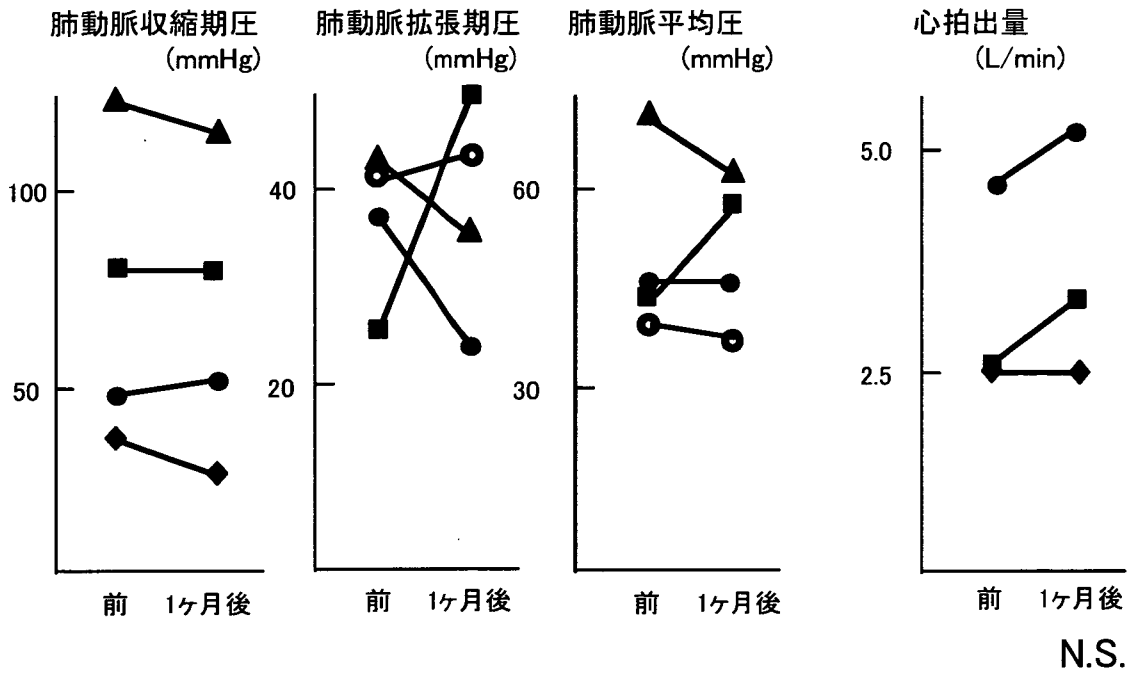
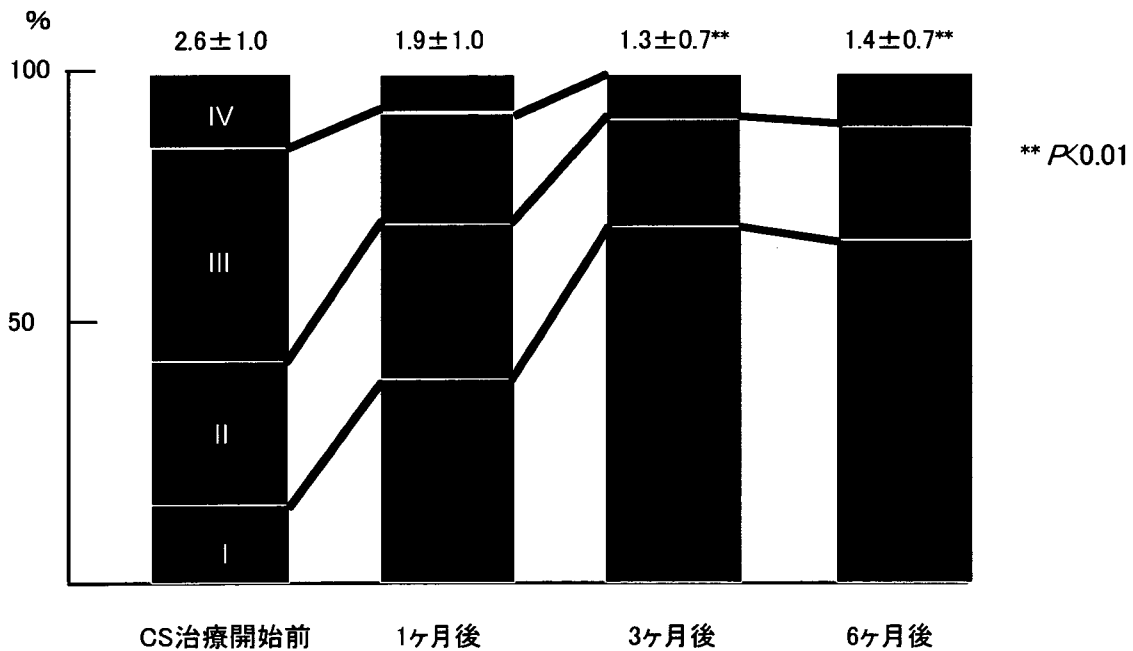


図3. 結果3 -心臓超音波検査-



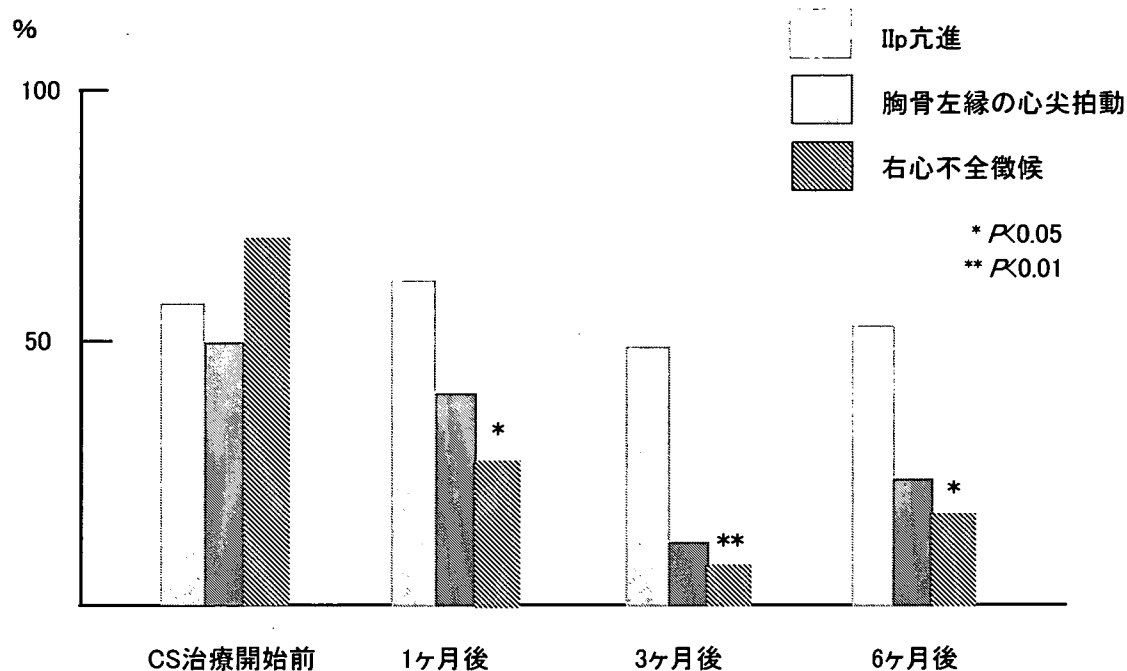
症例数が少なく有意差は認められなかったが、2例で心拍出量が増加した。

図4. 履歴調査研究 結果1 -NYHA 分類の変化-



CS 開始 3 ヶ月後に class III と IV の割合が減少し、その後も効果は継続した。

図 5. 履歴調査研究 結果 2 -理学所見-



CS使用前に比し、使用後に右心不全徴候を有する患者割合は有意に低下した。

表 3. 履歴調査研究 結果 3 -心臓超音波検査・血液検査-

	CS治療前	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後
<b>心臓超音波検査</b>				
PASP (mmHg)	66.2±21.7		56.2±24.3	46.1±14.3 #
PADP (mmHg)	25.0±21.2		11.0±11.7	NA*
PAMP (mmHg)	48.8±13.8		36.9±19.8	NA*
LVの変形あり(%)	46.7		15.4	11.1
<b>血液検査</b>				
BNP (pg/mL)	259±287	101±108	42±24	69±64
UA (mg/mL)	6.7±2.0	5.3±1.9	5.0±1.4 ##	5.4±1.0 ##
TB (mg/mL)	0.9±1.8	0.4±0.2	0.5±0.2	0.4±0.2
ESR (mm/h)	76.7±41.8	24.2±15.7 ##	26.4±23.6 #	56.6±39.9
IgG (mg/mL)	2849±1042	1895±980 #	1178±565 ##	1498±835 ##
抗DNA抗体** (IU/mL)	125±128	44±66	28±51 #	38±56

