

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

自己免疫疾患の病因・病態解析と新たな治療法の  
開発に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

March 2001

平成 13 年 3 月

主任研究者 小 池 隆 夫

—目次—

(1)	構成員名簿	3
(2)	総括研究報告書	7
	自己免疫疾患の病因・病態解析と新たな治療法の開発に関する研究	
	小池 隆夫	9

(3)分担研究報告書

1.	HTLV-I 遺伝子導入ラットに認める臓器特異的自己免疫疾患の発症機序に関する検討 石津明洋	19
2.	PD-1 受容体欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症の解析 篠原隆司	23
3.	NKT 細胞リガンド $\alpha$ -GalCer による自己反応性 CD4+T 細胞の活性化機構 西村 孝司	27
4.	SLE T 細胞の raft 画分シグナル伝達分子の発現と機能に関する研究 竹内 勤	32
5.	コンビナトリアルケミストリーを用いた T 細胞エピトープの解析 松下 祥	35
6.	全身性自己免疫疾患発症における CD40 リガンド過剰発現の役割 鏑田 武志	41
7.	ホスファチジルセリン依存性モノクローナル抗プロトンピン抗体を用いた半定量的 ループスアンチコアグラント法 小池隆夫	45
8.	病因となる自己抗体の検出とその臨床意義：抗 $\beta$ 2-GPI 抗体、抗 laminin-1 抗体、 および抗 sulfatide 抗体 松浦栄次	51
9.	ステロイド長期連用 SLE 患者リンパ球における多剤抵抗性遺伝子産物の発現調節 田中良哉	57
10.	抗 DNA 抗体 V 遺伝子に対する化学修飾リボザイムによる実験的 ループス腎炎発現の阻止 佐々木 毅	61

11. SLE 感受性を規定する Fcgr2b 遺伝子プロモーター領域多型の機能解析 広瀬幸子	66
12. 候補遺伝子アプローチによるヒト全身性エリテマトーデス感受性遺伝子の検討 徳永勝士	70
13. SLE における病像・病態の規定因子に関する研究 (第二報) 橋本博史	77
14. ループス腎炎における尿中 wt1 mRNA 検出の意義 三村俊英	81
15. 全身性エリテマトーデス患者血清中に見出された RNA ヘリケース A を認識する 平形道人	84
16. 抗 Killer Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) 自己抗体の検出と臨床的意義 加藤智啓	88
17. 全身性エリテマトーデスにおける in vivo でのアポトーシス指向性リンパ球の増加 とその臨床的意義：ミトコンドリア膜電位( $\Delta\Psi_m$ )測定による解析 簗田清次 (自治医科大学アレルギーリウマチ科)	91
18. 多発性筋炎・皮膚筋炎に合併した間質性肺炎に対するシクロスポリン療法に関する 全国調査 宮坂信之	93
19. 多発性筋炎・皮膚筋炎における罹患筋組織浸潤 T cell clone 樹立の試み 原まさ子	98
20. 抗 IL-6R 抗体による間質性肺炎の治療法の開発 —肺線維芽細胞における IL-6 の機能解析とマウス間質性肺炎モデルに対する治療実験— 西本 憲弘	101
21. 唾液腺培養上皮細胞を用いたシェーグレン症候群におけるサイトカイン、ケモカイン、 アポトーシス関連分子に関する研究 菅井進	108
22. シェーグレン症候群唾液腺細胞アポトーシス誘導機序の検討 江口勝美	111
(4) 研究成果の刊行に関する一覧表	115

## (1) 構成員名簿

平成十二年度 「自己免疫疾患の病因・病態解析と  
新たな治療法の開発に関する研究」 班員名簿

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態内科学分野	教授
分担協力者	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター	教授
	鏑田 武志	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウィルス・免疫疾患研究部門免疫疾患分野	教授
	西本 憲弘	大阪大学健康体育部健康医学第一部門	助教授
	広瀬 幸子	順天堂大学医学部病理学第二講座	助教授
	松下 祥	熊本大学大学院医学研究科脳免疫統合科学系・免疫識別学講座	教授
	宮坂 信之	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体環境応答学系生体応答学講座	助教授
研究協力者	石津 明洋	北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻 病態解析講座 分子病理学分野	助手
	原 まさ子	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	教授
	平形 道人	慶応義塾大学医学部内科リウマチ研究室	講師
	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	助教授
	田中 良哉	産業医科大学内科学第一講座	教授
	篠原 隆司	京都大学大学院医学研究科分子生体統御学分子生物学教室	教授
	江口 勝美	長崎大学医学部内科学第一講座	教授
	菅井 進	金沢医科大学血液免疫内科学	教授
	佐々木 毅	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病態制御学講座免疫・血液病制御学分野	教授
	橋本 博史	順天堂大学医学部内科学膠原病内科	教授
	籾田 清次	自治医科大学アレルギー膠原病科・リウマチ講座	教授
	三村 俊英	東京大学医学部附属病院内科アレルギー・リウマチ内科	助手
	篠原 隆司	京都大学大学院医学研究科生体統御学分子生物学教室	助手
	松浦 栄次	岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設細胞工学部門	講師
(事務局) 経理事務連絡 担当責任者	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態内科学分野 ☎060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL (011) 716-11616 (内5913) FAX (011) 706-7710	講師

## 総括研究者報告書

### 自己免疫疾患の病因・病態解析と新たな治療法の開発に関する研究

主任研究者 小池 隆夫

(北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座)

#### 研究要旨

全身性エリテマトーデス (SLE) 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と結合することから、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、これまでその対応抗原を含め、その解明は進んでいない。今回、NK レセプターに属し、NK 細胞及び T 細胞に発現して抑制性シグナルを伝達する KIR2DL1(p58.1)及び KIR2DL3(p58.2)に対する自己抗体の検索を行った。その結果、検討した慢性関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、ベーチェット病(BD)では、20～30%に抗体陽性者を認め、抗体陽性者は陰性者に比較し、有意に血清 IgG 高値(RA,SLE,BD)、血沈高値(RA,SLE)、白血球低値(RA)であった。以上より、自己免疫疾患において、KIR 分子が免疫応答の一つの標的となっており、KIR 分子からのシグナルの修飾が、自己免疫疾患の病態に関与している可能性があると考えられた。

