

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 6)。しかし、今回の結果は、膠原病の肺高血圧症では血清 LIGHT 値との明確な関連は示せなかった。むしろ、APS の血栓症発症時に LIGHT 値が著明に上昇することが示されたことは、心筋梗塞等でも LIGHT 値が上昇することと一致した結果と考えられる。PAH では、血管のリモデリングが起き、それに伴い血栓が形成されることもある。これら病変と LIGHT 値がどのように関連するか、今後更に検証する必要がある。

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。

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. 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 肺高血圧症における抗 ACE2 抗体の病因解析(平成 22 年度)

研究分担者： 三森 明夫 国立国際医療研究センター膠原病科・副院長
研究協力者： 高橋 裕子 同膠原病科・医員
芳賀しおり 同センター研究所難治性疾患研究部・任研究員
石坂 幸人 同研究部・部長

研究要旨：

我々が同定した“抗angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) 抗体”は、膠原病血管病変の患者に出現特異性が高く、“収縮・増殖性血管反応に拮抗して血管を保護するACE2”の生理作用を阻害するので、MCTDの肺動脈性肺高血圧症 (PAH) と末梢循環不全 (末端壊死) の原因になりうる (Arthritis Res Ther, 2010に報告)。今回、検討症例を追加し、MCTDを含む膠原病PAH 3例でACE2阻害自己抗体を再確認した。またSLE末端壊死患者のACE2阻害抗体に対する責任エピトープを2つ同定し、これらは他の患者4人中3人に共通だった。今回、血管病変なしに抗ACE2抗体高値を示す例がSLE 7人にみつけたが、いずれのIgG分画にもACE2阻害作用はなかった。すなわち、阻害作用をもつ抗体の陽性が、膠原病血管病変と相関すると示唆された。さらに特発性PAH 2例において、ACE2蛋白量正常、ACE2阻害抗体なしに、血清ACE2活性低下を認めた。膠原病PAHとは別種のACE2異常を意味するかもしれない。

A. 研究目的

抗 angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) 抗体 (昨年の本研究会議で報告) は、“収縮・増殖性血管反応に拮抗し血管を保護する ACE2” の生理作用を阻害するので、MCTD の肺動脈性肺高血圧症 (PAH) と末梢循環不全 (末端壊死) の原因になりうる。この機構を解明する。

B. 研究方法。

1) 組み替えヒト ACE2 を抗原とする ELISA : 昨年報告 (論文掲載) 以後、今回新たに PH 6 人 (MCTD 1, SLE 2, 強皮症/PBC/肝硬変あり 1, 特発性/IPAH 2)、血管病変のない 48 人 (SLE, 強皮症) で測定した。

2) 一部の症例について、免疫沈降後の Western blot により、血清 ACE2 蛋白量を半定量評価した。

3) 一部の症例について、血清 ACE2 活性、血清 IgG 分画による in vitro ACE2 活性の阻害作用の有無を評価した。

4) 昨年度に分析した症例群において ; 末端壊死 SLE 1 例 (P1) の血清とランダムペプチドライブラ

リーの反応により、抗 ACE2 抗体のエピトープを求めた。同エピトープ配列を合成し、P1 を含む計 5 人の血管病患者血清 (すべて抗 ACE2 抗体高値) に対する吸収実験を行なった。すなわち吸収後の抗 ACE2-ELISA 値、IgG 分画による in vitro ACE2 活性阻害作用を調べた。

(倫理的配慮)

本研究は、自施設倫理審査会 (検体利用委員会) で承認された。

C. 研究結果

血管病変なく抗 ACE2 抗体が高値の患者 (図 1) : 今回、症例数を増やして検討したところ、血管病変のない SLE 7 人に抗 ACE2-ELISA 高値を認めた。血清 IgG 分画を抽出し、in vitro ACE2 測定系に添加したところ、陽性対照 IgG (末端壊死患者) は ACE2 活性を阻害し、上記 7 人の IgG 分画は、阻害しなかった。すなわち、「膠原病患者群において、抗 ACE2 抗体陽性と血管病が相関する」という我々の既報告に加え、「ACE2 阻害作用をもつ抗 ACE2 抗体の陽

性が、血管病変と相関する」という可能性が示唆された。

ACE2 活性を阻害する自己抗体の責任エピトープ
：ランダムペプチドライブラリー法によって、末端壊死 SLE 患者 P1 の血清に反応した 2 つのエピトープ候補得た。335-DPGNVQK-341、462-MVFKG-466。これらは ACE2 蛋白表面の活性部位付近に位置した (1/22 班会議で呈示)。

上記配列を含むランダムペプチド-thioredoxine-大腸菌 flagellin extract (および同配列を含まない対照 extract) で患者血清を吸収後の抗 ACE2-ELISA において、該当ペプチドで血清を吸収したら、P1 および他 3 人の患者で抗 ACE2 抗体-ELISA 値低下をみた (図 2)。さらに上記配列の合成ペプチドを用いた吸収後でも、同様に有意な ELISA 値低下をみた (データ示さず。吸収効率は、上記 extract が優った)。

in vitro ACE2 活性測定系に、上記配列の合成ペプチドを添加すると、P1 および他 3 人の患者血清 IgG 分画による ACE2 活性阻害作用が有意に抑制された (図 2)。

すなわち複数の患者に共通のエピトープが同定できた。

PH 患者 (膠原病 PAH 3、IPAH 2、PBC-PH 1) における ACE2 阻害自己抗体の検討：

今回新たに 6 人の PH 血清を検討した (データ図は 1/22 班会議で呈示)。

6 人の血清 ACE2 蛋白量は健常対照と同程度であった。しかし血清 ACE2 活性は、PBC-PH 1 人を除く 5 人で、健常基準値の 50%以下に低下していた。

抗 ACE2-ELISA 値は、IPAH の 1 人を除く 5 人で高値であった。

血清 IgG 分画による、in vitro ACE2 活性阻害作用をみたところ、膠原病 PAH 3 人の IgG 分画には阻害作用あり、他の PH 3 人の IgG 分画には阻害作用がなかった。

D. 考察

既報告 (Arthritis Res Ther) で述べたように、膠原病の収縮性血管病における高率な抗 ACE2 抗体陽性と、それら血清 IgG 分画の ACE2 活性阻害作用から、抗 ACE2 抗体の病原性が強く示唆される。今回の検討で、同抗体は、血管病を発症していない膠原病患

者にも出現しうるが、ACE2 阻害作用をもつものに病原性があると考えられた。

膠原病 PAH では、既報と今回を合わせた 8 例全てに、ACE2 阻害自己抗体が同定された。IPAH (従来名の原発性肺高血圧症) について、我々の検討症例は少ないが、2 例ともに ACE2 阻害抗体がなく (抗体なし、または抗体に阻害活性なし)、ACE2 蛋白量の減少もないにも拘わらず、血清 ACE2 活性低下があった。自己抗体以外の阻害因子を探索する意義がありうる。上記 IPAH の 1 人は、抗 SSA 抗体陽性であったが、乾燥症状と口唇生検が陰性であり、シェーグレン症候群と診断できなかった。

E. 結論

MCTD を含む膠原病 PAH において、抗 ACE2 阻害自己抗体が病原性をもつ可能性がある。さらに特発性 PAH においても別種の ACE2 活性異常が関与する可能性がある。

