

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790361

研究課題名（和文） 混合性結合組織病における肺高血圧症発症機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of pathogenic mechanism of pulmonary hypertension in patients with mixed connective tissue disease.

研究代表者

鎌滝 章央（KAMATAKI AKIHISA）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：60360004

研究成果の概要（和文）：混合性結合組織病（mixed connective tissue disease; MCTD）に合併する肺高血圧症（pulmonary hypertension; PH）は、MCTD 患者の死因の重要な位置を占めるが、その発症機序は未だ明らかになっていない。PH 発症に至る初期変化として肺微小血管内皮細胞傷害が示されているため、本研究では肺微小血管内皮細胞を傷害する要因として、血清因子の一つである自己抗体、特に抗内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibody; AECA）に焦点をあて、研究を行った。AECA の抗原を二次元電気泳動とウエスタンブロット、質量分析を用いて解析した。また、肺微小血管内皮細胞の cDNA ライブラリーを構築して SEREX（serological identification of antigens by recombinant expression cloning）により抗原候補蛋白質の探索をおこなった。その結果、既知の抗原を含む抗原候補蛋白質を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Pulmonary hypertension (PH) is the major cause of death in patients with mixed connective tissue disease (MCTD). However, pathogenic mechanism of PH in MCTD is still unclear. Since pulmonary micro vascular endothelial cell injury is the first change on the development of PH, I focused on one of the serum factors, anti-endothelial cell antibodies (AECA), in this study. For identification of targets of AECA, two-dimensional electrophoresis, western blot analysis, and mass spectrometry were performed. I also constructed cDNA library of pulmonary micro vascular endothelial cell and performed serological identification of antigens by recombinant expression cloning (SEREX). As these results, possible antigens, including already-known antigens, were identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：膠原病、自己抗体、肺高血圧症

1. 研究開始当初の背景

混合性結合組織病 (mixed connective tissue disease; MCTD) は複数の膠原病の症状を呈する抗 RNP 抗体陽性が特徴的な疾患である。MCTD 患者で発症する肺高血圧症 (pulmonary hypertension; PH) の病理的な特徴は、原発性肺高血圧症に類似しており、肺血管に血栓形成や血栓の器質化、内腔狭窄、血管壁の肥厚が認められる。他の膠原病に比べ高頻度で合併する PH が MCTD 患者の主な死因 (16.7%) であるが、未だその発症原因は不明であり、PH の発症機序の解明と治療法の確立が重要な問題と考えられている。

臨床的には PH を示していない MCTD 患者の肺血管でも血栓の器質化や内膜筋細胞の増生など内皮細胞傷害に起因すると考えられる内膜肥厚の像がみられ、特に直径 100 μ m 以下の血管に高度な閉塞性病変が認められる。このことから、MCTD においては PH を示していない症例でも小血管を中心に病変が発生しており、徐々に進行して PH の発症に至ることが示唆されている。

PH 発症の初期変化として肺の微小血管の内皮細胞が傷害されるという標的の特異性から、本研究では、病因として血清因子の一つである抗内皮細胞抗体 (anti-endothelial cell antibody; AECA) に着目した。AECA は全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) や強皮症 (systemic sclerosis; SSc)、多発性筋炎 (polymyositis; PM) などの血管炎と関連する膠原病で検出されており、抗体依存性や補体依存性に細胞を傷害するだけでなく、アポトーシスや接着分子の発現も誘導することが明らかにされている。

国内外での MCTD における PH と AECA の関連についての報告はまだ少ない。本研究室において、ヒト肺微小血管内皮細胞に対する MCTD 患者血清の反応性をフローサイトメトリーにより解析した結果、PH を合併する MCTD 患者由来血清は健常者血清に比べて顕著に高い反応性を示した。また肺微小血管内皮細胞 (HMVEC-L) を用いた cyto-ELISA の結果からも健常者血清に比べ MCTD 患者血清が内皮細胞への反応性が高いことが確認できた。

2. 研究の目的

本研究では MCTD における PH 発症機序の解明を目的としており、AECA の発症機序への関与について検討した。具体的には、MCTD 患者の血清が特異的に反応する抗原蛋白質の同定を行った。

3. 研究の方法

HMVEC-L から蛋白質を調製し、二次元電気泳動で展開し、PVDF に転写後、MCTD 患

者血清または健常者血清を用いてウエスタンブロットを行い (2D ウエスタン)、患者血清と強く反応するスポットを選択した。質量分析によりスポットの蛋白質の同定を行った。

また、HMVEC-L から調製した RNA から cDNA を合成し、ファージに組み込み、cDNA ライブラリーを構築した。アガロースプレート上に網羅的に組換え蛋白質を発現させ、6名の MCTD 患者血清を混合した血清と反応する蛋白質をスクリーニングした

(serological identification of antigens by recombinant expression cloning; SEREX)。得られた候補について、組換え蛋白質を用いたウエスタンブロットで個々の患者の血清の反応性の確認を行った。

4. 研究成果

2D ウエスタンと質量分析により、20 個の抗原候補蛋白質が同定できた。同定できた蛋白質には U1RNP も含まれており、組換え蛋白質が患者血清と高く反応する候補も得られた (図 1)。また、ライブラリーを用いたスクリーニングにより (図 2)、 3×10^5 スクリーニングした時点で細胞膜にも局在する蛋白質や細胞外蛋白質が 19 個抗原候補としてあがった。この中には SNRPF も含まれていた。抗原候補の一つは RT-PCR でヒト臍帯静脈血管内皮細胞に比べ HMVEC-L で高く発現していることが確認でき (図 3)、スクリーニングの際にも高い反応性を示した抗原について患者個々人の血清で反応性を調べた結果、MCTD 患者 1 名で高い反応性が認められた (図 4)。

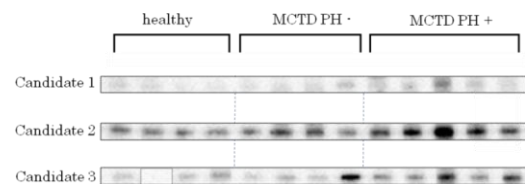


図 1 2D ウエスタンと質量分析により得られた抗原候補組換え蛋白質と患者血清の反応性の確認

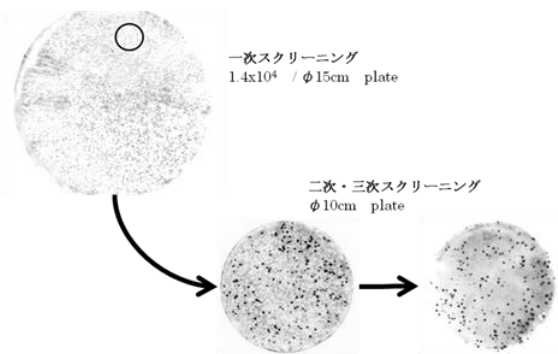


図 2 SEREX の概要

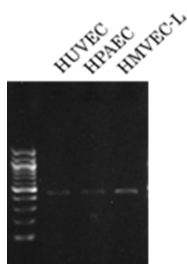


図 3 SEREX により得られた抗原候補の様々な血管内皮細胞における発現の解析

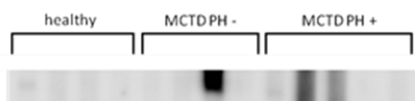


図 4 SEREX により得られた抗原候補組換え蛋白質と患者血清の反応性の確認

本研究により AECA の抗原候補蛋白質を得ることができた。さらなる AECA の抗原探索を行うとともに、これらの蛋白質について詳細に解析することで、PH 発症機序の一端の解明につながり、新たな治療法や診断法の可能性が開けると期待する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Sasaki N, Kamataki A, Sawai T. Histopathological study of pulmonary hypertension in connective tissue disease. Allergol Int. (in press) 査読あり
2. Uzuki M, Kamataki A, Watanabe M, Sasaki N, Miura Y, Sawai T. Histological Analysis of Esophageal Muscular Layer from 27 Autopsy Cases with Mixed Connective Tissue Disease (MCTD). Pathol Res Pract. (in press) 査読あり
3. Ouchi N, Uzuki M, Kamataki A, Miura Y, Sawai T. Cartilage destruction is partly induced by the internal proteolytic enzymes and apoptotic phenomenon of chondrocytes in relapsing polychondritis. J Rheum. (in press) 査読あり
4. Yamauchi K, Sasaki N, Niisato M,

Kamataki A, Shikanai T, Nakamura Y, Kobayashi H, Suwabe A, Kanno H, Sawai T and Inoue H. Analysis of pulmonary allergic vasculitis with eosinophil infiltration in asthma model of mice. Exp Lung Res. 36 (4): 227-236. 査読あり

