

多発筋炎のモデルマウスの作成に関する研究

分担研究者 上阪 等 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教授

研究要旨 我々の研究の目的は、特定疾患の一つ多発性筋炎のモデルマウスを作成して、副作用が少なく効果的な治療法を開発することである。今回、我々は、純化抗原として、組換えヒトC蛋白を用いて、EAM作成を試みた。【方法】組換えC蛋白を作成し、CFAと共に、BALB/cマウスに、週1回5週免疫した。同時に百日咳毒素の腹腔内投与も行った。筋炎発症の評価を行うため、最終免疫後2週後に、下肢近位筋について組織学的検索を行った。【結果】組換えC蛋白を免疫した群は、単核球浸潤を伴った筋線維の壊死像が認められ、筋炎の発症が確認された。CFAのみを免疫した群では、単核球浸潤を伴った筋線維の壊死像は認められなかった。【結論】組換えC蛋白をBALB/cマウスに免疫して、多発性筋炎のモデルマウス作成が可能と判断できる。モデルマウスを確立することにより、筋炎病態の理解や治療法開発に役立つものと期待される。

A. 研究目的

我々の研究の目的は、特定疾患の一つ多発性筋炎のモデルマウスを作成して、副作用が少なく効果的な治療法を開発することである。既にラットで、ミオシン粗精製物中のC蛋白が、ミオシンよりも少量でより重症度の高い実験モデル筋炎を発症させることが報告されている。一方、現在までモデルマウスとされてきた Experimental autoimmune myositis(EAM)の大部分は、SJL/Jマウスにミオシンを免疫して作成されている。SJL/Jマウスは dystrophin 欠損により、6ヶ月程度から筋線維が自然に変性し、単核球浸潤を伴った筋線維の壊死像が出現するため、病態解明や治療法の開発には不相当と認識されてきている。そこで、今後、非 SJL/J マウスで EAM 作成することも重要と考えられる。非 SJL/J マウスを使用した EAM に関する過去の報告では、muscle homogenate を免疫して、組織学的に筋炎の評価が行われたが、非 SJL/J マウスは SJL/J マウスに比較し

て筋炎を発症しにくかったとされている。そこで、ラットでの知見を考慮して、今回、我々は、純化抗原として、組換えヒトC蛋白を用いて、非 SJL/J マウスで EAM 作成を試みた。

B. 研究方法

ヒトC蛋白を純化抗原として免疫できるようにするため、まず、ヒトC蛋白の組換え蛋白を作成することとした。ヒト骨格筋からRNAを抽出して、C蛋白cDNAをクローニングし、これを4分割して、大腸菌に発現させ、フラグメント1-4の組換えC蛋白を作成した。

次に、EAM作成の際の免疫方法について検討した。非SJL/Jマウスを使用したEAMに関する報告では、muscle homogenateを7日目、14日目、21日目に免疫しており、非SJL/Jマウスの中では、BALB/cマウスでわずかに筋炎の組織像が観察された。また、C蛋白を使用したラットのEAMでは、週1回で4週免疫されている。そこで、今回は、ま

ず始めに、フラグメント1-4を混合して、CFAと共に、BALB/cマウスに、週1回5週免疫した。同時に、ラットのEAM同様に、百日咳毒素の腹腔内投与も行った。さらに、各々のフラグメントについても、単独で、フラグメント1-4を混合して免疫したときと同じ方法で免疫した。筋炎発症の評価は、最終免疫後2週後にサンプリングを行い、下肢近位筋について組織学的検索を行った。過去の知見より、HE染色で、単核球浸潤を伴った筋線維の壊死像を認めた場合、筋炎を発症したと定義した。また、以下のように、組織学的な筋炎の程度をスコア化した。Grade1 1-4の筋線維に炎症が存在。Grade2 5-30の筋線維に炎症が存在。Grade3 筋束全体に炎症が存在。Grade4 びまん性に広範囲に存在。複数の病変がある場合+0.5。

(倫理面への配慮)

なし。

C. 研究結果

フラグメント 1-4 を混ぜて免疫した群は、単核球浸潤を伴った筋線維の壊死像を認め、筋炎の発症が確認された。1つの筋線維に単核球が浸潤しているような grade1 の病変や、5-30 程度の筋線維に単核球が浸潤し、筋線維が壊死しているような grade2 の病変が認められた。さらに、フラグメント 1, フラグメント 2, フラグメント 4 を単独で免疫した群でも筋炎を発症した。筋炎を発症したマウスの頻度、組織学的検索を行った筋肉のブロックのうち、筋炎発症が確認されたブロックの頻度、各ブロックの組織学的なスコアの平均を、フラグメント 1-4 混合を免疫した群とフラグメント 1-4 を単独で免疫した群で評価した (図 1)。する

と、フラグメント 2 を免疫した群で、フラグメント 1-4 を混合して免疫した群と同程度の病変が観察された。また、過去に報告された muscle homogenate を免疫した BALB/c と比較して、筋炎発症の頻度、筋炎が確認されたブロックの頻度、組織学的なスコアの平均は高かった (図 1)。CFA のみを免疫した群では、単核球浸潤を伴った筋線維の壊死像は認められなかった。

D. 考察

過去の報告では、SJL/Jマウスと比較して、BALB/cマウスは、通常の方法で muscle homogenate を免疫した系では、筋炎を発症しにくいとされてきた。しかし、ラット同様、マウスでも、組換え C 蛋白は筋炎を発症させやすく、BALB/c マウスでも EAM を作成可能と考えられる。今後、免疫の回数を減らし、同様の解析を進める。

E. 結論

組換え C 蛋白を BALB/c マウスに免疫して、多発性筋炎のモデルマウス作成が可能と判断できる。モデルマウスを確立することにより、筋炎病態の理解や治療法開発に役立つものと期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録

なし。

図1 EAMでの筋炎の評価

	EAMの発症率	筋炎が確認された ブロックの頻度	組織学的なスコア
*Muscle homogenate を 免疫したBALB/c	2 / 28	7%以下	0.06以下
Fragment1-4混合	4 / 4	60%	0.75
Fragment 1	1 / 2	37.5%	0.38
Fragment 2	2 / 2	62.5%	0.75
Fragment 3	0 / 2	0%	0
Fragment 4	1 / 2	12.5%	0.12

* Clin.exp.Immunol.1987 より転用

T 細胞レセプター遺伝子移入による免疫応答改変操作法の開発

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

研究要旨 自己免疫疾患、癌、感染症などの病変に浸潤している T 細胞に注目し、クロナリティを解析することで、その病態における抗原特異的 T 細胞クローンを推定できることが判明した。そこで、このようにして同定した T 細胞クローンについて、まず、生体内から採取した直後の単一細胞から、2つの T 細胞レセプター遺伝子をクローニングする技術を確認した。さらにこれらの遺伝子を通常のリンパ球に遺伝子導入することで、抗原特異的 T 細胞を試験管内で再構築することに成功した。このようにして作成した改変 T 細胞は試験管内だけでなく、生体内でもその機能を発揮出来ることが判明した。このような技術を確認することで、抗原特異的免疫応答操作が可能な新しい方法が確立できると考える。

A. 研究目的 自己免疫疾患や感染症、癌などの免疫が関係する疾病において、患者の生体内で活性化し集積している抗原特異的 T 細胞の免疫応答をリアルタイムでとらえ、その1つのクローンで発現している T 細胞レセプターの遺伝子情報を獲得し、効率良くリンパ球に遺伝子導入する技術を中心とした、抗原特異的 T 細胞再構築システムを構築することによる新たな治療法の開発を目的として研究を進めた。

B. 研究方法 本研究では、すでに確立している RT-PCR と SSCP を組み合わせた T 細胞クロナリティ検出法を用いて、自己免疫疾患、感染症、癌などの免疫難病患者末梢血やモデル動物の脾細胞・病変局所に集積している抗原特異的 T 細胞クローンの状況を、そこから採取した少量の RNA から把握した上で、重要と考えられるクローンについて、その一つの細胞で使われている T 細胞レセプターの α 鎖、 β 鎖の両方の塩基配列の全情報を得る技術と、それらを自らのリンパ球に遺伝子導入し抗原特異性を再構築すると同時に、サイト

カインなど期待される機能遺伝子も導入できるベクターシステムを確認することを目指している。

生体内の一つの細胞から2つの異なる遺伝子情報を獲得する方法に関しては、単一細胞分離法を中心とした技術を確認しつつある。本年度は、単一細胞を96ウェルに分別した後、 β 鎖を固定した場合、 α 鎖の cDNA を高率に回収する方法を検討した。

一方、レトロウイルスを用いた T 細胞レセプターの遺伝子導入に関しては、我々のチームは既に、2つのベクターに別々に組み込んだ cDNA を用いて、通常のマウス脾細胞に遺伝子導入し、内因性の T 細胞レセプターの発現にうち勝ち40%以上の高率で両遺伝子を発現させ、さらに試験管内および生体内で機能を発現させることに成功している。これらの方法をさらに発展させ、全体として生体内の情報だけから抗原特異的機能性 T 細胞を再構築するシステムの確立と治療実験への応用を目指した。

（倫理面への配慮）

マウスでの研究であり、実験指針に従って

研究した。

C. 研究結果 具体的な例として、昨年度はマウスの HIV 感染モデルにおいて、CTL のエピトープ特異的 T 細胞からの T 細胞レセプター-cDNA の分離を報告したが、本年度はこのプロジェクトを進め、HIV 特異的 CTL を試験管で作成した。そして、生体内で HIV ウィルスエピトープを発現している細胞に対する細胞傷害活性を確認した。

さらに癌の局所浸潤 T 細胞、コラーゲン誘発関節炎の病変局所から分離した単一細胞から、 α 、 β 鎖の T 細胞レセプター-cDNA をクローニングすることに成功した。特に BALB/c 由来線維細胞肉腫 CMS5 を採取後の腫瘍内浸潤細胞クローンの動態を詳細に検討することで、CD4 陽性 T 細胞と比較して、CD8 陽性 T 細胞クローンは経時観察でも安定的に腫瘍内に集積していることが判明し、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞であることを示唆した。そこで浸潤 T 細胞の単一細胞から2つの T 細胞レセプター遺伝子をクローニングした。

次にこれらを別々のレトロウイルスベクターにクローニングし、パッケイジング細胞に導入後、脾臓細胞に遺伝子導入したところ、それぞれの病変における抗原認識機能を再構築できることが判明した。CMS5 においては、まず試験管内での腫瘍特異的細胞傷害活性を検出後、WINN アッセイ法にて、生体内での抗腫瘍活性を検討、次に治療実験にて腫瘍径の増大抑制が観察された。コラーゲン誘発関節炎モデルにおいては、T 細胞レセプターに加えて、第3の機能分子 (IL-10) を用いた遺伝子導入による改変リンパ球が、治療実験において機能することを示すことができた。

D. 考察 E. 結論 以上の結果から、我々が目指している T 細胞レセプターの試験管内機能再構築が基本的に可能であることが示された。これらの方法は病態の解析に有用な手段を提

供するだけでなく、抗原特異的な免疫応答制御への応用が可能と考える。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tokuhiko S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genet.* 35:341-348, 2003.

2) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genet.* 34:395-402, 2003.

3) Tahara H, Fujio K, Araki Y, Setoguchi K, Misaki Y, Kitamura T, Yamamoto K. Reconstitution of CD8⁺ T cells by retroviral transfer of the TCR $\alpha\beta$ -chain genes isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte¹. *J Immunol.* 171:2154-2160, 2003.

4) Yamamoto K. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev.* 2:13-18, 2003.

5) Yamada R, Suzuki A, Chang X, Yamamoto K. Peptidylarginine deiminase type4: identification of a rheumatoid arthritis-susceptible gene. *Trends Mol Med.* 9:503-508, 2003.

6) Sekiya T, Tsunemi Y, Miyamasu M, Ohta K, Morita A, Saeki H, Matsushima K, Yoshie O, Tsuchiya N, Yamaguchi M, Yamamoto K, Tamaki K and Hirai K. Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene. Immunogenetics. 54:742-745, 2003.

7) Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 32:197-204, 2003.

2. 学会発表

- 1) 山本一彦：ゲノム解析理解のための基礎知識. 第47回日本リウマチ学会 (2003. 4. 24-26 東京都)
- 2) 荒木靖人, 藤尾圭志, 中川洋子, 高橋秀実, 山本一彦:第33回日本免疫学会 (2003. 12. 8-10 福岡市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

MRL/Mp-*Fas*^{pr} マウスにおける自己反応性 Th1 細胞ワクチネーションに関する研究

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

研究要旨

SLE のモデル動物である MRL/*lpr* マウスの腎炎発症には血清中の抗 dsDNA 抗体に加え、自己反応性 CD4⁺αβ T 細胞と Th1 サイトカインの IFN γ が関与する。われわれは抗 dsDNA 抗体産生とループス腎炎発症に関与する自己反応性 CD4⁺αβ Th1 クローン (dna51) によるワクチネーションを試み、昨年度 MRL/*lpr* マウスの腎病変に関する有効性とワクチン細胞に対する抗体 (抗イディオタイプ抗体) の誘導を報告した。抗 dna51 抗体陽性血清は dna51 の T 細胞レセプター CDR3 部 (TCR-CDR3) と反応し、経時的な検討では最後のワクチン細胞投与 5 週後に初めて有意な抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価の上昇が確認された。また抗 dna51 TCR-CDR3 抗体陽性血清は、抗原提示細胞の存在下で dna51 の増殖を抑制し、その抑制は dna51 TCR-CDR3 と同じアミノ酸配列を有した合成ペプチドによる血清の前処置で解除された。さらに i-dna51 投与 MRL/*lpr* マウスでは CD4⁺ および CD8⁺ 両 T 細胞サブセットが dna51 に対して細胞傷害活性を有し、dna51 に対して抗原提示能をもつ B 細胞数が減少していた。B 細胞数減少の機序については今後の検討が必要であるが、MRL/*lpr* マウスにおける T 細胞ワクチネーションの機序としてワクチン細胞に対する抗イディオタイプ抗体の誘導と抑制性 T 細胞の活性化が重要である。

A. 研究目的

ループス腎炎は全身性エリテマトーデス (SLE) における最も重要な臓器病変のひとつである。近年では、難治性のループス腎炎に対しステロイドとシクロホスファミドの併用療法が一般的に使用されているが、未だ 10~15% の患者でコントロールが困難であり、31 歳以上では高率に卵巣機能不全 (閉経) が起こり問題となる。それに対し、新しい免疫抑制薬である mycophenylate mofetil の有用性が報告され、欧米では抗 CD40 リガンドモノクローナル抗体、抗 CD20 モノクローナル抗体など生物学的製剤の成績も蓄積されている。しかしこれらもル-

ープス腎炎に特異的な免疫抑制療法ではない。難治性自己免疫疾患において理想的な治療は、病態に直接関連する免疫異常を特異的に抑制することである。われわれは実験自己免疫性脳髄膜炎 (EAE) の発症が T 細胞ワクチネーションにより抑制されることから、SLE を自然発症する MRL/Mp-*Fas*^{pr} マウス (MRL/*lpr* マウス) において T 細胞ワクチネーションが成立するかどうかを昨年度の本研究班で調べた。ヒストンと dsDNA に反応して増殖し精製 MRL/*lpr* B 細胞から抗 dsDNA 抗体の産生を刺激する Th1 クローン dna51 (CD3⁺CD4⁺B220⁻V β 8.3) と、抗 U1RNP 抗体の産生を刺激する rnp2

(CD3⁺CD4⁺B220⁻ Vβ14) が分離され、Adoptive transfer study では、i-dna51 移入群で PBS 群に比し抗 dsDNA 抗体価の上昇が抑制され (18 週齢～最終観察時)、ループス腎炎の活動性指標は低下、糸球体細胞数も減少した。なお i-dna51 移入群で、最終観察時脾細胞中の CD4⁺Vβ8.3 T 細胞と B 細胞数が PBS 注射群に比し有意に減少していた。昨年度、CD4⁺Vβ8.3 T 細胞の減少に対し、ワクチン細胞であるクローン dna51 を特異的に認識する抗体が血清中に見いだされることを報告したが、本年度は抗 dna51 抗体の詳細な検討と、他の T・B 細胞の関与について調べた。

B. 研究方法

MRL/lpr マウス脾細胞から抗 dsDNA あるいは抗 U1RNP 抗体産生に関与する Th1 細胞をクローン化 (それぞれ dna51、rnp2 と命名) し、IL-2 で活性化 (s-) あるいは放射線照射 (20Gy) により増殖不能 (i-) とした後、1~2 × 10⁶ 細胞を野生型 MRL/lpr マウスに 3 週齢より計 6 回移入した。フローサイトメトリーを用い、ループス腎炎の発症を誘発する CD4⁺αβTh1 クローン dna51 の表面抗原を分析し、RT-PCR 法により T 細胞レセプター (TCR) の CDR3 のアミノ酸配列を分析した。血清中の抗ワクチン細胞抗体は、フローサイトメトリーとクローン dna51 の TCR-CDR3 の合成ペプチド (dna51 TCR-CDR3) を固相化した ELISA で測定した。また抗 dna51 抗体陽性血清を用いて抗原提示細胞 (APC) 存在下における dna51 の細胞増殖試験 (³H-サイミジン取り込み) を行った。さらにワクチン細胞を投与された MRL/lpr マウスにおける T および B 細胞の dna51 に対する反応性を細胞傷害試験 (LDH release assay) と細胞増殖試験 (³H-サイミジン取り込み) により検討した。

なお実験動物に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」(平成 11 年 12 月 1 日施行) に留意し、いかなる場合においても実験動物に

苦痛・恐怖を与えることのないように充分配慮した。

C. 研究結果

フローサイトメトリーで、抗 dna51 抗体陽性血清は rnp2、および dna51 以外の Vβ8.3 陽性 T 細胞とは反応せず、dna51 に特異的な抗イデオタイプ抗体で、その IgG サブクラスは IgG1、IgG2a、IgG2b が優位であることが判明した。そこでこの抗 dna51 抗体陽性血清がクローン dna51 に特異的な部位、すなわち TCR CDR3 部に反応する可能性を考えた。そこで dna51 TCR-CDR3 と同じアミノ酸配列をもつペプチドを用い、血清中の抗 dna51 TCR-CDR3 抗体を測定した (図 1)。経時的に採取した血清を用いた検討で、最後のワクチン細胞投与 5 週後に初めて有意な抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価の上昇が確認された。報告書には示していないが、抗 dna51 TCR-CDR3 抗体陽性血清は、APC 存在下で dna51 の増殖を有意に抑制し、その抑制は合成ペプチド dna51 TCR-CDR3 による血清の前処置で解除された。さらに i-rnp2 投与 MRL/lpr マウス脾細胞から分離精製した CD4⁺あるいは CD8⁺T 細胞をコントロールとすると、i-dna51 を投与された MRL/lpr マウスから分離精製した CD4⁺および CD8⁺両 T 細胞サブセットは dna51 に対して細胞傷害活性を有した (図 2)。さらに、i-dna51 を投与された MRL/lpr マウスから分離精製された B 細胞は、i-rnp2 を投与された MRL/lpr マウスの B 細胞に比し dna51 に対して抗原提示能が低下していた。

D. 考察

EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) と同様、MRL/lpr マウスでも放射線照射した自己反応性 CD4⁺αβTh1 細胞クローンの移入で MRL/lpr マウスの自己抗体の産生や病態の調節が可能と考えられる。本年度の検討より、抗移入クローン抗体は dna51 に対して抑制性の抗イデオタイプ抗体であり、Vβ8.3 の CDR3 部を認識する可能性が強く示唆された。その抗体の出現時期は 15 週以降であ

り、i-dna51 を用いた adoptive transfer study において 18 週目以降抗 dsDNA 抗体の上昇が抑制された機序のひとつと考えられる。なお本来自己である TCR に対して抗体が誘導された機序については不明であるが、アポトーシスの障害を有する *lpr* マウスであることも関連しているであろう。したがってヒト SLE において同様の反応が起こる可能性は少ないが、TCR を標的とした抑制性抗体は、今後特異的な免疫抑制療法として応用が可能と考えられる。なお dna51 を認識する B 細胞も i-dna51 でワクチネーションした MRL/*lpr* マウスには存在することも示唆され、同抗体の誘導がワクチネーションにおける免疫調節機序のひとつである可能性は高い。

一方で、i-dna51 を移入した MRL/*lpr* マウス血中では dna51 を傷害する T 細胞も増加していた。特に CD8 陽性細胞は E/T 比が低くても傷害活性をもつと考えられた。また CD4 陽性細胞も E/T 比が高ければ傷害活性を示したが、CD8 陽性 T 細胞とは異なる機序である可能性があり、今後検討してみたい。このような抑制性 T 細胞が dna51 のいかなる部位を認識するのか、またペプチド導入によりそれらの抑制性 T 細胞活性化が可能かどうかは今後の重要な課題である。

i-dna51 でワクチネーションした MRL/*lpr* マウスでは dna51 に抗原提示する能力を有した B 細胞が減少していることが示唆された。以前われわれは、抗 dsDNA 抗体の産生を抑制する $\gamma\delta$ T 細胞が MRL/*lpr* マウスの血中に存在することを見だし、その T 細胞クローンを分離した。本モデルにおける $\gamma\delta$ T 細胞の関与については不明であるが、B 細胞数減少の機序として考えられる。

多発性硬化症における T 細胞ワクチネーションでは、抗イディオタイプ抗体の産生も認められるが、病態制御には抑制性 CD4⁺T 細胞がより重要とされる。一方、自己抗体依存性に発症する重症筋無力症では抑制性抗 TCR 抗体 (抗 V β 5.1 抗体) が病態の軽症化と関連する。ヒト SLE において同様の報告はないが、SLE における特異的な免疫抑制療法として精製された抗イ

ディオタイプ抗体の投与、抑制性 T 細胞の活性化が期待される。

E. 結論

MRL/*lpr* マウスにおいて放射線照射した自己反応性 CD4⁺ $\alpha\beta$ Th1 細胞クローンの移入で MRL/*lpr* マウスの自己抗体産生と病態の調節が可能である。その機序として、1) 抑制性抗ワクチン細胞抗体 (抗イディオタイプ抗体) の誘導、2) ワクチン細胞に対する細胞傷害性 T 細胞の活性化、および 3) ワクチン細胞に抗原提示を行う B 細胞の減少、が示唆された。

G. 研究発表

発表論文

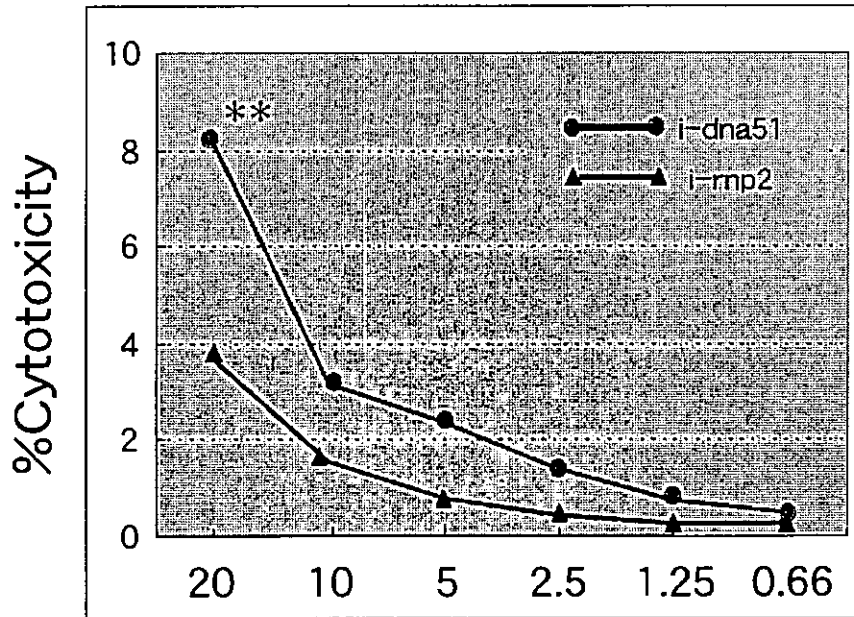
1. Kawabata D, Tanaka M, Fujii T, Umehara H, Fujita Y, Yoshifuji H, Mimori T, Ozaki S.: Ameliorative Effects of Follistatin-Related Protein/TSC-36/FSTL1 on Joint Inflammation in a Mouse Model of Arthritis. *Arthritis Rheum*, 50:660-668, 2004.
2. Sato S, Ohosone Y, Suwa A, Yasuoka H, Nojima T, Fujii T, Kuwana M, Nakamura K, Mimori T, Hirakata M.: Effect of Intermittent Cyclical Etidronate Therapy on Corticosteroid Induced Osteoporosis in Japanese Patients with Connective Tissue Disease: 3 Year Followup. *J Rheumatol*, 30:2673-2679, 2003.
3. Fujii T, Mimori T, Kimura N, Satoh S, Hirakata M.: Pseudoscleroderma associated with transforming growth factor β 1-producing advanced gastric carcinoma: Comment on the article by Varga. *Arthritis Rheum*, 48:1766-1767, 2003.
4. Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K.: High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 32:197-204, 2003.
5. 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 diseases. *Mod Rheumatol*, 13:333-338, 2003.
6. Yoneda O, Imai T, Nishimura M, Miyaji M, Mimori T, Ozaki T, Domaie N, Fujimoto H, Minami Y, Kono T, Bloom E.T, Umehara H.: Membrane-bound form of fractalkine induces IFN-g production by NK cells. *Eur J Immunol*, 33:53-58, 2003.
 7. Tanaka M, Ozaki S, Kawabata D, Kishimura M, Osakada F, Okubo M, Murakami M, Nakao K, Mimori T.: Potential preventive effects of follistatin-related protein/TSC-36 on joint destruction and antagonistic modulation of its autoantibodies in rheumatoid arthritis. *International Immunol*, 15:71-77, 2003.
 8. 三森経世：関節リウマチの新たな自己抗体－抗シトルリン化タンパク抗体。内科, 93(2):233-236, 2004.
 9. 吉藤元, 三森経世：多発性筋炎・皮膚筋炎。診断と治療, 92(2):277-281, 2004.
 10. 三森経世：インフリキシマブ。Cardiac Practice, 15(1):100(100)-102(102), 2004.
 11. 三森経世：抗リウマチ薬・免疫抑制薬。Current Therapy, 22(1):18-22, 2003.
 12. 三森経世：関節リウマチの治療ガイドライン。Mebio, 20(12):14-18, 2003.
 13. 三森経世：関節リウマチの新しい血清マーカー－シトルリン化蛋白に対する自己抗体－。Pharma Medica, 21(12):33-37, 2003.
 14. 三森経世：自己抗体の測定法と対応抗原の分析。臨床検査, 47(13):1619-1625, 2003.
 15. 臼井崇, 三森経世：免疫疾患の病態解明と治療戦略の進歩。Molecular Medicine 特集『免疫 2004』, 40(臨時増刊号):268-274, 2003.
 16. 川端大介, 三森経世：膠原病の治療－現状と問題点, 今後の方向－。今月の治療, 11(11):64(1232)-68(1236), 2003.
 17. 三森経世：リウマチの鑑別診断。関節外科『最近の関節リウマチ診療』, 22(増刊号):19-23, 2003.
 18. 三森経世：膠原病診療における臨床検査。日本内科学会雑誌, 92(10):1(1901)-3(1903), 2003.
 19. 三森経世：DMARDsに関するエビデンス。EBM ジャーナル, 4(5):14(518)-20(524), 2003.
 20. 三森経世：関節リウマチの早期診断における抗フィラグリン/CCP 抗体の意義。臨床免疫, 40(2):185-189, 2003.
 21. 三森経世：抗 ARS 抗体。内科『特集内科キーワード 2003』, 91(6):1295-1296, 2003.
 22. 三森経世：Amyopathic dermato-myositis (ADM)。内科『特集内科キーワード 2003』, 91(6):1294, 2003.
 23. 三森経世：エビデンスに基づく RA 診療ガイドライン 抗リウマチ薬。診断と治療, 91(5):809-815, 2003.
 24. 三森経世：関節リウマチの新しい自己抗体。炎症と免疫, 11(3):112(358)-116(362), 2003.
 25. 田中真生, 三森経世：関節リウマチと関連する新たな自己抗体。リウマチ科, 29(4):412-416, 2003.
 26. 三森経世：関節痛・関節腫脹。診断と治療「救急医療」, 91(Suppl.):379-385, 2003.
 27. 三森経世：自己抗体。Medico, 34(4):4(128)-7(131), 2003.
- 書籍
1. 三森経世：リウマチ性多発筋痛症。山口徹, 北原光夫, 他編集。「今日の治療指針 2004 年度版」医学書院 (東京), 579-580, 2004.
 2. 三森経世：関節リウマチ。「新薬開発・申請のポイントと疾病別ガイドライン」(株) 情報機構 (東京), 209-222, 2003.
 3. 三森経世：SLE (全身性エリテマトーデス)。「喘息・アレルギー・リウマチ疾患治療薬ハンドブック」メディカルレビュー社 (東京), 114-124, 2003.

4. 三森経世：多発性筋炎・皮膚筋炎. 「ダイナミックメディスン」西村書店（東京），19.91-19.94，2003.
5. 三森経世：強皮症. 高久史磨／総監修「外来診療のすべて 改訂第3版」メジカルレビュー社（東京），890-891，2003.
6. 三森経世：副腎皮質ステロイド. 「治療薬ガイド 2003～2004」文光堂（東京），774-782，2003.
7. 三森経世：全身性エリテマトーデス. 杉本恒明，小俣政男，水野美邦総編集「内科学 第8版」朝倉書店（東京），1232-1238，2003.
8. 三森経世：混合性結合組織病. 山口徹，北原光夫，他編集「今日の治療指針 2003年度版」医学書院（東京），546-547，2003.
9. 三森経世：膠原病・リウマチ性疾患における自己抗体. 狩野庄吾，中川武正，他編集「アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療」最先端医療技術研究所（東京），242-247，2003.

图 1

E= CD4, T= dna51



E= CD8, T= dna51

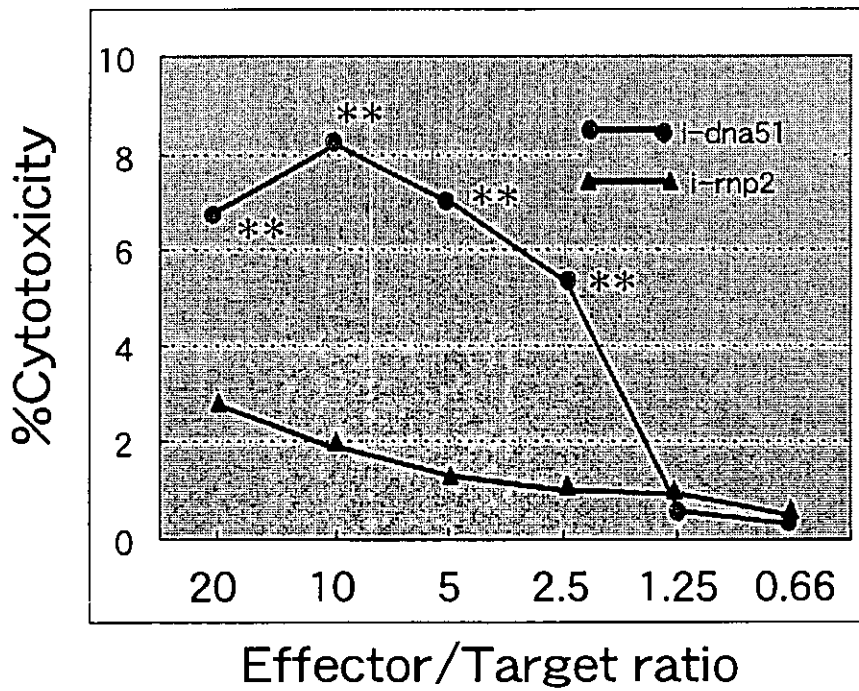
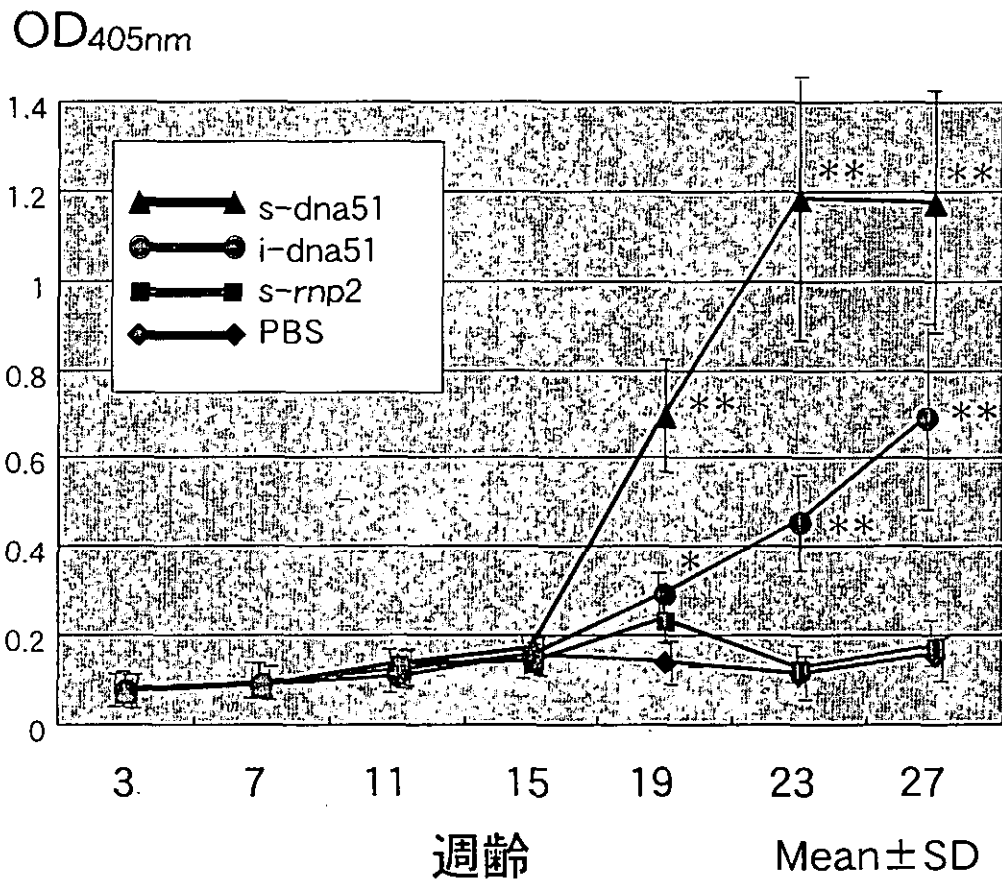


図 2



新しい調節性 T 細胞 (V α 7.2-J α 33 invariant T cells) の多発性硬化症における役割に関する研究

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部長

研究要旨

T 細胞レパトアには TCR に invariant chain を発現する細胞集団が含まれており、これまで自己免疫疾患における、V α 24-J α Q invariant NKT 細胞の研究が精力的に遂行されている。我々は最近第二の NKT 細胞集団として注目されている V α 7.2-J α 33 invariant T cell (V α 7.2 inv T cell) に注目し、SSCP 法により、その多発性硬化症 (MS) 末梢血および病変部位における発現を解析した。その結果、MS 脳病変の 50%、患者髄液の 73% で V α 7.2 inv TCR を検出できた。V α 7.2 inv T cell は腸管粘膜内に集族することから、消化管免疫の調節細胞としての役割が強調されている。しかし、我々の研究結果は、同細胞が自己免疫性炎症に関与し、自己免疫疾患の病態制御においても重要な役割を果たすことを示唆する。

A. 研究目的

T 細胞レパトアには TCR に invariant chain を発現する細胞集団が存在し、その中でも代表的なものが、V α 24-J α Q inv TCR を発現する NKT 細胞である。しかし、その他にも、V α 7.2-J α 33、V α 4-J α 29、V α 19-J α 48 などのインバリエント鎖を発現する T 細胞の存在が確認されている (*J. Immunol.* 163:301, 1999)。

我々はこれまで MS 患者の末梢血における V α 24-J α Q NKT 細胞の数と機能の変化について解析を加えてきたが (*J. Immunol.* 164:4375, 2000 ; *Int Immunol* 15:279, 2003)、本年度は V α 7.2-J α 33 TCR を発現する T 細胞に注目し、SSCP 法および定量的 PCR による解析を試みた。この細胞のマウスのホモログについては、

その多くが NK 細胞マーカーを発現することから、第二の NKT 細胞とも呼称されるようになっている (*FEBS Lett* 516:97, 2002)。し

かし、V α 24-J α Q NKT 細胞とは異なり、CD1d 分子ではなく、MR1 分子に拘束されることが Lantz らにより最近報告された (*Nature* 422: 164, 2003)。

B. 研究方法

MS 患者の髄液、剖検脳、CIDP などの末梢神経疾患の生検神経組織は、以前 NKT 細胞の検討に用いた材料を利用した。V α 7.2-特異的プライマーと C α 特異的プライマーにより PCR 増幅をかけた後、C α 特異的、J α 33 特異的、または V α 7.2-J α 33 インバリエント鎖特

異的プローブに hybridize する TCR クロノタイプを描出した。V α 7.2-J α 33 T 細胞の定量的解析には、LightCycler による Real-time PCR を用いた。

C. 研究結果

- 1) SSCP 解析の結果、健常者の末梢血では全例 (9/9) で V α 7.2 inv TCR が検出され、V α 7.2-J α 33 T 細胞がクローン増殖を起こしていることが示された。したがって欧米人と同様に日本人においても、同細胞が T 細胞レパトアの重要な構成成分であることが示された。一方、米国で確認されている V α 4-J α 29 および V α 19-J α 48 inv TCR については、今回の検討では検出できなかった。MS 患者末梢血では、15 例中 13 例で V α 7.2 inv TCR が検出された。
- 2) MS の末梢血では、V α 24-J α Q inv NKT 細胞の数が著明に減少している。そこで、V α 7.2 inv T cell も末梢血中で減少している可能性を考え、定量的 PCR で V α 7.2 inv TCR の発現量を計測した。しかし、健常者と MS 末梢血間で、V α 7.2 inv TCR 発現レベルの差は認められなかった。この結果から、V α 24-J α Q inv NKT 細胞と V α 7.2 inv T 細胞が MS 病態において異なる動態を示すことが示唆された。
- 3) つぎに MS の凍結脳病変 (14 サンプル) を RT-PCR-SSCP 法で解析した結果、7 サンプル (50%) で V α 7.2-TCR が増幅され、そのすべてが V α 7.2 inv TCR 特異的プローブに反応した。一方、同じ病変における NKT 細胞 (V α 24-J α Q inv TCR) の検出

頻度は低かった (1/14)。

- 4) MS 再発時に得られた髄液 11 サンプル中 8 サンプルで、V α 7.2 inv TCR が検出された。MS の脳病変で同鎖の検出頻度が高いこととあわせて、V α 7.2 inv T cell が MS の ennsyou

病変に積極的に浸潤することが推測された。

- 5) 末梢血で検出できる TCR クロノタイプの多くが脳炎症病変で検出できるのではないかと懸念があったため、対照として V α 19 陽性 T 細胞について SSCP 解析を行った。その結果、V α 19 TCR は健常者および MS 患者の末梢血サンプル全例で検出されたが、MS 病変ではまったく検出されなかった。

D. 考察

自己免疫疾患の病態は、自己反応性 T 細胞と、それを制御する調節細胞のバランスで規定される面が大きく、調節細胞の研究はきわめて重要である。今回我々は V α 7.2 inv T cell に注目し、同細胞が MS の脳病変に浸潤していることを証明した (*Int Immunol* 16: 223, 2004)。

Invariant TCR を発現する T 細胞は、系統的に古い細胞であり、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする重要な役割が推測されている。V α 7.2 inv T 細胞については、その多くが NK 細胞のマーカーを発現することが示され、“第二の NKT 細胞”と呼ぶことも可能な細胞集団である。NKT 細胞が CD1d 分子に結合した糖脂質 (α -galactosylceramide や OCH) を認識して、大量のサイトカインを産生するのに対し、第二の NKT 細胞は MHC class Ib 分子で

ある MR1 分子（主に B 細胞が発現する）に拘束される。さらに Lantz らは、この細胞が腸管の lamina propria に集積し、腸内免疫の制御に関与する可能性を指摘している。また、germ-free のマウスでは検出できないことから、腸内細菌の成分が V α 7.2-J α 33 T 細胞の維持に重要であることを示している。このような事実から、Lantz らは、V α 7.2 inv T cell を mucosal-associated invariant T cell (MAIT) と呼ぶことを提唱している。

しかし、我々の研究結果は、V α 7.2 inv T cell が腸管だけでなく、MS の脳病変や脳脊髄液に存在することを明確にした。すなわち、腸管免疫の制御だけではなく、自己免疫応答の制御にも関与する可能性を示唆し、きわめて興味深いものである。

近年ライフスタイルの西欧化に伴って、MS などの自己免疫疾患やアレルギー疾患が増加傾向を示している。食生活の変化により腸内細菌叢が変化し、V α 7.2 inv T 細胞の活性に変化が現れる可能性もあり、新しい調節細胞である V α 7.2 inv T 細胞は今後いろいろな領域で検討されるべきである。

E. 結論

第二の NKT 細胞、あるいは MAIT 細胞（腸管粘膜関連インバリアント T 細胞）と呼ばれる調節細胞（V α 7.2 inv T 細胞）が、MS の病変や髄液で検出されることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura T, Sonoda K-H, Faunce DE, Gumperz J, Yamamura T, Miyake S, Stein-Strcilin J: CD4⁺ NKT cells, but not conventional CD4⁺ T cells, are required to generate efferent CD8⁺ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J. Immunol.* 171:1266-1271, 2003

Bedoui S, Miyake S, Lin Y, Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, Beck-Sickinger A, von Hoersten S, and Yamamura T: Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY Y₁ receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J. Immunol.* 171: 3451-3458, 2003

Stanic AK, Shashidharamurthy R, Bezradica JS, Matsuki N, Yoshimura Y, Miyake S, Choi EY, Schell TD, Van Kaer L, Tevethia SS, Roopenian DC, Yamamura T and Joyce S: Another view of T cell antigen recognition: Co-operative engagement of glycolipid antigens by V α 14J α 18 natural TCR. *J. Immunol.* 171:4539-4551, 2003

Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T, and Miyake S: Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of α -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis. *Arthr. Rheumat.* 50:305-313, 2004

Illes Zs, Shimamura M, Newcombe J, Oka N, and Yamamura T: Accumulation of V α 7.2J α 33 invariant T cells in autoimmune inflammatory lesions of the nervous system. *Int. Immunol.* 16: 223-230, 2004

山村 隆、三宅 幸子：実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対する NKT 細胞の機能制御治療とその応用. *Molecular Medicine 臨時増刊号「免疫 2004」* (岸本忠三編集), 中山書店 (東京), pp 305-311, 2003

山村 隆：NKT 細胞による自己免疫疾患の制御. *Molecular Medicine* 40 : 562-568, 2003

山村 隆：多発性硬化症の発症機構と NK 細胞/NKT 細胞. *日本臨床* 61: 1329-1334, 2003

山村 隆：NKT 細胞を介した自己免疫疾患制御. *炎症と免疫* 11 : 616-622, 2003

佐藤 準一、山村 隆：多発性硬化症治療への新しい展望. *最新医学* 58:1926-1938, 2003

長山 成美、山村 隆：抗コレステロール薬による Th2 優位の誘導 -MS の治療への応用は可能か?-. *臨床免疫* 40: 205-208, 2003

長山 成美、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎と多発性硬化症. 特集 *Molecular mimicry (分子模倣) と疾患. 医学のあゆみ* 206:845-848, 2003

山村 隆：近未来の多発性硬化症治療. *BIO Clinica* 18: 1069-1073, 2003

山村 隆、林 幼偉、三宅 幸子：多発性硬化症の進行を抑制する免疫細胞. 特集 *脳と免疫. Brain Medical* 15: 401-405, 2003

2. 学会発表

山村 隆、佐藤準一、宮本勝一、三宅幸子：シンポジウム「神経疾患の克服」神経疾患の免疫療法. 第 26 回日本医学会総会. 福岡国際会議場. 福岡. 2003 年 4 月 5 日

山村 隆、荒木 学、三宅 幸子：新規糖脂質 OCH による自己免疫病態の制御. ワークショップ 13. 第 92 回日本病理学会総会. 2003 年 4 月 25 日, 福岡

山村 隆、三宅 幸子：合成糖脂質抗原と Th1/Th2 バランス. シンポジウム「気管支喘息・新しい治療戦略」第 15 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 横浜. 2003 年 5 月 12 日

山村 隆：多発性硬化症における NKT 細胞の役割. シンポジウム『自己免疫疾患とトレランス破綻のメカニズム』第 31 回日本臨床免疫学会. 東京. 2003 年 10 月 9 日

山村 隆、荒木 学、三宅 幸子：新規糖脂質 OCH による自己免疫病態の制御. ワークショップ 13. 第 92 回日本病理学会総会. 2003 年 4 月 25 日, 福岡

Yamamura, T: Immunology of Asian multiple sclerosis. *MS Across Continents: Insights from Asia and the Middle East. A programme organized under the auspices of the MS Forum. Bangkok, Thailand, Oct. 10, 2003*

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：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

G P I と自己抗体制御に関する研究

分担研究者松本 功（筑波大学 講師）

研究要旨

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

A.研究目的

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

B.研究方法

1）患者末梢血単核球 2×10^6 個を用いて始めに Cell proliferation ELISA にて患者おのこのG P Iに対する増殖活性を検定した上で、自己反応性T細胞をMACS サイトカイン・セクレション・アッセイにてクローニングした。G P I反応性T細胞について、Th1/Th2の偏向の有無、TCRの解析を行った。さらに、それよりT細胞ハイブリドーマ及びT細胞株を作成してT細胞エピトープの検索を行う。
2）G P I抗体陽性RA患者よりI g G分画をプロテインGカラムにて分離し、カニクイザル指関節に直接投与し、関節炎の発症及び組織学的解析を行った。
3）抗G P I抗体陽性、陰性群にわけ、G P Iの変異を遺

伝子レベル、メッセージレベルで比較検討した。

（倫理面への配慮）

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

C.研究結果

1）16名中5例のRA患者末梢血単核球より、G P Iに反応するTh1タイプ（I F N - g産生）の自己反応性T細胞をMACS サイトカイン・セクレション・アッセイにて同定し、TCRの解析では限局したCDR3領域を持つ細胞群がクローナルに増殖していることが判明した。抗G P I抗体陽性の全身性エリテマトーデス患者3例、健常人2例では抗体陽性者でもG P Iに対する反応は認められなかった。それよりT細胞ハイブリドーマ及びラインを作成しエピトープの検索を行う。

2）RA患者の抗G P I抗体を含むI g Gは、サルを用いた検討において関節軟骨表面で免疫複合体を作り、C 5 aレセプターを保持したエフェクター細胞を流入させることが判明した。

3）G P I抗原の検索ではゲノムレベルでは差が認められなかったが、抗G P I抗体陽性のRA患者よりメッセージレベルで変異型G P Iが22クローン得られた。

D.考察 E.結論

日本人RA患者で抗G P I抗体陽性患者が認められ、その抗体産生がH L Aと関連している可能性が示唆された。またG P I反応性T細胞がRA患者のみより同

定でき、これらの活性化が関節炎の発症に関与している可能性が示唆された。また抗 GPI 抗体陽性者より変異型 GPI が認められ、抗体産生との関連を検索中である。

G.研究発表

1.論文発表

1. Matsumoto I, Lee DM, Mansky RG, Sumida T, Hitchon CA, Schur PH, Anderson RJ, Coblyn JS, Weinblatt ME, Brenner M, Duclos B, Pasquali JL, Gabalawy HE, Mathis D, Benoist C. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum.* 48:944-954, 2003

2. Tsutsumi A, Ikegami H, Takahashi R, Murata H, Goto D, Matsumoto I, Fujisawa T, Sumida T. Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. *Human Immunol.* 64: 621-624, 2003

3. Murata H, Adachi Y, Ebisuka T, Chino Y, Takahashi R, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Akaza H, and Sumida T. Reiter's syndrome following intravesical Bacille bilie de Calmette-Guerin treatment for superficial bladder carcinoma. Report of six cases *Mod. Rheumatol.* (in press)

4. Muraki Y, Tsutsumi A, Takahashi R, Suzuki E, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, and Sumida T. Polymorphisms of IL-1b gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* (in press)

5、松本功 肥満細胞—自己抗体と関節炎のつなぎ役
臨床免疫 2003; 598-603.

6、松本功 関節炎の動物モデルとヒトの関節リウマチ
Pharma Medica 2003; 21(12): 15-17.

7、松本功 抗 GPI 抗体による関節炎発症機構
カレントセラピー2003; 22(1): 72-75.

8、松本功 第10回自己抗体と自己免疫シンポジウム講演録集
2003; 35-41.

9、松本功 解糖系酵素に対する自己抗体と RA 免疫
2004; 291-296.

10、松本功 自己抗体が何故関節炎を誘導するのか
内科 2004; 93(2): 204-207.

11、松本功 自己抗体により誘導される関節炎の発症機序
臨床免疫 in press

12、松本功、住田孝之 関節リウマチにおける新しい病因的自己抗体
臨床検査 in press

13、松本功 関節炎と抗 glucose-6-phosphate isomerase 抗体
リウマチ科 in press

β 2-グリコプロテイン I の新たな生物学的意義：ニック β 2GPI

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

研究要旨

抗リン脂質抗体の主要対応抗原である β 2 グリコプロテイン I (β 2GPI) はリン脂質と結合することにより凝固・線溶反応を多様に制御しているが、 β 2GPI をプラスミンで処理すると第 V ドメインの Lys-317/Thr-318 が切断され、そのリン脂質結合能が欠落し、 β 2GPI の機能は消失する。昨年に引き続き、プラスミン処理された β 2GPI (ニック β 2GPI) の新たな機能と臨床的意義につき検討した。ニック β 2GPI と glu-plasminogen の結合を ELISA 法および optical biosensor を用いて検討した。次に、ニック β 2GPI の線溶系における機能を plasminogen-fibrin 結合アッセイおよび in vitro の plasmin generation の評価によっておこなった。また、脳ドック受診者および脳梗塞患者の血漿中ニック β 2GPI を測定し、血中ニック β 2GPI の意義を併せて検討した。intact の β 2GPI は glu-plasminogen に結合しなかったが、ニック β 2GPI は結合を示し、plasminogen 上の結合部位は第 V クリンドメインのリジン結合部位で、その解離定数 (K_D) は 0.37×10^{-6} M であり、比較的強固な結合であった。ニック β 2GPI は glu-plasminogen と fibrin との結合を抑制し、plasminogen から t-PA の存在下でのプラスミン生成を有為に抑制し、この抑制効果は intact β 2GPI にはみられなかった。脳梗塞患者およびラクナ梗塞を有する者では脳 MRI 正常人にくらべて血漿ニック β 2GPI 値は著しく高く、他のトロンビン・プラスミン生成のマーカーと比べてそれらの臨床所見との相関が明らかに高かった。結語：ニック β 2GPI はプラスミン生成を抑制した。すなわち β 2GPI は新たな線溶インヒビターであるニック β 2GPI の前駆体であり、 β 2GPI は外因系線溶の negative feedback を担うことが示された。ニック β 2GPI はラクナ梗塞および脳梗塞患者血中で高値であり、その測定の臨床的有用性が示された。

A. 研究目的

β 2 グリコプロテイン I (β 2GPI) は抗リン脂質抗体症候群にみられる抗カルジオリピン抗体の対応抗原である。 β 2GPI はリン脂質と結合することにより凝固・線溶反応を多様に制御しているが、 β 2GPI をプラスミンで処理すると第 V ドメインの Lys-317/Thr-318 が切断され (ニック β 2GPI)、そのリン脂質結合能が欠落し、 β 2GPI の機能は消失すると考えられる。また、抗 β 2GPI 自己抗体と β 2GPI の結合には β 2GPI とリン脂質の相互作用が必須、すなわち β 2GPI のエピトープ発現にはリン脂質等の関与が必要であるので、 β 2GPI がニック

β 2GPI に変換されると抗原抗体反応がおこらなくなる。このことはプラスミンによる自己抗原の限定分解が生体自らの抗リン脂質抗体症候群という自己免疫異常からの回避の一序である可能性を示唆する。

これらのことより、ニック β 2GPI は凝血学的にも免疫学的にも抗リン脂質抗体症候群の病態においては「老廃物」的な位置付けにあり、ニック β 2GPI 自体の意義については報告はなかった。今回、プラスミンで処理、調整してニック β 2GPI を精製し、その新たな機能につき検討した。また、脳梗塞患者および脳ドック受診者の血漿中ニック β 2GPI を測定し、その意