

図2. 治療内容別PA圧の経時的変動

表. PA圧別のPAH治療

肺動脈圧 (mmHg)	患者数	ステロイド パルス含む	免疫抑制剤	経口PGI ₂	経口PGE ₁	ボセンタン	シルデナフィル
30~34	9	4 (1)	1 (0)	3 (1)	1 (1)	0	0
35~39	11	6 (0)	1 (0)	6 (3)	2 (1)	0	0
40~49	7	5 (3)	1 (0)	3 (2)	1 (0)	2 (2)	1 (0)
50~59	6	5 (4)	0	5 (4)	0	1 (1)	0
60~69	1	1 (0)	0	1 (0)	0	0	0
70~79	1	1 (1)	0	1 (0)	0	0	0
80~	4	4 (1)	1 (0)	3 (1)	1 (0)	2 (1)	0

()内: 主治医判定による有効症例数

MCTDのステロイド治療方針を標準化する研究(第2報;統計解析)

分担研究者 三森 明夫（国立国際医療センター 第一病棟部長）
研究協力者 高橋裕子、溝上哲也*（同上 膠原病科、*国際保健医療研究部長/疫学）
原まさ子*、高木香恵（東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター *教授）
高崎芳成（順天堂大学 膠原病科教授）
三村俊英（埼玉医大リウマチ 膠原病科教授）

研究要旨

MCTDの適正ステロイド治療方針を明らかにするため、多施設症例の全経過についてレトロスペクティブに調査し、91人（938人年、観察平均 10.3 ± 6.4 年、中央値 10年）データベースを作成し統計ソフトSTATAで解析した。また時系列分析を類縁疾患と比較検討するため、同時に作成した自施設SLEデータベースを用いた。一方これと別に、膠原病に合併した肺高血圧症の病歴を新たに10例収集し、ステロイド反応性を検討した。

再発を警戒すべき期間は、発生速度のKaplan-Meier (K-M) 分析から、MCTD病態全般、筋炎・間質性肺炎、SLE病態・髄膜炎いずれについても 8~10年と評価された。さらに筋炎・間質性肺炎について、初期ステロイド治療を行なった患者群では、この期間が5年に短縮しており、初回治療後の完全寛解率90%だった。初発時のステロイド投与は、その後のMCTD病態発生を抑制するだけでなく、投与量に用量依存性がない、と示唆された。SLE患者では、同様の解析で明らかな初期用量依存性がみられたので、ステロイド治療の効果におけるMCTDとSLEの違いが示唆された。病初期の再発回数は、SLE患者においてその後の再発速度を規定したが、MCTDでは無関係だった。

以上をまとめると、肺高血圧症および慢性病態を除くMCTDの主病態（筋炎、間質性肺炎、SLE病態、髄膜炎）の「発生予防」について、以下の可能性が示唆された；1) MCTD診断時のステロイド投与は、その後の病態発生を抑制し、抑制効果は低用量でも得られる、2) 維持ステロイドの必要性は10年以後には乏しく、また病初期の再発反復例に必要性がより高いとはいえない。

肺高血圧症（PH）に対するステロイド治療効果については、シェーグレン症候群 1例；PH再燃例で右心圧較差の消失、MCTD 4例；不明確1、無効2、不明1、強皮症3例；不明確1、無効1、不明1、SLE 2例；不明2、との結果であり、より多くの病歴収集、および治療の前向き調査の必要性が再確認された。

A. 研究目的

MCTD 治療の適正方針を確立するために；

- I. 病歴の時系列解析を行ない、ステロイド治療の必要性について統計的根拠を明示する。
- II. MCTDを含む膠原病に合併した、肺高血圧症のステロイド反応性につき、レトロスペクティブに分析する。

B. 研究方法

I. MCTD病態全般に対するステロイド治療；

症例：前年度収集したMCTD（3施設104人）の病歴の中に、今回、東京女子医大の外来追跡データを追加し、発症時からの病態発生と治療介入の情報を得られた人数を増やし、91人とした。

方法：昨年度、症例集団の経過に関しては観察事象を記述したのみであったが、今回、91人（938人年、観察平均 10.3 ± 6.4 年、中央値 10年）の全経過データベースを作成し、数値化し

て統計ソフトSTATAで解析した。MCTD診断から開始して、死亡または最終観察時まで追跡し、この間に生じた、ステロイド治療の適応があると一般に考えられる病態をイベントとして入力した。診断時+再発時のイベント総数は、214回だった。これらイベントへの治療介入状況は、有無・用量において不均一だったため、この違いに基づいて、治療必要性を分析した。

診断に先行したレイノー症状、関節痛のみなどは追跡開始点としなかった。また末梢循環不全、慢性関節痛、症状を伴わないデータ異常などは、イベントに算定しなかった。

上記の MCTD 病態時系列を類縁疾患と比較するため、ほかの研究計画の目的で作成した自施設 SLEデータベース（国際医療センター症例153人、3169人年、観察平均 20.8±9.3年）を用いた。

II. 膠原病に合併した肺高血圧症に対するステロイド反応性のレトロスペクティブ解析：

この1年以内に発症、再発、または初診し、病歴情報を入手できたものを、疾患・治療内容で選別せずに全て集めた10例；順天堂大学の最近半年 8人、熊本市民病院（田中智樹先生より情報提供）1人、国際医療センター 1人

C. 研究成果

I. MCTD病態全般に対するステロイド治療の必要性；

1. 再発を生じる期間の統計評価：

方法の項で述べたように、ステロイド治療の適応となりうるイベントのことを、再発とみなした。その無発症率を示すKaplan-Meier (K-M) 曲線は、MCTDにおいて10年でほぼ定常化した（図1）。SLE患者群では腎症・非腎症ともにK-M曲線が20年以後も明確に低下し続けた（データ示さず）。すなわちMCTDではステロイド治療介入の必要期間が、SLEに比べて短いと示唆された。

MCTD診断後に、次のイベントをおこさない確率は、観察平均期間10年までで50%、または期間を限定せずに40%と算定された（図1）。SLEにおいて相当する確率はそれぞれ、25%または10%だった。

（なおイベント以外のMCTD慢性病態が続く期

間は上記10年よりもはるかに長いこと、またMCTD再発が、稀に30年後にもみられたことは、昨年度報告に記した。）

2. 病初期のイベント頻度と、その後の再発速度の関係：

初期3年間のMCTD 再発イベント回数で1回以上の群、なしの群に分類したとき、その後のイベント速度に関するK-M曲線は、差がなく、8～10年で定常化した（図2）。さらに2種の病態、「明確なSLE病態または髄膜炎」、「脱力を伴う筋炎または進行性間質性肺炎」に分類した場合も、同様に定常化した（図3）。さらに「筋炎・間質性肺炎」についてこの期間は、初期ステロイド治療を行えば5年に短縮した（後出、図5c）。

一方、SLEにおいては、再発を反復する群が存在し（データ示さず）、初期5年に2回以上の再発をみた群と、再発なしの群では、患者の50%に再発を生じるまでの年数に、10年 対 17年の差をみた。

すなわち、SLEでは、初期の高頻度再発群が、その後の経過における高頻度再発群であり、ステロイドの総必要量の高い群とみなせたが、MCTDには、この意味での危険群は同定されなかった（図2）。

3. 非腎症病態で発症したSLEの経過が、MCTD のSLE病態の経過と異なることについて：

MCTD患者では、腎所見の発生が2例のみと稀だったが、SLE患者においては、初発時に腎症のなかった患者の50%に、腎症が遅発した。遅発腎症の新規発生速度は、SLE発症時に存在した腎症が再発する速度とほぼ等しく、かつその速度はほぼ一定値を示した（図4）。

すなわちSLE分類基準を満たした患者集団には、腎症を生じる一定の危険率が存在する可能性が示唆された。このことはまた、発症ないし診断した時点では「軽症SLE／腎症を生じないSLE」が定義できない、という周知の経験事実以上のことを意味すると思われる。

