

混合性結合組織病(MCTD)に合併した肺動脈性高血圧症(PAH)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内科・教授

研究協力者： 深谷 修作 藤田保健衛生大学医学部内科・講師

研究要旨

MCTDには高率にPAHの合併を認める。また、PAHに由来する徴候を認めず、肺動脈圧(PAP)が低値の症例も存在する。しかし、PAHの発症様式や発症時期、経過は明らかではない。そして、治療効果に関しても不明な点が多い。これらのことを検討するため、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協力の申し出のあった加古川病院において調査を行った。調査はアンケート法により、対象は平成19年9月から11月の3ヶ月間に受診したMCTD患者全例とした。10施設より159例の回答を得た。過去の調査での既登録例は117例中109例の回答があり、新規例は50例であった。発症時期に関しては解析可能な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例中今回の調査で40mmHg以上となったのは1例のみで、その値も43mmHgと比較的低値であった。以前の報告と同様に観察期間を長くしても軽症のPAHは軽症のまま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。

A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)には高率に肺高血圧症(PH)の合併を認める。そして、その多くは肺動脈性肺高血圧症(PAH)と考えられている。以前の合併率調査はPAHの徴候を有する患者だけを認識していた可能性が高く、その合併率は数%と考えられていた。ところが、PAHの徴候の有無にかかわらず心エコー検査を含めて検索すると、膠原病におけるPAHの合併率は9.5%と約2倍となった。これら無症候性のPAH例では、推定収縮期肺動脈圧(sPAP)40mmHg以下が多数であることも判明した。しかし、MCTDに合併するPAHの発症時期・その経過は依然明らかではない。特に、PAHの徴候を認めずsPAPが40mmHg以下の軽症例の経過は興味深い。そこで、①MCTDに合併したPAHの発症様式や時期を明らかにすること、②sPAPの程度によるPAHの経過の違いを明らかにすること、特に無症候性のPAHの経過およびPAH症例の治療による改善の有無を明らかにするこ

とを目的とした。

B. 研究方法

対象：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協力の申し出のあった加古川病院を平成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た。

方法：アンケート法により、質問内容は平成17年度(平成17年12月から平成18年3月)の調査と同様のものとした。具体的にはMCTDの診断年月日、PAHの診断年月日、診断時および直近のsPAP、PAHに由来する徴候、転帰などである。また、今回の調査ではsPAP25mmHg以上30mmHg未満をPAH疑い、30mmHg以上をPAHと定義した。

(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

加古川病院を含む10施設から159例の回答を得た。今までの調査で回答を得ていた117例では109例の回答があり、PAH (sPAP30mmHg以上) 29例は全例、PAH 疑い (sPAP25mmHg以上30mmHg未満) 10例も全例、PAH なし例では78例中70例であった。また、今回の調査で新たに50例の回答があり、PAH15例、PAH 疑い11例が含まれていた。

今回調査を含む複数回の調査で回答を得た109例におけるPAH合併状況の変化は、PAH例29例中4例が死亡し、2例が転院していた。PAH 疑い例10例中7例にPAHが確認された。また、PAH なし例70例中11例 (この中4例は以前からPAHを合併していたことが判明) にPAHが確認された。この中では死亡が1例、転院が2例であった。さらに、この70例中5例にPAH 疑い症例であった (表)。

MCTDに合併したPAHの診断時期であるが、MCTD診断時にはPAHも診断されている症例からMCTD診断約40年後の症例まで幅広く分布していた。しかし、ほとんどの症例はMCTDの診断10年後までにPAHを発症していた。中でも注目すべきは、41例中13例はMCTDの診断後1年以内にPAHも診断されていた。この中10例はMCTDの診断とPAHの診断がほぼ同時 (3ヶ月以内) であった。また、MCTD診断後15年以上経過した後PAHが診断された症例も数例存在し、これらはsPAPが40mmHg以下の軽症例であった (図1)。PAH診断時にsPAP40mmHg未満のPAH20例中今回の調査でsPAPが40mmHg以上となったのは1例のみで、その値も43mmHgと比較的低値であった。また、PAH診断時より最終調査時にsPAPが低下している症例も多数認められた (図2)。

D. 考察

以前の調査でPAHがなかった66例中7例でPAHが確認され、5例でsPAPが25mmHg以上

となっていた。WHOが提唱しているように、強皮症スペクトラムの疾患では最低1年に1回は心エコー検査によるPAHのスクリーニングが必要と考えられた。また、以前の調査でsPAPが25mmHg以上30mmHg未満であったPAH 疑い例10例では今回の調査では7例と高率にsPAPが30mmHg以上になっていた、このような症例では他の症例よりもPAHに関して、きめ細かい経過観察が必要と考えられた。なお、今回の調査で5例の死亡が確認されたが、この5例はすべてPAH合併例であり、PAHが死因にどの程度関与したかは不明であるが、PAH合併例の予後が不良であることの反映とも考えられた。

MCTDに合併するPAHの診断はMCTDの診断時から40年後まで幅広く分布していたが、その32%がMCTDの診断後1年以内に、24%がMCTDの診断とほぼ同時にPAHも診断されていたことが注目される。すなわち、MCTDに合併するPAHの約3分の1はMCTDの診断時から存在しており、MCTD診断時には心エコー検査によるPAHのスクリーニングを行う必要があることを指し示しているものと考えられた。これらの症例ではMCTDの活動性も認める場合が多いと考えられ、ステロイド薬を含めた免疫抑制療法が行われる可能性が高い。これらの症例の経過を追うことでMCTD患者に合併したPAHに対する免疫抑制療法の有用性を検討できるかもしれない。また、MCTDの診断1年以降もPAHの診断例は一定の頻度で存在し、定期的なPAHのスクリーニングも重要と考えられた。

PAHの経過であるが、PAH診断時のsPAPが40mmHg未満であった20例中今回の調査で40mmHg以上となっていたのは1例のみで、その値も43mmHgと比較的低値であった。これは以前の報告と同様、観察期間を長くしても、sPAPが40mmHg以下の症例ではPAHの増悪を認めることは少なく、軽症のまま推移する可能性が高いと考えられた。また、PAHの診断時に比し、今回の調査時にsPAPの低下を認める症例も存在し、ある程度治療可能なPAH例の存在

