

## 中枢神経症状を呈した抗U1RNP抗体陽性膠原病における髄液中の抗U1RNP抗体に関する研究

研究分担者： 藤井 隆夫 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・講師

研究協力者： 佐藤 毅 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学

## 研究要旨

本邦において無菌性髄膜炎を呈する膠原病患者は抗U1RNP抗体陽性例が多い。本研究では脳脊髄液（CSF）中の抗核抗体を測定し、その臨床的意義を調べた。中枢神経（CNS）症状を呈したSLE/MCTD 28患者血清中、抗U1RNP、dsDNA、SS-A、Sm、リボソームP抗体を75、61、57、25、14%に認めたが、CSF中では抗U1RNP抗体（36%）、抗SS-A抗体（14%）、抗dsDNA抗体（7%）のみが認められた。副腎皮質ステロイドを含む免疫抑制療法が必要であったSLE/MCTDによる活動性炎症性CNS症例では、それ以外のCNS症例に比しCSF中の抗U1RNP抗体陽性率が有意に高かった。またanti-U1RNP C/S ratio（ $= [\text{CSF-抗U1RNP抗体価}/\text{CSF-IgG濃度}] / [\text{血清-抗U1RNP抗体価}/\text{CSF-IgG濃度}]$ ）はCSF IL-6、IgG index、血液脳関門の傷害（Qalb）と相関がなく、SLE/MCTDに関連するCNS症状のより特異的な活動性指標となる可能性が示唆された。なおanti-U1-70K C/S ratioはanti-U1-AおよびU1-C C/S ratioよりも高値で、CSF中の抗U1-70K抗体の抗原エпитープは既報のT・B細胞エпитープと一致し、髄腔内でその産生が刺激されている可能性が示唆された。

## 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、特にMCTDでは高力価となる。以前からレイノー現象や肺高血圧症、無菌性髄膜炎など一部の病態と抗U1RNP抗体との関連が示唆されているが、抗U1RNP抗体の病原性について明確なエビデンスを示す報告は少ない。われわれは、抗U1RNP抗体（特に抗U1-70K抗体）が*in vivo*でそれらの関連病態に及ぼす影響を明確にしたいと考え、ルーブスモデルマウスを用いて抗U1RNP抗体モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作成した（平成19年度）。本年度は抗U1RNP抗体が関連する病態の局所においてその産生が亢進しているかを明確にするため、抗U1RNP抗体陽性患者で高頻度とされる無菌性髄膜炎を含む中枢神経系（central nervous system: CNS）症状をきたした膠原病患者において、その髄液（cerebrospinal fluid: CSF）中の抗核抗体を測定し、その臨床的意義を検討した。

## B. 研究方法

2002年から2008年の間にCNS症状（ACR分類、1999）を発症し、当院に入院した28例の膠原病患者（SLE 24

例、MCTD 4例、CNS症状を発症した平均年齢=34.1歳）を対象とした。血清とCSF中の抗U1RNP/Sm/SS-A抗体はRNA-免疫沈降法（RNA-IPP）とELISA（MBL社）で測定、抗dsDNA抗体と抗リボソームP抗体はELISA（MBL社）で測定して原疾患によるCNS症状との関連を調べた。またCSF/血清-抗U1RNP抗体比（ $= [\text{CSF-抗U1RNP抗体価}/\text{CSF-IgG濃度}] / [\text{血清-抗U1RNP抗体価}/\text{CSF-IgG濃度}]$ ；anti-U1RNP C/S ratio）を計算し、CSF IL-6、IgG index、および血液脳関門（blood brain barrier: BBB）透過性の指標であるalbumin quotient（ $Q_{alb} = \text{CSF-アルブミン濃度} [\text{mg/dl}] / \text{血清-アルブミン濃度} [\text{mg/dl}]$ 、正常<0.0076）との相関を調べた。

さらにその髄腔内局所における抗U1RNP抗体の特徴をより明確にするために、U1RNPに特異的な蛋白成分であるU1-70K、A、C各成分に対する反応性を、そのリコンビナント抗原を固相化したELISAで血清とCSFを用いてしらべた。なおU1-70K蛋白に関して、その全長蛋白を24アミノ酸ペプチドとして部分合成し、ELISAによって血清・CSFの反応性を検討した。

なお本研究は京都大学医学部 医の倫理委員会承認された研究（E97号）である。

### C. 研究結果

CNS症状を呈したSLE/MCTD 28患者の血清中、抗U1RNP、dsDNA、SS-A、Sm、リボソームP抗体をそれぞれ75、61、57、25、14%に認めた。しかしCSF中では抗U1RNP抗体(36%)、抗SS-A抗体(14%)、抗dsDNA抗体(7%)のみが認められ、抗Sm抗体、抗リボソームP抗体は検出されなかった(表1)。図1に示すように、SLE/MCTDと関連する活動性炎症性CNS症状(感染症などの他疾患が除外され、その治療に副腎皮質ステロイドを含む免疫抑制療法を要した症例)を有した症例ではそれ以外のCNS症状(薬剤性、感染症、血栓症など)を呈した症例に比しCSF中の抗U1RNP抗体陽性率が有意に高かった(70% vs. 7%、 $P < 0.001$ )。またanti-U1RNP C/S ratioはCSF中の抗U1RNP抗体陽性(RNA-IPP)例ではすべての症例で高値(2.1-13.6)となっていた(表1)。われわれの症例では、CSF IL-6やIgG indexが必ずしも活動性炎症性CNS症状症例で上昇を示していなかった

(表1)。一方、BBB傷害の指標であるQalbは活動性炎症性CNS症状症例で、それ以外のCNS症状症例に比して高値となる症例が高頻度であった。しかし、anti-U1RNP C/S ratioはこれらのいずれの指標とも相関を示さなかった(図2)。なお本報告書では示していないが、無菌性髄膜炎を呈した症例ではanti-U1RNP C/S ratioが4例中3例で治療後に低下していた。

抗U1RNP抗体は通常、U1RNP分子に特異的な蛋白であるU1-70K、A、Cのいずれかに反応する。anti-U1RNP C/S ratioと同様に計算したanti-U1-70K C/S ratio(=  $3.1 \pm 1.8$ )はanti-U1-A(  $1.5 \pm 1.2$ )およびU1-C(  $0.9 \pm 0.7$ ) C/S ratioよりも高値であった(結果は図示していない)。すなわち、CSF中の抗U1RNP抗体が血清中の抗U1RNP抗体のプロファイルと異なり、全IgGに比し、抗U1-70K抗体がもっとも“濃縮”されていることを示唆する。そこで、CSF中の抗U1RNP抗体が認識するU1-70Kのエピトープを抗原ペプチドを固相化したELISAで検討した(図3)。血清中の抗U1-70K抗体は、レトロウイルスp30<sup>TM</sup>に相同の部分(aa 59-73)およびRNA-binding domain(aa 104-183)を含む多くのペプチドに反応していたのに対し、CSF中の抗U1-70K抗体はp755の部分(aa 144-164)にもっとも高頻度に反応性を認めた。

