

9) 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。

10) 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。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。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。

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の効果はET-1を介したも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。

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の過剰発現は抑制的に働き、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発現抑制が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita T, Ohneda O, Nagano M, Iemitsu M, Makino Y, Tanaka H, Miyauchi T, Goto K, Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y, Poellinger L, Yamamoto M. Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS. *Mol Cell Biol.* 28(4):1285-1297, 2008.
2. Kagawa T, Watanabe N, Mochizuki K, Numari A, Ikeno Y, Itoh J, Tanaka H, Arias IM, Mine T. Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant Bsep and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294(1):G58-67, 2008
3. Yoshikawa N, Shimizu N, Sano M, Ohnuma K, Iwata S, Hosono O, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H. Role of the hinge region of glucocorticoid receptor for HEXIM1-mediated transcriptional repression.

- Biochem Biophys Res Commun.** 371(1):44-49, 2008
4. Yamochi T, Ohnuma K, Hosono O, Tanaka H, Kanai Y, Morimoto C. SSA/Ro52 autoantigen interacts with Dcp2 to enhance its decapping activity. **Biochem Biophys Res Commun.** 370(1):195-199, 2008
 5. Shimizu N, Yoshikawa N, Wada T, Handa H, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Sawai T, Morimoto C, Tanaka H. Tissue- and context-dependent modulation of hormonal sensitivity of glucocorticoid-responsive genes by hexamethylene bisacetamide-inducible protein 1. **Mol Endocrinol.** 22(12):2609-2623, 2008.
 6. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawarazaki W, Kurihara H, Tanaka H, Miyoshi J, Takai Y, Fujita T. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. **Nat Med.** 14(12):1370-1376, 2008.
 7. Hozawa S, Nakamura T, Nakano M, Adachi M, Tanaka H, Takahashi Y, Tetsuya M, Miyata N, Soma H, Hibi T. Induction of matrix metalloproteinase-1 gene transcription by tumour necrosis factor alpha via the p50/p50 homodimer of nuclear factor-kappa B inactivated human hepatic stellate cells. **Liver Int.** 28(10):1418-1425, 2008
 8. Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsuhashi 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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 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.
 14. 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
1. 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.
 2. 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

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

膠原病における肺動脈性肺高血圧症でも、肺血管のリモデリングやplexiform lesion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。そこで、膠原病性肺高血圧患者での、種々の血清因子を検討し、その臨床的意義の検討を行った。肺動脈圧(PAP)が40mmHg以上の膠原病症例ではD-Dimer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。また、PAPとD-Dimerとの間には $R^2 0.341$, $p < 0.01$ の正の相関がみられた。D-Dimerは、PAPと相関がみられ、治療の指標になる可能性が推測された。今後、治療との関連、経過等との関連をさらに検討する必要と考えられた。

血管内皮細胞を反映するsP-Selectin, sICAM-1についても検討した。膠原病症例ではsI-CAM1(ng/ml)とD-Dimerは $R^2=0.190$ $p < 0.003$, sI-CAM1とsP-Selectin, $R^2=0.193473$ $p < 0.0064$ の傾向が見られたが、PAPとの関係は明らかではなかった。

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。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。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。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 との関係：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)。

