

INVESTIGATION OF FAMILIAL MCTD FROM PERSONAL CASE RECORDS OF THE NATIONAL EPIDEMIOLOGIC SURVEY OF MCTD

Kondo H and Okada J

Dept. of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine

We investigate the familial prevalence of MCTD using personal case records of the national epidemiologic survey of patients with MCTD.

We analyzed the data from 3626 cases entered between 1999 and 2001 year, in which we sought the incidence of familial cases. Furthermore, we send the questionnaires to the hospital, to which patients who had familial occurrence of MCTD belonged. We found 16 pairs of familial cases of MCTD in 3626 MCTD case records. There were 10 definite pairs of MCTD from the questionnaire survey. Parents-offspring was 7, and 2 sibs. The incidence of familial MCTD was 0.52% (19/3656) in this survey.

We found 10 familial pairs of MCTD. It is suggested to investigate the genetic analysis of MCTD using familial cases.

4. MCTD 合併肺高血圧症の治療指針（案）

分担研究者 : 吉田俊治¹
研究協力者 : 岡田 純²、近藤 啓文²、深谷修作¹
所属施設 : ¹藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科
²北里大学医学部内科

研究要旨

平成8年にMCTD班は、「MCTDの治療指針」を作成し、その中で肺高血圧症（PH）についても詳細な治療指針を提示した。今回は、今期の成績を加味してこれを改訂することを目的とした。今期のMCTD班では、膠原病合併PH（CTD-PH）の治療の現況に関するアンケート調査を、当初、臨床系班員施設で行い、ついで平成10年度に行われた全国疫学調査の2次調査として行った。また医学中央雑誌にて過去5年間に原発性PHおよびCTD-PHに関する文献を抽出して、その治療状況を検索した。これらの情報を元にしてCTD-PHの治療指針を検討した。日本語文献では、高いevidence levelの治療法に関する文献は見あたらなかったが、ステロイド薬や免疫抑制薬有効例の報告が散見された。また調べ得た範囲内で、海外文献でも同様であった。治療状況に関するアンケート調査では、原発性PHの通常の治療薬に加えて、ステロイド薬や免疫抑制薬が少なからぬ頻度で使用されていた。またステロイド薬の有効性を示唆する実験成績もみられた。以上より、免疫療法が有効な症例の存在が考えられ、これらに留意した治療指針案を提示する。

A. 研究目的

今期のMCTD班の重要な目標であるMCTD合併肺高血圧症（PH）の治療方針改訂のため、文献的検索や過去2年間の当研究班の成績を再検討した。そしてこれらを元にしてMCTD合併PHの改訂治療指針案作成を目的とした。

B. 研究方法

膠原病合併PHの免疫療法の有用性を調べるため文献的検討を行った。1993年～1999年9月の期間に医学中央雑誌に収載されたPHに関する症例1541例のうち、膠原病合併例に関する報告110件について解析した。主な海外文献についても検討を行った。またPH治療に関する各種ガイドラインを検索し、比較検討を行い、改訂治療指針案を作成した。なお倫理面の配慮については、特に個人単位の情報扱っていないため、不要と考えた。

C. 研究結果

1. 文献的検索

医学中央雑誌に収載された膠原病合併PHの治療につ

き検討可能な症例59例のうち、ステロイドが有効と判定された症例32例、有効である可能性のある例9例、無効例11例であった。また、免疫抑制薬（アザチオプリン、シクロフォスファミドおよびそのパルス療法）が有効と判定された症例6例、有効である可能性のある例1例、無効例2例であった。

膠原病性PHに対してステロイド薬を含めた免疫抑制療法に関する主な英文文献を検討した。ステロイド薬に関しても、プレドニゾロン60mg、80mg、メチルプレドニゾロン500mgのパルス療法、デキサメサゾン20mgなどさまざまであり、悪化と報告されるものは少なく、大部分は改善例であった。

2. PH治療に関する最近の治療指針

平成8年にMCTD班は、「MCTDの治療指針」を作成し、その中でPHについても詳細な治療指針を提示した¹⁾。

一方、近年では、原発性PHの治療に関して、国内でも国外でも樹形図様のものが多くみられる。アメリカでは、RubinらのPPH治療指針²⁾があり、我が国でも厚

生労働省「特定疾患に伴う肺高血圧症の発症機序の解明と内科的治療指針確立を目指す診療科横断的研究」班の治療ガイドライン³⁾のほか、8学会共同の治療ガイドライン⁴⁾が作られようとしている。これらは、大部分がPPHに対するものであり、類似している点も少なくない。

3.MCTD 合併 PH の改訂治療指針案

PPHの従来の治療指針に、ステロイド薬を加味して、改訂治療指針案を作成した(図1)。

D. 考察

本邦および海外での膠原病合併 PH に対する免疫療法の効果についての既報告例を集計してみた。検討可能な膠原病合併 PH の中、ステロイド投与によって PH が改善したり、その可能性があるとして報告者によって判定された症例は41例であった。また、免疫抑制薬については7例であった。これはステロイドが一部の膠原病合併 PH に対して有用なことを示唆している。しかしほとんどの症例では他の血管拡張薬などの併用がなされている。従来の報告をみると、以下のような限界がある。

- ・多くの無効症例は報告されない。
- ・血管拡張薬などの併用薬があるため、免疫療法単独の効果が判定困難である。
- ・免疫療法のプロトコールが様々なため、比較が困難である。
- ・プラシーボを用いた対照研究が皆無である。したがって一概に免疫療法が膠原病合併 PH に有用であるとの判断は困難である。

今後、検討すべき課題として、膠原病合併 PH でいかなる症例に免疫療法がより効果的であるか、プロトコールは何がよいかなどの検討が必要であろう。

平成8年に作成された「MCTDの治療指針」のあと、いくつかの重要な進歩が見られた。つまりプロスタグランジン I_2 の登場である。我が国独自の経口薬(ベラプロスト)のほか欧米で広く使用されている静注用プロスタグランジン I_2 (エポプロステノール)が我が国でも PPH で使用できるようになり、しかも在宅静注療法も保険適用されたことである。膠原病性 PH については、現在、オーファンドラッグの指定を受けながら治験の真っ最中である。早期の保険適用が望まれる。

また PPH の治療ガイドラインについては、米国のほか我が国でも作成されてきている。ただ膠原病合併 PH の治療ガイドラインは未だ作成されていない。PPH の治

療ガイドラインともっとも異なる点は、ステロイド薬の扱いである。今期の MCTD 班では、膠原病合併 PH の治療の現況に関するアンケート調査を、当初、臨床系班員施設で行い⁵⁾、ついで平成10年度に行われた全国疫学調査の2次調査⁶⁾として行った。そしていずれの調査でも、ステロイド薬は高率に使用されていた。早期の PH などにステロイド薬が有効な可能性について、経験的に少なからず医師が感じている点であるが、高いレベルの証拠はみられない。同じ厚生労働省の重点研究班の治療ガイドラインとの整合性に気を付けつつ、ステロイド薬の使用を表中にいれてみた。もちろん、この点に関する高い evidence level のデータはみられず、今後の研究に待つところが大きい。

E. 結論

過去の文献や過去2年間の当研究班の成績を元にして、MCTD 合併 PH の改訂治療指針案を作成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・吉田俊治, 片山雅夫, 肺高血圧症を呈する主要疾患とその病態 膠原病性肺高血圧症. 日本臨床 59:1164-1167, 2001

2. 学会発表

- ・片山雅夫, 竹田洋祐, 吉田俊治, 他. 膠原病性肺高血圧に対するステロイド治療についての検討. 第16回日本臨床リウマチ学会総会, 名古屋, 2001.11.27.
- ・竹田洋祐, 片山雅夫, 吉田俊治, 他. モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルを用いたステロイド大量療法の PH 発症にかかわる諸因子に及ぼす影響についての組織化学的検討. 第45回日本リウマチ学会総会, 東京, 2001. 5.16
- ・深谷修作, 吉田俊治, 鳥飼勝隆, 他. MCTD と overlap 症候群 MCTD およびその他の膠原病における肺高血圧症. 第45回日本リウマチ学会総会, 東京, 2001. 5.14
- ・小松八千代, 片山雅夫, 吉田俊治, 他. 膠原病肺高血圧症の発症機序と治療に関する研究. 第98回日本内科学会講演会, 横浜, 2001.4.13

文 献

1. 国枝武義: MCTD の病態別治療指針 肺高血圧症. 混合性結合組織病の治療指針. (鳥飼勝隆, 柏木平八郎, 東條 毅編集) 厚生省特定疾患混合性結合組織病調査研究班 1996, pp26-31.
2. Rubin LJ: Primary pulmonary hypertension. N Engl J Med 1997;336:111-117.
3. 岡田 修, 田辺信宏, 國井玲子, 栗山喬之: 原発性肺高血圧症新規登録状況. 厚生省特定疾患呼吸不全研究班平成11年度研究報告書. 2000;205-209.
4. 1999-2000年度合同研究班: 循環器病の診断と治療に関するガイドライン(1999-2000年度合同研究班報告)肺高血圧症治療ガイドライン. Jap. Circulation J 2001; 65(SupplV): 1077-1126.

