

200731031A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

混合性結合組織病の病態解明と治療法の確立  
に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

平成20年3月

主任研究者 三 森 経 世

## 目 次

I. 総括研究報告	
混合性結合組織病の病態解明と治療法の確立に関する研究	1
(三森 経世)	
II. 分担研究報告	
1. 抗 U1RNP 抗体陽性膠原病患者の肺動脈性肺高血圧症に対する副腎皮質ステロイド療法 の検討 (多施設共同研究)	7
(三森 経世, 藤井 隆夫)	
2. ループモデルマウス由来の抗 U1RNP モノクローナル抗体に関する研究	13
(藤井 隆夫)	
3. 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	18
(澤井 高志)	
4. 新規抗核抗体産生マウスモデルの検討	22
(川畑 仁人)	
5. 改良型抗核抗体測定用 ELISA の感度と特異度の検討—MESACUP <sup>®</sup> -3 テスト Sm/SS-B/ Jo-1 を中心に—	27
(三森 経世, 藤井 隆夫)	
6. 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	37
(吉田 俊治)	
7. MCTD のステロイド治療方針に関する研究	41
(三森 明夫)	
8. 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	48
(田中 廣壽)	
9. 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 2 報)	53
(原 まさ子)	
10. Angiopoietin/PDGF の膠原病の PH に対する関与の検討	59
(岡田 純)	
11. 肺動脈高血圧症発症機転の解析に関する研究	63
(桑名 正隆)	
12. 肺動脈性肺高血圧症における脳性 Na 利尿ペプチド前駆体 N 末端断片 (NT-proBNP) の臨床的意義に関する研究	67
(諏訪 昭)	
13. 混合性結合組織病の肺高血圧症の病態解明と治療法の確立に関する研究	76
(高崎 芳成)	
14. 肺高血圧症を合併した膠原病患者に対するエンドセリン受容体拮抗剤ボセンタンの 効果に関する研究	79
(京谷 晋吾)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	81
IV. 平成 19 年度構成員名簿	90

# I. 総括研究報告

## 混合性結合組織病の病態解明と治療法の確立に関する研究

主任研究者： 三森 経世 （京都大学大学院医学研究科臨床免疫学・教授）

### 研究要旨

混合性結合組織病（MCTD）はわが国に多い疾患であり、これまでの調査研究により特徴的な臨床所見と抗 U1RNP 抗体とに密接な関連があること、自然歴より SLE, SSc, PM のいずれとも異なる独自の病像と自然経過を有すること、主な死因としての肺動脈性肺高血圧症（PAH）が重要であることが明らかにされてきた。しかし、MCTD の病態形成機序にはなお不明な点が多く、生命予後の悪い PAH についても発症のメカニズムは不明であり、その治療法についても原発性 PAH との異同を含めてなお多くの問題点が残されている。MCTD の病態形成機序解明と治療法確立のため、1)抗 U1RNP 抗体および他の液性因子の病因的意義、2)MCTD に合併する PAH の自然歴および病態の解明と治療、3)抗 U1RNP 抗体陽性患者の追跡調査、4)エビデンスに基づく MCTD の治療ガイドラインの策定、を重点研究課題とし歴代の研究班で未解決として残された課題の解決を目指した。

### 分担研究者

岡田 純（北里大学健康管理センター・准教授）  
川畑仁人（東京大学アレルギー・リウマチ内科・助教）  
京谷晋吾（国立循環器病センター・医長）  
桑名正隆（慶應義塾大学内科・准教授）  
澤井高志（岩手医科大学病理学第一講座・教授）  
諏訪 昭（東海大学リウマチ内科学・准教授）  
高崎芳成（順天堂大学膠原病内科・教授）  
田中廣壽（東京大学医科学研究所・准教授）  
原まさ子（東女医大膠原病リウマチ痛風センター・教授）  
藤井隆夫（京都大学大学院臨床免疫学・講師）  
三森明夫（国立国際医療センター・部長）  
吉田俊治（藤田保健衛生大リウマチ感染症内科・教授）

### A. 目的

混合性結合組織病(MCTD)は1972年にSharpらによって提唱された疾患概念で、抗 U1RNP 抗体高力価陽性と全身性エリテマトーデス（SLE）、強皮症（SSc）、筋炎（PM）様症状を合わせ持つ病態を特徴とする。米国では MCTD の疾患概念と独立性に対して議論もあるが、わが国では 1982 年以来特定疾患に指定され、診

断名として広く定着するとともに、これまでの調査研究によりわが国では欧米よりも頻度の高い疾患であること、特徴的な臨床所見と抗 U1RNP 抗体とに密接な関連があること、自然歴より SLE, SSc, PM のいずれとも異なる独自の病像と自然経過を有すること、主な死因としての肺高血圧症（PAH）が重要であることが明らかにされてきた。これまで 1982 年に MCTD 調査研究班発足以来、数回の全国疫学調査により MCTD には予後不良な PAH 合併が多く必ずしも予後の良い疾患ではないことが明らかにされた。さらに、MCTD 診断の手引き（粕川班 1987）、PAH 診断の手引き（横張班 1990）、MCTD 治療指針（東條班 1995）、PAH の治療ガイドライン（近藤班 2004）が作成されたことは大きな成果としてあげられ、我国における MCTD の臨床診療の向上に大きく貢献してきた。

しかし、MCTD の病態形成機序には不明な点が多い。特に MCTD の血清学的マーカーである抗 U1RNP 抗体がいかんして産生され、病態にどのようにかわるかについてはなお不明である。生命予後の悪い PAH についても発症のメカニズムは不明であり、その治療法については

原発性 PAH との異同を含めてなお多くの問題点が残されている。我々がかかる点を解明し、MCTD のさらなる予後改善のために昨年度より本研究班を立ち上げた。本研究は歴代の研究班で未解決として残された課題の解決を目指し、かかる問題点を重点研究課題とすることで、MCTD の病態解明を追究し、治療法の確立と生命予後改善を目指すことを目的とした。

## B. 方法

### 1. 抗 U1RNP 抗体陽性膠原病患者の肺動脈性肺高血圧症に対する副腎皮質ステロイド療法の検討 (多施設共同研究)

班員が所属する多施設共同の前向き研究により抗 U1RNP 抗体陽性 PAH 患者に対するステロイドの有用性を調べることにより、MCTD を中心とした抗 U1RNP 抗体陽性膠原病に合併した PAH 治療法に関するエビデンスをより明確にすることを目的として、その試験プロトコルを作成し、参加施設における倫理委員会の承認を受け、症例エントリーを開始した。

### 2. 抗 U1RNP 抗体および他の液性因子の病因的意義

抗 U1RNP 抗体自身や新たな抗血管内皮細胞抗体などの液性因子の病原性を追及するために培養肺血管内皮細胞を用いたプロテオーム解析で AECA の対応抗原を解析した (澤井)。MRL-*lpr* マウスより抗 U1RNP 抗体産生ハイブリドーマを作成し、モノクローナル抗体の対応抗原を解析した (藤井)。また抗 U1RNP 抗体産機序をヌードマウスに T 細胞を移入する系で検討した (川端)。