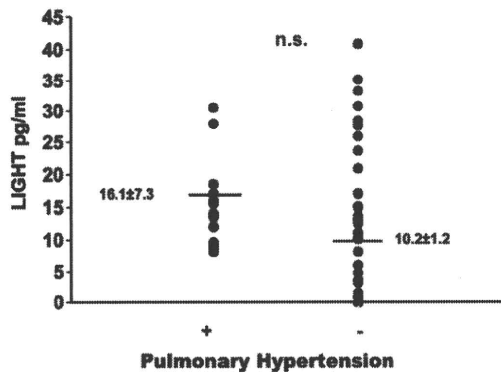


Fig 1. Relationship between LIGHT level and PAP in CTD

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)。

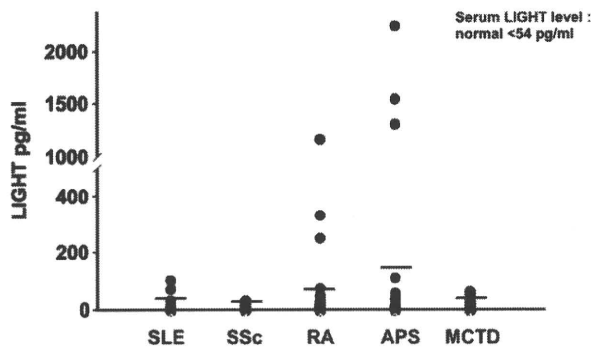


Fig 2. Serum LIGHT Level in patients with various CTD

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。

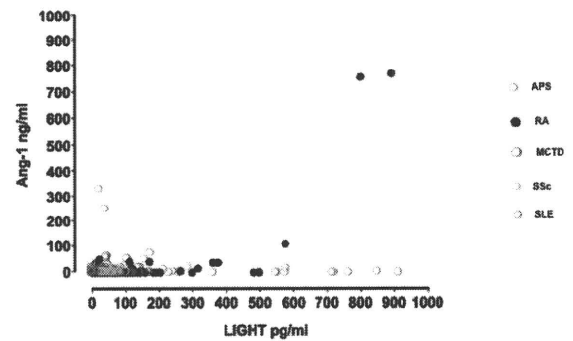


Fig 3. Relationship between Angiotensin-1 and LIGHT in Serum

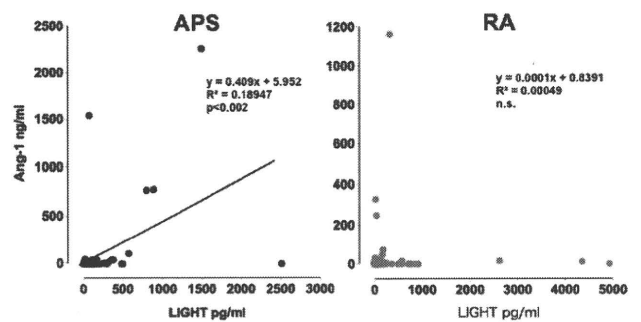


Fig 4. Relationship between Angiotensin-1 and LIGHT in Serum

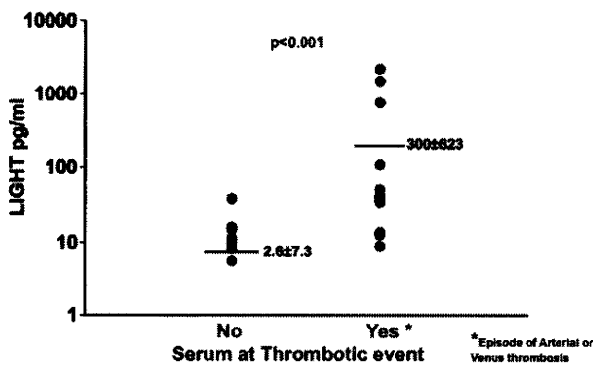


Fig 5. Serum LIGHT Level and Thrombosis in APS

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, 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., Damás 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20-22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・特任研究員
石坂 幸人 同研究部・部長

研究要旨： angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) は、血管内皮におもに発現し、とくに肺血管に豊富であり、ACEに起因する血管収縮・増殖反応と拮抗して血管保護に働く。我々は、膠原病患者（MCTD、SLE、強皮症）血清中に抗ACE2抗体を同定し、血管病変（肺動脈性肺高血圧症/PAHと末端壊死）患者に出現特異性が高いこと、これら患者の血清IgG分画がin vitro ACE2活性を阻害することを見出した（本稿G文献5）。論文掲載後さらに症例を追加し、新たにMCTDを含む膠原病PAH 3例でACE2阻害自己抗体を再確認した。一方、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、ACE2阻害作用をもつ抗体だけが膠原病血管病変と関連することが、強く示唆された。SLE末端壊死患者のACE2阻害抗体が標的と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人でも共通だった。

A. 研究目的

抗ACE2抗体は、ACE2（ACEの収縮・増殖性血管反応に拮抗し血管を保護する酵素）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：健常対照28人、膠原病（MCTD、SLE、強皮症）のうち血管病変（PHまたは末端壊死）のある22人、血管病変のない72人で抗ACE2抗体を測定した。PHのうち、1人は強皮症/PBC/肝硬変、他7人はPAHである。

ほかに特発性PAH 2人も検討したが（22年度報告書に記載）、本総合報告では膠原病症例のみを記す。

2) 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) 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) 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

抗ACE2抗体の存在（図1）：ELISA系を作製し、血管病変のある患者で有意に抗体価が高い結果を得た。

血清ACE2活性と抗ACE2抗体価の関係：血清ACE2活性値は、血管病変患者群において、健常人、対照患者群に比べ、平均活性値が低かったが、個人差が大きく対照群の一部にも低値例がみられた。しかし、抗ACE2抗体価と血清ACE2の関係をみると、血管病患者で明確に逆相関し（図2）、対照患者ではまったく相関がなかった（本稿G文献5：本稿にはデータ示さず）。とくに活性の低い5患者（図2；P1-P5）で血清ACE2蛋白量を健常対照と比較したところ、明らかな差はなく、活性低下は機能的低下と示唆され

た。

治療前後での血清抗ACE2抗体価と血清ACE2活性値の変化(図3)：進行性の末端壊死1患者で、抗体除去治療を行なったところ、欠損状態であった血清ACE2活性値が、正常値近くに回復した。

血清IgG分画によるACE2阻害(図4)：抗ACE2抗体価の高い血管病変患者3人の血清IgG分画を抽出し(A)、*in vitro* ACE2活性への影響を調べたところ、明確な抑制がみられ(B)、本抗体による阻害作用が示された。

ACE2阻害自己抗体の責任エピトープ(図5)：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を得た。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(2011, 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5-A)。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と他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5-B)。

すなわち複数患者に共通のエピトープが同定できた。

血管病変なく抗ACE2抗体が高値の患者：図1に示した患者群での検討の後、さらに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(図6-A)。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(図6-B)。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。

PH患者(MCTD- or SLE-PAH 3人、PBC/肝硬変-PH 1人)におけるACE2阻害自己抗体の検討：

図1に示した患者群での検討の後、さらに4人のPH血清を検討した(データ図は2011, 1/22班会議で呈示した。本稿に示さず)。4人ともに抗ACE2-ELISA高値であった。また、4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3人で、健常基準値の50%以下に低下していた。

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、PBC-PHのIgG分画には阻害作用がなかった。

D. 考察

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(G項、文献5)。症例数を増やして検討すると、同抗体は血管病を発症していない膠原病患者にも認められたが、それらの血清IgG分画には、*in vitro* ACE2阻害作用がなかった。すなわち、ACE2に対する自己抗体は、MCTD、SLE、強皮症に稀でなく出現し、そのうちのACE2活性阻害作用をもつ抗体が、膠原病の収縮性血管病変と相関することが強く示唆された。

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。

G. 研究発表

1. 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, Kuroki 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

8. 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

9. 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

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

1~40.日本リウマチ学会総会 (30題)、日本リウマチ学会関東支部会(5)、日本内科学会関東地方会(5)

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.

4. Yamashita H, Kubota K, Takahashi Y, Kunimatsu J, Shimizu A, Eri T, Itoh K, Mimori A: Value of PET/CT in clinical practice in patients with possible spondyloarthropathy. The 77th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Philadelphia, Oct, 2009

5. Takahashi Y, Haga S, Yamashita H, Ishizaka Y, Mimori A: Autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with rheumatic diseases. The 77th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Philadelphia, Oct, 2009

6. Kunimatsu J, Itoh K, Yanai A, Shimizu A, Takahashi Y, Suzuki A, Yamashita H, Mimori A: Quantitative assessment of cerebral blood flow in patients with polymyalgia rheumatica with mood disorder. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2008, Paris, Jun, 2008

7. Shimizu A, Itoh K, Kunimatsu J, Takahashi Y, Suzuki A, Yamashita H, Mimori A: Efficacy of combination therapy of TNF inhibitors and bisphosphonates on

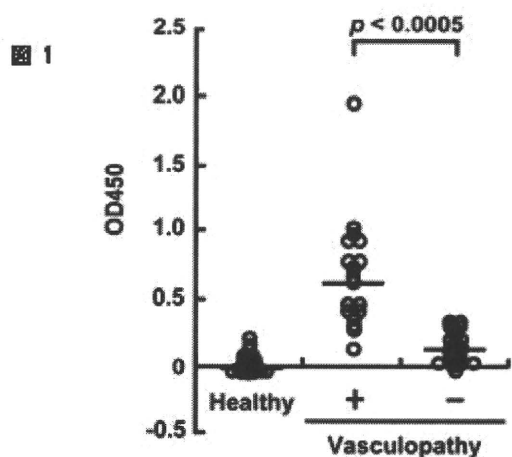
radiographic progression of rheumatoid arthritis. APLAR, Scientific Meeting, Yokohma, Sept, 2008

San-Fransisco, Oct, 2008

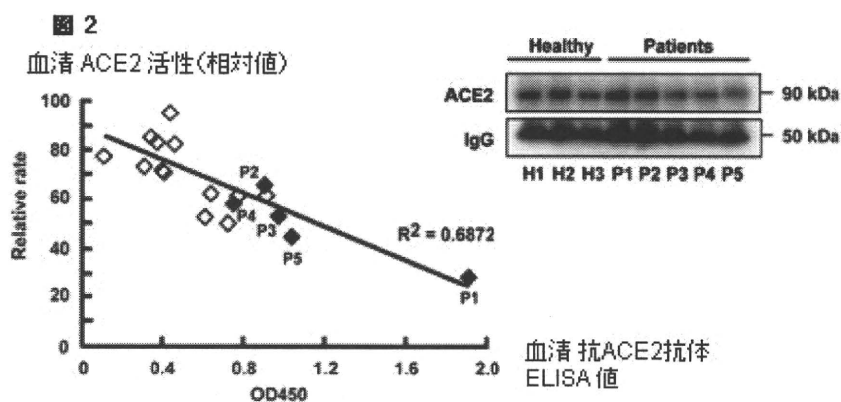
8. Takahashi Y, Sugiyama H, Kunimatsu J, Shimizu A, Eri T, Itoh K, Mimori A: A risk assessment of nontuberculous mycobacteriosis during TNF blocking therapy for rheumatoid arthritis. The 76th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting,

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

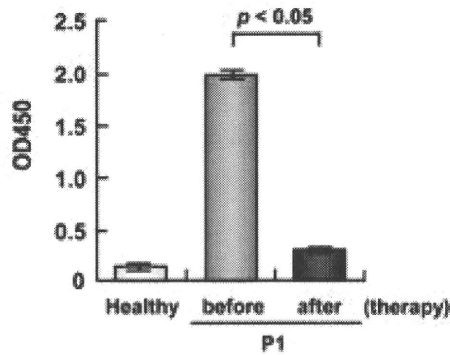


ヒト recombinant ACE2 を精製し、ELISA 系を確立し、血清との反応をみた。
血管病変のある膠原病患者(n = 18)は、血管病変のない対照患者(n = 24)、健常者(n = 28)に比べ、著明な高ELISA 値を示した。すなわち抗ACE2 自己抗体の存在が示唆された

