

厚生省特定疾患
免疫疾患調査研究班

平成10年度研究報告書

平成11年3月

自己免疫疾患分科会

分科会長 宮坂信之

厚生省特定疾患
免疫疾患調査研究班
自己免疫疾患分科会

目 次

〔Ⅰ〕 構成員名簿

〔Ⅱ〕 総合研究報告

〔Ⅲ〕 総括研究報告

〔Ⅳ〕 分担研究報告

1. 接着分子MAdCAM-1の自己免疫疾患モデルおよび経口寛容成立への関与に関する研究 …… 9
宮坂 信之他（東京医科歯科大学 医学部 第一内科）
2. 膠原病患者におけるT細胞共刺激分子に対する自己抗体…………… 14
加藤 智啓他（聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター）
3. SLE患者の自己抗体産生におけるRAGsの役割 …………… 18
坂根 剛他（聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター）
4. 全身性エリテマトーデスでのX染色体不活化モザイク現象と自己反応性T細胞の選択 …………… 21
坂根 剛他（聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター）
5. SLE末梢血T細胞におけるTCRと鎖発現異常の機序に関する研究 …………… 24
竹内 勤他（埼玉医大総合医療センター 第二内科）
6. SLE患者末梢血リンパ球サブセットにおける細胞表面機能分子の発現と病態形成との関連性 …… 27
田中 良哉他（産業医科大学 医学部 第一内科）
7. 自己免疫疾患モデルマウスとB細胞アポトーシス異常 …………… 30
鏑田 武志他（東京医科歯科大学 難治疾患研究所 免疫疾患）
8. L-6シグナル伝達阻害によるループス腎炎の治療法の開発（Ⅲ）－SSI-1による
ヒトIL-6シグナルの制御の可能性の検討－ …………… 33
西本 憲弘他（大阪大学健康体育部 健康医学第一部門）
9. 特発性炎症性筋疾患における筋MRIの有用性の検討 …………… 39
原 まさ子他（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター）
10. 特発性炎症性筋疾患における筋細胞上のCD40分子の発現とその役割 …………… 43
原 まさ子他（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター）
11. 抗KS（アスパラギニルトRNA合成酵素）抗体の臨床および免疫遺伝学的特徴に関する研究 …… 48
平形 道人他（慶応義塾大学 医学部 内科）
12. 自己免疫疾患素因遺伝子としてのFcγRIIB1の役割 …………… 52
広瀬 幸子他（順天堂大学 医学部 病理学第二）

13. IgG抗カルジオリピン抗体測定系の標準となりうる、ヒトIgG型キメラ抗体の作成	55
小池 隆夫他 (北海道大学 医学部 第二内科)	
14. 抗プロトロンビン抗体の臨床的意義に関する研究	59
小池 隆夫他 (北海道大学 医学部 第二内科)	
15. シェーグレン症候群小唾液腺内のCD40/CD40ligandとBcl-2関連蛋白の発現に関する研究	64
江口 勝美他 (長崎大学 医学部 第一内科)	
16. FK506のRA滑膜細胞に対する作用	68
江口 勝美他 (長崎大学 医学部 第一内科)	
17. HTLV-I Taxの抗アポトーシス作用の検討FK506のRA滑膜細胞に対する作用	70
江口 勝美他 (長崎大学 医学部 第一内科)	
18. CD40-CD40L相互作用のブロックによるマウス自己免疫性病変の制御	74
菅井 進他 (金沢大学 血液免疫内科)	
19. ファージ・ディスプレイによる抗イデオタイプ抗体のエピトープ解析	78
菅井 進他 (金沢大学 血液免疫内科)	
20. SLEにおけるTh1・Th2関連サイトカインと病態に関する研究	81
橋本 博史他 (順天堂大学 膠原病内科)	
21. SLE患者活性化CD4陽性T細胞のTh1/Th2バランス	87
橋本 博史他 (順天堂大学 膠原病内科)	
22. 抗リン脂質抗体症候群全国調査の臨床的検討	92
橋本 博史他 (順天堂大学 膠原病内科)	
23. 抗リン脂質抗体症候群におけるT細胞エピトープの解析	122
松下 祥他 (熊本大学 大学院医学研究科 免疫識別学講座)	
24. 新しい免疫抑制剤FTY720とセラミド経口投与による自己免疫モデル (MRL-1pr/1pr)	
マウスの治療の試み	125
箕田 清次他 (自治医科大学 医学部 アレルギー膠原病科)	
25. 炎症性筋疾患患者における末梢CD8T細胞のクローン性増多の解析	130
上阪 等他 (東京医科歯科大学 医学部 第一内科)	
26. シェーグレン症候群改訂診断基準	135
藤林 孝司他 (濁協医科大学 口腔外科)	
[V] 研究成果の刊行に関する一覧表	139
[VI] シンポジウム・研究発表会プログラム	157

〔I〕 構成員名簿

自己免疫疾患

区 分	氏 名	所 属	職 名
分 科 会 長	宮 坂 信 之	東京医科歯科大学医学部第一内科	教 授
分 科 会 員	加 藤 智 啓	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 臨床遺伝部門	講 師
	竹 内 勤	埼玉医科大学総合医療センター第二内科	教 授
	坂 根 剛	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 病因免疫部門	〃
	田 中 良 哉	産業医科大学第一内科	講 師
	鐙 田 武 志	東京医科歯科大学難治疾患研究所 ウイルス・免疫疾患研究部門	教 授
	西 本 憲 弘	大阪大学健康体育部健康医学第一部門	助 教 授
	原 まさ子	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	教 授
	平 形 道 人	慶應義塾大学医学部内科リウマチ研究室	助 手
	広 瀬 幸 子	順天堂大学医学部第二病理	助 教 授
(監 事)	小 池 隆 夫	北海道大学医学部第二内科	教 授
研 究 協 力 者	江 口 勝 美	長崎大学医学部第一内科	教 授
	菅 井 進	金沢医科大学総合医学研究科 難治疾患研究部門	〃
	橋 本 博 史	順天堂大学医学部膠原病内科	〃
	松 下 祥	熊本大学大学院医学研究科 脳免疫統合科学系・免疫識別学	助 教 授
	簗 田 清 次	自治医科大学アレルギー膠原病科	教 授
(基 礎 班)	稲 葉 宗 夫	関西医科大学医学部	講 師
	北 村 大 介	東京理科大学生命科学研究所	教 授
	佐 伯 行 彦	大阪大学医学部第三内科	助 手
	白 澤 専 二	九州大学生体防御医学研究所	〃
	住 田 孝 之	筑波大学医学専門学群臨床医学系	教 授
	永 井 正 規	埼玉医科大学公衆衛生学	〃
(難 病 特 別 研 究 員)	上 阪 等	東京医科歯科大学医学部第一内科	助 手
(事 務 局) 経理事務連絡担当責任者	上 阪 等	東京医科歯科大学医学部第一内科 〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45 TEL (03) 5803-5209 FAX (03) 5684-0057	助 手

〔Ⅱ〕 総合研究報告

総合研究報告

特定疾患免疫疾患調査研究班 自己免疫疾患分科会

主任研究者	宮坂信之（東京医科歯科大学 医学部）
分担研究者名	小池隆夫（北海道大学）
	加藤智啓（聖マリアンナ医科大学）
	上阪 等（東京医科歯科大学）
	竹内 勤（埼玉医科大学）
	広瀬幸子（順天堂大学）
	坂根 剛（聖マリアンナ医科大学）
	田中良哉（産業医科大学）
	鏑田武志（東京医科歯科大学）
	原 まさ子（東京女子医科大学）
	平形道人（慶応大学）
	西本憲弘（大阪大学）
	江口勝美（長崎大学）
	橋本博史（順天堂大学）
	松下 祥（熊本大学）
	簗田清次（自治医科大学）
	菅井 進（金沢医科大学）

【研究目的】

自己免疫疾患の中でも、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性筋炎・皮膚筋炎（PM/DM）、シェーグレン症候群（SS）の3疾患に研究対象を絞り、これらの難治性病態の成立機序の解明と新たな治療法の開発を行うことを目的とする。

【研究方法】

主として免疫学的手法及び分子生物学的手法を主な研究手法とし、動物モデルや患者由来の血清、細胞などを用いてT細胞レセプター分子、表面抗原、接着分子、サイトカイン、アポトーシス、トレランス、自己抗原エピトープなどの面からin vivo およびin vitroにおいて多角的に解析を行う。また、臨床症例の解析から、難治性病態の疾患活動性の指標の探索、難治性病態の新たな治療法の開発もあわせて行う。

【結果と考察】

1. 国際シンポジウム『膠原病フォーラム』の開催

3年目の総括として本分科会を中心として、難治性血管炎、ベーチェット病、混合性結合組織病、強皮症各分科会及び免疫基礎班の協力により、平成10年10月12、13日に『膠原病フォーラム』－難病の克服を目指して－というテーマで国際シンポジウムを開催し、多数の国内外の若手研究者を集めて活発な討論が行われた。

2. 疾患発症あるいは難治性病態形成に関与する遺伝子解析と分子機構の解明

1) SLEにおける素因遺伝子の解析

SLE自然発症マウスを用いてマイクロサテライトDNA多型を利用したQTL解析を行い、B細胞の負の調節因子であるFc γ II遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型と、C1q遺伝子多型がともにB細胞異常活性化に関与する可能性を明らかにした。さらに、ヒトSLE患者ではHLA-DNAタイピングにより、特定の病態とHLAハプロタイプとの相関が明らかとなり、病態形成における遺伝的素因の関与を明確にした。

2) SLEにおけるB細胞異常活性化の分子機構の解析

SLE自然発症マウスにおいてB細胞レセプター (BCR) を介するアポトーシスの異常が存在することが明らかにし、B細胞異常活性化の一因となる可能性が示唆された。この他、Fas、CTLA-4、CD80/86などの各分子に対する自己抗体の存在や、T細胞レパトワの偏り、RAG (recombination activation gene)の発現異常、なども報告された。

3) SLEにおけるT細胞機能異常機構の解析

SLE患者T細胞レセプター (TCR) と鎖発現低下を明らかにし、さらにこの異常がTCR-CD3複合体形成にも影響を及ぼしていること、そして鎖発現低下の一因にシグナル伝達機能に変調を来すような鎖トランスクリプトの変異、欠失が存在することを明らかにし、SLE T細胞のシグナル伝達異常の分子機構の一端を解明した。

4) SLEにおけるリンパ球サブセットの解析

皮疹を有する患者では、皮膚リンパ球関連抗原 (CLA) の発現増強と皮膚由来血管内皮細胞との接着増強がみられることを明かし、皮疹形成の分子機構を明らかにした。また、末梢血リンパ球サブセットを細胞質内サイトカイン、ケモカインレセプターなどを指標として解析し、活動期におけるリンパ球サブセットのアンバランスを明らかにした。

5) 抗カルジオリピン抗体による血管病変発現機序の解明

β 2-グリコプロテイン (β 2-GPI) は酸化LDLに結合し、マクロファージへの酸化LDLの取り込みを阻害するが、本抗体はこれを阻害することにより動脈硬化の促進に関与する可能性が示唆された。このほか、本抗体の認識するT及びB細胞エピトープが明らかにされた。

6) PM/DMにおける筋組織傷害の分子機構の解析

新たに開発したPCR-ELISA法とCDR3長スペクトラタイピング法を用いることにより、患者末梢血CD8陽性T細胞のクローナルな増多を証明し、これらが筋組織に浸潤して組織傷害を起こす可能性を明らかにした。また、患者筋組織は異所性にCD40分子が発現されており、CD40を介する組織傷害の可能性が示唆された。

7) シェーグレン症候群の病変形成とリンパ増殖性疾患好発の分子機構の解析

CD40、CD40リガンド、Fas、bc1-2などの異常発現が明らかとなり、唾液腺機能低下への関与が明らかとなった。また、単クローン病変発生における特定の免疫グロブリン遺伝子の関与が示唆された。さらに、HTLV-1が本症発症の一因となる可能性が示された。

3. 新たな診断法の開発

1) シェーグレン症候群診断基準の改訂

唾液腺シンチグラフィ、抗SS-A、SS-B抗体などの新しい検査所見を取り入れ、従来の診断基準よりも感度・特異性ともにすぐれた診断基準を作成した。

2) 抗カルジオリピン抗体測定系の標準抗体キメラ抗体の作成

SLEに合併する難治性病態として知られるAPSの早期診断のために用いる抗カルジオリピン・ヒトIgG型キメラ抗体を作成し、諸外国の検査施設において検討を行った結果、国際的標準血清としての有用性が明らかにされた。この他、抗プロトロンビン抗体の測定系が開発された。

3) 膠原病合併間質性肺炎の疾患活動性指標の検討

膠原病合併間質性肺炎の診断のみならず、活動性と重症度の判定に血清KL-6値の測定が有用であることが明らかとなった。

4) 間質性肺炎のマーカー抗体となりうる抗KS抗体の発見

筋炎に特異的に出現する抗アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)抗体の中から、新たな抗KS抗体の存在を明らかにし、本抗体が筋炎よりも間質性肺炎のマーカー抗体となりうることを明らかにした。

5) SLE患者のステロイド反応性とin vitroにおけるステロイド誘導アポトーシス感受性との間に有意の相関を認め、アポトーシス誘導がステロイド剤の作用機序の一つであることが示唆された。

4. 新たな治療法の開発

1) PM/DMに合併する間質性肺炎に対するシクロスポリン療法

全国の膠原病専門機関にアンケート調査を行い、58例のシクロスポリン投与例を集めて解析を行った結果、従来は致命的病態とされた急性型に対して68.4%、さらには慢性型には50.0%という高い有効率が得られることが明らかとなった。さらに、現在、ノバルティス・ファーマ社から薬剤の無償供与を受け、全国で臨床治験を行っている。

2) 難治性PM/DMに対するガンマグロブリン大量療法

プレドニゾロン50mg/日以上4週間以上投与しても筋症状の有意の改善を認めない難治性PM/DM症例に対してヒトガンマグロブリン(400mg/kg)を5日間連続点滴静注を行い、最終改善度87.5%という高い奏功率を得た。

4) SLE患者におけるシクロスポリン併用療法の有用性の検討

ステロイド抵抗性SLE患者に対して、シクロスポリン併用によるステロイド剤の漸減効果を明らかにし、同時に多剤抵抗性遺伝子産物であるP糖蛋白質の関与を示唆した。

5) IL-6シグナル伝達阻害によるループス腎炎の治療法の開発

レチノイン酸、抗IL-6レセプター抗体、IL-6のシグナル伝達における負の調節因子であるSSI-1(遺伝子14)の強制発現などによるメサングウム細胞の増殖抑制を介するループス腎炎の治療が可能であることをSLE自然発症動物を用いて示した。

6) アポトーシス誘導物質FTY720、セラミドを用いたループス腎炎の治療

アポトーシス誘導物質であるFTY720、セラミドをSLE自然発症動物であるMRL/lprマウスに投与し、生存率の延長、タンパク尿の減少、リンパ節腫脹の軽減などがみられることを明らかにした。

【次年度に残された課題と目標】

今回の研究において、分子生物学、分子遺伝学、免疫学における最新の研究手法が取り入れられ、遺伝子及び分子レベルで病因・病態研究がさらに進んだ。しかし一方で、未だ特定の膠原病の病因や難治性病態形成に関与する遺伝子の同定は十分になされておらず、今後のさ

らなる検討が必要である。診断法及び治療法の開発に関しては、既存の方法の改良と新たな方法の開発を目指した結果、日常臨床に応用しうる新たな診断法・治療法の開発が進みつつある。今後、その実用化を目指した研究がさらに必要となろう。

〔Ⅲ〕 総括研究報告

総括研究報告

特定疾患免疫疾患調査研究班 自己免疫疾患分科会

主任研究者	宮坂信之（東京医科歯科大学 医学部）
分担研究者名	小池隆夫（北海道大学）
	加藤智啓（聖マリアンナ医科大学）
	上阪 等（東京医科歯科大学）
	竹内 勤（埼玉医科大学）
	広瀬幸子（順天堂大学）
	坂根 剛（聖マリアンナ医科大学）
	田中良哉（産業医科大学）
	鐙田武志（東京医科歯科大学）
	原 まさ子（東京女子医科大学）
	平形道人（慶応大学）
	西本憲弘（大阪大学）
	江口勝美（長崎大学）
	橋本博史（順天堂大学）
	松下 祥（熊本大学）
	箕田清次（自治医科大学）
	菅井 進（金沢医科大学）

【研究目的】

自己免疫疾患の中でも、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性筋炎・皮膚筋炎（PM/DM）、シェーグレン症候群（SS）の3疾患に研究対象を絞り、これらの難治性病態の成立機序の解明と新たな治療法の開発を行うことを目的とする。

【研究方法】

主として免疫学的手法及び分子生物学的手法を主な研究手法とし、動物モデルや患者由来の血清、細胞などを用いてT細胞レセプター分子、表面抗原、接着分子、サイトカイン、アポトーシス、トレランス、自己抗原エピトープなどの面から*in vivo* および*in vitro*において多角的に解析を行う。また、臨床症例の解析から、難治性病態の疾患活動性の指標の探索、難治性病態の新たな治療法の開発もあわせて行う。

【結果と考察】

1. 国際シンポジウム『膠原病フォーラム』の開催

3年目の総括として本分科会を中心として、難治性血管炎、ベーチェット病、混合性結合組織病、強皮症各分科会及び免疫基礎班の協力により、平成10年10月12、13日に『膠原病フォーラム』－難病の克服を目指して－というテーマで国際シンポジウムを開催し、多数の国内外の若手研究者を集めて活発な討論が行われた。

2. 疾患発症あるいは病態形成に関与する遺伝子群の解析

a. SLEにおける高IgG血症の遺伝支配の解析

NZB/WF1xNZW退交配雌マウスを用いてマイクロサテライトDNA多型を利用したQTL解析を行い、第1染色体テロメア側に位置する遺伝子（FcγII遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型）の関与を明らかにした。本遺伝子はB細胞の負の調節因子であることから、B細胞異常活性化の一因と考えられる。

b. ループス腎炎発症に関与する補体系異常に関する遺伝子解析

上記と同様の解析により、C1q遺伝子多型とループス腎炎との関連を明らかにした。

c. B細胞アポトーシスの異常

ループスモデルマウスにおいてB細胞レセプター（BCR）を介するアポトーシスの異常を明らかにし、B細胞異常活性化の一因となる可能性を示唆した。

d. SLE患者T細胞レセプター（TCR）と鎖発現異常に関する解析

SLE患者TCRと鎖発現低下を明らかにし、シグナル伝達機能に変調を来すようなトランスクリプトの変異、欠失が見いだされたことから、SLE T細胞のシグナル伝達異常の一因となりうることを明らかにした。

3. 難治性病態形成の分子機構の解析

a. 皮疹を有する膠原病患者リンパ球におけるホーミング分子発現解析

皮疹を有する患者では皮膚リンパ球関連抗原（CLA）の発現増強が認められ、皮膚由来血管内皮細胞との接着増強がみられることを明らかし、皮疹形成の分子機構を明らかにした。

b. SLEにおけるTh1、Th2バランスの質的・量的異常の解析

SLE患者末梢血リンパ球サブセットを細胞質内サイトカイン、ケモカイン・レセプターなどを指標として解析し、活動期におけるリンパ球サブセットのアンバランスを明らかにした。

c. 多発性筋炎・皮膚筋炎患者における末梢血CD8陽性細胞のクローン解析

新たに開発したPCR-ELISA法とCDR3長スペクトラタイピング法を用いることにより、炎症性筋疾患患者末梢血CD8陽性T細胞のクローナルな増多を証明した。

d. シェーグレン症候群の病変形成におけるCD40L-CD40の関与

モデルマウスを用いて抗CD40抗体の治療効果があること、本症患者唾液腺においてCD40分子の過剰発現があることをそれぞれ明らかにした。

4. 新たな診断法及び治療法の開発

a. 抗カルジオリピン抗体測定系の標準抗体キメラ抗体の作成

難治性病態として知られる抗リン脂質抗体症候群（APS）の早期診断のために用いる抗カルジオリピン・ヒトIgG型キメラ抗体を作成し、諸外国の検査施設において検討を行った結果、国際的標準血清としての有用性が明らかにされた。

b. 間質性肺炎のマーカー抗体となりうる抗KS抗体の発見

筋炎に特異的に出現する抗アミノアシルtRNA合成酵素（ARS）抗体の中から、新たな抗KS抗体の存在を明らかにし、本抗体が筋炎よりも間質性肺炎のマーカー抗体となりうることを明らかにした。

c. ループス腎炎に対するIL-6シグナル伝達障害の治療効果

IL-6のシグナル伝達における負の調節因子であるSSI-1遺伝子を強制発現することによりメサンギウム細胞の増殖抑制が起こることを明らかにし、SLEにおける難治性病態であるループス腎炎に対する本分子による遺伝子療法の可能性を示唆した。

- d. SLEモデル動物におけるアポトーシス誘導物質セラミドの治療効果
MRL/lprマウスにC-セラミドを投与することにより、生存率の延長、タンパク尿の減少、リンパ節腫脹の軽減などがみられることを明らかにした。
- e. SLE患者におけるシクロスポリン併用療法の有用性の検討
ステロイド抵抗性SLE患者に対してシクロスポリン併用療法を行い、ステロイド剤の漸減効果があることを明らかにし、同時にステロイド抵抗性における多剤抵抗性遺伝子産物であるP糖蛋白質の関与を示唆するデータを提示した。
- f. 1978年に厚生省研究班で作成して以来、改訂の検討が行われていなかったシェーグレン症候群の診断基準について、日本シェーグレン症候群研究会に委託して新たな診断基準を提唱するに至った。

【残された課題】

本年度は、分子生物学、分子遺伝学、免疫学における最新の研究手法が取り入れられ、遺伝子及び分子レベルで病因・病態研究がさらに進んだことが強調される。しかし一方で、未だ特定の膠原病の病因や難治性病態形成に関与する遺伝子の最終的な同定はなされておらず、今後のさらなる検討が必要である。診断法及び治療法の開発に関しては、既存の方法の改良と新たな方法の開発を目指した。その結果、日常臨床に応用しうる新たな診断法・治療法の開発が進みつつあり、今後、その実用化を目指した研究がさらに必要となろう。

〔Ⅳ〕 分担研究報告

接着分子MAdCAM-1の自己免疫疾患モデル および経口寛容成立への関与に関する研究

宮坂信之（東京医科歯科大学，第一内科）

飯塚利彦（東京医科歯科大学，第一内科）

小池竜司（東京医科歯科大学，第一内科）

KEYWORD=MAdCAM-1, デキストラン腸炎, アジュバント関節炎, 経口寛容, 慢性関節リウマチ

【研究要旨】 [目的] 接着分子MAdCAM-1はリンパ球上の $\alpha 4\beta 7$ インテグリンをリガンドとし、腸管付属リンパ組織の高内皮細静脈（HEV）に限局した発現を示すことより同部での免疫応答に重要な役割を果たしていることが予想される。われわれが樹立した抗ラットMAdCAM-1抗体を用いてラットモデルにおいて自己免疫疾患や経口寛容誘導へのMAdCAM-1の関与について検討する。 [方法] 抗ラットMAdCAM-1抗体が生体内でも抗原を認識し、リガンド結合を阻害することを確認した後、デキストラン腸炎、アジュバント関節炎、およびアジュバント関節炎へのコラーゲン投与による経口寛容誘導系に上記抗体を投与し、その臨床所見を検討した。 [結果] 抗体は生体内でもHEVを認識し、パイエル板においてリンパ球ローリングを阻害することが確認できた。デキストラン腸炎では抗体投与による変化は認められなかったが、アジュバント関節炎およびその経口寛容誘導の系では抗体投与により発病が早まり、重症化する傾向が見られた。 [結論] 実験系についてさらに検討を行う必要があるが、アジュバント関節炎および経口寛容の系においてMAdCAM-1はむしろ抑制性の経路の一端を担っている可能性がある。

The study of the roles of MAdCAM-1 on the pathogenesis of autoimmune disease models and the mechanism of oral tolerance

Nobuyuki Miyasaka (Tokyo Medical and Dental University, The First Department of Internal Medicine), Toshihiko Iizuka (Tokyo Medical and Dental University), Ryuji Koike (Tokyo Medical and Dental University, The First Department of Internal Medicine)

[Purpose] MAdCAM-1, an adhesion molecule of which ligand is $\alpha 4\beta 7$ integrin on lymphocytes, may play important roles on the immunological responses at gut-associated lymphoid tissues (GALT) because its expression is restricted on high endothelial venules (HEV) at GALT. We study the roles of MAdCAM-1 on the pathogenesis of autoimmune disease model of which the lesion associates GALT and the mechanism of oral tolerance, using anti-rat MAdCAM-1 monoclonal antibodies we already established. [Methods] We examined the recognition of antigen and the activity to block ligand binding of our antibodies in vivo. Then, we treated the rats of dextran

sulfate-induced colitis, adjuvant-induced arthritis, and adjuvant-arthritis induced oral tolerance by type II collagen with the antibodies and we observed their clinical features. [Results] We ensured the antigen recognition and the blocking activity of the antibodies we established. The treatment with antibody revealed no influence to dextran sulfate colitis rat. However, it is possible that the antibody might worsen the extent and the onset of disease in adjuvant arthritis and interfere the induction of oral tolerance of adjuvant arthritis. [Conclusion] Although they are still preliminary findings, MAdCAM-1 may play a role on suppressive pathway in adjuvant induced arthritis and those induced oral tolerance.

【研究目的】 接着分子MAdCAM-1はリンパ球上の $\alpha 4\beta 7$ インテグリンをリガンドとし、腸管付属リンパ組織に限局した発現を示すため同部での免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられる。また自己免疫疾患においては腸炎や粘膜炎と関連した症候を示すものが存在し、さらに近年慢性関節リウマチの治療に抗原を経口投与することで寛容（トレランス）を誘導することを利用する試みが始まっており、腸管関連リンパ組織（GALT）での免疫応答機構の解析は自己免疫疾患の治療開発に重要な意味を有すると考えられる。われわれは昨年までの研究で、ラットのMAdCAM-1遺伝子やモノクローナル抗体といったプローブを作製してきた。そこでこれらを用いてラットでの自己免疫疾患モデルの病態や経口寛容誘導におけるMAdCAM-1分子の役割を検討し、その制御を介した新しい治療的アプローチを探索する。

【研究方法】 予備的検討としてわれわれが樹立した抗ラットMAdCAM-1モノクローナル抗体が生体内で機能するかについて、実体顕微鏡下での抗体投与実験や蛍光標識したリンパ球の生体内観察を行った。それをもとに、腸炎モデルとしてデキストラン腸炎ラット、自己免疫性関節炎モデルとしてアジュバント関節炎ラットに接着阻害性抗ラットMAdCAM-1抗体を投与し、影響を検討した。さらに経口寛容誘導の系としてアジュバント関節炎にII型コラーゲンを経口投与するモデルに抗体を投与し、関節炎や寛容誘導の程度を検討した。

【結果と考察】 抗体を直接蛍光標識しラットに静注後、パイエル板をはじめとする腸管付属リンパ組織を蛍光顕微鏡で観察したところ、MAdCAM-1が発現している高内皮細静脈に選択的に反応していることが実視下に観察できた（図1）。

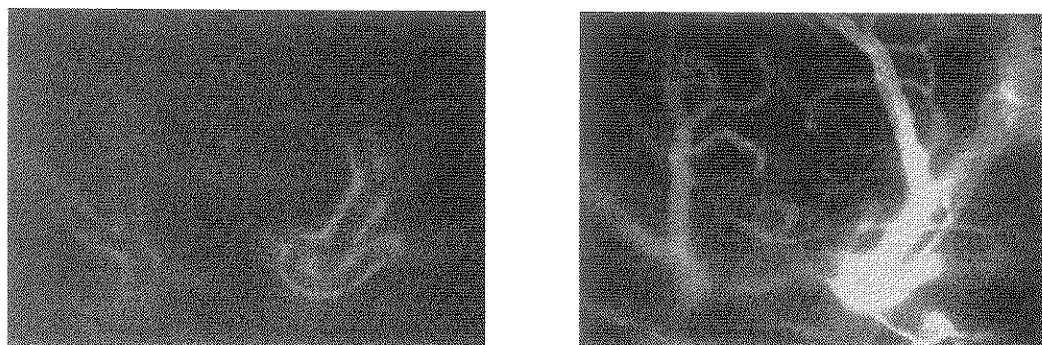


図1：抗MAdCAM-1抗体とHEVとの特異的反応

蛍光標識した抗MAdCAM-1抗体が一部の血管壁と特異的に反応しており（左）、これがHEVに相当する。右は蛍光標識したデキストランを静注した像ですべての血管が可視化されている。

さらに抗体をあらかじめ投与したラットに蛍光標識したリンパ球を静注し、パイエル板でのリンパ球ローリングを観察したところ、抗MAdCAM-1接着阻害抗体は生体内でも明らかにリンパ球のローリングを阻害することが確認された（図2）。

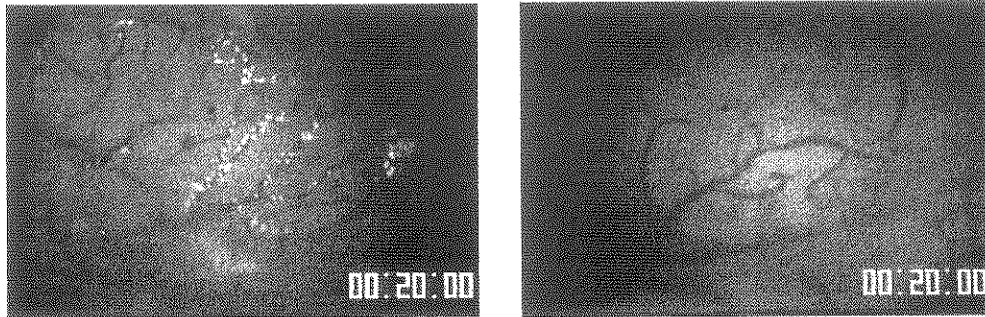


図2：抗MAdCAM-1抗体によるパイエル板でのリンパ球ローリングの阻害

抗体を静注20分後に蛍光標識したリンパ球を静注し、パイエル板でのリンパ球ローリングを観察した。リガンド接着を阻害しない抗体では（左）ローリングが観察されたが、接着阻害抗体は（右）ほぼ完全にリンパ球のパイエル板でのローリングを阻害した。

これらの結果をもとに、硫酸デキストランを経口投与してラットに腸炎を誘発させる系に図3のようなスケジュールでこの抗体を投与し、その影響を観察した。その結果個体差は存在するものの抗体を投与したラットにおいてその腸炎の程度や発病のタイミングに明らかな変化は見られなかった。

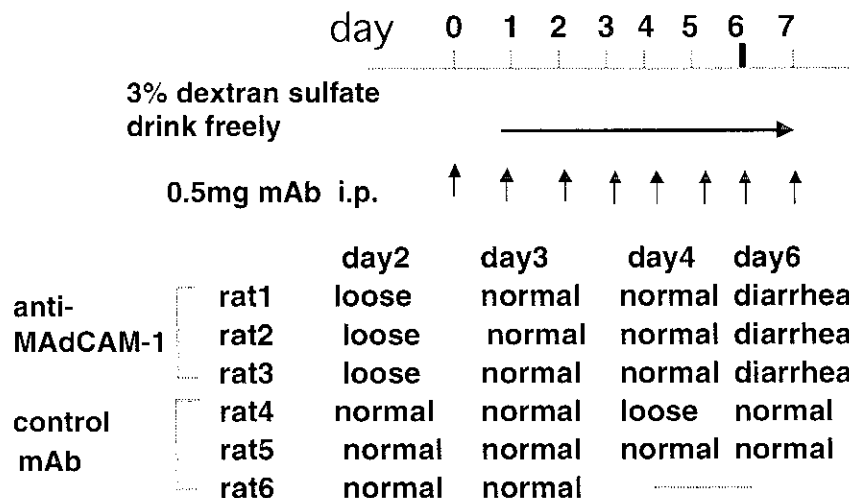


図3：デキストラン腸炎に対する抗MAdCAM-1抗体の効果

上記のようなスケジュールで投与したが、いずれも7日目頃に激しい下痢を生じ、対照群と比較して明らかな違いは見られなかった。

次に自己免疫性多発関節炎のモデルとしてアジュバント関節炎ラットに図4のようなスケジュールで抗体を投与したところ、コントロールに比較してわずかに早いタイミングで関節炎が発病する傾向が見られた。

いっぽうアジュバント関節炎ではあらかじめラットに少量のII型コラーゲンを経口投与しておくことと関節炎が軽減することが知られ、bystander suppressionによる経口寛容誘導のモデルの一つとされている。そこでII型コラーゲンを経口投与することでアジュバント関節炎に寛容を誘導する際に、抗MAdCAM-1抗体によってこの分子を介する接着経路を遮断してみたところ、寛容が誘導されていない状態以上に関節炎が悪化する傾向が観察された(図4)。

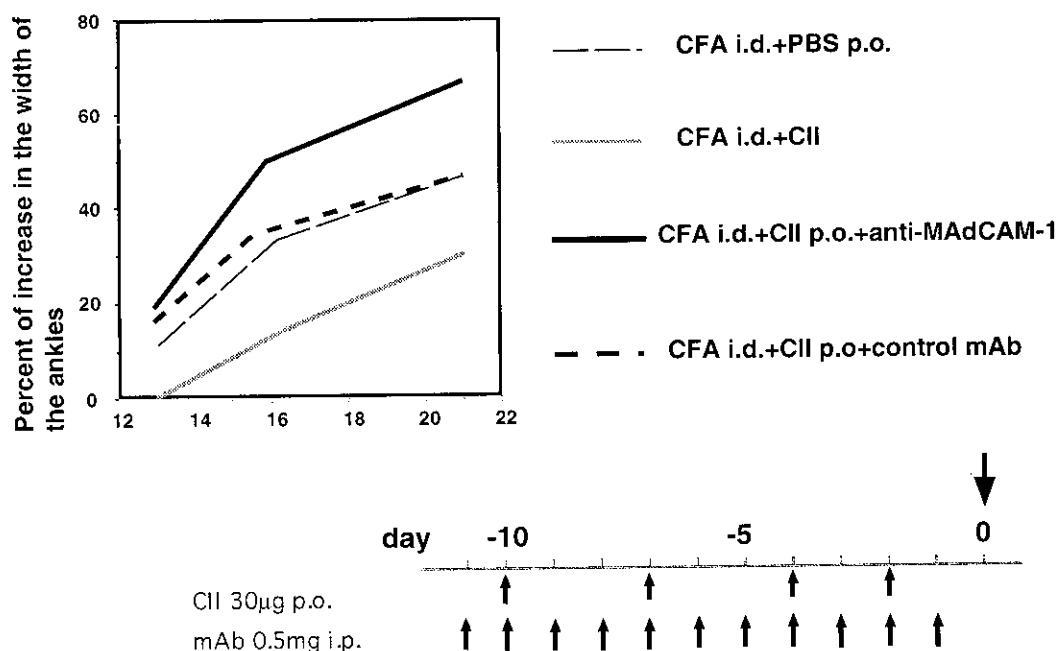


図4：経口寛容誘導アジュバント関節炎への抗MAdCAM-1抗体の効果

下のスケジュールで抗体投与したところ、経口寛容を誘導しないものより関節炎が悪化することが観察された。

MAdCAM-1はそのプロモーター領域にNF- κ B結合配列を持ち、ある種の細胞では炎症性サイトカインで発現が増加することが報告されている。またこれまで一部の自己免疫疾患モデルでは疾患出現に伴い発現が増加している報告も存在する。しかし実際にはMAdCAM-1の発現は腸管付属リンパ組織に厳密に局限しており、ほとんどの組織では強い炎症刺激でも発現誘導されない。したがって炎症の成立に真に関与しているかどうかについては疑問点も多い。今回のわれわれの結果はまだ検討数が少なく実験系も改良の余地が多いが、MAdCAM-1を介した経路は炎症成立においてむしろ抑制的な役割を果たしている可能性を示唆している。炎症などが全く存在しない状態でMAdCAM-1は腸管付属リンパ組織に非常に強い発現を示している事実は、この推測と矛盾しないものである。今後さらに検討を進め、自己免疫性炎症の成立におけるMAdCAM-1経路の役割を明らか