

図 2. 血清-抗 U1RNP 抗体陽性 NPSLE 例における CSF 中の液性因子
臨床的にステロイド精神病と診断された患者に比し、NPSLE 患者では CSF 中 MCP-1 が有意に高濃度であった。

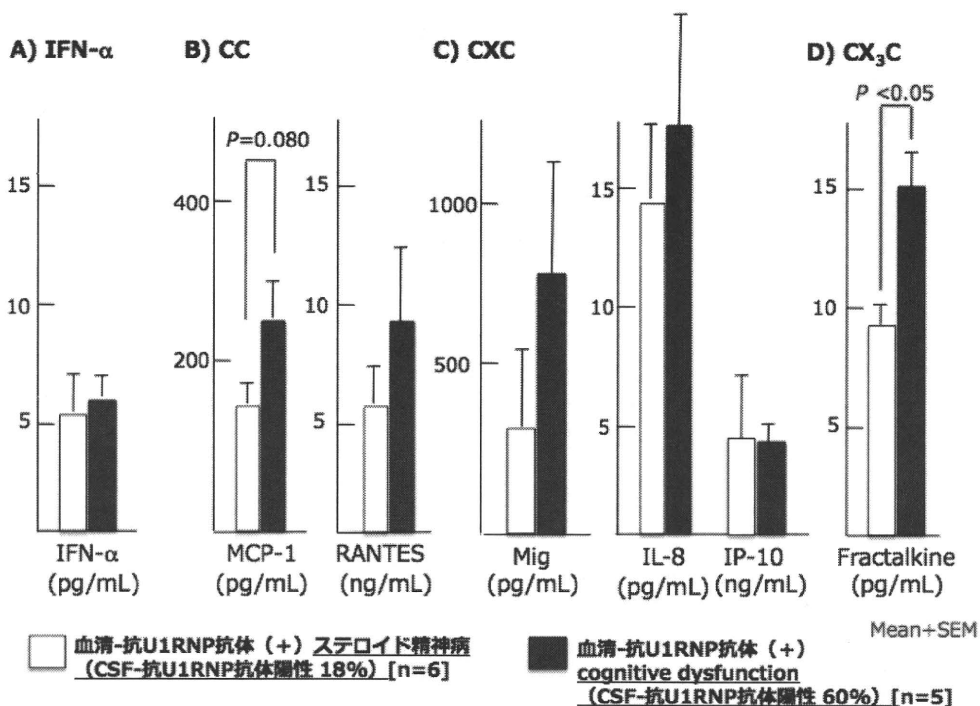


図 3. 血清-抗 U1RNP 抗体陽性 cognitive dysfunction 症例における CSF 中の液性因子
NPSLE のうち、比較的高頻度であった cognitive dysfunction を抽出してステロイド精神病と CSF 中のケモカインを比較した。cognitive dysfunction 患者において、CSF 中の MCP-1 は高値の傾向を認め、また fractalkine は有意に高値であった。

混合性結合組織病(MCTD)にともなう肺高血圧症(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）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 を明らかにすることを目的とした。また、食道にも MCTD 患者血清が高い反応性を示すため食道の病態にも自己抗体が関連すると考え、抗原の探索を行った。

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。また、剖検検体を用いた解析から、MCTD 患者の食道には抗体の沈着が認められ、また食道に MCTD 患者血清が高い反応性を示すことが明らかになったため、MCTD 患者の食道の病態にも自己抗体が関連すると考え、抗原の探索を行った。

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。食道については、RNA を購入し、cDNA ライブラリーを構築して、HMVEC-L と同様の実験を行った。

(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。剖検検体については倫理委員会の承認を受けたのち実験に供した。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イムノ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。この中には SNRPF も含まれていた。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々人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)。

MCTD 患者の食道では、筋層に免疫グロブリンの沈着が認められた (図 4)。また、MCTD 患者血清は、食道平滑筋や静脈壁の中膜平滑筋、アウエルバッハ神経叢の神経節細胞に高い反応性を示した (図 5)。食道の cDNA ライブラリーを用いた SEREX では、購入した食道の RNA に免疫グロブリンの mRNA が含まれており、それに由来する組換え蛋白質をスクリーニングの際の二次抗体が認識してしまい、期待するスクリーニング効率が得られなかった。

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 ウェ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 SNRPF を含め、複数の RNA スプライシングに関連する蛋白質や coiled-coil ドメインをもつ蛋白質も含まれていた。しかし、肺微小血管内皮細胞に特異的な抗原候補は得られず、肺微小血管内皮細胞と皮膚微小血管内皮細胞や臍帯静脈血管内皮細胞などの細胞とのサブトラクションライブラリーを用いたスクリーニングが必要と考えられた。

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

1. 論文発表

- 1) Takamiya M, Fujita S, Niitsu H, Aoki Y, Kanno H, Sawai T: A Case of Takayasu arteritis complicated by right atrium perforation and injuries of the right common iliac artery and vein caused by cannulation for percutaneous cardiopulmonary support. *Am J Forensic Med Pathol.* 31(1):72-6(2010)
- 2) Yamauchi K, Sasaki N, Niisato M, Kamataki A, Shikanai T, Nakamura Y, Kobayashi H, Suwabe A, Kanno H, Sawai T and Inoue H: Analysis of pulmonary allergic vasculitis with eosinophil infiltration in asthma model of mice. *Exp Lung Res.* 36: 227-36(2010)
- 3) Kurose R, Ichinohe S, Tajima G, Horiuchi S, Kurose A, Sawai T, Shimamura T: Characterization of human synovial fluid cells of 26 patients with osteoarthritis knee for cartilage repair therapy. *Int J Rheum Dis.* 13(1):68-74(2010)
- 4) 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、村上賢也、澤井高志：関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現の変化の解析. *岩手医誌.* 62(2): 85-94(2010)
- 5) 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、村上賢也、澤井高志：関節リウマチ滑膜における Bv8 の発現. *岩手医誌.* 62(1): 37-45(2010)
- 6) 石黒直樹、岩館克治、澤井高志：実験的変形性膝関節症に対する高分子量ヒアルロン酸 (平均分子量 270 万 HA) スベニールと架橋型ヒアルロン酸 (Hylan G-F20) SYNVISCO の作用比較. *関節外科.* 29(12): 112-124(2010)
- 7) 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(3): 224-233(2010)
- 8) 村上賢也、鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志：関節破壊の病理組織学的特徴. *日本臨床* 68 (増刊号 5) 「関節リウマチ (第 2 版) - 寛解を目指す治療の新時代 -」: 65-70(2010)
- 9) 宇月美和、鎌滝章央、佐々木喜子、徳永勢二、澤井高志：関節リウマチにおけるヒアルロン酸の合成と分解について. *臨床リウマチ.* 22: 337-43(2010)

