

不明が5例、MCTDを基礎疾患に有する患者では、IST先行が3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14例、不明が4例であった。すなわち、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（いずれも不明を除く）。

#### D. 考察

CTD-PAHの中でもSLE-PAHやMCTD-PAHではISTの有効性が報告されてきた<sup>1-3)</sup>。一方、SSc-PAHでのISTの効果は否定的とされている<sup>1),3)</sup>。

今回の調査でSSc-PAHに対するISTに25%以上の医師が期待すると答えており、さらなる啓蒙活動が必要と考えられた。CTD自体の活動性を伴わないCTD-PAHに対し、2005年以降ISTの実施症例が増加し、そのような治療を考え始めた時期としては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<sup>5)</sup>。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。一方で、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を考えるようになるまでの期間が短くなっていた。若い医師は身近でCTD自体の活動性を伴わないCTD-PAHに対するISTに関する議論に接する機会を得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。

症例調査において、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%）であり、ほぼ適切にISTが選択実施されていたと考えられる。

肺血管拡張療法と同時あるいは肺血管拡張療法に先行してISTが実施されていたのは基礎疾患がSLEの患者では53%、MCTDでは31%、SScでは14%であった。反対にISTが実施されなかったのはSLEで29%、MCTDでは54%、SScでは75%であり、基礎疾患によるISTへの期待度の違いを反映していた。

これらの結果からは、MCTD-PAHに対してももう少し積極的にISTが実施されても良いようにも思われるが、ISTの有効性はSLE>MCTD>SScであろうとの考え方に

概ね合致し、適切にISTが選択されているものと考えられた。

#### E. 結論

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。

文献)

- 1) Sanchez O., Sitbon O., Jais X., et al. Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* 130(1): 182-189, 2006.
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) 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.
- 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) 深谷修作:【リウマチ性疾患における心血管障害】膠原病性肺高血圧症のマネージメント. *リウマチ科* 46巻4号: 353-363, 2011.
- 2) Ozaki S., Ando M., Kobayashi S., et al: Guideline for management of vasculitis syndrome (JCS 2008). Japanese Circulation Society. *Circ J*. 75(2): 474-503, 2011.
- 3) 深谷修作, 西野譲, 加藤賢一. 膠原病患者における感染症 サイトメガロウイルス感染症を中心に. *感染防止* 22巻3号, 5-10, 2012.

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

5) 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

6) 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.

7) 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.

8) 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

深谷修作. 膠原病性肺高血圧症の治療戦略. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2012.

深谷修作. 膠原病性肺高血圧症の診断. 第 1 回日本肺循環学会学術集会. 2012.

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. 2013.

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）  
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診断の手引きの検証に関する研究

研究分担者	深谷 修作	藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科	臨床准教授
研究分担者	田中 住明	北里大学医学部膠原病感染内科学	准教授
研究分担者	藤井 隆夫	京都大学大学院医学研究科リウマチ性疾患制御学講座	准教授
研究分担者	桑名 正隆	慶應大学医学部リウマチ内科	准教授
研究分担者	松下 雅和	順天堂大学医学部膠原病内科	助教
研究分担者	川口 鎮司	東京女子医科大学リウマチ科	臨床教授
研究代表者	吉田 俊治	藤田保健衛生大学医学部リウマチ・感染症内科	教授

### 研究要旨

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

### A. 研究目的

平成 22 年度に「厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 混合性結合組織病の病態解明と治療法の確立に関する研究」班にて「混合性結合組織病（MCTD）の肺動脈性肺高血圧症（PAH）診断の手引き」（以下改訂手引き）が作成された<sup>1)</sup>。しかし、改訂手引きの検証は行われておらず、その検証を目的とした。

### B. 研究方法

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

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

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

#### （倫理面への配慮）

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

### C. 研究結果

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

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

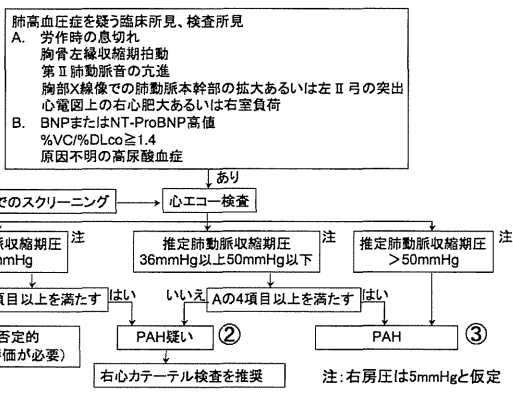


図1. 混合性結合組織病の肺動脈性肺高血圧症診断アルゴリズム(文献1)より引用改変)

1. ①に関する検討

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

MCTD例のみでの検討では4例中1例が偽陰性例であった。

2. ③に関する検討

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

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

3. 改訂手引きと旧手引きの比較(表1)

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

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

あった。

表1. 旧手引きと改訂手引きの感度・特異度の比較

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

膠原病患者全体

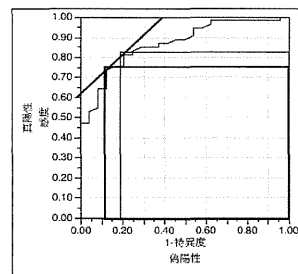
	感度	特異度
旧手引き	62.5%(10/16)	77.8%(7/9)
改訂手引き	94.2%(16/17)	88.9%(8/9)

混合性結合組織病患者のみ

4. その他の指標

TRPG(図2)

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



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

図2. TRPG値を用いた膠原病性肺動脈性肺高血圧症診断の感度・特異度

BNP(図3)

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

PAHあり:49例 352.6±427.7pg/ml  
PAHなし:21例 81.4±60.1pg/ml p<0.01

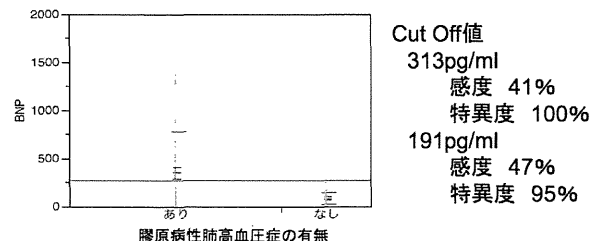


図3. BNPを用いた膠原病性肺動脈性肺高血圧症診断

%DLco

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

%VC・%DLco比(%VC/%DLco)

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

## D. 考察

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

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

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

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

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

## E. 結論

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

文献)

- 1) 吉田俊治、深谷修作、京谷晋吾、桑名正隆、藤井隆夫、三森経世. 混合性結合組織病(MCTD)の肺動脈性肺高血圧症(PAH)診断の手引き改訂について. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 混合性結合組織病の病態解明と治療法の確立に関する研究 平成2年度総括・分担研究報告書、7-13、2011.
- 2) 厚生省結合組織病調査研究班: 混合性結合組織病の肺高血圧症診断の手引き. リウマチ 31: 159-166, 1991
- 3) 吉田俊治、深谷修作、岡田純、近藤啓文. 混合性結合組織病における肺高血圧症の合併頻度. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 混合性結合組織病に関する研究 平成15年度 総括・分担研究

報告書、43-46、2004.

