

する比は、約4にまで回復した。この結果は、56Rマウスでは、一部の自己反応性B細胞が移行期B細胞から成熟B細胞に分化する段階でクローン除去を受け、このクローン除去がCD40シグナルにより回復することを強く示唆する。

さらに、56RトランスジェニックマウスおよびCD40L/56Rダブルトランスジェニックマウス脾臓B細胞を単離してLPSで刺激すると、56RマウスのB細胞は全く抗DNA抗体を産生しなかったが、CD40L/56RダブルトランスジェニックB細胞は抗二本鎖DNA抗体を多量に産生した。この結果は、CD40シグナルにより、二本鎖DNA特異的B細胞の除去が起こらなくなり、LPSに反応しうる成熟B細胞にまで分化することを強く示唆する。

D. 考察

本研究において、我々は、CD40LのB細胞での異所性発現によりDNA反応性B細胞の自己トレランスが破綻することを明らかにした。さらに我々は、CD40L発現があると骨髄内の未熟B細胞の自己トレランスは正常に保たれるものの、末梢リンパ臓器でのクローン除去に異常がおこることを明らかにした。したがって、CD40シグナルにより、本来自己抗原に反応して死滅するはずの末梢リンパ臓器の自己反応性B細胞が生存し、その結果、自己トレランスの破綻が起こるものと考えられる。この結果は、CD40シグナルが抗原との反応による成熟B細胞アポトーシスを阻害するという、我々の以前の*in vitro*での結果とよく合致し、このような現象が実際に生体内で起こっていることを強く示唆する。

DNAは骨髄を含めて種々の組織に広く分布する。新たに骨髄内で産生されたDNA反応性B細胞は骨髄内で自己抗原に反応し速やかに自己トレランスが誘導されることが示されている。しかし、本研究では、CD40L

が末梢リンパ組織での自己トレランスを阻害することにより、DNA反応性B細胞の自己トレランスの破綻を誘導することを示している。自己反応性B細胞の一部が何らかの機構で骨髄内でのトレランスから逃れて末梢リンパ臓器へと移動し、そこでさらに自己トレランスが誘導されると考えられる。したがって、たとえ骨髄を含めて広く種々の臓器に分布する自己抗原であっても、そのような自己抗原に反応する自己反応性B細胞の自己トレランスには、末梢リンパ臓器での自己トレランスが重要と考えられる。

我々はすでにCD40Lの異所性発現によってSLE様の自己免疫疾患がおこることを示している。末梢B細胞のトレランスの破綻により自己抗体産生がおこり、その結果SLE様の自己免疫疾患が発症すると考えられる。したがって、成熟B細胞のクローン除去を標的とする治療法の開発により、SLEのより根本的で特異的な治療が可能になることが強く示唆される。さらに、我々のモデル系は、このような治療法を開発する上で有用な評価系となると期待される。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Adachi, T., Wakabayashi, C., Nakayama, T., Yakura, H., and Tsubata T. (2000): CD72 negatively regulates signaling through the antigen receptor of B cells. *J. Immunol.* 164: 1223-1229.

2. Tsubata, T., and Honjo, T. (2000): B cell tolerance and autoimmunity. *Rev. Immunogenet.* 2: 18-25.
3. Yoshida, T., Higuchi, T., Hagiyaama, H., Strasser, A., Nishioka, K., and Tsubata, T. (2000): Rapid B cell apoptosis induced by antigen receptor ligation does not require Fas (CD95/APO-1), the adapter protein FADD/MORT1 or CrmA-sensitive caspases but is defective in both MRL-+/+ and MRL-*lpr/lpr* mice. *Int. Immunol.* 12: 517-526.
4. Nagaoka, H., Takahashi, Y., Hayashi, R., Nakamura, T., Ishii, K., Matsuda, J.-I., Ogura, A., Shirakata, Y., Karasuyama, H., Sudo, T., Nishikawa, S.-I., Tsubata, T., Mizuochi, T., Asano, T., Sakano, H., and Takemori, T. (2000): Ras mediates effector pathways responsible for pre-B cell survival, which is essential for the developmental progression to the late pre-B cell stage. *J. Exp. Med.* 191: 2113-2120.
5. Tsubata, T., Wakabayashi, C. and Adachi, T. (2001): Regulation of B cell antigen receptor signaling by CD72. In "Immunoglobulin-like Receptors" (ed. by Max D. Cooper, Toshiyuki Takai, and Jeffrey V. Ravetch) Springer-Verlag Tokyo. (in press).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ホスファチジルセリン依存性モノクローナル抗プロトロンビン抗体を用いた 半定量的ループスアンチコアグラント法

小池 隆夫（北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学・第二内科）

研究要旨

【目的】 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。【方法】 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 μ 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 μ 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。【結果】 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。【結語】 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。

A.研究目的

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は代表的な獲得性血栓性疾患で、静脈血栓症、動脈血栓症あるいは流死産の臨床症状に伴って抗リン脂質抗体が検出される症候群である。抗リン脂質抗体とは、凝固検査であるループスアンチコアグラント(LA)と、抗カルジオリピン抗体(aCL)あるいはカルジオリピン以外のリン脂質を「抗原」とした免疫学的検査 (ELISA など) によって検出される自己抗体の総称である(1)。

リン脂質は細胞膜構成成分のひとつであり、膜構造を維持するほか、あるタンパクと相互作用してその機能を修飾する機能をもつ。とりわけ血管が損傷をうけて出血した場合活性化される凝固反応カスケードにおいて陰性リン脂質の存在は極めて重要であり、反応系の

いくつかのステップはリン脂質により著しく促進される。

全身性エリテマトーデス(SLE)患者血漿中に *in vitro* のリン脂質依存性凝固反応を抑制する物質が存在することは 1960 年代から知られており、これはループスアンチコグラント(LA)と呼ばれていた。1980 年代になって、カルジオリピンや他のリン脂質を抗原として用いた抗リン脂質抗体の免疫学的アッセイが行われるようになり、これらの抗リン脂質抗体と血栓症や流死産の相関が注目されるようになった。Hughes らは動静脈血栓症や流死産に抗リン脂質抗体を伴う病態を「抗リン脂質抗体症候群(APS)」として扱うことを提唱した。現在では APS は、自己抗体が引き起こす血栓性疾患、という免疫学的、病因論的興味のみならず、獲得性血栓傾向の原因としては頻度の高い病態のひとつとして認識され、

