

表1 CCTTT の NOS2 遺伝子多型

Allele	MCTD patients		Healthy control
	With PH	Without PH	
6	1	0	0
7	1	0	0
8	4	0	4
9	3	1	8
10	5	5	19
11	4	5	25
12	2	10	42
13	0	2	32
14	0	4	29
15	0	1	13
16	0	2	13
17	0	0	4
18	0	0	1

PH: 肺高血圧症, MCTD: 混合性結合組織病

表2 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

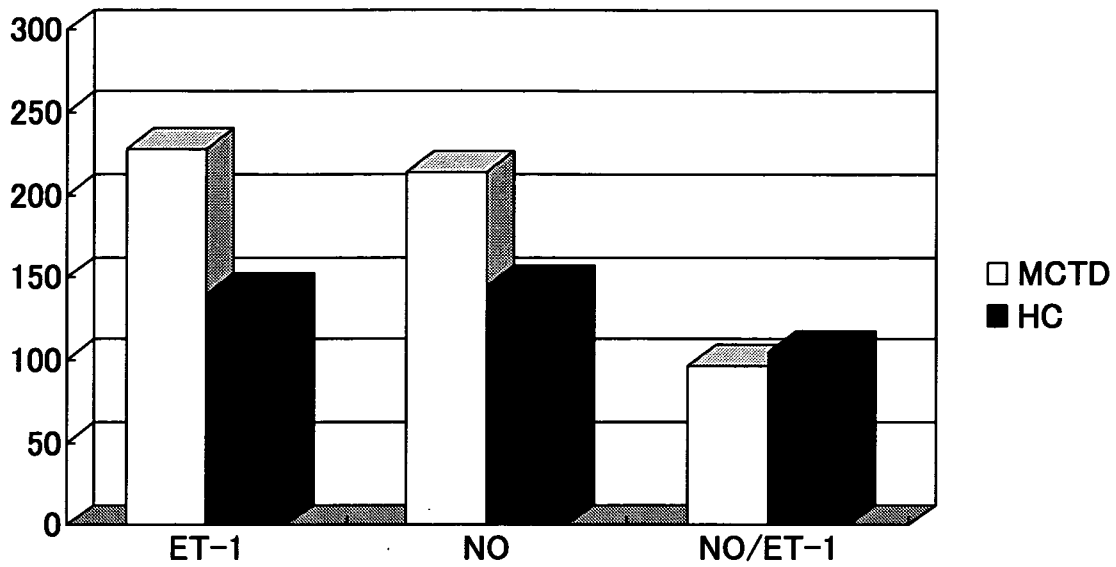


図1 MCTDおよび健常人(HC)の血中エンドセリン-1(ET-1)と一酸化窒素(NO)
*: $p < 0.01$ HCと比較しての有意差

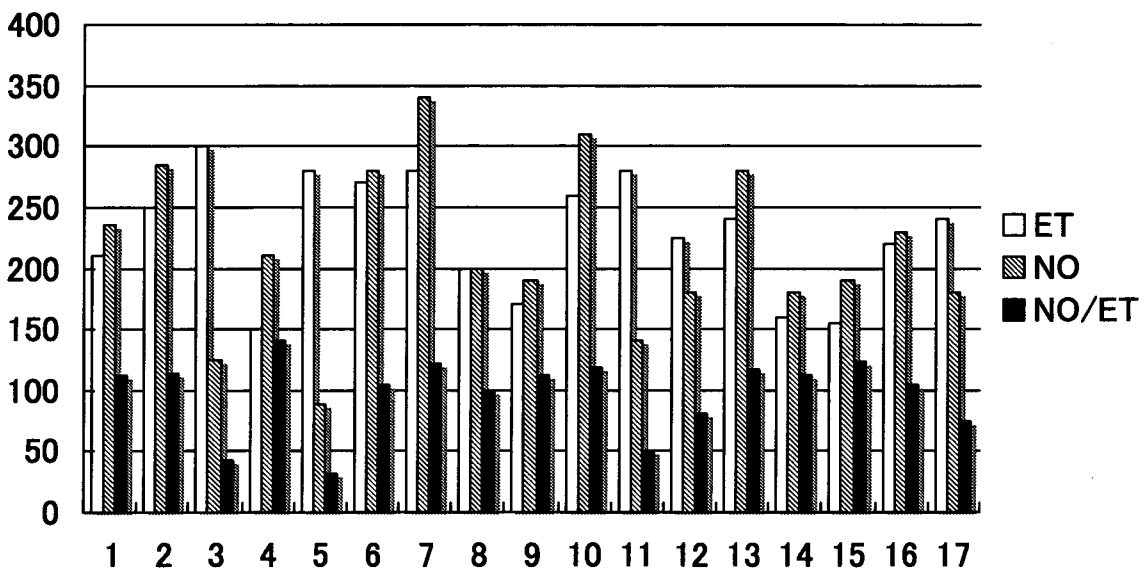


図2 17例のMCTDそれぞれのエンドセリン-1(ET-1)と一酸化窒素(NO)およびその比
症例3、5、11は肺動脈性肺高血圧症を合併

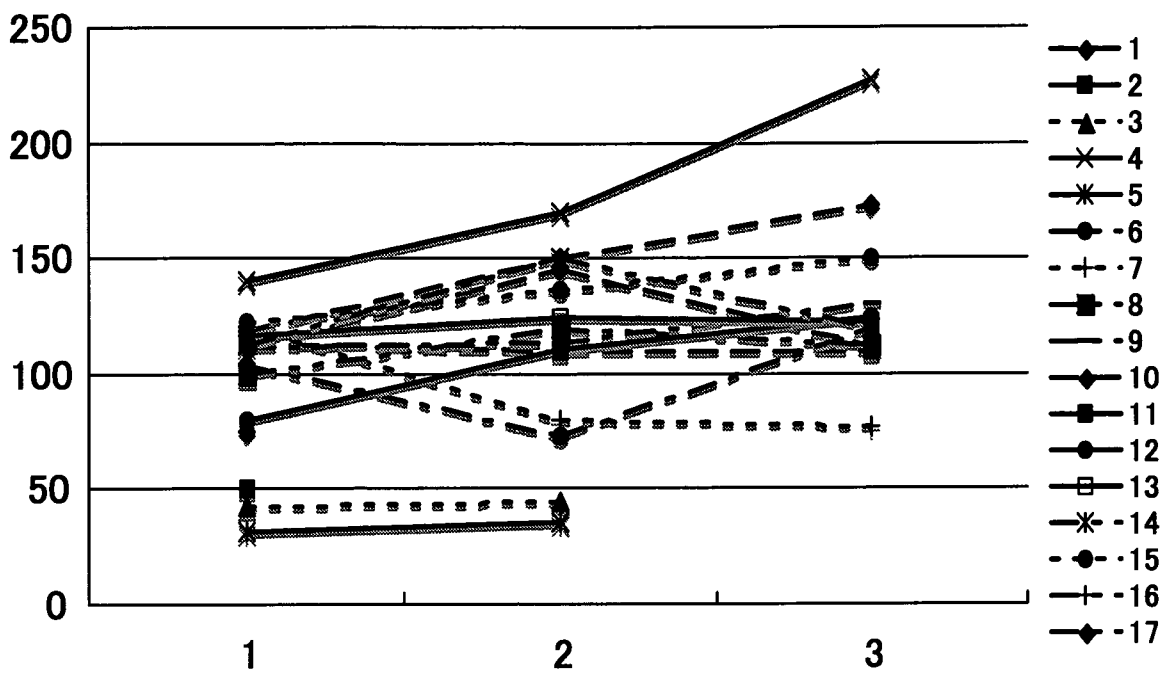


図3 17例のMCTDにおける継時的な一酸化窒素(NO)/エンドセリン-1(ET-1)比

MCTD の肺高血圧症に関する血清因子の研究

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

研究要旨

Angiotensin-1/2(Ang-1/2)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る。Ang-1 が血管の増殖や肺高血圧症 (PAH) での病態形成に関与することが推測されている。また、PDGF は、肺血管局所における発現の増加がみられ、肺高血圧症にも PDGF 受容体の発現の増加、PDGF の産生の増加が肺動脈の remodeling に影響し、肺高血圧症の発症に寄与していることが推測されている。MCTD にみられる PAH で、これらの血清因子の影響を検討した。

