

ならびにHEXIM1Tgマウス各3匹を正常もしくは低酸素分圧下（10%O₂）で8週間飼育し、PHとそれに引き続く右室リモデリングにおけるHEXIM1の意義を、遺伝子発現プロファイリング解析、心臓超音波検査、屠殺後の心の解剖学的計測と病理組織学的解析などによって検討した。

- 3) 心肥大におけるHEXIM1の意義を明らかにするため、Cre-loxPで制御可能なHEXIM1発現アデノウイルス（野生型およびP-TEFb抑制活性消失変異体HEXIM1dN）の系を樹立した。新生仔ラット培養心筋細胞をET-1で処理した際の、HEXIM1野生型あるいはHEXIM1dNの過剰発現の影響を、心筋細胞肥大（免疫染色法）、遺伝子発現（定量的RT-PCR）、RNAPIIリン酸化（ウェスタンブロット法）を指標に解析した。

倫理面への配慮

全ての動物実験、遺伝子組換え実験は東京大学医科学研究所ならびに慶応義塾大学が定める動物実験規定、遺伝子組換え生物の使用等に関する規定に従い、機関承認を受けて行われた。

C. 研究結果

- 1) 心筋選択的にHEXIM1野生型あるいはHEXIM1dNを内因性HEXIM1の4～5倍高発現するマウスの樹立に成功した。かかるTgマウスはいずれも正常に生まれ、通常の飼育環境下においては成長速度、体重、など、コントロールのマウスとの間には明らかな違いは認められなかった。16週で屠殺後の病理組織学的検討でも異常所見はなかった。
- 2) 野生型HEXIM1Tgマウスの心筋における遺伝子発現プロファイルマイクロアレイにより検討した。Tgマウスでは、Hif1an、Cebpd、Klf9、Thrb、Klf15、Ppargc1aなどの転写因子の遺伝子発現が低下していた（図1）。
- 3) 野生型マウスでは正常酸素分圧下飼育に比し低酸素分圧下飼育において右室/(左室+中隔)重量比が増加したが、野生型HEXIM1Tgマウスでは増加しなかった（図2）。
- 4) HEXIM1野生型あるいはHEXIM1dN発現アデ

ノウイルスを培養心筋細胞に感染させ各種解析を行った。ET-1による細胞肥大の誘導はHEXIM1野生型の過剰発現により抑制されたが、HEXIM1dNは影響を与えなかった（図3）。ET-1により心肥大マーカー遺伝子ANP、BNP、betaMHCのmRNA発現は増加し、HEXIM1野生型の過剰発現はそれらの変動を抑制したが、HEXIM1dNは影響を与えなかった（図4）。P-TEFb活性化指標であるRNAPIIのリン酸化はET-1によって誘導されたが、HEXIM1の過剰発現によって抑制された（図5）。低酸素下培養によるHIF1の標的遺伝子、エンドセリン受容体b、Gapdh、Vegf、Ldha、のmRNA発現増加はHEXIM1の過剰発現により抑制された（図6）。

D. 考察

HEXIM1の生体機能解析のためTgマウスを開発したとともに、HEXIM1過剰発現系を構築した。

HEXIM1遺伝子破壊マウスが著明な左室肥大を伴って胎生期に死亡することからHEXIM1Tgマウスでは心室壁は菲薄化することが予想されたが、実際のマウスでは予想を覆す結果となった。かかる結果は、生体内においてはRNAPIIのリン酸化状態や転写因子の活性化はHEXIM1の作用にカウンターする装置などによって巧妙に制御されている可能性を示唆する。したがって、今後、HEXIM1のみならずHEXIM1に拮抗する装置を明らかにすることでMCTDなどにおけるPHや右心肥大の分子機構のみならず新規治療法開発の方向性も明確になる可能性がある。

低酸素負荷PHマウスモデルを用いた心重量解析の結果から、HEXIM1Tgマウスでは右心肥大の誘導が抑制される可能性が示された。ごく最近、成獣マウス左室におけるHEXIM1発現量減少は左室肥大を増悪させることが示され、やはりHEXIM1の過剰発現が左右を問わず心肥大抑制に働きうることを支持する。現在、遺伝子プロファイル、心機能解析、病理組織学的解析をすすめ、その分子機構や生理学的意義についてのより詳細な解明を目標としている。

培養心筋細胞を用いた解析により、ET-1による心筋肥大刺激に対しHEXIM1の過剰発現は抑制性に働き、その分子機構のひとつとして、P-TEFb活性抑制/RNAPIIリン酸化阻害による心筋リモデリング関連

遺伝子の発現抑制が重要である可能性が示唆された。一方、今回使用したHEXIM1変異体HEXIM1dNは転写因子結合に重要な領域でもあり、HEXIM1が各種転写因子に対し直接作用している可能性もある。一方、ET-1による心筋細胞肥大刺激はP-TEFb/RNAPII活性化のみならず、Erk1/2-転写因子系、Erk1/2-Akt/mTOR/S6K蛋白合成促進系、カルシニューリン-NFAT系など各種のシグナル伝達経路をも活性化させることが知られている。そこで、それらに対するHEXIM1の影響、あるいはIGF-I、TNFalpha、圧・伸展負荷といった他の心肥大刺激系に対するHEXIM1の影響、さらに低酸素応答性因子HIF1活性化をどのレベルで抑制しているかなど、今後より詳細な解析を加えることで、心筋肥大におけるHEXIM1の意義がより明確になるものと考えられた。

E. 結論

マウスにおけるHEXIM1の心筋特異的過剰発現は、低酸素誘導性PHに伴う右心肥大の進行を抑制する可能性が示唆された。また、その分子機構の一つに、HEXIM1によるRNAPIIリン酸化抑制を伴う心筋リモデリング関連遺伝子の転写抑制が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnuma K, Hosono O, Katayose T, Yoshikawa N, Kawasaki H, Fujii T, Oyaizu N, Tanaka H, Morimoto C. Microscopic polyangiitis initiated with liver dysfunction, calf pain and fever of unknown origin. **Rheumatol Int.** [online publication], 2009
- 2) Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsushashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K. Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. **J Clin Invest.**

119(6):1477-1488, 2009

- 3) Yoshikawa N, Nagasaki M, Sano M, Tokudome S, Ueno K, Shimizu N, Imoto S, Miyano S, Suematsu M, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H. Ligand-based gene expression profiling reveals novel roles of glucocorticoid receptor in cardiac metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 296(6):E1363-1373, 2009
- 4) Ohnuma K, Hosono O, Kawasaki H, Yoshikawa N, Katayose T, Oyaizu N, Tanaka H, Morimoto C. An adult case of Henoch-Schönlein purpura complicating common peroneal nerve mononeuropathy. **Mod Rheumatol.** 19(1):73-79, 2009
- 5) Yo K, Iwata S, Hashizume Y, Kondo S, Nomura S, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C. SHP-2 inhibits tyrosine phosphorylation of Cas-L and regulates cell migration. **Biochem Biophys Res Commun.** 382(1):210-214, 2009

2. 学会発表

吉川賢忠, 森本幾夫, 田中廣壽. 膠原病性肺高血圧症に対する新規治療法創成への基礎的検討. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図3 HEXIM1の過剰発現はET-1による心筋細胞肥大誘導を抑制する

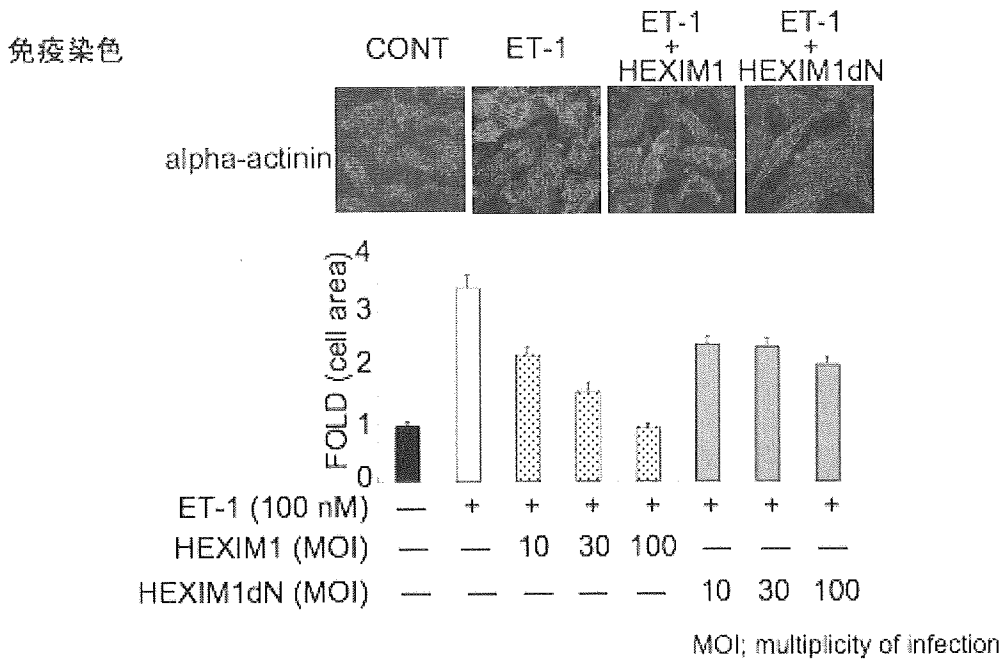


図4 HEXIM1の過剰発現はET-1による心肥大関連遺伝子の発現誘導を抑制する
定量的RT-PCR

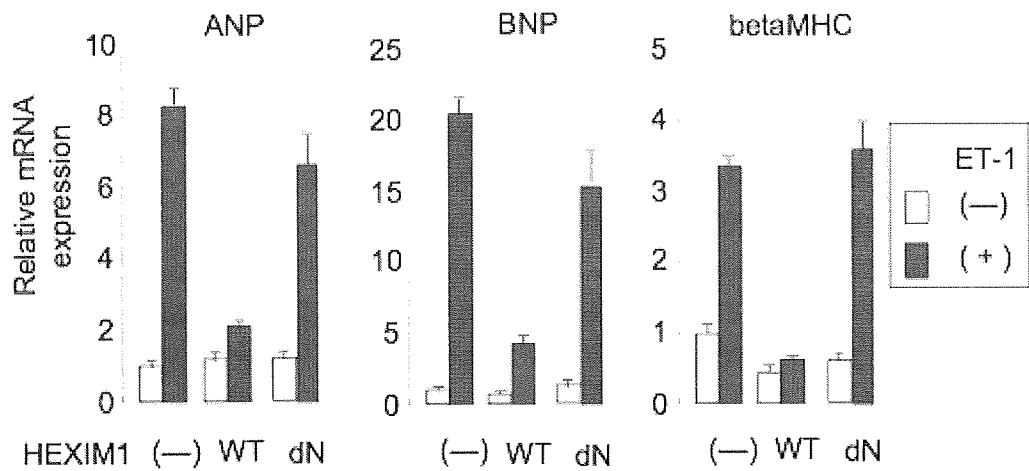


図5 HEXIM1の過剰発現はET-1によるRNAPIIリン酸化誘導を抑制する

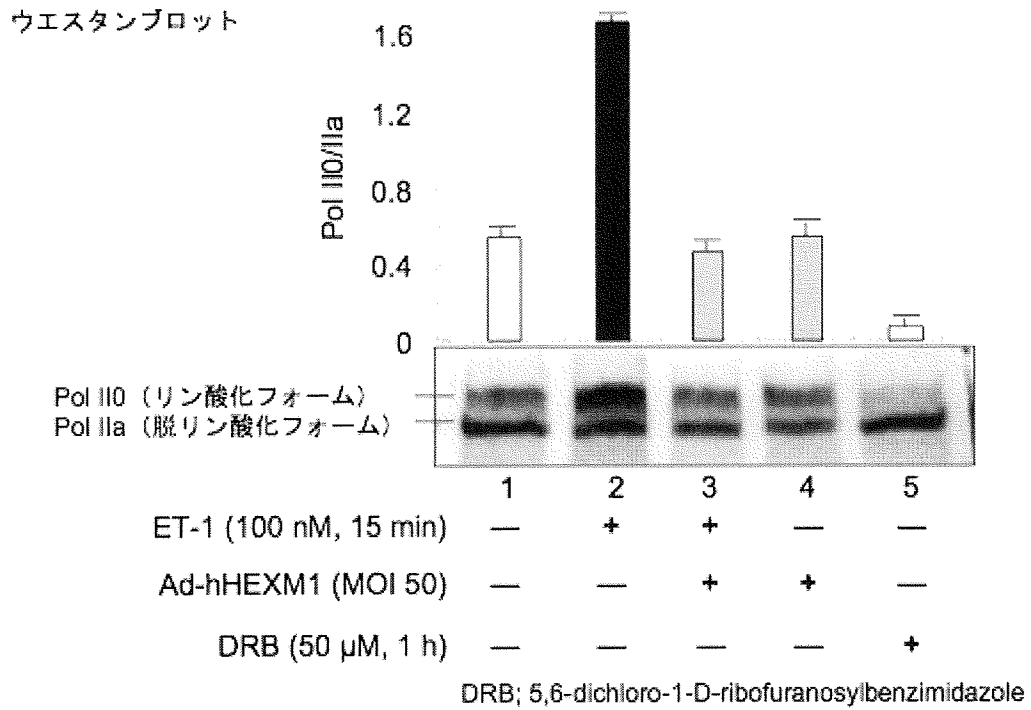
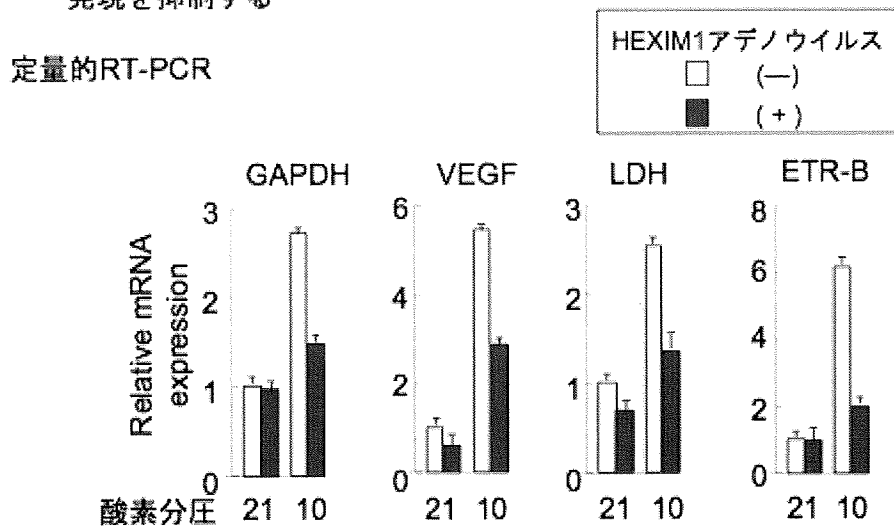


図6 HEXIM1の過剰発現は低酸素培養による低酸素応答性遺伝子群の遺伝子発現を抑制する



膠原病PAHにおける血管関連マーカーの臨床的意義に関する研究

研究分担者： 岡田 純 北里大学健康管理センター・教授
研究協力者： 和田 達彦 北里大学医学部総合診療部・助教
田中 住明 北里大学医学部膠原病感染内科・講師
廣畑 俊成 北里大学医学部膠原病感染内科・教授

研究要旨

研究目的：MCTDのPAHの早期診断および治療のマーカーとなる血清因子を検索してきた。今回は、D-Dimerに加えて血管内皮細胞を反映するsP-Selectin, sICAM-1、さらに最近PAHにて上昇することが報告されたLIGHT (Lymphotoxin-like Inducible protein that competes with Glycoprotein D for Herpesvirus entry mediator on T lymphocytes)に関しても検討したので報告する。研究方法：PAHを含む膠原病患者で、心臓超音波検査および血漿D-ダイマーの測定を行った症例を対象に、sP-Selectin, sICAM-1, LIGHTの測定をELISAにて行った。各パラメーターと臨床症状、BNP、各種自己抗体、治療内応等との関係を検討した。また、LIGHTに関しては、抗U1-RNP抗体陽性症例に関しても検討したので合わせて報告する。研究結果：心臓超音波検査時で肺動脈収縮期圧が40mmHg以上のPAHは10例であった。PAH合併例では、D-Dは $1.15 \pm 1.23 \mu\text{g}/\text{dl}$ に対して非PAH例では、 $0.52 \pm 0.39 \mu\text{g}/\text{dl}$ と低値であった。さらに、肺動脈圧(PAP)が40mmHg以上の症例ではD-Dは 1.41 ± 1.37 とPAPが40mmHg未満の 0.5 ± 0.4 に比べ高い傾向であった。sICAM-1(ng/ml)とD-Dimer $R^2=0.190681$ $p<0.003$, sICAM-1とsP-Selectin, $R^2=0.193473$ $p<0.0064$ の傾向が見られたが、PAPとLIGHTの関係は明らかではなかった。PAPとの関係はsICAM-1でやや正の相関の傾向が見られたが、有意差はなかった。一方、LIGHTはPAPとの相関は明らかではなかった。PAPで2群に分け比較検討すると、PAP収縮期圧40mmHg以上ではLIGHT $134 \pm 77 \text{pg}/\text{ml}$ と40mmHg未満の 107 ± 47 に比べやや高値を示したが有意差は認められなかった。経口PGI製剤およびwarfarinの使用の影響を検討した。LIGHTとberaprost Naの関係では、むしろ、治療群でLIGHTが高値となる傾向がみられた。これは、PGI製剤の使用量が少なく、LIGHTを十分に抑制できていない可能性も推測された。考察・結論：PAH例において、LIGHTが上昇する傾向がみられ、PAHのいかなる病態に関与するかさらに検証する必要があると考えられた。

A. 研究目的

MCTDでは、pulmonary artery hypertension(PAH)が生命予後に影響する重要な内臓病変であるが、その発症機序は不明な点が多く、原因療法となる治療法も確立していない。膠原病における肺動脈性肺高血圧症(PAH)においても、plexiform lesionと血栓形成は増悪の重要な因子である。これらの病態と的確にとらえ、治療することはPAHの治療管理上も重要である1, 2)。

LIGHT(Lymphotoxin-like Inducible protein that competes with Glycoprotein D for Herpesvirus entry mediator on T lymphocytes)/TNFRSF14はTNF super

familyに属し、リンパ球、好中球、マクロファージなどの免疫炎症に関与する細胞に発現する。血小板が関与した炎症にも関連することが明らかにされ、血管の平滑筋の増殖を誘導したり、動脈硬化病変における血管炎症を誘導することも報告されている3-6)。そこで、MCTDのPAHの早期診断および治療のマーカーとなる血清因子を検索してきたが、今回は、D-Dimerに加えて血管内皮細胞の炎症等を反映するsP-Selectin, sICAM-1, LIGHT についても検討した。

B. 研究方法

対象は、心臓超音波検査を施行した膠原病患者40例を対象とした。その内訳はMCTD 4例、SLE 3例、SSc 3例、PM 1例、UCTD 1例で、PAH合併は6例であった。UCGと同時に、血中のD-dimer, BNP, その他一般臨床検査を行い、D-dimerと各種臨床検査値、PAHのデータとの関連を検討した。健常人の成績より $0.7 \mu\text{g/ml}$ 以上を上昇と判定した。また、これらの症例について、sP-Selectin, sICAM-1, LIGHTの測定をELISA(R&D社)にて行った。各パラメーターと臨床症状、BNP、各種自己抗体、治療内応等との関係を検討した。また、LIGHTに関しては、抗U1-RNP抗体陽性症例についても検討したので合わせて報告する。倫理面への配慮をこない研究を実施した。

C. 研究結果

心臓超音波検査時で肺動脈収縮期圧が40mmHg以上のPAHは10例であった。PAH合併例では、D-Dimerは $1.15 \pm 1.23 \mu\text{g/dl}$ に対して非PAH例では、 $0.52 \pm 0.39 \mu\text{g/dl}$ と低値であった。PAPとsICAM-1, sPselectin, LIGHTとの関係を検討した。sICAM-1(ng/ml)とD-Dは $R^2=0.190681$ $p<0.003$, sICAM-1とsP-Selectinは $R^2=0.193473$ $p<0.0064$ の傾向が見られた。PAPとの関係はsICAM-1でやや正の相関の傾向が見られたが、有意差はなかった(Fig-1)。一方、LIGHTはではPAPとの相関は明らかではなかった(Fig-2)。

次に、対象群をPAPで2群に分け比較検討した(Fig-3)。PAP収縮期圧40mmHg以上ではLIGHT $134 \pm 77\text{pg/ml}$ と40mmHg未満の 107 ± 47 に比べやや高値を示したが有意差は認められなかった。次に、治療の影響を検討した。PGIは血小板からのLIGHTの放出を抑制することがほくこくされていることから、経口PGI製剤(ドルナー®、ケアーロード®)およびwarfarinの使用の影響を検討した(Fig-4,5)。LIGHTとberaprost Naの関係では、むしろ、治療群でLIGHTが高値となる傾向がみられた。これは、PGI製剤の使用量が少なく、LIGHTを十分に抑制できていない可能性も推測される。

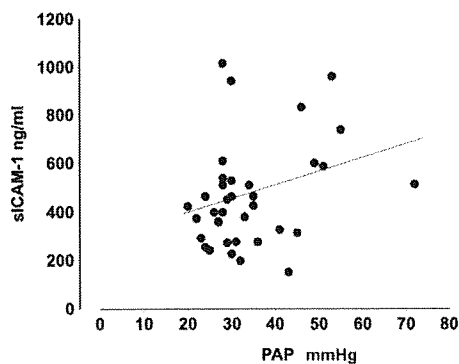


Fig 1 sICAM-1 and PAP in CTD

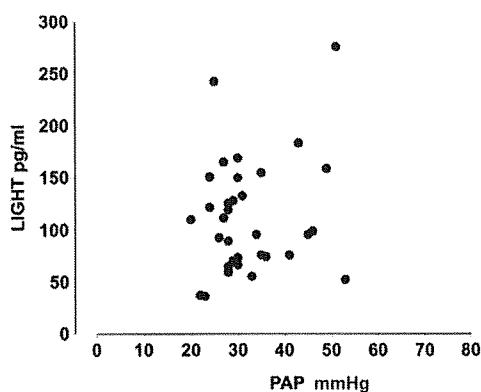


Fig2. LIGHT and PAP in CTD

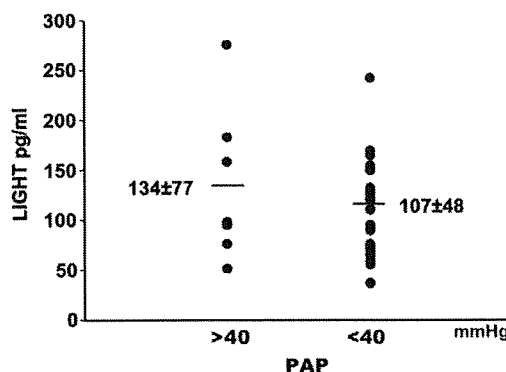


Fig 3. LIGHT and PAP in CTD

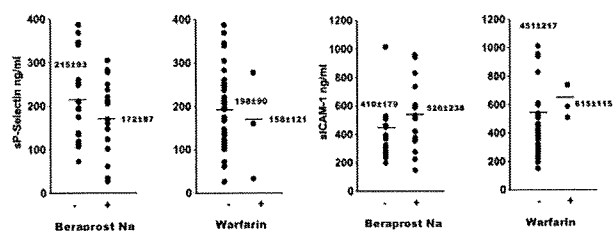


Fig 4 .P-Selectin and ICAM-1 and Treatments in Patients with CTD

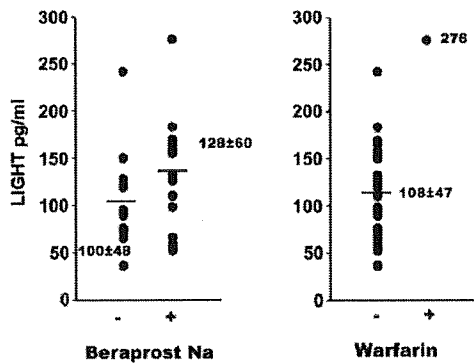


Fig-5. LIGHT and Treatments in Patients with CTD

D. 考察

膠原病においてPAPとD-Dimerの間の正の相関が見られたことは、PAHにおける血栓形成やPAHの進行のモニターの指標になる可能性が推測された。今回は、さらに、血管内皮細胞等のパラメーターであるsICAM-1, sP-Selectin, LIGHTも加えて検討した。特に、sICAM-1はD-DimerやPAPと正の相関がみられ、PAHにおける血栓形成の指標の一つになる可能性が推測された。

一方、LIGHTの受容体は、血管内皮細胞や平滑筋細胞に存在し、PAHではPGIは血小板からのLIGHTの放出のレベルを低下させ、血清の低下を生じることが報告されている6)。LIGHT自体は、tissue factor, plasminogen activator inhibitorおよびthrombomodulinの産生を増加させる。このような作用によりPAHでは、LIGHTが血栓形成の促進、plexiform lesion形成に関わる可能性が推測される。

本研究でも、PAHで、ICAM-1が上昇する傾向がみられ、血管の炎症を反映している可能性が推測された。今後は、LIGHT産生亢進と凝固系、炎症との関係がPAHでどのように進展しているかを、またMCTDにより特化した現象が見られるかをさらに検討しする必要はある。

E. 結論

PAH例において、LIGHTが上昇する傾向がみられ、PAHのいかなる病態に関与するかさらに検証する必

要があると考えられた。

文献

1. Fuster V., Steele P. M., Edwards W. D., Gersh B. J., McGoon M. D., and Frye R. L. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation* 70:580-7, 1984.
2. Johnson S. R., Mehta S., and Granton J. T.. Anticoagulation in pulmonary arterial hypertension: a qualitative systematic review. *Eur Respir J* 28:999-4, 2006.
3. Scholz H., Sandberg W., Damås J.K., et al. Enhanced plasma levels of LIGHT in unstable angina: possible pathogenic role in foam cell formation and thrombosis. *Circulation* 112:2121-29, 2005.
4. Otterdal K., Smith C., Øie E., et al. Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood* 108:928-935, 2006.
5. Galie N., Torbicki A., Barst R., et al.; Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension *Eur Heart J* 25:2243-78, 2004.
6. Otterdal K., Andreassen A.K., Yndestad A., et al. Raised LIGHT Levels in Pulmonary Arterial Hypertension: Potential Role in Thrombus Formation. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 202-7, 2008.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

MCTD肺高血圧症・末梢循環不全の病因解明に関する研究：
ACE2活性を阻害する新規自己抗体の同定と分析

研究分担者： 三森 明夫 国立国際医療センター・第一病棟部長
研究協力者： 高橋 裕子 同・膠原病科・臨床研修指導医
芳賀しおり 同・難治疾患研究部・流動研究員、
石坂 幸人 同左・研究部・部長

研究要旨：

MCTDと類縁膠原病（SLE、強皮症）の血管病変（末梢循環不全＝末端壊死、肺動脈性高血圧症）は、収縮性・増殖性を特徴とする。そこで血管保護に働く酵素angiotensin converting enzyme 2（ACE2）障害の有無を、膠原病・血管病変患者で検討した。精製ヒトACE2を用いた“抗ACE2-ELISA値”は、血管病変18人中17人（94%）が、健常者28人のベースラインOD値（ <0.1 ）を越え、OD 0.2～2.0（平均0.6）を示し、血管病変のない対照膠原病24人のOD 0～0.4（平均 0.2）より明確に高かった（ $p<0.0005$ ）。血管病変患者の血清ACE2活性の測定値は、抗ACE2-ELISA値と逆相関し（ $R^2=0.72$ ）、有意な低下者12/18（67%）、半減以下が8/18（44%）を占めたが、低下者の血清ACE2蛋白量は、健常者と同程度だった。指尖壊死SLE 1人は、ステロイド+血漿交換治療後に、抗ACE2-ELISA値低下（OD 2.0→0.3）、ACE2活性上昇（レファランス値の18%→71%）を示した。抗ACE2-ELISA値高値3患者の血清IgG分画は、ACE2活性を明確に低下させ、健常者IgG分画は影響しなかった。

結論：膠原病の末梢循環不全と肺動脈性高血圧症は、ACE2阻害自己抗体に起因する可能性がある

A. 研究目的

MCTDおよび類縁膠原病（SLE、強皮症）における、血管病変の病因を求める。

この血管病変は、収縮性ないし増殖性を特徴とすることに注目し、近年報告の多い、血管保護に働く酵素angiotensin converting enzyme 2（ACE2）の障害が、膠原病血管病変患者に検出されるかどうかを検討した。ACE2は、ACEホモログであり、各種血管床に分布し、angiotensin II（Ang II）の末端を切断して、血管収縮・増殖を抑制する分子Ang-(1-7)を生成する。

B. 研究方法

指尖壊死またはその既往のある末梢循環不全16例、肺動脈性高血圧症（PAH）5例からなる18人（うち3人は両病変あり）の血清を収集した。18人の基礎疾患：MCTD（8）、SLE（4）、強皮症（6）。Raynaud症状のみの患者は収集しなかった。さらに、血管病変のない対照患者24人（MCTD 1、SLE 21、強皮症 2）、および健常者（高血圧も無し）28人の血清を同時に

収集した。ヒトACE2精製蛋白を標的としたELISAで、抗ACE2抗体を測定した。血清ACE2活性を、蛍光標識した基質acetyl-YVADAPK-(2,4-dinitrophenyl)-OH（R&D Systems）を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、院内倫理審査会の承認を受けた。血液検体は、患者・本人すべてで書面による説明と同意取得を行なった。

C. 研究結果

抗ACE2-ELISA値は、血管病変（末梢循環不全またはPAH）患者18人中17人（94%）で、健常者28人で決定したベースライン値（OD <0.1 ）を越え、その値（OD 0.2～2.0、平均0.6）は、対照患者24人の値（OD 0～0.4、平均 0.2）より明確に高かった（ $p<0.0005$ ）。血管病変患者の血清ACE2活性の測定値は、抗ACE2-ELISA値と逆相関し（ $R^2=0.72$ ）、有意な低下者12/18（67%）、半減以下が8/18（44%）を占めた。とくに2人の患者（Pt1、Pt5）の活性は健常者レ

ファラリス活性の10~20%であった。この2人を含む患者5人の血清ACE2蛋白量は、健常対照2人のACE2蛋白量と同程度であった（免疫沈降後の電気泳動バンド定量による）。指尖壊死SLEのPt1は、ステロイド+血漿交換治療開始2ヶ月後に、抗ACE2-ELISA値低下（OD 2.0→0.3）、ACE2活性上昇（レファランス値の18%→71%）を示した。

血清抗ACE2抗体が、ACE2活性を阻害することの直接的証明：

抗ACE2-ELISA値高値の3患者、および健常3人の血清を、protein G sepharoseカラムにかけ、Glycine-HCl（pH 2.7）で溶出、1M Tris-HCl（pH 8.0）で中和し、IgGフラクションを得た。これら6つのIgG分画を、ACE2活性測定系に作用させた結果、患者IgG分画は、ACE2活性を明確に低下させ、健常者IgG分画は影響を与えなかった。

D. 考察

我々は予備的検討で、指尖壊死のため入院したSLE（Pt1）、重症PAHで入院した強皮症（Pt5：その後に突然死）の血清で、抗ACE2-ELISAでの異常高値とACE2活性欠損を認めたことから、本研究を企画した。膠原病血管病変の患者を可能な限り収集し、並行して血管病変のない対照患者を収集する、という方法をとった。したがってMCTD、SLE、強皮症の各疾患における、抗ACE2抗体陽性者の比率は算定できなかったが、抗ACE2抗体は、疾患横断的に膠原病血管病変を特徴づけると考えられた。抗ACE2抗体高値の強皮症患者1人は、末梢循環不全のほかに強皮症腎の既往があったので、同抗体が、強皮症腎にも関連する可能性について、今後検討する意義がある。

上記の結果を得た後、新たに血清を入手した、血管病変のない8人（MCTD4、強皮症4）でELISA陰性、指尖壊死の強皮症1人で高値（OD 0.9）という上記結果を支持する追加データを得た。この新たに入院した指尖壊死患者では、この種の患者に対する通常治療と同様に免疫抑制治療を加えず、保存治療のみで改善しつつあるので、末梢循環不全の悪化・改善が、抗ACE2抗体価のみで規定されるとは考えにくい。一方で、膠原病PAHに免疫抑制治療が効く理由のひとつが、抗ACE2抗体価を抑制することにある、という可能性はあり、今後検討する意義のある課題と思われる。

E. 結論

今回、初めて同定された抗ACE2自己抗体は、ACE2活性を阻害すること、および膠原病患者の末梢循環不全とPAHの病因となっている可能性がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

海外

1. Takahashi Y, Mizoue T, Suzuki A, Yamashita H, Kunimatsu J, Itoh K, Mimori A : Time of initial appearance of renal symptoms in the course of systemic lupus erythematosus as a prognostic factor for lupus nephritis. *Modern Rheumatol* 19:293-301, 2009
2. Kubota K, Ito K, Morooka M, Mitsumoto T, Kurihara K, Yamashita H, Takahashi Y, Mimori A. Whole-body FDG-PET/CT on rheumatoid arthritis of large joints. *Ann Nucl Med*. 23:783-91, 2009

国内

1. 高橋裕子、越智久さこ、柳井敦、山下裕之、伊藤健司、三森明夫：10年間持続した活動性がTocilizumab治療で寛解した成人発症Still病の1例. *日内会誌* 99(1): 130-132, 2010

2. 学会発表

海外

1. Hiroyuki Yamashita, Kazuo Kubota, Yuko Takahashi, Junwa Kunimatsu, Arisa Shimizu, Toshiki Eri, Kenji Itoh, Akio Mimori: Value of PET/CT in clinical practice in patients with possible spondyloarthritis. The 77th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Philadelphia, Oct, 2009
2. Yuko Takahashi, Shiori Haga, Hiroyuki Yamashita, Yukihito Ishizaka, Akio Mimori: Autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with rheumatic diseases. The 77th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Philadelphia, Oct, 2009

国内

1. 山下裕之、窪田和雄、高橋裕子、鈴木暁岳、國松淳和、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫：血清反応陰性脊椎関節炎の診断における18-FDG-PET/CTの有用性（第2報）. 第53回日本リ

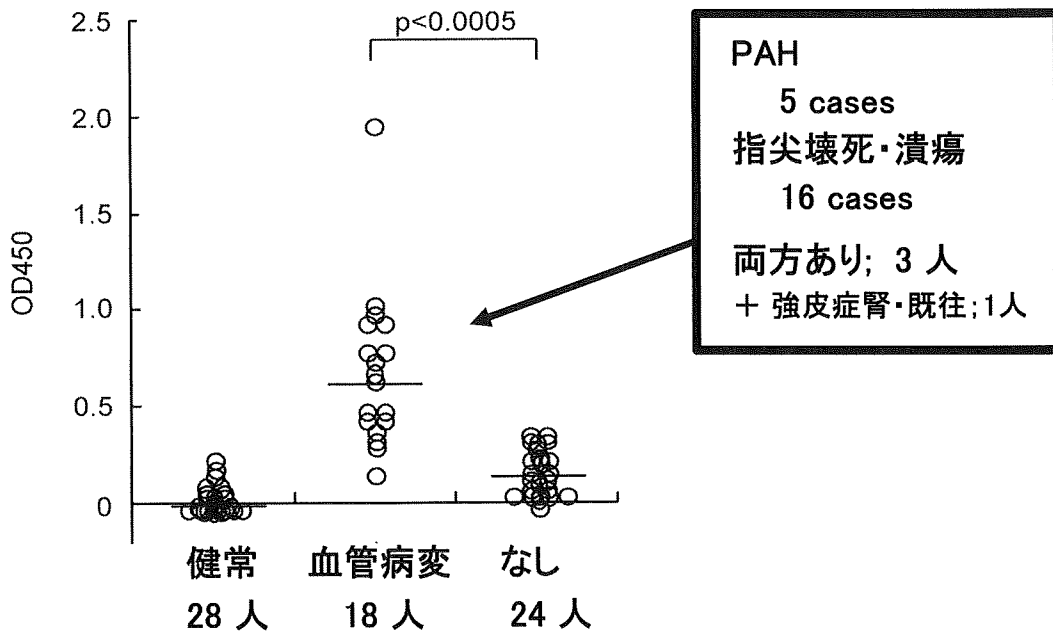
ウマチ学会、東京、4月、2009

2. 山下裕之、高橋裕子、鈴木暁岳、國松淳和、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫： 膠原病科における不明炎症の原因集計；悪性リンパ腫の重要性第53回日本リウマチ学会、東京、4月、2009
3. 高橋裕子、山下裕之、國松淳和、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫： 遅発ループス腎炎に対するシクロホスファミド治療の有効性評価. 第53回日本リウマチ学会、東京、4月、2009
4. 高橋裕子、関谷文男、松平蘭、山路健、田村直人、高崎芳成、三森明夫： 混合性結合組織病に対する初期ステロイド治療の意義（第2報）. 第53回日本リウマチ学会、東京、4月、2009
5. 高橋裕子、山下裕之、伊藤健司、杉山温人、三村俊英、三森明夫： 顕微鏡的多発血管炎とWegener肉芽腫症の予後決定因子. 第53回日本リウマチ学会、東京、4月、2009
6. 國松淳和、廣江道昭、山下裕之、高橋裕子、伊藤健司、三森明夫： SLEに伴う心筋障害3例にみられた異なる病態生理. 第53回日本リウマチ学会、東京、4月、2009
7. 國松淳和、山下裕之、高橋裕子、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫： リウマチ性多発筋痛症の鑑別診断；初診例の集計. 第53回日本リウマチ学会、東京、4月、2009
8. 江里俊樹、細川美里、山下裕之、高橋裕子、伊藤健司、三森明夫： Sjogren症候群に合併した末梢神経障害の3例. 第53回日本リウマチ学会、東京、4月、2009
9. 細川千里、山下裕之、高橋裕子、國松淳和、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫：
早期診断した大動脈炎の画像診断における治療成績の検討. 第53回日本リウマチ学会、東京、4月、2009

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

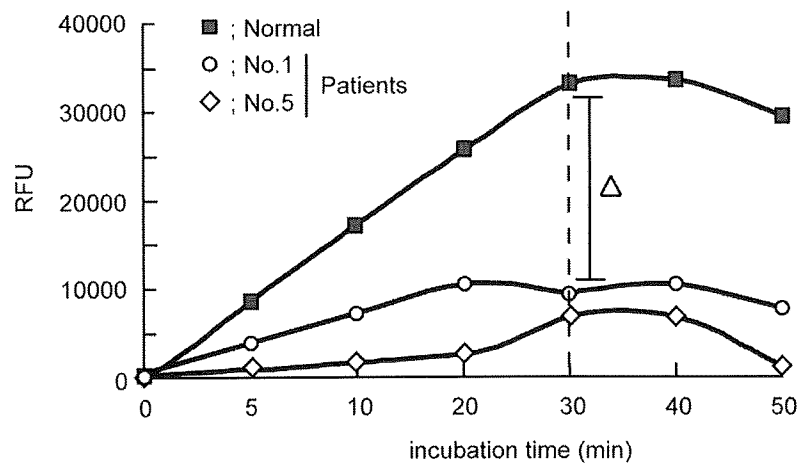
血清抗 ACE2 抗体価 (ELISA) ; SLE、強皮症、MCTD



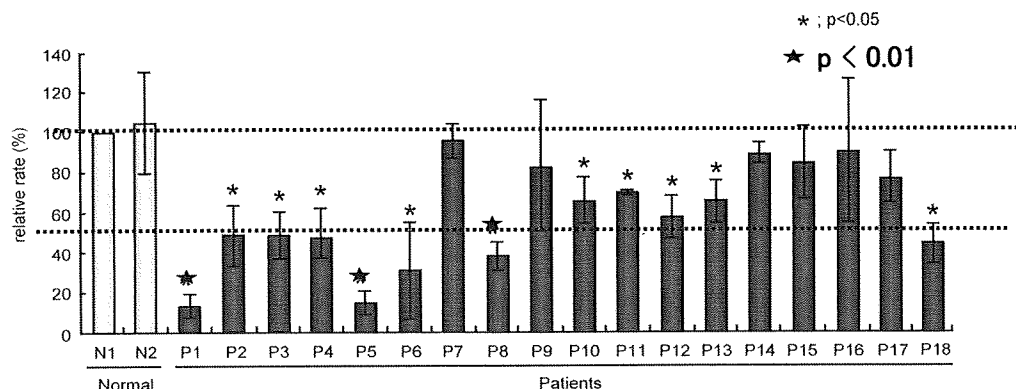
血清 ACE2 活性の測定法

蛍光標識・基質 acetyl-YVADAPK-(2,4-dinitrophenyl)-OH

(R&D Systems)



患者群の血清 ACE2 活性

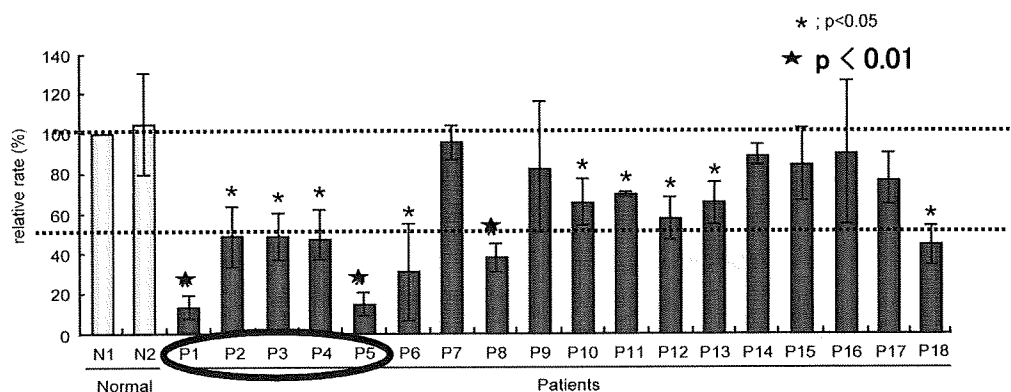


健常者

constrictive vasculopathy, 全18人

有意な低下者 12/18 (半減以下 8人)

患者群の血清 ACE2 活性



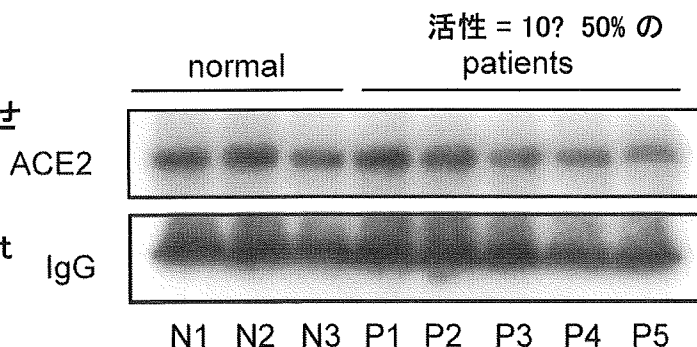
健常者

constrictive vasculopathy, 全18人

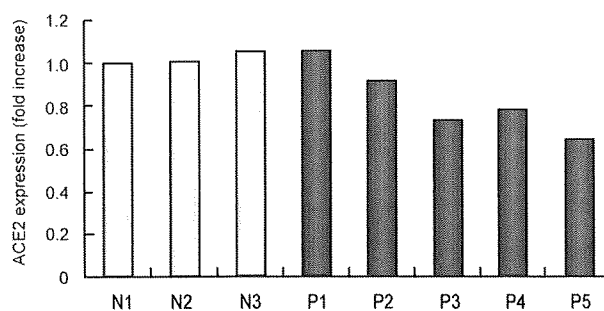
有意な低下者 12/18 (半減以下 8人)

血清 ACE2 の蛋白量は、低下していない

各人の血清に、市販の
抗ACE2 抗体を作用させ
免疫沈降後に
SDS-PAGE/ Western blot
IgG-heavy chain と比較

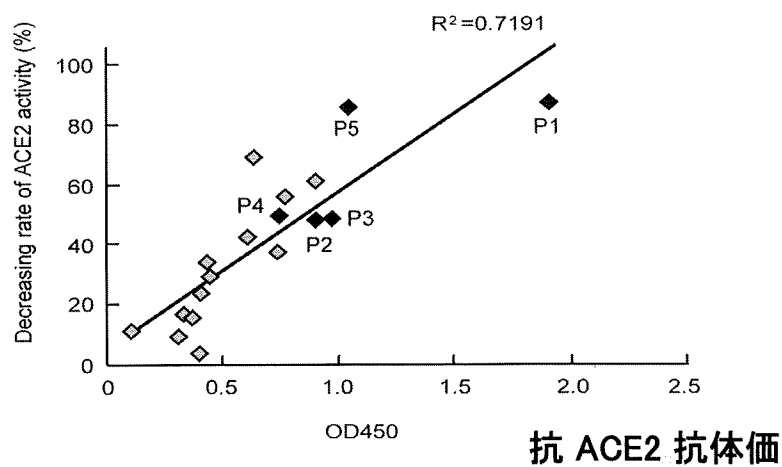


Densitometry



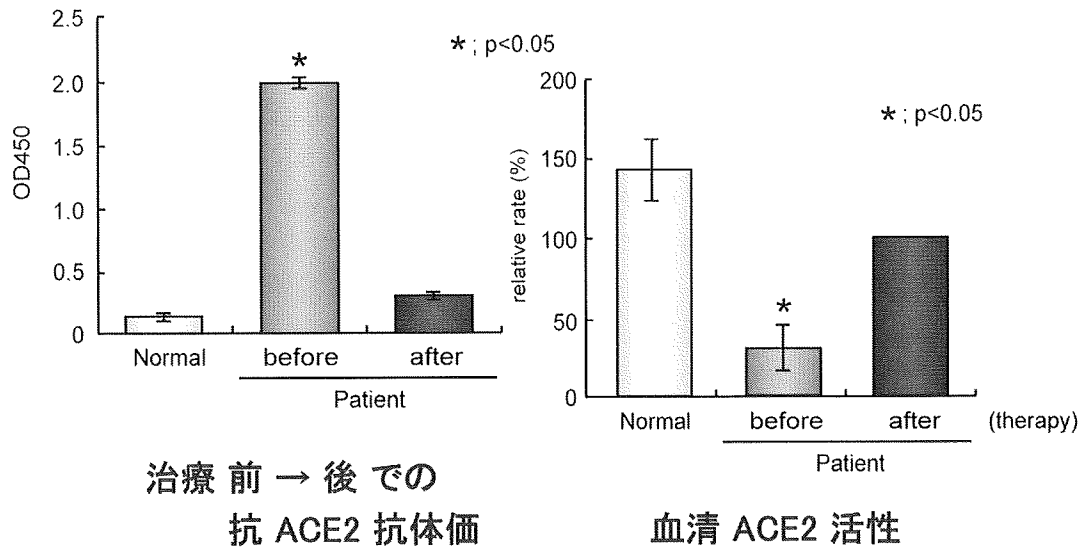
血管病変患者 18 人

ACE2 活性 低下率



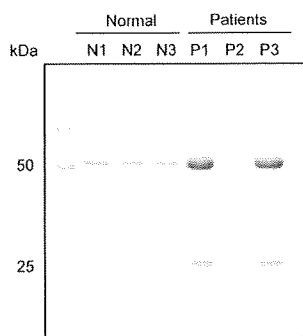
25才 SLE: 指尖壊死

ステロイドパルス、血漿浄化(DFPP)、局所処置



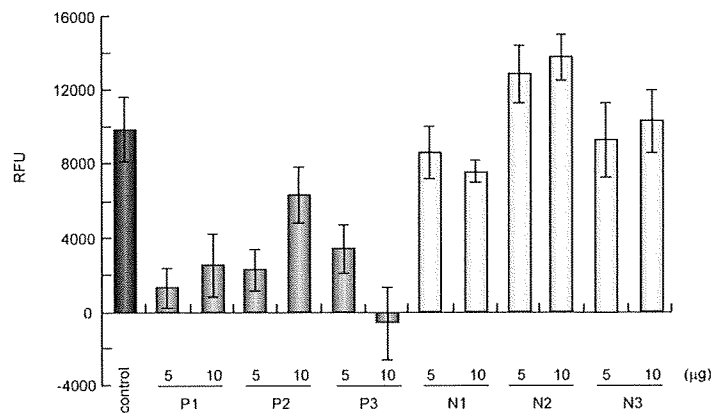
抗ACE2抗体陽性者の IgG 分画が、ACE2活性を阻害した

IgG分画のSDS-PAGE (CBB染色)



P1; SLE/ 指尖壊死
P2; 強皮症/ PAH
P3; PAH/ 強皮症腎

ACE2活性の測定



protein G beads から、IgG を溶出した

リコンビナントACE2、蛍光基質およびIgG画分を混合し、37°Cで120分間反応させた。

MCTDにおける肺動脈性肺高血圧症スクリーニング法の検討

研究分担者： 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科・准教授
研究協力者： 白井悠一郎 慶應義塾大学医学部・大学院生

研究要旨

肺動脈性肺高血圧症（PAH）はMCTDにおける難治性病態のひとつである。近年、肺動脈拡張作用を持つ新規分子標的薬が導入されたが、現状でも5年生存率は80%に満たない。さらなる予後改善には早期診断・治療介入が必須であり、そのためにはスクリーニングによりPAH疑い例を的確に抽出することが求められる。そこで、MCTDおよび強皮症患者における最適なPAHスクリーニング法を確立することを目的とした。MCTD22例と強皮症79例を対象とし、自覚症状、身体所見、胸部X線、安静時心電図、肺機能検査（%VC、%DLco）、血漿BNP、経胸壁心エコー（ドプラも含む）を実施した。高度の拘束性換気障害（%VC<65%）もしくは心筋障害、弁膜症などの左心疾患を有する例を除外した83例のうち、ドプラエコーによる推定収縮期肺動脈圧（sPAP）が37mmHg以上の5例で右心カテーテルを実施し、そのうち1例がPAHと診断された。新規診断例にPAH既診断13例を加えた14例（PAH群）とPAHなしが確認された82例（非PAH群）で各スクリーニング検査結果を比較した。その結果、労作時息切れ、下腿浮腫、肺性II音亢進、胸部X線上の左第2弓拡大、心電図右心負荷・肥大、%VC/%DLco2.0以上、%DLco48%未満、BNP90pg/ml以上、ドプラエコーによる推定sPAP37mmHg以上はPAHで非PAHに比べて有意に高率であった（すべてP<0.01）。また、PAHと非PAHを最適に層別化するカットオフとして、%DLco48%、推定sPAP37mmHg、血漿BNP90pg/mLが抽出された。これら所見を1項目以上有するとPAHを有するオッズ比が58、2項目以上で254、3項目全てを有すると520と上昇した（すべてP<0.0001）。MCTD/強皮症におけるPAHスクリーニングでは、自覚症状、身体所見、胸部X線、心電図、心エコーに加えてDLco、BNP、ドプラエコーによる推定sPAPも併せて実施すべきと考えられた。

A. 研究目的

肺動脈性肺高血圧症（PAH）はMCTDにおける主要な死因のひとつで、無治療であれば診断5年以内に80%以上の例が死亡する進行性かつ治療抵抗性の難治性病態である。近年、エポプロステノール、ベラプロスト、ボセンタン、シルデナフィル、タダラフィルなど肺動脈拡張作用を持つ新規分子標的薬が次々に診療に導入されたが、現状でも5年生存率は80%に満たない。その理由のひとつとして、既存の薬剤はPAHの本態である血管平滑筋や内皮細胞の増殖を十分に制御できないことが指摘されている。また、現状でも、診断時にすでにWHO機能分類クラスIII以上に進行している症例が過半数を占める。そこで、予後をさらに改善する方法のひとつとして早期診断・治療介入の重要性が指摘されている。MCTDや強皮症患者はPAHのハイリスク群であることから、自

覚症状の有無にかかわらず積極的なスクリーニングが推奨されている。1991年に厚生省研究班により作成された「MCTDにおける肺高血圧症診断の手引き」の臨床および検査所見では、自覚症状（労作時の息切れ）、身体所見（胸骨左縁収縮期拍動、第2肺動脈音の亢進）、胸部X線（肺動脈本幹の拡大あるいは左第2弓突出）、安静時心電図（右室肥大あるいは右室負荷）、経胸壁心エコー（右室拡大あるいは右室負荷）が挙げられている。近年、PAHのスクリーニングに有用な検査項目として肺機能検査（%VC、%DLco）および血漿BNPまたは血清NT-proBNPが報告されている。また、経胸壁心エコー上のドプラ法による三尖弁逆流ジェットを測定することにより求める推定三尖弁圧較差や収縮期肺動脈圧（sPAP）の有用性も知られている。最新のヨーロッパ循環器・呼吸器学会によるガイドラインでは、sPAP36mmHg

以下では肺高血圧症（PH）の存在は否定的で、37-50mmHgではPHの可能性があり、50mmHgを越えるとPHが存在する可能性が高いとされる（心エコーで右心負荷所見が明らかでない場合）。しかし、現状でMCTDをはじめとした膠原病患者におけるPAHのスクリーニングに用いる検査項目について明確なエビデンスはない。また、%DLco、BNP、ドプラエコーによる推定sPAPの至適なカットオフも明らかでない。そこで、本研究ではMCTDおよび強皮症患者を対象に、自覚症状の有無に関係なく各種スクリーニングを行うことで最適なPAHスクリーニング法を検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

平成21年4月から12月までに慶應義塾大学病院を受診したPHの診断を受けていない連続101症例を対象とした。内訳は、厚労省診断基準を満たすMCTD患者22例、ACR分類基準を満たす強皮症患者79例であった。また、過去にPAHと診断されたMCTD7例、強皮症6例を過去対照群とした。診断時のWHO機能分類はクラスIIが2例、IIIが10例、IVが1例であった。

(2) PHのスクリーニング

全例で自覚症状（労作時の息切れ、易疲労感）、身体所見（聴診および右心不全徴候）、胸部X線、安静時心電図、肺機能検査（%VC、%DLco）、血漿BNP、経胸壁心エコー（ドプラも含む）を実施した。ドプラエコーで推定sPAPが37mmHg以上もしくは他のスクリーニング項目でPHの存在が疑われた例では右心カテーテルによる確定診断を実施した。また、過去対照群ではPAH診断時のスクリーニング検査結果を履歴的に調べた。

(3) 統計学的検討

2群間の比較には χ^2 二乗検定またはUnpaired t検定を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究プロトコールは学内の倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

間質性肺疾患（ILD）による高度の拘束性換気障害（%VC<65%）もしくは左心疾患（心筋障害、弁膜症）

を有するMCTD4例、強皮症14例を除外した。残り83例（男性6、女性77）のMCTD／強皮症発症年齢は47.9±15.4歳、罹病期間は139±116ヶ月であった。労作時息切れは31例（37%）、下腿浮腫9例（11%）、肺性II音亢進3例（4%）、胸部X線上肺動脈本幹拡大/左第2弓突出0例、心電図上右室肥大/右室負荷1例（1%）に認めた。さらに、%VC/%DLco比が1.6を越える例が45例（54%）、2.0を越える例が12例（14%）、%DLco80%未満79例（95%）、%DLco60%未満47例（57%）、BNP高値（>30pg/mL）33例（40%）、心エコー上右室拡大/右室負荷0例、ドプラエコーによる推定sPAP37mmHg以上5例（6%）であった。推定sPAPが37mmHg以上の5例で右心カテーテルを実施し、そのうち抗セントロメア抗体陽性強皮症1例がPHと診断された（mPAP35mmHg）。肺動脈楔入圧正常

（9mmHg）、換気血流シンチグラム上慢性血栓塞栓症は否定的なことからPAHと診断した。本例では、労作時の息切れがあり（WHOクラスII）、聴診上肺性II音亢進、心電図で右心負荷所見、%VC/%DLco比は3.7、%DLco24%、BNP93pg/ml、ドプラエコーによる推定sPAPは45mmHgであったが、胸部X線では明らかなPH所見は認めなかった。

そこで、新規診断1例にPAH過去対照13例を加えた14例（PAH群）とPAHなしが確認された82例（非PAH群）で各スクリーニング所見について比較した（表1）。その結果、労作時息切れ、下腿浮腫、聴診上肺性II音亢進、胸部X線上肺動脈本幹拡大/左2弓突出、心電図上右室拡大/右室負荷、%VC/%DLco比>1.6および2.0、%DLco60%未満、BNP>30pg/mL、ドプラエコーによる推定sPAP37mmHg以上はすべてPAH群において非PAH群に比べて有意に高率であった（すべてP<0.004）。

PAHと非PAHを最適に層別化する%DLco、推定sPAP、BNPのカットオフを求めると、%DLco48%（感度100%、特異度80%）、推定sPAP37mmHg（感度100%、特異度95%）、BNP90pg/mL（感度93%、特異度95%）が抽出された。これら所見を1項目以上有するとPAHが存在するオッズ比が58（95%CI 7-478）、2項目以上で254（95%CI 26-2450）、3項目全てで520（95%CI 43-6154）であった（すべてP<0.0001）。

D. 考察

今回の横断的検討により、従来よりPHのスクリーニングとして用いられている労作時息切れ、聴診所見、胸部X線、心電図、%VC/%DLco比、%DLco、BNP、ドプラエコーによる推定sPAPはPAHと非PAH症例の層別化に有用であることが確認された。しかし、労作時息切れ、聴診所見、胸部X線、心電図や心エコーにおける右心負荷所見はPHがある程度進行した症例で検出されるものの、軽症もしくは早期例での検出頻度は低い。そのため、より早期にPHを検出することができるスクリーニング法の導入が必要である。その候補として、DLco、BNP、ドプラエコーによる推定sPAPが挙げられているが、いずれの項目も測定結果がPH以外の要因に影響される。DLcoはILDによる肺線維化を反映して減少し、BNPは左心機能や腎機能の障害でも上昇する。また、ドプラエコーによるsPAPは右心カテーテルにより測定したmPAPと相関はするものの、結果が乖離することも少なくない。そのため、PHの存在が強く疑われる症例を抽出するカットオフについてコンセンサスが得られたものはなかった。今回の検討により、日本人MCTD/強皮症におけるカットオフとして%DLco48%、BNP90pg/mL、推定sPAP37mmHgが得られた。今後の多数例を用いた検証が必要だが、労作時息切れ、聴診所見、胸部X線、心電図、心エコーにおける右心負荷所見がなくても、これら1項目でも満たす症例については右心カテーテル検査を考慮すべきと考えられる。

本研究における制約として以下の2つが挙げられる。まず、ILDによる高度の拘束性換気障害もしくは心筋障害、弁膜症など左心疾患を有する例を最初に除外している。実際にはILDや左心疾患を有する例がPAHを併発する場合もあり得る。また、高度の拘束性換気障害を%VC<65%で規定しているが、その根拠は現時点で明確でない。MCTD/強皮症においてはILDに伴うPHを併発することがあり、%VC<65%の症例についても同様にPHの各種スクリーニングを実施し、PHを疑う所見を認めれば右心カテーテル検査を実施すべきと考えられる。2点目は今回のPAH群の多くは診断時にWHO機能分類クラスIII以上の進行例であり、早期例を捉えるスクリーニング項目のカットオフを設定するための対照として不適切な可能性がある。その点については、今後クラスI、IIの症

例を蓄積して再検討する必要がある。

E. 結論

MCTD/強皮症患者におけるPAHスクリーニングでは自覚症状、身体所見、胸部X線、心電図、心エコーに加えてDLcoを含む肺機能検査、BNP、ドプラエコーによる推定sPAPも併せて実施すべきである。スクリーニングによりPHの存在が疑われた症例では右心カテーテルによるPHの確定診断および分類を行うことが必要である。PAHを早期に診断し、治療介入することで、MCTD患者のさらなる予後改善につながる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato S, Hoshino K, Satoh T, Fujita T, Kawakami Y, Fujita T, Kuwana M. RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: association with rapidly progressive interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 2009; 60(7): 2193-2200.
2. Fertig N, Domsic RT, Rodriguez-Reyna T, Kuwana M, Lucus M, Medsger TA Jr, Feghali-Bostwick CA. Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: A new serologic marker associated with pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009; 61(7): 958-965.
3. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J. Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* 2009; 19(5): 530-535.
4. 桑名正隆. 肺動脈性肺高血圧症と膠原病. 血栓と循環 17(3): 69-74, 2009.

2. 学会発表

1. Kuwana M: Early identification of PAH in patients with connective tissue disease-To get the best results-. 6th Scientific Symposium; Goal-oriented therapy based on Experience and Evidence: First line & Combination (Tokyo). 2009. 6.

2. Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Satoh T, Kuwana M: Clinical and immunological characteristics of Japanese patients with connective tissue disease and pulmonary arterial hypertension. 1st Systemic Sclerosis World Congress (Florence). 2010. 2.
3. 桑名正隆: カトレア教育研修講演; 膠原病性肺高血圧症の早期診断のポイント. 第53回日本リウマチ学会総会 (東京). 2009. 4.
4. 桑名正隆: 強皮症の新たな治療戦略. 第4回癩痕・ケロイド治療研究会 (東京). 2009. 8.
5. 桑名正隆: 膠原病関連肺高血圧症. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 (秋田). 2009. 10.

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。

表1: PAH群と非PAH群における各種スクリーニング項目の比較

臨床所見	PAHなし (n = 82)	PAHあり (n = 14)	P
CTD発症年齢 (歳)	47.8 ± 15.5	42.2 ± 10.2	NS
罹病期間 (ヶ月)	137 ± 115	216 ± 110	0.02
労作時息切れ (%)	30 (37%)	14 (100%)	<0.001
下腿浮腫 (%)	8 (19%)	11 (79%)	<0.001
聴診上IIP音亢進	2 (2%)	12 (86%)	<0.001
CXR (肺動脈本幹拡大/左第2弓突出)	0	10 (71%)	<0.001
ECG (右室肥大/右室負荷)	0	9 (64%)	<0.001
%VC/%DLco比>1.6	44 (54%)	14 (100%)	0.002
%VC/%DLco比>2.0	11 (13%)	12 (86%)	<0.001
%DLco	58.7 ± 13.0	31.5 ± 7.3	<0.001
%DLco<80%	78 (85%)	14 (100%)	NS
%DLco<60%	46 (56%)	14 (100%)	0.004
BNP (pg/mL)	31.4 ± 27.9	303.0 ± 219.2	<0.001
BNP >30 pg/mL	32 (39%)	14 (100%)	<0.001
sPAP (mmHg)	23.1 ± 8.6	76.6 ± 24.3	<0.001
sPAP ≥37 mmHg	4 (5%)	14 (100%)	<0.001

NS=not significant (P>0.05)

混合性結合組織病(MCTD)に合併した肺高血圧症(PH)に関する研究

研究分担者： 吉田 俊治 藤田保健衛生大学医部内科・教授

研究協力者： 深谷 修作 藤田保健衛生大学医部内科・准教授

研究要旨

MCTDにはPHが高率に合併する。しかし、MCTDに合併するPHの発症時期、その経過は依然明らかではない。特に、PHの徴候を認めず推定肺動脈収縮期圧（ePAP）が40mmHg以下の軽症例の経過は、PHの発症様式をみる上で興味深い。そこでePAPが40mmHg以下で無症候の症例も含めたPH患者のePAPの経時的変化を観察することとした。対象は本研究班の臨床系分担研究者が所属する医療機関および以前から本調査にご協力いただいている加古川病院（計11施設）において今までの調査で登録された（ePAPが一度でも20mmHg以上となった）患者86例中、死亡が確認されていない81例である。方法はアンケート法により、質問内容は直近のePAP、PHに由来する徴候の有無、右心カテーテル検査結果、転帰などである。加古川病院を含む7施設68例（84%）の回答を得た。PHへの進展に関しては過去の調査で登録されたPHあるいはPHが疑われる患者86例、ePAPの推移は今回の調査結果を含め、複数回のePAP測定が行われている55例で検討した。PHが疑われる患者19例中3例がPHの状態になっていた。調査のたびにPHへの進展症例が確認され、MCTDでは定期的なPHに対するスクリーニング検査が必要と考えられた。また、初回調査でePAPが40mmHg未満の症例のうち、30mmHg以上の患者24例中7例が40mmHg以上となり、30mmHg未満の患者では10例中1例が40mmHg以上になっただけであり、特にePAP30mmHg以上の患者ではPHの悪化に注意が必要と考えられた。

A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）には高率に肺高血圧症（PH）の合併を認める。当初の膠原病患者でのPH合併率の調査では合併率は数%と報告されている。これは主治医がPHの合併を認識している患者がカウントされているのみで、無症候のPH患者が存在すれば、それらの患者はカウントされていない。実際、PHの徴候の有無に関係なく、心エコーを含めてPHの検索をするとその合併率は約2倍となる。これら無症候のPH例では推定肺動脈収縮期圧（ePAP）は40mmHg以下が多数を占めることも判明している。

しかし、MCTDに合併するPHの発症時期、その経過は依然明らかではない。特に、PHの徴候を認めずePAPが40mmHg以下の軽症例の経過はPHの発症様式を観察する上で興味深い。そこでePAPが40mmHg以下で無症候の症例も含めたPH患者のePAPの経時の変化を観察することとした。

B. 研究方法

対象：本研究班の臨床系分担研究者が所属する医療機関および以前から本調査にご協力いただいている加古川病院（計11施設）において過去の調査で登録された（ePAPが一度でも20mmHg以上となった患者）86例中、死亡が確認されていない81例を対象とした。

方法：アンケート法により、質問内容は直近のePAP、PHに由来する徴候の有無、右心カテーテル検査結果、転帰などである。

（倫理面への配慮）

個人情報保護の観点より、調査票の個人の特定に関連する情報は、生年月日、性別、各医療機関におけるID番号あるいは各医療機関において連結可能な番号とした。

C. 研究結果

加古川病院を含む7施設68例（84%）の回答を得た。PHへの進展に関しては現在までに登録された86例で検討した。また、ePAPの推移は今回の調査結果