

200832020A

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

膠原病の生命予後規定因子である肺合併症の診断
及び
治療法の再評価と新規開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年3月

研究代表者 宮 坂 信 之

目次

I. 構成員名簿	1
II. 総括研究報告	
膠原病の生命予後規定因子である肺合併症の診断及び 治療法の再評価と新規開発に関する研究	3
東京医科歯科大学大学院膠原病・リウマチ内科学 教授 宮坂信之	
III. 分担研究報告	
1. 膠原病に合併した間質性肺炎および特発性間質性肺炎における 抗増殖因子受容体抗体の検討	9
徳島大学医学部呼吸器膠原病内科 教授 曾根三郎	
2. 間質性肺炎を合併した膠原病患者末梢血における 調節性T細胞サブセット変化に関する研究	12
順天堂大学医学部膠原病内科 教授 高崎芳成	
3. 間質性肺炎合併強皮症の気管支肺胞洗浄液における プロテオミクス解析に関する研究	16
東京医科歯科大学医学部附属病院統合呼吸器病学 教授 吉澤靖之	
4. 間質肺疾患の活動性評価における PET-CT の有用性に関する研究	20
国立国際医療センター呼吸器科 医長 杉山温人	
5. 強皮症患者の肺病変に対する末梢血幹細胞移植の有効性に関する研究	22
北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 助教 保田晋助	
6. 多発性筋炎／皮膚筋炎における治療抵抗性筋炎と間質性肺炎に 対するタクロリムスの有用性に関する研究	27
慶應義塾大学医学部医学教育統括センター 准教授 平形道人	
7. タクロリムスによる間質性肺炎の治療に関する研究	30
産業医科大学第一内科学講座 教授 田中良哉	
8. 多発性筋炎／皮膚筋炎の急速進行性肺炎の治療に関する研究	33
埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科 講師 亀田秀人	
9. SLE における感染症の危険因子に関する研究	36
東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授 原まさ子	

10. 膠原病に合併する急性進行性間質性肺炎への 「サイトメガロウイルス感染の関与に関する研究」	39
東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 講師 土肥 眞	
11. 関節リウマチにおける肺合併症の発生状況- <i>NinJa</i> 2003(5)～2007より-	42
(独)国立病院機構相模原病院臨床研究センター 部長 當間重人	
12. 膠原病の肺合併症診断および治療法に関する後ろ向き研究	46
東京医科歯科大学大学院膠原病・リウマチ内科学 教授 宮坂信之	
13. 膠原病における免疫抑制療法下の肺感染症に関する前向き研究	51
東京医科歯科大学大学院薬害監視学 教授 針谷正祥	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	57

I. 構 成 員 名 簿

平成20年度 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業(宮坂班)構成員名簿

区分	氏名	職名	所属
研究代表者	宮坂 信之	教授	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学分野
研究分担者	亀田 秀人	講師	埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科
	杉山 温人	医長	国立国際医療センター呼吸器科
	曾根 三郎	教授	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
	高崎 芳成	教授	順天堂大学医学部膠原病内科学講座
	田中 良哉	教授	産業医科大学第一内科
	當間 重人	部長	独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター
	土肥 眞	講師	東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ科
	原 まさ子	教授	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター
	針谷 正祥	客員 教授	東京医科歯科大学薬害監視学講座
	平形 道人	准教授	慶應義塾大学医学部医学教育統括センター
	保田 晋助	助教	北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科
	吉澤 靖之	教授	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科統合呼吸器病学分野

Ⅱ. 総括研究報告

膠原病の生命予後規定因子である肺合併症の診断及び治療法の再評価と新規開発に関する研究

研究代表者 宮坂信之 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 教授

研究要旨：本研究では、膠原病の最大の生命予後規定因子である肺合併症の早期診断法、鑑別法及び治療法の再評価と新規開発を行い、その成果を診療マニュアルとして公開することにより、国民に対する良質な医療を提供することを目的とする。本年度は、1) 膠原病の肺合併症診断及び治療法に関する後ろ向き研究、2) 膠原病における免疫療法下の肺感染症に関する前向き研究、などを中心に研究を行った。

研究分担者

亀田秀人 埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科 講師
杉山直人 国立国際医療センター呼吸器科 医長
曾根三郎 徳島大学大学院ヘルスケア・バイオサイエンス研究部 教授
高崎芳成 順天堂大学医学部膠原病内科学講座 教授
田中良哉 産業医科大学第一内科 教授
當間重人 (独)相模原病院臨床研究センター 部長
土肥 眞 東京大学医学部附属病院リウマチ・膠原病科 講師
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
針谷正洋 東京医科歯科大学薬害監視学講座 客員教授
平形道人 慶應義塾大学医学部内科学教室血液・感染・リウマチ内科学 専任講師
保田晋助 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 助教
吉澤靖之 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科統合呼吸器病学分野 教授

A. 研究目的

本研究では、膠原病専門医と呼吸器専門医とが協同研究を行うことにより、膠原病の最大の生命予後規定因子である肺合併症の早期診断法、鑑別法及び治療法の再評価と新規開発を行い、その成果を診療マニュアルとして公開することにより、国民に対する良質な医療を提供することを目的とする。まず研究分担者の各施設における過去5年間の膠原病における肺合併症のレトロスペクティブな実態調査を行い、