臨床上重要な位置を占めている。

LA は、in vitro のリン脂質依存性凝固反応(活性化部分トロンボプラスチン時間 aPTT、カオリン凝固時間 KCT、希釈ラッセル蛇毒時間 dRVVT) を阻害する免疫グロブリンと定義される(2)。臨床検査上の LA の同定はその heterogeneity から必ずしも容易でない。もっとも広くスクリーニングとしておこなわれている aPTT にしても使用する試薬によって感度がかなり異なっている。多くの LA の診断基準やガイドラインが提案され、各施設で感度および特異度をあげるために腐心しているが、単一の方法で LA の存在を決定することは困難であり、通常はいくつかの方法を組み合わせておこなう。すなわち、1) aPTT, KCT, dRVVT でリン脂質依存性凝固時間が延長していることをスクリーニングする、2) ミキシングテストでこの凝固時間延長が患者血漿中にインヒビターが存在するためであることを示す、3) 障害血小板やリン脂質による吸収中和試験でこのインヒビターが抗リン脂質抗体であることを確認、のステップが推奨されている(3)。しかし、これをすべてルーチンとしておこなうのは労力・費用の両者の面で負担となる。

LA はリン脂質依存反応を抑制するので、LA を感度よく検出するにはリン脂質濃度を低くすることが条件である。aPTT 試薬をそのまま使わず希釈することで感度を上げることができる。ただし市販の aPTT 試薬には凝固アクチベータが含まれており、試薬を単に希釈するとこのアクチベータも希釈されてしまうため反応が不安定になる。KCT は残存血小板の作用を極めて強くうけるため、サンプルの取扱には十分な注意が必要である。われわれはすべての血漿サンプルを 0.22 μm のフィルターを通して platelet free plasma としてから使用している。dRVVT はスクリーニング目的のアッセイのなかでは特異性の高い方法であるが、使用する蛇毒の作用機序から内因系上流のインヒビターは検出できない。

確認試験も各施設で工夫されている。ミキシングテストはサンプルと正常血漿を混合させ、凝固時間延長がインヒビターの存在のためか凝固因子欠乏のためかを確認するためにおこなう。われわれは Triplet の方法に準じて、サンプルと正常血漿を 1:1、1:4 および 1:9 で混合し、凝固時間をプロットしてその曲線のパターンによりインヒビターと凝固因子欠乏を鑑別している(3)。リン脂質添加試験は、希釈したリン脂質での延長した凝固時間が実際にリン脂質(またはリン脂質-蛋白複合体)に対する抗体のためであるかどうかを調べるため、逆に高濃度のリン脂質で凝固時間を測定して低濃度の凝固時間と比較することで判定する。LA であればリン脂質濃度の差により凝固時間の延長の程度が異なっているはずで、すなわち リン脂質低濃度の凝固時間/リン脂質高濃度の凝固時間、の比が他の原因による凝固時間延長よりも大きい。添加するリン脂質の量や組成を検討する必要がある。

これらのアッセイの基準値は条件により異なるので、それぞれの方法につき感度と特異度を各施設で十分検討する必要がある。われわれは、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 LA と極めて強い相関を示すことを報告した(4)。今回、モノクローナル aPS/PT を樹立し、LA 標準血漿を作成することで LA の定量化をこころみた。

B. 研究方法

1. モノクローナル aPS/PT の作成

Balb/c マウスをヒトプロトロンビン(Enzyme Research、米国) 50mg/マウスで完全フロイントアジュバンドとともに1回、続いて不完全フロイントアジュバンドとともに2回免疫した。脾細胞とミエローマ細胞を融合してハイブリドーマを作成し、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体アッセイ(4)でスクリーニングした。陽性ウエルのうち aPT 陽性ウエルを除外、すなわち aPS/PT 陽性、aPT 陰性クローンを選択した。

得られたホスファチジルセリン依存性モノクローナル抗プロトロンビン抗体、231D を Balb/c ノードマウス腹腔内に注入し、3 週目に腹水を採取した。プロテイン A カラムを用いて IgG を精製した。

正常血漿に 231D を 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 mg/ml として調整し、aPTT(試薬名 PTT-LA, Diagnostica Stago 社、仏国)、dRVVT(試薬名グラディポア試薬 1、グラディポア社、米国)、KCT(試薬名カオリンサスペンション、ベーリング社、独国)を測定した。

2. 半定量的 LA アッセイ

163 人の自己免疫疾患患者を対象とした。このうち 47 人に抗リン脂質抗体症候群分類基準案(1998)(5)に記載された APS の臨床症状(血栓症または流産)のエピソードがあった。

患者血漿：正常血漿を 20:80 でミックスして測定サンプルとし、上記試薬をそれぞれの試薬を用いて aPTT、dRVVT、KCT を測定した。

231D を加えた正常血漿の凝固時間を Y 軸、231D の濃度を X 軸としてそれぞれの凝固時間をプロットし、標準曲線を作成した。測定サンプルの凝固時間を標準曲線から「231D X $\mu\text{g/ml}$ に相当する抗凝固活性」として X Anticoagulant Unit(ACU) と表現した。健康人 30 人より同様に測定サンプルを用意し、その凝固時間の平均+2SD をそれぞれの試薬の正常上限とした。

3. 統計解析

グループ間 ACU の比較はノンパラメトリック Mann-Whitney 法、ACU で定義した LA の APS の臨床症状における相対危険率をオッズ比で近似し、95%信頼区間とともに示した。

C. 研究結果

aPTT、dRVVT、KCT のいずれの試薬を用いても 231D の添加により凝固時間は濃度依

存性に延長し、これを標準曲線とした(図 1)。

163 人の対象患者を APS の臨床症状のある群(T)のない群(non-T)にわけ、ACU の分布を示す(図 2)。aPTT、dRVVT、KCT のいずれにおいても T 群の ACU は non-T 群にくらべて有為に高かった。

