

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（Ⅲ）

—SSI-1によるヒトIL-6シグナルの制御の可能性の検討—

西本憲弘（大阪大学健康体育部健康医学第一部門）

田合ひろみ（大阪大学健康体育部健康医学第一部門）

松本智成（大阪大学健康体育部健康医学第一部門）

吉崎和幸（大阪大学健康体育部健康医学第一部門）

岸本忠三（大阪大学）

【研究要旨】ループス腎炎発症にIL-6によるメサンギウム細胞増殖刺激が関与すると考えられる。STATs-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)は、IL-6刺激により誘導され、JAKに結合し、そのリン酸化活性を阻害することでIL-6の働きを抑えるネガティブフィードバック因子である。そこでSSI-1の腎メサンギウム増殖病態への関与ならびにSSI-1発現操作によるIL-6シグナル調節の可能性を検討した。メサンギウム細胞は、*in vitro*において、可溶性IL-6受容体 (sIL-6R) の存在化でのみIL-6依存性の増殖を示した。ヒトメサンギウム細胞ではその培養上清中に40pg/day/10⁴cellsのIL-6分泌が認められた。そこでIL-6除去4時間後にIL-6及びsIL-6Rによる刺激を行い、SSI-1ならびにSSIファミリー分子の発現をRT-PCR法にて検討した。SSI-1およびSSI-3遺伝子は、すでに無刺激の状態でも発現していたが、刺激開始より60分後に一過性の発現増強が認められた。一方、SSI-2、SSI-4、SSI-6はIL-6の刺激とは無関係に発現していた。

次にメサンギウム細胞への遺伝子導入の前実験として、骨髄腫細胞株へSSI-1のセンス及びアンチセンスRNAを導入した。センスSSI-1はIL-6によるSTAT3のリン酸化を抑制し、またアンチセンスSSI-1はSTAT3のリン酸化を増強した。

以上より、SSI-1はヒトのメサンギウム細胞においてもIL-6のネガティブフィードバック因子として機能する可能性がある。またSSI-1の発現のコントロールによりIL-6シグナルを人為的に調節しうるということが明らかになった。

【研究目的】SLEの病態における免疫異常の解析は、新たな治療法の確立に不可欠である。ループス腎炎はSLEの患者の予後を左右する重要な難治性病態の一つであるが、ループス腎炎の発症に、多様な生理活性を有するサイトカインであるインターロイキン6 (IL-6)を介した腎メサンギウム細胞のオートクライン増殖機構の関与が示唆されている。すなわちIL-6の阻害は現在使用されているステロイドパルスや免疫抑制剤による治療に代わる新しい治療法となる可能性がある。H8年度とH9年度の研究ではループス腎炎におけるメサンギウム増殖病態にIL-6が関与することを明らかにするとともに、抗IL-6レセプター (IL-6R) 抗体、並びにIL-6、IL-6Rとgp130分子の発現抑制作用を有するレチノイン酸 (ATRA) を用いたループス腎炎の治療の可能性を示した。1997年IL-6刺激により誘導され、JAKに結合し、そのリン酸化活性を抑制することでIL-6の働きを抑えるネガティブフィードバック因子STATs-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)を見出した (図1参照)。この分子は、同時に他の研究グループによりSuppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) およびJAK binding protein (JAB) として報告された。この分子の機能から、IL-6がその病態に関与する疾患にSSI-1の発現あるいは機能異常が関与する可能性がある。そこでSSI-1のメサンギウム細胞における発現を検討し、増殖シグナルにおける意義を解析するとともに、この分子の発現をコントロールすることによる、IL-6シグナルを阻害するループス腎炎の治療への応用の可能性について検討した。またヒトSSI-1には構

造的に相同性を有するファミリー分子が SSI-1 も含め 5 つ報告されている。そこでこれらのファミリー分子についてもその発現を検討した。

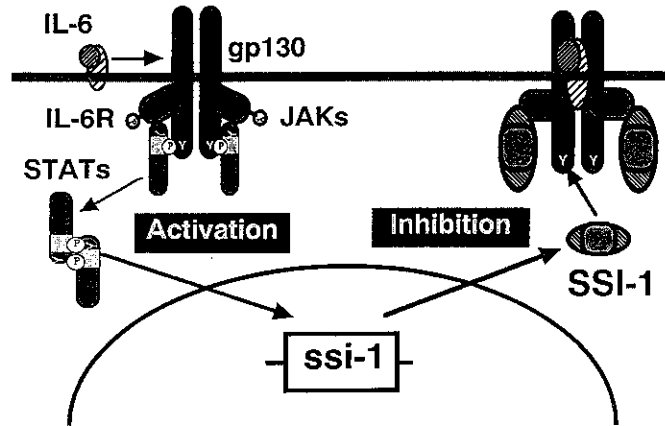


図1 SSI-1によるIL-6シグナル伝達経路のネガティブフィードバック機構
SSI-1は、STAT1,3によって誘導され、JAKに結合することでSTAT3のリン酸化を抑制する。

【研究方法】

1. メサングウム細胞

メサングウム細胞はラットより、Sieving 法で単離し、Thy-1 抗原陽性細胞として同定した。またヒトのメサングウム細胞は Fibronectin(+), Cytokeratin 18(-)19(-), Factor III(-)として同定した。また培養上清中のヒト IL-6 産生量を化学発光酵素抗体法 (CLEIA) にて検討した。この細胞は 40pg/day/10⁴cell の IL-6 分泌が認められた。

2. IL-6 及び sIL-6R による増殖刺激試験

単離したメサングウム細胞を 96 穴プレートを用い、1×10³/200μl/well で IL-6 ならびに sIL-6R の存在下 5 日間培養し、最後の 2 日間を 18.5KBq の ³H-TdR でラベルし DNA への取り組みにて増殖能を検討した。

3. RT-PCR による SSI-1 ならびに SSI family mRNA の検出

FCS 無添加の D-MEM で 4 時間前培養を行った後、IL-6(100ng/ml)、sIL-6R(100ng/ml)をそれぞれ添加し、経時的 (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間) に細胞を回収した。RNA 抽出は TRIzol®によって行った。抽出した RNA は DNA の混入を除去するため、DNase 1.0U を添加し、37℃、1 時間処理を行った後、再度 TRIzol®で処理し直し、total RNA 1μg より cDNA 合成を行った。

PCR は、Table 1 に示す PCR 設定および primer pair を用いて行い、SSI-1 は 200ng、その他の SSI family 分子の PCR には 100ng 担当の RNA から合成した cDNA を使用した。PCR 産物はエチジウムブロマイドを含むアガロースゲル(3%)で電気泳動を行った。

| Primer | Primer sequence | PCR program (°C/min) | | | |
|--------|-----------------------------|----------------------|-----------|-----------|--------|
| | | denature | annealing | extension | cycles |
| GAPDH | 5' GTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCT | 94 / 0.5 | 60 / 0.5 | 72 / 0.5 | 18 |
| | 3' GACGCCTGCTTCACCACCTTCTTG | | | | |
| IL-6R | 5' CATTGCCATTGTTCTGAGGTTC | 94 / 0.5 | 60 / 0.5 | 72 / 0.5 | 25 |
| | 3' CCAGGAGGAGTTCGGGCAAGG | | | | |
| SSI-1 | 5' CTGGCTCGCATCCCCCTCAAC | 94 / 0.5 | 60 / 0.5 | 72 / 0.5 | 25 |
| | 3' GGTGGAGGGAGCGGATGGGTGTAG | | | | |
| SSI-2 | 5' AAAACATCAGCTGGACCAAC | 96 / 1 | 60 / 0.5 | 72 / 2 | 25 |
| | 3' TCTTGTGGTAAAGGCAGTCCC | | | | |
| SSI-3 | 5' ACCAGCGCCACTTCTTCACG | 96 / 1 | 60 / 0.5 | 72 / 2 | 25 |
| | 3' GCGGGGCATCGTACTGGTCC | | | | |
| SSI-4 | 5' CAAGTGGGAGGGCGTGCCTTC | 96 / 1 | 60 / 0.5 | 72 / 2 | 25 |
| | 3' TGCATGAACCCGGACACTGGG | | | | |
| SSI-6 | 5' AATGCCCTTTTCCTGCTGGCTC | 96 / 1 | 60 / 0.5 | 72 / 2 | 25 |
| | 3' AAATACACACGGGTCATGGGCG | | | | |

Table.1 IL-6RおよびSSI/SOCS/CIS family 検出に用いたprimer pair とPCR program

4. Western blotting による STAT1,3 のチロシンリン酸化の検出

細胞の刺激は、SSI family 分子の検出と同じ条件を用いた。0-4 時間経過後、lysis buffer (0.25M Tris-HCl, 4%SDS, 2mM Na₃VO₄)150μl を用いて細胞を回収した。2× sample buffer (0.125M Tris-HCl, 4%SDS, 20%Glycerol, 0.01%BPB)150μl を加え、96℃で 10 分間加熱した後、SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲルを PVDF メンブレンにトランスファーし、5%スキムミルク/Tris buffer saline -Tween20 (TBST)を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体を添加し、37℃で 1 時間反応させた。抗体は抗チロシンリン酸化 STAT1 抗体(New England BioLabs)を 500 倍、抗チロシンリン酸化 STAT3 抗体(New England BioLabs)を 500 倍希釈で用いた。2 次抗体としてヤギ抗ウサギ IgG HR 抗体を用い、1 時間の反応を行った。発光反応は、Renaissance Kit (NEW life science Products) を用い、Kodak Biomax™ MR film に現像した。また、同じメンブレンを用いて、それぞれ転写された蛋白量を抗 STAT1 抗体 (Santa Cruz)、抗 STAT3 抗体 (Santa Cruz) により確認した。

5. 多発性骨髄腫細胞株への SSI-1 遺伝子導入

真核細胞発現ベクター pBCMGNeo の Xho-1 site にマウス cDNA を順方向あるいは逆方向に挿入し、導入用遺伝子発現ベクターを構築した。OCI-My5 と ARH77 骨髄腫細胞 (2×10⁷ cells) を PBS で 2 回洗浄後、10μgDNA/800μlPBS と共にキュベットに入れ、氷上で 10 分間置いた後、Gene Pulser® (Bio rad) を用いて、エレクトロポレーションを行った (350-400V, 35-40msec)。G418(800μg/ml)の存在下で 2 週間培養し、遺伝子導入株を得た。

【結果と考察】

1. IL-6 によるメサンギウム細胞の増殖刺激

すでに報告されている IL-6 による腎メサンギウム細胞の増殖に対する影響を確認するために in vitro 増殖試験を行った。

図 2 に示すように IL-6 は sIL-6R の存在下でラットメサンギウム細胞の増殖を促進したが非存在下では影響を与えなかった。したがって腎メサンギウム細胞には gp130 は十分に発現しているが IL-6R の発現量は少ないと考えられた。よって以後の実験には IL-6 と sIL-6 R を同時に添加し刺激を行った。

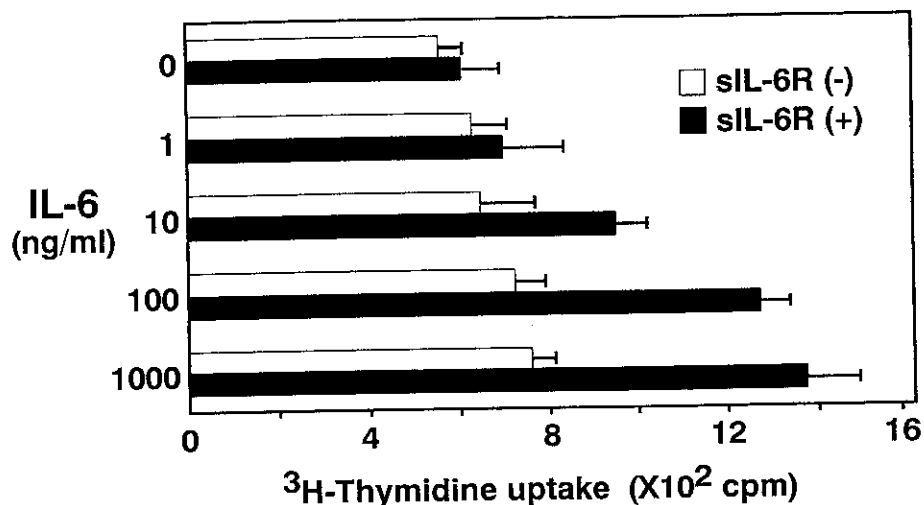


図 2 IL-6 は sIL-6R の存在下でラットメサンギウム細胞の増殖を促進した。

2. ヒトメサンギウム細胞における SSI-1 ならびに SSI family 分子の発現と IL-6/sIL-6R 刺激による発現の誘導

ヒトメサンギウム細胞はそれ自身が IL-6 を産生していたため、IL-6 無添加の新鮮なメディアムにて 4 時間の前培養を行った後、IL-6 ならびに sIL-6R (各々 100ng/ml) による刺激を行った。図 3 に SSI-1 ならびに SSI family 分子の発現を示す。SSI-1 は無刺激の状態でもわずかに発現されていたが、IL-6/sIL-6R の刺激により 1 時間後をピークとする一過性の発現誘導が認められた。また SSI-3 においても 30 分後より発現の増強が認められ、さらに 72 時間以上にわたり発現が持続した。これらの SSI-1 ならびに SSI-3 の発現増強は抗 IL-6R 抗体 (hPM-1) の添加により抑制されたことから IL-6 分子によることが確認された。しかしながら SSI-2、SSI-4、SSI-6、に関しては IL-6/sIL-6R の刺激の有無に関わらず恒常的に発現していた。また SSI-1 ならびに family 分子の発現パターンを 5 代と 8 代の継代を行ったメサンギウム細胞間で比較したが基本的に同じであった。以上よりメサンギウム細胞における IL-6 シグナル伝達には SSI-1 と SSI-3 の関与の可能性が考えられた。SSI-3 は SSI-1 と同様にマウスの前骨髄性白血病細胞の IL-6 による分化を抑制することが報告されているが、SSI-3 はヒトにおいても同様の作用を有する可能性がある。しかも SSI-3 の発現の誘導は SSI-1 に比べ非常に強いことが確認された。

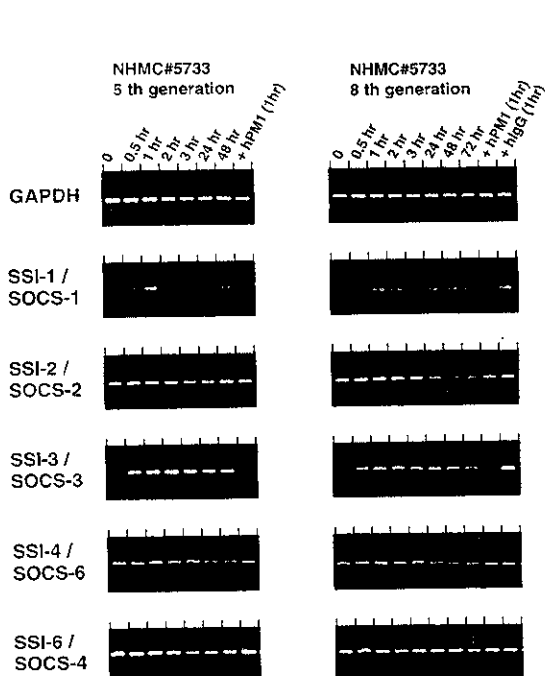


図 3 SSI-1 ならびに SSI family 分子の発現と IL-6/sIL-6R 刺激による発現の誘導

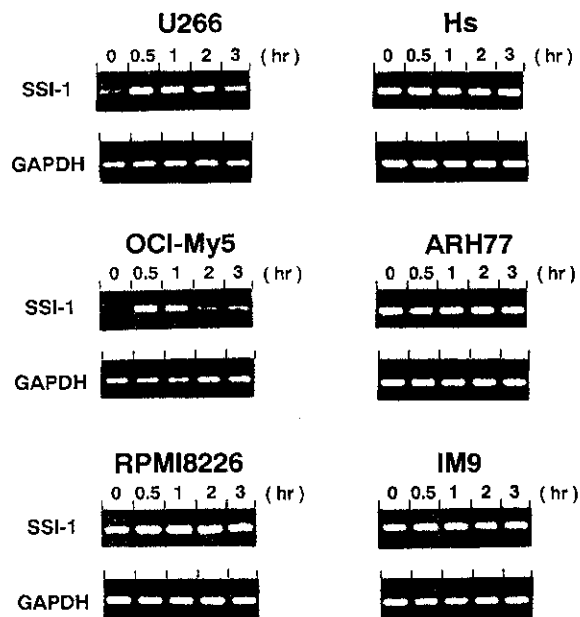


図 4 多発性骨髄腫細胞株における SSI-1 の発現
6 種類の細胞株のうち、IL-6(100ng/ml)/sIL-6R(100ng/ml)の刺激によって SSI-1 の発現が誘導されるもの (左側) と、SSI-1 を恒常的に発現しているもの (右側) に分かれた。

これらの分子がメサンギウム細胞において実際に機能分子として働いている可能性を確認するためにこれらの遺伝子を強制的に発現させるか、あるいは逆に消すことによる IL-6 に対する反応性の変化を検討する必要がある。しかしメサンギウム細胞は primary culture であり安定した遺伝子導入細胞を得るのが困難であるため、前実験として IL-6 がその病態に関与することが知られている多発性骨髄腫細胞に導入実験を行った。

3.1) 多発性骨髄腫細胞株における SSI-1 の発現

U266、OCI-My5、RPMI8226 は、無刺激の状態でも SSI-1 をわずかに発現してい

たが、IL-6(100ng/ml)、sIL-6R(100ng/ml)の添加によって、30分をピークに発現が増強した(図4、U266、OCI-My5、RPMI8226)。一方Hs、ARH77、IM9はIL-6添加前からすでにSSI-1を前述の3つの細胞株に比べ大量に発現しており、IL-6を添加しても発現の増強は認めなかった(図4、Hs、ARH77、IM9)。

2) STAT-1 および STAT-3 のチロシンリン酸化

多発性骨髄腫の6種の細胞株において、SSI-1の発現パターンから、大きく2つのグループに大別ができた。そこで、SSI-1の発現がIL-6の刺激によって誘導される細胞株(U266、OCI-My5、RPMI8226)とSSI-1を恒常的に発現している細胞株(Hs、ARH77、IM9)で、STAT1およびSTAT3のチロシンリン酸化の違いを調べた。

U266、OCI-My5、RPMI8226では、IL-6(100ng/ml)の添加によりSTAT1ならびにSTAT3のチロシンリン酸化が生じたが、Hs、ARH77、IM9は、IL-6の刺激を加えてもSTAT3のチロシンリン酸化は起こらなかった(図5)。

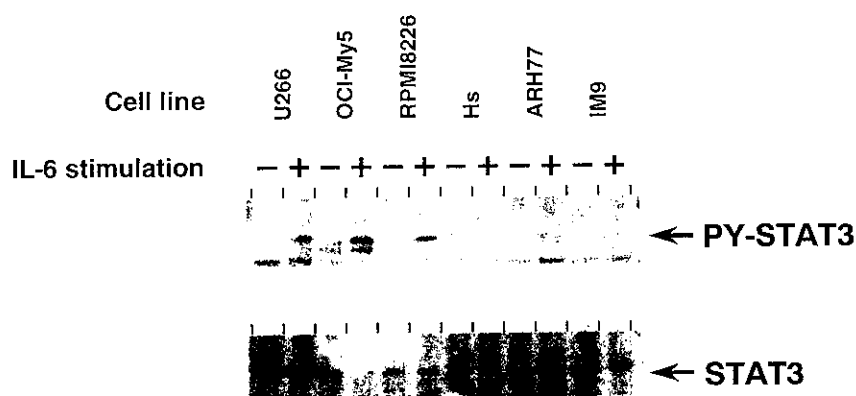


図5 多発性骨髄腫細胞株におけるSTAT-1,3のリン酸化

SSI-1の発現がIL-6の刺激によって誘導される細胞株(U266、OCI-My5、RPMI8226)ではIL-6(100ng/ml)、sIL-6R(100ng/ml)の添加によりSTAT3のチロシンリン酸化が生じたが、SSI-1を恒常的に発現している細胞株(Hs、ARH77、IM9)では、IL-6の刺激を加えてもSTAT3のチロシンリン酸化は起こらなかった。

3) SSI-1 遺伝子導入による機能解析

IL-6刺激後のSTAT3のリン酸化に対するSSI-1の作用を検討するため、多発性骨髄腫細胞にセンスおよびアンチセンスのSSI-1遺伝子を導入し恒常的発現株を作成した。細胞は、IL-6の刺激によりSTAT3のリン酸化が誘導され、SSI-1の一過性発現増強を生じる細胞株(U266、OCI-My5、RPMI8226)とSTAT3のリン酸化は生じずSSI-1を恒常的に発現している細胞株(Hs、ARH77、IM9)からそれぞれOCI-My5、ARH77を代表として用いた。

OCI-My5では、センスのSSI-1遺伝子の導入によって、IL-6刺激後のSTAT3のチロシンリン酸化は抑制された。また、アンチセンスのSSI-1遺伝子の導入によりSTAT3のチロシンリン酸化は増強した(図6、OCI-My5)。一方、ARH77ではアンチセンスのSSI-1遺伝子導入によって、非導入株、ベクターのみの導入株ならびにセンスSSI-1導入株では認められなかったSTAT3のチロシンリン酸化が生じた(図6、ARH77)。

特発性炎症性筋疾患における筋 MRI の有用性の検討

原まさ子（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター）

針谷正祥（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター）

高木香恵（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター）

【研究要旨】 [目的] 近年各種筋疾患における筋核磁気共鳴画像(MRI)の有用性が注目されている。そこで、特発性炎症性筋疾患(IIM)患者の筋 MRI を prospective に撮像し、その臨床的有用性を検討した。 [方法] 対象は多発性筋炎(PM) 7名、皮膚筋炎(DM)11名、その他の筋疾患 12名。MRIは T1 強調画像、T2 強調画像、脂肪抑制画像を撮像した。 [結果と考察] MRIでの筋病変の陽性所見の頻度は PM 100%、DM 45.5%、その他の疾患 33%であった。MRI上の罹患筋数と血清 CK 値、aldolase 値、myoglobin 値との間には有意な正の相関を認めた。MRI 画像は筋炎の疾患活動性の変化を反映し、MRI 上の罹患筋数は治療による筋炎の軽快と共に減少した。Gadolinium 造影 MRI が疾患活動性の判定に有用な症例も見られた。 [結論] 筋 MRI 上の罹患筋数は容易に算出可能で、IIM の診断、疾患活動性及び治療効果の評価に有用な指標である。

【研究目的】核磁気共鳴画像 MRI は非侵襲的に病変部を描出できることから、広く臨床で用いられている。特発性炎症性筋疾患 (IIM) においても、診断および経過観察への応用が報告されている。これまでの報告では、その定量化に特殊なソフトウェアを利用しており、実際の臨床場面への適用は必ずしも容易ではないと思われる。また、筋炎の MRI 所見は疾患活動性および罹病期間などに影響を受けるが、これまでの報告では発症早期の IIM を集めた検討は見られない。さらに、筋病変は IIM 以外のリウマチ性疾患でもしばしば認められるが、それらの MRI 所見に関する報告はほとんどない。そこで私達は、発症早期の筋疾患を疑われた患者の MRI を撮像し、臨床的意義の検討を行った。

【研究方法】表 1 に患者の一覧を示す。今回は、臨床症状あるいは検査所見から筋病変・筋疾患が疑われた 30 例を prospective に検討した。患者の内訳は PM7 例、DM11 例、その他の疾患 12 例で、男女比、平均年齢、平均罹病期間を表に示した。MRIは T1 強調画像 T1WI、T2 強調画像 T2WI、short-tau inversion recovery T2 強調画像 (STIR 画像) を撮像した。可能な場合には Gadolinium による造影を行った。筋炎のマーカーとしては血清 CK, aldolase, myoglobin, % クレアチン尿を用いた。

表 1 患者背景

| 疾患群 | 人数 | 年齢 ($m \pm SD$) | 性比 (M/F) | 罹病期間(月) ($m \pm SD$) |
|-------------------|----|----------------------|-------------|---------------------------|
| PM | 7 | 52.1 \pm 14.3 | 2/5 | 1.1 \pm 0.9 |
| DM | 11 | 56.3 \pm 8.3 | 3/8 | 0.8 \pm 0.8 |
| other myopathy | 12 | 45.7 \pm 14.3 | 2/10 | 1.8 \pm 2.8 |

【結果と考察】表 1 に示したように、PM 群、DM 群、その他のミオパチー群とも平均罹病期間は 2 ヶ月以内の発症早期の患者であった。図 1 に典型的な IIM 患者の MRI-STIR 画像を示す。図 1-A の PM 患者では大腿四頭筋、薄筋、縫工筋などの筋束内に high intensity area を認めた。図 1-B の DM 患者では中間広筋に強い homogeneous な high intensity を認め、半腱様筋の筋膜に一致して環状の high intensity を認める。このような STIR 画像および T2 強調画像における high intensity は、活動期の IIM における所見として報告されている。

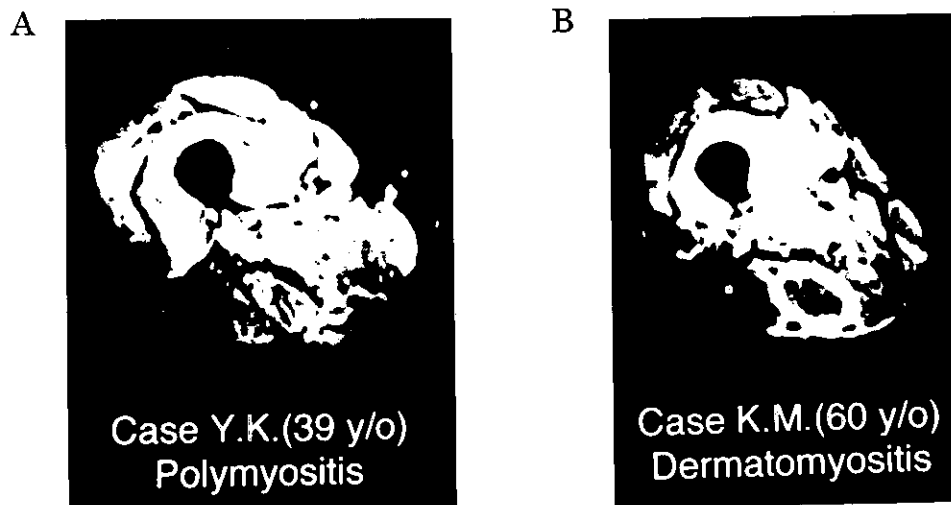


図 1 PM/DM の MRI 画像

そこで、骨盤、大腿部 MRI 上で STIR 画像および T2 強調画像の両方で high intensity が認められる筋を罹患筋として、その数を各患者で計測した。MRI 上、罹患筋数が 1 以上の患者の割合は PM では 100%、DM では 45%、その他のミオパチー群では 33%であった (図 2)。その他のミオパチー群で MRI 上、陽性所見を認めた疾患は SSc 2 例、PN 1 例、AGA 1 例であった。図 3 に各疾患群における MRI 上の罹患筋数を示した。各疾患群とも罹患筋数のばらつきが大きかった。

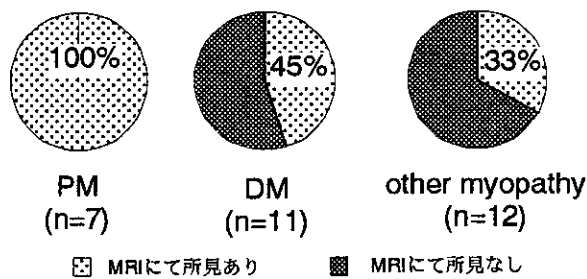


図2 各疾患群におけるMRI所見の陽性率

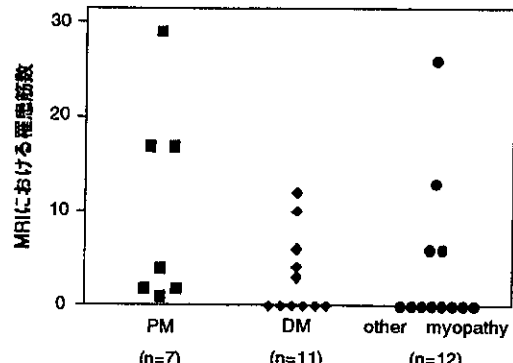


図3 各疾患群のMRIにおける罹患筋数

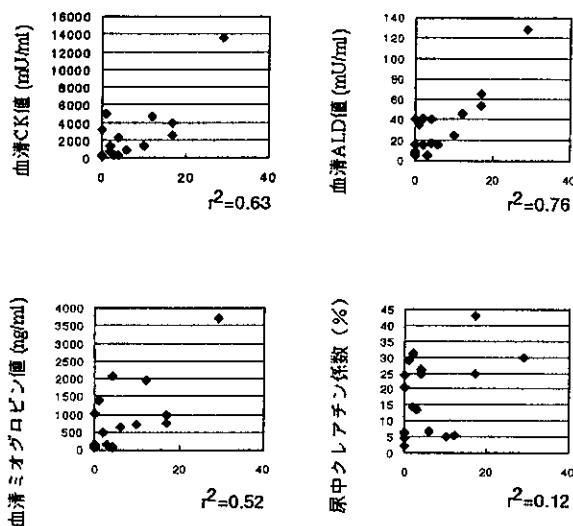


図4 PM/DM群におけるMRIでの罹患筋数と筋炎マーカーとの相関

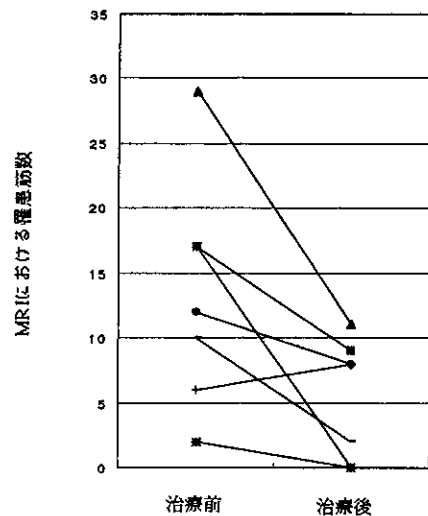


図5 治療前後におけるMRIでの罹患筋数の変化

次に罹患筋数と血清および尿の筋炎マーカーとの関連を検討した。MRI 上の罹患筋数は血清 CK, aldolase, myoglobin と有意な正の相関を示したが、尿中クレアチン係数とは相関を認めなかった (図4)。血清 CK, aldolase, myoglobin のなかでは aldolase との相関が最も強く、CK, myoglobin の順であった。

今回治療前後で撮像できた7症例の罹患筋数の変化を検討した。全例 PM/DM 症例で治療により疾患活動性が低下した時期に2回目のMRIを撮像した。7例中6例で罹患筋数の減少が認められた。罹患筋数が6から8へ増加したDM症例では、治療前に認められたGdによる強い造影効果が、治療後には消失し、筋炎の改善が示唆された。

これまでに報告されているように活動期のIIMのMRI画像では、T2WIおよびSTIR画像において高信号領域が認められた。しかし、従来IIMの約80%にみられると報告されている筋の脂肪置換は認められなかった。これは、今回の

対象患者の罹病期間が平均 3 ヶ月以下であり、発症早期の症例を使用したためと考えられる。これまでの報告でも、STIR 像における信号強度と筋炎活動性が正の相関を示すとされている。しかし、IIM における筋病変は patchy distribution を特徴とするために、信号強度を数量化することは非常に困難であり、特殊な計算を必要とするため日常臨床への応用が難しい。今回私達が報告した MRI 画像上の罹患筋数を計測する方法は MRI 画像上での筋の解剖学的位置関係さえ理解できれば、比較的容易に行なえる利点がある。MRI は非侵襲的で繰り返して行なえることから IIM の治療の評価には今後必須の検査法と考えられる。今回のデータで示したように、罹患筋数の変化は IIM の疾患活動性を反映することから、罹患筋数の計測は MRI による IIM のフォローアップにも有用であろう。

今回の症例のうち、その他のミオパチーに含まれた SSc 2 例、PN 1 例、AGA 1 例でも IIM と同様な T2WI、STIR による高信号域が認められた。これらの疾患における筋 MRI 像の報告はほとんど無く、今後症例をさらに増やして IIM との差異を検討する必要があるだろう。

【結論】

筋 MRI 上の罹患筋数は容易に算出可能で、IIM の診断、疾患活動性及び治療効果の評価に有用な指標である。

【参考文献】

1. Lamminen AE. Magnetic resonance imaging of primary skeletal muscle diseases: patterns of distribution and severity of involvement. *Br. J. Radiol.* 1990;63:946-950.
2. Fraser DD, Frank JA, Dalakas M, et al. Magnetic resonance imaging in the idiopathic inflammatory myopathies. *J. Rheumatol.* 1991;18:1693-1700.
3. Reimer CD, Schede H, Fleckenstein JL, et al. Magnetic resonance imaging of skeletal muscles in idiopathic inflammatory myopathies of adults. *J. Neurol.* 1994;241:306-314.
4. Park JH, Olsen NJ, King L, et al. Use of magnetic resonance imaging and P-31 magnetic resonance spectroscopy to detect and quantify muscle dysfunction in the amyopathic and myopathic variants of dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 1995;38:68-77.

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

原まさ子（東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター）
杉浦智子（東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター）
川口鎮司（東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター）
針谷正祥（東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター）

【研究要旨】特発性炎症性筋疾患（IIMs）では浸潤T細胞と筋細胞間の相互作用が病態形成に重要である。一方、活性化T細胞上のCD40リガンド（CD40L）はB細胞、間葉系細胞上のCD40分子を介してこれらの細胞を活性化する。今回私たちはIIMsにおいて筋炎局所におけるCD40およびCD40Lの発現を検討するとともに、同分子を介する刺激が病態形成にどのように関わっているかを解析した。免疫染色にてIIMs筋炎局所における筋細胞は正常では発現しないCD40を発現し、浸潤細胞の一部はCD40Lを発現していた。正常ヒト培養筋細胞は非刺激培養下ではCD40分子を発現していなかったものの、IFN- γ 刺激にて用量依存的にCD40分子を発現した。リコンビナントヒトCD40L蛋白を用いた架橋刺激により筋細胞からのIL-6、8、15及びMCP-1の産生亢進が見られた。IIMsにおいてCD40からのシグナルはサイトカイン産生を介して病態形成に関わっていることが示唆された。

【研究目的】IIMsでは炎症局所にオリゴクローナルな¹⁾、HLA-DRを発現する²⁾活性化T細胞が浸潤している。一方炎症巣の筋細胞はHLAクラスII分子やintercellular adhesion molecule-1（ICAM-1）などの細胞表面分子を発現し³⁾浸潤T細胞と相互作用することにより病態形成に関与するとされている。

CD40はB細胞⁴⁾のみならず最近間葉系細胞⁵⁾にもその発現が確認されており、活性化T細胞上に発現したCD40L⁶⁾と相互作用し発現細胞を活性化する。今回私たちはIIMsのT細胞-筋細胞間の情報伝達におけるCD40-CD40Lシステムの役割を検討し、同分子を介する刺激が炎症進展にどのように関わっているかを解析した。

【研究方法】1.対象；多発性筋炎（PM）5例、皮膚筋炎（DM）5例を対象とした。また組織学的に正常所見であった3例をコントロールとして用いた。

2.免疫染色: 筋生検より得られた筋組織から凍結切片を作成し、ABC法にて免疫染色を行った。切片を2%パラホルムアルデヒドにて固定し、ウマ血清にてブロック後、抗ヒトCD40抗体 (mAb89、マウスIgG1、Coulter)、抗ヒトCD40L抗体 (TRAP1、マウスIgG1、Coulter)、抗ヒトIFN- γ 抗体(ラビットIgG、Serotec)、コントロールマウスIgG1 (Dako) またはコントロールラビットIgG (Dako) にて30分室温にて反応させた。ビオチン化抗マウスIgGまたはビオチン化抗ラビットIgG (Vector) と30分反応させた後、アビジン、ビオチン、ペルオキシダーゼ複合体 (Vector) にて30分反応させ、DAB (diaminobenzidine) にて発色後、ヘマトキシリンにて対比染色した。

3.細胞; BioWhittaker社より購入した正常ヒト筋細胞を無血清培地 (QBSF 51、Sigma) にて37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で培養し、実験に供した。

4.RT-PCR; 培養ヒト筋細胞よりTRIzol (GIBCO) を用いてtotal RNAを抽出した。1 μ gのRNAよりreverse transcriptase (GIBCO) とrandom hexamer (Perkin Elmer) を用いてcDNAを合成した。特異的なプライマーを用いて得られたPCR産物は2%エチジウムブロマイドにて染色し、UVトランスイルミネーターにて観察した。

5.フローサイトメトリー; 培養ヒト筋細胞に抗ヒトCD40抗体またはコントロールマウスIgG1をそれぞれ10 μ g/10⁵細胞にて4 $^{\circ}$ C、30分反応させた後、FITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Becton Dickinson) にて染色した。蛍光強度はフローサイトメーターによりそれぞれ10⁴個の細胞を解析した。

6.ELISA; IL-6、8、15及びMCP-1についてそれぞれ特異的な抗体を用いたサンドイッチELISA法にてサイトカイン濃度を測定した。

【結果と考察】1.生検筋組織の免疫組織染色 PM 5/5例、DM 4/5例において浸潤単核細胞とともに筋細胞上にもCD40の発現が見られた(図1A)。正常コントロール例では筋細胞はCD40を発現していなかった。またPM5/5例、DM5/5例においてCD40Lが(図1B)、さらにPM4/5例、DM4/5例においてIFN- γ が浸潤細胞の一部に発現していた(図2)。正常コントロール例ではCD40LやIFN- γ 発現細胞はみられなかった。

2.培養ヒト筋細胞におけるCD40mRNAの発現 培養筋細胞においては、非刺激培養下でCD40mRNAの構成的な発現が見られた(図3)。

3.培養筋細胞におけるCD40の発現動態 非刺激下ではCD40の発現は見られなかったが、IFN- γ 刺激にて用量依存的に発現が誘導された(図4上段)。また、TNF- α はIFN- γ と相乗的に働いてCD40分子の発現を増強させた(図4下段)。

4.培養筋細胞におけるCD40架橋刺激 筋細胞にCD40を介する刺激を伝達するために図5に示すような方法でCD40架橋刺激を加えた。筋細胞表面にCD40分子を誘導するためにIFN- γ 100U/mlを加え、48時間培養した。PBSで洗浄後、種々の濃度のヒトCD40L蛋白 (trimeric human CD40L/fusion protein、Immunex) を加え、48時間後に細胞上清または細胞溶解液を回収し、ELISA法にてサイトカイン濃度を測定した。図6に示すようにCD40L蛋白はIFN- γ 処理した筋細胞からのIL-6、8、15及びMCP-1の産生を用量依存的に亢進させた。CD40L蛋白の効果が特異的なものか調べるためにCD40L蛋白と同時に種々の濃度の抗ヒトCD40L抗体 (TRAP1) を添加した。CD40L蛋白によるIL-6の産生亢進は10 μ g/mlの抗ヒトCD40L抗体によってほぼ完全に抑制された(図7)。IL-8、15及びMCP-1についても同様な抑制効果がみられた。

【結論】 IIMsにおいて炎症局所の筋細胞はCD40を発現しており、CD40Lを発現する浸潤T細胞と相互作用する可能性が考えられた。このような例ではIFN- γ 産生細胞が見られること、培養ヒト正常筋細胞はIFN- γ 刺激によりCD40分子を表出することより、IIMs炎症局所におけるCD40の発現にはIFN- γ が関与している可能性が示唆された。一方、正常ヒト培養筋細胞を用いた系でCD40架橋刺激が筋細胞からのIL-6、8、15及びMCP-1などのサイトカインの産生亢進をもたらすことを示した。以上より、IIMにおける筋炎局所での筋細胞とT細胞の、CD40-CD40Lを介するシグナル伝達は筋細胞からのサイトカイン産生を介して筋炎の炎症を増幅、遷延化させ、病態形成に関わっている可能性が示唆された。そしてCD40を介する刺激伝達系を阻害することにより筋炎の病態を制御できる可能性があると考えられた。

【参考文献】

1. Mantegazza, R. Andreette, F. Bernasconi, P. Baggi, F. Oksenberg, J. R. Simoncini, O. Mora, M. Cornelio, F. Steinman, L. Analysis of T cell receptor repertoire of muscle-infiltrating T lymphocytes in polymyositis. *J Clin Invest* 1993, 91;2880-2886
2. Hohlfeld, R. Engel, A, G. Immune responses in muscle. *Semin Neurosci* 1992,4;249-255
3. Bartoccioni, E. Gallucci, S. Scuderi, F. Ricci, E. Servidei, S. Broccolini, A. Tonali, P. MHC class I, MHC class II and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in inflammatory myopathies. *Clin Exp Immunol* 1994,95;166-172
4. Paulie, S. Ehlin-Henriksson, B. Mellstedt, H. Koho, H. Ben-Aissa, H. Perlmann, P. A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder

carcinomas and B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 1985,20; 23-28

5. Yellin, M.J. Winikoff, S. Fortune, S.M. Baum, D. Crow, M.K. Lederman, S. Chess, L. Ligation of CD40 on fibroblasts induces GD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation. *J Leukoc Biol* 1995,58;209-216
6. Noelle, R.J. Roy, M. Shepherd, D.M. Stamenkovic, I. Ledbetter, J.A. Aruffo, A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992,89; 6550-6554

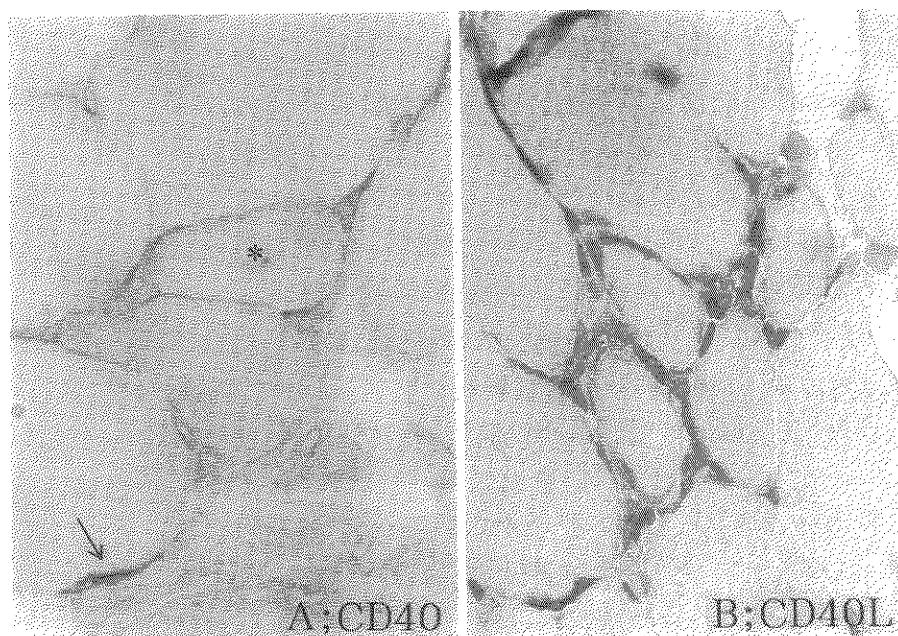


図 1 A PM患者におけるCD40の発現。筋細胞 (*) 表面上に発現が見られる。また、浸潤単核細胞 (→) もCD40を発現している。
 図 1 B PM患者におけるCD40Lの発現。浸潤単核細胞に発現が見られる。

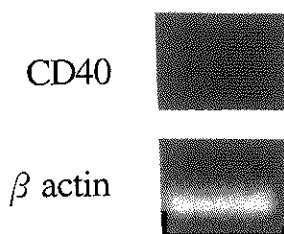


図 3 正常ヒト筋細胞におけるCD40mRNAの発現。

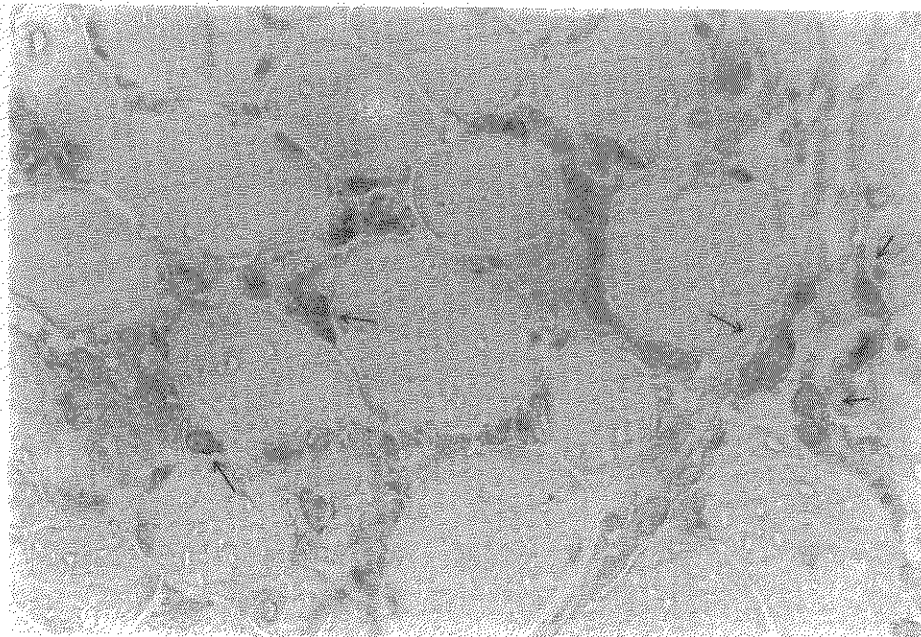


図2 DM患者におけるIFN- γ の発現。浸潤単核細胞の一部(→)に陽性細胞が見られる。

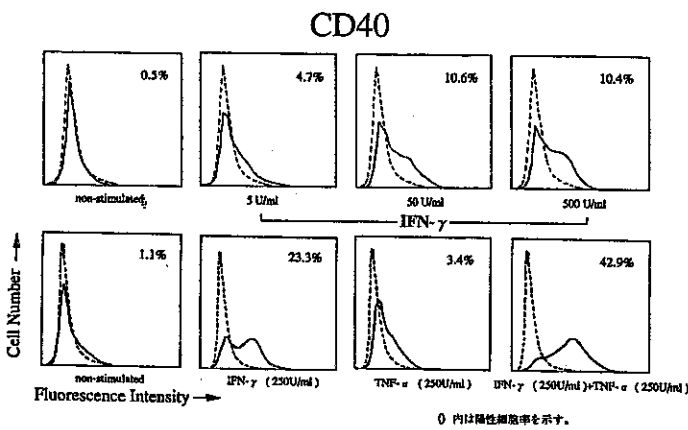


図4 培養筋細胞におけるCD40の発現。

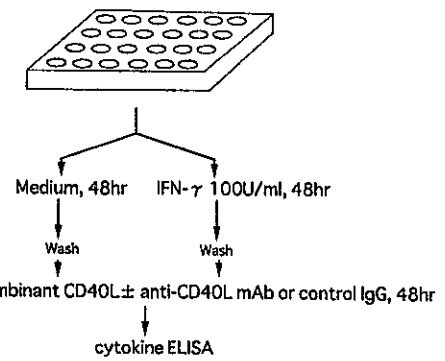


図5 Ligation of CD40 on Normal Myoblast in vitro.

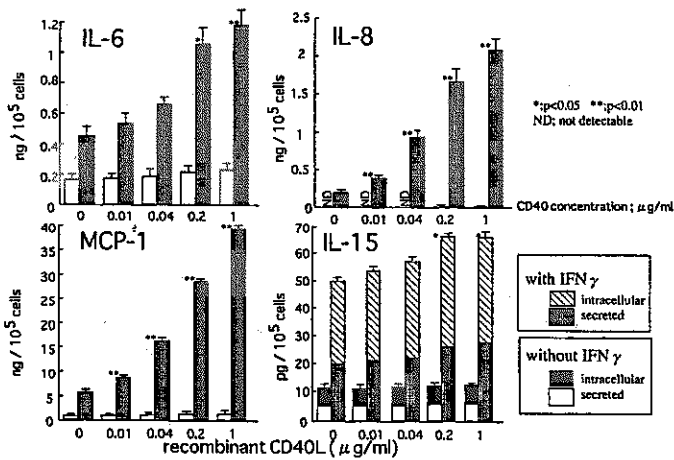


図6 Effects of CD40L on Cytokine Production by Normal Myoblasts

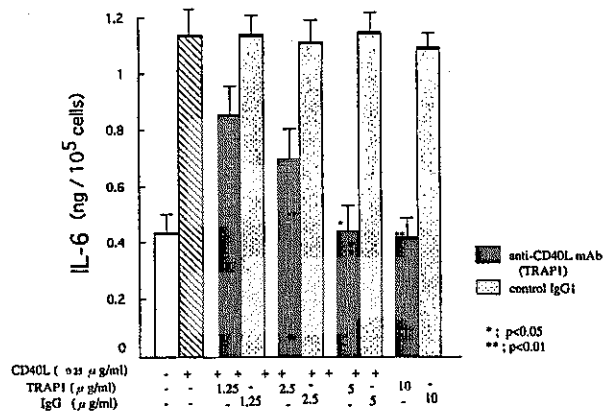


図7 Effect of anti-CD40L mAb (TRAP1) on CD40L-induced IL-6 production by normal myoblasts

抗KS(アスパラギニルtRNA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

平形 道人 (慶應義塾大学, 内科)
佐藤 慎二 (慶應義塾大学, 内科)
藤井 隆夫 (慶應義塾大学, 内科)
野島 崇樹 (慶應義塾大学, 内科)
諏訪 昭 (慶應義塾大学, 内科)
三森 経世 (慶應義塾大学, 内科)

【研究要旨】 アミノアシルtRNA合成酵素 (ARS) に対する自己抗体は、これまで抗Jo-1抗体をはじめ5種類が見出され、間質性肺炎を高頻度に併発するPM/DMとの密接な関連が報告されてきた。本研究は、多発性筋炎・皮膚筋炎、間質性肺炎などを含む結合組織疾患など約2400例を対象とし、新たな抗ARS抗体である、asparaginyl RSに対する抗KS抗体陽性8例を同定し、その臨床・免疫学的特徴を検討した。その結果、抗ARS抗体と関連する臨床特徴の中で、抗KS抗体が筋炎より間質性肺炎と密接に関連し、その要因の一つとして免疫遺伝学的背景の関与が示唆された。

【研究目的】 アミノアシルtransfer RNA(tRNA)合成酵素(ARS)はアミノ酸を対応するtRNAに結合する反応を触媒する酵素で、20種類のアミノ酸に対応する同酵素が細胞質内に存在する。これまで、このARSに対する自己抗体として、抗Jo-1;histidyl RS, 抗PL-7;threonyl RS, 抗PL-12;alanyl RS, 抗EJ;glycyl RS, 抗OJ; isoleucyl RS抗体の5種類が多発性筋炎患者に見い出された¹⁾。近年、同抗体が筋炎の他に、間質性肺炎、多発関節炎と密接に関連することが明らかとなり、教室では膠原病の診断基準を満たさない同抗体陽性間質性肺炎症例も報告した²⁾。かかる成績に基づき、多数の膠原病・特発性間質性肺炎症例を対象に抗ARS抗体を検索し、既知5種類とは異なる新たなARSに対する抗KS抗体を見出した³⁾。本研究は、6番目の抗ARS抗体である抗KS抗体の臨床免疫学的特徴を既知5種類の抗ARS抗体と比較し、明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】 1)対象:教室および共同研究施設の2390例 {多発性筋炎・皮膚筋炎(PM/DM) 175例, 全身性エリテマトーデス(SLE) 720例, 強皮症 300例, 慢性関節リウマチ(RA) 165例, 重複症候群 180例, 膠原病の診断基準を満たさない特発性間質性肺炎(IP) 200例, 関節痛・皮疹などを有する症例 650例} を対象とした。2)自己抗体の分析には、HeLa細胞抽出物を用いた二重免疫拡散法, LernerとSteitzの免疫沈降法, さらにアミノアシル化反応抑制試験を用いた³⁾。3)HLAクラスII遺伝子は、患者末梢血白血球より抽出したgenomic DNAを用い、PCR-RFLP法により同定した。4)抗KS抗体陽性例の臨床的特徴を検討した。

【結果】

1) 新たな抗KS抗体陽性例の同定：免疫沈降法による核酸成分のUrea-ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)において、抗KS抗体陽性代表6例（レーン 6-11）は既知5種類の抗ARS抗体陽性血清 {抗Jo-1（レーン 1）, 抗PL-7（レーン 2）, 抗PL-12（レーン 3）, 抗EJ（レーン 4）, 抗OJ（レーン 5）抗体}とは異なる分子量、パターンのtRNA成分を沈降した。KS血清は強い主要tRNAバンドと弱く、泳動易動度の速い弱いバンドを沈降した（図 1 A）。免疫沈降法による蛋白成分のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動において、抗Jo-1抗体(レーン 1)は50kDa蛋白, 抗PL-7抗体(レーン 2)は80kDa蛋白, 抗PL-12抗体(レーン 3)は110kDa蛋白, 抗EJ抗体(レーン 4)は75kDa蛋白, 抗OJ抗体(レーン 5)は150kDa蛋白と関連複合蛋白を沈降したが, 抗KS抗体陽性代表6例（レーン 6-11）は何れも65kDaの同一分子量蛋白と反応した（図 1B）。

次に、20種類のアミノ酸に対する抗KS抗体陽性血清とそのIgGのアミノアシル化反応抑制試験を、既知抗ARS抗体陽性例血清をpositive control, 健常人血清をnegative controlとして行った（陽性：>50%）。抗PL-12抗体陽性血清はalanyl tRNA合成酵素活性を91%, 抗EJ抗体陽性血清はglycyl tRNA合成酵素活性を89%抑制抑制したが、健常人血清は抑制しなかった。抗KS抗体およびそのIgGはasparaginyl tRNA合成酵素活性を88%抑制し、その他の19種類のアミノ酸のARS活性は抑制しなかった（表 1）。その他の抗KS陽性7血清も同様にasparaginyl tRNA合成酵素活性を特異的に抑制した。

2) 抗KS抗体陽性8例の臨床特徴（表 2）：発症は36才から72才と中高年齢で、女性が大多数を占めた。間質性肺炎は1例を除き全例に認めたが、筋炎は2例と少数であった。多発関節炎は半数に認めた。診断は2例がDMで、他6例は特発性間質性肺炎と診断された。

既知5種類の抗ARS抗体陽性例のHLAクラスII遺伝子を分析すると、抗Jo-1抗体陽性例にDRB1*0405-DQA1*0302-DQB1*0401を80%, 抗PL-12抗体陽性例にDRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602を57%に認め、有意に高頻度であった。本研究の抗KS抗体陽性例のHLAクラスII遺伝子では、検討し得た全4例がDR2(DRB1*1501/1502)を持っていた（表 3）。

【考察・結論】

ARSに対する自己抗体は、これまで抗Jo-1抗体をはじめ5種類が見出され、間質性肺炎を高頻度に併発するPM/DMとの密接な関連が報告されてきた¹⁾。教室では、新たな6番目の抗ARS抗体である、asparaginyl RSに対する抗KS抗体を発見し、その分子免疫学的性状を報告した²⁾。本研究は、PM/DM, IPなどを含む多数例を対象として、抗KS抗体陽性8例を同定し、その臨床・免疫学的特徴を検討した。

抗ARS抗体陽性例は、間質性肺炎、筋炎の他に、多発関節炎（非変形性、非破壊性）、レイノー現象、手指の色素沈着、落屑や裂溝を伴う乾燥・角化(Mechanic's hand)、発熱なども特徴的と報告されている¹⁾。抗KS抗体陽性例では、間質性肺炎を7例(88%), 多発関節炎を4例(50%)と高頻度に認めたが、筋炎は2例(25%), レイノー現象は1例(13%)と低頻度であった。対象症例中の抗ARS抗体陽性例における抗ARS抗体の3大臨床特徴である、多発関節炎、間質性肺炎、筋炎、の頻度を、各抗ARS抗体の特異性で分類し、調べた（図 2）。抗ARS抗体の中で多数を占める抗Jo-1抗体陽性例の臨床像より、抗ARS抗

体は間質性肺炎を併発するPM/DMという均質な病像との関連が報告されてきた。しかし、本研究により、抗ARS抗体特異性によりその臨床像も多様であることが明らかとなった。さらに、抗KS抗体陽性例が、筋炎よりむしろ間質性肺炎と密接に関連する抗PL-12抗体陽性例の臨床像と類似し、抗Jo-1抗体陽性例と異なる抗ARS臨床サブセットを形成するものと考えられた。しかし、抗ARS抗体陽性例では、特発性間質性肺炎と診断され経過観察中、筋炎を併発する症例もあり、症例の集積とともに今後の慎重な経過観察が必要とされる。

本研究では、抗ARS抗体陽性例のHLAクラスII遺伝子を検討したが、筋炎と関連する抗Jo-1抗体がDR4(DRB1*0405)と相関する一方、間質性肺炎と関連する抗KS抗体が抗PL-12抗体と同様、DR2(DRB1*1501/1502)と相関する可能性が示唆された。各抗ARS抗体と関連する臨床像の相違に対する免疫遺伝学的背景の関与が注目された。

ARSにはその構造よりClass IとClass IIがあり、asparaginyl RSはClass IIに分類される⁹⁾。6種類のARSのうち5種類がClass IIであり、Class IIがcomplexを形成しないでfreeの形で存在することが知られており、その構造も自己抗体産生に関連することが推定される。同抗原エピトープの分析、T細胞の認識機構の解明など同抗体産生機序の追究は、抗ARS抗体と関連する間質性肺炎、筋炎の病因解明につながり、重要な課題と考えられる。

【参考文献】

- 1) Targoff, I.N. Immune manifestations of inflammatory muscle disease. *Rheum. Dis. Clinics North Am.* 20:857-880, 1994
- 2) Hirakata, M., Nakamura, K., Okano, Y., Suwa, A., Inada, S., Akizuki, M., Hardin, J.A.: Anti-alanyl tRNA synthetase (PL-12) antibodies are associated with interstitial lung disease in Japanese patients. *Arthritis Rheum.* 38:S321, 1995
- 3) Hirakata, M., Suwa, A., Nagai, S., Kron, M.A., Trieu, E.P., Mimori, T., Akizuki, M., Targoff, I.N.: Anti-KS: Identification of autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase associated with interstitial lung disease. *J. Immunol.* 162:2315-2320, 1999
- 4) Moras, D. Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases. *Trends Biochem. Sci.* 17:59-164, 1992

図1. 抗ARS抗体陽性血清と抗KS抗体陽性血清が免疫沈降した核酸成分のUrea-PAGE(A)と蛋白成分のSDS-PAGE(B)

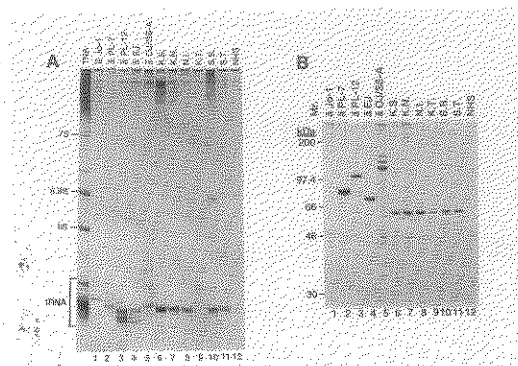


図2. 抗ARS抗体陽性例の臨床特徴

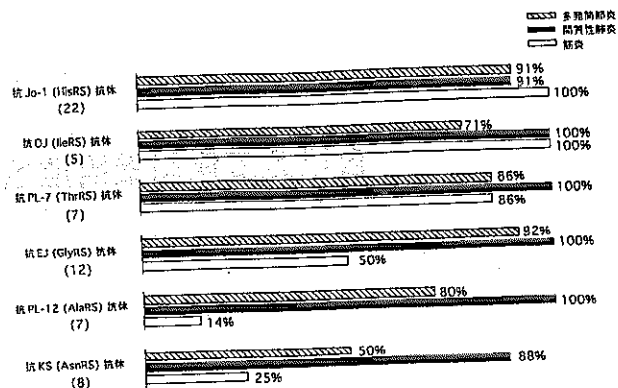


表1. 抗KS抗体陽性血清とそのIgGのアミノアシル化反応抑制試験

| Amino Acid | NHS 1:10 | NHS-IgG 6mg/ml | KS serum 1:10 | KS IgG 6mg/ml | Relevant* Synthetase |
|---------------|----------|----------------|---------------|---------------|----------------------|
| Alanine | 0 | 2 | 0 | 0 | 91 |
| Arginine | 0 | 0 | 4 | 0 | - |
| Asparagine | 0 | 14 | 88 | 88 | - |
| Aspartic Acid | 0 | 3.3 | 20 | 0 | - |
| Cysteine | 1.4 | 0 | 7.1 | 0 | - |
| Glutamic Acid | 0 | 0 | 3 | 0 | - |
| Glutamine | 0 | 0 | 19 | 0 | - |
| Glycine | 0 | 0 | 0 | 0 | 89 |
| Histidine | 0 | 0 | 0 | 0 | 98.9 |
| Isoleucine | 0 | 0 | 0 | 0 | 66 |
| Leucine | 0 | 0 | 3.4 | 0 | - |
| Lysine | 0 | 24 | 5 | 7.8 | 94.8 |
| Methionine | 0 | 24 | 1 | 16 | - |
| Phenylalanine | 0 | 17 | 0 | 7 | - |
| Proline | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| Serine | 0 | 30 | 6 | 15 | - |
| Threonine | 0 | 14 | 0 | 5.8 | 48.3 |
| Tryptophan | 0 | 8 | 29 | 4 | - |
| Tyrosine | 0 | 20 | 0 | 0 | - |
| Valine | 0 | 0 | 4 | 0 | - |

表2. 抗KS(AsnRS)抗体陽性例の臨床特徴

| 患者 | K.S. | K.N. | N.I. | K.T. | K.S. | D.O. | S.S. | S.T. |
|----------|-----------------|------|------|------|------|------|------|-----------------|
| 発症年齢 (歳) | 36 | 44 | 61 | 60 | 51 | 72 | 53 | 65 |
| 性別 | 女 | 女 | 女 | 女 | 女 | 女 | 女 | 男 |
| 間質性肺炎 | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) | (+) | (+) |
| 筋炎 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (-) |
| 多発関節炎 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (-) | (+) |
| DM 皮疹 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (-) |
| レイノー現象 | (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 診断 | ILD & Arthritis | ILD | ILD | ILD | ILD | DM | DM | ILD & Arthritis |

表3. 抗KS(AsnRS)抗体陽性日本人例のHLAクラスII遺伝子

| 患者 | K.S. | K.N. | N.I. | K.T. |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| DR | 2 / 5 | 2 / 1 | 2 / 2 | 2 / 4 |
| DRB1 | 1502 / 1101 | 1501 / 0101 | 1502 / 1502 | 1501 / 0405 |
| DQA1 | 0103 / 0501 | 0102 / 0101 | 0103 / 0103 | 0102 / 0303 |
| DQB1 | 0601 / 0301 | 0602 / 0501 | 0601 / 0601 | 0602 / 0401 |
| DPB1 | 0901 / 1401 | 0201 / 0501 | 0901 / 0901 | 0201 / 0402 |

自己免疫疾患素因遺伝子としての FcγRIIB1 の役割

広瀬幸子（順天堂大学医学部、第二病理）

姜 奕（順天堂大学医学部、第二病理）

【研究要旨】全身性エリテマトーデス(SLE)自然発症モデルである(NZB x NZW) F1 マウス系を用いて、SLE に特徴的な病態である自己抗体を含む高 IgG 血症の素因遺伝子を、マイクロサテライト DNA 多型を利用した QTL (quantitative trait loci) 法を用いてゲノムワイドに解析した。その結果、これが NZB マウスの第 1 染色体上テロメアに座位していることが示された。この部位には FcγRIIB をコードする遺伝子がマップされており、NZB には、NZW あるいは他の健常マウスには見られない FcγRII 遺伝子プロモーター領域の S box ならびに AP4 結合部位を含む転写制御分子結合領域の一部欠損が認められた。この欠損に相関して、NZB では活性化 B 細胞上の FcγRIIB1 分子の発現レベルが低下していることから、プロモーター領域を含む FcγRIIB 遺伝子多型が高 IgG 血症の素因となることが示された。

【研究目的】SLE はいくつかの遺伝子の組み合わせによる相補作用の結果として発症する多遺伝子の関与する遺伝性疾患である。SLE の特徴的病態の一つに、B 細胞の異常活性化に伴う自己抗体を含む高 IgG 血症があげられるが、この現象も明らかに遺伝的素因の関与する現象であることが、動物モデルを用いた解析から明らかとなっている。B 細胞の異常活性化の一要因として、B 細胞活性化抑制分子の機能不全が考えられる。本研究は、SLE における高 IgG 血症を伴う B 細胞異常活性化の素因として、実際に B 細胞活性化抑制分子の機能不全が関与するか否かを、SLE 自然発症モデルである(NZB x NZW) F1 マウス系を用いて明らかにすることを目的とした。

【研究方法】(NZB x NZW) F1 マウスと、それ自身では SLE を発症しない NZW マウスとを交配した 250 匹の退交配マウスを作製し、NZB と NZW の間で多型を示す約 170 個のマイクロサテライトマーカーを用いて、血中の IgG 抗 DNA 抗体ならびに total IgG 量についての QTL 解析により、素因遺伝子の座位決定を行った。