

体の出現と、prothrombinのrs5896変異との関連を検討した。

抗リン脂質抗体の出現とrs5896： SLE患者において、IgGクラスとIgMクラスのaPS/PTと、LAおよび、IgG、IgM、IgA各クラスの抗カルジオリピン抗体を測定し、rs5896変異との関連を検討した。aPS/PT 抗体陽性者と陰性者のrs5896の表現型は、IgGクラス、IgGまたはIgMクラスのaPS/PT抗体が陽性者群は、陰性者群に比べ、rs5896がT/Tの症例の割合が多く、Cアレルを持つ症例の割合が少ない傾向が認められたが、統計学的有意差はなかった。LA陽性者においてもT/Tの表現型を持つ患者の頻度が高かった。しかし、aCL陽性者においては、IgGクラス陽性者は、T/Tの頻度が高かったが、IgM陽性者、IgA陽性者、IgG、IgM、IgAどれかのクラス陽性者においては、T/Tの頻度は、陰性者に比べ低い傾向か同等であったが有意差はなかった。

rs5896の各表現型における、各抗体陽性率を検討したところ、rs5896 T/Tにおいて、IgG aPS/PT、aPS/PT全体、LAが陽性となる頻度が高かったが有意差は認めなかった。しかし、aCLにおいては一定の傾向が認められなかった。

#### D. 考 察

抗リン脂質抗体症候群においては、その疾患マーカーであり、病態形成に深く関与すると考えられているaCLの出現と、aCLの対応抗原である、 $\beta$ 2-グリオプロテインIのSNPsとの関連が示された。aCLと同様に抗リン脂質抗体症候群の発症・病態形成と深く関わっているaPS/PTの対応抗原であるプロトロンビンのSNPsに関しても、NCBIのSNPsデータベース上には、6個の翻訳領域のSNPsが報告され、rs5896、rs5897の2個のSNPsはアミノ酸置換を伴うと示されている。しかし、これらのSNPsの本邦におけるアレル頻度は明らかにはされておらず、自己免疫疾患におけるaPS/PTを初めとする抗リン脂質抗体産生との関連に関する検討はされていない。本研究では、これらの変異と、抗リン脂質抗体産生の関連を検討

した。

NCBI SNPsデータベース上では、rs5896のC、Tの頻度は、0.92 : 0.08とCの頻度が多いが、本研究では、日本人では、C : Tは、0.36 : 0.64とTが有意に多かった。また、rs5897は、検討した、健常人、SLE患者ともに見つからず日本人では非常に希な変異であると考えられた。対象の人種等が影響している可能性が考えられた。日本人は、欧米に比べ抗リン脂質抗体症候群が重症化しにくいのではないかとされているが、その原因として、rs5896の表現型の違い等の遺伝的な素因の違いが関与している可能性がある。しかし、本研究で検討したSLE患者群には、劇症型抗リン脂質抗体症候群患者は含まれておらずrs5896と劇症型抗リン脂質抗体症候群発症との関連は検討できなかった。SNP rs5897は検討したSLE患者、健常人全例がC/Cであった。NCBIのデータベースのCアレルの頻度が、0.975であることより、日本人でも、rs5897変異は、欧米と同様に非常に希であると考えられた。

統計学的な有意差は証明できなかったが、IgG、IgMどちらのクラスにおいてもaPS/PT陽性者にrs5896 T/Tが多い傾向があり、逆に、rs5896 T/TのSLE患者に、Cアレルを持つ患者よりも高率にaPS/PTが出現する傾向があり、rs5896 T/TとaPS/PT陽性との関連が示唆された。aCLでは、このような傾向が認められなかったことより、rs5896 T/Tとの関連は、aPS/PTに特異的である可能性がある。このSNPによるアミノ酸変異が、抗体産生に直接関わっているのか、抗体産生機構との連鎖不平衡なのかについては今後の検討が必要である。LAは、aPS/PTと同様にT/Tの表現型を持つSLE患者に多く出現し、逆にLA陽性者にはT/Tであることが多い。この結果は、LAの主要な対応抗原がフォスファチジルセリンとプロトロンビンの複合体であるとする報告があり、aPS/PTとrs5896 T/Tが関連することを反映していると考えられ、上記の報告にて説明できる。

本研究において、SLE患者における、プロトロンビンのSNP rs5896の多型性とaPS/PT産生

との関連が示唆され、自己抗体の産生機構に、対応抗原の多型性が影響を与える可能性が示された。今後、症例の集積を行うとともに、遺伝的素因の、自己抗体産生に及ぼす影響を解析し、遺伝子解析によってSLE患者の中からハイリスクグループを同定してゆける可能性が考えられた。

## E. 結 論

本研究において、SLE患者における、prothrombinのSNP rs5896の多型性とaPS/PT産生との関連が示唆され、自己抗体の産生機構に、対応抗原の多型性が影響を与える可能性が示された。今後、症例の集積を行うとともに、遺伝的素因の、自己抗体産生に及ぼす影響を解析し、遺伝子解析によってSLE患者の中からハイリスクグループを同定してゆける可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

PTのrs5896 Tアレルを持つSLE患者においては、劇症型抗リン脂質抗体症候群に高頻度にみられるLAの主要な対応抗原であるPS/PTに対する抗体が出現しやすく、注意深い診療を要することが示唆された。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Oku, K., Atsumi, T., Furukawa, S., Horita, T., Sakai, Y., Jodo, S., Amasaki, Y., Ichikawa, K., Amengual, O., Koike, T. Cerebral imaging by magnetic resonance imaging and single photon emission computed tomography in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. *Rheumatology*. 2003; 42:773-7

### 学会発表

1. 市川健司、小池隆夫。劇症型抗リン脂質抗体症候群。第47回日本リウマチ学会総会 2003年4月24日、東京

2. Ichikawa K, Koike T. Catastrophic antiphospholipid syndrome in Japanese population. 67<sup>th</sup> Annual scientific meeting of American

College of Rheumatology, October 26, 2003.  
Orlando, Florida, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

線維化病態におけるCD40-CD154シグナルを介した線維芽細胞と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

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、腎硬化症など線維化病変は依然難治性病態である。本研究テーマの目的は病的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である。昨年度は線維化モデルとして造血幹細胞移植後の慢性移植片対宿主病における涙腺病変の病理組織学的検討を行い、線維芽細胞とT細胞の相互作用が線維化病変形成に重要な役割を果たすこと、病変部の線維芽細胞はCD4<sup>+</sup>T細胞上に受容体が存在するHLA-DR、CD40、CD54を高発現することを見出した。そこで本年度は線維化組織における線維芽細胞が発現するCD40と活性化T細胞が一過性に発現するCD154の結合により導入されるシグナルに着目し、その線維芽細胞に及ぼす作用を追究した。ヒトCD40の全長遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを培養線維芽細胞に感染させ、CD40刺激後の増殖能および細胞外基質、サイトカイン、増殖因子受容体などの遺伝子発現の変化を調べた。CD40刺激は線維芽細胞の増殖に明らかな影響を与えなかったが、III型コラーゲンおよびPDGFR $\alpha$ のmRNAレベルでの発現を増強させた。したがって、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞によるCD40刺激が線維芽細胞における細胞外マトリックス産生を増強することが明らかとなった。また、CD40刺激がPDGF受容体の発現を増強させることから、線維化誘導因子PDGFに対する線維芽細胞の感受性を増強する可能性も考えられた。

