

抗体そのものが関与しているかどうかについて、精製抗 U1-RNP 抗体を添加して検討した。

精製抗 U1-RNP 抗体を添加した場合、ICAM-1、ELAM-1、Class II の発現が、濃度依存的に認められたが、抗 RNP 抗体除去 IgG の添加ではその発現レベルは低値であった。

MHC 分子発現は、Class I の発現は濃度依存的には認められなかった (図 3)。

4. $F(ab')_2$ 精製抗 U1-RNP 抗体による ICAM-1 発現への影響：精製抗 U1-RNP 抗体を $F(ab')_2$ にして検討した。A、B、2 例の患者血清から得た $F(ab')_2$ 抗 U1-RNP 抗体で ICAM-1 発現が誘導されるかどうかを見た結果、intact な抗 U1-RNP 抗体と同程度に ICAM-1 の発現を誘導した。この結果から、抗 U1-RNP 抗体による ICAM-1 の発現は、免疫複合体や会合した IgG によるものではなく、特異的に内皮細胞に作用して、ICAM-1 の発現を誘導していると考えられた (図 4)。

D. 考案

自己抗体による血管内皮細胞上の接着分子の発現亢進については、いくつかの報告がある。Chan や Lai らは、SLE の抗 dsDNA 抗体陽性 IgG が HUVEC の ICAM-1 や ELAM-1 の発現を亢進するという報告をしている。また、Papa らは、ウェジナー肉芽腫症の患者由来の抗内皮細胞抗体が接着分子の発現を亢進させるという報告、Johnson らは、ANCA 陽性あるいは抗核抗体陽性の血管炎の患者 IgG が、HUVEC の ICAM-

1 の発現を亢進するという報告をしている。本報告では、抗 U1-RNP 抗体が単独で内皮細胞の接着分子や MHC 分子の発現を誘導できるということを示した。

抗 U1-RNP 抗体により血管内皮細胞接着分子および MHC 分子が発現誘導されるという所見は、MCTD において病因的な意義を有する可能性が示唆される。その発現の機序についてはいくつかの可能性が想定される。Alarcon-Segovia により、抗 U1-RNP 抗体が生きている単核細胞の FcR を介して penetration するという報告や、Ma により、抗 U1-RNP 抗体は T 細胞上にある RNP ポリペプチドを認識するリセプターに特異的に結合して、penetration するという報告がある。また、Calin-Laurens は、RNP 抗原やまたは交叉反応性のエピトープが Class II 上に提示されていて T 細胞に認識されるということを報告している。

血管内皮細胞上で抗 U1-RNP 抗体が結合するだけなのか penetration しているのかについて確認していないが、これまでの報告と同様に、血管内皮細胞でも、同様のことが起こりうると考える。従って、抗 U1-RNP 抗体が血管内皮細胞表面の U1-RNP 分子に結合したあと、二次的にシグナル伝達機構が活性化され、接着分子の発現、MHC 分子の発現を引き起こすという可能性が推測される。またもう一つの可能性として、抗 U1-RNP 抗体を直接内皮細胞に添加しても有意な量の cytokine の産生は認められないが、ごく微量の cytokine が誘導され、それが接着分子を発現させる可能性も考えられる。

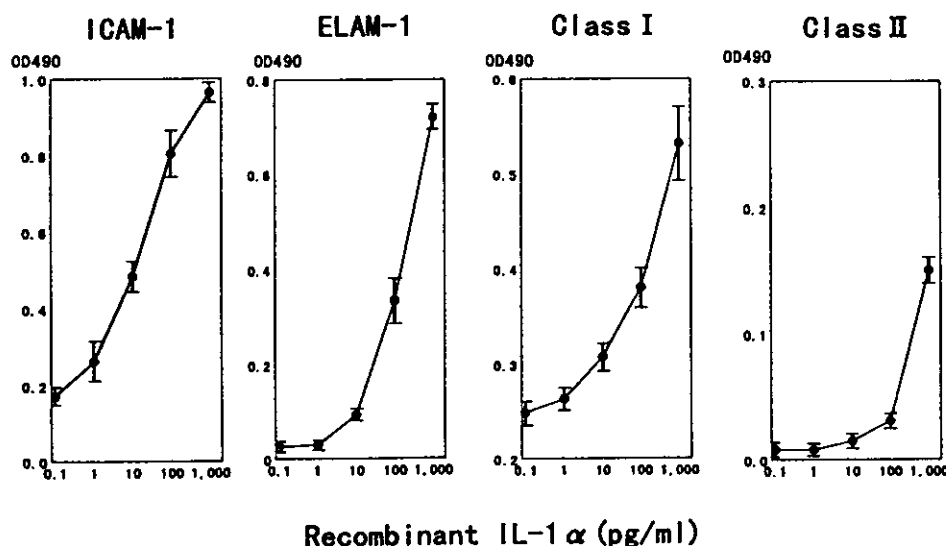


図 1、レコンビナント IL-1 α による内皮細胞の接着分子 (ICAM-1, ELAM-1) および MHC 分子 (Class I, Class II) の発現。

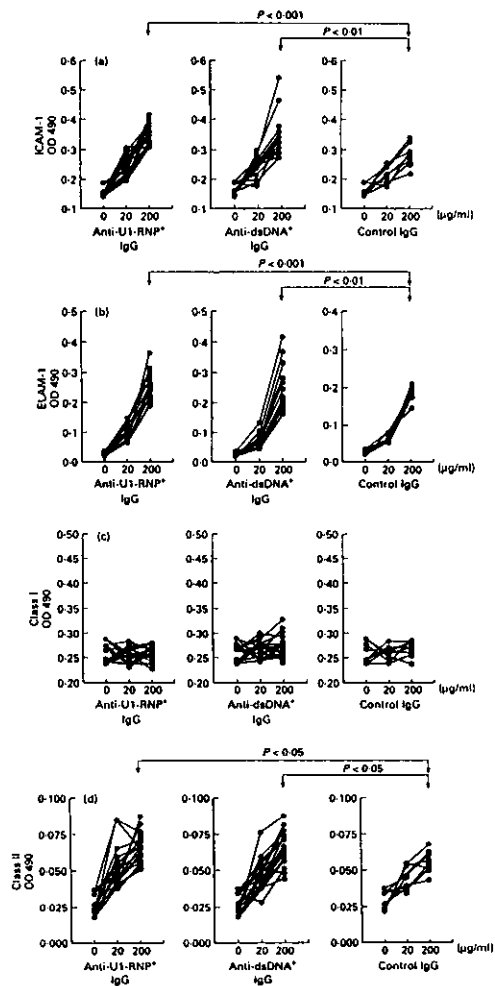


図2、抗U1-RNP抗体陽性IgG分画、抗dsDNA抗体陽性IgG分画、健常人IgG分画による内皮細胞の接着分子 (ICAM-1, ELAM-1) およびMHC分子 (ClassI, Class II) の発現。

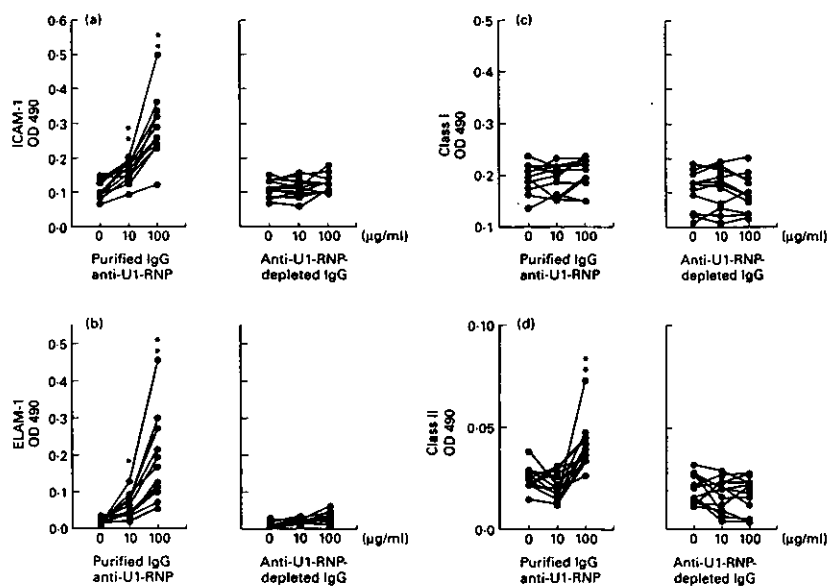


図3、精製抗U1-RNP抗体および抗U1-RNP抗体除去IgGによる内皮細胞の接着分子 (ICAM-1, ELAM-1) およびMHC分子 (ClassI, Class II) の発現。

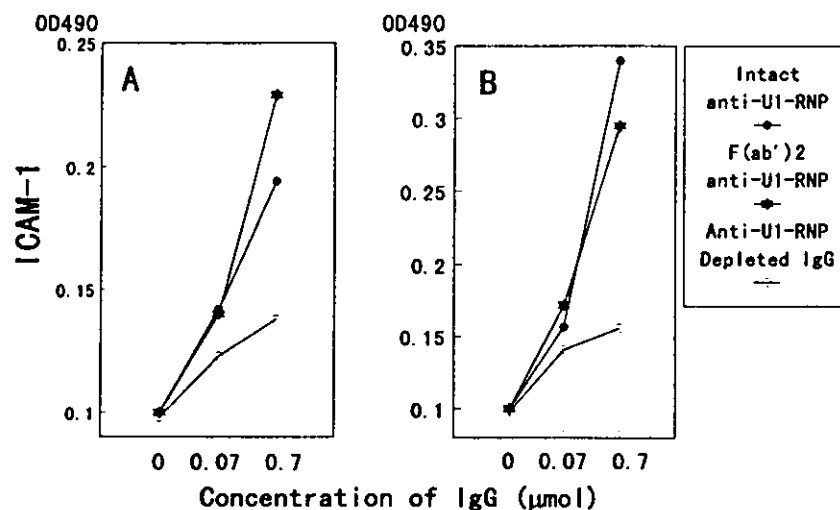


図4、F(ab')₂精製抗U1-RNP抗体によるICAM-1発現。

接着分子発現とMCTDの病態との関連を推測すると、MCTDの肺高血圧症で、血管内皮細胞の内膜や中膜の肥厚・増殖が見られるということは、接着分子発現による単球やリンパ球のrecruitmentによる活性化に伴うサイトカインや増殖因子に由来する可能性、あるいは可溶性接着分子そのものの増殖活性に由来する可能性が示唆される。

E. 結論

抗U1-RNP抗体により媒介される血管内皮細胞接着分子およびMHC分子発現誘導の発現誘導は、MCTDにおいて病因的な意義を有する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Okawa-Takatsuji, S. Aotsuka, M. Fujinami, S. Uwatoko, M. Kinoshita, M. Sumiya: Up regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and class II MHC molecules on pulmonary artery endothelial cells by antibodies against U1 ribonucleoprotein. Clin Exp Immunol 116: 174-180, 1999.

