

図2. HeLa細胞抽出物を用いた免疫ブロット法によるハイブリドーマIgGの反応性の検討.

ハイブリドーマ上清（中のIgG）を一次抗体とし、アルカリフォスファターゼ標識抗IgG抗体で、反応する蛋白を調べた。#1、11、121はIPPやELISAでは同様のパターンを示したが、IBではその反応性は異なった。一方#64は45kDaの蛋白に強く反応し（●）、ELISAの成績からapoptotic U1-70Kが対応抗原である可能性が示唆された。31kDaの蛋白（●）もapoptotic U1-70Kに関連するものと報告されている。しかし他にもバンドが認められ、単クローンではない可能性がある。また#104はC抗原と反応していると考えられたが、反応は強くなかった。なおこれらは抗Sm抗体のハイブリドーマであるY12の反応性とは全く異なった。

OC: 抗U1RNP/Sm抗体陽性患者血清

混合性結合組織病(MCTD)にともなう肺高血圧症(PH)に関連する 抗内皮細胞抗体(AECA)に関する研究

分担研究者	澤井高志	岩手医科大学医学部	病理学第一講座	教授
研究協力者	鎌滝章央	岩手医科大学医学部	病理学第一講座	助手
	佐々木信人	岩手医科大学医学部	内科学第三講座	助手
	畠山 明	東北労災病院	リウマチ膠原病科	部長

研究要旨

混合性結合組織病 (MCTD) に合併する肺高血圧症 (PH) はMCTD患者の死因の第一位を占めるが、その発症機序はいまだ明らかになっていない。PH発症に至る初期変化として肺微小血管内皮細胞傷害が示されているため、本研究では肺微小血管内皮細胞を特異的に傷害する血清因子として抗内皮細胞抗体 (anti-endothelial cell antibody, AECA) に焦点をあて、AECAの抗原の探索を行った。培養肺微小血管内皮細胞より調製した蛋白質を二次元電気泳動で展開し、PHを発症したMCTD患者血清を用いたウエスタンブロットによりスポットを選択し、ペプチドマスフィンガープリンティング法によりスポットの蛋白質を解析した結果、約10個の候補蛋白質を得ることができた。抗原候補蛋白質の一つ、nucleophosminに対して、PHを合併したMCTD患者の血清が強く反応することが確認された。

A. 研究目的

混合性結合組織病 (MCTD)では他の膠原病に比べ高率に発症する肺高血圧症 (PH)が死因の第一位を占めているが、その成因は不明である。本研究の目的は、MCTDにおけるPHの発症機序の解明である。本研究室での病理組織学的検討から、臨床的にはPHを示していないMCTD患者でも肺の小血管を中心に血管内皮細胞傷害に起因する病変が発生していることが明らかになり、小血管の障害から徐々に進行してPHの発症にいたることが示唆されている¹⁾²⁾。また、PHを発症しているMCTD患者血清が肺微小血管内皮細胞に対して高い反応性を示すことも明らかになっている³⁾。そこで、今回、我々はMCTD患者血清中の抗内皮細胞抗体 (anti-endothelial cell antibody, AECA)による肺微小血管の傷害や機能変化がPH発症の原因であると考え、PHを発症しているMCTD患者血清に特異的なAECAの抗原の探索を行った。

B. 研究方法

肺微小血管内皮細胞(HMVEC-L)から調製した

蛋白質を二次元電気泳動で展開し、PVDF膜に転写後、健常者血清やPHを発症しているMCTD患者血清を用いてウエスタンブロットを行った (2Dウエスタン)。PHを発症しているMCTD患者の血清に強く反応したスポットをゲルから切り出し、蛋白質分解酵素で処理した後、ペプチドマスフィンガープリンティング法を用いて、各々の蛋白質を同定した。同定できた抗原候補の組換え蛋白質を作製し、血清の反応性をウエスタンブロットにより確認した。

(倫理面への配慮)

採血にあたっては、提供者に使用目的、データ管理について説明し、インフォームドコンセントが得られた場合にのみサンプルの提供をうけた。これら提供者のデータの管理については研究中、研究終了後を問わずに厳重に行い、解析時や発表時には検体番号で扱い、個人名が第三者に知られないように配慮した。

C. 研究結果

2Dウエスタンの結果、PHを発症したMCTD患者の血清に強く反応するスポットを約20個選択できた(図1)。そのうちの半数をペプチドマスフィンガープリンティング法によって同定できた。同定できたAECAの抗原の候補蛋白質は、vimentin、serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9 (SERPINB9)、aldehyde dehydrogenase family 1 member A1 (ALHD1A1)、heat shock 70KDa protein 9B (HSPA9B)、protein disulfide isomerase family A, member 3 (PDIA3)、nucleophosmin (NPM1)、annexin A5、annexin A1、annexin A2などであった。ウエスタンブロットによりPHを合併したMCTD患者血清のNPM1に対する高い反応性が確認できた(図2)。

D. 考察

ウエスタンブロットによる検出では、抗体の反応性が高くなり非特異的なものを検出してしまう場合や逆に反応性が低くなる場合があり、今回同定できた蛋白質やスポットに対応する蛋白質の全てが疾患と関連しているとは言えない。しかし、vimentin、HSP、annexinといった様々な疾患で自己抗体の報告がなされている蛋白質⁴⁾⁵⁾が同定できた蛋白質に含まれたことを考えると、2Dウエスタンは自己抗体の抗原を探索するうえで有効な手段と言える。発症機序に関連するAECAの反応性が2Dウエスタンで検出できる程度の強さかという問題が残るものの、この方法で同定できる蛋白質の中にAECAの反応する抗原が含まれる可能性は高い。今回同定できた蛋白質の中にも、MCTDにおける自己抗体の報告は未だないが強皮症において抗体陽性の患者の方が陰性の患者に比べPHを発症している割合が高いと報告されているNPM1⁶⁾や、自己抗体の報告はないがPHのモデルの作製に使用されるモノクロタリンの代謝物によって修飾を受ける蛋白質の1つとしてあげられておりPH発症との関連が示唆されているPDIA3⁷⁾が含まれていて興味深い。

今回、強皮症患者の場合と同様にPHを合併したMCTD患者の血清がNPM1に高い反応性を示した事から抗NPM1抗体がPHの病態を反映している可能性が示された。

今後、さらに抗原候補蛋白質について解析し、

よりMCTDに特異的な抗原を探索する。また、同定した蛋白質に対する抗体による内皮細胞の傷害や活性化などを解析することにより、その抗体が病態を反映しているか、あるいはPHの発症機序に関連しているかを検討する。

E. 結論

本研究によりMCTDの自己抗体の抗原候補蛋白質を得ることができた。今回、反応性が確認できたのは、発現が内皮細胞特異的ではない蛋白質であったが、さらに候補蛋白質に対する抗体について詳細に解析し、AECAの抗原を明らかにすることで、PH発症機序の一端を解明につながり、新たな診断法や治療法の可能性が開けると考える。

