

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 の病態における単球の役割に関する研究

研究分担者 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科学教室
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：昨年我々は転写因子 Activator protein-1 (AP-1) を構成する Fos-related antigen-1 (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動脈の狭窄病変をきたし、その病理像が混合性結合組織病 (MCTD) でみられる間質性肺疾患 (ILD)、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) と類似していることを報告した。このマウスではこれら所見に先行して肺局所への単球の浸潤を認めていたことから、単球が病変形成に関わる可能性がある。そこで、MCTD 患者由来単球の AP-1 構成タンパクの発現レベルを検討した。

研究方法：対象は MCTD および強皮症 (SSc) 44 例、および健常人 36 例。末梢血より単核細胞を分離した後、MACS で磁気ビーズ結合抗 CD14 抗体を用いて末梢血単球を抽出した。AP-1 転写因子を構成する蛋白をコードする遺伝子 (Fra-1, Fra-2, c-Fos, FosB, ATF-2, ATF-3, B-ATF, c-Jun, JunB, JunD) の発現レベルをデンシトメトリによる半定量的 PCR、定量的 PCR により調べた。さらに、蛋白の発現レベルは CD14 陽性細胞溶解物を抗原とした免疫ブロットにより解析した。MCTD/SSc 患者 6 例および特発性肺線維症 (IPF) 4 例、特発性肺動脈性高血圧症 (iPAH) 3 例、健常人 2 例における肺組織での Fra-1 蛋白の発現は免疫組織化学で検討した。

研究結果：半定量的 PCR によるスクリーニングでは末梢血単球において、MCTD/SSc で健常人と比較して高発現する遺伝子として Fra-1 のみが抽出された。Fra-1 mRNA の発現は定量的 PCR でも同様に MCTD/SSc で高発現していた。さらに末梢血単球における Fra-1 およびリン酸化 Fra-1 蛋白の発現も MCTD/SSc で健常人と比較し増加していた。肺組織における Fra-1 の発現を検討すると、MCTD/SSc では浸潤する炎症性単核細胞および線維芽細胞で Fra-1 の発現を認めたが、IPF および iPAH、健常人では Fra-1 発現は明らかでなかった。

考察：MCTD および SSc 患者では Fra-1 TG マウスと同様に、末梢血単球および肺に浸潤する単核球で Fra-1 遺伝子および蛋白の高発現が認められた。Fra-1 高発現単球が ILD・PAH 病態に関与する可能性が考えられた。

結論：Fra-1 高発現による単球の形質が MCTD および SSc 病態形成に関与する可能性がある。

A. 研究目的

MCTD は SSc、多発性筋炎／皮膚筋炎、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、炎症病態を併せ持つことが挙げられる。強力な免疫抑制療法、肺血管拡張薬が使用されるようになった現状でも ILD、PAH が MCTD の主要な死因である。昨年度我々は転写因子 AP-1 を構成する

Fra-1を高発現するTGマウスに着目した。このマウスでは、肺間質の線維化および動脈内腔狭窄が自然発症することを報告した。肺組織はヒトのNSIPに、肺動脈の変化はHeath& Edwards分類のGrade IからIIIのPAHに合致していた。これら知見よりFra-1 TGマウスが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SScの病態解明に有用と考えた。一方Fra-1 TGマウスでは間質への単球の浸潤が肺病変の出現に先行する[1]ことからFra-1を高発現した単球の病態への関わりを想定した。そこで、本年度はMCTDやSSc患者でFra-1およびAP-1関連タンパクの発現変化が存在するかを検討した。

B. 研究方法

1.対象

対象は2004年度再改訂版厚生労働省研究班MCTD診断基準を満たすMCTD患者、ならびに1980年アメリカリウマチ協会による分類予備基準を満たすSSc患者44例。対照として健常人36例を用いた。肺組織の検討ではMCTD/SSc 6例、特発性肺線維症 (IPF) 4例、特発性肺動脈性肺高血圧症 (iPAH) 3例、健常人2例の肺組織を用いた。これら肺組織はピッツバーグ大学 Carol Feghali-Bostwick 先生より提供を受けた。

2. 末梢血単球におけるAP-1関連遺伝子発現の半定量的解析

末梢血単核球を比重遠心法で分離後、MACS (Miltenyi) を用いて磁気ビーズ結合抗CD14抗体で単球を分離した。分離した単球よりtotal RNAを抽出し、Oligo(dT)₁₂₋₁₈プライマー (Invitrogen) とAMV reverse transcriptase (Takara) を用い、2 μ gのtotal RNAよりcDNAを作成した。作成したcDNAを

用い、AP-1関連遺伝子としてFos family 遺伝子 (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2)、Jun family 遺伝子 (c-Jun, JunB, JunD)、ATF family 遺伝子 (ATF-2, ATF-3, B-ATF) の発現をPCRで検討した。それぞれPCRの産物をアガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで可視化し、ChemiDoc XRS (Biorad)で検出した。PCR産物のバンドをImage Jで定量化し、それぞれの遺伝子の発現レベルはG□□□□のバンドの強度で補正した。

3. 末梢血単球におけるAP-1関連遺伝子発現の定量的解析

半定量的解析で有意差を認めたFra-1遺伝子についてTaqMan® Gene expression assays (Invitrogen) のプローブ(Hs04187685)およびAbsolute QPCR Master Mix (Thermo Scientific) を用い、7500 Real time PCR system (Applied Biosystems)で検討した。それぞれの遺伝子の発現レベルはG□□□□の発現強度で補正した。

4. Fra-1タンパクの発現レベル解析

CD14⁺単球(2 x 10⁶)をsodium dodecyl sulfate および2-mercaptoethanol存在化で可溶化し、免疫ブロットの抗原として用いた。抗原をSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写、5%スキムミルク溶液でブロックした。一次抗体として抗Fra-1抗体または抗リン酸化Fra-1抗体 (Cell Signaling Technology) と室温で1時間反応させ、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体と室温で1時間反応後、化学発光法 (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer) を用いフィルム (Biomax Light Film, Kodak) を感光させて現像した。それぞれのタンパクのバンドをImage Jで定量化し、それぞれの

遺伝子の発現レベルは β -actin の発現強度で補正した。

5. 免疫組織化学による Fra-1 発現の評価

肺組織の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 Fra-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 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 (Vector)、引き続き 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) 試薬 (Invitrogen) と反応させ発色した。

6. 統計学的解析

2 群間の比較は Mann-Whitney U-test で、2 変数の相関は線形回帰分析で検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

本研究内容は学内の倫理委員会で承認され、すべての症例で事前に文書によるインフォームドコンセントを取得した。

C. 研究結果

1. 末梢血単球における AP-1 関連遺伝子発現の半定量的解析

末梢血単球における AP-1 関連遺伝子の発現を半定量的 PCR で検討した。Fos family 遺伝子では健常人と比較し MCTD/SSc で Fra-1 のみが高発現し (1.0 ± 0.5 vs 1.7 ± 1.0 , $p < 0.05$)、Fra-2、c-Fos、FosB は有意差を認めなかった。3 種類の Jun family 遺伝子 (c-Jun, JunB, JunD)、3 種類の ATF family 遺伝子 (ATF-2, ATF-3, B-ATF) は 2 群間で有意差を認めなかった。

2. 末梢血単球における AP-1 関連遺伝子発現の定量的解析

半定量的 PCR で抽出された Fra-1 に着目し、症例数を増やして定量的 PCR (TaqMan® PCR) による解析を行った。健常人と比較し MCTD/SSc では 7.38 倍発現が亢進していた (0.29 ± 0.56 vs 2.14 ± 2.41 , $p < 0.05$) (図 1)。