することが示された。

最後に今回の調査の問題点にも触れておきたい。第一には、現行の調査方法では前回の調査から今回の調査までの間に MCTD を発症しかつその間に死亡した、きわめて生命予後不良な症例が含まれていない。これらの症例が重篤な PAH を合併していた可能性もあることである。第二には、今回の調査では sPAP30mmHg 以上を PAH と定義したが、全くの無症候のものを約半数含む 30mmHg の数値が適当か否かの検討の必要性も考えられる。

E. 結論

MCTD に合併する PAH に関してアンケート法による本研究班内の継続調査を行い、新規例 50 例を含む 159 例の回答を得た。複数回の調査が可能であった PAH 例 47 例中 5 例が死亡していた。PAH 合併例の 32% が MCTD の診断 1 年以内に PAH も診断されており、MCTD ではその診断時から PAH の合併に注意する必要がある。これらの PAH 患者を継続的に調査することにより、免疫抑制療法の有用性なども検討でき

る可能性がある。PAH の治療が奏功し、sPAP が低下している可能性のある症例も存在した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

深谷修作、各種疾患領域におけるエポプロステノール処方の違い 膠原病の立場から. *Progress in Medicine*, 27 巻 2 号, 543-546, 2007.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

表 PAH合併状況の変化

既登録例：117例（回答109例）	新規登録例
・ PAH：29例（回答29例） 死亡4例、転院2例	・ PAH：15例
・ PAH疑い：10例（回答10例） PAH：7例 PAH疑い：3例	・ PAH疑い：11例
・ PAHなし：78例（回答70例） PAH：11例 （4例はPAHの以前からの存在が判明） 死亡1例、転院2例 PAH疑い：5例 PAHなし：54例 回答なし：8例	・ PAHなし：24例
	合計
	登録例：167例
	死亡5例、転院4例
	・ PAH：62例
	死亡5例、転院4例
	・ PAH疑い：19例
	・ PAHなし：86例

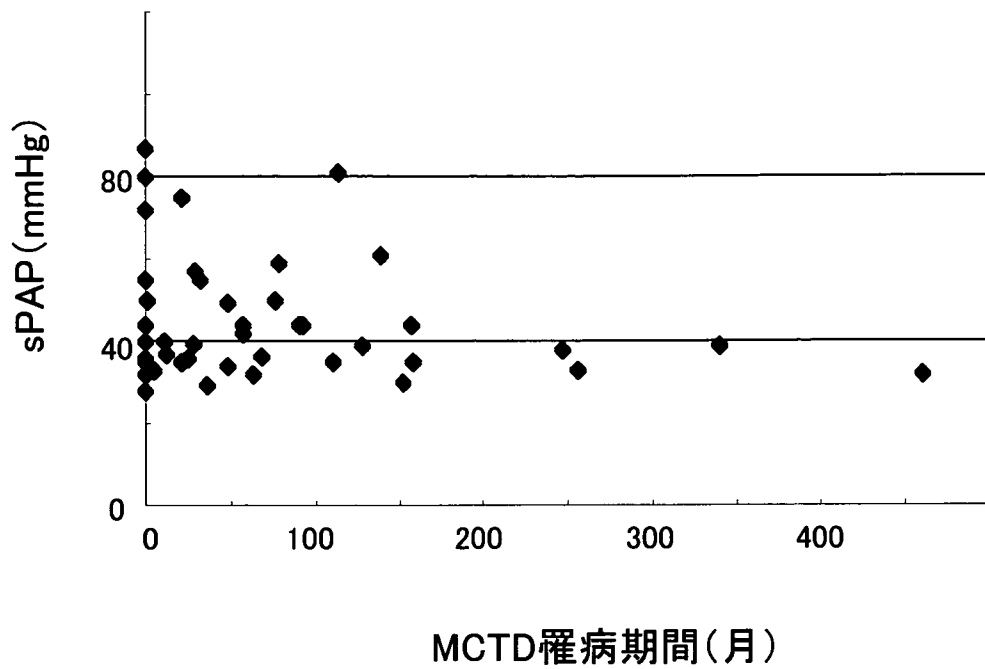


図1 PAHの診断時期と推定収縮期肺動脈圧 (sPAP)