参考文献

- 1) Sawai T, Murakami K, Kasukawa R and Kyogoku M. Histopathological study of mixed connective tissue disease from 32 autopsy cases in Japan. *Jpn J Rheumatology* 7: 279-292, 1997
- 2) 澤井高志、三上芳喜、吉村浩一. 混合性結合組織病における肺高血圧症の病理組織学的特徴. *リウマチ科* 8: 66-74, 1992
- 3) 佐々木信人、黒瀬頭、井上洋西、澤井高志. 混合性結合組織病に合併する肺高血圧症に対する抗内皮細胞抗体の関与について. *リウマチ* 42 (6): 885-894, 2002
- 4) Thebault S, Gilbert D, Hubert M, Drouot L, Machour N, Lange C, Charlionet R, Tron F. Orderly pattern of development of the auto-antibody response in (New Zealand White x BXSB) F1 lupus mice: characterization of target antigens and antigen spreading by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Immunol.* 2002;169(7):4046-53.
- 5) Tripathy NK, Sinha N, Nityanand S. Anti-annexin V antibodies in Takayasu's arteritis: prevalence and relationship with disease activity. *Clin Exp Immunol.* 2003;134(2):360-4.
- 6) Ulanet DB, Wigley FM, Gelber AC, Rosen A. Autoantibodies against B23, a nucleolar phospho-protein, occur in scleroderma and are associated with pulmonary hypertension. *Arthritis*

Rheum. 2003;49(1):85-92.

7) Lame MW, Jones AD, Wilson DW, Segall HJ. Monocrotaline pyrrole targets proteins with and without cysteine residues in the cytosol and membranes of human pulmonary artery endothelial cells. Proteomics. 2005;5(17):4398-413.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimura F, Kanno H, Uzuki M, Tajima K, Shimamura T and Sawai T: Downregulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor-alpha and actinomycin D. Osteoarthr Cartil. 14: 435-441(2006)
- 2) Watanabe T, Sato A, Sawai T, Uzuki M, Goto H, Yamashita H, Akamatsu D, Sato H, Shimizu T, Miyama N, Nakano Y, Satomi S: The elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms decreased to levels equal to those of healthy controls after an aortic repair. Ann Vasc Surg. 20(3):317-21(2006)
- 3) Sasaki N, Yamauchi K, Sato R, Masuda T, Sawai T, Inoue H: Klinefelter's syndrome associated with systemic lupus erythematosus and autoimmune hepatitis. Mod Rheumatol. 16: 305-308(2006)
- 4) 菅野祐幸、渡部大輔、清水則夫、駒井悦子、澤井高志 : Epstein-Barr virus(EBV) 陽性NK細胞の血管内皮細胞への接着能の検討. 日病理会誌. 95(1): 228(2006)
- 5) 渡部大輔、菅野祐幸、吉田亜希、赤坂俊英、澤井高志 : 尋常性乾癬患者リンパ球の培養血管内皮細胞への接着能の検討. 日病理会誌. 95(1): 242(2006)
- 6) 佐々木信人、黒瀬 顕、鎌滝章央、澤井高志 : 混合性結合組織病に合併する肺高血圧症に対する抗内皮細胞抗体の関与について. Ther Res. 27(10): 1940-41(2006)
- 7) 鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志 : 混合性結合

組織病 (MCTD) における肺高血圧症に関連する抗内皮細胞抗体 (AECA) の抗原の解析. Ther Res. 27(10): 1943-44(2006)

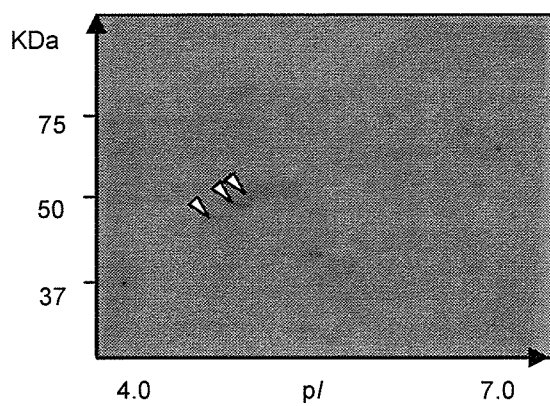
2. 学会発表

- 1) 鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志 : 混合性結合組織病 (MCTD) に合併する肺高血圧症 (PH) と抗内皮細胞抗体 (AECA) の関連の解析. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会/第15回国際リウマチシンポジウム. 4月. 長崎 (2006)
- 2) 菅野祐幸、渡部大輔、清水則夫、駒井悦子、澤井高志 : Epstein-Barr virus(EBV) 陽性NK細胞の血管内皮細胞への接着能の検討. 第95回日本病理学会総会. 4月. 東京 (2006)
- 3) 渡部大輔、菅野祐幸、吉田亜希、赤坂俊英、澤井高志 : 尋常性乾癬患者リンパ球の培養血管内皮細胞への接着能の検討. 第95回日本病理学会総会. 4月. 東京 (2006)
- 4) 渡部大輔、菅野祐幸、吉田亜希、赤坂俊英、澤井高志 : 尋常性乾癬患者リンパ球の培養血管内皮細胞への接着能の検討. 第105回日本皮膚科学会総会. 6月. 京都 (2006)
- 5) 菅野祐幸、三浦康宏、佐々木信人、船渡 治、澤井高志 : PR3-ANCA陽性で多発神経炎症状が前面に出た悪性関節リウマチの一部検例. 第11回血管病理研究会. 10月. 東京 (2006)
- 6) Kamataki A, Sasaki N, Sawai T: Identification of possible antigens of anti-endothelial cell antibodies (AECA) related to pulmonary hypertension (PH) in mixed connective tissue disease (MCTD). American College of Rheumatology 70th Annual Scientific Meeting. Nov10-15, Washington (2006)
- 7) 鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志 : 混合性結合組織病に合併する肺高血圧症における抗内皮細胞抗体の解析. 第96回日本病理学会総会. 3月. 大阪 (2007)

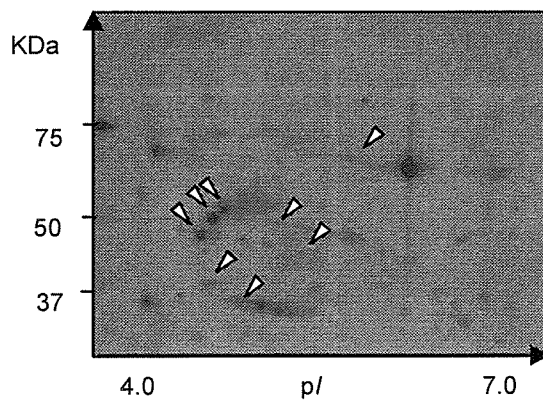
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 特になし。
2. 実用新案登録 特になし。
3. その他 特になし。