### 3. MCTD に合併する PAH の自然歴および病態の解明と治療

MCTD に合併する PAH (MCTD-PAH) の臨床的特徴および自然歴を疫学調査で検討した (吉田, 高崎)。MCTD-PAH の病態形成機序を血管運動性に関与する液性因子、転写因子などの分子から追及した (田中, 原, 岡田, 桑名, 諏訪)。MCTD-PAH におけるステロイド療法および免疫抑制薬の効果・有用性を後ろ向きおよび前向き研究によって検討した (三森明夫)。また

MCTD-PAH に対する血管拡張療法の適応, 有用性を前向き研究によって検討した (京谷)。

### 4. エビデンスに基づく MCTD の治療ガイドラインの策定

本研究で得られた成果と過去の文献のシステマティックレビューによりエビデンスレベルの高い治療法を整備し、エビデンスに基づいた治療ガイドラインを作成した (全員)。2008 年 1 月にワークショップを開催し、内容のコンセンサスと brush-up をはかった。

(倫理面の配慮)

プロジェクト研究においては主任研究者および各分担研究者の施設における倫理委員会の承認を得た後に研究を開始し患者へのインフォームドコンセントを遵守した。また各個研究においても、患者からの検体採取・利用を必要とする場合は各施設の倫理委員会の承認とインフォームドコンセント取得を行なった。

## C. 結果

### 1. 抗 U1RNP 抗体陽性膠原病患者の肺動脈性肺高血圧症に対する副腎皮質ステロイド療法の検討 (多施設共同研究)

本邦において膠原病に合併する PAH は抗 U1RNP 抗体陽性患者に多い。MCTD における PAH 治療のガイドラインでは、抗凝固療法と酸素療法を行った上で膠原病の活動性評価を行い、活動性があった場合、あるいは活動性がなくても PAH 発症早期にはステロイドや免疫抑制薬を考慮するとされている。しかしステロイドの PAH に対する有効性のエビデンスはまだ不十分である。そこで、班員が所属する多施設共同の前向き研究により抗 U1RNP 抗体陽性 PAH 患者に対するステロイドの有用性のエビデンスをより明確にするために試験プロトコルを作成し、エントリーを開始した。現在まで 5 例が登録され、ステロイド治療前に比し、治療 1 ヶ月後で尿酸値が有意に低下したが、自覚症状 (Borg Dyspnea Index), 6 分間歩行距離, 血中 BNP, および心臓超音波検査により測定された肺動脈圧や心拍出量には差を認めなかつ

た。今後エントリー症例を増やすため、他の血管拡張薬や免疫抑制薬の使用制限の検討や心臓超音波検査の標準化が必要である。

## 2. 抗 U1RNP 抗体および他の液性因子の病因的意義およびその産生機序

**2-1. ループモデルマウス由来の抗 U1RNP モノクローナル抗体に関する研究 (藤井) :** 抗 U1RNP 抗体の病原性を明らかにするため、MRL/lpr マウスの脾細胞から抗 U1RNP 抗体を産生する B 細胞ハイブリドーマを分離・クローニングした。分離されたクローンの 1 つ (Hy64) が産生する免疫グロブリンは IgM 型の抗 U1-70K 抗体と考えられた。また Hy64-IgM は 70kDa のみならず 48kDa と 28kDa 蛋白にも反応した。抗 U1RNP/U1-70K 抗体が他の自己抗原と反応することにより生体内で病原性を有する可能性を考慮し、2 次元電気泳動法を用いてその対応抗原を分析中である。

**2-2. MCTD に伴う PAH に関連する抗内皮細胞抗体(AECA)に関する研究 (澤井) :** MCTD 患者での PAH 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おり、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の対応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、PAH 発症 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 20 個の候補蛋白質を得ることができた。同定できた AECA の抗原候補蛋白質は、U1snRNP70K, hnRNPA1, hnRNPL, hnRNPQ, GAPDH, vimentin, annexin A1 などであった。

**2-3. 新規抗核抗体産生マウスモデルの検討 (川畑) :** ノードマウスへの 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 抗体の産生機序解明を目指した。抗 RNP 抗体は、抗 dsDNA 抗体や抗 H+/K+ATPase 抗体などと比べ、制御性 T 細胞の関与は少ないと考えられた。一方、RNA 受容体である TLR7 を阻害することで著明に抗 RNP 抗体が低下したことから、抗 RNP 抗体産生に TLR7 が関与して

いることが示唆された。核酸蛋白複合体である U1RNP に対する自己抗体産生に、核酸受容体がどのように関与しているか検討することは、本疾患の分子標的治療を開発する上で重要と考えられた。

**2-4. 改良型抗核抗体測定用 ELISA の感度と特異度の検討 (三森, 藤井) :** 自己抗体検査は患者の診断確定や治療法に影響を与えるため、感度および特異度の高い検査法の確立が望まれる。しかしこれまでの ELISA による測定結果には臨床所見とあわない偽陽性が少なからず認められていた。そこで (株) 医学生物学研究所の改訂された抗 RNP/Sm/SS-A/SS-B/Jo-1 抗体測定用 ELISA キット抗 U1RNP/ Sm/ SS-A/ SS-B/ Jo-1 抗体測定用 ELISA の有用性を調べた。抗 U1RNP 抗体、抗 SS-A 抗体については、従来法が特異度・感度ともに優れていたため、反应用緩衝液のみのマイナー変更であったが改訂法は同様の良好な成績を示した。精製抗原の高純度化やリコンビナント抗原に加えて精製抗原を固相化した MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Sm/ SS-B/ Jo-1 では偽陽性例の頻度、およびグレーゾーンに分類される頻度が少なくなった。改訂型 MESACUP<sup>®</sup>-3 Sm/SS-B/Jo-1 は、従来型の MESACUP<sup>®</sup>-2 テストに比してより特異性の高い抗核抗体測定法として有用と考えられる。

## 3. MCTD に合併する PAH の自然歴および病態の解明と治療

**2-1. MCTD に合併した PAH の自然歴に関する研究 (吉田) :** 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、③ PA 圧の程度による PAH の経過の違いを明らかにするため、分担研究施設において、平成 19 年 9 月から 11 月の 3 ヶ月間に受診した MCTD 患者全例を対象としてアンケート調査を行ない、10 施設より 159 例の回答を得た (過去の調査での既登録 109 例, 新規 50 例)。PAH41 例中 13 例は MCTD の診断後 1 年以内に PAH も診断され、その中 10 例は MCTD と PAH の診断がほぼ同時であった。また、以前の調査で収縮期 PAP40mmHg 未満の PAH20 例中今回 40mmHg 以上となったのは 1 例のみであり、軽症の PAH

