

(特別号 2): S 299, 2006

36)高崎芳成: 関節リウマチの関節外症状. 流  
254号: 5-11, 2007

37)高崎芳成: 抗リウマチ薬・サラゾスルファピ  
リジンの特徴—炎症・免疫系に対する効果につ  
いて—. 医学と薬学 57: 485-494, 2007

38)高崎芳成: ステロイド薬の位置づけ・使いか  
たと副作用. Medical Practice 24: 1795-1799, 2007

39)高崎芳成: 抗核抗体. 日内会誌 96:  
2124-2131, 2007

## 2.学会発表

1) Takasaki Y, et al: Autoimmune response to  
proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and  
associated antigens. 9yh International Workshop on  
Autoantibodies and Autoimmunity, Hotel Hilton  
University of Florida, Gainesville, USA, 2005, Sep  
29.

2) Takasaki Y, Furuhata N, et al: Clinical  
significance of anti-U1 RNP antibodies recognizing  
the conformation structure on U1 RNA/70-kd  
protein complex in patients with mixed connective  
tissue disease. 69th Annual Scientific Meeting of  
American College of Rheumatology, San Diego,  
USA, 2005, Nov 14.

3)松下雅和, 高崎芳成他: プロテアソームに対  
する自己免疫応答の多様性—抗 PA28 $\alpha$ 抗体、抗  
Ki抗体および抗20Sプロテアソームと抗体の比  
較—. 第50回日本リウマチ学会総会, 長崎, 長  
崎ブリックホール, 平成18年4月23日,

4) 高崎芳成: 自己抗体による難治性病態の診断  
と予後の予測 (教育講演). 第34回日本臨床免  
疫学会総会, 都市センターホテル, 東京, 平成  
18年10月2日, 2006

5)Matsushita M, Takasaki Y, et al: Autoimmune  
Response to Proteasome Complex in Patients with  
Connective Tissue Diseases. 70th Annual Scientific  
Meeting of American College of Rheumatology,  
Washington D.C., USA, 2006, Nov 14.

6)建部一夫, 高崎芳成他: 順天堂大学における  
過去10年間の肺高血圧症を伴う膠原病疾患の  
調査. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会  
プログラム・抄録集 289,

2007

7) 野澤和久, 高崎芳成他: リウマチ性疾患にお  
ける新規自己抗原 NA14 への反応性の検討. 第  
51回日本リウマチ学会総会・学術集会, パシフ  
ィコ横浜, 横浜, 平成19年4月26日, 2007

## I. 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

特になし

## 新規抗核抗体産生マウスモデルの検討

分担研究者： 川畑 仁人（東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科・助教）

### 研究要旨

混合性結合組織病(MCTD)は、抗核抗体である抗 RNP 抗体の出現を特徴とし、その出現機序の検討は、MCTD の病態解明に重要と考えられる。しかし、その解析に適した動物モデルは限られ大きな支障となっていた。本研究は、抗 RNP 抗体産生機序検討のための動物モデルを樹立し、それを用いて実際に抗 RNP 抗体産生に関わる細胞群や分子を同定することを目的とした。まず、ヌードマウスへの T 細胞移入による抗核抗体産生の系を確立し、抗 RNP 抗体産生機序研究への有用性を検討した。その結果、本系は早期に高力価の抗核抗体が誘導され、長期間観察でき、移入 T 細胞の変更や抗体やサイトカインの投与などによる様々な修飾が可能であるため、抗 RNP 抗体産生への種々の細胞群や分子の関与の解析が可能であることを確認した。そこで、本系を用いて、自己抗体産生制御に関わる可能性が示唆される細胞群として制御性 T 細胞を、候補分子として Toll 様受容体(TLR)を選択し検討した。その結果、抗 RNP 抗体は、抗 dsDNA 抗体や抗 H+/K+ ATPase 抗体と比べ、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 TLR 7 の阻害により著明に抗 RNP 抗体価が低下したことより、抗 RNP 抗体産生への TLR 7 の関与が示唆された。従って、本研究により、MCTD における抗 RNP 抗体産生機序研究に適した動物モデルが樹立され、実際に生体で、核酸蛋白複合体である RNP に対する自己抗体産生への核酸受容体の関与が明らかになった。本系により、核酸受容体など本疾患における分子標的治療の対象を開発することが可能と考えられた。

### A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)は抗核抗体である抗 RNP 抗体の出現を特徴としており、抗 RNP 抗体の出現機序の検討は混合性結合組織病の病態解明に重要である。しかし、抗核抗体産生機序を検討するための動物モデルは限られ、かつその有用性は限定的であるため、早期に抗核抗体が誘導でき種々の条件で検討が可能な系の開発が望まれている。そこで、本研究は、新たな抗 RNP 抗体産生モデルの樹立を行い、その自己抗体産生機序研究への有用性を明らかにし、実際に抗 RNP 抗体産生に関わる分子や細胞群を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### (1)マウスへの抗核抗体誘導

抗核抗体をマウスに誘導するために、CD4<sup>+</sup>T 細胞

や CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞などの T 細胞サブセットをヌードマウスへ移入し、長期間にわたる観察、血清採取を行い、間接蛍光抗体法による抗核抗体の検討のほか、以下の自己抗体の検出を行った。

