

201324033B

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 23～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 吉田 俊治

平成 26 年(2014)年 3 月

目次

I. 総合研究報告	
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. 分担研究報告書	
MCTD 伴う肺動脈性肺高血圧症の予測因子に関する研究	7
(川口 鎮司)	
混合性結合組織病生体試料バンクの構築およびそれを利用した疾患関連遺伝子の全ゲノム解析に関する研究	11
(大村 浩一郎)	
混合性結合組織病の肺動脈性肺高血圧症治療ガイドラインに関する研究-免疫抑制療法について-	15
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	20
(深谷 修作)	
NPSLE 患者脳脊髄液中における抗 U1RNP 抗体と液性因子に関する研究	24
(藤井 隆夫)	
混合性結合組織病 (MCTD) の病態における単球の役割に関する研究	30
(桑名 正隆)	
混合性結合組織病における自己抗体産生機序の検討	34
(川畑 仁人)	
混合性結合組織病 (MCTD) の全国調査結果より推定される発症要因解析と新しい治療法	39
(岡本 尚)	
混合性結合組織病を対象とした指尖血管内皮機能評価法の確立と非侵襲的な肺高血圧症早期診断への応用に関する研究	44
(田中 住明)	
膠原病に併発した肺高血圧症の非侵襲的検査法に関する研究	49
(松下 雅和)	
混合性結合組織病の予防に関する研究	54
(鷺尾 昌一)	
結合組織病性肺動脈性肺高血圧症の臨床像と肺静脈閉塞に関する研究	65
(中西 宣文)	
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	69
(深谷 修作・吉田 俊治)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	73
IV. 構成員名簿	85

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

平成23年度～平成25年度総合研究報告書

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、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おこなわれた。

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)
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)
山田秀裕(聖マリアンナ医科大学・教授)
鷺尾昌一(聖マリア学院大学看護部・教授)

B. 研究方法

【研究班全体の方法】

原則的に全員で行うプロジェクト研究を中心とし、各個研究としては、診断と治療に有用性のある病態解析から迫るものと特に喫緊の課題である肺高血圧症に関するものに焦点をしばって研究を行った。

【各分担研究項目の研究方法】

I MCTDの疾患としての病態の解明

- (1) 臨床調査個人票を用いた臨床像の抽出(岡本尚)
全国のMCTDの臨床調査個人票を利用し、治療などの疫学的事項や数理統計学的解析手法を用いてMCTDの臨床概念を改めて究明し、多段階発症モデルを適用して関与する遺伝子セットの数を予測する。
- (2) 発症リスク要因の解明(鷺尾昌一研究協力者)
MCTD患者、全身性エリテマトーデ(SLE)患者、強皮症患者、多発性筋炎患者を症例とし、非膠原病患者を対照とした症例対照研究を行い、他の膠原病と比較して、

A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)は、複数の膠原病の要素を持ち抗U1-RNP抗体陽性という特徴を持つ予後良好な疾患として提唱された。しかし一般には非常に稀な肺高血圧症が最大の死因になるなど、難治性病態の存在も明らかとなった。残された課題としては、抗U1-RNP抗体自身の病原性の解明、難治性病態の中で特に肺動脈性肺高血圧症(PAH)の病態解明と診断・治療法の確立があげられる。これらの解明を目的とする。

MCTDに特有な発症リスクがあるかどうかを検討する。

(3) 抗U1RNP抗体の産生機序の検討(川畑仁人)

抗U1RNP抗体産生マウスモデルを通して、本抗体の産生に関連するfollicular helper T細胞(fhT細胞)の性状を明らかにする。実際にヒトにおける本細胞群の動態を検討し、MCTDの病態形成への関与についても検討する。また腸内細菌の関与を検討するため、抗菌薬を投与してからCD4T細胞を移入して自己抗体やfhT細胞分化を検討する。

(4) 生体試料バンクを用いた疾患関連遺伝子検索(大村浩一郎研究協力者)

現在の研究班で構築された生体試料バンクのDNAを用いてDNAチップによる全ゲノムSNPタイピングを行う。これをタイピング済みの健常人を対照に用いて関連解析を行う。

(5) 抗細胞表面抗体の検索(三浦恵二研究協力者)

新たな抗血管内皮細胞抗体の測定法を用いてMCTDを中心とした膠原病の患者血清を調べ、その意義を調べる。

II 肺高血圧症——病態解明とそれによる早期診断——

(6) 単球の役割の解明(桑名正隆)

患者末梢血より分離した単球よりAP-1構成蛋白の遺伝子発現と蛋白発現をみて、健常人との差を見る。さらに患者肺の組織でのFra-1蛋白の発現を見る。またFra-1を高発現するトランスジェニックマウス(Fra-1 TGマウス)の肺組織や浸潤炎症細胞、特に単球について検討する。

(7) 一酸化窒素合成酵素2(NOS2)の遺伝子多型に関する研究(川口鎮司)

血管拡張因子である一酸化窒素(NO)の合成酵素であるNOS2の遺伝子多型(CCTTT microsatellite)について、2つの染色体上のCCTTT繰り返し配列の総和が23未満の患者は23以上の症例の20倍のPAH発症relative riskを持っていた。班の生体試料バンクのDNAも加えて多数例で検証する。

(8) 生体試料バンクを用いた疾患関連遺伝子検索(大村浩一郎研究協力者)

I(4)と同様の方法で検索を行う。

(9) 膠原病性PAHにおける肺静脈閉塞性病変の合併に関する研究(中西宣文)

膠原病性PAHの剖検肺を用いて合併する肺静脈病変の有無に関する病理組織学的検討を行う。

(10) 非侵襲的検査による膠原病性PHの予測(松下雅和)
膠原病性PHについて肺機能検査、胸部CT、血液検査にてPHの予測を検討する。

III 肺高血圧症——臨床的指標による早期診断——

(11) 運動負荷心エコー検査と運動負荷右心カテーテル検査による早期診断の試み(深谷修作)

膠原病(特にMCTD)患者を対象に、運動負荷心エコー検査、運動負荷右心カテーテル検査を行う。本法によりPHと早期診断したあるいは境界域と判断した患者の経過を追うことで、PHの悪化あるいは進展のリスクを検討する。

(12) レイノー現象に伴う指尖血管内皮機能評価法の確立とPH早期診断への応用(田中住明)

