

(倫理面への配慮)対象者に口唇小唾液腺生検施行の意義、必要性、危険性につき説明し、得られた組織は診断および研究目的にのみ使用することとした。研究に供する組織は診断に要する部分を除いた余剰組織を使用し、個人的情報については一切秘守した。すべての対象者より文書による同意を得た。本研究は金沢医科大学の臨床研究に関する倫理審査委員会の承認を受けている。

C.研究結果

1) p38MAPK および JNK の解析

p38 インヒビター(SB203580)および JNK インヒビター(SP600125)ともに抗 Fas 抗体および抗 CD40 抗体にて誘導される SS 唾液腺上皮細胞アポトーシスを抑制した(図 1)。2) CD40 刺激による p38MAPK の活性化の解析

IFN γ 刺激 SS 唾液腺上皮細胞に抗 CD40 抗体を作用させると、pp38 の発現は経時的に増大した(図 2)。

D.考察

今回の検討により、SS 唾液腺上皮細胞死において CD40 下流における p38MAPK および JNK の関与が示唆された。特に p38MAPK は CD40 刺激後その活性化型(pp38)が増大することが示された。これら分子が Fas death 経路の細胞死抑制蛋白 c-FLIP の調節に関与するのか、あるいは別の経路に関与するのかはこれから検討すべき課題である。今後はさらに研究を進めて、唾液腺上皮細胞死の伝達経路の全容を解明する予定である。

E.結論

現在までの研究成果により、SS 唾液腺上皮細胞死には IFN γ , Fas/FasL, CD40/CD40L, c-FLIP, p38MAPK などの分子が関与していることが示唆された。SS 唾液腺においてこれら分子の発現を調節することによる分子標的治療法の開発の可能性を模索する。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1.論文発表

- 1 Ogawa N, Sugai S Reply to the letter by Sfriso et al Arthritis Rheum 48(8) 2391-2392, 2003
- 2 Fujisawa A, Kitagawa K, Sugai S The effect of nasal mucosal stimulation on Schirmer tests in Sjogren's syndrome and dry eye patients Adv Exp Med Biology 506 1221-1226, 2003
- 3 Tonami H, Matoba M, Kuginuki Y, Yokota H, Higashi K, Yamamoto I, Sugai S Clinical and imaging findings of lymphoma in patients with Sjogren's syndrome J Comput Assist Tomogr 27 517-524, 2003
- 4 Kitagawa K, Nakamura T, Sugai S Keratoconjunctivitis sicca versus dry mouth and autoantibodies in primary and secondary Sjogren's syndrome Keratoconjunctivitis sicca versus dry mouth and autoantibodies in primary and secondary Sjogren's syndrome Adv Exp Med Biology 506 1195-1199, 2003

2.学会発表

- 1 太田 策啓、斉藤美和子、出井良明、近藤真偉智、小川法良、大橋弘幸、林秀晴。シェーグレン症候群患者の唾液腺上皮細胞における CD40、NF-kB の検討。第 47 回日本リウマチ学会総会 リウマチ 43(2) 348, 2003
- 2 Li Ping、小川法良、菅井進。CD40 刺激はシェーグレン症候群唾液腺上皮細胞死に必須である。第 47 回日本リウマチ学会総会 リウマチ 43(2) 349, 2003
- 3 董 凌莉、正木康史、下山久美子、河南崇典、福島俊洋、川端浩、小川法良、和野雅治、広瀬優子、菅井進。シェーグレン症候群関連リンパ腫における IgH および TCR モノクロナリティ。第 47 回日本リウマチ学会総会 リウマチ 43(2) 349, 2003
- 4 下山 久美子、小川法良、河南崇典、福

島俊洋、正木康史、和野雅治、広瀬優子、菅井 進。シェーグレン症候群(SS)唾液腺上皮細胞における iNOS 発現と NO_x 産生。第 47 回日本リウマチ学会総会 リウマチ 43(2) 350, 2003

5 河南 崇典、正木康史、下山 久美子、福島俊洋、川端 浩、小川法良、和野雅治、広瀬優子、菅井 進。シェーグレン症候群におけるイディオタイプ・ネットワークのモノクローナル Fab による検討。第 47 回日本リウマチ学会総会 リウマチ四十三 (2) 363, 2003

6 小川法良。シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞と正常唾液腺上皮細胞との相違一ケモカインおよびサイトカイン産生能からの検討一。第 12 回日本シェーグレン症候群研究会、第 12 回日本シェーグレン症候群研究会抄録集 p32-33, 2003

7 正木康史、河南崇典、下山久美子、唐澤博美、福島俊洋、川端 浩、小川法良、和野雅治、広瀬優子、菅井 進。シェーグレン症候群におけるイテイオタイプネットワークのモノクローナル Fab による検討。第 12 回日本シェーグレン症候群研究会、第 12 回日本シェーグレン症候群研究会抄録集 p70-71, 2003

8 下山久美子、小川法良、河南崇典、福島俊洋、正木康史、和野雅治、広瀬優子、菅井 進。シェーグレン症候群 (SS) 唾液腺上皮細胞における iNOS 発現と NO_x 産生。第 12 回日本シェーグレン症候群研究会、第 12 回日本シェーグレン症候群研究会抄録集 p84-85, 2003

9 李 萍、小川法良、河南崇典、下山久美子、福島 俊洋、正木康史、和野 雅治、広瀬優子、菅井 進。CD40 promotes Fas-dependent apoptosis through p38 pathway in SS salivary epithelial cells 第 12 回日本シェーグレン症候群研究会、第 12 回日本シェーグレン症候群研究会抄録集 p94-95, 2003

10 小川法良、河南崇典。シェーグレン症候

群唾液腺におけるサイトカインのケモカインの相互作用。第 24 回日本炎症・再生医学会、日本炎症再生医学会誌 23(6) 474, 2003

11 小川法良、河南崇典、正木康史、和野雅治、菅井 進。シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞死の分子機構の解析。第 33 回日本免疫学会総会、第 33 回日本免疫学会・学術集会記録 33 286, 2003

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1 : p38 MAPK inhibitor (SB203580) と JNK inhibitor (SP600125) の SS 唾液腺上皮細胞死に対する作用 (TUNEL assay)