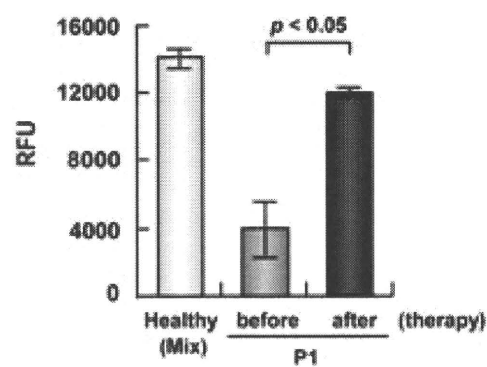


血管病変の患者 18人すべてについて、プロットした血清 ACE2 活性 と抗 ACE2 抗体量は、逆相関した。
5 人の患者血清で、免疫沈降したACE2蛋白質をWestern blot で半定量すると蛋白質の低下はない(健常者と同程度)、すなわち活性低下は機能性であることが示された

図 3 (A) 血清抗ACE2 ELISA値

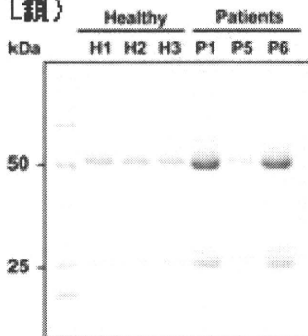


(B) 血清ACE2 活性

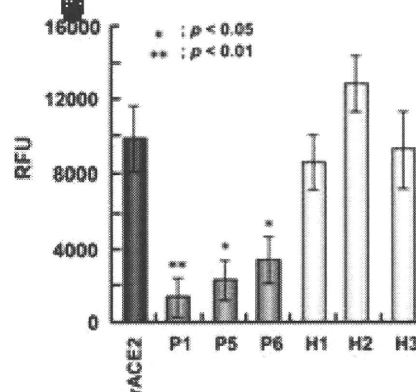


末端壊死進行のため入院したSLE女性(P1)に対し、ステロイドパルス+プレドニン+血漿交換(DFPP)によって、抗体除去を図った。治療後に、抗体が大幅低下し(A)、血清 ACE2 活性は回復した(B)。末端壊死は治癒し、切断は回避できた。

図 4 (A) 血清IgG (H鎖、L鎖)



(B) in vitro ACE2活性への影



血管病変患者 3人、健常者 3人から、血清 IgG 分画を精製した(A) IgG 分画 5 μ l を、in vitro ACE2 活性測定系に添加したところ、患者 IgG は、ACE2 活性を阻害した(B)。すなわち、患者血清中の抗 ACE2 抗体の存在と阻害活性が、証明された。

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

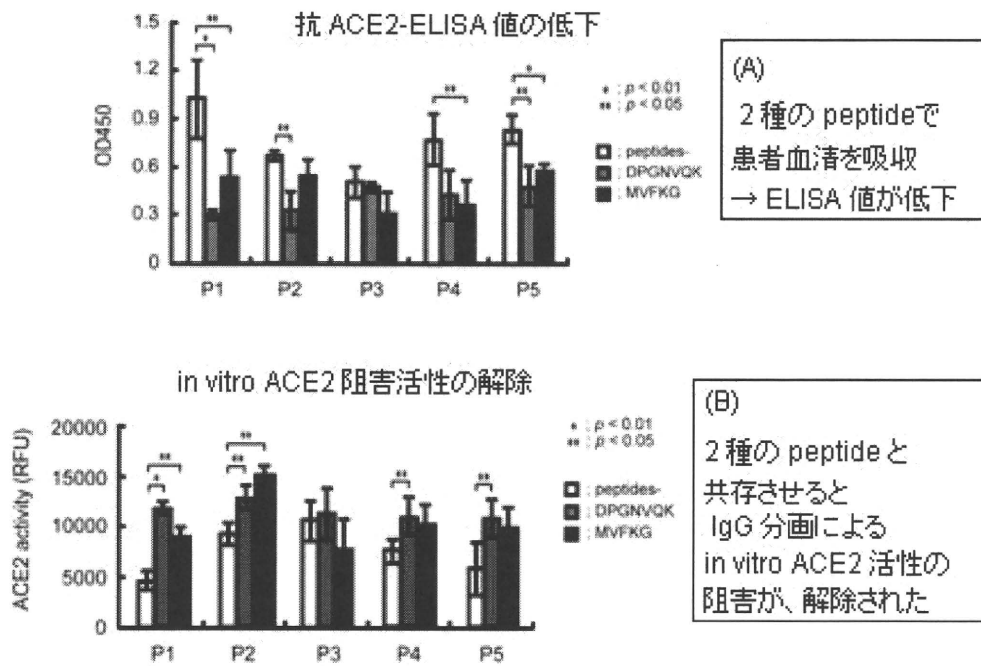
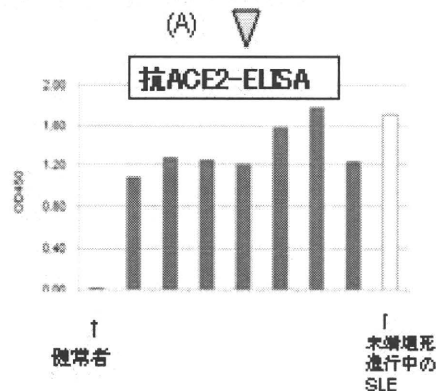
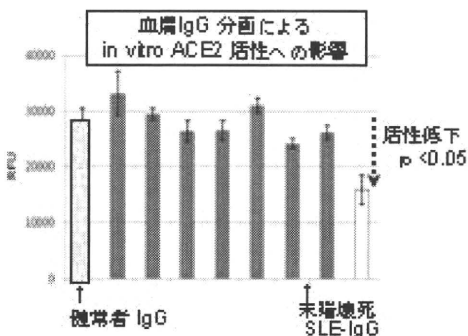