結果：SLE では APS 合併例など血管病変を有する症例で上昇が見られた。血管炎症例では 62.5% と最も陽性率が高かった。一方、MCTD は、膠原病の中では、最も上昇が少なく、その平均も 7 ± 24.2 と低値であった。PAH 例では、一部の症例では Ang-1 の増加がみられたが、他の疾患に比べその上昇率は軽度であった。

APS では PH 合併例(6)では、 $603.3 \pm 855.4 \text{ pg/ml}$ と PH のない 197.6 ± 557.2 に比べ高値であった。しかし、6 例中 1 例は 49.9 と低値で、SLE 合併で抗 U1RNP 抗体陽性症例であった。一方、SSc および SLE では PH 例では 5.8 ± 11.9 と非 PH 例の 81.2 ± 215.2 と有意に低値で、SLE においても、PH 例は Ang-1 の上昇例を認めなかった。以上より、Ang-1 は膠原病 PH により異なった病態を示す事が示唆された。APS 例のように血栓によらない PH 例では Ang-1 は上昇しない可能性が示唆された。

膠原病の PAH 群で、Ang-1/Ang-2 の関係を検討したが、相関関係は見られなかった。また、心臓超音波検査による肺動脈圧(PAP)と Ang-1 との間には、負の関係が見られたが有意差は見いだせなかった。PDGF と Ang1-/Ang-2 の関係は、抗 U1-RNP 陽性 CTD における PAH 群において、負の相関関係の傾向が見られたが有意差はなかった。抗 U1-RNP 陽性 CTD における PAH 群では PDGF は $2.7 \pm 1.8 \text{ ng/ml}$ と非 PAH 群 3.4 ± 1.8 と有意差はなかつが、U1-RNP 陽性 CTD では PAH 軽症例が多く含まれる為、診断が確定している膠原病 PAH 群で、PDGF 値を検討すると、PAP との有意の相関がみられた。

結論：MCTD の PAH などの肺動脈性 PH 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考えられた。一方、PDGF は血管の増殖に関与することが報告され一部 PAH でも増加していることが確認できた。

A. 研究目的

Angiotensin-1(Ang-1)は Tie2 受容体を介して血管平滑筋の増殖を誘導する因子であり、強力な血管増殖因子であるとともに、血管の保護作用を有することも知られている蛋白である[1, 2]。Du[3]は、Ang-1 が肺動脈性肺高血圧症(PAH)での病態形成に関与することを報告し注目された。一方、Ang-1 はより血管内皮細胞に防御的に働き、むしろ PAH には保護的に作用することを示

唆する報告 [5] もあり、Ang-1 の PAH 発症への関与は、いまだ明確ではない。また、膠原病性肺高血圧症におけるこれら因子の検討は行われていない。一方、Ang-2 は Ang-1 に対して相補的に作用することが報告されている[6]。

一方、PAH において、PDGF の関与が最近注目されている。すなわち、PDGF の肺血管局所における発現の増加がみられ、肺高血圧症にも PDGF 受容体の発現の増加、PDGF の産生の増

加が肺動脈の remodeling に影響し、肺高血圧症の発症に寄与していることが推測[7]され、PDGFの阻害薬のPAHの治療にも有効とする報告もある[8]。そこで、本研究では、各種膠原病における肺高血圧症における血清Ang-1/PDGFを測定し、検討したので報告する。

B. 研究方法

対象はSSc, MCTD, SLE, APS, 抗U1RNP抗体陽性例, PH with CTD, 健常人 (50)の血清を用いた。抗U1RNP抗体陽性の膠原病患者、MCTD、PAH合併(UCGでPAPs>40mmHg)のその他の膠原病を対象とした。これらの血中のAng-1 (ELISA), Ang-2 (Home made ELISA), PDGF (R&D社製ELISA)にて測定した。それぞれの臨床症状とAng-1/Ang-2, PDGFとの関連を検討した。

C. 研究結果

各種疾患での成績を示す(図1)。RA 147 ± 308 pg/ml (上昇55.1%), SLE 54.7 ± 145 (28.8), APS 83 ± 226 (54.5), PM-DM 26.1 ± 46.3 (30.7), SSc 97.6 ± 360 (25.9), MCTD 7 ± 24.2 (13.8), 血管炎症候群 136 ± 254 (62.5)であった。RAでは、早期RAでも上昇がみられ、SLEではAPS合併例など血管病変を有する症例で上昇が見られた。血管炎症例では62.5%と最も陽性率が高かった。一方、MCTDは、膠原病の中では、最も上昇が少なく、その平均も 7 ± 24.2 と低値であった。PH群では 12.3 ± 15.4 pg/ml と非PH群の 41.7 ± 57.6 に比較しAng-1の値は非PH群が有意に高値であった。

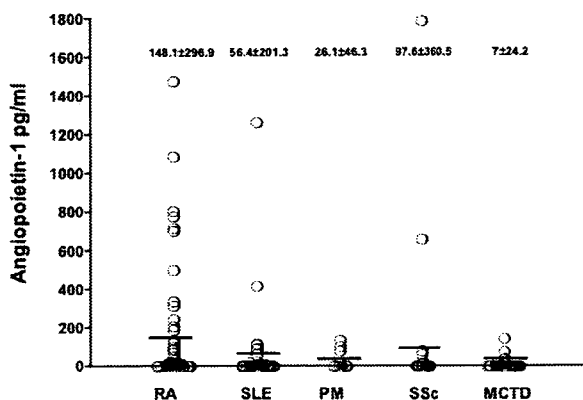


図1 各種膠原病と血中Ang-1

そこで、膠原病に伴うPH症例におけるAng-1

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

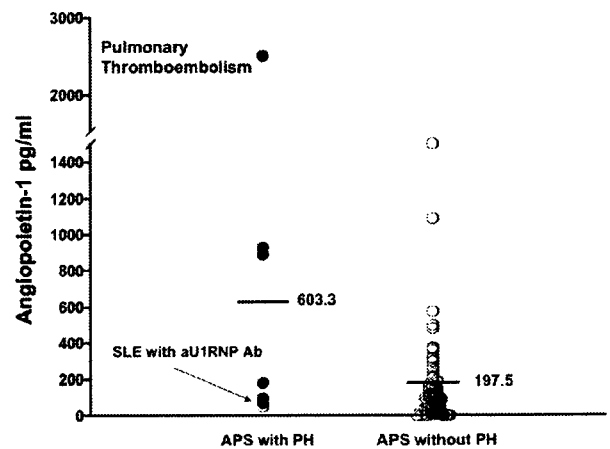


図2 APSの肺高血圧症と血中Ang-1

PHの多くがAng-1高値 147 ± 308 pg/mlを示したが、低値の1例はSLE(抗U1RNP抗体)陽性例で、PAHであった。一方、Ang-1高値のPH-APSはいずれも原発性APSで血栓性肺高血圧症であった。

MCTDのPAH例ではAng-1が低値を示す傾向が得られているため、Ang-1に相補的に作用するAng-2も同時に測定し両者の関係を検討した。抗U1-RNP陽性CTD群では、Ang-1とAng-2は軽度の正の相関関係が見られたが有意差は見られなかった。

この中で、PAH群はAng-2は 4.1 ± 2.2 pg/ml と非PAH群 5.8 ± 5.9 に比べ、やや低値であったが、やはり有意さはなかった。膠原病のPAH群に関しても、Ang-1/Ang-2の関係を検討したが、相関関係は見られなかった。また、心臓超音波検査による肺動脈圧(PAP)とAng-1の間には、負の関係が見られたが有意差は見いだせなかった。

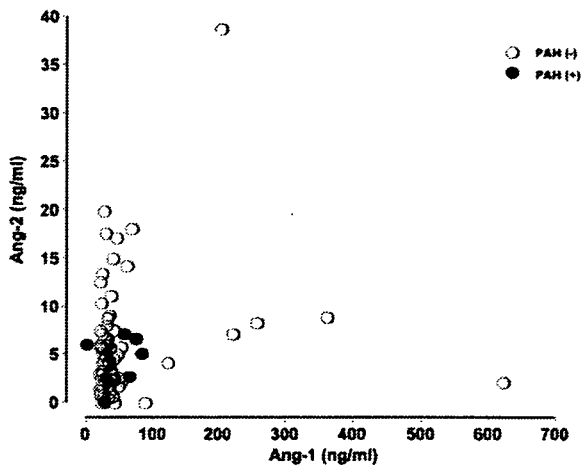


図3 血中 Ang-1 と Ang-2 の関係

次に、同じ血清を用いて PDGF と Ang1-/Ang-2 および PAH との関係を検討した。同時期の血小板数との相関は見られなく、血中の血小板の影響はなかった。PDGF と Ang1-/Ang-2 の関係は、抗 U1-RNP 陽性 CTD における PAH 群において、負の相関関係が見られたが有意差はなかった。抗 U1-RNP 陽性 CTD における PAH 群では PDGF は $2.7 \pm 1.8 \text{ ng/ml}$ と非 PAH 群 3.4 ± 1.8 と有意差はなかったが、U1-RNP 陽性 CTD では PAH 軽症例が多く含まれる為、診断が確定している膠原病 PAH 群で、PDGF 値を検討すると、PAP との有意の相関がみられた。