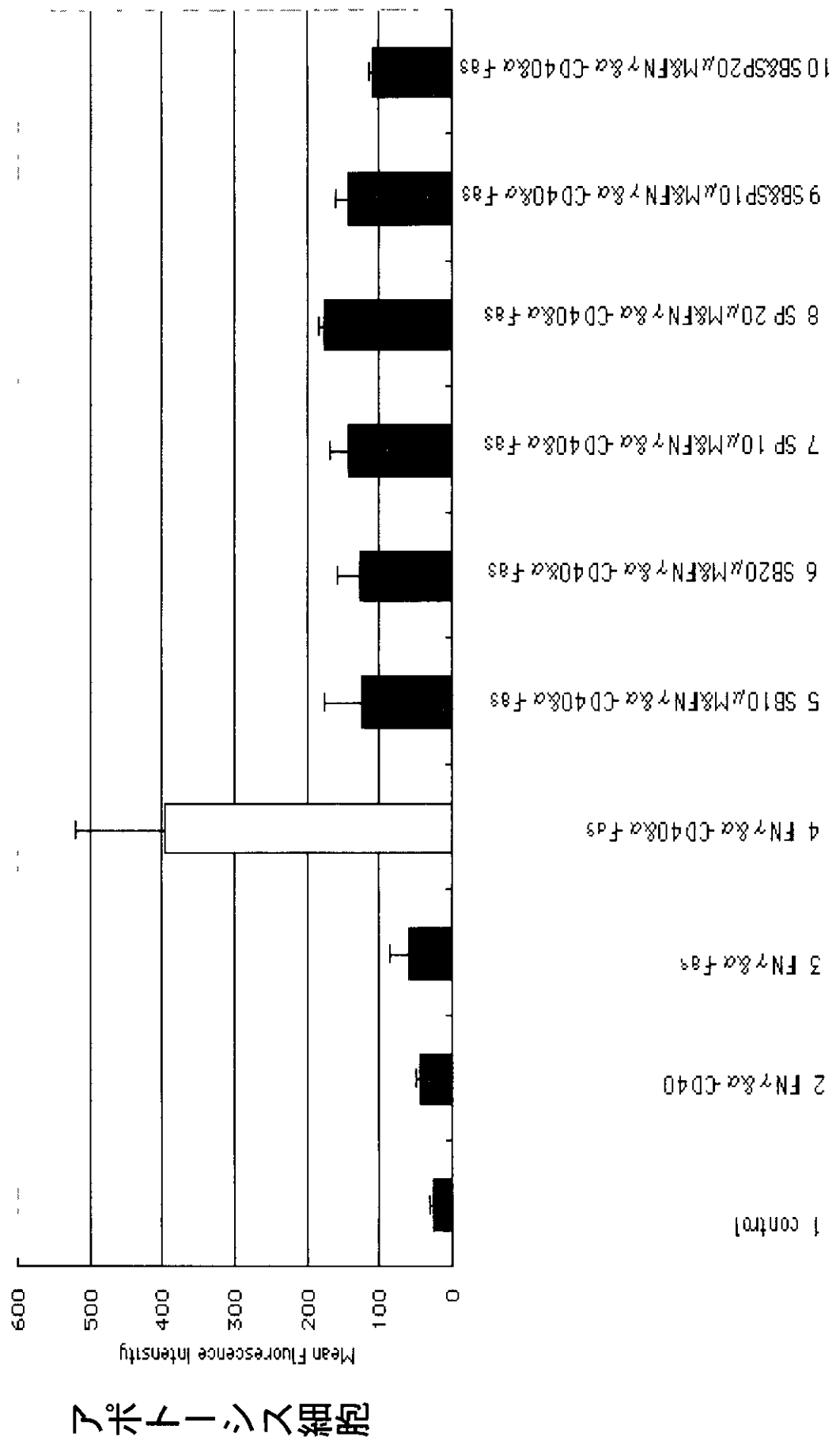
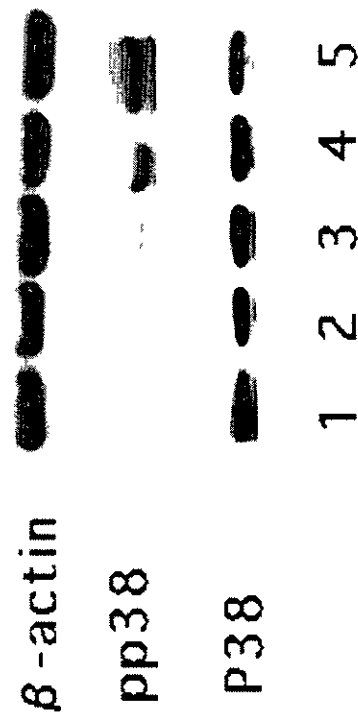


図2：IFN γ および抗CD40抗体によるSS唾液腺上皮細胞におけるp38MAPKの活性化



- 1. Control
- 2. IFN γ for 72 h
- 3. IFN γ & anti-CD40 for 6 h
- 4. IFN γ & anti-CD40 for 12h
- 5. IFN γ & anti-CD40 for 24h

シェークレン症候群唾液腺組織における TLRs 発現の検討に関する研究

分担研究者 江口勝美

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座 教授

研究要旨

シェークレン症候群 (SS) と Toll-like receptors (TLRs) との関連性を検討するため、SS 唾液腺組織での TLRs 発現と培養唾液腺細胞株 (HSG 細胞) における機能的 TLRs 発現を検討した。SS 症例小唾液腺組織には TLR2、TLR3、TLR4、MyD88 が発現し、これら発現はコントロール症例と比較し強く認められた。SS 小唾液腺組織の TLR2、TLR3、TLR4、MyD88 発現は浸潤単核球および唾液腺細胞の双方に認められた。In vitro の実験では HSG 細胞には TLR2、TLR3、TLR4、MyD88 発現が検出され、各 TLR ligands 刺激により、HSG 細胞表面の CD54 発現と培養上清中 IL-6 産生は有意に亢進した。しかしながら、HSG 細胞のアポトーシス感受性 (rTRAIL、抗 Fas 抗体、TNF- α 、IFN- γ で誘導されるアポトーシス) は TLR ligands 刺激の有無で変化しなかった。Kinase 活性化では HSG 細胞の ERK、JNK、p38 のリン酸化が TLR ligands 刺激で誘導された。これらより、SS 唾液腺組織に発現する TLRs は MAPK superfamily を介してサイトカイン産生や細胞浸潤を促進し、SS 唾液腺の慢性炎症を増強していることが示唆された。

A. 研究目的

TLRs は細菌菌体成分を認識するとともに、HSP やフィブリノーゲン分解産物などを認識することかわかり、ヒト自己免疫疾患との関わりが近年注目されている。SS は唾液腺組織および涙腺組織の慢性炎症性疾患であり、その病態にはサイトカインやアポトーシスの関与が考えられている。今回、SS と TLRs との関連性を検討するため、SS 唾液腺組織での TLRs 発現と培養唾液腺細胞株 (HSG 細胞) における機能的 TLRs 発現を検討した。

B. 研究方法

実験に使用したサンプルはすべてインフォームト Consent 下に採取した。

1 組織学的検討 SS 10 症例とコントロール症例 (SS を疑い生検するもリンパ球浸潤が認められなかった症例) の口唇小唾液腺組織の TLR2、TLR3、TLR4、MyD88 の発現は免疫組織学的に検討した。

2 HSG 細胞を用いた検討 HSG 細胞の

TLR2、TLR3、TLR4、MyD88 の発現は FACS と western blotting で確認した。HSG 細胞を TLR2 ligand (PGN)、TLR3 ligand (Poly I C)、TLR4 ligand (LPS) で 24 時間培養し、培養上清の IL-6 (ELISA) と細胞表面の CD54 発現 (FACS) を評価した。HSG 細胞のアポトーシス感受性は TLR ligand の有無で 24 時間培養後、rTRAIL、抗 Fas 体、TNF- α 、IFN- γ を加えてアポトーシスを誘導し、その感受性を caspase 活性化とミトコントリア膜電位の低下 ($\Delta\Psi_m$) で評価した。TLR ligand 刺激による ERK、JNK、p38 活性化は各々の抗リン酸化抗体を用いた western blotting で評価した。

(倫理面への配慮)

実験に使用したサンプル (口唇小唾液腺組織) はすべて文書でインフォームト Consent が得られた患者より用いた。

C. 研究結果

- 1 SS 症例小唾液腺組織にはコントロール症例と比較して、TLR2、TLR3、TLR4、MyD88 の強い発現が検出された。SS でのこれら発現は浸潤単核球および唾液腺細胞の双方に認められた。
- 2 HSG 細胞には TLR2、TLR3、TLR4、MyD88 の発現が認められ、TLR2 ligand (PGN)、TLR3 ligand (Poly I C)、TLR4 ligand (LPS) の刺激で CD54 発現と IL-6 産生は増強した (図 1 と図 2)。しかしながら、caspase 活性化と $\Delta\Psi_m$ で検討したアポトーシス感受性 (rTRAIL、抗 Fas 抗体、TNF- α 、IFN- γ で誘導されるアポトーシス) は TLR ligand 刺激の有無で変化しなかった。
- 3 各々の TLR ligand 刺激により、HSG 細胞の ERK、JNK、p38 のリン酸化が誘導された。

D. 考察

SS 唾液腺組織には TLRs の機能的発現があると考えられ、MAPK superfamily を介してサイトカイン産生や副刺激分子発現を誘導すると考えられた (図 3)。

