



Title	自己免疫疾患の難治性病態における新たな診断マーカーと治療ターゲットに関する研究
Author(s)	中村, 浩之
Description	配架番号 : 2397
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13018号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13018
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70829
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroyuki_Nakamura.pdf



学位論文

自己免疫疾患の難治性病態における
新たな診断マーカーと治療ターゲットに関する研究
**(Novel diagnostic markers and therapeutic targets for
refractory autoimmune diseases: antiphospholipid
syndrome, systemic sclerosis and rheumatoid arthritis)**

2018 年 3 月

北海道大学

中村 浩之

Hiroyuki Nakamura

目次

発表論文目録及び学会発表目録.....	1
1. 緒言.....	5
2. 略語表.....	7
3. 第一章.....	
高陽性的中率検査の組み合わせによる効率的な抗リン脂質抗体症候群の診断.....	9
3.1 背景.....	10
3.2 対象と方法.....	12
3.2.1 研究デザイン.....	12
3.2.2 対象.....	12
3.2.3 評価項目.....	12
3.2.4 血漿採取と保存.....	13
3.2.5 抗リン脂質抗体の測定.....	13
3.2.6 抗リン脂質抗体スコアの算出.....	14
3.2.7 統計解析.....	14
3.3 結果.....	15
3.3.1 患者背景.....	15
3.3.2 IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT の APS 診断能.....	17
3.3.3 IgG aDI と IgG/M aPS/PT を組み合わせた APS 診断能.....	19
3.3.4 IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT の抗体価.....	22
3.3.5 IgG aDI と IgG/M aPS/PT の組み合わせと aPL-S.....	24
3.4 考察.....	26

4. 第二章.....	28
抗リン脂質抗体症候群における補体制御因子の解析.....	28
4.1 背景.....	29
4.2 対象と方法.....	30
4.2.1 対象.....	30
4.2.2 補体制御因子、抗 H 因子抗体、aPL の測定.....	30
4.2.3 統計解析.....	31
4.3 結果.....	32
4.3.1 患者背景.....	32
4.3.2 血清 C3、C4、MCP、H 因子濃度.....	34
4.3.3 抗 H 因子抗体.....	37
4.3.4 血清 H 因子濃度と aPL の相関.....	39
4.4 考察.....	41
5. 第三章.....	43
膠原病性肺動脈性肺高血圧症における血清ハプトグロビン値の検討.....	43
5.1 背景.....	44
5.2 対象と方法.....	46
5.2.1 対象.....	46
5.2.2 統計解析.....	46
5.3 結果.....	47
5.3.1 患者背景.....	47
5.3.2 血清ハプトグロビン値と肺動脈圧との相関.....	49
5.3.3 フォローアップスタディー.....	57
5.3.4 血清ハプトグロビン値を加えた PAH スクリーニング.....	59
5.4 考察.....	61

6. 第四章.....	
強皮症に対する自家末梢血幹細胞移植の長期成績	62
6.1 背景.....	63
6.2 対象と方法.....	64
6.2.1 対象.....	64
6.2.2 自家末梢血幹細胞移植の方法.....	64
6.2.3 評価項目.....	65
6.2.4 統計解析.....	65
6.3 結果.....	66
6.3.1 患者背景.....	66
6.3.2 皮膚硬化の変化.....	68
6.3.3 間質性肺疾患の変化.....	71
6.3.4 有害事象.....	74
6.3.5 生存期間.....	75
6.4 考察.....	77
7. 第五章.....	
関節リウマチの滑膜増殖におけるシグナル分子発現異常と制御に関する研究.....	80
7.1 背景.....	81
7.2 目的.....	82
7.3 関節リウマチモデルマウスにおける RasGRP4 ノックダウンの影響.....	83
7.3.1 はじめに.....	83
7.3.2 方法.....	84
7.3.3 結果.....	85
7.3.4 再実験.....	91
7.3.5 考察.....	93

7.4	滑膜組織における RasGRP の発現解析.....	94
7.4.1	方法.....	94
7.4.2	結果.....	95
7.5	サイトカイン刺激による RasGRP2 の発現変化.....	101
7.5.1	方法.....	101
7.5.2	結果.....	102
7.6	FLS における RasGRP2 の強制発現の影響.....	104
7.6.1	RasGRP2 発現ベクターの作成.....	104
7.6.2	RasGRP2 強制発現によるシグナル伝達経路の変化.....	110
7.6.3	RasGRP2 強制発現と細胞増殖能.....	112
7.6.4	RasGRP2 強制発現と細胞接着・遊走・浸潤能.....	114
7.6.5	RasGRP2 強制発現と蛋白産生.....	120
7.7	考察.....	123
8.	総括及び結論.....	125
9.	謝辞.....	126
10.	引用文献.....	128

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. Hiroyuki Nakamura, Kenji Oku, Olga Amengual, Kazumasa Ohmura, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi, First-line, non-criterial antiphospholipid antibody testing for the diagnosis of antiphospholipid syndrome in clinical practice: a combination of anti-beta2-glycoprotein I domain I and phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies, *Arthritis Care & Research* (in press).
2. Hiroyuki Nakamura, Kenji Oku, Yusuke Ogata, Kazumasa Ohmura, Yoko Yoshida, Etsuko Kitano, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Yoshihiro Fujimura, Tsukasa Seya, Tatsuya Atsumi, Alternative pathway activation due to low level of complement factor H in primary antiphospholipid syndrome, submitted.
3. Hiroyuki Nakamura, Masaru Kato, Toshitaka Nakaya, Michihiro Kono, Shun Tanimura, Takahiro Sato, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Hiroshi Ohira, Toshiyuki Bohgaki, Shinsuke Yasuda, Ichizo Tsujino, Masaharu Nishimura, Tatsuya Atsumi, Decreased haptoglobin levels inversely correlated with pulmonary artery pressure in patients with pulmonary arterial hypertension: A cross-sectional study, *Medicine (Baltimore)*, 2017; 96(43): e8349.
4. Hiroyuki Nakamura, Toshio Odani, Shinsuke Yasuda, Atsushi Noguchi, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Junichi Sugita, Toshiyuki Bohgaki, Tomoyuki Endo, Takanori Teshima, Tatsuya Atsumi, Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Systemic Sclerosis: Long-term Follow-up on a Phase II trial and Treatment-related Fatal Cardiomyopathy, *Modern Rheumatology*, (in press).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Hiroyuki Nakamura, Kenji Oku, Olga Amengual, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. “Screening for antiphospholipid syndrome diagnosis using non-criteria antiphospholipid antibody tests with a high positive predictive value: anti-beta2-glycoprotein I domain I and phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies” 10th International Congress on Autoimmunity 2016, Leipzig, Germany. 6-10 April, 2016.
2. 中村浩之, Olga Amengual, 河野通大, 谷村瞬, 柴田悠平, 久田諒, 菅原恵理, 服部敏之, 大村一将, 嶋村抄苗, 野口淳史, 志田玄貴, 清水裕香, 加藤将, 奥健志, 坊垣暁之, 堀田哲也, 保田晋助, 渥美達也: 「膠原病性肺高血圧症における予後不良因子の検討」 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
3. Hiroyuki Nakamura, Kenji Oku, Olga Amengual, Michihiro Kono, Shun Tanimura, Yuhei Shibata, Ryo Hisada, Eri Sugawara, Toshiyuki Hattori, Kazumasa Ohmura, Sanae Shimamura, Atsushi Noguchi, Haruki Shida, Yuka Shimizu, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. “Combination of anti-beta2-glycoprotein I domain I and phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies may be a candidate of effective screening tests for diagnosis of antiphospholipid syndrome” 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 国際ワークショップ, 横浜, 2016年4月21-23日.
4. Hiroyuki Nakamura, Kenji Oku, Olga Amengual, Ryo Hisada, Kazumasa Ohmura, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. ”Effective procedure to diagnose antiphospholipid syndrome using the combination of anti-beta2-glycoprotein I domain I and phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies tests” 15th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Turkish Republic of Northern Cyprus, 21-24 September, 2016.
5. Hiroyuki Nakamura, Kenji Oku, Olga Amengual, Ryo Hisada, Kazumasa Ohmura, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. ”Complement Activation in Antiphospholipid Syndrome Due to the Multi-Activated Pathways of the Complement System” American College of

Rheumatology Annual Meeting 2016, Washington, DC, U.S.A., 11-16 November, 2016.

6. Hiroyuki Nakamura, Kenji Oku, Sawako Abe, Naoki Ohnishi, Michihiro Kono, Shun Tanimura, Ryo Hisada, Eri Sugawara, Kazumasa Ohmura, Sanae Shimamura, Yuka Shimizu, Mototsugu Doi, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. “Activation of Alternative Complement Pathway Due to Depletion of Factor H in Primary Antiphospholipid Syndrome” 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 国際ワークショップ, 福岡, 2017 年 4 月 20-22 日.
7. 中村浩之, 加藤将, 中谷資隆, 藤枝雄一郎, 奥健志, 大平洋, 坊垣暁之, 辻野一三, 保田晋助, 西村正治, 渥美達也 : 「肺動脈性肺高血圧症における血清ハプトグロビン値と肺動脈圧の相関」第 2 回肺高血圧・肺循環学会学術集会, 札幌, 2017 年 6 月 2-3 日
8. 中村浩之, 奥健志, 大西直樹, 久田諒, 大村一将, 藤枝雄一郎, 加藤将, 坊垣暁之, Olga Amengual, 保田晋助, 渥美達也 : 「高陽性的中率検査の組み合わせによる効率的な抗リン脂質抗体症候群のスクリーニングについて」第 39 回日本血栓止血学会学術集会, 名古屋, 2017 年 6 月 8-10 日
9. 中村浩之, 奥健志, 大西直樹, 久田諒, 大村一将, 藤枝雄一郎, 加藤将, 坊垣暁之, Olga Amengual, 保田晋助, 渥美達也 : 「H 因子の低下による補体代替経路活性化が抗リン脂質抗体症候群の向血栓性に関与する」第 39 回日本血栓止血学会学術集会, 名古屋, 2017 年 6 月 8-10 日
10. Hiroyuki Nakamura, Masaru Kato, Michihiro Kono, Shun Tanimura, Ryo Hisada, Eri Sugawara, Kazumasa Ohmura, Sanae Shimamura, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. “Usefulness of Serum Haptoglobin Levels as a Novel Marker for Pulmonary Arterial Hypertension complicated with Connective Tissue Disease” Annual European Congress of Rheumatology 2017, Madrid, Spain, 14-17 June, 2017.
11. 中村浩之, 藤枝雄一郎, 加藤将, 坊垣暁之, Olga Amengual, 保田晋助, 渥美達也 : 「抗リン脂質抗体症候群における補体制御因子の解析」第 54 回日本補体学会学術集会, 福島, 2017 年 9 月 1-2 日

12. Hiroyuki Nakamura, Shinsuke Yasuda, Atsushi Noguchi, Toshio Odani, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Junichi Sugita, Toshiyuki Bohgaki, Tomoyuki Endo, Takanori Teshima, Tatsuya Atsumi. "Long-term Follow-up Report on Japanese Patients with Severe Systemic Sclerosis after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation" American College of Rheumatology Annual Meeting 2017, San Diego, U.S.A., 4-8 November, 2017.

1. 緒言

自己免疫疾患とは、本来、非自己を認識し排除する機能をもつ免疫系が自己の正常な細胞あるいは分子を異物と認識し反応することで生じる症候群であり、自己免疫寛容の破綻に起因する疾患の総称である。自己免疫疾患の病理組織学的検討で、結合組織においてフィブリノイド変性という組織学的変化が共通して見られたことから、膠原病とも呼称される。発症機序はいまだ明らかとなっておらず、多くは慢性の経過で患者の QOL に大きな影響を与え、またときに進行性かつ非可逆的な重要臓器障害をきたす予後不良な病態となりうる。副腎皮質ステロイド剤の登場、種々の免疫抑制剤の開発により、患者の QOL、予後改善が可能となった現在も、長期間の維持療法 (特にステロイド) による蓄積性の副作用、治療反応性に乏しい重症例など今も数多くの問題が残っている。またこれら自己免疫疾患の多くは希少疾患であり、一般診療における認知、診断の難しさの問題も生じている。診断の誤り、遅れはそのまま患者の QOL や予後に大きな影響を与える。我々はこうした自己免疫疾患のうち、特に難治性と考えられる抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome: APS)、全身性強皮症 (Systemic sclerosis: SSc)、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の3つに焦点を当てた。

自己免疫疾患の一つである APS は抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibody: aPL) と呼ばれるリン脂質と蛋白の複合体に対する自己抗体が関連した再発性の血栓症や妊娠合併症である。APS の診断は一般的にサッポロクライテリア・シドニー改変に基づいて行われるが、一般診療医にとって複雑で、特に aPL 結果の解釈に難渋することが多い。またこれら自己抗体の産生機序、また血栓形成機序はいまだ不明な部分が多く、免疫抑制治療に抵抗性であることが知られている。そのため、対症療法としての抗血栓治療が施行されるに過ぎず、その予防効果も十分ではない。従って、我々は高陽性的中率の aPL 検査を用いた一般臨床における新たな APS 診断法について模索した。また、APS の血栓形成機序ならびに新たな治療ターゲットの候補として補体系に着目しその解析を行った。

SSc は皮膚をはじめとした全身の臓器に線維化、硬化と微小血管症をきたす自己免疫疾患で、免疫抑制治療の効果は部分的である。そのため患者は皮膚硬化や微小血管循環障害により QOL を著しく障害され、心や肺など重要臓器の線維化はときに致命的となる。特に肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) は最も予後不良な合併症で、認知、診断の遅れは予後に直結する。現在、心エコー検査や心電図、呼吸機能検査を用いて PAH の早期発見に努めているが、そのスクリー

ニング精度は十分ではない。我々は PAH の病態が肺動脈における微小血管症であることから、新たなバイオマーカーの候補として鋭敏な溶血マーカーである血清ハプトグロビン値に着目した。また難治性 SSc に対する新たな治療法として注目される自家末梢血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation: HSCT) の自験例における長期予後と安全性の解析を行った。

最後に RA は自己免疫機序による慢性多発性関節炎であり、滑膜の肥厚・増殖に伴う骨・軟骨破壊を特徴とする。最も頻度の高い自己免疫疾患の一つで、我が国では 70~80 万人程度の患者数があると想定される。有効な治療が存在しなかった時代には、非可逆的かつ進行性の関節破壊をきたし、患者の QOL ひいては生命予後の悪化をもたらしていた。近年 RA の病態に TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインが密接に関与していることが明らかとなり、それらをターゲットした抗サイトカイン療法が劇的に RA の予後を改善した。しかしいまだ存在する予後不良例、また強力な免疫抑制治療に伴う易感染性副作用などの問題から、さらなる RA の病態解明および新たな治療ターゲットの探索が求められている。我々は、RA の病態の一つである滑膜の腫瘍様増殖に着目し、滑膜増殖におけるシグナル分子発現異常と制御に関する研究を行った。

これら自己免疫疾患 (APS, SSc, RA) における難治性病態に対して、新たな診断マーカーおよび治療ターゲットの探索を本研究の目的とした。

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.

ANA	anti-nuclear antibody
aPL	anti-phospholipid antibodies
aPL-S	antiphospholipid score
APS	antiphospholipid syndrome
APTT	activated partial thromboplastin time
aCL	anticardiolipin antibodies
aDI	anti- β_2 GPI domain I antibodies
aHUS	atypical hemolytic uremic syndrome
aPS/PT	phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody
ATG	antithymocyte globulin
a β_2 GPI	anti- β_2 glycoprotein antibodies
BNP	brain natriuretic peptide
BrdU	Bromodeoxyuridine
CIA	collage-induced arthritis
CTEPH	chronic thromboembolic pulmonary hypertension
CY	Cyclophosphamide
CyA	Cyclosporine
ECM	extracellular matrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ePASP	pulmonary artery systolic pressure estimated by echocardiography
FLS	fibroblast-like synoviocytes
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
HRCT	high resolution computed tomography
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation
IABP	intra-aortic balloon pumping
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IVCY	intravenous cyclophosphamide
LA	lupus anticoagulant
LVEF	left ventricular ejection fraction

MCP	membrane cofactor protein
MCTD	mixed connective tissue disease
mPAP	mean pulmonary artery pressure
mRSS	modified Rodman total thickness skin score
MMF	mycophenolate mophetil
MMP	matrix metalloproteinase
OA	Osteoarthritis
ORF	open reading frame
PAH	pulmonary arterial hypertension
PBS	phosphate buffered saline
PCPS	percutaneous cardiopulmonary support
PDGF	platelet-derived growth factor
PED	Phosphodiesterase
PN	polyarteritis nodosa
PSL	Prednisolone
PVDF	polyvinylidene difluoride
RA	rheumatoid arthoritis
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RasGRP	Ras guanine nucleotide-releasing protein
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLE	systemic lupus erythematosus
SNPs	single nucleotide polymorphisms
SSc	systemic sclerosis
TAC	Tacrolimus
TBI	total body irradiation
TBS	tris-buffered saline
TGF	transforming growth factor
TMA	thrombotic microangiopathy
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
β_2 GP I	β_2 -glycoprotein I
%DLCO	% diffusing capacity of the lung carbon monoxide
%VC	% vital capacity

3. 第一章

高陽性的中率検査の組み合わせによる
効率的な抗リン脂質抗体症候群の診断

3.1 背景

抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome: APS) とは、抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibody: aPL) が関連する自己免疫血栓症および妊娠合併症と定義される。APS の診断には aPL の存在の証明とそれに伴う臨床所見が必要である。現在の APS の国際分類基準として、サッポロクライテリア・シドニー改変が用いられている。aPL は種々のリン脂質あるいはリン脂質蛋白複合体に結合する数種類の自己抗体の総称であり、APS と関連するとクライテリアが定める aPL は IgG および IgM 抗カルジオリピン抗体 (anticardiolipin antibodies: aCL)、IgG および IgM 抗 β_2 -グリコプロテイン I 抗体 (anti- β_2 glycoprotein antibodies: $\text{a}\beta_2\text{GPI}$)、ループスアンチコアグラント (Lupus anticoagulant: LA) の3つである¹。

aCL は最初に酵素免疫抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) で同定された aPL でカルジオリピンを固相化した ELISA プレートで検出される抗体群を呼称する²。ELISA のバッファーとして用いるウシの血清中に $\beta_2\text{GPI}$ が含まれていることから、カルジオリピンと $\beta_2\text{GPI}$ の複合体に対する抗体を検出する。 $\beta_2\text{GPI}$ は主に肝臓で産生される糖蛋白で、血清中では閉環構造として存在しているが、カルジオリピンなどの陰性荷電物質と結合することにより開環する。APS の臨床症状と相関するのは、カルジオリピンそのものに対する抗体ではなく、カルジオリピンに結合し開環した $\beta_2\text{GPI}$ に対する抗体である³。 $\beta_2\text{GPI}$ はプレートをガンマ線処理し陰性荷電させることで直接固相化することができ、そのような ELISA で検出される抗体を $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ と呼称する⁴。LA は凝固検査により機能的に検出される aPL で、*in vitro* のリン脂質依存性凝固反応を阻害する免疫グロブリンと定義される。リン脂質依存性凝固反応の異常がリン脂質の補充によって是正されるとき、その血清中にリン脂質に対する抗体の存在を推測し、LA 陽性と判定する⁵。

分類基準に基づいた場合、APS の診断には4種類の ELISA (IgG aCL, IgM aCL, IgG $\text{a}\beta_2\text{GPI}$, IgM $\text{a}\beta_2\text{GPI}$) 検査と複数の LA 凝固検査が必要になり⁶、実臨床の現場において、その煩雑な検査は大きな負担である。またこれら aPL は加齢、感染症、悪性疾患、肝疾患などでも検出されることがある。偽陽性を避けるため APS の分類基準には少なくとも12週間以上あけて2回以上検出する必要性を規定しており、さらなる負担、時間的制約が課される。

一方 APS においては患者毎に血栓リスクが大きく異なることが知られており、我々は過去の研究で、その血栓リスクが陽性 aPL の種類とその力価と関連することを明らかとし、定量的な APS 診断マーカーかつ血栓の予測マーカーとなる抗リン脂

質抗体スコア (antiphospholipid score: aPL-S) を作成した⁷⁾。しかしながら aPL-S の算出には非常に煩雑な網羅的 aPL 検査を要し、時間的かつ資源的に制約のある臨床現場に応用されるには至っていない。実臨床においてより簡便かつ直接的な APS 診断および血栓リスクマーカーが希求されている。

近年、APS に特異的な新たな aPL として、抗 β_2 GPI ドメイン I 抗体 (anti- β_2 GPI domain I antibodies: aDI) とホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies: aPS/PT) が着目されている。 β_2 GPI は 5 つのドメインから成り、それぞれのドメインにおけるいくつかのエピトープが知られていた⁸⁾ が、近年の研究ではそのうちドメイン I に対する抗体が特に APS の臨床症状との関係が深いことが明らかとなった⁹⁾。 β_2 GPI はドメイン I と V が結合する形で閉環構造をしているが、開環して初めて内部のドメイン I エピトープが露出する¹⁰⁾。リコンビナントの β_2 GPI ドメイン I を直接固相化した免疫検査法で検出される抗体は、血栓症の存在またクライテリアで規定される aPL の存在と強く相関した¹¹⁾。

一方、プロトロンビンは凝固因子の一つであり、また主要なリン脂質結合タンパクでもある。プロトロンビン単独に結合する抗体に病的意義は乏しいものの、リン脂質 (ホスファチジルセリン) に結合し変形したプロトロンビンに対する抗体が、APS の臨床症状、また LA の存在と非常に強く相関することが判明した¹²⁾。我々はこれら特異的な 2 つの aPL 検査の組み合わせが、より簡便かつ直接的な APS 診断に寄与するものと仮定し、その診断能について評価した。

3.2 対象と方法

3.2.1 研究デザイン

本研究は横断研究である。保存血漿を用いて aPL 測定を行い、血漿採取時の臨床情報は医療記録から収集した。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 (承認番号: 012-0338) を得て行った。

3.2.2 対象

2005 年から 2013 年の間に北海道大学病院の膠原病診療部門を受診した主に自己免疫疾患患者のうち、保存血漿があるものを対象とした。APS 患者は連続的に全例の血漿を保存し、非 APS 患者においては同意が得られた患者の中から非選択的に血漿を保存した。APS の診断は現行の分類基準¹に基づき少なくとも 2 名以上の専門医が行った。臨床症状の一つである血栓症は、CT、MRI、超音波検査などで画像的に確認できるものと定義した。

3.2.3 評価項目

分類基準に基づいた専門医診断をゴールドスタンダードとして、IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT およびそれら組み合わせの APS 診断における感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を算出した。また IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT 検査結果とクライテリアで規定される aPL の検査結果との一致度および相関を評価した。さらに IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT 検査の結果と、既存の血栓予測マーカーである aPL-S との関連を評価した。

3.2.4 血漿採取と保存

全ての血漿は、通常の外来受診時に患者の同意を得て採取・保存した。0.109 M クエン酸ナトリウム入りの採血管に静脈血を採取し、直ちに 4 °C で遠心分離した。得られた血漿は-80 °C で保存した。

3.2.5 抗リン脂質抗体の測定

IgG aDI は化学発光酵素免疫測定法 (QUANTA Flash ®, Inova Diagnostics, USA) を用いて測定した。 β_2 GPI ドメイン I を固相化した磁性粒子を血漿サンプル中でインキュベートし、磁性粒子を分離、洗浄した後に酵素標識抗ヒト IgG 抗体を添加した。未反応物を除去、洗浄した後、発光試薬を添加し発光量を測定した。IgG aDI の基準値は、健康成人の 99 パーセンタイル値をもとに、20 CUs/mL 未満と定めた¹³。

IgG および IgM aPS/PT は in-house の ELISA で測定した。50 μ g/mL の ホスファチジルセリン (Wako, Japan) を 4 °C overnight でマイクロプレートに固相化し、1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA) と 5 mM の CaCl_2 を含んだ Tris-buffered saline (TBS) でブロッキングした。TBS-Tween- CaCl_2 で洗浄後、BSA- CaCl_2 中に溶解した 10 μ g/mL のヒトプロトロンビン (Diagnostica Stago, France) と BSA- CaCl_2 のみをそれぞれ半分のウェルに添加した。37 °C 1 時間でインキュベートした後、プレートを TBS-Tween- CaCl_2 で洗浄し、BSA- CaCl_2 で 100 倍希釈した血漿サンプルをそれぞれのウェルに添加した。室温 1 時間でインキュベートした後、アルカリホスファターゼを結合したヤギ抗ヒト IgG および IgM 抗体を添加した。再び室温 1 時間でインキュベートした後、プレートを TBS-Tween- CaCl_2 で洗浄し、pH 9.8 に調整した 1M のジエタノールアミンバッファーと 1 mg/mL のニトロフェニルリン酸ジナトリウム塩 (Sigma) を添加した。その後、Multiskan Ascent Plate reader (Thermo Electron Corporation) を用いて光学濃度を測定した。同一血漿サンプルにおけるプロトロンビンを含むウェルとプロトロンビンを含まないウェルの光学濃度の差を算出し、陽性コントロールから作成されるスタンダードカーブを基に、aPS/PT の力価を決定した。基準値は健康成人の 99 パーセンタイル値をもとに、IgG aPS/PT < 2.0 units、IgM aPS/PT < 9.6 units と定めた¹²。

クライテリアに規定された IgG および IgM aCL^{14,15}、IgG および IgM $\alpha\beta_2$ GPI⁴ は、

標準化された in-house の ELISA を用い、また LA は国際血栓止血学会の推奨に従って測定した^{16,17}。基準値は IgG aCL < 18.5 IgG phospholipid units、IgM aCL < 7.0 IgM phospholipid units、IgG aβ₂GPI < 2.2 units/mL、IgM aβ₂GPI < 6.0 units/mL とした。

3.2.6 抗リン脂質抗体スコアの算出

我々は過去の研究において、APS に関連する臨床症状のオッズ比からそれぞれの aPL の種類と力価に応じた aPL-S を定義した。そして患者毎に保有する aPL-S の合計が 30 以上の場合、独立した血栓の予測因子となることを示した⁷。本研究では、既報に従って患者毎の aPL-S の合計を算出し、30 を超える aPL-S を血栓の高リスクとした。

3.2.7 統計解析

正規分布が仮定できない連続変数は中央値 [範囲] で示し、カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示した。連続変数の群間比較は Wilcoxon test または Kruskal-Wallis test を用いた。2 群間の一致度は Cohen's kappa statistic を 2 群間の相関は Spearman's rank-order correlation coefficient を用いて評価した。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 Pro software (ver. 12.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。

3.3 結果

3.3.1 患者背景

157例 (女性125例、男性32例) の自己免疫疾患患者が本研究の対象となった。そのうち51人がAPSと診断され、残りの106人においてはAPSが否定された。51人のAPS患者のうち、45人は原発性APSで、6人は全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE) に合併したAPSであった。また44人のAPS患者が血栓症歴を有し、16人に妊娠合併症歴があった。対象患者の背景疾患をTable 1に示した。

Table 1. 対象患者の背景疾患

疾患名	人数	%
抗リン脂質抗体症候群	51	32
血栓症	44	
妊娠合併症	16	
非抗リン脂質抗体症候群	106	68
全身性エリテマトーデス	37	24
関節リウマチ	33	21
シェーグレン症候群	7	5
全身性強皮症	6	4
筋炎症候群	4	3
血管炎症候群	2	1
ベーチェット病	2	1
その他*	14	9
合計	157	

*その他: 深部静脈血栓症 (n=2)、習慣流産 (n=2)、感染症 (n=2)、レイノー病 (n=2)、橋本病 (n=1)、多発性硬化症 (n=1)、自己免疫性脳炎 (n=1)、好酸球性筋膜炎 (n=1)、脳梗塞 (n=1)、虚血性心疾患 (n=1)

3.3.2 IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT の APS 診断能

IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT およびクライテリア aPL それぞれの APS 診断における感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を Table 2 に示した。IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT はいずれも APS 診断の高い陽性的中率を有し、クライテリア aPL の陽性的中率は 66.7% (IgM a β ₂GPI) ～94.9% (LA) であった。

Table 2. IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT、クライテリア aPL の APS 診断における感度 (陽性率)、特異度、陽性的中率、陰性的中率

aPL	感度 (陽性率)	特異度	陽性的中率	陰性的中率
IgG aDI	60.8	100	100	84.1
IgG aPS/PT	51.0	98.1	92.9	80.6
IgM aPS/PT	23.5	99.1	92.3	73.0
IgG aCL	64.7	92.5	80.5	84.5
IgM aCL	13.7	99.1	87.5	70.5
IgG a β_2 GPI	62.8	96.2	88.9	72.9
IgM a β_2 GPI	11.8	97.2	66.7	69.6
LA	72.5	98.1	94.9	88.1

数値はパーセンテージ (%) で示した。

aDI, anti- β_2 glycoprotein domein I antibodies; aPS/PT, phophatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies; aCL, anticardiolipin antibodies; a β_2 GPI, anti- β_2 glycoprotein antibodies; LA, lupus anticoagulant.

