

膠原病に合併するニューモシスチス肺炎の CT 所見と臨床特徴との関連に関する研究

研究分担者 金子祐子 慶應義塾大学医学部内科 助教

研究要旨 膠原病治療中のニューモシスチス肺炎（PCP）は、生命予後に関係する重大な日和見感染症であるが、HIV における PCP とは臨床像が異なることが報告されている。本研究では、膠原病に合併する PCP の胸部 CT 所見と臨床特徴との関連について検討した。膠原病患者 18 例について PCP 発症時の胸部 CT 所見を type A-C に分類し検討したところ、A 群では B、C 群に比して、血清 β -D-グルカン値が低く、肺泡洗浄液中総細胞数が多い傾向が認められ、菌体量が少数であるが炎症が強いことが推測された。膠原病に合併する PCP は CT 所見によって病態が異なる可能性があり、今後症例を集積し検討することが必要と考えられた。

A. 研究目的

膠原病治療中のニューモシスチス肺炎（PCP）は、生命予後に関係する重大な日和見感染症であり、その胸部 CT 所見が多彩であることや HIV における PCP とは臨床像が異なることが報告されている。本研究では、膠原病における PCP の胸部 CT 所見と臨床特徴との関連について検討した。

B. 研究方法

(1) 1999 年～2009 年の 10 年間に、当科に入院した膠原病約 1,800 例のうち、喀痰または気管支肺泡洗浄液（BALF）で Grocott 染色による *Pneumocystis jirovecii* の嚢子検出または PCR 法陽性、もしくは (1→3) β -D-グルカン陽性により PCP と判定された 18 例を抽出し、対象とした。(2) 発症時の胸部 CT 所見を、徳田らが提唱した画像パターン (Tokuda et al., Intern Med 47, 2008) により、type A（隣接する正常領域と境界が明瞭な汎小葉性のすりガラス影）、type B（均一または不均一でも境界不明瞭なすりガラス影）、type C（浸潤影などの A、B 以外の陰影）に分類し、その患者背景、検査所見、臨床経過などの臨床特徴を比較検討した。

（倫理面への配慮）

すべての臨床試験はヘルシンキ宣言を遵守し、患者よりの検体採取に際しては倫理審査委員会の承認を得るとともに患者より文書同意を取得して行うことを前提とする。

C. 研究結果

(1) 対象 18 例の基礎疾患は、全身性エリテマトーデス 11 例、関節リウマチ 5 例、悪性関節リウマチ 1 例、混合性結合組織病 1 例で、2007 年以後はすべて関節リウマチであった。全例がステロイドまたは免疫抑制剤で加療されていた。(2) 発症時 CT 所見により、type A 5 例、B 11 例、C 2 例に分類された。(3) A 2 例 (40%)、B 8 例 (74%)、C 2 例 (100%) が嚢子検出によって、A 1 例 (20%)、B 1 例 (9%) が PCR 法によって、A 2 例 (40%)、B 2 例 (18%) が臨床的に判定された。(4) $PaO_2/FiO_2 < 200$ Torr 以下の高度酸素化障害は、A 0 例、B 2 例 (18%)、C 2 例 (100%) であった。(5) 発症時の年齢、ステロイド量、リンパ球数には差を認めなかった。A 群では B、C 群に比して、血清 β -D-グルカン値が低く（平均値 (pg/ml) A 24, B 287, C 484）、BALF 総細胞数が多い（平均値 ($\times 10^5$ /ml) A 17, B 5, C 2) 傾向が認められた。(6) 16 例が ST 合剤とステロイド大量療法併用、呼吸不全を合併していなかった B 2 例が ST 合剤単独で治療され、

転帰はA 1例 (20%), B 0例, C 2例 (100%) が死亡していた。

D. 考察

膠原病に合併するPCPにおいて、発症時CT所見のパターンによって、臨床像が異なっていた。type AパターンでのCT所見を呈した症例では、嚢子検出による診断率や血清 β -D-グルカン値が低いこと、BALF総細胞数が多いことから、ニューモシスチスの菌体量が少数であるが炎症が強いことが推測される。PCPは菌体自身の障害のみならず過剰な免疫反応が肺障害を引き起こしていると考えられ、特に膠原病におけるPCPは、HIVと比して少数の菌体でも免疫反応が激しい可能性も報告されている。CT所見によって異なる臨床特徴が認められたことは、病態の違いを反映している可能性があり、今後、症例を集積し、経時的変化を含めて検討をしていく必要が示唆された。

E. 結論

膠原病におけるPCPは、CT所見によって異なる臨床特徴を呈していた。今後の早期診断や治療法の検討のために、さらなる症例集積と検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaneko Y, Suwa A, Hirakata M, Ikeda Y, Kuwana M. Clinical associations with autoantibody reactivities to individual components of U1 small nuclear ribonucleoprotein *Lupus*. In print
2. Takada T, Hirakata M, Suwa A, Kaneko Y, Kuwana M, Ishihara T, Ikeda Y. Clinical characteristics of Japanese patients with anti-OJ (anti-isoleucyl-tRNA synthetase) autoantibodies. *Mod Rheumatology*

19(2):156-64, 2009

3. Suwa A, Hirakata M, Kaneko Y, Sato S, Suzuki Y, Kuwana M. Successful treatment of refractory polymyositis with the immunosuppressant mizoribine: case report. *Clin Rheumatol* 28(2):227-229, 2008

2. 学会発表

1. Kaneko Y, Yasuoka H, Seta N, Kuwana M. Predictors of short-term radiological progression in Japanese patients with disease modifying antirheumatic drug (DMARD)-naïve rheumatoid arthritis: A single centre prospective study. 10th annual congress of the European League against Rheumatism, 2009 June, Copenhagen
2. Hanaoka H, Okazaki Y, Satoh T, Kaneko Y, Yasuoka H, Seta N, Kuwana M: Emergence of Circulating Anti-Double Strand DNA (dsDNA) Antibody-Secreting Cells Predicts Disease Flare in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. 73rd annual meeting of American College of Rheumatology, 2009 Nov, Philadelphia
3. Hirakata M, Takada T, Kaneko Y, Hardin JA.: Development of the Novel Assay System for Detecting Anti-SRP Autoantibodies. The Clinical Histopathological, and Immunogenetic Feature in Japanese Patients: 73rd annual meeting of American College of Rheumatology, 2009 Nov, Philadelphia
4. 金子祐子, 泉啓介, 白井悠一郎, 花岡洋成, 古屋善章, 高田哲也, 木村納子, 安岡秀剛, 瀬田範行, 桑名正隆: 未治療関節リウマチ(RA)患者の前向き観察研究 SAKURA study. 第53回日本リウマチ学会総会, 2009年4月, 品川
5. 井上有美子, 金子祐子, 桑名正隆: 関節リウマチ(RA)に合併した血管炎に対するタクロリムス(Tac)の使用経験. 第53回日本リウマチ学会総

会, 2009年4月, 品川

6. 平形道人, 諏訪昭, 高田哲也, 井上有美子, 金子祐子, 桑名正隆: 多発性筋炎・皮膚筋炎 抗アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) 抗体陽性例における臨床像と免疫遺伝学的背景との関連に関する研究. 第53回 日本リウマチ学会総会, 2009年4月, 品川

H. 知的財産権の出願・登録

なし

自己抗原発現マウスにおける肺線維化自然発症についての検討

研究分担者 土肥 眞 東京大学医学部アレルギーリウマチ科 講師

研究要旨 膠原病による間質性肺病変の形成機序を解析するため、核内に自己抗原を発現し、かつ末梢に自己反応性 T 細胞を持つマウスを作成した。生下時には免疫寛容が成立しているためどの臓器も異常を示さなかったが、SPF 下に飼育すると 12 週齢頃より肺に特異的に好球性炎症と線維化が惹起された。自己抗原に対する免疫寛容が肺で破綻した可能性と非特異的な感染が病態に関与した可能性が示唆された。

A. 研究背景と目的

膠原病に伴う間質性肺病変 (interstitial lung diseases: ILD) は、原病を引き起こす免疫学的異常に、内因性或いは外因性の何らかの要因が加わって発症すると想定されているが、実態は明らかでない。これまで、ヘルペスウイルスやサイトメガロウイルスの感染が ILD 発症に関与することを示唆するデータが、ヒト症例あるいは動物実験で得られているが、ヒト臨床検体の解析では、方法上の限界や問題点もあり、結果の再現性も完全ではない。ILD の病理学的パターン分類の中で、膠原病に合併する ILD の多くは非特異性間質性肺炎 (NSIP) のパターンをとることが明らかになっている。一方で、King らは、特発性 NSIP と診断された患者 28 例の臨床背景を詳細に検討した結果、88% の症例がいわゆる分類不能膠原病 (UCTD) の分類基準を満たしていたことを報告しており (Kinder, 2007)、自己免疫現象と NSIP 発症の間には密接な関係があると考えられる。免疫学的な機序により肺病変を引き起こす動物モデルにはこれまで、MRL/lpr マウス、TNF α トランスジェニックマウス、免疫複合体静注マウスなどがあるが、いずれの実験系においても肺に線維化は生じず、この点で膠原病の ILD にしばしば見られる fibrotic-NSIP とは解離がある。さらに、免疫寛容あるいは自己免疫と肺線維化の関係を検討できる有用なモデルはこれまで報告されていない。

B. 研究方法

私どもは以前、全身の細胞の核内に、卵白アルブミン (OVA) を内因性の自己抗原として発現するトランスジェニックマウス <Ld-nOVA> を作成した (Kawahata, 2002)。このマウスと、体内の T 細胞の全てが OVA 抗原に特異的な T 細胞からなるマウス <DO.11.10> を交配し、核内自己抗原反応性 CD4 陽性 T 細胞を持つマウス <DBL> を作成した。このマウスでは、自己抗原反応性 T 細胞が制御性 T 細胞へ分化するため、自己抗原に対する免疫応答は惹起されなかった。一方で、recombination activating gene (RAG) の作用により遺伝子組み換えが生じ、OVA 特異的 T 細胞が非特異的 T 細胞に分化することで自己反応性が回避される現象も認められた。そこで、後者の作用を取り除き、単一の抗原特異性を有する全身性自己抗原反応性 T 細胞の挙動を解析するため、<DBL> を RAG 欠損マウスと交配した <Rag DBL> マウスを作成し、経時的に表現形を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、東京大学動物倫理委員会の規定を遵守して実施した。検体の採取に際しては、麻酔下に可能な限り実験動物への苦痛を軽減する方法で行った。

C. 研究結果

<Rag DBL> マウスでは T 細胞の 90% 以上が CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ の制御性 T 細胞へと分化しており、自己 OVA 抗原に対して免疫寛容が成立していると考え

られた。このために、<Rag DBL>マウスは生下時にはどの臓器にも明らかな異常は認められなかった。一方で、このマウスを無処置で飼育すると、4~6 週齢までは正常だが、約 12 週齢を過ぎると肺に好中球の浸潤と軽度の線維化が認められ始めた。さらに経過を観察すると、好中球浸潤と線維化病変は経時的に進展増悪した。病変は肺にのみ生じ、脾臓、膵臓、腸管などの他の組織には見られなかった。気管支肺胞洗浄液(BALF)の解析では、好中球が優位で一部リンパ球も含む炎症性細胞の増加が認められた。同一条件下で飼育した<Rag-DO11.10>マウスでも、20 週齢を過ぎると、肺に炎症細胞の浸潤を認めるようになった。これらの結果の再現性も確認された。

D. 考察

考察: <Rag DBL>マウスでは 6 週齢では肺に病変は見られず、12 週齢前後から好中球性炎症と線維化が認められ始め、20 週齢では進行していた。この結果は、「内因性抗原とそれに本来は反応しうる T 細胞を持つマウスが週齢を重ねたことにより好中球性炎症と線維化が生じた」と解釈できる。そこで発表者らは「生下時には成立している、自己抗原に対する免疫寛容が、加齢に伴う何らかの内因性或いは外因性の要因により破綻して免疫応答が引き起こされ、その結果、肺に炎症と線維化が生じた」と考えた。本検討では、病変肺ではリンパ球ではなくむしろ好中球優位の炎症が惹起された。このことは必ずしも本検討で見られた病態に対してリンパ球を中心とする自己抗原に対する免疫応答の関与が低いことを意味するわけではない。例えば、インターロイキン(IL)-17 のような好中球優位の炎症を惹起する因子がリンパ球から産生されれば、リンパ球の数自体は少なくとも、好中球優位の炎症が引き起こされることは十分ありうる。本研究においても、予備実験の段階ではあるが、<Rag DBL>マウスにおいては CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺の制御性 T 細胞が IL-17 を産生することを確認している。しかし一方で、時間が経つにつれて 20 週齢では<DBL>マウスと<Rag-DO11.10>においても程度は弱いものの同様の炎症が惹起された。従って、この病変形成過程の一部は核内自己抗原の発現と無関係であ

る可能性が示唆され、感染などの、どの系統のマウスにも共通した要因が関与している可能性も考えられる。<Rag DBL>マウスを、膠原病に伴う間質性肺病変のモデルマウスであると認定するためには今後、上述した両者の可能性について検討する必要があると考えられる。

E. 結論

<Rag DBL>マウスは、自己抗原の発現を背景とし、加齢により肺線維化を発症した。一方で、非特異的な感染による影響も否定できず、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakagome K, Okunishi K, et al., and Dohi M. IFN- γ attenuates Ag-induced overall immune response in the airway as a Th1-type immune-regulatory cytokine. *J Immunol*: 183:209-220, 2009

Harada H, Imamura M, et al., and Dohi M. Up-regulation of lung dendritic cell functions in elastase-induced emphysema. *Int Arch Allergy Immunol*:149 :25-30,2009.

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*:149 :14-20,2009.

2 学会発表 :

土肥眞 : 膠原病の肺病変。第 59 回日本アレルギー学会イブニングセミナー。2009, 秋田 (抄録集 p1193)。

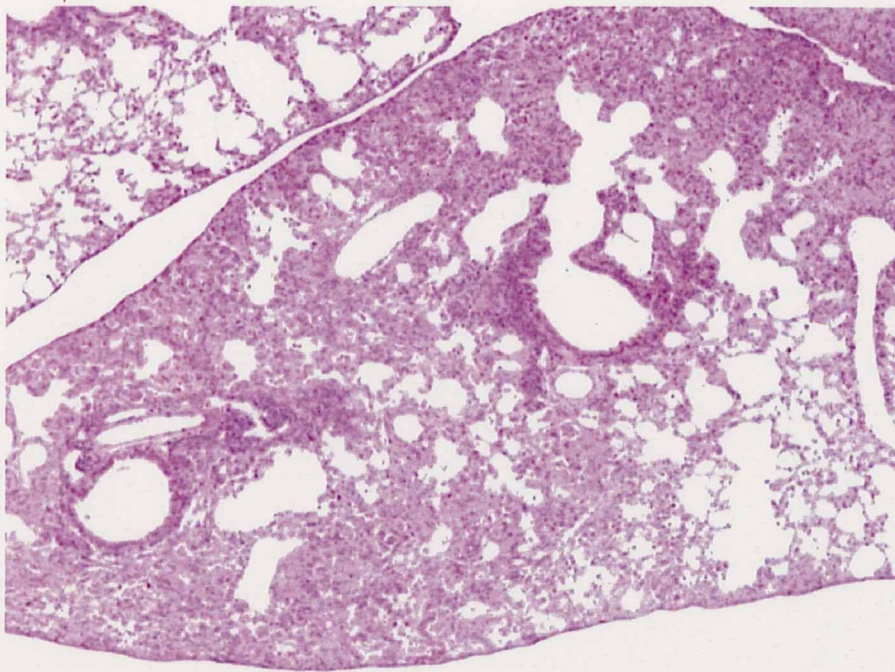
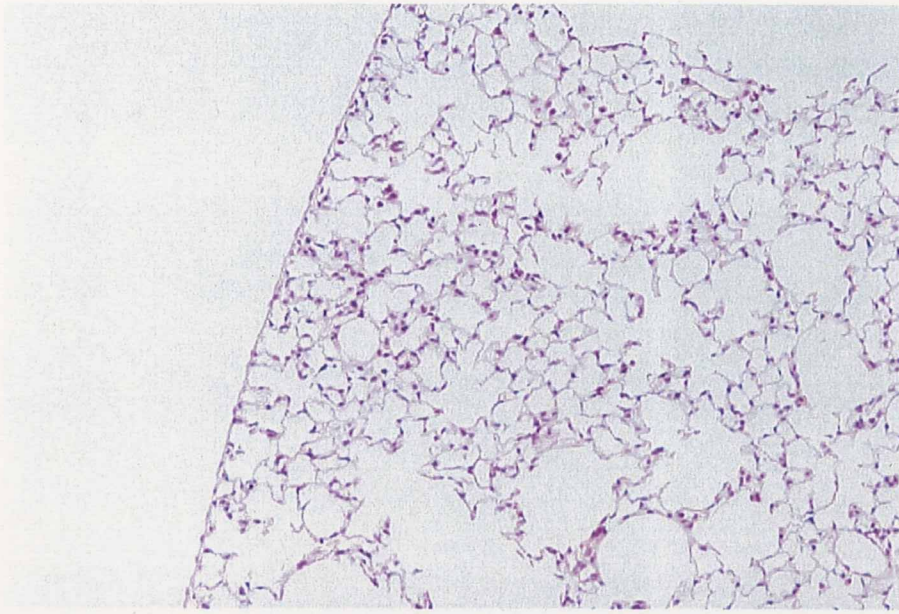
松本拓、土肥 眞、中込一之、他 : Simvastatin はアレルギー性鼻炎モデルにおける抗原誘発反応を抑制する。第 59 回日本アレルギー学会。2009, 秋田 (抄録集 p1222)

今村充、土肥眞、奥西勝秀、他：アレルギー性気道炎症におけるイソプレノイドの効果。第59回日本アレルギー学会。2009, 秋田（抄録集 p1250）。

中込一之、土肥眞、奥西勝秀：気管支喘息モデルにおける、IFN- γ 遺伝子導入による好酸球性気道炎症の抑制機序について。第59回日本アレルギー学会。2009, 秋田（抄録集 p1290）。

H. 知的財産権の出願・登録：

特になし。



<Rag DBL>マウスにおける肺線維化の発症。

上段:8 週齢

下段:20 週齢

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

研究分担者 稲瀬直彦 東京医科歯科大学呼吸器内科 教授

研究協力者 岡本 師、白濱龍太郎、宮崎泰成 東京医科歯科大学呼吸器内科

研究要旨: 間質性肺炎は、膠原病において予後を規定する重要な合併症の一つであるが、その病態は不明な点が多い。強皮症に伴う間質性肺炎の肺線維化の過程に関わる重要な蛋白を明らかにすることを目的とし、当科で 2004 年より 2008 年の間に経験した SSc fib- 群 4 例と SSc fib+ 群 5 例の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の蛋白発現を、two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) を用いて検討した。surfactant protein A (SP-A)、 α 2-macroglobin、 α 1-antitrypsin は SSc fib+ で有意に発現が亢進し、glutathione S-transferase (GST)、 α 2-heat shock protein (HSP) は SSc fib+ で有意に発現が低下していた。この SP-A に関しては 5 つの isoform を認め、その内質量が最小の spot (isoform 1) において有意差を認めた (spot quantity values: SSc fib+; 25.5 \pm 6.6 vs SSc fib-; 5.9 \pm 3.1, p <0.05)。今後 SP-A の isoform 1 の解析や翻訳後修飾の検討が必要である。

A. 研究目的

間質性肺炎は、膠原病において予後を規定する重要な合併症の一つである。しかしながら、その病態は不明な点が多い。これまでの研究では、間質性肺炎を合併しない強皮症 (SSc fib-) と間質性肺炎を合併する強皮症 (SSc fib+) の間で、16.3kDa から 69.8kDa の発現量の差を認めた 11 種類の蛋白が報告されている¹⁾。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の蛋白発現を網羅的に検討することで、強皮症に伴う間質性肺炎の肺線維化の過程に関わる重要な蛋白を明らかにする。

B. 研究方法

当科で 2004 年より 2008 年の間に経験した SSc fib- 群 4 例と SSc fib+ 群 5 例の BALF 中の蛋白発現を、two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

医学倫理に対する配慮の概要 ; 研究対象となる群に対して、インフォームド・コンセントに基づき、説明書を用い、研究方法、危険性、研究結果の取り扱い等について説明、同意を得た。

C. 研究結果

患者背景を表 1 に示す。間質性肺炎のマーカーとして知られる KL-6 が SSc fib+ 群で有意に高値であった。2-DE の結果 10.1kDa から 123.0kDa までの間に 432 の spot が認められ、SSc fib+ 群の発現量が SSc fib- 群の 1.5 倍以上、もしくは 0.67 倍以下であった蛋白を 16 種類同定した。SSc fib+ 群の発現量が SSc fib- 群の 1.5 倍以上の蛋白は α 2-macroglobulin, transferrin, α 2-antiplasmin, α 1-antitrypsin, immunoglobulin heavy chain γ , surfactant protein A, toll-like receptor の 7 種類であり、0.67 倍以下であった蛋白は、immunoglobulin heavy chain α , L-FABP, immunoglobulin J chain α -1 antichymotrypsin, haptoglobin heavy chain α , α -2HS glycoprotein (HSP), hemopexin, glutathione

S-transferase (GST)の9種類であった。その内、SP-A、 α -1-antitrypsin、 α -2-macroglobulin、HSP、GSTにおいて有意差を認めた(表2)。

SP-A領域に5つのisoformを認めた。質量が低いものからisoform 1とし、質量が増えるにつれisoform 5まで番号をふると、isoform 1においてSSc fib+群とSSc fib-群の間に有意差を認めた (spot quantity values: SSc fib+; 25.5 ± 6.6 vs SSc fib-; 5.9 ± 3.1 , $p < 0.05$) (表3)。