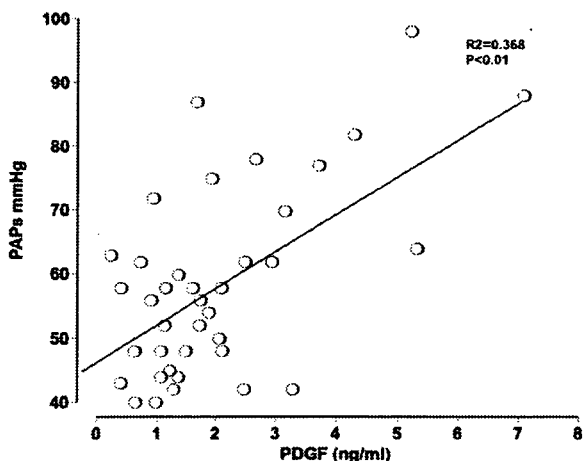


図4 血中 PDGF と肺動脈圧

D. 考察

MCTD の PAH では、Ang-1 が低値を示すことを報告したが、Ang-1 は血管内皮細胞の

apoptosis を抑制し、Ang-2 は逆に促進する作用を有していた[6]。PAH で、Ang-2 の上昇が予想されたが、PAH では Ang-2 の有意な上昇はみられず、このシステムにおいては、Ang-1 の低下により血管内皮細胞の保護が低下していることが肺高血圧症の発症に寄与する可能性が考えられた。

iPAH では、Ang-1 の血管増殖が、平滑筋増殖を呈し悪化させる因子との報告[9]と、逆に、血管内皮細胞上の Tie2 受容体の発現が低下し、平滑筋からの Ang-1、Ang-2 の産生も低下し、血管内皮細胞の apoptosis の抑制効果が低下することもいわれた。幾つかの低酸素誘発の PAH モデルでも、Ang-1 の産生が促進され、PAH がみられることが報告されており、PAH 発症の因子の一つであることは確認されている[10]。一方、Ang-1 が、Ang-2 との相関が見られなかったことは、膠原病の PAH では Ang-1/Ang-2 システムが正常に機能していないことが、PAH の発症に寄与している可能性もあり、実際の PAH 症例の血管内皮や平滑筋細胞における、分子レベルの発現状況を確認することが必要と考えられる。

PDGF の肺血管局所における発現の増加がみられ、肺高血圧症にも PDGF 受容体の発現の増加、PDGF の産生の増加が、肺動脈の remodeling に影響し、肺高血圧症の発症に寄与していることが推測されている[8]。肺高血圧症でも肺血管における PDGF 受容体の発現の増加、PDGF の産生の増加が肺動脈の remodeling に影響し、肺高血圧症の発症に寄与していることが推測されている [7, 11]。Imatinib は PDGF 阻害薬であり、PAH 動物実験モデルでも、Imatinib の有効性が報告されている[8]。Sildenafil は PDG を介した、肺動脈由来平滑筋細胞の増殖を抑制することも証明されている[12]。PDGF の産生を抑制する治療の検討が必要と考えられる。

E. 結論

膠原病における PH の鑑別に血清 Ang-1/Ang-2 の測定の有用性が明らかにされた。抗 U1RNP 抗体陽性例の PAH 例において PDGF の関与も推測され、Ang-1/PDGF が PAH の発症に関与するかを更に明確にする必要がある。

文献

1. Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K: Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res* 2006; 98(8): 1014-23.
2. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, et al.: Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S): 13S-24S.
3. Du L, Sullivan CC, Chu D, et al.: Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 500-9.
4. Kugathasan L, Dutly AE, Zhao YD, et al.: Role of angiopoietin-1 in experimental and human pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2005; 128(6 Suppl): 633S-642S.
5. Zhao YD, Campbell AI, Robb M, Ng D, Stewart DJ: Protective role of angiopoietin-1 in experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2003; 92(9): 984-91.
6. Imhof BA, Aurrand-Lions M: Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med* 2006; 12(2): 171-2.
7. Jones R, Capen D, Jacobson M, Munn L: PDGF and microvessel wall remodeling in adult rat lung: imaging PDGF-AA and PDGF-R α molecules in progenitor smooth muscle cells developing in experimental pulmonary hypertension. *Cell Tissue Res* 2006; 326(3): 759-69.
8. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, et al.: Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2811-21.
9. Dewachter L, Adnot S, Fadel E, et al.: Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(9): 1025-33.
10. Sullivan CC, Du L, Chu D, et al.: Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(21): 12331-6.

11. Barst RJ: PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2691-4.

12. Tantini B, Manes A, Fiumana E, et al.: Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 2005; 100(2): 131-8.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) Watabe H, Akahoshi T, Okada J, Kokubun S, Kurihara Y and Kondo H : Coexistence of nodular regenerative hyperplasia of the liver and pulmonary arterial hypertension in patients with connective tissue diseases: report of three cases and review of the literature. *Modern Rheumatol* 16,839-94.2005.

2) 岡田 純、石川 章、西 和男: TNF療法における infliximab から etanercept 変更の有効性. *新薬と臨床* 55:1446-52.2005.

3) Okada J: Autoimmune hemolytic Anemia in Primary Sjogren's Syndrome. *Intern Med* 45: 669-70. 2005.

4) Kawaguchi Y, Tochimoto A, Hara M, et al.: NOS2 polymorphisms associated with the susceptibility to pulmonary arterial hypertension with systemic sclerosis: contribution to the transcriptional activity. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(4): R104.

5) 近藤啓文、岡田 純: 混合性結合組織病の病態と治療-最近の研究の進歩. *日本内科学会雑誌* 95: 1881-7.2006.

学会発表

1) 坂井美保、石川 章、岡田 純、近藤啓文: 血清 Angiopoietin-1 の膠原病における臨床的意義. 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

なし

肺動脈高血圧症発症機転の解析に関する研究

分担研究者： 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科・准教授
研究協力者： 佐藤 隆司 慶應義塾大学医学部内科・特別研究助教

研究要旨

低酸素暴露により誘導される肺動脈高血圧症 (PAH) の発症機転を追究するため、低酸素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の同定を試みた。ヒト正常肺動脈、大動脈、臍帯静脈由来内皮細胞を通常 (21%O₂) または低酸素 (1%O₂) 条件下で培養し、TGF-β/BMP、血管新生関連遺伝子アレイ (179 遺伝子) を用いて、低酸素暴露により肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す分子をスクリーニングした。その結果、27 の候補遺伝子が抽出され、複数のロットを用いた半定量的 PCR、定量的 PCR、免疫ブロット法によるこれら遺伝子・蛋白発現解析の結果、最終的に 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った。また、肺動脈内皮細胞は低酸素暴露後に BMP の下流遺伝子 ID3 の発現も低下したことから、BMP 受容体の発現抑制は細胞機能に影響を与えることが示された。さらに、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるシンバスタチンの添加は、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。以上より、低酸素暴露により PAH が誘導される機序のひとつとして、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た。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 の発症予防に有用な可能性が考えられた。

A. 究目的

肺動脈高血圧症 (PAH) は MCTD 患者の予後を規定する主要な臓器病変の一つであるが、その発症機序はいまだ明らかでない。肺が慢性的に低酸素状態に暴露されると PAH が惹起されることは臨床観察、動物実験から明らかである。そのため、低酸素暴露が肺動脈内皮細胞に PAH の発症に関わる器質的变化をもたらす可能性が高い。PAH における細胞増殖性の変化は肺動脈に選択的で他の動脈や静脈にみられない点に注目し、本研究では異なる組織由来の培養ヒト血管内皮細胞を低酸素に暴露し、肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す分子の同定を試みた。

