

201128186A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

混合性結合組織病の病態解明、早期診断と治療法の確立  
に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 俊治

平成24年(2012)年3月

## 目次

|  |    |
|--|----|
| I. 総括研究報告  |    |
| 混合性結合組織病の病態解明、早期診断と治療法の確立に関する研究                        | 1  |
| (吉田 俊治)  |    |
| II. 分担研究報告   |    |
| 1. MCTD, SLE, SSc における NOS2 遺伝子多型と PAH との関連            | 4  |
| (川口 鎮司)  |    |
| 2. 全ゲノム関連解析を用いた MCTD 感受性遺伝子検索に関する研究                    | 7  |
| (大村 浩一郎)   |    |
| 3. 混合性結合組織病 (MCTD) の肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 診断の手引きの検証          | 9  |
| (深谷 修作)  |    |
| 4. レイノー現象に伴う指尖内皮機能評価に関する研究                             | 11 |
| (田中 住明)  |    |
| 5. 膠原病に併発した肺高血圧症の非侵襲的検査法に関する研究                         | 14 |
| (松下 雅和)  |    |
| 6. 間質性肺疾患および肺動脈性肺高血圧症を発症する新規モデルマウスに<br>関する研究           | 18 |
| (桑名 正隆)  |    |
| 7. 国立循環器病研究センターにおける結合組織病性肺動脈性肺高血圧症の臨床像と<br>肺静脈閉塞に関する研究 | 22 |
| (中西 宣文)  |    |
| 8. 混合性結合組織病における自己抗体産生機序の検討                             | 26 |
| (川畑 仁人)  |    |
| 9. 混合性結合組織病の症例対照研究(計画)                                 | 29 |
| (鷺尾 昌一)  |    |
| 10. MCTD の疾患概念に関する研究                                   | 33 |
| (岡本尚)  |    |
| 11. NPSLE 患者脳脊髄液中における抗 U1RNP 抗体と液性因子に関する研究             | 36 |
| (藤井 隆夫)  |    |
| 12. 膠原病特に混合性結合組織病における感染症誘発因子に関する研究                     | 41 |
| (吉田 俊治)  |    |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                                    | 44 |
| IV. 平成 23 年度構成員名簿                                      | 50 |

# I . 総括研究報告

# 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

## 統括研究報告書

### 混合性結合組織病の病態解明、早期診断と治療法の確立に関する研究

研究代表者 吉田俊治 藤田保健衛生大学リウマチ・感染症内科・教授

#### 研究要旨

混合性結合組織病(MCTD)の病態形成機序は未だ不明であり、特に難治性病態の中で肺高血圧症(PH)の病態、早期診断、治療法については不明な点が多い。そこでこれらについて明らかにすることを本研究班の目的とした。「MCTD および MCTD 合併 PH の遺伝子レベルの解析」と「昨年度改訂された MCTD の PH 診断の手引きの検証」をプロジェクト研究とし、その基盤が整えられた。また各個研究でも PH 関連の他、基礎的検討から臨床的検討まで種々の研究が進行中である。

#### 研究分担者

岡本 尚 (名古屋市立大学大学院医学研究科・教授)  
川口鎮司 (東京女子医科大学リウマチ科・臨床教授)  
川畑仁人 (東京大学アレルギーリウマチ内科・特任講師)  
桑名正隆 (慶応義塾大学医学部リウマチ内科・准教授)  
田中住明 (北里大学膠原病感染内科学・診療准教授)  
中西宣文 (国立循環器病研究センター・特任部長)  
深谷修作 (藤田保健衛生大学リウマチ・感染症内科・准教授)  
藤井隆夫 (京都大学大学院医学研究科・准教授)  
松下雅和 (順天堂大学医学部膠原病内科・助教)  
研究協力者  
大村浩一郎 (京都大学医学部臨床免疫学・講師)  
鷲尾晶一 (聖マリア学院大学看護部・教授)

態があることなどが判明し、これに基づいて治療ガイドライン(東條班)(近藤班)(三森班)も作成され、わが国における MCTD 診療の向上に多大な貢献をした。

しかし MCTD の病態形成機序は未だ不明であり、特に難治性病態の中で PAH の病態、早期診断、治療法については不明な点が多い。

本研究班では MCTD そのものの病態の解明を行うとともに難治性病態の中で特に PAH と中枢神経障害に絞ってそれらへの対策を検討する。

#### B.研究方法

1.班全体のプロジェクト研究として以下の2つの課題を設定した。

・プロジェクト研究(1): MCTD および MCTD 合併 PAH の遺伝子レベルの解析

以前の三森班で集積した生体試料バンクを用いて NOS2 遺伝子多型と全ゲノム関連解析を行う。また現在の班でも生体試料バンクへの登

#### A.研究目的

混合性結合組織病(MCTD)は、複数の膠原病の要素を持ち抗 U1-RNP 抗体陽性という特徴を持つ予後良好な疾患として提唱された。しかしながら一般には非常に稀な肺高血圧症(PH)が最大の死因になるなど、難治性病態の存在も明らかとなった。これまでの当該研究班の研究により、肺動脈性肺高血圧症(PAH)が MCTD に非常に高率に合併すること、通常の抗 PAH 薬に加えてステロイドなどの免疫療法の有効な例があること、その他にもいくつかの難治性病

録を続行する。

・プロジェクト研究(2) : MCTD の PAH 診断の手引きの検証

平成 23 年 3 月に厚労省 MCTD 研究班で改訂された MCTD の PAH 診断の手引きについて検証を行う。右心カテーテル検査をゴールドスタンダードとして後ろ向き調査と前向き調査を行う。

## 2. 各個研究

### (1) PH 関連

4 名の分担研究者によって行われた。NO 血管拡張能による末梢循環障害の検討、肺機能検査や CT スキャン、血清中バイオマーカーによる非侵襲的検索、新規モデルマウスの開発、剖検例の病理学的検索などが行われた。

### (2) その他

抗 U1-RNP 抗体の産生機序についてモデルマウスを用いて検討を行い、アンケートを用いた症例対照研究、また臨床所見による主成分分析で MCTD の発症リスクや疾患独立性などを解析した。さらに重要な合併症である中枢神経障害と抗 U1-RNP 抗体との関連について髄液を用いて検討した。そのほか治療上重要な感染症についてその誘発因子の検討を行った。

## C. 結果

### 1. プロジェクト研究

・強皮症(SSc)においては、MCTD と同様に NOS2 遺伝子多型が PAH 発症と関連した。しかし全身性エリテマトーデス(SLE)ではその関連が認められず、SLE における PAH の発症機序は、MCTD や SSc における機序と異なっていることが示唆された。(川口)

・全ゲノム SNP タイピングについて多数例の健常人では行われている。MCTD 患者の試料もかなり集まってきており、MCTD 患者についても近日中に行う予定である。(大村)

・MCTD の PAH 診断の手引きの検証については、主任研究者の施設での倫理委員会の承認は得られている。現在の分担研究者以外に心エコー検査と右心カテーテル検査を行える施設に拡大して次年度より開始する予定である。(深谷)

### 2. 各個研究

・レイノー現象をもつ膠原病患者の NO 血管拡張能は正常コントロールに比して有意に低下しており、末梢循環障害の評価に有用であることが示唆された。(田中)