2.学会発表

- 1) 澤井高志：RAにおける骨・軟骨破壊の病理。
第54回日本リウマチ学会総会・学術集会／第19回国際リウマチシンポジウム。4月。神戸(2010)
- 2) 村上賢也、澤井高志、鎌滝章央、嶋村 正：関節リウマチの慢性化機構におけるCD14陽性細胞の役割。第54回日本リウマチ学会総会・学術集会／第19回国際リウマチシンポジウム。4月。神戸(2010)
- 3) 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、嶋村 正、澤井高志：IL-6刺激によりRA患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞におけるADAMTS-4の発現が亢進した。第54回日本リウマチ学会総会・学術集会／第19回国際リウマチシンポジウム。4月。神戸(2010)
- 4) 宇月美和、澤井高志、益田郁子：CPPD結晶沈着症患者の関節組織におけるANK陽性細胞の特徴。第54回日本リウマチ学会総会・学術集会／第19回国際リウマチシンポジウム。4月。神戸(2010)
- 5) 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、嶋村 正、澤井高志：Bv8の関節リウマチ滑膜における発現解析。第54回日本リウマチ学会総会・学術集会／第19回国際リウマチシンポジウム。4月。神戸(2010)
- 6) 中川倫代、菅野祐幸、澤井高志：EBウイルス小RNA発現T細胞株の培養血管内皮への接着。第54回日本リウマチ学会総会・学術集会／第19回国際リウマチシンポジウム。4月。神戸(2010)
- 7) 佐々木信人、山内広平、長島広相、古和田浩子、中館俊英、中村 豊、内海 裕、鈴木奈緒美、秋山貞親、小林 仁、井上洋西、澤井高志：アレルギー性血管炎における血管リモデリングに対するイマチニブの効果。第50回日本呼吸器学会学術講演会。4月。京都(2010)
- 8) 菅野祐幸、中川倫代、澤井高志：EBウイルス小RNA発現T細胞株の培養血管内皮への接着。第99回日本病理学会総会。4月。東京(2010)
- 9) 三浦康宏、千葉隆史、二宮由香里、澤井高志：Sjögren症候群の小唾液腺組織の炎症学的指標と臨床検査項目との検討。第99回日本病理学会総会。4月。東京(2010)
- 10) 澤井高志：RAにおける骨・軟骨破壊の病理学的機序。第18回リウマチ診療研究会・仙台。9月。仙台(2010)
- 11) 村上賢也、鎌滝章央、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチにおけるCD14陽性細胞の役割—蛍光二重染色および電子顕微鏡学的解析—。第17回自己免疫疾患研究会。11月。盛岡(2010)
- 12) 鎌滝章央、石田睦子、村上賢也、宇月美和、澤井高志：ゼラチンコートフィルムを用いた関節液の包括的なゼラチン分解活性測定法の開発。第25回日本臨床リウマチ学会。11月。東京(2010)

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

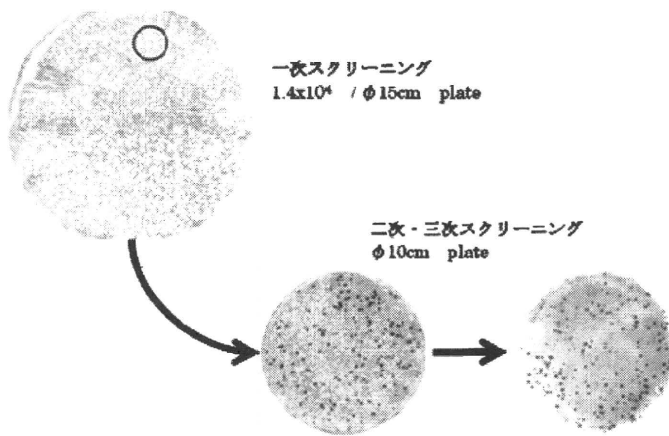


図1 SEREXの概要

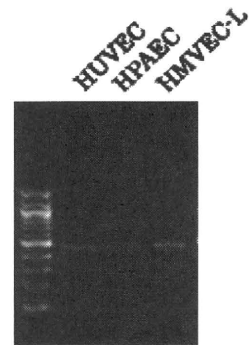


図2 SEREXにより得られた抗原候の様々な血管内皮細胞における発現の解析

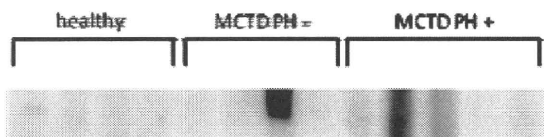


図3 SEREXにより得られた抗原候補組換え蛋白質と患者血清の反応性の確認

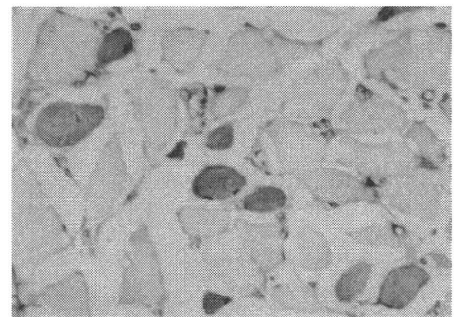


図4 MCTD患者食道筋層での免疫グロブリンの沈着

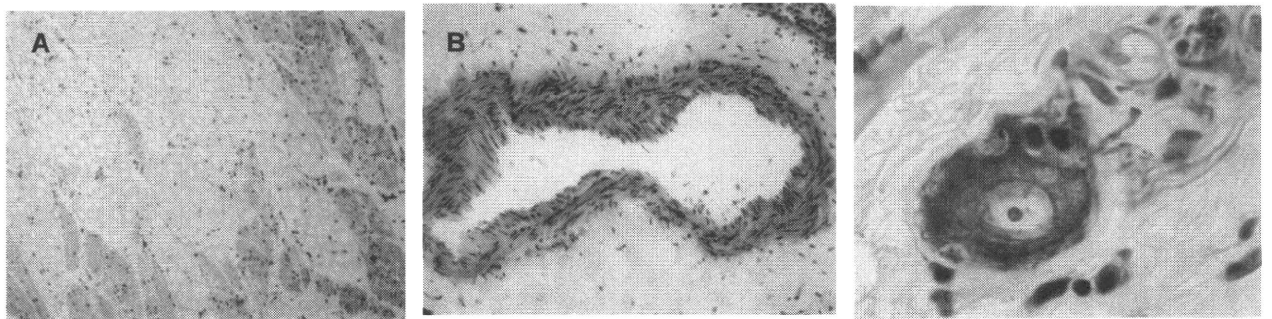


図5 MCTD患者血清から調製したIgGの組織反応性

A) 食道平滑筋 B) 静脈壁中膜平滑筋 C) アウエルパツハ神経叢神経節細胞

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・特任講師

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 抗体出現機序の解明は混合性結合組織病の病態理解と治療への応用に重要と考えられるが、解析に適した動物モデルを欠くためその検討が困難であった。そこで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。既に、この系を用いて、リンパ球減少下では CD4⁺CD25⁺T 細胞が新たな CXCR5⁺PD-1⁺follicular helper T 細胞サブセットに分化しうること、それに伴い germinal center が形成され、抗 RNP 抗体などの自己抗体産生を含む異常な B 細胞応答を惹起していることを明らかにしている。本年度は、抗 RNP 抗体産生に関わるこの新規 T 細胞サブセットの分化機構の解明を試みた。本研究により、この分化過程において、homeostatic proliferation や ICOS からのシグナルが促進的に関与する一方で、cognate な抗原認識は必要ではないこと、制御性 T 細胞が抑制的に作用していることも明らかとなった。本研究により明らかとなった自己抗体産生に関わる新たな follicular helper T 細胞サブセットとその分化経路の解明は、混合性結合組織病に対する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

難治性合併症を有する混合性結合組織病(MCTD)の治療開発には病態の解明が必須だが、それには疾患概念に密接に関連する抗 RNP 抗体の産生機序解明が重要である。これまでの本研究班での研究により、誘導条件を種々変更可能な抗 RNP 抗体産生マウスモデルを既に開発しており、この系では CXCR5⁺follicular T 細胞が分化し自己抗体産生を含む異常な B 細胞応答を惹起していることを明らかにしている。今回、本系における自己抗体産生に関わる新規 T 細胞サブセットの分化過程に関わる因子を明らかにして、自己抗体産生機序の全体像を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 抗 RNP 抗体産生マウスモデル

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(PC61)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 $40 \mu\text{l}$ 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 $2 \mu\text{g/ml}$ に希釈した anti-mouse IgG-Alexa 488 を $40 \mu\text{l}$ 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 $4 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に、 4°C 一晩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 $50 \mu\text{l/well}$ 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°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)、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。これを薄切し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 $5 \mu\text{g/ml}$ 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 2 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)、Ig-D(11-26c.2a)、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 follicular helper T 細胞(Tfh)の分化に関わる因子の解析

Cognate な抗原認識の関与

ニワトリ卵白アルブミン (OVA) を認識する単一 T 細胞受容体を発現する Rag2^{-/-}DO11.10 マウスの T 細胞 2.5×10^6 個/匹を、ノードマウスや、TCR α ^{-/-}マウス (ノードマウス同様に B 細胞は存在しているが $\alpha \beta$ T 細胞がないマウス) や TCR α ^{-/-}Ld-nOVA マウス (ノードマウス同様に B 細胞は存在しているが $\alpha \beta$ T 細胞がない OVA 発現マウス)に移入。ノードマウスへの移入実験では、レシピエントの腸炎発症を体重や組織学的に検討した。TCR α ^{-/-}マウスへの移入実験では、germinal center 形成や Tfh 細胞の出現を FACS や免疫蛍光法により検討した。

Foxp3 陽性細胞の関与

Foxp3 陽性細胞が Tfh に分化するとの報告から機能的 Foxp3 が誕生しない Rag2^{-/-}DO11.10Foxp3^{sf/sf} マウス T 細胞を TCR α ^{-/-}マウスや TCR α ^{-/-}Ld-nOVA マウスに移入し、germinal center 形成や Tfh 細胞の出現を FACS や免疫蛍光法により検討した。

Homeostatic proliferation の関与

Homeostatic proliferation と Tfh への分化の関連を明らかにするため CD4⁺CD25⁻T 細胞や Rag2^{-/-}DO11.10T 細胞を $1 \mu\text{M}$ CFSE で 37°C 15 分染色した後、ノードマウスに移入し、5 日後の細胞分裂数と CD4⁺PD-1⁺細胞の出現との関連を FACS で観察した。

ICOS の関与

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

CXCR5⁺PD-1⁺CD4⁺Tfh 細胞の出現

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、昨年度までクラススイッチが生じる場として重要な germinal center 形成と、それに関わる重要なヘルパー T 細胞サブセットである follicular helper T 細胞(Tfh)の誘導について検索を行っている。その結果、ヌードマウスに Tc を移入すると CD4⁺CD25⁻T 細胞は、CXCR5⁺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。更に、これまでの結果から、本細胞群は、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から、この細胞は Tfh と考えた。従って、自己抗体産生マウスで誘導されているこの細胞群は、CXCR5 陰性の新たな Tfh サブセットであることが明らかになった。本年度もこの研究結果を確認しており、この細胞群の分化過程を明らかにすることを目的に以下の研究を行った。

(2) 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

T 細胞受容体の関与

まず自己抗体産生マウスで誘導されている Tfh サブセットの分化に関わる因子の解析として、本細胞群における T 細胞受容体(TCR)の cognate な抗原認識が抗核抗体産生に必要なか否か検討した。ヌードマウス

に Tc を移入する系では抗核抗体産生のほか腸炎の発症も認めるが、OVA を認識する単一 TCR 発現トランスジェニックマウス Rag2^{-/-}DO11.10 由来 CD4⁺T 細胞(Treg を含んでいない)を移入した際には、抗核抗体産生は認めるものの(図 1A)、腸炎は発症しないことが体重変化(図 1B)や腸の組織学的検討(図 1C)により明らかとなった。このことから、ヌードマウスでは腸炎と異なる T 細胞の反応により抗核抗体の誘導が行われていることが明らかとなった。更に、ヌードマウスと同様 B 細胞は存在しているものの αβ T 細胞は存在しない TCR α^{-/-}マウスおよび OVA を全身的に発現している TCR α^{-/-}Ld-nOVA マウスに、Rag2^{-/-}DO11.10 由来 CD4⁺T 細胞を移入し、cognate な抗原認識が Tfh の分化に必要なか否か flow cytometry にて検討した(図 1D)。その結果、むしろ OVA を発現するレシピエントでは Tfh や germinal center の誘導が低い傾向があり、これらの結果から Tfh 誘導に cognate な抗原認識は必要がないことが明らかとなった。

