

クラス II HLA 分子を介したシグナル伝達による免疫制御機構に関する研究

松下 祥（埼玉医科大学免疫学 教授）

研究要旨

近年、抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示する際に、HLA クラス II 分子を介して抗原提示細胞側にも刺激が入ることが明らかになってきている。HLA クラス II 分子は、ヒトの活性化 T 細胞上にも発現しているが、その機能については不明であった。本研究では、活性化された CD4 陽性 T 細胞に発現している HLA-DR 分子を介するシグナルが、少なくとも Rap1 と p27^{Kip1} の発現増強を通して、T 細胞のアナジー誘導に貢献していることを明らかにした。

A.研究目的

Human leukocyte histocompatibility antigen (HLA) クラス II 分子は、抗原提示細胞に発現し、CD4 陽性 T 細胞に抗原を提示するという重要な役割を担っている。また近年、抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示する際に、HLA クラス II 分子を介して抗原提示細胞側にも刺激が入ることが明らかになってきている。このシグナルは自己免疫病における標的細胞側の応答を理解する上で非常に重要である。HLA クラス II 分子は、マウス以外のげっ歯類やヒトの活性化 T 細胞上にも発現しているが、その機能については不明である。本研究は、ヒトの活性化 T 細胞上の HLA クラス II 分子を架橋することによって生じる、T 細胞応答の変化ならびにその分子機構を解析することを目的とした。

B.研究方法

実験には、ヒト CD4 陽性 T 細胞クローン SF36.16 を用いた。SF36.16 は、HLA-DR4 (DRB1*0405) 分子により提示された BCGa 蛋白の第 84-100 番アミノ酸残基に相当するペプチドを特異的に認識する。また SF36.16 は、プラトーレベルで IFN- γ 40.5 ng/ml と IL-4 102 pg/ml を産生するため、Th1/Th0 細胞に分類される。まず、抗原刺激後の培養 6 日目、7 日目、8 日目の細胞は、99%が CD4

陽性であり、HLA-DR を発現している T 細胞であることを FACS で確認し、以降の実験には培養 6 日目または 7 日目の細胞を用いた。刺激には、T 細胞表面の HLA-DR 分子を、固相化した単クローン抗体で架橋する方法と、ピオチン化抗 HLA-DR 単クローン抗体+アビジンで刺激する方法を用いた。

C.研究結果

T 細胞表面の HLA-DR 分子を、固相化した単クローン抗体で架橋すると、CD3 分子を架橋した場合と同様に、T 細胞は刺激後 24 時間をピークとして増殖し(図1)、その後低応答(アナジー)に陥ることが明らかになった(図2)。また、ピオチン化抗 HLA-DR 単クローン抗体+アビジンで刺激した T 細胞も増殖したが、ピオチン化抗 HLA-DR 単クローン抗体単独で刺激した T 細胞は増殖しなかった。よって、T 細胞が増殖するためには抗 HLA-DR 単クローン抗体が T 細胞表面の HLA-DR 分子に結合するだけでは不十分で、さらにそれらが架橋される必要があると考えられた。T 細胞上の CD3 分子の架橋と HLA-DR 分子の架橋では、同程度の IFN- γ や IL-8 の産生が観察された。しかし、IL-10 の産生量は、HLA-DR 分子の架橋では、CD3 分子を架橋した場合の約 50%であった(図3)。したがって、IL-10 のような免疫抑制性

液性因子の産生がアナジーを誘導しているとは考えられなかった。T細胞上のCD3分子あるいはHLA-DR分子の架橋によりT細胞はアナジーに陥るが、この際に既に他のシステムでアナジーに陥ったT細胞で発現増強が報告されている、Rap1とサイクリン依存性キナーゼ(CDK)インヒビターの一種p27^{Kip1}の発現が共に増強することが明らかとなった。いずれの場合もCDKインヒビターp21^{Cip1}の発現増強は観察されなかった。同様に、可溶性抗原ペプチドをT細胞に作用させ、T細胞上のHLAクラスII分子による抗原提示によりT細胞にアナジーを誘導した場合にも、Rap1とp27^{Kip1}の発現増強が起こりp21^{Cip1}の発現増強は観察されなかった(図4)。

D. 考察

抗CD3抗体と抗DR抗体で誘導されるシグナルの類似性が、すでに報告されている。MHC class II分子を介してのシグナルは、ZAP-70依存性にホスホリパーゼCを活性化し、その結果、phosphoinositolの分解と細胞内Ca²⁺濃度の増加をもたらす。しかし、以下の理由により、MHCクラスII分子と共役しているシグナル伝達系は、TCR/CD3分子と共役しているものとは異なると考えられる;(a)フォスファターゼ活性をもつCD45分子の抗体による架橋は、TCR/CD3を介して誘導される細胞内Ca²⁺濃度の増加を抑制するが、MHCクラスIIを介して誘導される細胞内Ca²⁺濃度の増加は抑制しない;(b)TCR/CD3を介したシグナルによって、IL-2産生が誘導されるが、MHCクラスIIを介したシグナルによっては、IL-2産生は生じない。

T細胞はTCRとHLA-DR分子の両方を発現しているため、可溶性抗原ペプチドによって誘導されるアナジーの場合には、シグナルはTCRを介しただけでなく、クラスII HLA分子を介してもT細胞に伝えられる。co-stimulationの欠損によって誘導されるアナジーではCD28分子を介したシグナルによってアナジーは回避されるが、可溶性抗原ペプチドによって誘導されるアナジーでは、CD28分子を介したシグナルによってもアナジーを回避することはできない。この現象は、本研究においても観察

されている。以上より、たとえRap1やCDKインヒビターの挙動は一見同じでも、co-stimulationの欠損によって誘導されるアナジーとHLA-DR分子の架橋によって誘導されるアナジーとでは分子機構が異なると考えられる。すなわち後者ではHLA-DRないしはそれと会合した分子を介したシグナルがRap1やp27^{Kip1}を介してアナジー誘導に貢献している可能性がある。そして、それが、可溶性抗原ペプチドによるヒトT細胞アナジーの誘導の際に貢献しているのかもしれない。

E. 結論

活性化されたヒトCD4陽性T細胞に発現しているHLA-DR分子を介するシグナルが、少なくともRap1とp27^{Kip1}の発現増強を通して、T細胞のアナジー誘導に貢献していると考えられた。さらに可溶性抗原ペプチドによるヒトT細胞アナジーの誘導には、T細胞抗原受容体によるT細胞上のHLA-DR分子の架橋が関与している可能性が推察された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kudo, H., Matsuoka, T., Mitsuya, H., Nishimura, Y. and Matsushita, S. Cross-linking HLA-DR molecules on Th1 cells induces anergy in association with increased level of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Immunol. Lett.* 81: 149-155, 2002
2. Ohyama, H., Nishimura, F., Meguro, M., Takashiba, S., Murayama, Y. and Matsushita, S. Counter-antigen presentation: fibroblasts produce cytokines by signaling through HLA class II molecules without inducing T-cell proliferation. *Cytokine* 17: 175-181, 2002
3. Sakaguchi, H., Inoue, R., Kaneko, H., Watanabe, M., Suzuki, K., Kato, Z., Matsushita, S. and Kondo, N. Interaction among HLA-Peptide-TCR Complexes in cow's milk

- allergy: Significance of HLA and TCR-CDR3 Loops. Clin. Exp. Allergy 32: 762-770, 2002
5. Matsushita, S., Tanaka, Y., Ohyama, H., Matsuoka, T. and Nakashima, T. Application of combinatorial chemistry for the identification of peptide ligands recognized by T cells. Recent Research Developments in Immunology 4: 361-379, 2002
 6. Suzuki, K., Inoue, R., Sakaguchi, H., Aoki, M., Kato, Z., Kaneko, H., Matsushita, S. and Kondo, N. The correlation between ovomucoid-derived peptides, human leucocyte antigen class II molecules and T cell receptor-complementarity determining region 3 compositions in patients with egg-white allergy. Clin. Exp. Allergy 32:1223-1230, 2002
 7. Matsushita, S., Tanaka, Y., Tabata, H., Matsuoka, T., Ohyama, H. and Nakashima, T. Combinatorial peptide library for the analysis of antigen recognition by T cells. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening 5: 539-551, 2002
 8. Kohsaka, H., Nasu, K., Matsushita, S. and Miyasaka, N. Complete cDNA coding sequence for the HLA-DRB1*1405 allele: DRB1 alleles for two DR6 splits do not share the cytoplasmic domain. DNA sequence 13: 359-361, 2002
 9. 松下 祥: HLA 分子を介したシグナル伝達。最新医学57、1249-1253、2002
- 2002年9月25日。
3. 松下 祥・大山秀樹: 歯周病の現状と健康科学への展望 生物学の立場から。日本学会議研連シンポジウム。東京、2002年9月27日。
 4. 松下 祥: HLA-peptide 複合体とアレルギー。第54回日本皮膚科学会西部支部学術大会シンポジウム「皮膚アレルギー学の今日的理解」。松江、2002年11月10日。
 5. 松下 祥: アレルギー疾患の先鋭的治療戦略。神奈川科学技術アカデミー平成14年度教育講座「免疫システムの成り立ちと免疫疾患コース: 新しい免疫治療法開発へ向けて」。川崎、2002年11月21日。
 6. 松下 祥: 抗原特異的免疫療法の新たな戦略。第52回日本アレルギー学会総会シンポジウム「将来のアレルギー疾患治療」。横浜、2002年11月28日。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

