

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。病態解明に役立つ可能性が考えられた。さらに LN における腎障害の病態を考える上で、当該検査を用いることで新たな情報を獲得することが可能となり、病態解明に役立つと期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakajima, A., Ohnishi, S., Mimura, T., Kubo, K., Suzuki, A., Yazaki, Y., and Matsushashi, N. Protein-losing enteropathy associated with hypocomplementemia and anti-nuclear antibodies. *J. Gastroenterol.* 2000, 35, 627-630.
- 2) Morino, N., Matsumoto, K., Ueki, T., Mimura, T., Hamasaki, K., Kanda, H., Naruse, T., Yazaki, Y., and Nojima, Y. Glomerular overexpression and increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125FAK in lupus-prone MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Immunol.* 1999, 97, 634-640.
- 3) Kubo, K., Miyagawa, K., Yamamoto, R., Hamasaki, K., Kanda, K., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mimura, T. Detection of WT1 mRNA in urine from patients with

kidney diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999, 29, 824-826.

##### 2. 学会発表

- 1) Kanae Kubo, Kiyoshi Miyagawa, Hiroko Kanda, Ken Hamasaki, Toshiro Fujita, Kazuhiko Yamamoto, Toshihide Mimura. DETECTION OF wt1 mRNA IN URINE FROM LUPUS NEPHRITIS PATIENTS. *Arthritis Rheum*, 43, 2000
- 2) Kanae Kubo, Kiyoshi Miyagawa, Hiroko Kanda, Toshiro Fujita, Kazuhiko Yamamoto, Toshihide Mimura. Detection of Different Isoforms of wt1 mRNA in Urine from Nephropathy Patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2000
- 3) Kanae Kubo, Hideyuki Katori, Hiroko Kanda, Ken Hamasaki, Yoshihisa Nojima, Eri Amano, Toshiro Fujita, Kazuhiko Yamamoto, Shin-Ichiro Takahashi and Toshihide Mimura. INCREASED EXPRESSION OF p125FAK IN GLOMERULI OF DM NEPHROPATHY AND ITS SUPPRESSION BY ACE-INHIBITOR. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1999..

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

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

平形道人（慶應義塾大学医学部内科）

**研究要旨**

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、他の膠原病や健常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。

**A.研究目的**

膠原病は原因不明の炎症性疾患であり、自己細胞成分に対する多彩な自己抗体産生を特徴とする。これらの自己抗体は特定の臨床像と密接に関連し、診断や治療反応性、予後推定など臨床的に有用であるばかりでなく、細胞内分子の構造と機能解明にも役立つ。われわれはこれまでに、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血清中に <sup>35</sup>S 標識 HeLa 細胞を用いた免疫沈降法で 140kDa 蛋白 (p140) を沈降する新たな自己抗体を見出した。さらに予備的な検討により、この自己抗体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。

本研究では、抗 RHA 抗体について、その臨床的意義を明確にし、さらに対応抗原エピトープを追究することを目的とした。

**B.研究方法**

1. 血清

慶應義塾大学病院を受診した膠原病患者 531 例 (SLE 287 例, SSc 69 例, PM/DM 57 例, RA 53 例, MCTD 34 例, OL 20 例, SjS 11 例) と健常人 60 例より血清を得た。抗 RHA 抗血清はウサギを免疫して得た。

2. 免疫沈降法

<sup>35</sup>S または <sup>32</sup>P 標識 HeLa 細胞を抗原とし、免疫沈降法を行った。抗体が免疫沈降する蛋白成分は 10%SDS 加ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分画、核酸成分は尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (UREA-PAGE) で分画し、オートラジオグラフィで検出した。

3. 免疫プロット法

免疫プロット法は Towbin らの方法によった。

#### 4. 蛍光抗体法

Hep-2 細胞を基質とし (MBL 社), 蛍光抗体法で抗体を検出した。

#### 5. アポトーシスを用いた自己抗原の分析

<sup>35</sup>S 標識 Jurkat 細胞を培養後, 抗 Fas 抗体 (CH11, MBL 社) を培養液に加え, アポトーシスを誘導した。細胞より DNA を抽出し, 2%アガロースゲル電気泳動で DNA 断片化を検出した。同時に蛍光色素 (33258, ヘキスト社) を用いて核酸を蛍光染色し, 蛍光顕微鏡下に細胞を観察し, クロマチン凝縮, 核断片化を検出した。アポトーシス誘導後の細胞抽出物を抗原とし, 免疫沈降法を行った。

#### 6. 自己抗原エピトープの分析

遺伝子クローニングにより得た RHA をコードする全長 cDNA より, RHA 上の 4 領域 (D1; AA1-250, D2; 230-650, D3; 630-1020, D4; 1,000-1,279) をコードする部分 cDNA を得た。部分 cDNA を蛋白発現ベクター pGEX2TK に組換え, 大腸菌で Glutathione S-Transferase (GST) との融合蛋白として発現させた後, 免疫プロットで融合蛋白と患者血清との反応を調べた。

### C. 研究結果

#### 1. 抗 RHA 抗体の分析

プロトタイプの YF 血清は, <sup>35</sup>S 標識 HeLa 細胞を用いた免疫沈降法で 140kDa 蛋白 (p140) を沈降した。膠原病患者 531 例と健常人 60 例を対象とし免疫沈降法により自己抗体を検索したところ, YF 血清と同様の 140kDa 蛋白を沈降する 9 血清を新たに得た (図 1)。

<sup>32</sup>P 標識 HeLa 細胞を用いた免疫沈降法で YF 血清を含む 10 血清は高分子核酸成分を沈降した (図 2)。次に, 種々の塩濃度条件下での免疫沈降法を行ったところ, 高分子核酸成分の免疫沈降は 0.3M NaCl 以下の塩濃度条件下でのみ認められた (図は省略)。以上の成績より, これら患者血清中の自己抗体の対応抗原が核酸と結合する 140kDa の蛋

白であることが示唆された。そこで 140kDa 蛋白の候補と考えられた RHA に対するウサギ抗血清を用い, p140 を抗原とした免疫プロットを行ったところ, p140 はウサギ抗血清により認識され, p140 は RHA であることが証明された (図 3)。

蛍光抗体法で抗 RHA 抗体を検出したところ, YF 血清は微細斑紋型の核染色と核小体染色を示した (図は省略)。

#### 2. アポトーシスにおける RHA の動態と自己抗原エピトープの分析

抗 Fas 抗体で <sup>35</sup>S 標識 Jurkat 細胞にアポトーシスを誘導し, p140 の動態を調べたところ, p140 はアポトーシスの際に 130kDa 蛋白 (p130) と 120kDa 蛋白 (p120) に限定分解された。患者抗 RHA 抗体との反応を調べたところ, 1 例を除き全例が限定分解産物を認識した (図 4)。