### D. 考察

活動性炎症性CNS症状およびそれ以外のCNS症状を呈した抗U1RNP抗体陽性SLE/MCTD患者の血清・CSF中の抗核抗体を調べた。本研究で示された第1点は、抗U1RNP抗体陽性SLE/MCTDでCNS症状を発症した場合のCSF中抗U1RNP抗体の臨床的有用性である。本研究では抗U1RNP抗体の検出に関してもっとも特異性が高く、かつ高感度であるRNA-IPPを用いたが、陽性例ではその後強力な免疫抑制療法を必要としていた。一方、しばしば鑑別に苦慮するステロイドによる躁鬱病やCNS感染症(結核性髄膜炎)、非ステロイド抗炎症薬による無菌性髄膜炎ではCSF中の抗U1RNP抗体はきわめて低頻度であった。すなわちCSF中に抗U1RNP抗体が陽性であった場合には原疾患による活動性炎症性CNS症状と診断できる可能性が高い。また今回新たな指標として提唱・計算したanti-U1RNP C/S ratioは、いままで報告されてきたCNS症状の指標とは相関せず、より活動性炎症性CNS症状に特異的な活動性指標となる可能性がある。RNA-IPPが一部の研究室のみでしか施行されていないことを考慮すると、anti-U1RNP C/S ratioはELISAにより計算できるため、多くの施設で測定しうる。しかし、当科の症例では治療前後にCSFの採取が行われた症例が少数であったため、CNS症状のうち、いかなる病態の活動性に相関するののかについては今後の課題である。

また本研究で示された2点目は、CSF中の抗U1RNP抗体はBBBの傷害のみでは説明できず、髄腔内でその産生が刺激されている可能性である。anti-U1RNP C/S ratioがCSF中抗U1RNP抗体陽性のすべての症例で1をこえていたことは、抗U1RNP抗体がCSF中で血清中に比し“濃縮”されていることを示唆する。抗U1RNP抗体は血清中に高力価で存在するためにBBBの傷害により髄腔内に流入する可能性があるが、それだけではこのように“濃縮”される可能性は低い。またanti-U1RNP C/S ratioとQalbの値との相関が全く認められなかったこと、抗U1-AおよびU1-C C/S ratioに比し、抗U1-70K C/S ratioが高値であったことはU1-70K蛋白が抗U1RNP抗体の髄腔内での産生を刺激した可能性を支持する。さらにCSF中の抗U1-70K抗体の主要抗原エピトープ(p755、aa

141-164) は、T細胞 (aa 131-151) およびB細胞エピトープ (aa 104-183) としてすでに報告されている部位、すなわちRNA-binding domainと一部あるいはすべてが重複していた。したがって、CSF中の抗U1RNP抗体の産生がBBBを通して流れ込んできたB細胞の非特異的な活性化によるとは考えにくく、T細胞とB細胞のcognate interactionにより誘導された可能性が高い。

抗U1RNP抗体のCNSに対する病原性はいまだ不明である。今回CSF中に見いだされた抗U1RNP抗体は、CNS細胞の傷害により細胞外へ移動したU1-70Kが抗原刺激となり、活性化されたリンパ球が抗U1RNP抗体を産生したというシナリオが考えられる。今後モノクローナル抗体を用いて、抗U1RNP抗体あるいは抗U1-70K抗体がCNSにいかなる影響を及ぼすかを検討してみたい。無菌性髄膜炎などのNP-SLEの病因として抗U1RNP抗体が関与していれば、同抗体を治療ターゲットとすることが可能であり、MCTDの新たな治療ストラテジーが考えられる。

## E. 結論

抗U1RNP抗体陽性SLE/MCTD患者でCNS症状を呈した場合、CSF中の抗U1RNP抗体測定はCNS症状と原疾患との関連や活動性評価を知る上で有用である。またCSF中の抗U1RNP抗体はBBB透過性の亢進のみによるのではなくCNS局所でその産生が刺激されている可能性がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujita Y, Fujii T, et al. Aseptic meningitis in mixed connective tissue disease: cytokine and anti-U1RNP antibodies in cerebrospinal fluids from two different cases. *Mod Rheumatol* 2008; 18: 184-188.
- 2) 藤井 隆夫. SLEの免疫異常の解明. SLEにおける抗核抗体の病原性. *最新医学*. 2008; 63: 912-917.
- 3) 藤井 隆夫. 膠原病診療のブレイクスルー - 早期診断・早期治療のポイント- 混合性結合組織病. *内科* 2008; 101: 654-659

- 4) 藤井 隆夫. 混合性結合組織病における肺高血圧症の新規治療. *Medical Practice* 2008; 25: 1405-1409.

### 2. 学会発表

- 1) Murakami K, Fujii T, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer at the first visit is correlated with the next 2 years' disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. The 72<sup>nd</sup> Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology, San Francisco, October 2008.
- 2) Sato T, Fujii T, et al. Characterization of monoclonal anti-U1RNP-70K antibodies derived from lupus-prone mice. The 13<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, September 2008.
- 3) Murakami K, Fujii T, et al. Correlation between anti-CCP antibody titer and disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. The 13<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, September 2008.
- 4) 井村 嘉孝, 藤井 隆夫, ほか. tRNA 関連抗原を認識する新規自己抗体 - 抗Wa抗体. 第52回日本リウマチ学会総会・学術総会. 札幌, 2008年4月. 山川 範之, 藤井 隆夫, ほか. インフリキシマブが有効であった難治性 Wegener 肉芽腫症の1例. 第52回日本リウマチ学会総会・学術総会. 札幌, 2008年4月.
- 5) 武田 菜穂, 藤井 隆夫, ほか. SLE患者の結核診断における QuantiFERON TB-2Gの有用性. 第52回日本リウマチ学会総会・学術総会. 札幌, 2008年4月.
- 6) 村上 孝作, 藤井 隆夫, ほか. 早期関節リウマチにおける抗 CCP 抗体価と疾患活動性との相関の検討. 第52回日本リウマチ学会総会・学術総会. 札幌, 2008年4月.
- 7) 寺尾 知可史, 藤井 隆夫, ほか. 日本人RA患者を用いた TRAF1/C5遺伝子の多型と疾患感受性の検討. 第52回日本リウマチ学会総会・学術総会. 札幌, 2008年4月.
- 8) 湯川 尚一郎, 藤井 隆夫, ほか. 関節リウマチに対する白血球除去療法による末梢血制御性T細胞の変化. 第52回日本リウマチ学会総会・学術総会. 札幌, 2008年4月.

9) 中嶋 蘭、藤井 隆夫、ほか、ステロイド抵抗性ループス腎炎に対するタクロリムスの有効性に関する検討. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 札幌、2008 年 4 月.

10) 佐藤 毅、藤井 隆夫、ほか、ループスモデルマウス由来の抗 U1-70K モノクローナル抗体に関する研究.

