

patients with Sjogren's syndrome (SS)  
66th ACR meeting, New Orleans, 10月24-29  
日, 2002.

10. 村木祥文、堤明人ほか. 日本人シェーグレン症候群 (SS) および全身性エリテマトーデス (SLE) 患者におけるIL-1 $\beta$ 遺伝子多型と疾患の関連。第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、12月4-6日、2002.

11. 高橋令子、堤明人ほか. 全身性エリテマ

トーデス患者におけるMannose binding lectin遺伝子の多型性。第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、12月4-6日、2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

1. 特許取得：該当なし
2. 実用新案登録：該当なし
3. その他：特になし

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。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組織学的検討から、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可能性を考えた。そこで、病変部の線維芽細胞が発現するCD40と浸潤CD4<sup>+</sup>T細胞上に一過性に発現されるCD154の結合により導入されるシグナルに着目した。アデノウイルスベクターを用いて培養ヒト線維芽細胞にCD40を強制発現させ、さらにCD154刺激を加えると、IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1, ICAM-1のmRNA発現が増強した。さらに、ブレオマイシン投与により誘導したマウス皮膚線維化モデルに抗CD154抗体を投与すると、コントロール抗体あるいはPBS投与群に比べて組織学的に真皮膠原線維の増加、皮下脂肪織や筋層の萎縮が抑制され、単位面積皮膚あたりのヒドロキシプロリン量も約半分まで減少した。以上の結果から、CD40-CD154シグナルは病的線維化の誘導に重要な役割を果たす可能性が高い。すでにCD40-CD154シグナルを標的とした分子標的療法が臨床試験段階にあることから、それらの抗線維化療法への応用が期待される。

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の膠原病患者の予後やQOLは大きく改善したが、肺線維症、皮膚硬化、腎硬化症など線維化が中心の病態に対する効果が証明された治療法はない。線維化にかかわる液性因子としてTGF- $\beta$ が知られているが、病的線維化の誘導にはTGF- $\beta$ 単独では不十分なことが示されている。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げることを目的とする。そのため、まず造血幹細胞移植後の慢性移植片対宿主病（GVHD）患者の涙腺線維化病変の組織学的検討により、標的とする分子あるいは細胞内シグナルの候補を絞り込んだ。さらに、

候補分子の線維化病態における役割を、培養線維芽細胞を用いた*in vitro*の実験系および線維化動物モデルを用いた*in vivo*の系で評価した。

B. 研究方法

1. 慢性GVHD患者における涙腺組織の検討

造血幹細胞移植後の慢性GVHD患者9例およびシェーグレン症候群5例を対象として、生検により採取した涙腺組織のHE染色、マロリー染色、免疫染色（CD4, CD8, CD34, CD40, CD80, CD86, CD154, HLA-DR, ICAM-1）を行った。注目すべき所見のあった部位については電子顕微鏡により超微形態も観察した。

2. 培養線維芽細胞におけるCD40発現誘導

正常ヒト皮膚由来の培養線維芽細胞に100MOIのCD40全長遺伝子を組み込んだアデ

ノウイルスベクター (CD40-AdV) またはコントロールベクター (Control-AdV) を感染させた。感染効率はフローサイトメトリーによるCD40の発現により確認した。

### 3. 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, Control-AdV (100MOI) を感染させた。2日後に無血清培地に変えると同時に可溶性CD154 (500 ng/ml ; Peprotech社) を加えた。CD154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。また、CD154刺激72時間の細胞増殖は<sup>3</sup>H-サイミジンの取り込みにより評価した。刺激3~72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, RANTES, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1,  $\alpha$ 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ス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。また, I型およびIII型コラーゲン, IL-6, IL-8, ICAM-1の遺伝子発現変化はTaqman PCRによる定量的な解析も行った。

### 4. 線維化モデルにおける抗CD154抗体の効果

C3H/Heマウス (メス, 6週齢) の背部に100  $\mu$ gのプレオマイシンを3週間連日投与することで皮膚線維化モデルを作成した。プレオマイシン投与1週間前から, マウス腹腔内にハムスター抗CD154モノクローナル抗体 (MR1), コントロールのハムスターIgG (500  $\mu$ g/個体), リン酸緩衝液 (PBS) のみを隔日投与した3群を作成した。皮膚線維化は組織学的 (HE およびマロリー染色, 電子顕微鏡) および単位面積皮膚あたりのヒドロキシプロリン量により調べた。

(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

慢性GVHD患者では涙腺導管周囲に線維芽細胞の増加, 密な膠原組織の集積による線維化, 腺房組織の萎縮を認めた。これら所見は発症間もない軽症例でもみられたが, 重症例でより顕著であった。線維芽細胞が増生する涙腺導管周囲にはCD4<sup>+</sup>T細胞が浸潤し, 一部はCD154陽性であった。同部位の電顕像では, 細胞質突起の接着構造を介した線維芽細胞とT細胞を中心とした多彩な炎症細胞との結合所見が多数観察された。導管周囲の線維芽細胞の多くはHLA-DR, ICAM-1, CD40, CD80, CD86を発現していた。一方, シェーグレン症候群涙腺では線維芽細胞がきわめて少数で, 炎症性細胞との接着構造やHLA-DR, 接着分子, 副刺激分子の発現はみられなかった。以上の結果から, 病的線維化組織の線維芽細胞が発現するCD40と浸潤T細胞が発現するCD154の結合により導入されるシグナルに着目した。

様々なヒト線維化組織由来の線維芽細胞の初代培養ではCD40を細胞膜上に弱く発現していたが, 継代により消失した。そこで, 正常皮膚由来の培養線維芽細胞にアデノウイルスベクターを用いてCD40を強制発現させた。CD40-AdVを感染させることにより, 4日後にほぼ全ての培養線維芽細胞膜にCD40が発現した。CD40-AdV感染線維芽細胞に可溶性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を介して細胞内にシグナルが導入されることが確認された。CD154刺激はCD40<sup>+</sup>線維芽細胞の細胞増殖を約2倍亢進させた。CD40-AdV感染線維芽細胞では可溶性CD154刺激24時間後にIL-6, IL-8, RANTES, MCP-1, ICAM-1のmRNAレベルが増強したが, 他の遺伝子では再現性のある発

