



Title	全身性エリテマトーデスにおける臓器病変の病態解明の研究
Author(s)	清水, 裕香
Description	配架番号 : 2298
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12557号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12557
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70050
Type	doctoral thesis
File Information	Yuka_Shimizu.pdf



学位論文

全身性エリテマトーデスにおける臓器病変の
病態解明の研究

**(Pathogenesis of
Systemic Lupus Erythematosus)**

2017 年 3 月

北海道大学

清水 裕香

Yuka Shimizu

学位論文

全身性エリテマトーデスにおける臓器病変の
病態解明の研究

**(Pathogenesis of
Systemic Lupus Erythematosus)**

2017 年 3 月

北海道大学

清水 裕香

Yuka Shimizu

目次

発表論文目録及び学会発表目録.....	1
1. 緒言.....	3
2. 略語表.....	4
3. 第一章.....	6
SLEにおける高用量ステロイド投与時に発症した精神神経症状の解析.....	6
3.1 背景.....	7
3.1.1 精神神経ループス.....	7
3.1.2 ステロイド精神病.....	7
3.2 対象と方法.....	9
3.2.1 研究デザイン.....	9
3.2.2 対象、および主要評価項目.....	9
3.2.3 精神神経症状の評価.....	10
3.2.4 患者背景, 臨床データ, 疾患活動性の評価.....	10
3.2.5 神経学的検査所見.....	10
3.2.6 SLE 患者における治療効果および予後.....	11
3.2.7 統計解析.....	11
3.3 結果.....	12
3.3.1 PSNP 発症頻度 (SLE 群 vs. 非 SLE 全身性自己免疫疾患群).....	12
3.3.2 SLE 患者における PSNP 発症のリスクファクター解析.....	15
3.3.3 PSNP-SLE 群と <i>de novo</i> NPSLE 群における臨床所見比較.....	20
3.3.4 神経学的検査所見 (PSNP-SLE 群 vs. <i>de novo</i> NPSLE 群).....	22
3.3.5 精神神経症状に対する治療および臨床経過 (PSNP-SLE 群 vs. <i>de novo</i> NPSLE 群).....	24
3.3.6 精神神経症状の予後 (PSNP-SLE 群 vs. <i>de novo</i> NPSLE 群).....	27
3.4 考察.....	29

4. 第二章.....	32
SLE 患者の末梢血 T 細胞における発現異常遺伝子についての解析.....	32
4.1 背景	33
4.1.1 SLE におけるバイオマーカー、疾患活動性マーカー.....	33
4.1.2 SLE における T 細胞のシグナル伝達異常.....	34
4.2 目的.....	35
4.3 SLE 患者の末梢血 T 細胞における遺伝子発現の網羅的解析.....	35
4.3.1 方法	35
4.3.2 対象患者	35
4.3.3 結果 -SLE 患者末梢血 T 細胞における遺伝子発現の網羅的解析-.....	37
4.4 SLE 患者の末梢血 T 細胞における Mx1 遺伝子発現量	40
4.4.1 方法	40
4.4.2 統計学的解析.....	40
4.4.3 対象患者	41
4.4.4 結果 - SLE 患者の末梢血 T 細胞における Mx1, RGS1 遺伝子発現量-	41
4.5 考察	46
5. 第三章.....	48
精神神経ループスと Myxovirus Resistance Protein 1 (Mx1) の関連性の検討.....	48
5.1 背景	49
5.2 目的.....	49
5.3 Mx1 免疫組織化学染色 -予備実験-	50
5.3.1 HEK-293 細胞を用いた Mx1 のトランスフェクション	50
5.3.2 Mx1 をトランスフェクトされた HEK-293 細胞の免疫組織学染色.....	50
5.4 NPSLE と Mx1 の関連性の検討.....	52
5.4.1 対象と方法.....	52

5.4.1.1	研究デザイン	52
5.4.1.2	評価項目	52
5.4.1.3	NPSLE 剖検患者における脳組織の Mx1 免疫組織化学染色	52
5.4.1.4	統計学的解析	53
5.4.2	結果	54
5.4.2.1	対象患者	54
5.4.2.2	血清 Mx1 濃度	56
5.4.2.3	髄液 Mx1 濃度	57
5.4.2.4	血清 Mx1 濃度と髄液 Mx1 濃度の関係	59
5.4.2.5	SLE 群の同一患者内における血清 Mx1 濃度と髄液 Mx1 濃度の関係	60
5.4.2.6	SLE 群における血清、髄液 Mx1 濃度と臨床パラメータとの関係	61
5.4.2.7	NPSLE 群における血清、髄液 Mx1 濃度と臨床パラメータとの関係	62
5.4.2.8	NPSLE 剖検例における病変脳組織の Mx1 免疫組織化学染色	63
5.4.3	他の自己免疫疾患群における血清 Mx1 濃度	65
5.4.4	血清 Mx1 濃度とリウマチ因子の関係	66
5.5	考察	67
6.	第四章	68
	ループス腎炎と Myxovirus Resistance Protein 1 (Mx1) の関連性の検討	68
6.1	背景	69
6.2	目的	70
6.3	ヒト Mx1 Sandwich ELISA 構築 -予備実験-	71
6.3.1	ヒト Mx1 Sandwich ELISA 法の抗体条件検討	71
6.3.2	ヒト Mx1 Sandwich ELISA 法 プロトコール	71
6.4	ループス腎炎患者における Mx1 発現の検討	73
6.4.1	方法	73
6.4.1.1	PBMC 採取	73

6.4.1.2	Sandwich ELISA 法による PBMC における Mx1 蛋白濃度解析	74
6.4.1.3	腎生検組織サンプル	74
6.4.1.4	腎生検残余腎組織における Mx1 免疫組織化学染色	74
6.4.1.6	統計学的解析	76
6.4.2	結果	77
6.4.2.1	対象患者	77
6.4.2.2	PBMC における Mx1 蛋白濃度 - ELISA -	81
6.4.2.3	PBMC の Mx1 蛋白濃度と臨床パラメータ相関関係	83
6.4.2.4	腎組織における Mx1 免疫組織化学染色	85
6.4.2.5	ループス腎炎の腎組織における免疫抑制療法開始前後での Mx1 免疫組織化学染色	89
6.4.2.6	ループス腎炎腎組織における Mx1 免疫組織化学染色の糸球体領域、尿細管領域の相関	92
6.4.2.7	ループス腎炎 ISN/RPS class 分類別の Mx1 免疫組織化学染色	93
6.4.2.8	ループス腎炎における Mx1 免疫組織化学染色と臨床パラメータとの相関関係	94
6.5	考察	97
7.	総括及び結論	99
8.	謝辞	100
9.	引用文献	102

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yuka Shimizu, Shinsuke Yasuda, Yuki Kako, Shin Nakagawa, Masatoshi Kanda, Ryo Hisada, Kazumasa Ohmura, Sanae Shimamura, Haruki Shida, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Tetsuya Horita, Ichiro Kusumi, Tatsuya Atsumi, Post-steroid neuropsychiatric manifestations are significantly more frequent in SLE compared with other systemic autoimmune diseases and predict better prognosis compared with *de novo* Neuropsychiatric SLE, *Autoimmunity Reviews*. 2016;15(8):786-94.
2. Yuka Shimizu, Shinsuke Yasuda, Taichi Kimura, Hiroshi Nishihara, Saori Nishio, Kazumasa Ohmura, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Tetsuya Horita, Yuichiro Fukasawa, Shinya Tanaka, Tatsuya Atsumi, Expression of Interferon-Inducible Mx1 Protein in Renal Tissues in Patients with Lupus Nephritis, *Arthritis & Rheumatology*, 2016, submitted

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yuka Shimizu, Tatsuya Atsumi, Yuichiro Fujieda, Michihito Kohno, Yusaku Kanetsuka, Takashi Kurita, Toshio Odani, Masaru Kato, Kotaro Otomo, Shinji Fukaya, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Tsuyoshi Takeda, Takao Koike. “Post-steroid neuropsychiatric manifestations in patients with systemic lupus erythematosus” EULAR Annual European Congress of Rheumatology 2011, London, United Kingdom. 25-28 May, 2011.
2. 清水裕香, 渥美達也, 藤枝雄一郎, 河野通仁, 金塚雄作, 栗田崇史, 小谷俊雄, 加藤将, 大友耕太郎, 深谷進司, 保田晋助, 堀田哲也, 小池隆夫: 「高用量ステロイド投与時に発症した精神神経症状の検討」 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 2011年7月17-20日
3. Yuka Shimizu, Shinsuke Yasuda, Kanae Akita, Kazuma Omura, Masatoshi Kanda, Tomoko Fukui, Ikuma Nakagawa, Atushi Noguchi, Haruki Shida, Toshiyuki Watanabe,

Michihito Kono, Takashi Kurita, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Tetsuya Horita, Tatsuya Atsumi. "Post-steroid neuropsychiatric manifestations in patients with systemic lupus erythematosus" The 16th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Cebu, the Philippines, 1-5 April, 2014.

4. 清水裕香, 保田晋助, 栗田崇史, 大村一将, 秋田佳奈恵, 福井智子, 神田真聡, 中川育磨, 野口淳史, 志田玄貴, 渡邊俊之, 河野通仁, 奥 健志, 坊垣暁之, 堀田哲也, 渥美達也 : 「高用量ステロイド投与時に発症した精神神経症状の解析」第 58 回 日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2014 年 4 月 24-26 日
5. 清水裕香, 保田晋助, 栗田崇史, 久田諒, 菅原恵理, 嶋村抄苗, 神田真聡, 大村一将, 福井智子, 中川育磨, 野口淳史, 志田玄貴, 渡邊俊之, 河野通仁, 奥健志, 坊垣暁之, 堀田哲也, 渥美達也 : 「精神神経ループスにおける Mx1 の解析」第 42 回日本臨床免疫学会, 東京, 2014 年 9 月 25-27 日
6. Yuka Shimizu, Shinsuke Yasuda, Takashi Kurita, Sanae Shimamura, Ikuma Nakagawa, Atsushi Noguchi, Haruki Shida, Toshiyuki Watanabe, Michihito Kono, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tetsuya Horita, Tatsuya Atsumi. Upregulation of Mx1 (Myxovirus Resistance Protein 1) in patients with Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus. American College of Rheumatology Annual Meeting 2014, Boston, USA, 6-11 November, 2014.
7. Shinsuke Yasuda, Yuka Shimizu, Masatoshi Kanda, Michihiro Kono, Hiroyuki Nakamura, Ryo Hisada, Kazumasa Omura, Sanae Shimamura, Haruki Shida, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Tetsuya Horita, Tatsuya Atsumi. "Post-steroid neuropsychiatric manifestations are specific to SLE and predict better prognosis than de novo NPSLE" The 10th International Congress of Autoimmunity, Leipzig, Germany, 6-10 April, 2016.
8. 清水裕香, 保田晋助, 河野通大, 中村浩之, 久田諒, 大村一将, 嶋村抄苗, 志田玄貴, 加藤将, 奥健志, 坊垣暁之, 堀田哲也, 渥美達也 : 「高用量ステロイド投与時に発症した全身性エリテマトーデスにおける精神神経症状の解析」第 60 回 日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜, 2016 年 4 月 21-23 日

1. 緒言

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) は抗核抗体, 抗 DNA 抗体, 抗 U1-RNP 抗体, 抗 Sm 抗体などの多彩な自己抗体産生および免疫複合体の沈着に特徴づけられ、妊娠可能年齢の女性に多く発症する原因不明の全身性自己免疫疾患である。SLE の症状や重症度は症例毎に異なっており、その臓器障害も多岐にわたる^{1,2}。予後に関して、副腎皮質ステロイドが使用される以前は 50%程度であったが、近年では 10 年生存率が 90%程度と報告されており、全身倦怠感, 発熱, 皮疹, 関節炎などの一般的な症状のみを認める軽症例も多い。一方、重症例では腎病変, 中枢神経病変, 心病変, 肺臓炎, 漿膜炎, 血管炎などを合併する。ループス腎炎は SLE の経過中に 40~80%に発症し、精神神経ループス (neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: NPSLE) は 30~40%に発症するが、これら重症臓器病変は患者の QOL を著しく低下させ、予後不良な病態である^{3,4}。

SLE の発症過程では、遺伝的素因に加え、喫煙, ウイルス感染, 性ホルモン, 紫外線, 薬物などの環境因子が加わり、自己免疫現象が成立すると考えられている。自己反応性 T 細胞の出現, 多クローン性の B 細胞活性化, 抗 DNA 抗体をはじめとする自己抗体産生, 免疫複合体の形成, 補体系の活性化などが炎症を惹起し、臓器組織障害をきたす。その SLE の病態形成に重要な役割を果たす因子として、I 型インターフェロン (IFN) である IFN α の形質細胞様樹状細胞 (pDC) からの過剰産生が報告されている^{5,6}。そして、SLE 患者ではこの IFN 誘導遺伝子群が高発現している^{7,8}。IFN α により単球やマクロファージからの B cell Activating Factor (BAFF) 産生の誘導⁹やエフェクター T 細胞の活性化が起こる。また、SLE では T 細胞におけるシグナル伝達異常も多く報告されている¹⁰。さらに、核酸を含む免疫複合体により NETosis を起こした好中球から NETs (Neutrophil Extracellular Traps) が形成され、SLE の病態形成に関与することも報告されている^{11,12}。

治療に関しては、副腎皮質ステロイドや各種免疫抑制剤など治療ターゲットが必ずしも明確でない非特異的治療薬が用いられてきた。近年では T 細胞, B 細胞, BAFF¹³, IFN α ¹⁴ を治療標的とした治療研究が行われてきているが、疾患の多様性やエンドポイント設定の難しさから、これまでに抗 BAFF 抗体である belimumab が海外で承認に至るにとどまっている。SLE の heterogeneity という疾患特徴のため、各臓器障害における明確な重症度評価基準, 治療判断基準は存在せず、治療に難渋する症例は少なくない。SLE の予後を改善する上で、病態解明, 明確な評価マーカーの開発, 治療方針の確立は重要な課題である。

2. 略語表

本文中のおよび図中で使用した略語は以下の通りである.

AAV	ANCA-associated vasculitis
ACR	American College of Rheumatology
ACS	acute confusional state
ANA	anti-nuclear antibody
ANCA	anti-neutrophil cytoplasmic antibody
AOSD	adult onset Still's disease
aPBSCT	auto peripheral blood stem cell transplantation
aPLs	anti-phospholipid antibodies
APS	antiphospholipid syndrome
aPS/PT	phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody
BAFF	B cell Activating Factor
BBB	blood brain barrier
BILAG	British Isles Lupus Assessment Group
BSA	bovine serum albumin
CI	confidence interval
CIDP	corticosteroid-induced psychiatric disorders
CS	corticosteroid
CyA	cyclosporine
DD	degenerative disease
DHEA	dehydroepiandrosterone
DHEA-S	dehydroepiandrosterone sulfate
EEG	electroencephalogram
EGPA	eosinophilic granulomatosis with polyangiitis
FcR γ	γ chain of the Fc receptor
GPA	granulomatosis with polyangiitis
IFN	interferon
IgAN	IgA nephropathy
IQR	interquartile range
ISN/RPS	International Society of Nephrology and Renal Pathology Society
ISs	immunosuppressants
IVCY	intravenous cyclophosphamide

LN	lupus nephritis
MMF	mycophenolate mophetil
MPA	microscopic polyangitis
mPSL	methylprednisolone pulse
MRI	magnetic resonance image
MS	multiple sclerosis
Mx1	Myxovirus Resistance Protein 1
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NPSLE	neuropsychiatric systemic lupus erythematosus
OR	Odds Ratio
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
pDC	plasmacytoid dendritic cells
PEX	plasma exchange
PM/DM	polymyositis/dermatomyositis
PN	polyarteritis nodosa
PSL	prednisolone
PSNP	post-steroid neuropsychiatric disease
RA	rheumatoid arthoritis
RF	rheumatoid factor
RGS1	Regulator of G-protein Signaling 1
RTX	rituximab
RQ	relative quqntification
SD	standard deviation
SLE	systemic lupus erythematosus
SLEDAI-2K	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000
SPECT	single photon emission computed tomography
SSc	systemic sclerosis
Syk	spreen thyrosine kinase
TAC	tacrolimus
TBS	tris-buffered saline
TMA	thrombotic microangiopathy
WHO	World Health Organazation
ZAP-70	z-associated protein-70
β2GP I	β2-glycoprotein I

3. 第一章

SLE における高用量ステロイド投与時に 発症した精神神経症状の解析

3.1 背景

3.1.1 精神神経ループス

精神神経ループス (neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: NPSLE) は SLE を基礎疾患として中枢神経, 末梢神経, 自律神経, 精神症状を呈する症候群であり、ループス腎炎とならぶ SLE の主要臓器障害のひとつである。SLE 患者の 30~40% に出現する重篤な臓器病変であり、患者の QOL を著しく低下させる。

アメリカリウマチ学会 (American College of Rheumatology: ACR) では 1999 年に NPSLE を 1. 中枢神経症候群, 2. 精神神経症候群, 3. 末梢神経症候群の 3 つのグループに分類し、さらに細かく臨床症状に応じて 19 項目に分類している¹⁵ が、MRI (magnetic resonance image), SPECT (single photon emission computed tomography), 脳波 (electroencephalogram: EEG), 髄液所見などの神経学的異常所見を含めた診断基準は確立していない。さらに、精神神経症状は感染症や代謝障害、ある種の薬剤によっても出現し、明らかな神経学的異常所見を認めない場合もある。SLE の治療薬である副腎皮質ステロイド投与によって時に引き起こされるステロイド精神病では NPSLE との鑑別が困難となる場合があり、SLE 患者に精神神経症状が出現した場合にはその診断、治療に難渋することが多い¹⁶。

NPSLE では血管炎, 血栓症, 血管内皮障害, 凝固異常, 動脈硬化, 抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies: aPLs) の関与による循環障害や神経細胞障害をきたす。その病態としては自己抗体, 自己反応性 T 細胞, 脳内で産生される炎症性サイトカイン, ケモカインが関与する炎症性障害, 血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) の破綻などの関与が想定されているが、依然として不明な点が多い。これまでに NPSLE の診断, 治療, 効果判定基準は確立されておらず、予後, 予後規定因子なども報告によって一定の見解を得ていない^{16,17}。

3.1.2 ステロイド精神病

精神神経症状は副腎皮質ステロイド投与によっても引き起こされ、1950 年代に関節リウマチに対して副腎皮質ステロイドが投与され始めた頃から、ステロイド関連

精神神経症状(corticosteroid-induced psychiatric disorders: CIDP) が報告されている¹⁸。最近の報告では、その発症頻度は副腎皮質ステロイド治療が行われる様々な疾患において、3~10%程度とされる^{19,20}。用量依存性に発症頻度は高くなり、とくに、プレドニゾロン (PSL) 40mg/日以上使用時に、ステロイド精神病が高頻度に発症するとされた¹⁹。副腎皮質ステロイドによる精神症状は非常に多彩であり、多幸感、不眠、易興奮性など軽度なものから、気分障害、精神病症状、せん妄、昏迷状態、認知障害、自殺企図など重度なものなど多岐にわたる。

SLE 患者では副腎皮質ステロイド治療を開始後に精神神経症状をはじめて発症する症例も存在し、ステロイド精神病との鑑別に難渋する。副腎皮質ステロイド投与後に発症した NPSLE ではさらに免疫抑制療法が必要であるため、副腎皮質ステロイドの減量を要するステロイド精神病との鑑別は極めて重要であるが、これらの病態や症状の異同についてを評価した報告は少ない。そこで、今回、副腎皮質ステロイド投与後に発症した精神神経症状を post-steroid neuropsychiatric disease (PSNP) と定義し、SLE 患者における PSNP 発症の実態を明らかにすることを目的として本研究を立案した。コントロール群として、非 SLE 全身性自己免疫疾患における PSNP 発症頻度を検討した。さらに、大量ステロイド投与以前より精神神経症状を発症した NPSLE を *de novo* NPSLE と定義し、精神神経症状、神経学的異常所見、治療、予後について、単施設における後ろ向き解析を行った。

3.2 対象と方法

3.2.1 研究デザイン

本研究は後ろ向き単施設コホート研究である。SLE 患者における副腎皮質ステロイド投与後精神神経症状の発症の実態 (頻度, 精神神経症状の臨床的特徴, 免疫学的異常所見, 神経学的異常所見, 治療, 予後) を明らかにすることを目的とした。

臨床検査値, 画像所見, 臨床経過などの患者データは医療記録を用いて収集した。この研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 015-0274)。

3.2.2 対象、および主要評価項目

2002 年 4 月から 2015 年 3 月の間に当科に入院し、入院時には精神神経症状を認めず、PSL 40mg/日以上的大量ステロイドで治療を開始した SLE 患者および非 SLE 全身性自己免疫疾患患者を対象とした。非 SLE 全身性自己免疫疾患患者は多発性筋炎/皮膚筋炎 (Polymyositis/Dermatomyositis: PM/DM) 患者, 成人発症スティール病 (adult onset Still's disease: AOSD) 患者, 血管炎症候群患者と定義した。

SLE の診断はアメリカリウマチ学会 (ACR) の 1997 年改訂分類基準^{21,22}を用いて行った。PM/DM は 1975 年の Bohan と Peter の診断基準^{23,24}、AOSD は 1992 年山口らの分類基準²⁵を用いた。血管炎症候群については 2012 年 Chapell Hill 分類²⁶により分類された顕微鏡的多発血管炎 (MPA), 多発血管炎性肉芽腫症 (GPA), 好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA) は本邦の厚生労働省認定基準を用い²⁷、結節性多発動脈炎 (PN) は 1990 年 ACR 分類基準を用いた²⁸。

SLE 群、非 SLE 全身性自己免疫疾患群における患者背景を比較し、PSNP 発症頻度について評価した。

副腎皮質ステロイド投与後に精神神経症状をきたした SLE 群 (PSNP-SLE 群) と精神神経症状をきたさなかった SLE 群 (非 PSNP-SLE 群) を比較し、PSNP 発症のリスクファクターについて検討した。

さらに、大量ステロイド投与以前より精神神経症状を発症した *de novo* NPSLE 患

者を対象として、PSNP-SLE 群と比較し、精神神経症状の分類、臨床データ、神経学的異常所見、治療内容、治療効果、予後について解析した。

3.2.3 精神神経症状の評価

精神神経症状の分類は ACR の NPSLE1999 年分類を用いた¹⁵。頭痛のみの症例は NPSLE における特異性が低いために除外した²⁹。精神神経症状は 2 名の熟練した精神科専門医が精神神経症状発症時に評価した。

3.2.4 患者背景, 臨床データ, 疾患活動性の評価

患者背景, 臨床データは入院時に評価した。患者背景として、性別, 入院時年齢, 発症時年齢, 罹病期間, 精神疾患既往歴, 治療歴, 入院後初期治療を抽出した。入院後初期治療は大量ステロイド療法開始後の免疫抑制療法は精神神経症状出現まで、あるいは大量ステロイド投与後 30 日以内までを解析した。

SLE 患者群における臨床データは血清アルブミン値, 血清クレアチニン値, 白血球数, ヘモグロビン値, 血小板数, 血清 C3, C4, CH50 値, 抗核抗体 (ANA), 抗 DNA 抗体, 抗 U1-RNP 抗体, 抗 Sm 抗体, 抗 SS-A/Ro 抗体, 抗 SS-B/La 抗体, ループスアンチコアグラント (LA), 抗カルジオリピン抗体 (aCL), 抗 β 2-glycoprotein I (β 2GPI) 抗体, ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) を含む抗リン脂質抗体 (aPLs) を評価した。aPLs は既報に記述の通りに測定した³⁰。抗リン脂質抗体症候群 (APS) の合併も評価した。APS の分類基準は Sydney-revised Sapporo Criteria を用いた³¹。SLE の疾患活動性評価には Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) を用いて行った³²。

3.2.5 神経学的検査所見

神経学的検査所見は髄液検査, 脳 MRI, 脳波, SPECT を精神神経症状の新規出現時に評価し、感染症, 代謝異常, 他の脳血管病変の有無について鑑別した。髄液検査

異常所見は髄液細胞数 $5/\text{mm}^3$ 以上、髄液蛋白濃度 50mg/dL 以上、IgG indexes 0.7 以上、Q-albumin 9.0 以上と定義した。脳 MRI 異常所見は diffuse high intensity area、脳梗塞、脳出血を認める場合、脳波異常は徐波あるいは棘波を認める場合と定義した。

3.2.6 SLE 患者における治療効果および予後

診療録より、精神神経症状の出現前後での経口副腎皮質ステロイド剤、ステロイドパルス療法、シクロフォスファミド間欠的大量静注療 (IVCY)、アザチオプリン (AZA)、シクロスポリン (CyA)、タクロリムス (TAC)、ミコフェノール酸モフェチル (MMF)、リツキシマブ (RTX) を含む免疫抑制剤、向精神病薬、血漿交換療法 (PEX) による治療歴を詳細に検証した。エンドポイントは高用量ステロイド投与、ステロイドパルス療法、各種免疫抑制剤による再治療もしくは精神科への入院を要した精神神経症状の再燃あるいは死亡と定義し、PSNP-SLE 患者および *de novo* NPSLE 患者の治療内容、治療効果および予後を解析した。

3.2.7 統計解析

連続変数は正規分布している場合は平均 $\pm$ 標準偏差 (SD)、正規分布していない場合は中央値 [IQR (四分位範囲)] で示し、対応のない t 検定もしくは Welch 検定にて統計学的解析を行った。カテゴリ変数は実数値もしくはパーセンテージで示し、群間比較は Fisher's exact test にて統計学的解析を行った。

SLE における PSNP 発症のリスクファクターの解析では上記の単変量解析にて有意であった項目 ($p < 0.05$) および既報にてリスクファクターと報告されている項目を加え、多重ロジスティック解析を行い、オッズ比 (OR) および 95%信頼区間 (95%CI) を示した。

PSNP-SLE および *de novo* NPSLE のイベントフリー生存率および全生存率については Kaplan-Meier 法を用いて解析した。

すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は JMP®10.0.2 (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA) を用いて行った。

3.3 結果

3.3.1 PSNP 発症頻度 (SLE 群 vs. 非 SLE 全身性自己免疫疾患群)

SLE 患者 146 例、非 SLE 全身性自己免疫疾患患者 162 例を対象とした。全身性自己免疫疾患群での疾患別内訳は、PM/DM 76 例, AOSD 24 例, 血管炎症候群 62 例であった。

入院時の患者背景を Table 1 に示す。プレドニゾロン換算副腎皮質ステロイド投与量に有意差は認めなかったが、性別, 年齢, 罹病期間, ステロイドパルス療法, 免疫抑制剤による治療人数については、各疾患の疫学的特徴および一般的治療法の違いを反映した有意差を認めた。

SLE 患者では 146 例中 36 例 (24.7%) に PSNP を発症した。これに対し、非 SLE 全身性自己免疫疾患群では 162 例中 12 例 (7.4%) に PSNP が発症、OR は 4.09、95%CI は 2.04-8.22 と有意に SLE 群で発症頻度が高かった ($p < 0.0001$, Fisher's exact test, Figure 1)。高用量ステロイド投与後から精神神経症状発症までの期間の中央値は SLE 群では 12 日 [IQR 7-26 日]、全身性自己免疫疾患群では 20 日 [IQR 7-25 日]であった。

Table 1. SLE 群および全身性自己免疫疾患群における入院時患者背景

	SLE	非 SLE 全身性 自己免疫疾患群	p-value
患者数, n	146	162	
女性, n (%)	122 (83.6)	103 (63.6)	<0.0001
発症時年齢 (歳)	30.2 ± 14.6	50.6 ± 17.5	<0.0001
入院時年齢 (歳)	37.4 ± 14.4	52.4 ± 17.1	<0.0001
罹病期間 (月)	32 [5-140]	4.5 [2-15]	<0.0001
精神疾患既往歴, n (%)	20 (13.7)	7 (4.3)	0.004
入院前治療歴			
ステロイド投与歴, n (%)	78 (53.4)	33 (20.4)	<0.0001
ステロイドパルス療法, n (%)	27 (18.5)	10 (6.2)	0.001
免疫抑制剤, n (%)	38 (26.0)	21 (13.0)	0.004
入院後初期治療 [†]			
初期 PSL 量 (mg/日)	54.0 ± 8.3	52.5 ± 8.6	0.111
ステロイドパルス療法, n (%)	49 (33.6)	80 (49.4)	0.006
免疫抑制剤, n (%)	69 (47.3)	114 (70.3)	<0.0001

カテゴリー変数は患者数(%), 連続変数は中央値[IQR]、あるいは平均 ± 標準偏差で示した。

[†] 入院時初期治療は高用量ステロイド投与開始後、精神神経症状が出現するまで、あるいは 30 日以内のものと定義した。

PSL, prednisolone

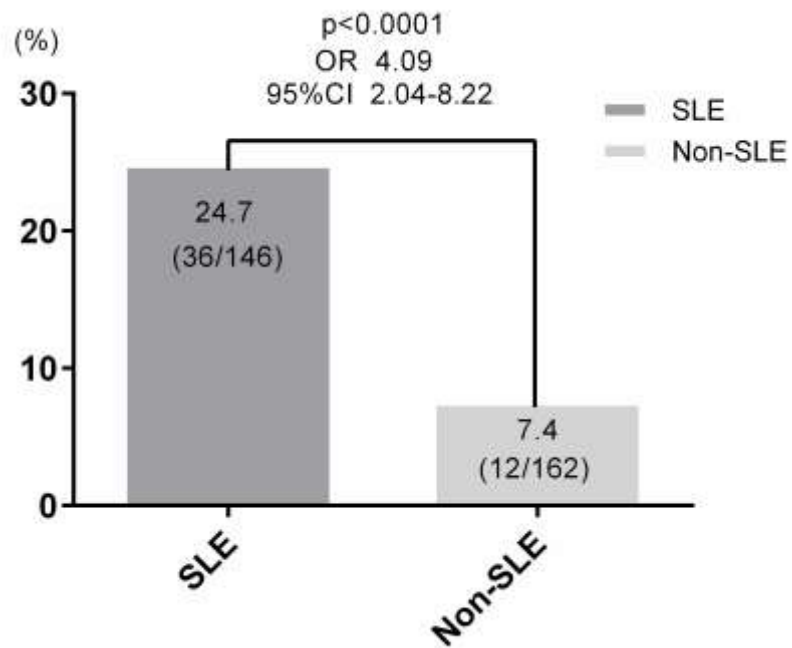


Figure 1. SLE 群および非 SLE 全身性自己免疫疾患群 (Non-SLE 群) における PSNP 発症頻度

SLE 群では PSL 40mg/日以上投与後の PSNP 発症頻度は 24.7%と有意に高かった ($p < 0.0001$, Fisher's exact test)。