(A) healthy control



(B) MCTD without PH



(C) MCTD with PH

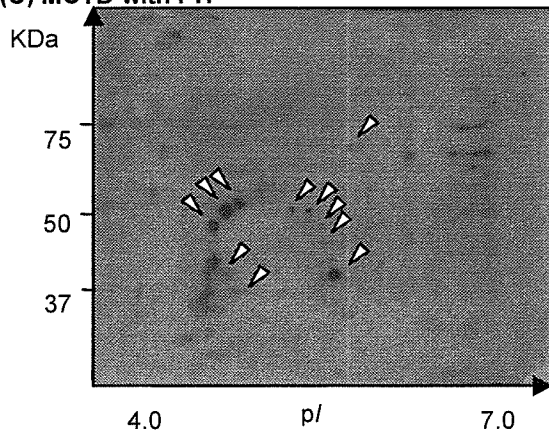


図1. HMVEC-Lから調製した蛋白質を用いた2D western blot法による患者血清と反応する蛋白質の検出

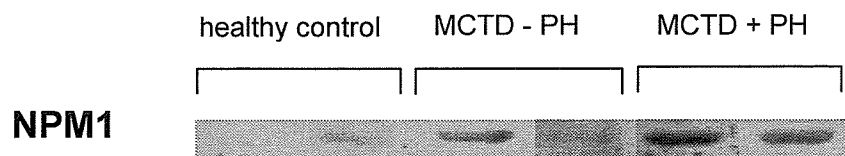


図2. 組換え蛋白質を用いた western blot法による患者血清との反応性の検討

MCTDのPHに関する自己抗体の検討

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

MCTDに肺高血圧症(PH)が合併し2度のステロイド治療を行い改善した患者血清を、経時的にウエスタンブロット法で分析した。ステロイド治療によるPH改善に伴い、減弱・消失した自己抗体と新たに出現した自己抗体が認められた。これらの抗体は、PHの病態に強く関連している可能性が考えられる。今回検出された自己抗体の抗原同定のためにアミノ酸配列の決定が重要と考えられる。また、MCTDのPHに特異的な自己抗体の検出・解析において臨床症状の程度やステロイドなどの治療状況との関連は重要であると考えられた。

A.研究目的

混合性結合組織病（MCTD）の重要な合併病態である肺高血圧症（PH）に関する自己抗体については種々の検討・報告がなされている。今回、我々はMCTDにPHを合併しステロイド投与により改善し、数年の経過中にPHの再燃を認め再びステロイド使用にて改善した症例を経験した。患者血清の経時的な分析によりPHに関与すると考えられる自己抗体の検討を試みた。

B.研究方法

患者保存血清を経時的にウエスタンブロット法にて分析し、臨床経過（PHとステロイド治療との関連）との関連を検討した。

（倫理面への配慮）

患者血清を研究に使用する同意を得ている。

C.研究結果

患者は24歳の女性。MCTD診断時に心エコーにて推定肺動脈圧58mmHgと高値で心臓カテーター検査でもPHが確認された。PSL60mg/日で治療開始し、肺動脈圧は30mmHgまで改善しステロイドは漸減できた。オフステロイドで外来通院となっていた。ステロイド治療前後の患者血清のウエスタンブロット法（患者血清100倍

希釈、ヒト肺動脈内皮細胞を抗原）にて分子量30kにステロイド治療後・PH改善時に消失したバンドを認めた。約4年後、大腿骨頭壊死に対して人工関節置換術後に右心不全となった。肺動脈圧は100mmHgと上昇を認め、PSL35mg/日で投与を開始した。速やかに右心不全は改善し、肺動脈圧も30mmHgと低下した。PH再燃前後のウエスタンブロット法で30kあたりのバンドの消失と300kあたりの新たなバンドの出現を認めた。PHはステロイド治療により改善し、ウエスタンブロット法にてPH出現時・ステロイド治療開始前には認められ、ステロイド治療により消失した自己抗体とステロイド治療後に新たに出現した自己抗体を認めた。

D.考察

本例で認められた自己抗体は、PHの病態に強く関連している可能性が考えられる。これらの自己抗体は、ステロイド治療により消失している。MCTDのPHに特異的な自己抗体の検出・解析において臨床症状の程度やステロイドなどの治療状況との関連は重要であると考えられる。また、今回検出された自己抗体の抗原同定のためにアミノ酸配列の決定が重要と考えられる。

E.結論

MTCDのPHに直接関与する自己抗体の存在が示唆される。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Shigetake Sasayama, Toru Satoh, Tohru Izumi, Shunji Yoshida, Shingo Kyotani, Nobuhiro Tahara. Long-term trial of bosentan monotherapy for pulmonary arterial hypertension in Japanese patients. *Curr Med Res Opin* 23: 395-400,2007.
2. Mihara T., Ueda A., Hirayama M., Takeuchi T., Yoshida S., Naito K., Yamamoto H., Mutoh T. Detection of new anti-neutral glycosphingolipids antibodies and their effects on Trk neurotrophin receptors. *FEBS Lett* 580: 4991-5,2006.
3. 吉田俊治. ステロイドの新しい使い方 *Mebio* 23: 102-9,2006.
4. 小野田覚、西野譲、吉田秀雄、長澤英治、大竹智子、小松八千代、加藤浩二、加藤賢一、深谷修作、吉田俊治. ANCA関連血管炎に血球貪食症候群を合併し剖検で肺胞蛋白症が明らかとなった1例 *日内会誌* 95: 2087-9,2006.
5. 深谷修作、小松八千代、吉田俊治. 膠原病に合併する肺高血圧症 *Heart View* 10:

866-9,2006.

6. 小松八千代、深谷修作、吉田俊治. 混合性結合組織病 特に肺高血圧症の診断と治療を中心に *Medical Practice* 23: 691-6,2006.

2. 学会発表

1. 小松八千代、深谷修作、片山雅夫、吉田秀雄、吉田俊治: 膠原病性肺高血圧症の合併率と自然経過。日本リウマチ学会総会、2006.
2. 片山雅夫、玉熊桂子、吉田秀雄、吉田俊治: 混合性結合組織病(MCTD)の肺高血圧症(PH)における抗 phosphatidylserine-prothrombin複合体 (PS/PT)抗体の臨床的意義についての検討。日本リウマチ学会総会、2006.
3. 吉田秀雄、玉熊桂子、吉田俊治: MCTDにおける抗血管内皮細胞抗体の検討。日本臨床免疫学会総会、2006.

