

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

SLE における難治性病態の早期診断と
治療に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

March 2001

平成 13 年 3 月

主任研究者 小 池 隆 夫

—目次—

(1) 構成員名簿	3
(2) 総括研究報告書	7
SLE における難治性病態の早期診断と治療に関する研究	
小池 隆夫	9
(3) 分担研究報告書	17
1. SLE における難治性病態の早期診断と治療：間質性肺炎	
土肥 眞	19
2. 抗リン脂質抗体症候群における抗プロトロンビン抗体	
—T細胞エピトープ解析—	
住田 孝之	22
3. エストロゲン応答遺伝子の SLE 病態、難治化への関与の可能性	
小池 竜司	24
4. MRI 拡散強調画像を利用した、ループス腎炎患者における早期診断法の確立	
江口 勝美	28
5. 抗リン脂質抗体症候群患者由来のフォ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の特異性とトロンビン生成への影響	
小池 隆夫	31
(4) 研究成果の刊行に関する一覧表	34

(1) 構成員名簿

SLEにおける難治性疾患病態の早期診断と治療研究班

区分	氏名	所属施設名	職名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態内科学分野	教授
分担協力者	江口 勝美	長崎大学医学部附属病院内科学第一講座	教授
	住田 孝之	筑波大学臨床医学系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）	教授
	小池 竜司	東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科生態環境応答学系専攻生体応答学講座	助手
	土肥 真	東京大学医学部医学部附属病院アレルギー・リウマチ科	助手
(事務局) 経理事務連絡 担当責任者	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態内科学分野 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL (011) 716-11616 (内5913) FAX (011) 706-7710	講師

(2) 平成 12 年度総括研究報告書
(特定疾患対策研究事業)

主任研究者 小池 隆夫

北海道大学大学院医学研究科
分子病態制御学講座・第二内科

総括研究者報告書

SLE における難治性病態の早期診断と治療

主任研究者 小池 隆夫
(北海道大学医学部内科学第二講座)

研究要旨

全身性エリテマトーデス (SLE) は、多彩な自己抗体の出現と腎や中枢神経系をはじめ、多臓器障害を特徴とする、代表的な自己免疫疾患である。近年、早期診断や早期からの積極的な治療により、本症の生命予後は著しく改善したが、あらゆる治療に抵抗する難治性の病態も依然として存在する。本研究ではその中から血栓症と習慣流産を伴う抗リン脂質抗体症候群、間質性肺炎及び難治性腎炎の 3 つの難治性病態に焦点を絞り、それらの病因を明らかにし、早期診断法を確立し、治療法の開発を試みた。

抗リン脂質抗体症候群に関しては、全身性エリテマトーデス等の自己免疫患者血中に、プロトロンビンに対する抗体がしばしば認められ、動・静脈血栓症、習慣流産等の抗リン脂質抗体症候群の症状と関連することが明らかにされてきた。抗プロトロンビン抗体の測定は、フォスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを認識する抗体 (抗 PS/PT 抗体) として検出する方法と、酸素原子が導入されたプレートに固相化されてプロトロンビンに対する抗体 (抗 PT 抗体) として検出する方法の 2 種類があるが、抗 SP/PT 抗体の方が、より臨床像との関連することが示されてきた。抗 PS/PT 抗体の特異性と、凝固への影響を検討するため、抗リン脂質抗体症候群患者末梢血リンパ球より、EBV による形質転換と、体細胞融合法を併用し、モノクローナル抗プロトロンビン抗体を 4 クローン作成した。4 クローン中 1 クローンは、酸素化プレートに固相化した PT にも結合したが、残りの 3 クローンは結合しなかった。全てのクローンは、プロトロンビンのフラグメント 1 には結合しなかった。トロンビン生成に対する影響を検討したモノクローナル抗 PS/PT 抗体 HG-4 は、トロンビン生成を阻害し、ループスアンチコアグラント様の活性を持つことが示された。抗 PS/PT 抗体には、酸素化されたプレートに固相化されたプロトロンビンに結合する群としない群がありその特異性には多様性があることが示され、抗プロトロンビン抗体を測定する上でこの多様性に注意する必要がある。また、抗 PS/PT 抗体には、ループスアンチコアグラント活性を持つものが示された。

抗プロトロンビン抗体の産生機序を解明するために、抗体産生をヘルプする T 細胞の認識抗原 (T 細胞エピトープ) について分子レベルで解析した。その結果、fragment-1、prethrombin-1 にそれぞれ T 細胞エピトープが存在すること、B 細胞エピトープに近い領域に存在する事が判明した。

間質性肺炎に関しては、間質性肺炎の臨床的マーカーとして血液中の KL-6 値が注目されている。KL-6 の傷害肺における意義を明らかにするために、動物実験モデルを用いた検討

を行った。マウスにブレオマイシンを投与して間質性肺炎・肺線維症を惹起し、KL-6/MUC1の発現を解析した。肺における発現は、傷害に対する修復機序である、肝細胞増殖因子(HGF)/c-Met系の発現と同様の経過をとった。KL-6の発現は、傷害部位の近傍の正常肺胞上皮細胞で最も強く認められた。以上より、KL-6は肺に対する傷害の存在と、それに対する修復機序の存在を反映しており、今後、潜在性の間質性肺炎の早期診断に有用である可能性が考えられた。