G. 研究発表

2. 論文発表

1. Muto G, Takahashi Y, Yamashita H, Mimori A. A patient with intravascular lymphoma presenting with cerebral infarction and a high serum MPO-ANCA level. *Mod Rheumatol* 2010 Oct 8 [Epub ahead of print]
2. Kobayashi M, Takahashi Y, Yamashita H, Kaneko H, Mimori A. Benefit and a possible risk of tocilizumab therapy for adult-onset Still's disease accompanied by macrophage-activation syndrome. *Mod Rheumatol*. 2010 Aug 26. [Epub ahead of print]
3. Okudaira N, Iijima K, Koyama T, Minemoto Y, Kano S, Mimori A, Ishizaka Y. Induction of long interspersed nucleotide element-1 (L1) retrotransposition by 6-formylindolo [3,2-b] carbazole (FICZ), a tryptophan photoproduct. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107: 18487-92, 2010.
4. Testempassi E, Kubota K, Ito K, Morooka M, Ito K, Masuda-Miyata Y, Yamashita H, Itoh K, Mimori A, Kuriki H. Constrictive tuberculous pericarditis diagnosed using 18F-fluorodeoxy- glucose positron emission tomography: a report of two cases. *Ann Nucl Med*. 24(5):421-425, 2010

5. Takahashi Y, Haga S, Ishizaka Y, Mimori A. Autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Arthritis Res Ther*. 2010 12 (3) :R85.
6. Ito K, Kubota K, Morooka M, Hasuo K, Kuroki H, Mimori A. Clinical impact of 18F-FDG PET/CT on the management and diagnosis of infectious spondylitis. *Nucl Med Commun*. 31(8):691-698, 2010
7. Myouzen K, Kochi Y, Shimane K, Fujio K, Okamura T, Okada Y, Suzuki A, Atsumi T, Ito S, Takada K, Mimori A, Ikegawa S, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 19:2313-20, 2010

和文誌

1. 上田洋、高橋裕子、山下裕之、金子礼志、三森明夫: ループス腎炎に対する免疫抑制治療中に発症し、ボセンタンが有効であった SLE 肺動脈性高血圧症の一例. *日臨免会誌* 2011 (印刷中)
2. 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* 99:130-132,2010

2.学会発表

国内

- 1-16. 第 54 日本リウマチ学会総会 (13 題)、第 21 回日本リウマチ学会関東支部会 (2 題)、その他

海外

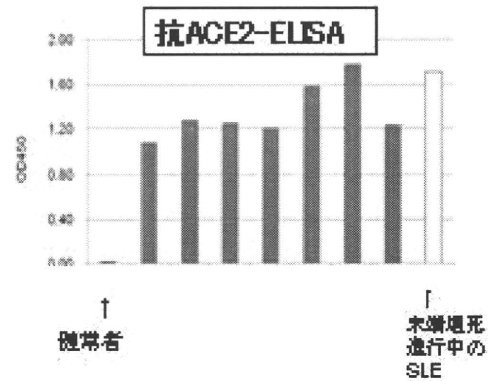
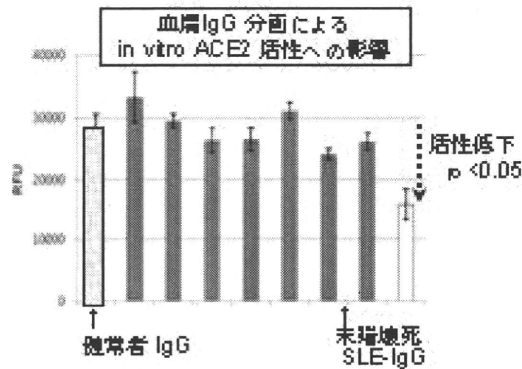
1. Takahashi Y, Yamashita H, Ueda Y, Yoshida Y, Kaneko H, Mimori A. Incidence of progressive interstitial pneumonia in patients with rheumatoid arthritis. The 78th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Atlanta, Nov, 2010.
2. Yamashita H, Kubota K, Takahashi Y, Kaneko H, Mimori A. Enthesopathy detected by 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with polymyalgia rheumatica. The 78th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Atlanta, Nov, 2010.
3. Yoshida Y, Takahashi Y, Yamashita H, Toshiki E, Ueda Y, Kobayashi M, Kaneko H, Mimori A. Different prognosis of Pneumocystis pneumonia in rheumatoid arthritis (RA) and non-RA patients. The 14th congress of asia pacific league of associations for rheumatology, Hong Kong, July, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

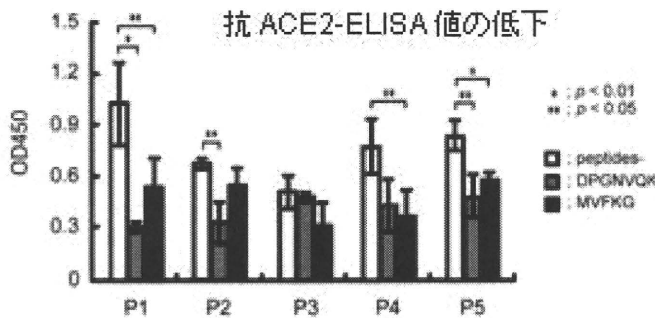
図1 <抗体のACE2 阻害作用と、血管病変を呈することとの関係>
膠原病の症例数を増やし、抗ACE2-ELISA測定を行なったところ、
血管病変のないSLE 7人に、抗ACE2-ELISA高値を認めた

ところが、これら7人の患者の
血清 IgG 分画は、in vitro ACE2
の活性を阻害しなかった

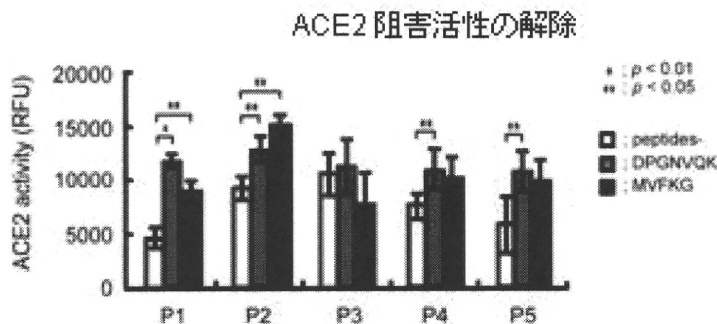


すなわち、抗ACE2 抗体のうち、
ACE2 阻害活性をもつものが
血管病変と相関する
という解釈が、さらに支持された

図2 末端壊死 (P1 ~P4)または肺高血圧 (P5) の5人(SLE, SSc)



2種の peptideで
患者血清を吸収
→ ELISA 値が低下



2種の peptideと
共存させると
IgG 分画による
in vitro ACE2 活性の
阻害が、解除された

肺動脈性肺高血圧症における末梢血単球の役割に関する研究

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

MCTD、全身性強皮症（SSc）の難治性病態の一つである肺動脈性肺高血圧症（PAH）は、肺動脈の内腔狭窄で、血管平滑筋および内皮細胞の増殖と線維化からなるリモデリングによって形成される。近年、循環血液中の単球が局所にリクルートされ、血管新生や線維化病態に関わることを示す知見が集積されている。そこで、末梢血単球の遺伝子発現を網羅的に検討することで、膠原病に伴う PAH 病態における単球の役割を追究することを目的とした。背景因子を一致させた PAH を有する SSc3 例と PAH のない SSc3 例から末梢血 CD14+単球を分離し、PCR アレイ法を用いてケモカイン、細胞外マトリックス、TGF β /BMP シグナル、血管内皮に関わる計 318 遺伝子の発現を比較した。その結果、PAH 症例で発現の高い 17 遺伝子と発現の低い 17 遺伝子が抽出された。これら遺伝子の既知の機能から、末梢血単球が遊走や接着能の亢進を介して肺動脈のリモデリングに関わ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 MCTD、全身性強皮症（SSc）を含む膠原病患者において生命予後を悪化させる難治性病態の一つである。病態の基本は肺動脈の内腔狭窄で、血管平滑筋および内皮細胞の増殖と線維化からなるリモデリングによって形成される。肺動脈における収縮因子（Endothelin-1）・拡張因子（NO, prostacyclin）が明らかになり、これらを標的にした新規治療薬が開発され、生存期間の延長が報告されている。しかし、進行を抑制できない症例も存在し、生命予後は依然として不良である。従って、根治的治療の開発が望まれており、そのためには新たなアプローチからの病態の追究が必要と考えられる。

MCTDやSScでは末梢動脈をはじめ全身の血管に内腔狭窄病変を高率に生じる。近年、循環血液中の CD14+単球が局所にリクルートされ、血管新生や線維化病態に関わることを示す知見が集積されている（Seta N, et al. *Exp Hematol* 2010）。PAHにおける肺動脈の内腔狭窄病変も末梢動脈病変と病理像が類似していることから、病態への末梢血単球の関与が示唆される。

そこで、PAH を有する症例の末梢血単球における遺伝子発現を網羅的に検討することで、PAH 病態における末梢血単球の役割を追究することを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

米国リウマチ学会の分類予備基準を満たす SSc 患者 31 例、厚生労働省研究班の診断基準（2004 年）を満たす MCTD 患者 9 例を対象とした。右心カテーテル検査で平均肺動脈圧 \geq 25mmHg かつ肺動脈楔入圧 \leq 12mmHg、肺疾患・慢性血栓塞栓症・先天性心疾患・左心疾患の除外により PAH と診断した。

アレイによる遺伝子発現解析には PAH を有する SSc3 例と PAH のない SSc3 例を用いた。これら症例は背景因子が一致するように選択し、全例が女性、高齢者（59 歳以上）、1 limited cutaneous SSc、間質性肺疾患がなく、Beraprost を服用中であった。採血時期は 10 月～11 月とした。

2. 患者末梢血単球の遺伝子発現の網羅的解析

患者末梢血 20ml から分離した末梢血単核球（PBMC）より、CD14+単球を磁気細胞分離法（Magnetic cell sorting; MACS[®] system, Miltenyi Biotec）を用いて分

取した。RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。3 例の total RNA をプールし、PCR アレイ (SABiosciences)を用いて遺伝子発現を PAH と非 PAH の 2 群間で比較した。各アレイは、ケモカイン、細胞外マトリックス、TGF β /BMP シグナル、血管内皮に関連する 84 遺伝子の解析が可能で、重複遺伝子を除くと、計 318 遺伝子の解析を行った。遺伝子発現量は一定の DNA 量まで増幅するのに必要な PCR サイクル数 (Ct 値) として得られた。特定の遺伝子について発現差を比較するには、まずその遺伝子発現に要した Ct 値から GAPDH の Ct 値を引いた Δ Ct 値を PAH、非 PAH の各群で求めた。両群間の Δ Ct 値の差から、非 PAH に対する PAH における発現量を fold change として求めた。1) fold change が 20 倍以上または 0.05 倍以下、2) 少なくとも 1 群の Ct 値が信頼できる定量範囲内 (35 以下)、の両者を満たす遺伝子を 2 群間で発現差のある遺伝子として抽出した。

3. 候補遺伝子の mRNA レベルの発現解析

今回は抽出された遺伝子のうち、CXCL12 について RT-PCR により確認した。PCR 条件は、95°C で 4 分間反応させた後、CXCL12 は 95°C 30 秒、56°C 30 秒、72°C 30 秒を 43 サイクル、GAPDH は 95°C 30 秒、59°C 30 秒、72°C 30 秒を 27 サイクル繰り返し、72°C で 7 分間反応後に 4°C に保存した。PCR 産物は、1.5% アガロースゲルで電気泳動し、ChemiDoc VES; UV trasilluminator (BIO-RAD) で検出した。各バンドのシグナル強度は Image J (NIH) を用いて定量化し、各遺伝子の発現量は GAPDH 発現量で補正した。

4. 統計学的解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では臨床検体を使用することから学内の倫理委員会での承認を得ている。検体採取に当たってはインフォームドコンセントの上で文書による同意を得た。

C. 研究結果

1. 患者末梢血単球の遺伝子発現の網羅的解析

PCR アレイで PAH 群と非 PAH 群の遺伝子発現差を fold change として求めた。318 個の遺伝子発現比 (fold change) は 0.000151-652.6 (平均 5.4 \pm 38.6) の範囲に分布し、両者における発現は正の相関を示した。

PAH 群で発現亢進と判定された 17 遺伝子を表 1 に示す。ケモカインとその受容体 (CXCL10、CXCL11、CCR2、CCRL1、CCL7)、細胞接着分子 (OCLN、ITG β 5、ITG α 6、NCAM1、ITG α 1) が多く含まれていた。一方、発現低下と判定された 17 遺伝子には、TGF β /BMP シグナル分子 (BMPER、BMPRI1B、TGF β 2)、細胞外マトリックス分解酵素 (ADAMTS13、ADAMTS8、MMP8、MMP1) が含まれていた (表 2)。

2. 候補遺伝子の mRNA レベルの発現解析

多数の患者・健常人検体を用いて、PAH で発現低下と判定された CXCL12 の mRNA 発現を RT-PCR で確認した (図 1)。CXCL12 と GAPDH のバンドのシグナル強度比として CXCL12 発現量を求めたところ、SSc、MCTD、健常人の間で発現量に統計学的な有意差は得られなかった (図 2)。PAH の有無で層別化したところ、SSc と MCTD を一括すると PAH 群で非 PAH 例に比べて CXCL12 発現量の発現が低い傾向がみられた (p=0.16) (図 3)。

D. 考察

今回、PAH の有無により層別化された 2 群間で遺伝子発現を比較したところ、発現量が異なる遺伝子の候補が抽出された。今回抽出された遺伝子のうち、発現差が比較的小さい CXCL12 について多数例での RT-PCR による半定量的解析を行ったところ、統計学的有意差には達しなかったもののアレイと同様の結果が再現された。

抽出された遺伝子のうち、PAH 群で発現が上昇していた 16 遺伝子 (CCL7、CCR2、CCRL1、CXCL10、IL1A、NOS3、TGFBR3、ITGA1、ITGA6、ITGB5、LAMB1、MMP15、NCAM1、THBS2、VTN) は細胞遊走・接着に関わる既知の遺伝子クラスターに含まれていた。このうち、CCR2 のリガンドである MCP-1 は、低酸素誘導 PH モデル動物の肺動脈内皮細胞で発現が亢進していることが報告されており (Hassoun P et al. J Am Coll Cardiol Suppl 2009)、MCP-1/CCR2 シグナル

によって末梢血単球が肺動脈局所へホーミングする機序が示唆された。また、同様に発現が上昇していた *ITGA1*、*ITGA6*、*ITGB5* もホーミングに関連しており、単球上に発現されたこれらインテグリンファミリー蛋白が ECM タンパクと接着することで細胞内に生存や増殖のシグナルを伝えることが報告されている(Fukushima K, et al. *Biol Reprod* 2005)。

CXCL10、*CXCL11*、*CCL7* などケモカインの発現も亢進しており、病変部へのマクロファージや T 細胞のホーミングを促進する可能性も考えられる。

MCTD や SSc では、末梢動脈を始め全身の血管に内腔狭窄病変を来たすが、末梢血単球のサブセットが血管病変を促進する可能性が示されている

(Yamaguchi Y, et al. *Arthritis Res Ther* 2010)。今回の検討から PAH の有無により末梢血単球の遺伝子発現プロファイルが異なることが示され、病態を促進する単球が臓器間のケモカイン発現差により肺動脈にホーミングすることが PAH 病態形成に寄与する可能性が示唆された。今後、PAH 病態形成に関わる末梢血単球の分子メカニズムが解明できれば、肺動脈リモデリングを人為的に制御する治療法の開発につながる可能性がある。

E. 結論

PAH の病態に末梢血単球のフェノタイプ変化が関連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. 論文発表

1. Kaneko Y, Suwa A, Hirakata M, Ikeda Y, and Kuwana M. Clinical associations with autoantibody reactivities to individual components of U1 small nuclear ribonucleoprotein. *Lupus*. 2010; 19(3): 307-312.
2. Seta N and Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14⁺ monocytes. *Exp. Hematol*. 2010; 38(7): 557-563.
3. Furuya Y, Satoh T, and Kuwana M. Interleukin-6 as a potential therapeutic target for pulmonary arterial

hypertension. *Int. J. Rheumatol*. 2010; 2010: 720305.

4. Furuya Y, Okazaki Y, Kaji K, Sato S, Takehara K, and Kuwana M. Mobilization of endothelial progenitor cells by intravenous cyclophosphamide in patients with systemic sclerosis: potential association with efficacy for interstitial lung disease. *Rheumatology*. 2010; 49(12): 2375-2380.
 5. Yamaguchi Y, Okazaki Y, Seta N, Satoh T, Takahashi K, Ikezawa Z, and Kuwana M. Enhanced angiogenic potency of monocytic endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther*. 2010; 12(6): R205.
- #### 2. 学会発表
1. Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Satoh Toru, 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.

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。

表1 発現亢進が見られた遺伝子(20倍以上)

遺伝子名	fold change	Δ Ct (PAH例)	Δ Ct (非PAH例)
<i>CXCL10</i>	652.6	6.32	15.67
<i>OCLN</i>	233.9	7.74	15.61
<i>VTN</i>	82.1	9.47	15.83
<i>TGFBR3</i>	72.5	9.47	15.65
<i>CXCL11</i>	63.1	9.69	15.67
<i>NOS3</i>	59.7	9.71	15.61
<i>IL1A</i>	54.9	9.89	15.67
<i>ITGB5</i>	43.4	10.39	15.83
<i>ITGA6</i>	40.8	10.48	15.83
<i>THBS2</i>	32.9	10.79	15.83
<i>MMP15</i>	29.4	10.95	15.83
<i>LAMB1</i>	29.0	10.97	15.83
<i>NCAM1</i>	25.6	11.15	15.83
<i>ITGA1</i>	25.3	8.88	13.54
<i>CCR2</i>	24.9	6	10.64
<i>CCRL1</i>	24.6	11.05	15.67
<i>GCL7</i>	20.8	11.29	15.67

表2 発現低下が見られた遺伝子(0.05倍以下)

遺伝子名	fold change	Δ Ct (PAH例)	Δ Ct (非PAH例)
<i>CXCL12</i>	0.047	11.26	6.86
<i>XCR1</i>	0.047	13.25	8.85
<i>ADAMTS13</i>	0.047	13.53	9.13
<i>KLK3</i>	0.041	12.99	8.38
<i>HAS1</i>	0.037	12.21	7.46
<i>BMPER</i>	0.036	14.99	10.2
<i>KDR</i>	0.036	13.85	9.04
<i>BMPRI1B</i>	0.032	14.17	9.22
<i>ADAMTS8</i>	0.028	13.6	8.43
<i>PLAT</i>	0.025	14.96	9.63
<i>COL1A1</i>	0.024	14.04	8.68
<i>TCP10</i>	0.018	16.11	10.31
<i>MMP8</i>	0.015	14.42	8.37
<i>IL3</i>	0.0127	13.02	6.72
<i>NR0B1</i>	0.0018	19.65	10.57
<i>TGFB2</i>	0.00148	19.06	9.66
<i>MMP1</i>	0.00015	20.84	8.15

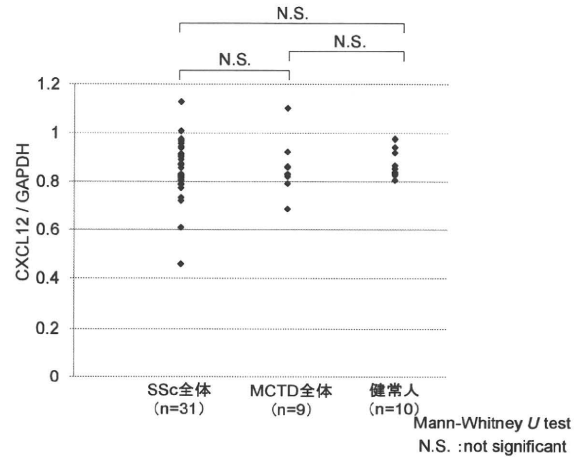


図2. SSc・MCTD 患者および健常人 CD14 陽性細胞の *CXCL12* mRNA 発現レベルの半定量的解析。

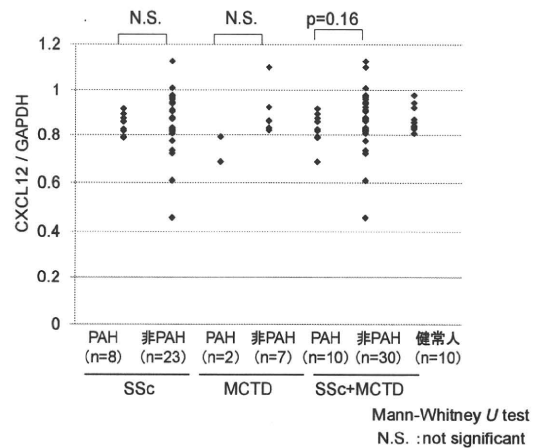


図3 : PAHの有無で層別化した、SSc・MCTD 患者 CD14 陽性細胞の *CXCL12* mRNA 発現レベルの半定量的解析。

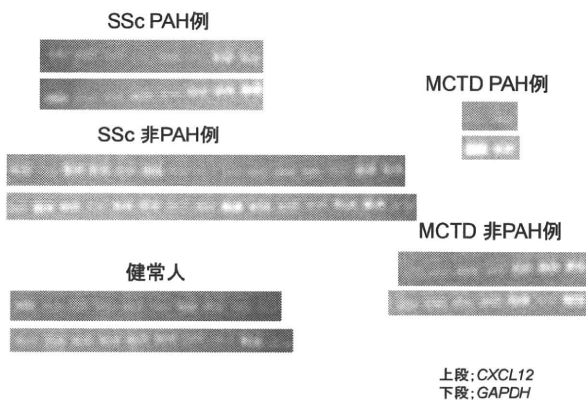


図1 : 患者・健常人 CD14 陽性細胞の *CXCL12* の mRNA 発現量の比較検討。同一検体の *CXCL12* のバンドを上段に、*GAPDH* のバンドを下段に示す。

膠原病における肺高血圧症の評価法と治療に関する研究

研究分担者： 高崎芳成 順天堂大学膠原病内科・教授

研究協力者： 松下雅和 1)、小笠原倫大 1)、建部一夫 2)、天野浩文 2)、森本真司 2)、山路 健 2)、
田村直人 3)

1) 順天堂大学医学部膠原病内科・助教、2) 同・准教授、3)同・先任准教授

研究要旨

混合性結合組織病(MCTD)は予後良好な疾患とされているが、肺高血圧症(PH)の合併は日常生活動作の低下や生命予後悪化の主要因となりうる。右心カテーテルは肺動脈圧以外の右心系の血行動態も把握でき、PHの確定診断に最も有用である。しかしスクリーニング検査や短期間での経過観察には適さない。本研究では血液検査、呼吸機能検査やCT スキャン上で測定した血管径などから非侵襲的に高い確率でPH合併を簡便に予測し、経過観察する方法について考察した。その結果、血清BNP値と右肺動脈径、上行大動脈径をそれぞれ組み合わせることにより、心臓超音波検査での推定右室圧と一定の相関を有することが明らかとなった。これらをPHが疑われる症例に用いることで、右心カテーテルの適応例や施行時期を的確に予測できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)は予後良好な疾患とされているが、肺高血圧症(PH)を合併すると患者の予後は著しく悪化する。肺動脈圧を正確に知るには右心カテーテルでの測定が必要である。本検査では肺動脈楔入圧なども測定でき、PHの診断や治療を行うに当たり強く推奨される検査である。しかし全例にスクリーニングとして行うことや、短期間での経過観察として用いるには不向きである。本研究では患者背景や臨床的特徴、血液検査、画像検査、呼吸機能検査などから非侵襲的に高い確率でPHの合併を簡便に予測し、非侵襲的に経過観察する方法や右心カテーテルを行うべき症例の選別法について考察した。