図6 <血管病変がない患者における、抗ACE2 抗体の作用の検討>

図1に呈示した症例に加え、新たに症例数を増やして抗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 (B)



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

MCTD における肺動脈性肺高血圧症の病態解析とスクリーニング法に関する研究

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

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は MCTD、全身性強皮症（SSc）の難治性病態である。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、5 年生存率は 80%に満たない。そこで、PAH の予後を改善するためには PAH 病態の解明と早期診断・治療介入を可能とするスクリーニング法の開発が必要である。病態面では、循環血中の血管内皮前駆細胞（EPC）、CD14+単球の PAH における役割を検討した。その結果、MCTD でも SSc と同様に EPC の減少がみられ、PAH を有する例では特に EPC 減少が顕著であった。この結果から、EPC による血管修復、脈管形成の不全が肺動脈病変形成を促す可能性が推測された。一方、SSc 患者末梢血中では代償性に血管内皮細胞への分化能を有する CD14+単球サブセットが増えており、PAH を有する例の CD14+単球では細胞遊走・接着に関わるケモカインやインテグリンの発現が上昇していることが明らかにされた。したがって、PAH 病態に末梢血 EPC や CD14+単球の数やフェノタイプの変化が関連する可能性が示唆された。

一方、PAH 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 SSc における最適な PAH スクリーニング法を検討した。PAH 群と非 PAH 群で各スクリーニング検査結果を比較すると、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。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。MCTD/SSc 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、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、PAH

の予後をさらに改善するため、循環細胞に注目した PAH 病態の追究と早期診断・治療介入を可能とするスクリーニング法の開発を検討した。

本研究では、PAH 病態における循環細胞の役割を血管内皮前駆細胞（EPC）と CD14+単球に着目した。EPC による血管内皮の新生・修復機構（脈管形成）は成人の血管構築、機能の維持にも脈管形成が重要な役割を果たすことが明らかにされている。我々は全身性強皮症（SSc）患者において EPC サブセットのひとつである CD34+VEGFR2+CD133+細胞の減少ならびに分化能障害を見出し、血管病変をきたす新たな機序として脈管形成異常による血管修復不全を提唱した（Kuwana M, et al. Lancet 2004;364:603）。

そこで、本研究では PAH 病態における EPC の関与を追究することを目的とした。一方、末梢血 CD14+ 単球はマクロファージに分化して炎症・免疫に関わるのみならず、組織再生や修復に重要な役割を果たすことが明らかにされた。PAH モデル動物では肺動脈壁に浸潤した単球が血管のリモデリングを誘導することが示されている。そこで、PAH を有する症例の末梢血単球で発現変化した遺伝子を網羅的にスクリーニングした。

MCTD や SSc 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。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 SSc 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 MCTD または SSc 連続 101 症例を対象とした。内訳は、厚生省診断基準を満たす MCTD 患者 22 例、ACR 分類基準を満たす SSc 患者 79 例であった。また、過去に PAH と診断された MCTD 7 例、SSc 6 例を過去対照群とし

た。過去対照群の PAH 診断時 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。EPC 測定では健康人 13 例を対照として用いた。

(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) EPC の定量

末梢血 20ml より単核球を分離し、MACS ビーズ（Miltenyi Biotech）を用いて CD34+細胞を enrich した。CD34、VEGFR2、CD133 に対するモノクローナル抗体を用いて CD34+細胞分画を三重染色した。さらに、死細胞を除くために 7AAD による染色を行った。CD34+VEGFR2+CD133+細胞の割合をフローサイトメトリーにより求め、FlowCount マイクロビーズ（Beckman-Coulter）を用いて定量化した。EPC 数は末梢血 1 ml あたりの絶対数で表した。

(4) 末梢血単球の遺伝子発現の網羅的解析

背景因子（性、年齢、SSc 病型、間質性肺疾患の有無、薬剤）を一致させた PAH を有する SSc 3 例と PAH のない SSc 3 例の末梢血 20ml から単核球を分離した。さらに、磁気細胞分離法（Miltenyi Biotech）を用いて CD14+単球を分取した。RNeasy[®] Mini Kit（QIAGEN）を用いて total RNA を抽出し、3 例の total RNA をプールした。遺伝子発現は PCR アレイ（SABiosciences）を用いて 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 群間で差のある遺伝子として抽出した。

(5) 統計学的検討

2 群間の比較には χ^2 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

(1) EPC 数の検討

MCTD/SSc 45 例の EPC 数を測定した。その結果、1mL あたり 10.6 ± 6.8 個で、健常人の 32.3 ± 13.6 に比べて有意に少なかった ($P < 0.001$)。MCTD 7 例と SSc 38 例に分けたところ、2 群間で EPC 数に差はなく、いずれの群も健常人より有意に少なかった (いずれも $P < 0.05$) (図 1)。また、肺高血圧症、PAH、間質性肺疾患の有無で層別化したところ 2 群間で EPC 数に有意差はなかったが、肺高血圧症/PAH 例で EPC 数が少ない傾向がみられた。採血時に皮膚潰瘍を有する 14 例は、皮膚潰瘍のなかった 31 例に比べて有意に EPC が少なかった (5.3 ± 3.5 vs 13.0 ± 6.6 , $P < 0.001$)。