D. 考察

SP-Aは、肺胞II型上皮細胞で産生される肺サーファクタントの構成成分であり、肺胞腔内のリン脂質を一定量に保ち、気道感染に対する自然免疫作用を持つ。近年、家族内発生したIPF家系に対する連鎖解析により、SP-A2の遺伝子の変異が報告された。構造異常を起こしたSP-Aが粗面小胞体に蓄積し、その小胞体ストレスにより細胞毒性を生じ、間質性肺炎を発症すると考えられている。BALF蛋白を2-DEに展開すると、様々なSP-A isoformとして観察され、これはアセチル化、prolineの水酸化、糖化、シアル化、カルボキシル化などの翻訳後修飾によるものと考えられている。cystic fibrosisの検討ではisoform 1にてhydroxy-prolineの付加やmethionineの酸化などの翻訳後修飾が起こり、surfactantの恒常性を不安定にしていると言われていた。そのほかにもCOPDや肺胞蛋白症におけるSP-A isoformの研究も見られる。本研究ではSP-Aの翻訳後修飾に関して検討していないが、MALDI-TOF-MSを行うことでどのような翻訳後修飾が起こっているのか確認できる可能性がある。

GSTは脂質過酸化反応の際に発生し抗酸化作用を持つ蛋白である。SSc fib+群でGSTが低下していることから、抗酸化剤であるN-アセチルシステイン吸入療法が有効である可能性がある。

HSPは様々なストレスで傷害を受け構造異常を起こした蛋白の修復、並びに蛋白の合成、運搬、分解に関与する生体防御蛋白である。肺傷害に対する防御機能の低下が肺線維化に関わっている可能性があ

る。

このように、間質性肺炎合併の病態として、以前より言われていた慢性持続性炎症、酸化ストレスによる肺障害が示唆され、またSP-Aのisoform 1の増加が関与している可能性がある。

E. 結論

SSc fib+とSSc fib-の間で発現量の異なる蛋白が明らかにされた。さらに多数の症例検討し、強皮症に伴う間質性肺炎の線維化の過程における重要な蛋白の同定を進める必要がある。また、SSc fib+群では、SP-Aのisoform 1の解析や翻訳後修飾の検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yoshizawa Y et al, 1999. Chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan: a national wide epidemiologic survey., *J Allergy Clin Immunol* 103:315-320
- Ohtani Y et al, 2003. Clinical features of recurrent and insidious chronic bird fancier's lung., *Ann Allergy Asthma Immunol* 90:60-610.
- Ohtani Y et al, 2005. Chronic birdfancier's lung: histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonia. *Thorax* 60:665-671
- Kondoh K et al. 2006. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in hypersensitivity pneumonitis., *J Med Dent Sci* 53:75-83
- 宮崎泰成ら、2006. 慢性鳥飼病における急性増悪の病態に関する検討-Th1/2 γ 17 γ ケモキンの役割について-びまん性肺疾患に関する調査研究班 平成17

年度研究報告書 78-83

- ・M.Kishi et al 2008.Pathogenesis of cBFL in common with IPF?-correlation of IP-10/TARC ratio with histological patients., Thorax. 63 :810-6

2. 学会発表

- ・平成 20 年度 厚生労働省 免疫アレルギー疾患予防、治験研究事業 合同研究発表会 「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」
- ・平成 21 年度 厚生労働省 免疫アレルギー疾患予防、治験研究事業 合同研究発表会 「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」
- ・American Thoracic Society 2009 SAN DIEGO (2009. 5. 19) 「Proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid in SSc-ILD」
- ・第 49 回日本呼吸器病学会学術講演会 (2009. 6. 12) 「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」

H. 知的財産権の出願・登録

なし

表1 患者背景

Parameter	SSc fib-	SSc fib+	P value
number	4	5	-
age	63.5±4.5	63.4±2.0	0.981
male/female	2/2	2/3	-
pack year	9.0±9.0	12.2±7.6	0.792
CRP (mg/dl)	0.2±0.1	0.6±0.3	0.323
LDH (IU/l)	208.2±22.0	228.2±24.9	0.570
ANA	546.7±375.5	304.0±96.0	0.453
Scl-70	1.3±1.3	15.8±12.1	0.405
KL-6 (U/ml)	561.3±257.5	1459.4±197.4	0.028
SP-D (ng/ml)	135.0±85.4	215.7±62.9	0.220
SP-A (ng/ml)	58.2±21.6	93.9±36.7	0.512
%VC (%)	96.2±13.1	73.1±4.7	0.111
%FEV1.0 (%)	82.7±1.1	81.2±1.3	0.448
%DLco (%)	67.8±12.0	56.9±8.4	0.473

表2 SSc Fib+と SSc fib-の間で発現に有意差を認めた蛋白

Protein	MW (kDa)	Spot quantity values of SSc fib+	Spot quantity values of SSc fib-	P value
α 1 antitrypsin	46.9	18.2±6.1	4.1±1.8	0.048
Surfactant protein A	26.7	25.5±6.6	5.9±3.1	0.024
α 2 macroglobulin	207.4	6.3±1.6	1.2±1.0	0.034
α 2 HS glycoprotein	13.6	0.0±0.0	6.2±3.6	0.045
Glutathione S-transferase	25.8	6.0±4.5	64.6±22.3	0.037

Spot quantity values: Measured on two BALF gel maps of individual SSc-ILD and SSc patients by software Progenesis PG220 Nonlinear. Result was shown as mean \pm SEM, P values. All data was assessed by Mann-Whitney method.

表3 SP-A isoform

Isoform number	SSc fib-	SSc fib+	P value
1	7.4±3.2	29.2±6.3	<0.05
2	4.0±2.6	8.4±8.4	0.25
3	0.8±0.7	1.4±0.8	0.59
4	1.6±1.5	0.6±0.6	0.31
5	1.5±1.5	0.5±0.4	0.5

皮膚筋炎／多発性筋炎に伴う急速進行性間質性肺炎の治療に関する研究

研究分担者 亀田秀人 慶応義塾大学医学部内科学教室リウマチ内科 講師

研究要旨 皮膚筋炎 (DM)／多発性筋炎 (PM)、特に筋炎所見の軽微な clinically amyopathic DM (c-ADM) に合併しやすく、(Ⅱ)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) はステロイドを中心とした治療に抵抗性で高率に致命的である。2003 年以降では 19 例を診断し、様々な併用を試みるも、IVCY のみ併用 2 例の他、タクロリムス投与 7 例中 4 例、リツキシマブ投与 2 例中 1 例、エタネルセプト投与 4 例中 1 例の計 8 例 (42%) が救命しえず、ステロイドに単剤を併用する有用性はいずれも不十分であった。しかし、免疫抑制薬の積極的併用に伴うステロイドの早期減量によって、RPIP の治療成績が経年的に向上したのみならず、感染症による死亡がほとんどなくなり、DM/PM の生命予後の向上にもつながった。従って、RPIP 合併 DM/PM 症例においては、造血器悪性腫瘍などに対する多剤併用化学療法と同様の考え方で積極的治療に望むべきであり、現時点ではステロイド + CsA + IVCY の併用療法を基軸として不応例に他剤を追加併用する治療戦略が最善と考えられた。

A. 研究目的

皮膚筋炎 (DM)／多発性筋炎 (PM)、特に筋炎所見の軽微な clinically amyopathic DM (c-ADM) に合併しやすく、(Ⅱ)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) は、ステロイドを中心とした治療に抵抗性で高率に致命的であることが知られている。本研究では RPIP の臨床・胸部画像的特徴を明らかにし、早期同定に役立てるとともに、発症・診断時より積極的に複数の免疫抑制薬併用や生物学的製剤をはじめとした新規治療薬を用いることで治療成績を向上させ、ひいてはその治療指針を策定することを目的とした。

B. 研究方法

RPIP の診断は (Ⅱ)急性に進行する臨床経過と HRCT 画像所見 (組織診断として DAD/fibrotic NSIP が予想される所見) に拠り、ステロイドを含む治療後に速やかな陰影の改善を認めないことで再確認した。2002 年までの治療成績をふまえて、2003 年以降は CsA の代わりにタクロリムス、IVCY の 1 回投与量を 1000 mg から 2000 mg

へ倍増、または投与間隔を 4 週毎から 2 週毎への短縮、IVCY に替えて rituximab の投与、そしてステロイド + CsA + IVCY に TNF 阻害薬の併用等も試みた。

(倫理面への配慮)

DM/PM に対してはステロイドのみが保険適応となっており、免疫抑制薬などは広く使用されていても適応外使用であるため、投与開始前に十分な説明を行い、同意を得てから投与した。

C. 研究結果

2003 年以降ではこれまでに 19 例を診断した。内訳は男性が 11 例と多く、病型も C-ADM が 8 例と DM が 9 例、PM は僅か 2 例であった。VATS による肺生検は 5 例で行われ、全例 non-specific interstitial pneumonia (NSIP) が主体と診断され、一方、剖検 3 例はいずれも diffuse alveolar damage (DAD) であった。様々な併用を試みるも、IVCY のみの 2 例の他、タクロリムス投与のべ 7 例中 4 例、リツキシマブ投与 2 例中 1 例、エタネルセプト投与 4 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、ステロイドに単剤を併用する有用性はいずれも不十分であった。特に、2003-2006年では12例中7例が死亡しており、ステロイド+CsA+IVCYの併用療法の成績を他の治療が上回ることはなかった。そこで2007年以降はステロイド+CsA+IVCYの併用療法を全例に最初から行う方針に戻し、反応性不十分ならエタネルセプトやメシル酸イマチニブなどの他剤を追加併用する治療戦略としたところ、7例中6例が軽快した。

また、患者全体におけるRPIP合併患者の位置づけを明らかにするために、2004-2008年の5年間に当科で初回治療を行ったDM 44例/PM 29例の計73例(男性28例、女性45例で、年齢は17-80歳、中央値57歳、観察期間は1-101ヶ月、中央値19ヶ月)を対象とした検討を行った。臨床的にRPIPと考えられた18例を含む42例(57.5%)に間質性肺炎を認めた。組織診断は11例で試行され、剖検の3例はすべてDAD、VATSはNSIP 3例、DADとLIPが各1例、TBLBの3例ではNSIPが示唆された。治療として免疫抑制薬は初回治療からの23例(54.8%)を含む32例(76.2%)に投与されており、21例に2剤以上(主にシクロスポリンとシクロホスファミドの併用)が使用された。生物学的製剤の使用は7例であった。RPIPと臨床的に関連したのはpalmar papuleの存在であり、HRCT画像所見としては胸膜直下の多発性浸潤影(consolidation)とそれに引き続くスリガラス陰影が特徴であった。また、死亡例の臨床病型はC-ADMが3例、DMとPMが各2例であった。C-ADMを含めてDM/PMの生命予後は2002年以前と比較して改善しており、感染症による死亡は1例のみで、他の死因はRPIPか悪性腫瘍のいずれかであった。

D. 考察

DM/PMの生命予後は間質性肺炎、特にRPIPの有無に大きく左右される。この一群は臨床病型としてC-ADM、臨床症状としてpalmar papule、そしてHRCT画像所見として胸膜直下のconsolidationとスリガラス陰影が特徴であった。これまでの症例蓄積からRPIP合併PM/DM症例に対するステロイドの有効性は期待できず、初期の

大量療法後は、感染リスク軽減を重視して早めの減量を心がけるべきであると考えられた。また、ステロイドに単剤の免疫抑制薬や生物学的製剤を併用する有用性は低く、また死亡例は臨床上または剖検上、全例が原疾患によると判断されたことから、併用による副作用リスクは原疾患のリスクより明らかに低く、早期からの積極的併用療法を支持する結果であった。また、線維化に対する治療薬としてメシル酸イマチニブの投与も選択肢の1つであると考えられた。

E. 結論

DM/PMの治療・管理において、予後の推定や向上に進歩が見られた。予後不良なRPIPに対しては、従来のステロイドを中心とした免疫抑制薬の追加併用方式とは異なる、悪性腫瘍に対する多剤併用化学療法と同様の考え方で治療に臨む必要がある。その治療レジユメの確立は今後の課題として残されたが、現時点ではステロイド+CsA+IVCYの併用療法を基軸として不応例に他剤を追加併用する治療戦略が最善と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) [Kameda H](#). Lung disease in EBV infection. ed. by [Michaela Bilic](#). Encyclopedia of Molecular mechanisms of Diseases. Springer, Heidelberg (in press).

2) [亀田秀人](#). 多発性筋炎(皮膚筋炎). [山口徹](#), [北原光夫](#), [福井次矢](#) 編集. 今日の治療指針. 医学書院, 東京, 610-12, 2009.

3) [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 erythmatosus. Rheumatology 2009;48:198-199.

4) [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* 2009;29:431-436.

5) Ogawa H, Kameda H, Amano K, Takeuchi T. Efficacy and safety of cyclosporine A in patients with refractory systemic lupus erythematosus in a daily clinical practice. *Lupus* (in press).

6) Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takei H, Nishi E, Okuyama A, Tsuzaka K, Takeuchi T: Single center prospective study of tacrolimus efficacy and safety in treatment of various manifestations in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology Int* (in press).

7) 西村幸治、亀田秀人. 間質性肺炎. *リウマチ科* 2009;41(4):344-350.

8) 亀田秀人. イマチニブ. *日本臨床免疫学会会誌* 2009;32(2):77-84.

9) 亀田秀人, 小川祥江, 鈴木勝也, 長澤逸人. カルシニューリン阻害薬の使い方. *日本内科学会雑誌* 2009;10:96-101.

2. 学会発表

1) 西村幸治, 亀田秀人, 倉沢隆彦, 近藤恒夫, 奥山あゆみ, 西英子, 武井博文, 鈴木勝也, 長澤逸人, 阿部治男, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤. 関節リウマチ合併間質性肺炎患者に対するトシリズマブ投与の影響. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009年4月、東京.

2) 亀田秀人. リウマチ性疾患におけるT細胞制御の意義. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会(サテライトシンポジウム). 2009年4月、東京.

3) Nishimura K, Kameda H, Kurasawa T, Kondo T, Okuyama A, Nishi E, Takei H, Suzuki K, Nagasawa H, Abe H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T. Influence of tocilizumab to interstitial pneumonia (IP) complicating rheumatoid arthritis patients. The 9th World Congress on Inflammation. 2009年7月、東京.

4) 亀田秀人. 分子標的治療-Annual Review 疾患における有効性、安全性. 第37回日本臨床免疫学会総

会. 2009年11月、東京.

5) 西村幸治、亀田秀人、倉沢隆彦、近藤恒夫、奥山あゆみ、西英子、武井博文、長澤逸人、天野宏一、竹内勤. 皮膚筋炎に合併した急速進行性間質性肺炎に対して多剤併用療法が奏効した一例. 第20回日本リウマチ学会関東支部学術集会. 2009年12月、横浜.

H. 知的財産権の出願・登録
特になし

膠原病に併発した間質性肺炎に対するタクロリムスによる治療に関する研究

研究分担者 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授
研究協力者 齋藤和義 産業医科大学医学部第一内科学講座 准教授
中野和久 産業医科大学医学部第一内科学講座 助教
平田信太郎 産業医科大学医学部第一内科学講座 助教

研究要旨 膠原病に併発する間質性肺炎はしばしば重篤で予後不良であり、既存治療に抵抗性を示す。本年度は、代表的な免疫抑制薬タクロリムスを膠原病に伴う間質性肺炎患者 50 症例に使用し、治療効果と有害事象を評価する事を目的とした。疾患重症度と治療効果は、臨床症候、画像所見、動脈血酸素分圧 (SpO₂) の 3 項目から構成されるアメリカ呼吸器学会(ATS)/ヨーロッパ呼吸器学会(ERS)の特発性肺線維症(IPF)の臨床的治療効果判定基準を用いて総合的に評価した。その結果、主要評価項目に関しては、6ヶ月後に 50 例中 19 例 (38%) が改善、23 例 (46%) が不変、8 例 (16%) が悪化した。疾患別には有意差を認めなかったが、RA で改善、SSc では不変が多い傾向であった。副次的評価項目である HRCT スコアは 27 例中、改善 16 (59%)、不変 10 (37%)、悪化 1 (4%) で、実測値でも 1.88 ± 0.75 から 1.66 ± 0.69 へ有意に改善、疾患別では RA と SSc で有意に改善した。主要評価項目の改善に及ぼす背景因子を単変量解析で解析したところ、乾性咳嗽、労作時呼吸困難、HRCT スコア高値、HRCT での線状影の 4 項目が抽出された。多変量解析では HRCT スコアが独立した全般的効果予測因子として抽出され、ROC 解析にて cut-off 値 2.387 にて全般的効果の有意差が確認された。副腎皮質コルチコイド投与量は 17.79 ± 17.62 から 10.29 ± 8.93 mg/day へ有意に減少した。重篤な有害事象としては、呼吸器感染症 5 例、腎機能障害 2 例、皮膚潰瘍 1 例、心嚢水貯留 1 例で、呼吸器感染症 5 例は、いずれも蜂巣肺を有する症例で生じた。PM/DM では 3 例が呼吸器感染症を併発し死亡し、いずれも CADM の症例であった。

A. 研究目的

膠原病に併発する間質性肺炎はしばしば重篤で予後不良であり、既存治療に抵抗性を示すが、治療法は未確立である。本研究では、代表的な免疫抑制薬タクロリムスを膠原病に伴う間質性肺炎患者 50 症例に使用し、治療効果と有害事象を評価する事を目的とした。

疾患重症度と治療効果は、臨床症候、画像所見、動脈血酸素分圧 (SpO₂) の 3 項目から構成されるアメリカ呼吸器学会(ATS)/ヨーロッパ呼吸器学会(ERS)の特発性肺線維症(IPF)の臨床的治療効果判定基準を用いて総合的に評価した。

B. 研究方法

臨床症候、及び、画像にて進行性間質性肺炎を合併した膠原病患者 50 例 [関節リウマチ (RA) 26, 皮膚筋炎・多発性筋炎 (PM/DM) 8, 全身性硬化症 (SSc) 16] を対象に、タクロリムス 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した。

主要評価項目は、6ヶ月後の ATS/ERS 全般的評価改善率とした。即ち、①臨床症候(呼吸困難、咳嗽など)、

② HRCT スコア、③ SpO₂ の変化 (>4%) の 3 項目を評価し、2 項目以上で改善が見られた場合を「改善」と判定した。

HRCT は大動脈弓、気管分岐部、右横隔膜頭側 1cm の 3 レベルで点数化(0-3)した。副次的評価項目は、6ヶ月後の同各コンポーネント、臨床検査値(KL6, LDH)、酸素吸入量、ステロイド服用量、有害事象件数とした。本研究は、当施設の倫理委員会の承認を受け文書でインフォームドコンセント取得して行われた。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報や所屬機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C. 研究結果

主要評価項目に関しては、6ヶ月後に50例中19例(38%)が改善、23例(46%)が不変、8例(16%)が悪化した。疾患別には、改善/不変/悪化はそれぞれRA26例中11/12/3例(42/46/12%)、PM/DM8例中3/2/3例(38/25/38%)、SSc16例中5/9/2例(31/56/2%)で、疾患別の χ^2 検定では有意差を認めなかった($p = 0.82$)が、RAで改善、SScでは不変が多い傾向であった。

副次的評価項目であるHRCTスコアは27例中、改善16(59%)、不変10(37%)、悪化1(4%)で、実測値でも 1.88 ± 0.75 から 1.66 ± 0.69 へ有意に改善し($p < 0.01$)、疾患別ではRA($p = 0.009$)、SSc($p = 0.04$)と有意に改善した。

主要評価項目改善に及ぼす背景因子を単変量解析したところ、乾性咳嗽、労作時呼吸困難、HRCTスコア高値、HRCTでの線状影の4項目が抽出された。多変量解析ではHRCTスコアが独立した全般的効果予測因子として抽出され、ROC解析にてcut-off値2.387にて感度50.0%、特異度89.5%、尤度比4.75で、同値による層別にて $p = 0.0316$ で全般的効果の有意差が確認された。

血清学的指標ではLDHは 252.3 ± 90.1 IU/lから 227.8 ± 74.4 IU/l($P = 0.0235$)、KL-6は 1170 ± 943 U/mlから 942 ± 858 U/ml($p = 0.0065$)と低下した。副腎皮質コルチコイド投与量は 17.79 ± 17.62 から 10.29 ± 8.93 mg/dayへ有意($p = 0.0004$)に減少した。

重篤な有害事象としては、呼吸器感染症5例(細菌性肺炎2例、ニューモシスチス肺炎2例、非結核性抗酸菌症1例)、腎機能障害2例、皮膚潰瘍1例、心嚢水貯留1例で、呼吸器感染症5例は、いずれも蜂巣肺を有する症例で生じた。PM/DMでは3例が呼吸器感染症を併発し死亡し、いずれもclinically amyopathic dermatomyositis (CADM)の症例であった。

D. 考察

タクロリムスは、RA、PM/DM、SScに伴う急性間質性肺炎に対し、38%の症例でATP/ERSのIPF治療効果判定基準で「改善」を示した。膠原病に伴う間質性肺炎に関して、治療有効性をグローバルな客観的指標で総合的に評価した初めての報告である。タクロリムスは、RA、SSc、PM/DMの何れに伴う治療抵抗性間質性肺炎に対しても有効で、RAで改善率が高い傾向を示した。

また、間質性肺炎の治療評価では、単変量解析にて臨床症候とHRCTの有用性が抽出された。多変量解析でHRCT値が抽出され、治療前cut-off値2.387でタクロリムスの効果が予測できる可能性が示唆された。

一方、蜂巣肺を有する症例では呼吸器感染症の危険性が高く、投与には適正な予防投与を施行するなど慎重な導入を要する事が示唆された。今後、保険オフアン申請に向けて、多施設間試験を行い、有効性と安全性を実証する必要性が示された。

E. 結論

膠原病に伴う急性間質性肺炎50例に対してタクロリムスを投与し、臨床症候、HRCTスコア、SpO₂を含むグローバルな客観的指標で総合的に評価し、半年後に約4割が「改善」を示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis, RRR (remission induction by remicade in RA) study. *Ann Rheum Dis* (in press)
2. Sawamukai N, Yukawa s, Saito K, Nakayamada S, Kambayashi T, Tanaka Y. Mast cell-derived tryptase inhibits apoptosis of human rheumatoid synovial fibroblasts via rho-mediated signaling. *Arthritis Rheum* (in press)
3. Suzuki K, Saito K, Tsujimura S, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamukai N, Iwata S, Nawata M, Tanaka Y. A calcineurin inhibitor, tacrolimus overcomes treatment-unresponsiveness mediated by P-glycoprotein on lymphocytes in refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* (in press)
4. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Etanercept overcomes P-glycoprotein-induced drug resistance in lymphocytes of patients with intractable rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* (in press)
5. Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Kishi T, Umene-Nakano W, Katsuki A, Saito K, Iwata H, Tanaka Y, Nakamura J. No association between BDNF^{Val66Met} polymorphism and emergence of psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus. *World J Biol Psychiatry* (in press)
6. Choo Q-Y, Ho PC, Tanaka Y, Lin H-S. Histone deacetylase inhibitors MS-275 and SAHA induced growth arrest and suppressed lipopolysaccharide-stimulated NF- κ B p65 nuclear accumulation in human rheumatoid arthritis synovial fibroblastic E11

- cells. *Rheumatology* (in press)
7. Suzuki K, Nakawaga 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 erythematosus. *Rheumatology* (2009) **48**, 198-199
 8. Komano Y, Harigai H, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Ohtsubo H, Hiramatsu K, Iwamoto M, Minota S, Matsuoka N, Kageyama G, Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Kudo K, Tanaka Y, Takeuchi T, Miyasaka N. Pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis Care Research* (2009) **61**, 305-312
 9. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Inoue, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Freundlich B, Suzukawa M. Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of etanercept in Japan. *J Rheumatol* (2009) **36**, 898-906
 10. Iwata S, Saito K, Yamaoka K, Tsujimura S, Nawata M, Suzuki K, Hanami K, Tanaka Y. Effects of anti-TNF- α antibody infliximab in refractory entero-Behçet's disease. *Rheumatology* (2009) **48**, 1012-1013
 11. Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol* (2009) **21**, 645-654
 12. Nakayamada S, Fujimoto T, Nonomura A, Saito K, Nakamura S, Tanaka Y. Usefulness of initial histological features for stratifying Sjogren's syndrome responders to mizoribine therapy. *Rheumatology* (2009) **48**: 1279-82
 13. Hirose A, Tanikawa T, Mori H, Okada Y, Tanaka Y. Advanced glycation end products increase endothelial permeability through RAGE/Rho signaling pathway. *FEBS Lett* (2009) **584**: 61-66
2. 学会発表
1. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. Discontinuation of infliximab therapy is possible after acquiring remission in patients with rheumatoid arthritis (RA): first report on RRR (remission induction by remicade in RA) study. The Annual European Congress of Rheumatology 2009, Copenhagen 平成 21 年 6 月
 2. Y. Tanaka, M. Suzuki, H. Nakamura, S. Toyozumi, S. H. Zwillich. The oral Jak inhibitor CP-690,550 in combination with methotrexate is efficacious, safe and well tolerated in Japanese patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to MTX alone. The Annual European Congress of Rheumatology 2009, Copenhagen 平成 21 年 6 月
 3. Tanaka Y. Rheumatoid arthritis in the context of bone disease: a recent paradigm shift of the disease control. The 6th International Bone Biology Forum, Susono 平成 21 年 8 月
 4. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. Can infliximab discontinue after attaining remission in patients with RA?: An interim report on RRR (remission induction by remicade in RA) study. The 4th Asian Congress on Autoimmunity, Singapore 平成 21 年 9 月
 5. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: an interim report on RRR (remission induction by remicade in RA) study. The 73rd National Meeting of American college of Rheumatology, Philadelphia 平成 21 年 10 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
 - 1) Fas 抗原発現増強剤（特許出願番号：特開 2003-171282）
 - 2) Akt シグナル経路の活性化阻害を目的として使用するレフルノミド（特願 2005-81972）
 2. 実用新案登録

なし

新規免疫抑制薬 FTY720 の肺線維症に及ぼす効果に関する研究

研究分担者 西岡安彦 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部呼吸器・膠原病内科学分野 准教授

研究要旨 FTY720 は成熟リンパ球の移動を抑制し、循環Tリンパ球を減少させることにより免疫抑制作用を發揮する。今回、我々は膠原病の重要な予後決定因子である間質性肺炎・肺線維症の病態解明と治療方法の開発を目的として、新規免疫抑制薬FTY720の肺線維症に及ぼす効果に関する研究を行った。FTY720はPDGF刺激による線維芽細胞の増殖を用量依存性に抑制した。しかしながら、 α SMAについては濃度依存性に発現増強効果を認め、筋線維芽細胞への分化を促進した。一方、プレオマイシン肺線維症モデルにおける検討では用量依存性に肺線維症を増悪させた。新規免疫抑制薬FTY720は肺線維症を増悪させる可能性があり、肺線維症合併症例への使用には注意が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

膠原病に合併する間質性肺炎・肺線維症は重要な予後規定因子である。現在、膠原病合併肺線維症に対しては、ステロイドに加えて免疫抑制剤の併用治療が行われることが多い。従って、肺線維症治療に使用しうる免疫抑制薬の開発は重要な検討課題である。

一方、新規免疫抑制薬FTY720はスフィンゴシン-1-リン酸受容体(S1PR)に結合してリンパ球浸潤を抑え免疫抑制効果を示す薬剤であり、同種移植モデルや自己免疫性脳脊髄炎、関節炎などの自己免疫疾患モデルにおいて免疫抑制作用を有することが報告されている。また、海外で実施された再発多発性硬化症患者を対象とした臨床第II相試験において既存薬より優れた効果が報告され、本邦でも多発性硬化症を対象に臨床試験が進行している。

今回、我々は新規免疫抑制薬FTY720の肺線維症に及ぼす効果をマウスモデルにて検討した。

B. 研究方法

6週齢のC57BL/6マウスに、浸透圧ポンプを用いてプレオマイシン(BLM)125mg/kgを持続皮下投与することで、肺線維症モデルマウスを作成した。FTY720

は0.1mgあるいは1mg/kg/dayを週3回腹腔内に投与した。28日目にマウスをsacrificeし、病理組織学的検討および肺コラーゲン含量の定量により、肺線維症を評価した。病理組織学的な肺線維症の評価には、Ashcroft scoreを用いた。また、C57BL/6マウス肺から樹立した線維芽細胞株を用いて、PDGF-BB刺激による増殖に対する抑制作用を、 3 H-thymidine incorporation assayにより検討した。さらにWestern blottingにより α -smooth muscle actin(SMA)の発現を検討することで、肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に及ぼす効果を検討した。