SLEは生殖年齢の女性に好発し、特に若年女性患者においては典型的な病型を呈して重篤な糸球体腎炎を伴うことが多いことから、女性ホルモンがその病態形成に重要な役割を果たしているとの仮説を立てた。ステロイドホルモンは核内転写制御因子でもあるレセプターに結合し、他の遺伝子発現を制御することで主に作用を発現することから、代表的な女性ホルモンであるエストロゲンによって免疫系細胞で発現変化が見られる遺伝子群をDNAマイクロアレイ法を用いて検討した。その結果T-B細胞相互作用に重要な機能を有するCD40分子の発現がBリンパ球系細胞株において発現が低下するのをはじめ、いくつかの遺伝子の発現変化が認められた。全体としては強い一定の傾向は見出せないものの、自己抗原の誘導、apoptosisの抑制といった傾向と、炎症反応や免疫応答の活性化を抑制する傾向が認められたことから、エストロゲン自身はSLEの病態維持には作用するものの急性炎症反応に対しては抑制的に作用することが推察され、特にSLEの発病や急性期の病態には性周期などに伴う血中濃度変化や、他のホルモンとのバランスなどが関与している可能性が推測された。

SLEにおける難治性病態の一つであるループス腎炎を早期に診断するため、非侵襲的検査法であるMRI(核磁気共鳴映像)を使用した。設定条件を決定する目的でループス腎炎のモデルマウスであるMRL/lprマウスを使用、MRI撮影(9.4T)を行った。麻酔下生存マウスにおける腎臓MRIでは、呼吸性移動、心拍のアーチファクトの影響で腎皮質病変の詳細な描出は困難であった。また、ループス腎炎患者の腎臓MRI撮影(1T)においても、腎皮質・髄質の区別はついたが、腎皮質病変の詳細な描出は困難であった。今後、MRI機器の解像度の向上を待たなければ、ループス腎炎患者の腎病変の描出は困難と考えられたため、腎臓MRIを拡散強調画像で撮影することによって、機能的に評価できないか検討したところ、早期ループス腎炎患者の腎皮質部の見かけの拡散係数(apparent diffusion coefficient; ADC)値が正常者に比べ増加していた。腎臓MRI拡散強調画像の腎皮質部のADC値の上昇が、ループス腎炎の早期診断に有用である可能性が示唆された。

A.研究目的

一般的なSLE患者の生命予後は本症の早期発見が可能となり、また治療法の大幅な進歩により著しく改善されてきた。しかし、抗リン脂質抗体症候群、間質性肺炎、難治性ループス腎炎のような難治性の病態も存在し、患者のOQLや生命予後を著しく阻害している。抗リン脂質抗体症候群はSLEに最も多く併発し、特に脳梗塞に代表される動脈系の血栓症が約半数の患者に認めら

れる。またSLE患者の流産の最大の原因ともなっている。間質性肺炎はSLE患者において肺高血圧や肺胞出血と同様に、患者の生命予後を左右する重大な肺合併症である。またループス腎炎の中にはあらゆる治療に抵抗し腎不全に進行する、極めて難治な一群が存在する。本研究の目的は、多彩なSLEの病態の中から上記の抗リン脂質抗体に起因する病態(動・静脈血栓症、習慣流産、血小板減少及びCNSループスの一部)、間

質性肺炎及び難治性ループス腎炎の3つの病態に焦点を絞り、それらの病因、早期診断及び新たな治療法を開発し、患者のOQLや生命予後の改善を計るものである。

B. 研究方法

1) 抗リン脂質抗体症候群：

①モノクローナル抗 PS/PT 抗体の作成：抗リン脂質抗体症候群患者末梢血より、磁気ビーズを用いて CD20 陽性細胞を分離し、EB ウィルスを用いて 96 穴プレートにて不死化した。抗 PS/PT 抗体産生細胞を含む細胞集団を SHMD-33 細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを作成し抗 PS/PT 抗体産生細胞を限界希釈法にてクローニングした。

②特異性の検討：作成したモノクローナル抗体の、フォスファチジルセリンに結合したプロトロンビン (PS/PT) と、酸素化プレートに固相化されたプロトロンビンへの反応性を固相酵素抗体法にて検討した。さらに、プロトロンビンをトロンビンで処理して作成し精製したフラグメント 1 へのモノクローナル抗 PS/PT 抗体の結合性を、フォスファチジルセリンを固相化したプレートを用いた固相酵素抗体法にて検討した。陽性コントロールとして、ヒトプロトロンビンを免疫して作成したポリクローナル抗ヒトプロトロンビン抗体を用いた。精製したリン脂質、ファクター V、ファクター X、カルシウムよりなるプロトロンビナーゼ複合体による、プロトロンビンからトロンビンの生成に対する、モノクローナル抗 PS/PT 抗体、HG-4 の影響を検討した。トロンビン生成量は合成基質を用いて測定した。

リコンビナント蛋白の作成：全長を含む 6 種類のリコンビナント蛋白 (全長、d318, AA1-106, d594, AA1-198, d942, AA1-314, d1059, AA1-353, d1458, AA1-486) を作成するために、それぞれをコードした DNA を PCR で作成し、pGEX-6p-1 発現ベクターに

組み込んだのち、BL21 E.coli に導入し、リコンビナント蛋白を発現させた。E.coli を sonication 後、不溶性画分を SDS-PAGE にて展開し、リコンビナント蛋白をゲルより切り出し、BioRad 社製 Model422 Electro-Eluter にて精製した。精製蛋白は SDS-PAGE にて検定した。

T 細胞応答：患者末梢血単核球 10⁶/ml を精製したリコンビナント蛋白 (10-50mg/ml) とともに 10%FCS を含む RPMI1640 メディウムで 4 日間培養し、BrdU 添加後 24h 後に OD 値を測定し T 細胞の増殖反応を検討した。5 日目の培養上清中の IL-2 濃度を ELISA キットで測定した。

2) 間質性肺炎：

雄 C57/Bl6 マウスに Bleomycin 0.1 単位を生理食塩水 40_l に溶解して気管内投与し、経時的に屠殺して検体を採取した。それぞれの検体について、KL-6/MUC 1 の肺における発現について検討した。加えて、傷害による肺の線維化の指標として hydroxyproline 量を、修復機序の指標として HGF/c-Met を使い、KL-6/MUC 1 の発現と比較検討した。

3) 難治性ループス腎炎：

免疫担当細胞のプロトタイプとして B リンパ球系細胞株である Raji、T リンパ球系細胞株である Jurkat、マクロファージ系細胞株である U937 を、activated charcoal でステロイド分画を吸着させた FCS を 10% 含むフェノールレッド除去 RPMI 培地で starve した後 10⁻⁶M の 17 β -estradiol を添加して 48 時間培養し、RNA を回収した。これらを Clontech 社 Human I・II DNA microarray system によって特異的プライマーを作製し、同メンブレンとハイブリダイズを行った後専用ソフトで解析を行い、17 β -estradiol 添加、非添加サンプルの間で差を認めた遺伝子をリスト

アップした。発現変化を認めた遺伝子のうち免疫応答に関与することが認知されているものの一部について、フローサイトメトリーやウェスタンブロット法によって蛋白レベルでの発現の違いを検証するとともに、発現変化を認めた遺伝子群について広くその生理的意義を調査し、全体として免疫応答や SLE の病態に対する関与について考察を試みた。

長崎大学熱帯医学研究所施設内マウス専用 MRI 装置(SPECTROSPIN 400, 9.4T, Bruker 社)を使用して、ループス腎炎のモデルマウスである MRL/lpr マウスの腎臓 MRI 撮影を行った。腎生検直前のループス腎炎患者の腎臓 MRI を T1・T2 画像にて撮影した(1T, GE Yokogawa 社)。ループス腎炎患者 5 例の腎臓 MRI を拡散強調画像で撮影した。各撮影条件における見かけの拡散係数 (apparent diffusion coefficient; ADC)を測定、正常者 5 例と比較した。

C. 研究結果

抗リン脂質抗体症候群

1. 抗 PS/PT 抗体の特異性

IgM クラスの抗 PS/PT 抗体産生細胞株を 4 クローン (HG-4, KE-6, KF-5, KF-6) 樹立した。

4 クローンのうち 3 クローン (HG-4, KF-5, KF-6) は、PS/PT のみに結合したが、KE-6 は、PS/PT にも、酸素化ポリスチレンプレートに固相化されたプロトロンビンにも結合した。作成した全てのモノクローナル抗 PS/PT 抗体は、フラグメント 1 に結合せず、プロトロンビンのみに結合した。陽性コントロールとして用いたポリクローナル抗プロトロンビン抗体は、フラグメント 1 と、プロトロンビンの両者に結合した。

2. トロンビン生成に対する影響

作成したモノクローナル抗 PS/PT 抗体、HG-4 の、プロトロンビナーゼ複合体による

トロンビン生成への影響を検討した。HG-4 は、濃度依存性にプロトロンビンの生成を阻害した。プロトロンビナーゼ複合体作成のため添加したフォスファチジルセリンを増量するとこの阻害作用は弱くなった。

T 細胞増殖反応では全長のプロトロンビンリコンビナント蛋白に対して細胞増殖反応を呈したのは 3 名 (30%) であった。

T 細胞エピトープの解析では、症例 1 が全長のリコンビナント蛋白に対して S.I.が 1.8-2.4 と細胞増殖反応を呈したが、fragment-1 をコードする d594 に対しては有意な増殖反応を示さなかった(S.I.=1.1)。このことは、症例 1 ではプロトロンビンの prethrombin-1 上に T 細胞エピトープがあることを示している。一方、他の二症例では、全長および AA1-198 (fragment-1) に対して、S.I.3.0 と 2.5、および、S.I.1.7 と 2.8 と有意な細胞増殖反応を呈した。以上の結果は、症例 2 と 3 では、プロトロンビンの fragment-1 に major T 細胞エピトープが存在している事を示している。

間質性肺炎

1) 投与後 3 日目より、肺胞腔内に好中球を主体とした炎症細胞が浸潤し始め、1 週間でピークを迎えた後、漸減した。2) hydroxyproline 量は、経過とともに投与 12 週まで漸増した。3) HGF と c-Met レセプターの肺での発現も、傷害の進展に対応して増強し、投与 2~4 週でピークを示した後、漸減した。4) mRNA レベルでは、KL-6/MUC1 の発現の経過は、HGF, c-Met の発現と同様の傾向を示した。5) 免疫組織化学的な検討では、MUC1 蛋白は、線維化を生じた傷害部のすぐ近傍に位置し、活発に再生していると考えられる肺胞上皮細胞に強く発現していたが、健常部における発現は弱かった。6) 肺傷害の程度が軽減するにつれて、修復機転の発現も低下し

た。以上より、KL-6 の発現は、修復システムである HGF/c-Met 系と連動する事が明らかとなった。

ループス腎炎

多くの遺伝子発現の変動が観察され、エストロゲンが免疫応答に対して多彩かつ複雑な影響を与えている可能性が推察された。これらの中で免疫応答の成立に重要な役割を果たしていることがすでに明らかとされている遺伝子として、B リンパ球系細胞株 Raji において CD40 の発現が estradiol 添加に伴って減弱するのが認められた。この現象はフローサイトメトリーとウェスタンブロットによって蛋白質レベルでも確認され、抗 CD40 抗体と IL-4 による刺激への反応性の低下も認められた。またマクロファージ系細胞株 U937 においては、CD4 リンパ球の初期分化に関連すると報告されている early growth response gene-1 (hEGR-1) の発現が減弱することがウェスタンブロットで確認された。また、すでにエストロゲンによって発現が誘導されることが知られている hsp27 も比較的強く誘導される結果が得られた。全体の遺伝子発現の変動は必ずしも免疫応答に対する作用において一定の傾向を示しているものではなかったが、炎症反応と apoptosis に対しては抑制的に作用し (IL-1、caspase の発現減弱)、自己抗原性を指摘されている遺伝子発現の誘導 (hsp60、topoisomerase I など) が認められ、このような結果をもとに SLE の疾患成立や難治化に対してどのように関与するかについて考察を行った。

麻酔下生存マウスにおける腎臓 MRI では、腎皮質と腎髄質の区別はついたが、腎皮質病変の描出は困難であった。その原因として、呼吸性移動、心拍のアーチファクトの影響が大きかった。フロリナート中の腎臓 MRI 像では、MRL/lpr マウス、Balb/c マ

ウスともに、組織染色のスライスに匹敵する解像度が得られた。

ループス腎炎患者の腎臓 MRI においても、腎皮質と腎髄質の区別はついたが、腎皮質病変の描出は困難であった。その原因として、呼吸性移動、MRI 自体の解像度の問題が大きかった。

傾斜磁場係数 (gradient factor)=500 [sec/mm²]にてループス腎炎患者は正常者に比べ、ADC値が有意に増加していた。

D. 考察

抗リン脂質抗体症候群

作成したモノクローナル抗 PS/PT 抗体の多くが、酸素化ポリスチレンプレートに固相化されたプロトロンビンに結合しないこと。モノクローナル抗 PS/PT 抗体の内 1 クロームは、両者に結合した。また、これまでの報告では、抗 PS/PT 抗体と抗 PT 抗体の抗リン脂質抗体症候群の臨床像との関連性が異なることより、プロトロンビンに対する抗体は、抗 PS/PT 抗体と、抗 PT 抗体、および抗 SP/PT 抗体と抗 PT 抗体の両者の性質を持った抗体とに分けることができると考えられた。これら 3 群の抗プロトロンビン抗体の臨床的意義を今後検討していく必要がある。

現在、抗プロトロンビン抗体として、酸素化プレートに固相化されたプロトロンビンに対する抗体が測定されることが多い。しかし、抗 PS/PT 抗体が、抗 PT 抗体より、有意に抗リン脂質抗体症候群の臨床像との関連が深いことが報告されており、臨床の場において、抗 PT 抗体とは異なる自己抗体群と考えられる抗 PS/PT 抗体も測定する必要があると考えられる。抗 PS/PT 抗体と抗 PT 抗体の両者の性質を持った抗体と、抗 PS/PT 抗体の性質のみを持った抗体の、臨床的意

義の異同については今後の検討課題と考えられる。

抗 PS/PT 抗体は、トロンビンのフラグメント 1 に結合しないことより、そのエピトープは、トロンビンの酵素活性部位があるプロトロンビン 1 上にある可能性がある。抗 PS/PT 抗体が、トロンビンの生体内での活性・機能を変化させ、血栓傾向を惹起する可能性が考えられる。

HG4 が、トロンビン生成をリン脂質の濃度依存性に阻害することより、抗 PS/PT 抗体がループスアンチコアグラント活性を持つことが示唆された。ループスアンチコアグラントは、SLE によくみられる抗リン脂質抗体症候群の病態と関連した重要な抗体であるが、定量的な検出方法がなかった。抗 PS/PT 抗体かを測定することにより、ループスアンチコアグラントの一部が定量的に測定できる可能性が示唆された。

プロトロンビンの T 細胞エピトープも B 細胞エピトープと同様に、fragment-1 あるいは prethrombin-1 に存在していると推察される。特に一症例では、T 細胞エピトープと B 細胞エピトープが同じ prethrombin-1 に存在していることから、T 細胞、B 細胞が認識するエピトープは近傍に存在している可能性が示唆された。今後、合成アミノ酸を用いた T 細胞エピトープのマッピングを進めていく。T 細胞が認識する T 細胞エピトープがアミノ酸レベルで解析されれば、そのアナログペプチドを介した、抗プロトロンビン抗体産生の特異的制御も魅力的な治療戦略として期待されよう。

間質性肺炎

KL-6 産生は、その時点での傷害に対する修復機転（肺胞上皮細胞の増殖）を反映している可能性が考えられ、同時に、修復機序を起動させる元となった、背景にある傷害の存在を示唆していると考えられた。

従って、間質性肺炎症例で認められる血清 KL-6 の上昇は、単に傷害を受けた肺組織から放出されて血中で上昇している事を意味しているのでは無い。前述した様に、KL-6 は、肺傷害そのものの指標というよりは、むしろ修復機序を通して傷害を反映していると考えられる。

一方、KL-6/MUC1 そのものに修復作用があるかについては明らかではない。KL-6 そのものには、線維芽細胞に対する遊走活性がある。この事は、通常の組織修復においては、KL-6/MUC1 が正常の組織への修復にかかわる可能性を示唆しているが、間質性肺炎においては、むしろ肺腔内の線維化を促進する可能性も考えられる。このことは、線維芽細胞自身が修復因子である HGF を産生することと対照的である。すなわち、傷害を促進させる因子と修復因子とは、独立した事象ではなく、生体内で互いに関連した複雑なネットワークを形成していると考えられることもできる。

以上の検討によって、KL-6 は、胸部写真や呼吸機能検査、動脈血ガス分析などの検査では異常を示さない段階での、早期の肺傷害を検出できる可能性が示唆される。今後、膠原病そのものによる病変に加えて、薬剤性、日和見感染など種々の原因により引き起こされる間質性肺炎で、潜在性の肺傷害の早期診断にもとづく早期治療が可能となることが期待される。

ループス腎炎

エストロゲンは自己抗原を誘導し apoptosis を抑制することより、自己反応性リンパ球や自己抗体産生細胞の生存を維持することによって SLE の病態の維持や持続に関与する可能性が予想され、これまでになされてきたいくつかの報告に合致するものであった。いっぽう昨年までのわれわれの研究や近年の報告を併せて考えると、急性期炎症応答やそれに伴う免疫系の活性化に対して

は、エストロゲン自身は一部の例外を除けば抑制的に作用すると考えられたことより、SLE 発病や急性期の病態に対しては性周期や生殖活動に伴う血中濃度の変動がむしろ関与すると推測した。今後さらに研究を進めて、さらに多数の遺伝子での解析を行い詳細なプロフィールを作製するとともに、性ホルモンの生理的血中濃度変動や他の性ホルモンの関与などを考慮に入れたアプローチも必要と思われる。

マウスおよびループス腎炎患者の腎臓 MRI の検討では、腎皮質の詳細な変化を画像上とらえることは、困難であった。そこで今回、腎臓 MRI の拡散強調画像を利用して機能的に評価できないか検討した。一般に正常腎では、水分が豊富で水の運動制限が少なく血流も豊富であるのに対し、慢性腎不全では線維化が生じるため、水分が比較的少なく水分子の運動制限は大きく血流も低下する。急性腎不全では細胞内浮腫のため水分子の運動制限を生じ、血流低下も生じる。これらの影響により、見かけの拡散係数 (ADC) 値は、正常、急性腎不全、慢性腎不全の順に低くなる。

まだクレアチニンの上昇がみられないループス腎炎患者 5 例の検討では、傾斜磁場係数 500 において、正常者に比べ、ADC 値が有意に増加していた。早期ループス腎炎患者において腎血流の増加はないことから、腎皮質内の拡散運動が増加している可能性が考えられる。今後、早期ループス腎炎患者に加え、腎不全をきたしたループス腎炎患者も検討、症例を増やし、なぜ ADC 値が増加するか考察したい。

臨床への応用として、たとえば、SLE 患者に定期的に侵襲のない腎臓 MRI を施行、腎皮質部の ADC 値が上昇してきたら、ループス腎炎発症を考え、腎生検、および治療を行う。また、経過中正常者の値より低い値がみられれば、腎不全へ進行している可能性も考えられる。

E. 結論

全身性エリテマトーデス (SLE) は、多彩な自己抗体の出現と腎や中枢神経系をはじめ、多臓器障害を特徴とする、代表的な自己免疫疾患である。近年、早期診断や早期からの積極的な治療により、本症の生命予後は著しく改善したが、あらゆる治療に抵抗する難治性の病態も依然として存在する。本研究ではその中から血栓症と習慣流産を伴う抗リン脂質抗体症候群、間質性肺炎及び難治性腎炎の 3 つの難治性病態に焦点を絞り、それらの病因を明らかにし、早期診断法を確立し、治療法の開発を試みた。

抗リン脂質抗体症候群に関する研究では、抗プロトロンビン抗体は、プロトロンビンとフォスファチジルセリンの複合体を認識する抗体 (抗 PS/PT 抗体)、酸素化プレートに固相化されたプロトロンビンを認識する抗体 (抗 PT 抗体)、両者の性質を持った抗体に分けることができる。抗リン脂質抗体症候群の臨床像と抗 PS/PT 抗体の関連が示唆されており、今後、抗 PS/PT 抗体を測定することが重要と考えられた。抗 PS/PT 抗体と、抗 PT 抗体の両者の性質を持った抗体と抗 PS/PT 抗体の性質のみを持った抗体の臨床的意義に違いがあるのか否かについては、今後の検討課題と考える。また、ループスアンチコアグラントの一部は、抗 PS/PT であることが示された。また、プロトロンビンの T 細胞エピトープは fragment-1 あるいは prethrombin-1 に存在することもあきらかになった。

間質性肺炎に関しては、KL-6 の増加は、肺に対する傷害と、それに対応する生体の修復機転の活性化を反映していると考えられた。今後、臨床的に潜在性の間質性肺炎の早期診断に有用であると考えられた。

ループス腎炎に関しては、代表的な女性ホルモンであるエストロゲンは、自己抗原の誘導や apoptosis の抑制によって、自己免疫

病態の維持に関与していることが予想されるが、急性期免疫応答に対しては抑制的に作用するため、SLEの急性期や免疫応答活性化を伴う状況に対しては、性周期などに伴う血中濃度の変動が重要である可能性があり、特に若年女性患者においてはこのような二面性をもってSLEの病態や難治化に関与していると推測された。これらをさらに明らかにしていくことによって、低用量ホルモン製剤やテストステロン誘導体などを用いてホルモン変動を安定化することによってSLEの難治化や病状の遷延を抑制できる可能性もある。

ループス腎炎の画像診断に関しては、今後、MRI機器の解像度の向上を待たなければ、画像上でのループス腎炎患者の腎病変の描出は困難と考えられた。腎臓MRI拡散強調画像の腎皮質部のADC値の上昇が、ループス腎炎の早期診断に有用である可能性が示唆された。

(3) 平成 12 年度 分担研究者報告書
(特定疾患対策研究事業)

SLE における難治性病態の早期診断と治療：間質性肺炎

土肥 眞 （東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科）

研究要旨

近年、間質性肺炎の臨床的マーカーとして血液中の KL-6 値が注目されている。KL-6 の傷害肺における意義を明らかにするために、動物実験モデルを用いた検討を行った。マウスにブレオマイシンを投与して間質性肺炎・肺線維症を惹起し、KL-6/MUC1 の発現を解析した。肺における発現は、傷害に対する修復機序である、肝細胞増殖因子 (HGF)/c-Met 系の発現と同様の経過をとった。KL-6 の発現は、傷害部位の近傍の正常肺胞上皮細胞で最も強く認められた。以上より、KL-6 は肺に対する傷害の存在と、それに対する修復機序の存在を反映しており、今後、潜在性の間質性肺炎の早期診断に有用である可能性が考えられた。

A. 研究目的

SLE を始めとする膠原病に合併した間質性肺炎は、時として進行性の予後不良の経過をとるために、患者の生命予後を決定する重要な因子の一つであると考えられている。膠原病では、原病そのものに関連した間質性肺炎に加えて、薬剤や日和見感染によっても間質性肺炎が起きる事がある。現在、病態の中心的機序として、肺傷害の早期に肺胞上皮細胞が障害を受け、その結果、線維芽細胞が活性化されて肺胞腔内へ侵入してコラーゲンを産生し、不可逆性の線維化へと至る事が知られている。逆に、傷害の初期の段階で肺胞上皮細胞の増殖を促し、上皮層の再生・修復をはかることで、引き続く線維化への進展を抑えることができる可能性がある。昨年度の本研究で、我々は肺胞上皮細胞の増殖因子である肝細胞増殖因子 (HGF) と、そのレセプタ

ー(c-Met)とからなるシステムが、肺傷害に対する生体の重要な防御機序である事を明らかにした。

一方、実際の診療では、病変の存在をいかに早期に発見・診断し、速やかに適切な治療を行うかが、非常に重要である。近年、間質性肺炎の臨床的なマーカーとして、血中 KL-6 値の上昇が注目されている。KL-6 は mucin 1(MUC1)に分類される巨大な糖蛋白分子である。多くの間質性肺疾患で血清中の KL-6 が上昇することが知られており、鑑別診断、疾患活動性の評価、治療反応性の判定などに有用とされている。一方で、KL-6 の上昇が、傷害を受けた肺のどの様な事象を反映しているのかについては、これまで十分には検討されていない。

本年度研究の目的は、肺傷害と修復過程における、KL-6 の病変局所における発現に

ついて、マウスモデルを用いて検討することである。

B. 研究方法

雄 C57/Bl6 マウスに Bleomycin 0.1 単位を生理食塩水 40 μ l に溶解して気管内投与し、経時的に屠殺して検体を採取した。それぞれの検体について、KL-6/MUC1 の肺における発現について検討した。加えて、傷害による肺の線維化の指標として hydroxyproline 量を、修復機序の指標として HGF/c-Met を用い、KL-6/MUC1 の発現と比較検討した。

C. 研究結果

1) 投与後 3 日目より、肺胞腔内に好中球を主体とした炎症細胞が浸潤し始め、1 週間でピークを迎えた後、漸減した。2) hydroxyproline 量は、経過とともに投与 12 週まで漸増した。(Figure 1)。3) HGF と c-Met レセプターの肺での発現も、傷害の進展に対応して増強し、投与 2~4 週でピークを示した後、漸減した (Figure 2)。4) mRNA レベルでは、KL-6/MUC1 の発現の経過は、HGF、c-Met の発現と同様の傾向を示した (Figure 3)。5) 免疫組織化学的な検討では、MUC1 蛋白は、線維化を生じた傷害部のすぐ近傍に位置し、活発に再生していると考えられる肺胞上皮細胞に強く発現していたが、健常部における発現は弱かった。6) 肺傷害の程度が軽減するにつれて、修復機序の発現も低下した。以上より、KL-6 の発現は、修復システムである HGF/c-Met 系と連動する事が明らかとなった。

D. 考察

KL-6 産生は、その時点での傷害に対する修復機序（肺胞上皮細胞の増殖）を反映している可能性が考えられ、同時に、修復機序を起動させる元となった、背景にある傷害の存在を示唆していると考えられた。従って、間

質性肺炎症例で認められる血清 KL-6 の上昇は、単に傷害を受けた肺組織から放出されて血中で上昇している事を意味しているのでは無い。前述した様に、KL-6 は、肺傷害そのものの指標というよりは、むしろ修復機序を通して傷害を反映していると考えられる。

一方、KL-6/MUC1 そのものに修復作用があるかについては明らかではない。KL-6 そのものには、線維芽細胞に対する遊走活性がある。この事は、通常の組織修復においては、KL-6/MUC1 が正常の組織への修復にかかわる可能性を示唆しているが、間質性肺炎においては、むしろ肺胞腔内の線維化を促進する可能性も考えられる。このことは、線維芽細胞自身が修復因子である HGF を産生することと対照的である。すなわち、傷害を促進させる因子と修復因子とは、独立した事象ではなく、生体内で互いに関連した複雑なネットワークを形成していると考えられることもできる。

以上の検討によって、KL-6 は、胸部写真や呼吸機能検査、動脈血ガス分析などの検査では異常を示さない段階での、早期の肺傷害を検出できる可能性が示唆される。今後、膠原病そのものによる病変に加えて、薬剤性、日和見感染など種々の原因により引き起こされる間質性肺炎で、潜在性の肺傷害の早期診断にもとづく早期治療が可能となることが期待される。

E. 結論

KL-6 の増加は、肺に対する傷害と、それに対応する生体の修復機序の活性化を反映していると考えられた。今後、臨床的に潜在性の間質性肺炎の早期診断に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

1 論文発表

Dohi, M., Hasegawa, T., Yamamoto, K., Marshall, B.C.: Hepatocyte growth factor attenuates collagen accumulation in a murine model of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, 162:2302-2307. .

2. 学会発表

土肥眞：膠原病に合併した間質性肺炎における血中 KL-6 測定の診断的意義. 第 21 回臨床免疫学会総会シンポジウム「自己免疫疾患における臨床検査の進歩」2000 年、東京。抄録集。p.56.

H. 知的所有権の取得状況

特になし。

抗リン脂質抗体症候群における抗プロトロンビン抗体の T 細胞エピトープ に関する研究

住田孝之（筑波大学臨床医学系内科）

研究要旨

全身性エリテマトーデス（SLE）における難治性病態の一つとして、抗リン脂質抗体症候群が知られている。抗リン脂質抗体症候群(APS)の発症には、抗カルジオリピン抗体の他に抗プロトロンビン抗体が関与している。本研究では、抗プロトロンビン抗体の産生機序を解明するために、抗体産生をヘルプする T 細胞の認識抗原（T 細胞エピトープ）について分子レベルで解析した。その結果、fragment-1、prethrombin-1 にそれぞれ T 細胞エピトープが存在すること、B 細胞エピトープに近い領域に存在する事が判明した。

A.研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）における難治性病態の一つとして、抗リン脂質抗体症候群が知られている。抗リン脂質抗体症候群(APS)の発症には、抗カルジオリピン抗体の他に抗プロトロンビン抗体が関与していることが最近注目されてきた。我々は、抗プロトロンビン抗体の測定法を樹立し、リコンビナント蛋白を用いて抗体の B 細胞エピトープについて解析を進めてきた。その結果、1)抗リン脂質抗体症候群患者では、fragment-1 あるいは prethrombin-1 のどちらかに対する抗体が存在していること、2)プロトロンビンの二つのフラグメント（fragment-1 と prethrombin-1）を用いた B 細胞エピトープの解析では、それぞれのフラグメントに B 細胞エピトープが存在していること、3)5 種類のリコンビナント欠損蛋白を用いた結果、prethrombin-1 上の B 細胞エピトープは AA272-622 に存在している事、を明らかにしてきた。本研究では、抗プロトロンビン抗

体産生をヘルプする T 細胞の対応抗原（T 細胞エピトープ）をアミノ酸レベルで明らかにする事を目的とした。

B.研究方法

1) 対象：抗プロトロンビン抗体陽性の SLE 患者あるいは抗リン脂質抗体症候群患者 10 名を対象とした。
2) リコンビナント蛋白の作成：全長を含む 6 種類のリコンビナント蛋白（全長、d318, AA1-106、d594, AA1-198、d942, AA1-314、d1059, AA1-353、d1458, AA1-486)を作成するために、それぞれをコードした DNA を PCR で作成し、pGEX-6p-1 発現ベクターに組み込んだのち、BL21 E.coli に導入し、リコンビナント蛋白を発現させた。E.coli を sonication 後、不溶性画分を SDS-PAGE にて展開し、リコンビナント蛋白をゲルより切り出し、BioRad 社製 Model422 Electro-Eluter にて精製した。精製蛋白は SDS-PAGE にて検定した。

3) T細胞応答：患者末梢血単核球 106/ml を精製したリコンビナント蛋白 (10-50mg/ml) とともに 10%FCS を含む RPMI1640 メディウムで 4 日間培養し、BrdU 添加後 24h 後に OD 値を測定し T細胞の増殖反応を検討した。5 日目の培養上清中の IL-2 濃度を ELISA キットで測定した。

C.研究結果

stimulation index (S.I.) 1.5 以上を有意の T細胞増殖反応と定義した。

1) 全長のプロトロンビンリコンビナント蛋白に対して細胞増殖反応を呈したのは 3 名 (30%) であった。

2) T細胞エピトープの解析では、症例 1 が全長のリコンビナント蛋白に対して S.I.が 1.8-2.4 と細胞増殖反応を呈したが、fragment-1 をコードする d594 に対しては有為な増殖反応を示さなかった(S.I.=1.1)。このことは、症例 1 ではプロトロンビンの prethrombin-1 上に T細胞エピトープがあることを示している。一方、他の二症例では、全長および AA1-198 (fragment-1) に対して、S.I.3.0 と 2.5、および、S.I.1.7 と 2.8 と有意な細胞増殖反応を呈した。以上の結果は、症例 2 と 3 では、プロトロンビンの fragment-1 に major T細胞エピトープが存在している事を示している。

D.考察

プロトロンビンの T細胞エピトープも B細胞エピトープと同様に、fragment-1 あるいは prethrombin-1 に存在していると推察される。特に一症例では、T細胞エピトープと B細胞エピトープが同じ prethrombin-1 に存在していることから、T細胞、B細胞が認識するエピトープは近傍に存在している可能性が示唆された。今後、合成アミノ酸を用いた T細胞エピトープのマッピングを進めていく。T細胞が認識する T細胞エピトープがアミノ

酸レベルで解析されれば、そのアナログペプチドを介した、抗プロトロンビン抗体産生の特異的制御も魅力的な治療戦略として期待されよう。

E.結論

E.結論

プロトロンビンの T細胞エピトープは fragment-1 あるいは prethrombin-1 に存在する。

G.研究発表

1.論文発表

Akimoto, T., Akama, T., Saito, M., Kono, I., and Sumida, T.: Anti-prothrombin autoantibodies in gestational toxicosis and abortion. *Am. J. Med.* (in press).

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得 (予定)

プロトロンビンの T細胞エピトープおよびアナログペプチド。

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

エストロゲン応答遺伝子の SLE 病態、難治化への関与に関する研究

小池 竜司（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体応答調節学・第一内科）

研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)は生殖年齢の女性に好発し、特に若年女性患者においては典型的な病型を呈して重篤な糸球体腎炎を伴うことが多いことから、女性ホルモンがその病態形成に重要な役割を果たしているとの仮説を立てた。ステロイドホルモンは核内転写制御因子でもあるレセプターに結合し、他の遺伝子発現を制御することで主に作用を発現することから、代表的な女性ホルモンであるエストロゲンによって免疫系細胞で発現変化が見られる遺伝子群を DNA マイクロアレイ法を用いて検討した。その結果 T-B 細胞相互作用に重要な機能を有する CD40 分子の発現が B リンパ球系細胞株において発現が低下するのをはじめ、いくつかの遺伝子の発現変化が認められた。全体としては強い一定の傾向は見出せないものの、自己抗原の誘導、apoptosis の抑制といった傾向と、炎症反応や免疫応答の活性化を抑制する傾向が認められたことから、エストロゲン自身は SLE の病態維持には作用するものの急性炎症反応に対しては抑制的に作用することが推察され、特に SLE の発病や急性期の病態には性周期などに伴う血中濃度変化や、他のホルモンとのバランスなどが関与している可能性が推測された。

A.研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)は生殖年齢の女性に圧倒的に好発し、また多彩な症状を呈する症候群であるものの若年女性患者では糸球体腎炎を初めとする典型的かつ重篤な病型をとる傾向にある。また動物モデルでも雌が早期に重篤な症状で発病すること、一般的に女性において免疫応答や抗体産生が強いことが古くより多くの研究者によって観察されており、性と免疫応答の強弱との関連は常に指摘されてきた。

いっぽう代表的な女性ホルモンであるエストロゲンは生殖臓器に様々な作用をもたらすだけでなく、骨、血管、神経といった全身のあらゆる組織に対しても多彩な作用を及ぼすことが明らかとなっており、免疫系に対して

の影響を示した報告が蓄積されつつあるが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。

われわれは昨年までの本研究において、エストロゲンによって発現誘導される自己抗原性遺伝子 GOR の機能と疾患への関与について解析し、それを通じてエストロゲン自体は SLE の病態や免疫応答に対して抑制的に作用する可能性を指摘したが、単一遺伝子に着目した解析における限界も同時に認識した。そこで今年度は DNA マイクロアレイシステムを用いて、エストロゲン添加に伴い発現が変動する複数の遺伝子を同時に検討し、典型的かつ重篤な SLE の病態形成にどのように関与するかについて考察を行った。

B.研究方法