

自己反応性T細胞のクローニングは、Naikiらの方法<sup>2)</sup>に従った。すなわち、抗U1RNP抗体あるいは抗dsDNA抗体陽性のMRL/lprマウス(18週齢)リンパ節細胞(4 x 10<sup>6</sup>/ml)を10% FCSを含んだClick培地(Irvine Scientific社)に浮遊させ、2 x 10<sup>6</sup>/mlの放射線照射(30Gy) MRL/lprマウス脾細胞を抗原提示細胞(APC)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。

### 3. 抗体刺激試験

T細胞クローン(5 x 10<sup>5</sup>/well)をMRL/lprマウス脾細胞から分離精製したB細胞(2 x 10<sup>6</sup>/ml)と一週間混合培養し、その上清中のIgG濃度、抗dsDNA抗体価、抗U1RNP抗体価をELISAで測定した。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polyethylene membrane insert(Transwell<sup>®</sup>, 0.4 μm pore size, Becton Dickinson Labware社)を挿入し、同様の実験を行った。

### 4. Transfer study

今回は対象となるMRL/lprマウスを4群に分けた。

すなわち、1) PBSのみを注射したもの、2) 抗U1RNP抗体陽性のマウスから分離したT細胞(rnp2)を移入したもの、<sup>3)</sup> 抗dsDNA抗体陽性のマウスから分離したT細胞(dna51)を移入したものに加えて、<sup>4)</sup> dna51を放射線照射して非活性化したもの(i-dna51)も移入した。T細胞は、一匹あたり1~2x10<sup>6</sup>細胞を3週齢から2週おきに、計6回静注した。これらのマウスから経時的に採血し、抗U1RNP抗体と抗dsDNA抗体をELISAで測定し、最終観察時(26週齢)に皮膚マクロ所見、背部の皮膚、肺、腎組織所見(いずれもHE染色)を検討した。なお肺組織では、Fujikiらの報告<sup>2)</sup>にしたがって血管・細気管支周囲のリンパ球浸潤、および肺胞隔壁の肥厚をスコアリングした。また腎組織は、Austinらが提唱したループス腎炎のactivity index<sup>2)</sup>により評価した。

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配慮した。

### 5. 精製dsDNAおよびU1RNP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<sup>2)</sup>に従った。また、抗U1RNP抗体はEhrlich ascites細胞から精製

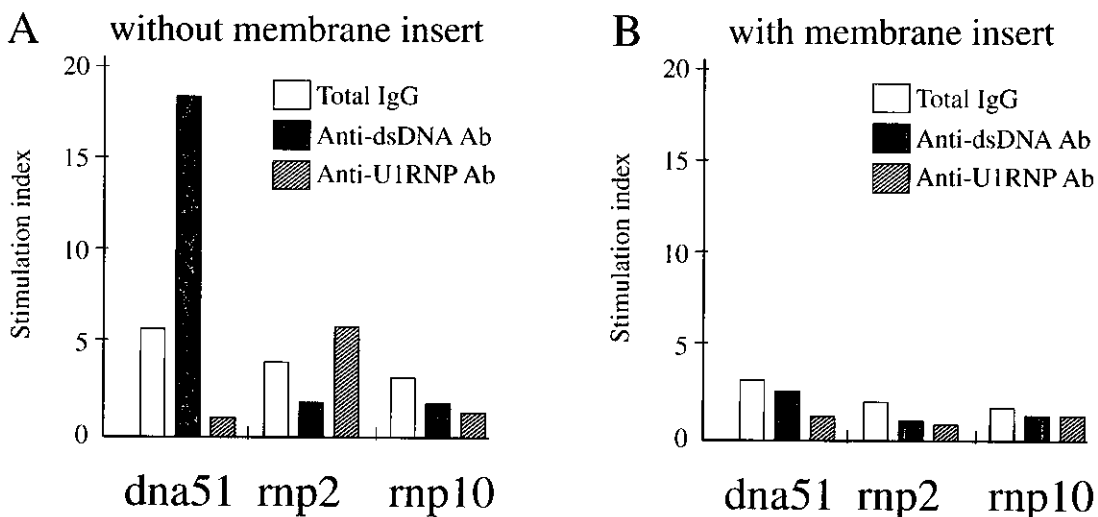


図1. 分離した自己反応性T細胞による抗体刺激試験

Stimulation index = (IgG titer [T cells + B cells]) / (IgG titer [B cells alone])

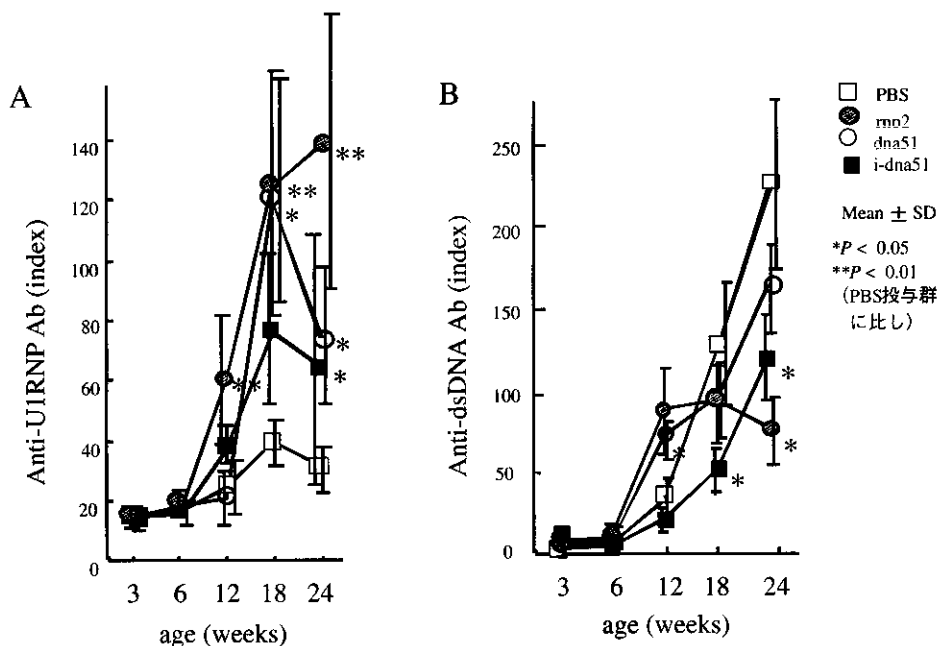


図2. Transfer study (血清中の抗核抗体)

したマウス U1RNP (1  $\mu$ 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。

### C. 研究結果

#### 1. 抗 U1RNP 抗体産生に關与する T 細胞の分離

抗 U1RNP 抗体陽性 MRL/lpr マウス脾細胞から、限界希釈法により、計 11 種の自己反応性 T 細胞を分離した。T 細胞単独に比べて、APC 存在下で有意な増殖を示したのは 3 つのライン (rnp2, 4, 10) のみであった。さらにそのうち rnp4 は抗 CD3 モノクローナル抗体刺激により、IFN  $\gamma$  と IL4 の両方を分泌した (ELISA により測定) ため、Th1 と Th2 の細胞が混在している可能性が考えられた。rnp2 と rnp10 は、すでに報告している dna51 と同様 IFN  $\gamma$  のみを産生し、Th1 細胞と考えられた。そこで以下の検討では dna51 に加えて rnp2 と rnp10 の Th1 細胞を使用した。

抗体刺激試験 (図 1 A) において、dna51 は抗 dsDNA 抗体を、rnp2 は抗 U1RNP 抗体の産生を、全 IgG とともに特異的に刺激したが、rnp10 は両抗体いずれの産生も刺激できなかった。T 細胞と B 細胞の直接的な接触を阻害することにより、いずれの抗体産生

も減弱した (図 1 B)。rnp2 と dna51 の表面抗原をフローサイトメトリーにより調べたところ、rnp2、dna51 とともに TCR  $\alpha\beta$  (T 細胞レセプター  $\alpha\beta$  鎖)、CD4、CD3 が陽性で、B220 は陰性であった。また TCR として、rnp2 は V  $\beta$  14 を、dna51 は V  $\beta$  8.3 を有した。これらの結果から、両細胞は同じ CD4 陽性 Th1 細胞でも抗原特異性が異なると考えられた。

#### 2. Transfer study

経時的な血清中抗 U1RNP 抗体と抗 dsDNA 抗体価を測定、平均値を比較した (図 2 A および B)。抗 U1RNP 抗体は、PBS 群では 24 週齢でも軽度の上昇にとどまっていた。一方 PBS 群を基準とすると、rnp2 移入群では 12、18、24 週齢で抗 U1RNP 抗体が有意に高値となった。しかし、*in vitro* の成績とは異なり、dna51 移入群でも 18 週齢および 24 週齢で抗 U1RNP 抗体価の上昇が認められ、さらに i-dna51 群でも 24 週齢で同抗体の上昇が認められた。抗 dsDNA 抗体は、PBS 群に比し dna51 移入群で 12 週齢で有意に高値であった。しかし 18、24 週齢では dna51 移入群においても同抗体価の上昇は見られなかった。逆に rnp2 移入群、i-dna51 移入群では 18 週齢あるいは 24 週齢において抗 dsDNA 抗体価の上昇が抑制されていた。なお抗体陽性率 (頻度) も同様の結果であった。

26 週齢における皮膚のマクロ・組織所見、肺組織所見は、群間では有意差を認めなかった。また腎組織の

活動性指標 (AI) で、PBS 群を基準とした場合、rnp2 移入群で有意な変化を認めなかった。しかし、dna51 移入群では AI が有意に上昇し、i-dna51 移入群では AI が有意に低下した (図 3 A)。さらに、AI を糸球体病変と間質性病変に分けて検討すると、rnp2 移入群では糸球体 AI が低く、逆に間質性 AI は PBS 群より有意に高かった。それに対し、dna51 移入群では糸球体 AI が高く、i-dna51 移入群では糸球体 AI が特異的に改善していた (図 3 B)。

#### D. 考察

MCTD 患者では、高力価抗 U1RNP 抗体および肺高血圧症を他の膠原病に比べて高頻度に認める。抗 U1RNP 抗体の産生が T 細胞依存性であることは過去の報告<sup>6)</sup>により強く示唆されており、その産生に関与する T 細胞については、本学会議でも検討がなされている。MCTD 患者末梢 T 細胞では Vβ14 陽性クローンが高頻度に認められたこと<sup>7)</sup>、抗 U1-A 自己抗体陽性患者の PBMC が、同抗体陰性患者の PBMC に比べて IL-2 産生が増強していること<sup>8)</sup>などが示されてきた。今回われわれが分離したのはマウス T 細胞であるが、11 種の中からただ 1 種抗 U1RNP 抗

体の産生に関与した rnp2 は IFNγ を分泌し、Vβ14 を有した。今回 rnp2 が認識する自己抗原あるいはペプチドに関しては未検討で、今までに MCTD 患者で報告されてきた U1RNP 関連ペプチドを認識する T 細胞との異同を調べるために、TCR の CDR3 部位のアミノ酸配列の同定が必要である。

本研究における Transfer study の結果から、*in vivo* では、特異性の異なった T 細胞が抗 U1RNP 抗体産生を刺激しうることを示唆する。*in vitro* において抗 dsDNA 抗体の産生のみを特異的に刺激した dna51 もまた血清抗 U1RNP 抗体価を上昇させたことは興味深い。そのメカニズムは今後検討する必要があるが、抗 U1RNP 抗体産生が Th1 依存性で、自己反応性 Th1 細胞の増加による高 IFNγ 血症の結果、抗 U1RNP 抗体の産生に関与する Th1 細胞が活性化された可能性を考えている。一方、他の特異性を持った Th1 細胞が抗 dsDNA 抗体抑制性に働いた理由として、同抗体の産生が Th2 依存性であり、Th1 サイトカインにより抑制がかかった可能性を考えた。

*in vivo* において dna51 は、抗 dsDNA 抗体価を上昇さ

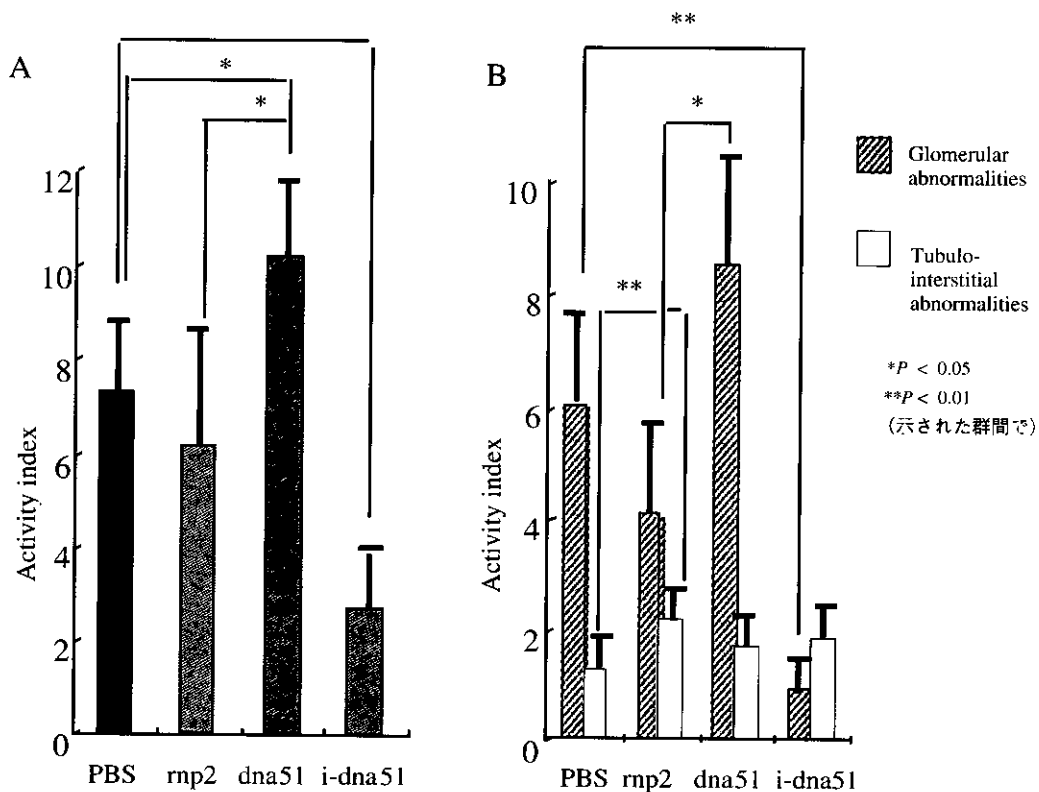


図 3. Transfer study (腎組織所見)

腎組織は、ループス腎炎における activity index (AI, Austin ら<sup>9)</sup>による) で評価した。

せることなく糸球体病変を悪化させた一方で、抗U1RNP抗体の産生を刺激したのにも関わらず間質性腎障害を悪化させなかった。それに対しrnp2の移入により間質性腎障害が悪化したことから、MRL/lprマウスでは、抗U1RNP抗体自身よりもその産生に関連するT細胞がより病態形成に関与した可能性が示唆される。しかしMCTD患者において間質性腎炎はまれであり、この病態形成機序がマウス特有のものであるのか、あるいはMCTD患者にも同様のTh1細胞が存在するのかは現在のところ不明である。さらにrnp2が直接間質性腎炎に関与したのかを明らかにするため、抗Vβ14モノクローナル抗体を用いた腎組織の免疫染色を予定している。

最後に、放射線照射して非活性化させたdna51 (i-dna51) は、dna51で誘発された糸球体障害を著しく軽減させ、dna51が関与する免疫異常症を特異的に抑制した可能性がある。rnp2に関しても、i-dna51と同様な効果を期待し、放射線照射したrnp2 (i-rnp2) が間質性腎炎を軽快させることができるかどうかを現在検討中である。

## E. 研究発表

1. Fujii T, Okada M, Craft J, et al: Down-regulation of autoantibody production by  $\gamma\delta$  T cells in murine lupus. *Arthritis Rheum* 41: S139, 1998.
2. Fujii T, Okada M, Craft J, et al: B cell proliferation and autoantibody synthesis aided by transmembrane TNF  $\alpha$  on CD4+ Th1 T cells in lupus-prone MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Arthritis Rheum* 41: S174, 1998.
3. Craft J, Peng S, Fujii T, et al: Autoreactive T cells in murine lupus. *Immunological Research* 2-3: 245-257, 1999.
4. Fujii T, Kameyama K, Mimori T, et al: T cell vaccination in murine lupus with the autoreactive Th1 lines which are involved in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 43: S93, 2000.
5. 三森経世, 藤井隆夫: 抗U1RNP抗体産生におけるCD40リガンドおよび膜結合型TNF  $\alpha$ の意義-CD40リガンド欠損MRL/MpJ-lpr/lprマウスを用いた検討-. 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11年度報告書, pp48-52, 2000.

## 文 献

1. Cohen IR, Ben-Nun A, Holoshitz J, et al: Vaccination against autoimmune disease with lines of autoimmune T lymphocytes. *Immunology Today* 4: 227-230, 1983.
2. 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* 149: 4109-4115, 1992.
3. Fujiki M, Shinbori T, Suga M, et al: Role of T cells in bronchoalveolar space in the development of interstitial pneumonia induced by superantigen in autoimmune-prone mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 675-683, 1999.
4. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM, et al: Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histology data. *Am J Med* 75: 382-391, 1983.

5. 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. Okubo M, Yamamoto K, Kato T, et al: Detection and epitope analysis of the autoantigen-reactive T cells to the U1-snRNP A protein in autoimmune disease patients. *J Immunol* 151: 1108-1115, 1993.
7. 大久保光夫ほか: MCTD患者T細胞U1snRNP Aと68K蛋白抗原の認識の差異に関する解析. 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, pp61-62, 1998.
8. 山本一彦ほか: MCTD患者における自己抗原反応性T細胞のサイトカイン発現の解析. 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7年度報告書, pp84-86, 1996.

## **PATHOLOGICAL CHANGES ASSOCIATED WITH ANTI-U1RNP AUTOANTIBODY-PRODUCING TH1 CELLS IN MRL/Mp-*Fas<sup>lpr</sup>* MICE.**

Tsuneyo Mimori<sup>1)</sup> and Takao Fujii<sup>2)</sup>

Department of Rheumatology and Clinical Immunology, University of Kyoto<sup>1)</sup>

Department of Internal Medicine, Keio University<sup>2)</sup>

To clarify the association between pathological changes and autoantibody-producing Th1 cells, we isolated autoreactive T cells from splenocytes of MRL/Mp-*Fas<sup>lpr</sup>* (MRL/*lpr*) mice. Two CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>*Fas<sup>lpr</sup>*  $\alpha$   $\beta$  Th1 cell lines (designated as dna51 and rnp2) were cloned from the splenocytes of 12-week-old MRL/*lpr* mice. Lines dna51 (TCR V  $\beta$  8.3) and rnp2 (TCR V  $\beta$  14) stimulated anti-dsDNA and U1RNP antibody (Ab) production in the presence of MRL/*lpr* B cells *in vitro*, respectively. Line dna51 or rnp2 was transferred into female MRL/*lpr* mice 6 times ( $2 \times 10^6$  cells/mouse/each time) from 3 weeks (wks) old. In the rnp2-transferred mice, increased titers of anti-U1RNP Ab were detected at 12, 18, and 24 wks compared with in the PBS-treated mice. The dna51-transferred mice showed increased titers of anti-U1RNP Ab at 18 and 24 wks, while anti-dsDNA Ab titers were higher than that of the PBS-treated mice only at 12 wks. Lymphocyte infiltration of skin and pulmonary lesions were equally observed between the line-transferred and the PBS-treated mice. Renal histology, which was evaluated by the activity index (AI; Austin *et al.*, *Am J Med*, 1983), demonstrated that in the dna51-transferred mice AI of glomerular abnormalities was predominantly increased whereas AI of tubulo-interstitial abnormalities was not affected. On the other hand, AI of tubulo-interstitial abnormalities in the rnp2-transferred mice was higher than that of the PBS-treated mice. These results suggest that Th1 lines of different specificity drive anti-U1RNP Ab production *in vivo* but clinical manifestations such as renal disorders may be regulated by the individual Th1 line in MRL/*lpr* mice.

## 9. MCTD における抗 U1RNP 抗体産生機序に関する研究 - 抗 U1RNP 抗体産生マウス B 細胞特異的発現遺伝子の解析

分担研究者 : 三崎 義賢  
研究協力者 : 瀬戸口京吾、山口 晃弘、川畑 仁人、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

U1RNP自己抗体の出現に関わる遺伝子の探索を目的として、自己抗体誘導系を用いてその個体における遺伝子発現プロフィールを解析することにした。プリスタンを免疫学的に正常と考えられている各種マウス系統に腹腔投与すると、投与後16週以降に抗U1RNP抗体を誘導できる。この系は、遺伝的背景と健常対照が明瞭なので抗U1RNP抗体産生に関与する遺伝子を解析できると考えられる。プリスタン投与20週後のC57BL/6血清をELISAで測定すると、100%とこれまでの報告よりも高率に抗U1-A自己抗体が出現していた。まず活性化されていると考えられているB細胞に注目し、蛍光Differential Display法を用いてこれまで解析できた9936バンドのうち、プリスタン由来B細胞にて発現が上昇したもの65、発現が低下したもの54であった。発現が上昇しているクローン20個について塩基配列を決定した。8個が既知であり、4個がdbESTと一致、未知のものが8個であった。今後解析する遺伝子の数、細胞集団の種類を拡大する予定である。

### A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)の重要な特徴の一つは、抗U1RNP抗体の産生である。この抗U1RNP抗体産生に関わる分子を探索することがMCTDの病態の理解に重要である。このような分子の探索にはU1RNP抗体産生に関連して発現している遺伝子のプロフィールを解析する手法が有効である。しかし、ヒトの実際の病変では病期の進行度、浸潤している細胞の種類、量、活性化の状態などの要素が、患者間で極めて多様で、ましてや健常人とは非常に異なり、正確な対照を取ることはほぼ不可能である。また多因子病の病態形成には、幾つかの遺伝子変異の組み合わせが必要なことが多く、一つの遺伝子異常でもマウスでは遺伝的背景により表現系が全く異なることが知られている。従ってそれらの情報まで把握できなければ、病態との関連の追及までは困難だと考えられる。

プリスタンをC57BL/6やBALB/cなどの免疫学的に正常と考えられている各種マウス系統に腹腔投与すると、投与後16週以降に抗U1RNP抗体を誘導できることが知られている。この自己抗体誘導系では健常

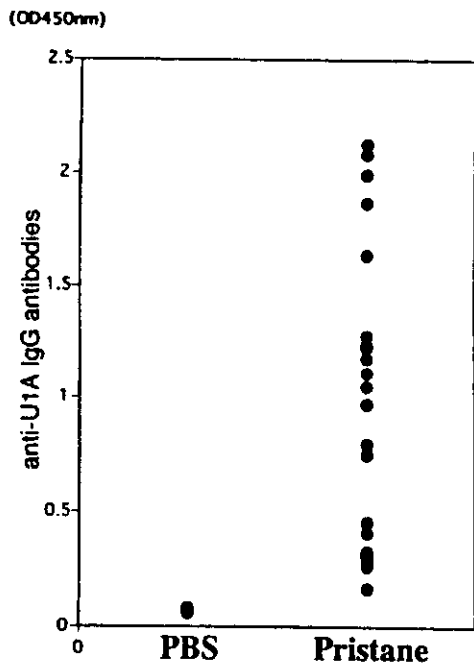
対照が明瞭であるので、U1RNP抗体産生マウスと健常対照における発現遺伝子プロフィールを比較することによって、U1RNP抗体産生に関与する遺伝子を探索する事が可能である。

また、遺伝的背景が明瞭であるので、このようにして得られた発現量に差のある遺伝子を導入した細胞を用いて病態との関連をin vitroだけでなくin vivoでも追及することが可能であると考えられる。以上よりプリスタンによるU1RNP自己抗体産生誘導系は、U1RNP自己抗体産生機序を遺伝子レベルで解析するのに適したモデルだと考えられる。そこでまずC57BL/6において直接自己抗体産生に関与していると考えられるB細胞における遺伝子発現プロフィールを検討した。

### B. 研究方法

C57BL/6マウスにプリスタンを腹腔投与し、20-24週後の脾臓B細胞を精製分離し、PBS投与マウス由来脾臓B細胞を対照として、蛍光Differential Display法にて発現プロフィールを解析した。この動

図1 pristane 投与 20 週後の抗 U1RNP-A 自己抗体価



物実験は東京大学医学部が定める動物実験の指針に基づいて行った。抗U1RNP-A抗体は、ELISAで測定した。

### C. 研究結果

C57BL/6 マウスにプリスタン投与し、20週後血清でほぼ100%とこれまでの報告よりも高率に抗U1-A自己抗体が出現していた(図1)。この中でも高力価に抗U1-A抗体を産生している3個体からまず活性化されていると考えられているB細胞に注目し、健常3個体より得られたB細胞を対照として、蛍光Differential Display法を用いて解析した。これまで9936バンドを解析し、すべてのプリスタン投与個体由来B細胞にて発現が上昇したものの65、発現が低下したものの54であった。発現が上昇しているクローン20個について塩基配列を決定した。8個が既知であり、4個がdbESTと一致、未知のものが8個であった。既知のなかには、テロメア長をネガティブに制御するTIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2)などが見出された。

我々は、これまで遺伝子導入が比較的困難とされていたマウス成熟リンパ球にも、レトロウィルスベクターを用いて高効率に遺伝子導入する系を確立した。従って、上記の手法で同定した遺伝子を、病態に関与していると考えられる未熟及び成熟リンパ球に比較的

短時間に効率よく導入でき、候補遺伝子の病態との関連効果を *in vitro* だけでなく *in vivo* で観察することが可能である。

MCTDは、抗U1RNP抗体など特徴的な面と高 $\gamma$ グロブリン血症など自己免疫疾患全般に共通する特徴とで構成される。プリスタンモデルでは抗U1RNP抗体だけでなく高 $\gamma$ グロブリン血症や他の自己抗体の出現が知られている。ところがIL-6欠損マウスでのプリスタン投与においては抗DNA抗体、糸球体腎炎など全身性エリテマトーデス様の症状が消え、抗U1RNP抗体産生が残るという報告があるので、MCTD的な面と自己免疫疾患に共通する面とを分離できる可能性がある。今後こうしたモデルに対象を広げ、細胞集団の種類も拡大して解析していく予定である。

### D. 研究発表

1. Setoguchi K, Misaki Y, Araki Y et al. Antigen-specific T cells transduced with interleukin-10 ameliorate experimentally induced arthritis without impairing the systemic immune response to the antigen. *J Immunol.* 165:5980-6, 2000
2. Misaki Y, Ezaki I, Ariga T, Kawamura N, Sakiyama Y, Yamamoto K. Gene-transferred oligoclonal T cells predominantly persist in peripheral blood from an adenosine deaminase deficient patient during gene therapy. *Molecular Therapy* 3; 24-27, 2001
3. Fujio K, Misaki Y, Setoguchi K et al. Functional reconstitution of class II restricted T cell immunity mediated by retroviral transfer of  $\alpha / \beta$  T cell receptor complex. *J Immunol.* 165:528-32, 2000.

### 文献

1. Satoh M, Kumar A, Kanwar YS, Reeves WH. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10934-8, 1995
2. Kim SH, Kaminker P, Campisi J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet.* 23:405-12, 1999
3. Richards HB, Satoh M, Shaw M, Libert C, Poli V, Reeves WH. Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus. *J Exp Med.* 188:985-90, 1998

## **ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PROFILE ASSOCIATED WITH ANTI-U1RNP AUTOANTIBODY PRODUCTION**

Yoshikata Misaki, Keigo setoguchi, Akihiro Yamaguchi,  
Kimito Kawahata and Kazuhiko Yamamoto.  
Department of Allergy and Rheumatology, University of Tokyo

In order to investigate the molecules which are associated with anti-U1RNP autoantibody production, we analyzed the expression profile of lymphocytes from pristane-induced autoimmune disease model mice. Since mice from several strains develop anti-U1RNP antibody and autoimmune disease 16 weeks after pristane treatment, this model provides with a clear healthy control to compare to the mice in which anti-U1RNP is produced. We confirmed the appearance of U1RNP-A autoantibody in almost all mice treated with pristane. From fluorescence-based differential display method, we detected a number of clones which are either up-regulated or down-regulated. In combination with retroviral transduction experiments of the candidate genes differentially expressed, this strategy would provide new insights into the molecules involved in U1RNP autoantibody production.



## 10. U1 RNPの高次構造を認識する自己抗体の測定系

分担研究者 : 高崎 芳成<sup>1</sup>  
研究協力者 : 村上 明弘<sup>2</sup>、竹内 健<sup>1</sup>、金田 和彦<sup>1</sup>、  
矢野 哲郎<sup>1</sup>、池田 圭吾<sup>1</sup>、松下 雅和<sup>1</sup>、  
縄田 益之<sup>1</sup>、松平 蘭<sup>1</sup>、橋本 博史<sup>1</sup>  
所属施設 : <sup>1</sup>順天堂大学膠原病内科医学生物学研究所  
<sup>2</sup>医学生物学研究所

### 研究要旨

自験MCTD199例、SLE119例、SSc20例、PM/DM25例、RA30例を対象とし、新たに開発された抗U1 RNP抗体測定キット(MESACUP-2 RNP; MSR2)の感度、特異性を検討した。また、抗U1 RNP抗体の認識する高次構造について解析を加えた。MSR2ではU1 RNAに加え、リコンビナント70kDa,AおよびC蛋白を抗原源として用いている。このELISAの測定結果をDIDおよび70kDa,AおよびC蛋白のみを抗原源として用いたELISA(MESACUP RNP II; MSRII)と比較検討した。その結果、MSR2ではDID陽性血清が全例陽性で、MSRIIでは13例が陰性となった。そこでU1 RNAと上述の個々の蛋白の複合体を作成し、13例の血清との反応性を検討した結果、70kDa-U1 RNA複合体と全例の血清が反応することが明らかとなった。以上の結果より、抗U1 RNP血清には70kDa-U1 RNA複合体の特異な立体構造を認識する抗体が存在し、MSR2ではその立体構造が再構築され、反応性が高まっていることが確認された。

### A. 研究目的

抗U1 RNP抗体は全身性エリテマトーデス(SLE)、強皮症(SSc)および多発性筋炎(PM)の臨床像を合わせ持つ混合性結合組織病(MCTD)の疾患標識抗体で、その診断の必須条件となっている。U1 RNPは代表的な可溶性核抗原の一つで、二重免疫拡散法(DID)がその抗体を特異的に検出する方法として用いられてきた。これに対し、より感度が高く、定量性にもすぐれる方法としてenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)の開発が試みられてきた。しかし、U1 RNPはU1 RNAとそれに結合する9個の蛋白から構成され、同一分子上にSLEに特異的に検出される抗Sm抗体との反応性も認められることから、その抗原の精製は必ずしも容易ではなかった。MBL社はリコンビナント抗原を用いることにより、抗U1 RNP抗体を特異的に検出するMESACUP RNP (およびMESACUP RNP II; MSRII)キットを開発した。しかし、U1 RNPの特異な構造に起因し、一部のDID陽性血清がこの測

定系と反応しないという問題を有していた。そこで、この点を解決する目的で、新たな測定系、MESACUP-2 RNP(MSR2)を開発した。今回、我々は自験患者を対象とし、MSR2の特異性および臨床的意義についてMSR Iと比較検討し、改良の結果もたらされた抗U1 RNA抗体への新たな反応性のメカニズムについて解析したので報告する。

### B. 研究方法

#### 対象

厚生省の診断の手引きの基準を満たすMCTD199例、シェーグレン症候群(SJS)20例、アメリカリウマチ協会(ACR)の分類基準を満たすSLE119例、慢性関節リウマチ(RA)33例、SSc20例、およびBohanの診断基準を満たすPMもしくは皮膚筋炎(DM)25例を対象とした。

#### 方法

1)MESACUPキットによるELISA

MSR1キットは大腸菌の遺伝子組換え操作により作成したU1 RNA抗原のリコンビナント70kDa、AおよびC蛋白をマイクロカップに固相化している。これに対し、MSR2キットでは昆虫細胞系の遺伝子組換え操作により作成したHis-tagged 70kDa、AおよびC蛋白上述の3種の蛋白に加え、*in vitro* transcription系で発現させたU1 RNAを上述の蛋白と結合させ、固相化している。各ANAの検出は添付の能書きに従って実施した。また、付属の標準血清と被験血清のOD450nmを測定し、以下の数式にてIndex値を求めた。
$$\text{Index} = (\text{検体の吸光度} - \text{Calibrator 1の吸光度}) \div (\text{Calibrator 2の吸光度} - \text{Calibrator 1の吸光度}) \times 100$$
(Calibrator1は陰性標準液で、Calibrator2は陽性標準液) MSR1キットでは15、MSR2キットでは22以上のindex値を陽性とした。

### 2)U1 RNAを抗原としたELISA

メチル化BSAを50  $\mu\text{g/ml}$ の濃度でマイクロタイタープレートの各ウェルに100  $\mu\text{l}$ ずつ添加し、25°Cで2時間放置した後、各ウェルから反応液を除去した。その後、リコンビナントU1 RNPを25  $\mu\text{g/ml}$ の濃度に10mM Tris、0.05% Tween20、1mM EDTAで希釈し、その100  $\mu\text{l}$ を各ウェルに添加、4°Cで一晩放置してプレート上に吸着させた。ブロッキングを行った後、被験血清の反応は上述の方法に準じて行った。

### 3)免疫沈降法(IP)

HeLa cell抽出液およびリコンビナントU1 RNPを抗原源とし、抗U1 RNP血清との反応性を検討した。proteinA-Sepharose 2mgと500  $\mu\text{l}$ のIPP buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 500mM NaCl, 0.1%NP-40)、および抗U1 RNP陽性患者血清20  $\mu\text{l}$ を混合し、4°Cでovernight rotateさせ、proteinA-Sepharose上に抗体を吸着させた。その後、IPP buffer 500 $\mu\text{l}$ で3回洗浄、最後の上清を捨てた後にNET-2buffer(50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl) 400  $\mu\text{l}$ を添加し、さらにHeLa cell extractの200  $\mu\text{l}$ を加えて4°C、2時間rotateすることにより、検体中のIgGとHeLa cell extract中の抗原を反応させた。この結合物を5回洗浄し、最後の上清を捨てた後、除蛋白を行った。その後、900  $\mu\text{l}$ の冷エタノールを添加し、-80°Cで1時間冷却後、遠心してRNAを沈殿させた。この沈降されたRNAを、7M尿素-10% polyacrylamide gelで泳動し、銀染色にて分析した。リコンビナントU1 RNAのIPは5mg/mlに調整した抗原溶液の20  $\mu\text{l}$ を添加し、上述の方法に準じて行った。また、U1 RNP 100  $\mu\text{g/ml}$ を含むPBS中にHis-tagged 70kDa蛋白(5.5  $\mu\text{g/ml}$ )、A蛋白(2.7  $\mu\text{g/ml}$ )ある

いはC蛋白(1.8  $\mu\text{g/ml}$ )を添加し、25°Cで10分反応させることよりU1 RNA-蛋白複合体を形成し、これらの分子と抗His tag抗体(MBL社製) および抗U1 RNP血清とのIPを上述の方法に準じて行なった。

## C. 結果

### 1) 各種膠原病血清のMSR1とMSR2への反応性の比較

同一膠原病患者血清を対象とし、MSR1とMSR2の両測定系にて検出された抗U1 RNP抗体のindex値は有意に相関した( $r=0.8456$ ,  $P<0.0001$ )。この際、従来のMSR1キットで低値を示していた群が改良法のMSR2で高いindex値を示す傾向が認められ、後者がより高い感度を有していることが示唆された。次に、各種膠原病疾患別に両測定系における抗U1 RNP抗体の出現率を比較すると(表1)、MSR2ではMCTDの98.5%、SLEの42.0%、SjSの16.0%、PPSSの5%、PM/DMの4.0%に抗U1 RNP抗体が検出され、MSR1の検出率に対し、SScを除く全ての疾患群でより高率になっていた。

### 2)DIDとの比較検討

次に、上述の患者血清を対象とし、抗U1 RNP抗体の検出率をDID法と比較検討した(表2)。DIDでは246例で抗U1 RNP抗体が陽性で、175例が陰性となった。246例のDID陽性血清の両ELISAにおける反応性を検討すると、MSR2では全例が陽性となったのに対し、MSR1では88.2%に止まった。一方、175例のDID陰性血清のうち3.4%がMSR2で、2.9%がMSR1で陽性となった。それぞれの感度および特異度はMSR2で感度100.0および93.2%、MSR1では感度88.2および特異度75.0%となっていた。図1はDIDにおける反応性と両ELISAのindex値の関係を示すが、MCTDおよびSLEを中心にMSR1では多数の症例でDID陽性血清が陰性となっている。

### 3)ELISAおよびIPによるDID陽性-MSR1陰性血清のU1 RNAへの反応性の検討

改良法のMSR2ではDID陽性の検体が全例陽性となったのに対し、MSR1では10.1%の血清が陰性となった。そこで改良法がどのような機序でその反応性が高まっているのかDID陽性-MSR1陰性の13血清を対象に検討を加えた。まず、これら血清をHeLa cell抽出液を抗原源としたIPで分析すると、全血清でU1 RNAの沈降が認められ、抗U1 RNP抗体が陽性であることが確認された。そこで改良法にて新たに添加された抗原であるU1 RNAに対する反応性をELISAおよびIPで検討したが、ELISAで3例、IPで2例が反応を示したのみであった(図2; lane3、5、表3)。

4) U1 RNA と U1 RNP 蛋白抗原の結合性と DID 陽性-MSRII 陰性血清の反応性

上述の結果から、MSR2 における反応性の向上は、ただ単に U1 RNP を添加したことに依存していないことが明らかとなった。そこで、U1 RNP の各リコンビナント蛋白を U1 RNA に加えることで両者の特異的な結合が形成されているかどうか IP を用いて解析した (図 3)。His-tagged 70kDa, A および C 蛋白をそれぞれ個々に、もしくは 3 者同時に U1 RNA と混合して反応させ、その後、His-tag に対する抗体を用い、U1 RNA とこれらの蛋白の結合性について解析した。その結果、測定系に用いられた U1 RNA と 70kDa および A 蛋白は U1 RNA と混和する過程で結合し、C 蛋白はそれのみでは U1 RNA と結合していないことが確認された。次に、これらの各 U1 RNA-リコンビナント U1 RNP 蛋白複合体に対する DID 陽性-MSRII 陰性血清の反応性を IP で検討した。その結果、全ての血清が U1 RNA-70kDa 蛋白複合体と反応するもの(図 4 左、lane3-10)、U1 RNA-A 蛋白複合体とは 2 例のみが反応を示すことが明らかとなった (図 4 右、lane3;内 1 例の反応を示す)。

D. 考案

U1 RNA には stem-loop I から IV までの 4 つの loop が認められ、このうち 70kDa が stem-loop I、A 蛋白が stem-loop II に直接結合するのに対し(1,2)、C 蛋白には RNA に直接結合する部位がなく、他の蛋白を介して

U1 RNP 上に結合していることが報告されている(3)。以前から DID にて陽性の抗 U1 RNP 血清の一部が U1 RNP の単離蛋白を用いた ELISA で陰性となることが知られ、その反応性の相違にはこれら一連の蛋白と RNA が結合することによって生じる何らかの立体構造が関与している可能性が示唆されていた(4)。今回の我々の検討で、この様な抗 U1 RNP 抗体の反応性は、主として U1 RNA が 70kDa 蛋白に結合する事によって生じる立体構造に起因していることが示された。さらに一部の血清は U1 RNA-A 蛋白複合体にも反応することも明らかにされた。新たに開発された MSR2 はこの U1 RNP の立体構造を再構築することによって DID と同等の反応性を確保していることが確認され、抗 U1 RNP 抗体を測定する上で感度および特異性の点でも優れた方法であることが示された。

文 献

1. Query CC, Bentley RC, Keene DJ: A specific 31-nucleotide domain of U1 RNA interacts with the 70K small nuclear ribonucleoprotein component. *Mol Cell Biol* 9: 4872-4881, 1989.
2. Lutz-Freyermuth C, Query CC, Keene JD: Quantitative determination that one of two potential RNA-binding domains of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex binds with high affinity to stem-loop II of U1 RNA. *Proc Acad Sci USA* 87: 6393-6397, 1999.
3. Nelissen RLH, Heinrichs V, Habets WJ, Simons F, Luhrmann R, van Venrooji WJ: Zinc-finger like structure in U1-specific protein C is essential for specific binding to U1 snRNP. *Nucleic Acid Res* 19: 449-454, 1991.
4. MESACUP RNP, Sm, SS-A および SS-B kit の特異性および臨床的意義の検討. 浅野正直, 高崎芳成, 官川 薫, 矢野哲郎, 川口里江子, 山中健次郎, 橋本博史, 廣瀬俊一. *医学と薬学* 29: 765-773, 1993.

表 1 MESACUP-2 RNP と MESACUP RNP II による各種膠原病における抗 U1 RNP 抗体の検出率

疾患名	患者数	MESACUP-2 RNP (%)	MESACUP RNP II (%)
MCTD	199	98.5	89.9
SLE	119	42.0	32.8
SjS	25	16.0	4.0
SSc	20	5.0	10.0
PM/DM	25	4.0	4.0
RA	33	0.0	0.0

表 2 DID と各 ELISA における抗 U1 RNP 抗体

DID	患者数	ELISA			
		MESACUP-2 RNP (%)		MESACUP RNP II (%)	
		陽性	陰性	陽性	陰性
陽性	246	100.0	0.0	88.2	11.8
陰性	175	3.4	96.6	2.9	97.1

表 3 MESACUP RNP II テスト陰性 DID 陽性血清の免疫沈降法および ELISA による反応性の検討

患者 No.	DID	ELISA			IP	
		MESACUP-2 RNP	MESACUP RNP II	U1 RNA	Hela cell	U1 RNA
1	+	+( 52.7)	-( 9.9)	-( 0.7)	+	-
2	+	+(128.4)	-( 9.9)	+( 1.4)	+	-
3	+	+(115.0)	-(11.1)	+( 2.6)	+	+
4	+	+(100.7)	-(10.9)	-( 0.8)	+	-
5	+	+( 51.4)	-(12.0)	+( 1.7)	+	+
6	+	+( 78.4)	-( 5.2)	-( 0.6)	+	-
7	+	+( 66.2)	-( 5.8)	-( 0.5)	+	-
8	+	+( 69.7)	-( 5.6)	-( 0.4)	+	-
9	+	+( 53.4)	-(10.1)	-( 0.6)	+	-
10	+	+( 65.6)	-( 7.5)	-( 0.3)	+	-
11	+	+( 76.9)	-(11.6)	-( 0.3)	+	-
12	+	+( 61.2)	-( 4.8)	-( 0.6)	+	-
13	+	+( 40.4)	-(10.2)	-( 0.7)	+	-

( ): %

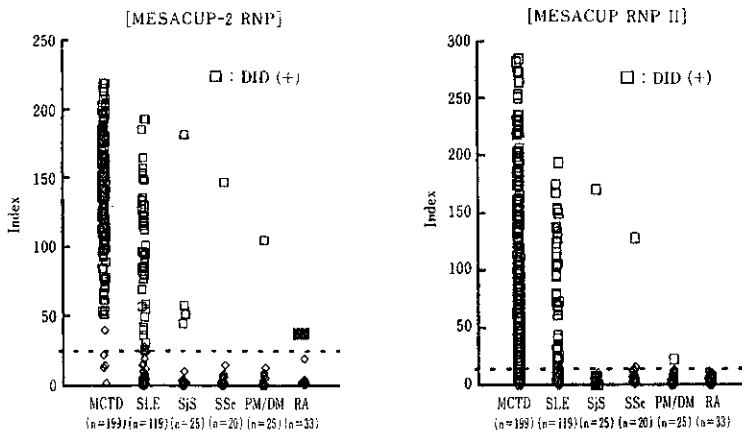


図1 二重免疫拡散法 (DID) 陽性抗 U1 RNP 抗体の MESACUP-2 RNP および MESACUP RNP II での反応性。破線は正常上限。

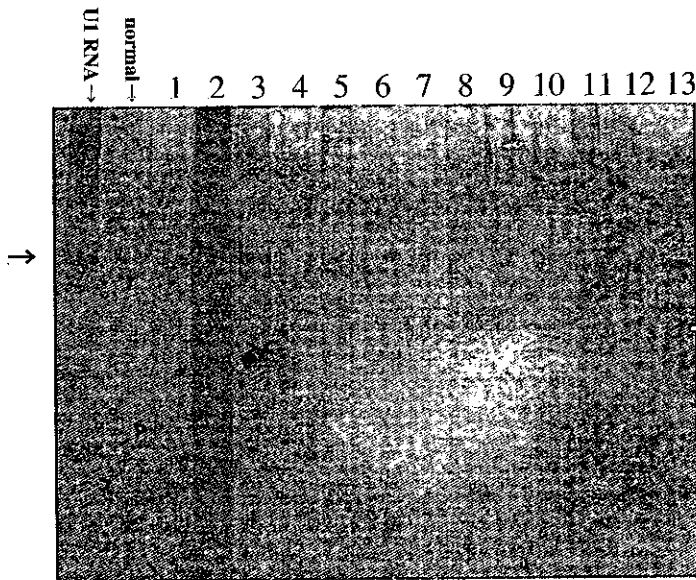


図2 リコンビナント U1 RNA を抗原源とした DID 陽性-MESACUP RNP II ELISA 陰性血清の IP。Lane 3 および 5 の血清は U1 RNA と反応し、それを沈降させている (lane 2 は除蛋白が不完全で非特異的な染色を認め、判読不能となっている)。

○	○	○	○	○	○	○	U1 RNA
	○				○		U1 RNP-70k
		○			○		U1 RNP-A
			○	○			U1 RNP-C
					○		60k Ro

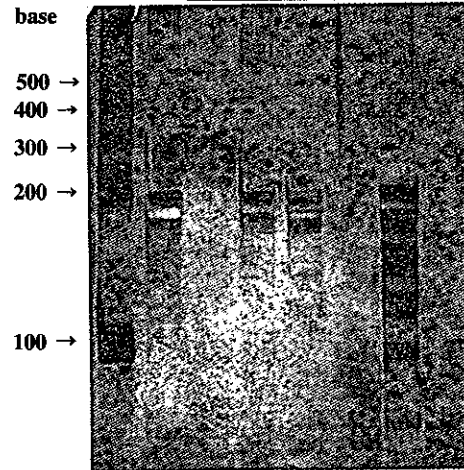


図3 リコンビナント U1 RNA と His-tagged 70 kDa, A および C 蛋白の IP による結合性の検討。U1 RNA と 70 kDa および A 蛋白は U1 RNA と混和する過程で結合し、抗 His-tag 抗体に反応して U1 RNA が検出されている。それに対し C 蛋白は U1 RNA との結合が認められなかった。

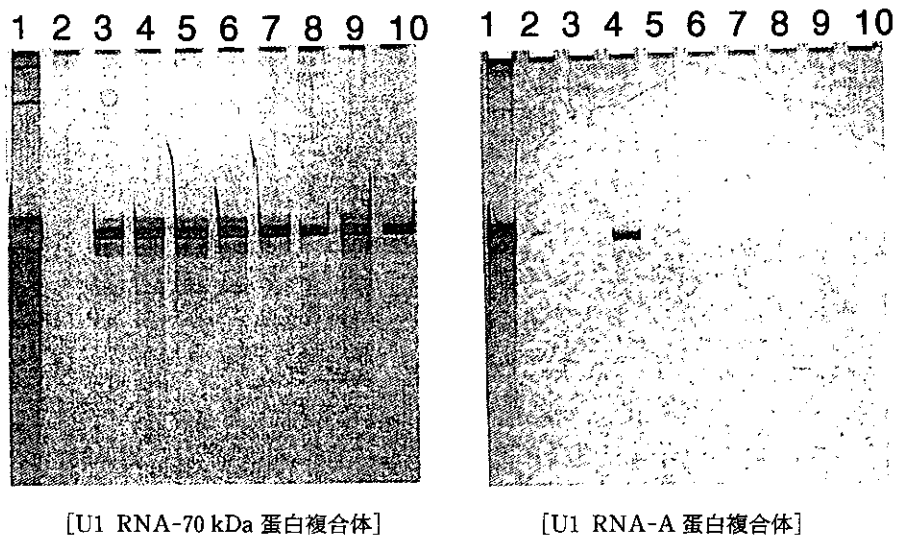


図4 U1 RNA-リコンビナント 70 kDa および A 蛋白複合体に対する DID 陽性-MESACUP RNP II ELISA 陰性血清の反応性の IP による検討。13 血清のうち、10 例の結果を示す (lane 3~10, lane 1 は U1 RNA, lane 2 は正常人血清)。

## **DETECTION OF ANTI-U1 RNP ANTIBODIES REACTIVE WITH THE CONFORMATION-STRUCTURE ON U1 RNP**

Yoshinari Takasaki<sup>1)</sup>, Akihiro Murakami<sup>2)</sup>, Ken Takeuchi<sup>1)</sup>, Kazuhiko Kaneda<sup>1)</sup>, Tetsuro Yano<sup>1)</sup>, Keigo Ikeda<sup>1)</sup>, Masakazu Matsushita<sup>1)</sup>, Masuyuki Nawata<sup>1)</sup>, Ran Matsudaira<sup>1)</sup>, Hiroshi Hashimoto<sup>1)</sup>

Department of Internal Medicine and Rheumatology, Juntendo University School of Medicine<sup>1)</sup>  
Medical & Biological Laboratories<sup>2)</sup>

Using sera from 199 patients with mixed connective tissue disease, 119 with systemic lupus erythematosus, 20 with scleroderma, 25 with polymyositis/dermatomyositis and 30 with rheumatoid arthritis, sensitivity and specificity of an ELISA using recombinant U1 RNA, and 70 kDa, A and C polypeptides of U1 RNP (MESACUP-2 RNP; MSR2) were studied. In addition, the conformation-structures on U1 RNP reactive with autoantibodies were analyzed. Two hundreds and forty-five sera were positive for anti-U1 RNP in double immunodiffusion(DID), and all those sera were positive in MSR2. In contrast, 13 out of them were negative in ELISA using recombinant 70 kDa, A and C polypeptides without U1 RNA (MESACUP RNP II; MSRII). Three of these 13 sera reacted with U1 RNA in ELISA and immunoprecipitation but others were negative suggesting that reactivities of these sera in MSRII were not depending upon the epitopes on U1 RNA. Then, we tested the reactivities of these 13 sera to the complex of U1 RNA and U1 RNP polypeptides, 70 kDa, A and C polypeptides and found that all those sera were reactive with the U1 RNA-70 kDa complex. These data suggest that MSR2 is useful to detect anti-U1 RNP antibodies that can specifically react with the conformation-structure on U1 RNP.

## 11. 抗U1-RNP抗体および抗dsDNA抗体の内皮細胞抗体活性

分担研究者 : 青塚 新一  
研究協力者 : 大川 雅子、上床 周、木下 牧子、隅谷 護人  
所属施設 : 国立国際医療センター研究所

### 研究要旨

抗U1-RNP抗体(Anti-U1RNP)や抗dsDNA抗体(Anti-dsDNA)が単球のサイトカイン産生を促進し、肺動脈血管内皮細胞(HPAEC)の接着分子発現を誘導する事を既に報告したが、今回これらの自己抗体の内皮細胞抗体(AEC)活性を検討した。Anti-U1RNP および Anti-dsDNA陽性患者血清からIgG分画を得、精製Anti-U1RNPは、アフィニティカラムで精製した。AEC活性は、HPAEC-CELL-ELISAで測定した。またNP40で可溶化したHPAECの膜画分について、イムノブロットングによる解析を行った。(1) Anti-U1RNP陽性IgG、Anti-dsDNA陽性IgG、精製Anti-U1RNPは、有意なAEC活性を呈した。(2)AEC活性は、U1-RNPセファロースおよびdsDNAセファロースで、その一部が吸収された。(3)精製Anti-U1RNPは、膜画分中の数個のペプチドと反応した。Anti-U1RNPとAnti-dsDNAはAEC活性を持ち、精製Anti-U1RNPは、HPAEC膜上のU1-RNP構成成分やその分解物と思われるペプチドと反応した。

### A. 研究目的

抗U1-RNP抗体や抗dsDNA抗体が、単球のサイトカイン産生(IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ )を促進し(1)、肺動脈血管内皮細胞(HPAEC)の接着分子やMHC分子の発現を誘導する事(2)を既に報告した。今回、その機序のひとつとして、自己抗体、特に抗U1-RNP抗体について、内皮細胞上に存在するエピトープを認識すると仮定し、その抗内皮細胞抗体活性を検討した。

### B. 研究方法

1. 抗U1-RNP抗体陽性または抗dsDNA抗体陽性患者血清からProtein GカラムによりIgG分画を得た。
2. 精製抗U1-RNP抗体は、U1-RNPアフィニティカラムにより得た。
3. 抗内皮細胞抗体活性は、肺動脈血管内皮細胞(HPAEC)を用いたcell-ELISAにより測定した。すなわち、コンフルエントになった内皮細胞を固定し、ブロッキング後、血清やIgG抗体を反応させ、洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体を反応させ、発色させた。

4. 抗U1-RNP抗体が反応する内皮細胞上のエピトープの解析は、NP40処理したHPAECの膜画分について、イムノブロットングによる解析を行った。

### C. 研究結果

1. 抗U1-RNP抗体陽性患者血清と健常人血清の抗内皮細胞活性: 抗U1-RNP抗体陽性患者血清と健常人血清を600倍希釈した時の抗内皮細胞抗体活性を示した。抗U1-RNP抗体陽性血清の抗内皮細胞抗体活性は、健常人血清に比較して有意に高値であった( $p < 0.01$ 、図1)。
2. 抗U1-RNP抗体陽性IgG、抗dsDNA抗体陽性IgG、健常人IgGの抗内皮細胞活性: 図2に、抗U1-RNP抗体陽性IgG、抗dsDNA抗体陽性IgG、健常人IgGの抗内皮細胞抗体活性を示した。抗U1-RNP抗体陽性IgGおよび抗dsDNA抗体陽性IgGの抗内皮細胞抗体活性は、健常人IgGに比較して有意に高値であった( $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$ ; 図1)。
3. U1-RNPセファロースで吸収した抗U1-RNP抗

体陽性 IgG 分画の抗内皮細胞抗体活性および抗 U1-RNP 抗体活性：図 3 に、抗 U1-RNP 抗体陽性 IgG 分画を U1-RNP セファロースで吸収した後の抗内皮細胞抗体活性および抗 U1-RNP 抗体活性を示した。BSA セファロースで吸収した対照と比較すると、抗内皮細胞抗体活性 ( $p < 0.01$ ) および、抗 U1-RNP 抗体活性 ( $p < 0.001$ ) とも、有意に減少した。このことから、抗 U1-RNP 抗体陽性 IgG 分画の抗内皮細胞抗体活性の一部は、U1-RNP あるいは交叉反応性エピトープとの結合に由来することが示唆された。

4. 抗 U1-RNP 抗体陽性 IgG 分画の抗内皮細胞抗体活性と抗 U1-RNP 抗体活性との相関：抗 U1-RNP 抗体陽性 IgG 分画の抗内皮細胞抗体活性と抗 U1-RNP 抗体活性の間には有意な相関が認められた ( $rs=0.632$ ,  $p < 0.01$ , 図 4)。

5. DsDNA セルロースで吸収した抗 dsDNA 抗体陽性 IgG 分画の抗内皮細胞抗体活性および抗 dsDNA 抗体活性：図 5 に、抗 dsDNA 抗体陽性 IgG 分画を dsDNA セルロースで吸収した後の抗内皮細胞抗体活性および抗 dsDNA 抗体活性を示した。BSA セファロースで吸収した対照と比較すると、抗 dsDNA 抗体陽性 IgG の抗内皮細胞抗体活性 ( $p < 0.05$ ) および抗 dsDNA 抗体活性 ( $p < 0.001$ ) は有意に減少した。このことから、抗 dsDNA 抗体陽性 IgG 分画中の抗内皮細胞抗体活性も、dsDNA あるいは交叉反応性エピトープとの結合に由来することが示唆された。

6. 精製 IgG 抗 U1-RNP 抗体、抗 U1-RNP 抗体除去 IgG 分画、 $F(ab')_2$  抗 U1-RNP 抗体の抗内皮細胞抗体活性：精製 IgG 抗 U1-RNP 抗体の抗内皮細胞抗体活性を示した。精製 IgG 抗 U1-RNP 抗体は、高い抗内皮細胞抗体活性を濃度依存的に認める一方、抗 U1-RNP 抗体除去 IgG 分画では、抗内皮細胞抗体活性の低下が認められた。さらに、抗 U1-RNP 抗体を  $F(ab')_2$  にして検討したが、同様に、濃度依存的に有意な抗内皮細胞抗体活性が認められた (図 6)。このことから、抗 U1-RNP 抗体は、Fc リセプターへ非特異的に結合するのではなく、内皮細胞上の何らかのエピトープを特異的に認識することが示唆された。

7. 抗 U1-RNP 抗体が認識する抗原の解析：既知の自己抗原を転写したニトロセルロース膜ストリップをイムノブロッキング用として市販されているもの (アフィニテック社) に、精製抗 U1-RNP 抗体を反応させ、アルカリフォスファターゼ染色により結合するバ

ンドの検討を行なった (図 7 - 下図)。陽性対照のバンドを左に示した。左から、Ribosomal P、Jo-1、Scl-70、SS-B、SS-A、Sm/U1-RNP である。右には、精製抗 U1-RNP 抗体 11 検体、正常人 IgG 10 検体の結果を示した。精製抗 U1-RNP 抗体の 11 検体中 10 検体が U1-RNP の構成成分である 68kDa ペプチドと反応した。その他にも RNP の構成成分である A 鎖 33kDa のペプチドと反応した抗体が 9 検体、B' の 26kDa のペプチドと反応した抗体が 7 検体、B の 25kDa のペプチドと反応した抗体が 2 検体、認められた。このほかにもいくつかのバンドが認められたが、既知のものとは異なり、どのような抗原に反応したのか不明である。

8. 抗 U1-RNP 抗体が認識する NP40 処理内皮細胞膜画分のエピトープの解析：図 7 - 上図に、NP40 処理内皮細胞膜画分と抗 U1-RNP 抗体を反応させた結果を示した。下図と同一患者である精製抗 U1-RNP 抗体 11 検体、正常人 IgG 10 検体を示した。精製抗 U1-RNP 抗体では、種々のバンドが認められたが、RNP の構成成分と思われる 68kDa と反応した抗体が 9 検体、33kDa(A) と反応した抗体が 11 検体、29kDa(B') と反応した抗体が 6 検体、28kDa(B) と反応した抗体が 9 検体で、これは、市販のストリップで検討した結果とほぼ一致した。このほかに認められたバンドは、90, 48, 43, 38kDa などであった。正常人 IgG については、市販のストリップで認められた 3 人のバンドは、NP40 処理内皮細胞膜画分でも同じような所に認められ、その他に認められたバンドは、90, 48, 43, 33 などであった。

9. ニトロセルロース膜ストリップと内皮細胞膜画分の結果の比較：NP40 処理内皮細胞画分、ニトロセルロース膜ストリップとも、同じ患者の精製抗 U1-RNP 抗体が結合する RNP 関連抗原については、ほとんど同じ位置にバンドが認められ、既知の抗原である RNP 構成成分の 68K、A 鎖、B' 鎖、B 鎖に反応していることが確認された。NP40 処理内皮細胞膜画分で、38kD にバンドが認められた抗 U1-RNP 抗体が 11 検体中 3 検体あったが、これは、70kD の分解産物に対して反応したバンドと考えられる。1 - 3 の抗 U1-RNP 抗体は肺高血圧症を有する MCTD 患者から得られたもので、3 検体中 2 検体が 38kD にバンドが認められていることが注目された。

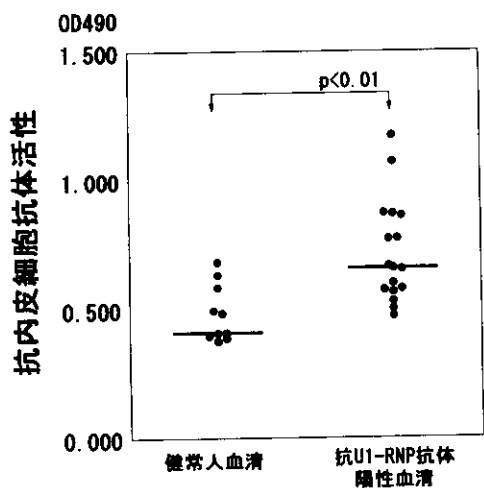


図1、ヒト肺動脈血管内皮細胞を用いた場合の600倍希釈血清中の抗内皮細胞抗体活性。

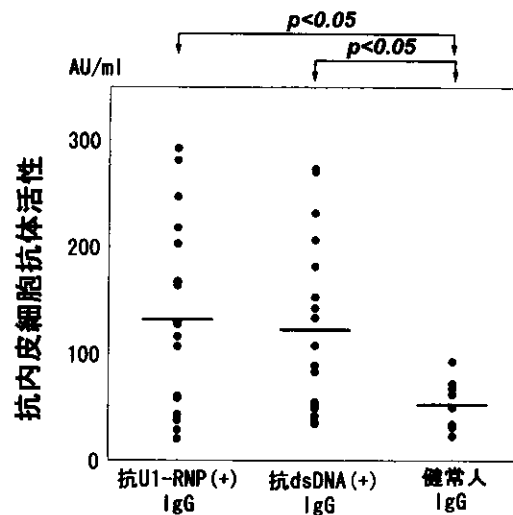


図2、抗U1-RNP抗体陽性IgG、抗dsDNA抗体陽性IgG、健常人IgGの抗内皮細胞抗体活性。

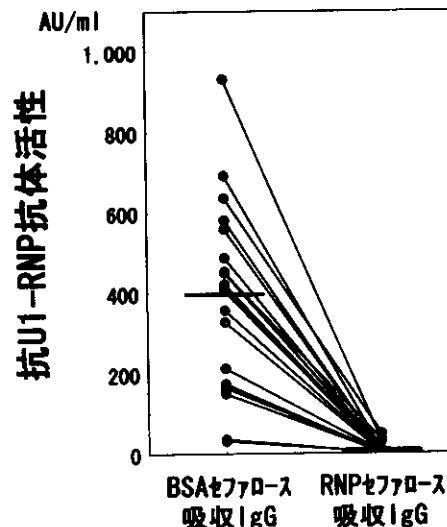
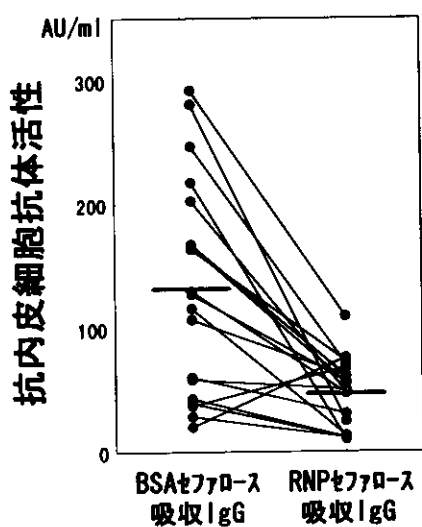


図3、RNP-sepharoseで吸収した場合の抗U1-RNP抗体陽性IgGの抗内皮細胞抗体活性と抗U1-RNP抗体活性。

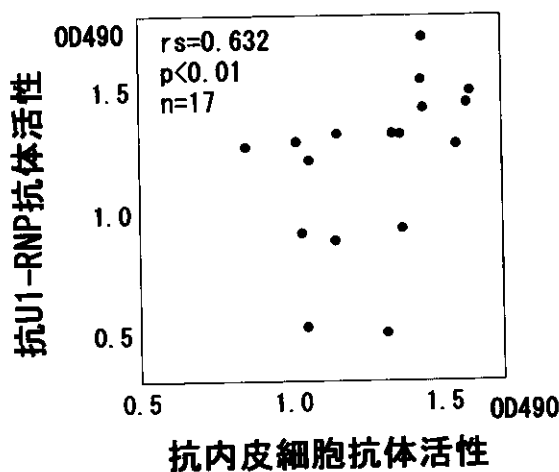


図4、抗U1-RNP抗体陽性IgGの抗内皮細胞抗体活性と抗U1-RNP抗体活性との関連。



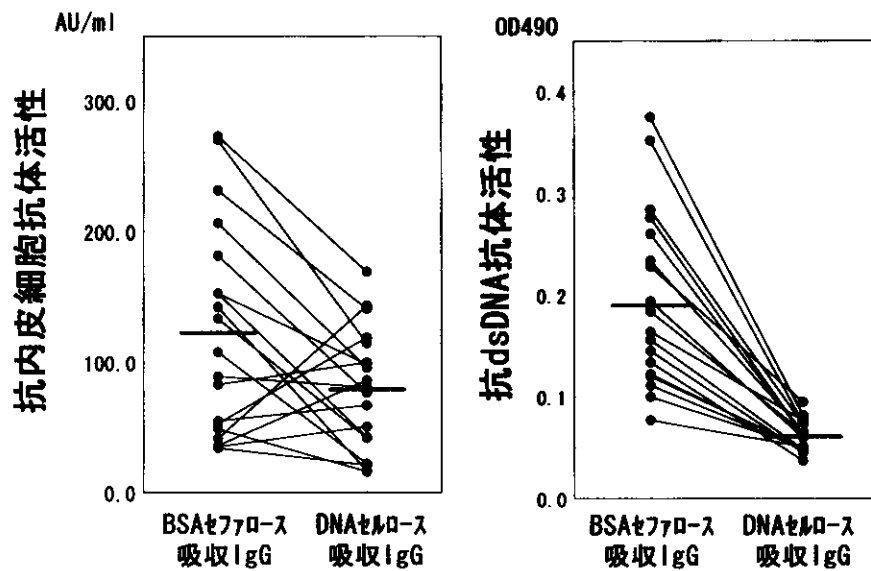


図5、DNA-celluloseで吸収した場合の抗dsDNA抗体陽性IgGの抗内皮細胞抗体活性と抗dsDNA抗体活性。

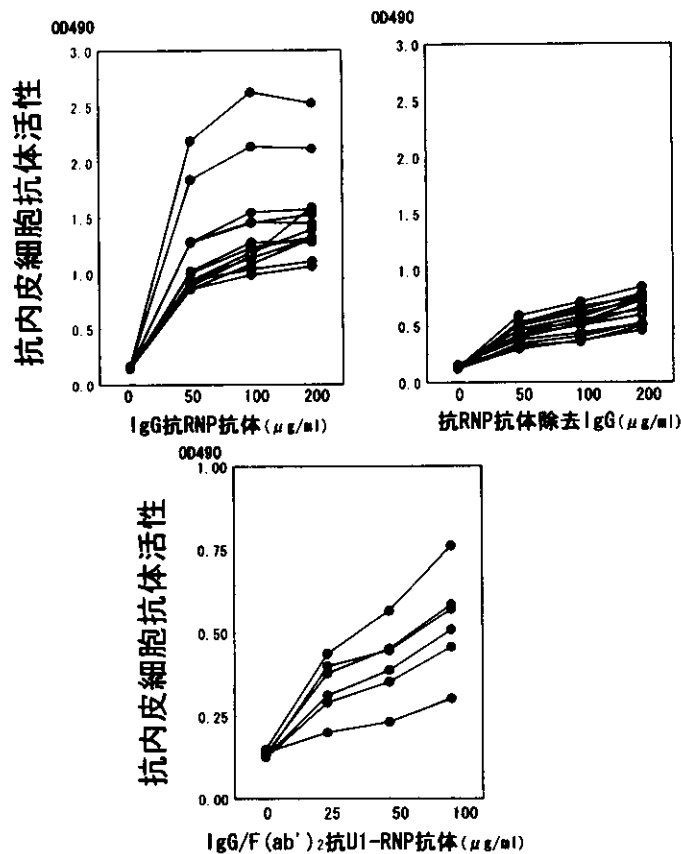


図6、精製IgG抗RNP抗体、抗RNP抗体除去IgG分画、IgG/F(ab')<sub>2</sub>抗RNP抗体の抗内皮細胞抗体活性。

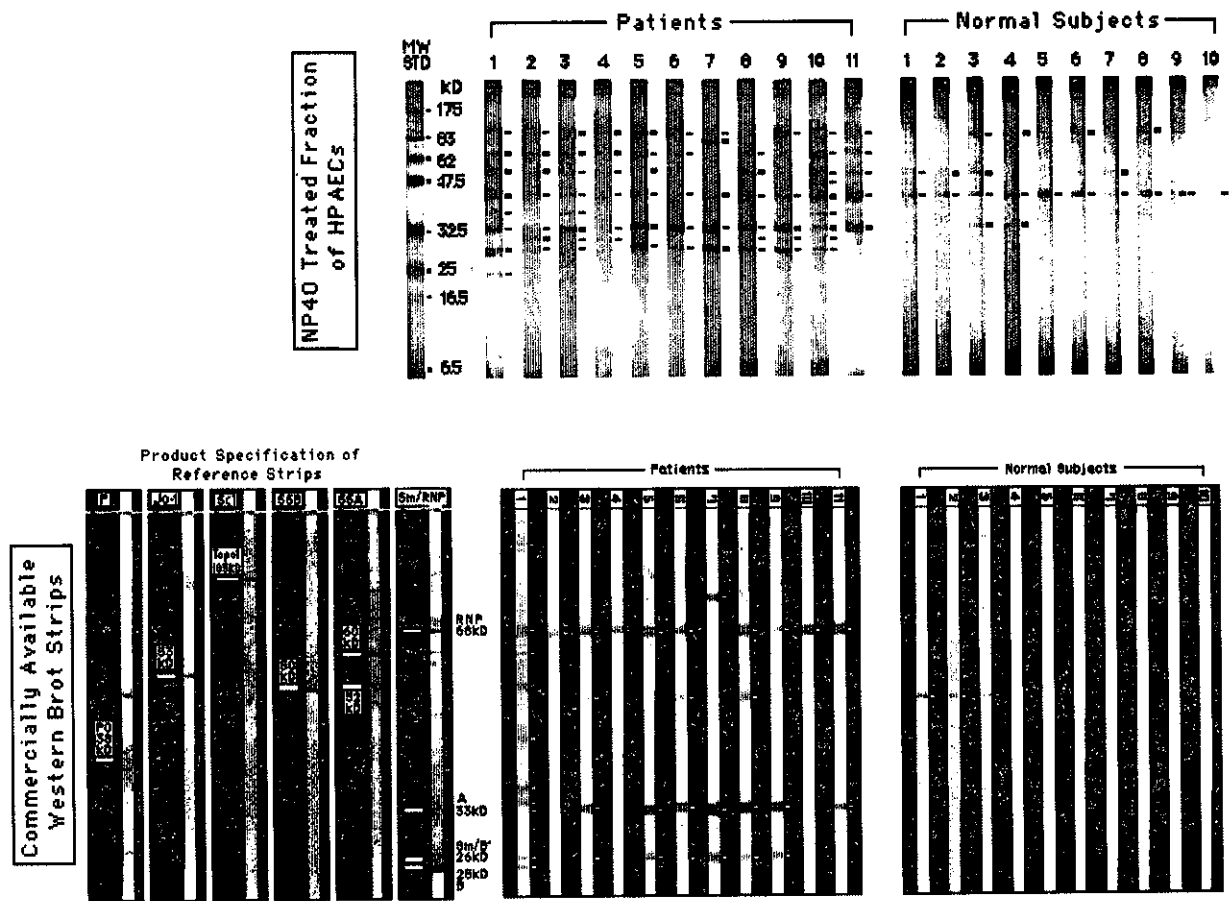


図7、既知の抗原をブロットングした市販のニトロセルロースストリップとNP40処理肺血管内皮細胞膜画分を用いた、抗U1-RNP抗体が認識する内皮細胞上エピトープの解析。

## D. 考案

今回の検討により、抗U1-RNP抗体と抗dsDNA抗体は、抗内皮細胞抗体活性を持ち、精製抗U1-RNP抗体は、肺動脈血管内皮細胞上のU1-RNP構成成分やその分解産物と思われるペプチドと反応することを確認した。このことから、抗U1-RNP抗体について言えることは、内皮細胞膜上のRNP構成成分やアポトーシスを起こした内皮細胞のRNP分解産物などに抗体が直接結合し、接着分子の発現亢進の引き金になることが推測された。抗U1-RNP抗体陽性IgG、抗dsDNA抗体陽性IgGは有意な抗内皮細胞抗体活性を持つことが認められた。精製抗U1-RNP抗体は、有意な抗内皮細胞抗体活性があり、この活性は、F(ab')<sub>2</sub>分画にしても残存した。抗U1-RNP抗体陽性IgGの抗内皮細胞抗体活性はRNPセファロスで吸収され、抗dsDNA抗体陽性IgGの抗内皮細胞抗体活性はDNAセファロスで吸収された。Immuno blotting法により精製抗U1-RNP抗体が反応する内皮細胞膜画分中のエピトープとして、U1-RNPの構成成分と思われる68, 33, 29, 28, 24kDaのペプチドの他、90, 48, 43, 38kDaのペプチドにも反応した。40kDa前後のバンドは、70kDaが分解したものである可能性が考えられた。Casciola-Rosenら(3)は、アポトーシスを起こした細胞では70kDaのタンパクから40kDaのフラグメントが作られていると報告されていて、私たちの示した38kDaというバンドがほぼ同一の大きさと言える。

## E. 結論

抗U1-RNP抗体や抗dsDNA抗体が、肺動脈血管内皮細胞(HPAEC)の接着分子やMHC分子の発現を誘導する機序のひとつとして、特に抗U1-RNP抗体が、内皮細胞上に存在するエピトープを認識する機序が示唆された。

## 文 献

1. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Uwatoko S, Sumiya M, Yokohari R.: Enhanced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes cultured in the presence of autoantibodies against U1-ribonucleoprotein and/or negatively charged molecules: implication in the pathogenesis of pulmonary hypertension in mixed connective tissue disease (MCTD). *Clin Exp Immunol* 98:427-33, 1994.
2. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Fujinami M, Uwatoko S, Kinoshita M, Sumiya M: Up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelial leukocyte 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.
3. Casciola-Rosen LA, Miller DK, Anhalt GJ, Rosen A: Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem* 269: 30757-60, 1994.

## **ENDOTHELIAL-CELL-BINDING ACTIVITY OF ANTI-U1-RIBONUCLEOPROTEIN ANTIBODIES IN PATIENTS WITH CONNECTIVE TISSUE DISEASES**

Shinichi Aotsuka<sup>1)</sup>, Masako Okawa-Takatsuji<sup>1)</sup>, Shu Uwatoko<sup>1)</sup>,  
Makiko Kinoshita<sup>2)</sup>, and Morito Sumiya<sup>2)</sup>

Division of Clinical Immunology, Research Institute<sup>1)</sup>, Division of Rheumatology<sup>2)</sup> International Medical Center of Japan

To clarify the pathogenic role of anti-U1-ribonucleoprotein (RNP) antibody, we examined endothelial-cell-binding by anti-U1-RNP antibodies in patients with connective tissue diseases (CTD) and epitopes on human pulmonary artery endothelial cells (HPAECs), to which the autoantibody bound. IgG positive for anti-U1-RNP from patients with CTD bound to the HPAECs. Furthermore, intact and F(ab')<sub>2</sub> IgG anti-U1-RNP purified by affinity chromatography also bound to endothelial cells. The binding activity of IgG positive for anti-U1-RNP to the endothelial cells could be effectively absorbed by U1-RNP-Sepharose. An immuno-blotting assay of purified IgG anti-U1-RNP antibodies showed that these antibodies could bind to various membrane proteins of NP40-treated HPAECs of molecular weights 68, 48, 43, 38, 33, 29, 28, and 24 kDa. Some bands—68, 33, 29, 28, and 24 kDa seemed to correspond to components of U1-RNP—68 kDa, A, B', B, and C peptides, respectively. Enough binding activity to react with epitopes other than U1-RNP on the surface of endothelial cells remained in the anti-U1-RNP-depleted IgG fractions and in normal IgG. We conclude that anti-U1-RNP antibodies can recognize a variety of antigens on the endothelial surface of the pulmonary artery, including the components of U1-RNP and other unknown polypeptides. Binding of anti-U1-RNP antibody to epitopes on HPAECs may induce up-regulation of adhesion molecules on the cells. This suggests that these autoantibodies may cause endothelial cell derangement and lead to proliferative vasculopathy.