3 試験のうち少なくともひとつの ACU が正常値を超えている場合を LA 陽性とした。T 群 47 人中 LA 陽性は 22 人であり、non-T 群 116 人中 31 人にくらべて有為に多かった(オッズ比 2.41 [1.19-4.88])。

古典的 LA 検査で陽性であった患者はワーファリンの使用の有無にかかわらず ACU は正常値を超えていたが、ワーファリン使用前に LA 陰性が確認できている患者ではすべて ACU は正常範囲であった(表 1)。

aPTT と dRVVT、および KCT と dRVVT での ACU を比較した。それぞれ ACU には有為な相関があったが、乖離する例が多くみられた(図 3)。

D. 考察

ホスファチジルセリン依然性モノクローナル抗プロトロンビン抗体である 231D を使用して、半定量的 LA が可能であった。

LA の対応抗原は、プロトロンビンと $\beta 2$ グリコプロテイン I が主要であるが多様である(6)。ACU は LA の責任抗体を抗プロトロンビン抗体と仮定した場合そのまま LA 活性を表すと考えられるが、抗 $\beta 2$ GPI 抗体やその他の抗体が責任抗体とした場合は必ずしも LA 活性を直接反映するものではない。実際、使用する試薬によって ACU の値が異なる。また、使用する正常血漿のプロトロンビンや $\beta 2$ GPI 濃度によっても影響され、同じ試薬であっても使用する血漿によって ACU の値に幅がある(結果は示さず)。これが本法を「半」定量的とした所以である。

しかしながら、正常血漿をプールして統一すれば施設間差は従来の LA に比べて著しく縮小すると考えられる。また、はじめからミ

キシングテストでアッセイを標準化することによりアッセイ系が安定するのでカットオフ値を低くおさえられ感度が改善する。さらにワーファリン使用等の凝固因子欠乏の影響を受けない。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi, M., Hirayama, F., Kanai, M., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., Sawada, K., Koike, T., Kuwabara, M., Ikeda, H., Ikebuchi, K.: Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood prothrombotic progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Exp Hematol* 2001 29:174-182.
2. Bertolaccini, M.L., Atsumi, T., Lanchbury, J., Scalliz, A.R., Katsumata, K., Vaughan, R.W., Kondeatis, E., Khamashta, M.A., Koike, T., Huges, G.R.V.: Plasma tumor necrosis factor α levels and the -238* promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2001;85. 198-203
3. Koike T: Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis. *Ann Med* 2000;32 Suppl 1; 27-31
4. Tsutsumi, A., Ichikawa, K., Matura, E., Sawada, K., Koike T.: Heterogeneous behavior anti- β 2-glycoprotein. *J. Rheumatol.* 2000; 22. 391-

397.

5. Bertolaccini, M.L., Atsumi, T., Caliz, A.R., Amengual, O., Khamashta, M.A., Huges, G.R.V., Koike, T.: Association of antiphospholipid antibodies with HLA class II genes. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 683-688..
6. Matura, E., Koike T.: Accelerated atheroma and anti- β 2-glycoprotein I antibodies. *Lupus.* 2000; 9:210-216.
7. Ieko, M., Ichikawa, K., Atsumi, T., Takeuchi, R., Sawada, K., Yasukouchi, T., Koike, T. : Effects of β 2glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies on extrinsic fibrinolysis. *Seminars Thrombosis Hemostasis.* 2000; 26:. 85-90.
8. Atsumi, T., Koike, T. Cardiac valve diseases and antiphospholipid syndrome. *Int.med.* 2000; 39:.446-447..
9. Takeda, t., Mizugaki, Y., Matsubara, L., Imai, S., Koike, T.: Lytic epstein-barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis.Rheum.* 2000; 43: 1218-1225..
10. Tsutsumi, A., Koike, T.: Antiphospholipid syndrome in the elderly. *Int .Med.* 2000; 39:.529-530.
11. Matsuura, E., Inagaki, J., Kasahara, H., Yamamoto, D., Atsumi, T., Kobayashi, K., Kaihara, K., Zhao, D., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Yasuda, T., Triplet, A.D., Koike, T.: Proteolytic cleavage of β 2-glycoprotein I: reduction of antigenicity and the structural relationship. *Int Immunol.* 2000;