\*測定された症例数が少ないため記載せず \*\* SLE患者のみ #P<0.05 ##P<0.01 (CS使用前に比し)

PASP, pulmonary arterial systolic pressure PADP, pulmonary arterial diastolic pressure

PAMP, pulmonary arterial mean pressure LV, left ventricle UA, 尿酸値 TB, 総ビリルビン

## 抗 U1RNP 抗体の病原性に関する研究

分担研究者： 藤井 隆夫（京都大学大学院医学研究科臨床免疫学・講師）

研究協力者： 佐藤 毅、郭 生玉、童 暁鵬（京都大学大学院医学研究科臨床免疫学）

### 研究要旨

抗 U1RNP 抗体陽性患者では肺高血圧症などの血管障害が高頻度である。われわれは、抗 U1RNP 抗体や抗 U1RNP 抗体と交叉反応する自己抗体が病因的意義を有する可能性を考え、抗 U1RNP 抗体と関連する新規自己抗体を検討した。初年度は、多数の抗 U1RNP 抗体陽性患者血清をスクリーニングし、ヒト肺動脈血管内皮細胞（HPAEC）に特異性が高いと考えられる 31kDa 蛋白を認識する自己抗体（抗 HPA31 抗体）を見出した。抗 HPA31 抗体は抗 B' /B 抗体と抗 A 抗体との共存が高頻度で、かつ HPAEC からの RANTES 分泌を刺激し、抗 U1RNP 抗体における肺動脈血管内皮傷害に関与する可能性がある。また次年度以降、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。抗 U1-C 抗体（IgG2b）を分泌する Hy104 と抗 U1-70K 抗体を分泌する Hy64 が分離された。Hy64 が産生する免疫グロブリンは IgM であり、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。また同時にこのように抗 U1RNP 抗体の一部のサブセットは他の蛋白を認識することにより病原性を有する可能性があると考えている。

### 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あるが、MCTD では特に高力価である。MCTD は一般に予後良好と考えられているが、肺高血圧症（PH）を合併する患者ではその予後は著しく悪化する。PH が MCTD など膠原病に伴うことはよく知られているが、われわれは抗 U1RNP 抗体が、抗 DNA 抗体と同様に病因的意義を有するか否かを明らかにするため、近藤班で抗 U1RNP 抗体陽性膠原病患者血清中における U1RNP 構成蛋白（70K、A、B'、C）を認識する IgG サブクラスと疾患活動性および PH との関連を調べてきた。その結果、抗 U1RNP 抗体の一部のサブクラスは疾患活動性あるいは PH と関連することが判明した。そこで本研究では、①全身性リウマチ性疾患患者血清中に、抗 U1RNP 抗体と相関しかつ HPAEC を特異的に認識する自己抗体が存在しないか調べ、②また *in vivo* での検討を行うため、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。

### B. 研究方法

#### ①HPAEC を特異的に認識する自己抗体

本研究に対して充分理解・同意された上で採血され（京都大学医学部 医の倫理委員会 承認番号 第 730 番）、抗 U1RNP 抗体陽性と判断された当院通院中の膠原病患者 64 血清（SLE 31、MCTD 14、SSc 3、RA 2、シェーグレン症候群 2、PM/DM 1、分類不能膠原病 1、DLE 1、その他 9）を用いた。なお健常人血清 3 例の血清あるいは精製 IgG をコントロールとした。IgG の精製は、プロテイン G カラム（ImmunoPure<sup>®</sup>G IgG purification Kit、Pierce 社）を用いて精製し、その後 PBS により透析を行った。また精製 IgG の濃度を測定した上で濃縮を行い、抗核抗体陰性の健常人 IgG を含め、10 μg/ml IgG 溶液を作成した。

培養細胞はクラボウ社のヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC) を用いた。24穴のカルチャープレートを用い、HPAECがサブコンフルエントとなった状態で培養上清に患者IgGを加え(終濃度として1 µg/dl)、さらに補体を添加した。その状態で48時間培養を継続し、その培養上清中のRANTESをELISA (R&D社)により測定した。なお培養上清の希釈などはそれぞれのキットのプロトコールに従った。

またHPAECを認識する自己抗体の検索は免疫ブロット法で行った。HPAECとHeLa細胞をLysisバッファーで溶解して抗原とした。SDSサンプルバッファーを加えて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後患者血清と反応させ、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体を用いることで、両抗原における反応性の違いを確認した。またU1RNPの構成蛋白に対する抗体反応性と抗HPAEC自己抗体の反応性とを比較した。

#### ②抗U1RNP抗体モノクローナル抗体

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ーマ細胞であるSP2/0-Ag14 (Ag14) と融合させた。数多くのハイブリドーマが分離されたが、それらの上清中の抗核抗体を以下の方法でスクリーニングした。

##### 1) HeLa細胞抽出物を用いたRNA-免疫沈降法 (RNA-IPP)

HeLa細胞抽出物と、プロテインAセファロースビーズと結合させたハイブリドーマ上清中のマウス免疫グロブリンを反応させ、その結果生じた免疫複合体中のRNAをフェノール抽出およびエタノール沈殿により抽出し、Urea-PAGEにて検討した。なお染色は銀染色を用いた。

##### 2) ELISA

抗U1RNP抗体 (Mesacup<sup>®</sup>-2テスト RNP、MBL社) および抗D抗体 (Mesacup<sup>®</sup> Sm テスト、MBL社) を検出するELISAを用いた。またU1RNPの構成成分である70K、A、C蛋白に対する反応を、各蛋白を固相化したELISA (MBL社)により検討した。なお抗Sm抗体を分泌するハイブリドーマであるY12の上清をコントロールとして用い

た。また抗U1-70K/C抗体を含む患者血清を抑制実験に使用した。

##### 3) 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 (hy64の場合) /IgG (Hy104の場合) 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=10 µg/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。

### C. 研究結果

#### ① HPAECを特異的に認識する自己抗体

64例の患者血清を破碎したHPAECとHeLa細胞蛋白と反応させ、WBで検討したところ、37例 (58%) でHPAECの31kDa蛋白に対する自己抗体 (抗HPA31抗体) が認められた (図1)。HeLa細胞蛋白では同じ血清を用いても同様のバンドを認めることは少なかった (6例、9.4%)。またHPAEC蛋白に対して認められた抗HPA31抗体は抗A抗体あるいは抗B'/B抗体と強く関連したが、抗70K抗体とは関連しなかった。