次に, 遺伝子発現産物を用い RHA 分子上の抗原エピトープを検討した。RHA 上の 4 領域 (D1, D2, D3, D4) をコードする部分 cDNA 由来融合蛋白と患者血清との反応を調べた。C 端の D4 は全例で認識され, ユニバーサルエピトープがこの領域に含まれると考えられた。D1 と D3 は 9 例で認識された。一方いずれの血清も D2 を認識しなかった (表 1)。

#### 3. 抗 RHA 抗体の臨床的意義の分析

抗 RHA 抗体は SLE 患者 10 例 (3.5%) に検出された。抗 RHA 抗体陽性例の臨床特徴を検討したところ, 同抗体陽性例は全例女性で腎症を有し, 4 例はネフローゼ症候群, 3 例は DPLN であった。同抗体陽性例では, 血清梅毒反応生物学的偽陽性 (BFP) と低補体血症が高頻度であった (表 2)。

### D. 考察

RHA は, 二本鎖 RNA 結合ドメイン, ヘリケースモチーフ, 一本鎖 DNA/RNA 結合ドメインからなる ATPase/helicase であり, その機能として, 転写仲介因子 CREB-

binding protein (CBP) や乳癌原因遺伝子産物 BRCA1, RNA ポリメラーゼ II などと複合体を形成し, 転写活性化に関与するとされる. さらに, RHA は転写産物である mRNA のプロセッシングやシャトリングにも関与し, 遺伝子の協調的発現に重要な役割を果たす可能性も示唆され, 注目されている.

本研究では, かかる生物学的に重要な意義をもつ RHA を標的とする自己抗体が膠原病患者において産生されることを初めて明らかとした. 膠原病患者血清 531 例のスクリーニングにより 10 例の陽性患者を認め, 陽性頻度は低かったものの, 陽性例の臨床診断は全て SLE であり, 疾患特異的と考えられた. さらに, 臨床特徴を詳細に検討したところ, 全例がループス腎炎を発症し, その病態との密接な関連が示唆された. 今後, リコンビナント RHA 蛋白を用いた高感度の抗体検出法を開発し, 多数の膠原病患者血清で自己抗体の出現頻度および陽性例の臨床的特徴を検討することにより, 本抗体の臨床的意義がさらに明確にされ, 膠原病の診断および病態把握上有用な情報がもたらされると考える.

自己免疫疾患の原因はいまだ不明であるが, 自己細胞成分や自己組織を攻撃する自己反応性 T 細胞の出現が一因であるとする証拠が明らかにされている. 自己反応性 T 細胞は, 胸腺におけるネガティブセレクションの過程でアポトーシスにより除去されるが, この機構が障害されると, 末梢に自己反応性 T 細胞が過剰に放出され, 自己抗体産生を惹起すると想定される. 例えば, MRL/lpr マウスは SLE のモデルマウスとされるが, Fas をコードする遺伝子の変異が明らかとされ, この変異が自己反応性 T 細胞のネガティブセレクションを妨害すると考えられている. 自己免疫疾患においてアポトーシスの異常が免疫学的寛容の破綻に関わっていることを示す証拠が多く報告されつつあり, 自己抗原とアポトーシスの関連を追究した検討では, U1RNP 分子の 70kDa 蛋白やポリ ADP リ

ボースポリメラーゼなど主要な自己抗原蛋白がアポトーシスの際に限定分解されることが明らかとされている. 本研究においては, RHA がアポトーシスの標的となり, p130 と p120 に限定分解されることが明らかとなった. さらに, 限定分解産物と自己抗体の反応性の検討では, 抗 RHA 抗体陽性患者の多くが p130 および p120 と反応し, 特に p130 と強く反応をした. 現在のところ, アポトーシスの過程でいかなる蛋白分解酵素が活性化され, RHA の限定分解が起こるかは不明であり, さらにアポトーシスの際の RHA の動態を詳細に解明していく必要がある.

RHA をコードする cDNA を用いたエピトープの解析では, RHA 上に少なくとも 3 つの異なるエピトープが存在したが, C 端の領域に抗 RHA 抗体の主要な自己抗原エピトープ (ユニバーサルエピトープ) が含まれることが明らかとなった. 自己抗体産生には, 自己抗原とウイルス蛋白との分子擬態に基づく交叉反応の可能性が示される一方で, 自己抗原自身の免疫応答系への提示を必要とする antigen driven の機序が示されている. さらに両者を結びつける仮説として, epitope progression (epitope spreading) 仮説も提唱されている. 今回の検討で明らかとなったエピトープの多様性は, native な RHA が生体内で抗原呈示され, antigen driven により自己抗体産生に関わるという従来の仮説を支持するものである. B 細胞および T 細胞が認識する抗原エピトープを解析し, アポトーシスによる正常細胞の破壊が, 隔絶抗原の遊離, 過剰な抗原提示, cryptic エピトープの発現など, 自己抗原の存在・提示様式の変化をもたらし, 免疫寛容の破綻機序に至る可能性を追究することが今後の大切な課題と考える.

## E. 結論

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。

## F.健康危険情報

該当無し

## G.研究発表

### 1.論文発表

該当無し

### 2.学会発表

1) Suwa, A., Hirakata, M., Nojima, T., Satoh, S., Fujii, T., Mimori, T.: Autoantibodies against 140 kDa polypeptide represent diagnostic markers for systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 2000, 59(S1), 39.

2) Suwa, A., Hirakata, M., Satoh, S., Ooishi, T., Nakajima, T., Mimori, T.: Autoantibodies to RNA helicase A in systemic lupus erythematosus and their autoantigenic epitope reactivity. Arthritis Rheum. 2000, 43(9), 1568.

## H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

### 1.特許取得

該当無し

### 2.実用新案登録

該当無し

### 3.その他

該当無し

## 抗 Killer Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) 自己抗体の検出と臨床的 意義に関する研究

加藤 智啓（聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター）

### 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

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患者血清中にリンパ球に対する自己抗体 (anti-lymphocyte antibody, ALA) が出現することが報告されており、ALA の存在はリンパ球減少症以外に、疾患活動性、T 細胞、B 細胞、単球の機能異常などとの関連が報告されているが、ALA の標的分子の検索及び機能的解析はほとんど進んでいない。通常行われている ALA の検出法 (microcytotoxicity test) では、個別の対応抗原が解析できないばかりか、リンパ球上に一過性に発現する分子や、発現の弱い分子に対する抗体を検出できない可能性がある。

これまでに、我々は各種自己免疫疾患における ALA の対応抗原を検索する目的で、リンパ球の活性化に関与する分子を中心に解析

し、以下のことを明らかにした。1) T 細胞活性化の inhibitory regulator と考えられている CTLA-4(CD152)分子が ALA の標的の一つになっており、抗 CTLA-4 自己抗体は *in vitro* でリンパ球の活性化を増強した。2) リンパ球の早期活性化マーカーとして知られる CD69 分子が ALA の標的の一つになっており、慢性関節リウマチ(RA)患者では抗 CD69 自己抗体陽性者は陰性者に比べ疾患活動性が高い傾向が認められた。以上のように、ALA は自己免疫疾患においてリンパ球機能に影響を与え、病態を修飾している可能性があり、ALA の対応抗原の検索は ALA の疾患への病因的意義を知る上で有用であると考えられる。

今回、注目した Killer Immunoglobulin-Like Receptor (KIR)は、MHC class I 抗原を認識する NK Receptor のうちの

Immunoglobulin (Ig) 型の総称であり、細胞質内に ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) 領域を有する抑制型 KIR と、ITIM 領域を欠き ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 領域をもつシグナル伝達分子 DAP12 と複合体を形成している活性型 KIR がある。同一細胞上に活性型及び抑制型 KIR が一緒に発現している場合には抑制型 KIR からのシグナルが活性型 KIR からのシグナルに対して優位に伝達される。KIR は NK 細胞の大部分と一部の T 細胞に発現しており、抑制型 KIR からのシグナルは NK 活性を抑制するだけでなく、T 細胞においても T 細胞受容体からのシグナルを抑制することが知られている。現在、T 細胞上に発現する抑制型 KIR の役割として、自己応答性 T 細胞の末梢におけるトレランスの維持に関与しているのではないかという仮説が立てられている。すなわち、末梢にて自己抗原を提示された自己応答性 T 細胞が、抑制型 KIR を介して抗原提示細胞上の class I を認識し、活性化が抑制されるという仮説であるが、説明はされていない。

そこで、本研究では、抑制型の KIR である KIR2DL1(p58.1) および KIR2DL3(p58.2) に対する自己抗体の検索を通して、KIR が自己免疫疾患の病因に関与しているかどうかを検討した。

## B. 研究方法

KIR2DL1 および KIR2DL3 の細胞外ドメインをコードする DNA を PCR にて増幅し、タンパク発現ベクター(pMAL-c2)に導入し、大腸菌にて maltose binding protein(MBP) との融合タンパクを発現させた。精製した recombinant KIR2DL1 タンパクおよび recombinant KIR2DL3 タンパクを用い、健康人 20 人、RA30 人、SLE30 人、Behcet 病 22 人の血清で Western blot を行った。また、抗体陽性者と陰性者の臨床所見・検査デ

ータの比較を行った。

## C. 研究結果

血清を 200 倍希釈し Western blot を行った結果、抗 KIR2DL1 抗体は RA で 9 人(30%)、SLE で 7 人(23.3%)、Behcet 病で 6 人(27.3%) に認められた。抗 KIR2DL1 抗体陽性者は全例、抗 KIR2DL3 抗体も陽性であり、一方だけの陽性例は認めなかった(Figure1)。抗体は ELISA の系にても確認され、個々の患者において、KIR2DL1 及び KIR2DL3 に対する反応性はほぼ同等であった。健康人には抗体陽性者は認められなかった。ALA 産生との関連が言われている輸血や妊娠の関与は抗 KIR2DL1 抗体及び抗 KIR2DL3 抗体では否定的であった。臨床データを比較すると、抗 KIR2DL1/3 抗体陽性者は陰性者に比べ、有意に 1)血清 IgG 値が高値(RA;  $1740 \pm 184$  vs  $1193 \pm 74$ , SLE;  $1900 \pm 185$  vs  $1280 \pm 108$ , Behcet 病;  $1489 \pm 74$  vs  $1116 \pm 66$ )、2)血沈が高値(RA;  $53 \pm 10$  vs  $30 \pm 5$ , SLE;  $35 \pm 5$  vs  $23 \pm 5$ )、3)白血球数が低値(RA;  $6322 \pm 692$  vs  $7690 \pm 394$ )であった。また、Behcet 病では有意差は認めないものの、抗 KIR2DL1/3 抗体陽性者は陰性者に比べ、血沈が高く( $26 \pm 9$  vs  $15 \pm 3$ )、白血球数が低い( $5433 \pm 594$  vs  $7771 \pm 750$ )傾向が認められた(Table1)。臨床症状では、各疾患とも抗 KIR2DL1/3 抗体陽性者および陰性者間で有意な差は認めなかった。

## D. 考察

今回の検討から、KIR2DL1 及び KIR2DL3 が ALA の標的の一つであることが示された。この抗 KIR2DL1/3 自己抗体の出現には疾患特異性は認められなかったが、検討したいずれの疾患においても、IgG 高値、血沈の亢進などの傾向が認められた。

現在、抑制型 KIR は末梢における自己反応性 T 細胞のトレランスの維持に重要ではないかと考えられている分子であるが、今回の

自己抗体の検索という側面から、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示唆された。抗 KIR 自己抗体の疾患特異性が認められなかった点  
からは、KIR 分子からのシグナル異常がそれぞれの疾患の病因に関与しているということ  
は推定しにくい。しかしながら、抗体陽性者が疾患を越えて同様な臨床データの特徴を示  
した点からは、KIR 分子からのシグナルの修飾が免疫応答の調整に広く関与しているこ  
とが考えられ、自己免疫疾患では自己抗体がそれらの一部を担ってリンパ球の活性化異常  
などを引き起こしているのではないかと考えられた。KIR は一部の T 細胞と大部分の NK  
細胞に発現しているわけであるが、NK 細胞は T 細胞の活性化や免疫グロブリンの産生に  
も深く関与していることが知られている。また、SLE や RA などの自己免疫疾患におい  
ては NK 細胞数の減少や、NK 細胞活性の異常も報告されており、SLE では NK 細胞に対  
する自己抗体の存在も報告されている。今回の抗 KIR 自己抗体も抗 NK 細胞自己抗体の  
一部として、NK 細胞機能を修飾している可能性もある。実際、IgG 産生の増加や血沈の  
亢進など、抗 KIR 自己抗体による NK 細胞上の抑制型 KIR の機能抑制により説明が可  
能であるかも知れない。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Matsui, T., Otsuka, M., Maenaka, K., Furukawa, H., Yabe, T., Yamamoto, K., Nishioka, K., Kato, T., Detection of autoantibodies to killer immunoglobulin-like receptors using recombinant two killer immunoglobulin-like receptors in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* (in press)

### 2. 学会発表

1) 全身性自己免疫疾患患者における Killer Inhibitory Receptor (KIR) に対する自己抗体の検討。松井利浩、古川宏、山本一彦、西岡久寿樹、加藤智啓。第 44 回日本リウマチ学会。2000 年。

2) Autoantibodies to killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) in systemic autoimmune diseases. Matsui, T., Maenaka, K., Furukawa, H., Yabe, T., Yamamoto, K., Nishioka, K., Kato, T. 64<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, ACR. *Arthritis Rheum* 2000, 43(9). S330.

3) 全身性自己免疫疾患患者における Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) に対する自己抗体の検索。松井利浩、古川宏、山本一彦、西岡久寿樹、加藤智啓。第 30 回日本免疫学会。2000 年。

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

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

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測定による解析

養田 清次（自治医科大学アレルギー膠原病学）

研究要旨

全身性エリテマトーデス（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。

A.研究目的

本研究は SLE 患者末梢血単核球（PBMC）が生体内（*in vivo*）でアポトーシス亢進を示すか否かを明らかとすることを目的とした。従来のアポトーシス検出法（DNA ladder 法や propidium iodide を用いた DNA loss の測定法など）では *in vivo* でのアポトーシスの有無を正確に解析することは困難である。そこでアポトーシスの早期変化を検出できるミトコンドリア膜電位（ $\Delta\Psi_m$ ）を測定することで、*in vivo* でのアポトーシス指向性リンパ球の検出と定量化、さらに疾患活動性との相関や副腎皮質ステロイド薬などの治療薬の影響を検討した。

B.研究方法

採血直後の SLE 患者 PBMC を各種表面マーカー抗体（CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD45RO）と DiOC<sub>6</sub>(3)（ $\Delta\Psi_m$ ）とで 2~3 重染色後、FACS-can で解析し DiOC<sub>6</sub>(3)low 細胞群をアポトーシス指向性細胞として定量

化した。SLE の活動期と非活動期とで比較測定した。尚、症例の一部ではアポトーシスの解析を従来法でも行い比較検討した。

C.研究結果

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。すなわち DiOC<sub>6</sub>(3)low 細胞群が CD4 陽性細胞では SLE  $9.0 \pm 8.8\%$ 、他の自己免疫疾患（AC） $4.8 \pm 5.9\%$ （ $p < 0.05$ ）、健常人（HC） $1.9 \pm 1.5\%$ （ $p < 0.01$ ）、CD8 陽性細胞では SLE  $15.4 \pm 15.9\%$ 、AC  $4.4 \pm 5.2\%$ （ $p < 0.05$ ）、HC  $3.2 \pm 2.4\%$ （ $p < 0.01$ ）、CD19 陽性細胞では SLE  $23.8 \pm 19.7\%$ 、AC  $10.4 \pm 9.8\%$ （ $p < 0.05$ ）、HC  $3.1 \pm 2.4\%$ （ $p < 0.01$ ）、CD56 陽性細胞では SLE  $22.4 \pm 19.6\%$ 、AC  $11.1 \pm 9.4\%$ （ $p < 0.05$ ）、HC  $5.1 \pm 4.0\%$ （ $p < 0.01$ ）であった。また CD4<sup>+</sup> DiOC<sub>6</sub>(3)low 細胞群の大部分は CD45RO 陽性メモリー細胞群であった。アポトーシス細胞数は疾患活動性と血清 C1q 値との間に各々正と負の相関関係が認め

られた。さらにアポトーシス亢進は治療後に是正された。

#### D. 考察

採血直後のヒト SLE 患者ではすべてのリンパ球分画でアポトーシスが亢進していることが明らかとなった。その機序としてウイルス感染による細胞障害性 T 細胞による killing (granzymeB 誘発性) の亢進、紫外線、ストレスなどの誘因で惹起されるミトコンドリア依存性細胞死の亢進に伴うことが推定される。また近年 SLE において好中球や単球においてもアポトーシスの増加が報告されており、マクロファージによるアポトーシス細胞除去効率の低下も考えられる。マクロファージのアポトーシス細胞除去を促進する因子としては血清 C1q 値や CRP などが挙げられる。実際、血清 C1q 値とアポトーシス細胞数との間には負の相関関係が確認されていること、また SLE では活動期であっても CRP 値は陰性である場合が多いことなどから、アポトーシス処理機構の異常に基づくことが考えられた。最近、アポトーシス細胞が自己抗原の供給源となる可能性が指摘されており、in vivo でのアポトーシス亢進は SLE における自己免疫応答成立に繋がると推察される。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okazaki, H., Sato, H., Kamimura, T., Hirata, D.,

Iwamoto, M., Yoshio, T., Mimori, A., Masuyama, J., Kano, S., Minota, S. : In vitro and in vivo inhibition of activation induced T cell apoptosis by bucillamine. J Rheumatol. 2000, 27:6, 1358-1364.

##### 2. 学会発表

佐藤英智、岡崎仁昭、平田大介、上村健、狩野庄吾、簗田清次。 : SLE 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測定による解析。リウマチ。2000, 40:2, 492。

岡崎仁昭、簗田清次。アポトーシスを介した膠原病発症制御機構の研究 (シンポジウム)。日本皮膚科学会東部支部総会・学術大会抄録集。2000, 64:64-65。

Sato, H., Okazaki, H., Hirata, D., Kamimura, T., Iwamoto, M., Yoshio, T., Masuyama, J., Kano, S., Minota, S. : Increased spontaneous ongoing apoptosis in freshly isolated lymphocytes from SLE patients. Arthritis Rheum. 2000, 43:9, S237.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

##### 1. 特許取得

特記すべきことはない。

##### 2. 実用新案登録

特記すべきことはない。

##### 3. その他

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

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（東京医科歯科大学大学院生体応答調節学）

研究要旨

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。

A. 研究目的

多発性筋炎・皮膚筋炎（PM/DM）に合併する間質性肺炎（IP）はしばしば治療抵抗性であり、生命予後を左右する重大な合併症である。近年、本病態に対するシクロスポリン（CyA）の有効性を示唆する報告が散見<sup>1) 2)</sup> されており、多数例での検討と CyA 療法の標準的治療指針の作成を目的として、本研究班および創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業により CyA を用いた多施設共同研究が平成 11 年度より開始された。その結果、PM/DM に合併する IP に対する CyA 療法は短期的評価では有用であることが客観的指標から示された<sup>4)</sup>。昨年度の検討課題として残された CyA 投与症例の予後の追跡、CyA 療法適応症例の選択基準の検討、そして CyA 療法と他の治療法との比較検討を目的としてアンケート調査と解析を行った。

B. 研究方法

PM/DM に合併した IP に対して CyA の投与を受けた症例および DM に合併した急速進行性の IP で何らかの治療を受けた症例を対象に、全国 32 膠原病専門施設にアンケートを行った。解析に際し、CyA 療法の効果判定については 14 日間以上 CyA の投与をうけた症例を、また DM の急性型 IP について複数の治療法を比較するにあたっては 14 日間以上治療をうけた症例を対象とした。IP の分類は主治医の判定に基づき、急性の発症あるいは急激に増悪した場合を急性型、慢性に進行したものを慢性型とした。

治療評価項目は前回と同様<sup>4)</sup>、自覚症状、身体所見、画像所見、respiratory index (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) の 4 項目を設けスコア一化し、治療開始時および1ヶ月後に採点を行った。評価基準は項目ごとに改善、不変、増悪の 3

段階を設け、これらの4項目から総合評価を行い、4項目中3項目以上が改善したものを著効、2項目が改善したものを有効、1項目が改善したものをやや有効、すべての項目で変化がないものを不変、それ以外を増悪とした。またCK、LDHは施設間の正常値を考慮し、(CK/CK正常値)/(LDH/LDH正常値)をCK/LDH指数と定義した。統計学的解析は、カイ二乗検定、Mann-WhitneyのU検定、Spearmanの相関係数、Kaplan-Meier法、Logrank検定を用い、p値0.05未満をもって有意と判定した。

### C. 研究結果

表1に示した25施設よりPM11例、DM72例、計83例の回答を得た。

#### 1) CyA療法の短期的総合評価と長期予後

CyA療法の治療1ヶ月における総合評価と転帰について病態別に示した(図1-1~1-5)。まず、PMの急性型IP(n=2)はともに著効であり、1例は軽快したが1例はIPの再燃により死亡した(図1-1)。PMの慢性型IP(n=7)は著効2例、有効2例、やや有効3例で有効性が高かったが、転帰では1例が死亡し、死因として呼吸器感染症が疑われた(図1-2)。

DMの急性型IP(n=19)は総合評価において著効4例、有効5例、やや有効1例、不変2例、増悪4例、1ヶ月以内の死亡は3例に認められ、PMに比べ治療抵抗性を示した。転帰では、やや有効以上(n=10)では軽快7例であり、死亡3例中2例は感染症であった(図1-3)。不変例(n=2)はともにシクロフォスファミド(CPA)パルス療法に変更し、1例は軽快となった。増悪例(n=4)ではIP増悪により3例が死亡しており有効と判定された後に死亡した症例とは死因が大きく異なっていた(図1-4)。DMの慢性型IP(n=6)

では著効3例、やや有効3例であったが、転帰ではともに死亡が各1例みられ、死因は各々IP増悪と感染の合併、悪性リンパ腫であった(図1-5)。評価対象症例の平均観察期間は軽快27.0ヶ月、不変11.1ヶ月、増悪45.4ヶ月、死亡3.04ヶ月であった。

なお、CyA療法での治療1ヶ月後における総合評価と転帰は弱い相関を示した( $\rho=0.5$ 、 $p=0.01$ )。

#### 2) CyA療法の治療効果予測因子の検討

CyA療法を受けたDMの急性型IPにおいて、総合評価でやや有効以上あるいは転帰で軽快であった有効群と不変以下および死亡例であった無効群の2群に分け、治療前における各検査所見(CK/LDH指数、respiratory index、血清KL-6、%VC)について比較検討した。しかしいずれのパラメーターも有効・無効群の間で差は認められなかった(図2)。

またDMの急性型IPで気管支肺胞洗浄施行例(n=13)において細胞数、白血球分画、CD4/8比の各項目につき同様に解析を行ったが、有意差は認められなかった(表2)。

#### 3) 病理組織型と予後の検討

剖検も含めた病理組織学的検討が行われた症例についてCyA投与群(n=13、すべてDM症例)、非投与群(n=9、すべてDM症例)に分け解析した。CyA投与群では、diffuse alveolar damage(DAD)パターン、bronchiolitis obliterans organizing-pneumonia(BOOP)パターン、non-specific interstitial pneumonia(NSIP)パターン、usual interstitial pneumonia(UIP)パターンが認められた(表3)。DAD(n=4)はすべて臨床的に急性型であり、またCyAを初期に投与した1例を除く3例がIP増悪により死亡した。BOOP(n=2)、NSIP(n=4)、UIP(n=3)では生存率はDADより高かったが、臨床的に急性型を呈した2症例はともに死亡した。一方、CyA非投与群(n=9)も同様の

結果であり、急性型 (n=8) で軽快は 1 例のみであった (表 4)。

#### 4) DM 急性型 IP の初期治療と予後

DM の急性型 IP で合計 14 日以上治療を受けた症例 (n=50) について、代表的な治療法ごとに分類し解析した。

ステロイド剤単独で治療を開始した群

(n=26) は、有効 5 例、無効及び死亡 21 例であった (図 3-1)。無効例は CyA あるいは CPA を用い、最終的には生存 8 例、死亡 18 例であった。多くはステロイド抵抗性であったが、ステロイド単独で長期予後を得た症例も確認された。初期からステロイド剤に加え免疫抑制剤を併用した症例 (n=24) の治療内容は多様であったが、1 次治療として CyA を併用した群 (n=13) は、最終的には生存 9 例、死亡 4 例であった (図 3-2)。

次に、上記のステロイド単独群 (n=26) と CyA 併用群 (n=13) の予後を比較した。各群の患者プロフィールは両群間で有意差を認めなかった (表 5)。各治療群における生存者数、死亡者数およびこれらの観察期間をもとに、Kaplan-Meier 法による累積生存率曲線を求めたところ、ステロイド単独群と CyA 併用群の間に有意差を認めた ( $p=0.04$ ) (図 4)。

#### D. 考察

IP は PM/DM で高頻度に認められる合併症である。従来よりステロイド剤を中心に治療が行われてきたが、治療に難渋することも多い。DM において IP は予後規定因子として挙げられている<sup>5)</sup>。特に急速進行性の IP は中年男性に多く、筋症状は軽微で、抗 Jo-1 抗体陰性であり極めて治療抵抗性を示すなど、特異な臨床像を呈するが<sup>6)</sup>、その治療法は確立されていない。以前行われた本研究班のアンケート調査<sup>7)</sup>では、免疫抑制剤の併用が有用であるという結果が得られたものの標準的治療指針の作成には至らなかった。しかし、

我々が前年度に行ったアンケート調査では PM/DM に対する CyA 療法は短期的には有用であることが明らかとなった<sup>4)</sup>。

そこで、昨年度に引き続き各症例の予後を追跡したところ、短期的総合評価と転帰の間に相関が認められた。総合評価と転帰が相反する症例も見られたが、多くは総合評価時あるいはそれ以後に併発した感染症により影響を受けたと考えられる。従って CyA 療法は治療 1 ヶ月後の総合評価により効果判定を行うことが可能であり、CyA 療法を継続する場合は、常に感染症に留意する必要があることが示唆された。

次に DM の急性型 IP について CyA 療法開始前における治療効果の予測を試みたが、有用なパラメーターは存在せず、現段階では CyA 適応症例の選択は困難であった。また、病理組織学的所見については症例数が限られており、CyA 療法の反応性について病態別に解析することはできなかった。しかし、極めて予後不良とされてきた DAD で CyA 奏功例が存在することから、CyA 療法の有用性が裏付けられた。DAD 以外においては、同じ病理組織型を呈しながら急性型は死亡例が多く慢性型では生存例が多い点から、病理組織型と比べ臨床経過の方が予後判定にはより重要であると考えられた。

さらに今回、DM の急性型 IP における初期治療と生命予後との関係を検討したところ、ステロイド + CyA 併用群はステロイド単独群に比して累積生存率が有意に高いことが判明し、長期予後におけるステロイド + CyA 併用療法の有用性が初めて明らかとなった。一方、ステロイド無効例に対する免疫抑制剤併用療法に関しては、生存例は 18 例中 4 例と少なく、救命率向上への寄与は少ないものと考えられる。しかし、CyA 無効例に CPA が有用であった例も少数例ながら存在したのも事実であり、今後、CPA 療法の有用性については検討の余地が残されている。

以上より、DMの急性型IPに対しては初期よりステロイド+CyA併用療法を開始し、1ヶ月後の臨床評価によって今後の治療法を決定することが現時点での最善の選択肢と考えられる。

### E. 結論

PM/DMに合併した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。

#### 【参考文献】

- 1) Gruhn WB, Diaz-Buxo DJ: Cyclosporine treatment of steroid resistant interstitial pneumonitis associated with dermatomyositis/polymyositis. J Rheumatol. 1987, 14, 1045-1047
- 2) Maeda K, Kimura R, Komuta K, et al. : Cyclosporine treatment for polymyositis/dermatomyositis: is it possible to rescue the deteriorating cases with interstitial pneumonitis? Scand J Rheumatol. 1997, 26, 24-29.
- 3) Nawata S, Kurasawa K, Takabayashi K, et al. : Corticosteroid resistant interstitial pneumonitis in dermatomyositis/ polymyositis: prediction and treatment with cyclosporine. J Rheumatol. 1999, 26, 1527-1533.
- 4) 宮坂信之: 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. 厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班平成11年度研究報告書. 2000, 88-97.
- 5) Maugars YM, Berthelot JMM, Abbas AA, et al. : Long-term prognosis of 69 patients with dermatomyositis or polymyositis. Clin Exp Rheumatol, 1996, 14, 263-274.

6) 齊藤栄造,小川武彦,定本清美: 多発性筋炎/皮膚筋炎における間質性肺炎に関する研究: 予後および予後に関する因子について. 厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班平成5年度研究報告書. 1994, 125-127.

7) 佐藤篤彦,千田金吾,早川哲史,他: 多発性筋炎/皮膚筋炎に伴う肺病変について: 全国調査.厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成7年度研究報告書. 1995, 61-64.

#### 【謝辞】

アンケート作成にあたり御指導頂いた東京女子医科大学原まさ子教授、針谷正祥先生、立石睦人先生、またアンケートに御協力頂いた諸先生方に深謝いたします。

表1: 協力施設

北海道大学	豊橋市民病院
東北大学	名古屋市立大学
筑波大学	金沢医科大学
自治医科大学	京都大学
埼玉医科大学	大阪大学
東京大学	(NTT西日本大阪通信病院)
東京医科歯科大学	天理よろず相談所病院
日本大学	香川医科大学
順天堂大学	愛媛県立中央病院
東京女子医科大学	九州大学
慶應義塾大学	産業医科大学
杏林大学	長崎大学
聖マリアンナ医科大学	鹿児島赤十字病院

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Adenoviral transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor genes suppresses collagen-induced arthritis in mice. K. Nasu, H. Kohsaka, Y. Nonomura, Y. Terada, H. Ito, K. Hirokawa, N. Miyasaka J. Immunol. 165:7246-7252,2000
2. Stage-specific expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 during embryogenesis in rats. T. Iizuka, T. Tanaka, M. Suematsu, S. Miura, T. Watanabe, R. Koike, Y. Ishimura, H. Ishii, N. Miyasaka, M. Miyasaka J. Immunol. 164:2463-2471, 2000
3. Deficiency of STE20/PAK family kinase LOK leads to the acceleration of LFA-1 clustering and cell adhesion of activated lymphocytes. J. Endo, N. Toyama-Sorimachi, C. Taya, S. Kuramochi, Miyagawa, K. Nagata, K. Kuida, T. Takashi, H. Yonekawa, Y. Yoshizawa, N. Miyasaka, H. Karasuyama FEBS Letter 468:234-238, 2000
4. Induction of anti-DNA antibodies by immunization with anti-DNA antibodies: mechanism and characterization. F. Satake, N. Watanabe, N. Miyasaka, Y. Kanai, T. Kubota Lupus 9:489-497,2000
5. Mannose trimming targets mutant  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor for degradation by the proteasome. D.H. Chung, K. Ohashi, M. Watanabe, N. Miyasaka, S. Hirosawa J. Biol. Chem. 275:4981-4987,2000
6. A novel point mutation of the splicing donor site in the intron 2 of the plasmin inhibitor gene. H. Yoshinaga, S. Hirosawa, D.H.

Chung N. Miyasaka, N. Aoki, R. Favier  
Thromb Haemost 84:307-311,2000

2. Activation of autoreactive T cells that help nucleobindin-injected mice produce anti-DNA antibodies. T. Kubota, N. Watanabe, T. Kaneko, F. Satake, K. Miura, Y. Kurosawa, N. Miyasaka, Y. Kanai Immunol. Lett. 75:111-115,2001

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

### 7. 特許取得

なし

### 8. 実用新案登録

なし

その他

なし

## 多発性筋炎・皮膚筋炎における罹患筋組織からの T 細胞クローン樹立の試み

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）

### 研究要旨

多発性筋炎・皮膚筋炎（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 に特徴的である可能性が考えられた。

### A. 研究目的

多発性筋炎・皮膚筋炎（PM/DM）の病態として自己免疫学的な機序が考えられているが、その詳細は未だ明らかでない。標的臓器である筋組織には多くの CD4 陽性、あるいは CD8 陽性 T 細胞が浸潤しており、これらの T 細胞の多くは HLA-DR 陽性、CD45RO 陽性で memory phenotype を有している(1)。過去に我々はこれら筋炎局所の T 細胞、特に CD4 陽性 T 細胞は Fas ligand (2)や CD40 ligand (3)を発現していることを示してきた。すなわちこれら T 細胞は活性化状態にあり、更に特定の自己抗原を認識し局所での免疫反応に関与している可能性がある。今回私たちは筋炎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、罹患筋組織より T 細胞クローンを樹立し、解析した

### B. 研究方法

T 細胞クローンの樹立：抗 Jo-1 抗体陽性である DM 患者 1 例(Pt1)の筋生検より得られた筋組織を細切後、トリプシン処理し、得られた細胞集団を 1 ng/ml の IL-2 存在下にて 2 週

間培養した。浮遊細胞を回収し、irradiated autologous PBMC を feeder 細胞として限界希釈法にて T 細胞をクローニングした。このようにして樹立した T 細胞クローンを irradiated EBV-transformed autologous B 細胞を feeder とし、維持した。今回この患者から 20 個の T 細胞クローンを樹立できた。

RT-PCR：T 細胞クローンまたは患者筋組織から total RNA を抽出し、逆転写酵素にて cDNA を合成後、TCRV $\beta$  1~24 に特異的な primer を用いて PCR を行なった。

TCR CDR3 領域の解析：アミノ酸配列は、T 細胞クローンの場合は PCR product からダイレクトシーケンスにて塩基配列を求め、アミノ酸配列を決定した。患者筋組織検体の場合は、PCR product を pGEM-T Easy Vector にサブクローニング後、JM109 に transform し、コロニーをランダムに pick up し、インサートの塩基配列を求め、アミノ酸配列を決定した。

### C. 研究結果

Pt1 から得られた T 細胞クローンは免疫



染色の結果、すべて CD4 陽性 T 細胞であった。これらのクローンは 10 種の V $\beta$  鎖を使用しており (図 1)、特に V $\beta$  21、13.1、22、17、2 が高頻度で使用されていた。一方、Pt1 の筋組織において発現されていた V $\beta$  鎖を RT-PCR にて解析したところ、図 1 に示すように◎と○の V $\beta$  鎖が使用されており、特に◎の V $\beta$  鎖の強い発現が認められた。このように T 細胞クローンと筋組織における V $\beta$  鎖の使用パターンは良く一致していた。Pt1 から樹立した 20 個の T 細胞クローンのうち、塩基配列が解析できた 15 個のクローンについて予想される CDR3 領域のアミノ酸配列を示した (表 1)。13G11 と 12F2 はそれぞれ他に 1 つずつ同一の CDR3 領域の塩基配列をもつクローンが存在した。これらのクローンを 3 つのグループに分けて示した。上段は高頻度に見られた V $\beta$  21、17、13.1 のいずれかの限られた V $\beta$  を使用しており、かつ J $\beta$  は J $\beta$  2.1、J $\beta$  2.7 のいずれかを使用していたグループである。CDR3 領域には J $\beta$  と D2 の germline に由来する配列が共通して保存されていた (下線部)。またグリシン(G)、セリン(S)というモチーフも共通して存在していた。中段には V $\beta$  の使用には偏りが見られなかったものの、J $\beta$  2.3 を共通して使用していたクローンを示す。同様に J $\beta$  2.3 の germline に由来する配列が共通して見られる。下段のクローンは V $\beta$  鎖、J $\beta$  鎖の使用に共通性が見られなかったものである。

T 細胞クローンが、それを樹立した患者筋組織での T 細胞レパートワーを反映しているかを確認するために以下の実験を行った。共通な TCR CDR3 領域アミノ酸配列をもつ T 細胞クローンが高頻度で使用していた V $\beta$  21、17、13.1 について Pt1 の筋組織から抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行い、PCR product をベクターにサブクローニング後、JM109 に

transform した。生育したコロニーをランダムに 13~23 個拾ってシーケンスを行った。頻度の高いものから順に CDR3 領域のみを表 2 に示す。V $\beta$  21 では 13 個のコロニー中 9 個が J $\beta$  2.1 の 2.7 いずれかを使用していた。V $\beta$  17 にて最も高頻度で存在したコロニーには共通性が見られないが、23 個中 3 個に J $\beta$  2.1 を使用するコロニーが見られた。V $\beta$  13.1 においても複数個存在したコロニーは J $\beta$  2.7 を使用していた。以上のことから、Pt1 の筋組織から樹立した T 細胞クローンは J $\beta$  の使用頻度に偏りがあるという点において in vivo での T 細胞レパートワーを反映していると考えられた。Pt1 から樹立したクローンが高頻度に J $\beta$  2.1 または J $\beta$  2.7 を使用しており、germline に由来する配列が良く保存されていたことから、この J $\beta$  の使用が筋炎患者に共通してみられる現象なのかを調べるために以下の実験を行なった。他の筋炎患者【抗 Jo-1 抗体陽性 PM1 例 (Pt2)、同抗体陰性 PM1 例 (Pt3)】筋組織から抽出した total RNA から各 V $\beta$  鎖について RT-PCR を行い、1 st PCR product を鋳型とし図 2 のように J $\beta$  2.1 に lower primer を設定し、それぞれの V $\beta$  に特異的な primer と組み合わせて 2 nd PCR を行った。斜体で示した部分が primer として設定した塩基配列に対応するアミノ酸配列である。2 nd PCR product はアガロースゲルにて泳動し、目的のバンドを切り出し精製後、ベクターにサブクローニング後シーケンスを行なった。

Pt2 における 2nd PCR product の塩基配列から推測された CDR3 領域のアミノ酸配列を表 3 に示す。下線部は J $\beta$  2.1 および D2 の germline に由来する配列である。この患者筋組織において強く発現していた V $\beta$  2、13.1、17 について解析を行なったところ V $\beta$  2 および 13.1 において高頻度に存在するコロニーがみられた。Pt3 における結果を表 4 に示す。V $\beta$  3 において 11 個中 10 個という高頻度で存在したコロ

ニーにグリシン (G)、セリン (S) という配列 (Pt1 の T 細胞クローンで見られたモチーフ) が存在した。

#### D. 考察

筋炎組織浸潤 TCR レパートワーに関する過去の報告が 2 編ある。いずれも抗 Jo-1 抗体陽性患者 10 数例の筋組織について共通して使用されていた V $\beta$  6(4)あるいは V $\beta$  15(5)について、PCR product をベクターにサブクローニングして CDR3 領域の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想したものである。興味深いことに、これらの報告でも私たちの結果同様、組織浸潤 T 細胞は J $\beta$  2.1、2.3、2.7(4)あるいは J $\beta$  2.1 (5)の限られた J $\beta$  鎖を使用しているという結果であった。一方、これらの患者において末梢血中の T 細胞については J $\beta$  鎖の使用に偏りがみられないという結果であった。以上より、少なくとも抗 Jo-1 抗体陽性筋炎では 14 種類の J $\beta$  鎖のうち、限られた J $\beta$  鎖を使用している可能性が考えられた。さらにこれら J $\beta$  2.1、2.3、2.7 の germline の塩基配列から合成されるアミノ酸配列は本来それぞれよく似通っており、また D 領域はすべて D2 の germline の塩基配列から合成されるため、必然的に CDR3 領域に似た配列を持ちやすくなると考えられた。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

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)

なし。

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

抗 IL-6R 抗体による間質性肺炎の治療法の開発  
-肺線維芽細胞に対する IL-6 の作用とマウス間質性肺炎モデルに対する治療実験-

西本 憲弘 (大阪大学健康体育部健康医学第一部門)

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。ラット肺組織へのIL-6/IL-6RおよびTGF- $\beta$ の遺伝子導入実験や高IL-6血症を中心病変とするキャスルマン病患者の病理所見から、IL-6はリンパ球浸潤に関わり、TGF- $\beta$ は肺線維化に作用すると考えられる。IL-6はTGF- $\beta$ と拮抗し抗線維化作用を示すIFN- $\gamma$ と同様のJAK-STAT経路を持つことや、RA患者由来の滑膜線維芽細胞や皮膚の線維芽細胞に対し増殖抑制作用を示すことから、IFN- $\gamma$ と同様に線維化を抑制する可能性がある。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静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。これらの病理像はキャスルマン病やシェーグレン症候群に見られるLIPの像に酷似していた。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。リンパ球性間質性肺炎を高頻度に合併するキャスルマン病患者においてヒト型化抗IL-6R抗体の投与期間中は血清中のTGF- $\beta$ 濃度が正常範囲内ではあるが低下し、治療を中止すると再び上昇したことから、ヒト型化抗IL-6R抗体は肺胞隔壁や気管支、肺血管への炎症性細胞の浸潤を抑え、二次的にTGF- $\beta$ の産生を抑制した可能性がある。すなわち、炎症の起点としてIL-6の過剰産生があり、炎症によって組織が障害を受けると、その修復機構としてTGF- $\beta$ が産生され、線維化が進行し肺線維症に至ると考えられる。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。

#### A. 研究目的

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。膠原病における肺病変の発症機序はいまだ明らかではないが、全身性の自己免疫反応に伴う炎症がその病態に関与すると考えられる。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。

間質性肺炎には肺組織へのリンパ球浸潤を中心とするリンパ球性間質性肺炎 (LIP) と線維化を主病変とする肺線維症を呈する

タイプがある。リンパ球を中心とした炎症性細胞の浸潤を肺臓器における自己免疫性の炎症の初期像ととらえ、肺の線維化は急性あるいは慢性の炎症の結果として生じる組織の修復が過度に生じた状態とみなすこともできる。これらは連続した病態であるが、それぞれのステージで中心的役割を演じるサイトカインは異なり、個々の症状や病理像の特徴は間質性肺炎のステージのみならず、これらサイトカインの量的バランスで決定されると考えられる。

IL-6はT細胞の活性化や自己抗体の産生を刺激し自己免疫反応を増幅させるばかりでなく、炎症反応を惹起する極めて重要なサイトカインであり、炎症局所への細胞浸潤に関わると考えられる。一方、肺間質の炎症から不可逆性の線維化病変へと進む過程において、線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックスの産生を促す作用を持つTGF- $\beta$ が関与していると考えられる。

実際に共同研究者の林らは、アデノウイルスベクター法ならびにHVJ-liposome法を用いてラット肺組織へIL-6/IL-6RおよびTGF- $\beta$ 遺伝子を導入したところ、IL-6/IL-6R遺伝子を導入した場合はリンパ球やマクロファージの浸潤を伴う炎症が生じ、TGF- $\beta$ 遺伝子を導入した場合は肺線維芽細胞の増殖とともに、細胞外マトリックスの沈着による組織の線維化が起こることを明らかにした(1)。

また、高IL-6血症を中心病変とするキャッスルマン病では高頻度に肺病変を合併するものの、その病理所見はLIPが中心であり、線維化はほとんど認められない(2)。

以上のことからIL-6はリンパ球浸潤に関わり、TGF- $\beta$ は肺線維化に作用することが考えられる。

一方、IFN- $\gamma$ はTGF- $\beta$ と拮抗し抗線維化作用を示すことが知られているが、その作用メカニズムは不明であった。最近になってIFN- $\gamma$ がJAK/STAT系を介してTGF- $\beta$ シグナルのネガティブフィードバック因子であるSmad7を誘導することが報告され、抗線維

化機構の一端として注目されている(3)。IL-6についてもIFN- $\gamma$ と同様にJAK/STAT系のシグナル伝達機構を有することや、慢性間質リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞や皮膚の線維芽細胞に対し増殖抑制作用を示すことから(4)、IFN- $\gamma$ と同様にTGF- $\beta$ と拮抗し、肺線維芽細胞の増殖ならびに組織の線維化を抑制する可能性も考えられる。

そこで、肺間質組織の線維化におけるIL-6とTGF- $\beta$ の相互作用を明らかにするため、*in vitro*でTGF- $\beta$ による肺線維芽細胞の増殖ならびに細胞外マトリックスの産生に対するIL-6の影響を検討した。さらに、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、肺病変の病理解析を行ないIL-6の役割を立証するとともに抗IL-6R抗体を用いた治療実験により新規治療法としてのIL-6阻害の有効性を検討した。また、キャッスルマン病患者に対するヒト型化抗IL-6R抗体治療による血清中のTGF- $\beta$ の推移を検討した。

## B. 研究方法

### [In vitro]

細胞は三光純薬より購入したヒト正常肺線維芽細胞 (NHLF)、大阪大学細菌学教室保有の胎児肺線維芽細胞 (HEL)、我々が特発性間質性肺炎患者からインフォームド・コンセントを得たのちに肺生検組織より分離した線維芽細胞 (IPF1~4) の計6種類を用いた。細胞増殖についてはサイトカイン刺激の24時間後にBrdUで細胞を標識し、4時間でのDNAへの取り込み量をELISAによって測定した。細胞外マトリックスの産生についてはサイトカイン刺激の72時間後に培養上清中のI型プロコラーゲンのC末端遊離ペプチドPICPをELISAによって測定した。

### [In vivo]

高IL-6血症に伴う間質性肺炎動物モデルとしてヒトIL-6トランスジェニックマウス