E 結論

TLR シグナルは SS の慢性唾液腺炎を、サイトカイン産生や副刺激分子発現誘導を介して増強することが考えられる。今後はシグナル伝達分子の解析を行い、SS の新たな治療ターゲットを探索したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka F, Migita K, Kawabe Y, Aoyagi T, Ida H, Kawakami A, Eguchi K Interleukin-18 induces serum amyloid A (SAA) protein production from rheumatoid synovial fibroblasts *Life Sci* 74 (13) 1671-1679, 2004
- 2) Saeki A, Nakao K, Nagayama Y, Yanagi K, Matsumoto K, Hayashi T, Ishikawa H, Hamasaki K, Ishii N, Eguchi K Diverse efficacy of vaccination therapy using the alpha-fetoprotein gene against mouse hepatocellular carcinoma *Int J Mol Med* 13 (1) 111-116, 2004
- 3) Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Kobayashi M, Fukushima T, Takahashi R, Kuwahara H, Kita A, Oshima K, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes *J Autoimmun* 22 (1) 73-78, 2004
- 4) Origuchi T, Kawasaki E, Ide A, Kamachi M, Tanaka F, Ida H, Kawakami A, Migita K, Eguchi K Correlation between interleukin 10 gene promoter region polymorphisms and clinical manifestations in Japanese patients with Sjogren's syndrome *Ann Rheum Dis* 62 (11) 1117-1118, 2003
- 5) Nakashima K, Kawakami A, Hida A, Yamasaki S, Nakamura H, Kamachi M, Miyashita T, Tanaka F, Izumi Y, Tamai M, Ida H, Furuyama M, Koji T, Nakamura T, Migita K, Origuchi T, Eguchi K Protection of mitochondrial perturbation by human T-lymphotropic virus type 1 tax through induction of Bcl-xL expression *J Lab Clin Med* 142 (5) 341-347, 2003
- 6) Ida H, Huang M, Hida A, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Tsujihata M, Mimori T, Eguchi K Characterization of anticytoplasmic antibodies in patients with systemic autoimmune disease *Mod Rheumatol* 13 (4) 333-338, 2003
- 7) Ida H, Nakashima T, Kedersha NL, Yamasaki S, Huang M, Izumi Y, Miyashita T, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Bird PI, Anderson P, Eguchi K Granzyme B leakage-induced cell death a new type of activation-induced natural killer cell death *Eur J Immunol* 33 (12) 3284-3292, 2003
- 8) Miyashita T, Kawakami A, Tamai M, Izumi Y, Mingguo H, Tanaka F, Abiru S, Nakashima K, Iwanaga N, Aratake K, Kamachi M, Arima K,

- Ida H, Migita K, Origuchi T, Tagashira S, Nishikaku F, Eguchi K Akt is an endogenous inhibitor toward tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis in rheumatoid synovial cells *Biochem Biophys Res Commun* 312 (2) 397-404, 2003
- 9) Kita-Furuyama M, Nagayama Y, Pichurin P, McLachlan SM, Rapoport B, Eguchi K Dendritic cells infected with adenovirus expressing the thyrotrophin receptor induce Graves' hyperthyroidism in BALB/c mice *Clin Exp Immunol* 131 (2) 234-240, 2003
- 10) Tanaka F, Migita K, Honda S, Fukuda T, Mine M, Nakamura T, Yamasaki S, Ida H, Kawakami A, Origuchi T, Eguchi K Clinical outcome and survival of secondary (AA) amyloidosis *Clin Exp Rheumatol* 21 (3) 343-346, 2003
- 11) Kusumoto K, Origuchi T, Migita K, Tanaka F, Miyashita T, Hida A, Ida H, Kawakami A, Kawabe Y, Ashizawa K, Eguchi K A case of amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis complicated with Graves' ophthalmopathy *Mod Rheumatol* 13 261-264, 2003
- 12) Migita K, Eguchi K FK506 Anti-inflammatory properties *Curr Med Chem-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 2 (3) 260-264, 2003
- 13) Shigeno M, Nakao K, Ichikawa T, Suzuki K, Kawakami A, Abiru S, Miyazoe S, Nakagawa Y, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Ishii N, Eguchi K Interferon- α sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF- κ B inactivation *Oncogene* 22 (11) 1653-1662, 2003
- 14) Ashizawa K, Eguchi K Serum anti-myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) in patients with Graves' disease receiving anti-thyroid medication *Intern Med* 42 (6) 463-464, 2003
- 15) Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Fukushima T, Takahashi R, Kuwahara H, Fujita N, Kita A, Oshima K, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Kawabata Y, Fujisawa T, Ikegami H, Eguchi K Stromal-cell derived factor-1 chemokine gene variant is associated with type 1 diabetes age at onset in Japanese population *Hum Immunol* 64 (10) 973-978, 2003
- 16) Kita A, Uotani S, Kuwahara H, Takahashi R, Oshima K, Yamasaki H, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nagayama Y, Yamaguchi Y, Eguchi K Vanadate enhances leptin-induced activation of JAK/STAT pathway in CHO cells *Biochem Biophys Res Commun* 302 (4) 805-809, 2003
- 17) 江口勝美 ヒト抗 TNF α 抗体アタリム マブを用いた関節リウマチの治療 *炎症免疫* 12 (1) 70-77, 2004
- 18) 江口勝美 関節リウマチの合併症の治療 *臨床と研究* 81 (2) 27-33, 2004
- 19) 江口勝美 RA の病態と最新の薬物療法 骨・関節・靭帯 17 (2) 149-159, 2004
- 20) 川上純, 江口勝美 Adalimumab *Current Therapy* 22 (1) 44-47, 2004
- 21) 折口智樹, 江口勝美 シェーグレン症候群 診断と治療 92 (2) 265-270, 2004
- 22) 江口勝美 ACR ガイトラインはとう変わったのか *Arthro-Care* 3 (4) 2-5, 2003
- 23) 江口勝美, 中島宗敏 抗リン脂質抗体症候群 今月の治療 10 (臨時増刊号) S281-S284, 2003
- 24) 江口勝美, 折口智樹 RA のテーラーメイド治療は可能か *診断と治療* 91 (5) 866-872, 2003
- 25) 江口勝美 関節リウマチの重篤な合併症の早期診断とその対策 *日本医事新報* 4131 1-8, 2003
- 26) 江口勝美 COX-2 選択的阻害薬の現況とさらなる可能性 *医薬ジャーナル* 39 (7) 83-92, 2003
- 27) 江口勝美 高齢者にみられる多発関節炎 *CLINICIAN* 522 (50) 25-30, 2003
- 28) 江口勝美, 田中良哉 リウマチ膠原病の重症肺病変 *九州リウマチ* 23 (1) S1, 2003
- 29) 江口勝美 変化するリウマチ治療と期待

される 生物学的製剤

江口勝美 早期関節リウマチの考え方

Pharma Medica 21 (12) 27-31, 2003

- 31) 山崎聡士, 江口勝美 関節リウマチにおける滑膜恒常性の再生 リウマチ科 30 (2) 163-170, 2003
- 32) 山崎聡士, 江口勝美 滑膜線維芽細胞の分化能と治療応用への可能性 臨床免疫 40 (2) 172-179, 2003
- 33) 井田弘明, 江口勝美 NK 細胞における活性化誘導細胞死の機序 臨床免疫 40 (2) 232-236, 2003
- 34) 右田清志, 江口勝美 二次性アミロイドーシス—原因と対策— 九州リウマチ 23 (1) 11-16, 2003
- 35) 山崎聡士, 江口勝美 関節リウマチにおける滑膜恒常性の再生 リウマチ科 30 (2) 163-170, 2003

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. TLR ligand 刺激による HSG 細胞 CD54発現の増強

