

図3. PPAR $\gamma$ +/- の human-U1RNP-A に対する T 細胞増殖応答

#### D. 考察

現在の所、U1-A 蛋白では、1-102 アミノ酸の RNA 結合領域、103-119 の poly A polymerase 結合領域の二つの機能的ドメインが知られているだけで、C 末側の機能は知られていない。しかし、これまでに報告されている U1-A 抗体陽性 MCTD 患者における主要な T 細胞エピトープは 201 アミノ酸以降の C 末側にあると報告されており<sup>(3, 4)</sup>、MHC も種も異なりながらも、C 末側への反応が主要である事実は、この領域への T 細胞応答が重要だと示唆する。しかし、この反応を合成ペプチドに置き換えることができなかった。

さらに、MuA に対しては免疫学的寛容が成立しているので、HuA に対して反応が生じるときには、おそらく HuA と MuA での若干異なるアミノ酸が存在する領域に対して反応している可能性がある。しかし、異なる部分に設定されたペプチドに対しても反応しなかった。

ペプチドで、HuA への反応を代替できない理由として、ペプチドでは生理的蛋白全体あるいは大腸菌蛋白と抗原プロセッシングが異なる、大腸菌由来蛋白では真核細胞由来アミノ酸分子以外の分子で修飾されている可能性などが考えられる。

抗原特異的免疫応答が増強されるはずの PPAR $\gamma$  heterozygote mice においては、HuA に対する応答は逆に抑制されていた。自己反応性 T 細胞或いは B 細胞レパトワーが B 細胞の高応答性によって逆に、あらかじめクローン削除されてしまっている可能性がある。だとすると HuA 自体は、MuA と幾つかの異なるアミノ酸を保持しているが、反応する部位は、MuA と相同な箇所ではないかと推察される。この考え方は、上記の HuA と MuA で相同でない領域に対して反応しない事実と符合する。

#### E. 結論

T 細胞レセプター情報だけなら、ハイブリドーマ或いは、リコンビナント蛋白刺激によりハイブリドーマを経て入手可能である。但し、そのレベルの情報に基づいた T 細胞クローン情報では、当初予定した U1-A 蛋白に対する免疫制御機構を精密に解析できるかは明確でない。免疫学的に正常な遺伝的背景における自己反応性 T 細胞の活性化には真核細胞由来アミノ酸プラス何らかの修飾が、抗原提示或いは増殖に必要である可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Dendritic Cells Expressing a Nuclear Autoantigen Lead to Persistent Anergic State of CD4+ Autoreactive T Cells After Proliferation. Kimito Kawahata, Yoshikata Misaki, Michiko Yamauchi, Shinji Tsunekawa, Keigo Setoguchi, Jun-ichi Miyazaki and Kazuhiko Yamamoto (J. Immunol. 168: 1103-12, 2002)
2. Setoguchi K, Misaki Y, Terauchi Y, Yamauchi T, Kawahata K, Kadowaki T, Yamamoto K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. J Clin Invest. 2001 Dec;108(11):1667-75.
3. Gene-transferred oligoclonal T cells predominantly persist in peripheral blood from an adenosine deaminase deficient patient during gene therapy. Yoshikata Misaki, Ichiko Ezaki, Tadashi Ariga, Nobuaki Kawamura, Yukio Sakiyama, and Kazuhiko Yamamoto. Molecular Therapy 3(1)24-27, 2001
4. 三崎義堅 自己抗体産生機序。臨床病理 (日本臨床検査医学会誌) vol 49 No. 6, p566-570, 2001
5. 三崎義堅 慢性関節リウマチの治療法と併用薬剤の注意点 臨床成人病 vol 31 No6, 809-812, 2001
6. 三崎義堅 サイトカイン遺伝子による治療 最新医学 56 (4) 902-908, 2001
7. 三崎義堅 IL-10 による慢性関節リウマチの治療 Molecular Medicine Vol 38 No4 418-424, 2001

### 2. 学会発表

1. Setoguchi K, Misaki Y, Terauchi Y, Yamauchi T, Kawahata

K, Kadowaki T, Yamamoto K. Haploinsufficiency of Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma affects B cell proliferative responses and the severity of experimentally induced arthritis. American College of Rheumatology, 2001 Annual Scientific Meeting. Arthritis & Rheumatism 44(9)S85, 2001

2. Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada K, Shukunami C, Hiraki Y, Yamamoto K. Chondromodulin, a joint-cartilage derived angiogenesis inhibitor, reduces the incidence of experimental arthritis via modulating T cell response. American College of Rheumatology, 2001 Annual Scientific Meeting. Arthritis & Rheumatism 44(9)S88, 2001.

## 文献

1. Kawahata K, Misaki Y, Komagata Y et al. Altered expression level of a systemic nuclear autoantigen determines the fate of immune response to self. J Immunol ;162:6482-91,1999
2. Setoguchi K, Misaki Y, Terauchi Y, Yamauchi T, Kawahata K, Kadowaki T, Yamamoto K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. J Clin Invest. 2001 Dec;108(11):1667-75.
3. Okubo M, Kurokawa M, Ohto H, Nishimaki T, Nishioka K, Kasukawa R, Yamamoto K. Clonotype analysis of peripheral blood T cells and autoantigen-reactive T cells from patients with mixed connective tissue disease. Journal of Immunology. 153(8):3784-90, 1994
4. Okubo M, Kokubun M, Nishimaki T, Kasukawa R, Ohto H, Yamamoto K, Muller S. T cell epitope mapping of U1-A RNP. Arthritis & Rheumatism. 38(8):1170-2, 1995

## THE ISOLATION OF ANTI-HUMAN U1RNP-A REACTIVE T CELL CLONES FROM IMMUNOLOGICALLY NORMAL MICE

Yoshikata Misaki

Department of Allergy and Rheumatology, graduateSchool of Medicine, university of Tokyo

We have demonstrated that anti-human U1A reactive T cell populations were able to induce anti-U1RNP autoantibody in human U1RNP-A autoantigen transgenic mice (HuATg). We also revealed the presence of regulatory T cells in the HuATg. In order to analyze the regulatory mechanism for anti-U1A response, we intended to generate T cell receptor Tg against HuA, by which we would be able to analyze the regulatory mechanism in a clonal level. Although splenocyte from HuA primed mice reacted the C-terminus fragments of HuA generated with GST fusion protein expression system, they did not recognize any synthetic peptide derived from HuA. In order to obtain autoreactive T cells, we employed PPAR $\gamma$ <sup>+/+</sup> heterozygote mutant mice which exhibits the enhanced antigen-specific immune response to exogenous derived antigens, due to hyperreactive B cells. Contrary to our expectation, we found that the immune response to HuA was suppressed. This is because autoreactive lymphocytes repertoire could be deleted due to the hyperreactivity of B cells. Therefore, the autoreactivity against human U1-A as well as mouse endogenous U1-A is tightly regulated. It is possible that this strict regulation does not allow immune response to peptides derived from eukaryote, and immune response to autoantigen requires additional modification like prokaryote derived antigens.

## 8. 抗 RNP 抗体産生機序の解明：MCTD における 自己抗原 RNP-A 遺伝子の塩基配列の変異

分担研究者：大久保 光夫

所属施設：埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部

### 研究要旨

昨年 MCTD の対応自己抗原である RNP-A gene の塩基配列解析を行い、抗 RNP 抗体陽性患者 RNP-A gene の transcription site の CTTCC motif に deletion を認めた。本年の研究では RNP-A gene の 3' UTR にある pyrimidine rich region に variation を持つ、MCTD 患者が健常人より統計学的に有意に多かった。さらに U1-RNA に RNP が結合すると想定される AG 配列にも variation を認めた。これらの結果から RNP-A 遺伝子の変異が RNP の発現と安定性に影響し、蛋白抗原としての RNP-A の構造および量に変化して、これが抗 RNP 抗体産生の一因となる可能性があるかと推定した。

### A. 研究目的

MCTD は対象となる自己抗原が特定されている数少ないヒト自己免疫疾患である。自己免疫疾患の病因には複数の遺伝子異常が関与していると推定されているが、抗原そのものの遺伝子の変異に関しては解析はなされていない。そこで、抗 RNP 抗体陽性患者遺伝子の塩基配列とくに 19 番染色体上の RNP-A をコードする領域の塩基配列の解析を行なった。解析の基本となる塩基配列はヒトゲノム解析により公開された塩基配列情報を使用している。これは、ゲノム解析の利益を患者にいち早く還元することにつながる。

### B. 研究方法

解析対象遺伝子は第 19 番染色体上の U1 snRNPA である。解析の方法は対象遺伝子配列上に存在する exon の外と intron の内に 3' 側 5' 側の両方から 500 から 2000bp 程度の長さの DNA を PCR 増幅できるようなプライマーを設定して増幅する。この PCR fragment を SSCP 法にて電気泳動し、泳動距離に差異が認められたものを TA クローニング法にてクローニングした後 ABI 377 オートシーケンサーにて塩基配列を決定する。