B. 究方法

(1) 低酸素暴露により誘導される培養血管内皮細胞の遺伝子発現変化の検討

培養ヒト正常肺動脈、大動脈、臍帯静脈由来内皮細胞を通常 (21%O₂) および低酸素 (1%O₂) に

24 時間暴露し、total RNA を抽出し、DNA アレイ (SuperArray 社) を用いて、血管新生関連および TGF-β/BMP 関連の計 179 遺伝子の発現変化をスクリーニングした。低酸素と通常培養の遺伝子発現が 1.5 倍以上異なるものを有意な発現変化と定義した。低酸素暴露により肺動脈内皮細胞での発現が変化し、その発現変化が大動脈および臍帯静脈内皮細胞と異なる、2 つの条件を満たした遺伝子を肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す候補遺伝子として抽出した。

DNA アレイの結果の確認および再現性を検討するため、さらに異なるロットの各種血管内皮細胞 (肺動脈:3, 大動脈:2, 臍帯静脈:2) を用いた。DNA アレイの結果から抽出された遺伝子群に特異的なプライマーを用いて PCR を行ない、PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、GelDoc XR (BIO-RAD Laboratories) で可視化をした。個々のバンドの発現強度を NIH Image を用いた

デンシトメトリーにより半定量的に解析した。複数のロットで再現性の得られた遺伝子については、さらに TaqMan PCR による定量的解析を行った。通常酸度条件で培養した肺動脈内皮細胞由来の cDNA の希釈系列を用いて各遺伝子の発現強度を標準化し、さらに β -actin の発現レベルにより補正した。最終的に、統計学的な検討を行い、肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す遺伝子を同定した。

(2) 培養血管内皮細胞における蛋白発現解析

遺伝子発現解析により同定された肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す分子について、肺動脈、大動脈、臍帯静脈血管内皮細胞を 12、24、48、72 時間低酸素に暴露し、それらの蛋白発現変化を検討した。各種細胞は RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl pH7.4、150mM NaCl、0.25% deoxycholic acid、1% Nonidet P-40、1mM PMSF、1mM sodium orthovanadate、1mM sodium fluoride、1 μ g/ml aprotinin、1 μ g/ml leupeptin) で溶解し、8.5%ポリアクリルアミド-SDS ゲル電気泳動で分画し、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。免疫プロット法は、ヤギポリクローナル抗 BMPR-IA 抗体 (R&D Systems)、マウスモノクローナル抗 BMPR-II 抗体 (Becton Dickinson) またはウサギポリクローナル抗 β -actin 抗体 (Sigma) を用い、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応後、化学的に発色することで検出した。分子量をもとに目的分子バンドを同定し、その強度をデンシトメトリーにより半定量的に求め、 β -actin 発現量との比を計算することで標準化した。

(3) BMP 下流遺伝子の発現変化の検討

BMP/TGF- β シグナルにより特異的に誘導される下流遺伝子として ID3、PAI-1 が知られている。低酸素に 24 時間暴露後の肺動脈、大動脈、臍帯静脈由来血管内皮細胞における ID3、PAI-1 遺伝子の発現変化をデンシトメトリーによる半定量 PCR、TaqMan PCR による定量 PCR を用いて検討した。

(4) シンバスタチンが BMPR-IA、BMPR-II 遺伝子発現変化に及ぼす影響の検討

低酸素培養開始時にシンバスタチン

(CALBIOCHEM) もしくは溶解液を添加し (最終濃度; 1 μ M、10 μ M)、BMPR-IA、BMPR-II 遺伝子発現の変化をデンシトメトリーによる半定量 PCR、TaqMan PCR による定量 PCR を用いて検討した。

(5) 統計学的検討

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究では購入した培養ヒト血管内皮細胞を用い、ヒト検体の採取は行なわなかった。

C. 究結果

(1) 低酸素暴露により肺動脈血管内皮細胞で特異的な発現変化を示す遺伝子の同定

DNA アレイによるスクリーニングの結果、低酸素暴露後に発現が低下した遺伝子は、肺動脈内皮細胞で 20、大動脈内皮細胞で 14、臍帯静脈内皮細胞で 10 検出された。一方、低酸素暴露後に発現が増加した遺伝子は、肺動脈内皮細胞で 10、大動脈内皮細胞で 10、臍帯静脈内皮細胞で 17 検出された。そのうち、27 遺伝子が肺動脈血管内皮細胞に固有の発現変化を示した。これら候補遺伝子について半定量的 PCR で再現性を確認したところ、5 遺伝子 (BMPR-IA、BMPR-II、Flt-1、Tie-1、CD31) に絞られた。さらに、定量的 PCR により、BMP 受容体である BMPR-IA、BMPR-II の 2 つが同定された。BMPR-IA 遺伝子発現は低酸素培養により肺動脈内皮細胞で 0.5 倍と有意に低下し、大動脈内皮細胞では 1.0 倍と変化せず、臍帯静脈内皮細胞では 1.7 倍に増加した (図 1A)。一方、BMPR-II 遺伝子発現は低酸素培養により、肺動脈内皮細胞で 0.6 倍と有意に低下し、大動脈内皮細胞では 0.8 倍、臍帯静脈内皮細胞では 1.4 倍と変化した (図 1B)。

(2) 低酸素暴露による BMPR-IA、BMPR-II の蛋白レベルでの発現変化

デンシトメトリーによる半定量的検討では、BMPR-IA 蛋白発現は肺動脈内皮細胞では低酸素暴露 48 時間より経時的に低下し、72 時間後では通常培養と比べ 0.5 倍となった。一方、72 時間後の発現は大動脈内皮細胞では 1.8 倍、臍帯静脈内皮細胞は 0.7 倍であった。BMPR-II 蛋白

発現は肺動脈内皮細胞では低酸素暴露 48 時間より経時的に低下し、72 時間後では通常培養と比べ 0.5 倍となった。大動脈内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞はそれぞれ 1.0 倍と変化しなかった。

(3) 低酸素暴露による BMP 下流遺伝子の発現変化

低酸素暴露による BMP 受容体の発現変化が ID3 発現に及ぼす影響を検討した。低酸素暴露 24 時間後に肺動脈内皮細胞における ID3 遺伝子発現は通常培養の 0.2 倍と減少した。一方、大動脈内皮細胞では 2.9 倍、臍帯静脈内皮細胞では 0.5 倍と変化した。また、肺動脈内皮細胞は低酸素暴露に TGF- β 受容体の下流遺伝子 PAI-1 の発現変化を認めなかった(肺動脈 0.7 倍、大動脈 2.0 倍、臍帯静脈、1.4 倍)。

(4) シンバスタチンの BMP 受容体発現に及ぼす影響

シンバスタチン存在下で肺動脈内皮細胞を低酸素に暴露し、BMPR-IA、BMPR-II 遺伝子の発現を検討した(図 2)。シンバスタチンは低酸素暴露による肺動脈内皮細胞における遺伝子発現の低下を容量依存的に抑制した。

D. 考察

本研究により、低酸素暴露により肺動脈内皮細胞において BMPR-IA および BMPR-II の発現が低下し、その変化は肺動脈血管内皮に固有であることが示された。さらに、肺動脈内皮細胞を低酸素に暴露すると BMP 下流遺伝子 ID3 発現が抑制されたことから、BMP 受容体発現低下が BMP シグナル不全を誘導すると考えられた。BMP は血管内皮細胞の増殖を強力に抑制することから、低酸素暴露による BMP シグナル不全が肺動脈血管内皮細胞の増殖を介して PAH 病態を誘導する可能性が考えられた。この点は、原発性 PAH で報告されている BMPR-II 遺伝子変異および肺組織における BMPR-IA、BMPR-II の発現低下が PAH 病態誘導に関わるという知見を支持する。

スタチン系薬剤が PAH 病態を改善することが報告されている。原発性および二次性 PAH 患者を対象としたシンバスタチン (20-80mg/日) のオープン試験では、6 分間歩行距離と心拍出量の

改善と右室収縮期圧低下を認めた。低酸素で誘導される PAH モデル動物にスタチン系薬剤を投与すると肺動脈壁肥厚の抑制、右室収縮期圧の低下を認めることが示されている。また、培養肺微小血管内皮細胞にシンバスタチンを添加することで、BMPR-II 遺伝子の発現が増加することも報告されている。本研究でも、シンバスタチン添加により、低酸素暴露により誘導される肺動脈内皮細胞における BMP 受容体の発現低下が抑制できることが示された。したがって、スタチン系薬剤が低酸素暴露による BMP シグナル不全を是正することで PAH の進展予防に有効な可能性が示された。