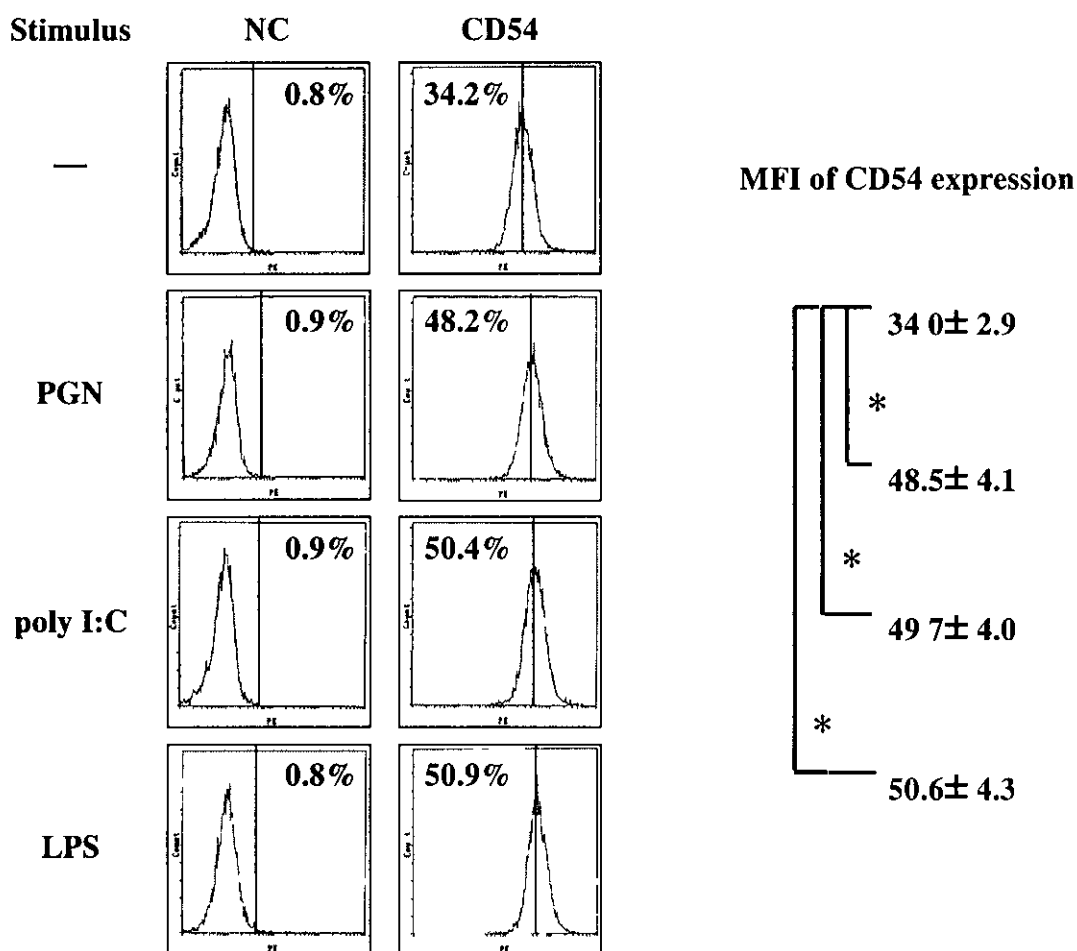


図2. TLR ligand 刺激による HSG 細胞 IL-6産生の増強

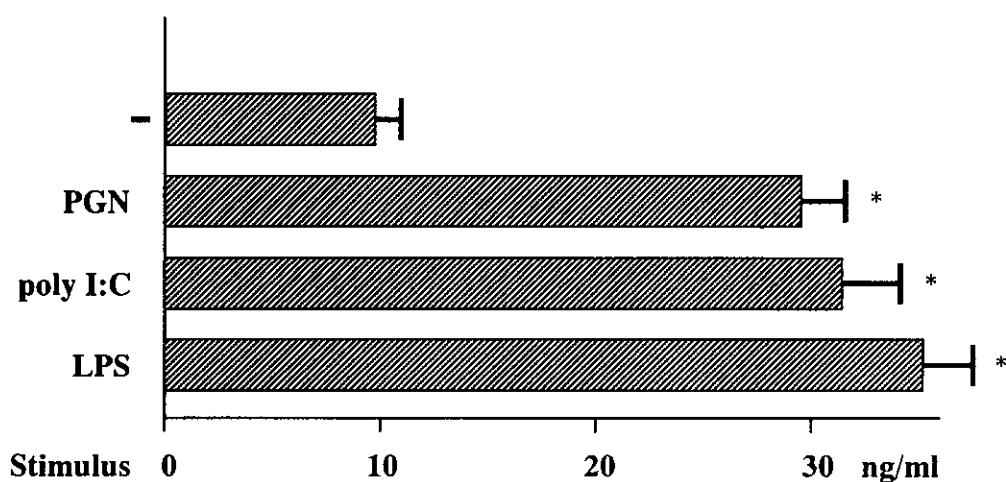
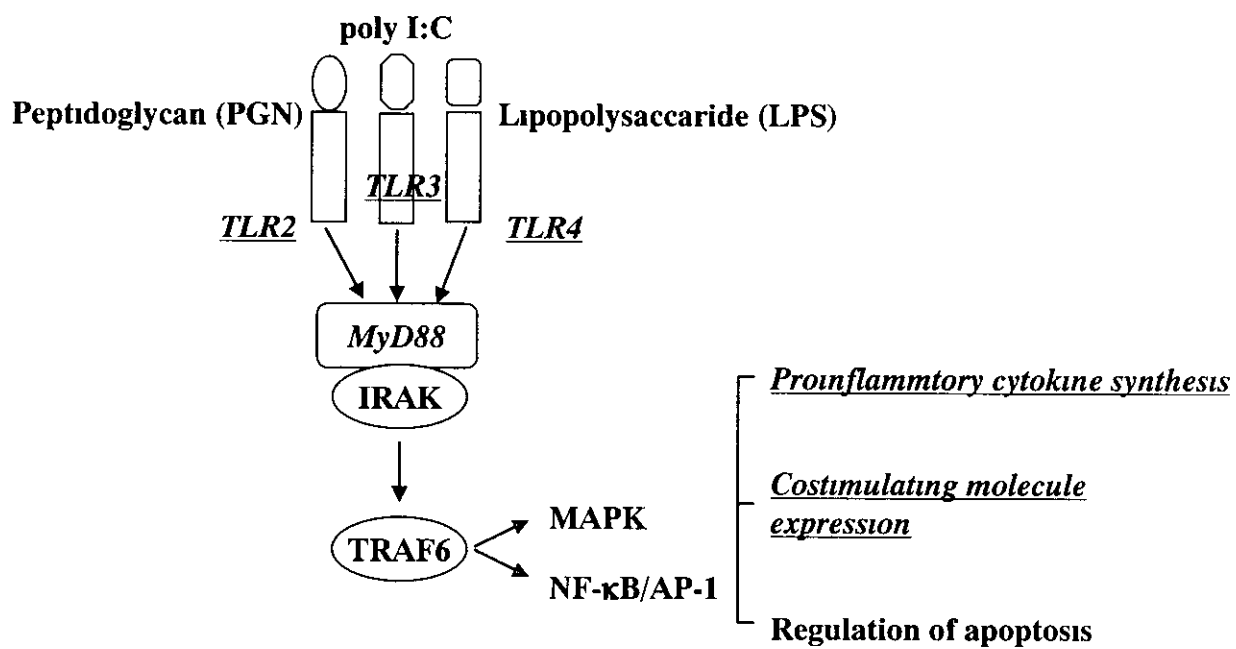


図3. SS 唾液腺細胞における TLRs シグナル伝達



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

全身性エリテマトーデス患者 T 細胞機能異常の分子機序に関する研究

○竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センター第二内科
津坂 憲政 埼玉医科大学総合医療センター第二内科
鈴木 勝也 千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学
吉本 桂子 慶応大学医学部総合医科学研究センター

研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)における末梢血 T 細胞機能の分子機序として、T 細胞レセプター・CD3複合体からの早期シグナル伝達に欠陥が存在し、解析した症例の60%に、TCRと鎖の蛋白合成低下か、一部の症例には異常スプライシングを伴ったメッセージ異常が見い出された。TCRと鎖蛋白合成障害に、この異常スプライシングを受けた TCRと鎖 mRNA ウェリアントかとのように関与しているかは不明である。その分子機序を明らかにするため、これらウェリアント mRNA を安定して発現する T 細胞株を樹立した。それら T 細胞株の TCRと鎖 mRNA 安定性を検討した所、exon7(-)ウェリアント、short 3'-UTR ウェリアントの両者において不安定性が確認され、それが TCRと鎖蛋白発現低下を引き起こしたものと考えられた。病態のエフェクター分子を明らかにする目的で、これら2つの T 細胞株に共通して認められる発現異常分子を遺伝子チップを用いて解析し、シグナル伝達分子、転写因子、アダプター分子、サイトカイン、ケモカインなどの有望な分子が明かとなった。

A. 研究目的

SLEは自己免疫疾患の原型で、多彩な自己抗体産生とそれに引き続く組織障害を特徴とする。これには、B細胞の自己抗体産生や自己反応性T細胞のエフェクター活性をコントロールすべき調節性T細胞の機能不全が重要な役割を演じている。T細胞機能不全の本態の一つに早期シグナル伝達分子の機能異常が関与する事が指摘されていたため、チロシンリン酸化を指標として異常分子の同定を試みた。その結果、TCRからのシグナル伝達で中心的役割を演じているTCRと鎖の蛋白発現が低下し、そのmRNAに異常が存在する事を明らかにした。その生成機序を解明すると共に、どのような機構によって自己免疫現象が誘導されるのかを明らかにすることを目的とする。T細胞機能異常の分子機序が解明されれば、より根本的で、理想的な治療薬の開発も期待でき、診断、分子異常の部位と病態との関連、予後、遺伝性などについて、これまでになく