- 12.1183-1192.
12. Takeuti,R.,Atsumi,T.,Ieko,M.,Takeya,H.,Yasuda,S.,Ichikawa,S.,Tsutsumi,A.,Suzuki,K.,Koike,T. : Coagulation and fibrinolytic activities in 2siblings with β 2-glycoprotein I deficiency. *Blood*. 2000; 96:4.1954-1955.
 13. Yasuda,S.,Tsutsumi,A.,Chiba,H.,Yanai,H.,Miyoshi,Y.,Takeuchi,R.,Horita,T.,Atsumi,T.,Ichikawa,K.,Mastuura,E.,Koike,T. : β 2-glycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. *Atherosclerosis*.2000; 152 : 337-346.
 14. Atsumi,T.,Ieko,M.,Bertolaccini,M.L.,Ichikawa,K.,Tsutsumi,A.,Matsuura,E.,Koike,T. :Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum*.2000; 43:. 1982-1993.
 15. Koizumi,K.,Nishio,M.,Endo,T.,Takashima,H.,Haseyama,Y.,FujimotoK.,Ymamamoto, S.,Sato,N.,Ikebuchi,K.,Ikeda,H.,Koike,T.,Sawada,K. : Large scale purification of human blood CD34+ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells,using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. *Bone Marrow Transplantation*. 2000; 26. 787-793.
 16. Takeuchi,M.,Bucala,L.,Suzuki,T.,Ohkubo,T.,Yamazaki,M.,Koike,T.,Kameda,Y., Makita,Z. : Neurotoxicity of advanced glycation end-products cultured cortical neurons. *J.Neuropathol Exp. Neurology*. 2000; 59: 1094-1105.
 17. Takeuchi,M.,Makita,Z.,Bucala,L.,Suzuki,T.,Koike,T.,Kameda,Y. : Immnological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. *Molecular Medicine*. 2000; 6: 114-125.
 18. Subang,R.,Levine,J.S.,Janoff,A.S.,Davidson,S.M.K.,Taraschi,T.F.,Koike,T.,Minchey,S.R.,Whiteside,M.,Tannenbaum,M.,Rauch,J. : Phospholipid-bound β 2glycoprotein I induces the production of anti-phospholipid antibodies. *J. Autoimm*. 2000; 15.21-32.
 19. Koike,T.,Ichikawa K.,Atsumi,T.,Kasahara,H.,Mastura,E.: β 2-glycoprotein I -anti- β 2-glycoprotein I Interaction.. *J Autoimm*. 2000; 15: 97-100.
 20. Sasaki,K.,Tsutsumi,A.,Wakamiya,K.,Ohtani,K.,Suzuki,Y.,Watanabe,Y.,Nakayama,N.,Koike,T.: Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus Infection. *Scand J Gastroenterol*. 2000; 9: 961-965.
 21. Nishio,M.,Koizumi,K.,Endo,T.,Haseyama,Y.,Fujimoto,K.,Ymamamoto,S.,Kobayashi,H.,Koike ,T.,Sawada,K. : Effective high+dose chemotherapy combined with CD34⁺-selected autologous peripheral blood stem cell trnsplantation in a patient with cutaneous CD30-negative Large T cell Lymphoma. *Bone Marrow Transplantation*, 2000; 25. 1315-1317

2. 学会発表

1. Koike,T. : “Valine/Leucine²⁴⁷ polymorphysm of β 2-glycoprotein I and prevalence of antiphospholipid syndrome.”6th International Lupus Conference,”Barcelona, Spain, March,24~28, 2001.
2. Koike,T. : “Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis” XIIIth Paavo Nurium Symposium, Hanasaari, Finland, September,1~3, 2000.
3. Koike,T. : “ β 2-glycoprotein I-anti- β 2-glycoprotein I Interaction.” 9th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies., Tours, France, September,12~16, 2000.
4. Koike,T. : “Anticardiolipin antibody; Specificity and Pathogenesis .” 5th Dresden symposium on antibodies., Dresden,Germany, October,18~21, 2000.

G.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
特になし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

病因となる自己抗体の検出とその臨床意義：抗 β 2-GPI 抗体、
抗 laminin-1 抗体、および抗 sulfatide 抗体に関する研究

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）

研究要旨

抗 β 2-グリコプロテイン I 抗体（抗 β 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 β 2-GPI 抗体は、 β 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 β 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 β 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。

A.研究目的

臓器非特異的な数多くの自己抗体の存在が知られているが、検出される抗体と病態発現との関連が明確にされていないものが少なくない。抗カルジオリピン抗体（aCL）やループスアンチコアグラントなどの自己抗体が出現する「抗リン脂質抗体症候群（APS）」は、血栓症に由来する様々な臨床症状を呈する。それらは、ごく軽微な静脈血栓症から致死

な動脈血栓症（心筋梗塞、脳梗塞、腸管膜動脈血栓症）まで極めて多彩であり、習慣流産と抗体陽性との関連も認められている。とりわけ、aCLの対応抗原が血漿アポリポ蛋白質、 β 2-グリコプロテイン I（ β 2-GPI）、であることや抗 β 2-GPI抗体と本疾患に於ける動脈血栓の既往との間に関連がある可能性が示されてきた。我々は、ごく最近、動脈硬化の初期に見られる酸化LDLのマクロファージによる取

り込み・泡沫化の現象を β 2-GPIが抑制的に調節していること、および、APSに於いては抗 β 2-GPI抗体に依存的な酸化LDLの取り込み機序があることを明らかにした。今回は、抗 β 2-GPI抗体に関しては、 β 2-GPIに特異的な酸化LDL中の脂質リガンドの構造を決定すると共に、それを化学合成し、臨床応用の可能性を検討した。血中酸化LDL値との関係についても合わせて検討したので報告する。また、接着分子の一つであるlaminin-1に対する自己抗体、および、神経障害、SLE、自己免疫性肝炎、およびI型糖尿病との関連が示唆されている抗スルファチド抗体についても解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. β 2-GPI に特異的なリガンドの精製と同定 硫酸銅処理して得られた酸化 LDL より β 2-GPI に特異的なリガンドを TLC および HPLC を用いて精製し、質量分析 (LC/MS) および NMR によって構造を特定した。

2. oxLig-1 (7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate) の合成 7-ketocholesterol および azelaic acid を用いて縮合反応により oxLig-1 を化学合成した。

3. マクロファージによる取り込み実験 精製および合成 oxLig-1 を組み込んだ ^3H 標識ホスファチジルコリン含有リポソームのマクロファージ (J774A.1) への結合量 (あるいは取り込み量) を測定した。

4. 抗 β 2-GPI・oxLig-1 複合体抗体価の測定 oxLig-1 固相化ポリスチレンプレートおよび β 2-GPI を用いる ELISA にて、血清中抗 β 2-GPI・oxLig-1 複合体抗体価を測定した。

なお、 β 2-GPI 依存的 aCL および抗 β 2-GPI 抗体は定法により測定した。

5. 血中酸化 LDL の測定 血中酸化 LDL は、モノクローナル抗 β 2-GPI 自己抗体 (WB-CAL-1) を固相化したポリスチレンプレートおよび標識モノクローナル抗アポ B-100 抗体を用いて測定した。原理としては、大過剰の β 2-GPI 存在下で oxLig-1 を介して β 2-GPI・酸化 LDL 複合体を形成させ、その複合体を上記2種類の抗体を用いて検出するものである。

6. 抗 laminin-1 抗体の測定 精製 laminin-1 固相化ポリスチレンプレートおよび標識抗ヒト IgG/IgM 抗体を用いる ELISA で血清中抗 laminin-1 自己抗体を測定した。

7. 抗 sulfatide 抗体の測定 精製 sulfatide および関連脂質を固相化したポリスチレンプレートに健常人血清の存在下および非存在下で結合する自己抗体を、標識抗ヒト IgG/IgM 抗体を用いる ELISA で測定した。

8. 抗 sulfatide 抗体コファクター (結合蛋白質) の精製 抗 sulfatide 抗体コファクター (結合蛋白質) を sulfatide-silica gel アフィニティークロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製中である。

C. 研究結果

1-1. 抗 β 2-GPI 抗体および oxLig-1 昨年度より、酸化 LDL が β 2-GPI および抗 β 2-GPI 抗体の標的であるという近年の我々の知見に基づいて、酸化 LDL より β 2-GPI に特異的なリガンド (oxLig-1) の同定を試みてきた。今年度の研究期間中に、質量分析および NMR

による解析で、oxLig-1 が 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate であることが判明した。さらに確認のため、7-ketocholesterol および azelaic acid を出発物質とし、oxLig-1 を化学合成し、自己抗体依存的なマクロファージによる取り込みが起こることを確認した。

1-2. 抗 β 2-GPI・oxLig-1 複合体および血中酸化 LDL の臨床意義

抗 β 2-GPI・oxLig-1 複合体自己抗体の高値例は、動脈血栓症の既往のある APS 患者で見られ特に SLE を合併する二次性 APS で動脈血栓症の既往の有無と抗 β 2-GPI・oxLig-1 複合体自己抗体の出現との間に高い相関が認められた。対象症例は異なるが APS 患者において血中酸化 LDL 濃度と動脈血栓の既往との間にも関連が認められた。

1-3. 抗 β 2-GPI 抗体の反応性

APS 患者で見られる抗 β 2-GPI 抗体が酸化リン脂質と β 2-GPI の共有結合性の adduct を認識する抗体であるとの報告があるが、今回、本抗体は、 β 2-GPI・oxLig-1 (cholesteryl-linoleate の酸化体) の静電的複合体を認識していることを示した。

2. 抗 laminin-1 抗体

習慣流産が APS の criteria で臨床症状の 1 つに取り上げられているものの、抗 β 2-GPI 抗体陽性例は、習慣流産患者の中の僅か数%にすぎない。そこで、抗 β 2-GPI 抗体以外の流産(不妊症)の原因抗体を検索したところ、抗 laminin-1 自己抗体の存在が明らかになった。結果的には、抗 laminin-1 自己抗体の出現は、抗 β 2-GPI 抗体やループスアンチコアグラントの出現とは相関せず、APS に特異的

な自己抗体ではなかった。すなわち、不妊症、子宮内膜症、および習慣流産の原因抗体として位置づけられ、新たな、自己免疫疾患を特定するのに有力な手段である。本抗体は、妊娠初期あるいは発生期にのみ現れる接着分子 (laminin-1) に対するもので、着床障害や胎児の発育不全を引き起こすと考えられ、極めて興味深い自己抗体である。最近の我々の検討では laminin-1 の G-domain にエピトープが存在することも明らかになっている。妊娠異常の見られない SLE やアレルギー疾患でも抗 laminin-1 抗体が検出されるが、これらの自己抗体は特異性を異にしている。

3. 抗スルファチド抗体

APS および SLE を中心に抗スルファチド抗体の測定を ELISA にて行った。これら疾患に一定の頻度 (30-50%) で抗スルファチド抗体陽性の症例が存在することが明らかになった。臨床意義については、十分な解析がなされていないが、興味深いことに、抗 β 2-GPI 抗体、すなわち、aCL、と同様に、コファクター (sulfatide 結合タンパク質) 依存性および非依存性抗体が存在する。現在、コファクターを精製し同定を行っている。

D. 考察

APS で見られる血栓症の中でも、特に、動脈血栓症、の発症に抗 β 2-GPI 抗体が関与している可能性を血清学的および生化学的アプローチによって示すことが出来た。今回の我々の解析で、酸化 LDL は、APS の血中に特異的に現れるものではなく、SLE、糖尿病、慢性腎炎、および慢性腎不全で一定の頻度で見られた。血中酸化 LDL は、進行度の進ん

でいる慢性腎不全患者で慢性腎炎患者より高値であった。また、酸化 LDL 値と蛋白質摂取量および塩分摂取量との間に関連が認められたことより、血中酸化 LDL 値の増加は食事などに由来する外因的な（全身的な）酸化ストレスと関連があると考えている。APS では、血中 β 2-GPI および抗 β 2-GPI 抗体の関与によって重篤な自己免疫性の動脈硬化および動脈血栓症が発症するのであろう。また、 β 2-GPI の特異的リガンドである oxLig-1 の構造が 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate であることが判明した。本化合物のマクロファージの泡沫化に及ぼす作用について解析を進めている。

抗 laminin-1 抗体が妊娠異常（不妊症、子宮内膜症、習慣流産）関与することを初めて見いだした。抗体の出現頻度および発症頻度から、抗 β 2-GPI 抗体以上に産婦人科領域での臨床意義は高い。

抗 sulfatide 抗体の臨床意義については明らかになっていないが、今回の検討でも、SLE および APS で一定の頻度で陽性が見られる。その中には、コファクター（sulfatide 結合蛋白質）に対する抗体が存在することが判っており、コファクターを同定することによって、本抗体と病態との関連が明らかになるものと期待している。

E. 結論

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、今年度の研究でお示したように、抗 β 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。その為の、oxLig-1、 β 2-GPI、および laminin-1 の提供が可能である。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と認識している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsutsumi, A., Ichikawa, K., Matsuura, E., Sawada, K., Koike, T. Heterogeneous behavior of anti- β 2-glycoprotein I antibodies on various commercially available enzyme immunoassay plates coated with β 2-glycoprotein I. *J. Rheumatol.*, 2000, 27:391-396.
2. Matsuura, E., Koike, T. Accelerated atheroma and anti- β 2-glycoprotein I antibodies. *Lupus* 2000, 9: 210-216.
3. Matsuura, E., Inagaki, J., Kasahara, H., Yamamoto, D., Atsumi, T., Kobayashi, K., Kaihara, K., Zhao, D., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Yasuda, T., Triplett, D.A., Koike, T. Proteolytic cleavage of β 2-glycoprotein I: reduction of antigenicity and the structural relationship. *Int. Immunol.*, 2000, 12: 1183-1192.
4. Yasuda, S., Tsutsumi, A., Chiba, H., Yanai, H., Miyoshi, Y., Takeuchi, R., Hiorta, T., Atsumi, T., Ichikawa, K., Matsuura, E., Koike, T. β 2-Glycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects

on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. *Atherosclerosis*, 2000, 152: 337-346.

5. Atsumi, T., Ieko, M., Bertolaccini, M.L., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Matsuura, E., Koike, T. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.*, 43: 1982-1993.
 6. Koike, T., Ichikawa, K., Atsumi, T., Kasahara, H., Matsuura, E. β_2 -glycoprotein I-anti- β_2 -glycoprotein I interaction. *J. Autoimmun.*, 2000, 15: 97-100.
 7. Inagaki, J., Matsuura, E., Nomizu, M., Sugiura-Ogasawara, M., Katano, K., Kaihara, K., Kobayashi, K., Yasuda, T., Aoki, K. IgG anti-laminin-1 autoantibody and recurrent miscarriages. *Am. J. Reprod. Immunol.* (in press)
 8. Kobayashi, K., Matsuura, E., Liu, Q., Furukawa, J., Kaihara, K., Inagaki, J., Atsumi, T., Sakairi, N., Yasuda, T., Voelker, D.R., Koike, T. A specific ligand for β_2 -glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low-density lipoprotein by macrophages. *J. Lipid Res.* (in press)
 9. Matsuura, E., Kobayashi, K., Kasahara, J., Kaihara, K., Shoenfeld, Y., Koike, T. Atherosclerosis and Autoimmunity, Oxidized autoantigens in atherosclerosis, Elsevier Science B.V. (In press)
2. 学会発表
1. Matsuura, E., Kobayashi, K., Liu, Q., Kaihara, K., Inagaki, J., Atsumi, T., Yasuda, T., Khamashta, M.A., Hughes, G.R.V., Koike, T. A β_2 -glycoprotein I-specific ligand derived from oxidized LDL: a possible involvement in development of arterial thrombosis/athrosclerosis in the secondary antiphospholipid syndrome. *Int. Symp. on Antiphospholipid Antibodies*, 2000, Tours, France.
 2. Zhao, D., Wang, X., Kasahara, J., Kobayashi, K., Dlott, J., Kaihara, K., Inagaki, J., Yasuda, T., Triplett, D.A., Koike, T., Matsuura, E. Oxidized low density lipoprotein is a risk factor of arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Int. Symp. on Antiphospholipid Antibodies*, 2000, Tours, France.
 3. Koike, T., Ichikawa, K., Atsumi, T., Kasahara, H., Matsuura, E. β_2 -Glycoprotein I-anti- β_2 -glycoprotein I Interaction. *Int. Symp. on Antiphospholipid Antibodies*, 2000, Tours, France.
 4. Ambrozic, A., Kveder, T., Ichikawa, K., Avcin, T., Matsuura, E., Rozman, B., Koike, T. Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in children with atopic dermatitis. *Int. Symp. on Antiphospholipid Antibodies*, 2000, Tours, France
 5. Yasuda, S., Atsumi, T., Ichikawa, K., Matsuura, E., Kaihara, K., Takeuchi, R., Horita, T., Amasaki, Y., Ieko, M., Yasuda, T., Koike, T. Valine/leucine polymorphysm at position 247 of human β_2 -glycoprotein I and reactivity of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies. *Int. Symp. on Antiphospholipid Antibodies*, 2000, Tours, France
 6. Ichikawa, K., Matsuura, E., Atsumi, T., Amasaki, Y., Kobayashi, S., Hughes, G.R.V., Khamashta, M.A., Koike, T. A chimeric antibody as a putative standard for assays to detect IgG anticardiolipin and anti- β_2 -

glycoprotein I antibodies. Int. Symp. on Antiphospholipid Antibodies, 2000, Tours, France

7. Yasuda, S., Atsumi, T., Ichikawa, K., Matsuura, E., Kaihara, K., Yasuda, T., Amasaki, Y., Koike, T. Valine/leucine247 polymorphism of β_2 -glycoprotein I affects the reactivity of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies. Natl. Scientific Meeting of Am. College of Rheumatol., 2000, Pennsylvania, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

抗 laminin-1 抗体の測定法

β_2 -GPI のリガンドと自己抗体の測定法

2. 実用新案登録

なし

SLE 患者における多剤抵抗性遺伝子発現と病態との関連性、及び、その制御に関する研究

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)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。

A.研究目的

多剤耐性遺伝子 MDR-1 がコードする P-糖蛋白質は、抗癌剤等の細胞障害性薬物投与により細胞膜に発現し、細胞内薬物を細胞外に能動輸送する機能を有する。全身性エリテマトーデス(SLE)では、ステロイド薬などの薬物長期連用を治療法の主体とするが、骨粗鬆症、感染症、高血糖、高脂血症等の副作用のためステロイド薬の減量を要するにもかかわらず長期に亘ってステロイド薬の維持量からの減量が困難な症例を多数経験し、治療に難渋する。ステロイド薬の標的細胞は、SLE の免疫異常や病態形成に中心的に関与する T 細胞、B 細胞、マクロファージ等の免疫担当細胞である。

薬物耐性獲得には様々な機構が存在するが、前年度にステロイド薬長期連用 SLE 患者末梢血リンパ球上に P-糖蛋白質が高発現する事

を報告した。今年度、健常人、未治療またはステロイド薬治療開始早期の SLE 患者、1 年以上の長期間ステロイド薬にて治療された SLE 患者の末梢血リンパ球における MDR-1 の転写因子 YB-1 とその産物 P-糖蛋白質の発現機序、および、シクロスポリン等の P-糖蛋白質拮抗薬によるステロイド薬の細胞外排出抑制機序を検討し、薬剤抵抗性の獲得機構と制御の可能性を解明した。

