

【結果と考察】高 IgG 血症の出現は NZB マウスの第 1 染色体テロメアの遺伝子の作用によって、また、IgG 抗 DNA 抗体産生はこの遺伝子と第 17 染色体上の主要組織適合抗原複合体(MHC)連鎖遺伝子の相補作用によって規定されていることが示された。前者の遺伝子は第 1 染色体セントロメアより約 92cM の部位に存在し、この近傍には Fc γ RIIB をコードする遺伝子がマップされていた。

Fc γ RIIB は IgG の Fc 部分に対する低親和性受容体のひとつで、その中でも、Fc γ RIIB1 分子は主に B 細胞上に発現し、その細胞内領域に B 細胞抗原受容体からの活性化グナルを抑制的に制御する immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) を有する重要な免疫反応調節分子である。Fc γ RIIB 遺伝子を欠損したマウスでは外来抗原に対する IgG 免疫応答が正常マウスに比較して亢進していることが、ノックアウトマウスの作製によって示されている。従って、以上の遺伝的連鎖解析の結果から、(NZB x NZW) F1 マウスにおける IgG 抗体産生亢進が、NZB マウスの Fc γ RIIB1 分子の機能不全に由来する可能性が考えられる。

この点を踏まえ、B 細胞上の Fc γ RIIB1 分子の発現レベルに NZB と NZW 間で差が認められるか否かを flow cytometry を用いて解析した。その結果、非活性化 B 細胞では両マウス間に差は認められなかったが、IL-4 を加えて in vitro で B 細胞を活性化すると NZB の B 細胞では NZW に比較して Fc γ RIIB1 発現レベルが有意に低下することが示された。また、加齢に伴って形成される脾臓 germinal center 内の peanut agglutinin 陽性活性化 B 細胞での Fc γ RIIB1 発現レベルも NZW に比較して NZB で顕著に低下していた。

NZB と NZW 間に認められる活性化 B 細胞上の Fc γ RIIB1 分子の発現レベルの差は、Fc γ RIIB 遺伝子多型に基づく現象と考えられる。そこで、NZB と NZW 間で Fc γ RIIB 遺伝子の塩基配列を比較した。その結果、構造遺伝子には両者に差は認められなかったが、NZB マウスのプロモーター領域には NZW および健常マウスに比べて 13 塩基の欠損が認められた。この欠損部位には S box ならびに AP-4 結合 consensus sequence が存在していることから、この部位が活性化 B 細胞における Fc γ RIIB1 分子の発現調節を行っていると考えられる。また、(NZB x NZW) F1 マウスの活性化 B 細胞での Fc γ RIIB1 分子の発現は NZW よりもむしろ NZB マウスと同様に低レベルであることから、Fc γ RIIB 遺伝子プロモーター領域欠損の効果は優性に作用すると考えられる。

【結論】以上の結果から、SLEに特徴的な病的IgG抗DNA抗体産生を含む高IgG血症の原因となるB細胞の異常活性化に、FcγRIIB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部位欠損、ならびにこれに伴うB細胞上でのFcγRIIB1分子の発現レベル低下が関与していることが強く示唆された。ヒトSLEの素因遺伝子の一つがマウスの場合と同様にやはりFcγRIIをコードする第1染色体テロメアに存在することが世界的に注目されている。今回の解析から、FcγRIIB1の機能低下によるB細胞活性化シグナルの抑制障害がヒトSLEにおいても一つの素因となることが示唆される。

【参考文献】

1. Fujimura, T., S. Hirose, Y. Jiang, S. Kodera, H. Ohmuro, D. Zhang, Y. Hamano, H. Ishida, S. Furukawa, T. Shirai : Dissection of the effects of tumor necrosis factor- α and class II gene polymorphisms within MHC on murine systemic lupus erythematosus. *Int.Immunol.* 10:1467-1472, 1998.
2. Ida, A., S. Hirose, Y. Hamano, S. Kodera, Y. Jiang, M. Abe, D. Zhang, H. Nishimura, T. Shirai : Multigenic control of lupus-associated antiphospholipid syndrome in a model of (NZW x BXSB) F1 mice. *Eur. J.Immunol.* 28: 2694-2703, 1998.
3. Hamano, Y., S. Hirose, A. Ida, M. Abe, D. Zhang, S. Kodera, Y. Jiang, J. Shirai, Y. Miura, H. Nishimura, T. Shirai, T. : Susceptibility alleles for aberrant B-1 cell proliferation involved in spontaneously occurring B cell chronic lymphocytic leukemia in a model of New Zealand White mice. *Blood* 92: 3772-3779, 1998.

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

小池 隆夫（北海道大学医学部第2内科）
市川 健司（北海道大学医学部第2内科）
堤 明人（北海道大学医学部第2内科）
渥美 達也（北海道大学医学部第2内科）
松浦 栄次（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設）
小林 清一（北海道大学医療短期大学部）

【研究要旨】抗カルジオリピン抗体（aCL）及び、抗 β 2-グリコプロテインI（ β 2-GPI）抗体の測定は、抗リン脂質抗体症候群の診療及び臨床研究に於いて重要である。ヒト IgG クラスの aCL 及び抗 β 2-GPI 抗体測定系の標準となる抗体を得るため、自然発症 APS マウス由来のモノクローナル aCL、WBCAL-1 の可変部領域と、ヒト γ 定常部領域よりなるキメラ抗体を作成しその特異性を検討した。WBCAL-1 の可変部領域遺伝子と、ヒト γ 定常部領域遺伝子を持つプラスミドを作成し、マウス形質細胞株に導入し、安定形質発現細胞株を得た。安定形質発現細胞株培養上清に、ヒト γ 定常部領域を持った、aCL 活性及び抗 β 2-GPI 抗体活性を持つキメラ抗体が得られた。得られたキメラ抗体の活性と、多施設の aCL 測定系の標準血清との比較を行った。キメラ抗体は、多くの研究施設で用いられてきた IgG aCL 測定系の標準血清と同様の抗原への反応性を示し、測定系の標準として有用であると考えられた。

【研究目的】aCL やループスアンチコアグラント等の抗リン脂質抗体は、SLE およびその関連疾患患者血中にしばしば認められる。抗リン脂質抗体は、習慣流産、動・静脈血栓症、血小板減少症と関連することが知られており、これらの臨床像を持ち、血中に抗リン脂質抗体が証明される患者群は、抗リン脂質抗体症候群と呼ばれている¹。現在抗リン脂質抗体症候群の詳細な臨床像、予後、より適切な治療戦略に関する臨床研究が多くの施設で精力的に行われている。aCL は、抗リン脂質抗体症候群の疾患マーカーであるのみならず、血液凝固・線溶・血管内皮細胞機能に影響を及ぼし、抗リン脂質抗体症候群の病態形勢に重要な役割を果たしていると考えられている。従って、aCL の測定結果を多施設での比較検討できることが、異なった研究施設における、抗リン脂質抗体症候群の臨床像・病態の解析・より適切な治療法の検討結果を比較検討する上で重要である。しかし、aCL 測定系の、安定した再現性のある標準が確立されていない。抗リン脂質抗体症候群患者リンパ球を用いて作成した、モノクローナル aCL は、無尽蔵に生産でき、測定系の標準として適している。IgM クラスのモノクローナル aCL は、すでに我々が作成し保有しているが²、IgG クラスのモノクローナル aCL を作成することは非常に難しい。そこで、IgG クラスの aCL 測定系の標準となりうる、抗リン脂質抗体症候群モデルマウス由来のモノクローナル aCL

の可変部領域と、ヒト γ 定常部領域を持ったキメラ抗体を作成した。

【研究方法】抗リン脂質抗体症候群自然発症モデルマウス、NZW x BXS B F1 マウスより作成した、抗リン脂質抗体症候群患者由来の aCL と同様の特異性を持ったモノクローナル抗体 WBCAL-1 の可変部領域遺伝子の塩基配列を、5'RACE 法を用いて明らかにし、クローニングした。クローニングした可変部領域遺伝子を、ヒト κ および γ 1 定常部遺伝子が組み込まれたプラスミド（九州大学医学部渡辺

武教授より供与を受けた。）に組み込み、マウスミエローマ細胞株 P3-X63-Ag8.U1 細胞に、lipotransfection 法にて導入し安定形質発現細胞株を得た。

抗リン脂質抗体症候群患者血中の aCL は、血清中のアポ蛋白 β 2-グリコプロテイン I (β 2-GPI) の存在下でカルジオリピンに結合し³⁻⁵、さらに、カルジオリピンが存在しなくても、酸素原子を導入したポリスチレンプレートに固相化された β 2-GPI に結合することがすでに示されている^{2, 6}。そこで、キメラ抗体の、 β 2-GPI 存在下でのカルジオリピンへのおよび、酸素原子が導入されたポリスチレンプレートに固相化された β 2-GPI に対する反応性を固相酵素抗体法にて検討した。

HCAL の力価を、現在比較的広く使われている Harris らの定めた aCL 抗体価の単位、GPL を用いて測定し⁷、HCAL 濃度を、GPL へ変換する式を算定した。

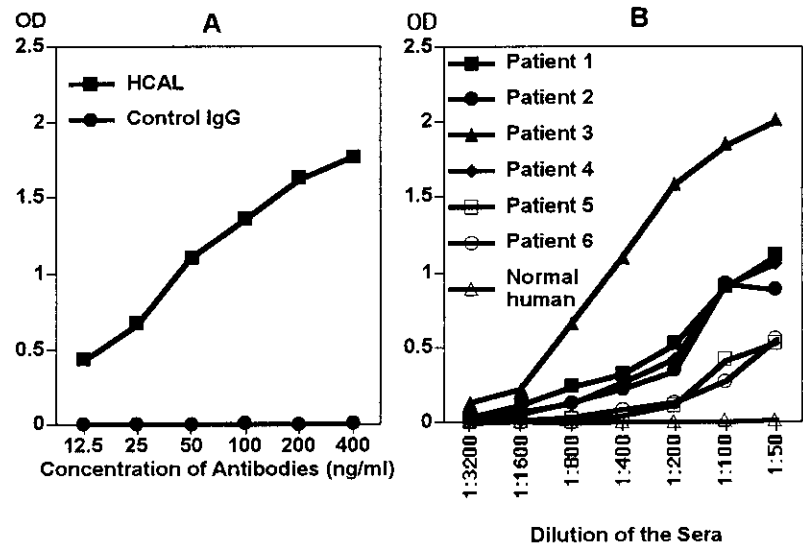


図1 HCAL(A)及び抗リン脂質抗体症候群患者6名(B)の血清の、固相化されたカルジオリピンへの反応性。

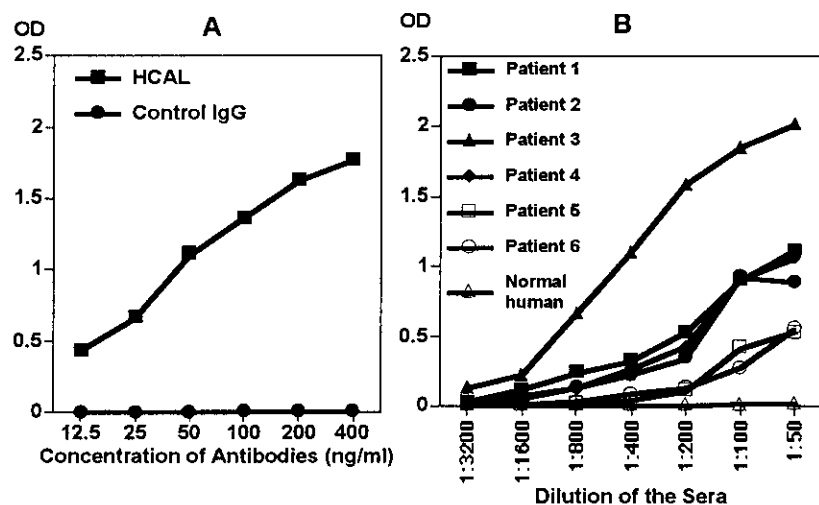


図2 HCAL(A)及び抗リン脂質抗体症候群患者6名(B)の血清の、固相化された β 2-GPI への反応性。

HCAL を APS に関する研究を行っているアメリカ、ヨーロッパ等の 18 の施設に送付し、HCAL と各施設のカルジオリピン、 β 2-GPI への反応性を、各施設の測定法にて比較検討した。

【結果と考察】

WBCAL-1 の可変部領域遺伝子の塩基配列を、リーダー領域から J 領域まで明らかにシクローニングした。クローニングした遺伝子を、ヒト γ 1 および κ 鎖定常部領域遺伝子を持ったプラスミドに組み込み、マウスミエローマ細胞株 P3-X63-Ag8.U1 細胞に発現させ、安定形質発現細胞株を得、クローニングした。クローニングした形質発現細胞培養上清中に、aCL 抗体活性を持ち、ヒト γ 定常部を持つキメラ抗体(HCAL)が、1 - 2 μ g/ml の濃度で検出された。クローニングした細胞は、凍結保存が可能であり、融解後も抗体を産生した。