したがって、MCTDとSLEでは、それぞれの分類基準を満たした時点で、その後の異なる

SLE病態の発生様式が規定されていること、換言するとMCTDのSLE病態は軽症SLEの重複といえないことが、示唆された。

4. 初期ステロイド治療と、その後のMCTD再発速度の関係：

最初のMCTD イベントに対し、ステロイド治療した群と無治療群に分けて、後発イベントの発生速度をK-M分析すると、治療群で後発率は低く、無治療群に対し、25% vs 60% だった ($p=0.018$; 図5a)。

治療の有無は、各主治医の判断に依存しており、初期治療がなされた群の病態は一般に、無治療群よりも重症とみなされたと考えられ、一方、低用量治療群と無治療群はともに、高用量群よりも軽症とみなされたと考えられる。

したがって低用量群と無治療群は比較する意味があると考えられるが、興味深いことに、初期治療ありの群におけるMCTD再発速度には用量依存性がなかった。すなわちMCTDにおいては、初期治療が、低用量であっても、その後のイベント発生を抑制することが示唆された。初期治療によるこの抑制は、MCTD病態をSLE病態(図5b)、筋炎病態(図5c)に分類しても同様だった。

筋炎では、MCTD発症時にステロイドを投与された群で、全経過を通じ筋炎を生じないK-M確率が90%という高値を示し、初期無治療群での60%より高かった ($p=0.033$)。

MCTD-SLE病態についても同様に、初期MCTD治療群 vs 無治療群で、寛解率70% vs 30%、患者の25%に再発をみるまでの時間2年 vs 8年の差をみた ($p=0.038$)。

一方、SLE患者では、初期治療の高用量群、中等量群、低用量～無治療群が、それぞれ異なる再発速度を示し(図5d)、MCTDのSLE病態とは異なる再発時系列を示した。

MCTDにおいて、イベントに属さない部分的SLE症状、強皮症症状は、初期治療の有無によらず発生が持続し、肺高血圧症にもステロイド治療後の発生をみた。

5. MCTDの生存率、SLEとの比較

MCTD の生命予後が良好といえないことは、

すでに本研究班調査により知られており、本集計もこれを裏付けた。発症後の K-M分析から、5年・10年生存率は、MCTD で 94%、88%であり、SLE の100%、97%よりも低値だった。死因はMCTDがおもに肺高血圧症、SLEでは感染症と種々の低頻度な難治病態だったので、2疾患の予後改善に対する目標は明確に異なる。

II. 膠原病に合併した肺高血圧症 (PH) に対するステロイド反応性のレトロスペクティブ解析：

10 例の治療反応性(表1)、治療経過(図6)を示した。昨年度の報告例と異なり、観察期間が短く、生命予後は比較されなかったこと、bosentan、epoprostenolの使用例があり、この効果の影響が、ステロイド効果をやや評価しにくくしている。

日の単位で低下した右室圧は、保存療法ないしepoprostenolの効果とみられ、また自然経過での圧低下もあるとみなされた。

Case 10 は、昨年度報告に示した症例の、その後の PH 再燃例である。このシェーグレン PH には、ステロイドが再び著効して圧較差が消失した。

ほかは、MCTD 4例；不明確1、無効2、不明1、強皮症3例；不明確1、無効1、不明1、SLE 2例；不明2、との結果であり、より多くの病歴収集、および治療の前向き調査の必要性が再確認された。

D. 考察

MCTD が、膠原病重複症候群と異なる疾患単位である、と考える意義には複数あり、PHの危険性を喚起させること、病態全般へのステロイド使用の必要性が高くない、と推測できることが臨床的に重要と思われるが、これらは経験的な推測といえる。

本調査研究では、MCTD の SLE 病態の時系列がSLE のそれと異なること、ステロイドの必要な期間、初期治療を行なう意義について、統計的な根拠を明らかにした。

ステロイド中等量以上による治療適応が明確な病態(脱力を伴う筋炎、進行性の間質性肺炎)を除き、MCTD一般へのステロイド適応、とくに初期治療する意義については、一致した

見解がないことが、今回の病歴調査からも知られた。

本報告の結果から、「MCTD病態の発生予防」に関する方針案(次項の結論に要約)を考えた。その前向き検証は、観察が長期にわたること、不均一な患者群を合理的に層別化できないことから困難であるが、ほかの多施設病歴調査で同様の結果を得るかどうかによって、検証可能と考えられる。

E. 結論

病歴の統計分析から、MCTD病態の発生予防に関し、1) MCTD診断時のステロイド投与は、その後の病態発生を抑制し、抑制効果は低用量でも得られること、および 2) 維持ステロイドの必要性は10年以後には乏しく、病初期の再発反復例に必要性がより高いといえないことが、示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(原著)

Itoh K., Kano T., Nagashio C., Mimori A., Kinoshita M. and Sumiya M: Progressive multifocal leuko-encephalopathy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:1020-1025 2006.

(学会発表)

1. Yuko Takahashi, Kae Takagi, Yoshihiro Yoshida, Rin Asao, Junwa, Kunimatsu, Hiroyuki Yamashita, Akitake Suzuki, Nobuyoshi Minemura, Toshihide Mimura, Masako Hara, Kenji Itoh, Shinichi Aotuka, Akio Mimori: Differential efficacy of steroid therapy for pulmonary arterial hypertension accompanied by mixed connective tissue disease and other rheumatic diseases. The 12th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Kuala Lumpur, Malaysia. Aug. 2006

2. Nobuyoshi Minemura, Yuko Takahashi, Rin

Asao, Junwa, Kunimatsu, Hiroyuki Yamashita, Akitake Suzuki, Kenji Itoh, Akio Mimori: The significance of measurement of (1→3)- β -D-glucan in the diagnosis and management of *Pneumocystis pneumonia* in patients with rheumatic diseases. The 12th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Kuala Lumpur, Malaysia. Aug. 2006

3. Junwa Kunimatsu, Yuko Takahashi, Nobuyoshi Minemura, Akitake Suzuki, Kyoichi Nakajima, Kenji Itoh, Akio Mimori: Assessment of cerebral hypoperfusion in polymyalgia rheumatica with ^{99m}Tc ECD single photon emission computed tomography. American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Washington, DC. Nov. 2006

4. Katsuya Nagatani, Kenji Itoh, Kyoichi Nakajima, Masako Okawa-Takatsuji, Hirohumi Kuroki, Yozo Katsuragawa, Akio Mimori: Rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes express BCMA and receive stimulating signal of APRIL. American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Washington, DC. Nov. 2006

5. 赤平理沙, 国松淳和, 峯村信嘉, 鈴木暁岳, 伊藤健司, 三森明夫: 血栓性血小板減少性紫斑病を合併したIV型ループス腎炎の1例. 第533回日本内科学会関東地方会, 東京, 2月, 2006

6. 永谷勝也, 伊藤健司, 中嶋京一, 大川雅子, 高橋裕子, 青塚新一, 三森明夫: APRILによるRA-FLS活性化とRA病態への関与についての検討. 第50回日本リウマチ学会総会, 長崎, 4月, 2006

7. 伊藤健司, 狩野俊和, 中嶋京一, 永谷勝也, 鈴木暁岳, 峯村信嘉, 高橋裕子, 国松淳和, 大川雅子, 青塚新一, 三森明夫: MRIを用いた関節リウマチの骨破壊進行の定量的測定. アレンドロネートによる影響についての検討. 第50回日本リウマチ学会総会, 長崎, 4月, 2006

8. 高橋裕子, 狩野俊和, 鈴木暁岳, 峯村信嘉, 国松淳和, 永谷勝也, 中嶋京一, 伊藤健司, 青塚新一, 三森明夫: ANCA関連血管炎におけるシクロフォスファミドの必要性の検討. 第50回

日本リウマチ学会総会，長崎，4月，2006

9. 国松淳和，高橋裕子，峯村信嘉，狩野俊和，鈴木暁岳，伊藤健司，青塚新一，三森明夫：痛みの訴えに乏しいリウマチ性多発筋痛症. 第50回日本リウマチ学会総会，長崎，4月，2006.

10. 鈴木暁岳，峯村信嘉，国松淳和，狩野俊和，高橋裕子，永谷勝也，中嶋京一，大川雅子，伊藤健司，青塚新一，三森明夫：SLE患者の維持ステロイド量を規定する因子の検討. 第50回日本リウマチ学会総会，長崎，4月，2006

11. 浅尾りん，高橋裕子，国松淳和，山下裕之，鈴木暁岳，伊藤健司，三森明夫：反復した肺高

血圧症に対してステロイド治療が有効であった一例. 第17回日本リウマチ学会関東支部会，東京，12月，2006

H. 知的財産の出願

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1 膠原病 PHのステロイド反応性
(血栓閉塞性などを除外した一次性 PAH)

	PH へのステロイド治療		右室圧 への治療効果	
	数	あり (なし)	半減→悪化→緩和	1/3 不変 2/3
MCTD	4	あり 3 (なし 1)	半減→悪化→緩和	1/3 不変 2/3
SSc	3	あり 2 (なし 1)	半減→悪化・不変	1/2 不変 1/2
SLE	2	(なし 2)		
SJS	1	あり 1	正常化	1/1

(bosentan and/or epoprostenol 使用者 5/10)

現在すべて生存

図1 Kaplan-Meier event-free curve

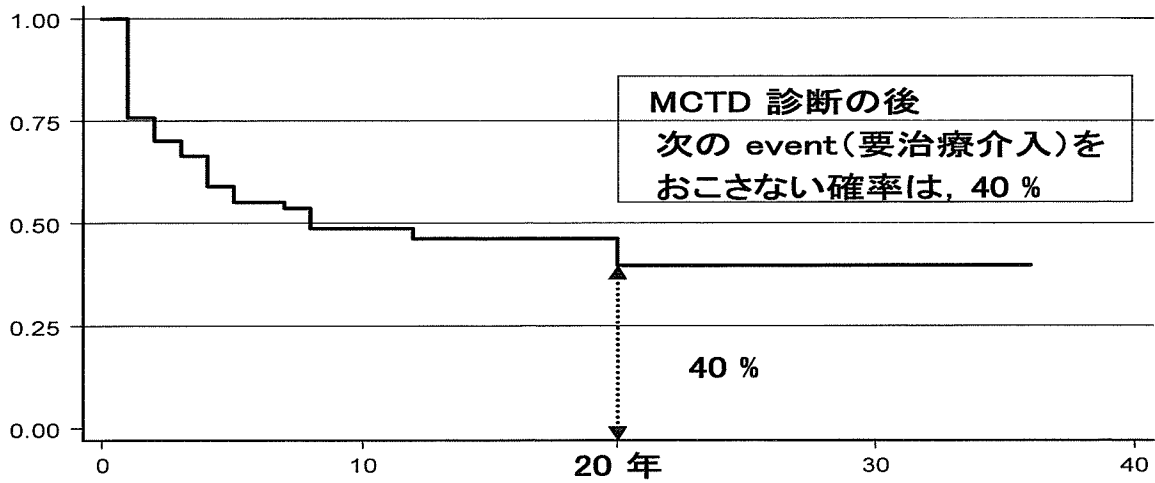


図2 「初期 3 年間の再発回数」→ MCTD 再発(なし曲線)

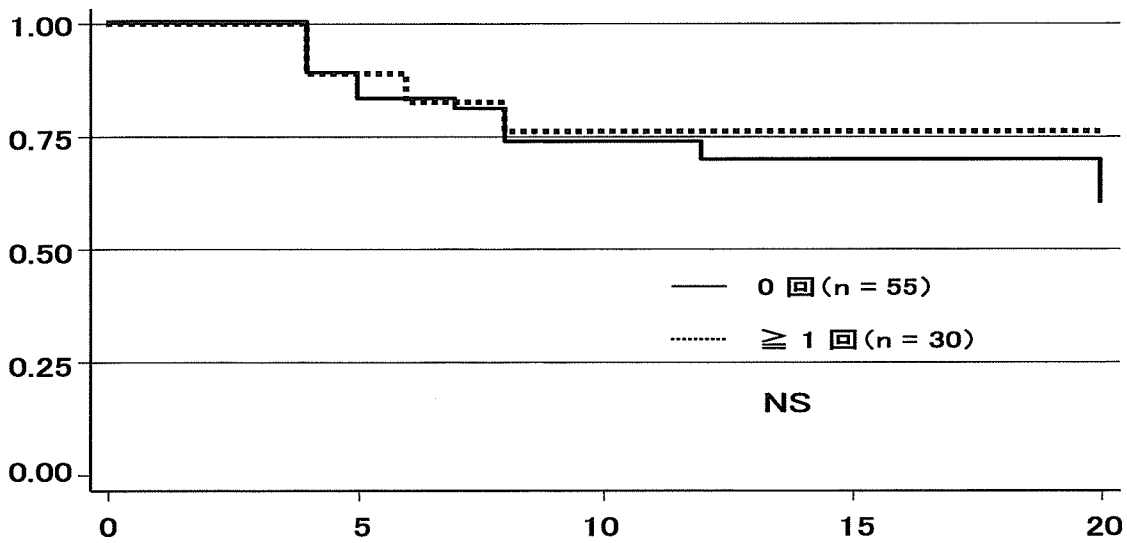


図3 「初期再発回数」と、その後の再発(なし曲線)
MCTDの筋炎/IP病態 MCTDのSLE 病態

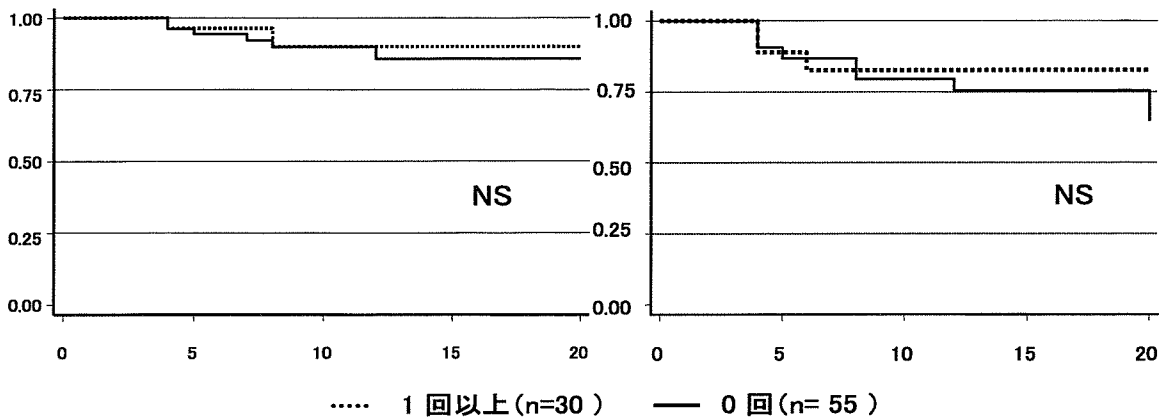


図4 SLE患者におけるループス腎炎の発生速度(発生なし曲線)

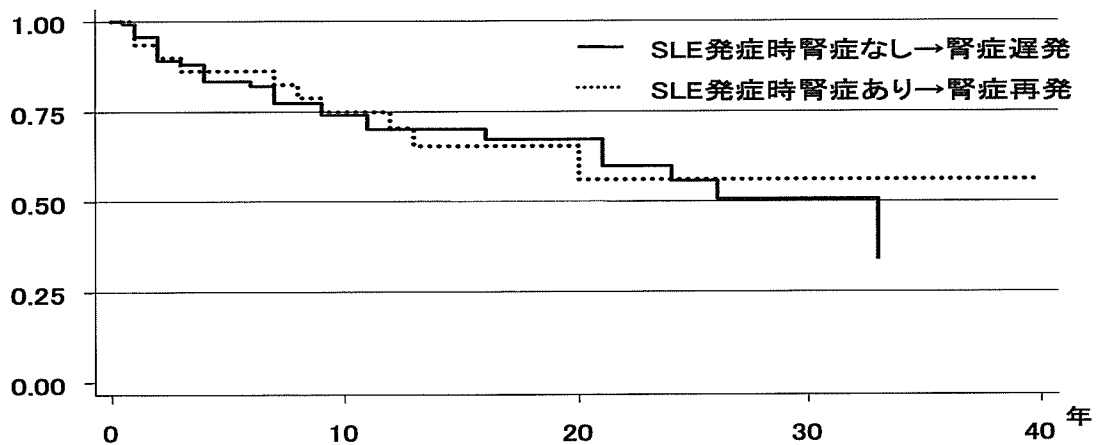


図5a MCTD 病態全般 発生(なし曲線)

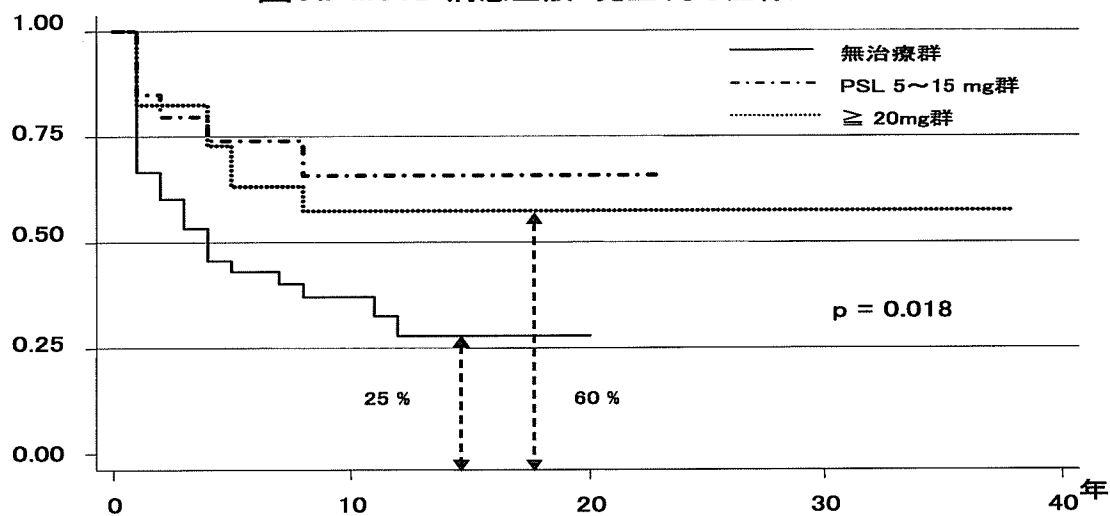


図5b MCTD の SLE 病態 & 髄膜炎発生(なし曲線)

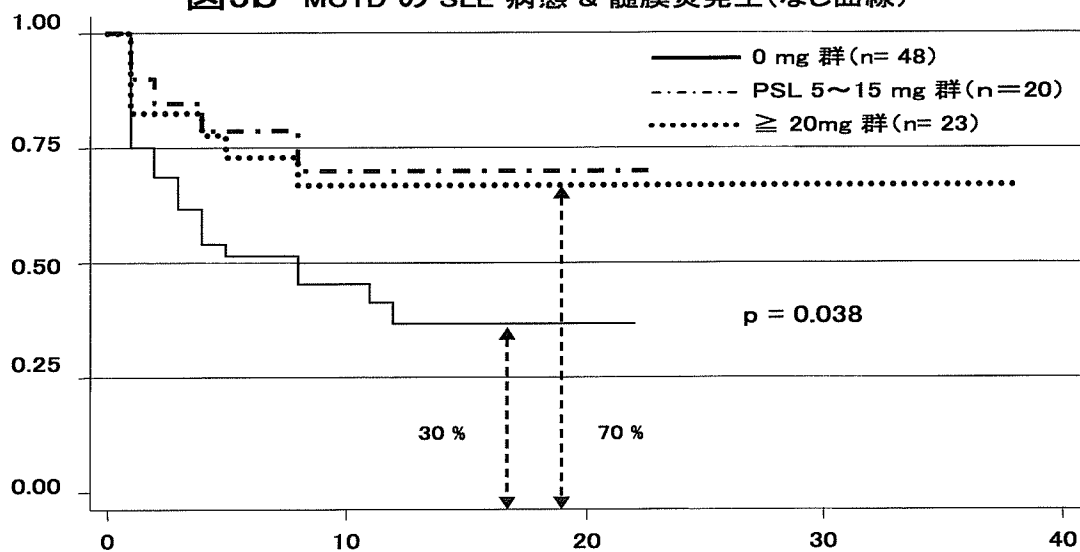


図5c MCTD-初期治療量と、その後の 筋炎 & IP 発生(なし曲線)

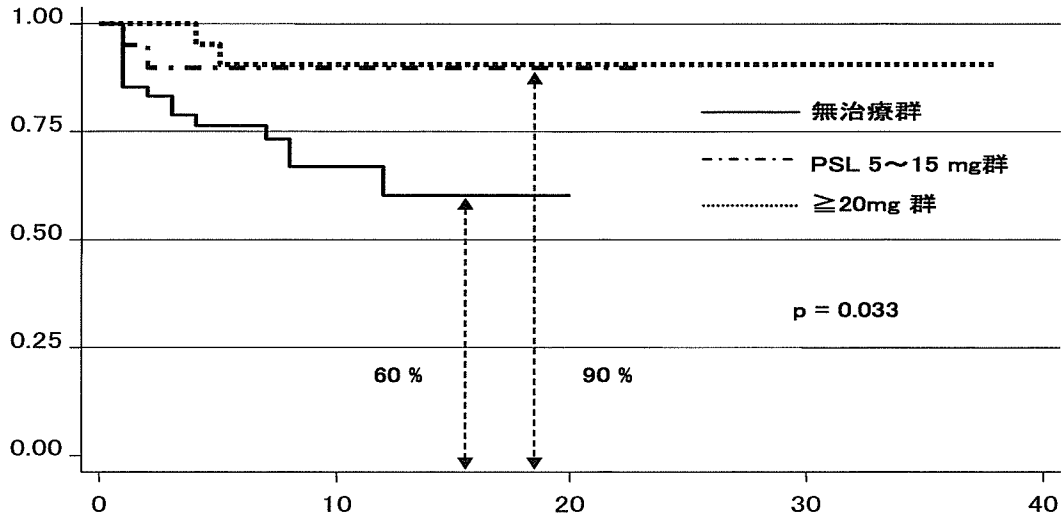


図5d SLE患者: 初期治療で分類した、再発(なし曲線)

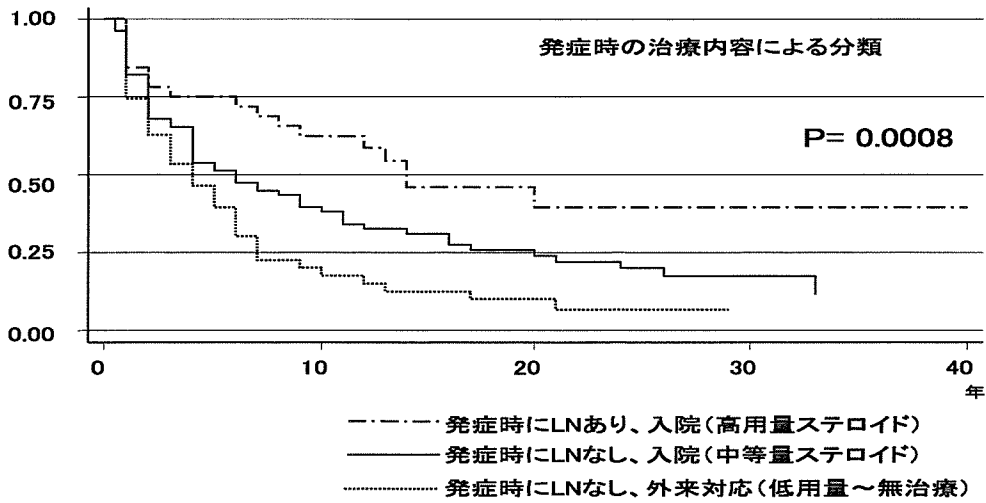
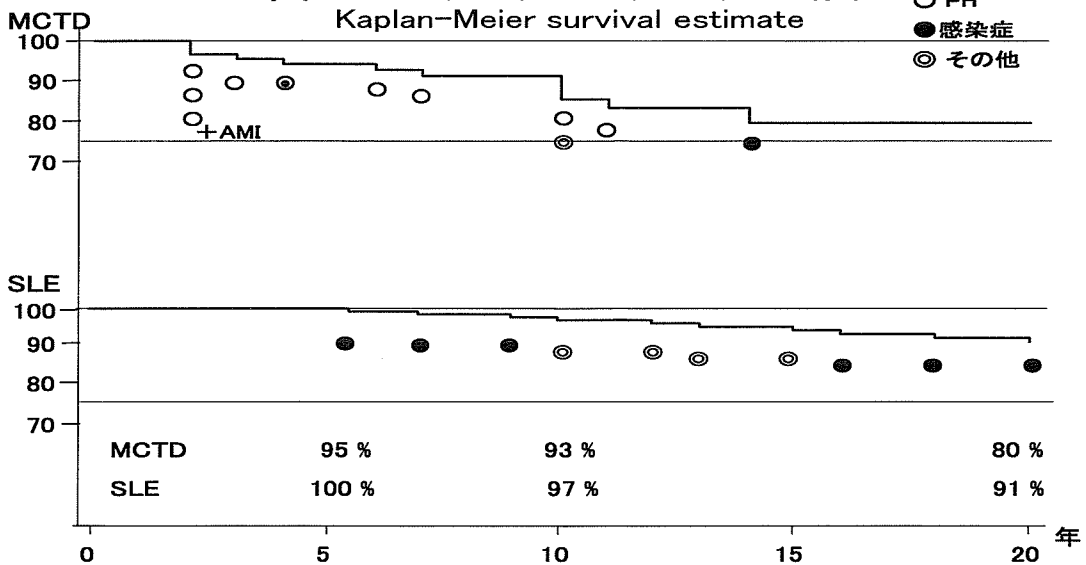


図6 MCTD(91人)とSLE(153人)の生存率
Kaplan-Meier survival estimate



Case1

49 y ♀ MCTD Dx ↓ pulse + PSL 60 mg + CyA 150 mg → 1年 → 7ヶ月
 RV 圧 56 mmHg → 28 mmHg → 64 mmHg → 79 mmHg
 ↓ pulse + 40 mg + CP 750 mg + Epo → 7日 → 7日 → 7日 → 3ヶ月
 Epo 10 ng/kg/min → bosentan+sildenafil に移行中
 71 mmHg → 49 → 56 → 42 mmHg → 40 mmHg

Case2

31 y ♀ MCTD Dx → 10年 ↓ PSL 30 mg / PGI2 → 7ヶ月
 RV 圧 28 mmHg → 60~65 mmHg → 40 mmHg → 70 mmHg

Case3

41 y ♀ SjS → 3年 ↓ PSL 30 mg → 1年 MCTD ↓ PGI2 → 2ヶ月 ↓ PSL 30 mg
 IP 増強 pleuritis, RV 圧 55 mmHg → 不変 との記載
 CHF 6MD 280 m → 350 m
 BNP 963 → 375

Case4

31 y ♀ MCTD, IP, SjS ステロイドなし → 4年 RV 圧 40 mmHg

Case5

63 y ♀ SSc, IP → 1年 ↓ pulse + PSL 50 mg
 pleuritis, pericarditis
 RV 圧 40~50 mmHg → 20~25 mmHg
 → 1年 ↓ CP 100mg/d → 5ヶ月 ↓ PSL 50 mg + bosentan + PGI2 → 1ヶ月
 IP 増強 65~75 mmHg → 50 mmHg
 BNP 760 388 215 154

Case6

74 y ♀ SSc, IP → 21年 ↓ ARB + bosentan
 Scl 70+ Ca-blocker
 RV 圧 40 mmHg → 28 mmHg
 6MD-O2 sat ↓ 80% ↓ 92%

Case7

34 y ♀ SSc, SjS → 半年 ↓ PSL 40 mg + bosentan + Epo → 2年
 RNP-, SSB+ Plt ↓ Epo 減量
 RV 圧 85 mmHg → 60 mmHg → 75~80 mmHg
 6MD 130 m/4min 350 m/6min

Case8

30 y ♀ SLE+SSc Dx (米国) ↓ Ca/ACE-block 利尿薬 → 3年 → 1年 PSL 15mg
 RNP+ Sm+
 RV 圧 75 mmHg → 45 mmHg → LN class III → 40~50 mmHg

Case9

71 y ♀ Raunaud → 13年 SLE Dx ↓ PSL 40mg → 5年 → 3年 → 4年 PSL 10mg
 ARB, PGI2
 LN class IV HCM RV 圧 40 mmHg → 不変

Case10

67 y ♀ DOE → 1年 SjS Dx → 1年 ↓ PSL 60mg → 2ヶ月 → 5ヶ月 ↓ bosentan
 利尿薬off
 RV 圧 59 mmHg → 76 mmHg → 57 → 45 → Δ PG 0
 BNP 1400 454 60 < 4
 → 14ヶ月 ↓ PSL 60mg → 4ヶ月
 40 mmHg → 80 mmHg → Δ PG 0
 BNP 43 BNP 13

膠原病肺高血圧の分子機構解明と新規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	先端医療研究センター（助教授）
研究協力者	吉川賢忠	東京大学医科学研究所	先端医療研究センター（助手）
	清水宣明	東京大学医科学研究所	先端医療研究センター （日本学術振興会特別研究員）

研究要旨

HEXIM1による遺伝子発現の抑制機構は、P-TEFb抑制、GRとの直接相互作用、という、少なくとも二つの異なった経路による。HEXIM1の発現は転写レベルで制御されている。プロモーター解析の結果、転写開始点から上流に2カ所、発現制御を正に制御する領域が存在することが示唆された。かかる領域に結合する転写因子を同定中である。今後、HEXIM1遺伝子発現を人為的に制御する仕組みを開発して膠原病肺高血圧の新規治療法開発などへと展開していきたい。

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。今回、HEXIM1 mRNAの発現調節機構を解明することを目的とした。

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の上流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。

（倫理面への配慮）

とくになし。

C. 研究結果

・ human HEXIM1 geneのReporter gene assayによるcis-element探索により、-3841〜-2264 間、-120〜-41の間に重要なcis-elementが存在する可能性が考えられた。

・ humanとmouseのHEXIM1 geneの相同性は、転写開始点から上流約800bpまでは約77%の、約800bp〜1600bp までは約56%の相同性が見られ、約1600bpより上流ではほとんど相同性が見られなかった。

・ mouse HEXIM1のReporter gene assayによるcis-element探索により、-120〜-41の間に重要なcis-elementが存在する可能性が考えられた。

・ human HEXIM1 geneのReporter gene assayによるcis-element探索により、-120〜-41の領域の-65〜-45の領域が重要なcis-elementであると思われるが、trans因子を同定するに至っていない。

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。HEXIM1遺伝子発現制御機構を解明することによってHEXIM1発現量を薬理的にコントロールする方法を開発したい。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の発現は転写レベルにおいて制御さ

れる。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

2. 論文発表

- 1) Takuya Fukazawa, Yutaka Maeda, Mary L. Durbin, Toru Nakai, Junji Matsuoka, Hirotohi Tanaka, Yoshio Naomoto, and Noriaki Tanaka: Pulmonary adenocarcinoma-targeted gene therapy by a cancer- and tissue-specific promoter system. **Mol. Cancer Ther.** 2007;6(1):244-252
- 2) Inamoto S, Iwata S, Inamoto T, Nomura S, Sasaki T, Urasaki Y, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C. Crk-associated substrate lymphocyte type regulates transforming growth factor-beta signaling by inhibiting Smad6 and Smad7. **Oncogene.** 2007;26(6):893-904
- 3) Sano M, Izumi Y, Helenius K, Asakura M, Rossi DJ, Xie M, Taffet G, Hu L, Pautler RG, Wilson CR, Boudina S, Abel ED, Taegtmeier H, Scaglia F, Graham BH, Kralli A, Shimizu N, Tanaka H, Makela TP, Schneider MD. Menage-a-Trois 1 Is Critical for the Transcriptional Function of PPARgamma Coactivator 1. **Cell Metab.** 2007;5(2):129-142
- 4) Kei Ohnuma, Masahiko Uchiyama, Tadanori Yamochi, Kunika Nishibashi, Osamu Hosono, Nozomu Takahashi, Shinichiro Kina, Hirotohi Tanaka, Xin Lin, Nam H. Dang, and Chikao Morimoto. Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1. **J. Biol. Chem.,** in press.

