

患者および健常人末梢血よりゲノム遺伝子を調整し、MBL遺伝子多型はすでにSLEとの関連が指摘されているコドン54多型をPCR-RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) 法により判定した。IL-1 β 遺伝子多型は既報告の-511、-31、+3263、+3857、+3953の5箇所の多型について同様にPCR-RFLP法により判定した。PCR-RFLP法の妥当性は、ランダムに選択した検体のいくつかをシークエンスする事により確認した。血中のMBLおよびIL-1 β 濃度は固相酵素抗体法により測定した。

(倫理面への配慮)

検体はすべて書面による患者もしくは健常人の同意を得た上採取したものをを用いた。遺伝子解析に関して筑波大学倫理委員会の承認を受けた。

C. 結果

SLE146名につきMBL遺伝子多型の解析を行い、正常型ホモ(AA)は84名、ヘテロ(AB)は54名、血中MBL濃度の著明な低下を伴う異常型ホモ(BB)は9名であった。BBである比率は健常人の160名中2名に比し有意に高頻度であった($p = 0.0218$)。各遺伝子型と血中MBL濃度との間には明らかな関連を認め、AB患者ではAA患者より有意に低濃度、BB患者ではさらに低濃度となっていた。BB患者はAAおよびAB患者に比しSLE発症年齢はAA患者で 35.52 ± 14.82 歳、AB患者では 30.66 ± 15.23 歳、BB患者で 23.44 ± 13.30 歳であり、BB患者で低い傾向が見られたが有意差はなかった。また、経過中に入院を要する感染症を併発する頻度はBB患者では8名中5名とBB以外の患者140名中40名に比し有意に高頻度であった($p = 0.0287$)。SLEの治療に伴い血中MBL濃度はやや低下する傾向が見られたが、上昇する例も見られた。一方AA患者において、血中MBL濃度と補体CH50との間には有意の正の相関が見られた。現時点では皮膚症状、中枢神経症状、腎症状、漿

膜炎等特定の症状とMBL遺伝子多型、もしくは血中濃度との明確な関連は見られていない。

IL-1 β 遺伝子多型は72名のSS患者、101名のSLE患者(二次性SS合併者を含まず)について検討を行った。-511、-31、+3877の3箇所の多型で、それぞれCC、TT、AAを持つ頻度がSS患者で15.3%、16.2%、20.7%と健常人の32.1%、29.2%、36.8%に比し有意に低下していた(それぞれ $p = 0.011$, $p = 0.050$, $p = 0.023$)。一方、SLE患者ではそのような傾向は見られず、頻度は健常人とほぼ同等でむしろSSとSLE患者間で有意差を認めた(-511、-31、+3877でそれぞれ $p < 0.005$, $p = 0.015$, $p = 0.026$)。+3263、+3953の多型ではSLE、SS、健常人各グループ間で有意差は見られなかった。発症年齢、乾燥症状、関節炎、SLE関連諸症状等患者の特徴および血中IL-1 β 濃度とIL-1 β 遺伝子多型との間には明確な関連を認めなかった。

D. 考察

MBL遺伝子多型性では血中MBL濃度低下の原因となるBアリアルとSLE発症との関連が指摘されている。今回の検討にてもBB患者は健常人に比し有意に高頻度であった。また、血中MBL濃度はSLEの病勢にともない変動する傾向が見られ、血中CH50とも有意に相関したが、現在のところ特定の病態と関連する等一定の傾向は見られず、さらに検討が必要と思われた。また、MBLは自然免疫に重要であり、骨髄移植時の感染症の合併とMBL遺伝子多型との関連も指摘されている。SLEをはじめとする全身性自己免疫疾患では治療時に強い免疫抑制をかけることが多いため、感染症合併を患者の予後を左右する重大な問題である。MBL遺伝子多型もしくは血中濃度と感染症合併との関連の有無はより多くの症例で明らかにして行くべきであると思われた。

一方、IL-1 β 遺伝子多型の検討ではSS患者で健常人とは有意に遺伝子型の比率が異なっていた。このような差はSLEと健常人の間には認

められず、IL-1 β がSSの病態形成に何らかの役割を果たしていることが考えられた。ただし、IL-1 β 遺伝子多型とIL-1 β 産生との関連は明らかになっておらず、この点についても今後解明が必要である。なお、全身性自己免疫疾患の病態に影響を与える分子をさらに検索するため、In-gel competitive reassociation (IGCR)法による発現遺伝子解析法の確立を行っている。本法では2つの検体間で発現の異なる遺伝子の選別が可能であり、現在関節リウマチ(RA)患者関節滑膜と変形性関節症患者関節滑膜間で比較を行い、RA患者関節滑膜に発現が増強していると思われる遺伝子のクローニングを行っている。今後SLEやSSに応用し、これらの疾患の病態の解析を進める予定である。

E. 結論

MBL遺伝子多型はSLE発症との関連が指摘されており、治療にともなう日和見感染と血中濃度の低下をとともなう遺伝子型との関連も疑われる。ただし、現時点では特定の病型・内臓病変との関連は明らかでない。IL-1 β 遺伝子多型もSS発症との関連が考えられたが特定の病型との関連は明らかでなかった。これら遺伝子多型につきさらに検討をすすめるとともに今後IGCR法の確立によりより多くの候補遺伝子を見いだす必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

学会発表

1) 高橋令子、堤明人、村木祥文、大谷克城、

若宮伸隆、住田孝之：全身性エリテマトーデス患者におけるMannose binding lectin遺伝子の多型性. 2002年免疫学サマースクール(淡路島) 7月、2002

2) Takahashi R, Tsutsumi A, Muraki Y, Ohtani K, Wakamiya N and Sumida T :

Association of mannose-binding lectin gene polymorphism with disease occurrence, characteristics and regression of systemic lupus erythematosus. American College of Rheumatology, 66th Annual Scientific Meeting (New Orleans), October, 2002

3) Muraki Y, Tsutsumi A, Takahashi R, Suzuki E, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, and Sumida T : Polymorphisms of IL-1 β gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome (SS). American College of Rheumatology, 66th Annual Scientific Meeting (New Orleans), October, 2002

3) 村木祥文、堤明人、高橋令子、鈴木英二、林太智、千野裕介、後藤大輔、松本功、村田秀行、住田孝之：日本人シェーグレン症候群(SS)および全身性エリテマトーデス(SLE)患者におけるIL-1 β 遺伝子多型と疾患の関連. 第32回日本免疫学会総会・学術集会(東京)、12月、2002. 12. 04-06

4) 高橋令子、堤明人、村木祥文、後藤大輔、松本功、村田秀行、大谷克城、若宮伸隆、住田孝之：全身性エリテマトーデス患者におけるMannose binding lectin遺伝子の多型性. 第32回日本免疫学会総会・学術集会(東京)、12月、2002. 12. 04-06

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

線維化病態における線維芽細胞とT細胞の協調作用に関する研究

分担研究者： 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所・講師

研究要旨

免疫抑制療法の導入により膠原病患者の予後やQOLは改善されたが、皮膚硬化、肺線維症など線維化病態に対する有効な治療法は現時点でない。本研究テーマでは線維化を誘導する因子を同定し、それらを標的とした新しい治療法を開発することを目的とする。本年度は、造血幹細胞移植後の慢性移植片対宿主病（cGVHD）患者における涙腺の線維化病変をモデルとして、超微形態を含めた病理組織学的検討により線維化病態のプロセスを追究した。ドライアイを呈したcGVHD9例および臨床症状が類似するシェーグレン症候群（SS）5例を対象とし、涙腺生検組織を病理組織学的に検討した。cGVHDでは涙腺導管周囲にCD34⁺線維芽細胞の増加、密な膠原組織の集積による線維化、腺房組織の萎縮を認め、血管壁基底膜は著明に肥厚、多層化していた。線維芽細胞の細胞質小器官は著明に発達し、膠原線維をactiveに産生している像が観察された。これら所見は発症間もない症例でもみられ、軽症例に比べて重症例で顕著であった。涙腺導管周囲にはCD4⁺およびCD8⁺T細胞が浸潤し、一部は活性化で発現誘導されるCD154/CD40リガンドが陽性であった。同部位の電顕像では、細胞質突起の接着構造を介した線維芽細胞とT細胞を中心とした多彩な炎症細胞との結合所見が多数みられた。導管周囲の線維芽細胞の多くはHLA-DR、接着分子、副刺激因子を発現していた。一方、SS涙腺ではT、B細胞浸潤が主体で、線維芽細胞は少数であった。以上の結果から、線維化病態における線維芽細胞とT細胞の協調作用の重要性が示された。T細胞由来の液性因子や膜蛋白からの活性化シグナルが線維芽細胞の持続的な増殖、細胞外基質産生を誘導している可能性が考えられた。

A. 研究目的

新規の免疫抑制療法や抗サイトカイン療法の導入により関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど膠原病患者の予後やQOLは大きく改善されてきた。しかしながら、これら治療法でもコントロール困難な難治性病態が依然として残っている。特に過剰な細胞外基質の蓄積による線維化病変に対しては、現時点で有効性が証明された治療法はない。膠原病患者では、皮膚硬化、肺線維症、腎硬化症、動脈硬化や血管炎による血管病変など線維化が中心となる病態が高率にみられる。線維化にかかわる液性因子とし

てTGF- β が同定されているが、TGF- β を正常マウス皮下に連続投与しても一過性の細胞外基質の増加を認めるのみで線維化を誘導できない。したがって、病的な線維化の誘導にはTGF- β とともに他の因子が必要と考えられている。本研究では、線維化誘導にかかわる因子を同定し、それらを標的とした新しい治療法の開発につなげることを目的とする。そのため、本年度は患者線維化組織を用いて線維芽細胞の活性化に関わる要因を検討した。

臨床症状が顕性化した膠原病患者では完成した線維化病変しかみられず、線維化のプロセス

を検討することは困難である。そこで本研究では、造血幹細胞移植後の慢性移植片対宿主病（cGVHD）における涙腺病変を線維化疾患のモデルとして用いた。cGVHD患者を解析に用いる長所として、移植後に正常組織が線維化していく過程を追跡できることが挙げられる。

B. 研究方法および対象

1. 対象

臨床的にドライアイを呈した造血幹細胞移植後のcGVHD患者9例を対象とした。そのうち6例は鼻刺激シャーマー試験が10mm以下の重症例であった。また、移植後の期間は5~36ヶ月と早期から時間の経過した症例まで含めた。コントロールとして臨床症状が類似するシェーグレン症候群（SS）患者5例を選んだ。

2. 免疫組織学的解析

生検により採取した涙腺組織を10%中性緩衝ホルマリン、パラフィンで固定し、薄切後にヘマトキシリン・エオジン染色、マロリー染色を行い光学顕微鏡で観察した。さらに、パラフィンあるいは凍結切片を抗CD4、抗CD34、抗HLA-DR（Becton-Dickinson、San Jose、CA、USA）、抗CD8（Ortho、Raritan、NJ、USA）、抗CD20、抗CD45RO、抗ラミニン（Dakopatts、Glostrup、Demnark）、抗CD40、抗CD54/ICAM-1、抗CD80、抗CD86（Ansell、Bayport、MN、USA）、抗CD154/CD40リガンド（Immunotech、Marseille、France）抗体を用いて染色し、これら分子の発現を検討した。一部の実験では蛍光二重染色を行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

3. 超微形態の解析

光学顕微鏡による観察で所見のあった部位については、電子顕微鏡により超微形態を検討した。

（倫理面への配慮）

すべての患者検体は学内の倫理委員会で承認された文書によるインフォームドコンセントを

得た上で提供を受けた。

C. 研究結果

cGVHD全例において涙腺導管周囲にCD34⁺線維芽細胞の増加、密な膠原組織の集積による線維化、腺房組織の萎縮を認めた。血管壁基底膜は著明に肥厚、多層化していた。線維芽細胞の細胞質小器官は著明に発達し、膠原線維をactiveに産生している像が電子顕微鏡により観察された。これらの所見は発症間もない軽症例でもみられたが、重症例では軽症例に比べて顕著であった。

線維芽細胞が増生している涙腺導管周囲にはCD4⁺およびCD8⁺T細胞が浸潤し、一部は抗原認識による活性化で一過性に発現されるCD154/CD40リガンドが陽性であった。同部位の電顕像では、細胞質突起の接着構造を介した線維芽細胞とT細胞を中心とした多彩な炎症細胞との結合所見が多数みられ、線維芽細胞がT細胞を抱き込むような像が観察された。導管周囲の線維芽細胞の多くはHLA-DR、接着分子（CD54/ICAM-1）、副刺激分子（CD40、CD80、CD86）を発現していた。T細胞におけるCD40リガンドの発現、線維芽細胞におけるHLA-DR、接着分子、副刺激分子の発現は重症度や移植後の期間とは関係なく検出された。

一方、SS患者由来の涙腺ではCD20⁺B細胞優位の著明なリンパ球浸潤が主体であった。線維芽細胞はきわめて少数で、炎症性細胞との接着構造やHLA-DR、接着分子、副刺激分子の発現はみられなかった。

D. 考察

cGVHD涙腺では導管周囲で線維芽細胞とT細胞の両者が活性化されている像が観察された。同部位で線維芽細胞とT細胞は密接に接着しており、線維化病変形成において協調的に働いている可能性が考えられた。線維芽細胞の多くはT細胞の活性化に必須なHLA-DRおよび接着、副刺

激分子を発現しており、抗原提示細胞として機能している可能性がある。ただし、間葉系に由来する線維芽細胞が外来抗原を取り込み、プロセッシングしえるかという点に関して疑問がある。T細胞と線維芽細胞が密接に接着している近傍にマクロファージやB細胞も存在することから、線維芽細胞はむしろ支持細胞としてT細胞の活性化に関与している可能性が高い。一方、線維芽細胞上に発現しているCD40やCD54/ICAM-1はT細胞上のリガンドCD154/CD40リガンド、LFA-1と結合することによりT細胞の活性化に関わるのみならず、活性化シグナルは線維芽細胞側にも伝わる。また、線維化誘導サイトカインとして報告されているIL-4、IL-6、IL-17はいずれも活性化T細胞により産生されることから、これら細胞表面分子間接着や液性因子を介してT細胞が線維芽細胞を活性化し、TGF- β と協調的に作用することで病的な線維化を誘導している可能性が考えられた。今後、これらの分子の線維芽細胞活性化における役割を検討していく予定である。

E. 結論

線維芽細胞の持続的な増殖、細胞外基質産生にはT細胞由来の膜表面分子間シグナルやサイトカインが関与している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuwana M, Kimura K, Hirakata M, Kawakami Y, Ikeda Y. Differences in anti-Th/To autoantibody response between systemic sclerosis and other autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(9): 842-846.
- 2) Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y. Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(10): 2742-2747.
- 3) 桑名正隆: 関節リウマチにおける滑膜線維芽細胞と治療. *現代医療*, 35(2): 129-134, 2003.

2. 学会発表

Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y: Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: Application to enzyme-linked immunosorbent assay. The 66th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (New Orleans). 2002. 10.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし

膠原病上皮傷害における接着分子の役割： $\alpha_E\beta_7$ が認識するE-cadherin 上の エピトープの検討

分担研究者： 津坂 憲政 埼玉医科大学総合医療センター第二内科・講師

研究要旨

われわれは、膠原病とくに多発性筋炎/皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に伴う上皮傷害やシェーグレン症候群の涙腺唾液腺上皮傷害では、 $\alpha_E\beta_7$ /E-cadherin接着が重要な役割を演じていることをこれまで明らかにしてきた。そこで $\alpha_E\beta_7$ のE-cadherinへの接着を阻害することでこのような上皮傷害が治療できる可能性を考慮し、 $\alpha_E\beta_7$ が接着するE-cadherin上のエピトープを同定することを本研究の目的とした。そのため本年度は、glutathione-S-transferase (GST)との融合タンパクとして発現させたrecombinant E-cadherinを用いて $\alpha_E\beta_7$ との接着を検討した。全長human E-cadherin cDNA (xxxx bp) をRT-PCR法で増幅しpCRII vectorに組み込んだものを鋳型DNAとして、E-cadherin細胞外領域を構成する5つの免疫グロブリン様構造 (CAD1, CAD2, CAD3, CAD 4, CAD5) をコードするcDNAならびに細胞外ドメイン全長をコードするcDNAをPCR法で増幅した。つぎにPCR産物を精製後回収し、pGEX4T-2 vectorに組み込み、GSTとの融合タンパクとして発現、精製した。融合タンパクと $\alpha_E\beta_7$ との接着は、 $\alpha_E\beta_7$ -K562 (α_E mRNA と β_7 mRNAとをdouble-transfectしたK562細胞) との接着態度で検討した。その結果、CAD1-GSTとCAD5-GSTは、GSTと比較して $\alpha_E\beta_7$ -K562との結合がより強い傾向にあり、 $\alpha_E\beta_7$ とE-cadherinとの結合にCAD 1あるいはCAD 5が重要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

従来から、膠原病における上皮傷害は、免疫複合体によるアルサス型の機序が中心であろうと考えられてきた。しかし我々は、膠原病に合併する血管炎や外分泌腺炎などの病態解析から、血管炎では、血管内皮細胞との接着にVLA-4/VCAM-1 が、多発性筋炎/皮膚筋炎における間質性肺炎やシェーグレン症候群における涙腺・唾液腺傷害における標的細胞と外分泌腺上皮細胞接着では、 $\alpha_E\beta_7$ /E-cadherin 接着が重要な役割を演じている事を明らかにした^{1,2)}。さらに、この接着を介して、T細胞を主体とする炎症細胞が、標的細胞にアポトーシスを誘導するという新たな組織障害の機序を見出した。そこで $\alpha_E\beta_7$ のE-cadherinへの接着を阻害することでこのような上皮傷害が治療できる可能性

を考慮し、 $\alpha_E\beta_7$ が接着するE-cadherin上のエピトープを同定することを本研究の目的とした。そのため本年度は、E-cadherin細胞外領域を構成する5つの免疫グロブリン様構造 (CAD1, CAD2, CAD3, CAD 4, CAD5) に着目し、それぞれのドメインタンパクをglutathione-S-transferase (GST)との融合タンパクとして発現させたrecombinant E-cadherinを用いて $\alpha_E\beta_7$ との接着を検討した。

B. 研究方法

1) RT-PCR

末梢血よりFicoll法を用いてリンパ球分画を抽出し、抽出したリンパ球からmRNA purification kit (Pharmacia社)を用いて全mRNAを抽出した。次に、全mRNA 1.0 μ gをreverse transcriptase (Clontech

社)を用い一本鎖cDNAに変換後、DNA polynucleotide kinaseにより二本鎖cDNAに変換した。

2) GST融合タンパクの生成

Insert DNAをpGEX4T-2 (Amersham Pharmacia社)に組み込み、Top10F'細胞にトランスフォームさせた。細胞を超音波で破碎させた後に、Glutathione-sephalose 4Bと4°C1時間インキュベートさせ、ビーズを洗浄後、還元型glutathioneを加えて遠心後の上清をGST融合タンパク溶液として回収した。陰性コントロールとして、insert DNAをもたないpGEX4T-2をTop10F'細胞にトランスフォームさせ、GSTタンパクのみを回収・精製した。

3) Binding assay

抗GST抗体(1.0 mg/ml, Amersham-Pharmacia社)を300倍に希釈したものを96穴細胞培養プレートに37°C1時間インキュベートしてコーティングし、PBSで3回洗浄後、ブロックエースで4°Cで一晩ブロッキングを行った。HBSで3回洗浄後GST融合蛋白5.0 μ g/mlを加えて37°C1時間インキュベートさせた。それと同時に $\alpha_5\beta_7$ -K562 (α_5 mRNAと β_7 mRNAとをdouble-transfectしたK562細胞) (UCSF Dr. Erleより供与) 5.0 $\times 10^6$ /mlにBCECF 5.0 μ g/ μ lを加え、37°Cで35分間インキュベートし、洗浄後に1.0 $\times 10^6$ /mlに調製した。この細胞を1.0 $\times 10^6$ /100 μ l/ウェル加えて37°C 40分間インキュベート後しマルチピペットを用いて3回洗浄後蛍光プレートリーダーの吸光高度を測定した。

C. 研究結果

健康人末梢血リンパ球(PBL)から全mRNAを抽出し、reverse transcriptaseで全cDNAに変換した。既報³⁾のE-cadherin cDNAヌクレオチド配列に基づいてプライマーを設定し、この全cDNAを鋳型DNAとしてPCR法で全長human E-cadherin cDNA (2,652 bp)を増幅し、pCRII vectorに組み込んだ(pCRII/E-CAD)。次にpCRII/E-CADを鋳型DNAとして、E-cadherin細胞外領域を構成する5つの

免疫グロブリン様構造(CAD1: 106 a.a., CAD2: 112 a.a., CAD3: 112 a.a., CAD4: 109 a.a., CAD5: 110 a.a.)をコードするcDNAならびに細胞外ドメイン全長をコードするcDNAをPCR法で増幅した(図1)。つぎにPCR産物を精製後回収し、pGEX4T-2 vectorに組み込み、GST融合タンパクとして発現、精製した。回収できたのは、CAD1, CAD2, CAD5、ならびに全細胞外ドメインとのGST融合タンパク(それぞれCAD1-GST, CAD2-GST, CAD5-GST, CAD-GST)と、キャリアタンパクであるGSTタンパクであったが、これらGST融合タンパクは抗GST抗体を用いたWestern blot法で確認した(図2)。次に、抗GST抗体を96穴細胞培養プレートにコーティングしブロックエースでブロッキングを行った後にGST融合蛋白を加えて37°C1時間インキュベートさせた。次に $\alpha_5\beta_7$ -K562をBCECFでラベルしたものを加えてインキュベートして吸光高度を測定した。その結果、GST-CAD1とGST-CAD5の吸光度(それぞれ22,800 indexと16,300 index)はGST(5,040 index)と比較して高い傾向が認められた(図3)。

D. 結語

以上のことから、 $\alpha_5\beta_7$ /E-cadherin 接着において $\alpha_5\beta_7$ はCAD1ならびにCAD5を認識する傾向が認められたと考えられる。これまで、Brennerら⁴⁾は、 $\alpha_5\beta_7$ とE-cadherinとのheterophilic adhesionにおいてCAD1が重要であることを報告している。この点に関しては我々の成績と一致するが、我々の今回の検討では、CAD1に加えてCAD5も重要である可能性が示唆された。どちらのドメインがより重要であるかは精製できなかったCAD3, CAD4タンパクも含めて検討していくべき課題と考えられた。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

【参考文献】

1. Fujihara T, Fujita H, Tsubota K, et al.

Preferential localization of CD8⁺ αEβ7⁺ T cells around acinar epithelial cells with apoptosis in patients with Sjogren's syndrome. *J Immunol* 163: 2226-2235, 1999

2. Takeuchi T, Amano K, Sekine H, et al. Upregulated expression and function of integrin adhesive receptors in systemic lupus erythematosus patients with vasculitis. *J Clin Invest* 92: 3008-16, 1993

3. Rimm DL and Morrow JS. Molecular cloning of human E-cadherin suggests a novel subdivision of the cadherin superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1754-61, 1994

4. Taraszka KS, Jonathan MG, and Higgins, et al.: Molecular basis for leukocyte integrin adhesion to epithelial (E)-cadherin *J Exp Med* 9: 1555-67, 2000

F. 研究発表

4. 論文発表

【原著】

1. Tsuzaka K, Onoda N, Yoshimoto K, et al. *Mod Rheumatol* 12: 167-173, 2002

2. Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, et al. *Clin Exp Immunol* 129: 160-168, 2002

3. Tsubota K, Fujita H, Tadano K, et al. *Clin Exp Immunol* 129: 177-182, 2002

2) 学会発表

1. Tsuzaka K, Shiraishi K, Tsubota K, et al. 8th International Symposium on Sjogren's syndrome. Kanazawa, Japan, May, 2002

2. Shiraishi K, Tsuzaka K, Tsubota K, et al. 8th International Symposium on Sjogren's syndrome. Kanazawa, Japan, May, 2002

3. Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. ACR 66th Annual Meeting, New Orleans, U.S.A., October, 2002

4. Tsuzaka K, Shiraishi K, Tsubota K, et al. ACR 66th Annual Meeting, New Orleans, U.S.A., October, 2002

5. Yoshimoto K, Nudejima M, Setoyama, et al. ACR 66th Annual Meeting, New Orleans, U.S.A., October, 2002

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特記すべきことなし。

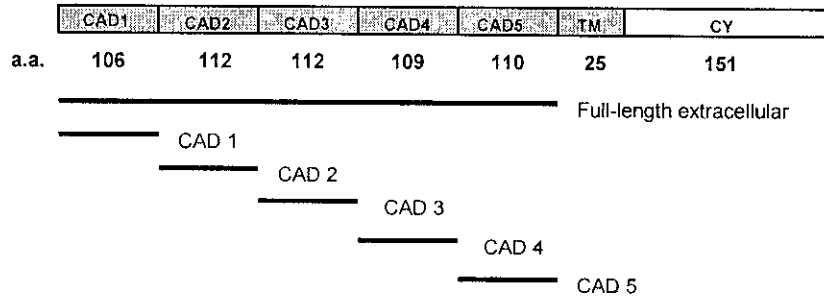


図 1. E-cadherinを構成する細胞外領域

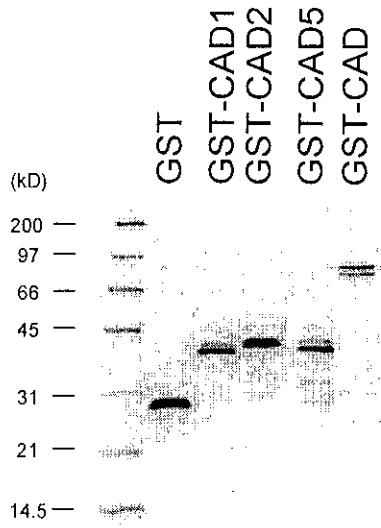


図2. E-cadherin-GST融合タンパク

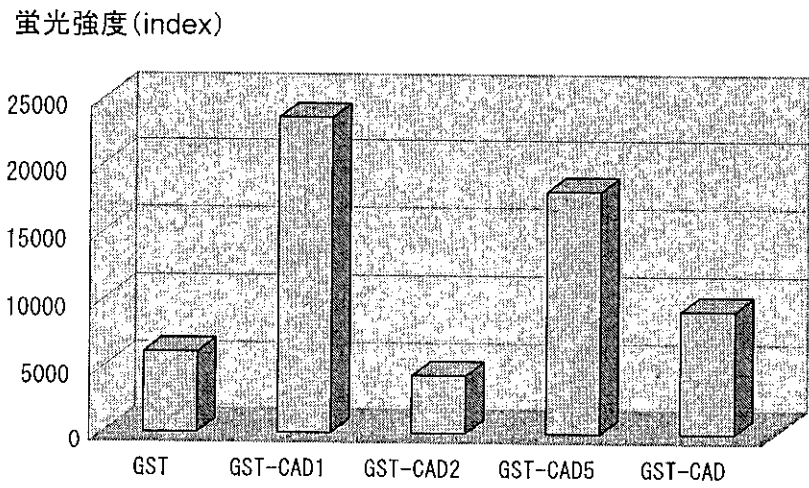


図 3. 各E-cadherin細胞外ドメインの $\alpha_E\beta_7$ との結合試験

多発性筋炎・皮膚筋炎に見出された抗Mi-2抗体の臨床免疫学的意義 に関する研究

分担研究者： 平形 道人 慶應義塾大学医学部内科・講師

研究要旨

抗Mi-2抗体は、皮膚筋炎(DM)と関連する自己抗体として欧米で報告されている。しかし、本邦での同抗体の臨床的意義は不明である。本研究では、多数の日本人膠原病患者血清を対象とし、抗Mi-2抗体の臨床的意義および対応抗原エピトープにつき追究した。免疫沈降法(IPP法)により膠原病血清をスクリーニングし、新たに7例の抗Mi-2抗体陽性血清を見出した。プロタイプ血清を加えた抗Mi-2抗体陽性8血清はいずれも240kDa蛋白(p240)を沈降したが、他のMi-2抗原構成蛋白は沈降しなかった。次に、免疫アフィニティークラムにより精製したMi-2抗原を用い、免疫プロットで患者血清との反応性を検討した。抗Mi-2抗体陽性血清は全例がp240を認識し、p240に主要なエピトープが存在する可能性が示唆された。抗Mi-2抗体は、DM 52例中7例と膠原病重複症候群(OL) 80例中1例(多発性筋炎-全身性硬化症(PM-SSc)OL)に検出され、同抗体はDMの疾患標識抗体であることが確認された。さらに、抗Mi-2抗体陽性例では、間質性肺炎と関節炎の頻度が低く、治療反応性が良好なDMという特徴的な臨床像を呈することが明らかとなった。

A. 研究目的

膠原病は、自己細胞成分に対する多彩な自己抗体産生を特徴とする。これらの自己抗体は特定の臨床像と密接に関連し、診断や治療反応性、予後推定など臨床的に有用であるばかりでなく、細胞内分子の構造と機能解明にも役立つ。多発性筋炎・皮膚筋炎(PM/DM)患者血清中には、抗Jo-1抗体を初めとする抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体、抗SRP抗体などが報告され、その臨床的意義が報告されている。抗Mi-2抗体は二重免疫拡散法(DID)により筋炎患者血清中に見出された自己抗体で、DMとの密接な関連が欧米の諸施設で報告されてきた。しかし、本邦での同抗体の臨床的意義は不明である。本研究では、多数の日本人膠原病患者血清を用い、抗Mi-2抗体の臨床免疫学的特徴を明確にすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象血清

慶應義塾大学病院を受診した膠原病患者963例(PM/DM 119例、全身性エリテマトーデス(SLE) 532例、全身性硬化症(SSc) 207例、PM-SSc重複症候群(OL) 80例、その他の膠原病25例、と健常人60例より血清を得た。抗Mi-2抗体の標準血清(KT血清)は、国立病院東京医療センター西海正彦博士より

供与された。

2. 免疫沈降法(immunoprecipitation assay: IPP)

Lerner & Steiz の方法に準じ、HeLa細胞抽出物を抗原として、免疫沈降法を行った。自己抗体が免疫沈降する蛋白(P)成分は10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分画、核酸成分は尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動(UREA-PAGE)で分画し、オートラジオグラフィー・銀染色で検出した。

3. 免疫プロット法(Immunoblots)

免疫プロット法はTowbinらの方法により行った。

4. 蛍光抗体法(Fluorescent anti-nuclear antibodies; FANA)

フルオロHEPANAテスト(MBL社)により、HEp-2細胞を基質とし、患者血清中の抗体を蛍光抗体法で検出した。

5. 免疫アフィニティークラムによるMi-2抗原の精製

抗Mi-2抗体IgGををimmobilized protein A column(PIERCE社)に非可逆的に結合させ、免疫アフィニティークラムを作製し、全HeLa細胞抽出物をカラムに加え、カラムを洗浄後、0.1Mグリシンバッファーにより、Mi-2抗原を溶出した。

7. 臨床的特徴の分析

抗Mi-2抗体陽性例の臨床的特徴を分析した。

C. 研究結果

1. 蛋白-免疫沈降(P-IPP)法による抗Mi-2抗体の検出

P-IPP法により, 抗Mi-2抗体標準血清(KT血清)と同様に, 膠原病患者血清中に分子量240kDa蛋白を免疫沈降する7血清を新たに得た(図1). 次に, これら患者血清が沈降する240kDa蛋白がMi-2抗原の240kDa蛋白(p240)と同一であるかどうかを調べた. 患者血清の免疫沈降物を抗原として, 抗Mi-2抗体標準血清(KT)を一次抗体とした免疫プロットを行った. 免疫沈降物中の240kDa蛋白はいずれもKT血清により認識され, 患者血清中の自己抗体が抗Mi-2抗体であることが確認された(図2).

2. 抗Mi-2抗体の対応抗原エピトープの分析

1)免疫プロット法による抗Mi-2抗体陽性血清の反応性の検討: 全HeLa細胞抽出物を抗原として用いた免疫プロットでは, 抗Mi-2抗体陽性血清はいずれの蛋白も認識しなかった. 次に, 抗Mi-2抗体陽性SY血清より免疫アフィニティ精製Mi-2抗原を用いた免疫プロットを行ったところ, 240kDa蛋白は, 抗Mi-2抗体陽性血清全例によっても認識された. 一方, Mi-2構成蛋白と報告された他の蛋白との反応は明らかでなかった.

2)RNA-IPP法による核酸蛋白複合体との反応性の検討: 抗Mi-2抗体陽性8血清は, UREA-PAGEでいかなる核酸成分も免疫沈降しなかった.

3)蛍光抗体法によるMi-2抗原の細胞内局在の検討: 抗Mi-2抗体陽性患者血清は, HEP-2細胞を基質とした蛍光抗体法で微細顆粒状の核染色を示し, Mi-2抗原の核への局在が示唆された.

3. 臨床的特徴の分析

膠原病患者血清のスクリーニングにより, 抗Mi-2抗体は8例に検出された. 陽性例の臨床診断は, DM(52例中7例, 13%)とOL(80例中1例(PM-SSc OL))であった. 同抗体は, PM(67例)や他の膠原病(764例), 健常人(60例)では検出されず, DMの疾患標識抗体となることが確認された(表1). 陽性患者血清中には, 他の筋炎特異自己抗体の併存はみられなかった. 次に, 抗Mi-2抗体陽性例の臨床特徴を検討したところ, 間質性肺炎(8例中1例)と多発関節炎(8例中2例)の頻度が低かった. 治療反応性については, 1例は薬物治療を必要とせず寛解し, 残りの7例でもステロイド治療で軽快し, 治療反応性良好なDMと関

連した(表2).

D. 考察

1. 抗Mi-2抗体の臨床的意義

抗Mi-2抗体は, 臨床的にDMとの密接な関連が欧米の諸施設より報告されてきたが, 本邦での同抗体の陽性率は非常に低いとされていた. その原因は, 従来抗Mi-2抗体の検出に用いられてきたDIDが多量の標準血清を必要とし, 低感度なため, 十分な検索を施行できなかったためと考えられる. 本研究では, 感度および特異性に優れたIPP法により多数血清での検討を行い, 抗Mi-2抗体はDM 7例とSSc-PM OL 1例に陽性で, 欧米の報告と同様, 本邦でもDMの疾患標識抗体となることが初めて確認された. DMにおける出現頻度は52例中7例(13%)で, Targoffらの15-20%(ELISA)という米国の報告とほぼ一致した. 近年, 自己抗体の産生が免疫遺伝学的に規定されていることを示す成績がみられる. 欧米白人での抗Mi-2抗体とHLAの相関では, HLA-DR7との強い正の相関, DR3と負の相関が報告されている. 免疫遺伝学的な検討は今後の課題と考える.

臨床特徴の検討では, 抗Mi-2抗体陽性例は, 間質性肺炎, 関節炎を特徴とする抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体, 治療抵抗性筋炎を特徴とする抗SRP抗体などの筋炎特異自己抗体と異なり, 間質性肺炎と関節炎の頻度が低く, 治療反応性が良好なDMサブセットと関連する可能性が考えられた.

2. 抗Mi-2抗体の対応抗原エピトープ

Nilasenaらは, 抗Mi-2抗体はP-IPP法により, 240, 200, 150, 75, 65, 63, 50および34kDaの8つの蛋白を沈降することを示した. 本研究では, P-IPP法によりp240は全8血清が認識したが, p240以外の構成蛋白との反応は明らかでなかった. その理由として以下の可能性があげられる. 第一に, 日本人患者血清の抗体価が欧米人に比べ低い可能性である. 第二に, 日本人患者血清の認識する抗原エピトープが欧米人血清と異なり, 蛋白複合体を構成した時には認識されにくいエピトープとなることも考えられる. 次に, アフィニティ精製抗原を用いた免疫プロットによるエピトープの検討で, 全例がp240を認識したが, 他のMi-2構成蛋白は患者血清により認識されなかった. 以上より, 日本人の抗Mi-2抗体の主要抗原エピトープがp240分子上に存在することが示唆された. 一方, 欧米人血清での免疫プロットの成績では, p240を約半

数の血清が認識し、加えて65/63kDa蛋白を多くの血清が認識することが示されている。さらにMi-2抗原の主要なエピトープがconformationalエピトープであることを示唆する報告もある。この人種による抗体の反応様式の相違は、自己抗体産生における免疫遺伝学的背景を考える上で、興味深い知見である。今後、抗Mi-2抗体の対応抗原を分子レベルで解明すると共に、T細胞の抗原認識機構を解析し、自己抗体産生機序を追究することが必要である。

近年、Mi-2抗原の構造と機能の解析が進み、Mi-2抗原はヘリケースファミリーに属し、巨大蛋白複合体を構成する可能性が注目されている。今後、さらにMi-2抗原の詳細な構造と生物学的機能を追究することにより、PM/DMの病因・病態の解析上有用な情報がもたらされることが期待される。

E. 結論

PM/DMの特異自己抗体として欧米で報告された抗Mi-2抗体について、日本人膠原病患者血清を対象に臨床免疫学的意義を検討した。同抗体はDMの疾患標識抗体であり、陽性症例は間質性肺炎と関節炎の頻度が低く、治療反応性が良好な臨床サブセットを形成する可能性が示唆された。また、抗Mi-2抗体の主要な抗原エピトープが、240kDa蛋白に存在することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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
 2. 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
 3. 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
 4. 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
- 学会発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図 1. 抗Mi-2抗体が免疫沈降する蛋白成分

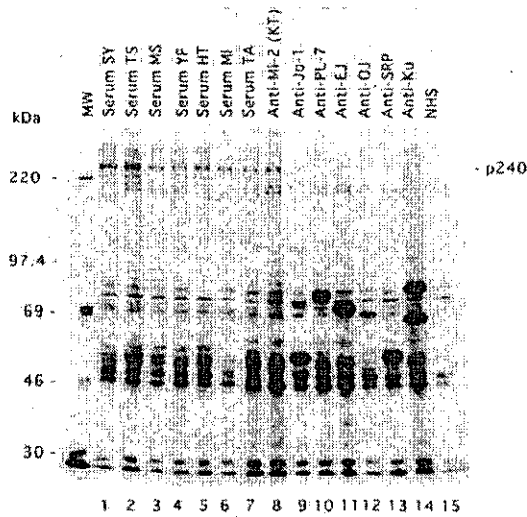


図 2. 免疫沈降物中の240kDa蛋白の分析

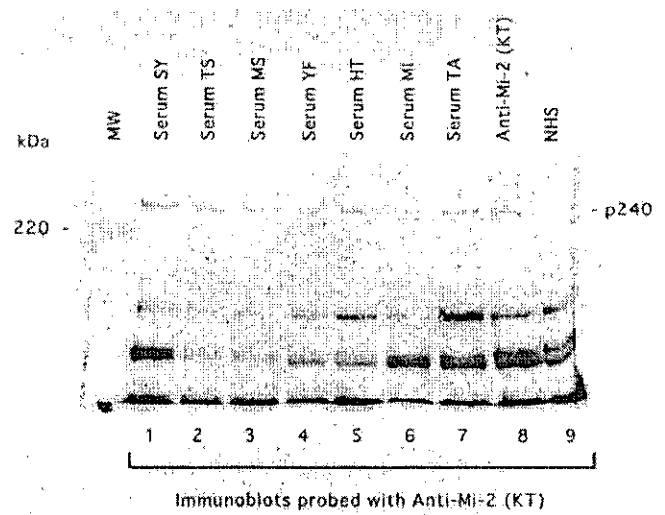


表 1. 抗 Mi-2 抗体の陽性率

診断名	陽性数 / 検索数
多発性筋炎 (PM)	0 / 67 (0 %)
皮膚筋炎 (DM)	7 / 52 (13 %)
全身性エリテマトーデス (SLE)	0 / 532 (0 %)
全身性硬化症 (SSc)	0 / 207 (0 %)
混合性結合組織病 (MCTD)/ 重複症候群 (OL)	1 / 80 (1 %)
シェーグレン症候群 (SjS)	0 / 10 (0 %)
関節リウマチ (RA)	0 / 5 (0 %)
成人発症スティル病 (AOSD)	0 / 3 (0 %)
自己免疫性肝炎 (AIH)	0 / 2 (0 %)
抗リン脂質抗体症候群 (APS)	0 / 1 (0 %)
ウェゲナー肉芽腫症 (WG)	0 / 1 (0 %)
結節性多発動脈炎 (PN)	0 / 1 (0 %)
リウマチ性多発筋痛症 (PMR)	0 / 1 (0 %)
キャッスルマン病	0 / 1 (0 %)
健常人	0 / 60 (0 %)

表 2. 抗 Mi-2 抗体陽性例の臨床特徴

DM 疹	88 % (7/8)
発熱	25 % (2/8)
多発関節炎	25 % (2/8)
レイノー現象	13 % (1/8)
漿膜炎	13 % (1/8)
間質性肺病変	13 % (1/8)
心電図異常	0 % (0/8)
血管炎症状	0 % (0/8)
治療反応性良好	100 % (8/8)

難治性筋炎におけるT細胞リクルートメント制御機構とその人為的制御

分担研究者： 南木 敏宏 東京医科歯科大学学生体応答調節学・助手

研究要旨

皮膚筋炎・多発性筋炎患者の筋炎症組織への炎症細胞浸潤にはケモカイン・ケモカインレセプターが深く関与すると考えられる。筋炎モデルマウスを樹立し、筋炎症組織で産生されるケモカインを解析した。また、ヒト筋芽細胞からのケモカインの産生を解析した。

A.研究目的

皮膚筋炎および多発性筋炎は、原因不明の難治性の炎症性筋疾患である。一般に副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤などが投与されているが、薬剤抵抗性の患者も多数みられ、治療薬は十分ではなく、新規治療薬の開発が期待されている。患者の罹患筋組織には炎症細胞浸潤がみられ、その炎症細胞から炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞障害性分子などの発現がみられ、皮膚筋炎・多発性筋炎の病態形成に深く関与している。その炎症細胞浸潤にはケモカイン・ケモカインレセプターが関与していると考えられているが、皮膚筋炎・多発性筋炎の炎症細胞浸潤に関与するケモカインについての報告は少なく、どのケモカイン・ケモカインレセプターが炎症細胞浸潤に重要であるかについては不明な点が多い。

そこで、皮膚筋炎・多発性筋炎の病態形成に関与するケモカイン・ケモカインレセプターを詳細に解析し、そのケモカイン・ケモカインレセプター相互作用阻害剤による新規治療薬の開発を目的とする。

B.研究方法

SJL/Jマウス（5週令、雄）にrabbit myosinとcomplete Freund's adjuvant (CFA)のエマルジョンを皮内投与し(day 1)、day 8, 15, 22, 29にrabbit myosin + CFAの皮内投与を繰り返し施行した。Day 36にマウスをsacrificeし、大腿筋のHE染色を行った。

コントロールマウス（正常マウス）、および筋炎モデルマウスの大腿筋組織からtotal RNAを抽出し、各種ケモカインの発現を、RT-PCRで比較した。

また、ヒト筋芽細胞を*in vitro*において、IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β で刺激し、各種ケモカインの発現を、RT-PCRで解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験においては、動物愛護などに配慮して行った。

C.研究結果

SJL/Jマウスに対しrabbit myosin + CFA投与を週に1回繰り返す、day 36にマウス大腿筋を組織学的に観察した。ヒトの皮膚筋炎・多発性筋炎患者と同様に、筋組織に多数の炎症細胞の浸潤が認められた（図1）。

筋炎モデルマウス筋組織、およびコントロール筋組織（正常マウスの筋組織）より、total RNAを抽出し、各種ケモカインの発現をRT-PCRで解析した。筋炎発症組織では、コントロール筋組織と比較し、CCL2 (monocyte chemotactic protein (MCP)-1), CCL3 (macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (regulated upon activation normally T cell expressed and secreted (RANTES)), CCL8 (MCP-2), CXCL9 (monokine induced by IFN- γ (Mig)), CXCL10 (interferon- γ -inducible protein (IP)-10), CXCL11 (interferon- γ -inducible T-cell α chemoattractant (I-TAC)), CXCL16, CX3CL1

(fractalkine)の発現が増強していた(図2A, B)。一方、CCL9 (EB11-ligand chemokine (ELC)), CCL21 (secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC)), CCL22 (macrophage-derived chemokine (MDC)), CXCL12 (stromal cell-derived factor (SDF)-1)ではその発現に明らかな差はみられなかった。また、CCL7 (MCP-3), CCL20 (liver and activation-regulated chemokine (LARC))の発現は認められなかった。

ヒト筋芽細胞のcell lineを用いて、*in vitro*での各種ケモカインの発現をRT-PCRで解析した。無刺激下でも、CCL2, CCL4, CCL7, CCL13 (MCP-4), CCL20, CXCL11, CXCL16の発現がみられた。IFN- γ 刺激により、CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16の発現が亢進した。また、TNF- α , IL-1 α , IL-1 β の刺激により、CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL19, CCL20, CXCL10, CXCL11, CXCL16の発現が亢進した。CCL21, CCL22, CX3CL1の発現はみられなかった。

D. 考察

SJL/Jマウスに、rabbit myosinをCFAとともに繰り返し免疫することにより、皮膚筋炎・多発性筋炎患者の炎症筋組織でみられるのと同様に、マウスの筋組織に炎症細胞の浸潤がみられた。このマウスが、皮膚筋炎・多発性筋炎のモデルマウスなりうると考えられる。

筋炎モデルマウスにおいて、罹患筋組織では、各種ケモカインの発現の増強がみられた。これまでに、Th1型T細胞にはCCR5, CXCR3, CX3CR1の発現が増強していることが報告されているが、筋炎マウスの筋組織で発現が増強していたCCL3, CCL4, CCL5はCCR5のリガンドであり、CXCL9, CXCL10, CXCL11はCXCR3のリガンド、CX3CL1はCX3CR1のリガンドである。筋炎組織で発現しているこれらのケモカインは、CCR5, CXCR3, CX3CR1を介してT細胞(特にTh1型T細胞)の浸潤に関与している可能性がある。CX3CR1はTh1型T細胞に発現するとともに、末梢血cytotoxic T細胞にその発現が報告されており、CX3CL1はCX3CR1を介してcytotoxic T細胞の浸潤にも関与している可

能性がある。

また、マクロファージにはCCR2, CCR5などの発現が報告されており、それらのリガンドケモカインであるCCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8がマクロファージの浸潤に関与していることが推測される。

ヒト筋芽細胞は、*in vitro*で無刺激でもいくつかのケモカインの産生がみられたが、皮膚筋炎・多発性筋炎の炎症部位で発現していることが報告されているIFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β で刺激することにより、ケモカインの産生が亢進した。筋組織においては、炎症細胞からのみならず、筋細胞からもケモカインが産生され、炎症細胞浸潤に関与している可能性がある。

皮膚筋炎・多発性筋炎患者の炎症筋組織では、著明な炎症細胞浸潤が認められ、TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ などの炎症性サイトカイン、granzyme A, perforinなどの細胞障害性分子が発現され、病態形成に深く関与していると考えられている。炎症性サイトカインは、マクロファージ、T細胞などの浸潤細胞より主に産生され、細胞障害性分子は浸潤しているT細胞より発現されている。産生された炎症性サイトカインは、筋細胞、血管内皮細胞、および浸潤している炎症細胞からのケモカイン産生をさらに亢進し、さらなる炎症細胞浸潤を促進し、筋炎の病態形成に関与していると考えられる。

今後、筋炎モデルマウスを用いて、ケモカインの発現をより詳細に検討し、また浸潤している炎症細胞に発現するケモカインレセプターの解析が必要である。また、ケモカイン・ケモカインレセプター相互作用を阻害することによる、筋炎の抑制効果を検討し、皮膚筋炎・多発性筋炎の新規治療薬の開発を目指す予定である。

E. 結論

皮膚筋炎・多発性筋炎のモデルマウスが作成できた。炎症筋組織ではいくつかのケモカインの発現の亢進がみられ、炎症細胞浸潤に関与していると考えられる。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

1) 論文発表

* Toshihiro Nanki, Toshio Imai, Kenji Nagasaka, Yasuyo Urasaki, Yoshinori Nonomura, Ken Taniguchi, Kenji Hayashida, Jun Hasegawa, Osamu Yoshie, Nobuyuki Miyasaka. Migration of CX3CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46(11): 2878-2883, 2002.

* Hermann J. Girschick, Amrie C. Grammer, Toshihiro Nanki, E Vazquez, Peter E. Lipsky. Expression of recombination activating genes 1 and 2 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 46(5): 1255-1263, 2002.

2) 学会発表

* Toshihiro Nanki. A role for chemokine and chemokine receptor interactions for T cell migration into RA synovium. University of Texas San Antonioにてseminar. 2002/10/25.

* 南木敏宏、今井俊夫、長坂憲治、野々村美紀、谷口顕、林田賢治、長谷川潤、義江修、宮坂信之。CX3CL1/CX3CR1相互作用による慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織へのT細胞浸潤。第67回日本インターフェロン/サイトカイン学会。2002。

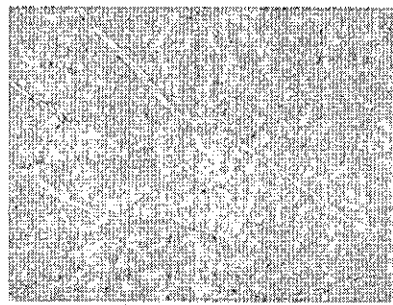
* 南木敏宏、今井俊夫、Peter E. Lipsky、宮坂信之。慢性関節リウマチ滑膜組織へのT細胞浸潤に関与するケモカインの解析。第23回日本炎症・再生医学学会。2002。

* Toshihiro Nanki. A role for chemokine and chemokine receptor interactions for T cell migration into RA synovium. NIHにてseminar. 2002/2/25.

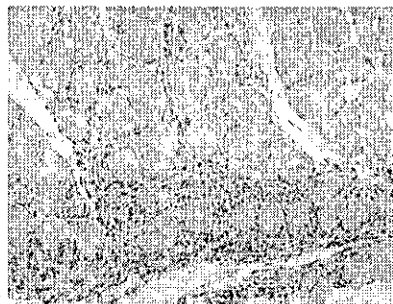
* 南木敏宏、今井俊夫、長坂憲治、野々村美紀、谷口顕、林田賢治、長谷川潤、宮坂信之。CX3CL1/CX3CR1相互作用による慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織へのT細胞浸潤。第46回リウマチ学会総会。2002。

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし。



正常マウス



筋炎マウス

図1 筋炎モデルマウス

SJL/J マウスに rabbit myosin + CFA を day 1 より 1 週間に一度繰り返し投与し、day 36 に大腿筋を観察。
(HE x200)

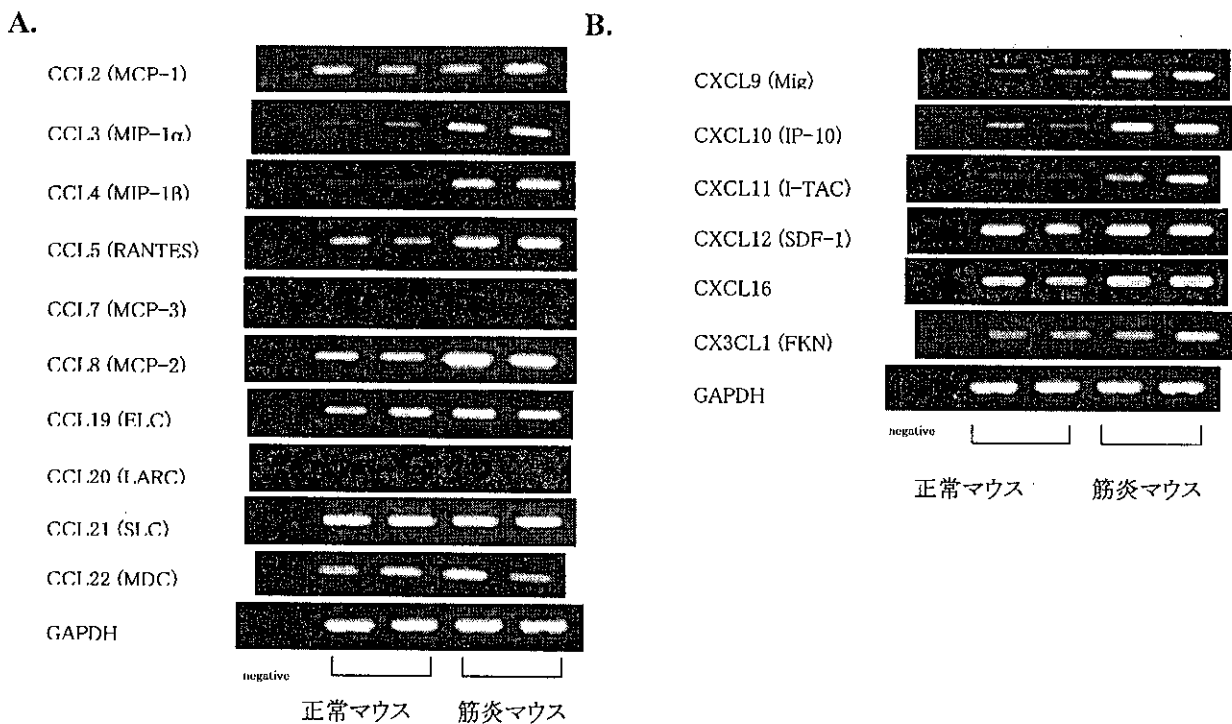


図2 筋炎モデルマウス筋組織からのケモカイン産生

正常マウス、および筋炎モデルマウスの筋組織からのケモカインの産生をRT-PCRで解析。CC chemokine (A), CXC and CX3C chemokine (B)。

中枢神経ループスの病態形成における抗リボソームP抗体の役割の解析に関する研究

分担研究者： 広畑 俊成 帝京大学医学部内科・助教授

研究要旨 本研究において、我々はヒト単球系細胞表面上のリボソームP抗原の発現および抗リボソームP抗体が単球系細胞からの血管内皮増殖因子(VEGF)の産生に与える影響について検討した。単球系細胞は、休止期ではリボソームP抗原を発現しないが、活性化に伴いリボソームP抗原を表面に発現する。抗リボソームP抗体は活性化した単球系細胞からVEGFの産生を増強することが明らかとなった。抗リボソームP抗体は単球系細胞からVEGFの産生を亢進することにより、SLEの様々な病態に影響を及ぼす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(SLE)は、多臓器を侵す自己免疫疾患で多種類の自己抗体の出現が大きな特徴である。抗リボソームP抗体はSLE患者の12-16%に認められ、CNSループスを含むSLEのいくつかの病態と関連することが明らかにされている。我々は、抗リボソームP抗体が活性化したT細胞と結合し、B細胞とは反応しないことを報告した。これは、抗リボソームP抗体が免疫系に直接影響を与える可能性を示唆する。一方、単球系細胞表面上のリボソームP抗原の発現については、これまで明らかにされていない。今回我々は、抗リボソームP抗体の単球系白血病細胞株THP-1と末梢血単球に対する反応性の有無および抗リボソームP抗体が単球系細胞からの血管内皮増殖因子(VEGF)の産生に与える影響について検討した。

B. 研究方法

抗リボソームP抗体陽性のSLE患者血清よりProtein G Sepharose 4FFカラム(アマルシヤム社)を用いてIgGを精製した。さらにこのIgGからリボソームPペプチド-ヒトアルブミン複合体を結合したNHS-activated Sepharose HPカラム(アマルシヤム社)を用いて、抗リボソームP抗体を精製した。その際、素通りの分画として、抗リボソーム

P抗体を含まない患者IgGを得た。

健常成人の末梢静脈血から比重遠心法により末梢血単核球(PBMC)を得、MACS Monocyte Isolation Kit(ミルテニイバイオテック社)を用いて単球を分離した。

THP-1(4×10^5 /ml)を抗リボソームP抗体あるいは対照ヒトIgG($5 \mu\text{g/ml}$)と共に24時間培養後、細胞および培養上清を回収した。単球は、IFN- γ (1000 units/ml)の存在あるいは非存在下で、抗リボソームP抗体あるいは対照ヒトIgG($5 \mu\text{g/ml}$)と共に培養し、48時間培養後に細胞を回収し、5日間培養後に培養上清を回収した。

細胞表面上のリボソームP抗原の発現をフローサイトメトリーにて検討した。細胞を抗リボソームP抗体あるいは対照ヒトIgGと2%ヤギ血清を含むPBS液中で4°Cで30分反応させた。その後FITC標識F(ab')²ヤギ抗ヒトIgG(カペル社)と4°Cで30分間反応させ、propidium iodide ($50 \mu\text{g/ml}$)を添加した後、EPICS XLフローサイトメーター(コールター社)を用いて染色パターンを解析した。propidium iodide陽性の死細胞を解析から除外した。

培養上清中のVEGFは、Human VEGF ELISA Kit(バイオソース社)を用いて測定した。

総RNAはTRIzol試薬(インビトロジェン社)を

用いて精製した。1 μ gのRNAより、オリゴdTプライマーを用いて、cDNAを合成した。VEGFのmRNAの定量は、LightCycler (ロシュ社) を用いて、SYBR Green染色にて行った。内部標準として、 β -actinを使用した。

(倫理面への配慮)

血液提供者に対しては、文書にてインフォームドコンセントを得た上でそのプライバシーが保護されるよう配慮する。

C. 研究結果

4名のSLE患者血清から精製した抗リボソームP抗体は、いずれもTHP-1と強い結合を示した。THP-1の表面上には、恒常的にリボソームP抗原の発現が認められることが明らかとなった。末梢血単球は活性化していない状態ではリボソームP抗原を発現していなかったが、IFN- γ (1000 units/ml)の存在あるいは非存在下でプレートへの接着刺激後3日目以後においては、単球の表面には有意のリボソームP抗原の発現が認められた。以上より、単球系細胞は、活性化に伴いリボソームP抗原を表面に発現することが明らかとなった。

抗リボソームP抗体は対照IgGに比し、用量依存性にTHP-1からのVEGFの産生を亢進させた。さらに、6名のSLE患者から精製した抗リボソームP抗体について検討したところ、抗リボソームP抗体は対照IgGおよび抗リボソームP抗体を含まない患者IgGと比し、統計学的に有意にTHP-1からのVEGF産生を亢進させた。同様に、抗リボソームP抗体は、IFN- γ (1000 units/ml)の存在下で、有意に単球からのVEGF産生を亢進させた。

リアルタイムPCR法により、抗リボソームP抗体は対照IgGおよび抗リボソームP抗体を含まない患者IgGと比し、有意にTHP-1でのVEGF mRNAの発現を亢進することが明らかとなった。同様に、抗リボソームP抗体は、IFN- γ (1000 units/ml)の存在下で、著明に単球でのVEGF mRNAの発現を増強した。

D. 考察

CNSループスではCNS内での免疫異常が病態形成上重要な役割を果たすことが明らかにされている。抗リボソームP抗体は、活性化した単球系細胞と結合することによりVEGFの産生を亢進させるだけではなく、単球系細胞のその他の機能にもさまざまな影響を与える可能性が考えられる。抗リボソームP抗体は、単球系細胞からVEGFや未検討ではあるがその他のサイトカインの産生を増強することにより、血管透過性を亢進させ、さらに血管内皮細胞に接着分子を誘導することにより、CNS内への免疫担当細胞の侵入を容易にし、CNS内での免疫異常の発生に関与している可能性が考えられる。

E. 結論

単球系細胞は、活性化に伴いリボソームP抗原を表面に発現する。抗リボソームP抗体は単球系細胞からVEGFの産生を増強することにより、SLEの様々な病態に影響を及ぼす可能性が示唆された。抗リボソームP抗体が単球系細胞に結合することにより生じる機能変化をさらに解析していくことが、CNSループス発症機序の解明の上でも重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

・ Hirohata S, Ohshima N, Yanagida T, Aramaki K. Regulation of human B cell function by sulfasalazine and its metabolites. *Int Immunopharm* 2: 631-640, 2002.

・ Hirohata S, Yanagida T, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Bone marrow CD34+ progenitor cells stimulated with stem cell factor and GM-CSF have the capacity to activate IgD- B cells through direct cellular interaction. *J Leukoc Biol* 71: 987-995, 2002.

・ Matsuda T, Ohno S, Hirohata S, Miyanaga Y, Ujihara H, Inaba G, Nakamura S, Tanaka S, Kogure M, Mizushima Y. Efficacy of Rebamipide as Adjunctive Therapy in the Treatment of Recurrent Oral Aphthous Ulcers in Patients with Behcet's Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Drugs R D* 4:19-28, 2003.

2.学会発表

・ Shibuya H, Nagai T, Yamamoto K, Ishii A, Hirohata S. Differential regulation of Th1 responses and CD154 expression in human CD4+ T cells by IFN- α . 66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, New Orleans, Arthritis Rheum (Suppl.): S248, 2002.

・ Nagai T, Shibuya H, Yamamoto K, Hirohata S. Antiribosomal P protein antibody reacts with activated human monocyte-lineage cells and enhances their

expression of vascular endothelial growth factor. 66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, New Orleans, Arthritis Rheum (Suppl.): S280, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定含む。)

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