(倫理面への配慮)

徳島大学動物実験施設のSPF環境下で、学内マニュアルに従い実験を行った。

C. 研究結果

FTY720は濃度依存性にPDGF-BB刺激による細胞増殖に対しては抑制効果を示した。(Fig 1)しかしながら、TGF β 刺激と同様に α SMAについては濃度依存性に発現増強効果を認め、筋線維芽細胞への分化を促進した。一方、FTY720単独投与では線維化は認められなかったが、BLM誘発肺線維症に対してFTY720の投与は、用量依存性に肺線維症を増悪させた。(Fig

2) また、病理組織学的な肺線維症の評価である Ashcroft score、肺コラーゲン含量の定量的検討においても、FTY720 は有意に線維化を増悪させた。

(Fig 3)

D. 考察

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)はリンパ組織内の Tリンパ球上の S1P 受容体に結合し、リンパ組織からのリンパ球の移出を促進する。S1P 受容体調整薬である FTY720 は天然マイリオシンの構造変換によって得られた化合物で、生体内ではスフィンゴシンキナーゼにより FTY720 リン酸(FTY720-P)に変換される。FTY720 はリンパ球上の S1P 受容体にアゴニストとして作用し、S1P 受容体の内在化を誘導する。その結果、二次リンパ組織からの移出が阻害され、循環Tリンパ球を減少させることにより免疫抑制作用を発揮する。

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P)は PDGF と共に肝細胞の線維化を促進するが、FTY720 がこの線維化を抑制するとの報告がある。今回我々は、膠原病に合併する間質性肺炎・肺線維症に対する新たな免疫抑制剤として、FTY720 に注目し検討を行った。

今回の検討では肺線維症に対する新規免疫抑制薬 FTY720 は、肺線維症を増悪させる可能性が示唆された。その増悪メカニズムとして、肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化促進作用が重要な役割を果たしていると考えられる。FTY720 は線維芽細胞の増殖に対して抑制効果を示したものの、in vivo では最終的に肺線維症を増悪させたことから、肺線維症に対する薬剤の効果を検討する場合、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に対する効果の検討がより重要である可能性が示唆された。一方、スフィンゴシン-1-リン酸を介する経路は、抗線維化療法の新たな標的経路となる可能性が考えられた。

E. 結論

FTY720 は、マウスブレオマイシン肺線維症に対して増悪作用を示した。臨床的には肺線維症合併症例に対する使用に際して注意が必要である可能性を示

唆するとともに、スフィンゴシン-1-リン酸を介する経路が肺線維症に対して強力な調節作用を有していることを示しており、その経路の阻害は新たな治療アプローチの標的となる可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Kishuku M, Nishioka Y, Abe S, Kishi J, Ogino H, Aono Y, Azuma M, Kinoshita K, Rentsenhand B, Makino H, Ranjan P, Minakuchi K, Sone S. Expression of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Human Monocyte-Derived Mature Dendritic Cells Contributes to Their Antiangiogenic Property. *J Immunol* 15: 8176-8185, 2009..

・西岡安彦、青野純典、岸 潤、東 桃代. 線維化病変に対するイマチニブの効果. *血液・腫瘍科* 59 : 181-188, 2009.

・西岡安彦. 肺線維症に対する分子生物学的アプローチ. *呼吸と循環* 58:179-187, 2010.

・西岡安彦、青野純典、東 桃代、岸 潤. 「間質性肺炎治療法の新展開」 イマチニブ(グリベック®). *呼吸と循環* (印刷中)

2. 学会発表

・Nishioka Y. Growth factors and growth factor receptors in IPF: Implication for the novel therapy. 14th congress of the APSR (Asian Pacific Society of Respiriology). Symposium 17. Interstitial lung disease. 2009年11月17日 (Seoul, Korea).

・ Kishi M, Nishioka Y, Aono Y, Azuma M, Batmunkh R, El-Morshedy R, Makino H, Kinoshita K, Sone S. Antifibrotic effects of APA5 and APB5, blocking antibodies specific for PDGF receptors on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 14th congress of the APSR (Asian pacific society of respiriology). 2009年11月16日 (Seoul, Korea).

H. 知的財産権の出願・登録

なし

FTY720 inhibit the proliferation of lung fibroblasts in response to PDGF

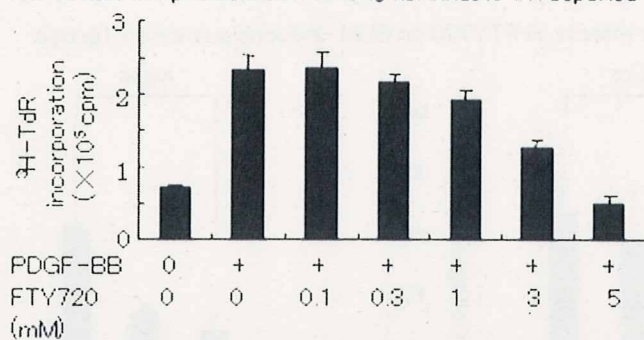


Fig 1

FTY720 exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis

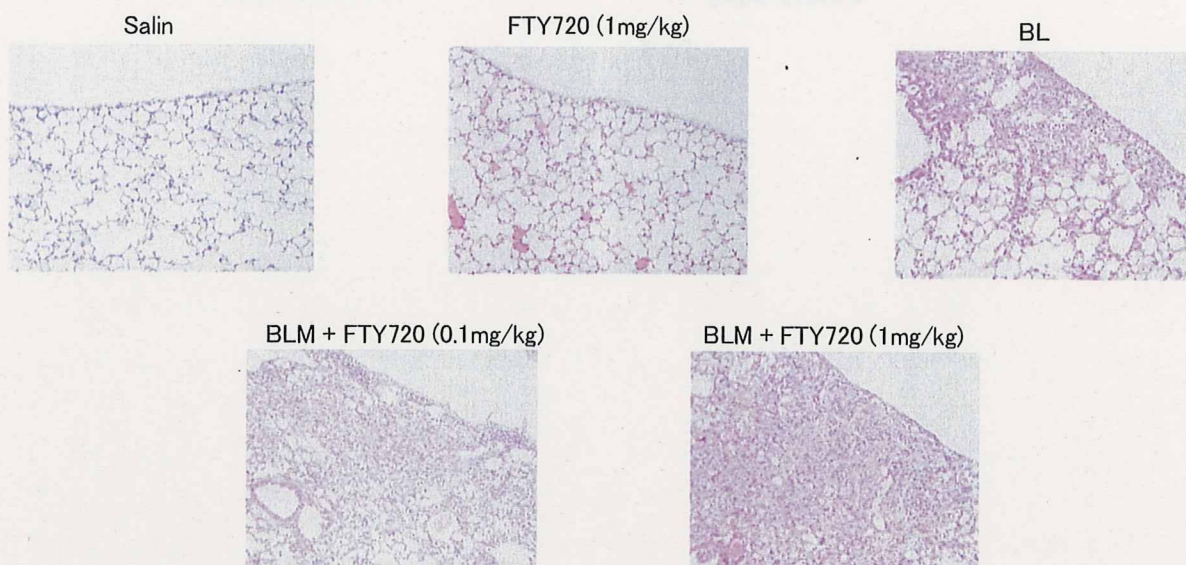


Fig2