVECを用いた膜表面に対する免疫細胞化学的間接蛍光抗体法

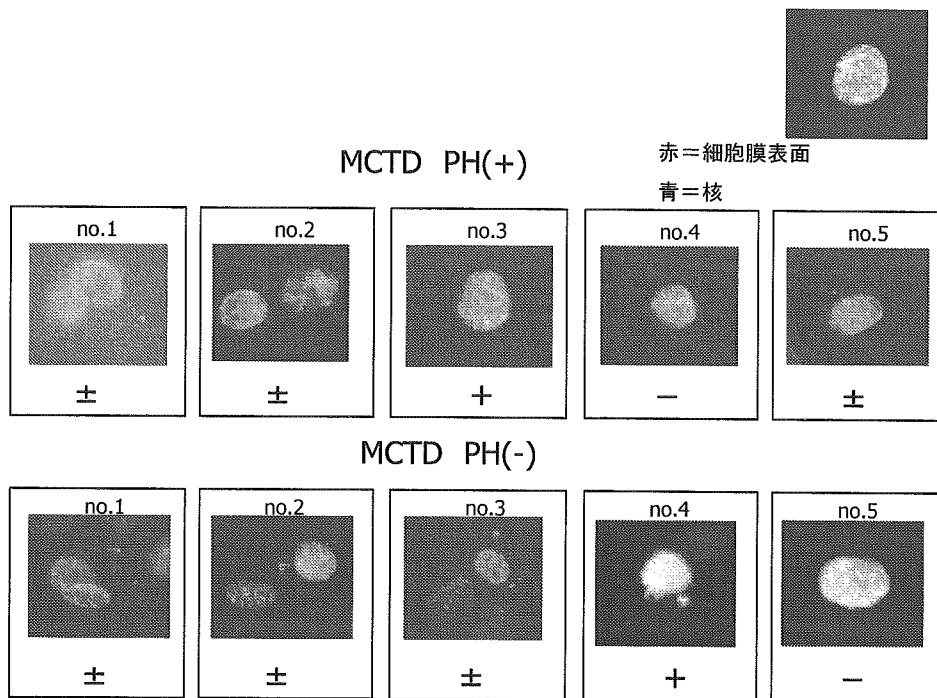


図2.HPAECを用いた膜表面に対する免疫細胞化学的間接蛍光抗体法

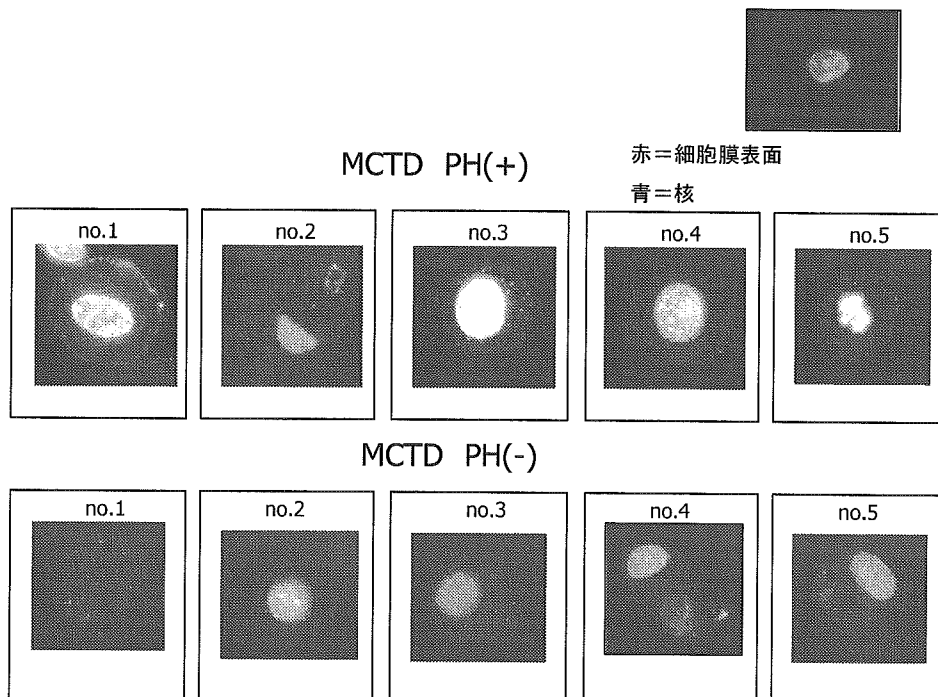
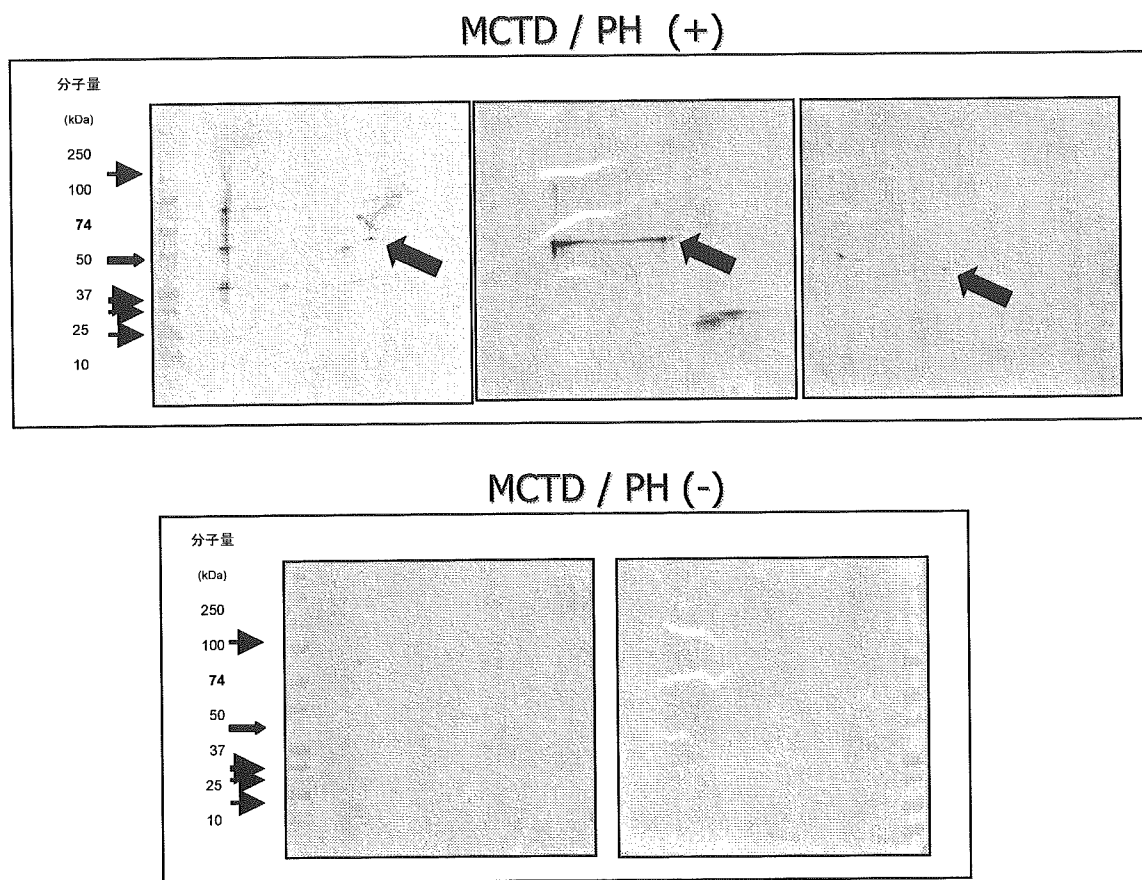


図 3.HPAECのmembrane fractionを用いたWestern blot法による検討



混合性結合組織病患者血清における新規自己抗原 NA14 への反応性に関する研究

分担研究者： 高崎芳成（順天堂大学医学部膠原病内科・教授）

研究協力者： 野澤和久、池田圭吾、松下雅和、縄田益之（順天堂大学医学部膠原病内科）

研究要旨

NA14(Nuclear Autoantigen of 14kDa)は、1998年にRiosらによりシェーグレン(SjS)患者血清をプローブとしてhuman testis cDNA libraryより同定された新規自己抗原である。しかしながら、その後NA14と自己免疫関連の追加報告は無く、各リウマチ性疾患でのNA14に対する自己抗体の出現率や臨床データとの相関、及びその生体内での役割は依然として不明なままである。我々はこのNA14 recombinant proteinを用いたELISA測定系によりMCTDを含む各種膠原病患者血清における新規自己抗原NA14に対する反応性を調べた。NA14に対する自己抗体の出現頻度はprimary SjS患者において最も高率に認められた。しかしながら、primary SiS患者と比べて頻度は少ないながらもMCTD患者にも少なからず抗NA14自己抗体の出現が認められた。又、抗NA14抗体はprimary SjS患者のみ高率に発現をみとめsecondary SjS患者においてはほとんど発現を認めないこと、MCTD患者における抗NA14抗体の出現率はsecondary SjSの合併の有無に左右されずMCTD患者に対する固有の現象である事を確認した。この事はこれらの疾患においてNA14及び抗NA14抗体が病態形成になんらかの役割を持っている可能性を示唆していると考えられた。また、リウマチ性疾患患者における抗NA14自己抗体の出現はほぼprimary SjS及びMCTD患者に限られており、他のリウマチ性疾患にはほとんど認められない事より、今後疾患特異性をもった自己抗体として臨床応用が出来る可能性を秘めていると考えられた。

A. 研究目的

NA14(Nuclear Autoantigen of 14kDa)は、1998年にRiosらによりシェーグレン(SjS)患者血清をプローブとしてhuman testis cDNA libraryより同定された新規核内自己抗原である。又、最近の細胞生物学分野研究において、生体内においてNA14は核内のみならず細胞質の中心体にも散在し細胞分裂、細胞周期の調節に重要な役割を担っている事が判明しつつある。しかしながら、その後NA14と自己免疫関連の追加報告は無く、各リウマチ性疾患でのNA14に対する自己抗体の出現率や臨床データとの相関、及びその生体内での役割は依然として不明なままである。NA14はその蛋白構造上の特徴としてcoiled-coil formationを有している。今まで細胞質内自己抗原として同定された蛋白の多くが、この蛋白構造を持つ事が判明しており、以前よりcoiled-coil formationと自己免疫反応との関連性が示唆されている。そこで今回我々は混合性組織

結合病(MCTD)及び、他の各リウマチ性疾患患者血清における新規自己抗原NA14に対する反応性を検討した。

B. 研究方法

本研究に対して充分理解・同意された上で採決された当院通院又は入院中のMCTDを含む各種膠原病患者血清(MCTD 113例、primary SjS 94例、secondary SjS 39例、SLE 80例、SSc 23例、RA 29例、PM/DM 20例)における新規自己抗原NA14に対する反応性を解析した。NA14蛋白の作製にあたっては、ヒトNA14のfull length cDNAをHisタグとのfusion proteinとして大腸菌を用いたpETシステムにて発現させた。大腸菌を溶解させその可溶性分画からニッケルカラムを用いてNA14 recombinant proteinの精製を行なった。精製されたNA14 recombinant proteinを用いてMCTDを含む各リウマチ性疾患患者血清との反応性を

conventional ELISAにて測定した。健常人30例におけるODの平均値+3SDをカットオフ値として陽性・陰性の判定とした。統計学的検定に関しては、疾患コントロールとしてSLE群に対する各リウマチ性疾患群における抗NA14抗体の陽性率を χ^2 検定にて解析した。

C. 研究結果

primary SjS患者において25.5%の患者においてNA14に対する自己抗体が認められた。MCTD患者においても15.9%の患者において抗NA14抗体が認められた。SLE患者については3.8%のみ陽性であった。又、primary SjS及びMCTD患者における抗NA14抗体の出現率は、SLE患者を疾患コントロールとして比較した場合、有意に高かった。尚、RA、SSc、DM/PM患者においてはNA14に対する陽性血清は認められなかった(表1、図1)。更に、抗NA14抗体が高率に認められたSjS及びMCTD患者血清について解析を進め、抗NA14抗体はprimary SjS患者のみ高率に発現をみとめsecondary SjS患者においてはほとんど発現を認めないこと(表2)、MCTD患者における抗NA14抗体の出現率はsecondary SjSの合併の有無に左右されずMCTD患者に対する固有の現象である事をつきとめた(表3)。

D. 考察

NA14はSjS患者血清をプローブとして同定された自己抗原であり、今回の結果ではNA14に対する自己抗体の出現率はSjS患者でもっとも高く過去の報告を裏付ける結果となった。興味深い事にSiS患者だけでなくMCTD患者においても少なからず抗NA14抗体が出現する事が判明した。又、この現象はprimary SjSに特有でありsecondary SjSには殆ど認められなかった事、MCTDにおける抗NA14抗体の出現率はsecondary SjSの合併の有無に左右されずMCTDに対する固有の現象である事より、これらの疾患においてNA14及び抗NA14抗体が病態形成になんらかの役割を持っている可能性が示唆された。今後、抗NA14抗体と臓器特異性や疾患活動性などの臨床データとの相関関係や、これ

らの疾患におけるNA14の過剰発現の有無などを中心に本研究を進めていくつもりである。

E. 結論

NA14に対する自己抗体の出現頻度はprimary SjS患者において最も高率に認められた。しかしながら、primary SiS患者と比べて頻度は少ないながらもMCTD患者にも少なからず抗NA14自己抗体の出現が認められた。NA14はその蛋白構造上の特徴によりcoiled coil formationを有しており、以前より示唆されているcoiled-coil 蛋白と自己免疫反応との関連性を支持する結果となった。また、リウマチ性疾患患者における抗NA14自己抗体の出現はほぼprimary SjS及びMCTD患者に限られており、他のリウマチ性疾患にはほとんど認められない事より、今後疾患特異性をもった自己抗体として臨床応用が出来る可能性を秘めていると考えられた。

F. 文献

1. Ramos-Morales F, Infante C, Fedriani C et al. NA14 is a novel nuclear autoantigen with a coiled-coil domain. *J Biol Chem.* Jan 16;273(3):1634-9, 1998.
2. Nyman M, Bonhomme F, Alam TM et al. A general synthetic procedure for heteropolyniobates. *Science.* Aug 9;297(5583):996-8, 2002.
3. Pfannenschmid F, Wimmer VC, Rios RM et al. Chlamydomonas DIP13 and human NA14: a new class of proteins associated with microtubule structures is involved in cell division. *J Cell Sci.* Apr 15;116(Pt 8):1449-62, 2003.
4. Errico A, Claudiani P, D'Addio M et al. Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum Mol Genet.* Sep 15;13(18):2121-32, 2004.
5. Schoppmeier J, Mages W, Lechtreck KF et al. GFP as a tool for the analysis of proteins in the flagellar basal apparatus of Chlamydomonas. *Cell Motil Cytoskeleton.* Aug;61(4):189-200, 2005.

**ANALYSIS OF REACTIVITY AGAINST
NOVEL AUTOANTIGEN, NA14, IN MIXED
CONNECTIVE TISSUE DISEASE AND
OTHER RHEUMATIC DISEASES.**

Yoshinari Takasaki, Kazuhisa Nozawa, Keigo
Ikeda, Masakazu Matsushita, Masuyuki Nawata

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

NA14 (Nuclear Autoantigen of 14 kDa) is a nuclear autoantigen originally identified using human autoimmune serum as a probe in human testis cDNA expression library. In cell biology field, it has been recently shown that NA14 is localized in not only nucleus but also centrosome, and play an important role for cell division. However, there are

no additional reports concerning NA14 and autoimmunity so far. Furthermore, correlation between NA14 and clinical manifestation is completely unknown. Therefore, we measured reactivity against NA14 using ELISA system in human sera with various rheumatic diseases including MCTD. Anti NA14 autoantibody had unique disease specificity for primary SjS and MCTD. A frequency of anti NA14 antibody in primary SjS and MCTD were 25.5%, 15.9% respectively, and the frequencies of these diseases are statistically greater than those of other rheumatic diseases such as SLE. These data suggest that NA14 itself and anti NA14 antibody may play an important role in pathogenesis of primary SjS or MCTD. Furthermore, a measurement of anti NA14 autoantibody may be useful diagnostic tool for primary SjS and MCTD, because the autoantibody is almost exclusive for these diseases.

新規抗核抗体産生マウスモデルの検討

分担研究者 川畑仁人 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科 助手

研究要旨

混合性結合組織病は、抗核抗体である抗RNP抗体の出現を特徴としており、抗RNP抗体の出現機序の検討は、混合性結合組織病の病態解明に重要と考えられる。しかし、その解析に適した動物モデルが限られており、今回、ヌードマウスへのT細胞移入による抗核抗体産生の系を樹立し、抗核抗体、特に抗RNP抗体の産生機序研究への有用性を検討した。本系では、早期に高力価の抗核抗体が誘導され、長期の抗核抗体産生を観察することができた。また、本系は誘導による抗核抗体産生の系であり、移入するT細胞やレシピエントの変更や、移入時や移入後の抗体やサイトカインの投与など、様々な修飾が可能である。従って、T細胞サブセットやT細胞受容体、MHC、T細胞表面分子やサイトカインなどの抗核抗体産生機序における意義の解析に適している。更に、この系では混合性結合組織病において認められる抗U1RNP-A抗体や抗U1RNP-70K抗体も出現することから、混合性結合組織病における抗核抗体産生機序の研究に適した動物モデルと考えられ、抗RNP抗体産生機構や病態形成への関与の検討において有用であることが示唆された。

A.研究目的

混合性結合組織病(MCTD)は、抗核抗体である抗RNP抗体の出現を特徴としており、抗RNP抗体の出現機序の検討は、MCTDの病態解明に重要と考えられる。抗核抗体産生機構の解明には動物モデルの解析が有用だが、現状では抗核抗体の解析に適切で有用なモデルは限られており、その検討が困難となっている。そのため、今回、抗核抗体産生マウスモデルを樹立し、抗核抗体、特に抗RNP抗体の産生機構研究への有用性を検討することを目的とする。

B.研究方法

(1)マウスへの抗核抗体誘導

抗核抗体をマウスに誘導するために、CD4⁺T細胞やCD4⁺CD25⁺T細胞(Tconv)、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞(Treg)などのT細胞サブセットを、ヌードマウスへ移入した。

(1-1)間接蛍光抗体法

抗核抗体の出現の有無は、レシピエントから経時的に採取した血清を用いて、HEp-2細胞の間接蛍光抗体法による核の染色により検討した。

(1-2)免疫沈降法

核内自己抗原を蛋白レベルで解析するため、マウス脾細胞から精製した核抽出液を用いて、マウス血清により核抗原の免疫沈降を行った。このために、まずマウス脾細胞から核を分離し、その抽出液をビオチン化した。ビオチン化核抽出液に血清を加えプロテインAビーズで核内自己抗原を沈降し、SDS-PAGEで展開後PVDF膜に転写した。それをストレプトアビジンHRPで可視化することにより核内自己抗原の存在を確認した。

(2)全身性自己免疫疾患、特にMCTDにおける抗核抗体研究への有用性検討

T細胞移入をうけたヌードマウスに、ヒトにおける全身性自己免疫疾患に特徴的な抗核抗体が出現しているか検討した。特に、今回抗ヌクレオソーム抗体、抗ds-DNA抗体、抗U1RNP-A抗体、抗U1RNP-70K抗体について検討することとした。