#### A. 研究目的

本研究の目的は各々の自己免疫疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者の QOL の向上を計り、さらには病気の治癒を目指す事である。

#### B. 研究方法

(1)全身性エリテマトーデス (SLE) および抗リン脂質抗体症候群(APS)の病因、病態および治療に関して以下の検討を行った。

①HTLV-I 遺伝子導入ラットに認められる臓器特異的自己免疫疾患の発症機序に関する検討。②自己免疫疾患発症における PD-1 の役割の検討。③NKT 細胞リガンド  $\alpha$ -GalCer による自己反応性 CD4+T 細胞の活性化機構の検討。④SLET 細胞の raft 画分シグナル伝達分子の発現と機能に関する検討。⑤コンビナトリアルケミストリーを用いた T 細胞エピトープの解析。⑥全身

性自己免疫疾患発症における CD40 リガンド過剰発現の役割の検討。⑦ホスファチジルセリン依存性モノクローナル抗プロトンピン抗体を用いたループスアンチコアグラントの半定療法の検討。⑧抗  $\beta$ 2GPI 抗体、抗 laminin-1 抗体および抗 sulfatide 抗体に関する検討。⑨ステロイド長期連用 SLE 患者リンパ球における多剤抵抗性遺伝子産物の発現機構に関する検討。⑩抗 DNA 抗体 V 遺伝子に対する化学修飾リポザイムによる実験的ループス腎炎の阻止に関する検討。⑪SLE 感受性を規定する Fcgr2b 遺伝子プロモーター領域多型の機能解析。⑫候補遺伝子アプローチによる SLE 感受性遺伝子の検討。⑬SLE における病像・病態の規定因子に関する研究。⑭ループス腎炎における尿中 wt1mRNA 検出の意義に関する検討。⑮SLE 患者血清中に見い出された RNA ヘリケース A を認識する新たな自己抗体の臨床的意義とその

対応抗原エピトープに関する研究。⑯抗 Killer Immunoglobulin-Like Receptor(KIR)自己抗体の検出と臨床的意義に関する検討。⑰SLEにおける in vivo でのアポトーシス指向性リンパ球の増加とその臨床的意義に関する検討。

(2)多発性筋炎／皮膚筋炎(PM/DM)およびシェーグレン症候群(SS)の病因、病態および治療に関して以下の検討を行った。

①多発性筋炎／皮膚筋炎(PM/DM)合併した間質性肺炎に対するシクロスポリン療法に関する全国調査。②PM/DMにおける罹患筋組織浸潤 T 細胞クローンの樹立。③抗 IL-6R 抗体による間質性肺炎の治療法の開発。④唾液腺培養上皮細胞を用いたシェーグレン症候群(SS)におけるサイトカイン、ケモカイン、アポトーシス関連分子に関する検討。⑤シェーグレン症候群(SS)唾液腺障害アポトーシスの制御機序の検討。

### C. 研究結果と考察

HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット(LTR-env-pX ラット)は、関節炎、血管炎、心筋炎、筋炎、皮膚炎など様々な膠原病を発症する。これら疾患の発症機序を明らかにするために、LTR-env-pX ラットと正常同系ラットとの間で脾細胞、骨髄細胞および胸腺の置換実験を行った。その結果、LTR-env-pX ラットに認められる疾患は標的となる臓器によって異なる機序により発症すると考えられた。LTR-env-pX ラットの病態を明らかにすることは、ヒト膠原病の病因解明につながると考えられる。また、本ラットを治療実験に用いることにより、自己免疫疾患の新しい治療法の開発が容易になると期待される。

PD-1 遺伝子は免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質をコードし、その細胞質領域に免疫反応を負に制御する ITIM motif を持つ。以前、C57BL/6 の遺伝的背

景においてその欠損マウスの作成、解析を行い、PD-1 が自己免疫病発症の制御に関与することを証明し、特に PD-1 が末梢における自己免疫寛容の制御を行っていることを示した。今回は、さらに BALB/C の遺伝的背景において PD-1 の欠損マウスは拡張型心筋症の症状を呈することを見だし、その発症には自己抗体が深く関わり結果を得るに至った。拡張型心筋症は現段階では極めて治療の困難な疾患であるが、この結果は、PD-1 分子による免疫反応の抑制性シグナルがこの病態の成立に関わりうることを示し、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患にも新たな治療法の確立への発展性を示唆した。

自己免疫病の原因究明において、自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞のトリガリング機構、さらには T 細胞により認識される自己抗原の同定は不可欠である。我々は NKT 細胞のリガンドである  $\alpha$ -GalCer により活性化された抗原提示細胞が自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化を誘起することを明らかにした。

C57BL/6、BALB/c マウスの胸腺および脾臓より NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞を単離し、 $\alpha$ -GalCer と同系マウス脾細胞、または  $\alpha$ -GalCer を投与した同系マウス脾細胞を共培養することにより自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞を誘導した。これら自己反応性 Th 細胞は同系の脾細胞、DC、B 細胞などで刺激することにより強いサイトカイン産生を認めた。このサイトカイン産生はクラス II 欠損マウス脾細胞による刺激では認められず、本系で誘導された自己反応性 Th 細胞は NKT 細胞以外のクラス II 拘束性 CD4<sup>+</sup>Th によるものと考えられる。これらの Th 細胞は生体内移入によっても自己反応性を示した。以上の結果は感染による自己免疫病憎悪機構の解明に有用な知見と考えられる。