指尖動脈の血管内皮機能や心拍変動の異常を評価する方法を確立し、レイノー現象に伴う自律神経機能を評価する。これを用いてPHの早期診断や評価に応用する。

IV PH ——新しい診断の手引きの検証——

(13) MCTD-PAHの改定診断の手引きの検証(全員)
分担研究者の施設でのMCTD患者に改定診断の手引きを当てはめ、感度と特異性を検討する。

V PH ——治療反応性の検討——

(14) MCTD-PAHの治療成績の追跡(全員)
分担研究者の施設のMCTD-PAH患者を各施設20例程度集め、その治療内容を検討する。

(15) 膠原病性PAHに対する膠原病専門医の免疫抑制療法に対する意識調査(全員)
膠原病性PAHに対して免疫抑制療法を行うことについての分担研究者の膠原病専門医の意識を調査する。

VI PH以外の重要臓器病変

(16) 膠原病に合併する中枢神経症状の病態に関する研究(藤井隆夫)

SLEやMCTDで中枢神経症状を合併した患者の血清と髄液を用いて、自己抗体と髄液中のIL-6やBAFFを測定する。

○倫理面への配慮

(1) (14) 臨床調査個人票は個人情報が含まれているため、インターネットに接続していないパソコンを鍵のかかる部屋で使用し、その漏洩がないように厳重に管理する。MCTD・PAHの症例情報は各施設で連結可能匿名化を行って事務局に送付して頂く。

(2) については、無記名のアンケートであり、必要な施設でのみ倫理委員会の承認を得る。

(3) (6) マウスに関しては動物愛護管理法を遵守する。

(3) (6) (10) 患者検体を用いる場合には該当施設での倫理委員会の承認を得るとともにインフォームドコンセントの上で本人から文書による同意を得る。

(4) (5) (7) (8) 生体試料バンクは各施設での倫理委員会承認を受けた後に集積されている。その使用に関しても連結可能匿名化がなされており、倫理的に問題ないと思われる。

(9) (16) 該当施設の倫理規定を遵守する。

(11) (12) 該当施設での倫理委員会の承認を得るとともにインフォームドコンセントの上で本人から文書による同意を得る。

(13) (15) 診療録を用いた後ろ向き調査であり、倫理的な問題は少ないと思われる。

主任研究者の施設における倫理委員会の承認状況は下記のごとくである。

(13) に関して

混合性結合組織病(MCTD)の肺動脈性肺高血圧症(PAH)診断の手引きの検証：本学の疫学・臨床研究倫理審査委員会承認(平成24年1月26日)

(4) (7) (8) に関して

混合性結合組織病の関連遺伝子検索に関する研究：本学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認(平成24年8月18日)

(2) に関して

本学の疫学・臨床研究倫理審査委員会承認

C. 研究結果

「B. 研究方法」の項の(1)から(17)にしたがって記載する。

(1) 過去6年間の新規登録MCTD患者3040例について、前

半3年と後半3年で発症年齢分布は全国でほぼ同様であり、症例の偏りは少ないと判断された。しかしきわめて多数の登録症例で「受給者番号」の重複がみられ、重複率は6年間の平均で42.5%に至った。重複例の属する都道府県は異なっており、全国に及んでいた。3040例のMCTD患者を疫学的に調査すると、69.1%に診断1年以内のステロイド使用がみられ、そのうちの37.5%にはプレドニゾン1日量が20mg以上であった。免疫抑制薬の使用もこの6年間で2.5倍に増加しており、年々増加傾向が見られた。発症年齢分布に多段階発症モデルを適用すると、発症潜伏期がないと仮定しておよそ3段階で発症すると推定された。

(2) MCTDの発症と関連したのは、1日30分以上の歩行、食生活の欧米化、手術の既往が統計学的に有意なものとしてあげられた。

(3) 抗U1RNP抗体の産生にはCXCR5陰性follicular helper T細胞という新規細胞群が関与することを見いだし、さらに同様の細胞群がヒト末梢血に存在することも明らかにした。またTLR9および腸内細菌がfhT細胞分化や自己抗体産生に関与していた。

(4) (8) 生体試料バンクには現時点でMCTDを含む抗U1-RNP抗体陽性膠原病のDNAおよび血漿(もしくは血清)が394例ある。それらの検体の詳細な臨床情報収集を行い、288例の全ゲノムSNPタイピングが終了し、既タイピングの健常人検体657例と24,525SNPsについて関連解析を行った。6遺伝子に有意水準を満たして関連がみられた。またPH合併の20例について同様のサブ解析を行い、4遺伝子に関連がみられた。

(5) より厳密な方法で細胞表面蛋白を取得しそれに対する自己抗体を測定する系を開発し、SLEやMCTDで約80%、強皮症で56%と高率に抗血管内皮細胞抗体を検出した。SDSによる軽度の変性処理によりSLE、MCTDでは抗体価が低下した。

(6) MCTD/強皮症の末梢血単球ではAP-1を構成する蛋白のうち、Fra-1のみがmRNAでも蛋白レベルでも高発現していた。肺組織におけるFra-1の発現は、健常人や特発性PAHでは検出できないが、MCTD/強皮症では浸潤する単核球と繊維芽細胞で発現を認めた。Fra-1 TGマウスではM2にシフトした単球の浸潤が先行し、間質性肺炎/PAHに類似した病態がみられた。

(7)一酸化窒素(NO)合成酵素であるNOS2の遺伝子多型についてCCTTT繰り返し配列が2つの染色体上で23未満の者は23以上の症例の20倍のPAH発症リスクがあることを少数例の検討で見いだしていた。今回、生体試料バンクの検体も加え、154例で再検討した。MCTDのPAH発症例では健康人に比しては有意に繰り返し配列の回数が少なかった。

(9)膠原病性PAHの剖検例10例のうち9例に肺静脈閉塞性病変を認め、狭窄率は平均74%であった、そして肺静脈閉塞性病変型、特発性PAH型、混合型に分類可能であった。

(10)胸部CTスキャンでの血管径の値、肺機能検査、血清ADMA値はPH合併のスクリーニングに有用と考えられる。

(11)MCTD19例、強皮症34例、SLE8例で安静時と運動負荷時の心エコー検査を行った。運動負荷による推定肺動脈圧の上昇はMCTD/強皮症で健康人に比し有意に高値であった。安静時心エコーによるPH検出の偽陰性を減じる可能性が考えられた。

(12)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おり、また恒常的に交感神経活動の亢進がみられた

(13)PHを疑われた膠原病患者において心エコー検査と右心カテーテル検査を同時期に行った95症例の情報が6施設から提出された。MCTD-PAH診断の手引きに当てはめると、旧基準では感度65.4%、特異度79.6%であった。三森班が策定した新基準では、推定肺動脈圧50mmHg以上での感度76.4%、特異度73.1%であり、推定肺動脈圧が36-50mmHgでの臨床項目4項目以上満たす例での偽陽性例は8例中1例、36mmHg未満で臨床項目4項目を満たさない例での偽陰性例は3例中3例であった。