3. Fra-1 タンパクの発現レベル解析

さらに分離した単球の溶解物を抗原とした免疫ブロットを行い、単球中の Fra-1 の発現について検討した。リン酸化 Fra-1 および total Fra-1 は共に健常人と比較し、いずれも MCTD/SSc で 3 倍高発現していた (1.0 ± 0.3 vs 2.9 ± 6.5 , $p < 0.05$)。なお、total Fra-1 中のリン酸化 Fra-1 の比でみると 2 群間で差を認めなかったが total Fra-1 とリン酸化 Fra-1 量は強い相関を認めた ($r = 0.995$, $p < 0.05$)。

4. 免疫組織化学による Fra-1 発現の評価

肺組織における Fra-1 の発現を免疫組織化学で検討した。MCTD/SSc 6 例、IPF 4 例、iPAH 3 例および健常人 2 例を対象とした。その結果、Fra-1 は MCTD/SSc の肺組織で特に高い発現を認め、浸潤する単核球および線維芽細胞で発現していた。また血管内皮細胞や肺胞上皮細胞にも染色が認められる症例が存在した (表 1)。

D. 考察

Fra-1 TG マウスは元々骨形成に異常をきたす骨硬化症のモデル動物として報告された [2]。前回の報告のように、肺組織では肺間質の線維化および肺動脈の狭小化を認め、組織学的には肺病変は NSIP、肺動脈の変化は Heath & Edwards 分類の Grade I から III の PAH と合致していた。そこで MCTD/SSc

患者で **Fra-1** および **AP-1** 関連タンパクが発現変化している可能性について追究した。その結果、末梢血単球では **AP-1** 関連遺伝子・タンパクのうち **Fra-1** のみが高発現していた。また **MCTD/SSc** 肺組織においても病変部に浸潤する単核球に **Fra-1** の強い発現を認めた。以上より **MCTD/SSc** 患者では **Fra-1** の高発現を通じて単球のフェノタイプが変化し、これらが浸潤することにより、引き続いて起きる肺線維化や肺動脈の狭窄形成のトリガーとなっている可能性がある。

Fra-1 TG マウスは、肺間質の線維化や肺動脈内腔の狭小化に先行し単球の浸潤を認める点が特徴的だが、**LPS** 刺激後の血清中では **proinflammatory cytokine** (**TNF-a**, **IL-12**, **IL-6**) 濃度が低下し **IL-10** が優位となっていたことから、**M2** マクロファージの産生するサイトカインプロファイルへのシフトが報告されている[3]。一方 **SSc** では、末梢血で **M2** マクロファージの precursor の比率が増加し、病変部皮膚組織でも **M2** マクロファージが増加していたことから線維化病態との関連が示唆されている[4]。これらの知見を合わせて考えると、**Fra-1** 高発現により単球が **M2** マクロファージへと分化する方向に進み、線維化病態に寄与する可能性が考えられる。

さらに **MCTD/SSc** 肺組織では線維芽細胞でも **Fra-1** の発現を認めていた。これまでの報告では **quiescent** な線維芽細胞では **c-Jun** や **JunD** のホモダイマーが検出されるが、血清による刺激により **Jun family** のタンパクと **c-Fos** または **FosB** のヘテロダイマーが形成され、さらに時間が経過すると **Fra-1** とのヘテロダイマーが優位となることが報告されている [5, 6]。これらより、今回の肺組織線維芽細胞でのリン酸化および **total Fra-1** の高発現は何らかの外的な刺激を持続的に

うけた結果として、あるいは自立的に形質転換した結果として、局所に存在する線維芽細胞が活性化した証を示しているか、あるいはその他の **linage** 由来の細胞、たとえば単球や **fibrocyte** が分化した結果をみている可能性も考えられる。

Fra-1 を発現し、**MCTD/SSc** 病変部に浸潤する単核球がどのようなフェノタイプをもち、病変形成にどのように関与するのか、また **Fra-1** を高発現することにより単球の形質がどのように変化するかという点は、今回の研究では明らかとなっていない。今後の追究が必要と考える。

E. 結論

MCTD および強皮症においても **Fra-1** TG マウスと同様に単球の形質が変化し、病態および病変形成に関与する可能性があると考えられた。**Fra-1** TG マウスは **MCTD** 患者における肺病変の病態形成機序の解明、さらには新たな治療法の開発にきわめて有用なモデルと考えられる。

(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. 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.

3. Takada Y, Ray N, Ikeda E, Kawaguchi T, Kuwahara M, Wagner EF, Matsuo K. Fos proteins suppress dextran sulfate sodium-induced colitis through inhibition of NF- κ B. *J Immunol.* 2010; 184(12): 1014-1021.
4. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, Yonemura Y, Komohara Y, Takeya M, Mitsuya H, Ihn H. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12: R128
5. Kovary K, Bravo R. Existence of different Fos/Jun complexes during G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1992; 12(11):5015-5023.
6. Lallemand D, Spyrou G, Yaniv M, Pfarr CM. Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts. *Oncogene.* 1997; 14(7): 819-830.

F. 健康危険情報
特記事項なし。

G. 研究発表
論文発表

1. Tamura Y, Ono T, Kuwana M, Inoue K, Takei M, Yamamoto T, Kawakami T, Fujita J, Kataoka M, Kimura K, Sano M, Daida H, Satoh T, and Fukuda K. Human pentraxin 3 (PTX3) as a novel biomarker for the diagnosis of pulmonary arterial hypertension.

PLoS One. 2012; 7(9): e45834.

2. 桑名正隆: 肺動脈性肺高血圧症診療の診療の新展開; 膠原病性肺動脈性肺高血圧症診療の新展開〜早期介入・免疫抑制療法へ. 炎症と免疫 20(5): 504-507, 2012.
3. Shirai Y, Yasuoka H, Okano Y, Takeuchi T, Satoh T, and Kuwana M. Clinical characteristics and survival of Japanese patients with connective tissue disease and pulmonary arterial hypertension: a single-center cohort. *Rheumatology.* 2012; 51(10): 1846-1854.
4. 桑名正隆: 肺高血圧診療の最前線; 膠原病疾患に伴う肺高血圧: 強皮症に合併する肺高血圧を中心に. *Pharma Medica* 30(11): 23-27, 2012.
5. Yasuoka H, and Kuwana M. Combined interstitial lung disease and pulmonary hypertension in systemic sclerosis: pathophysiology and management. *CML-Pulmonary Hypertension*. In press.
6. Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Satoh T, and Kuwana M. Intravenous epoprostenol treatment of patients with connective tissue disease and pulmonary arterial hypertension at a single center. *Mod. Rheumatol.* In press.

学会発表

1. 桑名正隆: 教育研修講演 1; 膠原病に合併する肺高血圧症の診断と治療. 第 56 回日本リウマチ学会総会 (東京). 2012.
- 4.

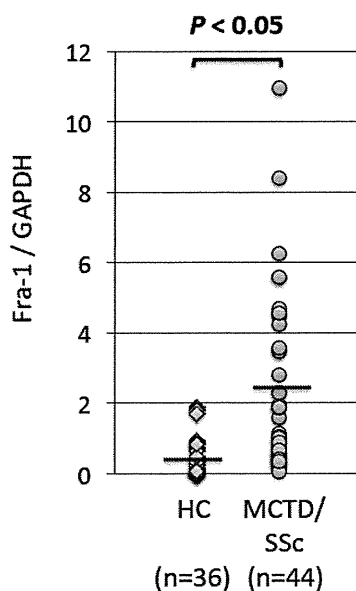


図1. 定量的PCRを用いた単球におけるFra-1 mRNAの発現の検討. TaqMan® PCRによりFra-1 mRNA発現を検討した。HC: healthy control, MCTD/SSc: mixed connective tissue disease/systemic sclerosis

表1. 免疫組織化学のまとめ

	MCTD/SSc					IPF				iPAH			HC	
Mononuclear cells	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-
VSMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endothelial cells	++	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Fibroblasts	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Alveolar epithelial cells	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

- no staining
 + weak staining
 ++ moderate staining
 +++ strong staining

MCTD/SSc: mixed connective tissue disease/systemic sclerosis, IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, iPAH: idiopathic pulmonary arterial hypertension, HC: healthy controls, VSMC: vascular smooth muscle cells