TCRと鎖発現低下によって惹起される上流シグナル伝達の異常を、T細胞膜に存在してシグナル伝達に中心的役割を果たしている raft/GEM に着目して解析した。TCR鎖は、細胞質、T細胞膜同様、raft/GEM画分にも全く検出されなかった。一方、そのなかで分子足場形成に必須の LAT は、正常 T細胞と異なり、SLET細胞では、無刺激の状態ですでに raft/GEM画分にチロシンリン酸化を受けた状態で存在しており、同時に複数のアダプター蛋白が会合していた。TCRと鎖が raft/GEM画分に存在しない事によって、負の制御の標的がなく、持続的な活性化が引き起こされている可能性が示唆された。これによって、インターフェロン- $\gamma$ や、BAFF/zTNF4/BlyS/TALL-1などのサイトカイン産生が亢進し、自己免疫現象を誘導したものと考えられた。

抗リン脂質抗体症候群(APS)の責任自己抗原 $\beta$ 2-glycoprotein Iを認識するT細胞の特徴を解析し、交差反応性が成立する抗原を効率よく同定する方法を開発した。また、特異性未知の一個のT細胞を出発材料として、その細胞が認識するペプチドリガンドを効率良く同定する方法を確立した。

SLE患者やSLEモデルマウスBXSBではCD40Lの過剰およびB細胞での異所性の発現が示されている。CD40LをB細胞で異所性発現するCD40LトランスジェニックマウスではSLE様の自己免疫疾患を発症するので、CD40Lの過剰または異所性発現はSLE発症に関与すると思われる。CD40Lは、骨髄内でのB細胞自己トレランスには影響を与えないが、末梢B細胞の自己トレランスの破綻を誘導する。したがって、末梢B細胞トレランス異常は、SLEのより根本的な治療法の標的となり、さらに、我々のマウス系が末梢トレランス制御によるSLE治療法の開発の良い評価系となることが強く示唆された。

LAは抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断に必要な検査であるが、その検出法は多様で施設間差が大きい。LAの責任抗体のひとつにホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)がある。今回マウスモノクローナルaPS/PTである231Dを用いた半定量的LA検出法を開発し、客観的なLAの評価を目的とした。163人の自己免疫疾患患者を対象とした。231Dを標準血漿50-3.1 $\mu$ g/mlで段階希釈しスタンダードとした。サンプル：標準血漿を1:4でmixして凝固時間(希釈aPTT、KCT、dRVVT)を測定し、231D 1.0  $\mu$ g/mlに相当する抗凝固活性を1.0 ACUとして半定量化した。47人にAPSの臨床症状を認め、ACUが基準値を超えたものはそのうち22人で、非APS 116人中31人に比べて有意に多かった(オッズ比2.41 [1.19-4.88])。ワーファリン使用患者でLA陰性者6人のACUは全員感度以下であった。231DはLAの半定量化に有用であり、これを使用してLAの標準化が可能である。

抗 $\beta$ 2-グリコプロテインI抗体(抗 $\beta$ 2-GPI抗体)に特異的な酸化LDL由来のリガンド(oxLig-1)は、7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoateであった。抗リン脂質抗体症候群(APS)患者血清中で検出される抗 $\beta$ 2-GPI抗体は、 $\beta$ 2-GPI・oxLig-1複合体に対する自己抗体であり、それらの出現と動脈血栓症の既往との間に強い関連が認められた。また、酸化LDLは外因性の酸化ストレスの結果現れるもので、APS以外にも、種々の慢性疾患、すなわち、SLE、糖尿病、慢性腎炎、および慢性腎不全など、の血中に出現する。特に、APSにおいては抗 $\beta$ 2-GPI・酸化LDL(oxLig-1)複合体抗体と酸化LDLの両者の出現が重篤な動脈血栓症を引き起こす原因となっていることが明らかになった。今年度の本研究事業で、抗 laminin-1自己抗体および抗 sulfatide自

己抗体に関する解析を新たに開始した。抗 laminin-1 自己抗体の出現は、不妊症および初期の流産に深く関与していることが示された。抗 sulfatide 自己抗体に関しては、APS および SLE で陽性例が確認されたが現在のところ、臨床的意義については明らかにされていない。また、抗カルジオリピン (aCL) 抗体、すなわち、抗 $\beta$ 2-GPI 抗体、と同様に、抗 sulfatide 抗体の中には、sulfatide 結合蛋白質を認識する抗体が存在することが明らかになり、その蛋白質の同定を現在行っている。

SLE においては、ステロイド薬や免疫抑制薬などの薬物長期連用を内科的治療法の主体とするが、多剤耐性の獲得のために治療に難渋する症例を少なからず経験する。ステロイド薬長期連用 SLE 患者の末梢血リンパ球では、多剤耐性遺伝子 MDR-1 の転写因子 YB-1 とその細胞膜上の産物で薬剤細胞外能動輸送機能を有する P-糖蛋白質の発現が増強した結果、薬物の細胞外排出が促進しステロイド薬などに対する抵抗性獲得の原因となり得る。さらに、シクロスポリンは、P-糖蛋白質と拮抗的に結合してステロイド薬の細胞外排出を抑制する。以上、長期治療によりステロイドを含む多剤抵抗性 SLE 症例では、多剤抵抗性改善を目的としたシクロスポリン等の P-糖蛋白質拮抗薬の治療的使用を考慮する価値があると思われる。

自己免疫疾患の病態形成で主要な役割を占める臓器障害性自己抗体の産生を特異的に制御する治療法として自己抗体 VH 遺伝子に対するリボザイム療法 of 基礎的検討を行った。V3-7VH 遺伝子 mRNA を特異的切断しうる化学修飾リボザイムは in vitro で抗 DNA 産生クローンによる、及び SCID マウスに投入した SLE リンパ球による抗 DNA 抗体の産生を抑制し、後者では免疫複合体腎炎の形成も阻止し、その有用性が