3.3.3 IgG aDI と IgG/M aPS/PT を組み合わせた APS 診断能

本研究の全対象患者のうち、31 人 (29%) が IgG aDI 陽性であり、35 人 (22%) が IgG または IgM (IgG/M) aPS/PT が陽性であった。APS 患者においては、31 人 (61%) が IgG aDI 陽性であり、32 人 (63%) が IgG/M aPS/PT 陽性であった。21 人 (41%) はその両者陽性であった。IgG aDI 陽性者は全例が APS であったが、IgG/M aPS/PT は 3 人の非 APS 患者にも検出された。IgG aDI と IgG/M aPS/PT の組み合わせは APS 患者の 82% (42/51) をカバーし、偽陽性も 2.8% (3/106) と低率であった (Figure 1A)。

IgG aDI と IgG/M aPS/PT の組み合わせを用いて APS 診断の予測を行った場合、IgG aDI が陽性のときの APS 診断の陽性的中率は 100%で、また IgG/M aPS/PT のみが陽性の場合も、陽性的中率は 79%と高値であった。一方、IgG aDI と IgG/M aPS/PT がいずれも陰性の場合、わずか 8%のみが APS と診断された (Figure 1B)。

IgG aDI、IgG/M aPS/PT の組み合わせとクライテリア aPL 検査結果の一致度は Cohen's kappa statistic: 0.68 [95%信頼区間 0.57-0.80] であった。また IgG aDI と IgG/M aPS/PT の組み合わせは、クライテリア aPL の陽性数と強い正の相関を示した ($p = 0.81, p < 0.001$)。

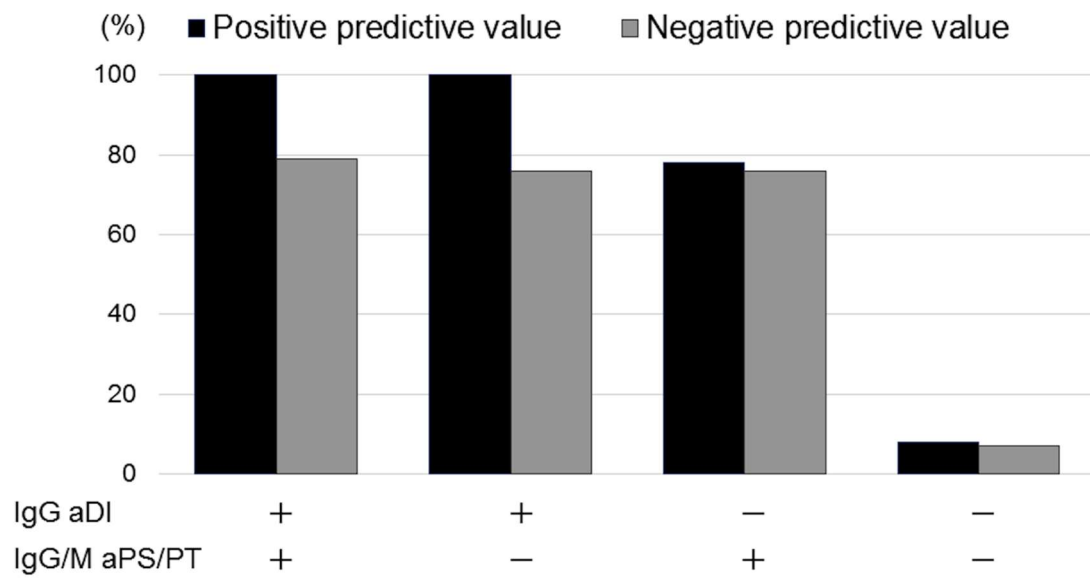


Figure 1A. IgG aDI と IgG/M aPS/PT の組み合わせにおける APS 診断の的中率
 IgG aDI, IgG anti- β_2 glycoprotein I domain I antibodies; IgG/M aPS/PT, IgG and/or IgM phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies.

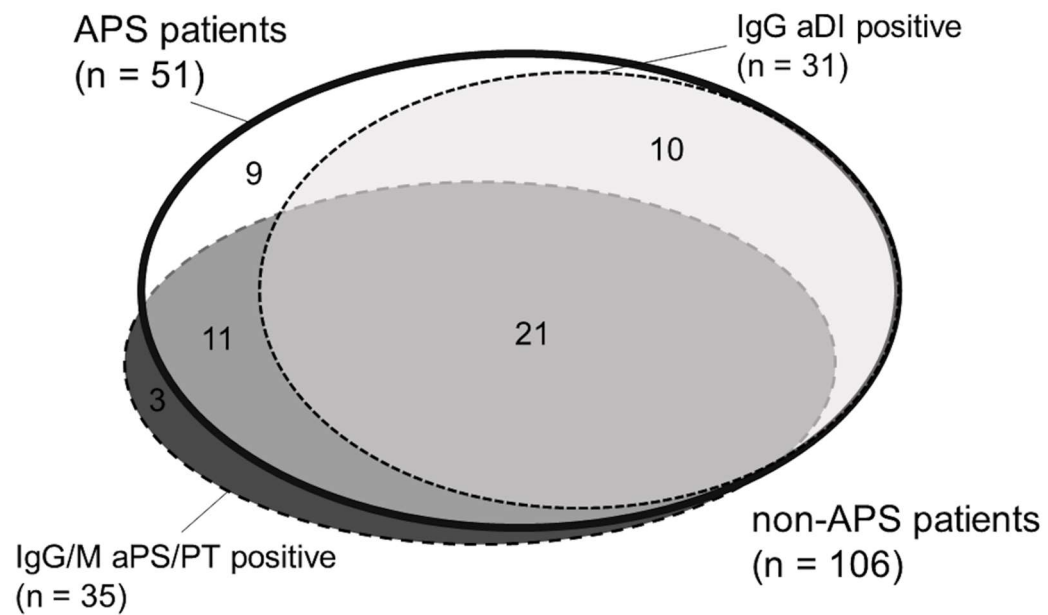


Figure 1B. APS と IgG aDI、 IgG/M aPS/PT の関係 (ベン図)

APS, antiphospholipid syndrome; IgG aDI, IgG anti- β_2 glycoprotein I domain I antibodies; IgG/M aPS/PT, IgG and/or IgM phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies.

3.3.4 IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT の抗体価

IgG aDI、IgG aPS/PT、IgM aPS/PT の抗体価は、いずれも非 APS 患者群に比べ APS 患者群で有意に高値であった (Figure 2)。

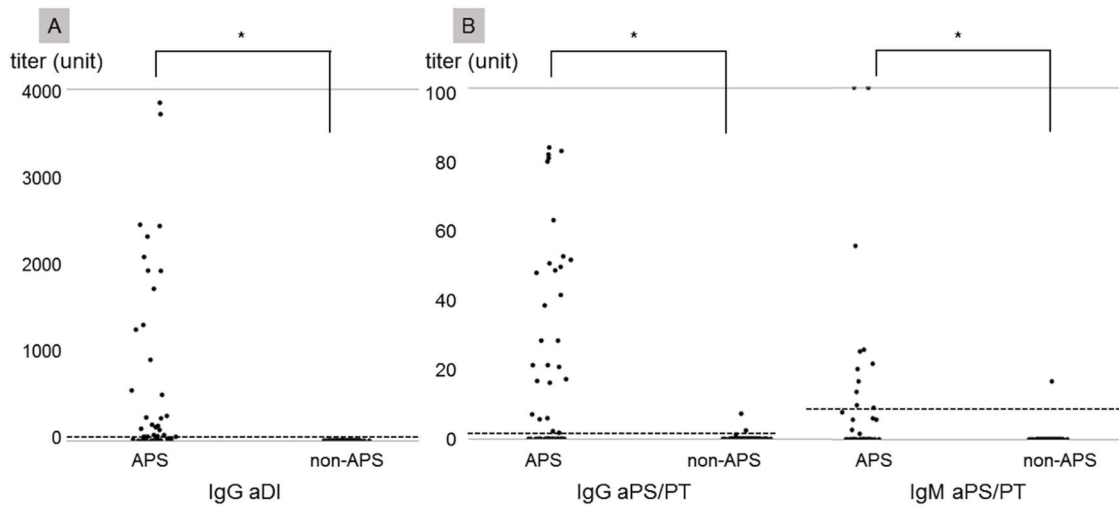


Figure 2. IgG aDI (A)、IgG および IgM aPS/PT (B) の抗体価

点線は基準範囲のカットオフを示す。* $p < 0.0001$

APS, antiphospholipid syndrome; IgG aDI, IgG anti- β_2 glycoprotein I domain I antibodies; IgG/M aPS/PT, IgG and/or IgM phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies.

3.3.5 IgG aDI と IgG/M aPS/PT の組み合わせと aPL-S

IgG aDI と IgG/M aPS/PT の両者陽性患者の aPL-S は、中央値 46 [範囲 26-76] と高値であった。また IgG aDI のみ、IgG/M aPS/PT のみの陽性例の aPL-S はそれぞれ中央値 22 [範囲 4-39]、中央値 23 [範囲 11-60]であった。一方、IgG aDI、IgG/M aPS/PT の両者陰性例の aPL-S は中央値 0 [範囲 0-26]と低値であった (Figure 3)。

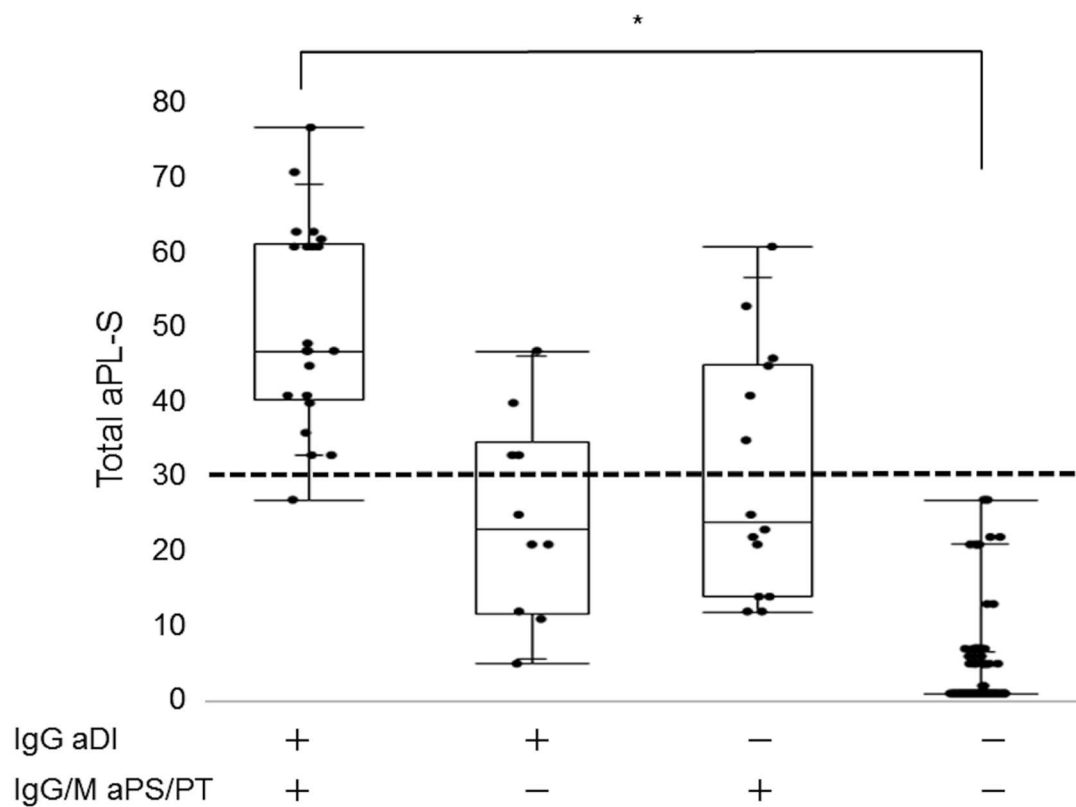


Figure 3. IgG aDI、IgG/M aPS/PT の組み合わせと aPL-S の関係 (箱ひげ図)

箱は四分位範囲を表し、内部の線は中央値を示す。またヒゲは最大値および最小値を表す。点線は血栓症リスクのカットオフ値である aPL-S=30 を示す。* $p < 0.0001$

IgG aDI, IgG anti- β_2 glycoprotein I domain I antibodies; IgG/M aPS/PT, IgG and/or IgM phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies, aPL-S, antiphospholipid score.

3.4 考察

本研究では、APS のクライテリアに含まれていない IgG aDI と IgG/M aPS/PT 検査の組み合わせが APS 診断の非常に高い陽性的中率を有すること、また血栓症の予測因子である aPL-S と強く相関することを明らかにした。

我々のコホートにおいて、IgG aDI の APS 診断における感度は 61%、特異度および陽性的中率は 100%であった。これらは同様に IgG aDI の感度、特異度を報告した既報と大きく矛盾しない結果であった¹⁸⁻²¹。IgG aDI の感度は、クライテリア aPL である IgG aCL (65%)、IgG aβ₂GPI (63%)とほぼ同様で、特異度は IgG aCL (93%)、IgG aβ₂GPI (96%) より高かった。すなわち、我々の研究は IgG aDI 検査は、感度を保ったまま、IgG aCL、IgG aβ₂GPI 検査の特異性を改善する可能性を示した。しかしながら、感度、特異度は対象患者集団、検査方法によって影響を受け^{13,20-24}、いくつかの既報では aDI、aCL、aβ₂GPI の特異度はほぼ同等であった^{15,21}。

IgG および IgM aPS/PT の感度は 51%および 24%、特異度は 98%と 99%、陽性的中率は 93%と 92%であった。これらも既報に矛盾のない結果であった^{12,25-27}。我々のコホートにおいて、IgG/M aPS/PT 陽性者のほとんどは LA 陽性であった。IgG/M aPS/PT は非 APS 患者においても 3 人に検出された。これら IgG/M aPS/PT は低抗体価であり、LA 活性を有していなかった。高抗体価の IgG/M aPS/PT は APS に特異的であり、LA の存在と非常に強く相関すると報告されている¹²が、低抗体価かつ LA 活性のない IgG/M aPS/PT は偽陽性の可能性がある。

IgG aDI と IgG/M aPS/PT が両者陽性的の場合、その APS 診断の陽性的中率は 100%であり、aPL-S も 30 以上の高値を示した。よってこれらの患者群は血栓リスクの高い APS と直ちに診断できるだろう。また IgG aDI のみが陽性例においても APS 診断の陽性的中率は 100%で、aPL-S は 30 前後であった。これらの患者群においても、APS の診断は迷うことなく、血栓リスクについても十分に注意する必要がある。そして IgG/M aPS/PT のみが陽性例においても 79%と高い陽性的中率と、30 前後の aPL-S を示し、抗体価にさえ注意すれば、困難なく APS と診断できるだろう。一方、9 人の APS 患者は IgG aDI と IgG/M aPS/PT のいずれもが陰性であった。しかし、これら APS 患者はクライテリア aPL のどれか一つだけ (LA5 人、IgG aCL3 人、IgG aβ₂GPI1 人) が陽性であり、その aPL-S も 4 から 20 と低値であった。すなわち、IgG aDI と IgG/M aPS/PT の両者陰性群にも、分類基準によって APS と診断されうる患者は少数存在するが (8%)、それらは血栓リスクの低い APS であった。

以上のように IgG aDI と IgG/M aPS/PT の組み合わせは、直接的かつ簡便な APS 診断および血栓リスク評価が可能となり、煩雑な既存の分類基準を改善できる可能性がある。特に時間的、資源的な制約のある実臨床現場においては、非常に実用的な診断ツールとなりえる可能性がある。

本研究は単施設の横断研究であり、比較的症例数が少ないこと、内的および外的検証コホートを欠くことから、さらなる検証研究が必要であるが、**APS** のよりよい診断法の確立に寄与するものと信じる。

4. 第二章

抗リン脂質抗体症候群における 補体制御因子の解析

4.1 背景

APS において、aPL の存在は活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time: APTT) を代表とするリン脂質依存性凝固反応を阻害することから、検査所見上は APTT の延長という凝固異常症として反映されるが、実際の生体内においては逆説的に血栓性素因として働く。aPL による血栓形成機序には諸説あるが、aPL は p38MAPK^{28,29} や NFκB^{30,31} を介して単球、血管内皮細胞など向血栓性細胞の組織因子発現を亢進させることが知られており、aPL の直接的あるいは補体活性を伴った血管内皮障害、血小板活性化が血栓形成の一因と考えられている。

APS の多くは SLE に合併し、また SLE と多くの共通した臨床的特徴を有する³²。我々は過去の研究で SLE のみならず、SLE を合併しない原発性 APS においても低補体血症が認められることを報告した。APS 患者血清中では、C3 と C4 が低値で、反対に C3a と C4a が増加していた³³。補体活性化によって生ずるアナフィラトキシン (C3a、C4a、C5a) は強力な炎症メディエーターであり、向血栓性細胞を活性化させ、血栓性病態に関与すると考えられる^{31,34}。補体活性化は APS の血栓形成における主要なメカニズムの一つである可能性がある³⁵⁻³⁷。

しかし、APS における補体活性化の原因は明らかにはなっていない。補体活性化には古典的経路、代替経路、レクチン経路の 3 つの経路が存在する。そのうち、古典的経路は免疫複合体に結合した C1q をトリガーとするが、ほとんどの APS 患者血清中における免疫複合体レベルは低値であった³³。一方、代替経路には C3 が自然分解されて生ずる C3b が関与し、過剰な補体活性化を抑制する補体制御因子と呼ばれる蛋白群が存在する。膜補助因子蛋白 (membrane cofactor protein: MCP) と H 因子は代表的な 2 つの補体制御因子であり、MCP は細胞膜表面において、H 因子は液性因子としてそれぞれ C3b を分解し、過剰な代替経路活性の制御を行っている^{38,39}。

興味深いことにこれら補体制御因子は aPL の主要対応抗原である β_2 GPI と Sushi-domain と呼ばれる共通の蛋白モチーフの繰り返しから構成されている⁴⁰。また β_2 GPI は C3 の H 因子への結合を介在し、H 因子のコファクターとしての役割を担うことも知られており、aPL の存在が交差反応して補体制御因子の機能異常を引き起こす可能性が考えられる。我々は、APS における補体活性化の一因として補体制御因子の異常を仮定し、主な補体制御因子である MCP と H 因子を評価した。

4.2 対象と方法

4.2.1 対象

2006 年から 2013 年に北海道大学病院膠原病外来を受診した原発性 APS の 27 例、SLE 合併 APS の 20 例、SLE の 24 例、非 SLE 膠原病の 25 例を対象とした。APS の診断は現行の分類基準に基づき少なくとも 2 名以上の専門医が行った。保存血清または血漿を用いて下記測定を行い、血清採取時の臨床情報を診療録から抽出した。同様に血清 C3 および C4 値は診療において標準化免疫比濁法で測定された結果を診療録から抽出した。なお、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 (承認番号: 012-0204) を得て行った。

4.2.2 補体制御因子、抗 H 因子抗体、aPL の測定

血清 MCP 値および H 因子値は ELISA で測定した。それぞれ市販の ELISA キット (MCP ELISA kit, Cloud-Clone, U.S.A., factor H human ELISA kit, Human Innovative Research, U.S.A.) を用い、プロトコールに従って測定した。抗 MCP 抗体また抗 H 因子抗体を固相化した 96-well ELISA プレートに患者血清を添加し、その後ビオチン結合抗 MCP 抗体または抗 H 因子抗体を添加した。さらにペルオキシダーゼ標識したアビジンと発光基質を添加し、450 nm の光学濃度を測定した。

抗 H 因子抗体は同様に市販の ELISA キット (MoBiTec, Germany) を用いて測定した。ヒト H 因子を固相化した 96-well ELISA プレートに患者血清とペルオキシダーゼ標識した抗ヒト IgG 抗体を添加し、450 nm の光学濃度を測定した。基準値は、健康成人の 99 パーセンタイル値をもとに、27 AU/mL 未満と定めた。

また原発性 APS 患者においては抗 H 因子抗体検出のため、Western-blotting 法も併せて行った。7.5%アクリルアミドゲルを作製し、SDS-PAGE で精製 H 因子を 5 μ L/well 泳動、転写した。1 レーンごとに分割したメンブレンに一次抗体としてスキムミルクで 100 倍希釈した患者血清と、コントロールとしてマウス抗ヒト H 因子モノクローナル抗体を一晩反応、洗浄した後、サンプルにペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Sigma)、コントロールにはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research, U.S.A.) を 2 次抗体として用い、検出試薬には AmerishamTM ECLTM Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Japan) を使用した。

aPL は保存血漿を用いて第一章に記述した方法と同様の方法で測定した。

4.2.3 統計解析

正規分布が仮定できない連続変数は中央値 [範囲] で示し、カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示した。連続変数の群間比較は **Steel-Dwass test** を用い、カテゴリー変数の群間比較は **chi-square test** を用いた。2 群間の相関は **Spearman's rank-order correlation coefficient** を用いて評価した。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 Pro software (ver. 12.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)** を用いて行った。

4.3 結果

4.3.1 患者背景

対象患者の背景を Table 3 に示した。原発性 APS 患者には動脈血栓症が多く (81%) 認められ、血小板減少も高頻度 (42%) であった。一方、静脈血栓症は SLE 合併 APS 患者に多く (65%) 認められた。また原発性 APS 患者の 3 人 (11%) に aPL 関連腎症を合併していた。

Table 3. 患者背景

	PAPS	APS + SLE	SLE	*Others	
人数	27	20	24	25	
年齢	43 [33-60]	35 [31-50]	38 [24-53]	57 [39-66]	††
女性	23 (85%)	17 (85%)	19 (79%)	21 (84%)	
血栓症	23 (85%)	19 (95%)			
動脈血栓症	22 (81%)	10 (50%)			††
静脈血栓症	5 (19%)	13 (65%)			†
妊娠合併症	7 (26%)	4 (20%)			
血小板減少	11 (41%)	2 (10%)			††
aPL 関連腎症	3 (11%)	0 (0%)			

全てのデータは中央値 [範囲] もしくは人数 (%) で示した。

† $p < 0.01$, †† $p < 0.05$

PAPS, primary antiphospholipid syndrome; APS, antiphospholipid syndrome; SLE, systemic lupus erythematosus; *Others, 非 SLE 膠原病: 関節リウマチ ($n = 10$), ベーチェット病 ($n = 5$), 血管症候群 ($n = 3$), シェーグレン症候群 ($n = 3$), 強皮症 ($n = 2$), 多発性筋炎 ($n = 2$); aPL, antiphospholipid antibodies.

4.3.2 血清 C3、C4、MCP、H 因子濃度

血清C3およびC4値は、SLE合併APS患者群 (C3: 71 [55-85] mg/dL, C4: 10 [7-15] mg/dL) のみならず原発性APS患者群 (C3: 82 [72-100] mg/dL, C4: 15 [8-21] mg/dL) においても、非SLE膠原病患者群 (C3: 112 [100-121] mg/dL; C4: 22 [17-29] mg/dL) と比較し低値であった (Figure 4)。

4群間で血清MCP値に有意な違いを認めなかったが、原発性APS患者群 (204 [123-636] μ g/mL) の血清H因子値はSLE患者群 (1275 [192-1629] μ g/mL) および非SLE患者群 (1220 [1109-1926] μ g/mL) と比較し有意に低かった (Figure 4)。

また原発性APS患者群において血清H因子値は血清C3値と正相関 ($p < 0.01$, $R = 0.55$) し、血清C4値とは有意な相関 ($p = 0.22$, $R = 0.33$) を認めなかった (Figure 5)。

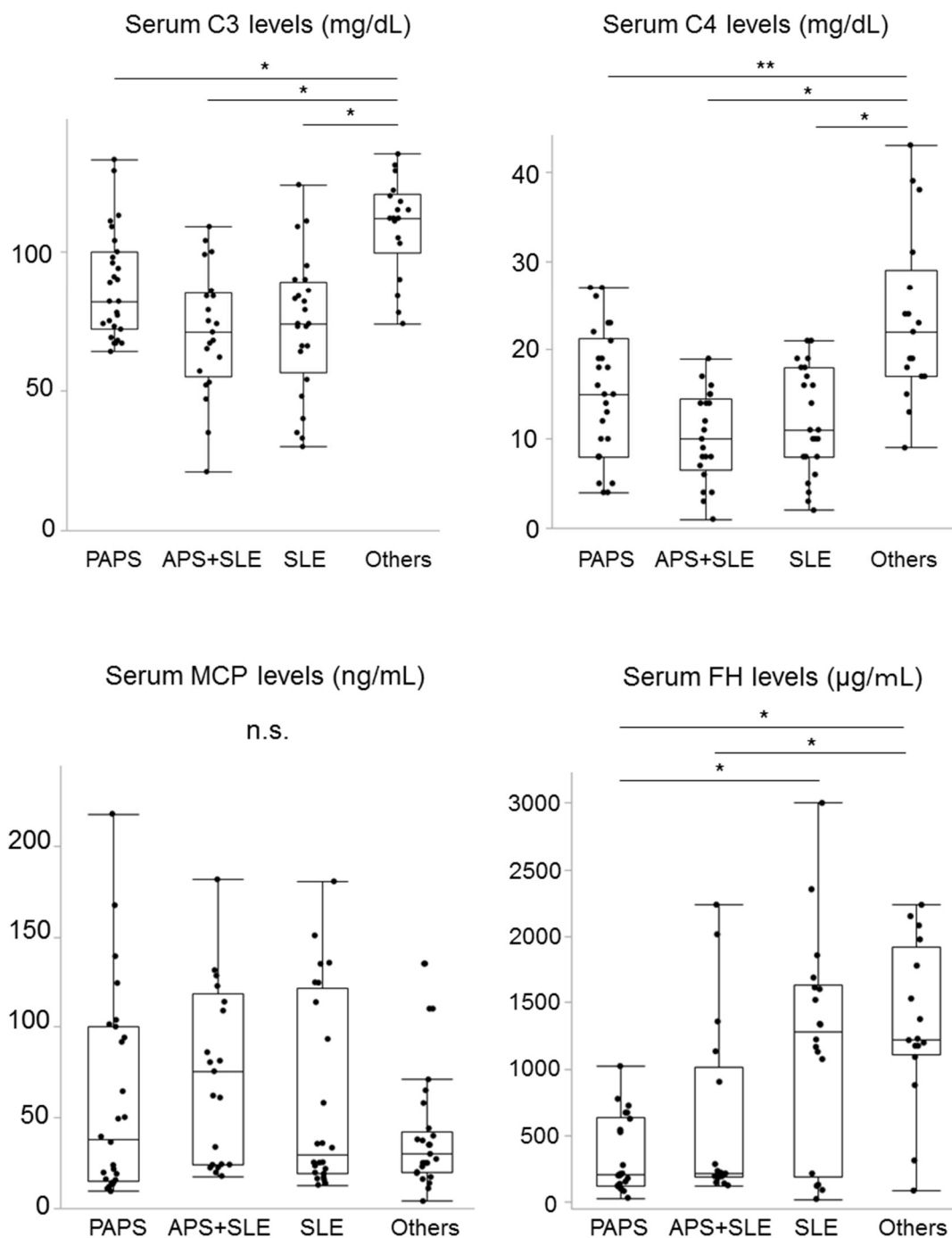


Figure 4. 血清 C3、C4、MCP、H 因子濃度

箱は四分位範囲を表し、内部の線は中央値を示す。またヒゲは最大値および最小値を表す。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$

PAPS, primary antiphospholipid syndrome; APS, antiphospholipid syndrome; SLE, systemic lupus erythematosus; Others, 非 SLE 膠原病; MCP, membrane cofactor protein; FH, factor H.

