

	MCTD	SSc	SLE	PM/DM	RA
肺高血圧症合併頻度	18.3	13.6	6.2	1.8	1.6
	(13/71)	(8/59)	(4/65)	(1/55)	(1/64)

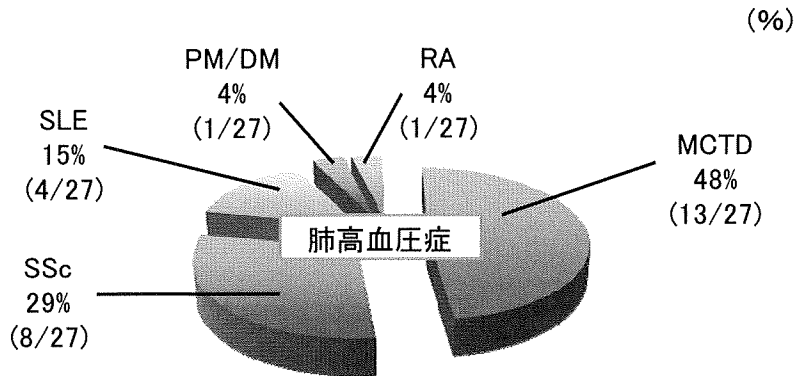


図1. 各疾患における肺高血圧症 (PAH) 合併頻度

MCTDでPAHが最も高頻度であった。多施設の患者を集計したものであるが、過去の報告と同様の合併頻度であり、今回の症例はMCTD基準の検定をする上で適切な症例群と考えられた。なお疾患名は主治医診断である。

	Sm	DNA	Scl-70	Jo-1
MCTD (主治医診断)	17.9	28.6	3.6	1.8

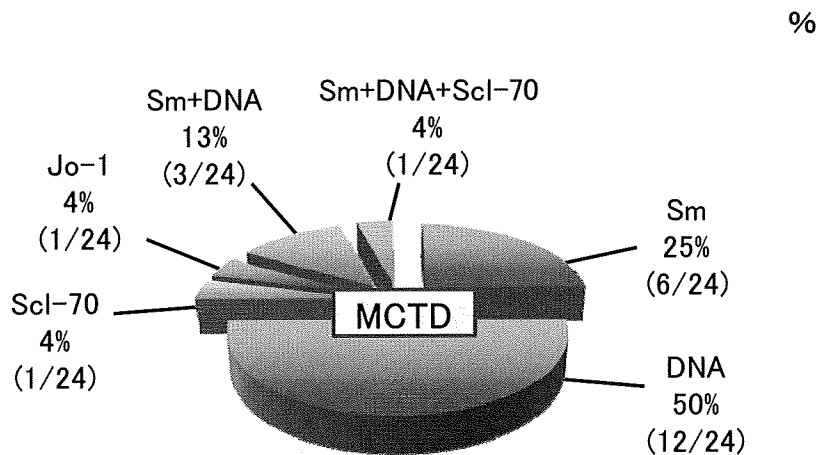


図2. MCTDにおける疾患標識抗体

抗DNA抗体が最も高頻度であった。またSharpらが世界に先駆けて報告したオリジナル症例において陰性と定義される抗Sm抗体は、今回の症例群では17.9%に認められた。なおMCTDの42.9%でいずれかの疾患標識抗体を有していた。

抗U1RNP抗体およびその免疫複合体によるサイトカイン誘導に関する研究

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・准教授
研究協力者： 横山 倫子 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・大学院生

研究要旨

本研究では、抗U1RNP抗体陽性MRL/lprマウス脾細胞を用いてモノクローナル抗U1RNP抗体を産生するB細胞ハイブリドーマをクローン化し、*in vitro*における抗U1RNP抗体免疫複合体（U1RNP-IC）のサイトカイン誘導能を調べることを目的とした。作成した多数のハイブリドーマのなかからRNA-免疫沈降法（IPP）とELISA（MBL社 MESACUP®-2 テストRNP）により抗U1RNP抗体を産生する細胞をスクリーニングし、その後クローン化したものを104-13と命名した。104-13が産生するIgG2b（104-13-IgG2b）は、HeLa細胞を抗原としたWBとU1RNP特異蛋白を抗原としたELISAでC抗原に対する抗体であることが確認された。なお104-13-IgG2bはC抗原のC末端（136-159アミノ酸）に反応した。この104-13-IgG2bと、コントロールIgG2bである4E11 mAb（抗FLAG™抗体）をそれぞれMRL/lprマウス脾細胞と共培養したところ、104-13-IgG2bでIL-6の産生が刺激された。しかし現時点でU1RNP-ICによる誘導かどうかは確認できず、現在104-13-IgG2b-ICの精製と同時に実験をすすめている。

A. 研究目的

近年、抗U1RNP抗体が形成する免疫複合体

（U1RNP-IC）は、I型インターフェロンであるIFN- α のinducerとして注目されている(Savarese E, *et al*, *Blood*, 2006, Ehlers M, *et al*, *Trend Immunol*, 2006)。血中IFN- α 濃度はU1RNPを含むRNA-binding protein

（RBP）に対する抗体（抗RBP抗体）や全身性エリテマトーデス（SLE）の皮膚症状や腎障害と相関する (Dall'Elra MC, *et al*, *Ann Rheum Dis*, 2005, Kyriakos A, *et al*, *Arthritis Rheum*, 2005) ため、ヒトSLEでもIFN- α は病因的なサイトカインのひとつと考えられているが、他のサイトカインの誘導については不明な点が多い。本研究では、抗U1RNP抗体陽性MRL/Mp-Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr) マウス脾細胞を用いて、モノクローナル抗U1RNP抗体を産生するB細胞ハイブリドーマをクローン化し、*in vitro*においてU1RNP-ICの脾細胞からのIL-6誘導能を調べることを目的とした。

B. 研究方法

抗U1RNP抗体陽性MRL/lprマウス脾細胞とマウスミ

エローマ細胞SP2/0-Ag14(Ag14)を融合し、ハイブリドーマを作成した。次にハイブリドーマ培養上清を用いてHeLa細胞あるいはAg14の核抽出物を抗原としたRNA-免疫沈降法（IPP）およびELISAによりハイブリドーマ上清中の抗U1RNP抗体をスクリーニングした。抗U1RNP抗体を分泌するハイブリドーマと考えられる細胞は限界希釈法によりクローン化し、そのサブクラスを調べた。クローン化された細胞（104-13）の上清を用いて、精製U1RNP-Cを抗原とした免疫ブロット法（WB）と、U1RNP-70K、A、Cを固相化したELISAによりU1RNPの特異蛋白との反応性を明らかとした。さらにU1RNP-C（159アミノ酸）の部分ペプチド（各24アミノ酸 [aa]、計8種類）を作成し、それらを固相化したELISAで104-13-IgG2bが認識するエピトープを調べた。

次に、104-13-IgG2b（終濃度2-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）または104-13-IgG2bとHeLa細胞核抽出物をpreincubationしたのちに、C57BL/6（wtおよびlpr）またはMRL（wtおよびlpr）マウス脾細胞（ $4 \times 10^6/\text{well}$ ）の培養系に加え、48時間後にその上清中におけるIL-6濃度をELISAで調べた。なおコントロールIgG2bとして、