の情報を得る事ができると期待される。

B. 結果と考察

1) SLE患者T細胞における鎖 mRNA 3'UTR 異常 mRNAの3'非翻訳領域(UTR)はmRNAの安定性に関与するだけでなく、mRNAの細胞質への輸送にも重要な役割を担っていることが報告されている。そこで我々は鎖 mRNAの3'UTR異常がSLE患者末梢血T細胞での鎖発現低下に関与する可能性を考え検討した。exon 8を含む鎖3'UTR cDNAをRT-PCR法で増幅しアカロースケルで電気泳動した結果、大部分のSLE患者では、正常の野生型と思われる910 bpのcDNAフラグメントと比較し560bpも短い350bpのcDNAフラグメントが優位に検出された。その一方で、正常コントロールでは全例で

910 bp の野生型 cDNA フラグメントが優位であった。この野生型 910 bp と短い 350 bp の cDNA フラグメントを比較した結果、野生型 mRNA の 3'UTR には splicing donor および acceptor site と考えられる配列が存在し、短い mRNA はこの部位でスプライシングが起こって 560bp がスプライスアウトされ、生成されたものと思われた。

2) SLE 患者における short exon8 ヴァリアントの発現 350bp の short exon8 スプライシングヴァリアントが SLE 患者 T 細胞で優位に認められるかどうかを定量的に検討するため、半定量 PCR 法を用いて ζ 鎖 mRNA の発現を比較した。その結果、健常人コントロールでは全例で野生型 3'UTR が short exon8 ヴァリアントよりも優位に強く発現していたか、SLE 患者 7 例では全例で、short exon8 ヴァリアントが野生型よりも優位に検出された。特に 5 例の SLE 患者では、野生型が検出不能な程度まで発現低下していた。

3) ヴァリアント TCR ζ 鎖遺伝子導入 T 細胞株の樹立 これらヴァリアントの蛋白発現低下および T 細胞機能に及ぼす影響を検討するため、レトロウイルスベクターに wild 型あるいはヴァリアント TCR ζ 鎖遺伝子を組み込み、TCR ζ 鎖欠損マウス T 細胞ハイブリトーマ MA5 8 にトランスフェクトして細胞株を樹立した。short 3'-UTR 株は、wild TCR ζ 鎖株に比し、TCR ζ の表面発現が平均蛍光強度で 65 から 24 へと有意に低下し、同時に X Δ 3 ϵ 鎖の発現も 38 から 15 へと低下していた。免疫フロットによって蛋白合成を検討したところ、short 3'-UTR 株の CD3 ϵ 鎖は wild 株と同等であることが確認され、CD3 ϵ 鎖の表面発現低下は TCR ζ 鎖の産生低下による二次的現象と考えられた。アクチノマイシン処理によって TCR ζ 鎖 mRNA 安定性を検討したところ、short 3'-UTR 株では wild 株に比べ mRNA の消滅は明らかで、安定性が低下していることが明らかとなった。一方、CD3 ϵ 鎖

の安定性は short 3'-UTR 株でむしろ亢進し、この安定性低下は TCR ζ 鎖 mRNA に特異的なものであった。

4) 遺伝子チップを用いたヴァリアント TCR \cdot 鎖導入 T 細胞株の mRNA 発現解析 SLE の病態形成において鍵を握る分子を探索するため、ヴァリアント TCR \cdot 鎖を遺伝子導入し TCR ζ 鎖蛋白発現低下を来した 2 つのクローンをを用いて、遺伝子チップによって網羅的 μ PNA 発現解析を行った。両者に共通して発現亢進する分子として、TXK などのシグナル伝達分子、転写因子、WASP などのアダプター分子、B7 インテグリンなどの接着分子が明らかとなった。一方、発現低下する分子として、IL-2 を初めとする種々のサイトカインが明らかとなった

C. 結論

長い間分子機序の不明であった SLE において、シグナル伝達分子の機能異常に焦点を当て解析した結果、その分子機序の一部が明らかとなった。この研究により、分子異常が特定され、異常分子そのものその生成機序が蛋白あるいは遺伝子レベルで明らかになれば、それを指標とした発症前診断、原因療法の開発が可能と考えられる。特に、TCR ζ 鎖蛋白発現低下を是正するような遺伝子治療は、今後も基礎的検討を積み重ね、臨床応用の可能性を検討していく必要がある。一方、今回明らかになった TCR ζ 鎖下流で発現亢進、あるいは低下している分子は、新たな治療標的となりうる可能性を秘めており、より原因に近い治療法開発に大きな進歩をもたらすものと期待される。

D 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

- 1 Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T Forced expression of TCR \cdot mRNA with alternatively spliced 3' untranslated region found in SLE patients lead to decreased production and cell surface expression of TCR \cdot and TCR-CD3 complex *J Immunol* 171 2496-2503, 2003
- 2 Takeuchi T, Tsuzaka K, and Abe T Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus *Int Rev Immunol* in press

I. 学会発表

- 1 Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T Expression of adapter proteins in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their involvements in the signaling from growth factor receptors 67th Annual Meeting, Orlando, U S A , October, 2003
- 2 Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T A splice variant of the TCR ζ mRNA lacking exon 7 can lead to the down-regulation of TCR ζ protein and IL-2 production in SLE T cells American College of Rheumatology, 67th Annual Meeting, Orlando, U S A , October, 2003
- 3 リウマチ 膠原病の最新の進歩 「関節リウマチの最新の治療 抗サイトカイン療法を中心として」 日本医学会総会 シンポジウム 2003 4 5 福岡
- 4 リウマチ薬物治療の最近の進歩「抗 TNF α 抗体インフリキシマブの臨床的効果と今後の課題」 第 47 回日本リウマチ学会 シンポジウム 2003 4 24-26 東京
- 5 リウマチ／膠原病の病態と薬物療法の進歩 日本内科学会生涯教育講演会 2003 東京／大阪／名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① T 細胞リセプターと鎖タンパク、これをコートする遺伝子若しくはその一部を含む精製された核酸又は該タンパク若しくは該核酸に基づく自己免疫疾患検出方法(特願平 9-309302)
- ② 分泌腺細胞とリンパ球との接着阻害剤 (08/946838)

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

抗リン脂質抗体症候群の診断法に関する検討

分担研究者 松浦 栄次 岡山大学大学院医歯学総合研究科病態制御科学専攻
病態機構学講座（細胞化学分野） 助教授

研究要旨

平成 11-13 年度の厚生省特定疾患対策事業「自己免疫疾患の病因・病態解析と新たな治療法の開発」および平成 14 年度より新たにスタートした特定疾患対策事業「自己免疫疾患に関する調査研究」で、酸化 LDL と β 2-グリコプロテイン I (β 2GPI) の相互作用の機序を分子レベルで解析すると共に、これらの複合体が抗リン脂質抗体症候群 (APS) で出現する主要な自己抗体である抗 β 2GPI 抗体 (いわゆる抗カルシオリピン抗体) の対応抗原であることを見いだした。さらに、本疾患患者血清中には IgG クラスの酸化 LDL・ β 2GPI 免疫複合体の存在が確認された。本年度は、これら、酸化 LDL・ β 2GPI 複合体 (自己抗原)、IgG 抗複合体抗体、および免疫複合体の新規測定法を確立した。ところで、C 反応性タンパク質 (CRP) とは、急性炎症期に肝臓で合成され血中に出現するタンパク質のことである。最近、CRP が肝臓ではなく、血管内皮傷害などが原因でマクロファージや血管平滑筋細胞などにより微量合成され血中に現れることが知られており、高感度 CRP (hsCRP) として区別されている。この hsCRP が酸化 LDL と Ca 依存的に結合することで、血清中で、hsCRP・酸化 LDL・ β 2GPI 複合体として存在することが明らかになった。本複合体は APS のみならず、SLE や糖尿病患者血清にも存在することか合わせて確認された。APS の診断で問題になるのは、既存の種々の抗リン脂質抗体の測定法を用いて、高い抗体価が確認されるにも関わらず、長期間全く血栓症の症状が認められないケースがあることである。我々は、自己抗体のみならず、自己抗原 (すなわち、酸化 LDL・ β 2GPI 複合体) あるいはそれらからなる IgG 免疫複合体を合わせて測ることによって APS に対する診断の臨床的特異性が改善されるか否かについて今年度より解析を開始した。さらに、hsCRP・酸化 LDL・ β 2GPI 複合体についてもその臨床意義について解析を開始すると共に、paraoxonase (PON) や platelet-activating factor acetyl hydrolase (PAF-AH) とこれら血清学的指標との関係についても若干の検討を行った。基礎医学的にはマクロファージによる β 2GPI の取り込みと、特異的 T 細胞への抗原提示への関係について解析を行っている。

A. 研究目的

【目的】自己抗体に起因する易血栓性が基本病態である抗リン脂質抗体症候群 (APS) では、血栓症 (特に、動脈血栓症) の原因か、抗カルシオリピン抗体 (抗 β 2-グリコプロテ

イン I (β 2GPI) 抗体) や抗プロトンヒン抗体による血液過凝固である他、動脈硬化の進展機序が関与している可能性を示し、自己抗原 (酸化 LDL・ β 2GPI 複合体)、IgG 抗酸化 LDL・ β 2GPI 複合体抗体、C 反応性タンパク質

(CRP)・酸化 LDL・ β 2GPI 複合体や IgG 免疫複合体の新規測定法を確立した。抗 β 2GPI 自己抗体に加えて、自己抗原(酸化 LDL・ β 2GPI 複合体)、IgG 抗酸化 LDL・ β 2GPI 複合体抗体、C 反応性タンパク質(CRP)・酸化 LDL・ β 2GPI 複合体)や IgG 免疫複合体の測定意義を明確にすることや、基礎医学的にはマクロファージによる抗原提示における自己抗体、自己抗原複合体、およびそれらの免疫複合体の関与の解明を通じて本疾患の発症機序を理解することか治療法の確立につながると考えている。さらに、*paraoxonase* (PON) や *platelet-activating factor acetyl hydrolase* (PAF-AH) とこれら血清学的指標との関係についても若干の検討を行った。

B. 研究方法

各種抗原、抗体、および免疫複合体を ELISA 法にて測定した。

1 酸化 LDL・ β 2GPI 複合体

WB-CAL-1 [APS の動物モデルである (NZW x BXSB) F1 雄性マウス由来のモノクローナル抗 β 2GPI 抗体]固相化マイクロテストプレートと HRP 標識抗ヒト apoB 抗体を用いるサンドイッチ ELISA で測定した。

2 IgG 抗酸化 LDL・ β 2GPI 複合体抗体

硫酸銅酸化 LDL と β 2GPI を Ca 非依存的に共有結合させた複合体をマイクロテストプレートに固相化し HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を用いて測定した。

3 IgG 抗酸化 LDL・ β 2GPI 免疫複合体

Cof-23 [ヒト β 2GPI を免疫することを得た BALB/c 由来のモノクローナル抗 β 2GPI 抗体]をマイクロテストプレートに固相化し HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を用いて測定した。

4 hsCRP・酸化 LDL・ β 2GPI 複合体

WB-CAL-1 固相化マイクロテストプレートと HRP 標識抗ヒト CRP 抗体を用いるサンドイッチ ELISA で測定した。標品として hsCRP と予め調製しておいた酸化 LDL・ β 2GPI 複合体を Ca 依存的に結合させた。

5 *paraoxonase* (PON) 活性

96 ウェルマイクロテストプレートを用い、PON (10 μ M) と血清 (5 μ l) を 300 μ l の 1 mM CaCl₂ 含有 50 mM glycine buffer 中で 37°C、15 分インキュベートし、産生される *p*-nitrophenol 量を 412 nm でモニターした。

6 *platelet-activating factor acetyl hydrolase* (PAF-AH) 活性

PAF-AH 活性は、血漿サンプルと 20 nmol の [³H]acetyl-PAF、5 mM EDTA、5 mM 2-ME を 50 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で 37°C、30 分間反応させた。

7 マクロファージによる β 2GPI の取り込みと特異的 T 細胞への抗原提示

マクロファージを各種リン脂質、[¹²⁵I] β 2GPI リガンド含有リポソームと β 2GPI と共に培養し β 2GPI の取り込み量を測定した。同様の培養系で、予め放射線照射したマクロファージと APS 患者末梢リンパ球より樹立した β 2GPI 特異的 T 細胞クローンを培養しこれらの細胞増殖を [³H]TdR の取り込み量として測定した。(倫理面への配慮)

血漿サンプルについては、インフォームトコンセントの上、了解の得られた患者および健康人より血清並びに血漿を得た。これらの血液由来のサンプルは使用時まで -20 °C で施錠して保管した。また、得られた結果等の扱いについて厳密に管理した。

C. 研究結果

酸化 LDL・ β 2GPI 複合体(抗原)は、SLE や APS のみならず、酸化ストレスが発症に関与すると考えられる糖尿病、あるいは、梅毒患者、強皮症患者血清で陽性になる一方、慢性関節リウマチ、血管炎患者血清では陽性例が認められず、本複合体の出現は、血管内皮傷害に関連していることが示唆された。IgG 抗酸化 LDL・ β 2GPI 複合体抗体および IgG・酸化 LDL・ β 2GPI 免疫複合体の何れもか、APS で高率に検出され、特に動脈血栓との関連が示された。PON 活性と抗酸化 LDL・ β 2GPI 複合体抗体との間で負の相関を、また、PAF-AH

と抗酸化 LDL・ β 2GPI 複合体抗体との間で逆に正の相関を認めた。CRP を酸化 LDL と共にインキュベートすると、 Ca^{2+} 依存的に酸化 LDL あるいは β 2GPI・酸化 LDL 複合体と結合した。ラテックス凝集法による血中高感度 CRP 値と CRP・ β 2GPI・酸化 LDL 複合体値の間には強い相関関係が存在した。本複合体は糖尿病患者のみならず、APS や SLE 患者血清中でも検出された。6~8 ヶ月間の follow up study では、酸化 LDL・ β 2GPI 複合体、IgG 抗酸化 LDL・ β 2GPI 複合体、およびそれらからなる IgG 免疫複合体、および CRP・ β 2GPI・酸化 LDL 複合体が長期に渡り陽性を示す症例か認められたか、SLE の疾患活動性とは関連か認められなかった。また、感染や急性炎症などにより肝臓で合成される CRP は、血管内皮傷害に伴ってマクロファージや血管平滑筋より産生される hsCRP と異なり酸化 LDL・ β 2GPI との複合体を形成せず、遊離の形で存在していた。

β 2GPI のマクロファージへの取り込みは、 β 2GPI 単独の添加では起こらず、ホスファチシルセリン、酸化 LDL 由来の β 2GPI リガンドなどを含有したリポソームを共存させた場合にのみ見られた。T 細胞への抗原提示に、 β 2GPI の取り込みが必須であるが、 β 2GPI の取り込み量と T 細胞への抗原提示能については必ずしも対応していなかった。

D. 考察

種々の酸化ストレス、高コレステロール血症、share stress などの risk factor と関連して酸化 LDL が産生され動脈硬化の進展に寄与していると考えられている。特に、冠動脈疾患では、一過的に顕著な量の酸化 LDL が血中に現れることか数多くの研究グループより報告されている。酸化 LDL 自体が酸化による陰性荷電を有しており、血中から速やかに肝臓等へクリアランスされるため長期間滞留することはない。

我々は、近年、酸化 LDL が特定のリガント（コレステリルリノレートの酸化体）を介し

て β 2GPI に結合することを見たいし報告してきた。この酸化 LDL・ β 2GPI 複合体は、冠動脈疾患のみならず、APS、SLE、強皮症、糖尿病、慢性腎炎、梅毒などの患者血清中に広く検出された。恐らく、血管内皮の機能障害に関連が示唆される。また、複合体形成に伴い、荷電が中和されるため長期間血中に滞留すると考えている。APS では、IgG 抗 β 2GPI 抗体（すなわち、抗カルシオリピン抗体）の他、IgG 抗酸化 LDL・ β 2GPI 複合体抗体、IgG 酸化 LDL・ β 2GPI 免疫複合体の陽性例か認められた。これらの間には概ね良好な相関($r^2=0.5$ 前後)か認められるが、個々の検体についてみると対応しない検体も多かった。APS では、IgG 抗 β 2GPI 抗体が強陽性であるにも関わらず、血栓症の発症か認められないケースも少なくなかった。今年度の研究だけで結論つけることかてきないが、自己抗体のみならず、自己抗原（酸化 LDL・ β 2GPI 複合体）あるいはそれらからなる免疫複合体の存在が発症（血栓形成）に不可欠な因子であるかどうか注目している。