E. 結論

低酸素暴露が PAH の病態を誘導する機序のひとつとして、肺動脈内皮細胞における BMPR-IA、BMPR-II の発現低下が明らかとなった。また、スタチン系薬剤が MCTD に伴う PAH の進展を抑制しえる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

Kuwana M: Deficient vascular repair as a mechanism for scleroderma vascular disease. Professor E. Carwile LeRoy Memorial International Workshop on Scleroderma (Tokyo). 2007. 5.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

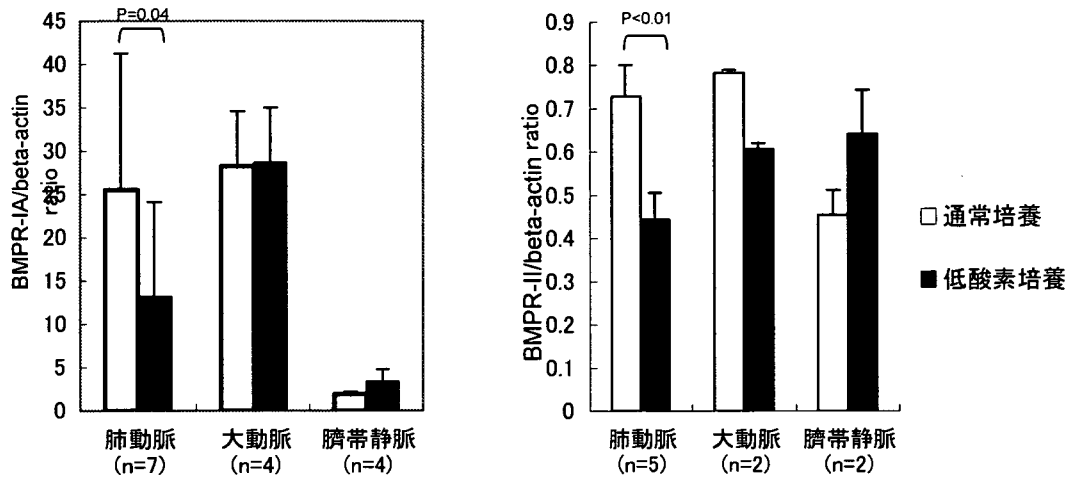


図 1: 通常培養および低酸素培養における肺動脈、大動脈、臍帯静脈由来の培養血管内皮細胞の BMPR-IA(A)と BMPR-II(B) 遺伝子発現の TaqMan PCR による定量的解析。BMPR-IA、BMPR-II の発現は β -actin 発現に対する比として表した。

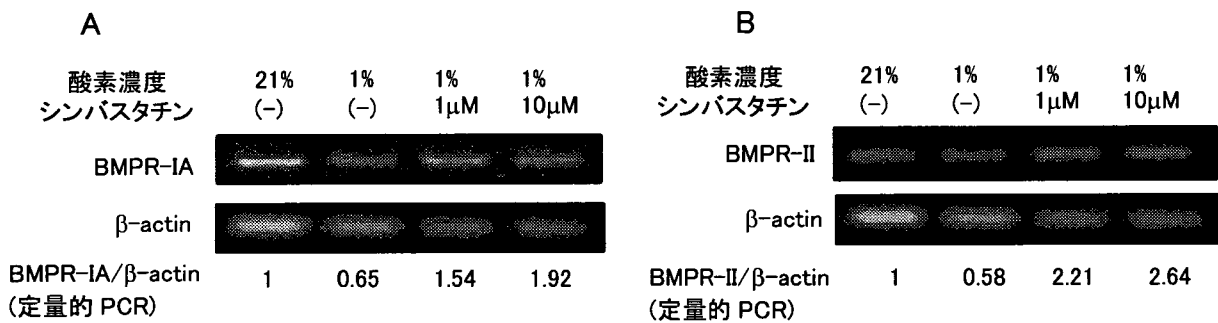


図 2: シンバスタチン存在下の低酸素暴露が肺動脈内皮細胞における BMPR-IA(A)と BMPR-II(B) 遺伝子発現に与える影響の検討。BMPR-IA、BMPR-II 発現は β -actin 発現量で標準化し、通常培養時の BMP 受容体発現量を 1 とした時の比として表記した。

膠原病性肺高血圧症における Na 利尿ペプチドファミリーの臨床的意義に関する研究

分担研究者：	諏訪 昭	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学・准教授
研究協力者：	佐藤 徹	慶應義塾大学医学部内科・准教授
	金子 祐子	慶應義塾大学医学部内科・特別研究助教
	佐藤 慎二	慶應義塾大学医学部内科・助教
	桑名 正隆	慶應義塾大学医学部内科・准教授
	平形 道人	慶應義塾大学医学部内・専任講師
	鈴木 康夫	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学・教授

研究要旨

【目的】心房性および脳性 Na 利尿性ペプチド (ANP, BNP) は、心不全において代償的に分泌・産生され、肺高血圧症 (PH) の診断、病態把握上有用である。BNP 前駆体は心筋細胞内で分解され、BNP とともに血中へ分泌されるが、BNP 前駆体 N 末端断片 (NT-proBNP) は、慢性および急性心不全では著明に増加し、PH の診断や予後因子として有用とされている。本研究では、膠原病性 PH (CPH) における ANP, BNP およびペプチド性血管内皮由来弛緩因子である CNP, 血管収縮因子であるエンドセリン-1 (ET-1), および Na 利尿性ペプチドの細胞内セカンドメッセンジャーであるサイクリック GMP (cGMP) の意義の追究を目的とした。【対象および方法】1) 対象は膠原病患者 111 例および特発性肺動脈性 PH (IPH) 患者 63 例の計 174 例とした。2) PH の診断は、心ドップラーエコー法による推定平均肺動脈圧 (PAm) ≥ 35 mmHg または心臓カテーテル検査により PAm ≥ 30 mmHg を示すものとした。3) 血漿 ANP, BNP, CNP は IRMA 法, ET-1 は RIA2 抗体法, cGMP は RIA 法, NT-proBNP は競合 ELISA 法 (BIOMEDICA 社; B) または電気化学免疫発光法 (Roche 社; R) を用いて測定した。4) 二群間の比較はマン・ホイットニ検定, 相関の程度は Spearman の順位相関, 因子分析を用い検定した。各因子の特性は ROC 曲線より曲線下面積 (AUC) を求め、ウィルコクソン符号付順位和検定の変法を用いて決定した。【結果】1) 体液量貯留をきたす病態では、BNP 値は上昇し、特に PH と心不全例で高値を示したが、これらを認めない例でも BNP 高値を示す例が存在した。2) 多変量解析により PH, 心不全, BNP, ANP, cGMP の関連が示された。3) 心不全, 腎不全, 高血圧を除く膠原病患者 79 例の検討において、PH 例 (N=16) では非 PH 例 (N=63) に比して、NT-proBNP (R), NT-proBNP (B), BNP, ANP, cGMP (いずれも $p < 0.01$), ET-1 ($p < 0.05$) が高値を示した。4) NT-proBNP (R) と BNP, ANP, cGMP ($p < 0.01$), NT-proBNP (B) と BNP ($p < 0.05$), BNP と ANP, BNP と cGMP, ANP と cGMP の間に相関が認められた ($p < 0.01$)。5) AUC は、ANP 0.90, NT-proBNP (R) 0.84, BNP 0.80, cGMP 0.79, NT-proBNP (B) 0.75 であり、これらの ROC 曲線が有意であった。PH 診断特性は、NT-proBNP (R) (≥ 78 pg/ml) : 感度 95%, 特異度 57%, NT-proBNP (B) (≥ 722 pg/ml) : 感度 79%, 特異度 61%, BNP (≥ 18 mg/dl) : 感度 79%, 特異度 50%, ANP (≥ 40 mg/dl) : 感度 74%, 特異度 89%, cGMP (≥ 4.1 mg/dl) : 感度 79%, 特異度 57% であった。6) CPH (N=38) と IPH (N=62) の比較では、NT-proBNP (R) と BNP に相関が認められた (0.942, $p < 0.01$)。PAm による重症度で層別化し、各群平均測定値をそれぞれのカットオフ値で除した INDEX を比較したところ、NT-proBNP (R) は重症度を反映した。【考察】血漿 BNP および ANP は、従来の報告と同様 PH 診断の有用な指標となることが確認されたが、CNP は心不全や PH などで上昇はみられなかった。血漿 cGMP は、心不全に加え CPH においても高値を示し

た。NT-proBNP (R) が CPH および IPH の診断および病態把握に有用なことが証明された。さらに、本研究では PH 診断に適した ANP および cGMP の境界値を見出した。これらの成績は PH の診断指針への応用が可能と思われる。【結論】 CPH において ANP・BNP/GC-A 系が活性化され、これら液性因子が診断、病態把握上有用な指標となることが示唆された。

A. 研究目的

心房性および脳性 Na 利尿性ペプチド (ANP, BNP) は、心不全において代償的に分泌・産生されるホルモンであり、原発性肺高血圧症 (PPH) および膠原病性肺高血圧症 (CPH) の診断、および病態把握上有用とされる。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の、PH の診断、心不全や心血管イベント、PH の予後因子としての有用性が示されている。一方、心不全の程度に関わらず BNP 高値を示す症例も一部の CPH 症例で見られるなど、なお不明な点も多い。そこで、本研究では、CPH における ANP, BNP, NT-proBNP および第三の Na 利尿性ペプチドである CNP, 血管収縮因子であるエンドセリン-1 (ET-1), および Na 利尿性ペプチドの細胞内セカンドメッセンジャーであるサイクリック GMP (cGMP) の臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

膠原病患者 111 例および特発性肺動脈性 PH (IPAH) 患者 63 例の計 174 例を対象とした。

2. 方法

1) 心ドップラーエコー法による推定平均肺動脈圧 (PAm) ≥ 35 mmHg を示す例または心臓カテーテル検査により PAm ≥ 30 mmHg を示すものを PH と診断した。

2) 血漿 ANP, BNP, CNP は IRMA 法, ET-1 は RIA2 抗体法, cGMP は RIA 法, NT-proBNP は競合 ELISA 法 (BIOMEDICA 社; B) または電気化学免疫発光法 (Roche 社; R) を用いて測定した。

3) 統計学的解析では、二群間の比較はマン・

ホイットニ検定, 相関の程度は Spearman の順位相関, 因子分析を用い検定した。各液性因子の特性は ROC 曲線 (受信者動作特性曲線) より曲線下面積 (AUC) を求め, ウィルコクソン符号付順位和検定の変法を用いて決定した。

(倫理面への配慮)

患者への説明の上同意を得た。また、得られた調査票の管理を厳重にし、プライバシーの保護に留意した。

C. 研究結果

1. 膠原病における各液性因子

1) 各種病態における BNP 値

膠原病患者 111 例につき、これまでに BNP 上昇との関連が知られている、PH, 心不全, 高血圧症, 腎機能障害の有無で群別化し、BNP 値を比較した。これらの病態では、いずれも BNP 値は上昇していたが、特に、PH と心不全合併例で高値を示した。一方で、これらの病態を認めない例でも BNP 高値を示す例がみられた (図 1)。

2) 多変量解析による液性因子の解析

17 変数 (NT-proBNP を除く) に対して、主因司法を用いて抽出した因子数が 8 で、重要な因子数は 6 と推定された。各因子により 17 変数が説明される割合は、因子 1 では 21.9% で、6 因子までで 75.3% を占めていた (表 1)。

因子分析により、変数間の相関行列、偏相関行列、因子間の主相関、直交・斜交スコアの重み付け、方本抽出の妥当性、変数の複雑性、比例分散寄与率を検討した。その結果、因子 1 で説明される変数として、PH, 心不全, BNP, ANP, cGMP が抽出され、これらの変数の関連が示された。

2. CPH における各液性因子の意義

1) CPH 患者背景

心不全,腎不全,高血圧を除く膠原病患者は,100例で,これらの診断は,全身性エリテマトーデス(SLE)(N=34),全身性硬化症(SSc)(N=33),混合性結合組織病/膠原病重複症候群(MCTD/OL)(N=11),シェーグレン症候群(SiS)(N=6),ベーチェット病(N=4),関節リウマチ(RA)(N=4),多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)(N=2),高安動脈炎(N=2),原発性リン脂質症候群(APS)(N=1),未分類膠原病(UCTD)(N=3)であった.

2) CPH と各液性因子

膠原病患者79例をPHの有無で二群に分け,NT-proBNP,ANP,BNP,CNP,ET-1,cGMP値を比較した.PH例(N=16)では非PH例(N=63)に比して,NT-proBNP(R)(中央値 317.2 ± 932.5 VS 74.4 ± 91.8 , pg/ml, $p < 0.01$),NT-proBNP(B)(772.0 ± 237.9 VS 498.1 ± 335.3 pg/ml, $p < 0.01$),BNP(50.1 ± 86.3 vs 18.3 ± 45.4 pg/ml, $P < 0.01$),ANP(199.7 ± 166.9 VS 17.7 ± 22.0 pg/ml, $P < 0.01$),cGMP(7.5 ± 3.3 VS 3.8 ± 1.6 pmol/ml, $p < 0.01$),ET-1(2.2 ± 0.7 VS 1.8 ± 0.4 , $p < 0.05$)が高値を示した(図2).

2) 各液性因子間の相関

NT-proBNP(R)とBNP,ANP,cGMP($p < 0.01$),NT-proBNP(B)とBNP($p < 0.05$),BNPとANP,cGMP,ANPとcGMPの間に相関が認められた($p < 0.01$)(表2).

3) 各液性因子の特性

ROC曲線からもとめたAUCは,ANP 0.90(95%CI:0.83-0.98),NT-proBNP(R) 0.84(0.74-0.95),BNP 0.80(0.67-0.92),cGMP 0.79(0.67-0.91),NT-proBNP(B) 0.75(0.62-0.88)であり,とこれらのROC曲線が有意であった(図3).

PH診断における特性は,NT-proBNP(R)(≥ 78 pg/ml):感度95%,特異度57%,NT-proBNP(B)(≥ 722 pg/ml):感度79%,特異度61%,BNP(≥ 18 mg/dl):感度79%,特異度50%,ANP(≥ 40 mg/dl):感度74%,特異度89%,cGMP(≥ 4.1 mg/dl):感度79%,特異度57%であった(表3).

4) 各液性因子のカットオフ Index

各群平均値をそれぞれのカットオフ値で除したカットオフ Index は,NT-proBNP(R)が8.21,BNPが7.80,ANPが2.18,cGMPが1.86と,PHにおいてNT-proBNP(R)の上昇が最も顕著であった(表4).

3. PHにおけるNT-proBNPの意義

1) PH患者背景

PH 100例の内訳は,CPHが37例(SSc(N=15),SLE(N=8),MCTD/OL(N=5),SiS(N=3),RA(N=2),ベーチェット病(N=1),UCTD(N=3)と,IPAH 63例であった.性別は,男性17例,女性83例であった.年齢は,平均 48.4 ± 15.6 歳であった.

PAmは30-91mmHg,平均 46.1 ± 17.1 mmHgであった.

2) CPH と IPAH における NT-proBNP (R) と BNP

CPHとIPAHの二群に分け,NT-proBNPおよびBNPを比較したところ,両者ともに差はみられなかった(図4).

3) NT-proBNP と BNP の相関

NT-proBNP(R)は 2119.8 ± 12553.0 pg/ml,BNPは 207.3 ± 502.1 pg/mlであり,両者に相関が認められた(0.942 , $p < 0.01$)(図5).

4) NT-proBNP と BNP のカットオフ Index

PAmで層別化し,カットオフ INDEXを比較したところ,重症($PAm \geq 55$ mmHg):NT-proBNP(R)14.8 vs BNP 8.9,中等症(40-54mmHg):13.0 vs 12.5,軽症(< 40 mmHg):2.4 vs 4.6とNT-proBNP(R)は重症度を反映した(図6).

D. 考察

ANPは,1984年に松尾らにより,単離,同定されたホルモンであり,血圧・体液調節に関わる心臓ホルモン,神経ペプチドであることが明らかとされた1988年には,第二のNa利尿性ペプチドであるBNPが脳と心臓から発見され,さらに1990年には,第三のNa利尿性ペプチドであるCNPが脳から発見された.Na利尿性ペプチドの受容体には,グアニルシクラーゼ(GC)-A(Na利尿性ペプチドA受容体;NPR-A),GC-B(Na利尿性ペプチドB受容体;NPR-B),クリ

アランス受容体 (Na 利尿性ペプチド C 受容体 ; NPR-C) があるが, NPR-B には CNP が特異的に結合し, NPR-A には, ANP, BNP が高い親和性を示し, NPR-C には, ANP>CNP>BNP の順に高い親和性を示す. ANP と BNP は, 心不全では重症度に比例して, 血中濃度が上昇することから, PH の診断の指標となることが指摘されてきた. 本研究においても, 血漿 BNP および ANP は, CPH および心不全において高値を示し, PH 診断の有用な指標となることが確認された.