2. 学会発表

1. 松下 祥: 抗原ペプチドを用いた免疫療法の位置づけ。第14回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム「特異的免疫療法の奏効機序とアレルギー疾患治療における位置づけ」。千葉、2002年3月21日。
2. 松下 祥: HLA 分子と T 細胞応答。第11回日本組織適合性学会大会教育講演。川越、

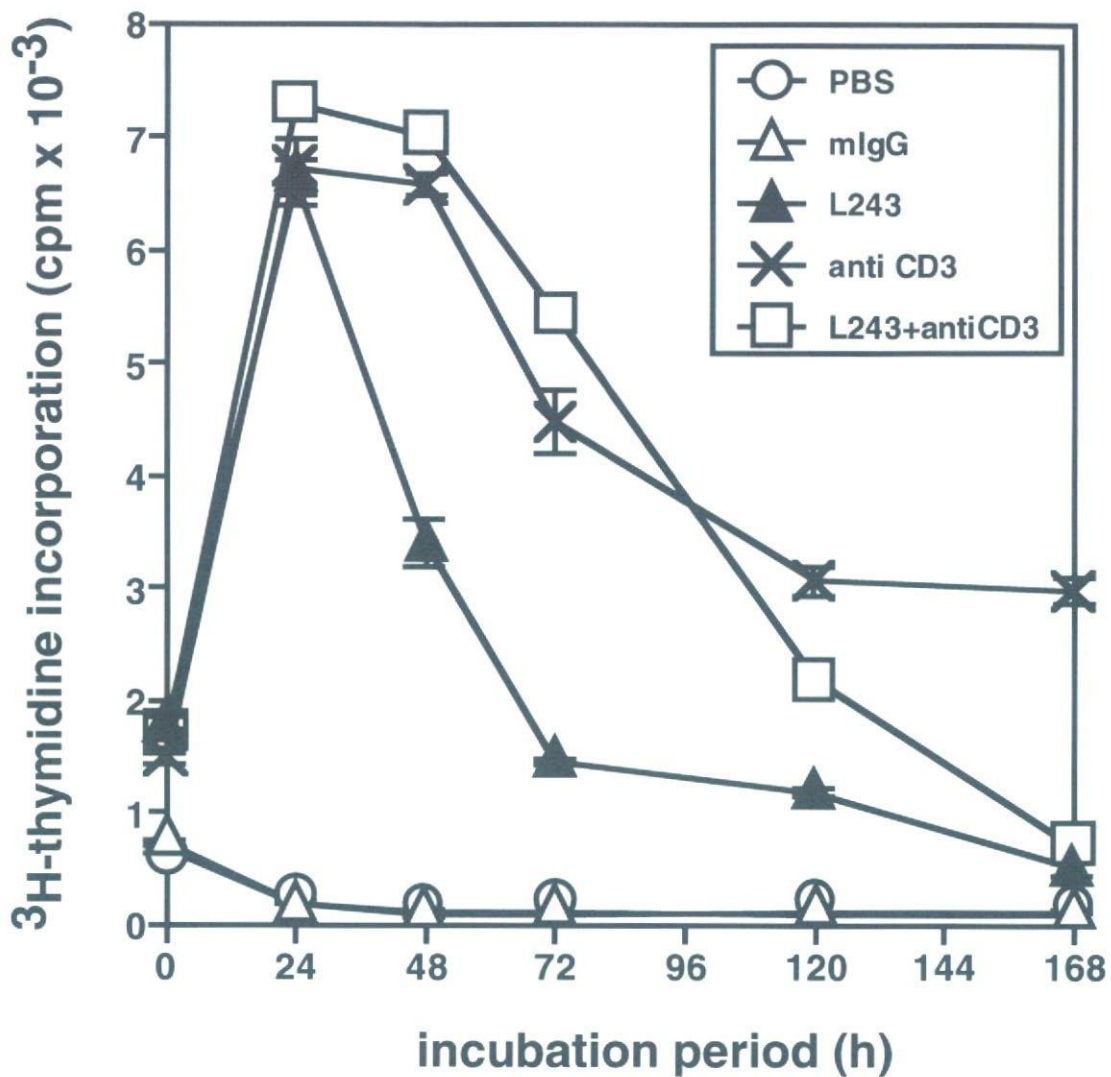


図 1 T 細胞上の HLA-DR 分子を架橋することによって誘導される増殖反応の経時的変化

CD4 陽性 T 細胞上の HLA-DR 分子、または CD3 分子を固相化モノクローナル抗体で架橋した際に観察される T 細胞増殖の経時的変化を調べた。図に示した培養期間 (0-168 hr) の後に、T 細胞を、さらに、16 時間、 $[^3\text{H}]$ チミジン $1 \mu\text{Ci}$ / ウェル と共に培養し、液体シンチレーションカウンターで、増殖した T 細胞の DNA に取り込まれた放射能を測定した。すべてのデータは、duplicate で測定し、平均値 \pm 標準誤差を示した。結果は、独立して 2 回行った実験のうちの 1 つを代表として示した。

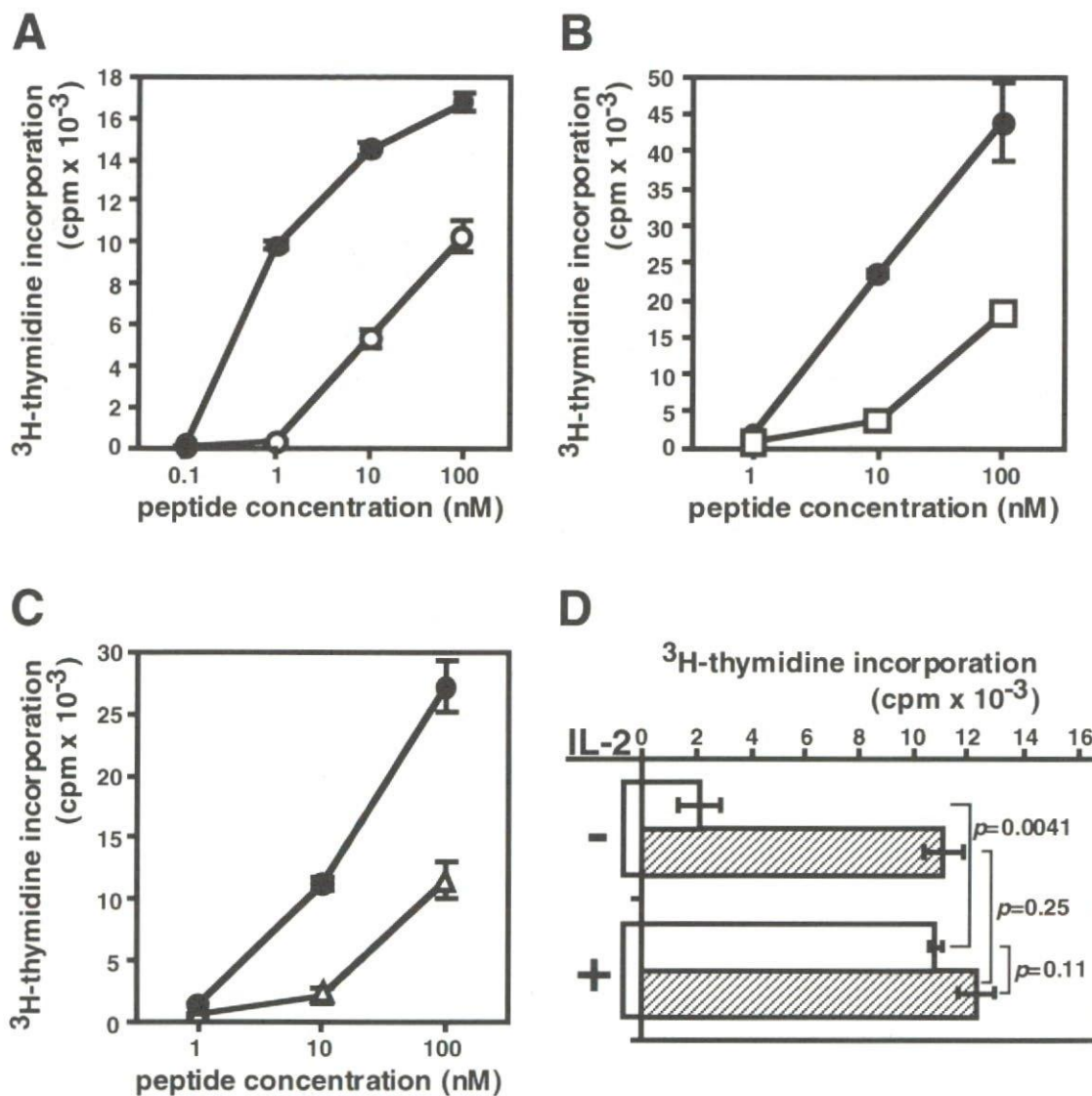


図2 可溶性抗原ペプチド(A)、抗 CD3 モノクローナル抗体(B)、抗 HLA-DR モノクローナル抗体(C, D)によって誘導される T 細胞アナジー SF36.16 T 細胞を、最初に、5 μM の BCGap84-100 ペプチドをプレパルス (37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 時間) して放射線照射した末梢血単核細胞 (closed circle or hatched bar)、1 μM の可溶性 BCGap84-100 ペプチド (open circle)、プラスチックに固相化した抗 CD3 抗体 (OKT3; open square)、または、プラスチックに固相化した抗 DR 抗体 (L243; open triangle or open bar) で刺激した (1 次刺激)。培養開始 7 日後に、これらの T 細胞を、様々の濃度の BCGap84-100 ペプチドと放射線照射した末梢血単核細胞 (A, B, C)、あるいは 10nM の BCGap84-100 ペプチドと放射線照射した末梢血単核細胞と共に外因性ヒト組み換え IL-2 200 U/ml の存在下あるいは非存在下に、共培養した (D) (2 次刺激)。2 次刺激では、T 細胞を、96 穴プレートで 72 時間培養し、 ^3H thymidine の T 細胞芽球への取り込みを測定した。(D) 外因性 IL-2 の存在下での、T 細胞の増殖反応；1 次刺激、2 次刺激と T 細胞増殖反応の定量は、上記と同様に行った。結果は、duplicate で測定し、平均値 \pm 標準偏差を示した。統計的有意差は、Student's *t* 検定を用いて解析した。