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

CSP-ELISA の開発と患者血清中の抗血管内皮細胞抗体の測定に関する研究

研究協力者 三浦恵二 藤田保健衛生大学総合医科学研究所抗体プロジェクト 講師
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

抗血管内皮細胞抗体 (AECA) を測定するための新たな方法として、細胞表面タンパクに焦点を当てた CSP-ELISA (solubilized cell surface protein-capture ELISA) を開発した。CSP-ELISA による測定では、SLE, MCTD 患者で約 80%が陽性を示した。ELISA ウェル上の抗原は、比較的マイルドな変性処理でも抗原性を失うことから、抗原の不安定な立体構造を認識して自己抗体は結合していると考えられた。今後は、さらに多くの患者で CSP-ELISA による AECA の測定を行い、抗体価と病態との関連を探り、診断法の確立を目標にする。

A. 研究目的

自己免疫疾患患者血清中には、血管内皮細胞表面に結合する AECA が存在することが知られているが、標準化された AECA 測定法はない。既知の自己抗原の多くが細胞内局在タンパクであるが、AECA を検出する方法として、界面活性剤で可溶化した細胞表面タンパクを固相化して使用する新たな ELISA 法の開発を目指した。AECA 抗体価と病態との関連を見つけることで、新たな臨床検査法としての利用が期待できる。

B. 研究方法

臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の細胞表面タンパクをビオチン化後に界面活性剤で可溶化し、予めニュートラアビジンでコートした ELISA ウェルに添加することでビオチン化膜タンパクを捕捉した。そこに患者血清を反応させ、洗浄後、結合している自己抗体を HRP 標識抗ヒト抗体で検出した。この新たな測定法を、CSP-ELISA と名付けた。

(倫理面への配慮)

本研究は、藤田保健衛生大学臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施しており、患者の同意を得た検体について測定を行なった。

C. 研究結果

CSP-ELISA で、様々な自己免疫疾患患者血清を測定したところ、SLE, MCTD, 強皮症で、それぞれ 78%, 81%, 56% の陽性率を示した。122 名の健常人での測定でカットオフ値を設定したが、4 名(約 3%)がそれを上回り陽性になった。固相化した抗原を比較的マイルドな変性処理を行うと、自己抗体の結合が阻害された。

D. 考察

SLE, MCTD, 強皮症において、血管内皮細胞表面タンパクに対する自己抗体が高率で検出されたことから、CSP-ELISA は AECA を多検体で測定できる有効な方法であり、今後さらに改良および最適化を行うことで AECA

測定のための標準法になり得ると考えられる。

E. 結論

CSP-ELISA は、これまでにない新たな自己抗体測定法であり、これにより測定した自己抗体価と病態との関連が判明すると、病態把握、診断、あるいは薬効の評価などにも利用が可能であることから、今後さらに多くの検体を測定し、カルテ・臨床データとの照合が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miura K, Aoun K, Yoshida S, Kurosawa Y. J. Immunol. Methods. 2012. 382(1-2):32-9.

2. 学会発表

三浦恵二, アウン桂子, 吉田俊治, 黒澤良和
第 35 回日本分子生物学会年会

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

特願 2012-212007、平成 24 年 9 月 26 日、
発明者：三浦恵二、吉田俊治、黒澤良和

2. 実用新案登録

3. その他

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おける自己抗体産生機序の検討に関する研究

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 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 の病態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。その結果、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、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。本研究では、自己抗体に関連する本細胞群の治療標的への応用を考え、本細胞群の分化因子とヒトでの本細胞群類似サブセットの同定を試みた。まず、本サブセット同定のため表面マーカーにつき再検討するとともに、T 細胞ホメオスターシスに伴う細胞分裂とそれに関与する T 細胞受容体特異性や腸内フローラ、また抗 RNP 抗体産生に重要と考えられている TLR シグナル、follicular helper T 細胞の分化に必要な Bcl-6 の本細胞群分化との関連につき検討を試みた。その結果、CXCR5-PD-1+follicular helper T 細胞サブセットをヒトでも確認することができ、T 細胞ホメオスターシスに伴う細胞分裂や Bcl-6 が分化因子であることが示された。TLR についても検討可能な遺伝子改変マウスの準備が整い現在検討中である。今後の新規治療を考える上で、今回の解明は重要な礎になると考える。

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(表1、表2)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を明らかにした。本研究では、今後の新規治療戦略を考える上で、この細胞群の表面マーカーをより明確に示すとともに、分化に関与する因子、特に T 細胞受容体や Bcl-6、Foxp3 などの関与や、抗 RNP 抗体産生に重要と考えられている To11 様受容体 (TLR) の関与を明らかにするとともに、ヒトの解析を行うことを目的とする。

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) 移入細胞特異的解析のためのマウスモデルの作成
ヌードマウスに内在する僅かな胸腺外 T 細胞と移入 T 細胞との区別を行うため、Th1.1+Balb/c マウスを作成した。そのマウスから CD4T 細胞を採取し、レシピエントである Th1.2+Balb/c マウスに移入することで Th1.1+CD4⁺T 細胞が移入 T 細胞由来と明確に分別できることとなる。T 細胞受容体特異性をみるために外来抗原であるニワトリ卵白アルブミン (OVA) 反応性単一 TCR 発現マウス (RAG2 欠損 D011.10 マウス) から CD4T

細胞を分離し移入する実験を行った。また、Bcl-6 や Foxp3 の関与を検討するため、Bcl-6 欠損マウスや Foxp3 欠損マウスから CD4T 細胞を分離し移入する検討も行った。

2) 抗 RNP 抗体誘導系の解析のための TLR シグナル欠損レシピエントマウスの作成
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、TLR7 欠損 TCR α 欠損マウスおよび TLR9 欠損 TCR α 欠損マウスを作成した。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。これらの遺伝子改変マウスを作成するために、MyD88 欠損 Balb/c マウス、TLR7 欠損 Balb/c マウス、TLR9 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した。

(2) 抗 RNP 抗体誘導モデルの解析

1) 実験系

Th1.1+Balb/c マウスや通常の Balb/c マウス、Bcl-6 欠損マウス、RAG2 欠損 D011.10 マウス、Foxp3 欠損マウスから以下の方法により採取した CD4T 細胞を、ヌードマウスもしくは TCR α 欠損マウスに分離移入し、その後、移入 T 細胞の解析を行った。

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。一部を生体における分裂の解析のため、CFSE ラベルを行い移入した。

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 ヌ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 $40 \mu\text{l}$ 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 $2 \mu\text{g/ml}$ に希釈した anti-mouse IgG-Alexa 488 を $40 \mu\text{l}$ 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 $4 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA) に、 4°C 一晚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 $50 \mu\text{l/well}$ 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°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% Na₃-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)。

CXCR5 の染色に関しては、ビオチン化抗 CXCR5 抗体を室温で反応させ PE 標識ストレプトアビジンで検出する方法や、PE 標識 CXCR5 や FITC 標識 CXCR5 の蛍光強度を増強する Faser キット (Miltenyi Biotec) を用いて種々の検討を行った。

(3) ヒトにおける解析

ヒト末梢血より Ficoll を用いて、末梢単核球分離し、CXCR5-PD-1+CD200+Helios+Foxp3-T 細胞の同定を FACS にて行った。

(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. 移入細胞群特異的解析による表面マーカーおよび細胞分裂の解析

