

201231046A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 俊治

平成 25 年(2013)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. 混合性結合組織病に合併する PAH の早期診断マーカーの確立・・・3  
(川口 鎮司)
2. MCTD 生体試料バンク構築と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・・・6  
(大村 浩一郎)
3. 混合性結合組織病の肺動脈性肺高血圧症診断の手引きの検証に関する研究・・・9  
(深谷 修作)
4. Type I インターフェロンが肺血管内皮細胞に及ぼす影響に関する研究・・・13  
(藤井 隆夫)
5. MCTD の病態における単球の役割に関する研究・・・17  
(桑名 正隆)
6. CSP-ELISA の開発と患者血清中の抗血管内皮細胞抗体の測定・・・23  
(三浦 恵二、吉田 俊治)
7. 混合性結合組織病における自己抗体産生機序の検討・・・24  
(川畑 仁人)
8. MCTD 全国調査結果(2006-2011)の解析(治療法の変遷と発症機構)・・・29  
(岡本尚)
9. レイノー現象に伴う指尖内皮機能と心肺自律神経機能に関する研究・・・32  
(田中 住明)
10. 混合性結合組織病における抗アミノアシル tRNA 抗体の臨床的意義に関する研究・・・36  
(松下 雅和)
11. 混合性結合組織病の予防に関する研究・・・40  
(鷲尾 昌一)
12. 結合組織病性肺動脈性肺高血圧症における肺静脈閉塞性病変の合併に関する研究・・・45  
(中西 宣文)
13. 膠原病患者における運動負荷心エコー検査に関する研究・・・48  
(吉田 俊治)

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・51

### IV. 平成24年度構成員名簿・・・57

# I . 総括研究報告

# 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)

## 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、データが集積されつつある。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)  
鷺尾晶一 (聖マリア学院大学看護部・教授)  
山田秀裕 (聖マリアンナ医科大学・教授)

#### 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。その後、一般には非常に稀で予後不良な肺高血圧症(PH)が最大の死因になるなど難治性病態も明らかとなった。このため MCTD や抗 U1-RNP 抗体の発生機序解明と重要な合併症である PH の早期診断および治療法の確立を目的とした。

#### B. 研究方法及び結果

MCTD については自己抗体の面、遺伝子の面、疫学的検討の面から解析を行っている。

自己抗体では抗 U1-RNP 抗体の産生に関与する細胞群の解析、本抗体以外の自己抗体の解析を進めている。

遺伝子については、前班で集積が開始された生体試料バンクで 400 例近い抗 U1-RNP 抗体陽性患者の DNA と血漿/血清を用いて全ゲノム SNP タイピングが終了し、臨床症状との関連を解析しつつある。

臨床調査個人票の検討から治療状況や発症に関与する遺伝子群数の想定を行った。

PH については、診断の手引きの検証と遺伝子面および各種バイオマーカーの検討を行っている。

全体のプロジェクト研究として、前班で改訂された「MCTD-PH の改訂診断の手引き」の検証のため、各分担研究者から集めた 100 例近くの PH 検索症例について解析を始め、その有用性を検討している。

遺伝子面では、単球の Fra-1 や NOS2 の CCTTT 繰り返し配列の数と PH との関連の研究が進んでいる。これにより PH を来すハイリスク群の同定ができ、早期診断が容易になることが期待される。

バイオマーカーとしては、運動負荷心エコー検査や指尖動脈の血管内非細胞の検査などから PH の早期診断が可能になることが期待される。

これらの研究により MCTD そのものの理解が深まり、新たな治療法の開発に結びつくことが期待される。また最も重要な合併症である PH については、ハイリスク群を抽出し、早期に診断でき、それにより適切な治療が早期から開始できるようになることが期待される。

#### D. 考察

診断については、中期的にはゲノム解析によりハイリスク群を抽出して早期診断に役立つ診断基準に改訂する。また特に予後に大きく関与する肺高血圧症についても NOS2 の多型などの遺伝子分析やその他の種々のマーカーの解析からハイリスク群を抽出し、PAH の早期診断ができるように PAH 診断の手引きを改訂する。これらの診断基準/診断の手引きを検証し、長期的により早期に MCTD そのものおよび PAH の診断ができるようにする。

治療に関しては、中期的には予後に大きく関連する PAH についてステロイドや免疫抑制薬の有用性を検討し、有効なサブグループを判別する。またやはり難治性の中枢神経症状についても自己抗体の面から治療の可能性を探る。さらに長期的には抗 U1-RNP 抗体の病原性の検討やモデル動物による単球の関与の検討から新しい薬剤の開発につながる可能性が期待できる。

#### 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（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

混合性結合組織病に合併する PAH の早期診断マーカーの確立に関する研究

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。多施設での症例での検討にて、MCTD にて NOS2 遺伝子多型の有意な偏りが認められた。今後は、NOS2 遺伝子多型が、多施設、多数例での検討においても、PAH の予測因子として有用であるかどうかを検討する。

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

MCTD 研究班の多施設にて集積した genomic DNA を用いた。患者は、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 104 例を対象とした。すべての施設にて倫理委員会の承認を得て、患者から文書にて同意をえて集積した。

2) 肺動脈性肺高血圧症 (PAH)患者の診断

PAH の診断は、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

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

MCTD 症例 104 例のうち、PAH と診断された症例は、5 例であった。患者集積時の臨床症状からは、約 5% の症例のみが PAH であり、少ない頻度であった。このことから、この集団においても、さらに PAH が発症する可能性が高いと考える。今後の臨床症状の追跡を行う必要がある。

### 2) NOS2 遺伝子多型 (CCTTT の繰り返し配列) の検討

表 1 に示すように、MCTD 患者では、健常人と比較し、NOS2 遺伝子多型の CCTTT 繰り返し配列が少ないことがわかった。12 回の繰り返し回数で区切り、検討すると有意な偏りがみとめられた ( $P=0.0003$ 、表 2)。2 本の染色体上の CCTTT 繰り返し回数の和での検討も同時に行った。表 3 に示すように、MCTD 患者では、健常人と比較し、その繰り返し回数の和が健常人より少なく、23 以上と未満で検討した結果、有意な差が認められた (表 4)。