肺合併症の病態の多様性とそれらの生命予後、生命予後不良因子などを明らかにする。特にRAについては東京女子医科大学のRA患者データベース IORRA、国立病院機構のNinja、東京医科歯科大学薬害監視学講座のREALなどを駆使してこれらの調査を行う。さらに、各施設から膠原病による肺合併症で入院した症例、入院中に肺合併症を発症した症例などを集積してプロスペクティブな解析を行う。最終年度の3年目には、これらのレトロスペクティブ及びプロスペクティブな解析結果を比較検討することによって有効性の高い治療法あるいは新規治療法を同定し、その成果を診療マニュアルの策定に還元する。また同時に、膠原病における薬剤性肺障害に特に注目してメトトレキサート(MTX)、レフルノミド(LEF)、シクロホスファミド(CY)、タクロリムス(TAC)、生物学的製剤などの治療薬剤によって起こる薬剤性間質性肺炎及び日和見感染症の発生頻度の検討を行い、併せて早期診断法、鑑別法、治療法に対する対策を再評価するとともに、病態解析、早期診断法及び治療法の新規開発を行う。また、間質性肺炎患者より肺胞気管支洗浄(BAL)、経気管支肺生検(TBLB)などによって得られる検体の免疫学的及び分子生物学的解析を行い、線維化、組織破壊などの病態形成の分子機構について検討を加える。さらに膠原病自体に基づく難治性肺合併症の新規治療法の開発を目指す。そのモデルケースとしてTACなど低分子化合物

の臨床応用を試みる。

B. 研究方法

1. 膠原病の肺合併症診断および治療法に関する後ろ向き研究：①膠原病各疾患の患者数調査：2006年4月1日から2006年9月30日の期間に、分担研究者の所属医療機関の外来を一度でも受診したことのある、関節リウマチ (RA)・全身性エリテマトーデス (SLE)・多発性筋炎 (PM)・皮膚筋炎 (DM)・全身性硬化症 (SSc)・混合性結合組織病 (MCTD)・顕微鏡的多発血管炎 (MPA)・Wegener 肉芽腫症 (WG) の患者を対象に、各疾患の外来受診患者数を調査。②肺合併症を有する膠原病患者の詳細調査：対象は、2004年4月1日から2007年3月31日の期間に分担研究者の所属医療機関に入院した RA・SLE・PM・DM・SSc・MCTD・MPA・WG のいずれかを有する患者で、入院中に間質性肺炎 (IP)・肺高血圧 (PH)・肺胞出血・肺肉芽腫および肺感染症の治療が施行された患者。疾患名・年齢・性別・罹病期間・肺合併症の種類・肺感染症の原因病原体の種類・退院時の肺合併症の転帰・2007年3月31日時点 (観察終了時)での患者の転帰、個人情報 を消去した退院時要約について調査。本年度は、昨年度に回収した①、また②のうちの2005年4月1日から2007年3月31日の期間に関するデータを解析した。2. 膠原病における免疫抑制療法下の肺感染症に関する前向き研究：1) 対象患者：以下の①、②を満たし、入院中に③、④または⑤に示す治療を受ける患者を対象とする。①分担研究者の所属医療機関に入院する、RA (MRAを含む)、SLE、PM、DM、SSc、MCTD、血管炎症候群、原発性シェーグレン症候群 (SS)、パーチェット病、成人 Still 病を有する患者。②本研究への参加に関する同意を文書にて得られる患者。③原疾患による活動性病変 (病変の種類は問わず) に対し、ステロイド薬の新規投与または増量 (投与量は問わない、パルス療法を含む) を受ける患者。④原疾患による活動性病変に対し、免疫抑制薬の新規開始、変更または増量する患者。⑤原疾患による活動性病変に対し、生物学的製剤を新規開始または変更する患者。2) データ収集方法および観察項目：分担研究者は対象患

者を同定後、2週間以内に本研究班専用の Web サイトから登録する。登録後4週間以内にベースラインデータ (人口統計学的項目、診断、感染症リスク因子、過去6ヶ月間の治療内容、登録対象となった治療内容、ワクチンおよび予防投与) を専用の用紙に記入して提出する。登録半年後に、原疾患の診断と罹患臓器、肺感染症発症の有無・診断根拠となる検査所見・画像所見・重症度・治療内容、肺以外の感染症、感染症リスク因子、免疫抑制療法の内容、予防投与とワクチン、肺感染症および原疾患の転帰等について専用の用紙に記入して提出する。登録1年後には、生命予後およびその時点での治療内容を研究専用ホームページから提出する。3) 対象とする肺感染症：細菌性肺炎、非定型肺炎、ニューモシチス肺炎 (PCP)、サイトメガロウイルス肺炎、真菌性肺炎、肺結核、非結核性抗酸菌症、その他 (気管支炎・胸膜炎・肺膿瘍など) 4) 研究実施予定期間：2008年6月から2010年6月を患者登録期間、2011年7月までを研究実施期間とする。5) 倫理的事項：本研究はヘルシンキ宣言および疫学研究に関する倫理指針に従い、各医療機関における倫理審査委員会等の審査・承認を経て実施する。3. 膠原病に対する TAC の有効性の検討と薬剤抵抗性改善の検討：ACR 診断基準などにて確定診断された膠原病患者で、胸写、胸部 CT にて活動性間質性肺炎を有する症例。TAC 1.5-3mg で開始し、血中濃度を5~20ng/ml に維持し得る用量を継続投与。咳嗽、呼吸困難、息切れなどの自覚症状、胸部単純 X 線、胸部 CT、KL-6、動脈酸素分圧などの客観的指標、有害事象を経過観察する。4. NinJa データベースを用いた RA における肺合併症の発生頻度の解析。5. PM/DM に合併する急速進行性間質性肺炎の治療に関する臨床疫学的解析。6. 膠原病に合併した間質性肺炎患者における気管支肺胞洗浄液を用いた免疫学的解析：サイトカイン及びそのレセプター、costimulatory 分子発現を検討する。なお、これらの研究は、いずれもヘルシンキ宣言および疫学研究に関する倫理指針に従い、各医療機関における倫理審査委員会等の審査・承認を経て実施する。

C. 研究結果

1. 膠原病の肺合併症診断及び治療法に関する後ろ向き研究；①膠原病各疾患の外来受診患者数：RA 16678 件、SLE 4357 件、PM 473 件、DM 432 件、SSc 1388 件、MCTD 687 件、MPA 263 件、WG 110 件。②肺合併症により入院加療を要した膠原病各疾患患者数：RA 271 件(40%)、SLE 78 件(11%)、PM 41 件(6%)、DM 96 件(14%)、SSc 112 件(16%)、MCTD 35 件(5%)、MPA 40 件(6%)、WG 10 件(1%)。③各肺合併症により入院加療を要した患者数：IP 274 件 (40%)、PH 55 件 (8%)、肺出血 16 件 (2%)、肺肉芽腫症 5 件 (1%)、肺感染症 334 件(49%)、薬剤性肺障害 15 件(2%)、合計 697 件。④各肺合併症により入院加療を要した患者の転帰、生命予後：各肺合併症により入院加療を要した患者の生命予後：2007年3月31日または死亡時あるいはフォロー中止時のうち最も早い時点を観察終了時とし、退院時および観察終了時の死亡症例の詳細を検討した。いずれの時点においても、死亡率が最も高いのは肺出血であったが、死亡件数、死亡率ともに高いのは、間質性肺炎および肺感染症であった。また、死亡症例全体における各合併症の割合については、間質性肺炎および肺感染症の占める割合が高く、死亡症例の約9割がこの2つの肺合併症での入院患者であった。さらに、観察期間を肺合併症に対する治療開始日あるいは入院日から1年とした、 Kaplan-Meier 生存曲線で示すと、観察期間1年までの各肺合併症別の生存率は、肺肉芽腫症が100%と最も高く、肺出血が71.4%と最も低い結果であった。間質性肺炎は88.2%、肺高血圧は84.2%、肺感染症は81.4%と、その中間に位置した。また、入院加療を要する肺合併症を有した膠原病患者の各疾患別の死亡率では、DMの生存率が最も低く、WG、MCTD、PM では生命予後は比較的良好であった。RA、SLE、SSc、MPA はその中間に位置した。

2. 膠原病における免疫療法下の肺感染症に関する前向き研究：上記研究計画を実施するための患者登録およびデータ送信専用 Web サイトを立ち上げ、倫理審査委員会等の承認手続きが完了した施設から症例登録を開始した。平成21年1月までに10施設が患

者登録を開始し、165例が登録された。疾患別の登録症例数は関節リウマチが最も多く63例、ついで全身性エリテマトーデス47例、血管炎症候群19例、多発性筋炎11例、皮膚筋炎10例、成人Still病8例、混合性結合組織病6例、全身性硬化症5例、原発性シェーグレン症候群4例、ベーチェット病2例の順であった。登録対象となった免疫抑制療法の割合を表1に示した。副腎皮質ステロイド薬の新規投与または増量が合計60.4%、免疫抑制薬の新規投与または増量が合計25.5%、生物学的製剤の新規投与、変更、または増量が29.2%であった。登録患者中女性が76.4%を占め、平均年齢は女性50.3±18.5才、男性58.4±14.8才、平均体重は女性52.4±10.0kg、男性61.0±13.1kg、平均罹病期間は女性87.7±125.2カ月、男性58.1±62.4カ月であった。

3. 膠原病に対するTACの有効性の検討と薬剤抵抗性改善の検討：分担研究者田中の施設で平成15年4月以降、膠原病に伴う活動性間質性肺炎50症例〔男12・女38〕に対してタクロリムスを使用した。基礎疾患は、関節リウマチ26(MRA4)、強皮症10、皮膚筋炎8(amyopathic DM5)、混合性結合組織病6など。平均2.0剤の免疫抑制剤での治療歴があった。皮膚筋炎においては、他3疾患に比べ有意にSpO₂低値で、有意に大量のglucocorticoid(GC)を要し、1例でステロイドパルス療法(mPSL1g)を施行した。タクロリムス投与6ヶ月後の臨床症状(労作時呼吸困難、乾性咳嗽、酸素投与の要否)は、どの疾患でも明らかに頻度の低下が見られたが、とくに皮膚筋炎・多発性筋炎での臨床症状改善効果が目立っていた。タクロリムス投与6ヶ月後のHRCTスコアは、全体ではp<0.001と明らかな低下が確認された。関節リウマチ、皮膚筋炎・多発性筋炎、強皮症のいずれも有意な改善が見られ、MCTDではHRCT画像を評価し得た症例が2例と少数であるため統計学的解析は不可であったが、2.19±0.98 → 1.92±0.59と低下を認めた。タクロリムス投与6ヶ月後のGC投与量(prednisolone換算量)は、全体ではp<0.001と有意な減量効果が得られ、殊に、関節リウマチと皮膚筋炎で有意な減量効果を認めた。強皮症、混合性結合組織病では減量傾向があった(統計学的有意差は検出されず)。

タクロリムス投与後に出現した有害事象については、細菌性肺炎、ニューモシスチス肺炎、非結核性抗酸菌症が各2、2、1例に出現し、タクロリムス使用時には呼吸器感染症に対する留意が重要である事が示唆された。

4. NinJa データベースを用いた RA における肺合併症の発生頻度の解析：①間質性肺炎（原因を問わず）による入院は男性 19 例/2728 患者年（0.70%）、女性 42 例/12221 患者年（0.34%）に認められた。現在、その詳細（原因、治療内容、予後）について調査中である。②結核：男性 8 例（肺外 1）/4048 患者年（0.20%）、女性 18 例（肺外 3）/18807（0.10%）患者年に結核が発症した。標準化罹患比（SIR）は男性 RA で 3.50（95%信頼区間 1.07-5.92）、女性 RA が 5.00（2.69-7.31）と有意に高いものであった。③肺結核、間質性肺炎を除く感染症により約 280 症例が入院していた。そのうち呼吸器感染症が最多であった。現在呼吸器感染症の詳細（感染部位、起因菌、治療内容、予後）について調査中である。④男性 6 例/4048 患者年（0.15%）、女性 8 例/18807 患者年（0.04%）に肺癌が発生していた。SIR は男性 RA で 1.23（0.50-1.96）、女性 RA が 1.32（0.60-2.04）と有意なリスクは認められていない。

