

Inc., Columbus, OH) でコートし、2%のウシ血清アルブミンと 1%のゼラチンにてブロッキングした後、100 倍に希釈した血清と室温で 90 分間反応させた。検出にはアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgM あるいは IgG 抗体を用いた。

C. 研究結果

1) ELISA による抗トポ II α 抗体

トポ II α に対する自己抗体のレベルは精製ヒトトポ II α を抗原に用いた ELISA によって測定した (図 1)。IgG 型抗トポ II α 抗体価は健常人に比較して dSSc および ISSc のいずれにおいても有意に高値であった。dSSc と ISSc の間に有意差は認められなかった。一方 IgM 型抗トポ II α 抗体は健常人と比較して dSSc および ISSc のいずれにも有意差は認められなかった。

ELISA による IgG 型抗トポ II α 抗体の陽性率を、健常人の平均値+2SD をカット・オフ値として算出した。SSc 全体における IgG 型抗トポ II α 抗体は 13%に陽性であった (図 2)。

2) IgG 型抗トポ II α 抗体と臨床所見との関連
SSc 患者を IgG 型抗トポ II α 抗体の陽性群と陰性群に分類し、臨床症状および血清学的所見との関連について検討した (表)。男女比は陽性群で男性が有意に多く、罹病期間は、陽性群で長い傾向はあったものの有意差は認められなかった。%VC、%DLco、血漿レニン活性は陽性群で有意に低下し、IL-12、血沈、CRP は有意に上昇していた。抗トポ I 抗体、抗セントロメア抗体の陽性の頻度に有意差は認められず、肺高血圧との関連も認めら

れなかった。

D. 考案

IgG 型抗トポ II α 抗体は日本人 SSc の約 15% に検出され、SSc 患者で検出される抗体の一つであると考えられた。また本抗体が存在する患者では%VC、%DLco は低下しており、肺病変の有無と関連があると考えられた。欧米では抗トポ II α 抗体は SSc 患者の 21.7%で検出され、抗トポ I 抗体、抗セントロメア抗体との関連はなく、さらに抗トポ II α 抗体陽性群では有意に DLco が低下し、肺高血圧が認められる頻度が高かったことが報告されている³。今回の検討では日本人においてもほぼ同等の陽性率を示し、DLco の低下が確認された。また日本人では肺高血圧が少ないが、肺高血圧の有無との関連は認められなかった。さらに IgG 型抗トポ II α 抗体陽性群では、IL-12、血沈、CRP は上昇しており、何らかの炎症が存在する際に高値となる可能性が考えられたが、それが特に肺病変の活動性と関連しているかどうかについては今後さらに検討する必要があると考えられた。

E. 結論

1) IgG 型抗トポ II α 抗体は日本人 SSc の約 15% に検出された。

2) IgG 型抗トポ II α 抗体が存在する患者では%VC、%DLco は低下しており、肺病変の有無と関連があると考えられた。

3) IgG 型抗トポ II α 抗体と抗トポ I 抗体、抗セントロメア抗体との関連はなく、肺高血圧の有無との関連は認められなかった。

4) IgG 型抗トポ II α 抗体陽性群では、インターロイキン-12、血沈、CRP は上昇しており、何らかの炎症が存在する際に高値となる可能性が考えられた。

F. 文献

1. Wang JC. DNA topoisomerases. Annu Rev Biochem 1985;54:665-97.
2. Grigolo B, Mazzetti I, Borzi RM, Hickson ID, Fabbri M, Fasano L, et al. Mapping of topoisomerase II α epitopes recognized by autoantibodies in idiopathic pulmonary fibrosis. Clin Exp Immunol 1998;114:339-46.
3. Grigolo B, Mazzetti I, Meliconi R, Bazzi S, Scorza R, Candela M, et al. Anti-topoisomerase II α autoantibodies in systemic sclerosis-association with pulmonary hypertension and HLA-B35. Clin Exp Immunol 2000;121:539-43.
4. Chang YH, Hwang J, Shang HF, Tsai ST. Characterization of human DNA topoisomerase II as an autoantigen recognized by patients with IDDM. Diabetes 1996;45:408-14
5. Zuklys KL, Szer IS, Szer W. Autoantibodies to DNA topoisomerase II in juvenile rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 1991;84:245-9
6. Meliconi R, Bestagno M, Sturani C, Negri C, Galavotti V, Sala C, et al. Autoantibodies to DNA topoisomerase II in cryptogenic fibrosing alveolitis and connective tissue disease. Clin Exp Immunol 1989;76:184-9.

7. Hoffmann A, Heck MM, Bordwell BJ, Rothfield NF, Earnshaw WC. Human autoantibody to topoisomerase II. Exp Cell Res 1989;180:409-18.

G. 研究発表

- 3) 論文発表
なし
- 4) 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 1. Serological and clinical features of SSc patients positive for IgG anti- topo II α Abs

	IgG anti-topo II α Ab + (n=12)	IgG anti-topo II α Ab - (n=92)
Serological		
Anti-topo I Ab	4 (31%)	24 (27%)
ACA	4 (31%)	42 (47%)
SIL-12	7.46 \pm 10.0*	3.39 \pm 3.44
ESR	37.6 \pm 38.0*	18.6 \pm 14.8
CRP	0.90 \pm 1.15*	0.28 \pm 0.50
Clinical		
Age at onset, years	42.1 \pm 14.5	44.9 \pm 15.8
Sex (male:female)	4:8	7:85
dSSc:ISSc	5:7	34:58
Duration, years	12.2 \pm 12.0	6.79 \pm 8.49
%VC	77.5 \pm 22.1*	99.9 \pm 23.3
%DLco	50.8 \pm 19.4*	63.0 \pm 16.5
PH	2 (15%)	9 (10%)
PRA	12.9 \pm 26.0*	2.83 \pm 4.78

* : p < 0.05

ACA=Anti-centromere Ab; VC=vital capacity; DLco=carbone monoxide for diffusing capacity; PH=pulmonary hypertension; PRA=plasma rennin activity.