### 3) NOS2 遺伝子多型による PAH 発症予測

本研究では、5 例の PAH 合併が認められたが、その CCTTT 繰り返し回数には、偏りが認められなかった (表 3)。

## D. 考察

104 例の MCTD 症例での検討では、MCTD において、NOS2 遺伝子多型の偏りがみとめられた。NOS2 遺伝子多型と PAH 発症との関連を今まで報告してきた。今回の結果は、PAH を高頻度で合併する MCTD では、NOS2 遺伝子多型との関連があることを示しており、今までの結果と同様と考える。

全身性エリテマトーデス (SLE) においても、同様の検討を行っているが、SLE の発症と NOS2 遺伝子多型との関連はなかった。このことより、MCTD は、SLE とは病因、病態が異なった疾患と考えることができる。

NOS2 遺伝子多型は、診断ばかりで無く、病因を解明する目的でも重要な因子と考える。

我々が、PAH 発症の危険因子と考える 23 未満の CCTTT 繰り返し回数を有する MCTD 患者は、今回の検討で 34 名確認できた。これらの症例が、今後、PAH を発症してくるかどうかを前向きに検討していく。

## E. 結論

104 例の MCTD 患者での検討において、NOS2 遺伝子多型は、MCTD 発症に関連する可能性が示唆された。こ

の発見は、いままでの検討では明らかとなっておらず、新規の知見である。一方、PAH を発症することを予測する因子として、研究をすすめてきたが、今回の少数の PAH 症例では、NOS2 遺伝子との関連はあきらかとできなかった。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Gono T, Kawaguchi Y, Kuwana M, Sugiura T, Furuya T, Takagi K, Ichida H, Katsumata Y, Hanaoka M, Ota Y, Yamanaka H. HLA-DRB1\*0101/\*0405 is associated with susceptibility to anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis in the Japanese population. *Arthritis Rheum* 64:3736-3740, 2012
2. Hasebe N, Kawasaki A, Ito I, Kawamoto M, Hasegawa M, Fujimoto M, Furukawa H, Tohma S, Sumida T, Takehara K, Sato S, Kawaguchi Y, Tsuchiya N. Association of UBE2L3 polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* 71:1259-1260, 2012

### 2. 学会発表

川口鎮司 全身性強皮症の基礎と臨床 第 56 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. NOS2遺伝子多型CCTTT繰り返し配列の数

CCTTT	MCTD	HC
8	1	4
9	14	8
10	44	19
11	39	25
12	46	42
13	17	32
14	10	29
15	11	13
16	14	13
17	8	4
18	0	1
19	2	0
20	2	0

MCTD: 混合性結合組織病、HC: 健常人

表3. CCTTT繰り返し数の和との関連

CCTTT総和	MCTD	PAH合併例	HC
17			
18	1		2
19	1		1
20	13		3
21	11	1	7
22	8		4
23	13	1	11
24	12	1	13
25	15	1	16
26	8	1	15
27	2		5
28	6		3
29	6		3
30	4		6
31	2		2
32	1		2
33	0		1
34	0		1
35	1		0

表2. CCTTT繰り返し数とMCTD発症の関連

	MCTD	HC
CCTTT < 12	98	56
12 ≤ CCTTT	110	134

P = 0.0003 by Fisher exact test; OR: 2.13, 95%CI: 1.41-3.23

MCTD: 混合性結合組織病、HC: 健常人

表4. CCTTT繰り返し数の和と発症との関連

	MCTD	HC
CCTTT総和 < 23	34	17
23 ≤ CCTTT総和	70	78

P = 0.022 by Fisher exact test; OR: 2.22, 95%CI: 1.15-4.34

MCTD: 混合性結合組織病、HC: 健常人

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

MCTD 生体試料バンク構築と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

混合性結合組織病 (MCTD) およびその合併症の病因、病態研究材料として、末梢血 DNA、血清、および生検材料などの生体試料を採取し保存する生体試料バンクを構築した。これらの試料には連結可能匿名化をほどこした詳細な臨床情報が含まれており、研究分担を行う希望者には生体試料の一部および臨床情報を提供することが可能である。これまでに、MCTD 患者および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病患者の試料 (DNA および血清/血漿) がそれぞれ 124 例と 337 例の計 461 例が収集された。また、その臨床情報は各患者が SLE、強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎の診断基準を満たしているか、どの項目を満たしているかを判定できる内容として詳細な情報を収集始めている。また、本生体試料バンクの DNA を用いて、全ゲノム関連解析を用いて、MCTD/抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病の原因遺伝子同定を行った。その結果、HLA のほかに BLK、STAT4 といった SLE と強皮症に共通して関連が報告された遺伝子が有意に同定された。今後、追認試験を行って関連遺伝子の数を増やし、遺伝子情報が MCTD の診断に適用できるか検証していく。

A. 研究目的

MCTD は全国に 10,000 人程度の有病率とされる希少難病であり、その原因、治療法の確立のためには全国の専門施設が協力して研究を行う必要がある。そのために必要な生体試料および詳細な臨床情報をバンクとして整備し、必要な研究者に配布することを第一の目的としている。MCTD の最大の特徴は抗 U1-RNP 抗体をもつことであり、MCTD の診断基準を満たさなくとも、抗 U1-RNP 抗体陽性の膠原病はレイノー現象を高率に合併し、肺高血圧症をきたしやすいなどの臨床的特徴をもつため、MCTD と同一の疾患単位であるという考え方もある。そのため、本研究では MCTD のみならず抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病を含めた広い疾患概念としてとらえて、研究を進めている。

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、未知の遺伝子も含めて網羅的に解析を行うことで、MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病の発症に関連する遺伝子を検索し、病態解明を行うことを第 2 の目的としている。また、サブ解析として MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病に共通してしばしば合併する肺高血圧症に関連する遺伝子を検索することも検討していく。

B. 研究方法

288 例の MCTD 患者および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病患者の DNA を用い、DNA チップ (Infinium HumanExome+ BeadChip Kit) を用いて全ゲノム SNP タイピングを行った。既にタイピング済みの健常人 (657 例) を用い