リンパ球減少下において分化する濾胞ヘルパー T 細胞が新規細胞群であることを明確に示すため追加実験を行った。本系でレシピエントがヌードマウスの場合、レシピエントの胸腺外 T 細胞の混入が否定しきれないため、CFSE で染色した Thy1.1 陽性 T 細胞を移入することによりレシピエントの細胞と識別し (表 3)、移入細胞が分裂し分化したことを示すことができた (表 4)。また TCR α 欠損マウスには胸腺外 $\alpha\beta$ T 細胞が存在しないため、このマウスに T 細胞を移入する検討によっても、同様に移入 T 細胞が分裂し新規細胞群に分化することを示すことができた。そして、CXCR5 の染色には工夫が必要であるため、本細胞群の CXCR5 陰性~弱陽性が染色不十分である可能性を否定する目的で、CXCR5 が十分に発現している T 細胞をコントロールに様々な条件で染色し、やはり CXCR5 陰性~弱陽性の濾胞ヘルパー T 細胞であることを確認した (表 3)。以上のことより、新規 CXCR5-PD-1+CD4⁺T 細胞サブセットが T 細胞ホメオスターシスに伴う分裂に伴い分化していることが明らかとなった。

2. T 細胞受容体特異性や Foxp3 の必要性に関する検討 RAG 欠損 D011.10 マウス由来の T 細胞でも抗核抗体が産生され、むしろマウス内にこの T 細胞受容体の cognate antigen である OVA がある場合、本細胞群が減少していることを確認した。また follicular helper T 細胞分化と Foxp3 との関連が他研究で指摘されているが、Foxp3 欠損マウス由来 T 細胞を移入しても本細胞群は分化してきていることから本系では関与は考えられなかった (表 4)。

2. 腸内フローラの関与に関する解析

本細胞群は、1 で行った CFSE による分裂と分化の相関をみた検討から、spontaneous proliferation と呼ばれる T 細胞ホメオスターシスの一機序により分化してきた細胞群であることが判明し、spontaneous proliferation を惹起させる腸内フローラと本細胞群の分化との関連が示唆された。そのため、現在、腸内フローラを破壊したレシピエントマウスを作成しており、このマウスを用いて本細胞群が分化するか、また抗 RNP 抗体をはじめとする自己抗体が産生されるのか否かを検討中である (表 5)。一シリーズの解析では、腸内フローラを破壊したマウスでは spontaneous proliferation が障害されていることが明らかと成っ

た。現在も検討を続けており、この検討は、自己抗体産生の新たな機序の解明に貢献するものとする。

3、TLR の関与の解析

次に本細胞群の分化に関わる因子を明らかにするため、まず Toll 様受容体の関与を検討することとした。レスピエントマウスとして用いるため MyD88 欠損 TCR α 欠損マウスの作成を行ったが、これらのマウスは誕生するも長期生存が難しく検討が困難であった。そこで TLR7 欠損 TCR α 欠損マウスおよび TLR9 欠損 TCR α 欠損マウスの作成を行った。現在、これらのマウスは生存できることを確認しており、実験を行える数を得るために準備をしている。

4、Bcl-6 の関与の解析

Bcl-6 欠損マウスから分離した CD4T 細胞を移入した系では抗 RNP 抗体産生が著明に低下しており、Bcl-6 が自己抗体産生に重要な役割を担っていることが明らかになった (表 6)。

5、ヒトでの解析

ヒトでの検討の準備として CXCR5-PD-1+

Helios+Foxp3-CD4+T 細胞の存在をヒト末梢血で確認することができた (表 7)。このことは、しかるべき学内手続きの後、実際にヒト疾患での検討を行うことが可能と考えられる結果である。

D. 考察

抗 RNP 抗体をはじめとする抗核抗体産生モデルにおいて、新規 CXCR5-PD-1+ICOS+Helios+Foxp3-CD4+T 細胞サブセットが誕生していることが、Thy1.1 マウスの使用や TCR α 欠損マウスの解析から明確に証明できた。更に、Bcl-6 や T 細胞ホメオスターシスに伴う細胞分裂が分化に重要な因子となっていることが明らかとなり、標的分子の同定の観点から今後の治療戦略を考える上で重要な結果と考えられた。

また、TLR7 欠損 TCR α 欠損マウスおよび TLR9 欠損 TCR α 欠損マウスをレスピエントとした抗 RNP 抗体誘導系の解析により本サブセットの分化と抗 RNP 抗体産生への TLR の影響が明らかになり、MCTD に特異的な治療介入ができるか今後検討が可能と考える。

また、これまでの研究により本細胞群が spontaneous proliferation と呼ばれる腸内フローラが重要な役割を担う T 細胞ホメオスターシス機序により誕生していることが明らかになっていることから、現在施行中の腸内フローラを破壊したレスピエントマウスの解析により、自己抗体産生に関わる新たな機序が解明されると考える。

E. 結論

マウスモデルを用いた本研究により、抗 RNP 抗体産生など異常な B 細胞応答に関与する新たな CXCR5-follicular helper T 細胞サブセットを明らかとなり、ヒトでも類似細胞群が同定できた。また、本細胞群の分化に Bcl-6 や T 細胞ホメオスターシスに関わる因子が関与していることが明らかとなり、今後、新規治療標的分子を考える上で重要な結果と考えられる。

細胞群の分化に Bcl-6 や T 細胞ホメオスターシスに関わる因子が関与していることが明らかとなり、今後、新規治療標的分子を考える上で重要な結果と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1, Kanzaki T, Kawahata K, Kanda H, Fujio K, Kubo K, Akahira L, Michishita K, Eri T, Yamamoto K. Long-term therapeutic effects and safety of tacrolimus added to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2012 Jul 18.

2, 修飾自己抗原を用いた自己反応性 B 細胞を標的とする選択的自己免疫疾患治療法の開発: 道下 和也, 川畑 仁人, 神崎 健仁, 赤平 理紗, 江里 俊樹, 山本 一彦, 日本臨床免疫学会誌 35 巻 4 号 Page344(2012.08)

3, 全身性自己免疫制御における自己反応性 T 細胞の新たな分化経路の解明: 赤平 理紗, 今村 充, 川畑 仁人, 神崎 健仁, 道下 和也, 江里 俊樹, 土肥 眞, 山本 一彦, 日本臨床免疫学会誌 35 巻 4 号 Page333(2012.08)

4, B 細胞・抗原提示細胞・自己抗体 リンパ球減少下誘導増殖(LIP)は、特有の個体発生を有する濾胞性ヘルパーT(TFH)細胞の分化と異常 B 細胞応答性において重要な役割をもたらす (Lymphopenia-induced proliferation (LIP) triggers the development of follicular helper T (TFH) cells which have a distinctive ontogeny and a critical role in aberrant B cell responses)(英語): 江里 俊樹, 今村 充, 神崎 健仁, 川畑 仁人, 赤平 理紗, 道下 和也, 土肥 眞, 徳久 剛史, 山本 一彦, 日本臨床免疫学会誌 35 巻 4 号 Page308(2012.08)

5, トシリズマブ投与にて病勢が抑えられた難治性成人発症ステイル病の 1 例, 森田 薫, 庄田 宏文, 桑原 里佳, 岩崎 由希子, 神崎 健仁, 住友 秀次, 久保 かなえ, 藤尾 圭志, 川畑 仁人, 山本 一彦, 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 56 回・21 回 Page690(2012.03)

6, 全身性自己免疫制御における自己反応性 T 細胞の新たな分化経路の解明: 赤平 理紗, 今村 充, 川畑 仁人, 神崎 健仁, 道下 和也, 江里 俊樹, 土肥 眞, 山本 一彦, 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 56 回・21 回 Page421(2012.03)

7, 膠原病における中枢神経障害, 川畑 仁人, 分子リウマチ治療(1882-9163)5 巻 1 号 Page27-35(2012.01)

8, アバタセプトはサイトカイン刺激 T 細胞と TLR による刺激により誘導されるマクロファージの炎症性サイトカイン産生を制御する, 川畑仁人, RA Trends 第 5 号

9, 最新内科学; 免疫に作用する薬剤、リウマチ性疾患に関わる全身の身体所見、リウマチ性疾患に関わる関節所見

2. 学会発表

1, APLAR2012 第 15 回アジア太平洋リウマチ学会議; Lymphopenia-induced proliferation (LIP) triggers the development of TFH cells which have a distinctive ontogeny and a critical role in breaking B cell tolerance