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

なし。

図1 ヒトHEXIM1遺伝子のプロモーター領域の構造

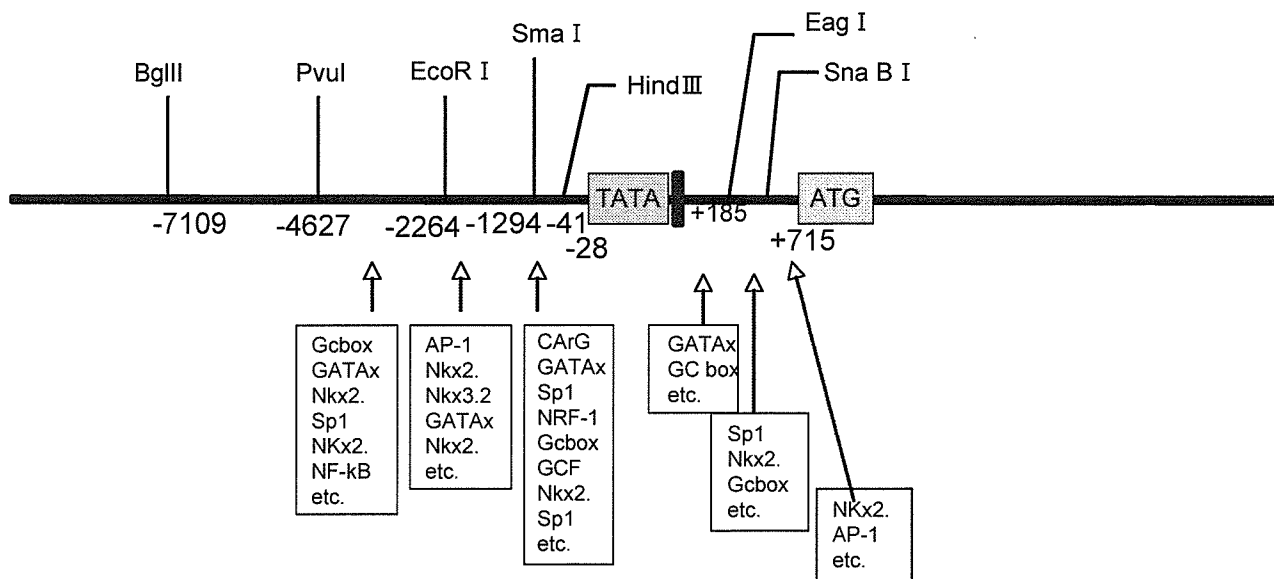
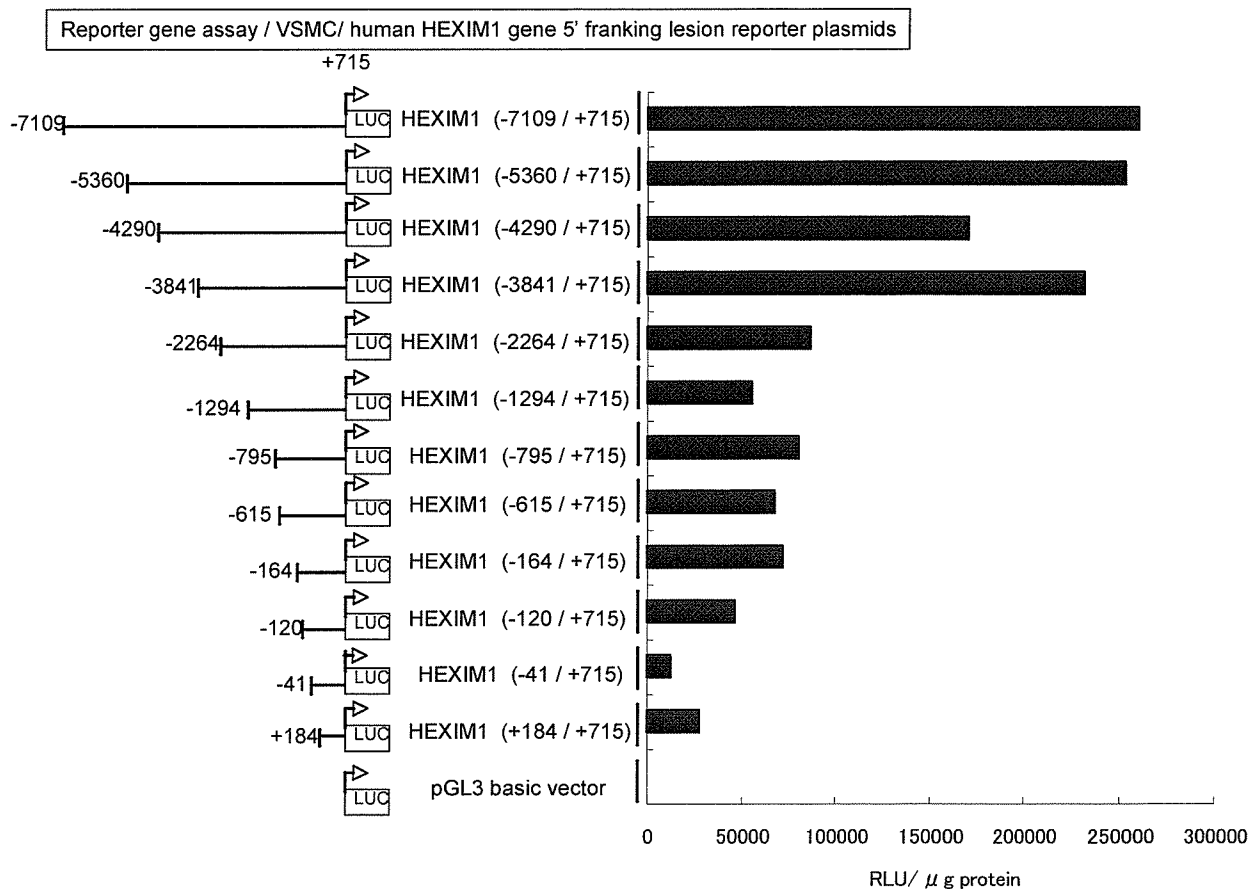


図2 ヒト血管平滑筋細胞におけるHEXIM1遺伝子プロモーターの発現制御機構
 - シス配列の同定



MCTD の肺動脈性肺高血圧症の発症予測因子、NOS2 遺伝子多型の前向き研究(第1報)

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)

研究研究者 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

混合性結合組織病(MCTD)は、全身性エリテマトーデス、炎症性筋炎、強皮症の症状を併せもち、抗U1-RNP抗体を有する膠原病の1疾患である。膠原病類縁疾患のなかでは比較的予後良好であるが、他の膠原病と比較し肺動脈性肺高血圧症(PAH)を合併する頻度が高い。そのため、PAHが生命予後を決定する非常に重要な因子となっている。しかし、PAHの発症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、PAH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産生量の違いに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本研究班にて報告してきた。今回の研究は、発症5年以内のMCTD患者で3年以上の追跡調査を行い、PAHの発症にNOS2遺伝子多型が予測因子になるかどうかを前向き検討で評価する。

A. 研究目的

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、混合性結合組織病(MCTD)の生命予後を決定する重要な病態である。我々は、レイノー現象を有するMCTDでは、血管の異常収縮・攣縮が生じており、その病態にエンドセリン-1 (ET-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、ET-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、PAH合併MCTD患者でも、血漿中ET-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、ET-1により誘導されることがわかっている。つまり、ET-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、PAHを併発した症例においては、ET-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⁾。この結果から、我々はPAH合併MCTD患者ではET-1によるNOS-2を介したNO合成過程に異常があ

ると仮定した。そこで、昨年までの本研究班にてNOS-2遺伝子の5'-UTRに存在する遺伝子多型を検索し、PAHの発症にNOS2遺伝子多型が関与していることを後ろ向き研究にてみいだした⁴⁾⁵⁾。今回の研究では、前向きにMCTDの症例を登録し、NOS2遺伝子多型とPAH発症の関連を検討する。

B. 研究方法

1) 対象患者

東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターに通院中の患者で、厚生労働省研究班による混合性結合組織病診断の手引き（1996年改訂）によりMCTDと診断でき、MCTD診断後5年以内の症例を対象とした。

2) 肺動脈性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以上の疑わしい症例にて、右心カテーテル検査を行い、平均肺動脈圧が、25 mmHg以上、あるいは、負荷時の平均肺動脈圧が、30 mmHg以上の症例をPAHとした。さらに、重度の肺線維症や心疾患、肺動脈血栓塞栓症による2次性のPHが否定された

症例とした。

3) 血中エンドセリン-1および一酸化窒素の定量

エンドセリン-1 (ET-1) は、患者血漿中の濃度をELISA法 (R & D systems) にて定量した。一酸化窒素 (NO) は、NOの代謝産物である NitriteとNitrateの総和を比色法 (Cayman Chemical) にて定量した。

4) マイクロサテライト (CCTTT repeat) の繰り返し回数の同定

NOS2遺伝子の-2.5 kb近傍に存在するCCTTT repeat microsatelliteを解析するため、蛍光ラベルしたプライマーを用いgenomic DNAを鋳型としてPCRを行い、PCR産物をABI 7900を用いて泳動し、GeneScan法にて繰り返し回数を決定した。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

1) 症例

2005年10月からの登録を行い、今までのところ、11例のMCTDを登録した。11例、全例女性で、平均年齢は、43歳である。そのうち、3例においてPAHが認められた。

2) 患者血中エンドセリン-1 (ET-1)および一酸化窒素の代謝産物(NO)の検討

MCTD患者11例と健常人との検討では、ET-1およびNOの有意な増加が認められた(図1)。症例ごとのET-1, NO, NO/ET-1 ratioを図2に示した。症例3、症例5、症例11では、NO/ET-1比が低下していた。

3) CCTTTの繰り返し配列の遺伝子多型の検討

表1に示すように、PAHの合併が認められる症例3、症例5、症例11では、CCTTT繰り返し配列の数が少ない傾向であった。また、PAHの合併は認められないが、症例6、症例7は、CCTTT繰り返し配列の数が少なく、ともに総和で20以下であった。

D. 考察

我々は、これまで、MCTDと全身性強皮症(SSc)に合併したPAH症例では、NOの血清中での上昇がみられないことを報告してきた³⁾⁵⁾。一方、MCTDでは、病初期に、血清NO代謝産物が上昇することが認められた⁶⁾。この現象は、MCTDの病変局所で増加している炎症性サイトカインやET-1によるNOS-2誘導が関与していると考えられる。つまり、血管収縮因子であるET-1の作用に拮抗するためにNO合成が促進されていると考えられる。しかし、PAH合併例では、PAH発症早期から、NO産生の亢進が認められない。このことより、我々は、PAH合併例では、血管拡張因子の誘導に異常があり、それが、病態に重要であると推定した。NOS2遺伝子多型の検討の結果、PAH合併症例は、NOS-2の転写活性が低下する遺伝子型を有していた⁵⁾。その結果、NOS2産生の低下に伴うET-1とNOの不均衡が続くことにより、PAHの病態が形成される可能性を我々は提唱している。そこで、今回の研究では、発症早期のMCTD患者を登録して、NOS2遺伝子多型を調べ、3年間の観察期間でPAH発症との関与を前向き研究にてしらべることとした。今までの、検討の結果では、11例中3例にてPAHの合併が観察されており、NOS2遺伝子多型CCTTT repeatの回数の少ない症例であった。また、今までの検討結果と一致して、NO/ET-1比の低下が認められた。症例数が少ないため、有意な差は認めないが、前向き検討においても、CCTTT repeatのPAH発症との関連が示唆されている。

PAHに対する経口内服薬での新たな治療法が開発され、有効性を示す臨床報告が多数みられている⁷⁾⁸⁾。1つは、エンドセリンの作用を抑制するエンドセリン受容体拮抗薬で、肺高血圧症や末梢の循環不全ばかりでなく、間質性の肺病変にも有効とする報告がある。エンドセリンがMCTDや全身性強皮症の病態に重要な働きをしていることが、このことから明らかとなった。2つめの薬剤は、ホスホジエステラーゼ5阻害剤(PDE5I)である。血管平滑筋細胞内のcGMPの分解を抑制することにより、NO作用を高め、血管拡張を引き起すとされている。半減期が短い薬剤であるが、1日3回の投薬でPHに対し有効性が報告されている。やはりPDE5Iも、末梢

循環不全に有効性があり、レイノー現象の改善が報告されている。NOS2遺伝子変異があり、PHの発症頻度が高いと推定された症例にNO活性を高める効果のあるPDE5Iを投与することは、発症の抑制に有効である可能性がある。

E. 結論

前向き研究にて、MCTDのPAH発症にNOS2遺伝子多型が関連しており、発症予測因子となりうることが示唆された。しかし、症例数の蓄積が必要であり、さらに検討を継続する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawaguchi Y, Tochimoto A, Hara M, Kawamoto M, Takagi K, Sugiura T, Katsumata Y, Okada J, Kondo H, Okubo M, Kamatani N: Association of Gene polymorphisms of *NOS2* with pulmonary arterial hypertension combined with systemic sclerosis in the japanese population. *Arthritis Res Ther* 8:R104, 2006

2. 学会発表

1. Y.Kawaguchi, A.Tochimoto, M.Kawamoto, K.Takagi, J.Okada, H.Kondo, M.Okubo, Y.Katsumata, N.Kamatani, M.Hara. Association of a polymorphism of *NOS2* gene with pulmonary arterial hypertension combined with systemic sclerosis in japanese population. ACR 2005 Annual scientific meeting

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

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。

表1 NOS2遺伝子のマイクロサテライト (CCTTT)_n 遺伝子多型

	CCTTT repeat genotype	繰り返し配列回数の総和	NO/ET-1	
MCTD + PAH				
	3	9/11	20	42
	5	8/9	17	32
	11	10/11	21	50
MCTD - PAH				
	1	14/16	28	112
	2	12/14	26	114
	4	10/14	24	140
	6	9/11	20	104
	7	8/10	18	121
	8	12/15	27	100
	9	10/13	23	112
	10	11/16	27	119

NOS2: nitric oxide synthase-2, MCTD: 混合性結合組織病, PAH: 肺動脈性肺高血圧症

膠原病のPHにおける血清Angiotensin-1の検討

分担研究者 岡田 純 北里大学健康管理センター 助教授
研究協力者 石川 章 北里大学医学部膠原病感染内科 講師

研究要旨

目的：Angiotensin-1(Ang-1)が特発性肺高血圧症での病態形成に関与することが推測されている。そこで、MCTDを始めとする膠原病にともなうPHにおける血清Ang-1の意義を検討したので報告する。
方法：対象は抗U1RNP抗体陽性症例、およびPAH合併SLE、APS、SScの血清を用いた。血清Ang-1値はELISAにて測定した。健常人の成績より10pg/ml以上を上昇と判定した。

結果：抗U1RNP抗体単独陽性例では、PH群では 12.3 ± 15.4 pg/mlと非PH群の 41.7 ± 57.6 に比較しAng-1の値は非PH群が有意に高値となった。この傾向が、他の膠原病PHにも共通したものかを見るため、APS、SLE、SScのPHに関して検討した。APSではPH合併例(6)では 603.3 ± 855.4 pg/mlとPHのない 197.6 ± 557.2 に較べ高値であった。しかし、6例中1例は49.9と低値で、SLE合併で抗U1RNP抗体陽性症例であった。一方、SScおよびSLEではPH例では 5.8 ± 11.9 と非PH例の 81.2 ± 215.2 と有意に低値で、SLEにおいても、PH例はAng-1の上昇例を認めなかった。以上より、Ang-1は膠原病PHにより異なった病態を示す事が示唆された。APS例のように血栓によらないPH例ではAng-1は上昇しない可能性が示唆された。

結論；血清Ang-1の解析は、膠原病のPHの病態を理解する上での重要性が示唆された。

A. 研究目的

Angiotensin-1(Ang-1)はTie2受容体を介して血管平滑筋の増殖を誘導する因子であり、強力な血管増殖因子であるとともに、血管の保護作用を有することも明らかになった蛋白である[1, 2]。Ang-1は70-kDの蛋白で、肺の血管形成に欠かせない因子であり、平滑筋細胞や周皮細胞前駆細胞から産生される[2]。Duら[3]は、Ang-1が肺動脈性肺高血圧症(PAH)での病態形成に関与することを報告し注目された。しかし、低酸素をモデルとするPAHでも、Ang-1の関与を示唆する報告があるが[4, 5] iPAHでは、Ang-1で前処理した肺動脈は血管平滑筋の増殖が誘導されことも報告されている[1, 6]、一方、Ang-1はより血管内皮細胞に防御的に働き、むしろPAHには保護的に作用することを示唆する報告[1, 6]もあり、Ang-1のPAH発症への関与は、いまだ明確ではない。

MCTDでは、PAHが生命予後に影響する最も重

要な内臓病変であるが、一部の症例には副腎皮質ステロイドが有効であることから、その発症機序に免疫学的機序も推測されている[7]。膠原病におけるPHでは、肺梗塞、血管炎など、種々の原因が混在する。そこで、本研究では、各種膠原病における肺高血圧症における血清Ang-1を測定することで、PHにおけるAng-1の意義を検討したので報告する。

B. 研究方法

対象はAPS(97), SSc(46), MCTD(46), 抗U1RNP抗体陽性例(82), PH with CTD(51), 健常人 (50)の血清を用いた。血清Ang-1値は抗ヒトAng-1ポリクロナール抗体 (R&D社製) を1次抗体とし、ELISA plateに吸着させ、1:20倍に希釈した血清を加え、2次抗体として、抗ヒトAng-1モノクロナール抗体を加え、最後にALPラベル抗マウスIgGモノクロナール抗体を加え反応後、発色、吸光度を測定した。健常人の成績より10pg/ml

以上を上昇と判定した。

C. 研究結果

昨年度の報告で、抗U1RNP抗体単独陽性例では、PH群では 12.3 ± 15.4 pg/mlと非PH群の 41.7 ± 57.6 に比較しAng-1の値は非PH群が有意に高値であった。そこで、膠原病に伴うPH症例におけるAng-1を検討した(図1)。

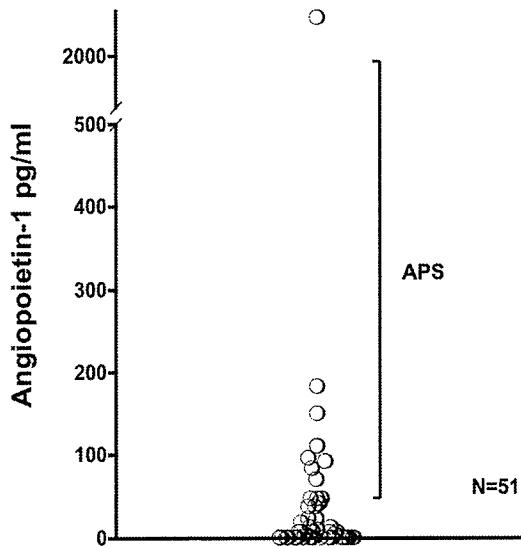


図1 膠原病合併PH症例におけるAng-1の分布

図のように、Ang-1は低値のものから、2000を越す高値のものまで、様々であったが、高値例の多くは、抗リン脂質抗体症候群(APS)の合併例であった。そこで、APSでPH合併の有無でAng-1を検討した。APSでは主として血栓症に伴う血管病変がみられ、APS合併肺高血圧症の多くは肺動脈梗塞によるものが多い。図2に示すように、PHの多くがAng-1高値 147 ± 308 pg/mlを示し

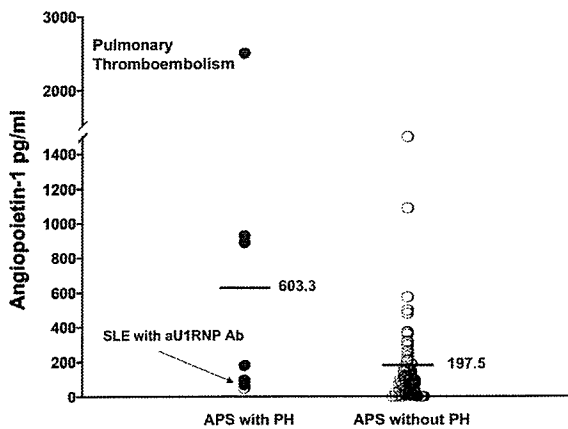


図2 抗リン脂質抗体症候群におけるPHとAng-1の関係

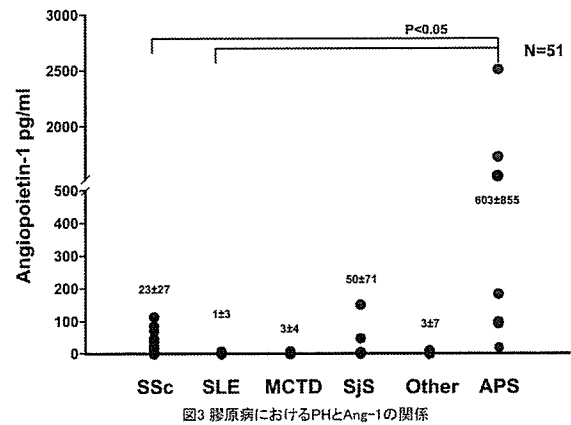


図3 膠原病におけるPHとAng-1の関係

たが、低値の1例はSLE(抗U1RNP抗体)陽性例で、PAHであった。一方、Ang-1高値のPH-APSはいずれも原発性APSで血栓性肺高血圧症であった。

APS以外のPH合併膠原病では、図3の如く、SSc、SLE、MCTD例では、Ang-1値は 22.2 ± 27.5 pg/ml、 1.9 ± 3.2 、 3.5 ± 4.5 とAPS合併例の 603.2 ± 855.2 に比べ有意に低値であった。膠原病に伴う他の臓器病変がAng-1上昇に関連している可能性もあり、各種臓器病変との関係を検討したが、間質性病変等明らかな相関は見られなかった。次に、抗U1RNP抗体陽性例とPHおよびAng-1との関係を検討した。抗U1RNP抗体陽性PH例では、抗U1RNP抗体陰性PH症例に比べ、Ang-1値は有意に低値を示した。膠原病に共通して、抗U1RNP抗体陽性PHは、Ang-1が低値を、抗リン脂質抗体症候群に伴う慢性肺血栓性肺高血圧症ではAng-1は高値を取ることが明らかに

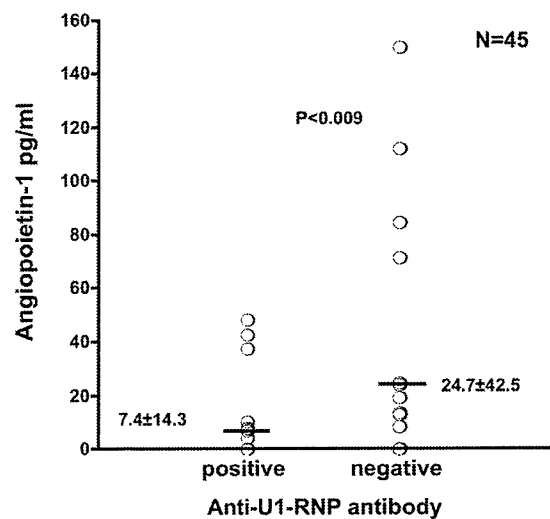


図4 抗U1-RNP抗体、PH、およびAng-1との関係