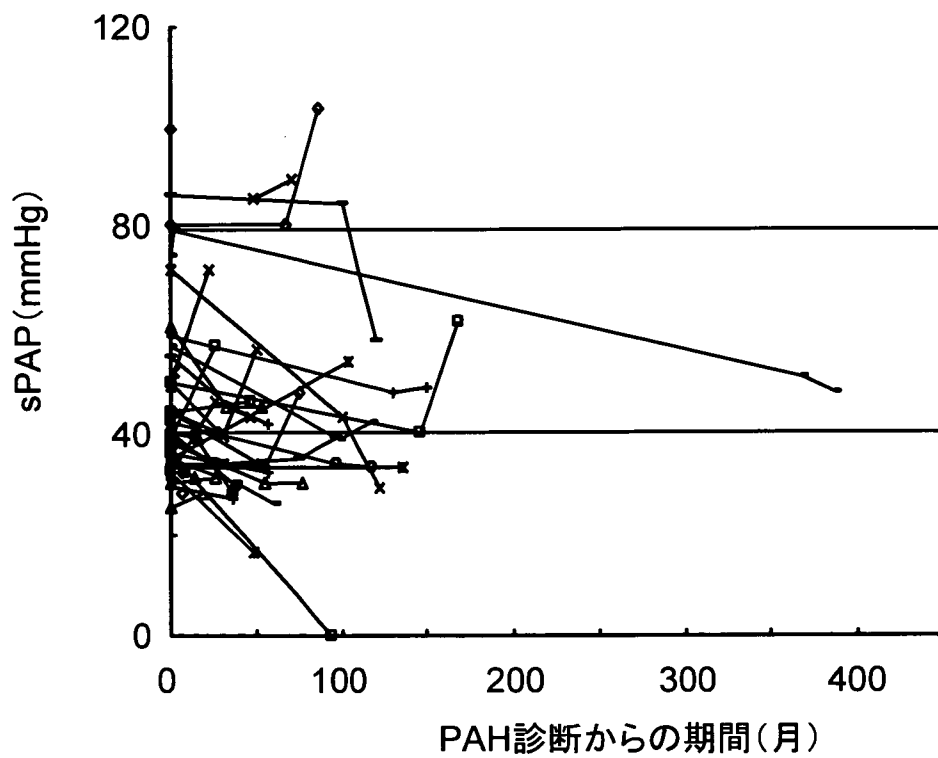


図2 推定収縮期肺動脈圧 (sPAP) の推移

MCTD のステロイド治療方針に関する研究

分担研究者： 三森明夫（国立国際医療センター膠原病科・第一病棟部長）

研究協力者： 高橋裕子（同・臨床指導医）、溝上哲也（同センター研究所・疫学統計研究部長）

原まさ子（東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター・教授）、

三村俊英（埼玉医大リウマチ膠原病科・教授）、

高崎芳成（順天堂大学膠原病内科・教授）

研究要旨

MCTD のステロイド治療適応は、病態によって不明確な点がある。そこで治療方針の根拠を求め、治療介入と予後の関係を統計的に検討した。昨年度、当科を含む3施設病歴91人の全経過につき、ステロイド適応のありうる病態をイベントと定義し、その時系列をデータベース化し、統計ソフト Stata で解析した。今回その結果を、研究班5施設の86例を加えた計178人（1761人年）で追試し、より強い有意差をもって確認された：MCTD 診断時、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。同時に分析した自施設 SLE では、低用量治療によるイベント抑制はみられないので、MCTD における初期低用量ステロイドの利点は、自明なことではない。

A. 研究目的

MCTD の適正ステロイド治療方針を求める。MCTD の病態は長期に反復するため、治療介入が経過全体に及ぼす影響の「前向き評価」は困難である。そこで病歴から履歴を分析する方法をとった。

昨年の本会議では、3施設の全病歴調査91例の結果を報告した：すなわちステロイド治療適応がありうる MCTD 病態を「イベント」と呼ぶと、診断時のステロイド治療介入は、低用量でもその後のイベントを抑制する、病初期の再発イベントの有無が、その後の再発有無と相関しない、8-10 病年以後の再発イベントが稀であること。今回、他施設の症例を加え、これらの結果を追試することを企画した。

B. 研究方法

MCTD イベント とステロイド介入を定義したアンケート調査を行ない、本研究班5施設（50音順）の方々（敬称略）：北里大（岡田純）、京都大（藤井隆夫）、慶応（桑名正隆）、東大（川

畑仁人）、藤田保健衛生大（吉田俊治）の協力をいただき、時系列解析可能な86例（823人年）を得た。しかし、この集団のみの解析では、昨年と矛盾しない傾向は得たものの、統計的有意差がなかった。施設別の「再発イベント 総数 / 総観察人年」に20倍の開きがあり（ $15/112 = 0.13$ - $1/144 = 0.007$ ）抽出症例の偏りが推定されたこと、および観察期間 ≤ 2 年が17例と比較的多く、統計検出力が不足したためと考えられた。

そこで、昨年症例と合わせた178人（1761人年）を解析した。MCTD イベント・ステロイド治療介入時系列表を作成し、統計ソフト Stata を用いた。

（倫理面への配慮）

レトロスペクティブな病歴分析であり、調査票は完全匿名化されている。

C. 研究結果

時系列追跡の起点を、MCTD 診断時（主治医または記載事項による認定）とした。レイノー

症状などの前駆症状や、強皮症のみの記載時を起点とせず、全経過を通じ、強皮症症状しか読み取れない症例は除外した。おもに強皮症に関連している MCTD 慢性病態、および慢性関節炎は、イベントの定義に含めていない。

<初期治療が、その後の MCTD 経過に与える影響>

診断時すなわち起点には、SLE 所見か筋炎所見のいずれかがあり、ステロイド治療介入は、低用量 32 人 (プレドニゾロン/PSL 相当 15mg/d 4 人、5-10mg/d 28 人)、中等量 (PSL 相当 20mg/d) 以上 68 人、無治療 78 人だった。

「MCTD 全般イベントなし」Kaplan-Meier (K-M) 曲線は、診断時の治療介入で分類したとき、無治療群または中等量以上群に比べ、低用量群において有意な低イベント率を示した (図 1 : Log-rank 検定、 $p = 0.0047$; 昨年度 91 例の解析では $p=0.018$)。「MCTD-SLE 病態イベントなし」についても同様だった (図 2 : $p = 0.0094$; 昨年度 91 例では 0.038)。すなわち昨年度の結果が検証された。

中等量 PSL が使用された群では、治療適応の明確な病態があったと考えられ、低用量群と無治療群の病態はともに、治療適応が不明確だったと考えられる。

診断時に低用量ステロイドが使われた群では、K-M 確率 70%で、以後の全経過を通じ、MCTD イベントをおこさないと算定された。これと異なり、無治療群は、高率にイベントを生じ、生じた第 1 回イベントに対する治療介入の平均用量は、PSL 30 ± 21 mg/d ($n = 45$; PSL 0mg/d の症例も含む)だった。すなわち診断時に比べ、ステロイド適応が明確な病態を生じたと考えられる。これが治療された後の再々発の速度は、中等量群の再々発速度と同様であった (図 3)。

MCTD の筋炎または間質性肺炎が、再発・後発しない K-M 確率は、低用量群では 90%であり、無治療群の 72%よりも高い傾向を示した (図 4)。

<MCTD イベントの再発頻度 (図 5) >

自施設 SLE 154 例調査において、初期 5 年間の再発頻度が高い症例は、その後も高い頻度で再発することがみられ、再発イベントが 20 年近くまで初期 5 年間と類似した頻度で分布していることが知られた。

これは反復性の事象一般で予想されることであるが、MCTD では、初期 5 年間の再発有無は、その後の再発速度に影響していないと算定された。

MCTD 筋炎・間質性肺炎は、K-M 曲線上、8-10 年以後に発生する率は、稀と算定された (図 4)。

SLE 病態・髄膜炎の再発・後発は、10 病年以後も速度が低下しなかった (図 2)。MCTD/SLE 病態について「10 年以後の頻度」は、平均観察 9.9 年 \pm 8 年の本調査法では、正確に評価できない。

D. 考察

MCTD 治療において、軽症病態へのステロイド薬の適応は明確でなく、実際、診断時に無治療または低用量が選択されていることが、本病歴調査から知られた。どちらの選択がよいかという問題に、前向き比較試験で答えようとすることは、MCTD の希少性、病態の不均一性、答えを得るまでの年数の長さのために、ほぼ不可能である。