#### (2)MCTD における抗核抗体研究への有用性検討

T 細胞移入をうけたヌードマウスに、ヒトにおける全身性自己免疫疾患に特徴的な抗核抗体が出現しているか検討した。特に、MCTD における抗核抗体として重要な抗 RNP 抗体を構成している抗 U1RNP-A 抗体、抗 U1RNP-70K 抗体、抗 U1RNP-C 抗体について、その出現の有無や経時的変化などの検討を行った。また、抗 RNP 抗体の出現の特徴を明らかにするため、比較として SLE に特徴的な抗ヌクレオソーム抗体、抗

dsDNA 抗体、臓器特異的自己抗体として抗 H+/K+ ATPase 抗体の測定も行った。

#### (2-1) 抗 U1RNP-A 抗体の検出

SLE や MCTD で認められる抗 RNP 抗体の一つである抗 U1RNP-A 抗体に関しては、マウス U1RNP-A リコンビナント蛋白を作成し ELISA を行い検討した。

この系で検出される抗体が実際に抗 U1RNP-A 抗体であることは、リコンビナント U1RNP-A 蛋白や、マウス核抽出液から抗 U1RNP-A モノクローナル抗体で免疫沈降した U1RNP-A 蛋白を、SDS-PAGE にて展開した後、PVDF 膜に転写し、マウス血清にてイムノプロットを行うことにより検討した。

更に、マウス脾細胞核抽出液から T 細胞移入を受けたヌードマウス血清により免疫沈降した核内自己抗原を、SDS-PAGE にて展開した後、PVDF 膜への転写し、抗 U1RNP-A モノクローナル抗体でブロッティングすることにより、沈降物に U1RNP-A 蛋白が含まれていることも検討した。

#### (2-2) 抗 U1RNP-70K 抗体、抗 U1RNP-C 抗体の検出

MCTD で認められる抗 RNP 抗体を構成する抗 U1RNP-70K 抗体および抗 U1RNP-C 抗体の出現の有無に関しては、市販のヒト U1RNP-70K リコンビナント蛋白およびヒト U1RNP-C リコンビナント蛋白を用いた ELISA によって検討した。

#### (2-3) 抗ヌクレオソーム抗体、抗 dsDNA 抗体の検出

SLE に特徴的な抗ヌクレオソーム抗体および抗 dsDNA 抗体の有無に関しては、市販の ELISA キットを用いて検討した。

#### (2-4) 抗 H+/K+ ATPase 抗体の検出

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

### (3) 抗 RNP 抗体産生における制御性 T 細胞の関与の検討

マウス脾細胞より MACS を用いて CD4<sup>+</sup>T 細胞や CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞などの T 細胞サブセットを分離し、ヌードマウスに移入した。その後、経時的にレシピエントから血清採取を行い、抗 RNP 抗体や抗ヌクレオソーム抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 H+/K+ ATPase 抗体の測定を行った。

(4) 抗 RNP 抗体産生における TLR の関与の検討  
自己抗体産生に関わる可能性が示唆される、核酸受容体である Toll 様受容体 (TLR)、特に RNA 受容体である TLR7 と、DNA 受容体である TLR9 を検討の対象とした。これらを阻害する DNA やコントロール用の DNA を、ヌードマウスへの CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞移入時及び一週間ごとに投与し、経時的にレシピエントから血清採取を行った。それらの血清の抗 RNP 抗体や抗ヌクレオソーム抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 H+/K+ ATPase 抗体の測定を行った。

TLR7 を阻害する DNA、TLR9 を阻害する DNA、コントロール用の DNA とともに既に他グループから複数の論文で使用されているものであり、TLR7 阻害 phosphorothioate DNA は IRS661、TLR9 阻害 phosphorothioate DNA は IRS869、TLR7/9 阻害 phosphorothioate DNA は IRS954 として報告されているものである。また、阻害 DNA のレシピエントへの投与経路の検討はすでに他論文で検討されており、それをもとに腹腔内投与とした。

抗核抗体誘導時のための移入する細胞は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞とした。これは、抗 RNP 抗体だけではなく、抗ヌクレオソーム抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 H+/K+ ATPase 抗体などが出現するため、各阻害 DNA がどの自己抗体の阻害効果をもたらしているか検討できると考え決定した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育や実験は、大学動物実験施設規定に従い適切に行われている。

## C. 研究結果

(1) ヌードマウスへの T 細胞移入による抗核抗体産生誘導の確認(図 1A・B)

ヌードマウスへ CD4+T 細胞や CD4+CD25-T 細胞、CD4+CD25+制御性 T 細胞などの CD4+T 細胞サブセットを移入し経時的に血清を採取した。その血清を用いて、間接蛍光抗体法により抗核抗体の有無を確認すると、CD4+CD25-T 細胞群で顕著だったが、どの群においても高抗体価の抗核抗体が産生されていることが判明した。3~4 週目には十分な抗核抗体が誘導されており、その後も CD4+T 細胞や CD4+CD25+制御性 T 細胞移入群では 8 ヶ月以上、CD4+CD25-T 細胞移入では、腸炎により約 3~4 ヶ月で死亡するまで持続して抗核抗体の産生を認めた(後述)。抗細胞質抗体は、CD4+CD25+制御性 T 細胞移入群で当初の一時期認められることがあるが、その後は消失し、抗核抗体のみとなっていた。従って、本系は早期に高抗体価の抗核抗体が検討でき、CD4+T 細胞移入群や CD4+CD25+制御性 T 細胞移入群では長期の抗核抗体の観察も可能であることが確認された。