2. 学会発表

大川(高辻)雅子、青塚新一、藤波睦代、上床周、木下牧子、隅谷護人：抗U1-RNP抗体による血管内皮細胞接着分子の発現。第42回日本リウマチ学会総会。1998、5月。

UP-REGULATION OF INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE-1 (ICAM-1), ENDOTHELIAL LEUKOCYTE ADHESION MOLECULE-1 (ELAM-1) AND CLASS II MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX MOLECULES ON PULMONARY ARTERY ENDOTHELIAL CELLS BY ANTIBODIES AGAINST U1-RIBONUCLEOPROTEIN

Shinichi Aotsuka, Masako Okawa-Takatsuji, Mutsuyo Fujinami, Shu Uwatoko,
Masako Kinoshita* and Morito Sumiya*

Division of Clinical Immunology, Clinical Research Institute,

*Division of Rheumatology, International Medical Center of Japan

In order to elucidate the pathogenic role(s) of autoantibodies in connective tissue disease (CTD), we examined whether autoantibodies against U1-ribonucleoprotein (RNP) and double-stranded (ds) DNA can up-regulate intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and class I and II major histocompatibility complex (MHC) molecule expression on pulmonary artery endothelial cells (HPAEC).

ICAM-1, ELAM-1 and class II MHC molecule expression on HPAEC cultured in the presence of anti-U1-RNP-containing and anti-dsDNA-containing IgGs from CTD patients was up-regulated significantly in comparison with that on HPAEC cultured with IgG from normal healthy volunteers. Affinity chromatographic enrichment and depletion of the anti-U1-RNP antibody content of anti-U1-RNP-containing IgG confirmed that the anti-U1-RNP antibody did up-regulate ICAM-1, ELAM-1 and class II MHC molecule expression.

The finding that an IgG F(ab')₂ purified anti-U1-RNP antibody also up-regulated expression of these molecules may indicate that mechanisms other than Fc-receptor-mediated stimulation are involved. These in vitro findings suggest that autoantibodies against U1-RNP and dsDNA play important roles in the immunopathological processes leading to the proliferative pulmonary arterial vasculopathy observed in CTD patients with pulmonary hypertension by up-regulating adhesion and class II MHC molecule expression on endothelial cells.

9. 膠原病に伴う肺高血圧症症例の抗トロンボモジュリン抗体、抗アネキシンV抗体の検討

分担研究者 : 吉尾 卓

研究協力者 : 奈良 浩之, 金子 尚子, 狩野 庄吾, 簗田 清次

所属施設 : 自治医科大学アレルギー膠原病科

研究要旨

膠原病に伴う肺高血圧症(PH)と抗血管内皮細胞抗体(AECA)との有意な関連を報告している。今回、膠原病に伴うPHと血管内皮細胞(EC)表面上に存在し、抗血栓性に働くトロンボモジュリン(TM)、アネキシンV(ANXN V)に対する抗体との関連性を検討した。組み換え型ヒトTM、組み換え型ヒトANXN Vを抗原としたELISAにて抗TM抗体、抗ANXN V抗体を測定した。PH症例9例の抗ANXN V抗体に関しては1例のみが陽性を示し、有意な関連を認めなかった。抗TM抗体に関してはPH症例の平均は正常人群のそれに比べて有意に高値を示し、全例が陽性を示した。更にPH症例の経過を追って上記抗体とAECAを検討したところ、PH軽快例ではPH診断時増加していたIgG-AECAと抗TM抗体はPH軽快後減少した。PH不変例ではPH診断時増加していたIgG-AECAと抗TM抗体はステロイド治療に反応せず、長期に渡って減少しなかった。IgG-AECAが認識している血管内皮細胞表面上の抗原の1つがTMであり、この抗TM抗体が肺動脈の血管内皮細胞表面上に豊富に存在するTMと反応することが、PHの発症・進展に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は膠原病に伴う肺高血圧症(PH)と抗血管内皮細胞抗体(AECA)との有意な関連を報告している^{1,2)}。しかし、血管内皮細胞(EC)表面上の何れの抗原と反応するかは未だに不明である。肺動脈のEC表面上にはトロンボモジュリン(TM)が豊富に存在し、抗血栓性に働いている³⁾。更にEC表面上にはアネキシンV(ANXN V)が存在し、抗血栓性に働いている⁴⁾。抗TM抗体および抗ANXN V抗体の存在がSLE症例などで報告されている^{5,6)}。そこで、膠原病に伴うPH症例血清中の抗TM抗体および抗ANXN V抗体を測定し、膠原病に伴うPHとこれらの抗体との関連性を検討した。

B. 研究方法

1. 対象: 対象は膠原病に伴うPH症例9例である。PHは心カテーテル検査または心エコー検査にて診断された。PH症例の膠原病の内訳はMCTD 3例, SLE 4例, PSS 2例である。対照として正常人42例, MCTD 32例, SLE 81例を用いた。採血後、-30℃に保存された血清を用いた。

2. 抗ANXN V抗体、抗TM抗体測定: 組み換え型ヒトトロンボモジュリン(旭化成工業(株) 供与)、組み換え型ヒトアネキシンV(興和(株) 供与)を96穴平底プレートに5 μ g/mlの濃度で固相化した。well内面を1% BSA・PBSでcoatした。1% BSA・PBSで200倍希釈した血清100 μ lを添加し、室温で90分間incubateした。ペルオロキシダーゼ結合抗ヒトIgGを用いて各々のO.D.値を測定した。抗体価(単位)はO.D.値高値例を100単位とし、それに対する割合で表現した。

3. AECA測定: 膠原病に伴うPH症例3例の経過を追って採血した血清を用いてAECAを以前報告した方法を用いて測定した¹⁾。

(倫理面への配慮)

患者対象者からの採血は、大学病院で行う一般的な採血検査と同時に行っており、患者対象者に対する負担は一般採血のみで危険性はなく、金銭的な負担も生じない。研究結果は患者対象者の実名と合わせて公表することはないので、人権的にも問題ないと思われる。以上の点より倫理面に関しては特に問題がないと思われる。

C. 研究結果

1. 抗 ANXN V 抗体価 (Fig. 1) : 正常人 42 例の平均は 8.2 ± 5.2 単位で、平均 $\pm 3SD$ を正常上限とすると、正常上限は 23.8 単位であった。SLE 症例、MCTD 症例、PH 症例の平均値は各々 24.0 ± 18.1 単位、 16.6 ± 4.5 単位、 19.0 ± 2.9 単位で、各群の平均値は正常人例に比べて有意に高値を示した。しかし PH 症例では 9 例中 1 例しか陽性を示さず、抗 ANXN V 抗体と PH との有意な関係は判明しなかった。

2. 抗 TM 抗体価 (Fig. 2) : 正常人 42 例の平均は 6.6 ± 2.3 単位で、平均 $\pm 3SD$ を正常上限とすると、正常上限は 13.5 単位であった。SLE 症例、MCTD 症例、PH 症例の平均は各々 12.6 ± 8.6 単位、 21.5 ± 6.3 単位、 24.6 ± 5.0 単位で、各群の平均値は正常人例に比べて有意に高値を示した。更に PH 症例全例が陽性を示し、PH 症例の平均値は SLE 症例に比べて有意に高値を示した。抗 TM 抗体と PH との有意な関係が示唆された。

3. PH 症例の経過

PH 症例の PH 発症前後の経過を追って AECA、抗 ANXN V 抗体、抗 TM 抗体の変動を検討した。

SLE 症例 (27 歳、女性) (Fig. 3) : 労作時息切れの出現から軽度の PH の存在が判明したが、プレドニゾロン 60mg/日の投与にて労作時息切れなどの自覚症状は消失し肺動脈圧も正常に回復した。PH 診断時 IgG-AECA 48.0 単位、抗 TM 抗体価 23.3 単位と増加していたが、PH 消失後には IgG-AECA 15.6 単位、抗 TM 抗体価 12.3 単位と両方の抗体は著明に減少し、抗 TM 抗体は正常範囲に入った。抗 ANXN V 抗体も正常範囲内で減少を示した。

SLE 症例 (28 歳、女性) (Fig. 4) : 1999 年に入ってから労作時息切れが出現し、3 月の時点で高度の PH が判明し、プレドニゾロン 50mg/日に増量して治療を行ったが、自覚症状の改善はほとんどなく、肺動脈圧は更に増加した。自宅にて酸素療法の導入を行った。1998 年 5 月の PH が認められない時点で IgG-AECA は 53.0 単位と既に高く、抗 TM 抗体も 19.3 単位と陽性を示していた。プレドニゾロン 40mg/日からの漸減投与を行っていたが、PH が判明した時点では、IgG-AECA 76.0 単位、抗 TM 抗体 29 単位と前年に比べて更に増加していた。この時点で抗 ANXN V 抗体は 24.2 単位と陽性を示した。プレドニゾロン 50mg/日の増量を行っても、IgG-AECA と抗 TM 抗体価は長期に渡って減少せず、治療抵抗性であった。

