

表 1

対象症例			
基礎疾患	人数 (%)	男:女(人)	年齢
MCTD	23 (42.6%)	3:20	58.2 (±19.2)
SSc	7 (13.0%)	1:6	62.7 (±4.8)
SLE	14 (25.9%)	4:10	51.0 (±18.6)
PM/DM	2 (3.7%)	0:2	47.0 (±2.8)
RA	1 (1.9%)	0:1	63.0 (±0.0)
血管炎	4 (7.4%)	2:2	45.8 (±20.9)
SjS	3 (5.6%)	1:2	53.7 (±24.0)
Total	54	11:43	54.8 (±17.0)

図 1

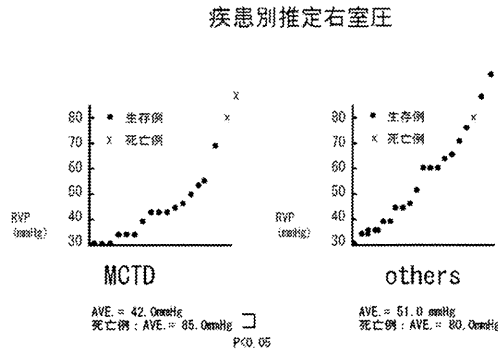


表 2

基礎疾患	血清ADMA LR11 NT-proBNP UA値			
	ADMA (μmol/l)	LR11 (ng/ml)	NT-proBNP (pg/ml)	UA (mg/dl)
MCTD	0.58 (±0.14)	20.3 (±6.49)	574.5 (±728.7)	6.3 (±1.80)
SSc	0.59 (±0.19)	12.8 (±3.90)	348.6 (±430.2)	4.2 (±1.93)
SLE	0.58 (±0.12)	17.0 (±7.57)	563.0 (±914.3)	6.2 (±1.87)
PM/DM	0.77 (±0.30)	18.6 (±0)	1205.5 (±939.7)	5.2 (±2.12)
RA	0.71	10.2	166	4.0
血管炎	0.95 (±0.50)	11.7 (±1.02)	5880.2 (±10764.2)	5.5 (±2.28)
SjS	0.61 (±0.1)	9.5 (±0)	1017.7 (±902.8)	10.2 (±4.49)
Total	0.62 (±0.21)	17.4 (±6.83)	975.9 (±3007.2)	6.1 (±2.32)

表 3

	PH合併例の呼吸機能検査値		
	MCTD	SSc	SLE
%VC	75.0 (±18.5)	61.4 (±19.3)	76.5 (±7.70)
%FVC	72.3 (±17.5)	60.8 (±19.0)	75.0 (±7.20)
%DLCO	48.7 (±13.5)	39.0 (±14.1)	45.6 (±14.4)
%VC/%DLCO	1.63 (±0.37)	1.86 (±0.77)	1.87 (±0.91)
%FVC/%DLCO	1.55 (±0.38)	1.84 (±0.72)	1.79 (±0.70)

図 2

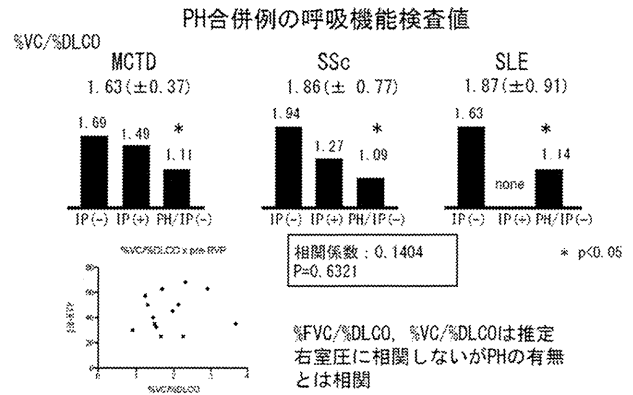


図 3

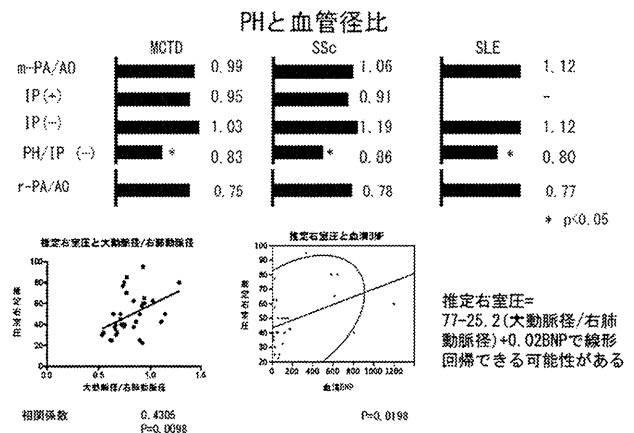
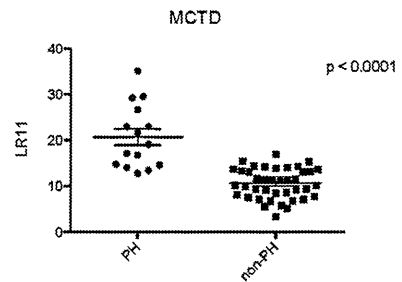
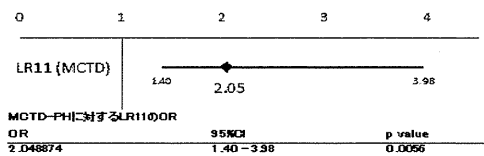


図 4

MCTDにおけるPH合併・非合併群間でのLR11値の検出



LR11のPHに対するOdds Ratio



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

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学教室

研究協力者 安岡 秀剛 慶應義塾大学医学部内科学教室

研究目的：疾患モデル動物は、疾患の病態解明や治療開発において重要な役割を果たしているが、現在まで MCTD の主要な死因となる間質性肺疾患(ILD)と肺動脈性肺高血圧症(PAH)を同時に再現したモデル動物の報告はない。最近我々は転写因子 AP-1 を構成する Fra-1 を高発現するトランスジェニック (TG) マウスが肺間質の線維化および肺血管系の異常を来すことを見いだした。本年度はこのマウスが MCTD 研究に応用できるか検討した。

研究方法：5-16 週齢の Fra-1 TG マウスを対象とし、同週齢の野生型マウスを対照とした。組織染色により経時的に肺および肺動脈について評価した。肺の線維化は Ashcroft score で定量化した。CD31 および alpha smooth muscle actin (α SMA) の発現を免疫組織化学で検出し、肺動脈病変、特に血管内皮および非筋性動脈の musculization についてそれぞれ評価した。機能的な右心負荷は心エコーおよび組織での心筋厚で評価した。

研究結果：Fra-1 TG マウスでは野生型マウスと比較し、有意に肺間質の線維化が進行し、その組織像は NSIP に合致していた。肺動脈は血管周囲の炎症性細胞浸潤と線維化、内膜の増殖・内腔の狭窄、さらに中膜筋層の肥厚を認めていた。一方で叢状変化や血管腫様変化、壊死性血管炎は認められなかった。また内膜では、血管内皮細胞の増殖は認められず、 α SMA 陽性細胞が多く認められた。非筋性動脈での musculization は 10 週から認められた。心エコーでは Fra-1 TG マウスで明らかな三尖弁逆流が検出され、また組織学的に右室壁の肥厚も認めた。

考察：Fra-1 TG マウスでは組織学的に肺間質の線維化および肺動脈の狭小化を認めていた。経時的変化および病変分布などを総合すると肺病変は NSIP、肺動脈の変化は Heath& Edwards 分類の Grade I から III の PAH と合致する変化を認めていた。これらの変化は MCTD でみられる ILD や PAH にきわめて類似していた。

結論：Fra-1 TG マウスは ILD および PAH を同時に発症する新規モデルマウスで、MCTD および強皮症の病態解析に有用と考えられた。

A. 研究目的

混合性結合組織病 (MCTD) は強皮症、筋炎、全身性エリテマトーデスのコンポーネントを併せ持つ疾患であるが、その原因および病態はいまだ明らかではない。MCTD の特徴として、抗 U1RNP 抗体産生に代表される自己抗体産生、血管障害、線維化といった病態を併せ持つこと、また内臓諸臓器病変をもつ

ことが挙げられる。なかでも間質性肺疾患 (ILD)、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は MCTD の主要な死因で、これらは未だに良い治療法がないのが現状である。

疾患モデル動物は様々な疾患でその病態の解析や治療法の開発に重要な役割を果たしてきた。しかし、ILD と PAH を同時に再現したモデル動物の報告はこれまでなく、新

規治療法開発の遅れの要因の一つとなっている。最近転写因子 AP-1 を構成する Fra-1 を高発現するトランスジェニック (TG) マウスが肺間質の線維化をきたすことが報告された (1)。我々は本マウスが肺血管系の異常も伴うことを見いだした。そこで、本年度は Fra-1 TG マウスが ILD/PAH 同時モデル動物として MCTD 研究に応用できるか検討した。