4E11 mAb (抗FLAGTM抗体) を用いた。

C. 研究結果

作成した多数のハイブリドーマのなかから、RNA-IPPでU1RNAを沈降し(図1)、ELISA(MBL社MESACUP®-2テストRNP)により陽性と判断されたハイブリドーマ株(104)を見いだした。その後限界希釈法でクローン化したものを104-13と命名した。104-13が産生する免疫グロブリンはIgG2b(104-13-IgG2b)であった。精製U1RNP-Cを抗原としたWB(図1)とU1RNP特異蛋白を抗原としたELISAでC抗原に対する抗体であることが確認された。なお104-13-IgG2bはU1RNP-C抗原のC末端(136-159aa)にエピトープを有することが確認された。この104-13-IgG2bと、コントロールIgG2bである4E11 mAb(抗FLAGTM抗体)をそれぞれB6マウス脾細胞と共培養したところ、104-13-IgG2bのみでIL-6の産生が刺激された(図2)。またその分泌刺激はMRL backgroundで明らかであった。しかし核抗原とpreincubationした104-13-IgG2bではIL-6産生の誘導は認められなかった。両者のpreincubationによりU1RNP-ICとなっていることは確認しているが、核抗原すべてが培養系に加えられたために、IL-6産生を抑制する蛋白やプロテアーゼが含まれてしまい、このような結果になったと考えている。一方、104-13-IgG2bは自己抗体であるため、培養を継続することで104-13-IgG2bがU1RNP-ICとなっている可能性もある。このように104-13-IgG2bを加えることによるIL-6分泌が、U1RNP-ICによる誘導かどうか確認できておらず、現在104-13-IgG2b-ICの精製をすすめている。

D. 考察

抗U1RNP抗体の病因的意義については以前から検討されてきた。古くは、大川らが抗U1RNP抗体や抗dsDNA抗体が末梢血単核球細胞のIL-1 α 、IL-1 β およびIL-6の産生を刺激することを示し、特に抗U1RNP抗体はFab部のみでもIL-1 α 産生の亢進を認めることを報告した(Okawa-Takatsuji M, *et al*, *Clin Exp Immunol*, 1994)。さらにヒト肺動脈内皮細胞(HPAEC)でも抗U1RNP抗体や抗dsDNA抗体がICAM-1、ELAM-1、MHC calss IIなどの発現を増強させること

を証明している(Okawa-Takatsuji M, *et al*, *Clin Exp Immunol*, 1999)。抗U1RNP抗体が細胞内に取り込まれる(Ma J, *et al*, *Clin Exp Immunol*, 1993)との報告もある。しかし抗U1RNP抗体価が疾患活動性と相関せず、抗U1RNP抗体陽性でも無症状の症例が少なくないことなどから、抗U1RNP抗体が直接組織傷害を誘導したり、抗U1RNP抗体単独で病原性を示したりする可能性は低いと考えられる。

近年、SLEなどの自己免疫疾患における免疫異常の活性化に、自然免疫に関与するToll-like receptor (TLR)が重要であることが明確に示された

(Christensen SR, *et al*, *Immunity*, 2006)。TLR9のリガンドはunmethylated CpG DNAであり、TLR7のリガンドはssRNAであることが知られているが、抗核抗体がDNAやRNAに関連する蛋白(あるいは核酸そのもの)を認識するIgGであることから、それらの免疫複合体がFc γ Rに認識されアダプター蛋白であるMyD88を介してTLR発現細胞を刺激する(Ehlers M, *et al*, *Trend Immunol*, 2006)。抗U1RNP抗体免疫複合体(U1RNP-IC)によりTLR7が刺激されると、plasmacytoid dendritic cellsからIFN- α が分泌され、その結果B細胞の活性化や自己抗原に対するトレランスの破綻を誘発する(Savarese E, *et al*, *Blood*, 2006)。一方、TLR9が刺激されることで、CD4⁺CD25⁺Tregが活性化され、IFN- α によるB細胞活性化を抑制し、トレランスの破綻を制御すると考えられている

(Ehlers M, *et al*, *Trend Immunol*, 2006)。このように、たとえばウイルス感染による自己抗原に対するトレランス破綻の機序や抗核抗体の産生刺激については多くの知見があるが、いったん抗U1RNP抗体の産生が始まってしまった系(たとえばMCTD患者)においてそのU1RNP-ICがT細胞を介することなく自己反応性B細胞を刺激しうる(Herlands RA, *et al*, *Immunity*, 2008)のか、またIFN- α が、自己反応性T細胞を刺激してIFN- γ を分泌するのかについては興味深いところである。さらに今回クローン化できた抗U1RNP-C抗体はIgG2bであり、Fc γ R IVに認識されることによりマクロファージなどからIL-6/TNF- α の分泌を刺激して組織傷害をおこすとの仮説が示されている(Ehlers M, *et al*, *J Exp Med*, 2006)が、それを証明するツールになりうると考えている。

E. 結論

1. MRL/lprマウス脾細胞より、抗U1RNP-C IgG2bを産生するハイブリドーマ104-13を分離した。
2. 104-13が産生するIgG2bは、MRL/+マウスあるいはMRL/lprマウス脾細胞と共培養することにより、IL-6分泌を亢進させた。
3. われわれが分離した104-13-IgG2bは、抗U1RNP抗体によって刺激される自己免疫現象をより明確にできるモノクローナル抗体であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito Y, Fujii T, et al. $\gamma\delta$ T cells are the predominant source of IL-17 in the affected joints of collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid

arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2294-2303.

2. Fujii T, et al. Vaccination with autoreactive CD4⁺Th1 clones in lupus-prone MRL/Mp-Fas^{lpr/lpr} mice. *J Autoimmun* 2009; 33: 125-134.
3. Kitaori T, Fujii T, et al. Severe erosive arthropathy requiring surgical treatments in systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 2009; 19: 431-436.
4. Mii S, Fujii T, et al. A histopathologic study of mechanic's hands associated with dermatomyositis: a report of five cases. *Int J Dermatol* 2009; 48: 1117-1182.

2. 学会発表

藤井 隆夫. 関節リウマチ診療における自己抗体の有用性. 第53回日本リウマチ学会総会シンポジウム. 2009年4月、横浜.

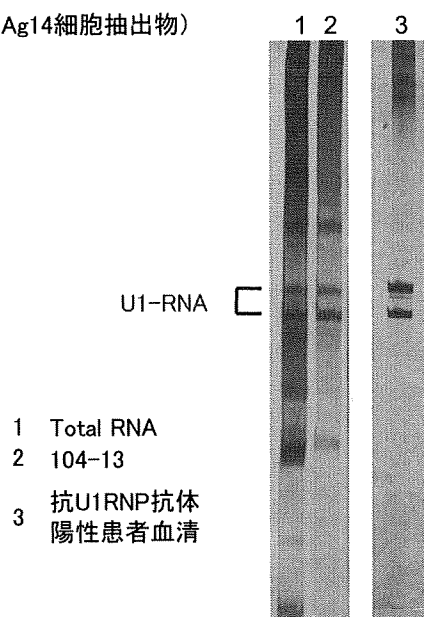
H. 知的財産権の出現・登録状況

なし

RNA-免疫沈降法

(抗原:

Ag14細胞抽出物)



免疫ブロット法

(抗原:

U1 RNP-C)

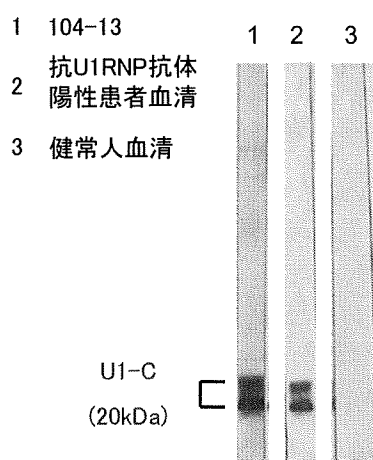


図1. ハイブリドーマ104-13上清中のモノクローナル抗体が認識する自己抗原

左に示すようにマウスAg14細胞抽出物を抗原としたRNA-免疫沈降法で104-13上清はU1RNAを沈降した。また右図の通り、U1RNP特異的な構成成分であるC蛋白に反応し、104-13上清が含むIgGは抗U1RNP-C抗体であることが示された。