CNP は血管内皮細胞で合成・分泌され, ペプチド性血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) として, 血管平滑筋細胞の受容体に作用し, cGMP 産生を亢進させる. CNP の分泌は, ANP, BNP などと異なり, 心負荷の病態では上昇せず, サイトカインなど別の因子によって調節を受け, 血管平滑筋細胞や血管内皮細胞の増殖や肥大を抑制することも, 明らかとされているが, PH における CNP の動態については, これまで不明であった. 今回の検討では, CNP は心不全や PH などの病態でも上昇はみられず, ほかの Na 利尿性ペプチドとの関連や炎症反応などとの関連は認められなかった.

cGMP は, GTP を基質として合成酵素 GC により生成され, cGMP ホスホジエステラーゼにより分解される細胞内情報伝達物質である. GC は, ANP, 副甲状腺ホルモンやカテコラミン, 大腸菌毒素などで活性化される. 排泄分泌された血中の cGMP は, 組織内の cGMP の変化を反映し, 心不全において上昇するとされていたが, 膠原病症例においても PH および心不全においても高値を示し, 新たな指標となることが明らかとなった.

また, ANP, BNP とともに EDRF である cGMP が上昇を示したことから, これまでの報告と異なり血管収縮因子である ET-1 は正常であったことから, CPH において, 体液量調節のために ANP・BNP/GC-A 系が作用していることを示唆し, CPH の病態を考える上で, 興味深い知見と思われる.

BNP 値は, 既知の体液貯留をきたす病態を認めない例においても基準値を超える例が多くみ

られた. BNP は不活性プロホルモンとして合成され, 活性型の BNP と不活性 N 末端断片 (NT-proBNP) に切断されるが, NT-proBNP が冠動脈性心疾患の長期マーカーとなることも, 近年報告されている. NT-proBNP は BNP に比して血中半減期が長く, 検体の保存安定性も高く, 軽度心機能障害の検出能に優れ, 重症度をよく反映することから, PH の早期診断および病態把握に有用な可能性が示されていた. 本研究において, NT-proBNP が BNP, ANP と同様に CPH において高値を示し, NT-proBNP の診断精度は, BNP より優れていることを明らかとした.

CPH と IPAH における NT-proBNP および BNP の比較では, 両者に差は認められなかった. これらの成績からは, CPH と IPAH の病態の類似性が示唆され, IPAH で得られたエビデンス CPH において利用可能であることを支持している. また, PAm 高値の重症例において, NT-proBNP は BNP に比してより上昇することから, NT-proBNP は重症度を反映し, 病態把握上有用なマーカーとなることが明らかとなった. 今後, これらの成果を CPH の診断, 治療効果判定のフローチャートへの導入が期待できる.

E. 結論

CPH において ANP・BNP/GC-A 系が活性化されており, これら液性因子の測定が診断, 病態把握上有用な指標となることが明らかとなった.

F. 健康危険情報

該当なし.

G. 研究発表

論文発表

1. Michito Hirakata, Akira Suwa, Masataka Kuwana, Shinji Sato, Tsuneyo Mimori, John A. Hardin. Autoantibodies to the Ku protein are associated with the DPB1 gene. *Arthritis Rheum* 52(2):668-669, 2005.
2. Shinji Sato, Shigeru Nogawa, Michito Hirakata,

- Hideko Iizuka, Akira Suwa, Tsuneyo Mimori, Yasuo Ikeda. Sensorimotor polyneuropathy as an initial clinical manifestation of sarcoidosis. *Mod Rheumatol* 15(2):144-147, 2005.
3. Shunichi Kumagai, Seiji Kawano, Tatsuya Atsumi, Shigeko Inokuma, Yosuke Okada, Yoshiki Kanai, Junichi Kaburaki, Hideto Kameda, Akira Suwa, Hiroyuki Harigaya, Shunsei Hirohata, Hirofumi Makino, Hiroshi Hashimoto. Vertebral fracture and bone mineral density in women receiving high-dose glucocorticoids for treatment of autoimmune diseases. *J Rheumatol* 32(5):863-869, 2005.
4. Shinji Sato, Michito Hirakata, Masataka Kuwana, Akira Suwa, Shinichi Inada, Tsuneyo Mimori, Takeshi Nishikawa, Chester V. Oddis, Yasuo Ikeda. Autoantibodies to a 140 kDa polypeptide, cADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 52(5):1571-1576, 2005.
5. Shinji Sato, Michito Hirakata, Masataka Kuwana, Kunio Nakamura, Akira Suwa, Shinichi Inada, Tsuneyo Mimori, Yasuo Ikeda. Clinical characteristics of Japanese patients with anti-PL-7 (anti-threonyl-tRNA synthetase autoantibodies. *Clin Exp Rheumatol* 23(5):609-615, 2005.
6. Yuko Kaneko, Karin Tanaka, Akihiro Yoshizawa, Hidekata Yasuoka, Akira Suwa, Tohru Sato, Shiro Iwanaga, Satoshi Ogawa, Yasuo Ikeda, Michito Hirakata. Successful treatment of recurrent intracardiac thrombus in Bechet's disease with immunosuppressive therapy. *Clin Exp Rheumatol* 23(6):885-887, 2005.
7. Yuko Kaneko, Akira Suwa, Yasuo Ikeda Michito Hirakata. Pneumocystis jiroveci pneumonia associated with low-dose methotrexate treatment for rheumatoid arthritis; report of two cases and a review of the literature. *Mod Rheumatol* 16(1):36-38, 2006.
8. 諏訪 昭. 混合性結合組織病 (MCTD) ・重複症候群 (OL) . 池田康夫, 鈴木則宏編集「内科研修マニュアル (改訂第2版)」. 南江堂, p548-549, 2006.
9. Michito Hirakata, Akira Suwa, Tetsuya Takada, Shinji Sato, Sonoko Nagai, Ekkehard Genth, Yeong W. Song, Tsuneyo Mimori, Ira N. Targoff. Clinical immunological features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase. *Arthritis Rheum* 56(4):1295-1303, 2007.
10. 諏訪 昭. 膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症の診断と最新の治療. 日本内科学会雑誌 96(12):2804-2811, 2007.
11. Shinji Sato, Tetsuya Takada, Yumiko Katsuki, Yuko Kaneko, Akira Suwa, Michito Hirakata, Masataka Kuwana. Longterm effect of intermittent cyclical etidronate therapy on corticosteroid-induced osteoporosis in Japanese patients with connective tissue disease: 7-year followup. *J Rheumatology* 35(1):142-146, 2008.

学会発表

1. 諏訪 昭, 佐藤慎二, 木村納子, 金子祐子, 野島崇樹, 藤井隆夫, 三森経世, 平形道人. MRL/MP-Fas^{lpr} マウスにおけるヌクレオソームに対する自己免疫. 第49回日本リウマチ学会総会, 横浜市, 平成17年4月.
2. 金子祐子, 諏訪 昭, 花岡洋成, 古屋善章, 高田哲也, 井上有美子, 岡 浩子, 安岡秀剛, 野島崇樹, 佐藤慎二, 平形道人. 混合性結合組織病 (MCTD) における抗 U1RNA 抗体の臨床免疫学的特徴に関する研究. 第49回日本リウマチ学会総会, 横浜市, 平成17年4月.
3. 野島崇樹, 諏訪 昭, 金子祐子, 佐藤慎二, 桑名正隆, 平形道人. 肺高血圧症を合併した混合性結合組織病患者の臨床免疫学的特徴. 第33回日本臨床免疫学会総会, 京都市, 平成17年10月.
4. 金子祐子, 諏訪 昭, 花岡洋成, 古屋善章, 高田哲也, 香月有美子, 木村納子, 佐藤慎二, 平形道人. 膠原病患者における抗 U1RNP 抗体対応抗原エピトープの多様性. 第50回日本リウマチ学会総会, 長崎市, 平成18年4月.
5. 野島崇樹, 諏訪 昭, 金子祐子, 佐藤慎二, 桑名正隆, 平形道人. 肺高血圧症を合併した混

合性結合組織病患者の臨床免疫学的特徴. 第 6 回日本抗加齢医学会総会, 東京都, 平成 18 年 5 月.