5. 吉田俊治、近藤啓文、高崎芳成、原まさ子、三崎義堅、三森経世、深谷修作. 肺高血圧症を合併した膠原病患者の治療状況に関する検討. 厚生省特定疾患対策研究事業 混合性結合組織病に関する研究班平成11年度研究報告書 2000;15-18.
6. 吉田俊治、岡田 純、近藤啓文、深谷修作. 膠原病4疾患における肺高血圧症の治療状況に関する全国疫学調査. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 混合性結合組織病に関する研究班平成12年度研究報告書 2001;28-31.

MCTD合併PHの治療指針改訂案

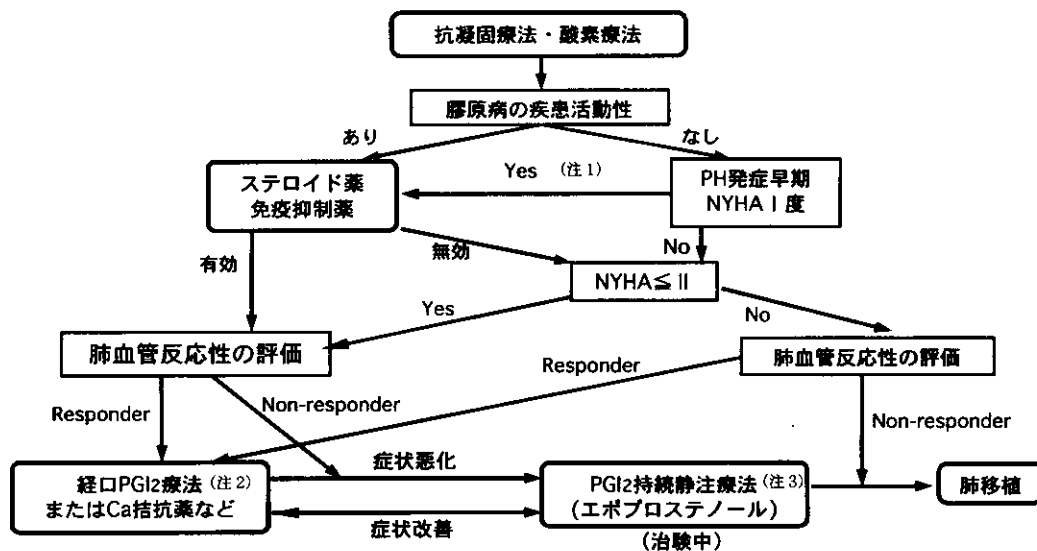


図1. MCTD 合併肺高血圧症の治療指針改訂案

平成8年に厚生省混合性結合組織病研究班が作成した「混合性結合組織病の治療指針」の中に肺高血圧症の治療指針が記載されている。その後、以下のような進展がみられた。

- ・ベラプロスト、エボプロステノールの原発性肺高血圧症への保険適用
- ・全国疫学調査や国内外の文献よりステロイド薬などの免疫抑制薬が少なからず使用され有効例もあること
- ・強皮症関連疾患に合併する肺高血圧症に対するエボプロステノール有用性の外国報告と国内治験の開始
- ・肺高血圧症に対する免疫学的機序の関与とステロイド薬の有用性を示唆する実験的研究
- ・米国および厚生労働省呼吸不全研究班における原発性肺高血圧症の治療指針策定

よってMCTD 合併肺高血圧症の治療指針も改訂することとした。

肺高血圧症はMCTDの最大の死因であり、WHOも強皮症関連疾患のみは肺高血圧症の有無にかかわらず年1回の心エコー検査を勧めている。本治療指針は原発性肺高血圧症と同様の前毛細血管性肺高血圧症に対するものであり、高度な肺線維症による後毛細血管性肺高血圧症に対するものではない。

注1 これに関しては、未だevidenceが少ない。

注2 膠原病性肺高血圧症に対する保険適応はない。

注3 膠原病性肺高血圧症に対する治験が進行中で、平成14年1月現在、保険適応はない。

PRELIMINARY REVISED THERAPEUTIC GUIDELINE FOR PULMONARY HYPERTENSION IN PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE

Shunji Yoshida¹⁾, Jun Okada²⁾, Hirobumi Kondo²⁾, and Shusaku Fukaya¹⁾

Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine¹⁾

Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine²⁾

To revise the therapeutic guideline for pulmonary hypertension (PH) in patients with mixed connective tissue disease (MCTD) by the Research Committee for MCTD on 1996, inquiries about the present status of the therapy for PH in connective tissue diseases (PH-CTD) were collected in the hospitals of the present members of the Research Committee for MCTD and in the secondary investigation of nationwide survey. Every Japanese literature about the primary PH and PH-CTD in the latest five years were collected and investigated the therapy for them in the Japan Central Review Medicine (Japana Centra Revuo Medicina).

No paper was found with high evidence level of the PH therapy and several papers were found that adrenocorticosteroid hormone and other immunosuppressants were effective in some PH patients. The inquiries for treatment of PH revealed the relatively high frequency of the use of steroids and immunosuppressants in PH-CTD patients in addition to the conventional therapy for primary PH. Some experiments suggested the possible effectiveness of steroids in PH-CTD. As these data suggested the usefulness of steroids for some PH-CTD, preliminary revised therapeutic guideline for CTD-PH patients was proposed.

5. 膠原病患者血清中に認められる抗U1RNP抗体の多様性と出現様式について

分担研究者 : 近藤 啓文¹
研究協力者 : 岡野哲郎²、佐藤隆司²、小笠原孝³、岡田 純¹
所属施設 : ¹北里大学医学部内科
²北里大学医学部医療衛生学部
³都立大塚病院

研究要旨

抗U1RNP抗体はDID（2重免疫拡散法）により定義付けられるMCTDに特徴的な疾患標識抗体である。近年、IPP（免疫沈降法）さらにリコンビナント成分を用いたELISA（酵素抗体法）が開発され、より高感度な検出が可能となった。しかしながら、抗U1RNP抗体は抗原分子を構成する種々の蛋白抗原およびRNA鎖と反応する多様性が知られ、検出に用いる基質により反応性が異なると考えられる。特にU1RNA鎖に対する抗体については抗U1RNP抗体陽性患者血清中に比較的高頻度と報告されているが、混合性結合組織病（MCTD）における存在意義は明らかでない。そこでIPPによるRNAと蛋白抗原、脱蛋白RNAを抗原としたIPP（RNA-IPP）によるU1RNA、U1RNA鎖およびリコンビナント蛋白抗原を含むELISAキットを用いて、抗U1RNP抗体、特に抗U1RNA抗体の出現様式をペア血清について検討した。結果：既報のように抗U1RNA抗体は抗U1RNP抗体陽性血清中に高頻度に検出された。抗U1RNP抗体のIPPとELISAの結果は、特異性、検出感度（98.2%）ともよく一致した。このELISA法では抗U1RNA抗体陽性血清群は、抗U1RNP抗体高力価陽性群に認められた。抗U1RNA抗体は26.3%に出現頻度の変動が認められた。また抗U1RNA抗体の出現は抗Sm抗体併存頻度と関係したが、抗SS-A/Ro抗体とは関係しなかった。

A. 目的

U1RNP抗原分子は70k、A、B/B'、C、D、E、F、G蛋白抗原およびU1RNA鎖により構成されている。この内70k、A、CおよびB/B'の一部とU1RNA鎖が抗U1RNP抗体の対応抗原である。特にU1RNA鎖に対する抗体は抗U1RNP抗体陽性患者血清中に比較的高頻度^{1)~4)}とされているが、混合性結合組織病（MCTD）における存在意義は明らかでない。そこで、抗U1RNP抗体の多様性と抗U1RNA抗体との関係を明らかにするため、IPPによるRNAと蛋白抗原、脱蛋白RNAを抗原としたIPPによるU1RNAを解析し、さらにU1RNAおよびリコンビナント蛋白抗原を含む改良されたELISA法を用いて、ペア血清中の抗U1RNP抗体と抗U1RNA抗体の反応動態を検討した。

B. 材料と方法

北里大学病院を受診し、抗U1RNP抗体が陽性の症例で、2年間以上経過観察をしいた90例（MCTD48例、SLE8例、SSC8例、その他26例）を対象とした。そのうち初診時の血清と観察平均期間7.6年後の血清であるペア血清と単独血清を含む172血清を対象とした。

1) IPP核酸免疫沈降法：Lerner-Steit⁵⁾ & Mimori等⁶⁾の方法により行い、染色は銀染色を行った。

2) RNA-IPP：脱蛋白HeLa RNAは、HeLa細胞抽出物をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（PCA）で脱蛋白を2回行い、HeLa細胞抽出脱蛋白RNA溶液とした。HeLa細胞 6×10^6 に対してPCA300 μ lを加え、15秒間混和後、室温で13000rpm 2分間遠心、水層を回収し、同じ操作をもう一度行った。尚、予備実

験においてRNA-IPP法で抗U1RNA抗体陽性9血清を用いて、脱蛋白操作回数による影響を検定した。PCA脱蛋白操作2、3、4回抽出物をRNA-IPPで検討したが、U1RNAは9血清の何れの脱蛋白操作回数にも確認され、O.D.280でも変化を認めなかった。よって、本研究でのPCA脱蛋白操作を2回とした。HeLa細胞抽出脱蛋白RNA溶液は冷却100% ethanol 900 μ lを加え、-80℃に1時間放置しRNAを沈殿させ、洗浄乾燥後、NET-2液に溶解し、RNA-IPPに用いた。

3) 抗U1RNP抗体ELISA法による測定⁷⁾

リコンビナント蛋白抗原(大腸菌組換え70kDa,A,C)を用いた酵素抗体法ELISA1(MESACUP RNP- IIテストMBL社)およびU1RNA鎖にリコンビナント蛋白抗原(His-tagged 70kDa,A,C)を加え抗原分子を再構築させたELISA2(MESACUP-2テストRNP)を用いた。ELISA1から、2への改良点はさらにPOD標識Protein AからPOD標識抗免疫グロブリン抗体に変更され、より幅の広い検出方法となっている。方法は能書に従い、判定はインデックスにより求めた。

C. 結果

1. IPP法における対象血清中の抗U1RNP抗体と抗U1RNA抗体陽性頻度およびペア血清における比較

172血清中169例(98.3%)に抗U1RNP抗体が認められた。また、抗U1RNP抗体陽性血清中の抗U1RNA抗体は111例(65.7%)に認められ(表1)、抗U1RNP抗体陽性ペア血清における抗U1RNA抗体の経時的変化は、陰性ペア20%、陰性から陽性化ペア8.8%、陽性から陰性化ペア17.5%、陽性ペア53.8%であり、変化を認めたものは26.3%であった。観察期間は陰性ペア 6.7 ± 3.9 年、陽性化ペア 7.5 ± 4.9 年、陰性化ペア 10.8 ± 6.1 年、陽性ペア 5.5 ± 4.2 年である。(図1)

2. IPP法における抗U1RNP抗体陽性血清中に併存する自己抗体

抗Sm抗体49例(29%)、抗SSA抗体52例(30.8%)、抗SSB抗体2例(1.2%)、抗tRNA抗体6例(3.6%)であった。(図2)

3. ペア血清における抗U1RNA抗体の経時的変化と併存する自己抗体

抗U1RNA抗体陽性化に伴い、抗Sm抗体併存頻度が増加し(14.3%から42.9%)、抗U1RNA抗体陰性化に伴い、抗Sm抗体併存頻度は減少(35.7%から0%)した。一方、抗U1RNA抗体陽性化に伴い、抗SSA抗体併存頻度の増加(28.6%から42.9%)が見られたが、抗

U1RNA抗体の陰性化群では抗SSA抗体併存頻度に変化は認められない(35.7%のまま)。(図3)

4. 抗U1RNP抗体陽性血清(IPP)とELISA法の比較

抗U1RNP抗体陽性血清(IPP)169例中、ELISA1 138例(81.7%)、ELISA2 162例(95.9%)陽性。IPP陽性のELISA偽陽性を陽性に含むとELISA1 154例(91.1%)、ELISA2 166例(98.2%)陽性であった。(表2)

5. 抗U1RNA抗体とELISA抗U1RNP抗体価との比較

ELISA2 Index平均(抗U1RNP抗体価)は抗U1RNA抗体陰性群74.2(ELISA1では42.4)に対し陽性群139(ELISA1では113.5)であり、抗U1RNA抗体陽性群は抗U1RNP抗体高力価群であった($p < 0.01$)。

6. 抗U1RNA抗体のペア血清前後とELISAとの関係

抗U1RNA抗体陰性ペアにおいては低力価に、また抗U1RNA抗体陽性ペアにおいては高力価に認められた。(図5)抗U1RNA抗体陽性化のうち57.1%に抗体価の上昇を認め、抗U1RNA抗体陰性化のうち92.9%に抗体価の減少を認めた。(図6)

7. 抗U1RNA抗体陽性群の臨床像

抗U1RNA抗体陽性群(N=61)と陰性群(N=29)の臨床像の比較を単独血清とペア前半血清を用い、フィッシャーカイ2乗検定を行った結果、手指に限局した皮膚硬化28/61 vs 7/29 ($p=0.03858$)、多発性関節炎33/61 vs 8/29 ($p=0.01560$)、において、抗U1RNA抗体陽性群では有意にこれらの症状の出現が高頻度に認められた。

D. 考案

1986年Keene等²⁾は抗U1RNP抗体中に核酸の立体構造を認識する抗U1RNA抗体が存在する事を明らかにした。また、種々の抗U1RNP抗体の多様性が報告されている。一方、抗U1RNP抗体はDID法により同定されるが、新たに開発されたIPP等の方法もDIDとの整合性に基いている⁹⁾。しかしながら、高感度なIPP、脱蛋白したRNAを抗原としたIPPとリコンビナント蛋白を用いたELISAを比較した検討例は少ない。そこでIPPによるU1RNP分子上のU1RNA、脱蛋白RNA-IPPによるU1RNA、U1RNAおよびリコンビナント蛋白抗原を含むELISA法(MBL社)を比較検討の上、ペア血清中の抗U1RNP抗体の多様性と出現様式、特に抗U1RNA抗体の反応様式を検討した。

IPP、RNA-IPPにおいては、抗U1RNP抗体陽性例中抗U1RNA抗体は65.7%に認められた。かかる抗体の

陽性頻度は30%~75.6%と種々報告がある^{1)~4)}。しかしながら、対象としたペア血清の前後では、抗U1RNA抗体が陰性もしくは陽性となる変動が26.3%に認められ、同一患者群でも病時期により抗体陽性頻度が異なると考えられた。抗U1RNP抗体陽性例において他の自己抗体の併存は抗Sm抗体、抗SS-A抗体が各々約30%認められた。また、抗Sm抗体陽性頻度は抗U1RNA抗体の陽性化に伴い増加し、陰性化に伴い低下した。抗U1RNA抗体の出現と抗Sm抗体の併存は、ELISA抗体価とは関連性がないとされるが⁴⁾、抗U1RNA抗体の頻度の変動(有無)と比較すると、抗SS-A抗体が変化しないにも拘わらず抗Sm抗体陽性頻度は抗U1RNA抗体と一致して変化した。抗U1RNA抗体と抗Sm抗体は同一分子上の異なる成分を対応抗原としていることから、いずれかのU1RNP構成成分の一部が抗原刺激となりその結果、U1RNP分子全体に免疫応答が誘導された可能性が考えられる。

ELISA2による抗体価とIPPの結果を比較すると、ELISA2でキット能書に従い偽陽性と判定された血清全てがIPP陽性であった。これら偽陽性を含めると抗U1RNP抗体IPP陽性169例中166例98.2%がELISA2陽性となり、ほぼIPPと一致した。このELISA2による抗U1RNP抗体価とRNA-IPPを比較すると、抗U1RNA抗体陽性群はELISA2抗体価平均139indexと高く、陰性群は平均74.2indexと有意に低力価($p<0.01$)であった。さらに、ペア血清前後では、抗U1RNA抗体陽性化群の57.1%にELISA抗体価上昇が認められ、抗U1RNA抗体陰性化群の92.9%に抗体価の減少が認められた。既報によれば抗U1RNP抗体価と抗U1RNA抗体価は相関関係を示すことが知られており⁴⁾、本研究においてもELISA抗U1RNP抗体価とIPP法による抗U1RNA抗体の有無は相関関係を示した。抗U1RNA抗体陽性群は抗U1RNP抗体高力価陽性群に多く認められ、臨床像も抗U1RNA抗体陰性群と異なった。MCTDにおける抗U1RNP抗体は高力価陽性のとき臨床的意義が高いとされており、抗U1RNA抗体陽性がMCTDの疾患鑑別上重要となる可能性が示唆された。

MCTDやレイノー現象、肺高血圧症との関連性が指摘されている抗U1RNP抗体存在の有無は病因論的には興味深い事柄であるが、今回検出された本抗体の低力価群すなわちIPP陽性ELISA偽陽性例など高感度検出法による低力価抗体の臨床的特徴を今後検討する必要があると思われた。

文 献

1. Hoet RM, De Weerd P, Gunnewiek JK, Koornneef I, Van Venrooij WJ : Epitope regions on U1 small nuclear RNA recognized by anti-U1RNA specific autoantibodies. *J Clin Invest* 90(5) : 1753-1762, 1992
2. Wilusz J, Keene JD : Autoantibodies specific for U1RNA and initiator methionine tRNA. *J Biol Chem* 261(12) : 5467-5472, 1986
3. Van Venrooij WJ, Hoet R, Castrop J, Hageman B, Mattaj JW, van de Putte LB : Anti-(U1) small nuclear RNA antibodies in anti-small nuclear ribonucleoprotein sera from patients with connective tissue diseases. *J Clin Invest* 86(6) : 2154-2160, 1990
4. 三森 経世, 小笠原 孝, Susan L. Deutscher, 東條 毅 : MCTD患者における抗U1RNA抗体の検出とその臨床的意義の検討. 厚生省特定疾患混合性結合病調査研究班, 平成6年度研究報告書, 70-72
5. Lerner MR, Steitz JA : Antibodies to small RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 5495-5499, 1979
6. 三森経世, 東條毅 : リボ核タンパク抗原の免疫沈降法による分析. 免疫実験操作法 I (右田俊介ほか編) 南江堂, 214-220, 1995
7. 高崎 芳成 ほか : U1RNPの高次構造を認識する自己抗体の測定系. 厚生労働省特定疾患 混合性結合組織病に関する研究班, 平成12年度研究報告書, 45-49

表 1. IPP, RNA-IPP における抗 U1RNP 抗体と抗 U1RNA 抗体の関係

抗 U1RNP 抗体陽性	
抗 U1RNA 抗体陽性	111(65.7)
陰性	58(34.3)

(カッコ内は%)

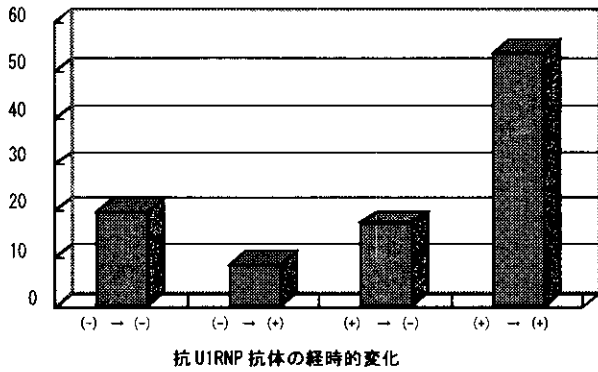


図 1. 抗 U1RNP 抗体陽性ペア血清における抗 U1RNA 抗体の経時的変化

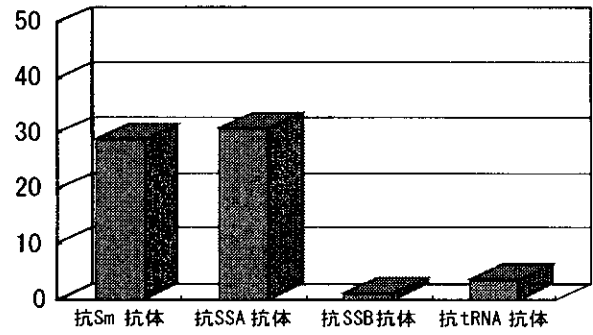


図 2. 抗 U1RNP 抗体陽性における併存抗体

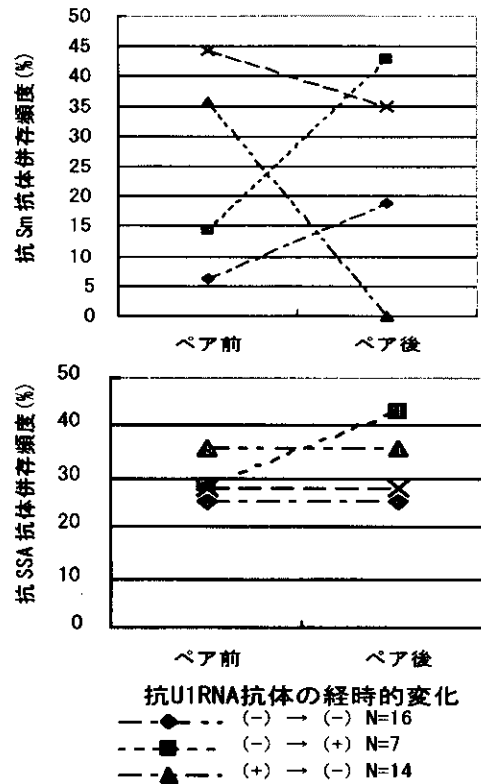


図 3. 抗 U1RNA 抗体の経時的変化と抗 Sm 抗体、抗 SSA 抗体の併存頻度

表 2. 抗 U1RNP 抗体陽性(IPP)における ELISA1,2 の比較

抗 U1RNP 抗体	陽性	偽陽性	陰性
ELISA1	138(81.7%)	16(9.5%)	15(8.9%)
ELISA2	162(95.9%)	4(2.4%)	3(1.8%)

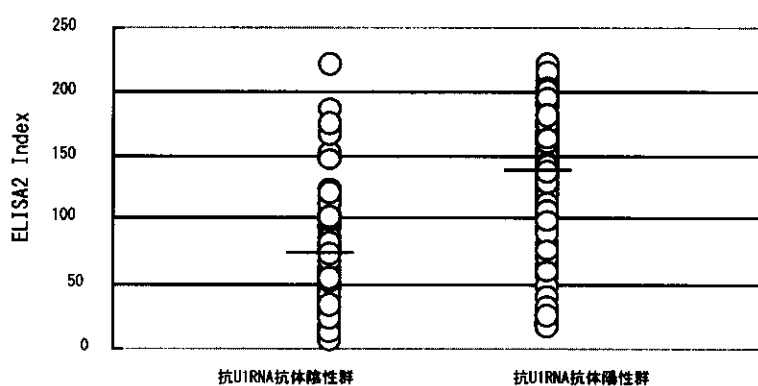


図 4. 抗 U1RNA 抗体と抗 U1RNP 抗体価(ELISA2)の比較

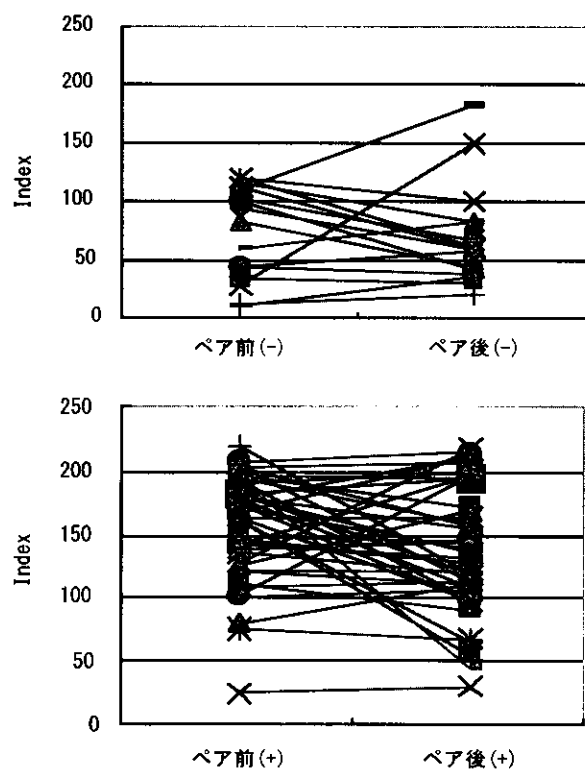


図 5. 抗 U1RNA 抗体陰性ペア・陽性ペアと ELISA2 index との関係

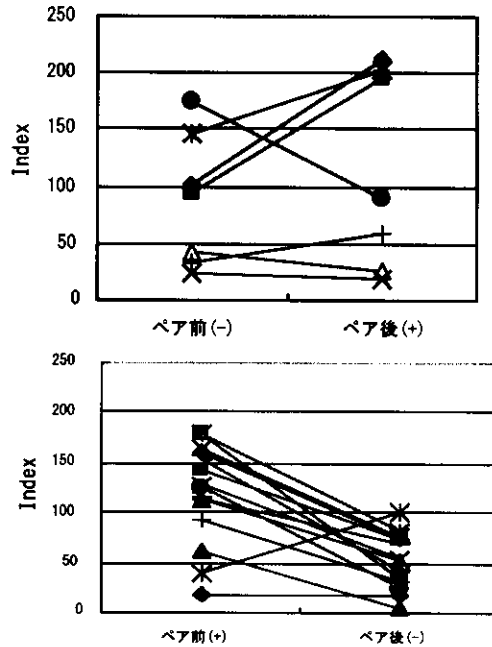


図6. 抗U1RNA抗体陽性化ペア・陰性化ペアとELISA2 index との関係

STUDIES ON AUTOANTIBODIES TO RNA COMPONENT OF RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEXES AND THEIR CLINICAL SIGNIFICANCE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC AUTOIMMUNE DISEASES.

Hirobumi Kondo¹, Tetsuroh Okano², Takashi Satoh², Takasi Ogasawara³, Jun Okada¹
 Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine¹
 Clinical Immunology, Kitasato University School of Allied Health Science²
 Ohtsuka Hospital³

Objective. To evaluate the time course and relationship between autoantibodies to ribonucleoprotein complexes (RNPs) vs. RNA component of RNPs and their clinical significance in patients with mixed connective tissue disease (MCTD).

Methods. Sera from patients with MCTD (82 patients with a pair sera at different time points and additional 8 sera, total of 172 sera) were tested for autoantibodies to RNPs [immunoprecipitation (IPP) of 35S methionine-labeled cell extract and analysis of proteins by SDS-PAGE] vs. RNA component [IPP of deproteinized cell extract (RNA-IPP) and analysis of RNAs by urea-PAGE]. The levels of anti-U1RNP antibodies were tested by ELISA. Autoantibodies in sera were also tested by indirect immunofluorescence, double immunodiffusion, and immunoblotting.

Results. In MCTD group, anti-U1RNP, anti-Sm and anti-SSA antibodies were found in 98.3%, 29%, and 30.8% of sera, respectively. Anti-U1RNA antibodies were detected in 111 (65.7%) of anti-U1RNP autoantibody positive sera. Anti-U1RNA antibodies were present in both of the paired sera in 73.7% of patients, however, they were present only in one of the paired sera in 26.3% of patients. The presence of anti-U1RNA antibodies was associated with the positive results for anti-Sm antibodies.

The levels of anti-U1RNP antibodies were higher in anti-U1RNA antibodies positive group than negative group by ELISA. Moreover, anti-U1RNA antibodies positive group had higher frequency of arthritis and sclerodactyly vs. negative group.

Conclusion. Autoantibodies to RNA component of RNPs were frequently found in patients with anti-U1RNP antibodies and associated with particular clinical symptoms. These autoantibodies to RNA may serve as a new serological marker for subset of systemic autoimmune diseases.

6. MRL/Mp-Fas^{lpr} マウスを用いた 抗 U1RNP 抗体産生性 Th1 細胞の研究 - Adoptive transfer による臨床病態の変動 -

分担研究者 : 三森 経世
研究協力者 : 藤井 隆夫
所属施設 : 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学

研究要旨

抗 U1RNP 抗体陽性 CD40 リガンド (CD40L) 欠損 MRL/Mp-Fas^{lpr} マウス (MRL/lpr マウス) および野生型 MRL/lpr マウス脾細胞から、抗 U1RNP 抗体の産生を in vitro のみならず in vivo においてもヘルプする CD4+αβTh1 細胞 (G2 および rnp2) を分離した。クローン化した rnp2 (CD40L+/+, Vβ14), G2 (CD40L-/-, Vβ10) を、PBS および抗 dsDNA 抗体の産生に関与すると考えられる dna51 (CD40L+/+, Vβ8.3) をコントロールとして MRL/lpr マウスに移入し、血清中の抗 U1RNP 抗体価および皮膚・肺・腎組織所見を調べた。a- (IL-2 による活性化), i- (IL-2 による活性化後に放射線照射) rnp2 あるいは i-G2 を移入することにより皮膚病変は拡大したが、後背部皮下のリンパ球浸潤は a-, i- によらずすべての細胞移入群で PBS 群に比し著明となった。肺血管炎と間質性肺炎は、a-, i- によらず rnp2 あるいは G2 の移入で変化を認めなかった。間質性腎炎が a-rnp2 の移入により増悪したが、i-rnp2 あるいは a-, i-G2 の移入により腎病変は変化しなかった。以上より、MRL/lpr マウスの病態に関与する抗 U1RNP 抗体産生性 T 細胞は存在するが、同じ抗体産生性を持った Th1 細胞でも CD40L 発現、移入前の放射線照射の有無により、細胞移入による病態への関与の仕方が異なると考えられた。

A. 研究目的

混合性結合組織病 (以下 MCTD) は、抗 U1RNP 抗体の産生と多臓器の炎症を特徴とする自己免疫疾患である。自己免疫疾患における病態の形成には数多くの免疫細胞が関与するが、なかでも抗核抗体の産生やその免疫異常においては T 細胞と B 細胞が深く関連すると考えられる。

昨年度われわれは、ヒト SLE 類似の病態を呈する代表的なモデル動物である MRL/Mp-Fas^{lpr} マウス (MRL/lpr マウス) の脾細胞から、in vitro で抗 U1RNP 抗体の産生を刺激する自己反応性 T 細胞 (rnp2) のクローン化に成功した¹⁾。また一昨年度には、T 細胞と B 細胞との相互作用に重要であり T 細胞の活性化マーカーである CD40 リガンド (CD40L) を欠損した MRL/lpr マウス脾細胞から抗 U1RNP 抗体の産生を刺激する自己反応性 T 細胞 (G2) を分離し、in vitro にてその特徴を分析した²⁾。そこで最終年度の本年度は、これらの T 細胞クローンと MRL/lpr マウス

を用いた Adoptive transfer study を行い、それらクローンの in vivo における臨床的意義、特に CD40L の発現の有無と病態との関連および放射線照射細胞移入による病態調節の可能性に関して検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. マウス

MRL/lpr マウスは三協ラボサービス (浜松) から購入した。

2. 抗 U1RNP 抗体産生性 T 細胞のクローニング

T 細胞のクローニングは、Naiki らの方法³⁾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 マウスリンパ節細胞 (4 x 10⁶/ml) を 10% FCS を含んだ Click 培地 (Sigma 社) に浮遊させ、2 x 10⁶/ml の放射線照射 (20Gy) 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ウェルのカルチャープレートに5 cells / ウェル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。またクローン化されたT細胞(5 x10⁵/well)をMRL/*lpr* マウス脾細胞から分離精製したB細胞(2 x10⁶/ml)と一週間混合培養し、その上清中の抗dsDNA、抗U1RNP抗体価をELISAで測定した(in vitro ヘルパー試験)。抗U1RNP抗体産生のみを特異的に刺激するクローンの細胞表面マーカーをフローサイトメトリーにて確認後、Adoptive transfer study に用いた。

3. Adoptive transfer study

今回は細胞移入の対象となるMRL/*lpr* マウスを7群に分けた。すなわち、1) PBSのみを注射した群、2) in vitro ヘルパー試験で抗U1RNP抗体産生に関与することを確認したCD40L+/+ T細胞(rnp2)をIL-2を用いて活性化した後移入した群、3) rnp2を活性化した後、放射線照射(20Gy)して増殖抑制した後移入した群、4) in vitro ヘルパー試験で抗U1RNP抗体産生に関与することを確認したCD40L-/- T細胞(G2)をIL-2により活性化した後移入した群、5) G2をIL-2により活性化した後、放射線照射(20Gy)して増殖抑制し移入した群、6)抗dsDNA抗体陽性の野生型(CD40L+/+) MRL/*lpr*マウスから分離し、in vitro ヘルパー試験で抗dsDNA抗体産生に特異的に関与することを確認したT細胞(dna51)をIL-2を用いて活性化後に移入し

た群、7) dna51をIL-2により活性化した後、放射線照射(20Gy)して増殖抑制した後移入した群、である。

T細胞は、一匹あたり1~2x10⁶細胞を3週齢から2週おきに計4回静注した。これらのマウスから経時的に採血して抗U1RNP抗体価を測定し、最終観察時に肉眼的皮膚所見、MRL/*lpr*マウスに特異的とされる後背部皮膚組織、肺組織、腎組織所見を調べた。肺組織では、Fujikiらの報告⁴⁾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活動性指標⁵⁾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。

4. U1RNPを抗原として用いたELISAによる抗核抗体の測定

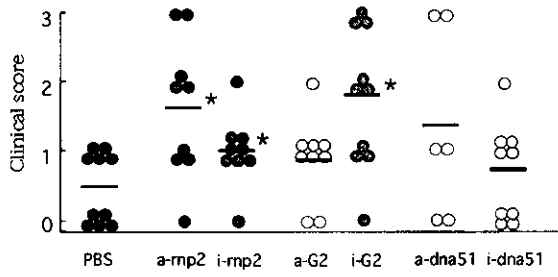
抗U1RNP抗体はEhrlich ascites細胞から精製したマウスU1RNP(1 mg/ml)を抗原として使用した。マウス血清は3% BSAを含んだPBSで100倍希釈とし、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(Southern Biotechnology Associates社)を使用し、ELISAリーダーでOD405nmの波長を用いて測定した。

表 Adoptive transfer study における血清中抗U1RNP抗体価の変動

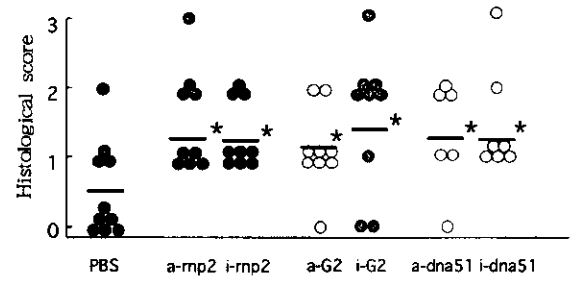
	3週齢 (移入前)	12週齢	24週齢
PBS注射群	3.6±0.5	14.3±11.4	47.9±9.2
以下細胞移入群			
a-rnp	4.2±2.0	61.6±15.5*	275.9±49.4**
i-rnp	4.0±1.5	30.6±53.9	31.0±28.4
a-G2	3.6±1.5	27.1±37.0	100.4±19.3**
i-G2	2.7±0.4	11.1±8.4	28.1±24.3
a-dna51	4.5±0.5	63.9±32.9*	30.6±28.4
i-dna51	4.3±1.9	11.0±17.8	17.0±21.3

単位 : index

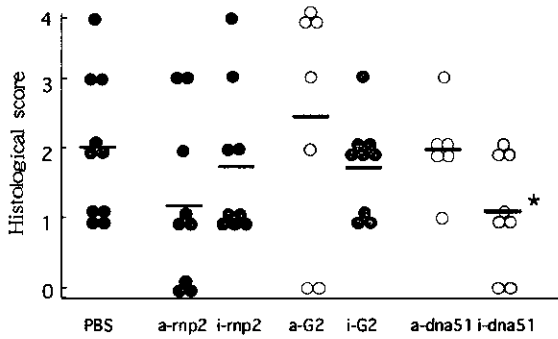
*P<0.05, **P<0.01 (同週齢のPBS注射群と比較して)



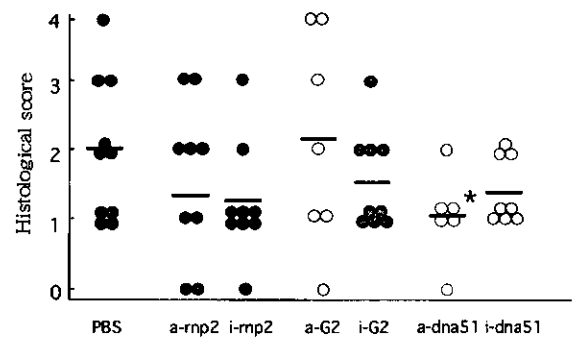
皮膚症状の拡大



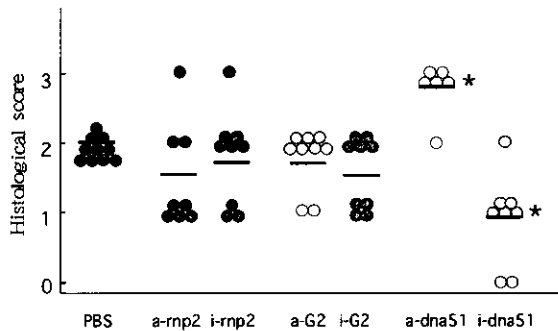
後背部皮下のリンパ球浸潤



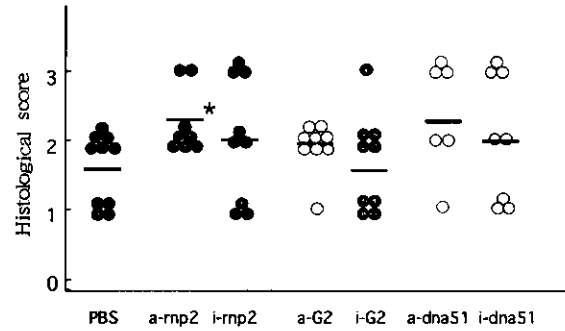
肺血管炎



間質性肺炎



糸球体腎炎



間質性腎炎

図. Adoptive transfer によるMRL/*lpr*マウス皮膚症状, 皮膚・肺・腎組織所見の変化
26週齢時の組織所見をスコアリングし比較した。皮膚症状の拡大は, 0=皮膚症状なし,
1=顔面のみ, 2=顔面と後背部, 3=顔面と後背部に加えて耳部の血管病変も認める,
の4段階で評価した。

* $P < 0.05$ (PBS注射群と比較して)

C. 研究結果

1. 抗U1RNP抗体産生に関与するT細胞の分離

抗U1RNP抗体陽性CD40L^{-/-}およびCD40L^{+/+}MRL/*lpr*マウス脾細胞から限界希釈法によって、多数のT細胞を分離した。その中で外来抗原を加えることなく、かつAPC依存性に増殖が認められるT細胞(自己抗原反応性T細胞)を選択した。また抗CD3抗体刺激にてIL-4を分泌せずIFN γ のみを分泌するTh1細胞を選択した。さらにin vitroヘルパー試験において、抗U1RNP抗体の産生を特異的に刺激したTh1細胞のみを以下のAdoptive transfer studyに用いることとした。このようにして選択されたrnp2 (CD40L^{+/+})とG2 (CD40L^{-/-})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、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 β 14を、G2はV β 10を有していた。

2. Adoptive transfer study

7群に分けてTh1クローンを移入あるいはPBSを注射した後、経時的に血清中抗U1RNP抗体価を測定、平均値を比較した(表)。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、a-rnp2移入群では12, 24週齢で抗U1RNP抗体価が有意に高値となった。またa-G2移入群でも24週齢時に抗U1RNP抗体価が高値となり、in vitroと同様の結果が得られた。しかし一方で、a-dna51移入群ではin vitroの成績とは異なり12週齢でのみ一過性の抗U1RNP抗体価の上昇が認められた。この現象は昨年度のtransfer studyでも同様に認められていたが、抗U1RNP抗体産生性B細胞に対するbystander helpの結果と考えられる。なお放射線照射により増殖を抑制した(i-)クローンの移入では、いずれも抗U1RNP抗体価の有意な上昇は認められなかった。

26週齢における皮膚病変の拡大、後背部皮膚組織所見、肺組織所見、腎組織所見の各群間比較を図に示す。皮膚病変は、PBS群よりa-rnp2, i-rnp2, i-G2群においてより広範囲に認められた。しかしMRL/*lpr*マウスに特徴的な後背部皮膚を採取し皮下のリンパ球浸潤を比較した場合、CD40L発現の有無、移入前の放射線照射の有無によらず、すべての細胞移入群でPBS群より著明となっていた。肺組織所見ではi-dna51移入群で肺血管炎の軽症化を認め、a-dna51移入群で間質性肺炎の軽症化を認めた。興味深い結果ではあるが、こ

のメカニズムに関する詳細は不明で、再現性も含め今後の検討が必要である。ただし抗U1RNP抗体産生に関与するrnp2またはG2はいずれの肺病変にも影響を与えなかった。最後に腎組織では、a-dna51移入により糸球体腎炎が明らかに増悪した一方、i-dna51の移入では逆に軽症化していた。i-rnp2あるいは、a-, i-G2の移入は腎病変に関与しなかったが、a-rnp2の移入によって間質性腎炎が増悪した。しかし、i-dna51と異なりi-rnp2の移入によって間質性腎炎が軽症化することはなかった。

D. 考察

MRL/*lpr*マウスは、ヒト全身性エリテマトーデスと同様の皮膚病変や免疫複合体性糸球体腎炎、慢性関節リウマチと同様の破壊性多発関節炎、またMCTDや強皮症と同様の肺線維症を発症する。また他の自然発症ループスのモデルマウスと異なり、唯一抗U1RNP抗体を自発的に産生する。したがってMRL/*lpr*マウスは、抗dsDNA抗体など他の抗核抗体と比べた場合、抗U1RNP抗体の産生機序や関連する病態との相違を分析する上で貴重なモデルと考えられる。MCTD患者では高力価抗U1RNP抗体を認めるが、その産生はT細胞依存性であることが示唆されており⁶⁾、関与するT細胞についても本班会議で検討されている。すなわち、MCTD患者末梢T細胞ではV β 14陽性クローンが高頻度に認められ⁷⁾、抗U1-A自己抗体陽性患者のPBMCでは、同抗体陰性患者のPBMCに比べてIL-2産生が增强していること⁸⁾などが示されてきた。しかしこれらの活性化T細胞がMCTDの病態に与える影響については不明である。

本研究におけるAdoptive transfer studyの結果から、少なくともMRL/*lpr*マウスにおいては抗U1RNP抗体産生をヘルプするCD4⁺ $\alpha\beta$ Th1細胞が存在し、かつ特定の病態に関与することが示唆される。より多くの抗U1RNP抗体産生性クローンを分離する必要はあるが、抗U1RNP抗体の産生を同様にヘルプするT細胞でもそのTCRの構造によって関連する病態は異なる可能性がある。またin vitroでは同様に抗U1RNP抗体産生性を持ったTh1細胞でもCD40L発現の有無、移入前の放射線照射の有無により、病態への関与の仕方が異なっていたことはT細胞を用いた免疫調節治療の可能性を示唆する。残念ながら、今回の検討では放射線照射した抗U1RNP抗体産生性Th1クローンを移入することで、抗U1RNP抗体の産性を抑制したり間質

性腎炎を軽症化させることはできなかった。しかし *i-dna51* が糸球体腎炎や肺血管炎を軽症化させたように、クローンを修飾して移入することによって、直接病態を抑制しうる、あるいは病態を抑制する免疫反応を誘発できる可能性がある。現時点では有効な治療法に乏しい MCTD の肺高血圧症や肺線維症に関し、今後抗 U1RNP 抗体産生性 T 細胞を用いた免疫調節療法についてさらに検討を続けたいと考えている。

文 献

1. 三森経世, 藤井隆夫: 抗 U1RNP 抗体産生を刺激する Th1 細胞と関連する病理所見 - MRL/Mp-*Fas^{lpr}* マウスにおける検討 -. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業, 混合性結合組織病に関する研究班. 平成 12 年度報告書, pp36-41, 2001.
2. 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 α 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
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 U1snRNPA 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.

ADOPTIVE TRANSFER STUDY WITH ANTI-U1RNP AUTOANTIBODY-PRODUCING CD4⁺ $\alpha\beta$ TH1 CLONES IN MRL/Mp-*Fas^{lpr}* MICE

Tsuneyo Mimori and Takao Fujii

Department of Rheumatology and Clinical Immunology
Kyoto University Graduate School of Medicine

To clarify how anti-U1RNP antibody (Ab) -producing T cells are involved in the MRL/*lpr* disease, we isolated autoreactive CD4⁺CD8⁻B220⁻*Fas^{lpr}* $\alpha\beta$ Th1 cell clones from splenocytes of CD40 ligand (CD40L, CD154)-intact and deficient MRL/Mp-*Fas^{lpr}* (MRL/*lpr*) mice. Two isolated clones, designated as rnp2 and G2, were transferred to wild-type MRL/*lpr* mice, and the sequential serum titers of anti-U1RNP Ab and the histological changes in skin, lungs, and kidney were examined. Before the adoptive transfer, clones were activated by IL-2 (a-), or activated by IL-2 followed by irradiation (20Gy, i-). Clone *dna51* (CD40L-intact, TCR V β 8.3), which was isolated CD40L-intact MRL/*lpr* mice and promoted anti-dsDNA Ab production *in vitro*, was also transferred as a control. In a-rnp2 (CD40L-intact, TCR V β 14)-received MRL/*lpr* mice, anti-U1RNP Ab production was increased at 12 and 24 weeks in comparison with the PBS-treated mice. Similarly, in a-G2 (CD40L-deficient, TCR V β 10)-received MRL/*lpr* mice, anti-U1RNP Ab production was increased at 24 weeks. While the irradiated clones, in which cell proliferation was stopped, failed to promote anti-U1RNP Ab production, the a-*dna51*-received MRL/*lpr* mice showed the increased titer of anti-U1RNP Ab at 12 weeks, but not at 24 weeks. The abnormal skin lesion was more extensively observed in the a-*i-rnp2* and *i-G2*-received than in the PBS-treated MRL/*lpr* mice. Renal histology, which was evaluated by the activity index (AI; Austin et al., *Am J Med*, 1983), demonstrated that the tubulo-interstitial nephritis was severer in the a-rnp2-received, but not in the *i-rnp2*, a-*i-G2*-received MRL/*lpr* mice than in the PBS-treated. These results suggest, Th1 clones, which drive anti-U1RNP Ab production *in vivo*, may be involved in the pathogenesis in MRL/*lpr* mice. In addition, the organ disorder induced by adoptive transfer of anti-U1RNP Ab-producing CD4⁺ $\alpha\beta$ Th1 clones depends upon the CD40L expression and cell proliferative ability of the clones.

7. ヒト U1snRNP-A 自己抗原に対するマウスでの T細胞応答に関する研究

分担研究者 : 三崎 義堅
研究協力者 : 川畑仁人、瀬戸口京吾、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

我々は、ヒト U1snRNP-A (HuA) トランスジェニックマウス (HuATg) に、野生型マウスで誘導した HuA 反応性 T 細胞集団を移入して、抗 U1RNP 抗体産生促進とそれを制御する T 細胞を見出した。この機序をクローンレベルで解析できる T 細胞 Tg 作成のため、抗 HuA クローン樹立を目指した。GST 融合蛋白で反応を確認した断片を中心に作成した合成ペプチドに反応は全くなく、またハイブリドーマの認識は目的部位と異なった。核内受容体ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ ヘテロ欠損マウスは、B 細胞が活性化され、抗原特異的応答が増強される。しかし HuA に対する応答は逆に半減し、B 細胞の高応答性により、自己反応レパトワーがクローン削除されたと考えられた。正常マウスでは免疫寛容が厳重に成立しており、自己反応性 T 細胞は、真核細胞由来分子とは異なる修飾を受けた自己抗原でないと反応しない可能性がある。

A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)では、U1RNP複合体に対する自己免疫応答が特徴的である。前MCTD研究班において、我々は、ヒト型 U1RNP トランスジェニックマウスを作成し、U1RNP に対する抗体が T 細胞依存性に産生されていること、この自己免疫応答を制御する T 細胞が存在することを明らかにした。

U1snRNP-A 抗原は、U1RNP 複合体に対する自己免疫応答の中で、最初に免疫系に認識されると考えられている抗原である。マウスでは、U1-A (MuA) に対して免疫学的寛容が成立しており、MuA に対する自己免疫応答誘導が困難であるが、野生型マウスではヒトの U1-A (HuA) に対する免疫応答を誘導することができる。また HuA は機能的には MuA を同一であり、細胞株に導入するとマウスの U1RNP 複合体の中に組み入れられる。さらに MuA の 3' UTR に結合して MuA の蛋白への翻訳を阻害する。そこでこの性質を利用して、ヒト U1snRNP-A 抗原を導入したトランスジェニックマウス (HuATg) を樹立したところ、期待どおりマウス U1RNP 複合体の中に組み入れられていた。この HuATg においては、ヒト型 U1-A 蛋白に対して

免疫学的寛容が成立していた。そこで、核内自己抗原 U1snRNP に対する自己免疫応答と病態との関連を解析するために、野生型マウスで誘導したヒト U1-A に対する T 細胞集団を移入してやると、U1-A に対する自己抗体のみならず、U1RNP 複合体中の 70K に対する自己抗体も出現し、糸球体腎炎、皮膚潰瘍が生じた。従って、U1RNP に対する特異的 T 細胞が存在すれば、自己抗体及び病変が誘導されることが判明した。一方、この自己反応性 T 細胞を制御するような T 細胞集団が存在すること、それが HuA 蛋白 / IFA の免疫で顕在化することを同時に見出した⁽¹⁾。このことは、U1RNP に対する制御機構が生理的に存在することを示唆する。

免疫学的寛容成立と維持の機序の解析は、T 細胞をクローンレベルで解析することが前提となる。上述の系では、T 細胞集団での挙動しか追求できない限界があった。そこで、U1RNP に対する自己免疫応答を、T 細胞クローンレベルの観点から理解するために、HuA に対する T 細胞クローンとそのエピトープの情報を入手し、HuA 抗原特異的 T 細胞レセプタートランスジェニックマウスを作成することが必要である。エピトープの性質 T 細胞のアフィニティーによって、免疫学的

寛容の機序が異なることも予想されるので、このT細胞レセプターは、immunodominant, cryptic epitopeそれぞれを認識し、かつアフィニティーが異なる幾つかの系統を作成することが望ましい。

この目的のために、マウスでのヒトU1-Aに対するT細胞エピトープを検討したところ、ヒトU1-AのC末側に主要なエピトープが存在すること、ハイブリドーマでは、おそらく cryptic epitope と考えられる76-156アミノ酸領域に反応するクローンが取得できた。

そこで、本年度は、immunodominant epitope を認識するクローンの取得を目指して、U1-AC 末側をカバーするオーバーラッピングペプチドを作成し、ペプチドでのエピトープの検討を行った。また一般的にはHuAに対する応答は、MuAに対する応答を避けながら立ち上がると考えられるので、HuAとMuAで、アミノ酸が異なる部分7カ所にそれぞれ対応したペプチドもあわせて作成し検討した。また、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ)は、脂肪細胞分化や糖代謝に関与する核内受容体である。炎症細胞でのメディエーター産生にも関与することで注目されている。このPPAR γ を1アリル欠損するPPAR γ +/-は、B細胞が活性化され、抗原特異的免疫応答が3倍程度増強される²⁾。そこでアフィニティーが低く存在頻度も高くないと想像される自己反応性T細胞の反応も増強されると予想した。そこで、このPPAR γ heterozygote mice を用いてT細胞クローンの単離をめざした。

B. 研究方法

ヒトU1-A蛋白を1-103, 76-156, 119-203, 172-250, 216-282の5つのフラグメントに分割し、GST融合蛋白発現系を用いて、大腸菌にて発現精製したものを抗原としたところ、172-250, 216-282断片に強い反応が観察された。

そこで、172-282の領域をカバーするoverlapping peptide12個(それぞれ互いに12アミノ酸ずつのoverlapping)を作成し、この領域のT細胞エピトープ決定を行った。

またHuAとMuAで、アミノ酸が異なる部分7カ所にそれぞれ対応したペプチドもあわせて作成し、全長U1-Aで免疫したC57BL/6マウスを全長ヒト型U1-A(huA)とCFAにて免疫し、10日後脾細胞を調整して、サイミジン取り込み法にてT細胞増殖応答を解析した。またhuA免疫マウスの対照としてPBSとCFA

を接種したマウス由来脾細胞を用いた。

抗原特異的免疫応答が増強されているPPAR γ heterozygote miceに、同様にHuAを免疫して、HUAに対する応答を評価した。PPAR+/-は、C57BL/6及びBALB/Cマウスそれぞれに7代以上バッククロスしたものを使用した。以上の動物実験は、東京大学医学部が定める動物実験指針に従って行った。

C. 研究結果

1-103, 172-250, 216-282に対するT細胞応答がみられ、特にC末側の断片(172-250, 216-282)に対しての応答は顕著で、Stimulation Indexでは3-13に達した。一方T細胞ハイブリドーマは、76-156断片に対して、反応するものが多かった。従って、主要なエピトープが172-282のC末側に、cryptic epitopeが76-156アミノ酸領域に存在すると予想された。

しかし、陽性コントロールであるHuAに対する反応とは異なり、両方の領域のオーバーラッピングペプチドには何の反応も検出できなかった(data not shown)。

PPAR γ +/-マウスは、代表的抗原である卵白アルブミンやメチル化ウシアルブミンを、免疫すると抗体産生とT細胞の増殖刺激ともに3倍程度に増強される(図1, 2)。これは、ICR, C57BL/6, BALB/Cいずれのバックグラウンドでも観察される。このミュータントマウスにおいては、B細胞のNF κ Bが自然に活性化されており、B細胞の増殖が促進しアポトーシスが抑制されていることが判明しているため、B細胞の抗原提示能を介してT細胞応答が増強されると推察された。抗HuAT細胞レセプターTgは、C57BL/6バックグラウンドでの作成を予定していることより、このC57BL/6-PPAR γ +/-にHuAを免疫して、U1-A反応性のT細胞取得をめざした。しかし、予想とは全く異なりPPAR γ +/-においては、U1-Aに対する反応は逆に抑制されていた(図3)。

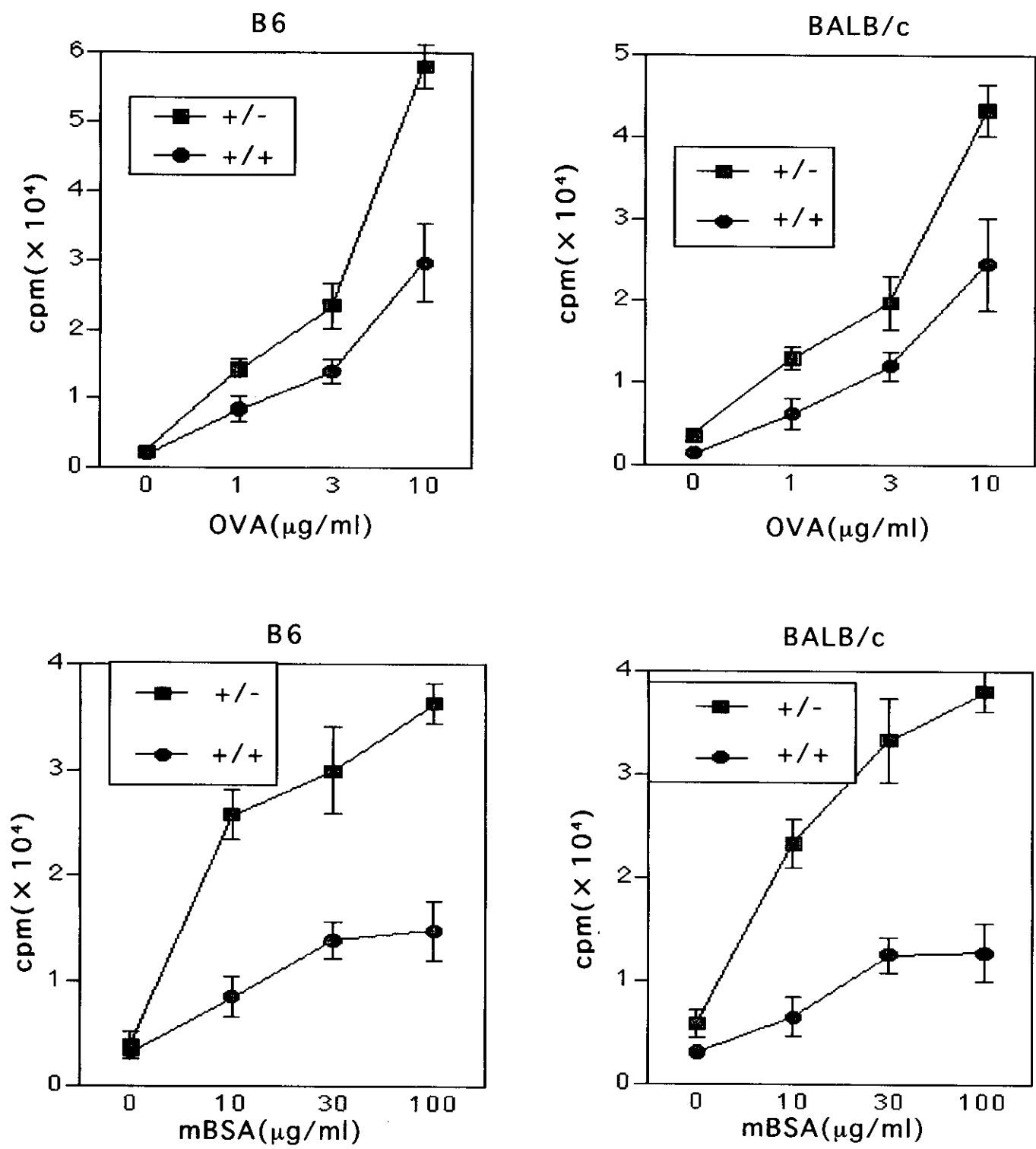


図1. PPAR γ +/-における外来抗原に対する免疫応答 (T細胞増殖応答)

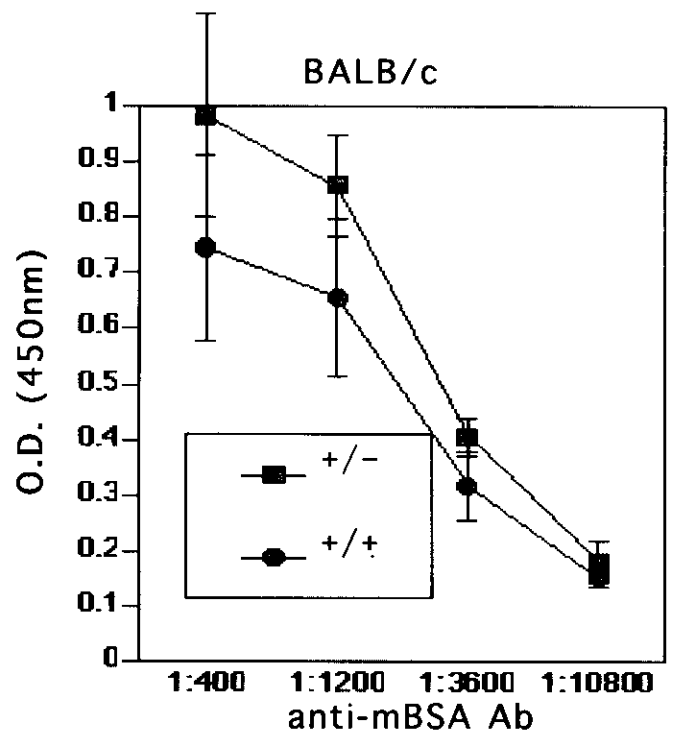
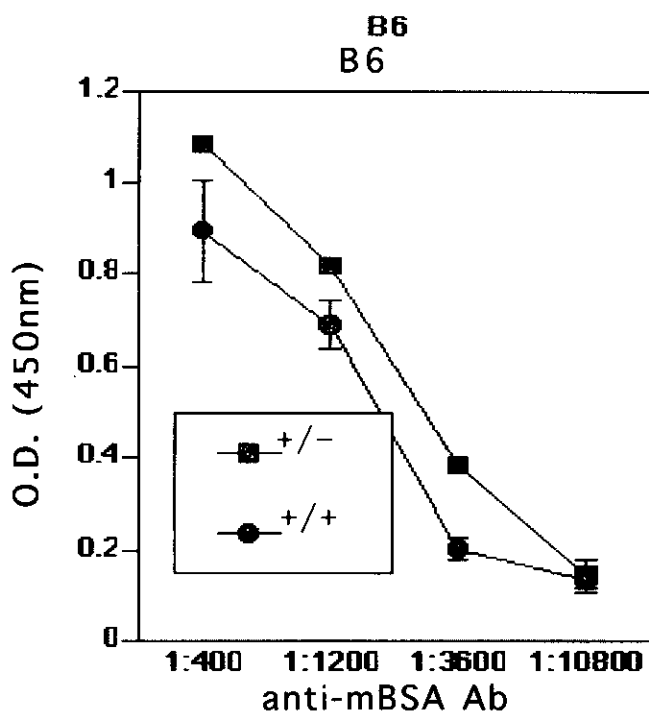
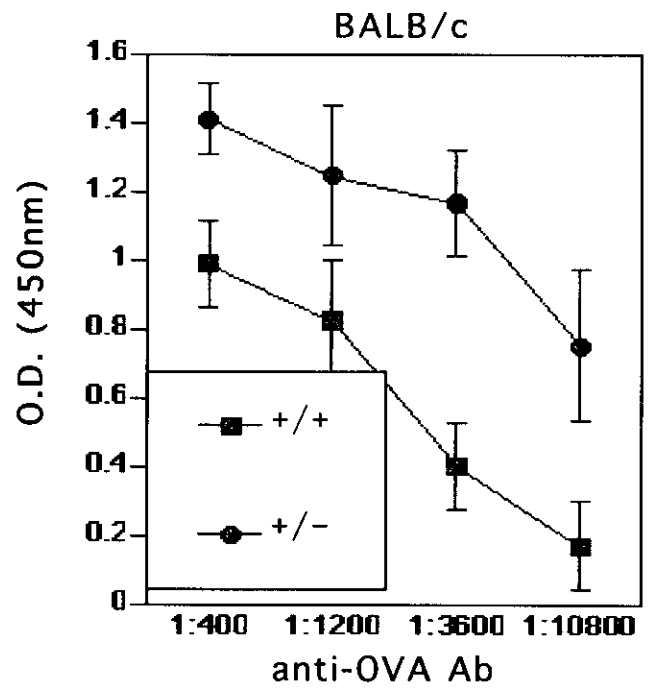
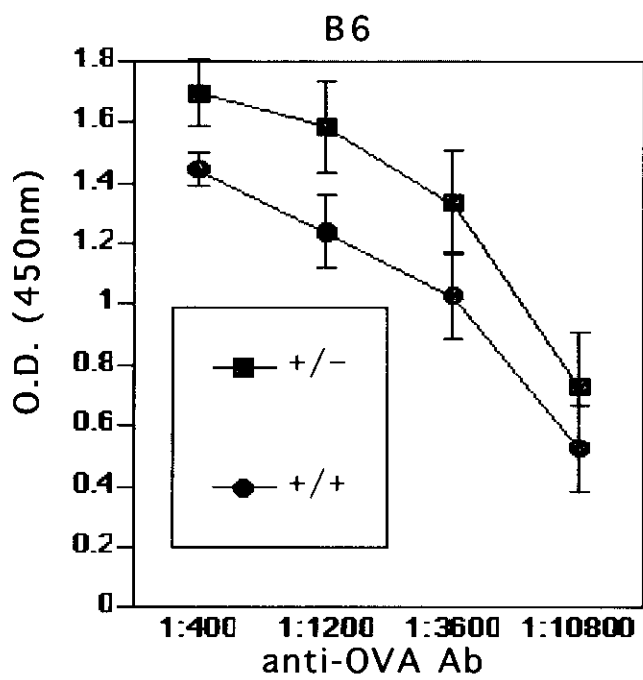


図2. PPAR γ +/-における外来抗原に対する免疫応答 (抗体価)