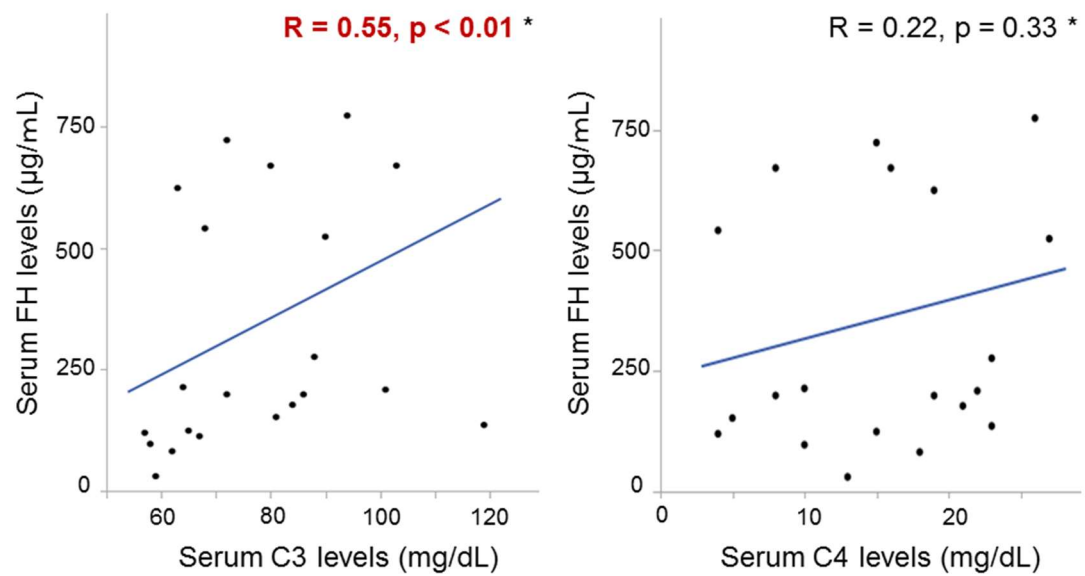


Figure 5. 原発性 APS における血清 H 因子値と C3 および C4 値との相関
 APS, antiphospholipid syndrome; FH, factor H; *Spearman rank correlation coefficient.

4.3.3 抗 H 因子抗体

ELISA、Western-blotting 法ともいずれの患者血清においても抗 H 因子抗体を検出できなかった (Figure 6)。

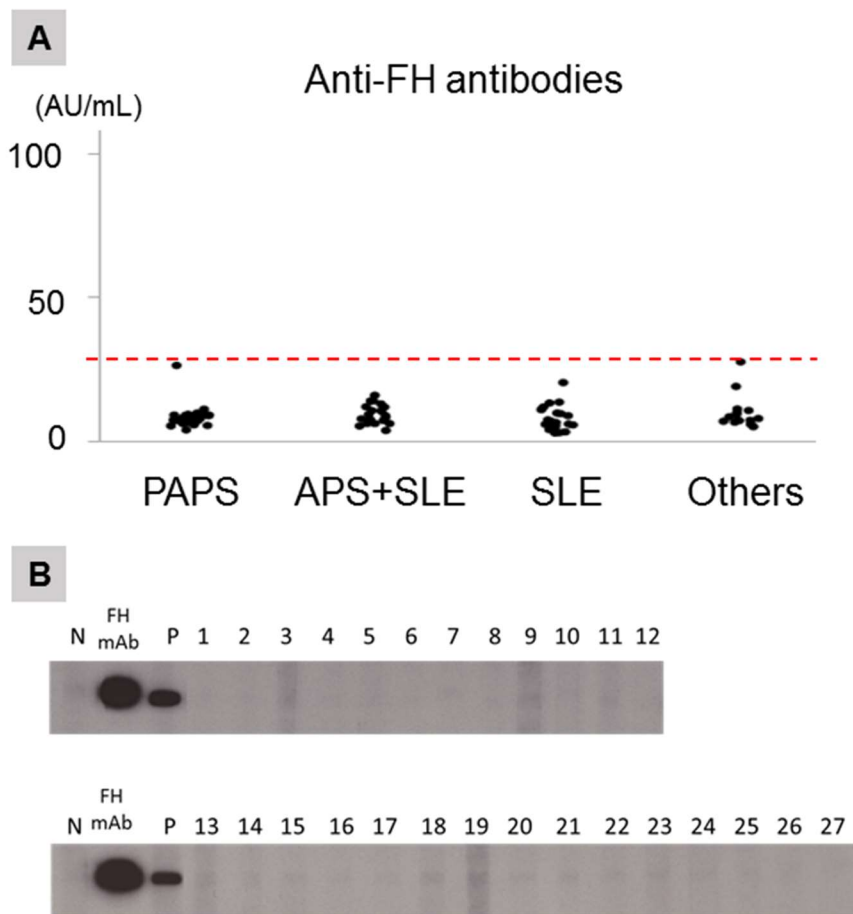


Figure 6. 抗 H 因子抗体 (A) ELISA, (B) Western-blotting

ELISA は全対象患者、Western-blotting は原発性 APS 患者のみにおいて施行した。
赤い点線は基準値上限を示す。

PAPS, primary antiphospholipid syndrome; APS, antiphospholipid syndrome; SLE, systemic lupus erythematosus; Others, 非 SLE 膠原病; N, negative control serum sample; FH mAb, anti-factor H monoclonal antibodies; P, positive control serum sample.

4.3.4 血清 H 因子濃度と aPL の相関

原発性 APS 患者群において血清 H 因子濃度と aPL 抗体価の間に有意な相関関係は認められなかった (Figure 7)。

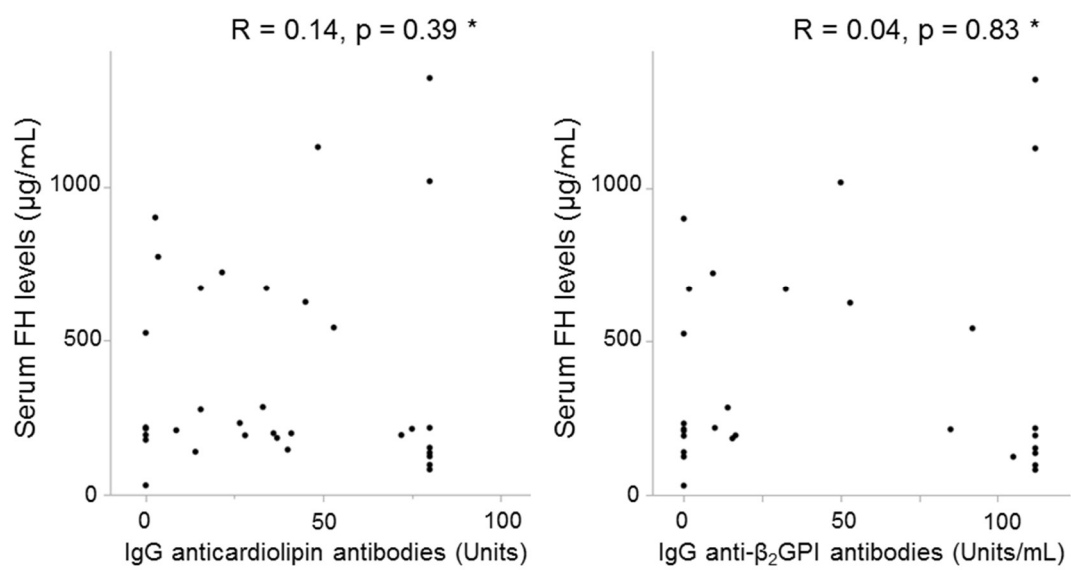


Figure 7. 血清 H 因子濃度と aPL の相関
 FH, factor H; aPL, antiphospholipid antibodies; *Spearman rank correlation coefficient.

4.4 考察

本研究では原発性 APS 患者において、血清 H 因子が低値であること、また血清 H 因子が血清 C3 値と正の相関を示すことを明らかにした。これらの知見は、原発性 APS において、H 因子低下により補体代替経路が活性化している可能性を示唆する。血清 H 因子値は C4 とは有意な相関を示さなかったが、C4 は代替経路に関与しないため矛盾しない結果と考える。

H 因子の機能異常は、非典型溶血性尿毒症候群 (atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS) と呼ばれる補体関連の血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy: TMA) を発症することが知られている⁴¹⁻⁴⁴。TMA は血管内皮障害とそれに続く微小血栓形成を病態とし、臨床的には血小板減少、溶血性貧血、多発微小血栓による臓器不全 (特に脳と腎) を特徴とする⁴⁵。APS は少なからず TMA の側面を持つ⁴⁶。例えば aPL による血管内皮障害性が証明され、特に脳梗塞を中心とした動脈血栓症が高頻度に認められる⁴⁷。また aPL 関連腎症と呼ばれる病態では腎に TMA の病理所見が認められることもしばしばである⁴⁸。さらには血小板減少も APS に高頻度に認められ⁴⁹⁻⁵¹、溶血性貧血も APS に合併することがある⁵²。さらには APS の最重症病型として知られる劇症型 APS は、全身型の TMA と考えられている⁴⁶。本研究の対象となった原発性 APS 患者においても、80%が動脈血栓症の既往を持ち、40%に血小板減少、10%に aPL 関連腎症、そして 1 人には劇症型 APS 様の全身型 TMA の所見が認められた。APS と aHUS は共通の H 因子機能異常という病因により似た臨床徴候を示している可能性が考えられる。APS において aPL が直接血管内皮細胞を活性化するのみならず⁵³、H 因子低下による代替経路活性化が血管内皮細胞活性を助長させ、さらに強力な向血栓状態を作り出しているのかもしれない。

我々の対象患者群において抗 H 因子抗体は ELISA、Western-blotting のいずれの方法でも検出できなかった。また aPL の交差反応性が H 因子の機能異常に関与すると仮定したが、aPL 抗体価と血清 H 因子値の関連を見出すこともできなかった。別の研究グループが、イタリアおよびセルビアの APS 患者コホートにおいて、ELISA で抗 H 因子抗体を検出し、その存在が APS の血栓再発リスクと関連することを報告した⁵⁴。人種の違いは影響しているものの、これらの結果の違いの原因は明らかではない。しかし、抗 H 因子抗体の有無の違いはあるが、我々と彼らの研究結果は、H 因子の異常が APS の向血栓性機序と関連する点で合致している。

H 因子低下のもう一つの考えられる原因は、遺伝子変異である。H 因子の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs) が aHUS⁴⁴ や SLE⁵⁵、加齢黄斑変性⁵⁶ など様々な病気と関連すると報告されており、APS においてもその検索の重要性が示唆される。

APS における補体活性化はさまざまな要因が複合している可能性が考えられる。今回の H 因子低下以外にも、我々は C1q に対する自己抗体が APS の補体活性化に関与している可能性を報告してきた⁵⁷。抗 C1q 抗体は、原発性 APS および

SLE 患者血清中に検出され、血清 C4a 値と有意な正の相関を示した。抗 C1q 抗体の存在は、免疫複合体の関与なしに C1q を活性化させ、古典経路の異常活性を引き起こしている可能性がある。また残りのレクチン経路に関しては、APS との関連は不明である。しかし、レクチン経路の主要蛋白質であるマンノース関連セリンプロテアーゼは補体経路のみならずプロトロンビンも活性化することが知られている⁵⁸。ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンは、 β_2 GPI と並ぶもう一つの aPL の主要対応抗原であり¹²、レクチン経路もまた APS における補体活性化に重要な役割を果たしている可能性がある。

本研究では、APS の血栓形成機序の一つとして H 因子の低下による代替経路活性化が関与している可能性を示した。また近年、劇症型 APS に対し抗 C5 モノクローナル抗体である eclizumab が奏功したという報告⁴⁶もあり、APS の治療ターゲットとしても補体は注目されている。今後のさらなる知見の集積を期待するとともに、本研究が APS の病態解明ならびに新たな治療ターゲット探索の一助となることを願う。

5. 第三章

膠原病性肺動脈性肺高血圧症における 血清ハプトグロビン値の検討

5.1 背景

肺高血圧症とは、肺動脈における血圧が異常に上昇した病態であり、右心カテーテル検査で測定される平均肺動脈圧 (mean pulmonary artery pressure: mPAP) が 25 mmHg 以上と定義される。肺高血圧の存在は過剰な右心負荷を引き起こし、高率に右心不全、呼吸不全へと進行する予後不良な病態である。最新の再改定版肺高血圧臨床分類 (ニース分類) では、肺高血圧症を原因に基づいて 5 つのグループに分類している。すなわち、(1) 肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH)、(2) 左心性心疾患に伴う肺高血圧症、(3) 肺疾患および/または低酸素血症に伴う肺高血圧症、(4) 慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (chronic thromboembolic pulmonary hypertension: CTEPH)、(5) 詳細不明な他因子のメカニズムに伴う肺高血圧症の 5 つである⁵⁹。そのうち PAH は、肺細動脈の異常によって引き起こされる肺高血圧症であり、その病理学的な特徴は、細動脈内の微小血栓と血管内皮細胞増殖である^{60,61}。PAH においてこうした肺動脈の TMA の存在は重要な病態形成メカニズムの一つと考えられている⁶²⁻⁶⁴。

PAH は特発性のみならず膠原病、特に全身性強皮症 (Systemic sclerosis: SSc)、SLE、混合性結合組織病 (mixed connective tissue disease: MCTD) に合併して発症しうる。PAH は膠原病の合併症の中でもとりわけ予後不良で、早期発見および積極的な治療介入の重要性が説かれてきた^{65,66}。近年、強皮症の PAH スクリーニングにおけるアルゴリズム (DETECT アルゴリズム) がヨーロッパの研究チームから報告された⁶⁷。このアルゴリズムは、身体所見および血液検査、心電図、呼吸機能検査といった非侵襲的な検査の結果に基づき、心エコー検査、また確定診断に必要な右心カテーテル検査の適応を決定ものであり、実臨床においても十分実施可能で、感度は 96% と高いため予後不良な PAH 患者を漏れ少なく拾い上げることができる。しかし特異度は 48% と低く侵襲的な右心カテーテル検査を不必要な患者にも数多く実施してしまう問題点があり、スクリーニングの精度を改善するためさらなる非侵襲的な PAH のマーカーが必要となっている。

また、近年の様々な肺血管拡張剤の登場、それら併用療法のエビデンスの構築により、PAH の劇的な予後の改善が得られたものの、いまだ治療反応性の乏しい予後不良な一群が存在する。PAH の病態の一つである肺動脈の TMA の程度は肺血管拡張療法の反応性と関連し、予後に影響する可能性がある⁶⁴。過去に PAH における過凝固状態と抗凝固療法の有用性が報告されてきたが、TMA の程度と抗凝固療法の効果が相関する可能性もある。しかし、肺動脈の TMA は組織学的に確認される所見であり、肺生検による評価には大きなリスクを伴うため、実臨床における非侵襲的な TMA の予測マーカーが求められる。

ハプトグロビンは主に肝細胞から産生されるヘモグロビン結合蛋白で、生理的にはヘモグロビンを無毒化処理し腎をその毒性から守る働きがある⁶⁸。血管内容血が生じた際には、大量に放出されるヘモグロビンと結合し鋭敏に消費低下することから、血管内容血のマーカーとして広く臨床応用されている⁶⁹。

我々は、その血清ハプトグロビン値が PAH における肺動脈の TMA とそれによる潜在性の血管内容血を反映すると仮定し、PAH 患者における肺動脈圧と血清ハプトグロビン値の関連を調査した。

5.2 対象と方法

5.2.1 対象

本研究は横断研究である。2015 年 4 月 1 日～2016 年 3 月 31 の期間に、北海道大学病院膠原病外来に通院歴を有し、膠原病性 PAH の診断もしくはその疑いで精査を受けたことのある患者対象とした。研究の目的を含む研究の実施についての情報を北海道大学病院ホームページに公開し、研究参加拒否の申し出があったものは除外した。また明らかな他の溶血性疾患を合併している患者も除外した。PAH は右心カテーテル検査によって診断した。また対照となる non-PAH 群は心エコー検査による推定肺動脈収縮期圧 (pulmonary artery systolic pressure estimated by echocardiography: ePASP) が 36 mmHg 未満と定義した。血清ハプトグロビン値と、同時期もしくは直近の患者情報、血液検査所見、心エコー所見、右心カテーテル検査所見を医療記録から収集した。血清ハプトグロビン値の下限値は、健康成人の 95 パーセンタイル値をもとに、19 mg/dL と定めた。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 (015-0535) を得て行った。

5.2.2 統計解析

正規分布が仮定できない連続変数は中央値 [範囲] で示し、カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示した。連続変数の群間比較は Wilcoxon's test を用い、カテゴリー変数の群間比較は chi-square test を用いた。2 群間の相関は Spearman's rank-order correlation coefficient を用いて評価した。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 Pro software (ver. 12.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。

5.3 結果

5.3.1 患者背景

26 人の膠原病性 PAH 患者が対象となったが、そのうち 2 人はクームス陽性の自己免疫性溶血性貧血合併もしくは機械弁置換術後のため除外し、残りの 24 人において解析を行った。また対照の non-PAH 群には 32 人が該当した。患者背景を Table 4 に記した。

年齢はいずれの群も 40 代後半を中央値とし、女性が圧倒的に多かった。膠原病性 PAH の 21 人が肺血管拡張剤で治療され、残りの 3 人は治療導入前であった。さらに 17 人にステロイドを中心とした免疫抑制剤、8 人にワファリンを中心とした抗凝固剤が併用されていた。いずれの患者においても血清ハプトグロビン値に影響しうる肝機能障害や炎症反応は認められなかった。

Table 4. 患者背景

	膠原病性 PAH	non-PAH
人数	24	32
年齢	49 [41-60]	48 [35-62]
性別 (女:男)	24 : 0	27 : 5
PAH の罹病期間 (年)	6.7 [4.1-10.6]	
背景疾患		
全身性強皮症	8 (33%)	6 (19%)
全身性エリテマトーデス	7 (29%)	14 (44%)
混合性結合組織病	8 (33%)	8 (25%)
皮膚筋炎	1 (4%)	1 (3%)
シェーグレン症候群		3 (9%)
血管拡張剤		
3 剤併用	0 (0%)	
2 剤併用	18 (75%)	
PDE5 阻害剤	3 (13%)	
エンドセリン受容体拮抗薬	0 (0%)	
免疫抑制療法	17 (71%)	26 (81%)
抗凝固療法	8 (33%)	5 (16%)
アルブミン (mg/dL)	4.0 [3.7-4.4]	3.9 [3.6-4.3]
コリンエステラーゼ (U/L)	282 [221-310]	298 [251-327]
CRP (mg/dL)	0.04 [0.02-0.08]	0.06 [0.02-0.13]

全てのデータは中央値 [範囲] もしくは人数 (%) で示した。

PAH, pulmonary arterial hypertension; PED, phosphodiesterase; CRP, C-reactive protein.

5.3.2 血清ハプトグロビン値と肺動脈圧との相関

膠原病性 PAH 群における血清ハプトグロビン値は中央値 72 [0-179]、non-PAH 群では中央値 79 [4-231]であった。19 mg/dL 未満のハプトグロビン低下は膠原病性 PAH に高頻度に観察された (Figure 8)。

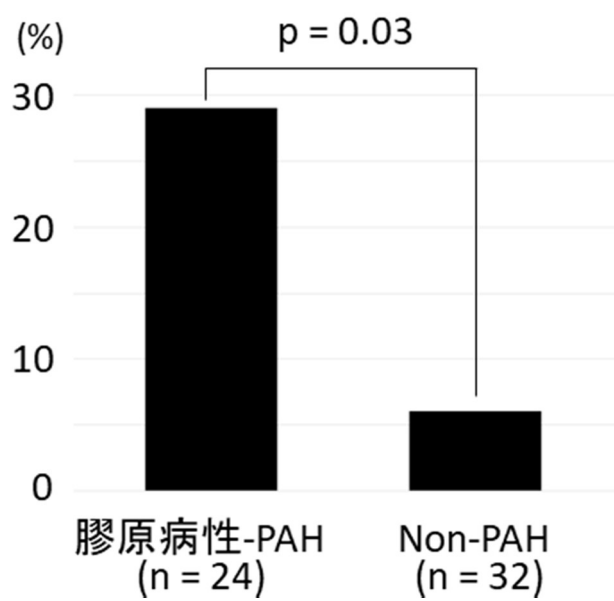


Figure 8. 血清ハプトグロビン低下の頻度
PAH, pulmonary arterial hypertension

また膠原病性 PAH 群において、血清ハプトグロビン値は mPAP と有意な負の相関を示した (Figure 9)。

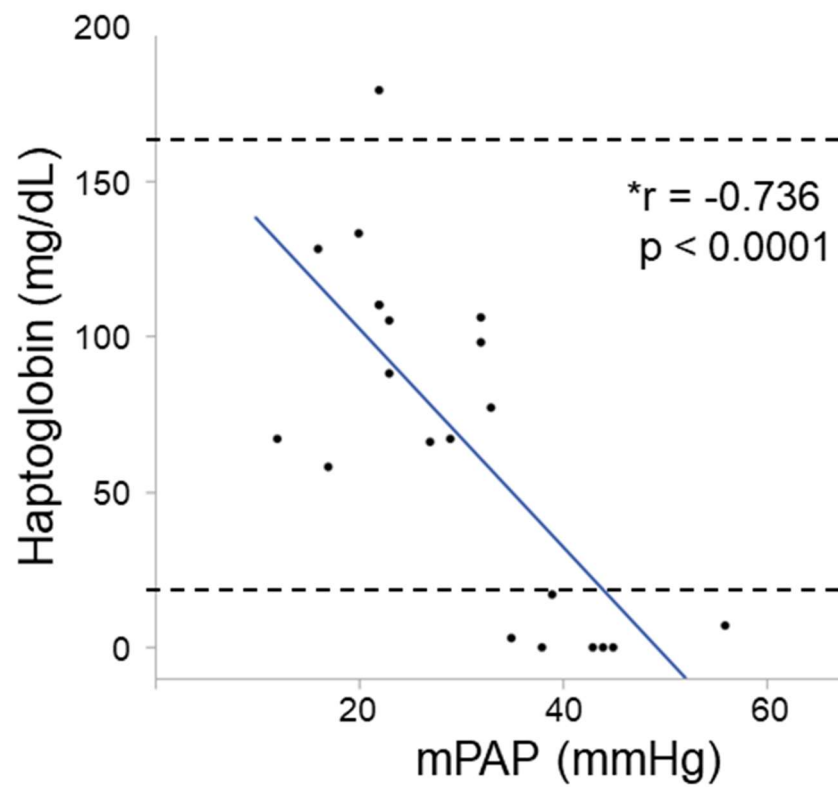


Figure 9. 膠原病性 PAH における血清ハプトグロビン値と mPAP の相関
 PAH, pulmonary arterial hypertension; mPAP, mean pulmonary artery pressure;
 *Spearman's rank-order correlation coefficient.

さらにその相関は、免疫抑制治療の有無、抗凝固療法の有無に関わらず有意であった (Figure 10)。

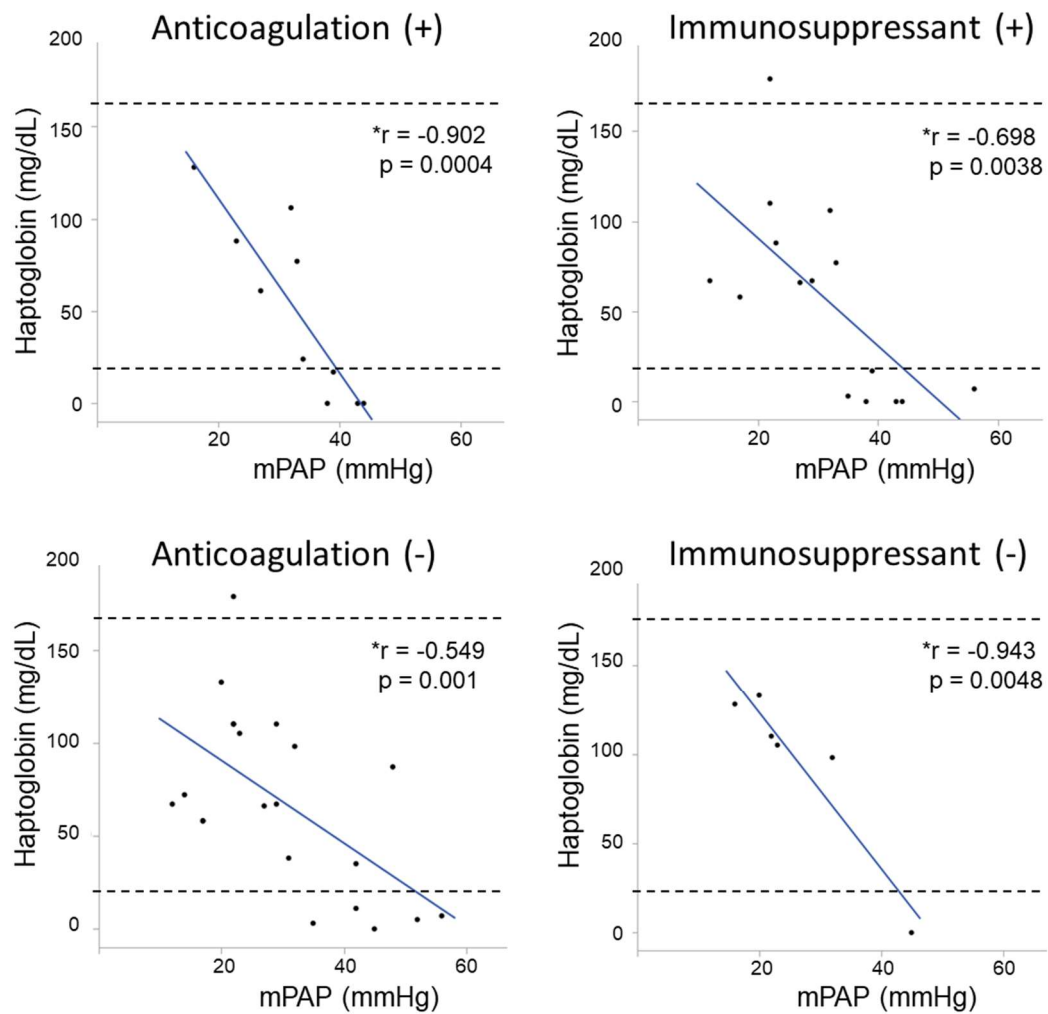


Figure 10. 免疫抑制治療と抗凝固療法の有無によるサブグループ解析
mPAP, mean pulmonary artery pressure; *Spearman's rank-order correlation coefficient.