CI, Confidence interval: OR, Odds Ratio

3.3.2 SLE 患者における PSNP 発症のリスクファクター解析

PSNP-SLE 患者 36 例, 非 PSNP-SLE 患者 111 例および *de novo* NPSLE 患者 43 例の入院時患者背景を Table 2A に、検査データを Table 2B に示す。臨床パラメータの比較解析に関しては、PSNP-SLE 群と非 PSNP-SLE 群の比較結果、PSNP-SLE 群と *de novo* NPSLE 群との比較結果を示した。

PSNP-SLE 群と非 PSNP-SLE 群における疾患活動性評価 SLEDAI-2K では有意差を認めなかった。単変量解析では APS の合併 ($p<0.01$)、精神疾患の既往歴 ($p<0.01$) が PSNP 発症のリスクファクターとして抽出された。精神疾患の既往歴にはうつ病, 不安障害, NPSLE の既往, ステロイド精神病の既往が含まれた。また、aPL の中では抗カルジオリピン抗体 IgG サブクラス (aCL-IgG) が PSNP-SLE 群において非 PSNP-SLE 群よりも有意に高頻度で陽性であった (25.7% vs. 8.3%, $p=0.015$)。他の自己抗体の陽性頻度では有意な差を認めなかった。

単変量解析で得られた APS の合併および精神疾患既往歴の 2 項目に加え、既報で報告されている高用量ステロイド投与後の新規精神神経症状の発症リスクファクターとして、ステロイドパルス療法による初期治療³³, 血清 C3 値の低下^{34,35}を含め、多重ロジスティック解析を行った。なお aCL-IgG の存在は APS と内部相関があるため、除外した。結果、多重ロジスティック解析から APS の合併および精神疾患の既往歴が PSNP 発症の独立したリスクファクターとして抽出された (Table 3)。

Table 2A. PSNP-SLE 群、非 PSNP-SLE 群および *de novo* NPSLE 群における患者背景

	PSNP -SLE	非 PSNP -SLE	p-value ⁺	<i>de novo</i> NPSLE	p-value ⁺⁺
患者数, n	36	110		43	
女性, n (%)	30 (83.3)	92 (83.6)	1.000	32 (74.4)	0.415
発症時年齢 (歳)	27.8 ± 13.5	31.0 ± 15.0	0.244	28.8 ± 15.5	0.748
入院時年齢 (歳)	34.9 ± 13.3	38.3 ± 14.7	0.215	36.2 ± 14.4	0.665
罹病期間 (月)	29 [2-127]	49 [5-142]	0.946	61 [8-153]	0.383
精神疾患既往歴, n (%)	10 (27.8)	10 (9.1)	0.010*	7 (16.3)	0.275
APS 合併, n (%)	11 (30.6)	11 (10.0)	0.006*	11 (25.6)	0.802
ループス腎炎, n (%)	18 (50.0)	64 (58.6)	0.441	12 (27.9)	0.062
入院前治療歴					
CS 投与, n (%)	16 (44.4)	62 (56.4)	0.250	27 (62.8)	0.118
CS パルス療法, n (%)	8 (22.2)	19 (17.3)	0.621	4 (9.3)	0.129
免疫抑制剤, n (%)	7 (19.4)	31 (28.2)	0.384	14 (32.6)	0.212
入院後初期治療					
PSL 投与量 (mg/日)	55.7 ± 8.6	54.1 ± 8.3	0.322	57.1 ± 5.9	0.413
CS パルス療法, n (%)	14 (38.9) [†]	30 (27.2) ^{††}	0.212	-	-
免疫抑制剤, n (%)	9 (25.0) [†]	34 (30.9) ^{††}	0.536	-	-
疾患活動性					
SLEDAI-2K	12 [8-16]	13 [8-19]	0.427	16 [11-21]	0.006*

カテゴリー変数は患者数 (%), 連続変数は中央値 [四分位範囲]、平均 ± 標準偏差で示した。

*p<0.05、カテゴリー変数は Fisher's exact test、連続変数は T-test あるいは Welch test を用いて各 2 群間を比較解析した。p-value⁺は PSNP-SLE 群と non-PSNP-SLE 群の比較結果、p-value⁺⁺は PSNP-SLE 群と *de novo* NPSLE 群の比較結果を示す。

[†] PSNP-SLE 群では精神神経症状発症前の初期治療を示す。

^{††} 非 PSNP-SLE 群では高用量ステロイド開始後 14 日以内の初期治療を示す。

APS, antiphospholipid syndrome: CS, corticosteroid: PSL, prednisolone: SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000

Table 2B. PSNP-SLE 群, 非 PSNP-SLE 群および *de novo* NPSLE 群における検査データ

	PSNP-SLE	非 PSNP-SLE	P-value ⁺	<i>de novo</i> NPSLE	P-value ⁺
血球数および生化学					
血清アルブミン (g/dl)	3.0 ± 0.7	3.0 ± 0.8	0.778	3.2 ± 0.8	0.205
血清クレアチニン(mg/dl)	0.69 [0.58-0.90]	0.70 [0.57-1.01]	0.193	0.65 [0.50-0.90]	0.783
白血球数 (/μl)	6,968 ± 4,136	5,949 ± 3,290	0.133	5,890 ± 3,070	0.188
ヘモグロビン (g/dl)	11.2 ± 2.3	11.1 ± 2.0	0.908	10.7 ± 2.3	0.409
血小板 (x10 ⁴ /μl)	15.8 [10.0-20.0]	18.3 [10.7-24.2]	0.619	16.9 ± 11.7	0.925
C3 (mg/dl)	55.4 ± 28.5	57.5 ± 35.9	0.745	58.8 ± 28.1	0.597
C4 (mg/dl)	9.5 [2.3-16.0]	8.0 [4.0-14.5]	0.486	9.4 ± 7.6	0.533
CH50 (U/ml)	27.1 ± 17.9	25.7 ± 18.0	0.686	26.6 ± 16.0	0.910
IgG (mg/dl)	1631 [1090-2291]	1604 [1128-2078]	0.601	1661 [1167-2044]	0.753
自己抗体					
ANA ≥320x, n (%)	27/34 (79.4)	84/102 (82.4)	0.799	31/40 (77.5)	1.000
aDNA ≥20 (IU/ml), n (%)	18/32 (56.3)	50/97 (51.5)	0.687	16/38 (42.1)	0.337
aU1-RNP, n (%)	19/34 (55.9)	44/104 (42.3)	0.234	20/39 (51.3)	0.815
aSm, n (%)	14/34 (41.2)	37/105 (35.2)	0.545	11/40 (27.5)	0.230
aSS-A/Ro, n (%)	18/34 (52.9)	64/106 (60.4)	0.549	20/40 (50.0)	0.820
aSS-B/La, n (%)	4/28 (14.3)	11/88 (12.5)	0.756	2/31 (6.5)	0.409
aPLs, n (%)	22/36 (61.1)	47/110 (42.7)	0.083	25/43 (58.1)	0.822
LA, n (%)	17/36 (47.2)	33/110 (30.0)	0.070	18/43 (41.9)	0.649
aCL-IgG, n (%)	9/35 (25.7)	9/109 (8.3)	0.015*	12/42 (28.6)	0.803
aCL-IgM, n (%)	3/35 (8.6)	8/109 (7.3)	0.729	6/42 (14.3)	0.499
aPS/PT-IgG, n (%)	8/35 (22.9)	12/109 (11.0)	0.094	14/42 (33.3)	0.448
aPS/PT-IgM, n (%)	1/35 (2.9)	10/109 (9.2)	0.296	10/42 (23.8)	0.010*
aβ2GPI, n (%)	7/36 (19.4)	16/106 (15.1)	0.602	15/42 (35.7)	0.135

カテゴリー変数は患者数 (%), 連続変数は中央値 [四分位範囲 25-75%], 平均 ± 標準偏差で示した。

*p<0.05、カテゴリー変数は Fisher's exact test、連続変数は T-test あるいは Welch test を用いて各 2 群間を比較解析した。p-value⁺は PSNP-SLE 群と非 PSNP-SLE 群の比較結果、p-value⁺⁺は PSNP-SLE 群と *de novo* NPSLE 群の比較結果を示す。

aCL, anticardiolipin antibody: aDNA, anti-DNA antibody: ANA, antinuclear antibody: aPLs,

antiphospholipid antibodies: aPS/PT, phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody:
aSm, anti-Sm antibody: aSS-A/Ro, anti-SS-A/Ro antibody: aSS-B/La, anti-SS-B/La antibody:
aU1-RNP, anti-U1-RNA antibody: a β 2GPI, anti- β 2-glycoprotein I: LA, lupus anticoagulant

Table 3. SLE 患者における PSNP 発症のリスクファクター (多重ロジスティック解析)

	OR	95%CI	p-value
精神疾患の既往歴	4.19	1.49 - 11.97	0.007*
APS の合併	4.73	1.71 - 13.39	0.003*
ステロイドパルス療法による初期治療	2.29	0.96 - 5.48	0.061
血清 C3 値	1.00	0.99 - 1.01	0.806

APS, antiphospholipid syndrome; CI, confidence interval; OR, odds ratio

3.3.3 PSNP-SLE 群と *de novo* NPSLE 群における臨床所見比較

PSNP-SLE 群 36 例と *de novo* NPSLE 群 43 例において、入院時 SLEDAI-2K のみ *de novo* NPSLE 群で有意に高値であったが、他の患者背景では有意な違いは認められなかった (Table 2A)。それぞれの群における、ACR の NPSLE 分類基準 (1999 年)¹⁵を用いた精神神経症状の内訳を Table 4 に示す。中枢神経症候群は *de novo* NPSLE 群で有意に高く (16.7% vs. 41.9%, $p=0.026$)、びまん性精神神経症候群は PSNP-SLE 群で有意に高い (94.4% vs. 67.4%, $p=0.004$) 結果であった。PSNP-SLE 群ではびまん性精神神経症候群のうち、気分障害の頻度が有意に高かった ($p=0.017$)。36 例中、9 例が精神科医によりステロイド精神病と診断され、7 例に気分障害、3 例に不安障害、3 例に精神病様症状を認めたが、急性錯乱状態 (ACS) は認めなかった。また、本研究における PSNP-SLE 群では末梢神経症候群は認めなかった。

Table 4. NPSLE に対する ACR 分類 (1999 年) による精神神経症状のうちわけ

	PSNP-SLE n=36 (%)	<i>de novo</i> NPSLE n=43 (%)	OR (95%CI)	p-value
中枢神経症候群, n (%)	6 (16.7)	18 (41.9)	0.28 (0.10-0.81)	0.026*
脳血管障害	4 (11.1)	7 (16.3)	0.64 (0.17-2.40)	0.746
無菌性髄膜炎	0 (0)	4 (9.3)	0 (-)	0.121
舞踏病	0 (0)	2 (4.7)	0 (-)	0.498
てんかん	2 (5.6)	4 (9.3)	0.57 (0.10-3.33)	0.683
脊髄症	0 (0)	2 (4.7)	0 (-)	0.498
びまん性精神神経症候群, n (%)	34 (94.4)	29 (67.4)	8.21 (1.72-39.14)	0.004*
急性錯乱状態	5 (13.9)	10 (23.3)	0.53 (0.16-1.73)	0.391
気分障害	17 (47.2)	9 (20.9)	3.38 (1.26-9.04)	0.017*
精神病性障害	11 (30.6)	6 (14.0)	2.71 (0.89-8.29)	0.100
認知障害	1 (2.8)	6 (14.0)	0.18 (0.02-1.54)	0.119
不安障害	6 (16.7)	3 (7.0)	2.67 (0.62-11.53)	0.287
末梢神経症候群, n (%)	0 (0)	5 (11.6)	0 (-)	0.057

*p<0.05、Fisher's exact test

CI, confidence interval: OR, odds ratio

3.3.4 神経学的検査所見 (PSNP-SLE 群 vs. *de novo* NPSLE 群)

髄液検査, 脳 MRI, 脳波, SPECT における異常所見陽性率を Table 5 に示す。何らかの神経学的検査異常所見を PSNP-SLE 群で 66.7%、*de novo* NPSLE 群で 83.7%の症例において認めた。徐波や棘波など脳波異常所見は PSNP-SLE 群で 52.6%、*de novo* NPSLE 群で 40.0%と有意は認めなかった。

髄液検査における蛋白濃度上昇, Q-albumin 上昇, MRI 異常所見は *de novo* NPSLE 群で有意に多かった。SPECT は施行された症例は少ないが異常所見の頻度は 2 群で有意差は認めなかった。

Table 5. 神経学的検査異常所見 (PSNP-SLE vs. *de novo* NPSLE)

	PSNP-SLE n=36 (%)	<i>de novo</i> NPSLE n=43 (%)	p-value
髄液検査異常 陽性 ^a	22/26 (84.6)	28/32 (87.5)	1.000
細胞数上昇 ^b	9/26 (34.6)	14/32 (43.8)	0.592
蛋白濃度上昇 ^c	3/26 (11.5)	17/32 (53.1)	0.001*
IgG index 上昇 ^d	19/23 (82.6)	22/31 (71.0)	0.358
Q-albumin 上昇 ^e	2/22 (9.0)	14/31 (45.2)	0.006*
MRI 異常 陽性 ^f	3/30 (10.0)	16/41 (39.0)	0.007*
脳波異常 陽性 ^g	10/19 (52.6)	8/20 (40.0)	0.527
SPECT 異常 陽性 ^h	8/9 (88.9)	8/13 (61.5)	0.333

*p<0.05, using Fisher's exact test

a. 髄液検査異常：細胞数、蛋白濃度上昇、IgG index 上昇のいずれか1つ以上.

b. 細胞数上昇 ≥ 5 cells/mm³, c. 蛋白濃度上昇 ≥ 50 mg/dl, d. IgG index 上昇 ≥ 0.7 e. Q-albumin 上昇 ≥ 9

f. MRI 異常所見 diffuse high intensity area、脳梗塞、脳出血所見

g. 脳波異常：徐波、棘波

h. SPECT 異常：cerebral hypoperfusion

3.3.5 精神神経症状に対する治療および臨床経過

(PSNP-SLE 群 vs. *de novo* NPSLE 群)

PSNP-SLE および *de novo* NPSLE における精神神経症状に対する治療経過を Figure 2 に示した。

de novo NPSLE 43 例中 16 例 (37.2%) がステロイドパルス療法 (IVCY 非併用) で治療、22 例 (51.2%) がステロイドパルス療法および IVCY で加療されていた。両群とも IVCY 以外の他の免疫抑制療法併用例を含む (Figure 2A)。最終的に、41 例 (95.3%) がステロイドパルス療法、IVCY、または他の免疫抑制剤による免疫抑制療法で治療されていた。向精神病薬は *de novo* NPSLE のうち 27 例 (62.8%) に投与されていた。精神神経症状は 41 例 (95.3%) で改善し、27 例 (62.8%) で寛解維持できていた (平均観察期間 51 か月)。イベントは 16 例に発症し、うち 2 例では SLE 活動性をコントロールできず、最終的には感染症で死亡した。10 例が精神神経症状を含む SLE 活動性で再燃し、うち 8 例は再度改善したが、1 例が急性膵炎、1 例が肺胞出血で死亡した。1 例は精神神経症状を伴わないコントロール不能な血球貪食症候群で再燃し、最終的には感染症で死亡した。残りの 3 例のうち 1 例は感染症で死亡、2 例は突然死であった。

PSNP-SLE 36 例中 27 例 (75%) が高用量ステロイド投与後に発症した NPSLE と診断された (Figure 2B1)。24 例 (66.7%) が精神神経症状に対し、新たにステロイドパルス療法、IVCY、他の免疫抑制剤を含む免疫抑制療法が強化されていた。24 例中、23 例で精神神経症状は改善したが、1 例は改善せず転院となった。19 例が精神神経症状の寛解を維持したが、3 例が精神神経症状を再燃し、1 例は改善したのち、感染症で死亡した。再燃をきたした 3 例のうち、2 例は再治療にて改善したが、1 例は再治療中に自殺のため死亡した。

PSNP-SLE 36 例中 9 例 (25%) がステロイド関連精神病 (CIDP) と判断され、精神神経症状に対し、7 例が向精神病薬 (リスペリドン、クエチアピン、パロキセチン、ロランザピン、バルプロ酸) にて加療され、2 例では経過観察とされた (Figure 2B2)。CIDP と診断された 9 例全例で精神神経症状が改善し、再燃はきたさなかったが、そのうち 6 例は向精神病薬に加え、精神神経症状以外の SLE 活動性病変に対し使用された免疫抑制療法の併用により症状の改善を得た。

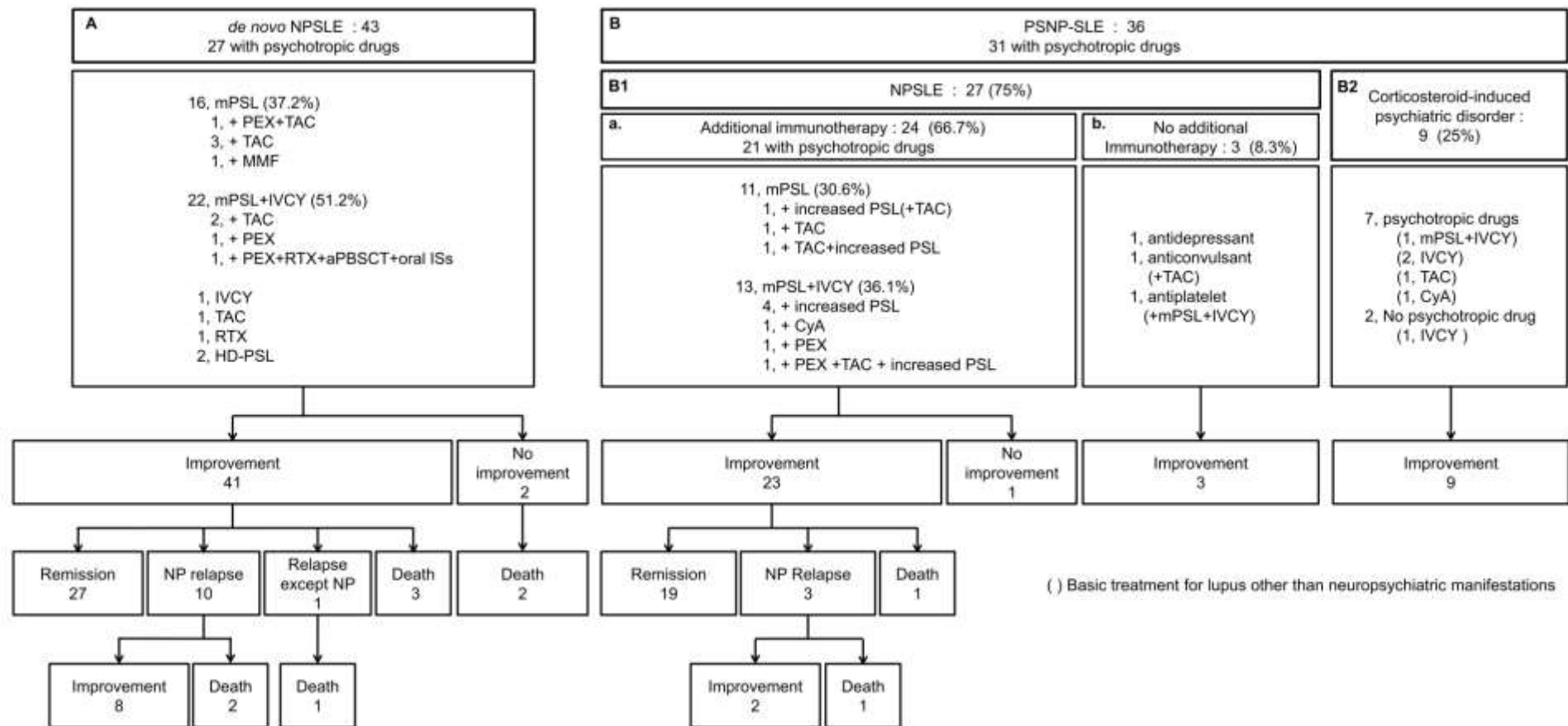


Figure 2. 治療および臨床経過 (*de novo* NPSLE (2A), PSNP-SLE (2B))

PSNP-SLE 36 例のうち 27 例 (75%) が高用量ステロイド投与後 NPSLE と判断され、11 例 (30.6%) がステロイドパルス療法、13 例 (36.1%) がステロイドパルス療法および IVCY (各群とも他の免疫抑制剤の併用を含む) により治療強化されていた。

aPBSCT, auto peripheral blood stem cell transplantation: CyA, cyclosporine: HD, high-dose: ISs, immunosuppressants: IVCY, intravenous cyclophosphamide: MMF, mycophenolate mophetil: mPSL, methylprednisolone pulse: PEX, plasma exchange: PSL, prednisolone: RTX, rituximab: TAC, tacrolimus

3.3.6 精神神経症状の予後 (PSNP-SLE 群 vs. *de novo* NPSLE 群)

PSNP-SLE 群および *de novo* NPSLE 群の Kaplan-Meier 法による 5 年イベントフリー生存曲線を Figure 3A、全生存曲線を Figure 3B に示す。

5 年イベントフリー生存率は PSNP-SLE 群が 83.7%、*de novo* NPSLE 群が 67.8% と有意に PSNP-SLE 群で良好な結果であった ($p=0.028$, Log Rank Test)。全生存率は PSNP-SLE 群が 93.8%、*de novo* NPSLE 群が 87.5% と PSNP-SLE 群で良好であった。

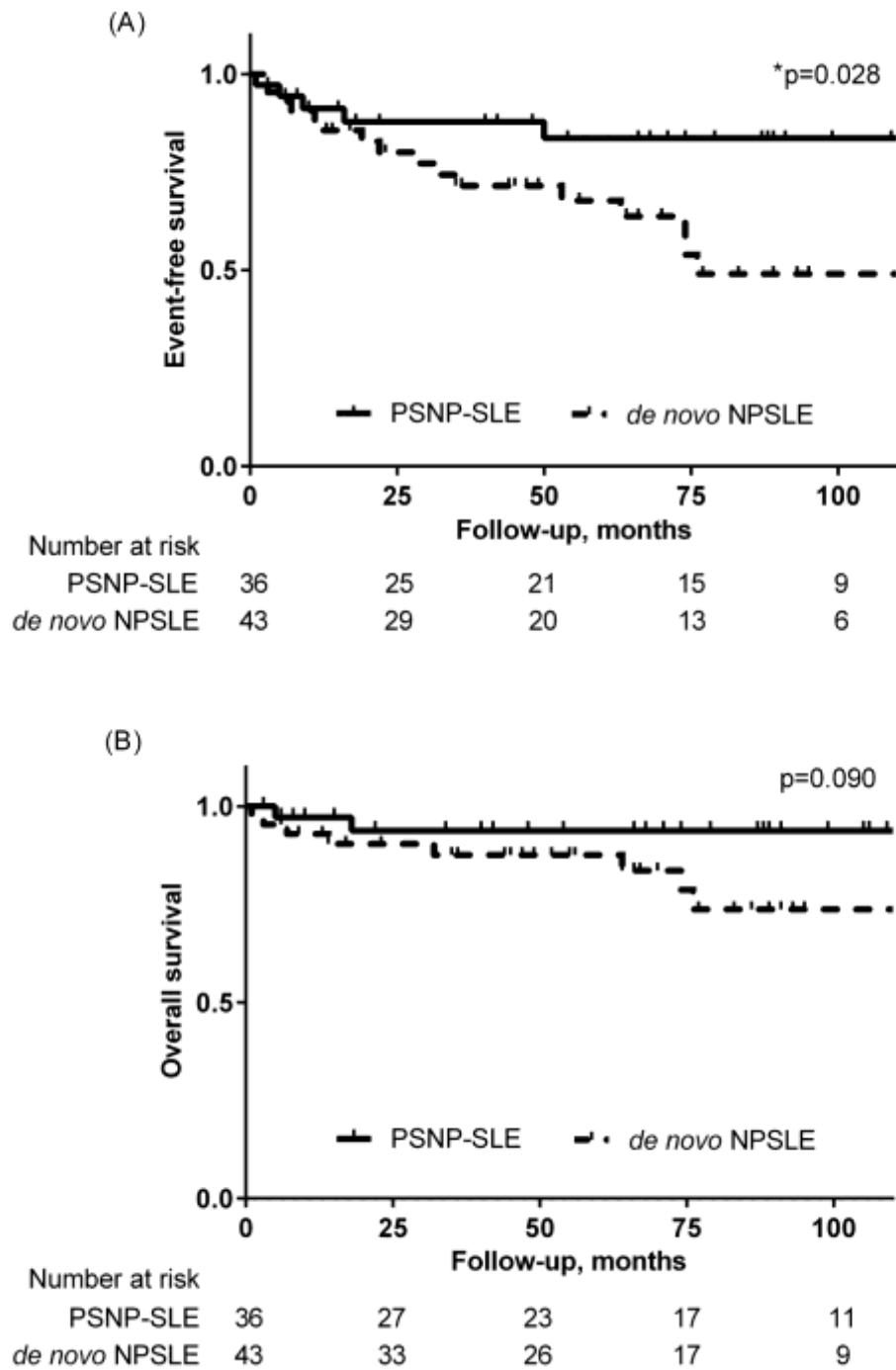


Figure 3. PSNP-SLE および *de novo* NPSLE におけるイベントフリー生存率 (A) と全生存率 (B)

5年イベントフリー生存率は PSNP-SLE 群が *de novo* NPSLE 群よりも有意に良好であった (83.7% vs. 67.8%, $p=0.028$, Log Rank Test)。

3.4 考察

本研究は北海道大学病院内科 II 病棟で治療をうけた SLE 患者および非 SLE 全身性自己免疫疾患患者を対象とし、精神神経症状に着目した単施設後ろ向き観察研究である。まず、はじめに、SLE 患者における PSNP の発症頻度は非 SLE 全身性自己免疫疾患に比較して有意に高頻度であることを示した。SLE 群と非 SLE 全身性自己免疫疾患群の 2 群間における性別、年齢、罹病期間、治療内容についての相違は各疾患の性質によるところが大きく、標準化補正することは困難である。最近の literature review でも SLE は CIDP を発症する疾患特異的なリスクであることが報告されており、本研究の結果と一致する³⁶。

既報における SLE 患者のコホートでは、精神神経症状の発症は副腎皮質ステロイドの使用の頻度と密接に関連していると述べられている³⁷。SLE に関連する症状の治療として、副腎皮質ステロイドは他の薬剤にとって変えることのできない中心的薬剤であり、それゆえに精神神経症状が SLE によるものなのか、副腎皮質ステロイドによるものなのかを判断することがより困難となっている¹⁵。実際、本研究でも Figure 2 に示したように、副腎皮質ステロイドの急速な減量あるいは中止をすることなく、免疫抑制療法を強化することにより大部分の症例が精神神経症状の改善を得た。さらに、PSNP-SLE 群と *de novo* NPSLE 群間に SLEDAI で示される疾患活動性以外には臨床背景に相違は認められなかった。本研究および他の報告からも、副腎皮質ステロイドは SLE 患者において、精神神経症状を顕在化させる作用があると考えられる。

SLE 患者において PSNP を発症する独立したリスクファクターとして精神疾患の既往歴、および APS の合併が抽出された。既報では、NPSLE と関連するリスクファクターとして、高疾患活動性、過去の精神神経症状のイベント、SLE 経過中に同時に発症した NPSLE 症状、そして APS が報告されている^{16,38-41}。本研究で抽出された精神疾患の既往、APS の合併の 2 つのリスクファクターは既報にある NPSLE のリスクファクターと共通しており、PSNP-SLE と NPSLE は非常に類似した臨床的特徴を示している。

抗リン脂質抗体に関しては aCL-IgG が非 PSNP-SLE 群よりも PSNP-SLE 群において有意に高頻度で陽性であった。aCL とびまん性微小脳血管障害との関連が報告されており^{42,43}、本研究の結果を支持するものと考えられた。ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 IgM サブクラス (aPS/PT-IgM) は PSNP-SLE 群と比較して *de novo* NPSLE 群において有意に高頻度であったが、これは、脳血管障害が *de novo* NPSLE 群で高頻度であることを反映している可能性が考えられる。

既報では血清 C3 低値が CIDP 発症のリスクファクターとして報告されている^{34,35} が、本研究では PSNP 発症のリスクファクターとしては抽出されなかった。これは本研究において PSL 40mg/日以上の治療を要する高疾患活動性 SLE 患者、つまり、高頻度に低補体血症をきたしている患者を対象としていることに起因すると考える。

PSNP-SLE 群と *de novo* NPSLE 群では精神神経症状のカテゴリ一分布に有意な相違が認められたが、大量ステロイド投与が契機となる症状はびまん性精神神経症候群が多く、副腎皮質ステロイドそのものの中枢神経への作用も起因しているかもしれない。また、その詳細な分類は精神神経症状の多彩性かつ異時性のため明確な分類が困難なことも起因すると考えられ、今後の検討を要する。

精神神経症状を有する SLE 患者では、疾患活動性の評価、他の要因による症状の鑑別のために、客観的指標である血液検査、髄液検査および画像評価が重要である¹⁵。軽度の髄液異常所見は NPSLE 患者においてしばしば認められるが、疾患特異的とはいえない³⁸。本研究では *de novo* NPSLE 群において PSNP-SLE 群よりも髄液検査における Q-albumin の上昇、髄液蛋白濃度の上昇を有意に高頻度に認めた。これは、前者における血液脳関門 (BBB) のより強い破綻を示している可能性が考えられた。他の報告では PSNP 発症のリスクとして Q-albumin の上昇が報告されている^{35,44}。また、髄液あるいは血清の抗リボゾーマル P 抗体、抗神経抗体などの自己抗体や IL-6, IL-8 などのサイトカインの上昇が NPSLE の病態形成に関与することから診断ツールとして有用であると報告されているが^{41,43,45-47}、本研究は後ろ向き観察研究であるため、SLE 全例での神経学的評価や自己抗体、サイトカインの解析は施行し得ていない。

神経学的画像評価では、MRI 異常所見が *de novo* NPSLE 群で有意に高頻度であった。脳 MRI は NPSLE の診断の神経イメージングとして最もよく施行される⁴²。MRI 異常所見は NPSLE に特異的ではないが⁴⁸⁻⁵⁰、MRI による脳血管障害の所見は NPSLE の特徴である。過去の SLE における MRI 所見の横断研究では、白質の高信号域、微小出血、そして脳萎縮は LA と関連すると報告されている⁵¹。本研究における *de novo* NPSLE 群での高頻度な MRI 異常所見は、中枢神経症候群が高頻度であることを反映しているとも考えられる。徐派や棘波等の脳波異常所見は PSNP-SLE 群、*de novo* NPSLE 群とも同頻度で認められた。少ない症例数ではあるが、精神神経症状をきたした SLE 患者全例に徐派が認められたとも報告されている⁵²。脳波異常は CIDP よりも NPSLE である可能性が示唆される所見である^{35,36}。

PSNP 発症また SLE 患者における高頻度な PSNP 発症のメカニズムは明らかになっていない。Wolkowitz ら⁵³は CIDP 発症のモデルを提唱している。ストレス誘発による視床下部-下垂体-副腎系の活性化や高濃度コルチコステロイドホルモンの状況下では、神経伝達物質の変化 (脳の特定の領域におけるセロトニン低下、ドーパミンの上昇) が起こり、うつ状態、精神症状を誘発する。さらに、DHEA (dehydroepiandrosterone) や DHEA-S (dehydroepiandrosterone sulfate) など他のステロイドホルモン、allopregnanolone (GABA 作動性神経ホルモン) の産生を抑制し、神経細胞の再生障害、不安、うつ症状を引き起こす。他、脳の特定領域でのグルコース代謝の変化、酸化ストレス、シナプス間のグルタミン酸クリアランス障害から興奮毒性を引き起こし、神経細胞に障害を与える。また、高濃度コルチコステロイドによりグルココルチコイド受容体のダウンレギュレーションが起こり、炎症性サイトカイン濃度が上昇する。このように多様な病態の変化により副腎皮質ステロイド投与後の精神神経症状が誘発される⁵³。そして、SLE 患者の副腎皮質ステロイドに対する治療効果、反応性の相違がみられる要

因の1つとして、グルココルチコイド受容体遺伝子の **polymorphisms** が報告されている^{54,55}。これらが **SLE** 患者における **PSNP** 発症のメカニズムの一因である可能性も示唆されるが、詳細は明らかとなっていない。

Figure 3 に示したように、*de novo* **NPSLE** 群に比較し、**PSNP-SLE** 群でイベントフリー生存率は有意に高く、全生存率も高い傾向にあった。*de novo* **NPSLE** 全例で免疫抑制療法が導入されており、**PSNP-SLE** 群では精神神経症状以外の **SLE** 臓器障害に対して強化された症例も含まれているが、その多くで免疫抑制療法が強化されていた。**PSNP-SLE** 群における良好な予後は、入院中に精神神経症状を発症し、**MRI** で検出できる重症神経障害が発症することなく、より早期に免疫抑制剤による治療介入が可能であったことに起因する可能性が考えられる。

本研究では **PSNP** は **SLE** 患者に特異的であり、副腎皮質ステロイド投与後に顕在化した **NPSLE** の臨床症状のひとつであることが示唆された。しかし、本研究は単施設で行われた後ろ向き観察研究であり、全例に対してすべての神経学的評価がなされていない、治療前の精神神経症状の持続期間の症例による相違、精神神経症状に対しての治療ストラテジーが確立されていないといった **limitation** が存在する。**PSNP-SLE** と *de novo* **NPSLE** 間の相違を明確にし、**NPSLE** の病態生理学的、かつ臨床的特徴の理解のため、治療ストラテジーの確立も含めた前向き研究が重要である。しかしながら、本観察研究は、**SLE** における 2 群の異なる **NPSLE** 発症形式間の相違を理解する上で、新たな知見を示し、今後の本分野における研究の発展の一助となるものである。

4. 第二章

SLE 患者の末梢血 T 細胞における
発現異常遺伝子についての解析

4.1 背景

4.1.1 SLE におけるバイオマーカー、疾患活動性マーカー

SLE は抗核抗体, 抗 DNA 抗体, 抗 Sm 抗体などの疾患特異的な自己抗体の産生および免疫複合体の沈着に特徴づけられ、その臓器障害は多岐にわたる原因不明の全身性自己免疫疾患である。個々人による病態が多彩であり、臓器障害の部位, 重症度, 自己抗体価, 低補体血症の程度なども個人差が大きい。また、一般的な感染症, 他の自己免疫疾患などでも認められる症状や自己抗体も認められ、判断に苦慮することがある。診断, 治療介入の遅れは患者の QOL を大きく低下させる。

代表的な SLE 疾患活動性指標として、SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) と BILAG (British Isles Lupus Assessment Group) があげられる。SLEDAI は 1992 年にオリジナルが策定され⁵⁶、2000 年に改訂された (SLEDAI-2K)⁵⁷。臨床所見 24 項目から評価されるが、中枢神経症状への点数のかたよりがある一方で、溶血性貧血, 肺障害, 心筋障害, 心血管障害, 消化管障害, 皮膚以外の血管炎症状, TMA (thrombotic microangiopathy) などの臓器障害項目がない。

BILAG は 1988 年に提唱され⁵⁸、2004 年版が改訂を経て最終版となっている⁵⁹。全身症状と 8 臓器障害別、97 項目について① 改善, ② 同様, ③ 悪化, ④ 新たに出現 または再発 (30 日以内) の評価が必要であり、活動性をカテゴリー A (高疾患), B (中等度), C (低疾患), D (既往のみ) に分類するものであるが、日常臨床で用いるには非常に煩雑である。多くの臨床研究において、これら SLEDAI, BILAG での活動性評価が行われているが、SLE の疾患特徴としてその heterogeneity のため疾患活動性評価には限界がある。そのため、SLE 患者の heterogeneity を考慮した層別化が可能であり、より特異的な診断、疾患活動性を鋭敏に判断できるバイオマーカーを探索する研究が行われている^{60,61}。

4.1.2 SLE における T 細胞のシグナル伝達異常

SLE の病態には遺伝性素因に環境因子が加わることで、自己反応性 T 細胞が増殖、活性化し、活性化された B 細胞により多彩な自己抗体が産生され、自己抗体自体あるいは自己抗原と抗体による免疫複合体が組織沈着、補体活性化を引き起こし、多臓器障害を呈する。

T 細胞は獲得免疫の制御において中心的役割を有し、SLE 病態形成にも重要な役割を担っている。SLE における T 細胞の機能異常については多くの研究が行われてきた。TCR (T cell receptor) を介した抗原刺激に対する閾値の低下、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の上昇により、細胞内シグナル伝達機能に関与する蛋白リン酸化の亢進が引き起こされている。CD3Z 鎖のスプライス異常などによる発現低下が起こり^{62,63}、これに代替すべく $\text{Fc}\gamma$ (γ chain of the Fc receptor) が会合し^{64,65}、通常の T 細胞シグナルにおける ZAP-70 (z-associated protein) のかわりに Syk (spleen tyrosine kinase) が活性化される。また、接着分子であるヒアルロン酸受容体 CD44 の細胞表面の発現も増強しており、炎症部位への T 細胞の接着や移動を亢進させ、病態形成に関与している^{10,66}。結果的に、下流シグナルに変化が生じ、 Ca^{2+} イオン- calcineurin の下流にある NFAT (nuclear factor of activated T cells) の活性亢進が起こる¹⁰。他、IL-2 産生を抑制する PP2A の亢進⁶⁷、CaMKIV の亢進、CREB/CREM ratio 異常も報告されている¹⁰。

一方で、Ras/MAPK 系において、Erk の活性低下およびその下流である AP-1 の減少がおけるといったシグナル経路のアンバランスが生じる。当研究グループからも、Ras の活性化因子である RasGRP1 のスプライス異常が SLE 患者 T 細胞において有意に高頻度であり、蛋白発現レベルも低いことを報告した⁶⁸。結果として、T 細胞における lipid raft の集積亢進や IL-2 産生の低下が生じる。通常、活性化した T 細胞で産生された IL-2 はさらに T 細胞の増殖、活性化に働き、マクロファージの活性化や B 細胞からの抗体産生を誘導する。IL-2 は制御性 T 細胞の維持にも重要である。このようなシグナル伝達異常が転写因子の発現の変化や ERK により制御される DNMT1 による DNA-methylation pattern 異常を呈し、遺伝子発現の異常につながると考えられる¹⁰。

第一章では SLE における PSNP 発症の独立したリスクファクターとして APS の合併、精神疾患の既往が抽出されたが、治療方針が異なるステロイド精神病との鑑別が極めて重要であり、より感度、特異度の高いバイオマーカーの開発、さらに明確な発症機序、病態の解明が期待されている。

特定のシグナル分子や表面マーカー異常の解析には GineChip を用いた網羅的解析が主流であるが、全血や PBMC (peripheral blood mononuclear cells) を対象としたものが多い。また、前述のように免疫異常を引き起こす T 細胞の内外の分子異常が明らかになりつつあり、より特異的な診断、疾患活動性マーカーあるいは治療のターゲットとなる可能性が示唆される。そこで、第二章では SLE の T 細胞に着目し、新たな診断、疾患活動性マーカーあるいは治療ターゲット分子の探索、および SLE 臓器病変との関連性の解析を目的とし、本研究を立案した。

4.2 目的

SLE の診断、疾患活動性マーカーあるいは新規治療ターゲットを模索するため、SLE 患者末梢血 T 細胞における発現異常分子を明らかにする。

4.3 SLE 患者の末梢血 T 細胞における遺伝子発現の網羅的解析

4.3.1 方法

北海道大学病院内科 II を受診し、アメリカリウマチ学会(American College of Rheumatology: ACR) の 1997 年分類基準^{21,22}を満たした SLE 患者、および健康人の末梢血 10ml より、RosetteSep T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada)と ficoll paque (GE Healthcare Biosciences, Fairfield, CT, USA)を用いて T 細胞を分離した。純度が 95%以上であることを Phycoerythrin (以下 PE) 標識抗 CD3 抗体 (eBioscience, San Diego, CA, USA)を用いて、FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)にて確認した。純化した T 細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて RNA プールを作製し、1 μ g を Exon array (Human Exon GeneChip1.0, Affymetrix) にアプライし、Whole Transcript Sense Target Labeling プロトコールを用いて解析した。データマイニングには GeneChipOperating Software (Affymetrix) および GeneSpring GX version 10.0 Build 77727 (Agilent Technologies)を用いた。SLE 群における発現亢進遺伝子は健康人と比較し、3 倍以上亢進しているものとした。

SLE 患者については性別、年齢、罹病期間、BILAG index⁵⁹を用いた疾患活動性、ステロイド投与量をそれぞれ検討した。

なお、本研究は北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得、SLE 患者および健康人とも文書同意を得て行った (承認番号 012-0020)。

4.3.2 対象患者

SLE 患者 14 名 (すべて女性, 30.7 ± 8.6 歳, 平均 $\pm$ SD)と健康人 14 名 (すべて女性, 29.9 ± 6.2 歳, 平均 $\pm$ SD)を対象とし、BILAG による疾患活動性で 2 群にわけ、解析した。1 群目は、疾患活動性が比較的高い SLE 患者 8 名 (BILAG 11.6 ± 7.7 , 平均 $\pm$ SD)と健康人 8 名、2 群目では、疾患活動性が比較的低い SLE 患者 6 名 (BILAG 3.5 ± 1.5 , 平均 $\pm$ SD) と健康人 6 名を対象とし、RNA プールを作製した。各群にわけた患者背景を Table 6 に示す。

Table 6. 患者背景 (SLE 患者末梢血 T 細胞の遺伝子発現の網羅的解析)

			1st Array		2nd Array	
			SLE 患者 (高活動性)	健常人	SLE 患者 (低活動性)	健常人
対象人数 (男性/女性)			0 / 8	0 / 8	0 / 6	0 / 6
年齢 平均±SD (歳)			28.9 ± 9.3	27.0 ± 4.4	31.7 ± 8.1	33.8 ± 6.4
BILAG index 平均			11.6	N/A	3.5	N/A
臓器障害						
NPSLE	n		1	N/A	0	N/A
LN	n		2	N/A	3	N/A
NPSLE+LN	n		1	N/A	2	N/A

BILAG index, British Isles Lupus Assessment Group index: LN, lupus nephritis:
N/A, not available: NPSLE, neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: SD,
standard deviation

4.3.3 結果 -SLE 患者末梢血 T 細胞における遺伝子発現の網羅的解析-

末梢血 T 細胞において、高疾患活動性 SLE 患者群では、健常人と比較して 3 倍以上発現増加していた遺伝子は 54 遺伝子であった (Table 7A)。低疾患活動性 SLE 患者群では、健常人と比較し、3 倍以上発現増加していた遺伝子は 20 遺伝子であった (Table 7B)。なかでも IFI44L, IFI27 などの IFN 誘導遺伝子が多くを占めていた。

さらに、疾患活動性に関わらず発現が亢進していた分子は Mx1 (Myxovirus Resistance Protein 1) と RGS1 (Regulator of G-protein Signaling 1) の 2 種類のみであり、両者とも IFN 誘導遺伝子に属する分子であった。

なお、IFN 誘導遺伝子は INTERFEROME ver2.01 (Australian National Data Service)⁶⁹ で IFN により 3 倍以上発現が亢進すると報告されている遺伝子あるいは既報にて何らかの疾患において発現が亢進していると報告されている IFN 誘導遺伝子⁷⁰ と定義した。

Table 7A. SLE 患者末梢血 T 細胞 RNA プールにおける遺伝子発現の網羅的解析
結果 (1st array; 高疾患活動性群)

Genesymbol	Fold change	Genesymbol	Fold change
TUBB1	32.618843	RBPM2	4.9605255
F13A1	27.571898	ZNF185	4.80953
PRKAR2B	21.762922	HIST1H3C	4.8001475
ITGB3	21.494757	PROS1	4.755794
PPBP	20.10467	PGRMC1	4.696868
IFI27	16.903648	PDE5A	4.244883
SPARC	15.806219	TYMS	4.2169056
C6orf25	13.202216	RGS1	4.1368194
NRGN	12.652159	CLIC4	4.1340733
PTGS1	11.908137	CXCL5	4.068734
CLU	10.488473	HIST1H2AL	4.06839
HIST1H3H	10.055442	HIST1H2BK	4.0005674
TREML1	9.817099	MKI67	3.9941673
SELP	9.693766	DDEF2	3.9686396
RGS18	9.254353	MPP1	3.8596146
DAB2	9.16994	PDLIM1	3.8284059
SDPR	8.88533	GP9	3.82021
MGC13057	8.472418	HIST1H2AH	3.6215994
SH3BGRL2	8.275794	CDK2AP1	3.607773
RAB27B	7.5997753	GNLY	3.5492887
RRM2	7.436925	HIST1H2BB	3.4699175
HIST1H4H	6.811315	LOC26010	3.3935134
CA2	6.2071877	CTDSPL	3.329987
C5orf4	5.7060795	MX1	3.2079318
GUCY1B3	5.387233	MPL	3.1683707
DTL	5.256297	GP1BA	3.1271737
MMD	5.2452474	CD38	3.0804687

Table 7B. SLE 患者末梢血 T 細胞 RNA プールにおける遺伝子発現の網羅的解析
結果 (2nd array; 低疾患活動性群)

Gene symbol	Fold change
<i>IFI44L</i>	16.942774
<i>IFIT1</i>	9.205521
<i>IFIT3</i>	9.082994
<i>HLA-DRB1</i>	8.012405
<i>IFI44</i>	7.229542
<i>HLA-DRB5</i>	6.2998953
<i>MX1</i>	5.304364
<i>IFNG</i>	4.753646
<i>IFI6</i>	4.606562
<i>RSAD2</i>	4.4700418
<i>HERC5</i>	4.4184895
<i>EGR2</i>	4.046869
<i>CCL4</i>	3.8603086
<i>HERC6</i>	3.7780907
<i>USP18 USP41</i>	3.699437
<i>RGS1</i>	3.6069634
<i>OAS1</i>	3.485444
<i>OAS3</i>	3.4429634
<i>AREG LOC727738</i>	3.3879638
<i>PARP9</i>	3.2652586

両群に共通して高発現していた遺伝子を太字で、IFN 誘導遺伝子をイタリックで示した。

4.4 SLE 患者の末梢血 T 細胞における Mx1 遺伝子発現量

4.4.1 方法

SLE 患者の末梢血 T 細胞では疾患活動性に関わらず、Mx1 および RGS1 の遺伝子発現が亢進していることから、次に、Mx1, RGS1 の mRNA の発現量を real-time qPCR を用いて、定量的に評価した。

4.3.1 の記載と同様に純化した T 細胞から RNA を精製し、SuperScript (Invitrogen) を用いて逆転写を行い、cDNA を作製した。得られた cDNA を Mx1, RGS1, GAPDH に対する特異的なプライマー (Mx1: Hs00895598_m1, RGS1: Hs001752960_m1, GAPDH: Hs00266705_m1) と TaqMan Universal Master Mix を用い、ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) で初期変性 (95°C, 10 分) 後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクル増幅した。各サンプルの mRNA の発現量を GAPDH mRNA 発現量で補正後、健常人の代表サンプル 1 検体を基準値として $\Delta\Delta CT$ 法による定量評価を行った。

4.4.2 統計学的解析

SLE 患者群と健常人群における Mx1 あるいは RGS1 遺伝子発現量 ($\Delta\Delta CT$ 値) の比較は、Mann-Whitney の U 検定によりノンパラメトリック解析を行った。また、各群における遺伝子発現量の分布については、Kolmogorov-Smirnov 検定を用いて正規性があることを確認し、Mx1 あるいは RGS1 の遺伝子発現量と BILAG による疾患活動性の相関関係を Pearson の積率相関係数により解析した。

4.4.3 対象患者

SLE 患者 34 例、年齢 34.9 ± 11.7 歳、健常人 22 例、平均年齢 33.9 ± 4.6 歳を対象とした。背景を Table 8 に示す。

Table 8. 対象患者背景

		SLE 患者	健常人
対象人数	n	34	22
女性 / 男性	n	33 / 1	20 / 2
年齢 平均 $\pm$ SD	(歳)	34.9 ± 11.7	33.9 ± 4.6
臓器障害			
NPSLE	n	11	N/A
LN	n	6	N/A
NPSLE+LN	n	7	N/A

NPSLE, neuropsychiatric systemic lupus erythematosus; LN, lupus nephritis; N/A, not available

4.4.4 結果 - SLE 患者の末梢血 T 細胞における Mx1, RGS1 遺伝子発現量-

SLE 患者の末梢血 T 細胞における Mx1 および RGS1 の遺伝子発現量は健常人と比較し、有意に SLE 患者で高発現していた (Figure 4, 5)。しかし、それぞれの遺伝子発現量と疾患活動性 BILAG index に相関関係は認められなかった (Figure 6, 7)。

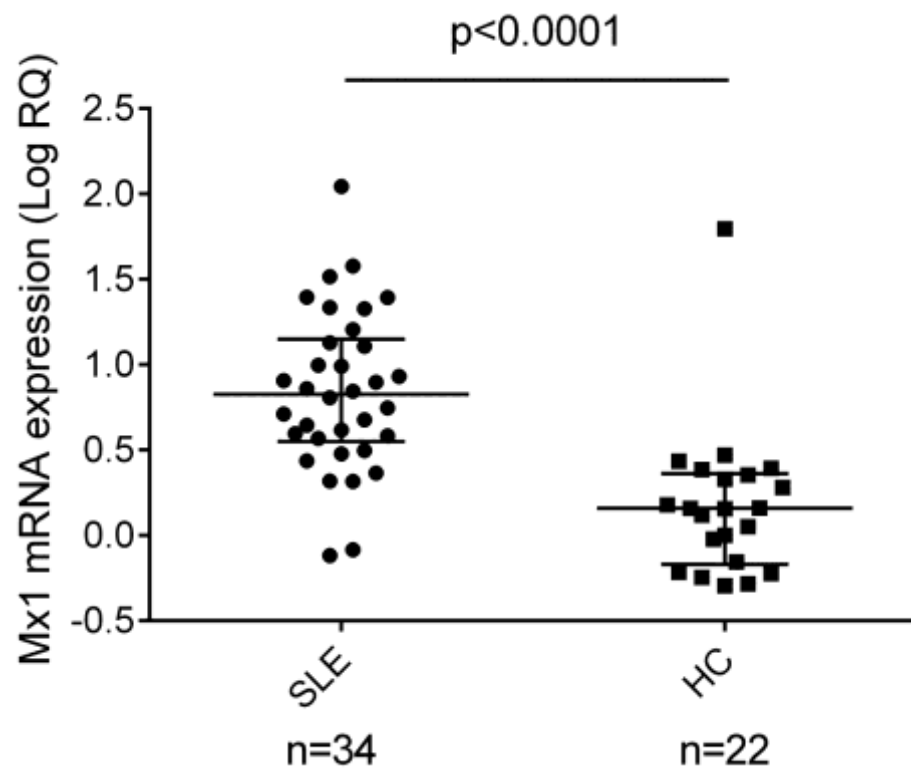


Figure 4. SLE 患者末梢血 T 細胞における Mx1 遺伝子発現量 (Real-time qPCR)
SLE 患者の末梢血 T 細胞における Mx1 遺伝子発現量は、健常人と比較し、有意に高発現していた ($p<0.0001$, Mann-Whitney U 検定)。

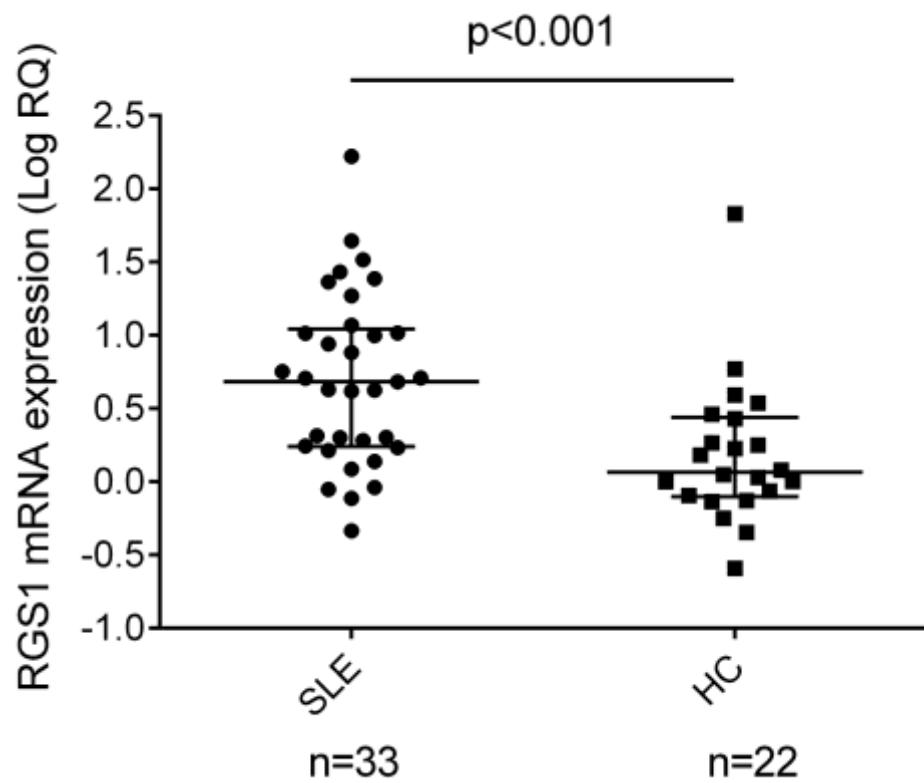


Figure 5. SLE 患者末梢血 T 細胞における RGS1 遺伝子発現量 (Real-time qPCR)
 SLE 患者の末梢血 T 細胞における RGS1 遺伝子発現量は、健常人と比較し、有意に高発現していた ($p < 0.001$, Mann-Whitney U 検定)。

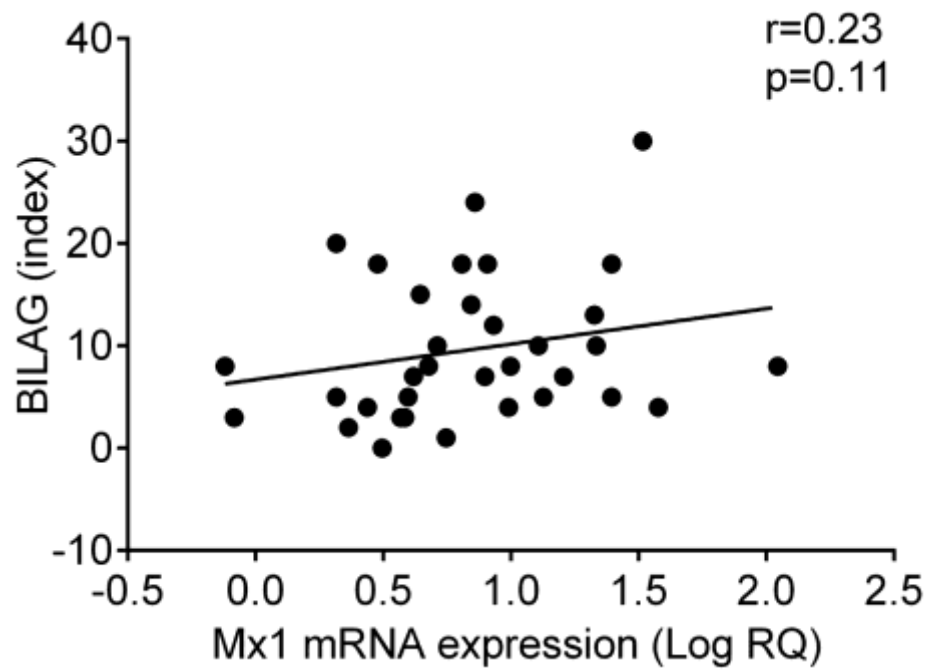


Figure 6. Mx1 遺伝子量と BILAG との相関関係

Mx1 遺伝子量と BILAG index 間に相関関係は認められなかった (Pearson の積率相関係数)。

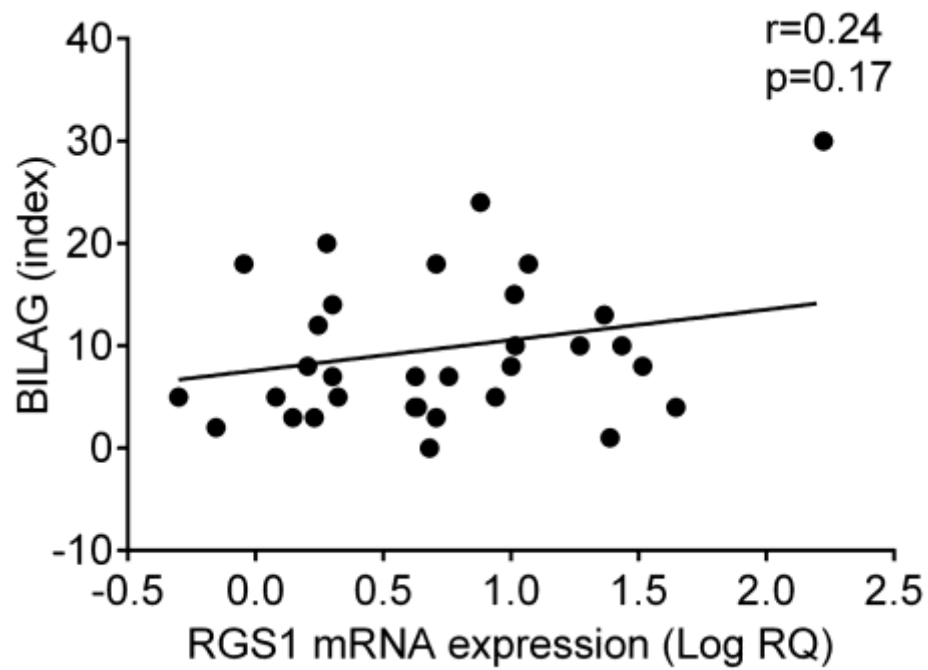


Figure 7. RGS1 遺伝子量と BILAG との相関関係
RGS1 遺伝子量と BILAG index 間に相関関係は認められなかった (Pearson の積率相関係数)

4.5 考察

本研究では SLE 患者の末梢血 T 細胞では疾患活動性に関わらず、IFN 誘導遺伝子の 1 つである Mx1 および RGS1 が異常発現していることが示された。

SLE では、I 型 IFN が SLE の病態形成を促進するサイトカインのひとつとして重要^{5-7,71-73}であり、本研究において SLE 患者由来末梢血 T 細胞で示したことと同様に、他の疾患と比較して、Mx1 や RGS1 を含む IFN 誘導遺伝子が PBMC で高発現しており、代表的な IFN 誘導遺伝子発現量から算出した IFN スコアが SLE 診断の新たな biomarker であると報告されている^{8,74-76}。また、SLE の活動性の指標である SLEDAI が高いほど、IFN スコアも高いとする報告もあり^{75,76}、IFN α 阻害薬 (sifalimumab)での治療により、IFN スコアが低下することも報告されている⁷⁷。自己抗体との関連では抗 U1-RNP 抗体、抗 Sm 抗体、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体陽性、抗 dsDNA 抗体陽性例では Mx1 発現が高いとも報告されている⁷⁸。一方で、経時的な活動性の推移とは相関はしないと報告もあり⁷⁹⁻⁸¹、SLE の heterogeneity という疾患特徴、評価法、解析手法、publication bias 等に起因するものと考えられる。

Mx1 は I 型 IFN によって誘導される代表的な IFN 誘導遺伝子の 1 つであり、Mx1 遺伝子は 21 番染色体長腕の 22.3 に位置し、分子量は 75.4kDa である。樹状細胞、単球、T 細胞、B 細胞、リンパ節、肺、神経にも発現しているとされる。その構造は GTPase domain, middle domain (MD), GTPase effector domain からなり、オリゴマーを形成して細胞質に存在し、ウイルス感染時にウイルス RNP に結合、転写を抑制することで、抗ウイルス作用を発揮する⁸²⁻⁸⁵。ウイルス感染と同様に、Mx1 の過剰発現が Swiss mouse 3T3 cell を用いた tunicamycin による小胞体ストレスを介して細胞死を誘導する報告があり⁸⁶、子宮上皮細胞由来のエクソソームに Mx1 を認めたことからエクソサイトーシスにも関わるとも考えられている⁸⁷。RGS1 も同様に IFN 誘導遺伝子の 1 つであるが、SLE における発現亢進の報告^{88,89}と SLE の T 細胞においては発現が低下していると報告があり⁹⁰、定まった見解は得られていない。このような状態から、その機能が比較的良好にわかっている Mx1 は多くの基礎研究において IFN 誘導遺伝子発現のマーカーとして使用されている^{75,76,91}。しかし、これまでの報告で、SLE 末梢血において Mx1 が高発現していることが病態形成にどう関与しているかは不明であり、また、特定の臓器障害との関連性についても明らかにはなっていない。

第一章において SLE では大量ステロイド投与後に精神神経症状を発症する頻度が高く、その独立したリスクファクターとして精神神経疾患の既往および APS の合併を示した。しかし、その明確な発症機序、病態関連因子は明らかにはなっていない。Mx1 と中枢神経疾患との関連では、多発性硬化症 (MS) で Mx1 の高発現が報告されている⁹²。MS 患者の中枢神経組織病変部位において、リンパ球、アストロサイト、上皮細胞に Mx 蛋白が染色され、さらに、脳脊髄液中のリンパ球においても同様に Mx 蛋白が染色されるという報告がある⁹³。また、ウイルス性脳炎においてもその脳病変部位での Mx1 発現が報告されている⁹⁴。そ

ここで、Mx1 が NPSLE の病態にも関与している可能性を考え、SLE の主要臓器障害のひとつである NPSLE と Mx1 の関連性について検討することとした。

5. 第三章

精神神経ループスと

Myxovirus Resistance Protein1 (Mx1) の

関連性の検討

5.1 背景

第一章では SLE において大量ステロイド投与後に発症する精神神経症状 (PSNP-SLE) の頻度は高く、その独立したリスクファクターとして、精神疾患の既往および APS の合併が抽出され、PSNP-SLE はステロイド投与後に顕在化した NPSLE である可能性を示した。第二章では疾患活動性に関わらず SLE の末梢血 T 細胞では IFN 誘導遺伝子である Mx1 の発現が亢進していることを示した。Mx1 が高発現している中枢性疾患として多発性硬化症 (MS)^{92,93} が報告されており、また、ウイルス性脳炎においてもその病変部位での Mx1 発現が報告されている⁹⁴。そこで、Mx1 が NPSLE の病態にも関与している可能性を考え、NPSLE 患者群における血清、髄液 Mx1 濃度を ELISA 法にて測定し、SLE の臨床パラメータとの関連を検討した。さらに脳病変組織における Mx1 発現を NPSLE 剖検例の脳組織を用いて Mx1 免疫組織化学染色を行った。

5.2 目的

NPSLE における Mx1 の発現量、および発現部位との関連性を明らかにし、病態への関与を明らかにする。

5.3 Mx1 免疫組織化学染色 -予備実験-

5.3.1 HEK-293 細胞を用いた Mx1 のトランスフェクション

ラビット抗ヒト Mx1 ポリクローナル抗体 (NOVOUSBIO NBP1-32905, UK) が免疫組織化学染色に適切に使用できるか判断するために、pcDNA 3.1-Mx1 vector を Mx1 の発現していない HEK-293 細胞 (line CRL-1573 ; American type Culture Collection) に PEI (Polyethylenimine) を用いてトランスフェクションを行い、免疫組織学染色を行った。

5.3.2 Mx1 をトランスフェクトされた HEK-293 細胞の免疫組織学染色

Mx1 あるいは Empty Vector をトランスフェクトした HEK-293 細胞を用いて、遠心後、4%パラホルムアルデヒドを加え、24 時間固定した。固定後パラフィン包埋したのち、3 μ m の厚さの組織切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。キシレンにて脱パラフィンを行い、エタノールで洗浄、精製水に置換した。抗原賦活化液 High pH (DAKO)を加え、95°C、20 分間静置したのち、水洗した。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するため、0.3%過酸化水素を混ぜた PBS に常温で 30 分間浸した。一次抗体 ラビット抗ヒト Mx1 ポリクローナル抗体 (NOVOUSBIO, NBP1-32905, UK) を 300 倍希釈、滴下し、常温で 30 分間、静置した。トリス緩衝生理食塩水 (TBS) にて 2 回洗浄後、二次抗体 EnVision+DAB キット(DAKO) を用いて、EnVision を加え、常温で 30 分間静置し、TBS で 2 回洗浄ののち、DAB 染色を行った。

5.3.3 結果

ラビット抗ヒト Mx1 ポリクローナル抗体 (NOVOUSBIO NBP1-32905, UK) により、Empty Vector をトランスフェクトした HEK-293 細胞は染色されなかったが Mx1 をトランスフェクトした HEK-293 細胞は染色され、ヒト Mx1 に特異的にはたらき、免疫組織化学染色に使用できることを確認した(Figure 8)。

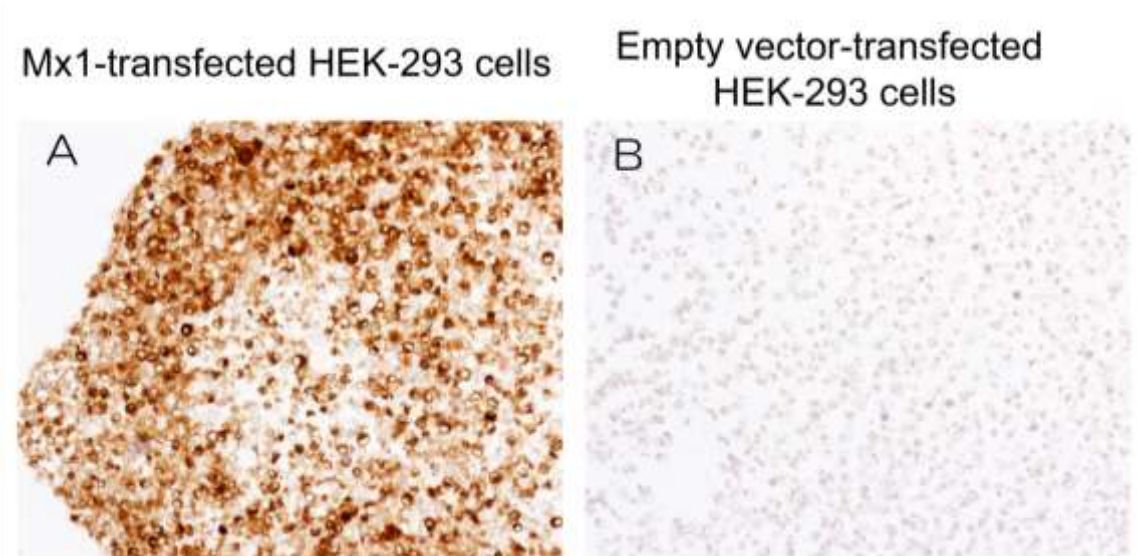


Figure 8. Mx1 をトランスフェクトした HEK-293 細胞を用いた Mx1 の免疫組織化学染色

A. Mx1 をトランスフェクトした HEK-293 細胞、B. Empty Vector をトランスフェクトした HEK-293 細胞

5.4 NPSLE と Mx1 の関連性の検討

5.4.1 対象と方法

5.4.1.1 研究デザイン

本研究は単施設で行われた後ろ向き観察研究である。NPSLE 患者、精神神経症状を認めない SLE 患者 (non NPSLE 患者)、コントロール群 (頭痛や運動障害、感覚障害をきたしたが、精査により中枢性器質的疾患が否定された患者群)、変性疾患 (脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、パーキンソン病、痙性対麻痺)、多発性硬化症 (MS) 患者を対象とした。さらに中枢神経の病変部における Mx1 発現を検討するため、NPSLE 剖検患者の脳組織を用いて Mx1 の免疫組織化学染色を行った。なお、本研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、保存血清、髄液、剖検患者組織の研究使用について、文書同意を得て行った。

5.4.1.2 評価項目

保存血清、および髄液を用いて Mx1 濃度を ELISA 法 (Human Mx1 ELISA kit, MyBioSource, MBS818713 または MBS2509987) で検討した。

SLE 患者においては血清、髄液 Mx1 濃度との関係、および臨床パラメータとして、SLEDAI-2K、髄液 IgG index, Qalb 値、血清 C3, C4, CH50 値、抗核抗体 (ANA)、抗 DNA 抗体、抗 U1-RNP 抗体、抗 Sm 抗体、抗 SS-A/Ro 抗体、抗 SS-B/La 抗体、ループスアンチコアグラント (LA)、抗カルジオリピン抗体 (aCL)、抗 β 2-glycoprotein I (β 2GPI) 抗体、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) を含む抗リン脂質抗体 (aPLs) を評価し、各 Mx1 濃度との相関関係を解析した。

5.4.1.3 NPSLE 剖検患者における脳組織の Mx1 免疫組織化学染色

NPSLE 剖検患者 2 例で得られた脳を 4%パラホルムアルデヒドにより固定した。固定後パラフィン包埋したのち、3 μ m の厚さの組織切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。キシレンにて脱パラフィンを行い、エタノールで洗浄、精製水に置換した。抗原賦活化液 High pH (DAKO)を加え、95℃で 20 分間静置したのち、水洗した。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するため、0.3%過酸化水素を混ぜた PBS に常温で 30 分間浸した。一次抗体 ラビット抗ヒト Mx1 ポリ

クローナル抗体 (NOVOUSBIO NBP1-32905, UK) を 300 倍希釈、滴下し、常温で 30 分間、静置した。TBS にて 2 回洗浄後、二次抗体 EnVision+DAB キット (DAKO) を用いて、EnVision を加え、常温で 30 分間静置し、TBS で 2 回洗浄のち、DAB 染色を行った。その後、ヘマトキシリンによる核染色を行った。

5.4.1.4 統計学的解析

カテゴリー変数は患者数 (%), 連続変数は中央値 [範囲]、平均 $\pm$ 標準偏差で示した。血清、髄液 Mx1 濃度における群間比較は Kruskal-Wallis Test を行い、3 群間で有意に差があるか確認し、各群との比較は Mann-Whitney の順位和検定を行った。また、血清 Mx1 濃度、髄液 Mx1 濃度の相関関係、血清 Mx1 濃度、髄液 Mx1 濃度と各種臨床パラメータとの相関関係は Spearman の順位相関係数にて統計学的解析を行った。各同一患者間の血清 Mx1、髄液 Mx1 濃度の関係は Wilcoxon paired signed rank test を行った。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, California, USA) を用いて行った。

5.4.2 結果

5.4.2.1 対象患者

NPSLE 患者 27 例と精神神経症状を認めない SLE 患者 (non-NPSLE 患者) 20 例 (うち血清のみが 11 例), コントロール群 (頭痛, けいれん, 意識障害, 運動障害, 感覚障害などを呈し精査したが中枢性器質的疾患が否定された患者群) 15 例, 神経変性疾患 15 例 (脊髄小脳変性症 6 例, 筋萎縮性側索硬化症 4 例, 進行性核上性麻痺 2 例, パーキンソン病 1 例, 大脳基底核変性症 1 例, 痙性対麻痺 1 例), MS 患者 13 例を対象として抽出した。Table 9 に患者背景を示す。SLE 群間では NPSLE 群の方が、年齢が高く、長い罹病期間および治療歴を有する患者が多かった。また、入院後の治療として、ステロイドパルスの使用が NPSLE 群に多かったが、疾患活動性の指標である SLEDAI-2K に有意差はなかった。他の疾患群では変性疾患がより高齢であり、男性が多いという患者背景の違いを認めた。

Table 9. 患者背景

	NPSLE	non-NPSLE	コントロール群	変性疾患	MS
対象人数, n	27	20	15	15	13
女性, n (%)	24 (88.9)	15 (75.0)	10 (66.7)	4 (26.7)	11 (84.6)
入院時年齢 (歳)	35.6 ± 15.1	31.0 ± 15.7	37.2 ± 23.0	64.7 ± 10.3	40.5 ± 11.7
発症時年齢 (歳)	29.3 ± 16.5	25.1 ± 15.9	N/A	N/A	N/A
罹病期間 (月)	48 [1-228]	25 [1-378]	N/A	N/A	N/A
入院前治療歴					
CS 投与, n (%)	19 (70.3)	11 (55.0)	N/A	N/A	N/A
CS パルス, n (%)	8 (29.6)	2 (10.0)	N/A	N/A	N/A
免疫抑制剤, n (%)	10 (37.0)	7 (35.0)	N/A	N/A	N/A
入院後治療					
PSL 投与量 (mg/日)	54.0 ± 13.1	46.4 ± 16.0	N/A	N/A	N/A
CS パルス, n (%)	21 (77.8)	8 (40.0)	N/A	N/A	N/A
免疫抑制剤, n (%)	16 (59.3)	14 (70.0)	N/A	N/A	N/A
SLEDAI-2K	16.6 ± 11.0	15.1 ± 6.4	N/A	N/A	N/A

カテゴリー変数は患者数 (%), 連続変数は中央値 [範囲], 平均 ± 標準偏差で示した。

MS, multiple sclerosis: N/A, not available: PSL, prednisolone: SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000

5.4.2.2 血清 Mx1 濃度

NPSLE 患者 27 例, non-NPSLE 患者 20 例、神経学的検査を施行も炎症性器質的疾患を認めなかったコントロール患者 15 例, 変性疾患 (DD) 患者 15 例, MS 患者 13 例を対象に解析した。中間値[IQR]にてそれぞれ、534.8ng/ml [274.8 – 710.9], 217.9ng/ml [158.0 – 453.2], 256.9ng/ml [218.4 – 296.2], 202.1ng/ml [182.3 – 300.3], 176.8ng/ml [156.9 – 203.0]であった(Figure 9)。5 群間で Kruskal-Wallis Test にて有意に差を認めることを確認 ($p<0.05$) し、NPSLE 群が他の各群と比較して有意に血清 Mx1 濃度が高かった ($p<0.05$, Mann-Whitney U test, Figure 9)。

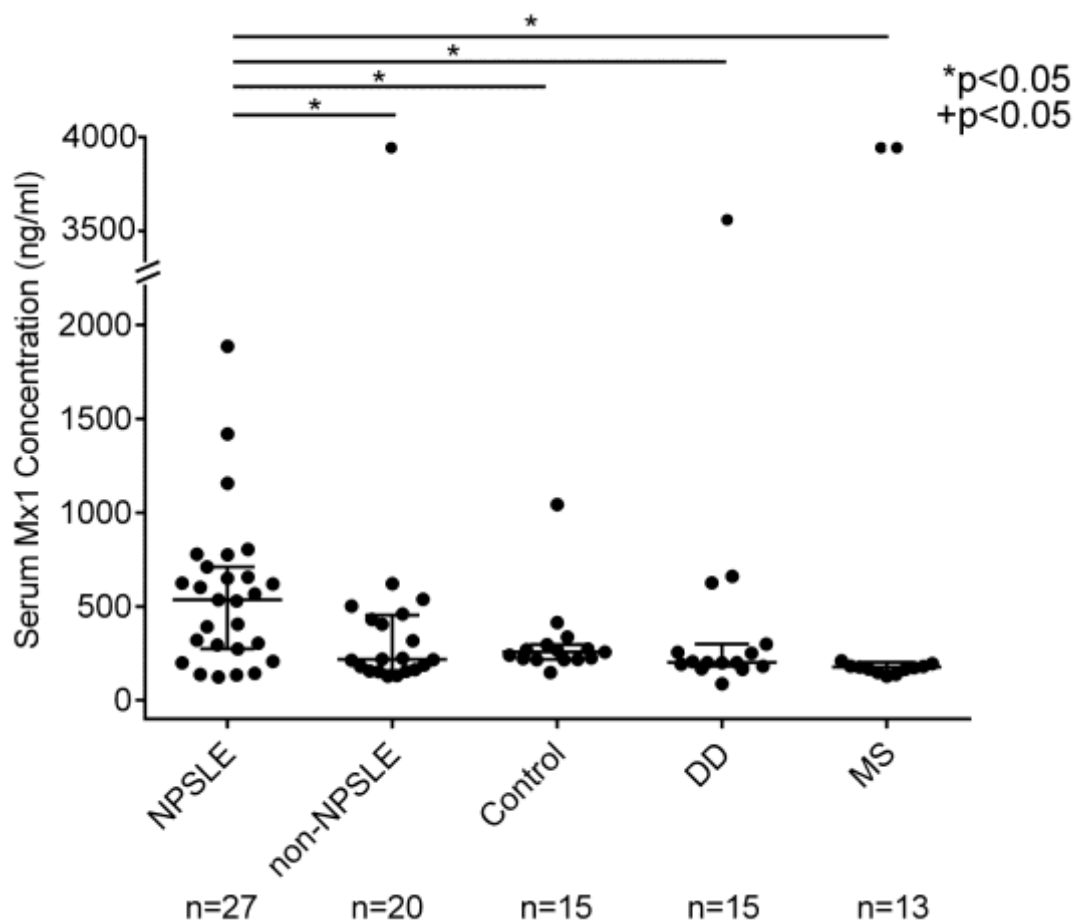


Figure 9. 血清 Mx1 濃度の比較

5 群間で Kruskal-Wallis Test にて有意に差を認めることを確認した(+ $p<0.05$)。Mann-Whitney U test では NPSLE 群が他の各群と比較して有意に血清 Mx1 濃度が高かった (* $p<0.05$)。

DD, degenerative disease: MS, multiple sclerosis: NPSLE, neuropsychiatric systemic lupus erythematosus

5.4.2.3 髄液 Mx1 濃度

NPSLE 患者 27 例, non-NPSLE 患者 9 例, 神経学的検査を施行も炎症性器質的疾患を認めなかったコントロール患者 15 例, DD 患者 15 例, MS 患者 13 例を対象に解析した。中間値 [IQR]にてそれぞれ、573.1ng/ml [262.5 – 794.2], 555.2ng/ml [458.7 – 746.2], 443.2ng/ml [413.9 – 463.6], 281.8ng/ml [270.1 – 381.6], 254.9ng/ml [240.6 – 273.2]であった(Figure 10)。5 群間で Kruskal-Wallis Test にて有意に差を認めることを確認 ($p<0.05$)し、NPSLE 群は DD 群, MS 群と比較し、有意に髄液 Mx1 濃度が高かった ($p<0.05$, Mann-Whitney U Test)。また non-NPSLE 群もコントロール群, DD 群, MS 群と比較し、有意に髄液 Mx1 濃度が高かった ($p<0.05$, Mann-Whitney U Test)。しかし、NPSLE 群と non-NPSLE 群に有意差は認めなかった (Figure 10)。

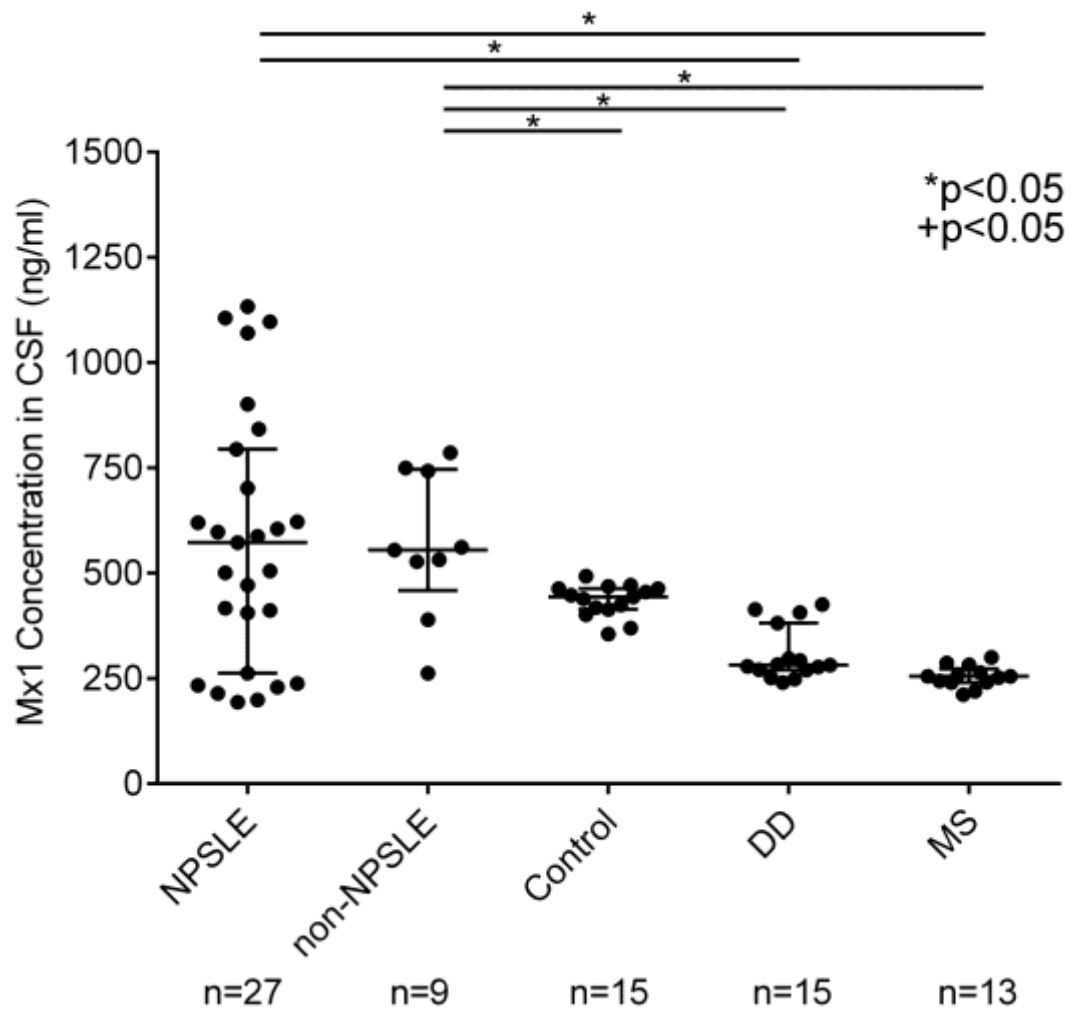


Figure 10. 髄液 Mx1 濃度の比較

5 群間で Kruskal-Wallis Test にて有意に差を認めることを確認した (+p<0.05)。Mann-Whitney U Test で NPSLE 群は DD 群, MS 群と比較し、有意に髄液 Mx1 濃度が高かった (*p<0.05)。また non-NPSLE 群もコントロール群, DD 群, MS 群と比較し、有意に髄液 Mx1 濃度が高かった (*p<0.05)。

DD, degenerative disease: MS, multiple sclerosis: NPSLE, neuropsychiatric systemic lupus erythematosus

5.4.2.4 血清 Mx1 濃度と髄液 Mx1 濃度の関係

SLE 群において、血清 Mx1 濃度および髄液 Mx1 濃度の関係は強い相関を認めた ($r=0.73$, $p<0.0001$, Spearman's rank correlation coefficient, Figure 11).

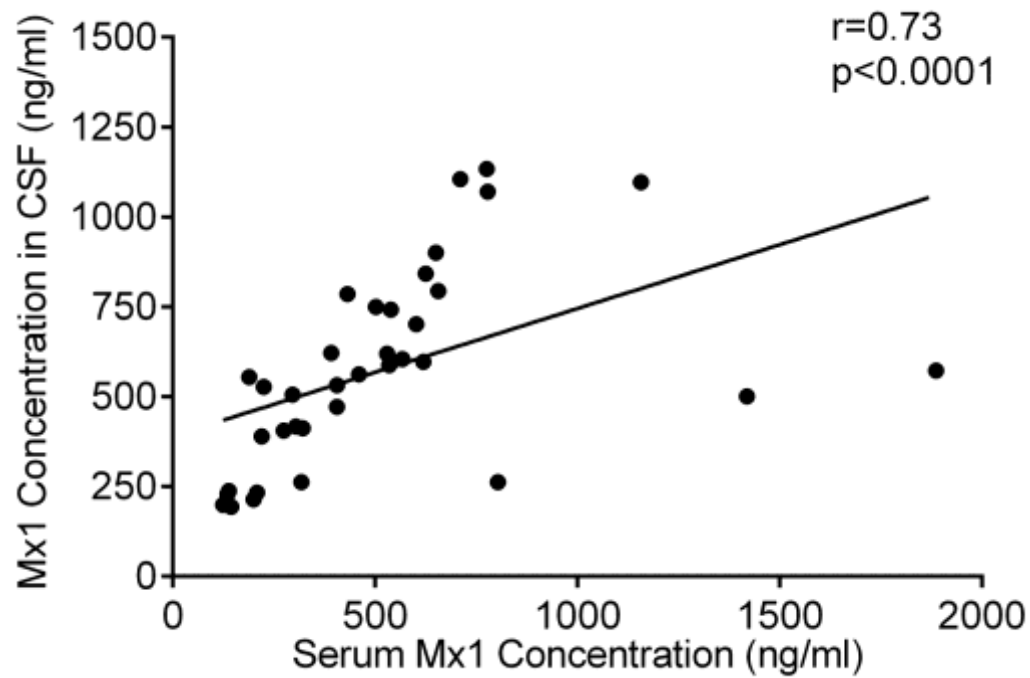


Figure 11. 血清 Mx1 濃度と髄液 Mx1 濃度の相関関係

SLE 群において、血清 Mx1 濃度と髄液 Mx1 濃度は強い正の相関を認めた ($r=0.73$, $p<0.0001$, Spearman's rank correlation coefficient)。

5.4.2.5 SLE 群の同一患者内における血清 Mx1 濃度と髄液

Mx1 濃度の関係

NPSLE 群と non-NPSLE 群の 2 群でそれぞれ個々の同一患者内の血清 Mx1 濃度と髄液 Mx1 濃度の関係について解析した (Figure 12)。両群とも有意に血清 Mx1 濃度よりも髄液 Mx1 濃度が高かった ($p<0.05$, Wilcoxon paired signed rank test)。

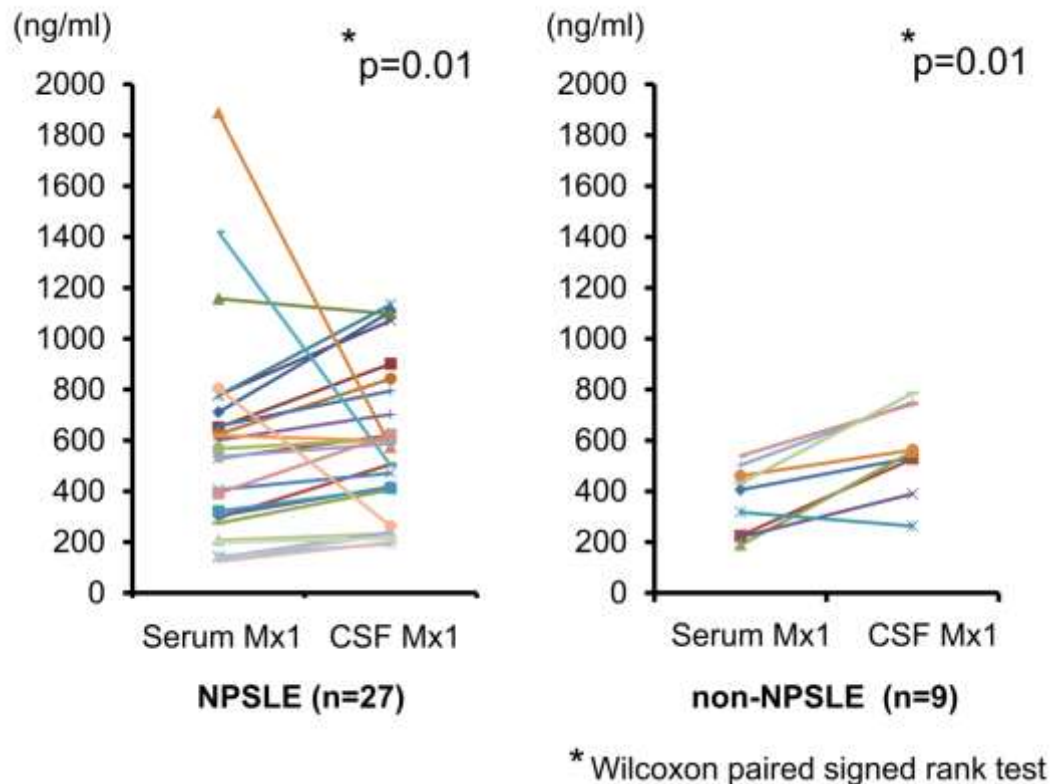


Figure 12. NPSLE 群、non-NPSLE 群において個々患者での血清 Mx1 濃度と髄液 Mx1 濃度の関係

NPSLE 群と non-NPSLE 群とも有意に血清 Mx1 濃度よりも髄液 Mx1 濃度が高かった ($*p<0.05$, Wilcoxon paired signed rank test)。

5.4.2.6 SLE 群における血清、髄液 Mx1 濃度と臨床パラメータとの関係

SLE 群 (n=36) において血清、髄液 Mx1 濃度と SLEDAI-2K, 血清 C3, C4, CH50 値, 抗 DNA, U1-RNP, Sm 抗体価との関係では有意な相関関係は認めなかった (Spearman's rank correlation coefficient) 。 Table 10 に結果を示す。

Table 10. SLE における血清、髄液 Mx1 濃度と臨床パラメータとの関係

	血清 Mx1 濃度 n=36		髄液 Mx1 濃度 n=36	
	r	p-value	r	p-value
SLEDAI-2K	-0.20	0.18	-0.20	0.24
C3 (mg/dl)	-0.09	0.55	0.19	0.27
C4 (mg/dl)	-0.25	0.09	0.18	0.28
CH50 (U/ml)	-0.09	0.54	0.11	0.56
抗 DNA 抗体 (U/ml)	0.18	0.25	-0.14	0.46
抗 U-1 RNP 抗体 (U/ml)	0.02	0.90	-0.14	0.45
抗 Sm 抗体 (U/m)	0.05	0.77	-0.16	0.38
抗 SS-A 抗体 (U/ml)	0.16	0.30	0.02	0.90

Spearman's rank correlation coefficient

5.4.2.7 NPSLE 群における血清、髄液 Mx1 濃度と臨床パラメータとの関係

NPSLE 群 (n=27) において、血清、髄液 Mx1 濃度と SLEDAI-2K, 血清 C3, C4, CH50 値, 抗 DNA, U1-RNP, Sm 抗体価との関係では有意な相関関係は認めなかった (Spearman's rank correlation coefficient) 。 Table 11 に結果を示す。

Table 11. NPSLE 群における血清、髄液 Mx1 濃度と臨床パラメータとの関係

	血清 Mx1 濃度 n=27		髄液 Mx1 濃度 n=27	
	r	p-value	r	p-value
SLEDAI-2K	-0.19	0.33	-0.17	0.38
C3 (mg/dl)	0.03	0.88	0.26	0.19
C4 (mg/dl)	-0.03	0.89	0.23	0.24
CH50 (U/ml)	0.05	0.82	0.31	0.11
抗 DNA 抗体 (U/ml)	0.12	0.57	-0.12	0.57
抗 U1-RNP 抗体 (U/ml)	-0.07	0.72	-0.13	0.53
抗 Sm 抗体 (U/ml)	-0.05	0.80	-0.30	0.19
抗 SS-A 抗体 (U/ml)	0.28	0.16	0.07	0.74

Spearman's rank correlation coefficient

5.4.2.8 NPSLE 剖検例における病変脳組織の Mx1 免疫組織化学染色

NPSLE 剖検患者 2 例における脳組織を用いて Mx1 免疫組織化学染色を行った。1 例目は 60 歳代女性、NPSLE, ループス腎炎 (LN), 汎血球減少をきたし、ステロイドパルス療法, 血漿交換療法, IVCY による加療を行ったが、第 120 病日に永眠された。2 例目は 40 歳代女性、NPSLE により加療歴があるがウイルス性腸炎を契機に NPSLE の再燃, LN を発症し、ステロイドパルス療法, 血漿交換療法, TAC, MMF, IVCY, RTX による加療を行ったが、肺胞出血をきたし第 60 病日に永眠された。1 例目の脳組織の Mx1 免疫組織化学染色を Figure 13 に示す。大脳白質深部に脱髄性病変を認め、Mx1 の染色性を認める細胞, 顆粒状物質を認めた。小脳血管に石灰化を認めるが正常小脳組織に Mx1 染色は認められなかった。2 例目では脳組織に Mx1 染色は認められなかった。

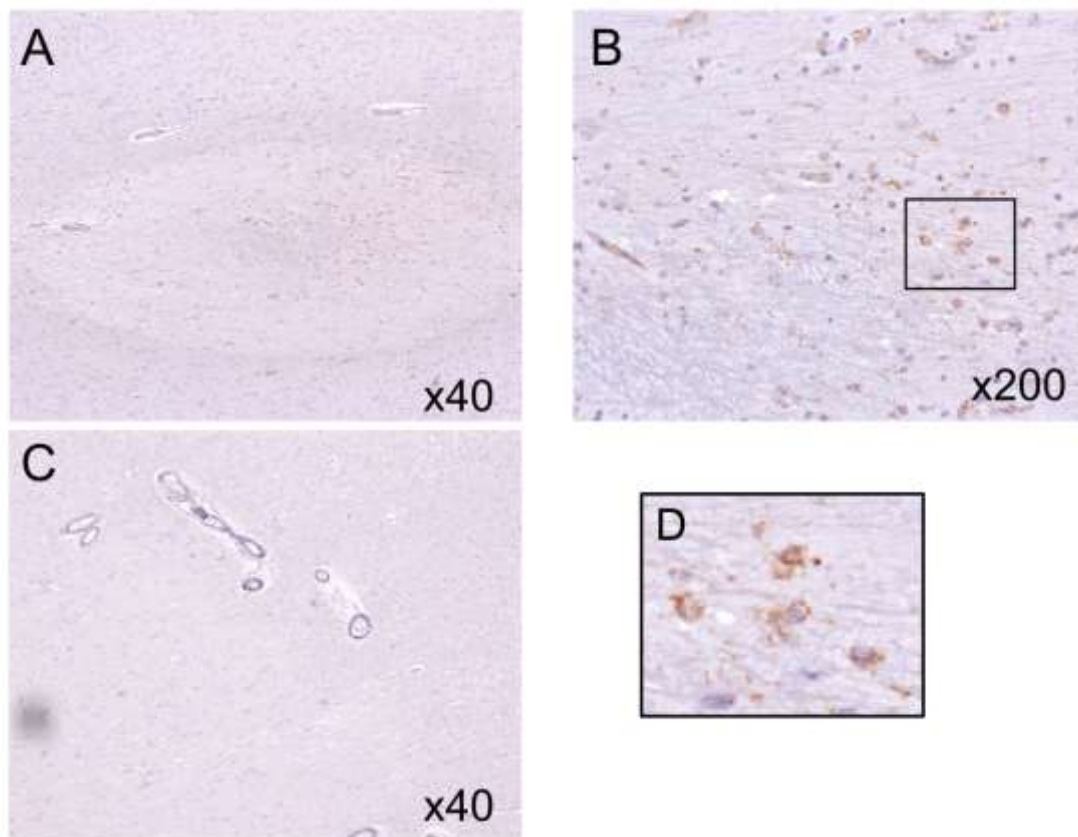


Figure 13. NPSLE 剖検例 (1 例目) における Mx1 免疫組織化学染色

大脳白質深部に脱髄性病変を認め、同部位に Mx1 で染色される細胞，顆粒状物質を認めた(A. $\times 40$, B. $\times 200$, D. 拡大図) が、小脳の正常脳組織に Mx1 染色は認められなかった(C)。

5.4.3 他の自己免疫疾患群における血清 Mx1 濃度

本研究で使用していた Human Mx1 ELISA kit (MyBioSource, MBS818713) が製造中止になったため、新たに Human Mx1 ELISA kit (MyBioSource, MBS2509987) を用いて再検討した。対象は LN, NPSLE 合併例が 5 例、NPSLE のみ 24 例、LN のみ 24 例、LN および NPSLE 以外の臓器障害の SLE 患者 10 例、多発性硬化症 (MS) 患者 10 例、変性疾患 (DD) 患者 10 例、神経学的器質疾患を認めなかったコントロール群 11 例、健常人 (HC) 20 例、関節リウマチ (RA) 患者 20 例、強皮症 (SSc) 患者 20 例を対象として測定した。しかし、新キットを用いた血清 Mx1 濃度は旧キットを用いた濃度よりも高く検出された。さらに Kruskal-Wallis test にて SLE と他の疾患群の間に有意な差はなく、また、NPSLE 患者群と non-NPSLE 患者群間にも差を認めなかった。つまり、新キットでは旧キットを用いた際に認めた結果に関する再現性は得られなかった (Figure 14)。

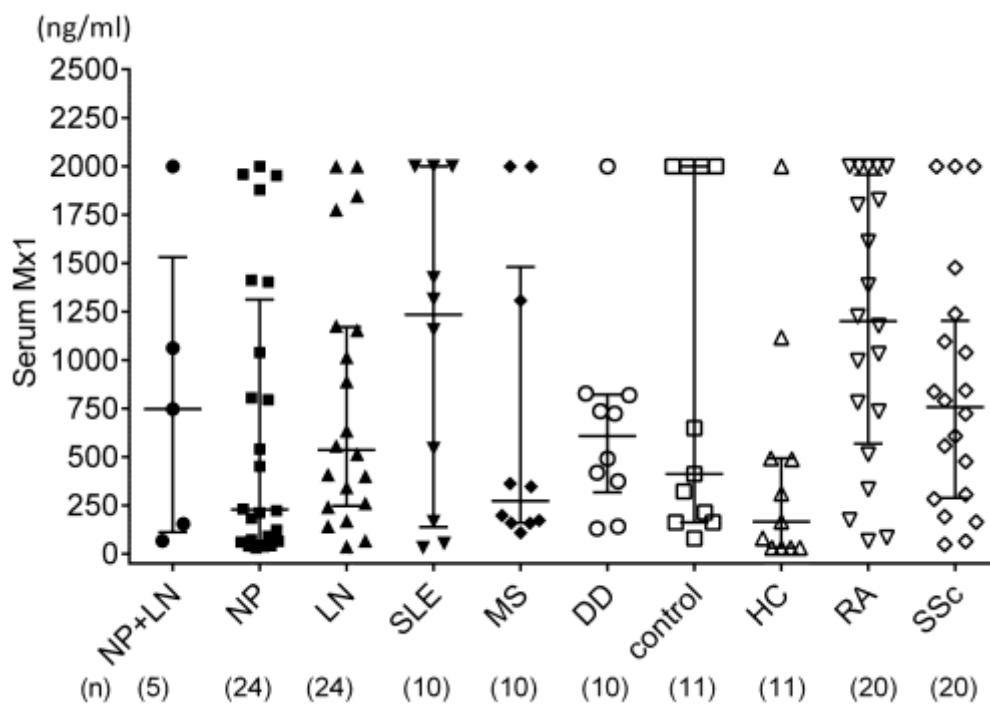


Figure 14. Human Mx1 ELISA kit (MyBioSource, MBS2509987) を用いた各種疾患の血清 Mx1 濃度

DD, degenerative disease; HC, healthy controls; LN, lupus nephritis; MS, multiple sclerosis; NP, Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus; RA, rheumatoid arthritis; SSc, systemic sclerosis

5.4.4 血清 Mx1 濃度とリウマチ因子の関係

ELISA 測定における Mx1 濃度へのリウマチ因子 (RF) の影響について RA 患者 20 例の血清を用いて検討した。Human Mx1 ELISA kit (MyBioSource, MBS2509987) を用いて測定した血清 Mx1 濃度とリウマチ因子の相関を Spearman の順位相関係数により解析した。しかし、相関関係は認めず、同 kit で測定した Mx1 濃度は RF の影響を受けなかった (Figure 15)。

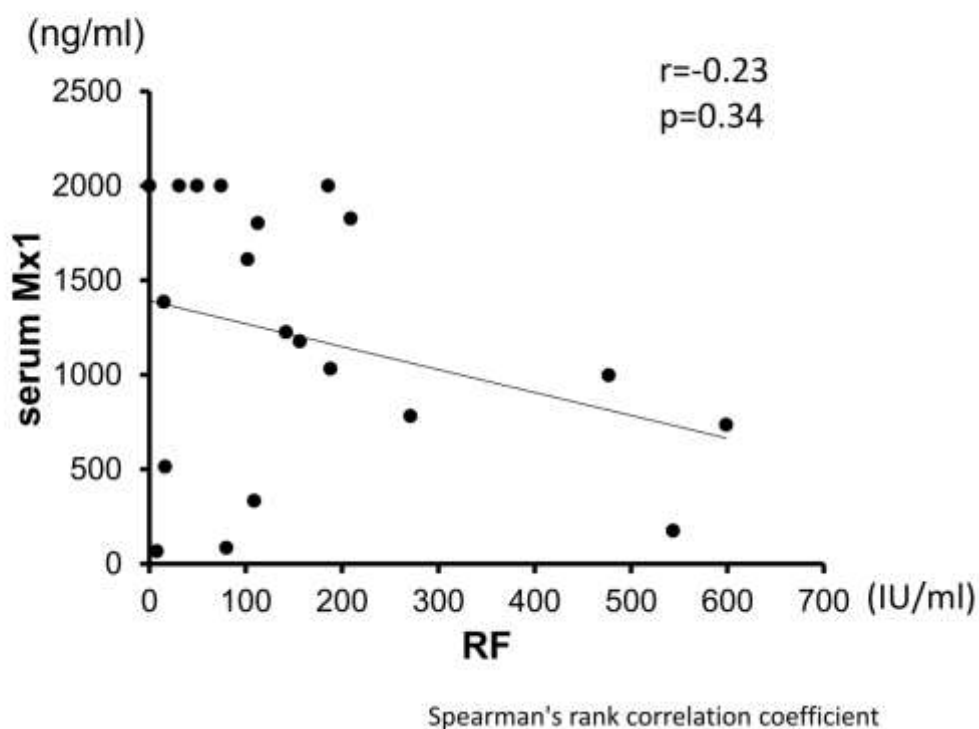


Figure 15. 血清 Mx1 濃度とリウマチ因子 (RF) の関係

MBS2509987 により測定した血清 Mx1 濃度は RF との相関を認めなかった (Spearman's rank correlation coefficient)。

5.5 考察

髄液 Mx1 濃度は血清 Mx1 濃度よりも有意に高値であり、正の相関を認めた。血清 Mx1 濃度は NPSLE で有意に高く、髄液 Mx1 濃度も SLE 群で有意に高かったが、髄液 Mx1 濃度の評価は神経病変を認めないループス腎炎症例での評価が限定的である。血清、髄液 Mx1 濃度と各種臨床パラメータとの間に相関は認めなかった。しかし、上記の結果が得られた Human Mx1 ELISA kit (MyBioSource, MBS818713) が製造中止になったため、新たに MyBioSource MBS2509987 での評価を行ったが、Figure 14 に示しように、RA 患者や SSc 患者でも高値であり、再現性のある有意な結果を得ることはできなかった。原因として RF による偽陽性も評価したが、明らかな影響はなかった。Mx1 は過剰発現による細胞死誘導⁸⁶やエクソサイトーシスによる分泌⁸⁷も報告されているが、ELISA での血清、髄液の Mx1 濃度測定系については今後さらに検討を要すると考えられた。NPSLE 剖検例では 1 例目は大脳白質の脱髄部に Mx1 染色を認めたが、2 例目では脳組織に Mx1 染色は認めなかった。2 例目は強力な免疫抑制療法後であることが脳組織での Mx1 発現に影響した可能性がある。MS 症例の脳組織病変部位に Mx1 染色を認めることが報告されており⁹³、治療前や経過中に NPSLE 患者の脳組織を得ることは困難であるが、今後、症例数を増やし、さらに検討する必要がある。次の研究として、SLE のもうひとつの主要臓器障害であるループス腎炎と Mx1 の関連について研究をすすめる方針とした。

6. 第四章

ループス腎炎と Myxovirus Resistance Protein 1 (Mx1) の関連性の検討

6.1 背景

SLE の病態を形成する重要なサイトカインのひとつとして I 型 IFN が報告されており^{5,71-73}、第二章では SLE 患者の末梢血 T 細胞においても IFN 誘導遺伝子のひとつである Mx1 および RGS1 が疾患活動性に関わらず、発現が亢進していることから、SLE 病態形成に強く関与している可能性が考えられた。PBMC における IFN 誘導遺伝子の発現が亢進、疾患活動性と相関しており^{8,76,95}、代表的な IFN 誘導遺伝子から算出した IFN スコアが診断に有用であることは報告されている⁷⁴が、臓器病変部位における発現を検討した報告は少ない。

ループス腎炎 (lupus nephritis: LN) は SLE の診断時に 21~65%、経過中に 40~82% に出現する SLE の主要臓器障害のひとつであり、糸球体係蹄、および、メサンギウムに免疫複合体が沈着、補体が活性化することで腎障害が生じる⁹⁶。腎組織分類として 1974 年に World Health Organization (WHO) 分類が作成され、1982 年、1995 年に改訂、さらに現在は臨床病理データを加味し、2003 年に ISN/RPS (International Society of Nephrology and Renal Pathology Society) 分類が作成され使用されている⁹⁷。ISN/RPS 分類の組織型と腎予後については、IV 型は予後が悪い傾向⁹⁸にあり、特に IV-G (A/C) 型や III+V, IV+V 型の予後が悪いと報告⁹⁹されている。このため、組織型により、免疫抑制療法の治療方針も異なる^{100,101}。LN における病理組織分類は非常に重要であり、組織学に有用なバイオマーカーの探索は LN の病態生理学の理解を深めると同時に治療方針の決定にも役立つ。

疾患特異的バイオマーカーの探索や発現異常遺伝子の検索のため、PBMC を用いた microarray による遺伝子の網羅的解析や Real-time qPCR による遺伝子発現量の測定が行われているが、その蛋白量の解析についての報告は少ない。そこで、第四章では LN 患者の PBMC における Mx1 蛋白量の定量的解析を行うこととした。市販されている Mx1 測定キットは前章で示したとおり再現性に疑問が生じたので、inhouse の sandwich ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) を構築し、腎生検組織における Mx1 蛋白の発現を検討することとした。

6.2 目的

LN の腎組織における Mx1 の発現を解析し、SLE の臓器障害病変部位での病態関与を検討する。

6.3 ヒト Mx1 Sandwich ELISA 構築 -予備実験-

6.3.1 ヒト Mx1 Sandwich ELISA 法の抗体条件検討

Mx1 蛋白のスタンダードとして、Mx1 recombinant protein (NOVOUSBIO, H00004599-P01, UK)、捕捉抗体としてラビット抗ヒト Mx1 ポリクローナル抗体 (NOVOUSBIO, NBP1-32905, UK)、検出抗体としてマウス抗ヒト Mx1 モノクローナル抗体 (ORIGENE, TA500357, USA)、3 次抗体にペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch)、検出には TMB substrate (SIGMA) を用い、450nm の吸光度 (OD) を測定した (Benchmark plusTM, BIO RAD)。

まず、抗体濃度の条件検討のため、捕捉抗体であるラビット抗ヒト Mx1 ポリクローナル抗体濃度を 1 ug/ml (1000 倍希釈), 2.5 ug/ml (400 倍希釈), 5 ug/ml (200 倍希釈) にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で調製、検出抗体であるマウス抗ヒト Mx1 モノクローナル抗体を 37.5 ng/ml (8000 倍希釈), 75 ng/ml (4000 倍希釈), 150 ng/ml (2000 倍希釈), 300 ng/ml (1000 倍希釈) に 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin) を PBS に加え作成したブロッキング溶液で調製した。Mx1 recombinant protein は 250 ng/ml, 25 ng/ml, 2.5 ng/ml にブロッキング溶液で調製し、Sandwich ELISA 法による格子実験を行った。

6.3.2 ヒト Mx1 Sandwich ELISA 法 プロトコール

既報にある Sandwich ELISA を参考^{102,103} とし、ヒト Mx1 Sandwich ELISA を行った。PBS で希釈した捕捉抗体ラビット抗ヒト Mx1 ポリクローナル抗体を各 well 50 μ l ずつ 96well マイクロプレート (NUNC) に散布し、4°C で overnight インキュベートした。捕捉抗体を除去し、PBS で 2 回洗浄後、ブロッキング溶液 (0.5% BSA/PBS) を各 well 200 μ l ずつ滴下、常温で 1.5 時間、インキュベートした。その間にスタンダードあるいはサンプルをブロッキング溶液で適切に希釈した。ブロッキング溶液を除去し、PBS で 2 回洗浄後、スタンダードあるいはサンプルを決めた well に 100 μ l ずつ滴下し、37°C で 1.5 時間、インキュベートした。その後、スタンダードあるいはサンプルを除去し、PBS-Tween で 2 回洗浄後に、検出抗体マウス抗ヒト Mx1 モノクローナル抗体を各 well 100 μ l ずつ滴下、常温で 2 時間、インキュベートした。検出抗体を除去し、PBS-Tween で 4 回洗浄後、5000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗

マウス IgG 抗体を 100 μ l ずつ滴下し、37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした。PBS-Tween で 4 回洗浄後、TMB を 100 μ l ずつ滴下し、遮光 37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした。Stop Solution (2M 硫酸) を 100 μ l ずつ滴下し、450nm で吸光度を測定した。

6.3.3 結果 -ヒト Mx1 Sandwich ELISA 抗体条件検討-

抗ヒト Mx1 ポリクローナル抗体濃度 5 ug/ml、抗ヒト Mx1 モノクローナル抗体濃度 37.5 ng/ml に設定した条件で、Mx1 Recombinant Protein 濃度 250 ng/ml で吸光度 1.85 を得、スタンダードを 1200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.25 ng/ml の測定範囲で Standard Curve を作成し、PBMC (peripheral blood mononuclear cell) Lysate の Mx1 蛋白濃度測定を行うこととした。

6.4 ループス腎炎患者における Mx1 発現の検討

6.4.1 方法

北海道大学病院内科 II に通院または入院し、2011 年 4 月から 2016 年 3 月の間に診断目的で腎組織検体を採取し、残余組織が保管されているループス腎炎 (LN) (III, IV, III+V, IV+V 型, V 型) 患者、および疾患コントロールとして IgA 腎症 (IgAN), ANCA 関連腎炎 (AAV) 患者を対象とし、腎組織における Mx1 蛋白の免疫組織化学染色を行い、糸球体領域、あるいは尿細管領域における Mx1 陽性面積を、ImageJ software with color deconvolution plugin java 1.48v (public domain - National Institutes of Health) を用いて定量的画像解析を行った。診療録から腎生検時の臨床パラメータを抽出し、腎組織 Mx1 陽性面積率との関連を後ろ向きに解析した。

さらに、同意を得られた同対象の LN 患者および健常人より、新たに血液サンプル 20ml を採取、PBMC (peripheral blood mononuclear cell) を分離し、lysate を作製、Mx1 蛋白濃度解析の対象とした。同様に診療録から採血時の臨床パラメータを抽出し、関連を検討した。なお、本研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得、対象患者および健常人より文書同意を得て行った (承認番号 015-0287, 016-0217)。

6.4.1.1 PBMC 採取

対象患者および健常人より、ヘパリン管にて 20ml 採血し、ficoll paque (GE Healthcare Biosciences, Fairfield, CT, USA) を用いて、PBMC を分離した。さらに、Cell Lysis Buffer (SIGMA) を用いて、PBMC Lysate を作製した。Protein Assay (BIO RAD) により、蛋白濃度を測定し、すべてのサンプルを 0.5%BSA/PBS を用いて 150 μ g/ml に調製し、ELISA 法による Mx1 蛋白濃度測定の対象とした。ELISA を施行するまでの間、すべてのサンプルは-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

6.4.1.2 Sandwich ELISA 法による PBMC における Mx1 蛋白濃度解析

PBS で希釈した捕捉抗体ラビット抗ヒト Mx1 ポリクローナル抗体 5 μ g/ml、を各 well 50 μ l ずつ 96well マイクロプレート(NUNC) に散布し、4°C で overnight インキュベートし、固相化した。ブロッキング溶液 (0.5%BSA/PBS)を滴下し、常温で 1.5 時間ブロッキングした。その間にスタンダードを 1200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.25 ng/ml に、およびサンプルを 150 μ g/ml にそれぞれブロッキング溶液で調製した。スタンダードあるいはサンプルを well あたり 100 μ l ずつ滴下し、37°C で 1.5 時間、インキュベートした。検出抗体マウス抗ヒト Mx1 モノクローナル抗体 37.5 ng/ml を各 well 100 μ l ずつ滴下し、常温で 2 時間インキュベートした。ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を 100 μ l ずつ滴下し、37°C で 30 分インキュベート後ののち、TMB を 100 μ l ずつ滴下し、遮光 37°C で 30 分間インキュベートした。Stop Solution (2M 硫酸)を 100 μ l ずつ滴下し、450nm で吸光度を測定した(Benchmark plusTM, BIO RAD)。

なお、SLE 患者 7 例、健常人 4 例の PBMC Lysate を用いて、マウス抗ヒト Mx1 モノクローナル抗体 (NOVOUSBIO) による Immunoblotting でも発現を確認した。

6.4.1.3 腎生検組織サンプル

当科において診断目的に施行した初回腎生検の残余腎組織を用いて、Mx1 蛋白の免疫組織学染色を行った。組織学分類は、IgAN は Oxford 分類基準 (2009 年)^{104,105}、AAV はアメリカ腎学会 ANCA 関連腎炎組織学的分類基準 (2010 年)¹⁰⁶、LN は ISN/RPS 分類 (2003 年)⁹⁷を用いて分類した。

6.4.1.4 腎生検残余腎組織における Mx1 免疫組織化学染色

腎生検施行後、腎組織に 4%パラホルムアルデヒドを加え、24 時間固定した。固定後パラフィン包埋したのち、3 μ m の厚さの組織切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。キシレンにて脱パラフィンを行い、エタノールで洗浄、精製水に置換し

た。抗原賦活化液 High pH (DAKO)を加え、95℃で 20 分間静置したのち、水洗した。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するため、0.3%過酸化水素を混ぜた PBS に常温で 30 分間浸した。一次抗体 ラビット抗ヒト Mx1 ポリクローナル抗体 (NOVOUSBIO, NBP1-32905, UK) を 300 倍希釈、滴下し、常温で 30 分間、静置した。TBS にて 2 回洗浄後、二次抗体 EnVision+DAB キット(DAKO) を用いて、EnVision を加え、常温で 30 分間静置し、TBS で 2 回洗浄ののち、DAB 染色を行った。その後、ヘマトキシリンによる核染色を行った。

6.4.1.5 評価項目

ELISA 法により測定した PBMC における Mx1 蛋白濃度を LN 群、健常人群で比較した。

腎組織における Mx1 免疫組織染色では糸球体領域、尿細管領域とも 400 倍で病理像を撮影した。各患者において 5 個の糸球体面積に対する Mx1 陽性面積率、ランダムに撮影した 10 視野の尿細管領域の面積に対する Mx1 陽性面積率を Image J を用いて定量的画像解析を行い、LN 群、IgAN 群、AAV 群で比較した。

さらに腎生検時、あるいは PBMC 採取時における臨床パラメータを診療録より抽出し、PBMC における Mx1 蛋白濃度、糸球体領域 Mx1 陽性面積率、尿細管領域 Mx1 陽性面積率との相関関係を解析した。

患者背景としては年齢、罹病期間、ステロイド治療歴、免疫抑制剤治療歴、喫煙歴、飲酒歴、合併症として高血圧症、脂質異常症、糖尿病を抽出した。

LN 患者群における臨床データは PBMC 採取時、あるいは腎生検時の尿蛋白 (g/gCre)、尿中 β 2MG/Cre、尿中 NAG/Cre、血清アルブミン値、血清クレアチニン値、白血球数、ヘモグロビン値、血小板数、血清 C3、C4、CH50 値、抗核抗体 (ANA)、抗 DNA 抗体、入院時の抗 U1-RNP 抗体、抗 Sm 抗体、抗 SS-A/Ro 抗体、抗 SS-B/La 抗体、ループスアンチコアグラント (LA)、抗カルジオリピン抗体(aCL)、抗 β 2-glycoprotein I (β 2GP I) 抗体、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) を含む抗リン脂質抗体 (aPLs) を評価した。抗リン脂質抗体症候群 (APS) の合併も評価した。APS の分類基準は Sydney-revised Sapporo Criteria を用いた³¹。疾患活動性評価には腎生検施行入院時、PBMC 採取時、Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) を用いて行った³²。

6.4.1.6 統計学的解析

PBMC における Mx1 蛋白量は LN 群と健常人群間比較で Mann-Whitney の順位和検定を行った。LN 患者における Mx1 蛋白濃度と各種臨床パラメータとの相関関係は Spearman の順位相関係数にて統計学的解析を行った。

腎組織における Mx1 染色陽性面積率の糸球体領域, 尿細管領域別に群間比較には Kruskal-Wallis Test を行い、3 群間で有意に差があるか確認し、Dunn の多重比較検定を行った。腎組織 Mx1 染色陽性面積率との臨床パラメータの相関関係については Spearman の順位相関係数にて統計学的解析を行った。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は GraphPad Prism Software 6 (GraphPad, San Diego, California, USA) を用いて行った。

6.4.2 結果

6.4.2.1 対象患者

研究期間内に LN 患者 18 例, IgAN 患者 18 例, AAV 患者 10 例が腎組織学解析の対象として抽出された。腎生検時平均年齢 $\pm$ SD はそれぞれ、 31.0 ± 14 歳, 42.0 ± 16.7 歳, 61.0 ± 13.3 歳であった。Table 12 に 3 群の詳細を示す。

PBMC は採取可能であった LN 患者 16 名 (男性 1 例, 女性 15 例, 36.6 ± 14.1 歳, 平均年齢 $\pm$ SD) と健常人 16 例 (男性 1 例, 女性 15 例, 29.0 ± 3.1 歳, 平均年齢 $\pm$ SD) で PBMC における Mx1 蛋白濃度解析を行った。Table 13 に PBMC 採取時の LN 患者 16 例の詳細を示す。

Table 12. 腎生検時の LN, IgAN, AAV の臨床的特徴

	LN	IgAN	AAV
患者人数	18	18	10
性別、女性, n(%)	16 (88.9)	11 (61.1)	7 (70)
腎生検時年齢 (歳)	31.0 ± 14.0	42.0 ± 16.7	61.0 ± 13.3
罹病期間 (月)	8.5 [4-36]	31 [9-102.5]	2 [1-5.5]
喫煙歴, n (%)	5 (27.8)	5 (27.8)	3 (30)
飲酒歴, n (%)	2 (11.1)	3 (16.7)	1 (10)
合併症			
高血圧症, n (%)	2 (11.1)	6 (33.3)	3 (30)
脂質異常症, n (%)	3 (16.7)	4 (22.2)	4 (40)
糖尿病, n (%)	0 (0)	1 (5.6)	1 (10)
APS	2 (11.1)	0 (0)	0 (0)
治療歴			
ステロイド治療, n (%)	3 (16.7)	0 (0)	0 (0)
免疫抑制剤, n (%)	2 (11.1)	0 (0)	0 (0)
Laboratory Data			
尿蛋白(g/gCre)	2.4 [1.3-3.8]	0.8 [0.4-2.5]	1.1 [0.6-2.0]
血清アルブミン (mg/dl)	3.0 ± 0.8	3.9 ± 0.6	3.2 ± 0.5
血清クレアチニン (mg/dl)	0.70 [0.57-0.81]	0.86 [0.71-1.39]	2.99 [1.36-3.77]
C3 (mg/dl)	46.1 ± 22.9	101.8 ± 20.2	122.8 ± 37.0
C4 (mg/dl)	7.9 ± 6.3	29.4 ± 9.1	32.5 ± 12.0
CH50 (U/ml)	18.9 ± 14.8	52.0 ± 7.5	61.6 ± 25.8
自己抗体			
ANA ≥ 320x , n (%)	16 (88.9)	1 (5.6)	0 (0)
aDNA (IU/ml)	142.5 ± 116	N/A	N/A
aU1-RNP, n (%)	6 (33.3)	N/A	N/A
aSm, n (%)	5 (27.8)	N/A	N/A
aSS-A/Ro, n (%)	12 (66.7)	N/A	N/A
aSS-B/La, n (%)	2 (10.0)	N/A	N/A
aPLs, n (%)	6 (33.3)	N/A	N/A
LA, n (%)	5 (27.8)	N/A	N/A
aCL-IgG, n (%)	2 (11.1)	N/A	N/A
aCL-IgM, n (%)	1 (5.6)	N/A	N/A
aPS/PT-IgG, n (%)	1 (5.6)	N/A	N/A
aPS/PT-IgM, n (%)	2 (11.1)	N/A	N/A
aβ2GPI, n (%)	2 (11.1)	N/A	N/A

疾患活動性			
SLEDAI-2K	23.6 ± 4.5	N/A	N/A
ISN/RPS 分類			
class III, n (%)	6 (33.3)	N/A	N/A
class IV-G, n (%)	5 (27.8)	N/A	N/A
class IV-S, n (%)	2 (11.1)	N/A	N/A
class IV-G + V, n (%)	4 (22.2)	N/A	N/A
class V, n (%)	1 (5.6)	N/A	N/A

number (percent), median [IQR], mean ± SD.

AAV, ANCA-associated vasculitis: ANA, anti-nuclear antibody: APS, antiphospholipid syndrome: CSs, corticosteroids: IgAN, IgA nephropathy: ISN/RPS, International Society of Nephrology and Renal Pathology Society: IQR, interquartile range: LN, lupus nephritis: M, months: N/A, not available: SD, standard deviation: SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000: yrs, year

Table 13. PBMC 採取時の LN 患者の臨床的特徴

	LN
患者人数	16
性別, 女性, n (%)	15 (93.6)
PBMC 採取時年齢 (歳)	36.6 ± 14.1
罹病期間 (月)	40.0 [30.8-197.3]
PSL 投与量 (mg/日)	7.6 ± 3.5
免疫抑制剤, n (%)	16 (11.1)
TAC	7 (43.4)
AZA	3 (18.8)
MMF	8 (50.0)
Laboratory Data	
尿蛋白 (g/gCre)	0.00 [0.00-0.02]
血清アルブミン(mg/dl)	4.2 ± 1.1
血清クレアチニン (mg/dl)	0.7 ± 0.2
C3 (mg/dl)	88.1 ± 30.0
C4 (mg/dl)	17.8 ± 9.1
CH50 (U/ml)	47.8 ± 19.8
抗 DNA 抗体 (IU/ml)	3.6 [1.7-10.7]
疾患活動性	
SLEDAI-2K	6.6 ± 4.4
ISN/RPS 分類	
class III, n (%)	2 (12.5)
class III+V, n (%)	1 (6.3)
class IV-G, n (%)	5 (31.3)
class IV-S, n (%)	2 (12.5)
class IV-G + V, n (%)	4 (25.0)
class V, n (%)	2 (12.5)

number (percent), median [IQR 25th-75th], mean ± SD.

AZA, azathioprine: ISN/RPS, International Society of Nephrology and Renal Pathology Society: IQR, interquartile range: LN, lupus nephritis: MMF, mycophenolate mofetil: PBMC, peripheral blood mononuclear cell: SD, standard deviation: SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000: yrs, years: TAC, tacrolimus

6.4.2.2 PBMC における Mx1 蛋白濃度 - ELISA -

LN 16 例, 健常人 16 例を対象とし、ELISA 法にて PBMC における Mx1 蛋白濃度を測定、比較した。PBMC における Mx1 蛋白濃度は LN 群が中央値で 39.5 ng/ml [IQR 2.1-58.7]、健常人群が中央値 17.0 ng/ml [IQR 10.9-22.6] であり、有意に LN 群で高値であった(Figure 16A, $p < 0.0001$, Mann-Whitney U test)。Immunoblotting 法でも SLE 患者由来 PBMC で Mx1 バンドが健常人由来 PBMC に比べて明らかに高密度であり、SLE 群 PBMC での発現が亢進していることを確認した(Figure 16B)。

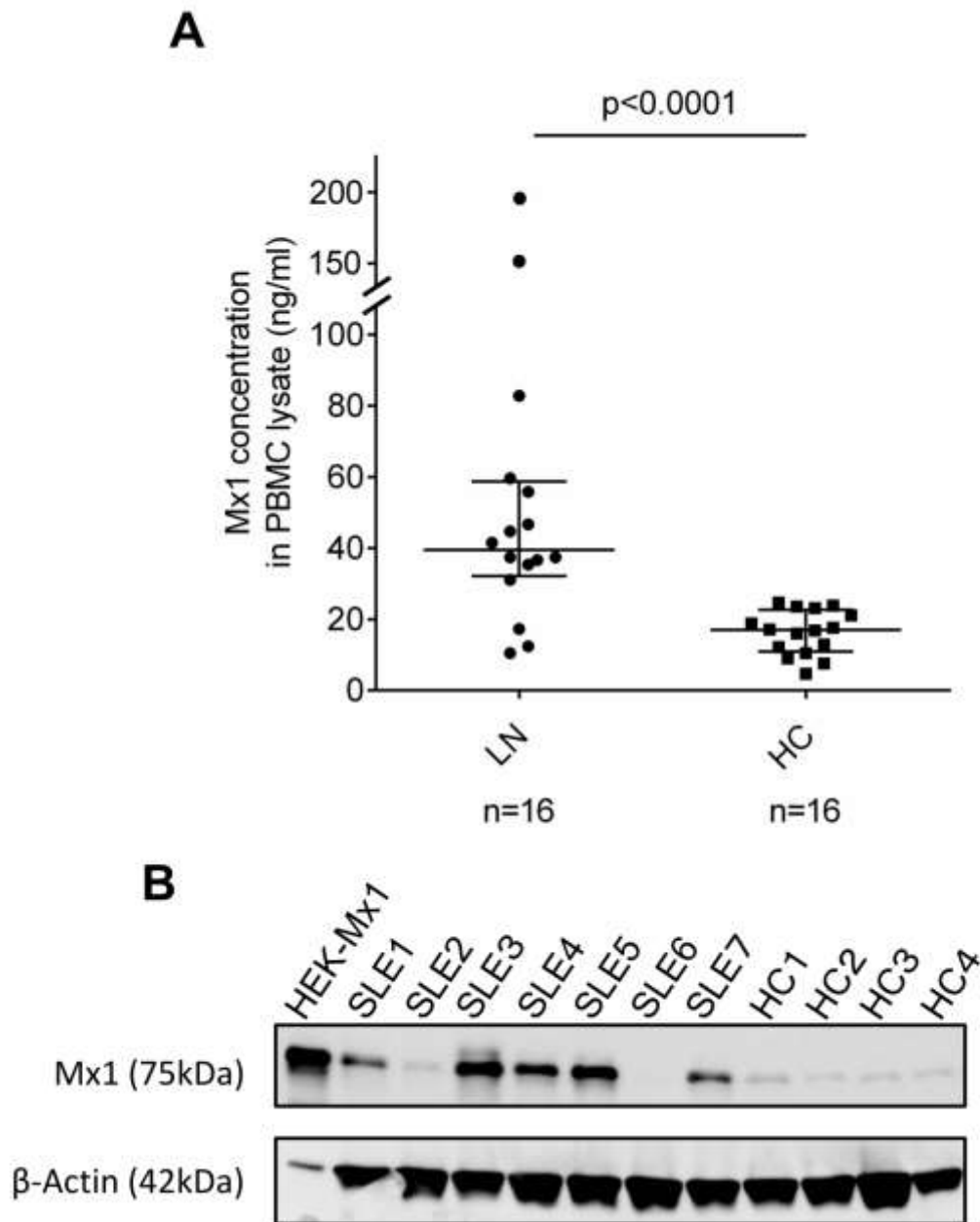


Figure 16. PBMC における Mx1 蛋白濃度(A)と Immunoblotting(B)

PBMC における Mx1 蛋白濃度は LN 群が健常人群よりも有意に高値であった (A, $p < 0.0001$, Mann-Whitney U test)。Immunoblotting では Mx1 の分子量である 75kDa にバンドを認め、SLE 群の PBMC でバンドは高密度であった。SLE, Systemic Lupus Erythematosus; HC, Healthy Control

6.4.2.3 PBMC の Mx1 蛋白濃度と臨床パラメータ相関関係

LN 患者において PBMC の Mx1 蛋白濃度は採取時の SLEDAI-2K, 血清アルブミン値, 血清クレアチニン値, 血清 C3, C4, CH50 値, 抗 DNA 抗体価との相関関係は認めなかった。PBMC 採取時の尿蛋白(g/gCre) はほぼ全例で臨床的寛解 (0.5mg/gCre 以下) を達成していた。Table 14 に相関係数のまとめ、Figure 17 に散布図を示す。

Table 14. PBMC における Mx1 蛋白濃度と臨床パラメータの相関関係

	Mx1 protein level in PBMCs n=16	
	r	p-value
SLEDAI-2K	0.13	0.64
血清アルブミン(mg/dl)	-0.13	0.58
血清クレアチニン (mg/dl)	-0.05	0.85
C3 (mg/dl)	-0.16	0.56
C4 (mg/dl)	-0.18	0.51
CH50 (U/ml)	-0.13	0.66
抗 DNA 抗体 (U/ml)	0.25	0.44

Spearman's rank correlation coefficient

SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000

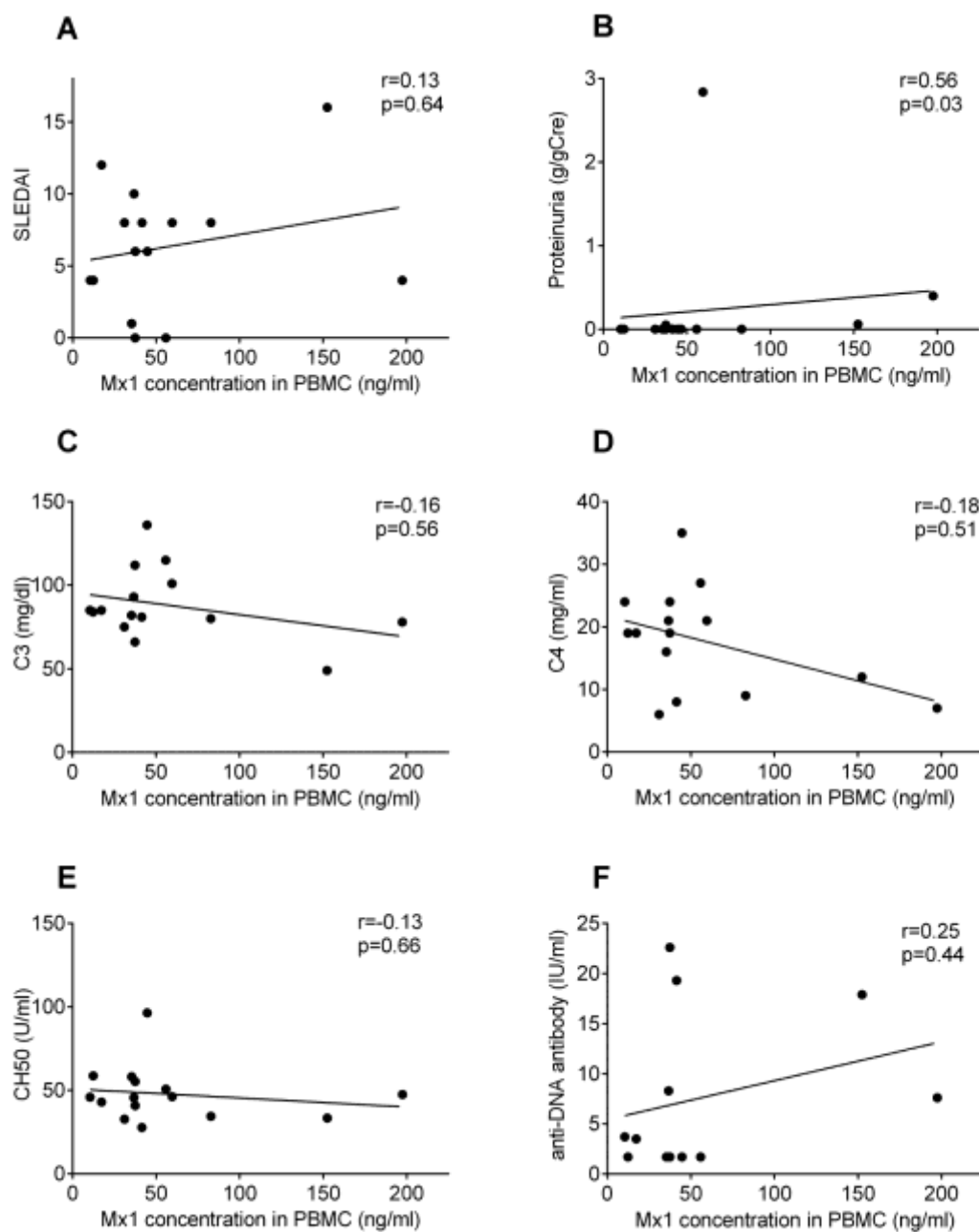


Figure 17. PBMC における Mx1 蛋白濃度と臨床パラメータとの相関
Mx1 蛋白濃度と A.SLEDAI-2K, B. 尿蛋白 (g/gCre), C. 血清 C3 値, D. 血清 C4 値, E. 血清 CH50 値, F. 抗 DNA 抗体価 の散布図を示す(Spearman's rank correlation coefficient)。尿蛋白はほぼ全例が 0.5g/gCre 以下を達成していた。

6.4.2.4 腎組織における Mx1 免疫組織化学染色

LN 患者 18 例, IgAN 患者 18 例, AAV 患者 10 例で解析を行った。各疾患者群の免疫抑制治療介入前の診断時腎生検の Mx1 免疫組織化学染色の代表的な病理像を Figure 18 に示す。LN class IV-G(A)患者の糸球体および尿細管上皮細胞に強い Mx1 染色を認めたが、IgAN, AAV 患者の腎組織では弱い Mx1 染色を認めるのみであった。

5 個の糸球体領域に対する Mx1 陽性面積率、ランダムに撮影した 10 視野の尿細管領域に対する Mx1 陽性面積率 (いずれも×400 で撮影) を Image J により定量的画像解析を行った。糸球体における Mx1 陽性率は中央値[IQR]において、LN 群 26.8% [7.6-40.6], IgAN 群 2.7% [0.8-4.9], AAV 群 2.0% [0.6-6.0]であった。

尿細管領域における Mx1 陽性面積率は同様に 21.1% [3.5-38.4], 0.6% [0.4-1.4], 1.2% [0.4-2.2]であった。3 群比較の結果を Figure 19 に示す。5 個の糸球体領域に対する Mx1 陽性面積率、10 視野の尿細管領域に対する Mx1 陽性面積率は Kruskal-Wallis Test で有意に 3 群間に差を認め、他の 2 群と比較し、LN 群において、両領域で有意に Mx1 陽性面積率が高かった (Dunn の多重比較検定)。

LN 患者, AAV 患者では免疫抑制療法開始後に腎生検が施行された症例も存在したため、免疫抑制療法開始前の患者群を対象として LN 7 例, IgAN 18 例, AAV 6 例で比較検討した。糸球体における Mx1 陽性率は中央値[IQR]において、LN 群 40.5% [37.0- 43.5], IgAN 群 2.7% [0.8-4.9], AAV 群 3.6% [2.2-12.5]であった。

尿細管領域における Mx1 陽性面積率は同様に 42.6% [35.4-46.3], 0.6% [0.4-1.4], 2.0% [1.2-5.0]であった。3 群比較の結果を Figure 20 に示す。5 個の糸球体領域に対する Mx1 陽性面積率は Kruskal-Wallis Test により 3 群間で有意に差($p<0.001$)を認め、LN 群が他の 2 群よりも有意に高かった(vs. IgAN $p<0.001$, vs. AAV $p<0.05$, Dunn の多重比較検定)。10 視野の尿細管領域に対する Mx1 陽性面積率も Kruskal-Wallis Test で有意に 3 群間に差($p<0.0001$) を認め、LN 群が IgAN 群よりも有意に高かった(vs. IgAN $p<0.0001$, Dunn の多重比較検定)。

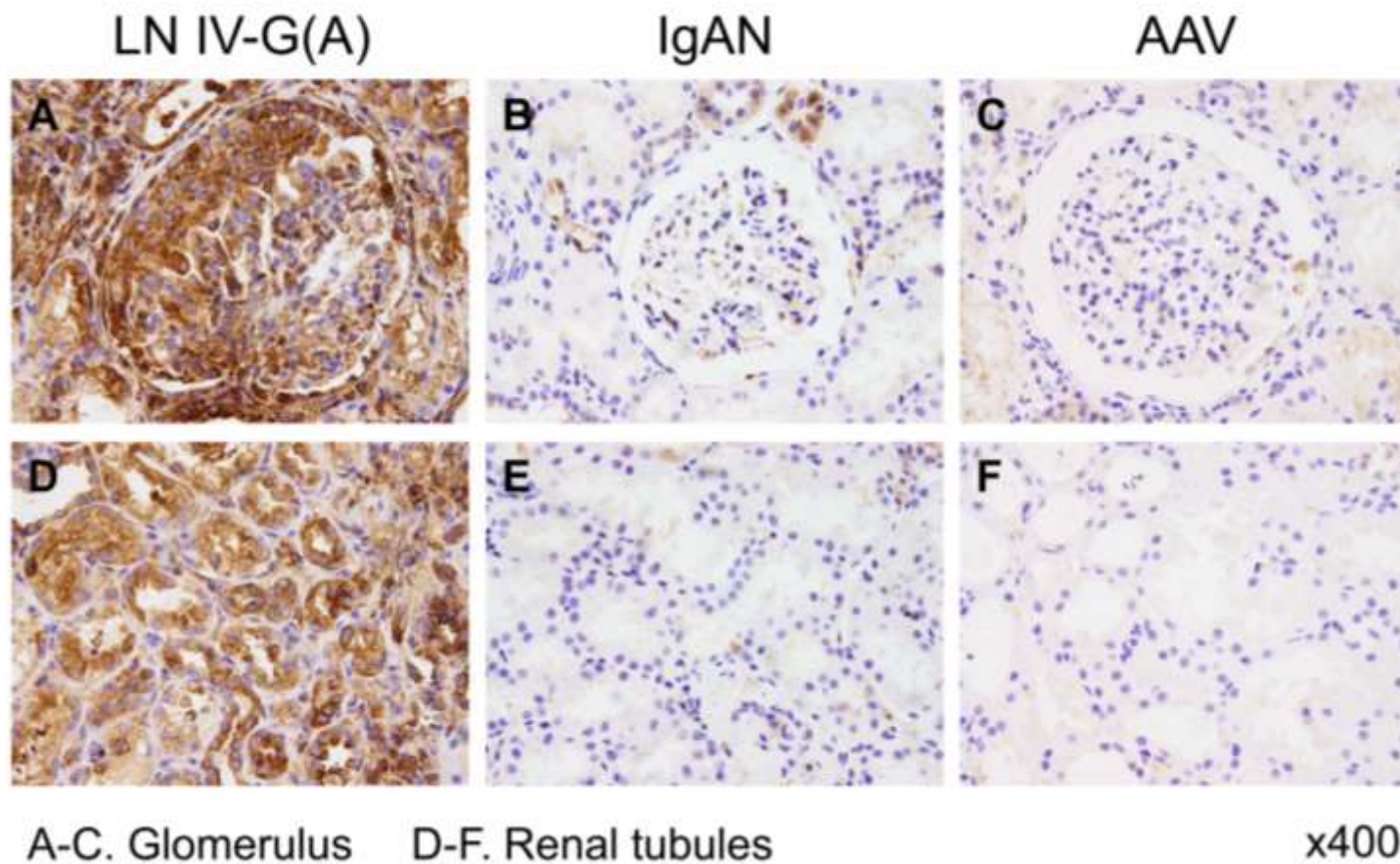


Figure 18. Mx1 免疫組織化学染色の病理像

LN class IV-G(A)患者では糸球体, 尿細管上皮細胞に強く Mx1 染色部位を認めるが、IgAN 患者, AAV 患者では Mx1 染色は弱く認めるのみである。

AAV, ANCA-associated vasculitis: IgAN, IgA nephropathy: LN, lupus nephritis

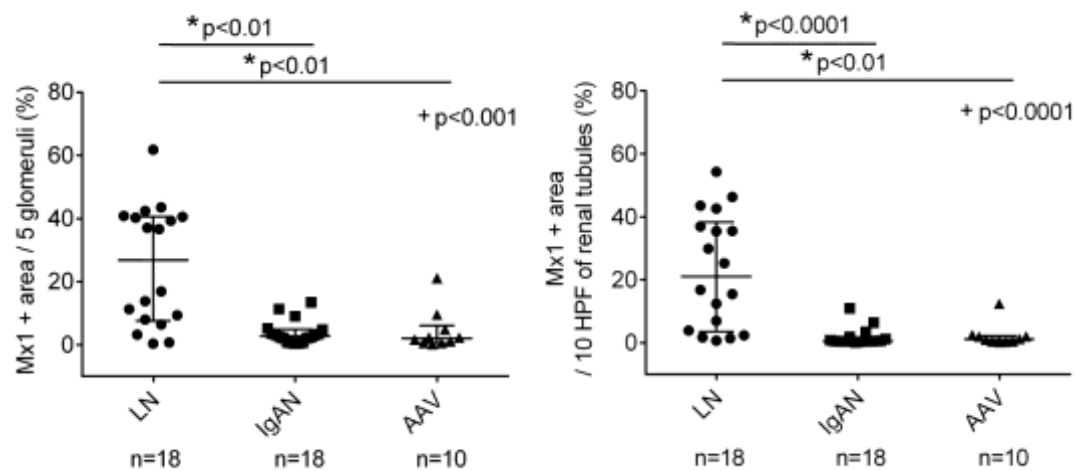


Figure 19. 5 個の糸球体領域(A)あるいは 10 視野尿細管領域(B)における Mx1 陽性面積率

両領域において Mx1 陽性面積率は LN 群で有意に高かった(+ Kruskal-Wallis test, * Dunn's test)。

AAV, ANCA-associated vasculitis; IgAN, IgA nephropathy; LN, lupus nephritis

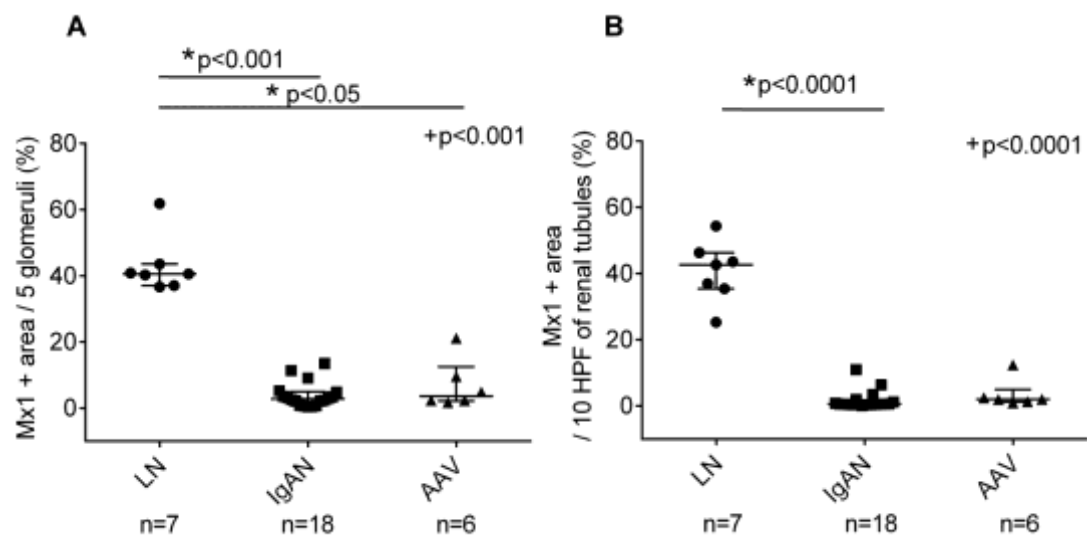


Figure 20. 免疫抑制治療前での 5 個の糸球体領域(A)あるいは 10 視野尿細管領域 (B)における Mx1 陽性面積率

糸球体領域では LN 群が他の 2 群に比較し有意に高く、尿細管領域では LN 群が IgAN 群よりも有意に高かった(+ Kruskal-Wallis test, * Dunn's test)。

AAV, ANCA-associated vasculitis; IgAN, IgA nephropathy; LN, lupus nephritis

6.4.2.5 ループス腎炎の腎組織における免疫抑制療法開始前後での Mx1 免疫組織化学染色

LN 患者の腎生検施行時期において、免疫抑制療法開始前 7 例, 治療開始 14 日以内 7 例, 治療開始 14 日以降の 4 例の 3 群にわけ、Mx1 陽性面積率について解析した。免疫抑制療法開始後 3 日目, 8 日目, 40 日目の代表的な LN の病理像を Figure 21 に、Imag J での解析結果を Figure 22 に示す。糸球体領域における Mx1 陽性面積率は中央値[IQR]において、治療前群, 14 日以内群, 14 日以降群でそれぞれ、40.5% [37.0-43.5], 13.8% [6.4-39.3], 4.4% [0.5-9.1]であった。尿細管領域においては、それぞれ、42.6% [35.4-46.3], 15.4% [7.0-29.9], 1.6% [0.8-2.2]であった。両領域とも Kruskal-Wallis Test で、有意に 3 群間に差を認め、治療前群が 14 日以降群と比較し有意に Mx1 陽性陽性面積率は高かった (糸球体領域: vs. 14 日以降 $p<0.01$ 、尿細管領域: vs. 14 日以降 $p<0.001$, Dunn の多重比較検定)。

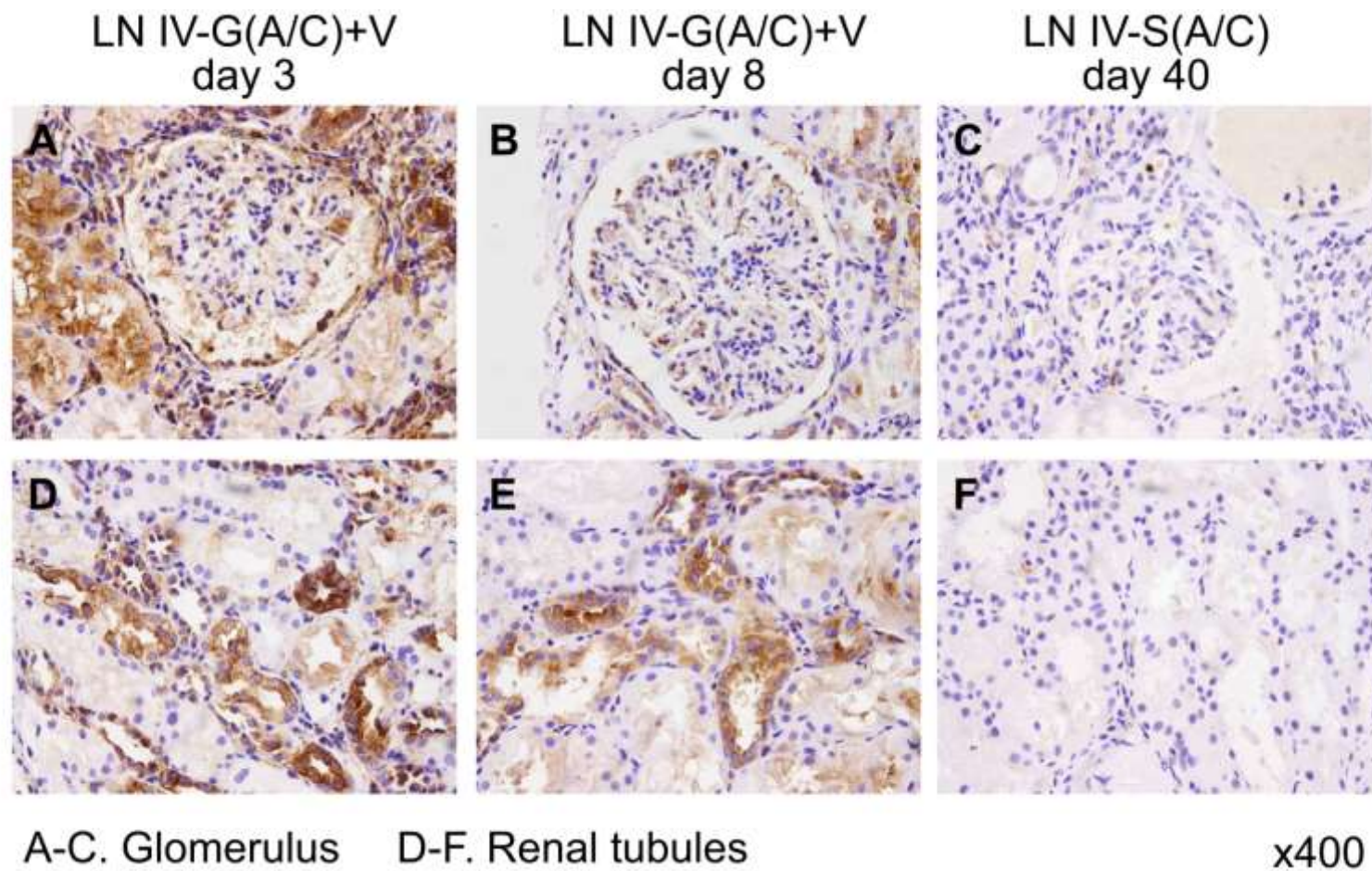


Figure 21. LN における免疫抑制療法開始後の Mx1 免疫組織化学染色の病理像
免疫抑制療法開始後、糸球体、尿細管上皮細胞の Mx1 染色部位は減少している。