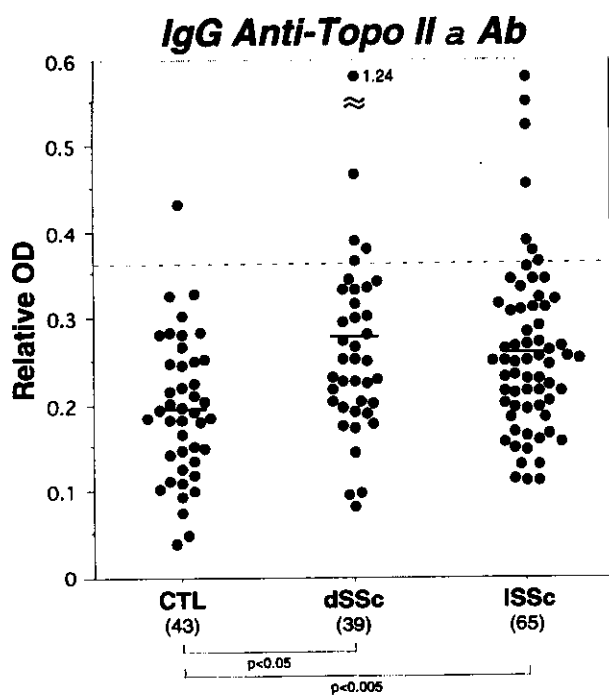


図 1 : ELISA による抗トポ II α 抗体価。破線は健常人の平均値+2SD のカット・オフ値を示す。

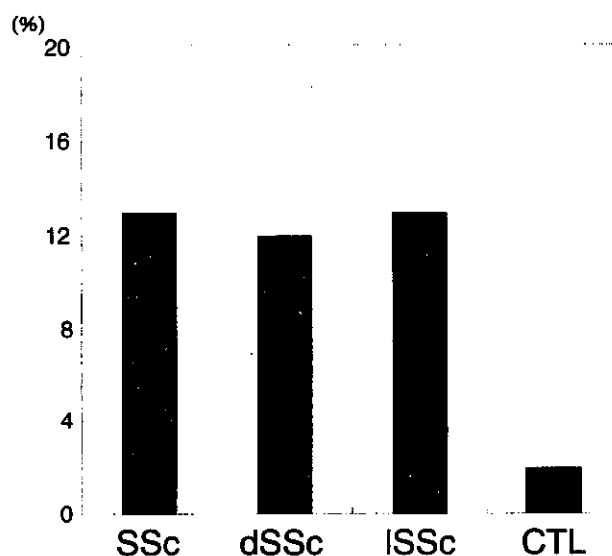


図 2 : ELISA による抗トポ II α 抗体の頻度

強皮症患者血清を用いてクローニングされた新規自己抗原 KRMP1 の自己免疫エピトープとその臨床的意義

分担研究者 室 慶直 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚結合組織病態学助教授

協力者 神本高宏 東京医科歯科大学難治疾患研究所統合生体信号研究系大学院生

協力者 萩原正敏 東京医科歯科大学難治疾患研究所統合生体信号研究系教授

研究要旨

全身性強皮症では各種の疾患特異性を有する抗核抗体が陽性になるが、細胞質成分に対する自己抗体に関する解析はあまり進んでいない。今回、我々は全身性強皮症患者血清を用いてクローニングされた細胞質蛋白 KRMP1 について、その変異削除株によるリコンビナント蛋白を作成し、自己免疫エピトープを調べた。その結果、他に細胞質自己抗原として知られるゴルジ体の複数構成蛋白の共通特徴であるコイルドコイル構造が、KRMP1 においても自己抗体に認識されていることが判明した。

A. 研究目的

全身性強皮症(Systemic sclerosis: SSc)では各種自己抗体の存在が特徴的であり、その対応抗原は topoisomerase 1 や 染色体 centromere を構成する蛋白など、生命機能に必須の役割を持つ分子が多い。これまでの報告では SSc に疾患特異性を有する自己抗体が認識する分子は核内蛋白が殆どであり、細胞質成分に対する自己抗体に関する解析はあまり進んでいない。

我々は以前、ある SSc 患者(#114)血清を用いて細胞質に局在する新規の自己抗原 dymp1 のクローニングに成功した¹。そのリコンビナント蛋白を利用した解析により、抗 dymp1 抗体は男性の間質性肺炎を伴った SSc との関連が示唆

された²。

今回の研究では同時にクローニングされた細胞質蛋白 KRMP1³ についての自己免疫応答を検討し、その臨床的意義を明らかにする。

B. 研究方法

KRMP1 はアミノ末端より head と呼ばれるモータードメイン(1-503 アミノ酸残基)、中央のコイルドコイルを形成するストーク(stalk)ドメイン(504-1519)、球状構造のテール(tail)ドメイン(1520-1780)の3つのドメイン構造からなる。Head、stalk の N 末端(504-1003)、stalk の C 末端(1004-1519)、tail の4種のリコンビナント断片蛋白をコードする DNA をそれぞれ PCR で

作成し、pGEX5X3 ベクターに導入した。GST との融合蛋白として大腸菌内で発現、グルタチオンセファロースにて精製し、血清との反応をイムノプロット法にて検討した。さらに、4種のインサート DNA を pET32 ベクターに導入、ウサギ網状赤血球内での *in vitro* 転写翻訳系を利用してチオレドキシンの融合蛋白として発現させ、それらは免疫沈降法に応用した。

C. 研究結果

1) イムノプロット法による反応性

Head、stalk の N 末端(stalk 1)、stalk の C 末端(stalk 2)、tail の4種のリコンビナント断片蛋白の発現、精製が抗 GST 抗体を利用したイムノプロットにて確認され、健常人血清はいずれにも反応を示さなかった。それに対して#114 血清は stalk 1 および stalk 2 のリコンビナント蛋白と反応を示した。

2) 免疫沈降法による反応性

in vitro 転写翻訳系による4種のリコンビナント断片蛋白の発現が、ビオチン化した tRNA の取込みをストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼとの反応で検出する系を用いて確認された。健常人血清はいずれの蛋白も免疫沈降しなかったが、#114 血清は stalk 1 および stalk 2 のリコンビナント蛋白を免疫沈降した。

D. 考 察

キネシンファミリー分子は ATP を利用して微小管上で働くモーター分子として知られており、数十種類報告されている多くは細胞分裂における紡錘糸や染色体の移動などの役割を担っている。KRMP1 は N 末端にキネシンモーター

ドメインを有し、C 末端の tail ドメインにおいて分裂期進行の制御因子である Pin1¹ と結合することから Kinesin-related Motor interacting with Pin1 より命名された。C 末端部分に対して作成したペプチド抗体や遺伝子過剰発現系を利用した実験結果から KRMP1 の主たる局在は細胞質であり、他に核小体にも存在することが判明している。今回の結果から KRMP1 が自己抗原であることが確認され、強皮症における抗 KRMP1 抗体の頻度は定かではないが、膠原病患者血清中に見られる抗細胞質抗体のひとつとして今後その臨床的意義を検討していく必要があると思われる。

興味深いことに、#114 血清は KRMP1 のコイルドコイルドメインをエピトープとしていた。コイルドコイルは蛋白分子の多量体形成に関与する構造ドメインで、実際に KRMP1 においてもこのドメインを介して結合が起きることが示されている。52kDa SS-A 抗原や代表的な細胞質自己抗原のゴルジ体を構成する多くの蛋白がコイルドコイル構造を有している⁵。このようなコイルドコイル蛋白群が如何にして自己免疫のターゲットになっているかの解明は今後の課題である。

Fritzler らは、idiopathic ataxia の患者血清を利用して KRMP1 の C 末端部分をクローニングしている⁶。これは本研究における stalk 2 と tail の部分に相当しているが(図1)、#114 血清では免疫スクリーニングの際にクローン化された cDNA のコードする領域が N 末端 586 アミノ酸であることより、stalk 1 とオーバーラップする 504-586 アミノ酸の領域がエピトープ形成に重要であることが推察される。

免疫沈降法によるコイルドコイルドメインの

陽性反応は多量体形成によるコンフォメーション依存性抗体の存在も疑わせ、更なる検討を要する。

E. 結 論

我々がクローニングした KRMP1 は新たな細胞質自己抗原蛋白であり、その特異なエピトープの存在より、今後多検体の強皮症を始めとする膠原病患者血清について同様の検討を加え、抗 KRMP1 抗体の強皮症における臨床的意義を明らかにする必要がある。

F. 文 献

1. Kamimoto T, Nagai Y, Onogi H, Muro Y, Wakabayashi T, Hagiwara M.: Dymple, a novel dynamin-like high molecular weight GTPase lacking a proline-rich carboxyl-terminal domain in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1998, 273:1044-51.
2. Muro Y, Kamimoto T, Tomita Y, Hagiwara M.: Spectrum of autoantibodies against a dynamin-related protein, dymple. *Arthritis Rheum.* 2000, 43:1516-9.
3. Kamimoto T, Zama T, Aoki R, Muro Y, Hagiwara M.: Identification of a novel kinesin-related protein, KRMP1, as a target for mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *J Biol Chem.* 2001, 276:37520-8.
4. Lu KP.: Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel cell cycle regulatory mechanism. *Prog Cell Cycle*

Res. 2000, 4:83-96.

5. Eystathioy T, Jakymiw A, Fujita DJ, Fritzler MJ, Chan EK.: Human autoantibodies to a novel Golgi protein Golgin-67: high similarity with Golgin-95/gm130 autoantigen. *J Autoimmun.* 2000, 14:179-187.
6. Fritzler MJ, Kerfoot SM, Feasby TE, Zochodne DW, Westendorf JM, Dalmau JO, Chan EK.: Autoantibodies from patients with idiopathic ataxia bind to M-phase phosphoprotein-1 (MPP1). *J Investig Med.* 2000, 48:28-39.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

室慶直：強皮症患者血清を用いた新規自己抗原キネシン関連蛋白"KRMP1"のクローニング、第46回日本リウマチ学会総会、2002. 4. 22. 神戸.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Autoepitopes & coiled-coil formation of KRMP1

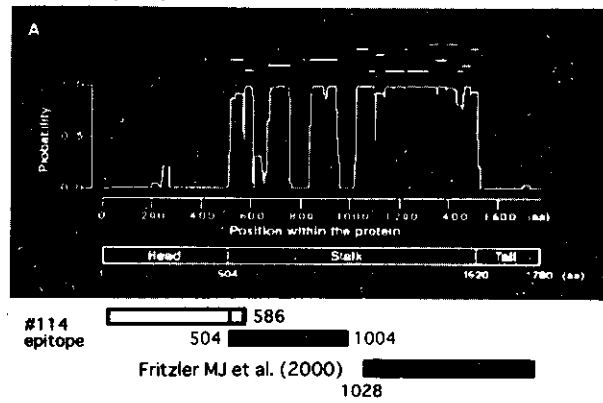


図1 : KRMP1 のドメイン構造と自己免疫エピトープ。図の上段は Lupas アルゴリズムによる coiled-coil 構造の予測と head、stalk、tail の3ドメインの一次構造上の位置を示す。下段は血清#114 でクローン化された部分と同血清と反応するリコンビナント蛋白フラグメント(stalk 1)、および Fritzler らによりクローン化された部分を示す。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

全身性強皮症における抗リン脂質抗体陽性率と臨床的特徴について

研究協力者 山崎雅英 金沢大学大学院医学系研究科血液内科学助手
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症における抗リン脂質抗体陽性率および本抗体陽性の強皮症症例の臨床的特徴を検討した。強皮症における抗リン脂質抗体陽性率は 53/102 例（52.0%）と極めて高率であり、特にループスアンチコアグラント陽性例が 45/102 例（44.1%）と大部分を占めていた。血栓症発症率も 34.3%と高率であることから強皮症症例では抗リン脂質抗体の測定と血栓予防が肝要であると考えられた。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群（antiphospholipid syndrome, APS）は抗カルジオリピン抗体（anticardiolipin antibody, aCL）またはループスアンチコアグラント（lupus anticoagulant, LA）などの抗リン脂質抗体（antiphospholipid antibodies, aPL）を有し、反復性血栓症または不育症をきたす自己免疫疾患の1つと考えられている¹。本症候群は何ら基礎疾患を有さない、いわゆる「原発性抗リン脂質抗体症候群（primary APS, PAPS）」のほか、全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus, SLE）などの膠原病にしばしば併発することが知られているが全身性強皮症（Systemic sclerosis, SSc）における aPL の合併頻度および aPL 陽性 SSc 症例の臨床的特徴に関する報告は極めて少なく、研究者が検索しえた限りでは SSc 症例 45 例における IgG 型または IgM 型 aCL 陽性率が 6.7%で

あった²、とする報告がほとんど唯一の報告である。

一方、SSc ではレイノー現象や指尖潰瘍もその臨床的特徴であるが、これらの所見は血管炎のほか血栓症でも生じることから APS の合併の有無も十分考慮する必要がある。また SSc における重篤な合併症の1つである肺高血圧症の一因として肺梗塞による血栓性肺高血圧症が報告されているが肺梗塞の原因としての抗リン脂質抗体症候群の存在も考慮する必要がある。

今回、SSc 症例 102 例につき aCL, LA を測定するとともに血栓症や不育症発症との関連を検討し、SSc と APS の関連につき検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

金沢大学医学部附属病院皮膚科にて診断され定期的に通院中の全身性強皮症症例 102 例（男性 12 例、女性 90 例、年齢 10～78 歳、平

均 42.8 歳) につき informed & consent を得た上で採血を行い、下記の項目を測定した。全身性エリテマトーデスや混合性結合織病などを合併した、オーバーラップ症候群は検討より除外した。同時にカルテより retrospective に血栓症の有無、不育症の有無につき確認した。

(2) 測定項目

(2)-1. 抗リン脂質抗体

抗リン脂質抗体 (aPL) として抗カルジオリピン抗体 (ACL) およびループスアンチコアグラント (LA) を測定し、下記の aPL のうち少なくともいずれか 1 つが陽性の症例を aPL 陽性と判定した。

ACL については β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI) 依存性・非依存性に関わらないカルジオリピンに対する抗体 (aCL) は MBL 社製 ELISA キット、 β_2 GPI 依存性 aCL (aCL/ β_2 GPI) はヤマサ社製 ELISA キットを用いて測定した。aCL は 10GPL 以上を陽性、aCL/ β_2 GPI は 3. IU/mL 以上を陽性とし、いずれか一方でも陽性の症例を ACL 陽性とした。

LA は患者血漿のカオリン凝固時間法 (kaolin clotting time, KCT) および希釈ラッセル蛇毒試験法 (diluted Russell's viper venom time, dRVVT) の両者を測定し、正常コントロール血漿の凝固時間の 1.3 倍以上の検体について混合試験および中和試験を施行した。KCT は自家製、dRVVT はグラディポア社製 dVVT キットを用いて測定した。混合試験より凝固時間の延長がインヒビターによるものであり、かつ中和試験により凝固時間の延長が是正されるものを KCT または dRVVT 陽性と判定し、いずれか一方が陽性と判定されたものを LA 陽性と診断した。

(2)-2. 臨床症状

血栓症の有無については動脈・静脈血栓症に大別し、各種画像診断およびカルテ記載より確認した。動脈血栓症は頭部 MRI および脳血流 SPECT により脳梗塞 (stroke) の有無を、眼底検査により網膜中心動脈血栓症の有無を検討した。また心臓超音波検査、心電図より心筋梗塞 (myocardial infarction, MI) の有無につき確認するとともに抗リン脂質抗体症候群の臨床的特徴の 1 つである僧房弁・大動脈弁閉鎖症の有無についてもドップラー法併用心臓超音波検査により検索した。静脈血栓症は下肢深部静脈血栓症 (deep vein thrombosis, DVT) は RI ベノグラフィーにより、肺梗塞 (lung embolism, PE) は肺血流・換気シンチグラフィーにより診断した。網膜中心静脈血栓症は眼底検査により診断した。今回の検討では指尖潰瘍は血栓症より除外した。

3 回以上の自然流産または妊娠 10 週以降の子宮内胎児死亡、胎児発育遅延症例を不育症とし、不育症の有無はカルテ記載より確認した。

C. 研究結果

1) SSc における各種抗リン脂質抗体陽性率 (表 1)

SSc における各種 APL 陽性率は aCL 18/70 例 (25.7%)、aCL/ β_2 GPI 7/51 例 (13.7%) であり、SSc における ACL 陽性率は 19/90 例、21.1% であった。

一方、LA については KCT にて LA 陽性と判定された症例が 41/102 例 (40.2%)、dRVVT にて LA 陽性と判定された症例は 8/102 例 (7.8%) であり SSc 症例における LA 陽性率は 45/102 例、44.1% であった。

以上の結果より今回検討した SSc 症例 102 例において何らかの aPL が陽性であった症例

は102例中53例、52.0%でありSScにおけるaPL陽性率はこれまでの報告より高率であることが示唆された。

抗リン脂質抗体のスペクトラムについて検討した(図1)。ACL、LAが両者とも陽性であった症例は53例中11症例に過ぎず、ACL単独陽性例8例、LA単独陽性例34例といずれか一方のみの抗リン脂質抗体の陽性症例が大部分を占めていた。

ACLに関しては全例で測定されていないが、aCLおよびaCL/ β_2 GPIの両者を検討した症例ではaCL/ β_2 GPI陽性例のうちaCL陰性症例は1例のみでありその他のaCL/ β_2 GPI陽性例6例ではaCLも陽性であった。

一方、LAに関してはKCT、dRVVT両者が陽性であった症例は45例中4例のみであり、dRVVT単独陽性例4例、KCT単独陽性例37例であり、LAの多様性を示唆する結果であった。

2) SScにおける血栓症の特徴

今回検討したSSc症例102例中何らかの血栓症が証明された症例は35例、34.3%であった。動・静脈の分類では動脈血栓症は27例、静脈血栓症10例であり、動脈血栓症が有意に高率に発症していた。動静脈の両者に血栓症の既往がある症例は2例のみであった。

動脈血栓症の内訳は脳血管障害(stroke)23例、MI1例、網膜中心動脈血栓症2例、一過性脳虚血発作1例であった。静脈血栓症ではDVT8例、PE4例であった。動静脈両者に血栓症が証明された2例はいずれもstrokeとDVTの発症例であった。

このほか、不育症は2症例で認められ、この2症例はいずれもDVTの既往が認められた。心臓超音波検査上、僧房弁または大動脈弁の弁膜症が9症例、8.8%で確認された。

3) SScにおける「抗リン脂質抗体症候群」合

併率

以上の結果より、今回検討したSSc症例102例におけるAPS合併率、すなわち何らかの抗リン脂質抗体陽性で血栓症または不育症を求めた症例は27例、26.5%であった。

何らかのaPL陽性で血栓症などの臨床症状を認めない症例は25例、逆に血栓症を認めるものの今回検討したaPLはいずれも陰性であった症例も8例みられた。

4) 各aPLと血栓症の関連

各aPLと血栓症の関連を表2に示す。何らかの抗リン脂質抗体が陽性であることと血栓症の存在との関連は感度77.1%、特異度61.0%、診断効率64.7%であった。ACLとLAを比較すると、感度はACL28.1%、LA54.3%とLAの方が優れていたが、一方特異度はACL83.3%、LA59.7%とACLが優れていた。個々の抗体で比較すると感度が高かったのはKCTによるLAであったもののその感度はわずか51.4%であり、感度を高めるためには複数の抗リン脂質抗体を測定する必要があると考えられた。特異度に関してはdRVVTによるLAが91.9%と高率であったものの本抗体の感度はわずか8.6%であった。

D. 考案

抗リン脂質抗体症候群(APS)は抗リン脂質抗体の存在により全身性反復性血栓症をきたす自己免疫疾患として近年注目されている疾患である。APSは全身性エリテマトーデス(SLE)に合併することは良く知られているが、その他の膠原病でもしばしば併発する。全身性強皮症(SSc)では皮膚病変とともに血管病変が重要であり、病理学的には内臓を含む全身の血管のフィブリノイド変性と内弾性板の断裂が生じることが知られている。このため

SScにおける血栓症は古くから知られていたが、血管障害の原因は血管炎によるものと考えられており、APSとの関連については比較的報告が少ない。SScにおける抗リン脂質抗体合併頻度に関してもaCL陽性症例がSScの6.8%~25.8%という報告が散見されるのみ^{2,3}でSScにおけるLAの陽性率やAPSの合併頻度に関する報告はみられない。

今回の検討ではaCL陽性例が25.7%とこれまでの報告とほぼ同等であったがaCLのうち血栓症との関連がより高いとされているaCL/ β_2 GPI陽性率は13.7%であった。一方、LA陽性率は44.1%と極めて高率であり、SScにおいては過半数の症例で何らかの抗リン脂質抗体が陽性となることが確認された。

抗リン脂質抗体のうちaCLおよびaCL/ β_2 GPIはenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により測定可能なため多くの疾患で測定されてきたが、LAは①定性検査であること、②単一の方法では検出されない症例が多く、複数の凝固時間法を用いて測定する必要があること、③検体の採血方法、処理方法が煩雑であること、などから各種疾患におけるLA陽性率に関する報告が少ないのが実情である。しかし、抗リン脂質抗体症候群で血栓症との関連性が高いのはaCL、aCL/ β_2 GPIよりLAである¹ことから、本症候群の存在を疑った場合にはLAの測定が必須である。実際、今回の検討でもaCL陽性率が21.1%と低率であったのに対し、LA陽性率は44.1%とaCL陽性率の約2倍であり、LA測定の重要性が示唆された。

LAの測定については我が国で保険収載されているdRVVTによるLAよりKCTによるLA陽性率が5倍以上(7.8% vs. 40.2%)であること、およびdRVVT陰性KCT陽性のLAがLA陽性45

例中37例も存在することから、従来の報告通りLA測定においては複数の検査法で測定する必要があること、特にKCT法による測定が重要であることが考えられた。

SScにおける血栓症の発症率は35例、34.3%と極めて高率であった。もちろんこの血栓症のすべてについて抗リン脂質抗体のみに原因を求めることはできないが、SScにおける抗リン脂質抗体陽性率の高さおよび感度・特異度を考慮すると、SScにおける血栓症と抗リン脂質抗体の関連性が示唆される。特にaCLのみならずLAも測定することにより感度、特異度がともに上昇したことから、SScにおいてはLAの測定が重要であると考えられた。

各抗リン脂質抗体と血栓症の関連では、aPL、KCTの感度が高く、一方特異度が高い抗リン脂質抗体はaCL/ β_2 GPIおよびdRVVTによるLAであった。しかし今回の検討では感度・特異度ともに優れた抗体は検出できなかった。これは、①SScの多くでは診断直後より指尖潰瘍やレイノー現象に対する予防・治療のためアスピリンなどの抗血小板薬やプロスタサイクリン製剤が投与されこれにより結果的には血栓症の一次予防がなされていること、②LAのサブクラス存在(LAの主体は抗 β_2 GPI抗体や抗プロトロンビン抗体であることが推察されているが、抗プロトロンビン抗体にも結合するプロトロンビンの種差や抗体とプロトロンビンの結合様式の相違によりサブクラスが存在することが報告されている^{4,5})などが推察され、今後SScにおいてどのような抗体が血栓症と相関するか、更なる検討が必要であろう。

血栓症が見られるものの今回検討した抗リン脂質抗体が検出されなかった症例も8例存

在した。前述の通り、SSc では血管障害が惹起されやすいことから SSc の血管障害による血栓症の可能性とともに未知の抗リン脂質抗体の存在の可能性も考慮する必要がある、今後の検討課題の一つであろう。

E. 結論

SSc においては抗リン脂質抗体の陽性率が 52% と極めて高く、特にループスアンチコアグラントの陽性頻度が高いことが確認された。SSc は血栓症の発症頻度も高率であり、26.4% で抗リン脂質抗体症候群の合併があることから、SSc においては LA を含む抗リン脂質抗体を測定し、抗体陽性例では血栓症の発症に留意する必要があると考えられた。今後、どのような抗リン脂質抗体の存在が SSc において血栓症の発症と関連するのか prospective な検討が必要であろう。

F. 文献

1. 山崎雅英: 抗リン脂質抗体症候群に関する 2000 年のトピックス(2)- 抗リン脂質抗体の病態について. 日本血栓止血学会雑誌 2001, 12: 333-339.
2. Merkel PA, Chang Y, Pierangeli SS, Convery K, Harris EN, Polisson RP. The prevalence and clinical associations of anticardiolipin antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. *Am J Med* 1996, 101: 575-583.
3. Picillo U, Migliaresi S, Marcialis MR, Ferruzzi AM, Tirri G. Clinical setting of patients with systemic sclerosis by serum autoantibodies. *Clin Rheumatol* 1997, 16: 378-383.

4. Yamazaki M, Triplett DA. Relationship between a subtype of antiprothrombin antibodies (anti-PT) and a clinical feature of antiphospholipid syndrome. *Autoimmunology* 2000, 15: A29.

5. Yamazaki M, Kaneda M, Yoshida T, Ontachi Y, Mizutani T, Ito T, Asakura H, Nakao S. Heterogeneity of lupus anticoagulant antibodies (LA): Different ligand-specificities determine a clinical features of APS. *Lupus* 2002, 11: 606.

表 1. 強皮症症例における各種抗リン脂質抗体の陽性率

	抗カルジオリピン抗体 (ACL)			ループスアンチコアグラント (LA)			aPL
	aCL	aCL/ β_2 GPI	total	KCT	dRVVT	total	
陽性例	18/70	7/51	19/90	41/102	8/102	45/102	53/102
陽性率 (%)	25.7	13.7	21.1	40.2	7.8	44.1	52.0

aCL ; 抗カルジオリピン抗体 (Harris の方法による)陽性群(n=70)、aCL/ β_2 GPI; β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI)依存性抗カルジオリピン抗体陽性群(n=51)、ACL(total);aCL または aCL/ β_2 GPI 陽性群 (n=90)、KCT;カオリン凝固時間法による LA 陽性群(n=102)、dRVVT ; 希釈ラッセル蛇毒時間法による LA 陽性群(n=102)、LA (total) ; KCT または dRVVT 陽性群 (n=102)、aPL ; いずれかの抗リン脂質抗体陽性群 (n=102)

表 2. 各抗リン脂質抗体と血栓症との関連

	aPL		aCL		aCL/ β_2 GPI		ACL		KCT		dRVVT		LA		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
血 栓	+	27	8	8	19	1	12	9	23	18	17	3	32	19	16
	-	25	39	10	34	6	31	9	45	23	39	5	57	25	37
sens. (%)	77.1		29.6		7.7		28.1		51.4		8.6		54.3		
spec. (%)	61.0		77.3		83.8		83.3		62.9		91.9		59.7		
effic. (%)	64.7		59.2		64.0		62.8		58.8		61.9		57.7		

aPL ; いずれかの抗リン脂質抗体、aCL ; Harris の法による抗カルジオリピン抗体、aCL/ β_2 GPI ; β_2 -glycoprotein I 依存性抗カルジオリピン抗体、ACL ; aCL または aCL/ β_2 GPI、KCT ; カオリン凝固時間法によるループスアンチコアグラント (LA)、dRVVT ; 希釈ラッセル蛇毒時間法による LA、LA ; KCT または dRVVT のいずれかによる LA.

sens. ; sensitivity (感度) , spec. ; specificity (特異度) , effic. ; efficiency (診断効率) .

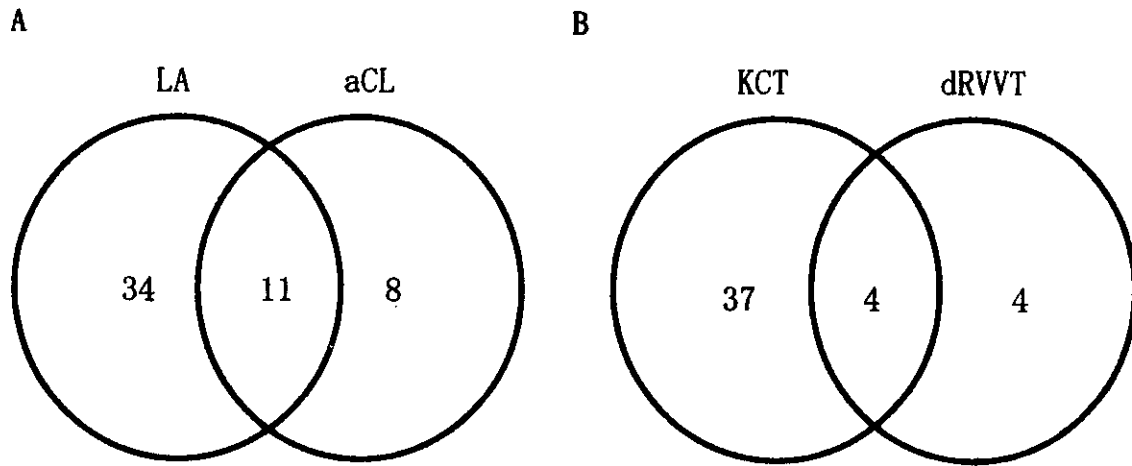


図1. 各種抗リン脂質抗体の関連

(A) : 抗リン脂質抗体陽性例における LA と ACL 陽性例の分布。LA ; ループスアンチコアグラント陽性例、ACL ; Harris の方法による抗カルジオリピン抗体または β_2 -glycoprotein I 依存性抗カルジオリピン抗体陽性例。

(B) : LA 陽性例における KCT 陽性例と dRVVT 陽性例の分布。KCT ; カオリン凝固時間法による LA 陽性例、dRVVT ; 希釈ラッセル蛇毒時間法による LA 陽性例。

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)

分担研究報告書

汎発性強皮症患者における血清 IgM、IgG、IgA 型リウマトイド因子および抗ガラクトース欠損 IgG 抗体の意義

分担研究者	尹 浩信	東京大学医学部皮膚科学講座講師
協力者	三村佳弘	東京大学医学部皮膚科学講座大学院生
協力者	神人正寿	東京大学医学部皮膚科学講座大学院生
協力者	浅野善英	東京大学医学部皮膚科学講座大学院生
協力者	山根謙一	東京大学医学部皮膚科学講座大学院生
協力者	玉置邦彦	東京大学医学部皮膚科学講座教授

研究要旨

リウマトイド因子は通常凝集法にて測定される IgG に対する IgM 型自己抗体である。他のクラス別リウマトイド因子 (IgG-RF, IgA-RF) は IgM 型とは異なり、慢性関節リウマチやその他の膠原病における有用性が確立していない。抗ガラクトース欠損 IgG 抗体はガラクトース欠損 IgG に対する抗体で、従来のリウマチ因子に比較し慢性関節リウマチにおいて、従来測定されてきたリウマトイド因子に比較し、よりその病勢と相関することが示されている。今回我々は汎発性強皮症患者におけるこれら4つの抗体の検出頻度および臨床症状との相関を調査し、その有用性を検討した。強皮症患者におけるリウマトイド因子および抗ガラクトース欠損 IgG 抗体の抗体価は正常人に比較し、有意に高かった。IgM および IgA 型リウマトイド因子の抗体価は limited cutaneous SSc (lcSSc) 患者 に比較し、diffuse cutaneous SSc (dcSSc) 患者において有意に高かった。汎発性強皮症における IgM 型、IgG 型、IgA 型リウマトイド因子および抗ガラクトース欠損 IgG 抗体の陽性頻度はそれぞれ 39%, 25%, 23%, および 35% であった。肺線維症の合併頻度は IgA-RF および anti-AG IgG 上昇群において、食道病変の合併頻度は IgM-RF, IgA-RF および anti-AG IgG 上昇群においてそれぞれ非上昇群に比較し有意に高かった。また、毛細血管拡張の合併頻度は IgM-RF, IgG-RF および IgA 上昇群において、指先部虫蝕状癬痕の合併頻度は IgM-RF および IgG-RF 上昇群において、手指屈曲拘縮の合併頻度は IgM-RF 上昇群においてそれぞれ非上昇群に比較し有意に高かった。血沈の亢進を認めた患者の割合は IgM-RF および IgG-RF 上昇群において、CRP の上昇を認めた患者の割合は IgM-RF 上昇群において非上昇群に比較しそれぞれ有意に高かった。以上の結果よりこれら4つの抗体は汎発性強皮症患者におけるいくつかの臨床症状に対する血清学的な指標となりうることを示唆された。

A. 研究目的

汎発性強皮症 (SSc)はコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの過剰な沈着による皮膚および内臓諸臓器の線維化を主徴としている。SScでは抗トポイソメラーゼ I 抗体や抗セントロメア抗体などの特異性の高い自己抗体の他、リウマトイド因子や抗 single-strand DNA 抗体など特異性の低い自己抗体もしばしば検出される。通常臨床で用いられているリウマトイド因子は IgG の Fc 部分を標的とする IgM 型抗体である。リウマトイド因子は慢性関節リウマチ (RA) にて高頻度で認められますが、他の結合織疾患や肝障害、サルコイドーシスなどでも認められる。

IgG 型 RF は主として関節腔内に多量に存在しているが、血清 IgG 型 RF の意義については RA の病勢と相関するという報告あるいはそれとは逆の報告もある。血清 IgA 型 RF についても統一した見解はない。

RA 患者の血中ではガラクトースを欠損した IgG が健常人に比較して顕著に増加していることが知られ、このガラクトース欠損 IgG に対する抗ガラクトース欠損 IgG 抗体は RA において、従来のリウマトイド因子と比較し、診断率が有意に高く、その病勢の指標となりうるとされています。SSc でも皮膚硬化の範囲や肺線維症の有無と相関するとの報告があります。

今回我々は抗ガラクトース欠損 IgG 抗体、IgM, IgG, IgA 型リウマトイド因子を測定し、SSc 患者における有用性を検討した。

B. 研究方法

対象 東大病院皮膚科を受診した SSc 患者79例および正常人14例。SSc 患者の内、diffuse type が39例、limited type が40例で、全例が American College of Rheumatology の強皮症診断基準を満たしていた。

ELISA 法

IgM-RF, IgG-RF, IgA-RF

Eitest IgM, IgG, IgAF (Eizai, Japan) を使用した。マイクロプレート上に固相したIgG-Fcに2倍希釈した被験者血清を加え、IgG-Fcに結合したIgG-RFと酵素標識抗ヒトIgG-Fd抗体を反応させた。基質液を加え発色し、ELISA readerにて405nmで吸光度測定した。

anti-AG IgG

Eitest CARF (Eizai, Japan) を使用した。マイクロプレート上に固相したガラクトース欠損IgGに201倍希釈した被験者血清を加え、抗ガラクトース欠損IgG抗体に存在する糖鎖とビオチン化レクチンを反応させた。さらにビオチン化レクチンと酵素標識ストレプトアビジンと反応させ、基質液を加え発色し、stop solutionを加え、ELISA readerにて420nmで吸光度測定した。

C. 研究結果と考案

正常皮膚線維芽細胞のII型TGFβ受容体蛋白量, 遺伝子発現量はEGFによって亢進する

図1-4に示すようにIgM-RF, IgG-RF, IgA-RF および anti-AG IgG のいずれにおいても, SSc 患者の抗体価は正常人に比し, 有意に高値を示した。また, RF-IgM および RF-IgA では dSSc 患者の抗体価は ISSc 患者に比し有意に高値を示した。

図 1. dSSc 患者, ISSc 患者及び正常人における IgM-RF 抗体価

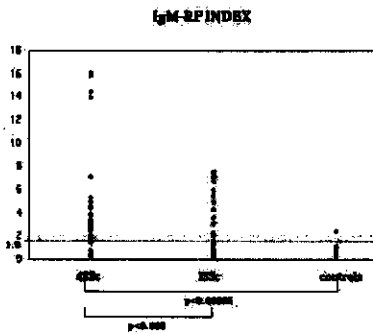


図 2. dSSc 患者, ISSc 患者及び正常人における IgM-RF 抗体価

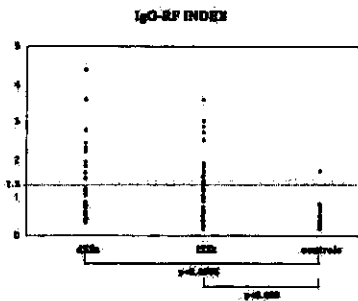


図 3. dSSc 患者, ISSc 患者及び正常人における IgA-RF 抗体価

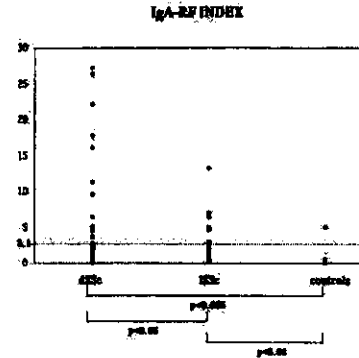
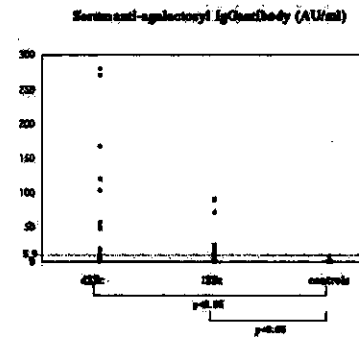


図 4. dSSc 患者, ISSc 患者及び正常人における anti-AG IgG 抗体価



さらに表 1-4 に示すように, 各抗体について, SSc 患者を上昇群と非上昇群に分類し, 臨床症状との相関について検討した。肺線維症の合併頻度は IgA-RF および anti-AG IgG 上昇群において, 食道病変の合併頻度は IgM-RF, IgA-RF および anti-AG IgG 上昇群においてそれぞれ非上昇群に比較し, 有意に高かった。また, 毛細血管拡張の合併頻度は IgM-RF, IgG-RF および IgA 上昇群において, 指先部虫蝕状癬痕の合併頻度は IgM-RF および IgG-RF 上昇群において, 手指屈曲拘縮の合併頻度は IgM-RF 上昇

群においてそれぞれ非上昇群に比較し、有意に高かった。血沈の亢進を認めた患者の割合は IgM-RF および IgG-RF 上昇群において、CRP の上昇を認めた患者の割合は IgM-RF 上昇群において非上昇群に比較しそれぞれ有意に高かった。

表 1. SSc 患者における IgM-RF 上昇群および非上昇群間での患者背景、臨床症状の比較

Table 1. Correlation of serum IgM-RF levels with clinical and serological features of patients with systemic sclerosis

	Patients with elevated IgM-RF (n=25)	Patients with normal IgM-RF (n=59)
Age (yr)	58	58
Age (mean year)	54	53
Disease duration (mean year)	7.4	7.3
Type of SSc (diffuse/limited)	16/9	14/14
Clinical features		
difficult swallowing	50*	34
difficult respiratory function	76	53
constipation of pharynx	67**	35
alginate	35	51
edema	45	35
swelling	62*	27
nail nail bleeding	64	35
Organ involvement		
esophagus	74*	44
pulmonary fibrosis	45	28
heart	5	0
kidney	5	3
muscle	8	15
joint	45	24
skin symptoms	47	39
ANA specificity		
anti-topo I	23	23
ACA	23	28
Laboratory findings		
elevated ESR	68*	44
increased CRP	37**	5

Values represent percentages unless otherwise specified. DLCO, diffusing capacity for carbon monoxide; VC, vital capacity; and Topo I, anti-topoisomerase I antibody; ACA, anticentromere antibody; ESR, erythrocyte sedimentation rate; LRF, latent rheumatoid factor; CRP, C-reactive protein. * p<0.05 versus patients with normal IgM-RF levels. ** p<0.01 versus patients with normal IgM-RF levels. *** p<0.005 versus patients with normal IgM-RF levels.

表 2. SSc 患者における IgG-RF 上昇群および非上昇群間での患者背景、臨床症状の比較

Table 2. Correlation of serum IgG-RF levels with clinical and serological features of patients with systemic sclerosis

	Patients with elevated IgG-RF (n=25)	Patients with normal IgG-RF (n=59)
Age (yr)	123	58
Age (mean year)	53	53
Disease duration (mean year)	7.4	7.3
Type of SSc (diffuse/limited)	14/11	35/14
Clinical features		
difficult swallowing	68**	33
difficult respiratory function	76	54
constipation of pharynx	63	42
alginate	35	53
edema	35	30
swelling	62*	30
nail nail bleeding	58	30
Organ involvement		
esophagus	77	49
pulmonary fibrosis	45	28
heart	13	0
kidney	13	2
muscle	11	12
joint	32	25
skin symptoms	47	38
ANA specificity		
anti-topo I	33	35
ACA	28	20
Laboratory findings		
elevated ESR	62**	40
increased CRP	35	12

Values represent percentages unless otherwise specified. DLCO, diffusing capacity for carbon monoxide; VC, vital capacity; anti-Topo I, anti-topoisomerase I antibody; ACA, anticentromere antibody; ESR, erythrocyte sedimentation rate; LRF, latent rheumatoid factor; CRP, C-reactive protein. * p<0.05 versus patients with normal IgG-RF levels. ** p<0.005 versus patients with normal IgG-RF levels.

表 3. SSc 患者における IgA-RF 上昇群および非上昇群間での患者背景、臨床症状の比較

Table 3. Correlation of serum IgA-RF levels with clinical and serological features of patients with systemic sclerosis

	Patients with elevated IgA-RF (n=11)	Patients with normal IgA-RF (n=61)
Age (yr)	47.4	58
Age (mean year)	55	53
Disease duration (mean year)	6.6	7.0
Type of SSc (diffuse/limited)	11/0*	19/42
Clinical features		
difficult swallowing	55	41
difficult respiratory function	73	67
constipation of pharynx	67	38
alginate	63	53
edema	36	30
swelling	73**	35
nail nail bleeding	64	35
Organ involvement		
esophagus	91**	45
pulmonary fibrosis	36*	25
decreased DLCO	90**	21
decreased VC	36	28
heart	0	2
kidney	0	2
muscle	15	11
joint	55	25
skin symptoms	32	38
ANA specificity		
anti-topo I	11	18
ACA	11*	38
Laboratory findings		
elevated ESR	73	48
increased CRP	24	14

Values represent percentages unless otherwise specified. DLCO, diffusing capacity for carbon monoxide; VC, vital capacity; anti-Topo I, anti-topoisomerase I antibody; ACA, anticentromere antibody; ESR, erythrocyte sedimentation rate; LRF, latent rheumatoid factor; CRP, C-reactive protein. * p<0.05 versus patients with normal IgA-RF levels. ** p<0.01 versus patients with normal IgA-RF levels. *** p<0.005 versus patients with normal IgA-RF levels.

表 4. SSc 患者における anti-AG IgG 上昇群および非上昇群間での患者背景、臨床症状の比較

Table 4. Correlation of serum anti-AG IgG levels with clinical and serological features of patients with systemic sclerosis

	Patients with elevated anti-AG IgG (n=65)	Patients with normal anti-AG IgG (n=81)
Sex (M/F)	32/33	47/34
Age (mean years)	64	62
Disease duration (mean years)	8.0	8.5
Type of skin (diffuse/limited)	38/27	48/33
Clinical features		
joint involvement	54	39
skin ulcers and fissures	66	37
swollen or puffy fingers	50	46
pigmentation	38	55
sclerodactyly	20	39
telangiectasia	55	32
soft tissue bleeding	74	31
Organ involvement		
lung	66*	45
pulmonary fibrosis	50*	25
elevated RV C	60**	5
elevated DLCo	47	35
heart	11	0
kidney	10	3
intestine	10	12
liver	30	23
skin symptoms	60	36
ANA specificity		
anti-topo I	18	24
ANA	35	53
Laboratory findings		
elevated ESR	45	49
elevated CRP	29	12

* Value represents percentage unless otherwise specified.
 DLCo, diffusing capacity for carbon monoxide; RV, vital capacity;
 and Topo I, anti-topoisomerase I antibody; ANA, antinuclear antibody;
 ACPA, anticytoplasmic antibody; ESR, erythrocyte sedimentation rate;
 CRP, C-reactive protein;
 ** p<0.05 versus patients with normal anti-AG IgG levels.
 * p<0.005 versus patients with normal anti-AG IgG levels.

以上の結果より、これら4つの抗体は汎発性強皮症患者において、内臓合併症の有無や皮膚硬化の範囲などその重症度を規定する因子と関連する上、その他のいくつかの臨床症状に対する血清学的な指標となりうる事が示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

全身性強皮症では matrix metalloproteinase-1 に対する
自己抗体がコラーゲンの分解を抑制する

分担研究者 佐藤伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
協力者 早川郁子 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
協力者 長谷川稔 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助手
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症では線維化に対する自己抗体の役割は不明である。今回、我々は全身性強皮症患者血清中に、コラーゲン分解に関与する matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) に対する自己抗体を見出した。抗 MMP-1 抗体は皮膚硬化、肺線維症、腎の血管抵抗の程度とそれぞれ相関した。さらに抗 MMP-1 抗体は MMP-1 の酵素活性を阻害した。以上より、抗 MMP-1 抗体は MMP-1 の活性を阻害することによって、線維化の進展に関与する自己抗体である可能性が示された。

A. 研究目的

組織における、コラーゲンなどの細胞外基質の量は、細胞外基質の合成と分解との間のバランスによって決定される。分解の過程は matrix metalloproteinase (MMP) と呼ばれる分解酵素によって制御されることが明らかとなっている¹。これら MMP の活性はさらに tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) によって抑制され、MMP と TIMP の間の活性レベルのバランスによって細胞外基質の適切な量が維持されていると考えられている。

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) の皮膚では 1 型および 3 型コラーゲンの増加が認められ²、その原因として SSc 由来線維芽細胞では MMP-1 の活性が低下していること³、

さらに、TIMP-1, 2, 3 の発現が亢進していることが過去に報告され^{4,5}、MMP-1 や TIMP の活性制御が SSc の病態に関与していることが示唆されている。

SSc は全身性自己免疫を特徴とする疾患であるが、抗セントロメア抗体や抗トポイソメラーゼ I 抗体とった SSc 特異的な自己抗体と線維化との関連性は全く不明といわざるを得ない。そこで、全身性自己免疫と線維化を結びつけるために、SSc では MMP-1 に対する自己抗体が産生され、この自己抗体が MMP-1 のコラーゲン分解酵素としての活性を抑制することによって、コラーゲン分解が低下し、その結果コラーゲンの異常な蓄積が生じるという仮説を想定した。今回の検討で