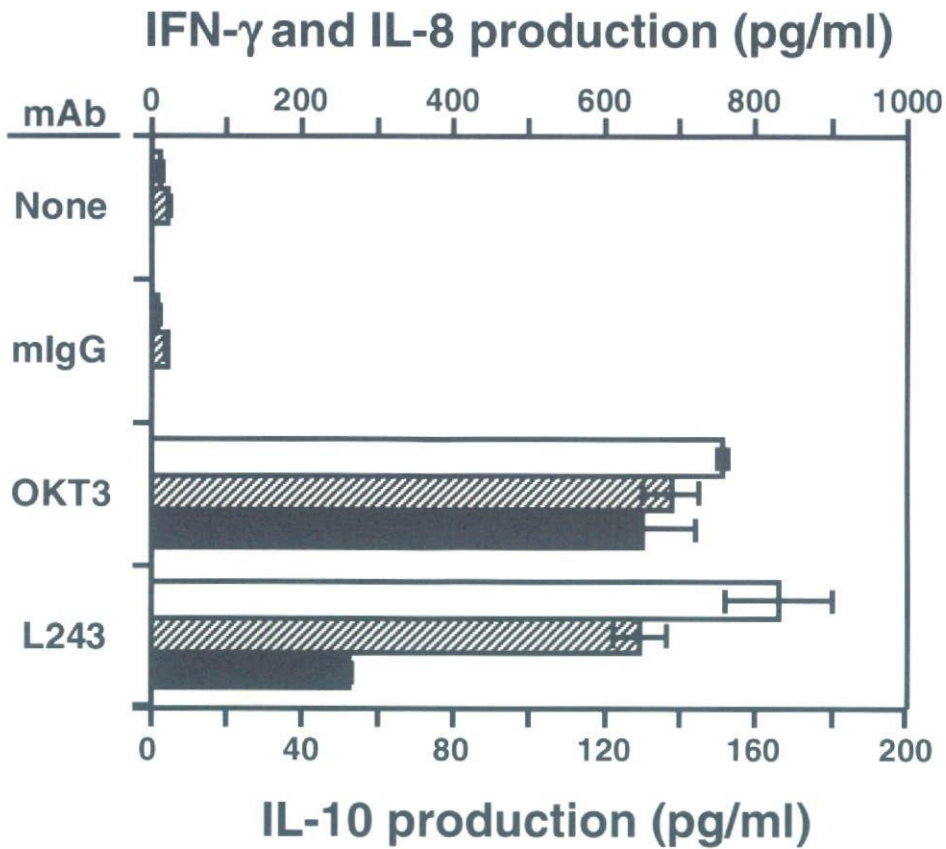


図3 T細胞上のCD3分子、HLA-DR分子を架橋した際に観察されるサイトカインの産生

SF36.16 T細胞を、コントロール(PBS)、固相化したコントロールモノクローナルIgG、固相化した抗CD3抗体(OKT3)、固相化した抗DR抗体(L243)の存在下に、37℃で培養した。刺激24時間後に、培養上清中のIFN- γ (open bars)、IL-8(hatched bars)、あるいはIL-10(closed bars)の濃度をELISAで測定した。結果は、duplicateで測定し、平均値 \pm 標準偏差を示した。

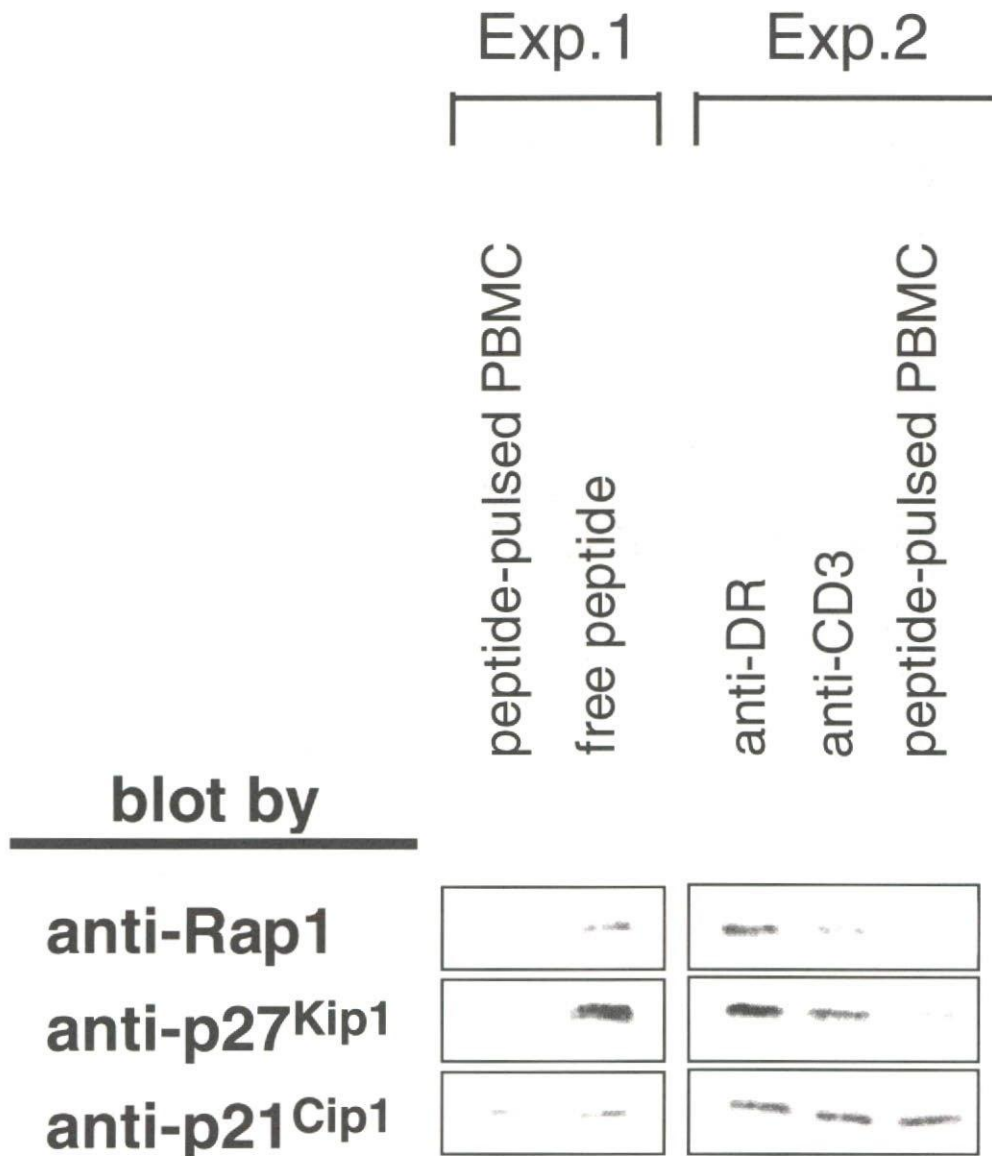


図4 アナジーに陥った T 細胞における、Rap1、CDK インヒビター p27^{Kip1}、p21^{Cip1} の発現

T 細胞クローン SF36.16 を、可溶性抗原ペプチド(1 μM BCGap84-100)、固相化抗 CD3 抗体(OKT3)、固相化抗 DR 抗体(L243)、あるいは、BCGap84-100 ペプチド(5 μM BCGap84-100)と 37°C で 5 時間インキュベートした後に放射線照射した末梢血単核細胞と共に、37°C で培養した。培養 7 日後に、T 細胞を溶解し、直接 13.5 % SDS-PAGE で泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、抗 Rap1 抗体、抗 CDK inhibitor p27^{Kip1} 抗体、抗 CDK inhibitor p21^{Cip1} 抗体を用いてイムノプロットした。

全身性自己免疫疾患における自己抗体産生機構についての研究

鏑田武志(東京医科歯科大学難治疾患研究所免疫疾患)

研究要旨

自己抗体産生制御機構を解明するために、CD40LトランスジェニックマウスにおけるBリンパ球自己トランス異常と産生される自己抗体の性状について検索した。その結果、中枢リンパ組織でのトランス機構と末梢リンパ組織でのトランス機構で標的となる自己抗体の性状が異なることが明らかとなった。この結果から、自己免疫疾患で産生される自己抗体の性状から、どのような自己トランス機構に異常があるのかを診断できる可能性が示唆された。

A.研究目的

全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患では、自己トランスの異常により自己抗体産生がおこると考えられる。これまで、自己反応性B細胞について種々の自己トランスメカニズムが示されてきたが、まだ全貌は明らかではない。また、自己免疫応答は種々の自己トランス機構の内の特定の機構の破綻によっておこるのではなく、種々の自己トランス機構の異常によりおこると考えられる。本研究では、自己トランス機構、とりわけ末梢リンパ臓器での自己トランス機構について解明すると共に、異なるトランス機構の異常により異なった性状の自己反応性B細胞が出現するのかを明らかにする。

B.研究方法

CD40LをB細胞で異所性に発現するトランスジェニック(Tg)マウスは我々の研究室で樹立した。抗DNA抗体IgH鎖Tgマウス56Rはプリンストン大学M. Weigert博士より供与を受けた。56RH鎖は種々のIgL鎖と会合して抗DNA抗体となるが、会合するL鎖によりDNAへの親和性が異なる。CD40LTgマウスと抗DNA抗体H鎖Tgマウスを交配し、得られたマウス脾細胞の切片を作成し、抗56RH鎖抗体で染色した。また、CD40LTgマウス

と抗DNA抗体H鎖TgマウスのF1マウスの脾細胞をLPSで刺激後、ハイブリドーマを樹立し、得られたモノクローナル抗体のDNAへの反応性をELISAで測定した。また、ハイブリドーマが、IgL鎖のうち、κ鎖を産生するか、λ鎖を産生するかはELISAで検索した。また、抗DNA抗体H鎖トランスジェーンを持つかをPCRで検索した。

C.研究結果

我々は、CD40LTgマウスが自己抗体産生や糸球体腎炎などを呈し、自己免疫疾患を自然発症すること、このマウスと56Rマウスを交配して得られたCD40L/56Rダブルトランスジェニックマウスでは自己トランスが破綻し、自己抗体の産生がおこることを示した。さらに、未熟B細胞段階でのクローン除去やクローン麻痺については正常であるが、末梢リンパ組織でのB細胞数が56Rではおそらく自己トランスのために減少し、この減少が56R/CD40Lでは回復することを示している。今回、56Rマウスおよび56R/CD40Lマウスの脾臓切片を、抗56RH鎖抗体で染色したところ、56RH鎖陽性B細胞は、濾胞に瀰漫性に分布し、56Rマウスではその数が減少していたが、56R/CD40Lマウスでは回復していた。アナジーを誘導されたB細胞は濾胞に分布できず、濾胞とT細胞領域

の境界周辺に分布するので、56R マウスでは自己反応性B細胞のアナジーが誘導されず、自己反応性B細胞が減少(クローン除去)することで自己トレランスが誘導され、この末梢リンパ臓器でのクローン除去が CD40L により解除されることが明らかとなった。

56R および 56R/CD40L マウスの脾臓細胞を LPS で刺激し、ランダムにハイブリドーマを樹立したところ、56R マウス由来ハイブリドーマでは DNA に反応するものが 10%以下であったが、56R/CD40 マウス由来ハイブリドーマでは、90%が抗 DNA 抗体を産生した。これらの抗体は、ssDNA には強く反応したが、dsDNA には弱くしか反応しなかった。また、56R/λ鎖は dsDNA に強く反応するが、λ鎖陽性の抗体は 56R マウス、56R/CD40L マウス由来ハイブリドーマで共に認められなかった。これらの結果から、末梢リンパ臓器での自己反応性B細胞のクローン除去に異常がおこった際には、ssDNA には強く反応するが dsDNA には弱くしか反応しない中間親和性の自己反応性B細胞が出現し、dsDNA にも強く反応するような高親和性B細胞については自己トレランスが維持されることが明らかとなった。

D. 考察

CD40L 発現により末梢リンパ組織でのクローン除去の異常がおこり、中間的な親和性の自己反応性B細胞が産生された。一方、中枢リンパ組織でのクローン除去は正常で、高親和性の自己反応性B細胞は出さなかった。この結果から、高親和性自己反応性B細胞は、中枢リンパ組織の未熟B細胞の段階で除去されるが、中間親和性B細胞は、中枢でのクローン除去を受けずに成熟し、末梢リンパ組織で除去を受けることが強く示唆される。CD40L により末梢でのトレランスは解除され、中枢でのトレランスは解除されないことから、異なる分子機構の存在が示唆される。中枢トレランスの異常による高親和性自己反応性B細胞の出現により、自己免疫疾患をきたす可能性もあるが、中間親和性自己反応性B細胞から、免疫グロブリン体細胞突然変の蓄積により高親和性自己抗体の産生がおこり、自己免疫疾患が発症することもあると考えられる。したがって、自己免疫疾患で

の突然変異導入以前の胚型の自己抗体を再構築することにより、自己トレランスの異常が、末梢組織のクローン除去が関与するか、中枢組織でのトレランスが関与するかなどを明らかにすることができると考えられる。

自己免疫疾患では、個々の症例により異なるメカニズムにより自己抗体の産生がおこると考えられる。それぞれのメカニズムによりどのような自己抗体の産生がおこるかが明らかになると、個々の症例においてどのようなトレランス機序の異常により自己抗体の産生がおこるのかを診断し、その異常を修復するというオーダーメイド医療を開発することが可能になると予測される。

E. 結論

中枢リンパ組織および末梢リンパ組織でのクローン除去により、それぞれ、高親和性および中間親和性自己反応性B細胞のトレランスが誘導されることが示唆された。この結果から、自己免疫疾患で産生される自己抗体の性状を明らかにすることにより、これらのトレランス機構のいずれに異常があるのかが判別できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Higuchi, T., Aiba, Y., Nomura, T., Matsuda, J., Mochida, K., Suzuki, M., Kikutani, H., Honjo, T., Nishioka, K. and Tsubata T. (2002): Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease. *J. Immunol.* 168: 9-12.
2. Wakabayashi, C., Adachi, T., Wienands, J. and Tsubata, T. (2002): A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor. *Science.* 298: 2392-2395.

Amyopathic Dermatomyositis 患者血清中の 140kDa 蛋白を 認識する自己抗体に関する研究

平形 道人(慶應義塾大学医学部・内科)

研究要旨

【目的】多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)において間質性肺炎(Interstitial Lung Diseases, ILD)は、重要な予後因子であるが、特に DM の中で、筋炎症状に乏しい症例(Amyopathic DM, ADM)に治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎(Acute Interstitial Pneumonia, AIP)を合併することが知られている。そのような症例では、自己抗体陰性がひとつの特徴であるが、その詳細は不明である。本研究は、白血病細胞由来 K562 細胞を用いて ADM 患者血清中の自己抗体の追究を目的とした。【方法】自己抗体の検索は、白血病細胞由来 K562 細胞を用いた ³⁵S メチオニン標識免疫沈降法、免疫プロット法および HEp-2 細胞を用いた間接蛍光抗体法でおこなった。これらの方法で、K562 細胞成分中の蛋白を認識した症例の臨床症状、検査所見、経過、治療、予後などについて検討した。【結果】1. ADM 患者 14 例中 7 例(50%)が免疫沈降法で 140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体(抗 US 抗体)を認めた。2. 抗 US 抗体陽性 7 例中 6 例で、ILD を併発しており、うち 3 例は AIP であった。また、2 例で、シクロスポリン(CyA)が有効であった。3. 抗 US 抗体は、ADM 患者に特異的に検出された。【考察】ADM 患者血清中に、140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体(抗 US 抗体)の存在が示唆された。

A.研究目的

ILD は、膠原病各疾患において重要な予後規定因子であるが、その発症機序は未だ不明である。PM/DM に併発する ILD は多彩な病態を示すことが知られており、これまで報告されている抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体(抗 ARS 抗体)は、その診断、病型分類、臨床経過の予測などに有用とされている。近年、DM の中で、筋炎症状に乏しい症例(ADM)に治療抵抗性の AIP が合併することが報告されている。かかる症例では、抗核抗体陰性が特徴とされているが、その詳細は不明である。そこで本研究は、白血病細胞由来 K562 細胞を用い、ADM 患者血清中の自己抗体の追究を目的とした。

B.研究方法

I. ADM 患者血清中の自己抗体の追究:

教室および共同研究施設の膠原病および健常

人 306 例を対象とした (PM/DM 85, ADM 15, 関節リウマチ 49, 全身性エリテマトーデス 44, 混合性結合組織病/重複症候群 27, 全身性強皮症 21, シェーグレン症候群 7, ILD 42, 健常人 16 例)。自己抗体の検索は、白血病細胞由来 K562 細胞抽出物を用いた ³⁵S メチオニン標識免疫沈降法、免疫プロット法および HEp-2 細胞を用いた間接蛍光抗体法でおこなった。

II. 140kDa を認識する自己抗体陽性 ADM 患者の臨床特徴の検討:

これらの方法で、K562 細胞成分中の蛋白成分を認識した症例の臨床症状、検査所見、経過、治療、予後などについて検討した。

C.研究結果

I. ADM 患者血清中の自己抗体の追究:

(i) K562 細胞を用いた ADM 血清中の自己抗体の追究

白血病細胞由来 K562 細胞抽出物を基質とした免疫沈降法で、ADM 患者血清 7 例が約 140kDa 蛋白を沈降した(図 1)。

K562 細胞抽出物中の 140kDa 蛋白を免疫沈降した ADM 患者 7 血清について、核酸成分についても検討した。1 例で、抗 SS-A 抗体が反応する核酸成分を認めるのみで、他の核酸成分は認められなかった。

(ii) ADM 患者 US 血清が免疫沈降した 140kDa 蛋白と既知の自己抗体との比較

ADM 患者 US 血清が免疫沈降した 140kDa 蛋白と既知の自己抗体とを比較した。US 血清が認識した蛋白は、抗 MJ 抗体や抗 RNA ヘリケース A 抗体よりやや分子量が小さく、抗 PL-12 抗体よりも分子量は大きく、これら既知の自己抗体とは、明らかに異なった蛋白を沈降することが示唆された(図 2)。われわれは、この新たな自己抗体を抗 US 抗体と命名した。

(iii) 抗 US 抗体の免疫プロット法による検討

免疫プロット法でも検討したところ、免疫沈降法と同様に、US 血清は、K562 細胞抽出物中の約 140kDa 蛋白と反応した。

(iv) 抗 US 抗体の間接蛍光抗体法による検討

抗 US 抗体と反応する抗原の細胞内局在を検討するために、間接蛍光抗体法をおこなった。US 血清は細胞質を網目状・顆粒状に染色し、抗 US 抗体が細胞質成分に対する自己抗体であることが示唆された。

(v) 抗 US 抗体の疾患別頻度

抗 US 抗体は、ADM 患者 14 例中 7 例 (50%) に認められた。しかし、ADM 以外の膠原病および健康人では認められなかった。

II. 抗 US 抗体陽性 ADM 患者の臨床的検討:

(i) 抗 US 抗体陽性 ADM 患者の臨床特徴

(表 1)

抗 US 抗体陽性 ADM 患者 7 例の臨床特徴をまとめた。全例で、ゴットロン徴候あるいはヘリオトロープ疹を認め、皮膚生検においても DM に特徴的な所見であったが、筋力低下は 2 例に軽度認めるのみであった。最大クレアチンキナーゼ(CK)値も、5 例は正常範囲内で、他の 2 例も軽度の上昇であった。筋生検は 4 例で施行されたが、2 例で、軽度の炎症細胞浸潤の所見を認めた。レイノー現象を 1 例、関節炎を 3 例に認め、他の自己抗体は、抗 SS-A 抗体が 1 例のみ陽性であった。

(ii) 抗 US 抗体陽性 ADM 患者に併発する間質性肺炎の特徴(表 2)

7 例中 6 例でILDを併発しており、その臨床特徴をまとめた。6 例中 3 例は AIP だった。KL-6 は測定した全例高値で、BALF 分類では全例 bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) パターンに分類された。AIP と診断された 3 例は、パルス療法を含むステロイド大量療法にシクロスポリン(CyA)を併用する強力な治療が行われ、2 例で CyA が有効であった。

D. 考察

I. ADM 患者血清中の自己抗体の追究:

PM は、骨格筋・横紋筋の炎症・変性および再生を主病変とする原因不明の慢性炎症性疾患である。筋肉の炎症のため、筋力低下や筋痛の自覚症状、血清筋原性酵素(CK, アルドラーゼ)の上昇、筋電図の筋原性変化などが特徴的な所見である。これらの筋炎所見に加え、ヘリオトロープ疹やゴットロン徴候などの特徴的な皮疹を認める場合には、DM と診断される。これら PM/DM の臨床的特徴は多彩であるが、これまでいくつかの病型に分類されており、PM/DM 患者血清中に見出される筋炎特異自己抗体がその病型分類に有用である。PM/DM の代表的な特異自己抗体である抗 ARS 抗体陽性例は、慢性に経過するILDを併発し、レイノー現象、関節炎、発熱などが高頻度に出現する。また、抗 SRP 抗体陽性例は、治療抵抗性・再燃性の重症筋炎が特徴的とされる。ADM は AIP を併発することが知られているが、かかる症例は、従来、

抗核抗体陰性とされている。近年, Targoff らは, 予備的な検討で clinically ADM 患者血清中に約 155 kDa 蛋白を認識する抗体の存在を報告しているが, ADM に特異的な自己抗体はこれまで詳細に検討されていない。本研究では, 白血病細胞由来 K562 細胞を基質とした免疫沈降法および免疫ブロット法で ADM 患者血清中に, 140kDa 蛋白に対する抗体の存在が示唆された。

小児の DM において約 140kDa 蛋白を認識する抗 MJ 抗体が欧米で報告されており, 今回の検討では, それとの異同が問題となった。そこで, 今回 ADM 患者 US 血清が免疫沈降した 140kDa と既知の自己抗体が免疫沈降する蛋白とを比較したところ, 抗 MJ 抗体を含めて, 既知の自己抗体とは, 分子量の異なる蛋白を沈降することが確認された。この未知の抗体(抗 US 抗体)陽性の ADM 患者 7 血清は, 既知の核酸成分(抗 SS-A 抗体)と 1 例が反応した以外に核酸成分を認識せず, 間接蛍光抗体法で, 細胞質が染色されたことから, 抗 US 抗体は細胞質成分に対する抗体であると考えられた。

抗 US 抗体は, これまでの検討で ADM 以外の膠原病および健常人では認められなかったことから, ADM の疾患特異抗体である可能性が示唆された。

II. 抗 US 抗体陽性 ADM 患者の臨床的

特徴:

抗 US 抗体陽性 ADM 患者は, 全例 DM に特徴的な皮疹を呈しながら, 筋炎症状に乏しい症例であり, Sontheimer らが, 提唱する分類の clinically ADM に相当する症例と考えられた。抗 ARS 抗体陽性症例とは異なり, レイノー現象, 関節炎などの臨床症状および筋炎特異自己抗体を含め他の自己抗体の併存は低頻度であった。

ILD を 7 例中 6 例で併発しており, その 6 例中 3 例が AIP であったことが特徴的であった。抗 US 抗体陰性の ADM 患者 7 症例中, AIP と診断されたのは 1 例のみであった。症例数が少なく, 統計学的に有意差はないが, 抗 US 抗体と AIP との関連が注目され, 今後の症例の集積が課題である。KL-6 は測定した全例高値で, 同抗体陽性 US 例の臨床

経過では, 肺病変の増悪と平行して, KL-6 値も上昇しており, 間質性肺炎の活動性の指標として臨床上有用であることが確認された。AIP と診断された 3 例を含め, パルス療法を含むステロイド大量療法に CyA を併用する強力な治療が行われ, 2 例で CyA が有効であった。これまで, AIP に対する CyA の有効性が報告されているが, 今回の検討でも, その有効性が示唆された。しかし, CyA の無効例もあり, かかる症例の治療法の開発が望まれる。

III. 今後の展望

今後, 抗 US 抗体陽性症例の集積とその対応抗原の追究・検討が課題である。この新たな自己抗体の同定は臨床に, 極めて予後不良とされている AIP 併発 ADM の早期診断・治療法の選択に有用と考えられ, その予後の改善につながるものと期待される。

E. 結論

1. ADM 患者 14 例中 7 例(50%)で 140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体(抗 US 抗体)を認めた。
2. 抗 US 抗体陽性 6 例は, ILD を併発しており, 3 例は AIP だった。うち 2 例で, CyA が有効であった。
3. 抗 US 抗体は, ADM 患者に特異的に検出され, ADM の疾患特異抗体である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Yuasa, S., Suwa, A., Hirakata, M., Hibi, N., Iwao, Y., Koizumi, K., Mimori, T., Ikeda, Y. A case of systemic lupus erythematosus presenting with rectal ulcers as the initial clinical manifestation of disease. Clin. Exp. Rheumatol. 20(3):407-410, 2002
2. Kuwana, M., Kimura, K., Hirakata, M., Kawakami, Y., Ikeda, Y. Differences in autoantibody response to Th/To between systemic sclerosis and other autoimmune diseases. Ann. Rheum. Dis. 61(9):842-846, 2002
3. Furuta, A., Fujii, T., Yasuoka, H., Takada,