(14)121例のMCTD-PAH例が集まった。免疫抑制療法はSLE>MCTD>強皮症であり、肺血管拡張薬は93%で使用されていた。強皮症の75%は肺血管拡張薬単独治療例であった。

(15)免疫抑制療法について、SLE、MCTDに合併するPAHには94.3%の医師が期待し、強皮症に対しては73.9%が期待しないと答えた。膠原病の活動性を伴わないPAHに対しては期待すると答えたのは20%にすぎなかった。

(16)抗NR2抗体陽性例では陰性例に比し、髄液中のIL-6

が高値であり、髄液BAFFも高濃度の傾向にあった。抗U1-RNP抗体陽性例ではこのような傾向は見られなかった。

D. 考察

MCTDを自己抗体と遺伝子の面からとらえる努力を続けている。

MCTDの血清学的特徴である抗U1-RNP抗体産生への関与が考えられる細胞亜群をモデル動物から見いだしている。さらによりすぐれた細胞表面蛋白の精製により抗U1-RNP抗体以外の自己抗体を見いだしている。

遺伝子においても、全ゲノムに対する疾患関連遺伝子の検索を行っている。世界的に見ても抗U1-RNP抗体陽性患者でこれだけ多数のDNAを集めているところは稀と思われる。関連が見いだされた遺伝子の中には他の膠原病で報告のないものもあるため、MCTDを特徴づける遺伝子の可能性もあり、疾患独立性や診断への寄与についても検証が必要であろう。

最も重要な合併症であるPHについて、遺伝子面の検討と各種バイオマーカー、さらに生体検査に収穫が得られた。つまり単球のFra-1やNOS2のCCTTT繰り返し配列の数とPHとの関連が示唆される。これがさらに検証できれば、MCTDにおけるPHを来すハイリスク群が同定でき、早期診断が可能となることが期待される。

臨床的に運動負荷心エコー検査や指尖動脈の血管内皮機能の検査により、PAHをはじめとする血管内皮機能障害を早期に診断できる可能性が示唆された。

各施設からの症例の集積により前のMCTD班が改訂したMCTD-PAH診断の手引きの高い有用性が検証された。さらにMCTD-PAHの治療に関しては、免疫抑制療法がSLEで高率になされ、強皮症では低率であること、MCTDはその中間に位置することが、班内の多数の集積例でも確認され、班内の施設の専門医の考えでも裏付けされた。今後は、MCTDにおいてSLE様病態と強皮症様病態のどちらに基づくPAHであるかの評価により免疫抑制療法など治療法の選択が異なっていく可能性が考えられる。

E. 結論

診断については、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可能性が考えられた。また

特に予後に大きく関与するPH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、PHの診断がより早期にできる可能性が考えられた。実際、前の班で改訂されたPH診断の手引きの有用性を検証できた。

治療に関しては、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使用現状が明らかとなり専門医の考えも明確となった。またやはり難治性の中樞神経症状についても自己抗体の面から分けられる可能性が判明した。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。

Ⅱ. 分担研究総合報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
平成 23 年～平成 25 年度分担研究総合報告書

MCTD 伴う肺動脈性肺高血圧症の予測因子に関する研究

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 講師

研究要旨

MCTD の 10-15%には、肺動脈性肺高血圧症(PAH)が合併する。PAH は、比較的早期の合併症であることがわかってきた。PAH が生命予後を決定する非常に重要な病態であることより、その早期診断と治療は重要である。近年、PAH の治療薬がめざましい発展をとげ、多くの新規治療方法が確立された。これらの薬剤は、早期 PAH 症例への有効性が高い。しかし、PAH 発症を早期に予測する方法は確立されていない。血管拡張因子である一酸化窒素(NO)は PAH の病態において重要な因子である。これまでの我々の検討では、MCTD において NO は血清中で増加しているが、PAH を合併した症例ではその増加が認められなかった。NO 産生の違いに NO 合成酵素である inducible NO synthase (NOS-2) の遺伝子多型の関与があることを本研究班にてみつけて報告してきた。今回の 3 年間の研究は、我々 1 施設での検討結果を、多施設での症例を用いて再度評価を行った。その結果、154 例の MCTD 症例を検討し、20 例に PAH の合併がみられた。NOS2 遺伝子多型は、MCTD の疾患感受性遺伝子であることがわかった。また、PAH 発症例ではより強い関連があることが認められた。この結果より、MCTD では、NOS2 遺伝子多型の偏りがみられ、血管拡張因子である NO 合成能が低下していることがわかった。さらに、NOS2 遺伝子多型は、PAH 合併例にて強い相関があることがわかった。PAH の予測因子として有用であり、また、早期から NO 増強効果のある治療薬による早期治療または PAH 予防目的での治療も可能となることが示唆された。

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。我々は、レイノー現象を有する 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ことを報告した。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、以前の我々の結果では、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、本研究班にて NOS-2 遺伝子の 5'-UTR に存在する遺伝子多型を検索し、PAH の発症に NOS2 遺伝子多型が関与していることを後ろ

向き研究にてみいだした。その結果が、大規模な多施設の症例でも再現されるかどうかを検討した。

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 154 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。

また、2006 年より継続している前向き検討では、新規で PAH を合併していない症例を集積してきた。現在、39 症例となりその NOS2 遺伝子の解析も行った。

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) の繰り返し回数の同定

東京女子医大倫理委員会の承認を経て、informed consent を行い、患者より末梢血を採血し、genomic

DNA を抽出した。NOS2 遺伝子の-2.5 kb 近傍に存在する CCTTT repeat microsatellite を解析するため、蛍光ラベルしたプライマーを用い genomic DNA を鋳型として PCR を行い、PCR 産物を ABI 7900 を用いて泳動し、GeneScan 法にて繰り返し回数を決定した。

(倫理面への配慮)

東京女子医科大学の倫理委員会にて審議し、承認を得て行っており、患者からの DNA 取得には、文書で同意を取得している。DNA は、匿名化番号を付記して、検査を行い、最後に、患者臨床データと連結を行っている。患者のデータの漏洩はない。

C.研究結果

1) 症例

MCTD 症例 154 例のうち、PAH と診断された症例は、20 例であった。患者集積時の臨床症状からは、約 13% の症例が PAH 合併例であった。頻度は本邦で報告されているものと一致している。