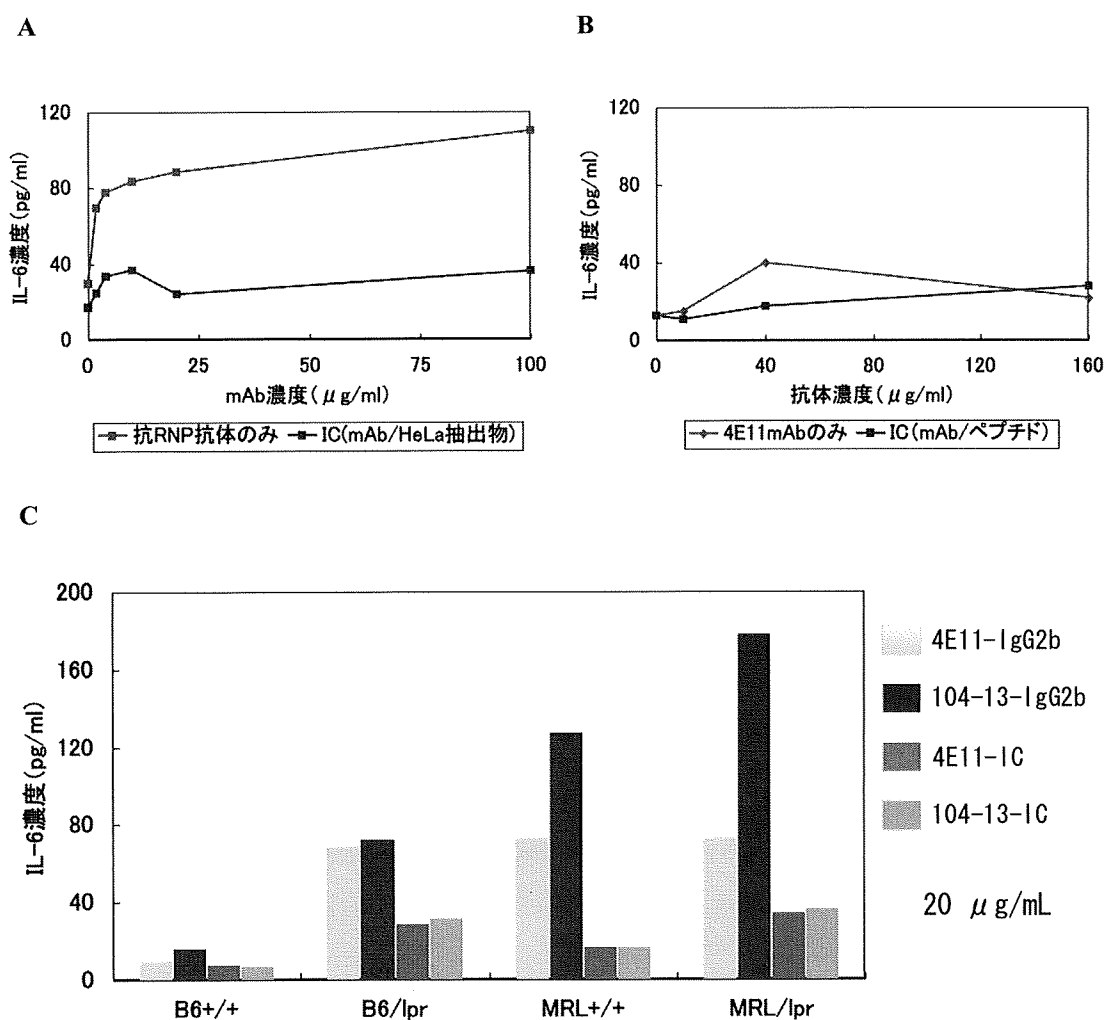


図2. 抗U1RNP抗体が正常およびループスモデルマウス由来脾細胞に及ぼす影響

A. 抗U1RNP抗体 (104-13-IgG2 b) は低濃度でMRL/lprマウス脾細胞からIL-6の分泌を刺激した。

B. 一方、コントロールIgG2b (4E11 mAb) では明らかなIL-6分泌刺激を認めなかった。刺激した細胞はAと同じである。

C. この抗U1RNP抗体による分泌刺激は、正常マウス (B6マウス) に比し、MRLマウスでより明確であった。なおHeLa細胞抽出物をpreincubationして作成した免疫複合体 (IC) を用いた場合、今回の系ではIL-6分泌は認められなかった。

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

島山 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。肺微小血管内皮細胞のcDNAライブラリーを構築してSEREX（serological identification of antigens by recombinant expression cloning）により抗原候補蛋白質の探索をおこなった。

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RNAからcDNAを合成し、ファージに組み込み、cDNAライブラリーを構築した。プレート上に網羅的に組換え蛋白質を発現させ、6名のMCTD患者血清を混合した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）。得られた候補について、組換え蛋白質を用いたウエスタンブロットで個々の患者の血清の反応性の確認を行った。

（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

ライブラリーを用いた免疫スクリーニングにより（図1）、 3×10^5 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19個抗原候補としてあがった。RT-PCRでヒト臍帯静脈血管内皮細胞に比べHMVEC-Lで高く発現していることが確認でき（図2）、スクリーニングの際にも高い反応を示した抗原について患者個人々の血清で反応性を調べたものの、MCTD患者1名でのみ高い反応性が認められた（図3）。

D. 考察

SEREXにより明らかになった抗原蛋白質に細胞外蛋白質などの2Dウエスタンでは検出の難しい蛋白質も含まれていたことから、SEREXの長所が生かされていることが確認できた。抗原候補蛋白質の中にはRNAスプライシングに関連する蛋白質も含まれていた。但し、スクリーニングの結果得られた抗原にUIRNPが含まれなかったため、さらに多くのクローンをスクリーニングする必要があると考えられた。

E. 結論

本研究によりAECAの抗原候補蛋白質を得ることができた。さらなるAECAの抗原探索を行うとともに、これらの蛋白質について詳細に解析することで、PH発症機序の一端の解明につながり新たな治療法や診断法の可能性が開けると期待する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Yamashita M, Iwama N, Date F, Chiba R, Ebina M, Miki H, Yamauchi K, Sawai T, Nose M, Sato S, Takahashi T, Ono M: Characterization of idiopathic diffuse alveolar damage. Hum Pathol. 40: 542-551. 2009
- 2) Yoshida W, Uzuki M, Nishida J, Shimamura T, Sawai T: Examination of *in vivo* gelatinolytic activity in rheumatoid arthritis synovial tissue using newly developed *in situ* zymography and image analyzer. Clin Exp Rheumatol. 27: 587-593. 2009
- 3) Sato Y, Kurose A, Ogawa A, Ogasawara K, Traganos F, Darzynkiewicz Z and Sawai T: Diversity of DNA damage response of astrocytes and glioblastoma cell lines with various p53 status to treatment with etoposide and temozolomide. Cancer Biol Ther. 8: 1-6(2009)
- 4) 鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志：MCTD患者に合併する肺高血圧症の病変とその発症機序の解析。自己抗体と自己免疫2009：31-35. 2009
- 5) 佐々木信人、鎌滝章央、澤井高志：全身性強皮症および類似疾患、肺病理。日本胸部臨床。69: 224-233. 2010

2. 学会発表

- 1) 澤井高志：膠原病にみられる肺高血圧症の病理学的特徴－混合性結合組織病（MCTD）の解析を中心に－。第24回日本臨床リウマチ学会，盛岡，2009年11月
- 2) 鎌滝章央、佐々木信人、畠山 明、澤井高志：混合性結合組織病患者における抗内皮細胞抗体の抗原の探索。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会，東京，2009年4月
- 3) 佐々木信人、山内広平、井上洋西、二宮由香里、鎌滝章央、澤井高志：アレルギー性肉芽腫性血管炎肺血管障害マウスモデルにおけるモンテルカストによる炎症の抑制。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会，東京，2009年4月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