は軽症のままで推移する可能性が高いと考えられた。PAH 診断時からの変化では多くの症例で収縮期 PAP の低下を認め、治療に反応している可能性が考えられた。

**2-2. MCTD のステロイド治療方針に関する研究 (三森明夫) :** MCTD のステロイド治療適応の根拠を求めるため、昨年度の 3 施設病歴 91 人に、さらに研究班 5 施設の 86 例を加えた計 178 人 (1761 人年) で治療介入と予後の関係を統計的に検討した。MCTD ではより強い有意差をもって、MCTD 診断時に軽症病態であっても、低用量ステロイド治療 (PSL 5-10mg/d) を行なうことは、無治療に比較して、その後の要治療病態の発生を抑制することが示された。これに対し、SLE では低用量治療によるイベント抑制はみられなかった。

**2-3. 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 (田中) :** 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 P-TEFb を抑制して転写伸張反応を負に制御する。正常人血管平滑筋や心筋で HEXIM1 が発現していることから、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 の P-TEFb 依存性 RNA polymerase II のリン酸化抑制作用と転写因子との直接の相互作用によるその転写因子標的遺伝子の発現制御作用には、中央部の塩基性アミノ酸領域が必要であった。HEXIM1 とその変異体を心筋組織特異的に発現させるトランスジェニックマウスを作成したところ、病理組織学的検討では心筋を含めて現時点では異常所見はなかった。今後、低酸素負荷による肺高血圧モデルなどを作成して解析を進める。

**2-4. MCTD-PAH の発症予測因子 NOS2 遺伝子多型の前向き研究 (原) :** 血管拡張因子である一酸化窒素(NO)は、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い。この NO 産生量の違いに NO 合成酵素である inducible NO synthase (NOS-2) の遺伝子多型が関与することを報告した。本年は発症 5 年以内の MCTD 患者

で 3 年以上の追跡調査を行い、継続的に ET-1 および NO を測定し、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した。多くの症例では、MCTD の治療としてプロスタサイクリン製剤や副腎皮質ステロイド薬が投与されている影響か、NO/ET-1 比は増加していた。一方、CCTTT 繰り返し配列が 18 回と少ない症例では NO/ET-1 比が計時的に低下した。今後、PAH の発症に留意して経過観察を行う。

**2-5. Angiopoietin/PDGF の膠原病性 PAH に対する関与の検討 (岡田) :** Angiopoietin-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、Ang-1 が RA における血管増殖や PAH での病態形成に関与することが推測されている。また PAH では PDGF 受容体の発現増加、PDGF 産生の増加が肺動脈の remodeling に影響し PAH の発症に寄与すると考えられる。MCTD の PAH では Ang-1 が低値を示し、Ang-1 の低下により EC の保護が低下していることが推測された。一方、PDGF は血管の増殖に関与しており一部 PAH でも増加していることが確認できたことは、今後の PDGF 阻害薬による PAH の治療の選択枝として検討する価値があるものと考えられた。

**2-6. 低酸素による PAH 発症機転の解析に関する研究 (桑名) :** 低酸素暴露により誘導される PAH の発症機転を追究するため、低酸素暴露により培養肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す分子を DNA アレイを用いて解析したところ、BMP 受容体である BMPR-IA と BMPR-II が同定された。低酸素暴露による BMP 受容体の発現低下は肺動脈内皮細胞に特異的であり、BMP 受容体の発現抑制は細胞機能に影響を与えた。さらに、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるシンバスタチンは、低酸素暴露による培養肺動脈内皮細胞の BMP 受容体の発現低下を抑制した。低酸素暴露による PAH 発症機序として、BMP 受容体の発現低下による血管内皮細胞の増殖抑制障害が考えられ、シンバスタチンは低酸素による BMP シグナル不全を是正することで、PAH の発症進展予防に有用な可能性が示さ

れた。

**2-7. 膠原病性 PAH における脳性 Na 利尿ペプチド前駆体 N 末端断片 (NT-proBNP) の臨床的意義 (諏訪) :** 心筋細胞内で BNP 前駆体の解離により BNP とともに血中へ分泌される BNP 前駆体 N 末端断片 (NT-proBNP) は、左心機能障害や心不全、肺高血圧症 (PAH) の診断、心不全や心血管イベント、PAH の予後因子としての有用性が示されている。NT-proBNP が膠原病性 PAH の診断および病態把握に有用なことを証明し、さらに PAH 診断に適した境界値を見出した (NT-proBNP(BIOMEDICA)  $\geq$  78pg/ml で感度 95%, 特異度 57% : NT-proBNP(Roche)  $\geq$  722pg/ml で感度 79%, 特異度 61%)。これらの成績は PAH の診断指針への応用が可能と思われる。

**2-8. MCTD における PAH の病態解明と治療法の確立に関する研究 (高崎) :** MCTD 142 例より MCTD 研究班 PAH 診断の手引きを満たす症例を抽出し、その臨床像および治療への反応性および予後をその他の膠原病患者に併発した PAH 例と比較検討した。MCTD では他の疾患に比較して PAH が高率に出現し、MCTD の PAH 症例は他の疾患に比較して予後良好な傾向があった。しかし、MCTD では PAH 自体が直接の死因となり、他疾患では感染症などの他の要因で死亡している傾向があった。ステロイドパルスをはじめとする既存の治療法は MCTD-PAH の予後に影響を与える力は希薄と考えられた。

**2-9. 肺線維症合併膠原病性肺高血圧症患者に対するプロスタサイクリン持続静注療法の効果に関する (京谷) :** PAH を合併した膠原病患者はプロスタサイクリン持続静注療法により顕著な改善がみられるが、しかしなおプロスタサイクリン持続静注療法によっても難治性である症例がみられる。膠原病性 PAH を含む肺動脈性肺高血圧症の生命予後はプロスタサイクリン持続静注治療により 3 年生存率は 74%、8 年生存率も同じく 74%であった。中等度以上の肺線維症を合併しない症例の 3 年生存率は 84% と良好で、8 年生存率も 84%を保っていた。一

方中等度以上の肺線維症を合併していた症例では 2 年生存率が 50%、3 年生存率は 25%しかなかった。プロスタサイクリン持続静注療法は膠原病に伴う PAH の生命予後を画期的に改善するが、肺線維症を合併すると肺高血圧は難治性で生命予後は不良である。

### 3. エビデンスに基づく MCTD の治療ガイドラインの策定 (全員)

MCTD の治療に関する過去 20 年間の文献のシステマティックなレビューによりエビデンスレベルの分類 (レベル I~VI) を行い、これらを元に現時点で最も信頼性の高いと考えられる MCTD の治療法を整備して、エビデンスに基づいた MCTD の治療ガイドラインを作成した。それぞれの治療法にはエビデンスレベルなどから勘案した推奨度 (A~D) を設定した。MCTD の治療ガイドラインとしては現時点で最良のものが作成されたと考えられる。このガイドラインは印刷して全国の主要な膠原病を専門とする医療施設へ配布するとともに、ウェブサイトで公開する予定である。