そして別の溶血マーカーである血清 LDH 値は、血清ハプトグロビンが低下している患者において、正常なハプトグロビン値の患者と比較し、有意に上昇していた (Figure 11)。

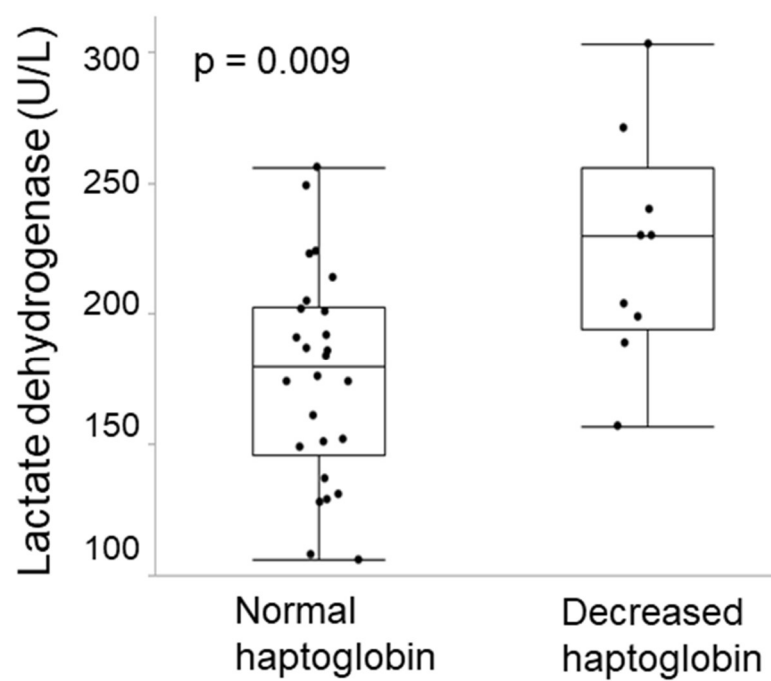


Figure 11. 血清 LDH 値とハプトグロビン低下との関係

5.3.3 フォローアップスタディー

治療開始前に血清ハプトグロビン値が測定されていた3症例において、治療開始後の血清ハプトグロビン値の推移をフォローした。その3症例において、肺動脈圧の低下に従い、血清ハプトグロビン値が増加することを確認した (Figure 12-A)。

そのうち1例の臨床経過は Figure 12-B に示した。症例は45歳の女性で、3か月前からの労作時息切れを主訴に初診した。レイノー症状に加え、手指の皮膚硬化の存在と、抗U1-RNP抗体陽性からSScと診断した。またePASPが79 mmHgと異常高値であったことから右心カテーテル検査を施行し、mPAP: 45 mmHg、肺動脈楔入圧: 5 mmHg、肺血管抵抗: 11.8 Wood Unitの結果からPAHと診断した。その時の血清ハプトグロビン値は検出感度以下 (< 2 mg/dL)であった。肺血管拡張剤であるタダラフィル (40 mg/day) とマシテンタン (10 mg/day) を逐次開始し、治療開始4か月後の右心カテーテル再検ではmPAPは26 mmHgと低下していた。血清ハプトグロビン値は、肺動脈圧の低下に伴って徐々に増加し、最終的には正常化を認めた。

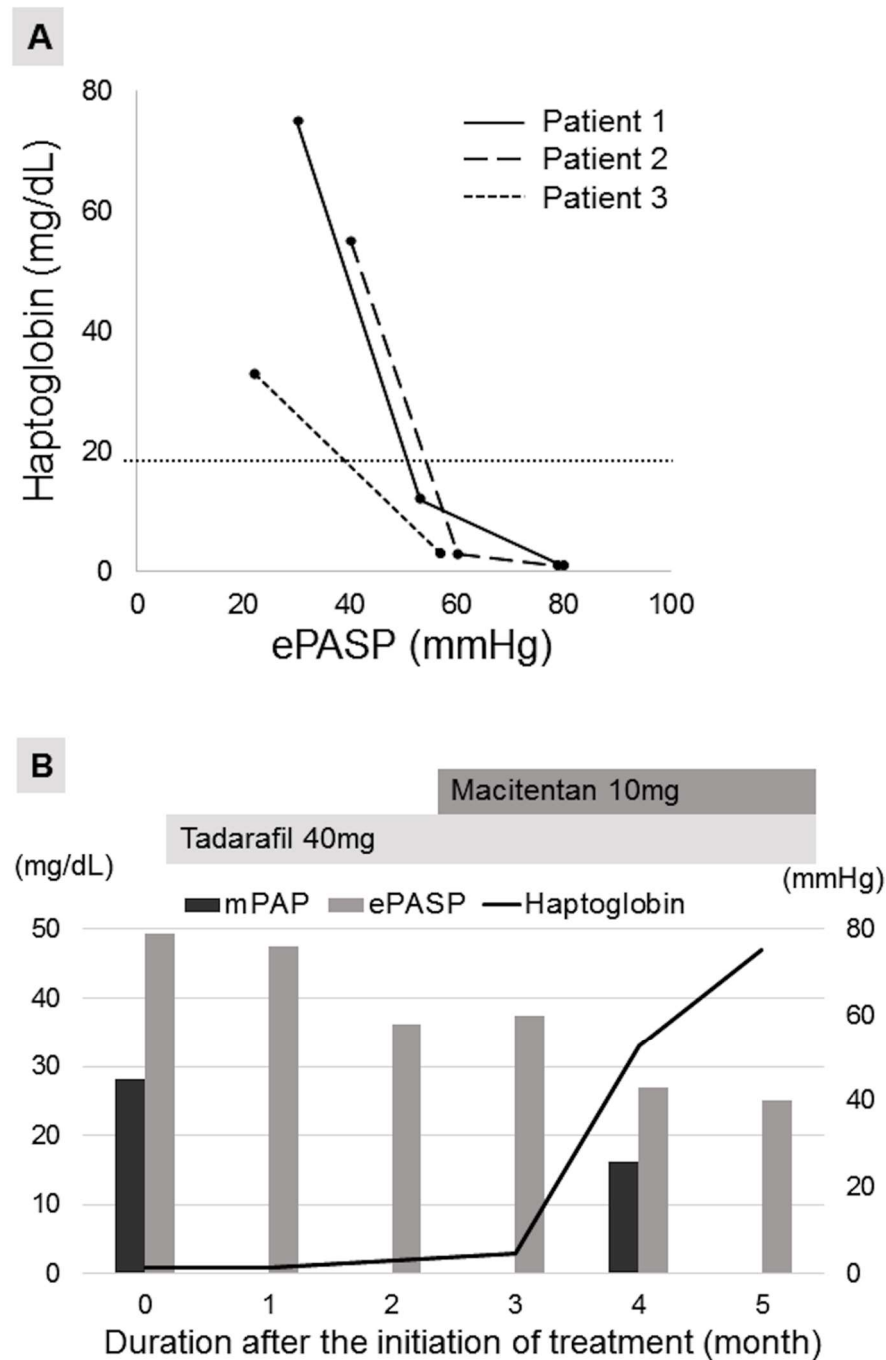


Figure 12. 治療介入による肺動脈圧の低下と血清ハプトグロビン値の変化
mPAP, mean pulmonary artery pressure; ePASP, pulmonary artery systolic pressure estimated by echocardiography.

5.3.4 血清ハプトグロビン値を加えた PAH スクリーニング

日常診療において、DETECT アルゴリズムを参考に、(1) PAH 関連自己抗体 (抗セントロメア抗体もしくは抗 U1-RNP 抗体) の存在、(2) 高尿酸血漿 (> 7.0 mg/dL)、(3) BNP 高値 (18.4 pg/mL)、(4) 心電図の右軸偏位、(5) 一酸化炭素肺拡散能/肺胞気量 $< 70\%$ 、を基に PAH のスクリーニングをした場合、右心カテーテル検査における mPAP ≥ 25 mmHg を予測する ROC 曲線下面積 (area under the curve: AUC) は 0.67 であった。それに血清ハプトグロビン低下 (< 19 mg/dL) を加えた場合、AUC は 0.70 となり、さらに心エコー検査 (ePASP ≥ 40 mmHg) を組み合わせると、その AUC は 0.80 と増加した。Youden Index 法によってカットオフ値を求めた場合、これら 7 項目中 5 項目以上陽性で感度 50% 、特異度 100% (または 3 項目以上陽性で感度 92% 、特異度 44%) であった (Figure 13)。

Routine examination

Laboratory test
(autoantibodies, BNP, UA)
Electrocardiogram
Spirometry (%DLCO/VA)

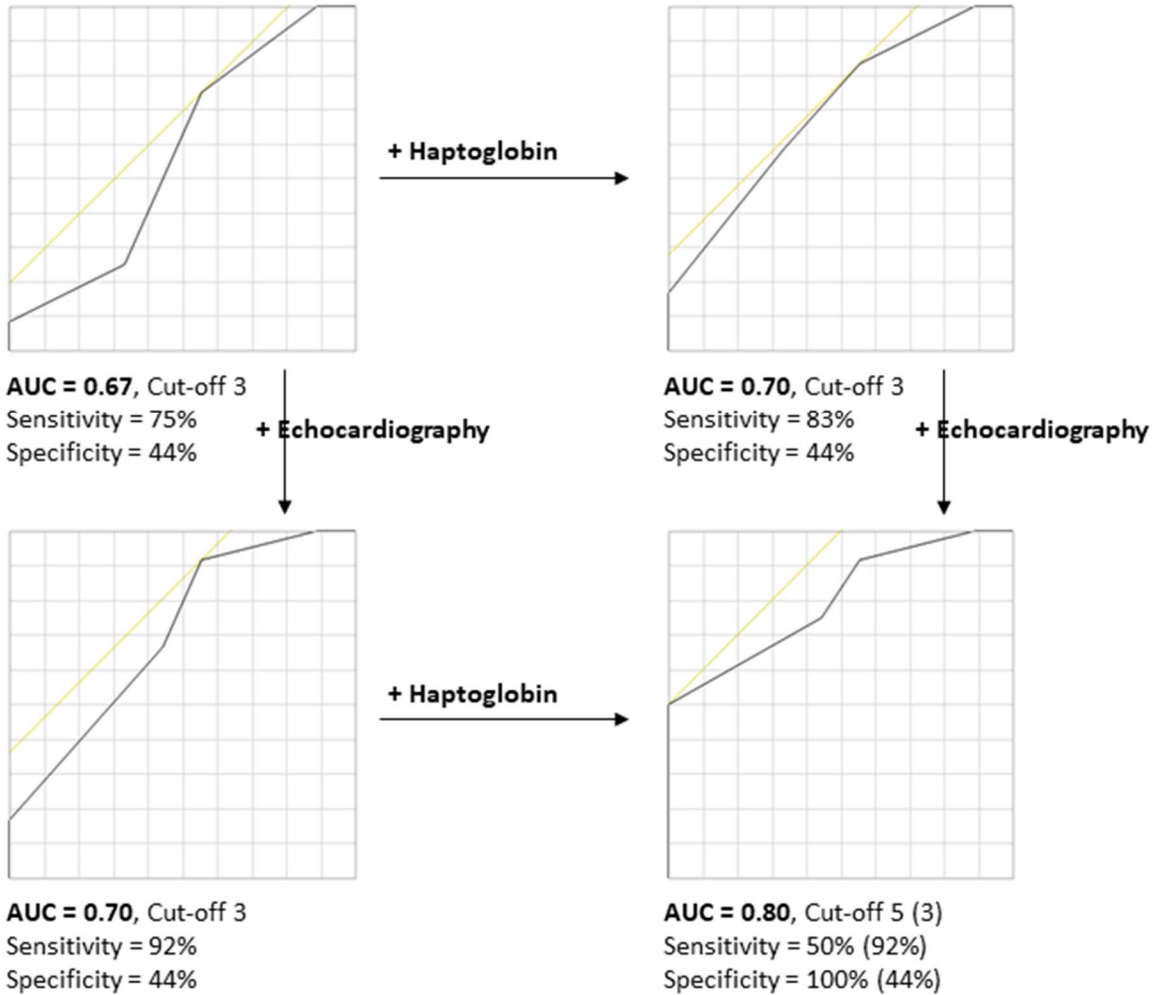


Figure 13. mPAP ≥ 25 mmHg 予測の ROC 曲線
mPAP, mean pulmonary artery pressure; AUC, area under the ROC curve.

5.4 考察

本研究で我々は、膠原病性 PAH 患者血清中でハプトグロビンが低下していることを初めて見出し、さらには血清ハプトグロビン値が肺動脈圧と有意な逆相関をしていることを示した。そして非侵襲的な血清ハプトグロビン測定が、AUC で表される PAH スクリーニング精度を若干改善し、新たな PAH のバイオマーカーの一つになりえる可能性を示唆した。

PAH 患者における血清ハプトグロビン値の低下は、肺動脈の TMA とそれによる潜在性の血管内容血を反映したものと考える⁶⁴。実際にもう一つの溶血マーカーである LDH⁶⁹ は血清ハプトグロビンの低下と一致して増加を認めていた。また今回の研究では確証できなかったが、血清尿酸値や血清ビリルビン値が PAH の重症度と関連しているという報告もあり^{70,71}、それらも PAH の潜在性血管内容血を反映した所見の可能性が考えられる。またもう一つの可能性として、PH によって引き起こされる三尖弁逆流のジェット血流によって機械的溶血が生ずる説が提示されている^{72,73}。しかしながら、人工弁に続発する溶血はよく知られているものの、自然弁に伴う溶血の報告は極めて稀で、弁逆流症で溶血が生ずるにはジェット血流のみならず、機械弁や血栓のような固い物質との衝突が必要と考えられている⁷⁴。そのため、PAH 患者の多くに三尖弁逆流症による溶血が起きているとはやや考え難い。

今回の膠原病性 PAH 患者においては、明らかな貧血や血小板減少は確認されなかった。それは TMA が肺動脈に限局性に生じているものだからと考えられ、溶血性貧血や血小板減少を引き起こす全身性の TMA とは概念を別に考える必要がある。近年、腎限局性に生じる TMA の存在が報告されており^{75,76}、PAH においても同様に組織学的のみに証明される肺動脈限局性の TMA ととらえるべきと考える。本研究からは血清ハプトグロビン値は、臓器限局的な TMA も鋭敏にとらえるサロゲートマーカーになりうる可能性が示唆されるが、実際の組織所見とハプトグロビン値を対比したさらなる確認研究が必要である。

また本研究では、血清ハプトグロビン値は治療介入による肺動脈圧の低下とも相関して推移することも明らかとなり、治療効果判定マーカー、または予後予測マーカーとしての有用性も示唆された。ただ、フォローアップできた症例はわずか3人であり、さらなる症例の蓄積が必要であるとともに、血管拡張療法や抗凝固療法の反応性との関係、さらには長期的な予後との関連などを明らかにするため、さらなる縦断的研究が必要である。

PAH の新たなバイオマーカーの候補として、我々は初めてハプトグロビンを報告した。本研究が PAH のスクリーニング精度の向上と予後改善の一助となることを願う。

6. 第四章

強皮症に対する自家末梢血幹細胞移植 の長期成績

6.1 背景

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) は微小血管障害、皮膚硬化、また臓器の線維化を特徴とする自己免疫疾患で⁷⁷、患者毎に異なった様々な臨床経過および臨床病型をとる⁷⁸。SScの多くは慢性かつ緩徐な進行を示すものの、既存のいかなる治療にも関わらず皮膚硬化や臓器の線維化が急速に進行し予後不良な経過を辿る一群が存在する^{79,80}。重症SScに対する有効な治療法はいまだ存在せず、新たな治療法の開発が望まれている。自家末梢血幹細胞移植

(hematopoietic stem cell transplantation: HSCT) とは、主に血液悪性腫瘍領域で進歩してきた治療法で、骨髄破壊的な抗がん剤や全身の放射線照射で腫瘍細胞を根絶した後、あらかじめ自分の末梢血から採取、保存しておいた造血幹細胞を移植することによって骨髄機能を回復させるものである。血液領域では現在広く行われている治療法であるが、膠原病領域においても、自己反応性リンパ球を大量の殺細胞性免疫抑制剤で根絶させ、幹細胞移植によって免疫システムの再構築に導ける可能性があることから、その有用性について指摘されてきた^{81,82}。多くの観察研究が重症SScに対するHSCTの効果を報告し⁸³⁻⁸⁷、HSCTと従来のシクロフォスファミド (cyclophosphamide: CY) 療法を比較したランダム化比較試験では、HSCTが生存期間を有意に延長することが示された⁸⁸。しかしながら本邦におけるその有用性と安全性に関するデータは乏しく、SScに対するHSCTは僅かな施設でそれぞれ試験的に行われているに過ぎない。以前に九州大学のチームが、単施設少数例のデータを報告している⁸⁹⁻⁹²。我々も2000年以降この重症SScに対しHSCTを行っている数少ない施設の一つであり、過去にその短期成績について報告を行ったが⁹³、それ以降も症例の蓄積と長期フォローアップを続けてきた。今回、日本人の重症SScに対するHSCTの有用性と安全性を明らかにするため、長期成績の解析を行った。

6.2 対象と方法

6.2.1 対象

本研究は医師主導のフェーズII試験である。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(011-0082)を得て行った。また研究の催行にあたり、参加者には十分なインフォームドコンセントを行った。

我々は北海道大学病院膠原病外来に通院中の全ての SSc 患者をスクリーニングし、以下の条件を満たすものを候補とした。

- (1) アメリカリウマチ学会の基準で診断されたびまん性 SSc
- (2) 罹病期間が 3 年未満
- (3) 急速に進行する皮膚硬化で、スキンスコアが 15 以上
- (4) 難治性の指尖部潰瘍や間質性肺疾患などの臓器病変を有する

そのうち、下記に該当するものは除外した。

- (1) 16 歳未満もしくは 60 歳以上
- (2) コントロール不良な不整脈の合
- (3) 心エコーで計測される左室駆出率が 50%未満
- (4) 一酸化炭素肺拡散能が 45%未満
- (5) クレアチニンクリアランスが 40 mL/min/m² 未満

また 2011 年以降は、臓器病変を有さなくても、罹病期間が 2 年未満でスキンスコアが 20 以上の高度皮膚硬化を有する症例は組み入れ可能と修正した。

6.2.2 自家末梢血幹細胞移植の方法

CY の静脈投与 (合計 4 g/m² を 2 日間で分割投与) の後、顆粒球コロニー刺激因子 (2.5-10 µg/kg/day) で末梢血に幹細胞の動員を行った。アフエレーシスで幹細胞の回収を行った後、最初の 5 症例においては、幹細胞マーカーである CD34 の抗体を用いた磁気免疫分離 (CliniMACS® system, Miltenyi Biotec, Germany) で幹細胞の純化 (CD34+ selection) を行った。残りの症例においては純化を行わなかった (CD34+ non-selection)。幹細胞 (CD34+ cells > 2 × 10⁶/kg) を凍結保存し、CY の大量投与 (合計 200 mg/kg を 4 日間で分割投与) による前治療の後、移植を行った。

6.2.3 評価項目

主要評価項目は皮膚硬化の奏効率とした。皮膚硬化の評価には Rodman によるスキンスコアシステム (modified Rodman total thickness skin score: mRSS) を用い、独立した皮膚科専門医がスコアリングを行った。HSCT 施行後、6 か月以内に 50% 以上の mRSS の低下を認めた場合、著効 (Good response) と定義した。また HSCT 施行後、12 か月以内に 25% 以上の mRSS の低下を認めた場合を部分奏功 (Partial response) と定義した。

副次評価項目は、皮膚硬化の再燃率、間質性肺疾患の進行の有無、安全性、全生存期間およびイベントフリー生存期間とした。皮膚硬化の再燃は mRSS が最低値より 50% 以上したときと定義した。また間質性肺疾患の進行は、CT 所見を基に独立した放射線読影医が判定した。合わせて肺活量、一酸化炭素肺拡散能、血清 KL-6 値の評価も行った。イベントは追加の免疫抑制治療を必要とする SSc の進行および生命を脅かすまたは非可逆性の有害事象と定義した。

6.2.4 統計解析

正規分布が仮定できない連続変数は中央値 [範囲] で示し、カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示した。連続変数の群間比較は Wilcoxon's test を用い、カテゴリー変数の群間比較は chi-square test を用いた。生存期間は Kaplan-Meier method を用いて算出した。欠損値は last observation carried forward (LOCF) 法に従って補完した。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 Pro software (ver. 12.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。

6.3 結果

6.3.1 患者背景

2000 年から 2012 年の間に、15 人の SSc 患者が基準を満たし、書面によるインフォームドコンセントを得た。そのうち 1 人は、末梢血への幹細胞の動員不全のため中止となり、残りの 14 人に HSCT を施行した。観察期間中央値は 137 か月で、1 人の患者は HSCT 後 3 年以内にフォロー脱落となった。HSCT 施行時の年齢中央値は 44.5 歳 [範囲 19-57] で、罹病期間は中央値 22.5 か月 [範囲 8-36]、mRSS は中央値 24.5 [範囲 15-40] であった。

全ての患者は抗核抗体が陽性で、7 人が抗 Scl-70 抗体陽性、4 人が抗 RNP ポリメラーゼ III 抗体陽性、1 人は抗セントロメア抗体陽性であった。指尖部潰瘍は 5 人に認められ、9 人が間質性肺疾患を合併していた (Table 5)。

Table 5. 患者背景

	N = 14
年齢	44.5 [19-57]
男性	3 (21%)
罹病期間 (月)	22.5 [8-36]
自己抗体	
抗 Scl-70 抗体	7 (50%)
抗 RNA ポリメラーゼ-III 抗体	4 (29%)
抗セントロメア抗体	1 (7%)
皮膚	
mRSS	24.5 [15-40]
指尖部潰瘍	5 (36%)
肺	
間質性肺疾患	9 (64%)
%VC	89 [50-114]
%DLCO	69 [45-84]
心	
LVEF (%)	70 [58-77]
BNP (pg/mL)	22 [4-42]
腎	
クレアチニークリアランス (mL/min/m ²)	88 [63-102]

全てのデータは中央値 [範囲] もしくは人数 (%) で示した。

mRSS, modified Rodman total thickness skin score; %VC, % vital capacity; %DLCO, % diffusing capacity of the lung carbon monoxide; LVEF, left ventricular ejection fraction; BNP, brain natriuretic peptide.

6.3.2 皮膚硬化の変化

皮膚硬化に対する Good response は 8 人 (57%) の患者で認められた。また Partial response 以上の反応は 10 人 (71%) の患者で認められた。効果が乏しかった残りの 3 人の患者で、シクロスポリンによる追加の免疫抑制治療が行われた。1 人の患者では後述する劇症型の心筋症により死亡したため、mRSS を含めた臨床的効果判定が施行できなかった。

Good response を示した 8 人の患者のうち、2 人に皮膚硬化の再燃がそれぞれ HSCT 後 8 年と 9 年に生じた。皮膚硬化の再燃は、タクロリムスもしくはミコフェノール酸モフェチルでそれぞれ治療され、若干の改善を認めた (Figure 14)。

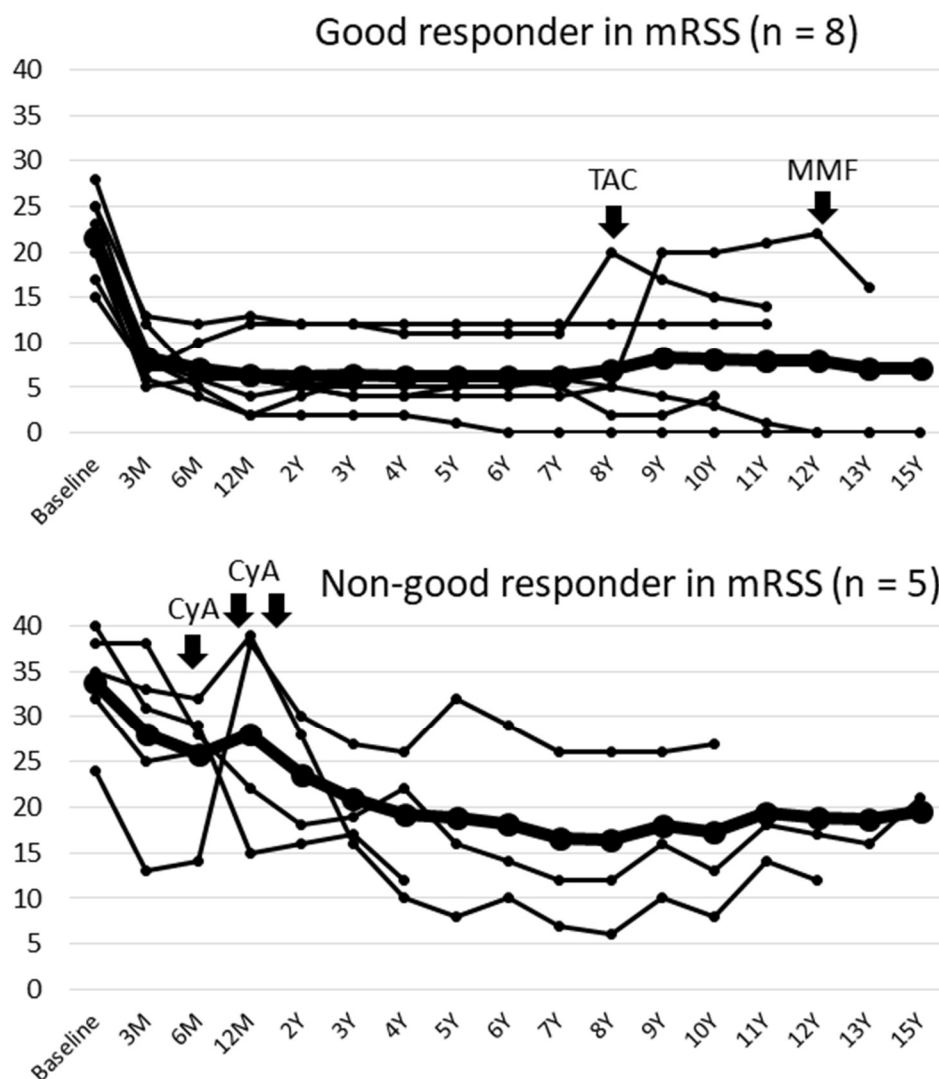


Figure 14. 自家末梢血幹細胞移植後のスキンスコアの変化
 それぞれの線は各患者のスキンスコアの推移を示し、太線はその平均値を表す。
 mRSS, modified Rodman total thickness skin score; M, months; Y, years; TAC, tacrolimus; MMF, mycophenolate mofetil; CyA, cyclosporine.

Good responde を示した患者とそうでない患者を比較した場合、HSCT の効果が乏しかった患者群は、HSCT 施行時の mRSS が高く、男性の比率が多かった。また統計学的な有意性はないものの、指尖部潰瘍合併の頻度も多かった。年齢、罹病期間、自己抗体の種類、間質性肺疾患の合併割合については、両群間に有意な差はなかった (Table 6)。

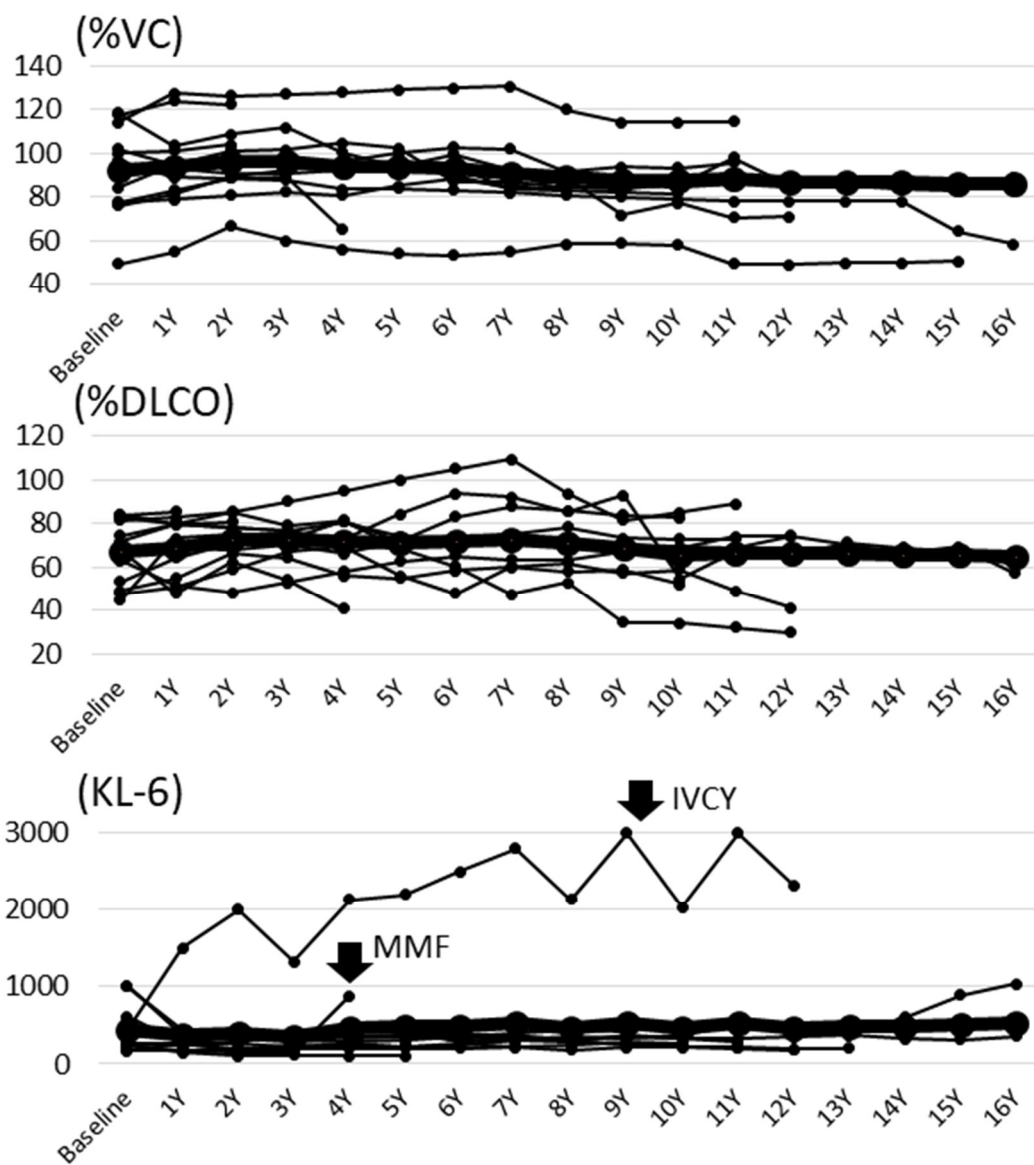
Table 6. Good responders と Non-good responders の比較

	Good responders (n = 8)	Non-good responders (n = 5)	p value
年齢	44.5 [19-54]	43 [28-57]	> 0.1
男性	0 (0%)	3 (60%)	0.013
罹病期間 (月)	22.5 [8-34]	21 [12-36]	> 0.1
抗 Scl-70 抗体	5 (63%)	2 (40%)	> 0.1
抗 RNAP-III 抗体	1 (13%)	2 (40%)	> 0.1
mRSS	21.5 [15-28]	35 [24-40]	0.013
指尖部潰瘍	1 (13%)	3 (60%)	0.07
間質性肺疾患	5 (63%)	3 (60%)	> 0.1

全てのデータは中央値 [範囲] もしくは人数 (%) で示した。
mRSS, modified Rodman total thickness skin score.