(倫理面への配慮) 解析対象検体は北里大学倫理委員会にて承認を受けた「説明と同意」をもとに、同施設に

おいて協力の同意を得て採血され、さらに無名化された抗 RNP 抗体陽性患者 30 名の末梢単核球由来の genomic DNA である。健常人の塩基配列は(新たに採血はせず) Genbank や NCBI により公開されている塩基配列情報を参照した<sup>1)</sup>(図 2)。

### C. 研究結果

1991 年に Venrooij らにより報告された U1-snRNP-A genome 塩基配列<sup>2)</sup>以外に RNP-A については塩基配列の variation の報告はなかった。しかし、MCTD 患者由来の塩基配列は exon1 の leader segment に相当する部位において CTGACTTC が CGATTC へと deletion している例がある事がすでに明かとなっている。本年の解析では抗 RNP 抗体陽性の患者群において図 1 に示す 5ヶ所の塩基配列に変異が認められた。詳細とその頻度は表 1 に示す。特に exon6 は変異が多い。これらの変異はアミノ酸に変換されない UTR と呼ばれる領域に集中しており、#1006 の T→C と #1127 の T→C の変異の頻度は高く、健常人と比較して有意差を認めた。

### D. 考察

昨年 の解析で RNP-A の CTTCC motif 内に deletion が認められた。この motif は transcription

siteである可能性が高い。したがって、この部位の塩基配列のdeletionはRNP-Aのtranscriptionに影響を与えている可能性があり、RNP-Aの発現量に影響を与えていると考えられた<sup>3)</sup>。本年の研究ではRNP-A geneの3' UTRにあるpyrimidine rich resionにvariationを持つ、MCTD患者が健常人より統計学的に有意に多かった。さらに3' UTR U1-RNAにRNPが結合すると想定されるAG配列にもvariationを認めた<sup>4)</sup>。一般に遺伝子解析ではUTRはアミノ酸に変換されないため、今まであまり重要視されていなかった。しかし、最近ではTNF $\alpha$ やモルヒネのレセプターなど3' UTRの遺伝子変異は、シグナルの不安定性に直接関与している事が明かとなっている<sup>5)</sup>。また、RNPの幹となるRNAは3' UTRに直接RNPを結合させるため、RNP-A遺伝子のAG配列における変異はRNPの発現と安定性に影響している可能性は高い<sup>6)</sup>。その結果として蛋白抗原としてのRNP-Aの構造および量が変化して、これが抗RNP抗体産生の一因となる可能性がある。このように、MCTDでは自己抗原そのものに関与する遺伝子と補体などの機能遺伝子など(ひとつの)染色体上の少なくとも複数の変異があり、これらが病因あるいは病態を形成している可能性があるため、今後も患者のgenomeの横断的な解析が重要な研究課題になると考えられる。

## E. 結論

抗RNP抗体陽性患者RNP-A geneのtranscription siteのCTTCC motifにdeletionを認めた。また、RNP-A geneの3' UTRにあるpyrimidine rich resionにvariationを持つ、MCTD患者が健常人より統計学的に有意に多かった。さらにU1-RNAにRNPが結合すると想定されるAG配列にもvariationを認めた。これらの結果からRNP-A遺伝子の変異がRNPの発現と安定性に影響し、蛋白抗原としてのRNP-Aの構造および量が変化して、抗RNP抗体産生の一因となる可能性がある。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. 大久保光夫：同種免疫におけるT細胞レセプター。日本輸血学会雑誌、45：784-785、1999
2. 大久保光夫、前田平生（埼玉医大総合医療センター輸血・細胞治療）：HLAに基づく個体差、自己免疫疾患とHLA。治療学、33：1277-1280、1999
3. 大久保光夫：慢性関節リウマチにおける自己抗原検索の進め方

とその解釈。リウマチ：21：430-435、1999

4. 大久保光夫、前田平生（埼玉医大総合医療センター輸血・細胞治療）：免疫不全-最新の病態と治療 Bare lymphocyte syndromeの病因・病態と治療。小児内科、：2049-2053、2000
5. Masao Tanaka, Masaaki Kishimura, Shoichi Ozaki, Fumio Osakada, Hidetaka Hashimoto, Mitsuo Okubo, Masao Murakami, and Kazuwa Nakao. :Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. Journal of Clinical Investigation. 106: 137-144, 2000

### 学会発表

- 大久保光夫、広畑俊成\*、前田平生（埼玉医大総合医療センター輸血・細胞治療、\*帝京大学医学部内科）：Neuropsychiatric syndromes of SLE (NPSLE)患者におけるHLAの解析。第44回リウマチ学会、横浜、2000/5/13/2000

## 文 献

1. International human genome project collaborators. Toward the complete sequence of the human genome. Homo sapiens chromosome 19 working draft sequence segment, complete sequence. NCBI, 2001 Nov.
2. Nelissen RL, Sillekens PT, Beijer RP, et al. Structure, chromosomal localization and evolutionary conservation of the gene encoding human U1 snRNP-specific A protein. Gene 102, 189-196, 1991.
3. Seidl R., Labudova O., Krapfenbauer K., et. al., Deficient brain snRNP70K in patients with Down syndrome. Electrophoresis; 22,43-48,2001.
4. Frankel AD., Mattaj IW., and Rio DC. RNA-protein interactions. Cell; 67,1041-1046,1991.
5. Locksley RM., Killeen N., and Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integration mammalian biology. Cell; 104,487-501,2001.
6. Boelens W., Scherly D., Jansen EJR., et al., Analysis of in vitro binding of U1-A protein mutants to U1snRNA. Nucleic Acids Res; 19,4611-4618,1991.

表 1 Frequency of sequence variation of U1-snRNP A

exon & number	allele variation	frequency			
		healthy	donor	anti-RNP ab (+)	patient
exon 1 #11 or 15	"C" deletion		0/52	1/30	
exon 2 #365	A→G		1/52	0/16	
exon 6 #1006	T→C		1/52	16/56	<i>p</i> =0.0004
exon 6 #1048	A→G		0/52	1/8	
exon 6 #1073	C→T		1/52	3/16	
exon 6 #1127	T→C		0/52	2/8	<i>p</i> =0.009

健康人はNCBIの26人52遺伝子と本研究対象患者31人62遺伝子の解析。  
 注) 62に達していないのは解析未終了のため。exon 6, #1006: T→Cは1例でhomo他はhetero.

```

exon 1 1 gaattcctga cttc[ ]ttttc ggaggaagat ccttgagcag cgcagcttgg gacaaggat
        61 ttggagaaac ccagggctaa agtcacgttt ttctccttt aagacttacc tcaacacttc
        121 actccatggc agttcccag agccgcctta accacactat ttatatcaac aacctcaatg
        181 agaagatcaa gaaggatg
exon 2 241 agatcctgga tatectggta tcacggagcc tgaagatgag gggccaggcc tttgtcatct
        301 tcaaggaggt cagcagcgcc accaacgccc tgcgctccat gcagggtttc cctttctatg
        361 acaag[ ]ctat g
exon 3 421 gcaccttcgt ggagcgggac cgcaagcggg agaagaggaa gcccaagagc caggagaccc
        481 cggccaccac gaaggctgtg caagcggggg gagccacccc cgtggtgggg gctgtccagg
        541 ggctgtccc g
exon 4 601 gccagccgcc ctacatgccg cccctgggta tgatccccc gccaggcctt gcacctggcc
        661 agatcccacc aggggccatg ccccgcagc agcttatgcc aggacagatg ccccctgcc
        721 agcct
exon 5 781 ccaacgagct catgctgtcc atgcttttca at
exon 6 841 tggataccgg gcggcatgac atgccttcg tggagtttga caatgagga caggcagggg
        901 cagctcgcga tgacctgag ggctttaaga tcacgcagaa caacgccatg aagatctcct
        961 ttgccaagaa gtgacacctt ttcccccat gctgccctt teccc[ ]ttc tggggcacc
        1021 ctttccccc ttggctcagc cccctg[ ]gg taagtcccc cttggaggcc tttctggagc
        1081 cgtgtgtgag tgaotgggtc ccaacagca ttgtaccag agtctg[ ]cc cagacattgc
        1141 acctggcgt gttaggccgg aattaagtg gctttttgag gtttggttt tcacaaaaa
        1201 aaggaattc
    
```