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

特になし

抗NA14(nuclear autoantigen of 14 kDa)抗体の臨床的意義の検討

分担研究者 高崎芳成 順天堂大学医学部膠原病内科(教授)

研究協力者 野澤和久, 縄田益之, 松下雅和, 松平 蘭 (順天堂大学医学部膠原病内科)

研究要旨

シェーグレン症候群(SjS)患者血清をブロープとしてhuman testis cDNA libraryより同定されたNA14(nuclear autoantigen of 14kDa)の混合性結合組織病(MCTD)における臨床的意義について検討した。自験MCTD 113例、原発性シェーグレン症候群(primary SjS) 94例、二次性SjS (secondary SjS) 39例、全身性エリテマトーデス(SLE) 80例、全身性硬化症(SSc) 23例、関節リウマチ(RA) 29例、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM) 20例を対象とし、ヒトNA14のfull length cDNAを用いて作成したリコンビナントナント蛋白を抗原としたELISA法にて抗NA14抗体を検出した。その結果、抗NA14抗体はPrimary SjS患者の25.5%の患者に検出され、最も高率であったが、それに次いでMCTD患者の15.0%の患者に検出され、SLE患者の3.8%、さらにRA、SSc、PM/DMの0%に比較して有意に高率となっていた。更に、抗NA14抗体はprimary SjS患者では高率に検出されたが、secondary SjS患者においては4%の患者でのみ陽性となっていた。また、MCTD患者における抗NA14抗体の出現率をSjS合併群と非合併群で比較すると両者の間の陽性率には有意の差は認めず、MCTDにおける抗NA14抗体の出現にはSjSの存在自体は関与していないことが明らかにされた。また、MCTDにおける抗NA14抗体陽性例の男女比、臨床および血清学的所見について検討を加えたが特に有意な所見は認めなかった。今回の検討で抗NA14抗体はprimary SjSに加え、MCTD患者においても少なからず検出されることが確認されたが、MCTD患者においてはその出現とSjSには有意の相関を認めなかった。MCTDにおける同抗体の出現の意義を解析すべくその臨床および血清学的所見について検討したが抗SS-A抗体をはじめとして特にSjSに関連する要素との相関を見いだすことができなかった。抗NA14抗体がSjSに加えてMCTDに特異的に検出されるメカニズムは不明であるが、SLE、SScおよびPM/DMなどMCTDと共通する臨床像を有する他の膠原病ではほとんど検出されず、MCTDの疾患独立性を示唆する免疫学的異常所見として注目された。

A.研究目的

1998年にRamosら¹⁾は、リシェーグレン症候群(SjS)患者血清をブロープとし、human testis cDNA libraryより生体内において核内および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NA14(nuclear autoantigen of 14kDa)を同定した²⁻⁵⁾。今回我々は、このNA14に対する抗体の混合性結合組織病(MCTD)における臨床的意義について検討した。

B.研究方法

自験MCTD 113例、原発性シェーグレン症候群(primary SjS) 94例、二次性SjS (secondary SjS) 39例、全身性エリテマトーデス

(SLE) 80例、全身性硬化症(SSc) 23例、関節リウマチ(RA) 29例、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM) 20例を対象とした。抗NA14抗体は、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、ニッケルカラムを用いてNA14蛋白を抗原として用いたELISA法にて検出した。同時に測定した健常人30例のODの平均値+3SDを正常値とした。

C.研究結果

抗NA14抗体はPrimary SjS患者の25.5%の患者に検出され、最も高率であったが、それに次いでMCTD患者の15.0%の患者に検出され、SLE患

者の3.8%、さらにRA、SSc、PM/DMの0%に比較して有意に高値となっていた(表1)。更に、抗NA14抗体はprimary SjS患者では高率に検出されたが、secondary SjS患者においてはわずか4%の患者でのみ陽性となっていた(データは示していない)。また、MCTD患者における抗NA14抗体の出現率をSjS合併群と非合併群で比較すると(表2)、SjS非合併群では14.3%、合併群では13.3%に検出され、両者の間には有意の差は認めず、MCTDにおける抗NA14抗体の出現にはSjSの存在自体は関与していないことが明らかにされた。また、MCTDにおける抗NA14抗体陽性例の男女比、確定診断時の年齢、診断からの観察期間等には有意の差を認めなかった(表3)。また、両群の他の膠原病の診断基準の満足度を比較検討するといずれの診断基準も満たさない群は抗NA14抗体陽性群で47.1%に対し、陰性群では29.1%で有意差はないものの、抗NA14抗体はいわゆる定型的なMCTD患者群に出現する傾向が認められた。

次に、抗NA14抗体陽性群の臨床的特徴について解析した。臨床を陽性群と陰性群で比較すると有意差は認めないものの陽性群にてCNSループスの出現頻度が17.7%と高い傾向にあった

(表4)。また、広範囲に渡る皮膚硬化は陰性群の14.6%に対して5.9%と低い傾向にあった

(表5)。検査所見では高 γ -グロブリン血症や抗2本鎖DNA抗体価、さらに抗SS-A抗体の出現率が高い傾向を認めたが有意差はなかった(表5)。また、一例で病態および活動性と抗体価の相関を検討したが特異な傾向は認められなかった(データは示していない)。

D. 考察

今回の検討で抗NA14抗体はprimary SjSに加え、MCTD患者においても少なからず検出されることが確認されたが、MCTD患者においてはその出現とSjSには有意の相関を認めなかった。MCTDにおける同抗体の出現の意義を解析すべくその臨床および血清学的所見について検討したが抗SS-A抗体をはじめとして特にSjSに関連する要素との有意な相関を見いだすことができ

なかった。これまでSjSとMCTDの二つの異なる疾患に共通して特異的に検出される抗体は報告されていない。抗NA14抗体はこの点においてユニークであるがMCTDとSjSの病態は大きく異なることから、今回我々が検討しなかった何らかの両疾患に共通する病態に相関している可能性もある。この点について解析するにはSjSにおける本抗体の特徴的臨床所見についても検討する必要があると思われた。

以上、抗NA14抗体がSjSに加えてMCTDに特異的に検出されるメカニズムは不明であるが、SLE、SScおよびPM/DMなどMCTDと共通する臨床像を有する他の膠原病ではほとんど検出されず、MCTDの疾患独立性を示唆する免疫学的異常所見として注目される。

E. 結論

抗NA14抗体はprimary SjSに加え、MCTD患者において特異的に検出される自己抗体であることが確認され、MCTDとSLE、SScおよびPM/DMなどの古典的膠原病との相違を示唆する新たな血清学的所見として注目された。今後、抗NA14抗体の産生機構について解析を加えることは両疾患の病態解明に重要な研究課題と思われた。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

なし

1. 論文発表

文献参照

2. 学会発表

なし

H. 文献

1) Ramos-Morales F, Infante C, Fedriani C et al. NA14 is a novel nuclear autoantigen with acoiled-coil domain. J Biol Chem 273: 1634-9, 1998

2) Nyman M, Bonhomme F, Alam TM et al. A general synthetic procedure for heteropolyniobates.