現変化は観察されなかった。これら遺伝子の発現増強は刺激後3時間で観察され、48時間まで持続した。一方、Control-AdV感染線維芽細胞ではCD154刺激による遺伝子発現の変化はみられなかった。定量的PCRによる解析では、CD154刺激によりIL-6の発現は約30倍、IL-8は約10倍、ICAM-1は約5倍に上昇することが確認された。CD154刺激24時間後の培養上清中へのIL-8分泌量も約3倍に増加した。ブレオマイシン投与により誘導したマウス皮膚線維化モデルでは、真皮の過剰な細胞外マトリックス蓄積に加えて浸潤CD4<sup>+</sup>T細胞とマスト細胞におけるCD154の発現、線維芽細胞におけるCD40の発現が認められた。電子顕微鏡による観察では、線維化組織中に多数の線維芽細胞とT細胞、マスト細胞との接着構造が観察された。抗CD154抗体を投与した線維化モデルマウスでは、コントロール抗体あるいはPBS投与群に比べて組織学的に真皮膠原線維の増加、皮下脂肪織や筋層の萎縮が抑制された。また、抗CD154抗体投与群では単位面積皮膚あたりのヒドロキシプロリン量も約半分まで減少した。

#### D. 考察

臨床症状が顕性化した膠原病患者では完成した線維化病変しかみられず、線維化のプロセスを検討することは困難である。そこで、本研究では造血幹細胞移植後の慢性GVHD患者における涙腺病変をヒト線維化疾患のモデルとして用いた。慢性GVHD患者を解析に用いる長所は、移植後に正常組織が線維化していく過程を追跡できることである。慢性GVHD涙腺では導管周囲で線維芽細胞とT細胞が密接に接着しており、線維化の形成過程でこれら細胞が協調的に働く可能性が考えられた。線維芽細胞の多くはT細胞上にリガンドが存在するHLA-DR、接着、副刺激分子を発現し、これら細胞表面分子間接着を介して病的線維化を誘導する仮説を考えた。そこで、線維芽細胞に発現するCD40と活性化T細胞に一過性に発現されるCD154の相互作用に着

目した。

CD40を強制発現させた培養線維芽細胞を用いた実験系では、CD40<sup>+</sup>線維芽細胞にCD154からの刺激が導入されれば、細胞増殖に加えてマトリックス産生を増強するIL-6、末梢血からの炎症細胞や線維芽細胞前駆細胞を引き寄せるケモカイン（IL-8, RANTES, MCP-1）、T細胞との接着を強めるICAM-1の発現が誘導されることが明らかとなった。さらに、マウスモデルにおける皮膚線維化を抗CD154抗体が抑制したことは、CD40-CD154シグナルが線維化誘導に重要な役割を果たしていることを示す。実際の線維化組織ではTGF- $\beta$ 、PDGFなど液性因子による刺激も同時に存在することから、CD40を介したシグナルが他のシグナルと協調的に作用して病的線維化を誘導すると考えられる。すでにCD40-CD154シグナルを標的とした分子標的療法が臨床試験段階にある。したがって、それらを抗線維化療法へと応用することは比較的容易である。現状で病的線維化を抑制する効果が実証された治療法がないことから、早急な検討が期待される。

#### 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*in vitro*および*in vivo*の実験系で示された。したがって、CD40-CD154シグナルが抗線維化療法の新たな標的となる可能性が示された。

#### 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 44: 1888-1896, 2003.

2. 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* 171: 6883-6890, 2003.

3. 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* 58: 81-87, 2003.

4. 桑名正隆: 膠原病の難治性病態- 呼吸器 (肺高血圧症を除く- . *日本臨床免疫学会誌* 27: 118-126, 2004.

5. 桑名正隆: 肺線維症の発症機序. *医学のあゆみ* 211: 1063-1067, 2004.

6. 桑名正隆: CD40およびCD40リガンド. *臨床免疫* 43: 39-46, 2005.  
学会発表

1. Kuwana M, Nakamura M, Tanaka Y, Satoh T,

2. Kawai M, Hirakata M, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y: Autoantibody to CD40 ligand is associated with thrombocytopenia, but not with thromboembolism. The 68th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Antonio). 2004. 10.

3. Ogawa Y, Razzaque MS, Kawai M, Kameyama K, Mashima Y, Tsubota K, Kuwana M: Fibrogenic role of collagen-binding heat shock protein 47 in lacrimal glands of patients with chronic graft versus host disease. 4<sup>th</sup> International Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes (Puerto Rico). 2004. 11.

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

$\alpha_E\beta_7$ のE-cadherinへの接着阻害が膠原病における上皮傷害の治療標的として期待されることから、 $\alpha_E\beta_7$ が認識する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。まず、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（EC1, EC2, EC3, EC4, EC5）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（ECF）をPCR法で増幅し、pGEX4T-2 vectorに組み込み、GST融合タンパク（EC1-GST, EC2-GST, EC3-GST, EC4-GST, EC5-GST, ECF-GST）として発現、精製した。これらGST融合タンパクと $\alpha_E\beta_7^+$ K562との接着態度をELISA法で検討したところ、EC1-GSTだけでなくEC3-GSTやEC4-GSTと $\alpha_E\beta_7$ -K562との結合もより強い傾向にあった。つぎに我々は、nativeに近い状態での接着態度を検討するために、E-cadherinを哺乳類細胞に発現させた系で $\alpha_E\beta_7$ /E-cadherin接着を検討した。EC1-EC5をコードする部位をそれぞれ欠損したE-cadherin cDNAと全長E-cadherin cDNAをベクターに挿入したものを作成し、それぞれマウスL細胞にtransfectionして細胞表面上に発現させたものを作製した（ $\Delta$ EC1- $\Delta$ EC5, ECF）。これらE-cadherin<sup>+</sup>L細胞と $\alpha_E\beta_7^+$ K562細胞との接着態度を検討したところ、EC5はE-cadherin同士のhomophilic adhesionに必須でないが、 $\alpha_E\beta_7$ とのheterophilic adhesionに重要な関与をしていることが示唆された。

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。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E-cadherin同士の接着を阻害せず $\alpha_E\beta_7$ 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うる可能性を考慮し、 $\alpha_E\beta_7$ 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。

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、また、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上のエピトープを検討してきた。しかし、GST融合タンパクとして発現させた場合にはconformational epitopeが変化するためにnativeな状態での接着態度を検討することが困難と思われた。そこで本年度は、 $\alpha_E\beta_7$ のE-cadherinへの接着阻害が治療標的として期待されることから、よりnativeに近い状態での接着態度を検討するために、E-cadherinを哺乳類細胞に発現させた系で $\alpha_E\beta_7$ /E-cadherin接着を検討した。

B. 研究方法

1) RT-PCR

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

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

## 2) GST融合タンパクの生成

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

## 3) Binding assay

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シ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。

## 4) inverse PCR

全長E-cadherin cDNAを組み込んだpXベクターから、inverse PCR法を用いてEC1~EC5それぞれを欠損したcDNAを増幅しその後ligationさせて、それぞれを欠損したE-cadherin mutant cDNAをinsert DNAとしてもつXベクターを作製した。次に、lipofectamine法を用いてpXベクターをマウスL細胞にtransfectionし、これらE-cadherin mutantを細胞表面上に発現させた細胞( $\Delta$ EC1~ $\Delta$ EC5, ECF)を構築した。

## 5) 細胞接着アッセイ

L細胞同士のhomophilic adhesionに関しては、L細胞をcomplete medium中で37°C、16時間培養し、phase-contrast microscopeで観察して細胞同士の接着態度を検討した。

E-cadherin mutantと $\alpha_E\beta_7$ との接着は、 $\alpha_E\beta_7$  mRNAをdouble transfectionして $\alpha_E\beta_7$ を発現させたK562細胞( $\alpha_E\beta_7^+$ K562細胞)をDiIで、E-cadherin mutantを発現したL細胞をDiOで標識後に37°Cで16時間培養し、confocal laser scanning microscopeで接着態度を検討した。

## C. 研究結果

### 1) GST-E-cadherin融合タンパクの作製

健康人末梢血リンパ球(PBL)から全mRNAを抽出し、reverse transcriptaseで全cDNAに変換しこれを鋳型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(EC1: 106 a. a., EC2: 112 a. a., EC3: 112 a. a., EC4: 109 a. a., EC5: 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。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、EC1, EC2, EC3, EC4, EC5, 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EC1-GST, EC2-GST, EC3-GST, EC4-GST, EC5-GST, ECF-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1)。

### 2) ELISA法を用いたGST融合タンパクと $\alpha_E\beta_7$ -K562細胞とのbinding assay

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

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で35分間インキュベートし、洗浄後に $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ に調製した。この細胞を $1.0 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ /ウェル加えて $37^{\circ}\text{C}$ 、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、EC1-GST, EC2-GST, EC3-GST, EC4-GST, EC5-GST, ECF-GST, GSTに $\alpha_{\text{E}}\beta_{\text{T}}$ -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、EC1-GSTだけでなくEC3-GSTやEC4-GSTと $\alpha_{\text{E}}\beta_{\text{T}}$ -K562との結合もより強い傾向にあった (図2)。

### 3) E-cadherin transfectantを用いた細胞接着アッセイ

GST融合タンパクとして発現させた場合にはconformational epitopeが変化するためにnativeな状態での接着態度を検討することが困難と思われたため、次に我々はnativeに近い状態での接着態度を検討するために、E-cadherinを哺乳類細胞であるマウスL細胞に発現させた系で $\alpha_{\text{E}}\beta_{\text{T}}$ /E-cadherin接着を検討した。E-cadherin<sup>+</sup>L細胞同士のhomophilic adhesionを検討したところ、ECFと $\Delta\text{EC5}$ では細胞凝集を形成したが、 $\Delta\text{EC1}$ ,  $\Delta\text{EC2}$ ,  $\Delta\text{EC3}$ ,  $\Delta\text{EC4}$ では形成しなかった (図3)。その一方で、heterophilic adhesionを検討したところ、 $\alpha_{\text{E}}\beta_{\text{T}}$ <sup>+</sup>K562細胞はECFと凝集を形成したが、 $\Delta\text{EC1}$ ,  $\Delta\text{EC2}$ ,  $\Delta\text{EC3}$ ,  $\Delta\text{EC4}$ では形成しなかった。 $\Delta\text{EC5}$ の場合は凝集は認められたが、これはE-cadherin<sup>+</sup>L細胞同士のhomophilic adhesionで、heterophilic adhesionは認められなかった (図4・図5)。

### D. 考察・結論

GST融合タンパクを用いた系では、 $\alpha_{\text{E}}\beta_{\text{T}}$ とE-cadherin接着において $\alpha_{\text{E}}\beta_{\text{T}}$ はEC1, EC3, EC4を認識する傾向が認められた。しかしこの系では、conformational epitopeが変化するためにnativeな状態での接着態度を検討することが困難であることから、よりnativeに近い状態での接着態度を検討するために、

E-cadherinを哺乳類細胞であるマウスL細胞に発現させた系で $\alpha_{\text{E}}\beta_{\text{T}}$ /E-cadherin接着を検討した。その結果、E-cadherinのhomophilic adhesionには、HAVを有するEC1だけでなく、EC2, EC3, EC4も関係していると思われた。また、EC5はhomophilic adhesionに必須でないが、 $\alpha_{\text{E}}\beta_{\text{T}}$ とのheterophilic adhesionに重要な関与をしていることが示唆された。このことから、EC5はE-cadherinの上皮細胞間接着機能に影響を与えず、 $\alpha_{\text{E}}\beta_{\text{T}}$ の接着を阻害する標的として非常に適した部位だと考えられた。今後は、EC5を標的とした治療戦略が、膠原病・リウマチ性疾患における上皮傷害治療に有用とされることが示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

[原著]

- 1) Tsuzaka K, Onoda N, Yoshimoto K, et al. *Mod Rheumatol* 12: 167, 2002
- 2) Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, et al. *Clin Exp Immunol* 129: 160, 2002
- 3) Tsubota K, Fujita H, Tadano K, et al. *Clin Exp Immunol* 129: 177, 2002
- 4) Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, et al. *Exp Eye Res* 76: 233, 2003
- 5) Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. *J Immunol* 171: 2496, 2003
- 6) Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T. *Int Rev Immunol* 23: 273, 2004
- 7) Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, et al. *J Immunol* (in press) 2005

[総説]

- 1) 鈴木勝也, 津坂憲政, 竹内勤. 炎症と免疫, 10: 322, 2002
- 2) 鈴木勝也, 津坂憲政, 竹内勤. 炎症と免疫, 10: 322, 2002
- 3) 津坂憲政, 竹内勤. 日本医事新報, 4079: 1, 2002
- 4) 津坂憲政, 竹内勤. 臨床医, 28 (増刊号), 1147, 2002
- 5) 津坂憲政. 日本臨床免疫学会会誌, 26: 43, 2003

- 6) 津坂憲政, 竹内勤. 治療, 85: 1925, 2003
- 7) 津坂憲政. 炎症と免疫, 11: 101, 2003
- 8) 津坂憲政, 竹内勤. 内科 93: 972, 2004
- 9) 津坂憲政. 分子リウマチ 3: 183, 2004
- 10) 津坂憲政. 最新医学 59: 2165, 2004
- 11) 津坂憲政. 臨床免疫 42: 427, 2004

## 2. 学会発表

[海外]

- 1) Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. 66<sup>th</sup> ACR Annual Meeting, New Orleans, U.S.A., October, 2002
- 2) Tsuzaka K, Shiraishi K, Tsubota K, et al. 66<sup>th</sup> ACR Annual Meeting, New Orleans, U.S.A., October, 2002
- 3) Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. 67<sup>th</sup> ACR Annual Meeting, Orlando, U.S.A., October, 2003
- 4) Shiraishi K, Yoshimoto K, Abe T, Tsuzaka K, et al. The EULAR annual congress of rheumatology, Berlin, Germany, June, 2004
- 5) Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, et al. American College of Rheumatology, 68<sup>th</sup> ACR Annual Meeting, San Antonio, U.S.A., October,

2004

[国内]

- 1) 津坂憲政, 安倍達, 竹内勤. 第46回日本リウマチ学会総会, 2002年4月。
- 2) Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. (国際ワークショップ) 第47回日本リウマチ学会総会, 2003年4月。
- 3) 津坂憲政, 瀬戸山由美子, 吉本桂子, 他。第48回日本リウマチ学会総会, 2004年4月。
- 4) 津坂憲政. 第13回日本リウマチ学会近畿支部学術集会 (シンポジウム), 2003年9月。
- 5) 福原 ずみ, 津坂憲政, 瀬戸山由美子, 他. 第31回日本臨床免疫学会総会, 2003年10月
- 6) Tsuzaka K. (国際シンポジウム) 第32回日本臨床免疫学会総会。2004年10月。
- 7) Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. 第32回日本免疫学会総会, 2002年11月。
- 8) Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. 第33回日本免疫学会総会, 2003年12月。
- 9) Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, et al. 第34回日本免疫学会総会, 2004年12月。

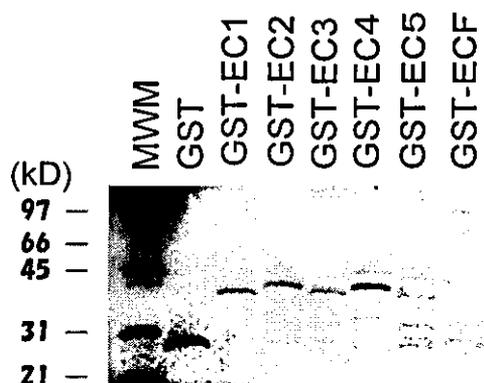


図1. E-cadherinドメインとGSTとの融合タンパク

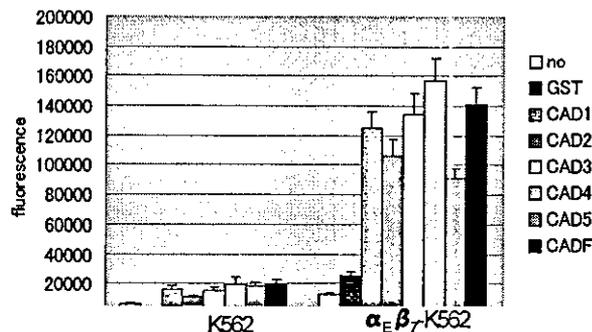


図2. GST融合タンパクと $\alpha_5\beta_1$ -K562細胞とのbinding assay

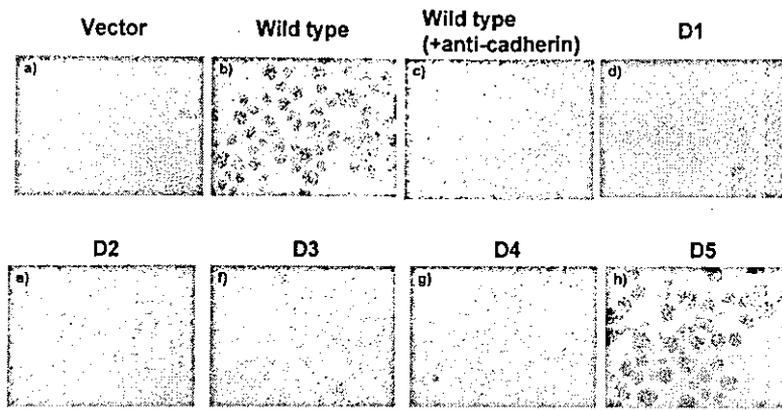


図 3. E-cadherin<sup>+</sup> L細胞の homophilic adhesion

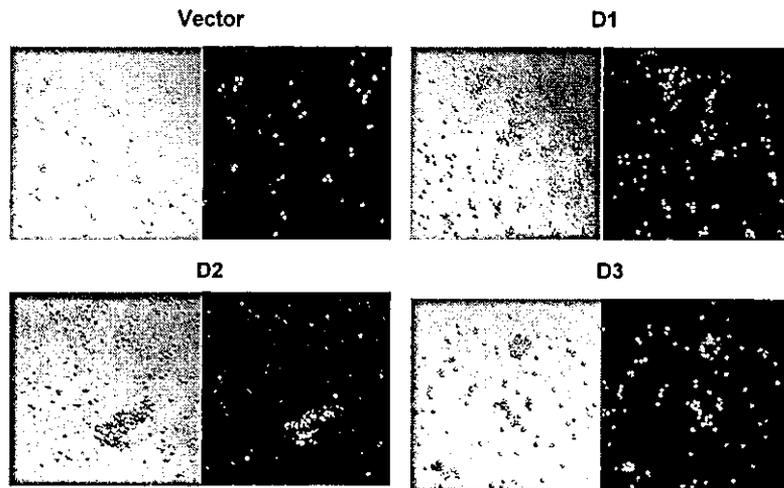


図 4. E-cadherin<sup>+</sup> L細胞と  $\alpha_E \beta_7^+$  K562 細胞との heterophilic adhesion

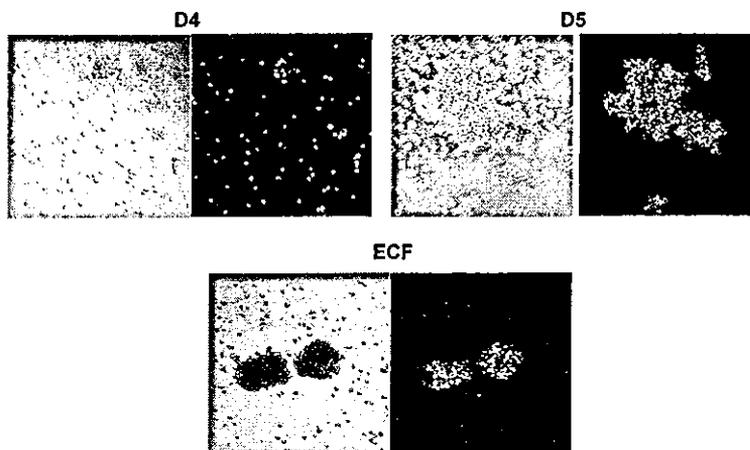


図 5. E-cadherin<sup>+</sup> L細胞と  $\alpha_E \beta_7^+$  K562 細胞との heterophilic adhesion

## 多発性筋炎・皮膚筋炎(PM/DM)における自己抗体とその関連病態に関する研究

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

多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)に特異的に検出される筋炎特異自己抗体(MSA)は診断、病型分類、臨床経過の推測など臨床的に有用とされるが、未だ不明な点が多い。本研究は、MSAの関連病態(臨床免疫学的特徴、筋組織像など)を明らかにすることを目的とした。抗Mi-2抗体は、日本人患者血清でもDMに特異的に検出され、間質性肺炎と関節炎の頻度は低く、治療反応性が良好な病型を形成する可能性が示唆された。一方、抗SRP抗体はステロイド療法抵抗性筋炎と関連し、抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体とは異なる筋炎の一病型を形成し、臨床経過の予測、治療方針の選択など臨床的有用性が示された。MSAと筋組織所見との関連を検討し、抗Jo-1抗体は障害の軽度な筋炎、抗SRP抗体は壊死・再生像を認めるものの、炎症所見の乏しい筋炎、抗RNP抗体は炎症性細胞浸潤が高度な筋炎が特徴的であった。MSAは特異的病態と密接に関連し、その測定は診断、病型分類、治療方針の選択など臨床的に有用である。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。

### A. 研究目的

膠原病は、自己細胞成分に対する多彩な自己抗体産生を特徴とする。これらの自己抗体は特定の臨床像と密接に関連し、診断や治療反応性、予後推定など臨床的に有用であるばかりでなく、細胞内分子の構造と機能解明にも役立つ。その中で、抗Jo-1抗体などの抗アミノアシルtRNA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。本研究では、PM/DM患者血清中に見出されるものの、その臨床病態の詳細が明らかでない抗Mi-2抗体、抗シグナル認識粒子(Signal Recognition Particle: SRP)抗体の関連病態、さらに筋炎特異自己抗体(myositis specific antibody:MSA)と関連する筋組織学的特徴を追究することを目的とした。

### B. 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(IPP)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) 筋炎特異自己抗体の臨床意義の検討: 筋炎特異自己抗体の出現頻度、同抗体と関連する臨床像(症状、治療反応性、予後など)を検討した。5) 筋生検組織の検討: Hemato-xylin/Eosin染色, Alkaline phosphatase染色, Acid phosphatase染色, NADH-TR染色, ATPase染色などを用い、検討した。

### C. 結果

1) 膠原病患者血清のスクリーニングにより、抗Mi-2抗体は8例に検出された。陽性例の臨床診断は、DM(52例中7例, 13%)とOL(80例中1例(PM-SSc OL))であった。同抗体は、PM(67例)や他の膠原病(764例)、健常人(60例)では検出されず、DMの疾患標識抗体となることが確認された。陽性患者血清中には、

他の筋炎特異自己抗体の併存はみられなかった。次に、抗Mi-2抗体陽性例の臨床特徴を検討したところ、間質性肺炎（8例中1例）と多発関節炎（8例中2例）の頻度が低かった。治療反応性については、1例は薬物治療を必要とせず寛解し、残りの7例でもステロイド治療で軽快し、治療反応性良好なDMと関連した。

2) 抗SRP抗体陽性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) 抗Jo-1抗体陽性例の筋組織像：筋の壊死・再生所見および炎症性細胞浸潤は4例中1例と低頻度で、Type 1 線維優位は認めなかった。一方、type 2B 線維萎縮を75%、神経原性変化を50%と高頻度に認めた。抗SRP抗体陽性例の筋組織像：8例全例に、壊死または再生像を認めたが、炎症性細胞浸潤はなかった。一方、抗Jo-1抗体陽性例でなかった、type 1 線維優位を50%に認め、特徴的と考えられた。

抗U1 RNP抗体陽性例の筋組織像：全5例に炎症性細胞浸潤、筋壊死・再生がみられたが、type 1 線維優位は1例(20%)に認めたのみであった。

#### D. 考察

抗Mi-2抗体は、臨床的にDMとの密接な関連が欧米の諸施設より報告されてきたが、本邦での同抗体の陽性率は非常に低いとされていた。その原因は、従来抗Mi-2抗体の検出に用いられてきた二重免疫拡散法が多量の標準血清を必要とし、低感度なため、十分な検索を施行できなかったためと考えられる。本研究では、感度および特異性に優れたIPP法により多数血清での検討を行い、抗Mi-2抗体はDM 7

例とSSc-PM OL 1例に陽性で、欧米の報告と同様、本邦でもDMの疾患標識抗体となることが初めて確認された。DMにおける出現頻度は52例中7例(13%)で、Targoffらの15-20% (ELISA) という米国の報告とほぼ一致した。臨床特徴の検討では、抗Mi-2抗体陽性例は、抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体陽性例に比べ、間質性肺炎と関節炎の頻度が低く、治療反応性が良好なDMサブセットと関連する可能性が考えられた。

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。

抗Jo-1抗体陽性例の筋炎は、ステロイド反応性が比較的良好とされるが、欧米では治療反応性不良や再燃傾向を示すとの報告もある。本研究では筋線維の壊死・再生が乏しく、筋障害の程度が軽度である可能性が示唆された。一方、抗SRP抗体陽性例では、炎症性細胞浸潤が認められず、type 1 線維優位が特徴的で、同抗体陽性例のステロイド抵抗性筋炎との関連性を示す重要な所見と考えられた。また、抗RNP抗体陽性例では、全例に炎症性細胞浸潤を認めるとともに、type 1 線維優位が低頻度で、臨床的なステロイド反応性良好を支持する特徴所見と考えられた。

#### E. 結論

抗Mi-2抗体は、日本人患者血清でもDMに特

異的に検出され、間質性肺炎と関節炎の頻度は低く、治療反応性が良好な病型を形成する可能性が示唆された。

抗SRP抗体がステロイド療法抵抗性筋炎と関連し、抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体とは異なる筋炎の一病型を形成することが明らかとなり、臨床経過の予測、治療方針の選択など臨床的有用性が示された。

抗Jo-1抗体は障害の軽度な筋炎、抗SRP抗体は炎症所見の乏しい治療抵抗性筋炎、抗RNP抗体は炎症性細胞浸潤が高度な筋炎など、MSAと特徴的筋組織所見との関連性が示唆された。

MSAの測定は、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。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

##### 1. 論文発表

- 1) Kuwana M, Kimura K, Hirakata M, Kawakami Y, Ikeda Y. Differences in autoantibody response to Th/To between systemic sclerosis and other autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2002;61(9):842-846.
- 2) Fujii T, Mimori T, Kimura N, Satoh S, Hirakata M. Pseudoscleroderma associated with transforming growth factor beta1-producing advanced gastric carcinoma: comment on the article by Varga. *Arthritis Rheum* 2003;48(6):1766-1767.
- 3) Satoh M, Mizutani A, Behney KM, Kuroda Y, Akaogi J, Yoshida H, Nacionales DC, Hirakata M, Ono N, Reeves WH. X-linked immunodeficient mice spontaneously produce lupus-related anti-RNA helicase A autoantibodies, but are resistant to pristane-induced lupus. *Int Immunol* 2003;15(9): 1117-1124.
- 4) 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 follow up. *J Rheumatol* 2003;30(12):2673-2679.
- 5) Yasuoka H, Ihn H, Medsger TA, Hirakata M, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. A novel testicular protein highly expressed in testis is overexpressed in systemic sclerosis fibroblasts and targeted by autoantibodies. *J Immunol*. 2003;171(12):6883-6890.
- 6) Miyachi K, Hirano Y, Horigome T, Mimori T, Miyakawa H, Onozuka Y, Shibata M, Hirakata M, Suwa A, Hosaka H, Matsushima S, Komatsu T, Matsushima H, Hankins RW. Autoantibodies from primary biliary cirrhosis patients with anti-p95c antibodies bind to recombinant p97/vcp and inhibit in vitro nuclear envelope assembly. *Clin Exp Immunol* 2004;136 (3) :568-573.
- 7) Yasuoka H, Okazaki Y, Kawakami Y, Hirakata M, Inoko H, Ikeda Y, Kuwana M. Autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes to major histocompatibility complex class I chain-related gene A in patients with Behcet's disease. *Arthritis Rheum* 2004;50(11):3658-62.
- 8) Satoh T, Kimura K, Okano Y, Hirakata M, Kawakami Y, Kuwana M. Lack of circulating autoantibodies to bone morphogenetic protein receptor-II or activin receptor-like kinase I in mixed connective tissue disease patients with pulmonary arterial hypertension. *Rheumatology* 2005; 44(2):192-196.
- 9) Mizutani A, Shaheen VM, Yoshida H, Akaogi J, Kuroda Y, Nacionales DC, Yamasaki Y, Hirakata M, Ono N, Reeves WH, Satoh M.

Pristane-induced auto-immunity in germ-free mice. *Clinical Immunol* 2005;114(2):110-118.

10) Hirakata M, Suwa A, Kuwana M, Sato S, Mimori T, Hardin JA. Association between autoantibodies to the Ku protein and DPB1. *Arthritis Rheum* 2005; 52(2):668-669.

11) Sato S, Hirakata M, Kuwana M, Suwa A, Inada S, Mimori T, Nishikawa T, Oddis CV, Ikeda Y. Autoantibodies to a 140kDa polypeptide (anti-CADM-140 autoantibodies) in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum* (in press)

12) 平形道人: 抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体症候群-抗ARS抗体症候群. *臨床免疫* 37(4):472-478, 2002

13) 平形道人: 抗KS(アスパラギニルtRNA合成酵素)抗体. *リウマチ科* 27(6):591-597, 2002

14) 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

15) 平形道人: 抗リボ核酸蛋白(ribo-nucleoprotein:RNP)抗体. *日内会誌* 92(10):1932-1940, 2003

16) 平形道人: 抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体と多発性筋炎. *炎症と免疫* 12(3):308-316, 2004

17) 佐藤慎二, 平形道人: Amyopathic dermatomyositisに特異的に出現する自己抗体-抗US抗体の臨床的意義を中心に-. *リウマチ科* 31(6):596-599, 2004

18) 平形道人, 高田哲也: 筋および神経・筋疾患とその鑑別疾患. *多発性筋炎・皮膚筋炎. 脊椎脊髄ジャーナル* 17(9):862-870, 2004

19) 平形道人: 筋炎患者血清に見出される特異自己抗体および関連自己抗体. *Clinical Neuroscience* 22(10):1155-1157, 2004

20) 平形道人: 抗Jo-1抗体. *Clinical Neuroscience* 22(10):1190-1191, 2004

## 2. 学会発表

1) Hirakata M, Suwa A, Satoh S, Nojima T,

Kaneko Y, Akizuki M, Mimori T, Hardin JA. Clinical features of Japanese patients with anti-SRP autoantibodies: The immunogenetic backgrounds. 66<sup>th</sup> Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2002

2) Hirakata M., Suwa A, Sato S, Nojima T, Okada T, Kawakami Y, Nishikai M, Hardin JA, Targoff IN. New profiles of autoantibodies in the sera of Japanese patients with myositis. 67<sup>th</sup> Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2003

3) Hirakata M, Suwa A, Nojima T, Sato S, Akizuki M, Hardin JA, Targoff IN. Clinical and immunological features in patients with anti-fer (Elongation factor 1 alpha) autoantibodies. 67<sup>th</sup> Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2003

4) Hirakata M, Suwa A, Takada T, Sato S, Nojima T, Okada T, Kawakami Y, Hardin JA. Clinical and Immunological Features in Japanese Patients with Anti-PMS1 Autoantibodies. 68<sup>th</sup> Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2004

5) Hirakata M, Takada T, Suwa A, Sato S, Ishihara T, Shimizu J, Hardin JA. Histopathological Features of Myopathies in Patients with Anti-SRP Auto-antibodies. 68<sup>th</sup> Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2004

## 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

## 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（東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科学・助手）

### 研究要旨

多発性筋炎(PM)・皮膚筋炎(DM)の筋炎症部位に浸潤している炎症細胞は、炎症性サイトカイン・細胞障害性分子の産生により病態形成に深く関与している。その炎症細胞浸潤にはケモカイン・ケモカインレセプターが寄与していると考えられるが、その詳細は解明されていない。そこで本研究はPM/DMの炎症細胞浸潤に関与するケモカインを解明し、その阻害剤による新規治療薬の開発を目的とした。筋炎モデルマウスを樹立し、筋炎症組織で産生されるケモカインを解析したところ、fractalkine (FKN), MCP-1, RANTES等いくつかのケモカイン発現の亢進がみられた。本研究ではFKN-CX3CR1相互作用に着目した。筋炎モデルマウスおよびPM/DM患者の罹患筋組織では、浸潤炎症細胞にFKN、CX3CR1の発現が認められた。また、抗FKN抗体の投与により、筋炎モデルマウスの筋組織への炎症細胞浸潤が抑制され、炎症性サイトカイン、細胞障害性分子の発現が低下した。これらのことより、FKN-CX3CR1相互作用は、筋炎マウスおよびPM/DM患者の罹患筋組織への炎症細胞浸潤に寄与すると考えられ、その阻害薬がPM/DM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

多発性筋炎(PM)および皮膚筋炎(DM)は、原因不明の難治性の炎症性筋疾患である。治療薬として一般に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くみられ、治療薬は十分ではなく、新規治療薬の開発が期待されている。患者の罹患筋組織にはT細胞、マクロファージなどの炎症細胞の浸潤がみられる。それらの炎症細胞からは炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞障害性分子などの発現がみられ、PM/DMの病態形成に深く関与している。その炎症細胞の浸潤には筋組織で発現されるケモカイン、炎症細胞上に発現するケモカインレセプターが重要な役割を果たしていると考えられているが、PM/DMの炎症細胞浸潤に関与するケモカインについての報告は少なく、どのケモカイン・ケモカインレセプターが炎症細胞浸潤に重要であるかについては未解明である。そこで、本研究はPM/DM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解明し、

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CFAのエマルジョンをday 1, 8, 15に皮内投与し、day 22に大腿四頭筋をHE染色、および抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗F4/80抗体による免疫染色を施行した。また、正常マウス、筋炎モデルマウスの大腿四頭筋からtotal RNAを抽出し、各種ケモカインの発現を、半定量RT-PCR法で比較した。筋炎マウスの大腿四頭筋、およびPM/DM患者の罹患筋組織を抗FKN抗体にて免疫染色。抗CX3CR1抗体、および抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗F4/80抗体で蛍光二重染色し、筋炎モデルマウスにおけるCX3CR1発現細胞を同定した。またPM/DM患者の罹患筋組織を抗CX3CR1抗体で免疫組織染色した。

筋炎モデルマウスにday 1より抗マウス

FKN抗体またはコントロール抗体を500 $\mu$ g、週3回腹腔内投与し、day 22の大腿四頭筋をHE染色により炎症細胞浸潤の程度をスコア化評価し、また壊死筋線維数の変化も解析した。また免疫染色にて浸潤しているCD4, CD8, F4/80陽性細胞数の変化を解析した。大腿四頭筋組織からtotal RNAを抽出し、TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , perforin mRNAの発現の変化を、定量PCRで解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、動物愛護などに配慮して行った。PM/DM患者の筋組織の研究に関しては、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会にて承認を得ている。

### C. 研究結果

正常マウスでは大腿四頭筋に炎症細胞浸潤等の変化はみられなかったが、rabbit myosinを繰り返し免疫したマウスでは、endomysium、perimysium、およびepimysiumに炎症細胞浸潤がみられた。また一部に壊死筋線維への炎症細胞の集簇がみられた。抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗F4/80抗体で免疫染色すると、CD4陽性T細胞は主にperimysiumへ浸潤しており、一部endomysiumにもみられた。CD8陽性T細胞は主にendomysiumへ浸潤し、また、F4/80陽性のマクロファージも同様にendomysiumに主に浸潤し、また壊死筋線維にも集簇していた。これらの組織学的特徴は、PM/DM患者に類似したものであり、このマウスをPM/DMのモデルマウスと考え以下の研究を続けた。

筋炎モデルマウス、および正常マウスの筋組織より、total RNAを抽出し、各種ケモカインの発現をRT-PCRで解析した。筋炎発症組織では、正常筋組織と比較し、MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MCP-2, Mig, IP-10, I-TAC, CXCL16, fractalkine (FKN)の発現が増強していた。一方、ELC, SLC, MDC, SDF-1ではその発現に明らかな差はなく、またMCP-3, LARCの発現は正常マウス、筋炎マウスともに認められなかった。

FKN-CX3CR1相互作用に着目して研究を進

めた。筋炎モデルマウス、PM/DM患者の罹患筋組織におけるFKNの発現を免疫染色で解析した。正常マウスの大腿四頭筋ではFKNの発現は認めなかったが、筋炎モデルマウスの大腿四頭筋では、浸潤している炎症細胞（主にendomysium）からFKNの発現が認められた。PM/DM患者の罹患筋組織でも、筋炎マウスと同様に、endomysiumを中心に浸潤炎症細胞よりFKNの発現が認められた。また、筋炎モデルマウスでCX3CR1とCD4, CD8, F4/80を二重染色したところ、一部のCD4 T細胞、大部分のCD8 T細胞およびマクロファージにおいてCX3CR1の発現が認められた。PM/DM患者の罹患筋組織においても、免疫染色にて一部の浸潤炎症細胞からCX3CR1の発現がみられた。

筋炎モデルマウスに、抗FKN抗体を投与し、その効果を解析した。炎症細胞浸潤の程度をスコア化し、コントロール抗体投与群と比較すると、抗FKN抗体投与群では、炎症細胞浸潤の程度は有意に軽減していた。また壊死筋線維数も有意に減少した。浸潤している炎症細胞数を免疫染色にて測定すると、CD4 T細胞は約30%減少し、CD8 T細胞およびマクロファージは約50%減少した。また筋組織からのTNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , perforinのmRNAの発現を定量PCRで解析したところ、抗FKN抗体の投与によりそれらの発現は有意に低下した。

### D. 考察

SJL/Jマウスに、rabbit myosinを繰り返し免疫することにより、PM/DM患者の炎症筋組織と同様に、マウスの筋組織に炎症細胞の浸潤がみられた。このマウスが、PM/DMのモデルマウスなりうると考えられた。

PM/DM患者の炎症筋組織では、TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ などの炎症性サイトカイン、granzyme A, perforinなどの細胞障害性分子が発現され、病態形成に深く関与していると考えられている。炎症性サイトカインは、マクロファージ、T細胞などの浸潤細胞より主に産生され、細胞障害性分子は浸潤しているT細胞より発現されている。産生された炎症性サイ

トカインは、筋細胞、血管内皮細胞、浸潤している炎症細胞からのケモカイン産生をさらに亢進し、さらなる炎症細胞浸潤を促進し、筋炎の病態形成に関与していると考えられる。

筋炎モデルマウスの罹患筋組織では、いくつかのケモカインの発現の亢進がみられた。これまでに、Th1型T細胞にはCCR5, CXCR3, CX3CR1の発現が増強していることが報告されているが、筋炎マウスの筋組織で発現亢進がみられたMIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTESはCCR5のリガンドであり、Mig, IP-10, I-TACはCXCR3のリガンド、FKNはCX3CR1のリガンドである。これらのケモカインは、CCR5, CXCR3, CX3CR1を介してTh1型T細胞の浸潤に関与している可能性がある。CX3CR1は末梢血cytotoxic T細胞にその発現が報告されており、FKNはCX3CR1を介して細胞障害性分子を発現するcytotoxic T細胞の浸潤にも関与している可能性がある。また、マクロファージにはCCR2, CCR5, CX3CR1などの発現が報告されており、それらのリガンドケモカインであるMCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MCP-2, FKNがマクロファージの浸潤に関与していることが推測される。

FKNはtype-1型のサイトカイン、細胞障害性分子を発現する特異なT細胞、およびマクロファージの遊走に関与することより、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、筋炎症部位でのFKN, CX3CR1の発現の解析、抗FKN抗体投与による筋炎モデルマウスに対する効果を検討した。筋炎マウスおよびPM/DM患者の罹患筋組織において、浸潤炎症細胞よりFKNの発現がみられた。Endomysiumに浸潤している炎症細胞が主にFKN産生細胞であることより、CD8 T細胞またはマクロファージがFKNを産生していると考えられる。また、CX3CR1は、CD4, CD8 T細胞、マクロファージから発現していた。FKN-CX3CR1相互作用によりCX3CR1陽性T細胞、マクロファージの浸潤にも寄与していると推測される。実際に、筋炎モデルマウスに抗FKN抗体を投与

すると、筋組織へのCD4, CD8 T細胞、およびマクロファージの浸潤が軽減し、炎症性サイトカイン・細胞障害性分子の発現も低下した。

これらの結果より、FKN-CX3CR1相互作用は、筋炎モデルマウスおよびPM/DM患者において、T細胞、マクロファージの浸潤に深く関与していることが示唆される。また、その阻害剤はPM/DM患者に対する新規治療薬として有用と考えられる。

## E. 結論

筋炎モデルマウス、およびPM/DM患者の罹患筋組織において、FKN, CX3CR1の発現がみられた。FKN阻害により筋炎モデルマウスの炎症細胞浸潤が改善した。FKN阻害薬が筋炎の新規治療薬として有用である。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

\* Toshihiro Nanki, Yasuyo Urasaki, Toshio Imai, Miyuki Nishimura, Kenzo Muramoto, Tetsuo Kubota, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of fractalkine ameliorates murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 173(11): 7010-7016, 2004.

\* Junko Nishio, Mihoko Suzuki, Toshihiro Nanki,

Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka.  
Development of TCRB CDR3 length repertoire of human T lymphocytes. *Int. Immunol.* 16(3): 423-431, 2004.

\* Ayako Arai, Aishun Jin, Weihua Yan, Daisuke Mizuchi, Koh Yamamoto, Toshihiro Nanki, Osamu Miura. SDF-1 synergistically enhances IL-3-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk signaling pathway through activation of Rac and its effector Pak kinases to promote hematopoiesis and chemotaxis. *Cell. Signal.* 17(4): 497-506, 2005.

## 2. 学会発表

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

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

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

\* 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.

\* 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.

\* 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回日本リウマチ学会総会。2003.

\* 駒野有希子、南木敏宏、宮坂信之。ヒト末

梢血単球サブセットによる破骨細胞への分化能の比較検討。第34回日本免疫学会総会。2004.

\* Tetsuo Kubota, Kyoko Wakamatsu, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Kazuo Umezawa. A Small Molecule NF- $\kappa$ B Inhibitor Suppresses Inflammatory and Destructive Activities of Synovial Cells in Rheumatoid Arthritis. 第68回アメリカリウマチ学会。2004.

\* Kazuki Takada, Toshihiro Nanki, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Nobuyuki Miyasaka. Chemokine Receptor Expression on the Peripheral Blood and Synovial B Cells in Rheumatoid Arthritis Patients. 第68回アメリカリウマチ学会。2004.

\* Hermann Girschick, Toshihiro Nanki, Henner Morbach, Sunit Singh. Differential Expression of Chemokines in Synovial Cells Infected with Different *Borrelia burgdorferi* Isolates. ヨーロッパリウマチ学会。2004.

\* Hermann Girschick, Toshihiro Nanki, Claudius Faber, Verena Baar, Sunit Singh. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases and Cyclooxygenases in Synovial Cells Infected by *Borrelia burgdorferi*. ヨーロッパリウマチ学会。2004.

\* 若松恭子、窪田哲朗、南木敏宏、宮坂信之、梅澤一夫。NF- $\kappa$ B阻害剤による関節リウマチ滑膜細胞活性化の抑制。第25回日本炎症・再生医学会。2004.

\* 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25回日本炎症・再生医学会。2004.

\* 鈴木文仁、南木敏宏、上阪等、宮坂信之。筋炎モデルマウスにおける筋炎症部位への細胞浸潤に関与するケモカインの解析。第25回日本炎症・再生医学会。2004.

\* 高田和生、南木敏宏、林田賢治、谷口顕、宮坂信之。関節リウマチ滑膜へのB細胞浸潤に関与するケモカインレセプターの解析。第48回日本リウマチ学会総会。2004.

\* 鈴木文仁、南木敏宏、上阪等、宮坂信之。  
筋炎モデルマウスにおける筋炎症部位への細胞浸潤に  
関与するケモカインの解析。第48回日本リウマチ学会  
総会。2004.

\* 若松恭子、南木敏宏、宮坂信之、窪田哲朗。  
NF- $\kappa$ B阻害剤の関節リウマチ治療への応用に

関する基礎的検討。第48回日本リウマチ学会  
総会。2004.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**  
特になし。

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

分担研究者 広畑 俊成（帝京大学医学部内科・助教授）

**研究要旨** 本研究において、我々はヒト単球系細胞表面上のリボソームP抗原の発現および抗リボソームP抗体が単球系細胞の機能に与える影響について検討した。単球系細胞は、休止期ではリボソームP抗原を発現しないが、活性化に伴いリボソームP抗原を表面に発現する。抗リボソームP抗体は活性化した単球系細胞からVEGF、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。抗リボソームP抗体は単球系細胞からVEGF、TNF $\alpha$ およびIL-6の産生を促進することにより、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、リボソームの60Sサブユニットに存在する3種類の酸性リン酸化蛋白(P0、P1、P2)を同時に認識する自己抗体である。これらのリボソームP蛋白はC末端の22個のアミノ酸からなる共通の抗原決定基を有している。抗リボソームP抗体はSLEに特異性が高く、SLE患者の12-16%に認められる。

中枢神経(CNS)の障害は、SLEの合併症として比較的良好に見られるものであり、脳器質症候群や非器質性精神病(神経症、うつ病、分裂病など)などの精神機能の異常(いわゆるCNSループス)がSLEにおけるCNS障害の1つの特徴である。その頻度は軽症のものも含めると全患者の25~60%に及ぶと言われている。しかしながら、SLEにおけるCNS障害の機序についてはよくわかっていない。

抗リボソームP抗体は中枢神経(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が、それらの病態形成における抗リボソームP抗体の役割は不明のままである。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(リボソームP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たが、抗リボソームP抗体が実際にそれらの細胞の機能を変化させるという報告はない。一方、単球系細胞表面上のリボソームP抗原の発現については、これまで明らかにされていない。今回我々は、抗リボソームP抗体の単球系白血球細胞株THP-1と末梢血単球に対する反応性の有無および抗リボソームP抗体が単球系細胞の機能に与える影響について検討した。

### B. 研究方法

同意を得た、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N-hydroxysuccinimide-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。精製抗リボソームP抗体中のエンドトキシン濃度は、0.8 pg/ml未満であった。患者IgGのF(ab')<sub>2</sub>断片は、患者IgGをペプシン分解した後にSephadex G 100カラムを用いたゲルろ過により得られた。抗リボソームP抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片は、患者IgGのF(ab')<sub>2</sub>断片からアフィニティー精製によ