抗HPA31抗体陽性患者6例と、抗HPA31抗体陰性患者3例からIgGを精製し、HPAECの培養上清中に加え、48時間培養後の上清中のRANTES濃度を測定した。これら9例はいずれも抗U1RNP抗体陽性で、そのELISAで測定した抗体価や併存する他の抗核抗体には有意差はなかった。しかし上清中のRANTES濃度は抗HPA31抗体陽性IgGを加えた場合、同抗体陰性IgGを加えた場合に比し、有意に高濃度であった (図2)。

#### ②抗U1RNP抗体モノクローナル抗体

数多くのハイブリドーマ (Hy) が分離されたが、Hy64とHy104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。限界希釈法でクローン化したところ、Hy64はIgM、Hy104はIgG2bであることが判明した。

##### 1) 免疫沈降法

Hy104-IgG2bはHeLa細胞およびマウスAg14細胞を抗原として用いたRNA-IPPで、U1RNAを沈

降した。一方Hy64-IgMはプロテインAに結合しないため、UIRNAの沈降は認めなかった。

## 2) ELISA

Hy104はtotal U1-RNPとU1-Cとに反応した(図3)。一方Hy64-IgMはtotal U1RNPとU1-70Kに反応した。次に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ところ、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。

## 3) WB

Hy64-IgM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 k Da) の可能性が考えられたため、Ag14を用いてanisomycinによりアポトーシスを誘導し、その細胞抽出物をWBの抗原として検討した。図3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。

なおHy104-IgG2bはU1-C抗原に反応した。

## D. 考察

### ① HPAECを特異的に認識する自己抗体

抗U1RNP抗体陽性患者血清中に、HPAECを特異的に認識しHPAECからのRANTES分泌を刺激する自己抗体、抗HPA31抗体を見いだした。抗U1RNP抗体がHPAECを刺激し、ICAM-1などの内皮細胞マーカー発現を刺激することは報告されている。しかし、抗U1RNP抗体陽性患者すべてにおいて肺高血圧が認められるわけではなく、また無症状の場合でも抗U1RNP抗体が検出されることもある。今回示した抗HPA31抗体は、

抗A抗体、抗B'/B抗体と強く相関し、抗HPA31抗体が抗U1RNP抗体と関連する可能性を示唆する。しかしelution blotによる検討では、これらの自己抗体に交差反応性はなかった。

抗HPA31抗体により分泌が亢進したRANTESは、血小板第4因子(PF4)スーパーファミリーに属し、メモリーT細胞(CD45RO)に対するchemotactic activityを有するケモカインである。アレルギー性あるいは自己免疫性の炎症局所を説明するケモカインとして重要であり、SLEにおいてもその活動性やループス腎炎の病態との関与が報告されている。一方で、原発性肺高血圧症(PPH)患者の肺動脈血管内皮細胞においてRANTESが高発現し、肺高血圧症の病態に関与すると考えられている。その機序としてendothelin-converting enzyme-1やET-1の誘導が推定されている。今回の成績から、抗HPA31抗体のみがPHを誘導している可能性はきわめて低いと考えられるが、本抗体はHPAECの細胞表面に結合することが確認されており、その抗体価やサブクラス、さらには抗原エピトープによって、より病因的な抗HPA31抗体を抽出できる可能性がある。

### ② 抗U1RNP抗体モノクローナル抗体

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。同時に抗リボゾーム抗体を分泌するHy11-IgG2b、また自己抗原を認識しないHy49-IgG2bも分離されているので、これらのIgG2bを精製して*in vitro*および*in vivo*で、抗体の機能分析をする予定である。

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。

近年、中枢神経に対する抗 DNA 抗体の病原性も報告された。DeGiorgio らはマウスモノクローナル抗 DNA 抗体 (R4A) が認識するアミノ酸シーケンスを同定した (Asp/Glu-Trp-Asp/Glu-Tyr-Ser/Gly)。またそのシーケンスが *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor のサブユニットである NR2A/NR2B レセプターの細胞外ドメインに含まれることを報告した。NR2 レセプターは neurotransmitter (glutamate) と結合することにより、海馬がつかさどる「記憶」機能に関与する。モノクローナル抗体 R4A や患者抗 DNA 抗体はこれらの NR2 レセプターに結合し、神経細胞のアポトーシスを誘導した。さらに SLE 患者髄液中にこのアミノ酸配列を認識する抗 DNA 抗体が存在し、マウスの中枢神経障害を誘発できることも確認されている。われわれが分離したハイブリドーマが産生するモノクローナル抗 U1RNP 抗体が U1RNP 以外の細胞内機能分子を認識することが示されれば、より病原性を明確にできるため、現在 2 次元電気泳動法により Hy64 や Hy104 が認識する自己抗原を分析中である。

## E. 結論

抗 U1RNP 抗体陽性患者血清中に肺動脈血管内皮細胞(HPAEC)を特異的に認識する自己抗体を見いだした。本抗体は HPAEC からの RANTES 分泌を刺激したことから、抗 U1RNP 抗体陽性患者における肺血管傷害に関与している可能性がある。またモノクローナル抗 U1RNP 抗体を産生するハイブリドーマ Hy64 と Hy104 を分離した。Hy64 が産生する免疫グロブリンは、48kDa > 28kDa > 70kDa 蛋白に反応し apoptotic U1-70K に対する抗体とは異なった。抗 U1RNP 抗体の一部のサブセットは他の蛋白を認識して病原性を有する可能性があると考えている。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hajime Yoshifuji, Takao Fujii, et al. Amelioration of experimental arthritis by a calpain-inhibitory compound: regulation of cytokine production by E-64-d *in vivo* and *in vitro*. *Int Immunol* 2005; 17: 1327-1336.
2. Hajime Yoshifuji, Takao Fujii, et al. Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity*. 2006; 39:233-41.
3. Yoshimasa Fujita, Takao Fujii, et al. Successful treatment of primary Sjögren's syndrome with chronic natural killer lymphocytosis by high-dose prednisolone and indomethacin farnesil. *Intern Med* 2007; 46: 251-254.
4. 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.
5. Kosaku Murakami, Takao Fujii, et al. Successful treatment of a patient with refractory adult Still's disease by tacrolimus. *Mod Rheumatol* 2007; 17:167-170.
6. Yoshinaga Ito, Takao Fujii, et al. Severe subcutaneous generalized edema in a patient with dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 2007; 17:171-173.
7. 藤井隆夫. 免疫疾患における免疫抑制薬の使い方. 膠原病・リウマチ性疾患. 最新医学 2005; 60: 404-410.
8. 藤井隆夫. 膠原病の病理診断マニュアル (臨時増刊号). 膠原病の臨床所見とその読み方. b. 自己抗体の臨床的意義. 病理と臨床 2005; 23: 32-37.
9. 藤井隆夫, 三森経世. 関節リウマチの動物モデルでの新しい治療 自己反応性 T 細胞

ワクチネーション. 分子リウマチ 2005; 2: 218-222.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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作用機序. 臨床免疫・アレルギー科. 2007; 48: 471-475.
14. 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. 佐藤 毅, 藤井 隆夫, 他. 中枢神経症状を呈した患者の脳脊髄液中における抗 U1RNP 抗体測定の意義. 第 49 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2005 年 4 月.
2. 藤井 隆夫. 膠原病における抗核抗体の産生機序と病原性. 第 33 回日本臨床免疫学会総会. 京都, 2005 年 10 月.
3. 佐藤 毅, 藤井 隆夫, 他. 精神神経症状を呈した膠原病患者の血清と髄液中における抗 U1RNP 抗体測定の意義. 第 50 回日本リウマチ学会総会, 長崎, 2006 年 4 月.
4. Takao Fujii, Takeshi Sato, et al. Generation of regulatory antibodies against T cell receptor by vaccination with CD4+ Th1 clones in lupus-prone mice. 第 36 回日本免疫学会総会, 大阪, 2006 年 12 月.
5. 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.