て関連解析を行った ( $\chi$  二乗検定)。Quality Control 基準として、call rate  $> 0.95$  (/sample, /SNP)、Minor Allele Frequency  $> 0.05$ 、Hardy-Weinberg Equilibrium  $p > 0.00001$ 、Kinship PI\_HAT  $< 0.1$  を適用し、その結果 case 286 vs control 657 を 24,525 SNPs にて関連解析を行うことになった。有意水準は Bonferroni 補正を行った厳しい基準で  $p < 4.0 \times 10^{-5}$  とした。

(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「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言 (2004 年改訂) を遵守する。本研究は京都大学医学部医の倫理委員会の承認を受けて進めており、各研究協力施設においても倫理委員会で協議、承認されている。

C. 研究結果

1. MCTD 生体試料バンクの整備

各研究分担施設において DNA を含めた検体採取のための倫理委員会の申請を行い、ほぼすべての施設で承認を得た。昨年度よりもさらに検体収集がすすみ、平成 25 年 1 月 25 日現在、MCTD 患者および抗 RNP 抗体陽性膠原病患者の試料 (DNA および血清/血漿) がそれぞれ 124 例と 337 例収集された。計 461 例の検体は間違いなく国内最大のバンクである。これまで簡単な臨床情報は伴っていたが、MCTD において全身性エリテマトーデス (SLE)、強皮症 (SSc)、多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) のどの component をもっていて、それぞれの診断基準を満たしているかどうか検討できるように、各診断基準の項目すべてを含めた詳細な臨床情報収集

を進めることを班会議にて確認し、情報収集を始めている。

## 2. MCTD の感受性遺伝子検索

生体試料バンク DNA を用いて MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病の関連遺伝子検索を行った。抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病患者 286 例と健常人 657 例の全ゲノム SNP タイピング (24, 525 SNPs) をし、関連解析 (Genome-wide Association Study: GWAS) を行った。図 1 にマンハッタンプロットを示した。また、関連の強い方から上位 10 遺伝子を表 1 に示した。

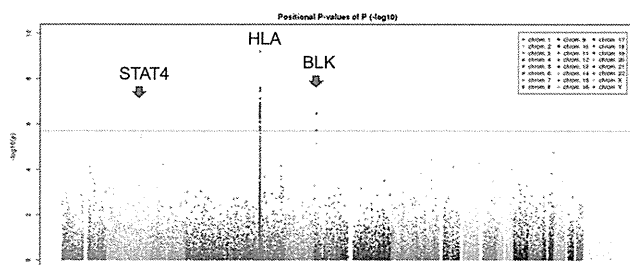


図 1 MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病との関連を示す SNP のマンハッタンプロット

各 SNP と疾患との関連を示す p 値の  $-\log(p \text{ 値})$  を縦軸に、各 SNP をゲノムの位置に沿ってプロットした。異なる染色体は異なる色で示している (印刷は白黒)。保守的な有意水準 ( $p < 4.0 \times 10^{-5}$ ) を横線で示している。

表 1. MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病と関連を示した上位 10 遺伝子

genes	chr	P	OR
HLA-DRA	6	6.32E-10	1.87
BLK	8	3.44E-07	1.86
STAT4	2	3.11E-06	2.03
BC37295_3	19	1.74E-05	1.54
TGIF2LX	X	1.93E-05	1.55
DKFZp434N2030	12	3.63E-05	1.52
C14orf78	14	4.21E-05	1.54
RAET1E	6	7.18E-05	1.74
HDGF	1	7.54E-05	1.74
BTF3L1	13	7.60E-05	1.50

GWAS にて最も強く関連した SNP を上位からリストアップし、それらの最も近傍にある遺伝子名と染色体、p 値、odds ratio (OR) を示した。上位 6 遺伝子は  $p < 4.0 \times 10^{-5}$  の有意水準を満たしている。

## D. 考察

生体試料バンクの検体数は着実に増加しており、その詳細な臨床情報も増えてきている。本年度、より詳

細な解析ができるように、SLE、SSc、PM/DM の診断基準に含まれる項目、および MCTD に伴う肺高血圧症の診断基準に含まれる項目をすべて網羅するように、臨床情報の充実を図った。現在 461 例の MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病の検体が収集されており、今後も増加していくことが期待される。臨床情報の充実した多数の検体は希少難病の研究には欠かせず、世界に誇れるバンクであると自負している。

MCTD の病因、病態を解析するために GWAS を行った。Preliminary な解析結果であるが、6 つの遺伝子が有意差をもって検出された。追認試験が必要であるが、上位 3 遺伝子はこれまでに SLE および SSc の関連遺伝子として報告されているものであることから、MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病も同様な遺伝子が関係していることを示唆しており、興味深い。今後純粋な MCTD の関連遺伝子や肺高血圧症を伴った症例の関連遺伝子をサブ解析として行う予定である。それらの解析の結果、確認された遺伝子多型を用いて MCTD の診断能をあげることができるかどうかの検討を今後していかなければならない。

## E. 結論

MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病の生体試料バンクの整備を行い、461 例の検体を収集し、より詳しい臨床情報を現在追加収集中である。

全ゲノム関連解析により、MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病の関連遺伝子として HLA、BLK、STAT4 など 6 遺伝子が有意差をもって発見された。上位 3 遺伝子はこれまでに SLE および SSc の感受性遺伝子として報告が認められるものであり、MCTD という病気の性質を表していると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tanii H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitsh KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012, 44(5): 511-6
- Terao C, Ohmura K, Ikari K, Kochi Y, Maruya E,

Katayama M, Yurugi K, 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. ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. **PLoS One**. 2012;7(7): e40067

- 3) Kitai Y, Murakami K, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Ohmura K, Fujii T, Mimori T. A case of Behçet's disease developing after poststreptococcal acute glomerulonephritis. **Mod Rheumatol**. 2012 Aug 30. [Epub ahead of print]
- 4) Nakano M, Fujii T, Hashimoto M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Nakaizumi A, Mimori T. Type I interferon induces CX3CL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary vascular endothelial cells. **Clin Exp Immunol**. 2012 Oct;170(1):94-100.
- 5) Ohmura K, Terao C, Mimori T. Recent advances on the genetics of rheumatoid arthritis: current topics and the future. **Inflamm Regen** 2012, 32 (3): 90- 98.
- 6) Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, Tsunoda T, Takahashi A, Kubo M, Taniguchi A, Matsuda F, Ohmura K, Momohara S, Mimori T, Yamanaka H, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional Variants in NFKBIE and RTKN2 Involved in Activation of the NF-κB Pathway Are Associated with Rheumatoid Arthritis in Japanese. **PLoS Genet**. 2012 Sep;8(9):e1002949
- 7) Kiyama K, Kawabata D, Hosono Y, Kitagori K, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T. Serum BAFF and APRIL levels in patients with IgG4-related disease and their clinical significance. **Arthritis Res Ther**. 2012 Apr 24;14(2):R86.
- 8) Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. **Arthritis Rheum**. 2012 Nov 1. doi: 10.1002/art.37777. [Epub ahead of print]

## 2. 学会発表

- 1) 大村浩一郎: 抗 CCP 抗体陰性関節リウマチに関連する遺伝因子。第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 東京(品川) シンポジウム(oral presentation)
- 2) Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: ACPA-NEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS CONSISTS OF TWO GENETICALLY DISTINCT SUBSETS BASED ON RF POSITIVITY. European League Against Rheumatism 2012, Berlin, June. 2012. (poster presentation)

## 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（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

混合性結合組織病の肺動脈性肺高血圧症診断の手引きの検証に関する研究

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	臨床准教授
研究分担者	田中 住明	北里大学医学部膠原病感染内科学	准教授
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
研究分担者	桑名 正隆	慶應大学医学部リウマチ内科	准教授
研究分担者	松下 雅和	順天堂大学医学部膠原病内科	助教
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

平成 22 年度に厚生労働省混合性結合組織病（MCTD）研究班で「MCTD の肺動脈性肺高血圧症（PAH）診断の手引き」が改訂された。多施設より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集め、この手引きの検証を行い、従来の手引きと比較した。改訂手引きの感度は膠原病患者全体では 94.3%（50/53）、特異度は 75.0%（18/24）で、旧手引きではそれぞれ 73.1%（38/52）、79.2%（19/24）であった。MCTD 例のみでの検討では、改訂手引きの感度は 94.2%（16/17）、特異度は 88.9%（8/9）で、旧手引きではそれぞれ 65.2%（10/16）、77.8%（7/9）であった。改訂手引きは従来の手引きに比し、感度に優れ、特異度は同程度であった。MCTD 例のみでの検討でも感度も特異度も優れていた。改訂手引きは十分に臨床使用に耐えうるものと考えられた。

A.研究目的

平成 22 年度に「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と治療法の確立に関する研究」班にて「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」（以下改訂手引き）が作成された<sup>1)</sup>。しかし、改訂手引きの検証は行われておらず、その検証を目的とした。

B.研究方法

【対象】本研究班の臨床系班員が所属する施設で、過去に心エコー検査と右心カテーテル検査を 1 か月以内の間隔で実施された肺高血圧症（PH）が疑われた膠原病患者を対象とした。施設毎の患者数はそれぞれの施設で任意に設定し、患者は無作為に抽出することとした。

【方法】各施設に調査票を送付し、調査項目を記載した後に藤田保健衛生大学医学部感染症・リウマチ内科宛に返送していただいた。調査項目は平成 3 年に厚生労働省結合組織病調査研究班にて作成された「MCTD の PH 診断の手引き」<sup>2)</sup>（以下旧手引き）に記載されている臨床症状および検査所見の 6 項目に加え、左室拡張障害・僧帽弁異常・心嚢液の有無、左室・右室の TEI インデックス、TAPSE、右心カテーテルでの肺動脈収縮期圧、肺動脈拡張期圧、肺動脈平均圧、肺動脈楔入圧、右房圧、総肺血管抵抗、肺血管抵抗、心拍出量、心係

数、肺機能検査での%VC、%FEV1.0、%DLco、肺換気血流シンチ所見、肺動脈造影所見、胸部 CT 所見、胸部造影 CT 所見、肺高血圧症分類（Dana Point）、BNP、NT-ProBNP、尿酸値、施設名、担当医名、年齢、性別、基礎疾患（膠原病）、基礎疾患の罹病期間、右心カテーテル実施年月日とした。旧手引き、改訂手引きでの PAH 診断の感度、特異度を比較検討した。なお、真の PAH は右心カテーテル検査で肺動脈平均圧が 25mmHg 以上で、肺動脈楔入圧が 15mmHg 以下の症例とした。

（倫理面への配慮）

本研究は藤田保健衛生大学の「疫学・臨床研究倫理審査委員会」の承認を得た上で、必要に応じて各施設の倫理委員会の承認を得た。また、送付していただく患者データは連結不可能なものとした。

C. 研究結果

藤田保健衛生大学以外に 5 施設（北里大学、京都大学、慶應大学、順天堂大学、東京女子医科大学）より回答があり、合計 95 症例が集積された。疾患の内訳は MCTD 28 例、全身性硬化症 47 例、全身性エリテマトーデス 11 例、シェーグレン症候群 4 例、関節リウマチ 2 例、多発性筋炎 2 例、アレルギー性肉芽腫性血管炎 1 例であった。PH があると判定された症例は 69 例で、膠原病にともなう PAH（CTD-PAH）と判定されたのが 55 例、先天性心疾患に伴う PAH が 1 例、PAH ではない PH

が13例であった。また、PHがないと判定された症例は26例であった。調査票記載の情報不足のため、9例を除外し、解析にはCTD-PAH 53例、PHなし24例を用いた。MCTD例に限定するとCTD-PAH 17例、PHなし9例であった。改訂手引きにおいて感度、特異度に影響をおよぼすのは図1<sup>1)</sup>に示した①、③に該当する症例である。②に該当する患者は基本的には右心カテーテル検査が実施されるべきであり、ここに該当する患者は正しく診断されるものとした。しかし、②に該当する症例があまりに多数であれば、CTD-PAHの診断には必ず右心カテーテルを実施することにすれば良く、敢えて診断の手引きを作成する必要はない。今回の検討では対象症例77例中12例(15.6%)が該当し、決して多数ではなく、そのうち3例がCTD-PAHであった。