MCTD 症例 (46 歳、女性) (Fig. 5) : 1994 年 11 月より労作時息切れが出現し、1995 年 5 月時点で高度の PH が判明した。プレドニゾロン 60mg/日の増量を行い、若干肺動脈圧は改善したものの、同年 10 月頃から再び肺動脈圧が上昇してきた。自覚症状は全然軽快しなかった。IgG-AECA は PH 診断時 17.0 単位と陽性を示していたが、同年 10 月には 47.0 単位と更に著明に増加した。抗 TM 抗体も PH 診断時 16.4 単位と陽性を示し、その後も徐々に増加傾向を示し、減少しなかった。抗 ANXN V 抗体は PH 診断時、正常範囲に有り、その後も大きな変化を示さなかった。

D. 考 察

我々は AECA と膠原病に伴う PH との有意な関連を報告している^{1,2)}。今回の経過を追った検討でも、PH 症例は診断時 IgG-AECA 高値を示し、軽快例は減少し、不変例は高値を持続し、減少しなかった。抗 TM 抗体も同様の動きを示した。肺動脈の EC 表面上には豊富に TM が存在するといわれており³⁾、TM が IgG-AECA の対応抗原の 1 つである可能性が示唆された。

thrombin が EC 表面上の TM に結合することにより、prostaglandin I_2 (PGI_2) 産生を増加させ、また thrombin が結合した TM は protein C を活性化し、活性化された protein C は更に活性化された凝固因子 (F.Va, F.VIIIa) を分解する。このような TM の作用により、thrombin は凝固酵素から抗凝固酵素に変換され、血管内での血液の流動性が保たれている。SLE 症例での抗 TM 抗体の存在、抗 TM 抗体による TM の protein C 活性化の阻害が報告されている⁵⁾。抗 TM 抗体が TM に結合することにより PGI_2 産生が減少する可能性、抗 TM 抗体と TM との結合による局所での免疫複合体形成、それによる補体活性化からの炎症反応出現の可能性、血小板にも TM が存在しており、抗 TM 抗体が血小板に結合し、血小板を活性化させ thromboxane B_2 産生を増強させる可能性が考えられる。このような抗 TM 抗体の作用が PH の発症・進展に関与していることが示唆される。

今後、膠原病に伴う PH 症例由来の抗 TM 抗体が上記の様な作用を有するか否かを更に検討していく必要があると思われる。

文献

1. Yoshio T, Masuyama J, Sumiya M, Minota S, Kano K. Antiendothelial cell antibodies and their relation to pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994; 21: 2058-63
2. Yoshio T, Masuyama JI, Kohda N, et al. Association of interleukin 6 release from endothelial cells and pulmonary hypertension in SLE. *J Rheumatol* 1997; 24: 489-95
3. Maruyama I, Bell CE, Majerus PWJ. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol* 1985; 101:363-71
4. Flaherty MJ, West S, Heimark RL, Fujikawa K, Tait JF. Placental anticoagulant protein-I: Measurement in extracellular fluids and cells of the hemostatic system. *J Lab Clin Med* 1990; 115: 174- 81
5. Cariou R, Tobelem G, Belluci S, et al. Effect of lupus anticoagulant on antithrombogenic properties of endothelial cells: Inhibition of thrombomodulin-dependent protein C activation. *Thromb Haemost* 1988; 60: 54- 8
6. Satoh A, Suzuki K, Takayama E, et al. Detection of antiannexin IV and V antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999; 26: 1715-20

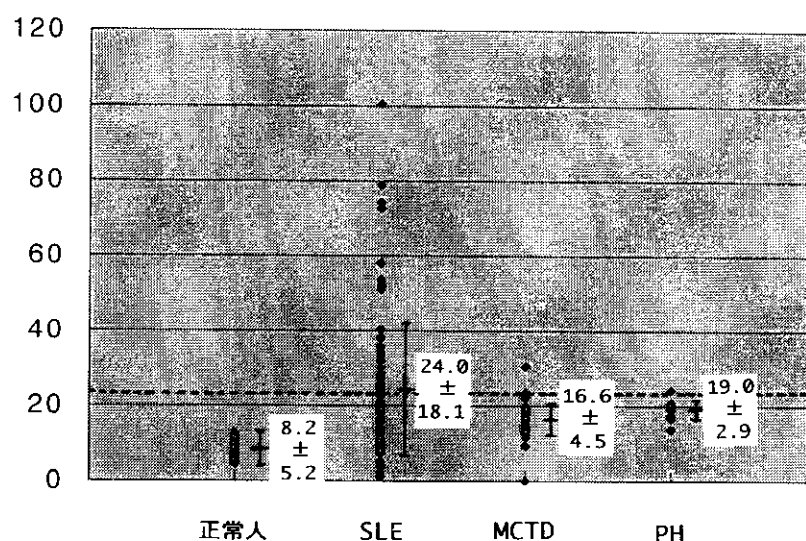


Fig. 1. Anti-ANXN V titers in normal controls, patients with SLE, MCTD and PH.

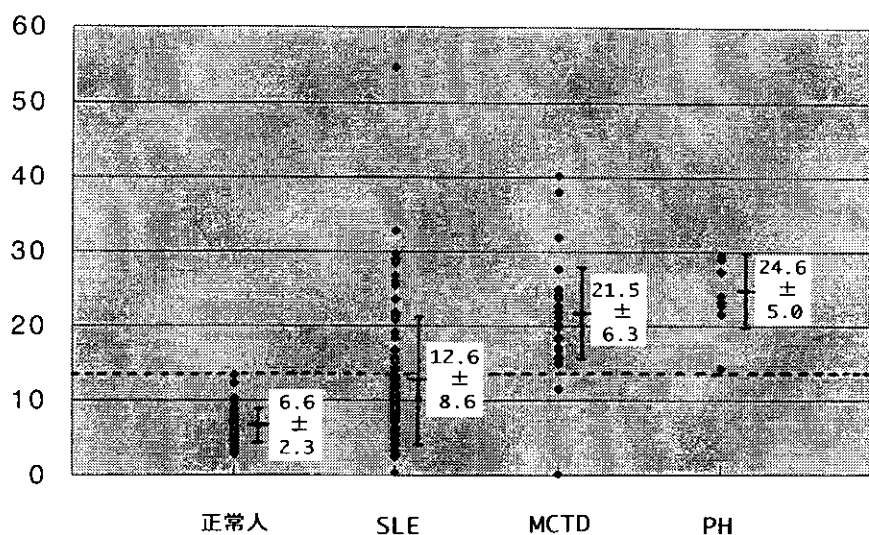


Fig. 2. Anti-TM titers in normal controls, patients with SLE, MCTD and PH.

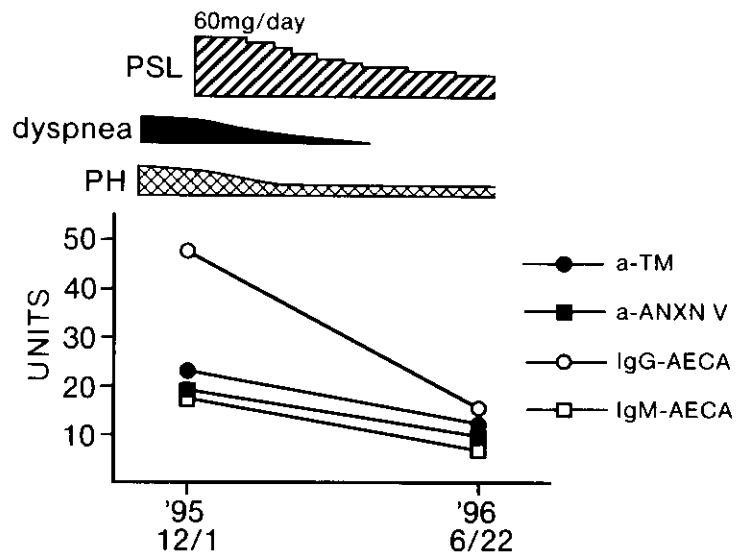


Fig. 3. Serial studies of anti-TM, anti-ANXN V and AECA in the patient with SLE of whom PH improved.

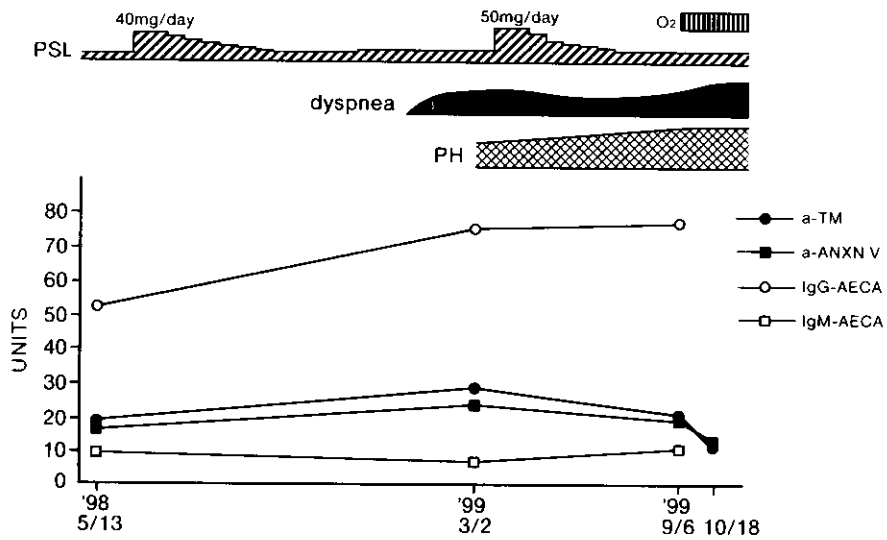


Fig. 4. Serial studies of anti-TM, anti-ANXN V and AECA in the patient with SLE of whom PH did not improve.