6. Takeshi Sato, Takao Fujii, et al. Detection of anti-U1RNP antibodies in cerebrospinal fluid in patients with systemic lupus erythematosus. The Annual European Congress of Rheumatology. Amsterdam, 2007 年 6 月.
7. Takao Fujii, 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.
8. Takao Fujii, Guo Shengyu, Tong Xiaopeng, 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.
9. Takeshi Sato, Takao Fujii, et al. Detection of anti-U1RNP antibodies in cerebrospinal fluid in patients with systemic lupus erythematosus. The 1<sup>st</sup> East Asia Group of Rheumatology (EAGOR) meeting. 東京, 2005 年 5 月.
10. 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

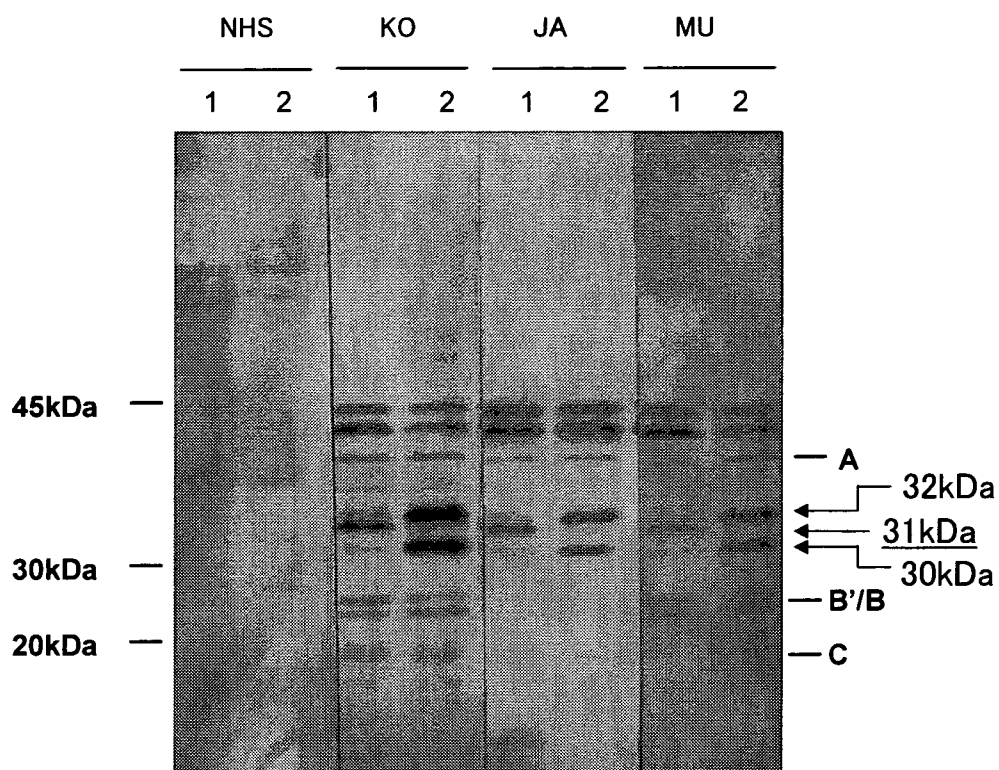


図 1. HPAEC と HeLa 細胞蛋白を用いた免疫プロット法

HPAEC 蛋白 (レーン 1) を抗原とした場合に 31kDa 蛋白に対する自己抗体が認められた。同抗体が陽性の症例では、HeLa 細胞蛋白 (レーン 2) に対し、32/30kDa に対する自己抗体が認められた。

(NHS, normal human serum; KO, JA, MU, 抗 HPA31 抗体陽性患者)

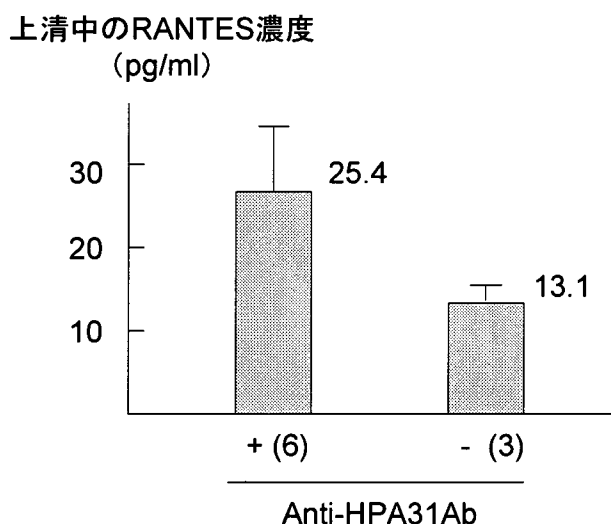


図 2. 抗 HPA31 抗体陽性患者から精製した IgG による HPAEC 刺激

9 例とも抗 U1RNP 抗体は陽性であるが、抗 HPA31 抗体陽性患者 IgG では陰性患者に比し HPAEC からの RANTES 分泌が刺激されていた ( $P < 0.05$ )。



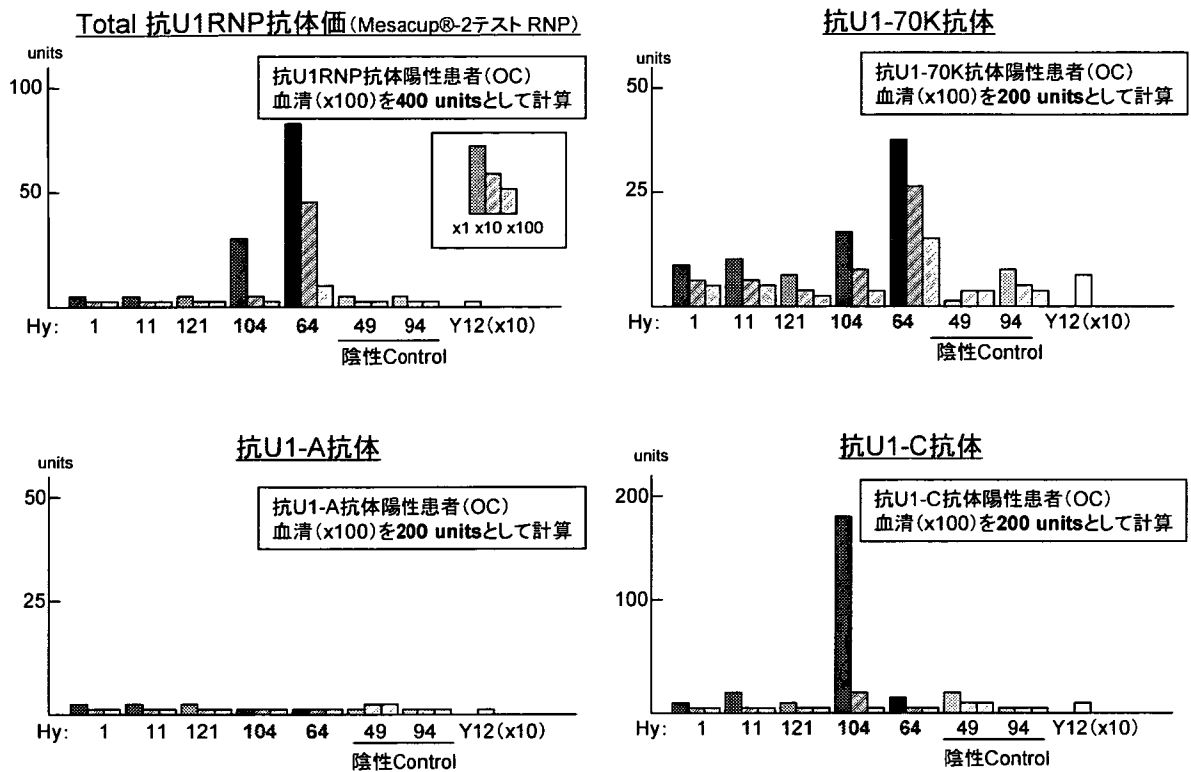


図3. ELISAを用いた抗U1RNP抗体産生ハイブリドーマ上清の反応性

Hy104とHy64ハイブリドーマ上清は抗U1RNP抗体と反応した。またU1RNPを構成するそれぞれの蛋白との反応性を調べると、Hy64は抗U1-70K抗体であり、Hy104は抗U1-C抗体であることが確認された。