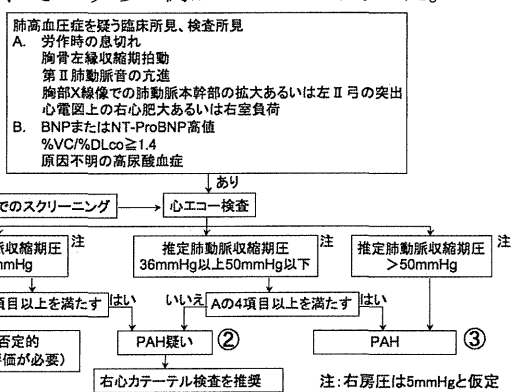


図1. 混合性結合組織病の肺動脈性肺高血圧症診断アルゴリズム(文献1)より引用改変)

### 1. ①に関する検討

①に該当する12例中3例はCTD-PAHであり、改訂手引きでの偽陰性例であった。

MCTD例のみでの検討では4例中1例が偽陰性例であった。

### 2. ③に関する検討

③に該当する症例は53例で、心エコー検査で測定される三尖弁圧較差(TRPG) >45mmHgの46例と31mmHg < TRPG ≤ 45mmHgで改訂手引きに定められたAの項目<sup>1)</sup>を4項目以上満たす7例であった。前者では5例、後者では1例がPHなしであり、改訂手引きでの偽陽性例であった。

MCTD例のみでの検討ではTRPG > 45mmHgの14例中1例が偽陽性であった。31mmHg < TRPG ≤ 45mmHgで改訂手引きに定められたAの項目を4項目以上満たす2症例はいずれもCTD-PAHであり、偽陽性例はなかった。また、②に該当する症例は6例(23.1%)でそのうち1例がCTD-PAHであった。

### 3. 改訂手引きと旧手引きの比較(表1)

改訂手引きの感度は94.3%(50/53)、特異度は75.0%(18/24)で、旧手引きの感度は73.1%(38/52)、特異度は79.2%(19/24)であった。

MCTD例のみでの検討では、改訂手引きの感度は94.2%(16/17)、特異度は88.9%(8/9)で、旧手引きの感度は65.2%(10/16)、特異度は77.8%(7/9)で

あった。

表1. 旧手引きと改訂手引きの感度・特異度の比較

	感度	特異度
旧手引き	73.1%(38/52)	79.2%(19/24)
改訂手引き	94.3%(50/53)	75.0%(18/24)

膠原病患者全体

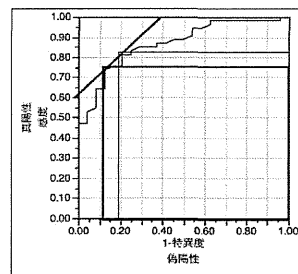
	感度	特異度
旧手引き	62.5%(10/16)	77.8%(7/9)
改訂手引き	94.2%(16/17)	88.9%(8/9)

混合性結合組織病患者のみ

### 4. その他の指標

TRPG(図2)

TRPG > 42mmHgをCTD-PAHありとするとその感度、特異度はそれぞれ81.1%、79.2%であった。TRPG > 45mmHgでは77.4%、79.2%で、TRPG > 48mmHgでは73.6%、87.5%、TRPG > 61mmHgでは47.1%、100%であった。



TRPG (mmHg)	>61	>48	>45	>42
感度	47.1%	73.6%	77.4%	81.1%
特異度	100%	87.5%	79.2%	79.2%

図2. TRPG値を用いた膠原病性肺動脈性肺高血圧症診断の感度・特異度

BNP(図3)

BNPはCTD-PAHあり群で352.6 ± 427.7pg/ml、PHなし群で81.4 ± 60.1pg/mlでCTD-PAHあり群で有意に高値であった(p < 0.01)。また、カットオフ値を313pg/mlに設定するとCTD-PAHに対する感度は41%、特異度は100%であった。また、191pg/mlでは感度47%、特異度95%であった。

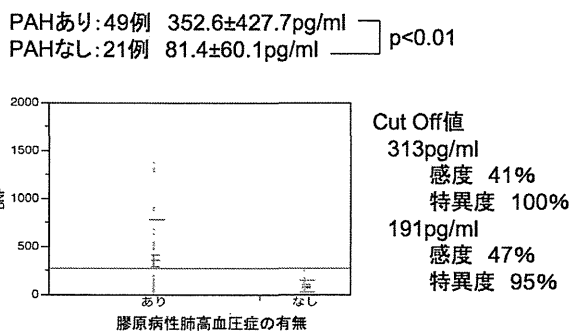


図3. BNPを用いた膠原病性肺動脈性肺高血圧症診断

#### %DLco

%DLcoはCTD-PAHあり群で36.0±19.4%、PHなし群で39.2±21.3%で両群間に差を認めなかった(p=0.58)。CTD-PAHの有無を判別する適切なカットオフ値は設定できなかった。

#### %VC・%DLco比(%VC/%DLco)

%VC/%DLcoはCTD-PAHあり群で2.85±1.57、PHなし群で2.50±1.18と両群間に差を認めなかった(p=0.39)。CTD-PAHの有無を判別する適切なカットオフ値は設定できなかった。

## D. 考察

改訂手引きは1)PAHの診断には肺動脈圧の測定を必須とする2)PAHの診断には右心カテーテル検査を必須とはしないが、積極的に推奨する、3)PAHの診断に必要な心エコー検査でのTRPGの具体的な数値を記載する、4)旧手引きに記載されたPHを示唆する臨床所見にも注目する、5)PHではなくPAHの診断の手引きとする、の5項目を「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と治療法の確立に関する研究」班内の合意事項として作成された<sup>1)</sup>。したがって、その診断のためにあまりに多数の症例で右心カテーテル検査が必要となるならば、そもそも手引き自体は不要で、PAHを疑う症例全例に右心カテーテル検査を実施すれば良い(もちろんこれが理想的ではある)。しかし、循環器内科医ではないリウマチ内科医がCTD-PAHを診断する際に、右心カテーテル検査を行えない状況であっても可能な限り正しくCTD-PAHを診断できるようにすることも必要である。そのように考えると、今回の検討ではCTD-PAHの診断に際し、右心カテーテル検査が必要となった症例は15.6%であり、この数値は満足いくものであると考える。しかし、今回の調査は後ろ向き調査で、対象の中にはかなり以前の症例もある。最近の症例に限定した場合には積極的にCTD-PAHの検索をした結果、TRPGが45mmHg以下とTRPGがしっかりとした上昇を示さずCTD-PAH疑いと分類され、右心カテーテル検査が必要となる症例の割合が増加する可能性もあり、最近の症例に限定した調査も望まれる。