(2) 単球における網羅的遺伝子発現解析

PCR アレイで PAH 群と非 PAH 群の遺伝子発現差を fold change として求めたところ、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*, *ITGB5*, *ITGa6*, *NCAM1*, *ITGa1*) 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)。

(3) PAH スクリーニングの検討

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 MCTD 4 例、強皮症 14 例を除外した。残り 83 例の

うちドプラエコーによる推定 sPAP 37mmHg 以上の 5 例 (6%) 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 PAH と診断された。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 3)。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、%DLco 60% 未満、BNP > 30pg/mL、ドプラエコーによる推定 sPAP 37mmHg 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、%DLco 48% (感度 100%、特異度 80%)、推定 sPAP 37mmHg (感度 100%、特異度 95%)、BNP 90pg/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

今回の検討では、MCTD でも強皮症と同様に EPC の減少がみられ、EPC 減少は長い罹病期間と手指潰瘍と相関を示した。最近、IPAH 患者で EPC 数の減少が報告されているが、PAH を有する例で EPC 数が少ない傾向が見られた。EPC による血管修復、脈管形成の不全が PAH にみられる肺動脈病変形成を促す可能性が推測された。一方、SSc 患者末梢血中で血管内皮細胞への分化能を有する CD14+ 単球サブセットが増えていることが報告されている。この現象は EPC 減少に対する代償的な反応の可能性がある。本研究により、末梢血中に動員された CD14+ 単球では PAH の有無により遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかにされた。特に PAH では単球における細胞遊走・接着に関わるケモカインやインテグリンの発現が上昇しており、末梢血単球が肺動脈局所へ優先的にホーミングする機序が示唆された。

一方、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/SSc 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。

E. 結論

PAH の病態に末梢血中の EPC や CD14+単球の数やフェノタイプの変化が関連する可能性が示唆された。

MCTD/SSc 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。

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. Kawai M, Masuda A, Kuwana M. A CD40-CD154 interaction in tissue fibrosis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(11): 3562-3573.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Kaneko Y, Suwa A, Hirakata M, Ikeda Y, Kuwana M. Clinical associations with autoantibody reactivities to individual components of U1 small nuclear ribonucleoprotein. *Lupus*. 2010; 19(3): 307-312.
6. Seta N, Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14⁺ monocytes. *Exp. Hematol*. 2010; 38(7): 557-563.
7. Furuya Y, Satoh T, Kuwana M. Interleukin-6 as a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Rheumatol*. 2010; 2010: 720305.
8. Furuya Y, Okazaki Y, Kaji K, Sato S, Takehara K, 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.
9. Yamaguchi Y, Okazaki Y, Seta N, Satoh T, Takahashi K, Ikezawa Z, 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. Kuwana M: Circulating endothelial cell progenitors in scleroderma. The 10th International Workshop for Scleroderma Research (Cambridge). 2008. 8.
2. Kuwana M: Insufficient repair as a mechanism for scleroderma vasculopathy. 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (Yokohama). 2008. 9.
3. 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.

4. 桑名正隆: カトリア教育研修講演; 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.

5. 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.

6. 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。

肺高血圧症の合併した膠原病症例における治療と予後に関する研究

研究分担者： 高崎芳成 順天堂大学膠原病内科・教授

研究研究者： 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

肺高血圧症(PH)は混合性結合組織病や強皮症に多くみられる重篤な合併症の一つで、患者の日常生活動作および生命予後を大きく左右する病態である。本研究では膠原病に合併した PH の臨床的特徴、治療法およびその反応性をレトロスペクティブに検討し、PH のスクリーニング法や適切な治療法などの確立を目的とした。基礎疾患の違いや間質性肺炎、レイノー現象や抗 U1-RNP 抗体の有無にかかわらずステロイド薬やベラプロスト、ワルファリン、カルシウム拮抗薬などによる治療は生命予後に対して統計学的に有意な効果は得られなかったが、ボセンタンは生命予後改善効果が期待できる薬剤であった。呼吸機能検査、血清 BNP 値や CT スキャン上で測定した右肺動脈径と上行大動脈径比などを合わせた評価は、心臓超音波検査での推定右室圧と一定の相関を有し、PH の診療において有用であることが示された。

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)を併発すると患者の予後は著しく悪化する。エンドセリン受容体拮抗薬や PDE5 阻害薬などの登場で治療の選択肢は増えたもののいまだ課題が残されている合併症である。

PH の診断や治療を行うに当たり、右心カテーテルは肺動脈圧以外に肺動脈楔入圧なども測定でき、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 PH を発症した膠原病を抽出してレトロスペクティブにその臨床的特徴や治療法などの評価を行い、生命予後を改善しうる治療法や適切な介入時期を考察した。さらには血液検査、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、経過観察する方法などの確立を目的とした。

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。これらを基礎疾患、発症年齢、性別、投薬内容や臨床症状で分類し、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、推定肺動脈圧との関連を統計学的に解析した。これらの結果を総合し、非侵襲的に PH を経過観察する最善の方法について考察した。

(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

前述した方法により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平成 20 年度までの調査では 91 例で、基礎疾患は MCTD が最も多く 38.5%であった。その後さらに通院歴のある患者をスクリーニングしたところ、

