

ては2000年以降が多数を占めていた。本邦において、1999年頃よりCTD-PAHに対するISTの有効性についての論議が活発になってきた⁵⁾。本研究班ではCTD-PAHに対するISTを積極的に取り上げてきた。これらはその活動の効果とも考えられる。CTD自体の活動性を伴わないCTD-PAHに対するISTを肯定的に考える医師は否定的に考える医師よりも経験年数が長かった。しかし、CTD-PAHに対するISTを肯定的に考える医師の中で見てみると、経験年数が短くなるほどCTD自体の活動性を伴わないCTD-PAHに対するISTを肯定的に考えるようになるまでの期間が短くなっていた。最近では、CTD自体の活動性を伴わないCTD-PAHに対するISTに関する議論がかなり身近になったで、若い医師は医師になった時点でこれらの議論に接する機会を得るようになってきたためと考えられた。

ISTと肺血管拡張療法との関連では、両者を同時に開始する医師が30名、ISTを先行される医師と肺血管拡張療法を先行させる医師が17名で同数であった。CTD-PAH治療の当初よりISTを実施する医師が73%を占めており、多くの医師がCTD-PAH治療におけるISTを評価していると考えられた。

E. 結論

MCTD-PAHを始めとするCTD-PAHへのISTの理解は深まってきたことが確認できた。しかし、SSc-PAHへのISTに期待するとの回答が25%以上を占め、さらにCTD-PAHへのISTの理解を高める活動の必要性が示された。また、CTD-PAHの治療にはISTだけあるいは肺血管拡張薬だけでなく、これら2つの治療法を上手に取り入れて治療を考えていることが判明した。

文献

- 1) 吉田俊治. 肺高血圧症. 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 研究代表者: 三森経世・編. 混合性結合組織病の診療ガイドライン(改訂第3版) 27-32, 2011年.
- 2) Sanchez O., Sitbon O., Jais X., et al. Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* 130(1): 182-189, 2006.
- 3) Jais X., Launay D., Yaici A., et al. Immunosuppressive therapy in lupus- and mixed connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension: a retrospective analysis of twenty-three cases. *Arthritis Rheum* 58(2): 521-531, 2008.
- 4) Miyamichi-Yamamoto S., Fukumoto Y., Sugimura K., et al. Intensive immunosuppressive therapy improves pulmonary hemodynamics and long-term prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. *Circ J*

75(11): 2668-2674, 2011

- 5) 鳥飼勝隆、見山仁美、水谷昭衛ほか. 膠原病合併PHの治療に関する研究. 厚生省特定疾患 呼吸不全研究班 平成11年度研究報告書: 191-195, 2000.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuhara T., Watanabe D., Ishida N., et al. Quantitative analysis of shedding of Epstein-Barr virus in saliva from patients with connective tissue diseases: a pilot study. *Int J Dermatol.* 50(7): 887-890, 2013
- 2) Otake T., Ashihara M., Nishino J., et al. Stressors and rheumatoid arthritis: changes in stressors with advances in therapeutic agents. *Rheumatol Int.* 33(4): 887-891, 2013. ○○○○○○
- 3) 深谷修作、芦原このみ、胡桃沢芽久美. PGI2経口薬をベースとした併用療法 軽症肺動脈性肺高血圧症(PAH)患者におけるPGI2経口薬の長期使用経験(第2報) 混合性結合組織病の2例. *Therapeutic Research* 34巻9号: 1198-1200, 2013.
- 4) 胡桃沢芽久美、深谷修作. 混合性結合組織病の予後. *リウマチ科* 49巻6号: 691-698, 2013.

2. 学会発表

- 1) 深谷修作、田中住明、藤井隆夫、桑名正隆、松下雅和、川口鎮司、吉田俊治. 混合性結合組織病の肺動脈性肺高血圧症診断の改訂手引きの検証. 第1回日本肺高血圧学会.
- 2) 深谷修作、胡桃沢芽久美、高桑蓉子、伊藤義浩、加藤靖周、吉田俊治. 膠原病にともなう肺動脈性肺高血圧症の診断・病態. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2013.
- 3) 胡桃沢芽久美、深谷修作、芦原このみ、吉田晃子、金森里美、水野正巳、平野大介、登坂信子、小野田寛、西野譲、加藤賢一、吉田俊治. 強皮症患者のPH早期診断における運動負荷心エコー検査の有用性に関する検討. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2013.

G. 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（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

NPSLE 患者脳脊髄液中における自己抗体と IL-6/BAFF/APRIL に関する研究

分担研究者 藤井 隆夫
研究協力者 近藤 聖子

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
京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学

A. 研究目的

われわれは本班会議で、primary neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (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、CSF-抗 U1RNP 抗体陽性例では陰性例に比し CSF 中の IFN- α 、MCP-1 が高値となることを報告してきた。本年度は、CSF 中の IL-6、BAFF (CD257、B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family)、APRIL (CD256、a proliferation-inducing ligand) を測定し、抗 U1RNP 抗体あるいは抗 N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NR2) 抗体と相関があるかどうかを検討した。

B. 研究方法

精神神経症状を呈した SLE あるいは MCTD 77 例において、血清および CSF 中の抗 U1RNP 抗体を RNA 免疫沈降法で、抗 NR2 抗体を ELISA で測定した。また CSF 中の BAFF/APRIL は ELISA で、IL-6 は Filgen 社に依頼し、Procarta® Cytokine Assay kit を用いて Bio-Plex™ により測定した。これらの CSF 中の液性因子と、抗 U1RNP 抗体あるいは抗 NR2 抗体陽性との相関があるかどうかを検討した。

C. 研究結果

A. 1) 抗 U1RNP 抗体と液性因子

過去の成績から、血清-抗 U1RNP 抗体陰性例はすべて CSF-抗 U1RNP 抗体陰性である。対象例では、抗 U1RNP 抗体 血清・CSF 陰性例は 29

例(38%)、血清陽性・CSF 陰性例は 30 例(39%)、また血清・CSF 陽性例は 18 例(23%)であった。これら 3 群で CSF 中の IL-6、BAFF、APRIL 濃度を比較したが CSF-抗 U1RNP 抗体陽性例で陰性例に比し有意に高値となるものは存在しなかった。

2) 抗 NR2 抗体と液性因子

一方、抗 NR2 抗体では、血清で陰性であっても CSF で陽性になる症例が存在した。抗 NR2 抗体血清・CSF 陰性例は 34 例 (SnCn、44%)、血清陰性・CSF 陽性例は 10 例 (SnCp、13%)、血清陽性・CSF 陰性例は 20 例 (SpCn、26%)、血清・CSF 陽性例は 13 例 (SpCp、17%) であった。SpCp 群は SnCn および SpCn 群に比し CSF-IL-6 が有意に高濃度 ($p < 0.005$) であった。また CSF-BAFF については SpCp 群と SnCp 群で SpCn 群に比し、高濃度となる傾向 ($p < 0.1$) があつたが SnCn 群とは全く差を認めなかった。APRIL については群間で差はなかった。

D. 考察

In vitro の実験系で抗 NR2-IgG が血管内皮細胞から IL-6 や IL-8 分泌を亢進させるとする報告がある (Yoshio T, *et al*, *Arthritis Rheum*, 2012)。抗 NR2 抗体が病因的意義を有するためには血液脳関門の透過性亢進が必要であるが、中枢神経系で活性化された IL-6 が血液脳関門を傷害し、抗 NR2 抗体を CSF 中に誘導した可能性がある。一方、今回の検討では CSF-抗 U1RNP 抗体陽性 NPSLE に関する有用なデータは得られなかった。CSF 採取と同

時期の血清中 BAFF や APRIL を測定し、それらの CSF/血清比と CSF-抗 U1RNP 抗体との相関を検討したい。

E.結論

NPSLE 患者において CSF-抗 U1RNP 抗体の存在は CSF-IL-6/BAFF/APRIL 濃度に影響を与えなかったが、CSF-抗 NR2 抗体陽性症例では陰性症例に比し CSF-IL-6 が高濃度であった。