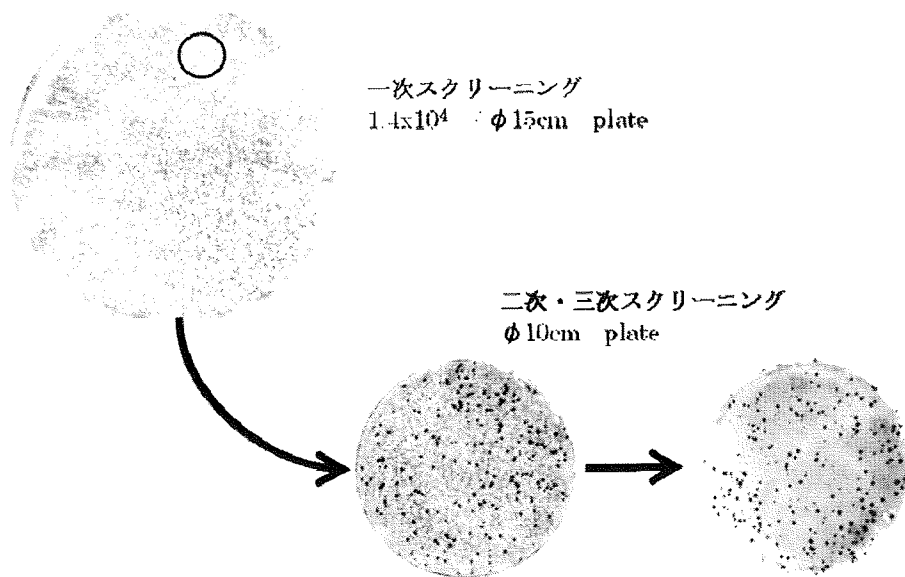


図1. SEREXの概要

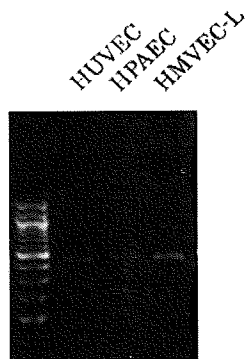


図2. 抗原候補の様々な内皮細胞での発現

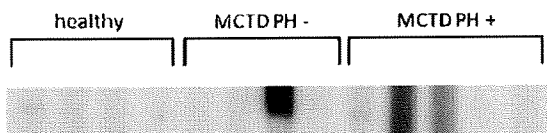


図3. 抗原候補の組換え蛋白質の患者血清との反応性

マウスモデルを用いた抗RNP抗体産生機序の解明

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ことから、病態解明が困難となっていたため、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、抗RNP抗体の産生機序研究への有用性を明らかにしてきた。そこで、本年度は実際に本系を用いて、抗RNP抗体産生の産生機構の解明を試みた。その結果、本系では、移入されたCD4⁺CD25⁻T細胞が、homeostatic proliferationの存在下にfollicular helper T細胞に分化し、germinal centerが形成され、抗RNP抗体をはじめとする自己抗体産生が生じることが明らかとなった。これらの過程にICOSが重要な役割を担う一方、制御性T細胞は抑制的に作用し、全身性自己免疫を制御していることが明らかとなった。抗RNP抗体の出現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、自己抗体産生に関わるfollicular helper T細胞分化経路を標的とする治療の自己免疫病態への有効性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重要と考えられた。

A. 研究目的

本研究は、混合性結合組織病の疾患概念に密接に関連し臨床的に重要な抗RNP抗体の産生機序を、新たな動物モデルを通して明らかにすることを目的とする。既にT細胞移入を受けたヌードマウスでは抗RNP抗体が出現し、この目的の解析に適している実験系であることを見いだしている。この系の誘導条件を種々変更することにより、抗RNP抗体の産生機構を明らかにすることが可能である。今回、この系における自己抗体産生に関わるT細胞の特徴を明らかにし、これまでに本研究を通して得られた制御性T細胞の知見とともに、本系における自己抗体産生機序の全体像を明らかにする。

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⁺T細胞やCD4⁺T細胞サブセットを分離し、ヌードマウスへ移入した。その後、経時的に血清採取を行い、抗核抗体や抗RNP抗体の測定を行った。方法の詳細は以下の通りである。

マウス

7-8週齢のBALB/c マウスとBALB/c ヌードマウスを使用した。すべてのマウスはSpecific Pathogen Free環境で飼育された。

T細胞の分離

CD4⁺T細胞の分離は、脾細胞をビオチン標識抗B220(RA3-6B2)、抗CD8a(53-6.7)、抗CD11b(M1/70)、抗CD49b(DX5)、抗I-Ab/d(25-9-17)、抗Ly-6G/Ly-6C(Gr-1:RB6-8C5)と反応後、streptavidin-conjugated microbeads(Miltenyi Biotec)を結合させ、これをMACSにてネガティブセレクションを行い分離した。また最初の抗体反応時にビオチン標識抗CD25 抗体(7D4)を加えることにより、CD4⁺CD25⁻T細胞を分離した。CD4⁺CD25⁺T細胞は、上述の方法でCD4⁺細胞を回収したのち、PE結合抗CD25 抗体と反応させ、anti-PE microbeadsと反応後にポジティブセレクションを行い分離した。

CD8⁺T細胞の分離では、マウス脾細胞をビオチン結合抗CD8a抗体(53-6.7)と反応させた後にstreptavidin-conjugated microbeadsを結合させ、ポジティブセレクションを行い分離した。

T細胞の移入

前述の方法により分離したCD4⁺T細胞を 2.5×10^6

個/匹、BALB/c ノードマウスに腹腔内注射にて移入した。

蛍光抗体法による抗核抗体の検出

抗核抗体の検出には、フルオロ HEPANA Test Kit (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan)内のHEp-2細胞基質スライドを用いた。PBSを用いてマウス血清を40、80、160、320、640、1280、2560、5120倍希釈し、器質スライドの各wellに40 μ lずつ30分間反応させた。その後PBSで洗浄し、二次抗体として2 μ g/mlに希釈したanti-mouse IgG-Alexa 488を40 μ lずつ遮光下で30分間反応させた。これをPBSで洗浄した後に、蛍光顕微鏡で観察した。

ELISA

抗RNP抗体測定のため、Scipac社のU1A、U1-70K抗原蛋白を用いてELISAを行った。抗原をpH 9.6、0.03 M carbonate buffer に4 μ g/mlに希釈し、96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に、4 $^{\circ}$ C一晚静置して個層化した。洗浄後に1% BSA-0.05% Tween20-PBSで2時間ブロッキングし、50倍に希釈したマウス血清50 μ l/wellを常温、1時間反応させた。二次抗体にHRP結合抗mouse IgG 抗体を用い、3,5,3',5'-tetramethylbenzidine (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)で発色させ、リン酸で発色を止め、波長450nmで吸光度を測定した。

(2)抗RNP抗体産生マウスにおけるリンパ球の解析
抗核抗体産生マウス脾臓リンパ球を以下のようにflow cytometry及び蛍光免疫染色にて検討した。

Flow cytometry

表面分子の染色は、細胞を4 $^{\circ}$ Cに保ちつつ染色を行った。反応時のバッファーは3%bovine serum albumin, 0.05%NaN₃-PBSを用いた。抗体添加後30分で洗浄し測定した。使用した抗体を以下に示す：

B220(RA3-6B2)、CD4(GK1.5)、CD8a(53-6.7)、CD21(7E9)、CD23(B3B4)、CXCR4(2B11)、CXCR5(2G8)、Fas(Jo2)、T- and B-cell activation antigen(GL7)、ICOS(C398.4A)、PD-1(RMP1-30)。

組織の蛍光免疫染色

マウスの脾臓をOCTコンパウンド(サクラファインテック、日本)に包埋したのち、液体窒素で急速に凍結した。これを薄切シアセトンで固定した。Protein Block serum-free(Dako, Real carpinteria, CA)と10分ほ

ど反応させた後、一次抗体をAntibody Diluent with Background Reducing Components(Dako)で5 μ g/mlに希釈し室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、Dylight488またはDylight594標識二次抗体(Jackson laboratories, Baltimore, PA)を250倍に希釈し反応させた。二重染色では二次抗体の蛍光色を変えて同様の過程をもう一度行った。その後、Vectashield(Vector laboratories, Burlingame, CA)を用いて封入し、蛍光顕微鏡で観察した。染色に使用した抗体はCD4(RM4-5)、CD19(1D3)、Ig-D(11-26c.2a)、MAdCAM-1(MECA367)、PDCA-1(120G8)、PD-1(RMP1-30)。他にビオチン化PNA(Vector laboratories Burlingame, CA)も用いた。