5. 三又義訓, 鎌滝章央, 及川伸也, 村上賢也, 澤井高志: 関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現の変化の解析. 岩手医学雑誌 62 (2): 85-94, 2010. 査読あり
6. 及川伸也, 鎌滝章央, 三又義訓, 村上賢也, 澤井高志: 関節リウマチ滑膜における Bv8 の発現. 岩手医学雑誌 62 (1): 37-45, 2010. 査読あり
7. 村上賢也, 鎌滝章央, 佐々木信人, 澤井高志: 関節破壊の病理組織学的特徴. 日本臨床 68 増刊号 5: 65-70, 2010. 査読無
8. 宇月美和, 鎌滝章央, 佐々木喜子, 徳永勢二, 澤井高志: 関節リウマチにおけるヒアルロン酸の合成と分解について. 臨床リウマチ 22 (3): 337-343, 2010. 査読無
9. 佐々木信人, 鎌滝章央, 澤井高志: 全身性強皮症および類似疾患、肺病理. 日本胸部臨床 69 (3): 224-233, 2010. 査読無
10. 鎌滝章央, 佐々木信人, 澤井高志: MCTD 患者に合併する肺高血圧症の病変とその発症機序の解明. 自己抗体と自己免疫 2009 31-35, 2009. 査読無
11. 澤井高志, 鎌滝章央, 佐々木信人, 畠山明: 混合性結合組織病 (MCTD) にともなう肺高血圧症 (PH) に関連する抗内皮細胞抗体 (AECA) 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と治療法の確立に関する研究」平成 20 年度総括・分担研究報告書 24-26, 2009. 査読無

[学会発表] (計 14 件)

1. 鎌滝章央, 石田睦子, 村上賢也, 宇月美和, 澤井高志: ゼラチンコートフィルムを用いた関節液の包括的なゼラチン分解活性測定法の開発. 第 25 回日本臨床リウマチ学会. 2010 年 11 月 27-28 日. 東京.

2. 村上賢也、鎌滝章央、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチにおける CD14 陽性細胞の役割 — 蛍光二重染色および電子顕微鏡学的解析 —. 第 17 回自己免疫疾患研究会. 2010 年 11 月 4 日. 盛岡.
 3. Oikawa S, Kamataki A, Mimata Y, Murakami K, Shimamura T, Sawai T. Angiogenetic factor, BV8, is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis, and experimentally up-regulated by TGF- β . Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2010. 2010. 16-19. June. Rome. Italy.
 4. 鎌滝章央、及川伸也、三又義訓、澤井高志：新規血管新生因子 Bv8 の関節リウマチ滑膜での発現の検討. 第 99 回日本病理学会総会. 2010 年 4 月 27-29 日. 東京.
 5. 村上賢也、澤井高志、鎌滝章央、嶋村正：関節リウマチの慢性化機構における CD14 陽性細胞の役割. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2010 年 4 月 22-25 日. 神戸.
 6. 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、嶋村正、澤井高志：IL-6 刺激により RA 患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞における ADAMTS-4 の発現が亢進した. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2010 年 4 月 22-25 日. 神戸.
 7. 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、嶋村正、澤井高志：Bv8 の関節リウマチ滑膜における発現解析. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2010 年 4 月 22-25 日. 神戸.
 8. 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、嶋村正、澤井高志：関節リウマチ滑膜における Bv8 の発現の検討. 第 16 回岩手県自己免疫疾患研究会. 2009 年 11 月 27 日. 盛岡.
 9. 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、嶋村正、澤井高志：関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する Interleukin-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現の変化の解析. 第 16 回岩手県自己免疫疾患研究会. 2009 年 11 月 27 日. 盛岡.
 10. 佐々木信人、山内広平、井上洋西、鎌滝章央、澤井高志：全身性エリテマトーデスに合併した自己免疫性辺縁系脳炎の 1 例. 第 24 回日本臨床リウマチ学会. 2009 年 11 月 20-21 日. 盛岡.
 11. 鎌滝章央、佐々木信人、畠山明、澤井高志：混合性結合組織病患者における抗内皮細胞抗体の抗原の探索. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月 23-26 日. 東京.
 12. 佐々木信人、山内広平、井上洋西、二宮由香里、鎌滝章央、澤井高志：アレルギー性肉芽腫性血管炎肺血管障害マウスモデルにおけるモンテルカストによる炎症の抑制. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月 23-26 日. 東京.
 13. 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、西田淳、嶋村正、澤井高志：関節リウマチ患者滑膜における Bv8 の遺伝子発現の検討. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月 23-26 日. 東京.
 14. 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、西田淳、嶋村正、澤井高志：関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現動態. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月 23-26 日. 東京.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
鎌滝 章央 (KAMATAKI AKIHISA)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：60360004
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし