

T細胞レセプター遺伝子移入による免疫難病の新たな治療法の開発

分担研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

研究要旨 種々の免疫難病患者の生体内で活性化し集積している抗原特異的T細胞の免疫応答をリアルタイムでとらえ、そのT細胞レセプターの遺伝子情報を獲得し、効率良くリンパ球に遺伝子導入し、さらに機能遺伝子も付加する技術を中心とした、抗原特異的T細胞再構築システムによる新たな治療法の開発のための基礎研究を行った。本研究では、特に生体内で集積している病態形成性T細胞の、1つの細胞の中で発現している2つのT細胞レセプター (α 、 β 鎖)の全長cDNAをクローニングするための技術的可能性について検討した。

A. 研究目的

本研究の目的は、我々がすでに確立しているT細胞クロナイトプ検出法を用いて、リウマチ性疾患患者やモデル動物の病変などに集積している抗原特異的T細胞クローンの状況を、そこから採取した少量のRNAから把握した上で、重要と考えられるクローンについて、その一つの細胞で使われているT細胞レセプターの α 鎖、 β 鎖の両方の塩基配列の全情報を得る技術と、それらを自らのリンパ球に遺伝子導入し抗原特異性を再構築すると同時に、サイトカインなど期待される機能遺伝子も導入できるベクターを確立することである。

本研究で確立を目指している技術が可能になれば、今までと全く異なったリンパ球改変技術となり、免疫が関与する多くの疾患での抗原特異的治療法に応用可能な、極めて有用な基盤技術になると考える。

B. 研究方法

目標とする全体のシステムは、以下の通りである。免疫難病患者の生体内で活性化され病変などに集積しているT細胞クローンを検出し、その細胞で使われているT細胞レセプターの α 、 β 鎖の全長cDNA情報を獲得し、レトロウイルスベクターに組み込む。これにはRT-PCR/SSCP法によるクロナイトプ分析と単一細胞分離法を用いる。これらのT細胞レセプター遺伝子を発現する感染性レトロウイルスベクターを作成し、マウスの脾細胞に遺伝子移入することで、抗原特異的T細胞レセプターを再構築し、さらにこ

のT細胞に抑制性のサイトカインなど機能をもつ分子を規定する遺伝子を導入し、抗原特異的機能性T細胞を構築する。次にこの細胞を生体内に移入することで、抗原特異的免疫機能を発揮し、免疫疾患に対して治療効果を発揮出来ることを確かめる。

生体内の一つの細胞から2つの異なる遺伝子情報を獲得する方法は、過去に我々の研究室で試行が繰り返され、単一細胞分離法を中心として複数技術を確立しつつある。本年度はこの点に焦点をあて、実際に1つの細胞から回収した2つのT細胞レセプターcDNAsが機能を再構築可能であることを示す実験を行った。

C. 研究結果

今回の実験の目的には、アジュバントなど免疫操作自体によるT細胞クローンの活性化を抑制する必要があるため、マウスのHIV免疫応答モデルを用いた。CTLのエピトープと判明しているP18IIIBペプチドを樹状細胞にパルスし、これでBALB/cマウスを免疫した。免疫されたマウスの脾臓細胞を試験管内で再刺激したところ、CTL活性を示した細胞集団ではT細胞がクローナルに増殖していることを確認した。さらにこの集団で主に使われているT細胞レセプターのV領域の分析から、 $V\alpha 2$ と $V\beta 7$ を選択した。次にこの両者が陽性の1つの細胞に着目し、免疫染色とセルソーターによる単一細胞分離法とRT-PCR法により、そこに発現しているT細胞レセプターの α 鎖、 β 鎖をクローニングした。次にこれらを別々のレトロウイルスベクターにク

ローニングし、パッケージング細胞に導入後、脾臓細胞に遺伝子導入したところ、HIV エピトープを発現している細胞に対して細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、我々が目指している T 細胞レセプターの試験管内機能再構築が基本的に可能であることが示された。

D. 考察

従来 T 細胞の研究では、T 細胞クローンや T 細胞ハイブリドーマを樹立する方法が行われてきたが、クローン樹立までに大きな労力を要し、試験管の中での人為的バイアスがあり、実際の治療には不向きなことなどの問題点がある。

リンパ球集団で発現している T 細胞レセプター遺伝子の検出で現在用いられているのは、CDR3 領域の核酸の長さを分析する方法 (CDR3 length analysis) が欧米を中心に行われている。これは、我々の SSCP 法を用いるクロナタイプ分析法と似ているが、一つ一つの T 細胞クローンの区別をすることは出来ず、従って本研究のような方向に向かって進展することは難しい。従って、本研究は今までの研究成果に立脚した独自の方法論の確立であり、極めて独創的なものである。

生体内の一つの細胞から 2 つの異なる遺伝子情報を獲得する方法は、過去に我々の研究室で試行が繰り返され、単一細胞分離法を中心として複数技術を確立しつつある。本年の研究成果はこれが実際に働くことを示したものである。

レトロウイルスを用いた T 細胞レセプターの遺伝子導入に関しては、アメリカのチームが一つのベクターに α 、 β 鎖の cDNA を組み込み細胞株に導入しているが、効率が悪く細胞表面に有意な量を検出できていない。一方、我々のチームは、2 つのベクターに別々に組み込んだ cDNA を用いて、通常のマウス脾細胞に遺伝子導入し、内因性の T 細胞レセプターの発現にうち勝ち 40% 以上の高率で両遺伝子を発現させ、さらに試験管内および生体内で機能を発現させることに成功している。

最近欧州でのレトロウイルスベクターを用いた、血液幹細胞への遺伝子導入によりリンパ腫の報告がなされている。我々が確立しつつある方法もレトロウイルスを用いるものであり、今後慎重に推移を見守る必要はあるが、末梢血への遺伝子導入ではこ

のような報告はないことと、将来的には自殺遺伝子をはじめ数種の安全システムを内蔵させておくことで安全性を高めることが可能であることから、研究の継続は問題ないと判断する。

以上の点から、本研究の目標である「T 細胞レセプター遺伝子移入による免疫難病の新たな治療法」は大筋実現可能であると考えられる。

E. 結論

T 細胞遺伝子導入の手法を用いた新しい治療法の開発のための重要な技術的ブレークスルーとして、1 つの細胞から 2 つの T 細胞レセプター全長 cDNA をクローニングし、それを用いて抗原認識機能が試験管内で再構築可能であることを示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawahata K. Misaki Y. Yamaguchi M. Tsunekawa S. Setoguchi K. Miyazaki J. and Yamamoto K. Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen:dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4+ autoreactive T cells after proliferation. *J Immunol.* 168:1103-1112, 2002

2) Kawahata K. Misaki Y. Yamauchi M. Tsunekawa S. Setoguchi K. Miyazaki J. and Yamamoto K. Generation of CD4+CD25+ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol.* 168:4399-4405, 2002

3) Kono H. Suzuki T. Yamamoto K. Okada M. Yamamoto T. and Honda Z. Spatial raft coalescence represents an initial step in Fc γ R signaling. *J Immunol.* 169:193-203, 2002

4) Takahama H. Masuko-hongo K. Tanaka A. Kawa Y. Ohta N. Yamamoto K. Mizoguchi M. Nishioka K. and Kato T. T-cell clonotypes specific for dermatophagoides pteronyssinus in the skin lesions of patients with atopic dermatitis. *Human Immunol.* 63:558-566, 2002

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録

特になし

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

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究

多発性硬化症における NKT 細胞の変調と病態への関与

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部部長

自己免疫疾患では NKT 細胞の数の減少や機能的変調が見られることが認識されているが、最近 CD4⁺NKT と CD4⁻CD8⁻ (double negative, DN) NKT 細胞が機能的に異なることが示されており、より詳細な解析が求められている。分担研究者らは、多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) の寛解期には末梢血 invariant V α 24J α Q NKT 細胞が著明に減少することを報告している (J. Immunol. 164:4375, 2000)。本研究では、抗 TCR 抗体および CD1d テトラマーを用いて、フローサイトメーターで MS 患者および健常者末梢血の CD4⁺NKT、DN NKT 細胞数を評価した。さらに NKT 細胞培養株を誘導し、その機能的変化を健常者と比較検討した。その結果、1) MS 寛解期には DN NKT 細胞が著明に減少するが、CD4⁺NKT 細胞の減少は有意でないこと、2) MS 寛解期に CD4⁺NKT 細胞は Th2 偏倚優位の状態となり、CD4⁺NKT 細胞が MS 寛解維持に重要な役割を担うことが示された。

分担研究者

山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 部長

研究協力者

荒木 学 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長

対象は性別、年齢を合わせた MS39 例 (寛解期 27 例, 再発期 12 例)、対照コントロール 15 例。寛解期症例の定義は、ステロイド、免疫抑制剤などの治療薬を 3 ヶ月以上未使用で臨床的に安定している症例とした。また、治療薬の NKT 細胞頻度に与える影響としてステロイド長期使用 10 例 (5~20mg/日, 3 ヶ月以上) と IFN- β 治療 10 例 (開始 3 ヶ月後) についても別個に評価した。末梢血 V α 24⁺V β 11⁺ NKT 細胞頻度は、フローサイトメーターを用いて測定した。その後、糖脂質 (α -galactosylceramide) 刺激を加えて NKT 細胞を増殖させ、培養開始 20~30 日目にセル・ソーターにて NKT 細胞を分取した (CD4⁺または CD4⁻)。分離した細胞に CD3/CD28 共刺激を行い、培養上清中のサイトカイン (IL-4, IFN- γ) 産生を測定した。また、 α -GC 刺激にて NKT 細胞が増加した培養細胞集団に対して、PMA/ionomycin 刺激を行い、cell surface affinity matrix technology (Cytokine secretion assay, Milteni Biotec) を用いて、NKT 細胞 (V α 24⁺) と conventional T 細胞

A. 研究目的

分担研究者らは、多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 寛解期には末梢血 invariant V α 24J α Q NKT 細胞が著明に減少することを SSCP 法を用いて示した。本研究では、フロー・サイトメーターにより定量的な解析を行い、機能的解析も行った。具体的には NKT 細胞を CD4⁺NKT、CD4⁻CD8⁻ (double negative, DN) NKT 細胞に分類、その数的・機能的変化を健常者と比較検討した。また、NKT 細胞の産生するサイトカインの conventional T 細胞に対する影響について解析した。

B. 対象・方法

(V α 24) の各々のサイトカイン産生を定性的に評価した。

C. 結果

健常対照群と比較して、MS 寛解期では末梢血 DN NKT 細胞頻度の減少を認めたが ($p < 0.01$)、CD4⁺NKT 細胞頻度の有意な減少は認めなかった ($p = 0.18$)。同一症例では寛解期の NKT 細胞頻度に比べ再発時には増加する傾向を示した。一方、同じ寛解状態にあっても、ステロイド長期使用症例においては、NKT 細胞頻度の減少を認めなかった。in vitro における α -GC 刺激後 7 日目の培養細胞中 NKT 細胞頻度は、末梢血とほぼ同様に、DN NKT 細胞の著明な減少を示した ($p < 0.001$)。サイトカイン産生については、CD4⁺NKT 細胞が DN NKT 細胞に比べ IL-4 をより多く産生 (Th2 タイプ)、IFN- γ 産生は同程度であった。MS 寛解期にはこの偏倚がより顕著となり、DN NKT 細胞のサイトカイン産生は減少し、NKT 細胞全体としては Th2 偏倚を示した。末梢血 NKT 細胞頻度では減少を認めなかったステロイド症例も、サイトカイン産生パターンでは Th2 偏倚の傾向を維持していた。また、この MS 寛解期の NKT 細胞 Th2 偏倚は、NKT 細胞のみならず、conventional T 細胞の IL-4 産生をも増加させることが判明した。

D. 考察

全身性硬化症など多くの自己免疫疾患で末梢血 NKT 細胞の減少が報告されているが、過去の報告では主に DN NKT 細胞の数的、機能的変化に焦点が当てられていた。今回は、もう一つの主たるサブセットである CD4⁺ NKT 細胞が IL-4 を多量に産生し、MS 寛解期に Th2 偏倚を示すことを明らかにした。CD4⁺ NKT は病態の免疫調節に重要な役割を担うサブセットとして、今後さらなる機能解析が必要である。また、ステ

ロイド治療症例において末梢血 NKT 細胞頻度が補正され、その機能として Th2 偏倚が維持されたことから、corticosteroid の作用が一部 NKT 細胞を介することを示唆する結果として興味深いものである。

E. 結論

MS 寛解期には Th1 偏倚 DN NKT 細胞が減少、相対的に Th2 偏倚 CD4⁺NKT 細胞優位の状態となり、CD4⁺NKT 細胞が MS 寛解維持の重要な役割を担うことが示された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Gumperz, J.E., S. Miyake, T. Yamamura, and M.B. Brenner: Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* 195: 625-636, 2002

Araki, M., T. Kondo, J.E. Gumperz, M.B. Brenner, S. Miyake and T. Yamamura: Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.*, 15: 279-288, 2003

荒木 学、高橋 和也、山村 隆：多発性硬化症における NK 細胞、NKT 細胞の関与。神経内科 56:312-318, 2002

2. 学会発表

Araki, M., T. Kondo, and T. Yamamura: Th2 bias of CD4⁺ NKT cells in multiple sclerosis. Concurrent Thematic Symposium II. Innate Immunity. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting, San Francisco, June 29, 2002

Yamamura, T., M. Araki, and S. Miyake: OCH, an altered glycolipid ligand of α -GalCer, induces Th2 bias of rodent and human NKT cells: The

implication for treatment of human autoimmune disease. 2nd International Workshop on CD1 antigen presentation & NK T cells. Woods Hole, USA, Nov 8, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

自己反応性 Th1 クローンを用いた MRL/Mp-*Fas^{lpr}* マウス自己抗体の 産生調節に関する研究

分担研究者 三森 経世
協力研究者 藤井 隆夫
研究施設 京都大学大学院 医学研究科 臨床免疫学

研究要旨

MRL/Mp-*Fas^{lpr}* マウス脾細胞から、ヒストンと dsDNA に反応して増殖し抗 dsDNA 抗体の産生を刺激する自己反応性 CD4⁺αβTh1 細胞 dna51 と、抗 U1RNP 抗体の産生を刺激する rnp2⁺ を分離した。dna51 は Vβ8.3 を有し、TCRβ鎖 CDR3 部位は酸性アミノ酸を多く含んでいた。dna51 を放射線照射後に移入した群 (i-dna51 移入群) では、PBS 群に比し抗 dsDNA 抗体価の上昇が抑制され、糸球体腎炎の活動性指標は低下、糸球体に浸潤する細胞数も減少した。したがって EAE と同様、MRL/*lpr* マウスでも放射線照射した自己反応性 CD4⁺αβTh1 細胞クローンの移入で MRL/*lpr* マウスの自己抗体産生および病態の調節が可能と考えられた。なお最終観察時、i-dna51 移入群の脾細胞において CD4⁺Vβ8.3T 細胞が有意な減少を認め、血清中に dna51 に対する抗体が見いだされた。したがって病態抑制の機序として、移入クローンに対する液性免疫の関与が示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (以下 SLE) は、種々の抗核抗体の産生と、ループス腎炎や血管炎など免疫複合体による病態を特徴とする。これらの自己免疫現象は自己抗原に反応する T・B 細胞の異常増殖・活性化によると考えられる。健康人では、自己抗原に反応する細胞はトレランス (免疫寛容) の状態にあるため疾患が発症しないのに対し、SLE 患者では、このトレランスが破綻し発症を抑制する機構が傷害されていると考えられる。Ben-Nun と Cohen らは myelin basic protein (MBP) 特異的な T 細胞株を放射線照射やマイトマイシン処理して不活化した後、マウスに投与しておく、その後 MBP 感作で誘導される実験自己免疫性脳髄膜炎 (EAE) の発症が抑制されることを見だし、T 細胞ワクチネーションとして報告した。EAE は臓器特異性自己免疫疾患である多発性硬化症の動物モデ

ルであるが、この結果は潜在的に EAE を誘発できる MBP 反応性 T 細胞が存在しても、正常マウスではその発症を抑制できる機構が存在することを示唆する。本班研究では、全身性自己免疫疾患である SLE を自然発症する MRL/Mp-*Fas^{lpr}* マウス (MRL/*lpr* マウス) において、同様の抑制機構が残存しているのか否かを調べることを第一の目的とする。すなわち、同様の手法により末梢におけるループス自己抗原反応性 T 細胞トレランスの破綻の修復と、同 T 細胞による SLE 発症を抑制する機構の賦活化誘導を試みた。現在までループスモデルマウスにおける非特異的 T 細胞を用いたワクチンの報告はあるが、EAE のように自己抗原反応性のクローンを用いた自己抗原反応性 T 細胞クローンを用いたワクチネーションの検討はない。そこで本研究の第二の目的として、放射線照射したループス自己抗原反応性 T 細胞ワクチンにより、

MRL/lpr マウスのループス腎炎治療を試みた。

B. 研究方法

1. MRL/lpr マウス脾細胞を用いた自己反応性 T 細胞のクローニング

間接蛍光抗体法にて抗核抗体陽性、マウス自己抗原を基質とした ELISA にて抗 dsDNA 抗体または抗 U1RNP 抗体陽性を確認した 7~8 週齢の MRL/lpr マウスから無菌的に脾臓を採取し、single cell suspension によって脾細胞を 10% 非働化牛胎児血清添加 EHAA (Click's) 培地に浮遊させる。その後トリス-塩酸アンモニウムにより赤血球を破碎除去し、カルチャーフラスコ内で培養した。週一回放射線照射 (30Gy) MRL/lpr マウス脾細胞を抗原提示細胞 (2×10^6 /well) として加え、また週 2 回 マウス リコンビナント IL-2 (10 units/ml) を加えた。それ以外の外来抗原は加えなかった。約 3 週間培養後には自己反応性 T 細胞のみが生存する (培養 T 細胞以外の細胞は自然に死滅する) と考えられ、その時点で 96 穴丸底培養プレートに 3-5 細胞/well の割合で、抗原提示細胞 (4×10^5 /well) および IL-2 (10 units/ml) とともに培養した (限界希釈法)。細胞増殖が認められた well のみから細胞を採取し、12 穴培養プレートに移してさらに増殖させた。

2. クローン化された自己反応性 T 細胞の *in vitro* における分析

クロマチン存在下での T 細胞クローンの増殖促進を ^3H -thymidine の取り込み (T cell proliferation assay) により確認した。抗原に特異的に反応した T 細胞クローンについては、その phenotype (CD4/CD8 などの表面抗原および T 細胞レセプター: TCR) をフローサイトメトリーで分析した。また reverse transcription-PCR 法により TCR β 鎖の CDR3 部位のアミノ酸配列を分析した。さらに抗 CD3 抗体刺激により T 細胞クローンから分泌される

Th1/Th2 サイトカインをサンドイッチ ELISA にて検出した。

同時に T 細胞クローンと MRL/lpr マウス由来の B 細胞と混合培養し、*in vitro* で B 細胞の活性化試験を行った。まず放射線照射 (20Gy) T 細胞クローンによる MRL/lpr B 細胞の増殖促進を ^3H -thymidine の取り込みで調べた (B cell proliferation assay)。またその細胞増殖が CD40-CD40L に依存するかどうかを抗 CD40L モノクローナル抗体を用いた阻害実験により確認した。また T 細胞クローンと MRL/lpr B 細胞を一週間混合培養しその培養上清中の抗核抗体 (抗 dsDNA 抗体と抗 U1RNP 抗体) および IgG 濃度を ELISA により測定した (*in vitro* helper assay)。

3. 自己反応性 T 細胞クローンを用いた adoptive transfer study

分離された自己反応性 Th1 細胞クローンを 3 週齢より MRL/lpr マウスに移入した (2×10^6 /回、2 週間おき 6 回)。Th1 クローン (dna51 と rnp2) をそれぞれ、IL-2 で活性化 (s-) あるいは放射線照射 (20Gy) により増殖不能 (i-) とした後、それぞれ $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞を 3 週齢より計 6 回野生型 MRL/lpr マウスに移入した。クローン移入後、PBS 注射群 (コントロール群)、細胞移入群の MRL/lpr マウス血清中の経時的抗 dsDNA あるいは抗 U1RNP 抗体価を ELISA により測定した。また最終観察時の皮膚病変をマクロ所見と組織所見でスコア化した。腎病変については、ループス腎炎に用いられる活動性指標と、PAS 染色を用いた Carl Zeiss Vision 社 KS400 システムにより糸球体細胞数とメサンギウム領域面積を計算した。またフローサイトメトリーを用いて、細胞移入による最終観察時の脾細胞のリンパ球分画の変動を調べた。さらに最終観察時の MRL/lpr マウス血清中における、移入した T 細胞クローンに対する抗体の有無を、二次抗体に FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いてフローサイトメトリーで調べた。

実験動物に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」(平成 11 年 12 月 1 日施行)に留意し、いかなる場合においても実験動物に苦痛・恐怖を与えることのないように充分配慮した。

C. 研究結果

われわれはヒストンと dsDNA に反応して増殖し精製 MRL/*lpr* B細胞から抗 dsDNA 抗体の産生を刺激する dna51 と、同様に抗 U1RNP 抗体の産生を刺激する rnp2 とを分離した。両クローンは Th1 で、CD3⁺CD4⁺B220⁻を有していた。また dna51 は V β 8.3 を有し、TCR β 鎖 CDR3 部位は 12 アミノ酸から構成されていたが、酸性アミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン酸)を多く含んでいた。一方 rnp2 は V β 14 を有していた。

in vitro での成績では i-dna51、i-rnp2 は抗 CD3 抗体刺激により s-dna51、s-rnp2 と同レベルの IFN γ を分泌した。また i-dna51 は抗 CD3 抗体刺激により s-dna51 と同様に CD40L を発現し、in vitro で精製 MRL/*lpr* B細胞の増殖を刺激したが、その増殖は抗 CD40L モノクローナル抗体で濃度依存的に阻害された。

Adoptive transfer study では、PBS 注射群に比し s-dna51 移入群でループス腎炎の活動性指標が有意に上昇した。また s-dna51 移入群において、糸球体細胞数の増加とメサンギウム領域面積の拡大が認められた(表 1)。一方 i-dna51 移入群では、PBS 群に比し抗 dsDNA 抗体価の上昇が抑制され(18 週齢～最終観察時)、ループス腎炎の活動性指標は低下、糸球体細胞数も減少していた。s-rnp2 移入群でも最終観察時のみ抗 dsDNA 抗体価上昇が抑制されたが、糸球体腎炎の活動性指標に変動はなく、間質性腎炎が増悪していた。皮膚病変では移入細胞間で差を認めなかった。なお i-dna51 移入群で、最終観察時脾細胞中の CD4⁺V β 8.3 T細胞と B細胞数が PBS 注射群に比し有意に減少した。

i-dna51 移入群のマウス血清中で高率に抗 dna51 抗体が認められた(図 1)。なお s-dna51 移入群でも 25%で同抗体が認められた。またこれらの血清は rnp2、および dna51 以外の V β 8.3 陽性 T細胞と反応しなかった。

D. 考察

MRL/*lpr* マウスは、SLE 患者に認められる IgG 型抗核抗体(抗 dsDNA 抗体、抗 Sm/snRNP 抗体など)を自発的に産生し、かつ SLE と同様の病理組織像をもった腎障害、皮膚症状、血管炎、関節炎などを発症するループスモデルマウスである。遺伝学的に T細胞を除去した MRL/*lpr* マウス(β および δ T細胞レセプター欠損 MRL/*lpr* マウス)の血清中には IgG 型抗核抗体が認められないため、抗 dsDNA 抗体あるいは抗 Sm/snRNP 抗体の産生には T細胞が必要とされる。また CD40L 欠損 MRL/*lpr* マウスは、高力価抗 Sm/snRNP 抗体を産生するが抗 dsDNA 抗体を産生せず、腎炎を発症しない。さらに外来抗原である PCC (pigeon cytochrome c) に特異的に反応する T細胞レセプターのトランスジェニック MRL/*lpr* マウスでは、非特異的な B細胞の活性化による低力価抗 dsDNA 抗体の産生は認められるが重篤な腎障害は起こさない。以上の報告から、MRL/*lpr* マウスにおける腎炎発症には CD40L を発現した自己反応性 T細胞、特にクロマチン(DNA-ヒストン複合体)と特異的に反応する T細胞が重要である。

本研究においてわれわれは、抗 dsDNA 抗体高力価陽性 MRL/*lpr* マウスの脾細胞から自己反応性 T細胞をクローニングした。さらに dna51 を放射線照射により不活化した後、MRL/*lpr* マウスに移入することで同マウスの抗 dsDNA 抗体産生および腎障害を抑制できることを示した。なおクローン dna51 の TCR は V β 8.3 を有していたものの、その CDR3 部位のアミノ酸配列は他のループスモデルマウス(SNF1 など)にお

ける既報告とは異なっていた。一方で、その CDR3 部位には既報告と同様、陰性荷電をもったアミノ酸を含み、dna51 がクロマチンを認識できる可能性を示唆する所見と考えられた。

現在まで MRL/*lpr* マウスを用いた T 細胞ワクチネーションの試みはあるが、それぞれ CD3⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺ (Double Negative) 全 T 細胞、MRL/Mp-*Fas*^{+/+} マウス全リンパ球をワクチン細胞として使用したものであった。しかしこれらのワクチン細胞は、無数の種類の T 細胞を含むことから、含まれる細胞の割合により効果が異なることは明らかで、臨床応用は不可能である。その点においてわれわれがクローニングした細胞は CD3⁺CD4⁺CD8⁻B220⁻ の T 細胞クローンであり、ヒト SLE 血中にも同様の細胞が存在している可能性が高い。また T 細胞クローンが関与する病態のみを抑制できる可能性があり、細胞レベルのきわめて特異性が高くかつ副反応の少ない免疫調節が可能と考えられる。ただし今回の移入実験では、Th2 細胞の病態への関与については不明である。実際、びまん性増殖性ループス腎炎 (DPLN) では血中および糸球体において Th1 が優位であるとする報告がある一方で、ループス腎炎における糸球体浸潤細胞は Th2 細胞であるとする報告もある。われわれは同様の抗原反応性をもった Th2 細胞も保有していることから、今後 Th2 クローンの移入に伴う病態の修飾についても検討を加える必要があろう。

現在まで多発性硬化症あるいは EAE における T 細胞ワクチネーションによって、移入した T 細胞に対して CD4 陽性 $\alpha\beta$ T 細胞が誘導されたとした報告、CD8 陽性 T 細胞が誘導されたとした報告、 $\gamma\delta$ T 細胞が誘導されたとした報告、あるいは移入したリンパ球に対する自己抗体が誘導されたとした報告などがある。今回の成績から、MRL/*lpr* マウスでは移入した Th1 クローンに対する抗体産生が誘導され、CD4⁺V β 8.3 T 細胞が減少した可能性が示唆された。しかし同時に B 細胞数が減少した機序については今後検

討する必要がある。最近われわれは MRL/*lpr* マウスにおいて、抗 dsDNA 抗体の産生を抑制する $\gamma\delta$ T 細胞が存在することを見だし、その T 細胞クローンを分離した。来年度以降、 $\gamma\delta$ T 細胞を含め、他の細胞が関与する作用機序についても調べる予定である。

E. 結論

放射線照射した自己反応性 CD4⁺ $\alpha\beta$ Th1 細胞クローンの移入で MRL/*lpr* マウスの自己抗体産生および病態の調節が可能である。その機序のひとつとして、移入クローンに対する抗体の誘導が重要と考えられた。

G. 研究発表

発表論文

1. Fujii, T., Okada, M., Mimori, T., Craft, J.: The transmembrane form of TNF α drives autoantibody production in the absence of CD154: studies using MRL/Mp-*Fas*^{pr} mice. *Clin Exp Immunol* 130: 224, 2002.
2. Fujii, T., Okada, M., Craft, J.: Regulation of T cell-dependent autoantibody production by a $\gamma\delta$ T cell line derived from lupus-prone mice. *Cell Immunol* 217: 23, 2002.
3. Umehara, H., Inoue, H., Huang, J., Kono, T., Tanaka, Y., Okazaki, T., Mimori, T., Bloom, E.T., Domae, N.: Role for adapter proteins in costimulatory signals of CD2 and IL-2 on NK cell activation. *Mol Immunol*, 38: 587, 2001.
4. Fujita, Y., Murakami, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Tanaka, M., Ozaki, S., Nakao, K., Mimori, T.: Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 128: 21, 2002.
5. Furuta, A., Fujii, T., Yasuoka, H., Takeda, R., Hirakata, M., Mimori, T.: Severe hypertension associated with multiple intrarenal microaneurysms in a patient with systemic lupus

- erythematosus and antiphospholipid antibodies. *Mod Rheumatol*, 12: 178, 2002.
6. 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: 407, 2002.
 7. Kobayashi, H., Hosono, O., Mimori, T., Kawasaki, H., Dang, N.H., Tanaka, H., Morimoto, C.: Reduction of Serum Soluble CD26/Dipeptidyl Peptidase IV Enzyme Activity and Its Correlation with Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Rheumatology*, 29: 1858, 2002.
 8. Inoue, H., Miyaji, M., Kosugi, A., Nagafuku, M., Okazaki, T., Mimori, T., Amakawa, R., Fukuhara, S., Domae, N., Bloom, E.T., Umehara, H.: Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: tyrosine phosphorylation and association of LAT with phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-g following CD2 stimulation. *Eur J Immunol*, 32: 2188, 2002.
 9. 三森経世, 吉藤 元: 多発性筋炎・皮膚筋炎. *脳の科学*, 24: 393, 2002.
 10. 川端大介, 三森経世: 本邦臨床統計集(3) 全身性エリテマトーデス. *日本臨床*, 60 (増刊号1): 359, 2002.
 11. 三森経世: 膠原病における自己抗体研究の進歩. *日本臨床免疫学会会誌*, 25: 23, 2002.
 12. 三森経世: 全身性エリテマトーデスの治療. *内科*, 89: 257-260, 2002.
 13. 三森経世: 膠原病における自己抗体の多様性. *総合臨床*, 51: 2092, 2002.
 14. 三森経世, 田中真生: 慢性関節リウマチの新しい自己抗体. *炎症と免疫*, 10: 78, 2002.
 15. 三森経世: リウマチ性疾患における免疫学的検査 自己抗体の分類と種類. *リウマチ科*, 27(Suppl.1): 294, 2002.
 16. 三森経世: 慢性関節リウマチ. *総合臨床*, 51: 709, 2002.
 17. 三森経世: 主要疾患の歴史-混合性結合組織病. *日本内科学会雑誌*, 91: 2676, 2002.
 18. 三森経世: 多発性筋炎, 皮膚筋炎. *日本医師会雑誌*, 128: S250, 2002.
 19. 三森経世: 高安動脈炎. *日本医師会雑誌*, 128: S258, 2002.
 20. 三森経世, 田中真生: 関節リウマチの新しい自己抗体と対応抗原. *日本臨床*, 60: 2263, 2002.
 21. 三森経世: 鑑別診断. *最新医学 別冊*, 8: 136-142, 2002.
 22. 藤井隆夫: SLE 研究における最近の進歩. *ペプチドを用いたループモデルマウスの治療. 臨床免疫*, 38: 36-40, 2002.
- 書籍
1. 三森経世: 膠原病総論 概念と病因, 病態. 玉置邦彦, 飯塚一, 清水宏, 富田靖, 宮地良樹, 橋本公二, 古江増隆編集 *最新皮膚科学大系* 第9巻 膠原病非感染性肉芽腫, 中山書店 9: 2, 2002.
 2. 学会発表
 1. 藤井 隆夫, 亀山 香織, 藤田 義正, 平形 道人, 三森 経世. 自己反応性 Th1 クローンを用いた MRL/Mp-*Fas*^{lpr} マウスの免疫調節. 第 52 回日本アレルギー学会総会 2002.
 2. 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+ $\alpha\beta$ Th1 クローンを用いた MRL/Mp-*Fas*^{lpr} 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.
 3. Takao Fujii, Yoshimasa Fujita, Kaori Kameyama, Michito Hirakata, Tsuneyo Mimori. Vaccination with autoreactive CD4⁺V β 8.3 Th1 clone in MRL/Mp-*Fas*^{lpr} mice. The 66th American College of Rheumatology Annual Meeting, 2002.
 4. Yoshimasa Fujita, Takao Fujii, Shoichi Ozaki, Tsuneyo Mimori. Isolation of CD4⁺V $\alpha\beta$ Th1 clones

that are reactive with vascular smooth muscle antigens and induce pulmonary vasculitis in

MRL/Mp-*Fas*^{lpr} mice. The 66th American College of Rheumatology Annual Meeting, 2002.

表1. 細胞移入したMRL/lprマウスにおける糸球体細胞数とメサンギウム領域面積

	Glomerular cell number (/glm)	Mesangial area (μm^2 /glm)
PBS-treated	34.4 \pm 5.7	953 \pm 147
s-rnp2	30.1 \pm 6.2	871 \pm 155
s-dna51	46.0 \pm 9.3*	1124 \pm 49*
i-dna51	25.7 \pm 3.4*	847 \pm 143

Mean \pm SD

PAS染色を用いたCarl Zeiss Vision KS400システムにより計算

* $P < 0.05$ (PBS群に比して)

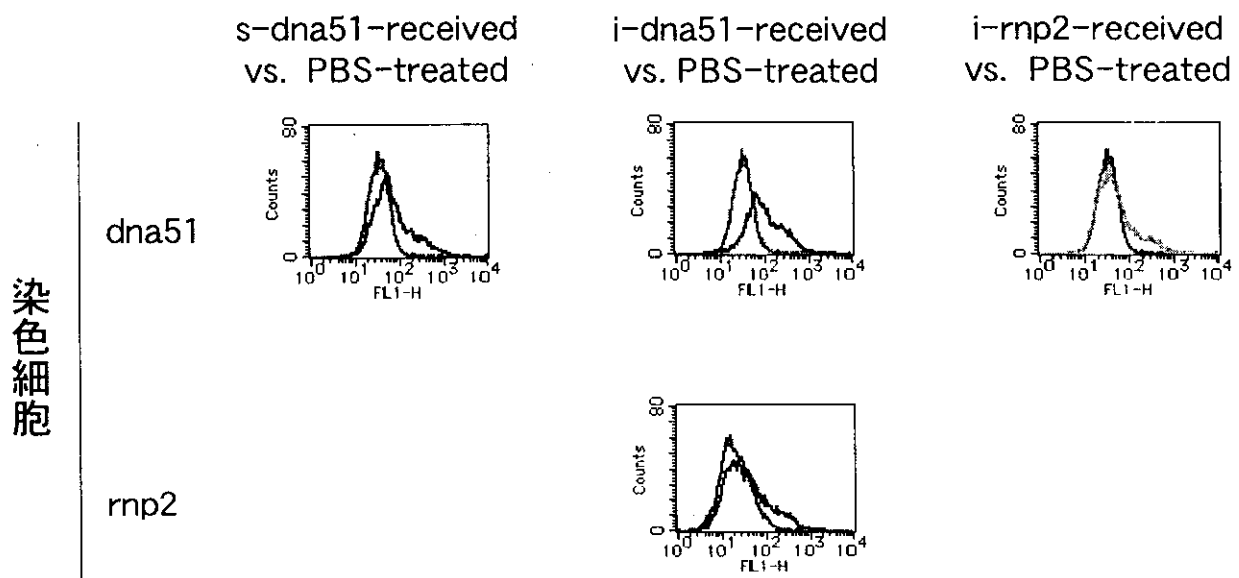


図1. 細胞移入したMRL/lprマウス血清中の抗dna51抗体

s-dna51移入群、i-dna51移入群の血清中に抗dna51抗体が認められたが、i-dna51群でより高頻度であった。濃いラインは細胞移入群、薄いラインはPBSコントロール群を示す。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

G P I と自己抗体制御に関する研究

分担研究者松本 功（筑波大学 講師）

研究要旨

関節リウマチの病因については未だ不明な点が多いが、解糖系酵素G P I に対する抗体が単独で関節炎を誘導できることがマウスで明らかになっている。我々は日本人RA患者において抗G P I 抗体を保持する患者が多いことを明らかにしてきたが、これらヒトG P I 抗体の関節炎源性の有無を明らかにし、抗体依存性の関節炎のメカニズムについて探求していく。また抗G P I 抗体などを保持する自己免疫疾患患者の免疫系を他の動物の生体内で制御調整することにより、新規治療法の開発をめざす。

A.研究目的

関節リウマチ（RA）は発症頻度が高い自己免疫疾患であるが、その病因については未だ不明な点が多い。我々は解糖系酵素 glucose-6-phosphate isomerase（G P I）に対する免疫応答が単独で関節炎を惹起することを明らかにしてきた。また、このG P I 抗体が何故関節炎だけを引き起こすのかについても我々は明らかにしてきており、抗原の関節軟骨表面での強発現がヒトでも重要であることが判明している。RA患者でこの抗体が高頻度で認められることはすでに報告されているが、ヒトリコンビナントG P I 蛋白を用いて行った我々の研究では、Schaller らが報告した頻度よりは低い、関節炎患者に多く発現しており、日本でも十数名の抗G P I 抗体強陽性者を確認している。そこでRA患者におけるG P I 抗体誘導性関節炎の探索と、その制御機構の解明を目的として研究を進める。本研究では、1）日本人自己免疫疾患患者の抗G P I 抗体の解析、2）ヒトG P I 反応性T細胞とT細胞エピトープ解析、3）新しい自己抗体産生型ヒト化モデルの作成、4）抗G P I 抗体の他動物での関節炎源性検討、を明らかにすることを目的とする。

B.研究方法

1）ヒトリコンビナント G P I 蛋白とウサギ G P I 蛋白の両者を用いた ELISA 法を行った。対象はRA患者199名、SLE144名、SS20名、その他自己免疫患者73名、そして健康人137名、計553名の血清を用いた。抗G P I 抗体陽性者のHLA、抗体の親和性を比較検討した。
2）患者末梢血単核球 2×10^6 個を用いて始めにCell proliferation ELISAにて患者おのこのG P I に対する増殖活性を測定した上で、自己反応性T細胞をMACS サイトカイン・セクレション・アッセイにてクローニングした。G P I 反応性T細胞について、Th1/Th2の偏向の有無、TCRの解析を行った。さら

に、それよりT細胞ハイブリドーマ及びT細胞株を作成してT細胞エピトープの検索を行う。

3）NOD-SCIDマウスの脾臓、及び腹腔内にヒトの末梢血単核球を注入することにより、ヒトの抗体産生やヒト免疫細胞をマウスに構築する。単核球投与前にマウス側のNK活性をさらに抑制する為にIL2レセプター β やNKに対する抗体を腹腔内に投与しておく。単核球のドナーとしては、抗G P I 抗体陽性RA患者を用いる。抗G P I 抗体産生の確認後にリコンビナントG P I やペプチドを免疫し、より強い自己抗体の産生を促す。このようにヒト抗G P I 抗体による関節炎動物モデルを作成する。

4）G P I 抗体陽性RA患者よりI g G分画をプロテインGカラムにて分離し、カニクイザル指関節に直接投与し、関節炎の発症及び組織学的解析を行った。

（倫理面への配慮）

動物内にヒトの血球を投与する際、感染症のチェック（HBs抗原、HCV抗体、HTLV-I抗体、ワ氏）をしている。また、被験者の血球成分などを動物に投与するという作業に懸念をもつ方がいる可能性があるが、十分な説明と、有効な治療法の開発を副作用なく検討できる旨説明し、納得していただけるよう配慮する。筑波大学の医の倫理特別委員会はすでに承認済みであり、研究の説明文、同意書を渡し同意を得ている。

C.研究結果

1）ELISA ではRA患者(10/199)にやや頻度が高く抗G P I 抗体が認められた。一方、SLE(3/142)、SS(0/20)、その他自己免疫疾患(0/73)、健康人(2/137)では低頻度であった。RA患者で抗体の親和性は健康人と比較しやや高く、抗体陽性者ではHLA-D R0803が高頻度に認められた。2）RA患者1例の末梢血からG P I 反応性Th1細胞が多く認められ、その患者からのG P I 反応性Th2細胞は同定できなかった。健康人2名ではG P I に対する反応は認められなかった。現在症例数を増やして検討中である。

3）ヒト末梢血はNOD-SCIDマウスでIL-2

R β 抗体投与下では残存率が高く、ヒトの抗体もマウスの血液中に存在した。ヒト抗体の定量、また今後自己抗体の制御をマウスの生体内で検討していく。

4) カニクイザルを用いた実験では明らかな関節腫脹は認められなかった。現在指組織の病理組織解析、及びRNAレベルでの局所浸潤細胞の確認を行っている。

D.考察 E.結論

日本人RA患者で抗GPI抗体陽性患者が認められ、その抗体産生がHLAと関連している可能性が示唆された。またGPI反応性T細胞がRA患者より同定でき、これらの活性化が関節炎の発症に関与している可能性が示唆された。今後、このヒトGPI抗体の関節炎源性についてさらに検討を加える。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, Maurice M, Simmons B, Brenner M, Mathis D, Benoist C. How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nature Immunol.* 2002; 3:360-365.
2. Matsumoto I, Sumida T. B cells and immunoglobulins dependent mechanism in rheumatoid arthritis. *Ther. Apheresis* 2002; 6(4):317-319.
3. Matsumoto I, Lee DM, Mansky RG, Sumida T, Hitchon CA, Schur PH, Anderson RJ, Coblyn JS, Weinblatt ME, Brenner M, Duclos B, Pasquali JL, Gabalawy HE, Mathis D, Benoist C. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum.* in press
4. Tsutsumi A, Ikegami H, Takahashi R, Murata H, Goto D, Matsumoto I, Fujisawa T, Sumida T. Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. *Human Immunol.* in press
5. 松本功. GPI抗体と関節炎 *Mebio* 2002; 19: 49-54
6. 松本功、内藤祐介、住田孝之. シェーグレン症候群と自己抗体 *日本臨床* in press
7. 松本功、住田孝之. 関節炎と解糖系酵素に対する自己抗体 *リウマチ科* 2002; 28: 374-381

β2-グリコプロテイン I の新たな生物学的意義：ニックβ2GPI

分担研究者 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態分野 教授

研究要旨

β2-グリコプロテイン I (β2GPI) は抗リン脂質抗体の主要対応抗原である。β2GPI はリン脂質と結合することにより凝固・線溶反応を多様に制御しているが、β2GPI をプラスミンで処理すると第 V ドメインの Lys-317/Thr-318 が切断され、そのリン脂質結合能が欠落し、β2GPI の機能は消失する。今回、プラスミン処理されたβ2GPI (ニックβ2GPI) の新たな機能につき検討した。ニックβ2GPI と glu-plasminogen の結合を ELISA 法で検討した。glu-plasminogen の結合部位を各フラグメントによる inhibition assay により決定した。次に、ニックβ2GPI の線溶系における機能を in vitro の plasmin generation の評価によっておこなった。また、脳梗塞患者の血漿中のニックβ2GPI を測定し、in vivo におけるニックβ2GPI の意義を併せて検討した。intact のβ2GPI は glu-plasminogen に結合しなかったが、ニックβ2GPI は結合を示し、その結合部位は inhibition assay により第 IV クリングルドメインのリジン結合部位であることがわかった。ニックβ2GPI は glu-plasminogen から t-PA の存在下でのプラスミン生成を有為に抑制し、この抑制効果は intact β2GPI にはみられなかった。脳梗塞患者では健常人にくらべて血漿ニックβ2GPI 値は著しく高かった。結語：ニックβ2GPI はプラスミン生成を抑制した。すなわちβ2GPI は新たな線溶インヒビターであるニックβ2GPI の前駆体であり、β2GPI は外因系線溶の negative feedback を担うことが示された。ニックβ2GPI は脳梗塞患者血中で高値であり、in vivo でも出現、機能している可能性が示された。

A. 研究目的

β2 グリコプロテイン I (β2GPI) は抗リン脂質抗体症候群にみられる抗カルジオリピン抗体の対応抗原である。β2GPI はリン脂質と結合することにより凝固・線溶反応を多様に制御しているが、β2GPI をプラスミンで処理すると第 V ドメインの Lys-317/Thr-318 が切断され (ニックβ2GPI)、そのリン脂質結合能が欠落し、β2GPI の機能は消失すると思われる。また、抗β2GPI 自己抗体とβ2GPI の結合にはβ2GPI とリン脂質の相互作用が必須、すなわちβ2GPI のエピトープ発現にはリン脂質等の関与が必要であるので、β2GPI がニックβ2GPI に変換されると抗原抗体反応がおこらなくなる。このことはプラスミンによる自己抗原の限定分解が生体自らの抗リン脂質抗体症候群という自己免疫異常からの回避の一序である可能性を示唆する。

これらのことより、ニックβ2GPI は凝血的にも免疫学的にも抗リン脂質抗体症候群の病態においては「老廃物」的な位置付けにあり、ニックβ2GPI 自

体の意義については報告はなかった。今回、プラスミンで処理、調整してニックβ2GPI を精製し、その新たな機能につき検討した。また、血漿中にニックβ2GPI を検出し、その意義について検証をおこなった。

B. 研究方法

ヒト血漿よりβ2GPI を精製し、プラスミン処理してニックβ2GPI を調整した。インタクトβ2GPI とニックβ2GPI の glu-plasminogen への結合を ELISA 法で比較検討した。ニックβ2GPI の glu-plasminogen の結合部位をリジン誘導体である εアミノカプロン酸、および glu-plasminogen のフラグメント (ミニプラスミノゲン [クリングル V + Catalytic Domain]、クリングル IV およびクリングル I+II+III) による inhibition assay により決定した。

次に、ニックβ2GPI の線溶系における機能を in vitro の plasmin generation の評価によっておこな

った。すなわち、異なる濃度のサンプル(ニックβ2GPI、インタクトβ2GPI、β2GPIドメインI-IVミュータント、ウシアルブミン)に、組織プラスミノゲンアクチベータ(tPA; 31mU/ml)、glu-plasminogen (70mg/ml)、可溶性フィブリンモノマー(3.3mg/ml)、S-2251 (0.6mM)を混和し、37°Cで12時間インキュベートした。その後、OD405を測定し、tPAの段階希釈で得られた標準曲線よりplasmin産生をtPA活性として表現した。

また、ニックβ2GPIを特異的に認識するモノクローナル抗体および抗ヒトβ2GPIポリクローナル抗体を使用してサンドイッチELISAをおこない、ニックβ2GPI濃度を測定した。すなわち、抗リン脂質抗体症候群および脳梗塞患者の血漿中のニックβ2GPIを測定し、これらの疾患のin vivoにおけるニックβ2GPIの意義を併せて検討した。

(倫理面への配慮)

この研究には倫理的問題は特に含まれない。

C. 研究結果

インタクトβ2GPIはglu-plasminogenに結合しなかったが、ニックβ2GPIは結合を示した(図1)。この結合はεアミノカプロン酸によって強く抑制されたので、glu-plasminogen上のニックβ2GPI結合の領域はリジン結合部位であることが証明された。また、glu-plasminogenフラグメントを用いたinhibition assayでは、ミニプラスミノゲンではglu-plasminogenのニックβ2GPIへの結合が抑制されたのに対し、クリングルIVおよびクリングルI+II+IIIでは抑制がかからず、したがってニックβ2GPIへの結合部位はglu-plasminogenの第IVクリングルドメインリジン結合部位であることがわかった。

ニックβ2GPIはglu-plasminogenからtPAの存在下でのプラスミン生成を有意に抑制し、この抑制効果はインタクトβ2GPI、およびβ2GPIドメインI-IVミュータント(第Vドメイン欠損β2GPI)にはみられなかった(図2)。

抗リン脂質抗体症候群と血漿ニックβ2GPI濃度とは相関はなかったが、脳梗塞患者では健常人にくらべて血漿ニックβ2GPI値は著しく高かった(196±146 vs. 59±39 ng/ml, p<0.0001)。

D. 考察

ニックβ2GPIの存在と、その構造についてはこれまでに報告してきたが、ニックβ2GPIの機能についてはこれまで全く報告がなかった。

本研究では以下のことを明らかにした。ニックβ2GPIはglu-plasminogenに結合してプラスミン生成を抑制した。この作用はインタクトβ2GPIにはみられなかった。すなわちβ2GPIは新たな線溶インヒビターであるニックβ2GPIの前駆体であり、β2GPIは外因

系線溶のnegative feedbackを担うことが示された。外因系線溶には組織プラスミノゲンアクチベータインヒビター1(PAI-1)、α2アンチプラスミンなどの様々なインヒビターが知られているが、negative feedback機構としてのインヒビターはこのニックβ2GPIがはじめての報告である。

ニックβ2GPIは抗リン脂質抗体症候群というよりむしろ脳梗塞患者血中で高値であり、in vivoでも出現、機能している可能性が示された。すなわちニックβ2GPIを測定することは自己免疫現象の有無にとどまらず、おそらく生体内でのプラスミン生成を反映しており、血栓傾向あるいは動脈硬化のマーカーとなりうることを意味する。

E. 結論

抗リン脂質抗体の主要な対応抗原であるβ2GPIとその生成物であるニックβ2GPIの、外因系線溶抑制というあらたな機能を明らかにした。また、血漿ニックβ2GPI測定抗リン脂質抗体症候群や血栓疾患での臨床的意義を示した。血漿ニックβ2GPI高値は少なくとも脳梗塞のマーカーとなる可能性を示した。

F. 健康危険情報

本年度の研究からは該当無し。

G. 研究発表

①. 国外発表

- 1.Koike,T.:" Anticardiolipin and anti-β2-glycoprotein I antibodies:application in the clinic" 3rd International Congress on Autoimmunity, Geneva, Switzerland, February, 20~24, 2002.
- 2.Koike,T.:" Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis." 1st Tuzing Antiphospholipid, Conference, Tuzing, Germany, April, 22~25, 2002.
- 3.Koike,T.:" Anti-prothronbin antibodies; pathogenesis and specificity." 6th Dresden symposium on Autoantibodies, Dresden, Germany, September, 4~7, 2002.

②. 国内発表

- 1.小池隆夫:「抗リン脂質抗体症候群:最近の話題」第166回日本内科学会東北地方会生涯教育講演会、仙台市、2002年2月9日
- 2.小池隆夫:「膠原病と幹細胞移植」厚生労働省ヒトゲノム・再生医療等研究事業五班合同公開シンポジウム会、東京都、2002年2月16日
- 3.小池隆夫:「1型糖尿病と研究の流れと問題点」第45回日本糖尿病学会、東京都、2002年5月16-19日
- 4.小池隆夫:「抗リン脂質抗体症候群:自己

抗体による血栓症と動脈硬化」国立国際医療
センター研究所第9回箱根山セミナー、東京
都、2002年6月10日

5. 小池 隆夫：「抗リン脂質抗体症候群」第32
回日本臨床免疫学会学術総会、東京都、2002
年12月4～6日

- H. 知的財産権の出願・登録
該当無し

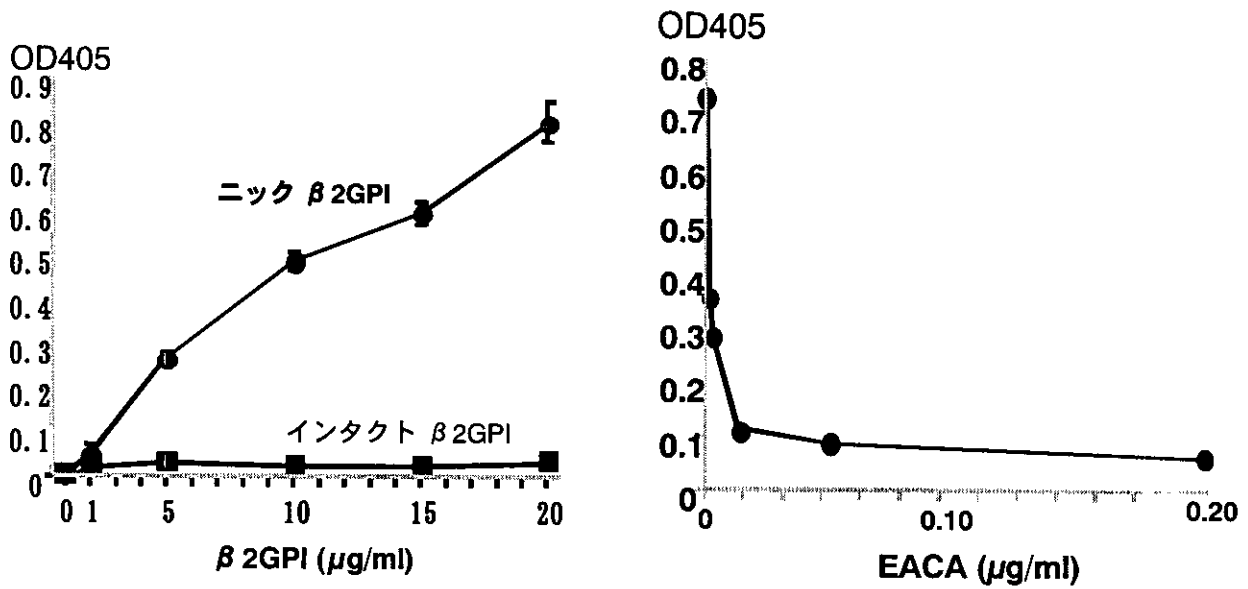


図1 glu-plasminogen へのニックおよびインタクト $\beta 2\text{GPI}$ の結合(図左) および ϵ アミノカプロン酸によるニック $\beta 2\text{GPI}$ - glu-plasminogen 結合の抑制 (図右)

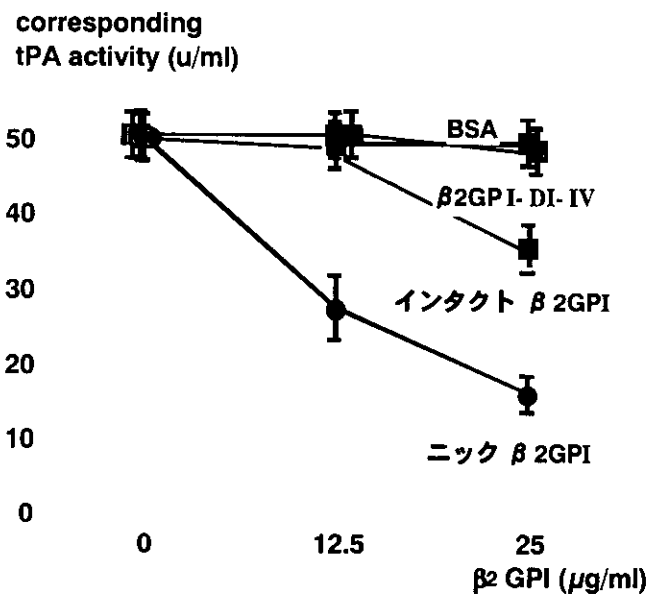


図2 プラスミン生成アッセイ。ニック $\beta 2\text{GPI}$ は tPA によるプラスミン生成を抑制したが、インタクト $\beta 2\text{GPI}$ は高濃度で軽度の抑制のみ、 $\beta 2\text{GPI}$ の第 V ドメインを欠くミュータント ($\beta 2\text{GPI-DI-IV}$) では抑制がみられなかった。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

【雑誌】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimizudani N, Murata H, Keino H, Kojo S, Nakamura H, Morishima Y, Sakamoto T, Ohtsuka M, Sekisawa K, Sumida M, <u>Sumida T</u> , and Matsuoka K	Conserved CDR3 region of TCR BV gene in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis.	Clin.Exp. Immunol.	129	140-149	2002
Matsumoto I, and <u>Sumida T</u> .	B cells and Immunoglobulins dependent mechanisms in rheumatoid arthritis.	Therapeutic Apheresis	6	317-319	2002
Tsutsumi A, Ebisuka T, Murata H, Takemura H, and <u>Sumida T</u>	An HLA-B27-positive patient diagnosed with ulcerative colitis 15 years after onset of arthropathy.	Mod. Rheumatol	12	349-353	2002
Murata H, Matsumura R, Koyama A, Sugiyama T, Sueishi M, Shibuya K, Tsutsumi A, and <u>Sumida T</u> .	T cell receptor repertoire of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis.	Arthritis Rheum.	46	2141-2147	2002
Yasukochi T, Ozawa K, Sato M, Tsutsumi A, <u>Sumida T</u> , Shibana Y.	Evaluation of the improvement of IGCR technique.	Nucleic Acids Res. Suppl	2	199-200	2002
Ohnishi Y, Tsutsumi A, Sakamaki T, and <u>Sumida T</u> .	T cell epitopes of type II collagen in HLA-DRB1*0101 or DRB1*0405-positive Japanese patients with rheumatoid arthritis.	Int. J. Mol. Med.	11	331-335	2002
Ohnishi Y, Tsutsumi A, and <u>Sumida T</u> .	Antibodies to type II collagen and their association with HLA DR1 allele in Japanese patients with rheumatoid arthritis.	Mod. Rheumatol.			in press
Adachi Y, Tsutsumi A, Murata H, Takemura H, Chino Y, Takahashi R, Ebisuka T, and <u>Sumida T</u> .	Behcet's disease accompanied by myelodysplastic syndrome with trisomy 8: Two case reports and a review of 15 Japanese cases.	Mod. Rheumatol.			in press