B.研究方法

健常人、未治療またはステロイド薬治療開始後 1 カ月以内の早期 SLE 患者、および、1 年以上ステロイド薬にて治療された SLE 患者の末梢血よりリンパ球を得、以下の解析に用いた。まず、 $[^3\text{H}]$ -デキサメサゾンと $[^{14}\text{C}]$ -ブタノールを用いて、リンパ球の細胞内外のステロイド濃度比を測定した。リンパ球の P-

糖蛋白質の細胞膜上発現は、P-糖蛋白質の特定のエピトープに対する MRK16 抗体で染色し、MDR-1 の特異的転写活性因子 YB-1 の細胞内発現は、ホルマリンとサポニンで処理後に抗 YB-1 抗体で染色して、フローサイトメーターで解析した。また、YB-1 や YB-1 アンチセンスオリゴの遺伝子導入は、リポフェクション法で行った。

C. 研究結果

SLE 患者末梢血リンパ球の細胞内外のステロイド濃度比を測定した結果、長期間治療を受けた SLE 患者リンパ球では、健常人のみならず未・短期治療患者群に比し、細胞内ステロイド濃度が有意に低下した。そこで、P-糖蛋白質の発現を測定したところ、健常人と未治療・治療早期 SLE 患者の末梢血 CD4, CD8, CD19 陽性細胞における P-糖蛋白質の発現は、極軽度であったが、長期治療患者の末梢血リンパ球の約 30% に P-糖蛋白質が発現し、29 例中 10 例においては 50% 以上のリンパ球に発現した。また、P-糖蛋白質を高発現する長期治療 SLE 患者では、未治療・早期患者に比し細胞内ステロイド濃度が有意に低下した。一方、特異的転写活性因子 YB-1 の細胞内発現は、健常人と早期 SLE 患者の末梢血 CD4, CD8, CD19 陽性細胞では殆ど認められなかったが、長期治療 SLE 患者の末梢血リンパ球の約 20~30% に発現し、29 例中 5 例においてはほぼ 100% のリンパ球に YB-1 が発現した。また、正常リンパ球に YB-1 を遺伝子導入すると、P-糖蛋白質の発現と細胞内ステロイド濃度の低下が誘導された。

ところで、免疫抑制薬であるシクロスポリンやタクロリムス、ベラパミル等のカルシウムチャンネル阻害薬は、P-糖蛋白質と拮抗的に結合して薬物の細胞外排出を抑制する。in

vitro で SLE 患者リンパ球にシクロスポリンを 15 分間添加し、添加前後で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、シクロスポリン処理によって NF-AT 阻害に必要な濃度より低濃度(25 ng/ml)で健常人の濃度にまで改善した。また、タクロリムスやベラパミルも、患者リンパ球の細胞内ステロイド濃度を改善した。さらに、長期治療 SLE 患者の末梢血リンパ球に YB-1 アンチセンスオリゴヌクレオチドを遺伝子導入すると、細胞表面の P-糖蛋白質の発現が抑制され、リンパ球に於ける P-糖蛋白質の発現においても YB-1 を介する MDR1 遺伝子の転写調節機序が関与することが示唆された。

以上、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、少なくとも in vitro では、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。

しかし、未治療時・発症早期 SLE 症例の一部で、リンパ球における YB-1 や P-糖蛋白質の高発現を呈し、疾患活動性の高い症例にこの傾向を認めた。一方、我々は活動期の SLE 患者末梢血リンパ球における細胞質内 IL-2 や IL-4 の発現亢進を報告してきた。そこで、健常人リンパ球、及び、T 細胞細胞株に IL-2 や IL-4 を添加したところ、YB-1 のみならず P-糖蛋白質の発現が著明に誘導された。これらの結果は、P-糖蛋白質の発現に伴う薬剤耐性は、サイトカインによっても誘導され得ることを示唆する。

D. 考察

ステロイド薬長期連用 SLE 患者の末梢血リンパ球では、MDR-1 の転写因子 YB-1 とその産物 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事が示された。さらに、YB1 アンチセンスによる P-糖蛋白質の発現抑制やシクロスポリンによる P-糖蛋白質の拮抗的機能阻害は、ステロイド薬の細胞外排出を抑制し、ステロイド抵抗性を克服する可能性を示した。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。癌の化学療法分野では多剤耐性の克服薬として、免疫抑制作用や腎毒性がなく強力な耐性克服効果を有するシクロスポリンの誘導體 PSC833、カルシウム拮抗作用が弱く強い耐性克服効果を有する新規キノリン化合物 MS-209 を始めとする様々臨床試験が進行しつつある。これに対して、SLE 等の自己免疫疾患における MDR-1 の関与については報告が殆どない。

日常臨床では、長期薬物連用によってステロイド抵抗性を獲得した SLE 症例を多数経験し治療に難渋する。我々は、ステロイド薬を1年以上使用し、副作用のため減量を要するが減量困難なステロイド薬抵抗性 SLE 患者 18 症例にシクロスポリンの併用投与を Informed consent を得る等の条件の下に行い、18 症例中 15 例で臨床症状・所見、免疫学的検査所見等の改善を得、ステロイド薬の減量を可能にした。これらの SLE 患者の疾患活動性は軽～中等度で、末梢血には IL-2/IL-4 産生リンパ球は極僅かで、シクロスポリンの作用機序としては、NF-AT 阻害以外の機序も考えられた。また、これらの患者のリンパ球は、P-糖蛋白質を高発現する傾向を認め、

前述の *in vitro* の結果と併せると、シクロスポリンによる P-糖蛋白質機能の拮抗的阻害を介するステロイド薬抵抗性克服の可能性が示唆された。

一方、活動期の SLE 患者末梢血リンパ球における細胞質内 IL-2 や IL-4 の発現亢進を報告してきた。健常人リンパ球、及び、T 細胞細胞株に IL-2 や IL-4 を添加する事によって、YB-1 のみならず P-糖蛋白質の発現が著明に誘導されたとの結果は、P-糖蛋白質の発現に伴う薬剤耐性は、サイトカインによっても誘導され得ることを示唆する。実際、未治療時・発症早期 SLE 症例の一部で、リンパ球における YB-1 や P-糖蛋白質の高発現を呈し、疾患活動性の高い症例にこの傾向を認めた事より、一部の疾患活動性の高い SLE 症例では、発症早期からステロイド薬を含む多剤抵抗性が誘導されている可能性が示唆される。

E. 結論

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。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

論文発表

1. Tanaka, Y.: Integrin activation by chemokines: Relevance to inflammatory adhesion cascade during T cell migration. *Histol. Histopathol.* 2000, 15: 1169-1176.
2. Tanaka, Y., Nomi, M., Fujii, K., Hubscher, S., Maruo, A., Matsumoto, S., Awazu, Y., Saito, K., Eto, S., Minami, Y.: ICAM-1 distinguishes functional heterogeneity of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000, 43: 2513-2522.

1.学会発表

該当なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

VH リボザイムによるループス腎炎の制御に関する研究

佐々木毅（東北大学大学院医学研究科免疫・血液病制御学、血液・免疫科）

研究要旨

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の基礎的検討を行った。V3-7VH 遺伝子 mRNA を特異的に切断しうる化学修飾リボザイムは *in vitro* での抗 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、その有用性を認められた。

A. 研究目的

自己免疫疾患の治療として、免疫機能全般を強力に抑制するステロイド剤等に代わり、病変形成を担う臓器障害性自己抗体を選択的に制御する試みがなされてきた。しかし、種々の要因のために臨床応用には至っていない。

本研究では、腎障害性抗 DNA 抗体 0-81 を規定する VH 遺伝子 mRNA を切断する能力を持つリボザイム及び DNA ザイムを作成し、これが SLE リンパ球により産生される抗 DNA 抗体、免疫複合体腎炎形成を阻止しうるか検討した。

B, C. 方法と結果

1. ヒト抗 DNA 抗体 0-81 の VH 遺伝子のリーダー部分及び CDR2 に相応するアンチセンス V3-7 及び CDR2 アンチセンス、更に同領域を切断することが推定されるハンマー

ヘッド型リボザイム V3-7-RZ 及び CDR2-RZ を作成した。これを用い以下の成績を得た。

(i) V3-7 アンチセンスは CDR2 アンチセンスに比し、*in vitro* での 0-81 クロンの抗 DNA 抗体産生を著明に抑制した。

(ii) V3-7-RZ は *in vitro* で 0-81 VH mRNA を切断した。一方、CDR2-RZ の場合は明確ではなかった。

(iii) V3-7-RZ を組み込んだベクターを移入した 0-81 クロンでは、コントロールに比して有意に抗 DNA 抗体産生が抑制された。

(iv) 遺伝子治療のカテゴリーに入らないリボザイム療法を開発するために V3-7-RZ を化学修飾した 2 種類の 0-81 RZ を作成した (RZ-I, RZ-II)。両者共に 0-81 クロンに取り組まれた抗 DNA 抗体産生を抑制したが、RZ-II では非特異的な細胞障害が目立った。RZ-I は V3-7 アンチセンスに比べて安定した抗 DNA 抗体産生の抑制をもたらした。

2. SLE リンパ球を移入した SCID マウスでのループス腎炎モデルでの VH リボザイムの効果

(i) SLE 例由来免疫グロブリン、抗 DNA 抗体を SCID マウスに注入することにより 30 日後に尿蛋白強陽性、腎糸球体における IgG 免疫複合体沈着を認めた。

(ii) 未治療の活動期ループス腎例由来の末梢血単核球 2×10^6 を SCID マウスに 2 度移入したところ、2-(i)と同様の所見を得た。

(iii) 2-(ii)での単核球移入時に RZ-1 を同時に移入した群ではコントロール群に比して、尿蛋白出現率の低下、抗 DNA 抗体価低値を示し、腎糸球体での IgG deposit も少なかった。

3. DNA ザイムの開発

DNA ザイムはリボザイムに比して、より安定で、有効性が高いことが示唆されている。現在、DNA ザイムによる細胞内取り込みの効率がよく、かつ非特異的な細胞障害も少ないことを認めている。

D. 考察

アンチセンスは特定の遺伝子発現を選択的に抑制するにも関わらず、認むべき副作用もなく、特定の遺伝子発現或いは蛋白の産生を制御する能力を有する。しかし、RNase による分解のため十分な効果が発揮できないなど問題点も多い。これを改善すべくアンチセンスリボザイムが開発され、ガンの治療あるいは薬剤耐性の感受性回復等に試みられてきた。我々は、これまでの研究で、SLE 例より、ループス腎糸球体に沈着している抗 DNA 抗体と共通するイディオタイプを有するヒト型抗 DNA 抗体 0-81 の V 遺伝子の性状を明らかとしてきた。これに基づ

き得られた 0-81VH を切断するリボザイムは、0-81VH 遺伝子の規定する抗 DNA 抗体の産生を抑制することが示された。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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Y.Suzuki, T.Funato, Y.Munakata, K.Sato, Y.Hirabayashi, T.Ishii, N.Takasawa, T.Ootaka, T.Saito, T.Sasaki.: Chemically modified ribozyme to V gene inhibits anti-DNA production and the formation of immune deposits caused by lupus lymphocytes. *J Immunol*, 165:5900-5905, 2000
2. Y.Munakata, K.Masuda, S.Shibata, T.Sasaki.: Detection of complement-fixing anti-phospholipid antibodies in association with thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 83:728-731, 2000
3. T.Funato, J.Satou, Y.Nishiyama, S.Fujimaki, T.Miura, M.Kaku, T.Sasaki.: In vitro leukemia cell models of Ara-C resistance. *Leukemia Research*, 24:535-541, 2000
4. T.Funato, T.Ishii, M.Kambe, K.J.Scanlon,