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、これらの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存在する。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- $\beta$ が同定されているが、TGF- $\beta$ のもつ成長、分化、

免疫など多彩な機能のためにその阻害療法は副作用の点から実用化の可能性は低い。一方、TGF- $\beta$ 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ことから、病的線維化の誘導にはTGF- $\beta$ とともに他の因子の存在が必須である。そこで、本研究テーマでは線維化誘導にかかわるTGF- $\beta$ 以外の因子を同定し、それらを標的とした新しい治療法の開発につながることを目的とする。昨年度は線維化モデルとして造血幹細胞移植後の慢性移植片対宿主病における涙腺病変の病理組織学的検討を行い、線維芽細胞とT細胞の相互作用が線維化

病変形成に重要な役割を果たすことを報告した。また、病変部の線維芽細胞はCD4<sup>+</sup>T細胞上に受容体が存在するHLA-DR、CD40、CD54を高発現することを見出した。線維芽細胞は本来これらの分子を発現していないことから、病的プロセスにより発現誘導されたこれら分子を介したシグナルが線維芽細胞の活性化にかかわる可能性が考えられる。そこで本年度は線維芽細胞が発現するCD40と活性化T細胞が一過性に発現するCD154の結合により導入されるシグナルに着目し、その線維芽細胞に及ぼす作用をin vitroの実験系で検討した。

## B. 研究方法

### 1. 培養線維芽細胞の樹立

正常および慢性移植片対宿主病患者由来の皮膚、眼球結膜、涙腺組織の生検組織を培養することにより線維芽細胞の一次培養株を樹立した。

### 2. アデノウイルスベクターの作成

EBウイルス感染ヒトB細胞株からNCBIに登録されている配列と一致するCD40の全長遺伝子を分離した。CD40遺伝子はAdEasy<sup>TM</sup> Adenoviral Vector System (Stratagene社)を用いてアデノウイルスベクターに組み込んだ(CD40-AdV)。コントロールのインサートを挿入していないベクターとともに293細胞に導入して、ウイルス粒子を作成した。

### 3. 培養線維芽細胞におけるCD40発現誘導

培養線維芽細胞に様々なウイルス量のCD40-AdVを感染させ、3-7日後の細胞表面上のCD40蛋白の発現を調べ、至適な感染条件を決定した。このベクターは感染細胞で目的遺伝子とともにGFPを発現することから、感染効率はフローサイトメトリーによるCD40蛋白とGFPの共発現により確認した。

### 4. CD40シグナル導入が培養線維芽細胞に及ぼす影響の検討

培養線維芽細胞にCD40-AdVおよびコントロールAdVを感染させた。4日後に培地中の仔牛胎児血清濃度を0.5%へ下げて血清因子の影

響を最小限としてから、CD40モノクローナル抗体 (250ng/ml; Techne社) またはアイソタイプを一致させたコントロール抗体によりCD40からのシグナルを導入した。一部の実験では抗CD40抗体の代わりに可溶性CD154 (500ng/ml; Peprotech社) を用いた。

CD40刺激により誘導される細胞内シグナルは、刺激後2~30分後に回収した細胞抽出物中のI $\kappa$ B- $\alpha$ 総量とリン酸化I $\kappa$ B- $\alpha$ をPhosphoPlus I $\kappa$ B- $\alpha$  Antibody Kit (Cell Signaling社)を用いた免疫プロット法により半定量的に評価した。CD40刺激72時間後の細胞増殖は<sup>3</sup>H-サイミジンの取り込みにより評価した。また、CD40刺激72時間後の遺伝子発現変化はRT-PCRにより調べた。検索した遺伝子はI型およびIII型コラーゲン、フィブロネクチン、TGF- $\beta$ RII、PDGFR $\alpha$ 、HLA-DR、CTGF、IL-6、IL-8、CD54、CD106、 $\alpha$ SMA、Smad2、Smad3、Smad4、Smad6、Smad7、GAPDHであった。電気泳動後のバンド強度をデンシトメトリーにより半定量化し、GAPDHのバンド強度により補正した。

### (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

100MOIのCD40-AdVを感染させることにより、4日後にはほぼ全ての培養線維芽細胞でCD40蛋白の発現が確認され、viabilityも良好であった。感染効率は皮膚、眼球結膜、涙腺組織由来線維芽細胞いずれでも約100%であった。

CD40-AdV感染線維芽細胞に抗CD40抗体および可溶性CD154によるCD40刺激を加えると、I $\kappa$ B- $\alpha$ のリン酸化が2~30分で時間依存的に増強し、I $\kappa$ B- $\alpha$ の総量は減少した。したがって、培養線維芽細胞に強制発現させたCD40を介して細胞内シグナルが導入されることが確認された。CD40刺激はCD40発現線維芽細胞の細胞増殖に明らかな影響を与えなかったが、3

日後のIII型コラーゲンおよびPDGFR $\alpha$ の mRNA レベルでの発現を増強させた。他の細胞外基質、サイトカイン、接着分子、Smad蛋白の発現については再現性のある変化はみられなかった。

#### D. 考 察

病的な線維化組織では線維芽細胞増生と細胞外基質の蓄積に加えてT細胞を中心とした炎症性細胞浸潤を伴う。線維化組織で増加している線維芽細胞は通常は発現していないCD40を発現し、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞からの刺激が導入されれば単独でも細胞外マトリックス産生が増強されることが今回の検討から明らかとなった。今回の実験系ではTGF- $\beta$ 非存在下での結果であることから、CD40シグナルはTGF- $\beta$ 非依存性に線維化を誘導できる可能性が示された。またCD40刺激がPDGF受容体の発現を増強させることから、線維芽細胞の増殖や細胞外基質産生を促進するPDGFの作用を増強させる可能性がある。現在、遺伝子発現変化については定量的PCRによる経時的解析を行い、今回の結果を確認中である。また、線維芽細胞の活性化におけるCD40シグナルとPDGFとの協調作用についても検討する予定である。すでに臓器移植後の拒絶反応抑制の目的で抗CD154抗体が実用化されており、抗線維化療法への応用の可能性が示された。

#### E. 結 論

CD40-CD154シグナルを介した線維芽細胞と活性化CD4<sup>+</sup>T細胞の相互作用が病的線維化を誘導する要因のひとつであることが示された。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

論文発表

1) Ogawa Y, Kuwana M, Yamazaki K, Mashima

Y, Yamada M, Okamoto S, Oguchi Y, Kawakami Y. Periductal area as the primary site for T-cell activation in lacrimal gland chronic graft-versus-host disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1888-1896.

2) Kuwana M, Sato S, Kikuchi K, Kawaguchi Y, Fujisaku A, Misaki Y, Hatamochi A, Kondo H, Takehara K. Evaluation of functional disability using the Health Assessment Questionnaire in Japanese patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003; 30: 1253-1258.

3) Kuwana M, Pandey JP, Silver RM, Kawakami Y, Kaburaki J. HLA class II alleles in systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase I/III antibody: associations with subunit reactivities. *J Rheumatol* 2003; 30: 2392-2397.

4) Yasuoka H, Ihn H, Medsger TA Jr, Hirakata M, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. A novel protein highly expressed in testis is overexpressed in systemic sclerosis fibroblasts and targeted by autoantibodies. *J Immunol* 2003; 171: 6883-6890.

5) Kuwana M, Nomura S, Fujimura K, Nagasawa T, Muto Y, Kurata Y, Tanaka S, Ikeda Y. The effect of a single injection of humanized anti-CD154 monoclonal antibody on the platelet-specific autoimmune response in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004; 103: 1229-1236.

6) 桑名正隆、池田康夫：自己免疫疾患に対する抗CD154抗体療法。最新医学 2003; 58: 81-87.

学会発表

Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y: Impaired function of circulating endothelial precursors in patients with systemic sclerosis: Implication for pathogenesis of microvascular damage. The 67th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Orlando).

H. 知的所得権の出願・登録状況 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

われわれはこれまで、膠原病に伴う上皮傷害では、 $\alpha_E\beta_7$ /E-cadherin接着が重要な役割を演じていることを報告し、昨年度にはglutathione-S-transferase (GST)との融合タンパクとして発現させたrecombinant E-cadherin各ドメインを用いて $\alpha_E\beta_7$ が接着するE-cadherin上のエピトープとの結合態度を検討したところ、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ることを報告した。しかし、この測定法ではバックグラウンドが比較的高かったことと、CAD-GST3およびCAD-GST4融合タンパクが精製・回収できなかったことから、今回E-cadherin各ドメインと $\alpha_E\beta_7$ との接着アッセイの方法を改良し検討した。全長human E-cadherin cDNA (2,652 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 (CAD1-5-GST) として発現、精製した。GST融合タンパクを96穴細胞培養プレートに固相化し、 $\alpha_E\beta_7$ -K562 ( $\alpha_E$  mRNAと $\beta_7$  mRNAとをdouble-transfectしたK562細胞) をBCECFで標識したものを加え、蛍光プレートリーダーで吸光度を測定した。その結果、 $\alpha_E\beta_7$ -K562とCAD4-GSTならびにCAD3-GSTとの接着がもっとも強かった。これまでの報告では、 $\alpha_E\beta_7$ とE-cadherinとのheterophilicな接着においてはCAD1がもっとも重要であるとされてきたが、CAD4ならびにCAD3も重要なドメインであることが推察できた。

### A. 研究目的

従来から我々は、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・唾液腺傷害など膠原病における上皮傷害には、 $\alpha_E\beta_7$ /E-cadherin 接着が重要な役割を演じている事を明らかにしてきた<sup>1,2)</sup>。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。昨年度、glutathione-S-transferase (GST)との融合

タンパクとして発現させた recombinant E-cadherin 各ドメイン (CAD1-5) を用いて  $\alpha_E\beta_7$  が接着する E-cadherin 上のエピトープとの結合態度を検討したところ、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ることを報告した。しかし、この測定法ではバックグラウンドが比較的高かったことと、CAD-GST3 および CAD-GST4 融合タンパクが精製・回収できなかったことから、今回 E-cadherin 各ドメインと  $\alpha_E\beta_7$  との接着アッセイの方法を改良し検討した。

### 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  $\mu$ gをreverse transcriptase (Clontech社)を用いて一本鎖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

GST融合タンパク5.0  $\mu$ g/ml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。それと同時に $\alpha_E\beta_7$ -K562 ( $\alpha_E$  mRNAと $\beta_7$  mRNAとをdouble-transfectしたK562細胞) (UCSF Dr. Erleより供与)あるいはK562細胞5.0  $\times 10^6$ /mlにBCECF 5.0  $\mu$ g/ $\mu$ 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  $\mu$ 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度を測定した。

## C. 研究結果

健常人末梢血リンパ球 (PBL) から全mRNAを抽出し、reverse transcriptaseで全cDNAに変換した。既報<sup>3)</sup>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。その結果、CAD1, CAD2, CAD3, CAD4, 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, CAD3-GST, CAD4-GST, CAD5-GST, CAD-GST) と、キャリアタンパクであるGSTタンパクを回収することができ、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、GST融合タンパクならびにGSTタンパク5.0  $\mu$ g/ml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。それと同時に $\alpha_E\beta_7$ -K562あるいはK562細胞5.0  $\times 10^6$ /mlにBCECF 5.0  $\mu$ g/ $\mu$ 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  $\mu$ 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度を測定した。その結果、CAD1-GST, CAD2-GST, CAD3-GST, CAD4-GST, CAD5-GST, CAD-GST, GSTに $\alpha_E\beta_7$ -K562を加えた時の吸光度 (index) はそれぞれ124, 807 $\pm$ 10, 804, 106, 273 $\pm$ 11, 222, 134, 339 $\pm$ 14, 520, 157, 004 $\pm$ 15, 103, 91, 204 $\pm$ 6, 954, 141, 316 $\pm$ 11, 735, 12, 464 $\pm$ 914であり、CAD1-GSTだけでなくCAD3-GSTやCAD4-GSTと $\alpha_E\beta_7$ -K562との結合もより強い傾向にあった (図3)。

## D. 結語

以上のことから、 $\alpha_E\beta_7$ とE-cadherin接着において $\alpha_E\beta_7$ はCAD1, CAD3, CAD4を認識する傾向が認められたと考えられる。これまで、Taraszkaら<sup>3)</sup>は、 $\alpha_E\beta_7$ 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。しかし、今回の我々の検討では、CAD1 に加えて CAD3 および CAD4 も重要である可能性が示唆された。しかし今回の検討で使用した GST 融合タンパクは、E. coli によって発現されたりコンビナントタンパクであるため、本来 E-cadherin がもつ IgG 様の高次構造を有していない可能性があり、今後はより native に近い状態の E-cadherin と  $\alpha_E\beta_7$  との結合態度を検討するため、E-cadherin を哺乳動物細胞表面上に発現させた細胞を用いて E-cadherin と  $\alpha_E\beta_7$  との結合態度を検討する予定である。

#### 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<sup>+</sup>  $\alpha_E\beta_7$ <sup>+</sup> 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. 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

##### 1) 論文発表

#### 【原著】

1. Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, et al. *Exp Eye Res* 76: 233-240, 2003
2. Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. *J Immunol*. 171: 2496-2503, 2003

#### 【総説】

1. 津坂憲政。日本臨床免疫学会会誌, 26:

43-53, 2003

2. 津坂憲政, 竹内勤。治療, 85, 1925-1928, 2003
3. 津坂憲政。炎症と免疫, 11, 101-108, 2003
4. 津坂憲政。薬事日報, 9820, 23, 2003

#### 【学会発表】

1. Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. ACR 67th Annual Meeting, Orlando, U.S.A., October, 2003
2. Shiraishi K, Yoshimoto K, Tashiro S, et al. ACR 67th Annual Meeting, Orlando, U.S.A., October, 2003
3. Yoshimoto K, Setoyama Y, Suzuki K, et al. 67th ACR Annual Meeting, Orlando, U.S.A., October, 2003

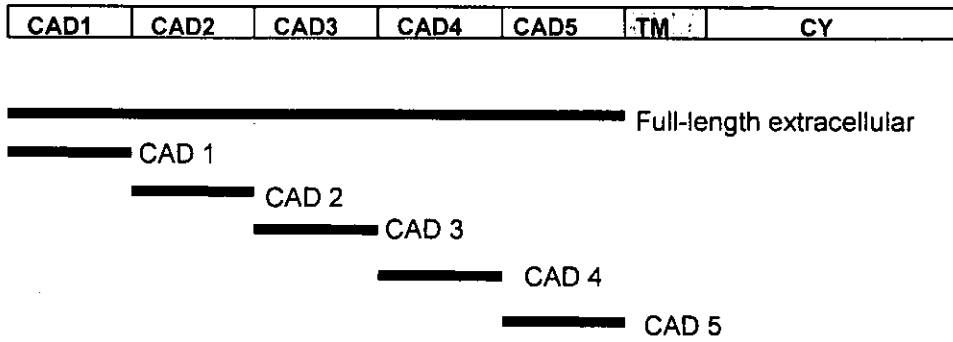
#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特記すべきことなし。

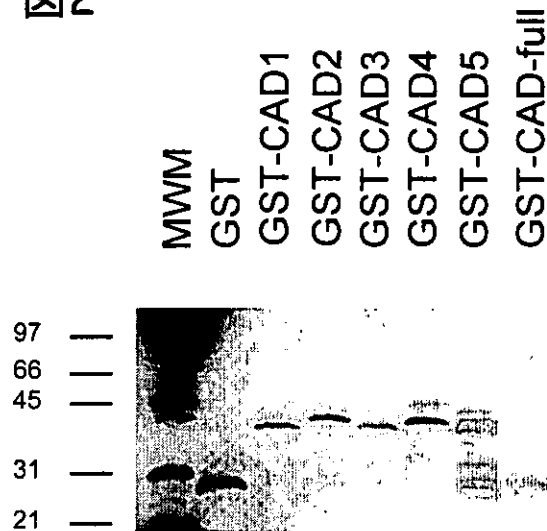


☒1

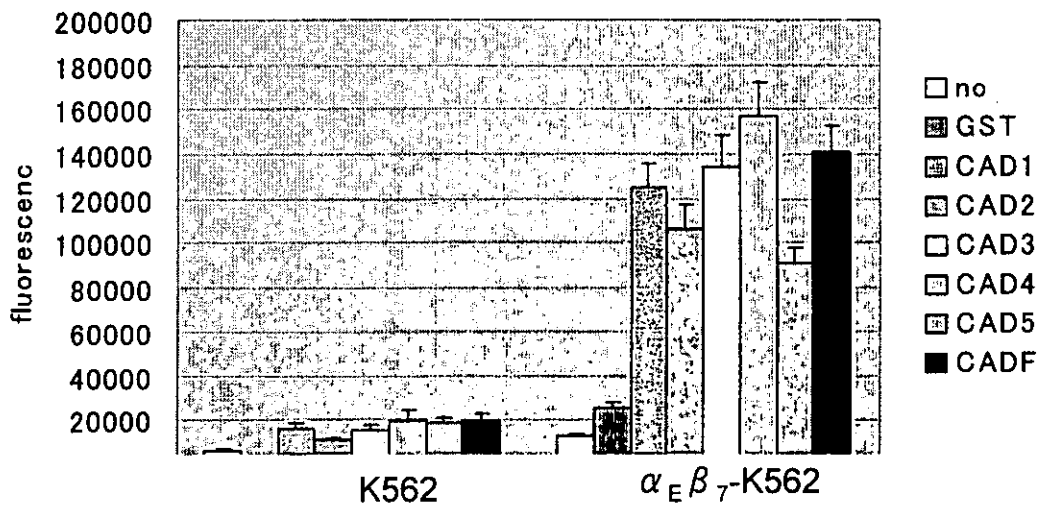
E-cadherin cDNA



☒2



☒3



## 抗SRP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SRP抗体は多発性筋炎に見いだされる自己抗体として報告されているものの、その産生機序や関連する病態は不明な点が多い。本研究では、多数例の膠原病患者血清を用い、同抗体の臨床的意義を追究するとともに、プリスタン投与マウスにおける同抗体の産生誘導を検討した。同抗体陽性20例(多発性筋炎:13例,皮膚筋炎:3例,重複症候群:2例,関節リウマチ:2例)血清がRNA免疫沈降法により見出された。20例中18例が筋炎を持っていたが、筋炎と診断されない関節リウマチ2例を認めた。間質性肺炎(20%), 関節炎(20%), レイノー現象(5%)などの筋外症状は低頻度で、ステロイド療法抵抗性で、免疫抑制薬の併用を要する症例を認めた。筋炎組織の検討では、炎症性細胞浸潤のない、type I fiber優位の所見が特徴的で、ステロイド抵抗性筋炎との関連を追究する上で重要な所見と考えられた。プリスタン投与により、抗SRP抗体産生が種々の正常マウス系で誘導され、同抗体産生に対する環境要因の関与が示唆された。

### A. 研究目的

膠原病患者血清中には細胞内の種々の生物活性分子に対する自己抗体が膠原病患者血清に見出され、各々が特異臨床像と密接に関連することが明らかとなった。その中で、抗Jo-1抗体などの抗アミノアシルRNA合成酵素抗体は多発性筋炎・皮膚筋炎(PM/DM)に特異的に検出され、間質性肺炎、多発関節炎、レイノー現象などを高頻度に併発することが明らかとなった。一方、粗面小胞体リボゾームでの蛋白合成・分泌を調節するシグナル認識粒子(Signal Recognition Particle: SRP)に対する自己抗体がPM患者血清に報告されたものの、その産生機序や関連する病態は未だ不明な点も多い。本研究では、1)多数例の膠原病患者血清を用い、同抗体の臨床的意義を追究すること、2)プリスタン投与による正常マウスにおける同抗体の産生誘導を検討すること、を目的とした。

### B. 研究方法

1)慶應義塾大学および共同研究施設を受診し

たPM/DMを初めとする各種膠原病患者血清3,500例血清を対象とした。2)自己抗体の検索：HeLa細胞抽出物を用いた免疫沈降法により、患者血清中の自己抗体が認識する核酸成分、蛋白成分を分析した。3)HLAクラスII遺伝子：患者、健常人末梢血白血球より抽出したgenomic DNAを用い、PCR-RFLP法により同定した。4)筋生検組織の検討：Hematoxylin/Eosin染色、Alkaline phosphatase染色、ATPase染色(pH 4.5)などを用いた。5)抗SRP抗体の臨床意義の検討：抗SRP抗体の出現頻度、同抗体と関連する臨床像(症状、治療反応性、予後など)、筋生検組織所見を検討した。6)プリスタン投与/正常マウスにおける抗SRP抗体産生の誘導：プリスタン(2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane)を種々の系の正常マウスに投与し、抗SRP抗体産生の誘導を検討した。

### C. 研究結果

抗SRP抗体の同定と免疫学的性状の分析：免疫沈降法による核酸成分のUreaポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)において、20例

(PM:13例, DM:3例, 重複症候群:2例, 関節リウマチ(RA):2例)血清が抗SRP標準血清と同様の7SL RNAを免疫沈降した。これらの抗SRP抗体陽性血清が免疫沈降したSRP構成サブユニット蛋白をSDS-PAGEで検討したところ, 54 kDa蛋白と反応しない血清の存在, 血清により異なる各蛋白成分との反応性など, 多様な反応性を示した。2)抗SRP抗体の臨床特徴:平均発症年齢は52歳と中高年齢であった。RA 2例を除き, 20例中18例が筋炎を持っていたが, ゴットロン徴候などDMに特異的な皮疹は3例(15%)のみと少数であった。悪性腫瘍併発1例(5%), 他の膠原病との重複もRA合併2例(10%)と少数であった。また, 間質性肺炎 4例(20%), 多発関節炎4例(20%), レイノー現象 1例(5%)と筋外症状は低頻度であった。治療ではステロイド反応性を認めるものの, 重症筋炎, 再燃を繰り返す筋炎例があり, ステロイド療法が無効, あるいは副作用の出現のため, 9例(45%)が免疫抑制薬を併用されていた。3)筋組織の検討:組織所見を検討し得た同抗体陽性全10例(100%)に筋線維の壊死, 再生を認めたが, 炎症性細胞浸潤がなく, 50%(4/8例)にtype1 fiber優位の所見を認めた。4)HLA DR8を17例中8例(41%)に認め, 高頻度であった。5)抗SRP抗体はプリスタン投与により種々の正常マウス系{B6 (2/30), BALB/cBy (1/20), C3H/HeOuj (2/8), DBA/1 (1/15)}に誘導された。

#### D. 考察

シグナル認識粒子(SRP)は7SL-RNAと6種類のポリペプチド(72, 68, 54, 19, 14, 9 kDa)から構成される細胞質リボ核蛋白で, シグナルペプチドの認識, 蛋白翻訳の制御, 粗面小胞体における膜輸送を司ることが報告されている。同粒子に対する自己抗体は, 筋炎症例に初めて見出され, 同抗体の主要エピトープは54 kDa蛋白に存在すると報告されているが, 本研究により, 同抗体の免疫学的多様性が明らかになった。

教室の抗SRP抗体陽性例は, 大多数例が筋炎で, DM皮疹, 悪性腫瘍の併発, 他の膠原病

との合併も少なく, 同抗体が典型的PM (Bohan分類type 1)に特異的な自己抗体であることが確認され, 米国Targoffらの成績に一致した。また, 筋炎を持たないRA 2例を見出し, 筋炎以外の自己免疫疾患での同抗体の検出の可能性も示唆された。間質性肺炎, 多発関節炎, レイノー現象などの筋外症状は低頻度であり, PM/DMの疾患標識抗体とされる抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体陽性例とは異なるPM病型との関連が明らかとなった。さらに, ステロイド療法抵抗性で, 免疫抑制薬の併用を要する症例が特徴的で, 同抗体の検出が診断, 治療法の選択, 予後の推測など臨床的に有用と考えられた。筋組織の検討では, 炎症性細胞浸潤がなく, 筋ジストロフィー, 先天性非進行性筋疾患などで見られるtype 1 fiber優位の所見を高頻度に認め, 同抗体陽性例とステロイド抵抗性筋炎との関連を追究する上で重要な所見と考えられた。免疫遺伝学的背景では, 同抗体産生が米国で報告されたHLA DR5と異なり, DR8との関連が示唆された。一方, プリスタン投与により, 抗SRP抗体産生が種々の正常マウス系に誘導され, 環境要因の関与も考えられた。

#### E. 結論

本研究により, 抗SRP抗体が特徴的組織所見を持つステロイド療法抵抗性筋炎と関連し, 抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体陽性とは異なる筋炎の一病型を形成することが明らかとなった。したがって, 同抗体の検索は, 診断, 病型分類, 臨床経過の予測, 治療方針の選択など臨床的に有用である。また, 同抗体産生には免疫遺伝学的背景とともに, 環境要因が関与する可能性も示唆された。同抗体の産生機序の解明, 臨床像との関連機序の追究は筋炎の病因解明に大切な課題と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

## 論文発表

- 1) Fujii T, Mimori T, Hirakata M, et al.: Pseudoscleroderma associated with transforming growth factor beta1-producing advanced gastric carcinoma: comment on the article by Varga. *Arthritis Rheum* 48(6):1766-1767, 2003
- 2) Yoshida T, Hirakata M: Therapeutic benefits of irsogladine maleate on aphthous stomatitis induced by methotrexate in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30(9):2082-2083, 2003
- 3) Satoh M, Mizutani A, Hirakata M, et al.: X-linked immunodeficient mice spontaneously produce lupus-related anti-RNA helicase A autoantibodies, but are resistant to pristane-induced lupus. *Int Immunol* 15(9):1117-1124, 2003
- 4) Sato S, Ohosone Y, Hirakata M, et al.: Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on corticosteroid induced osteoporosis in Japanese patients with connective tissue disease: 3 year follow up. *J Rheumatol* 30(12):2673-2679, 2003
- 5) Yasuoka H, Ihn H, Hirakata M, et al.: A novel testicular protein highly expressed in testis is overexpressed in systemic sclerosis fibroblasts and targeted by autoantibodies. *J Immunol* 171(12):6883-6890, 2003
- 6)佐藤 実, 赤荻 淳, 平形道人, 他: プリスタン誘発自己免疫. *リウマチ科* 29(1):89-97, 2003
- 7)平形道人: 炎症性筋疾患(多発性筋炎・皮膚筋炎)の予後. *リウマチ科* 30(1):35-42, 2003
- 8)平形道人:抗リボ核酸蛋白 (ribonucleoprotein:RNP)抗体. *日内会誌* 92(10):1932-1940, 2003
- 9)平形道人: 膠原病の診断, 疾患活動性・治療

効果判定のための検査. 今月の治療.

11(11):56-63, 2003

## 2. 学会発表

- 1) Hirakata M, Suwa A, Kaneko Y, et al.: Immunogenetic features of anti-Ku autoantibodies in Japanese patients. 8<sup>th</sup> International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity. Berlin, Germany, Sep., 2003
- 2) Hirakata M, Suwa A, Sato S, et al.: New profiles of autoantibodies in the sera of Japanese patients with myositis. 67th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2003
- 3) Hirakata M, Suwa A, Nojima T, et al.: Clinical and immunological features in patients with anti-Fer (Elongation factor 1  $\alpha$ ) autoantibodies. 67th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2003
- 4) Sato S, Suwa A, Hirakata M et al.: Clinical and immunological associations of autoantibodies to the 140 kDa polypeptide (the US autoantigen) in patients with clinically amyopathic dermatomyositis. 67th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2003

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

その他

なし

## 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ている。筋炎モデルマウスの炎症筋組織では、fractalkine (FKN)、CX3CR1を含め、いくつかのケモカイン、ケモカインレセプターの発現亢進が認められた。抗マウスFKN抗体でFKN/CX3CR1相互作用を阻害することにより、筋組織への炎症細胞浸潤の抑制がみられた。このことより、FKN阻害薬が筋炎の新規治療薬として有用であると考えられた。

### A. 研究目的

皮膚筋炎および多発性筋炎は、原因不明の全身性の炎症性筋疾患である。治療薬として副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤などが用いられているが、薬剤抵抗性の患者も多数みられるため、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T細胞、マクロファージなどの炎症細胞浸潤が多数みられ、その炎症細胞からは炎症性サイトカイン、細胞障害性分子などが発現され、皮膚筋炎・多発性筋炎の病態形成に深く関与している。炎症細胞浸潤には筋組織で発現されるケモカインが寄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、不明な点が多い。

本研究では、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にrabbit myosin + CFAの皮内投与を繰り返し施行した。

Day 22にマウスをsacrificeして、大腿筋を切り出した。また、Day 1より抗マウスfractalkine (FKN)抗体またはコントロール抗体を500 $\mu$ gずつ週3回腹腔内投与し、筋炎抑制効果を検討した。

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、ケモカインレセプターの発現を、real time PCRで解析した。

また、大腿筋組織を用いてHE染色、および免疫染色（各種ケモカイン、ケモカインレセプター、CD4, CD8 T細胞、マクロファージ）を施行した。

（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回繰り返し、day 22にマウス大腿筋を組織学的に観察した。HE染色では、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、筋線維の壊死像が認められた（図1）。また免疫染色にて、CD4, CD8 T細胞、およびマクロファージの浸潤が認められた（図2）。

筋炎モデルマウス大腿筋組織、およびコン

トロール筋組織より、total RNAを抽出し、各種ケモカイン・ケモカインレセプターの発現をreal time PCRで定量的に解析した。筋炎発症組織では、コントロール筋組織と比較して、MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , FKNの発現が増強していた。また、ケモカインレセプターでは、CCR2, CCR5, CX3CR1の発現が炎症筋組織で亢進していた。免疫染色では、炎症筋組織にMCP-1, RANTES, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , FKNの発現を認め、また浸潤している炎症細胞にCX3CR1の発現が認められた。

以上の結果より、FKN/CX3CR1相互作用が炎症細胞浸潤に関与している可能性があると考え、抗マウスFKN抗体を投与し、筋炎の抑制効果を解析した。Day 22の大腿筋HE染色では、抗FKN抗体投与群は、コントロール抗体投与群と比較して炎症細胞の浸潤が抑制され、壊死筋線維数も減少していた。(図3) また、CD4, CD8 T細胞、マクロファージの免疫染色にて、CD8 T細胞、マクロファージの浸潤細胞数が減少傾向にあった。

#### 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見られるのと同様に、マウスの筋組織に炎症細胞の浸潤(CD4, CD8 T細胞、マクロファージ)がみられた。

筋炎症部位では、いくつかのケモカイン(MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , IP-10, FKN)、ケモカインレセプター(CCR2, CCR5, CX3CR1)の発現亢進がみられた。これまでに、CX3CR1はtype-1型のサイトカイン、および細胞障害性分子を発現する特異なT細胞、マクロファージ、樹状細胞などに発現し、FKNは活性化血管内皮細胞などから発現されることが報告されている。そのため、FKN/CX3CR1相互作用が筋炎症部位への炎症細胞浸潤に関与している可能性があると考え、抗FKN抗体を用いてFKN/CX3CR1相互作用の阻害を試みた。プレリミナリーな結果ではあるが、FKN阻害により、CD8 T細胞、マクロファージの筋組織への

浸潤が抑制され、筋炎症部位の細胞浸潤、壊死筋線維数が減少していた。

FKNにより遊走することが疑われるマクロファージ、CD8 T細胞は、TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ などの炎症性サイトカインを産生し、産生されたサイトカインは、血管内皮細胞、筋線維、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することにより、さらなる炎症細胞浸潤を促進し、筋炎の病態形成に深く関与していると考えられる。また、CX3CR1陽性のT細胞は、granzyme A, perforinなどの細胞障害性分子を発現し筋組織障害を起こしていると考えられる。

これらの結果より、FKNを阻害することは、T細胞、およびマクロファージの筋組織への浸潤を抑制して、筋炎の軽減に寄与する可能性がある。

#### E. 結 論

皮膚筋炎・多発性筋炎のモデルマウスにおいて、FKN阻害により筋組織への炎症細胞浸潤を抑制する可能性があり、FKN阻害薬が筋炎の新規治療薬として有用であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1) Junko Nishio, Mihoko Suzuki, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka.

Development of TCRB CDR3 length repertoire of human T lymphocytes. Int. Immunol. (inpress)

##### 学会発表

1) 南木敏宏、浦崎康代、今井俊夫、村本賢三、窪田哲朗、宮坂信之。抗fractalkine (FKN: CX3CL1)抗体による関節炎抑制効果の検討。第33回日本免疫学会総会。2003。

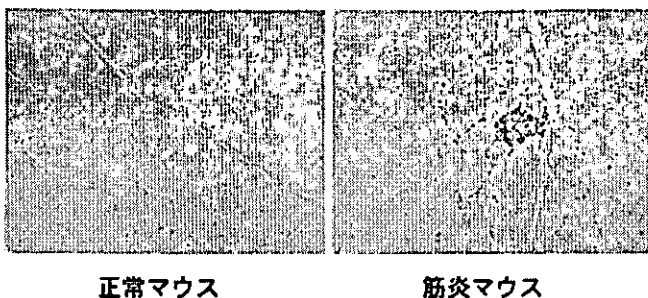
2) Toshihiro Nanki, Yasuyo Urasaki, Toshio Imai, Kenzo Muramoto, Tetsuo Kubota, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of Fractalkine Ameliorates

Mouse Collagen-Induced Arthritis. 第67回アメリカリウマチ学会。2003.

3) 浦崎康代、南木敏宏、今井俊夫、村本賢三、窪田哲朗、宮坂信之。抗fractalkine (CX3CL1) 抗体による関節炎抑制効果の検討。第47回リウマチ学会総会。2003.

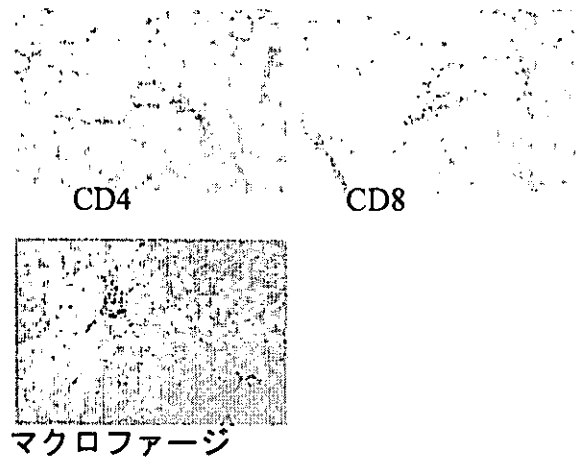
H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

図1 筋炎モデルマウス



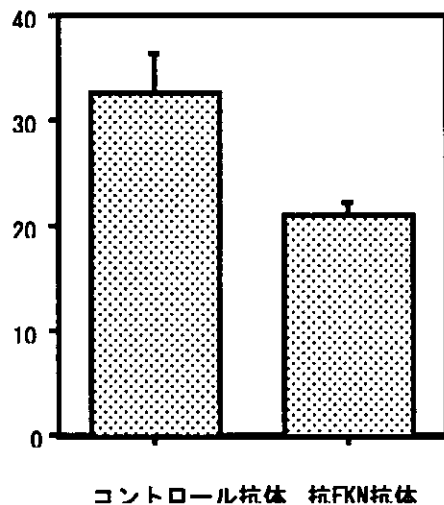
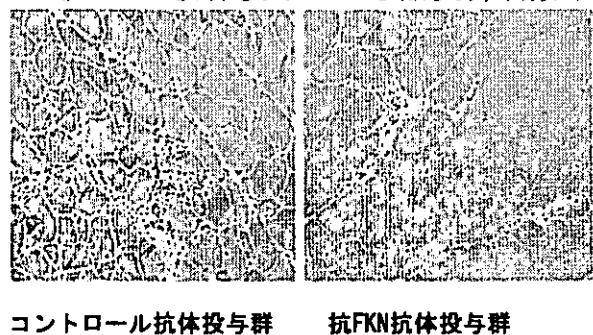
SJL/J マウスに rabbit myosin + CFA を day 1 より 1 週間に一度繰り返し投与し、day 22 に大腿筋を観察。(HE 染色 x200)

図2 炎症筋組織での CD4, CD8 T 細胞、マクロファージの浸潤



筋炎モデルマウスで CD4, CD8, マクロファージ (Mac-1) の免疫組織染色を施行。

図3 抗 FKN 抗体投与による筋炎抑制効果



コントロール抗体、または抗 FKN 抗体を筋炎マウスに投与し、筋組織を HE 染色で比較 (上段)。壊死筋線維数の比較 (下段)。

## 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、我々は抗リボソームP抗体が活性化したヒト末梢血単球からのTNF- $\alpha$ およびIL-6の産生に与える影響について検討した。抗リボソームP抗体は、用量依存性に活性化した単球からTNF- $\alpha$ およびIL-6の産生を増強することが明らかとなった。さらに、抗リボソームP抗体は、IFN- $\gamma$ の存在下で、単球のTNF- $\alpha$ およびIL-6のmRNA発現を亢進した。抗リボソームP抗体は単球からTNF- $\alpha$ およびIL-6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相関することが明らかにされている。我々は、血清中の抗リボソームP抗体と髄液中の抗神経細胞抗体という自己抗体のトロピズムがCNSループスの病態形成の上で重要であることを裏付けてきた。

これまで、抗リボソームP抗体の標的抗原が血管内皮細胞や活性化したT細胞の表面に存在することが報告されているが、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、明らかにされていなかった。昨年、我々は、抗リボソームP抗体が単球系白血病細胞株THP-1および培養により活性化した末梢血単球と反応し、抗リボソームP抗体が活性化した単球系細胞からの血管内皮増殖因子(VEGF)の産生を亢進することを報告した。今回我々は、炎症性サイトカインの中で血管内皮細胞の活性化や血管透過性の亢進に関わるものに注目し、抗リボソームP抗体が単球系細胞からのTNF- $\alpha$ およびIL-6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(アマルシャム社)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(アマルシャム社)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(ミリテニイバイオテック社)を用いて単球を分離した。

単球は、IFN- $\gamma$  (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 $\mu$ 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。

培養上清中のTNF- $\alpha$ は、Human TNF- $\alpha$  ELISA Kit(バイオソース社)を用いて測定した。培養上清中のIL-6は、MH60. BSF2を用いたバイオアッセイにより測定した。

総RNAはTRIzol試薬(インビトロジェン社)



を用いて精製した。1  $\mu$ gのRNAより、オリゴdTプライマーを用いて、cDNAを合成した。TNF- $\alpha$ およびIL-6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、 $\beta$ -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

ヒト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- $\gamma$  (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、IFN- $\gamma$  (1000 units/ml)の存在あるいは非存在下で、用量依存性に末梢血単球からのTNF- $\alpha$ およびIL-6の産生を亢進した。次に、複数の健常成人より分離した単球について検討したところ、2名のSLE患者から精製した抗リボソーム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に比し、IFN- $\gamma$ の存在あるいは非存在下で、統計学的に有意に単球からのTNF- $\alpha$ およびIL-6産生を亢進した。さらに、特定の健常成人より分離した単球に対して、8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に比し、IFN- $\gamma$ の存在あるいは非存在下で、統計学的に有意に単球からのTNF- $\alpha$ およびIL-6産生を亢進した。

リアルタイムPCR法によりmRNAを定量した所、同様に抗リボソームP抗体は、IFN- $\gamma$ の存在下で、統計学的に有意に単球のTNF- $\alpha$ およびIL-6のmRNA発現を亢進した。

### 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。血清中の抗リボソームP抗体とCNSループスとが有意に相関することが示されてきているが、髄液中では抗リボソームP抗体は認められない。抗リボソームP抗体は、活性化した単球と結合することにより、VEGF、TNF- $\alpha$ およびIL-6などのサイトカインの産生を増強することにより、血管新生を促進し、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

抗リボソームP抗体は活性化した末梢血単球からTNF- $\alpha$ およびIL-6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や、抗リボソームP抗体が血管内皮細胞と直接結合することにより生じる影響を今後さらに検討していくことが、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

- Shibuya H, Nagai T, Ishii A, Yamamoto K, Hirohata S. Differential regulation of Th1 responses and CD154 expression in human CD4+ T cells by IFN- $\alpha$ . Clin Exp Immunol 132: 216-224, 2003
- Takizawa K, Takeuchi F, Nabeta H, Hirohata S, Takeuchi A, Matsumura Y, Yamamoto K. Association of transporter associated with antigen processing genes with Behcet's disease in Japanese. Autoimmunity 36: 161-165, 2003

- ・Iwai M, Harada Y, Ishii M, Tanaka S, Muramatsu A, Mori T, Nakashima T, Okanoue T, Hirohata S. Autoimmune hepatitis in a patient with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 22: 234- 236, 2003
- ・Takayanagi M, Haraoka H, Kikuchi H, Hirohata S. Myocardial infarction caused by rheumatoid vasculitis: histological evidence of the involvement of T lymphocytes. *Rheumatol Int* 23:315-318, 2003
- ・広畑俊成 免疫血清検査の最新情報と、輸血過誤防止および輸血の最新情報 第4章自己免疫疾患検査の最新情報 4. 膠原病の検査—特に最近の進歩を中心として 臨床病理レビュー 124: 76-80, 2003
- ・広畑俊成 解説ACRより新たに提唱されたSLEの精神神経症状の分類リウマチ科 30:171-173, 2003
- ・広畑俊成 特集：膠原病を疑ったら・・・適切な診断と治療法の選択 推薦処方とその解説 中枢神経症状を伴った全身性エリテマトーデス 今月の治療 11:44-46, 2003
- ・広畑俊成 臓器病変からリウマチ・膠原病へのアプローチ5 精神神経病変とリウマチ・膠原病 臨床医 29:2074-2077, 2003
- ・広畑俊成 特集：肺血管炎の診断と治療 膠原病の肺血管炎(ベーチェット病を含む) 呼吸器科 4:501-504, 2003
- ・広畑俊成 痴呆症学(2) —高齢社会と脳科学の進歩— 臨床編 —各論— IV. 一般身体新刊による痴呆 リウマチ性疾患(膠原病・血管炎症候群) Systemic lupus erythematosus 日本臨床増刊号 62 増刊号1 429-434, 2004
- ・広畑俊成 第10章膠原病類縁疾患の治療 1. Behçet病「先端医療シリーズ19・アレルギー・リウマチ・膠原病」アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療 狩野庄吾、中川武正編集主幹、先端医療技術研究所 pp. 341-346, 2003
- ・広畑俊成 「今日の臨床検査」河合 忠、水島裕 監修、櫻林郁之介、中川武正、星恵子、板橋明、広畑俊成、伊藤要一 編集、南江堂 2003
- ・広畑俊成 治療薬ハンドブック 喘息・アレルギー・リウマチ疾患 森田寛、永倉俊和、廣畑俊成 編集、メディカルレビュー社 2003
- ・広畑俊成 各論 骨・関節疾患 1. 骨粗鬆症 2. 関節リウマチ 3. 変形関節症「薬物療法学」石崎高志、鎌滝哲也、望月真弓 編集、南江堂 205-219, 2003
- 2. 学会発表**
- ・Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, Hashimoto H, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. The 6<sup>th</sup> Korea-Japan combined Meeting of Rheumatology, p.39, 2003 Seoul Korea
- ・Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, Hashimoto H, Yoshikawa H, Mori T, Ochi T. Enhanced generation of VEGF and soluble VCAM-1 from CD34+ progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. 67th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Orlando, Arthritis Rheum (Suppl.): S341, 2003.
- ・Aramaki K, Kikuchi H, Hoshino E, Haraoka H, Hirose N, Takeuchi A, Hashimoto T, Hirohata S. Preliminary criteria for the evaluation of the severity of Behcet 's disease. 67th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Orlando, Arthritis Rheum (Suppl.): S386, 2003.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 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

## 実験的肺線維症モデルにおける、IL-10の治療効果に関する研究

分担研究者： 土肥 眞 （東京大学保健管理センター・助手）

### 研究要旨

Th2型サイトカインである IL-10は、幅広い免疫調節・抑制作用を有すると同時に、抗線維化作用を示す事が、線維芽細胞の系で認められている。今年度は、マウスブレオマイシン実験的肺線維症の系に、IL-10を発現するベクターを投与して、生体内で高濃度にIL-10を発現させる事で、肺線維化が抑制されるかについて検討した。その結果、IL-10は肺内でのTGF- $\beta$ の産生を抑制する事によって肺線維化の程度を抑制した。抑制効果の程度は、プラスミドをブレオマイシン投与の前と後でそれぞれ導入した場合、ほぼ同等であった。TGF- $\beta$ の産生細胞としては、線維芽細胞の他に、肺泡マクロファージや気道上皮細胞などが考えられ、今後、その作用機序についてさらに検討する必要があると考えられた。

### A. 研究目的

全身性の自己免疫疾患である膠原病には、間質性肺炎・肺線維症が高い頻度で発症し、時として生命予後を決定する因子となる。一般的に膠原病に随伴する肺病変では、患者の肺内ではリンパ球を中心とする炎症性細胞がしばしば増加しており、何らかの免疫学的な機序により引き起こされる炎症が先行して病態形成に影響を及ぼし、その結果として肺の線維化に至ると考えられる。

一方、Th2型サイトカインの一つである interleukin(IL)-10は、多くの免疫担当細胞に対して、活性化やサイトカイン産生能の制御、遊走能の抑制などの抑制調節作用を発揮することで、過度な免疫反応を制御する作用を持つ。さらにIL-10には、線維芽細胞に作用して、コラーゲン産生を抑制する効果がある事も報告されている。

本研究は、マウスのブレオマイシン (Bleomycin: 以下Bleo) 惹起性肺線維症の実験系を用い、これにIL-10を産生するプラスミドベクターを投与する事によって、生体内に高濃度のIL-10を誘導発現させて、それにより

肺の線維化形成が制御されるかについて検討する事を目的とする。

### B. 研究方法

C57BL/6マウス（雄8週齢）を用いた。ペントバルビタールを用いて腹腔内麻酔後、気管切開を施行し、頸部気管より、Bleo溶液 (0.1unit/50 $\mu$ l 生理食塩水:生食)を投与した。コントロールとして、同量 (50 $\mu$ l) の生理食塩水を投与した。さらに、IL-10産生ベクター (pCACGIL-10)100 $\mu$ gを、リンゲル液0.5mlに溶解し、尾静脈よ約5秒間で静脈注射した。陽性コントロールとして、1)プラスミドを含まないリンゲル液(Bleo-lac群)、2)サイトカインcDNAを含まないコントロールベクター (Bleo-cont V群)の2群を設定した。ベクターの投与は、Bleo投与2日前 (前投与群)あるいは投与翌日 (後投与群)に実施した。投与14日目(d14)に、体重を測定した後に麻酔し、1)採血、2)気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)、3)肺標本を採取した。血清は今後の解析のために凍結保存した。BALFは、分画算定のためのサイトスピン標本作

成するとともに、ヘモサイトメーターを用いて細胞数を計測した。上清を用いて、TGF- $\beta$ の総量（活性型と非活性型との総和）をELISA法にて測定した。左肺は線維化の指標であるhydroxyproline (Hyx. P)の測定に用いた。右肺はホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。さらに、肺標本を用いて、活性型TGF- $\beta$ 1の免疫組織染色を行った。

（倫理面への配慮）

マウスへの薬剤投与ならびに検体採取においては、十分な麻酔下に実施し、痛み刺激等を最小限にした。

## C. 研究結果

### 1) 体重変化

生食群に対して Bleo群ではいずれも低下傾向を示した。Bleo-IL-10群とBleo-cont V群とで差は認められなかった。

### 2) BALF細胞所見

生食群と比べ、Bleo群ではいずれも総細胞数およびリンパ球数、好中球数が増加していた。IL-10前投与群ではこれらの増加は有意に抑制されたが、後投与群では有意な抑制は認められなかった。

### 3) 肺内Hyx. P量

生食群と比べ、Bleo群ではいずれもHyx. P量が増加していた。Bleo-IL-10群では、この増加は前投与でも後投与でも有意に抑制された。

### 4) BALF TGF- $\beta$ 濃度

肺内Hyx. P量と同様の傾向が認められた。

### 5) TGF- $\beta$ の免疫組織染色

陽性コントロール群の肺では、活性型TGF- $\beta$ 1は、線維化を起こした間質と肺胞マクロファージとに強く発現していた。一方、Bleo-IL-10投与群では、この発現は強く抑制されていた。前投与でも後投与でも同様であった。

## D. 考 察

ブレオマイシン肺線維症のモデル系におけるIL-10の治療効果については、Hayashiらの報

告がある。彼等はIL-10産生プラスミドをHVJリポソームとともに Bleo気管内投与の前に腹腔内投与し、炎症ならびに線維化に対する効果を確かしている(Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000)。今回我々が用いたプラスミドの急速静脈内投与法は、数 $\mu$ g/mlオーダーの高い血中濃度を達成できる利点があり、これによって、より強くIL-10の活性を生体内で発揮できる。その結果、従来報告と同様に前投与で効果を発揮したのみで無く、Bleo投与の後にベクターを投与した場合にも、同等の抑制効果を得る事が可能であったと考えられる。さらに、今回の検討で新たに、IL-10の高濃度生体内発現によって、線維化を促進する成長因子であるTGF- $\beta$ の、肺における産生と活性化とが抑制される事が明らかとなった。肺におけるTGF- $\beta$ の産生細胞としては、間質の線維芽細胞の他に、肺胞マクロファージや気道の上皮細胞なども考えられる。IL-10の作用が、これらのいずれかの細胞（群）に対する直接作用であるのか、あるいは他の細胞を介する間接的なものであるのかについては現在不明である。BALFの解析結果と免疫染色の結果からは、標的細胞のひとつとして、肺胞マクロファージの可能性が強く示唆される。今後、肺胞マクロファージに対する作用機序を中心にIL-10の作用効果のメカニズムについて検討する事によって、より効果的で副作用の少ない、新たな治療法を開発・確立できる可能性が考えられた。

## E. 結 論

IL-10遺伝子導入は、肺内での炎症細胞の増加を抑制するとともに、肺でのTGF- $\beta$ の産生を抑制することによって、実験的肺線維症において、線維化を軽減する可能性が示唆された。