B. 研究方法

当科に受診歴のある症例のうち心臓超音波検査(UCG)が施行され、推定右室圧が40mmHg以上の症例を抽出した。これらの症例を基礎疾患、発症年齢、性別や投薬内容で分類し、カプランマイヤー曲線で生命予後を比較した。さらに心電図や呼吸機能検査、胸部CTスキャンが施行された症例を選択し、%VC

や%DLCO、主肺動脈径、右肺動脈径や大動脈径などを計測した。これらの数値とUCGでの推定肺動脈圧との関連を統計学的に解析し、推定肺動脈圧と相関する因子の検索を行った。以上の結果を総合し、PHの非侵襲的な予測法、評価法を検討した。

(倫理面への配慮)

すべての症例は匿名化し検査結果など、個人の特定は不可能な状態で評価した。

C. 研究結果

前述した方法でスクリーニングした結果、UCGで推定右室圧が40mmHgを超えていた症例は136例であった。基礎疾患はMCTDが43例(31.6%)、強皮症(SSc)が30例(22.1%)、全身性エリテマトーデス(SLE)が24例(17.6%)、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)が8例(5.9%)、関節リウマチ(RA)が8例(5.9%)、血管炎症候群が6例(4.2%)で肺動脈血栓症やシェーグレン症候群(SjS)、リウマチ性多発筋痛(PMR)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、動脈管開存症(PDA)などの症例も見られた。男女比はMCTDやSSc、SLE、PM/DN、RAなどでは女性が多くを占めていた。調査時の各疾患の平均年齢は

50-60歳代がほとんどであったが、血管炎症候群は74.0歳と高齢で、男女とも同数であった(表1)。基礎疾患の診断からPHの併発が判明するまでの期間は概ね6-10年であり、疾患間での差は見られなかった。

PHを併発した症例に関して基礎疾患により生命予後に差が存在するか否かを検討した。結果、SScではMCTD、SLEに比し予後不良である傾向が見られたが、統計学な有意差は得られなかった。治療薬と生命予後について検討したが、カルシウム拮抗薬、ベラプロスト、サルポクレラート、低用量アスピリン、ワーファリン、ステロイドなどは生命予後の改善に寄与しないことがあらためて示された。統計学な有意差は示されなかったが、ボセンタンは膠原病を基礎疾患に有する症例に対しても生命予後の改善に有用である傾向が見られた(図1)。

次にPHの症例数が多く見られたMCTD、SSc、SLEで血清BNP値、呼吸機能検査、胸部CTスキャンが施行されていた症例を選択した。PHの併発が見られた前後での血清BNP値はMCTDではそれぞれ52.1pg/mlおよび59.5 pg/ml、SLEでは186.0 pg/mlおよび436.2 pg/mlと統計学的に有意差が見られた。一方、SScでは前後とも300台であった。同様に心電図により脈拍数と電気軸を比較したが、有意な所見は得られなかった。これらの疾患でPH合併後に呼吸機能検査が行われた症例を選択し、%VC/%DLCOおよび%FVC/%DLCOを計算した。MCTD、SSc、SLEで前者はそれぞれ1.63、1.86、1.87であり、後者は1.55、1.84、1.79であった。これらを間質性肺炎(IP)の有無で分類したが両者に統計学な有意差は見られなかった(図2)。さらに胸部CTスキャンが行われた症例で主肺動脈径および右肺動脈径を測定し、それぞれの値と上行大動脈径との比を計算した。図3に示した通りMCTD、SSc、SLEでは右肺動脈径/上行大動脈径は0.75、0.78、0.77であった。これらはIPの併発にかかわらず一定した値であった。

これらの結果とUCGでの推定肺動脈圧との関連性を検討するため、統計学な処理を行った。心電図は電気軸、脈拍数とも推定肺動脈圧との関連は見られなかった。呼吸機能検査においても%FVC/%DLCOおよび%VC/%DLCOは推定肺動脈圧と相関は示さなかった(相関係数はそれぞれ0.11、0.14)。しかし、その比が一定値を超えると有意に推定肺動脈圧が

40mmHgを超える症例が多く見られた。これらの結果から、呼吸機能検査を用いて肺動脈圧を推定することは困難であるが、PHの存在を予測するには有用であることが示唆された。次にCTスキャン上で計測した主肺動脈径および右肺動脈径と上行大動脈径の比率を求め、推定肺動脈圧との相関について検討した。これらの計算値で最も相関が見られたのは上行大動脈径/右肺動脈径であり相関係数は0.43、 $p=0.01$ で統計学的にも有意であった。さらに血清BNP値も良好な相関が見られたため、これらの比と血清BNPを用いて重回帰分析を行った。その結果、UCGでの推定肺動脈圧は「 $77-25.2(\text{大動脈径/右肺動脈径}+0.02\text{BNP値})$ 」で線形回帰出来る可能性が示された(図4)。

D. 考察

膠原病患者はPHのハイリスク群であるが、特に抗U1-RNP抗体を有するMCTDやSScでは有意に高率である。PHは潜在性に進行することが多く、労作時呼吸困難や動悸などの患者が自覚症状を訴えた時点では、すでに進行して症例がほとんどである。さらに膠原病を基礎疾患に有する場合は、IPをはじめとした肺病変や心膜炎、心筋炎などの心病変の併発も比較的多くみられるため注意を要する。さらにPHは無治療で経過すると極めて生命予後が不良である。PHの併発を早期に確実に把握するためには、右心カテーテルが必須である。しかし実際の臨床の間では全例にカテーテル検査を行うことは困難であり、PHが明らかとなった症例に対しても短期間で頻回に施行するには向いていない。

今回の検討では右心カテーテルを行うべき症例の確実な抽出法と、定期的に頻回にかつ簡便に経過観察出来る方法の確立を目的とした。PHは何らかの要因で肺動脈圧が高値を示す病態であり、その結果、肺拡散能の低下や肺動脈の拡張、右心圧の上昇から右心不全に至る疾患である。

我々の検討では、心臓負荷を反映する血清BNP値、肺拡散能である%DLCO、CTスキャン上で測定した肺動脈径などを組み合わせて用いることによりPHのスクリーニングと経過観察に有用である可能性が示された。具体的には%VC/%DLCOまたは%FVC/%DLCOの値でPHの有無の予測が可能であり、血清BNP値と上行大動脈径/右肺動脈径の結果を前述した計算式を用いれ

ば推定肺動脈圧と相関するため、圧のみではあるが簡便な経過観察が可能である。

UCGから求める推定肺動脈圧と右心カテーテルによる実測値には一定の相関は見られるが、必ずしも一致しないことは周知の事実である。今回の検討はUCGで得られた推定右室圧を利用したため、実測値とは異なる。今後は右心カテーテルを積極的に行い同様の検討を行うことが必要である。

E. 結論

膠原病を基礎疾患に有しUCGで推定右室圧が40mmHg以上を示した症例について検討した。呼吸機能検査では%FVC/%DLCO、%VC/%DLCOはIPの有無にかかわらず上昇していたが、推定肺動脈圧との相関は見られなかった。血清BNP値とCTスキャン上で測定した大動脈径/右肺動脈径を用いた計算式は、推定右室圧と良好な相関が見られた。前者はPH合併の有無、後者は肺動脈圧のモニタリングに有用である可能性が示された。