Foxp3 の関与

また、Treg が Tfh に分化しうることが報告されているため、図 1D の実験において、Foxp3^{sf/sf}Rag2^{-/-}DO11.10 マウス由来 CD4⁺T 細胞の移入も同時に行った。この T 細胞は移入前だけではなく移入後も機能的 Foxp3 が誘導されることはなく、Tfh 誘導における Foxp3 の役割を明らかにできる。その結果、自己抗体産生マウスに誘導されている Tfh 分化に、Foxp3 は必要ではないことが判明した。これまでの結果からもむしろ Foxp3 はこの分化過程に抑制的である。

homeostatic proliferation の関与

また本系はリンパ球減少下のマウスに Tc を移入することで Tfh が誘導されているが、実際にこの現象で生じる homeostatic proliferation が分化に必要なか否か検討した(図 2)。このために CFSE という色素で染めた Tc をヌードマウスに移入し、5 日目の脾細胞を flow cytometry により解析を行った。細胞が一回分裂すると CFSE の信号強度が半減する現象を利用し、分裂回数が明らかとなる。その結果、分裂回

数が多い細胞群で Tfh に分化しているが明らかとなった。

ICOS の関与

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(図 3)。従って、本系における Tc 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。

以上の結果から、本系ではヌードマウスへの CD4⁺CD25⁺T 細胞移入により、germinal center 形成とともに抗体のクラススイッチが亢進し、IgG タイプの抗 RNP 抗体をはじめとする抗核抗体産生を認め、この過程には、移入 T 細胞が分化した CXCR5⁺PD-1⁺CD4⁺細胞が関与していることが明らかとなった。本細胞群は germinal center に存在し、IL-21 発現を認め、B 細胞の IgG 産生を促進したことから、濾胞ヘルパー T 細胞の新規サブセットと考えた。この分化過程に homeostatic proliferation や ICOS からのシグナルが関与する一方で、cognate な抗原認識は必要ではないこと、制御性 T 細胞が抑制的に作用していることも明らかとなった。

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。移入 CD4⁺T 細胞の Tfh への分化とレシピエントの異常な B 細胞応答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) CD8⁺T 細胞は CD4⁺T 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) CFSE で標識した T 細胞が分裂して Tfh に分化していることから、ヌードマウスに存在している胸腺外 T 細胞が分化している可能性は否定的であること、などのデータにより示されている。

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。そのためにも、マウスの系を C57BL/6 に変更するなどの遺伝的背景の変更や、レシピエントマウスに toll 様受容体欠損マウスを用いなどの検討が必要と考えられる。

(2) Tfh の誘導分化に関する考察

Homeostatic proliferation と新たな Tfh サブセットの分化については本研究で示された。Homeostatic proliferation には、これまでの報告から、早い分裂と遅い分裂にわかれ、前者はエフェクター T 細胞に分化すること、その過程は制御性 T 細胞により抑制されることが示されており、本系で明らかにした Tfh サブセットの分化過程とその制御機構に合致している。しかし新たな Tfh サブセットに関してはこれまで全く報告がなく新規のものである。

Homeostatic proliferation の Tfh 分化誘導機構に関しては不明な点が多い。これまでの報告から、IL-21 の機能として、homeostatic proliferation の促進、Tfh の分化に重要な役割を担っていることが示されており、両者の IL-21 を介した密接な関連が示唆され、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、ステロイドや免疫抑制剤以外に有効な薬剤に乏しく、難治性病態の治療や薬剤副作用の軽減においては新たな治療が求められている。本研究により明らかとなった自己抗体産生を含む異常 B 細胞応答を惹起する経路は、今後新たな分子標的治療の候補として有用となる可能性がある。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新たな Tfh サブセットの分化や 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考える。

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 の存在下に新たな Tfh サブセットに分化し germinal center が形成され、抗 RNP 抗体産生など異常な B 細胞応答が生じることが明らかとなった。この分化過程において、homeostatic proliferation や ICOS からのシグナルが促進的に関与する一方で、cognate な抗原認識は必要ではないこと、制御性 T 細胞が抑制的に作用していることも明らかとなった。今後、この新たな Tfh サブセットへの分化経路を標的とした治療の自己免疫病態への有効性を検討していくことは、抗 RNP 抗体産生が主要な病態である混合性結合組織病に対する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

1. 論文発表

Kawahata, K, Kanzaki K, Imamura M, Akahira L, Michishita K, Dohi M, Yamamoto K. Regulatory T cells in the control of T cell homeostasis. *Inflammation and Regeneration*. 2010;30:502-506

2. 学会発表

1,第 39 回日本免疫学会総会・学術集(2010 年)
 神崎健仁、川畑仁人、山本一彦；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,
 2,第 31 回日本炎症・再生医学会(2010 年)
 神崎健仁、川畑仁人、山本一彦；Homeostatic proliferation による CD4⁺ T 細胞の follicular helper T 細胞(Tfh) への分化と自己免疫への関与
 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

4. 特許取得

なし

5. 実用新案登録

なし

6. その他

なし

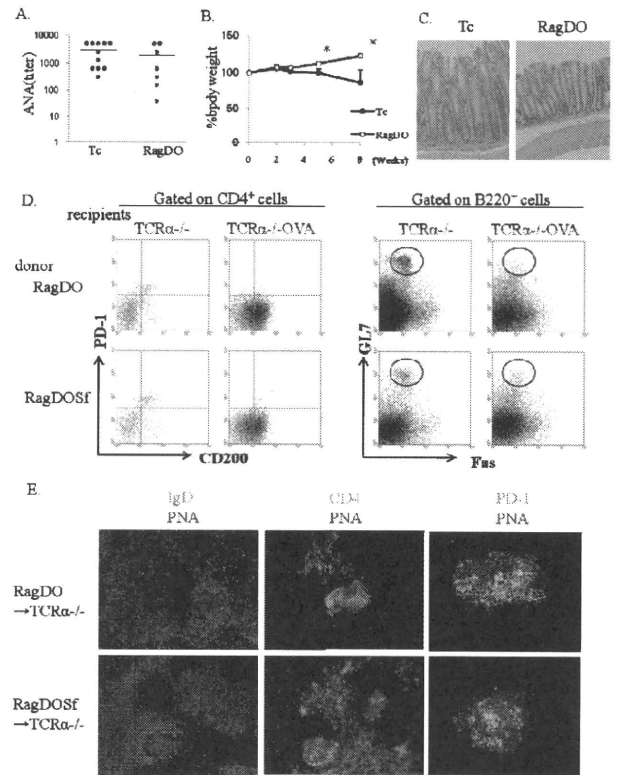


図 1、CD4+PD-1+細胞分化に T 細胞受容体の cognate な抗原認識は必要としない

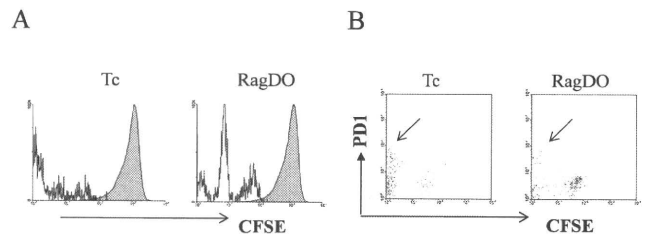


図 2、CD4+PD-1+細胞分化における細胞分裂の影響

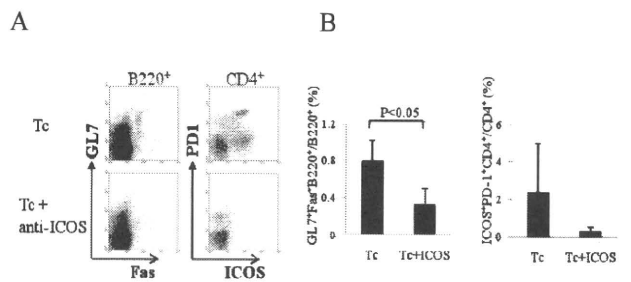


図 3、CD4+PD-1+細胞分化への ICOS の関与

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。近年、PAH の治療薬がめざましい発展をとげ、多くの新規治療方法が提唱されている。これらの薬剤は、早期 PAH 症例への有効性が高い。しかし、PAH 発症を早期に予測する方法は確立されていない。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 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、前向き研究であり、発症 4 年以内の PAH を合併していない MCTD 患者を登録し、PAH の発症に NOS2 遺伝子多型が関連するかを検討した。26 名の患者での前向き検討で、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 合成を増加させる。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、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。症例は、2005 年 11 月から 2009 年 10 月までに同意を得て登録した 26 名であった。

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) 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 11 月から 2009 年 10 月の登録を行い、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、7 例において PAH が認められた (表 1)。26 例での罹病期間の平均値は 62 ヶ月であった。MCTD 診断から PAH 発症までの期間は、平均値で 24 ヶ月であった。MCTD と診断されて早期に PAH と診断された症例が多かった (表 2)。

2) 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 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。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 7 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. Sugiura T, Kawaguchi Y, Soejima M, Katsumata Y, Gono T, Baba S, Kawamoto M, Murakawa Y, Yamanaka H, Hara M: Increased HGF and c-Met in muscle tissues of polymyositis and dermatomyositis patients: Beneficial roles of HGF in muscle regeneration. **Clin Immunol** 136:387-399, 2010

2. Gono T, Kawaguchi Y, Satoh T, Kuwana M, Katsumata Y, Takagi K, Masuda I, Tochimoto A, Baba S, Okamoto Y, Ota Y, Yamanaka H: Clinical Manifestation and prognostic factor in anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 antibody-associated interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. **Rheumatology** 49:1713-1719, 2010

3. Gono T, Kawaguchi Y, Hara M, Masuda I, Katsumata Y, Shinozaki M, Ota Y, Ozeki E, Yamanaka H: Increased ferritin predicts development and severity of acute interstitial lung disease as a complicated of dermatomyositis. **Rheumatology** 49:1354-1360, 2010

4. Gono T, Kawaguchi Y, Katsumata Y, Takagi K, Tochimoto A, Baba S, Okamoto Y, Ota Y, Yamanaka H:

Clinical manifestations of neurological involvement in primary Sjogren's syndrome. **Clin Rheumatol** in press

5. Gono T, Kawaguchi Y, Sugiura T, Furuya T, Kawamoto M, Hanaoka M, Yamanaka H: Interferon-induced helicase (*IFIH1*) polymorphism with systemic lupus erythematosus and dermatomyositis/polymyositis. **Modern Rheumatol** 20:466-470, 2010

6. Ota Y, Kawaguchi Y, Takagi K, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Gono T, Masuda I, Ikari K, Momohara S, Yamanaka H: Single nucleotide polymorphisms of *CD244* gene predispose to renal and neuropsychiatric manifestations with systemic lupus erythematosus. **Modern Rheumatol** 20:427-431, 2010

7. Gono T, Kawaguchi Y, Sugiura T, Ichida H, Takagi K, Katsumata Y, Hanaoka M, Okamoto Y, Ota Y, Yamanaka H: Interleukin-18 is a key mediator in dermatomyositis: potential contribution to development of interstitial lung disease. **Rheumatology** 49:1878-1881, 2010

2. 学会発表

1. 川口 鎮司 炎症性筋疾患 間質性肺病変 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 312, 2010

2. 川口 鎮司 全身性強皮症における肺動脈性肺高血圧症の診断と治療方法 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 422, 2010

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

表 1 患者背景

- 26 症例、全例女性
- 平均発症年齢： 39 歳 (15-68)
- 臨床症状
 - ◆ レイノー現象 26 例
 - ◆ 間質性肺病変 8 例
 - ◆ 皮膚硬化範囲 diffuse 9 例、limited 17 例
 - ◆ 筋炎 8 例
 - ◆ 血球減少 4 例
 - ◆ 抗 U1-RNP 抗体 26 例、抗セントロメア抗体 1 例、抗 dsDNA 抗体 4 例

表 2 観察結果

- 観察期間 2005 年 11 月から 2011 年 2 月
- 最終観察期間 平均値 56 ヶ月
- 最終罹病期間 平均値 64 ヶ月
- MCTD 診断から PAH 発症までの期間 平均値 26 ヶ月
- PAH 発症年齢 平均値 34 歳