PON は HDL に存在するいわゆる phospholipase A2 (PLA2) ファミリーの 1 種で、いわゆる抗酸化酵素である。一方、PAF-AH は、LDL や HDL (主に LDL) に存在する PLA2 で、これも PON 同様酸化リン脂質の sn2 の脂肪酸エステルを加水分解する。前者の活性が遺伝的に規定されているのに対して、後者は酸化度に依存して活性を示すことを本研究の結果か示している。APS においてこれらの酵素との関係を詳細に調べていきたい。

マクロファージや樹状細胞による抗原 (β 2GPI) 提示には、 β 2GPI か酸化 LDL や感染細菌などを介してこれら抗原提示細胞に取り込まれることが必須であるか、T 細胞への抗原提示は、複合体を形成した脂質側の細胞内輸送経路に依存する（リソソームへ移行できるかどうかにか依存する）可能性かあり今後検討する。

E. 結論

酸化 LDL・ β 2GPI 複合体および hsCRP・酸化 LDL・ β 2GPI 複合体の測定系を確立し、APS、SLE をはじめとする血管内皮傷害が関連する疾患の血中にこれらの複合体が出現することを認めた。APS においては、自己抗体のみならず、これら自己抗原、免疫複合体の血栓形成への関与が示唆された。来年度、このことについて詳細に解析を行う。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Inagaki, J , Sugiura-Ogasawara, M , Nomizu, M , Nakatsuka, M , Ikuta, K , Suzuki, N , Kaihara, K , Kobayashi, K , Yasuda, T , Shoenfeld, Y , Aoki, K , and Matsuura, E An association of IgG anti-laminin-1 autoantibodies with endometriosis in infertile patients *Human Reprod* 18 544-549, 2003
- 2 Matalon, T S , Blank, M , Matsuura, E , Inagaki, J , Nomizu, M , Koike, T , Ornoy, A , and Shoenfeld Y Immunization of naive mice with mouse laminin-1 affected pregnancy outcome in a mouse model *Am J Reprod Immunol* 50 159-165, 2003
- 3 Wu, R, Shoenfeld, Y, Sherer, Y, Patnaik, M , Matsuura, E , Gilburd, B , Koike, T , and Peter JB Anti-idiotypes to oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations-possible immunomodulation of atherosclerosis *Autoimmunity* 36 91-97, 2003
- 4 Sherer, Y, Tartakover-Matalon, S , Blank, M , Matsuura, E , Shoenfeld, Y Multiple autoantibodies associated with autoimmune reproductive failure *J Assist Reprod Genet* 20 53-57, 2003
- 5 Matsuura, E , Kobayashi, K , Koike, T , Shoenfeld, Y , Khamashta, M A , Hughes, G R V Atherogenic autoantigen oxidized LDL complexes with β 2-glycoprotein I *Immunobiology* 207 17-22, 2003
- 6 Matsuura, E , Kobayashi, K , Koike, T , Shoenfeld, Y , Khamashta, M A , Hughes, G R V Oxidized low-density lipoprotein as a risk factor of thrombosis in antiphospholipid syndrome *Lupus* 12 550-554, 2003
- 7 Kobayashi, K , Kishi, M , Atsumi, T , Bertolaccini, M L , Makino, H , Sakurai, N , Yamamoto, I , Yasuda, T , Khamashta, M A , Hughes, G R V , Koike, T , Voelker, D R , and Matsuura, E Circulating oxidized low density lipoprotein forms complexes with β 2-glycoprotein I implication as an atherogenic autoantigen *J Lipid Res* 44 716-726, 2003
- 8 Born, W K , Vollmer, M , Reardon, C , Matsuura, E , Voelker, D R , Giclas, P C , and O'Brien, R L Hybridomas expressing $\gamma\delta$ T-cell receptors respond to cardiolipin and β 2-glycoprotein 1 (apolipoprotein H) *Scand J Immunol* 58 374-381, 2003
- 9 Lopez, D , Kobayashi, K , Merrill, J T , Matsuura, E , and Lopez, L R IgG autoantibodies against β 2-glycoprotein I complexed with a lipid ligand derived from oxidized low-density lipoprotein are associated with arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome *Clin Dev Immunol* 10 203-211, 2003
- 10 Lopez, D , Garcia-Valladares, I , Palafox-Sanchez, C A , De La Torre, I G , Kobayashi, K , Matsuura, E , and Lopez, L R Oxidized low-density lipoprotein/ β 2-glycoprotein I complexes and autoantibodies to oxLig-1/ β 2-glycoprotein I in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome *Am J Clin Pathol* 121 426-436, 2004
- 11 Yasuda, S , Atsumi, T , Ieko, M , Matsuura, E , Inagaki, J , Hisao, H , Tanaka, H , Yamakado, M , Akino, M , Saito, H , Amasaki, Y , Jodo, S , Amengual, O , and Koike, T Nicked β 2-glycoprotein I A marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of

- extrinsic fibrinolysis *Blood* (in press)
- 12 Kasahara, J, Kobayashi, K, Maeshima, Y, Yamasaki, Y, Kubono K, Hibi N, Yasuda, T, Koike, T, Matsuura, E, and Makino, H Clinical significance of serum oxidized LDL in patients with chronic renal diseases *Nephron Clin Practice* (in press)
 - 13 Atsumi, T, Matsuura, E, and Koike, T Immunology of antiphospholipid antibodies and cofactors In *Systemic Lupus Erythematosus (Fourth Edition)* Lahita, R G, ed, Elsevier Scientific Publisher, Amsterdam, The Netherlands (in press)
 - 14 Matsuura, E, and Lopez, L R Autoimmune-mediated atherosclerosis pathogenic role of oxLDL/ β 2GPI complexes Recent Research Developments in Lipids Transworld Research Network, Kerala, India (in press)
 - 15 Matsuura, E and Lopez, L R Oxidized low-density lipoprotein complexed with β 2-glycoprotein as a common metabolic form in atherogenesis and autoimmune-mediated atherosclerosis In *Progress in Atherosclerosis Research* Columbus, F ed Nova Science Publishers, Inc Hauppauge, NY, USA (in press)
 - 16 松浦栄次、小林和子 酸化 LDL 研究の現状 アニムス、アニムス刊行会、東京 pp21-27, 2003
 - 17 稲垣純子、青木耕治、松浦栄次 子宮内膜症と抗ラミニン-1 抗体 *臨床免疫* 39 575-581, 2003
 - 18 松浦栄次、小林和子、小池隆夫 自己免疫と動脈硬化 *日本アフェレシス学会学会誌* (印刷中)
 - 2 Lopez, D, Garcia-Valladares, I Palafox-Sanchez, C Matsuura, E De La Torre, I G, and Lopez, L R OxLDL/ β 2GPI complexes are frequent in SLE whereas autoantibodies to oxLig-1/ β 2GPI are more prevalent in patients with antiphospholipid syndrome Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, 2003
 - 3 Kobayashi, K, Kishi, M Atsumi, T, Bertolaccini, M L Kasahara, J Makino, H, Sakurai, N, Yamamoto, I Yasuda, T, Khamashta, M A, Hughes, G R V, Koike, T, Voelker, D R, and Matsuura, E Detection and clinical significance of oxidized LDL complexes with β 2-glycoprotein I and/or C-reactive protein Atherosclerosis, Gordon Research Conference, Meriden, USA, 2003
 - 4 Kuwana, M, Okazaki, Y, Kaburaki, J, Kawakami, Y, and Matsuura, Y Binding of β 2-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells ACR USA, 2003
 - 5 小林和子、渥美達也、保田立二、小池隆夫、松浦栄次 血中酸化 LDL- β 2-グリコプロテイン I 複合体の意義 第 47 回日本リウマチ学会 東京 2003
 - 6 松浦栄次、小林和子、渥美達也、山本 格、榎野博史、保田立二、小池隆夫 血中酸化 LDL・ β 2-グリコプロテイン I 複合体とそれらの免疫複合体の意義 日本動脈硬化学会 京都 2003

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

2. 学会発表

- 1 Lopez, D, Merrill, J T, Matsuura, E, and Lopez, L R IgG autoantibodies to oxLig-1/ β 2GPI complex are associated with arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, 2003

抗リン脂質抗体症候群の病因として β_2 -グリコプロテインIの分子修飾

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

抗リン脂質抗体症候群(APS)における抗 β_2 -グリコプロテインI(β_2 GPI)抗体の産生機序を β_2 GPI反応性CD4⁺T細胞の活性化メカニズムに着目して検討した。 β_2 GPI反応性T細胞はDRB4*0103に拘束されたリン脂質結合部位を含む cryptic なペプチド(p276-290)を認識する。昨年度はAPS患者由来のp276-290反応性CD4⁺T細胞クローン株を用いて β_2 GPIのリン脂質への結合か抗原提示細胞におけるp276-290の提示を誘導することを報告した。本年度はリン脂質に結合した β_2 GPIによりDRB4*0103を持つ健常人6名の末梢血T細胞を刺激し、 β_2 GPI反応性T細胞のプライミングを試みた。末梢血単球から作成した樹状細胞、マクロファージにフォスファチシルセリン・リポソームに結合させた β_2 GPIをパルスし、IL-2存在下で自己末梢血CD3⁺T細胞と共培養した。10日後にT細胞を回収し、各種抗原をパルスした自己B細胞株と培養し、上清中に産生されたIFN- γ を測定した。その結果、p276-290に対するT細胞の特異的反応は樹状細胞を用いると5例、マクロファージを用いると1例で検出され、リン脂質に結合した β_2 GPIで健常人T細胞を感作することにより β_2 GPIに対するT細胞のプライミングを誘導することができた。したがって、 β_2 GPIが陰性荷電を有する外来微生物成分やアポトーシス細胞と結合して強力な抗原提示能を持つ樹状細胞などに取り込まれれば、 β_2 GPI反応性T細胞の活性化を介してAPSの発症につながる可能性が考えられた。

A.研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)は動静脈血栓症、習慣性流産をきたす自己免疫疾患で、血清中には様々なリン脂質結合蛋白に対する自己抗体が検出される。抗リン脂質抗体の対応抗原として最も頻度が高いのは β_2 -グリコプロテインI(β_2 GPI)で、動物モデルでは抗 β_2 GPI抗体の血栓症を誘導する病原性が示されている。我々はこれまで β_2 GPIを認識するCD4⁺T細胞について検討し、APS患者における抗 β_2 GPI抗体産生は正常のT細胞レパトワに存在する β_2 GPI反応性CD4⁺T細胞の活性化によることを見出した。APS患者由来の β_2 GPI反応性CD4⁺T細胞クローン株の解析から、 β_2 GPI反応性T細胞の多くはDRB4*0103に拘束されたリン脂質結合ドメインを含むエピトープ(p276-290)を認識する。ただし、このエピトープペプチドは抗原提示細胞(APC)におけるnativeな β_2 GPI分子からのプロセ

ッシングでは作られず、その発現には β_2 GPIの人為的な分子修飾が必要であった。このことから、APS患者ではAPCによりp276-290が提示され、 β_2 GPI反応性T細胞の活性化を介して抗 β_2 GPI抗体産生を誘導している可能性が考えられる。昨年度までの β_2 GPI反応性T細胞クローン株を用いた検討により、本来は分子表面に露出している β_2 GPIのリン脂質結合ドメインが分子構造変化や陰性荷電を有するリン脂質と結合により覆われると、エピトープペプチドが提示され、 β_2 GPI反応性T細胞の活性化が誘導されることか明らかとなった。そこで、本年度はリン脂質に結合した β_2 GPIにより健常人において β_2 GPI反応性T細胞のプライミングがてきるかを検討することで、APSの発症機序を追究した。

B.研究方法

1 対象

DRB4*0103 (DR53)を持つ健常人6名を対象とした。

2 リン脂質結合 β_2 GPI の作成

ウシ脳由来フォスファチジルセリンを30%含むリポソームは岡山大学大学院医歯学総合研究科細胞化学分野の松浦栄次先生より供与を受けた。リポソームはヒト β_2 GPIと室温で30分反応させ、終濃度0.1 $\mu\text{mol/ml}$ lipid、10 $\mu\text{g/ml}$ proteinで用いた。

3 リン脂質結合 β_2 GPI を用いた *in vitro* での β_2 GPI に対するT細胞のプライミング

リポソームを取り込むことができるマクロファージ、樹状細胞をAPSとして用いた。マクロファージと樹状細胞は末梢血単球からM-CSFまたはGM-CSFとIL-4存在下で7日間培養することで作成した。マクロファージ、樹状細胞にリポソーム結合 α_2 GPI、リポソーム、 β_2 GPIをパルスし、TNF- α 存在下で48時間培養することで活性化あるいは成熟させた。抗原を取り込んだ抗原提示細胞と磁気ビーズ結合抗CD3抗体を用いて分離した自己のT細胞を共培養し、3日目にIL-2を添加した。さらに7日間培養した後に生細胞を回収し、ヒトnative β_2 GPI、GP-F(β_2 GPI全長とMBPの融合蛋白)、MBP、p276-290、p306-320をパルスした自己のEBVトランスフォームB細胞株と3日間培養し、上清中のIFN- γ 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

すべての検体は学内の倫理委員会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

図1に代表例の樹状細胞を抗原提示細胞として用いた実験結果を示す。健常人末梢血T細胞をリン脂質結合 β_2 GPIで1回刺激することにより、GP-Fおよびp276-290と特異的に反応するT細胞を誘導することができた。p276-290に対するT細胞の反応はリン脂質または β_2 GPI単独で刺激した際には検出されなかった。健常人6例で検討すると、樹状細胞を用いると5例(83%)でp276-290特異的なT細胞の反応が検出された。

一方、マクロファージをAPCとして用いると、特異的反応が得られたのはわずか1例(17%)であった。健常人の末梢血T細胞にp276-290を直接添加してもT細胞の反応は検出されないことから、リン脂質結合 β_2 GPIをパルスした樹状細胞によりp276-290と反応するT細胞をプライミングしたと考えられた。

D.考察

自己反応性T細胞の胸腺における除去は完全でなく、正常のT細胞レパトワには多くの自己反応性T細胞が残存する。これら自己反応性T細胞は調節性細胞などを介して抑制されているが、何らかの要因により活性化されれば自己免疫疾患を発症しうる。したがって、自己免疫疾患の病因解明には自己反応性T細胞の活性化メカニズムの追究が不可欠である。

APSにおいては、抗リン脂質抗体産生を誘導する α_2 GPI反応性CD4⁺T細胞が病態と密接に関連している。その選択的な活性化のためにはエピトープペプチドか末梢APCにより提示される必要がある。APCにおけるプロセッシングでは、取り込んだ抗原がエンドソームで各種プロテアーゼの作用を受けてペプチド断片となり、そのうち自己HLAクラスIIと親和性のあるものだけが膜表面に発現される。したがって、 β_2 GPI反応性CD4⁺T細胞により認識されるcrypticなp276-290がAPCにより発現されるためにはプロセッシング過程における何らかの変化が必要である。昨年度の β_2 GPI反応性T細胞クローン株を用いた検討により、本来は分子表面に露出している β_2 GPIのリン脂質結合ドメインが分子修飾などで覆われることでエピトープペプチドが提示されることが示された。今回の検討により、HLA拘束因子であるDR53を有する健常人ではリン脂質に結合した β_2 GPIを取り込んだ強力なAPC存在下でp276-290に対するT細胞の応答が誘導されることが示された。したがって、DR53保有者が陰性荷電を持つアポトーシスに陥った細胞やリン脂質を豊富に含む外来微生物に大量に暴露されると、 β_2 GPIが結合したこれら抗原を取り込んだAPCが β_2 GPI反応性T細胞の活性化し、抗 β_2 GPI抗体産生を誘導するかもしれない。興味深いことに、 β_2 GPIを結合させたアポトーシス細