4) 吉田俊治、深谷修作. 膠原病性肺高血圧症の頻度と病態の解析. 厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 全身性自己免疫疾患における難治性病態の診断と治療法に関する研究 平成15年度 総括・分担研究報告書、40-43、2004.

5) Galie N., Hoepfer M.M., Humbert M., et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Heart J. 30(20) : 2493-2537, 2009

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1.論文発表

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

### 2.学会発表

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

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

## H.知的財産権の出願・登録状況

### 1.特許取得

なし

### 2.実用新案登録

なし

### 3.その他

なし

## NPSLE 患者脳脊髄液中における抗 U1RNP 抗体と液性因子に関する研究

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

### 研究要旨

われわれは、全身性エリテマトーデス (SLE) および MCTD 患者が中枢神経 (CNS) 症状を合併した場合、primary neuropsychiatric SLE (primary NPSLE) では脳脊髄液 (CSF) 中の抗 U1RNP 抗体が高率に陽性となること、また CSF-抗 U1RNP 抗体陽性例では陰性例に比し IFN- $\alpha$ 、MCP-1 が高値となることを報告した。さらに最終年度では、CSF 中の IL-6 と 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。CNS 症状を呈した 77 例の MCTD あるいは SLE において CSF-抗 U1RNP 抗体の存在と CSF-IL-6、BAFF、APRIL とは有意な相関はなかった。一方、血清/CSF-抗 NR2 抗体陽性の患者では血清/CSF-陰性例あるいは血清陽性/CSF 陰性症例に比し CSF-IL-6 が有意に高値であった (59.1 vs. 28.8 pg/mL あるいは 59.1 vs. 2.85 pg/mL)。また CSF-BAFF も血清/CSF-抗 NR2 抗体陽性の患者で高濃度になる傾向があった。しかし CSF-APRIL については差を認めなかった。本研究から CSF-抗 U1RNP 抗体陽性例の CNS で BAFF や APRIL の活性化は示されなかったが、抗 NR2 抗体との差異が認められたことは、これらの CSF 中の自己抗体により病態が異なる可能性を示唆していると考えられる。

### A. 研究目的

われわれは本学会で、抗 U1RNP 抗体陽性全身性エリテマトーデス (SLE) および混合性結合組織病 (MCTD) 患者が中枢神経 (CNS) 症状を合併した場合、primary neuropsychiatric SLE (primary NPSLE) では脳脊髄液 (CSF) 中の抗 U1RNP 抗体が高率に陽性となるのに対し、ステロイド精神病など他の原因による secondary NPSLE 症例では陰性であることを報告してきた (Sato T, et al, *Arthritis Rheum*, 2010)。また CSF-抗 U1RNP 抗体と炎症性メディエーター (NPSLE と関連するサイトカイン・ケモカイン) に相関がないかどうかを CSF 中の抗 SS-A/Ro 抗体や抗 N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NR2) 抗体と比較して調べ、本会

議でも報告してきた (図 1、2)。近年、BAFF (CD257、B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family) を標的とする生物学的製剤 Belimumab が SLE 治療薬としてアメリカ FDA で承認されたが、古くから SLE における BAFF の病因的意義が注目されている。またわれわれは CSF-抗 U1RNP 抗体が CNS で産生刺激されていると考えているが、BAFF 濃度の上昇は自己反応性 B 細胞活性化の根拠となる。そこで本年度は、NPSLE 患者において、血清および CSF-抗 U1RNP 抗体および抗 NR2 抗体の測定とともに、同検体で BAFF、APRIL (CD256、a proliferation-inducing ligand) および IL-6 を測定して比較し、抗体とこれらの液性因子との相関を調べた。

## B. 研究方法

精神神経症状を呈した膠原病(SLEあるいはMCTD)患者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(Sato T, et al, *Arthritis Rheum*, 2010)で、抗NR2抗体をELISAで測定した。なお抗NR2抗体のELISAはOmdaiらの方法(*Eur J Neurol*, 2005)に従った。またCSF中の液性因子(IL-6、BAFF、APRIL)の測定はFilgen社に依頼し、Procarta® Cytokine Assay kitを用いてBio-Plex™により測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、京都大学大学院医学研究科 医の倫理委員会において承認された(平成17年E97号)。

## C. 研究結果

### 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。今回の対象例では、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濃度を比較検討したがCSF-抗U1RNP抗体陽性例で有意に高値となるものは存在しなかった(本報告書にデータは示していない)。

### 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。図3のとおり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( $p < 0.1$ )があった

がSnCn群とは全く差を認めなかった(図4)。さらにAPRILについては群間で差はなかった(データは示していない)。

## D. 考察

NPSLEはしばしば診断が困難である。また診断されても、いくつかの病態が混在するため症状が複雑である。またその局所でいかなる炎症性メディエーターが活性化されかつ病態に関与しているか明確でないため、一律にステロイド大量療法を含めた免疫抑制療法が導入されることになる。われわれは本班会議でCSF中の抗U1RNP抗体の測定が臨床的意義を有し、また検出された場合、CSF中のIFN- $\alpha$ やMCP(monocyte chemoattractant protein)-1が高濃度になることを報告してきた(図1、横山ら、*Lupus*, in revision)。またCSF-抗NR2抗体陽性の場合にはCSF-MIG(monokine induced by IFN- $\gamma$ )が高値となっていた。これらの炎症性メディエーター(IFN- $\alpha$ 、MCP-1、MIG)は過去にprimary NPSLEのCSF中で高濃度となることが報告され、病因的意義を有する可能性が高いと考えている。したがって、抗U1RNP抗体と抗NR2抗体はそれぞれ特異的な病因的炎症性メディエーターの活性化とともにNPSLEの病態に関わっている可能性があり、かつお互い異なっていた。