### D. 考察および結論

MCTD はわが国に多い疾患であり、わが国が中心となって研究を進める責務がある。これまでの調査研究によりわが国では欧米よりも頻度の高い疾患であること、特徴的な臨床所見と抗 U1RNP 抗体とに密接な関連があること、自然歴より SLE, SSc, PM のいずれとも異なる独自の病像と自然経過を有すること、主な死因としての PAH が重要であることが明らかにされてきた。これらの過去の研究班の努力によって、MCTD が独立した疾患概念であることはほぼ確立したと考えてよい。しかし、MCTD の病態形成機序にはなお不明な点が多い。特に MCTD の血清学的マーカーである抗 U1RNP 抗体がいかにして産生され、病態にどのようにかわるかにについてはなお不明である。生命予後の悪い PAH についても発症のメカニズムは不明であり、その治療法については近年プロスタサイクリン製剤やエンドセリン受容体拮抗薬が我国でも適応となったが、その適応や効果には原発



性 PAH との異同を含めてなお多くの問題点が残されている。我々がかかる点を解明し、MCTD のさらなる予後改善のために本研究班で研究を続けてきた。MCTD の PAH は原発性 PAH と異なってステロイドや免疫抑制薬に反応する可能性があり、原発性 PAH とは異なった独自の治療指針を確立する必要性が大きい。

本年度は MCTD の病態形成機序解明と治療法確立のため、1)抗 U1RNP 抗体および抗肺血管内皮細胞抗体などの液性因子の病因的意義、2)MCTD に合併する PAH の病態の解明と治療法の確立、を重点研究課題とし、一定の成果が得られたと考える。プロジェクト研究として、抗 U1RNP 抗体陽性 PAH 患者に対するステロイド療法の前向き研究を立ち上げたが、患者エントリー数がまだ少なく、今後もエントリーを続けたい。これらの成果は、エビデンスを重視し

た MCTD の診療ガイドラインの作成に活かされたものと考えられる。MCTD は当初考えられていたほど予後のよい疾患ではないため、患者の生命予後と QOL 改善は急務といえる。ガイドライン策定により全国での一定レベルの診療が可能となろう。

**E. 健康危険情報**

なし

**F. 研究発表**

「III. 研究成果の刊行に関する一覧表」参照

**G. 知的財産権の出願・当録状況**

なし

## II. 分担研究報告

**抗 U1RNP 抗体陽性膠原病患者の肺動脈性肺高血圧症に対する副腎皮質ステロイド療法の検討  
-多施設共同研究-**

主任研究者： 三森 経世 （京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・教授）

研究協力者： 藤井 隆夫 （京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・講師）

**研究要旨**

班員が所属する臨床 9 施設の共同研究により、抗 U1RNP 抗体陽性肺動脈性肺高血圧症（PAH）患者に対する副腎皮質ステロイドの有用性を明らかにすることを目的とした。前向き研究として現在まで 5 例が登録され、ステロイド治療前に比し、治療 1 ヶ月後で尿酸値が有意に低下したが、自覚症状（Borg Dyspnea Index）、6 分間歩行距離、血中 BNP、および心臓超音波検査により測定された肺動脈圧や心拍出量には差を認めなかった。1 例でステロイド骨粗鬆症による脊椎圧迫骨折を認めた。現時点でエントリー症例数が少なく治療期間も短いため、有用性の判断は困難である。今後エントリー症例を増やすため、他の血管拡張薬や免疫抑制薬の使用制限の検討や心臓超音波検査の標準化が必要である。

**A. 研究目的**

本研究では、抗 U1RNP 抗体陽性 PAH 患者における副腎皮質ステロイド（以下 CS）治療に関するエビデンスを構築することを目的とした。昨年度に作成した研究計画を用い、抗 U1RNP 抗体陽性の膠原病に伴う PAH 患者において、中等量以上の CS により自覚所見（息切れや 6 分間歩行距離）や検査所見（心臓超音波検査）の改善が得られるのかを膠原病を専門とする多施設でプロスペクティブに観察する。

**B. 研究方法**

昨年度の研究計画あるいは平成 17-19 年度の報告書を参照。

**C. 研究結果**

京都大学、国立国際医療センター、東海大学より計 5 例がエントリーされた。男性 1 例、女性 4 例であった（表 1）。3 例が SLE であり NYHA 分類はいずれも II 度であった。3 例（症例 1、3、4）で疾患活動性に対して、2 例（症例 2、5）で PAH に対して CS が開始あるいは増量されていた。なおこれらのエントリー症例はいずれも抗

U1RNP 抗体陽性であるが、抗 SS-A 抗体や抗 Sm 抗体も高頻度に認められた。抗リン脂質抗体陽性は 1 例のみであった（表 2）。

Borg dyspnea index、6 分間歩行距離（6MWD）、血中 BNP 値は中等量以上の CS 使用後もその平均値に有意な変化はなかったが、6MWD は 4 例中 3 例で改善していた（図 1）。また血液検査で尿酸値は有意に低下し、赤沈値、IgG 濃度も低下傾向を認めた（図 2）。さらに、心臓超音波検査では治療前後で有意差は認めなかったものの心拍出量が 2 例で増加していた（図 3）。

総合的な主治医評価として、5 例中 2 例で有効、2 例では判定不能（1 例は観察期間が短すぎる、1 例は原病の活動性が高くシクロホスファミドの追加併用を要した）であった。1 例は無効と判断されボセンタンが使用されていた。一方ステロイド糖尿病の増悪（2 例）、骨粗鬆症による圧迫骨折（1 例）といった副反応を認めた。

**D. 考察**

現在まで、膠原病性肺高血圧症に対して CS や免疫抑制薬を使用し、プロスペクティブに検討した報告はない。本研究を班会議のプロジェクト

ト研究とした意義として、①多施設で検討できること、②エントリーおよび評価基準を統一したプロスペクティブ研究であること、③また膠原病の専門施設で PAH による胸部症状ができる以前の早期 PAH 症例のエントリーができること、などがあげられる。しかし実際に患者エントリーを行って問題点も認められた。第1にCSの効果をみる目的のため、ボセンタンなどの他の血管拡張薬、あるいは膠原病における重篤な内臓障害にはしばしば必要となる免疫抑制薬の併用が許されない。これについてはPAHが重篤な（かつ致命的な）病態であることを考慮し、必要以上にCS単独で治療を行わないようプロトコルに記載されている。また第2に、エントリー症例の大部分で発熱や筋肉痛、多関節痛などの全身症状を有しており、PAHにおける大切な指標である6分間歩行が行えないか、評価が困難な症例があることである。すなわち、急性期には多関節痛のため歩行距離が短く（あるいは全く不能で）、CS増量後に関節症状の改善が見られたため、PAHの活動性とは関係なく歩行距離が伸びる可能性がある。この点については、6分間歩行距離を測定するときに、他の臓器障害を併記することとした。また第3に患者のエントリー医が循環器専門医でないため、心臓超音波の測定項目が一部異なっていた。今後標準化を行う必要がある。