Science 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 Cen Sci 116:1449-62, 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 13:2121-32, 2004

5) Schoppmeier S, Mages W, Lechtreck KF et al. GFP as a tool for the analysis of proteins in the flagellar basal apparatus of Chlamydomona. Cell Motil Cytoskeleton 61:189-200, 2005

表1 各種膠原病における抗NA14抗体の出現率

	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%	15.0%**	0%	0%	0%

*P<0.0001 **P<0.007

表2 SJS合併および非合併MCTDにおける抗NA14抗体

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

表3 患者背景

	抗NA14抗体	
	陽性 (n=13)	陰性 (n=96)
男女比	12:1	93:3
確診時年齢	34.2±11.4	36.2±10.5
診断からの観察期間 (年)	8.4±5.2	8.3 8±4.6

表4 表膠原病の診断基準の満足度の比較検討

病型	Patients	
	with anti-NA14 (N=17)	without anti-NA14 (N=96)
SLE	29.4 %	46.8 %
SSc	17.6	36.4
PM/DM	0	3.1
いずれの基準も満足しない	47.1	29.1

表5 抗NA14抗体陽性例と陰性例の臨床像 I

Clinical features	Patients	
	with anti-NA14 (N=17)	without anti-NA14 (N=96)
Raynaud's phenomenon	100 %	100 %
Swollen fingers/hands	100	86.4
Photosensitivity	5.9	7.3
Malar rash	17.6	14.6
Alopecia	5.9	5.2
Arthritis	100	81.5
Pleuritis	7.7	5.2
Pericarditis	0	0
Lymphadenopathy	17.7	19.8
CNS involvement	11.8	3.1
Proteinuria	35.3	26.0
Hemolytic anemia	0	0
Leukopenia	64.7	50.0
Lymphopenia	35.3	34.4
Thrombocytopenia	17.6	14.6
Muscle weakness	47.1	30.2
Myalgia	47.1	41.6
Increased level of CK	41.2	30.2

表6 抗NA14抗体陽性例と陰性例の臨床像 II

Clinical features	Patients	
	with anti-NA14 (N=17)	without anti-NA14 (N=96)
Sclerodactyly	46.2%	44.7%
Diffuse scleroderma	5.9	14.6
Digital ulcer	5.9	5.3
Dilatation of esophagus	5.9	10.4
Lung fibrosis/Interstitial pneumonitis	29.4	30.2
Pulmonary hypertension	0	2.1
%VC<80%	29.4	31.3
%DLco<70%	35.3	39.6
Hyper-globulinemia	88.2	67.1
Anti-dsDNA Ab	29.4	19.8
Anti-Sm Ab	5.9	9.4
Anti-SS-A Ab	23.5	19.8
Anti-SS-B Ab	0	1.0
Hypocomplementemia	23.5	19.8
Rheumatoid factor	41.2	39.6

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は限られており、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の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、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。特に、本系では混合性結合組織病で認められる抗RNP抗体を構成する抗U1-70K抗体や抗U1-A抗体、抗U1-C抗体などの自己抗体が強く誘導されることより、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混合性結合組織病の病態解明に重要である。しかし、抗核抗体産生機序を検討するための動物モデルは限られ、かつその有用性は限定的であるため、早期に抗核抗体が誘導でき種々の条件で検討が可能な系の開発が望まれている。そこで、今回新たな抗核抗体産生モデルの開発を行い、特に抗RNP抗体の産生機序研究への有用性を研究することにより、混合性結合組織病における自己免疫異常のモデルとなりうるか検討する。

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。今回多数例の長期間にわたる観察、血清採取を行い、間接蛍光抗体法による抗核抗体の検討のほか、以下の自己抗体の検出を行った。

(2)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、MCTDにおける抗核抗体として重要な抗RNP抗体を構成している抗U1RNP-A抗体、抗U1RNP-70K抗体、抗U1RNP-C抗体について、その出現の有無や経時的変化などの検討を行った。また、抗RNP抗体の出現の特徴を明らかにするため、比較としてSLEに特徴的な抗ヌクレオソーム抗体、抗ds-DNA抗体、臓器特異的自己抗体として抗H+/K+ ATPase抗体の測定も行った。

(2-1)抗U1RNP-A抗体の検出

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。この系で検出される抗体が実際に抗U1RNP-A抗体であることは、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昨年度確認している。

更に、マウス脾細胞核抽出液から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ことも昨年度確認している。

(2-2)抗U1RNP-70K抗体、抗U1RNP-C抗体の検出

MCTDで認められる抗RNP抗体を構成する抗U1RNP-70K抗体および抗U1RNP-C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およびヒトU1RNP-Cリコンビナント蛋白を用いたELISAによって検討した。

(2-3)抗ヌクレオソーム抗体、抗ds-DNA抗体の検出

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。

(2-4) 抗H+/K+ ATPase抗体の検出

臓器特異的自己抗体の一つである抗H+/K+ ATPase抗体の測定は、市販のヒトH+/K+ ATPaseリコンビナント蛋白を用いたELISAによって検討した。

(3)抗核抗体産生におけるT細胞受容体特異性の関与の検討

本モデルにおける自己抗体産生へのT細胞受容体特異性の関与を検討するため、限られたT細胞受容体レパトワを有するT細胞サブセットを移入し各種自己抗体を測定することとした。ニワトリ卵白アルブミン(OVA)反応性T細胞受容体発現トランスジェニックマウス(DO11.10)脾細胞からCD4T細胞サブセットを分離しヌードマウスに移入し、上記自己抗体の有無を野生型マウスから得られたCD4T細胞サブセットを移入した場合と比較し検討した。

(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を移入する系は臓器特異的自己免疫疾患誘導の系として知られているが、前年度の研究により約3週間で高力価の抗核抗体産生も惹起されることが確認された。今回更に多数例の長期間にわたる観察を行ったが、腸炎により約2ヶ月後から体重減少が出現し、約3~4ヶ月で死亡するマウスが多くなるため、Tconv移入マウスでは長期の抗核抗体の観察は困難であった。生存期間中は、継続して抗核抗体の産生を認めることができた。

(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細胞サブセットのヌードマウスへの移入では、Tregは臓器特異的自己免疫疾患を惹起せず、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、前年度の検討では、Tregの移入やCD4T細胞全体を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ている。今回更に多数例の長期間にわたる観察を行ったが、Tconv移入群では、多くのマウスが臓器特異的自己免疫疾患にて死亡していくものの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8ヶ月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

昨年度の研究により細胞移入をうけたマウス血清により免疫沈降した核内自己抗原をSDS-PAGEにて展開した結果、Treg、Tconv、CD4T細胞サブセットのいずれの系でも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明らかになっている。抗核抗体産生モデルであるプリスタン誘発全身性自己免疫マウスと共通して認められた核内自己抗原があり、MCTD患者血清によるブロッティングの結果、複数のバンドが確認でき、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ている。そこで、本年度更に特異性のわかっている以下の自己抗体の測定を行っている。

