

図2：腎由来ICの10%SDS-PAGE. レーン1-4、IC；レーン5-8、腎粗抽出液。矢頭はASSを示す。レーン1はNuc-KO, レーン3は野生型を示す。

Titers of serum anti-ASS IgG antibody

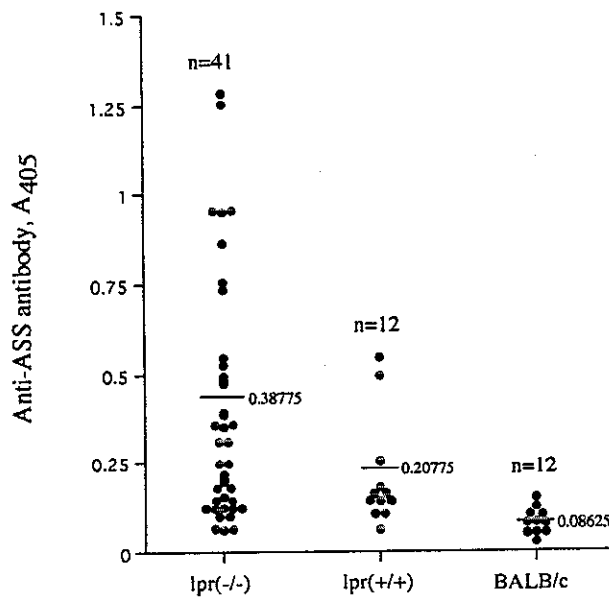


図3：各マウスの血清抗rASS抗体価。*lpr*(-/-)、Nuc-KO;*lpr*(+/+)、野生型。血清希釈 1:100

14. 血管炎におけるストレス蛋白 150-kD oxygen-regulated protein (ORP150) の発現

塚本 吉胤 (国立循環器病センター臨床検査部病理)

由谷 親夫 (国立循環器病センター臨床検査部病理)

KEYWORD=低酸素、ストレス蛋白、大動脈炎

[目的] ORP150は、低酸素負荷ラット・アストロサイトよりクローニングされたストレス蛋白であり、ヒト ORP150は、ラットと高い相同性を有している。さらに生体では、マウスの脳虚血巣およびヒト動脈硬化巣のマクロファージおよびヒト乳癌での発現が報告されている。以上より、ORP150は、生体内において低酸素に代表されるエネルギー障害の示標となると考え、血管病変における発現を組織学的に検討した。[方法] 急性期大動脈解離4例、大動脈炎7例を対象とし、抗ヒトORP150抗体で免疫染色を行った。[結果] 急性期大動脈解離例では、中膜平滑筋細胞に著明なORP150免疫原性をみた。大動脈炎例では、急性期大動脈解離例ほど著明ではなかったが、血管壁に浸潤している炎症細胞の一部とその近傍の中膜平滑筋に免疫原性をみた。[総括] 大動脈炎では、炎症に伴い血管の細胞のエネルギー障害が起きている可能性がある。

Expression of 150-kD oxygen-regulated protein (ORP150) in surgical specimen of patients with Takayasu's disease

Tsukamoto Yoshitane, Yutani Chikao (National Cardiovascular Center, Department of Pathology)

[Purpose] 150-kD oxygen-regulated protein (ORP150) was first described with reference to the central nervous system in cultured astrocytes subject to severe hypoxia. Subsequently its transcript was found in macrophages within human atherosclerotic plaques, suggesting a role in protecting cells under hypoxic stress. In a mouse model of permanent focal brain ischemia, ORP150 message and antigen were enhanced in the center of ischemic lesions, while other stress

proteins were induced around the ischemic core. We further investigate the expression of ORP150 antigen in human cancers by the immunohistochemical method. We detected the antigenicity in human cancers (breast, thyroid, and pancreas) with the consistent expression of ORP150 message. These data above led us to the speculation that in the aortic wall of Takayasu's disease severe stress response may occur and then ORP150 may be the marker of the severely damaged tissue. [Method] We selected surgical and autopsy specimen of 4 cases of acute aortic dissection and 7 cases of Takayasu's disease. We developed polyclonal anti-human ORP150 antibody raised against about the half of human ORP150 polypeptides from amino acid terminal. The specificity of the antibody was confirmed as described in our previous study. We tried to investigate the antigenicity in the specimen above by the immunohistochemical method. [Results] We detected very prominent antigenicity through the aortic medial layer in samples from acute aortic dissection. Although the expression of ORP150 antigen in samples from Takayasu's disease is not so evident as that in samples from acute aortic dissection, we detected ORP150 antigen in the surgical and autopsy specimen from Takayasu's disease. The antigenicity of ORP150 in samples from the aortic walls of Takayasu's disease was expressed in partial smooth muscle cells around the severely damaged aortic tissue. [Conclusion] The expression of ORP150 antigenicity in the aortic wall of Takayasu's disease may show the possibility of severe stress response of the aorta.

【はじめに】 従来より固形腫瘍は、血流があまり豊富でないにも係わらず治療に抵抗性を示すことが知られている。放射線基礎医学の分野では、それは腫瘍の虚血部位あるいはその周辺で虚血に耐性を獲得するような機序が働くためと考えられた。Sutherlandらは腫瘍におけるその様な耐性の獲得は、虚血耐性を起こす蛋白の新生によりおこるとの考えから、そのような蛋白をOxygen-regulated proteins (ORPs)と呼ぶことを提唱した¹⁾。そして様々な腫瘍細胞に低酸素をかけ、分子量にして33, 78, 94, 150 kDaの蛋白が誘導されることを確認した。そこで我々はラットのアストロサイトに低酸素をかけることにより同様の分子量の蛋白の誘導を確認し、それぞれの蛋白の同定を試みた。その結果、前3者はそれぞれheme oxygenase-1, GRP78, GRP94であることが判明した。また150 kDaの蛋白 (ORP150)は新規の蛋白であることが判明し、その全長のクローニングを開始した。その結

果、ORP150は、GRP (glucose-regulated protein) familyに属し、細胞内では小胞体に局在し、少なくとも初代培養系では低酸素に特異的誘導がみられるストレス蛋白であることがわかった²⁾。現在までにラット及びヒトのORP150のcloningに成功したが^{2, 3)}、他の種でのhomologueとして、GRP170・CBP-140・Lhs1pが報告されている。GRP170は、SubjeckらがCHO cellよりGRP familyとしてcloningしたものである^{4, 5)}。また、同時にGRP170は、イヌの膵臓から抽出したmicrosomeを用いた蛋白輸送系で、ATPに最も効率的に結合し蛋白の小胞体内への輸送に関する蛋白として報告された⁶⁾。また、小胞体内で他のchaperone (GRP78, GRP94など) と会合し蛋白のmaturationに関与しているとの報告もある⁷⁾。また、LHS1 (Luminal HSP Seventy¹⁾)は、Yeast genome projectで新規のHSP70 familyに属する遺伝子として発見されたものであり、Lhs1pとGRP170とは顕著な相同性を有していることがわかっている⁸⁾。CBP-140は、140 kDa calcium binding proteinとして、mouse teratomaのCell lineであるF9 embryonal carcinoma cell cDNA expression libraryよりcloningされたものである⁹⁾。臨床的には、さまざまな虚血負荷時におけるORP150の発現に関心もたれる。そこで脳虚血モデルでのORP150の発現を検討した。マウス脳虚血モデルでは、高度に障害された神経細胞に著明な発現をみた。しかし、その発現形式は他のストレス蛋白のそれと異なり、転写レベル以降で虚血中心部で著明に持続性に発現をみた¹⁰⁾。また動脈硬化巣におけるマクロファージにおけるORP150の発現も報告されている¹¹⁾。またORPsは腫瘍から提唱された概念であることより原点に戻って腫瘍におけるORP150の発現の検討を行った。ヒト乳癌をまず対象とした。その結果、腫瘍組織にて蛋白・メッセージレベルの著明な発現の上昇を認めた。その傾向は甲状腺癌および膵癌でも認められた。更に組織学的検討においては旧来の提唱されていた概念とは異なり、cancer nestよりも間質に浸潤している腫瘍細胞に強い発現をみた¹²⁾。この知見は癌の生物学を考える上で非常に重要であると考え。腫瘍細胞におけるORP150発現を人為的に調節してそれが、どのような意義をもっているかを検討する必要性がでてきた。強制発現させても、定常状態の発現に変化は認められず、むしろストレス条件下における発現が、強く起こることが判明した。そして、低酸素条件下で誘導される細胞死をORP150が抑制する作用があることが判明した¹³⁾。以上より、ORP150は、生体内において低酸素に代表されるエネルギー障害の示標となると考え、血管病変における発現を組織学的に検討した。【方法】 急性期大動脈解離4例、大動脈炎7例を対象とし、抗ヒトORP150抗体で免疫染色を行った。【結果】 急性期大動脈解離例では、中膜平滑筋細胞に著明なORP150免疫原性をみた。大動脈炎例では、急性期大動脈解離例ほど著明ではなかったが、血管壁に浸潤している炎症細胞の一部とその近傍の中膜平滑筋に免疫原性をみた。【総括】 大動脈炎では、炎症に伴い血管の細胞のエネ

ルギー障害が起きている可能性がある。

[参考文献]

- 1) Heacock CS, Sutherland RM: Induction characteristics of oxygen regulated proteins. *Int J Oncology Biol Phys* 1986;12:1287-1290.
- 2) Kuwabara K, Matsumoto M, Ikeda J, Hori O, Ogawa S, Maeda Y, Kitagawa K, Imuta N, Kinoshita T, Stern DM, Yanagi H, Kamada T: Purification and characterization of a novel stress protein, the 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain. *J Biol Chem* 1996;271:5025-5032.
- 3) Ikeda J, Kaneda S, Kuwabara K, Ogawa S, Kobayashi T, Matsumoto M, Yura T, Yanagi H: Cloning and expression of cDNA encoding the human 150 kDa oxygen-regulated protein, ORP150. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:94-99.
- 4) Lin HY, Masso-Welch P, Di YP, Cai JW, Shen JW, Subject JR: The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. *Mol Biol Cell* 1993;4:1109-1119.
- 5) Chen X, Easton D, Oh HJ, Lee-Yoon DS, Liu X, Subject J: The 170 kDa glucose regulated stress protein is a large HSP70-, HSP110-like protein of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 1996;380:68-72.
- 6) Dierks T, Volkmer J, Schlenstedt G, Jung C, Sandholzer U, Zachmann K, Schlotterhose P, Neifer K, Schmidt B, Zimmermann R: A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1996;15:6931-6942.
- 7) Kuznetsov G, Chen LB, Nigam SK: Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1997;272:3057-3063.
- 8) Craven RA, Egerton M, Stirling CJ: A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J* 1996;15:2640-2650.
- 9) Naved AF, Ozawa M, Yu S, Miyauchi T, Muramatsu H, Muramatsu T: CBP-140, a novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with a carboxy-terminal NDEL sequence showed partial homology with 70-kDa heat shock protein

(hsp70). Cell Struct Funct 1995;20:133-141.

10) Matsushita K, Matsuyama T, Nishimura H, Takaoka T, Kuwabara K, Tsukamoto Y, Sugita M, Ogawa S: Marked, sustained expression of a novel 150-kDa oxygen-regulated stress protein, in severely ischemic mouse neurons. Brain Res Mol Brain Res 1998; 60 :98-106.

11) Tsukamoto Y, Kuwabara K, Hirota S, Ikeda J, Stern D, Yanagi H, Matsumoto M, Ogawa S, Kitamura Y: 150-kD oxygen-regulated protein is expressed in human atherosclerotic plaques and allows mononuclear phagocytes to withstand cellular stress on exposure to hypoxia and modified low density lipoprotein. J Clin Invest 1996;98:1930-1941.

12) Tsukamoto Y, Kuwabara K, Hirota S, Kawano K, Yoshikawa K, Ozawa K, Kabayashi T, Yanagi H, Stern D, Tohyama M, Kitamura Y, Ogawa S: Expression of the 150-kd Oxygen-Regulated Protein in Human Breast Cancer. Lab Invest 1998;78:699-706.

13) Ozawa K, Kuwabara K, Tamatani M, Takatsuji K, Tsukamoto Y, Kaneda S, Yanagi H, Stern DM, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Ogawa S, Tohyama M: 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. J Biol Chem 1999;274:6397-6404.

平成10年度業績

1. Tsukamoto Y, Kuwabara K, Hirota S, Kawano K, Yoshikawa K, Ozawa K, Kabayashi T, Yanagi H, Stern D, Tohyama M, Kitamura Y, Ogawa S: Expression of the 150-kd Oxygen-Regulated Protein in Human Breast Cancer. Lab Invest 1998;78:699-706.

2. Matsushita K, Matsuyama T, Nishimura H, Takaoka T, Kuwabara K, Tsukamoto Y, Sugita M, Ogawa S: Marked, sustained expression of a novel 150-kDa oxygen-regulated stress protein, in severely ischemic mouse neurons. Brain Res Mol Brain Res 1998;60:98-106.

3. Ozawa K, Kuwabara K, Tamatani M, Takatsuji K, Tsukamoto Y, Kaneda S, Yanagi H, Stern DM, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Ogawa S, Tohyama M: 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. J Biol Chem 1999;274:6397-6404.

15. 全身性エリテマトーデスにおける T細胞 ζ鎖発現と 血管炎症状との関連について

津坂憲政 (埼玉医科大学総合医療センター第二内科)

小野田夏子 (埼玉医科大学総合医療センター第二内科)

Pang Ming (埼玉医科大学総合医療センター第二内科)

吉本桂子 (埼玉医科大学総合医療センター第二内科)

安倍 達 (埼玉医科大学総合医療センター第二内科)

竹内 勤 (埼玉医科大学総合医療センター第二内科)

KEYWORD=血管炎、全身性エリテマトーデス、TCR ζ鎖、スプライシング異常

[目的] 全身性エリテマトーデス(SLE) に血管炎症状が合併することか知っている。

これまで我々は、SLE患者T細胞ではT cell Receptor ζ鎖(ζ鎖)の発現が低下していることを報告してきた(Int. Immunol., 1998, J. Autoimmunity, 1998)。そこで今回、SLE患者T細胞におけるζ鎖発現の程度と、血管炎を含めた116項目の臨床所見との関連性を検討した。

[方法・結果] SLE患者21例を対象とし、ζ鎖発現は抗CD3 抗体を用いたwesternblot 法でdensitometerにより定量化したところ、抗リン脂質抗体陽性例では有意($p<0.009$) にζ鎖の発現が低下し、また血管炎合併例でも同様の傾向 ($p=0.100$) が認められた。さらに、ζ鎖 mRNA をRT-PCR法で解析したところ、このようなζ鎖発現低下例ではexon 8 上の560bp がスプライストされた短いζ鎖mRNA が優位であった。[考察]SLE患者において末梢血T細胞 ζ鎖発現低下か抗リン脂質抗体および血管炎症状に関与し、ζ鎖mRNAのsplicing異常がこのようなζ鎖発現低下に結びつく可能性が示唆された。

Relationship between T cell receptor ζ chain expression and vasculitis in patients with systemic lupus erythematosus

Kensei Tsuzaka (Dept. of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School)

Natsuko Onoda (Dept. of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School), Pang

Ming (Dept. Internal Medicine,Saitama Medical Center,Saitama Medical School), Keiko Yoshimoto (Dept.of Internal Medicine,Saitama Medical Center, Saitama Medical School),Tohru Abe (Dept.of Internal Medicine, Saitama Medical Center,Saitama Medical School),Tsutomu Takeuchi (Dept. of Internal Medicine,Saitama Medical Center, Saitama Medical School)

[Objective] Systemic lupus erythematosus (SLE) is well known to be accompanied by the vasculitic phases. We have recently reported that peripheral blood T cell receptor ζ chain (ζ chain) expression in SLE patients is down-regulated or missing (Int. Immunol.,1998, J.Autoimmunjty, 1998). In this study,we investigated the relationship between the ζ chain expression and the clinical findings presented in 21 SLE patients. Also we analyzed the 3'UTR of the ζ chain mRNA because the mRNA 3'UTR is known to be related to the stability of mRNA.

[Methods] Expression of the ζ chain was quantified by the westernblot using anti-CD3 antibody and densitometer. ζ chain mRNA 3UTR was analyzed by RT-PCR and the direct sequencing.

[Results] ζ chain expression in patients with anti-phospholipid antibodies ($p=0.009$) and in those with vasculitis ($p<0.100$) was decreased compared with those without the findings. In most these patients, 560bp-short ζ chain mRNA3'UTR was dominant compared with normal 3'UTR.

[Conclusion] It is possible that the decreased expression of the ζ chain is corresponding to the anti-phospholipid antibodies or vasculitic phase in SLE patients. We could conclude that aberrant splicing of the ζ chain mRNA may lead the decreased expression of the ζ chain.

【はじめに】

全身性エリテマトーデス(SLE)は、全身性の自己免疫疾患であり、血管炎や抗リン脂質抗体症候群が合併することが知られている。しかしその病因に関してはいまだ不明な点が多い。これまで、SLE患者では末梢血T細胞の機能が低下していること、そしてT細胞受容体(TCR)を含むT細胞表面抗原レセプターからのシグナル伝達に何らかの異常が存在し、これらがSLE発症に関与する可能性が報告されてきた。一方、TCR ζ 鎖(ζ 鎖)はTCR構成成分の一つで、T細胞が抗原認識を行った後にそれを細胞内にシグナル伝達する上で重要な役割を担っている膜タンパクであることが知られている。 ζ 鎖細胞内ドメインにはITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) と呼ばれるシグナル伝達に重要な部位が3ヶ所(ITAM1・ITAM2・ITAM3)存在し、その中でもとくにITAM2とITAM3は細胞内チロシンキナーゼの一つであるZAP-70が結合しシグナル伝達をする上で重要な部位として知られている。最近になり我々は、SLE患者末梢血T細胞では ζ 鎖の発現が低下あるいは欠損しているために細胞内のシグナル伝達に異常を来すことを報告した¹⁾。すなわち、 ζ 鎖を

免疫沈降しそのチロシンリン酸化を比較すると、約70%のSLE患者で活動性の有無に関わらずζ鎖のチロシンリン酸化が低下あるいは消失していること、ζ鎖のタンパク発現をwestern blot法で調べると67%のSLE患者でζ鎖発現が低下あるいは欠損していることがわかった。さらに、多くのSLE患者ではζ鎖mRNAにも異常が存在することも報告してきた²⁾。すなわち、ζ鎖mRNAのヌクレオチド配列を検討すると、健常人、強皮症患者の末梢血T細胞のζ鎖mRNAには全く異常は認められなかったが、多くのSLE患者T細胞ではζ鎖mRNAにはアミノ酸置換を伴うpoint mutation等の異常があり、しかもそのmutationはζ鎖のITAM3ドメインあるいはGTP/GDP結合部位に集中していた。その中には、ζ鎖mRNAのexon 7に相当する部位を欠損するものも存在した。

これまで我々は、open reading frameを中心にζ鎖の解析を行ってきたがSLE患者T細胞でのζ鎖のタンパクレベルでの発現低下や欠損がζ鎖mRNAの発現低下に伴うものであることも予想されたため、本研究では、ζ鎖mRNAの安定性にも関与する3' untranslated region (3' UTR)に着目し、SLE患者末梢血T細胞におけるζ鎖発現の程度と血管炎との関連性を検討した。

【対象・方法】

1) 対象

埼玉医科大学総合医療センター第2内科を受診したSLE患者21例を対象とし、強皮症(SSc)患者3例と健常人10例を陰性コントロールとした。

2) 統計学的方法

臨床所見・検査所見116項目(SLEの改訂分類基準とSSc分類予備基準,多発性筋炎/皮膚筋炎ならびに混合性結合組織病の各診断基準に記載されている53項目,および同SLE,SSc基準作成のための調査項目に記載されている63項目)それぞれの陽性群と陰性群でのζ鎖発現程度を比較した。さらに、ζ鎖発現程度とSLEDAI,ならびにステロイドホルモン投与量との相関関係を検討した。

3) ζ鎖発現の定量化

末梢血よりFicoll法を用いてリンパ球分画を抽出し、lysate bufferを用いて細胞を破碎後10,000gで10分間遠心し上清を抗原抽出液として用いた。次に抗原抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動させ、ニトロセルロース膜に電気的に転写させた。ニトロセルロース膜をブロッキング液でブロックさせた後、ζ鎖発現を抗CD3抗体を用いたwestern blot法でdensitometerにより定量化した。

4) ζ鎖cDNA RT-PCR 法

末梢血よりFicoll法を用いてリンパ球分画を抽出し、抽出したリンパ球からmRNA purification kit (Pharmacia 社)を用いて全mRNAを抽出した。次に、全mRNA 1μgをreverse transcriptase (Clontech社)を用いて一本鎖cDNAに変換後、DNA polynucleotidekinase により二本鎖cDNAに変換した。さらに、変換した全 cDNA を鋳型DNAとして、ζ鎖cDNA 3'UTRをPCR 法により増幅した。

5) ζ鎖Genomic DNA シークエンシング

末梢血リンパ球よりgenomic DNA purification kit (Promega社)を用いて全genomic DNAを抽出した。次にζ鎖cDNA 3'UTR 相当部位を増幅できるようにプライマーを設定し、その部位のζ鎖genomic DNAを全genomic DNAからPCR 法で増幅した。そして増幅したgenomic DNAをTA ベクターにライゲートし、得られたTAベクターに含まれるgenomic DNAのヌクレオチド配列をautosequencer で決定した。

【 結果】

SLE患者末梢血T細胞におけるζ鎖発現程度をwestern blot 法で健常人と定性的に比較検討すると、21 例中14 例のSLE 患者でζ鎖の発現が低下していた。さらに、臨床所見・検査所見116 項目の有無によってζ鎖発現に差があるかどうかをwestern blot 法で定量的に検討したところ、ζ鎖の発現は、顔面紅斑陽性群(p = 0.005)、抗リン脂質抗体陽性群(p=0.009)では陰性群と比較し有意に低下し、また血管炎合併群でも同様の傾向(p=0.001)が認められた。しかし、腎症(p=0.553)、中枢神経症状(p=0.833)、多関節炎(p=0.280)、ディスコイド疹 (p=0.283) とζ鎖発現程度にはそれぞれ有意差は認められなかった。次に、ζ鎖発現程度と、SLEDAI あるいはステロイドホルモン投与量との相関関係を検討した結果、ζ鎖発現程度とSLEDAIあるいはステロイドホルモン投与量との間には有意な相関関係は認められなかった。

つぎに、SLE患者末梢血T細胞ζ鎖mRNAの3'UTR をRT-PCR法で解析した。5'プライマーはexon 7 の3'側に、3'プライマーはexon 8 の3'側に設定したものを用い、ζ鎖cDNAの3'UTR を、末梢血リンパ球より抽出した全mRNAを変換した全cDNAを鋳型DNAとしてPCR法により増幅した。増幅したcDNAをアガロースゲル電気泳動で確認したところ、検出できた10例中7例のSLE 患者で、T細胞ζ鎖mRNAの3'UTR 上の560bp がスプライスアウトされた短いζ鎖mRNAが正常ζ鎖mRNAと比較し侵位に認められた。いっぽう、陰性コントロールとした10例の健常人・3例のSSc 患者ではこの3'UTR に異常は認められなかった。さらに興味あることに、560bpのスプライスアウトされた領域の5'および3'側は、本来splicing acceptor

siteとsplicing donor siteに相当する部位であった。また、スプライスアウトされた短い鎖mRNAが有意に認められたSLE患者7例中5例は、鎖のタンパクレベルでの発現が低下していた。次に我々は、この鎖mRNAの3'UTRに相当するgenomic DNAをPCR法で増幅し、TAベクターにライケートし、得られたTAベクターに含まれるgenomic DNAのヌクレオチド配列をautosequencerで検討したが、Genomic DNAのヌクレオチド配列には異常は認められなかった。

【考察】

SLEに代表される臓器非特異的自己免疫疾患において末梢血T細胞は、AMLRやConAなどに対する反応が低下し、さらに抗CD3抗体刺激に伴うカルシウム動員が低下し、細胞増殖反応やIL-2産生も低下していることが以前から明らかにされていた³⁾。またSLE患者末梢血T細胞機能不全は、フォルポールエステルでPKCを直接活性化することで是正される⁴⁾ことから、機能不全の原因はTCRからPKCまでの経路に存在することがこれまで指摘されてきた。SLEモデル動物のMRL/lprマウスで(CD2⁻CD4⁻CD8⁻CD3⁺, α/β ⁺T細胞(double negative: DN T細胞)は、TCRの架橋スーパー抗原刺激に低応答であることが示されてきた。その機序として、TCR β からのシグナル伝達に欠陥がある可能性が想定されていた。最近になり我々は、TCR ζ を免疫沈降しそのチロシンリン酸化を比較すると、約70%のSLE患者で活動性の有無に関わらず鎖のチロシンリン酸化が低下あるいは消失していること、鎖のタンパク発現をwestern blot法で調べると67%のSLE患者で鎖発現が低下あるいは欠損していることを報告¹⁾し、このような鎖の発現低下が、SLE発症病因と何かの関連があることがわかってきた。SLEにおける血管炎あるいは抗リン脂質抗体陽性例では、血管内皮細胞における接着分子の活性化がこれまで指摘されてきた。いっぽう、鎖の発現が低下しているSLE患者T細胞では、種々の接着分子等のco-stimulatory pathwayが異常に活性化されることが予想でき、今回の検討で抗リン脂質抗体陽性例や血管炎合併例で鎖発現が低下していたことから、鎖発現低下に伴うシグナル伝達異常によって活性化された接着分子によりこのような血管炎様病態が惹起されている可能性が示唆された。また分子生物学的には、このようなSLE患者T細胞では短い3'UTRを持ち不安定な鎖mRNAか何らかのsplicing異常にともなって出現するために鎖発現が低下し、細胞内のシグナル伝達に異常を来す可能性も示唆された。

【参考文献】

1. Takeuchi T, et al. TCR ζ chain lacking exon 7 in two patients with systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* 10: 911, 1998
2. Tsuzaka K, et al. Mutations in T cell receptor ζ chain mRNA of peripheral T cells from systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmunity* 11: 381, 1998
3. Samelson, L.E. et al. An abnormal tyrosine phosphorylation on T cell receptor in lymphoproliferative disorders. *Nature*, 324: 674, 1986
4. Huang, Y.P. et al. The interleukin 2 secretion defect in vitro in systemic lupus erythematosus is reversible in rested cultured T cell. *J. Immunol.* 137: 3515, 1986

【研究業績】

1. Tsuzaka K, Takeuchi T, Onoda N, Pang M, Abe T. Mutations in T cell receptor ζ chain mRNA of peripheral T cells from systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmunity* 11: 381-385, 1998
2. Takeuchi T, Tsuzaka K, Pang M, Amano K, Koide J, Abe T. TCR ζ chain lacking exon 7 in two patients with systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* 10: 911-921, 1998
3. Pang M, Abe T, Fujiwara T, Mori S, Tsuzaka K, Amano K, Koide J, Takeuchi T. Up-regulation of $\alpha E \beta 7$, novel integrin adhesion molecule, on T cells from systemic lupus erythematosus patients with specific epithelial involvement. *Arthritis Rheum.* 41: 1456-1463, 1998
4. Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, Takeuchi T. Lacrimal gland function, lymphocyte infiltration and apoptosis of lacrimal cells in Mikulicz's disease and Sjogren's syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (in press) 1999.
5. 天野宏一, 中林和宏, 津坂憲政, 竹内 勤, 小出 純, 安倍達。抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎を合併した慢性関節リウマチの1症例。 *リウマチ*. 38: 741-746, 1998
6. 津坂憲政, 竹内勤。チロシンフォスファターゼ SYP の T 細胞活性化における役割。 *臨床免疫*, 29: 1020-1023, 1997.
7. 津坂憲政。RA 臨床の Q & A. RA & セラピー, 3: 54-55, 1997
8. 津坂憲政。全身性エリテマトーデス, *リウマチ科*, 19: 25-29, 1998
9. 津坂憲政, 竹内勤。全身性エリテマトーデスにおける T 細胞と鎖。 *炎症と免疫*, 6: 41-46, 1998

16. Small vessel vasculitis における MMP の関与

亀山 香織 (慶應義塾大学医学部病理診断部)

大谷 吉秀 (慶應義塾大学医学部外科学)

木全 大 (慶應義塾大学医学部外科学)

岡崎 勲 (東海大学医学部地域保健学)

細田 泰弘 (慶應義塾大学医学部病理学)

KEYWORD =small vessel vasculitis, matrix metalloproteinase, gelatin zymography, film in situ zymography, immunohistochemistry

[目的] 細胞外マトリックス分解酵素であるMMP(matrix metalloproteinase)は現在まで17種が同定されており、各種病態との関連が研究されている。本研究では難治性血管炎における血管壁障害機序解明の一助として、本酵素との関連につき検討し、治療への応用を目指す。 [方法] 対象は、病理組織学的にleukocytoclastic vasculitisと診断した皮膚切除生検材料である。本年度は昨年陽性結果の得られた、血管壁の主要な構成成分であるIV型コラーゲン分解能を有するMMP-2および-9に着目しgelatin zymography、免疫染色、さらにfilm in situ zymographyを行い、病期との関連を調べた。 [結果]MMP-2あるいは-9の活性が認められる例が存在し、染色上、血管内皮細胞や線維芽細胞あるいは炎症細胞に蛋白の局在がみられた。film in situ zymographyでは病変部の血管に陽性所見が得られた。こうした活性は活動期の病変から得られた組織で高頻度確認された。 [総括] MMP-2および-9が本疾患における血管壁障害の病変成立に関与している可能性が示唆される。

Expression of matrix metalloproteinases in small vessel vasculitis

Kameyama Kaori (Division of Diagnostic Pathology, Keio University Hospital),

Otani Yoshihide (Department of Surgery, School of Medicine, Keio University),

Kimata Masaru (Department of Surgery, School of Medicine, Keio University),

Okazaki Isao (Department of Community Health, School of Medicine, Tokai University),

Hosoda Yasuhiro (Department of Pathology, School of Medicine, Keio University)

[Purpose] Expression and activity of MMPs in small vessel vasculitis were studied. [Method] Gelatin zymography, immunohistochemistry, and film in situ zymography were carried out in biopsied

specimens of the human skin diagnosed as leukocytoclastic vasculitis. [Results] 1) Active form of MMP-2 and -9 was detected by gelatin zymography and immunohistochemistry. 2) Gelatinolytic enzymes are detected in active lesions of vasculitis by film in situ zymography. [Conclusion] MMP-2 and -9 may play an important role in establishment of the lesion in small vessel vasculitis.

[はじめに]

細胞外マトリックス (ECM) は細胞を取り巻く環境物質であり、主な成分はコラーゲン・エラスチンなどの線維性タンパク、プロテオグリカンなどの複合糖質、フィブロネクチン・ラミニンなどの糖タンパクである。これらは組織支持としての機械的な役割だけでなく、代謝・増殖・分化などに深く関わっていることが知られるようになり、生体の発生・形態形成や炎症・腫瘍など各種病態との関係が解明されつつある。

一方、血管壁の主要なECM成分はコラーゲン・エラスチンであり、各種血管炎においてはECM分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の関与が想定される。

これまで我々は、ヒト皮膚血管炎を用いて主要なMMPsにつきその活性と局在の検討を行ってきたが、本年度はその病期との関連につき考察を加えた。

[対象と方法]

臨床的にanaphylactoid purpuraの診断のもとに生検し、病理組織学的にleukocytoclastic vasculitisと診断した14例の検体の凍結材料、およびホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。1)凍結材料を薄切した後、マイクロダイセクション法にて病変部のみを抽出した。これをホモジナイズし、ゼラチンザイモグラフィーを行った。2)パラフィン切片においては、MMP-2 (75-7F7)およびMMP-9 (56-2A4)の単クローン抗体を用いて、SAB法により免疫染色を行った。3)凍結材料を用いてfilm in situ zymographyを行った。

film in situ zymographyはmatrix degradation enzymeの活性および局在を同時に知ることができ、我々のグループでも現在改良を重ねている。これはgelatin薄膜をcoatしたポリエステルフィルムに凍結切片をのせ、incubateすることによって、gelatinolytic enzymeの活性部位ではgelatinが分解されその局在を明らかにできるものである。

[結果]

1. Film in situ zymography

small vessel vasculitisの病変が認められる部位でgelatinolytic activityがみられる（白く抜けた部分）。



図1. Film in situ zymography

2. Gelatin zymography, immunohistochemistry, film in situ zymographyの結果と病期との関係を図2に示す。

	寛解期	活動期	
MMP-2	latent form	+	-
	active form	--~+	-
	localization	neutrophils, fibroblasts	
MMP-9	latent form	--~+	-
	active form	--~+	-
	localization	fibroblasts	

図2. MMPと病期との関係

[考案]

生体を構成する蛋白の約3分の1はコラーゲンであり、血管壁、あるいは血管周囲組織にも各種コラーゲンが広く分布している。一方、コラーゲンは一般に蛋白分解酵素の影響を受けにくく、特異的分解酵素であるMMPが、血管炎における組織破壊時のマトリックス代謝に、重要な役割を担っていることが推測される。

MMPは現在まで17種類が同定されており、一次構造と基質特異性により5群に分類されている。このうち、昨年度は間質の主要構成成分であるIおよびIII型コラーゲンを基質とするMMP-1に着目し、その発現につき検討を行ったが、有意な所見を得ることができなかった。そこで、本年度は血管基底膜破壊に注目し、基底膜の主要構成成分であるIV型コラーゲンを分解するMMP-2および-9についての検討を試みた。その結果、一部の症例で、その発現および活性が確認され、発症初期の比較的activeなstageにおいてよりその程度が強い傾向が認められ、炎症の終息とともにこれらの酵素活性も消失する傾向がみられた。

本疾患にみられる壊死性血管炎の病因には、溶連菌あるいはvirus感染、薬剤（penicillin, erythromycin等）や食物（卵、ミルク等）に対するアレルギー、IgAを含む免疫複合体等が病因といわれている。壊死性血管炎で観察される血管壁障害は、こうした原因に加え直接マトリックスを分解する能力を有するMMP-2, -9がその成立に関与している可能性が示唆された。

我々の研究グループでは、これまで各種の疾患においてMMPsの発現を検討してきた結果、各MMPは疾患あるいは病期により、その産生細胞や発現量が異なることがわかってきた2)-10)。これらMMPは、1)各種サイトカインによる転写レベルでの調節、2)不活性化前駆体として分泌された後の活性化因子による制御、3)活性化MMPの抑制因子(TIMP)による制御といった3段階でコントロールされていることが知られている。従ってsmall vessel vasculitisにおいても多岐にわたるinteractionの存在が予想される。今回の検討から、film in situ zymographyも有用性が明らかとなったことで、現在さらに解像度を上げるべく改良を加えている。

[参考文献]

- 1) Otani Y, Yokoyama T, Sakurai Y, Igarashi N, Kimata M, Wada N, Kameyama K, Kubota T, Kumai K, Kitajima M: Role of matrix metalloproteinase in ulcer perforation. Yoshikawa T and Arakawa T, ed. Bioregulation and Its Disorders in the Gastrointestinal Tract. Blackwell Science Japan, 1998; 231-240
- 2) Kameyama K, Shibata T, Ito K, Hosoda Y, Fibril assay for type IV collagenolytic activity in papillary thyroid cancer tissue. *Thyroidol Clin Exp* 10: 159-161, 1998
- 3) Otani Y, Sakurai Y, Kameyama K, Igarashi N, Yokoyama T, Kubota T, Kumai K, Kitajima M : Matrix metalloproteinase gene expression in chronic gastric ulcer: a potential role of eosinophils in perforation. *J Clin Gastroenterol* 25(Suppl.1): S101-S104, 1997
- 4) Sakurai Y, Otani Y, Kameyama K, Igarashi N, Kubota T, Kumai K, Kitajima M : The role of stromal cells in the expression of interstitial collagenase(matrix metalloproteinase-1) in the invasion of gastric cancer. *J Surg Oncol* 66: 168-172, 1997
- 5) Ono Y, Fujii M, Kameyama K, Otani Y, Sakurai Y, Kanzaki J : Expression of matrix metalloproteinase-1(MMP-1) mRNA related to eosinophilia and Interleukin-5(IL-5) gene expression in head and neck tumor tissue. *Virchows Archiv* 431: 305-310, 1997
- 6) Sakurai Y, Otani Y, Kameyama K, Hosoda Y, Okazaki I, Kubota T, Kumai K, Kitajima M : Expression of interstitial collagenase(matrix metalloproteinase-1) in gastric cancers. *Jpn J Cancer Res* 88: 401-406, 1997
- 7) Okazaki I, Wada N, Nakano M, Saito A, Takasaki K, Doi M, Kameyama K, Otani Y, Kubochi K, Niioka M, Watanabe T, Maruyama K : Difference in gene expression for matrix metalloproteinase-1 between early and advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25: 580-584, 1997
- 8) Kameyama K : Expression of MMP-1 in the capsule of thyroid cancer - relationship with invasiveness. *Path Res Pract* 192 : 20-26, 1996
- 9) Otani Y, Sakurai Y, Igarashi N, Yokoyama T, Kubota T, Kumai K, Kitajima M, Kameyama K : Expression of matrix metalloproteinases and their possible role in the invasion of gastric cancer. *Recent Advances in Gastroenterological Carcinogenesis*. Monduzzi Editore, Bologna-Italy, 113-117, 1996
- 10) Sakurai Y, Otani Y, Kameyama K, Hosoda Y, Okazaki I, Kitajima M, Kubota T, Kumai K : Interstitial collagenase(matrix metalloproteinase 1) and 92kD gelatinase(matrix metalloproteinase 9) are expressed in stromal cells in gastric cancer. 1st International Gastric Cancer Congress. Monduzzi Editore, Bologna-Italy, 969-971, 1995
- 11) Otani Y, Okazaki I, Arai M, Kameyama K, Wada N, Maruyama K, Yoshino K, Kitajima M, Hosoda Y, Tsuchiya M : Gene expression of interstitial collagenase(matrix metalloproteinase-1) in

gastrointestinal tract cancers. *J Gastroenterol* 29: 391-397, 1994

[研究業績]

- 1) Kameyama K, Shibata T, Ito K, Hosoda Y, Fibril assay for type IV collagenolytic activity in papillary thyroid cancer tissue. *Thyroidol Clin Exp* 10: 159-161, 1998
- 2) Otani Y, Yokoyama T, Sakurai Y, Igarashi N, Kimata M, Wada N, Kameyama K, Kubota T, Kumai K, Kitajima M Role of matrix metalloproteinase in ulcer perforation. Yoshikawa T and Arakawa T, ed. *Bioregulation and Its Disorders in the Gastrointestinal Tract*. Blackwell Science Japan, 1998; 231-240
- 3) Kameyama K, Kuramochi S, Ueda T, Kawada S, Tominaga N, Mimori T, Hata J-i Takayasu's aortitis with dissection in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*, in press
- 4) Kameyama K, Kuramochi S, Kamio N, Akasaka Y, Higa S, Hata J-i Isolated periarteritis nodosa of the spermatic cord presenting as a scrotal mass. *Heart Vessels*, in press
- 5) Otani Y, Sakurai Y, Kameyama K, Igarashi N, Yokoyama T, Kubota T, Kumai K, Kitajima M : Matrix metalloproteinase gene expression in chronic gastric ulcer: a potential role of eosinophils in perforation. *J Clin Gastroenterol* 25(Suppl.1): S101-S104, 1997
- 6) Sakurai Y, Otani Y, Kameyama K, Igarashi N, Kubota T, Kumai K, Kitajima M : The role of stromal cells in the expression of interstitial collagenase(matrix metalloproteinase-1) in the invasion of gastric cancer. *J Surg Oncol* 66: 168-172, 1997
- 7) Ono Y, Fujii M, Kameyama K, Otani Y, Sakurai Y, Kanzaki J : Expression of matrix metalloproteinase-1(MMP-1) mRNA related to eosinophilia and Interleukin-5(IL-5) gene expression in head and neck tumor tissue. *Virchows Archiv* 431: 305-310, 1997
- 8) Sakurai Y, Otani Y, Kameyama K, Hosoda Y, Okazaki I, Kubota T, Kumai K, Kitajima M : Expression of interstitial collagenase(matrix metalloproteinase-1) in gastric cancers. *Jpn J Cancer Res* 88: 401-406, 1997
- 9) Okazaki I, Wada N, Nakano M, Saito A, Takasaki K, Doi M, Kameyama K, Otani Y, Kubochi K, Niioka M, Watanabe T, Maruyama K : Difference in gene expression for matrix metalloproteinase-1 between early and advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25: 580-584, 1997
- 10) Nakamura Y, Mashima Y, Kameyama K, Mukai M, Oguchi Y : Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 81: 308-313, 1997

17. SLE 症例の心筋内血管の病理学的検討

居石克夫 (九州大学医学部第一病理)

中島 豊 (九州大学医学部第一病理)

野中大輔 (九州大学医学部第一病理)

増野年彦 (九州大学医学部第一病理)

KEYWORDS: SLE, 心筋内線維化, 血栓症, 抗リン脂質抗体, 血管炎

【研究要旨】 SLE の症例では心機能異常を示すものが認められるが、その病理学的検索は不十分である。今回我々は SLE の症例の心臓を中心に病理学的検索を行い、検査データとの関連を検索した。対象は SLE の剖検例 23 例(17-83 歳, 平均 43.5 歳)で、心臓は僧坊弁から約 2cm と 5cm 下部の全断面で組織学的検索をおこなった。その結果 23 例中 16 例の左心室心筋内に 1ヶ所から 148ヶ所までの線維化巣を認めた。また、その 16 例中 6 例に抗リン脂質抗体が認められた。一方、23 例中 6 例の心筋内小血管に血栓が認められ、そのうち 4 例は血栓が多発し心筋内小線維化巣を伴っていた。血管炎は 2 例に認められたが、小線維化巣は認められないか、少数認めるのみであった。以上のように SLE では高頻度に心筋内の小線維化巣が認められるが、その発生には抗リン脂質抗体ならびに心筋内小血管の血栓が関与していることが示唆される。

Pathological Study of Intramyocardial Blood Vessels in SLE Patients

Katsuo Sueishi (First Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyushu University)

Yutaka Nakashima (First Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyushu University)

Daisuke Nonaka (First Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyushu University)

Toshihiko Mashino (First Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyushu University)

[Purpose] In the present study, a correlation between pathological findings of the heart and laboratory findings was investigated in SLE patients. [Methods] In 23 autopsy cases of SLE patients, aging from 17 to 83 years (mean 43.5), ventricular myocardium was transversely cut in the level below 2 and 5 cm from mitral valve and cut surfaces were histologically examined. [Results] Intramyocardial fibrosis was found in the left ventricle in 16 cases. Of the 16 cases, antiphospholipid antibody was present in 6 cases. Thrombosis was found in intramyocardial small vessels in 6 of 23 cases, and 4 of these which demonstrated multiple thromboses were associated with intramyocardial fibrosis. Necrotizing angiitis was present in 2 cases and they were not or only minimally associated with fibrosis. [Conclusion] These results suggested that intramyocardial fibrosis occurs frequently in SLE patients and antiphospholipid antibody and thrombosis may relate to the pathogenesis.

【研究目的】SLE 症例に見られる心臓の異常としては、以前は Libman-Sacks 心内膜炎がその代表的なものであったが、最近では虚血性心臓病や左心機能異常など多彩な病像を呈する事が知られるようになってきた。しかし、SLE 症例の心臓の病理学的検索は不十分であり、心筋梗塞や心筋炎が起こりうる事が僅かに報告されているにすぎない。本研究では SLE の剖検例を用いて心臓を中心とした病理学的検索を行い、形態学的異常と臨床症状ならびに検査データとの関連を検索することを目的とした。

【研究方法】1. 症例：検索したSLEの剖検例は23例で、年齢は17から83歳（平均年齢 43.5歳、男性5例、女性18例）であり、臨床的には明らかな心症状は呈していなかった。対照として年齢ならびに性を合わせた剖検例23例を用いた。心臓は僧帽弁より下2cmと5cmの心室の横断面全面を組織切片に作製した。心外膜の冠状動脈はAHAのsegment分類に準拠し、14ヶ所を切り出した。また、腎、肺など全身の他臓器についても検索を行った。組織切片はそれぞれHE, Elastica van Gieson, Masson trichrome 染色を行った。

2. 組織学的検索：組織学的には心筋の変化や、心外膜ならびに心筋内の血管の変化に注目した。また冠状動脈全体の動脈硬化の程度を、fatty streakとadvanced lesionの数によって6段階に分類した。

3. 臨床検査項目：抗核抗体や抗リン脂質抗体（抗カルジオリピン抗体、Lupus anticoagulant）の有無、心機能検査などに注目し、組織学的変化との関連を検討した。

【結果と考察】1. 心筋内線維化巣：SLEの症例23例中の16例に心筋内に線維化（figure 1）が認められ、その数は1から148ヶ所（平均±標準偏差 = 43.6 ± 45.6 ）であった（figure 2）。線維化の発生部位には特徴的なものはなく、多発しているものでは全周性に認められた。また、この線維化は心筋梗塞後の癒痕に見られるような膠原線維の多量の増加による線維化とは異なり、膠原線維の増加は軽度であり、心筋細胞の脱落を主体とするような病変であった。また、16例中3例には心内膜下梗塞が併発していた。一方、対照群にも線維化巣は認められたが、5症例に1から3ヶ所（平均±標準偏差 = 1.4 ± 0.9 ）の小線維化巣が見られるのみであった。

SLE の症例では冠状動脈硬化 (1) や心筋梗塞を認めることが知られるようになってきたが、心エコーやタリウムシンチで左室心筋の機能的な異常が認められることもいくつか報告されている(2, 3, 4)。しかし、その形態学的裏付けは心臓という臓器の特殊性から殆どなされていない。本研究で認められた心筋内線維化が心機能にどの程度影響を及ぼすかは明らかではないが、その病変の大きさや範囲など、上記の心エコーやシンチにおける機能異常との関連を考える上で興味深い。

2. 臨床検査所見と心筋内線維化との関連：SLE 症例 23 例中の 12 例は抗カルジオリピン抗体もしくは lupus anticoagulant、の検索がなされており、そのうち 6 例ではどちらかが陽性であった。また、その 6 例にはすべて心筋内線維化が存在し、それも多発するものが多かった（figure 3 左）。他の臨床検査所見に関しては特に線維化との関連は認められなかった。