以上から、症例数あるいは十分に検討できるデータの集積が遅れているが、明確なエビデンスを提示するために、今後も少しでも多くの症例をエントリーできるよう班員に働きかける予定である。現在まで、プロスペクティブな検討は全く報告がないので本研究を継続する価値は充分にある。なお肺高血圧症の指標のひとつである尿酸値が低下していたことは注目に値する。今回副作用として重篤な健康被害は認めていないが、中等量以上のCS使用については多くの副作用が予想される。CSの有用性を明確にするためには他の薬剤との比較試験が必要であろう。

田中ら (J Rheumatol 29:282-289, 2002) は12例のSLE患者（うち4例は強皮症の合併あり）において、Ca拮抗薬やPG製剤などの

conventional therapy に反応しない症例に対してCS（シクロホスファミドの併用例あり）を使用した8例を履歴的に検討した。その結果、8例中7例で有効であり、その後の再燃時にも免疫抑制薬がPAHに有効と報告している。このような単施設の研究において一部の症例で有効であったことは認められているものの、ガイドラインに記載されるほどのインパクトを有する症例数ではない。しかし一方ではPAHが必ずしも高頻度に認められないため、単施設では症例数に限界があると考えられる。今後、多施設で症例を集積するのみでなく、PAHの病因に関与する新規血清マーカーも検討し、CSが有用である症例の特徴をより明確にしたいと考えている。

#### E. 結語

抗U1RNP抗体陽性膠原病におけるPAHに対するCSの有用性を明確にするためには、新規血清マーカーも含め、より多くの症例エントリーが必須である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Mimori T, Imura Y, Nakashima R, Yoshifuji H. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathy: an update on clinical and pathophysiological significance. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19(6):523-9.
2. Handa T, Nagai S, Miki S, Ueda S, Yukawa N, Fushimi Y, Ito Y, Ohta K, Mimori T, Mishima M, Izumi T. Incidence of pulmonary hypertension and its clinical relevance in patients with interstitial pneumonias: comparison between idiopathic and collagen vascular disease associated interstitial pneumonias. *Intern Med.* 2007; 46(12):831-7.
3. Hirakata M, Suwa A, Takada T, Sato S, Nagai S, Genth E, Song YW, Mimori T, Targoff IN. Clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA

synthetase. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(4): 1295-303.

4. Tokunaga M, Saito K, Kawabata D, Imura Y, Fujii T, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Iwata S, Azuma T, Mimori T, Tanaka Y. Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(4):470-5.

5. 藤井 隆夫. 膠原病のプライマリ・ケア -早期診断と治療方針- 混合性結合組織病. 膠原病診療の A to Z. 総合臨床 2007; 56: 518-523.

6. 藤井 隆夫. 混合性結合組織病. データで読み解く内科疾患. 総合臨床 2007; 56:681-685.

7. 藤井 隆夫. 診療 controversy-medical decision making のために- 混合性結合組織病に合併する肺高血圧症に対する治療. Bosentan の立場から. 内科 2007; 100: 738-741.

8. 藤井 隆夫、三森 経世. リウマチ・膠原病のいろいろ. 混合性結合組織病. からだの科学. 2008; 256:79-89.

学会発表

1. Takao Fujii, Yoshimasa Fujita, Takeshi Sato, Tsuneyo Mimori, et al. Association between IgG subclasses reactive with U1RNP particles and disease activity in Japanese patients with systemic rheumatic diseases. The 12<sup>th</sup> APLAR Congress Asian Rheumatology. Kuala Lumpur, 2006 年 8 月.

2. Takao Fujii, Guo Shengyu, Tong Xiaopeng, Tsuneyo Mimori et al. Newly identification of autoantibodies against human pulmonary artery endothelial cells in sera from patients with anti-U1RNP antibodies. The 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the American College of Rheumatology. Washington DC, 2006 年 11 月.

H. 知的財産権の出現・登録状況

なし

表 1. エントリー症例のプロファイル

症例	原疾患	NYHA分類	合併症(主要なもの)	CS使用量(mg/日)	
1	SLE	II	ループス腎炎、PAH	15→	35
2	SLE	II	PAH、甲状腺機能低下症	17→	50
3	SLE	II	ループス腎炎、血小板減少症 PAH	20→	42
4	シェーグレン 症候群	II	間質性肺炎、PAH	0→	45
5	強皮症	II	PAH	0→	40

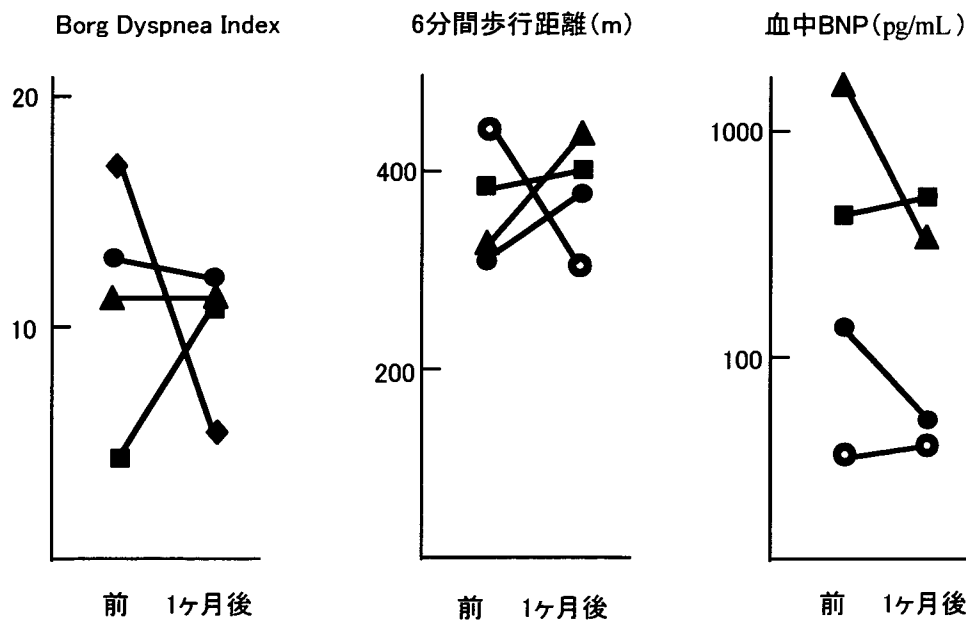
CS, 副腎皮質ステロイド PAH, 肺動脈性肺高血圧症

表 2. エントリー症例の自己抗体と治療

症例	抗U1RNP抗体価 (index)	その他の抗核抗体	抗リン脂質 抗体	併用された治療 (CS以外の主要なもの)
1	111	抗Sm抗体 抗SS-A/Ro抗体	-	ワーファリン、ベラプロスト
2	245	抗Sm抗体 抗SS-A/Ro抗体	-	ベラプロスト
3	60	抗Sm抗体 抗SS-A/Ro抗体	+	シクロスポリン、利尿薬
4	126	抗SS-A/Ro抗体 抗SS-B/La抗体	-	
5	38	抗Scl-70抗体	-	