B. 研究方法

1. 対象

対象は Fra-1 TG マウス (♀) 8 匹 (5-16 週齢) および同週齢の野生型マウス (♀) を対照とした。Fra-1 TG マウスは全長の *fra-1* 遺伝子を組み込んだ H2-*fra-1* TR ベクター (p128/1) を HindIII 処理後、受精卵に導入し (C57BL/6 x CBA F1)、作成した。10 世代以上 C57BL/6 とバッククロスしたものを用いた。5 週齢 (1 匹)、10 週齢 (3 匹)、14 週齢 (2 匹)、16 週齢 (2 匹) をそれぞれサクリファイスし、心臓、肺を摘出した。

2. 線維化および肺動脈病変の評価

それぞれのマウスから得られた組織を 10% 緩衝ホルマリン固定後、パラフィン包埋した。それぞれ切片を作製し、Hematoxylin & Eosin 染色、Masson-Trichrome 染色、Elastica-van Gieson (EVG) 染色を行い、経時的に肺および肺動脈について評価した。肺の線維化の程度は Ashcroft score (2) を用いて定量化した。H&E 染色のスライドを用いて心筋厚を測定し、右心室壁厚/左心室壁厚比を計算して右心負荷を評価した。

3. 免疫組織化学による評価

病変形成が進んだ 10 週齢以降のマウスを用いて CD31 および alpha smooth muscle

actin (α SMA) の発現を免疫組織化学で検出した。パラフィン切片を脱パラフィンし、microwave 法による抗原賦活化の後、一次抗体として抗 CD31 抗体 (Abcam) または抗 α SMA 抗体 (Sigma) と室温で 1 時間反応させた。それぞれビオチン化抗ウサギ IgG 抗体またはビオチン化抗マウス IgG 抗体と反応させた後、avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) 試薬、引き続き 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) 試薬と反応させ発色した。

4. 心エコーによる肺高血圧の機能的評価
病変が完成した 14-16 週のマウスで三尖弁逆流ジェットを心エコーを用いて (VisualSonics) で評価した。

5. 統計学的解析

2 群間の比較は Mann-Whitney U-test で検討し、 $P < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

Fra-1 TG マウスでは野生型マウスと比較し、肺間質の線維化が進行し、Ashcroft の線維化スコアでみても有意な線維化を認めた ($P < 0.05$) (図 1)。5 週齢の時点で既にびまん性に肺胞隔壁の肥厚と炎症性細胞浸潤を認め、経時的にかつ時相が一致して線維化が進行していた。その分布は特に血管気管支束および間質の線維化が著明であった。その組織所見の特徴は non-specific interstitial pneumonia (NSIP) の組織像と合致していた。

肺動脈では血管周囲の炎症性細胞浸潤と線維化を認め、10 週より内膜の変化 (血管内皮の増高と増殖、内腔の狭窄)、14 週目には増殖した内膜がその萎縮と重層化し、16 週目には中膜筋層の肥厚が著明となった。ま

た Masson-Trichrome 染色では血管壁および血管周囲の線維化が認められた。一方でこのマウスでは叢状変化や血管腫様変化や壊死性血管炎の像は認められなかった。また血管の内膜では CD31 陽性の血管内皮細胞の増殖はみられず、かわりに α SMA 陽性細胞が多く認められた。また、非筋性の細小動脈では 10 週齢より musculization が認められた。心エコーでは、Fra-1 TG マウスで明らかな三尖弁逆流が検出された。また組織学的に右室壁の肥厚も認め、機能的にも肺高血圧、右室負荷が認められた。

D. 考察

Fra-1 TG マウスは元々骨形成に異常をきたすマウスとして報告された(3)。今回の我々の検討では、Fra-1 TG マウスの形質を肺に着目して詳細に検討した。その結果、組織学的に肺間質の線維化および肺動脈の狭小化を認めた。経時的変化および病変分布などを総合すると肺病変は NSIP に合致し、肺動脈の変化は Heath& Edwards 分類の Grade I から III の PAH と合致する変化を認めていた。これらの変化は MCTD でみられるILDやPAHに類似していた。以上より Fra-1 TG マウスはILDおよびPAHを同時発症する疾患モデルマウスとしてMCTDや強皮症の病態解明に有用である可能性が考えられた。

炎症性細胞の存在は線維化病態において重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細な分子寄稿は明らかでない。Fra-1 TG マウスでは炎症性細胞浸潤に引き続き線維化ならびに血管病変が進行していた。したがって炎症性細胞浸潤がこれらのトリガーとなっている可能性がある。また血管内膜において細胞増殖が認められたものの、増殖した内膜を構成する細胞は血管内皮細

胞ではなく、 α SMA 陽性細胞であった。 α SMA 陽性細胞の由来として、血管壁に局在する線維芽細胞、血管平滑筋細胞や内皮細胞からの形質転換、また循環中に存在する炎症性細胞や幹細胞由来細胞などが考えられる。本マウスにおける肺病変の発症メカニズムの追究はMCTD患者のILDやPAHの病態解明や新規治療法の開発につながる。

E. 結論

Fra-1 TG マウスはILDおよびPAHを同時に発症する新規モデルマウスで、MCTDおよび強皮症の病態解析に有用と考えられた。

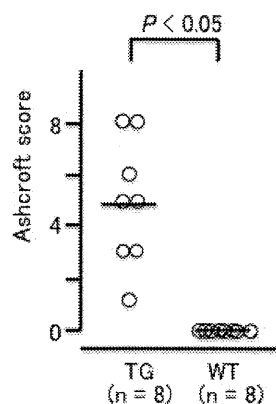


図1. Fra-1トランスジェニック(TG)マウスおよび野生型マウス(WT)における肺線維化の比較(Ashcroft scoreによる)。

(文献)

1. Takada Y, Gresh L, Bozec A, Ikeda E, Kamiya K, Watanabe M, Kobayashi K, Asano K, Toyama Y, Wagner EF, Matsuo K. Interstitial lung disease induced by gefitinib and Toll-like receptor ligands is mediated by Fra-1. *Oncogene*. 2011; 30(36): 3821-3832.
2. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical

scale. *J Clin Pathol.* 1988; 41(4): 467-470.

3. Jochum W, David JP, Elliott C, Wutz A, Plenk H Jr, Matsuo K, Wagner EF. Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med.* 2000; 6(9): 980-984.

F. 健康危険情報
特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Hoshino K, Satoh T, Kawaguchi Y, and Kuwana M. Association of *Hepatocyte Growth Factor* promoter polymorphism with severity of interstitial lung disease in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(8): 2465-2472.
2. Furuya Y, and Kuwana M. Effect of bosentan on systemic sclerosis-associated interstitial lung disease ineligible for cyclophosphamide therapy: a prospective open-label study. *J. Rheumatol.* 2011; 38(10): 2186-2192.
3. 桑名正隆: リウマチ性疾患における心血管障害; 膠原病に伴う末梢循環不全とその薬物療法. *リウマチ科* 46(4): 364-371, 2011.
4. 桑名正隆: 肺高血圧症各論 (疾患の解説と内科治療); 結合組織病に伴う肺高血圧症. *医学のあゆみ* 240(1): 77-82, 2012.
5. 桑名正隆: 最新の膠原病診療—そのパラダイムシフト; 混合性結合組織病.

日本医師会雑誌 140(11): 2319-2323, 2012.

6. 桑名正隆: 肺高血圧症・肺血栓塞栓症の最新情報; 全身性強皮症と肺高血圧症. *呼吸器科* 21(1)、印刷中.

学会発表

1. 桑名正隆: イブニングセミナー; 膠原病内科医の立場から考える肺高血圧症の治療戦略. 第55回日本リウマチ学会総会 (神戸). 2011. 7.
2. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Takeuchi T: Impaired in vivo neovascularization capacity of endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. The 75th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Chicago). 2011. 11.
3. Kuwana M, Kaburaki J: Natural history of pulmonary function in patients with systemic sclerosis and interstitial lung disease. 2nd Systemic Sclerosis World Congress (Madrid). 2012. 2.
4. Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Satoh T, Kuwana M: Long-term outcomes of patients with pulmonary arterial hypertension and connective tissue disease treated with intravenous epoprostenol. 2nd Systemic Sclerosis World Congress (Madrid). 2012. 2.

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

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肺静脈閉塞に関する研究

研究分担者：中西宣文 国立循環器病研究センター 心臓血管内科部門肺循環科 特任部長

研究協力者：大郷 剛 国立循環器病研究センター 心臓血管内科部門肺循環科

研究要旨

結合組織病性肺動脈性肺高血圧症 (CTD-PAH) は特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) と比較し予後不良であることが知られているが、その臨床像は不明な点が多い。近年の肺高血圧症に対する PAH specific therapy の進歩にもかかわらず予後が不良である原因の一つとして、CTD-PAH 症例において PAH specific therapy に対して抵抗性を示す症例群が存在する可能性があり、その原因の一つとして結合組織病による静脈炎を基礎とする肺静脈閉塞様病態が存在すると仮定し、検討を行った。対象は過去 15 年間に国立循環器病研究センターに入院した CTD-PAH 患者 64 人 (SLE: 39%, MCTD: 29%, SSc: 20%, Sjogren: 3%, Others: 9%) において臨床所見、心臓カテーテル検査による血行動態、PAH specific therapy への反応、予後、死亡群の特徴、剖検例での病理所見（静脈閉塞所見を中心）を後ろ向きに再検討した。発症様式は 55/64 症例が膠原病を先行し肺高血圧を発症し、9/64 症例 (14%) においては肺高血圧症先行して膠原病を発症していた。死亡例は 16 名で、全体での 5 年生存率は 67%、PAH specific therapy を行っている群では 71%であった。SSc 群 (n=13) と比較して Non-SSc 群 (n=47) は予後が悪かった ($p < 0.05$)。SSc 群と Non-SSc 群は治療開始前の心臓カテーテル検査にて血行動態に有意差は認めなかったが、SSc 群では有意に DLco の低下を認めた。PAH specific therapy の反応の心臓カテーテルによる血行動態評価では平均肺動脈圧、心係数、肺血管抵抗共に非死亡群と比較して死亡群では有意に改善率が悪かった。剖検を行なった 10 名の CTD-PAH 患者中 7 名 (SLE 1 名、SSc 1 名、SSc +MCTD 1 名、MCTD 1 名、シェーグレン症候群 2 名、RA 1 名) を検討し、病理所見上 6/7 症例 (86%) において静脈閉塞所見を認めた。今後さらに予後不良群の検討及び病理所見の詳しい検討が必要である。

A. 研究目的

結合組織病に伴う肺動脈性肺高血圧症 (CTD-PAH)は特発性肺動脈性肺高血圧症と比較し予後が悪いことが知られている。しかし、CTD-PAH における肺内血管病変の特徴やそれに伴う肺高血圧発症のメカニズムにおいては不明な点が多い。CTD-PAH 例において、経験的に肺動脈性肺高血圧特異的治療に対して抵抗性を示す症例が存在し、CT 上小葉間隔壁肥厚や運動時の著明な低酸素などの所見を認める症例が存在する。同様の肺血管拡張薬に対する反応は肺静脈閉塞症 (Pulmonary veno-occlusive disease: PVOD)にて以前より知られており、肺静脈の血管閉塞により肺高血圧症を呈し、治療に抵抗性で予後が不良な疾患である。CTD-PAH では血管炎が病態として関与しており、肺動脈のみならず肺静脈での炎症を引き起こし、肺静脈閉塞様病態を併発している可能性がある。今回我々は、CTD-PAH において一部の患者では肺静脈閉塞が関与しており、PAH specific therapy への反応が不良であるため予後が悪くなっていると仮定し、これを検討するために研究を行った。

B. 研究方法

当院における過去 15 年間(1996 – 2011 年)に膠原病性肺動脈性肺高血圧症と診断された患者 64 名に関して臨床所見、心臓カテーテル検査による血行動態、PAH specific therapy への反応、予後、死亡の有無とその特徴、剖検例での病理所見 (静脈閉塞所見を中心に) を後ろ向きに検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」に基づき、国立循環器病研究センター倫理規定を

遵守して行った。

C. 研究結果

64 名の CTD-PAH 患者の内訳は SLE 25 人 (39%)、MCTD 19 名 (29%)、SSc 13 名 (20%)、Sjogren 症候群 2 名 (3%)、他 6 名 (9%) であった。CTD-PAH の発症様式としては 64 症例中 55 症例 (86%) が膠原病を先行して発症し、そののちに肺高血圧を発症していたが、9 症例 (14%) は肺高血圧を先行して発症した後で膠原病を発症していた。その 9 症例の内訳は SLE 3 例、SSc 2 例、MCTD 1 例、PM 1 例、RA 1 例、自己免疫性肝炎 1 例であった。

心臓カテーテル検査による血行動態評価としては平均肺動脈圧 (mean pulmonary artery pressure: mPAP) 46.9 ± 12.5 mmHg、心係数 (Cardiac index: CI) 1.99 ± 0.7 L/min/m²、肺血管抵抗 (pulmonary vascular resistance: PVR) 1159 ± 663 dyn · s · cm⁻⁵ であった。

予後であるが、当院での CTD-PAH 全体で 3 年生存率は 84% であった。この中で PAH specific therapy (PGI2 持続静脈注射、プロスタサイクリン内服、エンドセリンレセプター拮抗薬、PDE5 阻害剤これら単剤もしくは組み合わせによる治療) を施行していない群では 3 年以内にほとんどの患者が死亡しているのに対し、PAH specific therapy を施行した患者群では 3 年生存率 91% と高い生存率を示していた。

死亡例の検討を行ったところ、64 症例中 16 例 (25%) が死亡しており、死亡原因としては 15 例が右心不全増悪による死亡であり、1 例が原因不明の突然死をおこしていた。16 例の死亡例中 5 例 (31%) が PH を先に発症する PH 先行型 CTD-PAH であった。またこの PH 先行型 CTD-PAH のうち死亡率は 5/9 症例: 56% と

著明に高かった。16例の死亡例のうち10例に剖検を行っていた。

次にSScとNon-SScにおいて当院のデータにて予後及び心臓カテーテル検査により血行動態の評価を行った。欧米のデータにてSScは予後が悪いとされるが、当院の調査においても同様の結果を認め、SSc群はNon-SSc群と比較し有意に低い生存率であった($p < 0.01$)。さらにNon-SSc群よりSLE群とMCTD群を抽出し、SSc群と比較したがSLE群とMCTD群は有意さ差を認めなかったものの、SScと比較し両者ともに生存率は良好であった($p < 0.01$)。心臓カテーテル検査にてNon-SScとSScにおいて血行動態を比較したところ、平均肺動脈圧、心係数、肺血管抵抗いずれも統計学的な差は認めなかった。DLcoはSScはNon-SScと比較して有意に低下していた($p < 0.01$)。

次にCTD-PAHにおけるPAH specific therapyの効果を調べた。PAH specific therapyの使用により症例全体では肺動脈圧は低下(平均48.2より42.6mmHgに改善)し、心係数は上昇(1.98より2.39 L/min/m²)していた。しかし、死亡群と非死亡群を比較したところ非死亡群ではPAH specific therapyを施行することで肺動脈圧は低下(-16.3%)、心係数は増加(43.9%)し、肺血管抵抗は低下(-25.3%)していたにもかかわらず、死亡群では改善方向には働かなかつた($p < 0.05$)。剖検例10例のうち7例について肺病理組織を確認し、6例において肺静脈閉塞所見を認めた(86%)。

D. 考察

CTD-PAHはIPAHと比較し予後が不良であることは報告されているもののその原因は不明である。海外のデータは症例の基礎疾患の分布がSSc中心であり、今回の我々の症

例のようにSLE, MCTD, SScともに比較的均等に多いという症例分布とは異なり、海外のデータを参考にすることは注意が必要である。症例の分布が異なり、また治療方針もやや異なる海外のデータは日本ではややあてはまらない場合も多く、日本でのデータの集積が望まれる。今回我々は日本の単施設における肺循環器科による15年間のCTD-PAH患者を検討した。これは国内のデータであるという点と膠原病科ではなく、循環器のナショナルセンターでの治療成績であり血行動態の評価やPAH specific therapyを積極的に行っているという点、比較的重症肺高血圧症例が多いという点などに特徴があると考えられる。

CTD-PAHにおいてSSc、DLco低下症例等の予後が不良である事は欧米の過去のデータと比較しても同様の結果であるが、それだけではなく、CTD-PAHの死亡例においてPAH specific therapyの反応が極めて悪い症例が存在していることが示された。これらの症例は死亡例であり、通常予後不良群と考えられ、PAH specific therapyへの反応が悪いことは明らかに予後不良である徴候と考えられた。また今回のデータでは死亡群ではむしろPAH specific therapyの使用が血行動態の悪化をまねく可能性も示唆している。同じような現象が起こる疾患としては、肺静脈閉塞症(PVOD)が挙げられる。これは独立した疾患として挙げられるが、肺高血圧を示し、肺血管拡張を作用に持つPAH specific therapyを使用することで肺静脈からのうっ血状態を引き起こし、肺水腫を起こす場合や、血行動態が悪化する場合があることが知られている。PVODが疑われる場合PAH specific therapyの使用は注

意する必要がある。また Dorfmueller らは CTD-PAH の剖検例において 75%に肺静脈のリモデリングを指摘している。今回の結果により CTD-PAH の一部で膠原病による肺静脈炎症が PVOE 様病態を併発しており、これが PAH specific therapy への抵抗性を示し、予後を悪化させているのではないかと考えられた。その中で今回の剖検例での検討において 6/7 症例 (86%) において静脈閉塞所見を認めたことは興味深い。剖検例は予後不良群であり、静脈閉塞の病態が PAH specific therapy の効果を妨げている可能性があると考えられた。今後症例を増やし、肺静脈閉塞の程度や臨床所見、画像所見との関連を検討し、画像的診断や予後との関連を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

今回、国立循環器病研究センターにおける 15 年間の CTD-PAH 症例の臨床所見、治療への反応性及び病理所見を検討した。当院での生存率の検討より CTD-PAH において近年の PAH specific therapy により予後は確実に改善傾向にあることが示された。しかし CTD-PAH 症例の中で予後が悪い症例群が存在しており、予後不良群を検討することで、その要因を明らかにすることとした。SSc は欧米のデータでも指摘されているように今回の研究でも Non-SSc 症例と比較して有意に予後が不良であった。また今回の研究にて新たに判明したこととして肺高血圧先行型 CTD-PAH 症例の予後が比較的悪い可能性が示唆された。また死亡群においては PAH specific therapy への反応性が極めて不良であることが示され、かつ、データ上血行動態を悪化させている可能性を示していた。剖検による病理所見上現時点で 86%の症例に程度の差はあるものの、肺静

脈閉塞所見を認めていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Molecular Genetic Characterization of SMAD Signaling Molecules in Pulmonary Arterial Hypertension. Nasim MT, Ogo T, Ahmed M, Randall R, Chowdhury HM, Snape KM, Bradshaw TY, Southgate L, Lee GJ, Jackson I, Lord GM, Gibbs JS, Wilkins MR, Ohta-Ogo K, Nakamura K, Girerd B, Coulet F, Soubrier F, Humbert M, Morrell NW, Trembath RC, Machado RD. Human mutation. 2011 Dec;32(12):1385-9

2. BMPR-II deficiency elicits pro-proliferative and anti-apoptotic responses through the activation of TGF β -TAK1-MAPK pathways in PAH. Nasim MT, Ogo T, Chowdhury HM, Zhao L, Chen C, Rhodes C, Trembath RC. Human Molecular Genetics (accepted)

2. 学会発表

1. Prostacyclin analogues restore BMPR2-mediated cellular defects by inhibiting the exuberant TGF beta pathway. T. Ogo et al. American thoracic society annual meeting 2011.

2. Blood type O is associated with lower risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension and lower complication rates of antiphospholipid syndrome than is blood type A. T. Ogo et al. European Society of Cardiology 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

混合性結合組織病における自己抗体産生機序の検討

研究分担者 川畑仁人 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科 特任講師

研究要旨

混合性結合組織病 (MCTD) は抗 RNP 抗体の出現を特徴としており、抗 RNP 抗体出現機序の解明は MCTD の病理理解と治療への応用に重要である。しかし解析に適した動物モデルを欠くためその検討が困難であった。そこで本研究班にてリンパ球減少マウスへの T 細胞移入による抗核抗体産生系を樹立し、抗 RNP 抗体の産生機序研究への有用性を明らかにしてきた。既に本系を用いて、リンパ球減少下では抗原非特異的に CD4⁺CD25⁺T 細胞が follicular helper T 細胞に分化しうること、それに伴い germinal center が形成され、抗 RNP 抗体などの自己抗体産生を含む異常な B 細胞応答が誘導されることを明らかにしている。本年度は、この自己抗体誘導マウスモデルを用いて、他の系で抗 RNP 抗体産生への関与が示唆されている Toll 様受容体 (TLR) の、本系における抗 RNP 抗体産生への役割について検討した。現在、Toll 様受容体からのシグナルがどの細胞で重要かを明らかにすることが可能な MyD88 欠損 TCR α 欠損マウスや MyD88 欠損 RAG2 欠損マウスを作成し検討を進めている。また MCTD と同様にリンパ球減少があり抗 RNP 抗体を自然産生するマウスにおいても follicular helper T 細胞の検討を行い、本系と類似した細胞サブセットが存在していることを確認した。本研究により明らかとなった自己抗体産生に関わる follicular helper T 細胞サブセットとその分化経路の解明は、MCTD に対する分子標的治療を開発する上で重要と考えられた。

A. 研究目的

難治性合併症を有する混合性結合組織病 (MCTD) の治療開発には病態の解明が必須だが、それには疾患概念に密接に関連する抗 RNP 抗体の産生機序解明が重要である。これまでの混合性結合組織病研究班における研究により、抗 RNP 抗体産生マウスモデルを通して、MCTD の疾患概念に密接に関連する抗 RNP 抗体の産生には CD200+PD-1+ICOS+follicular helper T 細胞が関わり、制御性 T 細胞がその制御を担っていることが明らかにした。この細胞群の多くは CXCR5^{low} だが、一部に CXCR5⁺ が存在している。本研究では、この細胞群の抗 RNP 抗体産生機序における役割を、抗 RNP 抗体産生に重要と考えられている Toll 様受容体 (TLR) からのシグナルを欠いたマウスや、抗 RNP 抗体自然産生マウスの解析を通して明らかにすることを目的とする。今回、MCTD や本系と類似しリンパ球減少があり、抗 RNP 抗体を自然産生するマウスとして、NZB/WF1 マウスを選択した。

B. 研究方法

(1) 抗 RNP 抗体産生機序解析のためのマウスモデル
1) 抗 RNP 抗体誘導系の解析のための遺伝子改変マウス作成
抗 RNP 抗体をマウスに誘導するために、CD4⁺T 細胞や CD4 T 細胞サブセットを分離し、ヌードマウスへ移入する系を樹立している。抗 RNP 抗体産生への TLR の関与を検討するために、MyD88 欠損 TCR α 欠損マウスを作成する。TCR α 欠損マウスは、ヌードマウスと同様に $\alpha\beta$ T 細胞を欠損しており、レシピエントマウスとして使用可能であることを確認している。

MyD88 欠損 TCR α 欠損マウスを作成するために、MyD88 欠損 Balb/c マウス (オリエンタルバイオサービス) を、TCR α 欠損 Balb/c マウスに交配しダブルノックアウトマウスを作成する。

2) 抗 RNP 抗体自然産生モデルマウス

MCTD や本系と類似しリンパ球減少があり、抗 RNP 抗体を自然産生するマウスとして、10 週齢の雌 NZBWF1 マウスを使用。

(2) MyD88 欠損マウスを用いた抗 RNP 抗体誘導モデルの解析

1) 実験系

MyD88^{+/+}TCR α 欠損マウスおよび MyD88^{-/-}TCR α 欠損マウスをレシピエントとし、MyD88^{+/+}マウスおよび MyD88^{-/-}マウスより分離した CD4⁺T 細胞を移入した。その後、経時的に採取した血清より抗 RNP 抗体の産生への影響と、PD-1+ICOS+follicular helper T 細胞の分化について検討した。

2) T 細胞の分離

CD4⁺T 細胞の分離は、脾細胞をビオチン標識抗 B220 (RA3-6B2)、抗 CD8a (53-6.7)、抗 CD11b (M1/70)、抗 CD49b (DX5)、抗 I-Ab/d (25-9-17)、抗 Ly-6G/Ly-6C (Gr-1:RB6-8C5) と反応後、streptavidin-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec) を結合させ、これを MACS にてネガティブセレクションを行い分離した。また最初の抗体反応時にビオチン標識抗 CD25 抗体 (PC61) を加えることにより、CD4⁺CD25⁺T 細胞を分離した。

3) T 細胞の移入

前述の方法により分離した CD4⁺T 細胞を 2.5×10^6 個/

匹、BALB/c ノードマウスに腹腔内注射にて移入した。その後、経時的に血清を採取した。

4) 蛍光抗体法による抗核抗体の検出

抗核抗体の検出には、フルオロ HEPANA Test Kit (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan)内の HEP-2 細胞基質スライドを用いた。PBS を用いてマウス血清を 40、80、160、320、640、1280、2560、5120 倍希釈し、器質スライドの各 well に 40 μ l ずつ 30 分間反応させた。その後 PBS で洗浄し、二次抗体として 2 μ g/ml に希釈した anti-mouse IgG-Alexa 488 を 40 μ l ずつ遮光下で 30 分間反応させた。これを PBS で洗浄した後に、蛍光顕微鏡で観察した。

5) ELISA

抗 RNP 抗体測定のため、Scipac 社の U1A、U1-70K 抗原蛋白を用いて ELISA を行った。抗原を pH 9.6、0.03 M carbonate buffer に 4 μ g/ml に希釈し、96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に、4 $^{\circ}$ C一晩静置して個層化した。洗浄後に 1% BSA-0.05% Tween20-PBS で 2 時間ブロッキングし、50 倍に希釈したマウス血清 50 μ l/well を常温、1 時間反応させた。二次抗体に HRP 結合抗 mouse IgG 抗体を用い、

3, 5, 3', 5'-tetramethylbenzidine (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)で発色させ、リン酸で発色を止め、波長 450nm で吸光度を測定した。

6) Flow cytometry

レシピエントにおける移入 T 細胞や B 細胞の表面分子の染色は、細胞を 4 $^{\circ}$ C に保ちつつ染色を行った。反応時のバッファは 3% bovine serum albumin, 0.05% NaN₃-PBS を用いた。抗体添加後 30 分で洗浄し測定した。使用した抗体を以下に示す：B220 (RA3-6B2)、CD4 (GK1.5)、CXCR5 (2G8)、Fas (Jo2)、T- and B-cell activation antigen (GL7)、ICOS (C398.4A)、PD-1 (RMP1-30) CD200 (OX90.1)。

(3) 抗 RNP 抗体自然産生モデルマウスにおける

PD-1+ICOS+follicular helper T 細胞の解析

10 週齢の雌 NZBWF1 マウス脾細胞を採取し、上記の方法にて flow cytometry にて PD-1+ICOS+follicular helper T 細胞の有無を解析した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育や実験は、大学動物実験施設規定に従い適切に行われている。

C. 研究結果

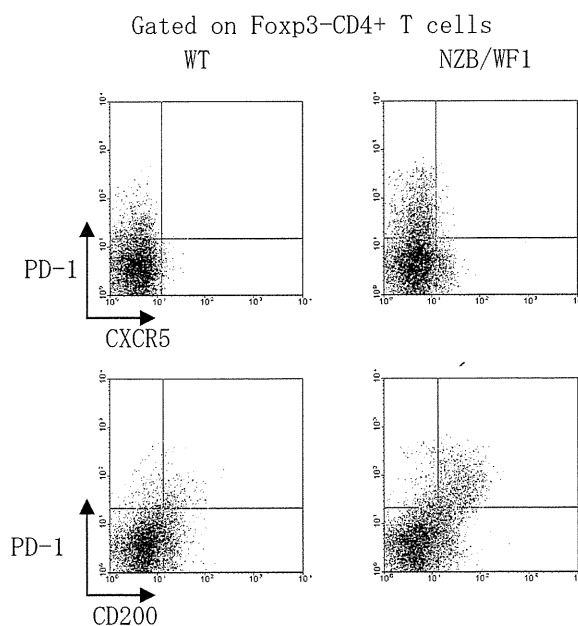
(1) MyD88 欠損マウスを用いた抗 RNP 抗体誘導モデルの解析

現在、MyD88 欠損マウスと TCR α 欠損マウスの交配により、MyD88 欠損 TCR α 欠損マウスを作成することができる。このマウスに MyD88^{+/+}もしくは MyD88^{-/-}CD4⁺CD25⁻T 細胞を移入することにより、抗 RNP 抗体産生および PD-1+ICOS+follicular helper T 細胞分化への TLR の影響を検討することができる。また、誘導系であることから、TLR が抗 RNP 抗体産生に重要で

あることが判明した場合、どの細胞で TLR からのシグナルが必須なのかが、このマウスや現在作成している MyD88 欠損 RAG2 欠損マウスを用いることで検討が可能である。MyD88 欠損 TCR α 欠損マウスを多く繁殖しつつ、移入実験の準備および基礎検討を行っている。

(2) 抗 RNP 抗体自然産生モデルマウスにおける CD200+PD-1+ICOS+T 細胞 T 細胞の解析

NZBW/F1 マウスでは、リンパ球減少があり、抗 RNP 抗体をはじめとする抗核抗体が産生されることが判明している。この NZBW/F1 マウスの脾細胞においても、本サブセットが分化しているか FACS にて検討したところ、以下のように野生型マウスより、より多く出現していることが判明した。ただ、CXCR5^{low}CD200+PD-1+ICOS+ T 細胞のほか、CXCR5+CD4T 細胞も存在していた。



D. 考察

(1) MyD88 欠損マウスを用いた抗 RNP 抗体誘導モデルの解析

抗 RNP 抗体産生に TLR からのシグナルが重要であることはループモデルマウスの解析により示唆されている。CD4T 細胞を移入して抗 RNP 抗体を誘導する本系では、この抗 RNP 抗体自然産生系と異なり、TLR からのシグナルがどの細胞で重要なかを比較的容易に同定できることが特徴である。現在、レシピエントとして MyD88 欠損 TCR α 欠損マウスを、CD4T 細胞として MyD88 欠損マウス由来 CD4T 細胞を用意しており、抗 RNP 抗体産生における T 細胞およびそれ以外の細胞における TLR シグナルの重要性を評価できる状況になっている。更に詳細な抗 RNP 抗体産生機序を解明するために、MyD88 欠損 RAG2 欠損マウスも準備しており、T 細胞、B

細胞、T・B細胞以外の細胞におけるTLRシグナルの重要性を評価する準備も行っている。

またTLRシグナルが重要である場合、RNA受容体であるTLR7欠損マウスを中心とした解析を行うことで、より詳細な機序を解明することができると思う。

(2) 抗RNP抗体自然産生モデルマウスにおける

PD-1+ICOS+follicular helper T細胞の解析

MCTDや本系と類似しリンパ球減少があり、抗RNP抗体自然産生マウスとしてNZB/WF1マウスを解析することとした。NZB/WF1マウスでは野生型マウスと比較して、CXCR5^{low}CD200+PD-1+ICOS+ T細胞のほか、CXCR5+CD4T細胞も存在しており、これらの自己抗体産生への関与が示唆された。どちらが重要かは現時点では不明だが、今後、B細胞との培養や組織学的評価により、明らかになると考える。

(3) MCTD治療への応用に関する考察

MCTDの治療は、現在、ステロイドや免疫抑制剤以外に有効な薬剤に乏しく、難治性病態の治療や薬剤副作用の軽減においては新たな治療が求められている。本研究により明らかとなった自己抗体産生を含む異常B細胞応答を惹起する経路は、今後新たな分子標的治療の候補として有用となる可能性がある。例えばICOSやIL-21はfollicular helper T細胞の出現に重要であることが報告されており、本系でもこれらの分子が新たなfollicular helper T細胞サブセットの分化やB細胞抗体産生に影響を及ぼしていることを明らかにしており、分子標的薬の候補として検討に値すると思う。そのためにまずMCTD患者におけるCD200+PD-1+ICOS+ T細胞の評価を予定しており、学内審査の準備を行っている。

E. 結論

これまでの研究により、リンパ球減少下ではCD4⁺CD25⁺T細胞が、homeostatic proliferationによりfollicular helper T細胞に分化し、germinal centerの形成とともに、抗RNP抗体産生など異常なB細胞応答が生じることが明らかとなっている。今回、他の系で抗RNP抗体産生への関与が示唆されているTLRが、本系においても重要か検討するため、遺伝子改変マウスの準備を行い、基礎検討を進めた。また、MCTDと同様にリンパ球減少がある抗RNP抗体を自然産生するNZB/WF1マウスにおいても、本系で出現するfollicular helper T細胞と類似の細胞群が出現していることが明らかになった。

今後、自己抗体産生に関わるfollicular helper T細胞への分化経路、特に重要と考えられるTLRシグナルや細胞群を明らかとすることは、抗RNP抗体産生が主要な病態であるMCTDに対する分子標的治療を開発する上で重要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1, Iwagami M, Kubo K, Tanaka R, Kawahata K, Okamoto A, Hagino N, Yamamoto K. Thrombotic thrombocytopenic purpura with severe hypertension in a patient with systemic sclerosis sine scleroderma and polymyositis. *Intern Med.* 2011;50(20):2413-2416.

2, Nakagome K, Imamura M, Kawahata K, Harada H, Okunishi K, Matsumoto T, Sasaki O, Tanaka R, Kano MR, Chang H, Hanawa H, Miyazaki J, Yamamoto K, Dohi M. High expression of IL-22 suppresses antigen-induced immune responses and eosinophilic airway inflammation via an IL-10-associated mechanism. *J Immunol.* 2011;187(10):5077-5089.

3, Iwasaki Y, Okamoto A, Shoda H, Takahashi Y, Fujio K, Kawahata K, Yamamoto K. Subacute cerebellar ataxia and atrophy developed in a young woman with systemic lupus erythematosus whose cerebrospinal fluid was positive for antineuronal cell antibody. *Lupus.* 2011;0:1-5.

4, Seri Y, Shoda H, Iwasaki Y, Okamoto A, Hagino N, Kawahata K, Yamamoto K. Case report: a case of adult-onset Still's disease with thrombotic microangiopathy-like disorder successfully treated by plasma exchange and anti-TNF therapy. *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* 2011;100(7):1963-1965.

5, Nakagome K, Imamura M, Okada H, Kawahata K, Inoue T, Hashimoto K, Harada H, Higashi T, Takagi R, Nakano K, Hagiwara K, Kanazawa M, Dohi M, Nagata M, Matsushita S. Dopamine D1-like receptor antagonist attenuates Th17-mediated immune response and ovalbumin antigen-induced neutrophilic airway inflammation. *J Immunol.* 2011;186(10):5975-5982.

2. 学会発表

1, 第40回日本免疫学会総会・学術集(2011年)

Mitsuru Imamura, Kimito Kawahata, and Kazuhiko Yamamoto. Novel differential pathway of autoreactive T cell in the thymus

2, 第55回日本リウマチ学会総会・学術集(2011年)

今村充、神崎健仁、川畑仁人、山本一彦; Critical role of TFH in antinuclear antibody production during lymphopenia

3, 第39回日本日本臨床免疫学会(2011年)

今村充、神崎健仁、川畑仁人、山本一彦; 自己反応性T細胞の新たな分化・制御経路についての検討
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

混合性結合組織病の症例対照研究（計画）

研究協力者	鷺尾 昌一	聖マリア学院大学・看護学部（教授）
研究分担者	深谷 修作	藤田保健衛生大学・リウマチ感染症内科（准教授）
研究分担者	川口 鎮司	東京女子医科大学・リウマチ膠原病内科（臨床教授）
研究分担者	川畑 仁人	東京大学・アレルギーリウマチ科（特任講師）
研究分担者	桑名 正隆	慶応義塾大学・リウマチ内科（准教授）
研究分担者	田中 住明	北里大学・膠原病リウマチ感染症内科（診療准教授）
研究分担者	藤井 隆夫	京都大学・リウマチ性疾患制御学（准教授）
研究分担者	松下 雅和	順天堂大学・膠原病リウマチ科（助教）
共同研究者	豊島 泰子	四日市看護医療大学・看護学部（准教授）
共同研究者	森 満	札幌医科大学・公衆衛生学（教授）
共同研究者	廣田 良夫	大阪市立大学・公衆衛生学（教授）
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

MCTD は原因不明の自己免疫疾患で、レイノー現象と抗 U1RNP 抗体陽性を特徴とするが、抗 U1RNP 抗体陽性は MCTD だけではなく、SLE や強皮症、多発性筋炎・皮膚炎、関節リウマチなどほかの膠原病・リウマチ性疾患にも認められ、これらの症状や検査所見は MCTD に特異的なものではない。このため、海外には MCTD という疾患概念を否定する医師もいる。海外では結合組織病(Connective Tissue Disease)発症のリスクを検討した研究はあるが、MCTD 単独の発症リスクについてはよく解っていない。海外とは対照的に、わが国では抗 U1RNP 抗体陽性というだけで安易に MCTD の診断がなされている場合もある。このため、MCTD の発症リスクを検討するための症例対照研究は診断基準をはっきりと定め、共通の疾患単位を症例として症例対照研究を行う必要があり、リウマチの専門医と疫学者が共同で、症例対照研究を行い、MCTD の発症リスクを解明することは大変意義深いことである。

A. 研究目的

混合性結合組織病（Mixed Connective Tissue Disease, 以下 MCTD と略す）は 1972 年に Sharp ら¹⁾ によって提唱された疾患で、全身性エリテマトーデス（Systemic Lupus Erythematosus, 以下 SLE と略す）、強皮症、多発性筋炎にみられる症状が混在し、血清学的に抗 U1RNP 抗体陽性を特徴とする。

MCTD は原因不明の自己免疫疾患で、1982 年に厚生省の特定疾患に指定されている^{2、3、4)}。男女比は 1:13~16 で女性に多く、好発年齢は 30~40 歳代である²⁾。MCTD に認められる特徴的な症状と検査所見としてはレイノー現象と抗 U1RNP 抗体陽性である²⁾ が、抗 U1RNP 抗体陽性は MCTD だけではなく、SLE や強皮症、多発性筋炎・皮膚炎、関節リウマチなどほかの膠原病・リウマチ性疾患にも認められるほか、抗 U1RNP 抗体陰性であっても SLE や強皮症、多発性筋炎の混合所見を認めることがあり、これらの症状や検査所見は MCTD に特異的なものではない^{2、3、4)}。このため、海外には MCTD という疾患概念を否定する医師もいる^{2、}

³⁾。

海外では結合組織病(Connective Tissue Disease)発症のリスクを検討した研究^{5、6)}はあるが、結合組織病には SLE や強皮症、多発性筋炎・皮膚炎、関節リウマチ、overlap 症候群などほかの膠原病・リウマチ性疾患が含まれており⁷⁾、MCTD 単独の発症リスクについてはよく解っていない。藤井³⁾は海外とは対照的に、わが国では抗 U1RNP 抗体陽性というだけで安易に MCTD の診断がなされているようであると述べている。厚生労働省の MCTD 診断基準（表 1）⁴⁾は治療および予後に差がないという理由で、ある一つの膠原病の診断基準を満足する症例や複数の膠原病の診断基準を重複して満たす症例が含まれている⁸⁾。

このため、MCTD の発症リスクを検討するための症例対照研究では除外基準を含めた診断基準をはっきりと定め、共通の疾患単位を症例として症例対照研究を行う必要があり、リウマチの専門医と疫学者が共同で、症例対照研究を行い、MCTD の発症リスクを解明することは大変意義深いことである。

我々が既に行なった症例対照研究では歩行（1日30分以上）と膠原病の既往歴がMCTD発症のリスクと関連していた⁹⁾が、症例数も少なく、はっきりとした発症の関連要因を見出すことはできなかった。このため、今回は、SLE、強皮症、多発性筋炎の症例対照研究を同時に行なうことで、MCTDで関連が見られないが他の膠原病で関連が見られる項目も検討することで、MCTDの発症要因を明らかにすることを目的として、複数の疾患の症例対照研究を計画した。

B. 研究方法

MCTD臨床班の班員の施設を中心にMCTD患者、SLE患者、強皮症患者、多発性筋炎患者を症例とし、非膠原病患者、一般対照を用いた症例対照研究を行い、MCTD発症のリスクと他の膠原病発症のリスクを比較する。発症の関連要因は自記式のアンケート用紙で調査する。自記式の調査票による調査とし、月経関連の項目、生活習慣、食生活、既往歴、家族歴のほか、身長、体重についても情報の提供を依頼する。調査項目は①性、年齢、身長、体重、②月経関連の項目（初潮の時期、妊娠回数、出産回数、ピルの使用など）、③生活習慣（飲酒、喫煙、運動、睡眠時間、睡眠の規則正しさ、ストレスなど）、④食生活（野菜、肉類、魚、豆類、ご飯、パンなど）、⑤既往歴（手術歴、輸血歴などを含む）、⑥家族歴（両親、きょうだいの膠原病などの既往歴）等である。

（倫理面への配慮）

対象者への依頼は口頭で行い、無記名の自記式調査票への記入後の提出を持って同意が得られたとする。本研究は聖マリア学院大学および藤田保健衛生大学ほか、各参加施設の倫理委員会の承認を得て行う。

C. 研究結果

過去にMCTD単独の発症リスクをみた研究ではないが、Henekensら⁵⁾は乳房のインプラントが結合組織病の発症のリスクを高めると報告したが、Janowskyら⁶⁾のmeta-analysisはその関係を否定している。今回、我々が計画している調査ではMCTDと他の膠原病（SLE、強皮症、多発性筋炎）のそれぞれの発症要因の比較を行うことで、MCTDの発症のリスクがさらに明確になると考えられる。

D. 考察

わが国では厚生労働省の診断基準（表1）⁴⁾がMCTDの診断に用いられているが、他の膠原病（SLE、強皮症、多発性筋炎）の診断基準を完全に満足しても除外するようにはなっていないので、MCTDの診断を満たしていてもほかの膠原病の診断基準も満足する場合はoverlap症候群と考えるほうが良い場合もあり³⁾、症例対照研究の症例選定に際しての診断基準（除外基

準を含む）ならびに質問項目の詳細についてはMCTD臨床班内で会議をもうけ決定する予定である。また、現在、診断基準の見直しが本研究班（MCTD臨床班）において行われている。以上の理由より、前回の研究⁹⁾では本研究班以外の施設にも参加を呼びかけていたが、今回は本研究班の施設に限定した調査を先行させることにしている。

E. 結論

現在、診断基準の見直しMCTD臨床班において行われている。MCTDの発症要因解明のためにはoverlap症候群の混入を防ぐことが重要あり、MCTD臨床班の施設に限定した調査を先行させる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G, Takahashi H, Tada Y, and the Kyushu Sapporo SLE (KYSS) Study Group.

Risk modification by *CYP1A1* and *GSTM1* polymorphisms in the association of cigarette smoking and systemic lupus erythematosus in a Japanese population.

Scand J Rheumatol (in press).

2. 近江雅代、鷲尾昌一、堀内孝彦、塚本浩、赤司浩一、多田芳史、長澤浩平、澤部琢哉、佐々木敏、永井正規、城田知子。

全身性エリテマトーデス発症に関連する食事因子。臨床と研究 2012; 89(1): 74-78.

2. 学会発表

1. 堀内孝彦、石ヶ坪良明、井田弘明、楠原浩一、高橋裕樹、武井修治、田平知子、藤井隆夫、蓑田清次、鷲尾昌一。

TNF受容体関連周期性症候群(Tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: TRAPS)の全国実態調査。

第108回日本内科学会総会 2011年
(東日本大震災のため、誌上発表)。

2. 鷲尾昌一、近江雅代、堀内孝彦、塚本浩、赤司浩一、多田芳史、長澤浩平、澤部琢哉、佐々木敏、岡由紀子、城田知子、森満、永井正規。

全身性エリテマトーデス発症に関する食事因子、第1報：栄養素等摂取状況について。

第15回日本病態栄養学会、京都、2012年1月。

3. 近江雅代、鷲尾昌一、堀内孝彦、塚本浩、赤司浩

一、多田芳史、長澤浩平、澤部琢哉、佐々木敏、岡 由紀子、城田知子、森 満、永井正規。
全身性エリテマトーデス発症に関する食事因子、第2報：食品群別摂取量に着目して。
第15回日本病態栄養学会、京都、2012年1月。

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

I. 参考文献

- 1) Sharp GC, Irvine WS, Tan EM, et al. Mixed connective tissue disease. An apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 52: 148-159, 1972.
- 2) 藤井隆夫、三森経世. 混合性結合組織病. *からだの科学* 256: 79-84, 2008.
- 3) 藤井隆夫. 混合性結合組織病. *総合臨床* 56(3): 518-523, 2007.
- 4) 東條 毅. 混合性結合組織病. 大野良之、田中平三、中谷比呂樹、他編、*難病の最新情報、疫学から臨床・ケアまで*. 南山堂、東京、p 354-357, 2000.
- 5) Hennekens CH, Lee IM, Cook NR, et al. Self-reported breast-implants and connective-tissue diseases in females health professionals, a prospective cohort study. *JAMA* 275: 616-621, 1996.
- 6) Janowsky EC, Kupper LL, Hulka BS. Meta-analysis of the relation between silicone breast implants and the risk of connective-tissue diseases. *N Engl J Med* 342: 781-790, 2000.
- 7) Gaubitz M. Epidemiology of connective disorders. *Rheumatology* 45: iii3-iii4, 2006.
- 8) 高橋芳成. 膠原病の診断基準をどう使うか、有用性と適応上の問題点. *Medical Practice* 20: 550-557, 2003.
- 9) 鷺尾昌一、廣田良夫、永井正規、他. 混合性結合組織病の症例対照研究. 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業、特定疾患の疫学に関する研究、平成22年度総括・分担研究報告書(研究代表者永井正規)、p272-277, 2011.

表 1. 混合性結合組織病の診断基準 (厚生省 MCTD 調査研究班、1996 年改訂)

混合性結合組織病の概念：全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎などに見られる症状や所見が混在し、血清中に抗 U1RNP 抗体が見られる疾患である。

I. 共通所見

1. レイノー現象
2. 指ないし手背の腫脹

II. 免疫学的所見

抗 U1RNP 抗体陽性

III. 混合所見

A. 全身性エリテマトーデス様所見

1. 多発性関節炎
2. リンパ節主張
3. 顔面紅班
4. 心膜炎または胸膜炎
5. 白血球減少 ($4000/\mu\text{L}$ 以下) または血小板減少 ($100,000/\mu\text{L}$ 以下)

B. 強皮症様所見

1. 手指に限局化した皮膚硬化
2. 肺線維症、拘束性換気障害 (%VC = 80%以下) または肺拡散能低下 (%DLco = 70%以下)
3. 食道蠕動低下または拡張

C. 多発性筋炎様所見

1. 筋力低下
2. 筋原性酵素 (CK) 上昇
3. 筋電図における筋原性異常所見

診断：

1. I の 1 所見以上が陽性
 2. II の所見が陽性
 3. III の A, B, C 項のうち、2 項目以上につき、それぞれ 1 所見以上が陽性
- 以上の 3 項を満たす場合を混合性結合組織病と診断する。

付記：

1. 抗 U1RNP 抗体の検出は二重免疫拡散法あるいは酵素免疫測定法 (ELISA) のいずれでもよい。
ただし、二重免疫拡散法が陽性で ELISA の結果と一致しない場合には、二重免疫拡散法を優先する。
2. 以下の疾患標識抗体が陽性の場合には混合性結合組織病の診断は慎重に行う。
 - 1) 抗 Sm 抗体
 - 2) 高力価の抗二本鎖 DNA 抗体
 - 3) 抗トポイソメラーゼ I 抗体 (抗 Scl-70 抗体)
 - 4) 抗 Jo-1 抗体
3. 肺高血圧症を伴う抗 U1RNP 抗体陽性例は、臨床所見が十分にそろわなくても、混合性結合組織病に分類される可能性が高い。

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 の疾患概念に関する研究

研究分担者 岡本 尚 名古屋市立大学医学部医学研究科 教授

研究要旨

MCTD は膠原病三疾患、SLE, PSS および PM/DM、の病像を併せ持ち、しかも免疫学的には RNA に対する自己抗体を「単独」に陽性に持つことを特徴とするとされている。そもそも膠原病自体が複数の臨床所見を持つことを特徴としているので、通常の臨床研究で用いられてきた単変量の統計学的解析ではその全体像を理解し、解析することがほとんど不可能である。そこで、最初の年度である今年度の本研究計画では上記膠原病の診断基準を満たした過去の症例に多変量解析法のうち主成分分析を適用し、まず症例全体の臨床像を数理統計学的に求めた。

A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)の疾患概念が Sharp ら (Am. J. Med. 52: 148-159, 1972)によって提唱されて以来 40 年が経つが、その考え方は時代とともに推移している。その背景には、膠原病の病像に関する認識の格段の深まりと臨床免疫学の検査技術の進歩と普及がある。最初に提唱された米国でも当初の否定的な見解とは異なり MCTD を独立した疾患として認識しようという意識が高まっている。そこで、本研究では、まず臨床認識の立場から果たして MCTD が独立の疾患概念として把握されるのか、を多変量解析の手法を適用して検証を試みた。

B. 研究方法

患者症例は、慶応病院内科を受診し、膠原病 3 疾患、SLE, PSS, PM/DM のいずれかの確定診断を受けた症例のうちで少なくとも 1 年間以上の経過観察を行うことのできた 331 例とした。全ての患者に対して 56 項目の臨床症状、臨床所見および検査所見の有無と各種抗核抗体を調べた。臨床症状などの所見の有無は経過を通して確実に確認されたものを採用した。

これらの症状の中から頻度の極めて低い症候や欠落データを除いた 44 項目を選択し、主成分分析を実行した。

(倫理面への配慮)

本研究は全て後ろ向き研究であり、カルテ情報のみに基づいてデータ採取を行ったものである。また、本研究の結果を元に治療もしくは検査などの介入は行わなかったため、インフォームドコンセントを取得しなかった。

C. 研究結果

図 1 に主成分分析の結果得られた第 1 主成分と第 2 主成分を元に 2 次元散布図を作成し、さらにそれぞれおの細領域ごとに症例数の度数を縦軸に表した 2 次元ヒストグラムを示した。作成した全対象例は色分けしたように 4 群に分けられた。それぞれ、SLE, PSS,

PM/DM および新たに得られた『第 4 群』である。

ついで、この『第 4 群』と Sharp の提唱する MCTD との異同を検証した。表 1 は MCTD の 10 項目の臨床特徴の出現頻度を Sharp et al (1972)の当初の症例と比較したものである。この表から明らかのように、『第 4 群』では Swollen hand と Myositis の頻度が低く、逆に腎障害が 10%に認められた。また、その RNP 抗体陽性率は 50%であり、RNP 抗体単独とすると 33.8%と Sharp らの報告に比べて明らかに低頻度であった。

膠原病の多変量解析
—主成分分析 2 次元ヒストグラム—

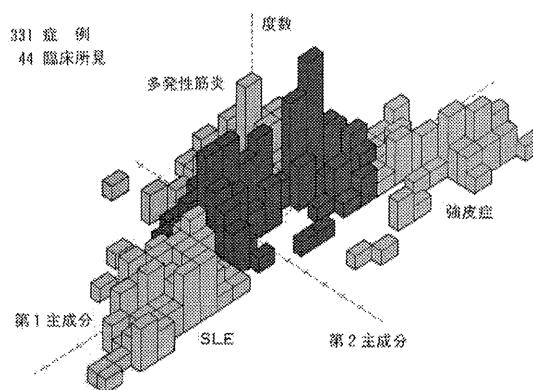


図 1 膠原病 3 疾患の症例の主成分分析の結果の 2 次元散布図 全対象症例 331 例を第 1 および第 2 主成分の数値によってプロットし、縦軸上に度数分布として表した。第 4 群をこの中で黒で示した。

D. 考察

膠原病 3 疾患を対象として RNP 抗体を除いた膠原病の臨床所見を多変量解析することによっても、Sharp が提唱した MCTD と類似の臨床像を示した。しかし、その際に RNP 抗体は必ずしも「単独陽性」とする必要はなかった。この点は、最初に米国で一つの疾患概念

をまとめあげる際に必要であった論理的要請に基づくものであり、不自然なことは判断されなかった。しかしながら、少なくとも膠原病の呈する多彩な臨床症状の組み合わせの中には MCTD のような新しい疾患概念が含まれていることが今回の統計解析の結果から明らかとなった。その背後には臨床認識が単一性を指向するという論理形式の特質に由来する部分が多いと考えられた。

他方、RNP 抗体が引き起こし得る臨床病変の詳細とその病態生理学の解明は今後の研究成果に待たなくてはならないが、少なくとも特定の自己抗体が特定の臨床病像を規定するというパラダイムを支持する結果であると考えられた。

RNP 抗体の実態は明らかにされていないが、本抗体の存在は膠原病を成り立たせる未知の分子基盤の存在を示唆した。他の自己抗体についても同様な対応が考えられるか、特定病像との対応が見られない自己抗体は果たして病態生理学的特徴としては何が違うのか、など多くの重要な課題が残されたので、次年度以降に解決を試みる。

表1 第4群と Sharp MCTD 症例の臨床所見の比較

臨床所見	第4群	MCTD (Sharp)	%
多発性関節炎	71	96	
手指の腫脹(swollen hand)	33	88	
Raynaud 現象	74	84	
筋炎症状	28	72	
リンパ腺腫脹	49	68	
発熱	63	32	
漿膜炎	10	24	
腎障害	10	0	
白血球減少症	49	52	
高 γ グロブリン血症	73	80	

E. 結論

膠原病三疾患の診断の確定した 331 例の呈した 44 項目（自己抗体のデータを含まない）に至る臨床所見を元に主成分分析を行って、多次元での臨床解析をおこなったところ、当初各症例が診断を受けた既存の膠原病の集団とは別に第4の集団が抽出された。この集団を構成する症例の臨床所見と自 RNP 抗体を中心とする自己抗体の出現を対比させたところ、RNP 抗体単陽性例は第4群の約 1/3 ほどに過ぎなかった。このことは、MCTD の概念は必ずしも自己抗体のみに規定される血清学的概念ではないことを強く示唆した。しかし、これと同時に、RNP 抗体を持つことは明らかに臨床では複数の膠原病の症状を併せ持つという特質と強く関連していることを示した。また、このことは RNP 抗体を出現させた病態生理学的背景に膠原病の本態に直結する要素の存在を示唆した。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Marni Cueno, Kenichi Imai, Kuniyasu Ochiai and Takashi Okamoto
Cytokinin dehydrogenase differentially regulates cytokinin and indirectly affects hydrogen peroxide accumulation in tomato leaf
Journal of Plant Physiology. 2011 (in press)
- 2) Kenichi Imai, Kiyoshi Yamada, Muneaki Tamura, Kuniyasu Ochiai and Takashi Okamoto.
Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria.
Cell Mol Life Sci. 2012 (in press)
- 3) Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Victoriano AF, Kurimoto E, Kato K, Okamoto T.
Functional characterization of human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation.
J Mol Biol. 410(5):887-95. 2011
- 4) Victoriano AF, Imai K, Togami H, Ueno T, Asamitsu K, Suzuki T, Miyata N, Ochiai K, Okamoto T.
Novel histone deacetylase inhibitor NCH-51 activates latent HIV-1 gene expression.
FEBS Lett. 585(7):1103-11. 2011
- 5) Victoriano AF, Okamoto T.
Transcriptional control of HIV replication by multiple modulators and their implication for a novel anti-viral therapy.
AIDS Res Hum Retrovir. 28(2):125-38. 2011
- 6) Tan Gana HN, Victoriano AF, Okamoto T.
Evaluation of online miRNA resources for biomedical applications.
Gene to Cell. 2012 (in press).

2. 学会発表 (年度内の国際学会のみ記載)

- 1) Asamitsu K, Okamoto T.
Involvement of the N-terminal region of human CyclinT1 for the trans-activation of Human Immunodeficiency Virus-1 transcription by Tat.

FASEB Summer Research Conferences for
2011 (Transcription Elongation in Health
and Disease)

Lucca(Italy), 2011 Sep 11-16.

2) T.Okamoto

Epigenetic Control of the HIV Latent
Infection

Kaori Asamitsu and Takashi Okamoto

Involvement of the N-terminal Region of
Human Cyclin T1 for the Transactivation of
Human Immunodeficiency Virus-1
Transcription by Tat

6th GERMAN-JAPANESE HIV-Symposium
Bochum, Germany, 2011 Nov.21-22.

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

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

研究分担者: 藤井 隆夫 京都大学大学院医学研究科リウマチ性疾患制御学講座(准教授)
研究協力者: 横山 倫子 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学

研究要旨

われわれは、抗 U1RNP 抗体陽性全身性エリテマトーデス(SLE)および MCTD 患者が中枢神経(CNS)症状を合併した場合、primary neuropsychiatric SLE(primary NPSLE)では脳脊髄液(CSF)中の抗 U1RNP 抗体が高率に陽性となることを報告してきた。本研究では、CSF-抗 U1RNP 抗体と液性因子に相関がないかどうかを調べた。精神神経障害を呈した膠原病患者 82 例において、血清-抗 U1RNP 抗体陽性例(48 例、59%)に限り液性因子を比較すると、CSF-抗 U1RNP 抗体陽性例では陰性例に比し有意に IFN- α 、MCP-1 が高値であったが、血清-抗 U1RNP 抗体陰性例(すべて CSF-抗 U1RNP 抗体陰性、34 例、41%)を含めると有意差は消失した。一方、CSF-抗 NR2 抗体は血清-抗 NR2 抗体が陰性の症例でも認められ、CSF-抗 NR2 抗体陽性例(25 例、30%)と陰性例(57 例、70%)にわけて検討したところ、陽性例で MIG が高値であった。また CSF-抗 SS-A/Ro 抗体陽性例は液性因子との相関はなかった。NPSLE 患者において、CSF-抗 U1RNP 抗体陽性例と CSF-抗 NR2 抗体陽性例では CSF-液性因子のプロファイルが異なると考えられる。

A. 研究目的

われわれは、本班会議で抗 U1RNP 抗体陽性全身性エリテマトーデス(SLE)および混合性結合組織病(MCTD)患者が中枢神経(CNS)症状を合併した場合、primary neuropsychiatric SLE(primary NPSLE)では脳脊髄液(CSF)中の抗 U1RNP 抗体が高率に陽性となるのに対し、ステロイド精神病など他の原因による secondary NPSLE 症例では陰性であることを報告してきた(*Arthritis Rheum*, 2010)。しかし NPSLE 患者で脳組織に免疫複合体や IgG の沈着が認められることはきわめて少なく、CSF-抗 U1RNP 抗体の病因的意義は不明である。本研究では、CSF-抗 U1RNP 抗体と液性因子(NPSLEと関連するサイトカイン・ケモカイン)に相関がないかどうかを CSF 中の抗 SS-A/Ro 抗体や抗

N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NR2) 抗体と比較して調べた。

B. 研究方法

精神神経症状を呈した膠原病患者 82 例(SLE 76 例、NCTD 3 例、1 次性シェーグレン症候群 3 例)において、血清および CSF 中の抗 U1RNP 抗体と抗 SS-A/Ro 抗体を RNA 免疫沈降法で、抗 NR2 抗体を ELISA で測定した。なお抗 NR2 抗体の ELISA は Omdai らの方法(*Eur J Neurol*, 2005)に従った。また CSF 中の液性因子の測定は Filgen 社に依頼し、Procarta® Cytokine Assay kit を用いて IFN- α 、IL-8、IP (interferon-inducible protein)-10、MCP (monocyte chemoattractant protein)-1、MIG (monokine induced by IFN- γ)、RANTES (regulated upon