F.研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

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リウマチ内科 准教授
研究協力者 安岡 秀剛 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 助教

研究要旨

Fra-1 を高発現するトランスジェニック (TG) マウスは先行する炎症性細胞浸潤の後、間質の線維化、肺動脈の狭窄を同時期に発症する。浸潤する炎症性細胞、特に単球が病変形成に重要と考え、そのフェノタイプを検討した。年齢性別をマッチさせた Fra1 TG マウスおよび野生型マウス(WT)の肺組織を免疫組織化学、免疫蛍光多重染色により評価し、機能的な右心負荷は右心室壁厚/（左心室壁厚+心室中隔厚）比（RV/LV+IVS）で検討した。TG では WT と比較し、肺間質の線維化が進行し、($P < 0.0008$)、時間的・空間的に均一であった。また、TG の肺動脈には血管周囲の細胞浸潤、内膜・中膜の増殖と肥厚、線維化を認め、WT に比べて RV/LV+IVS が増大していた ($P < 0.002$)。さらに、TG の肺組織に浸潤する単核球の多くは M2 単球であった。Fra-1 TG マウスは M2 単球浸潤に引き続き、MCTD と類似した ILD や PAH を同時に発症し、M2 単球の病変形成への関与が考えられた。

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では間質性肺疾患(ILD)、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) が主要な死因で、自覚症状、機能の改善が得られる対症療法薬はあるものの、いまだ根治的治療法はない。ILDとPAHはいずれも肺組織のリモデリングを伴い、両者が併存することも多い。

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、MCTDにみられるILDとPAHを同時に再現するモデル動物は少なく、新規治療開発が進まない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)。さらに詳細な検討をしたところ本マウスが肺血管系の異常も伴うことを見いだした。これまでの検討では少数での検討ではあるが、肺組織では間質ならびに血管気管支束周囲の線維化、炎症性細胞浸潤を、肺動脈では内膜・中膜の線維化、増殖、肥厚、血管周囲の炎症性細胞浸潤と線維化を認め、MCTD でみられるILDやPAHの病理所見と類似していることを示してきた。さらにこのマウスではこれら所見の顕性化に先行して病変部への炎症性細胞浸潤を認め、これらが病変形成に重要な役割を持つ可能性がある。そこで本年度は対象となるマウス数を増やして線維化、血管病変について検討するとともに、組織に浸潤する炎症性細胞、特に単球の特徴について検討した。

B. 研究方法

1.対象

Fra-1 TG マウス (♀) 11 匹 (5-16 週齢) および同週齢の野生型 (WG) マウス (♀) 10 匹を用いた。Fra-1 TG マウスは全長の *fra-1* 遺伝子を組み込んだ H2K-*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を用いた。5、10、14、16、24 週のマウス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+心室中隔厚）を計算して右室肥大の程度を評価した。

3. 免疫組織化学・蛍光染色による評価

T 細胞、B 細胞、単球は免疫組織化学で検出した。切片を脱パラフィン化し、microwave 法による抗原賦活化の後、一次抗体として抗 CD3 抗体 (LabVision)、CD45R 抗体 (BD Pharmingen)、抗 CD68 抗体 (Serotec) と室温で 1 時間反応させた。それぞれ二次抗体として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。また、蛍光多重染色により M1 サブセット (CD68⁺CD206⁻細胞)、M2 サブセット (CD68⁺CD206⁺細胞) を検出した。一次抗体として抗 CD68 抗体および抗 CD206 抗体 (Abcam) を用いた。光学顕微鏡 (Olympus BX81) を用い、高倍率 (400x) 1 視野における陽性細胞数を計数し、TG マウスと WT マウスで比較した。

4. 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 WT マウスと比較し、肺間質の線維化が進行、Ashcroft の線維化スコアでも有意な線維化を認め ($P < 0.0008$) (図 1)、その分布は特に血管気管支束・間質の線維化が著明で、どの週齢においても時間的・空間的に均一であった。

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。また組織学的に右室壁の肥厚も認め ($P < 0.002$)、右室負荷が確認された。

さらに浸潤する炎症性細胞浸潤を免疫蛍光染色で検討した。一視野あたりの細胞数を TG マウスと野生型で比較すると、TG マウスでは単球が有意に多く浸潤していた。浸潤する単球は TG マウスで WT と比較し、M2 優位であった (図 2)。

D. 考察

今回の検討では、マウスを増やし肺に着目して Fra-1 TG マウスの形質を検討した。その結果、これまでと同様、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。さらに本マウスの特徴としてこれら形質の顕在化に先立ち、炎症性細胞の浸潤を認めていた。今回の検討で、浸潤細胞は主に M2 単球であることが明らかとなった。単球のサブセットについては組織、動物種などで差があり議論があるものの、M1 は細胞障害、M2 は免疫制御や線維化への関与が提唱されている(3)。したがって、TG マウスでは単球が M2 への分化を介して線維化や血管リモデリングの誘導に関わっているかもしれない。また、昨年度の検討で MCTD・SSc 患者末梢血単球では Fra-1 の高発現がみられ、肺組織に Fra-1 を発現する M2 単球の浸潤を認めたことを報告した(4)。したがって、Fra-1 高発現が M2 単球への偏倚を惹起することで ILD や PAH の病変形成に関与する可能性が考えられた。現時点で Fra-1 高発現が M2 への偏倚を促進する機序は明らかでないが、M2 単球あるいはその分化過程が MCTD に伴う肺病変の新たな治療標的となる可

能性が示された。

E. 結論

Fra-1 を高発現するマウスは ILD と PAH の病態解析に有用なツールである。M2 単球の組織リモデリングにおける役割の追究は MCTD の難治性病態の病態解明、新規治療法の開発に有用である。

(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. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004; 25(12): 677-686.
4. 桑名正隆、安岡秀剛. MCTD の病態における単球の役割に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 混合性結合組織病の病態解明、早期診断と治療法の確立に関する研究 平成 24 年度 総括・分担研究報告書 p17-22.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda A, Yasuoka H, Satoh T, Okazaki Y, Yamaguchi Y, and Kuwana M. Versican is upregulated in circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and amplifies a CCL2-mediated pathogenic loop. *Arthritis Res. Ther*. 2013; 15(4): R74.
2. Kuwana M, Watanabe H, Matsuoka N, and Sugiyama N. Pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease: meta-analysis of clinical trials. *BMJ Open*. 2013; 3: e003113.
3. 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*. 2013; 23(6): 1211-1220.
2. 学会発表
1. Kuwana M, Shirai Y, Yasuoka H, Masui K: Risk stratification of pulmonary arterial hypertension in routine rheumatology clinics: roles of clinical diagnosis and antibody testing. 5th International SSc Forum 2013 (Prague). 2013. 10.

2. Yasuoka H, Shirai Y, Tamura Y, Satoh T, Takeuchi T, Kuwana M: Baseline characteristics that predict a short-term response to immunosuppressive treatment in patients with pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. The 77th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Diego). 2013. 10.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

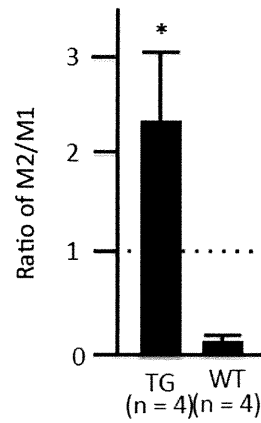


図2. Fra-1 トランスジェニック(TG)マウスおよび野生型マウス(WT)における単球サブセット M1 に対する M2 の比率. * $P < 0.05$

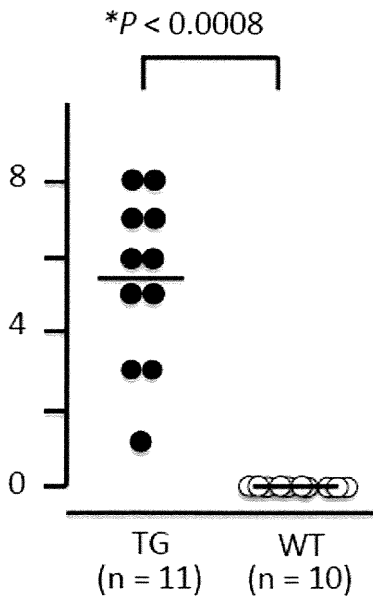


図1. Fra-1 トランスジェニック(TG)マウスおよび野生型マウス(WT)における肺線維化の比較(Ashcroft score による)

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 MCTD 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 リウマチ・感染症内科学 教授

研究要旨

MCTD 患者血清中に存在することが知られている抗血管内皮細胞抗体 (AECA) を、新たに開発した CSP-ELISA 法で測定した。細胞表面のタンパクをビオチン化し、立体構造をできるだけ保持した状態で抗原として使用するのが CSP-ELISA の特徴である。MCTD 生体試料バンクの 200 検体を CSP-ELISA で測定したところ、IgG-AECA が 97%、IgA-AECA が 20% の陽性を示した。IgG-AECA、IgA-AECA が結合している自己抗原を同定すること、また自己抗体価と病態との関連を見つけることで、MCTD の診断に利用できる可能性を示すことができた。

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 (Anti-endothelial cell antibody: 抗血管内皮細胞抗体) が存在することが 40 年以上前から知られているが、混合性結合組織病 (MCTD) においても約半数の患者において陽性になるとの報告がある。多くの研究者が、AECA が結合する血管内皮細胞表面上の自己抗原の探索を行ってきた。しかし、未だに解明されていない点が多い。細胞表面抗原に対する自己抗体検査法の種類は少なく、AECA を測定するための標準化された方法もこれまでなかった。既知の自己抗原の多くが細胞内局在タンパクであり、MCTD の診断マーカーになっている U1-RNP も RNA スプライシングに関与するタンパクで細胞内に局在するタンパクである。不思議なことに抗 U1-RNP 抗体価と MCTD の病態とは直接関連はないが、MCTD で特異的に観察されるため診断マーカーとして使われているのが現状である。MCTD 患者血清中に存在する AECA は、細胞表面の何に結合しているのか？細胞表面上での抗原抗体反応を明らかにすることは、血管炎の発症の解明にも繋がり、自己抗原の同定は、MCTD の新たな診断マーカーになることが期待できる。AECA に焦点を当てた新たな測定法として、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 ELISA 法 CSP-ELISA (solubilized cell surface protein-capture ELISA) を 2012 年に開発できたことから、MCTD 患者血清中の AECA を CSP-ELISA で測定し、AECA 抗体価と病態との関連を見つけることを研究目的とした。

B. 研究方法

血管内皮細胞を使用する研究では、臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) が最も使用されているが、臍帯が特殊な組織であること、さらに MCTD の病態の特徴として肺高血圧症があることから、肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC) を使

用することにした。まず HPAEC の細胞表面タンパクのリジン残基を、Sulfo-NHS-LC-Biotin でビオチン化した。このビオチン化試薬は、生きた細胞では細胞内に取り込まれないため、細胞内に存在する自己抗原はビオチン化されず、多くの既知の自己抗原を排除できることを想定した。ビオチン化処理した HPAEC をホモジナイズにより破碎し、可溶性画分を除去後、1% n-dodecyl- β -D maltopyranoside (DDM) で可溶化し膜画分とした。その膜画分を、予めビオチン結合タンパク NeutrAvidin 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。DDM は、膜タンパク研究において汎用性の高い界面活性剤として知られることから、膜タンパクあるいはその複合体の立体構造をできるだけ保持したまま固相化できることを期待した。ELISA ウェル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。この新たな測定法が CSP-ELISA である。自己抗体のアイソタイプについては、IgG と IgA を検出した。MCTD 患者血清は、本研究班の活動として集められた MCTD 生体試料バンクの 200 検体を使用した。

(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た。また、MCTD 生体試料バンクについては、各研究協力施設において倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) CSP-ELISA による IgG, IgA 自己抗体の測定
MCTD 生体試料バンクの血清 200 検体と健常人 (HC) 血清 121 検体について測定を行った。測定のための血清は、IgG については、200 倍希釈、IgA については 100 倍希釈した。(図 1, 2)

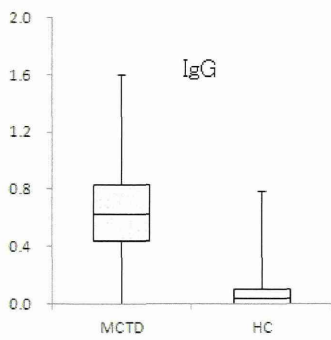


図 1 CSP-ELISA による IgG 自己抗体の測定

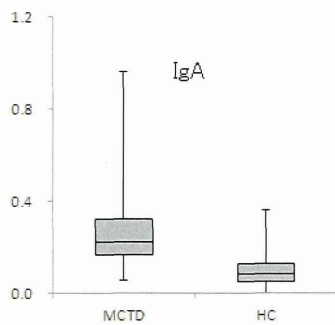


図 2 CSP-ELISA による IgA 自己抗体の測定

健常人(HC)の測定値から求めたカットオフ値(平均値+2σ)は、IgGで0.23、IgAで0.35になった。MCTDでの陽性率は、IgGで194/200(97%)、IgAで40/200(20%)になった。

2) CSP-IgG 値、CSP-IgA 値の相関

CSP-IgG 値と CSP-IgA 値との相関係数は 0.40 になり、中程度の正の相関が見られた。(図 3)

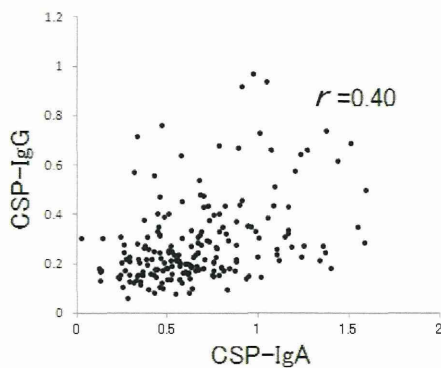


図 3 CSP-IgG と CSP-IgA の相関性

3) 他の自己抗体価との相関性

CSP-IgG 値は、抗 U1-RNP 抗体価との間に中程度の正の相関が見られたが、CSP-IgA 値と抗 U1-RNP 抗体価との間には相関は見られなかった。また、抗 DNA 抗体、抗 Sm 抗体については、CSP-IgG 値、CSP-IgA 値共にほとんど相関は見られなかった。(図 4)

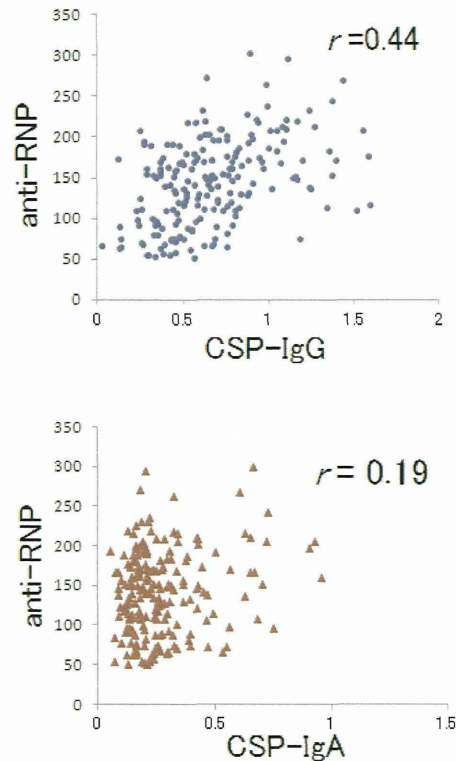


図 4 抗 U1-RNP 抗体との相関性

D.考察

新たに開発した CSP-ELISA で、抗 U1-RNP 抗体陽性患者だけを対象にした MCTD 生体試料バンクの血清中の IgG、IgA 自己抗体を検出することができた。IgG については、97%という高率で陽性を示した。U1-RNP は、RNA スプライシングに関するタンパクで細胞内に局在すると考えられるため、正常に生育させた血管内皮細胞の細胞表面に発現しているとは考えにくい。従ってビオチン化されておらず、CSP-ELISA のウェルに存在していないと考えられ、検出されている IgG、IgA 自己抗体は、未知の自己抗原に結合していると考えられる。しかしながら、CSP-IgG 値に関しては、抗 U1-RNP 値との間に中程度の正の相関性が見られたことは興味深い。U1-RNP と似たエピトープを持ったものがウェル上に存在しているのかもしれない。

図 3

E.結論

AECA の測定を標準化でき、かつ多検体にも対応できる新たな測定法 CSP-ELISA は、MCTD 患者血清中の AECA 測定にも適用できた。自己抗体が結合している自己抗原を同定すること、CSP-ELISA 値と病態との関連を見つけることで、MCTD の診断に役立つ方法になり得ると判断できた。

F.研究発表

1.論文発表

Miura K, Aoun K, Yoshida S, Kurosawa Y.
Autoantibodies directed against labile epitopes on cell surface proteins in autoimmune disease patients: Proposal of a novel ELISA for the detection of anti-endothelial cell antibodies. J.Immunol.Methods. 2012. 382(1-2):32-39.

2.学会発表

Keiji Miura, Ayako Kondo, Kazuo Takahashi, Daisuke Hirano, Yoshiyuki Hiki, Shunji Yoshida, Yukio Yuzawa, Yoshikazu Kurosawa. Autoantibodies Directed Against Cell Surface Components in Autoimmune Disease Patients: Proposal of a Novel ELISA for the Detection of Anti-Endothelial Cell Antibodies. American College of Rheumatology, annual meeting. 2013.10 (SanDiego). (poster presentation)

G. 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

該当なし

3. その他

該当なし

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 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(LIP-TFH)に分化しうることを明らかにしている。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、LIP-TFHの分化過程を明らかにするため、従来の研究により明らかとなっているT細胞ホメオスターシスと腸内細菌叢の関わりから、本系における自己免疫と腸内細菌との関連を検討した。その結果、LIP-TFHの分化や全身性及び臓器特異的自己抗体の産生に腸内細菌叢が関わっており、TLR9がこの過程に重要な役割を担っている可能性が示唆された。従来の免疫抑制療法と異なる新規治療法を考える上で、本研究により明らかとなった腸内細菌と自己免疫との関連は重要な知見と考える。

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Toll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) 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、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、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) 腸内細菌の関与を検討するためのマウスの作成

腸管滅菌は、8週令のヌードマウスを購入後、バンコマイシン、メトロニダゾール、イミペネム、シプロフロキサシン、アンホテリシンBを継続的に経口投与することで行った。抗生剤投与1週間以上を経て、CD4⁺T細胞を移入し自己抗体やTfh分化について検討を行った。

(2) 抗RNP抗体誘導モデルの解析

1) 実験系

Balb/cマウスより採取したCD4⁺T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 \times 10⁶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 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°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 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°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。

(倫理面への配慮)

動物実験は動物実験委員会にて承認された実験計画書に従い遂行する。組換え DNA 実験に関しても、東京大学第二種使用等拡散防止争議機関確認・承認申請書を得て遂行している。

C. 研究結果

(1) TLR7 および TLR9 の抗核抗体産生への関与

TCR α 鎖および TLR7 または TLR9 を欠いた、TCR α 欠損 TLR7 欠損マウスと TCR α 欠損 TLR9 欠損マウスを作成した。TCR α 欠損マウスでも、ヌードマウスと同様に、長期間の観察により抗核抗体が自然発生することを観察したが、TCR α 欠損 TLR9 欠損マウスでは抗核抗体産生が全く見られなかった (n=5)。一方 TCR α 欠損 TLR7 欠損マウスでは TCR α 欠損マウスと同程度の抗核抗体産生が見られた。この結果により、抗核抗体産生誘導の経路において、TLR9 が重要な役割を果たしていることが示された。

(2) 腸内細菌の Tfh 分化への影響

抗生剤投与開始から 10 日後に CFSE ラベルした

Thy1.1+CD4+CD25-細胞を移入し、5 日目の脾臓を flow cytometry で解析したところ、移入細胞の分裂は抗生剤投与群ではほとんど消失しており、PD-1+細胞への分化もほとんど見られなかった (図 1)。組織学的検討では Tc 細胞移入で見られた GC 形成が、抗生剤投与により消失していた (図 2)。以上より本系における移入細胞の LIP および LIP-TFH への分化には、腸内細菌の存在が必須であることが示された。

(3) 腸内細菌の自己抗体産生への影響

上記の実験と同様に腸管滅菌を行ったうえで、Tc 細胞または Tc+Treg 細胞を移入して 14 週後の抗 ds-DNA 抗体および抗胃壁抗体を ELISA にて測定した。Tc 細胞移入によって見られた抗 ds-DNA 抗体と抗胃壁抗体の上昇は、抗生剤投与によって 14 週間にわたって抑制されていた (図 3)。本実験において非移入群のヌードマウスでも長期間経つと、早期には見られなかった抗 ds-DNA 抗体の上昇が認められることが判明したが、それも抗生剤投与により抑制されていた。Tc+Treg 移入群では抗生剤投与の有無にかかわらず抗 ds-DNA 抗体価の上昇は抑制されていた。以上より腸内細菌の存在は、LIP-TFH を介した自己抗体産生においても必須であることが示された。また、Tc を移入しないヌードマウスでも長期間の観察では抗核抗体が上昇することから、LIP-TFH はリンパ球減少マウスにおける自己抗体産生において抗胃壁抗体のように必須である場合と、抗 ds-DNA 抗体のように単に促進的に働く場合があることが示された。

(4) 抗生剤の組み合わせの検討

上記の 5 種の抗生剤のうち、どの組み合わせが最も効果的であるかを検討するため、CPF_X、IPM、AMB をそれぞれ除いた 4 剤の組み合わせを作成して Tc 移入ヌードマウスに投与し、14 週時点での抗 ds-DNA 抗体価を 5 剤投与群および非投与群と比較した。いずれの 4 剤の組み合わせにおいても非投与群と比較し抗体産生抑制効果が見られたが、5 剤投与群と比較し CPF_X を除いたものでは抑制効果が劣り、IPM もしくは AMB を除いたものでは 5 剤投与群と差が見られなかった。この結果より、CPF_X の必要性および MTZ と VCM の 2 剤もしくはどちらかの重要性が示唆された (図 4)。

図 1

Depletion of intestinal microbiota significantly reduced LIP and production of LIP-T_{FH} cells

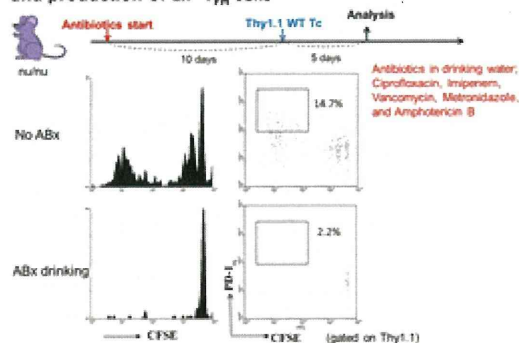


図 2

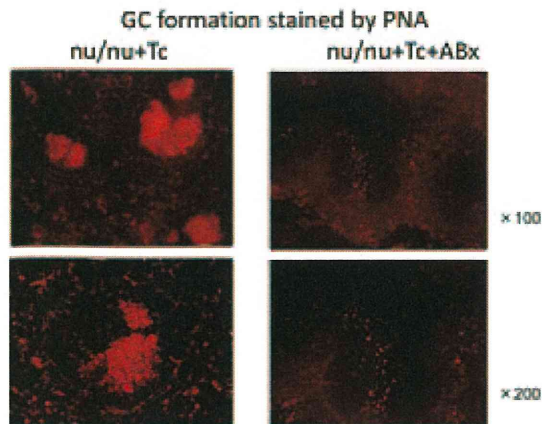


図 3

Antibiotics inhibit antibodies production (3 months)

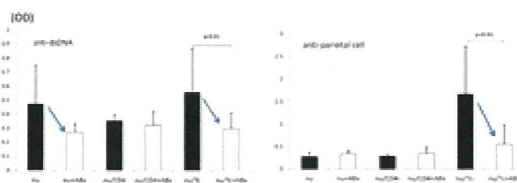
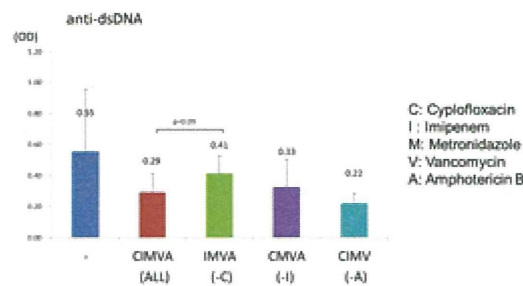


図 4

Effect by combination of antibiotics



D. 考察

腸内細菌を除去すると Tfh への分化および自己抗体が減少したことから、何らかの腸内細菌の認識が自己免疫を惹起していると考えられた。これまでの報告では、rapid spontaneous proliferation では細菌抗原から TLR を介した刺激が樹状細胞に伝わり IL-6 とともに T 細胞分裂を促していることが判明しており、今回の研究で明らかになった TLR9 の重要性とともに、本系でもその経路が働いている可能性がある。

自己免疫原性の腸内細菌を同定することができれば従来の免疫抑制治療とは異なるアプローチの新規治療が

生まれる可能性があり、今後の展開が望まれる。

E. 結論

MCTD の疾患概念に深く関係している抗 RNP 抗体を短期間に高率に高抗体価で誘導できる系を樹立した。本系を用いて、自己抗体産生に Tfh が関係する一方で制御性 T 細胞が抑制していること、TLR9 および腸内細菌が Tfh 分化や自己抗体産生に関与していることを明らかになった。

F. 研究発表

1, 論文発表

- 1) Imamura M, Sasaki O, Okunishi K, Nakagome K, Harada H, Kawahata K, Tanaka R, Yamamoto K, Dohi M. Perillyl alcohol suppresses antigen-induced immune responses in the lung. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 2
- 2) 川畑 仁人, 中枢神経日本内科学会雑誌 102 巻 p2532-2542, 2013
- 3) 川畑 仁人, 今後期待される関節リウマチ治療薬, *Progress in Medicine* 33 巻 p1953-1957, 2013
- 4) 川畑 仁人, 混合性結合組織病 最新医学 68 巻 6 月増刊 p1254-1264, 2013
- 5) 川畑 仁人, カルシニューリン阻害薬タクロリムス別冊 *Bio Clinica: 慢性炎症と疾患* 2 巻 p20-25, 2013
- 6) 川畑 仁人, この症例から何を学ぶか 唾液腺腫脹を認めた関節リウマチの 3 例 *Medical Practice* 30 巻 p698-701, 2013

2, 学会発表

- 1) 第 41 回日本臨床免疫学会総会
1, 道下 和也, 川畑 仁人, 神崎 健仁, 赤平 理紗, 江里 俊樹, 山本 一彦, 修飾自己抗原テトラマーを用いた特異的 B 細胞除去による関節炎モデルマウスの治療 *日本臨床免疫学会誌* (0911-4300) 36 巻 5 号 Page399
- 2, 江里 俊樹, 川畑 仁人, 今村 充, 神崎 健仁, 赤平 理紗, 道下 和也, 土肥 眞, 徳久 剛史, 山本 一彦, 免疫疾患のホットトピック 基礎から臨床まで 腸内細菌は Lymphopenia-Induced Autoimmunity における抗核抗体産生を誘導する *日本臨床免疫学会誌* (0911-4300) 36 巻 5 号 Page331 (2013. 10)
- 2) 第 42 回日本免疫学会学術集会
3, Kazuya Michishita, Kimito Kawahata, Lisa Akahira, Toshiki Eri, and Kazuhiko Yamamoto, Targeting therapy of citrullinated antigen-specific B cells ameliorates collagen-induced arthritis in mouse model of rheumatoid arthritis.
- 4, Toshiki Eri, Kimito Kawahata, Mitsuru Imamura, Takeyuki Kanzaki, Lisa Akahira, Kazuya Michishita, Makoto Dohi, Takeshi Tokuhisa, and Kazuhiko Yamamoto, Intestinal Microbiota Plays A Critical Role In The Production Of Antinuclear Antibodies In

Lymphopenia-Induced Autoimmunity

3) 日本リウマチ学会

5, 土田 優美, 庄田 宏文, 住友 秀次, 久保 かなえ, 川畑 仁人, 山本 一彦, トシリズマブが奏功した成人発症 Still 病の 4 例 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 57 回・22 回 Page298 (2013. 03)

4) 2013 American College of Rheumatology Annual Meeting

6, Kazuya Michishita, Kimito Kawahata, Lisa Akahira, Toshiki Eri, and Kazuhiko Yamamoto, Targeting therapy of citrullinated antigen-specific B cells attenuates collagen-induced arthritis in mouse model of rheumatoid arthritis.

7, Toshiki Eri, Kimito Kawahata, Mitsuru Imamura, Takeyuki Kanzaki, Lisa Akahira, Kazuya Michishita, Makoto Dohi, Takeshi Tokuhisa, and Kazuhiko Yamamoto, Intestinal Microbiota Plays A Critical Role In The Production Of Antinuclear Antibodies In Lymphopenia-Induced Autoimmunity

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 (MCTD) における unmet needs と新規治療薬の開発に関する研究

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

研究要旨

過去の MCTD 班報告書で我々が報告してきた様に、MCTD を始めとする自己免疫疾患の治療法は依然としてプレドニゾンや免疫抑制剤を用いた非特異的治療法が主体であり、しかもこれらの治療法が有効でない症例が一定数存在することが問題となっている。これらの治療のためにはいわゆる unmet needs に該当する治療法の開発が必須である。他方、MCTD などの免疫学的基礎過程に「非古典的」NF- κ B の活性化カスケードが関与することを示す複数の実験的エビデンスが得られ、また臨床的にも本カスケードの亢進を示唆する事実が知られている。そこで、本研究では NF- κ B 活性化の「非古典的」カスケードに特異的に作用する阻害剤の開発を行った。

A. 研究目的

MCTD や SLE などの全身性自己免疫疾患に対する治療薬の選択肢は極めて限られており、しかも PSL や免疫抑制剤など非選択的な薬剤が主体である。一方でこれらの疾患の複雑な病態の分子レベルの理解が進んだ。その中で免疫炎症応答における一連の遺伝子発現制御に関わる誘導型転写因子 NF- κ B の作用が病因解明の鍵としてのみならず治療の標的としても注目されるようになった。NF- κ B は、通常は発生の早い段階で除去される自己反応性リンパ球の生存にも関与することが示唆されている。NF- κ B は細胞内シグナル伝達系を介して活性化されるがその経路には「古典的」と「非古典的」経路の二つの独立なものが存在する。前者に対する阻害化合物は早くから開発が進んだが、その作用が普遍的であり、個体レベルで強い副作用が出現するため一部を除き薬剤開発には至っていない。他方、後者の経路に対する特異的阻害剤はこれまでになかった。我々は後者の経路で中心的な役割を担う IKK α に対する特異的阻害剤を初めて見出し報告した (Asamitsu et al, 2008; 特許申請中)。その IKK α 特異的阻害作用と小動物を用いた個体レベルでの生物活性を調べたので、その結果を報告する。

B. 研究方法

薬剤化合物はキナーゼが共通に使用する ATP に類似するヌクレオシド化合物による NF- κ B 作用のスクリーニングによって見出した。阻害活性を認めた化合物の

IKK α および β に対する直接の阻害活性は in vitro kinase assays, endogenous assay と exogenous assay によって行った。今回は化合物の生物活性をコラーゲン誘導関節炎 (CIA) を感受性マウスに誘導し、リウマチ類似関節炎の出現阻止効果と治療効果によって評価した。

(倫理面への配慮)

当研究課題は該当せず。

C. 研究結果

ATP の糖部分を炭素環に置換した NAM (noraristeromycin) は培養細胞における NF- κ B 依存性遺伝子発現を μ M オーダーで抑制した。次いで、細胞に内在する IKK 複合体を免疫沈降し精製した I κ B α を加えて in vitro kinase assay を行ったところ、IKK α 複合体による作用を特異的に阻害した。この作用は細胞にタグ付き IKK α 遺伝子を共発現させて得た IKK α 複合体で再現性よく見られたが、IKK β 遺伝子を共発現させた場合には阻害活性は見られなかったことから IKK α に対する特異性が確認された。また、マウスを用いた collagen-induced arthritis (CIA) の実験系で調べたところ、比較的低容量で preventive にも therapeutic にも高い有効性が得られた (Ito et al., Mod Rheum. 2014, in press)。図 3 は発症予防効果を示すが、CIA の発症早期に投与した際の治療効果も有意に観察された。

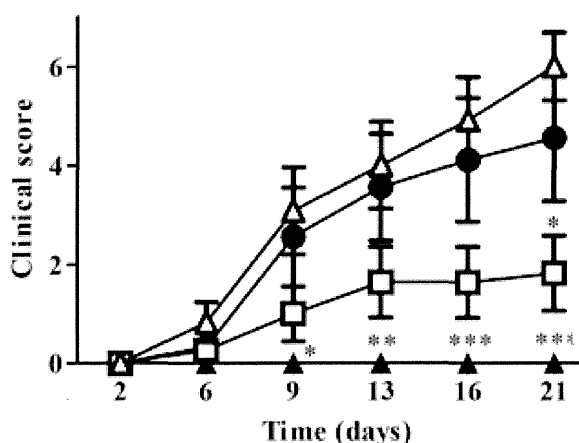


図3 NAM投与によるCIAマウスモデルでのRA様関節炎の発症予防効果。動物実験は一群あたり9-12頭で実施。NAMは0, 0.03, 0.1, 0.3 mg/kg投与した。縦軸は関節炎の臨床的所見のスコア、各点の偏差はSEMで示した。

D. 考察

IKK α を中核とする「非古典的」NF- κ B活性化経路が自己免疫疾患と深く関わっていることを示唆する報告は数多く存在する。また、上記の実験からNAMはIKK α に対する選択的で強い阻害効果を持ち、しかも生物学的にも高い有効性を示すことが明らかになった。現時点ではまだaffordableなMCTDの動物実験モデルもしくは細胞培養系モデルが存在しないためにMCTDに対する治療効果については不明であるが、今年度の研究でCIAでは個体レベルでの有効性が立証できた。また、MCTDに高頻度に合併する肺高血圧症の培養細胞実験モデルを構築中であるので、次年度以降にその効果を検討すべきであると考えている。

E. 結論

IKK α は「非古典的」NF- κ B活性化経路の中核分子であり、MCTDを始めとする自己免疫疾患に対するより特異的な治療標的と考えられる。我々が見出したNAMおよびその誘導体はその有力な候補化合物である可能性が実験的に示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cueno ME, Imai K, Okamoto T, Ochiai K.: Overlapping glycosylation sequon influences the glycosylation pattern of a chimeric protein expressed in tomato leaf and callus. *J Biotechnol.* 2013. 10;164(1):9-12.
- 2) Okamoto T.: Dual Use in Pathogen Research. *JDR.* 2013. 8:714-716.
- 3) Victoriano AF, Imai K, Okamoto T.: Interaction

between endogenous bacterial flora and latent HIV infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2013. 20: 773-779.

- 4) Suzuki T, Kasuya Y, Itoh Y, Ota Y, Zhan P, Asamitsu K, Nakagawa H, Okamoto T, Miyata N.: Identification of highly selective and potent histone deacetylase 3 inhibitors using click chemistry-based combinatorial fragment assembly. *PLoS One.* 2013. 8: e68669
- 5) 岡本 尚: 2.病原体研究のデュアルユース (dual use) 問題について *ウイルス* 2013. 63(1): 89-92.
- 6) 日本学術会議基礎医学委員会病原体研究に関するデュアルユース問題分科会: 提言 病原体研究に関するデュアルユース問題 日本学術会議 2014.
- 7) Ito M, Hamano T, Komatsu T, Asamitsu K, Yamakawa T, Okamoto T.: A novel IKK α inhibitor, noraristeromycin, blocks the chronic inflammation associated with collagen-induced arthritis in mice. *Mod Rheumatol.* 2014 (in press)

2. 学会発表

- 1) Takashi Okamoto
Structural Bioinformatics of molecular recognition between HIV-1 Tat and host factor Cyclin T1
UST Symposium
Manilla(Phillipines), 2013 Nov 26.
- 2) NH Tan Gana, T Onuki, AFV Victoriano, K Asamitsu and T Okamoto
Towards understanding the dynamics of cellular microRNAs targeting HIV-1 LTR and its proposed roles in antiretroviral therapy development
Keystone Symposia Conference RNA Silencing
Seattle (USA), 2014 Jan 31-Feb 5.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

混合性結合組織病における心拍変動の周波数領域解析に関する研究

研究分担者 北里大学医学部 膠原病感染内科学 田中 住明 診療准教授
研究協力者 北里大学医学部 膠原病感染内科学 和田 達彦 助教
研究協力者 北里大学医療衛生学部 リハビリテーション学科 増田 卓 教授
研究協力者 北里大学医学部 膠原病感染内科学 廣畑 俊成 教授

研究要旨

レイノー現象に伴う指尖内皮機能評価の確立と肺高血圧症早期診断への応用レイノー現象と心臓病変に関する研究において、レイノー現象のある膠原病患者の常時の自律神経活動に特徴がある事が、昨年の成果から示唆された。このため本年度は、レイノー現象のある膠原病患者(肺高血圧症や心疾患を合併していない事を日常診療において鑑別さされている)に施行された 24 時間ホルター心電図の心拍変動データ(混合性結合組織病 10 シリーズ、全身性強皮症 5 シリーズ、全身性エリテマトーデス 4 シリーズ)を、MemCalc™法を用いた周波数領域解析を行い、レイノー現象を有する膠原病患者の常時の自律神経活動の特徴を明らかにする事を試みた。さらに、心肺臓器病変との関連、膠原病の種類による差などを明らかにする事も試みた。交感神経活動の指標である LF/HF は全身性強皮症が最も高く、混合性結合組織病、全身性エリテマトーデスの順に低くなった。全身性強皮症と混合性結合組織病は、全身性エリテマトーデスと比べて優位に高値であった。心臓超音波による推定肺動脈圧が 35mmHg を越える症例では、LF/HF が高値である傾向が認められた。一方、副交感神経活動の指標である HF はこの 3 つの膠原病において有意な差は認められなかった。レイノー現象を有する 3 つの膠原病で、交感神経活動の恒常的な亢進状態が明らかにされた。さらに、その活動性は高い順に SSc、MCTD、SLE と疾患ごとに有意差があり、同じレイノー現象が観察される疾患での差が明らかにされた。また、推定肺動脈圧と交感神経活動の関連が認められた事は、肺高血圧症の診断や治療の指標に応用できる可能性を示唆しているものと考えられた。

A.研究目的

レイノー現象に伴う指尖内皮機能評価の確立と肺高血圧症早期診断への応用レイノー現象と心臓病変に関する研究の昨年度の成果において、レイノー現象のある膠原病患者では、常時の自律神経活動がレイノー現象のない膠原病患者および正常健常者と異なることが示唆された。本年度はこの点に注目し、ホルター心電図で得られた心拍変動を対象として、レイノー現象を有する膠原病患者の常時の自律神経活動の特徴を明らかにする事を目的とした。さらに、心肺臓器病変との関連、膠原病の種類による差などを明らかにする事も試みた。

B.研究方法

① 対象

混合性結合組織病(MCTD)患者 10 名、全身性強皮症(SSc)患者 4 名、全身性エリテマトーデス(SLE)患者 4 名の日常診療で行われた 24 時間ホルター心電図から収集した心拍を用いて心拍変動解析を行った。

② 心拍変動解析

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。

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

③ 統計解析

周波数解析及び統計解析は、MemCalc、JMP 及び STATA を用いて行った。群間のパラメータ比較には分散分析を用いた。また、各疾患における自律神経活動指標の比較には、線形混合モデル(fixed effect: 疾患群、random effect: 患者)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、及びホルター心電図は、保険収載されている。本研究は探索的な要素が強いため、観察研究の手法を選択し診療記録を用いて行った。

C. 研究結果

MemCalc による周波数領域解析で得られた LF/HF と HF は 10 秒ごとに平均値を算出したため、1 シリーズには 8640 個の測定値が含まれた。それらの分布は対数正

規分布であったため、以後の解析には各々の対数変換値を用いて行った(図1)。

LF/HF(対数変換)は高い順にSSc(平均 0.686605, 95%CI 0.498072 - 0.875138)、MCTD(平均 0.474485, 95%CI: 0.385598 - 0.563372)、SLE(0.255910, 95%CI: 0.101954 - 0.409867)であった。MCTDとSScでは、SLEより有意に高値であった(図2)。心臓超音波による推定肺動脈圧が35mmHgを越える症例では、LF/HF(対数変換)が高値である傾向が認められた。

一方、HFはこの3つの膠原病において有意な差は認められなかった。

D. 考察

レイノー現象を有する3つの膠原病で、交感神経活動の恒常的な亢進状態が明らかにされた。さらに、その活動性は高い順にSSc、MCTD、SLEと疾患ごとに有意差があり、同じレイノー現象が観察される疾患での差が明らかにされた。また、推定肺動脈圧と交感神経活動の関連が認められた事は、肺高血圧症の診断や治療の指標に应用できる可能性を示唆しているものと考えられた。

E. 結論

レイノー現象を有する膠原病においては交感神経活動の恒常的な亢進状態が存在し、その活動性はSSc、MCTD、SLEにおいて異なった

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. Serum chemokine levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicenter, prospective, observational study. *Mod Rheumatol*. 2013. 23(6):1076-84
2. 田中住明. 我が国における肺高血圧症の最新治療の現状 膠原病性肺高血圧症の標準的治療の現状. *Therapeutic Research* 2013. 34(9) 1213-1215
3. 田中住明, 荘 信博. 【肺高血圧症の最新治療戦略】 膠原病に伴う肺高血圧症 治療の開始時期とゴール. *Circulation* 3(10) 2013, 44-52
4. 田中住明. 【リウマチ・膠原病における重要臓器障害と難治性病態・病態と治療の進歩】 トピックス 難治性の病態 肺高血圧症." *日本内科学会雑誌* 2013. 102(8) 2613-2620

2. 学会発表

1. 田中住明. 長期治療成績から考察する膠原病性肺動脈性肺高血圧症の治療戦略. 第57回日本リウ

マチ学会総会・学術集会・第22回国際リウマチシンポジウム2013. 4 (京都) (同抄録集 711)

2. 田中住明. 膠原病性肺高血圧症治療における免疫抑制薬・肺動脈性肺高血圧症治療薬の使用のポイント. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会・第22回国際リウマチシンポジウム2013. 4 (京都) (同抄録集 724)
3. 田中住明, 小川英佑, 和田達彦, 永井立夫, 廣畑俊成. シンポジウム1 膠原病関連PAHの治療戦略「膠原病関連PAHの治療戦略」についての現状. 第2回日本肺循環学会学術総会 2013. 6 (東京)
4. 田中住明, 松枝祐, 荘信博, 原亮祐, 和田達彦, 廣畑俊成. シンポジウム3 膠原病に伴う肺高血圧症の特殊性と最新知見「肺高血圧症臨床分類における膠原病合併肺高血圧症の特殊性」第1回日本肺高血圧症学会学術総会 2013. 10 (横浜)
5. **Tanaka S**, Arinuma Y, Wada T, Nagai T, Okada J and Hirohata S. Left Ventricular Dysfunction Reflected By Higher Serum Brain Natriuretic Peptide Accounts For Poorer Prognosis of Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Systemic Sclerosis. 77th ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2013.10(San Diego)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

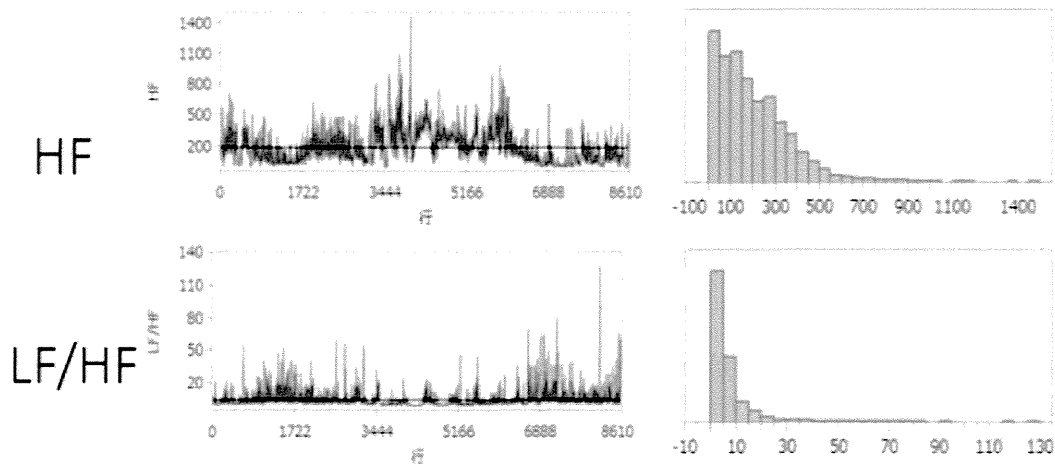


図 1
 レイノー現象に伴う混合性結合組織病 30 歳女性
 左図は HF と LF/HF のトレンドグラフ、右図はヒストグラム

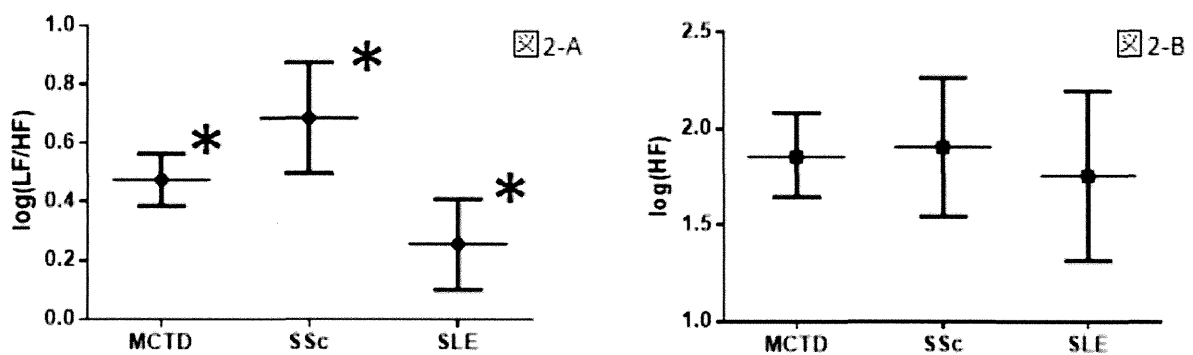


図 2
 24 時間心拍変動の解析(交感神経活動指標(A), 副交感神経活動指標(B))
 心拍変動は周波数解析をして、結果を線形混合モデルで解析。*: $p < 0.001$ で各群間で有意差あり

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

慢性低酸素曝露肺高血圧ラットにおけるイソフラボノイド Genistein の効果に関する研究

研究分担者 松下雅和 1)

研究協力者 栗山祥子 2)、小笠原倫大 1)、建部一夫 3)、天野浩文 1)、野澤和久 1)、多田久里守 1)、関谷文男 1)、今高之 1)、草生真規雄 1)、仲野総一郎 1)、安藤誠一郎 1)、箕輪健太郎 1)、小田啓介 1)、山路 健 1)、田村直人 1)、高橋和久 2)、高崎芳成 1)

- 1) 順天堂大学医学部膠原病内科 2) 順天堂大学医学部呼吸器内科
3) 順天堂大学医学部医学教育研究室

研究要旨

慢性低酸素性肺高血圧症 (hypoxic-PH)の病態の成因である持続性肺動脈攣縮および肺動脈のリモデリングにおいては、血管内皮細胞障害による NO 経路の機能障害が重要な要素である。我々の検討で、イソフラボノイドの一種である Genistein (Gen)が、慢性低酸素曝露 PH ラット肺において、NO 経路を介した急性血管拡張効果を有していることが認められた。また Gen の慢性投与により、血行動態および肺動脈リモデリングを改善し、肺組織の Phospho-eNOS (Ser¹¹⁷⁷) および Phospho-Akt の発現増強を介した NO 経路の活性化が認められた。以上より、Gen が hypoxic-PH の病態に対して治療・予防的効果を有している可能性が示唆された。

A.研究目的

慢性低酸素性肺高血圧症 (hypoxic-PH)の病態の成因である持続性肺動脈攣縮および肺動脈のリモデリングにおいては、血管内皮細胞障害による NO 経路の機能障害が重要な要素である。大豆に含まれるイソフラボノイドの一種である Genistein (Gen)は、NO 経路の機能改善により、高血圧症に対する治療および予防的効果が報告されており、その多彩な効果と低毒性という特性から、肺高血圧治療薬としての可能性も期待されている。本研究では慢性低酸素曝露 PH ラットを用い、Gen の PH に対する効果を、急性肺血管拡張反応および慢性投与にて検証した。

B.研究方法

雄の Sprague-Dawley ラットを低圧低酸素環境(吸入気酸素分圧約 76mmHg)下で 3 週間飼育し、慢性低酸素曝露性肺高血圧 (CH) モデルを作成した。CH 肺で肺血管異常収縮と肺動脈のリモデリングが存在することを確認した。CH 肺の摘出灌流肺標本を作成し、肺血管異常収縮に対する Gen の血管拡張作用と、それに対する NO および Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 阻害薬の影響について検証した。次に、Gen の慢性投与(0.2mg/kg/日、21 日間、1 日 1 回皮下注射)による hypoxic-PH の予防的効果を検討した。正常気圧群および CH 群で、day21 の血行動態、右室肥大の重症度、肺血管リモデリングの重症度、NO 経路への関与を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、順天堂大学の動物実験管理

等規則に準じて、動物の福祉・倫理面に最大限配慮し、実験を実施した。

C. 研究結果

摘出肺灌流肺実験において、Gen は CH 肺の肺血管異常収縮に対して血管拡張効果を認めた。また、Gen の血管拡張効果は NO と PI3K/Akt 阻害薬の投与により遮断された。慢性投与実験において、Gen 群では血行動態、右室肥大の重症度、肺血管リモデリング重症度が有意に改善されており、hypoxic-PH に対する Gen の予防的効果が認められた。加えて Gen 投与群では、肺組織の Phospho-eNOS(Ser¹¹⁷⁷)および Phospho-Akt の発現が増強し、肺 cGMP 値が改善されていた。

D.考察

Gen は CH 肺の肺血管異常収縮において、NO 経路を介した急性血管拡張効果を有していることが認められた。また Gen の慢性投与により、CH 肺の血行動態および肺動脈リモデリングを改善し、hypoxic-PH の発症を予防する効果が認められた。その背景としては、肺組織の eNOS (Ser¹¹⁷⁷)と Akt のリン酸化の増強を介した NO 経路の活性化が関与していると考えられた。

E.結論

Gen は hypoxic-PH の病態形成において、PI3K/Akt 依存性の NO 経路の増強により、治療・予防的効果を有していることが示唆された。

F.研究発表

1. 論文発表

Murayama G, Ogasawara M, Nemoto T, Yamada Y, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Clinical miscount of involved joints denotes the need for ultrasound complementation in usual practice for patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2013 Jul-Aug;31(4):506-14.

Ogasawara M, Murayama G, Yamada Y, Nemoto T, Kageyama M, Toyama S, Kusaoi M, Onuma S, Kon T, Sekiya F, Sugimoto K, Matsudaira R, Matsushita M, Tada K, Kempe K, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Autofeedback from ultrasound images provides rapid improvement in palpation skills for identifying joint swelling in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2012 Jun;39(6):1207-14.

Ogasawara M, Kageyama M, Kusaoi M, Onuma S, Kon T, Sekiya F, Sugimoto K, Matsudaira R, Matsushita M, Tada K, Kempe K, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Recent trends in use of nonbiologic DMARDs and evaluation of their continuation rates in single and dual combination therapies in rheumatoid arthritis patients in Japan. Mod Rheumatol. 2012 Nov;22(6):831-6.

Ogasawara M, Tamura N, Kageyama M, Onuma S, Kusaoi M, Toyama S, Sekiya F, Matsudaira R, Nawata M, Tada K, Matsushita M, Kempe K, Amano H, Morimoto S, Yamaji K, Takasaki Y. Single-center, retrospective analysis of efficacy and safety of tacrolimus as a second-line DMARD in combination therapy and the risk factors contributing to adverse events in 115 patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2012 Feb;31(2):251-7.

縄田益之, 松下雅和, 松平蘭, 山田浩史, 金田和彦, 浅野正直, 山中健次郎, 村上昭弘, 高崎芳 成混合性結合組織病におけるU1 RNP70-Kd蛋白とU1 RNAによる立体構造を対応抗原とする抗U1 RNP抗体の臨床的意義の検討(Clinical Significance of Anti-U1 RNP Antibodies Recognizing The Conformation Structure on U1 RNA/70-kd Protein Complex in Patients with Mixed Connective Tissue Disease) 順天堂医学 57 巻 5号 477-487

2. 学会発表

栗山 祥子, 守尾 嘉晃, 鳥羽 慶栄, 長岡 鉄太郎, 高橋 和久 ジェニステイン慢性投与による肺高血圧発症予防効果の検討 日本呼吸器学会誌(2186-5876)2 巻増刊 P308 2013 03.

鳥羽 慶栄, 栗山 祥子, 長岡 鉄太郎, 守尾 嘉晃, 岡正彦, 高橋 和久 肺高血圧症モデルにおけるホーミングペプチド CAR による肺選択的な薬剤効果増強作用 日本呼吸器学会誌(2186-5876)2 巻増刊 P308 2013 03.

長岡 鉄太郎, 栗山 祥子, 鳥羽 慶栄, 守尾 嘉晃, 高橋 和久 肺病変を有する肺高血圧症における Tadalafil の有用性の検討 日本呼吸器学会誌(2186-5876)2 巻増刊 P179 2013 03

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

予定なし

2. 実用新案登録

予定なし

3. その他

特記すべきことなし