

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

膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対する  
タクロリムスの有用性に関する検討

分担研究者 宮坂 信之 東京医科歯科大学大学院生体応答調節学/膠原病・リウマチ内科 教授  
研究協力者 高田 和生 東京医科歯科大学大学院生体応答調節学/膠原病・リウマチ内科 助手

研究要旨

膠原病には間質性肺炎（IP）が高頻度に合併するが、大量ステロイド療法に対しても治療抵抗例が少なくない。そのような症例には様々な免疫抑制剤が保険適応外で使用されているが十分なエビデンスは存在しないのが現状である。一方、タクロリムス（TAC）の膠原病に合併する IP における有効性が国内外から散発的に報告されていることから、本剤が新たな治療薬となりうる可能性がある。そのため我々はタクロリムスの有用性に関する検討を行っている。

第一段階として、当科の膠原病に合併する IP 症例で TAC（目標全血中トラフ濃度 5-9ng/ml）が最低 3 ヶ月以上投与された 9 例（TAC 開始時年齢平均 61.6 歳、TAC 投与前 IP 治療歴平均 37.0 ヶ月）にて臨床効果を評価した。9 例全例に救命効果があり、8 例は呼吸機能検査値・血清 KL-6 値・及び CT 画像上所見を含めた評価にて改善または安定化を示し、残り 1 例は併用するプレドニゾロンの増量後に著明に改善した。副作用としては可逆性の軽度腎機能低下及び手指振戦が 1 例ずつに見られた。経過観察中（平均 20.5 ヶ月）、1 例が細菌性肺炎を契機に IP の増悪を来し、シクロホスファミドを追加以降安定化した。第 2 段階として単一施設前向きオープン試験を計画し、当院倫理審査委員会にて 2004 年 2 月に承認された。2005 年 1 月末までに、皮膚筋炎患者 3 名が候補に挙げられたが、いずれも選択基準を満たさなかった。

第一段階の後ろ向き解析の所見は本病態における TAC の有用性を示唆するものである。第二段階の単一施設前向きオープン試験の問題点として、患者登録が緩徐であること、その原因として単一施設である点、対象が「難治性」である点、そしてその上に主評価項目である呼吸機能検査が施行可能であることが選択基準に含まれる点が挙げられる。これに対して、医学的及び倫理的見地から問題がない範囲内で選択基準・評価項目の変更を検討している。更に、膠原病の中で合併する IP の予後が最も悪い多発性筋炎・皮膚筋炎に絞り、日本医師会治験促進センターの援助及び治験ネットワークを利用し、効能追加承認のためのデータ提供を直接目的とした多施設臨床治験を現在計画中である。また、他の膠原病に合併する IP に関しては上記第二段階の臨床試験を継続し、評価を進めていく予定である。

A. 研究目的

間質性肺炎(IP)は膠原病に高頻度に合併し、予後規定因子であるが、現在確立された治療法がない。一般に副腎皮質ステロイド療法が用いられるが半数近くの症例は抵抗性であり、そのような場合限られたエビデンスにもとづきシクロスポリンやシクロホスファミドなどが使用されるが、いずれも効能・効果を取得しておらず、適切な用法用量設定も行われていないまま適応外使用されている。更に、そ

れらにも治療抵抗性を示す難治例や、また副作用のためにそれらを継続使用できない症例も多く存在する。その一方、近年皮膚筋炎・多発性筋炎を中心とした膠原病に合併する難治性 IP におけるタクロリムスの有効性が国内外から散発的に報告されており、同薬が新たな治療薬となりうる可能性があるとして注目されている。しかしながら非採算性などの理由から適応承認を目的とした企業主体の臨床試験の実現性は極めて低い。したがって我々は 2002 年度より、膠原病に合併する IP に対するタクロリムスの有用性に関する検討を開始し、2004 年度はその第一段階である後ろ向き検討を継続するとともに、第二段階として安全性・治療効果の更なる予備知識の獲得のため企画し 2003 年度末に患者登録を開始した単一施設前向きオープン試験にての開発を進めた。

## B. 研究方法

### (1) タクロリムス使用症例における後ろ向き評価

2004 年 2 月までに東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科にて、膠原病に合併する IP に対しタクロリムスが最低 3 ヶ月以上投与された症例において、以下の 4 項目において臨床反応を評価した。

**呼吸機能検査:** 肺活量(%VC)及び肺拡散能(%DLCO)の変動。

**血清マーカー:** IP 病変での再生 II 型肺胞上皮細胞に強く発現しており、IP に特異性が高くその活動性も反映するシアル化糖鎖抗原である KL-6 の変動。

**画像:** 高分解能 CT において、IP に特異的で治療に対する高い反応性を持つすりガラス影の変動。

**プレドニゾン投与量:** タクロリムス開始前 1 ヶ月と、開始後 1 ヶ月毎のプレドニゾン総投与量の変動。

統計方法は、タクロリムス開始前の数値と、開始後 3 ヶ月、6 ヶ月、および 12 ヶ月以内の

最終観測値における変動を、対応のある t 検定または Wilcoxon の符号付順位検定も用いて解析した。

### (2) 単一施設前向きオープン試験

膠原病に合併する IP で、ステロイド大量療法・シクロスポリン・シクロホスファミドの少なくとも一つに対して抵抗性または副作用のため継続不可能であった症例を対象とした、比較群なしの、単一血中濃度目標域を用いたタクロリムスの単一施設前向きオープン試験であり、24 週間を必須治療期間とし安全性及び治療効果の評価を行う。治療効果の評価には呼吸苦スコア(Mahler Transition Dyspnea Index)、呼吸機能検査(%FVC, %DLCO, 安静時 PaO<sub>2</sub>, AaDO<sub>2</sub>)、高分解能 CT(Wells らによる半定量化法を使用)、及び ADL や QOL (quality of life) における、治療前後での変動を解析する。目標症例数はタクロリムス投与 24 週間以上の症例で 8 例、途中脱落例を考慮して目標登録症例を 12 例とした。

また、これと平行する補足研究として、タクロリムスは多剤耐性遺伝子 MDR-1 の産物である P-glycoprotein の基質であり、P-glycoprotein は腸間上皮のみでなく末梢血単核球にも発現していることから、単核球における P-glycoprotein mRNA 及び蛋白発現を測定し、それとタクロリムスの臨床効果との関連の解析も行う。

## C. 研究結果

### (1) タクロリムス使用症例における後ろ向き評価

当科の膠原病に合併する IP 症例でタクロリムスが最低 3 ヶ月以上投与された 10 例のうち、経済的事情で服用中止した 1 例を除外した 9 例(皮膚筋炎 5 例、多発性筋炎、成人発症ステイル病、シェーグレン症候群、強皮症各 1 例)にて臨床効果の評価した (table 1)。

縦隔気腫の合併や強い呼吸苦のために、タクロリムス投与開始前後で解析可能な呼吸機

能検査値が得られた6例においては、生命予後と強く相関することが示されている「10%以上の%肺活量の低下」を来した症例はなく、タクロリムス開始前に急性な低下を示していた症例においても安定化が見られ、%肺活量において10%以上の上昇を来したのも6例中4例あった(**figure 1**)。

血清 KL-6 値は9例全例にて追跡され、タクロリムス開始前に比べ6ヵ月後、12ヶ月後の値には有意な低下が認められた(**figure 2**)。

CT画像においては、すりガラス影の増強を示した症例はなく、3例において同所見の減弱が認められた。2例において蜂窩肺領域の若干の拡大を認めた。

プレドニゾン投与量は、KL-6値上昇が続いたために2ヵ月後に投与量が増量された1例以外では、減量達成または必要最低限の維持量が継続された (**figure 3**)。

継続投与観察中1例が投与開始13ヶ月後に、細菌性肺炎を契機にIPの増悪(CT画像所見及びKL-6値にて)を来し、シクロホスファミドを追加、以降安定化した。副作用としては投与量減量により可逆性の軽度の腎機能低下及び手指振戦がそれぞれ1例ずつに見られたのみであり、いずれも米国立癌研究所(NCI)によるCTCAE(Common Terminology Criteria for Adverse Events)によるGrade 1であった。

## (2) 単一施設前向きオープン試験

東京医科歯科大学倫理審査委員会により2004年2月承認され、患者登録が開始された。2005年2月末までに、皮膚筋炎患者3名が候補に挙がった。一名は痴呆による失見当識のため本人に同意能力がなかったため、二名はIPの活動性が比較的強く選択基準を満たさなかったため登録されなかった。

## D. 考察

2002年度より、膠原病に合併するIPに対するタクロリムスの有用性に関する検討を開始し、今年度も第一段階である後ろ向き検討

を継続した。筋炎を中心に様々な膠原病に合併した難治性IP症例10例が検索され、その9例において解析を行った。9症例中8例はシクロスポリンまたはシクロホスファミドに抵抗性を示した難治例であった。タクロリムス治療開始後、9症例全例が、呼吸機能検査値、血清KL-6値、そしてCT画像を含めた評価で改善または安定化を示し、1例を除いて継続観察中(中間値25ヶ月、最長33ヶ月)再燃を認めなかった。一方、副作用としては投与量減量により可逆性の軽度の腎機能低下及び手指振戦がそれぞれ1例ずつに見られたのみであった。これらは、膠原病に合併するIPに対するタクロリムスの有用性を示唆している。

タクロリムスは、強力なT細胞抑制作用を持つ免疫抑制剤として既に重症筋無力症の治療に承認されているほか、関節リウマチ、ループス腎炎、潰瘍性大腸炎などに対する開発も進められている。膠原病に合併するIPに対する有用性も、症例報告や後ろ向き検討を中心に国内外から散発的に報告されている。Oddisらは2003年のアメリカリウマチ学会にて、抗tRNAシンテターゼ抗体陽性筋炎に合併したIP13症例におけるタクロリムスの臨床効果を後ろ向きに評価し、FVC及びDLCOに著明な改善を認め、またステロイド減量も達成されたと報告している。我々の症例は筋炎以外の膠原病に合併したIPも含めるが、現在までに得られている病理所見、臨床経過、及び治療への反応性に関する知見に基づき、筋炎に合併する難治性IPもそれ以外の膠原病に合併するものも非常に似た臨床病態であると考えられ、したがってOddisらの報告とあわせて、広く膠原病に合併する難治性IPに対するタクロリムスの有用性を示唆しているものと考察する。

第一段階の後ろ向き検討で得られたタクロリムスの安全性及び治療効果に関する知見の前向き試験での再現性を評価し、また後に企画される検証的治験のための方法論の根拠を

得る目的で、第二段階である単一施設前向きオープン試験を企画し、当院倫理審査委員会での承認を得て、患者登録を開始したが患者登録が緩徐であった。その主な原因としては、対象が「難治性」である点、その上に主評価項目である呼吸機能検査施行可能という選択基準がある点、そしてやはり最も大きなものは単一施設ゆえの低い患者集積率が挙げられる。患者登録を促進するために、当科への患者紹介の多い医療機関や当科の関連病院における医師に積極的にコンタクトし本研究の紹介を行い、また本臨床試験の主とする目的に影響がなくまた医学倫理的見地から問題がない範囲での選択基準の変更を検討している。それとともに、このような稀少疾患における患者集積率改善のためには多施設化が不可欠と考え、日本医師会治験促進センターの治験推進研究事業に応募し、採択された。最終的に効能追加を目標とすることから、膠原病の中でも IP 合併頻度が比較的高くその予後が悪い皮膚筋炎・多発性筋炎を対象を絞り、既に治験薬提供者である藤沢薬品工業も含めて協議を重ね、治験計画に取り組んでいる。同事業の治験ネットワークを通じた多施設化により PM/DM に合併する IP における開発を進める一方、それ以外の膠原病に合併する IP における開発に関しては、現行の単一施設前向きオープン試験にて評価を進める。

#### E. 結論

膠原病に合併する IP におけるタクロリムスの有用性が示唆されており、その新規治療薬としての開発を研究者主導で行うべく、後ろ向き解析と共に単一施設前向きオープン試験を開始したが、希少疾患故の、患者登録における効率が問題点としてあげられた。今後多施設化にて開発における効率を上げ、速やかな評価を実現するべく現在計画中である。これら臨床治験を通してタクロリムスの有用性とそれを裏付ける質の高いエビデンスを提供し、また補足研究を通して治療薬選択やタ

クロリムス初期投与量設定に有用なデータを提供し、結果、膠原病に合併する IP 治療のテーラーメイド化の実現に貢献できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

高田和生：多発性筋炎/皮膚筋炎に合併する治療抵抗性間質性肺炎に対する治療戦略。内科 95: 443-448, 2005

Takada K, Nagasaka K, Miyasaka N: Polymyositis/Dermatomyositis and interstitial lung disease; a new therapeutic approach with T cell-specific immunosuppressants. Autoimmunity, in press.

##### 2. 学会発表

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

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

**Table 1.** タクロリムスが投与された9症例の患者背景

年齢/性別	原病	IP発症 <sup>1)</sup> (月)	TAC開始前		TAC開始時			TAC治療	
			IP罹病期間 <sup>1)</sup> (月)	IP治療	PSL 投与量 (mg/日)	TAC 投与量 (mg/日)	KL-6値 (U/ml)	治療期間 (月)	臨床反応
58/女性	PM	18	26	PSL/CyA/CYC	12.5	3	1260	32	Cre上昇 (CTCAE-I <sup>1)</sup> )
58/女性	ADM	0	23	PSL/CyA/CYC	10	4	1210	16	-
64/女性	DM	3	97	PSL/CyA/CYC	7	3	669	15	-
49/男性	AOSD	2	10	PSL/CyA/CYC	10	5	932	28	-
69/女性	DM	4	8	PSL/CyA/CYC	25	5	1710	29	-
55/女性	SLE	22	11	PSL/CYC	9	3	496	25	-
65/女性	ADM	0	6	PSL/CyA	45	3	2590	4	-
67/男性	DM	4	2	PSL/CyA	15	3	1030	9	-
64/女性	SJS	18	150	PSL	30	3	1950	25	振戦 (CTCAE-I <sup>1)</sup> )

<sup>1)</sup> PM/DM 発症年齢

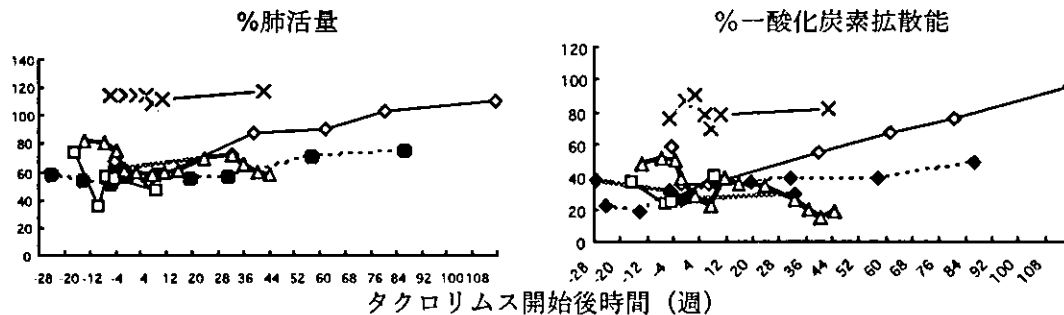
<sup>1)</sup> PM/DM 発症後、治療を必要とするIP発症までの期間

<sup>1)</sup> 治療を必要とするIP発症後、タクロリムス投与開始までの期間

PM:多発性筋炎、DM:皮膚筋炎、IP:間質性肺炎、TAC:タクロリムス、PSL:プレドニゾロン、CyA:シクロスポリン、CYC:シクロホスファミド

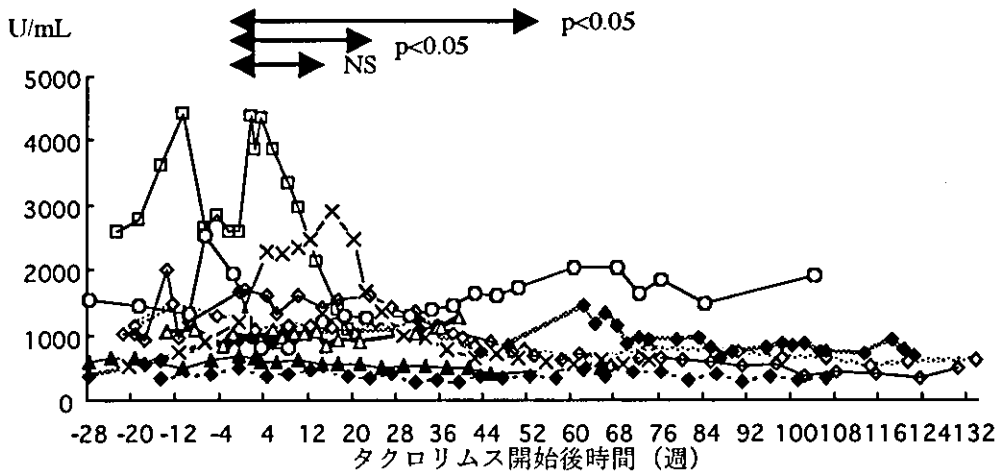
<sup>1)</sup> Common Terminology Criteria for Adverse Events grade I

**Figure 1.** 呼吸機能検査値の変動



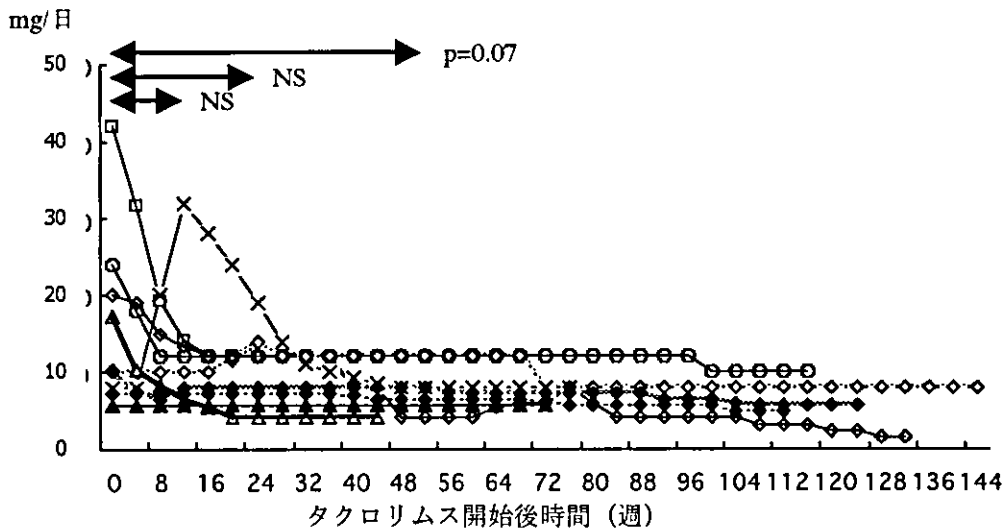
%肺活量、%一酸化炭素拡散能の治療前後比較評価は6症例で可能であり、死亡率と強く相関する「10%以上の%肺活量の低下」を来した症例はなく、タクロリムス開始前に急性な低下を示していた症例においても安定化が見られ、%肺活量において10%以上の上昇を来したのも6例中4例あった。

Figure 2. 血清 KL-6 値の変動



血清 KL-6 値は 9 症例全例にて追跡され、タクロリムス開始前に比べ 6 カ月後、12 ヶ月後の値には有意な低下が認められた、

Figure 3. プレドニゾン投与量の推移



プレドニゾン投与量は、KL-6 値上昇が続いたために 2 カ月後に投与量が増量された 1 症例 (x) 以外では、減量達成または必要最低限の維持量が継続された。

Clinically Amyopathic Dermatomyositis患者血清中の140kDa蛋白  
(CADM-140 抗原)を認識する自己抗体の臨床的意義に関する研究

分担研究者 平形 道人 慶應義塾大学医学部内科 講師

研究要旨

【目的】多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)において間質性肺炎(Interstitial Pneumonia, IP)は、重要な予後因子であるが、特に、臨床的に筋炎症状に乏しいDM (Clinically amyopathic DM, C-ADM) 症例に治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎(Acute Interstitial Pneumonia, AIP)を合併することが知られている。かかる症例では、抗核抗体陰性が特徴とされてきたが、その詳細は不明である。本研究は、白血病細胞由来K562細胞を用いてADM患者血清中の自己抗体の追究を目的とした。【方法】自己抗体の検索は、白血病細胞由来K562細胞を用いた<sup>35</sup>Sメチオニン標識免疫沈降法でおこなった。これらの方法で、K562細胞成分中の蛋白を認識した症例の臨床症状、検査所見、経過、治療、予後などについて検討した。【結果】1. C-ADM患者15例中8例(53%)が免疫沈降法で140kDa蛋白を認識する新たな自己抗体(抗CADM-140抗体)を認めた。2. 抗CADM-140抗体は、C-ADMに特異的に検出された。3. 抗CADM-140抗体陽性ADM7例は、IPを併発しており、うち4例はAIPだった。4. 抗CADM-140抗体陽性DMは、陰性DMと比較して、AIP併発が有意に高頻度だった。【考察】C-ADM患者血清中に、140kDa蛋白を認識する新たな自己抗体(抗CADM-140抗体)の存在が示唆された。

A. 研究目的

間質性肺炎(IP)は、膠原病各疾患において重要な予後規定因子であるが、その発症機序は未だ不明である。近年、筋炎症状に乏しいClinically amyopathic DM (C-ADM) 症例に治療抵抗性のAIPが合併することが報告されている。かかる症例では、自己抗体陰性が特徴とされているが、その詳細は不明である。本研究は、C-ADM患者血清中の自己抗体の追究を目的とした。

B. 研究方法

I. C-ADM患者血清中の自己抗体の追究

膠原病、特発性間質性肺炎および健常人314例を対象とした(PM 61, DM 42 (C-ADM 15を含む)、関節リウマチ 50, 全身性エリテマトーデス 46, 混合性結合組織病

/重複症候群 27, 全身性強皮症 22, シェーグレン症候群 7, 特発性間質性肺炎 43, 健常人 16例)。自己抗体の検索は、白血病細胞由来K562細胞抽出物を用いた<sup>35</sup>Sメチオニン標識免疫沈降法でおこなった。

II. 自己抗体陽性C-ADM患者の臨床特徴の検討

免疫沈降法で、K562細胞成分中の蛋白成分を認識した症例の臨床症状、検査所見、経過、治療、予後などについて検討した。

C. 研究結果

I. C-ADM患者血清中の自己抗体の追究

(i) 免疫沈降法による検討

免疫沈降法による蛋白成分分析で、C-ADM患者血清8例が約140kDa蛋白を沈降した(図1)。これらの血清は、既知の自己

抗体とは、明らかに異なった分子量の蛋白を免疫沈降した。そこで、この新たな自己抗体を抗 CADM-140 抗体と命名した。

## (ii) 抗 CADM-140 抗体の疾患別頻度

抗 CADM-140 抗体は、DM42 例中 8 例 (19%) に認め、その全 8 例は、C-ADM 症例であった。また、C-ADM 以外の膠原病および健常人では認められなかった。

## II. 抗 CADM-140 抗体陽性 C-ADM

### 患者の臨床特徴の検討

#### (i) C-ADM 患者の臨床特徴

当教室で経験した C-ADM 症例の臨床免疫学的な特徴を検討した。全例で、ゴットロン徴候あるいはヘリオトロフ疹を認め、皮膚生検においても DM に特徴的な所見だったが、筋力低下は認められなかった。最大クレアチン・キナーゼ値も、抗 CADM-140 抗体陽性の 2 例で軽度の上昇を認めるのみだった。筋生検は 7 例で施行され、抗 CADM-140 抗体陽性 2 例および陰性 1 例で、軽度の炎症性細胞浸潤を認めるのみだった。関節炎は陽性例、陰性例おのおの 4 例認めたが、レイノー現象は陽性例 1 例のみと低頻度だった。悪性腫瘍は、陰性例の 2 例に認め、抗核抗体は、陽性 2 例および陰性 4 例で陽性だった。しかし、陽性例と陰性例の間では、明らかな違いは認めなかった。

#### (ii) C-ADM 患者に併発する IP の特徴

次に、C-ADM に併発する IP の臨床免疫学的特徴について検討した。C-ADM 15 例中 13 例 (87%) で IP を併発していた。抗 CADM-140 抗体陽性 8 例中 7 例で IP を併発、うち 4 例は急速進行性間質性肺炎 (AIP) だった。AIP と診断された 4 例は、パルス療法を含むステロイド大量療法にシクロスポリン (CyA) などを併用する強力な治療が行われ、2 例で CyA が有効だった。抗 CADM-140 抗体陰性 7 例中 6 例にも IP 併発していたが、AIP は 1 例のみであった。

#### (iii) 抗 CADM-140 抗体陽性および陰性 DM 患者の臨床特徴の比較

抗 CADM-140 抗体陽性の C-ADM を含む

DM 患者および同抗体陰性 DM 患者の臨床的特徴を比較した。抗 CADM-140 抗体陽性例は陰性例と比較して、AIP の併発が有意に高頻度だった。また、同抗体陽性例では、筋炎特異自己抗体は検出されなかったが、陰性例との間に有意差は認めなかった (表 1)。

## D. 考察

### I. C-ADM 患者血清中の自己抗体の追究

これまで、C-ADM に AIP を併発することが知られているが、かかる症例は、従来、特異自己抗体陰性とされ、ADM に特異的な自己抗体はこれまで詳細に検討されていない。近年になり、ADM 患者における自己抗体の報告が散見される。Targoff らは、HeLa 細胞抽出物を基質とした免疫沈降法で、C-ADM 患者血清中の自己抗体を検討し、18 例中 13 例で 155 kDa 蛋白、6 例で 95 kDa (Se) 蛋白を認識する自己抗体を認めたと報告した。抗 155 kDa 抗体は、C-ADM 以外に小児 DM など DM に主に見出されたが、抗 Se 抗体陽性例は、全例 C-ADM 例で、既知の筋炎特異自己抗体は、陰性であったとしている。

本研究により、C-ADM 患者血清中に、140kDa 蛋白に対する抗体の存在が示唆された。抗 CADM-140 抗体は、DM のサブタイプである C-ADM のみで認められ、C-ADM の疾患特異抗体の可能性が示唆された。

### II. 抗 CADM-140 抗体陽性 C-ADM

#### 患者の臨床特徴の検討

抗 CADM-140 抗体陽性患者は、IP を 8 例中 7 例で併発しており、その 7 例中 4 例が AIP であった点が注目された。一方、同抗体陰性の C-ADM 患者 7 症例中、AIP と診断されたのは 1 例のみであった。抗 CADM-140 抗体陽性例は陰性例に比較し、AIP の併発が有意に高頻度だった。したがって、同抗体の測定は、極めて予後不良とされる AIP 併発 C-ADM の早期診断・治療法の選択に有用と考えられ、その予後の改善につながるものと期待される。

### III. 今後の展望



今後、抗 CADM-140 抗体陽性症例の集積とその対応抗原の追究・検討が課題で、抗 CADM-140 抗体の産生機序の追究は、C-ADM に合併する AIP の病態を解明する上で重要であると考えられた。

#### E. 結論

1. C-ADM 患者 15 例中 8 例(53%)で 140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体(抗 CADM-140 抗体)を認めた。
2. 抗 CADM-140 抗体陽性 7 例は、IP を併発しており、4 例は AIP だった。
3. 抗 CADM-140 抗体陽性 DM は、陰性 DM と比較して、AIP 併発が有意に高頻度だった。
4. 抗 CADM-140 抗体は、C-ADM の疾患特異抗体である可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Hirakata M, Suwa A, Kuwana M, Sato S, Mimori T, Hardin JA. Association between autoantibodies to the Ku protein and DPB1\*. *Arthritis Rheum* 52(2):668-669, 2005
- 2) 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)
- 3) 佐藤慎二, 平形道人: Amyopathic dermatomyositis に特異的に出現する自己抗体. *臨床免疫* 41(3):318-321, 2004
- 4) 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
- 5) 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

6) 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

7) 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

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

9) 平形道人: 自己抗体の臨床的意義. *Medico* 35(10):368-375, 2004

##### 学会発表

1) 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

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

3) Sato S, Suwa A, Kaneko Y, Oka H, Yasuoka H, Nojima T, Inada S, Hirakata M. Clinical Characteristics of Patients with Anti-PL-7 (Threonyl tRNA Synthetase) Autoantibodies. 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 (予定も含む)

##### 特許取得

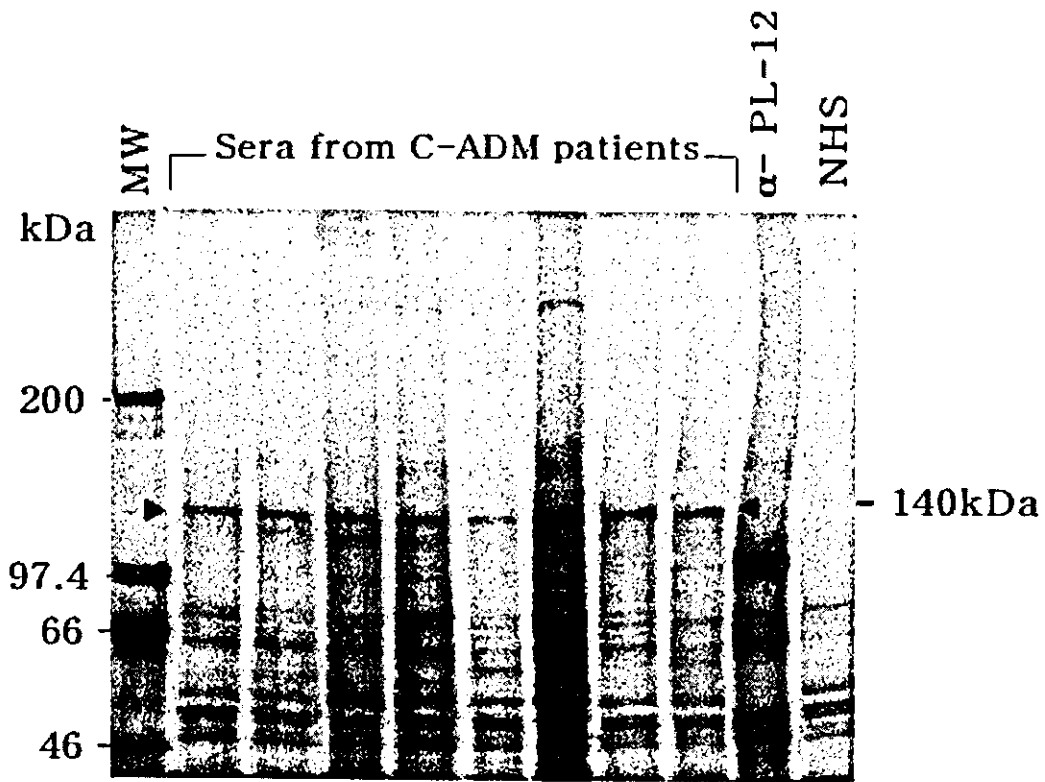
該当なし。

##### 実用新案登録

該当なし。

##### その他

該当なし。



**図1 ADM患者血清が免疫沈降する蛋白成分**  
 免疫沈降法による蛋白成分の分析では、ADM患者血清8例で140kDa蛋白を沈降した。

表 1 抗CADM-140抗体陽性DM患者の臨床的特徴

	抗CADM-140(+) (n=8)	抗CADM-140(-) (n=34)	p value
発症時年齢 (平均±SD)	44.5 ±12.7	46.5 ±15.7	NS
男女比	2 / 6	8 / 26	NS
ゴットロン徴候 (%)	75	88	NS
ヘリオトロープ疹 (%)	50	53	NS
筋力低下 (%)	25	76	p<0.05
CK値上昇 (%)	25	74	p<0.05
発熱 (%)	25	50	NS
レイノー現象 (%)	13	24	NS
関節炎 (%)	50	71	NS
急性間質性肺炎 (%)	50	6	p<0.05
KL-6値上昇 (%)	100 (5 / 5)	55 (6 / 11)	NS
悪性腫瘍合併 (%)	0	18	NS
筋炎特異自己抗体 (%)	0	29	NS
筋炎関連自己抗体 (%)	13	18	NS

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

ICOS-ICOS リガンド相互作用の阻害による実験的自己免疫性筋炎の改善に関する研究

分担研究者 原 まさ子(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授)  
研究協力者 勝又 康弘(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 助手)  
研究協力者 針谷 正祥(東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科/臨床試験管理センター 助教授)  
研究協力者 杉浦 智子(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 研究生)

**研究要旨**

組換え C 蛋白誘導性実験的自己免疫性筋炎 (experimental autoimmune myositis, EAM) ラットにおいては、ヒト多発性筋炎と近似して、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を認め、Inducible Costimulator (ICOS)-ICOS リガンドの相互作用が病態形成に重要であること等が明らかになった。

**A. 研究目的**

多発性筋炎や皮膚筋炎などの自己免疫性筋炎は、基礎的研究・報告が少ない疾患であり、その病態解明や難治性病態に対する新規治療の開発も遅れている。特に、従来、多発性筋炎の優れた実験モデル動物作製の報告は少ない。最近、ミオシン分画中に含まれる C 蛋白に、精製ミオシンよりも強い筋炎惹起性があることが、我々の共同研究者である東京都神経科学総合研究所の松本陽らによって報告され、新しい筋炎モデルとして注目を集めている。我々は昨年度までの本研究において、組換え C 蛋白誘導性ラット EAM では、ヒト多発性筋炎と近似して CD8 陽性 T 細胞の浸潤を認め、これらの T 細胞とマクロファージ・血管内皮細胞・筋細胞間の、接着分子や IL-1 $\alpha$ などのサイトカインを介した相互作用が病態形成に重要であること等を報告してきた。本年度の研究では、組換え C 蛋白誘導性 EAM ラットに対する ICOS 抗体の病態抑制効果および作用機序を検討し、将来的には新規治療法の開発に役立てることを目的とした。

**B. 研究方法**

6 週齢の雌 Lewis ラットに、ヒト組換え C 蛋

白フラグメントを完全フロイドアジュバントと共に、週 1 回、計 3 回免疫した。また、百日咳菌毒素を免疫時に腹腔内投与した。最終免疫の 2 週間後にエチルエーテル吸入にて安楽死させ、ラット後肢筋組織を採取した。筋組織を凍結切片にして、HE 染色・鏡検を行い、炎症スコアを測定した。また、各種 1 次抗体を用いて免疫染色を行った。day28 に屠殺したラットからリンパ節と脾臓を採取し、リンパ球を分離し、免疫に用いた C 蛋白を各濃度で添加・培養し、<sup>3</sup>H-thymidine を加え、その取り込みを測定した。次に、同様に作製したラット EAM に抗 ICOS 抗体またはコントロール抗体を投与し、day28 のラット筋組織の組織学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

EAM 誘導に用いる組換え C 蛋白の作製にあたっては、組換え DNA 実験指針に基づき実施した。また、動物実験の実施にあたっては、本学の動物実験倫理委員会の承認を得、同委員会の動物実験に関する指針に従った。

**C. 研究結果**

C 蛋白免疫ラット筋組織の HE 染色にて、筋線維の大小不同、壊死再生線維、筋線維間

や筋束周囲および血管周囲への単核細胞の浸潤といった筋炎所見を認めた。一方、対照群のアジュバントのみ投与したラットの筋組織では一部に筋線維間への僅かな単核細胞の浸潤を認めたのみで、明らかな筋炎所見は認めなかった。炎症の程度を各群間で比較したところ、C 蛋白免疫ラットにおいては、大腿四頭筋と前脛骨筋の何れにおいても、対照群のアジュバントのみ投与したラットや無処置ラットに比べて、有意に強い炎症所見を認めた。

免疫組織染色の結果、C 蛋白免疫ラットにおいて、筋炎組織への CD8 陽性 T 細胞と CD11b/c 陽性マクロファージの浸潤と、CD8 陽性 T 細胞における ICOS の発現を認めた。

C 蛋白免疫ラットのリンパ節細胞や脾細胞においては、C 蛋白の刺激によって、用量依存性に <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みが増加し、C 蛋白反応性リンパ球が誘導されていると考えられた。

コントロール抗体を投与した C 蛋白免疫ラット筋組織では無治療ラット EAM での検討と同様に、激しい筋炎所見を認め、また筋炎組織への CD8 陽性 T 細胞と CD11b/c 陽性マクロファージの浸潤と、CD8 陽性 T 細胞における ICOS の発現を認めた。一方、抗 ICOS 抗体投与群ではコントロール抗体投与群に比べて組織学的スコアの有意な改善を認めた。また、筋組織において ICOS の発現は認めなかった。

#### D. 考察

上記の結果は本 EAM モデルの病態形成における ICOS-ICOS リガンドの相互作用の重要性を示すと考えられた。

#### E. 結論

ヒトの多発性筋炎のモデル動物を作製し、抗 ICOS 抗体投与によってその病態を抑制した。今後の臨床応用として、抗 ICOS 抗体のヒトの筋炎に対する治療薬としての開発や、本筋炎モデルを用いた抗 CD40 リガンド抗体投与などの新規治療法の有効性・作用機序の

検討への発展が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

原まさ子: 多発性筋炎・皮膚筋炎 内科 93 (2)、259-263, 2004

Okamoto, H. et al.: Dermatomyositis associated with autoimmune idiopathic thrombocytopenia and anti-Ku antibody. *Modern Rheumatology* 14(2):187-190, 2004

##### 2. 学会発表

勝又康弘, 他: 組換え C 蛋白誘導性自己免疫性筋炎 (EAM) の経時的病態解析. 第 48 回日本リウマチ学会総会, 2004

Katsumata Y, et al: Attenuation of experimental autoimmune myositis by blocking inducible costimulator (ICOS) - ICOS-ligand interaction. The 68th ACR Annual Scientific Meeting, 2004.

#### 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

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

IL-6 阻害による難治性 SLE に対する探索的治療と DNA チップを用いた  
病因・病態関連分子の解析に関する研究

分担研究者 西本 憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科免疫制御学講座 教授

**研究要旨** 難治性 SLE 患者に対するヒト化抗 IL-6レセプター抗体(tocilizumab)療法を行った。また、末梢血細胞中の mRNA 発現変動をマイクロアレイ DNA チップにて測定し、治療効果に関連する分子群の解析を行った。SLE 患者末梢血中で48分子が健常人に比べ有意に変動していた。tocilizumab の投与前と投与後の mRNA の比較を行ったところ IL-6 阻害に伴い変動する分子として機能が未知のものを含む 5 分子が同定された。

### A.研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)にはステロイド剤や免疫抑制剤に抵抗性を示す難治例も多く、新しい治療法の開発が望まれる。

IL-6 は免疫応答や炎症反応を調節するサイトカインであり、ループス腎炎や CNS ループスなどの難治性病態に IL-6 の過剰産生の関与が示唆される。そこで、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を用いた探索的治療を行い、IL-6 阻害治療の可能性を検討した。また、IL-6 阻害治療に対して反応する分子群、さらには病因・病態関連分子を同定するため、DNA マイクロアレイを用いて SLE 患者末梢血に発現する分子の網羅的解析を行い、健常人との比較を行った。また、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体投与の前後で末梢血細胞中の mRNA 発現変動の比較を行った。

### B.研究方法

女性 SLE 患者11例 (median 35 歳)を対象とし、マイクロアレイ DNA チップを用い、患者末梢血細胞中に発現している分子の検索を行った。DNA チップは、ヒトの 3 万個の遺伝子からデザインされたオリゴ DNA を搭載したチップ (AceGene® Human Oligo Chip 30K、日立ソフトエンジニアリング株式会社/DNA チップ研究所、横浜)を用いた。

また、年齢のマッチした健常人女性ボランティアより採血した末梢血液との比較を行った。

末梢血細胞から抽出した total RNA より、アミノアルル増幅 aRNA を調整し、蛍光色素 Cy3、Cy5 で間接標識後 DNA マイクロアレイ (AceGene® Human Oligo Chip Human 30K) にてハイブリダイゼーションを行い、蛍光スキャナーで末梢血細胞中に発現している遺伝子の発現量の変化を測定した。aRNA の増幅は末梢血細胞由来 total RNA を Amino Allyl MessageAmp™ aRNA kit (#1752:Ambion)を用いた。

個々の SLE 患者末梢血細胞中の mRNA 発現は健常人の RNA より作製した aRNA を混合して作製した Healthy Reference Mixture (HRM) と比率として示し、健常人のそれと比較した。また、難治性 SLE 患者に対する IL-6 阻害治療前後での RNA 発現量の比較を行った。

aRNA を各々蛍光色素 Cy3、Cy5 で間接標識 (ポストラベル)してさらに、標識ラベル Cy3 と Cy5 を入れ替えた組み合わせ (Dye swap) で同様のハイブリダイゼーションを行い、発現量変化の再現性確認を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪大学の臨床研究倫理委員会

の承認の下に行った。また、被験者の文書による同意の取得のうえ行った。診療記録や採取した検体は、氏名・生年月日・住所などの情報を削除し、匿名化した。

### C. 研究結果

11例のSLE患者末梢血細胞中のmRNA発現量を健常人群と比較したところ、3万個の分子中48分子に有意な発現の増加または減少( $p < 0.05$ )が見られ、うち $p < 0.005$ の有意差をもち変動していた分子群には、Bennettら(J Exp Med 2003, 197:711-723)により報告されたインターフェロン関連分子6分子とdefensin alphaを含む26分子が含まれた。

免疫抑制療法やrituximabに抵抗性を示した極めて難治性のSLE患者に、ヒト化抗IL-6レセプター抗体による探索的治療を行った。施設倫理委員会ならびに厚生労働省監視指導課の許可の下に、ヒト化抗IL-6レセプター抗体、MRA(一般名tocilizumab)を使用した。さらに、tocilizumabの投与前後で、DNAチップによる検索を行った。患者は35歳女性。1991年にSLE(ループス腎炎WHOII型)が発症、その後ループス腎炎V型に進行、CNSループスを生じた。ステロイド療法、mizoribine、CyA、IVCY、AZP、MTX、COP療法、rituximab、DNA吸着療法、血漿交換療法に抵抗性を示したため、tocilizumabを使用した。Tocilizumab使用開始後、血中アルブミンの増加傾向を認めたが、2週間後にTTPを併発したため、tocilizumabは中止した。さらに、4週間後にはCNSループスの悪化を認めた。しかし、それまで、無効であったステロイドが奏効し、CNSループスはコントロールできた。

この症例のtocilizumabの投与前と投与後の末梢血細胞中のmRNA発現変動の比較を行ったところ機能が未知の分子を含む5分子がIL-6阻害に伴い変動する事がわかった。

### D. 考察

SLEに対するIL-6阻害治療の有効性については、本症例の結果のみでは未だ判断でき

ない。米国で開始された、SLEに対する臨床第1相試験では、tocilizumabの投与により、SLEの活動性の低下とT細胞、B細胞ともにメモリーのマーカーを持つ細胞が減少し、ナイーブ細胞が増加したとのことである。今後、IL-6 疎外の有効性に関しては更なる検討を行う必要がある。

一方、DNAチップを用いた網羅的解析により、新たな治療標的分子が同定できる可能性がある。Bennettら(J Exp Med 2003, 197:711-723)は末梢血単核球での検索を行い、インターフェロンによって誘導される分子群を同定した。我々は全血を用いて解析を行い、同様の結果を得た。このことから末梢血全血での検索が可能であることを示唆する。さらにIL-6阻害により、機能が未知の分子を含む5分子が同定された。現在これらの分子の機能を解析中である。

### E. 結論

DNAマイクロアレイを用いた解析より、IFN-inducible geneを含めた48分子がSLE患者で有意に変動していることが確認された。IL-6阻害治療により変動する分子として、機能が未知の分子を含む5分子が同定された。

### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

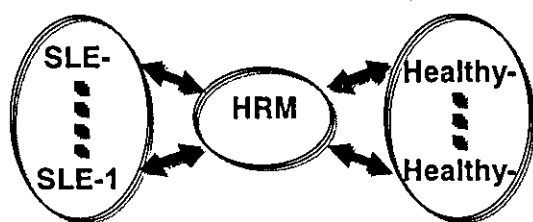
### G. 研究発表 論文発表

1. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T. Treatment of Rheumatoid Arthritis with Humanized Anti-interleukin 6 Receptor Antibody. Arthritis Rheum 2004, 50: 1761-69.
2. Nishimoto N, Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. Curr Opin Pharmacol 2004, 4: 386-91.
3. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T,

- Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama T, Kishimoto T. A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease. *Gastroenterol* 2004, 126: 989-96.
4. Kunitomi A, Konaka Y, Yagita M, Nishimoto N, Kishimoto T, Takatsuki K. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody induced long-term remission in a patient with life-threatening refractory autoimmune hemolytic anemia. *Int J Hematol* 2004, 80: 246-9.
  5. Mihara M, Shiina M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Akamatsu K. Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits murine AA-amyloidosis. *J Rheumatol* 2004, 31: 1132-8.
  6. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004, 21: 491-501.
  7. Yoshio NH, Watanabe D, Adachi Y, Nishimoto N. The blockade of interleukin-6 receptor as a therapeutic strategy for chronic inflammatory diseases. *Therapy* 2004, 1: 267-75.
  8. Saiki O, Uda H, Nishimoto N, Miwa T, Mima T, Ogawara T, Azuma N, Katada Y, Sawaki J, Tsutsui H, Matsui K, Maeda A, Nakanishi K. Adult Still's disease reflects a Th2 rather than a Th1 cytokine profile. *Clin. Immunol.* 2004, 112: 120-125.
  9. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad el-B, Schmitt E, Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Renz H, Neurath MF, Galle PR, Finotto S. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest.* 2005 115: 313-325.
  10. Nishimoto N. Clinical study in patients with Castleman's disease, Crohn's disease and rheumatoid arthritis in Japan. *Clin Rev Allergy and Immunol* (in press)
  11. Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T. Therapeutic Efficacy of Humanized Recombinant Anti-IL 6-Receptor Antibody for Children with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum* (in press)
  12. Shima Y, Iwano M, Yoshizaki K, Tanaka T, Kawase I, Nishimoto N. All-trans retinoic acid inhibits the development of mesangial proliferative glomerulonephritis in interleukin-6 transgenic mice. *Nephron.* 2005(in press)
  13. Mihara M, Nishimoto N, Ohsugi Y. Effect of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody in autoimmune mouse models. *Prog. Monoclon. Antibody Res.* 2004 (in press)
  14. Nishimoto N. Cytokine signal regulation and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 2005(in press)
- 学会発表**
1. Nishimoto N, et al. Repeated treatments with anti-IL-6 receptor antibody(MRA) lead to extended clinical response rheumatoid arthritis even after cessation of MRA . ACR/ARHP 68th Annual Scientific Meeting 2004. 2004.10.16-21.
  2. Nishimoto N, et al. Increase in serum levels of IL-6 and soluble IL-6 receptor after anti-IL-6 receptor antibody therapy in patients with rheumatoid arthritis. ACR/ARHP 68th Annual Scientific Meeting 2004. 2004.10.16-21.
  3. 西本憲弘. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for rheumatoid arthritis. 第34回日本免疫学会総会. 2004.12.01-03.
  4. Nishimoto N. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for immunological diseases. 2005 Keystone Symposia-Cytokines, Disease and Therapeutic Intervention. 2004. 2.12-17.
- H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)**  
特記すべきことなし。



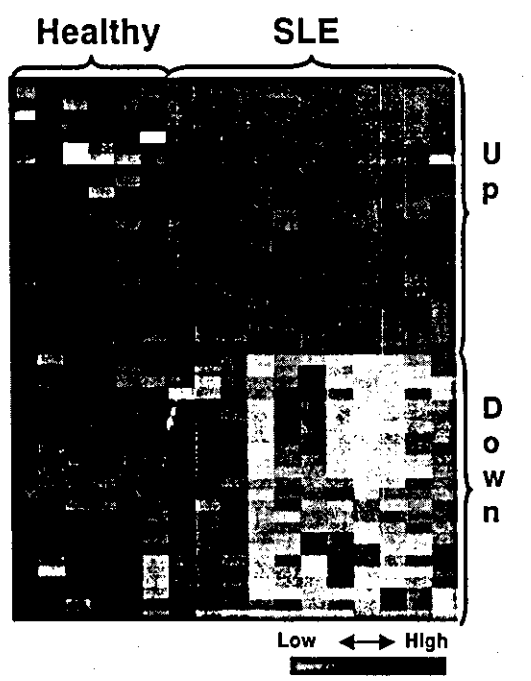
# SLE vs Healthy Individuals



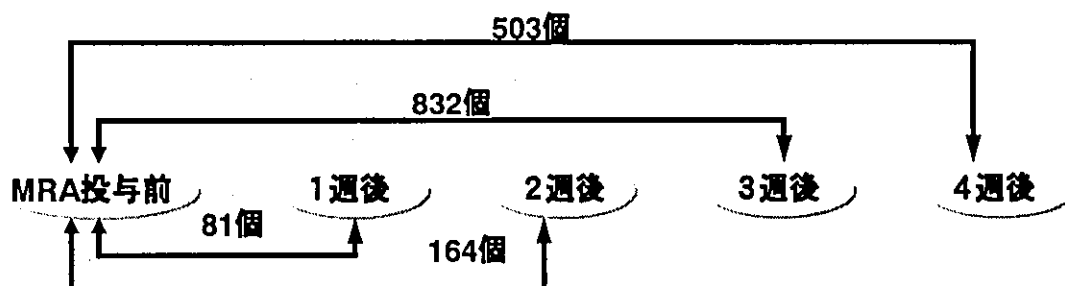
Healthy群で有意な変動が無く、かつSLE群で変動が2倍以上または1/2以下の分子数

○P<0.05 ⇔ 48個  
○P<0.005 ⇔ 26個

HRM : Healthy Reference Mix  
(Mixture of aRNA prepared from 12 healthy individuals)



## MRA投与経過において発現が変化した遺伝子数



健常者との比較で発現量に差があり、かつMRA投与前後(1週目)の比較で発現量に変化した分子

Definition	p-value (t-test)	Mean of Log <sub>2</sub> (SLE / HRM)	Mean of Log <sub>2</sub> (After / Before)
Clone 1	0.000002	1.985	-1.033
Clone 2	0.030382	1.416	-1.348
Clone 3	0.002300	-1.185	1.008
Clone 4	0.009014	-1.345	-1.200
Clone 5	0.014904	-1.084	1.001

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

シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞死における CD40 の役割に関する研究

分担研究者 菅井 進 金沢医科大学血液免疫制御学講座 教授  
小川 法良 金沢医科大学血液免疫制御学講座 助教授

研究要旨

シェーグレン症候群（以下 SS）唾液腺上皮細胞は、IFN $\gamma$ 刺激により Fas、CD40 を発現し、両者を同時に刺激すると Fas death 経路の細胞死抑制分子である cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) の発現が抑制され、効率的に細胞死に至る。今回の検討では CD40 下流に存在し、唾液腺上皮細胞死に関与する分子の同定を試みた。その結果、1) p38 インヒビター、SB203580 は抗 Fas 抗体と抗 CD40 抗体にて誘導される上皮細胞死を部分的に抑制した。2) CD40 刺激後、SS 唾液腺上皮細胞に pp38（活性化 p38）発現が誘導され、c-FLIP の発現が抑制された。3) NF- $\kappa$ B インヒビターである CAPE も SS 唾液腺上皮細胞のアポトーシスを抑制した。これらより、SS 唾液腺上皮細胞においては CD40 の下流に p38 や NF- $\kappa$ B などのシグナル伝達分子が存在することが示唆された。以上より、1) Fas・FasL、CD40・CD40L などの細胞表面機能分子や 2) c-FLIP、p38、NF- $\kappa$ B などの細胞内シグナル伝達因子が唾液腺上皮細胞死の調節を目的とした分子標的治療のターゲットとなりうる可能性を持つことが明らかになった。

A. 研究目的

シェーグレン症候群（以下 SS）においては唾液腺における組織障害の分子機構の解明が治療戦略を考える上で重要である。現在までの検討により、IFN $\gamma$  が SS 唾液腺上皮細胞に Fas および CD40 発現を誘導し、抗 Fas 抗体と抗 CD40 抗体を同時に作用させるとアポトーシスが効率的に誘導されることが判明した。この細胞死は Fas 中和抗体により抑制され、また CD40 刺激は Fas death 経路に関与する細胞死抑制蛋白 c-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein) の発現を低下させることにより Fas のシグナルを促進した。今回は唾液腺上皮細胞死のメカニズムをさらに解明することを目的として、CD40 下流に存在し、細胞死シグナル伝達に関与する分

子の同定を試みた。

B. 研究方法

1) p38MAPK の解析

IFN $\gamma$ 刺激 SS 唾液腺上皮細胞に抗 Fas 抗体および抗 CD40 抗体を作用させ、この系に p38 インヒビター (SB203580) を添加し、アポトーシス細胞を TUNEL 法にて測定した。また IFN $\gamma$ 刺激 SS 唾液腺上皮細胞に抗 CD40 抗体を作用させ、p38 とその活性化分子であるリン酸化 p38 (pp38) の発現を Western blot 法を用いて解析した。また p38 の c-FLIP 発現に対する影響を検討した。

2) NF- $\kappa$ B の解析

IFN $\gamma$ 刺激 SS 唾液腺上皮細胞に抗 CD40 抗体を作用させ、NF- $\kappa$ B インヒビターである CAPE を添加し、アポトーシスに対

する作用を解析した。また核蛋白を分離し、ゲルシフト法を用いて NF- $\kappa$ B 量を検討した。

#### (倫理面への配慮)

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

### C.研究結果

#### 1) p38MAPK の解析

p38 インヒビター(SB203580)は抗 Fas 抗体および抗 CD40 抗体にて誘導される SS 唾液腺上皮細胞アポトーシスを抑制した(図 1)。また IFN $\gamma$ 刺激 SS 唾液腺上皮細胞に抗 CD40 抗体を作用させると、pp38 の発現は時間および濃度依存的に増大した(図 2)。c-FLIP 発現抑制は SB203580 により阻害された(図 3)。

#### 2) NF- $\kappa$ B の解析

NF- $\kappa$ B インヒビター(CAPE)は抗 Fas 抗体および抗 CD40 抗体にて誘導される SS 唾液腺上皮細胞アポトーシスを抑制した(図 4)。また CD40 刺激は SS 唾液腺上皮細胞において、核内の NF- $\kappa$ B 量増大をもたらした(図 5)。

### D.考察

今回の検討により、SS 唾液腺上皮細胞死において CD40 下流における p38MAPK および NF- $\kappa$ B の関与が示唆された。特に p38MAPK は Fas death 経路の細胞死抑制蛋白 c-FLIP の調節に関与する可能性が示された。

### E.結論

現在までの研究成果により、SS 唾液腺上皮細胞死には IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , Fas/FasL, CD40/CD40L, c-FLIP, p38MAPK, NF- $\kappa$ B などの分子が関与していることが示唆された(図 6)。SS において、これら分子の発現や機能を調節することによる唾液腺障害に対する分子標的治療法の開発が望まれる。

### F.健康危険情報

該当なし

### G.研究発表

#### 1.論文発表

Ping L, Ogawa N, Sugai S. CD40-mediated Fas-dependent apoptosis in cultured salivary epithelial cells derived from patients with Sjogren's syndrome. 金沢医科大学雑誌 29:40-48, 2004

Ogawa N, Kawanami T, Shimoyama K, Ping L, Sugai S. Expression of I-TAC (interferon-inducible T cell  $\alpha$  chemoattractant, CXCL11) in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. Clin. Immunol. 112(3):235-238, 2004

Ping L, Ogawa N, Sugai S. Novel role of CD40 in Fas-dependent apoptosis of cultured salivary epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum, 52:573-581, 2005.

#### 2.学会発表

河南崇典、小川法良。ヒト唾液腺上皮細胞の初代培養および characterization. 第 3 回日本再生医療学会・日本再生医療学会雑誌 3:166, 2004

小川法良、下山久美子、唐澤博美、河南崇典、福島俊洋、正木康史、和野雅治、菅井進。シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞死への p38 および JNK の関与。第 48 回日本リウマチ学会総会・抄録集 199, 2004

斎藤美和子、太田策啓、出井良明、近藤

真偉智、小川法良、大橋弘幸、林 秀晴。  
シェーグレン症候群(SjS)患者の唾液腺培養上皮細胞における ICAM-1 発現調節機序の検討。第48回日本リウマチ学会総会・抄録集199、2004

下山久美子、河南崇典、小川法良。シェーグレン症候群(SS)唾液腺上皮細胞における inducible nitric oxide synthase(iNOS)発現と nitric oxide(NO)産生。第25回日本炎症・再生医学会 炎症・再生24(4):456, 2004

河南崇典、下山久美子、小川法良。シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞における TGFβ産生低下。第25回日本炎症・再生医学会 炎症・再生24(4):469, 2004

河南崇典、小川法良、下山久美子、唐澤博美、正木康史、和野雅治、廣瀬優子。ヒト口唇小唾液腺由来の組織幹細胞同定の試み。第32回日本臨床免疫学会総会 日本臨床免疫学会雑誌27(4):282, 2004

河南崇典、下山久美子、小川法良 ヒト口唇小唾液腺培養細胞における幼若細胞分画の同定と発現解析。第34回日本免疫学会総会 日本免疫学会総会学術集会記録77, 2004

Ogawa N, Ping L, Shimoyama K, Kawanami T, Sugai S. Novel role of CD40 in Fas-dependent apoptosis of cultured salivary epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. 68<sup>th</sup> ACR meeting Arthritis Rheum 50 (9, suppl): S580, 2004

Ohashi H, Ohta Y, Ogawa N, Saito M, Dei Y, Kondo S, Hayashi H. The role of CD40 ligand in patients with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 50 (9, suppl): S580-581, 2004

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も

含む)

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