レトロスペクティブかつ病歴原本を参照しにくい多施設調査という制約の下でも、MCTD イベントの時系列と治療介入の関係をみる、という本調査の方法は、結果に再現性がみられたので、有用と思われた。すなわち、MCTD 診断時に低用量ステロイドを使用することが、無治療の場合と比較して、その後の MCTD イベントを抑制する、という昨年度の結果 (3 施設 91 例) は、症例数を増やした今回 (計 8 施設 178 例) の結果で、統計的により低い危険率 (p 値) に基づいて、再確認された。

また病初期の再発頻度が、20 病年にわたり再発速度に影響する SLE と異なり、MCTD では病初期の再発が、その後の再々発に関係していないことが、統計的に示された。さらに腎症のな

い SLE に、20 年以上にわたりほぼ一定速度で腎症が遷発することを昨年示した。したがって、MCTD の SLE 病態は SLE と異なる、すなわち MCTD は軽症 SLE を合併した重複症候群ではない、ということが、本調査でも示唆された。

E. 結論

MCTD 診断時、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、という利点がありうる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

国内

1. 高橋裕子、森口正人、住永佳久、長汐千秋、狩野俊和、鈴木暁岳、国松淳和、浅尾りん、山下裕之、伊藤健司、三森明夫 : Arterial mediolysis の一例. 日臨免会誌 30(3):193-197, 2007.

海外

1. Nagatani K, Itoh K, Nakajima K, Kuroki H, Katsuragawa Y, Mochizuki, M Aotsuka S, Mimori A: Rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes express BCMA and are stimulated by APRIL. Arthritis Rheum 56(11):3554-3563, 2007.

2. Nakajima K, Itoh K, Nagatani K, Okawa M, Fujii T, Kuroki H, Katsuragawa Y, Aotsuka S, Mimori A: Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 36:365-372, 2007.

3. Okawa-Takatsuji M, Nagatani K, Nakajima K, Itoh K, Kano T, Nagashio C, Takahashi Y, Aotsuka S, Mimori A: Recruitment of immature neutrophils in peripheral blood following leukocytapheresis therapy for rheumatoid arthritis. J Clin Apheresis 22:323-329, 2007

4. Soejima M, Sugiura T, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Katsumata Y, Takagi K, Nakajima A, Mitamura T, Mimori A, Hara M, and Kamatani N: Association of the diplotype configuration at the

N-acetyltransferase 2 gene with adverse events with co-trioxazole in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther 9(2): R23, 2007

2. 学会発表

国内

1. 高橋裕子、国松淳和、浅尾りん、山下裕之、鈴木暁岳、伊藤健司、三森明夫 : 高安病に伴った難治性反復性多関節炎の 1 例. 第 542 回内科学会関東地方会 東京, 2 月, 2007

2. 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 : TNF 遮断治療中の関節リウマチ患者における非定型抗酸菌症. 第 51 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2007 年 4 月

3. 国松淳和、伊藤健司、浅尾りん、高橋裕子、山下裕之、鈴木暁岳、三森明夫 : リウマチ性多発筋痛症と繊維筋痛症における脳血流低下所見. 第 51 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2007 年 4 月

4. 国松淳和、伊藤健司、浅尾りん、高橋裕子、山下裕之、鈴木暁岳、三森明夫 : 不明熱の疾患スペクトラムの再評価. 第 51 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2007 年 4 月

5. 山下裕之、浅尾りん、国松淳和、高橋裕子、鈴木暁岳、伊藤健司、三森明夫 : 遺伝背景が推定された自己免疫性 TTP 合併シェーグレン症候群の 1 例. 第 51 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2007 年 4 月

6. 山下裕之、浅尾りん、国松淳和、高橋裕子、鈴木暁岳、伊藤健司、三森明夫 : 抗 TNF 抗体治療中の関節リウマチ 1 例に生じた、ニューモシステイス肺炎の異例な病像. 第 51 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2007 年 4 月

7. 鈴木暁岳、山下裕之、浅尾りん、国松淳和、高橋裕子、伊藤健司、三森明夫 : 抗 CD20 抗体とシクロフォスファミドパルス療法 (IVCY) により治療に成功した SLE による反応性難治性血球貪食症候群の一例. 第 51 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2007 年 4 月

8. 高橋裕子、杉山温人、狩野俊和、鈴木暁岳、

國松淳和、浅尾りん、山下裕之、吉田佳宏、伊藤健司、三村俊英、三森明夫：顕微鏡的多発動脈炎におけるシクロフォスファミドの適応（第2報）第51回日本リウマチ学会総会，横浜，2007年4月

9. 高橋裕子，鈴木暁岳，國松淳和，山下裕之，浅尾りん，狩野俊和，伊藤健司，三森明夫：ループス腎炎の予後決定因子，病歴データベースによる検討 第51回日本リウマチ学会総会，横浜，2007年4月

10. 柳井敦，高橋裕子，山下裕之，鈴木暁岳，伊藤健司，三森明夫：シクロフォスファミドパルス療法（IVCY）により軽快したSLEによる反応性難治性血球貪食症候群の一例 第18回日本リウマチ学会関東支部会，横浜，12月，2007

11. 高橋裕子，柳井敦，山下裕之，鈴木暁岳，伊藤健司，三森明夫：成人発症Still病による髄膜炎の一例 第18回日本リウマチ学会関東支部会，横浜，12月，2007

12. 柳井敦，高橋裕子，山下裕之，鈴木暁岳，伊藤健司，三森明夫：成人発症Still病に合併した眼瞼炎の一例 第551回内科学会関東地方会，東京，2月2008年

海外

1. Takahashi Y, Suzuki A, Kunimatsu J, Yamashita H, Asao R, Kano T, Itoh K, Mimori A: Prognostic factors of lupus nephritis other than renal pathology. 75th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Boston, November, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

図1 MCTD 全般 event-free 曲線(178人)

<MCTD 診断/発症時の 初期治療量による分類>

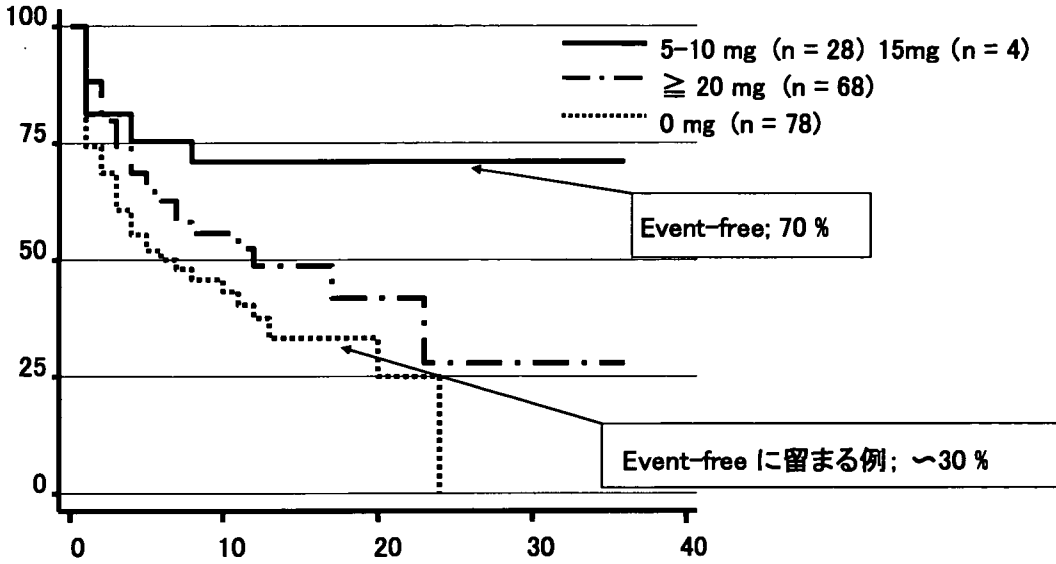


図2 MCTD SLE病態 event-free 曲線(178人)

<MCTD 診断(発症)時の 初期治療量による分類>

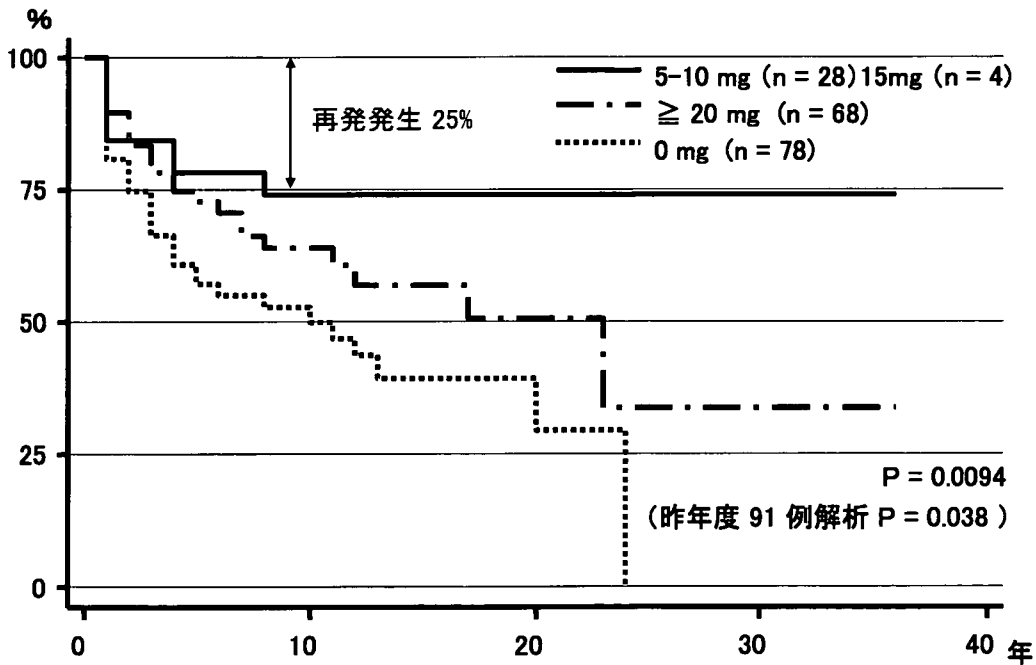


図3 第2再燃なし (2nd event-free) 率(178人)

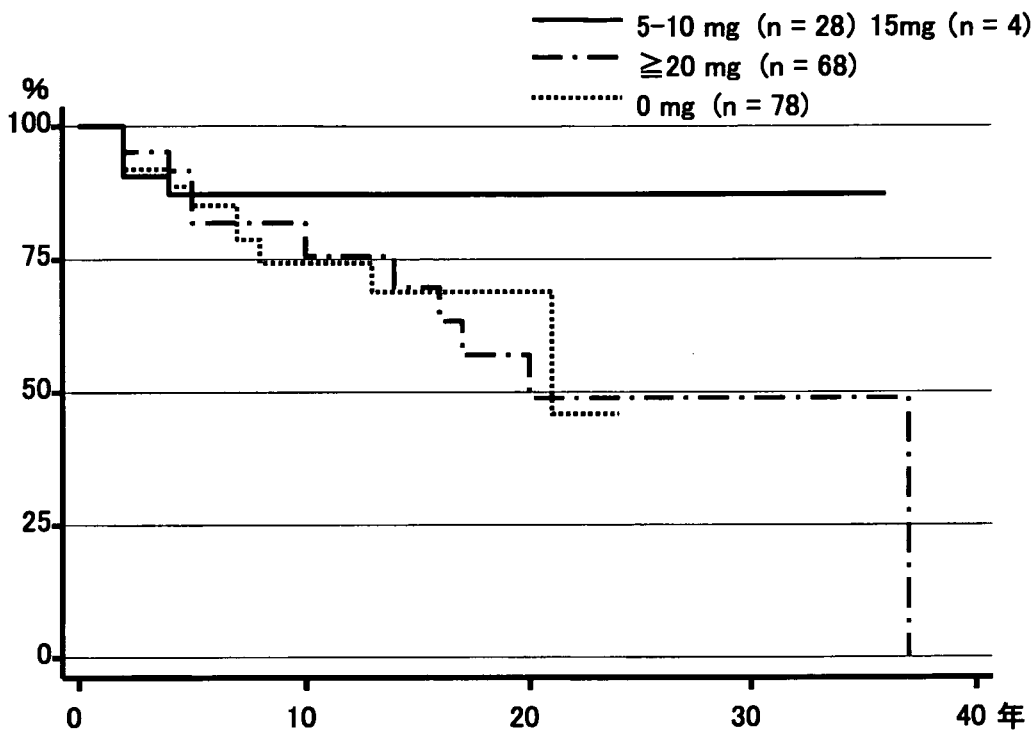


図4 MCTD / 筋炎・IP-event free 曲線(178人)