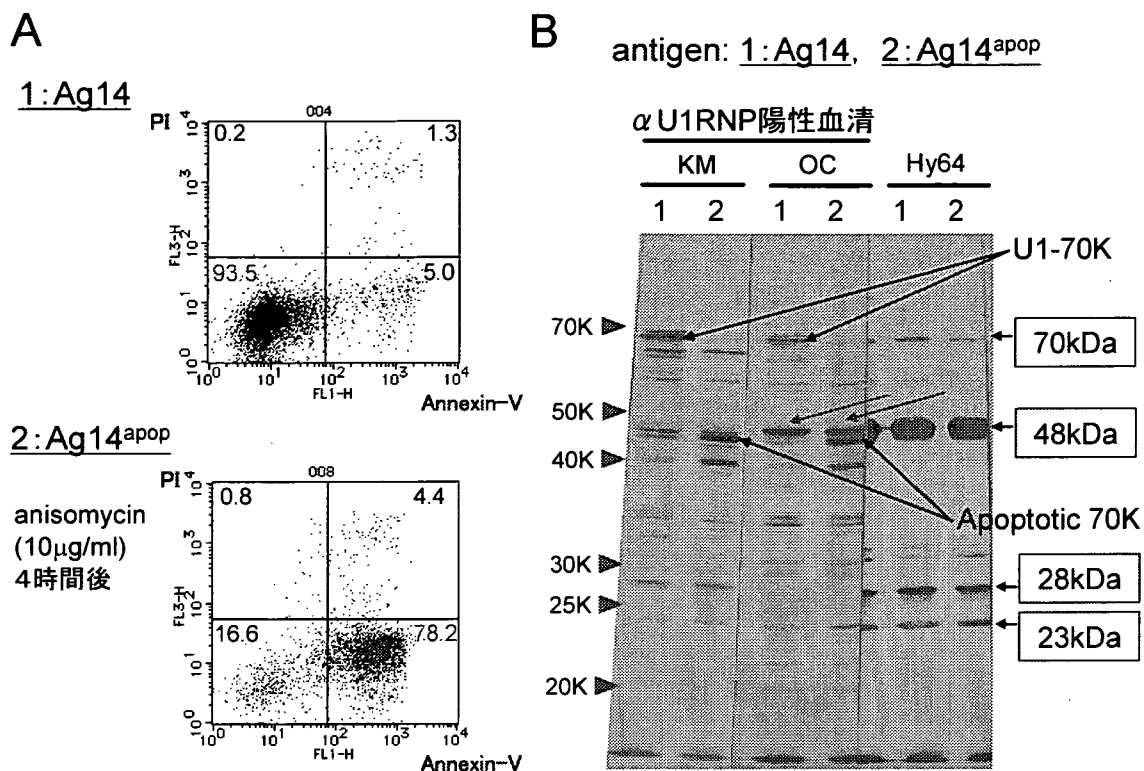


図 4. Hy64-IgM が反応する自己抗原

- A. 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。
- B. 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。

## 混合性結合組織病(MCTD)にともなう肺高血圧(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・助教)  
佐々木 信人 (岩手医科大学医学部内科学第三講座・助教)  
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 患者の死因の重要な位置を占めるが、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傷害する要因として、血清因子の一つである抗内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibody, AECA）に焦点をあて、研究を行った。培養肺微小血管内皮細胞を用いた cyto-ELISA による解析の結果、血清中に肺微小血管内皮細胞に反応する抗体を有する MCTD 患者の割合が高いことが確認できた。AECA の抗原を二次元電気泳動とウエスタンブロット、質量分析を用いた解析により探索した。約 20 の抗原候補蛋白質を得ることができ、その中には U1snRNP70K や hnRNPA1 も含まれていた。

### A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）患者では、他の膠原病患者に比べ高率に発症する肺高血圧症（PH）が死因の重要な位置を占めているが、その発症要因は不明である。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っており、小血管の傷害から徐々に進行して PH 発症に至ることが示唆されている<sup>1)2)</sup>。また、PH を発症 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<sup>3)</sup>。本研究において、我々は、MCTD 患者血清中の抗内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibody, AECA）による肺微小血管内皮細胞の傷害や機能変化が PH 発症の原因であると考え、MCTD 患者血清中の AECA について解析した。

### B. 研究方法

MCTD 患者の AECA の陽性率を cyto-ELISA で

解析した。肺微小血管内皮細胞を 96 ウェルプレートで培養し、健常者あるいは MCTD 患者血清と反応させた後、抗ヒト IgG 抗体を用いて検出した。

AECA の抗原候補蛋白質を同定するため、肺微小血管内皮細胞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 MCTD 患者血清から精製した IgG を用いてウエスタンブロットを行った（2D ウエスタン）。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、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。同定できなかったスポットについては LC-MS/MS で再度同定を試みた。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、同意の得られた場合のみサンプルの提供をうけた。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

AECA の力価を肺微小血管内皮細胞を用いた cyto-ELISA で測定した結果、各々の吸光度は、健常者 (n=11) では  $0.082 \pm 0.033$ 、PH 未発症 MCTD 患者 (n=22) では  $0.292 \pm 0.231$ 、PH 合併 MCTD 患者 (n=6) では  $0.371 \pm 0.246$  であった。健常者の平均吸光度  $\pm 2$  S.D. を cut-off 値とすると、MCTD 患者の AECA の陽性率は 62.5% であった (図 1)。

2D ウェスタンの結果、MCTD 患者血清に強く反応するスポットを約 20 個選択できた (図 2)。約半数を MALDI-TOF MS を用いたペプチドマスマスフィンガープリンティングで同定でき、残りについては LC-MS/MS で同定を試みた。同定できた AECA の抗原候補蛋白質は、U1snRNP70K、hnRNPA1、hnRNPL、hnRNPQ、SF2AF、ZNF585、GAPDH、vimentin、annexin A1 などであった。

### D. 考察

同定できた蛋白質の中に、MCTD の特徴である U1snRNP70K や、RA と SLE と MCTD で自己抗体の報告のある hnRNPA1<sup>4)</sup> が含まれていた。また、近年、hnRNPL に対する抗体は hnRNPA1 に対する自己抗体をもつ患者に認められることが多いという報告<sup>5)</sup>があることから、MCTD 患者血清中に hnRNPL に対する抗体が存在する蓋然性は高い。これらのことは、二次元電気泳動とウェスタンブロットを用いた抗原候補の探索法が有用であり、抗原候補蛋白質の中に、MCTD 患者における PH 発症に関連する抗原が含まれている可能性を示している。

### E. 結論

本研究により MCTD 患者血清中の自己抗体の抗原候補蛋白質を得ることができた。これらの抗原候補蛋白質が、肺微小血管内皮細胞に特異的に発現するか解析するとともに、PH 発症機序や病態との関連を明らかにしていくことで、新たな治療法や診断法の開発につながると

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、吉村幸一. 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) Astaldi Ricotti GC, Bestagno M, Cerino A, Negri C, Caporali R, Cobianchi F, Longhi M, Maurizio Montecucco C. Antibodies to hnRNP core protein A1 in connective tissue diseases. *J Cell Biochem.* 40(1):43-7, 1989
- 5) Siapka S, Patrino-Georgoula M, Vlachoyiannopoulos PG, Guialis A. Multiple specificities of autoantibodies against hnRNP A/B proteins in systemic rheumatic diseases and hnRNP L as an associated novel autoantigen. *Autoimmunity.* 40(3):223-33, 2007