2) NOS2 遺伝子多型の検討

表 1 に 154 例の MCTD の CCTTT 繰り返し配列の 2 本の染色体の総和を示した。PAH を合併した 20 例の MCTD と 95 名の健常人の結果も示した。PAH 合併例では、CCTTT 繰り返し配列が少ないことがわかる。繰り返し配列が 23 未満と 23 以上に分けて表 2 に示した。MCTD と健常人との比較では、CCTTT 繰り返し配列が健常人に比較し MCTD で有意に少なかった。また、その相関は、PAH を合併した MCTD においてより強い相関係数を示した。

MCTD 症例において、PAH 合併例と非合併例に分けて CCTTT 繰り返し配列の関連を検討した。表 3 に示すように、CCTTT 繰り返し配列が 23 未満の症例は、23 以上の症例と比較して 3.52 倍 PAH を発症する危険性があることがわかった。

前向き検討の症例が 39 症例集積でき、そのうち 12 症例が PAH を発症した。前向き研究であり、相対危険度が検定でき、今回の検討では、CCTTT 繰り返し配列が 23 未満の症例は、23 以上の症例に比較して、6.8 倍 PAH を合併する危険性があることがわかった。

D.考察

大規模な後ろ向き研究と、我々 1 施設での前向き研究の 2 つの研究を進めることができた。その結果から、NOS2 遺伝子多型の CCTTT 繰り返し配列は、PAH 合併の予測因子となり得ることがわかった。特に CCTTT 繰り返し配列が 23 未満の症例では、高い頻度で PAH を発症する。この原因は、CCTTT の長さで NOS2 遺伝子の転写に相関があり、CCTTT が短いほど、転写効率が低下することがわかっている。この事実より、より NO 産生が低下している症例ほど、PAH 合併の危険性が高いことが推測された。今後、早期より NO 増強効果の

ある薬剤を投与することにより、有用な治療あるいは進展の抑制に貢献できる可能性が示唆された。

E.結論

154 例の MCTD 患者での後ろ向き検討および 39 例の MCTD 患者での前向き検討において、NOS2 遺伝子多型は、MCTD 発症に関連する可能性が示唆された。また、大規模な多施設検討においても、我々の 1 施設での結果と同様、CCTTT 繰り返し配列が少ないほど、PAH 発症の危険性は高くなることが明らかとなった。今後、CCTTT 繰り返し配列の検索により、より早期に PAH 発症を予測することが可能となる。

F.研究発表

1. 論文発表

1. Takagi K, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Ota Y, Tochimoto A, Gono T, Katsumata Y, Takagi M, Hara M, Yamanaka H: Activation of the activin A-Alk-Smad pathway in systemic sclerosis. *J Autoimmunity* 36:181-188, 2011
2. Tochimoto A, Kawaguchi Y, Hara M, Tateishi M, Fukasawa C, Takagi K, Nishimagi E, Ota Y, Katsumata Y, Gono T, Tanaka E, Yamanaka H: Efficacy and safety of intravenous cyclophosphamide pulse therapy with oral prednisolone in the treatment of interstitial lung disease with systemic sclerosis: four-year follow-up. *Modern Rheumatol* 21:296-301, 2011
3. 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
4. Hanaoka M, Gono T, Kawaguchi Y, Uchida K, Koseki Y, Katsumata Y, Kaneko H, Takagi K, Ichida H, Nitta K, Yamanaka H. Urinary free light chain is a potential biomarker for ISN/RPS class III/IV lupus nephritis. *Rheumatology* 52:2149-2157, 2013
5. Ota Y, Kawaguchi Y, Takagi K, Ichida H, Gono T, Hanaoka M, Higuchi T, Yamanaka H. Ghrelin attenuates collagen production in lesional fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol* 147:71-78, 2013
6. 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* 65:472-480, 2013

2. 学会発表

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

総会 2011

2. 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 2012
3. 川口鎮司。膠原病に伴う肺高血圧症における多剤
併用療法 第57回日本リウマチ学会総会・学術
集会 2013

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 MCTD における NOS2 遺伝子多型の解析

CCTTT 総和	MCTD		健常人 (N = 95)
	全体 (N = 154)	PAH 合併 (N = 20)	
17	1	1	
18	3	1	2
19	3	2	1
20	14	1	3
21	16	2	7
22	15	5	4
23	14	2	11
24	17	1	13
25	23	2	16
26	16	3	15
27	4		5
28	8		3
29	8		3
30	7		6
31	3		2
32	1		2
33	0		1
34	0		1
35	1		

表 2 MCTD と健常人における NOS2 遺伝子多型の関連

	MCTD		健常人
	全体	PAH 合併例	
CCTTT 総和 < 23	52	12	17
CCTTT 総和 ≥ 23	102	8	78

MCTD と健常人との比較検定： P = 0.008, OR: 2.34, 95%CI: 1.26-4.36

PAH 合併 MCTD と健常人との比較検定： P = 0.0003, OR: 6.88, 95%CI: 2.44-19.41

表 3 PAH 合併例と非合併例の MCTD における NOS2 遺伝子多型の関連

	MCTD	
	PAH 合併例	PAH 非合併例
CCTTT 総和 < 23	12	40
CCTTT 総和 ≥ 23	8	94

P = 0.011, OR: 3.52, 95%CI: 1.39-9.28

表 4 前向き検討による 39 例の MCTD 患者での PAH 発症と NOS2 遺伝子多型の関連

	CCTTT 総和 < 23	CCTTT 総和 ≥ 23
PAH 有り	6	2
PAH なし	6	25

P = 0.0056, RR: 6.8, 95%CI: 1.59-28.73

混合性結合組織病生体試料バンクの構築およびそれを利用した 疾患関連遺伝子の全ゲノム解析

研究協力者 大村 浩一郎

京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 講師

研究要旨

混合性結合組織病（MCTD）は抗 U1-RNP 抗体陽性を特徴とする希少疾患である。その病因解明を目的に生体試料バンクを設立し、整備を行った。抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病として計 516 例（うち MCTD197 例）を収集し、臨床情報も充実させ、世界最大級のバンクとなった。このバンク検体を用いて抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病の関連遺伝子解析を行った。抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病 286 例と健常人 657 例で GWAS を行い、有意水準を満たさない上位の 4 遺伝子は抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病 217 例 vs 健常人 1405 例の追認試験を行った。結果、HLA-DRA、BLK、STAT4 が有意水準を満たした。MCTD の関連遺伝子のサブ解析を同様に行い、sema6D が suggestive な関連を示した。

A. 研究目的

混合性結合組織病（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 1 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、試料を収集し研究を進めることとした。

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（GWAS）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探索し、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も探索する。

B. 研究方法

MCTD 生体試料バンクの整備

研究代表者および分担研究者の所属施設の MCTD 患者より文書によるインフォームド Consent のもとに末梢血 DNA、血清、髄液、胸水、および生検材料などの生体試料を採取し、冷凍保存する。試料の採取に当たっては連結可能匿名化を行う。研究分担を行う希望者には試料の一部ずつを提供する。

MCTD の疾患関連遺伝子の検索

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（ χ 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 $p < 2.0 \times 10^{-6}$ とした。追認試験は抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病患者 217 例 vs 健常人 1405 例で行い TaqMan Allelic Discrimination 法にて行った。メタ解析は Mantel-Haenszel 法にて行った。

（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。

試料は京都大学大学院医学研究科臨床免疫学の専用の冷凍庫に保管し、管理者が施錠する。臨床データは匿名化し、患者の個人情報と匿名番号を結びつける対照表は各施設で厳重に管理する。匿名番号と遺伝情報、臨床情報に関しては京都大学で一括管理し、個人情報と遺伝情報は同じコンピュータや同じファイルで管理しない。

C. 研究結果

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。平成 26 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 197 例と 319 例収集された。計 516 例の検体となり、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を収集した。

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。

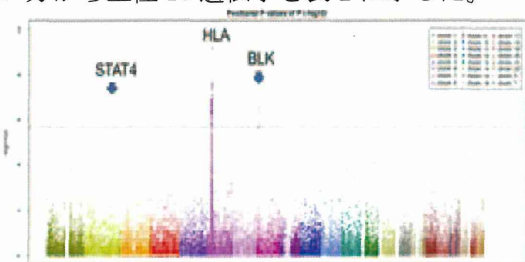


図 1 MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病との関連を示す SNP のマンハッタンプロット

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 ($p < 2.0 \times 10^{-6}$) を横線で示している。

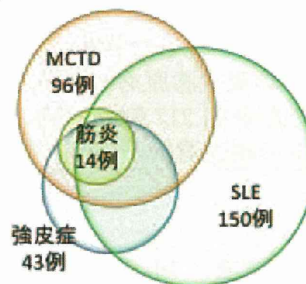
表 1. MCTD および抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病と関連を示した上位 10 遺伝子領域

Gene	Chr	P value	OR
HLA-DRA	6	6.32E-10	1.865
BLK	8	3.44E-07	1.861
STAT4	2	3.11E-05	2.033
ZNF835	19	1.74E-05	1.539
TGIF2LX	23	1.93E-05	1.551
C12orf29	12	3.63E-05	1.518
C14orf78	14	4.21E-05	1.543
FRMD4B	3	5.89E-05	1.603
HDGF	1	7.54E-05	1.739
BTF3P11	13	7.60E-05	1.504

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。有意水準 $p < 2.0 \times 10^{-6}$ 。

STAT4 と ZNF835 に関して追認試験を行った。217 例の抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病患者 vs 1405 例の健常人を TaqMan によるタイピングを行い、 $p=0.003$, OR 1.54 (1.15 - 2.11) となり、GWAS とのメタ解析を Mantel-Haenszel 法によって行くと $p=1.07 \times 10^{-7}$, OR 1.81 (1.46 - 2.24) となり、GWAS 有意水準 ($p=2.04 \times 10^{-6}$) を超えた。ZNF835 は追認解析で $p=0.219$, OR 1.13 (0.92 - 1.40) となりメタ解析でも $p=0.029$, OR 1.14 (0.99-1.32) と関連は否定的となった。

図 2 GWAS に用いた検体の診断基準満足度とそのうちわけ



また、MCTD の診断基準を満たす 96 例と健常人 657 例を用いて GWAS を行い、関連の示唆された上位 10 SNPs を表 2 に示す。

表 2. MCTD と関連を示した上位 10 遺伝子領域

Gene	Chr	P value	OR
HLA-DRA	6	2.13E-06	2.097
CCDC8	19	7.94E-05	1.84
SEMA6D	15	9.82E-05	1.858
DCHS2	4	1.94E-04	2.191
PSORS1C1	6	1.98E-04	1.814
LOC646898	18	3.91E-04	1.769
LHX5	12	4.01E-04	1.812
HIVEP3	1	5.10E-04	1.757
JPH3	16	5.21E-04	1.74
PSMF1	20	6.11E-04	1.755

CCDC8, SEMA6D に関して MCTD 80 例 vs 健常人 1405 例による追認試験を行った。CCDC8 は $p=0.769$, OR 1.05 (0.75-1.46) となり関連は否定的。SEMA6D に関しては $p=0.033$, OR 1.44 (1.01 - 2.04) となり、メタ解析では $p=2.30 \times 10^{-5}$, OR 1.66 (1.31 - 2.10) と suggestive な関連を示した。

肺高血圧症のサブ解析も行った。

MCTD の診療ガイドライン第 3 版に準拠して、心エコーにて肺高血圧症疑いとされた 20 例と健常人 657 例とを用いて GWAS のサブ解析を行った。例数が少ないため参考結果であるが、有意水準を超える遺伝子も見つかると今後検討する価値がありそうである。

D. 考察

MCTD 生体試料バンクの検体数は 500 を超え、詳細な臨床情報を含んだ DNA および血清であり、他に例を見ない貴重な試料である。おそらく世界でも最大で最も臨床情報が豊富なバンクであろうと考えられる。特に、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している点は特筆すべきである。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。MCTD に限局すると症例数が限られ検出率が低くなるため、共通の特徴をもつ抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病としてまずは解析した。追認試験を行い 3 つの遺伝子が有意差をもって検出された (HLA-DRA, BLK, STAT4)。これらはこれまでに 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。純粋な MCTD でサブ解析を行うと HLA 領域を除くと統計学的有意な遺伝子は外れてしまうが、suggestive な関連を示すものとして Sema6D が候補に挙がった。これらはこれまでに SLE、SSc、PM/DM では関連遺伝子として報告がないことから、MCTD を特徴づける遺伝子の可能性もあり、今後さらなる検証が必要である。肺高血圧症を伴った症例のサブ解析も症例数が非常に少ないため現時点では参考程度とするべきであるが、今後追認試験を行う予定である。確認がとれた遺伝子多型を用いて MCTD の診断に寄与できるかの検討を今後行っていきたい。MCTD バンクの検体数が増えれば追認試験の正確度も上昇するため、今後バンクの充実も重要である。

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を充実させた。詳細な臨床情報を付帯させた検体が計 516 検体収集された。次に、抗 U1-RNP 抗体陽性膠原病の GWAS および候補遺伝子の追認試験を行った結果、HLA, BLK, STAT4 の関連が認められ、また MCTD の特異的関連遺伝子として、sema6D が suggestive な関連を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terao C, Yamada R, Ohmura K, Takahashi M, Kawaguchi T, Kochi Y, Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 20(13):2680-2685, 2011.
- 2) Terao C, Ohmura K, Katayama M, Takahashi M, Kokubo M, Diop G, Toda Y, Yamamoto N; Human

Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura R, Shimizu M, Gut I, Heath S, Melchers I, Manabe T, Lathrop M, Mimori T, Yamada R, Matsuda F. Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis--a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One.* 6: e20457, 2011.