平成 22 年度には 136 例の症例が抽出された。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%)であり、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/DM、RA などでは女性が多くを占めていた。基礎疾患および PH の併発が判明した年齢は表 1 に示したごとくであり、PH の併発が判明するまでの期間は概ね 6-10 年であった。これらの年齢や期間に有意差は見られなかった。

UCG による推定右室圧の平均値は MCTD が 49.6mmHg、SLE が 53.2mmHg、SSc が 56.8mmHg と各疾患間に差は見られなかった。推定肺動脈圧が高値であった症例は予後不良である傾向にあり MCTD のうち 13 例が、SSc と SLE ではそれぞれ 6 例および 4 例が死亡例であった。死因は SLE や SSc では腎不全や脳出血、間質性肺炎(IP)などであり、PH が直接の死因と考えられた症例はそれぞれ 1 例ずつであった。一方、MCTD においては PH を直接の死因とした症例が他の疾患より有意差をもって多くみられた(平成 20 年度調査)。

PH を併発した膠原病症例に関して基礎疾患により生命予後に差が見られるか否か検討した。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。さらに IP の併発や抗 U1-RNP 抗体の存在は予後に影響を与えず、基礎疾患の初発症状と PH の発症に関連する項目は見られなかった(図 1)。

次に治療薬と生命予後について検討した。ステロイド薬は PH の有無にかかわらず最も高率に投与されている薬剤であった。ベラプロストやカルシウム拮抗薬、サルボクレラート、低用量アスピリン、ワーファリンなどは基礎疾患を問わず多く使用されていたが、これらの薬剤は、PH に対して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(図 2)。

統計学な有意差は示されなかったが、ポセントンは膠原病を基礎疾患に有する症例に対しても

予後改善に効果的である傾向が見られた(平成 22 年度報告)。これらは観察期間および症例数が変化すれば有意となりうると考えられた。

平成 20 年度および平成 21 年度はおもに PH を併発した膠原病症例の背景や治療効果、臨床的な特徴に関して考察したが、平成 22 年度は PH の症例数が比較的多く見られた MCTD、SSc、SLE 患者のうち血清 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、推定肺動脈圧と関連する因子についての検討を行った。まず血清マーカーである BNP 値に関して、PH の併発が見られた前後での値は 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 と有意な変動が見られた。一方、SSc では前後とも 300 台であった。これらの値と推定右室圧に相関は見られなかったが、個々の症例における変動は、圧との相関が見られた。なお尿酸値に関しても同様であった。

これらの症例のなかで呼吸機能検査や胸部 CT スキャンが行われた症例を選択し、%FVC/%DLCO および %VC/%DLC 値、さらには主肺動脈径、右肺動脈径、上行大動脈径などを測定した。MCTD、SSc、SLE における %VC/%DLCoO はそれぞれ 1.63、1.86、1.87 であり、%FVC/%DLCO は 1.55、1.84、1.79 であった IP の併発により %FVC および %VC の低下が予測されることから、前記の結果を IP の有無で分類した。しかし IP の有無での統計学な有意差は見られなかった(図 3)。また、MCTD、SSc、SLE において CT スキャン上で測定した右肺動脈径はそれぞれ 22.3mm、24.7mm、21.5mm、主肺動脈径はそれぞれ 29.3mm、34.2mm、31.0mm であり、一般健常人と比して拡張が見られた。これらの値を上行大動脈径で除した値は 0.75、0.78、0.77 であった。呼吸機能検査での検討と同様にこれらの値は、IP の併発に有意な影響を受けなかった。

UCG での推定肺動脈圧と %FVC/%DLCO および %VC/%DLCO は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。また CT スキャン上で測定した上行大動脈径と右肺動脈径との比率(上行

大動脈径/右肺動脈径)は、相関係数が 0.43、 $p=0.01$ と有意に推定肺動脈圧と相関することが明らかとなった。さらに血清 BNP 値をこれらの結果と合わせ重回帰分析を行うと、推定肺動脈圧は

「 $77-25.2(\text{大動脈径}/\text{右肺動脈径}+0.02\text{BNP 値})$ 」で線形回帰出来る可能性が示された(図 4)。以上の結果から、呼吸機能検査や血清 BNP 値、胸部 CT スキャンを用いれば、PH の存在と、ある程度の肺動脈圧を予測できる可能性が示唆された。

D. 考察

PH の治療に関する平成 20 年度から平成 22 年度にわたる我々の検討では、ステロイド薬や抗血小板薬、ベラプロストなどの血管拡張薬は一時的に肺動脈圧を低下させる作用は見られるが、生命予後の改善には寄与しないことが示された。一方、統計学的に有意差は見られなかったが膠原病を基礎疾患に有する PH に対してワルファリンやステロイドパルス療法、ボセンタンは予後改善に有用である可能性が示唆された。

一般的に基礎疾患を有しない肺動脈性肺高血圧症は、好発年齢が本稿で検討した症例より若年であり、生命予後もさらに不良であることが知られている。膠原病を基礎疾患に有する PH の症例は、腎症や IP、血球異常、皮膚症状などに対しステロイド薬や免疫抑制薬が PH の発症以前から投与されている症例が多く見受けられる。仮説にすぎないが、これらの治療薬が PH の発症や進行を遅らせている可能性も考えられる。今後はステロイド薬や免疫抑制薬の有無による PH の発症年齢や予後に関し検討を追加する必要がある。