5. PM/DM に合併する急速進行性間質性肺炎の治療に関する臨床疫学的解析：分担研究者亀田の施設では、PM/DM に合併する（亜）急性の経過で進行する急速進行型間質性肺炎（rapidly progressive interstitial pneumonia; RPIP）を対象とし、2003 年以降ではこれまでに 18 例を診断し、様々な併用を試みるも、TAC 投与のべ 7 例中 4 例、IVCY 投与のべ 14 例中 7 例、リツキシマブ投与 2 例中 1 例、エタネルセプト投与 3 例中 1 例が RPIP の進行による呼吸不全で短期間に死亡しており、確実に有効な治療薬は見いだせなかった。全体としても 18 例中 8 例が死亡しており、ステロイド+CsA+IVCY の併用療法を上回ることは出来なかった。

D. 考察

今回の調査において、膨大な症例数の集積が行われたことは特筆に値する。その結果、膠原病患者における肺合併症としては、IP および肺感染症が入院患

者、死亡患者共に多く認められ、特にこの 2 つの肺合併症が膠原病患者の生命予後に重要であることが改めて確認された。これは、わが国で行われた膠原病の肺合併症に関しては最大のデータベースであると考えられ、わが国初のエビデンスが創出されたと考える。現在、膠原病における免疫抑制療法下の肺感染症に関する前向き研究が行われているが、症例登録が全施設で継続的に行われるように、定期的な情報提供およびフィードバックを研究本部が実施すること、研究計画書にしたがってデータを確実に収集することが良質な研究成果を得るためには最も重要である。また、今回の NinJa データベースの解析結果からは、肺合併症は、本邦 RA 患者における重篤な合併症として圧倒的に多いことが再確認された。特に呼吸器感染症は入院理由そして死因として最も頻度の高い合併症であった。RA 患者における結核の発症リスクは、これまで報告してきたようにやはり高いものであったが、治療による予後は概ね良好であった。本邦 RA 患者における肺癌の発生については、標準化死亡率（SIR）上有意な差異は認められなかった。また、膠原病に合併する活動性間質性肺炎に対する TAC の有用性が明らかにされたが、一方で治療抵抗例の存在も確認された。

E. 結論

本研究により、膠原病患者における肺合併症の現状が明らかになり、肺感染症と IP が生命予後を規定する因子であることが判明した。また、膠原病に併発した活動性間質性肺炎に対して、TAC の有用性が明らかとなり、IV-CY と共に first line での併用が推奨された。しかし、RPIP 合併 PM/DM 症例の一部ではこれらの治療に対して抵抗性を示すものも少なからず認められたことから、さらなる治療法の開発が必要と思われる。今後、多施設共同による疫学的調査研究を継続することにより、肺合併症の発症予防・早期診断・新規治療法の検証そして開発に有用なデータベースの構築を継続していく予定である。特に、膠原病における免疫抑制療法下の肺感染症に関する前向き研究を本研究班の共同研究として開始し、着実に症例を集積しつつある。本研究の結果を、「膠原病の肺合併症診断および治療法に関する後ろ向き研究」と併せて、「膠原病における肺合

併症に対する診療マニュアル」作成のためのエビデンスとして活用する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Takeuchi T, Tatsuki Y, Nogami Y, Ishiguro, N., Tanaka Y., Yamanaka, H., Kamatani, N., Harigai, Ryu, J., Inoue, K., Kondo, H., Inokuma, S., Ochi, T., Koike, T. Postmarketing surveillance of the safety profile of infliximab in 5000 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:189-94.

2. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Bolus infusion of human urinary trypsin inhibitor improves intractable interstitial pneumonia in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology* 2008;47: 907-913

3. Nii T, Kubota T, Nanki T, Komano Y, Harigai M, Kohsaka H, Hirose W, Nagasaka, K, Sakurai T, Miyasaka N. Reevaluation of antibody titers I year after influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis receiving TNF blockers. *Mod Rheumatol*. 2008 Nov 18. [Epub ahead of print]

4. Takizawa Y, Inokuma S, Tanaka Y, Saito K, Atsumi T, Kameda H, Hirohata S, Kondo H, Kumagai S, Tanaka Y. Clinical characteristics of cytomegalovirus infection in rheumatic diseases: multicentre survey in a large patient population. *Rheumatology* 2008;47: 1373-1378.

5. Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takei H, Sekiguchi N, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, Takeuchi T. Single center prospective study of tacrolimus efficacy and safety in treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* (in press)

6. Suzuki K, Nagasawa H, Kameda H, Amano K, Kondo T, Itoyama S, Tanaka Y, Takeuchi T. Severe acute thrombotic exacerbation in two cases with anti-phospholipid syndrome after retreatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory

systemic lupus erythematous. *Rheumatology* (in press).

7. Katagiri A, Morimoto S, Nakiri Y, Nakano S, Mitsuo A, Suzuki J, Amano H, Nozawa K, Asano M, Tokano Y, Hashimoto H, Takasaki Y. Decrease in CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁺ T cells in interstitial pneumonitis associated with rheumatic disease. *Mod Rheumatol*. 2008; 18: 562-569

8. Tokuda H, Sakai F, Yamada H, Johkoh T, Imamura A, Dohi M, Hirakata M, Yamada T, Kamatani N, Kikuchi Y, Sugii S, Takeuchi T, Tateda K, Goto H: Clinical and radiological features of pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis, in comparison with methotrexate pneumonitis and pneumocystis pneumonia in acquired immunodeficiency syndrome: a multicenter study. *Intern Med*. 47(10):915-23, 2008.

9. Takizawa Y, Inokuma S, Tanaka Y, Saito K, Atsumi T, Hirakata M, Kameda H, Hirohata S, Kondo H, Kumagai S, Tanaka Y: Clinical characteristics of cytomegalovirus infection in rheumatic diseases: Multicenter survey in a large patient population. *Rheumatology* 47(9):1373-1378, 2008

10. Okunishi K, Sasaki O, et al. and Dohi M. Intratracheal delivery of hepatocyte growth factor directly attenuates allergic airway inflammation in mice. *Int Arch Allergy Immunol*; 2009; in press.

11. Imamura M, Okunishi K, et al. and Dohi M. Pravastatin attenuates allergic airway inflammation by suppressing antigen-sensitization, IL-17 production, and antigen-presentation in the lung. *Thorax* 64:44-49, 2009.

12. Miyasaka N Clinical investigation in highly disease-affected rheumatologic arthritis patients in Japan with adalimumab applying standard and general evaluation: the CHANGE study. *Mod. Rheumatol*. 18(3):252-262, 2008

13. 越智小枝, 窪田哲朗, 杉原毅彦, 小川純, 駒野有希子, 野々村美紀, 宮坂信之 関節リウマチに伴う急速進行性間質性肺炎及び多

発肺嚢胞の治療中に縦隔気腫を合併し、
tacrolimus が有効であった1例. Jpn. J. Clin.
Immunol. 31(1):62-67, 2008

14. Mizoguchi F, Nanki T, Takada K, Miyasaka
N Recurrent pulmonary embolism due to
intracardiac thrombi in systemic sclerosis.
Clin. Exp. Rheum. 26:157, 2008

15. Miyasaka N Adalimumab for the
treatment of rheumatoid arthritis. Expert
Review of Clinical Immunology in press

H. 知的財産権の出願・登録
特になし

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告

膠原病に合併した間質性肺炎および特発性間質性肺炎における抗増殖因子受容体抗体の検討

研究分担者 曾根三郎 徳島大学医学部呼吸器膠原病内科 教授

研究要旨 【目的】我々は血小板由来増殖因子(PDGF)に注目し、そのレセプター阻害薬であるイマチニブの抗線維化効果について検討してきた。一方、Baroniらは、強皮症(SSc)患者血清中にPDGF受容体に対する刺激抗体が存在することを報告した(N Engl J Med: 2006)。そこで特発性肺線維症(IPF)および膠原病患者における抗 PDGF 受容体抗体について検討した。【方法】健常人(10例)を対象に、SSc10例、全身性エリテマトーデス(SLE)10例、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)11例、NSIP 8例、IPF 14例の血清を用い、可溶性PDGF α 受容体蛋白を固相化したELISA法およびWestern blotting法にて抗PDGF受容体抗体の有無について検討した。【結果】ELISA法では健常人に比較し、SSc:60%(5/10例)、SLE:40%(4/10例)PM/DM:27%(3/11例)、NSIP:37.5%(3/8)、IPF:20%(3/15例)で抗体価の上昇を認めた。Western blotting法でも抗PDGF受容体抗体の存在が示唆された。

A. 研究目的

血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor: PDGF)は線維芽細胞に対して強力な増殖活性を有し、間質性肺炎の線維化のメカニズムに関与していることが注目されている。

我々はこれまでにPDGFのレセプター阻害薬であるイマチニブの肺線維症における抗線維化効果の検討を行い、肺線維症の治療ターゲットとしてPDGFが有力な候補となることを示した。

一方、Baroniらは、強皮症(systemic sclerosis: SSc)患者血清中にはPDGF受容体に対する刺激抗体が存在し、線維化形成の原因になっている可能性を報告している(N Engl J Med: 2006)。

本研究では膠原病関連間質性肺炎患者において、PDGFのみならず肺線維症に関与する増殖因子のレセプター刺激抗体の有無と肺線維化との関連を検討することを目的とする。

B. 研究方法

健常人10例(男性/女性(M/F): 4/6例)を対象に、SSc 10例(M/F: 2/8例)、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)10例(M/F: 1/9)、多発性筋炎/皮膚筋炎(polymyositis/dermatomyositis PM/DM)11例(M/F: 2/9例)、特発性間質性肺炎患者のなかで外科的肺生検にて組織診断を行った nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) 8例(M/F: 5/3)、IPF

15例(M/F: 11/4例)の血清を用い抗増殖因子受容体抗体の有無を検討した。

可溶性PDGFR α 蛋白および可溶性TGF- β 受容体II(TGF- β R II)蛋白を固相化したELISA法にて抗PDGF受容体抗体および抗TGF- β R II抗体の有無を検討した。OD405nmで測定し、計測値を健常人の平均値で割った値をOD indexとし、OD indexがコントロールの2SD以上を陽性とした。OD indexと患者血清のKL-6値、SP-D値との関連の有無を検討した。

また可溶性PDGFR α 蛋白に対して血清で免疫沈降を行い、ヤギ抗ヒトPDGF受容体 α 抗体を用いたWestern Blotting法による可溶性PDGFR α 蛋白の検出により抗PDGF受容体抗体の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

膠原病患者、特発性間質性肺炎患者における抗増殖因子レセプター抗体の測定において患者検体を使用することから、学内倫理委員会において本研究課題について承認を得た後、研究を進めた。

C. 研究結果

抗PDGF受容体抗体に関しては、ELISA法ではSSc: 60%(6/10例)、SLE: 40%(4/10例)、PM/DM: 27%(3/11例)、NSIP: 37.5%(3/8)、IPF: 20%(3/15例)で抗体価の上昇を認めた。(Figure 1)

ELISA法にて陽性であった患者血清を用いて

Western blotting を施行したところ、SSc、PM/DM、IPF 患者では可溶性 PDGFR α 蛋白が強く検出され抗 PDGF 受容体抗体の存在が示唆されたが、SLE では健康人と同程度であった。(Figure 2)

一方、抗 TGF- β RII 抗体に関しては、ELISA 法にて SSc:60% (6/10 例)、SLE:40% (4/10 例)、PM/DM:0% (0/6 例)、IPF:0.83% (1/12 例) で抗体価の上昇を認めた。(Figure 3)

SSc 患者における抗 PDGF 受容体抗体と抗 TGF- β RII 抗体には相関関係が認められた。(r=0.86, P<0.05)

SSc 患者において、KL-6、SP-D の上昇と抗 PDGF 受容体抗体および抗 TGF- β RII 抗体における ELISA 法での ODindex 上昇との相関はみられなかった。

D. 考察

SSc、SLE、PM/DM、IPF 患者血清中に抗 PDGF 受容体抗体が検出された。また SSc、SLE 患者血清中に抗 TGF- β RII 抗体が検出された。

SSc 患者において PDGFR を刺激する血清自己抗体があり、内因性 PDGFR を認識し、チロシンリン酸化と ROS の蓄積を促しコラーゲン遺伝子の発現と筋線維芽細胞の表現型の変換を促進し強皮症の発症に対する病因的役割があることが強く示唆されると報告されている³⁾。さらには chronic graft-versus-host disease (GVHD) においても抗 PDGF 受容体抗体の発現がみられ、病因に関与している可能性が示唆されている⁴⁾。これらのことから様々な線維化をきたす疾患において PDGF やその他の増殖因子受容体に対する自己抗体が発現し病因に関与している可能性がある。

E. 結論

今回の我々の結果から膠原病関連間質性肺炎ならびに特発性間質性肺炎において PDGF や TGF- β などの増殖因子の受容体を刺激する自己抗体が存在し肺の線維化を引き起こしている可能性が示唆された。今後の課題として、さらなる症例を集積し、肺線維症の程度と自己抗体の相関関係の検討、また検出された抗増殖因子受容体抗体が受容体刺激抗体としての機能を有しているかどうかの検討が必要である。

膠原病患者における抗増殖因子受容体抗体の出現と間質性肺炎の合併の関連の有無について、

IPF 患者における抗増殖因子受容体抗体の出現と臨床的特徴について、さらに idiopathic nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) における抗増殖因子受容体抗体の出現の有無についても検討する予定である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Lkhagvaa B., Tani K., Sato K., Toyoda Y., Suzuka C., Sone S, Bestatin, an inhibitor for aminopeptidases, modulates the production of cytokines and chemokines by activated monocytes and macrophages. *Cytokine* 2008;44:386-91

2) Maekawa Y., Minato Y., Ishifune C., Kurihara T., Kitamura A., Koijima H., Yagita H., Sakata-Yanagimoto M., Saito T., Taniuchi I., Chiba S., Sone S., Yasutomo K. Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* 2008;9:1140-7

3) Sugita A., Ogawa H., Azuma M., Muto S., Honjo A., Yanagawa H., Nishioka Y., Tani K., Itai A., Sone S. Antiallergic and Anti-Inflammatory Effects of a Novel IkappaB Kinase beta Inhibitor, IMD-0354, in a Mouse Model of Allergic Inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;148:186-98

学会発表

1) 西岡安彦、青野純典、東 桃代、曾根三郎 呼吸器学トランスレーショナルリサーチにむけた疾患モデルの意義と限界 肺線維症 第 47 回日本呼吸器学会総会シンポジウム6 2007 年5月

2) Azuma M, Nishioka Y, B.Rentsenkhand, et.al. CCN6/WISP-3 stimulates the growth of lung fibroblasts via integrin beta1. 103th American thoracic society. 2007 May.

3) Aono Y, Nishioka Y, Kishi J, et.al. Human fibrocytes express PDGF receptor and migrate in response to PDGF. 103th American thoracic society. 2007 May.

H. 知的財産権の出願・登録

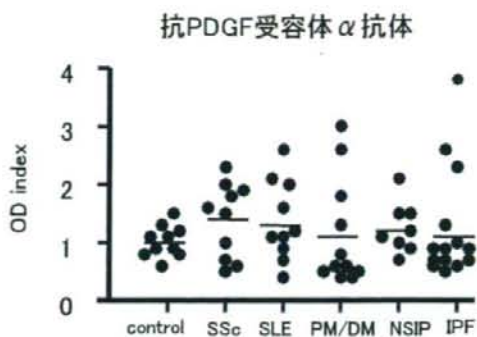


Figure 1

抗PDGF受体抗体 (Western blotting)

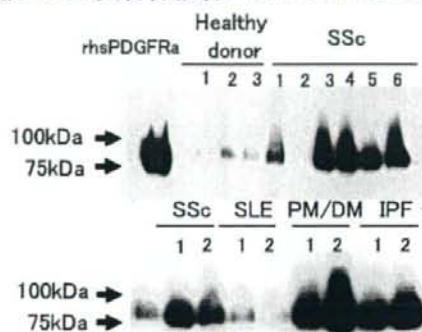


Figure 2

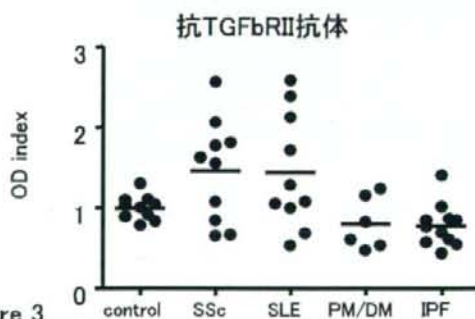


Figure 3

間質性肺炎を合併した膠原病患者末梢血における調節性T細胞サブセット変化に関する研究

研究分担者 高崎芳成 順天堂大学 医学部 膠原病内科 教授

研究協力者 片桐彰、天野浩文、森本真司、戸叶嘉明 順天堂大学 医学部 膠原病内科

研究要旨 T細胞の活性化が病態の一つとされる膠原病に伴う間質性肺炎（IPRD）において、調節性T細胞（CD4⁺CD25⁺T細胞や、CD8⁺CD28⁻T細胞）の異常が存在しうるか患者末梢血を用いて検討した。

CD4⁺CD25⁺T細胞の比率は、IPRD患者群でIPを合併していない膠原病（RD）患者群と比較し有意に低い結果となり、病態形成との関連が示唆された。CD8⁺CD28⁻T細胞の比率は、IPRD患者群でRD患者群や正常有意に高い結果となったが、CD8⁺CD28⁻T細胞の比率低下による影響も考えられた。CD8⁺CD28⁻T細胞の比率低下に関し、組織移行及びActivation induced cell death（AICD）の観点から調べたが有意な差は認められなかった。治療後CD4⁺CD25⁺T細胞の比率は、増加する傾向を認め、CD8⁺CD28⁻T細胞の比率は、疾患により違いを認めた。

A. 研究目的

膠原病に伴う間質性肺炎（以下IPRD）の病態にT細胞の活性化が関与することが報告されてきた。このT細胞の活性化は、主にCD8陽性細胞の活性化が主体であると考えられている。一方、免疫反応は促進因子だけではなく抑制因子が存在し、この両者のバランスで免疫反応の正負の方向付けを調節している。抑制因子としてTGF-β、IL-10等のサイトカインや、CTLA-4、CD22、KIR等の細胞表面分子が知られ、調節性T細胞としては、CD4⁺CD25⁺T細胞や、CD8⁺CD28⁻T細胞が知られている。今回我々は、T細胞の活性化が病態の一つとされるIPRD患者の末梢血を調べ、これらの調節性T細胞の異常が存在するかどうかを検討した。

B. 研究方法

当院加療中のIPRD患者34例（RA 8例、SjS 4例、SSc 7例、PM/DM 8例、MCTD 6例、MPA 1例）、IPを合併していない膠原病（RD）患者21例（RA 6例、SjS 1例、SSc 3例、PM/DM 6例、MCTD 5例）および健康者（NC）23例を対象とした。末梢血単核球（PBMC）を分離後、抗ヒトCD4、CD25、CD8、CD28及びCD62L、CD95（Fas）、IL-2Rγ抗体を組み合わせた染色後、フローサイトメトリーを用いて解析した。

（倫理面への配慮）

すべての対象患者にインフォームドコンセントを得て末梢血を採取した。

C. 研究結果

1. CD4⁺CD25⁺T細胞の比率は、IPRD患者群で、RD患者群に比べて有意に低かった（Fig1）。

CD25⁺細胞は活性化Tリンパ球の可能性はあるが、制御性T細胞と考えられる、brightなCD25⁺細胞や、より制御性が強いと言われるCD62L⁺細胞も同様にIPRD患者群で低かった。

2. IPRD患者群において、CD8⁺CD28⁻T細胞の比率は、他群に比べ有意に高かった。しかしこの結果は、CD8⁺CD28⁻T細胞の比率低下による相対的な影響も考えられた（Fig2）。

3. CD8⁺CD28⁻T細胞の減少に関し、組織移行の観点からCD62Lの発現を調べた。しかしIPRD患者群とRD患者群に有意な差は認めなかった。

Activation induced cell death（AICD）の観点からCD95、IL-2Rγを調べた。正常群と比べ、CD95、IL-2Rγともに患者群で有意に発現の上昇を認めたものの、IPRD患者群とRD患者群に有意な差は認められなかった（Fig3）。

4. 治療前後で各細胞群の比率の変化を4例で観察した。CD4⁺CD25⁺T細胞の比率は、治療後に増加する傾向を認めた。しかし、CD8⁺CD28⁻T細胞およびCD8⁺CD28⁺T細胞の比率の変化は、疾患により違いを認めた（Fig4）。

D. 考察

IPRD 患者群において、末梢血中の CD4⁺CD25⁺T 細胞は減少していた。しかし、CD25 陽性 T 細胞は、活性化リンパ球を反映する可能性がある。そのため、調節性 T 細胞とされる bright な CD25⁺細胞や、細胞接触性により、強い調節機能を持つとされる CD62L⁺細胞を調べたが、同様に IPRD 患者群で比率の低下を認めた。従い、この比率の低下は IPRD の病態形成との関連が示唆された。

一方 IPRD 患者群において、サブレッサー T 細胞を含むとされる CD8⁺CD28⁻T 細胞は有意に高い結果となり、量的減少は示さなかったが、これは CD8⁺CD28⁺T 細胞の減少による相対的な影響が考えられた。

この CD8⁺CD28⁺T 細胞の減少に関して、肺への組織移行および AICD の両面で検討した。

まず組織移行に関連する CD62L に関して、IPRD 患者群で低い傾向にあるものの、有意な低下は認めなかった。

一方、AICD に関連する CD95、及び IL-2R γ の発現は、ともに、IPRD 患者群、RD 患者群両群で高い結果となった。

以前我々は、IPRD 患者において、血中 IL-15 濃度が高いこと報告している。CD8⁺CD28⁺T 細胞が、非常に死に陥りやすい環境下、肺局所で IL-15 等の AICD 抵抗因子により生き残り、病態形成に関与しているのではないかと考えられた。

治療前後で各細胞群の比率の変化を 4 例で観察した結果、CD4⁺CD25⁺T 細胞の比率は、治療後に増加する傾向を認めた。CD8⁺CD28⁻T 細胞および CD8⁺CD28⁺T 細胞の比率の変化は、PM 及び MPA 例では上昇する傾向にあったものの、SSc 例では明らかな変化は無く、疾患による違いがある可能性が示唆された。

E. 結論

IPRD の病態形成に調節性 T 細胞の関与が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

・Katagiri A, Morimoto S, Nakiri Y, Nakano S, Mitsuo A, Suzuki J, Amano H, Nozawa K, Asano M, Tokano Y, Hashimoto H, Takasaki Y. Decrease in CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁺ T cells in interstitial pneumonitis associated with rheumatic disease Mod Rheumatol. 2008; 18: 562569

2. 学会発表

なし

Fig 1

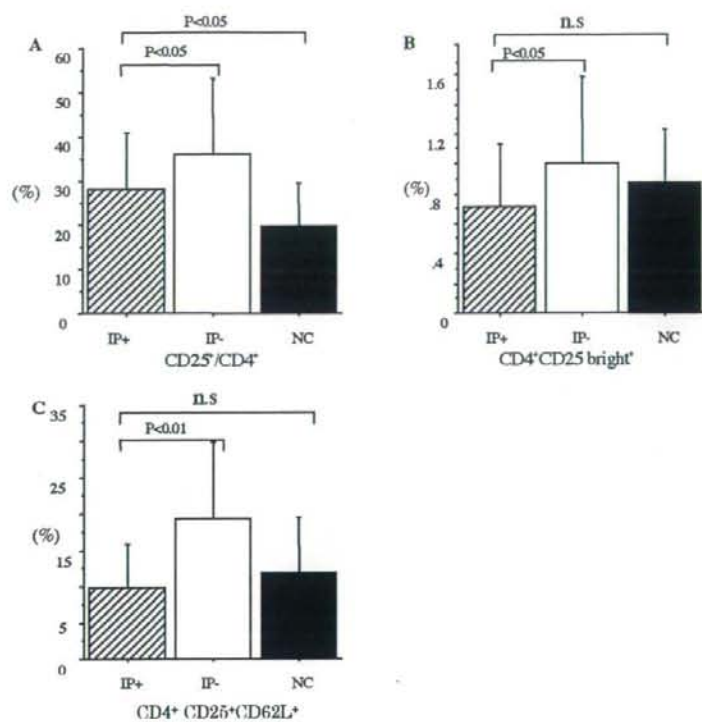


Fig 2

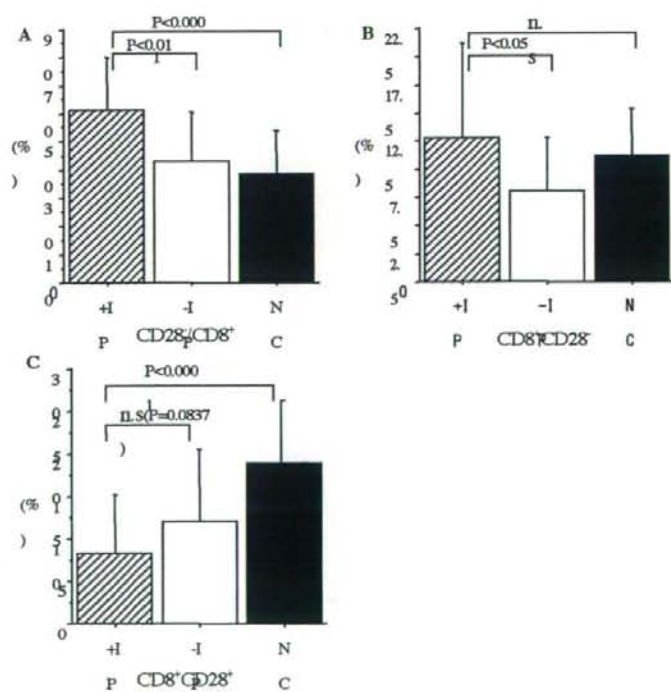


Fig
3

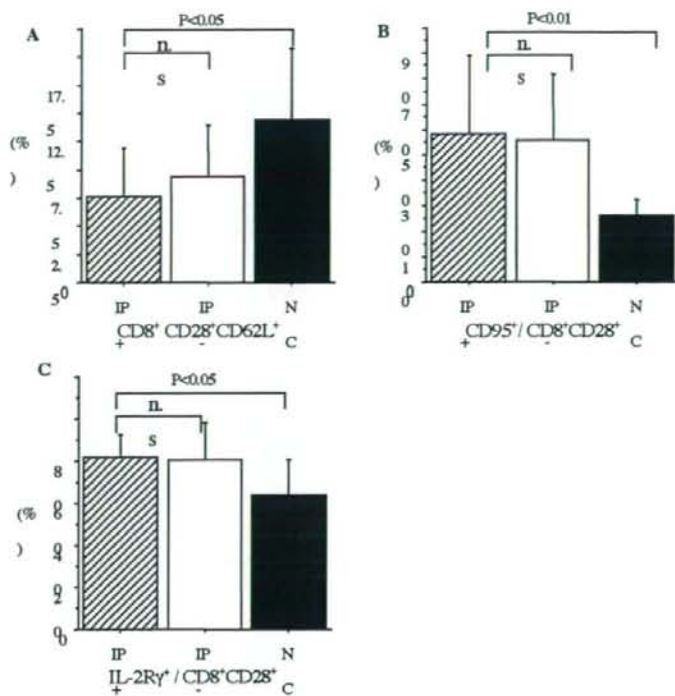


Fig
4