今回測定したBAFFとAPRILはCD40リガンドと同じTNFファミリーに属する分子で、いずれもB細胞を活性化因子である。近年、BAFFをターゲットとした生物学的製剤(Belimumab)がFDAで承認され、アメリカではSLE治療薬として使用できるようになった。血清中のBAFFやAPRILの濃度がSLEで高くなることは古くから報告され(Zhang J, et al, *J Immunol*, 2001, Koyama T, et al, *ARD*, 2005)、最近ではSLEのCSFでその両者が高濃度になることも示された(George-Chandy A, et al, *Arthritis Res Ther*, 2008)。しかし明らかなNPSLEに症例を限るとCSF-BAFF濃度で有意差はなく、APRILのみ有意であった(Hopia L, et al, *Scand J Rheumatol*,



2011)。今回のわれわれの検討では、APRIL 濃度の差異は CSF-抗 U1RNP 抗体あるいは抗 NR2 抗体陽性・陰性例で認められなかった。CNS 症状を有しない SLE 患者あるいは非 SLE コントロールがとれていないため、過去の成績と比べることができないが、CSF-BAFF 濃度についてはその CSF 中に存在する抗 NR2 抗体が重要である可能性が示唆された。過去の論文データとの相違を明らかにするため、適切なコントロールと比較する必要はある。

In vitro の実験系で、抗 NR2-IgG が血管内皮細胞から IL-6 や IL-8 の分泌を亢進させるという報告がある (Yoshio T, *et al*, *Arthritis Rheum*, 2012)。今回のわれわれの結果と合わせ、CSF-IL-6 は CSF-抗 NR2 抗体により CNS で誘導された可能性が考えられる。抗 NR2 抗体が病因的意義を発揮するためには血液脳関門傷害が必要であるが、高濃度 CSF-IL-6 は血液脳関門の破壊にも関与する可能性がある。

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。今後 CSF 中のみでなく、血清中の BAFF や APRIL を併せて測定し、血清中に比べ CSF 中でこれらの液性因子がより上昇していないか (CSF/血清比) と CSF-抗 U1RNP 抗体との相関を検討したい。

#### E. 結論

血清-抗 U1RNP 抗体が陽性で精神神経症状を有した場合、CSF-抗 U1RNP 抗体は臨床的意義を有し、その陽性患者における中枢神経障害に IFN- $\alpha$  や MCP-1 が関与している可能性がある。また 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. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Kazuhiro Kiyama, Daisuke Kawabata, Yuji Hosono, Koji Kitagori, Naoichiro Yukawa, Hajime Yoshifuji, Koichiro Omura, Takao Fujii, and Tsuneyo Mimori. Serum BAFF and APRIL levels in patients with IgG4-related disease and their clinical significance. *Arthritis Res Ther* 2012;14: R86.
2. Masayoshi Nakano, Takao Fujii, Motomu Hashimoto, Naoichiro Yukawa, Hajime Yoshifuji, Koichiro Ohmura, Akihiko Nakaizumi, and Tsuneyo Mimori. Type I interferon induces CX3CL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 2012;170:94-100.
3. Naoichiro Yukawa, Takao Fujii, Seiko Kondo-Ishikawa, Hajime Yoshifuji, Daisuke Kawabata, Takaki Nojima, Koichiro Ohmura, Takashi Usui, and Tsuneyo Mimori. 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*, 2011;13:R213.
4. Naho Takeda, Tataka Nojima, Chikashi Terao, Naoichiro Yukawa, Daisuke Kawabata, Koichiro Ohmura, Takashi Usui, Takao Fujii, Yosinaga Ito, Yoshitaka Iinuma, and Tsuneyo Mimori. Interferon-gamma release assay for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infections in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011; 20: 792-800.

#### H. 知的財産権の出現・登録状況

なし

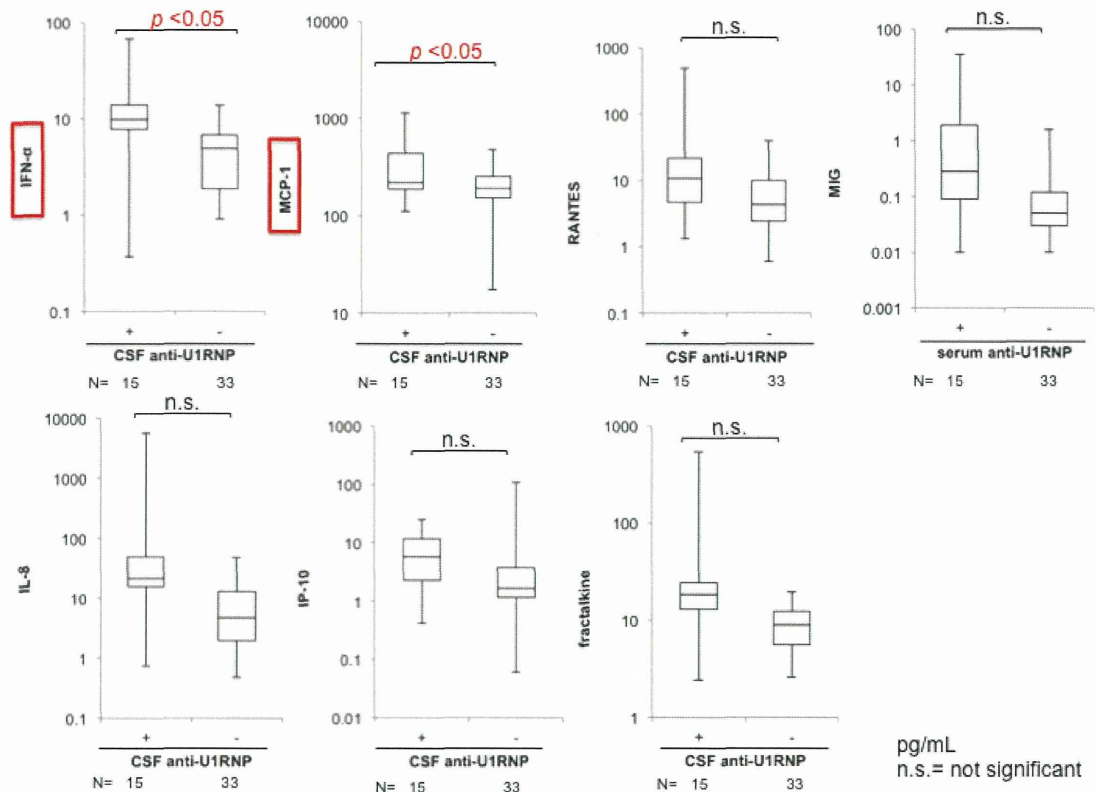


図 1. CSF-抗 U1RNP 抗体と CSF 中の液性因子 (2011 年度データ)