6. 諏訪 昭, 平形道人, 金子祐子, 佐藤慎二, 桑名正隆, 齋藤栄子, 若林孝幸, 鈴木康夫. 膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症 (CPH) における Na 利尿ペプチドの意義に関する研究. 第 51 回日本リウマチ学会総会, 横浜市, 平成 19 年 4 月.

7. Akira Suwa, Michito Hirakata, Toru Satoh, Yuko Kaneko, Shinji Sato, Masataka Kuwana, Eiko Saito, Takayuki Wakabayashi, Yasuo Suzuki. N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a diagnostic marker of pulmonary arterial hypertension in connective tissue disease. American College of Rheumatology 71st Annual Meeting, Boston, November, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

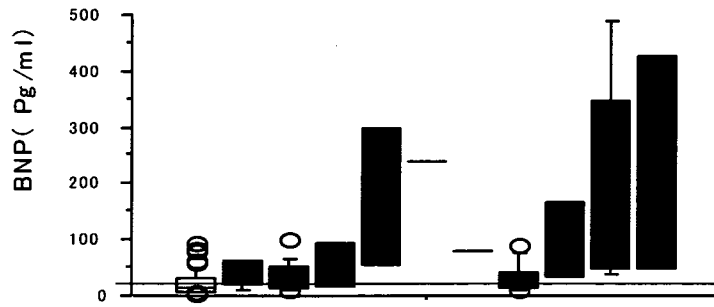
該当なし.

実用新案登録

該当なし.

その他

該当なし.



肺高血圧症(20) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+)(+)(+)(+)
 心不全 (13) (-) (-) (-) (-)(+)(+)(+) (-) (-)(+)(+)
 高血圧症 (27) (-) (-) (+)(+)(-) (+)(+) (-)(+)(-)(+)
 腎機能障害(10) (-) (+) (-) (+)(-) (-)(+) (-) (-) (-) (-)

図1 種々の病態におけるBNP値

因子分析基本統計量

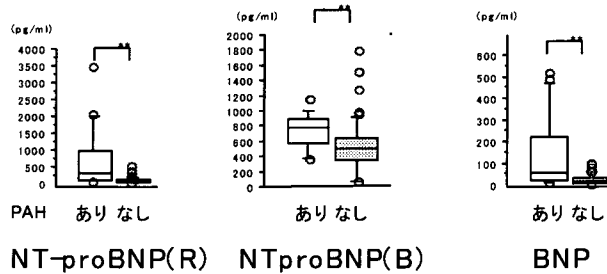
変数の数	17
推定因子数	8
因子数	6
例数	32
欠測値	79
自由度	152
Bartlettのカイ2乗	350.538
p値	<.0001

因子抽出法: 主因子法
 因子数の定め方: デフォルト
 変換法: 直交/バリマックス

固有値

固有値の大きさ変動率	
値1	3.715 .219
値2	2.706 .159
値3	2.025 .119
値4	1.814 .107
値5	1.432 .084
値6	1.109 .065
値7	.945 .056
値8	.721 .042

表1 因子分析による基本統計量と固有値



**P < 0.01, *P < 0.05

図2 (A)肺動脈性高血圧症とNT-proBNP, BNP

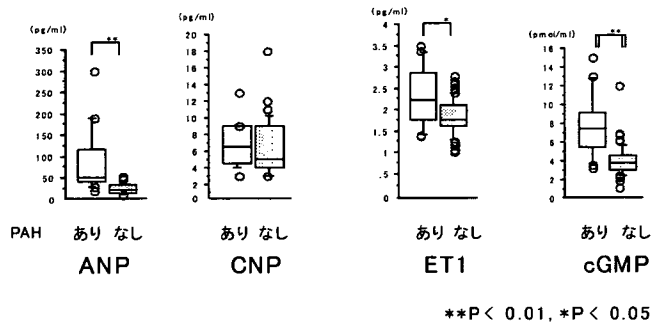


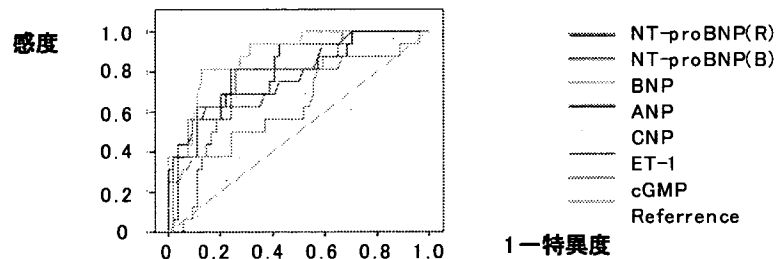
図2 (B) 肺動脈性高血圧症と ANP, CNP, ET-1, cGMP

Spearman の順位相関順位調整ρ値

	NT-proBNP(R)	NT-proBNP(B)	BNP	ANP	CNP	ET1	cGMP
NT-proBNP(R)	1.000	0.270*	0.875**	0.769**	0.106	0.267*	0.544**
NT-proBNP(B)	0.270	1.000	0.293*	0.221	-0.036	0.133	0.097
BNP	0.875	0.293	1.000	0.762**	0.076	0.176	0.532**
ANP	0.769	0.221	0.762	1.000	0.059	0.229*	0.629**
CNP	0.106	-0.036	0.076	0.059	1.000	0.076	0.062
ET1	0.267	0.133	0.176	0.229	0.076	1.000	0.209
cGMP	0.544	0.097	0.532	0.629	0.062	0.209	1.000

P < 0.05*, p < 0.01**

表2 Na利尿ペプチドファミリー, cGMPとET1の相関



検定結果変数	面積	標準誤差 ^a	漸近有意確率 ^b	漸近 95% 信頼区間	
				下限	上限
NT-proBNP(R)	.841	.053	.000	.737	.945
NT-proBNP(B)	.749	.064	.003	.623	.875
BNP	.799	.064	.000	.674	.924
ANP	.901	.038	.000	.674	.924
CNP	.560	.071	.439	.420	.700
ET1	.607	.0083	.167	.445	.770
cGMP	.787	.083	.167	.670	.770

a. パラメトリックの仮定のもとで
b. 非無仮説
真の面積 = 0.5

図3 ROC曲線を用いた各マーカーの検定

NT-proBNP						BNP			ANP			cGMP		
ROCHE			BIOMEDICA											
境界値 pg/m	感度 (%)	特異度 (%)	境界値 pg/m	感度 (%)	特異度 (%)	境界値 pg/m	感度 (%)	特異度 (%)	境界値 pg/ml	感度 (%)	特異度 (%)	境界値 pmol/ml	感度 (%)	特異度 (%)
8	100	0	67	100	0	3	100	0	9	100	0	0.1	100	0
...
51	95	30	445	88	59	13	84	43	29	95	68	3.6	95	41
78	95	57	598	81	74	18	79	50	40	79	89	4.1	79	57
89	74	61	638	63	76	33	69	76	50	42	99	4.7	68	70
124	63	80	680	56	81
...
541	0	100	1808	0	100	518	0	100	191	0	100	128	0	100

表3 各マーカーの感度と特異度

	平均値	カットオフ Index
NT-proBNP (R)	707.5 ± 932.5 (pg/ml)	8.21
BNP	142.2 ± 41.7 (pg/ml)	7.80
ANP	87.2 ± 19.3 (pg/ml)	2.18
cGMP	2.3 ± 0.2 (pmol/ml)	1.86

*カットオフ Index = 各群平均値/カットオフ値

表4 各マーカーのカットオフ Index

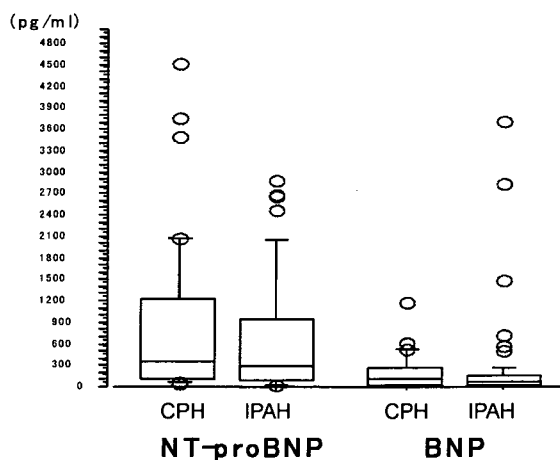


図4 肺動脈性肺高血圧症におけるNT-proBNP, BNP