CS, 副腎皮質ステロイド

図1. 結果1 -自覚症状とBNP-

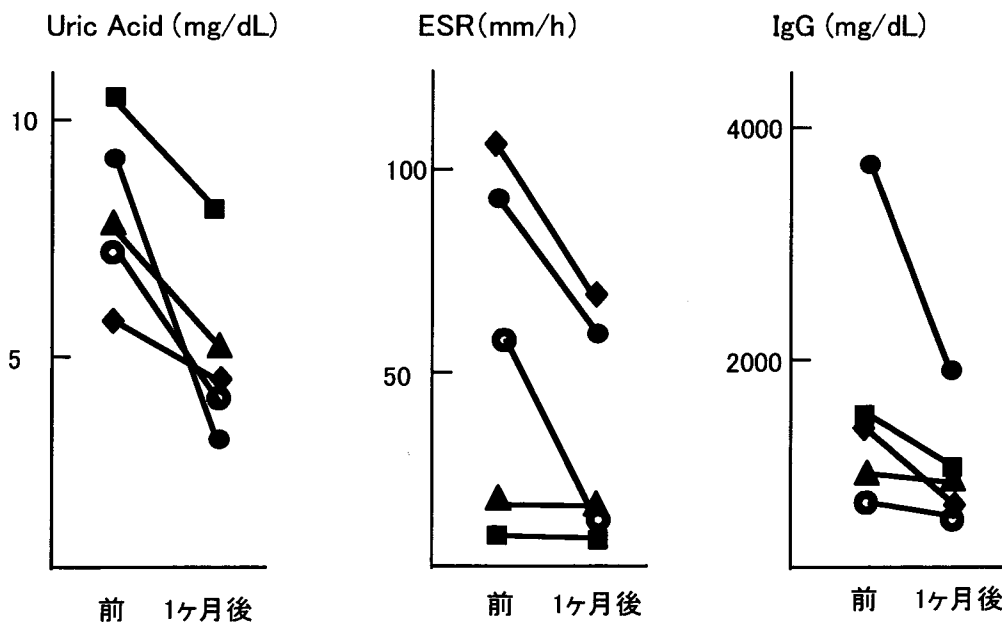


N.S.

各症例でCS使用前後のデータをプロットした。6分間歩行距離は3例で明らかに改善したが、1例では悪化、またここに記載されていない1例はNP-SLEの合併により検査が不可能であった。

NS= not significant

図2. 結果2 -血液検査-



$P < 0.05$

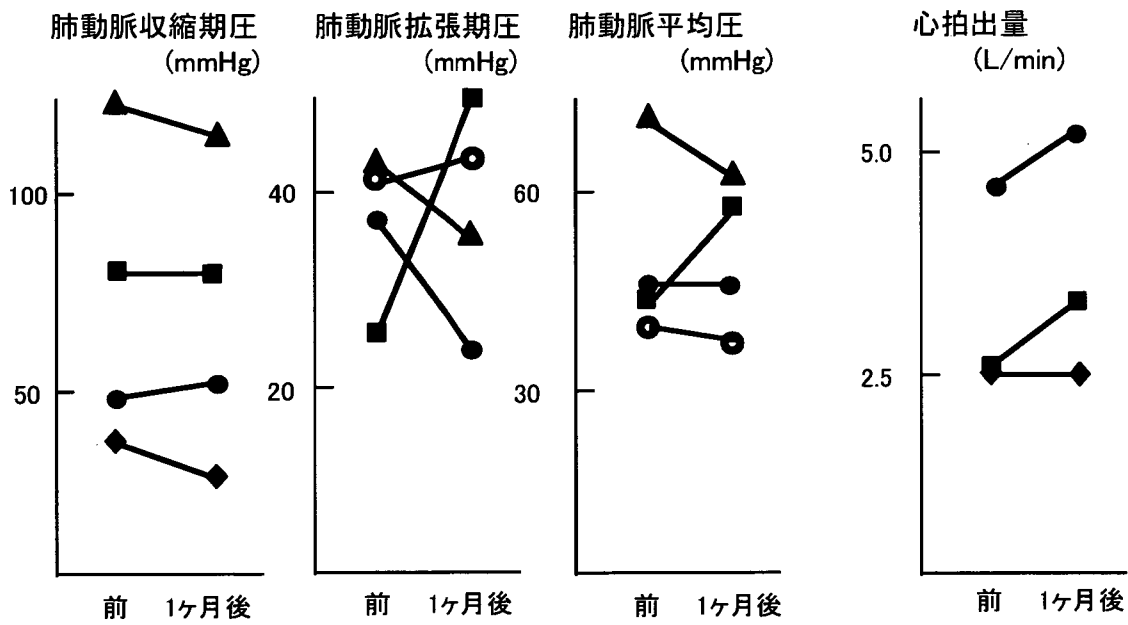
N.S.

N.S.

尿酸値は全例で低下した。赤沈値 (ESR) 亢進例、IgG 高値例ではいずれもCS使用後に改善した。

NS= not significant

図 3. 結果 3 -心臓超音波検査-



N.S.

症例数が少なく有意差は認められなかったが、2例で心拍出量が増加した。



## ループモデルマウス由来の抗 U1RNP モノクローナル抗体に関する研究

分担研究者： 藤井 隆夫 （京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・講師）

研究協力者： 佐藤 毅 （京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学）

### 研究要旨

抗 U1RNP 抗体の病原性を明らかにするため、MRL/*lpr* マウスの脾細胞をもちいて抗 U1RNP 抗体を産生する B 細胞ハイブリドーマ (Hy) を分離・クローニングした。分離された Hy64 が産生する免疫グロブリンは IgM であり、ELISA にて抗 U1RNP 抗体/抗 U1-70K 抗体であると考えられた。また免疫ブロット法 (WB) では、Hy64-IgM は 48kDa > 28kDa > 70kDa 蛋白に反応した。細胞にアポトーシスを誘導したうえで WB を行ってもその反応性は変化せず、apoptotic U1-70K (=43 kDa) に対する抗体とは異なった。さらに ELISA における反応は抗 U1RNP/U1-70K 抗体を含む膠原病患者血清により阻害された。抗 U1RNP/U1-70K 抗体が他の自己抗原と反応することにより生体内で病原性を有する可能性を考慮し、現在 2 次元電気泳動法を用いてその対応抗原を分析中である。

### A. 研究目的

抗 U1RNP 抗体は膠原病患者血清中で高頻度に検出される抗核抗体で、特に MCTD では高力価となる。以前からレイノー現象や肺高血圧症など一部の病態と抗 U1RNP 抗体との関連が示唆されているが、抗 U1RNP 抗体の病原性についてエビデンスはない。一方 MCTD 患者では、U1-70K 蛋白が細胞のアポトーシスにより約 43kDa の蛋白断片となった U1-70K<sup>apopt</sup>により強く反応するために、抗 U1RNP 抗体価が高力価となることが示唆されている。このように U1RNP 分子に対する反応性は多様であり、すべての抗 U1RNP 抗体が病因的意義を有することはないが、一部のサブセットは病原性を持つ可能性はある。

われわれは、抗 U1RNP 抗体（特に抗 U1-70K 抗体）が *in vitro* および *in vivo* において何らかの影響を与えるかを明確にするため、昨年度よりループモデルマウスを用いて抗 U1RNP 抗体モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作成した。本年度はそのモノクローナル抗 U1RNP 抗体の反応性に関して検討した。

### B. 研究方法

抗 U1RNP 抗体陽性の MRL/MP-*Fas*<sup>*lpr/lpr*</sup> (MRL/*lpr*) マウス脾細胞をマウスミエロマ細胞である SP2/0-Ag14 (Ag14) と融合させた。数多くのハイブリドーマ (Hy) が分離されたが、Hy64 と 104 がモノクローナル抗 U1RNP 抗体を産生することが確認された。また限界希釈法でクローン化したところ、Hy64 は IgM を、Hy104 は IgG2b であることが判明している（昨年度までの成績）。今回は U1-70K と反応すると考えられる Hy64-IgM を以下の方法を用いて検討した。

#### 1) 免疫ブロット法 (WB)

マウス Ag14 の細胞抽出物を抗原として用いた。二次抗体はアルカリフォスファターゼ (AP) - 標識抗マウス IgM 抗体を用い（ただしヒト血清を一次抗体とした場合には、AP-標識抗ヒト IgG 抗体）、NBT/BCIP を基質として発色させた。なお一部の実験では培養上清に anisomycin（終濃度=10mg/mL）を加え、4 時間培養を継続してから抗原を抽出して WB を行った。

#### 2) ELISA

抗 U1RNP 抗体 (Mesacup®-2 テスト RNP、MBL 社) および抗 70K、A、C 抗体 (MBL 社) を検出する ELISA を用いた。なお抗 U1-70K/C 抗体を含む患者血清を抑制実験に使用した。

## C. 研究結果

### 1) WB

限界希釈法によりクローン化された Hy64 が産生する免疫グロブリンは IgM であり、ELISA で U1-70K と反応する。しかし昨年度までの検討でその対応抗原は 48kDa 蛋白と考えられ、U1-70K 蛋白の apoptotic form である U1-70K<sup>apopt</sup> (43 kDa) の可能性が否定できなかった。そこで Ag14 を anisomycin によりアポトーシスを誘導し、その細胞抽出物を WB の抗原として用いて検討した。図 1 に示すとおり、抗 U1RNP/U1-70K 抗体陽性患者血清はアポトーシスを誘導する前には U1-70K に、誘導した後の抗原では 43kDa の U1-70K<sup>apopt</sup> に反応したが、Hy64-IgM はアポトーシスの前後で反応性が変化せず、48kDa>28kDa>70kDa>23kDa 蛋白に反応していた。

### 2) ELISA

Hy64-IgM が認識する U1-70K 蛋白上のエピトープとヒト抗 U1-70K 抗体が認識するエピトープとの共通性を調べるため、ELISA を用いて抑制実験を行った (図 2)。健康人血清あるいは抗 U1RNP/U1-C 抗体を含む血清を preincubation した場合には Hy64-IgM の反応性は全く変化しなかったのに対し、抗 U1RNP/U1-70K 抗体を含む血清を用いた場合には、Hy64-IgM の反応性は阻害された。この反応性は total U1RNP と U1-70K を固相化した ELISA プレートでのみ認められ、U1-A 蛋白や U1-C 蛋白を固相化したプレートでは認められなかった。

## D. 考察

昨年度より抗 U1RNP 抗体を産生するハイブリドーマを作成し、Hy64 と Hy104 が得られた。Hy104 は IgG2b であり、RNA-免疫沈降法で U1-RNA を沈降、ELISA で抗 U1-C 抗体であることが確認されている。一方、Hy64 が産生する抗体は IgM であったため、プロテイン A セファロースビーズを用いる免疫沈降法では U1-RNA を沈降せず、ELISA で抗 U1RNP/U1-70K 抗体で

あることが確認された。しかし WB では 70kDa 蛋白よりも 48kDa 蛋白に強く反応した。以上から当初われわれは Hy64 を抗 apoptotic U1-70K 抗体を産生するハイブリドーマと考えていたが、細胞にアポトーシスを誘導したのちも反応性が変化しないこと、また分子量が異なることから否定された。そこで再度 U1-70K との反応性を確認する目的で、抗 U1RNP 抗体のなかでも U1-70K に強く反応する血清、および U1-C 抗体に反応する血清を用いて、抑制実験をおこなった。その結果、抗 U1-70K 抗体でのみ Hy64-IgM の反応が有意に抑制されたことから、Hy64-IgM は U1-70K と反応し、その抗原エピトープはヒト抗 U1RNP/U1-70K 抗体と少なくとも一部は共通すると考えられた。そのエピトープ部位は現時点で不明であるが、現在 U1-70K の蛋白フラグメントを作成し確認中である。

抗 U1-70K<sup>apopt</sup> 抗体の B 細胞エピトープは U1-70K 蛋白の T 細胞エピトープに含まれ、かつ U1RNA の結合部位である 180-205 アミノ酸である可能性が示唆されている。しかしこの部分のペプチドを固相化した ELISA では反応せず、conformational epitope である可能性も示唆されている。さらに SLE や強皮症にくらべて MCTD で抗 U1-70K<sup>apopt</sup> 抗体が高頻度であり、それが抗 U1RNP 抗体高力価陽性と関連するとの報告がある。また抗 U1-70K<sup>apopt</sup> 抗体は疾患活動性とは相関しないが、病初期に出現し、その後抗 intact U1-70K 抗体へと epitope spreading する可能性がある。今回分離したモノクローナル抗体、Hy64-IgM の抗原エピトープとの異同を明確にする必要がある。

## E. 結論

モノクローナル抗 U1RNP 抗体を産生するハイブリドーマ Hy64 を分離した。Hy64 が産生する免疫グロブリンは IgM であり、48kDa>28kDa>70kDa 蛋白に反応し apoptotic U1-70K に対する抗体とは異なった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- 1) Mikiko Tokunaga, Takao Fujii, et al. Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 470-475.
- 2) Kosaku Murakami, Takao Fujii, et al. Successful treatment of a patient with refractory adult Still's disease by tacrolimus. *Mod Rheumatol* 2007; 17(2): 167-170.
- 3) Yoshinaga Ito, Takao Fujii, et al. Severe subcutaneous generalized edema in a patient with dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 2007; 17(2): 171-173.
- 4) 藤井 隆夫. 膠原病のプライマリ・ケア -早期診断と治療方針- 混合性結合組織病. 膠原病診療の A to Z. *総合臨床* 2007; 56: 518-523.
- 5) 藤井 隆夫. 混合性結合組織病. データで読み解く内科疾患. *総合臨床* 2007; 56:681-685.
- 6) 藤井 隆夫. 診療 controversy-medical decision making のために- 混合性結合組織病に合併する肺高血圧症に対する治療. *Bosentan* の立場から. *内科* 2007; 100: 738-741.
- 7) 藤井 隆夫. 全身性リウマチ性疾患における T 細胞ワクチネーション. 自己免疫疾患の免疫療法ととの作用機序. *臨床免疫・アレルギー科*. 2007; 48:471-475.
- 8) 村上 孝作, 藤井 隆夫, 三森 経世. 膠原病を疑ったときの診断の進め方. リウマトイド因子. 抗 CCP 抗体が陽性・陰性の臨床的意義. *medicina* 2008;45:64-67.
- 9) 村上 孝作, 藤井 隆夫. 膠原病の診断、治療開始とフォローの実際. 成人 Still 病. *medicina* 2008;45:100-103.
- 10) 藤井 隆夫, 三森 経世. リウマチ・膠原病のいろいろ. 混合性結合組織病. *からだの科学*. 2008; 256: 79-89.