- 3) Terao C, Ohmura K, Kochi Y, Ikari K, Maruya E, Katayama M, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Ann Rheum Dis.* 70: 2134-2139, 2011.
- 4) Iguchi-Hashimoto M, Usui T, Yoshifuji H, Shimizu M, Kobayashi S, Ito Y, Murakami K, Shiomi A, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Overexpression of minimal domain of calpastatin suppresses IL-6 production and Th17 development via reduced NF- κ B and increased STAT5 signals. *PLoS ONE* 6(10):e27020, 2011.
- 5) Yukawa N, Fujii T, Kondo-Ishikawa S, Yoshifuji H, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. *Arthritis Res Ther.* 13(6):R213, 2011.
- 6) Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Follistatin-related protein/ follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 586(4):319-324, 2012.
- 7) Terao C, Ikari K, Ohmura K, Suzuki T, Iwamoto T, Takasugi K, Saji H, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H, Matsuda F, Mimori T: Quantitative effect of HLA-DRB1 alleles to ACPA levels in Japanese rheumatoid arthritis: no strong genetic impact of shared epitope to ACPA levels after stratification of HLA-DRB1*09:01. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]
- 8) 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, Tani 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

- 9) 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
- 10) 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]
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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
- 14) 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.
- 15) Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, et al., PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. **Arthritis Rheum**. 2013 Feb; 65(2): 472-80.
- 16) Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, et al., Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. **Nat Genet**. 2012, 44(5): 511-6
- 17) Terao C, Ohmura K, Ikari K, Kochi Y, Maruya E, et al., ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. **PLoS One**. 2012;7(7): e40067
- 18) 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.
- 2) Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with anti-citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis in Japanese. American College of Rheumatology 2011, Chicago, Nov. 2011.
- 3) 中坊周一郎ほか：混合性結合組織病（MCTD）および抗U1-RNP抗体陽性膠原病のゲノムワイド関連解析（GWAS）。第41回日本臨床免疫学会，下関，2013年11月（日本臨床免疫学会誌 36（5）：143，2013）

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

2. 学会発表

- 1) Terao C, Ohmura K, Yamada R, Kochi Y, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: A haplotype of the human AIRE gene is associated with the risk for Rheumatoid Arthritis in Japanese population. European League Against Rheumatism 2011, London, June 2011. (Ann Rheum Dis 2011;70(Suppl3):146)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
平成 23 年～平成 25 年度分担研究総合報告書

混合性結合組織病の肺動脈性肺高血圧症治療ガイドラインに関する研究
-免疫抑制療法について-

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
研究協力者	芦原このみ	藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内	助手
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
研究分担者	桑名 正隆	慶應大学医学部内科学教室	准教授
研究分担者	田中 住明	北里大学医学部膠原病感染症内科学	診療准教授
研究分担者	中西 宣文	国立循環器病研究センター研究所肺高血圧先端医療学研究部	部長
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	松下 雅和	順天堂大学膠原病内科	助教
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

【目的】混合性結合組織病(MCTD)の診療ガイドラインにおいて、MCTDに伴う肺動脈性肺高血圧症(PAH)(MCTD-PAH)の治療法として免疫抑制療法(IST)が記載されている。MCTD-PAHの治療ガイドラインの検証の一部としてPAHの中でも膠原病性PAH(CTD-PAH)に特異的なISTに注目して、①CTD-PAHの診療に携わっている医師がCTD-PAHに対するISTをどのように考えているか、②実際の症例にISTがどのように実施されているか明らかにする。【方法】①質問紙法を用いてCTD-PAHに対するISTについての医師の考え、②調査票を用いて症例の情報を収集した。①の対象は本研究班の臨床系班員が所属する施設でCTD-PAHの診療に携わっている医師とした。②の対象は①と同じ施設で最近治療されたCTD-PAH例を優先とし、各施設20例を目安とした。【結果】医師のISTに関する考え方の調査では、全身性エリテマトーデス(SLE)に伴うPAH(SLE-PAH)やMCTD-PAHに対するISTに期待するとの回答は66名(94.3%)、全身性硬化症(SSc)に伴うPAH(SSc-PAH)では18名(26.1%)であった。ISTと肺血管拡張療法との関連では、肺血管拡張療法にISTを先行させる医師は17名、両者同時に開始する医師は30名、肺血管拡張療法をISTに先行して実施する医師は17名、その他および未記入が6名であった。CTD-PAHの治療の実態に関する調査では、IST実施率は基礎疾患がSLEでは78%、MCTDでは50%、SScでは17%であった。SLEはMCTD、SScに比し高率で、MCTDはSScに比し高率であった。その中、ISTの対象病態がPAHであったのはSLEでは8例(57%)、MCTDでは6例(43%)、SScでは1例(13%)であった。また、SLEを基礎疾患に有する患者では53%でPAH治療当初にISTが行われ、ISTが実施されていないのは29%、SScを基礎疾患に有する患者ではそれぞれ14%、75%、MCTDを基礎疾患に有する患者ではそれぞれ31%、54%であった。【考察およびまとめ】CTD-PAHに対するISTについての医師の理解は良好であり、実際の患者に対しても適切にISTが実施されていることが判明した。しかし、SSc-PAHのISTに期待する医師もおり、さらなる啓蒙活動の必要性が示唆された。また、CTD-PAHの基礎疾患毎に肺血管拡張療法を先行させたり、ISTを先行させたりあるいは両者を同時に開始したりと肺血管拡張療法とISTをうまく組み合わせCTD-PAHの治療を行っている実態が明らかとなった。

A.研究目的

膠原病性肺動脈性肺高血圧症(CTD-PAH)では、基礎疾患である膠原病(CTD)の種類によっては免疫抑制療法(IST)が有効であることが報告されている¹⁻³⁾。また、平成22年度の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(MCTD)の病態解明と治療法に関する研究」班にて作成されたMCTDの診療ガイドライン⁴⁾においても、肺動脈性肺高血圧症(PAH)に対する治療法としてISTが含まれている。そこで、この診療ガイドライン検証の一部として、①

CTD-PAHの診療に携わっている医師がCTD-PAHに対するISTをどのように考えているか、②実際の症例にISTがどのように実施されているかを明らかにする。

B.研究方法

①質問紙法を用いてCTD-PAHに対するISTについての医師の考え、②調査票を用いて症例の情報を収集した。①の対象は厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「MCTDの病態解明、早期診断と治療法の確立に関する研究」班の臨床系班員が所属する施