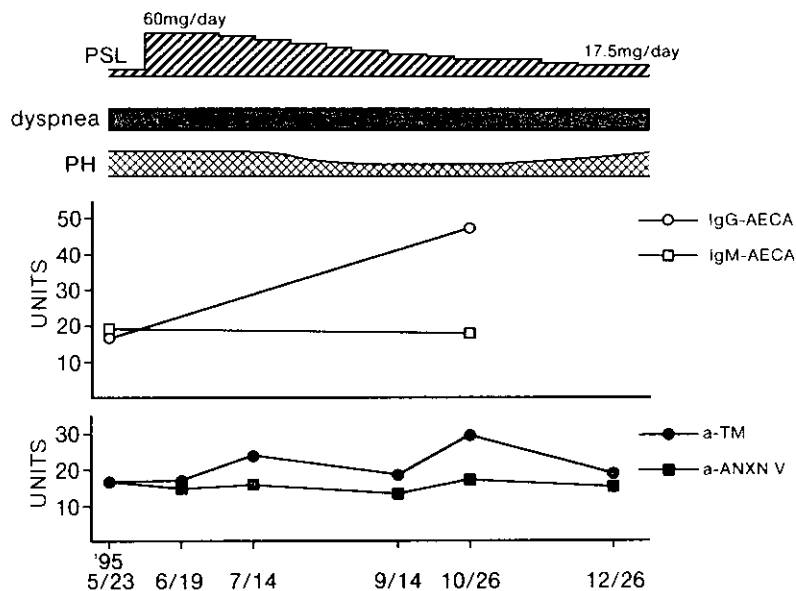


Fig. 5. Serial studies of anti-TM, anti-ANXN V and AECA in the patient with MCTD of whom PH did not improve.

THROMBOMODULIN ANTIBODIES WITH COLLAGEN-DISEASE-RELATED PULMONARY HYPERTENSION

Taku Yoshio, Hiroyuki Nara, Naoko Kaneko, Seiji Minota, and Shogo Kano
Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Jichi Medical School

To clarify the relationship of IgG anti-annexin V antibodies (anti-ANXN V) and IgG anti-thrombomodulin antibodies (anti-TM) with collagen-disease-related pulmonary hypertension (PH), anti-ANXN V and anti-TM in sera from 9 patients with collagen-disease-related PH (3 patients with MCTD, 3 with SLE, 2 with PSS) were measured by ELISA using recombinant proteins. Sera from 42 normal controls, 32 patients with MCTD, and 81 patients with SLE were also used as controls. The mean levels of anti-ANXN V and anti-TM in sera from normal controls were 8.2 ± 5.2 units and 6.6 ± 2.3 units, respectively. The normal ranges of anti-ANXN V and anti-TM (mean+3SD) were 23.8 units and 13.5 units, respectively. The mean levels of anti-ANXN V in sera from patients with SLE, patients with MCTD, patients with PH (24.0 ± 18.1 units, 16.6 ± 4.5 units, 19.0 ± 2.9 units, respectively) were significantly higher than that in normal controls, but only one out of 9 patients with PH had positive anti-ANXN V. The mean levels of anti-TM in sera from patients with SLE, patients with MCTD, patients with PH (12.6 ± 8.6 units, 21.5 ± 6.3 units, 24.6 ± 5.0 units, respectively) were significantly higher than that in normal controls. In addition, the mean level of anti-TM in patients with PH was significantly higher than that in patients with SLE and all patients with PH had positive anti-TM. Serial studies of anti-TM, anti-ANXNV and antiendothelial cell antibodies (AECA) in the patients with PH showed as follows. In the patients, of whom PH improved in response to steroid therapy, elevated anti-TM and IgG-AECA in the active stage of PH decreased after the improvement of PH. In the patients, of whom PH persisted, elevated anti-TM and IgG-AECA in the active stage of PH did not decreased. These results suggested the possibility that anti-TM may be related to the pathogenesis and progression of collagen-disease-related PH.

10. ヒト U1snRNP-A 自己抗原に対するマウスでの T 細胞応答の関する研究

分担研究者 : 三崎 義賢

研究協力者 : 川畑 仁人, 永谷 勝也, 山本 一彦

所属施設 : 東京大学アレルギーリウマチ内科

研究要旨

我々は、これまでヒト U1snRNP-A (huA) 抗原を導入したトランスジェニックマウス (huATg) を樹立し、野生型マウスで誘導したヒト U1-A に対する T 細胞集団を移入するという手法で、核内自己抗原 U1snRNP に対する自己免疫応答と病態との関連を解析してきた。このモデルを用いて、huA 抗原に対する免疫学的寛容成立の機序を T 細胞クローンレベルの観点から解析するために、マウスでのヒト U1-A に対する T 細胞エピトープを検討した。5つのフラグメントに分割した huA で、全長 huA で免疫した C57BL/6 マウス脾細胞で増殖応答を検討した。特に C 末側の断片に対しての応答が顕著であった。MCTD 患者における U1-A に対する T 細胞応答も 201 アミノ酸以降の C 末側にあるので、機能的ドメインや B 細胞エピトープ部位とは異なる C 末側の免疫原性が強いと考えられた。

A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)で特徴的な U1RNP 複合体に対する自己免疫応答を制御することで MCTD に対する新たな治療を開発できると考えられている。しかし、U1RNP と免疫系との関係、特に免疫学的寛容と破綻の状況については不明である。

U1snRNP-A 抗原は、U1RNP 複合体に対する自己免疫応答の中で、最初に免疫系に認識されと考えられている抗原である。マウスでは、U1-A (muA) に対して免疫学的寛容が成立しており、muA に対する自己免疫応答誘導が困難であるが、野生型マウスではヒトの U1-A (huA) に対する免疫応答を誘導することができる。また huA は機能的には muA を同一と考えられ、マウスの U1RNP 複合体の中に組み入れられる。そこでこの性質を利用して、我々は、これまでヒト U1snRNP-A 抗原を導入したトランスジェニックマウス (huATg) を樹立し、野生型マウスで誘導したヒト U1-A に対する T 細胞集団を移入するという手法で、核内自己抗原 U1snRNP に対する自己免疫応答と病態との関連を解析してきた。この huATg においても、ヒト型 U1-A 蛋白に対して免疫学的寛容が成立していた。そこで、この免疫学的寛容成立の機序を T 細胞クローンレベルの観点から解析することで、U1RNP に

対する自己免疫応答を理解することをめざしている。そのために、huA に対する T 細胞クローンとそのエピトープの情報を入手することが必要である。今年度は、まずマウスでのヒト U1-A に対する T 細胞エピトープを検討した。

B. 研究方法

大腸菌での GST 融合蛋白発現系を用いて、ヒト U1-A 蛋白を 1-103、76-156、119-203、172-250、216-282 の 5つのフラグメントに分割し、発現精製した。全長 U1-A で免疫した C57BL/6 マウスを全長ヒト型 U1-A (huA) と CFA にて免疫し、10 日後脾細胞を調整して、全長 huA と 5つの精製フラグメントに加えて融合部位なしの GST のみの精製蛋白を対照とし、サイミジン取り込み法にて T 細胞増殖応答を解析した。また huA 免疫マウスの対照として PBS と CFA を接種したマウス由来脾細胞を用いた。三匹づつの集団の結果をまとめて、抗原刺激なしの集団の取り込みに対する Δ cpm で表示した (表 1)。この動物実験は、東京大学医学部が定める動物実験指針に従って行った。

また、この脾細胞より T 細胞ハイブリドーマを樹立し、3 回の限界希釈法によるクローニング後、IL2 産生刺激を指標に T 細胞応答を解析した。IL2 産生能は

表1 huA 抗原のT細胞エピトープ

cell source	whole huA	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5	GST
PBS	0 ± 0	294 ± 509	4.11 ± 7.12	460 ± 340	1490 ± 225	1430 ± 915	0 ± 0
huA	2590 ± 1810	1070 ± 1490	117 ± 133	853 ± 775	2950 ± 1770	4860 ± 1660	132 ± 96.2

表2 T細胞ハイブリドーマのstimulation index

clone	whole huA	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5	GST
40-4-1	10.64	8.95	20.19	14.8	8.51	8.95	0.56
40-4-5	4.71	0.28	11.89	1.19	0.23	0.47	0.19
50-1-1	34.3	1.15	56.23	1.56	0.46	1.68	0.38

CTLLラインの増殖 (cpmで表示) で解析した (表2)。

huATg モデル系にて解析を進める予定である。

C. 研究結果

1-103、172-250、216-282に対するT細胞応答がみられ、特にC末側の断片 (172-250、216-282) に対しての応答は顕著で、Stimulation Indexでは3-13に達した (表1)。この傾向は、別の機会の実験でも確かめられた。

一方T細胞ハイブリドーマは、76-156断片に対して、反応するものが多かった (表2)。一部のクローンで複数の断片に対して反応したので、これらは単一クローン由来にはまだなっていないと考えられた。

D. 考察

現在の所、U1-A 蛋白において、1-102 アミノ酸のRNA結合領域、103-119のpoly A polymerase結合領域の二つの機能的ドメインが知られている。C末側の機能は知られていないが、MCTD患者におけるU1-Aに対するT細胞応答も201アミノ酸以降のC末側にあると報告されており、MHCはもちろん種の異なる個体においてもC末側がT細胞エピトープとなることは興味深い。

E. 結論

今後、さらに詳細にエピトープを解析し、ヒトでの反応と比較し、かつこれらのドミナント及びサブドミナントエピトープに対するT細胞クローンを樹立し、

文 献

- 1.Kawahata K, Misaki Y, Komagata Y et al. Altered expression level of a systemic nuclear autoantigen determines the fate of immune response to self. J Immunol ;162:6482-91,1999
- 2.Okubo M, Kokubun M, Nishimaki T, Kasukawa R, Ohto H, Yamamoto K, Muller S. T cell epitope mapping of U1-A RNP. Arthritis Rheum. 38(8):1170-2,1995
- 3.Okubo M, Kurokawa M, Ohto H, Nishimaki T, Nishioka K, Kasukawa R, Yamamoto K. Clonotype analysis of peripheral blood T cells and autoantigen-reactive T cells from patients with mixed connective tissue disease. J Immunol. 153(8):3784-90, 1994

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Miyamasu M, Nakajima T, Misaki Y et al. Dermal fibroblasts represent a potent major source of human eotaxin: In vitro production and cytokine-mediated regulation. Cytokine 1999 ; 11:751-8
- 2.Miyamasu M, Yamaguchi M, Nakajima T et al. Th1-derived cytokine IFN-gamma is a potent inhibitor of eotaxin synthesis in vitro. Int Immunol 1999 ;11:1001-4
- 3.Kawahata K, Misaki Y, Komagata Y et al. Altered expression level of a systemic nuclear autoantigen determines the fate of immune response to self. J Immunol 1999 ;162:6482-91

2. 学会発表

1. 瀬戸口京吾、三崎義堅、荒木靖人 et al. マウス IL-10 を導入した抗原特異的T細胞による実験的関節炎の治療. 免疫学会誌 1999;29;188 (第29回免疫学会)
2. 川畑仁人、三崎義堅、瀬戸口京吾、恒川伸二、宮崎 純一、山本一彦. 全身性細胞内自己抗原反応性T細胞の末梢における挙動の解析. 免疫学会誌 1999; 29;327 (第29回免疫学会)
3. 川畑仁人、三崎義堅、瀬戸口京吾、恒川伸二、山本一彦. 核内自己抗原反応性T細胞の選択と自己抗体産生における役割. リウマチ 1999;39;332 (第43 回リウマチ学会)
4. Misaki Y, Setoguchi K, Fujio K et al. Autoreactive T cell as a therapeutic vehicle. リウマチ 1999;39; 223 (第43回リウマチ学会)

5. K Kawahata, Misaki Y, Setoguchi K et al. Spontaneous autoantibody production and escape of autoreactive T cells from tolerance induction in transgenic mice expressing intracellular autoantigen. Arthritis Rheum 1999; 42 ;S360. American College of Rheumatology 63rd annual meeting.
6. Setoguchi K, Misaki Y, Araki Y et al. Antigen specific T cells transduced with murine interleukin-10 ameliorates experimental induced arthritis without the impairment of systemic immune response to the antigen. Arthritis & Rheumatism 1999; 42 ; S107. American College of Rheumatology 63rd annual meeting.

THE ANALYSIS OF IMMUNE RESPONSE TO HUMAN U1snRNP-A AUTOANTIGEN IN MICE.

Yoshikata Misaki, Kimito Kawahata, Katuya Nagatani, Kazuhiko Yamamoto
Department of Allergy and Rheumatology, University of Tokyo

In order to investigate the pathogenesis of anti-U1RNP autoantibody in Mixed Connective Tissue Disease, we generated human U1RNP-A autoantigen transgenic mice (huATg). This transgenic mice system provides several advantages for anti-U1RNP autoantibody study. First, human U1-A (huA) is supposed to be the key molecule for the recognition of U1RNP by the immune system. Second, anti-huA immune response can be induced in mice while mice are tolerant to mouse U1-A (muA). Third, disease can be induced by adoptive transfer of anti-huA reactive T cells into huATg. huATg has two lines which are different in expression level of huA as well as disease phenotype. In order to elaborate this system and investigate the tolerance of T cell clonal level, we started epitope analysis of anti-huA T cell analysis. Splenic T cells from C57BL/6 mice immunized with huA reacted to the C-terminus of huA. It has been demonstrated that the C-terminus of huA is also dominant T cell epitope in MCTD patients. Therefore, in spite of the difference of MHC and species, the C-terminus of huA might be susceptible to the exposure to the immune system. we are going to study on further precise mapping and to establish T cell clones.

11. 抗U1RNP抗体産生におけるCD40リガンドおよび膜結合型TNF α の意義 — CD40リガンド欠損MRL/MpJ-*lpr/lpr*マウスを用いた検討—

分担研究者 : 三森 経世

研究協力者 : 藤井 隆夫

所属施設 : 慶應義塾大学医学部内科

研究要旨

CD40リガンド(CD40L, CD154)は抗核抗体の産生に重要な共刺激分子である。しかしCD40Lを欠損した全身性エリテマトーデス(SLE)のモデルマウスMRL/MpJ-*lpr/lpr*マウス(MRL/*lpr*マウス)では、抗dsDNA抗体の産生がないにもかかわらず、抗U1RNP抗体の産生は認められる。そこで同マウス脾細胞から抗U1RNP抗体産生を刺激するCD3⁺CD4⁺CD8⁻B220⁻TCR $\alpha\beta$ Th1クローンを分離した。クローンの増殖はMHC class II (I-E^b)に依存し、IFN γ を分泌、細胞表面に膜結合型TNF α を発現した。またクローンによる抗U1RNP抗体の産生は、T・B細胞の分離、抗TNF α 抗体、抗TNF-R2抗体により阻害された。以上から抗dsDNA抗体産生はCD40-CD40Lに依存するのに対し、抗U1RNP抗体産生では膜結合型TNF α -TNF-R2の関与が示唆された。

A. 研究目的

T細胞依存性抗原に対するB細胞の抗体産生には、MHC class II-T細胞レセプターを介したシグナルと、T-B細胞表面に発現する共刺激分子 (costimulatory molecules) を介したシグナルが必要である。なかでもCD40リガンド(CD40L, CD154)は、261アミノ酸からなる約39kDaのTNFファミリーに属するtype II膜蛋白で、主としてCD4陽性T細胞表面に発現し、B細胞上のCD40と結合することによりB細胞を活性化するための主要な共刺激分子として知られている。SLE患者ではその疾患活動期にCD40Lの発現が増強し、T細胞および共刺激分子の活性化は正常な抗体の産生のみならずSLEの病態や抗核抗体の産生機序を考える上で重要な役割を果たしていると考えられる。一方でMCTD患者血清中で著しく高力価となる抗U1RNP抗体に関しては、U1RNP抗原に特異的に反応するT細胞が報告され¹⁾、その自己抗原上のエピトープも知られている²⁾。またわれわれは、昨年度までに抗U1RNP抗体の産生と特定のHLAクラスII遺伝子との相関を報告してきた³⁾。これらの結果は、抗U1RNP抗体の産生がT細胞に依存することを示唆するが、共刺激分子との関連については不明である。

MRL/MpJ-*lpr/lpr*マウス(MRL/*lpr*マウス)は、

SLEの代表的なモデル動物で、抗dsDNA抗体のみならず自発的な抗U1RNP/Sm抗体の産生が認められる唯一のマウスである。興味深いことに、CD40Lを遺伝的に欠損させたMRL/*lpr*マウスでは、抗dsDNA抗体やリウマトイド因子の産生が認められず、腎障害も軽症であるが、IgG2a型抗RNP抗体の産生に関してはwild-typeと同様に認められた⁴⁾。そこで今回われわれは、wild-typeおよびCD40L欠損MRL/*lpr*マウスを用いて、抗dsDNA抗体と抗U1RNP抗体産生におけるT細胞上の共刺激分子の意義を調べることを目的とした。

B. 研究方法

1. マウス

MRL/*lpr* mice はJackson研究所(Bar Harbor, ME)から購入した。またCD40L欠損MRL/*lpr* mice⁴⁾はCraft博士(Yale大学医学部)より供与された。

2. 精製dsDNAおよびsnRNPを抗原として用いたELISAによる抗核抗体の測定

抗dsDNA抗体の測定はRubinらの方法⁵⁾に従った。また、抗RNP抗体はEhrlich ascites細胞から精製したマウスRNP(1 μ g/ml)を抗原として使用した。マウス血清は3% BSAを含んだPBSで100倍希釈とし、

二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG (Southern Biotechnology Associates 社) を使用し、ELISA リーダーで OD405nm の波長を用いて測定した。

3. 自己反応性 T 細胞のクローニング

自己反応性 T 細胞のクローニングは、Naiki らの方法⁶⁾に従った。すなわち、抗 U1RNP 抗体陽性の CD40L-deficient MRL/*lpr* マウス (18 週齢) リンパ節細胞 ($4 \times 10^6/\text{ml}$) を 10% FCS を含んだ Click 培地 (Irvine Scientific 社) に浮遊させ、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ の放射線照射 (3000 rad) MRL/*lpr* マウス脾細胞を抗原提示細胞として加え、10 u/ml のマウスリコンビナント IL-2 (R&D systems 社) 存在下で培養を開始した。約 1 ヶ月後に、96-well のカルチャープレートに 5 cells/wells に薄めた状態で培養を継続し (限界希釈法)、増殖が認められたウェルの細胞のみをカルチャーフラスコにて再度増殖させ、以下の実験に使用した。

4. *in vitro* ヘルパー試験

T 細胞クローン ($5 \times 10^5/\text{well}$) を MRL/*lpr* マウス脾細胞から分離精製した B 細胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) と一週間混合培養し、その上清中の抗 dsDNA 抗体、抗 RNP 抗体を ELISA にて測定した。また抗体産生が T と B の細胞間接触に依存するものか否かを調べるため、両細胞間にサイトカインなど可溶性分子のみを通す膜 (Transwell[®]) を挿入し、同様の実験を行った。なお外来抗原に反応するコントロール T 細胞として、PCC (pigeon cytochrome c) を特異的に認識する MRL/*lpr* T 細胞⁷⁾をコントロールとして用いた。さらに T 細胞あるいは B 細胞表面分子 (CD40L, TNF α , TNF-R1, TNF-R2) および IFN γ のブロッキング抗体を用いて同様の検討を行った。さらに TNF-R2 の関与を確認するため、一部の実験では抗 RNP 抗体陽性 TNF-R2 欠損 MRL/*lpr* マウス (Yale 大学医学部 Fatenejad 博士から供与) 脾細胞から分離精製した B 細胞を用いた。

なお実験動物に関しては、動物の保護および管理に関する法律 (昭和 58 年 12 月 2 日 法律 第 80 号) および実験動物の飼育および保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月 27 日 総理府告示 第 6 号) に留意し、いかなる場合においても実験動物に苦痛・恐怖を与えることのないように配慮した。

C. 研究結果

1. wild-type および CD40L 欠損 MRL/*lpr* マウス血清

中の抗核抗体の検出

wild-type MRL/*lpr* マウス、CD40L 欠損 MRL/*lpr* マウス、および正常コントロールマウス (18 週齢) 血清中の抗 dsDNA 抗体と抗 RNP 抗体価を ELISA により測定した (図 1)。wild-type に比べ CD40L 欠損 MRL/*lpr* マウスでは抗 dsDNA 抗体の産生が低下し、正常マウスとほぼ同等であったのに対し、抗 RNP 抗体は wild-type に比し力価平均値の低下はあるものの、依然高力価で正常マウスよりも有意に産生が亢進していた。

2. CD40L 欠損 MRL/*lpr* マウス脾細胞を用いた RNP 抗原特異的 T 細胞クローンの分離

CD40L 欠損 MRL/*lpr* マウス脾細胞から限界希釈法によりクローン化され、かつ可溶性核抗原 (ENA: extractable nuclear antigens) を培地に加えることにより増殖が亢進した 5 つの T 細胞を表 1 に示した。これらはいずれもマウス MHC class II である I-E^k に対するモノクローナル抗体で阻害された。なお、E7 をのぞいた全クローンは IFN γ を分泌し Th1 細胞と考えられた。

3. CD40L 非依存性抗 U1RNP 抗体産生における膜結合型 TNF α の関与

これら T 細胞クローンと、MRL/*lpr* マウス脾細胞から分離精製した B 細胞を 1 週間混合培養し、その上清中の抗核抗体を ELISA で測定した (図 2A)。膜 (Transwell[®]) の有無、すなわち T 細胞と B 細胞間接触のあるなしに関わらず、抗 dsDNA 抗体の産生は刺激されず、PCC 特異的 T 細胞コントロールと同レベルであった。一方で、G1 と P5 の培養上清中で、特に膜を挿入しない場合 (T 細胞と B 細胞の接触がある場合) に抗 RNP 抗体が比較的高い濃度で検出された。なお

表 1. CD40L 欠損 MRL/*lpr* マウスから分離した自己反応性 T 細胞

Isolated T cell lines	T cell proliferation with APC/ENA*		% inhibition (anti-E ^k /IgG2a)	TCR V β usage
	+ IgG2a	anti-E ^k		
C2	14,531	3,004	77	V β 6
G1	39,582	3,343	92	V β 8.1/8.2
G2	66,534	3,952	95	V β 10
P5	26,136	4,837	81	V β 8.3
E7	31,249	14,468	54	V β 14

*[³H]-thymidine incorporation (cpm) in the presence of ENA with the shown antibodies.

PCC特異的T細胞コントロールも抗RNP抗体の分泌を刺激しており、これはIFN γ などサイトカインを介した刺激によるcontact-independentな抗体産生¹¹⁾と考えられた。

次にCD40L非存在下で、いかなる共刺激分子が関与しているかを調べるため、ブロッキング抗体を用いて同様の検討を行った(図2B)。アイソタイプコントロールに比し抗CD40L、抗TNF-R1抗体では抗RNP抗体の分泌は阻害されず、抗TNF α 、IFN γ 、TNF-R2抗体あるいは抗TNF α と抗IFN γ 抗体を混合した場合に一部阻害された。さらにTNF-R2欠損MRL/lprマウスB細胞を用いた場合には、膜を取り除いた場合(T細胞とB細胞の接触がある場合)でも、B細胞単独の約1.2倍程度でTNF-R2-intact MRL/lprマウスB細胞を使用した場合に比して抗体産生を認めず、TNF-R2-intact MRL/lprマウスB細胞をT細胞との接触がない状態で培養した場合とほぼ同等であった(図2C)。

なおELISAで用いたRNP抗原はU1-U6RNPを含むが、培養上清を用いた免疫沈降法ではU1RNAのみを沈降し、分離したTh1クローンについては抗U1RNP抗体の産生に関与する細胞と考えられた。

D. 考察

MCTDは、高力価の抗U1RNP抗体産生を特徴とする。抗U1RNP抗体の産生機序については未だ不明の点も多いが、膠原病患者からRNP分子に特異的に反応するT細胞が分離され、抗体の産生における自己反応性T細胞の関与が報告されている¹²⁾。またわれわれは昨年度までに、抗U1RNP抗体陽性例で健常人に比しDQB1*0302が有意に増加していること、またMCTD患者ではDRB1*0901-DQA1*0302-DQB1*0303-DPB1*0901が特異的に認められたことを報告してきた³⁾。これらは抗U1RNP抗体の産生がMHC class IIとT細胞レセプターのinteractionにより刺激されていることを強く示唆する結果である。しかしMHC class II分子-T細胞レセプター間のシグナルのみではB細胞の活性化には不十分で、そのシグナルによって細胞表面に発現される共刺激分子(co-stimulatory molecules)による別のシグナルが必要である。むしろこれらの分子の発現がない場合には細胞がアネルギーとなる可能性も指摘されている⁸⁾。T細胞依存性の抗体産生において最も重要な役割を果たす共刺激分子が

CD40あるいはCD40Lであり、それらを遺伝的に欠損させたマウスが報告されて以来、その機能が明らかとなってきた⁸⁾。

今回われわれはCD40L非依存性の抗核抗体産生機序、特に抗U1RNP抗体の産生機序を調べるためにCD40L欠損MRL/lprマウス脾細胞から抗U1RNP抗体の産生をヘルプする自己抗原反応性T細胞を分離した。T細胞クローンの増殖はマウスMHC class II(I-E^k)に依存したが、T細胞レセプターの構造が互いに異なりスーパー抗原の関与は否定的であった。クローンはCD40L非存在下でもB細胞からの抗RNP抗体産生を刺激し、抗体産生がT細胞依存性であるにもかかわらず、必ずしもCD40-CD40Lの系を必要としないことが示された。さらにこの抗体産生はTNF α -TNF-R2の系を阻害することで低下し、かつ抗RNP抗体の産生がT-B細胞間の接触に依存していることから、可溶性のTNF α ではなく、膜結合型TNF α がCD40Lの代替分子と考えられた。膜結合型TNF α を介した抗体産生は以前から報告されていた⁹⁾が、同分子と抗核抗体産生との関連を見いだしたのは本報告が初めてである。また抗IFN γ 抗体によっても抗U1RNP抗体の産生が一部阻害されているが、TNF-R2欠損MRL B細胞を用いて抗体産生がほぼ完全に阻害されていることから、TNF α -TNF-R2の系の活性