(2-1)抗ヌクレオソーム抗体および抗ds-DNA抗体

SLEに特徴的な抗ヌクレオソーム抗体および抗

図1 各種リウマチ性疾患におけるNA14に対する抗体

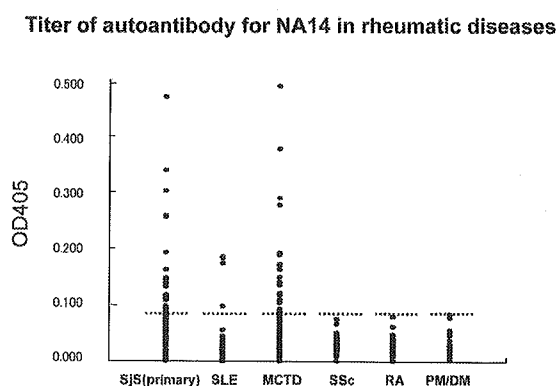


表1 各種リウマチ性疾患におけるNA14に対する自己抗体の出現率

Prevalence of autoantibody for NA14 in rheumatic diseases

	Primary SJS	SLE	MCTD	SSc	RA	PM/DM
Number of patients	94	80	113	23	29	20
Frequency of anti NA14 antibody	25.5%	3.8%	15.9%	0%	0%	0%
X ² test (compared to SLE)	P=0.0001		P=0.0074			

表2 一次性及び二次性シェーグレン症候群におけるNA14に対する反応性の比較

Comparison between primary and secondary SjS in reactivity against NA14

Anti NA14 antibody	Number of patients	Primary SjS	Secondary SjS
Positive	25	96.0% (n=24)	4.0% (n=1)
Negative	108	64.8% (n=70)	35.2% (n=38)

Total 133 patients with primary SjS (n=94) and secondary SjS (n=39) were analyzed for reactivity against NA14.
 Secondary SjS: RA+SjS (n=16), SLE+SjS (n=10), DM+SjS (n=4), SSc+SjS (n=3), MCTD+SjS (n=2), PN+SjS (n=2), APS+SjS (n=2)

表3 MCTD単独例及び2次性シェーグレン症候群合併例におけるNA14に対する反応性の比較

Comparison between MCTD and secondary SjS in reactivity against NA14

	Number of patients	Frequency of anti NA14 antibody
MCTD	70	14.3% (n=10)
MCTD+SjS	15	13.3% (n=2)

Total 85 patients with MCTD were divided into two groups depend on presence of SjS or not. then, analyzed for reactivity against NA14 in each groups.

新規抗核抗体産生マウスモデルの検討

分担研究者 川畑仁人 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科 助手

研究要旨

混合性結合組織病は、抗核抗体である抗RNP抗体の出現を特徴としており、抗RNP抗体の出現機序の検討は、混合性結合組織病の病態解明に重要と考えられる。しかし、その解析に適した動物モデルが限られており、今回、ヌードマウスへのT細胞移入による抗核抗体産生の系を樹立し、抗核抗体、特に抗RNP抗体の産生機序研究への有用性を検討した。本系では、早期に高力価の抗核抗体が誘導され、長期の抗核抗体産生を観察することができた。また、本系は誘導による抗核抗体産生の系であり、移入するT細胞やレシピエントの変更や、移入時や移入後の抗体やサイトカインの投与など、様々な修飾が可能である。従って、T細胞サブセットやT細胞受容体、MHC、T細胞表面分子やサイトカインなどの抗核抗体産生機序における意義の解析に適している。更に、この系では混合性結合組織病において認められる抗U1RNP-A抗体や抗U1RNP-70K抗体も出現することから、混合性結合組織病における抗核抗体産生機序の研究に適した動物モデルと考えられ、抗RNP抗体産生機構や病態形成への関与の検討において有用であることが示唆された。

A.研究目的

混合性結合組織病(MCTD)は、抗核抗体である抗RNP抗体の出現を特徴としており、抗RNP抗体の出現機序の検討は、MCTDの病態解明に重要と考えられる。抗核抗体産生機構の解明には動物モデルの解析が有用だが、現状では抗核抗体の解析に適切で有用なモデルは限られており、その検討が困難となっている。そのため、今回、抗核抗体産生マウスモデルを樹立し、抗核抗体、特に抗RNP抗体の産生機構研究への有用性を検討することを目的とする。

B.研究方法

(1)マウスへの抗核抗体誘導

抗核抗体をマウスに誘導するために、CD4⁺T細胞やCD4⁺CD25⁺T細胞(Tconv)、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞(Treg)などのT細胞サブセットを、ヌードマウスへ移入した。

(1-1)間接蛍光抗体法

抗核抗体の出現の有無は、レシピエントから経時的に採取した血清を用いて、HEp-2細胞の間接蛍光抗体法による核の染色により検討した。

(1-2)免疫沈降法

核内自己抗原を蛋白レベルで解析するため、マウス脾細胞から精製した核抽出液を用いて、マウス血清により核抗原の免疫沈降を行った。このために、まずマウス脾細胞から核を分離し、その抽出液をビオチン化した。ビオチン化核抽出液に血清を加えプロテインAビーズで核内自己抗原を沈降し、SDS-PAGEで展開後PVDF膜に転写した。それをストレプトアビジンHRPで可視化することにより核内自己抗原の存在を確認した。

(2)全身性自己免疫疾患、特にMCTDにおける抗核抗体研究への有用性検討

T細胞移入をうけたヌードマウスに、ヒトにおける全身性自己免疫疾患に特徴的な抗核抗体が出現しているか検討した。特に、今回抗ヌクレオソーム抗体、抗ds-DNA抗体、抗U1RNP-A抗体、抗U1RNP-70K抗体について検討することとした。

(2-1)抗ヌクレオソーム抗体および抗ds-DNA抗体

SLEに特徴的な抗ヌクレオソーム抗体および抗

ds-DNA抗体の有無に関しては、市販のELISAキットを用いて検討した。

(2-2)抗U1RNP-A抗体

SLEやMCTDで認められる抗RNP抗体の一つである抗U1RNP-A抗体に関しては、マウスU1RNP-Aリコンビナント蛋白を作成しELISAを行い検討した。またリコンビナントU1RNP-A蛋白や、マウス核抽出液から抗U1RNP-Aモノクローナル抗体で免疫沈降したU1RNP-A蛋白を、SDS-PAGEにて展開した後、PVDF膜に転写し、マウス血清にてイムノブロットを行うことにより、更に抗U1RNP-A抗体の出現を確認した。また、マウス核抽出液からT細胞移入をうけたヌードマウス血清により免疫沈降した核内自己抗原を、SDS-PAGEにて展開した後、PVDF膜への転写し、抗U1RNP-Aモノクローナル抗体でブロッティングすることにより、沈降物にU1RNP-A蛋白が含まれているか検討した。

(2-3)抗U1RNP-70K抗体

MCTDで認められる抗RNP抗体の一つである抗U1RNP-70K抗体の出現の有無に関しては、市販のヒトU1RNP-70Kリコンビナント蛋白を用いたELISAによって検討した。

(2-4)患者血清

T細胞移入をうけたヌードマウス血清による免疫沈降の実験において、PVDF膜への転写された核内自己抗原を、MCTD患者血清によりイムノブロットを行い、MCTD患者血清中の抗核抗体と同様の抗原特異性のある抗核抗体がT細胞移入ヌードマウスに存在しているか検討した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育や実験は、大学動物実験施設規定に従い適切に行われている。

C.研究結果

(1)Tconvによるヌードマウスへの抗核抗体産生誘導

ヌードマウスへTconvを移入する系は、従来より臓器特異的自己免疫疾患誘導の系として知られており、この系では臓器特異的自己抗体も出現する。今回、Tconvをヌードマウスに移入すると、臓器特異的自己免疫応答だけではなく、約3週

間で高力価の抗核抗体産生が惹起されることが、間接蛍光抗体法により確認された(図1A)。その後も、これらのマウスでは抗核抗体産生が持続するが、腸炎などの臓器特異的自己免疫疾患により、約2ヶ月で体重減少などが出現し、約3~4ヶ月で死亡するため、長期の抗核抗体の観察は困難であった。

(2)TregやCD4T細胞によるヌードマウスへの抗核抗体産生誘導

T細胞サブセットによるヌードマウスへの臓器特異的自己免疫疾患誘導の系では、Tregは疾患を惹起せず、むしろTconvによる疾患誘導を抑制することが知られている。しかし、今回の抗核抗体産生の検討では、Tregの移入やTconvとともにTregを同時移入した場合においても、Tconvと同様に早期に抗核抗体産生が誘導されることが、間接蛍光抗体法にて確認された(図1A・B)。更に、Tconv移入では、マウスが臓器特異的自己免疫疾患にて死亡していくが、Tregを含んだ細胞群の移入では、抗核抗体を長期にわたり観察でき、少なくとも半年以上にわたり抗核抗体産生が認められた。

(3)本系により認識される核内自己抗原についてT細胞移入をうけたヌードマウス血清により免疫沈降した核内自己抗原をSDS-PAGEにて展開した。その結果、Tconv移入により、多数の核内自己抗原を認識する抗体が出現していることがわかった。Tregによっても、Tconvより少数ではあるが、多数の核内自己抗原を認識する抗体が出現していた。また、本系と、抗核抗体産生モデルとしても知られるプリスタン誘発全身性自己免疫マウスを比較したところ、幾つかの共通した核内自己抗原が認められた(図1C)。

(4)抗ヌクレオソーム抗体および抗ds-DNA抗体TconvやTreg移入ヌードマウス血清中の抗ヌクレオソーム抗体および抗ds-DNA抗体について、市販のELISAキットにて検討した。その結果、Tconv移入マウスでは早期より抗ヌクレオソーム抗体や抗ds-DNA抗体が出現する一方、Treg移入マウスや、TconvにTregを同時移入したマウスではこれらの自己抗体は認められなかった(図2A)。

(5)抗U1RNP-A抗体

TconvやTreg移入ヌードマウス血清中の抗U1RNP-A抗体について、マウスU1RNP-Aリコンビナント蛋白によるELISAを行い検討した。その結果、抗ヌクレオソーム抗体や抗ds-DNA抗体と異なり、Tconv移入マウスだけではなく、Treg移入マウスや、TconvにTregを同時移入したマウスにおいても、抗U1RNP-A抗体を認めた(図2B)。

更に、他方法でも抗U1RNP-A抗体の出現を確認するため、SDS-PAGEにて展開したリコンビナントU1RNP-A蛋白や、マウス核抽出液から抗U1RNP-Aモノクローナル抗体で免疫沈降したU1RNP-A蛋白を、T細胞移入ヌードマウス血清にてイムブロットを行った。その結果、ELISAの結果と同様に、Tconv移入マウスだけではなく、Treg移入マウスにおいても抗U1RNP-A抗体が存在することが確認できた。

また、T細胞移入ヌードマウス血清により免疫沈降した核内自己抗原をSDS-PAGEにより展開後PVDF膜に転写し、抗U1RNP-Aモノクローナル抗体でブロッティングしたところ、プリスタン誘発全身性自己免疫疾患モデルマウス血清による場合と比較して、かなり少量だが、Tconv移入マウスやTreg移入マウスにおいて、U1RNP-A蛋白が含まれていることが確認できた。

(6)抗U1RNP-70K抗体

TconvやTreg移入ヌードマウス血清中の抗U1RNP-70K抗体に関しては、リコンビナントU1RNP-70K蛋白を用いたELISAを行い検討した。その結果、抗ヌクレオソーム抗体や抗ds-DNA抗体と異なり、Tconv移入マウスだけではなく、Treg移入マウスや、TconvにTregを同時移入したマウスにおいても抗U1RNP-70K抗体を認めた。この結果は、抗U1RNP-A抗体と同様であった。

(7)患者血清

T細胞移入ヌードマウス血清により免疫沈降した核内自己抗原をSDS-PAGEにより展開後PVDF膜に転写し、MCTD患者血清によりブロッティングしたところ、複数のバンドが確認でき

た。従って、MCTD患者血清中の抗核抗体と同様の抗原特異性のある抗核抗体が、T細胞移入を受けたヌードマウスにも存在していることが確認された。

D.考察

(1)本系の抗核抗体産生研究への有用性についてこの系の特徴として、まず自然発症ではなく誘導により自己抗体が惹起される点と、早期に高力価の抗核抗体が産生される点があげられる。自然発症の全身性自己免疫モデルでは、抗核抗体の研究を始めるには誕生後数ヶ月以上を要することが多いが、本系はT細胞移入後2~3週後より解析可能となり、抗体産生誘導から解析までの期間が短縮できる。このことは、移入後の抗体やサイトカイン投与などの実験を試みた場合も、投与期間が少なく費用や時間の面で大きな利点と考えられる。

更に、ヌードマウスへのT細胞移入というシンプルな誘導系であり、移入するT細胞やレシピエントを変える、移入時や移入後に抗体やサイトカインなどの物質を投与するなど、様々な修飾が可能である。従って、T細胞サブセットやT細胞受容体、MHC、T細胞表面分子やサイトカインなどの、抗核抗体産生機序における意義の解析に適していると考えられる。

一方、本系は、抗核抗体だけではなく全身性自己免疫疾患も誘導されているかについてはまだ不明であり、今後の解析が必要である。

(2)本系の抗RNP抗体研究への有用性について本系は抗核抗体産生機序研究において、上記のような利点を有しているほか、抗RNP抗体も出現し、特に抗U1RNP-A抗体のほか抗U1RNP-70K抗体も出現することから、MCTDにおける抗RNP抗体産生モデルとしても有用と考えられる。Tconv移入マウスでは、臓器特異的自己免疫疾患が生じ、SLEにおいて認められる抗ヌクレオソーム抗体や抗ds-DNA抗体も同時に認めるが、CD4T細胞やTreg移入マウスでは、臓器特異的自己免疫疾患や抗ヌクレオソーム抗体は認めず、抗U1RNP-A抗体や抗U1RNP-70K抗体が出現するため、特に長期の産生機構の検討には有利と

考えられる。

一方、本系では、全身性自己免疫疾患で認める腎障害や関節炎、MCTDで認める肺高血圧症などの有無に関しては、まだ不明である。従って、本系がMCTD研究において、抗核抗体機序のモデルとして有用なのか、病態研究のモデルとしても用いることができるのかにつき、今後病理学的検討したうえで明らかにしたい。

(3)T細胞移入ヌードマウスにおける抗核抗体産生機序について

ヌードマウスにTconvを移入すると、臓器特異的自己免疫応答が惹起されるが、Tregとの同時移入やTregの単独移入では、これらの自己免疫応答は認められなくなることが知られている。しかし、全身性自己免疫では、臓器特異的自己免疫と異なることが確認された。抗ヌクレオソーム抗体や抗ds-DNA抗体などの抗核抗体では、臓器特異的自己抗体と同様、主にTconvによって誘導され、Tregによって制御されているが、抗RNP抗体を構成している抗U1RNP-A抗体や抗U1RNP-70K抗体などの抗核抗体では、TconvだけではなくTregによっても惹起されるものがあり、抗核抗体産生には上記の異なる機序が推察される。この相違が生じる原因に関しては、現在、核内自己抗原発現トランスジェニックマウスと核内抗原特異的T細胞受容体発現トランスジェニックマウスとの交配で得られる抗核抗体産生マウスを用いて解析が進んでいる。

E.結論

ヌードマウスへのT細胞移入による抗核抗体産生の系を樹立した。この系では、早期に高力価の抗核抗体が誘導され、長期の抗核抗体産生が

観察できる。更に、本系は誘導による抗核抗体産生の系であり、移入するT細胞やレシピエントの変更や、移入時や移入後の抗体やサイトカインの投与など、様々な修飾が可能である。従って、T細胞サブセットやT細胞受容体、MHC、T細胞表面分子やサイトカインなどの抗核抗体産生機序における意義の解析に適している。

また、この系では抗U1RNP-A抗体や抗U1RNP-70K抗体も出現することから、MCTDにおける抗RNP抗体産生機序の研究に適した動物モデルと考えられる。

従って、本系は抗核抗体産生機序の検討に有用であり、特にMCTDの病態研究で重要と考えられる抗RNP抗体産生機構や病態形成への関与の検討において有用であることが示唆された。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

2. 論文発表

なし

2.学会発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

4. 特許取得

なし

5. 実用新案登録

なし

6. その他

なし

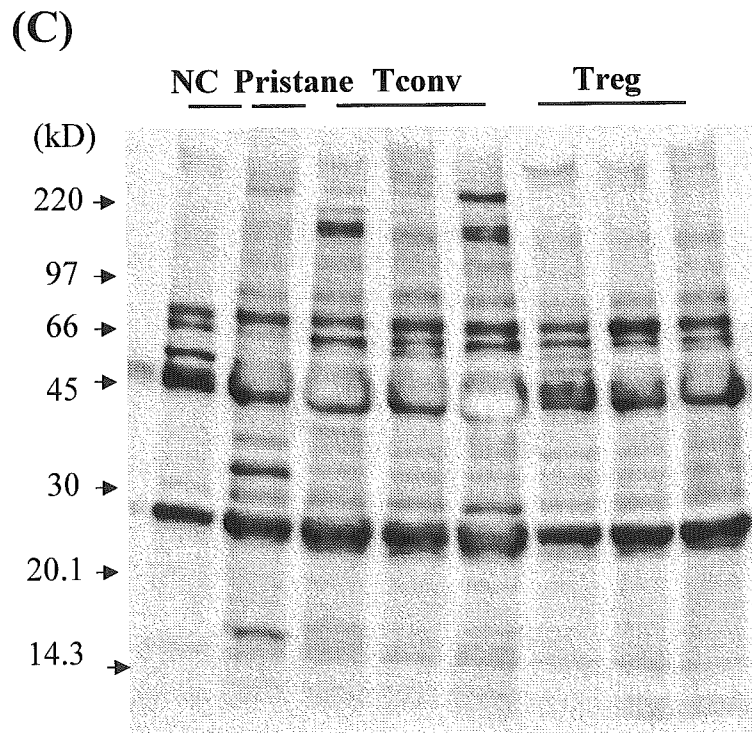
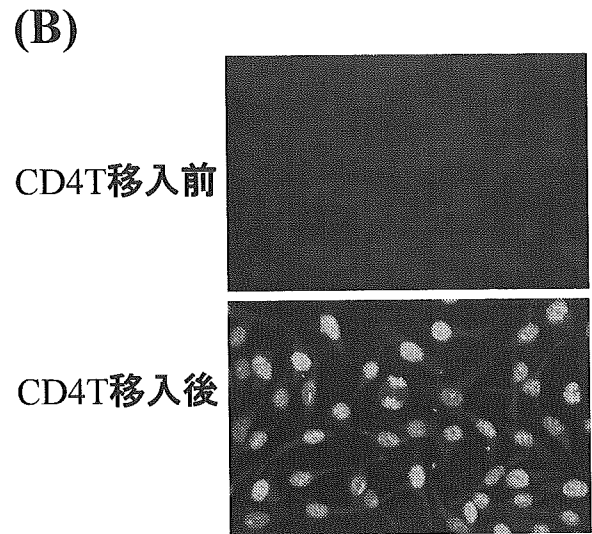
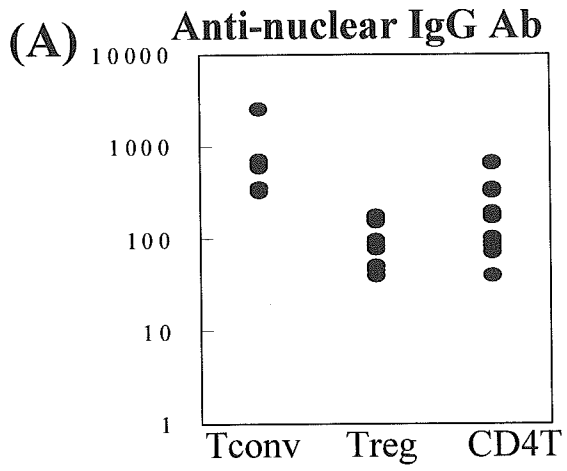
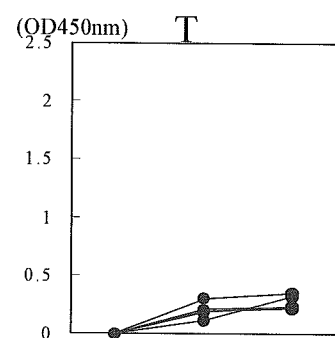
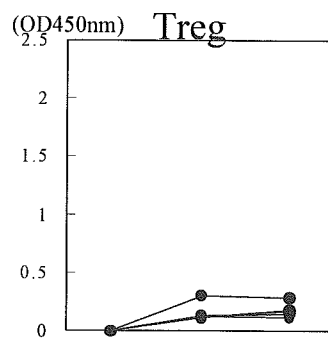
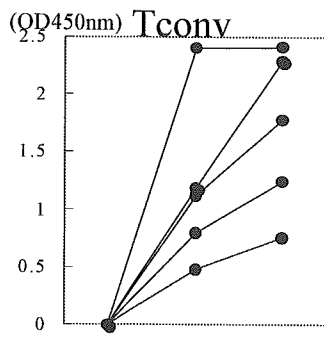


図1. ノードマウスへの T 細胞移入による抗核抗体産生

(A) Anti-nucleosome IgG



(B) Anti-U1A IgG

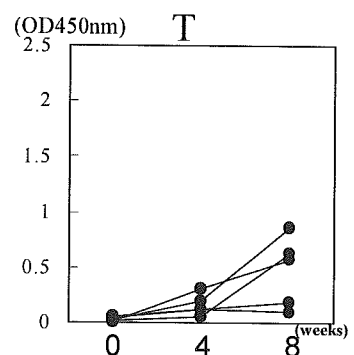
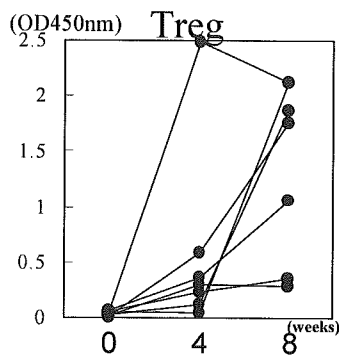
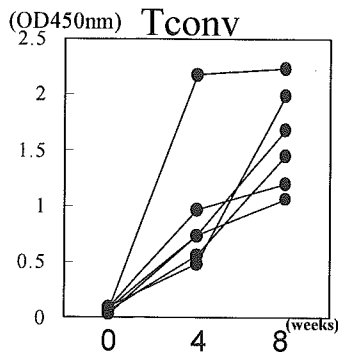


図2. ノードマウスへの T 細胞移入による抗ヌクレオソーム抗体および抗 RNP 抗体産生誘導

肺高血圧に合併する心血管系のリモデリングの病態解明と治療法開発に関する研究

分担研究者 田中廣壽 東京大学医科学研究所（助教授）

研究要旨

混合性結合組織病（MCTD）をはじめとする膠原病患者における肺高血圧（PH）の発症や治療法開発における低酸素誘導性転写因子(HIF-1)とHEXIM1の意義を明らかにし、新規治療法開発の基盤をつくることを目的とした。HEXIM1遺伝子プロモーター上には3カ所、HEXIM1遺伝子発現に関連する領域が存在した。HEXIM1は血管平滑筋細胞の増殖を抑制した。HEXIM1は、P-TEFb抑制とGRとの結合を介したGR転写調節機能抑制、2つの経路によって遺伝子発現を制御することが示された。

A. 研究目的

肺高血圧(PH)は混合性結合組織病(MCTD)の予後規定因子であるが、その病態はいまだに明らかではなく、根本的治療法もない。病変部では低酸素誘導性転写因子HIF-1の標的遺伝子であるエンドセリン(ET)-1などのmRNAが高発現しており、末梢血中においてもET-1が高値を示すなど、肺高血圧症発症ならびに病態形成における血管平滑筋細胞におけるHIF-1->ET-1経路の役割が示唆されている。また、HIF-1 α ノックダウンマウスでは低酸素飼育下における肺高血圧が発症しにくいとの報告もある。しかし、PH患者におけるHIF-1の活性化機構やHIF-1とET-1制御の治療的意義に関しては不明のままである。一方、最近、血管平滑筋増殖や心肥大の新しい分子機構が発見され注目されている。すなわち、これらの病態において、RNA polymerase IIのリン酸化が亢進しており、それはcyclin T1とともにP-TEFb複合体を構成するCDK9によること、ET-1刺激はこの経路をも介して心肥大の形成に密接に関与していることが報告された(Sano, M., et al. Nat. Med. 2002)。また、血管平滑筋の分化誘導に伴って発現する遺伝子の一つとして発見されたHEXIM1はNF- κ B依存性の転写を抑制するとともに(Ouchida, R., et al. Genes Cells 2003)、P-TEFbを抑制して転写伸張反応を負に制御することも最近明らかにされた(Yik, J.,

et al., Mol Cell, 2004)。以上の背景をもとに、MCTDをはじめとする膠原病患者におけるPHの発症や治療法開発におけるHIF-1とHEXIM1の意義を明らかにし、新規治療法開発の基盤をつくることを目的とした。以下に、HEXIM1遺伝子の発現調節機構とHEXIM1の転写抑制作用に関する研究成果を報告する。なお、HIF-1、HEXIM1の野生型ならびに各種変異体発現プラスミドを構築し、培養細胞においてその発現と機能をすでに検証した。また、動物への導入を考慮し、これらの発現プラスミドをもとにアデノウイルス発現系を構築し、すでに各々の発現ならびに機能を検証済であることを申し添える。

B. 研究方法

HEXIM1遺伝子のプロモーターを単離し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の上位に組み込んだとともに、各種変異体を作成した。トランスフェクションとルシフェラーゼアッセイは既報のごとく行った。HEXIM1の発現はWestern blot法、免疫組織染色によった。HEXIM1発現レベルを調節するためsiRNAシステム、Cre-loxPアデノウイルスシステムを構築した。これらを培養血管平滑筋に導入し、細胞増殖に与える影響を観察した。HEXIM1の各種転写因子の活性に与える影響を各々のレポーター遺伝子を用いて検討した。とくに、グルココルチコイドレセ