図 1. 変異の位置

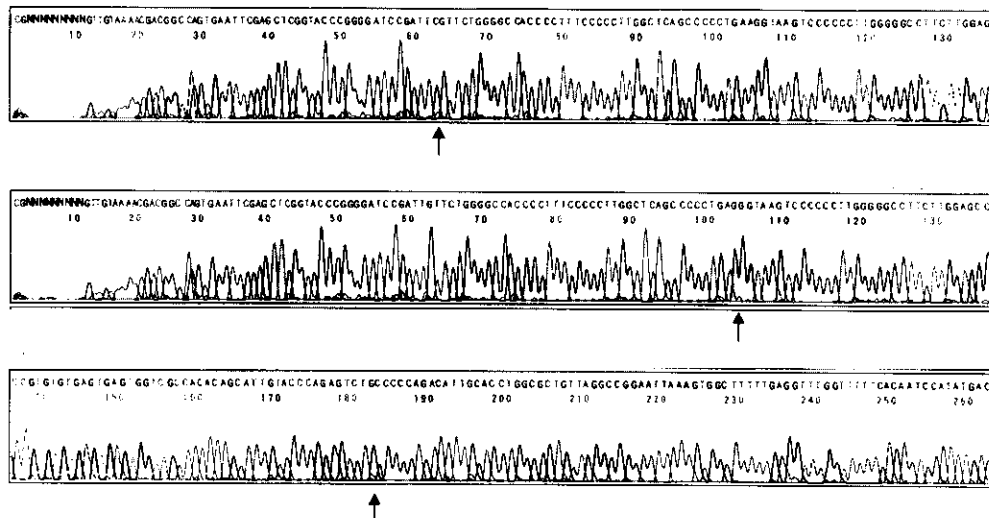


図 2. 塩基配列解析結果例 上: #106 TからC、中: #1048 AからG、下: #1127 TからC

# **ANALYSIS OF U1-snRNP-A GENE VARIATION IN PATIENTS WITH ANTI-RNP-A AUTOANTIBODY.**

Mitsuo Okubo<sup>1)</sup>, Ai Kobayashi<sup>2)</sup>, Jun Okada<sup>2)</sup>, Hirobumi Kondo<sup>2)</sup>,  
and Hiroo Maeda<sup>1)</sup>

Division of Blood Transfusion and Cell Therapy, Saitama Medical Center, Saitama Medical School<sup>1)</sup>.  
Department of Internal Medicine, Kitasato University  
School of Medicine<sup>2)</sup>

To clarify whether the RNP-A genes from patients with anti RNP antibody have sequence variations, we analyzed DNA of exon 1-6 on RNP-A gene. Thirty one DNA samples with informed consent were obtained from the patients with anti RNP antibody. PCR amplified DNA fragments were cloned into plasmids and then analyzed DNA sequence. The resultant data were compared with DNA database, such as Genbank or NCBI. There were six kinds of DNA sequence variations in RNP-A gene from the patients. Especially frequency of variation: T → C at 1006bp was significantly higher than the frequency of healthy donors'. It was also found that variation: A → G at 1048bp in 3' UTR of exon 6, which is known as an RNP binding site to RNA. From these results, it is suggested that DNA variations of RNP-A might be a pathogenesis of anti RNP antibody production.

## 9. 混合性結合組織病 (MCTD) における疾患活動性と抗 TS1-RNA 抗体

分担研究者 : 高崎 芳成  
研究協力者 : 池田圭吾、官川 薫、縄田益之、松下雅和、松平 蘭、  
金田和彦、竹内 健、橋本博史  
所属施設 : 順天堂大学膠原病内科

### 研究要旨

自己免疫疾患における自己抗体の対応抗原の多くはRNA-蛋白の複合体で、蛋白成分に対する抗体に加え、RNAに対する抗体の存在も近年報告されている。最近、我々は25塩基のランダムな配列のRNAライブラリーを用いたスクリーニング法により、シェーグレン症候群 (SS) 患者血清と高率に反応する新たな RNA 抗原の塩基配列 (TS1-RNA) を決定し、このRNAがMCTDおよびSS患者血清と反応することを報告した。今回、MCTD患者の抗TS1-RNA抗体を免疫沈降法で検出し、その臨床的意義について検討した。同抗体はMCTD患者の31.7%で検出され、その陽性群では陰性群に比べ、有意に蛋白尿や高血圧を高率に認め、抗dsDNA抗体なども高率に検出された。また抗体価と臨床像の変遷を長期的に観察すると、抗TS1-RNA抗体価が臨床症状や各種検査所見の経過と平行して変動していた。以上の結果より、抗TS1-RNA抗体はMCTD患者において、主に全身性エリテマトーデス (SLE) 様症状の活動性と相関し、疾患活動性の指標となりうることが示唆された。

### A. 研究目的

ランダムRNAライブラリー法にてSS患者より同定された、抗TS1-RNA抗体のMCTD患者における出現率及び臨床的意義について検討した。

### B. 研究方法

TS1-RNAを<sup>32</sup>Pで標識し、免疫沈降法にてMCTD、SS、抗U1 RNP抗体陰性SLE、慢性関節リウマチ(RA)患者血清との反応性を検索し、MCTD患者の抗TS1-RNA抗体陽性群の臨床的特徴について陰性群と比較検討した。さらに、抗TS1-RNA抗体と抗U1 RNP抗体との相関を調べる目的で、抗U1 RNP抗体陽性と陰性のSLE患者の抗TS1-RNA抗体陽性率を比較検討した。反応性は、%Binding = [沈降した抗体・<sup>32</sup>P標識TS1-RNA複合体の放射活性(cpm値) / 添加した<sup>32</sup>P標識TS1-RNAの放射活性(cpm値)] × 100として定量した。また、HeLa細胞抽出液とそれより抽出したRNAを抗原源とした免疫沈降により抗TS1-RNA抗体陽性血清と反応する体細胞中のRNAについて解析を加え

た。

(倫理面への配慮)

患者氏名は公表せず、研究結果と個人の氏名が一致しないよう配慮した。

### C. 研究結果

- 1) 各種膠原病における抗TS1-RNA抗体の出現率  
抗TS1-RNA抗体はSS患者の53.3%についてMCTD患者の31.7%に検出され、抗U1 RNP抗体陰性SLEの13.3%に比べ、有意に高率となっていた (図1)。
- 2) 抗TS1-RNA抗体陽性MCTD患者の臨床像  
抗TS1-RNA抗体陽性群と陰性群の臨床像を比較すると、陽性群でSSに関連した乾燥症状や抗SS-A抗体、血清IgAレベルの上昇に加え、SLEに関連した蛋白尿(60.6%)や高血圧(24.2%)、抗Sm抗体(36.4%)や抗dsDNA抗体(54.5%)などが陰性群より有意に高率に認められた (表1及び表2)。
- 3) SLEにおける抗U1 RNP抗体と抗TS1-RNA抗体

MCTDにおいてSLE様所見との関連が認められたため、抗U1 RNP抗体陽性及び陰性SLEにおける抗TS1-RNA抗体の出現率を検討した。その結果、抗TS1-RNA抗体陽性率は抗U1 RNP陽性SLE患者で48.45%と陰性群の13.3%に比較して有意に高率となっていた(図2)。

#### 4) MCTDの臨床像の変遷と抗TS1-RNA抗体

3症例において、抗TS1-RNA抗体価が臨床症状や血液検査所見、治療の経過と平行して変動した。図3にその代表例の結果を示す。この症例は1997年、レイノー現象のみを認めていたが、その後手背の腫脹、さらに関節痛の出現とともに抗TS1-RNA抗体が上昇し、その抗体の上昇後一連の症状が増悪し、治療に反応して低下した。

#### 5) 抗TS1-RNA抗体とHeLa細胞抽出液の反応性

HeLa細胞抽出液とそれより抽出したRNAを抗原源とした免疫沈降では抗TS1-RNA抗体陽性血清に共通するRNAは検出されなかった。この結果より、この測定系で検出される範囲では体細胞中のRNAとは反応しないことと同時に、U1 RNPとの交叉反応も認めないことが明らかとなった(データは示していない)。

### D. 考察

膠原病で検出される抗核抗体の対応抗原の多くがRNAと蛋白が結合した複合体、すなわちribonucleo-protein(RNP)の形態をとり<sup>1)</sup>、蛋白成分に対する抗体に加え、RNAに対する抗体の存在が近年報告されている<sup>2-4)</sup>。それらの中で、MCTDにて抗U1 RNA抗体が疾患活動性と相関することが報告されている<sup>5)</sup>。今回我々が検討した抗TS1-RNA抗体<sup>6)</sup>はMCTD患者にてSLE様の臨床所見と関連し、その疾患活動性と相関していることが明らかになった。SLE患者での検討から抗U1 RNP抗体そのものとの関連も示唆されたが、今回の検討でU1 RNAやhY-RNAとの交差反応性は無いことが確認された。このRNAエピトープの実体は不明であるがMCTDでは活動性の指標となる免疫学的所見が乏しく、この点で抗TS1-RNA抗体が有用であることが示唆された。

### E. 結論

抗TS1-RNA抗体はMCTD患者において、主にSLEに関連した症状と相関し、同抗体が疾患活動性の指標となりうることが示された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Hirokawa K, Takasaki Y, Takeuchi K, et al: Characterization of a novel antibody against the sequence-specific RNA by a random RNA selection in patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* (in press).