表 3 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	6 例	1 例
合併無し	4 例	15 例

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

PAH: 肺動脈性肺高血圧症

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。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、心筋特異的 HEXIM1 過剰発現マウス（HEXIM1Tg）では変化がなかった。心病理組織学的解析によっても、HEXIM1Tg において右室心筋細胞の肥大が抑制されていることが確認された。したがって、個体レベルにおいて、HEXIM1 は 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) 心筋特異的 HEXIM1 発現トランスジェニックマウス（HEXIM1Tg マウス）：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：野生型ならびに HEXIM1Tg マウスを低酸素分圧下（10%O₂）で 8 週間飼育した。
- 3) 心臓病理組織・心筋細胞径解析：マウスをソムノペンチル麻酔下に開胸し、左室穿刺によりマウス全身をホルマリン液還流し、心臓を摘出後ホルマリンで再固定した。右室乳頭筋起始部近傍の横断面を HE 染色し、長軸に沿って断面が見えている細胞を抽出し、核に対し垂直かつ核の中心を通る細胞短径を測定解析した。
- 4) 血行動態解析：イソフルレン麻酔下にマウス気管を人工呼吸器に接続して開胸し、21G 針で右室を直接穿刺し圧トランスデューサー（Micro-Tip

Catheter transducer SPR-671, Millar Instruments, Houston, TX)を挿入して右室収縮期圧を測定した。

5) 心臓超音波解析: イソフルレン麻酔下にマウスをヒートステージに固定し、心拍数を400-500/分になるように麻酔を調節して心臓超音波解析(Vevo 2100®, VisualSonics, Toronto, Canada)を行い、左室駆出率EF、右室拡張期終末径RVdDを測定した。

6) ET-1のELISA: ソムノペンチル麻酔下に開腹し、下大静脈より血漿を採取し、血漿中した(Big Endothelin-1 EIA kit, Enzo Life Sciences International, Inc., Plymouth Meeting, PA)。

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) 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/体重比が有意に増加したが、HEX-Tgでは増加しなかった。一方、左室/体重比は酸素分圧、HEXIM1発現量のいずれの影響をも受けなかった(図1)。

2) 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RVdDが有意に増加したが、HEX-Tgでは増加しなかった(図2)。

3) 低酸素分圧下飼育により野生型マウス、HEX-TgともにRVSPが有意に増加したが、両者のRVSPには差がなかった(図3)。

4) 酸素分圧、HEXIM1発現量にかかわらず各マウスのEFに変化は認められなかった(図4)。

5) 低酸素分圧下飼育により野生型マウス、HEX-Tgともに全肺組織中のET-1遺伝子発現ならびに血漿中ET-1濃度が有意に増加したが、両者には差が認められなかった(図5)。

6) 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心筋細胞径が有意に増加したが、HEX-Tgでは増加しなかった。左室心筋細胞径はいずれのマウスにおいても変化がなかった(図6)。

D. 考察

HEXIM1の生体機能解析のためTgマウスを開発し、低酸素負荷PHマウスモデルを用いて検討した。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。一方、ET-1濃度には有意差はなく、かかるHEXIM1の効果がET-1を介したのではないことが示唆された。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。心病理学的解析では、低酸素負荷PHモデルにおいて、野生型マウスでは右室心筋線維径の増加が認められたが、HEXIM1Tgマウスでは認められなかった。

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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 雑誌発表論文

1. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H. Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Nutritional Sensor mTOR in Skeletal Muscle. *Cell Metab*. 2011;13(2):170-82
2. Fukazawa T, Maeda Y, Matsuoka J, Ono T, Mominoki K, Yamatsuji T, Shigemitsu K, Morita I, Murakami I, Tanaka H, Durbin ML, Naomoto Y. Targeting KRAS mutation-bearing lung cancer in vivo by pulmonary surfactant-adenovirus-mediated gene transfer. *Anticancer Res*. 2010;30(12):4925-35.
3. 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*. 2010;30(12):1651-6.

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分子標的薬開発へ向けた基礎的検討、第54回日本リウマチ学会総会・学術総会、神戸、2010年4月24日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 低酸素飼育による心室/体重の変化

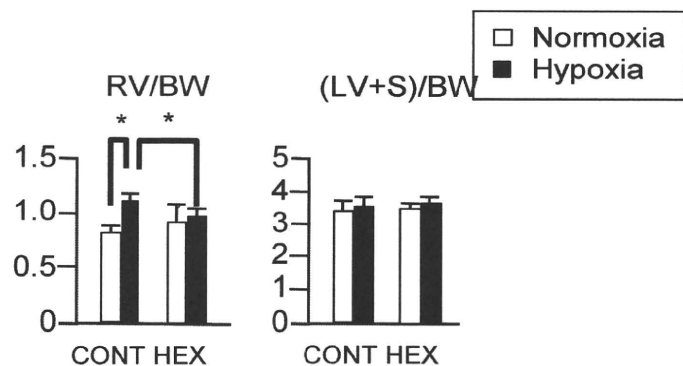


図2 低酸素飼育による右心室拡張期径の変化

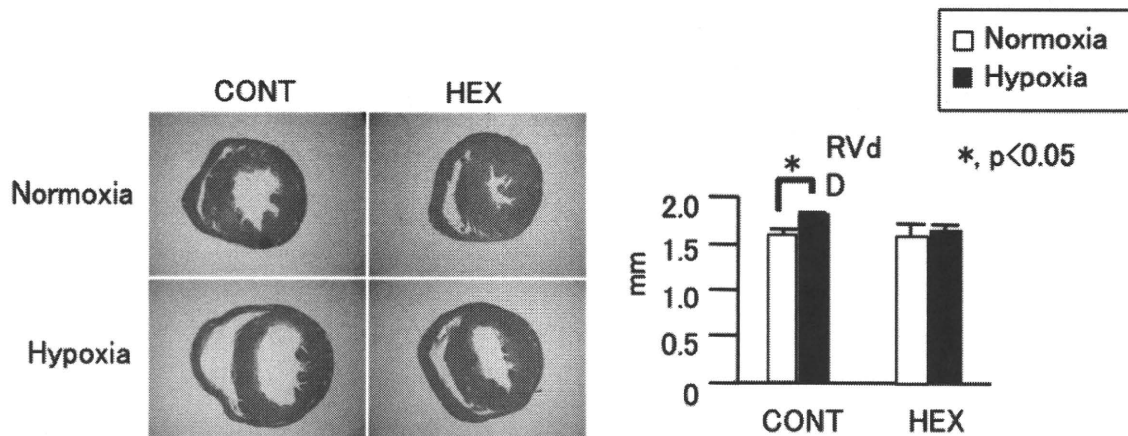


図3 右室収縮期圧

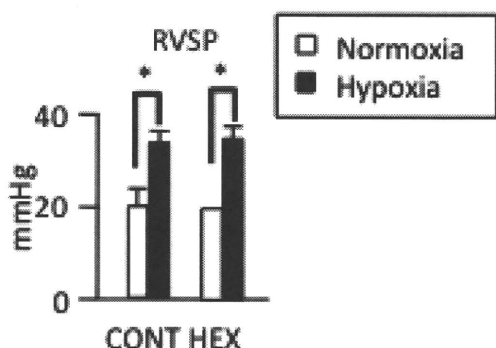


図4 左心拍出量の変化

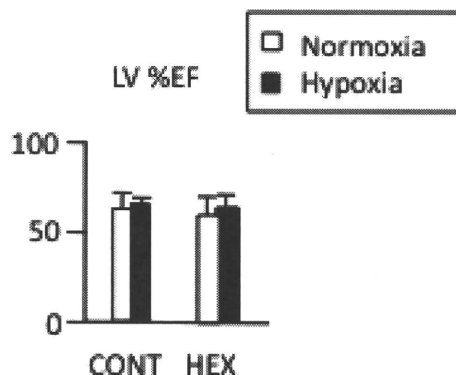


図5 エンドテリン-1(ET-1)発現量

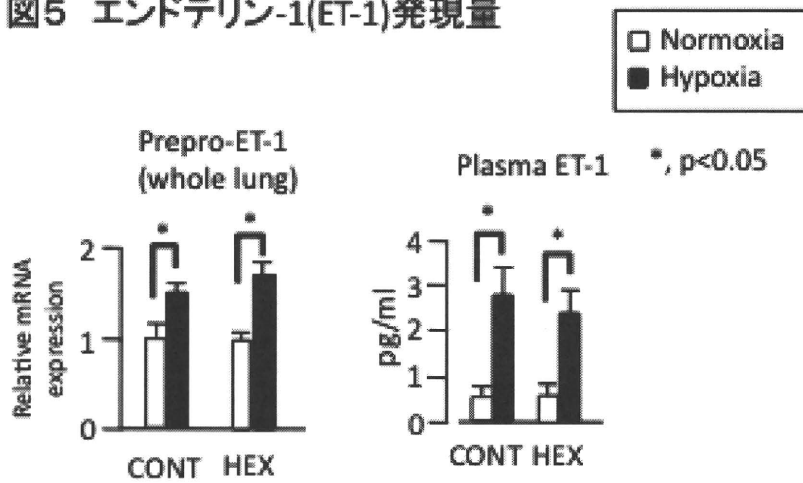
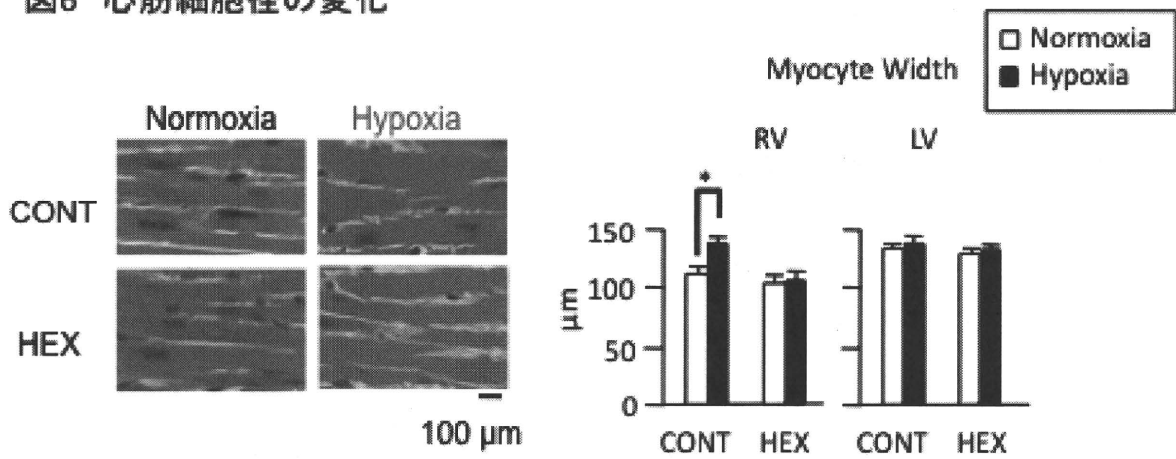


図6 心筋細胞径の変化



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

A. 研究目的： LIGHT (lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpes virus entry mediator on T cells)は、IFN- γ によりT細胞に誘導されTNF superfamilyであるが、血管内細胞にも見られ、血栓や肺高血圧症との関連も報告されている。そこで、膠原病に伴う肺高血圧および膠原病におけるLIGHTの意義を検討した。

B. 研究方法： 膠原病およびPAH合併膠原病を対象に、血清中のLIGHTをELISAにて測定した。ELISAはPAHの病態、各種膠原病の臨床症状とLIGHTとの関係も検討する。

C. 研究結果： 膠原病PAHとの関連： PAHを認めた症例ではLIGHTは 14.1 ± 3.1 pg/mLと非PAH群の 9.5 ± 4.7 pg/mLとPAH群でやや高い傾向が見られた。その他の膠原病でも、高値を示した症例があるため、MCTDとその他の膠原病との関連を比較した。MCTDでは 6.4 ± 16.5 pg/mL, RA 18.5 ± 106 , SLE 10.2 ± 2.5 , APS 83.3 ± 335 , SSc 7.1 ± 9.4 と、RAおよびAPSにて高値を示す症例が多かった。RAの活動性とLIGHTとの間の相関はなかったが、APSで最も高値を示し、血栓症との関連が推測された。

D. 考察： 血清中のLIGHTはMCTDでの上昇は軽度であったが、PAH例では上昇する傾向が見られた。一方、血栓症を主要な病態とするAPSで最も高値を示し、膠原病では血栓症を反映する可能性が推測された。

E. 結論： PAH例において、LIGHT値が上昇する傾向がみられたが、PAHとの関連は明確ではなく、むしろ、APSの血栓症に強く関連する因子と考えられた。

A. 研究目的

CTD では、pulmonary artery hypertension(PAH)が生
命予後に影響する最も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、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¹⁻⁴⁾。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、PAHにて上昇する
ことが報告された⁴⁾、LIGHT (Lymphotoxin-like
Inducible protein that competes with Glycoprotein D for
Herpesvirus entry mediator on T lymphocytes)に関して
検討したので報告する。

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48
例と膠原病(SLE, MCTD, SSc, RA, PMDM, APS等)の
血清を用いた。これら血清中のAngiotensin-1、
LIGHTをhome-made ELISAにて測定した。抗ヒト
angiotensin-1、抗ヒトLIGHT抗体、リコンビナント
angiotensin-1、LIGHTはA&D社製のものを用いた。
健常人の成績よりLIGHTは55pg/mL以上を上昇と
判定した。

C. 研究結果

膠原病PAHとの関連： PAHを認めた症例では
LIGHTは 16.1 ± 7.3 pg/mLと非PAH群の 10.2 ± 1.2

pg/mL と PAH 群でやや高い傾向が見られたが、有意差は認めなかった(Fig-1)。

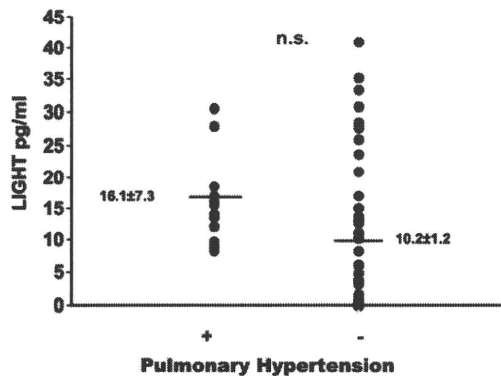


Fig 1. Relationship between LIGHT level and PAP in CTD

その他の膠原病でも、高値を示した症例があるため、膠原病における LIGHT の上昇の意義を検討した。MCTD では 6.4 ± 16.5 pg/mL、RA 18.5 ± 106 、SLE 10.2 ± 2.5 、APS 83.3 ± 335 、SSc 7.1 ± 9.4 と、RA および APS にて高値を示す症例が多かった (Fig-2)。

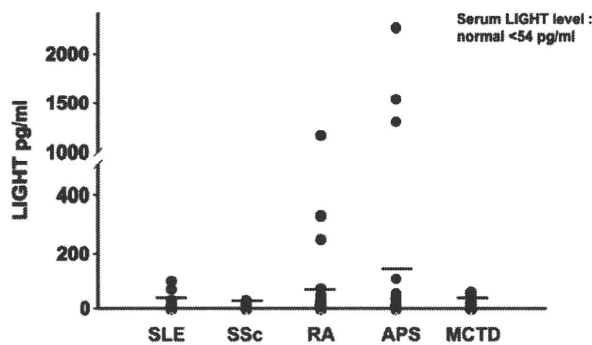


Fig 2. Serum LIGHT Level in patients with various CTD

そこで、RA でも高値を示した血管増殖因子である Ang-1 と血清 LIGHT 値との関係を解析した。MCTD、SLE、および SSc では、両者の間に相関は見られなかった(Fig-3)。APS で最も高値を示し、血栓症との関連が推測された。

しかし、RA では Ang-1 と LIGHT は逆相関する傾向が見られたが、有意差はなかった。また、RA において、RA の活動性、CRP、LIGHT との関係を検討したが、やはり、関連は認めなかった。一方、APS では、Ang-1 と LIGHT との間に、有意な正の相関 ($p < 0.002$) がみられ、両者が、APS の血管病変関連する因子であることが考えられた。

そこで、APS において、血栓症発症時の血清と、血栓を認めなかった症例にわけ、LIGHT 値を比較し

た。血栓時には、LIGHT は 10.2 ± 1.2 pg/mL と非血栓時に比べ、有意に高値を示した。このことから、APS では、LIGHT 値の上昇は血栓に関連していることが推測された。

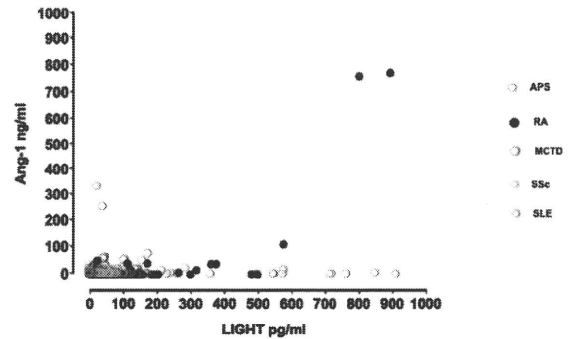


Fig 3. Relationship between Angiotensin-1 and LIGHT in Serum

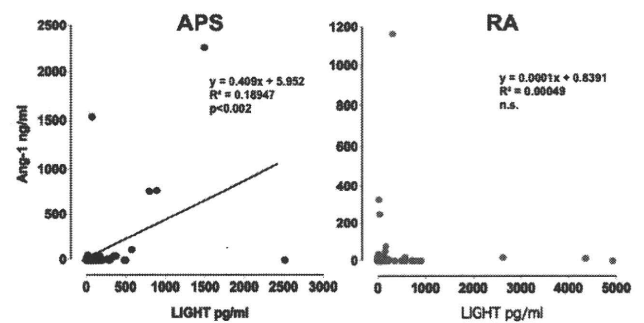


Fig 4. Relationship between Angiotensin-1 and LIGHT in Serum

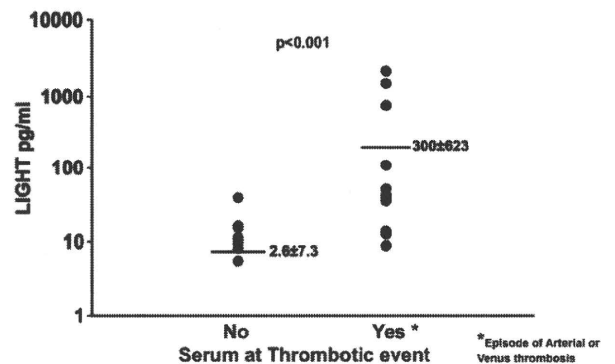


Fig 5. Serum LIGHT Level and Thrombosis in APS

D. 考察

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⁵⁾。LIGHT 自体は、tissue factor、