プターGRに与える影響は、既報のGR発現系などを用いて詳細に解析した。

C. 研究結果

ヒト冠状動脈由来血管平滑筋細胞、ヒト病理組織冠状動脈ならびに心筋切片において、HEXIM1の発現を免疫組織学的に検討した。HEXIM1は、血管平滑筋細胞にくまなく、しかも核に発現していた。冠状動脈を含む病理組織切片においては、HEXIM1は動脈壁平滑筋細胞のみならず、血管内皮細胞、心筋細胞の核においても発現が認められた。HEXIM1遺伝子のプロモーターを単離し、様々な変異体を作製した。これらをHeLa細胞にトランスフェクとし、その発現調節領域を同定した結果、プロモーター領域に-3841~-2264、-164~-120、-70~-41の3カ所存在した。現在、これらの領域に結合する転写因子の同定などを進めている。HEXIM1が血管平滑筋細胞の増殖に与える影響をアデノウイルス発現系を用いて検討した。まず、HEXIM1発現がCreリコンビナーゼで誘導されることをウエスタンブロット法で確認した。血管平滑筋細胞の増殖は、HEXIM1発現アデノウイルスの量に依存して抑制されることが示された。HEXIM1はGRを結合し、グルココルチコイド応答性遺伝子発現を負に制御することを発見した。HEXIM1はその中央部に存在するNLSを介してGRのLBDと結合し、GRがTIF2などの共役因子と相互作用するのを阻害した。なお、HEXIM1は、たとえば、AhRやPPAR γ などの転写因子とは結合せず、核内レセプター、とくにステロイドレセプターと比較的選択的に結合した。GRはそのLBDのN末端部分を介して、HEXIM1のNLSのC末端部分と結合した。一方、7SKはNLSのN末端部分と結合した。さらに、GRはHEXIM1と7SK RNAの結合を阻害した。

D. 考察

少なくとも培養細胞ならびに正常人血管平滑筋、心筋ではHEXIM1が発現していることから、ヒトにおいても血管平滑筋・心筋細胞の増殖や心肥大にHEXIM1が関与している可能性がある。

今後、剖検例を含むPH患者における病理組織学的解析とともに、PHの動物モデルにおける詳細な解析を計画している。一方、HEXIM1は転写伸張反応のみならず、たとえば、GRとの結合を介して、特定の転写因子による転写開始反応をも抑制的に制御することが示された。かかるGRの作用機構はGRが単に核内レセプターとして機能するだけではなく、P-TEFb活性化因子として多くの遺伝子の発現調節に重要な役割を担う可能性をも示唆する。したがって、HEXIM1とGRの相互作用をさらに究明することはMCTDなあどの治療におけるグルココルチコイドの作用機構とその意義を解明する上でも重要かもしれない。

E. 結論

HEXIM1はPHや右心肥大の病態を解明し治療法を開発する上で鍵分子である可能性がある。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuyo Urasaki, Mamoru Nori, Satoshi Iwata, Takahiro Sasaki, Osamu Hosono, Hiroshi Kawasaki, Hirotohi Tanaka, Nam H Dang, Eiji Ikeda, Chikao Morimoto. Roxithromycin specifically inhibits development of collagen induced arthritis and production of proinflammatory cytokines by human T cells and macrophages. *J Rheumatol.* 2005; 32(9):1765-74
- 2) Sola S, Amaral JD, Castro RE, Ramalho RM, Borralho PM, Kren BT, Tanaka H, Steer CJ, Rodrigues CM. Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF-beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 2005;42(4):925-34
- 3) Kei Ohnuma, Tadanori Yamochi, Masahiko Uchiyama, Kunika Nishibashi, Satoshi Iwata, Osamu Hosono, Hiroshi Kawasaki, Hirotohi Tanaka, Nam H. Dang, and Chikao Morimoto.

CD26 Mediates Dissociation of Tollip and IRAK-1 from Caveolin-1 and Induces Upregulation of CD86 on Antigen-Presenting Cells. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25(17): 7743-7757

4) Kei-ichi Hara, Mayumi Okamoto, Toshihiko Aki, Hideo Yagita, Hirotohi Tanaka, Yoichi Mizukami, Hiroshi Nakamura, Akio Tomoda, Naotaka Hamasaki, Dongchon Kang. Synergistic enhancement of TRAIL- and TNF α -induced cell death by a phenoxazine derivative. *Mol. Cancer Ther.* 2005;4(7):1121-7

5) Noriaki Shimizu, Rika Ouchida, Noritada Yoshikawa, Tetsuya Hisada, Hajime Watanabe, Kensaku Okamoto, Masatoshi Kusahara, Hiroshi Handa, Chikao Morimoto, and Hirotohi Tanaka. HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102(24): 8555-8560

6) Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, Morimoto C. Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia. *Stroke* 2005;36(11):2457-62

7) Iwata S, Souta-Kuribara A, Yamakawa A, Sasaki T, Shimizu T, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Watanabe T, Arima N, Morimoto C. HTLV-I Tax induces and associates with

Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L). *Oncogene.* 2005;24(7):1262-71

8) Hiroshi Nakamura, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Lorenz Poellinger, Kei Ohnuma, Chikao Morimoto, and Hirotohi Tanaka. TCR Engagement Increases Hypoxia-Inducible Factor-1 Protein Synthesis via Rapamycin-Sensitive Pathway under Hypoxic Conditions in Human Peripheral T Cells. *J. Immunol.*, 2005; 174(12): 7592-7599.

9) Noritada Yoshikawa, Keiko Yamamoto, Noriaki Shimizu, Sachiko Yamada, Chikao Morimoto, and Hirotohi Tanaka. The distinct agonistic properties of the phenylpyrazolosteroid cortivazol reveal interdomain communication in the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 2005;19(5): 1110-1124

10) Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, Inagi R, Tanaka H, Sassa R, Fujita T, Nangaku M. A biologic role of HIF-1 in the renal medulla. *Kidney Int.* 2005;67(4):1428-39

2. 学会発表

とくになし。

H.知的財産権の出願・

低酸素誘導性転写因子活性化剤(特許出願中)

NOS2遺伝子多型による肺高血圧症発症の予測

分担研究者 原まさ子 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 教授
研究協力者 川口鎮司 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 講師

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、明かではなく、発症を予測する方法も確立していない。血管拡張因子である一酸化窒素(NO)は、以前の我々の検討で、MCTD患者において血清中で増加しているが、肺高血圧症を合併した症例では、NOの増加が認められなかった。このNO合成量の違いにNO合成酵素であるinducible NO synthase (NOS-2) の遺伝子多型の関与があることを昨年の本研究班にて報告した。今回の研究では、さらに、異なる症例において、遺伝子多型を検討し、研究成果の再現性を評価した。その結果、昨年同様の結果が得られ、NOS2遺伝子多型は、PHの発症に関与していることが推測された。今後前向きに、発症早期のMCTD患者で、かつ、PHの合併が認められない症例を抽出し、3年以上の追跡調査を行い、PHの新たな発症にNOS2遺伝子多型が関与するかどうかを検討し、発症予測因子になりうるかの検討を行って行きたいと考える。

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、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¹⁾。近年、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再確認されている²⁾。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¹⁾。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³⁾。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、昨年の本研究班にてNOS-2遺伝子の5'-UTRに存在する遺伝子多型を検索し、PHの発症にNOS2遺伝子多型が関与していることをみいだした⁴⁾。今回の研究では、MCTDの症例をあらたに集め、再現性を検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

MCTD患者25例と健常人95例を対象とした（表1）。東京女子医大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、-1000か