図1.
wild-type およびCD40L欠損MRL/lpr
マウス血清中の抗核抗体
抗dsDNA抗体 抗RNP抗体

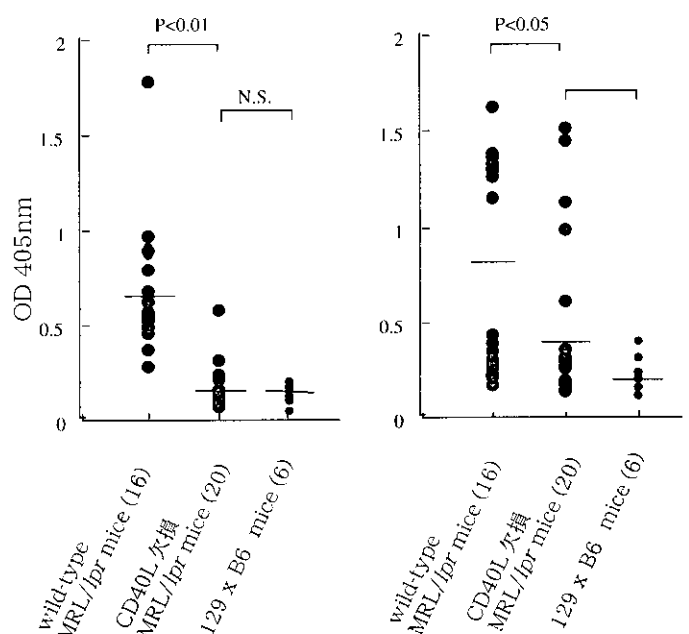


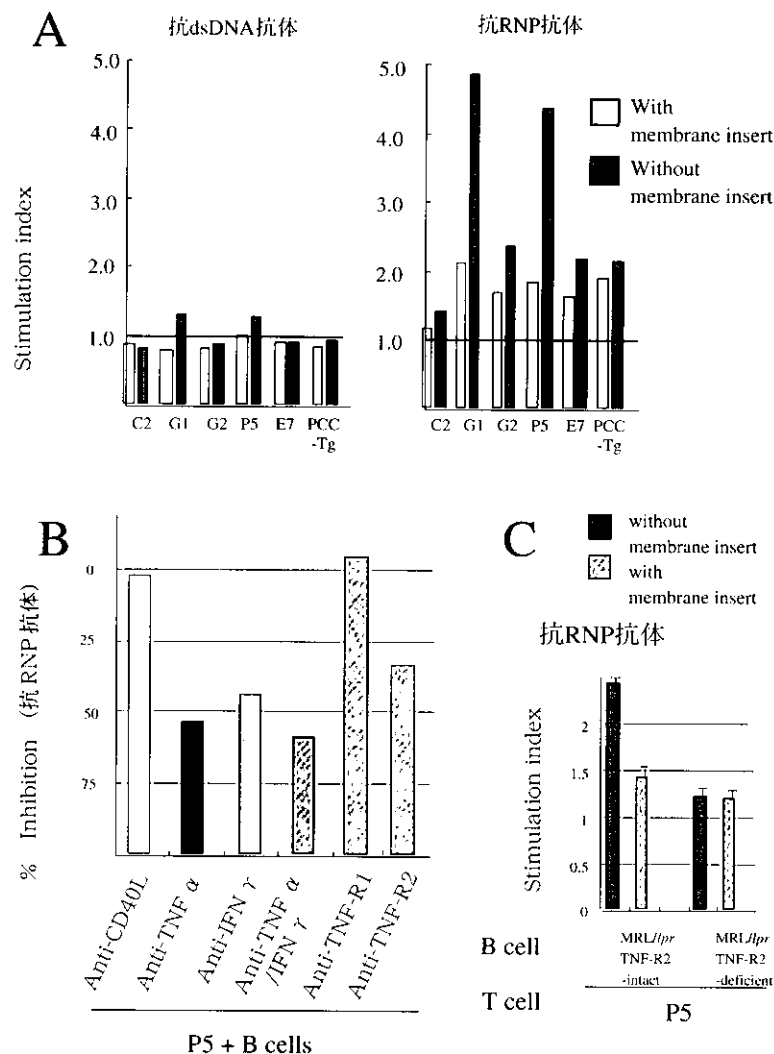
図 2 .

T 細胞クローンを用いた *in vitro* ヘルパー試験

Stimulation index =
(the value of
concentration in
culture supernatant of
experimental wells) /
(the value of
concentration in
culture supernatant of
B cells alone).

% Inhibition = (1-(the
titer of anti-RNP Ab
with blocking mAb
(OD405nm) / anti-RNP
Ab with isotype control
(OD405nm))) x 100.

The concentration of
blocking Ab and
isotype control were 25
mg/ml.



化が第一で、IFN γ はそれに伴って分泌され抗U1RNP抗体産生を刺激したと考えられる。なおTNF α は、主としてTh1細胞表面に発現・分泌され、膜結合型TNF α -TNF-R2を介した抗U1RNP抗体は、Th1細胞依存性と考えられた。

SLEに特異的かつその抗体価が疾患活動性と並行して推移する抗dsDNA抗体と、MCTDをはじめとする多種類の膠原病に認められ治療によっても抗体価が変動することが少ない抗U1RNP抗体の産生機序を解明することは、SLEとMCTDの疾患の発症機序を知る上で大切である。なぜ抗dsDNA抗体がTNF α -TNF-R2の系のみでは産生されないのか、またMCTD患者におけるこれら共刺激分子発現の分析は今後の課題である。

文 献

- Hoffman RW, Takeda Y, Sharp GC, et al. Human T cell clones reactive against U-small nuclear ribonucleoprotein autoantigens from connective tissue disease patients and healthy individuals. *J Immunol* 1993;151:6460-6469.
- Okubo M, Yamamoto K, Kato T, et al. Detection and epitope analysis of autoantigen-reactive T cells to U1-small nuclear ribonucleoprotein A protein in autoimmune disease patients. *J Immunol* 1993; 151:1108-1115.
- 三森経世ほか：抗U1-RNP抗体産生および混合性結合組織病に關与する免疫遺伝学的要因。厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班混合性結合組織病分科会、平成9年度報告書、pp22-33, 1998.
- Ma J, Xu J, Madaio MP, et al. Autoimmune *lpr/lpr* mice deficient in CD40 ligand. Spontaneously Ig class switching with dichotomy of autoantibody responses. *J Immunol* 1996;157:417-426.
- Rubin RL. Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-DNA and antihistone antibodies including anti-(H2A-H2B). In *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 4th Ed.1992 American Society for Microbiology. Washington D.C., p735-740.

6. Naiki M, Chiang BL, Cawley D, et al. Generation and characterization of cloned T helper cell lines for anti-DNA responses in NZBH-2bm12 mice. *J Immunol* 1992; 149: 4109-4115.
7. Peng SL, Fatenejad S, Craft J. Induction of nonpathologic, humoral autoimmunity in lupus-prone mice by MHC class II-restricted, transgenic $\alpha\beta$ T cell. Separation of autoantigen-specific and-nonspecific help. *J Immunol* 1996;157: 5225-5230.
8. Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 1995;378:617-620.
9. Aversa G, Punnonen J, de Vries JE. The 26-kDa transmembrane form tumor necrosis factor α on activated CD4+ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. *J Exp Med* 1993; 177: 1575-1585.

THE SIGNIFICANCE OF CD40 LIGAND AND THE TRANSMEMBRANE FORM OF TNF α ON ANTI-U1RNP ANTIBODY PRODUCTION: STUDIES USING CD40L-DEFICIENT MRL/MpJ-*lpr/lpr* MICE

Tsuneyo Mimori and Takao Fujii

Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine

It is well accepted that the interaction between CD40 and its ligand (CD40L) plays a decisive role in contact-dependent help between T and B cells. In CD40L-deficient MRL/MpJ-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) mice, however, high titers of autoantibodies to U1 small nuclear ribonucleoproteins (anti-U1RNP Ab) along with the development of CD44^{high}CD45RB^{high} effector CD4⁺ T cells was observed. We successfully isolated two CD40L-deficient MRL/*lpr* Th1 lines, which could provide B cell help for anti-U1RNP Ab production. Proliferative responses of Th1 lines were MHC class II (I-E^k)-restricted. Anti-TNF α , IFN γ , and TNF-R2 mAb inhibited anti-U1RNP Ab secretion induced by CD40L-deficient Th1 lines, but anti-CD40L or TNF-R1 mAb did not. In addition, the Th1 lines failed to induce anti-U1RNP Ab secretion from B cells derived from anti-U1RNP Ab-positive TNF-R2-deficient MRL/*lpr* mouse. Anti-U1RNP Ab was secreted mainly in contact-dependent manner, suggesting that the transmembrane form of TNF α (mTNF α) - TNF-R2 co-stimulation participates in B cell activation. These results indicate that the interaction of mTNF α on activated Th1 cells with TNF-R2 on B cells may be involved in anti-U1RNP Ab production in MRL mice and, possibly, mixed connective tissue disease.

12. MCTD および各種膠原病患者血清に対する RNA エピトープの解析

分担研究者 : 高崎 芳成

研究協力者 : 官川 薫, 竹内 健, 金田 和彦, 池田 圭吾, 橋本 博史

所属施設 : 順天堂大学膠原病内科

研究要旨

自己免疫疾患での自己抗体の対応抗原の多くがRNA-蛋白の複合体であるが、蛋白成分に対する抗体に加え、RNAに対する抗体の存在が近年報告されている。最近、我々は25塩基のランダムな配列のRNAライブラリーを用いたスクリーニング法により、膠原病患者血清と特異的に反応する新たなRNA抗原の塩基配列を決定し、このRNAがMCTDおよびシェーグレン症候群(SjS)患者血清と反応することを明らかにした。今回、このRNAの一部の塩基配列を変異させたものを作成し、変異RNAと患者血清との反応性を免疫沈降法にて検討した。各患者血清により反応性のパターンに差が認められたが、いずれの変異RNAも選ばれたRNAに比べると反応性が弱い傾向が見られており、特定の塩基配列を持ったRNAエピトープと反応するMCTDおよびSjS患者血清中の新たな抗RNA抗体の存在が示唆された。

A. 研究目的

MCTDおよびSjS患者血清と反応するRNAおよびその変異RNAを用いた免疫沈降法にて、膠原病患者血清と特異的に反応するRNA抗原のエピトープを検討した。

B. 対象および方法

MCTDおよびSjS患者血清と特異的に反応するRNAは、ランダムRNAライブラリーを用いたスクリーニング法にて選ばれた。患者血清と結合したRNAは抽出し、RT-PCR法で増幅され、同一血清を用いてスクリーニングを繰り返した。最終的に選ばれたRNAはクローニングし、シーケンス法により塩基配列を決定した。塩基配列の決定されたRNAは³²Pで標識し、免疫沈降法にてMCTDおよびSjS患者群血清と反応することを確認した。更にこのRNAの一部の塩基配列を変異させたものを作成し、患者血清と変異RNAとの反応性を同様の免疫沈降法にて検索した。反応性は、%Binding = [沈降した抗体・³²P標識RNA複合体の放射活性(cpm値) / 添加した³²P標識RNAの放射活性(cpm値)] × 100として定量した。

C. 結果

1) スクリーニングされたRNAとMCTDおよび各種膠原病患者群の血清との反応性

上記スクリーニング法にてSjS患者(イニシャルT.S.)血清に結合するRNAの塩基配列が決定された(図1)。そのRNAの内1つ(TS1-RNA)はSjS患者群血清61例中32例が反応したが、SjSの合併のないMCTD患者群血清6例中3例にも反応を認めた。一方、SjSの合併のないSLE患者血清、RA患者血清とこのRNAとの反応はそれぞれ41例中8例、25例中3例のみに認めた(図2)。

2) TS1-RNAのエピトープの解析

このMCTDおよびSjS患者血清と反応するRNAエピトープを解析するために、TS1-RNAの一部の塩基配列を変異させたものを作成し、患者血清との反応性を調べた。TS1-RNAの25塩基のうち17番から25番目を変異させたRNA、8番から15番目を変異させたRNA、2番から7番目を変異させたRNA、TS1-RNAと全く異なった塩基配列のcontrol RNAを用意し、それぞれのRNAと患者血清、正常人血清との反応性を検索した。血清はSjS患者3例、正常人2例について検索を行い、反応性は%Bindingとして定量した。患

TS1 CGAAAGUCCGAUCGGCGUAAUGUCA
 TS2 CGAAAGUCCGAUCGGCGUAAUGUCA
 TS3 CGAAAGUCCGAUCGGCGUAAUGUCA
 TS4 CGAAAGUCCGAUCGGCGUAAUGUCA
 TS5 CGAAAGUCCGAUCGGCGUAAUGUCA
 TS6 GUUUGGCGACGUCCACAUGAGCC
 TS7 GUUUGGCGACGUCCACAUGAGCC
 TS8 GUUUGAUGGAUACCUAUCCUUGGCC
 TS9 GUUUGGUACGACCUGAUCAUGCGCC
 TS10 AUGUCACGUAUCUUAAGAUCGAAG

図1. Selected RNA Sequences to bind TS Serum

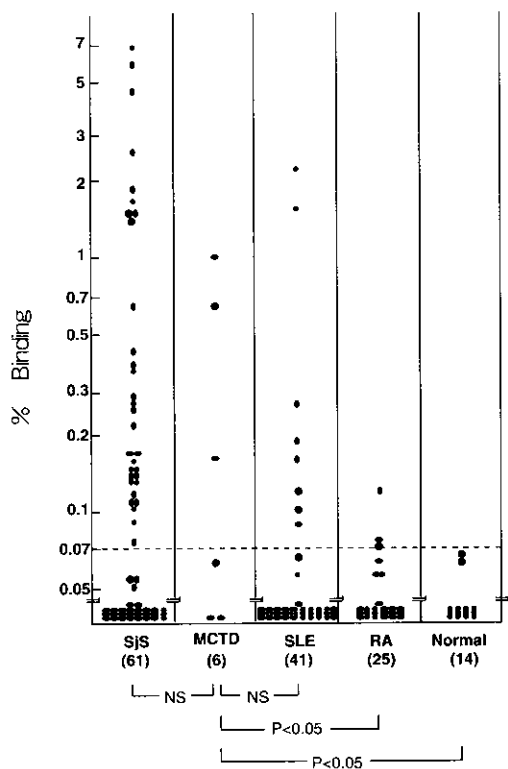


図2. Reactivity to TS1-RNA by Sera from Patients with SjS, MCTD, SLE and RA

者血清により反応性のパターンに差が認められたが、いずれの変異RNAも元のTS1-RNAに比べると、反応性が弱い傾向がみられた。対照の正常人血清はいずれのRNAとも明らかな反応性を認めなかった(図3)。この結果から、TS1-RNAの25塩基全体が患者血清との反応に関与している可能性が示唆された。

D. 考案

膠原病で検出される抗核抗体の対応抗原の多くがRNAと蛋白が結合した複合体、すなわち ribonucleo

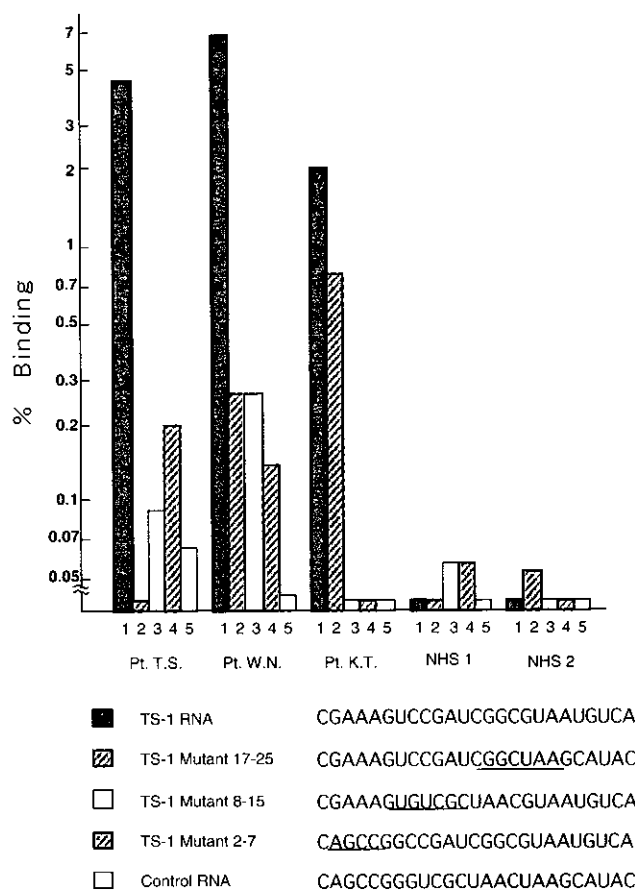


図3. Binding of Patients Sera to Mutants of TS1-RNA
 Pt. T.S., Pt. W.N., Pt. K.T.: Patient Sera, NHS 1, NHS 2: Normal Human Sera

protein(RNP)の形態をとっているが、蛋白成分に対する抗体に加え、RNAに対する抗体の存在が近年報告されている。例えばMCTDなどで検出される抗U1 RNP抗体の対応抗原、U1 RNPはU1 small nuclear RNAと9種の蛋白の複合体で形成されており、抗U1 RNP抗体陽性血清は70kD、A、C、などの蛋白に加え、約40%の血清がU1 RNAのstem loop2および4などと反応する¹⁾。このような複合体においてはその構成成分の一部に対する免疫応答を誘導すると、"antigen driven"の形で分子全体に対する免疫応答を引き起こすことが可能となる。この点でRNAに対する免疫応答が自己抗体産生を誘導する引き金になっている可能性も指摘されている。近年、RNAは生体内においてそれ自身が酵素としての活性を有し、種々の蛋白と結合する事が明らかになってきた²⁾。また、ウイルスにトランスフォームされた細胞では、RNA polymerase IIIの転写終結因子であるSS-Bなどの自己抗原がウイルス関連RNAに結合する事も知られて

いる³⁾。更に最近、RNAが形成するepitope (ribotope) が蛋白抗原上のepitope (proteotope) と交差反応する可能性も示されている⁴⁾。このように自己免疫疾患における抗RNA抗体については以前から高い関心がもたれていたが、その抗原性が破壊され易いこともあり、不明な点が多かった。

最近、我々はランダムな配列のRNAライブラリーを用いたスクリーニング法⁵⁾⁶⁾⁷⁾により、膠原病患者血清と特異的に反応する新たなRNA抗原の塩基配列を決定し、このRNAがMCTDおよびSjS患者血清と反応することを明らかにした。今回、我々は研究を進め、このRNAの25塩基全体が患者血清との反応に関与している可能性を示した。更に、塩基配列上もU1 RNAやhY-RNAとの明らかな相同性を認めず、genebankのコンピューター検索にてもTS1-RNAと相同性を持ったDNA、RNAは見つからなかったことより、特定の塩基配列を持ったRNAと反応する、MCTDおよびSjS患者血清中の新たな抗RNA抗体の存在が示唆された。

文 献

1. van Venrooij WJ, Hoet R, Castrop J, Hageman B, Mattaj JW, van de Putte LB: Anti-(U1) small nuclear RNA antibodies in anti-small nuclear ribonucleoprotein sera from patients with connective tissue diseases. *J Clin Invest* 86: 2154-2160, 1990
2. Keene JD, Query CC: Nuclear RNA-binding proteins. *Progress Nucleic Acids Res Mol Biol* 41: 179-202, 1991
3. Chang YN, Kenan DJ, Keene JD, Gatlignol A, Jeang KT: Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *J Virol* 68: 7008-7020, 1994
4. Keene JD: RNA surfaces as functional mimetics of proteins. *Chem Biol* 3: 505-513, 1996
5. Tsai DE, Harper DS, Keene JD: U1-snRNP-A protein selects a ten nucleotide consensus sequence from a degenerate RNA pool presented in various structural contexts. *Nucl Acid Research* 19: 4931-4936, 1991
6. Tsai DE, Kenan DJ, Keene JD: In vitro selection of an RNA epitope immunologically crossreactive with a peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8864-8868, 1992
7. Tsai DE, Keene JD: In vitro selection of RNA epitopes using autoimmune patient serum. *J Immunol* 150: 1137-1145, 1993

ANALYSIS OF A NOVEL RNA EPITOPE RECOGNIZED BY SERA IN PATIENTS WITH MCTD AND CONNECTIVE TISSUE DISEASES

Yoshinari Takasaki, Kaoru Hirokawa, Ken Takeuchi,
Kazuhiko Kaneda, Keigo Ikeda, Hiroshi Hashimoto
Division of Rheumatology, Department of Medicine,
Juntendo University School of Medicine

Sera from patients with various connective tissue diseases often contain autoantibodies against RNA-protein complex. In addition to antibodies directed to the protein part, antibodies to the RNA moiety have been recently found. We have previously identified novel antibody directed against RNA of 25 nucleotides (TS1-RNA) from a randomized RNA library in patients with MCTD and Sjögren's syndrome. In the present study, the epitopes on this RNA were further analyzed by immunoprecipitation using mutants of TS1-RNA. The reaction of patient sera with the RNAs declined when any part of the TS1-RNA was mutated. This finding indicates that the selected TS1-RNA is a novel sequence-specific RNA epitope that binds specifically sera with MCTD and Sjögren's syndrome.