膠原病患者は、IP や血管炎を始めとした PH 以外の呼吸器や循環器疾患の合併症が多く、これらの合併症は動悸や息切れなどを訴える主要因となりうる。PH が原因でこれらの症状が出現した時は、すでに進行している症例がほとんどである。PH の併発を早期に確実に把握し、詳細な血行動態を知るためには、右心カテーテルが必須である。今回の我々の検討では血清 BNP 値や呼吸機能検査、CT スキャンを用いればある程度、PH 合併の有無や肺動脈圧の評価が可能であることが示された。しかしこれまで検討してきた治療法と予後の

関連や、肺動脈圧の評価などは、そのほとんどが UCG を用いた値を参照している。UCG で得られた推定肺動脈圧と右心カテーテルで測定した肺動脈圧に差が見られることは周知の事実である。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必要がある。

E. 結論

PH は予後不良の疾患である。特に MCTD や SSc では他の膠原病に比し PH の合併は高率で大きな予後決定因子となる。UCG での評価では推定右室圧を改善させる作用は見られなかったがボセンタンは MCTD に併発した PH においても有効である可能性が示された。

血液検査や呼吸機能検査、CT スキャンを合わせて評価を行うことにより PH の有無がある程度予測が可能で、右心カテーテルの適応例をより確実に選別でき、経過観察にも有用であることが示された。

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) Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, Takasaki Y : Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus.

Rheumatology 47: 145-149, 2008

2) Watanabe T, Suzuki J, Mitsuo A, Nakano S, Tamayama Y, Katagiri A, Amano H, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y : Striking alteration of some populations of T/B cells in systemic lupus erythematosus: relationship to expression of CD62L or some chemokine receptors. Lupus 17(1): 26-33, 2008

3) Nozawa K, Fritzler MJ, Ikeda K, Takasaki Y, Satoh M, Chan EKL: Differential Anti-Golgi Complex Autoantibody Production Following Murine Lactate Dehydrogenase-Elevating Virus Infection. Immunopharmacol Immunotoxicol 30: 13-25, 2008

- 4) Nozawa K, Ikeda K, Satoh M, Reeves WH, Stewart CM, Li YC, Yen TJ, Rios RM, Takamori K, Ogawa H, Sekigawa I, Takasaki Y, Chan EK: Autoantibody to NA14 is an independent marker primarily for Sjogren's syndrome. *Front Biosci* 14: 3733-3739, 2009
- 5) Morimoto S, Tokano Y, Nakano S, Watanabe T, Tamayama Y, Mitsuo A, Suzuki J, Kaneko H, Sekigawa I, Takasaki Y: Chemoattractant mechanism of Th1 cells in class III and IV lupus nephritis. *Autoimmunity* 42: 143-149, 2009
- 6) Matsushita M, Matsudaira R, Ikeda K, Nawata M, Tamura N, Takasaki Y: Anti-proteasome activator 28 α is a novel anti-cytoplasmic antibody in patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol* 19: 622-628, 2009
- 7) 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.
- 8) Kawasaki M, Fujishiro M, Yamaguchi A, Nozawa K, Kaneko H, Takasaki Y, Takamori K, Ogawa H, Sekigawa I. Fluctuations in the gene expression of peripheral blood mononuclear cells between the active and inactive phases of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(3):311-7.
- 9) 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; 28(3):419-23.
- 10) 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.
- 11) 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;49(5):876-81.
- ## 2. 学会発表
- 1) Takasaki Y, Matsushita M, Matsudaira R, Nawata M: Autoimmune response to proteasome in patients with Sjögren's syndrome(SjS). 10th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, Guadalajara, Mexico, 2008, March 6.
- 2) 松下雅和, 松平蘭, 縄田益之, 高崎芳成: プロテアソーム複合体に対する自己免疫応答の検討 (シンポジウム 15: 自己抗体研究の進歩). 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008.
- 3) Takasaki Y: Treatment of Intractable Organ Involvement. 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, Japan, 2008.
- 4) Ikeda K, Pauley KM, Satoh M, Fritzler MJ, Takasaki Y, Chan EK: Autoantigens in the Cellular RNA Interference Pathway Capture miR-146a and IRAK1/TRAF6 mRNAs During LPS and Cytokine Stimulation of Monocytes. 72nd Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology, San Francisco, USA, 2008.
- 5) 天野浩文, 天野恵理, 仲野総一郎, 安藤誠一郎, 箕輪健太郎, 渡辺崇, 森本真司, 林青順, 広瀬幸子, 戸叶嘉明, 高崎芳成: Toll-like receptor(TLR)とリウマチ性疾患 (シンポジウム S4: リウマチ性疾患の病因・病態解明の進歩). 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2009.
- 6) 仲野総一郎, 天野浩文, 田嶋美智子, 安藤誠一郎, 箕輪健太郎, 渡邊崇, 森本真司, 戸叶嘉明, 高崎芳成: 全身性エリテマトーデスにおける UNC93B 発現の検討 (ワークショップ W09: SLE の病因・病態). 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2009.
- 7) 森本真司, 渡邊崇, 仲野総一郎, 天野浩文, 高崎芳成: 増殖性ループス腎炎におけるタクロリムスの効果の検討<寛解維持療法における有用性を中心に>. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2009.
- 8) 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