- R., Hirakata, M., Mimori, T. Severe hypertension associated with multiple intra-renal microaneurysms in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies. *Mod. Rheumatol.* 12(2):178-181, 2002
4. 古屋善章, 鈴木美佐子, 阿部浩子, 金子裕子, 安岡秀剛, 野島崇樹, 佐藤慎二, 諏訪 昭, 平形道人, 池田康夫: 肥厚性硬膜炎を合併した Wegener 肉芽腫症の一例. *日内会誌* 91(12):184-186, 2002
 5. 平形道人: 塩酸セビメリン(SNI-2011). *臨床と薬物治療* 21(4):337-338, 2002
 6. 平形道人: 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体症候群-抗 ARS 抗体症候群. *臨床免疫* 37(4):472-478, 2002
 7. 阿部浩子, 平形道人: 乾癬性関節炎. *リウマチ科* 27(6):561-564, 2002
 8. 平形道人: 抗 KS(アスパラギニル tRNA 合成酵素)抗体. *リウマチ科* 27(6):591-597, 2002
 9. 平形道人: 「検査値異常から読む病態と診断計画-多発性筋炎/皮膚筋炎」*臨床医* 28 巻 増刊号 1546-1550, 2002
 10. 佐藤慎二, 平形道人: 全身病としての膠原病. 筋における症状の特徴. *モダンフィジシャン* 22(11):1351-1356, 2002
 11. 平形道人, 佐藤慎二: 間質性肺炎と自己抗体. *Molecular Medicine* 39(12):1406-1412, 2002
 12. 佐藤 実, 赤荻 淳, 黒田嘉紀, 吉田秀雄, 水谷昭衛, 平形道人: プリスタン誘発自己免疫. *リウマチ科* 2003 (印刷中)
 13. 平形道人: 好酸球性びまん性筋膜炎. 「リウマチ基本テキスト」, pp463-467, 日本リウマチ財団 2002
 14. 平形道人: ベーチェット病. 亀山正邦, 高久史磨 総編集「今日の診断指針(第5版)」, pp1200-1203, 医学書院 2002
 15. 平形道人: 2. 関節の痛み, 腫れ, 変形, 検査値などはどう変わるのか? 川合眞一 編著「やさしい慢性関節リウマチの管理」, pp10-15, 医薬ジャーナル社, 2002
 16. 平形道人: 3. 特殊な病型・合併症について. 川合眞一 編著「やさしい慢性関節リウマチの管理」pp 16-24, 医薬ジャーナル社, 2002
 17. 平形道人: 皮膚筋炎・多発性筋炎に伴う間質性肺炎. 竹原和彦 他 編集「新・膠原病-診断と治療の最新ポイント; 皮膚から内臓へ」, pp194-201, 診断と治療社 2002
 18. 平形道人: 皮膚筋炎・多発性筋炎-間質性肺炎の治療. 竹原和彦 他 編集「新・膠原病-診断と治療の最新ポイント; 皮膚から内臓へ」, pp280-283, 診断と治療社 2002
 19. 平形道人: 膠原病と γ グロブリン大量静注療法. 竹原和彦 他 編集「新・膠原病-診断と治療の最新ポイント; 皮膚から内臓へ」, pp304-307, 診断と治療社 2002
 20. 平形道人: 多発性筋炎/皮膚筋炎. 住田孝之 編集「Essence 膠原病・リウマチ学」pp.72-73, 診断と治療社 2002
 21. 平形道人: フェルティ-症候群. 山口 徹, 北原光夫 総編集「今日の治療指針(2003年版)」pp550-551, 医学書院 2003
 22. 平形道人: 多発性筋炎・皮膚筋炎. 狩野庄吾, 中川武正 編集「アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療」, pp314-321, 先端医療技術研究所 2003
 23. 平形道人: 全身性エリテマトーデス. 高久史磨, 黒川 清 編集「今日の治療と看護(第2版)」南江堂 2003 (印刷中)
 24. 平形道人: 主な鎮痛薬の使い方/非ステロイド性抗炎症薬. 高木 誠, 箕輪良行 編集「全科 痛み治療マニュアル 第2版」2003 (印刷中)
 25. 平形道人: 多発性筋炎・皮膚筋炎. 泉 孝英 編集「ガイドライン 外来診療2003」日経メディカル 2003 (印刷中)
 26. 平形道人. IV 管理 悪性関節リウマチと特殊病態 4. 他の膠原病(他の膠原病合併時の管理はどのように行えばよいでしょうか.) 竹内 勤 編集「リウマチ-専門医にきく最新の臨床」, 中外医学社 2003 (印刷中)

学会発表

1. Yasuoka, H., Shimada, N., Nojima, T., Satoh, S., Suzuki, M., Fujii, T., Suwa, A., Kuwana, M., Hirakata, M., Mimori, T., Ikeda, Y. Predictors and prognosis of Japanese patients with Sjogren's syndrome developing malignancies. VIII International Symposium on Sjogren's syndrome, Kanazawa, Japan, May, 2002
2. Hirakata, M., Suwa, A., Okubo, A., Yamauchi, Y., Suzuki, M., Kaneko, Y., Abe, H., Nojima, T., Sato, S., Ishihara, T. Clinical and immunological characteristics of anti-SRP autoantibodies in Japanese patients. Annual European Congress of Rheumatology, June, 2002
3. Suwa, A., Hirakata, M., Suzuki, M., Kaneko, Y., Abe, H., Nojima, T., Sato, S., Nakajima,

- T., Mimori, T. Analysis of autoimmune response against RNA helicase A-RNA polymerase II transcriptional complex. Annual European Congress of Rheumatology, June, 2002
4. Yoshida, T., Hirakata, M. Detection of interstitial pneumonitis in patients with collagen disease by measuring circulating levels of surfactant protein D. Annual European Congress of Rheumatology, June, 2002
 5. Okubo, A., Nishikai, M., Suwa, A., Yamauchi, Y., Suzuki, M., Kaneko, Y., Abe, H., Nojima, T., Sato, S., Akiya, K., Hirakata, M. Clinical and immunological analysis of anti-Mi-2 autoantibodies in Japanese patients with dermatomyositis. Annual European Congress of Rheumatology, June, 2002
 6. Hirakata, M. Suwa, A., Satoh, S., Nojima, T., Kaneko, Y., Akizuki, M., Mimori, T., Hardin, J.A. Clinical features of Japanese patients with anti-SRP autoantibodies: The immunogenetic backgrounds. 66th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2002
 7. Suwa, A., Hirakata, M., Kaneko, Y., Suzuki, M., Nojima, T., Satoh, S., Nakajima, T., Mimori, T. Autoantibodies to RNA helicase A-Transcriptional complex and their autoantigenic epitope reactivity. 66th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2002
 8. Yasuoka, H., Hirakata, M., Kawakami, Y., Ikeda, Y., Kuwana, M. HLA-B51-restricted T cells responsive to a polymorphic region of MHC class I chain-related gene A *MICA in Behcet's disease. 66th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct, 2002
 9. Sato, S., Suwa, A., Nojima, T., Suzuki, M., Kaneko, Y., Kuwana, M., Inada, S., Akizuki, M., Nishikawa, T., Hirakata, M. Clinical and immunological features of autoantibodies to the 140kDa polypeptide in patients with amyopathic dermatomyositis. 66th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2002
 10. Yamauchi, Y., Nojima, T., Shirai, Y., Abe, H., Suwa, A., Miyachi, K., Mimori, T., Hirakata, M. Molecular cloning of the Wa autoantigen and clinical features of anti-Wa autoantibodies. 66th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2002
 11. Fujii, T., Fujita, Y., Kameyama, K., Hirakata, M., Mimori, T. Vaccination with autoreactive CD4+Vβ8.3Th1 clone in MRL/Mp-Faslpr mice. 66th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2002
 12. 野島崇樹, 岡野 裕, 金子祐子, 佐藤 慎二, 諏訪 昭, 岩永史郎, 佐藤 徹, 小川 聡, 平形道人, 池田康夫. 肺高血圧を合併した膠原病患者の臨床免疫学的研究. 第 99 回 日本内科学会総会 2002 年 3 月
 13. 平形道人, 諏訪 昭, 佐藤 実, 秋月正史, 三森経世, 西海正彦. 多発性筋炎・皮膚筋炎と自己抗体-その対応抗原と関連病態-. 第 46 回 日本リウマチ学会総会 2002 年 4 月
 14. 平形道人, 諏訪 昭, 佐藤慎二, 鈴木美佐子, 金子祐子, 安岡秀剛, 阿部浩子, 野島崇樹, 三森経世. 多発性筋炎・皮膚筋炎における自己抗体の臨床免疫学的意義に関する研究. 第 46 回 日本リウマチ学会総会 2002 年 4 月
 15. 諏訪 昭, 平形道人, 鈴木美佐子, 野島崇樹, 佐藤慎二, 中島利博, 三森経世. 抗 RNA helicase A 抗体の臨床免疫学的特徴および対応抗原エピトープに関する研究. 第 46 回日本リウマチ学会総会 2002 年 4 月
 16. 岡野 裕, 秋月正史, 平形道人. 慢性関節リウマチのメトトレキサート療法の副作用. 第 46 回日本リウマチ学会総会 2002 年 4 月
 17. 野島崇樹, 鈴木美佐子, 阿部浩子, 金子祐子, 安岡秀剛, 佐藤慎二, 諏訪 昭, 箕島伸生, 清水信義, 平形道人, 池田康夫. 慢性関節リウマチにおける抗ヒト DNA helicase-V(c-myc FUSE 結合蛋白)に対する自己抗体の検索. 第 46 回日本リウマチ学会総会 2002 年 4 月
 18. 藤井隆夫, 亀山香織, 藤田義正, 田中真生, 平形道人, 梅原久範, 三森経世. 自己抗体産生をヘルプする CD4+αβTh1 クローンを用いた MRL/Mp-Faslpr マウスの病態調節に関する研究. 第 46 回 日本リウマチ学会総会 2002 年 4 月
 19. 安岡秀剛, 平形道人, 河上 裕, 池田康夫, 桑名正隆. ベーチェット病における精巢特異抗原 PHET に対する自己抗体の検索. 第 46 回 日本リウマチ学会 総会 2002 年 4 月
 20. 佐藤慎二, 諏訪 昭, 鈴木美佐子, 金子祐

- 子, 野島崇樹, 西川武二, 稲田進一, 秋月正史, 三森経世, 平形道人. Amyopathic Dermatomyositis 患者血清中の140kDa 蛋白を認識する自己抗体に関する研究. 第46回 日本リウマチ学会総会 2002年4月
21. 山内良兼, 野島崇樹, 白井悠一郎, 大久保彩子, 鈴木美佐子, 安岡秀剛, 金子祐子, 阿部浩子, 佐藤慎二, 桑名正隆, 諏訪昭, 平形道人, 宮地清光, 三森経世. 抗 Wa 抗体の臨床免疫学的特徴に関する研究. 第46回 日本リウマチ学会総会 2002年4月
22. 宮地清光, Hanins W. Raleigh, 平形道人, 諏訪昭, 浅田洸一. 高度な脳萎縮をきたしたcytoplasmic vesicular stainingをしめす抗細胞質抗体陽性のシェーグレン症候群疑いの1女性例. 第46回 日本リウマチ学会総会 2002年4月
23. 鈴木美佐子, 平形道人, 石田睦子, 金子祐子, 阿部浩子, 安岡秀剛, 野島崇樹, 佐藤慎二, 諏訪昭, 三森経世, 池田康夫. 高分子量核酸成分を免疫沈降する自己抗体の対応抗原の分析とその臨床的意義の解析. 第46回 日本リウマチ学会総会 2002年4月
24. 金子祐子, 諏訪昭, 鈴木美佐子, 阿部浩子, 安岡秀剛, 野島崇樹, 佐藤慎二, 宮地清光, 平形道人. ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群を呈した抗 Ku 抗体陽性全身性エリテマトーデスの一例. 第46回 日本リウマチ学会総会 2002年4月
25. 加藤雅志, 佐藤慎二, 鈴木美佐子, 阿部浩子, 金子祐子, 安岡秀剛, 野島崇樹, 諏訪昭, 平形道人. 血球貪食症候群に対してシクロホスファミド間歇静注療法が奏功した混合性結合組織病(MCTD)の一例. 第43回 関東リウマチ研究会 2002年6月22日
26. 加藤 淳, 野島崇樹, 高田哲也, 金子祐子, 佐藤慎二, 諏訪昭, 平形道人, 池田康夫, 鏑木淳一. 腹腔内小動脈瘤破裂を合併した Wegener 肉芽腫の1例. 第504回 日本内科学会関東地方会 2002年11月

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
該当なし.
2. 実用新案登録
該当なし.
3. その他
該当なし.

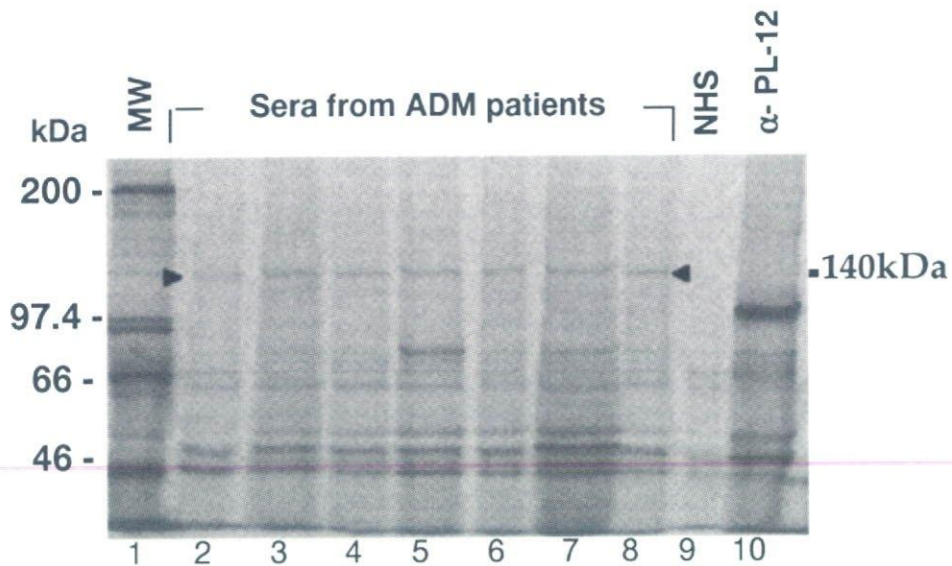


図1 ADM患者血清が免疫沈降する蛋白成分
 免疫沈降法による蛋白成分の分析では，ADM患者血清7例で約140kDa蛋白を沈降した。

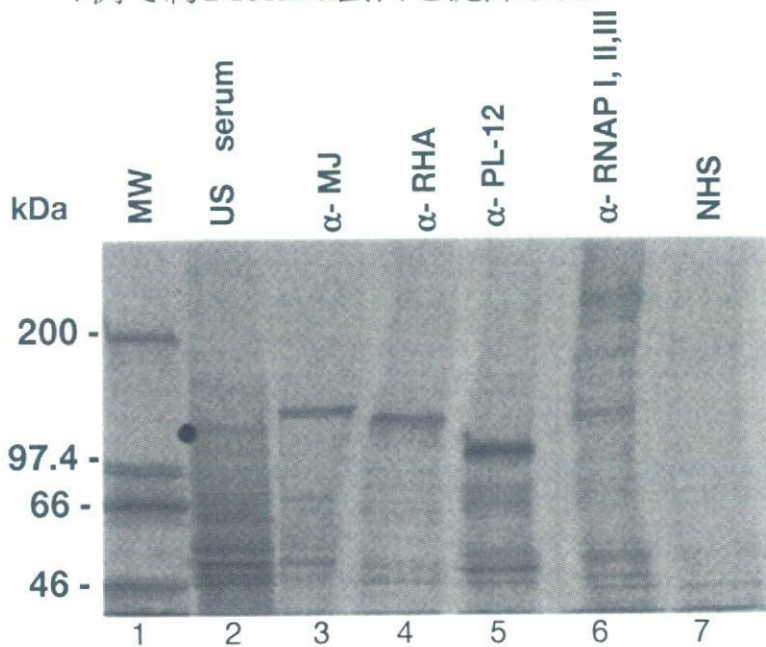


図2 ADM患者(US血清)が認識する140 kDa蛋白と他の自己抗体の比較
 レーン2のUS血清が認識した蛋白は，既知の自己抗体と明らかに異なった蛋白を沈降することが示唆された

表1 抗US抗体陽性ADM患者の臨床特徴

No.	1	2	3	4	5	6	7
	K.H.	U.S.	Y.H.	T.S.	Y.F.	Y.O.	A.S.
年齢/性	62/F	56/F	39/M	52/F	19/M	51/F	39/F
ゴットロン徴候	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ヘリオトロープ疹	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
皮膚生検でDM所見	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
筋力低下	(-)	(-)	(-)	(±)	(-)	(±)	(-)
筋痛	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(-)
最大CK値(IU/l)	85	68	167	185	238	138	47
筋原性変化(筋電図)	(-)	n.d.	(-)	(-)	(-)	(-)	n.d.
筋生検で筋炎所見	n.d.	n.d.	(-)	(-)	(±)	(±)	n.d.
レイノー現象	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
関節炎	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
他の自己抗体	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ANA/ SS-A	(-)

n.d. not done

表2 抗US抗体陽性ADM患者の間質性肺炎の臨床特徴

No.	1	2	3	5	6	7
	K.H.	U.S.	Y.H.	Y.F.	Y.O.	A.S.
臨床経過	急性	急性	急性	慢性	慢性	慢性
拘束性障害	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	n.a.
KL-6 高値	(+)	(+)	(+)	n.d.	(+)	n.a.
Gaシンチ陽性	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	n.d.
BALF パターン	BOOP	BOOP	BOOP	BOOP	BOOP	n.d.
治療	PSLパルス +CyA	PSLパルス +CyA	PSLパルス +CyA	n.d.	n.d.	n.d.
転帰	死亡	改善	改善			

n.d. not done, n.a. not available

IL-6 阻害による間質性肺炎の治療法の開発に関する研究

西本 憲弘(大阪大学健康体育部健康医学第一部門・
大学院医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学)

研究要旨

間質性肺炎は膠原病患者の予後を左右する合併症の一つである。ステロイドや免疫抑制剤に抵抗性を示す症例があり、新しい治療法の開発が必要とされている。間質性肺炎の炎症性細胞浸潤に Interleukin-6 (IL-6) が関わる。そこでリンパ球性間質性肺炎(LIP)に対する IL-6 阻害の効果を明らかにするため、LIP を合併した 26 例のキャスルマン病患者に対しヒト化抗 IL-6 レセプター抗体(MRA)を使用し、高分解能 CT(HRCT)を用いて検討した。MRA は、炎症性細胞浸潤に基づくと考えられる HRCT 上での小葉中心性粒状影、小葉間隔壁の肥厚、気管支血管束の肥厚、スリガラス影を有意に改善した。一方、不可逆性変化と考えられる浸潤影、嚢胞は改善しなかった。したがって、IL-6 阻害治療は炎症細胞浸潤が主体の LIP の治療に有効であることが検証された。次に、IL-6 阻害が炎症細胞浸潤を抑え、それに引き続く肺線維化を抑制するか否かを明らかにするため、プレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスに抗 IL-6 レセプター抗体を投与し、肺線維化の抑制効果を検討した。しかし、ラット抗マウス IL-6 レセプター抗体、MR16-1 はプレオマイシンによる線維化を抑えなかった。今後、IL-6 阻害による肺線維化の抑制の可能性をさらに検討する必要がある。

A.研究目的

間質性肺炎は膠原病患者の予後を左右する合併症の一つである。ステロイドや免疫抑制剤といった現在用いられている治療法に抵抗性を示す症例があり、新しい治療法の開発が必要とされている。間質性肺炎の発症機序は未だ明らかではないが、炎症性細胞の浸潤を炎症の初期像ととらえ、肺の線維化は組織の修復が過度に生じた状態とみなすことができる。リンパ球やマクロファージなど炎症性細胞浸潤に Interleukin-6 (IL-6) が、肺線維芽細胞の増生と細胞外マトリックスの沈着を伴う線維化には Transforming growth factor- β (TGF- β) が関わることが報告されている。我々は、これまでの研究で、IL-6トランスジェニックマウスの肺病変がリンパ球性間質性肺炎(lymphocytic interstitial pneumonia, LIP)の病理所見を呈することを明らかにし、IL-6がLIPの病態形成に関わっていることを示した。さらに、昨年度

の研究で、LIPを合併した6例のキャスルマン病患者に対しヒト化抗IL-6レセプター抗体(MRA)による治療を行い、IL-6阻害がLIP治療に有用である可能性を示した。今回、MRAによる治療効果をさらに26例のLIP患者で検証した。間質性肺炎の評価には、高分解能CT(HRCT)を用い病変のスコア化を試みた。一方、IL-6阻害が炎症細胞浸潤を抑え、それに引き続く肺線維化を抑制するか否かを明らかにするため、プレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスにIL-6レセプター抗体を投与し肺線維化の抑制効果を検討した。

B.研究方法

(1)LIP に対するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体(MRA)治療の有用性の検討

ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体(MRA)のキャスルマン病に対する臨床第 II 相試験において、インフォームドコンセントを得た 26 例の LIP 合併キャッ

スルマン病患者に MRA 8 mg/kg を 2 週間毎に計 8 回使用し、前後で肺病変を評価した。

評価には HRCT を用いた。スライス間隔を 5-10 mm、スライス厚を 1 mm 以下とした。昨年度と同様に、肺野を左右とも気管分岐部と下大静脈流入部を境に左右それぞれ、上肺野、中肺野、下肺野の 6 領域に分け、6 区分それぞれについて、各区分に含まれる全スライスを用いその区分の病変を評価した。間質性肺炎に特徴的な異常陰影をスリガラス影、浸潤影、嚢胞、小葉中心性粒状影、小葉間隔壁の肥厚、気管支血管束の肥厚の 6 種類に細分化し、各項目について点数化を行い治療前後で比較検討を行った。スリガラス影、浸潤影、嚢胞、小葉中心性粒状影に関しては各 HRCT スライス全体の面積中の病変部の面積の割合を算出した。小葉間隔壁の肥厚は、全肺野に網目状にある小葉間隔壁を想定して、そのうちの肥厚した小葉間隔壁の割合で算出した。気管支血管束の肥厚については、分岐の見える部分は分節から分節までを 1 単位、また横断面や斜断面も 1 単位とし、可視範囲の全体の単位数のうち肥厚を有する割合で評価した。病変は 0-100% まで 10% 間隔で点数化した。なお病変は存在するが 10% に満たない場合はすべて 10% とした。

HRCT の撮影時期、患者 ID は無作為化し、盲検下にて 2 名の評価者が独立して行った。

有意差の検定は対応ある 2 群間の T 検定で行った。

(2) プレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスにおける、IL-6 レセプター抗体による肺線維化の抑制効果の検討

プレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスにラット抗マウス IL-6 レセプター抗体、MR16-1 を投与し、肺線維化抑制効果を検討した。プレオマイシンの気管内あるいは腹腔内投与により間質性肺炎を誘導し、肺の湿重量、ハイドロキシプロリン量の変化を検討した。また、組織学的に検討した。MR16-1 は投与時期(プレオマイシン投与の前後)あるいは投与経路(気管内あるいは腹腔内)を変えて検討した。さらに、リコンビナント IL-6 を経気道的に投与し、間質性肺炎の増強の有無を検討した。

C. 研究結果

(1) 抗 IL-6 レセプター抗体治療による HRCT 所見の変化

抗体治療前後の HRCT での評価結果を図 1 に示した。MRA は、炎症性細胞浸潤に基づくと考えられる小葉中心性粒状影、小葉間隔壁の肥厚、気管支血管束の肥厚、スリガラス影を有意に改善した。一方、浸潤影、嚢胞に変化は無かった。

独立して評価を行った 2 名の評価者の間で、結果に差はなく評価の妥当性が保証された。

(2) プレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスにおける、IL-6 レセプター抗体による肺線維化の抑制効果の検討

プレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスにラット抗マウス IL-6 レセプター抗体、MR16-1 を投与し、肺線維化抑制効果を検討した。プレオマイシンの気管内あるいは腹腔内投与により間質性肺炎を誘導し、肺の湿重量、ハイドロキシプロリン量の変化を検討した。また、組織学的に検討した。図 2 にハイドロキシプロリン量の定量結果を示す。MR16-1 は投与時期あるいは投与経路の如何に関わらず、プレオマイシンによる間質性肺炎の発症を抑えなかった。一方、リコンビナント IL-6 を経気道的に投与し、間質性肺炎の増強の有無を検討したが、ハイドロキシプロリン量の増加は認めなかった。

D. 考察

昨年、パイロットスタディとして、極少数例の LIP に対し抗 IL-6 レセプター抗体治療を行い、その効果を検討するとともに、評価方法として HRCT を用いた定量化が可能であるかどうかを試した。その結果をもとに、本年はキャスルマン病に合併した LIP 患者 26 例において抗 IL-6 レセプター抗体治療の有用性について検討した。IL-6 阻害は HRCT 所見を有意に改善し、抗 IL-6 レセプター抗体治療の有用性が検証された。また、HRCT 所見の定量化についても、盲検下で独立して評価を行った 2 名の評価者の間で、結果に差はなく評価の妥当性が保証され、この方法が有用であると思われる。

昨年の 6 例での検討ではスリガラス陰影に改

善傾向は認められたものの有意差はなかったが、今回スリガラス陰影も改善した。HRCT 所見とその所見に対応する病変部位ならびに病理像、抗 IL-6 レセプター抗体治療による HRCT 所見の変化を表に示す(表 1)。HRCT における小葉中心性粒状影、小葉間隔壁の肥厚、気管支血管束の肥厚、スリガラス陰影の病変部位は小葉中心や小葉間隔壁、気管支血管周囲といったいわゆる広義間質である。これらの病理所見には線維性変化も含まれるがほとんどは炎症細胞浸潤であり、この段階の病理変化は可逆性で、IL-6 阻害により改善すると考えられる。

一方、嚢胞と浸潤影は改善しなかった。浸潤影に対応する病変部位は肺胞および肺胞隔壁で、炎症細胞浸潤以外に、肺胞内の浸出液、線維化など多様な病理像を反映していると考えられる。また、嚢胞は肺胞隔壁の破壊を反映している。これらは不可逆的な変化を含んでおり、IL-6 阻害でも改善しなかったと思われる。したがって、IL-6 阻害治療は器質的変化が生じる前に治療を行う必要がある。

以上より、IL-6 阻害治療は炎症細胞浸潤が主体の LIP の治療に有効であることが明らかとなった。

一方、IL-6 阻害が炎症性細胞浸潤を改善し、結果的に線維化へと進行するのを防ぐ可能性がある。そこでプレオマイシン誘導性間質性肺炎マウスにおいてラット抗マウス IL-6 レセプター抗体を投与し、肺線維化抑制効果を検討したが、MR16-1 は投与時期や投与経路の如何に関わらず、間質性肺炎の発症を抑えなかった。この実験で使用した抗体の量は、コラーゲン関節炎の発症を抑制した量であり、IL-6 の作用は十分に阻害できていたと思われる。したがって、このモデルでは IL-6 阻害は線維化を抑制し得ない。しかし、このモデルの肺線維化の機序は自己免疫疾患に伴う肺線維症とは異なることから、現時点で IL-6 阻害が自己免疫疾患に伴う線維化型間質性肺炎に対し無効との結論を出すのは早すぎると思われる。今後、有用なモデル系を確立するとともに、IL-6 阻害治療の可能性をさらに検討する必要がある。

E. 結論

IL-6 阻害が LIP の治療に有効であること、その治療の評価に HRCT 所見のスコア化が有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Song J, Ohkura T, Sugimoto M, Mori Y, Inagi R, Yamanishi K, Yoshizaki K, Nishimoto N. Human interleukin-6 induces human herpesvirus-8 replication in a body-cavity-based lymphoma cell line. *J. Med. Virol.* 2002;68:404-411.
- 2) Okazaki M, Yamada Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mihara M. Characterization of anti-mouse IL-6 receptor antibody. *Immunol. Lett.* 2002;84:231-240.
- 3) Mihara M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Suzuki T. Influences of anti-mouse IL-6 receptor antibody on immune responses in mice. *Immunol. Lett.* 2002;84:223-229.
- 4) Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T, Panay GS. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.* 2002;46:3143-3150.
- 5) Iwamoto M, Nara H, Hirata D, Minota S, Nishimoto N, Yoshizaki K. Humanized monoclonal anti-interleukin 6 receptor antibody for treatment of intractable adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum.* 2002;46:3388-3389.
- 6) Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Kakehi T, Takagi N, Suemura M, Kishimoto T. Toxicity, pharmacokinetics, and dose finding