認められた。

SLE の特徴的病態である高 IgG 血症の感受性遺伝子として、B 細胞の活性化を抑制する Fc $\gamma$ RIIB1 分子をコードする Fc $\gamma$ RIIB 遺伝子の制御領域多型が関与していることが、遺伝的解析から推定された。今回、Fc $\gamma$ RIIB 遺伝子プロモーター領域の転写制御部位を含む一部欠損を伴う遺伝子多型が、IgG 抗体応答能を亢進させる機構を、keyhole lipmet hemocyanin (KLH) を免疫したマウス系を用いて解析した。その結果、この多型をもつマウス系では、免疫後に形成されるリンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞における Fc $\gamma$ RIIB1 の発現抑制と、この現象に相関した IgG 抗 KLH 抗体価の上昇をきたすことが明らかとなった。また、ルシフェラーゼレポーター法での解析で、実際に多型を示すプロモーター領域が転写制御に関わっていることが示された。本研究によって、Fc $\gamma$ RIIB 遺伝子プロモーター領域多型は免疫制御遺伝子としての役割を担っており、感染防御の面から有益な形質として保持された多型である一方で、SLE 感受性遺伝子の一つとして機能していることが示唆された。

近年のゲノム医学の進展を背景に、SLE の病因・病態をより明らかなものとし、診断や治療のターゲットの設定に向けての応用を目的として、SLE の疾患感受性遺伝子の検出を試みている。本年度は、CD19, FCGR2B, BCMA, NKG2A の解析を行い、多数の新たな多型部位を見出すとともに、CD19 の 3'非翻訳領域の反復配列多型、FCGR2B 翻訳領域の非同義置換と SLE との新たな関連を検出した。

急性期 SLE 患者 CD4 陽性 T 細胞 Th1/Th2 を IL-13 を用いた細胞内染色で検討した。その結果、IL-4 を用いた時と同様、Th1 優位であった。この比率は症例によりばらつきはあったが、病気が軽快した状態でも Th1 優位を示した。また、IL-12

とともに Th1 誘導因子である IL-18 を急性期 SLE 患者で測定すると、有意に高値を示し、Th1・Th2 両方のサイトカインに関連していた。一方、局所におけるサイトカインの病態との関与を検討するために、CNS ループスの髄液中の IFN $\alpha$  とモノアミンとの関連を検討した。その結果、脳器質症候群を呈する症例で IFN $\alpha$  とモノアミンの変動を認め、両者の病態への関与が示唆された。

SLE における腎障害（ループス腎炎）の発症機序の解明と糸球体障害の程度および予後の推測のため、患者尿沈渣から得られた RNA から RT-PCR 法を用いて、進行性腎障害との関連の可能性のある wt1 遺伝子の解析を行った。その結果、尿中に wt1 を検出と尿蛋白の程度に関連が認められることが示された。

膠原病患者血清中に 140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体を見出し、その対応抗原が細胞内高分子蛋白である RNA ヘリケース A (RHA) であることを明らかとした。RHA は Fas を介したアポトーシスの際に 130kDa と 120kDa 蛋白に限定分解され、患者血清中の抗 RHA 抗体は限定分解産物と反応したが、一部の血清では限定分解産物を認識しなかった。RHA をコードする cDNA を利用して、抗 RHA 抗体の対応抗原エピトープを分析したところ、RHA 上には少なくとも 3 カ所のエピトープの存在が確認された。これらエピトープと自己抗体の反応様式は多様であり、native な抗原が生体内で呈示され antigen driven により自己抗体産生が惹起される可能性が示唆された。抗 RHA 抗体は、10 例の全身性エリテマトーデス患者血清中に特異的に見出され、他の膠原病や健康人ではみられなかった。同抗体陽性例は腎症を特徴とし、ループス腎炎患者の特異自己抗体となる可能性が考えられた。

SLE 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と結合することから、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、これまでその対応抗原を含め、その解明は進んでいない。今回、NK レセプターに属し、NK 細胞及び T 細胞に発現して抑制性シグナルを伝達する KIR2DL1 (p58.1) 及び KIR2DL3 (p58.2) に対する自己抗体の検索を行った。その結果、検討した慢性関節リウマチ(RA)、SLE、ベーチェット病(BD)では、20~30% に抗体陽性者を認め、抗体陽性者は陰性者に比較し、有意に血清 IgG 高値(RA,SLE,BD)、血沈高値(RA,SLE)、白血球低値(RA)であった。以上より、自己免疫疾患において、KIR 分子が免疫応答の一つの標的となっており、KIR 分子からのシグナルの修飾が、自己免疫疾患の病態に関与している可能性があると考えられた。

SLE 活動期の *in vivo* でのリンパ球アポトーシス亢進の有無を、DiOC<sub>6</sub>(3)を用いたミトコンドリア膜電位を測定することで解析した。SLE 患者では T、B、NK 細胞のすべてのリンパ球でのアポトーシス亢進が観察され、疾患活動性と正の相関をまた血清 C1q 値との間に負の相関関係が認められた。さらに治療後にその異常が是正された。増加したアポトーシス細胞が自己抗原の供給原となり、自己免疫応答成立に繋がると推察された。

難治性とされる多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM/DM) に合併した間質性肺炎 (IP) に対するシクロスポリン (CyA) 療法について多施設共同による retrospective study を行った。その結果、DM に合併した急性型 IP に対しては、初期治療として CyA とステロイド剤とを併用することでステロイド単独で治療開始するよりも救命率を向上させることが初めて明らかとなった。CyA 療法の治療 1 ヶ月における総合評価は転帰と相関しており、治療効果をみる目安となりうる事が判明したが、治療

前における CyA 療法の効果予測は不可能であった。また治療中に感染症を併発し死亡した症例もみられ、感染症合併には留意する必要があると考えられた。

PM/DM 患者筋組織に浸潤する T 細胞レパートワーを解析するために、DM 患者 1 例の筋組織から T 細胞クローンを樹立した。これらのクローンは限られた T cell receptor (TCR) V $\beta$  鎖を使用しており、更に J $\beta$  鎖の使用にも強い偏りがみられた。complementary determining region 3 (CDR3) 領域には保存されたアミノ酸モチーフが存在していた。過去の報告とあわせてもこのような偏った J $\beta$  鎖の使用は PM/DM に特徴的である。