・呼吸機能検査や CT スキャンを用いた肺動脈径および大動脈径の測定は PH の診断や経過観察の補助的な役割を担う可能性があり、また MCTD において血清 LR11 は PH 併発により有意に高値となりスクリーニングへの有用性が示唆された。(松下)

・間質性肺炎と PAH を同時に発症する新規モデルマウスである Fra-1 を高発現するトランスジェニックマウスを開発した。今後、MCTD および強皮症の病態解明に有用と考えられる。(桑名)

・剖検を行った 7 名の膠原病性 PAH 患者のうち 6 名に静脈閉塞所見を認め、これが予後を不良にしている可能性も考えられる。(中西)

・リンパ球減少マウスへの T 細胞移入による自己抗体誘導マウスモデルを用いて、他の系で抗 U1-RNP 抗体産生への関与が示唆されている Toll 様受容体の役割の検討を進めている。さらに自己抗体産生に関わる follicular helper T 細胞サブセットの関与も検討している。(川畑)

・MCTD の発症リスクを検討するための症例対照研究を行うため、対照として SLE や SSc を用いて班内で調査を行う予定である。(鷲尾)

・膠原病 3 疾患の臨床所見の主成分分析により第 4 の集団が抽出され、その集団の抗 U1-RNP 抗体陽性率は 50%であった。(岡本)

・血清中の抗 U1-RNP 抗体が陽性で精神神経症状を有した場合、脳脊髄液中の抗 U1-RNP 抗体は臨床的意義を有し、その陽性患者における中枢神経障害にインターフェロン  $\alpha$  や MCP-1 が関与している可能性がある。(藤井)

・併発感染症の誘発因子として累積ステロイド投与量、IgG 減少量が抽出された。(吉田)

#### D. 考察および結論

プロジェクト研究において、遺伝子レベルの検索により MCTD そのものの特徴を知るとともに、合併する PH の特徴を知ることにより、早期診断やハイリスクグループの把握を

行えるようにしたい。また前の班で策定された改訂 MCTD の PH 診断の手引きを検証して、その有用性を検討するとともに他の膠原病への適用の可能性についても検証したい。また各個研究において、PH を非侵襲的方法、モデル動物、病理所見など種々の方法で検討を加え、今後につながる可能性が考えられた。その他にも抗 U1-RNP 抗体の産生機序の前班から引き続き検討が加えられている。重要な合併症である中枢神経障害や感染症についても検討が加わり、さらに MCTD そのものの発症リスクや独立性なども次年度に向けて検討が加えられる予定である。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 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

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

MCTD, SLE, SSc における NOS2 遺伝子多型と PAH との関連

研究分担者 川口鎮司 東京女子医科大学リウマチ科 (臨床教授)  
研究協力者 高木香恵 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター (准講師)

### 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(SLE)、炎症性筋症、全身性強皮症(SSc)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。MCTD は、比較的予後良好な疾患と位置づけられてきたが、肺動脈性肺高血圧症(PAH)を高頻度（約 15%）に合併することがわかってきた。PAH は、膠原病の合併症のなかでも最も予後不良であり、早期での診断が重要と考えられている。PAH の発症予測の指標として、我々は、一酸化窒素合成酵素(NOS)-2 の遺伝子多型を研究してきた。NO は、血管拡張因子であり、肺動脈の拡張に重要な因子である。いままでの研究において、NOS2 遺伝子多型の変異がある MCTD 患者は、変異がない症例より有意差をもって高頻度に PAH を合併することがわかってきた。膠原病の中で、PAH を高頻度に合併する MCTD 以外の疾患として、SLE および SSc があり、この2つの疾患において、NOS2 遺伝子多型と PAH 発症との関連を検討した。SSc においては、MCTD 同様に、NOS2 遺伝子多型が、PAH 発症に関連した。しかしながら、SLE においては、その関連が認められなかった。このことは、SLE における PAH の発症機序は、MCTD や SSc における機序とは異なっていることが示唆されると考える。

### 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。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。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、我々の研究では、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、本研究班において、NOS2 遺伝子多型と PAH 発症との関連を検討してきた。その結果、昨年までに、NOS2 遺伝子多型が、将来において、PAH を発症するかどうかの予測因子として有用であることをみつけた。今回の研究では、この NOS2 遺伝子多型は、MCTD にだけ認められることかどうかを検討することを目的と

した。膠原病のなかで、PAH を高頻度に合併する SLE と SSc において NOS2 遺伝子多型と PAH 発症との関連を検討した。

### 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 と診断できた症例 49 例を対象とした。SLE および SSc は、アメリカリウマチ学会の分類基準を満たす症例をそれぞれ 80 名抽出した。ただし、抗 U1-RNP 抗体陽性例、または、他の膠原病の重複症候群は除外した。

2) 肺動脈性肺高血圧症患者の診断  
心臓超音波検査にて、RVSP (right ventricular systolic pressure)が、40 mmHg 以上の疑わしい症例にて、右心カテーテル検査を行い、平均肺動脈圧が、25 mmHg 以上で、肺動脈楔入圧が 15 mmHg 以下の症例を PAH とした。さらに、重度の肺線維症や心疾患、肺動脈血栓塞栓症による 2 次性の PH が否定された症例とした。

3) 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

SLE および SSc の症例の詳細な臨床症状に関しては、表 1 および表 2 に記載した。MCTD の症例は、いままですら本研究班にて検討してきた症例であり、49 例を解析した。PAH 合併症例は、18 例であり、全例すでに NOS2 遺伝子多型の解析は終了している。

また、健常人としてもちいた 90 例は、以前の本研究班で報告した日本人健常人の結果である。

#### 2) NOS2 遺伝子多型 (CCTTT の繰り返し配列) の検討

表 3 に示すように、かつての報告と同様に、PAH 合併 MCTD 症例では、健常人と比較して CCTTT 繰り返し配列の数が有意に少なかった ( $P=0.0001$ )。また、SSc においても同様の結果が認められた ( $P=0.004$ )。一方、SLE 症例での検討では、健常人との比較において有意な NOS2 遺伝子の偏りは認められなかった。

それぞれの疾患で、PAH 合併の有群となし群で、比較検討した。MCTD と SSc では、有群と無し群の間に有意な偏りが認められた。しかし、SLE では、みられなかった。

#### 3) NOS2 遺伝子多型による PAH 発症予測

CCTTT の繰り返し数は、それぞれの症例でホモ、あるいはヘテロで 2 つある。その 2 つを加えて、CCTTT 総和数を計算する。その総和数が 23 以上と未満で症例を分ける。表 4 に示すように、MCTD と SSc においては、PAH を発症した症例は、CCTTT 総和数が 23 未満の症例に有意に偏っている。Fisher 正確検定を行うと、MCTD では、 $P=8.0 \times 10^{-7}$  であり、SSc では、 $P=6.6 \times 10^{-4}$  であった。それぞれの odds ratio は、MCTD で 58、SSc で 12 であった。

### D. 考察

MCTD 症例では、前向き検討にて、PAH 発症予測因子として、NOS2 遺伝子多型が有用であると報告してきた。今回の検討により、NOS2 遺伝子多型は、膠原病に合併する PAH すべてに有用なわけではなく、SLE 症

例では、関連がみられなかった。

免疫抑制療法などの治療の反応性が、SLE、SSc、MCTD において異なっていることは以前から経験し、また、若干の報告がある。治療反応性が疾患によって異なることは、その発症の機序が、同じ膠原病関連の PAH であっても異なっている可能性がある。今回の我々の遺伝子多型の解析からは、少なくとも、MCTD および SSc に伴う PAH では、NOS2 遺伝子多型との関連が示唆され、発症機序に関連が有る可能性がみられた。一方、SLE に伴う PAH では、NOS2 遺伝子多型とは、関係ない機序にて発症していることが推測された。

SLE に伴う PAH では、副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制療法が有効であるとする論文が多いのに比較し、SSc では無効とされている。我々の結果は、この治療反応性の違いにもよく合致している。

CCTTT 繰り返し配列が少ない、MCTD や SSc では、早期から NO 増強を可能にする薬剤の投与が考慮される。

### E. 結論

NOS2 遺伝子多型の偏りは、MCTD だけで無く、抗 U1-RNP 抗体陰性の全身性強皮症においても再現された。しかしながら、SLE では遺伝子多型の関連は見られなかった。膠原病のなかでも、基礎疾患により、PAH 発症機序には異なった病態が関連していることが示唆された。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Takagi K, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Ota Y, Tochimoto A, Gono T, Katsumata Y, Takagi M, Hara M, Yamanaka H: Activation of the activin A-Alk-Smad pathway in systemic sclerosis. **J Autoimmunity** 36:181-188, 2011
2. Tochimoto A, Kawaguchi Y, Hara M, Tateishi M, Fukasawa C, Takagi K, Nishimagi E, Ota Y, Katsumata Y, Gono T, Tanaka E, Yamanaka H: Efficacy and safety of intravenous cyclophosphamide pulse therapy with oral prednisolone in the treatment of interstitial lung disease with systemic sclerosis: four-year follow-up. **Modern Rheumatol** 21:296-301, 2011

#### 2. 学会発表

川口鎮司 膠原病における肺動脈性肺高血圧症の病態・診断・治療 第 55 回日本リウマチ学会総会

### 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 全身性エリテマトーデスの症例

|          |               |          |
|----------|---------------|----------|
| 年齢       | 41 歳 (28-65)  |          |
| 性別       | 女性 73 例 (91%) |          |
| 罹病期間 (月) | 66 (24-145)   |          |
| 臨床症状     |               |          |
|          | 中枢神経症状        | 31 (39%) |
|          | ループス腎炎        | 46 (58%) |
|          | 血球減少          | 53 (66%) |
|          | 関節炎           | 28 (35%) |
|          | 肺動脈性肺高血圧症     | 6 (8%)   |
| 自己抗体     |               |          |
|          | 抗 2 本鎖 DNA 抗体 | 75 (94%) |
|          | 抗 SSA 抗体      | 38 (48%) |

表2 全身性強皮症の症例

|          |                |          |
|----------|----------------|----------|
| 年齢       | 55 歳 (31-73)   |          |
| 性別       | 女性 69 例 (86%)  |          |
| 罹病期間 (月) | 72 (36-400)    |          |
| 臨床症状     |                |          |
|          | びまん皮膚硬化型       | 42 (53%) |
|          | 間質性肺病変         | 35 (44%) |
|          | 腎病変            | 1 (1%)   |
|          | 肺動脈性肺高血圧症      | 12 (15%) |
| 自己抗体     |                |          |
|          | 抗 Scl70 抗体     | 25 (31%) |
|          | 抗セントロメア抗体      | 42 (53%) |
|          | 抗 RNA ポリメラーゼ抗体 | 8 (10%)  |
|          | 抗 U3-RNP 抗体    | 3 (4%)   |

表3 PAH を合併した MCTD, SLE, SSc における NOS2 遺伝子多型の解析

| アレル | MCTD (N=18) | SLE (N=12) | SSc (N=12) | 健常人 (N=90) |
|-----|-------------|------------|------------|------------|
| 6   | 1           | 0          | 0          | 0          |
| 7   | 2           | 0          | 0          | 0          |
| 8   | 5           | 0          | 3          | 4          |
| 9   | 4           | 1          | 4          | 8          |
| 10  | 11          | 2          | 6          | 19         |
| 11  | 8           | 0          | 2          | 25         |
| 12  | 4           | 5          | 6          | 42         |
| 13  | 0           | 2          | 0          | 32         |
| 14  | 0           | 1          | 3          | 29         |
| 15  | 1           | 0          | 0          | 13         |
| 16  | 0           | 1          | 0          | 13         |
| 17  | 0           | 0          | 0          | 4          |
| 18  | 0           | 0          | 0          | 1          |

Fisher 正確検定を用いた有意差検定 健常人との比較  
MCTD: P=0.0001, SLE: P=0.73, SSc: P=0.004

表4 CCTTT 総和数と PAH 発症との関連

| PAH        | MCTD |    | SLE |    | SSc |    |
|------------|------|----|-----|----|-----|----|
|            | 有り   | 無し | 有り  | 無し | 有り  | 無し |
| CCTTT < 23 | 17   | 7  | 1   | 6  | 10  | 20 |
| CCTTT ≥ 23 | 1    | 24 | 5   | 68 | 2   | 48 |

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

全ゲノム関連解析を用いた MCTD 感受性遺伝子検索に関する研究

研究協力者 大村 浩一郎 京都大学医学部医学科 臨床免疫学 講師

### 研究要旨

混合性結合織病（MCTD）の原因および病態解明を目指して、MCTD 患者の DNA を用いて、全ゲノム関連解析を行う。昨年度の MCTD 班にて MCTD 患者の生体試料バンクが稼動をはじめた。ここで収集された DNA を用い、全ゲノム SNP タイピングを行い、これまでに我々の行った健常人まの全ゲノム関連解析のデータと比較することで、病因に関わる遺伝子多型の検索を行う。

### A.研究目的

MCTD およびその合併症の原因および病態に関しては不明な点が多く、遺伝的な要因に関しては HLA が関連すること以外にはほとんど知られていない。本研究では全ゲノム関連解析により、MCTD の原因遺伝子を検索することを主目的とする。また、そのサブ解析として、合併症である肺高血圧症や肺線維症の関連遺伝子検索も行う。

### B.研究方法

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<sup>®</sup>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。

（倫理面への配慮）

本研究は遺伝子情報を扱う臨床研究であることから、厚生科学審議会による「遺伝子解析研究に付随する倫理的問題等に対応するための指針」および、三省の定める「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、厚生労働省の定める「臨床研究に関する倫理指針」を遵守する。本研究は京都大学医学部および各研究協力機関の倫理委員会承認を受けて進めている。患者名など個人情報がわからないように遺伝子解析は匿名化して行われる。

### C. 研究結果

現在、近藤研究班時に収集した DNA 検体（MCTD 69 例、RNP+膠原病 80 例）に加えて、京都大学で収集している DNA が MCTD 55 例、RNP+膠原病 140 例に達している。肺高血圧症（推定肺動脈圧 40mmHg 以上）は計 22 例が合併していた。他施設での検体が MCTD 21 例収集され、計 MCTD 145 例、RNP+膠原病 220 例が収集された。

### D.考察

ようやく全ゲノム関連解析を行う最低限の症例数が確保できた。来年度、症例数を増やしつつ全ゲノム SNP タイピングを 200 例まず開始する。

### E.結論

全ゲノム関連解析を行うための DNA 収集を行い、MCTD145 例、RNP+膠原病 220 例が準備できた。肺高血圧症合併は 22 例であった。サブ解析を行うための臨床情報の収集も継続して収集している。

### F.健康危険情報

特になし。

### G.研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Terao C, Yamada R, Ohmura K, Takahashi M, Kawaguchi T, Kochi Y, Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 20(13):2680-2685, 2011.
- 2) Terao C, Ohmura K, Katayama M, Takahashi M, Kokubo M, Diop G, Toda Y, Yamamoto N; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura R, Shimizu M, Gut I, Heath S, Melchers I, Manabe T, Lathrop M, Mimori T, Yamada R, Matsuda F. Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis--a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One.* 6: e20457, 2011.
- 3) Terao C, Ohmura K, Kochi Y, Ikari K, Maruya E, Katayama M, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto

K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Ann Rheum Dis.* 70: 2134-2139, 2011.

- 4) Iguchi-Hashimoto M, Usui T, Yoshifuji H, Shimizu M, Kobayashi S, Ito Y, Murakami K, Shiomi A, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Overexpression of minimal domain of calpastatin suppresses IL-6 production and Th17 development via reduced NF-kB and increased STAT5 signals. *PLoS ONE* 6(10):e27020, 2011.
- 5) Yukawa N, Fujii T, Kondo-Ishikawa S, Yoshifuji H, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. *Arthritis Res Ther.* 13(6):R213, 2011.
- 6) Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 586(4):319-324, 2012.
- 7) Terao C, Ikari K, Ohmura K, Suzuki T, Iwamoto T, Takasugi K, Saji H, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H, Matsuda F, Mimori T: Quantitative effect of HLA-DRB1 alleles to ACPA levels in Japanese rheumatoid arthritis: no strong genetic impact of shared epitope to ACPA levels after stratification of HLA-DRB1\*09:01. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]

## 2. 学会発表

- 1) Terao C, Ohmura K, Yamada R, Kochi Y, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: A haplotype of the human AIRE gene is associated with the risk for Rheumatoid Arthritis in Japanese population. European League Against Rheumatism 2011, London, June 2011.
- 2) Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with anti-citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis in Japanese. American College of Rheumatology 2011, Chicago, Nov. 2011.

## 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

混合性結合組織病（MCTD）の肺動脈性肺高血圧症（PAH）診断の手引きの検証（計画）

研究分担者 深谷 修作 藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科 准教授  
研究代表者 吉田 俊治 藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科 教授

### 研究要旨

MCTD の PAH の診断には 1991 年に厚生省 MCTD 研究班において作成された「MCTD の肺高血圧症（PH）診断の手引き」が用いられてきた。この手引きの感度は 92%、特異度は 100%とされている。しかし、無症候あるいは軽微な症状の PH 患者の存在は想定されていない。また、心エコー検査での推定肺動脈収縮期圧（ePAP）を用いた PH の診断も可能となっているが、PH の診断に用いるべき ePAP の具体的な数値の記載はない。これらの問題を解決すべく、平成 23 年 3 月に、厚生労働省 MCTD 研究班においてこの診断の手引きの改訂が行われ、「MCTD の PAH 診断の手引き」として公表された。この新たな手引きの感度・特異度の検討はなされておらず、この手引きを作成した厚労省研究班としてこれらの検討に携わるべき責務があり、本研究を実施することとした。

### A.研究目的

MCTD をはじめ、膠原病患者には高率に PAH の合併を認め、PAH は予後に大きな影響を及ぼす重要な因子であることが判明している。したがって、PAH を適確に診断し、必要に応じてその治療にあたることは MCTD の診療を行う上できわめて重要である。

MCTD の PAH の診断には 1991 年に厚生省 MCTD 研究班において作成された「MCTD の PH 診断の手引き」が用いられてきた。この手引きの感度は 92%、特異度は 100%とされている。しかし、この時検討されたのは、症候性の（進行した）PH 患者であり、積極的なスクリーニング検査により発見される無症候あるいは軽微な症状の PH 患者の存在は想定されていない。また、心エコー検査での ePAP を用いた PH の診断も可能となっているが、PH の診断に用いるべき ePAP の具体的な数値の記載はない。これらの問題を解決すべく、平成 23 年 3 月に、厚生労働省 MCTD 研究班においてこの診断の手引きの改訂が行われ、「MCTD の PAH 診断の手引き」として公表された。この手引きでは、積極的なスクリーニングによって発見される無症候あるいは軽微な症状の PAH 患者の診断も念頭においているし、種々のエビデンスに基づき PAH の診断に用いる心エコー検査での ePAP 値も具体的に記載されている。さらには、平成 20 年に WHO から提唱された境界域 PH の概念にも対応できるものとなっている。しかし、この新たな手引きの感度・特異度の検討はなされておらず、この手引きを作成した厚労省研究班としてこれらの検討に携わるべき責務があり、本研究を実施することとした。

### B.研究方法

後ろ向き調査と前向き調査とを行う。

#### ①対象

MCTD を中心とするが、他の膠原病症例も含める。

##### 1. 後ろ向き調査

研究参加施設で PAH を疑い精査した MCTD を中心とした膠原病患者のうち、右心カテーテル検査と心エコー検査の両方が行われた患者を対象に解析する。

##### 2. 前向き調査

研究参加施設施設で PAH を疑って検査を進める症例を登録し（可能な限り連続症例とする）、通常の診療で PAH の診断に必要な検査を実施する。その中で、心エコー検査と右心カテーテル検査の両方が実施されている症例を解析対象とする。

#### ②説明と同意

本研究は、通常の診療で行われる範囲のこと以外行わず、基本的に履歴研究である。前向き調査は原則的に連続症例で登録制とするが、これは都合の良い症例を恣意的に選択するのを防ぐために行うもので、本研究のために通常診療以上に何らかの情報を求めるものではないので、個々の患者への説明と同意を必要とする研究ではない。ただし、患者への周知を図り、本研究へ情報の使用を拒否できる機会を設けるため、可能な限り参加各施設のホームページや診察室内などに研究内容を掲載する。

#### ③調査項目

##### 1. 新旧診断の手引きにある臨床所見、検査項目

労作時息切れの有無、胸骨左縁収縮期性拍動の有無、第Ⅱ肺動脈音の亢進の有無、胸部 X 線像での肺動脈本幹部の拡大あるいは左Ⅱ弓の突出の有無、心電図上の右室肥大あるいは右室負荷の有無に加え、新しい手引きに記載されている BNP または NT-ProBNP 高値の有無、%VC/%DLco $\geq$ 1.4 の有無、高尿酸血症の有無。

##### 2. 心エコー検査所見

三尖弁圧較差、右室肥大の有無、左室圧排像の有無、その他の所見。

### 3. 右心カテーテル検査所見

肺動脈圧（収縮期、拡張期、平均）、肺動脈楔入圧、総肺血管抵抗、肺血管抵抗。

4. 肺換気・血流シンチ、肺動脈造影、胸部造影 CT などの検査所見

5. PH の分類

6. 基礎疾患、基礎疾患の罹病期間、年齢、性別、PH 診断年月日

#### ④研究組織

多施設共同研究とし、「厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 混合性結合組織病の病態解明、早期診断と治療法の確立に関する研究」班の班員、研究協力者のうち、臨床の医師を研究担当医師とし、参加施設は研究担当医師が所属する施設とする。

（倫理面への配慮）

①通常の診療に必要な検査のみを行う。その中で本研究の条件に合致した症例のみを解析象とする。

②患者の登録および解析は藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科が担当する。後ろ向き調査では各施設にて連結可能な対応表を作成し、藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科へは連結不能なデータの形で個々の患者のデータを送付する。各施設においては患者対応表や個々の患者のデータは、インターネット非接続のコンピュータ、あるいはそれぞれを異なったコンピュータに保存するなど、それぞれの施設の規則、倫理委員会などでもとめられる方法で保存する。一方、藤田保健衛生大学リウマチ・感染症内科では、各施設から送付されたデータはインターネット非接続の起動にパスワードの入力を必要とし、ファイルを開くにもパスワードの入力が必要な形式で保存する。さらに、このパスワードを知るのは研究責任者である藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科 教授 吉田俊治とデータ解析を担当する藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科 准教授 深谷 修作の二人だけとする。本研究得た個人情報本研究終了時に廃棄する。

③本研究によって生じる個人への利益、不利益：通常の診療の結果として生じた検査データなどのみの使用であり、個々の患者への利益、不利益はない。

④研究費および利益相反：本研究は「厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 混合性結合組織病の病態解明、早期診断と治療法の確立に関する研究」の研究費を用いて行うもので、特定の企業との利益相反は生じない。

### C. 研究結果

平成 23 年度第 1 回班会議での議論を踏まえて、上記研究方法に示した内容で研究計画書を作成した。そして、この研究計画書に基づき、藤田保健衛生大学「疫学・臨床研究倫理審査委員会」の承認を得た。

### D. 結論

本研究開始の準備は整ったので、必要に応じて各施設での倫理委員会承認後、来年度より本研究をスタートさせる。

### E. 健康危険情報

特になし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) 深谷修作：【リウマチ性疾患における心血管障害】膠原病性肺高血圧症のマネージメント. リウマチ科 46 (4) : 353-363, 2011

2) Ozaki S., Ando M., Kobayashi S., et al: Guideline for management of vasculitis syndrome (JCS 2008). Japanese Circulation Society. Circ J 75(2): 474-503, 2011

#### 2. 学会発表

1) 西野譲、野寄美幸、平野大介、他：膠原病患者における胃食道逆流症と QOL に関する検討。第 55 回日本リウマチ学会総会、2011

2) 平野大介、登坂信子、深谷修作、他：EB ウイルスの再活性化を生じた若年性特発性関節炎の 1 例。第 55 回日本リウマチ学会総会、2011

3) 岩破由実、西野譲、野寄美幸、他：当科における RA 患者の Infliximab 増量症例の検討。第 55 回日本リウマチ学会総会、2011

4) 早川和恵、伊達秀樹、森田充浩、他：生物学的製剤が普及した時代における内科と整形外科の連携 人工膝関節置換術における生物学的製剤の関わり。第 55 回日本リウマチ学会総会、2011

5) 西野譲、野寄美幸、平野大介、他：膠原病患者の胃食道逆流症と QOL に関する検討。第 108 回日本内科学会総会、2011

### G. 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

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

レイノー現象に伴う指尖内皮機能評価に関する研究

研究分担者 北里大学医学部 膠原病感染内科学 田中住明（診療准教授）  
研究協力者 北里大学医学部 膠原病感染内科学 和田達彦（助教）  
研究協力者 北里大学医学部 膠原病感染内科学 小川英佑（助教）  
研究協力者 北里大学医療衛生学部 リハビリテーション学科 増田卓（教授）  
研究協力者 北里大学医学部 膠原病感染内科学 廣畑竣成（教授）

研究要旨

混合性結合組織病(MCTD)に合併する肺動脈性肺高血圧症(PAH)の非侵襲的な早期診断法・評価方法を確立するために、レイノー現象に伴う指尖動脈の血管内皮機能に注目した。指尖動脈の血管内皮機能は、非侵襲的なEndo-PATを用いてNO依存性血管拡張能を測定して評価した。レイノー現象のあるMCTDおよび他の膠原病患者のNO血管拡張能は、正常コントロール者と比較して有意に低下していた。さらに、レイノー現象と心肺臓器病変との関連性を検討するために、レイノー現象誘発に伴う心肺自律神経活動を、心拍動から周波数領域解析で検討する事を試みた。MCTD患者の自律神経活動のパターンは、正常コントロール者のパターンとは異なった。本報告の時点では、この差異の定性および定量化までには到達せず、さらなるシステム改良と解析が必要である。以上の結果から、Endo-PATシステムを用いた指尖動脈の血管内皮機能検査は、MCTD患者の末梢循環障害の評価に有用であり、レイノー現象の病態にはNO依存する血管内皮機能障害の関与が考えられた。

A.研究目的

混合性結合組織病(MCTD)に合併する肺動脈性肺高血圧症(PAH)の非侵襲的な早期診断法・評価方法として、MCTD患者の多くに合併するレイノー現象に伴う指尖動脈の血管内皮機能評価が利用するために、本研究の本年度は、レイノー現象に伴う指尖動脈の血管内皮機能評価と、レイノー現象誘発試験に伴う心拍変動測定による自律神経活動評価方法の確立を目的とした。

B.研究方法

1. 指尖動脈の血管は内皮機能評価

健常者4名と、MCTD患者6名およびレイノー現象を有するSLE患者2名を対象とした(年齢:中央値31.5歳、範囲21~60歳)。

指尖動脈の血管内皮機能評価にはEndo-PATシステムを利用した。指尖内皮機能を指標する反応性充血指数(RHI: Reactive Hyperemia Index)と、指尖動脈の硬化を指標するAugmentation Index(AI)を測定した。

2. レイノー現象における自律神経活動の評価について

これらの患者でレイノー現象誘発試験を行った。心拍モニター(ホルター心電図)を装着し、安静常温(5-10分)→冷水に両手を沈め(5分)→常温(10分)で観察した。

収集した心拍は、MemCalc™法を用いて周波数領域解析心拍変動解析を行い、高周波数成分(HF: high frequency, 0.15-0.40Hz)、低周波数成分(LF: low

frequency, 0.05-0.15Hz)、エントロピーを求めた。

HF、エントロピーはそれぞれ、副交感神経活動の指標、交感神経活動の指標、状況変化への頑健さの指標となるが、これらと心拍数を用いて、レイノー現象誘発に伴う自律神経活動の記載を試みた。

統計学的な評価は、MemCalc、JMPを用いて行った。

(倫理面への配慮)

Endo-PATを用いた血管内皮機能評価、およびホルター心電図は、保険収載されている。本研究では、その診療記録を用いた。

C. 研究結果

1. 指尖動脈の血管は内皮機能評価

健常者のコントロール群と、MCTDおよびレイノー現象を有するSLEの患者群の年齢(平均±標準偏差)には有意差はなかった(32.3±12.5歳 vs. 40.0±13.2歳, p=0.016)。RHIは、コントロール群の2.41±0.61に比べ、患者群では1.54±0.38と有意に高かった(p=0.0124)(図1-A)。

年齢で調節したAIは、コントロール群の-3.59±10.91%に比べ患者群では12.54±7.61%と有意に高かった(p=0.0246)(図1-B)。

2. レイノー現象における自律神経活動の評価について

測定システム構築のために、健常者3名および患者2名を対象に繰り返した。レイノー現象の出現は健常者

では誘発されず、患者群では約 20%で誘発された。健康者における HF、LF/HF、エントロピーの変動に対して、患者では指標の変動は異なった(図 2)。

## D. 考察

まず End-PAT による計測により、レイノー現象を合併している MCTD および SLE 患者の RIH の有意な低下が明らかにされた。このことから、これらの患者では指尖動脈 NO 依存性血管拡張能が低下している事が分かった。

末梢組織が必要とする血液量を動脈拡張して供給しバランスを保つ事が、動脈の生理機能における恒常性の維持であり、その動脈拡張能は、血管内皮の一酸化窒素 (NO) 産生能と血管平滑筋の反応性に依存する事が知られている。可逆的な末梢動脈の収縮拡張調節が、時によって不可逆的な調節障害に陥り指尖の壊死や壊疽にまで至るレイノー現象は、この末梢動脈の恒常性の破綻である事が推測される。また、フォスフォジエステラーゼ-5 を阻害する事により NO 刺激に由来する cGMP を増加して血管拡張作用をもたらすシルデナフィルやタダラフィルがレイノー現象は指尖潰瘍に有効であった報告も、この事を支持する。

これまで NO 依存性血管拡張は、血流依存性血管拡張反応検査 (FMD: Flow Mediated Dilatation) において肘動脈で測定されてきた。世界的な標準検査ではあるが、その測定には熟練が必要とされ、簡便ではない。本研究で用いた End-PAT システムは、非侵襲的に、特別な技術習熟なしに、NO 反応性の動脈拡張 (動脈血容積増加) を再現性よく測定する事を可能とした。さらに、指尖動脈レベルの拡張能を評価できる事は、レイノー現象における動脈血管内皮動脈機能評価に適していると考えられた。

今回、レイノー現象を合併する患者において指尖動脈血管の NO 依存血管拡張の障害を示し、その評価方法に End-PAT システムが有用である事を示した。レイノー現象に対する各種薬物治療や物理療法の有効性の評価に End-PAT システムを利用できると考えられ、新規治療方法に寄与する可能性が期待できる。また、レイノー現象と PAH の関連性や、シルデナフィルやタダラフィルが両者に有効である事などから推測して、指尖動脈の NO 依存性血管拡張障害を、PAH の超早期診断やリスク診断へ応用できる可能性が推測された。

End-PAT による RHI は、年齢に依存しないされている。しかし、本研究では未知な事が多いため、概ね年齢をマッチさせて検討したが、今後症例を増やし年齢の範囲を拡大し、ステロイドや内服薬を調節した検討も必要と考えられた。

指尖動脈の血管内皮機能、すなわち NO 依存性血管拡張能と心肺自律神経活動の関連性を評価するために、レイノー現象に伴う自律神経活動を周波数領域解析で検討した。正常者では、副交感神経活動優位が寒冷刺激により交感神経系優位となり、エントロピーの急激な減少、そして寒冷刺激後の副交感活動優位へ復帰し

た。しかし、MCTD 患者の自律神経活動は明らかにレイノー現象を有する MCTD 患者では異なったが、そのバリエーションは様々であり、今回の検討では法則性を示すには至らなかった。この事には、測定システムや、寒冷刺激の見直しが必要であり、さらなる研究が必要と考えている。

## E. 結論

Endo-PAT システムを用いて MCTD 患者の末梢循環障害を評価する事ができた。レイノー現象の病態には、NO 依存する血管内皮機能障害の関与が考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 田中住明, 星健太, 廣畑俊成. 【関節リウマチを疑ったら 診断・治療の Update と鑑別すべき膠原病】 関節リウマチと鑑別が必要な疾患とその特徴 【若年～中年で多い疾患】 Behcet (ベーチェット) 病. *Medicina* 2011; 48: 214-7.
2. 田中住明, 星健太. 【肺循環・肺高血圧を識る 診断・治療の現在】 治す 新規治療薬の Potential soluble guanylate cyclase 刺激薬. *Heart View* 2011; 15: 95-8.
3. 田中住明, 小川英佑. 【内科診療における論点】 膠原病・リウマチ 混合性結合組織病に合併する肺高血圧症にステロイド治療は有効か? *内科* 2011; 107: 1434-9.
4. Hashimoto A, Tejima S, Tono T, Suzuki M, Tanaka S, Matsui T, Tohma S, Endo H, Hirohata S. Predictors of Survival and Causes of Death in Japanese Patients with Systemic Sclerosis. *J Rheumatol* 2011; 38: 1931-9.
5. Kelley JM, Monach PA, Ji C, Zhou Y, Wu J, Tanaka S, Mahr AD, Johnson S, McAlear C, Cuthbertson D, Currence S, Davis JC, Jr., Dellaripa PF, Hoffman GS, Khalidi N, Langford CA, Seo P, St Clair EW, Specks U, Stone JH, Spiera RF, Ytterberg SR, Merkel PA, Edberg JC, Kimberly RP. IgA and IgG antineutrophil cytoplasmic antibody engagement of Fc receptor genetic variants influences granulomatosis with polyangiitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 20736-41.

### 2. 学会発表

1. 田中住明, 小川英佑, 星健太, 田中淳一, 和田達彦, 永井立夫, 岡田純, 廣畑俊成. リウマチ性疾患の肺病変 膠原病に合併する肺動脈性肺高血圧症

の罹患率についての検討. 第55回日本リウマチ学会総会・第20国際リウマチシンポジウム神戸, 2011(7) (同抄録集 336頁)

2. 田中住明. 膠原病診療における肺高血圧症のピットフォール. 55回日本リウマチ学会総会・20回国際リウマチシンポジウム, 2011(7) (同抄録集 678)
3. Hoshi K, Tanaka S, Wada T, Tanaka J, Nagai T, Hirohata S. Retrospective Analysis of the Efficacy of Tacrolimus in Rheumatoid Arthritis: Suggestive Synergistic Effects with Methotrexate. ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2011, Chicago IL USA, 2011(11) (Arthritis and Rheumatism 2011; 63(10supp): S499)
4. Tanaka S, Hoshi K, Tanaka J, Wada T, Okada J, Nagai T, Hirohata S. Serum Brain Natriuretic Peptide is a Reliable Marker for Survival of Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Connective Tissue Diseases, Including Systemic Sclerosis, Mixed Connective Tissue Disease and Systemic Lupus Erythematosus. ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2011 Chicago IL USA, 2011(11) (Arthritis and Rheumatism 2011; 63(10supp) S577)
5. Hashimoto A, Endo H, Matsui T, Tohma S, Tanaka S, Hirohata S. The Risk of Cancer in Japanese Patients with Systemic Sclerosis. ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2011 Chicago IL USA, 2011(11) (Arthritis and Rheumatism 2011; 63(10supp): S600)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得                   なし
2. 実用新案登録           なし
3. その他                   なし

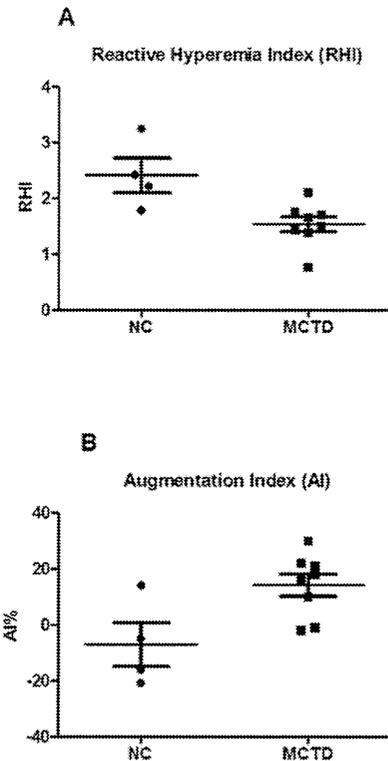


図1. End-PATを用いて測定した A) 反応性充血指数(RHI: Reactive Hyperemia Index)と、B) Augmentation Index(AI)

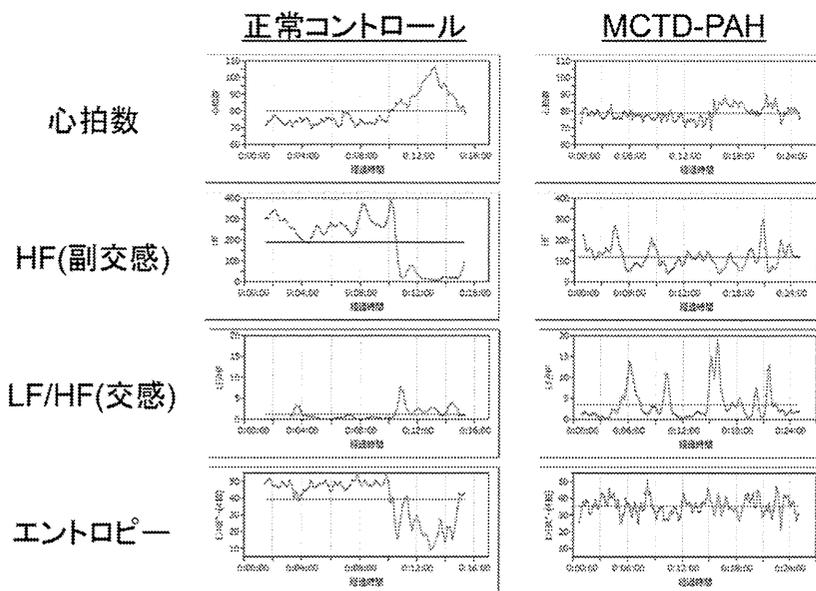


図2. レイノー現象における(心肺)自律神経機能活動  
レイノー現象誘発試験を行った。  
心拍モニター(ホルター心電図)を装着し、安静常温(5-10分) → 冷水に両手を沈め(5分) → 常温(10分)で刺激

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

膠原病に併発した肺高血圧症の非侵襲的検査法に関する研究

研究分担者 松下雅和 順天堂大学膠原病内科（助教）  
研究協力者 小笠原倫大 1)、建部一夫 2)、天野浩文 2)、野澤和久 2)、山路 健 3)、  
田村直人 3)、高崎芳成 4)

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、4) 同 教授

研究要旨

混合性結合組織病(MCTD)は全身の様々な臓器に炎症を来しうる疾患である。肺高血圧症(PH)は患者の予後を大きく左右する合併症であり、早期の診断・治療が重要となる。PHの確定診断には右心カテーテル検査が必須であるが、全例および頻回に施行することは困難である。本研究では、非侵襲的に患者血清を用いたバイオマーカーや胸部CTスキャン、呼吸機能検査所見などからPHの早期発見、経過観察に有用な指標および右心カテーテルの適応症例などを確実に選別しうる方法について検討した。

A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)は全身の様々な臓器に障害を来しうる疾患である。

肺高血圧症(PH)は患者の日常生活動作(ADL)や生命予後を大きく左右する合併症であるが、特異的な自覚症状などがなく、早期診断が困難である。PHの確定診断には右心カテーテルが必要であり、本検査によって得られる情報量は多く、PHの分類や他の疾患の鑑別などにも有用である。したがってPHが疑われる症例には強く推奨される検査であるが、全例に行うことは困難であり、さらに短期間かつ頻回の経過観察にも向かない。

本研究では呼吸機能検査や胸部CTスキャン、血液検査所見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、経過観察する方法や右心カテーテルを行うべき症例を的確に選別しうる方法の確立を目的とした。

B. 研究方法

当科に受診歴のあるMCTDを始めとした膠原病症例のうち、心臓超音波検査(UCG)が施行され、推定右室圧が40mmHg以上を示した症例を選択した。これらの症例のうち、適切な時期に呼吸機能検査、胸部CTスキャン血液検査などが施行された症例を対象とした。

対象症例の%VCや%DLCO、主肺動脈径、右肺動脈径や大動脈径などを計測し、UCGでの推定右室圧との関連を検討した。さらに患者血清中のasymmetric dimethylarginine(ADMA)やLDL receptor relative with 11 binding repeats(LR11)値との相関関係を解析した。

ADMAは1992年Vallanceらにより内因性NO合成(enOS, iNOS, nNOS)阻害物質として報告された。NOの生

物学的活性が低下した病態で上昇が見られ、活性酸素を過剰に産生し、内皮機能を低下させることが知られている。一方、LR11はLDLレセプタースーパーファミリーに属する可溶性受容体として、1996年にクローニングされた。本レセプターは、細胞膜上のウロキナーゼ受容体と複合体を形成し、細胞外マトリックスの分解、細胞骨格の再構成を促進し、平滑筋細胞の遊走能を促すとされている。両者とも血管内皮の増殖や動脈硬化の指標となることが知られており、その機序から肺高血圧症のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆される。

対象症例およびPHの合併が見られない膠原病症例での血清ADMAやLR11などの値、呼吸機能検査所見、血管径などを評価した。これらの結果を統計学的に解析し、PHの非侵襲的な予測法、評価法などについて検討した。

(倫理面への配慮)

すべての症例は番号化して検体や検査結果など、個人の特定は不可能な状態で評価した。

C. 研究結果

対象症例数はMCTDが23例(42.6%)、全身性エリテマトーデス(SLE)が14例(25.9%)、強皮症(SSc)が7例(13.0%)、血管炎症候群が4例(7.4%)、シェーグレン症候群(SjS)が3例(5.6%)、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)が2例(3.7%)、関節リウマチ(RA)が1例(1.9%)であった。男女比はMCTDが3:20でSLEが4:10、SScが1:6と表1に示したごとく血管炎を除く各疾患群で女性症例が多く見られた。

UCGによる推定右室圧はMCTDでは平均40.2mmHgであ

り、このうち死亡例での平均は 85.0mmHg と有意に高値であった。同様に MCTD 以外の膠原病においては、それぞれ 51.0mmHg、80.0mmHg であった(図 1)。

次に、これらの症例の血清を用いて ADMA、LR11、NT-pro BNP、尿酸値を測定した。ADMA は MCTD、SSc、SLE、PM/DM、RA、血管炎、SjS においてそれぞれ 0.58( $\mu$  Mol/l)、0.59( $\mu$  Mol/l)、0.58( $\mu$  Mol/l)、0.77( $\mu$  Mol/l)、0.71( $\mu$  Mol/l)、0.95( $\mu$  Mol/l)、0.61( $\mu$  Mol/l) であり、血管炎の症例で有意に高値であった。一方、LR11 は同様に 20.3(ng/ml)、12.8(ng/ml)、17.0(ng/ml)、18.8(ng/ml)、10.2(ng/ml)、11.7(ng/ml)、9.5(ng/ml) を示した(表 2)。同様の測定を PH の合併が見られない膠原病症例(MCTD:40 例、SLE:10 例、SjS:9 例、RA:8 例)で検討したところ、ADMA は 0.52( $\mu$  Mol/l)で LR11 は 10.6(ng/ml)であった。

PH の症例が多く見られた MCTD、SSc、SLE で呼吸機能検査結果から%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(表 3)。両者は UCG での推定右室圧との相関は見られなかったが、PH 合併・非合併膠原病症例で検討すると間質性肺炎(IP)の有無にかかわらず有意差をもって高値であった(図 2)。

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、上行大動脈径との比を計算した。図 3 に示したごとく 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。血清 BNP 値は UCG での推定右室圧と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(大動脈径/右肺動脈径+0.02BNP 値)で線形回帰出来る可能性が示された。

次に、推定右室圧と血清中の ADMA、LR11、NTpro BNP および UA 値との相関を解析した。これらのバイオマーカーは推定右室圧と相関が見られなかったが ADMA は、NT-pro BNP および UA と有意な相関を示した。前述した PH 非合併膠原病症例と PH 合併膠原病症例を用いてさらに検討を進めた。両群で ADMA および LR11 を評価し、PH の診断や治療に有用であるか否かを検討した。結果、ADMA は推定右室圧や PH 合併との相関は見られなかったが、LR11 は PH の合併した膠原病で有意に高値であり、PH の診断に有用である可能性が示唆された。特に対象疾患を MCTD に限定すると P 値は 0.0001 未満であり(図 4)、odd ratio は 2.05 と計算され、PH のスクリーニングに有用であることが示唆された。

## D. 考察

近年、エンドセリン受容体拮抗剤や PDE5 阻害剤を始めとした様々な治療薬が登場し、PH に対する治療の選択肢も増え、患者の ADL や生命予後にも改善が見られている。しかし PH は自覚症状が出現した時点ではす

で進行しており、治療に対する反応も良好でない傾向にある。早期に診断し、治療を開始することが重要である。右心カテーテルは肺動脈圧のみならず肺血管抵抗や肺動脈楔入圧を正確に知ることができ、正確な PH の病態を把握することが可能である。本来であれば、PH 合併危険群には全例に右心カテーテルを施行すべきであるが、侵襲度を考慮すると、右心カテーテルが必要な症例を的確に選択して行うことが望ましいと考えられる。

昨年度は、CT スキャンや呼吸機能検査、血清 BNP などを用いて PH を予測する方法について検討し、%VC/%DLCO または%FVC/%DLCO の値で PH の有無の予測が可能であることを示した。さらに血清 BNP 値と上行大動脈径/右肺動脈径を用いると、UCG での推定右室圧は前述した式で線形回帰出来る可能性を報告した。

本年度はさらに、心血管イベントを始めとした動脈硬化に関連すると思われる ADMA や LR11 などについて検討した。

ADMA は内因性 NO 合成阻害物質であり、LR11 は血管平滑筋細胞の増殖度と相関することが知られている。PH において内因性 NO や血管内皮細胞の異常は、病態形成に重要な役割を担っている。したがってこれらの測定値が膠原病に合併した PH の症例で有用である可能性が考えられる。しかし今回の検討では、ADMA は NT-pro BNP および UA とは有意な相関を示したが、推定右室圧との相関は LR11、ADMA とも得られなかった。一方、PH 合併膠原病症例と PH 非合併膠原病症例での検討では、LR11 は PH の合併した膠原病で有意に高値であることが明らかとなった。

ADMA および LR11 は動脈硬化や新規血管イベントの指標となることも報告されているが、今回の検討では動脈硬化のリスクファクターである LDL コレステロール値や糖尿病などの合併症を考慮しておらず、少ない症例での検討であった。また、用いた症例は UCG での推定右室圧を基準にしている。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。今後は、対象症例数を増やすとともに右心カテーテルを施行した症例で、同様の検討を行い、さらに他の心血管イベントのリスクファクターなどの影響も考慮した解析を行う必要がある。

## E. 結論

膠原病症例において呼吸機能検査や CT スキャンを用いた肺動脈径および大動脈径の測定は、PH の診断や経過観察の補助的な役割を果たせる可能性を有することが示唆された。MCTD において、血清 LR11 は PH を併発すると有意に高値であり、PH のスクリーニングや右心カテーテルを積極的に施行すべきか否かの判断に有用である可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

なし

## 1. 論文発表

Minowa K, Amano H, Nakano S, Ando S, Watanabe T, Nakiri Y, Amano E, Tokano Y, Morimoto S, Takasaki Y: Elevated serum level of circulating syndecan-1(CD138) in active systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 44: 357-362, 2011

Kawamoto T, Abe Y, Ito J, Makino F, Kojima Y, Usui Y, Ma J, Morimoto S, Yagita H, Okumura K, Akiba H, Takasaki Y: Anti-T cell immunoglobulin and mucin domain-2 monoclonal antibody exacerbates collagen-induced arthritis by stimulating B cells. *Arthritis Res Ther* 13: R47, 2011

Ogasawara M, Tamura N, Kageyama M, Onuma S, Kusaoi M, Toyama S, Sekiya F, Matsudaira R, Nawata M, Tada K, Matsushita M, Kempe K, Amano H, Morimoto S, Yamaji K, Takasaki Y: Single-center, retrospective analysis of efficacy and safety of tacrolimus as a second-line DMARD in combination therapy and the risk factors contributing to adverse events in 115 patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 31: 251-257, 2011

Hotatsu K, Yamaji K, Yamada R, Oda K, Kageyama M, Kusaoi M, Onuma S, Kawamoto T, Sugimoto K, Sekiya F, Kon T, Ogasawara M, Kempe K, Tsuda H, Takasaki Y: Effect of Various Anticoagulant Agents on Large-Volume Leukocytapheresis Using New Cellsorb CS-180S Filter. *Ther Apher Dial* 15:355-359, 2011

Nawata M, Matsushita M, Matsudaira R, Yamada H, Kaneda K, Asano M, Yamanaka K, Murakami A, Takasaki Y: Clinical Significance of Anti-U1 RNP Antibodies Recognizing The Conformation Structure on U1 RNA/70-kd Protein Complex in Patients with Mixed Connective Tissue Disease. *Juntendo Med Journal* 157:477-487, 2011

膠原病における免疫抑制療法の有用性 高崎芳成  
*PROGRESS IN MEDICINE* 31: 137-142, 2011

## 2. 学会発表

松下雅和, 箕輪健太郎, 天野浩文, 田村直人, 高崎芳成: 肺高血圧症が先行した関節リウマチの一例. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸ポートピアホテル, 神戸, 平成23年7月17日-20日, 2011 (第55回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集 550, 2011)

森本真司, 仲野総一郎, 渡邊崇, 天野浩文, 高崎芳成: SLEの病態形成におけるIL-27/WSX-1の関与の検討. 第39回日本臨床免疫学会総会, 京王プラザホテル, 東京, 平成23年8月15日-17日, 2011 (第39回日本臨床免疫学会総会抄録集号 282, 2011)

Matsushita M, Ogasawara M, Amano H, Tamura N, Takasaki Y: Effect of Bosentan on Digital Ulcers in Systemic Sclerosis. The 4<sup>th</sup> East Asian Group of Rheumatology. Keio Plaza Hotel Tokyo, Japan, 2011, October, 15. (The 4<sup>th</sup> East Asian Group of Rheumatology Program 99, 2011)

高崎芳成: ランチョンセミナー「膠原病における免疫抑制療法の有用性」, 第55回日本リウマチ学会, 神戸ポートピアホテル, 神戸, 平成23年7月19日, 2011

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

### 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