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) Takasaki Y. A nti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody. *Nippon Rinsho*. 2010 Jun;68 Suppl 6:578-81.
- 2) Takasaki Y. Anti-U1 RNP and -U2 RNP antibodies. *Nippon Rinsho*. 2010 Jun;68 Suppl 6:561-4.
- 3) Takasaki Y. Anti-polymyositis-scleroderma (PM-Scl) antibody. *Nippon Rinsho*. 2010 Jun;68 Suppl 6:548-50.
- 4) Toyama S, Tamura N, Haruta K, Karakida T, Mori S, Watanabe T, Yamori T, Takasaki Y. Inhibitory effects of ZSTK474, a novel phosphoinositide 3-kinase inhibitor, on osteoclasts and collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):R92. Epub 2010 May 18.
- 5) Sekigawa I, Fujishiro M, Yamaguchi A, Kawasaki M, Inui A, Nozawa K, Takasaki Y, Takamori K, Ogawa H. A new hypothesis of the possible mechanisms of gender differences in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp*

Rheumatol. 2010 May-Jun;28(3):419-23. Epub 2010 Jun 23. Review.

- 6) Matsuyama N, Morimoto S, Tokano Y, Amano H, Nozawa K, Isonuma H, Hashimoto H, Takasaki Y. The long-term prognosis of lupus nephritis patients treated with intravenous cyclophosphamide. *Intern Med*. 2010;49(9):823-8.
- 7) Nakano S, Morimoto S, Suzuki S, Watanabe T, Amano H, Takasaki Y. Up-regulation of the endoplasmic reticulum transmembrane protein UNC93B in the B cells of patients with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 May;49(5):876-81.

2.学会発表

- 1) 高崎芳成: 全身性エリテマトーデスー最近の診断と治療ー. 日本内科学会生涯教育講演会, 平成22年2月7日, 2010.
- 2) 高崎芳成: 膠原病の難治性病態とその治療 (ランチョンセミナー). 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010.
- 3) 松下雅和, 建部一夫, 小笠原倫大, 田村直人, 高崎芳成: 肺高血圧症の合併した膠原病症例における治療と予後. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010.
- 4) 山中健次郎, 仲野総一郎, 石山健太郎, 志村右子, 金井美紀, 高崎芳成: 全身性エリテマトーデスの抗p53抗体の臨床的特徴. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010.
- 5) 渡邊崇, 仲野総一郎, 天野浩文, 森本真司, 戸叶嘉明, 高崎芳成: 急性期SLEを中心とする異所性リンパ組織の産生及び免疫反応の有無についての検討. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010.
- 6) 森本真司, 渡邊崇, 天野浩文, 高崎芳成: ループス腎炎におけるタクロリムス療法の効果の検討. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010.
- 7) 金子俊之, 天野浩文, 安藤誠一郎, 小笠原倫大, 森本真司, 高崎芳成: 抗核抗体陽性かつKL-6高値症例の自己抗体プロフィールと血清学的特徴. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010.
- 8) 天野浩文, 天野恵理, 安藤誠一郎, 箕輪健太郎, 森本真司, 戸叶嘉明, 広瀬幸子, 高崎芳成: SLEモデルマウス脾臓辺縁帯B細胞形成における補体とB細

胞抗原受容体の関与. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会,2010.

9) 安藤誠一郎, 天野浩文, 天野恵理, 渡邊崇, 名切裕, 森本真司, 戸叶嘉明, 林青順, 大辻秀樹, 広瀬幸子, 高崎芳成: FTY720によるBXSBマウスのループス腎炎抑制機序の解析. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会,2010.

10) 高崎芳成: 全身性エリテマトーデスー最近の診断と治療ー. 日本内科学会生涯教育講演会, 平成22年5月30日, 2010

11) 高崎芳成: 全身性エリテマトーデスー最近の診断と治療ー. 日本内科学会生涯教育講演会, 平成22年9月12日, 2010

12) 杉本 郁, 山田里沙, 菱沼留加, 小田啓介, 寶達桂, 景山倫彰, 河本敏雄, 草生真規雄, 小沼 心, 関谷文男, 今 高之, 安田光徳, 建部一夫, 小笠原倫大, 山路 健, 津田裕士, 高崎芳成: 膠原病・リウマチ性疾患に対するアフェレシス療法の実際と今後の展望. 第31回日本アフェレシス学会学術大会, 2010.

13) Kawamoto T, Akiba H, Abe Y, Morimoto S, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y: The Role for TIM-2 in Collagen-Induced Arthritis. 74th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology, Atlanta, USA, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記すべきことなし

表1

PH発症膠原病				
基礎疾患	人数	(%)	男:女(人)	年齢
MCTD	43	(31.6)	4:39	56.5
SSc	30	(22.1)	4:26	67.5
SLE	24	(17.6)	4:20	52.4
PM/DM	8	(5.9)	0:8	57.1
RA	8	(5.9)	2:6	66.5
血管炎	6	(4.2)	3:3	74.0
血栓	6	(4.4)	3:3	63.3
SJS	2	(1.5)	1:1	55.0
Others	9	(6.6)	2:7	49.0
Total	136	(100)	23:113	60.1

図1

Bosentan投与群および非投与群間での予後の比較

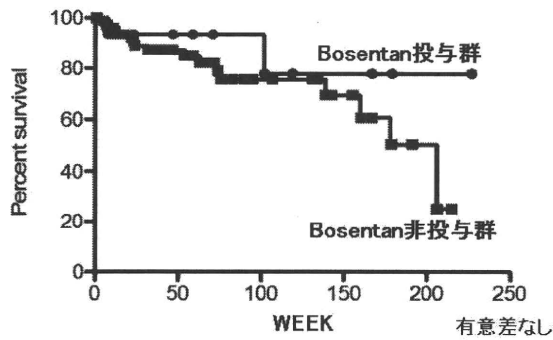


図2

PH併例の呼吸機能検査値 (IP併発の有無で分類)

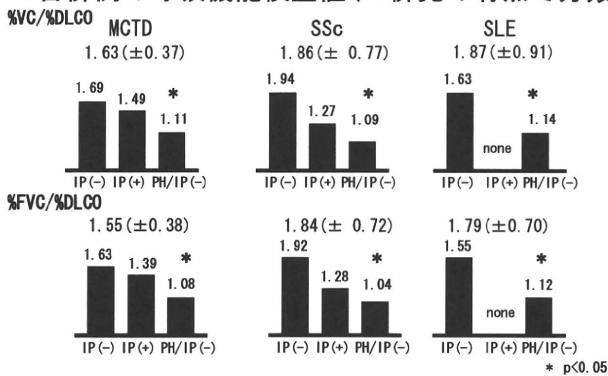


図3

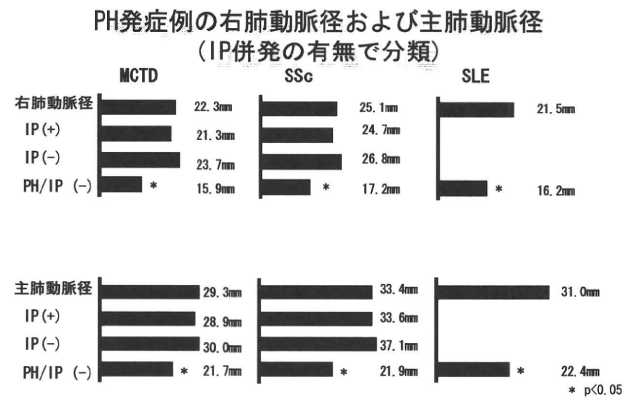
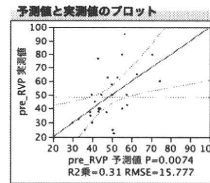


図4

BNP値および大動脈径/右肺動脈径を用いた推定肺動脈圧との相関性の検討



長時間作用型肺高血圧治療薬の有用性に関する研究

研究分担者： 京谷 晋吾 国立循環器病センター・客員研究員

研究要旨

肺動脈性肺高血圧症に対する治療薬がいくつか開発された。作用機序が同一だが作用時間の異なる薬剤の有用性の相違について検討した。膠原病性を含む肺動脈性肺高血圧症患者で、短時間作用薬シルデナフィルによる治療を行っていた4名に対してタダラフィルに変更して治療を行った。短時間作用薬シルデナフィルによる治療を行っていた際には薬剤急性効果に伴う副作用である動悸、頭痛、胸部圧迫感のために、十分な増量が果たせずにいた。タダラフィルへ変更した後はそうした副作用は軽減し、十分な増量を行うことができた。心臓超音波検査での推定肺動脈圧は120.5mmHgから73.5mmHgへと低下し、BNPも328.9pg/mlから138.1pg/mlへと改善がみられた。長時間作用型薬剤においては、急性血管拡張作用に基づく副作用が軽減され、忍容性が向上し、ひいては高用量治療の導入が容易であった。その結果と考えられる治療効果の増強が観察された。

A. 研究目的

肺動脈性肺高血圧症に対する治療薬がいくつか開発された。それらの薬剤は作用機序によりいくつかの群に分類できるが、さらにそれぞれの群に経口投与後の薬物血行動態の異なる薬剤が開発されている。作用機序が同一だが作用時間の異なる薬剤の有用性の相違について検討した。

B. 研究方法

膠原病性を含む肺動脈性肺高血圧症患者で、短時間作用薬シルデナフィルによる治療を行っていた4名に、一日一回服用で有効であるタダラフィルを投与した。治療によるNYHA分類の重症度、副作用症状の変化、心臓超音波検査、血中脳性利尿ホルモン（BNP）濃度を測定し比較した。

C. 研究結果

短時間作用薬シルデナフィルによる治療を行っていた際には薬剤急性効果に伴う副作用である動悸、頭痛、胸部圧迫感などのために、苦痛を覚えていたり、十分な増量が果たせずにいた。タダラフィルへ変更した後はそうした副作用は軽減し、十分な増量を行うことができた。心臓超音波検査での推定肺動脈圧は120.5mmHgから73.5mmHgへと低下し、BNPも

328.9pg/mlから138.1pg/mlへと改善がみられた。

D. 考察 長時間作用型薬剤においては、肺高血圧治療薬に共通してみられる服用後の頭痛、顔面紅潮、動悸、胸部圧迫感など急性血管拡張作用に基づく副作用が軽減され、忍容性が向上し、ひいては高用量治療の導入が容易であった。その結果と考えられる治療効果の増強が観察された。

E. 結論

肺動脈性肺高血圧症に対し長時間作用型肺高血圧治療薬は、患者の忍容性および効果において短時間作用型薬剤に対して優れていた。今後肺動脈性肺高血圧に対する長期効果についても慎重に検討して行く必要がある。

F. 健康危険情報

今回の検討では中止を余儀なくされるような副作用はみられなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 京谷晋吾：肺動脈性肺高血圧症の治療概論. 循環器内科 67, 482-486、2010

2. 京谷晋吾：タダラフィルの使用経験. 治療学 44,

59-61, 2010

3. 京谷晋吾: 肺高血圧症の治療について. 心エコー、
12、126-131、2011

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

混合性結合組織病生体試料バンクの構築およびそれを利用した疾患関連遺伝子の全ゲノム解析

研究代表者： 三森 経世 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・教授

研究協力者： 大村浩一郎 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・院内講師

研究要旨

混合性結合組織病（MCTD）およびその合併症の病因、病態研究材料として、末梢血DNA、血清、および生検材料などの生体試料を採取し保存する生体試料バンクを構築した。これらの試料には連結可能匿名化をほどこした詳細な臨床情報が含まれている。研究分担を行う希望者には生体試料の一部および臨床情報を提供することが可能である。これまでに、MCTD患者および抗U1RNP抗体陽性膠原病患者の試料（DNAおよび血清/血漿）がそれぞれ88例と160例収集された。また、収集したDNA検体を用いて全ゲノム関連解析によるMCTDの疾患関連遺伝子検索を行う準備がほぼ整った。MCTDのような比較的希少な疾患の場合、生体試料バンクは今後の研究に非常に有用である。それを用いた全ゲノムSNPタイピングと関連解析においてMCTDの発症や肺高血圧症合併に関係する遺伝子多型（SNP）を見つけ出すことができれば、将来のテーラーメイド医療や新規治療開発の基礎を作ることができる可能性がある。

A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）は臨床的に全身性エリテマトーデス（SLE）、強皮症（SSc）、筋炎（PM）様症状を合わせ持ち、血清中の抗U1RNP抗体高力価陽性を特徴とする疾患である。

以前の近藤班（混合性結合組織病の病態、治療と関連する遺伝的因子、自己抗体の研究。平成11-16年度）において、班のプロジェクト研究として抗U1RNP抗体陽性で無治療の膠原病患者188例を登録し、その臨床症状、検査所見、自己抗体、HLAのDNAタイピングを含むデータベースを構築させた。うち142例については、血清とDNAを一括して保存し、研究班で使用できるように整備されている。その142例はMCTD基準に合致するMCTD確診例82例と非診断例（SLEなど他の抗U1RNP抗体陽性例が含まれる）60例であり、平成17年度からの本研究班でも活用されている。

しかし、このデータベースと生体試料は、主に抗U1RNP抗体陽性の初診患者から得られたものであり、特にMCTDの予後規定因子である肺動脈性肺高血圧症（PAH）を合併した症例については必ずしも充分でない。本研究班では、多施設共同プロジェクト

研究として「抗U1RNP抗体陽性膠原病患者の肺動脈性肺高血圧症に対する副腎皮質ステロイド療法の検討」を行っている。本研究は最新のPAH治療ガイドライン作成のための前向き研究であるが、患者により必ずしも治療反応性は一定していない。そのため、いかなる患者サブセットで治療反応性がよいのかなどを明確にする目的で血清学的・遺伝的指標を追加検討することは重要と考えた。すなわち本プロジェクト研究をより充実させるため積極的に生体試料を採取することは難治性病態の研究を行う上で必要である。また京都大学では、MCTDで認められることが多い無菌性髄膜炎などの中枢神経症状を呈した患者の急性期血清と脳脊髄液を患者同意のもとに保存し、これらの試料を用いた研究成果を示してきた（研究分担者：藤井隆夫）。さらに、分担研究にはNOS2遺伝子多型によるMCTDのPAH発症予測（川口）、HEXIM1によるPAHおよび右心肥大進展の分子機構（田中）、血管関連マーカーによるPAHの診断と病態解析（岡田）、新たな自己抗体の探索（澤井、三森）など生体試料を必要とする研究が多く、単独施設での生体試料採取には限界がある。今後、当初の計画で想定していた目的に到達するため

には、これらのMCTD予後に関連する難治性病態を多施設で研究・検討するための患者生体試料バンクの構築は重要と考え、その整備を開始することとした。また、集められた資料のうちDNA検体を用いてMCTDの病因としての疾患関連遺伝子検索を行うことを目的とした。

B. 方法

1. MCTD生体試料バンクの整備

研究代表者および分担研究者の所属施設のMCTD患者より文書によるインフォームドコンセントのもとに末梢血DNA、血清、髄液、胸水、および生検材料などの生体試料を採取し、冷凍保存する。試料の採取に当たっては連結可能匿名化を行う。試料は研究代表者（京都大学大学院医学研究科臨床免疫学）の専用の冷凍庫に保管し、管理者が旋錠する。臨床データはやはり匿名化し、管理者が外部と接続していない専用のコンピューターを使用し外部記憶装置に記録させ、そのメディアは鍵をかけて厳重に保管する。研究分担を行う希望者には試料の一部ずつを提供する。

2. MCTDの疾患関連遺伝子の検索

MCTD患者および抗U1RNP抗体陽性膠原病患者のDNAを用い、DNAチップ（Illumina Human610-Quad[®]を用いる予定）を用いて全ゲノムSNPタイピングを行う。DNAのSNPタイピングおよび得られたデータの関連解析は京都大学疾患ゲノムセンターと共同で行う。絞られた候補遺伝子の関連確認を別コホートの検体を用いてTaqMan allelic discrimination法でタイピングを行い、Fisher正確検定などによる関連解析を行う。

また、既に我々が行った計990例のRAと1241例の健常人による全ゲノム関連解析のデータを対象として、MCTD固有の疾患関連遺伝子の検索を行う。

C. 結果

研究代表者が所属する京都大学医学部医の倫理委員会に本研究計画を申請し、承認を得た（第G351号、平成22年4月26日承認）。この承認を受けてMCTD検体の収集を開始した。現在、分担研究施設においても倫理委員会承認手続きを行っており、一部の研究機関ではすでに試料収集が始まっている。

以前の近藤班（混合性結合組織病の病態、治療と関連する遺伝的因子、自己抗体の研究。平成11-16年度）において収集し保存されていた抗U1RNP抗体陽性膠原病患者のDNA157検体と血清139検体は、北里大学より当研究班へ移管を行い、生体試料バンクに統合した。

これまでに合計MCTD88例、抗RNP抗体陽性膠原病160例のDNAが収集され、またそれぞれ86例、158例の血清または血漿が収集されている。このうちPAH合併例は20例であった。今後、MCTDとして200例以上の生体試料収集を目指す。

本年度は研究班全体としてDNA検体を利用したMCTDの疾患関連遺伝子検索のための検体収集を継続し、全ゲノム関連解析（GWAS）のための遺伝子タイピングのチップを購入した。十分な数の検体が集まり次第、MCTDの疾患関連遺伝子の解析を遂行する予定である。

D. 考察

MCTDの病因および病態研究に役立てるための生体試料バンクが稼働始めた。個々の分担研究で患者生体試料を用いる場合には、単独施設では検体数が限られるばかりでなく、患者の偏在や診断のバイアスがかかりがちであり、生体試料バンクはかかる研究の遂行に有用と考えられる。

近年、ヒトの全ゲノム配列が解読されたのち、遺伝子多型情報の蓄積とテクノロジーの急速な進歩により、全ゲノム一塩基多型（SNP）をもちいた関連解析を比較的容易に行うことが可能となり、関節リウマチ（RA）や全身性エリテマトーデス（SLE）の原因遺伝子が数多く見つかってきている。これらの中には予想された遺伝子も含まれるが、免疫と一見無関係に見える予想外の遺伝子も多く含まれ、そこから新たな原因究明につながる発見も少なくない。そこで、我々はMCTDやその合併症に関連する遺伝子の検索を行うため、MCTD患者のGWASを行うことを計画した。本研究はMCTDのDNAを含む生体試料バンクを設立することで、比較的稀な疾患であるMCTDの患者検体を全国規模で収集し、健常人や他の膠原病を対照としたGWASを行うことによりMCTDおよびその合併症の原因究明をゲノムレベルで行うものである。MCTDの遺伝的要因においては、

これまでHLAとの関連が報告されているが、非MHC遺伝子との関連の報告はほとんどない。また、家族性肺高血圧症の原因遺伝子は報告されているが、孤発性または膠原病性肺高血圧症における関連遺伝子も報告は少なく、これまでGWAS解析はなされていない。

GWASによりMCTDおよびその合併症の原因が明らかとなる可能性があり、その結果としてより深い病態の理解、新規治療法につながる可能性がある。

E. 結論

MCTDの病因および病態研究に役立てるための生体試料バンクが稼動を始めた。全ゲノムSNPタイピングと関連解析によりMCTDの発症やPAH合併に関係する遺伝子多型を見つけるべく、その準備がほぼ整った。今後そこから得られた遺伝子情報により深い病態の理解につながるとともに、将来のテーラーメイド医療や新規治療開発の基礎を作ることができると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Okawa K, Mimori T: The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen recognized by anti-CADM-140 antibody.

Rheumatology (Oxford) 49(3):433-40, 2010.

2) Yamaguchi H, Fujimoto T, Nakamura S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Nagata S. Aberrant splicing of milk fat globule EGF factor 8 gene in human systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.*

40(6):1778-1785, 2010.

3) Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, Ikari K, Terao C, Takahashi A, Yamazaki K, Hosono N, Myouzen K, Tsunoda T, Kamatani N, Furuichi T, Ikegawa S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Iwamoto T, Momohara S,

Yamanaka H, Yamada R, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K: A regulatory variant in CCR6 is

associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat Genet* 42(6):515-9, 2010.

4) Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, Maeda S, Teradaira S, Akizuki S, Prieto-Martin P, Nomura T, Sakaguchi N, Köhl J, Heyman B, Takahashi M, Fujita T, Mimori T, Sakaguchi S. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med* 207(6):1135-43, 2010.

5) Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T; for the RRR study investigators. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: RRR (remission induction by Remicade in RA) study. *Ann Rheum Dis* 69(7):1286-1291, 2010.

6) Hoshino K, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y, Nakashima R, Mimori T: Anti-MDA5 and anti-TIF1 antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 49(9):1726-33, 2010.

7) Tanaka M, Murakami K, Ozaki S, Imura Y, Tong XP, Watanabe T, Sawaki T, Kawanami T, Kawabata D, Fujii T, Usui T, Masaki Y, Fukushima T, Jin ZX, Umehara H, Mimori T: DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (*Drosophilla*) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1. Analysis of their binding with TGF- β superfamily proteins. *FEBS J.* 277(20):4278-89, 2010.

8) Nakashima R, Mimori T: Clinical and pathophysiological significance of myositis-specific autoantibodies and myositis-associated antibodies. *Int J Clin Rheumatol.* 5(5): 523-536, 2010.

9) Ohmura K, Terao C, Maruya E, Katayama M, Matoba K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Tohma S, Matsuo K, Tajima K, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Fujii T, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. Anti-citrullinated peptide antibody-negative RA is a genetically distinct subset: a definitive study using only bone-erosive ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 49(12): 2298-2304, 2010.

10) Kang EH, Nakashima R, Mimori T, Kim J, Lee YJ,

Lee EB, Song YW: Myositis autoantibodies in Korean patients with inflammatory myositis: Anti-140-kDa polypeptide antibody is primarily associated with rapidly progressive interstitial lung disease independent of clinically amyopathic dermatomyositis. *BMC Musculoskelet Disord.* 11(1):223, 2010.

11) Sato T, Fujii T, Yokoyama T, Fujita Y, Imura Y, Yukawa N, Kawabata D, Nojima N, Ohmura K, Usui T, Mimori T: Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* 62(12):3730-40, 2010.

12) Van Praet J, Van Steendam K, Smith V, De Bruyne G, Mimori T, Bonroy C, Elewaut D, Deforce D, De

Keyser F: Specific antinuclear antibodies in systemic sclerosis patients with and without skin involvement: an extended methodological approach. *Rheumatology (Oxford)* 2011 Feb 17. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) Yukawa N, Ohmura K, Mimori T, et al. Correlation of antinuclear antibodies and anti-DNA antibodies with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. EULAR, Rome, June 2010.

2) Ohmura K, Mimori T, et al: HLA-DR8 is associated with ACPA-negative RA in Japanese (Oral presentation). 第14回国際免疫会議、神戸、2010年8月

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし