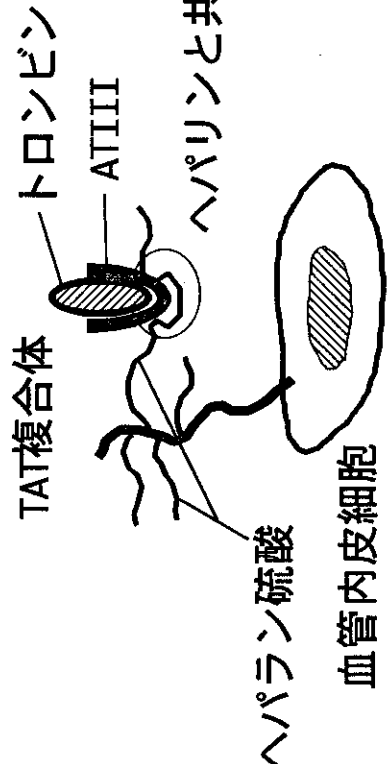


A. VPSの生理学的抗凝固活性



ヘパリンと共通するATIII結合部位 (五糖体) =VPS  
 → TAT複合体形成の促進(〜x1000)⇨  
 トロンビンの抑制  
 ⇨凝固カスケードの抑制

B. 抗VPS自己抗体の病的意義

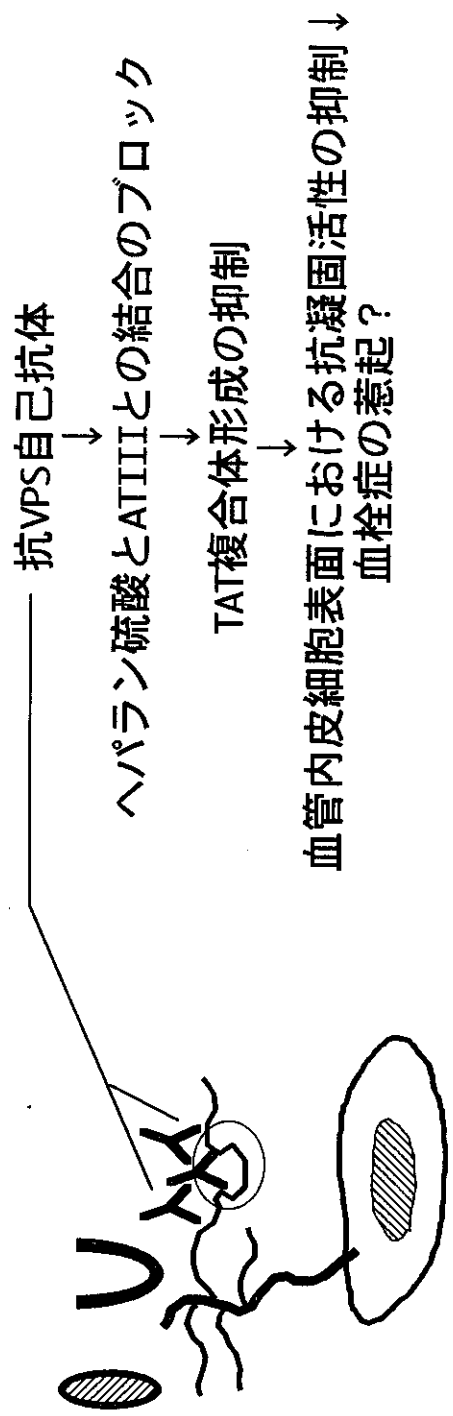
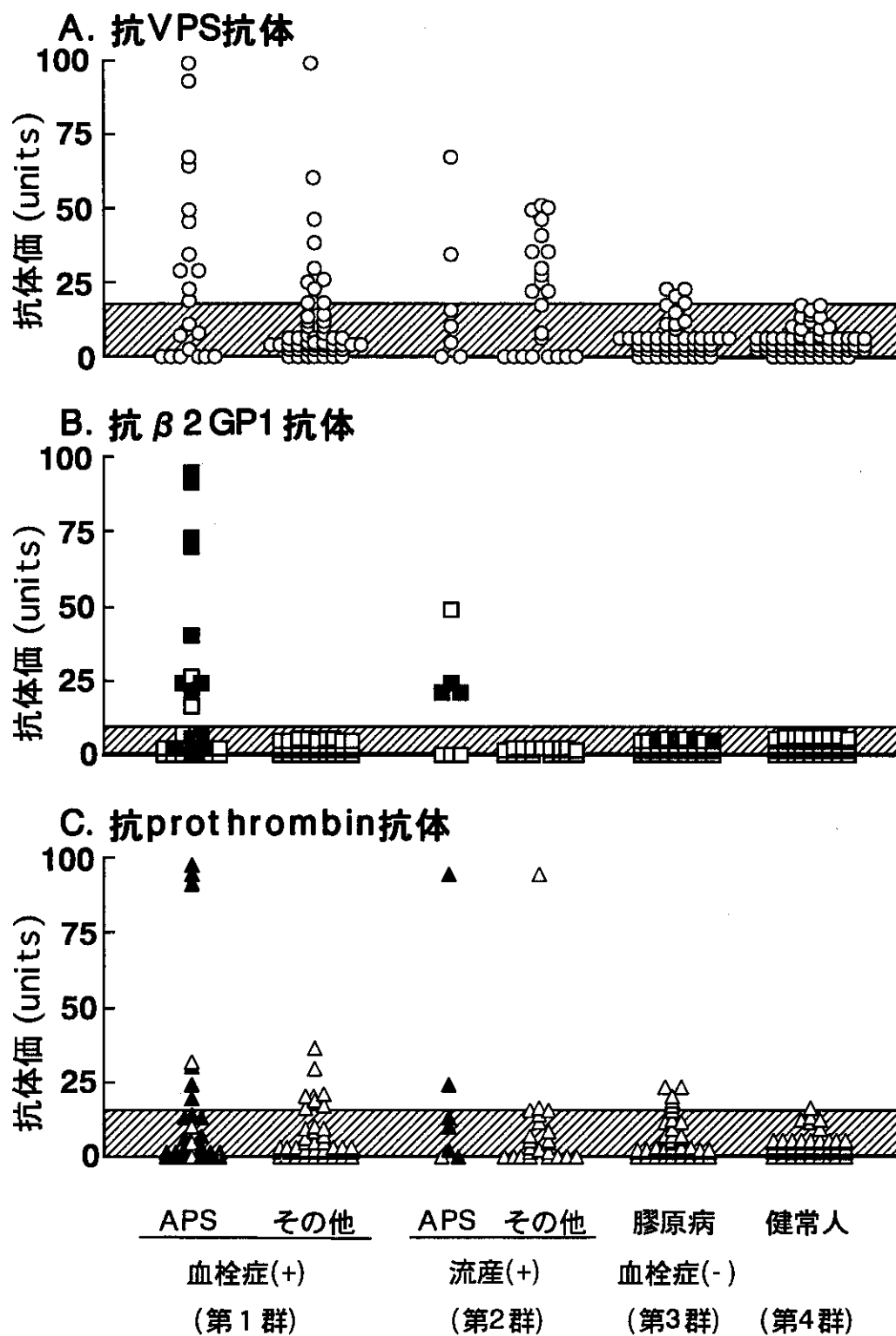


図1 VPSの生理学的抗凝固活性 (A) と抗VPS自己抗体の病的意義 (B) .



**図2**：血栓症および習慣流産患者における抗VPS抗体(A)，抗β2GP1抗体(B)，抗プロトロンビン抗体(C)の抗体価。  
 抗カルジオリピン抗体陽性例をBに■，ループスアンチコアグラント陽性例をCに▲で示した。健常人の平均値+3SD以下を斜線の領域で示した。

## 可溶性 CTLA-4 の検出と解析

分担研究者：小池 隆夫  
(北海道大学医学部内科学第二講座)

### 研究要旨

CTLA-4(CD152)は、T細胞活性化に伴って一過性に発現されるI型膜蛋白であり、T細胞活性化の負の調節分子として免疫応答の調節機能を担っている。T細胞活性化を特徴とするSLEにおいてCTLA-4の発現異常の有無を調べるために、末梢血単核細胞によるCTLA-4遺伝子の発現をRT-PCR解析した。その結果、SLE症例よりCTLA-4遺伝子変異体をクローニングし、塩基配列と蛋白発現解析から、それが可溶性CTLA-4遺伝子であることを明らかにした。また、可溶性CTLA-4分子に新たに付加されたアミノ酸配列を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製して、可溶性CTLA-4測定サンドイッチELISAを確立した。SLE群では血清可溶性CTLA-4レベルはむしろ健常者群よりも低下していた。しかし、臨床検査データとの相関ならびに治療前後の可溶性CTLA-4レベルから、可溶性CTLA-4レベルは疾患活動性を反映していると考えられた。健常者における一定レベル以上の可溶性CTLA-4の存在は、T細胞活性化の制御因子として何らかの生理的役割を担っていると推測され、生物製剤としての臨床的応用について考察した。

### A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)の発症には、遺伝的背景、物理・化学的環境要因、微生物感染、免疫学的異常などの多因子が複合的に関与することが推定されているが、そのメカニズムは未だに完全には解明されていない。しかし、発現するSLE病態には共通する特徴が認められる。その一つは、種々の活性化抗原を発現した活性化T細胞が末梢血にて容易に検出されることである<sup>1)</sup>。このような活性化T細胞の過剰な出現は、免疫応答部位におけるT細胞活性化の制御機構に

何らかの異常を示唆するものであり、その結果、末梢リンパ組織における自己反応性T細胞クローンの増大と共に、臓器特異的T細胞クローンの浸潤による臓器障害とB細胞活性化を介した自己抗体産生とを誘導するものと考えられる。われわれはこれまでに、T細胞活性化制御機構の一つであるFas/FasL系アポトーシス機構について解析を行ってきた<sup>2,3)</sup>。しかし、SLE症例によっては、必ずしもFas/FasL系に有意な異常を示さなかった。そこで本研究は、Fas/FasL系アポトーシス機構と並んでもう一方の重要なT細胞活性化制御機構であるCTLA-4分子によ

る負の活性化制御機構に注目し, SLE における CTLA-4 の発現解析を行った<sup>4)</sup>.

## B. 研究方法と結果

### 1. SLE における CTLA-4 遺伝子の RT-PCR 解析

SLE の末梢血単核細胞(PBMC)から抽出した全 RNA より cDNA を合成し, 既報<sup>5)</sup>の如く RT-PCR 解析を行った. エクソン 2 と 3' 非翻訳領域に設定したプライマーによる CTLA-4 遺伝子発現は, 健常者(NC)と同様にほとんど発現を認めない SLE 症例から, 高発現を示す症例まで幅広い発現が認められた. しかし, 症例によっては予想されるサイズの PCR 産物以外に約 100bp 短い未知の PCR 産物が認められた. そこで, 5' と 3' 非翻訳領域のプライマーによる全長 CTLA-4 遺伝子発現を最も発現の強い SLE 症例について行ったところ, 予想される約 740bp の PCR 産物と共に約 100bp 短い未知の PCR 産物も同様に増幅された (図 1).

### 2. CTLA-4 遺伝子変異体の単離と塩基配列

未知の PCR 産物が CTLA-4 遺伝子に関連するかどうかを決定するために, 図 1 において約 100bp 短い PCR 産物を TA ベクター (pCR2.1; Invitrogen Corp., San Diego, CA) にサブクローニングした. 複数のクローンを蛍光自動シーケンサー (Prism 377; Perkin-Elmer, Norwalk, CT)にて塩基配列を決定すると, 654bp のインサートのうち 1 塩基のみが異なる 2 種類のクローン(クローン 3-4 と 3-11) が得られた (図 2). データベースによるホモロジー検索ではいずれも CTLA-4cDNA であったが, これらのクローンではエクソン 3 に相当する 110bp が

完全に欠落していた. 1 塩基置換は 83 番目の塩基に認められ, クローン 3-4 では"A", クローン 3-11 では"G"であった. GenBank に登録されている CTLA-4 cDNA の塩基配列 (L15006)では, この置換部位は 49 番目に相当し, 遺伝的多型(A/G)部位であった. さらに, GenBank の CTLA-4 cDNA における 272 番目(C/T)と 439 番目(A/G)の塩基にも遺伝的多型が存在しており, クローン 3-4 および 3-11 ではいずれも, それぞれ"T"および"A"であった. 得られた塩基配列からアミノ酸配列を推定すると, クローン 3-4 および 3-11 では, エクソン 3 の欠損とフレームシフトによって細胞外ドメイン基部 10 個のアミノ酸と膜貫通領域および細胞内領域が失われ, エクソン 4 に生じた早期ストップコドンにより, C 端側は 22 個の非 CTLA-4 アミノ酸配列に置換することが予想された (図 3).

### 3. 可溶性 CTLA-4 蛋白分子の発現解析

クローニングした CTLA-4 遺伝子変異体が実際に蛋白をコードしているかどうかを確認するために, TA ベクター (クローン 3-4)の EcoRI 断片を発現ベクター pcDL-SR  $\alpha$ 296 の EcoRI サイトに挿入した. この発現ベクターを COS-7 細胞に DEAE-dextran 法または FuGENE6 試薬 (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)にて遺伝子導入し, 3 日後に回収した培養上清中に可溶性 CTLA-4 蛋白分子が存在するかどうかを ELISA 法にて検討した (図 4). ポリクローナル抗 CTLA-4 抗体を捕獲抗体, ビオチン標識モノクローナル抗 CTLA-4 抗体を検出抗体とするこのサンドイッチ ELISA では, 遺伝子導入した COS-7 細胞の

培養上清のみに可溶性 CTLA-4 蛋白分子が検出された。

#### 4. 可溶性 CTLA-4 特異的モノクローナル抗体の作製

前記培養上清中の可溶性 CTLA-4分子は、いずれも CTLA-4 の細胞外ドメインを認識する抗体によって検出されているので、真に可溶性 CTLA-4 分子かどうかは断定できない。そこで、フレームシフトによって生じた C 端側 22 個の新たな非 CTLA-4 ペプチド (AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM) を合成し、その KLH 抱合体を BALB/c マウスに過免疫して、モノクローナル抗ペプチド抗体を定法に従って作製した。最終的に 7 個の抗ペプチド抗体から、COS-7 細胞培養上清中の可溶性 CTLA-4 を特異的に認識するクローン H11.6 (IgG2a,  $\kappa$ ) を選別した。以後のサンドイッチ ELISA では、ハイブリドーマの培養上清からプロテイン A カラムにて精製した H11.6 をビオチン化し、検出抗体として使用した。

#### 5. 可溶性 CTLA-4 の分子構造

遺伝子導入した COS-7 細胞の培養上清を Superose 12 ゲルろ過法 6) により溶出し、各分画における可溶性 CTLA-4 活性をサンドイッチ ELISA で測定すると、可溶性 CTLA-4 活性のピークは約 20kD の位置に溶出された。

#### 6. 血清中可溶性 CTLA-4 レベルの解析

ランダムに得た SLE (n=49) および健常者血清 (n=36) における可溶性 CTLA-4 レベルをサンドイッチ ELISA にて測定したところ、いずれの群も比較的幅広い分布を示した (図

5)。遺伝子導入 COS-7 細胞の培養上清中の可溶性 CTLA-4 を 100 単位/ml として便宜的に表すと、健常者群では中央値 49.3U/ml (範囲 3.5~179.8U/ml) に対して SLE 群では中央値 33.0U/ml (範囲 0.0~255.0U/ml) であった。統計学的に SLE 群では健常者群に比較して可溶性 CTLA-4 レベルが有意に低下していた ( $P=0.0273$ ; Mann-Whitney の U 検定)。健常者群ではある一定レベル以上の可溶性 CTLA-4 が認められるのに対して、SLE 群では可溶性 CTLA-4 が血清中に殆ど認められない症例が約 22% (11/49) も存在していた。そこで、SLE における可溶性 CTLA-4 レベルの臨床的意義を探るために、各種臨床検査値との相関を調べた。可溶性 CTLA-4 レベルは SLE の疾患活動性と相関する白血球数 ( $P=0.0276$ ; Spearman の順位相関) や補体価 (CH50) ( $P=0.0106$ ) と有意の逆相関が見られたが、抗 DNA 抗体価とは相関する傾向はあるものの有意ではなかった ( $P=0.0711$ )。また、グルココルチコイド (GC) の 1 日投与量による可溶性 CTLA-4 レベルへの影響は認められなかった ( $P=0.6300$ )。次に、GC 治療前後の可溶性 CTLA-4 レベルの変化を測定し得た 19 名の SLE 症例において検討すると、入院時可溶性 CTLA-4 レベルが中央値 33.0U/ml (範囲 0.0~255.0U/ml) であるのに対して、治療後のレベルは中央値 0.0U/ml (範囲 0.0~142.0U/ml) であり、GC 治療により有意に可溶性 CTLA-4 レベルの低下が認められた ( $P=0.0010$ ; Wilcoxon の符号付順位検定)。

#### C. 考察

本研究においてわれわれは、SLE 症例の

PBMC から初めて CTLA-4 遺伝子変異体をクローニングした。その CTLA-4 遺伝子変異体はエクソン 3 全体が欠損した塩基配列を示し、選択的スプライシングにおけるエクソンスキッピングにより発現したものと考えられた。しかも、遺伝的多型が知られているシグナル配列内の部位において塩基の異なる 2 種類の CTLA-4 遺伝子変異体が同一症例より得られたことから、エクソンスキッピングは両対立遺伝子で生じていると考えられた。

エクソン 3 の欠損およびそれに伴うフレームシフトは、成熟膜型 CTLA-4 分子 186 アミノ酸のうち膜型 CTLA-4 の細胞外ドメイン基部から膜貫通領域および細胞内ドメインを含む C 端側 71 個のアミノ酸を消失させ、その代わり新しい 22 個のアミノ酸を付加した 137 アミノ酸から構成される CTLA-4 変異分子を発現させることが推定された。

このアミノ酸配列からなる CTLA-4 変異分子は次の 4 つの特徴を有すると考えられる。まず第一は、膜貫通領域の欠失により細胞膜結合性を失うことと、第二に、細胞内ドメインに存在するチロシンモチーフ (YVKM) の消失により、クラスリン結合蛋白複合体 AP50 との反応性を失い、発現される CTLA-4 変異蛋白がエンドゾームに貯留しないことである。これら 2 つの特徴とシグナル配列により、発現される蛋白は可溶性 CTLA-4 として細胞外へ分泌される可能性が高い。第三には、リガンドとの結合に重要なモチーフである MYPPPY 配列を含む細胞外 IgV 様ドメインの大部分が保存されているため、可溶性 CTLA-4 分子も膜型 CTLA-4 と同様に抗原提示細胞上の

CD80/CD86 との結合能を保持すること。第四には、細胞外ドメイン基部にある Cys 残基の欠損により、分子間 SS 結合によるホモダイマー形成が起こらないことである。

遺伝子導入実験から、この遺伝子変異体は、CTLA-4 の細胞外ドメインを認識するポリクローナル抗体およびクローンの異なる複数のモノクローナル抗体のみならず、今回作製したモノクローナル抗ペプチド抗体 (H11.6) も認識する可溶性 CTLA-4 蛋白分子をコードする遺伝子であることがわかった。また、遺伝子導入 COS-7 細胞培養上清の HPLC 解析では、可溶性 CTLA-4 分子は分子量約 20kD のモノマーであることも明らかとなった。

可溶性 CTLA-4 分子の C 端側に特異的なモノクローナル抗体 H11.6 の作製により、新たな可溶性 CTLA-4 検出用サンドイッチ ELISA を確立することができた。これを用いて血清中の可溶性 CTLA-4 を測定すると、意外なことに健常者血清中にはある一定レベル以上の可溶性 CTLA-4 が存在することがわかった。このことは、可溶性 CTLA-4 が通常の免疫応答における T 細胞活性化制御機構に何らかの役割を果たしていることを示唆する。RT-PCR のサイクル増加により、健常者においても膜型および可溶性 CTLA-4 遺伝子の発現が認められ、CTLA-4 遺伝子の選択的スプライシングは SLE 特異的な現象ではなかった。むしろ特徴的なのは、RT-PCR 解析で容易に可溶性 CTLA-4 遺伝子の発現が認められる SLE 群の方が、統計学的に血清可溶性 CTLA-4 レベルが低下していたことである。この結果には、SLE49 例中 11 例に可溶性 CTLA-4 がほとんど検出できないことが大きく影響してい

る。しかし、SLE 群の可溶性 CTLA-4 レベルは白血球数や補体価(CH50)と有意の逆相関を示し、同一症例では GC 治療によって著明に低下することから、可溶性 CTLA-4 レベルはやはり疾患活動性を反映していると考えられた。

遺伝子発現との矛盾は以下のように説明できるかも知れない。その一つは、炎症性サイトカインなどで知られているように、GC が直接 CTLA-4 の遺伝子発現を抑制する可能性である。GC による遺伝子発現の抑制機序は、プロモーター領域での GC レセプター (GR) による転写因子 AP-1 への干渉効果や、GR により遺伝子発現が負に制御される応答配列(nGRE)の存在などが考えられる。実際に CTLA-4 プロモーター領域 7) における転写因子結合モチーフを検索すると、AP-1 や NF- $\kappa$ B をはじめ約 60 種類のモチーフが確認された。GC に関連する GRE や nGRE のコンセンサス配列 (スコア 85 以上) は検出されないものの、GRE のパリンδροーム配列のうち半分(AGAACA)の配列が存在していた。ウシプロラクチン遺伝子のプロモーター領域にはこの半パリンδροーム配列を含む nGRE の存在が知られているので、CTLA-4 プロモーターでもこれが nGRE として機能する可能性は否定できない。それが正しければ、GC 投与量と可溶性 CTLA-4 レベルには逆相関が推測されるが、GC 1 日投与量との有意な相関は認められていない。また、疾患活動性が高く GC 治療前でも可溶性 CTLA-4 が全く検出されない症例も実際に存在するので、血清可溶性 CTLA-4 レベルは GC による遺伝子発現調節のみならず、種々の因子が分泌後の kinetics に影響していることも考えられる。すなわち、活性化 T

細胞は CD40L を介して B 細胞をも活性化させるので、発現が亢進した CD80/CD86 によって可溶性 CTLA-4 がトラップされ、血清レベルを減少させる可能性もある。また、われわれのサンドイッチ ELISA による可溶性 CTLA-4 検出に影響する未知の抑制または結合蛋白、自己抗体、可溶性リガンドなどが存在する可能性があり、これらについては現在検索が進行中である。

本研究で見出した“生理的”可溶性 CTLA-4 の機能については未だ不十分である。従来より可溶性 CTLA-4 として機能的解析等に使用されてきた分子は、CTLA-4 の細胞外ドメインと IgG の Fc 部分を遺伝子組換えにより作製したキメラ蛋白(CTLA-4-Ig)である。自己免疫(NZB/NZW)F1 マウスへの CTLA-4-Ig 投与実験では、自己抗体産生を抑制し、自己免疫発症後においても生命予後の改善に有効であったとされている<sup>8)</sup>。また、ヒトへの第 I 相試験では、T 細胞介在性の皮膚疾患である尋常性乾癬において 46% の患者に臨床的ならびに病理組織学的改善が認められている<sup>9)</sup>。これらの結果は、自己免疫疾患における活性化 T 細胞の病因論的意義に重要な示唆を与えている。すなわち、T 細胞表面上における CD28 と CTLA-4 の発現レベルから考えても、CTLA-4-Ig は CD80/CD86-CTLA-4 のみならず CD80/CD86-CD28 相互作用をもブロックすると予想されるので、治療としての活性化 T 細胞制御は活性化の induction レベルにおいて、より有効であると推測される。従って、少量の CTLA-4-Ig ではすでに活性化された T 細胞の活性化期間を遷延させ、むしろ病態を悪化させる可能性が考えられる。SLE での可溶性 CTLA-4 レベルは、まさにその

ような状態に寄与しているのではないだろうか。

今回の可溶性 CTLA-4 が生理的制御因子としてそのままの状態に機能するならば、キメラ蛋白を作成する必要はなく、また、Fc部分が免疫系に及ぼす影響も回避できると思われる。この意味において、より有効でかつ生理的な可溶性 CTLA-4 の開発と治療への応用が今後に残された大きな課題と考えられる。

#### D. 参考文献

- 1) Amasaki, Y., Kobayashi, S., Takeda, T., Ogura, N., Jodo, S., Nakabayashi, T., Tsutsumi, A., Fujisaku, A., Koike, T.: Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus: a possible mechanism for lymphopenia. *Clin. Exp. Immunol.* 1995, 99:2, 245-250.
- 2) Jodo, S., Kobayashi, S., Kayagaki, N., Ogura, N., Feng, Y., Amasaki, Y., Fujisaku, A., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Koike, T.: Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 1997, 107:1, 89-95.
- 3) Kobayashi, S., Hirano, T., Kakinuma, M., Uede, T.: Transcriptional repression and alternative splicing of Fas mRNA by early transposon (ETn) insertion in autoimmune lpr mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 191:2, 617-624.
- 4) Moriyama, T., Ikeda, H.: Hydrolases acting on glycosidic bonds: chromatographic and electrophoretic separations. *J. Chromatogr. B* 1996, 684:1-2, 201-206.
- 5) Harper, K., Balzano, C., Rouvier, E., Mattei, M-G., Luciani, M-F., Golstein, P.: CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J. Immunol.* 1991, 147:3, 1037-1044.
- 6) Finck, B. K., Linsley, P. S., Wofsy, D.: Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science* 1994, 265:5176, 1225-1227.
- 7) Guinan, E. C., Boussinotis, V. A., Neubergh, D., Brennan, L. L., Hirano, N., Nadler, L. M., Gribben, J. G.: Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340:22, 1704-1714.



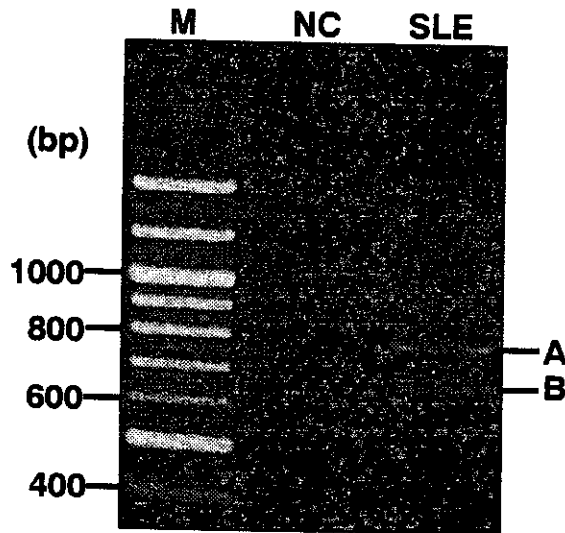


図1 SLE末梢血単核細胞におけるCTLA-4遺伝子のRT-PCR解析.  
A: 予想されるサイズのPCR産物, B: 未知のPCR産物

**Clone 3-4**

TTCTCGAGGACCTGAACACCGCTCCCA TAAAGCCATGGCTTGCCTTGGATTTAGCGGCA  
CAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT ACCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCTGTTTTTCTTCT  
CTTCATCCCTGTCTTCTGCAAAGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAG  
CAGCCGAGGCATCGCCAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGT  
CCGGGTGACAGTGTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTA  
CATGA TGGGGAATGAGTTGACCTTCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGG  
AAATCAAGTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTG  
CAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGA ACCCAGAT  
TTATGTAATTGCTAAAGAAAAGAAGCCCTCTTACAACAGGGGTCTATGTGAAAATGCCCC  
CAACAGAGCCAGAATGTGAAAAGCAATTTAGCCTTATTTTATTCCCATCAATTGAGAAA  
CCATTATGAAGAAGAGAGTCCATATTTCAATTT CCAAGAGCTGAGGCAATTCTA

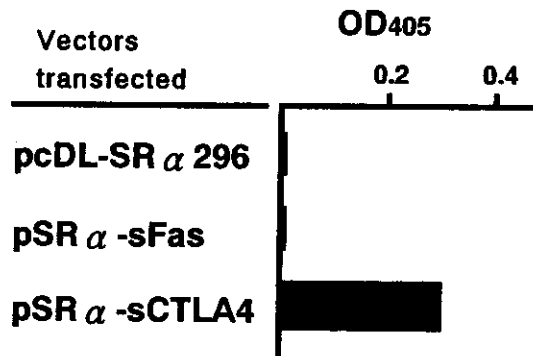
**Clone 3-11**

TTCTCGAGGACCTGAACACCGCTCCCA TAAAGCCATGGCTTGCCTTGGATTTAGCGGCA  
CAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT GCCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCTGTTTTTCTTCT  
CTTCATCCCTGTCTTCTGCAAAGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAG  
CAGCCGAGGCATCGCCAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGT  
CCGGGTGACAGTGTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTA  
CATGA TGGGGAATGAGTTGACCTTCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGG  
AAATCAAGTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTG  
CAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGA ACCCAGAT  
TTATGTAATTGCTAAAGAAAAGAAGCCCTCTTACAACAGGGGTCTATGTGAAAATGCCCC  
CAACAGAGCCAGAATGTGAAAAGCAATTTAGCCTTATTTTATTCCCATCAATTGAGAAA  
CCATTATGAAGAAGAGAGTCCATATTTCAATTT CCAAGAGCTGAGGCAATTCTA

図2 CTLA-4遺伝子変異体の塩基配列.  
両端の下線部はプライマー部分. 83, 306, 473番目は遺伝的多型部位.

**mCTLA-4** MACLGQRHKAQLNLAARTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHV  
**Clone 3-4** \*\*\*\*\*T\*\*\*\*\*  
  
 AQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLROADSQ  
 \*\*\*\*\*  
 VTEVCAATYMTGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLR  
 \*\*\*\*\*M\*\*\*\*\*  
 AMDTGLYICKVELMYPPPYLGI~~NGTQIYVIDPEPCPDS~~  
 \*\*\*\*\*-----  
DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGV  
 -----AKEKKPSYNRG  
  
 YVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN  
 LCENAPNRARM

**図3 CTLA-4遺伝子変異体の塩基配列から推定されるアミノ酸配列.**  
 N端下線部はシグナル配列. mCTLA-4: 膜型CTLA-4. 二重下線部は膜貫通領域. \*は同一アミノ酸, 破線はアミノ酸の欠損.



**図4 可溶性CTLA-4蛋白の発現解析.**  
 pSR  $\alpha$  -sFas, pSR  $\alpha$  -sCTLA4はそれぞれ可溶性Fas遺伝子, 可溶性CTLA-4遺伝子の発現ベクター.

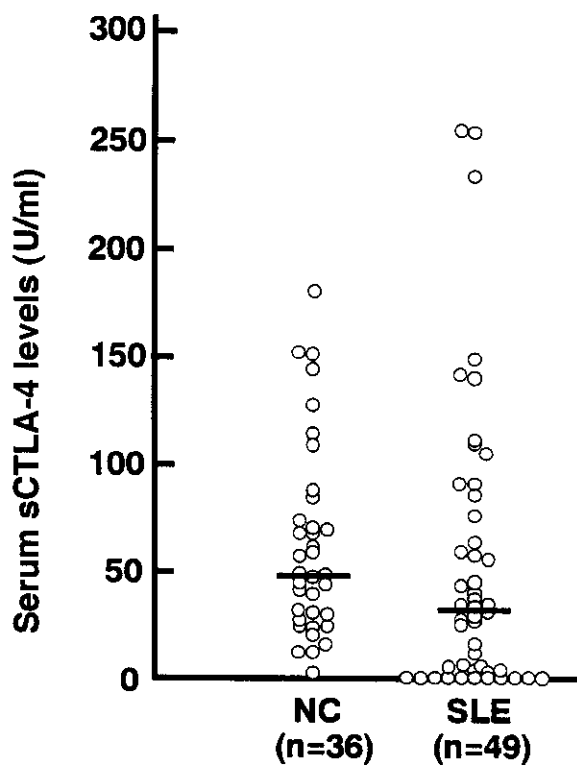


図5 健常者(NC)とSLE患者における血清可溶性CTLA-4レベル.  
横線は各群の中央値.

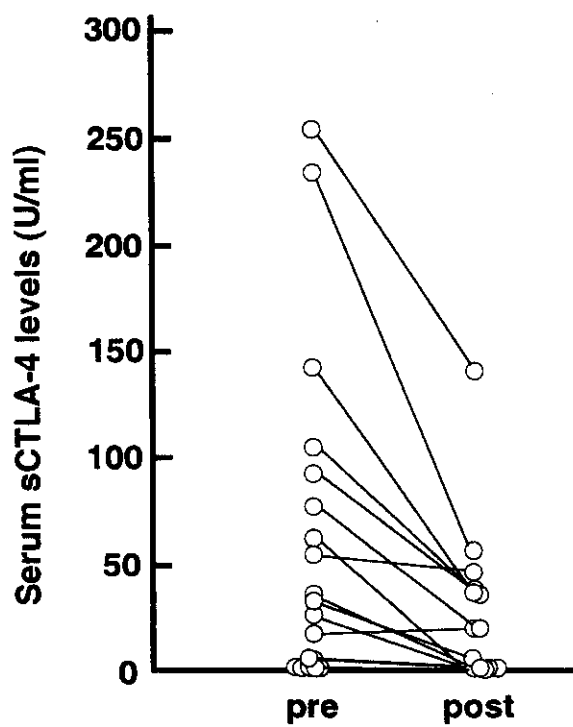


図6 SLE患者における治療前後の血清可溶性CTLA-4レベル.

## 抗リンパ球抗体を中心とした全身性自己免疫疾患病態の解明

研究協力者：加藤 智啓

(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター第一部門)

### 研究要旨

全身性エリテマトーデスをはじめとする全身性自己免疫疾患で検出される抗リンパ球抗体は、抗核抗体と異なり直接リンパ球に結合することから、リンパ球機能、ひいては病態を修飾する可能性がある。しかし、これまで対応抗原の同定を含め、その解明は進んでいない。今回、T細胞活性化に関係するT細胞共刺激分子であるCTLA-4(CD152)、CD28、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)に対する自己抗体、また、T細胞の活性化に関わると考えられるCD69に対する自己抗体の検索を行った。その結果、前者の分子群ではCTLA-4に対する自己抗体が存在し、しかもこのCTLA-4自己抗体はリンパ球増殖を増強することを見出した。また、CD69に対する自己抗体も20%以上の頻度で検出された。これらのことから、抗リンパ球抗体の対応抗原になる分子は多いと考えられ、今後さらに抗原の同定とリンパ球に対する影響の解析を進めていくことが必要と思われた。

### A. 研究目的

自己抗体は全身性自己免疫疾患の特徴である。そのうち抗核抗体は約20年以上にわたり研究が進められ、その結果、診断的意義のある抗核抗体が見出されている。しかしながら、抗核抗体そのものが細胞機能に直接影響を与えるか否かについては現在否定的な見解が多い。一方、最近、抗リン脂質抗体症候群などのように自己抗体が全身的自己免疫疾患の病因病態に直接関わる場合があることが分かってきている。これを踏まえ、細胞の機能に影響を及ぼす自己抗体がほかにも存在し病態形成に関与しているかどうかを解析することは全身的自己免疫疾患の病因病態を追求する上で重要なことである。

上記の観点で、抗核抗体や抗リン脂質抗体と共に、全身的自己免疫疾患で高頻度に検出される自己抗体である抗リンパ球抗体は重要な意味を持つ。抗リンパ球抗体はその名の通り、リンパ球表面抗原に結合することから、それを通してリンパ球機能ひいては病態に影響を与える可能性があるといえる。抗リンパ球抗体は全身性エリテマトーデスをはじめとする各種全身性自己免疫疾患のほか、感染症、輸血、妊娠などで出現することが報告されている。全身性エリテマトーデスにおいては、疾患活動性、リンパ球減少、種々のリンパ球機能異常と相関するという報告があり、病因論的な役割を担っている可能性も示唆されている。しかし、これまでその作用機

序はほとんど不明であり、抗リンパ球抗体検査も自己免疫現象の一証拠として利用されているのみである。抗リンパ球抗体の解析を妨げている第一の原因は標的分子がほとんど解明されていないことである。したがって、対応抗原の同定を行い、抗原別にその機能的意義を明らかにしていくことが解析の第一歩である。

リンパ球表面に発現する分子は種々あるが、リンパ球の活性化に必要な共刺激シグナルを伝達する共刺激分子もそのひとつである。T細胞上に発現するCTLA-4、CD28と抗原提示細胞上に発現するB7-1、B7-2の分子群は、特に重要な共刺激シグナル系として知られているが、最近、これら共刺激シグナル系の異常が自己免疫疾患の病態に関与している可能性が示唆されている。我々は、T細胞の活性化に重要な共刺激分子（CTLA-4、CD28、B7-1、B7-2）が抗リンパ球抗体の標的となり、それがリンパ球機能を修飾する可能性を考え、それを検証することを目的とした。第一歩として、膠原病患者において、これらの分子に対する自己抗体が存在するかどうかの検索を行った。我々は昨年各種膠原病患者において、CTLA-4に対する自己抗体が存在することを報告したが、今回はさらに症例数を増やし、また、他のT細胞共刺激分子（CD28、B7-1、B7-2）に対する自己抗体の検索も併せて行った。さらに、抗CTLA-4自己抗体の機能的解析を試みた。また、これに加え、T細胞の活性化に関わると考えられるCD69に対する自己抗体の検索も行った。

## B. 研究方法

<対象> 全身性自己免疫疾患患者 162 人 [全身性エリテマトーデス 49 人、慢性関節リウ

マチ 48 人、全身性強皮症 32 人、Behcet 病 22 人、Sjogren 症候群 15 人、慢性関節リウマチと Sjogren 症候群合併症例 4 例は慢性関節リウマチ、Sjogren 症候群いずれにも含めて検討] とそれに性、年齢の適合した健常人 82 人の血清を用意した。

<方法> 抗体検索のための抗原蛋白（CTLA-4、CD28、B7-1、B7-2）をコードする DNA を PCR 法を用いて増幅し、蛋白発現ベクター（pTEX7）に挿入し、大腸菌にてβガラクトシダーゼとの融合蛋白を発現させ、精製した。組み換え融合蛋白が目的とした蛋白であることを immunoblotting で確認した後、これらを抗原として、希釈した血清を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を行い、IgG タイプの抗体を検索した。それぞれの解析において、性と年齢の適合した健常人の平均値+3SD をカットオフ値と設定し、それ以上を陽性と判定した。また、抗 CTLA-4 抗体陽性者より精製した抗 CTLA-4 自己抗体をリンパ球混合反応系に添加し、リンパ球増殖に与える影響を検討した。また、CD69 についてもマルト-ス結合蛋白との融合蛋白として発現させたほかは基本的に同様の手法を用いて解析した。

## C. 研究結果

大腸菌にて発現させた CTLA-4、CD28、B7-1、B7-2 の融合蛋白に対し、各々の蛋白に特異的な抗体を用いて immunoblotting を行い、いずれも目的の蛋白であることを確認したのち、この 4 種の融合蛋白を抗原として ELISA を行い、血清の反応性を検討した。健常人ではいずれの分子に対しても抗体陽性者は認められなかったが、患者 162 症例中、抗 CTLA-4 抗体は 21 例（13.0%）で陽性で

あり、抗 B7-2 抗体は 3 例 (1.9%)のみで陽性、抗 CD28 抗体、抗 B7-1 抗体陽性者は認められなかった。抗 CTLA-4 抗体の陽性率を疾患別に検討したところ、全身性エリテマトーデスで 49 例中 4 例 (8.2%)、慢性関節リウマチで 48 例中 9 例 (18.8%)、全身性強皮症で 32 例中 1 例 (3.1%)、Behcet 病で 22 例中 7 例(31.8%)、Sjogren 症候群で 15 例中 2 例 (13.3%) が陽性となり、検討した疾患の中では Behcet 病に高率に検出された。また、患者血清より精製した抗 CTLA-4 自己抗体をリンパ球混合反応系に添加し、リンパ球増殖への影響をサイミジンの取り込みで検討したところ、増殖を増強する傾向を認めた。

CD69 についても SLE 患者で 15%、慢性関節リウマチ患者で 38%に検出された。さらに CD69 のエピトープの検索を行い、主要エピトープに対する抗体が LRP-2 に交差反応を示すことを見出した。

#### D. 考察

以上の結果より、抗 CTLA-4 自己抗体は、リンパ球上の CTLA-4 に結合し、CTLA-4 からのシグナル、すなわち、T 細胞の活性化に対して抑制的なシグナルを阻害し、リンパ球機能に影響を与え、病態を修飾する可能性が示唆された。最近、CTLA-4 分子を介したシグナル異常と自己免疫疾患の関連が示唆されている。すなわち、CTLA-4 ノックアウトマウスでは諸臓器へのリンパ球浸潤など自己免疫疾患様の所見が認められる。また、抗 CTLA-4 抗体の投与で、モデルマウスにおける自己免疫性脳脊髄炎の悪化がみられる。さらに、ヒトにおいても Graves 病や自己免疫性糖尿病で CTLA-4 遺伝子の偏った

多型性が報告されている。本研究は、CTLA-4 からのシグナル異常に自己抗体が関与している可能性を示唆しており、今後、この自己抗体の機能的な側面の解析をさらに進めていく必要があると考えられた。また、今回 CD69 も抗リンパ球抗体の主要な標的分子のひとつであること、細胞表面分子同士の相同性から、二つ以上の細胞表面分子を認識する自己抗体があることが判明し、その自己抗体の影響が広く複雑に及ぶ可能性が示唆された。

#### E. 結論

全身性免疫疾患患者において、T 細胞の共刺激分子である CTLA-4 に対する自己抗体が存在することが示された。この抗 CTLA-4 自己抗体はリンパ球機能に影響を与え、病態を修飾する可能性があると考えられた。また、CD69 に対する自己抗体も存在し、この自己抗体は他の細胞表面分子である LRP-2 に交差反応を示すことが判明した。これらのことから抗リンパ球抗体の対応抗原と細胞への影響をさらに進めていくことが全体的自己免疫疾患の病因病態を解明する一助となると思われた。

#### F. 参考文献

なし

# SLE 患者のリンパ球におけるステロイド抵抗性獲得の機序と多剤抵抗性遺伝子の発現との関連性、及び、その制御

研究協力者： 田中良哉  
(産業医科大学、医学部、第一内科)

## 研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)の臨床では、副作用のためステロイドの減量を要するが長用量投与を余儀なくされる症例を多数経験し、治療に難渋する。その多くはステロイド抵抗性獲得の結果であると考えられる。最近、抗癌剤抵抗性の獲得機序が解明され、多剤抵抗性遺伝子(MDR-1)産物で、細胞膜に発現し抗癌剤を細胞外に能動輸送する P-糖蛋白質の関与が報告される。今回、SLE 患者における MDR-1 の関与について検討した。長期ステロイドを服用した SLE 患者末梢血 CD4、CD8、CD19 リンパ球では、P-糖蛋白質と MDR-1 遺伝子転写調節因子 YB-1 の発現が有意に増加し、また、細胞内ステロイド濃度は減少した。代表的な免疫抑制薬シクロスポリン(CyA)は、P-糖蛋白質と拮抗的に結合して薬剤耐性を改善する作用も有する。SLE 患者リンパ球を *in vitro* で CyA 処理すると、細胞内ステロイド濃度を 15 分以内に有意に上昇させた。これらの結果を基に、ステロイドを長用量使用し減量が困難な SLE 患者 18 症例に CyA の併用投与を行った結果、15 例で臨床症状・所見、免疫学的検査所見等の改善を認め、ステロイドの減量を可能にした。以上より、ステロイド抵抗性を呈しリンパ球の P-糖蛋白質高発現を呈する SLE 症例では、ステロイド抵抗性の改善を目的とした CyA の使用を考慮する価値があると思われる。

## A. 研究目的

SLE 患者では、疾患活動性が亢進しステロイド薬のみでは効果不十分な症例や、ステロイドの副作用発現にもかかわらず減量困難でステロイド長用量投与を余儀なく要する症例を多数経験し、治療に難渋する。後者の多くは、ステロイド抵抗性獲得の結果であり、その機序として、多剤抵抗性遺伝子(MDR-1)発現によるステロイドの細胞外への能動輸送に伴う細胞内ステロイド濃度の減少が想定される。MDR-1 は、抗癌剤抵抗性の獲

得機序において注目され、その対策が開始されている。しかし、SLE 等の自己免疫疾患患者の治療における MDR-1 の関与については報告がない。

今回、SLE 患者におけるステロイド抵抗性獲得機序の解明とその制御を主目的として、以下の研究を行った。ステロイドを長用量服用した SLE 患者末梢血リンパ球を用いて、MDR-1 転写調節因子 YB-1 と P-糖蛋白質の発現、及び、細胞内ステロイド濃度を解析し、ステロイド抵抗性の獲得機構の存在を解明

した。さらに、免疫抑制作用と同時に P-糖蛋白質拮抗作用を有するシクロスポリン (CyA) が、in vitro で SLE 患者リンパ球の細胞内ステロイド濃度を改善しうる事を認め、これらの結果を基に、CyA が実際にステロイド抵抗性の SLE 患者の病態改善とステロイド減量を可能とし得るかを検討した。

## B. 研究方法

(1) 1年以上ステロイド薬を投与されている SLE 患者および健常人より末梢血リンパ球を採取し、CD4、CD8、CD19 抗体と P-糖蛋白質のエピトープ MRK16 に対する抗体を用いて二重染色し、フローサイトメーターで解析した。また、リンパ球をホルマリンとサポニンで処理後、MDR-1 遺伝子転写調節因子 YB-1 に対する抗体を用いて細胞内の YB-1 を染色し、同様に解析した。

(2) P-糖蛋白質を高発現する SLE 患者及び健常人より末梢血リンパ球を採取し、<sup>3</sup>H-デキサメサゾンと <sup>14</sup>C-ブタノールを添加し培養後シリコンオイル上に重層し、遠心後凍結して上層培地分画と下層細胞分画を得た。シンチレーションカウンターで計測し、ステロイドの細胞内濃度と上清中濃度の比率を算出した。また、試験管内で、SLE 患者のリンパ球に P-糖蛋白質拮抗薬を添加し 15 分間培養後、上記手法でステロイド濃縮率を解析した。

(3) 1. 1年以上の長期間にわたってステロイドの維持量からの減量できない；2. 骨粗鬆症、大腿骨頭壊死症、糖尿病、高脂血症、白内障などによりステロイド減量を必要とし、患者も強く希望する；3. 肝障害、腎障害などの臓器障害が少ない；4. 十分なインフォームドコンセントが得られた；以上の 4

条件を全て満たすステロイド抵抗性の SLE 患者に対して、CyA の併用療法の効果に関して検討した。

## C. 研究結果

(1) P-糖蛋白質は、健常人の末梢血 CD4、CD8、CD19 細胞では殆ど発現しないが、ステロイド抵抗性 SLE 患者の末梢血リンパ球サブセットでは、P-糖蛋白質を高発現し、患者によって幅広く分布するものの、健常人との間に明らかな有意差を示した (表 1)。また、MDR-1 遺伝子の特異的転写調節因子である YB1 は、健常人の CD4、CD8、CD19 細胞には殆ど発現しないが、SLE 患者リンパ球では、有意に高発現した。(表 1)

(2) P-糖蛋白質を高発現する SLE 患者の末梢血リンパ球では、健常人に比し細胞内ステロイド濃度が有意に低下した。さらに、試験管内で、SLE 患者の末梢血リンパ球に、P-糖蛋白質の拮抗的阻害薬である verapamil、CyA、FK506 で 15 分間処理後、リンパ球の細胞内外のステロイド濃度比を測定したところ、SLE 患者で低下していた細胞内ステロイド濃度は、添加した薬物濃度に依存して健常人のレベルにまで改善した。特に、CyA は、既知の免疫抑制作用としての NF-AT 阻害に必要な濃度より低濃度 (25ng/ml) で細胞内ステロイド濃度を有意に上昇させた (図 1)。

(3) 上記条件を満たすステロイド抵抗性 SLE 患者 18 症例に、50~150mg の CyA を経口併用投与したところ、18 例中 15 例において、臨床症状、臨床所見、及び、検査所見の改善を認め、ステロイド薬の維持量からの減量に成功した。また、これらの患者では、末梢血では、自己抗体産生や免疫複合体の沈



着を伴う糸球体腎炎の発症など SLE 様の症状を呈することが示された。この結果は、CD40シグナルの過剰により自己トレランスが破綻し、全身性自己免疫疾患が発症することを示している。CD40Lの過剰発現やB細胞での異所性発現は、これまでにSLE患者やSLEモデルマウスBXS Bで示されている(5-7)。我々の結果は、これらの患者やモデルマウスのSLE発症において、CD40Lの発現異常が重要な役割を果たすことを強く示唆している。したがって、SLEの病因を解明し、病因に添ったより根本的な治療法を開発する際に、CD40Lは重要な標的分子となろう。CD40Lトランスジェニックマウスにおけるトレランス破綻の機構についてはまだ不明である。しかしながら、我々が示唆してきた、CD40シグナルが自己抗原と反応したB細胞のアポトーシスを阻害することにより(3,4)、自己反応性B細胞のクローン除去を阻害する可能について、今後検討する必要がある。

また、CD40Lトランスジェニックマウスでは、B細胞の増多や液性免疫応答の亢進、さらに、全身性自己免疫疾患の発症など、種々の免疫異常が認められるにも関わらずCD40の存在下ではCD40Lの発現を確認することはできなかった。この結果は、CD40存在下ではCD40Lの発現が低下するため(8)、免疫異常をおこすのに十分なCD40Lの発現があっても、通常のフローサイトメトリーでは検出できないということを示している。したがって、SLE患者などでCD40Lの発現を検索する際には、十分注意する必要がある。今後、CD40存在下でのCD40L発現検索法の開発が必要である。

#### D. 考察

以上より、長期間にわたりステロイド投与を受けているSLE患者では、多剤耐性遺伝子MDR-1の転写とその表現型であるP-糖蛋白質の発現の双方が増強している結果が得られた。また、これらの患者では細胞内ステロイド濃度の低下が認められ、P-糖蛋白質の高発現が細胞内ステロイド濃度の低下をもたらすステロイド抵抗性を誘導する事が示唆された。さらに、試験管内でSLE患者リンパ球にCyAを添加したところ、細胞内ステロイド濃度が回復する事が明らかとなった(図2)。これらの結果を基に、長期に亘ってステロイド抵抗性を呈するSLE患者に、CyAの併用投与を行った結果、15例で臨床症状・所見、免疫学的検査所見等の改善を認め、ステロイドの維持量よりの減量を可能にした。

CyAは、NFAT阻害を介してIL-2/IL-4等の産生を抑制する代表的な免疫抑制薬である。しかし、これらの症例の疾患活動性は軽～中等度であり、実際末梢血リンパ球にはIL-2/IL-4産生性サブセットは殆ど検出できなかった。したがって、今回のCyAの臨床的効果は、免疫抑制作用以外の機序、即ち、ステロイド抵抗性改善作用が考えられた。

今後、長期に亘ってステロイド抵抗性を呈するSLE患者の多数症例に於いて、抵抗性改善を目的としたCyAや他のP-糖蛋白質拮抗作用を有する薬剤の適応に関して検討する必要がある。また、YB-1などを正常リンパ球に遺伝子導入して、P-糖蛋白質の発現増強と細胞内デキサメタゾンの濃度低下を検討し、今回の結果をより明確にする。さらに、P-糖蛋白質は、ステロイド薬のみならず他の免疫抑制薬や抗リウマチ薬もを細胞外

へ排出し、薬剤耐性をもたらすことが報告されが、P-糖蛋白質の観点からこれらの薬剤に対する抵抗性の可能性が考えられる膠原病・リウマチ性疾患症例においては、その克服を目的とした CyA、さらにはその誘導体の適応が期待される。

#### E. 結論

長期ステロイドを服用した SLE 患者末梢血 CD4、CD8、CD19 リンパ球では、P-糖蛋白質と MDR-1 遺伝子転写調節因子 YB-1 の発現が有意に増加し、細胞質内ステロイド濃度は減少した。CyA は、P-糖蛋白質と拮抗して、試験管内に於いて SLE 患者リンパ球内のステロイド濃度を改善させ、さらに、ステロイド抵抗性を呈する SLE 患者に併用投与を行った結果、臨床症状・所見、免疫学的検査所見等の改善とステロイドの維持量よりの減量を可能にした。以上、疾患活動性の高い SLE 症例のみならず、ステロイド抵抗性を呈しリンパ球の P-糖蛋白質高発現を呈する SLE 症例でも、ステロイド抵抗性の改善を目的とした CyA を始めとする P-糖蛋白質拮抗薬の使用を考慮する価値があると思われる。

#### F. 参考文献

該当無し

表1 ステロイド長期連用 SLE 患者末梢血リンパ球における P-糖蛋白質と YB-1 の発現

	P-糖蛋白質		YB-1	
	% positivity	MFI	% positivity	MFI
normal CD4 (n=21)	1.8±1.0	167±41	0.5±0.4	86±48
SLE CD4 (n=35)	27.6±29.5**	226±75**	4.7±6.1*	173±99**
normal CD8 (n=21)	2.7±3.1	201±41	0.3±0.2	129±20
SLE CD8 (n=35)	27.6±32.4**	217±56	4.8±7.1*	201±88**
normal CD19 (n=21)	12.7±7.6	215±49	2.2±1.5	138±39
SLE CD19 (n=35)	26.5±23.1*	226±65	12.7±12.8**	213±86**

\*p < 0.05, \*\* p < 0.01, compared to normal lymphocytes by Student's *t*- test.

MFI: mean fluorescence intensity of the mAb binding

図1 SLE患者リンパ球におけるCyAによる細胞内ステロイド濃度上昇効果

C/M ratio: intracellular steroid concentration and extracellular concentration ratio

\*p<0.05, \*\*p<0.01, compared to normal lymphocytes by Student's *t*- test (N=16)

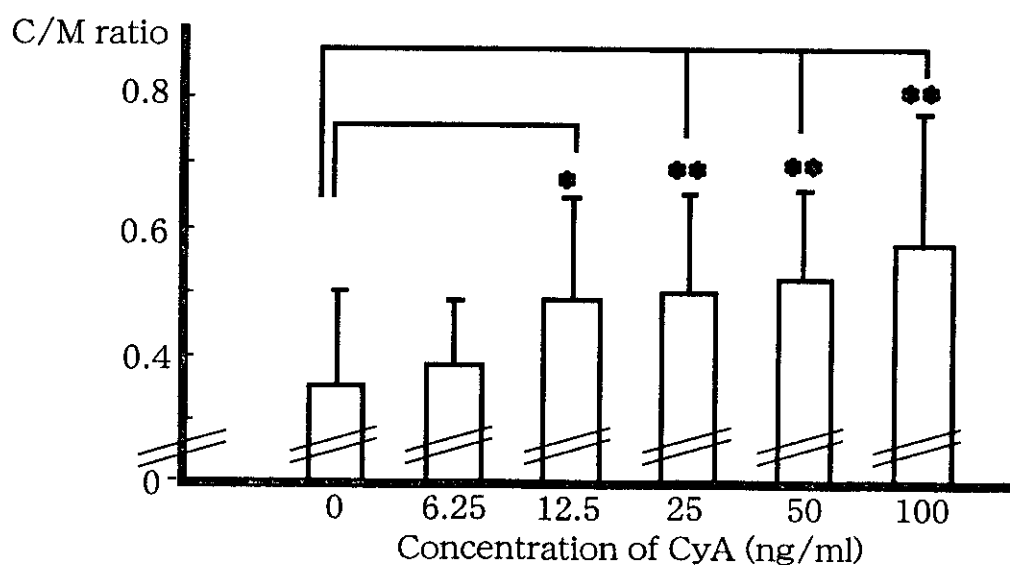


図2 長期間ステロイドを投与されたSLE患者末梢血リンパ球におけるP-糖蛋白質の発現増強、細胞内ステロイド濃度の低下(↑)とCyAによる制御(⇄)

