



Title	強皮症における心臓MRIを用いた肺動脈性肺高血圧症の病態評価に関する研究
Author(s)	野口, 淳史
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13292号
Issue Date	2018-09-25
DOI	10.14943/doctoral.k13292
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/71887
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2427
File Information	Atsushi_Noguchi.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

強皮症における心臓MRIを用いた肺動脈性
肺高血圧症の病態評価に関する研究

(Assessment of pulmonary arterial hypertension using
cardiac magnetic resonance in systemic sclerosis)

2018年9月

北 海 道 大 学

野 口 淳 史

学 位 論 文

強皮症における心臓 MRI を用いた肺動脈性
肺高血圧症の病態評価に関する研究

(Assessment of pulmonary arterial hypertension using
cardiac magnetic resonance in systemic sclerosis)

2018年9月

北 海 道 大 学

野 口 淳 史

目 次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
1. 緒言.....	3
2. 略語表.....	6
3. 第一章 心臓 MRI を用いた強皮症性肺動脈性肺高血圧症の病態評価.....	10
3.1 緒言.....	11
3.2 患者と方法.....	17
3.2.1 患者.....	17
3.2.2 心臓 MRI 検査.....	18
3.2.3 統計解析.....	18
3.3 結果.....	19
3.3.1 患者背景.....	19
3.3.2 右心カテーテル検査と心臓 MRI 検査.....	19
3.3.3 強皮症患者と非強皮症患者の血行動態の比較.....	22
3.3.4 平均肺動脈圧と心臓 MRI 検査値との相関.....	24
3.3.5 経時変化と予後.....	30
3.4 考察.....	35
3.5 結語.....	39
【補遺】.....	40
4. 第二章 肝細胞増殖因子受容体フラグメントによる抗線維化作用の研究.....	41
4.1 緒言.....	42
4.1.1 TGF β /Smad シグナル経路と線維化.....	42
4.1.2 肝細胞増殖因子とその受容体.....	45
4.1.3 MET の C 末端フラグメント、M10.....	46
4.2 実験方法.....	50
4.2.1 実験方法 1 : TGF β /Smad2 シグナル経路における M10 の抗線維化作用の解析..	50
4.2.1.1 材料.....	50
4.2.1.2 細胞培養.....	50
4.2.1.3 免疫染色法.....	51
4.2.1.4 ウェスタンブロッティング.....	52
4.2.1.5 ペプチド-タンパク結合実験.....	52
4.2.1.6 共免疫沈降法.....	52
4.2.1.7 ブレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウス.....	53

4.2.1.8	肺組織の固定および組織学的検討	53
4.2.1.9	コラーゲンアッセイ	54
4.2.1.10	ELISA 法	54
4.2.1.11	統計解析	55
4.2.2	実験方法 2 : BMP9/Smad1/5/8 経路における M10 の抗線維化作用の解析	56
4.2.2.1	材料	56
4.2.2.2	細胞培養	56
4.2.2.3	<i>in silico</i> によるペプチド-タンパク相互作用の予測	57
4.2.2.4	Real-Time PCR	57
4.2.2.5	ウェスタンブロッティング	57
4.2.2.6	統計解析	58
4.3	実験結果	59
4.3.1	実験結果 1	59
4.3.1.1	M10 の合成、細胞生存への影響	59
4.3.1.2	線維芽細胞内における M10 の局在	62
4.3.1.3	線維芽細胞における M10 の抗線維化作用	63
4.3.1.4	M10 の抗線維化メカニズムの解析	66
4.3.1.5	ブレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウスにおける M10 の抗線維化作用	70
4.3.1.6	M10 の薬物動態解析	72
4.3.1.6	実験 1 のまとめ	75
4.3.2	実験結果 2	76
4.3.2.1	M10 と BMP9 の相互作用の予測	76
4.3.2.2	BMP9 の Smad1/5/8 リン酸化への寄与	77
4.3.2.3	MRC5 における I 型コラーゲン産生への BMP9 の寄与	78
4.3.2.4	健常者および SSc 患者の肺線維芽細胞における I 型コラーゲンおよび α -SMA 発現への BMP9 の寄与	79
4.3.2.5	BMP9 刺激による Smad1/5/8 のリン酸化に対する M10 の効果	80
4.3.2.6	BMP9 刺激による I 型コラーゲン産生に対する M10 の効果	81
4.3.2.7	線維化マーカーや転写因子に対する BMP9 および M10 の影響 (Real-Time PCR)	82
4.3.2.8	実験 2 のまとめ	83
4.4	考察	84
4.5	結語	86
5.	第三章 関節リウマチに対して IL-6 阻害療法が及ぼす免疫学的影響についての研究	87
5.1	緒言	88

5.2 患者と方法.....	91
5.2.1 研究デザイン.....	91
5.2.2 フローサイトメトリー法.....	91
5.2.3 統計解析.....	92
5.3 結果.....	93
5.3.1 臨床パラメータ.....	93
5.3.2 末梢血 B 細胞サブセットの解析.....	96
5.3.3 抗 CCP 抗体価と B 細胞サブセットとの関係.....	99
5.4 考察.....	102
5.5 結語.....	104
6. おわりに.....	105
7. 総括および結論.....	106
8. 謝辞.....	108
9. 引用文献.....	109

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文で発表した。

1. Noguchi A, Kato M, Kono M, Ohmura K, Ohira H, Tsujino I, Oyama-Manabe N, Oku K, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Nishimura M, Atsumi T. Bi-ventricular interplay in patients with systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension: Detection by cardiac magnetic resonance. *Mod Rheumatol* 2017 May;27(3):481-488.

本研究の一部は下記の学会で発表した。

1. Noguchi A, Atanelishvili I, Akter T, Silver RM, Bogatkevich GS. “M10, a caspase cleavage product of the hepatocyte growth factor receptor, downregulates bone morphogenetic protein-9-induced Smad1/5/8 phosphorylation and collagen production in human lung fibroblasts.” American College of Rheumatology Annual Meeting, San Diego, California, November 3-8, 2017
2. Noguchi A, Atanelishvili I, Akter T, Silver RM, Bogatkevich GS. “Efficacy of M10, a caspase cleavage product of the HGF receptor, in BMP9-induced fibrosis in scleroderma lung fibroblasts.” The 15th International Workshop on Scleroderma Research, Pittsburgh, Pennsylvania, August 5-9, 2017
3. Noguchi A, Yasuda S, Hisada R, Ohmura K, Shimamura S, Shimizu Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Suzuki M, Matsumoto Y, Atsumi T. “Anti-CCP antibody titers decrease with altered B-cell subpopulation in RA patients treated with tocilizumab.” American College of Rheumatology Annual Meeting, Washington, D.C., November 11-16, 2016
4. Noguchi A, Yasuda S, Kono M, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Sato T, Tsujino I, Nishimura M, Atsumi T. “Cardiac magnetic resonance imaging detects disease-specific biventricular involvement in

patients with systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension.” The European League Against Rheumatism, Rome, June 10-13, 2015

5. 野口 淳史、保田 晋助、河野 通仁、加藤 将、真鍋 徳子、佐藤 隆博、辻野 一三、西村 正治、渥美 達也「心臓 MRI は強皮症性肺高血圧症の予後予測に有用である」第 2 回日本肺高血圧学会・第 3 回日本肺循環学会合同学術集会、東京、2014 年 10 月 3-5 日

6. 野口 淳史、保田 晋助、河野 通仁、秋田 佳奈恵、大村 一将、神田 真聡、福井 智子、中川 育磨、志田 玄貴、渡邊 俊之、清水 裕香、栗田 崇史、奥 健志、坊垣 暁之、堀田 哲也、渥美 達也「強皮症性肺高血圧症の診断における%DLco/V_Aと心臓 MRI の有用性」第 58 回日本リウマチ学会学術集会、東京、2014 年 4 月 24-26 日

1. 緒言

関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)や全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)をはじめとする自己免疫疾患は、免疫寛容の破綻により様々な症状を引き起こすが、その原因は未だ明らかにされていない。しかしながら、近年の免疫学および分子生物学の進歩により、これらの疾患の進展に深く関与する免疫異常の解明に大いなる成果をもたらし、結果として早期診断や早期治療が可能となり、予後の改善につながっている。まず RA では、骨破壊の進行を積極的に抑制し、臨床的、機能的、そして社会的な寛解導入を目指した新たな分類基準(Aletaha et al., 2010)が策定され、これによって早期に診断して治療介入することが可能となった。これとともに、RA の病態に関与する特定のサイトカインや免疫細胞表面の分子を標的とした生物学的製剤が次々と上梓され、治療成績は飛躍的に向上した。また SLE では、ステロイド治療が導入される 1950 年以前の 3 年生存率は 50%以下であったが、抗核抗体をはじめとする疾患特異的自己抗体の発見と、それを用いた診断基準による早期診断、さらにステロイドやシクロフォスファミド等の強力な免疫抑制治療の導入により、90 年代以降は 5 年生存率が 95%以上と劇的な改善がみられている(Cervera et al., 2003, Kasitanon et al., 2006, Pons-Estel et al., 2010)。

一方、そのようなめざましい進歩を遂げた現代においてもなお、自己免疫疾患に対する診療において、解決しなければならない課題が山積している。

第一に、依然として治療法が確立していない難治性病態が存在することである。例えば SLE の中枢神経症状や血栓性微小血管障害、強皮症や多発性筋炎/皮膚筋炎に合併する間質性肺病変、強皮症や混合性結合組織病、SLE に伴う肺動脈性肺高血圧症、血管炎に伴う肺胞出血、劇症型抗リン脂質抗体症候群等が挙げられる。これらの病態は治療の遅れが致命的になるのみならず、発症の予測自体が困難である場合が少なくない。

第二に、超高齢社会を迎えた現代における健康寿命の問題である。RA においては、先に述べたように病態の形成に直接関与する特定のサイトカインを標的とする治療法が開発され、パラダイムシフトと呼ばれるほどの大きな進歩を遂げたが、それでもすべての症例において寛解を達成することは難しく、関節破壊の進行により生活機能が著しく損なわれる症例も未だ存在する。平均寿命が延び、少子高齢化に歯止めのかからない本邦において、RA をはじめとするリウマチ性疾患や合併症により運動機能障害を来し、長期に渡って不自由な生活を余儀なくされる患者は今後とも増え続けることが予想される。すべての患者が必ずしも現代の治療薬の恩恵を受

けられない理由のひとつとして、それぞれの薬剤には **responder** と **non-responder** が存在し、いずれの薬剤がある特定の症例に最も有効であるかを判断することが困難であることが挙げられる。また生物学的製剤はその高いコストも大きな問題で、これを理由に断念せざるを得ない患者も少なくないのが現状である。

そして第三の問題は、自己免疫疾患に対する強力な治療の代償である。強力な免疫抑制療法によって誘発される合併症としてまず挙げられるのが、感染症である。ニューモシスチス肺炎や真菌感染症、結核、B型肝炎の再活性化、非結核性抗酸菌症、サイトメガロウイルス感染症等、いずれも重症化すれば致命的となる。またステロイド大量療法による糖尿病、骨粗鬆症、大腿骨頭壊死症、血栓症、さらに免疫抑制薬の様々な副作用が大きな問題となっており、原疾患に対する治療戦略を立てる上ではリスクとベネフィットのバランスを考慮することが求められる。

そのような数多くの課題を克服するためには、自己免疫疾患の各病態をより深く理解する必要がある。難治性自己免疫疾患の代表格である強皮症は、他の自己免疫疾患と異なり、免疫抑制療法が奏功しにくく、未だ治療法が確立していない。皮膚硬化のみならず、肺や心臓、腎臓、消化管等多臓器に病変が及び、予後不良であるとともに生活機能が著しく障害される。中でも肺高血圧症は強皮症における最も重要な合併症のひとつであり、肺血管拡張薬が相次いで登場しているにも関わらず治療成績が悪く、予後不良である。その理由としては以下のように考えられる。一般に、自己免疫疾患に合併する肺高血圧症は、肺動脈内腔に狭窄を来す、いわゆる肺動脈性肺高血圧症に分類されるが、強皮症では疾患特有の心病変や慢性肺病変の存在が影響し、肺動脈性肺高血圧症という単一の病態では説明が困難な場合がある。すなわち、肺血管を拡張させる治療のみでは不十分であるばかりか、かえって病態を悪化させる可能性すらある。以上から、自己免疫疾患に伴う肺高血圧症の診療においては、強皮症とその他の自己免疫疾患とは分けて考える必要があるといえる。近年、肺高血圧症診療における心臓MRI検査の有用性が報告されており、右心機能を中心に病態評価に用いられるケースが増えている。そこで、心臓MRI検査を用いて強皮症とその他の自己免疫疾患に合併した肺動脈性肺高血圧症の病態を客観的に評価し、予後との関連を見出すことを本研究のテーマとした。

さらに、本研究とは直接関連しないが、自己免疫疾患に関してこの他に2つの研究に携わったため、補遺として触れることとする。

一つ目は、『肝細胞増殖因子受容体フラグメントによる抗線維化作用の研究』である。強皮症における、肺高血圧症と並び最も重要な肺合併症のひとつである間質性肺病変に着目し、線維化を主体として難治性である本疾患に対して、抗線維化療法というこれまで臨床では日の目を見ていない新規治療法の開発を目指した基礎研究である。線維化抑制シグナルに関わるチロシンキナーゼ細胞表面受容体のC末端フ

ラグメントとして存在する M10 という小ペプチドに着目し、その抗線維化作用を検討することにより新規治療薬としての可能性について探った。こちらは第二章として触れる。

二つ目は、『関節リウマチに対して IL-6 阻害療法が及ぼす免疫学的影響についての研究』である。自己免疫疾患で最も頻度の高い RA については、生物学的製剤や新たな低分子化合物の普及により治療選択の幅が広がった今こそ、関節破壊を来す原因、メカニズムをさらに解明し、患者個々の病態に応じた適切な薬剤選択を確立することが次の課題である。RA の病態メカニズムに着目し、炎症性サイトカインのひとつである IL-6 が、RA の病態、特に B 細胞の分化と疾患特異的自己抗体の産生にどのように関わっているかを調べるため、RA に対して高い効果を示す生物学的製剤のひとつである IL-6 阻害薬(tocilizumab)を用いて前向き臨床研究をおこなった。こちらは第三章で述べる。

2. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ACPA	anti-citrullinated protein antibodies
ACR	American College of Rheumatology
ActRIIB	activin receptor type II B
AEC	alveolar epithelial cells
ALK	activin-like kinase
ANCOVA	analysis of covariance
ANOVA	analysis of variance
APC	allophycocyanin
ARB	angiotensin II receptor blocker
ATP	adenosine triphosphate
AUC	area under the curve
BMP	bone morphogenetic protein
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor type II
BSA	bovine serum albumin
CAV1	caveolin-1
CCP	cyclic citrullinated peptide
CDAI	clinical disease activity index
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CI	cardiac index
CMR	cardiac magnetic resonance
CPFE	combined pulmonary fibrosis and emphysema
CRP	C-reactive protein
CTD	connective tissue disease
CTGF	connective tissue growth factor
CXCR5	C-X-C chemokine receptor type 5
dcSSc	diffuse cutaneous systemic sclerosis
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAS28	disease activity score 28
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTPA	diethylenetriaminepentaacetic acid

ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELS	ectopic lymphoid structures
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
ERA	endothelin receptor antagonist
Erk	extracellular signal-regulated kinase
ESR	erythrocyte sedimentation rate
EULAR	European League Against Rheumatism
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
Gd	gadolinium
GDF	growth differentiation factor
HAQ	health assessment questionnaire
HGF	hepatocyte growth factor
HIV	human immunodeficiency virus
HPAH	heritable pulmonary arterial hypertension
HRP	horseradish peroxidase
Id1	inhibitor of differentiation-1
IL	interleukin
ILD	interstitial lung disease
IPAH	idiopathic pulmonary arterial hypertension
IQR	interquartile range
IRB	Institutional Review Board
lcSSc	limited cutaneous systemic sclerosis
LF	lung fibroblasts
LGE	late gadolinium enhancement
LV	left ventricle
LVEDV	left ventricular end-diastolic volume
LVEDVI	left ventricular end-diastolic volume index
LVEF	left ventricular ejection fraction
LVESV	left ventricular end-systolic volume
LVESVI	left ventricular end-systolic volume index
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	metacarpophalangeal
MCTD	mixed connective tissue disease

MCV	mutated citrullinated vimentin
MEF	mouse embryonic fibroblast
MET (c-MET)	cellular mesenchymal-epithelial transition factor
MH	Mod Homology
MMP	matrix metalloprotease
mPAP	mean pulmonary arterial pressure
MRI	magnetic resonance imaging
MUSC	Medical University of South Carolina
Nml	normal
NT	non-transfected
PAH	pulmonary arterial hypertension
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAP	pulmonary arterial pressure
PAWP	pulmonary arterial wedge pressure
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PDB	protein data bank
PDE-5i	phosphodiesterase type 5 inhibitor
PE	phycoerythrin
PFA	paraformaldehyde
PGI ₂	prostacyclin analogue
PH	pulmonary hypertension
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP	proximal interphalangeal
PKC	protein kinase C
PLC γ	phospholipase C- γ
PVR	pulmonary vascular resistance
RA	rheumatoid arthritis
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
Ras	rat sarcoma viral oncogene homologue
RF	rheumatoid factor
RHC	right heart catheterization
RLU	relative light unit
RNA	ribonucleic acid
RV	right ventricle
RVEDV	right ventricular end-diastolic volume

RVEDVI	right ventricular end-diastolic volume index
RVEF	right ventricular ejection fraction
RVESV	right ventricular end-systolic volume
RVESVI	right ventricular end-systolic volume index
Scr	scrambled peptide
SD (S.D)	standard deviation
SDAI	simple disease activity index
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE	succinimidyl ester
SF	serum free
SkF	skin fibroblasts
SLE	systemic lupus erythematosus
SLICC	systemic lupus international collaborating clinics
SMA	smooth muscle actin
SPF	specific pathogen free
SSc	systemic sclerosis
TAMRA	carboxytetramethylrhodamine
TBS	tris-buffered saline
TFE	turbo field echo
Tfh	follicular helper T
TGF β	transforming growth factor β
TMB	tetramethylbenzidine
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	world health organization
WT	wild type
WU	wood units

3. 第一章

心臓 MRI を用いた強皮症性肺動脈性
肺高血圧症の病態評価

3.1 緒言

強皮症(systemic sclerosis: SSc)は、微小血管障害および広汎な線維化を特徴とする原因不明の慢性自己免疫疾患である(Desbois and Cacoub, 2016)。自己抗体やコラーゲンの沈着により正常組織構造が侵され、皮膚硬化のみならず、肺や消化管、心臓、腎臓など多臓器に障害を引き起こし、予後不良であるとともに、生活機能が著しく障害される(Almeida et al., 2015)。

SSc はびまん皮膚硬化型全身性強皮症(diffuse cutaneous SSc: dcSSc)と限局皮膚硬化型全身性強皮症(limited cutaneous SSc: lcSSc)に分類される。両者の違いは皮膚硬化の範囲のみで説明され、頸や肘、膝を超えて近位部に皮膚硬化がみられるものを dcSSc、肘や膝より末梢、顔面に留まるものを lcSSc と定義されている(Wollheim, 2005)。臓器障害の合併については、dcSSc で心病変や腎病変の頻度が高いとされている一方、肺動脈性肺高血圧症は lcSSc でより高頻度に見られるなど、皮膚硬化の範囲と臓器障害の有無は必ずしも相関しない(Table 1, (Desbois and Cacoub, 2016))。また SSc 患者の男女比は 1:6 で女性に多く、女性患者は男性患者と比べ dcSSc 型が少なく若年発症が多いが、その一方で男性患者は手指潰瘍や肺高血圧症の発症頻度が高く、予後不良であるとされる(Elhai et al., 2016)。

SSc の診断は現在、2013 年の ACR/EULAR の分類基準をもとにおこなわれる(Table 2, (van den Hoogen et al., 2013))。本分類基準は皮膚、肺病変を含む臨床所見、自己抗体、毛細血管の特徴をスコア化しており、特に皮膚病変は硬化に至る前のいわゆる浮腫期の段階も含まれる。従来診断基準と比べ感度・特異度ともに高く、より早期の診断に繋げることを目指している。また肺病変として肺動脈性肺高血圧症と間質性肺疾患も診断項目に加えられており、その予後に与える影響、重要性を反映している。

Table 1. 強皮症の分類と自己抗体の有無による主な臨床所見の頻度*

	lcSSc	dcSSc	抗セントロメア抗体	抗トポイソメラーゼ I 抗体	抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体
手指潰瘍	33-38%	43%	18-42%	40-45%	20%
間質性肺炎	35%	53%	13-21%	30-60%	20%
腎クリーゼ	1%	4-11%	1%	2-4%	20%
肺動脈性肺高血圧症	9%	6%	5-10%	13-17%	10%
食道病変	67%	68%	64-71%	68%	60%
心病変	6%	8%	9%	17%	15%
筋病変	22%	37%	23-40%	32-50%	50%

*各数値は、lcSSc 患者、dcSSc 患者、各種自己抗体陽性 SSc 患者全体に占める主要臨床所見の発症率を示している。

Table 2. 強皮症の分類基準 (2013 年 ACR/EULAR)*1

項目	副項目	点数*2
MCP 関節より近位まで拡がる両手指の皮膚硬化		9
手指の皮膚硬化 (高得点のみ計算)	手指腫脹	2
	PIP 関節から MCP 関節までの手指硬化	4
指尖部の病変 (高得点のみ計算)	指尖部潰瘍	2
	指尖部陥凹癬痕	3
毛細血管拡張症		2
爪郭の毛細血管異常		2
肺動脈性肺高血圧症および/または間質性肺疾患 (最大点数は 2 点)	肺動脈性肺高血圧症	2
	間質性肺疾患	
レイノー現象		3
強皮症関連自己抗体 (最大点数は 3 点)	抗セントロメア抗体	3
	抗トポイソメラーゼ I (抗 Scl-70) 抗体	
	抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体	

*1 本基準は手指の皮膚硬化を有しない患者や強皮症類縁疾患としての特徴をより強く示唆する患者には適応しない。

*2 総合点数は各項目の最大点数を合計して算出する。9 点以上で強皮症と分類する。

臨床的に重要な SSc の肺病変としては、間質性肺疾患(interstitial lung disease: ILD)と肺高血圧症(pulmonary hypertension: PH)が挙げられる。1980年代以降、かつて最も重篤で予後不良な合併症であった腎クリーゼに対する治療法が確立し、近年ではこのいずれかの肺病変の存在が SSc に関連する死因の約 60%を占めている(Tyndall et al., 2010)。SSc 合併 ILD (SSc-ILD)に罹患した患者の 5 年生存率は 82-90%、10 年生存率は 29-69%であり、SSc 合併 PH (SSc-PH)患者の 1,2,3 年生存率はそれぞれ 81%, 63%, 56%と報告されている。

PH は 2013 年のニース臨床分類で第 1 群から第 5 群に分類されている(Table 3, (Simonneau et al., 2013))。第 1 群は肺動脈性肺高血圧症(pulmonary arterial hypertension: PAH)、第 1 群の亜群のひとつ(第 1'群)として肺静脈閉塞性疾患および肺毛細血管腫症、第 2 群は左心系疾患に伴う PH、第 3 群は肺疾患および/または低酸素による PH、第 4 群は慢性血栓閉塞性 PH、第 5 群は原因不明の複合的要因による PH としている。膠原病に合併する PH は大部分が第 1 群、いわゆる PAH に該当する。しかしながら SSc の場合、その疾患特有の病態から、第 1 群のみならず第 1'群、第 2 群、第 3 群等を併せ持った複雑な機序により PH を発症することが知られており、どの群の要素が優位であるかによって、治療戦略も異なってくる。それ故、病態把握に難渋することが多く、予後不良である大きな理由のひとつと考えられる。近年、新規の肺血管拡張薬が相次いで承認され、PAH に対する治療は格段に進歩してきたが、SSc-PAH についてはそのような背景から、それほど予後改善につながっていないのが現状である。すなわち、SSc-PAH はその他の膠原病に合併した PAH(Chung et al., 2014, Chung et al., 2010, Condliffe et al., 2009)や特発性 PAH (idiopathic PAH: IPAH)(Fisher et al., 2006, Launay et al., 2010, Clements et al., 2012, Kawut et al., 2003)と比べてさらに予後不良と報告されている。また SSc 患者における PAH の合併率は比較的高く、10-12%と報告されている(Lambova, 2014, Hachulla et al., 2005, Mukerjee et al., 2003)。SSc における PAH が他の PAH と比べ重篤になりやすい理由として、SSc では強い炎症性変化はおこりにくい一方、線維化を基盤とする多彩な病態を多臓器に呈することが挙げられる。特に ILD や潜在的な心病変が肺循環動態に少なからず影響し、病態把握と治療選択を困難にするケースが多い。したがって、SSc 患者の生命予後を改善するためには、PAH を可及的早期に診断し、その病態を正確に把握して適切な治療選択に結びつけることが極めて重要となる。

Table 3. 肺高血圧症の分類 (2013年, Nice)

<p>第1群：肺動脈性肺高血圧症 (PAH)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) 2) 遺伝性肺動脈性肺高血圧症 (HPAH) <ol style="list-style-type: none"> i. BMPR2 ii. ALK1, endoglin, SMAD9, CAV1, KCNK3 iii. 不明 3) 薬物および毒物誘発性の肺動脈性肺高血圧症 4) 各種疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症 <ol style="list-style-type: none"> i. 結合組織病 ii. HIV 感染症 iii. 門脈圧亢進症 iv. 先天性心疾患 v. 住血吸虫症 	<p>第3群：肺疾患および/または低酸素血症に伴う肺高血圧症</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 慢性閉塞性肺疾患 2) 間質性肺疾患 3) 拘束性と閉塞性の混合障害を伴うその他の肺疾患 (CPFE) 4) 睡眠呼吸障害 5) 肺胞低換気障害 6) 高所における慢性暴露 7) 発達障害
<p>第1'群：肺静脈閉塞疾患および/または肺毛細血管腫症 第1"群：新生児遷延性肺高血圧症</p>	<p>第4群：慢性血栓塞栓性肺高血圧症</p> <p>第5群：原因不明の複合的要因による肺高血圧症</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 血液疾患 (慢性溶血性貧血、骨髓増殖性疾患、摘脾) 2) 全身疾患 (サルコイドーシス、肺ランゲルハンス細胞組織球症、リンパ脈管筋腫症、神経線維腫症、血管炎) 3) 代謝疾患 (糖原病、ゴーシェ病、甲状腺疾患) 4) その他 (腫瘍塞栓、線維性縦隔洞炎、慢性腎不全、区域性肺高血圧症)
<p>第2群：左心系疾患に伴う肺高血圧症</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 収縮障害 2) 拡張障害 3) 弁膜症 4) 先天性/後天性の左室流入路/流出路閉塞 	

心臓 MRI 検査(cardiac magnetic resonance: CMR)は、近年 PAH 患者の病態評価に広く利用されている。PAH の診断には右心カテーテル検査(right heart catheterization: RHC)が必須であるが、RHC で測定される平均肺動脈圧(mean pulmonary arterial pressure: mPAP)や肺血管抵抗(pulmonary vascular resistance: PVR)を CMR で予測することが可能であり、非侵襲的な PAH 診断ツールとして位置付けられている(Rajaram et al., 2012, Swift et al., 2012, Swift et al., 2013)。また、CMR は潜在的な心病変を早期に同定することにも適している。CMR によるスクリーニングをおこなった SSc 患者のうち 75%において、左室駆出率の低下や拡張障害といった潜在的心病変を一つ以上認めたことが報告されている(Hachulla et al., 2009)。しかしながら、SSc のもつ潜在的心病変が PAH の病態にどのように影響しているかを検討した報告は少ない。これを踏まえ、我々は SSc-PAH 特有の病態を把握することを目的とし、CMR を用いてその他の膠原病に合併する PAH との血行動態の違いを検討した。

3.2 患者と方法

3.2.1 患者

この研究は膠原病(connective tissue disease: CTD)に合併した PAH を有する患者の CMR 画像を評価することを目的とした、後ろ向き単施設コホート研究である。対象は 2010 年 1 月から 2015 年 10 月までの間に当科に入院または外来受診した CTD 患者 6,685 名のうち、RHC と CMR を同時期(1 週間以内)に施行した 40 名である。いずれの患者も、労作時呼吸困難あるいは心臓超音波検査で三尖弁逆流速度の上昇(> 2.8 m/s)を認めており PAH の存在が疑われていた。CTD に合併する PAH (CTD-PAH)は、いずれかの膠原病を有し、前毛細血管性 PH (pre-capillary PH)の基準(mPAP が 25mmHg 以上かつ肺動脈楔入圧(pulmonary arterial wedge pressure: PAWP)が 15mmHg 以下(Galiè et al., 2015))を満たすものと定義した。なお、後毛細血管性 PH (post-capillary PH)は mPAP が 25mmHg かつ PAWP が 15mmHg を超えるものと定義されており、さらにこのうち DPG (diastolic pressure gradient, $DPG = \text{diastolic PAP} - \text{mean PAP}$)が 7mmHg 未満かつ/または PVR が 3 wood units (WU)以下であるものを isolated post-capillary PH、DPG が 7mmHg 以上かつ/または PVR が 3WU を超えるものを combined post-capillary and pre-capillary PH と定義されている(Galiè et al., 2015)。SSc 患者は 2013 年 ACR/EULAR SSc 分類基準(van den Hoogen et al., 2013)、SLE 患者は SLICC 分類基準(Petri et al., 2012)あるいは 1982 年の ACR 分類基準(Tan et al., 1982)、混合性結合組織病(mixed connective tissue disease: MCTD)患者は Ortega-Hernandez らがまとめた 3 つの分類基準(Sharp, Alarcón-Segovia, Kasukawa) のいずれか 1 つ(Ortega-Hernandez and Shoenfeld, 2012)、多発性筋炎患者は Bohan と Peter の分類基準(Bohan and Peter, 1975)、シェーグレン症候群患者は 2012 年 ACR 分類基準(Shiboski et al., 2012)、抗リン脂質抗体症候群患者は Miyakis らの分類基準(Miyakis et al., 2006)、RA 患者は 2010 年 ACR/EULAR 分類基準(Aletaha et al., 2010)を満たすものとそれぞれ定義した。そして非 SSc (non-SSc)患者については SSc のいずれの分類基準(1980 年の ACR SSc 分類基準(Anonymous, 1980)、LeRoy/Medsger の SSc 分類基準(LeRoy and Medsger, 2001)、2013 年の ACR/EULAR SSc 分類基準(van den Hoogen et al., 2013))も満たさなかった。本研究プロトコールは北海道大学病院の倫理委員会で承認され、ヘルシンキ宣

言の基本理念に従って施行した。

3.2.2 心臓 MRI 検査

CMR は 1.5 テスラ Philips Achieva magnetic resonance imaging system (Philips medical Systems 社)を用いた(5 チャンネルコイル、最大傾斜磁場強度 33mT/m、最大スルーレート 100mT/m/m)。ベクトル心電図を用いた心電同期により、呼気時に息止めさせて撮像した。画像の解析には Extended MR Work Space (ver. 2.6.3, Philips Medical Systems, Amsterdam, The Netherlands)を使用した。左室(left ventricle: LV)の容量は冠状断および矢状断から得られる LV 短軸像から計測した。LV 駆出率(LV ejection fraction: LVEF)は拡張末期と収縮末期における連続した短軸スライスの LV 心内膜を手動でトレースして算出した。右室(right ventricle: RV)の容量と RV 駆出率(RV ejection fraction: RVEF)については、Alfakih らが長軸方向の方が短軸方向と比べ計測のばらつきが少ないと示したことを踏まえ、長軸方向で計測した(Alfakih et al., 2003)。Gd-DTPA (0.1mmol/kg, Magnevist; Berlex Laboratories, Wayne, NJ)は経静脈的に投与した。10 分後に息止めさせ、心電同期による 3 次元 TFE (turbo field echo)法にプリパレーションパルスとして反転回復(inversion recovery)を挿入したパルスシーケンスを用いて、周波数選択的脂肪抑制法による遅延造影を施行した。

3.2.3 統計解析

カテゴリー変数は%で表記し、連続変数は、正規分布に従う場合は平均値±標準偏差(mean ± SD)、正規分布に従わない場合は中央値と四分位範囲(median (IQR))で表記した。*P*値が 0.05 未満であれば有意とした。相関分析は Spearman の順位相関係数を用いた。共分散分析(analysis of covariance: ANCOVA)は 2 つの線形回帰スロープを比較するのに用いた。生存率は Kaplan-Meier 法を用い、log-rank 検定で解析した。すべての統計解析は、IBM SPSS Statistics (version 22.0.0, Inc., Armonk, NY)を使用した。

3.3 結果

3.3.1 患者背景

2010年1月から2015年10月までに当科に入院または外来受診したCTD患者6,685名のうち、RHCとCMRを同時期(1週間以内)に施行した40名を本研究に登録した(Figure 1)。患者背景、RHCおよびCMRパラメータをTable 4に示す。40名のうち、32名(80%)はpre-capillary PH、2名(5%)はisolated post-capillary PH、6名(15%)はPHを有しなかった。37名(93%)は女性であった。登録時の平均年齢は 53.8 ± 14.5 歳であった。登録時のWHO機能分類はIが1名(3%)、IIが14名(35%)、IIIが22名(55%)、IVが3名(8%)であった。疾患の内訳は、SScが21名(53%)、SLEが8名(20%)、MCTDが5名(13%)、その他のCTD(多発性筋炎、原発性シェーグレン症候群、原発性抗リン脂質抗体症候群、RA)が6名(15%)であった。

3.3.2 右心カテーテル検査と心臓MRI検査

RHCでは収縮期、拡張期、平均肺動脈圧(systolic, diastolic and mean pulmonary arterial pressure (PAP))、PAWP、心係数(cardiac index: CI)、PVRを測定した。CMRでは左室拡張末期容量(left ventricular end-diastolic volume index: LVEDVI)、右室拡張末期容量(right ventricular end-diastolic volume index: RVEDVI)、左室収縮末期容量(left ventricular end-systolic volume index: LVESVI)、右室収縮末期容量(right ventricular end-systolic volume index: RVESVI)、LVEF、RVEFを測定した。右室と左室の相互作用を解析するため、RVEDVとLVEDVの比(RVEDV/LVEDV)、RVESVとLVESVの比(RVESV/LVESV)、RVEFとLVEFの比(RVEF/LVEF)を算出した。結果、mean PAPは 35.0 ± 11.9 mmHg、PVRは 5.71 [IQR 3.76-9.29] WU、RVEDV/LVEDVは 1.43 [IQR 1.20-1.99]であった(Table 4)。

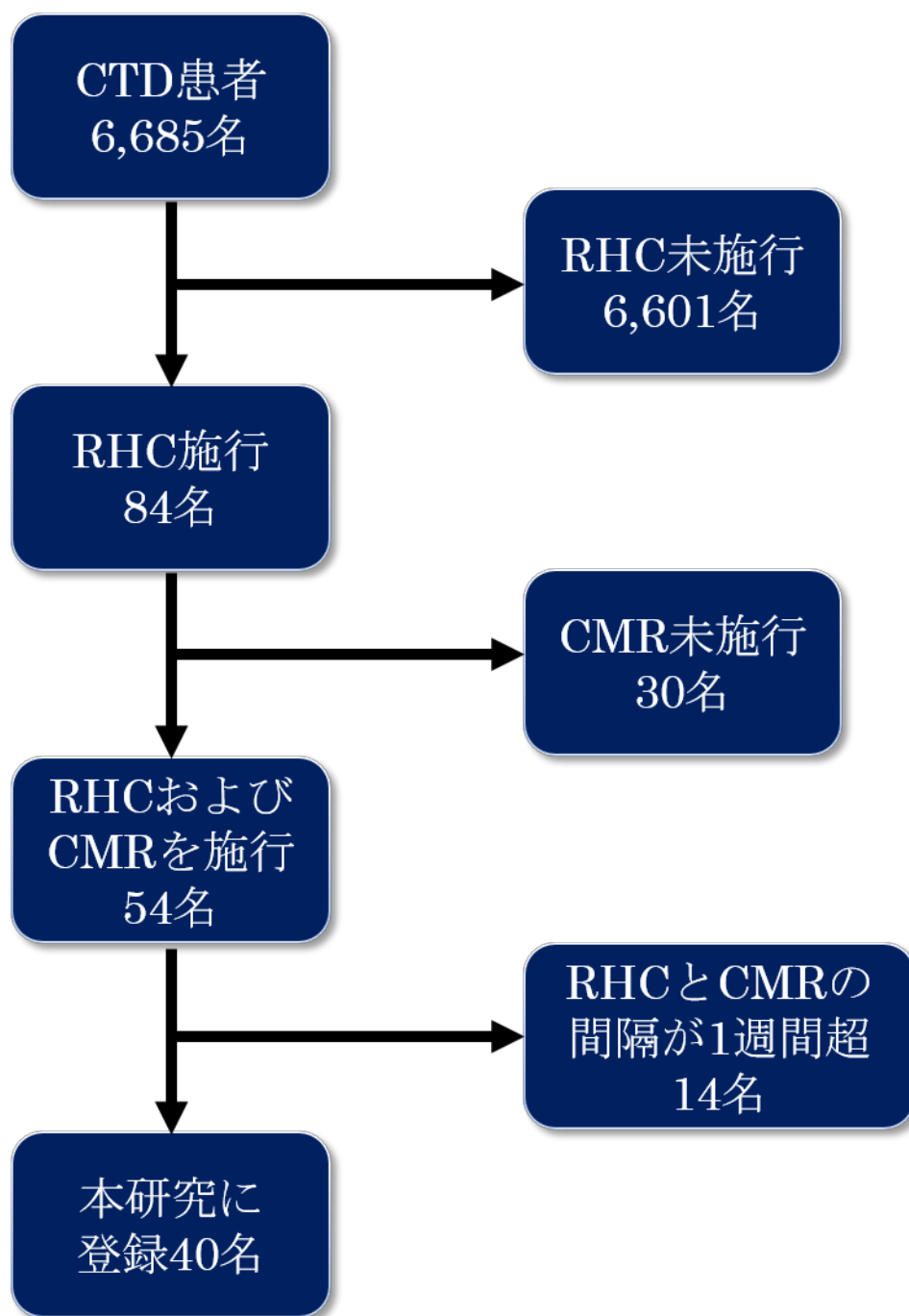


Figure 1. 本研究の登録患者の抽出方法。2010年1月から2015年10月までに当科に入院または外来受診したCTD患者6,685名のうち、RHCおよびCMRを同時期(1週間以内)に施行した40名を本研究に登録した。

Table 4. 患者背景、RHC および CMR の検査値

患者背景	
女性, <i>n</i> (%)	37 (93)
登録時年齢, mean ± SD, 歳	53.8 ± 14.5
登録時 WHO 機能分類 I / II / III / IV, <i>n</i>	1 / 14 / 22 / 3
PH の分類	
pre-capillary PH, <i>n</i> (%)	32 (80)
isolated post-capillary PH, <i>n</i> (%)	2 (5)
combined post-capillary and pre-capillary PH, <i>n</i> (%)	0 (0)
non-PH, <i>n</i> (%)	6 (15)
疾患	
SSc, <i>n</i> (%)	21 (53)
SLE, <i>n</i> (%)	8 (20)
MCTD, <i>n</i> (%)	5 (13)
多発性筋炎, <i>n</i> (%)	2 (5)
原発性シェーグレン症候群, <i>n</i> (%)	2 (5)
原発性抗リン脂質抗体症候群, <i>n</i> (%)	1 (3)
RA, <i>n</i> (%)	1 (3)
RHC のパラメータ	
systolic PAP, mean ± SD, mmHg	55.2 ± 19.4
diastolic PAP, mean ± SD, mmHg	21.8 ± 7.8
mean PAP, mean ± SD, mmHg	35.0 ± 11.9
PAWP, median (IQR), mmHg	8.0 (5.5 - 10.5)
CI, mean ± SD, L/min/m ²	2.8 ± 0.6
PVR, median (IQR), WU	5.71 (3.76 - 9.29)
CMR のパラメータ	
LVEDVI, mean ± SD, mL/m ²	57.7 ± 12.7
LVESVI, median (IQR), mL/m ²	19.6 (16.4 - 23.4)
LVEF, mean ± SD, %	63.8 ± 8.1
RVEDVI, median (IQR), mL/m ²	83.1 (75.2 - 96.3)
RVESVI, median (IQR), mL/m ²	49.1 (35.9 - 58.2)
RVEF, mean ± SD, %	44.5 ± 11.3
RVEDV / LVEDV, median (IQR)	1.43 (1.20 - 1.99)
RVESV / LVESV, median (IQR)	2.31 (1.61 - 3.42)
RVEF / LVEF, mean ± SD	0.70 ± 0.17

3.3.3 強皮症患者と非強皮症患者の血行動態の比較

Pre-capillary PH を有する SSc 患者と non-SSc 患者の血行動態の違いを評価するため、両群における RHC と CMR のデータを比較検討した (Table 5)。SSc 患者は non-SSc 患者と比べ、mPAP が有意に低かった。一方、WHO 機能分類、PVR、CMR データについては両群で差を認めなかった。この結果は、mPAP のみでは SSc における PAH の重症度を必ずしも反映しないことを示唆しており、その理由として SSc では潜在的なものも含め、疾患に関連する心機能の低下が影響するためと推測される。

Table 5. Pre-capillary PH を有する SSc 患者と non-SSc 患者の背景・血行動態の比較

	SSc (<i>n</i> = 15)	non-SSc (<i>n</i> = 17)	<i>P</i> 値
患者背景			
女性, <i>n</i> (%)	14 (93)	17 (100)	-
登録時年齢, mean ± SD, 歳	57.0 ± 11.6	51.8 ± 13.6	0.250
PH 発症から登録までの期間, median (IQR), 月	0.0 (0.0-0.0)	33.0 (1.0-63.0)	0.001
登録からの観察期間, mean ± SD, 月	34.6 ± 20.3	36.1 ± 20.5	0.841
WHO 機能分類 I/II/III/IV, <i>n</i>	0/1/12/2	1/4/11/1	0.123
登録前の血管拡張薬による治療あり, <i>n</i> (%)	2 (13)	11 (65)	0.004
ERA/PDE-5i/PGI ₂ (経口)/PGI ₂ (静注)	2/1/1/0	7/8/6/1	
RHC パラメータ			
systolic PAP, mean ± SD, mmHg	55.3 ± 14.2	66.4 ± 17.0	0.054
diastolic PAP, mean ± SD, mmHg	22.0 ± 5.2	26.2 ± 6.6	0.054
mean PAP, mean ± SD, mmHg	34.7 ± 7.4	42.3 ± 10.9	0.027
PAWP, mean ± SD, mmHg	6.9 ± 3.2	8.8 ± 3.1	0.114
CI, mean ± SD, L/min/m ²	2.8 ± 0.6	2.8 ± 0.5	0.992
PVR, mean ± SD, WU	7.13 ± 2.89	8.13 ± 3.56	0.387
CMR パラメータ			
LVEDVI, mean ± SD, mL/m ²	56.2 ± 13.8	54.1 ± 10.2	0.639
LVESVI, median (IQR), mL/m ²	20.5(17.3-23.4)	18.4(15.5-19.7)	0.069
LVEF, mean ± SD, %	61.8 ± 7.2	66.9 ± 9.2	0.093
RVEDVI, median (IQR), mL/m ²	93.8(80.9-100)	79.3(72.2-102)	0.246
RVESVI, median (IQR), mL/m ²	53.0(47.7-63.2)	46.1(32.4-71.7)	0.278
RVEF, mean ± SD, %	41.9 ± 5.3	43.3 ± 15.3	0.734
RVEDV/LVEDV, mean ± SD	1.79 ± 0.61	1.74 ± 0.59	0.789
RVESV/LVESV, median (IQR)	2.90(1.84-3.09)	2.57(1.85-4.53)	0.852
RVEF/LVEF, mean ± SD	0.69 ± 0.12	0.65 ± 0.20	0.489
心筋遅延造影, <i>n</i> (%)	12 (80)	10 (59)	0.265
LVEDVI/mPAP, mean ± SD	1.72 ± 0.63	1.38 ± 0.51	0.102
LVESVI/mPAP, mean ± SD	0.67 ± 0.33	0.46 ± 0.20	0.029
LVEF/mPAP, mean ± SD	1.84 ± 0.33	1.68 ± 0.51	0.317
RVEDVI/mPAP, mean ± SD	2.82 ± 0.67	2.27 ± 0.83	0.048
RVESVI/mPAP, median (IQR)	1.65(1.37-1.95)	1.14(0.98-1.57)	0.018
RVEF/mPAP, median (IQR)	1.25(1.03-1.43)	0.90(0.75-1.39)	0.189
(RVEDV/LVEDV)/mPAP, mean ± SD	0.052 ± 0.013	0.042 ± 0.012	0.034
(RVESV/LVESV)/mPAP, median (IQR)	0.077(0.016-0.022)	0.058(0.048-0.100)	0.313
(RVEF/LVEF)/mPAP, median (IQR)	0.020(0.016-0.022)	0.014(0.011-0.022)	0.114

3.3.4 平均肺動脈圧と心臓 MRI 検査値との相関

次に SSc に関連する心機能低下を評価するため、SSc 患者と non-SSc 患者それぞれにおける mPAP と CMR データとの相関を解析した。CMR で評価した 9 つの指標 (LVEDVI, RVEDVI, LVESVI, RVESVI, LVEF, RVEF, RVEDV/LVEDV, RVESV/LVESV and RVEF/LVEF)のうち、RVEDV/LVEDV、RVESV/LVESV、RVEF/LVEF はその他の RV、LV 単独の指標と比べ、mPAP や PVR と良い相関を示した(Figure 2(A-C), Figure 3, Figure 5)。すなわちこの 3 つの指標は PAH の重症度を反映しているといえる。興味深いことに、mPAP と RVEDV/LVEDV との相関を表す散布図において、SSc 群の近似直線が non-SSc 群の近似直線と乖離していた(Figure 2(D))。一方で mPAP と RVESV/LVESV との相関、mPAP と RVEF/LVEF との相関を表す散布図では 2 つの近似直線は近接していた(Figure 2(E,F))。9 つの CMR の指標のうち、SSc 群と non-SSc 群の 2 つの近似直線の傾斜の違いが最も大きいのは、有意差はないものの RVEDV/LVEDV であった(Figure 2(D-F), Figure 4, Table 6)。SSc 群と non-SSc 群における mPAP と RVEDV/LVEDV との相関の違いを同定するため、我々は次に RVEDV/LVEDV と mPAP との比を検討した。SSc 群では、(RVEDV/LVEDV)/mPAP は non-SSc 群と比べ有意に高値を示していた(Table 5)。SSc 群は non-SSc 群と比べ、登録時の PH 罹病期間が短く、血管拡張薬による治療頻度も低かったが(Table 5)、これらの因子と (RVEDV/LVEDV)/mPAP との間に有意な相関はみられなかった。以上の結果から、RVEDV/LVEDV は PAH の重症度のみならず、SSc に関連する心機能低下を反映していることが示唆された。

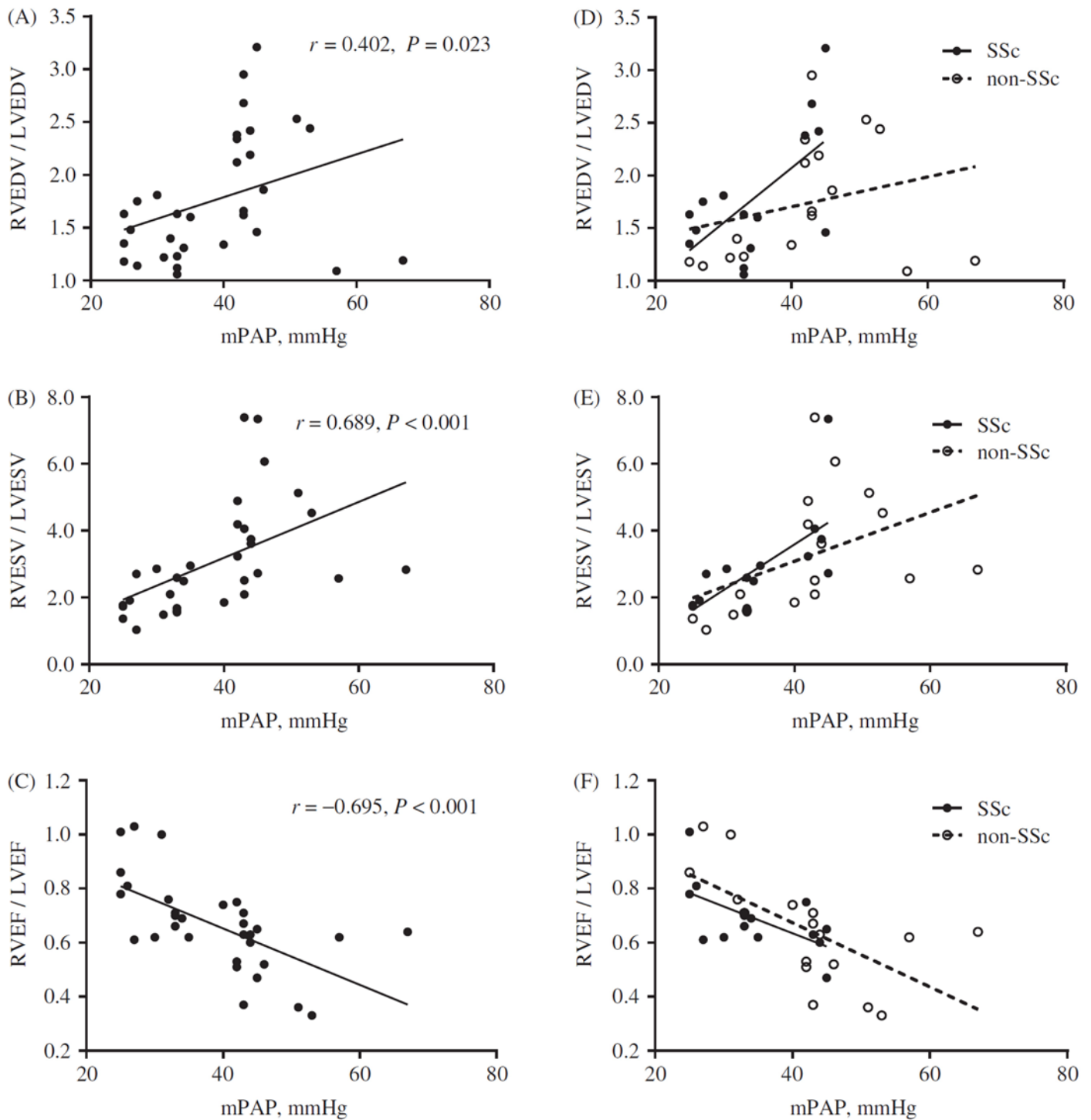


Figure 2. Pre-capillary PH を有する患者における mPAP と RVEDV/LVEDV (A)、RVESV/LVESV (B)、RVEF/LVEF (C)との相関。D, E, F はそれぞれ A, B, C のサブ解析であり、SSc 群と non-SSc 群に分けて検討した。

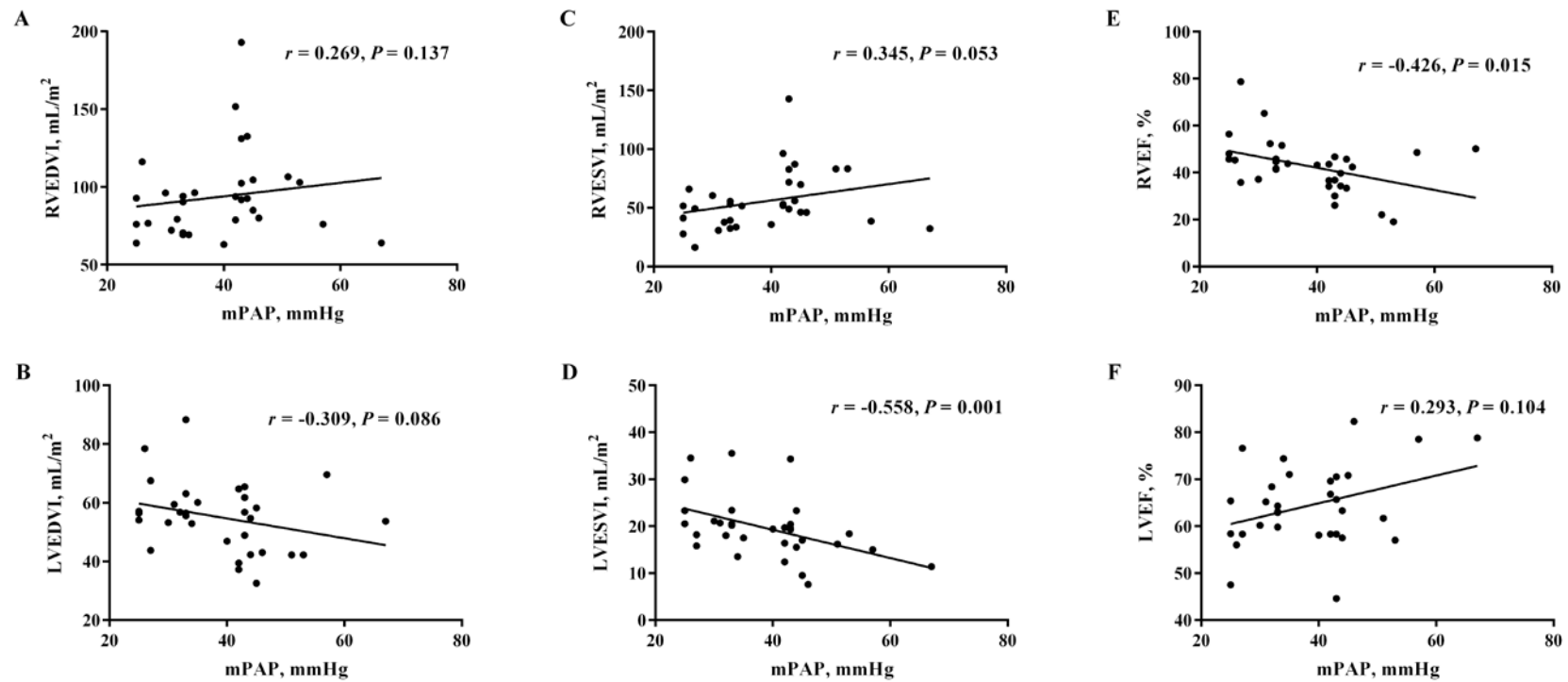


Figure 3. mPAP と RVEDVI (A)、LVEDVI (B)、RVESVI (C)、LVESVI (D)、RVEF (E)、LVEF (F)との相関。

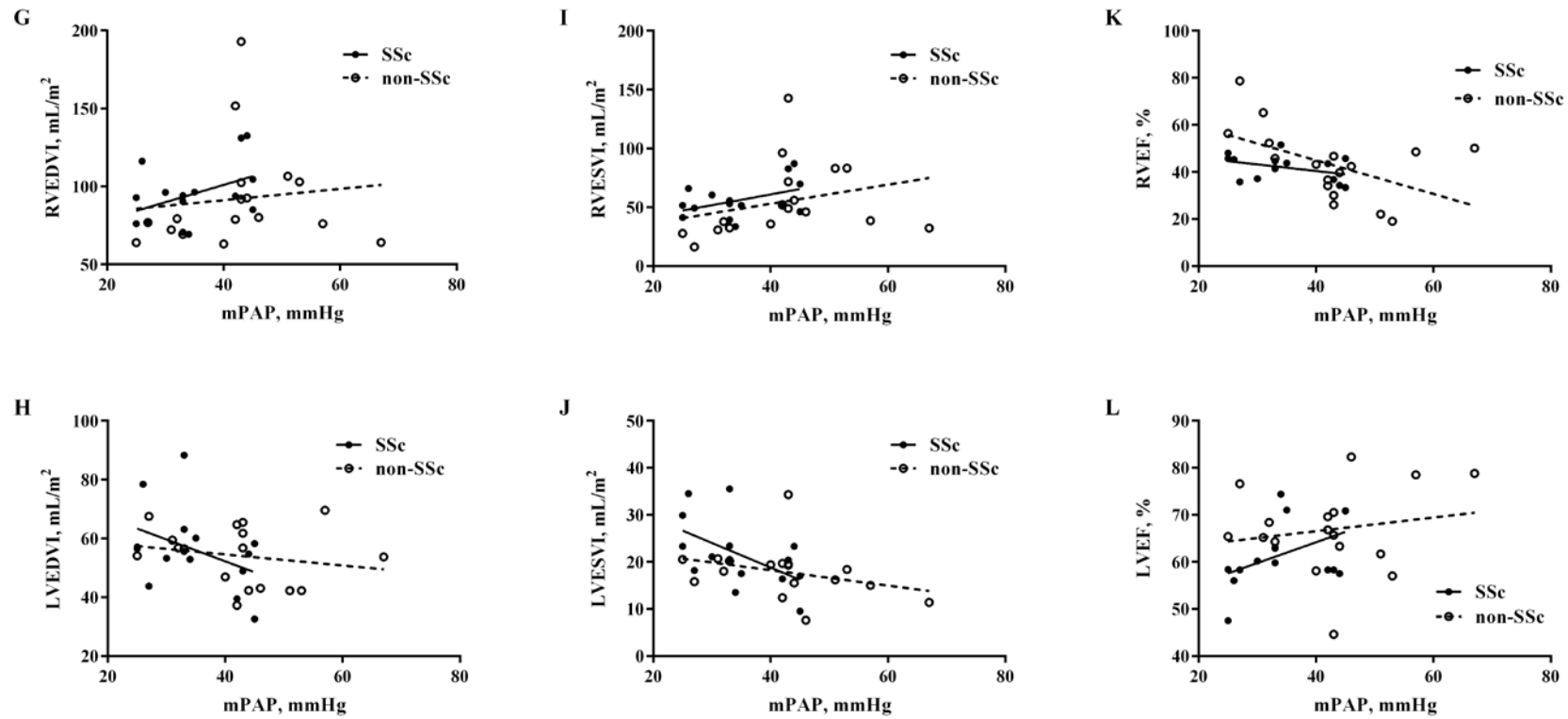


Figure 4. G, H, I, J, K, L はそれぞれ Figure 3 の A, B, C, D, E, F のサブ解析を示し、SSc 群と nonSSc 群に分けて検討した。

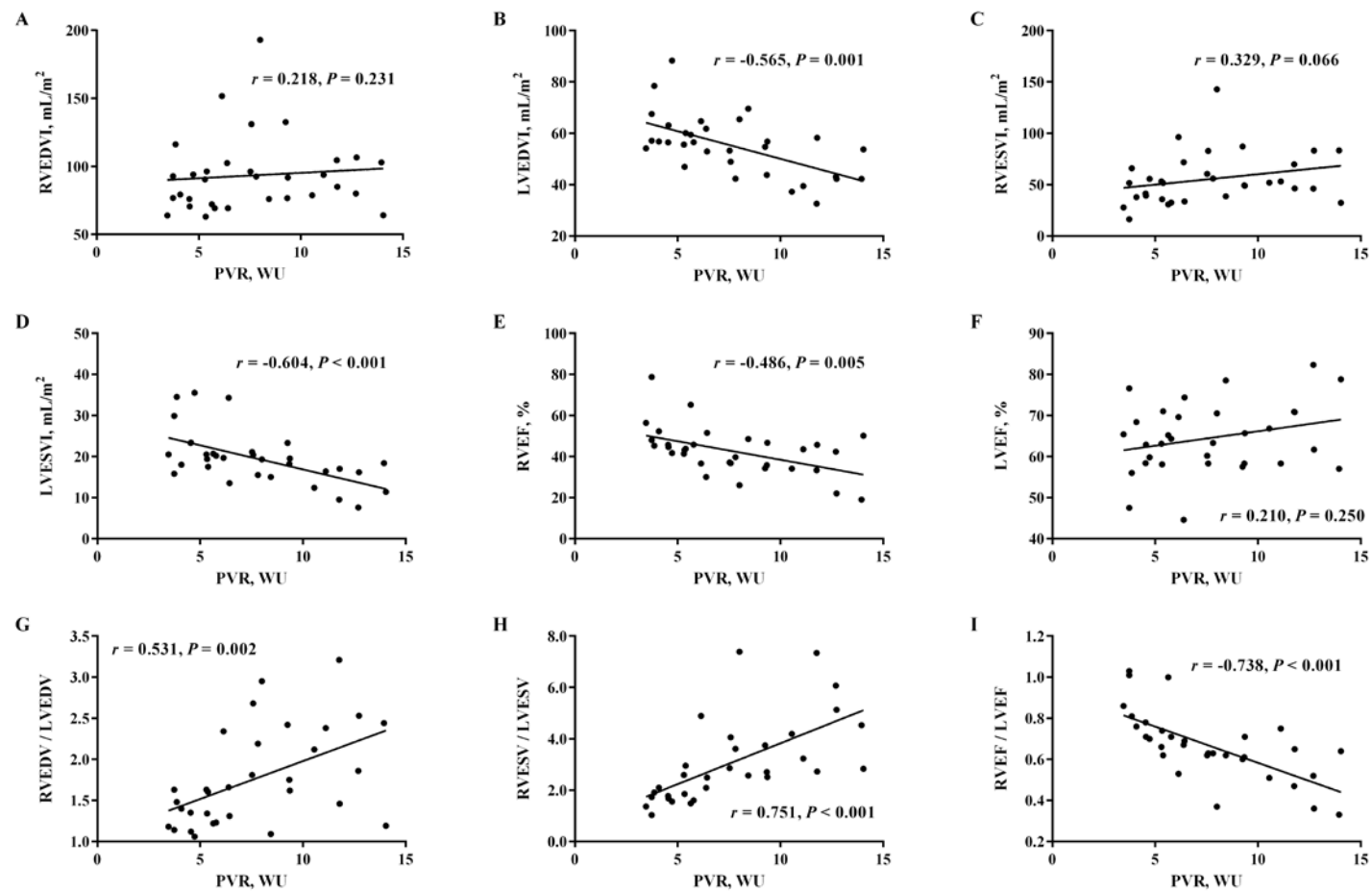


Figure 5. PVR と RVEDVI (A)、LVEDVI (B)、RVESVI (C)、LVESVI (D)、RVEF (E)、LVEF (F)、RVEDV/LVEDV (G)、RVESV/LVESV (H)、RVEF/LVEF (I)との相関。

Table 6. mPAPとCMRパラメータとの相関およびSSc群・non-SSc群の線形回帰スロープの比較

	<i>r</i>	<i>P</i> 値(*)	スロープ (SSc)	スロープ (non-SSc)	<i>P</i> 値(**)
LVEDVI	-0.309	0.086			
LVESVI	-0.558	0.001	-0.523	-0.164	0.163
LVEF	0.293	0.104			
RVEDVI	0.269	0.137			
RVESVI	0.345	0.053			
RVEF	-0.426	0.015	-0.278	-0.716	0.338
RVEDV/LVEDV	0.402	0.023	0.0522	0.0141	0.112
RVESV/LVESV	0.689	< 0.001	0.131	0.0732	0.362
RVEF/LVEF	-0.695	< 0.001	-0.0099	-0.0119	0.734

*Spearman の順位相関分析

*ANCOVA, SSc vs non-SSc

3.3.5 経時変化と予後

本研究に登録されたpre-capillary PHを有する患者32名のうち、17名が経過観察目的に2度目のRHCおよびCMRを同時期に施行された。全患者が経過中に1剤以上の血管拡張薬を投与されていた。治療後に、ほとんどの患者でmPAP, PVR, RVEDV/LVEDVの低下を認めており(Figure 6(A-C))、改めてRVEDV/LVEDVがPAH重症度の指標となることが示唆された。しかしながら、3名において経過中にRVEDV/LVEDVが上昇しており(Figure 6(F))、うち2名はmPAPとPVRが低下していた(Figure 6(D,E))。この2名はいずれもSSc患者であり、うち1名(Case 2)はPAH発症から2年以内に右心不全で死亡していた(Table 7, Table 8)。さらに、RVEDV/LVEDVが上昇した群は低下した群と比べ予後不良であった(Figure 7(A))。そしてmPAPとRVEDV/LVEDVのいずれかが上昇した患者はいずれも低下した患者よりも顕著に予後不良であった(Figure 7(B))。以上から、治療経過中におけるRVEDV/LVEDVの変化は、特にSSc-PAH患者において重要な予後予測因子となり得ることが示唆された。

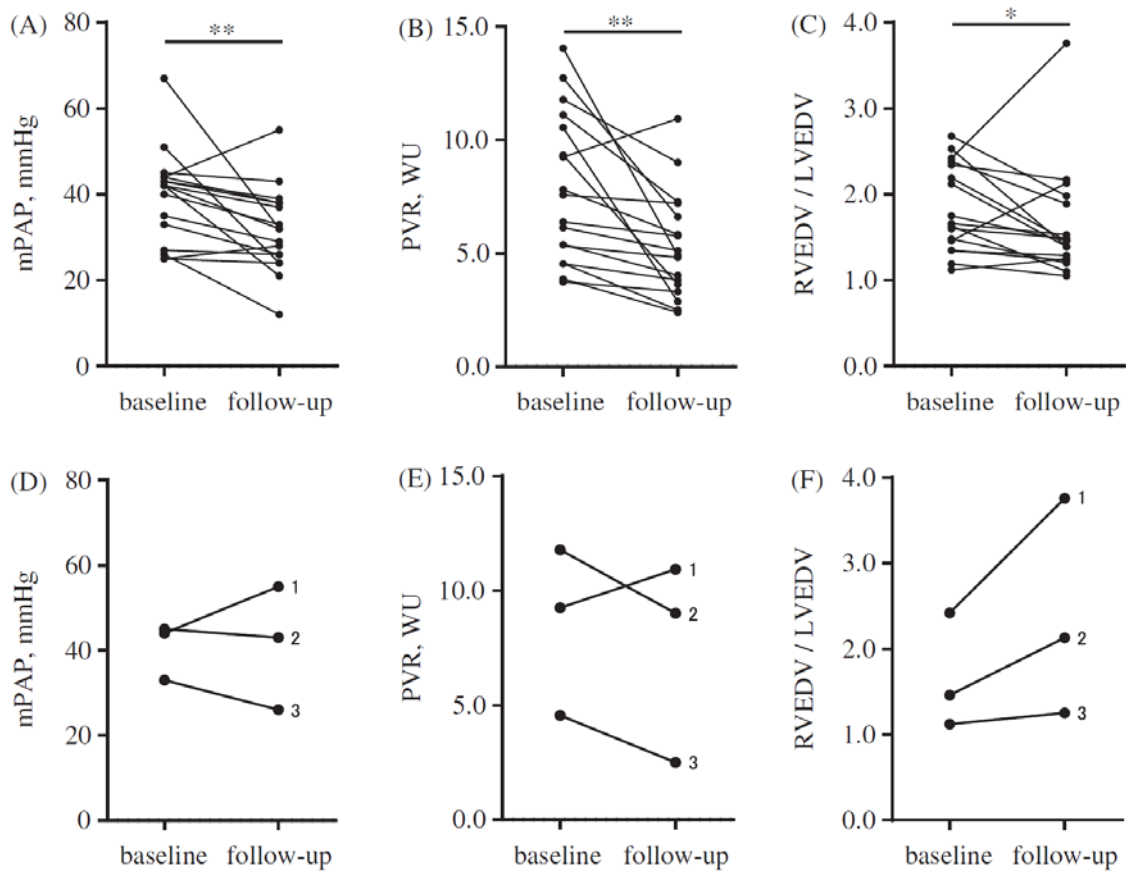


Figure 6. 経過観察目的に2度目のRHCおよびCMRを同時期に施行した17名の患者におけるmPAP (A)、PVR (B)およびRVEDV/LVEDV (C)の変化。D, E, Fは血管拡張薬による治療にもかかわらずRVEDV/LVEDVが上昇した3名におけるデータで、A, B, Cにそれぞれ対応している。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 。 P 値はベースラインと経過観察時のデータを比較し、対応のある t 検定またはWilcoxonの符号順位検定を用いて計算した。

Table 7. PAHの治療経過中にRVEDV/LVEDVが上昇した3名の背景

	症例 1	症例 2	症例 3
背景			
性別, 登録時年齢	Female, 71	Female, 66	Female, 40
疾患	SSc	SSc	SSc
合併症	ILD	ILD	腎クリーゼ
登録時 WHO 機能分類	IV	III	III
罹病期間	5 ヶ月	19 ヶ月	37 ヶ月
登録からの観察期間	4 ヶ月	3 ヶ月	3 ヶ月
治療内容とアウトカム			
肺血管拡張薬	ボセンタン, シルデナフィル	ボセンタン	ボセンタン, タダラフィル
利尿薬	なし	なし	なし
ACE 阻害薬あるいは ARB	なし	なし	なし
転帰	死亡	死亡	生存
死亡原因	右心不全	右心不全	—

Table 8. PAH の治療経過中に RVEDV/LVEDV が上昇した 3 名の RHC と CMR データ

	症例 1		症例 2		症例 3	
	baseline	follow-up	baseline	follow-up	baseline	follow-up
RHC パラメータ						
systolic PAP, mmHg	73	96	85	75	50	45
diastolic PAP, mmHg	25	35	25	25	21	17
mean PAP, mmHg	44	55	45	43	33	26
PAWP, mmHg	13	20	4	10	10	11
CI, L/min/m ²	2.32	2.23	2.26	2.38	2.92	3.25
PVR, WU	9.25	10.94	11.79	9.01	4.55	2.50
CMR パラメータ						
LVEDVI, mL/m ²	54.7	39.8	58.2	50.9	63.1	69.0
LVESVI, mL/m ²	23.3	12.8	17.0	12.5	23.4	21.7
LVEF, %	57.5	67.7	70.8	75.3	62.9	68.5
RVEDVI, mL/m ²	132.5	149.8	85.1	108.5	70.6	86.0
RVESVI, mL/m ²	87.1	94.5	46.2	60.3	39.2	43.4
RVEF, %	34.3	18.2	45.7	44.4	44.6	49.5
RVEDV / LVEDV	2.42	3.76	1.46	2.13	1.12	1.25
RVESV / LVESV	3.74	7.38	2.72	4.82	1.68	2.00
RVEF / LVEF	0.60	0.27	0.65	0.59	0.71	0.72

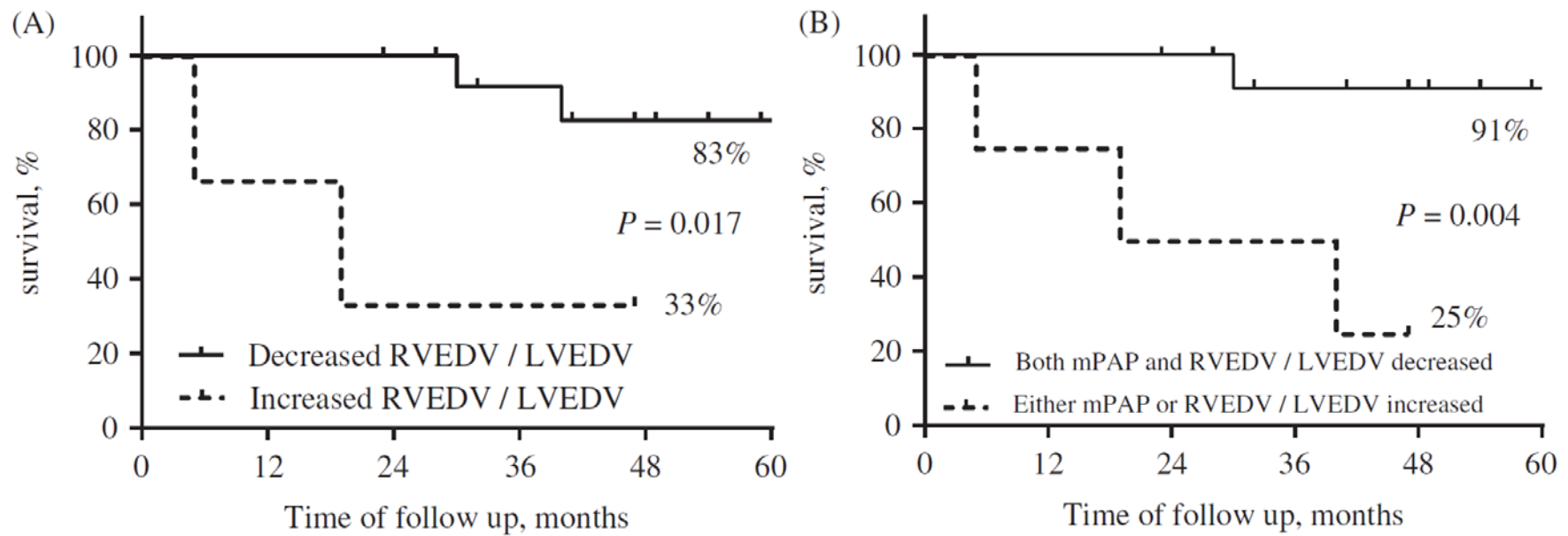


Figure 7. (A) RVEDV/LVEDVの上昇した群 (n=3)と低下した群 (n=14)におけるKaplan-Meier生存分析。
 (B) mPAPとRVEDV/LVEDVのいずれかが上昇した群 (n=4)といずれも低下した群 (n=13)におけるKaplan-Meier生存分析。

3.4 考察

我々は CMR を用いて左右心室の相互作用を評価することにより、SSc に関連する心病変の存在が SSc-PAH の病態、予後に影響していることを見出した。近年、SSc-PAH 患者が他の CTD に合併した PAH 患者あるいは IPAH 患者と比較し予後不良であることが数多く報告されているが、その理由については未だ明らかになっていない(Chung et al., 2014, Fisher et al., 2006, Launay et al., 2010)。既報では、SSc-PAH 患者における mPAP と PVR が他の PAH 患者と比較し同等か低値であることが示されている(Fisher et al., 2006)。これと同様に、本研究においても SSc 患者では、non-SSc 患者と比較し、mPAP が低値であり PVR は同等という結果であった。すなわち、RHC の測定データは必ずしも SSc-PAH の予後を正確に反映していないということを示唆している。

CMR は、心臓の機能的、形態学的情報を明らかにするのみならず、RHC の測定データを予測できることが示されている。Swift らは、CMR で右室と左室の心筋重量から計測される ventricular mass index、および心室中隔角度を用いて mPAP が正確に予測できることを示した(Swift et al., 2013)。これらはいずれも右室と左室の相互作用を反映している。また同研究では、この 2 つの指標が LV や RV 単独の指標と比べて、mPAP とよりよく相関することが示された。我々の研究でも、右室と左室の相互作用を反映するパラメータである RVEDV/LVEDV, RVESV/LVESV, RVEF/LVEF が mPAP とよく相関することがわかった。

一方、本研究において明らかにした重要な点は RHC と CMR データが必ずしも一致するとは限らないことである。SSc 群と non-SSc 群において、mPAP と RVEDV/LVEDV との相関には乖離が見られた。SSc 群では、non-SSc 群と比べ、mPAP と RVEDV/LVEDV との比が有意に高値を示していた。さらに RHC と CMR の経時変化を観察すると、SSc 患者 2 名において、mPAP と PVR が低下しており PAH が改善したように考えられるが、RVEDV/LVEDV は逆に上昇しており、うち 1 名は診断から 2 年以内に右心不全で死亡していた。この結果は、治療経過中の RHC と CMR データは必ずしも同様に推移しないということを示している。他の PAH 患者と異なり、SSc-PAH 患者では肺動脈圧の上昇に伴ういわゆる『二次性』の心機能低下のみならず、SSc 由来の病態として線維性、炎症性あるいは虚血性の心筋障害から来る『一次性』の心機能低下を来すものと考えられる(Lambova, 2014)。SSc 患者における心病変

は、従来の予想以上に高頻度にみられることが明らかになっている (Foocharoen et al., 2015)。CMR を用いた検討では、SSc 患者の 75%において LV の拡張能低下や心筋遅延造影など、無症候性も含めた心病変が確認されたと報告されている (Hachulla et al., 2009)。以上から、CMR は RHC で評価困難な SSc の『一次性』の心病変を捉えることができ、SSc-PAH 患者の予後を反映し得るものといえる。

また、PAH 患者では心筋のリモデリングが起きていることが示されている (Vonk-Noordegraaf et al., 2013)。RV は、その壁を厚くすることにより、増加した後負荷に適応している。しかし、SSc-PAH 患者では IPAH 患者と比べ、RV の心筋重量が増加しにくいことが示されており、後負荷に対する心筋の適応能、すなわち代償性肥大が障害されていることを示唆している (Kelemen et al., 2015)。Tedford らによる別の研究では、RV の圧と容量の関係に基づいて評価した RV 収縮能が SSc-PAH 患者で低下しており、やはり後負荷の上昇に適応できていないことを示している (Tedford et al., 2013)。我々の研究では、2 名の SSc 患者において、治療後に mPAP と PVR が改善した一方で、RVEDV/LVEDV は悪化していた。すなわち SSc 由来の『一次性』の心病変が悪化したことで、治療によって後負荷が改善したにも関わらず RV が代償できずに右心不全となり、予後不良の一因となることを示唆している (Figure 8)。

LV と RV の機能を分けて考えると、SSc 患者において、CMR で同定される LVEF 低下や拡張不全といった LV の運動異常は RV の運動異常と比べ 3 倍も高頻度に認められる (Hachulla et al., 2009)。我々の検討では、SSc 群の LVEDVI/mPAP は non-SSc 群と比べ高い傾向にあったが、統計学的に有意な差は出なかった。一方、RVEDVI/mPAP は SSc 群で有意に高値を示した (Table 5)。この結果は、SSc 患者では高頻度に左心疾患を呈するのみならず、RV の拡張を来しやすいことを示唆しており、やはり PAH が引き起こす後負荷に対して RV が代償できないことが原因と考えられる。

さらに我々は、心筋遅延造影法 (late gadolinium enhancement: LGE) を用いて心筋の異常を評価した。統計学的に有意差は出していないが、SSc 群では心筋の LGE 陽性率が non-SSc 群と比べ高かった (80% vs 59%, Table 5)。LGE の陽性所見は SSc-PAH 患者のみならず IPAH 患者や SSc 以外の CTD-PAH 患者でも認められることがわかっている (Shehata et al., 2011, Hesselstrand et al., 2011) が、SSc-PAH における『一次性』の心病変を同定するのに LGE が有用であるか、更なる検討が必要である。

本研究のリミテーションは母集団が少ないこと、単一施設での試験であること、後ろ向き観察研究であることである。母集団が少ないため、我々は pre-capillary PH の基準を満たすすべての患者を含めたが、肺病変を有する患者を

除外しなかった。また肺静脈閉塞性疾患や肺毛細血管腫症の CMR パラメータへの影響は、病理組織学的検討がないため評価できていない。SSc 群と non-SSc 群における RVEDV/LVEDV と mPAP との相関の違いを検討するにあたっては、RVEDV/LVEDV と mPAP の比を 2 標本 t 検定で解析することで統計学的有意差を得たが、ANCOVA で比較した 2 つの線形回帰の傾きに有意差は出なかった。CTD-PAH はまれな病態であり、CMR が施行可能な施設も限られるが、母集団の多い前向きが多施設共同研究を行うことで我々の研究結果がより確かなものとなることが期待される。

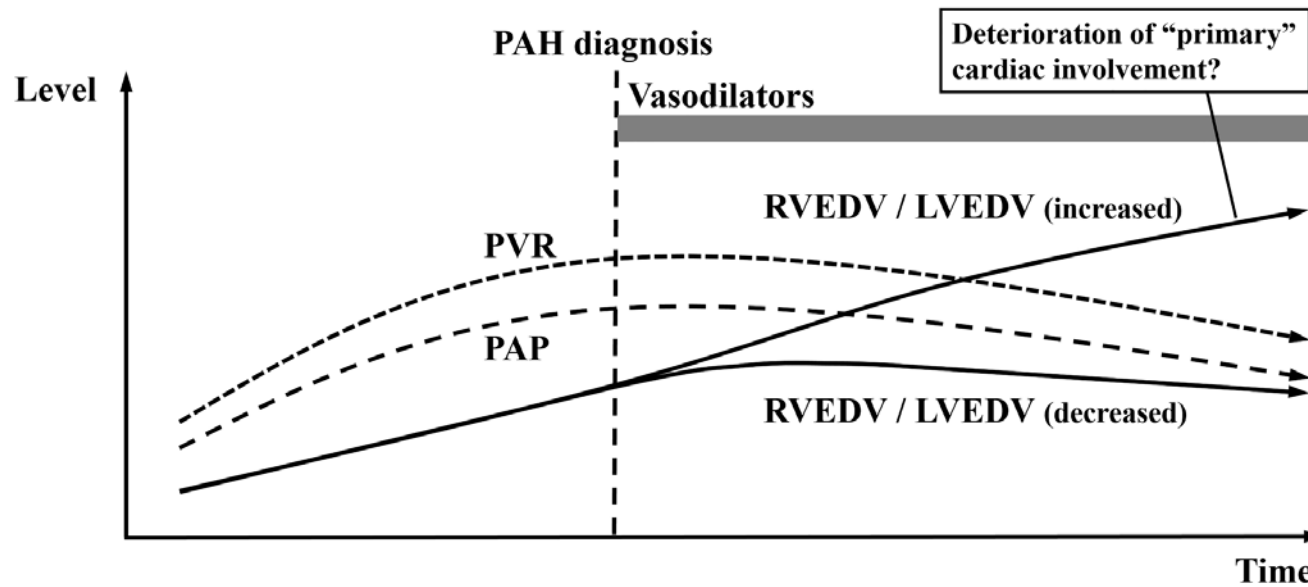


Figure 8. 血管拡張薬による治療後に PAP と PVR が改善した SSc-PAH 患者の経過図。本研究結果を踏まえると、RVEDV/LVEDV の値は必ずしも PAP や PVR と一致して低下するとは限らない。その理由として、SSc のもつ『一次性』の心病変の悪化により後負荷への代償がきかなくなることが原因と考えられる。この他、性別や年齢、PAH 発症から治療開始までの期間なども影響する可能性があるが、更なる検討が必要である。

3.5 結語

CMR を行うことにより、特に SSc-PAH 患者において、治療効果や予後予測を評価する上で RHC のみでは評価できない付加的な情報を得ることができ、我々のデータから、SSc の『一次性』の心病変は両心室の相互的な作用に影響し、SSc-PAH が他の CTD-PAH と比べ予後不良である根拠のひとつと考えられる。すなわち、RHC のみならず CMR を用いて両心室の相互的な作用を評価することは、SSc-PAH の病態評価や予後予測を行う上で重要である。

【補遺】

本研究のメインテーマとは直接関連しないが、さらに自己免疫疾患に関する2つの研究に携わっており、補遺として以下に追記する。

4. 第二章

肝細胞増殖因子受容体フラグメントによる 抗線維化作用の研究

4.1 緒言

4.1.1 TGF β /Smad シグナル経路と線維化

SSc は冒頭に述べた通り自己免疫疾患に区分されるが、他の自己免疫疾患と異なり、免疫抑制療法に対する反応性が著しく悪いのが特徴である。SSc に特徴的な「線維化」という病態を克服するためには、いわゆる抗線維化療法の確立が必要と考えられるが、その道のりは未だ険しいのが現状である。

第一章では、SSc の難治性病態のひとつである PAH をテーマとし、他の CTD による PAH との病態の違いについて CMR を用いて検討した。一方 PAH と並び、間質性肺病変(ILD)は SSc における最も重要な肺合併症のひとつであるが、その発症メカニズムは未だ十分に解明されていない。TGF β (Transforming Growth Factor β)は SSc-ILD のメディエーターとして最も広く研究されており、損傷した肺組織で放出される(Akter et al., 2014)。TGF β は肺胞上皮細胞 (alveolar epithelial cells: AEC)の増殖を抑制するとともに、MMP (Matrix Metalloprotease) 7 の発現、筋線維芽細胞の動員、細胞外基質(extracellular matrix (ECM))の蓄積を促進する(Li et al., 2011, Kitani et al., 2003, Sime and O'Reilly, 2001, Wei et al., 2011, Willis and Borok, 2007)。SSc-ILD において、TGF β はヘテロ二量体の細胞表面受容体に結合し、標準経路、非標準経路を活性化してシグナル伝達に多彩な役割を担っている。標準経路では、TGF β は Smad2/3 をリン酸化し、リン酸化した Smad2/3 は Smad4 と結合する。Smad4 は転写因子として機能し、ECM タンパク(コラーゲン、PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)、CTGF (connective tissue growth factor, CCN2)など)の発現に寄与している。非標準経路は特異的な制御タンパクである MAPK や PAR6、RhoAなどを介する経路で、細胞骨格の再構築や細胞接着、細胞運動性に関与している(Willis and Borok, 2007)。TGF β は肺の線維化の発症や進行の中心的な役割を担っていることから、TGF β の働きを抑えることは重要な治療戦略となり得る。実際に、TGF β の II 型受容体を肺胞上皮でコンディショナルノックアウトしたマウスでは、AEC における Smad2 と Smad3 のリン酸化が抑制され、ブレオマイシン誘導による肺の線維化レベルが低下して生存率が向上したことが報告されている(Li et al., 2011)。

Bone morphogenetic proteins (BMPs)は TGF β スーパーファミリーに属する

リガンドで、異所性の骨形成を引き起こす生理活性物質として同定された(Ducy and Karsenty, 2000)。BMP は骨格の発育や骨増殖、幹細胞の分化、神経発生、腹側中胚葉の誘導などに重要な役割を担っている(Kang et al., 2004, Gonzalez-Nunez et al., 2013)。BMP9 は、GDF-2 (growth differentiation factor 2)としても知られており、TGF β の I 型受容体のひとつである ALK1 (activin-like kinase 1)の、血管新生における効果を誘導する強力なリガンドとして同定された(David et al., 2007)。BMP9 は骨形成や軟骨形成を強力に誘導したり(Majumdar et al., 2001)、コリン作動性ニューロンの分化を促進したり(Lopez-Coviella et al., 2000)、グルコース代謝や鉄動態のホメオスタシスを調節する(Chen et al., 2003, Truksa et al., 2006)などの役割がある。

BMP9 はマウス胚線維芽細胞(mouse embryo fibroblasts: MEF)において線維化を促進することが報告されている(Munoz-Felix et al., 2016)。培養した MEF では、BMP9 は Smad1/5/8 や Smad2/3、MAPK/Erk1/2 経路を介してコラーゲンやフィブロネクチン、CTGF の発現を上昇させる。ここで、血管内皮細胞や線維芽細胞をはじめとする多くの細胞では、Smad2/3 経路は I 型受容体である ALK5 を介して活性化するが、Smad1/5/8 経路は ALK1/2/3/6 受容体を介して活性化する(Figure 9)。また III 型受容体と呼ばれる Endoglin は、この 2 つの Smad 経路のバランスを調整している。SSc 患者の線維芽細胞では、Endoglin の発現が亢進しており、ALK1/Smad1/5/8 経路を優位に活性化し、線維化に重要な役割を担っていることが示されている(Morris et al., 2011, Pannu et al., 2008, Gregory et al., 2014)。BMP9 は ALK1 と BMPRII に結合して Smad1/5/8 経路のシグナルを活性化する。しかしながら、SSc 患者の線維芽細胞における BMP9 の役割については、これまで検討した報告はない。

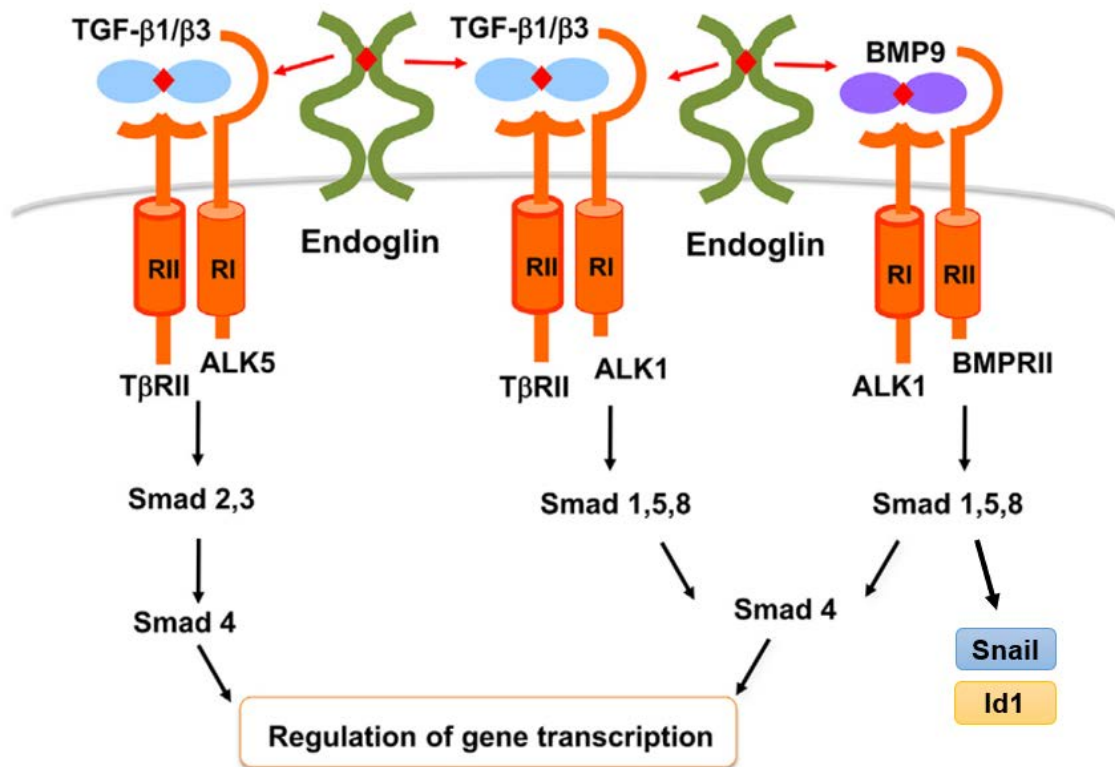


Figure 9. 血管内皮細胞における TGFβ と BMP9 をリガンドとした Smad シグナル経路(Gregory ら(Gregory et al., 2014)、一部改変)。内皮細胞においては、TGFβ1 と β3 が TGFβ の II 型受容体に結合して I 型受容体である ALK5 と ALK1 を呼び寄せリン酸化を引き起こす。ALK5 は Smad2/3 を介してシグナル伝達するのに対し、ALK1 は Smad1/5/8 を介してシグナル伝達する。Endoglin は III 型受容体と呼ばれており、この 2 つの Smad シグナルのバランスを調整している。SSc の線維芽細胞においては Endoglin の発現が亢進しており、ALK1/Smad1/5/8 を優位に活性化させ、線維化に関与していることが知られている。一方 BMP9 は TGFβ スーパーファミリーに属する別のリガンドである。BMP9 は ALK1 と BMPRII に結合して Smad1/5/8 経路のシグナルを活性化する。

4.1.2 肝細胞増殖因子とその受容体

肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)とその受容体である c-MET (cellular mesenchymal-epithelial transition factor, MET)を起点とするシグナル経路は、様々な細胞内シグナル蛋白を誘導することにより細胞増殖や遊走、分化、形態、生存などに重要な役割を担っている。この HGF は肝臓や肺などの組織の線維化に対して抑制的に働くことが動物モデルで示されている(Gazdhar et al., 2013, Inoue et al., 2003, Mizuno et al., 2005)。また肺組織において、HGF-MET シグナルは Smad7 を介し、TGF β で誘導される線維化、すなわち上皮間葉変換 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT)、線維芽細胞の分化、そして筋線維芽細胞の増殖を抑制することが示されている(Shukla et al., 2009)。

MET は膜貫通性のチロシンキナーゼ細胞表面受容体であり、50kD の α 鎖と145kD の β 鎖がジスルフィド結合で繋がっている。 α 鎖と β 鎖の N 末端の一部が細胞外ドメインを構成し、残りの β 鎖が膜貫通ドメイン、チロシンキナーゼドメイン、C 末端領域を構成している(Skead and Govender, 2015)。HGF が MET に結合することにより MET のチロシンキナーゼが活性化し、チロシンの自己リン酸化を引き起こすことで下流の細胞内シグナルタンパクを活性化していく(Nakamura et al., 2011)。このカスケードには Ras-Erk や PI3K-Akt、PLC γ -PKC が含まれる(Skead and Govender, 2015)。

SSc 患者の線維芽細胞では MET の発現が亢進していることが報告されている(Kawaguchi et al., 2002)。Foveau らは、MET が過剰発現することにより内因性のカスパーゼ(Caspase)が活性化することを示している(Foveau et al., 2007)。また別の研究グループでは、MET が HGF の誘導する肺や肝臓の筋線維芽細胞のアポトーシスを仲介することを示している(Kim et al., 2005)。

4.1.3 MET の C 末端フラグメント、M10

Caspase-3 は、下流のアポトーシスシグナルの発現に重要な特定の基質を切り出すことにより、アポトーシス誘導に主要な役割を担っている(Slee et al., 2001)。SSc 患者では Caspase-3 に対する自己抗体が産生され、SSc-ILD の重症度や血管障害、炎症と関連していると報告されている(Okazaki et al., 2010)。活性化した Caspase-3 は MET にあるアスパラギン酸を含むモチーフを認識していくつかの安定なフラグメントを切り出し、アポトーシスの制御や MET の発現に関わっている(Foveau et al., 2007, Lefebvre et al., 2013, Ma et al., 2014)。このフラグメントのひとつとして、C 末端領域の 10 個のアミノ酸配列、“TRPASFWETS” (M10 と命名)が切り出される(Figure 10-1)。しかし、もしこの 1398 番目のアミノ酸がアスパラギン酸ではなくグリシンなど別のアミノ酸に置換された場合、Caspase-3 が認識できないため、M10 を切り出すことができない(Figure 10-2)。

この D1398G 変異をもつ MET に関して、我々は以下のデータを示している(Atanelishvili et al., 2016)。SSc 患者の肺線維芽細胞に wild type の MET と D1398G 変異をもつ MET をそれぞれトランスフェクションして HGF 刺激による抗線維化作用を比較した(Figure 11)。Wild type の MET をトランスフェクションした場合、HGF 刺激により抗線維化作用が示されているのに対し、D1398G 変異をもつ MET をトランスフェクションした場合は HGF で刺激しても抗線維化作用が発揮されなかった。すなわち、線維化抑制シグナルである HGF-MET 経路が機能していないことを示唆している。両者の差をもたらしているのは、Caspase-3 で切り出される M10 の有無、ということになる。したがって我々は、この M10 こそが、HGF-MET 経路における抗線維化作用の鍵を握っているものと推測した。そこで本研究では、肺や皮膚の線維芽細胞、ならびに動物モデルにおける M10 の抗線維化作用について検討することを目的とした。

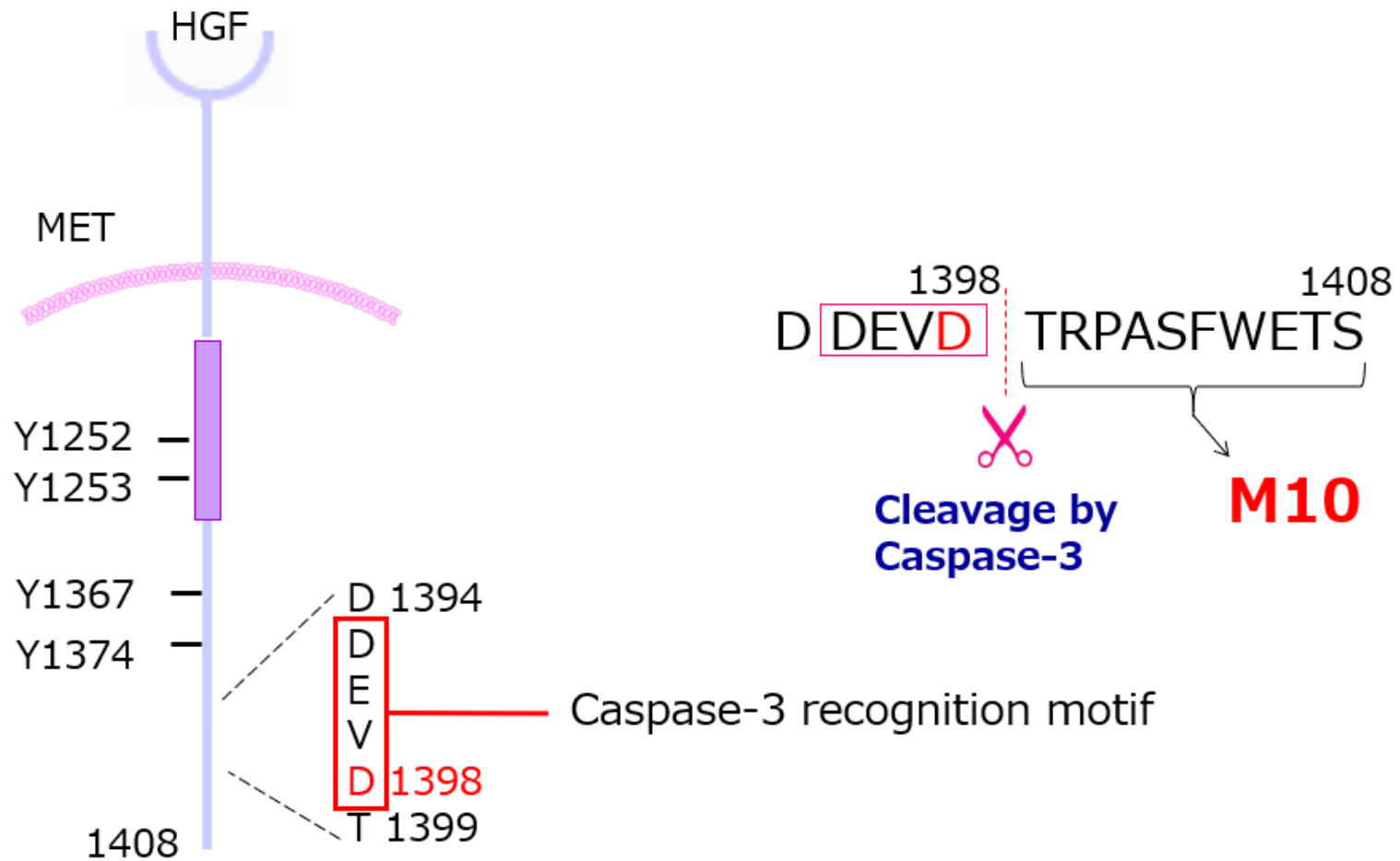


Figure 10-1. MET の C 末端領域。Caspase-3 によって認識されるモチーフがあり、C 末端のアミノ酸配列 10 個(M10)が切り出される。

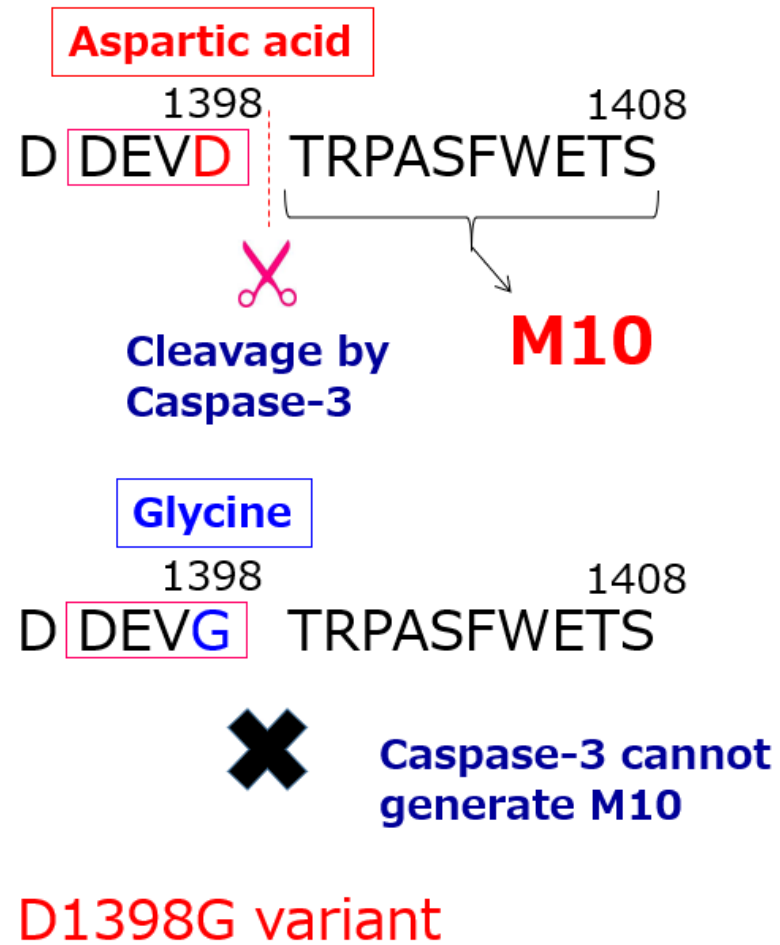
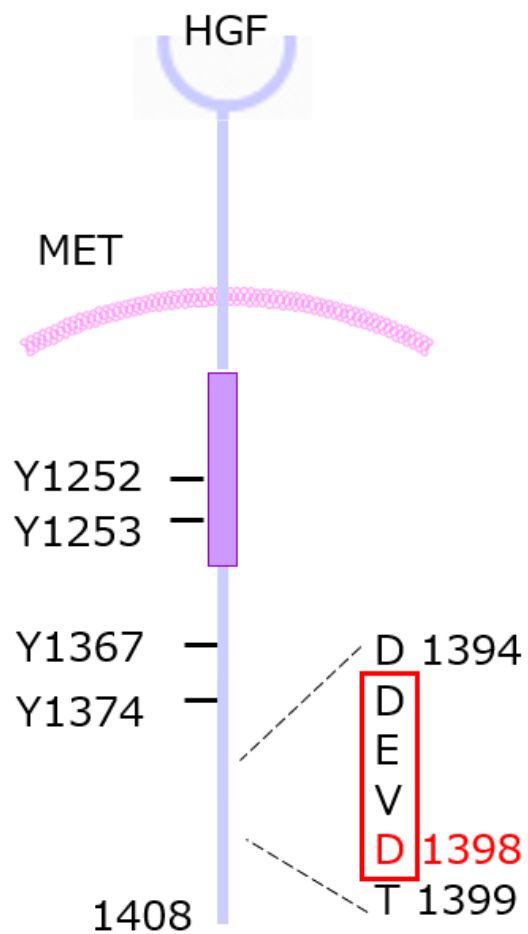


Figure 10-2. MET の 1398 番目のアミノ酸がアスパラギン酸ではなくグリシンに置換された場合(D1398G)、Caspase-3 によって認識されないため、M10 を切り出すことができない。

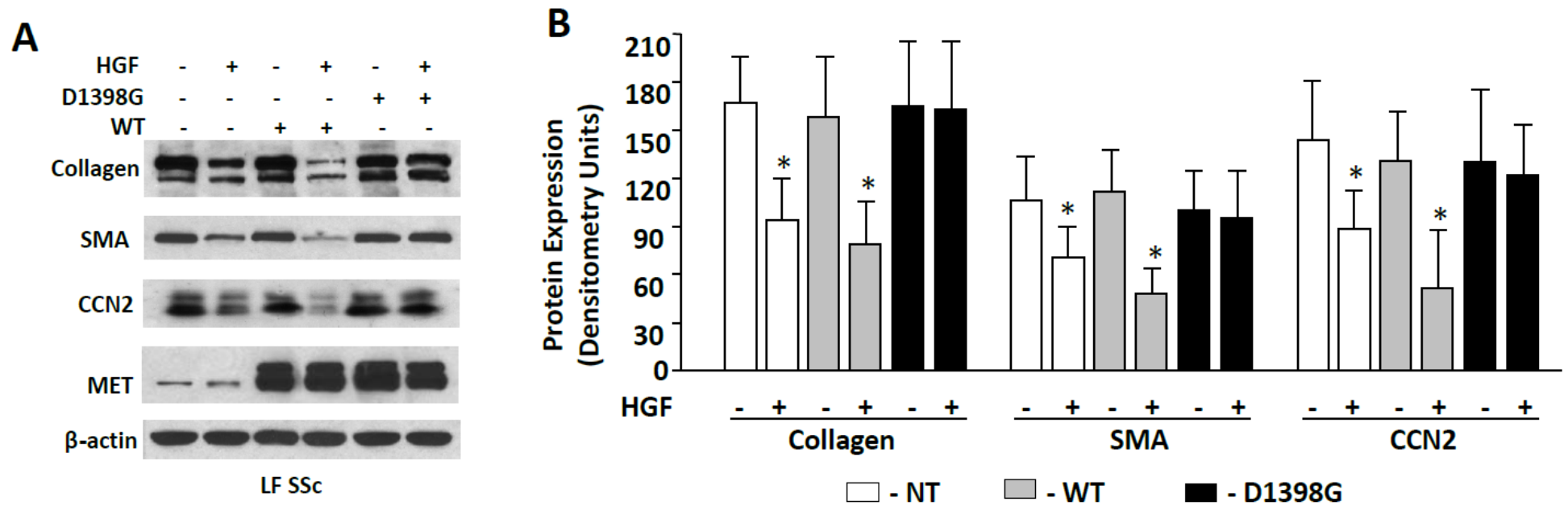


Figure 11. SSc 患者の肺線維芽細胞(lung fibroblasts: LF)に wild type (WT)の MET あるいは D1398G 変異をもつ MET (D1398G)をトランスフェクションし、HGF の刺激下・非刺激下で I 型コラーゲン、 α SMA、CTGF (CCN2)の発現レベルを検討。トランスフェクションしていない(non-transfected: NT) LF とトランスフェクションした LF を血清フリーで 24 時間培養し、HGF (50 ng/mL)を加えてさらに 48 時間培養。蛋白を回収してウェスタンブロッティング法で検討(A)。B は A で得られた結果をデンスITOMETリー法で解析。値は 4 回の実験の平均値と標準偏差で表記。* $P < 0.05$ (HGF 非刺激下の細胞と比較)。

4.2 実験方法

4.2.1 実験方法 1 : TGF β /Smad2 シグナル経路における

M10 の抗線維化作用の解析

4.2.1.1 材料

M10 と、比較対象としての 10 個のアミノ酸からなるスクランブルペプチドは GenScript (Piscataway, NJ) から購入した。また赤色蛍光を発する 5,6-carboxytetramethylrhodamine, succinimidyl ester (5,6-TAMRA, SE) をコンジュゲートした M10 (5,6-TAMRA-M10) は BioSynthesis (Lewisville, Tex) から購入した。I 型コラーゲンに対する抗体は Southern Biotechnology (Birmingham, Ala)、抗 Met (C12) 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif)、Smad2 および phospho-Smad2 に対する抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, Mass)、抗 β -actin 抗体は Sigma (St. Louis, Mo) から購入した。Alexa Fluor 647 をコンジュゲートしたヤギの抗ウサギ二次抗体、Alexa Fluor 488 Phalloidin、ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI は Life Technologies (Grand Island, NY) から購入した。C 末端 MYC/DDK タグ付き Smad2 (NM_005901)、C 末端 MYC/DDK タグ付き Smad4 (NM_005359)、抗 DDK 抗体は OriGene Technologies (Rockville, Md) から購入した。TGF β は R&D systems (Minneapolis, Minn)、ブレオマイシン(bleomycin sulfate) は TEVA Pharmaceuticals USA (Sellersville, PA) から購入した。

4.2.1.2 細胞培養

ヒトの肺組織は、2013 年の ACR/EULAR の SSc 分類基準(van den Hoogen et al., 2013) を満たし、サウスカロライナ医科大学(Medical University of South Carolina: MUSC) の倫理委員会(Institutional Review Board: IRB) のガイドラインに基づき肺病変を有することが示された 3 名の SSc 患者の病理解剖検体から

採取した。SSc-ILD の診断は肺組織の病理学的評価によりなされた。肺の線維芽細胞は同 3 名の SSc 患者および年齢・人種・性別の一致した健常者の検体から単離して培養し、全ての実験は第 2～第 4 継代培養したものを使用した。ヒト胎児肺線維芽細胞株である MRC5 は Sigma 社(St. Louis, Mo)から、ヒト肺腺癌上皮細胞株である A549 は Lonza 社(Walkersville, Md)から購入した。

皮膚の線維芽細胞は MUSC の IRB のガイドラインに基づき、3 名の SSc 患者および年齢・性別・人種の一一致した健常者の前腕の皮膚より 3mm 大の生検を施行し単離した。皮膚は脂肪と毛を取り除き、0.5 x 0.5mm の切片にした上で、5%CO₂、37°C の条件で、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco, Grand Island, NY)に 20%の FBS (fetal bovine serum)、l-glutamine (2mM)、gentamicin sulfate (50μg/mL)、amphotericin B (5μg/mL)を加えたものを培地として培養した。線維芽細胞がコンフルエントになるまでの間、死細胞や接着しない細胞を取り除くため、5 日毎に培地を交換した。単層培養は 10%FBS 入りの DMEM で継続した。

4.2.1.3 免疫染色法

4 チャンバーのスライドガラス上で細胞を 60-70%コンフルエント程度まで培養し、血清を取り除いて一晩置いたのち、TGFβの刺激下、あるいは非刺激下で M10(あるいは 5,6-TAMRA-M10)とともに 24 時間インキュベートした。細胞は 4%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde: PFA)で固定し、5%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA)、0.1% Triton、0.0004%アジ化ナトリウムを含む PBS (phosphate-buffered saline)でブロッキングした。スライドの一部は抗 Met C12 抗体あるいは抗 Smad2 抗体を加え、その後二次抗体として Alexa Fluor 647 をコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ抗体を添加した。続いて PBS で洗浄したのち Alexa Fluor 488 Phalloidin を加えて 30 分インキュベートした (PBS で 50 倍希釈)。最後に ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI を滴下してカバーし、Zeiss Axio Imager M2 microscope system を用いて撮像した。

4.2.1.4 ウェスタンブロッティング

肺および皮膚の線維芽細胞を 6 ウェルプレート上で培養し、90%コンフルエント(2×10^6 cells/well)に達したら血清フリーとし、24 時間インキュベートした。続いて M10 あるいはスクランブルペプチドを投与し、40 分後に TGF β (5 ng/mL)を投与した。30 分インキュベートしたのち、氷冷した PBS で洗浄し、1 x SDS (sodium dodecyl sulfate)サンプルバッファー(100 μ L/well)を用いてタンパク質を回収した。95 $^{\circ}$ C 4 分でボイルし、ブロモフェノールブルーの染色液を 1.5 μ L、 β メルカプトエタノールを 3 μ L 加え、各サンプルを 20 μ L ずつ SDS ポリアクリルアミドゲルのウェルにアプライした。ウェスタンブロッティングにはニトロセルロースメンブレンを使用し、SDS-PAGE 後のアクリルアミドゲルからメンブレンにウェット法で転写後、5% Skim Milk でブロッキング処理し、0.1%Tween20 添加 TBS (tris-buffered saline)で洗浄したのち、ウサギ抗 phospho-Smad2 抗体によるブロッティングをおこなった。二次抗体には HRP (horseradish peroxidase)標識モノクローナル抗ウサギ IgG 抗体を使用した。HRP の検出には ECL (Enhanced Chemiluminescence) (Amersham Biosciences)を用いた。

4.2.1.5 ペプチド-タンパク結合実験

DDK タグで標識したリコンビナント Smad2 と Smad4 を M10 とともにインキュベートし、Buffer A (Tris-HCl 20mM, pH 7.5, EDTA 0.6mM, NaCl 70mM, 0.01% Thesit)で全量 500 μ L とし、4 $^{\circ}$ C で 40 分攪拌した。続いて抗 C12 抗体を 1 μ g 加え、さらに 30 分攪拌したのち、50 μ L の Protein G-Sepharose 懸濁液とともに 20 分インキュベートした。その後 Buffer A で 3 回洗浄し、得られたタンパク質複合体は Laemmli sample buffer で可溶化して抗 DDK モノクローナル抗体を用いてブロッティングした。

4.2.1.6 共免疫沈降法

SSc 患者の皮膚および肺線維芽細胞を 100mm プレート上で培養し、血清フ

リーで一晩置き、M10 とともに 24 時間インキュベートした。その後氷冷した PBS で洗浄し、1mL の氷冷した solubilization buffer (Tris-HCl 10mM, pH 7.4, EDTA 10mM, NaCl 150mM, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS) を用いて回収した。サンプルは 3 時間攪拌し、4°C で遠心分離した。次に抗 C12 抗体 (1 μ g) を加え、4°C で 90 分間攪拌した。Protein G-sepharose ビーズを用いて単離し、buffer (Tris-HCl 10mM, pH 7.4, EDTA 10mM) で洗浄した。得られたサンプルをゲルに流して電気泳動し、抗 Smad2 抗体を用いてブロッティングした。

4.2.1.7 ブレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウス

本実験では C57BL/6 マウスを用い、SPF (specific pathogen free) 環境で飼育した。イソフルレンによる麻酔科でブレオマイシン (2U/kg) を気管内投与して肺障害を誘発した。コントロールとして、同量の生理食塩水を使用した。M10 (10mg/kg) は 48 時間毎に腹腔内投与した。M10 のコントロール群としてスクランブルペプチド (10mg/kg) を同様に投与した。3 週間後にマウスをイソフルレン曝露により屠殺した。M10 投与群については、マウス血漿中の M10 の濃度変化を調べるため、最後に M10 の腹腔内投与を施行してから屠殺するまでの時間を 15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間に設定 (それぞれ n=3) し、屠殺直後の血漿を 0.01% クエン酸ナトリウムの存在下に心臓血より採取した。その後肺組織を、染色やコラーゲン量測定用に採取した。全ての実験手順は MUSC の Institutional Animal Care and Use Committee のガイドラインを遵守して行った。

4.2.1.8 肺組織の固定および組織学的検討

屠殺したマウスは正中切開にて開胸した。気管にカニューレを挿入し、ホルマリンで肺の灌流固定を行った。24 時間後に 70% エタノールで洗浄し、さらに 24 時間後にパラフィンブロックを行った。

肺の線維化を評価するため、肺の各分葉に H&E 染色またはコラーゲンや他の細胞外マトリックス蛋白を染めるトリクローム染色を施した。線維化の定量には Ashcroft scale を使用した (Ashcroft et al., 1988)。肺胞中隔の肥厚や結合組

織の蓄積、炎症細胞浸潤といった形態学的変化を解析した。組織学的評価としては、それぞれの標本を 10 個の重複しない領域に分け、それぞれ個別にスコアリングした。バイアスを避けるため、全ての標本は 3 名がブラインドで評価し、その平均値をスコアとして使用した。

4.2.1.9 コラーゲンアッセイ

可溶性コラーゲンの総量は Sircol Collagen Assay kit (Biocolor, Northern Ireland)を用いて評価した。マウス肺は PBS で灌流し、血液の混入を防いだ。左肺を小さく切り刻み、0.5M の酢酸および 0.2mg/mL のペプシンにて一晩溶解した。可溶性コラーゲンは遠心(13000g, 4°Cで 1 時間)で単離し、Sircol dye reagent と混ぜ合わせた。室温で 10 分遠心(13000g)してペレットとし、キットに含まれる alkali reagent で再懸濁して、Spectra Max Plus spectrophotometer にて 540nm の波長で定量値を得た。

4.2.1.10 ELISA 法

4.2.1.7 で採取した血漿は 2500rpm で 10 分間遠心し、 -80°C で保存した。当研究室(MUSC)で開発した間接 ELISA 法を用いて M10 の濃度を測定した。純度 98%以上の既知濃度の M10 ペプチド(GenScript, Piscataway, NJ)を用いてスタンダードカーブを作製した。高親和性ポリスチレンマイクロタイタープレート上に、既知濃度の M10 (10 ng/mL から 500 ng/mL)、M10 を含まない PBS、希釈したマウス血漿を 1 ウェルあたり 100 μL ずつ滴下した。1 サンプルにつき 3 ウェルずつ使用した。サンプルは緩やかに振盪しながら 4°Cで一晩インキュベートし、5%BSA でブロッキングした。洗浄したのち、抗 c-MET ウサギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を加えて 2 時間室温でインキュベートし、さらに HRP 標識モノクローナル抗ウサギ IgG 抗体(Rockland, Limerick, PA)を加えて 1 時間置いた。M10 は ultra-TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)-substrate で同定し、2M の硫酸を用いて反応を停止させた。吸光度は Spectra Max Plus spectrophotometer を用いて 450nm で測定した。血漿中の M10 の濃度は、既知の M10 濃度から作製したスタンダードカーブをもとに、Softmax Pro 4.8 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて、吸光度から算出し

た。陰性コントロール群として、超純水(milliQ)を腹腔内投与したマウスから採取した血漿を使用し、各サンプルの濃度は陰性コントロール群における M10 濃度の平均値を差し引いて標準化した。最終濃度はサンプルの希釈倍率をもとに算出した。

4.2.1.11 統計解析

統計解析は KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software, Reading, Pa)を使用した。全てのデータは ANOVA (analysis of variance)により事後的に解析した。 P 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

4.2.2 実験方法 2 : BMP9/Smad1/5/8 経路における M10 の抗線維化作用の解析

4.2.2.1 材料

M10 は GenScript (Piscataway, NJ)、ヒトリコンビナント BMP9 は R&D systems (Minneapolis, Minn)から購入した。抗 type I collagen 抗体は Southern Biotechnology (Birmingham, Ala)、抗 α -SMA (smooth muscle actin)抗体は Sigma (St. Louis, Mo)、 β -actin、Smad1/5/8 および phospho-Smad1/5/8 に対する抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, Mass)から購入した。HRP をコンジュゲートした抗ウサギ IgG、抗ヤギ IgG、抗マウス IgG は Rockland (Limerick, PA)から購入した。

4.2.2.2 細胞培養

ヒトの肺組織は、2013 年の ACR/EULAR の SSc 分類基準(van den Hoogen et al., 2013)を満たし、MUSC の IRB のガイドラインに基づき肺病変を有することが示された 3 名の SSc 患者の病理解剖検体から採取した。SSc-ILD の診断は肺組織の病理学的評価によりなされた。肺の線維芽細胞は同 3 名の SSc 患者および年齢・人種・性別の一致した健常者の検体から単離して培養し、全ての実験は第 2～第 4 継代培養したものを使用した。MRC5 は Sigma 社(St. Louis, Mo)から購入した。

各肺線維芽細胞は 5%CO₂、37°C の条件で、DMEM (Gibco, Grand Island, NY) に 20%FBS、l-glutamine (2mM)、gentamicin sulfate (50 μ g/mL)、amphotericin B (5 μ g/mL)を加えたものを培地として培養した。線維芽細胞がコンフルエントになるまでの間、死細胞や接着しない細胞を取り除くため、5 日毎に培地を交換した。単層培養は 10%FBS 入りの DMEM で継続した。

4.2.2.3 *in silico*によるペプチド-タンパク相互作用の予測

M10 と BMP9 の相互作用を予測するのに PepSite を用いた。構造データが蓄積されている PDB (Protein Data Bank) から得た BMP9/ALK1/ActRIIB 複合体の PDB code (4FAO) を M10 のアミノ酸配列とともに入力することにより、構造上最も有意な結合パターンの情報を取得した。

4.2.2.4 Real-Time PCR

Qiagen 社(Germantown, MD)の RNeasy Mini Kit を用いてヒト肺線維芽細胞から RNA を抽出した。2 μ g の RNA から Invitrogen 社(Carlsbad, CA)の SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR を用いて相補的 DNA (cDNA)を合成し、Bio-Rad 社(Hercules, CA)の iQTM SYBR Green Supermix を用いて定量的 Real-Time PCR を行った。プライマーは以下を用いた；

- GAPDH Forward 5'-GGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'
- GAPDH Reverse 5'-AGCCAAATTCGTTGTCATAC-3'
- Collagen 1a1 Forward 5'-CCAGAAGAACTGGTACATCAGCA-3',
- Collagen 1a1 Reverse 5'-CGCCATACTCGAACTGGAAT-3'
- α -SMA Forward 5'-CCGACCGAATGCAGAAGGA-3'
- α -SMA Reverse 5'-ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA-3'
- Snail Forward 5'-ACCACTATGCCGCGCTCTT-3'
- Snail Reverse 5'-GGTCGTAGGGCTGCTGGAA-3'
- Id1 Forward 5'-AGAACCGCAAGGTGAGCAA-3'
- Id1 Reverse 5'-CCAACCTGAAGGTCCCTGATGTAG-3'

1 サンプルあたり 3 ウェルずつアプライし、それぞれ GAPDH を基準として相対値を算出した。

4.2.2.5 ウェスタンブロッティング

肺および皮膚の線維芽細胞を 6 ウェルプレート上で培養し、90%コンフルエント(2 x 10⁶ cells/well)に達したら血清フリーとし、24 時間インキュベートした。続いて M10 を投与し、40 分後に BMP9 (20ng/mL)を投与した。30 分インキュ

ベートしたのち、氷冷した PBS で洗浄し、1xSDS サンプルバッファ (100 μ L/well)を用いてタンパク質を回収した。95 $^{\circ}$ C4分でボイルし、ブロモフェノールブルーの染色液を 1.5 μ L、 β メルカプトエタノールを 3 μ L 加え、各サンプルを 20 μ L ずつ SDS ポリアクリルアミドゲルのウェルにアプライした。ウェスタンブロッティングにはニトロセルロースメンブレンを使用し、SDS-PAGE 後のアクリルアミドゲルからメンブレンにウェット法で転写後、5% Skim Milk でブロッキング処理し、0.1%Tween20 添加 TBS で洗浄したのち、ウサギ抗 phospho-Smad2 抗体によるブロッティングをおこなった。二次抗体には HRP 標識モノクローナル抗ウサギ IgG 抗体を使用した。HRP の検出には ECL を用いた。

4.2.2.6 統計解析

統計的評価は、対応のある t 検定によって実施し、 P 値 0.05 未満を有意とした。すべての統計解析は IBM SPSS Statistics (version 22.0.0, Inc., Armonk, NY)を用いて行った。

4.3 実験結果

4.3.1 実験結果 1

4.3.1.1 M10 の合成、細胞生存への影響

M10 は HGF の受容体である MET の最後の 10 個のアミノ酸、TRPASFWETS からなるペプチドであり、MET の細胞内ドメイン C 末端が Caspase-3 によって切り出されて作られる。M10 の化学式は $C_{53}H_{76}N_{14}O_{17}$ であり、分子量は 1181.27 g/mol、pH 6.97 にて電氣的に中性である。合成 M10 は GenScript 社から高純度でオフホワイトの凍結乾燥粉末として得ることができ、水溶性である。M10 のそれぞれのアミノ酸の疎水性を Figure 12 に示す。

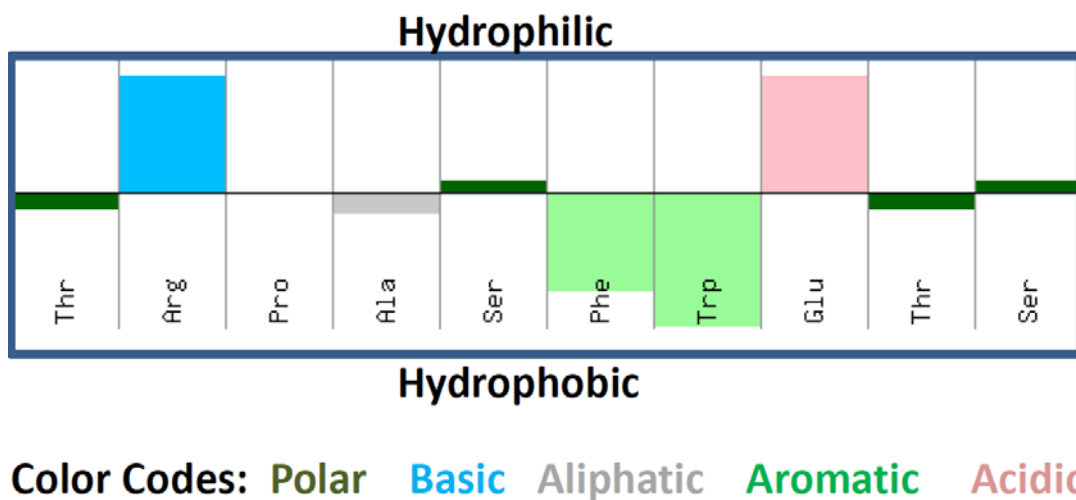


Figure 12. M10 の疎水性プロット。Hopp-Woods の親水性スケール(Hopp and Woods, 1983)で表記。親水性アミノ酸は上向き、疎水性アミノ酸は下向きのバーで示している。

M10の細胞生存への影響を調べるため、4つのプライマリー細胞株（健常者およびSSc患者の肺と皮膚の線維芽細胞）と2つの不死化細胞株(MRC5とA549)を用いて細胞生存アッセイを行った。ApoSENSOR Cell Viability Assayは哺乳類細胞におけるATP (adenosine triphosphate)レベルを生物発光検出することができる。細胞死はATPを必要とするエネルギー依存性のプロセスであることから、ATPレベルの上昇により細胞生存を評価することができる。本アッセイはATPとルシフェリンからの化学発光を触媒する酵素であるルシフェラーゼを利用し、ルミノメーターで発光量(relative light unit: RLU)を測定する。結果、コントロール群での血清フリーの細胞生存は $1.03 \times 10^6 - 3.04 \times 10^6$ RLUであった。M10は、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $10\mu\text{g/mL}$ 、 $100\mu\text{g/mL}$ のいずれの濃度においても、6種類のどの細胞株においても細胞生存に影響を与えなかったことから、同濃度においては、M10は細胞毒性を示さないことがわかった(Figure 13)。

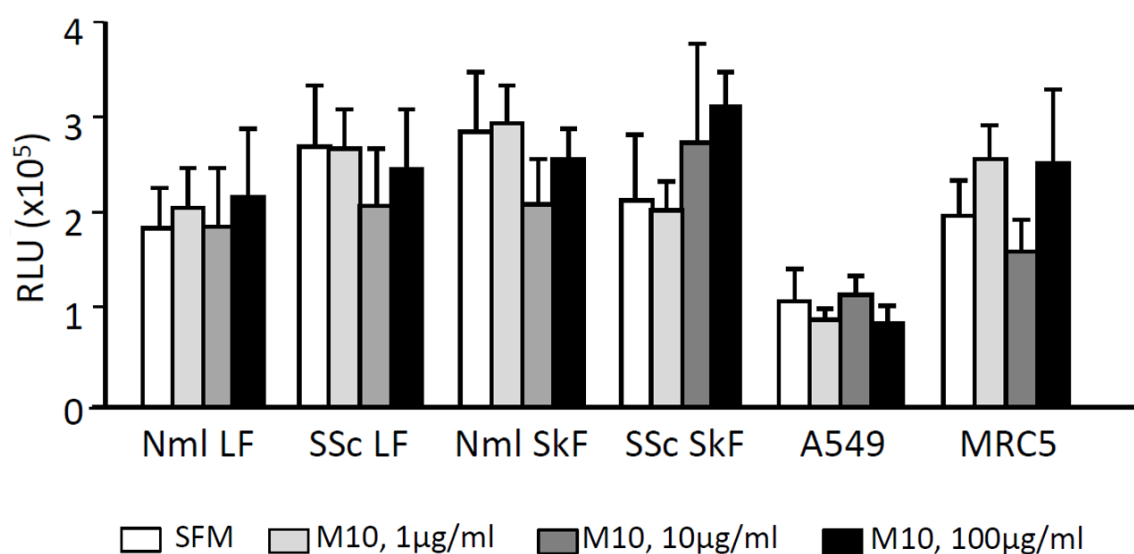


Figure 13. ATPを用いた細胞生存アッセイ。M10は細胞生存に影響を与えない。

同様の結果は Trypan blue を用いた細胞数算定によっても得られた。コントロール群と M10 治療群における生存細胞数は 1 ウェルあたり $2.12 \times 10^5 - 3.27 \times 10^5$ の範囲で同等であることがわかった(Figure 14)。すなわち、線維芽細胞および AEC において、M10 は $100 \mu\text{g/mL}$ 以下の濃度であれば細胞毒性を持たないことが明らかとなった。

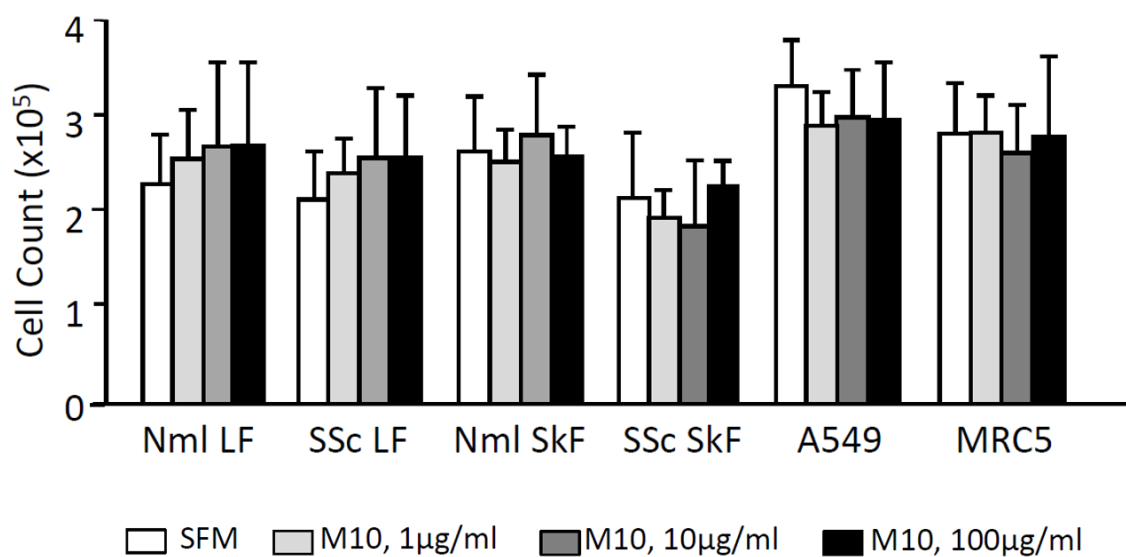


Figure 14. Trypan blue を用いた生存細胞数の算定結果。ATP を用いた細胞生存アッセイと同様、M10 は細胞毒性を持たないことを示している。

4.3.1.2 線維芽細胞内における M10 の局在

M10 は N 末端に極性をもたないプロリン(P)と並んで陽イオン性アミノ酸であるアルギニン(R)を有し、ペプチドが細胞膜を通過するのに好都合となっている(Fonseca et al., 2009)。M10 の細胞内における局在を調べるため、我々は MET の最後の 12 個のアミノ酸を標的とした抗 Met C12 抗体を用いた。この抗体は M10 を認識する。さらに、N 末端に赤色蛍光マーカーである 5,6-TAMRA をコンジュゲートした M10 を用いた。M10 を線維芽細胞に投与し、24 時間インキュベートした結果、M10 および 5,6-TAMRA-M10 は肺線維芽細胞の細胞質および核内に局在していることがわかった(Figure 15)。

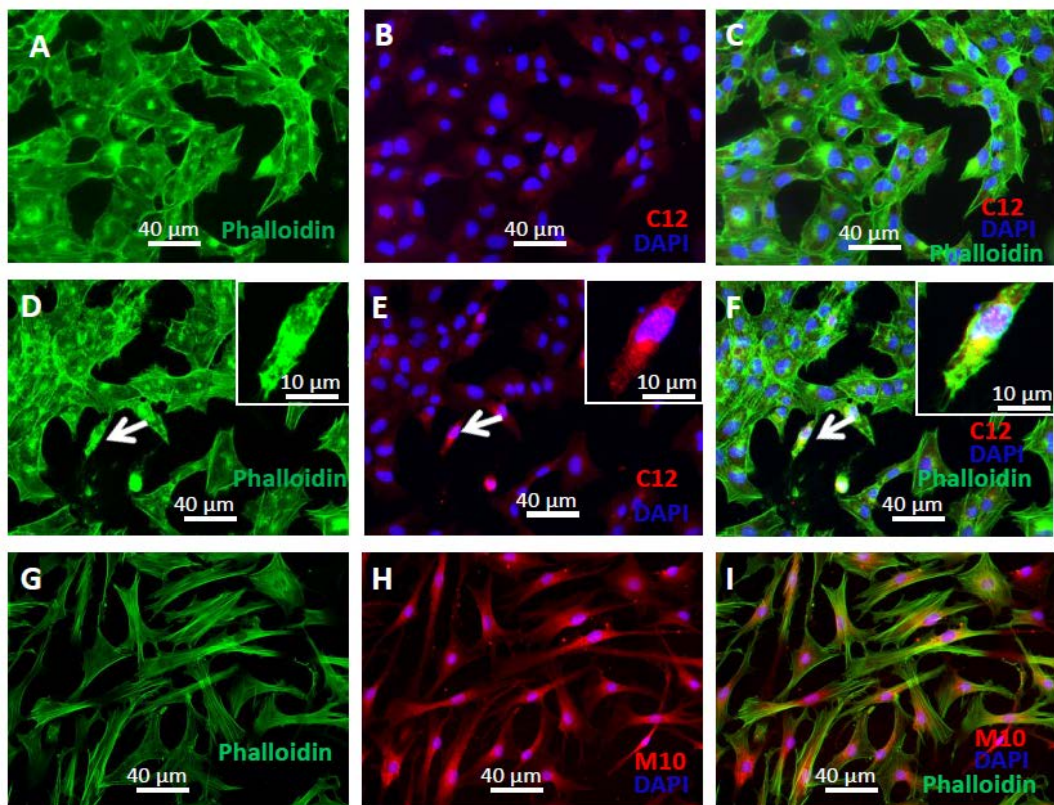


Figure 15. M10 の肺線維芽細胞内の局在。A-F. 4 チャンバースライドで肺線維芽細胞を培養し、24 時間血清フリーとしたのち M10 (10 μ g/mL)を投与。24 時間後、細胞は 4%PFA で固定し抗 Met C12 抗体で染色した。G-I. M10 の代わりに 5,6-TAMRA-M10 を加えて固定。“方法”で述べた通りの手順で可視化。D-F の白矢印は C12 染色陽性細胞であり、右上に 4 倍にて拡大表示した。

4.3.1.3 線維芽細胞における M10 の抗線維化作用

M10 が SSc 患者の線維芽細胞におけるコラーゲン発現に影響を与えるかどうか調べるため、6 名の SSc 患者の皮膚および肺線維芽細胞を M10 とともに培養し、抗 type I collagen 抗体を用いてウェスタンブロッティングで解析した。SSc の肺・皮膚線維芽細胞は、ベースラインにおいても I 型コラーゲンを高発現していた。1 μ g/mL および 10 μ g/mL の M10 を加えて 24 時間インキュベートした結果、SSc 患者 6 名の肺・皮膚線維芽細胞すべてにおいて、M10 は濃度依存性に I 型コラーゲン発現量を減少させた。一方スクランブルペプチドは全く効果を示さなかった(Figure 16)。

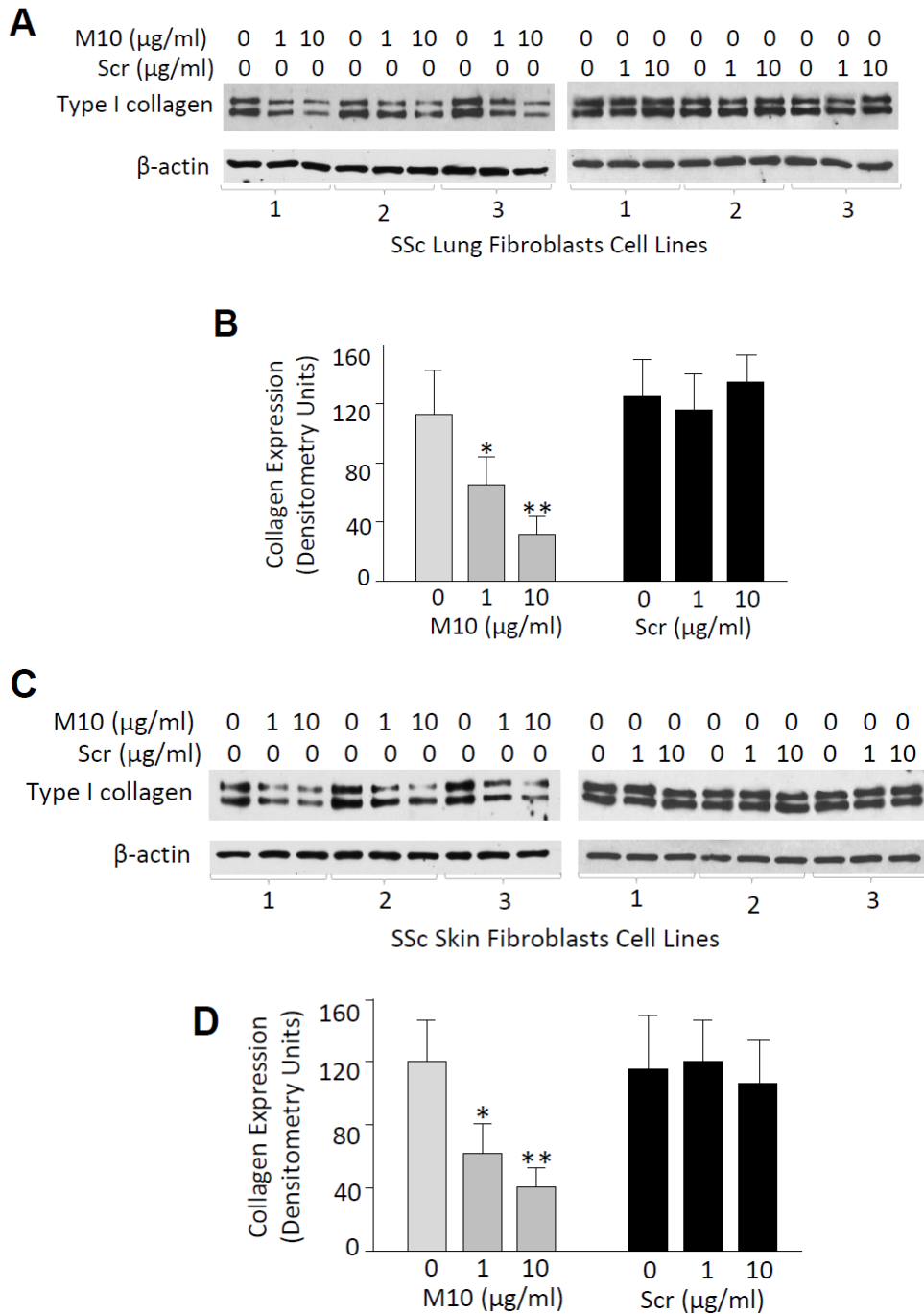


Figure 16. SSc 患者の肺・皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン発現量に対する M10 の効果。[A, C] 24 時間血清フリーとしたのち M10 あるいはスクランブルペプチド(Scr)を加えて 48 時間インキュベートした。細胞は lysis buffer で回収し抗 type I collagen 抗体、ローディングコントロールとして抗β-actin 抗体を用いてウェスタンブロッティングで解析した。[B, D] A と C をそれぞれデンストメトリー法で解析。値は 3 回の実験の平均値と標準偏差で表記。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (無刺激の細胞と比較)

4.3.1.4 M10 の抗線維化メカニズムの解析

M10 は TGF β が誘導するコラーゲン産生を抑制することから、我々は *in silico* にて M10 が TGF β シグナル経路にどのように作用するのかを検討した。タンパクの構造からペプチドが結合する部位を推測する PepSite を用いて検討したところ(Trabuco et al., 2012)、M10 が Smad2 の Mod Homology (MH) 2 ドメインと統計学的に有意な相互作用 ($P < 0.02$)を有することを見出した(Figure 18A)。PepSite で予測された M10 と Smad2 の相互作用を確認するため、我々は合成した M10 と DDK でタグ付けしたヒトリコンビナント Smad2 を用いてペプチド-タンパク結合実験を行った。陰性コントロールとして、DDK でタグ付けしたヒトリコンビナント Smad4 と M10 の組み合わせ、および Smad2/Smad4 とスクランブルペプチドの組み合わせを用いた。抗 DDK 抗体に対する陽性コントロールとしては、DDK でタグ付けしたリコンビナント Smad2 あるいは Smad4 タンパクを含むバッファーを 5 μ L、ゲルに流して電気泳動を行った。結果、M10 は Smad2 と結合していたが、Smad4 とは結合していなかった。そしてスクランブルペプチドは Smad2、Smad4 のいずれとも結合しなかった(Figure 18B)。

次に我々は、M10 と Smad2 が実際に肺・皮膚線維芽細胞において結合するかどうか調べるため、共免疫沈降法を行った。ここでは、内因性の Smad2 を高発現している SSc 患者の線維芽細胞を使用した。M10 を投与した肺・皮膚のいずれの線維芽細胞においても、Smad2 との結合が確認されたが、スクランブルペプチドを投与した群では Smad2 との結合は確認されなかった(Figure 18C)。

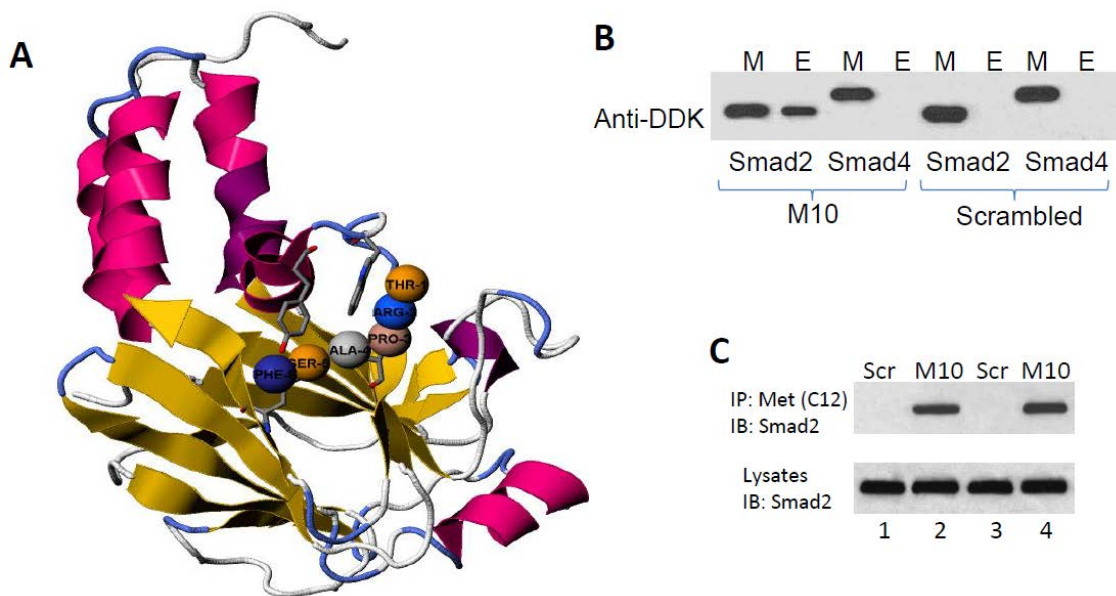


Figure 18. M10 と Smad2 の相互作用。A. *in silico* で予測される M10 と Smad2 の結合。M10 の一部(アミノ酸 pro-3, ala-4, trp-7, glu-8, thr-9, and ser-10)が Smad2 の MH2 ドメインと統計学的有意差 ($P < 0.02$)をもって相互作用を示した。B. M10 と Smad2 の結合を示すペプチド-タンパク結合実験。“方法”で述べた通り、DDK でタグ付けしたリコンビナント Smad2 と Smad4 を M10 と共培養した。結合した複合体は protein G-sepharose でキャプチャーし、抗 DDK 抗体でブロッティングした。ペプチド-タンパク結合体(M)を陽性コントロールとして用いた。(E)は溶出した複合体を表す。C. SSc 患者の肺(1 と 2)・皮膚(3 と 4)線維芽細胞における M10 と Smad2 の相互作用。細胞は 100mm プレートで培養し、一晚血清フリーとしたのち、M10 あるいはスクランブルペプチド(Scr)を加えて 24 時間インキュベートした。“方法”で述べた通りに回収して共免疫沈降法を行った。

M10 と Smad2 の相互作用についてさらに詳しく検討を加えるため、肺線維芽細胞を用いて TGF β の刺激下、非刺激下における M10 と Smad2 の局在について検討した。免疫染色を行った結果、TGF β の刺激下、非刺激下のいずれにおいても、M10 と Smad2 の局在が一致していることが判明した。さらに興味深いことに、TGF β の非刺激下においては M10 と Smad2 は細胞質と核内に均一に分布していたのに対し、TGF β で刺激すると M10 も Smad2 も核内に移行していることが明らかとなった(Figure 19A)。

また TGF β は Smad2 のリン酸化を促進することがわかっている。M10 が TGF β による Smad2 のリン酸化に影響を与えるか調べるため、我々は肺および皮膚線維芽細胞を M10 の存在下、非存在下で培養し、TGF β が誘導する Smad2 のリン酸化を検討した。結果、TGF β 刺激後 20 分で Smad2 のリン酸化が著明に亢進した。さらに M10 (1 μ g/mL) は TGF β 刺激による Smad2 のリン酸化を抑制した。しかし M10 はベースラインの total-Smad2 および phospho-Smad2 レベルに影響を与えなかった(Figure 19B)。

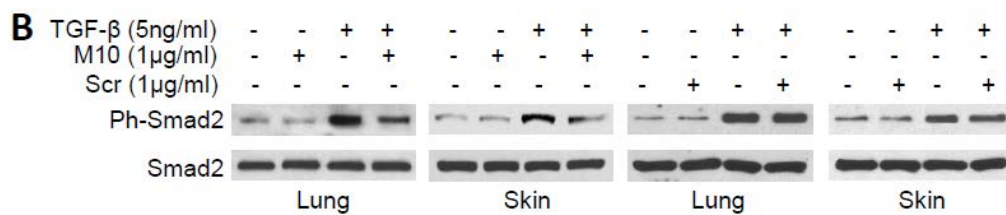
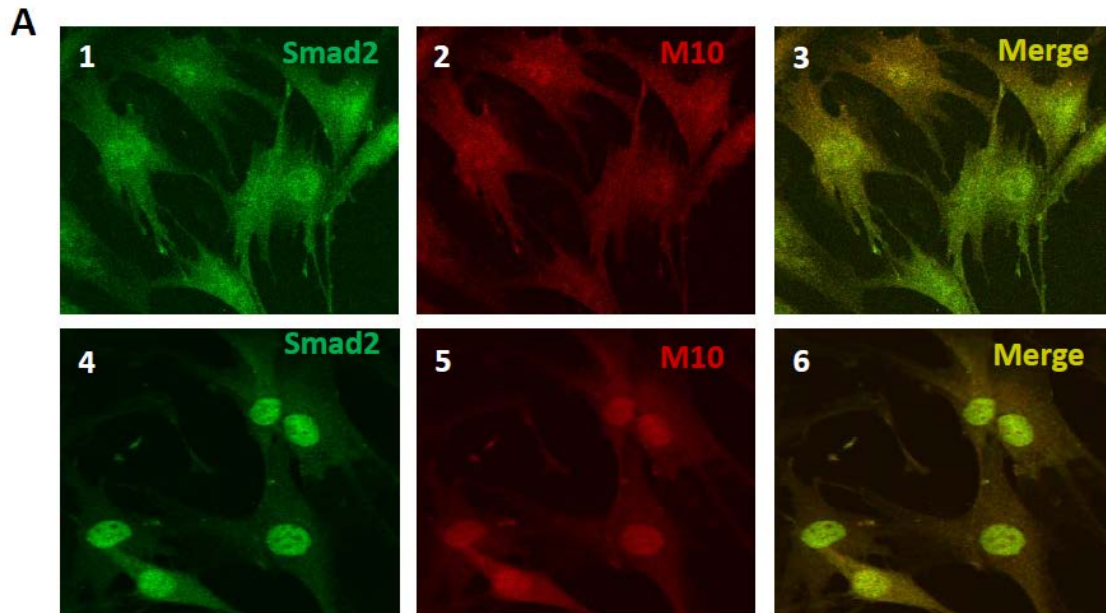


Figure 19. M10 は Smad2 と線維芽細胞内での局在が一致するとともに、TGF β 刺激による Smad2 のリン酸化を抑制する。A. 肺線維芽細胞を血清フリーで培養し、TGF β の非刺激下(1-3)および刺激下(4-6)における Smad2 と M10 の局在を検討した。B. 健常者の肺および皮膚線維芽細胞において、M10 が TGF β 刺激による Smad2 のリン酸化を抑制するか検討。細胞は 90%コンフルエントになるよう 6 ウェルプレートで培養し、一晚血清フリーとしたのち、M10 あるいはスクランブルペプチド(Scr)、TGF β の存在下・非存在下で培養し、回収した。“方法”で述べた通りにブロッティングを行った。

4.3.1.5 ブレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウスにおける M10 の抗線維化作用

コントロール群として生理食塩水を気管内投与したマウスの肺組織では、M10 治療群、スクランブルペプチド治療群のいずれにおいても、肺胞構造は正常に保たれ、血管や結合組織も異常を認めなかった。ブレオマイシンを気管内投与し、スクランブルペプチドで治療した群では、気管周囲や間質に炎症細胞が著明に浸潤しており、肺胞壁は肥厚し、ECM タンパクが過剰に蓄積した多発性の線維化病変を認めた。一方、M10 で治療した群では炎症細胞は著明に減少し、肺胞壁の肥厚や ECM タンパクの蓄積も軽度に留まっていた(Figure 20A)。

線維化レベルの定量には Ashcroft score を用いた(Ashcroft et al., 1988)。生理食塩水+M10 群と、生理食塩水+スクランブルペプチド群では Ashcroft score に差を認めなかった(それぞれ 0.65 ± 0.37 , 0.69 ± 0.35)。ブレオマイシン+スクランブルペプチド群では 5.63 ± 1.72 に達し、コントロール群と比べ 8.2 倍に及んだ。ブレオマイシン+M10 群では 1.67 ± 1.01 まで低下していたことから、ここでも M10 の抗線維化作用が示された($P < 0.05$; Figure 20B)。

さらに肺組織におけるコラーゲンの蓄積量を定量化するため、我々は Sircol collagen assay を行った。本アッセイは、コラーゲンに存在する塩基性アミノ酸の側鎖に特異的に反応する試薬、Sirius Red を利用して直接的にコラーゲンを定量する手法である。結果、生理食塩水+M10 群の可溶性コラーゲン量は生理食塩水+スクランブルペプチド群と同等であった(それぞれ $9.4 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{mg}$, $9.6 \pm 3.9 \mu\text{g}/\text{mg}$)。一方ブレオマイシン+スクランブルペプチド群では 4 倍以上に増加していた。そしてブレオマイシン+M10 群ではブレオマイシン+スクランブルペプチド群と比べ、可溶性コラーゲン量は 50%未満に減少していた(Figure 20C)。

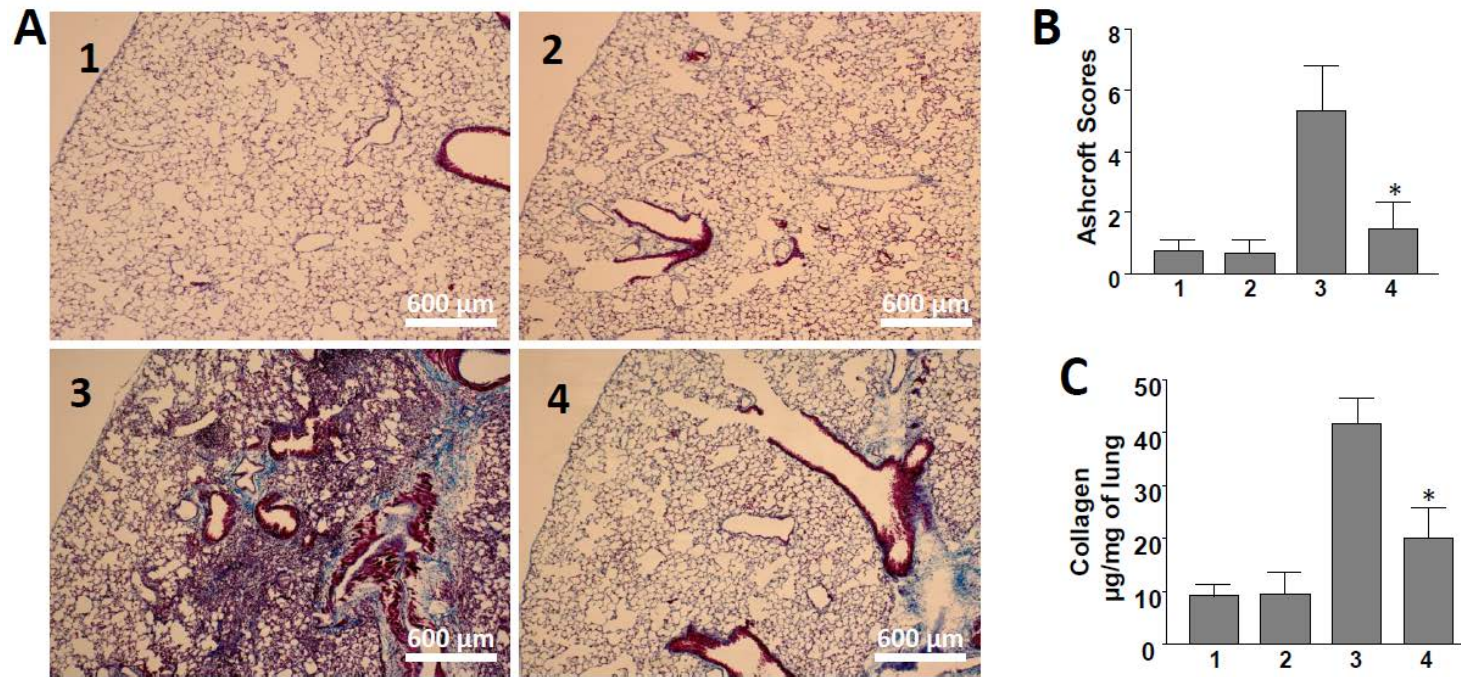


Figure 20. ブレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウスにおける M10 の効果。A. 肺の炎症および線維化を示す組織学的所見。1: 生理食塩水+スクランブルペプチド群、2: 生理食塩水+M10 群、3: ブレオマイシン+スクランブルペプチド群、4: ブレオマイシン+M10 群。B. Ashcroft score による線維化の定量評価(n = 32, 各群 8 匹ずつ)。C. Sircol collagen Assay による肺のコラーゲン量の評価(n = 24, 各群 6 匹ずつ)。B と C は平均値±標準偏差で表記。*はブレオマイシン+スクランブルペプチド群とブレオマイシン+M10 群を比較して得た統計学的有意差($P < 0.05$)を示す。

4.3.1.6 M10 の薬物動態解析

先のブレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウスを用いて、マウス血漿中の M10 の濃度推移を解析した。結果、M10 は腹腔内投与から 6 時間で最高濃度に達し、48 時間後には測定可能な最小濃度付近にまで低下した(Figure 21)。また、24 時間後の時点では 1000ng/mL (1 μ g/mL)弱の濃度に維持されていた。AUC (area under the curve)、血漿半減期($t_{1/2}$)、最大血漿濃度(C_{max})、M10 の血漿濃度が最大に達するまでの時間(T_{max})を Table 9 に示す。半減期は以下の計算式から算出した。 $N_t = N_0(1/2)^{t/t_{1/2}}$; N_0 は M10 の初期値、 t は時間、 N_t は M10 投与 t 時間後の値をあらわす(Martinez, 1998)。

ELISA 法で得られた M10 の $t_{1/2}$ (6.8 \pm 0.7 h)は ProtLifePred software (<http://protein-n-end-rule.leadhoster.com/>)で得られた N-end rule に基づく理論上の推定値(Figure 22)と同等の結果となった(Bachmair et al., 1986, Varshavsky, 1997)。

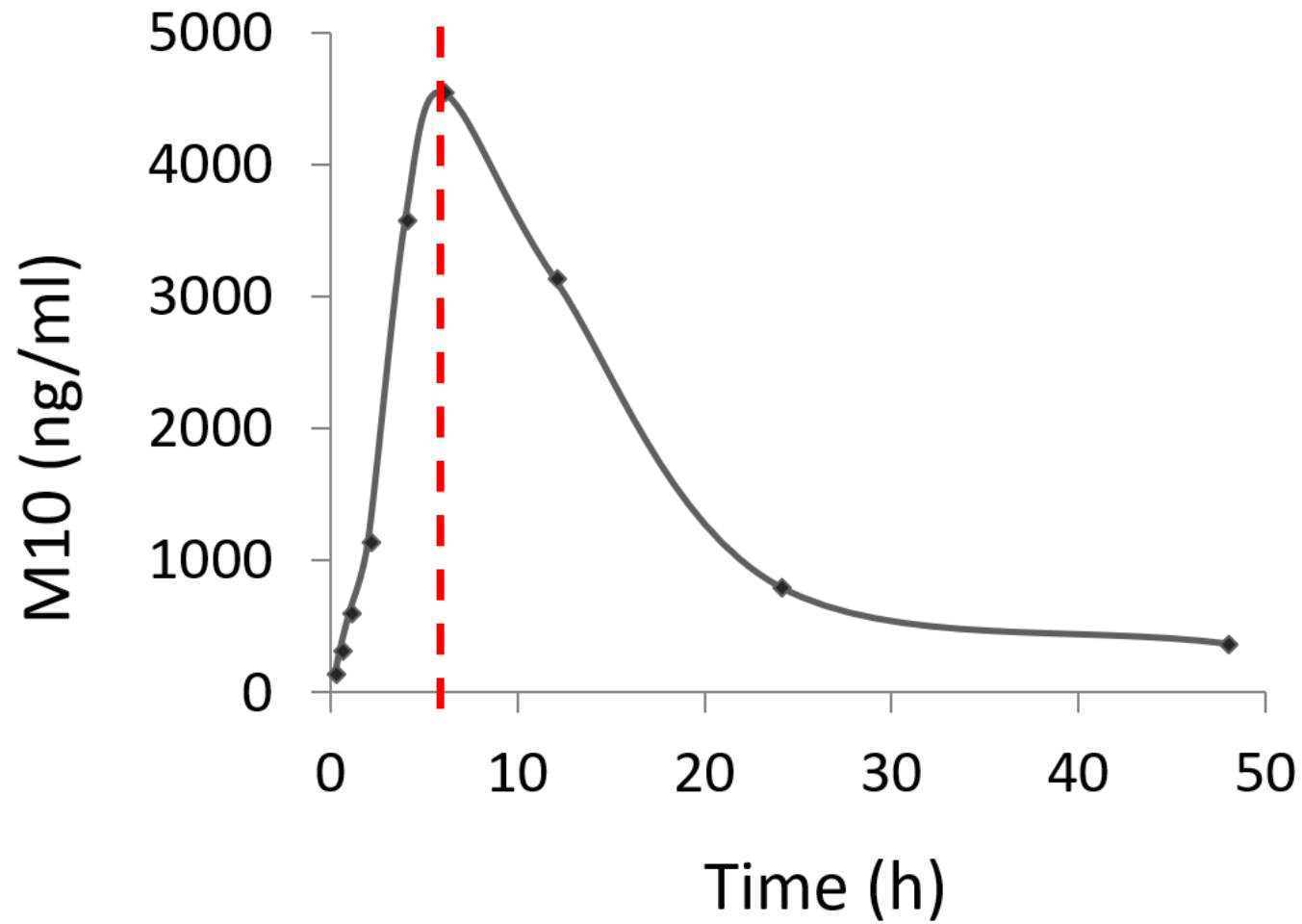


Figure 21. マウスに腹腔内投与した M10 の血漿中の濃度推移。M10 は腹腔内投与 6 時間後(赤の点線)に最大濃度に達し、その後 48 時間かけて低下した。24 時間後の時点では 1000 ng/mL 弱の濃度を維持していた。

Table 9. M10 の薬物動態パラメータ

薬物動態パラメータ	値
用量 (mg/kg(マウス体重))	1.0
AUC 0-48h (ng.h/mL)	72463 ± 2390
半減期 (h)	6.8 ± 0.7
Tmax (h)	6
Cmax (ng/mL)	4861.5 ± 11.5

AUC、半減期、Cmax は mean ± SD で表記した。値は GraphPad Prism 7 を用いて算出した。

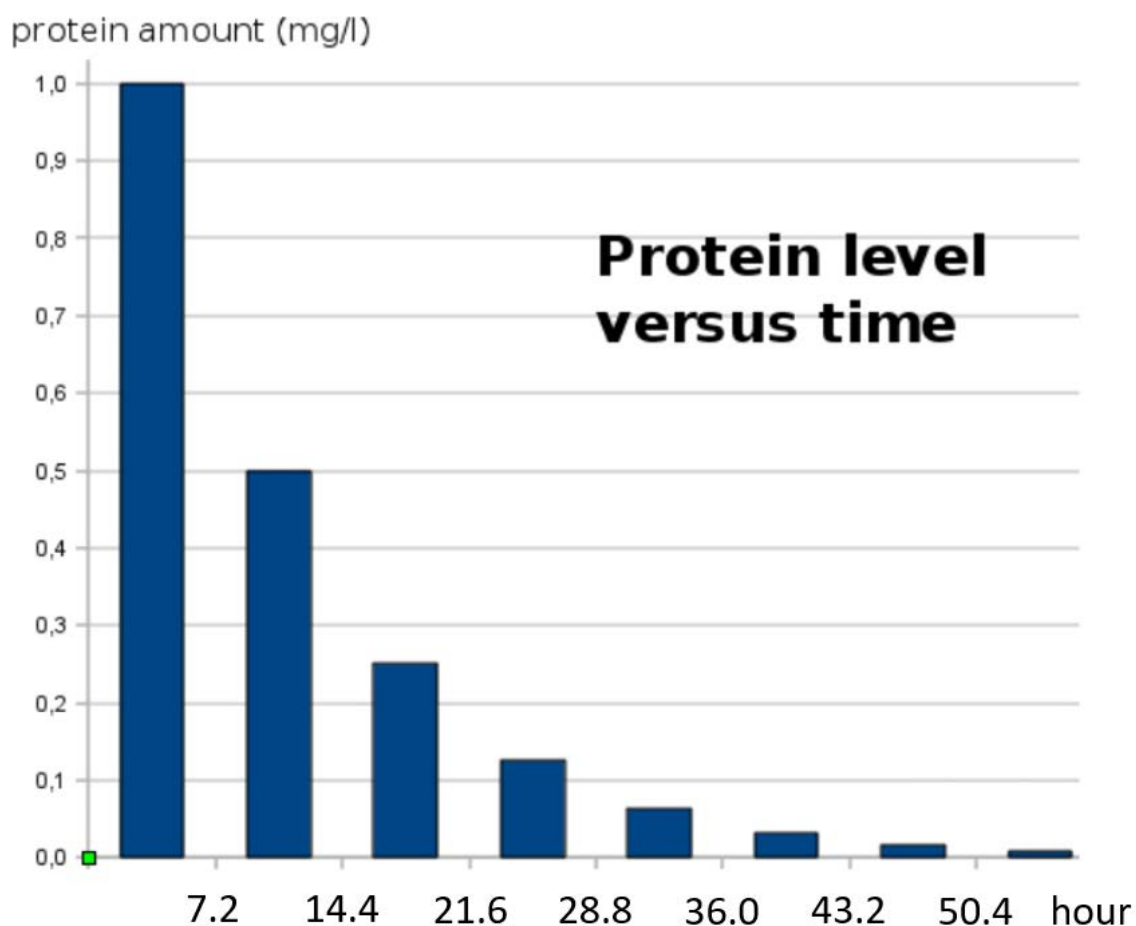


Figure 22. ProtLifePred software による血漿中の M10 の推定半減期。実験で得られたマウス血漿中の M10 の半減期(6.8 ± 0.7h)は N-end rule に基づいた推定半減期(7.2h)と同等であった。

4.3.1.6 実験1のまとめ

HGF受容体c-METのC末端フラグメントであるM10は、Smad2と結合し、*in vitro*と*in vivo*のいずれにおいても抗線維化作用を発揮することが示された。

4.3.2 実験結果 2

4.3.2.1 M10 と BMP9 の相互作用の予測

PepSite による計算モデルを用いて、M10 と BMP9 との相互作用を検討したところ、M10 が BMP9/ALK1/ActRIIB 複合体と統計学的に有意な相互作用($P = 0.00008$)を有することが判明した(Figure 23A)。最も可能性のある結合部位は BMP9 の β ターンモチーフに位置していた(Figure 23B)。

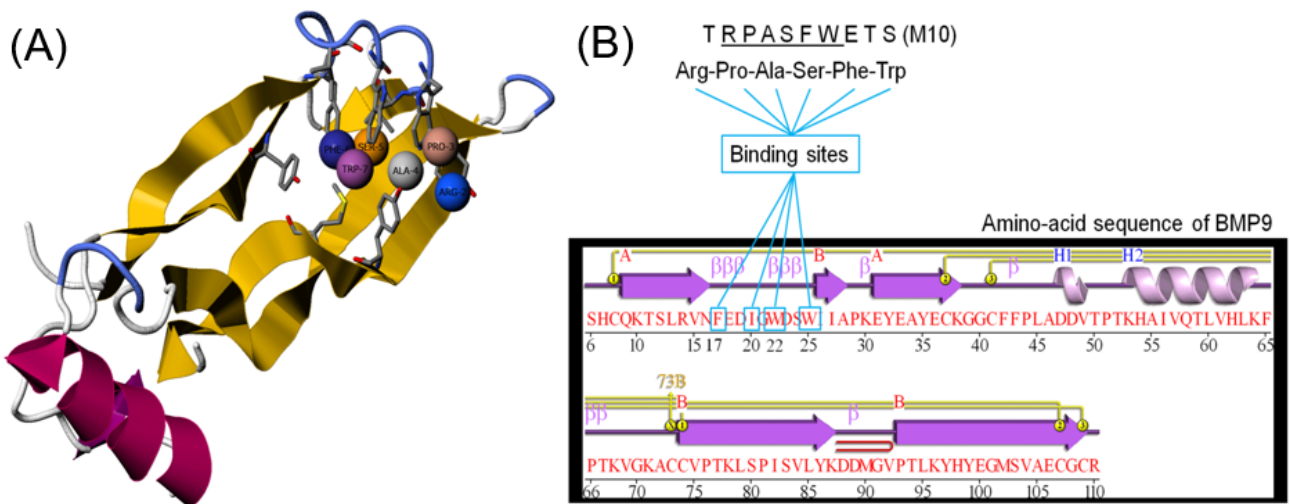


Figure 23. M10 と BMP9 の相互作用。A. *in silico* で予測した M10 と BMP9/ALK1/ActRIIB (PDB code: 4FAO)の結合。M10 の一部(アミノ酸 arg-2, pro-3, ala-4, ser-5, phe-6 and trp-8)が BMP9 の β ターンモチーフと統計学的有意な($P = 0.00008$)相互作用を示す。B. BMP9 のアミノ酸配列。M10 との予測される結合部位を示す。

4.3.2.2 BMP9 の Smad1/5/8 リン酸化への寄与

MRC5 および SSc 患者の肺線維芽細胞において BMP9 の Smad1/5/8 のリン酸化に対する効果を検討した。MRC5 では BMP9 は濃度依存性に Smad1/5/8 のリン酸化を促進した(Figure 24(A,C))。SSc 患者の肺線維芽細胞でも、BMP9 刺激により Smad1/5/8 のリン酸化が促進された(Figure 24(B,D))。SSc 患者の肺線維芽細胞では BMP9 が 0.5ng/mL という低濃度であっても Smad1/5/8 を強くリン酸化しており、MRC5 と比べ BMP9 への感受性が高いと考えられた。

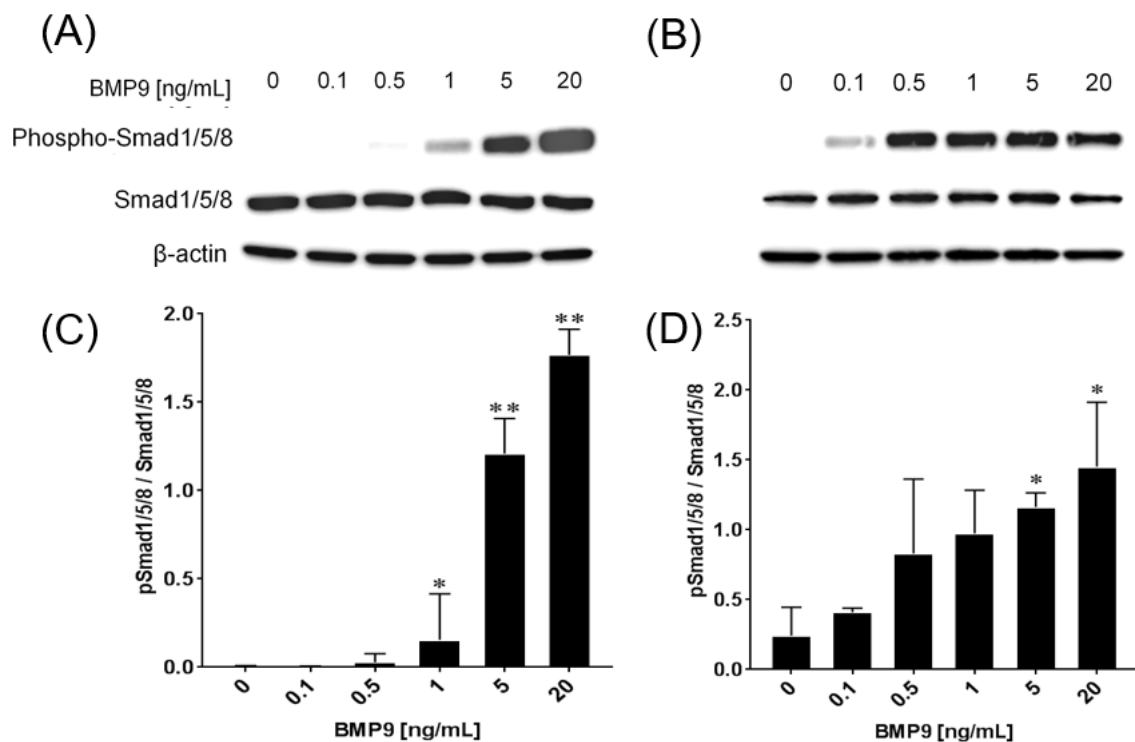


Figure 24. BMP9 はヒト肺線維芽細胞において、濃度依存性に Smad1/5/8 のリン酸化を促進する。A,C: MRC5, B,D: SSc 患者の肺線維芽細胞。値は3回の実験から得た平均値と標準偏差を示す。*および**は BMP9 治療群と無治療群間の統計学的有意差(それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$)を示す。

4.3.2.3 MRC5 における I 型コラーゲン産生への BMP9 の寄与

MRC5 において、BMP9 による I 型コラーゲン産生への影響を検討した。結果、BMP9 刺激により、MRC5 における I 型コラーゲンの発現が有意に上昇した。BMP9 は 0.5 から 1ng/mL の濃度で最も強く I 型コラーゲン産生を促進した(Figure 25)。

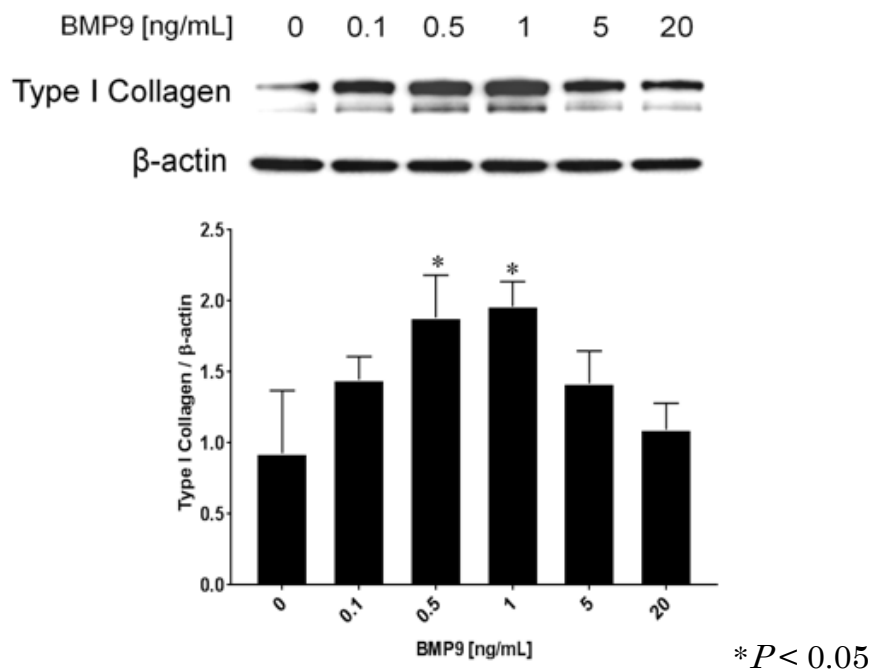


Figure 25. MRC5 における BMP9 刺激による I 型コラーゲン発現の検討。BMP9 は I 型コラーゲンの発現を有意に上昇させる。 P 値は 3 つの独立した実験結果をもとにベースラインと比較して算出した。

4.3.2.4 健常者および SSc 患者の肺線維芽細胞における I 型コラーゲンおよび α -SMA 発現への BMP9 の寄与

健常者および SSc 患者の肺線維芽細胞において、BMP9 刺激後の I 型コラーゲンおよび α -SMA の発現を検討した。健常者の肺線維芽細胞では BMP9 は概ね濃度依存性に I 型コラーゲンおよび α -SMA の発現を上昇させた(Figure 26A)。SSc 患者の肺線維芽細胞では、BMP9 刺激により I 型コラーゲンの発現が上昇したが、 α -SMA の発現は上昇しなかった(Figure 26B)。SSc 患者の肺線維芽細胞では、ベースラインにおいても α -SMA の発現量が多いことが影響しているものと考えられた。

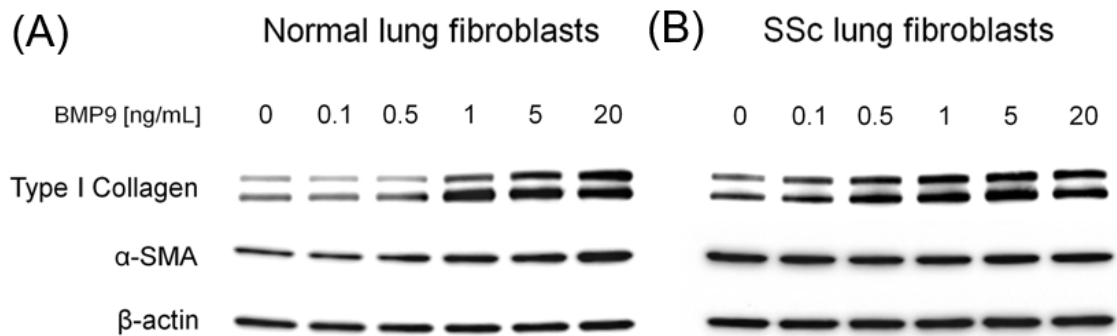


Figure 26. ヒト肺線維芽細胞における BMP9 刺激による I 型コラーゲンおよび α -SMA 発現の検討。A. 健常者の肺線維芽細胞。BMP9 は概ね濃度依存性に I 型コラーゲンおよび α -SMA の発現を上昇させる。B. SSc 患者の肺線維芽細胞。BMP9 刺激により I 型コラーゲンの発現はやや増加するが、 α -SMA の発現は増加しない。

4.3.2.5 BMP9 刺激による Smad1/5/8 のリン酸化に対する M10 の効果

M10 が BMP9 と相互作用を示す可能性があることを踏まえ、ヒト肺線維芽細胞において BMP9 が誘導する線維化に対する M10 の効果を検討した。肺線維芽細胞を無治療群、BMP9 単独群、M10 単独群、BMP9+M10 群の 4 つに分けた。MRC5、健常者および SSc 患者の肺線維芽細胞のいずれにおいても、M10 は BMP9 が誘導する Smad1/5/8 のリン酸化を低下させた(Figure 27)。

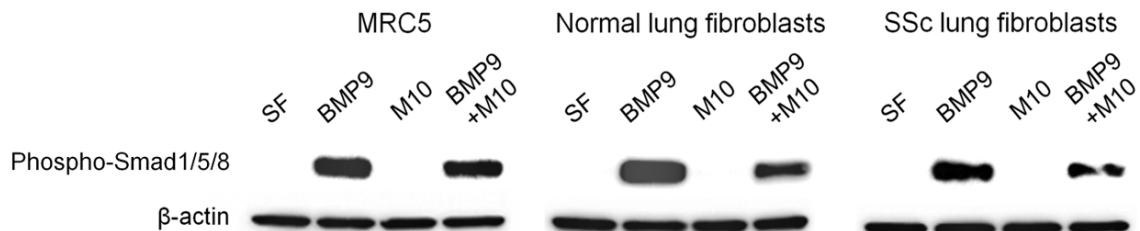


Figure 27. BMP9 が誘導する Smad1/5/8 のリン酸化に対する M10 の効果。MRC5、健常者および SSc 患者の肺線維芽細胞のいずれにおいても、M10 は BMP9 が誘導する Smad1/5/8 のリン酸化を低下させる。

4.3.2.6 BMP9 刺激による I 型コラーゲン産生に対する M10 の効果

次に、健常者の肺線維芽細胞において BMP9 および M10 を投与して 48 時間インキュベートした後、I 型コラーゲンと α -SMA の発現を検討した。結果、M10 は BMP9 が誘導する I 型コラーゲンおよび α -SMA の発現を低下させた (Figure 28)。

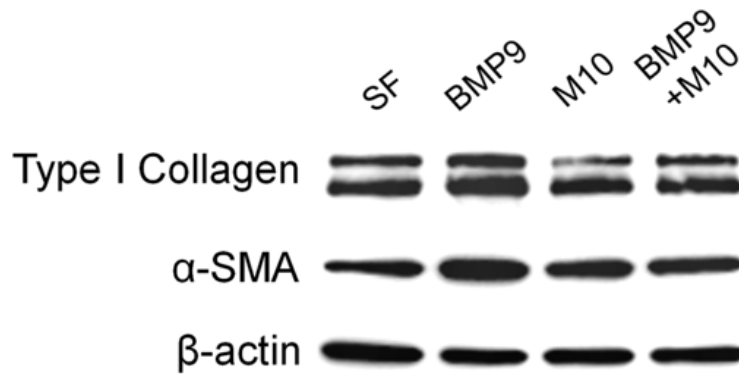


Figure 28. BMP9 が誘導する I 型コラーゲンおよび α -SMA 発現に対する M10 の効果。健常者の肺線維芽細胞において、M10 は BMP9 が誘導する I 型コラーゲンおよび α -SMA 発現を低下させる。

4.3.2.7 線維化マーカーや転写因子に対する BMP9 および M10 の影響 (Real-Time PCR)

最後に健常者の肺線維芽細胞における BMP9 および M10 の線維化マーカー遺伝子や転写因子への影響を mRNA レベルで検討した。転写因子である Snail、Id1 は BMP9 シグナルの標的遺伝子で、いずれも EMT に関与する重要な因子として知られている(Li et al., 2007, Medici et al., 2008)。BMP9 は I 型コラーゲンや α -SMA に比べ Snail および Id1 の発現を強力に促進していた(Figure 29)。このことから、ヒト肺線維芽細胞において、BMP9 シグナルは EMT の促進に大きく寄与していることが示唆された。また M10 は BMP9 で刺激した I 型コラーゲン、Snail の発現を mRNA レベルにおいて抑制していた。

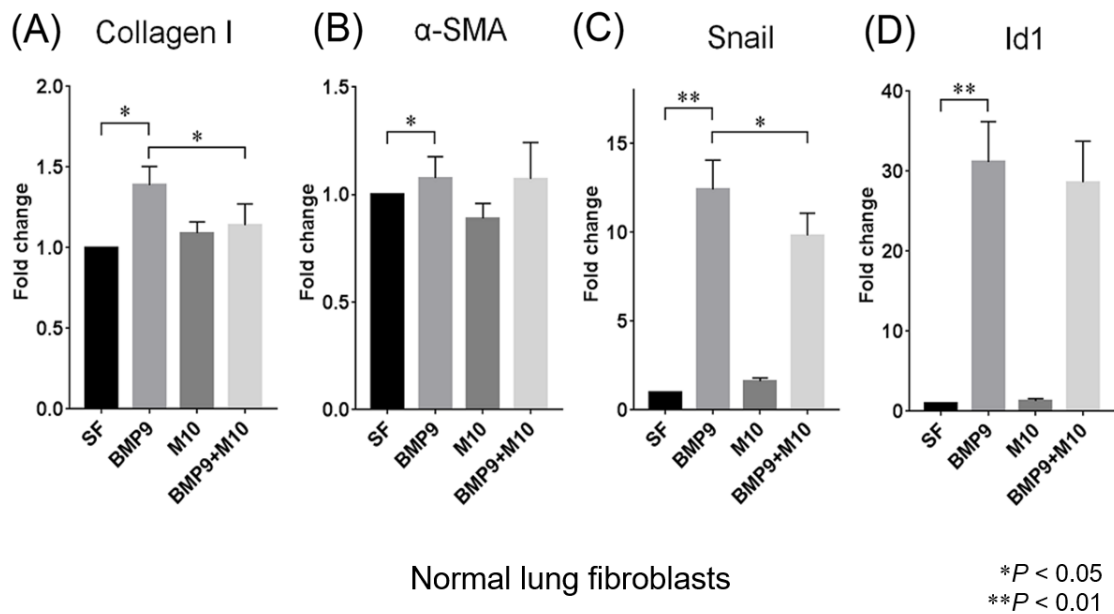


Figure 29. BMP9 および M10 が線維化マーカー・転写因子の発現に与える影響を mRNA レベルで検討。BMP9 は I 型コラーゲンや α -SMA に比べ Snail および Id1 の発現を強力に促進する。M10 は BMP9 で刺激した I 型コラーゲン、Snail の発現を mRNA レベルにおいて抑制する。 P 値は 3 つの独立した実験結果をもとに算出した。

4.3.2.8 実験 2 のまとめ

BMP9/ALK1/Smad1/5/8 シグナルのヒト肺線維芽細胞における役割と、M10 の本シグナルへの影響を示した。BMP9 はヒト肺線維芽細胞において Smad1/5/8 をリン酸化し、線維化に促進的に働くことを確認した。また M10 は Smad1/5/8 のリン酸化を抑えることで BMP9 シグナルによる線維化を抑制する可能性が示唆された。

4.4 考察

SSc に合併した ILD に対して高い効果をもつ治療薬は未だに存在しない。しかしながら、抗線維化作用をもつ薬物の研究は進んでおり、なかでも小ペプチドに対する期待は大きい。その理由として、小ペプチドは高い生物活性を有し、特異性が高く、低毒性であることが挙げられる(Craik et al., 2013)。

M10 は MET 受容体チロシンキナーゼの C 末端が Caspase-3 により自然に切り出されてできた小ペプチドである。本研究は、SSc 患者を含むヒトの肺・皮膚線維芽細胞に対する M10 の抗線維化作用を検討することを目的としておこなった。M10 は MET の細胞内フラグメントであることから、我々は M10 が細胞内で効果を発揮するものと推測した。一般にペプチドの細胞内への移動はエンドサイトーシスあるいは膜電位によるエネルギー依存的拡散で起こる。M10 は N 末端に陽イオン性アミノ酸であるアルギニン(R)と電荷を持たないプロリン(P)を含み、膜を通過しやすい配列になっている(Fonseca et al., 2009)。このことから、M10 は細胞膜のみならず核膜の脂質二重層を容易に通過しうることが示唆される。これを裏付けるように、免疫染色法により M10 が線維芽細胞の細胞質にも核内にも分布していることを確認した。ここで用いた抗 C12 抗体は M10 のみならずフラグメントになっていない MET も認識することから、線維芽細胞における M10 そのものの分布をみるために蛍光標識(5,6-TAMRA)した M10 も使用して検討した。抗 C12 抗体を発色した場合も 5,6-TAMRA-M10 を用いた場合も細胞内の染色パターンは同等であったことから、M10 は細胞質あるいは核内のいずれにも分布することを示唆する結果となった。

SSc はコラーゲンの過剰な蓄積を来す疾患であり、TGF β は線維芽細胞におけるコラーゲン産生を刺激する主要なサイトカインである。したがって我々は、SSc 患者および TGF β で刺激した健常者の肺および皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン産生に対する M10 の効果を検討した。M10 は SSc の肺および皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン発現を低下させた。また M10 は TGF β で刺激した健常者の線維芽細胞においても I 型コラーゲン発現を低下させたが、ベースラインのコラーゲン産生量には影響を与えなかった。すなわち M10 は TGF β 依存性の線維化誘導経路を阻害することが示唆された。

細胞内において、TGF β が誘導するシグナル伝達の多くは Smad を介している。Smad は特異型 Smad (Smad2, 3)、共有型 Smad (Smad4)、抑制型 Smad (Smad6, 7)があり、遺伝子発現を制御する転写因子として働く。Smad ファミリーは N 末端の MH1 ドメインと C 末端の MH2 ドメインとこれらをつなぐ linker

region からなり、MH2 ドメインは膜蛋白や転写因子を含む様々なタンパク質と相互作用を示す。

我々は M10 が Smad2 の MH2 ドメインと相互作用することを示した。さらに免疫染色法にて M10 と Smad2 が細胞質および核内で共存していることがわかった。このことから M10 が Smad2 の機能に影響を与えていることが示唆された。さらに M10 は皮膚や肺線維芽細胞において、TGFβ で誘導した Smad2 のリン酸化を抑制していた。Smad2 のリン酸化は TGFβ 依存性のコラーゲン産生に必須であることから (Ishida et al., 2006)、Smad2 のリン酸化に対する抑制作用は、M10 のもつ抗線維化メカニズムのひとつと考えられる。

SSc 患者において、肺の線維化は主要な致命的合併症である (Fan et al., 2014)。*in vivo* における M10 の抗線維化効果を検討するため、我々はブレオマイシンを気管内投与して肺の線維化を誘導したモデルマウスを用いた。M10 を腹腔内投与することにより、ブレオマイシンによる肺の線維化が抑制されたことから、M10 は SSc-ILD や特発性肺線維症の治療に有用である可能性が示唆された。そして、薬物動態解析により、M10 は腹腔内投与後 6 時間で血漿最大濃度に達し、24 時間後においても 1μg/mL 弱の濃度を維持していた。M10 は線維芽細胞において、同濃度で十分な生物活性を発揮することから、血漿中においては安定性の高いペプチドであると考えられる。

さらに我々は別の Smad シグナル経路である Smad1/5/8 にも着目し、M10 の抗線維化作用について検討を加えた。TGFβ スーパーファミリーのひとつである BMP9 は Smad1/5/8 シグナルを活性化するリガンドであり、マウスの線維芽細胞において線維化を促進する作用を有することが示されている。我々の検討によりヒト肺線維芽細胞においても BMP9 が I 型コラーゲンや α-SMA の発現を誘導するとともに Smad1/5/8 のリン酸化も促進することが明らかとなった。さらに BMP9 は EMT に関わる転写因子である Snail や Id1 の発現を mRNA レベルで強く促進した。そして M10 は BMP9 が誘導する Smad1/5/8 のリン酸化および I 型コラーゲンや Snail の発現を抑制していた。以上から、M10 はヒト肺線維芽細胞において、BMP9 で誘導されるコラーゲン産生および EMT に抑制的に作用すると考えられた。

以上の結果から、M10 は TGFβ スーパーファミリーの関与する線維化病態に対して高い治療効果を示す可能性がある。すなわち、M10 を基盤とした小ペプチドが、SSc の皮膚硬化やILD に対して抗線維化作用を発揮する新たな治療戦略のひとつとして臨床応用されることが期待される。

4.5 結語

SSc-ILD や他の線維化病態に対しては未だ画期的な治療法がなく、抗線維化療法の開発は大きな課題である。ペプチドを用いた薬は 40 年以上にわたって多くの疾患に用いられ、成功を収めてきている(Vlieghe et al., 2010)。ペプチドはその高い生物学的活性、特異性、低毒性が大きなアドバンテージとなっている。M10 は *in vitro*、*in vivo* のいずれにおいても抗線維化効果を発揮していることから、これをもとに、SSc-ILD をはじめとする難治性の線維化病態に対してより有効性の高い治療薬が開発されることが期待される。

5. 第三章

関節リウマチに対して IL-6 阻害療法が及ぼす免疫学的影響についての研究

5.1 緒言

第三章では、同じ自己免疫疾患の中でも最も頻度の高い RA について、B 細胞と自己抗体を中心に、病態を考察する。SSc と比べると、RA の診療はこの 10 年で格段に進歩しているものの、以下に述べるように病態は未だ不明な点が多い。

RA は、多関節に滑膜の炎症と増殖を生じる慢性の自己免疫疾患であり、リウマチ因子 (rheumatoid factor: RF) や ACPA (anti-citrullinated protein antibodies) などの自己抗体や免疫複合体が産生される (McInnes and Schett, 2011)。破壊性の関節炎を来すことで、生活機能が著しく障害される。しかしながら、2010 年に ACR/EULAR による RA 分類基準が導入され (Table 10, (Aletaha et al., 2010))、早期診断が可能となり、さらに生物学的製剤の普及により関節破壊を阻止し、生活機能を改善、維持することができるようになったことから、この 10 年で RA に対する診療は格段に進歩した。それでも、RA の経過は一様でなく、関節破壊が急速に進行して早期に機能障害を呈する例も少なくない。特に、ACPA 陽性 RA は ACPA 陰性 RA と比べ、関節破壊の進行が早いことが報告されている (van den Broek et al., 2012)。ACPA は RA の対応抗原として同定されたシトルリン化フィラグリンの主要抗原エピトープペプチドを人工的に環状化させた分子、CCP (cyclic citrullinated peptide) に対する自己抗体であり、本邦では、抗 CCP 抗体として保険収載されている。ACPA は RF とともに、先の RA 分類基準の配点が高く、早期診断においても重要性が示唆されている。

RA の病態形成には T 細胞、B 細胞、マクロファージ、滑膜線維芽細胞、破骨細胞などの多くの細胞と、それらの主要なコミュニケーションを司るサイトカインが重要な役割を果たしている。そのメカニズムのひとつとして、シトルリン化ペプチドなどの抗原提示により活性化された T 細胞が、B 細胞やマクロファージの活性化を介して持続性滑膜炎を生じ、破骨細胞と滑膜線維芽細胞を中心とした骨破壊を誘導する。また ACPA そのものがシトルリン化抗原と免疫複合体を形成し、Fc レセプターを介して炎症性サイトカインを誘導するという報告もあり、ACPA の病原性についてもいくつか知見が存在する (Clavel et al., 2008, Lu et al., 2013)。

Table 10. 関節リウマチの分類基準 (2010 年、ACR/EULAR)

適用対象集団：

- 1) 1ヶ所以上の関節に明確な臨床的滑膜炎(腫脹)がみられる
- 2) 滑膜炎をより妥当に説明する他の疾患がみられない

A. 罹患関節	点
大関節に 1ヶ所	0
大関節に 2～10ヶ所	1
小関節に 1～3ヶ所 (大関節の罹患の有無を問わない)	2
小関節に 4～10ヶ所 (大関節の罹患の有無を問わない)	3
11ヶ所以上 (1ヶ所以上の小関節を含む)	5
B. 血清学的検査	
RF 陰性かつ ACPA 陰性	0
RF 低値陽性または ACPA 低値陽性	2
RF 高値陽性または ACPA 高値陽性	3
C. 急性期反応物質	
CRP 正常かつ ESR 正常	0
CRP 異常または ESR 異常	1
D. 症状(滑膜炎)の持続期間	
6 週未満	0
6 週以上	1

罹患関節とは、評価時に腫脹または圧痛がみられる関節を指す。「大関節」とは肩関節、肘関節、股関節、膝関節、足関節を指す。「小関節」とは、中手指節関節、近位指節間関節、第 2～5 中足趾節関節、母指指節間関節、手関節を指す。6 点以上を関節リウマチと分類する。

RA 発症の原因については様々な因子が考えられているが、TNF (tumor necrosis factor)- α や IL (interleukin)-1 β , IL-6 を含む炎症性サイトカインが RA 発症に重要な役割を担っていることが知られている(Smolens et al., 2007)。RA 患者の関節においては血管新生や炎症細胞浸潤、滑膜増生といった変化が特徴的であり、結果としてパンヌスが形成される(Hashizume and Mihara, 2011)。IL-6 は血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)の産生を介した血管新生、RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)を介した破骨細胞の成熟と活性化、B 細胞の成熟による自己抗体産生、そして肝臓での CRP 産生といった様々な生物学的活性を有する炎症性サイトカインであり、これらの機能はすべて関節破壊をもたらす(Shetty et al., 2014)。

IL-6 はもともと B 細胞から免疫グロブリンを分泌する成熟した形質細胞への分化を誘導する B 細胞分化因子として同定された(Muraguchi et al., 1988)。IL-6 のもつ液性免疫の誘導能は濾胞性ヘルパー T (Tfh)細胞が関与している(Hunter and Jones, 2015)。Tfh 細胞はケモカイン受容体である CXCR5 を発現し、リンパ濾胞に局在する CD4 陽性 T 細胞のサブセットであり、B 細胞の分化を促進するとともに免疫グロブリンのクラススイッチを誘導する。IL-6 が過剰に活性化することにより、ポリクローナルな B 細胞の活性化や高グロブリン血症、自己抗体産生が誘導される(Tanaka et al., 2014)。プリスタンで誘導したループスのモデルマウスでは、IL-6 が直接的に自己抗体産生を誘導することが報告されている(Richards et al., 1998)。しかし、RA では IL-6 が B 細胞の分化や自己抗体(特に ACPA)産生にどのように寄与しているのか、十分に明らかになっていない。Roll らは、RA 患者において、抗 IL-6 受容体抗体(tocilizumab)が血中の総 IgG・IgA レベルを低下させ、同時に pre-switch および post-switch memory B 細胞を減少させたと報告しているが、ACPA については言及していない(Roll et al., 2011)。Carbone らは tocilizumab 投与後に IgG4 型の抗 CCP 抗体が低下したが IgG1 型の抗 CCP 抗体は低下しなかったと報告している(Carbone et al., 2013)。同 study では RA 患者において、IL-21 が IgG4 型の抗 CCP 抗体を強く誘導すると述べられているが、B 細胞の分化や自己抗体産生細胞に対して tocilizumab がどのように寄与しているかについては考察されていない。

Tocilizumab は可溶性および膜結合型の IL-6 受容体に高親和性に結合するヒト化リコンビナントモノクローナル抗体であり、RA に対して高い効果を示す治療薬のひとつである。RA における、B 細胞の分化や自己抗体産生に対する IL-6 の役割を調べるため、我々は tocilizumab を開始した RA 患者における B 細胞のサブセットや抗 CCP 抗体の産生に対する同薬剤の効果を検討する前向き臨床研究をおこなった。

5.2 患者と方法

5.2.1 研究デザイン

本研究は中外製薬株式会社との協働により、RA における B 細胞の分化と自己抗体産生に対する IL-6 阻害の影響を検討した前向き観察研究である。中外製薬株式会社には、フローサイトメトリー法のプロトコール、末梢血 B 細胞サブセットの測定における適切な抗体選択について事前に検討を依頼した。2013 年 12 月から 2015 年 9 月までに tocilizumab を開始した連続する 14 名の RA 患者を本研究に登録した。全患者が 2010 年の ACR/EULAR の RA 分類基準(Aletaha et al., 2010)を満たしており、tocilizumab 162mg を隔週で皮下投与した。末梢血サンプルを回収し、Human Immunology Project で提唱されたプロトコールをもとに、tocilizumab 投与前、12 週後、24 週後の B 細胞サブセットをフローサイトメトリー法にて解析した(Maecker et al., 2012)。それぞれの時点における疾患活動性や血清中の自己抗体価を含む臨床パラメータも評価した。本研究プロトコールは北海道大学病院および中外製薬株式会社の倫理委員会で承認されており、書面にて各患者の同意を取得した。

5.2.2 フローサイトメトリー法

Ficoll-Paque Plus (GE healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)を用いた密度勾配遠心分離法により、末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells: PBMC)を単離した。PBMC は CD19-PerCP-Cy™5.5, CD27-PE, CD38-APC, IgD-FITC にて染色した。B 細胞サブセットは以下の通り定義した ; naïve B 細胞 [CD19+CD27-], pre-switch memory B 細胞 [CD19+CD27+CD38-IgD+], post-switch memory B 細胞 [CD19+CD27+CD38-IgD-], plasmablasts [CD19+CD27+CD38+IgD-]。抗体はすべて BD Biosciences (San Jose, CA)から購入した。フローサイトメトリー法による解析は BD FACS Aria II (BD Biosciences)を用いた。

5.2.3 統計解析

正規分布した連続変数は **mean ± S.D** で表記し、正規分布していなければ **median** と **IQR** で表記した。p 値は治療前と治療期間中(12 週あるいは 24 週)のデータを比較し、対応のある *t* 検定または **Wilcoxon signed-rank** 検定で算出した。相関係数は **Spearman rank method** で求めた。p 値 0.05 未満を有意とした。すべての統計解析は IBM SPSS Statistics (version 22.0.0, Inc., Armonk, NY)を用いておこなった。

5.3 結果

5.3.1 臨床パラメータ

14名のRA患者が登録されたが、1名はデータ欠損のため脱落した。残る13名について、治療前と治療経過中のデータを解析した(Table 11)。8名(62%)が女性であり、平均年齢は 55.8 ± 13.2 歳、罹病期間の中央値は44 (IQR: 24-60)ヶ月であった。9名(69%)はこれまで生物学的製剤の使用歴がなかった。DAS28-ESRとHAQは24週目において有意に改善していた(それぞれ $p < 0.001$, $p = 0.036$)。抗CCP抗体価は24週目において有意に低下していた($p = 0.033$, Figure 30)。

Table 11. 患者背景と臨床パラメータ

	Baseline (n = 13)	Week 12 (n = 13)	p 値	Week 24 (n = 13)	p 値
患者背景					
女性, n (%)	8 (62)				
年齢, mean ± S.D, years	55.8 ± 13.2				
罹病期間, median (IQR), 月	44 (24 - 60)				
生物学的製剤投与歴なし, n (%)	9 (69)				
臨床パラメータ					
DAS28-ESR, mean ± S.D	5.00 ± 1.39	2.42 ± 1.14	< 0.001	2.20 ± 1.00	< 0.001
DAS28-CRP, median (IQR)	3.79 (3.57 - 5.17)	2.05 (1.45 - 2.58)	0.001	2.15 (1.17 - 2.44)	0.001
SDAI, mean ± S.D	24.16 ± 14.98	8.70 ± 6.97	< 0.001	7.60 ± 6.76	< 0.001
CDAI, mean ± S.D	21.28 ± 13.52	8.48 ± 6.44	0.002	7.57 ± 6.76	0.001
HAQ, mean ± S.D	0.63 ± 0.53	0.46 ± 0.39	0.089	0.40 ± 0.35	0.036
抗 CCP 抗体, median (IQR), U/mL	123.7 (55.9 - 234.8)	114.8 (49.9 - 224.3)	0.075	99.6 (45.1 - 255.0)	0.033
抗 MCV 抗体, median (IQR), U/mL	223.8 (125.6 - 297.9)	201.8 (130.2 - 226.8)	0.133	196.5 (83.2 - 267.9)	0.422
RF, median (IQR), IU/mL	74.3 (27.2 - 112.5)	42.8 (17.4 - 100.5)	0.028	61.5 (16.4 - 82.9)	0.133

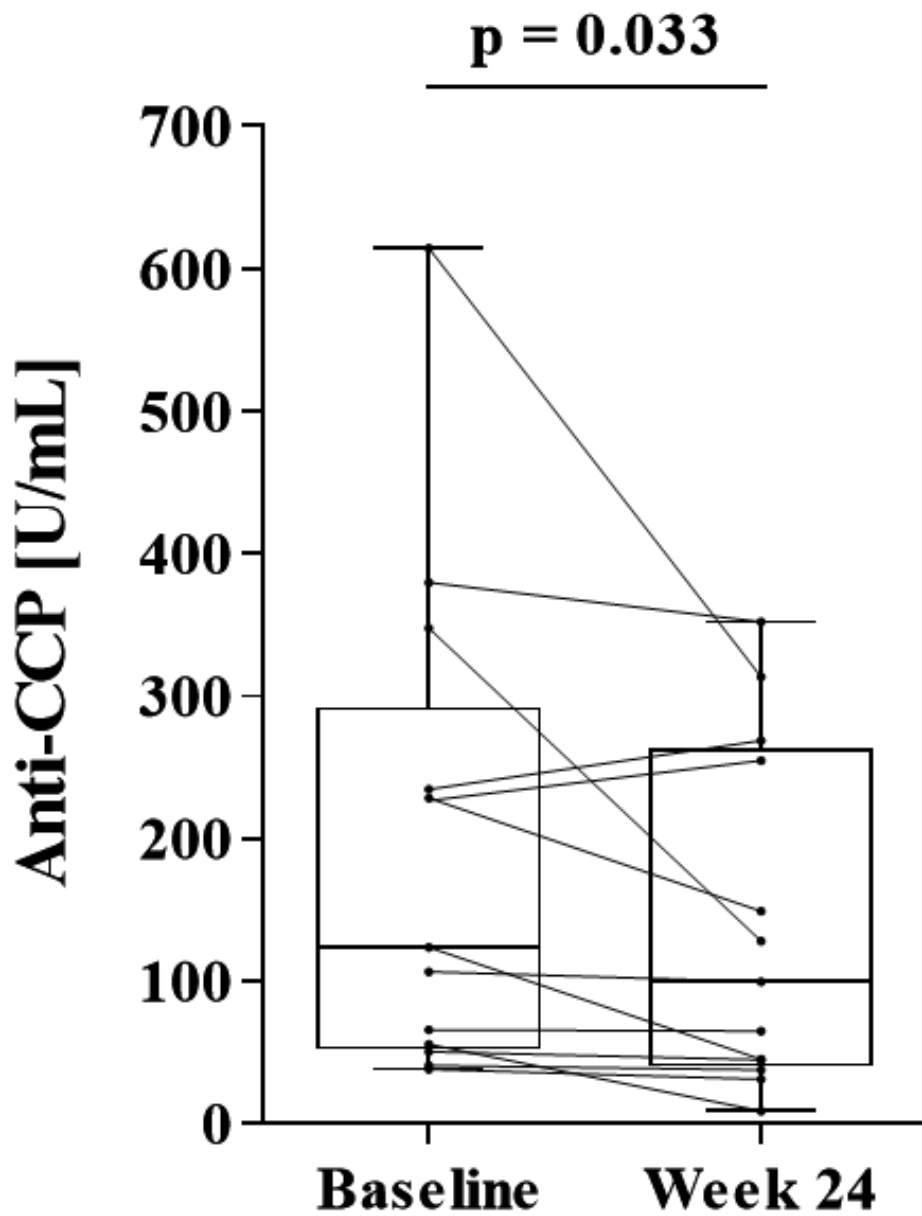


Figure 30. 血清抗 CCP 抗体価の推移。データは患者毎にシンボルとラインでプロットし、さらにボックスプロット(最小値、第一四分位数、中央値、第三四分位数、最大値)を重ねている。

5.3.2 末梢血 B 細胞サブセットの解析

フローサイトメトリー法による解析では、CD19 陽性細胞における post-switch memory B 細胞の割合が 12 週目で有意に増加していた ($p = 0.011$, Figure 31)。しかし、24 週目には増加している患者はいるものの、全体としてはベースラインレベルに戻っていた。他の B 細胞サブセットについては、観察期間中有意的な変化はみられなかった。特筆すべきことに、ベースラインから 24 週までの naïve B 細胞の変化 (Δ naïve/CD19+) と post-switch memory B 細胞の変化 (Δ post-switch/CD19+) は逆相関していた ($r = -0.703$, $p = 0.007$, Figure 32)。この結果は、tocilizumab で治療中の末梢血では、post-switch memory B 細胞の増加と naïve B 細胞の減少が関連していることを示唆している。

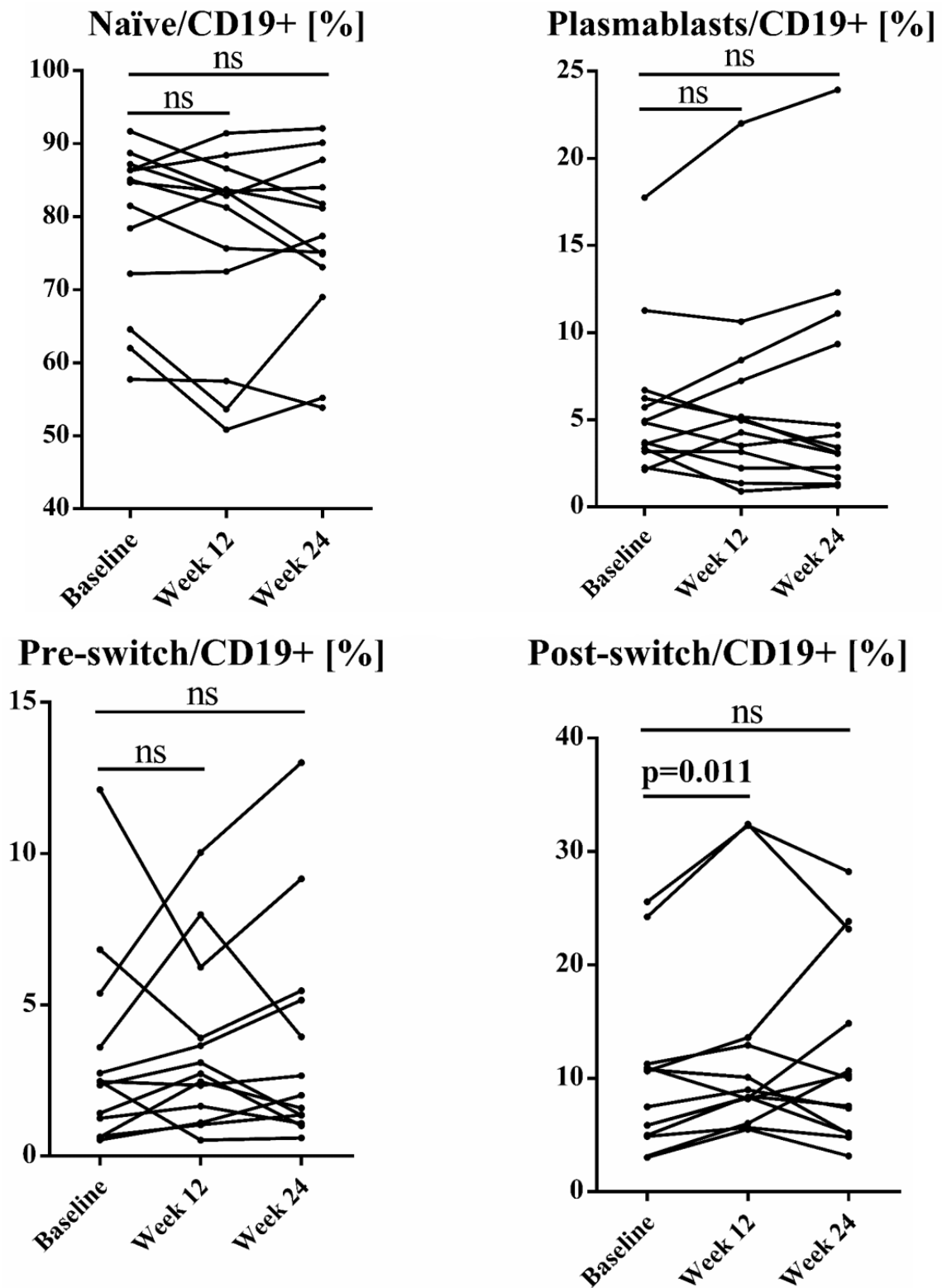


Figure 31. Tocilizumab 投与中の CD19 陽性細胞中の B 細胞サブセットの割合の変化。p 値は Wilcoxon signed rank 検定で算出した。

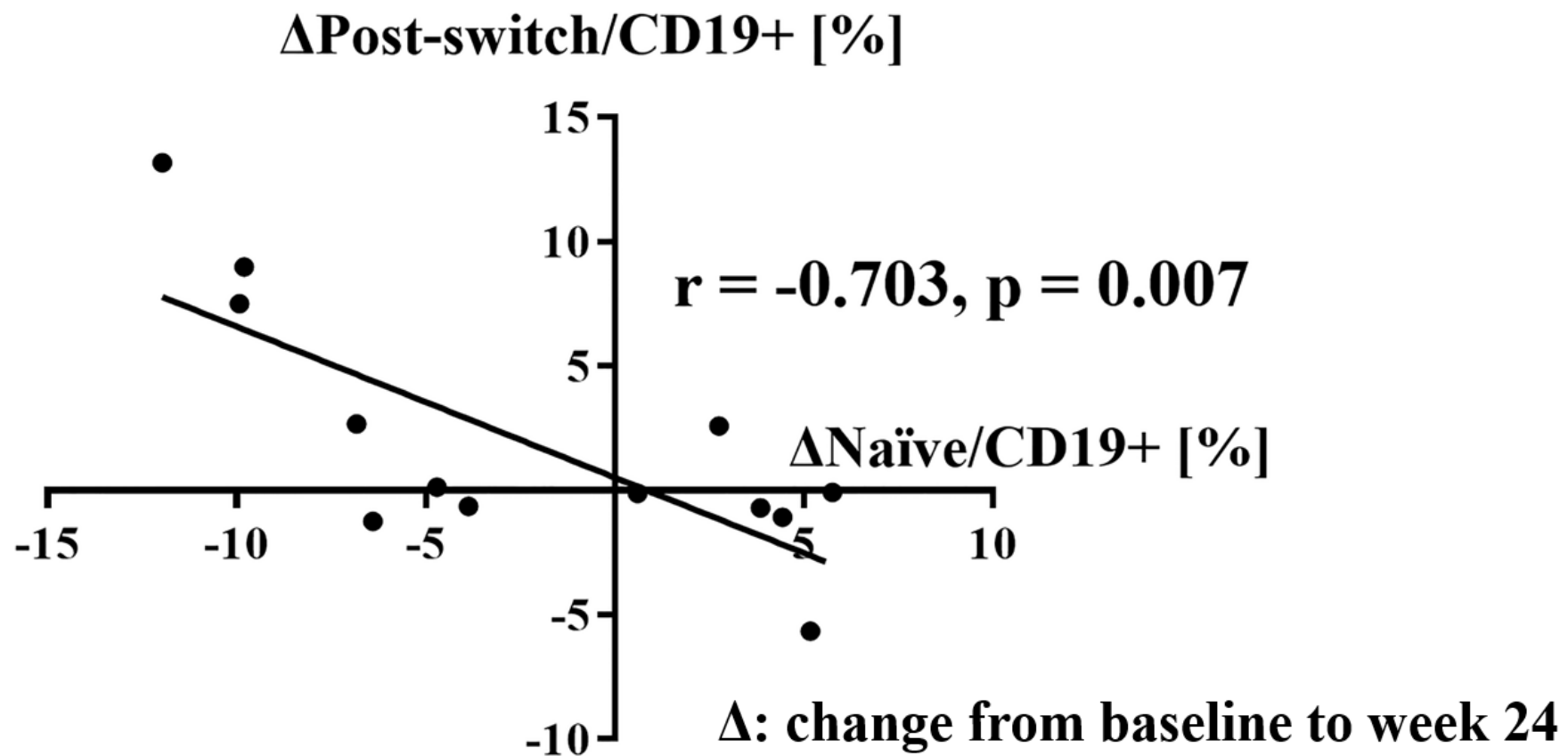


Figure 32. ベースラインから 24 週にかけての Δ naïve/CD19+と Δ post-switch/CD19+との相関。相関係数は Spearman rank method にて算出した。

5.3.3 抗 CCP 抗体価と B 細胞サブセットとの関係

次に tocilizumab が B 細胞の抗 CCP 抗体産生能にどのように影響を与えるかを調べるため、我々は抗 CCP 抗体の抗体価と B 細胞サブセットとの関係について検討した。結果、どの観察時期においても、naïve B 細胞と post-switch memory B 細胞との比(naïve/post-switch)が抗 CCP 抗体価と正相関していた(0 週 : $r = 0.621$, $p = 0.024$ 、12 週 : $r = 0.623$, $p = 0.023$ 、24 週 : $r = 0.702$, $p = 0.007$, Figure 33)。さらに、naïve/post-switch 比の変化(Δ naïve/post-switch)と抗 CCP 抗体価の変化(Δ anti-CCP)についても正の相関を示していた(0-12 週 : $r = 0.709$, $p = 0.007$ 、0-24 週 : $r = 0.588$, $p = 0.035$, Figure 34)。

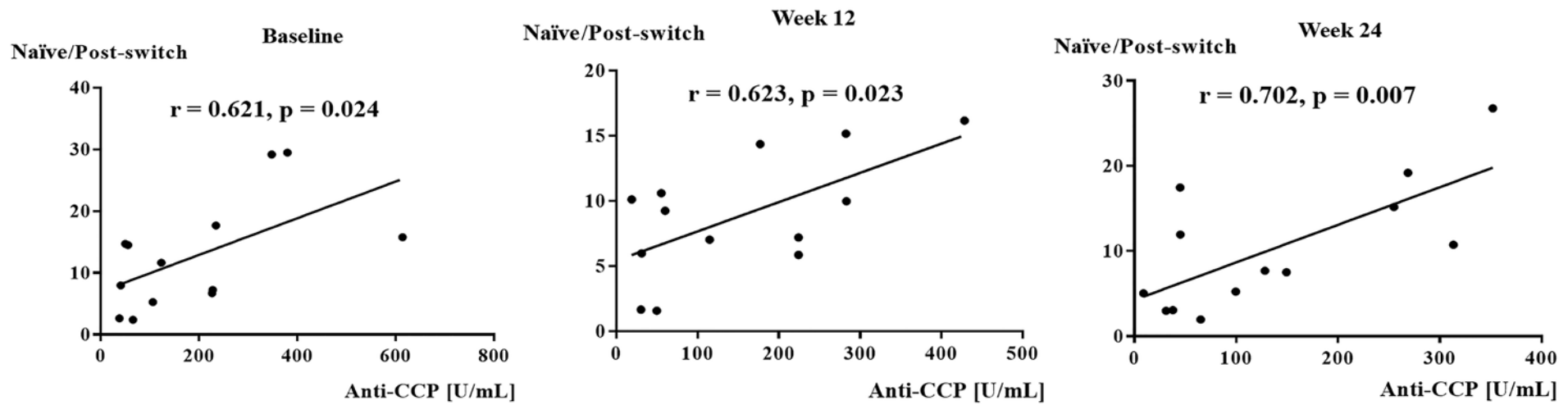


Figure 33. ベースライン、12 週、24 週における抗 CCP 抗体価と naïve/post-switch 比の相関。相関係数は Spearman rank method を用いて算出した。

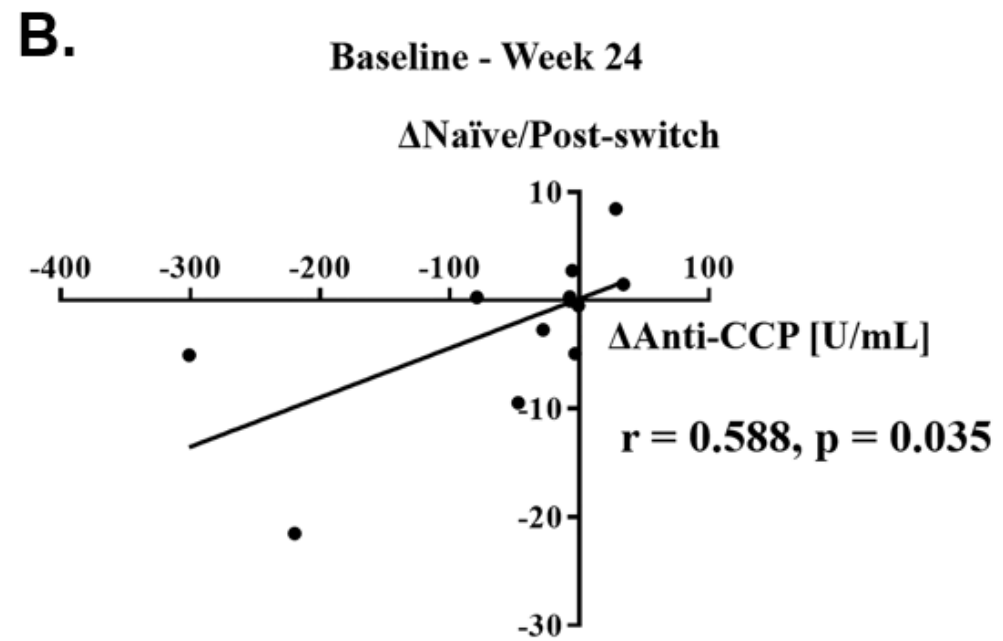
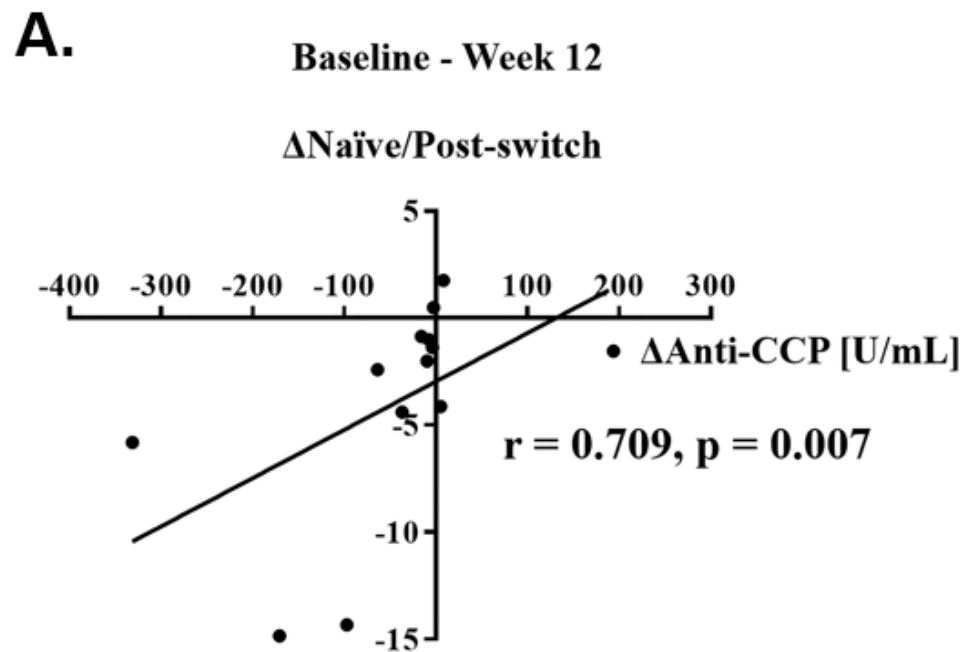


Figure 34. 抗 CCP 抗体価の変化と naïve/post-switch 比の変化との相関 (A. 0-12 週, B. 0-24 週)。相関係数は Spearman rank method で算出した。

5.4 考察

RA 患者に対する tocilizumab の疾患活動性改善効果、関節破壊抑制効果については、数多くの臨床研究で示されている (Scott, 2017)。今回の前向き臨床研究において、我々は tocilizumab が疾患活動性のみならず抗 CCP 抗体価を低下させることを示し、この結果は RA において IL-6 が抗 CCP 抗体産生に寄与していることを示唆している。抗 IL-6 療法が血液中の B 細胞サブセットに与える影響についてはいくつか報告がある。Roll らは、tocilizumab が RA 患者の pre-switch memory B 細胞および post-switch memory B 細胞数を有意に減少させることを示し、また DAS28 スコアの変化と pre-switch memory B 細胞数の変化との間に相関があることを示した (Roll et al., 2011)。Moura らは tocilizumab 投与後に double negative (IgD-CD27-) B 細胞の比率と double negative B 細胞による IgM 発現量が有意に低下することを示している (Moura et al., 2017)。しかしながら、tocilizumab を投与した RA 患者における B 細胞サブセットの変化と自己抗体価との関係をみた報告はない。

我々は tocilizumab が抗 CCP 抗体を減少させ、12 週間の投与により CD19 陽性細胞に対する post-switch memory B 細胞の比率が上昇することを示した。また、tocilizumab による治療経過中において post-switch memory B 細胞の増加が naïve B 細胞の減少と関連していたことから、tocilizumab は血中の B 細胞の分画、特に naïve B 細胞と post-switch memory B 細胞のバランスをシフトさせることにより抗 CCP 抗体産生を低下させる可能性があることを示唆している。なお、Roll らの研究 (Roll et al., 2011) では RA 患者において tocilizumab 投与 24 週後に pre-switch および post-switch memory B 細胞の比率がいずれも減少したと報告しており、我々の結果と相違がみられている。しかし、同研究では罹病期間の平均が 11.7 年と非常に長く、患者背景において我々のデータと乖離がある。早期 RA では末梢血の memory B 細胞の比率が低いと報告されていることから、罹病期間の違いがベースラインの B 細胞サブセット、そして tocilizumab 投与後の推移に影響している可能性が考えられる。また TNF 阻害療法が pre-switch memory B 細胞の増加と関連しているとも報告されており (Souto-Carneiro et al., 2009)、tocilizumab 導入前の治療内容も結果に影響を与えた可能性がある。

さらに我々は、naïve/post-switch 比が血清中の抗 CCP 抗体価を反映する重要なマーカーとなることを見出した。Naïve/post-switch 比は tocilizumab 投与中のいずれの観察時期においても抗 CCP 抗体価と正の相関を示していた。そ

して、naïve/post-switch 比の変化もまた、抗 CCP 抗体価の変化と相関していた。以上から、抗 CCP 抗体価は B 細胞分画を反映しており、tocilizumab は naïve/post-switch 比に影響を与えることにより抗 CCP 抗体産生を調節している可能性がある。すなわち、多くの症例では naïve/post-switch 比を低下させることで抗 CCP 抗体価を下げ、RA の疾患活動性を抑えていると考えられる。

活動性 RA の滑膜組織では、異所性リンパ組織様構造(ectopic lymphoid structures: ELS)がしばしば認められる(Takemura et al., 2001)。RA の滑膜ではシトルリン化蛋白が豊富に存在することが報告されている(Amara et al., 2013)。このため、そのようなリンパ組織では、ヒストン 2A やヒストン 2B、ビメンチンといったシトルリン化蛋白に対する抗体が活発に産生・分泌される(Corsiero et al., 2016)。van Oosterhout らは、抗 CCP 抗体陽性患者において末梢血中の白血球数 (特にリンパ球数)が減少しており、抗 CCP 抗体陽性患者では抗 CCP 抗体陰性患者と比べ、滑膜組織中のリンパ球浸潤が多かったと報告している(van Oosterhout et al., 2008)。これについては、抗 CCP 抗体陽性患者では白血球が末梢血から局所の関節に集まりやすいためと考えられている。また、シトルリン化蛋白は RA 患者の口腔粘膜や肺組織、腸管にも豊富に存在しており、抗 CCP 抗体はこれらの局所臓器でも産生されていると考えられている(Mankia and Emery, 2015, Bennike et al., 2017)。以上から、我々の検討で tocilizumab を開始した後比較的早期に post-switch memory B 細胞が血中で増加したことについては、このサブセットが関節局所や口腔粘膜、肺組織、腸管から循環血液中に再分布し、これにより抗 CCP 抗体産生が抑制されたことを示唆しているものと考えられる。

本研究にはいくつかのミテーションが存在する。まず、単一施設のパイロット研究であり母集団が少ない点。次に、B 細胞分画のみ検討していること。さらに、観察期間が短いことである。母集団を増やし、観察期間を延ばし、さらに滑膜組織を同時に評価することができれば、RA 患者における ELS に対する tocilizumab の効果を見出すことが可能になると思われる。

5.5 結語

RA 患者において、IL-6 は抗 CCP 抗体産生に寄与する重要なサイトカインのひとつであり、tocilizumab は循環血液中の B 細胞サブセットの分布を変えることより抗 CCP 抗体産生を低下させる可能性がある。

6. おわりに

SScの肺病変は日常診療において病態把握と治療戦略に難渋することが多く、予後不良であることから、画期的な診断技術、治療薬の開発が求められている。これを踏まえ、臨床および基礎の両側面からSScの肺病変の研究に着手し、本論文の第一章、第二章にまとめた。

第一章はSScに合併するPAHに関する臨床研究である。SSc-PAHの病態評価や予後予測を行う上でCMRが大変有用であり、CMRを用いることによりSScの『一次性』の心病変が両心室の相互的な作用に影響することを突き止めた。これにより、なぜSSc-PAHが他のCTD-PAHと比べ予後不良であるのか、その理由のひとつが明らかとなった。

第二章はSScに合併するILDに対する創薬に向けた基礎研究である。HGFの受容体フラグメントであるM10はアミノ酸10個からなる小ペプチドであり、*in vitro*および*in vivo*の検討において抗線維化作用を発揮することを示した。SSc-ILDに対する新規治療薬の開発に向けて大きな期待が寄せられる。

SScはCTDの中で最も難治性の疾患であり、予後の改善が大きな課題である。特に肺合併症に対する診療レベルの向上は予後改善に不可欠である。SSc-PAHについては心病変を含めた様々なSSc特有の合併症を考慮に入れた早期の病態把握、SSc-ILDについては抗線維化薬の開発こそが、予後や生活機能改善に向けた命題である。本研究を通して得られた知見を今後の更なる研究に活かし、将来的にSScの肺病変に対する診療水準の向上に期待したい。

そしてRAについては、SScと比べ、治療成績は生物学的製剤の登場以来飛躍的に進歩している。しかしながら、それでも早期から関節破壊を来す重症例も数多く存在している。特にACPA陽性RAでは関節破壊の進行が早いことが知られ、自己抗体産生が病態形成に深く関わっていると考えられている。この観点から、抗IL-6製剤で治療したRA患者における自己抗体産生とB細胞サブセットへの影響について研究し、第三章にまとめた。IL-6阻害により抗CCP抗体産生が抑制されるとともに、循環血液中のB細胞サブセットの分布が抗CCP抗体価と相関して変化することがわかった。RA患者におけるIL-6の役割は多岐にわたるが、ACPA産生への影響という観点から病態解明が進み、更なるアウトカムの向上につながることを期待される。

7. 総括および結論

本研究から得られた新知見は以下のとおりである。1, 2, 3 の知見はそれぞれ第一章、第二章、第三章で得られた知見に該当する。

1. SSc-PAH と SSc 以外の CTD-PAH では、左右心室の相互作用に差がみられ、それは SSc-PAH の予後とも関連する。
2. HGF 受容体フラグメントのひとつである小ペプチド、M10 は、*in vitro* および *in vivo* のいずれにおいても抗線維化作用を発揮する。
3. RA 患者において、IL-6 阻害療法は循環血液中の B 細胞の分化に影響を与え、抗 CCP 抗体産生を低下させる可能性がある。

新知見の意義と、これに基づく更なる研究の展望、課題について以下に述べる。

第一章では、SSc における PAH の病態について、CMR を用いて解析した。本研究では、RHC のデータに CMR のパラメータを組み合わせることにより、SSc-PAH と SSc 以外の CTD-PAH における血行動態の違いを初めて示した。SSc に関連する『一次性』の心病変は、潜在的に両心室の相互作用に影響を与え、結果として SSc-PAH の予後を悪化させる要因になっていると考えられる。今後は、母集団をさらに増やすのみならず、拡張能指標を含めた心臓超音波検査のパラメータも加えることにより、治療効果や予後予測をさらに適切に評価可能となることが期待される。また、SSc においては肺病変の存在も無視することができず、SSc-PAH の予後を説明する上で大変重要である。したがって、更なる研究のためには循環器内科、呼吸器内科を含めた多岐にわたる専門領域の介入が必要であり、今後の課題といえる。

第二章では、Caspase-3 によって切り出される HGF 受容体フラグメント、M10 の抗線維化作用について、特に TGF β スーパーファミリーを起点とする Smad シグナルへの影響を中心に示した。SSc をはじめとする線維化病態に対して未だに画期的な治療法がないのが現状であるが、M10 のようなペプチドを用いた薬の研究が進むことにより、『抗線維化療法』という新たな治療戦略が生ま

れることに期待がもたれる。ペプチドはその高い生物学的活性、特異性、低毒性が大きなアドバンテージとなっている上、アミノ酸配列の組み換え等により更なる安定性の向上や副作用の軽減を目指すことが可能である。現時点で、M10は線維化を予防する効果は発揮しているが、一旦線維化した組織を可逆的に改善させる効果までは示していない。したがって、今後はM10の、線維化の進んだ病態を改善させる効果を検証するとともに、M10を基盤とした構造の改良により、臨床応用に結びつく新たなペプチドの開発が求められる。

第三章では、RAにおいてIL-6阻害薬であるtocilizumabが自己抗体産生に与える影響について解析した。IL-6の機能のひとつとして、B細胞を活性化して自己抗体産生を誘導することが知られているが、RAにおいても抗CCP抗体産生に寄与しており、tocilizumabは抗体産生に寄与する細胞と寄与しない細胞の血中におけるバランスを制御することで抗CCP抗体産生を低下させていることが明らかとなった。この機序として、tocilizumabが関節局所をはじめとする末梢組織から循環血液中に抗体産生細胞を再分布させ、局所での抗CCP抗体産生を阻害している可能性が考えられるが、これを示すには末梢血と同時に滑膜組織におけるB細胞分画や抗体産生の評価が必要である。滑膜検体の収集には整形外科との協力が必要であり、綿密な計画を要するが、滑膜組織中の異所性リンパ組織様構造へのtocilizumabの影響を知ることでIL-6の関節局所での役割をさらに詳しく解析することが可能となる。そして関節局所における、抗TNF α 製剤をはじめとする他の生物学的製剤との効果の違いを見出すことができれば、局所の抗体産生細胞や自己抗体価から、将来的に患者毎に最適な生物学的製剤の選択が可能となる時代が来ることが期待できる。

8. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学研究院免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中、ならびに米国サウスカロライナ医科大学(Medical University of South Carolina; MUSC)、Division of Rheumatology and Immunology の Richard M. Silver 教授、Galina S. Bogatkevich 准教授の研究室に留学中の研究成果をまとめたものです。北海道大学本教室の渥美達也教授には強皮症および関節リウマチの臨床研究の実施の機会およびご指導、ならびに博士課程在籍中という立場にありながら海外留学の機会を与えていただき、終始、ご高配とご指導ご鞭撻を賜りました。ここに深謝の意を表します。

本研究の第二章は MUSC 留学中におこなった研究となりましたが、Bogatkevich 准教授には Principal Investigator として研究全般において手厚いご指導をいただきました。Silver 教授には臨床の側面からのアドバイス、学会発表のご指導を賜りました。ここに深く謝意を表します。

本教室准教授の保田晋助先生、助教の加藤将先生には、研究全般において終始丁寧なご指導を賜りました。特に学会発表や論文作成におきまして、非常に手厚くご指導いただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本教室助教の Olga Amengual 先生には、英語教育において多大なるご指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

また当科実験助手であった小出秀之さん、下道真由美さんのご協力無しに実験を遂行することは不可能でした。厚く御礼申し上げます。この他にも、この学位論文作成に当たり、ご協力、ご助言、ご支援をいただきました多くの諸先輩方、同僚、後輩の皆様に対しまして、心より深謝の意を表します。

9. 引用文献

- Akter, T., Silver, R. M. & Bogatkevich, G. S. 2014. Recent advances in understanding the pathogenesis of scleroderma-interstitial lung disease. *Curr Rheumatol Rep*, 16, 411.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., 3RD, Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M., Hobbs, K., Huizinga, T. W., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T. K., Laing, T., Mease, P., Menard, H. A., Moreland, L. W., Naden, R. L., Pincus, T., Smolen, J. S., Stanislawska-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P. P., Upchurch, K. S., Vencovsky, J., Wolfe, F. & Hawker, G. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 62, 2569-81.
- Alfakih, K., Plein, S., Bloomer, T., Jones, T., Ridgway, J. & Sivananthan, M. 2003. Comparison of right ventricular volume measurements between axial and short axis orientation using steady-state free precession magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging*, 18, 25-32.
- Almeida, C., Almeida, I. & Vasconcelos, C. 2015. Quality of life in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*, 14, 1087-96.
- Amara, K., Steen, J., Murray, F., Morbach, H., Fernandez-Rodriguez, B. M., Joshua, V., Engstrom, M., Snir, O., Israelsson, L., Catrina, A. I., Wardemann, H., Corti, D., Meffre, E., Klareskog, L. & Malmstrom, V. 2013. Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. *J Exp Med*, 210, 445-55.
- Anonymous. 1980. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum*, 23, 581-90.
- Ashcroft, T., Simpson, J. M. & Timbrell, V. 1988. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*, 41, 467-70.
- Atanelishvili, I., Shirai, Y., Akter, T., Noguchi, A., Ash, K. T., Misra, S.,

- Ghatak, S., Silver, R. M. & Bogatkevich, G. S. 2016. D1398G variant of MET is associated with impaired signaling of hepatocyte growth factor in alveolar epithelial cells and lung fibroblasts. *PLoS One*, 11, e0162357.
- Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A. 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234, 179-86.
- Bennike, T. B., Ellingsen, T., Glerup, H., Bonderup, O. K., Carlsen, T. G., Meyer, M. K., Bogsted, M., Christiansen, G., Birkelund, S., Andersen, V. & Stensballe, A. 2017. Proteome Analysis of Rheumatoid Arthritis Gut Mucosa. *J Proteome Res*, 16, 346-354.
- Bohan, A. & Peter, J. B. 1975. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med*, 292, 344-7.
- Carbone, G., Wilson, A., Diehl, S. A., Bunn, J., Cooper, S. M. & Rincon, M. 2013. Interleukin-6 receptor blockade selectively reduces IL-21 production by CD4 T cells and IgG4 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Int J Biol Sci*, 9, 279-88.
- Cervera, R., Khamashta, M. A., Font, J., Sebastiani, G. D., Gil, A., Lavilla, P., Mejia, J. C., Aydinug, A. O., Chwalinska-Sadowska, H., De Ramon, E., Fernandez-Nebro, A., Galeazzi, M., Valen, M., Mathieu, A., Houssiau, F., Caro, N., Alba, P., Ramos-Casals, M., Ingelmo, M., Hughes, G. R. & European Working Party on Systemic Lupus, E. 2003. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)*, 82, 299-308.
- Chen, C., Grzegorzewski, K. J., Barash, S., Zhao, Q., Schneider, H., Wang, Q., Singh, M., Pukac, L., Bell, A. C., Duan, R., Coleman, T., Duttaroy, A., Cheng, S., Hirsch, J., Zhang, L., Lazard, Y., Fischer, C., Barber, M. C., Ma, Z. D., Zhang, Y. Q., Reavey, P., Zhong, L., Teng, B., Sanyal, I., Ruben, S. M., Blondel, O. & Birse, C. E. 2003. An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol*, 21, 294-301.
- Chung, L., Farber, H. W., Benza, R., Miller, D. P., Parsons, L., Hassoun, P. M., Mcgoon, M., Nicolls, M. R. & Zamanian, R. T. 2014. Unique predictors of mortality in patients with pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis in the REVEAL registry. *Chest*, 146, 1494-1504.

- Chung, L., Liu, J., Parsons, L., Hassoun, P. M., Mcgoon, M., Badesch, D. B., Miller, D. P., Nicolls, M. R. & Zamanian, R. T. 2010. Characterization of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension from REVEAL: identifying systemic sclerosis as a unique phenotype. *Chest*, 138, 1383-94.
- Clavel, C., Nogueira, L., Laurent, L., Iobagiu, C., Vincent, C., Sebbag, M. & Serre, G. 2008. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum*, 58, 678-88.
- Clements, P. J., Tan, M., McLaughlin, V. V., Oudiz, R. J., Tapson, V. F., Channick, R. N., Rubin, L. J., Langer, A. & Investigators, P. A. H. Q. E. R. I. P.-Q. 2012. The pulmonary arterial hypertension quality enhancement research initiative: comparison of patients with idiopathic PAH to patients with systemic sclerosis-associated PAH. *Ann Rheum Dis*, 71, 249-52.
- Condliffe, R., Kiely, D. G., Peacock, A. J., Corris, P. A., Gibbs, J. S., Vrapic, F., Das, C., Elliot, C. A., Johnson, M., Desoyza, J., Torpy, C., Goldsmith, K., Hodgkins, D., Hughes, R. J., Pepke-Zaba, J. & Coghlan, J. G. 2009. Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era. *Am J Respir Crit Care Med*, 179, 151-7.
- Corsiero, E., Bombardieri, M., Carlotti, E., Pratesi, F., Robinson, W., Migliorini, P. & Pitzalis, C. 2016. Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs. *Ann Rheum Dis*, 75, 1866-75.
- Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S. & Price, D. 2013. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des*, 81, 136-47.
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J. & Bailly, S. 2007. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 109, 1953-61.
- Desbois, A. C. & Cacoub, P. 2016. Systemic sclerosis: An update in 2016. *Autoimmun Rev*, 15, 417-26.
- Ducy, P. & Karsenty, G. 2000. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*, 57, 2207-14.

- Elhai, M., Avouac, J., Walker, U. A., Matucci-Cerinic, M., Riemekasten, G., Airo, P., Hachulla, E., Valentini, G., Carreira, P. E., Cozzi, F., Balbir Gurman, A., Braun-Moscovici, Y., Damjanov, N., Ananieva, L. P., Scorza, R., Jimenez, S., Busquets, J., Li, M., Muller-Ladner, U., Kahan, A., Distler, O., Allanore, Y. & Co-Authors, E. 2016. A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Ann Rheum Dis*, 75, 163-9.
- Fan, M. H., Feghali-Bostwick, C. A. & Silver, R. M. 2014. Update on scleroderma-associated interstitial lung disease. *Curr Opin Rheumatol*, 26, 630-6.
- Fisher, M. R., Mathai, S. C., Champion, H. C., Girgis, R. E., Houston-Harris, T., Hummers, L., Krishnan, J. A., Wigley, F. & Hassoun, P. M. 2006. Clinical differences between idiopathic and scleroderma-related pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum*, 54, 3043-50.
- Fonseca, S. B., Pereira, M. P. & Kelley, S. O. 2009. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 953-64.
- Foocharoen, C., Pussadhamma, B., Mahakkanukrauh, A., Suwannaroj, S. & Nanagara, R. 2015. Asymptomatic cardiac involvement in Thai systemic sclerosis: prevalence and clinical correlations with non-cardiac manifestations (preliminary report). *Rheumatology (Oxford)*, 54, 1616-21.
- Foveau, B., LeRoy, C., Ancot, F., Deheuninck, J., Ji, Z., Fafeur, V. & Tulasne, D. 2007. Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ*, 14, 752-64.
- Galie, N., Humbert, M., Vachiery, J. L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Vonk Noordegraaf, A., Beghetti, M., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M. A., Hansmann, G., Klepetko, W., Lancellotti, P., Matucci, M., McDonagh, T., Pierard, L. A., Trindade, P. T., Zompatori, M. & Hoeper, M. 2015. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint 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: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society

- for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J*, 46, 903-75.
- Gazdhar, A., Temuri, A., Knudsen, L., Gugger, M., Schmid, R. A., Ochs, M. & Geiser, T. 2013. Targeted gene transfer of hepatocyte growth factor to alveolar type II epithelial cells reduces lung fibrosis in rats. *Hum Gene Ther*, 24, 105-16.
- Gonzalez-Nunez, M., Munoz-Felix, J. M. & Lopez-Novoa, J. M. 2013. The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochim Biophys Acta*, 1832, 1492-510.
- Gregory, A. L., Xu, G., Sotov, V. & Letarte, M. 2014. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta*, 35 Suppl, S93-9.
- Hachulla, A. L., Launay, D., Gaxotte, V., De Groote, P., Lamblin, N., Devos, P., Hatron, P. Y., Beregi, J. P. & Hachulla, E. 2009. Cardiac magnetic resonance imaging in systemic sclerosis: a cross-sectional observational study of 52 patients. *Ann Rheum Dis*, 68, 1878-84.
- Hachulla, E., Gressin, V., Guillevin, L., Carpentier, P., Diot, E., Sibilia, J., Kahan, A., Cabane, J., Franc S, C., Launay, D., Mouthon, L., Allanore, Y., Tiev, K. P., Clerson, P., De Groote, P. & Humbert, M. 2005. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum*, 52, 3792-800.
- Hashizume, M. & Mihara, M. 2011. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*, 2011, 765624.
- Hesselstrand, R., Scheja, A., Wuttge, D. M., Arheden, H. & Ugander, M. 2011. Enlarged right-sided dimensions and fibrosis of the right ventricular insertion point on cardiovascular magnetic resonance imaging is seen early in patients with pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. *Scand J Rheumatol*, 40, 133-8.
- Hopp, T. P. & Woods, K. R. 1983. A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Mol Immunol*, 20, 483-9.
- Hunter, C. A. & Jones, S. A. 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*, 16, 448-57.
- Inoue, T., Okada, H., Kobayashi, T., Watanabe, Y., Kanno, Y., Kopp, J. B., Nishida, T., Takigawa, M., Ueno, M., Nakamura, T. & Suzuki, H. 2003. Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor-beta1, through attenuation of connective tissue growth factor induction, and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. *FASEB J*,

- 17, 268-70.
- Ishida, W., Mori, Y., Lakos, G., Sun, L., Shan, F., Bowes, S., Josiah, S., Lee, W. C., Singh, J., Ling, L. E. & Varga, J. 2006. Intracellular TGF-beta receptor blockade abrogates Smad-dependent fibroblast activation in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*, 126, 1733-44.
- Kang, Q., Sun, M. H., Cheng, H., Peng, Y., Montag, A. G., Deyrup, A. T., Jiang, W., Luu, H. H., Luo, J., Szatkowski, J. P., Vanichakarn, P., Park, J. Y., Li, Y., Haydon, R. C. & He, T. C. 2004. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther*; 11, 1312-20.
- Kasitanon, N., Magder, L. S. & Petri, M. 2006. Predictors of survival in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)*, 85, 147-56.
- Kawaguchi, Y., Harigai, M., Hara, M., Fukasawa, C., Takagi, K., Tanaka, M., Tanaka, E., Nishimagi, E. & Kamatani, N. 2002. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor (c-met) in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*, 29, 1877-83.
- Kawut, S. M., Taichman, D. B., Archer-Chicko, C. L., Palevsky, H. I. & Kimmel, S. E. 2003. Hemodynamics and survival in patients with pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis. *Chest*, 123, 344-50.
- Kelemen, B. W., Mathai, S. C., Tedford, R. J., Damico, R. L., Corona-Villalobos, C., Kolb, T. M., Chaisson, N. F., Harris, T. H., Zimmerman, S. L., Kamel, I. R., Kass, D. A. & Hassoun, P. M. 2015. Right ventricular remodeling in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension: two distinct phenotypes. *Pulm Circ*, 5, 327-34.
- Kim, W. H., Matsumoto, K., Bessho, K. & Nakamura, T. 2005. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol*, 166, 1017-28.
- Kitani, A., Fuss, I., Nakamura, K., Kumaki, F., Usui, T. & Strober, W. 2003. Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *J Exp Med*, 198, 1179-88.
- Lambova, S. 2014. Cardiac manifestations in systemic sclerosis. *World J Cardiol*, 6, 993-1005.

- Launay, D., Sitbon, O., Le Pavec, J., Savale, L., Tch Rakian, C., Ya Ci, A., Achouh, L., Parent, F., Jais, X., Simonneau, G. & Humbert, M. 2010. Long-term outcome of systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension treated with bosentan as first-line monotherapy followed or not by the addition of prostanoids or sildenafil. *Rheumatology (Oxford)*, 49, 490-500.
- Lefebvre, J., Muharram, G., LeRoy, C., Kherrouche, Z., Montagne, R., Ichim, G., Tauszig-Delamasure, S., Chotteau-Lelievre, A., Brenner, C., Mehlen, P. & Tulasne, D. 2013. Caspase-generated fragment of the Met receptor favors apoptosis via the intrinsic pathway independently of its tyrosine kinase activity. *Cell Death Dis*, 4, e871.
- LeRoy, E. C. & Medsger, T. A., Jr. 2001. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*, 28, 1573-6.
- Li, M., Krishnaveni, M. S., Li, C., Zhou, B., Xing, Y., Banfalvi, A., Li, A., Lombardi, V., Akbari, O., Borok, Z. & Minoo, P. 2011. Epithelium-specific deletion of TGF-beta receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, 121, 277-87.
- Li, Y., Yang, J., Luo, J. H., Dedhar, S. & Liu, Y. 2007. Tubular epithelial cell dedifferentiation is driven by the helix-loop-helix transcriptional inhibitor Id1. *J Am Soc Nephrol*, 18, 449-60.
- Lopez-Coviella, I., Berse, B., Krauss, R., Thies, R. S. & Blusztajn, J. K. 2000. Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science*, 289, 313-6.
- Lu, M. C., Lai, N. S., Yin, W. Y., Yu, H. C., Huang, H. B., Tung, C. H., Huang, K. Y. & Yu, C. L. 2013. Anti-citrullinated protein antibodies activated ERK1/2 and JNK mitogen-activated protein kinases via binding to surface-expressed citrullinated GRP78 on mononuclear cells. *J Clin Immunol*, 33, 558-66.
- Ma, J., Zou, C., Guo, L., Seneviratne, D. S., Tan, X., Kwon, Y. K., An, J., Bowser, R., Defrances, M. C. & Zarnegar, R. 2014. Novel Death Defying Domain in Met entraps the active site of caspase-3 and blocks apoptosis in hepatocytes. *Hepatology*, 59, 2010-21.
- Maecker, H. T., McCoy, J. P. & Nussenblatt, R. 2012. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*, 12, 191-200.
- Majumdar, M. K., Wang, E. & Morris, E. A. 2001. BMP-2 and BMP-9 promotes

- chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol*, 189, 275-84.
- Mankia, K. & Emery, P. 2015. Is localized autoimmunity the trigger for rheumatoid arthritis? Unravelling new targets for prevention. *Discov Med*, 20, 129-35.
- Martinez, M. N. 1998. Use of pharmacokinetics in veterinary medicine. Article. II: Volume, clearance, and half-life. *J Am Vet Med Assoc*, 213, 1122-7.
- McInnes, I. B. & SCHETT, G. 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 365, 2205-19.
- Medici, D., HAY, E. D. & OLSEN, B. R. 2008. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell*, 19, 4875-87.
- Miyakis, S., Lockshin, M. D., Atsumi, T., Branch, D. W., Brey, R. L., Cervera, R., Derksen, R. H., De Groot, P. G., Koike, T., Meroni, P. L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P. G. & Krilis, S. A. 2006. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*, 4, 295-306.
- Mizuno, S., Matsumoto, K., Li, M. Y. & Nakamura, T. 2005. HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J*, 19, 580-2.
- Morris, E., Chrobak, I., Bujor, A., Hant, F., Mummery, C., Ten Dijke, P. & Trojanowska, M. 2011. Endoglin promotes TGF-beta/Smad1 signaling in scleroderma fibroblasts. *J Cell Physiol*, 226, 3340-8.
- Moura, R. A., Quaresma, C., Vieira, A. R., Goncalves, M. J., Polido-Pereira, J., Romao, V. C., Martins, N., Canhao, H. & Fonseca, J. E. 2017. B-cell phenotype and IgD-CD27- memory B cells are affected by TNF-inhibitors and tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 12, e0182927.
- Mukerjee, D., ST George, D., Coleiro, B., Knight, C., Denton, C. P., Davar, J., Black, C. M. & Coghlan, J. G. 2003. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis*, 62, 1088-93.

- Munoz-Felix, J. M., Cuesta, C., Perretta-Tejedor, N., Subileau, M., Lopez-Hernandez, F. J., Lopez-Novoa, J. M. & Martinez-Salgado, C. 2016. Identification of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) as a novel profibrotic factor in vitro. *Cell Signal*, 28, 1252-61.
- Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. & Kishimoto, T. 1988. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med*, 167, 332-44.
- Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T. & Matsumoto, K. 2011. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 Suppl 1, 188-202.
- Okazaki, S., Ogawa, F., Iwata, Y., Hara, T., Muroi, E., Komura, K., Takenaka, M., Shimizu, K., Hasegawa, M., Fujimoto, M. & Sato, S. 2010. Autoantibody against caspase-3, an executioner of apoptosis, in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int*, 30, 871-8.
- Ortega-Hernandez, O. D. & Shoenfeld, Y. 2012. Mixed connective tissue disease: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 26, 61-72.
- Pannu, J., Asano, Y., Nakerakanti, S., Smith, E., Jablonska, S., Blaszczyk, M., Ten Dijke, P. & Trojanowska, M. 2008. Smad1 pathway is activated in systemic sclerosis fibroblasts and is targeted by imatinib mesylate. *Arthritis Rheum*, 58, 2528-37.
- Petri, M., Orbai, A. M., Alarc N, G. S., Gordon, C., Merrill, J. T., Fortin, P. R., Bruce, I. N., Isenberg, D., Wallace, D. J., Nived, O., Sturfelt, G., Ramsey-Goldman, R., Bae, S. C., Hanly, J. G., Sanchez-Guerrero, J., Clarke, A., Aranow, C., Manzi, S., Urowitz, M., Gladman, D., Kalunian, K., Costner, M., Werth, V. P., Zoma, A., Bernatsky, S., Ruiz-Irastorza, G., Khamashta, M. A., Jacobsen, S., Buyon, J. P., Maddison, P., Dooley, M. A., Van Vollenhoven, R. F., Ginzler, E., Stoll, T., Peschken, C., Jorizzo, J. L., Callen, J. P., Lim, S. S., Fessler, B. J., Inanc, M., Kamen, D. L., Rahman, A., Steinsson, K., Franks, A. G., Sigler, L., Hameed, S., Fang, H., Pham, N., Brey, R., Weisman, M. H., McGwin, G. & Magder, L. S. 2012. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 64, 2677-86.
- Pons-Estel, G. J., Alarcon, G. S., Scofield, L., Reinlib, L. & Cooper, G. S. 2010.

- Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*, 39, 257-68.
- Rajaram, S., Swift, A. J., Capener, D., Elliot, C. A., Condliffe, R., Davies, C., Hill, C., Hurdman, J., Kidling, R., Akil, M., Wild, J. M. & Kiely, D. G. 2012. Comparison of the diagnostic utility of cardiac magnetic resonance imaging, computed tomography, and echocardiography in assessment of suspected pulmonary arterial hypertension in patients with connective tissue disease. *J Rheumatol*, 39, 1265-74.
- Richards, H. B., Satoh, M., Shaw, M., Libert, C., Poli, V. & Reeves, W. H. 1998. Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus. *J Exp Med*, 188, 985-90.
- Roll, P., Muhammad, K., Schumann, M., Kleinert, S., Einsele, H., Dorner, T. & Tony, H. P. 2011. In vivo effects of the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab on the B cell compartment. *Arthritis Rheum*, 63, 1255-64.
- Scott, L. J. 2017. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs*, 77, 1865-1879.
- Shehata, M. L., Lossnitzer, D., Skrok, J., Boyce, D., Lechtzin, N., Mathai, S. C., Girgis, R. E., Osman, N., Lima, J. A., Bluemke, D. A., Hassoun, P. M. & Vogel-Claussen, J. 2011. Myocardial delayed enhancement in pulmonary hypertension: pulmonary hemodynamics, right ventricular function, and remodeling. *AJR Am J Roentgenol*, 196, 87-94.
- Shetty, A., Hanson, R., Korsten, P., Shawagfeh, M., Arami, S., Volkov, S., Vila, O., Swedler, W., Shunaigat, A. N., Smadi, S., Sawaqed, R., Perkins, D., Shahrara, S. & Sweiss, N. J. 2014. Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond. *Drug Des Devel Ther*, 8, 349-64.
- Shiboski, S. C., Shiboski, C. H., Criswell, L., Baer, A., Challacombe, S., Lanfranchi, H., Schiodt, M., Umehara, H., Vivino, F., Zhao, Y., Dong, Y., Greenspan, D., Heidenreich, A. M., Helin, P., Kirkham, B., Kitagawa, K., Larkin, G., Li, M., Lietman, T., Lindegaard, J., Mcnamara, N., Sack, K., Shirlaw, P., Sugai, S., Vollenweider, C., Witcher, J., Wu, A., Zhang, S., Zhang, W., Greenspan, J., Daniels, T. & Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance Research, G. 2012. American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjogren's International

- Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 64, 475-87.
- Shukla, M. N., Rose, J. L., Ray, R., Lathrop, K. L., Ray, A. & Ray, P. 2009. Hepatocyte growth factor inhibits epithelial to myofibroblast transition in lung cells via Smad7. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40, 643-53.
- Sime, P. J. & O'Reilly, K. M. 2001. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol*, 99, 308-19.
- Simonneau, G., Gatzoulis, M. A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M. A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R. F., Olschewski, H., Robbins, I. M. & Souza, R. 2013. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62, D34-41.
- Skead, G. & Govender, D. 2015. Gene of the month: MET. *J Clin Pathol*, 68, 405-9.
- Slee, E. A., Adrain, C. & Martin, S. J. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 7320-6.
- Smolen, J. S., Aletaha, D., Koeller, M., Weisman, M. H. & Emery, P. 2007. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*, 370, 1861-74.
- Souto-Carneiro, M. M., Mahadevan, V., Takada, K., Fritsch-Stork, R., Nanki, T., Brown, M., Fleisher, T. A., Wilson, M., Goldbach-Mansky, R. & Lipsky, P. E. 2009. Alterations in peripheral blood memory B cells in patients with active rheumatoid arthritis are dependent on the action of tumour necrosis factor. *Arthritis Res Ther*, 11, R84.
- Swift, A. J., Rajaram, S., Condliffe, R., Capener, D., Hurdman, J., Elliot, C. A., Wild, J. M. & Kiely, D. G. 2012. Diagnostic accuracy of cardiovascular magnetic resonance imaging of right ventricular morphology and function in the assessment of suspected pulmonary hypertension results from the ASPIRE registry. *J Cardiovasc Magn Reson*, 14, 40.
- Swift, A. J., Rajaram, S., Hurdman, J., Hill, C., Davies, C., Sproson, T. W., Morton, A. C., Capener, D., Elliot, C., Condliffe, R., Wild, J. M. & Kiely, D. G. 2013. Noninvasive estimation of PA pressure, flow, and resistance with CMR imaging: derivation and prospective validation study from the ASPIRE registry. *JACC Cardiovasc Imaging*, 6, 1036-47.

- Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin, P. J., Cofield, R. H., O'Fallon, W. M., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. 2001. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol*, 167, 1072-80.
- Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., Mcshane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N. & Winchester, R. J. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 25, 1271-7.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Ogata, A. & Kishimoto, T. 2014. A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. *Semin Immunol*, 26, 88-96.
- Tedford, R. J., Mudd, J. O., Girgis, R. E., Mathai, S. C., Zaiman, A. L., Houston-Harris, T., Boyce, D., Kelemen, B. W., Bacher, A. C., Shah, A. A., Hummers, L. K., Wigley, F. M., Russell, S. D., Sagggar, R., Sagggar, R., Maughan, W. L., Hassoun, P. M. & Kass, D. A. 2013. Right ventricular dysfunction in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Circ Heart Fail*, 6, 953-63.
- Trabuco, L. G., Lise, S., Petsalaki, E. & Russell, R. B. 2012. PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic Acids Res*, 40, W423-7.
- Truksa, J., Peng, H., Lee, P. & Beutler, E. 2006. Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10289-93.
- Tyndall, A. J., Bannert, B., Vonk, M., Airo, P., Cozzi, F., Carreira, P. E., Bancel, D. F., Allanore, Y., Muller-Ladner, U., Distler, O., Iannone, F., Pellerito, R., Pileckyte, M., Miniati, I., Ananieva, L., Gurman, A. B., Damjanov, N., Mueller, A., Valentini, G., Riemekasten, G., Tikly, M., Hummers, L., Henriques, M. J., Caramaschi, P., Scheja, A., Rozman, B., Ton, E., Kumanovics, G., Coleiro, B., Feierl, E., Szucs, G., Von Muhlen, C. A., Riccieri, V., Novak, S., Chizzolini, C., Kotulska, A., Denton, C., Coelho, P. C., Kotter, I., Simsek, I., De La Pena Lefebvre, P. G., Hachulla, E., Seibold, J. R., Rednic, S., Stork, J., Morovic-Vergles, J. & Walker, U. A. 2010. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis*, 69, 1809-15.
- van den Broek, M., Dirven, L., Klarenbeek, N. B., Molenaar, T. H., Han, K. H.,

- Kerstens, P. J., Huizinga, T. W., Dijkmans, B. A. & Allaart, C. F. 2012. The association of treatment response and joint damage with ACPA-status in recent-onset RA: a subanalysis of the 8-year follow-up of the BeSt study. *Ann Rheum Dis*, 71, 245-8.
- van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S. R., Baron, M., Tyndall, A., Matucci-Cerinic, M., Naden, R. P., Medsger, T. A., Jr., Carreira, P. E., Riemekasten, G., Clements, P. J., Denton, C. P., Distler, O., Allanore, Y., Furst, D. E., Gabrielli, A., Mayes, M. D., van Laar, J. M., Seibold, J. R., Czirjak, L., Steen, V. D., Inanc, M., Kowal-Bielecka, O., Muller-Ladner, U., Valentini, G., Veale, D. J., Vonk, M. C., Walker, U. A., Chung, L., Collier, D. H., Csuka, M. E., Fessler, B. J., Guiducci, S., Herrick, A., Hsu, V. M., Jimenez, S., Kahaleh, B., Merkel, P. A., Sierakowski, S., Silver, R. M., Simms, R. W., Varga, J. & Pope, J. E. 2013. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 65, 2737-47.
- van Oosterhout, M., Bajema, I., Levarht, E. W., Toes, R. E., Huizinga, T. W. & van Laar, J. M. 2008. Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 58, 53-60.
- Varshavsky, A. 1997. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells*, 2, 13-28.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. & Khrestchatisky, M. 2010. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today*, 15, 40-56.
- Vonk-Noordegraaf, A., Haddad, F., Chin, K. M., Forfia, P. R., Kawut, S. M., Lumens, J., Naeije, R., Newman, J., Oudiz, R. J., Provencher, S., Torbicki, A., Voelkel, N. F. & Hassoun, P. M. 2013. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol*, 62, D22-33.
- Wei, J., Bhattacharyya, S., Tourtellotte, W. G. & Varga, J. 2011. Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmun Rev*, 10, 267-75.
- Willis, B. C. & Borok, Z. 2007. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol*

Physiol, 293, L525-34.

Wollheim, F. A. 2005. Classification of systemic sclerosis. Visions and reality.
Rheumatology (Oxford), 44, 1212-6.