精神神経症状を呈した膠原病患者 82 例 (SLE 76 例、NCTD 3 例、1 次性シェーグレン症候群 3 例) において、血清および CSF 中の抗 U1RNP 抗体と抗 SS-A/Ro 抗体を RNA 免疫沈降法で、抗 NR2 抗体を ELISA で測定した。また CSF 中の液性因子の測定は Filgen 社に依頼し、Procarta® Cytokine Assay kit を用いて IFN- $\alpha$ 、IL-8、IP (interferon-inducible protein) -10、MCP (monocyte chemoattractant protein) -1、MIG (monokine induced by IFN- $\gamma$ )、RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)、fractalkine の 7 種類を Bio-Plex™ により測定した。対象症例 82 例は、アメリカリウマチ学会 NPSLE 分類では、headache:18 例、psychosis:12 例 cranial neuropathy 9 例、mononeuropathy 8 例、cognitive dysfunction:7 例、seizure disorder:6 例、cerebrovascular diseases:5 例、aseptic meningitis:4 例、myelopathy:4 例、mood disorder:3 例、acute confusional state:2 例、demyelinating disease (transverse myelopathy): 1 例、movement disorder:1 例、polymyopathy:1 例、acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy:1 例 (最も前面にたった症状を記す) であった。CSF-抗 U1RNP 抗体は、血清-抗 U1RNP 抗体陽性の症例のみに見いだされたため、血清-抗 U1RNP 抗体陽性 48 例に限り液性因子を比較すると、CSF-抗 U1RNP 抗体陽性例では IFN- $\alpha$  (13.7 vs. 4.9 pg/mL,  $p < 0.05$ )、MCP-1 (364 vs. 208 pg/mL,  $p < 0.05$ ) が有意に高値であった。

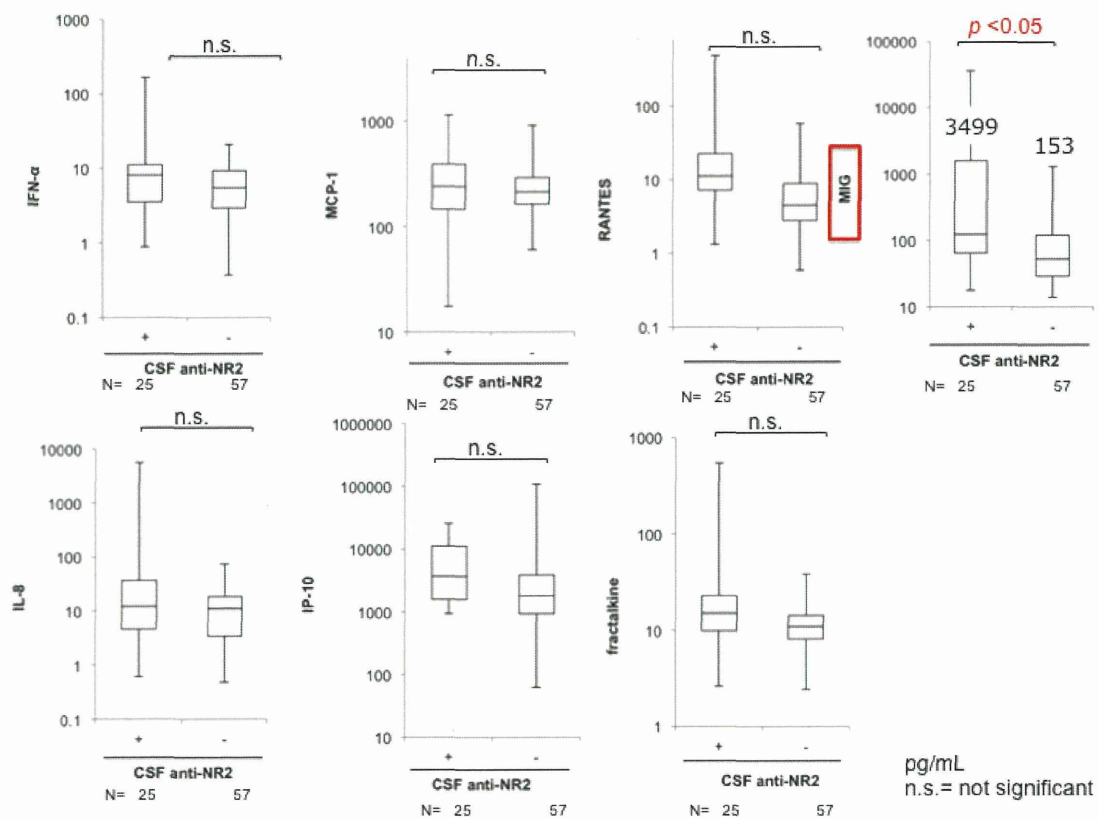


図 2. CSF-抗 NR2 抗体と CSF 中の液性因子 (2011 年度データ)

CSF-抗 NR2 抗体は血清-抗 NR2 抗体が陰性の症例でも 10%で認められ、CSF-抗 NR2 抗体陽性例 (25 例、30%)と陰性例 (57 例、70%)にわけて検討したところ、陽性例で MIG (3499 vs. 153 pg/mL、 $p < 0.05$ )が高値であった。

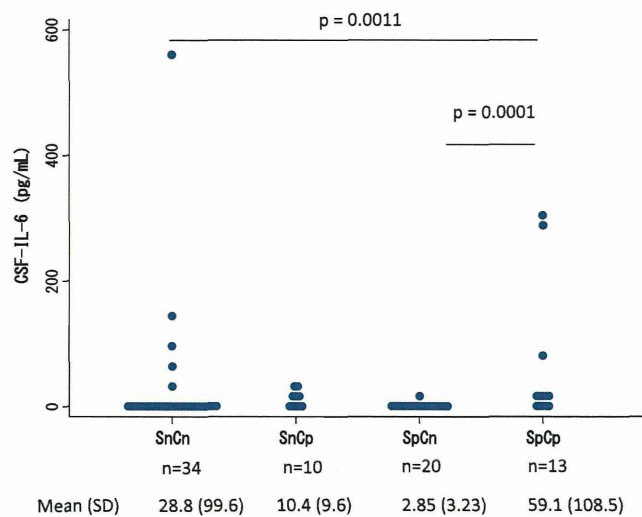


図 3. CSF-抗 NR2 抗体と CSF-IL-6 濃度 (2013 年度データ)

血清/CSF-抗 NR2 抗体陽性例 (SpCp) では血清/CSF-抗 NR2 抗体陰性例 (SnCn) および抗 NR2 抗体血清陽性・CSF 陰性例 (SpCn) に比して有意に IL-6 濃度が高かった。抗 NR2 抗体は血清で陰性でも CSF で陽性になる症例 (SnCp) があつたが、他の群間では有意差を認めなかつた。

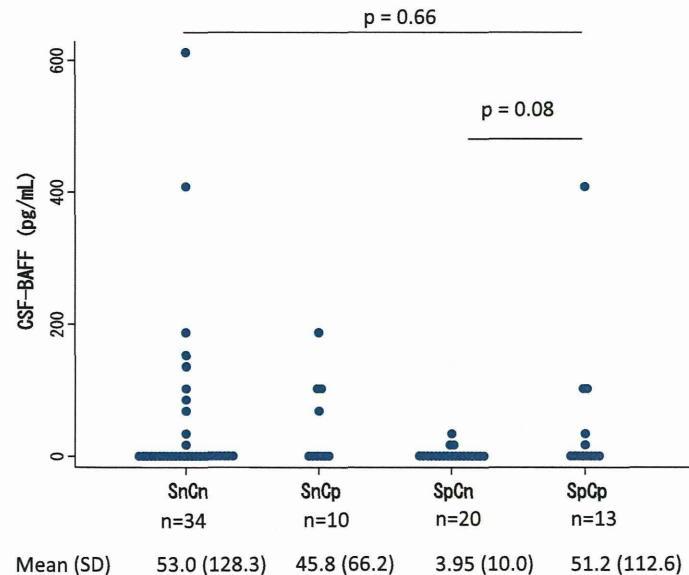


図 4. CSF-抗 NR2 抗体と CSF-BAFF 濃度 (2013 年度データ)

血清/CSF-抗 NR2 抗体陽性例 (SpCp) では抗 NR2 抗体血清陽性・CSF 陰性例 (SpCn) に比して CSF-BAFF 濃度が高い傾向にあつた。しかし血清/CSF-抗 NR2 抗体陰性例 (SnCn) との差はなかつた。また他の群間では有意差を認めなかつた。

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 (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

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) マウスは肺間質の線維化および肺動脈の狭窄病変を自然発症する。これらフェノタイプの発現に先行し病変部への単球を中心とした炎症性細胞浸潤が認められる。そこで本マウスを用いて、混合性結合組織病 (MCTD) の予後規定因子である間質性肺疾患(ILD)、肺動脈性肺高血圧症(PAH)の病態における単球の役割を追究した。Fra-1 TG マウスでは野生型マウスと比較し、肺間質、気管支血管束の炎症性細胞浸潤と線維化が進行し( $P < 0.0008$ )、時間的・空間的に均一であった。肺動脈は血管周囲の炎症性細胞浸潤と線維化、内膜の増殖・内腔の狭窄、中膜筋層の肥厚を認めた。また Fra-1 TG マウスではエコー上、三尖弁逆流が検出され、右室肥大がみられた。浸潤する炎症性細胞は単球が優位で、M2 に偏移していた。また MCTD/強皮症患者末梢血単球でも Fra-1 が高発現し、肺病変部組織では Fra-1 を発現する M2 単球が優位に浸潤していた。Fra-1 TG マウスは M2 単球優位の浸潤が先行し、ILD/PAH を同時に発症する新規モデルマウスである。MCTD/強皮症患者でも同様の変化がみられ、Fra-1 TG マウスが MCTD の病態解析に有用なツールと考えられた。

A. 研究目的

混合性結合組織病 (MCTD) は強皮症 (SSc)、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、線維化の三つの病態を併せ持つことが挙げられる。なかでも間質性肺疾患(ILD)、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) はMCTDの主要な死因で、自覚症状や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(1)、肺血管系の異常も伴うことを見いだした。これらの顕性化に先行し病変部への炎症性細胞浸潤が認められることから、浸潤する単球などの炎症性細胞が病変形成に重要な役割を持っている可能性がある。そこでこのマウスを用い、混合性結合組織病の予後規定因子である間質性肺疾患 (ILD)、肺動脈性肺高血圧症(PAH)の病態形成における単球の役割を追究することを目的とした。

B. 研究方法

1. Fra-1 TG マウスおよび対照マウス

Fra-1 TG マウス (♀) 11 匹 (5-24 週齢) および同週齢の野生型マウス (♀) 11 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 H2-*fra-1* TR ベクター (p128/1) を HindIII 処理後、受精卵に導入し (C57BL/6 x CBA F1)、作成した。心臓、肺を摘出した。

2. 対象患者と対照症例

対象は 2004 年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 より提供を受けた。

3. 線維化および肺動脈病変の評価

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) 染色を行った。肺の線維化の程度は Ashcroft score (2) を用いて定量化した。右室肥大の程度は右心室壁厚/(左心室壁厚+心室中隔厚)により評価した。

4. 心エコーによる肺高血圧の機能的評価

病変が完成した 14-16 週のマウスで、心エコーを用

いて、三尖弁逆流ジェットを評価した。

#### 5. 免疫蛍光染色・免疫組織化学による評価

T細胞、B細胞、単球、および単球サブセットは免疫組織化学で検出した。一次抗体として抗CD3抗体、CD45R抗体、抗CD68抗体を用いた。Fra-1、alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)の発現は抗Fra-1抗体、抗CD31抗体または抗 $\alpha$ SMA抗体を用いた。また、蛍光多重染色によりM1サブセット(CD68<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>細胞)、M2サブセット(CD68<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>細胞)を検出した。

6. 末梢血単球における Fra-1 遺伝子発現の定量的解析  
末梢血単核球を比重遠心法で分離後、MACS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)<sub>12-18</sub> プライマーおよび reverse transcriptase を用い cDNA を作成した。作成した cDNA を用い TaqMan® Gene expression assays を用いた定量的 PCR で検討した。それぞれの遺伝子の発現レベルは GAPDH の発現強度で補正した。

#### 7. 末梢血単球における Fra-1 蛋白の発現レベル解析

CD14<sup>+</sup>単球( $2 \times 10^6$ )を sodium dodecyl sulfate および 2-mercaptoethanol 存在化で可溶化し、免疫プロットの抗原とした。Fra-1 およびリン酸化 Fra-1 の検出は抗 Fra-1 抗体、抗リン酸化 Fra-1 抗体を用いて検出した。それぞれのバンドを Image J で定量化し、発現レベルは  $\beta$ -actin の発現強度で補正した。

#### 8. 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。

#### (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、全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. Fra-1TG マウスの組織学的検討

Fra-1 TG マウスでは野生型マウスと比較し、肺間質の線維化が進行し、Ashcroft の線維化スコアでも有意な線維化を認めた ( $P < 0.0008$ ) (図1)。病変はびまん性に肺胞隔壁の肥厚と血管気管支束に沿って、炎症性細胞浸潤、時間的、空間的に均一な線維化が経時的に進行していた。肺動脈では血管周囲の炎症性細胞浸潤を初期に、後期には線維化を認め、10週より内膜の増殖と肥厚、および内腔の著明な狭窄を認め、14週目には増殖した内膜がその萎縮しつつ重層化、16週目には中膜筋層の肥厚が著明となった。肥厚した血管の内膜や中膜の線維化および血管周囲の線維化を認め、さらに肥厚した血管の内膜や中膜では $\alpha$ SMA陽性細胞が多く認められた。また、10週齢のマウスでは本来非筋性

の細小動脈の muscularization を認めた。心エコーでは、Fra-1 TG マウスで三尖弁逆流が検出され、また野生型マウスに比べて右室肥大も認められた ( $P < 0.002$ )、肺高血圧の存在が確認された。

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、T細胞、B細胞では差を認めなかったのに対し、TG マウスでは単球が有意に多く浸潤していた。さらに浸潤する単球は M2 単球が優位であった (図2)。

### 3. MCTD/SSc 患者由来末梢血単球における Fra-1 遺伝子発現の定量的解析

Fra-1 に着目し、末梢血単球における Fra-1 遺伝子の発現を定量的 PCR (TaqMan® PCR) で解析した。MCTD/SSc では健常人と比較し 7.38 倍 Fra-1 遺伝子の発現が亢進していた ( $0.29 \pm 0.56$  vs  $2.14 \pm 2.41$ ,  $p < 0.05$ ) (図3)。

### 4. MCTD/SSc 患者由来末梢血単球における Fra-1 蛋白発現レベルの解析

単球中の Fra-1 の発現について免疫プロットを用いて検討した。Total Fra-1 およびリン酸化 Fra-1 は共に健常人と比較し、MCTD/SSc で高発現していた ( $1.0 \pm 0.3$  vs  $2.9 \pm 6.5$ ,  $p < 0.05$ )。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 は強い相関を認めた ( $r = 0.995$ ,  $p < 0.05$ )。

### 5. 免疫組織化学による MCTD/SSc 肺病変部組織における 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。さらに単球のサブセットでは M2 単球の浸潤を有意に認めていた ( $P < 0.05$ )。

## D. 考察

Fra-1 TG マウスは元々骨形成に異常をきたし、骨硬化症のモデルマウスとして報告された(3)。今回の我々の検討では、Fra-1 TG マウスの肺の形質に着目して詳細に検討した。その結果、組織学的に肺間質の線維化が進行、その分布は特に血管気管支束・間質への炎症性細胞浸潤と線維化が著明で、どの週齢においても時間的・空間的に均一な病変であった。また、肺動脈では血管周囲の炎症性細胞浸潤が先行し、線維化を後期に認めた。また10週の時点で内膜の変化(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。これら肺病変および肺血管病変の組織学

的变化はMCTDやSScで認められるILDやPAHの病理像に類似していた。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。Fra-1 TG マウスでも浸潤細胞は主に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、ヒトの検体での検討では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ている。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 TG マウスはILDおよびPAHを同時に発症する新規モデルマウスで、MCTDおよびSScの病態解析に有用と考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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. Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Satoh T, Kuwana M: Long-term outcomes of patients with pulmonary arterial hypertension and connective tissue disease treated with intravenous epoprostenol. 2nd Systemic Sclerosis World Congress (Madrid). 2012. 2.
2. 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. 5<sup>th</sup> International SSc Forum 2013 (Prague). 2013. 10.
3. 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

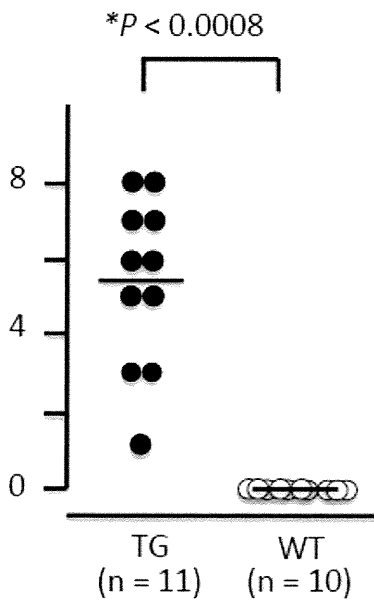


図1. Fra-1 トランスジェニック(TG)マウスおよび野生型マウス(WT)における肺線維化の比較(Ashcroft scoreによる)