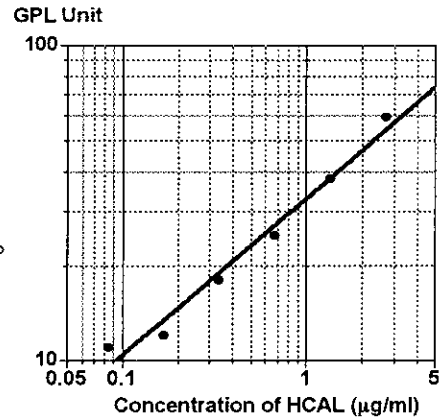


図3 HCAL 濃度と、GPL の関係

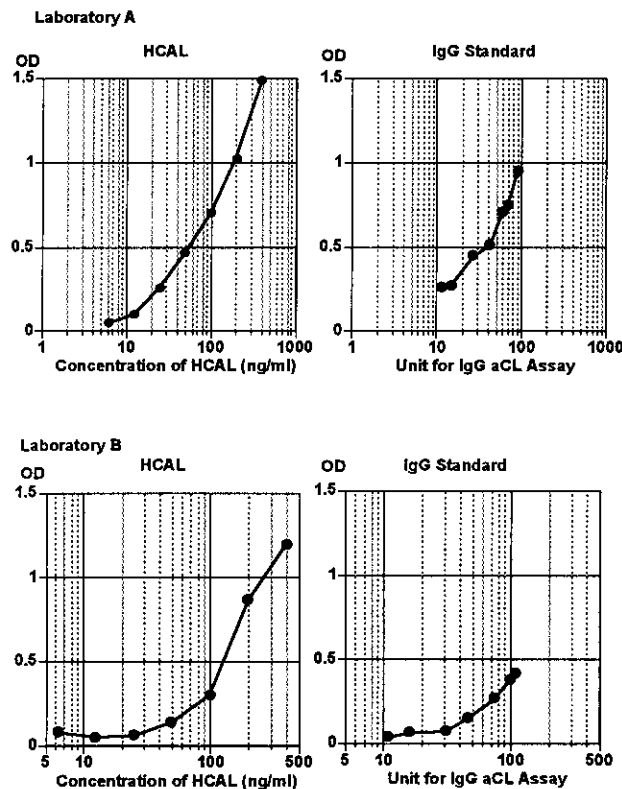


図4 代表的な2施設のHCALと標準血清のカルジオリピンへの結合

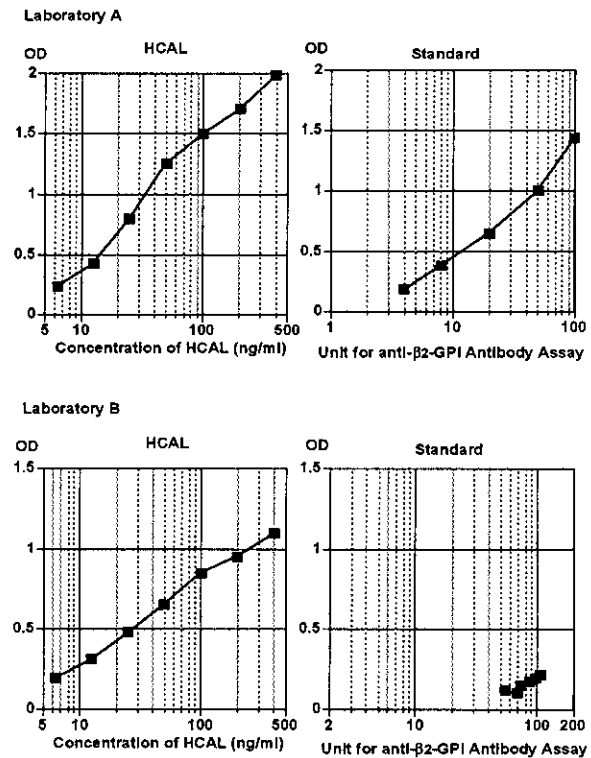


図5 代表的な2施設のHCALと標準血清の β 2-GPIへの結合

HCAL の、 β 2-GPI 存在下での固相化されたカルジオリピンへの、濃度依存性結合が、固相酵素抗体法にて示された (図1)。6.3 ng/ml の濃度にて HCAL の aCL 活性が検出された。HCAL は、酸化ポリスチレンプレートに固相化されたヒト β 2-GPI にも、濃度依存的に結合した (図2)。HCAL の、固相化されたカルジオリピンおよび、 β 2-GPI への反応性は、高力価の aCL が血中に証明される患者血清と同様であった (図1, 2)。

HCAL 0.084, 0.7, 0.33, 0.67, 1.3, 1.7 μ g/ml の aCL 活性を、現在比較的広く世界で使われて

いる aCL 測定単位、GPL に換算すると各々、11, 12, 18, 25, 38, 59 GPL であった。HCAL の濃度は、次の式にて GPL Unit に換算可能であった。GPL Unit = 32.9 x (HCAL 濃度 (μg/ml))^{0.503} (図 3)。

抗リン脂質抗体症候群に関する研究を行っている 18 研究施設において HCAL のカルジオオリピンへの反応性を検討した結果、17 施設で、HCAL は IgG クラスの aCL 測定の標準曲線となりうる、良好なカルジオオリピンへの結合曲線が得られた。HCAL のカルジオオリピンへの結合性は、各施設の標準血清の結合性と似ていた (図 4)。HCAL は酸化ポリスチレンプレートに固相化されたβ2-GPI へも、各施設で用いられてきた標準血清と同様の良好な結合性を示した (図 5)。

【結論】

抗リン脂質抗体症候群モデルマウス由来のモノクローナル aCL、WBCAL-1 の可変部領域と、ヒトκおよびγ1 鎖定常部領域よりなるキメラ抗体、HCAL を、マウスミエローマ細胞株にて発現させ、安定形質発現細胞株を得た。得られたキメラ抗体 HCAL は、多くの施設で、各々の施設の測定法にて、固相化されたカルジオオリピンおよびβ2-GPI に良好な反応性を示し、IgG クラスの aCL および抗β2-GPI 抗体測定系の標準血清となりうると思われる。

【参考文献】

1. Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13:486-9.
2. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E, Hughes GR. β2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1453-61.
3. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336:177-8.
4. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4120-4.
5. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335:1544-7.
6. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize β2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179:457-62.
7. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68:215-22.

抗プロトロンビン抗体の臨床的意義に関する研究

小池隆夫（北海道大学医学部、第二内科）
渥美達也（北海道大学医学部、第二内科）
市川健司（北海道大学医学部、第二内科）
堤 明人（北海道大学医学部、第二内科）
家子正裕（北海道医療大学、内科）

【研究要旨】 抗リン脂質抗体症候群(APS)は後天性血栓傾向としては最も頻度の高い病態として注目されている。APS の診断には抗リン脂質抗体の検出が必須である。抗リン脂質抗体ファミリーはリン脂質あるいはリン脂質結合蛋白と反応する多様な自己抗体の一群であり、その検出は必ずしも容易でない。今回、抗リン脂質抗体ファミリーのひとつである抗プロトロンビン自己抗体の測定方法を樹立し、その臨床的意義につき検討する。

【研究目的】 抗リン脂質抗体ファミリーのうち、最も研究がすすんでいるのは抗カルジオリピン抗体 (aCL)である。APS と関連した aCL はリン脂質であるカルジオリピンとリン脂質結合蛋白である $\beta 2$ グリコプロテイン I($\beta 2$ GPI)の複合体に結合し、しかもそのエピトープは $\beta 2$ GPI の分子上に分布していることが明らかとなり(1)、したがってこの抗体は抗 $\beta 2$ GPI 抗体ともよばれる。aCL の検出は ELISA で行なわれるが、スタンダードな ELISA プレートに直接 $\beta 2$ GPI を固相化しても $\beta 2$ GPI 上の aCL へのエピトープが表出しないため aCL は検出できない。しかし、カルジオリピン- $\beta 2$ GPI 複合体をプレートに固相化するか、または γ 線や β 線照射により酸化した ELISA プレートに $\beta 2$ GPI を固相化することで $\beta 2$ GPI 上のエピトープが aCL に暴露されるので、このいずれかの方法で aCL は検出可能である。しかもそれら 2つのアッセイで得られた aCL の力価には高い相関があり(2)、いずれも APS の臨床症状に特異性の高い aCL 検出法として確立されている。

aCL ELISA よりも以前から行なわれていた抗リン脂質抗体ファミリーの検出法は、凝固反応によるループスアンチコアグラント(LA)である。LA には著しい多様性があり、その標準化は長く困難であった。しかし 1990 年代になってから、代表的な LA には 2種類あることが明らかとなってきた。すなわちひとつは前述した $\beta 2$ GPI の存在に依存する LA(3)、いまひとつはプロトロンビン濃度に依存する LA(4)で、それぞれ $\beta 2$ GPI 依存性およびプロトロンビン依存性 LA とよばれる。プロトロンビンは代表的なリン脂質結合蛋白で、リン脂質-プロトロンビン複合体に反応する抗体、すなわち抗プロトロンビン抗体がプロトロンビン依存性 LA 活性の責任抗体である可能性が示唆された。そこで抗プロトロンビン抗体の免疫学的検出法が検討された。 $\beta 2$ GPI と同様に酸化 ELISA プレートにプロトロンビンを固相化すると LA 陽性血漿中に抗プロトロンビン抗体が検出さ

れた(5)。そこでこのアッセイを用いて臨床的意義が検討されたが、APS の臨床症状との相関はないか(6)、または弱い(7)とされ、抗プロトロンビン抗体測定の意義は疑問視されるようになった。ところが一方、ホスファチジルセリン(PS)結合プロトロンビンを抗原にしたアッセイ(8)での臨床的意義についての報告はなく、それと LA との関連も不明である。

本研究は未だ意義の確立されていない抗ホスファチジルセリン-プロトロンビン複合体抗体(aPS/PT)について、その検出法の樹立と自己免疫疾患における臨床的意義の検討を目的とする。

【研究方法】

当科膠原病外来を受診した 265 例を対象とした。臨床経過はカルテおよび病歴聴取により注意深く調査した。LA 測定に用いる Platelet free plasma(PFP)は、0.105M クエン酸ナトリウムを 1/10 量含む採血管を用いて採血後ただちに 4°C、2,000 g にて 15 分間遠心し、径 0.22 μ m のフィルターを通して分注、凍結保存した。同時に血清サンプルを採取した。

aPS/PT は、PS を ELISA プレートに固相化後、5mM CaCl₂ の存在下でプロトロンビンを加え、PS-プロトロンビン複合体をプレート上の抗原として測定した。プロトロンビン単独を抗原とする抗プロトロンビン抗体(aPT)アッセイは、照射 ELISA プレート(Maxisorp, Nunc 社)にプロトロンビンを直接固相化して測定した。IgG aCL はウシ血清をブロッキング剤やサンプル希釈液として用いる標準法で測定し、GPL 標準単位で力価をもとめた。陽性血清については aCL 活性の β 2GPI 依存性を調べた。

ワーファリンを使用していない患者では希釈ラッセル蛇毒時間(dRVVT)およびその確認試験にて LA を調べた。

【結果と考察】

IgG aPT/PS は IgG 29 例に検出できた。陽性患者は原発性 APS 4 例、SLE 24 例で、その他の疾患(慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群など)ではすべて陰性であった。IgG aPS/PT の分布を図 1 に示す。APS にみられる臨床症状(動・静脈血栓症、習慣流産、血小板減少症)の既往のある患者は 90/265 例(34%)であり、この患者群における aPS/PT、 β 2GPI 依存性 aCL、LA および aPT の臨床的意義(オッズ比、感度、特異度、positive predictive value)を表 1 にまとめた。dRVVT による LA は 49 例に認められ、そのうち 24 例(49%)で IgG aPS/PT が陽性であったのに対し、LA 陰性者 204 例中 IgG aPS/PT は 5 例(2%)にのみ陽性であり、dRVVT と aPS/PT の強い相関が示された(オッズ比 38.2 [95%CI 13.4-109.1]、感度 49.0%、特異度 97.5%、positive predictive value 82.8%)。IgG aPT と IgG aPS/PT には有為な相関がなかった(図 2)。また aPT は APS の臨床症状とも LA とも有為な相関が示されなかった(結果は示さず)。

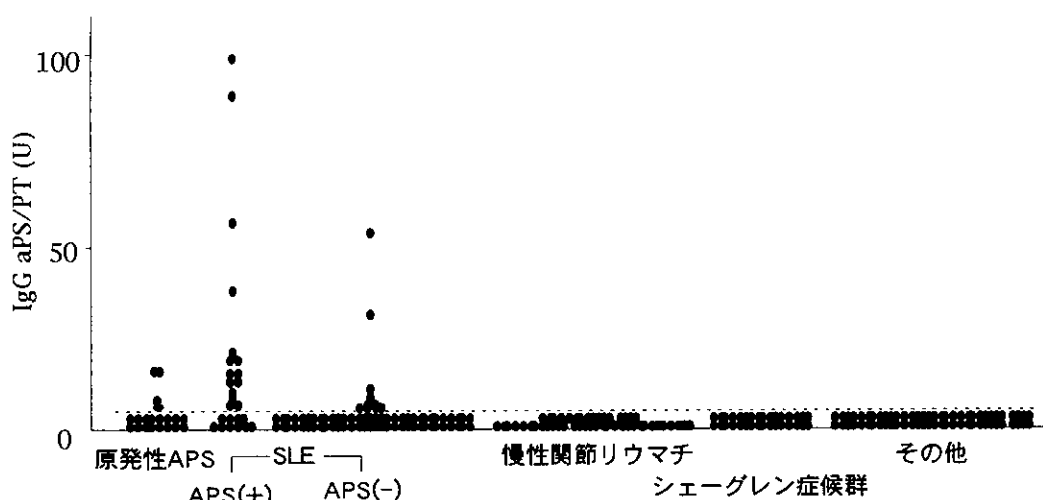


図1. IgG aPS/PT の分布

以上の結果は、IgG aPS/PT は APS の臨床症状に極めて特異性の高いマーカーとしての可能性を示唆した。その特異度や positive predictive value の高さは、すでに特異的な APS のマーカーとして確立され我が国でも広く施行されている β 2GPI 依存性 aCL に匹敵することが示された。aPT で検出される抗プロトロンビン抗体は、aPS/PT 陽性者にもみられる一方、多くの不一致例が認められた。aPT と LA や APS の相関は弱く、aPT の APS のマーカーとしての有用性は確認されなかった。aPS/PT と aPT が同じエピトープを認識しているかどうかは今後の検討が必要であるが、少なくとも LA や APS と関連した抗プロトロンビン抗体検出の方法としては aPT より aPS/PT が優れていることが示された。なお、本研究では IgM aPS/PT もあわせて測定し、IgG と双方陽性の 8 例を含めて 13 例で陽性であった。IgM を含めた場合、aPS/PT の APS に対する感度は 24.4%、特異度は 92.6% となり、IgG のみの場合 (表 1 参照) とくらべたときさほど特異度を失うことなく若干感度をあげることができた。

表 1. APS にみられる臨床症状に対する各抗リン脂質抗体検出法の臨床的意義

	Odds Ratio [95% CI]	sensitivity (%)	specificity (%)	positive predictive value (%)
aPS/PT	4.42 [1.96 - 9.97]	21.1	93.9	65.5
aCL	3.33 [1.73 - 6.45]	28.9	87.8	57.8
aCL/ β 2GPI	5.73 [2.15 - 15.24]	17.8	96.4	72.7
LA	4.13 [2.16 - 7.91]	35.8	86.8	59.2
aPT	1.44 [0.72 - 2.90]	18.8	86.1	41.0

aPS/PT; 抗ホスファチジルセリン-プロトロンビン抗体、aCL; 抗カルジオリピン抗体 (標準法)、aCL/ β 2GPI; β 2 グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体、LA; ループスアンチコアグラント、aPT; 抗プロトロンビン抗体 (直接固相による)

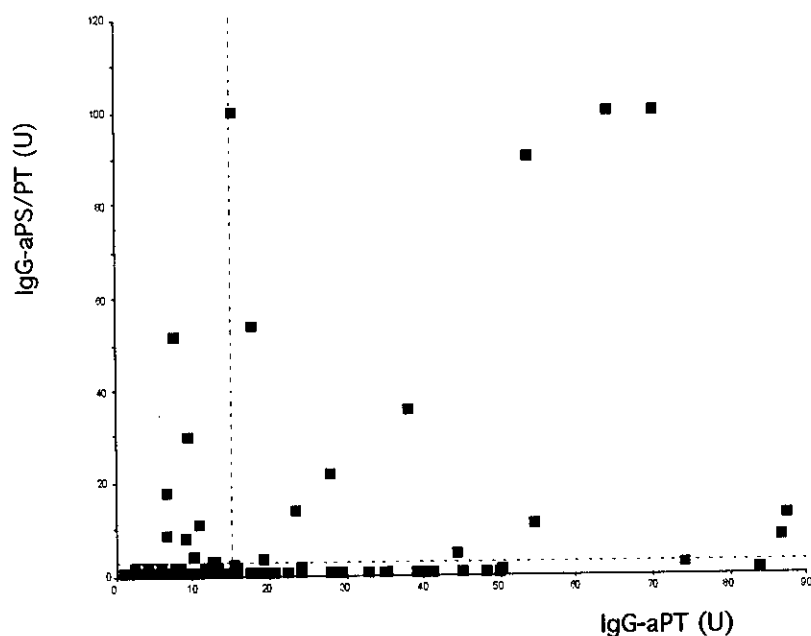


図2. IgG aPS/PTとIgG aPT の関係。両者に有為な相関は認めなかった。

【結論】 抗プロトロンビン抗体の意義は測定法によって異なっていた。aPT/PS は APS の臨床症状に特異性の高いマーカーとしての役割をもつ可能性が示された。今後、抗プロトロンビン抗体の免疫学的特性、凝固線溶系にあたる影響や病原性について検討をつづけていく予定である。

【参考文献】

1. Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA et al. Human β 2-glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using deleted mutants expressed by a Baculovirus system. *Blood* 1996;87:3262-70.
2. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize β 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994;179:457-62.
3. Takeya H, Mori T, Gabazza EC, Kuroda K, Deguchi H, Matsuura E et al. Anti-beta2-glycoprotein I (beta2GPI) monoclonal antibodies with lupus anticoagulant-like activity enhance the beta2GPI binding to phospholipids. *J Clin Invest* 1997;99:2260-8.

4. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991;66:629-32.
5. Arvieux J, Darnige L, Caron C, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1995;74:1120-5.
6. Horbach DA, van Cort E, Donders RC, Derksen RH, de Groot PG. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison between different assays for the detection of antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1996;76:916-24.
7. Bertolaccini ML, Atsumi T, Khamashta MA, Amengual Q, Hughes GRV. Autoantibodies to human prothrombin and clinical manifestations in 207 patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998;25:1104-8.
8. Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997;77:486-91.

シェーグレン症候群小唾液腺内のCD40/CD40 ligandとBcl-2関連蛋白の発現に関する研究

分担研究者 江口勝美（長崎大学医学部、第一内科）
中村英樹（長崎大学医学部、第一内科）
川上純（長崎大学医学部、第一内科）
富永雅博（長崎大学医学部、第一内科）
右田清志（長崎大学医学部、第一内科）
河部庸次郎（長崎大学医学部、第一内科）

【研究要旨】 シェーグレン症候群では自己抗体産生がさかんであるが、抗体産生にはT-B細胞の接合が必要である。このとき、副シグナルであるCD40/CD40 リガンドがT-B細胞の接合、B細胞の分化に必要である。また、シェーグレン症候群の発症にHTLV-Iが関与していることが知られているため、抗HTLV-I抗体の有無でこれら蛋白の発現を比較検討した。10人の抗HTLV-I抗体陽性患者と8人の抗HTLV-I抗体陰性患者を対象とし、末梢血でのCD40/CD40リガンドの発現をフローサイトメーターで検討し、組織での発現を免疫組織染色にて検討した。その結果、末梢ではCD40の発現は殆どB細胞上に、またCD40は5-10%の末梢血単核球上に見られ、CD40 リガンドは殆ど発現していなかった。一方、唾液腺局所では多数のCD40とCD40よりは少数であるがCD40リガンドの発現も観察された。また、CD40は浸潤単核球上に多数発現しているBcl-2, Bcl-xとco-expressionしていることが明らかとなった。これら蛋白の発現は抗HTLV-I抗体の有無で差を認めなかった。これによりB細胞がCD40/CD40リガンドとBcl-2 family蛋白の発現によりアポトーシスを免れ、形質細胞へ分化し、自己抗体産生を行っていることが示唆された。

【研究目的】 シェーグレン症候群では抗SS-A/SS-B抗体など自己抗体産生がさかんである（1）。抗体産生にはT細胞とB細胞の接合が必要であるが、その際にB細胞上のCD40と活性化されたT細胞上に発現するCD40リガンドが副シグナルとして重要であると考えられている。例えば、CD40とCD40リガンドの接合をブロックするとB細胞の抗体産生能が低下することが知られており（2）、ループス腎炎の動物モデルでは、抗CD40抗体を投与することにより炎症が抑制されることが証明されている（3）。さらに、B細胞はBcl-2の発現増強によりアポトーシス抵抗性になることが知られ（4）、また、シェーグレン症候群の唾液腺内の浸潤リンパ球がアポトーシス抵抗性であることも報告された（5）。このため、今回の研究ではCD40/CD40LリガンドとともにBcl-2 family 蛋白の発現も検討した。一方、私達はシェーグレン症候群の発症にHTLV-Iが関与していることを報告してきた（6、7）。例えばHTLV-I関連脊髄症の患者には60%に同症候群が合併することが明らかとなった（8）。このため、今回の研究でも免疫組織学的にCD40/CD40リガンドとBcl-2 family

蛋白の発現を抗HTLV-I抗体の有無で比較検討した。

【研究方法】

抗HTLV-I抗体陽性SS (HAM患者4人)が8人、同抗体陰性SSが10人で、平均年齢はそれぞれ64.3±16.0歳、59.8±9.4歳であった。HAMの診断は納らの診断基準(9)に従った。また、今回の研究では全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、強皮症などの自己免疫疾患を合併した二次性のシェーグレン症候群は除外した。シェーグレン症候群の診断はヨーロッパ予備分類(10)に従った。またインフォームド・コンセントは各々の患者より得た。唾液腺生検を行い、得られた組織は直ちに4%パラホルムアルデヒドにて固定し凍結保存した。免疫組織染色はストレプトアビジン・ビオチン法を用いDAB発色を行った。また、ミラー切片(11)を作成しco-expressionの検討を行った。

【結果と考察】

まず、抗HTLV-I抗体陽性および陰性患者群の末梢血上のCD40/CD40リガンドの発現をフローサイトメーターにて検討した。いずれの群でもCD40は5-10%の末梢血に陽性でありCD40リガンドの発現は観察されなかった。正常対照群の末梢血ではCD40/CD40リガンドともに発現していなかった。次にCD3陽性T細胞およびCD20陽性B細胞上のCD40/CD40リガンドの発現を二重染色法にて観察した。殆どのCD40陽性細胞はB細胞上に発現しており、CD40リガンドはT細胞上にもB細胞上にも殆ど発現していないことが示された。これら蛋白の発現は抗HTLV-I抗体の有無で有意差を認めなかった。

次に免疫組織染色にて唾液腺局所でのCD3, CD40リガンド, CD20, CD40およびPCA-1(形質細胞のマーカー)(12)の発現を連続切片で観察した。この結果、50%以上の浸潤単核球がCD3とCD40を発現していた。また、CD20とPCA-1も10-50%の浸潤単核球上に発現していた。CD40リガンドは、末梢血では殆ど発現が見られなかったが、組織局所ではCD40よりは陽性率が低いものの明らかな発現が観察された。同時にこの連続切片での検討でCD40/CD40リガンドの発現がTおよびB細胞上に見られることが観察された。これは抗HTLV-I抗体の有無に関わらず同様の傾向を示した。さらにアポトーシス抑制蛋白であるBcl-2 family蛋白(13)とCD40/CD40リガンドの発現を抗HTLV-I抗体の有無で連続切片にて検討した。この結果、Bcl-2はCD40と同様50%以上の浸潤単核球上に発現しており、これに対しBaxの発現はBcl-2に比し有意に少なかった。また、Bcl-xの発現もBcl-2と同様に多数の浸潤単核球上に発現していた。また、ミラー切片による検討でCD40はBcl-2とBcl-xの両方とco-expressionしていることが示された。

今回の検討でシェーグレン症候群患者のCD40やCD40リガンドは末梢血では発現が殆ど見られず、組織局所で発現していることが明らかとなった。また、組織学的検討で多数のCD40とともに多数のBcl-2, Bcl-xが発現していることが明らかとなったが、B細胞や形質細胞にCD40, Bcl-2とBcl-xが多数発現した。このことは、HTLV-I感染の有無に関わらず、浸

潤単核球上にCD40/CD40リガンドとともにBcl-2/Bcl-xが発現することによりB細胞がアポトーシスを免れ（４）、形質細胞へ分化し抗体産生を行うことが示唆された。

【結論】

シェーグレン症候群では唾液腺局所の浸潤リンパ球上に抗HTLV-I抗体の有無に関わらずCD40およびCD40リガンドが発現しており、Bcl-2/Bcl-xのco-expressionによりアポトーシス抵抗性になっている可能性が示唆された。これにより、唾液腺局所の浸潤B細胞は形質細胞へ分化可能となり抗体産生に関与すると考えられた。

【参考文献】

1. Moutsopoulos HM, Chused TM, Mann DL, Rlippel JH, Fauci AS, Frank MM, Lawley TJ, Hamburger MI. Sjogren's syndrome (sicca syndrome) current issues. *Ann Intern Med* 1980; 92: 212-226
2. Nonoyama S, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ledbetter JA, Ochs HD. B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1097-1102
3. Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJA, Claassen E. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2499-2504
4. Tsubata T, Wu J, Honjo T. B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* 1993; 364: 645-648
5. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, Liu GT, D'souza E, McGuff HS, Guerrero D, Talal N, and Dang H. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 87-97
6. Eguchi K, Matsuoka N, Ida H, Nakashima M, Sakai M, Sakito S, Kawakami A, Terada K, Shimada H, Kawabe Y, Fukuda T, Sawada T, Nagataki S. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 769-776
7. Terada K, Katamine S, Eguchi K, Moriuchi R, Kita M, Shimada H, Yamashita I, Iwata K, Tsuji Y, Nagataki S, Miyamoto T. Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-I in Sjogren's syndrome. *Lancet* 1994; 344: 1116-1119

8. Nakamura H, Eguchi K, Nakamura T, Mizokami A, Shirabe S, Kawakami A, Matsuoka N, Migita K, Kawabe Y, Nagataki S. High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 167-172
9. Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Tara M, Igata A. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T cell leukemia-like cells. *Ann Neurol* 1987; 21: 117-122
10. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, Bjerrum KB, Braga S, Coll J, Vita S, Drosos AA, Ehrenfeld M, Hatron PY, Hay EM, Isenberg DA, Janin A, Kalden JR, Kater L, Konttinen YT, Maddison PJ, Maini RN, Manthorpe R, Meyer O, Ostuni P, Pennec Y, Prause JU, Richards A, Sauvezie B, Schi'ldt M, Sciuto M, Scully C, Shoenfeld Y, Skopouli FN, Smolen JS, Snaith ML, Tishler M, Todesco S, Valesini G, Venables PJW, Wattiaux MJ, Youinou P. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome: results of a prospective concerted action supported by European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 340-347
11. Osamura RY, Watanabe K, Nakai Y, Imura H. Adrenocorticotrophic hormone cells and immunoreactive b-endorphin cells in the human pituitary gland. *Am J Pathol* 1980; 99: 105-124
12. Nakao H, Eguchi K, Kawakami A, Migita K, Otsubo T, Ueki Y, Shimomura C, Tezuka H, Matsunaga M, Maeda K, Nagataki S. Phenotypic characterization of lymphocytes infiltrating synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis: analysis of lymphocytes isolated from minced synovial tissue by dual immunofluorescent staining. *J Rheum* 1990; 17: 142-148
13. Boussiotis VA, Lee BJ, Freeman GJ, Gribben JG, Nadler LM. Induction of T cell clonal anergy results in resistance, whereas CD28-mediated costimulation primes for susceptibility to Fas- and Bax-mediated programmed cell death. *J Immunol* 1997; 159: 3156-3167

FK506 のRA滑膜細胞に対する作用

右田清志 (長崎大学医学部、第一内科)
分担研究者 江口勝美 (長崎大学医学部、第一内科)

【研究要旨】 免疫抑制剤FK506とステロイドの、RA滑膜細胞に対する相互作用について検討した。FK506で前処置した滑膜細胞では、低濃度のステロイド刺激により、細胞質ステロイドレセプターの核への移行が増強された。またFK506は、低濃度のステロイドによる、RA滑膜細胞のCOX-2mRNA、及び蛋白の発現の抑制を増強した。

【研究目的】 グルココルチコイドは、強力な抗炎症作用を含め広範な生理作用を有し、現在、免疫学的疾患、炎症性疾患の治療に用いられている。近年、ステロイドの作用機序の解明が、分子レベルで進んでいる。細胞質ステロイドレセプターは、そのリガンドであるステロイドと結合すると、複合体を形成している熱ショック蛋白と解離して、核へ移行し標的遺伝子を、転写レベルで制御する。今回、ステロイドと、免疫抑制剤FK506との相互作用について分子レベルで検討した。

【研究方法】 1. 慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞の cyclooxygenase-2(COX-2)の発現は、RT-PCR法、イムノプロットで測定した。
2. 滑膜細胞のCOX-2発現に対する、FK506、デキサメサゾンの影響を検討した。
3. 細胞質ステロイドレセプターの細胞内局在は、抗ステロイドレセプターを用いた蛍光抗体法で検討した。

【結果と考察】 1. FK506(1 μ M)で前処置したRA滑膜細胞を、デキサメサゾン(10^{-9} M- 10^{-8} M)で刺激すると、無処置の滑膜細胞にくらべ、細胞質ステロイドレセプターの核移行が増強された。
2. FK506で前処置したRA滑膜細胞を、デキサメサゾン(10^{-9} M)で刺激すると、無処置の滑膜細胞にくらべ、COX-2mRNAの発現がより抑制された。
3. IL-1 β で誘導される滑膜細胞のCOX-2蛋白の発現は、低濃度のデキサメサゾン(10^{-9} M)では抑制されないが、FK506で前処置することで抑制された。

ステロイドは細胞質ステロイドレセプター(GR)を介して、標的遺伝子を転写レベルで制御し、その生理作用を発揮する。つまりステロイドがGRに結合すると、GRと複合体を形成している、熱ショック蛋白(HSPs)と解離し核へ移行し、標的遺伝子のプロモーターに存在するGRE(glucocorticoid responsive element)に結合し転写を促進したり、他の転写因子間相互作用を介し、負の調節を行う(1)。最近、GRと複合体を形成しているHSPのひとつであるHSP56がFK506結合蛋白(FKBP)であることが判明した(2)。今回の実験結果より、細胞をFK506で前処理することで、GRとHSPとの解離、GRの核移行を促し、その転写活性を増強させた。さらに、ステロイドで制御される標的遺伝子として、COX-2を例にとり(3)、FK506とステロイドの影響について検討した。滑膜細胞をFK506で前処置することで、低濃度のステロイドで、COX-2mRNA、蛋白の発現が抑制されることを確

認した。つまり免疫抑制剤FK506は、低濃度のステロイドによるGRの核移行を促し、その転写活性を増強させることで、ステロイドの免疫抑制効果、抗炎症効果を増強させることが示唆された。

【結論】免疫抑制剤FK506は、低濃度ステロイド存在下で、細胞質ステロイドレセプターの核への移行を促し、転写を促進させ、ステロイドの生理作用を増強させることが明らかになった。

【参考文献】

1. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson J-A, and Van de Saag PT. Negative cross-talk between Rel A and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoid. *Mol. Endocrinol* 1995;9:401-412.
2. Yem AW, Tomasselli AG, Heinrikson RL, Zurcher-Neely H, Ruff VA, Johnson RA, and Deibel MR. The hsp56 component of steroid receptor complexes binds to the immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:2868-2871.
3. Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, and Hla T . Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 β , phorbol ester and corticosteroids. *J. Clin. Invest.* 1994; 93:1095-1101.

HTLV-I Tax の抗アポトーシス作用の検討

川上 純 (長崎大学医学部、第一内科)
中島友紀 (長崎大学薬学部、病院薬学)
中村英樹 (長崎大学医学部、第一内科)
飛田あゆみ (長崎大学医学部、第一内科)
山崎聡士 (長崎大学医学部、第一内科)
浦山哲 (長崎大学医学部、第一内科)
右田清志 (長崎大学医学部、第一内科)
河部庸次郎 (長崎大学医学部、第一内科)

分担研究者 江口勝美 (長崎大学医学部、第一内科)

〔研究要旨〕 NF- κ B の抗アポトーシス作用が最近注目されている。今回、NF- κ B 活性化阻害によるアポトーシス誘導の分子機構、および、HTLV-I Tax の効果について検討した。Jurkat 細胞および同細胞に HTLV-I Tax cDNA を導入した JPX-9 細胞 (CdCl₂により Tax 発現を誘導) を実験に使用し、アポトーシスは NF- κ B 阻害剤である PDTC および NAC 添加により誘導した。CdCl₂非添加では、PDTC および NAC で誘導されるアポトーシスの程度は Jurkat と JPX-9 細胞間では差がなかった。このアポトーシスは、caspase-8 活性化を介した caspase-3 活性化により惹起された。一方、CdCl₂を添加すると、JPX-9 細胞の NF- κ B の核内移行は顕著に促進され、PDTC および NAC で誘導されるアポトーシスには抵抗性を示したが Jurkat 細胞のアポトーシスには差がなかった。このアポトーシス誘導過程では Bcl-2/Bax の発現の差はなかった。以上の結果より、HTLV-I Tax は NF- κ B 活性化により宿主細胞のアポトーシスを抑制し、自己免疫疾患の発症や進展に関与することが示唆された。

〔研究目的〕 HTLV-I は ATL のみではなく、HAM、RA、SS 等の自己免疫疾患の発症に関与していると考えられ、その機序としては Tax 蛋白による NF- κ B 活性化を介したサイトカイン産生の亢進が示唆されている (1-7)。一方、最近、NF- κ B は抗アポトーシス作用も注目されている (8-13)。今回、我々は、NF- κ B 活性化阻害によるアポトーシス誘導機序、および、Tax 遺伝子導入細胞を用いて、Tax 蛋白が NF- κ B 活性化を介して抗アポトーシス作用を惹起しうるか否かについて検討した。

〔研究方法〕

1. 細胞は Jurkat 細胞および Jurkat 細胞に HTLV-I Tax cDNA を導入した

JPX-9 細胞(CdCl₂添加により Tax 発現を誘導)を実験に使用した(東北大学 菅村教授より供与)。

2. アポトーシスは、NF-κB 阻害剤である PDTC および NAC を加え誘導した。NF-κB の核内移行は EMSA にて、また、アポトーシスは hypodiploid DNA および Hoechst 33258 dye staining にて評価した。

3. アポトーシス誘導過程における caspase-3 活性は、a. Western blotting b. Ac-DEVD-MCA による Enzyme activity assay にて評価した。Caspase-3 活性の抑制実験は、Ac-DEVD-CHO (DEVD-CHO) を添加して行った。一部の実験には Ac-YVAD-CHO (YVAD-CHO、caspase-1 阻害ペプチド)、Z-IETD-FMK (IETD-FMK、caspase-8 阻害ペプチド) も使用した。Bcl-2 と Bax の発現は Western blotting にて確認した。

[結果と考察] 上記の研究方法により、以下の実験結果が得られた。

1. CdCl₂ 非添加では、PDTC および NAC で誘導されるアポトーシスの程度は Jurkat 細胞および JPX-9 細胞間で差がなかった。

2. CdCl₂ を添加すると、JPX-9 細胞の NF-κB の核内移行は顕著に促進され、同細胞は PDTC および NAC で誘導されるアポトーシスに強い抵抗性を示したが、Jurkat 細胞では CdCl₂ 非添加時と差がなかった。

3. PDTC および NAC で誘導されるアポトーシスは、NF-κB の核内移行が阻害された後に、caspase-8 を介した caspase-3 の活性化により惹起された。caspase-1 の関与は認められなかった。CdCl₂ を添加して培養した JPX-9 細胞は、このアポトーシスに抵抗性であったが、この細胞では caspase-8 および caspase-3 の活性化が著明に抑制されていた。

4. Bcl-2 および Bcl-2/Bax 比の量的な変化は、PDTC および NAC で誘導されるアポトーシスの過程において差はなかった。

以上より、NF-κB の核内移行が阻害されると、Bcl-2 関連蛋白以外の抗アポトーシス作用がある蛋白 (caspase の活性化抑制作用がある蛋白) の発現が抑制され、その結果 caspase-8 から caspase-3 への caspase cascade が作動して細胞にはアポトーシスが誘導されることが考えられた。HTLV-I Tax 蛋白は NF-κB の核内移行を顕著に促進し、caspase cascade を抑制し抗アポトーシス作用を現すことが示唆された。

[結論] NF-κB 活性化を阻害すると caspase-3 活性化を介して細胞にはアポトーシスが誘導されることが示唆された。HTLV-I は Tax 蛋白発現を介して NF-κB 活性化を強く誘導し、ひいては HTLV-I 感染細胞の増殖やサイトカイン産生を促進し、自己免疫疾患の発症および進展に関与することが考えられた。

[参考文献]

1. Wano Y, T. Hattori, M. Matsuoka, K. Takatsuki, A.O. Chua, U. Gunler, W.C. Greene: Interleukin 1 gene expression in adult T cell leukemia. *J Clin Invest* 80: 911, 1987
2. Maruyama M, H. Shibuya, H. Harada, M. Hatakeyama, M. Seiki, T. Fujita, J. Inoue, M. Yoshida, T. Taniguchi: Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-I-encoded p40x and T3/Ti complex triggering. *Cell* 48: 343, 1987
3. Siekevitz, M, M.B. Feinberg, N. Holbrook, F. Wong-Staal, W.C. Greene: Activation of interleukin-2 and interleukin-2 receptor (Tac) promoter expression by the trans-activator (tat) gene product of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5389, 1987
4. Sakai M, K. Eguchi, K. Terada, M. Nakashima, I. Yamashita, H. Ida, Y. Kawabe, T. Aoyagi, H. Takino, T. Nakamura, S. Nagataki: Infection of human synovial cells by human T cell lymphotropic virus Type I; proliferation and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor production by synovial cells. *J Clin Invest* 92: 1957, 1993
5. Baeuerle, PA, T. Henkel: Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141, 1994
6. Yamashita I, S. Katamine, R. Moriuchi, Y. Nakamura, T. Miyamoto, K. Eguchi, S. Nagataki: Transactivation of the human interleukin-6 gene by human T-lymphotropic virus type 1 Tax protein. *Blood* 84: 1573, 1994
7. Terada K, S. Katamine, K. Eguchi, R. Moriuchi, M. Kita, H. Shimada, I. Yamashita, K. Iwata, Y. Tsuji, S. Nagataki, T. Miyamoto: Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-I in Sjögren's syndrome. *Lancet* 344: 1116, 1994