11) 秋月 修治、藤井 隆夫、ほか、当科で経験した膠原病性肺高血圧症 18 例の臨床的特徴. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 札幌、2008 年 4 月.

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

表1. 活動性炎症性CNS症状を呈したSLE/MCTD患者

	age	Dx.	CSF			IgG index	CNS manifestations
			Cell /3 $\mu$ l	Protein mg/dl	IL-6 pg/ml		
1	32	SLE	<u>43</u>	<u>128</u>	<u>1190</u>	<u>0.80</u>	Aseptic meningitis
2	30	SLE	<u>15</u>	31	3.19	<u>0.76</u>	Aseptic meningitis, Cognitive dysfunction
3	29	MCTD	<u>33</u>	<u>81</u>	<u>3240</u>	<u>0.72</u>	Aseptic meningitis
4	20	SLE	1	<u>48</u>	2.31	0.62	Cognitive dysfunction, Psychosis
5	39	SLE	<u>13</u>	20	1.85	0.61	Movement disorder, Headache
6	40	MCTD	<u>121</u>	<u>155</u>	<u>837</u>	0.59	Aseptic meningitis, Cognitive dysfunction
7	43	MCTD	8	<u>49</u>	1.48	<u>0.77</u>	Psychosis
8	22	SLE	<u>97</u>	<u>132</u>	<u>7.8</u>	<u>0.77</u>	Acute confusional state Cerebrovascular disease
9	32	SLE	1	14	N.D.	<u>0.89</u>	Headache
10	26	SLE	<u>10</u>	29	<u>644</u>	<u>0.83</u>	Psychosis, Headache
11	41	SLE	8	<u>119</u>	N.D.	<u>0.68</u>	Demyelinating syndrome
12	56	SLE	2	35	1.99	<u>0.68</u>	Headache
13	29	SLE	3	<u>52</u>	N.D.	0.65	Acute confusional state, Psychosis

	Treatments	serum ANA	CSF ANA	Anti-U1RNP ratio	Qalbumin (x10 <sup>3</sup> )
1	mPSL pulse, high-dose CS	U1RNP, DNA, SSA, SSB	U1RNP, SSA	2.1	18.6
2	mPSL pulse, high-dose CS cyclosporine A, IVCY	U1RNP, DNA, SSA Sm, tRNA, Ribo P	U1RNP, SSA	12.4	3.7
3	high-dose corticosteroids	U1RNP, SSA, Ribo P	U1RNP, SSA	9.4	15.7
4	mPSL pulse, IVCY DFPP, rituximab	U1RNP, Sm, SSA Ribo P	U1RNP	7.6	8.1
5	mPSL pulse, high-dose CS	U1RNP, SSA	U1RNP	2.1	2.8
6	high-dose CS, IVCY	U1RNP, DNA	U1RNP	3.0	30.3
7	mPSL pulse, high-dose CS, IVCY	U1RNP, U2RNP	U1RNP	8.8	7.3
8	high-dose CS, IVCY	U1RNP, Sm, Ribo P	U1RNP	2.2	20.4
9	high-dose CS	U1RNP, DNA, Sm,	U1RNP	13.6	1.9
10	high-dose CS	U1RNP, SSA	Neg	N.D.	8.6
11	high-dose CS, IVCY	DNA, SSA,	DNA	N.D.	1.9
12	mPSL pulse	DNA	Neg	N.D.	4.5
13	high-dose CS, rituximab	Neg	Neg	N.D.	9.5

CS, corticosteroids; IVCY, intravenous cyclophosphamide; N.D., not determined

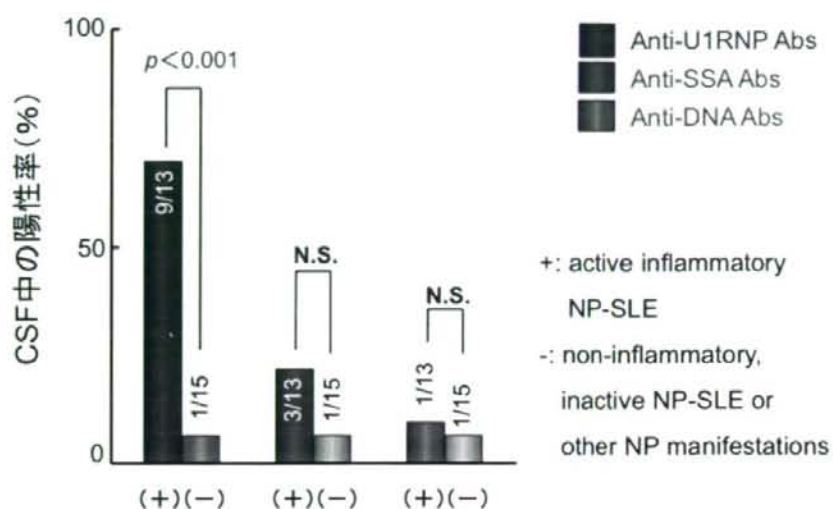


図1. 活動性炎症性CNS症状とCSF中の抗核抗体との関連

抗U1RNP抗体のみでなく、抗SS-A抗体や抗DNA抗体もCSF中に検出されたが、活動性炎症性CNS症状を呈した患者で、それ以外のCNS症状を呈した患者に比し、CSF中に高頻度に見いだされたのは抗U1RNP抗体のみであった。

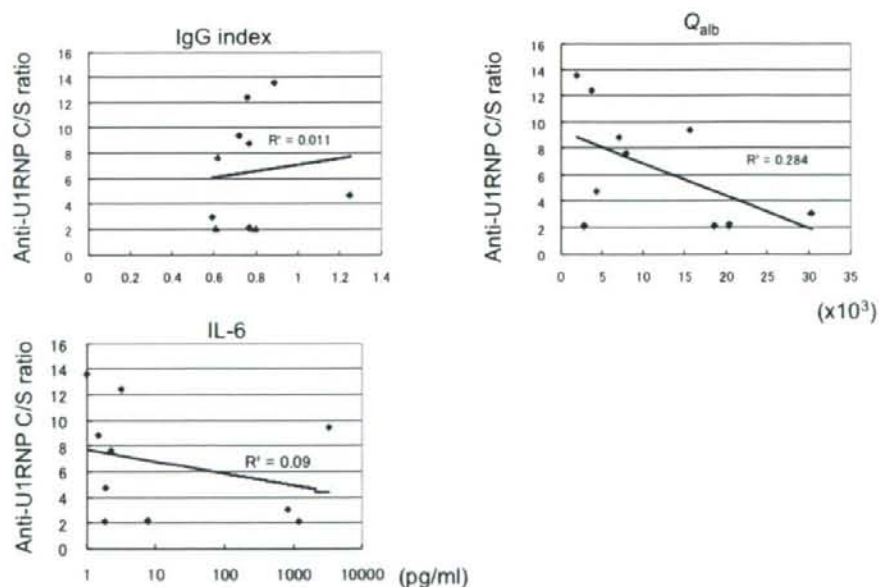


図2. Anti-U1RNP C/S ratioと他のCNSマーカーとの相関

既存のCNSマーカーであるIgG index、CSF IL-6とanti-U1RNP C/S ratioとの相関は認めなかった。またBBB傷害の指標であるQ<sub>alb</sub>との相関もなかったことから、CSF中の抗U1RNP抗体はBBBの透過性の亢進のみでは説明できず、かつ新たなSLE/MCTDにおけるCNS症状のマーカーとなる可能性がある。