2, 第 40 回日本臨床免疫学会総会; 修飾自己抗原を用いた自己反応性 B 細胞を標的とする選択的自己免疫疾患治療法の開発、道下 和也, 川畑 仁人ほか

3, 第 40 回日本臨床免疫学会総会; 全身性自己免疫制御における自己反応性 T 細胞の新たな分化経路の解明、赤平 理紗、川畑 仁人ほか

4, 第 40 回日本臨床免疫学会総会; Lymphopenia-induced proliferation (LIP) triggers the development of follicular helper T (TFH) cells which have a distinctive ontogeny and a critical role in aberrant B cell responses、江里 俊樹、川畑 仁人ほか

5, 第 41 回日本免疫学会総会; Lymphopenia-induced proliferation (LIP) triggers the development of TFH cells which have a distinctive ontogeny and a critical role in breaking B cell tolerance 江里 俊樹、川畑 仁人ほか

6, 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術総会; トシリズマブ投与にて病勢が抑えられた難治性成人発症ステイル病の 1 例、森田 薫, 川畑 仁人ほか

6, 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術総会; 全身性自己免疫制御における自己反応性 T 細胞の新たな分化経路の解明: 赤平 理紗、川畑 仁人

3, その他、専門医、一般医等医療従事者への情報提供 (シンポジウムの開催、講演等での発表)

1, リウマチ学会関東支部学術集会; 12 月 1 日講演「生物学的製剤の増量・変更をどうするか」

2, 第 8 回近畿大学病診連携リウマチ研究会; 11 月 17 日講演「関節リウマチ治療における抗リウマチ薬併用療法について」

3, 第 4 回生物学的製剤を語る会; 10 月 18 日症例発表 第 11 回リウマチ膠原病・よつやセミナー; 9 月 8 日講演「胸腺における自己反応性 T 細胞の新たな分化経路」

4, T cell camp; 8 月 4~5 日

5, リウマチ性疾患症例検討会; 6 月 15 日症例発表 名古屋市立大学; 6 月 23 日「関節リウマチにおけるアバタセプト 2012」講演

6, 御茶ノ水膠原病談話会; 1 月 11 日症例発表

4, 患者、家族、患者会や一般市民への情報提供 (シンポジウムの開催、講演等での発表、マスコミでの発表

など)

1, リウマチのお話〜リウマチ治療の最前線〜; 6 月 2 日「抗リウマチ薬の役割」

2, 城東保健相談所難病講演会; 2 月 18 日「成人ステイル病の症状と治療について」

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1; 抗 RNP 抗体産生マウスモデル

抗 RNP 抗体を産生する動物モデルの確立

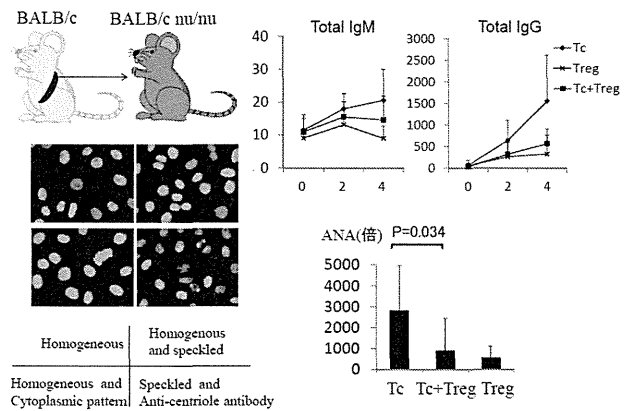


表 2; 抗 RNP 抗体の産生

抗核抗体の検出

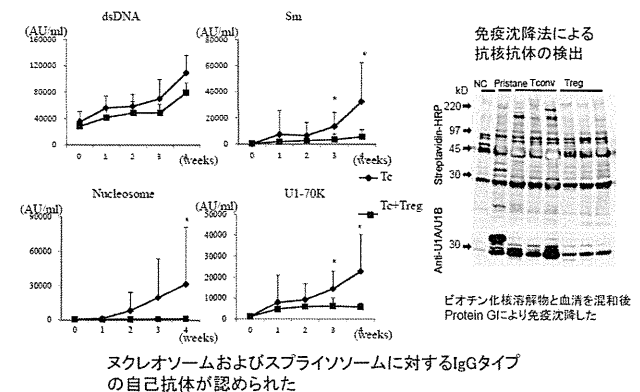
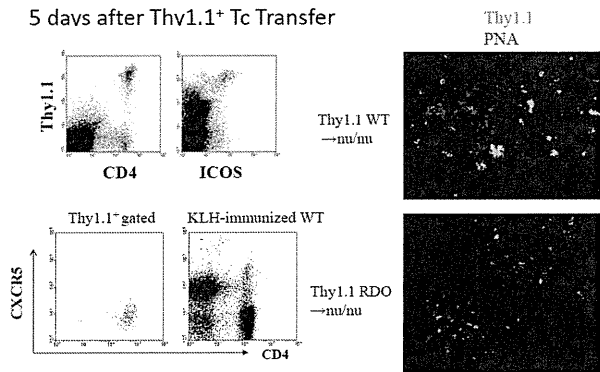


表 3 ; 移入 T 細胞の CXCR5-follicular T 細胞への分化



移入細胞から誘導されたCXCR5⁺ ICOS⁺ PD-1⁺ CD200⁺ CD4⁺ T細胞がGc形成に関与

表 6 ; Bcl-6 の関与の検討

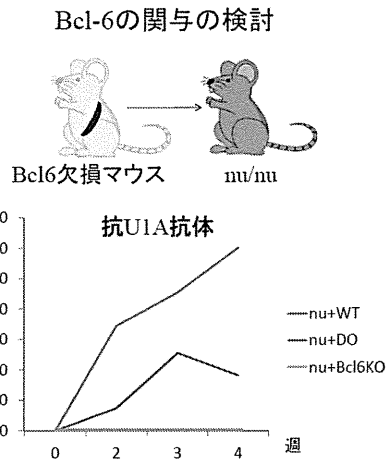
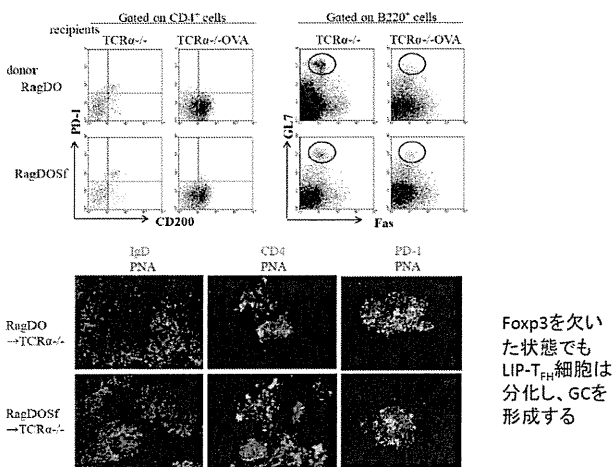


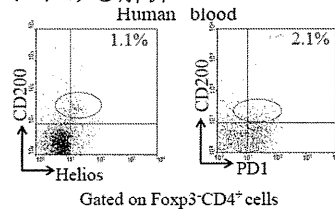
表 4; 本細胞群 (LIP-TFH) 分化への T 細胞受容体や Foxp3 の関与についての検討

LIP-T_{FH} 分化に関わる因子の検討 : TCR 特異性と Foxp3 の関与について



Foxp3 を欠いた状態でも LIP-T_{FH} 細胞は分化し、GC を形成する

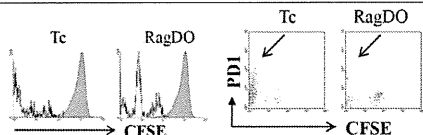
表 7 ; ヒトにおける解析



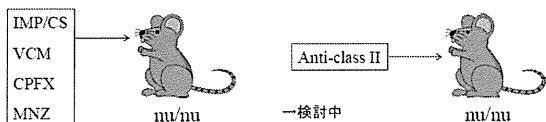
健康ヒト末梢血において CXCR5⁺PD-1⁺CD200⁺Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 細胞が少数存在する