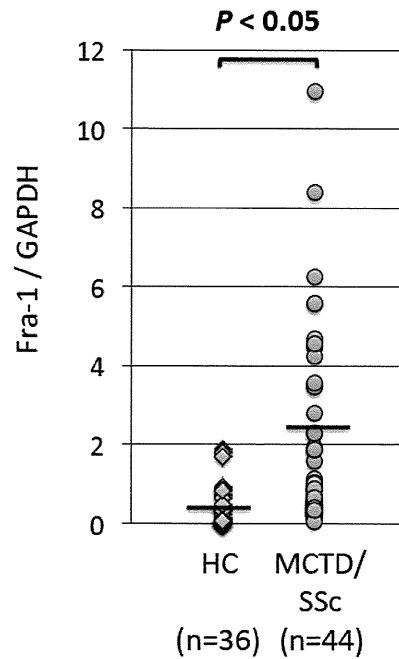


図3. 定量的PCRを用いた単球におけるFra-1 mRNAの発現の検討. TaqMan® PCRによりFra-1 mRNA発現を検討した。HC: healthy control, MCTD/SSc: mixed connective tissue disease/systemic sclerosis

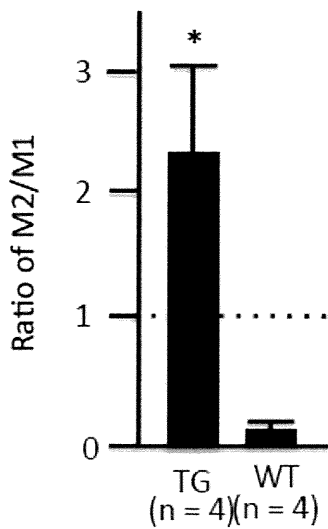


図2. Fra-1 トランスジェニック(TG)マウスおよび野生型マウス(WT)における単球サブセット M1 に対する M2 の比率. \*P < 0.05



## 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

混合性結合組織病は抗核抗体である抗 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混合性結合組織病の病態理解と治療への応用に重要と考えられるが、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まずヌードマウスへの T 細胞移入による抗核抗体産生系を樹立し、その系を用いて抗 RNP 抗体の産生機序の研究を行ってきた。これまでの研究により、抗 RNP 抗体産生の産生に関わる T 細胞の同定を行い、リンパ球減少下では CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は新たな follicular helper T 細胞サブセットと考えられる CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞 (LIP-TFH) に分化しうることを、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が惹起されることを明らかとなった。今回この 3 カ年の研究を通して、LIP-TFH の分化過程を明らかにすることができた。まず T 細胞受容体に関しては、LIP-TFH の分化や抗核抗体産生においては、臓器特異的な自己抗体産生や疾患発症と異なり特異性に乏しかった。また制御性 T 細胞が TFH 様細胞に分化することが報告されているが、制御性 T 細胞のマスター遺伝子である Foxp3 欠損マウスを用いた研究から本系では LIP-TFH の分化には関連していないと考えられた。更に、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結果、LIP-TFH の分化や全身性及び臓器特異的な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ことが示された。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 MCTD の主病態である全身性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。本研究は、既に抗 RNP 抗体産生を認めるマウスモデルを開発しており、この系の誘導条件を変更することにより、抗 RNP 抗体産生機構の検討が可能となっている。そこで、本系を用いて、自己抗体産生に関わる因子として、T 細胞受容体特異性の検討、toll 様受容体や制御性 T 細胞の関与の解析を行うことを目的とする。更に、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との関係から、本系における自己免疫と腸内細菌との関連の解析を行い、抗 RNP 抗体産生に関わる分子や細胞群を明らかにすることを目的として本研究を行った。

### B. 研究方法

(1) 抗 RNP 抗体産生機序解析のためのマウスモデル

1) 抗 RNP 抗体誘導系の解析のための 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<sup>+</sup>T 細胞や CD4<sup>+</sup>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 $\alpha$  欠損マウスおよび TLR9 欠損 TCR $\alpha$  欠損マウスを作成した。TCR $\alpha$  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 $\alpha$  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。

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 DO11.10 マウス) から CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し移入する実験を行った。更に、Foxp3 の関与を検討するため、Foxp3 欠損 RAG2 欠損 DO11.10 マウスから CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し移入する検討も行った。

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<sup>+</sup>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 マウスもしくは RAG2 欠損 DO11.10 マウスや Foxp3 欠損 RAG2 欠損 DO11.10 マウスからより採取した CD4<sup>+</sup>T 細胞を、ヌードマウスもしくは TCR $\alpha$  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<sup>+</sup>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  $2.5 \times 10^6$  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、 $4^\circ\text{C}$  一晩静置して個層化した。洗浄後に 1% BSA-0.05% Tween20-PBS で 2 時間ブロッキングし、50 倍に希釈したマウス血清  $50 \mu\text{l/well}$  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 (K irkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) で発色させ、リン酸で発色を止め、波長 450nm で吸光度を測定した。

### 6) Flow cytometry

レシピエントにおける移入 T 細胞や B 細胞の表面分子の染色は、細胞を  $4^\circ\text{C}$  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% NaN<sub>3</sub>-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) 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ため、Foxp3 欠損マウス由来の CD4T 細胞を移入し、LIP-TFH が出現しているか検討した。Foxp3 欠損マウスは致死的になるが、Foxp3 欠損 RAG 欠損マウスは正常に生育することから、Foxp3 欠損 RAG 欠損マウス由来 CD4T 細胞を移入した。その結果、Foxp3 欠損 CD4T 細胞であっても本細胞群は分化可能なことから、LIP-TFH の分化には制御性 T 細胞の関与は考えられなかった (図 1)。

(2) (1) TLR7 および TLR9 の抗核抗体産生への関与  
TCR $\alpha$  鎖および TLR7 または TLR9 を欠いた、TCR $\alpha$  欠損 TLR7 欠損マウスと TCR $\alpha$  欠損 TLR9 欠損マウスを作成した。TCR $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  欠損 TLR7 欠損マウスでは TCR $\alpha$  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 2)。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 3)。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 4)。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、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 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 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 5)。