(4)抗ヌクレオソーム抗体および抗ds-DNA抗体 (図1)

TconvやTreg、CD4T細胞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抗体に関しては、市販のELISAキットにて検討した。その結果、Tconv移入群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やCD4T細胞移入群ではこれらの自己抗体は認められなかった。

(5)抗U1RNP-A抗体・抗U1RNP-70K抗体・抗U1RNP-C抗体 (図1)

TconvやTreg、CD4T細胞移入ヌードマウス血清中の抗U1RNP-A抗体、抗U1RNP-70K抗体および抗U1RNP-C抗体に関しては、リコンビナント蛋白を用いて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、抗U1RNP-70K抗体および抗U1RNP-C抗体を認めた。

TconvやTreg、CD4T細胞移入ヌードマウス血清中の抗H+/K+ ATPase抗体に関しては、リコンビナント蛋白を用いてELISAを行い検討した。その結果、Tconv移入群では早期より抗H+/K+ ATPase抗体が出現する一方、Treg移入群や、CD4T細胞移入群ではこれらの自己抗体は認められなかった。

(8)抗核抗体産生におけるT細胞受容体特異性の関与 (図2)

T細胞受容体トランスジェニックマウス由来T細胞サブセットを移入した系では、野生型マウス由来T細胞サブセットを移入した場合と比較して、Tconv移入群における抗H+/K+ ATPase抗体や抗ds-DNA抗体の抗体価が著しく低下した。一方、抗U1RNP-A抗体、抗U1RNP-70K抗体および抗U1RNP-C抗体に関しては、抗体価に有意な低下はなかった。

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、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。自然発症全身性自己免疫モデルでは、抗核抗体研究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週間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点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の変更、移入時や移入後の抗体やサイトカイン投与など、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、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。実際、今回T細胞受容体特異性の各種抗核抗体産生への影響を検討することができた。

一方、本系では、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不明であり、今後、病理学的検討を要した解析が必要である。

(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U1RNP-70K、抗U1RNP-A抗体および抗U1RNP-C抗体が出現することから、抗RNP抗体産生モデルとしても有用と考えられる。Tconv移入群では、抗RNP抗体のほか、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移入群では、臓器特異的自己免疫疾患や抗ヌクレオソーム抗体、抗ds-DNA抗体は認めない一方で抗RNP抗体が出現するため、SLEモデルというよりもMCTDに近い自己抗体パターンを示しており、特に長期の検討には有利と考えられる。従って、エピトープや長期経過に伴うU1snRNP複合体に対する自己免疫応答の変化の検討が可能であり、今後の重要な課題と考えられる。

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、特に抗RNP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。つまり、Tconvには臓器特異的自己免疫応答惹起性のT細胞が含まれ、Tregにはそれを抑制しうる細胞が含まれていると考えられてきたが、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本研究により確認された。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抗体は、TconvだけではなくTregの移入によっても惹起されており、抗核抗体産生機序は抗体間で異なる可能性が推察された。この相違が生じる原因に関しては、本系における誘導条件を変更することにより検討できると考えられる。

(4)T細胞受容体特異性の抗核抗体、特に抗RNP抗体産生への関与について

T細胞受容体レパトワを限定したT細胞集団を移入することにより、Tconv移入群で抗H+/K+ATPase抗体や抗ds-DNA抗体の抗体価が著しく低下したが、抗RNP抗体価はいずれのT細胞サブセット移入群でも変化を受けなかった。従って、抗H+/K+ATPase抗体や抗ds-DNA抗体はある特異性を有したTconvが惹起している可能性が考えられる一方で、抗RNP抗体産生はこれらのT細胞サブセットや特定のT細胞受容体に規定されない機序が働いている可能性が示唆された。その機序の詳細は不明だが、これに関しても本系の誘導条件を変化させることで今後検討できると思われる。

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、長期にわたり抗核抗体産生が観察できる。特に抗U1RNP-70K抗体、抗U1RNP-A抗体抗U1RNP-C抗体などが出現することから、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。更に、本系は移入するT細胞やレシピエントの変

更や、移入後の抗体やサイトカインの投与など様々な移入条件の修飾が可能であり、T細胞サブセットやT細胞受容体、MHC、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。今回の検討では、抗RNP抗体産生はTreg、TconvなどのT細胞サブセットや特定のT細胞受容体に規定されていない可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

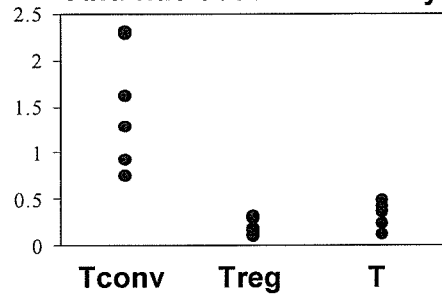
なし

图 1

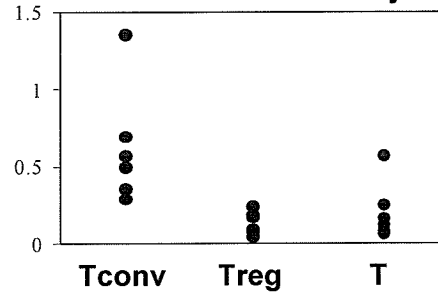
Nucleosome (x100)

(OD450nm)

Anti-nucleosome antibody



Anti-ds DNA antibody



Spliceosome (x500)

(OD450nm)

Anti-U1A antibody



Anti-U1 70K antibody

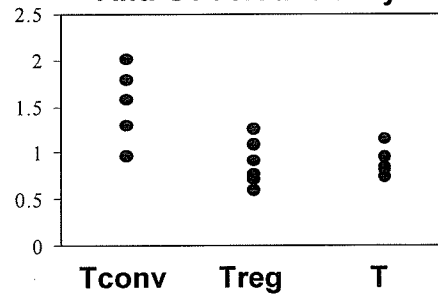
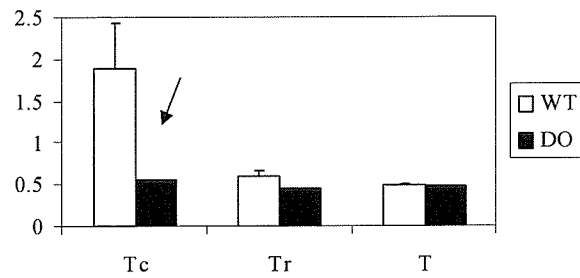
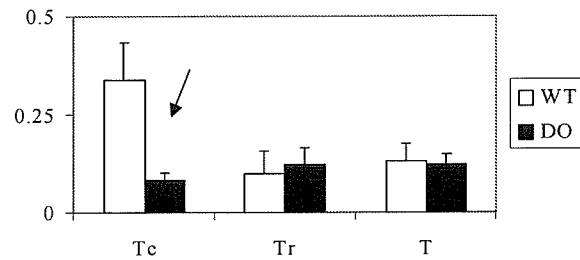


图 2

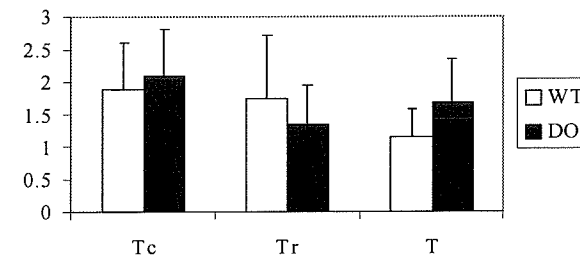
Anti-H+/K+ ATPase



Anti-ds DNA



Anti-U1A



混合性結合組織病(MCTD)に合併した肺高血圧症(PAH)の経過に関する研究

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	小松八千代	藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科	講師
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】MCTDには高率にPAHの合併を認め、その予後を悪化させると考えられている。しかし、PAHの発症様式や経過、治療反応性など不明なことも多い。そこで、①MCTDに合併したPAHの発症様式、②治療によるPAHの経過の違い、③PA圧の程度によるPAHの経過の違いを明らかにすることを目的とした。【方法】本研究班の臨床系分担研究者の所属する医療施設を平成17年12月から平成18年3月受診したMCTD患者全例を対象とし、臨床所見、治療内容、転帰の調査を行った。【結果および結論】118例のMCTD患者の調査票が得られ、30例（25.4%）にPAHの合併を認めた。MCTDの発症時あるいは発症早期にPAHが完成されている症例も存在する可能性も考えられた。また、MCTD発症後ある程度の期間を経てPAHを発症する場合においても、比較的短期間でPAHが進行する可能性が考えられた。PAH診断時のPA圧にかかわらず3～4年程度の観察期間ではPA圧はほとんどの症例で不変あるいは改善を示した。治療の効果かもしれないが、軽症例は軽症のまま経過する可能性も考えられた。また、治療にもかかわらずPA圧の低下が十分でない患者も多数存在しており、PA圧の降圧に関する検討も必要である。今回の調査ではPA圧高値例におけるPA圧の上昇過程は不明であり、多数例の前向き調査も必要である。

A. 研究目的

MCTDには高率にPAHを合併することが知られている。また、PAHはMCTDの重要な死因の一つであり予後を悪化させている因子でもある。平成14～16年度の厚生労働省難治性疾患克服研究事業混合性結合組織病研究班での検討で、MCTDに合併するPAHにはPAHに関連する臨床症状・所見を認めず、推定肺動脈（PA）圧も40mmHg程度の軽症例が約半数存在することが判明した。さらに、1年間の経過観察では軽症例は軽症のまま推移することが示唆されている。しかし、PAHの発症様式や経過、治療反応性など明らかにされていないことも多い。そこで、MCTDに合併したPAH患者において、①MCTD合併PAHの発症様式、②治療によるPAHの経過の違い、③PA圧の程度によるPAHの経過の違いを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

本研究班の臨床系分担研究者が所属する医療機関および財団法人甲南病院加古川病院を受診したMCTD患者全例を対象とした。調査期間は平成17年12月から18年3月の4ヶ月間とした。調査項目はMCTDの発症年月・診断年月および調査時点におけるMCTD合併PAHの診断基準項目である労作時の息切れ、胸骨左縁収縮期性拍動、第II肺動脈音の亢進、胸部X線写真での肺動脈本幹部の拡大あるいは左第2弓突出、心電図での右室肥大あるいは右室負荷、心臓超音波検査上の右室拡大あるいは右室負荷、心臓超音波検査での推定肺動脈圧、可能であれば右心カテーテル検査での平均肺動脈圧とした。さらに、すでにPAHの存在が判明している場合には、PAH診断時における同様の項目とPAHの発症年月・診断年月、治療薬およびその効果、転帰も調査項目に加えた。

(倫理面への配慮)

個人情報保護の観点より調査票の個人の特定に関連する情報は、生年月日と各医療機関におけるID番号または各医療機関において連結可能な番号、性別のみとした。

行うべき検査項目はMCTD患者における通常の診療で必要と考えられる項目のみとした。

C. 研究結果

8施設よりMCTD患者118例の調査票が得られた。PAHの合併は30例(25.4%)であった。また、PAHの診断基準には該当しないが、推定PA圧が30~34mmHgを示すPAHが疑われる症例も9例存在した。このうち、以前の研究班で26例に関しては把握しており、今回の調査で新たに13例のPAH合併あるいはPAH疑い患者の存在を把握した。また、無症候性のPAH患者は11例(36.7%)であった。

①MCTDに合併したPAHの発症様式 (MCTD診断からPAH診断までの期間とPAH診断時のPA圧との関連)

図1にMCTDの診断からPAHの診断までの期間とPAH診断時のPA圧との関連を示す。両者の間には相関関係を認めなかった。また、10例(33.3%)はMCTD診断時にあるいはMCTDの診断に先行してPAHが診断されていた。MCTDの診断からPAHの診断までにある程度の期間が経過していた症例におけるその期間内のPA圧の推移は、今回の調査では把握できていない。

②治療によるPAHの経過の違い

A. PAHに対する治療

表にPAH診断時のPA圧別のPAHに対する治療内容を示す。ステロイド薬(パルス療法を含む)は22例(73.3%)に使用されており、このうち主治医によりPAHに対して有効と判定されたのは9例(40.9%)であった。ベラプロストは19例(63.3%)に使用されており、10例(52.6%)が有効と判定されていた。今回の調査ではエポプロステノールの使用例はなかった。ボセンタンは5例(16.7%)に使用されており、4例(80%)が有効と判定されていた。

B. 治療によるPAHの経過の違い

図2に治療内容毎のPA圧の経時的変動を示す。殆どの症例でステロイド薬とベラプロストの両者が使用されており、治療毎の経過の違いを明らかにすることはできなかった。

③PA圧の程度によるPAHの経過(図2)

多くの症例でPA圧は改善傾向を示した。しかし、PAH診断時のPA圧が80mmHg程度と高値を呈した2例ではPA圧の改善を認めず、40mmHg程度であった1例で悪化を認めた。

D. 考察

今回の調査では、対象がある時点において生存している患者に限られてしまっている。そのため、急速にPAHが進展し短期間で死亡してしまうような最重症例が含まれていない可能性がある。しかし、PAH合併あるいは合併疑い例39例中26例は平成15年度から経過を追っている症例であり、少なくともこの中には急速にPAHが悪化し、死亡した症例は存在しなかったことになる。また、PAH合併率は25.4%で、平成16年度の厚生労働省難治性疾患克服研究事業混合性結合組織病研究班における心エコー検査を行った場合のPAH合併率22.5%と類似した結果であった。

図1に示したごとく、MCTD診断からPAH診断までの期間とPAH診断時のPA圧には相関を認めなかった。また、PAH30例中10例(33.3%)においてMCTD診断時あるいはMCTDの診断に先行してPAHの診断もなされていた。さらに、このうち2例はPA圧が70mmHg以上を呈していた。これらのことは、MCTDに合併するPAHはMCTDの発症から徐々に形成され悪化していくのではなく、MCTDの発症時あるいは発症早期にPAHが完成されている症例も存在する可能性を示唆する。図2に示したごとく、治療の影響は否定できないが、PA圧の経時的な悪化を認めたのは2例のみであった。これは、多くの症例では少なくとも長期間にわたってPA圧が徐々に悪化しているわけではないことを示している。PAHは短期間で形成され、PA圧高値の症例はその短期間に高値に達し、低値の症例はそれ以上悪化しない可能性すらあるものと考えられた。MCTDに

合併したPAHの治療ガイドラインでは、すべてのPAH合併例が治療対象となっているが、PA圧が低値、特にPAHに関連する臨床症状・所見を呈していない症例に対しては治療の必要性を十分に吟味すべきである。

多くの症例でPA圧は改善傾向を示していた。しかし、高値のまま不変の症例、改善はしているが40mmHg以上を呈している症例も多数存在していた。PAHの治療目標に関しては未だ定まったものはない。PA圧の高圧を図るべきか否かの検討も必要である。

これらPAHの経過は治療内容にも影響を受ける可能性がある。そこで各症例における治療内容について検討した。表に示したごとく、ほとんどの症例がステロイドとベラプロストとの併用例であり、治療内容ごとの経過の違いを検討するまでには至らなかった。しかし、主治医判定による判定ではボセンタンで5例中4例(80%)が有効とされ、ボセンタンでの有効率の高さが目立った。

E. 結論

調査票を回収し得たMCTD患者数は118例で、PAHの合併は30例(25.4%)であった。MCTDに合併するPAHはMCTDの発症から徐々に形成され悪化していくのではなく、MCTDの発症時あるいは発症早期にPAHが完成されている症例の少なからず存在する可能性が考えられた。また、MCTD発症後ある程度の期間を経てPAHを発症する場合においても、比較的短期間でPAHが進行する可能性がある。3～4年程度の観察期間ではPA圧はほとんどの症例で不変あるいは改善を示した。治療の効果かもしれないが、軽症例は軽症のまま経過する可能性がある。また、治療にもかかわらずPA圧の低下が十分でない患者も多数存在しており、PA圧の降圧に関する検討も必要である。今回の調査ではPA圧高値例におけるPA圧の上昇過程は不明であり、多数例の前向き調査も必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shigetake Sasayama, Toru Satoh, Tohru Izumi, Shunji Yoshida, Shingo Kyotani, Nobuhiro Tahara. Long-term trial of bosentan monotherapy for pulmonary arterial hypertension in Japanese patients. *Curr Med Res Opin* 23: 395-400,2007.
2. Mihara T., Ueda A., Hirayama M., Takeuchi T., Yoshida S., Naito K., Yamamoto H., Mutoh T. Detection of new anti-neutral glycosphingolipids antibodies and their effects on Trk neurotrophin receptors. *FEBS Lett* 580: 4991-5,2006.
3. 吉田俊治. ステロイドの新しい使い方 *Mebio* 23: 102-9,2006.
4. 小野田覚、西野譲、吉田秀雄、長澤英治、大竹智子、小松八千代、加藤浩二、加藤賢一、深谷修作、吉田俊治. ANCA関連血管炎に血球貪食症候群を合併し剖検で肺胞蛋白症が明らかとなった1例 *日内会誌* 95: 2087-9,2006.
5. 深谷修作、小松八千代、吉田俊治 膠原病に合併する肺高血圧症 *Heart View* 10: 866-9,2006.
7. 小松八千代、深谷修作、吉田俊治 混合性結合組織病 特に肺高血圧症の診断と治療を中心に *Medical Practice* 23: 691-6,2006.

2. 学会発表

1. 小松八千代、深谷修作、片山雅夫、吉田秀雄、吉田俊治 : 膠原病性肺高血圧症の合併率と自然経過。日本リウマチ学会総会、2006.
2. 片山雅夫、玉熊桂子、吉田秀雄、吉田俊治 : 混合性結合組織病(MCTD)の肺高血圧症(PH)における抗 phosphatidylserine-prothrombin複合体(PS/PT)抗体の臨床的意義についての検討。日本リウマチ学会総会、2006.
3. 吉田秀雄、玉熊桂子、吉田俊治 : MCTDにおける抗血管内皮細胞抗体の検討。日本臨床免疫学会総会、2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

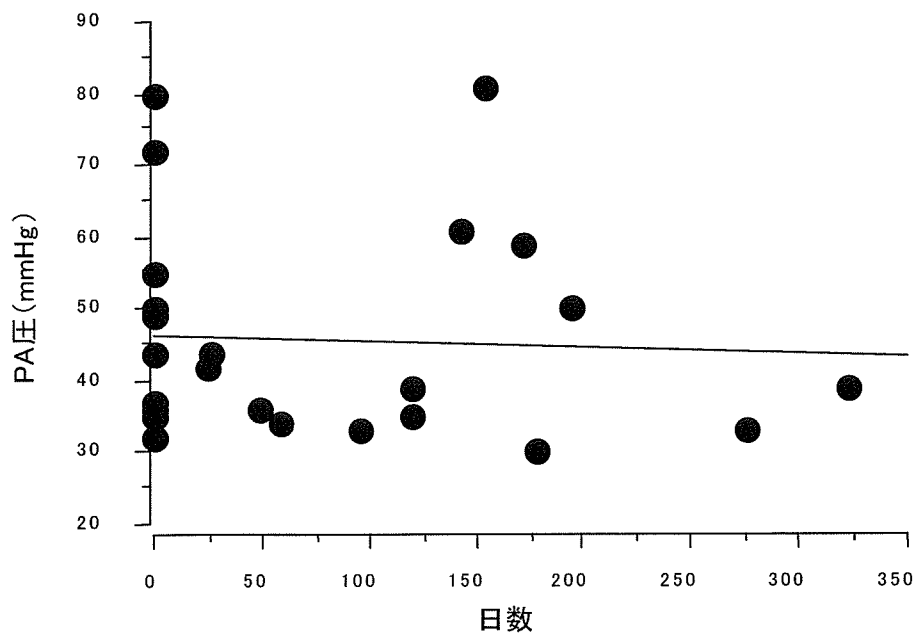


図1. MCTD診断からPAH診断までの期間とPA圧