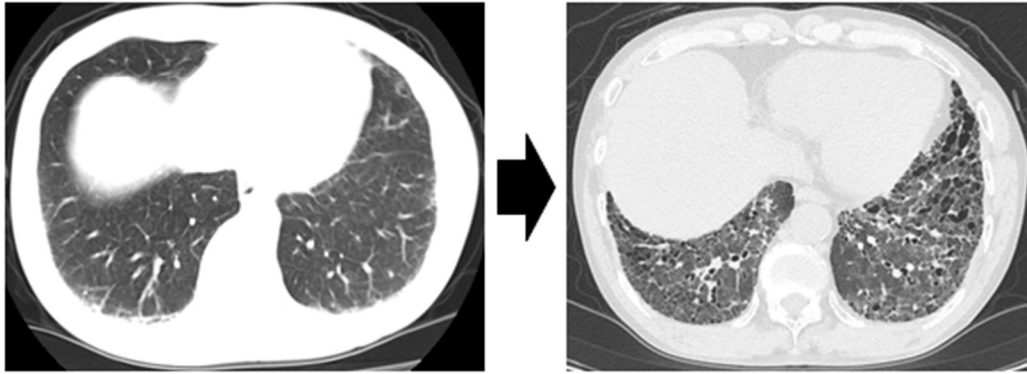
6.3.3 間質性肺疾患の変化

HSCT に Good responde が得られなかった患者のうち 2 人が間質性肺疾患の明らかな増悪を認め、追加の免疫抑制治療を要した。残りの 11 人 (85%) の患者においては、CT 所見および呼吸機能、血清 KL-6 値とも明らかな増悪なく経過した (Figure 15)。



(HRCT)

Patient 6



Patient 13

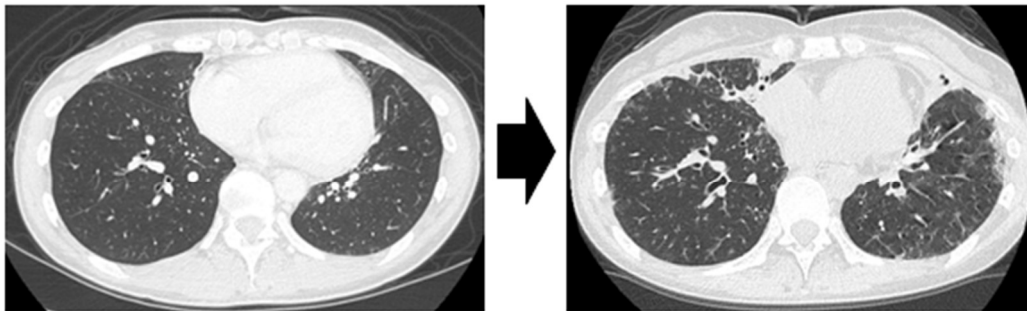


Figure 15. 間質性肺疾患パラメータの変化

それぞれの線は各患者を示し、太線はその平均値を表す。CT 所見は増悪を認めた 2 例のものを示した。

%VC, % vital capacity; %DLCO, % diffusing capacity of the lung carbon monoxide; M, months; Y, years; MMF, mycophenolate mofetil; IVCY, intravenous cyclophosphamide; HRCT, high resolution computed tomography.

6.3.4 有害事象

有害事象は6人(43%)の患者に生じた。生着症候群が2人に、血球貪食症候群が1人に生じたが、いずれもステロイドで改善した。アデノウイルスが関連した出血性膀胱炎が1人に生じ、不可逆的な膀胱尿管逆流で永久的な尿道カテーテル留置を余儀なくされた。また、2人の患者にHSCT後に新たな自己免疫疾患の発症を認めた。そして劇症型の心筋症が2人の患者に生じ、1人は治療関連死へと至った。

劇症型心筋症を発症したうちの一名では、CYの前治療を終え、幹細胞移植当日に発生した。心エコー検査にて心筋のびまん性アネキジアを示し、患者はICU入室の上、経皮的人工心肺補助(percutaneous cardiopulmonary support: PCPS)と大動脈内バルーンパンピング(intra-aortic balloon pumping: IABP)で循環動態をサポートした。心筋の運動は徐々に改善傾向を示すようになり、ICU入室後15日と20日にそれぞれPCPSとIABPが離脱できた。心筋生検結果に特記すべき異常はなく、明らかな後遺症なく現在も生存している。

もう一人の患者は、CYによる前治療中に心肺停止へと至った。PCPSを含む蘇生処置を行ったが、そのまま致死的な経過を辿った。これら劇症型心筋症を起こした2人の患者は、HSCT施行前の心電図および心エコー検査によるスクリーニングでは、心機能に特記すべき異常を認めなかった。しかし死に至った後者の患者では、極めて急速に皮膚硬化が進行しており、動員時に使用したCYの効果も乏しく、前治療を開始した際のmRSSは36と異常高値であった。

6.3.5 生存期間

HSCTに関連した死亡が1例に認められた。現時点においてはその他の死亡は確認されていない。生存率は5年、10年とも93%であった。

イベントは8人の患者に生じた。そのうち6人が追加治療を要するSScの進行であり、4人が生命を脅かすまたは非可逆的な有害事象であった。2人にはその両者が認められた。イベントフリー生存期間は5年50%、10年40%であった (Figure 16)。

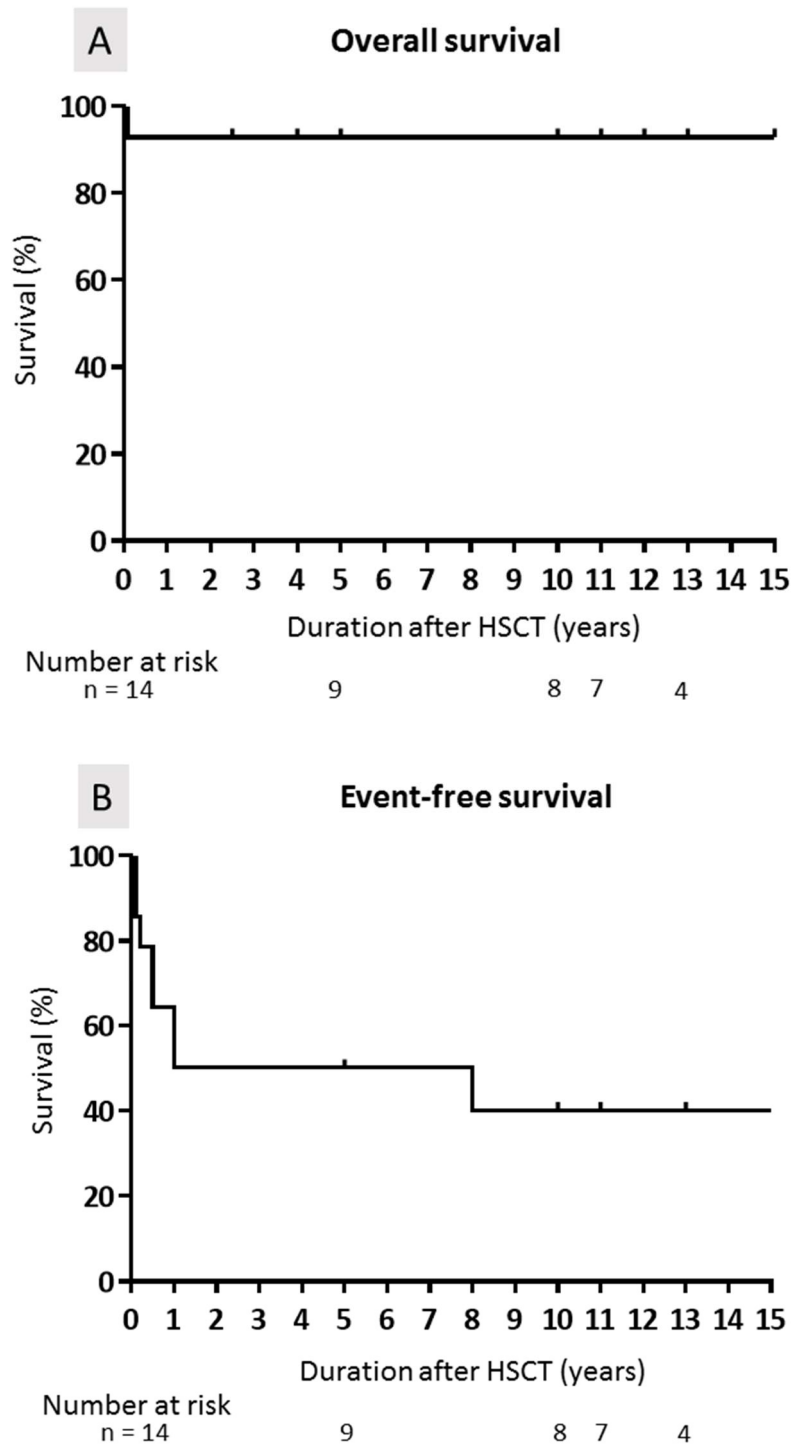


Figure 16. 全身性強皮症に対する自家末梢血幹細胞移植後の全生存期間 (A) とイベントフリー生存期間 (B)

6.4 考察

我々は、日本人 SSc 患者における HSCT の長期成績を初めて解析、報告した。HSCT はおよそ 60% の SSc 患者の皮膚硬化を劇的に改善し、およそ 80% 以上の SSc 患者において間質性肺疾患の進行を抑制した。これらの結果は、日本人の SSc 患者においても、HSCT は有用である可能性を示唆している。しかしながら、長期観察の中では、決して少なくない数の再燃が認められ、また同時に有害事象も多く観察された。特に心筋症は生命を脅かすものであった。結果として全生存率は極めて良好にも関わらず、イベントフリーの生存率は 10 年で 50% 未満であった。

難治性膠原病に対する HSCT は 1984 年に始まり、これまで全世界で 1000 人以上の膠原病患者が HSCT を受けてきた⁸²。海外の大規模なレジストリーデータが示すところによれば、HSCT を受けた SSc 患者の 5 年生存率はおよそ 80% であった^{94,95}。生存期間をプライマリーエンドポイントとした HSCT と従来の CY 療法を比較したランダム化比較試験では、HSCT 群が mRSS、全およびイベントフリー生存期間を有意に改善した (参考 Figure)⁸⁸。しかしこのランダム化比較試験では、イベントを死亡もしくは致死的な重症主要臓器障害と定義しており、今回の我々のイベントの定義とは大きく異なる。皮膚硬化の再燃や有害事象を含めた真のイベントフリー生存期間はまだ満足できる成績ではない。また、今回の我々の結果では、mRSS が特に高い進行例においては、HSCT の反応性は不良であった。HSCT の真の重症 SSc に対する効果は限定的なのかもしれない。

我々の検討において、劇症型的心筋症が 2 人の患者に生じ、不幸にも 1 名は致死的な経過を辿った。HSCT 関連の死亡は、ときに SSc 関連の死亡を上回ることが報告されており^{88,94-96}、特に HSCT に伴う心合併症は大きな問題となっている。今回生じた心筋症は、高用量 CY による心筋毒性と、潜在性に存在したであろう SSc の心筋病変が関与したと考えられる。CY が関連した心筋症は典型的には投与から 1~3 週間以内に生じるとされており、単回投与量や年齢が発症に関わる可能性が指摘されている⁹⁷。病態としては CY の直接的な心内膜障害性に加え、続発する微小血栓形成が心筋虚血をもたらすと想定されている⁹⁸。CY 心筋症は時に重症心不全を引き起こし、致死的となる⁹⁹。

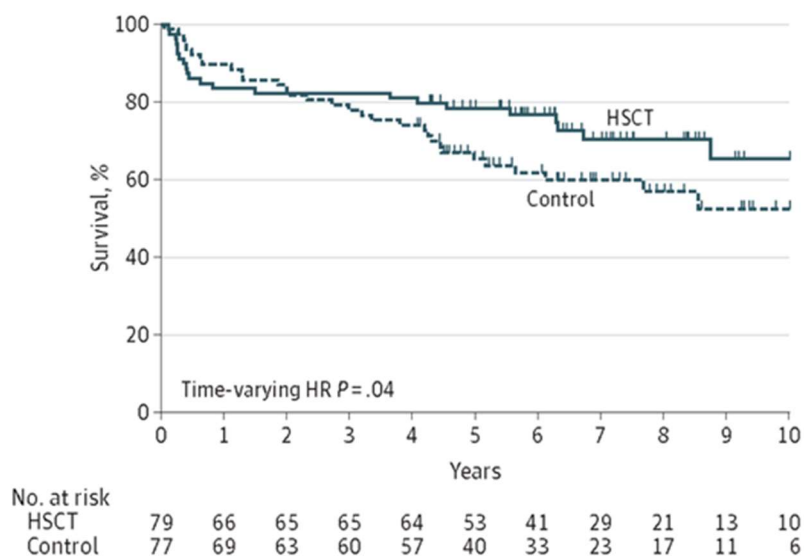
一方、SSc にも心筋の線維化によって拡張障害、不整脈、心嚢液貯留など様々な心合併症をきたすことが知られている¹⁰⁰。しかしこうした SSc の心合併症の多くは無症候性かつ潜在性のため、MRI や心筋生検を含めた精密検査でようやく見つかることが多い¹⁰¹⁻¹⁰³。心筋症を起こした我々の 2 症例も無症候性で心電図や心エコーのスクリーニングでも特記すべき異常を認めなかった。ただ我々の 2 症例はいずれも抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体が陽性であった。抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体が陽性の SSc は、極めて急速かつ高度な皮膚硬化を示し、また腎クリーゼの合併が高頻度であることが知られている^{104,105}。抗 RNA ポリメ

一ゼIII抗体と心合併の関係性は不明であるが、急速な皮膚硬化進行期と同期して潜在性の心筋線維化が進行していた可能性も考えられる。今回の研究には抗RNAポリメラーゼIII抗体陽性例が4人含まれているが、そのうち Good responseを示したのはわずか1人であり、2人に劇症型の心筋症が生じた。

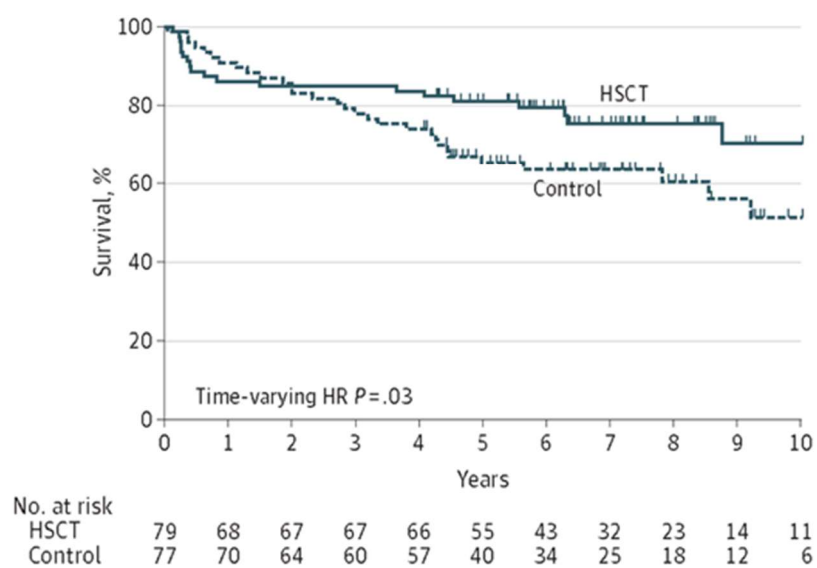
我々は、HSCTの方法の違い、例えばCD34陽性細胞純化の有無、放射線照射(total body irradiation: TBI)や抗胸腺細胞グロブリン(antithymocyte globulin: ATG)の併用の有無、がHSCTの効果や安全性に影響する可能性を検討する必要がある。CD34陽性細胞の純化は移植細胞中の自己反応性リンパ球を除去する目的で行われる。しかし、動員時に用いられる高用量のCY投与以上にさらなる除去は必要かどうかは分かっておらず、我々の過去の検討でもCD34陽性細胞の純化と非純化で効果には有意な差を認めていない。またCD34陽性細胞純化移植では移植後の感染症リスクが増加する可能性があることや、純化に高額のコストがかかることが問題となっている。一方、移植の前治療についても最適なレジメンはいまだ定まっていない。海外の報告ではCYに加えてTBIやATGもしくはその両方を併用されていることが多いが、その必要性については明らかではなく、併用によって毒性が強まっている危険性もある。最近、HSCTに伴う心合併症を減らすために、より慎重な移植前スクリーニングとより心毒性の少ない前治療でHSCTを行う試みが報告された¹⁰⁶。心機能に問題を抱える6人のSSc患者は24時間ホルター心電図と心エコー、また心筋生検を含めた右心カテーテル検査でスクリーニングされ、全例に植え込み型の除細動器が設置された。前治療には低用量のCYと心毒性のないアルキル化薬であるチオテパが用いられた。結果、その6人において死亡例は認められず、除細動器は3人に作動したとのことであった。SScに対するHSCTの最適なスクリーニング法および前治療については議論すべきことがいまだ多く残っている。

我々は本研究において、HSCTが重症SScの多くに有用であること、また同時に長期的なイベントフリー生存率は十分な成績ではないこと、致死的な心筋症を発症するリスクがあること、を報告した。これらの知見は、SScに対するHSCT実施にあたり十分に慎重な患者選択と適応決定をするよう警鐘をならすものであるとともに、日本人SScに対するHSCTの有用性と安全性について重要な示唆を与えるものであると信じる。

A Event-free survival



B Overall survival



参考 Figure. HSCT と従来療法を比較したランダム化比較試験の生存期間⁸⁸
 HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

7. 第五章

関節リウマチの滑膜増殖における
シグナル分子発現異常と制御に関する研究

7.1 背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は自己免疫機序による慢性多発性関節炎であり、滑膜の肥厚・増殖に伴う骨・軟骨破壊を特徴とする。RA の病態においては、関節滑膜局所で活性化された T 細胞、マクロファージから産生される tumor necrosis factor alpha (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインにより腫瘍様増殖した線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes: FLS) が中心的役割を担う。無秩序に増殖した FLS は matrix metalloproteinase (MMP) などのタンパク分泌を介して軟骨破壊に関わるとともに、Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) を発現することで破骨細胞を活性化し骨破壊を引き起こす。TNF- α 阻害薬、IL-6 阻害薬などの生物学的製剤が開発され RA の治療は劇的に進歩したが、現状のいかなる治療によっても骨破壊、関節破壊を完全に阻止できる症例は半数程度であり、RA の病態解明および新たな治療ターゲットの探索、新規治療薬の開発が求められている¹⁰⁷。

過去の腫瘍学分野の研究から、Ras-MAPK 経路のシグナル伝達が細胞増殖に密接に関係していることが明らかとなり、その経路をターゲットとした様々な抗腫瘍薬が開発、臨床応用されるに至っている¹⁰⁸。Ras は small G タンパクの一種で、受容体型チロシンキナーゼの下流で guanine nucleotide exchange factor (GEF) が GDP を GTP に変換することで活性化される。Ras guanine nucleotide-releasing protein (RasGRP) は別名 CalDAG-GEF と呼ばれる GEF の一種であり、RasGRP1 から 4 まで同定されている¹⁰⁹。当教室の過去の研究では健常者と比較し、関節リウマチ患者の末梢血 CD14 陽性単球において、RasGRP4 のスプライシング変異が有意に多くタンパク発現レベルが低下していることを報告した¹¹⁰。また、Golinski ML らは関節リウマチ患者の末梢血 T 細胞において、RasGRP1 のタンパク発現レベルが低下していることを報告した¹¹¹。RA の血球系においてこれらの分子の発現低下の病的意義は不明だが、RA の病態の中心となる FLS の腫瘍様増殖にこの RasGRP ならびに Ras-MAPK 経路が密接に関係している可能性がある。我々は RA の病態解明および新たな治療ターゲットの候補分子として RasGRP に着目した。

先行研究で我々は、RA 患者の FLS で RasGRP4 の発現が亢進していることを見出し、FLS における RasGRP4 の mRNA 発現量と細胞増殖能は正の相関関係にあること、siRNA を用いて RasGRP4 をノックダウンした場合、FLS の細胞増殖能が低下することを示した。またコラーゲン誘導滑膜炎 (collage-induced arthritis: CIA) ラットにおいて、RasGRP4 siRNA の足関節内投与は、コントロールと比較して有意に足関節炎スコアと足関節径を減少させ、また骨破壊、軟骨破壊も軽減させることを示した¹¹²。

7.2 目的

RA の FLS における RasGRP ファミリー分子を介した機能解析とその制御による治療法の開発を本研究の目的とした。

7.3 関節リウマチモデルマウスにおける RasGRP4 ノックダウンの影響

7.3.1 はじめに

先行研究で我々は CIA ラットにおける RasGRP4 siRNA の関節注射が、関節炎、骨破壊、軟骨破壊を軽減させることを明らかにし、RasGRP4 が新たな RA の治療ターゲットとなりうることを示した。しかし、RA は多くの場合、手指関節を中心とした小関節の多発関節炎をきたすため、薬剤の関節内投与による治療機会は非常に限定的である。そこで我々は、次に臨床応用の可能性を模索するため、CIA マウスを用いて RasGRP4 siRNA 全身経静脈投与の関節炎抑制効果を検討することとした。

7.3.2 方法

7 週齢の雄 DBA/1 マウスに対し Day 0 に complete Freund's adjuvant (Chondrex) 100 μ l に溶解したブタ Type II collagen (Chondrex) 100 μ g を尾に皮下投与し免疫を行った。また Day 18 には、incomplete Freund's adjuvant (Chondrex) 100 μ l に溶解したブタ Type II collagen 100 μ g を尾に再皮下投与し追加免疫を行った。Day 18 以降は誘導された関節炎について、関節炎スコアと足関節の直径を週 2 回測定を行った。関節炎スコアは既報に従って 0 点：関節に発赤および腫脹を認めない、1 点：足根骨または足関節に軽度の発赤と腫脹を認める、2 点：足関節から足根骨にかけて軽度の発赤と腫脹を認める、3 点：足関節から中足骨関節にかけて中等度の発赤と腫脹を認める、4 点：足関節、足部、足趾にまで広がる重度の発赤と腫脹を認める、または足趾の関節強直を認める、と定めた。

Day 21 と 33 にそれぞれ 40 μ M に希釈した RasGRP4 siRNA 50 μ L を atelocollagen (Koken) 50 μ L に混合し尾静脈から全身投与した。またコントロール群には同量の negative control siRNA を atelocollagen に混合し尾静脈から全身投与した。

CIA マウスは Day 53 に麻酔下の心臓全採血により安楽死処理した。大腿骨の骨髓腔内を RPMI 培地で洗浄し、遠心分離した細胞成分から TRIzol RNA Reagent (Life Technologies) を用いて mRNA を抽出した。また摘出した脾臓をホモジナイズし、同様に TRIzol RNA reagent を用いて mRNA を抽出した。抽出した mRNA は SuperScript VILO (Invitrogen) を用いて cDNA とし、Taq-Man Gene Expression Assay (Applied Biosystems) による Real-time-PCR 法でマウス RasGRP4 mRNA およびマウス GAPDH mRNA の発現を定量した。 $\Delta\Delta$ CT 値法によって各個体の骨髓細胞および脾臓における RasGRP4 mRNA 発現量を比較し、siRNA 全身投与における RasGRP4 のノックダウン効果を評価した。

足関節組織は 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した。足関節の micro CT を撮像した後、脱灰しパラフィン包埋を行った。Micro CT 所見は既報に従い、0 点：正常、1 点：軟部組織の腫脹のみ、2 点：軟部組織の腫脹と軽度の骨びらん、3 点：重度の骨びらん、と骨破壊についてスコア化した。

以上の動物実験は北海道大学の動物実験倫理委員会の承認（承認番号：013-0209）のもと、北海道大学動物実験に関する規定に従い行った。

7.3.3 結果

RasGRP4 siRNA の経尾静脈全身投与によって、骨髄細胞および脾臓における RasGRP4 mRNA の発現量がノックダウンされていることを確認した (Figure 17)。

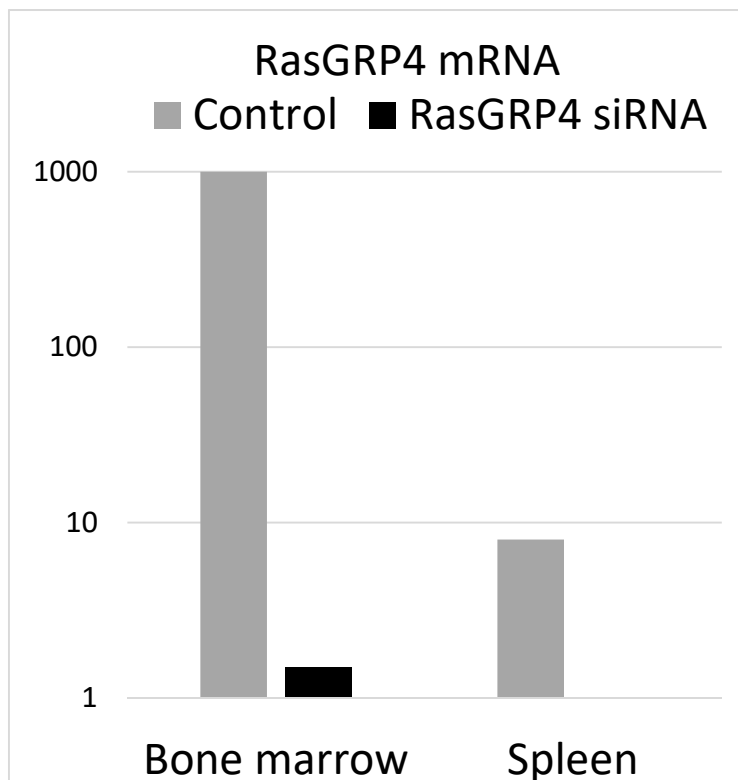


Figure 17. 骨髄細胞、脾臓における RasGRP4 mRNA 発現量
データは GAPDH mRNA 発現量を基とした $\Delta\Delta CT$ 値を示した。

RasGRP4 の siRNA 投与群はコントロール群と比較し、特に関節炎の発症早期において有意に関節炎スコア、足関節径ともに抑制された (Figure 18)。

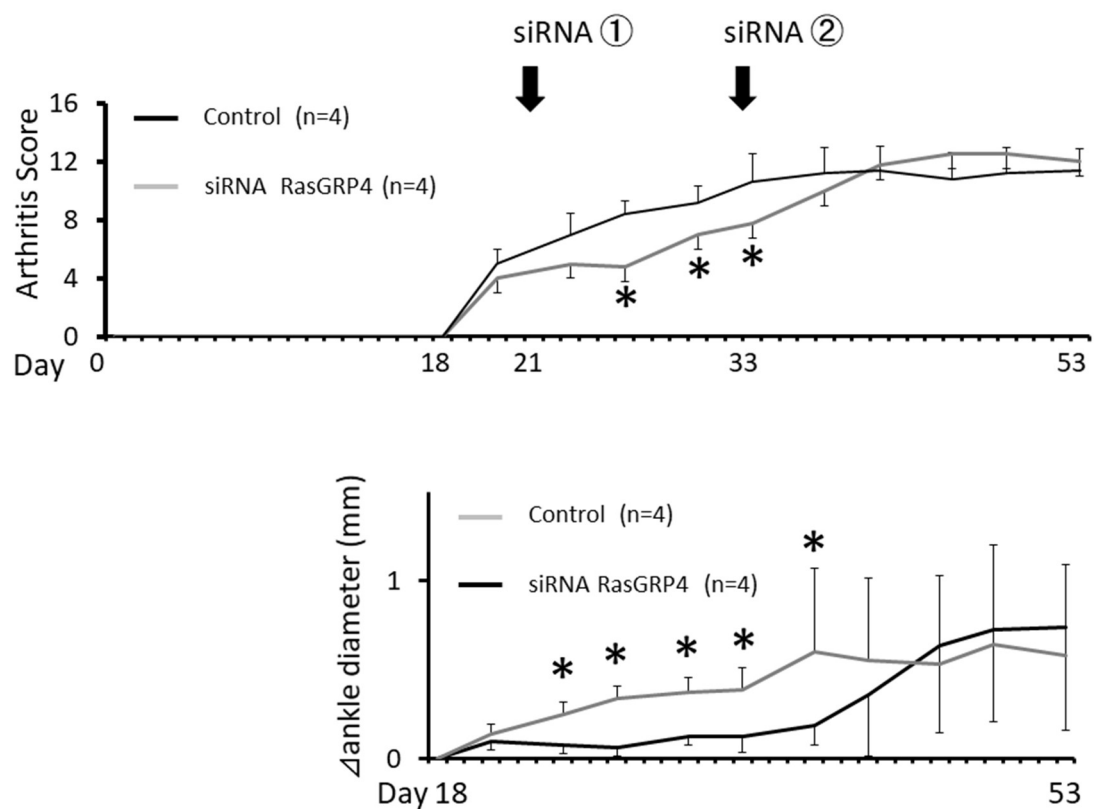


Figure 18. RasGRP4 特異的 siRNA 全身投与における CIA マウスの関節炎スコアおよび足関節径の変化
 データは平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, t-test.