間質性肺炎は膠原病患者の予後を左右する重要な合併症の一つであるが、その発症機序は明らかではない。現在ステロイド剤や免疫抑制剤が治療に用いられているが、抵抗性を示す例も多く、新しい治療法の開発が望まれている。In vitro で IL-6 と TGF- $\beta$  の相互作用を検討した結果、IL-6 は TGF- $\beta$  による線維化に対し全く影響を与えないか、あるとしてもごくわずかな抑制作用であることが明らかとなった。続いて全身性の高 IL-6 血症に伴う間質性肺炎の動物モデルとして IL-6 トランスジェニックマウスを用い、抗 IL-6R 抗体による治療実験を行なった。コントロール群では動脈周囲や気管支周囲へのリンパ球の浸潤による炎症がみられたが、線維化は認められなかった。一方、抗 IL-6R 抗体投与群では炎症性細胞の浸潤が顕著に抑えられていたことから、IL-6 阻害によって線維化に至っていない肺組織の炎症を抑制できることが明らかとなった。炎症の早期にヒト型化抗 IL-6R 抗体治療を行なうことにより、炎症性細胞浸潤の阻害および TGF- $\beta$  の産生抑制を介し不可逆的な肺線維症の発症を予防する可能性が示唆された。

シェーグレン症候群 (以下 SS) 唾液腺組織障害における唾液腺上皮細胞の役割を解明するため、ヒト唾液腺上皮細胞の特異的培養法を確立し、得られた細胞の遺伝子発現を解析し、正常唾液腺上皮細胞と比較検討した。培養細胞は EGF レセプター陽性、 $\alpha$ -amylase 1 陰性の導管上皮細胞であった。この細胞を IFN $\gamma$  の存在および非存在下で培養し、RT-PCR 法により唾液腺組織障害関連分子 (サイトカイン、ケモカイン、アポトーシス関連分子) の発現を解析したところ、SS 唾液腺上皮細胞は、1) IFN $\gamma$  刺激により IL-6 発現が増大し、また TNF $\alpha$  を発現している例を認めた、2) IFN $\gamma$  非存在下において T 細胞ケモカインである IP-10 および Mig の発現を認める例があり、IFN $\gamma$  刺激にてそれらの発現が増大した、3) Bcl-2 は予想されるバンドより約 50bp 短い PCR 産物を生じた、など正常唾液腺上皮細胞と異なる点を認めた。SS においては浸潤リンパ球のみならず唾液腺上皮細胞も積極的に局所の免疫反応に関与しており、病態形成に寄与していることが示唆された。

シェーグレン症候群 (SS) 唾液腺細胞のアポトーシスによる細胞死は、SS の唾液腺機能障害を引き起こす重要な機序である。今回、SS 唾液腺細胞のアポトーシスを制御する液性および細胞性の因子を検討した。免疫組織および培養唾液腺細胞株を用いた検討により、SS 唾液腺細胞のアポトーシスを誘導する重要な因子として Fas および TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  などサイトカインの関与が考えられた。TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  は抗アポトーシス蛋白発現を抑制し唾液腺細胞のアポトーシスを誘導するとともに、これら細胞の Fas 依存性アポトーシスへの感受性を増大させることが明らかとなった。唾液腺細胞の Fas 依存性アポ

トーシスは唾液腺浸潤T細胞（CD4<sup>+</sup>T細胞）のFas ligand（FasL）に加え、腺房細胞由来の可溶性FasL（sFasL）により惹起される可能性も示唆された。HTLV-I感染はSS発症のリスクファクターであるが、今回の研究によりこの発症機序にもHTLV-I感染T細胞（CD4<sup>+</sup>T細胞）の機能的FasL発現増強およびアポトーシス抵抗性の獲得によることが考えられた。

## E. 結論

### SLE および APS

(1)HTLV-1 遺伝子導入ラットを用いた臓器特異的自己免疫疾患の発症機序を検討した結果 LTR-env-pX ラットに認める自己免疫疾患は、標的となる臓器により発症機序が異なる事、正常ラット脾細胞中には、自己免疫反応抑制作用をもつ細胞が存在する事、LTR-env-pX ラットのCD4CD25陽性細胞は、免疫反応抑制機能に障害がある事などから LTR-env-pX ラットはヒト自己免疫疾患のプロトタイプ・モデルと考えられる。LTR-env-pX ラットの病態を明らかにすることは、ヒト膠原病の病因解明につながると考えられる。また、本ラットを治療実験に用いることにより、自己免疫疾患の新しい治療法の開発が容易になると期待される。

(2)BALB/C の遺伝的背景において PD-1 の欠損マウスは拡張型心筋症の症状を呈することを発見した。拡張型心筋症は現段階では心臓移植しか治療法のない難治性疾患であるが、今回の結果はマウスにおいては少なくとも自己免疫性の拡張型心筋症が存在することを初めて報告するものであり、PD-1 分子による免疫反応の抑制性シグナルがこの病態の成立に関わりうることを示した。このマウスモデルにおける結果はヒトにおいても同様のメカニズムによる心筋症の存在を強く示唆するものであり、また新たな治療法の確立への発展性を示したも

のである。

(3)NKT リガンド  $\alpha$ -GalCer により *in vitro* あるいは *in vivo* において活性化された抗原提示細胞により、マウス胸腺および脾細胞における自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞を効率的に誘導することが可能であった。 $\alpha$ -GalCer によって NKT 依存的に活性化された B 細胞では、高い CD69 抗原の発現および補助刺激分子の発現増強が見られ、自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞を誘導した。上記の方法で誘導された自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞は Th2 に偏向する傾向を認めた。以上の結果は、感染による自己免疫病の増悪機構解明において有用な知見と考えられた。

(4)TCR と 鎖 発 現 低 下 に よ っ て、raft/GEM を中心とするシグナル伝達の負の制御に失調を来し、その持続的な活性化から、下流のインターフェロン- $\gamma$ や、BAFF/zTNF4/BlyS/TALL-1 などのサイトカイン産生が亢進し、自己免疫現象の誘導につながったと考えられた。今後、この異常経路を是正するモノクローナル抗体やレセプターアンタゴニストの開発が進めば、より病態に則した、しかも副作用の少ない新規薬剤が生み出される可能性があり、さらなる検討が期待される。

(5) $\beta$ 2-GPI 上の T細胞エピトープを明らかにし、交叉反応するペプチドを同定する方法を開発した。クリプティックなエピトープが抗原提示される特殊な環境やメカニズムを解明することを含めたこれら一連の研究は、抗 $\beta$ 2-GPI 抗体の産生および APS 発症の病因を理解し、さらには治療に応用するために重要なヒントを提供するものと期待される。

(6)SLE 患者では CD40L の過剰発現や異所性発現を認めるが、CD40L が末梢 Bリンパ球の自己トレランスの破綻を誘導することが明らかとなった。末梢 B細胞トレランスの破綻により、自己抗体の産生や自己免疫疾患の発症がおこることが強く示

唆された。したがって、末梢B細胞トレランスの異常の修復により SLE のより根本的な治療法の開発が可能となることが明らかとなった。

(7)ホスファチジルセリン依然性モノクローナル抗プロトンピン抗体である 231D を使用して、半定量的 ループスアンチコアグラント (LA) が可能となった。231D を使用する本法を用いれば、長年の課題であった LA 標準化に極めて有用な手段であると考えられる。

(8)数多くの臓器非特異的な自己抗体の存在が知られているが、今年度の研究で示したように、抗 $\beta$ 2-GPI 抗体および抗 laminin-1 抗体は明らかに病因となりうる自己抗体である。それらの関与する発症の機序解明には、今後様々な検証が必要であるが、本研究班において多施設共同研究として、臨床意義を確認したい。この種の自己抗体の測定法の確立および標準化は特定疾患のみならず少子化の問題を抱える我が国の厚生行政上重要な問題である。

(9)長期ステロイド薬投与を受けている SLE 患者リンパ球では、転写因子 YB-1 を介して P-糖蛋白質の発現が増強し、細胞内ステロイドの細胞外排出亢進による細胞内ステロイド濃度の低下をもたらすこと、シクロスポリンのような P-糖蛋白質拮抗薬がステロイド薬抵抗性を改善しうる可能性が示唆された。以上、疾患活動性が極めて高く、ステロイド薬単独では疾患制御が困難で、生命臓器を傷害する SLE 症例では、シクロスポリンによる NF-AT 阻害を介する IL-2/IL-4 産生抑制機構を念頭に、また、ステロイド薬の長期連用によりステロイド薬抵抗性を獲得し、且つ副作用が危惧される SLE 症例では、P-糖蛋白質を介するステロイド薬抵抗性の改善を目的として、シクロスポリンの使用を考慮する価値があると思われる。

(10)リボザイム療法は認むべき副作用はほ

とんどないとされている。in vivo での作用を持続するために種々のデリバリー法が検討されているが、今回提示した化学修飾リボザイムは、RNase 抵抗性であり in vivo でも有効と考えられた。DNA エンザイムはリボザイムに比して細胞内取り込みが更にその有用性を増すことが期待しうる。本療法は、自己抗体が病態形成に主要な役割を担う自己免疫疾患においてより望ましい治療法として期待しうる。

(11)Fc $\gamma$ RIIB 遺伝子プロモーター領域多型の解析から、13 塩基および 3 塩基の欠損を伴う NZB 型の Fc $\gamma$ RIIB 遺伝子プロモーター領域多型が実際に転写制御に関わっており、この多型によりリンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞での Fc $\gamma$ RIIB1 分子の発現抑制、B 細胞の異常活性化、ならびに IgG 免疫応答の亢進がもたらされるものと考えられた。Fc $\gamma$ RIIB 遺伝子プロモーター領域多型は一種の免疫制御遺伝子として機能しており、B 細胞の異常活性化を病因とする SLE の感受性遺伝子の一つとして機能すると考えられる。

(12)SLE の疾患感受性候補遺伝子として、今年度は *FCGR2B*, *CD19*, *BCMA*, *NKG2A* の解析を行い、*FCGR2B*, *CD19* に新たな SLE との関連を見出した。

(13)急性期 SLE 患者の CD4 陽性細胞は Th1 優位で、回復期も変動はあるが同様の結果で収束していた。急性期 SLE 患者では IL-18 が高値で Th1/Th2 両方に関与していた。OBS では髄液中の IFN $\alpha$  の増加とともに、モノアミンの変動が病態に関与している可能性が示唆された。

(14)SLE 患者尿中 wt1 の検出は、重症 LN に認められた。isoform の解析に関しては、例数が少なく十分な臨床意義の検討は出来なかった。LN においても、尿中 wt1 の解析が腎臓の状態を把握する上で安全でかつ有効な検査法となり、経時的・即時的に腎

に関する状態や進行性腎機能低下の危険が高いかどうかの予後判定を行うことが可能となり、進行性腎障害の危険性の高いものに対しては積極的な治療を行うなど、より病態に即した治療戦略が可能となり得る。

(15)SLE 患者血清中に RHA を認識する新たな自己抗体を見出し、陽性例ではループス腎炎を特徴とすることを明らかとした。RHA 分子上に複数のエピトープが同定されたが、その抗 RHA 抗体との反応は多様であることが示された。かかる研究成果は、自己免疫疾患の病因・病態の解析や新たな治療法の開発に重要な知見をもたらすことが期待される。

(16)全身性自己免疫疾患患者において、抑制性 KIR である KIR2DL1 及び KIR2DL3 に対する自己抗体が存在することが示された。このことから、自己免疫疾患において、KIR 分子が免疫応答の一つの標的となっており、KIR 分子からのシグナルの修飾が、自己免疫疾患の病態に関与している可能性があると考えられた。この抗 KIR 自己抗体の NK 細胞及び T 細胞に及ぼす影響についてさらに研究を進めていくことにより、全身性自己免疫疾患の病因病態解明の一助になると考えられた。

(17)SLE 活動期では T 細胞だけでなく B、NK 細胞もアポトーシス亢進を示した。増加したアポトーシス細胞が免疫原となり、自己免疫応答を増強している可能性が推察された。

## PM/DM およびシェーグレン症候群

(1)PM/DM に合併した間質性肺炎(IP)に CyA とステロイド剤の併用療法は有効であり、DM の急性型 IP では初期治療としての CyA 療法は救命率を向上させることが明らかとなった。

(2)筋炎患者 1 例の筋組織から T 細胞クローンを樹立した。これらのクローンは比較的限られた V $\beta$  鎖を使用しており、更に J

$\beta$  鎖の使用頻度に強い偏りが見られた。過去の報告とあわせてもこの J $\beta$  の偏りは筋炎に特徴的である可能性が示唆された。

CDR3 領域には germline に由来する良く保存されたアミノ酸モチーフおよび germline に由来しない比較的保存されたモチーフが存在していた。一方、樹立されたクローンは in vivo でのレパートワーを反映していると考えられ、今後、このような T 細胞クローンを in vitro で機能解析をすることで、本疾患の抗原の同定、病態解明につながる可能性があると思われた。

(3)IL-6 阻害による間質性肺炎の治療の可能性が示唆された。ヒト型化抗 IL-6R 抗体による IL-6 の阻害は間質性肺炎の初期病変である炎症性細胞の浸潤を阻害し、TGF- $\beta$  の産生抑制を介し不可逆的な肺線維症の発症を予防する可能性が考えられた。したがって、炎症の早期にヒト型化抗 IL-6R 抗体治療を行なう必要があると考えられる。

(4)新たに確立した方法により得られたヒト唾液腺培養上皮細胞は導管細胞の特徴を有し、SS 唾液腺病変の解析に非常に有用である。これにより SS 唾液腺において上皮細胞がサイトカインやケモカイン、アポトーシス関連分子を発現していることが示され、浸潤細胞のみならず上皮細胞も唾液腺病変の進展に関わっていることが示唆された。またこれら分子の発現調節が正常唾液腺上皮細胞と異なっている可能性が示され、特に Bcl-2 は予想されるバンドより約 50bp 短い PCR 産物を SS 培養上皮細胞に特異的に認めた。

(5)SS 唾液腺組織には TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  などサイトカインの強い発現とともに活性化 T 細胞、特に CD4<sup>+</sup>T 細胞の顕著な浸潤が認められる。今回の研究により、これら液性および細胞性因子は SS 唾液腺細胞のアポトーシスによる細胞死誘導に深く関与し、SS 唾液腺機能障害を惹起することが示唆さ

れた。HTLV-Iも感染CD4<sup>+</sup>T細胞のアポトーシス抵抗性の獲得およびFas陽性唾液腺細胞へのFas依存性アポトーシス誘導機序などにより唾液腺機能障害、ひいてはSSを発症させるものと考えられる。今後はこの基礎的検討をもとに唾液腺細胞表面のレセプターレベル（サイトカインレセプターやFasなど）や細胞内のアポトーシス関連蛋白レベルでこれら細胞のアポトーシス感受性を調節し、SSの病態を制御しうる可能性が強く示唆される。

(3) 平成 12 年度 分担研究者報告書  
(特定疾患対策研究事業)

## HTLV-I 遺伝子導入ラットに認める臓器特異的自己免疫疾患の 発症機序に関する研究

石津 明洋（北海道大学・大学院医学研究科・分子病理）

### 研究要旨

HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット（LTR-env-pX ラット）は、関節炎、血管炎、心筋炎、筋炎、皮膚炎など様々な膠原病を発症する。これら疾患の発症機序を明らかにするために、LTR-env-pX ラットと正常同系ラットとの間で脾細胞、骨髄細胞および胸腺の置換実験を行った。その結果、LTR-env-pX ラットに認められる疾患は標的となる臓器によって異なる機序により発症すると考えられた。LTR-env-pX ラットの病態を明らかにすることは、ヒト膠原病の病因解明につながると考えられる。また、本ラットを治療実験に用いることにより、自己免疫疾患の新しい治療法の開発が容易になると期待される。

### A. 研究目的

我々が作製した HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット（LTR-env-pX ラット）は、関節炎、血管炎、心筋炎、筋炎、皮膚炎など様々な膠原病を発症する。LTR-env-pX ラットの血中には抗核抗体や抗 DNA 抗体、リウマトイド因子などの自己抗体の産生が認められることから、本ラットの疾患発症には自己免疫的機序が関与していると考えられる。これまでの解析で以下のことが明らかとなっている。

1. 導入遺伝子は全身臓器に構成的に発現している。
2. 炎症局所では pX mRNA の発現が増強している。
3. 炎症局所にはオリゴクローナルな CD4 陽性 T 細胞の集積がある。

4. 末梢リンパ球における CD80/86 などの副シグナル分子の発現が疾患発症前から亢進しており、本ラットは過剰な免疫反応をおこしやすい状態にある。

LTR-env-pX ラットに認める種々の膠原病の発症における過免疫反応性リンパ球の病因的関与を明らかにするために、疾患発症前の LTR-env-pX ラットと正常同系ラットとの間でリンパ球置換実験を行った。

### B. 研究方法

致死量の放射線を照射した疾患発症前の LTR-env-pX ラットおよび正常同系ラットに、疾患発症前の LTR-env-pX ラットまたは正常同系ラットの脾細胞あるいは骨髄細胞を移入した。また、正常同系ラットに致死

量の放射線を照射後、胸腺を摘出し、腎被膜下にリンパ球を除去したLTR-env-pX ラットまたは正常同系ラットの新生仔胸腺を移植し、正常骨髄細胞を移入した。

### C. 研究結果

LTR-env-pX ラットの脾細胞を移入した正常同系ラットに血管炎と皮膚炎の発症が認められた。LTR-env-pX ラットの骨髄細胞を正常同系ラットに移入した場合には、皮膚炎のみ発症が認められた。LTR-env-pX ラットの血液細胞を正常骨髄で置換した場合には、皮膚炎の発症は抑制されたが、その他の疾患については病変の程度は軽減したものの発症は抑制されなかった。リウマトイド因子は、背景がLTR-env-pX ラットで関節炎を発症した群の一部に産生が認められた。また、LTR-env-pX ラットに正常脾細胞を移入した場合には、ほとんどの疾患発症が抑制された。一方、胸腺の非リンパ球系細胞にのみ env-pX 遺伝子を発現するように作製したラットに血管炎の発症が認められた。

### D. 考察

血管炎と皮膚炎は正常組織を構成する分子を標的とした自己免疫疾患と考えられる。血管炎の発症には、未熟なリンパ球が env-pX 遺伝子を発現する胸腺の非リンパ球系細胞と相互作用することが重要と考えられる。今後、env-pX 遺伝子を発現する胸腺非リンパ球系細胞がどのような分子機構を介してリンパ球の成熟過程に異常を誘導しているのかを明らかにする必要がある。これに対し、皮膚炎の発症には、リンパ球における env-pX 遺伝子の発現が重要であると考えられる。

一方、関節炎や心筋炎、筋炎では、標的臓器における env-pX 遺伝子の発現が重要と考えられるが、導入遺伝子産物が唯一の標的ではなく、導入遺伝子に関連した多彩な抗原が標的となっている可能性が高い。今後、関節組織より採取した細胞の相互置換とリンパ球置換を組み合わせた細胞移入実験を行い、関節炎の発症機序を明らかにしていく必要がある。また、臓器特異的自己免疫疾患を誘導する T 細胞クローンの樹立とその標的分子の同定を併せて行っていく予定である。

このほか、正常ラットの脾細胞には自己免疫反応を抑制する細胞が存在することが示唆された。マウスでは最近、CD4CD25 陽性細胞が自己免疫反応抑制作用を持つ細胞として注目されている。ラットの系でこの細胞について検討したところ、正常ラットの CD4CD25 陽性細胞は抗原提示細胞の存在下で CD3 を介した T 細胞増殖反応を抑制するのに対し、LTR-env-pX ラットの CD4CD25 陽性細胞には疾患発症前からその抑制機能に障害が認められた。自己免疫反応抑制細胞の機能障害も LTR-env-pX ラットの疾患発症に関与している可能性が考えられる。

### E. 結論

1. LTR-env-pX ラットに認める自己免疫疾患は、標的となる臓器により発症機序が異なる。

(1) 皮膚炎は、env-pX 遺伝子を発現するリンパ球が、env-pX 遺伝子に関連しない皮膚の抗原を標的として発症する。

(2) 血管炎の発症には、env-pX 遺伝子を発現する胸腺非リンパ球系細胞が重要な働きをしている。

(3) 関節炎, 心筋炎, 筋炎の発症には, 標的臓器における env-pX 遺伝子の発現が必要と考えられる.

2. 正常ラット脾細胞中には, 自己免疫反応抑制作用をもつ細胞が存在する. LTR-env-pX ラットの CD4CD25 陽性細胞は, 免疫反応抑制機能に障害がある.

3. LTR-env-pX ラットはヒト自己免疫疾患のプロトタイプ・モデルと考えられる. LTR-env-pX ラットの病態を明らかにすることは, ヒト膠原病の病因解明につながると考えられる. また, 本ラットを治療実験に用いることにより, 自己免疫疾患の新しい治療法の開発が容易になると期待される.

#### F. 健康危険情報

該当なし.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ishizu, A., Sawai, K., Ikeda, H., Hirano, T., Ishiguro, N., Meruelo, D.: Transduction of a murine dominant negative activation transcription factor 1 increases cell surface expression of the class I major histocompatibility complex on a human epidermoid tumor cell. *Int. Immunol.* 2000, 12: 161-168.

石津明洋, 吉木 敬: 動物モデルとリウマチ性疾患. *Rheumatology Clinical Update* 2000, 4: 40-41.

石津明洋, 吉木 敬: 血管炎のモデル動物. *最新医学* 2000, 55: 2611-2615.

##### 2. 学会発表

石津明洋: リウマチ性疾患の病因とレトロウイルス. シンポジウム「リウマチ性疾患の病因と新しい治療戦略」 第44回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜. 第44回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 2000, 40: 242.

石津明洋: シンポジウム「新しい血管炎発症モデル」 第46回日本病理学会秋期特別総会, 仙台. *日本病理学会会誌* 2000, 89: 12.

Ishizu, A., Ikeda, H., Shibata, M., Fugo, K., Higuchi, M., Tsuji, M., Sugaya, T., Nakamaru, Y., Yamazaki, H., Koike, T., Yoshiki, T.: Immunological features of HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: a prototype model for collagen vascular diseases. 9th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, APLAR, Beijing, China. Abstract 2000, p221.

辻 宗啓, 池田 仁, 富居一範, 樋口正人, 鈴木 昭, 石津明洋, 柴田雅彦, 吉木 敬: HTLV-I LTR-env-pX トランスジェニックラットにおける自己免疫疾患発症の抑制に関する検討. 第25回北海道リウマチ研究会, 札幌. *北海道医学雑誌* 2000, 75: 365.

樋口正人, 池田 仁, 富居一範, 菅谷壽晃, 石津明洋, 柴田雅彦, 吉木 敬: 自己免疫疾患を発症する HTLV-I LTR-env-pX トランスジェニックラットの解析: リンパ組織における CD25+CD4+T 細胞分画の動態の検討. 第89回日本病理学会総会, 大阪. *日本病理学会会誌* 2000, 89: 192.

樋口正人, 池田 仁, 富居一範, 菅谷壽晃,  
石津明洋, 柴田雅彦, 吉木 敬: HTLV-I  
LTR-env-pX トランスジェニックラットの  
胸腺, リンパ節, 脾臓における  
CD25+CD4+T 細胞分画の動態の検討及び  
脾細胞投与の試み. 第44回日本リウマチ学  
会総会・学術集会, 横浜. 第44回日本リウ  
マチ学会総会・学術集会抄録集 2000, 40:  
525.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし.