

胞をアジュハントなしで正常マウスに免疫することにより抗 $\alpha_2$ GPI 抗体産生を誘導できたことが報告されている。ただし、エピトープペプチドを樹状細胞などの強力な APC が提示することが必要であり、さらに *in vivo* では調節性細胞の活性低下、抗体産生を誘導する免疫バランスなど他の要因も必要である。今後は、今回の成績をさらに確認するため HLA-DR53 トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* での検討を行う予定である。

## E. 結論

$\alpha_2$ 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などと結合して強力な APC に取り込まれるは、 $\alpha_2$ 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。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y  
Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is a sensitive and specific test for the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia *Am J Med* 2003, 114(4) 322-325
- 2) Kuwana M Autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells to  $\beta_2$ -glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome *Autoimmun Rev* 2003, 2(4) 192-198
- 3) 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(4) 1229-1236
- 4) Satoh T, Pandey JP, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M Single nucleotide polymorphisms of the inflammatory cytokine genes in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura *Br J Haematol*

- 2004, 124(6) 796-801
- 5) 桑名正隆 抗リン脂質抗体症候群 *Medical Science Digest* 2003, 29(1) 4-5
- 6) 鎌木淳一、桑名正隆、池田康夫 抗リン脂質抗体症候群の診断における抗フォスファチシルセリン・プロトロンビン複合体抗体の臨床的意義 *臨床血液* 2003, 44(1) 28-30
- 7) 桑名正隆、池田康夫 ステロイド/摘脾抵抗性 ITP-CD40 リガンドを標的とした治療法 *臨床血液* 2003, 44(2) 82-89
- 8) 桑名正隆 CD40/CD154 相互作用遮断による Tr 細胞の誘導 *臨床免疫* 2003, 39(5) 228-231
- 9) 桑名正隆 自己免疫疾患における CD40/CD154 シグナル阻害療法 *日本臨床免疫学会会誌* 2003, 26(5) 259-266
- 10) 鎌木淳一、桑名正隆、池田康夫 抗リン脂質抗体 *臨床病理* 2003, 51(7) 639-643
- 11) 桑名正隆 抗リン脂質抗体の測定法 検査と技術 2004, 32(1) 11-16

### 2. 学会発表

- 1) 鎌木淳一、桑名正隆、池田康夫 抗リン脂質抗体症候群の診断における抗フォスファチシルセリン・プロトロンビン複合体抗体の臨床的意義 第 100 回日本内科学会総会(福岡) 2003 4
- 2) 鎌木淳一、桑名正隆、池田康夫 全身性エリテマトーデスにおける抗フォスファチシルセリン・プロトロンビン複合体抗体の臨床的意義 第 47 回日本リウマチ学会総会(東京) 2003 4
- 3) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Matsuura E Binding of  $\beta_2$ -glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells The 67th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Orlando) 2003 10

## 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。

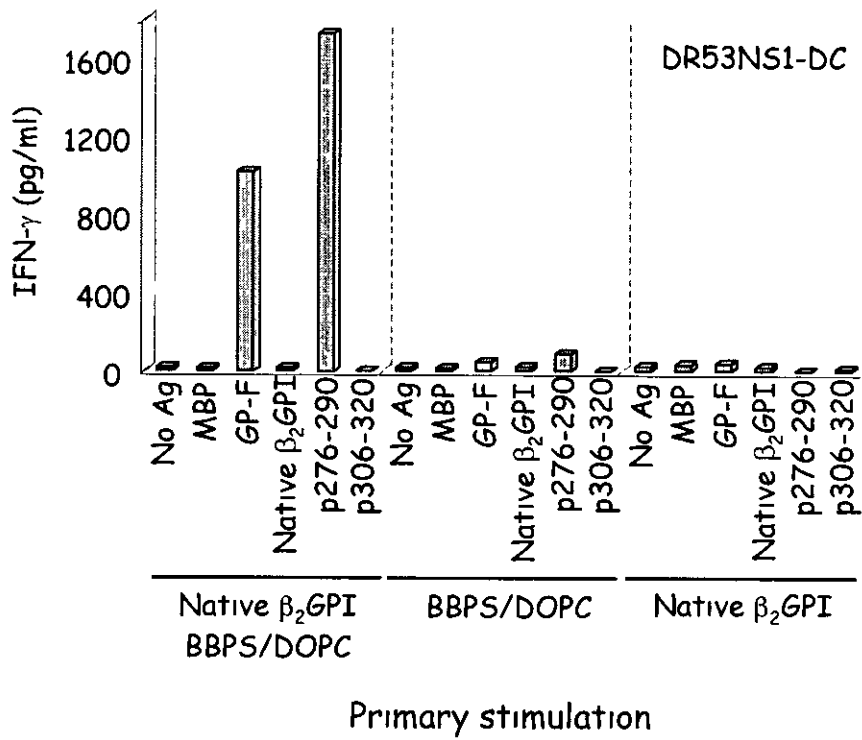


図1 リン脂質結合 $\beta_2$ GPI を用いた *in vitro* での $\beta_2$ GPI に対する T 細胞のプライミング

## 抗リン脂質抗体関連血小板減少症のマネージメントについて

主任研究者 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座免疫代謝内科分野 教授

### 研究要旨

抗リン脂質抗体症候群(APS)の旧診断基準では、臨床症状の一項目に血小板減少あげられていたが、Sapporo-Criteria では特発性血小板減少性紫斑病(ITP)と考えられる患者群を除外することで血栓傾向としての症候群の認識を優先した結果、血小板減少は Criteria から除外された。ところが Sapporo-Criteria に従って APS の診断をすると、抗リン脂質抗体(aPL)かたとえ強陽性でも血栓症や妊娠合併症のない血小板減少症は APS から除外され、ITP と分類せざるを得なくなる。しかし ITP は出血性疾患であり、aPL が血栓のリスクとして同時に存在するならその病態は複雑である。

今回、aPL と血小板減少症の関係を明らかにして、aPL に伴う血小板減少症のマネージメントにつき提案する。当科自己免疫疾患患者あわせて 342 人を対象とした。血小板数 10 万/ $\mu$ l 以下を血小板減少症とした。IgG/M 抗カルジオリピン抗体、ループスアンチコアグラント(aPTT、dRVVT、KCT)、IgG/M ホスファチシルセリン依存性抗プロトロンヒン抗体を aPL として測定した。他の原因によらない血小板減少症は 64 人に認めた。175 人にいずれかの aPL が陽性であった。はじめに、APS と診断された 81 人(すなわち血栓または妊娠合併症+ aPL)を除く 261 人で解析したところ、aPL 陽性患者の血小板減少は 21/94(22%)にみられ、aPL 陰性患者の 8/167(5%)に比べて有意に高頻度であった( $p < 0.0001$ )。次に血小板減少のみられた 64 例に注目した。64 例中 aPL 陽性は 51 人で、血栓症/妊娠合併症は 31 例(61%)にみられたが、aPL 陰性 13 例中には血栓症/妊娠合併症はひとりもいなかった。

我々の集計では、aPL は APS 患者を除外しても血小板減少症と関連していた。また、血小板減少を認めた患者のなかで aPL の存在は明らかに血栓症/妊娠合併症のリスクであった。海外からの報告でも ITP 患者をプロスペクティブにフォローしたところ aPL 陽性患者は高率に血栓症を発症したとされ、血小板減少症患者における aPL の存在は主治医が「血栓のリスク」と認識するために重要であるとされている。また、aPL 陽性の ITP 患者にステロイドを投与するとロビンシエネレーションのマーカールが上昇、すなわち血栓傾向となることも比較的よく知られている。以上のことより、aPL 陽性の(自己免疫)血小板減少症の患者は ITP とは別の疾患概念で考えたほうがそのマネージメントの確立に有利であると考え、血栓/妊娠合併症のリスクとしての「抗リン脂質抗体関連血小板減少症」という症候群に分類することを提唱する。

### A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断基準として、現在いわゆる Sapporo-Criteria が国際的に日常使用されている。本研究班の目的のひとつは、APS の診断基準(改訂)と治療指針を作成す

ることであり、Sapporo-Criteria をもとに我が国での診断基準を整備する予定である。

APS の旧診断基準では臨床症状の一項目に血小板減少あげられていたが、Sapporo-Criteria を決めた国際ワークショップでは APS の症状とし

て血小板減少を盛り込むかどうか議論された。抗リン脂質抗体(aPL)陽性の患者で血小板減少があった場合でも、それが真にaPLによるものであるかどうか確認する手段がなく、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)と考えられる患者群を除外することで血栓傾向としての症候群の認識を優先した結果、血小板減少はCriteriaから除外された。しかしこのことは血小板減少とaPLの関係を否定するものではない。

ところかSapporo-Criteriaに従ってAPSの診断をすると、aPLかたとえ強陽性でも血栓症や妊娠合併症のない血小板減少症はAPSから除外され、ITPと分類せざるを得なくなる。一方ITPは出血性疾患であり、aPLか血栓のリスクとして同時に存在するならその病態は複雑である。

今回、あらためてaPLと血小板減少症の関係を明らかにして、aPLに伴う血小板減少症のマネージメントにつき提案する。

## B. 研究方法

当科自己免疫疾患患者あわせて342人を対象とした(女性305人、原発性APS40人、APS合併SLE41人、APS非合併SLE46人、他の膠原病115人)。DIC、TTP、薬剤性血小板減少症を除外したうえ、血小板数10万/ $\mu$ l以下を血小板減少症とした。

APSと関連したaPLとして、依然として国際的にもっともひろく施行されているIgG/M抗カルシオリピン抗体をHarrisの従来法で、これまでの当班の研究で示してきたようにAPSに極めて特異性の高いIgG/Mホスファチシルセリン依存性抗プロトンピン抗体をELISAで、またこれも当班研究で開発したモノクローナル抗プロトンピン抗体を使用した高感度ループスアンチコアグラント半定量法(aPTT, dRVVT, KCT)で検出した。

## C. 研究結果

自己免疫以外の他の病態によらない血小板減少症は64人に認めた。175人にいずれかのaPLが陽性であった。

はじめに、APSと診断された81人(すなわち血栓または妊娠合併症+aPL)を除く261人で解析したところ、aPL陽性患者の血小板減少は21/94(22%)にみられ、aPL陰性患者の8/167(5%)に比べて有意に高頻度であった( $p < 0.001$ )(図1)。

次に血小板減少のみられた64例に注目した。64例中aPL陽性は51人で、血栓症/妊娠合併症は31例(61%)にみられたか、aPL陰性13例中には血栓症/妊娠合併症はひとりもいなかった(図2)。

APS患者とAPSの症状を欠くaPL陽性血小板減少症患者のあいだでaPLのプロフィールを比較した。抗カルシオリピン抗体はその順に42%と50%、ホスファチシルセリン依存性抗プロトンピン抗体は49%と35%、ループスアンチコアグラントは73%と75%にみられ、いずれのaPLも陽性率には両群間で差がなかった。

## D. 考察

我々の集計では、aPLはAPS患者を除外しても血小板減少症と関連していた。また、血小板減少を認めた患者のなかでaPLの存在は明らかに血栓症/妊娠合併症のリスクであった。

Diz-Kucukkayaら(Blood 98 1760-4, 2001)は、新規にITPと診断された82名のうち31名(38%)にaPLが陽性で、これらの患者を5年間prospectiveに経過観察したところ、血栓症の発生率がaPL陽性者では61%であったのに対し、aPL陰性者では23%のみであり、aPL陽性のITP患者ではその経過中に高率にAPSを発症すると報告した。すなわち血小板減少症患者におけるaPLの存在は主治医が「血栓のリスク」と認識するために重要であるとした。aPL陽性のITP患者にステロイドを投与するとプロトンピンシミュレーションのマーカーが上昇、すなわち血栓傾向となることも比較的よく経験される。

aPLか血小板減少症においてどのような役割を担っているのかは現在のところ明らかになっていない。1980年代はaPLか血小板の細胞膜に豊富に存在するリン脂質に結合し網内系に取り込まれ、血小板が破壊されると考えられていた。aPLが結合するのは陰性荷電のリン脂質に結合したリン脂質結合蛋白( $\beta$ 2-グリコプロテインI、プロトンピン)であり、血小板の陰性荷電のリン脂質は他の細胞と同様に細胞膜の内側に存在しているため、aPLが直接血小板細胞膜上のリン脂質に結合するには、血小板が活性化され陰性荷電のリン脂質が細胞膜の外側に位置する状態でなければならない。このことは、血小板の活性化すなわち血栓傾向か血小板減少と表裏

一体であることを意味し、抗リン脂質抗体関連血小板減少症が血栓症のリスクであることを説明する。

別の見解として、aPL 自体が血小板を活性化し、血小板の凝集を亢進するために血小板数が減少する機序も考えられてきた。APS 患者によくみられる軽症の血小板減少症はこのことを反映していると考えられているが、すなわち血小板減少自体が血栓傾向のひとつの表現型とも考えられる。

以上のことより、aPL 陽性の(自己免疫)血小板減少症の患者は ITP とは別の疾患概念で考えたほうがそのマネジメントの確立に有利であると考え、血栓/妊娠合併症のリスクとしての「抗リン脂質抗体関連血小板減少症」という症候群に分類することを提唱する。

## **E. 結論**

経過中に出血と血栓両者のリスクとして「抗リン脂質抗体関連血小板減少症」を提唱した。この症候群の治療指針確立のためには抗リン脂質抗体関連血小板減少症に含まれる患者のデータをさらに集積して、臨床的検討を重ねていくことが重要と考える。

## **F. 健康危険情報**

特記事項なし

## **H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)**

### **1. 特許取得**

特記事項なし

### **2. 実用新案登録**

特記事項なし

### **3. その他**

特記事項なし

(謝辞)

本研究は、北海道大学大学院医学研究科病態

内科学講座、渥美達也講師および古川真大学院生の御協力で行われたことに深謝する。

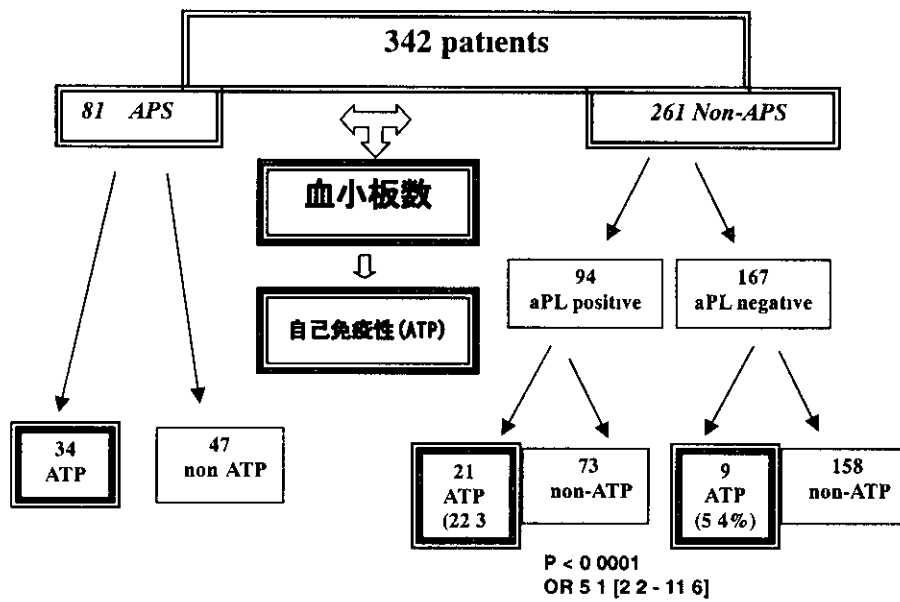


図1 非APS患者における血小板減少症と抗リン脂質抗体の関係

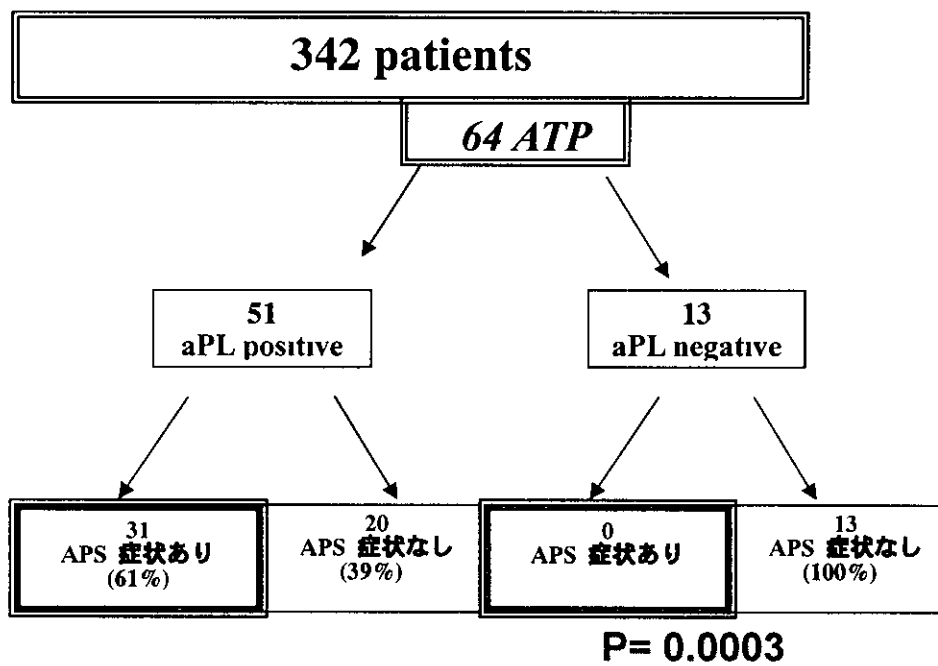


図2 血小板減少症患者における抗リン脂質抗体とAPSの関係

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

全身性エリテマトーデス疾患感受性遺伝子に関する研究

分担研究者 土屋 尚之 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野 助教授

研究要旨

われわれは、昨年度までに、B細胞の抑制型受容体である FcγRIIB の膜貫通領域にアミノ酸置換を伴う多型 Ile232Thr(I232T)を見出し、232Tアリルが日本人およびタイ人集団において全身性エリテマトーデス(SLE)と関連することを報告した。本年度は、中国人集団における解析にて同様の傾向を認め、さらに、アジア3集団の結果のメタアナリシスにより、これらの集団におけるSLEと232Tアリルとの関連は高度に有意であることを確認した。一方、ヨーロッパ系アメリカ人集団では、232Tアリル頻度は少なく、SLEとの有意な関連も検出されなかった。機能解析により、232Tアリル産物は、232Iと比較して、膜脂質ラフトへの局在が減少し、抑制性シグナルが減弱することを見出した。また、同様にB細胞抑制型受容体であるCD72多型とSLEにおける腎症の有無との有意な関連が存在することと、この多型がスプライシング・アイソフォームの量比に関連することを見出した。このことから、CD72多型がスプライシングに対する影響を介して、SLE腎症の発症に関連する可能性が示唆された。

A 研究目的

われわれは、昨年度までに、B細胞の抑制型受容体であるFcγRIIBの膜貫通領域にアミノ酸置換を伴う多型 Ile232Thr(I232T)を見出し、232Tアリルが日本人およびタイ人集団において全身性エリテマトーデス(SLE)と関連することを報告した。FcγRIIB 遺伝子(*FCGR2B*)は、きわめて相同性が高く、かつそれぞれが機能的な多型を持つ *FCGR2A*, *3A*, *3B* 遺伝子と1q23 にクラスターを形成して位置する。さらに、これらの遺伝子のそれぞれにつき、過去にSLEとの関連が報告されている。*FCGR2B*の関連が一義的なものか、他の*FCGR*との連鎖不平衡による二次的なものか、あるいは複数の*FCGR*遺伝子のそれぞれが疾患感受性に関連するのかを検討するためには、他集団の解析と集団間の比較が必要である。本年度は、中国人集団およびヨーロッパ系アメリカ人集団の検討を加えた。

また、*FCGR2B*-232TのSLE発症における分子機構を明らかにするため、*FCGR2B*欠損細胞に各アリルを遺伝子導入し、シグナル伝達を検討し

た(東大病院アレルギーリウマチ内科本田、河野らとの共同研究。)

さらに、新たな候補遺伝子として、同様にB細胞抑制型受容体であるCD72の多型解析と関連研究を施行した。

B 研究方法

中国雲南省にて研究に参加したの中国人SLE患者167例、対照健常者117例の*FCGR2A*, *2B*, *3A*, *3B* 遺伝子型を決定し、患者対照法によりSLEとの関連を検討した。さらに、われわれ自身の過去の日本人、タイ人集団の結果と合わせてメタアナリシスを施行した。また、米国 Los Angelesにて研究に参加したSLE患者およびその両親からなる94家系につき、*FCGR2A*, *2B*, *3A* 遺伝子型を決定し、transmission/disequilibrium test (TDT)およびpedigree disequilibrium test (PDT)を用いてSLEとの関連を検討した。*FCGR3B*欠失ハプロタイプ、重複ハプロタイプの存在のため、*FCGR3B*についてはTDT, PDTを用いた解析は困難であった。

機能解析は、ヒト FcγRIIB 欠損 B 細胞株にそれぞれのアリルを遺伝子導入し、B 細胞受容体 (BCR) 架橋および BCR と FcγRIIB 共架橋時のシグナル伝達について検討した。

CD72 遺伝子につき、多型スクリーニングを行い、見出された多型につき、日本人 SLE167 例、対照健常者 344 例の遺伝子タイピングを行い、患者対照法により、関連を検討した。また、末梢血単核球より得た RNA を RT-PCR にて検討し、CD72 のスプライシング・アイソフォームを存在と、その通常型との相対的な量比を解析した。

#### (倫理面への配慮)

これらの研究は、東京大学大学院医学系研究科および共同研究施設の研究倫理審査委員会の承認を得た研究計画に従い、匿名化した検体を用いて行われた。

### C 研究結果

1) 中国人集団においても、SLE における *FCGR2B*-232T, *3A*-176F アリルの増加が検出された。日本、タイ、中国集団の結果をメタアナリシスを用いて解析すると、*FCGR2B*-232T アリルの SLE における関連は高度に有意であった(表1)。*FCGR3A*, *FCGR3B* にも関連を認め、独立性の検討の結果、いずれもか SLE 発症に寄与する可能性が示唆された。

一方、ヨーロッパ系アメリカ人集団では、*FCGR2B*-232T アリル頻度は少なく、*2B*, *3A* ともに有意な関連は検出できなかったのに対し、*FCGR2A*-131R アリルの有意な関連が検出された。

2) 遺伝子導入 B 細胞を用いた機能解析により、FcγRIIB-232T アリル導入細胞においては、FcγRIIB 分子の膜脂質ラフトへの局在が減少し、かつ、BCR 架橋時の B 細胞活性化シグナルがより増強することが見出された。