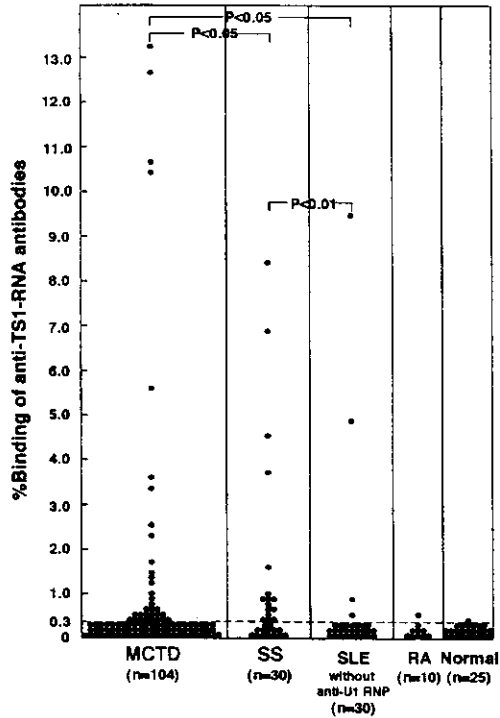
#### 2. 学会発表

Ikeda K, Hirokawa K, Takasaki Y, et al: Anti-TS1-RNA antibodies as useful markers for disease activity of patients with mixed connective tissue disease(MCTD). The 7th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, Awajishima, 2001.

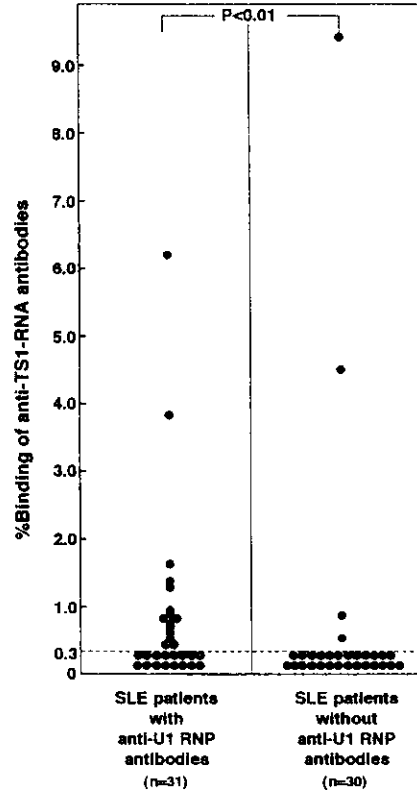
### 文 献

1. Tan EM: Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 44: 93-152, 1989
2. Tsai DE, Harper DS, Keene JD: U1-snRNP-A protein selects a ten nucleotide consensus sequence from a degenerate RNA pool presented in various structural contexts. *Nucl Acid Research* 19: 4931-4936, 1991
3. Tsai DE, Kenan DJ, Keene JD: In vitro selection of an RNA epitope immunologically cross-reactive with a peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8864-8868, 1992
4. Tsai DE, Keene JD: In vitro selection of RNA epitopes using autoimmune patient serum. *J Immunol* 150: 1137-1145, 1993
5. Hoet RM, Koornneef I, de Rooij DJ, et al: Changes in anti-U1 RNA antibody levels correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus overlap syndrome. *Arthritis Rheum* 35: 1202-10, 1992
6. Hirokawa K, Takasaki Y, Takeuchi K, et al: Characterization of a novel antibody against the sequence-specific RNA by a random RNA selection in patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* (in press).





(图 1)



(图 2)

(表 1) Comparison of clinical features in MCTD patients with and without anti-TS1-RNA antibodies

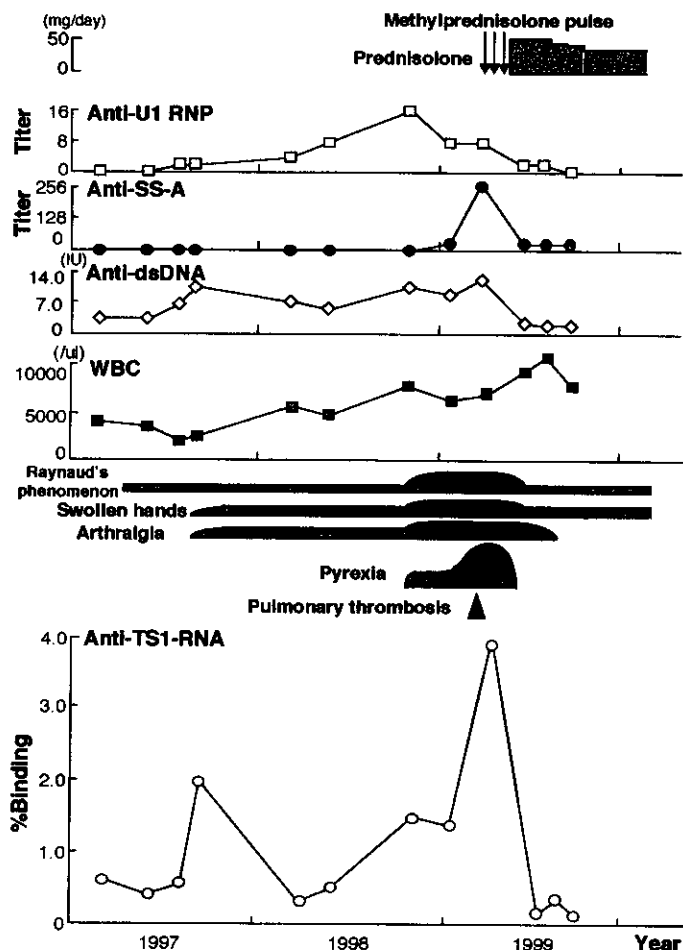
Clinical features	Anti-TS1-RNA antibodies (n=104)		
	with (n=33)	without (n=71)	p value
Raynaud's phenomenon	87.9%	95.8%	NS
Swollen fingers or hands	51.5	80.3	0.001
Polyarthritits	81.8	77.5	NS
Lymphadenopathy	24.2	16.9	NS
Malar rash	21.2	23.9	NS
Eruption	27.3	23.9	NS
Photosensitivity	18.2	12.7	NS
Oral ulcer	6.1	15.5	NS
Alopecia	9.0	5.6	NS
Pericarditis	6.1	4.2	NS
Pleuritis	6.1	1.4	NS
Proteinuria (> 0.5g/day)	60.6	35.2	0.01
Hypertension	24.2	8.5	0.01
CNS involvement	3.0	2.8	NS
Sclerodactyly	42.4	36.6	NS
Skin ulcer	12.1	7.0	NS
Telangiectasia	3.0	5.6	NS
Interstitial pneumonitis	39.4	28.2	NS
Abnormality of pulmonary function tests	45.5	39.4	NS
Pulmonary hypertension	3.0	4.2	NS
Hypomotility or dilatation of esophagus	9.0	9.9	NS
Myalgia	27.3	49.3	0.01
Muscle weakness	30.3	46.5	0.01
Sicca complex	63.6	38.0	0.01
Thyroiditis	18.2	21.1	NS

Values are percentages. NS=not significant.  
CNS=central nervous system

(表 2) Comparison of laboratory findings in MCTD patients with and without anti-TS1-RNA antibodies

Laboratory findings	Anti-TS1-RNA antibodies (n=104)		
	with (n=33)	without (n=71)	p value
Leukocytopenia (<3000/ul)	18.2%	23.9%	NS
Lymphocytopenia (<1000/ul)	63.6	60.6	NS
Anemia (<11.2g/dl)	27.3	26.8	NS
Thrombocytopenia (<100,000/ul)	9.1	11.3	NS
Increased ESR (>30mm/hr)	75.8	63.4	NS
Increased serum level of CRP (>0.3mg/dl)	36.4	32.4	NS
Increased serum level of CPK (>93IU/l)	21.2	29.6	NS
Increased serum level of Amy (>400IU/l)	27.3	26.8	NS
Increased serum level of IgG (>1700mg/dl)	87.9	83.1	NS
Increased serum level of IgA (>410mg/dl)	45.5	25.4	0.05
Increased serum level of IgM (>260mg/dl)	6.1	4.2	NS
Hypocomplementemia (<25IU)	27.3	15.5	NS
Rheumatoid factor (RF)	18.2	36.6	0.05
Platelet associated IgG (PAIgG)	6.1	5.6	NS
IgG-rheumatoid factor (IgGRF)	6.1	8.4	NS
Circulating immune complexes	27.3	26.8	NS
Anticardiolipin antibodies (aCL)	21.2	22.5	NS
Lupus anticoagulant (LAC)	9.1	5.6	NS
Anti-U1 RNP antibodies	100.0	100.0	NS
Anti-Sm antibodies	36.4	16.9	0.01
Anti-SS-A antibodies	54.5	31.0	0.01
Anti-SS-B antibodies	3.0	7.0	NS
Anti-Topoisomerase I antibodies	0.0	0.0	NS
Anti-Jo-1 antibodies	0.0	0.0	NS
Anti-dsDNA antibodies (RIA)	54.5	38.0	0.05

Values are percentages. NS=not significant.  
RIA=radioimmunoassay  
dsDNA=double-stranded DNA



(图 3)

## CLINICAL SIGNIFICANCE OF ANTIBODIES TO TS1-RNA IN PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASES (MCTD)

Yoshinari Takasaki, Keigo Ikeda, Kaoru Hirokawa, Masuyuki Nawata, Masakazu Matsushita, Ran Matsudaira, Kazuhiko Kaneda, Ken Takeuchi, Hiroshi Hashimoto.

Department of Internal Medicine and Rheumatology, Juntendo University School of Medicine

Anti-TS1-RNA antibodies were clarified in sera from patients with Sjögren's syndrome by using a random RNA epitope protocol, and we investigated the clinical significance of anti-TS1-RNA antibodies in MCTD patients. Anti-TS1-RNA antibodies were detected in the way that the transcription of <sup>32</sup>P-UTP labeled TS1-RNA was immunoprecipitated with sera from patients. We examined the prevalence of anti-TS1-RNA antibodies in 104 MCTD patients and studied clinical characteristics of patients with anti-TS1-RNA antibodies. Anti-TS1-RNA antibodies were detected in 31.7% of patients with MCTD. The frequency of proteinuria ( $p < 0.01$ ), hypertension ( $p < 0.01$ ), sicca complex ( $p < 0.01$ ), anti-Sm ( $p < 0.01$ ), anti-SS-A ( $p < 0.01$ ), and anti-ds DNA antibodies ( $p < 0.01$ ) were more predominant in MCTD patients with anti-TS1-RNA antibodies. These results suggested the strong association of anti-TS1-RNA to lupus like syndrome, and we studied the relationship between anti-TS1-RNA and anti-U1 RNP in SLE. Then, anti-TS1-RNA antibodies were detected significantly higher in SLE patients with anti-U1 RNP antibodies than those without anti-U1 RNP antibodies ( $p < 0.01$ ). In the longitudinal studies using 3 patients with MCTD, the titer of anti-TS1-RNA antibodies changed in parallel with disease activities.

These results suggest that anti-TS1-RNA antibodies are correlated with the clinical features associated with SLE in addition to sicca complex, and the detection of anti-TS1-RNA antibodies is useful to evaluate the disease activity in MCTD.

## 10. MESACUP-2 RNP および 二重免疫拡散法による抗 U1 RNP 抗体の測定 - 多施設データとの比較検討 -

分担研究者 : 高崎芳成  
研究協力者 : 池田圭吾、縄田益之、松下雅和、山田浩史、松平 蘭、矢野哲郎、  
官川 薫、金田和彦、竹内 健、橋本博史  
所属施設 : 順天堂大学膠原病内科

### 研究要旨

同一血清を対象とし、MESACUP-2 RNP(MC2-R)に対する抗U1 RNP抗体の反応性を3つの異なる検査施設にて測定した二重免疫拡散法(DID)の結果と比較検討した。対象はMCTD59例を含む100症例で、DIDは3つの異なる外注検査センターに依頼した。MC2-Rでは抗U1 RNP抗体は100例中68例で陽性、32例で陰性となった。それぞれの群にて各センターにて実施したDIDと比較すると、AおよびCセンターではELISA陽性68例中66例が陽性であったのに対しBセンターでは63例のみが陽性となっていた。一方、ELISA陰性の32例はすべての検査センターのDIDでも陰性となっていた。HeLa細胞抽出液を用いた免疫沈降ではMC2-Rにて抗U1 RNP抗体陽性となった5血清はいずれもU1 RNAの沈降が確認された。以上の結果よりMC2-Rは抗原特異的に反応し、DID法より高い感度を有していることが示唆された。

### A. 研究目的

MCTDでは抗U1 RNP抗体陽性が診断の必須項目となっており、その抗体を特異的に検出する方法としてDIDが長い間用いられてきた。最近、リコンビナント抗原を抗原源としたELISA法が開発されたものの、その感度は必ずしもDIDより高いとは言えなかった。今回はこの問題を解決するために新たに開発された抗U1 RNP抗体測定系、MESACUP-2 RNP(MC2-R)を客観的に評価する目的で、同一血清を対象とし、3つの異なる検査施設にて測定したDIDの結果と比較検討した。

### B. 対象および研究方法

#### 1)対象

厚生省の診断の手引きの基準を満たすMCTD59例、アメリカリウマチ協会(ACR)の分類基準を満たすSLE29例と強皮症(SSc)5例、さらにBohanの診断基準を満たす多発性筋炎(PM)もしくは皮膚筋炎(DM)7例を対象とした。

#### 2) MESACUP-2 RNP(MC2-R)キットによるELISA

被検血清を反応用緩衝液で101倍に希釈し、その100 $\mu$ lを各wellに添加、室温で1時間反応させた。洗浄後、100 $\mu$ lのペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を添加し、室温にて1時間反応させた後、テ

トラメチルベンチジン基質溶液を用いて発色させた。付属の標準血清と被検血清のOD450nmを測定し、以下の数式にてIndex値を求めた。Index=(検体の吸光度-Calibrator 1の吸光度) $\div$ (Calibrator 2の吸光度-Calibrator 1の吸光度) $\times$ 100 (Calibrator1は陰性標準液で、Calibrator2は陽性標準液)。添付の説明書では15.0以下のindex値を陰性、22.0以上を陽性、その間をgray zoneとしている。

#### 3) 二重免疫拡散法 (DID)

100検体のDIDによる抗U1 RNP抗体の測定は3つの異なる検査センターに依頼して行った。各検査センターにおけるDIDはそれぞれの施設で異なり、使用しているゲルの濃度、抗原の種類、抗原及び血清の濃度などの詳細は明らかにされていないが、それぞれ独自の調製が行われていることが推定される。

#### 3)免疫沈降法(IP)

HeLa細胞抽出液を抗原源とし、被検血清と反応させ、U1 RNAの沈降を検出した。

(倫理面への配慮)

患者氏名は公表せず、研究結果と個人の氏名が一致しないよう配慮した。

## C. 研究結果

### 1) 各種膠原病血清のMC2-Rへの反応性

図1に各疾患の患者血清を対象とし、MC2-Rを用いて測定した抗U1 RNP抗体の検出結果を示す。MCTD59例の全例で抗U1RNP抗体が検出されたのに対し、SELでは29例中9例、31.0%で抗U1 RNP抗体が検出された。その他の疾患では全て陰性となっていた。index値を比較すると、一般にMCTDの症例はSLEに比較して高値を示し、全体としても有意に高値となっていた。

### 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1)。MC2-Rでは抗U1 RNP抗体は100例中68例で陽性、32例で陰性となっていた。それぞれの群において3つの異なる検査センターにて実施したDIDによる測定結果と比較すると、AおよびB検査センターではELISA陽性68例中66例が陽性となり、それに対してB検査センターでは63例のみが陽性となっていた。一方、ELISA陰性の32例はいずれの検査センターでも陰性で、ELISAとDIDの測定結果は完全に一致していた。以上の結果より、ELISAの感度がDIDより高いこと、さらにDIDの陽性結果にはセンター間で相違があることが明らかとなった。表2はELISAとDIDの測定結果に乖離が認められた5血清の測定結果を示す。血清SKを除けばいずれの血清もindex値が低く、特にMHとOMはMBL社の指定するgray zoneの領域に入っていた。DIDのこれらの血清に対する反応性はAおよびB検査センターの測定結果ではMHを除けばほぼELISAのindex値に相関すると思われた。これに対し、B検査センターのDIDは明らかに他の2センターと比較して感度が低くなっていることが示された。

### 3) IPとの比較検討

MC2-Rの特異性を確認する目的でMC2-R陽性DID陰性となった5血清を対象とし、U1 RNPへの反応性をIPで検討した。その結果、図2に示すようにgray zoneの2血清も含めていずれの血清でもU1 RNAの沈降が確認された。

## D. 考察

U1 RNPはU1 RNAと70(68)kDa、A、B/B'、C、D、E、F、およびGの9個の蛋白から構成され<sup>1)</sup>、抗U1 RNP陽性血清は、約40%がU1 RNAのstem-loop IIもしくは

はIVと反応し<sup>2,3)</sup>、ほぼ全ての血清が70kDa、AおよびCの3つの蛋白のいずれかと反応する<sup>1-3)</sup>。さらに、抗Sm抗体もDおよびB/B'と反応性することから<sup>1)</sup>、ELISAなどの抗原特異的定量系を確立するためにはU1 RNPから抗U1 RNP抗体が反応する70kDa、AおよびCなどの蛋白を分離する必要があった。MBL社は約95%の抗U1 RNP血清が認識する<sup>4)</sup>70kDaおよびA蛋白の2つのリコンビナント蛋白を用いた、MESACUP RNPキットを開発したが、このキットは高い特異性を有していたものの、DIDで陽性となる血清の約8%がこのELISAで反応しなかった<sup>5)</sup>。そこで70kDa、AおよびC蛋白にU1 RNAを加えたMC2-Rキットを開発した。このキットでは70kDaおよびA蛋白がU1 RNAに結合する事によって生じる新たなepitopeが誘導され、MBL社DIDキットで陽性となる全ての抗U1 RNP抗体の反応性が確保された<sup>6)</sup>。しかし、日常診療の場では実地診療医家がいくつかの異なる検査センターに依頼し、抗U1 RNP抗体を測定している実体があり、MBL社のDIDとは異なる調製による測定系が用いられている。そこで、今回は抗U1 RNP血清のMC2-RとDIDに対する反応性をより客観的に評価する目的で、同一血清を対象として異なる3つの検査センターに依頼したDID法と比較検討した。その結果、MC2-RはDIDより高い感受性を有していることが示唆された。さらに、ELISA陽性DID陰性となった血清のすべてがIPでU1 RNAを沈降したことからMC2-Rは、DIDより高い感度を有して抗原特異的に反応していることが確認された。これらの結果より、本測定系はMCTDをはじめとする膠原病患者血清の抗U1 RNP抗体を高感度で特異的に検出し、MCTDの診断に的確な情報を提供しうることが示された。

## E. 結論

MC2-RはU1 RNPと抗原特異的に反応し、DIDより高い感度を有していることが示され、MCTDの診断に有用と思われた。

## F. 研究発表

論文発表

高崎芳成、村上昭弘、児島和夫他: MESACUP-2 RNPおよび二重免疫拡散法による抗U1 RNP抗体の測定—多施設データとの比較検討—。医学と薬学 46: 803-808, 2001

文 献

1. Tan EM: Antinuclear antibodies; Diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology. *Adv Immunol* 44: 93 - 151, 1989
2. Deutscher SL, Keene JD: A sequence-specific conformational epitope on U1 RNA is recognized by a unique autoantibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3299-3303, 1988
3. Hoet RM, Koornneef I, de Rooij DJ, Van de Putte LB, van Venrooij WJ: Changes in anti-U1 RNA antibody levels correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus overlap syndrome. *Arthritis Rheum* 35: 1202-1210, 1992
4. Takeda Y, Wang GS, Wang RJ, Anderson SK, Petterson I, Amaki S, Sharp GC. Enzyme-linked immunosorbent assay using isolated (U) small nuclear ribonucleoprotein polypeptides as antigens to investigate the clinical significance of autoantibodies to these polypeptides. *Clin Immunol Immunopathol* 50: 213 - 230, 1989
5. 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: 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. *医学と薬学* 29: 765-773, 1993
6. 高崎芳成、村上明弘、小島和夫、矢野哲郎、官川 薫、矢野哲郎、金田和彦、川口里江子、竹内 健、橋本博史: MESACUP-2 RNP による抗 U1 RNP 抗体の測定-MESACUP RNP II との比較検討. *医学と薬学* 44: 599-609, 2000

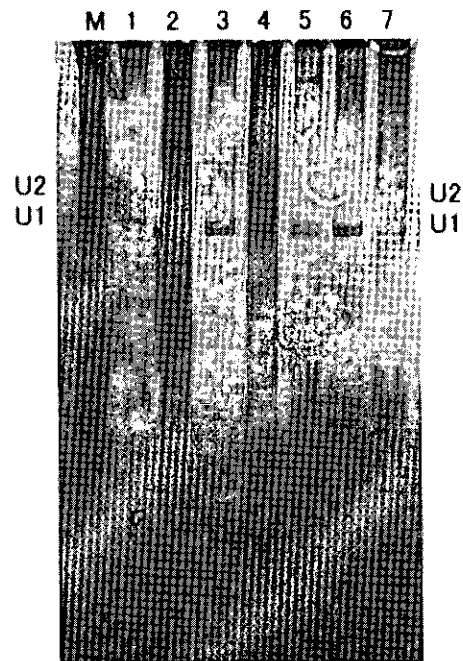
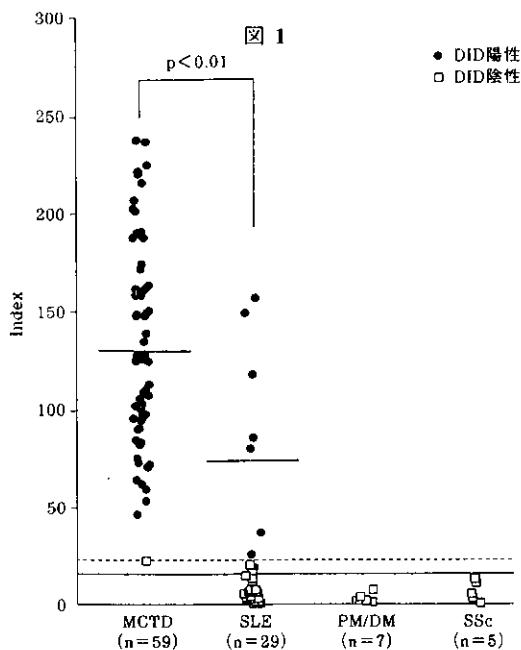


図 2 HeLa cell extract を抗原源とした MESACUP-2 RNP 陽性, DID 陰性血清の免疫沈降法 (IP) による分析。Lane 1 は正常人血清, lane 2 は抗 Sm および U1 RNP 陽性標準血清, lane 3~7 はそれぞれ患者血清 MH, OM, NT, MK および SK。いずれの患者血清でも U1 RNA の沈降が認められる。

表 1 MESACUP-2 RNP と二重免疫拡散法 (DID) による抗 U1 RNP 抗体出現頻度のセンター間比較

MESACUP-2 RNP	患者数	DID					
		A 検査センター		B 検査センター		C 検査センター	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
陽性	68	66	2	63	5	66	2
陰性	32	0	32	0	32	0	32

表 2 不一致検体の MESACUP-2 RNP の抗体価と DID における反応性

患者血清	疾患名	MESACUP-2 RNP		DID		
		Index	判定	A 検査センター	B 検査センター	C 検査センター
M H	SLE	19.4	+ (G)	+	-	+
O M	SLE	19.6	+ (G)	-	-	-
N T	MCTD	22.7	+	-	-	-
M K	SLE	25.9	+	+	-	+
S K	MCTD	46.4	+	+	-	+

(G) : gray zone, Index between 15.0~22.0

## DETECTION OF ANTI-U1 RNP ANTIBODIES BY MESACUP-2 RNP - COMPARISON WITH DOUBLE IMMUNODIFFUSION PERFORMED IN MULTIPLE LABORATORIES.

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

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

The sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), MESACUP-2 RNP (MC2-R), were compared with those of double immunodiffusion (DID) performed in different multiple laboratories. Using sera obtained from 59 patients with MCTD, 29 with SLE, 5 with SSc, 7 with PM/DM, anti-U1 RNP antibodies were tested by MC2-R, and DIDs that were performed in three different laboratory centers, A, B and C. Anti-U1 RNP antibodies were detected in 68 out of 100 sera, and 32 sera were negative in MC2-R. Sixty-six of 68 sera positive for anti-U1 RNP in MC2-R were also positive in DID performed by A and C centers, but only 63 were positive in DID performed by B center. In contrast, all 32 sera negative for anti-U1 RNP by MC2-R were also negative in DID tested by A, B and C centers. To confirm the specificity of MCR-2, 5 sera that were positive for anti-U1 RNP in MC2-R but negative in DID, immunoprecipitation study using <sup>32</sup>P labeled Hela cell extract was performed, and all those 5 sera precipitated U1 RNA.

These results suggest that MC2-R has higher sensitivity than DID and is specifically reactive with antibodies to U1 RNP.

## 11. 混合性結合組織病 (MCTD)における p53 抗原および抗体の検討

分担研究者 : 北里 英郎<sup>1</sup>  
研究協力者 : 岡田 純<sup>2</sup>、近藤 啓文<sup>2</sup>  
所属施設 : <sup>1</sup>北里大学医学部微生物学教室  
<sup>2</sup>北里大学医学部内科

### 研究要旨

MCTD 21 例の患者血清を用いて、ELISA 法にて p53 抗原、抗 p53 抗体を測定した。対象として、シェーグレン (Sj) 患者 9 例、慢性関節リウマチ (RA) 患者 29 例、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 10 例、健常人 9 例の血清を用いた。その結果、MCTD 11 例、RA 17 例、Sj 5 例、健常人 1 例について p53 抗原の発現が認められた。高い p53 抗原価を示した、MCTD 7 例、RA 13 例に関して、rheumatoid factor を測定したが、両者に相関関係は認められなかった。MCTD 2 例に関して、経時的に p53 抗原を測定したところ筋炎、腎炎などの炎症に伴い値が上昇する傾向が見られた。高い p53 抗原価を示した MCTD、RA 各 1 例に関して、抗 p53 抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、53KD にバンドが検出された。今後、p53 抗原の変異の解析、病態との関係について検討を加えたい。

### A. 研究目的

癌抑制遺伝子産物 p53 は、細胞周期、アポトーシスの制御に大きくかかわっている<sup>1)</sup>。p53 の変異は、約半数の癌で見られ、結果として生じる変異 p53 蛋白の蓄積に伴って抗 p53 抗体が約 30-50% の癌患者で見出されている<sup>2,3)</sup>。慢性関節リウマチ (RA) の滑膜細胞においても、p53 遺伝子の変異、p53 の高発現、p53 抗体の存在が示唆された<sup>4-6)</sup> が、近年、それらを否定する論文も数多く報告されている<sup>7-10)</sup>。MCTD においても、強皮症などを合併することから、p53 抗原およびその抗体の役割を検討した。

### B. 研究方法

MCTD 患者 21 例の患者血清を用いて、ELISA 法 (p53 pan ELISA kit, Roche 社) にて p53 抗原価を測定した。対象として、シェーグレン (Sj) 患者 9 例、慢性関節リウマチ (RA) 患者 29 例、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 10 例、健常人 9 例の血清を用いた。Rheumatoid factor (RF) の測定は、ラテックス免疫比濁法を用いて行った。p53 抗原価の高い血清検体に関しては、抗 p53 抗体の検出を p53-autoantibodies ELISA kit (Dianova 社) にて試みた。また、いくつ

かの高 p53 抗原価を示した血清検体に関しては、抗 p53 抗体 (anti-human p53 (Bp53-12) mouse IgG MoAb, IBL 社) を用いてウエスタンブロット法を行い、p53 抗原を確認した。

### C. 研究結果

MCTD 21 例、RA 29 例、Sj 9 例、SLE 10 例、健常人 9 例の血清中の p53 抗原価は、ELISA 法により測定され、その平均値を示した (表 1)。この結果、MCTD 11/21 例、RA 17/29 例、Sj 5/9 例、健常人 1/9 例の血清について陽性であり、MCTD、RA、Sj 患者血清中の p53 抗原価の平均値は、有意に SLE、健常人より高いことが判明した ( $p < 0.01$ )。

肺高血圧症非合併 MCTD (MCTD) 5 例、肺高血圧症合併 MCTD (MCTD+PH) 3 例において p53 抗原および RF を測定した結果を表 2 に示した。また、RA 29 例のうち 13 例について、同様に p53 抗原、RF の解析を行った (表 3)。その結果、肺高血圧症合併の有無に関して、p53 抗原の発現の差は見られなかった。また、MCTD 7 例、RA 13 例に関して、p53 抗原発現と RF の相関関係は認められなかった。その相関図を図 1 に示した。

MCTD 2例 (MCTD No.1 および No.5)の臨床経時変化とp53抗原発現を図2, 3にそれぞれ示した。その結果、図2に示すよう、MCTD No.1では、筋炎の際に高かったp53抗原の値が炎症の寛解とともに減少することが分かった。また、図3に示すよう、MCTD No.5においては、妊娠時に高かったp53抗原の値がリンパ腺症の際に減少し、腎炎の際に再び上昇することが、判明した。

高いp53抗原価を示した、MCTD No.2, RA No.4について、抗p53抗体をもちいて、ウエスタンブロットを行った。その結果、約53KDの位置に、抗p53抗体と反応したバンドが希釈段階に応じて検出されたが、非特異的なバンドが検出されたため現在、他の抗体を用いて検討中である。

#### D. 研究考察

MCTD、Sj, RAの約半分の血清でp53抗原がELISA法にて検出され、特にRAにおいて、数10ng/mlのレベルの高い値を示した。また、MCTD 2例における臨床の経時変化とp53抗原発現の関係から、筋炎、腎炎などの炎症にともない、発現が上昇する可能性が示された。MCTD 1例、RA 1例の血清を用いたWestern blotting法により約53KDの位置に抗p53抗体と反応した抗原を見出した。このことからこれら2例に関して検出されたp53抗原は、二つの異なる方法にて確認された。

膠原病におけるp53抗原の変異、抗p53抗体については、さまざまな議論があるが、近年の報告によると、変異、抗体ともに存在しない可能性が高い<sup>7-10)</sup>。今回、抗p53抗体がすべての検体で検出されなかったことから、wild typeのp53抗原の存在が予測されるが、mutant, wild typeを区別できる抗体をもちいてWestern blottingを行いp53抗原のtypeを同定する予定である。また、血清中のp53抗原を除去した後に、抗p53抗体の正確な測定を行いたい。

血清中の高濃度p53の役割については、不明であるが炎症のマーカーとして、十分なりうる可能性が示唆

された。今後、機序について十分検討したい。

#### 文 献

1. Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Acta* 1155:181-205, 1993.
2. Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70-complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3439-42, 1992.
3. Soussi T. The humoral response to the tumor-suppressor gene product p53 in human cancer: implications for diagnosis and therapy. *Immunol Today* 17:354-6, 1996.
4. Firestein GS, Nguyen K, Aupperle K. et al. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 149:2143-51, 1996.
5. Firestein GS, Echeverri F, Yeo M. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10895-900, 1997.
6. Inazuka M, Tahira T, Horiuchi T. et al. Analysis of p53 tumor suppressor gene somatic mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Rheumatology* 39:262-6, 2000.
7. Sugiyama M, Tsukazaki T, Yonekura A. et al. Localization of apoptosis and expression of apoptosis related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 55:442-3, 1996.
8. McGonagle D, Reece RJ, Green MJ. Et al. No p53 expression in rheumatoid arthritis synovium in early and late diseases. *Br J Rheumatol* 36 (suppl 1):92, 1997.
9. Lee CS, Portek I, Edmonds J. et al. Synovial membrane p53 protein immunoreactivity in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 59:143-5, 2000.
10. Kitasato H, Okamoto R, Kawai S. Absence of p53 mutation in Japanese patients with rheumatoid arthritis: comment on the article by Han et al. *Arthritis Rheum* 43: 469-70, 2000.



**表1. p53 antigen in serum samples**

<b>Diagnosis</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	
		<b>Age</b>	<b>p53 (pg/ml)</b>
<b>MCTD</b>	<b>21</b>	<b>37</b>	<b>1180</b>
<b>RA</b>	<b>29</b>	<b>58</b>	<b>8759</b>
<b>Sij</b>	<b>9</b>	<b>44</b>	<b>1440</b>
<b>SLE</b>	<b>10</b>	<b>35</b>	<b>45</b>
<b>Healthy control</b>	<b>9</b>	<b>36</b>	<b>190</b>

**表2. p53 antigen and rheumatoid factor in MCTD**

<b>Diagnosis</b>	<b>No</b>	<b>p53 (pg/ml)</b>	<b>Rheumatoid factor</b>
<b>MCTD</b>	<b>1</b>	<b>2862</b>	<b>11</b>
	<b>2</b>	<b>5327</b>	<b>53</b>
	<b>3</b>	<b>3106</b>	<b>5</b>
	<b>4</b>	<b>3710</b>	<b>47</b>
	<b>5</b>	<b>8376</b>	<b>NT</b>
<b>MCTD+PH</b>	<b>1</b>	<b>7586</b>	<b>259</b>
	<b>2</b>	<b>289</b>	<b>651</b>
	<b>3</b>	<b>361</b>	<b>19</b>

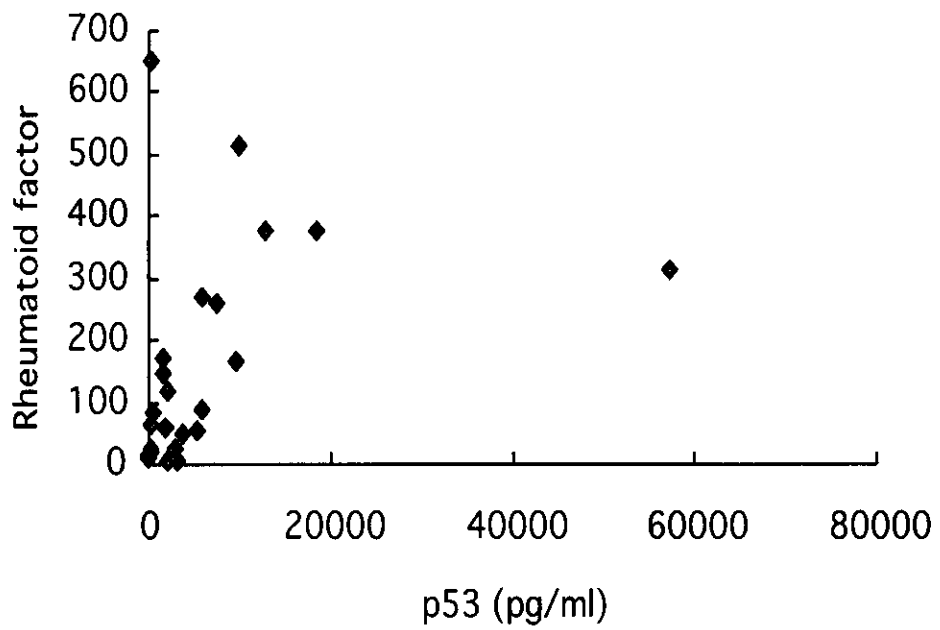


Figure 1. Relationship of rheumatoid factor and p53 antigen

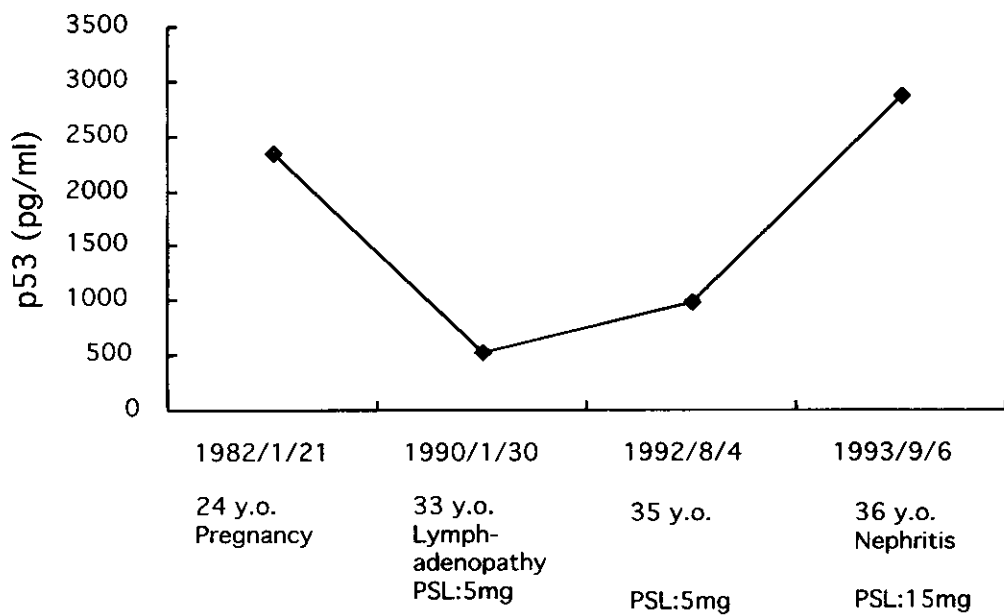


Figure 2. p53 antigen in MCTD patient No.1 without PH

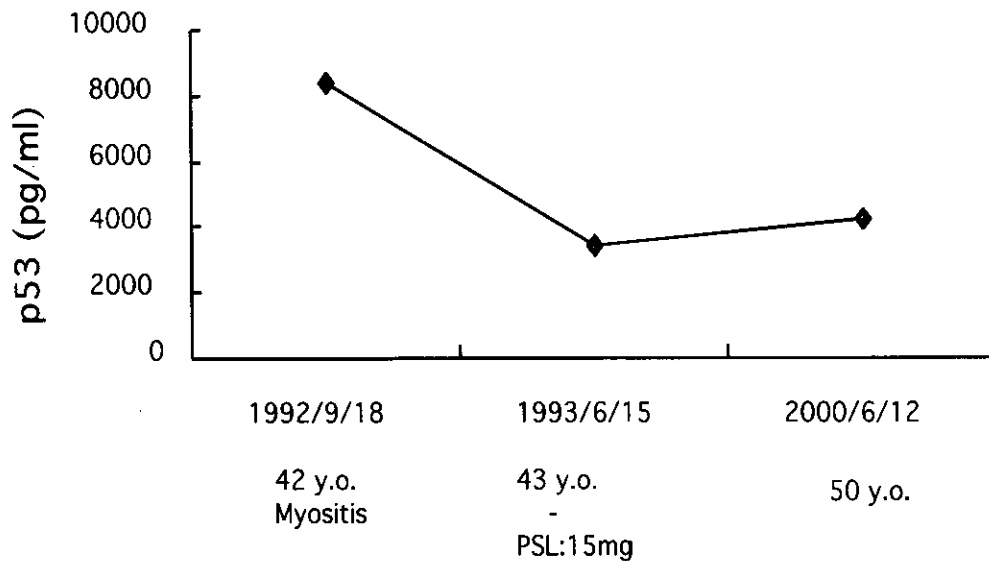


図3. p53 antigen in MCTD patient No.3 without PH

## THE DETECTION OF p53 ANTIGEN AND ANTI-p53 ANTIBODY IN THE SERUM OF MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE (MCTD)

Hidero Kitasato<sup>1)</sup>, Jun Okada<sup>2)</sup>, and Hirobumi Kondo<sup>2)</sup>

Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine<sup>1)</sup>  
 Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine<sup>2)</sup>

To evaluate the role of p53 in MCTD, the serum derived from 21 MCTD cases were examined for the expression of p53 antigen and antibody, using ELISA test. The serum derived from 29 RA, 10 Sj, 10 SLE patients and 9 health control were used as controls. The p53 antigen expressed in the serum from 11 MCTD, 17 RA, 5 Sj cases and 1 healthy control. Anti-p53 antibody was not observed in all cases showing high level of p53 antigen expression. No co-relation was found between p53 expression and rheumatoid factor in the serum derived from 7 MCTD and 13 RA cases, showing high level of p53 expression. Furthermore, the expression of p53 increased with inflammation such as myositis and nephritis, in 2 MCTD cases. The size of 53KD was found in 1 MCTD and 1 RA cases using Western blotting with anti-p53 antibody. The type and role of p53 antigen will be evaluated in future study.

## 12. 混合性結合組織病に併発する肺高血圧症発症機序の検討 血管作動性因子発現の解析

分担研究者 : 原 まさ子  
研究協力者 : 川口 鎮司  
所属施設 : 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター

### 研究要旨

肺高血圧症は、混合性結合組織病(MCTD)の生命予後を決定する重要な合併症の一つであるが、その発症の機序は明らかにされていない。そこで、我々は血管収縮因子および血管内皮細胞増殖因子であるエンドセリン-1 (ET-1)、アンギオテンシンII (AgII)の病態形成への関与を明らかにし、さらに、血管拡張作用を有する一酸化窒素 (NO)の発現低下が肺高血圧症発症に重要な要因であることを示した。

### A. 研究目的

MCTDは、抗U1RNP抗体の産生を特徴とする病因不明の自己免疫疾患であり、その病因の解明および病態特異的な治療法の開発が必要と考えられている。抗U1RNP抗体陽性を特徴とするMCTDでは、肺高血圧症の合併頻度が高く、生命予後に大きな影響をあたえている。現在、種々の血管拡張薬が投与され、治療がすすめられているが、根治療法とは言えず、欧米では移植術の適応と考えられている。他の膠原病においても抗U1RNP抗体陽性症例では、統計学的に肺高血圧症の合併が高頻度である。病理学的検討において、MCTDに併発する肺高血圧症は、肺動脈の内膜・中膜の肥厚、血管の収縮などに伴う血管内腔の狭窄により病態が形成されていると考えられている。そのため、抗U1RNP抗体と血管内皮傷害の関与が推定されているが、詳細は不明である。

また、血管内皮傷害の原因として、血管収縮因子の病変局所での過剰産生、および、血管拡張因子の産生が抑制されている可能性が考えられる。今回の研究では、血管収縮因子として、エンドセリン-1 (ET-1)、アンギオテンシンII (AgII)を、血管拡張因子として一酸化窒素 (NO)をそれぞれ末梢血中で測定し、肺高血圧症発症との関与を検討する。

### B. 研究方法

MCTD患者19例(肺高血圧症合併例4例)、健常人

10例より、血漿、血清を採取し、測定まで-70℃にて保存した。血漿中ET-1濃度および血清中AgII濃度をELISAキットにて測定した。NOは、非常に不安定な因子であり、その代謝産物である血清中のnitriteおよびnitrateの総和量を比色法にて測定し血清中NO量とした。

### C. 研究結果

血管収縮因子としてET-1およびAgIIの末梢血中での濃度を測定した。図1に示すようにMCTDでの血漿中ET-1濃度は、健常人と比較し、有意に高値であった(5.2 pg/ml v.s. 1.6 pg/ml,  $p < 0.01$ )。さらに肺高血圧症合併例では、8.7 pg/mlと著明に増加していた。血清中AgII濃度は、MCTDでは、18.9 pg/mlであり、健常人の10.9 pg/mlに比し、有意に高値であったが、肺高血圧症合併例と非合併例での差はみられなかった(図2)。一方、血清中NO濃度は、MCTDでは、107.9  $\mu\text{M}$ であり、健常人の85.4  $\mu\text{M}$ に比し有意に増加していた(図3)。肺高血圧症合併例で、89.0  $\mu\text{M}$ と健常人と差がなく、非合併例と比較し有意に低下していた(図3)。

### D. 考察

MCTD症例では、末梢血中での血管収縮因子、ET-1およびAgIIの増加が認められた。末梢血中での増加は、病変局所での状態を反映していることが推定される。血管の収縮によると考えられるレイノー現象は、