改訂手引きと旧手引きの感度、特異度を比較した。膠原病患者全体では改訂手引きの感度、特異度はそれぞれ94.3%、75.0%で、旧手引きの感度、特異度は73.1%、79.2%と特異度は両手引きでほぼ同等、感度は改訂手引きで優れていた。旧手引きはCTD-PAHの進行例を対象にしていたと推定され、軽症例を診断しきれない可能性が指摘されていた<sup>3,4)</sup>が、改訂手引きではそれらの症例も旧手引きより高感度に診断し得ることを示している。また、MCTD例のみでの検討でも、改訂手引きの感度、特異度はそれぞれ94.2%、88.9%、旧手引きでの感度、特異度は65.2%、77.8%で、感度、特異度とも改訂手引きの方が優れていた。

感度は90%を超えてはいるが、偽陰性例も存在する。偽陰性例は早期治療の機会を逸することになり、その予後への影響も懸念される。改訂手引きにBNP 313pg/ml以上でCTD-PAHと診断可能とすれば、特異度を落とすことなく偽陰性例が1例減り、感度が96.2%となる。これをMCTD例のみに当てはめた場合には残念ながら偽陰性例の減少に至らなかった。

特異度に関しても膠原病患者全体でも、MCTD患者に限局しても良好な値ではあったが、偽陽性例も存在する。特異度を高めるにはCTD-PAHと診断できるTRPGの設定を変更すればよい。実際、TRPG>48mmHgに設定すれば膠原病患者全体で特異度は87.5%まで改善する。TRPG>61mmHgに設定すれば100%となる。しかし、当然感度の低下を伴い、右心カテーテル検査を行うべき②に該当する症例が増加することになる。また、TRPG>45mmHgは海外においてPHの可能性が大とされる数値でもあり<sup>5)</sup>、このままの数値で変更せずにおきたい。

その他、%DLco、%VC/%DLcoを用いて感度、特異度を改善させうるカットオフ値の設定を試みたが、適切な数値を設定できなかった。

## E. 結論

平成22年度に「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と治療法の確立に関する研究」班にて「混合性結合組織病の肺動脈性肺高血圧症診断の手引き」<sup>1)</sup>は平成3年に厚生省結合組織病調査研究班にて作成された「混合性結合組織病の肺高血圧症診断の手引き」<sup>2)</sup>に比し、感度に優れ、特異度も同等あるいは優れていた。さらに、感度、特異度を上昇させ得る工夫もあるが、手引きの煩雑化、右心カテーテル検査施行必要症例の増加につながる面もあり、現状で十分使用に耐えられる手引きと考えられた。ただし、今回の検討に用いた症例にはかなり以前にCTD-PAHと診断されている症例もあり、それが故にCTD-PAH進行例が多数含まれていた可能性を否定できない。最近の症例を用いたさらなる検証が望まれる。

文献)

- 1) 吉田俊治、深谷修作、京谷晋吾、桑名正隆、藤井隆夫、三森経世. 混合性結合組織病 (MCTD) の肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 診断の手引き改訂について. 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と治療法の確立に関する研究 平成2年度総括・分担研究報告書、7-13、2011.
- 2) 厚生省結合組織病調査研究班: 混合性結合組織病の肺高血圧症診断の手引き. リウマチ 31: 159-166, 1991
- 3) 吉田俊治、深谷修作、岡田純、近藤啓文. 混合性結合組織病における肺高血圧症の合併頻度. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 混合性結合組織病に関する研究 平成15年度 総括・分担研究報告書、43-46、2004.
- 4) 吉田俊治、深谷修作. 膠原病性肺高血圧症の頻度と病態の解析. 厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 全身性自己免疫疾患における難治性病態の診断と治療法に関する研究 平成15年度 総括・分担研究報告書、40-43、2004.
- 5) Galie N., Hoeper M.M., Humbert M., et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Heart J. 30(20) : 2493-2537, 2009

### 3. その他

なし

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

吉田俊治、深谷修作. 混合性結合組織病の診断と治療の進歩. 日本内科学会雑誌 101 巻 5 号、1413-1419、2012.

### 2. 学会発表

深谷修作. 膠原病性肺高血圧症の治療戦略. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 ランチョンセミナー、2012年4月28日.

深谷修作. 膠原病性肺高血圧症の診断. 第1回日本肺循環学会学術集会 スポンサーシップシンポジウム、2012年9月22日.

## 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



## Type I インターフェロンが肺血管内皮細胞に及ぼす影響に関する研究

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 中野 正祥 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

MCTDをはじめとする抗 U1RNP 抗体陽性膠原病では肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の合併が高頻度であるが、抗 U1RNP 抗体が直接的に肺血管内皮細胞傷害を起こしている可能性は低い。近年、抗 U1RNP 抗体などの RNA 結合蛋白に対する自己抗体の免疫複合体が Type I インターフェロン (IFN) の産生を刺激し、ループス自己抗原に対するトレランスの破綻や自己抗体産生に関与している可能性が示唆されている。今回われわれは IFN- $\alpha/\beta$  を肺血管培養細胞に添加し、PAH に関係するケモカイン分泌を調べた。Fractalkine (CX3CL1) は IFN- $\alpha/\beta$  添加後ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に比しヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC) とヒト肺血管微小血管細胞 (HLMVEC) で有意な蛋白レベルの上昇が認められた。一方 RANTES (CCL5) では、HUVEC に比し、IFN- $\alpha$  刺激では HPAEC および HLMVEC で、IFN- $\beta$  ではヒト大動脈内皮細胞 (HAEC)、HPAEC、HLMVEC で蛋白レベルの上昇を認めた。またこれらのケモカイン分泌はいずれも JAK 阻害薬で濃度依存的に抑制された。fractalkine と RANTES は、PAH 患者肺動脈で発現が亢進するケモカインであるため、血中 Type I IFN が高濃度となる抗 U1RNP 抗体陽性膠原病の肺動脈局所において、これらのケモカインが病態に関与している可能性がある。

### A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) をはじめとした膠原病において Type I インターフェロン (IFN) は病因的意義を有するサイトカインと考えられている。特に混合性結合組織病 (MCTD) で高力価陽性となる抗 U1RNP 抗体の免疫複合体が Type I IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ) を誘導することが知られ、自己抗原に対するトレランスの破綻や持続的な自己抗体産生に関与している可能性が数多く報告されている。

一方、Type I IFN は様々な疾患で治療薬として使用されてきた。きわめてまれではあるが、この IFN 治療による肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の発症が報告されている。基礎疾患は C 型肝炎、多発性硬化症、メラノーマなど多岐にわたるため、その基礎疾患に依存せず、むしろ

過剰な Type I IFN と PAH とが関連する可能性が高い。

本研究では、IFN- $\alpha/\beta$  が PAH の治療ターゲットになるかどうかを将来的に明確にするため、肺血管培養細胞を用いて、IFN- $\alpha/\beta$  による刺激実験を行った。

### B. 研究方法

培養細胞はヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC)、ヒト肺微小血管内皮細胞 (HLMVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC)、およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。これらをリコンビナント IFN- $\alpha 2b$  および IFN- $\beta$  と共培養 (0.1-10 ng/mL) し、培養上清中の CCL2 (MCP-1)、CX3CL1 (fractalkine)、CCL5 (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted [RANTES]) 濃度および発現する蛋白の mRNA

を reverse transcription-PCR で調べた。また細胞表面にそれらが発現しているかどうかを HPAEC を用いた蛍光染色で明らかにした。さらにそれらの分泌が JAK 阻害薬により抑制されるかどうかを調べた。

### C. 研究結果

まずはじめに、HPAEC 培養上清中に IFN- $\alpha/\beta$  を加えることで MCP-1、fractalkine、RANTES のいずれが有意に分泌されるかを調べた。Fractalkine は IFN- $\beta$  で最高  $5.9 \pm 0.5$  ng/mL、また RANTES は IFN- $\alpha/\beta$  で最高  $77.4 \pm 2.7 / 230.9 \pm 9.4$  pg/mL まで分泌が刺激された (72 時間後) が、MCP-1 の分泌はいずれの IFN でも刺激されることはなかった (発表論文参照)。また同様に、IFN- $\alpha/\beta$  (50ng/mL) を加えることで、fractalkine と RANTES が HPAEC の細胞質に発現することを確認した。そこで以下の検討では、MCP-1 は除外し fractalkine と RANTES のみを測定した。

IFN- $\alpha/\beta$  は、HUVEC、HAEC、HPAEC、および HLMVEC で fractalkine の発現を亢進させたが、その mRNA のピークは刺激後 8 時間であった (図 1a-A/B)。しかしそのピーク時にコントロール培養細胞と比較して有意に発現が亢進したのは mRNA レベルでは HPAEC であり (図 1a-C)、蛋白レベルでは HPAEC と HLMVEC であった (図 1a-D)。一方、IFN- $\alpha/\beta$  による RANTES の mRNA 発現は 24 時間がピークであり (図 1b-A/B)、そのピーク時に mRNA 発現は HUVEC と有意な差は認めなかったものの (図 1b-C)、培養上清中における RANTES の濃度は HPAEC や HLMVEC で有意に高かった (図 1b-D)。

さらに本研究では IFN- $\alpha/\beta$  (10 ng/mL) による fractalkine と RANTES の分泌亢進が JAK 阻害薬により影響を受けるかどうかを確認した。図 2 にしめすとおり、これらのケモカイン分泌は、JAK 阻害薬の濃度依存的 (0.1-1  $\mu$ M) に抑制された。

### D. 考察

PAHの発症機序はいまだ明らかではない。しかし、MCTDや強皮症、SLEなどの全身性自己免疫疾患に続発することが多く、特発性PAHでも自己免疫現象がしばしば認められる。したがってPAHの成因には免疫異常が関与している可能性がある。しかしPAHのリスク因子とされる抗U1RNP抗体についても直接的な関与は十分明らかにされていない。以前より血管内皮細胞に対する自己抗体の併存を示唆する報告があるが、病理組織において免疫複合体やIgGの沈着は必ずしも明らかでなく、effector分子は異なる可能性もある。われわれは抗U1RNP抗体をはじめとするRNA-binding proteinに対する自己抗体-免疫複合体が樹状細胞のToll-like receptorにより認識されてtype I IFNを分泌すること、またきわめてまれではあるがIFN- $\alpha/\beta$ を用いた治療によりPAHが誘導された症例報告があることから、抗U1RNP抗体がtype I IFNを介して間接的にPAHの成因に関与している可能性があるとして仮説を立てた。

一方特発性PAH患者においては、病態の局所でMCP-1、fractalkine、RANTESなどのケモカイン発現が亢進することが知られている。われわれの成績から、IFN- $\alpha/\beta$ は特にHPAECにおいて、fractalkine、RANTESの産生誘導を強く示唆する。ここでfractalkineはセレクチンやインテグリン非依存性の白血球接着因子であるとともに、単球の遊走を誘導することが知られているため、これらの血球を介した肺血管傷害機序が考えられる。過去には、強皮症から得られた肺組織において発現が亢進しているという報告やfractalkineのレセプターに関する遺伝子異常がPAHを合併した強皮症で認められるとする報告がある。またRANTESの発現はPAH患者の肺血管のみでなく、SLE患者血漿中でも亢進している。したがって、抗U1RNP抗体陽性PAH患者でType I IFNの発現が亢進することにより、PAHに関連するケモカインが局所的に活性化され、単球をはじめとした炎症細

胞を肺血管内皮および平滑筋細胞に誘導している可能性がある。 *In vitro*におけるデータから、Type I IFNは抗U1RNP抗体高力価陽性のMCTDでより強く誘導されると考えられるが、今回のデータのみではまだ抗U1RNP抗体とPAHとのリンクは明確でない。今後 *in vivo*の系を用いてより詳細な検討を加えたい。

関節リウマチ治療薬として近日中に発売されるJAK阻害薬により、Type I IFNで誘導されるケモカインが抑制されることは、新たなPAH治療薬の可能性を示唆する。近い将来、JAK阻害薬や抗IFN- $\alpha$ 抗体

(sifalimumab、現在SLEで治験中)が抗U1RNP抗体陽性膠原病におけるPAHを改善させた症例を見いだせば、本研究と併せてType I IFNやfractalkine、RANTESがPAHの治療ターゲットとなるエビデンスとなり、難治性病態であるPAHの治療進歩につながると考える。

## E. 結論

血中 IFN- $\alpha$  /  $\beta$  が高濃度となる抗 U1RNP 抗体陽性膠原病の肺動脈局所でfractalkineとRANTESの発現が亢進している可能性がある。また JAK 阻害薬でその発現が抑制しうる可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

Masayoshi Nakano, Takao Fujii, Motomu Hashimoto, Naoichiro Yukawa, Hajime Yoshifuji, Koichiro Ohmura, Akihiko Nakaizumi, Tsuneyo Mimori. Type I interferon induces CXCL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 170:94-100, 2012.

### 2.学会発表

Association between autoantibodies and inflammatory mediators in cerebrospinal fluids from patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus.

Takao Fujii, Tomoko Yokoyama, Seiko

Kondo-Ishikawa, Noriyuki Yamakawa, Masayoshi Nakano, Naoichiro Yukawa, Hajime Yoshifuji, Koichiro Ohmura, Tsuneyo Mimori.

Annual European Congress of Rheumatology, June 6-9, 2012, Berlin, Germany.

## H. 知的財産権の出現・登録状況

なし

a) CX3CL1 (Fractalkine)

b) CCL5 (RANTES)

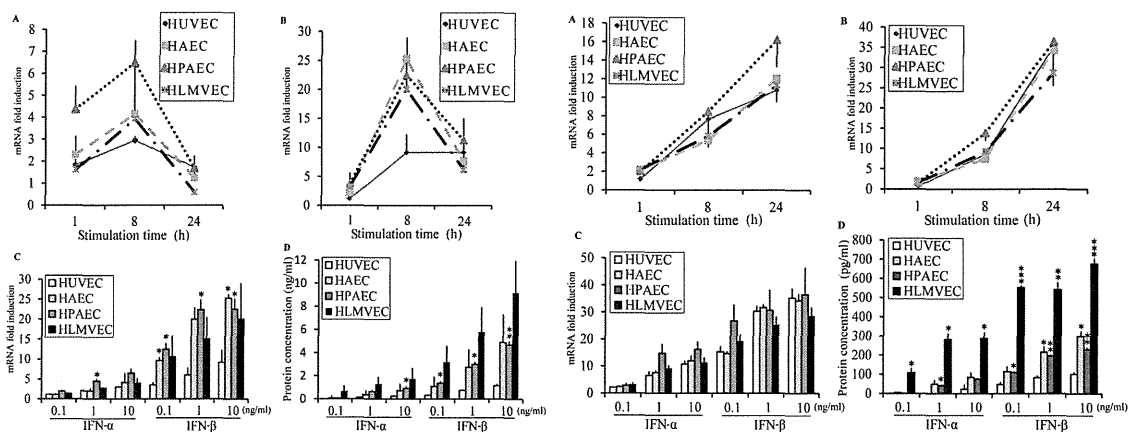


図 1. Type I IFN により肺血管内皮細胞から誘導されるケモカイン

A) IFN- $\alpha$  刺激による mRNA の発現 (1-24 時間)、B) IFN- $\beta$  刺激による mRNA の発現 (1-24 時間)、C) IFN- $\alpha$  /  $\beta$  刺激による mRNA の発現。HUVEC をコントロールとし、HAEC、HPAEC、HLMVEC における発現を比較した。\* $P < 0.05$ 。D) IFN- $\alpha$  /  $\beta$  刺激による培養上清中蛋白濃度の検討。HUVEC をコントロールとし、HAEC、HPAEC、HLMVEC における発現を比較した。\* $P < 0.05$ 。

a) CX3CL1 (Fractalkine)

b) CCL5 (RANTES)

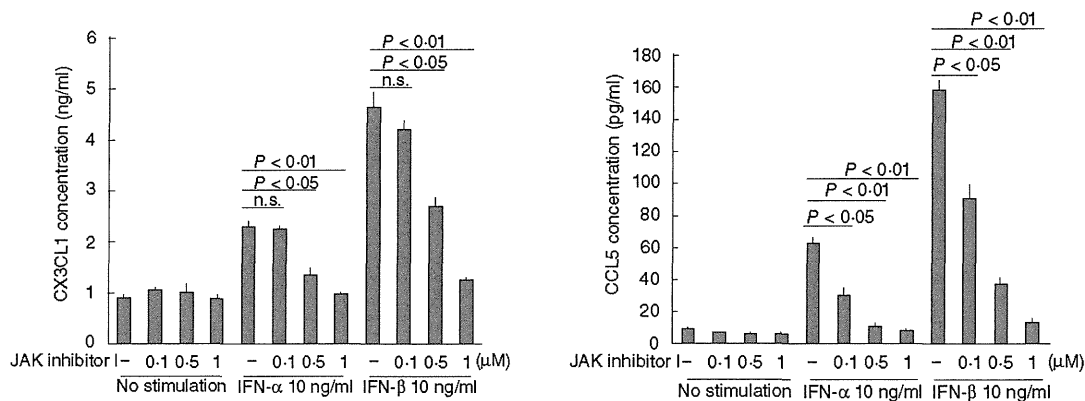


図 2. JAK 阻害薬による Type I IFN 誘導性肺血管ケモカインの抑制

IFN- $\alpha$  /  $\beta$  刺激による fractalkine および RANTES の誘導は、JAK 阻害薬により濃度依存的に抑制された。HPAEC を用いた実験結果を示している。