### 2.学会発表

- 1) 臼井 崇, 藤井 隆夫, 他. 疾患特異的な免疫制御法の可能性. 第 51 回日本リウマチ学会総会、横浜、2007 年 4 月.
- 2) 寺尾 知可史, 藤井 隆夫, 他. リツキシマブ

使用後に *Aeromonas Hydrophila* 敗血症を生じた難治性 SLE の 1 例. 第 51 回日本リウマチ学会総会、横浜、2007 年 4 月.

- 3) 湯川 尚一郎, 藤井 隆夫, 他. TNF 阻害療法中に SLE であっても CRP 免疫異常を認めた関節リウマチの 5 例. 第 51 回日本リウマチ学会総会、横浜、2007 年 4 月.
- 4) 田中 真生, 藤井 隆夫, 他. ホリスタチン関連蛋白 (FRP) /FSTL1 を投与した関節炎マウス関節組織における cDNA アレイ解析. 第 51 回日本リウマチ学会総会、横浜、2007 年 4 月.
- 5) 池田 正治, 藤井 隆夫, 他. エタネルセプト投与中に白血球除去療法を併用し有効であった関節リウマチの 2 例. 第 51 回日本リウマチ学会総会、横浜、2007 年 4 月.
- 6) Naoichiro Yukawa, Takao Fujii, et al. Beneficial effects of intravenous cyclophosphamide pulse therapy and double-filtration plasmapheresis in diffuse alveolar hemorrhage associated with systemic lupus erythematosus. *The Annual European Congress of Rheumatology*. Barcelona, 2008 年 6 月.
- 7) 佐藤 毅, 藤井 隆夫, 他. ループスモデルマウス由来の B 細胞ハイブリドーマが認識する核抗原の検討. 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、2007 年 10 月.
- 8) 湯川 尚一郎, 藤井 隆夫, 他. TNF 阻害療法施行関節リウマチ患者における整形外科手術についての検討. 第 22 回日本臨床リウマチ学会、鹿児島、2007 年 11 月.
- 9) Takeshi Sato, Takao Fujii, et al. Anti-U1RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with active central nervous system involvements in patients with systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *The 71<sup>th</sup> Annual Meeting of the American College of Rheumatology*. Boston, 2007 年 11 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

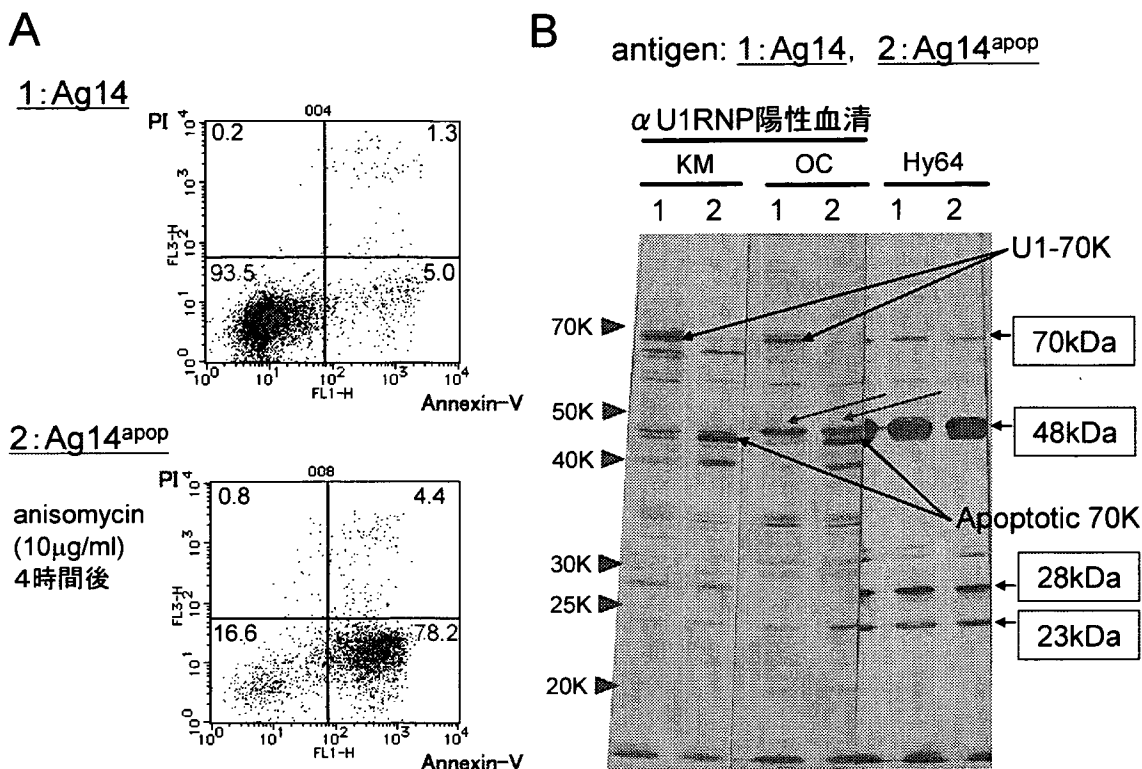


図 1. Hy64-IgM が反応する自己抗原.

マウス Ag14 細胞にアポトーシスを誘導した。anisomycin を加えない場合には Annexin V 陽性細胞はわずかであったが、anisomycin と 4 時間培養した後には Annexin V 陽性細胞が増加しアポトーシスが確認された。

アポトーシスを誘導する前後の細胞をそれぞれ Lysis buffer で溶解し、電気泳動で展開後に WB を行った。SLE 患者血清 KM、OC (ともに抗 U1RNP/U1-70K 抗体陽性) では Ag14 では 70kDa に強いバンドが認められ、Ag14<sup>apop</sup> ではそのバンドがほぼ消失すると同時に 43-45kDa 付近に新たなバンドが出現した。したがってこの後者のバンドが U1-70K<sup>apop</sup> を示すと考えられる。一方、Hy64-IgM では 70kDa に対する反応性もわずかながら確認できるものの 48kDa 付近に強いバンドが認められ、また 28kDa、23kDa にも反応があった。これらは Ag14 と Ag14<sup>apop</sup> との間に差はなく、細胞のアポトーシスにより変化しない自己抗原と考えられる。