Micro CTによる骨破壊スコアも RasGRP4 siRNA 投与群において有意に抑制されていた (Figure 19)。

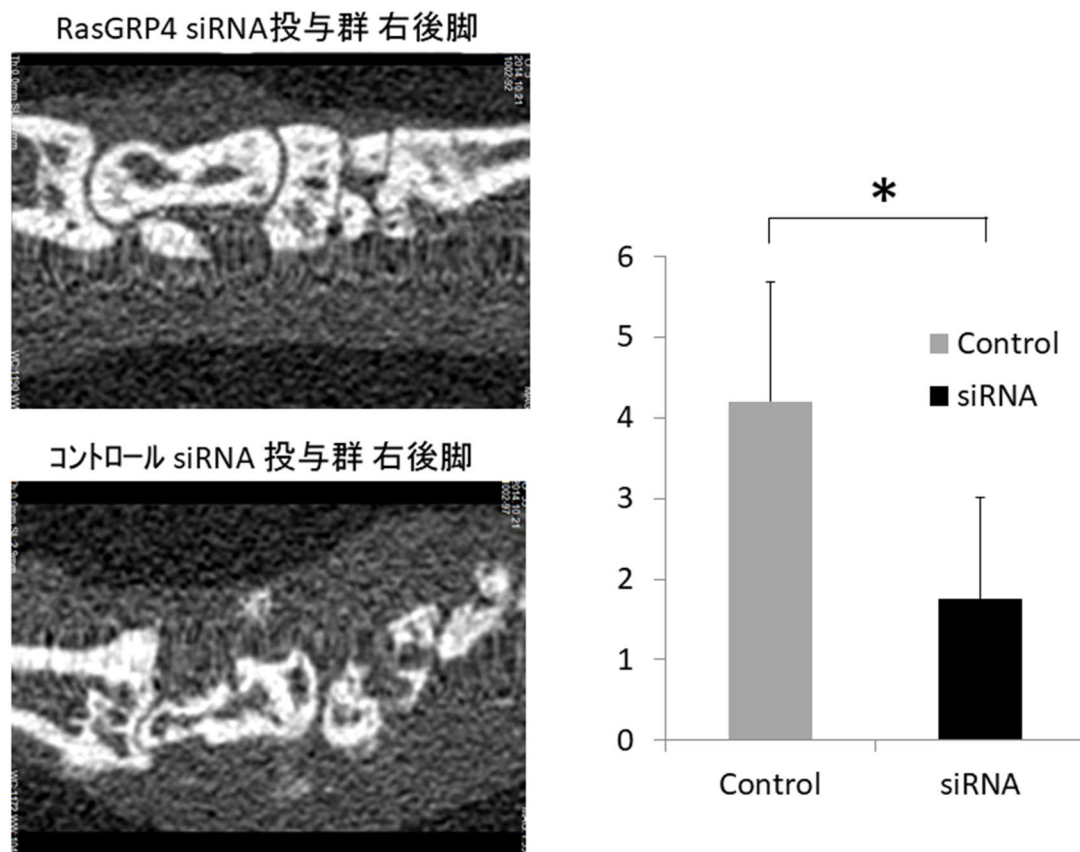


Figure 19. RasGRP4 特異的 siRNA 全身投与における CIA マウスの足関節 micro CT 所見の変化

データは平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, Welch test.

画像は代表例を示した。

7.3.4 再実験

RasGRP4 siRNA の経尾静脈全身投与によって、CIA マウスの関節炎スコア、足関節径、micro CT の骨破壊スコアは有意な改善を認めたが、後半の経過においては関節炎スコアおよび足関節径の有意差は消失していた。我々は siRNA の投与量不足の影響と考え、1 回の siRNA 投与量を 30 μ M, 100 μ L と増量し、さらに期間も短縮して Day 21, 28, 35 の 3 回の投与で再実験を行った。

しかし、siRNA を増量した再実験では、関節炎の改善効果は確認できず、逆に Day 32 の時点では RasGRP4 siRNA 投与群において有意に関節炎が増悪するという結果となった。その後も RasGRP4 siRNA 投与による明らかな関節炎改善効果は得られず、Day 40 に安楽死処理を行った (Figure 20)。

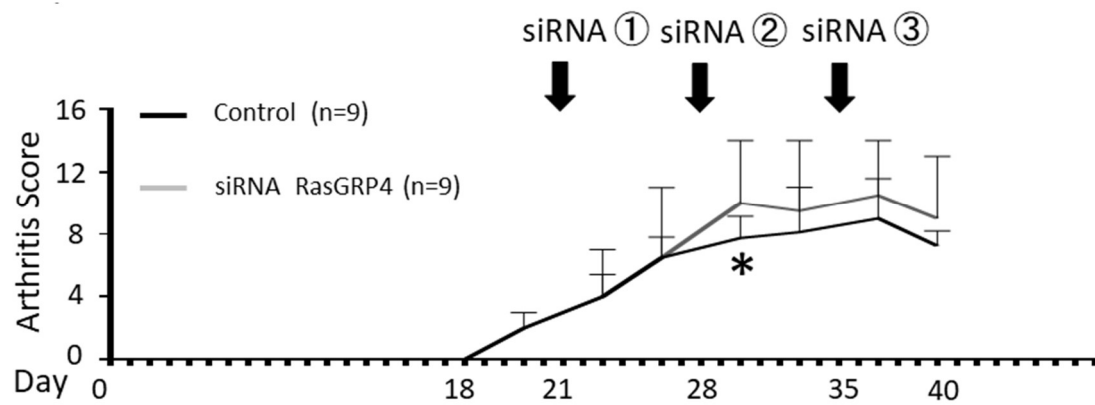


Figure 20. RasGRP4 特異的 siRNA 全身投与における CIA マウスの関節炎スコアの変化 (siRNA を増量した再実験)
データは平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, t-test.

7.3.5 考察

CIA マウスに対する RasGRP4 siRNA の全身投与により関節炎スコア、足関節径、骨破壊スコアともコントロール群と比較し有意に抑制できたが、再実験を行った際には有意な差は認められず、四肢関節炎の抑制効果を再現できなかった。CIA マウスに対する RasGRP4 siRNA の全身投与では、安定した治療効果は示されず、実際の臨床応用に至っては、siRNA の初回通過効果、半減期、薬剤分布の問題など検討、解決しなければならない課題が多い。また siRNA の全身投与に至っては、強い **infusion reaction** を示した個体も認められた。大量の siRNA 投与によって、IFN α 応答を惹起する懸念が指摘されており¹¹³、さらには全身投与では標的臓器である滑膜組織以外にも siRNA は分布し、関節注射には見られない副次反応をきたす恐れもある。siRNA の全身投与に至っては効果のみならず安全性についても十分に検討する必要がある。

7.4 滑膜組織における RasGRP の発現解析

7.4.1 方法

2012 年 4 月から 2017 年 4 月までに北海道大学病院整形外科で人工膝関節置換術を施行された RA および変形性関節症 (osteoarthritis: OA) の患者から、文書による説明と同意取得を行った後、滑膜組織を採取した。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 (承認番号: 008-0103) を得て行った。

滑膜組織は結合組織や脂肪を除去した後、細かく切り刻み、5 mg/mL の Type I collagenase (Sigma) 含有 Hanks' balanced salt solution で 37°C 2 時間でインキュベートを行った。その後メッシュを通し、遠心分離した細胞成分を 10% 非働化ウシ胎児血清 (fatal bovine serum: FBS) 含有の Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma) で培養を行った。この方法で分離・培養される細胞は 97% 以上の純度で FLS であることを HSP-47 染色によって過去に確認した。4~8 継代培養した FLS を回収し、TRIzol RNA reagent を用いて mRNA を抽出した。抽出した mRNA は SuperScript VILO を用いて cDNA とし、Taq-Man Gene Expression Assay (Applied Biosystems) による Real-time-PCR 法でヒト RasGRP1 mRNA, ヒト RasGRP2 mRNA, ヒト RasGRP3 mRNA, ヒト RasGRP4 mRNA およびヒト GAPDH mRNA の発現を定量した。 $\Delta\Delta CT$ 値法によって各 FLS における RasGRP1-4 の mRNA 発現量の比較を行った。

また滑膜組織の一部は 4% パラホルムアルデヒドで 24 時間固定し、パラフィン包埋の後、6 μm 厚さの組織切片を作成した。キシレンで脱パラフィンを行い、エタノールで洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) に置換した。抗原賦活化液 High pH (DAKO) を加え、95°C 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。抗 Cadherin-11 抗体、抗 RasGRP2 抗体、抗 RasGRP4 抗体を加えて一晩 4°C でインキュベートし、それぞれ免疫組織化学染色を行った。連続切片を用いて免疫組織化学染色することでこれらの蛋白の共発現を検討した。また前実験で採取した CIA マウスの足関節組織も 6 μm 厚さの組織切片を作成し、キシレンで脱パラフィン、エタノール洗浄を行った後、PBS に置換した。同様に抗原賦活化および内因性ペルオキシダーゼ不活化処理を行い、抗 RasGRP2 抗体による免疫組織化学染色を行った。

7.4.2 結果

RA 患者群の FLS において OA 患者群と比較して RasGRP1-4 は全て mRNA の発現が亢進していたが、特に RA 患者の一部に RasGRP4 とともに RasGRP2 の顕著な発現亢進が認められた (Figure 21)。

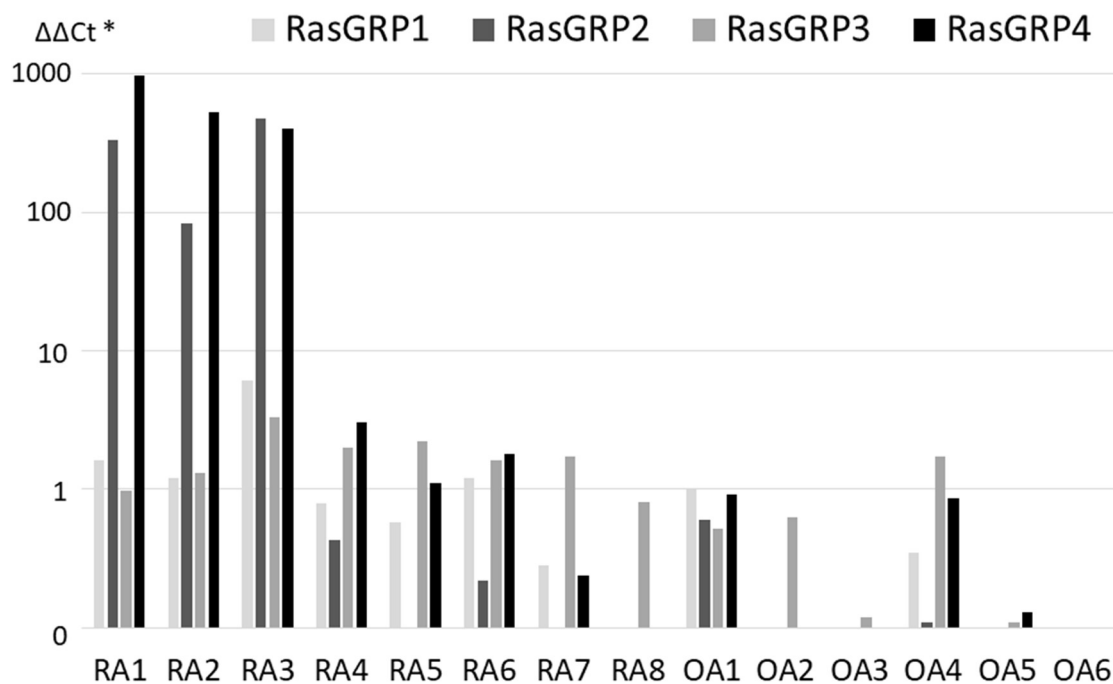


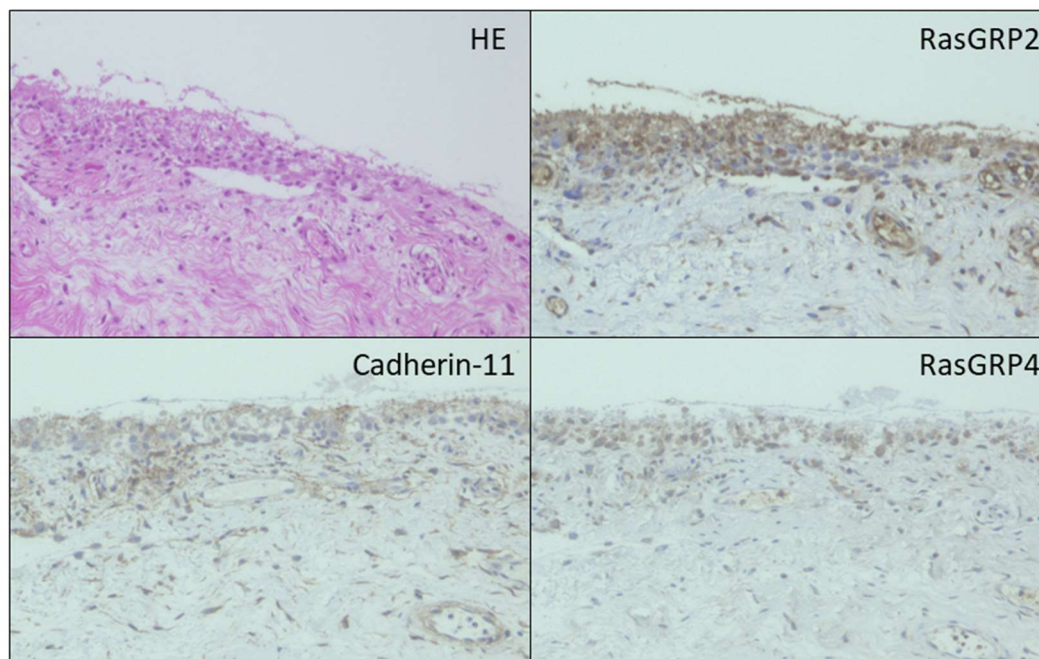
Figure 21. RA 患者と OA 患者の RasGRP1-4 の mRNA 発現量

* $\Delta\Delta C_t$ 値は OA1 における RasGPR1 の発現量を 1 とした。

RA, rheumatoid arthritis; OA, osteoarthritis

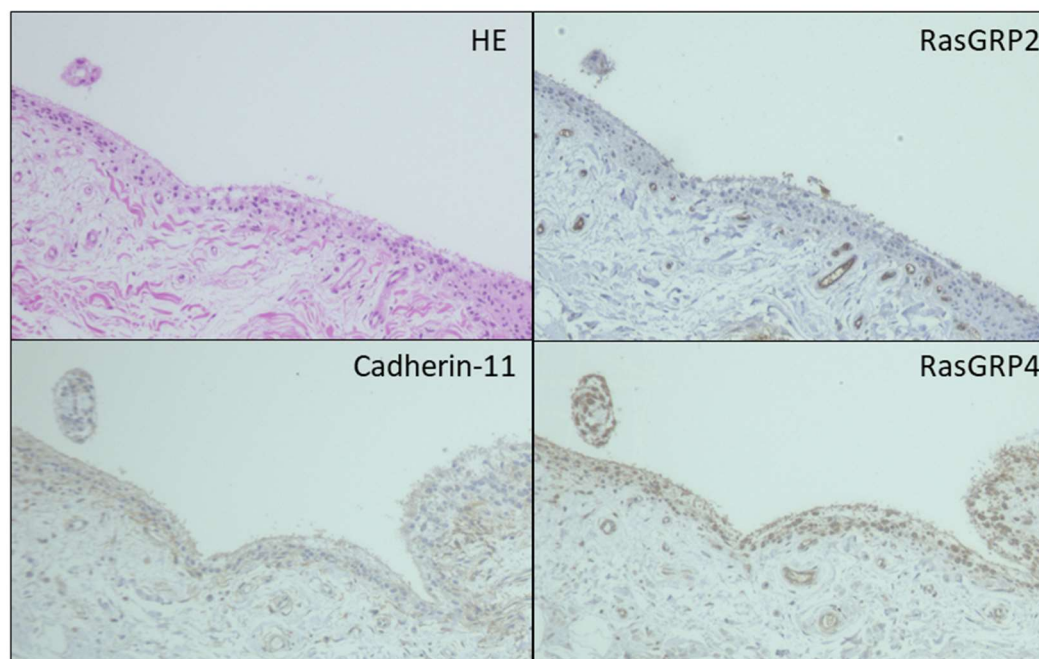
免疫組織化学染色において、RasGRP2はRA患者の血管内皮細胞と Cadherin-11 で同定される FLS に発現が確認された。一方 OA 患者においては血管内皮細胞に発現は認められるものの、FLS における発現は確認されなかった。過去の研究で示したように、RasGRP4 は FLS に発現しており、OA 患者と比較し RA 患者の滑膜表層の RasGRP4 陽性面積は増加していた (Figure 22)。

RA



x200

OA



x200

Figure 22. RA および OA 患者の滑膜組織における Cadherin-11、RasGRP2、RasGRP4 の免疫組織化学染色
RA, rheumatoid arthritis; OA, osteoarthritis

CIA マウスの滑膜組織においても、RasGRP2 の発現が確認された。またその発現はパンス形成部位の滑膜に顕著であった (Figure 23)。

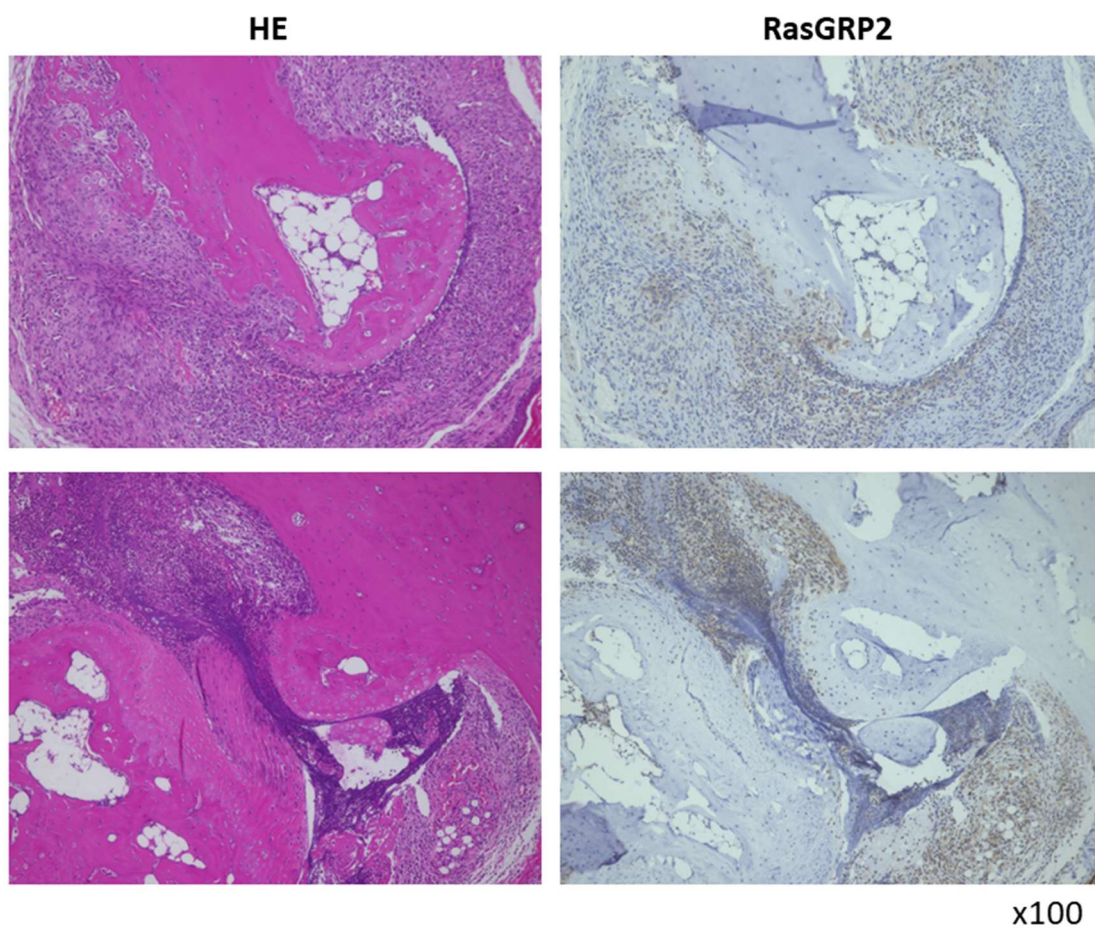


Figure 23. CIA マウスの足関節組織における RasGRP2 の免疫組織化学染色

7.5 サイトカイン刺激による RasGRP2 の発現変化

7.5.1 方法

4～8 継代の FLS を 12 well plate に散布し、10% 非働化 FBS 含有 Iscove's modified Dulbecco's medium で培養を行った。1-10 ng/mL の TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、interferon gamma (IFN- γ)、IL-17A、platelet-derived growth factor (PDGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor beta (TGF- β) を培養液に添加し、24 時間後に細胞を回収した。前述のように mRNA を抽出し、Real-time-PCR 法でヒト RasGRP2 mRNA とヒト GAPDH mRNA の発現を定量した。 $\Delta\Delta CT$ 値法によってサイトカイン刺激における RasGRP2 の mRNA 発現量の比較を行った。

また回収した細胞は protease inhibitor (Sigma) 含有の cell lysis buffer (Wako) で処理を行い、15 分間氷上放置、10 分間遠心分離した後の上清を回収した。濃度調整した上清にドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS) を加え 95°C で 10 分間加温した。次に 9% アクリルアミドゲルを作製し、サンプル中の蛋白質を電気泳動させた。その後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに蛋白質を転写し、スキムミルクでブロッキングを行った。Solution 1 (Toyobo) で 1000 倍希釈した抗 RasGRP2 抗体を室温で一晩反応させ、洗浄後、二次抗体を反応させた。検出試薬には Amerisham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を使用した。

7.5.2 結果

VEGF および TGF- β の刺激によって、RasGRP2 mRNA の発現量が増加した。また統計学的有意差は確認できなかったものの、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-17A、PDGF の刺激によっても RasGRP2 mRNA の発現量が増加する傾向が認められた。また immunoblotting では PDGF、VEGF、TGF- β の刺激による RasGRP2 の蛋白発現量の増加が確認された (Figure 24)。

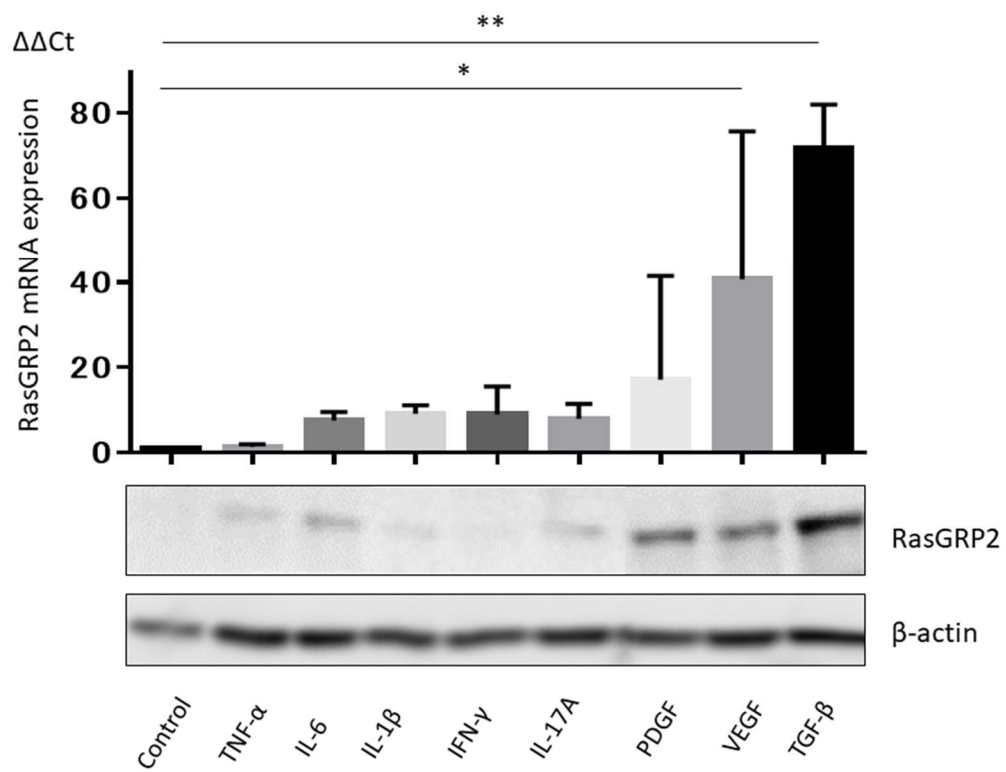


Figure 24. サイトカイン刺激による RasGRP2 の mRNA および蛋白発現量の変化
データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, t-test.

7.6 FLS における RasGRP2 の強制発現の影響

7.6.1 RasGRP2 発現ベクターの作成

RasGRP2 のリファレンス配列 NM_001098670.1 (Homo sapiens RAS guanyl releasing protein 2, transcript variant 3) を Pubmed から入手し、Primer-BLAST を用いて全オープンリーディングフレーム (open reading frame: ORF) を含むようにプライマーを下記 (Table 7) のように設計した。

Jurkat 細胞の cDNA を鋳型とし、KOD plus Neo (Toyobo) を用いた PCR 反応で、RasGRP2 の ORF 配列の増幅を行った。その後 PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、目的サイズの DNA 断片が増幅されていることを確認 (Figure 25-A) した。目的の DNA は Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲル片から抽出した。得られた DNA は、Taq 酵素 (Toyobo) を用いて T 付加反応を行った後、pcDNA3.1/V5-His-TOPO expression vector (Thermo Fisher Scientific) にライゲーションした。

その後、大腸菌コンピテントセルに形質転換し、培養を行った。得られたコロニーに対し、下記プライマー (Table 8) を用いてコロニーPCRを行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動 (Figure 25-B) し、目的のバンドが得られたコロニーを液体培地でさらに培養し、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いてプラスミドベクターの単離、精製を行った。完成したプラスミドベクターは、下記プライマー (Table 9) を用いてシーケンスを行い、RasGRP2 のリファレンス配列と相違ないことを確認した。

Table 7. RasGRP2 の ORF 配列を PCR 増幅するためのプライマー

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward	CTCCTTGCGGCAGGTCCCAAG	21	65.6	66.7
Reverse	CAAGTGGATGTCAAACACCCCATCC	25	64.0	52.0

Table 8. コロニーPCR のためのプライマー

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward	GTACACAACCTCCAGGAGAG	20	55.1	50.0
Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	18	55.6	55.6

Table 9. シークエンスプライマー

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward	TAATACGACTCACTATAGGG	20	50.3	40.0
Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	18	55.6	55.6

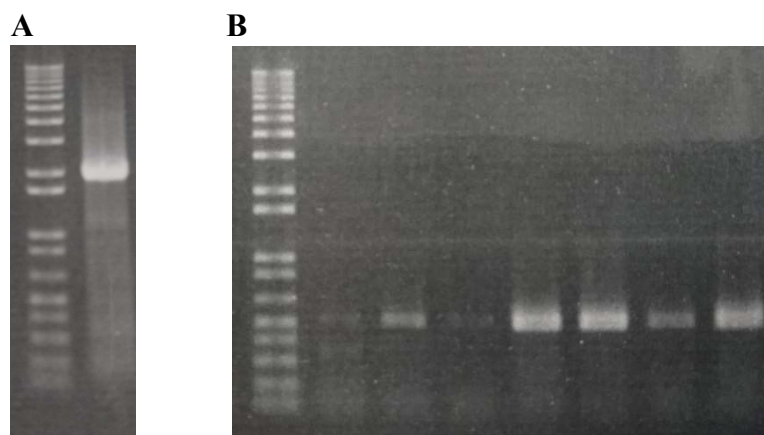


Figure 25. アガロースゲル電気泳動
A: RasGRP2 全 ORF の PCR 増幅結果
B: コロニーPCR 結果

完成したプラスミドベクターは Neon® Transfection System (Thermo Fisher Scientific) を用いたエレクトロポレーション法で FLS にトランスフェクションを行った。

初めに、緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein: GFP) 発現ベクターを用いてトランスフェクションし、蛍光顕微鏡観察で最大のトランスフェクション効率となる条件を検討 (Figure 26) した。

次に同様の条件で、RasGRP2 発現ベクターをトランスフェクションし、前述した Real-time-PCR 法と Immunoblotting で RasGRP2 の mRNA と蛋白質発現量が増加することを確認 (Figure 27) した。

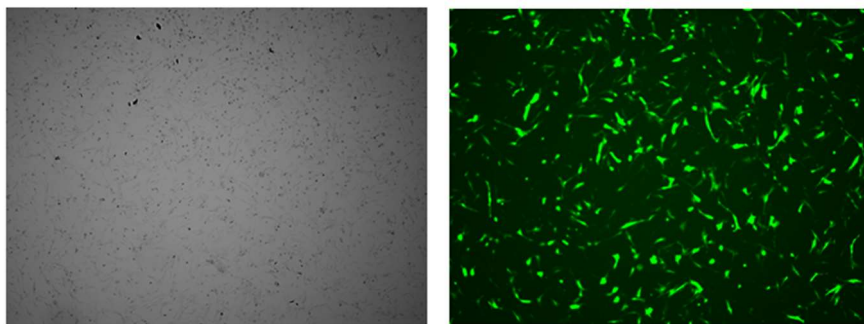


Figure 26. GFP 発現ベクターをトランスフェクションした FLS

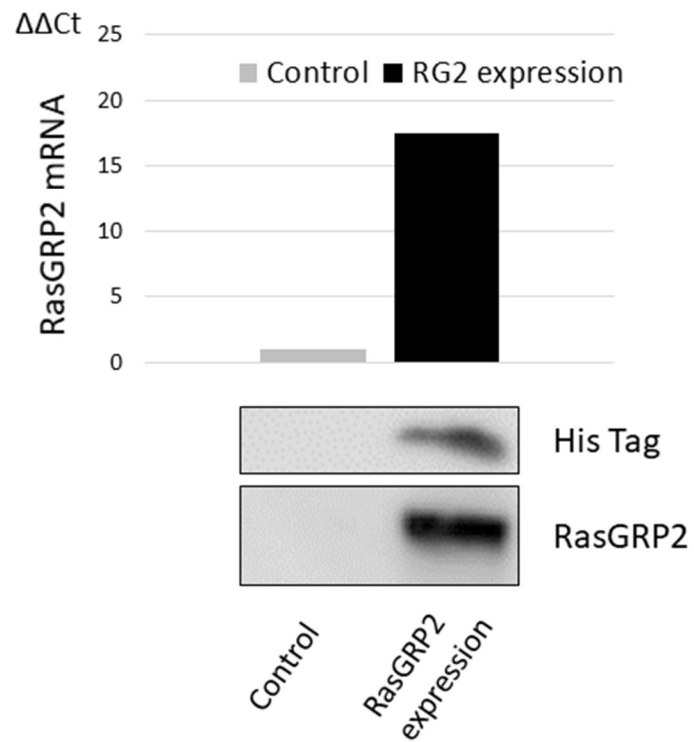


Figure 27. 発現ベクターによる FLS の RasGRP2 mRNA および蛋白発現量の変化

7.6.2 RasGRP2 強制発現によるシグナル伝達経路の変化

上述の方法で RasGRP2 発現ベクターを FLS にトランスフェクションを行い、72 時間後に細胞を回収した。また対象として空ベクターも同様の方法で FLS にトランスフェクションした。前述の方法でそれぞれの細胞 Lysate を作成し、そのうち一部は、Glutathione S-transferase 融合蛋白質、グルタチオンアガロースビーズ (Cell signaling technology) とともにインキュベートを行い、SDS 溶液で GTP 結合 Rap-1 を pull down した。得られた Lysate および Eluate はポリアクリルアミド電気泳動の後、Immunoblotting を行った。

Erk 経路、p38MAPK 経路、JNK 経路、m-TOR 経路の明らかな変化は認められなかったが、RasGRP2 強制発現により GTP 結合型の Rap-1 蛋白の増加が確認された (Figure 28)。

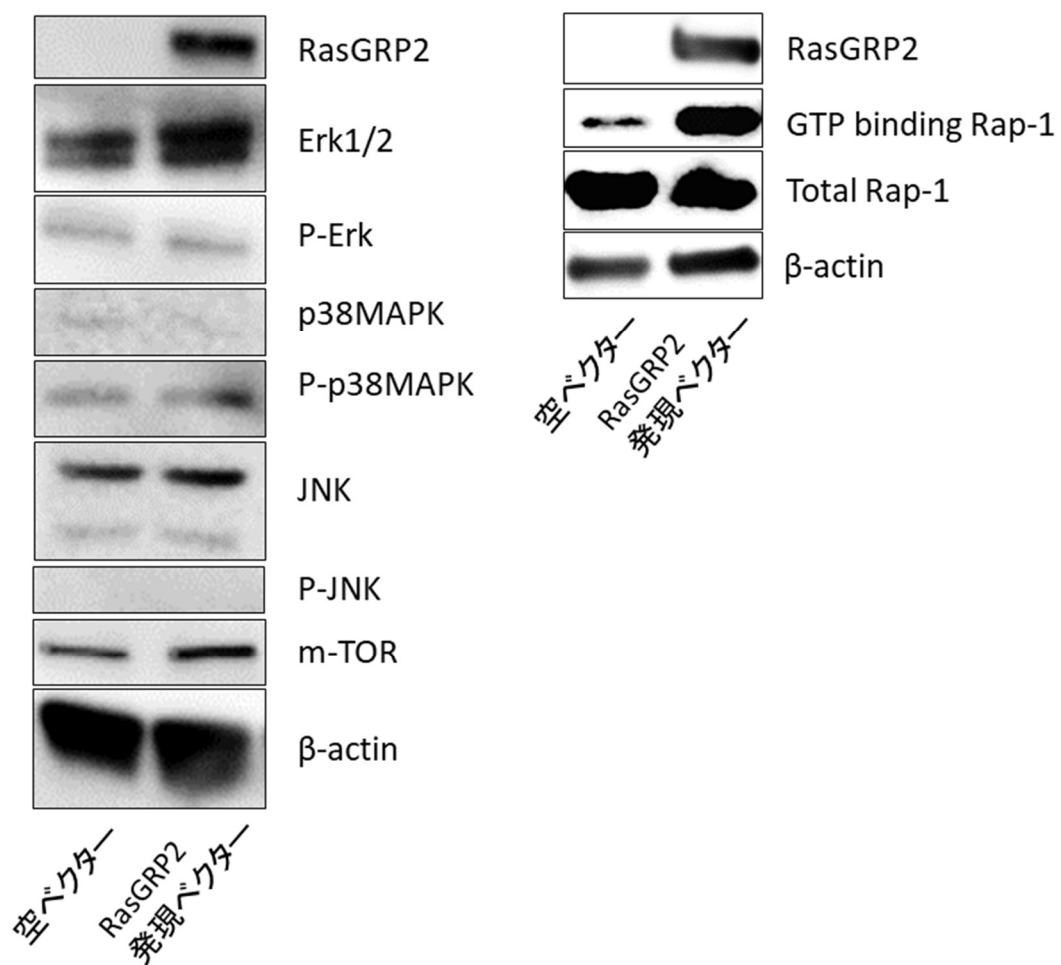


Figure 28. RasGRP2 強制発現によるシグナル伝達の変化

7.6.3 RasGRP2 強制発現と細胞増殖能

上述の方法で RasGRP2 発現ベクターもしくは空ベクターをそれぞれ FLS にトランスフェクションを行い、48 時間後に細胞培養液中にブロモデオキシウリジン (Bromodeoxyuridine: BrdU) を添加した。チミジンアナログである BrdU は、細胞周期の S 期において新たに合成された DNA に取り込まれ、細胞増殖を反映する。添加 24 時間後に細胞を固定し、ペルオキシダーゼ標識抗 BrdU 抗体 (Roche) を反応させた。その後化学発光基質を加え、発光強度を ELISA リーダーで測定した。

RasGRP2 の強制発現は、BrdU アッセイにおける細胞増殖能評価に明らかな影響を及ぼさなかった (Figure 29)。

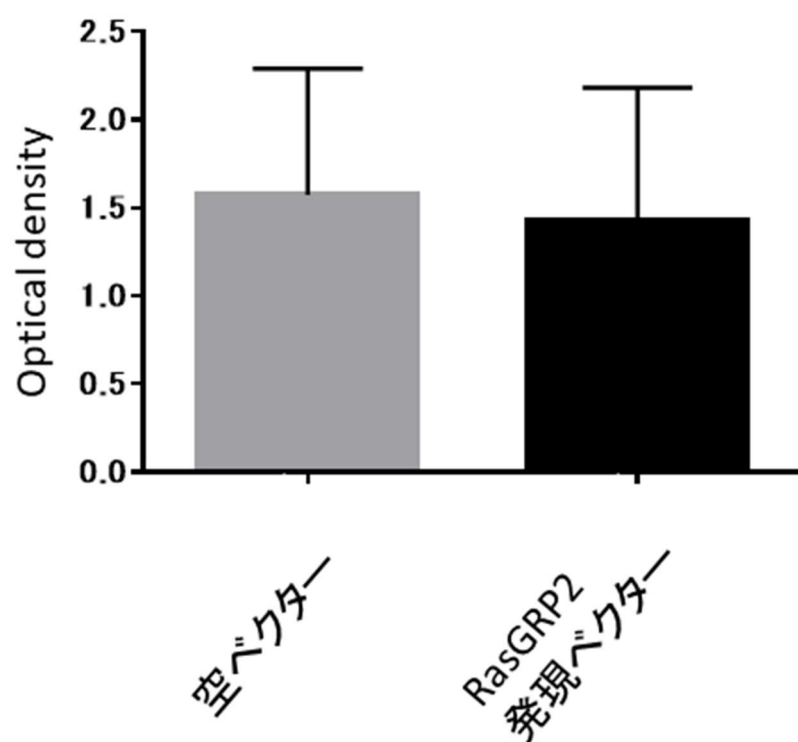


Figure 29. BrdU assay による細胞増殖の評価
データは平均±標準誤差で示した。

7.6.4 RasGRP2 強制発現と細胞接着・遊走・浸潤能

上述の方法で RasGRP2 発現ベクターもしくは空ベクターをそれぞれ FLS にトランスフェクションを行い、48 時間後に細胞を回収した。細胞数を揃えた FLS を 1% 非働化 FBS 含有 Iscove's modified Dulbecco's medium で希釈し、8 μ m pore size の polycarbonate membrane または細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) コーティングの polycarbonate membrane で作成された Insert (Cell Biolabs) 内に投入した。Insert は 10% 非働化 FBS 含有 Iscove's modified Dulbecco's medium の入った well 内に浮かべ、インキュベートした。24 時間後に Insert の底面を光学顕微鏡で観察し、細胞が接着した面積を Image J で定量した。またそれぞれの membrane を通過し、well 側に移動した細胞を膜から剥離、溶解し、CyQuant® GR Dye (Cell Biolabs) 反応後の蛍光強度によって細胞数を定量した。ECM なしの膜通過は単純な細胞の遊走によってのみ達成されるが、ECM コーティング膜の通過には ECM の分解を含む細胞の浸潤能が必要となる。

また次に創傷治癒アッセイとして、RasGRP2 発現ベクターもしくは空ベクターをそれぞれ同様に FLS にトランスフェクションし、48 時間後にコンフルエントとなるように 12 well プレートで培養を行った。コンフルエントとなった 12 well プレートを 1000 μ l ピペットチップの先端でひっかき細胞の空白地帯 (創傷) を作成した。その後細胞が遊走し空白が埋まっていく (創傷が治癒していく) 様子を経時的に光学顕微鏡で観察し、空白 (創傷) 面積の大きさを Image J で定量した。

ECM なしの膜に対する細胞接着において両者に明らかな差は認めなかったが、RasGRP2 の強制発現において ECM コーティング膜に対する有意な接着の増加が認められた (Figure 30, 31)。一方、RasGRP2 の強制発現によって ECM なしの膜を通過 (遊走) した細胞数は有意に増加したが、ECM コーティング膜の通過 (浸潤) 細胞数に有意な違いは認めなかった (Figure 32)。創傷治癒アッセイにおいては、RasGRP2 の強制発現によって有意な創傷治癒 (遊走) の促進が確認された (Figure 33, 34)。

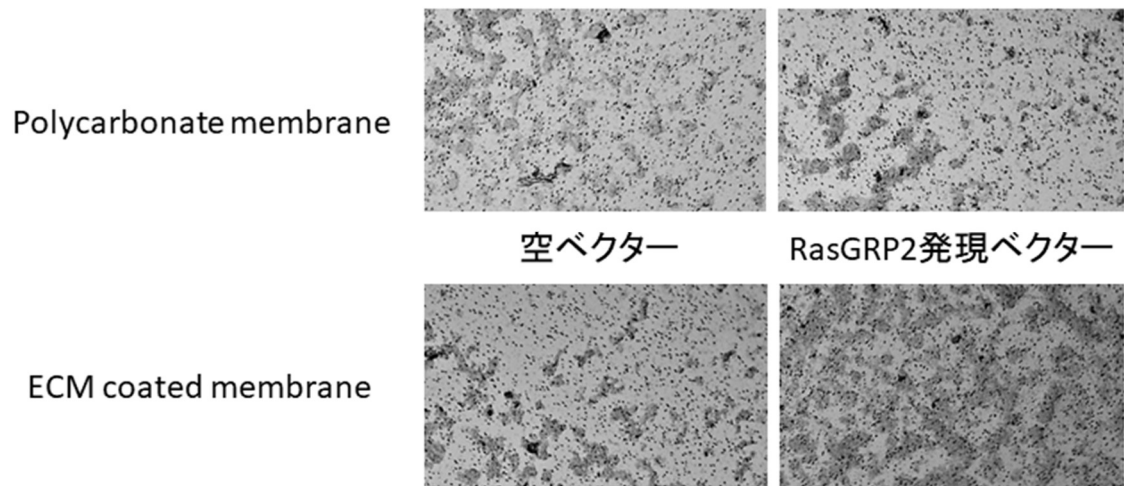


Figure 30. メンブレンの顕微鏡観察像
ECM, extracellular matrix.

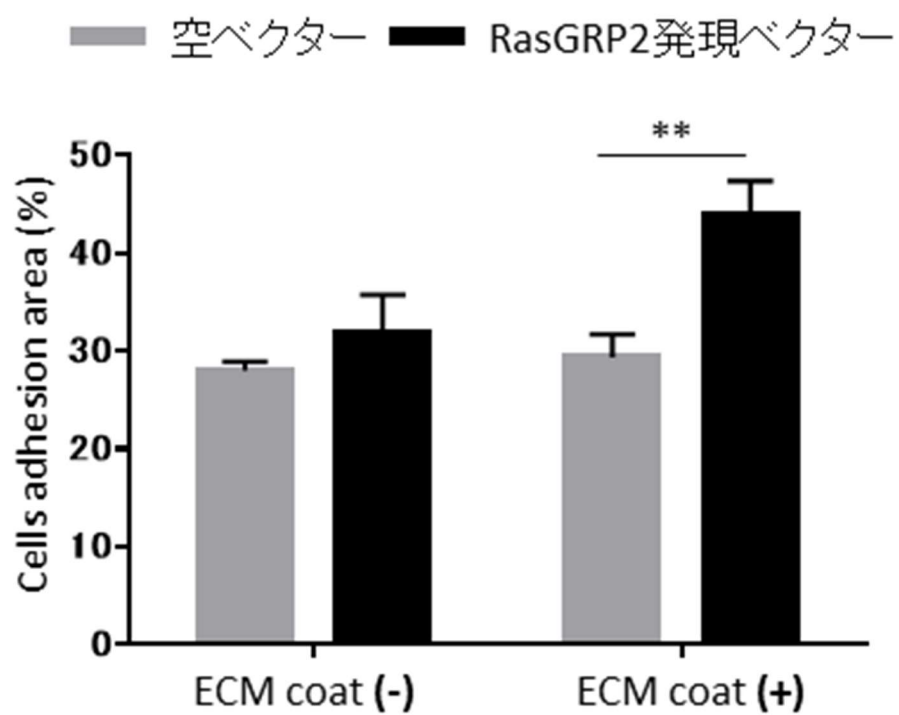


Figure 31. Image J を用いた細胞接着面積の定量

ECM, extracellular matrix.

データは平均±標準誤差で示した。**: $p < 0.01$, t-test.

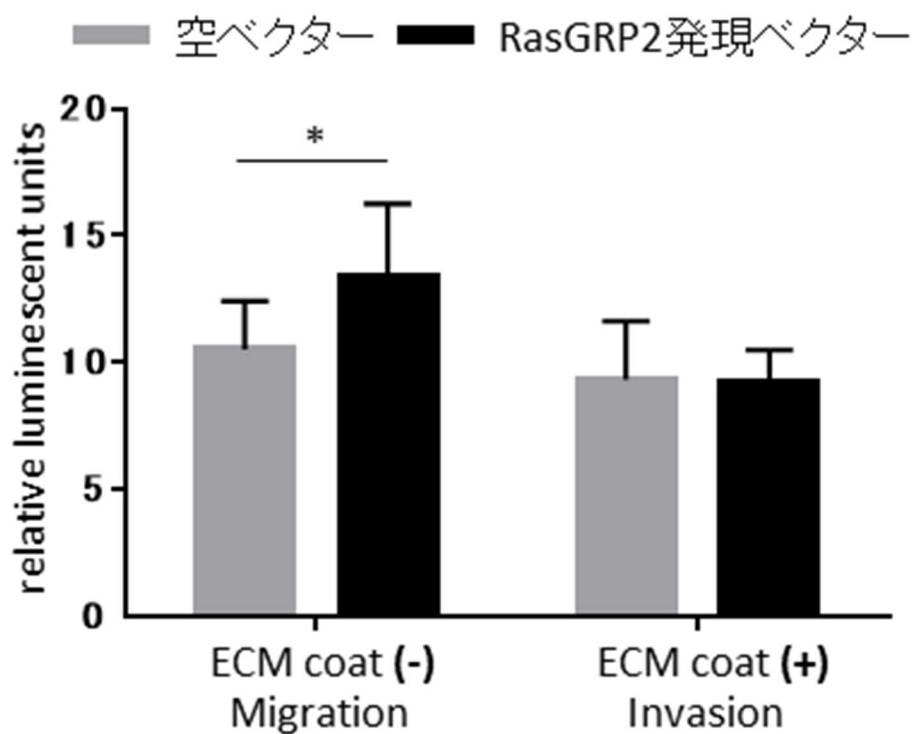


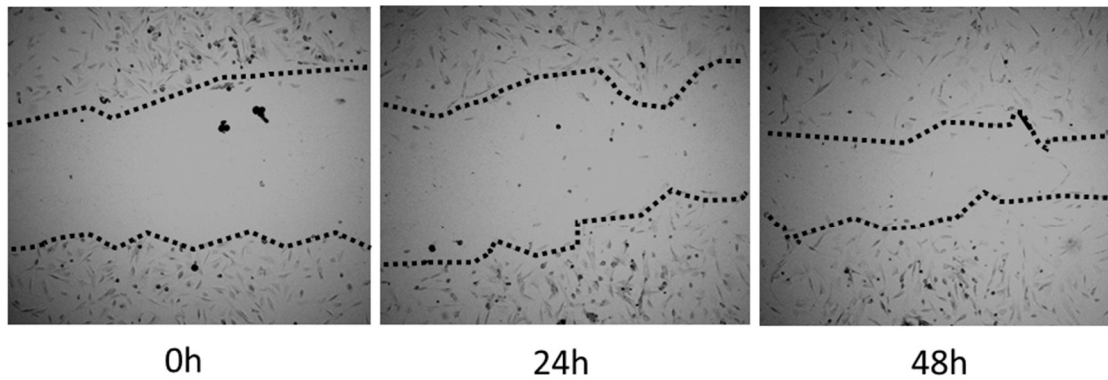
Figure 32. 膜通過細胞数の定量

ECM コーティングなしの膜通過は細胞の遊走を表し、ECM コーティングされた膜の通過は細胞の浸潤を模倣している。

ECM, extracellular matrix.

データは平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, t-test.

空ベクター



RasGRP2発現ベクター

Figure 33. RasGRP2 強制発現による創傷治癒能の変化

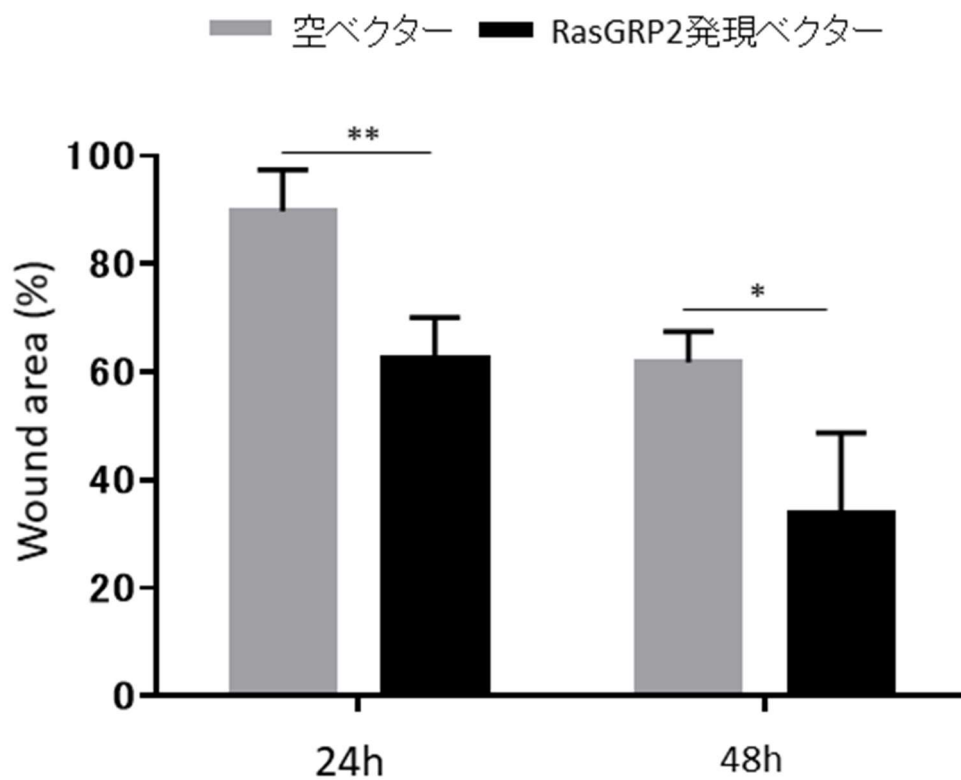


Figure 34. Image J を用いた上記創傷面積の定量
データは平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, t-test.

7.6.5 RasGRP2 強制発現と蛋白産生

上述の方法で RasGRP2 発現ベクターもしくは空ベクターを FLS にトランスフェクションを行い、48 時間後に細胞を回収した。前述のように mRNA を抽出し、Real-time-PCR 法でヒト IL-6、MMP-1、MMP-3、VEGF、RANKL の mRNA の発現を定量した。ヒト GAPDH mRNA の発現量を基準とした $\Delta\Delta CT$ 値法によって RasGRP2 強制発現による mRNA 発現量の変化を検討した。

また同様にトランスフェクションを行った FLS において 48 時間後に培地交換を行い、その 24 時間後に細胞培養上清を回収した。その培養上清中の IL-6 濃度を ELISA キット (R&D System) で定量した。

RasGRP2 の強制発現によって mRNA 発現量、培養上清中の IL-6 濃度とも有意な増加が認められた (Figure 35, 36)。MMP-1、MMP-3、VEGF、RANKL においては有意な mRNA 量の変化は確認できなかった (Figure 35)。

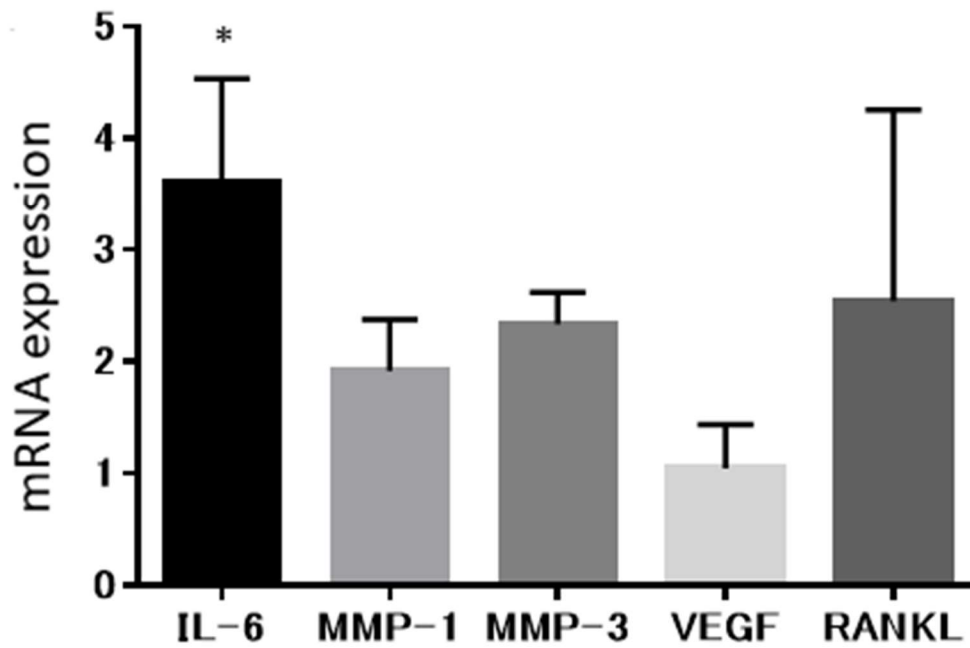


Figure 35. RasGRP2 強制発現による FLS 産生蛋白の mRNA 量の変化
データは空ベクターに対する RasGRP2 発現ベクターの mRNA 量の比を表し、平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, t-test.

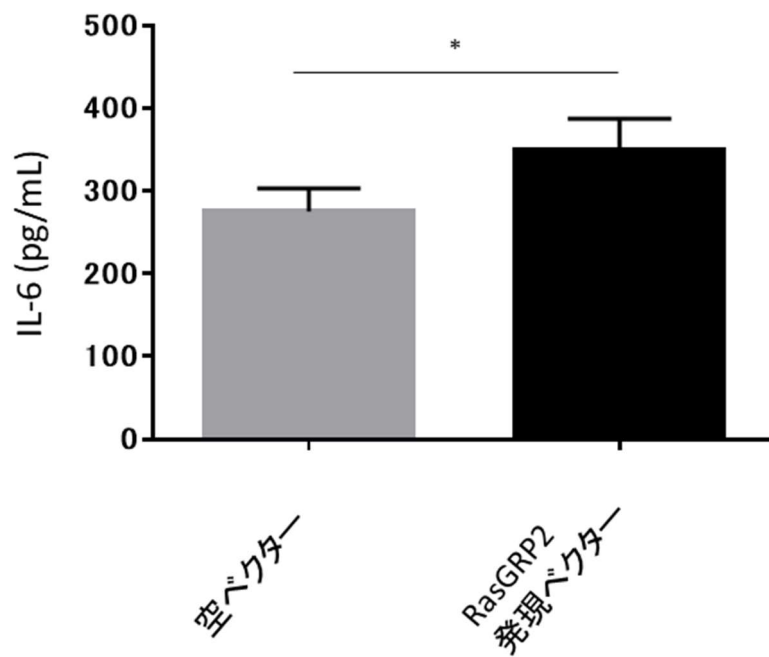


Figure 36. ELISA による FLS 培養上清中の IL-6 濃度測定データは平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, t-test.

7.7 考察

我々は、RA 患者の FLS において先行研究で示した RasGRP4 のみならず RasGRP2 も高発現していることを今回初めて見出した。RasGRP2 は主に血小板領域でよく研究されている分子であるが、RA の関連、また FLS における役割は全く分かっていない。RasGRP2 は Ras と Rap-1 の二つの活性化を司る GEF であり¹¹⁴、血小板において RasGRP2 は Ras 活性化因子というよりむしろ Rap-1 の活性化を通じてインテグリンの発現を調整し、血小板の接着、凝集に関与しているとされる¹¹⁵。

RA 患者内においても RasGRP2 の発現量はばらつきが多く、RasGRP2 の発現の低かった RA 患者群は一部の例外を除いて FLS 採取時に炎症性サイトカインをターゲットとした生物学的製剤治療が行われていた。そのため我々はサイトカイン刺激による FLS の RasGRP2 発現量の変化を検討した。RA の病態と関連が深いとされるサイトカインとして TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-17A、IL-22、PDGF、VEGF、TGF- β を抽出し、そのうち IL-22、PDGF、VEGF、TGF- β の刺激により RasGRP2 の発現は亢進した。

次に、FLS における RasGRP2 の役割を明らかにするため、RasGRP2 の強制発現 FLS を作成し、シグナル伝達経路の変化また細胞機能の変化を検討した。我々は先行研究で RasGRP4 の強制発現が MAPK 経路を活性化し、細胞増殖能を増加させることを示した (Shimamura et al, unpublished data) が、RasGRP2 の強制発現においては MAPK 経路および m-TOR 経路など細胞増殖に関わる経路の活性化は確認できず、また BrdU の取り込みで評価される細胞増殖能にも明らかな変化は生じなかった。しかし、血小板における既報通り、RasGRP2 の強制発現において Rap-1 の活性化が生じ、FLS の接着、遊走能が亢進した。FLS の接着能亢進は ECM コーティング膜で顕著であり、これはインテグリンの発現亢進が ECM との結合を強固にするからと考えられる。また遊走能の亢進は認められたものの ECM コーティング膜を通過しうる浸潤能には明らかな変化は認められなかった。これは細胞浸潤がインテグリンの発現は介した接着、遊走以外に ECM を分解するプロセスを必要とするからで、RasGRP2 の強制発現によって蛋白分解酵素である MMP の産生には明らかな変化は生じなかった。また骨破壊に関与する RANKL の産生にも明らかな変化は生じなかった。一方、RasGRP2 の強制発現によって IL-6 産生が増加し、RasGRP2 は RA において FLS の炎症増幅に寄与していることも明らかとなった。これらの知見を総合すると、RA の FLS が腫瘍様に増殖し、骨・軟骨に遊走、浸潤してパニナスを形成していく過程で、RasGRP2 は遊走と炎症増幅としての IL-6 産生に関与するが、増殖能や MMP、RANKL の産生には影響を及ぼさず総合的な RA の病態形成には RasGRP4 など他の共作用分子が必要と考えられる。

以上の見解から、RasGRP2 は RA の病態と深く関わっており、一つの新たな治療ターゲットの候補と考える。生物学的製剤の使用者の多くで RasGRP2 の発現は低下していたが、一部生物学的製剤使用者においても RasGRP2 が高発現している症例も認められ、既存治療への抵抗例とも考えられる。特に RasGRP2 は

既存治療がターゲットとする TNF- α 、IL-6 とは全く異なる VEGF、TGF- β との関連が今回明らかとなり、現存の難治例に対し新たな治療機会を提供できる可能性が示唆される。また RasGRP2 阻害は免疫抑制作用を介さないと考えられ、現行のリウマチ治療の効果と表裏一体である易感染性の問題を解決できる可能性もある。追加検討すべき事項がまだ数多く存在するが、今回の研究で RasGRP2 の新たな治療ターゲットとなる可能性を我々は示唆した。

8. 総括及び結論

- IgG aDI と IgG/M aPS/PT 検査の組み合わせは APS 診断の非常に高い陽性的中率を示し、血栓症の予測因子である aPL-S と強く相関した。これら検査は実臨床における効率的な APS 診断、血栓予測ツールとなる可能性がある。
- APS において血清 H 因子が低値であり、補体の活性化と関連していた。血清 H 因子は代替経路活性化を通じて APS の血栓形成に関与し、新たな治療ターゲットとなる可能性がある。
- 膠原病性 PAH において肺動脈圧を逆相関した血清ハプトグロビン値の低下を認め、血清ハプトグロビン値は膠原病性 PAH の新たな非侵襲的な予測マーカー、治療効果判定マーカーとなる可能性がある。
- HSCT は重症 SSc 患者の皮膚硬化を劇的に改善し、その全生存期間は良好であった。一方、HSCT 後にも SSc が再燃、増悪することがあり、また HSCT により致死的な心筋症を発症するリスクもある。慎重に適応を判断した上で、HSCT は重症 SSc に対する治療選択肢の一つとして提示されうる。
- RA の FLS には RasGRP2 が高発現しており、FLS の接着、遊走、IL-6 産生と関連していた。RasGRP2 は RA の新たな治療ターゲットの候補となる可能性が考えられた。

本研究では、自己免疫疾患の難治性病態として、APS、SSc、RA を対象とした。第一章では IgG aDI と IgG/M aPS/PT 検査の組み合わせが、高い APS 診断の陽性的中率と血栓予測マーカーである aPL-S との相関を有することを示し、実臨床における有用な APS の診断ツールとなりえることを提示した。また第二章では APS における血清 H 因子低下を明らかにし、補体活性化を通じ血栓形成に寄与している可能性とともに、新たな治療ターゲットとなりえる可能性を示唆した。第三章では膠原病 (特に SSc) の最も予後不良な合併症である PAH において血清ハプトグロビン値が新たなバイオマーカーとして PAH の早期診断や予後予測に寄与できる可能性を提示した。そして第四章では重症 SSc 患者に対する HSCT の長期成績を解析することによって、日本人 SSc 患者に対する HSCT の有用性、忍容性、安全性についての非常に多くの示唆を与えた。第五章では RA 患者の FLS に RasGRP2 が高発現していることを初めて見出し、FLS の接着、遊走、IL-6 産生能を通じて RA の病態形成に関与している可能性を示した。関節炎モデルラットを用いて、RasGRP2 のノックダウンが、関節炎や骨、軟骨破壊に与える影響を現在検討中であるが、RasGRP2 は RA の新たな治療ターゲットの候補と考えられる。本研究で得られたこれらの結果は、今後さらに継続的、長期的に検討していく必要があるが、現在、自己免疫疾患の難治性病態に苦しむ患者の一助となっていくことを願う。

9. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室 博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室、渥美達也教授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。

本教室膠原病グループ保田晋助准教授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。ここに心より深く感謝の意を表します。

第一章および第二章における抗リン脂質抗体症候群の研究につきましては、Olga Amengual 助教、奥健志診療講師には多大な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。

第三章の膠原病性肺動脈性肺高血圧症における研究では加藤将助教に御指導をいただきました。また本研究の遂行にあたりましては、西村正治教授、辻野一三特任教授を始めとした北海道大学病院第一内科の諸先生方に多大な御協力、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。

第四章の強皮症に対する自家末梢血幹細胞移植の長期成績におきましては、長年当教室において行われてきた研究結果を引継ぎまとめさせていただいたものです。今まで当研究に関わられてきた多くの先生方に感謝を申し上げるとともに、特に引継ぎにあたり直接のご指導を賜りました坊垣暁之助教、小谷俊雄先生、野口淳史先生には深く感謝の意を示します。自家末梢血幹細胞移植の実施にあたり臨床的サポートをいただいた血液内科の諸先生方、スキンスコアの評価をいただいた皮膚科の諸先生方、肺 CT 画像の読影をいただいた放射線診断科の諸先生方にも深くの感謝の意を示します。

第五章の研究は河野通仁先生、清水裕香先生の先行研究を引き継いだものです。河野通仁先生が残された多くの患者検体なくしてはこの研究は成り立ちませんでした。清水裕香先生にはマウス実験の遂行にあたり懇切丁寧なご指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。そして同研究グループとしていつも温かい励ましを与えてくれた嶋村抄苗先生、後輩ながらいつも適切な助言をくれた河野通大先生にも深い感謝の意を示します。また滑膜検体の採取にあたり多大な御協力をいただきました整形外科の諸先生方に深く感謝の意を示します。

また藤枝雄一郎助教にはベクターの作成を中心に細かな実験手技に渡り懇切丁寧なご指導を賜りました。久田諒先生は大学院の先輩として模範となるべき道を示しいつも明確な目標であり続けてくれました。菅原恵理先生は研究室の机を隣としいつもよき研究の相談相手となってくれました。工藤友喜大学院生は Immunoblotting の手技に関して多くのアドバイスを授けてくれました。大村一将先生、谷村瞬先生、柴田悠平先生、大西直樹先生、Lee Wenshi 大学院生、曾若櫻大学院生、には同じ大学院の仲間として、研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言をいただき、心より深く感謝を申し上げます。当科実験助

手の下道真由美さん、金子由美子さん、山田あや香さん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、ここに書ききれないくらい多くの御協力、御助言、御支援をいただきました。重ねまして心より感謝を申し上げます。

何より筆者の臨床研究およびトランスレーショナルリサーチは患者様たちの協力なしには成り立たないものです。研究の趣旨に御理解と御協力をいただき、研究の遂行を可能にしてくれた多くの患者様たちに心より感謝申し上げます。最後に遠く故郷より見守ってくれていた両親、いつも優しく支え続けてくれた妻と子供たち家族に心から感謝致します。

10. 引用文献

- 1 Miyakis, S. *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* **4**, 295-306, (2006).
- 2 Matsuura, E., Igarashi, Y., Yasuda, T., Triplett, D. A. & Koike, T. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J. Exp. Med.* **179**, 457-462, (1994).
- 3 Devreese, K. & Hoylaerts, M. F. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a plethora of obstacles to overcome. *Eur. J. Haematol.* **83**, 1-16, (2009).
- 4 Amengual, O., Atsumi, T., Khamashta, M. A., Koike, T. & Hughes, G. R. Specificity of ELISA for antibody to beta 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br. J. Rheumatol.* **35**, 1239-1243, (1996).
- 5 Adams, M. Measurement of lupus anticoagulants: an update on quality in laboratory testing. *Semin. Thromb. Hemost.* **39**, 267-271, (2013).
- 6 Triplett, D. A. Many faces of lupus anticoagulants. *Lupus* **7 Suppl 2**, S18-22, (1998).
- 7 Otomo, K. *et al.* Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum.* **64**, 504-512, (2012).
- 8 Hunt, J. E., McNeil, H. P., Morgan, G. J., Cramer, R. M. & Krilis, S. A. A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* **1**, 75-81, (1992).
- 9 Ioannou, Y. *et al.* Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum.* **56**, 280-290, (2007).
- 10 Zager, U., Kveder, T., Cucnik, S., Bozic, B. & Lunder, M. Anti-beta2-glycoprotein I paratopes and beta2-glycoprotein I epitopes

- characterization using random peptide libraries. *Autoimmunity* **47**, 438-444, (2014).
- 11 de Laat, B., Derksen, R. H., van Lummel, M., Pennings, M. T. & de Groot, P. G. Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood* **107**, 1916-1924, (2006).
 - 12 Atsumi, T. *et al.* Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.* **43**, 1982-1993, (2000).
 - 13 Pengo, V. *et al.* Antiphospholipid syndrome: antibodies to Domain 1 of beta2-glycoprotein 1 correctly classify patients at risk. *J. Thromb. Haemost.* **13**, 782-787, (2015).
 - 14 Harris, E. N., Gharavi, A. E., Patel, S. P. & Hughes, G. R. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin. Exp. Immunol.* **68**, 215-222, (1987).
 - 15 Devreese, K. M. *et al.* Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 792-795, (2014).
 - 16 Brandt, J. T., Triplett, D. A., Alving, B. & Scharrer, I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb. Haemost.* **74**, 1185-1190, (1995).
 - 17 Pengo, V. *et al.* Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1737-1740, (2009).
 - 18 Banzato, A. *et al.* Antibodies to Domain I of beta(2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS). *Thromb. Res.* **128**, 583-586, (2011).
 - 19 de Laat, B. *et al.* The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J.*

- Thromb. Haemost.* **7**, 1767-1773, (2009).
- 20 Meneghel, L. *et al.* Detection of IgG anti-Domain I beta2 Glycoprotein I antibodies by chemiluminescence immunoassay in primary antiphospholipid syndrome. *Clin. Chim. Acta.* **446**, 201-205, (2015).
 - 21 De Craemer, A. S., Musial, J. & Devreese, K. M. Role of anti-domain 1-beta2 glycoprotein I antibodies in the diagnosis and risk stratification of antiphospholipid syndrome. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 1779-1787, (2016).
 - 22 Pelkmans, L. *et al.* Variability in exposure of epitope G40-R43 of domain i in commercial anti-beta2-glycoprotein I IgG ELISAs. *PLoS One* **8**, e71402, (2013).
 - 23 Mondejar, R. *et al.* Role of antiphospholipid score and anti-beta2-glycoprotein I Domain I autoantibodies in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin. Chim. Acta.* **431**, 174-178, (2014).
 - 24 Mahler, M. *et al.* Autoantibodies to domain 1 of beta 2 glycoprotein I determined using a novel chemiluminescence immunoassay demonstrate association with thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* **25**, 911-916, (2016).
 - 25 Hoxha, A. *et al.* Relationship between antiphosphatidylserine/prothrombin and conventional antiphospholipid antibodies in primary antiphospholipid syndrome. *Clin. Chem. Lab. Med.* **53**, 1265-1270, (2015).
 - 26 Pregnolato, F. *et al.* Anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies: an additional diagnostic marker for APS? *Immunol. Res.* **56**, 432-438, (2013).
 - 27 Atsumi, T., Amengual, O., Yasuda, S. & Koike, T. Antiprothrombin antibodies--are they worth assaying? *Thromb. Res.* **114**, 533-538, (2004).
 - 28 Oku, K. *et al.* Essential role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue factor gene expression mediated by the phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody. *Rheumatology (Oxford)* **52**, 1775-1784, (2013).
 - 29 Bourke, L. T. *et al.* Antiphospholipid antibodies enhance rat neonatal cardiomyocyte apoptosis in an in vitro hypoxia/reoxygenation injury model via p38 MAPK. *Cell Death Dis.* **8**, e2549, (2017).
 - 30 Xia, L. *et al.* Both NF-kappaB and c-Jun/AP-1 involved in anti-beta2GPI/beta2GPI-induced tissue factor expression in monocytes. *Thromb. Haemost.* **109**, 643-651, (2013).

- 31 Oku, K., Amengual, O. & Atsumi, T. Pathophysiology of thrombosis and pregnancy morbidity in the antiphospholipid syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* **42**, 1126-1135, (2012).
- 32 Watanabe, H. *et al.* Relationship of complement activation route with clinical manifestations in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: a retrospective observational study. *Mod. Rheumatol.* **25**, 205-209, (2015).
- 33 Oku, K. *et al.* Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 1030-1035, (2009).
- 34 Pierangeli, S. S. *et al.* Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum.* **52**, 2120-2124, (2005).
- 35 Girardi, G., Redecha, P. & Salmon, J. E. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat. Med.* **10**, 1222-1226, (2004).
- 36 Oku, K. *et al.* Complement and thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* **15**, 1001-1004, (2016).
- 37 Matsuki, Y. *et al.* Clinical features and pregnancy outcome in antiphospholipid syndrome patients with history of severe pregnancy complications. *Mod. Rheumatol.* **25**, 215-218, (2015).
- 38 Kim, D. D. & Song, W. C. Membrane complement regulatory proteins. *Clin. Immunol.* **118**, 127-136, (2006).
- 39 Seya, T. *et al.* Purification and functional properties of soluble forms of membrane cofactor protein (CD46) of complement: identification of forms increased in cancer patients' sera. *Int. Immunol.* **7**, 727-736, (1995).
- 40 Gropp, K. *et al.* beta(2)-glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator. *Blood* **118**, 2774-2783, (2011).
- 41 Fremeaux-Bacchi, V. *et al.* The development of atypical haemolytic-uraemic syndrome is influenced by susceptibility factors in factor H and membrane cofactor protein: evidence from two independent cohorts. *J. Med. Genet.* **42**, 852-856, (2005).
- 42 Aguilar, A. Thrombotic microangiopathies: Complement factor H: beyond

- aHUS. *Nat. Rev. Nephrol.* **13**, 136, (2017).
- 43 Hofer, J., Giner, T. & Jozsi, M. Complement factor H-antibody-associated hemolytic uremic syndrome: pathogenesis, clinical presentation, and treatment. *Semin. Thromb. Hemost.* **40**, 431-443, (2014).
 - 44 Mukai, S. *et al.* Factor H gene variants in Japanese: its relation to atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol. Immunol.* **49**, 48-55, (2011).
 - 45 Riedl, M. *et al.* Spectrum of complement-mediated thrombotic microangiopathies: pathogenetic insights identifying novel treatment approaches. *Semin. Thromb. Hemost.* **40**, 444-464, (2014).
 - 46 Johnsen, S. J., Valborgland, T., Gudlaugsson, E., Bostad, L. & Omdal, R. Thrombotic microangiopathy and the antiphospholipid syndrome. *Lupus* **19**, 1569-1572, (2010).
 - 47 Fujieda, Y. *et al.* Predominant prevalence of arterial thrombosis in Japanese patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* **21**, 1506-1514, (2012).
 - 48 Tektonidou, M. G. Identification and treatment of APS renal involvement. *Lupus* **23**, 1276-1278, (2014).
 - 49 Diz-Kucukkaya, R. *et al.* Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in patients presenting with immune thrombocytopenic purpura: a prospective cohort study. *Blood* **98**, 1760-1764, (2001).
 - 50 Atsumi, T., Furukawa, S., Amengual, O. & Koike, T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus* **14**, 499-504, (2005).
 - 51 Hisada, R. *et al.* Thrombotic risk stratification by platelet count in patients with antiphospholipid antibodies: a longitudinal study. *J. Thromb. Haemost.*, (2017).
 - 52 Comellas-Kirkerup, L., Hernandez-Molina, G. & Cabral, A. R. Antiphospholipid-associated thrombocytopenia or autoimmune hemolytic anemia in patients with or without definite primary antiphospholipid syndrome according to the Sapporo revised classification criteria: a 6-year follow-up study. *Blood* **116**, 3058-3063, (2010).
 - 53 Meroni, P. L., Raschi, E., Testoni, C. & Borghi, M. O. Endothelial cell activation by antiphospholipid antibodies. *Clin. Immunol.* **112**, 169-174, (2004).
 - 54 Foltyn Zadura, A. *et al.* Factor H Autoantibodies in Patients with

- Antiphospholipid Syndrome and Thrombosis. *J. Rheumatol.* **42**, 1786-1793, (2015).
- 55 Zhao, J. *et al.* Association of genetic variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus erythematosus susceptibility. *PLoS Genet.* **7**, e1002079, (2011).
- 56 SanGiovanni, J. P., SanGiovanni, P. M., Sapieha, P. & De Guire, V. miRNAs, single nucleotide polymorphisms (SNPs) and age-related macular degeneration (AMD). *Clin. Chem. Lab. Med.* **55**, 763-775, (2017).
- 57 Oku, K. *et al.* Autoantibodies against a complement component 1 q subcomponent contribute to complement activation and recurrent thrombosis/pregnancy morbidity in anti-phospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* **55**, 1403-1411, (2016).
- 58 Jenny, L., Dobo, J., Gal, P. & Schroeder, V. MASP-1 of the complement system promotes clotting via prothrombin activation. *Mol. Immunol.* **65**, 398-405, (2015).
- 59 Galie, N. *et al.* 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl Ed)* **69**, 177, (2016).
- 60 Tudor, R. M. *et al.* Development and pathology of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, S3-9, (2009).
- 61 Irzyk, K. *et al.* Assessment of systemic and pulmonary arterial remodelling in women with systemic sclerosis. *Scand. J. Rheumatol.* **44**, 385-388, (2015).
- 62 Stuard, I. D., Heusinkveld, R. S. & Moss, A. J. Microangiopathic hemolytic anemia and thrombocytopenia in primary pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* **287**, 869-870, (1972).
- 63 Jubelirer, S. J. Primary pulmonary hypertension. Its association with microangiopathic hemolytic anemia and thrombocytopenia. *Arch. Intern. Med.* **151**, 1221-1223, (1991).
- 64 Johnson, S. R., Granton, J. T. & Mehta, S. Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. *Chest* **130**, 545-552, (2006).
- 65 Ngian, G. S. *et al.* Predictors of mortality in connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension: a cohort study. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R213, (2012).

- 66 Hesselstrand, R., Wildt, M., Ekmehag, B., Wuttge, D. M. & Scheja, A. Survival in patients with pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis from a Swedish single centre: prognosis still poor and prediction difficult. *Scand. J. Rheumatol.* **40**, 127-132, (2011).
- 67 Coghlan, J. G. *et al.* Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1340-1349, (2014).
- 68 Dobryszczyka, W. Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **35**, 647-654, (1997).
- 69 Barcellini, W. & Fattizzo, B. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis. Markers* **2015**, 635670, (2015).
- 70 Voelkel, M. A., Wynne, K. M., Badesch, D. B., Groves, B. M. & Voelkel, N. F. Hyperuricemia in severe pulmonary hypertension. *Chest* **117**, 19-24, (2000).
- 71 Gong, J. N. *et al.* Serum Bilirubin and 6-min Walk Distance as Prognostic Predictors for Inoperable Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Prospective Cohort Study. *Chin. Med. J. (Engl)* **128**, 3125-3131, (2015).
- 72 Zagorski, J., Marchick, M. R. & Kline, J. A. Rapid clearance of circulating haptoglobin from plasma during acute pulmonary embolism in rats results in HMOX1 up-regulation in peripheral blood leukocytes. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 389-396, (2010).
- 73 Kline, J. A., Marchick, M. R. & Hogg, M. M. Reduction in plasma haptoglobin in humans with acute pulmonary embolism causing tricuspid regurgitation. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1597-1599, (2009).
- 74 Garcia, M. J. *et al.* Mechanisms of hemolysis with mitral prosthetic regurgitation. Study using transesophageal echocardiography and fluid dynamic simulation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **27**, 399-406, (1996).
- 75 Tomov, S., Lazarchick, J., Self, S. E., Bruner, E. T. & Budisavljevic, M. N. Kidney-limited thrombotic microangiopathy in patients with SLE treated with romiplostim. *Lupus* **22**, 504-509, (2013).
- 76 Barrera-Vargas, A. *et al.* Renal Thrombotic Microangiopathy in Proliferative Lupus Nephritis: Risk Factors and Clinical Outcomes: A Case-Control Study. *J.*

- Clin. Rheumatol.* **22**, 235-240, (2016).
- 77 Gabrielli, A., Avvedimento, E. V. & Krieg, T. Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1989-2003, (2009).
- 78 Nishimagi, E., Kawaguchi, Y., Tanaka, E., Hara, M. & Kamatani, N. Classification of systemic sclerosis in the Japanese population based on rapid progression of skin thickening. *Mod. Rheumatol.* **14**, 216-221, (2004).
- 79 Becker, M. O. & Riemekasten, G. Risk factors for severity and manifestations in systemic sclerosis and prediction of disease course. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* **12**, 115-135, (2016).
- 80 Hashimoto, A., Endo, H., Kondo, H. & Hirohata, S. Clinical features of 405 Japanese patients with systemic sclerosis. *Mod. Rheumatol.* **22**, 272-279, (2012).
- 81 Zeher, M., Papp, G., Nakken, B. & Szodoray, P. Hematopoietic stem cell transplantation in autoimmune disorders: From immune-regulatory processes to clinical implications. *Autoimmun Rev.*, (2017).
- 82 Swart, J. F. *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 244-256, (2017).
- 83 Henes, J. *et al.* Analysis of anti-topoisomerase I antibodies in patients with systemic sclerosis before and after autologous stem cell transplantation. *Rheumatology (Oxford)* **56**, 451-456, (2017).
- 84 Del Papa, N. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation has better outcomes than conventional therapies in patients with rapidly progressive systemic sclerosis. *Bone Marrow Transplant* **52**, 53-58, (2017).
- 85 Daikeler, T. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation reverses skin fibrosis but does not change skin vessel density in patients with systemic sclerosis. *Pathol. Biol. (Paris)* **63**, 164-168, (2015).
- 86 van Laar, J. M., Naraghi, K. & Tyndall, A. Haematopoietic stem cell transplantation for poor-prognosis systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **54**, 2126-2133, (2015).
- 87 Burt, R. K. *et al.* Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet* **378**, 498-506, (2011).

- 88 van Laar, J. M. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial. *Jama* **311**, 2490-2498, (2014).
- 89 Suwa, A. Hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of autoimmune diseases. *Mod. Rheumatol.* **11**, 91-102, (2001).
- 90 Tsukamoto, H. *et al.* A phase I-II trial of autologous peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of refractory autoimmune disease. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 508-514, (2006).
- 91 Yabuuchi, H. *et al.* Evaluation of the extent of ground-glass opacity on high-resolution CT in patients with interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis: comparison between quantitative and qualitative analysis. *Clin. Radiol.* **69**, 758-764, (2014).
- 92 Yabuuchi, H. *et al.* Correlation between pretreatment or follow-up CT findings and therapeutic effect of autologous peripheral blood stem cell transplantation for interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis. *Eur. J. Radiol.* **79**, e74-79, (2011).
- 93 Bohgaki, T. *et al.* Immunological reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis: relationship between clinical benefits and intensity of immunosuppression. *J. Rheumatol.* **36**, 1240-1248, (2009).
- 94 Pasquini, M. C. *et al.* Transplantation for autoimmune diseases in north and South America: a report of the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol. Blood Marrow Transplant* **18**, 1471-1478, (2012).
- 95 Farge, D. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. *Haematologica* **95**, 284-292, (2010).
- 96 Burt, R. K. *et al.* Cardiac involvement and treatment-related mortality after non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation with unselected autologous peripheral blood for patients with systemic sclerosis: a retrospective analysis. *Lancet* **381**, 1116-1124, (2013).
- 97 Senkus, E. & Jassem, J. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment.

- Cancer Treat. Rev.* **37**, 300-311, (2011).
- 98 Meserve, E. E., Lehmann, L. E., Perez-Atayde, A. R. & Labelle, J. L. Cyclophosphamide-associated cardiotoxicity in a child after stem cell transplantation for beta-thalassemia major: case report and review of the literature. *Pediatr. Dev. Pathol.* **17**, 50-54, (2014).
 - 99 Katayama, M. *et al.* Fulminant fatal cardiotoxicity following cyclophosphamide therapy. *J. Cardiol.* **54**, 330-334, (2009).
 - 100 Jaeger, V. K. & Wirz, E. G. Incidences and Risk Factors of Organ Manifestations in the Early Course of Systemic Sclerosis: A Longitudinal EUSTAR Study. **11**, e0163894, (2016).
 - 101 Farge, D. *et al.* Cardiopulmonary assessment of patients with systemic sclerosis for hematopoietic stem cell transplantation: recommendations from the European Society for Blood and Marrow Transplantation Autoimmune Diseases Working Party and collaborating partners. *Bone Marrow Transplant*, (2017).
 - 102 Noguchi, A. *et al.* Bi-ventricular interplay in patients with systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension: Detection by cardiac magnetic resonance. *Mod. Rheumatol.* **27**, 481-488, (2017).
 - 103 Kanno, H. *et al.* Systemic sclerosis presented as congestive heart failure: an autopsy case. *Mod. Rheumatol.* **21**, 423-427, (2011).
 - 104 Wirz, E. G. *et al.* Incidence and predictors of cutaneous manifestations during the early course of systemic sclerosis: a 10-year longitudinal study from the EUSTAR database. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1285-1292, (2016).
 - 105 Penn, H. *et al.* Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes. *Qjm* **100**, 485-494, (2007).
 - 106 Henes, J. C. *et al.* Autologous stem cell transplantation with thiotepa-based conditioning in patients with systemic sclerosis and cardiac manifestations. *Rheumatology (Oxford)* **53**, 919-922, (2014).
 - 107 McInnes, I. B. & Schett, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* **389**, 2328-2337, (2017).
 - 108 Wang, C. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor promotes osteosarcoma growth and lung metastasis through activating the RAS/MAPK pathway. *Cancer Lett.* **403**, 271-279, (2017).

- 109 Coughlin, J. J., Stang, S. L., Dower, N. A. & Stone, J. C. The role of RasGRPs in regulation of lymphocyte proliferation. *Immunol. Lett.* **105**, 77-82, (2006).
- 110 Hashimoto, T. *et al.* Aberrant splicing of the hRasGRP4 transcript and decreased levels of this signaling protein in the peripheral blood mononuclear cells in a subset of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R154, (2011).
- 111 Golinski, M. L. *et al.* Dysregulation of RasGRP1 in rheumatoid arthritis and modulation of RasGRP3 as a biomarker of TNFalpha inhibitors. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 382, (2015).
- 112 Kono, M. *et al.* Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and controls their proliferation. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 396-407, (2015).
- 113 Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J. & Weissman, D. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J. Immunol.* **172**, 6545-6549, (2004).
- 114 Clyde-Smith, J. *et al.* Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor. *J. Biol. Chem.* **275**, 32260-32267, (2000).
- 115 Stefanini, L. & Bergmeier, W. CalDAG-GEFI and platelet activation. *Platelets* **21**, 239-243, (2010).