3) *CD72* 多型スクリーニングにより、10 箇所の変異・多型が検出された。SLE 発症との関連は検出されなかったものの、SLE における腎症の有無との有意な関連が検出された。また、*CD72* に exon 8 を欠く新たな選択的スプライシング産物が見出

され、さらに、上記のゲノム DNA 多型とスプライシング・アイソフォームの量比の間に有意な関連が見いだされた。このことから、*CD72* 多型がスプライシングに対する影響を介して、SLE 腎症の発症に関連する可能性が示唆された。

### D 考察

*FCGR2B*-232T アリルと SLE の関連は、日本、タイ、中国集団を通して検出され、メタアナリシスの結果、高度に有意であったことから、東～東南アジア集団に共通の SLE 感受性遺伝子であることが示唆された。これに対し、ヨーロッパ系アメリカ人集団では、このアリルの頻度は少なく、SLE との関連は検出されず、逆に、アジア集団では頻度が少なく、関連が検出されない *FCGR2A*-131R アリルの関連が検出された。このように、*FCGR* 遺伝子群の SLE 遺伝素因における関与は複雑で、集団の遺伝的背景により異なる *FCGR* 遺伝子が発症に関連する可能性が示され、アジア集団、日本人集団における独自の研究の重要性が再確認された。

*FCGR2B*-I232T 多型に伴う機能的変化は、B 細胞の過剰な活性化を介して SLE 発症の分子機構を説明しうるのみならず、多型によるラフトへの局在の違いが疾患発症に関連するという新たな概念を示した初めての例と考えられる。

また、*CD72* 多型がスプライシング・アイソフォームの量比に影響し、SLE の臨床病型に関連することが示唆された。今後、このアイソフォームの機能的検討を行うとともに、*CD72* と *FCGR2B* 多型の遺伝子間相互作用についても検討を加える予定である。

### E. 結論

*FCGR2B*-232T は東～東南アジア集団共通の SLE 感受性遺伝子であり、B 細胞の抑制シグナルの減弱により、SLE 発症に関連すると考えられることが明らかになった。また、*CD72* 多型は、スプライシング効率への影響を介して、SLE の臨床病型に関連することが示唆された。

### F 健康危険情報



該当なし。

#### G. 研究発表

- 1 Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K Variations of human killer cell lectin-like receptors common occurrence of *NKG2-C* deletion in the general population *Genes Immun* 4 160-167, 2003
  - 2 Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirkong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Fujiwara K, Chandanayingyong D, Tokunaga K Association of Fcγ receptor IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais *Tissue Antigens* 61 374-383, 2003
  - 3 Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, Tokunaga K, Hashimoto H Genetic background of Japanese patients with ANCA-associated vasculitis Association of *HLA-DRB1\*0901* with microscopic polyangitis *J Rheumatol* 30 1534-1540, 2003
  - 4 Karassa FB, Bijl M, Davies KA, Kallenberg CGM, Khamashta MA, Manger K, Michel M, Piette J-C, Salmon JE, Song YW, Tsuchiya N, Yoo D-H, Ioannidis JPA\* The role of the FcγRIIA polymorphism in the antiphospholipid syndrome An international meta-analysis *Arthritis Rheum* 48,1930-1938, 2003
  - 5 Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K Association of Fcγ receptor IIB polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese a common susceptibility gene in the Asian populations *Tissue Antigens* 63,21-27, 2004
  - 6 Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, Kuroki K, Fukazawa T, Bijl M, Kallenberg CGM, Hashimoto H, Yabe T, Tokunaga K Molecular genetic analyses of human *NKG2C (KLRC2)* gene deletion *Int Immunol* 16 163-168, 2004
  - 7 Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K Association of Fcγ receptor IIA, but not of IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus A family-based association study in Caucasians *Arthritis Rheum* 50 671-673, 2004
  - 8 Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, Tsuchiya N, Tokunaga K, Masawa N, Azuma M, Okumura K, Kobata T BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell co-receptor complex *Blood* (in press)
- #### 2. 学会発表
- 1 徳永勝士、橋本博史、土屋尚之 膠原病感受性遺伝子の探索。第 26 回日本医学会総会。2003 年 4 月、福岡。(要旨 p179)
  - 2 Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Tokunaga K Induction of proliferation of activation of endothelial cells by overexpression of *ID3* gene リウマチ 43 252, 2003
  - 3 Kuroki K, Tsuchiya N, Matsuta K, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K Association of Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor 1 (LIR1, ILT2, LILRB1) polymorphism with susceptibility to RA and SLE in Japanese リウマチ 43 254, 2003
  - 4 京極千恵子、河野肇、土屋尚之、鈴木毅、山本一彦、徳永勝士、本田善一郎 SLE に関連する FcγRIIB 多型の B 細胞受容体シグナル抑制機能の検討 リウマチ 43 304, 2003
  - 5 川崎綾、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、橋本博史、徳永勝士 BAFF-R、TACI 遺伝子の多型解析と SLE および RA との関連の検討。リウマチ 43 307, 2003
  - 6 宮下リサ、土屋尚之、氷上光輝、黒木喜美子、徳永勝士 ヒト *NKG2C* 遺伝子欠失の分子遺伝学的解析。リウマチ 43 319, 2003
  - 7 櫻井大祐、土屋尚之、大梶祐頼、津野寛和、高橋孝喜、徳永勝士 血管内皮細胞活性化および血管新生誘導における Id 遺伝子の役割。第 62 回日本癌学会総会、2003 年 9 月、名古屋。
  - 8 櫻井大祐、土屋尚之、山口晃弘、大梶祐頼、津野寛和、高橋孝喜、徳永勝士 Crucial role for Id in the induction of activation and angiogenic property of endothelial cells 日本人類遺伝学会 第 48 回大会抄録集 p118, 2003 年 10 月、長崎。
  - 9 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、深沢徹、松多邦雄、Betty Tsao, 橋本博史、徳永勝士 ヒ

- ト CD72 遺伝子の多型解析と、全身性エリテマトーテスおよび関節リウマチとの関連の検討。日本人類遺伝学会第 48 回大会抄録集 p139、2003 年 10 月、長崎。
- 10 江原幸和、土屋尚之、櫻井大祐、山口晃弘、徳永勝士 ヒト follistatin-related protein (FRP) 遺伝子多型の関節リウマチとの関連の検討。日本人類遺伝学会第 48 回大会抄録集 p139、2003 年 10 月、長崎。
- 11 宮下リサ、土屋尚之、屋部登志雄、徳永勝士、関節リウマチにおける KIR 遺伝子プロファイルの解析。日本人類遺伝学会第 48 回大会抄録集 p139、2003 年 10 月、長崎。
- 12 黒木喜美子、土屋尚之、前仲勝実、Linda Rasubala、白石充典、山下由美、松多邦雄、深沢徹、神田大輔、小他隆夫、十字猛夫、橋本博史、徳永勝士 Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LIR) 遺伝子群多型と日本人 RA、SLE との関連。日本人類遺伝学会第 48 回大会抄録集 p140、2003 年 10 月、長崎。
- 13 Kusaoi M, Fukazawa T, Hirashima M, Morita Y, Morita T, Okamoto K, Ikuta T, Tamiya G, Tsuchiya N, Tokunaga K, Inoko H, Hashimoto H Genome-wide association study of systemic lupus erythematosus on chromosome 1 Arthritis Rheum 48 (Suppl), S226, 2003
- 14 Kuroki K, Tsuchiya N, Maenaka K, Rasubala L, Shiroishi M, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kohda D, Koike T, Juji T, Hashimoto H, Tokunaga K Distinct associations of the leukocyte immunoglobulin-like receptor (LIR)1 and LIR6 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) Arthritis Rheum 48 (Suppl), S197, 2003
- 15 Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K Association of Fc gamma receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese a common susceptibility gene in the Asian populations ? Arthritis Rheum 48 (Suppl), S380, 2003
- 16 Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K Association of Fcγ receptor IIA, but not of IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Caucasians a family-based association study Arthritis Rheum 48 (Suppl), S380, 2003
- 17 Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Tsuno NH, Okaji Y, Tokunaga K, Takahashi K Crucial role for Id in the induction of activation and angiogenic property of endothelial cells Arthritis Rheum 48 (Suppl), S340, 2003
- 18 Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Matsuta K, Hase H, Kobata T, Hashimoto H, Tokunaga K Association of TACI polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis Arthritis Rheum 48 (Suppl), S383, 2003
- 19 Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, Kuroki K, Fukazawa T, Biji M, Kallenberg CGM, Hashimoto H, Yabe T, Tokunaga K Molecular genetic analyses of human NKG2C gene deletion Arthritis Rheum 48 (Suppl), S473, 2003
- 20 Kyogoku C, Kono H, Tsuchiya N, Suzuki T, Yamamoto K, Tokunaga K, Honda Z-I SLE-associated polymorphism of FcγRIIB Ile232Thr affects localization at lipid rafts and attenuation of BCR signaling Arthritis Rheum 48 (Suppl), S647, 2003
- 21 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、深沢徹、松多邦雄、Betty Tsao、橋本博史、徳永勝士 ヒト CD72 遺伝子の多型解析と、全身性エリテマトーテスおよび関節リウマチとの関連の検討。日本免疫学会総会学術集会記録 33 196、2003
- 22 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、松多邦雄、長谷英徳、小端哲二、橋本博史、徳永勝士 TACI、APRIL 遺伝子多型と RA および SLE 疾患感受性の関連。日本免疫学会総会学術集会記録 33 196、2003
- 23 河野肇、京極千恵子、鈴木毅、土屋尚之、山本一彦、徳永勝士、本田善一郎 SLE に関連するヒト FcγRIIB 多型の脂質ラフト会合および B 細胞受容体信号伝達抑制への影響。日本免疫学会総会学術集会記録 33 197、2003
- 24 宮下リサ、土屋尚之、松多邦雄、屋部登志雄、徳永勝士 日本人関節リウマチと KIR 遺伝子多型との関連の検討。日本免疫学会総会

学術集会記録 33 213, 2003

25 Kuroki K, Tsuchiya N, Maenaka K, Rasubala L, Shiroishi M, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kohda D, Koike T, Juji T, Hashimoto H, Tokunaga K Distinct associations of the leukocyte immunoglobulin-like receptor (LIR)1 and *LIR6* polymorphisms with susceptibility to RA and SLE 日本免疫学会総会学術集会記録 33 214, 2003

26 江原幸和、土屋尚之、櫻井大祐、山口晃弘、松多邦雄、徳永勝士 ヒト follistatin-related protein (FRP)遺伝子多型の関節リウマチとの関連の検討。日本免疫学会総会学術集会記録 33 214, 2003

27 Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno NH, Takahashi K, Tokunaga K Induction of proliferation and activation of endothelial cells by overexpression of ID gene 日本免疫学会総会学術集会記録 33 224, 2003

28 申栄吉、土屋尚之、櫻井大祐、川崎綾、長谷英徳、大梶祐頼、津野寛和、高橋孝喜、小端哲二、徳永勝士 ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)における BlyS の発現 日本免疫学会総会学術集会記録 33 319, 2003

H 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1 特許取得

出願番号2001-258594 全身性エリテマトーテスの感受性遺伝子およびその使用 (平成13年8月28日)

2 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

表 1 日本、タイ、中国集団 SLE における *FCGR* 遺伝子群の関連 (メタアナリシス)

比較	SLE vs controls		腎症合併 SLE vs 非合併 SLE	
	odds ratio (95%CI)	P	odds ratio (95%CI)	P
<i>FCGR2A</i>				
R vs H	1.12 (0.92-1.36)	0.28	1.01 (0.70-1.44)	0.97
RR vs HH	1.10 (0.68-1.78)	0.69	0.93 (0.40-2.14)	0.86
RH vs HH	1.18 (0.91-1.54)	0.22	1.19 (0.44-3.20)	0.73
<i>FCGR2B</i>				
T vs I	1.47 (1.19-1.81)	0.0004	1.39 (0.65-2.97)	0.39
TT vs II	2.45 (1.49-4.02)	0.0004	2.26 (0.54-9.44)	0.26
TI vs II	1.26 (0.95-1.68)	0.11	1.10 (0.41-2.96)	0.85
<i>FCGR3A</i>				
F vs V	1.43 (1.18-1.73)	0.0003	0.87 (0.47-1.61)	0.67
FF vs VV	2.20 (1.36-3.55)	0.001	0.85 (0.30-2.38)	0.76
FV vs VV	1.49 (0.92-2.40)	0.10	1.14 (0.48-2.64)	0.77
<i>FCGR3B</i>				
NA2 vs NA1	1.30 (1.09-1.55)	0.004	1.48 (1.11-1.96)	0.007
NA2/2 vs NA1/1	1.79 (1.22-2.63)	0.002	2.73 (1.41-5.24)	0.003
NA1/2 vs NA1/1	1.23 (0.93-1.62)	0.14	1.09 (0.70-1.69)	0.70

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

ループス腎炎患者腎内浸潤 T 細胞サイトカインの単細胞レベルでの解析に関する研究

分担研究者 伊藤 聡 筑波大学臨床医学系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー) 講師

**研究要旨**

ループス腎炎腎内浸潤 CD4<sup>+</sup>T細胞のサイトカイン mRNA 発現を単細胞レベルで解析した。WHOIV 型 3 例の腎生検標本を対象に、Laser Microdissection 法により、CD4<sup>+</sup>T細胞を単細胞レベルで採取し、浸潤 CD4<sup>+</sup>T細胞のサイトカイン mRNA 発現を nested PCR 法と Southern blot 法にて解析した。その結果、1) 糸球体、間質に CD4<sup>+</sup>T細胞の浸潤を認めた。2) 6 々の単細胞からの mRNA が採取された。3) 浸潤 CD4<sup>+</sup>T細胞は、IL-10 mRNA 発現が高く、IFN- $\gamma$  mRNA 発現は低かった。

【考察および今後の展望】ループス腎炎患者の腎内浸潤 T 細胞は、Th2 タイプ(または調節性)の T 細胞として作用し、ループス腎炎の発症進行に関与している可能性が示唆された。今後は症例数を増やし、組織型による違いや、治療前後での違いを検討する予定である。また、ループスマデルマウスでの解析も予定している。

**A. 研究目的**

ループス腎炎腎内浸潤 CD4<sup>+</sup>T細胞のサイトカイン mRNA 発現の単細胞レベルでの解析。

**B 研究方法**

アメリカリウマチ学会分類基準を満たす全身性エリテマトーデス(SLE)患者で、腎生検でループス腎炎(WHOIV)と診断された 3 名を対象とした。腎生検標本より、凍結切片を作成し、HistoGene LCM Frozen Section Staining Kit を用い、染色・エタノール固定し、Arcturua 社製 Laser Capture Microdissection System にて、腎糸球体および間質における浸潤細胞を採取した(図 1)。次に採取した細胞から single cell lysis 法を用い、RNA を抽出し、cDNA を合成した。 $\beta$ -actin の PCR 解析で band 陽性かみられ、細胞採取、

RNA 抽出、cDNA 合成が行われていることを確認した上で、TCR  $\gamma$ -C beta 鎖 の RT-PCR および digoxigenin による Southern blot 解析を施行した。T 細胞と判明したサンプルに対して、CD4、CD8 に特異的なプライマーを用い、RT-PCR を施行した。次に、これら T 細胞と判明したサンプルについて、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-10 に特異的なプライマーを用い、nested PCR を施行し、Southern Blot 解析を施行した。

(倫理面への配慮)

研究方法、発表形式について説明を行い、文書で同意を得た。

**C 研究結果**

CD4 陽性は、7 サンプル中 6 サンプルに検出さ

れ、糸球体(2個)、間質(に4個)ともにみられた。CD8陽性は1サンプルのみであったか、糸球体に認められた(図2)。次に、これらT細胞と判明したサンプルについて、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-10に特異的なプライマー用い、nested PCRを施行した(図3)。CD4陽性が確認された6サンプルで、IL-10、IL-2は全サンプルで陽性、IL-4は1サンプルで陽性であったか、IFN- $\gamma$ 陽性は認められなかった。腎糸球体、間質についてみると、腎糸球体CD4陽性T細胞は、IL-10陽性が2サンプル、間質CD4陽性T細胞は、IL-10陽性が全サンプル、IL-4陽性が1サンプルに認められた。以上の結果をまとめると、ループス腎炎患者の腎内、腎糸球体では、CD4陽性T細胞がみられ、一部にはCD8陽性T細胞もみられた。このCD4陽性T細胞は、IL-10陽性が全サンプル、間質では、CD4陽性T細胞のみがみられ、IL-10陽性が全サンプル、その一部に、IL-4が陽性であった。またいずれの細胞もIFN- $\gamma$ 発現は認められなかった。

#### D. 考察

今回の解析で、ループス腎炎患者の腎内浸潤T細胞は、Th2タイプ(または調節性)のT細胞として作用し、ループス腎炎の発症進行に参与している可能性が示唆された。病変浸潤T細胞のサイトカイン解析について、Masutaniらは、ループス腎炎患者末梢血と腎組織において、浸潤しているT細胞はTh1に偏っていることを報告している(Arthritis Rheum 44 2097-2106, 2001)。これに対して、我々は、ホールの腎生検標本を用いて、サイトカインメッセージを検討し、IL-4、IL-10高発現、IFN- $\gamma$ 低発現の所見より、Th2タイプのT細胞として機能している可能性が示唆されることを報告した(Arthritis Rheum 46 2141-2147, 2002)。この結果の相違は、アッ

セイの違いによる可能性がある。ループス腎炎の発症機構をさらに解明するために、今後さらに多数の患者で腎内浸潤T細胞のサイトカイン発現をsingle cellレベルで解析し、組織型による違いや、治療前後での違いを検討する予定である。また、MRI/pr、male BXSB、NZB/W F1などのループスモデルマウスでの解析も予定している。

#### E. 結論

ループス腎炎腎内浸潤CD4<sup>+</sup>T細胞は、サイトカイン mRNA 発現の単細胞レベルでの解析では、Th2タイプ(または調節性)のT細胞として作用し、ループス腎炎の発症進行に参与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1 Ito S, et al Patient with diffuse mesangial and endocapillary proliferative glomerulonephritis with hypocomplementemia and elevated anti-streptolysin O treated with prednisolone, angiotensin-converting enzyme inhibitor, and angiotensin II receptor antagonist Clin Exp Nephrol 7 290-295, 2003

2 伊藤 聡 難治性病態の治療戦略 ループス腎炎 内科 93,283-287, 2004

##### 2. 学会発表

村田秀行ほか ループス腎炎患者内浸潤T細胞サイトカインの単細胞レベルでの解析 第47回日本リウマチ学会総会(リウマチ 43 345, 2003)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

##### 1. 特許取得

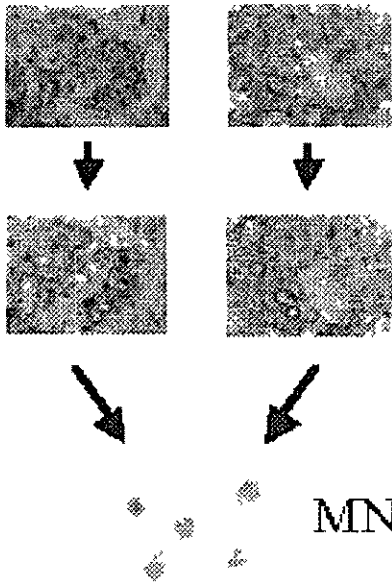
なし

##### 2. 実用新案登録

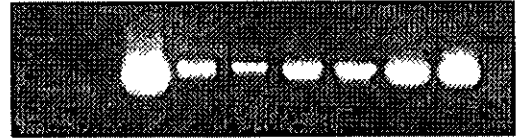
なし

##### 3. その他 なし

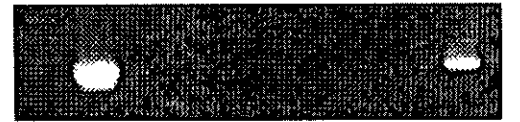
**glomeruli      interstitium**



**CD4**



**CD8**



M  
LN 1-g  
LN 2-g  
LN 3-I  
LN 4-I  
LN 5-I  
LN 6-g  
LN 7-I  
C

☒ 1 Preparation of mononuclear cells by laser micro dissection

☒ 2 RT-PCR analysis of CD4/CD8 cells

**IFN- $\gamma$**



**IL-2**



**IL-4**



**IL-10**



M  
LN 1-g  
LN 2-g  
LN 3-I  
LN 4-I  
LN 5-I  
LN 6-g  
LN 7-I  
C

☒ 3 Cytokine mRNA expression in kidneys of lupus nephritis patients

## プロテオミクスを用いた自己免疫疾患における自己抗体の網羅的検出と その機能の解析

分担研究者 加藤 智啓 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター助教授

### 研究要旨

近年指摘された関節リウマチにおけるシトルリン化蛋白質自己抗原性の重要性のこ  
とく、自己免疫疾患において翻訳後修飾と自己抗原性との関連を明らかにすることか  
必要である。本研究では翻訳後修飾のひとつとして、酸化ストレスの自己抗原性に対  
する影響をプロテオミクスの手法を用いて検討した。培養 HUVEC に酸化ストレスを負  
荷した後、抽出した総蛋白質を2次元電気泳動で展開した。これを膜転写後、自己  
免疫疾患患者血清を用いた western blot 法により、蛋白質の抗原性の変化を網羅的  
に解析した。酸化により等電点あるいは分子量を変化させた蛋白質が数多く検出さ  
れた。少数ではあったが、見かけ上、酸化により等電点、分子量、あるいは存在量  
の変化しなかった蛋白質で、かつ自己抗原性の増強する蛋白質が観察された。これは  
生体内において酸化修飾を受けた抗原決定基が強い抗原性を発揮している場合か  
あることを意味している。本研究は抗体(B細胞)に関するものであるか、今後、T細胞  
に対する抗原提示においても、酸化修飾により非自己と認識され、自己抗原性を獲  
得する経路が推測され、今後の検討が必要と考えられる。

### A. 研究目的

近年、関節リウマチにおいて、蛋白質  
の翻訳後修飾によりアルキニン残基か  
シトルリン残基に変換されたいわゆるシ  
トルリン化蛋白質が重要な自己抗原性  
を持っていることが判明した。生体内に  
おける自己抗原の役割を明らかにする  
ためには、蛋白質が産生された後の様  
々な修飾を考慮する必要があるという代  
表的な例となっている。本研究では翻  
訳後修飾のひとつとして、酸化ストレス  
の影響を検索する。酸化ストレスは普  
遍的に存在する細胞ストレスであるか、  
蛋白質の酸化が自己免疫にいかに関  
連するかについてはこれまでにほとん  
ど知られていない。ここでは酸化ス  
トレス(蛋白質の酸化)が蛋白質の自  
己抗原性にどのような変化を与える  
かについて、HUVEC 抽出蛋白質と  
自己免疫疾患患者血清を材料とし、  
2次元電気泳動と質量分析器を用い

たプロテオミクスの手法を用いて検討  
する。

### B. 研究方法

培養 HUVEC に酸化ストレス、すなわ  
ち 100 $\mu$ M の過酸化水素の負荷を1時間  
行った。その後、HUVEC より総蛋白質を  
4% CHAPS、7M 尿素および2M チオ尿  
素を含む溶液で抽出し、2次元電気泳  
動で展開した。これをニトロセルロース  
膜に転写した後、自己免疫疾患(全身  
性エリテマトーデスおよび関節リウ  
マチ)患者血清を一次抗体、抗ヒト  
IgG 抗体を二次抗体として用いた  
western blot 法により、蛋白質の  
抗原性の変化を解析した。さらに、  
抗原性蛋白質を質量分析器で同定  
する。

### C 研究結果

1、HUVEC 由来の蛋白質の中には酸化  
により等電点あるいは分子量を変化  
させ



るものが数多く検出された。

2、全身性エリテマトーデスおよび関節リウマチ患者血清を用いた western blot 法では、見かけ上、酸化により等電点、分子量、あるいは存在量の変化しなかった蛋白質であっても、自己抗原性の減弱する蛋白質が多数認められた。

3、少数ではあったが、見かけ上、酸化により等電点、分子量、あるいは存在量の変化しなかった蛋白質で、かつ、自己抗原性の増強する蛋白質が観察された。

#### D. 考察

見かけ上、酸化により等電点、分子量、あるいは存在量の変化しなかった蛋白質で、自己抗原性の減弱した蛋白質については、抗原決定基に含まれるアミノ残基側鎖が酸化により修飾をうけ抗原決定基の構造が破壊されたと考えられる。一方、見かけ上、酸化により等電点、分子量、あるいは存在量の変化しなかった蛋白質で、自己抗原性の増強した蛋白質については、生体内において酸化修飾を受けた抗原決定基が存在し、それがB細胞に強く認識されていることを意味している。本研究はB細胞抗原決定基に関する知見であるが、T細胞に抗原提示されるペプチドについても、蛋白質が酸化修飾により、非自己と認識され、自己抗原性を獲得する経路が推測され、今後の検討が必要と考えられる。全身性エリテマトーデスにおける日光過敏性など、酸化と病態とは関りが深いと推測される場合があり、病態に対する直接的な影響も考えられる。

#### E. 結論

酸化修飾は蛋白質の抗原性を変化させることから、自己免疫疾患の発症と病態において、蛋白質酸化修飾の影響を認識し、解明していく必要がある。

F. 健康危険情報 なし。

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

1 Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, and Kato T Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis Identification of triose phosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis Arthritis & Rheum (in press)

2 Nakamura M, Tsutsumi K, Ooka S, Sekine T, Koizuka I, Nishioka K, Kato T Identification of  $\beta$ -tubulin isoform as an autoantigen in allergic rhinitis Microbiol Immunol (in press)

##### 2 学会発表

1 Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T Proteomic Surveillance of Autoimmunity in Osteoarthritis Identification of Triosephosphate Isomerase as an Autoantigen in Patients with Osteoarthritis American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting Orlando, Florida 10/23-28, 2003

2 Karasawa R, Sekine T, Ooka S, Nishimura H, Nukina N, Mitsui K, Ozaki S, Nishioka K, Kato T Targets of Anti-endothelial Cell Antibodies in Patients with Systemic Vasculitis Identification by the Proteomic Approach American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting Orlando, Florida 10/23-28, 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(予定を含む。)

##### 1 特許取得

血管炎抗原ペプチドと血管炎診断方法、加藤智啓、西岡久寿樹、尾崎承一、唐沢里江(2003年4月出願)

##### 2 実用新案登録

なし

##### 3 その他 なし

## 抗 DNA 抗体による未知の病態機序の追及

### — 細胞侵入性抗 DNA 抗体の病的役割

分担研究者 佐々木 毅（東北大学免疫血液病制御学）  
研究協力者 石井智徳、周穎哲、平林泰彦（同上）

#### 研究要旨

全身性エリテマトーデス（SLE）活動期に出現する抗 DNA 抗体は免疫複合体として組織に沈着しループス腎炎に代表される SLE 病変を起こすとされている。しかし、血管内皮細胞をはじめとする細胞内に存在する免疫グロブリンの病態上の意義や機序に関しては不明の点が多い。我々は、正常免疫グロブリンは細胞内に直接的には侵入しにくいのか、陽性荷電の強い SLE 抗 DNA 抗体は細胞内に侵入しやすいことを見出した。抗 DNA 抗体は T 細胞にも侵入し、CD3 を介する細胞増殖や T 細胞における IL2 産生を増強させた。SLE における自己抗体の未知であった病態への関与様式とされる。

#### A. 研究目的

抗 DNA 抗体をはじめ自己抗体の標的抗原の多くは細胞内に存在する。抗体は細胞外で抗原と反応する。したがって自己抗体の病態への関与は、対応抗原である自己抗原との関連で考えられるのは例外的な場合に限られていた。しかしながら、他の抗体と違って自己抗体が細胞内に進入しうるのであれば、これまで考えられた以上に自己抗体が病態に関連する可能性が注目されることになる。そこで本研究では SLE において自己抗体、特に抗 DNA 抗体が細胞内に取り込まれることを示し、またこれら自己抗体が細胞内に取り込まれることによって細胞機能に影響を与えうるかどうかを検討することを目的とした。

#### B 研究方法

1) 血清からの免疫グロブリン、抗 DNA 抗体の精製、および FITC ラベル  
健康人、抗 DNA 抗体高力価の活動期 SLE 患者、非活動期 SLE 患者由来の血清よりプロテイン A/G (Pierce) カラムを用いて免疫グロブリン

を精製した。精製した免疫グロブリンより、抗 DNA 抗体豊富な血清から得た抗体の 1 部を DNA カラムで抗 DNA 抗体に精製した。精製した免疫グロブリンおよび抗 DNA 抗体をそれぞれ FITC (Sigma) で定法に従いラベルし透析後 Centr1plus (MILLIPORE) にて濃縮した。

2) 正常人末梢血リンパ球への SLE 患者由来免疫グロブリンの取り込み

リンパ球を  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度にて FITC ラベルした抗体を  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度で加え一定時間共培養した。培養後リンパ球を pH3 のクエン酸バッファーにて 30 秒洗浄更に PBS で 3 回洗浄し、これら細胞に取り込まれた FITC ラベル抗体をフローサイトメトリー、蛍光顕微鏡、SDS-PAGE にて解析した。

3) 08-1 単鎖抗体 (08-1ScFv) の作成

前年度に報告した pUC19 にクローニングされた 08-1 クローンの VH および V $\kappa$  遺伝子を用いた。大腸菌 JM109 株に形質転換し発現させ PinPointXaProteinPurificationSystem にて精製した。また作成した ScFv は Livingcolor GFP-N2 ベクター (CLONTECH) にサブクロー

ニングし Jurkat 細胞腫への遺伝子導入に用いた。

#### 4) 08-1 単鎖抗体の PBL に対する効果

96well プレートに抗 CD3 抗体 (OKT3) を PBS に溶解して、それぞれ 0.1、1、3  $\mu$ g/ml の濃度で 4 度 0/N で固相化後、遊離抗体を PBS で 3 回洗浄した。PBL は  $1 \times 10^6$ /ml の濃度に 10%FCS-RPMI で調整し  $1 \times 10^5$ /well で各 well にて 37 度 48 時間刺激した。このとき同時に 10  $\mu$ g/ml の濃度の 08-1ScFvWT、08-1ScFvMT、およびタクのみのコントロールを刺激と同時に加え抗 CD3 抗体刺激へのこれら抗体の影響を検討した。

#### 5) 08-1 遺伝子の Jurkat へ遺伝子導入

GFP N2 ヘクターにクローニングされた 08-1 遺伝子は X-treamGENE Q2 Transfection Reagent (Roche) を使って Jurkat 内に導入した。導入された Jurkat は 1ng/ml の G418 で選択し 1 ヶ月培養後、限界希釈法にてクローン化した。それぞれの遺伝子の発現の確認と発現の局在は GFP による蛍光発光をフローサイトメトリー、蛍光顕微鏡を使用し行った。クローン化された Jurkat は  $1 \times 10^6$ /ml に調整し  $2 \times 10^5$  個/well で 96well プレートに撒き PMA 3、10、60 ng/ml の濃度で刺激した。24 時間刺激後培養上清を集め IL2 濃度を IL2 測定キット (FUJISAWA) で測定した。

### C 研究結果

#### 1) 正常人リンパ球への抗 DNA 抗体の侵入

FACScan による解析により SLE 活動期由来免疫グロブリンが正常人末梢血に取り込まれることか確認された。それに対して正常人由来および非活動期 SLE 由来免疫グロブリンは正常人末梢血に取り込まれることはなかった (図 1)。リンパ球に抗体が取り込まれる動態を時間経過で観察すると時間経過と共に 6 時間までは細胞内への取り込みは増加するか 6 時間をピークにその後は減少に転じ 24 時間後にはほとんど細胞内に見られなくなった。一方 PMA 刺激後の細胞への抗体取り込みの動態は無刺激の細胞に対する動態と異なり取り

込みは 72 時間を越えても認められた。2 重染色により、抗体が取り込まれる細胞の種類を検討した結果、リンパ球のうち NK 細胞はほぼ 100% 取り込み T 細胞は 20% 程度の細胞で取り込みを認めたか B 細胞には全く取り込まれなかった。更に DNA カラムで精製した抗 DNA 抗体を同様に検討したところ、抗 DNA 抗体の正常人リンパ球に対する取り込みは同様の動態を示した。蛍光顕微鏡での検討ではこれら細胞内に取り込まれた抗体はリンパ球細胞内のライソゾームを中心に分布した。SDS-PAGE の検討では少なくともその一部は細胞内で抗体としての形で存在することか示された。

#### 2) 抗 DNA 抗体である 08-1 の T 細胞機能へ対する影響

抗 DNA 抗体の細胞に対する影響をみるために Fc レセプターの影響やポリクローナル抗体による多様性を排除するために抗 DNA 抗体 08-1 のリコンヒナント ScFv を作成しリンパ球の機能の検討に使用した。作成したリコンヒナント ScFv は 08-1ScFvWT において抗 DNA 抗体活性を認めるか 08-1ScFvMT は抗 DNA 抗体活性を認めなかった。正常人リンパ球を抗 CD3 抗体刺激する系における 08-1ScFv の影響を検討したところ、正常人リンパ球は抗 DNA 抗体活性を持った ScFv の添加により、通常ではほとんど反しない低濃度の抗 CD3 抗体刺激にも反応し増殖することか観察された。

#### 3) T 細胞腫 Jurkat への 08-1ScFv の細胞内発現とサイトカイン産生に対する影響

抗 DNA 抗体活性を持つ 08-1 イディオタイプの T 細胞への機能を更に詳しく検討する目的で Jurkat 細胞腫へ 08-1ScFv 遺伝子を導入した。Mock ヘクター、08-1ScFvWT、08-1ScFvMT それぞれに GFP のタグをつけて Jurkat 内に導入し、それぞれ 6 つの stable なクローンを得た。これらのクローンで導入された遺伝子は大部分かライソゾームに局在した。得られたクローンに対する PMA や Ionomycin 刺激により、08-1ScFvWT 導入クローンにおいて IL2 産生の増強を認めた (図 2)。

## D E 考察及び結論

本研究により少なくとも一部の自己抗体は細胞内に抗体としての形を保ちながら入りうることも示された。細胞内に取り込まれた抗体は機能分子としてT細胞に働きCD3抗体よりの刺激を増強した。この機序の一つとして細胞内の抗DNA抗体がIL2産生を増強していることが判明した。これらのことは活動期SLE患者において抗DNA抗体が免疫複合体として沈着するのみならず積極的にT細胞に働き病態の形成に役割を果たしていることも考えられた。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Saito,T,Munakata,Y,Fu,Y,Fujii,H,Kodera,T,Miyagawa,E,Ishii,K,Sasaki,T Evaluation of anti-parvovirus B19 activity in sera by assay using quantitative polymerase chain reaction J Virol Methods 107 81-87, 2003
- 2 Hirabayashi,Y,Saito,S,Takeshita,M,Kodera,T,Munakata,Y,Ishii,T,Fujii,H,Shimura,M,Sasaki,T Mononeuritis multiplex, protein-losing gastroenteropathy and chroidopathy seen together in a case systemic lupus erythematosus Mod Rheumatol 13 265-269, 2003
- 3 Minami,Y,Sasaki,T,Arai,Y,Kurisu,Y,and Hisamichi,S Diet and systemic lupus erythematosus A4 year prospective study of Japanese patients J Rheumatol 30 747-754, 2003
- 4 Harigae,H,Nakajima,O,Suwabe,N,Yokoyama,H,Furuyama,K,Sasaki,T,Kaku,M,Yamamoto,M,Sassa,S Aberrant iron accumulation and oxidized status of erythroid-specific  $\delta$ -aminolevulinatase synthase (ALAS2)-deficient definitive erythroblasts Blood 101 1188-1193, 2003
- 5 Yokoyama,H,Harigae,H,Takahashi,S,Takahashi,S,Furuyama,K,Kaku,M,Yamamoto,M,and

Sasaki,T Regulation of YB-1 gene expression by GATA transcription factors Biochem Biophys Res Commun 303 140-145, 2003

- 6 Suzuki,T,Saito,S,Hirabayashi,Y,Harigae,H,Ishii,T,Kodera,T,Fujii,H,Munakata,Y,Sasaki,T Human parvovirus B19 infection during the inactive stage of systemic lupus erythematosus Intern Med 42 538-540, 2003
- 7 Yokoyama,H,Harigae H,Takahashi,S,Kameoka,J,Miyamura,K,Ishizawa,K,Kaku,M,Sasaki,T High expression of YB-1 gene in erythroid cells in patients with refractory anemia Int J Hematol 78 213-218, 2003
- 8 Miura,T,Yokoyama H,Minegishi,N,Sasaki,T,Kaku,M,Harigae,H Flow cytometry of GATA transcription factors Cytometry 56 1-7, 2003
- 9 Hirabayashi,Y,Ishii,T,Kodera,T,Fujii,H,Munakata,Y,Sasaki,T Acute cytomegalovirus infection and transient carotid intimal medial thickening in a young, otherwise healthy woman J Clin Microbiol 41 3978-3980, 2003
- 10 Fujii,H,Nakatani,K,Arita,N,Ito,MR,Terada,M,Mitazaki,T,Yoshida,M,Ono,M,Fujiwara,T,Saiga,K,Ota,T,Ohtani,H,Lockwood,M,Sasaki,T Internalization of antibodies by endothelial cells via fibronectin implicating a novel mechanism in lupus nephritis Kidney International 64 1662-1670, 2003
- 11 Abe,S,Miyamura,K,Oba,T,Terakura,S,Kasai,M,Kitaori,K,Sasaki,T,Kodera,Y Oral ribavirin for severe adenovirus infection after allogeneic marrow transplantation Bone Marrow Transplantation 32 1107-1108, 2003

## H 知的財産権の出願・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