表 5 ; 本細胞群と T 細胞ホメオスタシスとの関連および腸内フローラの関与を検討するマウスモデル

CD4T 細胞の homeostatic proliferation
 ・狭義の homeostatic proliferation ; 遅い分裂、IL-7、class II 非依存性
 ・Spontaneous proliferation ; 速い分裂、腸内フローラ、class II 依存性



→ “Spontaneous proliferation” を経た T 細胞が LIP-TFH に分化
 → 腸内フローラと LIP-TFH、自己抗体の関連を示唆



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 全国調査結果(2006-2011)の解析（治療法の変遷と発症機構）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

我が国では厚労省が主体となって全国の医療機関から毎年新規に発症する特定疾患の個々の患者情報の登録集計がされている。本研究では、これらの貴重な情報を活用して、疾患の本体と各疾患の治療動向を見据えるための臨床的な指針を得ることを目的に種々の解析を行なった。MCTDは2006年から2011年までの6年間に新規に3040例が登録されている（平均507例）。プレドニン投与はおよそ69%の症例が一年以内に受けており、過半数は20mg/day以上であった。免疫抑制剤の使用頻度はこの数年間で2.5倍に増加していた。PG製剤や循環改善剤などの補助的治療薬の使用頻度は併せて全体の2割程度であった。3040例のMCTD患者の発症年齢分布は、各年度ごとに分割してもほぼ同型であり、年度ごとの症例に大きな違いやバイアスがかかっていること、またその分布型はワイブル分布関数の形状に極めて類似していた。このことから、実際の個体レベルの発症から医療機関に受診し臨床的にそれと把握されるまでの「潜伏期間」をゼロとした場合の発症に必要なステップ数はおおよそ3と推定され、従来の考え方に合致した。他方、内外で実施されたGWASの結果からはより多数の遺伝子異常（もしくは遺伝的多型性）が報告されている。我々はこれらの結果から多数の検出された遺伝子はおおよそ3つの遺伝子群にまとめられる、というモデルを提唱した。

A. 研究目的

我が国で混合性結合組織病(MCTD)の疾患概念はほぼ確定され、その共通する病態の解析結果をもとに新しい治療的試みが進められている。そこで、この数年間の本疾患患者の厚労省特定疾患への登録情報を用いて、実際に行なわれているMCTDの治療法の実態調査と適用について調査することを第1の目的とした。MCTDを含む全身性自己免疫疾患の成因として、いわゆる「相加的ポリジーン」モデルが提唱されている。自己抗体は健常人でもエイジングによって低力価のものが検出されるが、症状発現に結びつくほどの高力価になるという量的形質については効果の小さな複数のポリジーンに支配される、と考えられている。しかし、この「複数」さのオーダーをあらかじめ知っておくことは、今後GWASなどを適用して遺伝子解析を進める際の「落としどころ」として極めて重要である。事実、多くの原因不明の疾患の発症機構の研究の中でどれほど多数の遺伝的要因が潜んでいるかを求めることがヒトゲノム解明以降の

多くの臨床研究の課題でもある。そこで、今年度の全国調査の中で発症年齢の分布型を解析し、発症機構に関する情報の概略を得ることを第2の目的とした。

B. 研究方法

解析対象は、2006年から2011年の6年間に各年度で新規に登録された全国MCTD症例、総数3040例、とした。まず対象症例の記載疫学的項目を年度ごとに調べ、年度ごとのばらつきの有無を調べた後、実際に施行された治療法の実態を調べた。プレドニソロン一日投与量、各種免疫抑制剤およびPG製剤などの末梢血管拡張療法、と臨床症状との関連を調査した。また、発症年齢分布の分布型を調べ、かかる発症過程を最も合理的に記述しうる分子機構を検討した。

C. 研究結果

1-1) MCTD患者に対するプレドニソロン(PSL)治療の実態：3040例中2102例(69.1%)が診断より1年以内にPSLが投与されていた。

その内の 58.3%は PSL 一日量が 20mg 以上であり、パルス療法を受けていた患者は全体の 6.5%であった。1-2) 免疫抑制剤の使用頻度はこの数年間で毎年増加し、2011 年は 2006 年の 2.5 倍であった。特定の症状との関連はなかった。1-3) PG 製剤の使用頻度は 12%であった。2-1) 発症年齢分布は 2006-2008 の 3 年間で 2009-2011 の 3 年間で全国ほぼ同様であり、症例の偏りが少ないと判断され、以後の解析に耐えうることを示唆された。2-2) MCTD の発症年齢分布は、機械故障を解析するために広く用いられワイブル分布によって記載された。また、その解釈に多段階発症モデルを適用したところ、発症潜伏期がないと仮定した場合にはおよそ 3 段階、発症潜伏期を 3-4 年と推定した場合にはおよそ 2 段階の過程で発症に至ると推定された。

D. 考察

以上の結果は、MCTD に対する PSL 治療が単独で十分な場合と、肺高血圧症等を併発した場合あるいは強度のレーノー現象を伴った場合には局所循環改善療法を組み合わせる必要性のあることを示唆した。なお、発症年齢分布型の解析結果は、本疾患の発症が 2-3 つという比較的少数の独立事象から成ることを示唆するが、これは必ずしも発症に関連する遺伝子の数を意味するものではなく、実際には 2-3 の独立した遺伝子ネットワークを担う個々の遺伝子のどこかでそれぞれ異常が蓄積された結果であることを示している、と解釈された。

E. 結論

以上、全国の MCTD 症例は比較的均質な集団であり、十分に統計学的解析に耐え得るものであると考えられた。調査結果のさらなる解析は、現行の治療法の有効性の評価にも耐え得るものであり、さらに発症機構の解明にも有用な情報を与えると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Imai K, Victoriano AF, Ochiai K, Okamoto T. Microbial Interaction of Periodontopathic Bacterium Porphyromonas gingivalis and HIV-Possible Causal Link of Periodontal Diseases to AIDS Progression. *Curr HIV Res.* 10:238-244. 2012.
2. Cueno ME, Imai K, Ochiai K, Okamoto T. Cytokinin dehydrogenase differentially regulates cytokinin and indirectly affects hydrogen peroxide accumulation in tomato leaf. *J Plant Physiol.* 169: 834-838. 2012.
3. Imai K, Yamada K, Tamura M, Ochiai K, Okamoto T. Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. *Cell Mol Life Sci.* 69:2583-2592. 2012.
4. Tan Gana NH, Victoriano AF, Okamoto T. Evaluation of online miRNA resources for biomedical applications. *GenesCells.* 17:11-27. 2012.
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 Retroviruses.* 28:125-138. 2012.

2. 学会発表

Neil H. Tan Gana, Ann Florence B. Victoriano, Yurina Hibi, Kaori Asamitsu, Hiroaki Uranishi, Takashi Okamoto
Interactions of Cellular microRNAs in HIV-1 latently infected cells
AIDS 2012, Washington DC, USA

Ann Florence B. Victoriano, yurina Hibi,
Neil H. Tan Gana, Kaori Asamitsu and Takashi
Okamoto

Role of UHRF1 in transcriptional regulation
and maintenance of HIV-1 latency
AIDS 2012, Washington DC, USA

Takaichi Hamano, Masumi Ito, Kaori Asamitsu,
Keiichi Tozawa, Tomio Yamakawa and
Takashi Okamoto

NORARISTEROMYCIN INHIBITED THE CELL
PROLIFERATION AND MOTILITY, AND LED TO
APOPTOSIS OF HUMAN PROSTATE CANCER CELL
LINES

EFMC-ISMC 2012 22nd International
Symposium on Medicinal Chemistry
Berlin, German

H. 知的財産権の出願・登録状況：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

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

研究分担者 田中住明 北里大学医学部 膠原病感染内科学 (診療准教授)
研究協力者 和田達彦 北里大学医学部 膠原病感染内科学 (助教)
研究協力者 小川英佑 北里大学医学部 膠原病感染内科学 (助教)
研究協力者 廣畑竣成 北里大学医学部 膠原病感染内科学 (教授)

研究要旨

混合性結合組織病 (MCTD) 患者の指尖動脈レベルの NO 依存性血管拡張能を、非侵襲的な End-PAT を用いてを評価した。その結果、レイノー現象のある MCTD などの膠原病患者では、NO 依存性血管拡張能は、正常コントロール者と比較して有意に低下していた。また MCTD および SLE 患者では、PAH 合併により NO 依存性血管確証機能はさらに低下する傾向が認められた。レイノー現象誘発に伴う心拍変動を周波数領域解析した結果、レイノー現象を有する患者では、平時の心肺交感神経活動の亢進と副交感神経活動の抑制傾向が認められた。これらの観察結果より、MCTD 患者のレイノー現象に NO 依存性血管拡張障害が関与している事、レイノー現象と肺動脈性肺高血圧症 (PAH) との間に病態生理的関連性が存在する事が分った。また、これらの非侵襲的生理検査は、レイノー現象の評価や治療への応用、PAH の早期診断に応用できる可能性があると考えられた。

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事を着想した。そのためにレイノー現象に伴う血管内皮機能を評価、レイノー現象と PAH に代表される心肺合併症との関連を生理解剖学的アプローチにより明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

1. 指尖動脈の血管内皮機能

(レイノー現象、PAH との関連について)

健常者 6 名と、MCTD 患者 11 名およびレイノー現象を有する全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 4 名、全身性強皮症 (SSc) を対象とした。

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 (RHI: Reactive Hyperemia Index) を測定した。

2. 心肺自律神経活動の評価

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。

3. 解析方法

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。得られたパラメータの代表値は、その分布から心拍数、エントロピーは中央値を、LF, HL およびその比は対数正規変換後の中央値を用いた。また、平均値の記載には平均±標準誤差を用いた。

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 を用いて行い分散分析 (ANOVA および MANOVA)、T 検定および名義ロジスティック解析を用いて行った。

(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. 指尖動脈の血管内皮機能検査

まず RHI は、健常者コントロール群 (のべ 9 測定) の 2.21 ± 0.15 に比べ、レイノー現象を有する患者群 (のべ 24 測定) では 1.43 ± 0.08 と有意に低下していた ($p < 0.001$)。

次に、健常者コントロール、MCTD 患者、SLE 患者、SSc 患者の群間比較において RHI を検討した (図 1)。SSc 患者群の RHI は他群のいずれに対しても有意に低下していた ($F=13.41$, $p < 0.05$)。次に MCTD 患者と SLE 患者

を対象とした場合、PAHを合併する患者のRHIは 1.75 ± 0.10 で、PAHを合併していない患者の 1.49 ± 0.06 に対して低い傾向が観察された($p=0.073$, 図2)。ROC解析によるカットオフ値は1.57であった(感度0.88、特異度0.69)。

2. レイノー現象における自律神経活動の評価について

レイノー現象前後における健常者コントロール4名およびMCTD患者8名を対象に14回レイノー現象誘発検査を行った(図3)。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。

MCTD患者では平時のLF/HFが高値で、HFは低値である傾向が認められた。また、平時のエントロピーも低下している傾向が認められた。冷水刺激時に伴うHRとLF/HFの上昇は、正常者コントロール群とMCTD患者(すなわちレイノー現象陽性者)群との間に優位な差は認められなかった。しかし、HFとエントロピーの低下は両群間で有意に異なり、冷水刺激時には両群間でほぼ同じ値になった。

D. 考察

今回の検討において、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、SLEおよびSSc患者のRHIが健常者コントロールと比べて有意な低下が確認された。

RHIの低下は、NO依存性血管拡張機能の低下を反映する事が知られているので、レイノー現象には指尖動脈NO依存性血管拡張能の低下している事が分かった。今回の検討では、SSc患者ではレイノー現象の有無とは関係なく正常者コントロールやMCTD、SLE患者よりRHIが低下していた。これは、SSc患者の指尖部の皮膚硬化が影響したと推測した。End-PATシステムが指尖部の容積変化を感知するためである。この判断の下で、SSc患者を対象から除外して、以下の検討を行う事とした。レイノー現象を有するMCTDおよびSLE患者の層別解析において、PAHを合併していた患者のRHIがさらに低い傾向が認められた事は、PAHと指尖動脈レベルのNO依存性血管拡張障害に関連性がある事を推測させる。

次に、レイノー現象誘発試験で観察された、心肺自律神経活動のダイナミズムには、レイノー現象を有する患者と健常者コントロールとの間に差がある事が分かった。すなわち、レイノー現象を有する患者(本研究ではMCTD患者)では、平時の交感神経系機能の亢進と、エントロピーの低値で示された自律神経活動の単調性が示された。

E. 結論

MCTD患者のレイノー現象にNO依存性血管拡張障害が関与している事、レイノー現象と肺動脈性肺高血圧症(PAH)との間に病態生理的な関連性が存在する事が

推察された。また、非侵襲的生理検査であるEnd-PAT、心拍変動の周波数領域解析は、レイノー現象の評価や治療への応用、PAHの早期診断に応用できる可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hashimoto A, Arinuma Y, Nagai T, Tanaka S, Matsui T, Tohma S, Endo H, Hirohata S. Incidence and the risk factor of malignancy in Japanese patients with systemic sclerosis. Intern Med. 2012, 51(13): 1683-8.
2. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, Inoue K, Ishikawa O, Kawaguchi Y, Kuwana M, Muro Y, Ogawa F, Sasaki T, Takahashi H, Tanaka S, Takehara K, Sato S. Investigation of prognostic factors for skin sclerosis and lung function in Japanese patients with early systemic sclerosis: a multicentre prospective observational study. Rheumatology 2012, 51(1): 129-33.
3. 田中住明. 強皮症腎の診断と治療の進歩: 強皮症腎クリーズ. リウマチ科 2012, 48(4): 417-421.

2. 学会発表

1. 田中住明. シンポジウム4:「リウマチ膠原病諸疾患の薬効評価法: 進歩と問題点」膠原病性肺高血圧症に対する薬物治療評価方法の進歩と問題点. 第33回日本臨床薬理学会学術総会 2012.11(沖縄)
2. 田中住明、小川英佑、和田達彦、広畑俊成. シンポジウム1:「肺循環診療・研究の現状と今後の課題」肺循環診療・研究の現状と今後の課題. 第1回日本肺循環学会学術総会 2012.9(東京)
3. Tanaka S, Ogawa E, Wada T, Nagai T, Okada J and Hirohata S. Left Ventricular Diastolic Dysfunction may play a Role in Pathophysiology and Poor Prognosis of Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Systemic Sclerosis. 76th ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2012.11(Washington DC)

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 |

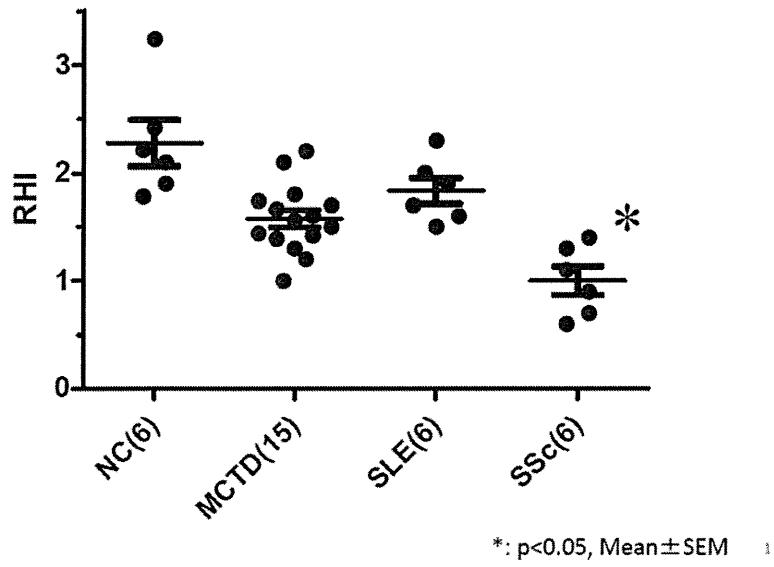


図1

図 1. 正常者コントロール(NC)、混合性結合組織病(MCTD)、全身性エリテマトーデス(SLE)患者におけるRHI.