設でCTD-PAHの診療に携わっている医師とした。②の対象は①と同じ施設で最近治療されたCTD-PAH例を優先とし、各施設20例を目安とした。

①の調査内容は診療科、医師経験年数、PAH診療年数、全身性エリテマトーデス(SLE)・MCTD・全身性硬化症(SSc)に伴うPAHに対するISTの有効性に期待するか否か、CTD自体の活動性を伴わないCTD-PAH例に対するISTの有効性に期待するか否か、CTD自体の活動性を伴わないCTD-PAH例へのIST実施可否および実施していればその時期、CTD-PAHへのISTを考慮し始めた時期、ISTと肺血管拡張療法開始のタイミングである。

②の調査内容は基礎疾患としてのCTD、性別、年齢、PAHのWHO機能分類、肺動脈平均圧、肺動脈楔入圧、推定三尖弁圧較差、PAH以外のISTを必要とする病態の有無およびその病態、IST実施の有無およびその対象病態、実施したISTの内容、PAHがなかった場合の治療内容、肺血管拡張療法の有無およびその薬剤、肺血管拡張療法とISTとの実施タイミングである。

(倫理面への配慮)

患者情報の収集に関しては、個人情報保護のため、個人が特定される可能性のある患者番号、生年月日などの調査票への記載は求めている。

C. 研究結果

①CTD-PAHに対するISTをどのように考えているか。

リウマチ内科医64名、循環器内科医5名、診療科未記入1名の8施設70名の医師から回答を得た。SLEに伴うPAH(SLE-PAH)に対するISTに期待するとの回答は66名(94.3%)、期待しないとの回答は4名であった。MCTDに伴うPAH(MCTD-PAH)に対してはそれぞれ66名(94.3%)、4名、SScに伴うPAH(SSc-PAH)ではそれぞれ18名(26.1%)、51名であった(表1)。

表1. 基礎疾患ごとの肺動脈性肺高血圧症に対する免疫抑制療法への期待

	期待する	期待しない	計
全身性エリテマトーデス(SLE)	66名(94.3%)	4名	70名
混合性結合組織病(MCTD)	66名(94.3%)	4名	70名
全身性硬化症(SSc)	18名(26.1%)	51名	69名

CTD自体の活動性を伴わないCTD-PAH例に対するISTに期待するとの回答は14名で、リウマチ内科医が10名、循環器内科医が3名、診療科未記入が1名であった。全員がSLE-PAH、MCTD-PAHに対するISTに期待をし、SSc-PAHに対するISTに期待するのは1名のみであった(表2)。

表2. 膠原病の活動性を持たない肺動脈性肺高血圧症への免疫抑制療法に期待する医師の背景

医師経験年数	PAH診療経験年数	診療科	SLE-PAH	MCTD-PAH	SSc-PAH
34	10	リウマチ内科	○	○	×
28	15	リウマチ内科	○	○	×
25	25	リウマチ内科	○	○	×
20	20	リウマチ内科	○	○	×
14	9	未記入	○	○	×
8	5	リウマチ内科	○	○	×
8	3	リウマチ内科	○	○	×
10	4	リウマチ内科	○	○	○
10	6	循環器内科	○	○	×
15	5	リウマチ内科	○	○	×
25	23	リウマチ内科	○	○	×
13	5	循環器内科	○	○	×
35	未記入	循環器内科	○	○	×
11	8	リウマチ内科	○	○	×

また、CTD自体の活動性を伴わないPAH例に対するISTに期待すると答えた医師は期待しないと答えた医師に比し、医師経験年数が有意に長かった(図1)。

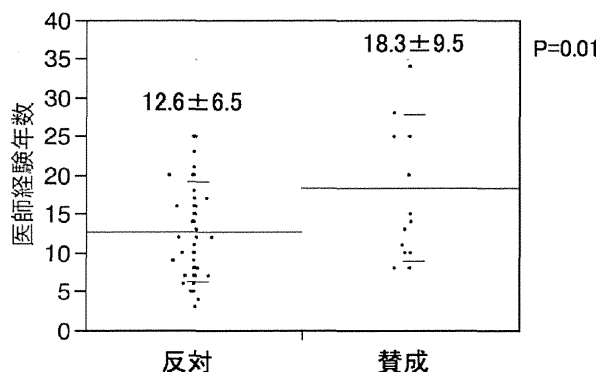
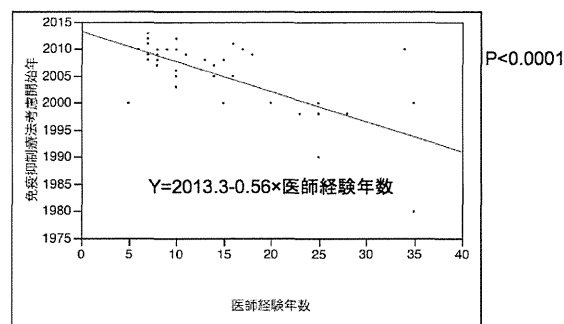


図1. 膠原病の活動性を持たない肺動脈性肺高血圧症への免疫抑制療法の賛否による医師経験年数



経験年数が長い医師ほど免疫抑制療法を考え始めた時期が早いのはもちろんであるが、傾きは-0.56と経験年数が短い医師ほど免疫抑制療法を考え始めるまでの期間が短くなっていることがわかる。

図2. 医師経験年数と免疫抑制療法を考え始めた時期との関連

CTDの活動性を伴わない例へのISTは2000年以前より行われてはいるが、2005年以降増加していた。CTDの活動性を伴わないCTD-PAH例へのISTを考え始めた時期としては、2000年以降が多くを占めていた。また、医師経験年数やPAH診療経験が短い程、これらの例にISTを考慮するまでの年数が短くなってきていることが判明した(図2)。

ISTと肺血管拡張療法との関連では、肺血管拡張療法にISTを先行させる医師は17名、両者同時に開始する医師は30名、肺血管拡張療法をISTに先行して実施する医師は17名、その他および未記入が6名であった。

②CTD-PAHに対するISTの実態

8施設より121例のCTD-PAH例が収集された。ISTの実態に関しては重複症候群（シェーグレン症候群の合併は重複とはしない）を除いた104例、ISTと肺血管拡張療法との実施タイミングの検討には121例全例を用いた。