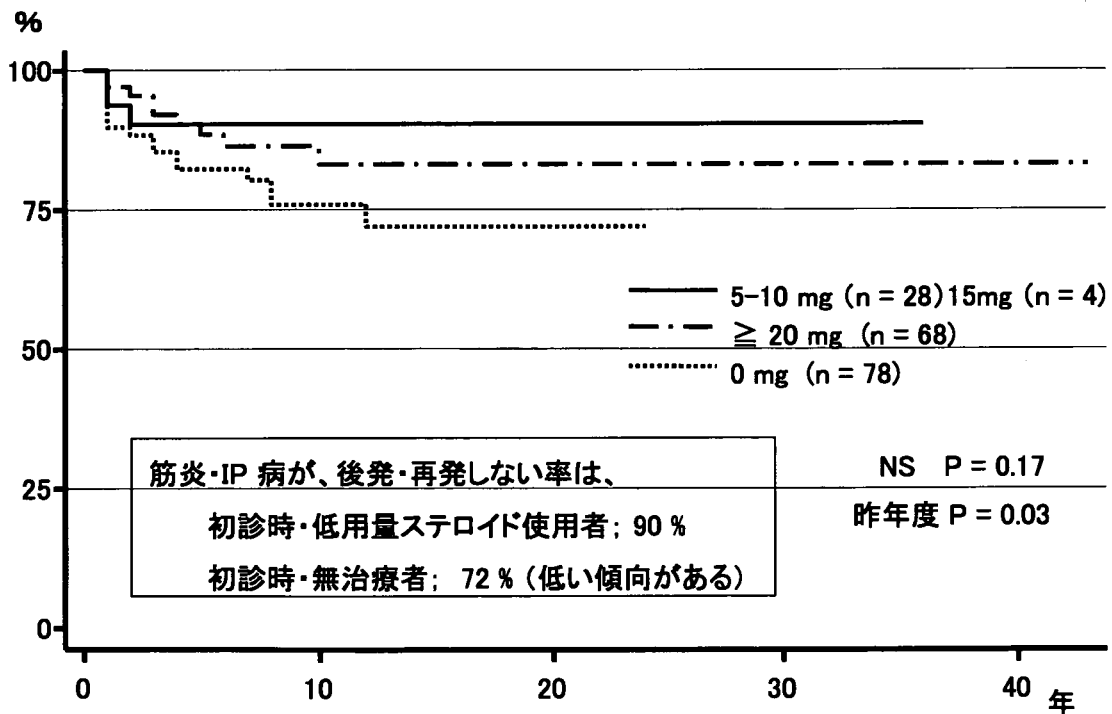
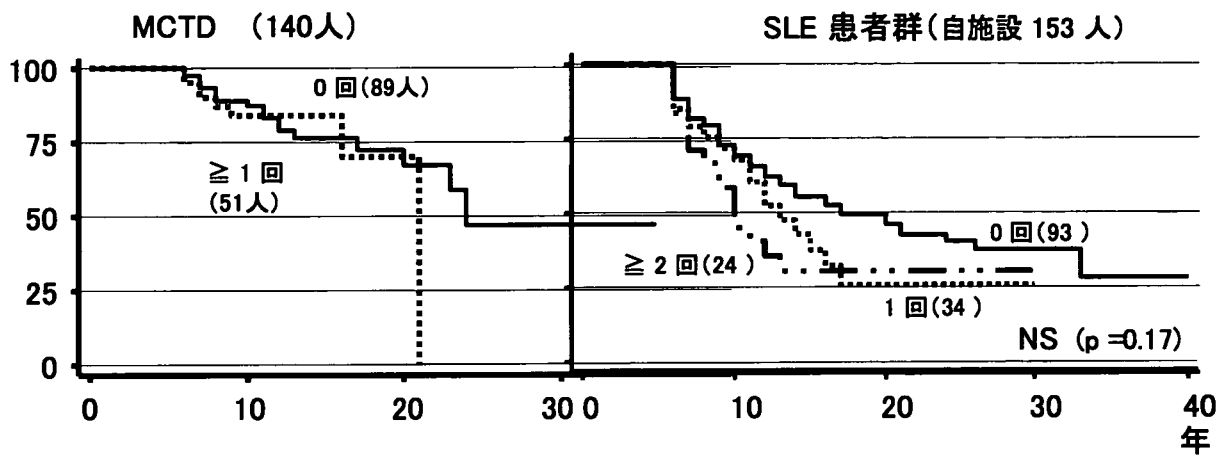


図5

5年以後の再発 event free 曲線



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(平成 19 年度)

分担研究者： 田中廣壽 東京大学医科学研究所・准教授
研究協力者： 吉川賢忠 東京大学医科学研究所・助教
清水宣明 東京大学医科学研究所・本学術振興会特別研究員
佐野元昭 慶応義塾大学医学部再生医学教室・講師
福田恵一 慶応義塾大学医学部再生医学教室・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）とそれに合併する右心肥大の発症や治療法開発における 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 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。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。

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。とくに、肺血管抵抗の増大と低酸素血症による右心負荷の増大は右心肥大、肺性心を招来し、予後をさらに悪化させる。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, 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 と右心肥大の発症や治療法開発における 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。

B. 研究方法

- 1) 内因性 HEXIM1 発現量を操作するべく、Cre-loxP で制御可能な HEXIM1 siRNA 発現アデノウイルスの系を樹立。
- 2) 心筋特異的に HEXIM1 を発現するトランスジェニックマウスを作成。その際、野生型 HEXIM1 のみならず、P-TEFb との結合活性を欠いた変異 HEXIM1 発現マウスをも作成。
- 3) 低酸素負荷肺高血圧モデルにおいて、右室、肺動脈などの病理学的変化ならびに心機能を解析。