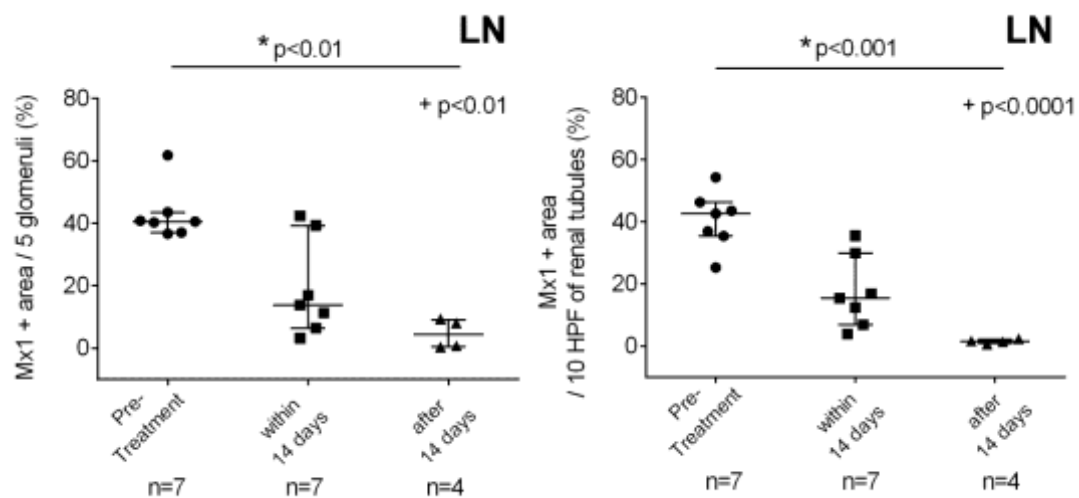


Figure 22. LN 群の腎組織における免疫抑制療法開始前後での Mx1 免疫組織化学染色

糸球体領域(A)、尿細管領域(B)とも治療前, 14 日以内, 14 日以降の 3 群間に Kruskal-Wallis Test で有意な差を認め、治療前群が 14 日以降群と比較し、両領域で有意に Mx1 陽性面積率が高かった(+ Kruskal-Wallis test, * Dunn's test)。

6.4.2.6 ループス腎炎腎組織における Mx1 免疫組織化学染色の糸球体領域、尿細管領域の相関

LN 患者 18 例の腎組織において個々での、糸球体領域の Mx1 陽性面積率, 尿細管領域の Mx1 陽性面積率は正の相関を認めた ($r=0.75$, $p<0.001$, Spearman's rank correlation coefficient, Figure 23)。

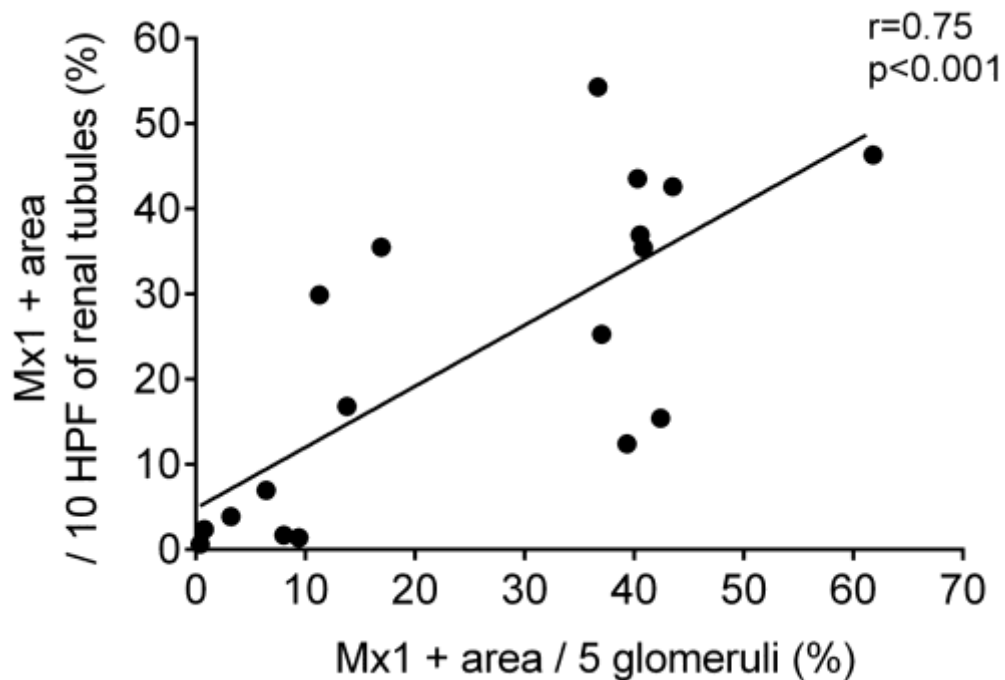


Figure 23. LN 腎組織における Mx1 免疫組織化学染色の糸球体領域、尿細管領域の相関

糸球体領域と尿細管領域 Mx1 陽性面積率は強い正の相関関係を認めた($r=0.75$, $p<0.001$, Spearman's rank correlation coefficient)。

6.4.2.7 ループス腎炎 ISN/RPS class 分類別の Mx1 免疫組織化学染色

LN ISN/RPS class 分類別に糸球体領域、尿細管領域の Mx1 陽性面積率を解析した。class IV 型では Mx1 陽性面積率が高い傾向はあったが、有意差は認めなかった (Figure 24)。

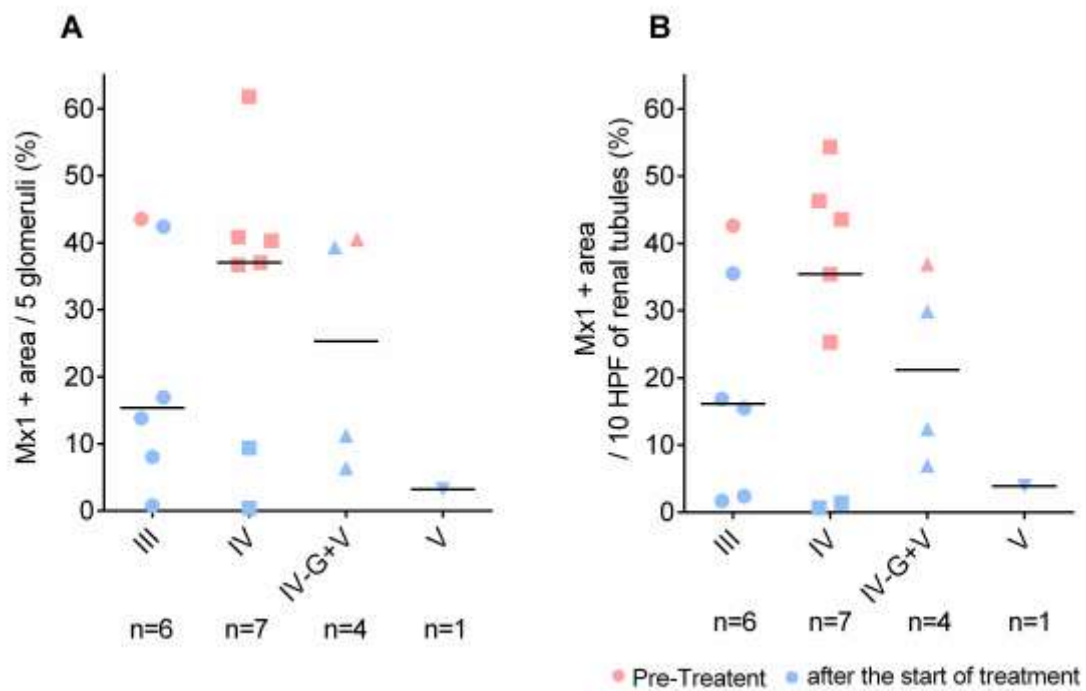


Figure 24. ループス腎炎 class 分類別 Mx1 陽性面積率

A.糸球体領域、B.尿細管領域

糸球体領域、尿細管領域の Mx1 陽性面積率を解析した。class IV 型で Mx1 陽性面積率が高い傾向はあったが、有意差は認めなかった。

6.4.2.8 ループス腎炎における Mx1 免疫組織化学染色と臨床パラメータとの相関関係

糸球体領域 Mx1 陽性面積率と腎生検時 SLEDAI-2K, 尿蛋白, 尿中 β 2MG/Cre, 尿中 NAG/Cre, 血清 C3, C4, CH50 値, 抗 DNA 抗体価, 入院時の抗 U1-RNP, Sm, SS-A 抗体価との相関関係は認めなかった (Figure 25)。

同様に尿細管 Mx1 陽性面積率と腎生検時 SLEDAI-2K, 尿蛋白, 血清 C3, C4, CH50 値, 抗 DNA, Sm 抗体価との相関関係は認めなかったが (Figure 26)、抗 U1-RNP 抗体価と正の相関 ($r=0.56$, $p=0.02$, Spearman's rank correlation coefficient) を認め、抗 SS-A 抗体とは負の相関 ($r=-0.50$, $p=0.03$, Spearman's rank correlation coefficient) を認めた。相関係数のまとめを Table 15 に示す。

Table 15. ループス腎炎における Mx1 免疫組織化学染色と臨床パラメータとの相関関係

	Mx1 + area / 5 glomeruli n=18		Mx1 + area / 10 HPF of renal tubules n=18	
	r	p-value	r	p-value
SLEDAI-2K	-0.06	0.82	0.19	0.44
尿蛋白(g/gCre)	-0.04	0.88	0.06	0.80
尿中 β 2MG/Cre	0.01	0.97	0.13	0.65
尿中 NAG/Cre	-0.16	0.58	-0.09	0.76
血清アルブミン(mg/dl)	-0.01	0.96	-0.28	0.26
血清クレアチニン (mg/dl)	-0.04	0.88	0.08	0.75
C3 (mg/dl)	-0.16	0.52	-0.07	0.80
C4 (mg/dl)	-0.13	0.60	-0.10	0.68
CH50 (U/ml)	-0.27	0.29	-0.29	0.24
抗 DNA 抗体 (U/ml)	0.29	0.26	0.30	0.23
抗 U1-RNP 抗体 (U/ml)	0.27	0.29	0.56	0.02*
抗 Sm 抗体 (U/ml)	-0.01	0.98	0.31	0.20
抗 SS-A/Ro 抗体 (U/ml)	-0.13	0.62	-0.50	0.03*

Spearman's rank correlation coefficient

NAG, N-acetyl- β -D-glucosaminidase: SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000: β 2MG, β 2-microglobulin

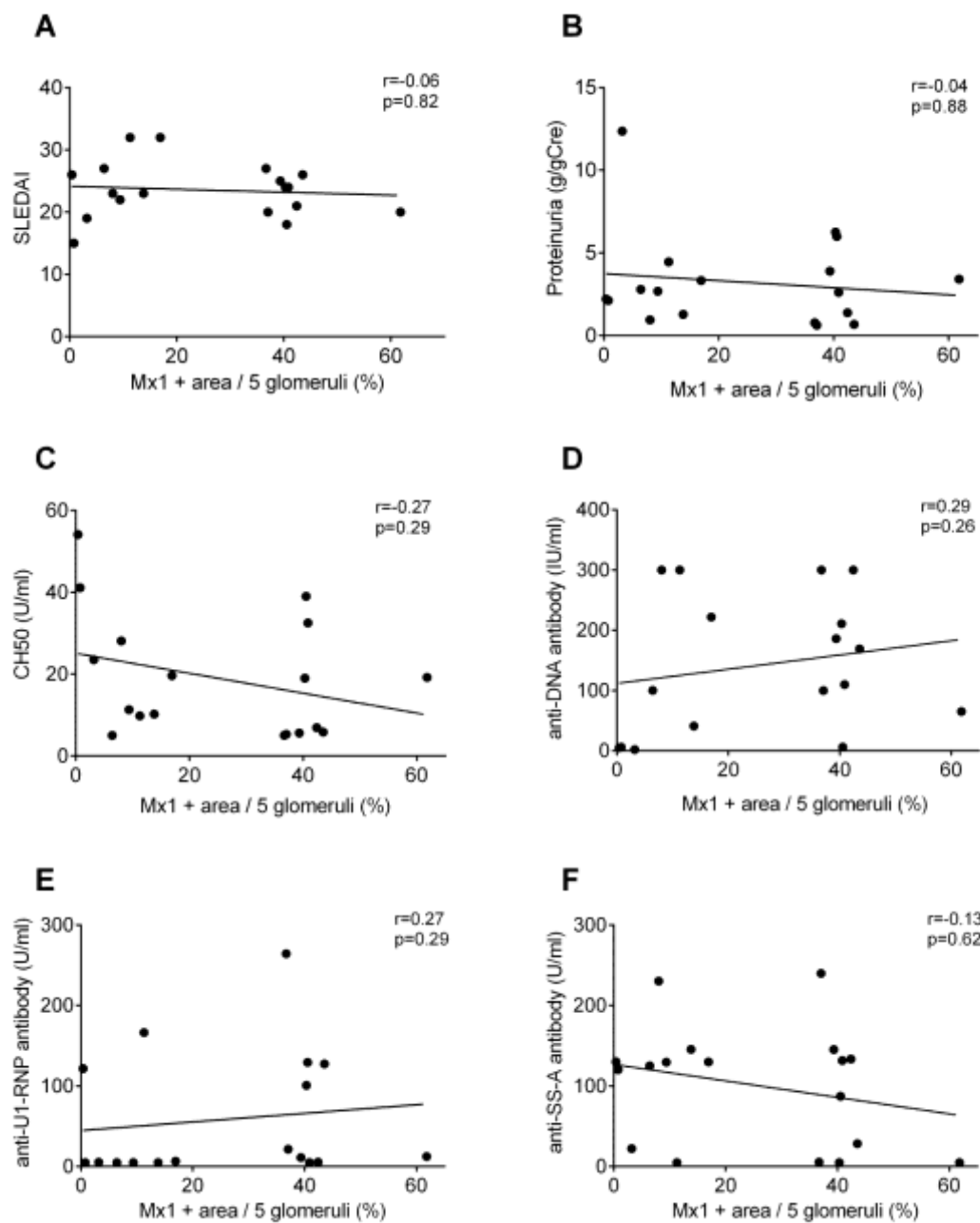


Figure 25. 糸球体 Mx1 陽性面積率と臨床パラメータの相関関係

糸球体領域 Mx1 陽性面積率と腎生検時 A.SLEDAI-2K, B.尿蛋白, C.血清 CH50 値, D.抗 DNA 抗体価, E.抗 U1-RNP 抗体価, F. 抗 SS-A 抗体価との相関関係は認めなかった (Spearman's rank correlation coefficient)。

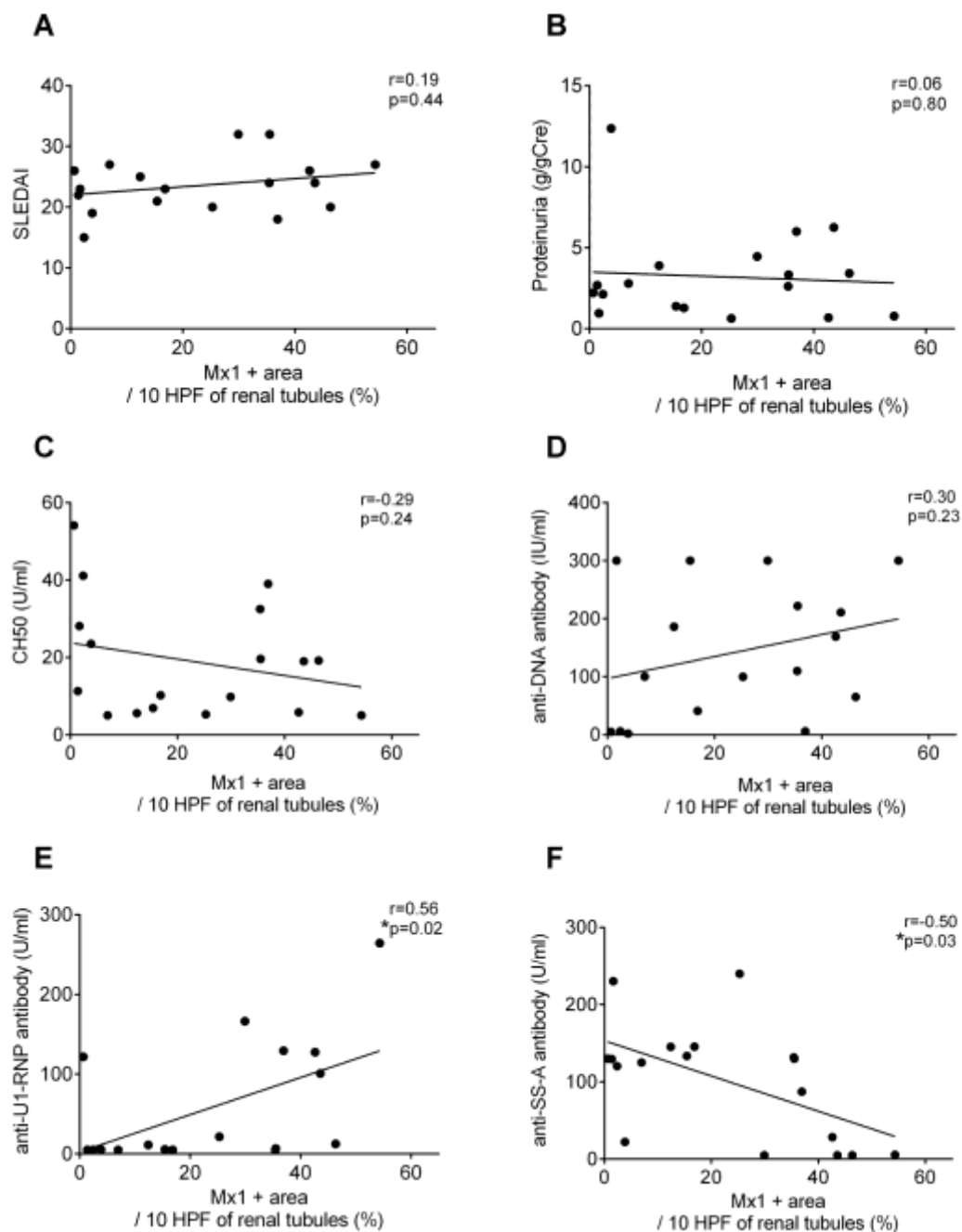


Figure 26. 尿細管 Mx1 陽性面積率と臨床パラメータの相関関係

尿細管領域 Mx1 陽性面積率と腎生検時 A. SLEDAI-2K, B. 尿蛋白, C. 血清 CH50 値, D. 抗 DNA 抗体価との相関関係は認めなかった。E. 抗 U1-RNP 抗体価と正の相関を、 F. 抗 SS-A 抗体価と負の相関を認めた (Spearman's rank correlation coefficient)。

6.5 考察

第二章において、疾患活動性に関わらず SLE の末梢血 T 細胞では IFN 誘導遺伝子である Mx1, RGS1 の mRNA レベルでの発現が亢進していることを示した。LN の PBMC における蛋白レベルでも Mx1 濃度は健常人と比較し、有意に高値であった。しかし、Mx1 mRNA 発現量と BILAG で相関関係がなかったことと同様に、PBMC の Mx1 蛋白濃度と疾患活動性指標である SLEDAI-2K や補体、抗 DNA 抗体価との相関関係は認められなかった。IFN 誘導遺伝子の発現が SLE の疾患活動性を反映するかについては一定した見解を得ていないが、SLE の分子レベルでの heterogeneity を評価するため、R.Banchereau ら¹⁰⁷は 158 例の小児ループス患者の血液における transcriptome profile を長期的に解析、IFN signature の発現亢進を確認し、plasmablast signature が最も鋭敏な疾患活動性のバイオマーカーであり、活動性 LN と neutrophil transcript と相関することを示した。personalized immunomonitoring により、疾患活動性との相関を基準とした患者層別化を図ることが可能であると報告している。日本人においても、より多くの症例数で、一貫した長期的な研究が必要であると考えられた。

最近では免疫組織学的研究としては、SLE の皮膚病変において Mx1 発現が亢進しており^{108,109}、皮膚病変における Mx1 の強い染色は他の皮膚疾患との鑑別に有用¹¹⁰であるとの報告がある。一方で、LN の腎組織と Mx1 の関連についての報告は少ない。Watanabe ら¹¹¹は少数例であるが LN IV 型において、糸球体メサンギウム細胞で Mx1 発現が亢進していると報告している。一方で、G. Castellano ら⁹¹は糸球体領域ではなく、尿細管上皮細胞に Mx1 発現が亢進していると報告している。本研究では、腎生検組織における Mx1 免疫組織化学染色では LN 群が糸球体領域においても尿細管領域においても、IgAN 群, AAV 群と比較し有意に Mx1 陽性面積率が高値であった。さらに、免疫抑制治療前の患者群に限定した場合、その結果はより顕著であった。既報では IgAN や半月体形成性紫斑病性腎炎の腎組織では Mx1 染色は認められないと報告^{111,112}があり、本研究の結果を支持するものと考えられる。また、LN 群では 2 週間の免疫抑制療法で腎組織における Mx1 発現は治療前と比較し有意に抑制されていた。

IFN α の主な産生細胞は形質細胞様樹状細胞 (pDC)とされているが、活動性の高い SLE では血液中の pDC 数が減少する¹¹³。一方で、高疾患活動性の LN では、糸球体領域への浸潤¹¹³や尿細管間質領域への浸潤¹¹⁴が認められ、また、LN 患者の腎組織では Mx1 と pDC が Co-localization しているという報告⁹¹がある。ステロイド療法により、IFN α の最も主要な産生細胞である pDC からの IFN α 産生の抑制や¹¹⁵や IFN 誘導遺伝子の発現が即座に抑制されたという報告^{76,116}がある。Mx1 はウイルス感染時にウイルス RNP に結合、転写を抑制することで、抗ウイルス作用を発揮する⁸²が、ウイルス感染と同様に、Mx1 の過剰発現が小胞体ストレスを介して細胞死を誘導する報告がある⁸⁶。本研究から活動性の高い LN の腎組織では、血液中から浸潤した pDC から産生された IFN α により Mx1 が過剰に発現し、細胞死を誘導することで LN の病態形成に関与することが示唆された。

本研究では尿蛋白が 0.5g/gCre 以下と腎炎が寛解に至っているにも関わらず

PBMC の Mx1 蛋白濃度は LN 群では高値であった。さらに、免疫抑制療法により糸球体、尿細管領域の Mx1 発現が低下していることから、Mx1 は SLE 患者の末梢血では潜在的に高値であり、活動期 LN の病態形成において重要な key mediator であることが示唆された。

尿細管 Mx1 陽性面積率は抗 U1-RNP 抗体価とは正の相関関係を、抗 SS-A 抗体価とは負の相関関係を認めたが、その意義ははっきりしない。腎組織での Mx1 発現は尿細管障害マーカーである尿中 β 2MG/Cre や尿中 NAG/Cre との関連も認められなかった。Mx1 はウイルス感染時に vRNP と結合し、抗ウイルス作用を示すことから、ヒト RNP とも関連し自己抗体産生に関与しているかもしれないが、詳細は不明であり、今後の検討を要する。

本研究では同一患者で繰り返して腎生検を施行しておらず、経時的に腎組織での Mx1 発現を評価できていないため、実際に免疫抑制剤により Mx1 発現が抑制されたかは明らかではない。さらに、同一患者で末梢血における Mx1 の遺伝子発現量の経時変化も評価し得ていない。LN の病態形成に関連する Mx1 の機能評価、より正確な Mx 発現量と臨床パラメータとの関連の解析のために、末梢血あるいは腎組織の長期的、連続的な解析が必要である。

本研究の結果から、SLE 患者では末梢血 T 細胞, PBMC および活動性の高い LN の腎組織において Mx1 が高発現しており、免疫抑制治療の介入によりその発現が抑制されることが示唆された。Mx1 は SLE、特に LN における新規マーカーあるいは新規治療ターゲットとなりえる可能性があると考えられた。

7. 総括及び結論

- PSNP は他の全身性自己免疫疾患に比較し、SLE で有意に発症頻度が高かった。
- 精神疾患の既往, APS の合併が SLE における PSNP 発症の独立したリスクファクターとして抽出された。
- PSNP-SLE ではびまん性精神神経症候群、とくに気分障害が多く、*de novo* NPSLE では中枢神経症候群が多かった。
- PSNP-SLE は多くが免疫抑制療法により改善し、*de novo* NPSLE 群よりも予後良好であった。
- SLE 患者における末梢血 T 細胞では疾患活動性に関わらず、I 型 IFN 誘導遺伝子である Mx1, RGS1 の発現が亢進していた。
- NPSLE における血清、髄液 Mx1 濃度は高値であったが、ELISA kit により一定した結果が得られなかった。
- ループス腎炎患者における PBMC での Mx1 は蛋白レベルでも有意に高値であった。
- ループス腎炎の腎組織では糸球体領域、尿細管領域とも Mx1 発現が亢進しており、免疫抑制療法により発現は抑制された。

本研究では、第一章ではステロイド精神病との鑑別に難渋する PSNP の発症が SLE において有意に高頻度であることを示し、その独立したリスクファクターとして精神疾患の既往, APS 合併が抽出された。PSNP-SLE は *de novo* NPSLE との共通点が多く、ステロイド投与後に顕在化した NPSLE の可能性が示唆された。

第二章では SLE の病態解明、より特異的な診断、疾患活動性マーカー、治療ターゲット検索のために、獲得免疫の中心的役割を担う T 細胞に着目し、遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、SLE の病態を促進するサイトカインの 1 つである IFN α により誘導される Mx1 と RGS1 の mRNA レベルが疾患活動性に関わらず亢進していることを示した。

第三章では NPSLE と Mx1 の関連性について血清、髄液 Mx1 濃度を ELISA 法により測定したが、NPSLE で高値である結果が得られるも、kit により一定した結果を得ることができなかった。

第四章では SLE のもう一つの主要臓器障害であるループス腎炎と Mx1 の関連について解析した。PBMC における Mx 蛋白濃度を測定可能な ELISA を構築し、ループス腎炎では PBMC における Mx1 蛋白レベルでも高値であることを示した。さらに、ループス腎炎の活動性腎組織病変では Mx1 の発現が亢進していることを示した。免疫抑制療法によりその発現が抑制されることも示唆された。IFN α の主要な産生細胞である pDC がループス腎炎の糸球体や尿細管領域に浸潤していることが報告されており、ループス腎炎の腎組織局所での Mx1 過剰発現が病態形成に関与していることが示唆された。今後、より多くの症例で、長期的、連続的な末梢血あるいは腎組織での Mx1 発現を評価し、明確な臨床パラメータとの相関関係、腎予後との関連性の解析が必要であると考えられた。

8. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学研究科 内科学講座 免疫・代謝内科学分野博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同分野教授 渥美達也先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本分野膠原病グループ准教授 保田晋助先生には本研究の遂行にあたり、終始、丁寧かつ熱心に御指導、適切な御助言をいただきました。保田先生をなくして本研究をまとめることは不可能であり、ここに心より深く感謝の意を表します。

第一章における精神神経ループスの病型分類につきましては、精神科神経科講師 賀古勇輝先生、准教授 中川伸先生、教授 久住一郎 先生には多大なご協力を賜り、御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

第三章の精神神経ループスにおける血清、髄液 Mx1 濃度測定に関しては、北海道大学大学院医学研究科 神経病態学講座 神経内科学分野 助教 高橋育子先生、助教 加納崇裕先生、教授 佐々木秀直先生には神経疾患患者の検体の提供ならびに本研究の御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

第四章のループス腎炎における Mx1 免疫組織化学染色では市立札幌病院 病理診断科 部長 深澤雄一郎先生には膨大な量の腎組織プレパラートの作成に御協力いただきました。北海道大学大学院医学研究科 探索病理学講座 特任助教 木村太一先生、特任教授 西原広史先生、病理学講座 腫瘍病理分野 教授 田中伸哉先生には条件検討から解析まで多大な御協力、御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本分野膠原病グループ非常勤講師 堀田哲也先生、助教 Olga Amengual 先生、坊垣暁之先生、奥健志先生、加藤将先生、藤枝雄一郎先生、大学院生の中川育磨先生、野口淳史先生、大村一将先生、嶋村抄苗先生、久田諒先生、菅原恵理先生、河野通大先生、中村浩之先生、柴田悠平先生、谷村瞬先生、大学院を修了された栗田崇史先生、河野通仁先生、神田真聡先生、志田玄貴先生、渡邊俊之先生には研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言をいただいただけでなく、夜遅くまで基礎、臨床研究とともに切磋琢磨し、時には精神的につらく落ち込んでいるときには優しく見守り、励ましをいただいたこと、言葉で感謝し尽すことはできず、本当に心より深く感謝を申し上げます。

本分野腎グループ 診療准教授 西尾妙織先生はじめ、腎グループの諸先生方にも腎疾患における Mx1 発現の検討にあたり、患者さん抽出から解析まで、大変お世話になりました。また、当科実験助手の小出秀之さん、下道真由美さん、金子由美子さん、桜井美和さん、寺田智子さん、腫瘍病理分野実験助手の竹浪智子さん、そして市立札幌病院病理診断科の検査技師の皆様の御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。心より感謝を申し上げます。この他にも、この論文作成にあたり、御協力、御助言、御支援をいただきました多くの諸先輩方、同僚、後輩、スタッフの皆様に対しまして、心より感謝を申し上げます。

最後に、遠く故郷より優しく支え続けてくれた両親，家族に心から感謝致します。

9. 引用文献

- 1 Yazdany, J. & Dall'Era, M. WHAT IS LUPUS? in *DUBOIS' Lupus Erythematosus and Related Syndromes* (Daniel J. Wallace & Bevra Hannahs Hahn, eds), ELSEIVOR, Philadelphia, 2013, pp.1-7.
- 2 Lisnevskaja, L., Murphy, G. & Isenberg, D. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 384, 1878-1888 (2014).
- 3 Cervera, R., Khamashta, M. A., Font, J., Sebastiani, G. D., Gil, A., Lavilla, P., Mejia, J. C., Aydintug, 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. 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 (2003).
- 4 Bernatsky, S., Clarke, A., Gladman, D. D., Urowitz, M., Fortin, P. R., Barr, S. G., Senecal, J. L., Zummer, M., Edworthy, S., Sibley, J., Pope, J., Ensworth, S., Ramsey-Goldman, R. & Hanly, J. G. Mortality related to cerebrovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 15, 835-839 (2006).
- 5 Ronnblom, L. & Elkon, K. B. Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 339-347 (2010).
- 6 Elkon, K. B. & Wiedeman, A. Type I IFN system in the development and manifestations of SLE. *Curr. Opin. Rheumatol.* 24, 499-505 (2012).
- 7 Baechler, E. C., Gregersen, P. K. & Behrens, T. W. The emerging role of interferon in human systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 801-807 (2004).
- 8 Baechler, E. C., Batliwalla, F. M., Karypis, G., Gaffney, P. M., Ortmann, W. A., Espe, K. J., Shark, K. B., Grande, W. J., Hughes, K. M., Kapur, V., Gregersen, P. K. & Behrens, T. W. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2610-2615 (2003).
- 9 Vincent, F. B., Morand, E. F., Schneider, P. & Mackay, F. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 365-373 (2014).
- 10 Crispin, J. C., Kyttaris, V. C., Juang, Y. T. & Tsokos, G. C. How signaling and gene transcription aberrations dictate the systemic lupus erythematosus T cell phenotype. *Trends. Immunol.* 29, 110-115 (2008).
- 11 Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R. L., Barrat, F. J., Banchereau, J. & Pascual, V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3, 73ra20 (2011).
- 12 Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., Bassett, R., Amuro, H., Fukuhara, S., Ito, T., Liu, Y. J. & Gilliet, M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3, 73ra19 (2011).
- 13 Furie, R., Petri, M., Zamani, O., Cervera, R., Wallace, D. J., Tegzova, D., Sanchez-Guerrero, J., Schwarting, A., Merrill, J. T., Chatham, W. W., Stohl, W., Ginzler, E. M., Hough, D. R., Zhong, Z. J., Freimuth, W., van Vollenhoven, R. F. & Group, B.-S. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 63, 3918-3930 (2011).
- 14 Kirou, K. A. & Gkrouzman, E. Anti-interferon alpha treatment in SLE. *Clin. Immunol.* 148, 303-312 (2013).
- 15 ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature. The American College of

- Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis. Rheum.* 42, 599-608 (1999).
- 16 Bertsias, G. K. & Boumpas, D. T. Pathogenesis, diagnosis and management of neuropsychiatric SLE manifestations. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 358-367 (2010).
 - 17 Hanly, J. G. Diagnosis and management of neuropsychiatric SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 338-347 (2014).
 - 18 Boland, E. W. & Headley, N. E. Management of rheumatoid arthritis with smaller (maintenance) doses of cortisone acetate. *J. Am. Med. Assoc.* 144, 365-372 (1950).
 - 19 Program., B. C. D. S. Acute adverse reactions to prednisone in relation to dosage. *Clin. Pharmacol. Ther.* 13, 694-698 (1972).
 - 20 Lewis, D. A. & Smith, R. E. Steroid-induced psychiatric syndromes. A report of 14 cases and a review of the literature. *J. Affect. Disord.* 5, 319-332 (1983).
 - 21 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. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 25, 1271-1277 (1982).
 - 22 Hochberg, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 40, 1725 (1997).
 - 23 Bohan, A. & Peter, J. B. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 292, 344-347 (1975).
 - 24 Bohan, A. & Peter, J. B. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 292, 403-407 (1975).
 - 25 Yamaguchi, M., Ohta, A., Tsunematsu, T., Kasukawa, R., Mizushima, Y., Kashiwagi, H., Kashiwazaki, S., Tanimoto, K., Matsumoto, Y., Ota, T. & et al. Preliminary criteria for classification of adult Still's disease. *J. Rheumatol.* 19, 424-430 (1992).
 - 26 Jennette, J. C., Falk, R. J., Bacon, P. A., Basu, N., Cid, M. C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L. F., Gross, W. L., Guillevin, L., Hagen, E. C., Hoffman, G. S., Jayne, D. R., Kallenberg, C. G., Lamprecht, P., Langford, C. A., Luqmani, R. A., Mahr, A. D., Matteson, E. L., Merkel, P. A., Ozen, S., Pusey, C. D., Rasmussen, N., Rees, A. J., Scott, D. G., Specks, U., Stone, J. H., Takahashi, K. & Watts, R. A. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis. Rheum.* 65, 1-11 (2013).
 - 27 Ozaki, S. ANCA-associated vasculitis: diagnostic and therapeutic strategy. *Allergol. Int.* 56, 87-96 (2007).
 - 28 Lightfoot, R. W., Jr., Michel, B. A., Bloch, D. A., Hunder, G. G., Zvaifler, N. J., McShane, D. J., Arend, W. P., Calabrese, L. H., Leavitt, R. Y., Lie, J. T. & et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of polyarteritis nodosa. *Arthritis. Rheum.* 33, 1088-1093 (1990).
 - 29 Ainiala, H., Hietaharju, A., Loukkola, J., Peltola, J., Korpela, M., Metsanoja, R. & Auvinen, A. Validity of the new American College of Rheumatology criteria for neuropsychiatric lupus syndromes: a population-based evaluation. *Arthritis. Rheum.* 45, 419-423 (2001).
 - 30 Otomo, K., Atsumi, T., Amengual, O., Fujieda, Y., Kato, M., Oku, K., Horita, T., Yasuda, S. & Koike, T. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis. Rheum.* 64, 504-512 (2012).
 - 31 Miyakis, S., Lockshin, M. D., Atsumi, T., Branch, D. W., Brey, R. L., Cervera, R., Derksen, R. H., PG, D. E. G., Koike, T., Meroni, P. L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P. G. & Krilis, S. A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 4, 295-306 (2006).
 - 32 Gladman, D. D., Goldsmith, C. H., Urowitz, M. B., Bacon, P., Fortin, P., Ginzler, E., Gordon, C., Hanly, J. G., Isenberg, D. A., Petri, M., Nived, O., Snaith, M. & Sturfelt,

- G. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J. Rheumatol.* 27, 373-376 (2000).
- 33 Wysenbeek, A. J., Leibovici, L. & Zoldan, J. Acute central nervous system complications after pulse steroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 17, 1695-1696 (1990).
- 34 Chau, S. Y. & Mok, C. C. Factors predictive of corticosteroid psychosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Neurology* 61, 104-107 (2003).
- 35 Nishimura, K., Omori, M., Sato, E., Katsumata, Y., Gono, T., Kawaguchi, Y., Harigai, M., Yamanaka, H. & Ishigooka, J. New-onset psychiatric disorders after corticosteroid therapy in systemic lupus erythematosus: an observational case-series study. *J. Neurol.* 261, 2150-2158 (2014).
- 36 Bhangle, S. D., Kramer, N. & Rosenstein, E. D. Corticosteroid-induced neuropsychiatric disorders: review and contrast with neuropsychiatric lupus. *Rheumatol. Int.* 33, 1923-1932 (2013).
- 37 Hanly, J. G., McCurdy, G., Fougere, L., Douglas, J. A. & Thompson, K. Neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus: attribution and clinical significance. *J. Rheumatol.* 31, 2156-2162 (2004).
- 38 Bertsias, G. K., Ioannidis, J. P., Aringer, M., Bollen, E., Bombardieri, S., Bruce, I. N., Cervera, R., Dalakas, M., Doria, A., Hanly, J. G., Huizinga, T. W., Isenberg, D., Kallenberg, C., Piette, J. C., Schneider, M., Scolding, N., Smolen, J., Stara, A., Tassioulas, I., Tektonidou, M., Tincani, A., van Buchem, M. A., van Vollenhoven, R., Ward, M., Gordon, C. & Boumpas, D. T. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations: report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 2074-2082 (2010).
- 39 Mikdashi, J. & Handwerger, B. Predictors of neuropsychiatric damage in systemic lupus erythematosus: data from the Maryland lupus cohort. *Rheumatology (Oxford)* 43, 1555-1560 (2004).
- 40 Bujan, S., Ordi-Ros, J., Paredes, J., Mauri, M., Matas, L., Cortes, J. & Vilardell, M. Contribution of the initial features of systemic lupus erythematosus to the clinical evolution and survival of a cohort of Mediterranean patients. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 859-865 (2003).
- 41 Ho, R. C., Thiaghu, C., Ong, H., Lu, Y., Ho, C. S., Tam, W. W. & Zhang, M. W. A meta-analysis of serum and cerebrospinal fluid autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 15, 124-138 (2016).
- 42 Zardi, E. M., Taccone, A., Marigliano, B., Margiotta, D. P. & Afeltra, A. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: tools for the diagnosis. *Autoimmun. Rev.* 13, 831-839 (2014).
- 43 Zandman-Goddard, G., Chapman, J. & Shoenfeld, Y. Autoantibodies involved in neuropsychiatric SLE and antiphospholipid syndrome. *Semin. Arthritis. Rheum.* 36, 297-315 (2007).
- 44 Nishimura, K., Harigai, M., Omori, M., Sato, E. & Hara, M. Blood-brain barrier damage as a risk factor for corticosteroid-induced psychiatric disorders in systemic lupus erythematosus. *Psychoneuroendocrinology* 33, 395-403 (2008).
- 45 Fragoso-Loyo, H., Richaud-Patin, Y., Orozco-Narvaez, A., Davila-Maldonado, L., Atisha-Fregoso, Y., Llorente, L. & Sanchez-Guerrero, J. Interleukin-6 and chemokines in the neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 56, 1242-1250 (2007).
- 46 Hanly, J. G., Urowitz, M. B., Su, L., Bae, S. C., Gordon, C., Clarke, A., Bernatsky, S., Vasudevan, A., Isenberg, D., Rahman, A., Wallace, D. J., Fortin, P. R., Gladman, D., Romero-Diaz, J., Sanchez-Guerrero, J., Dooley, M. A., Bruce, I., Steinsson, K., Khamashta, M., Manzi, S., Ramsey-Goldman, R., Sturfelt, G., Nived, O., van Vollenhoven, R., Ramos-Casals, M., Aranow, C., Mackay, M., Kalunian, K., Alarcon,

- G. S., Fessler, B. J., Ruiz-Irastorza, G., Petri, M., Lim, S., Kamen, D., Peschken, C., Farewell, V., Thompson, K., Theriault, C. & Merrill, J. T. Autoantibodies as biomarkers for the prediction of neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1726-1732 (2011).
- 47 Hirohata, S., Kanai, Y., Mitsuo, A., Tokano, Y., Hashimoto, H. & Subcommittee, N. R. Accuracy of cerebrospinal fluid IL-6 testing for diagnosis of lupus psychosis. A multicenter retrospective study. *Clin. Rheumatol.* 28, 1319-1323 (2009).
- 48 Kozora, E., West, S. G., Kotzin, B. L., Julian, L., Porter, S. & Bigler, E. Magnetic resonance imaging abnormalities and cognitive deficits in systemic lupus erythematosus patients without overt central nervous system disease. *Arthritis. Rheum.* 41, 41-47 (1998).
- 49 Nomura, K., Yamano, S., Ikeda, Y., Yamada, H., Fujimoto, T., Minami, S., Fukui, R., Takaoka, M., Yamamoto, Y. & Dohi, K. Asymptomatic cerebrovascular lesions detected by magnetic resonance imaging in patients with systemic lupus erythematosus lacking a history of neuropsychiatric events. *Intern. Med.* 38, 785-795 (1999).
- 50 Toledano, P., Sarbu, N., Espinosa, G., Bargallo, N. & Cervera, R. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: magnetic resonance imaging findings and correlation with clinical and immunological features. *Autoimmun. Rev.* 12, 1166-1170 (2013).
- 51 Sarbu, N., Alobeidi, F., Toledano, P., Espinosa, G., Giles, I., Rahman, A., Yousry, T., Capurro, S., Jager, R., Cervera, R. & Bargallo, N. Brain abnormalities in newly diagnosed neuropsychiatric lupus: systematic MRI approach and correlation with clinical and laboratory data in a large multicenter cohort. *Autoimmun. Rev.* 14, 153-159 (2015).
- 52 Pego-Reigosa, J. M. & Isenberg, D. A. Psychosis due to systemic lupus erythematosus: characteristics and long-term outcome of this rare manifestation of the disease. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1498-1502 (2008).
- 53 Wolkowitz, O. M., Burke, H., Epel, E. S. & Reus, V. I. Glucocorticoids. Mood, memory, and mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1179, 19-40 (2009).
- 54 Bazso, A., Szappanos, A., Patocs, A., Poor, G., Shoenfeld, Y. & Kiss, E. The importance of glucocorticoid receptors in systemic lupus erythematosus. A systematic review. *Autoimmun. Rev.* 14, 349-351 (2015).
- 55 Zou, Y. F., Xu, J. H., Wang, F., Liu, S., Tao, J. H., Cai, J., Lian, L., Xiao, H., Chen, P. L., Tian, G., Wu, M., Wang, D. G., Liu, S. X., Liang, C. M., Pan, F. M., Su, H., Pan, H. F. & Ye, D. Q. Association study of glucocorticoid receptor genetic polymorphisms with efficacy of glucocorticoids in systemic lupus erythematosus: a prospective cohort study. *Autoimmunity* 46, 531-536 (2013).
- 56 Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Caron, D. & Chang, C. H. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis. Rheum.* 35, 630-640 (1992).
- 57 Gladman, D. D., Ibanez, D. & Urowitz, M. B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J. Rheumatol.* 29, 288-291 (2002).
- 58 Symmons, D. P., Coppock, J. S., Bacon, P. A., Bresnahan, B., Isenberg, D. A., Maddison, P., McHugh, N., Snaith, M. L. & Zoma, A. S. Development and assessment of a computerized index of clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. Members of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG). *Q. J. Med.* 69, 927-937 (1988).
- 59 Yee, C. S., Farewell, V., Isenberg, D. A., Griffiths, B., Teh, L. S., Bruce, I. N., Ahmad, Y., Rahman, A., Prabu, A., Akil, M., McHugh, N., Edwards, C., D'Cruz, D., Khamashta, M. A., Maddison, P. & Gordon, C. The BILAG-2004 index is sensitive to change for assessment of SLE disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 48, 691-695 (2009).
- 60 Schiffenbauer, J., Hahn, B., Weisman, M. H. & Simon, L. S. Biomarkers, surrogate markers, and design of clinical trials of new therapies for systemic lupus

- erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 50, 2415-2422 (2004).
- 61 Ahearn, J. M., Liu, C. C., Kao, A. H. & Manzi, S. Biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Transl. Res.* 159, 326-342 (2012).
- 62 Liossis, S. N., Ding, X. Z., Dennis, G. J. & Tsokos, G. C. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J. Clin. Invest.* 101, 1448-1457 (1998).
- 63 Nambiar, M. P., Enyedy, E. J., Warke, V. G., Krishnan, S., Dennis, G., Wong, H. K., Kammer, G. M. & Tsokos, G. C. T cell signaling abnormalities in systemic lupus erythematosus are associated with increased mutations/polymorphisms and splice variants of T cell receptor zeta chain messenger RNA. *Arthritis. Rheum.* 44, 1336-1350 (2001).
- 64 Enyedy, E. J., Nambiar, M. P., Liossis, S. N., Dennis, G., Kammer, G. M. & Tsokos, G. C. Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 44, 1114-1121 (2001).
- 65 Duriagin, S., Ofori, H. & Jagodzinski, P. P. Flow cytometric analysis of CD4+ T cell receptor zeta chain deficiency in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv. Med. Sci.* 51, 181-183 (2006).
- 66 Crispin, J. C., Kyttaris, V., Juang, Y. T. & Tsokos, G. C. Systemic lupus erythematosus: new molecular targets. *Ann. Rheum. Dis.* 66 Suppl 3, iii65-69 (2007).
- 67 Katsiari, C. G., Kyttaris, V. C., Juang, Y. T. & Tsokos, G. C. Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 115, 3193-3204 (2005).
- 68 Yasuda, S., Stevens, R. L., Terada, T., Takeda, M., Hashimoto, T., Fukae, J., Horita, T., Kataoka, H., Atsumi, T. & Koike, T. Defective expression of Ras guanyl nucleotide-releasing protein 1 in a subset of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 179, 4890-4900 (2007).
- 69 Rusinova, I., Forster, S., Yu, S., Kannan, A., Masse, M., Cumming, H., Chapman, R. & Hertzog, P. J. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic. Acids. Res.* 41, D1040-1046 (2013).
- 70 Mostafavi, S., Yoshida, H., Moodley, D., LeBoite, H., Rothamel, K., Raj, T., Ye, C. J., Chevrier, N., Zhang, S. Y., Feng, T., Lee, M., Casanova, J. L., Clark, J. D., Hegen, M., Telliez, J. B., Hacohen, N., De Jager, P. L., Regev, A., Mathis, D., Benoist, C. & Immunological Genome Project, C. Parsing the Interferon Transcriptional Network and Its Disease Associations. *Cell* 164, 564-578 (2016).
- 71 Kirou, K. A. & Kalliolias, G. D. A new tool for detection of type I interferon activation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Res. Ther.* 12, 138 (2010).
- 72 Kim, J. M., Park, S. H., Kim, H. Y. & Kwok, S. K. A Plasmacytoid Dendritic Cells-Type I Interferon Axis Is Critically Implicated in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 14158-14170 (2015).
- 73 Crow, M. K. & Kirou, K. A. Interferon-alpha in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16, 541-547 (2004).
- 74 Feng, X., Huang, J., Liu, Y., Xiao, L., Wang, D., Hua, B., Tsao, B. P. & Sun, L. Identification of interferon-inducible genes as diagnostic biomarker for systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 34, 71-79 (2015).
- 75 Feng, X., Wu, H., Grossman, J. M., Hanvivadhanakul, P., FitzGerald, J. D., Park, G. S., Dong, X., Chen, W., Kim, M. H., Weng, H. H., Furst, D. E., Gorn, A., McMahon, M., Taylor, M., Brahn, E., Hahn, B. H. & Tsao, B. P. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 54, 2951-2962 (2006).
- 76 Kirou, K. A., Lee, C., George, S., Louca, K., Peterson, M. G. & Crow, M. K. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus

- erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum.* 52, 1491-1503 (2005).
- 77 Yao, Y., Higgs, B. W., Richman, L., White, B. & Jallal, B. Use of type I interferon-inducible mRNAs as pharmacodynamic markers and potential diagnostic markers in trials with sifalimumab, an anti-IFNalpha antibody, in systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Res. Ther.* 12 Suppl 1, S6 (2010).
- 78 Zhuang, H., Narain, S., Sobel, E., Lee, P. Y., Nacionales, D. C., Kelly, K. M., Richards, H. B., Segal, M., Stewart, C., Satoh, M. & Reeves, W. H. Association of anti-nucleoprotein autoantibodies with upregulation of Type I interferon-inducible gene transcripts and dendritic cell maturation in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 117, 238-250 (2005).
- 79 Landolt-Marticorena, C., Bonventi, G., Lubovich, A., Ferguson, C., Unnithan, T., Su, J., Gladman, D. D., Urowitz, M., Fortin, P. R. & Wither, J. Lack of association between the interferon-alpha signature and longitudinal changes in disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 1440-1446 (2009).
- 80 Petri, M., Singh, S., Tesfayone, H., Dedrick, R., Fry, K., Lal, P., Williams, G., Bauer, J., Gregersen, P., Behrens, T. & Baechler, E. Longitudinal expression of type I interferon responsive genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 18, 980-989 (2009).
- 81 Hua, J., Kirou, K., Lee, C. & Crow, M. K. Functional assay of type I interferon in systemic lupus erythematosus plasma and association with anti-RNA binding protein autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 54, 1906-1916 (2006).
- 82 Haller, O. & Kochs, G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 31, 79-87 (2011).
- 83 Kochs, G. & Haller, O. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J. Biol. Chem.* 274, 4370-4376 (1999).
- 84 Haller, O., Gao, S., von der Malsburg, A., Daumke, O. & Kochs, G. Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *J. Biol. Chem.* 285, 28419-28424 (2010).
- 85 Gao, S., von der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G. & Daumke, O. Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* 465, 502-506 (2010).
- 86 Numajiri Haruki, A., Naito, T., Nishie, T., Saito, S. & Nagata, K. Interferon-inducible antiviral protein MxA enhances cell death triggered by endoplasmic reticulum stress. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 31, 847-856 (2011).
- 87 Racicot, K., Schmitt, A. & Ott, T. The myxovirus-resistance protein, MX1, is a component of exosomes secreted by uterine epithelial cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 67, 498-505 (2012).
- 88 Crow, M. K. & Wohlgemuth, J. Microarray analysis of gene expression in lupus. *Arthritis. Res. Ther.* 5, 279-287 (2003).
- 89 Sun, C., Molineros, J. E., Looger, L. L., Zhou, X. J., Kim, K., Okada, Y., Ma, J., Qi, Y. Y., Kim-Howard, X., Motghare, P., Bhattarai, K., Adler, A., Bang, S. Y., Lee, H. S., Kim, T. H., Kang, Y. M., Suh, C. H., Chung, W. T., Park, Y. B., Choe, J. Y., Shim, S. C., Kochi, Y., Suzuki, A., Kubo, M., Sumida, T., Yamamoto, K., Lee, S. S., Kim, Y. J., Han, B. G., Dozmorov, M., Kaufman, K. M., Wren, J. D., Harley, J. B., Shen, N., Chua, K. H., Zhang, H., Bae, S. C. & Nath, S. K. High-density genotyping of immune-related loci identifies new SLE risk variants in individuals with Asian ancestry. *Nat. Genet.* 48, 323-330 (2016).
- 90 Bradley, S. J., Suarez-Fueyo, A., Moss, D. R., Kyttaris, V. C. & Tsokos, G. C. T Cell Transcriptomes Describe Patient Subtypes in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS. One.* 10, e0141171 (2015).
- 91 Castellano, G., Cafiero, C., Divella, C., Sallustio, F., Gigante, M., Pontrelli, P., De Palma, G., Rossini, M., Grandaliano, G. & Gesualdo, L. Local synthesis of

- interferon-alpha in lupus nephritis is associated with type I interferons signature and LMP7 induction in renal tubular epithelial cells. *Arthritis. Res. Ther.* 17, 72 (2015).
- 92 Reder, A. T. MxA: a biomarker for predicting multiple sclerosis disease activity. *Neurology* 75, 1222-1223 (2010).
 - 93 Al-Masri, A. N., Heidenreich, F. & Walter, G. F. Interferon-induced Mx proteins in brain tissue of multiple sclerosis patients. *Eur. J. Neurol.* 16, 721-726 (2009).
 - 94 Lampe, J. B., Schneider-Schaulies, S. & Aguzzi, A. Expression of the interferon-induced MxA protein in viral encephalitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29, 273-279 (2003).
 - 95 Crow, M. K., Kirou, K. A. & Wohlgemuth, J. Microarray analysis of interferon-regulated genes in SLE. *Autoimmunity* 36, 481-490 (2003).
 - 96 Jakes, R. W., Bae, S. C., Louthrenoo, W., Mok, C. C., Navarra, S. V. & Kwon, N. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: prevalence, incidence, clinical features, and mortality. *Arthritis. Care. Res. (Hoboken)* 64, 159-168 (2012).
 - 97 Weening, J. J., D'Agati, V. D., Schwartz, M. M., Seshan, S. V., Alpers, C. E., Appel, G. B., Balow, J. E., Bruijn, J. A., Cook, T., Ferrario, F., Fogo, A. B., Ginzler, E. M., Hebert, L., Hill, G., Hill, P., Jennette, J. C., Kong, N. C., Lesavre, P., Lockshin, M., Looi, L. M., Makino, H., Moura, L. A., Nagata, M., International Society of Nephrology Working Group on the Classification of Lupus, N. & Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus, N. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney. Int.* 65, 521-530 (2004).
 - 98 Kono, M., Yasuda, S., Kato, M., Kanetsuka, Y., Kurita, T., Fujieda, Y., Otomo, K., Horita, T., Oba, K., Kondo, M., Mukai, M., Yanai, M., Fukasawa, Y. & Atsumi, T. Long-term outcome in Japanese patients with lupus nephritis. *Lupus* 23, 1124-1132 (2014).
 - 99 Hiramatsu, N., Kuroiwa, T., Ikeuchi, H., Maeshima, A., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K. & Nojima, Y. Revised classification of lupus nephritis is valuable in predicting renal outcome with an indication of the proportion of glomeruli affected by chronic lesions. *Rheumatology (Oxford)* 47, 702-707 (2008).
 - 100 Bertias, G. K., Tektonidou, M., Amoura, Z., Aringer, M., Bajema, I., Berden, J. H., Boletis, J., Cervera, R., Dorner, T., Doria, A., Ferrario, F., Floege, J., Houssiau, F. A., Ioannidis, J. P., Isenberg, D. A., Kallenberg, C. G., Lightstone, L., Marks, S. D., Martini, A., Moroni, G., Neumann, I., Praga, M., Schneider, M., Starra, A., Tesar, V., Vasconcelos, C., van Vollenhoven, R. F., Zakharova, H., Haubitz, M., Gordon, C., Jayne, D., Boumpas, D. T., European League Against, R., European Renal Association-European, D. & Transplant, A. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1771-1782 (2012).
 - 101 Hahn, B. H., McMahon, M. A., Wilkinson, A., Wallace, W. D., Daikh, D. I., Fitzgerald, J. D., Karpouzas, G. A., Merrill, J. T., Wallace, D. J., Yazdany, J., Ramsey-Goldman, R., Singh, K., Khalighi, M., Choi, S. I., Gogia, M., Kafaja, S., Kamgar, M., Lau, C., Martin, W. J., Parikh, S., Peng, J., Rastogi, A., Chen, W., Grossman, J. M. & American College of, R. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis. Care. Res. (Hoboken)* 64, 797-808 (2012).
 - 102 Maria, N. I., Brkic, Z., Waris, M., van Helden-Meeuwsen, C. G., Heezen, K., van de Merwe, J. P., van Daele, P. L., Dalm, V. A., Drexhage, H. A. & Versnel, M. A. MxA as a clinically applicable biomarker for identifying systemic interferon type I in primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1052-1059 (2014).
 - 103 Vallittu, A. M., Eralinna, J. P., Ilonen, J., Salmi, A. A. & Waris, M. MxA protein

- assay for optimal monitoring of IFN-beta bioactivity in the treatment of MS patients. *Acta. Neurol. Scand.* 118, 12-17 (2008).
- 104 Working Group of the International Ig, A. N. N., the Renal Pathology, S., Cattran, D. C., Coppo, R., Cook, H. T., Feehally, J., Roberts, I. S., Troyanov, S., Alpers, C. E., Amore, A., Barratt, J., Berthoux, F., Bonsib, S., Bruijn, J. A., D'Agati, V., D'Amico, G., Emancipator, S., Emma, F., Ferrario, F., Fervenza, F. C., Florquin, S., Fogo, A., Geddes, C. C., Groene, H. J., Haas, M., Herzenberg, A. M., Hill, P. A., Hogg, R. J., Hsu, S. I., Jennette, J. C., Joh, K., Julian, B. A., Kawamura, T., Lai, F. M., Leung, C. B., Li, L. S., Li, P. K., Liu, Z. H., Mackinnon, B., Mezzano, S., Schena, F. P., Tomino, Y., Walker, P. D., Wang, H., Weening, J. J., Yoshikawa, N. & Zhang, H. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney. Int.* 76, 534-545 (2009).
 - 105 Working Group of the International Ig, A. N. N., the Renal Pathology, S., Roberts, I. S., Cook, H. T., Troyanov, S., Alpers, C. E., Amore, A., Barratt, J., Berthoux, F., Bonsib, S., Bruijn, J. A., Cattran, D. C., Coppo, R., D'Agati, V., D'Amico, G., Emancipator, S., Emma, F., Feehally, J., Ferrario, F., Fervenza, F. C., Florquin, S., Fogo, A., Geddes, C. C., Groene, H. J., Haas, M., Herzenberg, A. M., Hill, P. A., Hogg, R. J., Hsu, S. I., Jennette, J. C., Joh, K., Julian, B. A., Kawamura, T., Lai, F. M., Li, L. S., Li, P. K., Liu, Z. H., Mackinnon, B., Mezzano, S., Schena, F. P., Tomino, Y., Walker, P. D., Wang, H., Weening, J. J., Yoshikawa, N. & Zhang, H. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney. Int.* 76, 546-556 (2009).
 - 106 Berden, A. E., Ferrario, F., Hagen, E. C., Jayne, D. R., Jennette, J. C., Joh, K., Neumann, I., Noel, L. H., Pusey, C. D., Waldherr, R., Bruijn, J. A. & Bajema, I. M. Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 1628-1636 (2010).
 - 107 Banchereau, R., Hong, S., Cantarel, B., Baldwin, N., Baisch, J., Edens, M., Cepika, A. M., Acs, P., Turner, J., Anguiano, E., Vinod, P., Kahn, S., Obermoser, G., Blankenship, D., Wakeland, E., Nassi, L., Gotte, A., Punaro, M., Liu, Y. J., Banchereau, J., Rossello-Urgell, J., Wright, T. & Pascual, V. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell* 165, 551-565 (2016).
 - 108 Reefman, E., Kuiper, H., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G. & Bijl, M. Type I interferons are involved in the development of ultraviolet B-induced inflammatory skin lesions in systemic lupus erythematosis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 11-18 (2008).
 - 109 Wenzel, J., Worenkamper, E., Freutel, S., Henze, S., Haller, O., Bieber, T. & Tuting, T. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J. Pathol.* 205, 435-442 (2005).
 - 110 Wang, X. & Magro, C. M. Human myxovirus resistance protein 1 (MxA) as a useful marker in the differential diagnosis of subcutaneous lymphoma vs. lupus erythematosus profundus. *Eur. J. Dermatol.* 22, 629-633 (2012).
 - 111 Watanabe, S., Imaizumi, T., Tsuruga, K., Aizawa, T., Ito, T., Matsumiya, T., Yoshida, H., Joh, K., Ito, E. & Tanaka, H. Glomerular expression of myxovirus resistance protein 1 in human mesangial cells: possible activation of innate immunity in the pathogenesis of lupus nephritis. *Nephrology (Carlton)* 18, 833-837 (2013).
 - 112 Floege, J., Burg, M., Al Masri, A. N., Grone, H. J. & von Wussow, P. Expression of interferon-inducible Mx-proteins in patients with IgA nephropathy or Henoch-Schönlein purpura. *Am. J. Kidney. Dis.* 33, 434-440 (1999).
 - 113 Tucci, M., Quatraro, C., Lombardi, L., Pellegrino, C., Dammacco, F. & Silvestris, F. Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis: role of interleukin-18. *Arthritis. Rheum.* 58, 251-262 (2008).
 - 114 Fiore, N., Castellano, G., Blasi, A., Capobianco, C., Loverre, A., Montinaro, V., Netti, S., Torres, D., Manno, C., Grandaliano, G., Ranieri, E., Schena, F. P. & Gesualdo, L.

- Immature myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis. *Mol. Immunol.* 45, 259-265 (2008).
- 115 Shodell, M. & Siegal, F. P. Corticosteroids depress IFN- α -producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 108, 446-448 (2001).
- 116 Bennett, L., Palucka, A. K., Arce, E., Cantrell, V., Borvak, J., Banchereau, J. & Pascual, V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J. Exp. Med.* 197, 711-723 (2003).