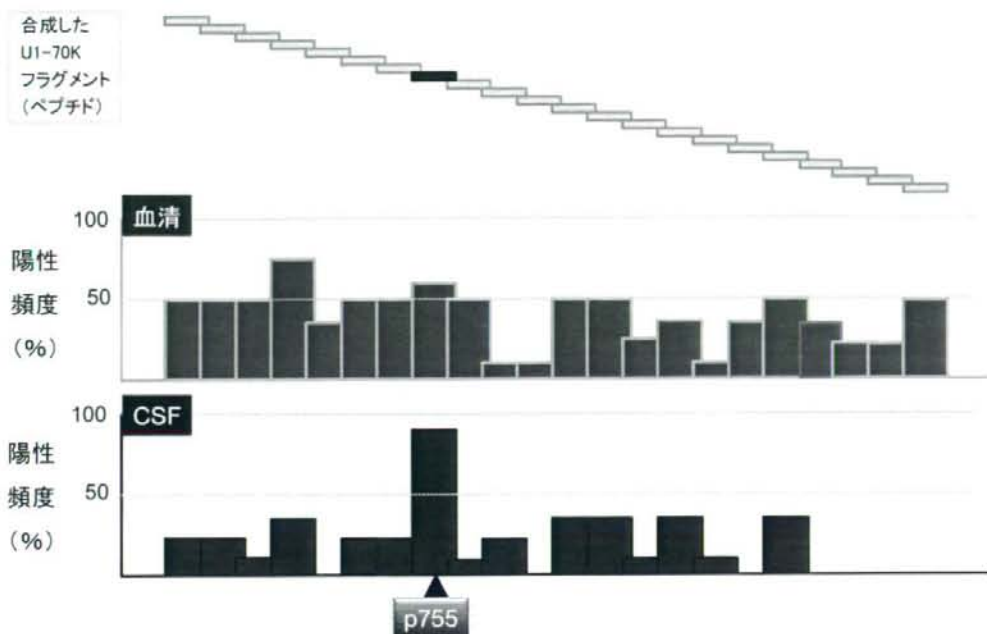


図3. 血清およびCSF中の抗U1RNP抗体の抗原エピトープ

U1-70K蛋白をペプチドフラグメントとして新たに合成し、それらを固相化したELISAによって、血清(x100)、CSF(x10)の反応性を調べた。抗U1RNP抗体陰性検体を陰性コントロールとしてその平均+3SDをcut offとしたところ、血清ではすでに報告されているエピトープ部位を含んで多くのペプチドに反応を認めたのに対し、CSFではp755に対する反応が最も高頻度で、87%に認めた。

## 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

研究分担者	澤井高志	岩手医科大学医学部	病理学講座	教授
研究協力者	鎌滝章央	岩手医科大学医学部	病理学講座	助教
	佐々木信人	岩手医科大学医学部	内科学講座	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自己抗体、特に抗内皮細胞抗体(anti-endothelial cell antibody, AECA)に焦点をあて、研究を行った。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結果、約20の抗原候補蛋白質を得ることができ、その中にはUI-70K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。また、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。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

肺微小血管内皮細胞(HMVEC-L)から調製した蛋白質を二次元電気泳動で展開し、PVDFに転写後、ウエスタンブロットを行った(2Dウエスタン)。MCTD患者血清と強く反応したスポットの蛋白質をPMFやLC-MS/MSで同定した。得られた抗原候補蛋白質の

組換え蛋白質を作製し、ウエスタンブロットで抗体の反応性を確認した。一方で、肺微小血管内皮細胞由来のRNAからcDNAライブラリーを作製し、網羅的に組換え蛋白質を発現させ、患者血清と反応する蛋白質をスクリーニングした(SEREX, serological identification of antigens by recombinant expression cloning)。

(倫理面への配慮)

採血にあたっては、提供者に使用目的やデータ管理について説明し、同意の得られた場合にのみサンプルの提供をうけた。提供者のデータ管理については研究中と研究終了後を問わずに厳密に行い、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

2DウエスタンとPMFあるいはLC-MS/MSにより約20個の抗原候補蛋白質が同定できた。同定できた蛋白質にはUIRNPも含まれていた。得られた抗原候補の組換え蛋白質を用いたウエスタンブロットで、そのいくつかについてはMCTD患者血清との反応性を確認できた(図1)。また、ライブラリーを用いたイムノスクリーニングでは、 $1 \times 10^5$ スクリーニングした時点で細胞膜にも局在する蛋白質や細胞外蛋白質



が抗原候補としてあがった(図2)。

#### D. 考察

同定できた蛋白質の中にはMCTDの特徴であるU1-70Kや、RAとSLEとMCTDで自己抗体の報告のあるhnRNPA1が含まれていた。また、hnRNPLも含まれており、近年のhnRNPLに対する抗体は、hnRNPA1に対する抗体を有する患者に認められることが多いという報告とも矛盾しない。これらのことは、抗原候補の中にMCTD患者血清の反応する蛋白質が含まれている可能性が高いことを示唆している。また、SEREXにより明らかになった抗原蛋白質には細胞外蛋白質などの2Dウェスタンでは検出の難しい蛋白質も含まれていた。これらのことより、MCTD患者におけるPHに関連する自己抗原を解明できる可能性があると考ええる。

#### 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。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamauchi K, Piao HM, Nakadate T, Shikanai T, Nakamura Y, Ito H, Mouri T, Kobayashi H, Maesawa C, Sawai T, Ohtsu H, Inoue H: Enhanced goblet cell hyperplasia in HDC knockout mice with allergic airway inflammation. *Allergol Int.* 58(1):125-134. 2009

2) Watabe D, Kanno H, Inoue-Narita T, Onodera H, Izumida W, Kowada S, Sawai T, Akasaka T: A case of primary cutaneous natural killer/T-cell lymphoma, nasal type, with indolent clinical course: monoclonal expansion of Epstein-Barr virus genome correlating with the terminal aggressive behavior. *Br J Dermatol.* 160(1):

205-207. 2009

3) Shimizu N, Yoshikawa N, Wada T, Handa H, Sana M, Fukuda K, Suematsu M, Sawai T, Morimoto C and Tanaka H: Tissue- and context-dependent modulation of hormonal sensitivity of glucocorticoid-responsive genes by hexamethylene bisacetamide-inducible protein 1. *Mol Endocrinol.* 22(12):2609-23, 2008

4) 澤井高志. RAの関節破壊における病理学的特徴. *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology.* 2(3):168-173. 2008

5) 澤井高志, 三浦康宏, 宇月美和; リウマチ性疾患における病理組織画像のプレゼンテーション. *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology.* 2(3):168-173. 2008

6) 宇月美和, 佐々木喜子, 澤井高志: RAにおける骨・軟骨破壊の病理学的特徴. *Rheumatology Clinical Update.* 15: 7-10. 2008

##### 2. 学会発表

1) Yoshida W, Numata N, Kikuchi T, Shimamura T, Sawai T: Rapid destruction of the hip joint in mixed connective tissue disease. 13<sup>th</sup> congress of the asia pacific league of associations for rheumatology (APLAR 2008), Sep 23-27, 2008, Yokohama

2) Kamataki A, Sasaki N, Hatakeyama A, Sawai T: Identification of autoantigen targeted by anti-endothelial cell antibody from patients with MCTD. 13<sup>th</sup> congress of the asia pacific league of associations for rheumatology (APLAR 2008), Sep 23-27, 2008, Yokohama

3) Itoh Y, Uzuki M, Sawai T, Kamataki A: Connective tissue growth factor (CTGF), a key cytokine that induces synovial cell growth, especially in early stage of RA. 13<sup>th</sup> congress of the asia pacific league of associations for rheumatology (APLAR 2008), Sep 23-27, 2008, Yokohama

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 特になし

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし

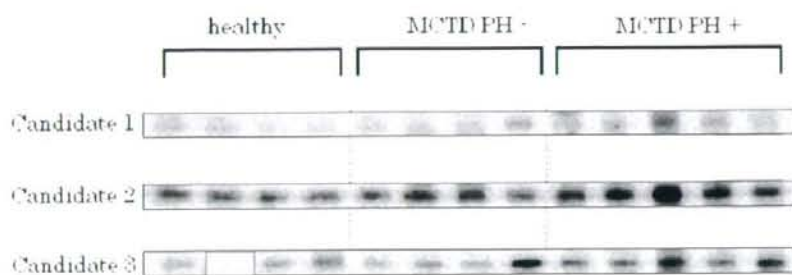


図 1 抗原候補の組換え蛋白質を用いた患者血清との反応性の確認

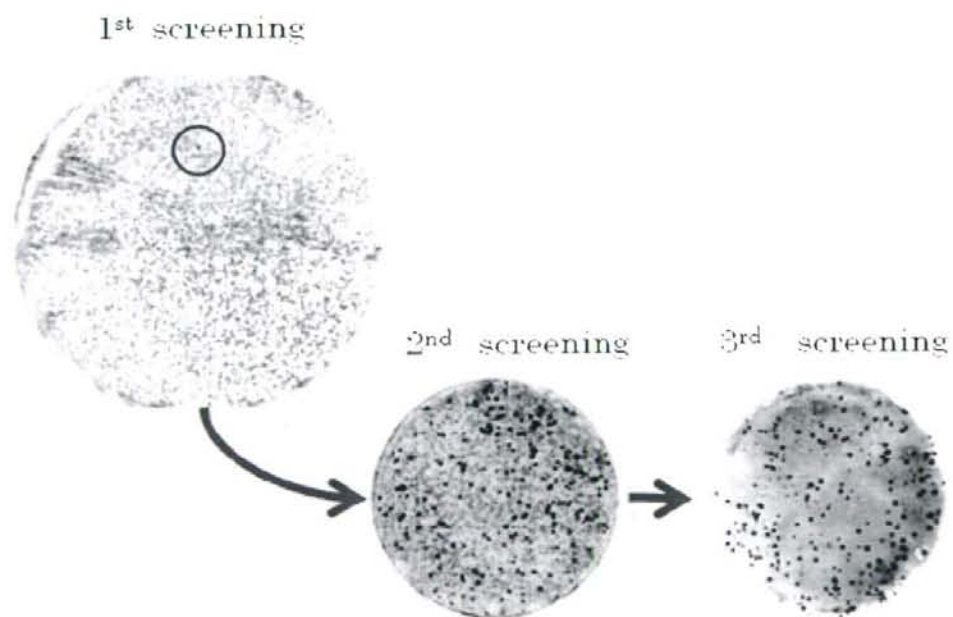


図 2 SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) の一例

## 新規マウスモデルを用いた抗RNP抗体産生機序の検討

研究分担者 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と考えられる。しかし、その解析に適した動物モデルを欠くため、本研究班にてヌードマウスへのT細胞移入による抗核抗体産生の系を樹立し、特に抗RNP抗体の産生機序研究への有用性を明らかにした。そこで、本年度は実際に本系を用いて、抗RNP抗体産生の制御に関わる細胞群および分子の同定を試みた。検討の対象とした細胞群として制御性T細胞のほか、自己抗体産生に関わる可能性が指摘されているB細胞サブセットや樹状細胞を、分子としてはToll様受容体(TLR)やT細胞受容体を選択した。現在これらの細胞群の関与につき検討中である。現段階では、抗RNP抗体産生制御に制御性T細胞は重要な役割を担っていると考えられたが、その関与はヌクレオソームに対する抗体より少なかった。一方、本実験により、RNA受容体であるTLR7は抗RNP抗体産生に強く関与し、その阻害により抗RNP抗体産生抑制が得られることが示された。また、本系において抗RNP抗体誘導にT細胞受容体特異性は必要ないことが判明したことより、抗RNP抗体産生にはT細胞の増殖自体が重要であり、TLR7を介して産生に至っていると考えられた。

### 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RNP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、これまでの本研究班にて、早期に抗RNP抗体を誘導でき種々の条件で検討が可能な系の開発を行った。そこで、今回は、実際に本系を用いて、自己抗体産生の制御に関わる可能性が示唆されている細胞群および分子の抗RNP抗体産生への関与を明らかにすることを目的とし研究を行った。候補の細胞群として制御性T細胞やM2B細胞、B1細胞、NK細胞、形質細胞様樹状細胞を、分子としてはTLRやT細胞受容体を選択した。

### B. 研究方法

#### (1)マウスへの抗RNP抗体誘導

抗RNP抗体をマウスに誘導するために、CD4<sup>+</sup>T細胞やCD4<sup>+</sup>T細胞サブセットをヌードマウスへ移入した。経時的に血清採取を行い、抗RNP抗体のほか、抗RNP抗体の特徴を明らかにするため、以下のような他の

自己抗体の検出も行った。また、本系では臓器特異的自己免疫である腸炎も生じるため、体重も経時的に測定し、抗RNP抗体制御と臓器特異的自己免疫制御との比較も行った。

#### (2)抗RNP抗体及びその他自己抗体の検出

T細胞移入をうけたヌードマウスに、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变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-70K抗体、抗U1RNP-A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-A抗体、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-Aリコンビナント蛋白、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。これまでの研究により、実際にマウスU1RNP-Aリコン

ピナント蛋白によるELISAや、イムノブロット、免疫沈降法などによりマウス蛋白に反応していることは確認している。

**(2-2)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。

**(2-3) 抗H+/K+ ATPase抗体の検出**  
臓器特異的の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、制御性T細胞を除いた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。これらを阻害する核酸やコントロール用の核酸を、ヌードマウスへのCD4+CD25-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、抗二本鎖DNA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とも既に複数の論文で使用され、TLR7阻害phosphorothioate DNAはIRS661、TLR9阻害phosphorothioate DNAはIRS869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も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。

#### **(5)抗RNP抗体産生におけるT細胞受容体特異性の関与の検討**

T細胞受容体特異性が抗RNP抗体産生に重要か否かを検討するために、単一のT細胞受容体を有し外来抗原ニワトリ卵白アルブミンを認識するRAG欠損DO11.10マウス(制御性T細胞を欠くRag欠損

DO11.10Foxp3<sup>sf</sup>マウスも使用)由来CD4+CD25-T細胞をヌードマウスに移入し、多様なT細胞受容体を有しているBALB/cマウス由来CD4+CD25-T細胞を移入した場合と、抗RNP抗体産生について比較検討した。

#### **(6)抗RNP抗体産生制御に関わる細胞群の同定**

本系における抗RNP抗体産生に関わる細胞群の同定を試みるために、本系誘導とともに、以下の方法を用いて候補細胞群を除去した。自己抗体産生への関与が知られているB1細胞は腹腔内への水注射により除去し、同様に自己抗体産生との関わりが示唆されているMZB細胞は抗CD49d抗体+抗LFA抗体投与で除去、NK細胞は抗アシアロGMI抗体にて除去、形質細胞様樹状細胞は抗PDCA1抗体にて除去をかけた。これらの方法は各、幾つもの報告にて確認されている手法である。これらの方法にて特定の細胞群を除去し、その抗RNP抗体産生に及ぼす影響を検討した。

(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)抗RNP抗体産生への制御性T細胞の関与**

抗ヌクレオソーム抗体、抗dsDNA抗体は、CD4T細胞からCD4+CD25+制御性T細胞を除去したCD4+CD25-T細胞の移入群で出現した。抗RNP抗体も、制御性T細胞を除去したCD4+CD25-T細胞の移入群が最も抗体価が高かったが、CD4T細胞、CD4+CD25+T制御性T細胞を移入した群でも、有る程度の抗体産生を認めた(図1)。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。

#### **(2)抗RNP抗体産生へのTLRの関与**

細胞移入時およびその後各週ごとに、TLR7とTLR9それぞれに対する阻害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投与群では一週目より徐々に抗体価が上昇していくが、TLR7やTLR9阻害DNA投与群では、当初より継続的に抗体価抑制効果を認めることができた。特にTLR7阻害DNAの投与の場合にその効果は顕著であった(図2)。抗dsDNA抗体はTLR9阻害DNA投与により抗体産生が抑

制された。

### (3) 抗RNP抗体産生におけるT細胞受容体特異性の必要性の有無

ヌードマウスに、単一の外来抗原反応性T細胞受容体を発現しているRAG欠損DO11.10マウス由来CD4+CD25-T細胞を移入した場合でも、BALB/cマウス由来CD4+CD25-T細胞と同様に高抗体価の抗RNP抗体産生を示した。従って、T細胞受容体特異性は、本系の抗RNP抗体産生には関わっていないという意外な結果となった(図3)。一方、BALB/cマウス由来CD4+CD25-T細胞(WTTC)を移入した場合と異なり、DO11.10マウス由来CD4+CD25-T細胞(DOTC)を入れた場合は腸炎が生じず、抗RNP抗体の産生と異なる結果になった(図4)。

### (4) 抗RNP抗体産生制御に関わる細胞群の同定

現在、制御性T細胞以外に本系における抗RNP抗体産生制御にかかわる細胞群の同定を、方法に記載した細胞群除去により試みている。

## D. 考察

### (1) 抗RNP抗体産生制御に関わる細胞群

抗RNP抗体が出現するモデルでは、自然発症ループモデルマウスが主で半年近く解析に時間がかかり、誘導型であるプリスタン誘発モデルマウスでも同様である。従って、本系の有用な点の一つは早期に高率に高抗体価の抗RNP抗体を認める点であり、誘導型の条件を変更することにより短期間で抗RNP抗体産生制御に関わる細胞群や分子を同定することが可能となった。

今回、制御性T細胞を中心に、自己抗体産生関わる可能性が指摘されている、B1細胞やMZB細胞、形質細胞様樹状細胞、NK細胞の関与について、これらの細胞群の除去効果を検討することで解析しているところである。

Foxp3遺伝子に異常を認めるマウスやヒトの疾患、ヌードマウスへのT細胞サブセットの移入実験などにより、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。本研究でも、CD4T細胞からCD4+CD25+制御性T細胞を除き移入することにより、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。抗RNP抗体に関しても、制御性T細胞を除いたCD4T細胞群で最も抗体価が高いが、CD4T細胞や制御性T細胞移入でも有る程度の抗体産生は確認された。従って、自己抗体産生抑制における制御性T細胞の関与の程度は抗体により異なるものと考えられた。抗RNP抗体産生制御においても制御性T細胞は重要であるものの、他の細胞群や因子も重要な役割を担っていると考えられた。

### (2) 抗RNP抗体産生制御に関わる分子

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投与により抗U1RNP-70K抗体価の低下を認めたことより、TLR7が抗RNP抗体産生過程に関与し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+CD25-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dsDNA抗体はTLR9阻害DNA投与によりその抗体価が低下し、DNAに対する抗体にはDNA受容体であるTLR9が関与していることが示唆された。

また、他の要素として、T細胞受容体の関与についても検討を行った。その結果、T細胞受容体特異性は本系では必要ないことが判明した。これまで、自己抗体の性質の検討から、種々の自己抗体においてT細胞の関与があることが示唆されてきたが、自己抗原特異的T細胞の関与が必要なのか否かは不明であった。今回の意外な結果に関しては、今後抗RNP抗体の産生機序をより詳細に検討するさいに重要な結果と思われる。本系ではヌードマウス内でT細胞がhomeostaticに増殖していくが、このT細胞の増殖自体が重要であり、TLR7を介して抗RNP抗体産生に至っていると考えられる。この機序のより詳細な解明が今後の課題と考える。

### (3) 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、そして薬剤投与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

抗RNP抗体産生制御に、抗dsDNA抗体や抗ヌクレオソーム抗体と同様に、制御性T細胞は重要な役割を担っていると考えられたが、その関与は他の自己抗体より少なかった。一方、本実験により、RNA受容体であるTLR7は抗RNP抗体産生に強く関与し、その阻害により抗RNP抗体産生抑制が得られることが示された。また、本系において抗RNP抗体誘導にT細胞受容体特異性は必要ないことが判明したことより、抗RNP抗体産生にはT細胞の増殖自体が重要であり、TLR7を介して産生に至っていると考えられる。抗RNP抗体の存在は混合性結合組織病の疾患概念に密接に関連していることから、今後更に、TLR7などの核酸受容体阻害の抗RNP抗体産生や自己免疫病態への効果につき検討を進めていくことは、本疾患の分子標的治療を開発する上でも意義があることと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

今回の研究成果は本年論文として発表する予定である。

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

第38回日本免疫学会総会

#### 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

##### 3. その他

なし

図1

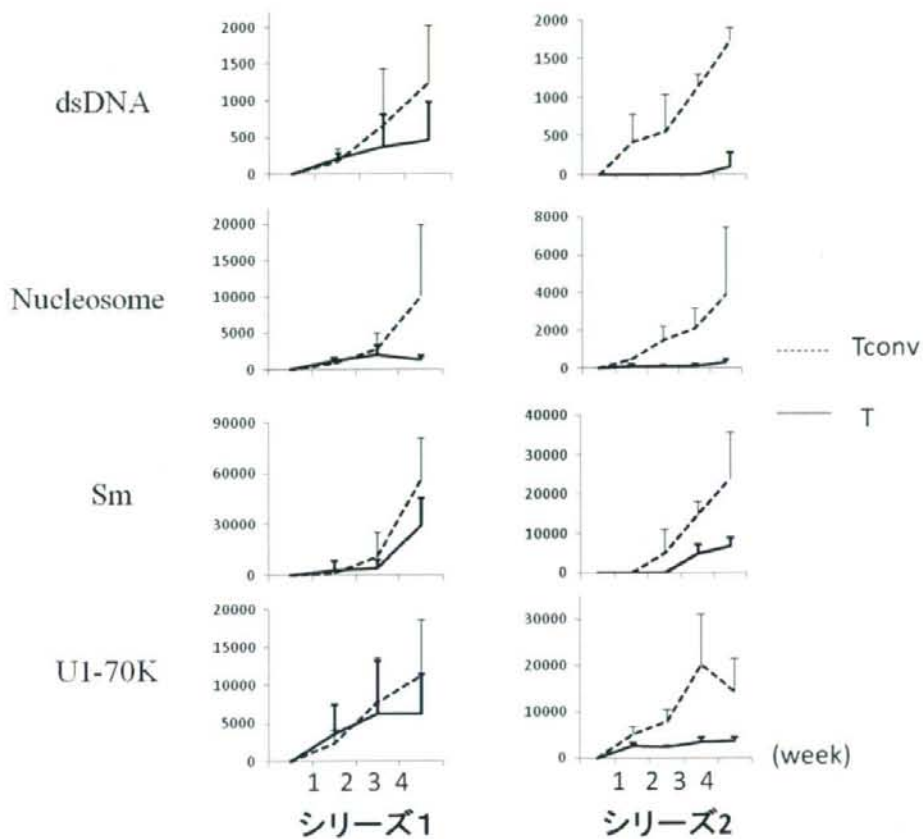


図2

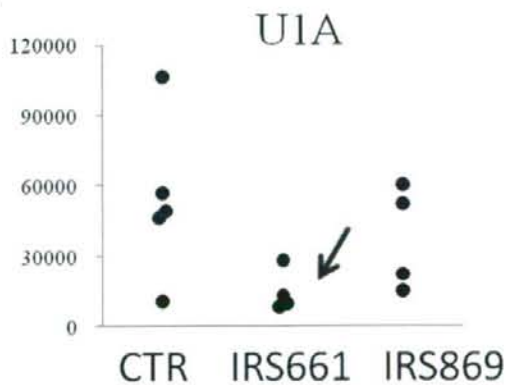


図3

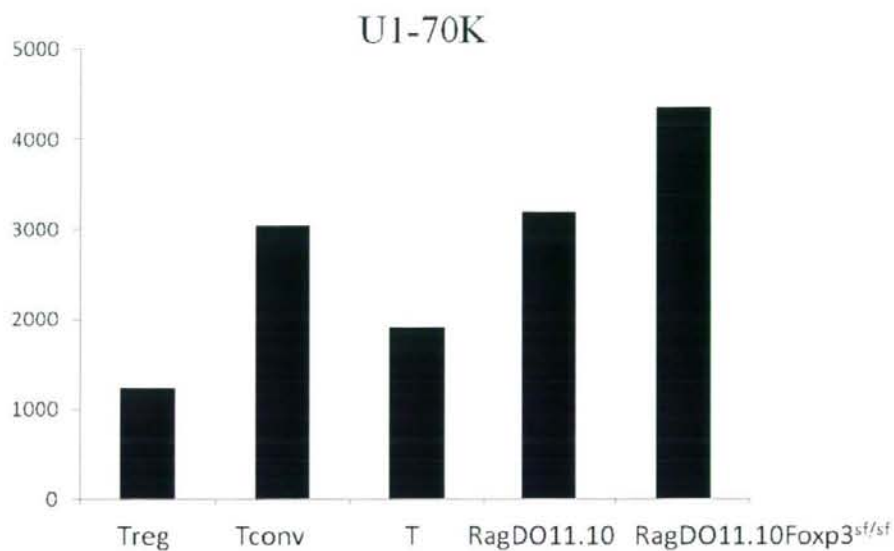
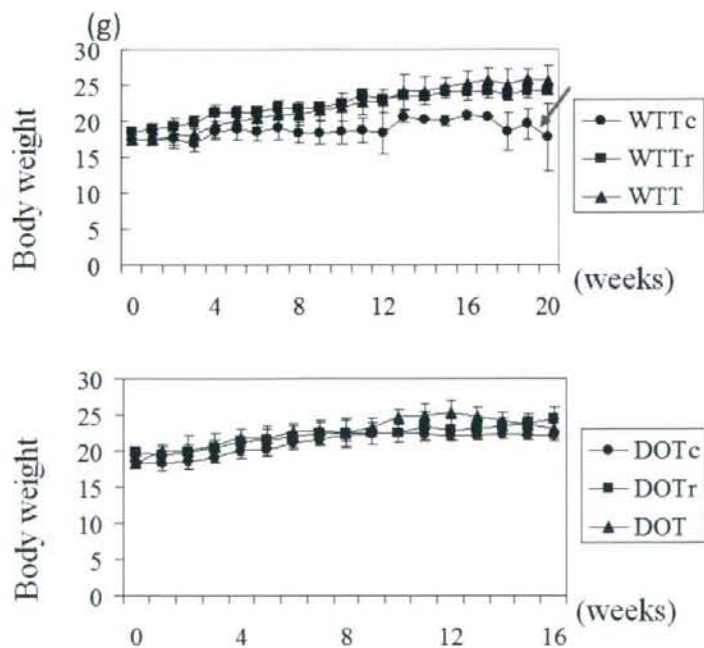


図4





## MCTDの肺動脈性肺高血圧症の発症予測因子、NOS2遺伝子多型の前向き研究（第3報）

研究分担者 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 准教授

### 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抗体が陽性となる膠原病の1疾患である。膠原病類縁疾患のなかでは比較的予後良好であるが、他の膠原病と比較し肺動脈性肺高血圧症(PAH)を合併する頻度が高い。そのため、PAHが生命予後を決定する非常に重要な因子となっている。しかし、PAHの発症機序は明かではなく、発症を予測する方法も確立していない。血管拡張因子である一酸化窒素(NO)は、以前の我々の検討で、MCTD患者において血清中で増加しているが、PAHを合併した症例では、NOの増加が認められなかった。このNO産生量の違いにNO合成酵素であるinducible NO synthase (NOS-2) の遺伝子多型の関与があることを本研究にて報告してきた。今回の研究は、発症4年以内のMCTD患者で3年以上の追跡調査を行い、PAHの発症にNOS2遺伝子多型が予測因子になるかどうかを前向き検討で評価する。NOS2遺伝子多型のCCTTT繰返し配列が少ないことは、PAH発症と関連していた。NOS2遺伝子多型は、PAH発症の遺伝子学的指標となる可能性が示唆された。

### 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、健康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4年以内の症例を対象とした。

#### 2) 肺動脈性肺高血圧症患者の診断

心臓超音波検査にて、RVSP (right ventricular systolic pressure) が、40 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) 症例

2005年10月からの登録を行い、本年度の登録患者4例を加え、22例のMCTDを登録した。22例、全例女性で、年齢の中央値は、38歳であった。そのうち、5例においてPAHが認められた。

#### 2) 患者血中エンドセリン-1 (ET-1) および一酸化窒素の代謝産物 (NO) の検討

MCTD患者22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。経過中にPAHを発症した症例3、症例5、症例11、症例19、症例21では、NO/ET-1比が低下していた (図2)。その5症例とその他の17症例を比較した結果、表1に示すように、NO/ET-1 ratioは、有意差をもってPAH発症群で低下していた。

#### 3) CCTTTの繰り返し配列の遺伝子多型の検討

22症例のCCTTT繰り返し配列の回数を測定し、2つの染色体上のCCTTT配列の繰り返し数の和を図3に示した。症例3、症例5、症例11、症例19、症例21のPAHを発症した症例では、CCTTT繰り返し配列の総和が低下していた。22症例をCCTTT繰り返し数の数で、17-21、22-26、27以上の3群にわけた。7症例、6症例、9症例がそれぞれの群に属していた。それぞれの群にて、NO/ET-1 ratioを比較検討した結果、CCTTT繰り返し数の少ない群は、NO/ET-1 ratioが有意に低値を示した (表2)。繰り返し配列を21以下と、22以上に分けて検討した

結果、CCTTT繰り返し配列の数が少ないことは、PAHの発症と有意な相関が認められた (表3)。

### 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産生の増加が認められない。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。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た。今までの、検討の結果では、22例中5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。CCTTT repeatの回数の総和を指標とし、総和が21以下の症例と、22以上の症例の2群にわけた検討では、21以下の群では、有意にPAHの発症と関連が認められた。CCTTT repeatの回数は、前向き検討においても、PAHの発症を予測する有用な遺伝子マーカーとなる可能性が示唆された。

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が示唆された。

#### F. 文献

1) 原まさ子、高木香恵、川口鎮司。MCTDの血管病変におけるET-1、NOの関与。厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班 混合性結合組織病分科会 平成10年度 研究報告書 36-37, 1999

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

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

13年度 研究報告書 56-59, 2002

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

5) Kawaguchi Y, Tochimoto A, Hara M, Kawamoto M, Takagi K, Sugiura T, Katsumata Y, Okada J, Kondo H, Okubo M, Kamatani N: Association of Gene polymorphisms of *NOS2* with pulmonary arterial hypertension combined with systemic sclerosis in the Japanese population. *Arthritis Res Ther* 8:R104, 2006

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

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

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

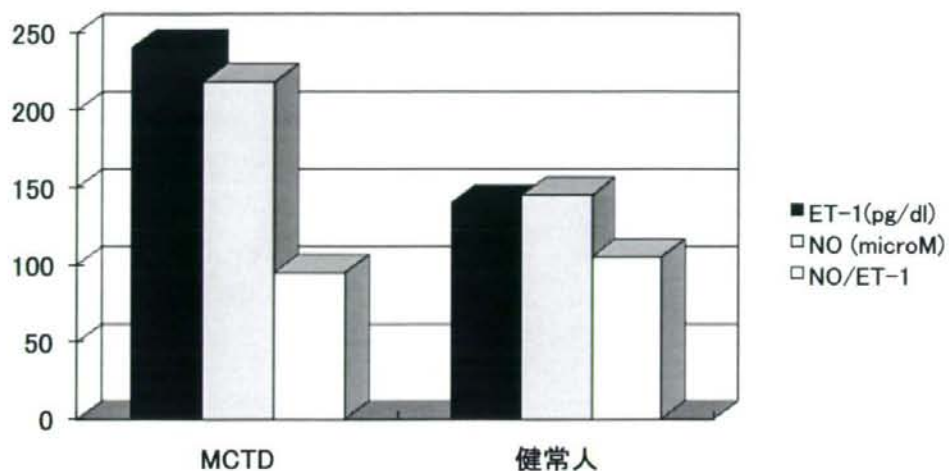


図1 MCTDおよび健常人(HC)の血中エンドセリン-1(ET-1)と一酸化窒素(NO)  
\*:  $p < 0.01$  HCと比較しての有意差

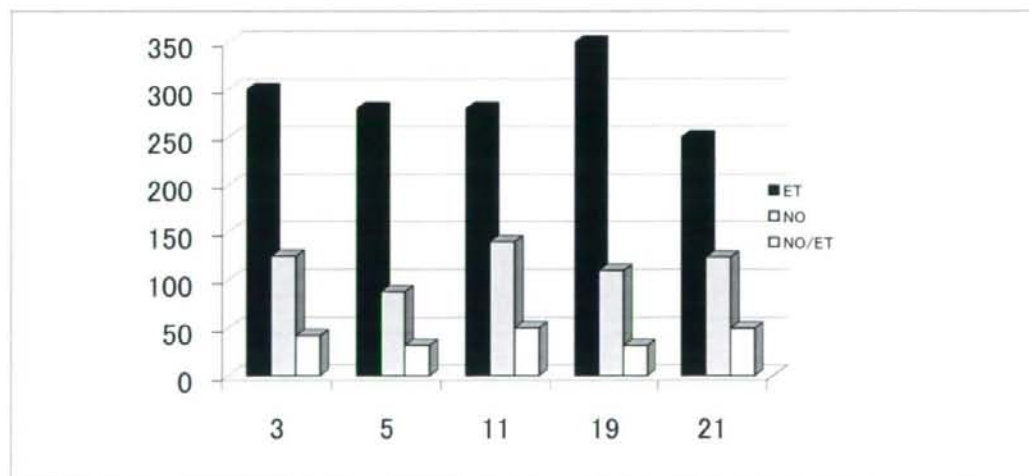


図2 PAH発症症例のエンドセリン-1(ET-1) と一酸化窒素 (NO) およびその比