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Piao H-M, Yamauchi K, Pan L-H, Nakadate T, Ito H, Mouri T, Kobayashi H, Sawai T, Nakahishi T, Takigawa M, Inoue H. Increased levels of CTGF mRNA expression in a murine model of allergic airway inflammation. *Allergol Int.* 54 (1): 107-115, 2005
- 2) Kanno H, Onodera H, Endo M, Maeda F, Chida S, Akasaka T, Sawai T. Vascular lesion in a patient of chronic active Epstein-Barr virus infection with hypersensitivity to mosquito bites: vasculitis induced by mosquito bite with the infiltration of

- nonneoplastic Epstein-Barr virus-positive cells and subsequent development of natural killer/T-cell lymphoma with angiodestruction. *Hum Pathol.* 36(2): 212-218, 2005
- 3) Kanno H, Ouchi N, Sato M, Wada T, Sawai T. Hypereosinophilia with systemic thrombophlebitis. *Hum Pathol.* 36(5): 585-9, 2005
- 4) Kimura N, Ogasawara T, Asonuma S, Hama H, Sawai T, Toyota T. Granulocyte-colony stimulating factor-and interleukin 6-producing diffuse diciduooid peritoneal mesothelioma. *Mod Pathol.* 18(3): 446-450, 2005
- 5) Itoh Y, Uzuki M, Fujii K, Sawai T. Connective tissue growth factor (CTGF) is expressed in early inflammatory stage of synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA), and proliferates fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 52: S48, 2005
- 6) Uzuki M, Sawai T, Ryan LM, Rosenthal A, Masuda I. Characterization of ANK positive cells in joint tissue from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease (CPPD). *Arthritis Rheum.* 52: S102, 2005
- 7) 宇月美和、徳永総二、澤井高志。 II. 各論一臓器病変と鑑別診断一 4. 関節・骨. 病理と臨床. 23: 105-115, 2005
- 8) 菅野祐幸、澤井高志。 III. 症例の実際-病理診断クルー- 症例 1: 血管炎を伴った関節リウマチ. 病理と臨床. 23: 214-217, 2005
- 9) 黒瀬頭、浅井大志、澤井高志。 III. 症例の実際-病理診断クルー- 症例 15: 肺高血圧症を伴った混合性結合組織病 (MCTD). 病理と臨床. 23: 271-274, 2005
- 10) 菅野祐幸、柴田祐二、高橋幸洋、澤井高志、細川敬輔、吉田浩子、小林仁、木澤哲也、谷藤幸夫、山内広平、井上洋西. Myeloperoxidase-anti-neutrophil cytoplasmic antibody 関連頭微鏡的多発血管炎の一症例. *Clin Rheumatol.* 17: 42-47, 2005
- 11) 宇月美和、大内修二、貝山潤、澤井高志. 関節リウマチにおけるヒアルロン酸の動態-高分子ヒアルロン酸による治療の有効性を示す基礎的研究-. *Clin Rheumatol.* 17: 126-134, 2005
- 12) 高橋幸洋、菅野祐幸、嶋村正、澤井高志 関節リウマチ滑膜組織における Epstein-Barr virus 感染. *岩手医誌* 57 (4): 349-356, 2005
- 13) 宇月美和、高橋和広、笹野公伸、澤井高志 末梢 CRF と urocortin の役割-免疫系. *内分泌・糖尿病科* 21 (5): 482-489, 2005
- 14) 伊藤吉賢、徳永勢二、澤井高志 リウマチ性疾患の病理、病態. *MB Orthop.* 18 (10): 23-31, 2005
- 15) 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. *Osteoarthritis Cartil.* 14(5): 435-441, 2006
- 16) 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
- 17) 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(5): 305-308. 2006
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 佐々木信人、黒瀬頭、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. *Therapeutic Res.* 27(10): 1940-41. 2006
- 21) 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) の抗原解析. *Therapeutic Res.* 27(10): 1943-44. 2006

22) Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chem Acta.* 387(1-2):55-8. 2007

23) Kitamura T, Kabuyama Y, Kamataki A, Homma MK, Kobayashi H, Aota S, Kikuchi SI, Homma Y. Enhancement of lymphocyte migration and cytokine production by ephrin B1 system in rheumatoid arthritis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294(1):C189-96. 2007

24) Watabe D, Kanno H, Yoshida A, Akasaka T, Sawai T. Adhesion of peripheral blood mononuclear cells and CD4+ T cells from the patients with psoriasis to cultured endothelial cells via the interaction between LFA-1 and ICAM-1. *Br. J. Dermatol.* 157(2):259-65. 2007

25) Kobayashi G, Fujita N, Noda Y, Ito K, Horaguchi J, Takasawa O, Obana T, Nakahara K, Uzuki M, Sawai T. Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis forming a localized mass: a variant form of autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol.* 42(8):650-6. 2007

26) Yoshida A, Kanno H, Watabe D, Akasaka T and Sawai T. Role of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in the epidermal proliferation of psoriasis in cooperation with TNF  $\alpha$ . *Arch. Dermatol. Res.* 300(1): 37-45. 2008

27) 鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志：膠原病肺の病理学的特徴. *リウマチ科.* 37(4): 392-398. 2007

28) 宇月美和、佐々木喜子、澤井高志：関節疾患の病理学的基礎. *臨床画像.* 23(12): 1346-61. 2007

## 2.学会発表

1) 菅野祐幸、小野寺英恵、遠藤幹也、前田文彦、千田勝一、赤坂俊英、澤井高志。慢性活動性EBV感染症における血管病変：虫刺部位での血管炎の発症と血管破壊性. 第94回日本病理学会学術集会. 4月. 横浜 2005

2) 菅野祐幸、清水則夫、駒井悦子、澤井高志. Epstein-Barr virus 陽性 NK/T 細胞の血管内皮細胞への接着能の検討. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月. 横浜 2005

3) 澤井高志、菅野祐幸、鎌滝章央、和田龍一、八木橋操六、佐藤工。肺にフィブリノイド血管炎を伴って死亡した肺高血圧症の一例-原発性肺高血圧症 (PPH) と膠原病肺高血圧症との鑑別. 第10回血管病理研究会. 10月. 福岡 2005

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 菅野祐幸、三浦康宏、佐々木信人、舩渡治、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例. 第11回血管病理研究会. 10月. 東京 2006

9) 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 70<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting.* Nov10-15, Washington 2006

10) 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

11) 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51回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月. 横浜 2007

12) 澤井高志、鎌滝章央：膠原病における肺高血圧症の病理学的特徴. 第8回肺高血圧症治療研究会. 6月. 東京 2007

13) 鎌滝章央、佐々木信人、畠山明、菅野祐幸、澤井高志. 混合性結合組織病 (MCTD) に合併する肺高血圧症 (PH) における肺血管内皮細胞傷害に関連する自己抗体の探索. 第12回血管病理研究会. 10月. 盛岡 2007

14) Kamataki A, Sasaki N, Hatakeyama A, Sawai T: Analysis of the serum reactivity against possible target proteins for anti-endothelial cell antibodies from sera of mixed connective tissue disease patients with pulmonary hypertension. American College of Rheumatology 71<sup>st</sup> Annual Scientific Meeting, Nov 6-11, 2007, Boston.

#### H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特許取得

特になし。

実用新案登録

特になし。

その他

特になし。

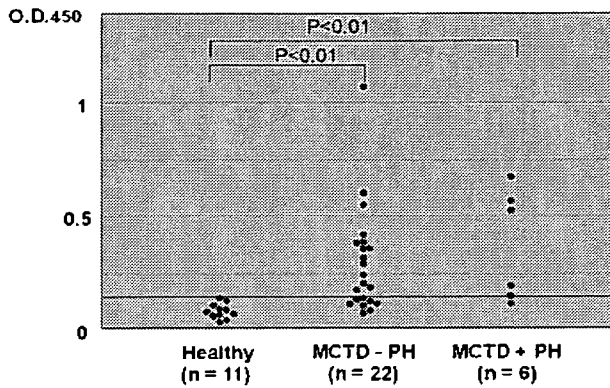


図 1. 肺微小血管内皮細胞を用いた cyto-ELISA による MCTD 患者血清中の AECA の解析

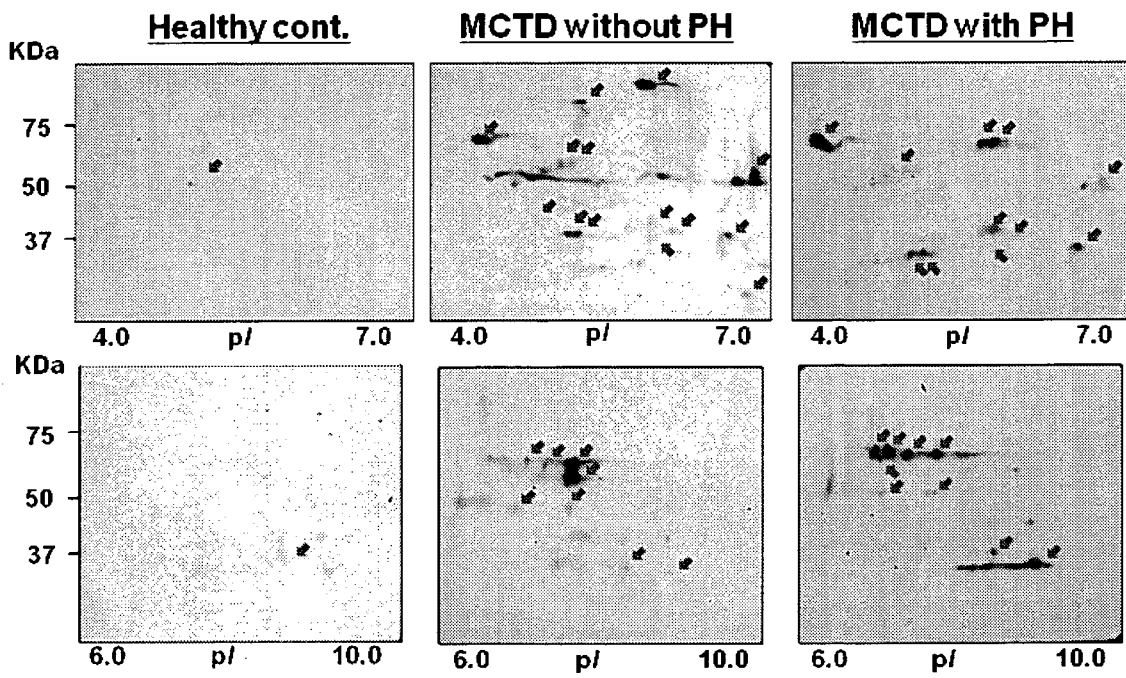


図 2. 肺微小血管内皮細胞から調製した蛋白質を用いた 2D ウェスタンブロット法による患者血清と反応する蛋白質の検出



## 混合性結合組織病 (MCTD) における新規自己抗原 NA14 (nuclear autoantigen of 14 kDa) に対する抗体の臨床的意義および MCTD の肺高血圧症の病態解明と治療法の確立に関する研究

分担研究者： 高崎 芳成 （順天堂大学医学部膠原病内科：教授）  
研究協力者： 野澤 和久、松下 雅和、縄田 益之、松平 蘭

### 研究要旨

MCTD における新規自己抗原 NA14 (nuclear autoantigen of 14 kDa) に対する抗体を、ヒト NA14 の full length cDNA を用いたリコンビナント抗原を用いた ELISA 法で検出し、その臨床的意義を検討した。その結果、抗 NA14 抗体は一次性シェーグレン症候群 (SjS) 患者の 25.5% の患者に検出され、それに次いで MCTD 患者の 15.0% の患者に検出され、他の膠原病ではほとんど検出されなかった。更に、抗 NA14 抗体は一次性 SjS 患者では高率に検出されたが、二次性 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。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。抗 NA14 抗体が SjS に加えて MCTD にて特異的に検出されるメカニズムは不明であるが、全身性エリテマトーデス (SLE)、強皮症 (SSc) および多発性筋炎/皮膚筋炎 (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。

一方、MCTD の診断基準を満たす 142 例の自験例より MCTD 研究班肺高血圧症 (PH) 診断の手引きを満たす症例を抽出し、我々の教室でこの 10 年間に経験した SSc、SLE、SjS およびその他の膠原病患者に併発した PH 例と、その臨床像および治療への反応性ならびに予後の比較検討も行った。その結果、MCTD では他の疾患に比較して PH が高率に出現し、MCTD の PH 症例は他の疾患に比較して予後良好な傾向がある事が示された。しかし、MCTD では PH 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-PH の予後に影響を与える力は希薄で、今後シルデナフィール、エポプロステノール、ボセンタンなどの治療効果の検討を要すると思われた。

### A. 研究目的

MCTD 患者の QOL を向上させるためにはその本質的な病態を明らかにする必要がある。我々はその病態形成に関与する免疫異常を明らかにする目的で、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) を抗原源とし、それに対する MCTD 血清の反応性とその抗体の臨床的意義について検討した。

また、種々の治療に抵抗し、MCTD の予後を悪化させる因子として知られている PH の病態

や、各種治療への反応性を MCTD をはじめとする各種膠原病で比較検討し、MCTD における PH の特徴や治療に対する反応性の相違を明らかにし、本症における PH の治療法について検討を加えた。

### B. 研究方法

#### 1) 抗 NA14 抗体の臨床的意義の検討

ヒト NA14 の full length cDNA を用いたリコンビナント抗原を用いた ELISA 法による測定系を確立し、自験 MCTD 113 例、一次性 SjS 94 例、二次性 SjS 39 例、SLE 80 例、SSc 23 例、

関節リウマチ(RA) 29例、PM/DM) 20例を対象とし、その臨床的意義について解析した。

## 2)肺高血圧症の病態解明と治療法の確立に関する研究

MCTDの診断基準を満たす142例の自験例よりMCTD研究班肺高血圧症診断の手引きを満たす症例を抽出し、我々の教室でこの10年間に経験したSSc、SLE、SjSおよびその他の膠原病患者に併発したPH例と、その臨床像および治療への反応性および予後を比較検討した。

(倫理面への配慮)

検体および患者の資料に関する匿名性について配慮がなされている。

## C. 研究結果

### 1)抗NA14抗体の臨床的意義の検討

抗NA14抗体は一次性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。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、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。さらに、抗NA14抗体陽性および陰性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陽性群での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が、陽性群にてCNSループスの出現頻度が17.7%と高い傾向にあり、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。

## 2)肺高血圧症の病態解明と治療法の確立に関する研究

教室でこの10年間に入院したPH患者におい

て、MCTDは41.8%と最も高率で、それについてSScが18.6%、SLEが18.6%、その他としてSLEとSScの重複症候群およびRAを各2例、PM、高安病、悪性RAおよび結節生多発動脈炎の患者を各一例認めていた。また、診断から発症までの期間はMCTDでは5.6年でSLEの13.7年やSScの9.3年に比較して短い傾向があった。しかし、PA圧に関しては各疾患全体の平均が57.4mmHgで、特に疾患間で相違はなかった。

死亡症例は43人中11例(25.6%)で、MCTDの症例はPHを発症した症例中11.1%とSLEやSScに比較して少ない傾向があったが、MCTD以外の症例では感染症などPh以外の原因で死亡することが多かった。