ISTの実態に関して検討した患者背景は表3、4の如くであった。十分な症例数のあるSLE-PAH、MCTD-PAH、SSc-PAHをこれ以降の検討対象とした。

表3. 患者背景-1

疾患	症例数	男/女 (不明)	平均年齢 (不明)
全体	104	9/93 (2)	52.1±16.6 (3)
全身性エリテマトーデス (SLE)	18	1/17	36.3±14.1
全身性硬化症 (SSc)	47	4/43	61.6±12.7 (2)
混合性結合組織病 (MCTD)	28	3/24 (1)	50.5±15.5 (1)
多発性筋炎 (PM)	1	0/0 (1)	47.0
原発性シェーグレン症候群 (pSS)	4	0/4	46±13.7
高安静脈炎	2	0/2	38.0
ANCA関連血管炎 (AAV)	2	1/1	48.0
関節リウマチ (RA)	1	0/1	35.0
成人発症Still病	1	0/1	39.0

年齢 SSc vs SLE: p<0.0001, SSc vs MCTD: p=0.0014, SSc vs pSS: p=0.0341, SLE vs MCTD: p=0.0011

表4. 患者背景-2 (PAHの状態)

疾患	WHO機能分類 (不明) I / II / III / IV	mPAP (不明)	TRPG (不明)	楔入圧 (不明)
全体 (104)	7/40/38/8 (11)	38.6±9.9 (28)	52.2±17.5 (22)	7.9±4.3 (35)
SLE (18)	0/7/9/1 (1)	41.3±11.5 (1)	53.8±17.0 (4)	7.4±4.2 (3)
SSc (47)	2/20/16/4 (5)	34.2±7.7 (9)	48.3±14.6 (8)	9.0±4.5 (12)
MCTD (28)	4/11/11/1 (1)	43.4±8.1 (13)	55.0±20.7 (7)	6.8±3.5 (15)
PM (1)	0/0/0/0 (1)	— (1)	55	— (1)
pSS (4)	0/1/0/2 (1)	50.3±8.3	90 (3)	4.5±3.7
高安静脈炎 (2)	1/0/0/0 (1)	— (2)	69.9	— (2)
AAV (2)	0/1/1/0	52.0 (1)	48.5	8.0 (1)
RA (1)	0/0/1/0	31.0	40	5.0
成人発症Still病 (1)	0/0/0/0 (1)	— (1)	66	— (1)

mPAP SSc vs SLE: p=0.0074, SSc vs MCTD: p=0.0009, SSc vs pSS: p=0.0009, pSS vs SLE: p=0.0696, 楔入圧 SSc vs pSS: p=0.0504

表5. 基礎疾患別あるいは免疫抑制療法対象病態別免疫抑制療法実施状況

基礎疾患	免疫抑制療法		原病		PAH		PAHのみ
	あり	なし	Yes	No	Yes	No	
SLE	14	4	12	2	8	6	2
SSc	8	39	7	1	1	7	1
MCTD	14	14	10	4	6	8	4

免疫抑制療法 PAH SSc vs SLE: p=0.0001, SSc vs MCTD: p=0.0026, SLE vs MCTD: p=0.0723, SSc vs SLE: p=0.0743

(いずれもFisherの直接確率計算法)

基礎疾患別のIST実施の有無、ISTの対象病態（原病あるいはPAH）を表5に示す。SSc-PAHでは他の2疾患に比し、ISTの実施率は有意に低かった。また、MCTD-PAHではSLE-PAHに比し、IST実施率は低い傾向を認めた。また、SSc-PAHではPAHに対するIST実施率がSLE-PAH

に比し低い傾向を認めた。SLE-PAHでは2例、SSc-PAHでは1例、MCTD-PAHでは4例、PAHのみを対象としてISTが実施されていた。

IST実施患者における疾患別のISTの実態を表6に示す。ステロイド薬投与量はSLE-PAH、MCTD-PAH、SSc-PAHの順で、SSc-PAH、MCTD-PAHはSLE-PAHに比し有意に低量であった。

内服の免疫抑制薬使用については各疾患において差を認めなかった。

シクロホスファミド (CPM) パルス療法はSLE-PAH、SSc-PAHでMCTD-PAHに比し高率に実施されていた。しかし、SSc-PAHにおいてはCPMパルス療法の対象病態はPAHではなく、間質性肺炎にであった。

表6. 疾患別免疫抑制療法の実態

疾患	免疫抑制療法実施患者数	PSL投与量 (mg/日)	ステロイドパルス		免疫抑制薬 (内服)		CPMパルス	
			あり	なし	あり	なし	あり	なし
SLE-PAH	14	51.3±17.6	10	7	4	13	9	8
SSc-PAH	8	21.9±19.3	3	15	3	14	8	10
MCTD-PAH	14	32.5±10.5	8	25	1	16	3	14

PSL投与量 ステロイドパルス CPMパルス
SLE vs SSc: p=0.0001 SLE vs SSc: p=0.0609 SLE vs MCTD: p=0.0461
SLE vs MCTD: p=0.0025 SLE vs MCTD: p=0.0768 SSc vs MCTD: p=0.0173
(いずれもFisherの直接確率計算法)

PAHの存在がISTの強化につながった症例は重複症候群を含めた121例中16例に認めた。この中、10例はISTの対象病態がCTD-PAHのみであり、他の6例はPAH以外の活動性病態に必要な治療以上のISTが実施されていた。

肺血管拡張療法は重複症候群を含む121例で検討した。肺血管拡張療法実施患者は113例、未実施7例、不明1例であった。肺血管拡張療法の併用療法は68例で実施され、3剤併用は27例、2剤併用は41例であった。2剤併用例中、プロスタグランディンI2製剤 (PGI2) とエンドセリン受容体拮抗薬 (ERA) の併用は17例、PGI2とホスホジエステラーゼ-5阻害薬 (PDE-5I) の併用は9例、ERAとPDE-5Iの併用は15例であった。

表7. 免疫抑制療法と肺血管拡張療法との実施タイミング

基礎疾患	免疫抑制療法先行	同時	肺血管拡張療法先行	肺血管拡張療法のみ
全体	10	18	12	58
SLE	3	6	3	5
SSc	2	5	6	38
MCTD	3	5	4	14

肺血管拡張療法とISTとの実施タイミングについて表7に示す。IST先行が10例、同時が18例、肺血管拡張療法先行が12例、肺血管拡張療法のみが58例、不明が15例であった。しかし、基礎疾患によりこの分布は異なっていた。基礎疾患にSLEを有する患者では、IST先行が3例、同時が6例、肺血管拡張療法先行が3例、肺血管拡張療法のみが5例、不明が2例、SScを基礎疾患に有する患者では、IST先行が2例、同時が5例、肺血管拡張療法先行が6例、肺血管拡張療法のみが38例、