*:ANOVA F=13.41, Post hoc comparison (Bonferroni's) $p<0.05$

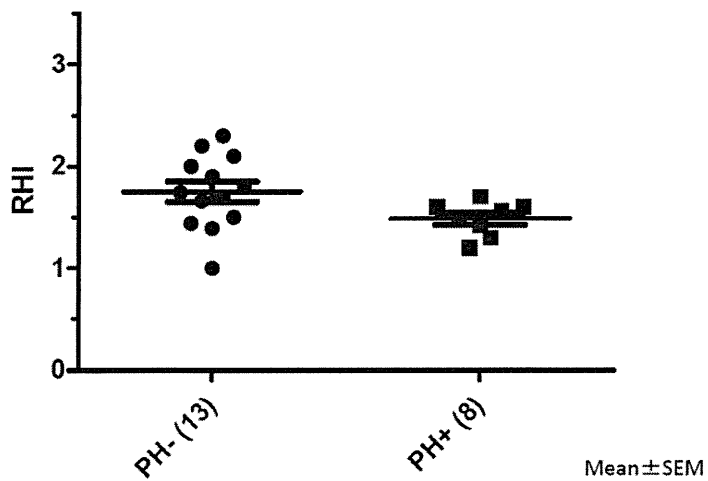


図2

図 2. 混合性結合組織病(MCTD)および全身性エリテマトーデス(SLE)患者における肺動脈性肺高血圧症(PAH)とRHIの関係.

$p=0.073$ (t-test)

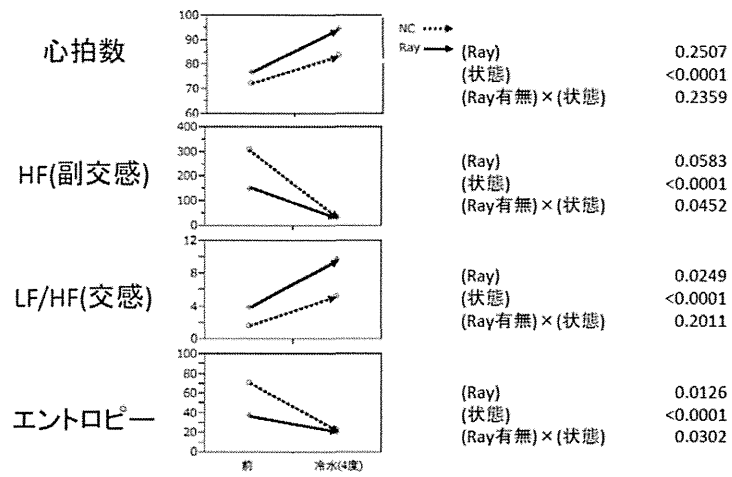


図3

図 3. レイノー誘発試験における、心肺自律神経機能のダイナミズムの検討.

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

研究分担者 松下雅和 順天堂大学膠原病内科（助教）
共同研究者 李 鍾碩 1)、山路 健 2)、田村直人 3)、高崎芳成 4)

1) 順天堂大学医学部膠原病内科 助手、2) 同 准教授、3) 同 先任准教授、4) 同 教授

研究要旨

抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体は、筋炎特異自己抗体として知られ、また間質性肺炎や関節炎をはじめとした様々な臨床像と関連性を示す。混合性結合組織病(MCTD)は、その混合所見の一部として筋症状を呈することがあるが、同疾患における抗 ARS 抗体の意義については明らかになっていない。本研究では MCTD 患者における抗 ARS 抗体の陽性率や臨床像との関連について調べ、MCTD における抗 ARS 抗体測定の有用性を検討した。

A. 研究目的

抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体は、PM/DM に特異的に見出される筋炎特異自己抗体(myositis-specific autoantibodies: MSAs)として知られ、診断、病型の分類、予後の推定、治療法の選択など臨床的に有用である¹⁾²⁾。また筋症状のみならず、間質性肺炎や関節炎をはじめとした様々な臨床像と関連を示すことも明らかになっている。ARS は対応するアミノ酸を転移 RNA (tRNA) の 3' 末端に結合させ、アミノアシル tRNA の合成反応を触媒する酵素である。20 種類すべてのアミノ酸に対応する ARS が細胞質に存在するが、これまでヒスチジル tRNA 酵素に対する抗 Jo-1 抗体を始め³⁾、8 種類の抗 ARS 抗体が報告されている。

一方、混合性結合組織病(MCTD)は、レイノー現象と手指または手背の腫脹を共通所見とし、抗 U1RNP 抗体が陽性で、かつ全身性エリテマトーデス(SLE)・強皮症(SSc)・多発性筋炎(PM)にみられる症状や所見が混在する疾患である。MCTD はその部分症状として筋炎様症状を呈することがあるが、MCTD における抗 ARS 抗体の臨床的意義は明らかになっていない。

本研究では MCTD 患者における抗 ARS 抗体の陽性率や臨床像との関連について調べ、MCTD における抗 ARS 抗体測定の有用性を検討した。

B. 研究方法

当院に受診歴のある MCTD 患者 82 名、多発性筋炎(PM)/皮膚筋炎(DM)患者 62 名を対象に抗 ARS 抗体の測定を行った。同抗体の測定には、Immunoblot 法の原理を利用した EUROIMMUNE 社の筋炎関連自己抗体検査キット「Myositis Profile 3 EUROLINE」を使用した。これは 11 種類の抗原がストリップ上に配置されているもので、抗 Jo-1 抗体、抗 PL7 抗体、抗 PL12 抗体、抗 EJ 状態、抗 OJ 抗体の 5 種類の抗 ARS 抗体を測定すること

ができる(図 1)。

まず、両疾患における前述の 5 種類の抗 ARS 抗体の陽性率を調べ、MCTD に関しては、各抗体別に MCTD の混合所見の有無を調べた。特に筋症状を有する MCTD に限局し、PM/DM と各抗体の出現パターンを比較した。

次に、抗 ARS 抗体陽性・陰性群にわけ間質性肺炎や関節炎などの臨床所見の有病率を比較検討した。特に間質性肺炎、肺高血圧症に関しては、両者の病態の有無で同抗体の陽性率を比較した。

統計学的検定には χ^2 検定を用い、P 値が 0.05 以下の場合に有意差ありとした。

(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

対象となった MCTD 82 症例の男女比は 1:5.8 で女性の比率は 85.4%であった。発症時の平均年齢 \pm SD は 36.1 \pm 17.1 歳だった。

MCTD 82 例と PM/DM 患者 62 例の抗 ARS 抗体の陽性率を、表 1 に示した。MCTD では抗 ARS 抗体全体の陽性数は 82 例中 7 例(8.5%)で、PM/DM では 62 例中 18 例(29%)であった。MCTD 患者における各抗 ARS 抗体の詳細は、抗 Jo-1 抗体が 1 例(1.2%)、抗 PL7 抗体が 4 例(4.8%)、抗 PL12 抗体が 1 例(1.2%)、抗 EJ 抗体が 1 例(1.2%)で、抗 OJ 抗体は検出されなかった。

各抗 ARS 抗体と、MCTD の混合所見の有無の一覧を表 2 に示した。抗 ARS 抗体が出現した 7 症例のうち、SLE 様所見を有する例が 7 例、強皮症様所見が 6 例、筋炎様所見が 1 例であった。次に抗 ARS 抗体の出現パターン