**(2)本系により認識される核内自己抗原の探索**  
細胞移入をうけたマウス血清により免疫沈降した核内自己抗原を SDS-PAGE にて展開した結果、CD4+CD25+制御性 T 細胞、CD4+CD25-T 細胞、CD4T 細胞サブセットのいずれの系でも多数の核内自己抗原を認識する抗体が出現していることが明らかとなった。抗核抗体産生モデルであるプリスタン誘発全身性自己免疫マウスと共通して認められた核内自己抗原の存在の他、MCTD 患者血清によるブロッティングの結果、複数のバンドが確認でき、MCTD 患者血清中の抗核抗体と同様の抗原特異性のある抗核抗体が、T 細胞移入を受けたヌードマウスにも存在していることが確認された。そこで抗 RNP 抗体およびその他の自己抗体の有無につき検討した。

#### **(2-1)抗ヌクレオソーム抗体および抗 dsDNA 抗体**

CD4+CD25-T 細胞や CD4+CD25+制御性 T 細胞、CD4T 細胞移入ヌードマウス血清中の抗ヌクレオソーム抗体および抗 dsDNA 抗体に関しては、市販の ELISA キットにて検討した結果、CD4+CD25-T 細胞移入群では早期より抗ヌクレ

オソーム抗体や抗 ds-DNA 抗体が出現する一方、CD4+CD25+制御性 T 細胞や CD4T 細胞移入群ではこれらの自己抗体は認められなかった。

#### **(2-2)抗 U1RNP-A 抗体・抗 U1RNP-70K 抗体・抗 U1RNP-C 抗体**

CD4+CD25-T 細胞や CD4+CD25+制御性 T 細胞、CD4T 細胞移入ヌードマウス血清中の抗 U1RNP-A 抗体、抗 U1RNP-70K 抗体および抗 U1RNP-C 抗体に関しては、ヒトリコンビナント蛋白を用いた ELISA を行った結果、抗ヌクレオソーム抗体や抗 dsDNA 抗体と異なり、CD4+CD25-T 細胞移入マウスだけではなく、CD4+CD25+制御性 T 細胞や、CD4+T 細胞を移入したマウスにおいても各自己抗体を認めた。実際に抗 U1RNP-A 抗体が出現していることは、マウスリコンビナント蛋白を使用した上記実験や、方法で記載したイムノブロットや免疫沈降法においても確認できた。

#### **(2-3) 抗 H+/K+ ATPase 抗体**

CD4+CD25-T 細胞や CD4+CD25+制御性 T 細胞、CD4T 細胞移入ヌードマウス血清中の抗 H+/K+ ATPase 抗体に関しては、リコンビナント蛋白を用いて ELISA を行い検討した結果、CD4+CD25-T 細胞移入群では早期より抗 H+/K+ ATPase 抗体が出現する一方、CD4+CD25+制御性 T 細胞移入群や、CD4T 細胞移入群ではこれらの自己抗体は認められなかった。

#### **(3)抗 RNP 抗体産生への制御性 T 細胞の関与(図 2)**

抗 H+/K+ ATPase 抗体や抗ヌクレオソーム抗体、抗二本鎖 DNA 抗体は、CD4T 細胞から CD4+CD25+ 制御性 T 細胞を除去した CD4+CD25-T 細胞の移入群でのみ出現した。一方、抗 RNP 抗体は、CD4+CD25-T 細胞だけではなく、CD4T 細胞、CD4+CD25+T 制御性 T 細胞を移入した群でも、その発現を認めた。抗 RNP 抗体は、抗 U1RNP-70K 抗体、抗 U1RNP-A 抗体、抗 U1RNP-C 抗体のいずれも認めることができた。各群は以下の特徴を認めた。

#### **(1-1) CD4+CD25-T 細胞移入群**

腸炎により約 2 ヶ月後から体重減少が出現し、

約3～4ヶ月で死亡するマウスが多くなるため、CD4+CD25-T細胞移入マウスでは長期の抗核抗体の観察は困難であった。生存期間中は、継続して抗核抗体の産生を認めることができた。

#### (1-2) CD4T細胞、CD4+CD25+T制御性T細胞移入群

CD4T細胞、CD4+CD25+T制御性T細胞移入群では、抗核抗体を長期にわたり観察でき、少なくとも8ヶ月以上にわたり抗核抗体産生が認められた。CD4+CD25-T細胞移入群で認めた腸炎による体重減少や死亡は認められなかった。

#### (2)抗RNP抗体産生へのTLRの関与

細胞移入時およびその後毎週、TLR7阻害DNA、TLR9阻害DNA、コントロールDNAをレシピエントに投与した。抗U1RNP-70K抗体に関しては、コントロールDNA投与に比し、TLR7やTLR9を阻害するDNA投与の場合に、その抗体価の抑制が認められた。特にTLR7阻害DNAの投与の場合にその効果が顕著であり、コントロールDNA投与の場合の約23%と著明に抗体価が低下していた(図3)。

抗H+/K+ATPase抗体に関しては、TLR7阻害DNAの効果は乏しく、一方、TLR9阻害DNA投与群では約50%に抗体価が低下していた(図4)。

抗dsDNA抗体や抗ヌクレオソーム抗体、抗U1RNP-A抗体、抗U1RNP-C抗体に関しては、現在検討中である。

### D. 考察

#### (1)本系の抗核抗体産生研究への有用性について

この系の特徴として、自然発症ではなく誘導により自己抗体が惹起される点と、早期に高力価の抗核抗体が産生される点があげられる。自然発症全身性自己免疫モデルでは、抗核抗体研究には誕生後数ヶ月以上を要することが多いが、本系はT細胞移入後2～3週後より解析可能となり、抗体産生誘導から解析までの期間が短縮できる。このことは、移入後の抗体やサイトカイン投与などの実験を試みた場合も、投与期間

が少なく費用や時間の点で大きな利点と考えられる。

更に、ヌードマウスへのT細胞移入というシンプルな誘導系であり、移入するT細胞やレシピエントの変更、移入時や移入後の抗体やサイトカイン投与など、様々な修飾が可能である。従って、T細胞サブセットやT細胞受容体、MHC、細胞表面分子やサイトカインなどの抗核抗体産生機序における意義の解析に適している。実際、今回T細胞受容体特異性の各種抗核抗体産生への影響を検討することができた。

一方、本系では、抗核抗体だけではなく全身性自己免疫疾患も誘導されているかについては不明であり、今後、病理学的検討を要した解析が必要である。

#### (2)本系の抗RNP抗体研究への有用性について

本系は抗核抗体産生機序研究において、上記のような利点を有しているほか、抗U1RNP-70K、抗U1RNP-A抗体および抗U1RNP-C抗体が出現することから、抗RNP抗体産生モデルとしても有用と考えられる。CD4+CD25-T細胞移入群では、抗RNP抗体のほか、臓器特異的自己免疫疾患が生じ、SLEにおいて認められる抗ヌクレオソーム抗体や抗dsDNA抗体も同時に認めるが、CD4T細胞やCD4+CD25+制御性T細胞移入群では、臓器特異的自己免疫疾患や抗ヌクレオソーム抗体、抗dsDNA抗体は認めない一方で抗RNP抗体が出現するため、SLEというよりもMCTDに近い自己抗体パターンを示しており、特に長期の検討には有利と考えられる。従って、エピトープや長期経過に伴うU1snRNP複合体に対する自己免疫応答の変化の検討が可能であり、今後の重要な課題と考えられる。

一方、本系では、全身性自己免疫疾患で認める腎障害や関節炎、MCTDで認める肺高血圧症などの有無に関しては、まだ不明である。従って、本系がMCTD研究において、抗核抗体機序のモデルとして有用なのか、病態研究のモデルとしても用いることができるのかにつき、今後病理学的検討したうえで明らかにしたい。

### (3) 抗 RNP 抗体産生への制御性 T 細胞の関与について

ヌードマウスへの T 細胞サブセットの移入実験により、制御性 T 細胞は臓器特異的自己免疫疾患を抑制していることが知られている。この際に、抗 H+/K+ ATPase 抗体の産生も抑制していることから、制御性 T 細胞は自己抗体の産生も抑制している可能性が示唆されてきた。本実験でも、CD4<sup>+</sup>T 細胞から CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞を除くことにより、抗 H+/K+ ATPase 抗体のみならず抗 dsDNA 抗体、抗ヌクレオソーム抗体の産生が誘導されたことから、制御性 T 細胞がこれら自己抗体産生を抑制していることを確認できた。しかし、抗 RNP 抗体に関しては、CD4<sup>+</sup>T 細胞や制御性 T 細胞だけでも誘導できたことから、その産生制御における CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞の関与は少ないと考えられた。

### (4) 抗 RNP 抗体産生への TLR の関与について

核酸蛋白複合体である RNP に対する自己抗体産生に、核酸受容体が関与しているかどうかを検討するために、RNA 受容体である TLR7、DNA 受容体である TLR9 を阻害する DNA を本系に投与し、その後の抗 RNP 抗体の推移を検討した。TLR7 阻害 DNA 投与時に著明な抗 U1RNP-70K 抗体価の低下を認めたことより、TLR7 が抗 RNP 抗体産生過程に関わっていることが推測された。

TLR9 阻害 DNA でもある程度の抗 RNP 抗体産生抑制が認められたが、これに関しては、本実験では CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を移入したため種々の自己抗体が産生されており、TLR9 も関与した抗原提示細胞の活性化や抗体産生が生じている可能性があると考えられた。

抗 RNP 抗体産生における TLR7 の関与に関して、選択的な関与なのか否かについては、現時点では不明な点が多い。しかし、抗 H+/K+ ATPase 抗体産生に関しては TLR7 阻害 DNA による影響をほとんど受けておらず、ある程度選択的に働いている可能性がある。

### (5) 本系の分子もしくは細胞標的治療開発への

### 有用性について

本系は、抗核抗体の早期から長期にわたる簡便な誘導系であり、抗体やサイトカイン投与、移入 T 細胞の変更、レシピエントの変更など種々の誘導条件変更が可能である点が特徴である。従って、本系は、抗核抗体産生自己免疫疾患における分子標的治療もしくは細胞標的治療を開発する際に有用と考えられ、実際に今回の TLR に関する検討によりそれが示唆された。

MCTD では主体となる治療がステロイドであり、広範な副作用の可能性が常に存在し、肺高血圧症のように、治療困難な病態も存在している。そこで、本疾患の病態に基づいた治療の開発は重要な課題である。MCTD では抗 RNP 抗体の存在はその診断に欠かすことのできない重要な現象であり、その産生機序は深く本疾患の病態に関与していると考えられる。今回抗 RNP 抗体価を著明に低下させた TLR7 阻害が治療として有用かどうかは現時点では不明だが、その効果から今後の有用性の検討は、本疾患の分子標的治療の開発の観点からも充分意義あることと考えられる。

### E. 結論

ヌードマウスへの T 細胞移入による抗核抗体産生の系を樹立した。この系では、早期に高力価の抗核抗体が誘導され、長期にわたり抗核抗体産生が観察できる。特に抗 U1RNP-70K 抗体、抗 U1RNP-A 抗体抗 U1RNP-C 抗体などが出現することから、MCTD における抗 RNP 抗体産生機序の研究に適した動物モデルと考えられる。更に、本系は移入する T 細胞やレシピエントの変更や、移入後の抗体やサイトカインの投与など様々な移入条件の修飾が可能であり、T 細胞サブセットや T 細胞受容体、MHC、細胞表面分子やサイトカインなどの抗核抗体産生機序における意義の解析に適している。今回の検討では、抗 RNP 抗体は、抗 dsDNA 抗体や抗 H+/K+ ATPase 抗体と比べ、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 の阻害により著明に抗 RNP 抗体価が低下したことより、抗 RNP 抗体産生への TLR7 の関与

が示唆された。従って、本研究により、MCTDにおける抗 RNP 抗体産生機序研究に適した動物モデルが樹立され、実際に生体で、核酸蛋白複合体である RNP に対する自己抗体産生への核酸受容体の関与が明らかになった。また、本系により、核酸受容体など本疾患における分子標的治療の候補の創出と検討を行うことが可能と考えられた。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

本研究は、公表した段階で容易に類似の実験が可能になってしまうため、段階的な発表は控えた。現在用意している報告にて広く公表する予定である。

論文発表

なし

2.学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### **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

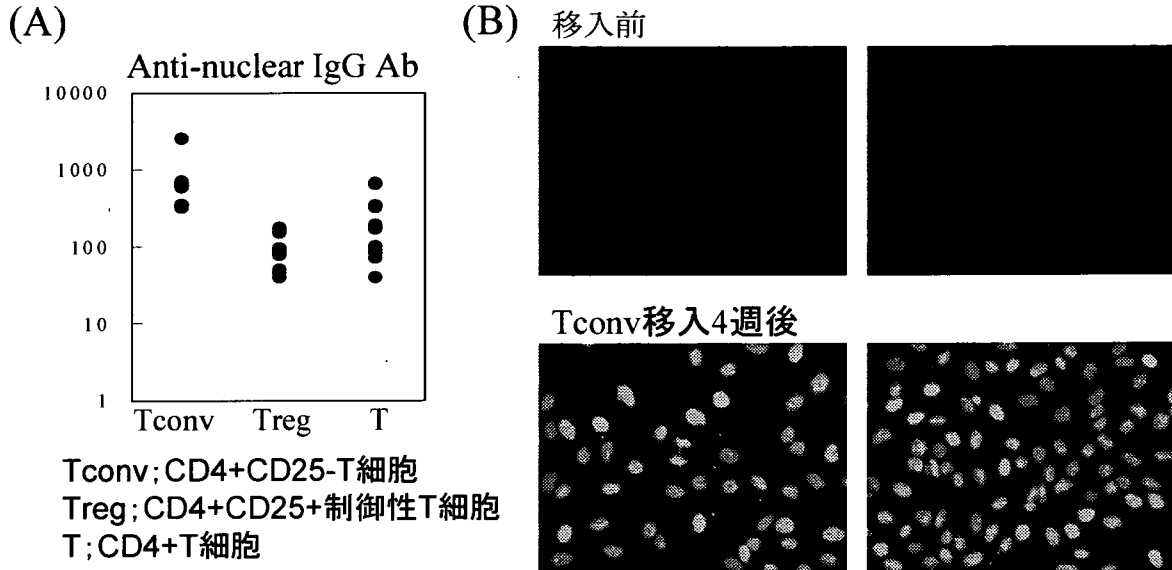


図2

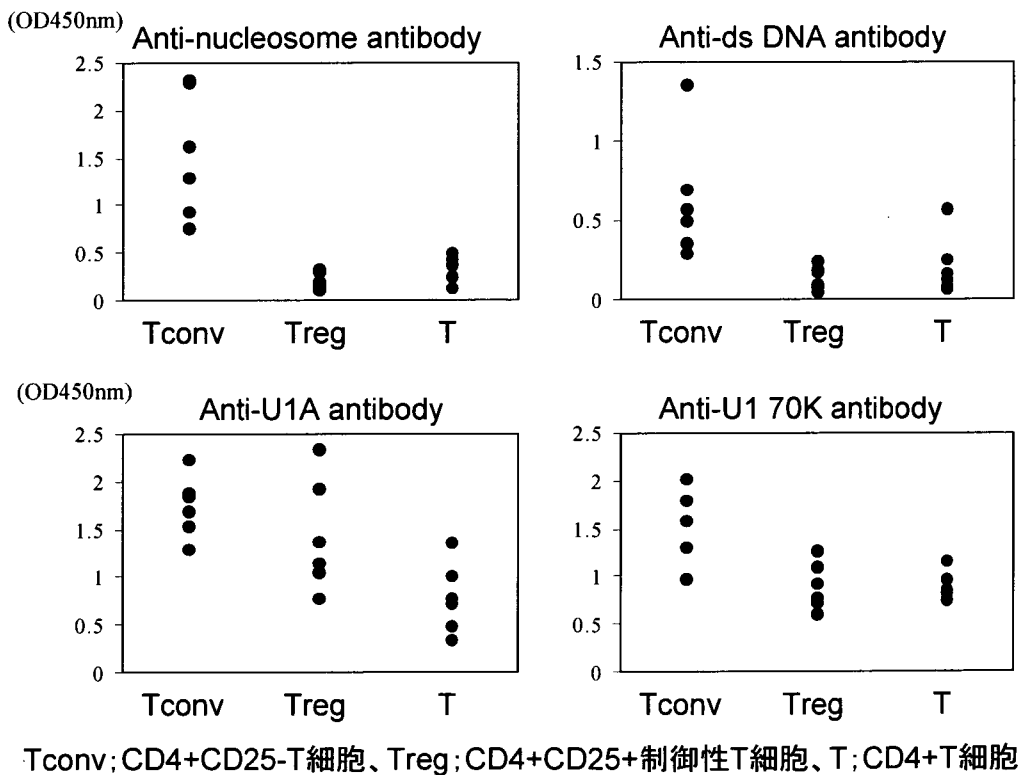
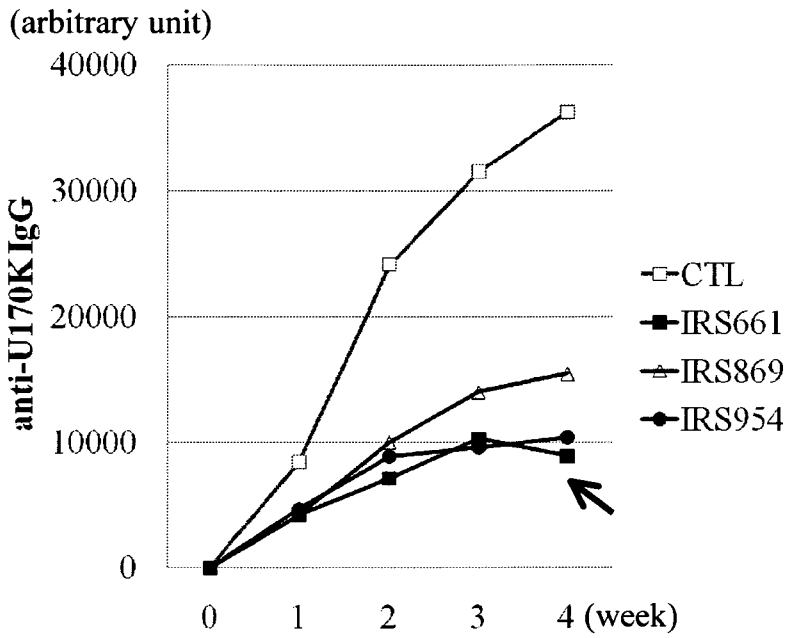


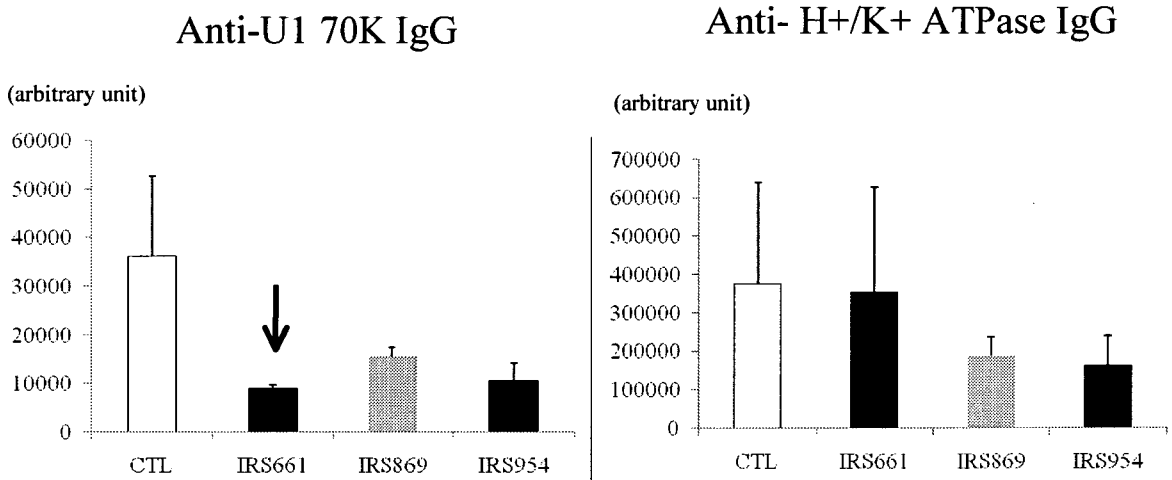


図3



IRS 661 ; TLR7阻害、IRS 869 ; TLR9阻害、IRS 954 ; TLR7/9阻害

図4



IRS 661 ; TLR7阻害、IRS 869 ; TLR9阻害、IRS 954 ; TLR7/9阻害

## 混合性結合組織病(MCTD)に合併した肺動脈性肺高血圧症(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リウマチ・感染症内科・教授  
研究協力者： 深谷 修作 藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科・講師  
小松八千代 藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科・客員講師

### 研究要旨

MCTD には 5%ほどの頻度で PAH の合併を認めると言われており、特発性 PAH に比しきわめて高率である。また、PAH は MCTD の予後を悪化させる重要な因子でもある。しかし、一方で PAH に由来する徴候を認めず、推定収縮期肺動脈圧 (sPAP) も 40mmHg 未満の軽症例が存在し、これら軽症例は比較的短期間の観察では PAH の増悪を認めなかった。このように MCTD に合併する PAH は、その経過や予後、発症様式や発症時期など不明な点も多い。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、平成 17 年 12 月から平成 18 年 3 月と平成 19 年 9 月から 11 月の 2 回実施した。対象はそれぞれの期間に上記医療機関受診した MCTD 患者全例とした。初回調査では 8 施設より 117 例、第 2 回調査では 10 施設より 159 例の回答を得た。第 2 回調査では初回調査で回答を得た 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 例で 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 sPAP40mmHg 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 low 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。また、PAH は MCTD の予後を悪化させる重要な因子でもある。一方、以前の PAH 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 5%程度と考えられていた。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 2 倍程度となった。これら無症候性の PAH 例では、推定収縮期肺動脈圧 (sPAP) 40mmHg 未満が多数であることも判明した。無症候で sPAP も低値な症例では比較的短期間の観察では PAH の増悪を認めな

かった。このように MCTD に合併する PAH の経過や予後、発症様式や発症時期など不明な点も多い。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 17 年 12 月から平成 18 年 3 月、およ

び平成19年9月から11月のそれぞれの期間に受診したMCTD患者全例を対象とした。

方法：アンケート法により、調査項目は初回調査では、MCTDの発症年月・診断年月および調査時点におけるMCTDに合併したPAHの診断基準項目である労作時の息切れ、胸骨左縁収縮期性拍動、第Ⅱ肺動脈音の亢進、胸部X線写真での肺動脈本幹部の拡大あるいは左第2弓突出、心電図での右室肥大あるいは右室負荷、心臓超音波検査上の右室拡大あるいは右室負荷、心臓超音波検査での推定肺動脈圧、可能であれば右心カテーテル検査での平均肺動脈圧とした。さらに、すでにPAHの存在が判明している場合には、PAH診断時における同様の項目とPAHの発症年月・診断年月、治療薬およびその効果、転帰も調査項目に加えた。第2回調査では初回の調査と同様のものとしたが、直近のsPAP、PAHに由来する徴候、転帰などを加えた。この2回の調査により横断的あるいは経時的なPAHに関する検討を行った。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

初回調査では8施設より117例の回答を得た。第2回調査では10施設から159例の回答を得た。初回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、第2回調査で新たに50例の回答があり、PAH15例、PAH疑い11例が含まれていた。

第2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例が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診断時のsPAPが30mmHg以上40mmHg未満のPAH20例中第2回調査で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）。しかし、殆どの症例でステロイド薬とベラプロストの両者が使用されており、治療毎のPAHの経過の違いを明らかにすることはできなかった。

### D. 考察

初回調査でPAHがなかった66例中7例で第2回調査において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、初回調査でsPAPが25mmHg以上30mmHg未満であったPAH疑い例10例では第2回調査で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、第2回調査で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 の合併が診断される症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 例中第 2 回調査で 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。しかし、殆どの症例でステロイド薬とベラプロストの両者が使用されていたため、治療薬の違いによる PAH の経過の違いを明らかにすることはできていない。最近、作用機序の異なる PAH 治療薬が使用可能となってきており、これらの薬剤の位置づけのためにも更なる検討が必要である。

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初回調査から今第 2 回調査までの間に 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、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。また、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。作用機序の異なる PAH 治療薬の位置づけが明らかとなり、更なる治療成績の向上につながる事が望まれる。

## 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。
- ・深谷修作、小松八千代、吉田俊治、【肺高血圧症を診る】 診る 肺高血圧症の臨床分類各論 膠原病に合併する肺高血圧症。Heart View、10 巻 8 号、866-869、2006。
- ・小松八千代、深谷修作、吉田俊治、【膠原病 膠原病の新たな治療戦略とその実際】 膠原病治療のポイントとその実際 混合性結合組織病特に肺高血圧症の診断と治療を中心に。Medical Practice、23 巻 4 号、691-696、2006。
- ・小松八千代、深谷修作、吉田俊治、混合性結合組織病 (MCTD) における肺高血圧症 (PH)

合併率および合併 PH の自然経過. Therapeutic Research、26 巻 10 号、2005-2006、2005.

## 2. 学会発表

・小松八千代、深谷修作、片山雅夫、他 2 名、  
膠原病性肺高血圧症の合併率と自然経過. 第 50  
回日本リウマチ学会総会、2006.

・星野八千代、深谷修作、片山雅夫、他 2 名、  
混合性結合組織病 (MCTD) 患者に合併する肺  
高血圧症 (PH) の頻度および自然経過. 第 33  
回日本臨床免疫学会総会、2005.

・深谷修作、難治性免疫疾患に対する新たな治  
療法 肺高血圧症. 第 33 回日本臨床免疫学会総  
会、2005

## 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

## 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

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日本学術振興会特別研究員  
高木 智 国立国際医療センター研究所地域保健医療研究部・部長  
大川-高辻 雅子 国立国際医療センター研究所地域保健医療研究部研究員  
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。健常人 80 名、MCTD、SLE、Sjogren 症候群、SSc、RA 患者、各 27 例、78 例、79 例、45 例、77 例、の一部の血清中には抗 HEXIM1 抗体活性が認められた。しかし、現時点では疾患特異性などは明らかではなかった。HEXIM1 の発現は転写レベルで制御されており、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。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- $\kappa$ 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、そこで、HEXIM1 に焦点を当て、自己抗体、遺伝子発現調節機構、生体調節における役割など多方面から解析し、肺高血圧と右心肥大の病態を明らかにして新たな治療法を開発することを目的とする。

### B. 研究方法

- 1) 病因解明に向けて、抗 HEXIM1 抗体測定用 ELISA を開発し、MCTD 患者血清中のよる抗 HEXIM1 抗体などの新たな自己抗体検出を試みる。
- 2) HEXIM1 遺伝子発現調節機構を検討する。

すなわち、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 upstream 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。

3) 肺高血圧とそれに引き続く右室リモデリングにおける HEXIM1 の意義を解明するため、HEXIM1 トランスジェニックマウスを作成し、それを用いて低酸素負荷モデルを構築して解析する。

### C. 研究結果

1) HEXIM1 抗体を検出可能な ELISA を開発した。健康人 80 名、MCTD、SLE、Sjogren 症候群、SSc、RA 患者、各 27 例、78 例、79 例、45 例、77 例、の一部の血清中には抗 HEXIM1 抗体活性が認められた。しかし、現時点では疾患特異性などは明らかではなかった。今後疾患病態との関連などを含めより詳細な解析を実施する予定である（国立国際医療センターとの共同研究）。

2) HEXIM1 遺伝子のプロモーターを単離し、様々な変異体を作製した。これらを HeLa 細胞にトランスフェクトし、そのとくに分化誘導薬剤 hexamethylene bisacetamide (HMBA) による発現調節領域を同定した結果、プロモーター領域に -3841~-2264、-164~-120、-70~-41 の 3 カ所存在した。現在、これらの領域に結合する転写因子の同定などを進めている。

3) 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。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。ここで、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。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。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（慶応義塾大学再生医学教室との共同研究）。

### D. 考察

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。

## E. 結論

HEXIM1 は PH や右心肥大の病態を解明し治療法を開発する上で鍵分子である可能性がある。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yasuyo Urasaki, Mamoru Nori, Satoshi Iwata, Takahiro Sasaki, Osamu Hosono, Hiroshi Kawasaki, Hirotoshi Tanaka, Nam H Dang, Eiji Ikeda, Chikao Morimoto. Roxithromycin specifically inhibits development of collagen induced arthritis and production of proinflammatory cytokines by human T cells and macrophages. *J Rheumatol.* 2005;32(9):1765-74
- 2) Sola S, Amaral JD, Castro RE, Ramalho RM, Borralho PM, Kren BT, Tanaka H, Steer CJ, Rodrigues CM. Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF-beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 2005;42(4):925-34
- 3) Kei Ohnuma, Tadanori Yamochi, Masahiko Uchiyama, Kunika Nishibashi, Satoshi Iwata, Osamu Hosono, Hiroshi Kawasaki, Hirotoshi Tanaka, Nam H. Dang, and Chikao Morimoto. CD26 Mediates Dissociation of Tollip and IRAK-1 from Caveolin-1 and Induces Upregulation of CD86 on Antigen-Presenting Cells. *Mol. Cell. Biol.* 2005 25(17): 7743-7757
- 4) Kei-ichi Hara, Mayumi Okamoto, Toshihiko Aki, Hideo Yagita, Hirotoshi Tanaka, Yoichi Mizukami, Hiroshi Nakamura, Akio Tomoda, Naotaka Hamasaki, Dongchon Kang. Synergistic enhancement of TRAIL- and TNF $\alpha$ -induced cell death by a phenoxazine derivative. *Mol. Cancer Ther.* 2005;4(7):1121-7
- 5) Noriaki Shimizu, Rika Ouchida, Noritada Yoshikawa, Tetsuya Hisada, Hajime Watanabe, Kensaku Okamoto, Masatoshi Kusuhara, Hiroshi Handa, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka. HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102(24): 8555-8560
- 6) Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, Morimoto C. Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia. *Stroke* 2005;36(11): 2457-62
- 7) Iwata S, Souta-Kuribara A, Yamakawa A, Sasaki T, Shimizu T, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Watanabe T, Arima N, Morimoto C. HTLV-I Tax induces and associates with Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L). *Oncogene.* 2005;24(7):1262-71
- 8) Hiroshi Nakamura, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Lorenz Poellinger, Kei Ohnuma, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka. TCR Engagement Increases Hypoxia-Inducible Factor-1 Protein Synthesis via Rapamycin-Sensitive Pathway under Hypoxic Conditions in Human Peripheral T Cells. *J. Immunol.*, 2005; 174(12): 7592 - 7599.
- 9) Noritada Yoshikawa, Keiko Yamamoto, Noriaki Shimizu, Sachiko Yamada, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka. The distinct agonistic properties of the phenylpyrazolosteroid cortivazol reveal interdomain communication in the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 2005;19(5): 1110-1124
- 10) Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, Inagi R, Tanaka H, Sassa R, Fujita T, Nangaku M. A biologic role of HIF-1 in the renal



medulla. *Kidney Int.* 2005;67(4):1428-39

11) 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

12) 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

13) 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

14) 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

15) 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

16) 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。

## 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検討

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みつけた。さらに、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した。

### 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>1)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4)5)</sup>。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 17 症例を前向き検討研究の対象とし、それ以外の 25 症例を後ろ向き検討の対象とした。

#### 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

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) 後ろ向き検討によるNOS2遺伝子-2.5 kb近傍の-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合併群と健常人において、CCTTT回数に有意な差が認められた ( $p < 0.0001$ )。この差は、非合併群と健常人では、認められなかった。また、PAH合併例と非合併例においても、CCTTT回数の有意な差が認められた ( $p < 0.0001$ )。

### 2) 前向き検討症例

2005年10月からの登録を行い、今までのところ、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。

### 3) 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。

### 4) 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<sup>3)5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>7)8)</sup>。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を示唆された。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

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

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