各疾患の生存率に有意の相関はなく、治療には種々の薬剤が用いられていたが、ステロイド薬のパルス療法も含め、特に治療法による生存率の相違は認めなかった。

一方、MCTD研究班肺高血圧症診断の手引きを満たす症例142人のうち、PHは22例に認められ、そのうち9例、40.9%が死亡していた。その死因は肺高血圧が44.4%で、感染症が33.3%、腸管出血およびTEN・骨髄抑制が11.1%となっていた。これらの症例に対して種の治療が行われていたが、ステロイド薬のパルス療法も含め、特に治療による予後の相違は認められなかった。また、ボセンタン、クエン酸シルデナフィル、エポプロステノールの投与例には死亡例は認められていなかったが、これの症例では投与期間も短く、今後の経過観察が必要と思われた。

## D. 考察

今回の検討で抗NA14抗体は一次性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

は報告されておらず、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。

一方、PH に関する検討では、この 10 年間の入院例では、MCTD は他の疾患に比較して PH が高率に認められていた。MCTD の PH 症例は他の疾患に比較して予後良好な傾向があったが、これは MCTD の PH が軽症と言うことではなく、他の疾患例が感染症など PH 以外の要因で死亡しているためと思われた。

治療においては各疾患において種々の薬剤が用いられているが、MCTD では PH 自体による死亡が多い傾向にあり、ステロイドパルスをはじめとする既存の治療法は MCTD の PH の最終的な予後に影響を及ぼす力は希薄と思われた。シルデナフィル、エポプロステノール、ボセンタンなどの投与例に死亡例を認めていなかったが、これらの症例における観察期間は短く、その治療効果の評価には今後さらなる検討を要すると思われた。

## E. 結論

抗 NA14 抗体は 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。

また、MCTD では他の疾患に比較して PH が高率に認められ、予後は他疾患に比較して良好な傾向があったが、PH が直接的な死因となる症例が他疾患に比較して多かった。治療としてはステロイドパルスをはじめ、種々の薬剤が用いられていたが、既存の治療法は MCTD の PH の予後に影響を与える力は希薄と思われた。今後、シルデナフィル、エポプロステノール、ボセンタンなどの新たな治療方の効果が期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tokano Y, Takasaki Y, et al: The relation between initial clinical manifestation and long term prognosis of patients with systemic lupus erythematosus. *Modern Rheumatol* 15: 275-282, 2005
- 2) Mahler M, Takasaki Y, et al: International multicenter evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins. *Clin Vaccine Immunol* 13: 77-83, 2006
- 3) Akagawa M, Takasaki Y, et al: Bispecific abs against modified protein and DNA with oxidized lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6160-6165, 2006
- 4) Mitsuo A, Takasaki Y, et al: Decreased CD161+CD8+ T cells in the peripheral blood of patients suffering from rheumatic diseases. *Rheumatology* 45: 1477-1484, 2006
- 5) Morita Y, Takasaki Y, et al: The effect of methotrexate (MTX) on expression of signalling lymphocytic activation molecule (SLAM) in patients with rheumatoid arthritis (RA) and its role in the regulation of cytokine production. *Scand J Rheumatol* 35: 268-272, 2006
- 6) Toyoda K, T, Takasaki Y, et al: Protein-bound 4-hydroxy-2-nonenal: an endogenous triggering antigen of anti-DNA response. *J Biol Chem* 282: 25769-25778, 2007
- 7) Nakiri Y, Takasaki Y, et al: Expression of CD22 on peripheral B cells in patients with rheumatoid arthritis: relation to CD5-positive B cells. *Clin Rheumatol* 26: 1721-1723, 2007
- 8) Negishi M, Takasaki Y, et al: Bmi1 cooperates with Dnmt1-associated protein 1 in gene silencing. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 992-998, 2007
- 9) Nakano S, Takasaki Y, et al: Down-regulation of

CD72 and increased surface IgG on B cells in patients with lupus nephritis. *Autoimmunity* 40: 9-15, 2007

10) Kawasaki A, Takasaki Y, et al: Role of *APRIL* (*TNFSF13*) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology* 46: 777-782, 2007

11) Morimoto Takasaki Y, et al: Expression of B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) in T cells in Active Systemic Lupus Erythematosus. The Role of BAFF in T cell-dependent B cell Pathogenic Autoantibody Production. *Rheumatology* 46: 1083-1086, 2007

12) Inui A, Takasaki Y, et al: Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 26: 1675-1678, 2007

13) Njaman W, Takasaki Y, et al: Serum uric acid as a prognostic predictor in pulmonary arterial hypertension with connective tissue disease. *Int Heart J* 48: 523-532, 2007

14) Nakano Takasaki Y, et al : Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 47: 145-149, 2008

15) Watanabe T, Takasaki Y, et al : Striking alteration of some populations of T/B cells in systemic lupus erythematosus: relationship to expression of CD62L or some chemokine receptors. *Lupus* 17(1): 26-33, 2008

16) Nozawa K, Takasaki Y, et al: Differential Anti-Golgi Complex Autoantibody Production Following Murine Lactate Dehydrogenase-Elevating Virus Infection. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 30: 13-25, 2008

17) awasaki A, Takasaki Y, et al: Association of IRF5 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: Support for a crucial role of intron 1 polymorphisms. *Arthritis Rheum* 58: 826-834, 2008

18)全 峰, 高崎芳成他: ヒトアジュバント病に関する臨床的検討. *順天堂医学* 52: 580-587,

2006

19)張 麗萍, 高崎芳成他: ループス腎炎合併妊娠の予後. *日本臨床免疫学会誌* 30: 185-192, 2007

20)松平 蘭, 高崎芳成他: リツキシマブが有効であった肥厚性硬膜炎および右眼窩内肉芽腫を認めた難治性 Wegener 肉芽腫症の1例. *日本内科学会誌* 96: 1464-1466, 2007

21)高崎芳成, 縄田益之他: ユニキャップエリア抗 Sm 抗体, 抗 SS-A 抗体, 抗 Jo-1 抗体および抗 dsDNA 抗体の臨床的有用性の評価. *医学と薬学* 59: 263-270, 2008

22)高崎芳成: 臨床症状 網内系病変. 関節リウマチー成因研究から治療の新時代へー. *日本臨床 (増刊号 1)* 63: 270-273, 2005

23)高崎芳成: 薬物療法 NSAIDs 概論. 関節リウマチー成因研究から治療の新時代へー. *日本臨床 (増刊号 1)* 63: 473-476, 2005

24)高崎芳成: ステロイド薬の位置づけと使い方. *Medical Practice* 22: 457-459, 2005

25)高崎芳成: RA 治療ガイドラインにおける NSAIDs の位置づけ. *骨・関節・靭帯* 18: 509-514, 2005

26)高崎芳成: 抗 PM-SCL 抗体. *日本臨床 (増刊号 7)* 63: 502-504, 2005

27)高崎芳成: 抗 U1 RNP 抗体と抗 U2 RNP 抗体. *日本臨床 (増刊号 7)* 63: 512-514, 2005

28)高崎芳成: ステロイド薬. *Orthopaedics* 18: 94-100, 2005

29)高崎芳成: 抗 OU1 RNP 抗体. *medicina* 42: 416-417, 2005

30)高崎芳成: 非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs). *内科* 97: 631-635, 2006

31)高崎芳成: 膠原病の新たな治療戦略とその実態. *Medical Practice* 23: 549, 2006

32)高崎芳成: ステロイドをどのように考えるか. *Current Therapy* 24: 57-61, 2006

33)高崎芳成: 全身性エリテマトーデス. *Medicina* 44: 929-931, 2006

34)高崎芳成: 抗 U1 RNP 抗体. *リウマチ科* 36: 326-330, 2006

35)高崎芳成: 抗 U1 RNP 抗体. *日医会誌* 135