C. 研究結果

- 1) loxP サイトを有する HEXIM1、HEXIM1 siRNA 発現アデノウイルスを作成した。両者を Cre 発現アデノウイルスとともに COS7 細胞、ヒト冠状動脈由来血管平滑筋細胞、に感染させ、HEXIM1 の発現量をウエスタンブロットで解析した結果、HEXIM1 タンパク発現量は各々増加、減少していた（図 1）。以上から、これらのアデノウイルスは各組織特異的プロモーターでドライブされる

Cre recombinase 発現アデノウイルスと共感染させることにより HEXIM1 発現量とその下流の遺伝子発現ならびに生理機能との関連を探索する有用なツールとなりうる事が確認された。

2) 野生型 HEXIM1 は、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の少なくとも二つの機構で遺伝子の発現を制御する。心血管系における HEXIM1 のはたらきを詳細に理解するには、したがって、両作用を分離可能な解析系が必要なことは自明である。今回、培養細胞を用いた実験により、HEXIM1 の中央部に存在する塩基性アミノ酸に富んだ領域がこれらのいずれの作用にも必要であり、前半部分はとくに P-TEFb 依存性経路に必須であることがわかった。また、かかる領域をすべて欠失させると HEXIM1 の遺伝子発現調節機能はすべて消失することがわかった (図 2)。そこで、これらの変異体を含め、HEXIM1 を各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。さらに、これらの loxP-HEXIM1 (野生型、各種変異体) トランスジェニックマウスと MHC-Cre トランスジェニックマウスを交配させ、心筋選択的に HEXIM1 を内因性 HEXIM1 の 4-5 倍高発現するマウスの樹立に成功した。かかるトランスジェニックマウスはいずれも正常に生まれ、通常の飼育環境下においては成長速度、体重、など、コントロールのマウスとの間には明らかな違いは認められなかった。16 週で屠殺して病理組織学的に検討したが、心筋を含めて現時点では異常所見はなかった。

3) マウスを酸素分圧 5% の低酸素環境下で一定期間飼育して肺高血圧を惹起させるべき基礎検討を行った。3 週間後の心臓超音波、病理学的検討では変化は軽微にとどまるため条件決りを再度行っている。

D 考察ならびに E. 結論

HEXIM1 の生体機能解析のため siRNA 発現系、トランスジェニックマウスを開発した。当初、HEXIM1 遺伝子破壊マウスが著明な左室肥大を伴って胎生期に死亡することから、HEXIM1 トラ

ンスジェニックマウスでは心室壁はむしろ非薄化することが予想されたが、実際のマウスでは予想を覆す結果となった。かかる結果は生体内においては RNA polymerase II のリン酸化状態は HEXIM1 の作用にカウンターする装置などによって巧妙に制御されている可能性を示唆する。したがって、今後、HEXIM1 のみならずその機能を負に制御する生体装置を明らかにすることで MCTD などにおける肺高血圧や右心肥大の分子機構解明のみならず新規治療法開発の方向性も明確になる可能性がある。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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, Taegtmeyer 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) Ohnuma K, Uchiyama M, Yamochi T, Nishibashi K, Hosono O, Takahashi N, Kina S, Tanaka H, Lin X, Dang NH, Morimoto C. Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1. **J Biol Chem.**

2007;282(13):10117-10131

5) Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, Morimoto C. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. **J Biol Chem.** 2007;282(19):14073-14078

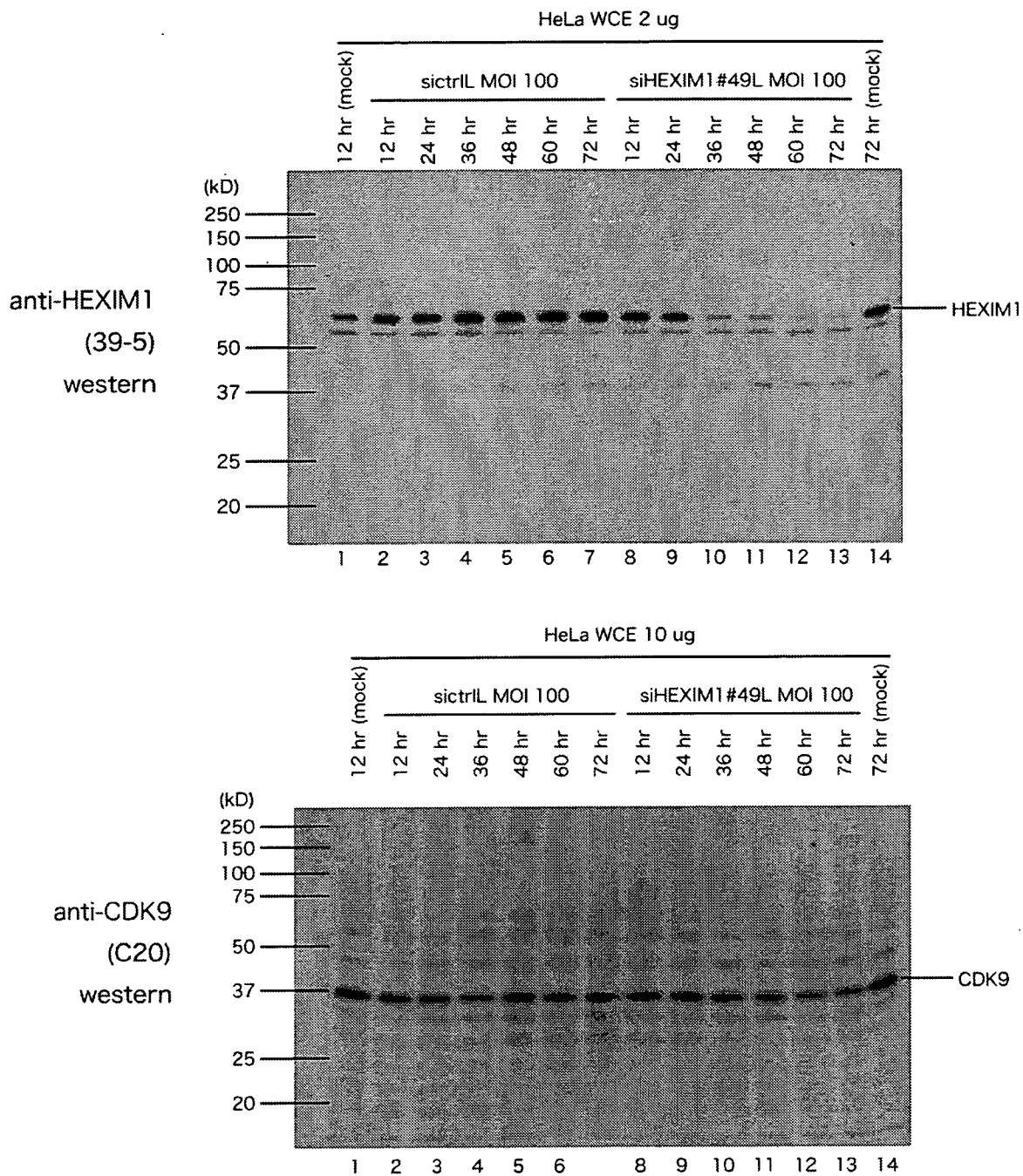
6) Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, Shirakawa K, Endo J, Katayama T, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Hattori F, Tanaka H, Fukuda K (equal last authors). Intramolecular

control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of PGC-1alpha. **J Biol Chem.** 2007;282(35):25970-25980.

2. 学会発表
とくになし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
とくになし。

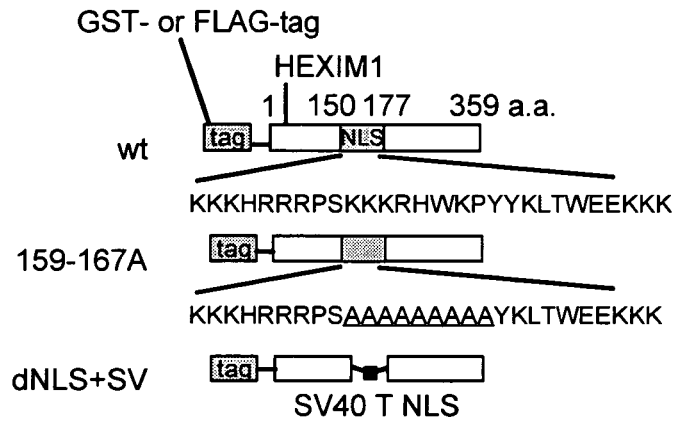
図1 HEXIM1 siRNAによる内因性HEXIM1タンパク量の変化



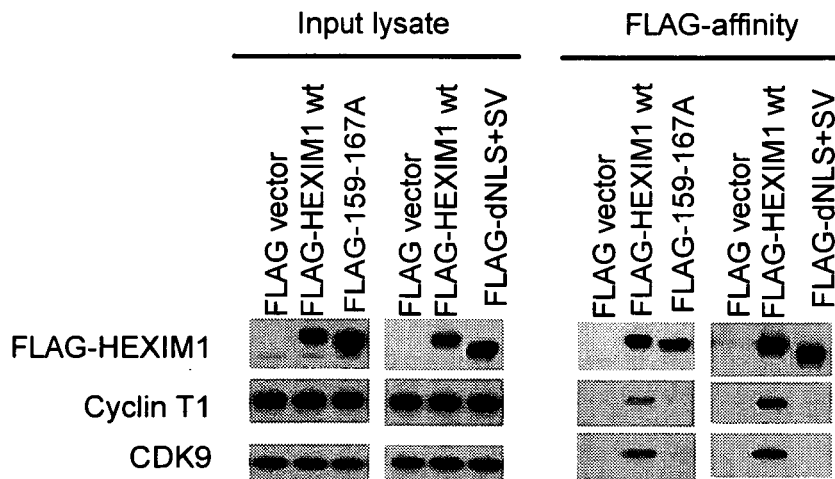
HeLa細胞にHEXIM1 siRNA発現アデノウイルスを感染させ、内因性HEXIM1タンパク量の経時的变化をウエスタンブロット法で解析した。下段はコントロールのCDK9のタンパク発現量。

図2 HEXIM1の機能ドメインの解析

A HEXIM1と変異体の発現プラスミドの構造



B HEXIM1とその変異体とP-TEFb構成成分であるCyclin T1、CDK9との結合



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)

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

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) の繰り返し回数と同定

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。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。

C. 研究結果

1) 症例

2005 年 10 月からの登録を行い、本年度の登録患者 4 例を加え、17 例の MCTD を登録した。17 例、全例女性で、平均年齢は、46 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 17 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 ($p < 0.01$, 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。全症例において 6 ヶ月に 1 度以上 ET-1 および NO の測定を繰り返した。図 3 に継時的な NO/ET-1 比の結果を示した。不変か増加を示す症例が多いが、症例 7 では顕著に低下した。

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

昨年までの検討とは異なり、継時的な ET-1 および NO の結果が得られた。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。その影響もあり、NO/ET-1 比は、多くの症例で増加していた。一方、CCTTT 繰り返し配列が 18 回と少ない症例 7 では、NO/ET-1 比が 3 回の計測で低下した。今後、PAH の発症に留意して経過観察を行う。

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) 原まさ子、高木香恵、川口鎮司。MCTD の血管病変における ET-1, NO の関与。厚生省特定疾

患 皮膚・結合組織疾患調査研究班 混合性結合組織病分科会 平成 10 年度 研究報告書 36-37, 1999

2) Humbert M, Cabane J. Successful treatment of systemic sclerosis digital ulcers and pulmonary arterial hypertension with endothelin receptor antagonist bosentan. *Rheumatology*. 42:191-193, 2003

3) 原まさ子、川口鎮司。混合性結合組織病に併発する肺高血圧症発症機序の検討。血管作動因子発現の解析。厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 混合性結合組織病に関する研究班 平成 13 年度 研究報告書 56-59, 2002

4) 原まさ子、川口鎮司、岡田純、近藤啓文、大久保光夫。肺高血圧症合併混合性結合組織病における NOS2 遺伝子多型の関与。厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 混合性結合組織病に関する研究 平成 16 年度 研究報告書 59-63, 2005

5) 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

6) Takagi T, Kawaguchi Y, Hara M, Sugiura T, Harigai M, Kamatani N. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin Exp Immunol* 134:538-544, 2003

7) Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, placebo controlled, multicenter study. *N Engl J Med* 346:896-903, 2002

8) Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Eng J Med* 353:2148-2157, 2005

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
12	12/16	28	131
13	12/12	24	108
14	14/16	28	113
15	12/17	29	123
16	13/15	28	105
17	10/12	22	75

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