(3)抗RNP抗体産生マウスにおけるT細胞機能解析
抗核抗体誘導マウスにおけるT細胞の発現分子(Bcl6、IL-21)および抗体産生誘導能の検討を以下の方法で行った。

PCR

リンパ球サブセットを分離後、RNeasy mini kit(QIAGEN, Valencia, CA)を用いてRNAを精製し、SuperScriptTM III Reverse Transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてcDNAを作成した。Primerは、GAPDH-forward, 5'-GAAGGTCGGTGTGAACGGA-3' GAPDH-reverse, 5'-GTTAGTGGGGTCTCGCTCCT-3' Bcl6-forward, 5'-GCCCCACTGACCCGAAAGCC-3' Bcl6-reverse, 5'-GCCTGCCAGGGACCTGTTCAC-3' IL-21-forward, 5'-ATCCTGAACCTTCTATCAGCTCCAC-3' IL-21-reverse, 5'-GCATTTAGCTATGTGCTTCTGTTC-3'を用いた。

共培養

BALB/cマウスの脾細胞をビオチン標識抗CD19(1D3)抗体とインキュベートした後、ストレプトアビジンマイクロビーズと反応させてMACSによりポジティブセクションしB細胞を分離した。また、Tc移入BALB/cノードマウスの脾細胞をFITC標識抗CD4抗体とインキュベートした後、Anti-FITC MultiSort Kit(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いてCD4+細胞をポジティブセクションした後CD4+細胞からビーズを外した。この細胞とビオチン標識抗PD-1抗体をインキュベートし

た後ストレプトアビジンマイクロビーズと反応させMACSによりCD4+PD1+T細胞とCD4+PD1-T細胞を分離した。

培養には96well-round bottomのプレートを用い、培養液には10%FCS-RPMIを用いた。各wellにおいてB細胞 2×10⁵、T細胞 2×10⁴を混合し、37度、CO₂ 5%で96時間培養した。T細胞の刺激は、プレート固相化10 μg/mlの抗CD3抗体と、培養液中に加えた5 μg/ml抗CD28抗体で行った。ICOSの阻害は、抗ICOS抗体(7E.17G9; BioLegend, San Diego, CA)を5 μg/mlで加え、IL-21阻害には抗IL-21抗体(R&D systems, Minneapolis, MN)を10 μg/mlで加えた。培養96時間後に上清を回収し、IgGの測定を行った。

培養液中のIgGの測定

Affinipure Donkey anti-mouse IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA)をPBSで1.3 μg/mlに希釈し、50 μlづつ96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に分注し、4℃一晩静置し固相化した。洗浄後1% BSA-0.05% Tween20-PBSで2時間ブロッキングした後、培養上清を50 μl/wellで常温、1時間反応させた。濃度測定のためのスタンダードにはChromopure Mouse IgG(Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA)を用いた。二次抗体に10000倍希釈したPeroxidase-conjugated Affinipure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-mouse IgG Fc γ Fragment-specific(Jackson ImmunoResearch)を用いた。

(4) 抗RNP抗体産生マウスにおけるfollicular helper T細胞の分化に関わる因子の解析

ヌードマウスにCD4+CD25-T細胞を移入(day0)後、day2、day4、day7、day10に抗ICOS抗体(7E.17G9)100 μg/匹/回を腹腔内投与し、day5、day14にTfhおよびgerminal centerの形成をFACSにて解析した。

(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抗体産生マウスにおけるリンパ球の解析
本研究班におけるこれまでの検討から、CD4+CD25-T細胞の移入をうけたヌードマウスでは、短期間に高

率に高抗体価のIgGタイプの抗RNP抗体をはじめとする抗核抗体が誘導されることが明らかになっている。従って、クラススイッチが生じる場として重要なgerminal centerの形成と、それに関わる重要なT細胞サブセットとして近年明らかとなったfollicular helper T細胞(Tfh)の誘導について検索が必要と考えた。

T細胞移入後5日目の脾臓より凍結切片を作製して、蛍光抗体法による免疫染色を行って組織学的変化を観察した(図1)。その結果、Tcを移入した群においてMAdCAM-1により境界されるリンパ濾胞の拡大、抗IgD抗体で染色されるB細胞濾胞内へのCD4陽性細胞の局在、PD-1陽性細胞の出現、pDCの増加が認められた。

そこで更に、レシピエント脾臓におけるgerminal centerの形成について詳細に検討した。Germinal center B細胞はGL-7⁺Fas⁺細胞であることから、レシピエントの脾細胞における、これらの細胞表面分子の発現についてflow cytometryで解析した。その結果、Tc群ではTc+Treg群と比較してGL-7⁺Fas⁺B220⁺細胞が明らかに増加しており、germinal centerが形成されていることが判明した(図2A)。実際にTc群における脾臓の組織染色を行うと、PNAで染まるgerminal centerの出現が認められ、これはB細胞濾胞をしめすIgD染色域内に存在する事が判明した(図2B)。また、CD4染色部位とPNA染色部位との関係を見ると、CD4⁺細胞はT細胞ゾーンに多く存在していたが、germinal center内にも多数のCD4⁺細胞が存在することが判明した。

Germinal centerの形成に重要な役割を担い、同領域内に局在するT細胞サブセットとしてTfhが知られており、一般的にCXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞として同定されている。Tc移入群ではgerminal centerの形成が顕著に認められ、内部にCD4⁺T細胞が局在したことより、Tfhのフェノタイプを有するT細胞が存在しているか検討した。TcまたはTc+Treg移入後5日目の脾細胞において、これらの表面マーカーについてflow cytometryで解析したところ、Tc移入群においてCXCR5の発現は低かったがCXCR4、ICOS、PD-1を発現する細胞が存在していた(図3A)。同一の細胞がこれらを発現していることは、flow cytometryにおける多重染色にて確認しており、

CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞が存在していることが明らかとなった。TfhではCCR7を発現しなくなるが、その局在に重要な意義をもつが、この細胞もCCR7の発現は認めなかった。脾臓凍結切片における免疫蛍光染色においても、Tc移入群ではPD-1発現細胞が存在し、これがgerminal zoneにのみ多数存在していることが判明した(図3B)。

次に本系で認めるCXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞の局在とgerminal centerとの関連をTc移入マウスの脾臓で詳細に検討し、その結果を図4に示した。PD-1⁺細胞はCD19で染色される領域の内部に存在するもののCD19は発現しておらず、CD4との二重染色では黄色になることからCD4を同時に発現していることが確認された。またCD4⁺細胞全体の中でPD-1⁺細胞の局在は、T細胞ゾーンにはほとんどなく、B細胞濾胞内と考えられる部位に存在していた。実際にPNAで染色されるgerminal centerとの位置関係をみることで、PD-1⁺細胞がgerminal centerに存在していることが明らかとなった。

ここまでの検討においてはT細胞移入後5日の早い段階での変化を解析してきたため、次にこれらの変化が移入早期の一過的な変化ではなく、長期的に持続するものか解析した。移入4週間後の脾細胞を解析した(図5)。その結果、germinal center B細胞、CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞ともに消失せずに保たれており、移入早期のみではなく長期間持続する変化であることが確認できた。

以上より、Tcを移入すると、homeostatic proliferationを経てCXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞に分化し、同時にgerminal centerが形成されることが明らかとなった。また、TcとともにTregを移入した群ではこの分化が抑制されていた。つまり、homeostatic proliferation下において、TcはCXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞に分化しうる可能性を内在しているが、Tregが存在するとこの分化が抑制されると考えられた。

(2) 抗RNP抗体産生マウスにおけるT細胞機能解析 抗核抗体産生マウスに誘導される

CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞が、Tfhのmaster遺伝子であるBcl6や機能分子であるIL-21の発現の有無や、実際の抗体誘導能を有しているのかを評価した。移入前のTc細胞、移入後のCD4+PD1+細胞、

CD4+PD1-細胞の計3群においてPCRで発現遺伝子を検討すると、Bcl6は移入後のCD4+PD1+細胞、CD4+PD1-細胞の両群において発現を認めたが、IL-21はCD4+PD1+細胞でのみ発現を認めた(図6)。

次に移入後のCD4+PD1+細胞、CD4+PD1-細胞をBALB/cマウスのB細胞と共培養して、これらのT細胞の抗体産生誘導能を評価した(図7)。その結果、CD4+PD1-細胞に比較してCD4+PD1+細胞において、B細胞に対する強いIgG産生誘導能が認められた(図7A)。更にこのCD4+PD1+細胞のIgG産生誘導能に対するICOSとIL-21の関与を、阻害抗体を加えた培養により検討した(図7B)。その結果、ICOS、IL-21のいずれを阻害してもIgG産生亢進能が低下し、両者を阻害すると相加的にIgG産生が低下した。以上より、CD4+PD1+細胞にはB細胞のIgG産生を促進する作用があり、その機序にICOS、IL-21が関与していることが判明した。

これまでの結果からCXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞は、Bcl6を発現し、germinal centerに局在して、B細胞のIgG抗体産生誘導能を有していること、また、その機序にICOSやIL-21が関係している事が判明したため、この細胞はTfhと考えた。

(3) 抗RNP抗体産生マウスにおけるfollicular helper T細胞の分化に関わる因子の解析

ICOSを強発現しているTfhの出現にはICOSが重要な役割を担っているとの報告がある。本系の抗核抗体産生を誘導したマウスにおけるTfhの分化においても、ICOSの関与を検討するため、ICOS/ICOSLを阻害する抗体を投与した。その結果、この阻害抗体によりTfh分化やgerminal centerの形成が障害されることが判明した。従って、本系におけるCD4+CD25-のTfh分化にICOSからのシグナルが重要な役割を担っていることが明らかとなった。

D. 考察

(1) Tfh分化と抗RNP抗体との関連に関する考察

今回の研究により、抗RNP抗体産生マウスにおいて、Tfhが出現しgerminal centerが形成されていることが明らかとなった。Tfhと自己抗体との関連については、本研究データとともに、これまで施行した検討において、1)CD8T細胞はCD4T細胞と同様homeostatic

proliferationを生じるが、移入しても顕著なgerminal center形成や抗核抗体価の上昇を認めないこと、2)Rag欠損マウスにCD4T細胞とB細胞を移入することでTfhやgerminal center出現とともに抗核抗体産生が誘導されることなどの結果を得ており、示されている。

本研究で解析しているマウスは、抗RNP抗体を産生するが、同時に種々の抗核抗体も産生することから、より抗RNP抗体産生に関わる因子の解析も今後更に重要と考える。遺伝的背景の変更、toll様受容体の関与などの検討が必要と思われる。

(2)Tfhの誘導分化に関する考察

Homeostatic proliferationとTfhの出現については本研究で示されたが、その詳細な機序については更なる検討を必要とする。Homeostatic proliferationはIL-21が関与し促進されることが示されているが、同時にこのIL-21はTfhが分化する際に重要な役割を担っており、両者はIL-21を介した密接な関連が示唆される。生理的な現象であるhomeostatic proliferationが誘導される際に亢進するIL-21産生が、Tfhの誘導を促している可能性がある。

(3)混合性結合組織病治療への応用に関する考察

混合性結合組織病の治療は、現在、50年以上前に開発されたステロイドや免疫抑制剤以外に有効な薬剤に乏しい。本研究により明らかとなった自己抗体産生経路は、今後新たな分子標的の候補として有用な可能性がある。例えばICOSやIL-21はTfhの出現に重要であることが報告されており、本系でもこれらの分子がB細胞抗体産生に影響を及ぼしていることを明らかにしており、分子標的薬の候補として検討に値すると思われる。

E. 結論

本研究によりヌードマウスにCD4+CD25-T細胞を移入することで、homeostatic proliferationの存在下にTfh

に分化しgerminal centerが形成され、抗RNP抗体をはじめとする自己抗体産生が生じることが明らかとなった。これらの過程にICOSからのシグナルが関与する一方、制御性T細胞は抑制的に作用し、全身性自己免疫を制御していることが明らかとなった。抗RNP抗体の出現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、自己抗体産生に関わるTfh分化経路を標的とした治療の混合性結合組織病における自己免疫病態への有効性を検討していくことは、本疾患の分子標的治療を開発する上で重要と考えられた。

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

(1)第39回日本免疫学会総会

(2)第37回日本臨床免疫学会総会

全身性自己免疫マウスモデルを用いた抗核抗体制御機構の検討；日本臨床免疫学会誌(0911-4300)32巻5号 Page364

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

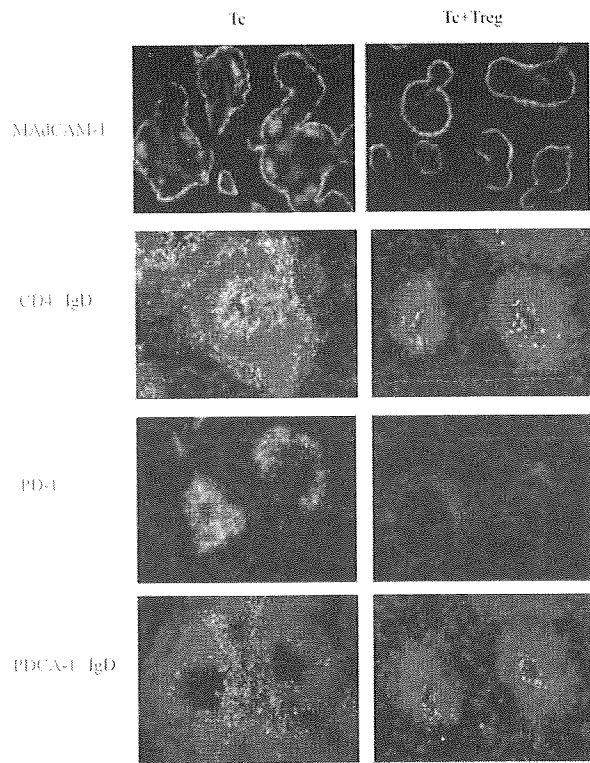


図1. 抗核抗体産生マウス脾臓における組織学的変化

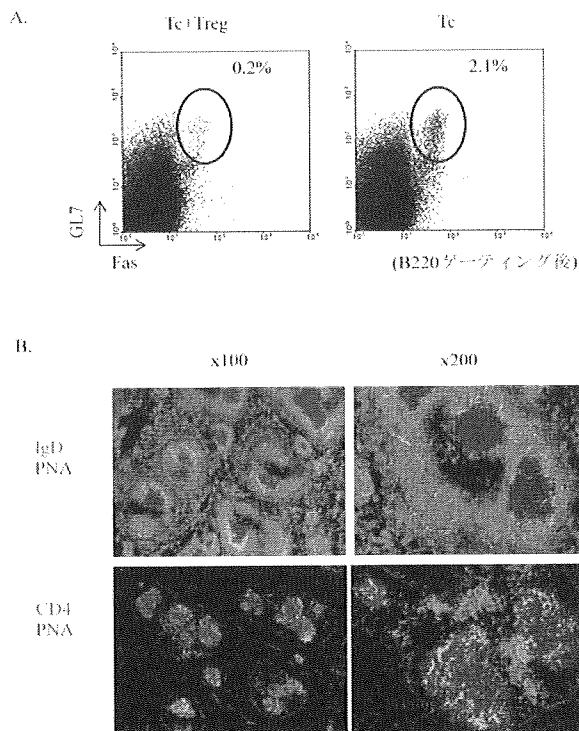


図2. 抗核抗体産生マウスにおけるgerminal centerの形成

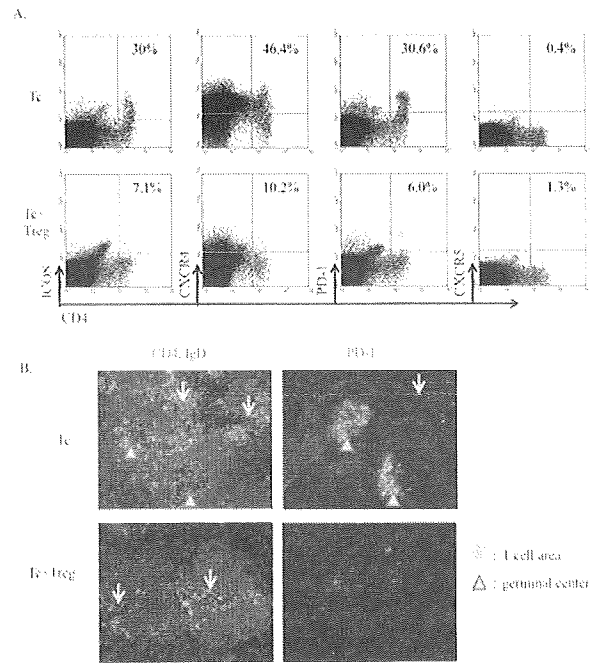


図3. 抗核抗体産生マウスにおけるCXCR4⁺ ICOS⁺ PD-1⁺T細胞の出現

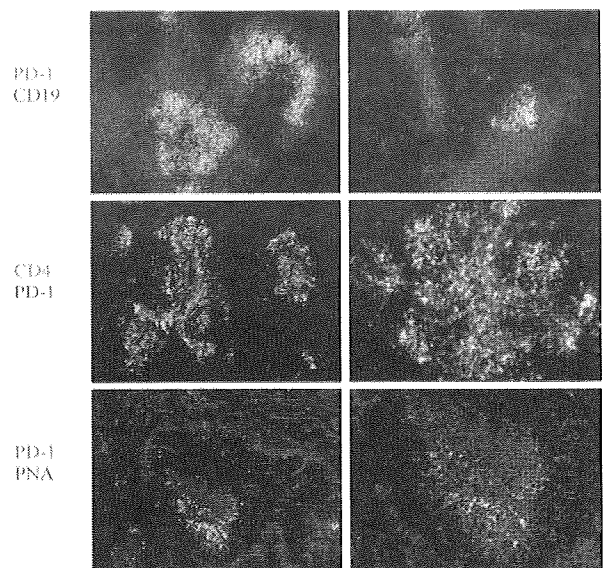


図4. 抗核抗体産生マウスにおけるPD-1⁺T細胞の局在

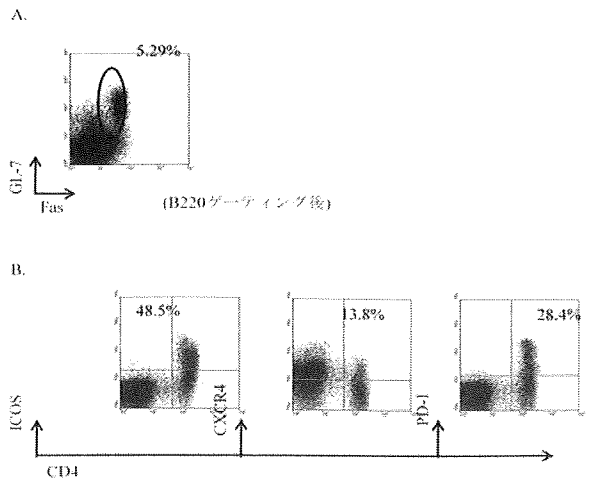


図5. germinal centerおよびICOS+PD-1+T細胞の長期間の持続

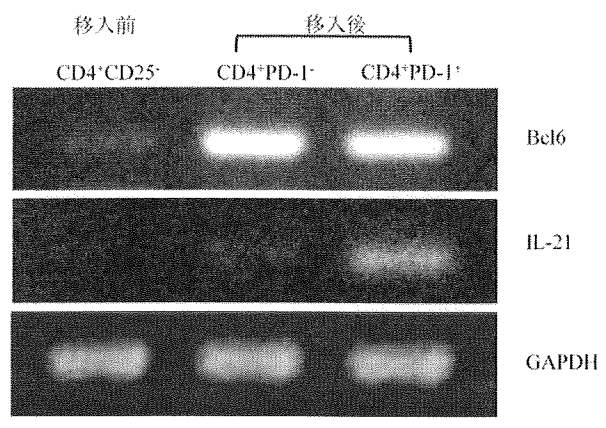


図6. CD4+PD-1+細胞のIL-21産生

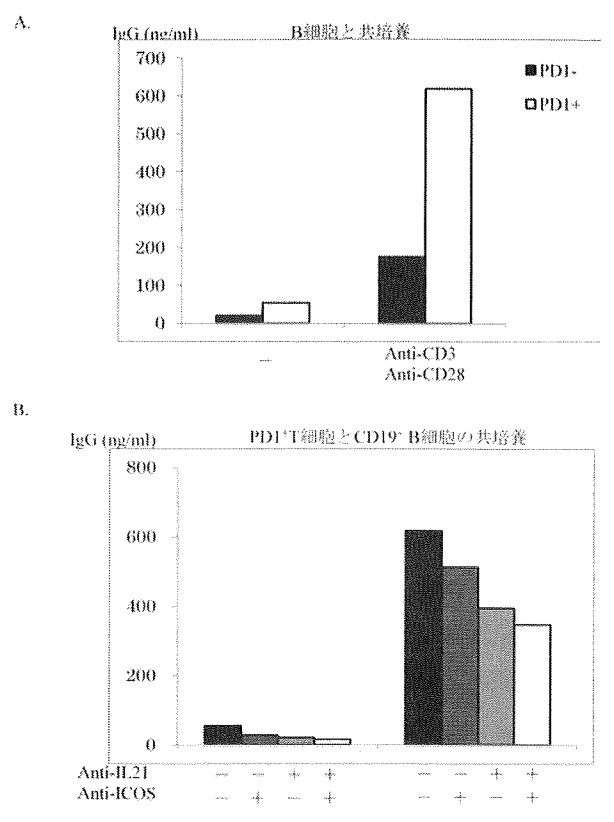


図7. CD4+PD-1+細胞によるB細胞抗体産生誘導

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

研究分担者： 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、炎症性筋症、全身性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班にて報告してきた。今回の研究は、発症4年以内のMCTD患者で4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繰り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。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。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。しかし、我々の結果では、PAHを併発した症例においては、ET-1の亢進にもかかわらず、血清中NO濃度は、健常人と差が認められなかった。この結果から、我々はPAH合併MCTD患者ではET-1によるNOS-2を介したNO合成過程に異常があると仮定した。そこで、昨年までの本研究班にてNOS-2遺伝子の5'-UTRに存在する遺伝子多型を検索し、PAHの

発症にNOS2遺伝子多型が関与していることを後ろ向き研究にてみいだした。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以上で、肺動脈楔入圧が15 mmHg以下の症例を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。

(倫理面への配慮)

東京女子医科大学の倫理委員会にて審議し、承認を得て行っており、患者からのDNA取得には、文書で同意を取得している。DNAは、匿名化番号を付記して、検査を行い、最後に、患者臨床データと連結を行っている。患者のデータの漏洩はない。

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、26例のMCTDを登録した。26例、全例女性で、年齢の中央値は、40歳であった。そのうち、6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26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)。経過観察中にPAHを発症した症例3、症例5、症例11、症例19、症例21、症例26では、NO/ET-1比が低下していた。その6症例とその他の20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

26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検討した。繰り返し配列を23未満と、23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2)。

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。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。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。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、5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、26例中6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22以下の症例と、23以上の症例の2群にわけた検討では、22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。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

NOS2遺伝子の転写調節領域に存在するCCTTT繰り返し配列の数が2つの染色体をあわせて22以下の症例では、高頻度にPAHを合併する。MCTDでCCTTT繰り返し配列の少ない症例では、PAHの発症を予防することが重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawaguchi Y, Ota Y, Kawamoto M, Ito I, Tsuchiya N, Sugiura T, Katsumata Y, Soejima M, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kuwana M, Yamanaka H, Hara M: Association study of a polymorphism of the *CTGF* gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis* 68:1921-1924, 2009

2. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara N. Muscarinic-3 Acetylcholine Receptor Autoantibody in Patients with Systemic Sclerosis: Contribution to Severe Gastrointestinal Tract Dysmotility. *Ann Rheum Dis* 68: 710-714, 2009

2. 学会発表

1. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Ota Y, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara M. Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 58 (Supplement):S375, 2009

2. Ota Y, Kawaguchi Y, Masuda I, Kawamoto M, Sugiura T, Fukasawa C, Takagi K, Nishimagi E, Ichida H, Soejima M, Masako H, Kamatani N. Association

between a polymorphism of the *CTGF* gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population. *Arthritis Rheum* 58 (Supplement):S927, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

4. 特許取得

特になし

5. 実用新案登録

特になし

6. その他

特になし

表1 NO/ET-1比とPAH発症の関連

	NO/ET-1 比
PAH 発症群	42*
PAH 非発症群	119

*: P < 0.0001 by Student's t-test

NO: 一酸化窒素、ET: エンドセリン、PAH: 肺動脈性肺高血圧症

表2 CCTTT repeat と PAH 発症の関連

PAH	CCTTT の和	
	2 3 未満	2 3 以上
合併有り	5 例	1 例
合併無し	4 例	1 6 例

P = 0.01 by Fisher exact test, RR: 20 (1.8-223)

PAH: 肺動脈性肺高血圧症

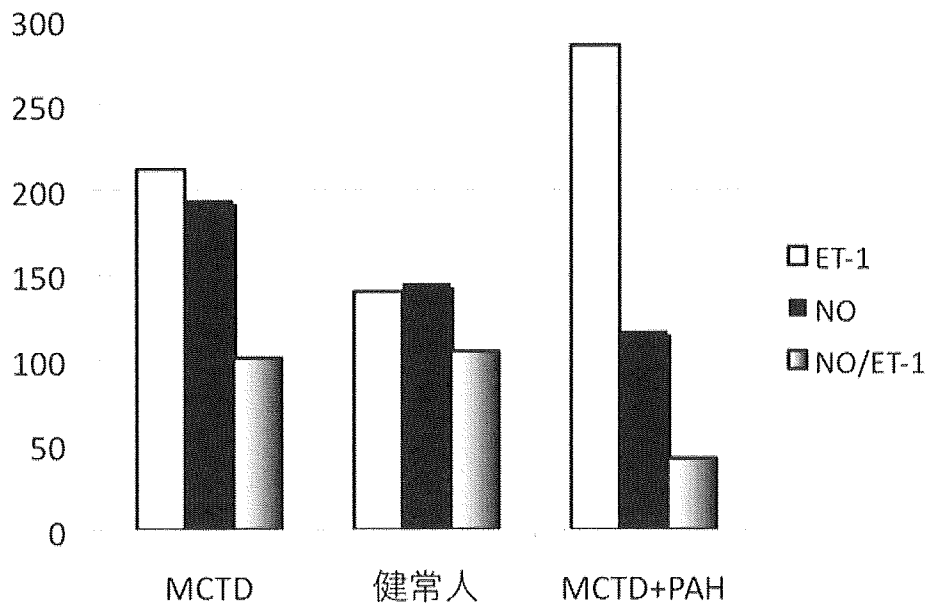


図1 エンドセリン(ET-1)、一酸化窒素(NO)の血中濃度

健常人との比較で、MCTDはET-1およびNOが有意に上昇(* P < 0.01)、PAH合併MCTDは、ET-1の有意な上昇とNO/ET-1比の有意な低下が認められた

肺高血圧症に合併する心血管系のリモデリングの病態解明と治療法開発に関する研究

研究分担者： 田中 廣壽 東京大学医科学研究所・准教授
研究協力者： 吉川 賢忠 東京大学医科学研究所・助教
研究協力者： 清水 宣明 東京大学医科学研究所・特任研究員
研究協力者： 佐野 元昭 慶応義塾大学医学部再生医学教室・講師
研究協力者： 福田 恵一 慶応義塾大学医学部再生医学教室・教授

研究要旨

混合性結合組織病（MCTD）をはじめとする膠原病患者における肺高血圧症（PH）とそれに合併する右心肥大（RVH）の病態におけるHEXIM1の意義を明らかにし、新規治療法開発の基盤をつくることを目的とした。心筋特異的HEXIM1過剰発現マウス（HEXIM1Tg）は通常飼育では表現形の異常を認めなかったが、遺伝子発現プロファイル解析において、心筋における多くの転写因子や増殖関連因子のmRNA発現が低下していた。低酸素負荷によるPHモデルでは、野生型マウスでは右心肥大の指標である右室/左室+心室中隔重量比は有意に増加したが、HEXIM1Tgでは変化がなかった。次に、新生仔ラット心筋培養細胞を用いて心筋肥大におけるHEXIM1の役割を、野生型とP-TEFb抑制活性消失変異体HEXIM1dNを対比して解析した。HEXIM1野生型過剰発現下では、エンドセリン1（ET-1）による心筋細胞肥大作用、心肥大マーカー遺伝子のmRNA発現増加は抑制されたが、HEXIM1dNは影響を与えなかった。また、P-TEFb活性化に伴うRNAポリメラーゼII（RNAPII）のリン酸化も、HEXIM1過剰発現下でのみ抑制された。低酸素培養における低酸素誘導性転写因子HIF-1の標的遺伝子群のmRNA発現増加に対しても、HEXIM1は抑制的に働いた。したがって、HEXIM1は心筋肥大刺激によるP-TEFb/RNAPII活性化や心筋リモデリングあるいは低酸素応答に関与する各種の遺伝子発現を抑制することによって、PHに伴うRVH進展抑制に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

肺高血圧症（PH）は混合性結合組織病（MCTD）の予後規定因子であるが、その病態はいまだに明らかではなく、根本的治療法もない。とくに、肺血管抵抗の増大と低酸素血症による右心負荷の増大は右心肥大、肺性心を招来し、予後をさらに悪化させる。

最近、エンドセリン1（ET-1）などによる血管平滑筋増殖や心肥大病態は、cyclin T1とともにP-TEFb複合体を構成するCDK9活性の上昇に引き続くRNAポリメラーゼII（RNAPII）のリン酸化亢進によることが明らかになった（Sano, M., et al., Nat Med, 2002）。一方、HEXIM1は、P-TEFbを抑制して転写伸長反応を負に制御し（Yik, J., et al., Mol Cell, 2004）、心血管内分泌制御に関与する転写因子活性を阻害する核蛋白質であり（Ouchida, R., et al., Genes Cells, 2003, Shimizu, N., et al., Mol Endocrinol, 2009）、そのノック

アウトマウスは心肥大を呈し胎生致死である

（Huang, F., et al., Mech Dev, 2004）。したがって、HEXIM1は、PHに引き続く右心肥大の発症に関与している可能性がある。そこで、かかる病態におけるHEXIM1の意義を明らかにし新規治療法開発の基盤をつくることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) loxP-HEXIM1（野生型、各種変異体）トランスジェニックマウスとalphaMHC-Creトランスジェニックマウスを交配させ、心筋特異的にHEXIM1を発現するトランスジェニックマウス（HEXIM1Tgマウス）を慶応義塾大学医学部再生医学教室 佐野元昭講師の協力によって作成した。
- 2) 低酸素負荷PHマウスモデルを構築した。野生型