図 1

LIP-T<sub>FH</sub> 分化に関わる因子の検討：TCR 特異性と Foxp3 の関与について

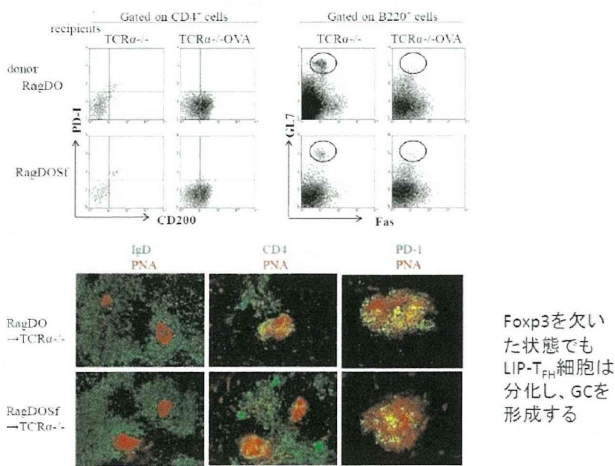


図 2

Depletion of intestinal microbiota significantly reduced LIP and production of LIP-T<sub>FH</sub> cells

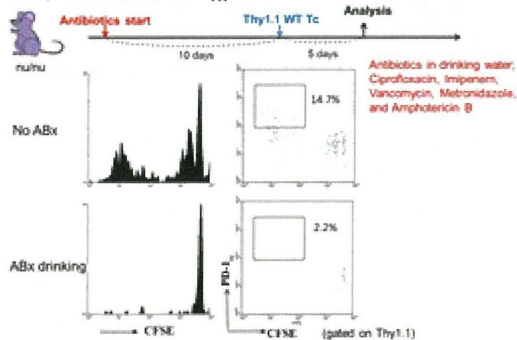


図 3

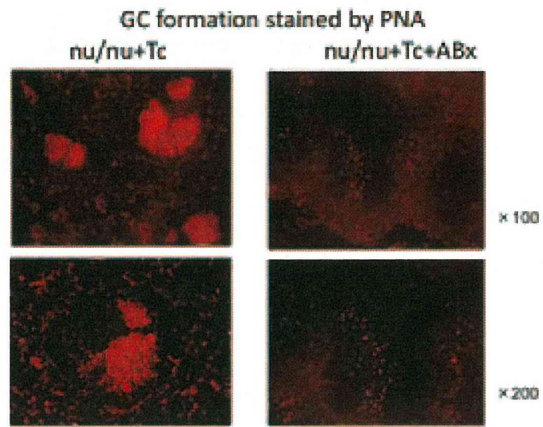


図 4

Antibiotics inhibit antibodies production (3 months)

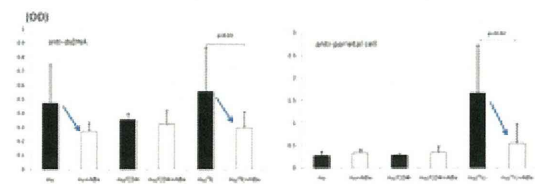
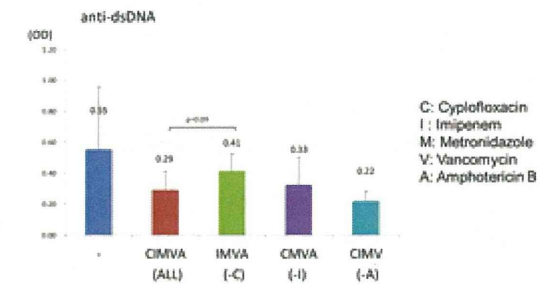


図 5

Effect by combination of antibiotics



D. 考察

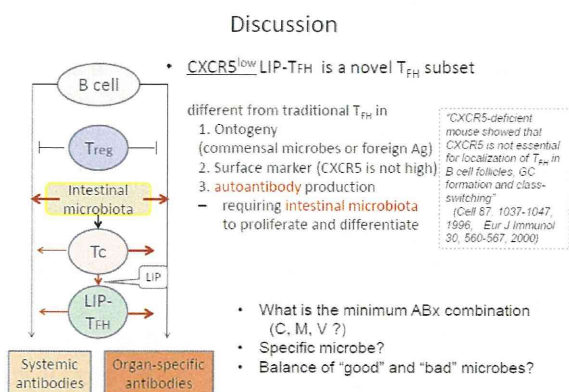
本系の研究から、抗 RNP 抗体をはじめとする抗核抗体産生には CD4T 細胞は促進的に作用していること、そして CD4T 細胞は LIP-T<sub>FH</sub> として自己抗体の産生に関わっていることが明らかになった。この分化には T 細胞受容体の特異性や制御性 T 細胞は関わりがなく、一方で、腸内細菌を除去すると T<sub>FH</sub> への分化および自己抗体が減少したことから、何らかの腸内細菌の認識が自己免疫を惹起していると考えられた。これまでの報告では、rapid spontaneous proliferation では細菌抗原から TLR を介した刺激が樹状細胞に伝わり IL-6 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。

以上より、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る。抗生剤投与前後での細菌叢の変化から自己免疫を促進する細菌もしくは抑制する細菌を同定できれば、その菌を標的とした治療が可能となる。また、これらのマウス研究を基盤に、実際のヒトにおいても、疾患の有無による腸内細菌叢の変化を確認することや、抗生剤治療の可能性を探索することで、本研究の成果を応用することが可能と考える (図 6)。

図 6



## 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。本研究の知見は従来の免疫抑制治療と異なる新規治療の開発にとって重要なものと考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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), 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 33:871-877.
- 3), Iwagami M, Kubo K, Tanaka R, Kawahata K, Okamoto A, Hagino N, Yamamoto K. Thrombotic

thrombocytopenic purpura with severe hypertension in a patient with systemic sclerosis sine scleroderma and polymyositis. *Intern Med*. 2011;50:2413-2416.

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

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

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

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

8) 川畑 仁人, 中枢神経, 日本内科学会雑誌 102, p2532-2542, 2013

9) 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  
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

10) 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

11) 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

12) 山口 正雄, 川畑 仁人, 発熱に伴う四肢体幹の紅斑を生じ、フェリチンが異常高値を示した25歳の女性成人ステイル病, *検査と技術* 40巻 p1065-1070, 2012

13) 川畑 仁人, TNF受容体の新たなリガンド progranulinによるTNF阻害, *リウマチ科* 46巻 p642-644, 2011

14) 川畑 仁人, 免疫抑制薬・抗リウマチ薬 タクロリムス, 日本内科学会雑誌 100巻 p2948-2953, 2011

15) 川畑 仁人, 自己抗体による中枢神経疾患, 感染・炎症・免疫 41巻 p62-68, 2011