

200400804 B

厚生科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

自己免疫疾患に関する調査研究

平成14～16年度 総合研究報告書

平成17年3月

主任研究者 小池隆夫

—目次—

(1)	構成員名簿	3
(2)	総合研究報告書	7
	自己免疫疾患に関する調査研究	
	小池 隆夫(北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科)	
	(附1) ループスアンチコアグラント・スクリーニング試験の標準化	17
	(附2) 抗リン脂質抗体症候群の治療指針(案)	23
	研究発表	27
(3)	研究成果の刊行に関する一覧表	53

(1) 構成員名簿

平成16年度 構成員名簿
(H14-難治-05)

区分	氏名	所属	職名
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・第二内科	教授
分担研究者	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター第二内科	教授
	鏑田 武志	東京医科歯科大学大学院疾患生命科学高次生体制御学	教授
	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
	広瀬 幸子	順天堂大学医学部第二病理学教室	助教授
	松下 祥	埼玉医科大学医学部免疫学講座	教授
	宮坂 信之	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学	教授
	石津 明洋	北海道大学大学院医学研究科病態解析学講座 分子病理学分野	講師
	江口 勝美	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座(第一内科)	教授
	伊藤 聡	筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻臨床免疫学分野	講師
	岡崎 拓	京都大学大学院医学研究科 21世紀COE・分子生物学	助手
	加藤 智啓	聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター生体機能・プロテオーム制御部門	助教授
	桑名 正隆	慶応義塾大学医学部 先端医科学研究所	講師
	佐々木 毅	東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座免疫・血液病学分野	教授
	菅井 進	金沢医科大学血液免疫制御学	教授
	田中 良哉	産業医科大学医学部第一内科学講座	教授
	土屋尚之	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学教室	助教授
	西村 孝司	北海道大学 遺伝子病制御研究所 疾患制御部門・免疫制御分野	教授
	橋本 博史	順天堂大学医学部膠原病内科学講座	教授
	原 まさ子	東京女子医科大学 膠原病リウマチ痛風センター	教授
	平形 道人	慶応義塾大学医学部内科リウマチ研究室	講師
松浦 栄次	岡山大学大学院医歯学総合研究科 細胞化学分野	助教授	
簗田 清次	自治医科大学内科学講座アレルギー・膠原病学部門	教授	
三村 俊英	埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科	教授	
山崎 雅英	金沢大学医学部附属病院血液内科	助手	
事務局	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座・第二内科 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL(011)706-5915 FAX(011)706-7710	講師
経理事務担当者	小田桐 英樹	北海道大学大学院医学研究科経理掛 TEL(011)706-5009 FAX(011)706-7873 e-mail:keiri@med.hokudai.ac.jp	

(2) 総合研究報告書

自己免疫疾患に関する調査研究

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御学講座・第二内科 教授

研究要旨

以下の項目を全体研究として行った。

①膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対する新たな治療法を開発する目的で、タクロリムスの有用性について検討を開始した。②抗リン脂質抗体症候群の治療指針(案)の作製を引き続き行った。③抗リン脂質抗体測定法の標準化をすすめた。④SLEの疾患感受性遺伝子解析を、厚生労働科学研究費補助金によるヒトゲノム・再生医療等研究事業「SLEを中心とした自己免疫疾患感受性遺伝子の解明班(笹月健彦主任研究者)」との共同研究事業として継続した。

以下の項目を分担研究として行った。

①全身性エリテマトーデス(SLE)患者 T細胞機能の異常、②SLEにおける T細胞-B細胞相互関係の解析、③SLE および膠原病間質性肺炎に対する新たな治療法の展望、④抗リン脂質抗体と関連する病態の解析、⑤抗リン脂質抗体症候群における自己抗体産生機構ならびに血管病変発現機構の解析、⑥多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)の病態解析、⑦PM/DMに合併する間質性肺炎の発症機序ならびに治療の検討、⑧シェーグレン症候群の組織障害機構の解析

A.研究目的

本研究の目的は難治性の自己免疫疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者のQOLの向上を計り、さらには病気の治癒を目指す事である。

B.研究方法

平成14年度から16年度の3年間で、難治性自己免疫疾患の中から研究調査の対象を全身性エリテマトーデス(SLE)、抗リン脂質抗体症候群(APS)、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)、シェーグレン症候群(SJS)の4疾患に絞り、各々の疾患における

免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者のQOLの向上を計り、さらには病気の治癒を目指すために以下の研究を行った。

1. HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおけるCD25⁺CD4⁺ T細胞の機能異常に関する研究。
2. PD-1 受容体欠損マウスにおける自己免疫疾患の解析。
3. CD25⁺CD4⁺T細胞(Treg)によるCD4⁺T細胞の増殖抑制メカニズムの解析。
4. 免疫バランス(Th1/Th2バランス)の自己免疫病における意義。

5. 全身性エリテマトーデス患者 T 細胞機能異常の分子機序に関する研究
6. クラス II HLA 分子を介したシグナル伝達による免疫制御機構に関する研究。
7. 全身性自己免疫疾患における自己抗体産生機構についての研究。
8. 抗リン脂質抗体産生を誘導する β 2-グリコプロテイン I 分子修飾に関する研究。
9. 抗リン脂質抗体症候群の診断法:酸化 LDL $\cdot\beta$ 2-グリコプロテイン I 複合体(自己抗原)とそれらの免疫複合体の測定意義。
10. 抗プロトロンビン抗体の接着因子誘導に関する研究。
11. 抗リン脂質抗体と血小板減少症の関連についての研究
12. 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。
13. Amyopathic Dermatomyositis 患者血清中の新規抗 US 自己抗体に関する研究。
14. 実験的自己免疫性筋炎(EAM)の作製と経時的病態解析に関する研究。
15. 間質性肺炎画像の自動分析法の開発に関する研究。
16. シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞死における CD40 下流分子の解析に関する研究。
17. *Ltk* 遺伝子多型と自己反応性 B 細胞の増殖に関する研究。
18. 候補遺伝子解析による SLE 疾患感受性遺伝子に関する研究。
19. SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御に関する研究。
20. ループス腎炎における Th1 細胞の動態に関する研究。
21. 細胞侵入性抗 DNA 抗体の病原性の研究。
22. 全身性自己免疫疾患における自己抗体の網羅的検索に関する研究。
23. スタチン類の自己免疫疾患に対する治療に関する研究。
24. ループス腎炎腎内浸潤 T 細胞サイトカインの単細胞レベルでの解析。
25. シェーグレン症候群唾液腺組織における TLRs 発現の検討に関する研究

(倫理面への配慮)

研究対象者に対する人権擁護に関しては最大の配慮を行い、また、研究による不利益・危険性の可能性とそれらを可能な限り排除する方法等についても、十分な説明を行い、理解して頂いたのちにインフォームド・コンセントの書式で各説明項目にチェックと署名をしてもらった。動物実験に関しては過度の苦痛を与えないように十分配慮し、必要最小限にとどめた。

C. 研究結果

1) HTLV-I env-pX 遺伝子がコードする p40Tax は複数の経路を介して宿主細胞のさまざまな遺伝子転写に影響を及ぼす。HTLV-I 感染者に限らず p40Tax の作用経路を模倣する分子異常が生じた場合、CD25⁺CD4⁺ T 細胞に機能障害が発生し、自己免疫疾患の発症に関与する可能性が考えられる。

2) PD-1 欠損マウスに発症する拡張型心筋症の原因である、抗心筋型トロポニン I 自己抗体の作用機序を明らかとした。心筋細胞のカルシウム電流が障害を受ける事により拡張型心筋症が発症しうることを示したものであり、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患に対し、免疫抑制、自己抗体の除去、カルシウム電流の調節といった新たな治療法の可能性を開いた。

3) CFSE 染色による in vitro での細胞分裂回数の評価から、Treg はこれまで anergic とされてきたが、他の CD4⁺T 細胞の存在に依存して分裂していることが判明した。この分裂は IL-2 に依存していることが抗 IL-2 抗体を用いた実験から明らかになった。更に in vivo の cell transfer の実験を行い、Treg は allo の CD25-CD4⁺T 細胞の存在によって分裂がより進むことが判明した。allo の T 細胞は活性化 T 細胞と考えられるため、今回得られた結果は炎症に依存して Treg が増殖するという、negative feedback のシステムの存在を示唆する。

4) VD3 を BMDC1 の誘導系に加えることに

よって、MHC class Iや共刺激分子の発現増強を著しく抑制し、BMDC1 が本来示す Th1 や Tc1 の誘導促進効果も、強く抑制された。このことから、V.D3 は IFN- γ や IL-12 の作用抑制を介して DC1 誘導を阻害し、Th1 免疫を低下させている可能性が示された。次に、ナイーブ Th 細胞から、IL-2 と抗原あるいは抗 CD3 抗体で刺激する際に、VD3 を添加して、VD3 の T 細胞に対する直接作用を検討した。その結果、VD3 を添加することによって、IFN- γ 産生型 Th1 の誘導は抑制され、IL-4 産生型の Th2 細胞の誘導が亢進された。これらの結果から、VD3 は DC サブセットの誘導制御を介した間接的作用、あるいは T 細胞に対する直接作用を介して、Th1 免疫を抑制し、免疫バランス制御に影響を及ぼし得ることが明確にされた。

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

6) 抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示する際に、HLA クラス II 分子を介して抗原提示細胞側にも刺激が入ることが明らかになってきている。HLA クラス II 分子は、IFN の刺激によりヒト繊維芽細胞上にも発現する

が、その機能については不明であった。本分担研究では、抗原提示の際の HLA-DR 分子を介したシグナルにより繊維芽細胞が RANTES などを産生し、これには JNK-2 の活性化が関与することを明らかにした。

7) 自己抗体産生制御機構を解明するために、CD40L トランスジェニックマウスにおけるBリンパ球自己トレランス異常と産生される自己抗体の性状について検索した。その結果、自己抗体の親和性により、中枢リンパ組織または末梢リンパ組織でトレランスが誘導されることが明らかとなり、異常となっている自己トレランス機構の同定には、親和性によく依存するアッセイ系が有用であることが明らかとなった。

8) DRB4*0103を持つ健常人6名を対象とし、末梢血単球から作成した樹状細胞、マクロファージを APC として用いた。これら APC にフォスファチジルセリン・リポソームに結合させた β 2GPI をパルスし、IL-2 存在下で自己末梢血 CD3⁺T 細胞と共培養した。T 細胞を回収し、native な β 2GPI、リコンビナント β 2GPI断片、p276-290をパルスした自己 B 細胞と培養し、上清中に産生された IFN- γ を測定した。その結果、p276-290 に対する T 細胞の特異的反応は樹状細胞を用いると4例、マクロファージを用いると1例で検出された。このようにリン脂質に結合した β 2GPIで健常人 T 細胞を感作することにより、 β 2GPI に対する T 細胞のプライミングを誘導できた。 β 2GPI が陰性荷電を有する外来微生物成分やアポトーシス細胞と結合して強力な抗原提示能を持つ樹状細胞に取り込まれれば、 β 2GPI 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。

9) 酸化 LDL $\cdot\beta$ 2GPI 複合体(抗原)は SLE や APS のみならず、酸化ストレスが発症に関与すると考えられる糖尿病や梅毒患者で見られ血管内皮傷害に関連していることが示唆された。抗酸化 LDL $\cdot\beta$ 2GPI 複合体抗体に関しては、APS で高率に検出され、特に動脈血栓との関連が示された。PON 活性は抗酸化 LDL $\cdot\beta$ 2GPI 複合体抗体との間で負の相関を、また、PAF-AH は逆にこれと正の相関を認めた。これら種々

の酸化ストレス、炎症、あるいは動脈硬化の進展に関連する因子の測定により、動脈硬化性疾患の診断の可能性が示された。

10) 陰性リン脂質および Ca^{2+} 依存性にヒトプロトロンビンとのみ結合する抗プロトロンビン抗体は血管内皮からの ICAM-1, VCAM-1 発現を有意に増強した。このタイプの抗プロトロンビン抗体添加により血管内皮活性化が生じ、接着分子の発現が亢進して白血球(単球)・血小板との相互作用により血栓が生じる可能性が示唆された。

11) 抗リン脂質抗体は 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。したがって抗リン脂質抗体陽性の(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。

12) タクロリムスの有用性に関する検討を後ろ向き評価によりおこなった。8例(皮膚筋炎3例など)を対象とし、臨床効果を評価した。7例のうち1例においては、タクロリムス開始後症状・呼吸機能・CT 上変化は見えないものの KL-6 値が上昇を続け7週間後にプレドニンの増量を必要としたが、残り6例全例で KL-6 値低下(平均低下率:-31%)、呼吸機能検査が行われた3例全例で %VC (平均上昇率:23%) 及び %DLCO (平均上昇率:39%) の改善が見られ、症状及び CT 所見も安定又は改善を来した。これらは本病態におけるタクロリムスの有用性を示唆するものである。

13) Amyopathic DM 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 US 抗体)を認めた。抗 US 抗体陽性 8 例中 7 例で、IP を併発しており、うち 4 例は急性間質性肺炎であった。すなわち Amyopathic DM 患者血清中に、140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗

体(抗 US 抗体)の存在が示唆された。

14) 実験的自己免疫性筋炎(experimental autoimmune myositis, EAM)における免疫学的病態の経時的解析を行った。罹患筋組織では、初期には主に CD8 陽性 T 細胞とマクロファージの浸潤が認められ、炎症極期には主に CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞とマクロファージの浸潤が認められた。C 蛋白誘導性 EAM の病態形成には病初期からのマクロファージの関与が重要と考えられた。

15) 間質性病変の CT 像のコンピュータを用いた定量評価を試みた。新規開発したボリュームヒストグラム法を用いて各種間質性肺疾患において3種の特徴量(Contrast, Entropy, Variance)の算出を行い、その傾向を比較した。さらに、膠原病に伴う Non-specific Interstitial Pneumonia (NSIP) 6 症例におけるステロイド治療前後の特徴量の変化を検討した。その結果、NSIP の 6 症例全てにおいてステロイド治療後に Contrast が上昇し、Variance と Entropy が低下した。これよりボリュームヒストグラムを用いた特徴量解析による自動診断の可能性が示唆された。

16) シェーグレン症候群液腺上皮細胞死には $IFN\gamma$, Fas/FasL, CD40/CD40L, c-FLIP, p38MAPK などの分子が関与していることが示唆された。SS 唾液腺においてこれら分子の発現を調節することによる分子標的治療法の開発の可能性が生まれた。

17) SLE 自然発症 New Zealand マウス系を用いて、自己反応性 B 細胞の増殖に係わる感受性遺伝子のゲノムワイドな連鎖解析を行った。その結果、第2染色体上にコードされる *Ltk* (leukocyte tyrosine kinase) 遺伝子の kinase domain に見られる NZB 型多型が、PI3 kinase の活性化を介して自己反応性 B1 細胞の増殖をきたす遺伝要因となっている可能性が示唆された。さらに、ヒトにおいても *Ltk* 遺伝子多型と SLE の相関が認められた。

18) *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。

19) 健常人末梢血リンパ球は P 糖蛋白質を発現しなかったが、SLE リンパ球は、P 糖蛋白質発現率が高く、活動期症例で高度で、SLEDAI と正相関した。リンパ球を IL-2 や IL-4 等で刺激すると、MDR1 特異的転写因子 YB-1 の核内移行、MDR-1 転写、P 糖蛋白質発現、細胞内ステロイド濃度低下が誘導された。また、ステロイド不応性の活動期 SLE の P 糖蛋白質発現は、パルス療法を含む強化療法の反復にて減弱し、治療反応性や臨床症状改善が得られた。以上、疾患活動性の高い SLE 患者リンパ球は、活性化刺激により P 糖蛋白質が誘導されて治療不応性に陥るが、パルス療法や免疫抑制薬等による強化治療により P 糖蛋白質抑制を介して治療不応性の解除が可能であり、P 糖蛋白質発現の評価は、薬剤不応性の予測、治療方針決定に有用であると考えられた。

20) ループス腎炎 WHO IV 型における Th1 細胞を IFN γ /IL-13 の細胞内染色により識別し、その動態を血中の CD62L の発現、MCP-1 の測定、*in vitro* における IFN γ の産生を測定することにより検討した。WHO IV 型では血中の Th1 細胞が増加していたが、Th1 サイトカインの IFN γ は増加していなかった。血中の CD62L 陽性細胞は増加しておらず局所嗜好性を示し、MCP-1 は高値であり局所への移行の可能性が示唆された。

21) 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、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。

22) 酸化ストレスによって修飾された蛋白

が新たな抗原性を獲得する可能性のあることが、自己免疫疾患患者血清を用いた解析で明らかになった。このことは、蛋白の酸化が、生体内において自己免疫応答の誘導あるいは緩解に関係している可能性を示唆する。

23) スタチン類の多面的効果としての免疫抑制作用の解析について、今回はループモデルマウス (MRL-lpr/lpr) に対して治療効果を示すか否かを検討した。フルバスタチン投与開始 8 週後ではコントロール群と比較して生存率の延長、尿一般検査で蛋白尿と潜血反応との改善、さらに血清 BUN の正常化が認められた。フルバスタチンは、少なくとも短期的には MRL-lpr/lpr マウスに対して治療効果を示した。

24) 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。

25) シェーグレン症候群患者唾液腺組織に発現する TLRs は MAPK superfamily を介してサイトカイン産生や細胞浸潤を促進し、SS 唾液腺の慢性炎症を増強していることが示唆された。

D. 考察

1. 全体研究

- ① ループスアンチコアグラント・スクリーニング試験の標準化を行った。(附1)
- ② 「抗リン脂質抗体症候群の治療指針」はほぼ班員のコンセンサスを得る段階にまでまとまった。(附2)
- ③ 抗リン脂質抗体の測定法の標準化を、キメラ型のモノクローナル抗体を用いた系で確立した。この抗体の有用性に関してはアメリカリウマチ学会でも認定され、欧米でも使用されるようになった。
- ④ 新たに抗プロトロンビン抗体測定法を確立し臨床におけるその重要性を明らかにした。
- ⑤ 膠原病に合併する難治性間質性肺炎

に対する新たな治療法を開発する目的で、タクロリムスの有用性について検討した。全症例が8例と少数ながら、極めて有効であることが確認された。今後症例を増やしてより確実な臨床成績が得られることが期待される。

- ⑥ SLEの疾患感受性遺伝子解析を、厚生労働科学研究費補助金によるヒトゲノム・再生医療等研究事業「SLEを中心とした自己免疫疾患感受性遺伝子の解明班(笹月健彦主任研究者)」との共同研究事業として行った。班員の協力の下、400検体を越すDNAサンプルを収集することが出来た。近日中にこれまで同定されてこなかった、新しいSLEの疾患感受性遺伝子の全貌が明らかになる予定である。

2. 分担研究

- ① 新たな自己トレランス機構の発見や、この機構がCD40Lにより解除されることが明らかになった。また、自己抗体の性状によりどの自己トレランス機構の異常がおこっているかを診断できることを証明し、さらに、このような診断のための自己抗体の性状の測定法を開発するなど、計画していた目的を達成した。
- ② IL-6のシグナル阻害研究を、実際にヒトの間質性肺炎治療へとトランスレーションができたこと、さらに、SLE患者の探索的治療も開始できたことから、目標はほぼ達成できた。
- ③ SLE自然発症New Zealandマウス系を用いて、自己反応性B細胞の増殖に係わる感受性遺伝子のゲノムワイドな連鎖解析を行った。計画していた目的はほぼ達成されたが、発見した遺伝子多型を入れ替えたマウス系での疾患発症あるいは発症の抑制についての確認は、マウスの作製に時間を要するため、現在進行中である。
- ④ 膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対する新たな治療法を開発する目的で、タクロリムスの有用性について検討を行った。第2段階の臨床試験において、患者登録が緩徐であり、その主な原因として対象が「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が施行可能であることという選択基準がある患者登録を制限しており、また単一施設であるということも影響していると考えられる。患者登録を促進するために、患者紹介の多い医療機関や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った。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。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

- ① 抗リン脂質抗体症候群の治療指針(案)の作製は難治性の本症の臨床にあたって、極めて有用な意義のあるものとする。
- ② 新たな自己トレランス機構の発見や、その性状の解明は、国際的にも先導的な業績であり、学術的・国際的意義は大きい。また、自己抗体の性状からどのような自己トレランス機構に異常があるかを診断するかは、自己免疫疾患のテーラーメイド医療の開発に重要であり、社会的意義は大きい。
- ③ ヒト化抗IL-6受容体抗体によるIL-6阻害治療の研究は、世界に先駆けて行っており、国際的にも高く評価されている。また、自己免疫疾患の新たな治療戦略を示した社会的意義は大きい。さらに、間質性肺炎の定量的評価法を確立できたことは、今後の治療研究に大きく貢献できる。
- ④ ヒトゲノムの解読の目的の一つに、多遺伝子疾患感受性遺伝子解析があげられる。この解析は、テーラーメイド医療を目指す国際的観点からも重要な切り口であり、理論に基づいた治療法の開発や疾患発症の予防といった観点から社会的意義の大きい研究である。
- ⑤ HLAクラスII分子のアイソフォームが異なるシグナル伝達を誘導すること、特にHLA-DQはDC2を誘導すること、また、繊維芽細胞は抗原提示をできないにもかかわらず、自らは応答してしまうこと、などの発見は学術的意義が大

きい。

- ⑥ 難治性間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性については、このように段階的な臨床試験を経た開発により、予後不良で現在限られたエビデンスのもと免疫抑制薬が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本疾患における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できる可能性がある。

3) 今後の展望について

- ① 自己トレランス機構の解明を通じた自己免疫疾患の発症機構の解明や、自己トレランス異常の修復法の開発による根本的な自己免疫疾患治療の開発へと発展する可能性がある。
- ② IL-6 阻害治療は、SLEをはじめ他の自己免疫疾患治療へ適応拡大も可能である。
- ③ ヒト *Ltk* 遺伝子は 15q15.1-21.1 に存在している。オクラホマのグループが SLE と 15q15.1 近傍に存在するマイクロサテライトマーカー多型との相関を報告しており、日本人 SLE のみでなく、人種を越えて *Ltk* 遺伝子多型と SLE の相関が見られるかをオクラホマグループとの共同研究を行う必要がある。
- ④ 今後、さらなる SLE 感受性遺伝子の検出と、遺伝子多型間の相互作用の検討が、予防医学上重要な課題となる。また、機能解析による病因・病態への関与の機序の解明により、創薬の分子標的を見出すことが必要である。
- ⑤ 自己免疫疾患の病因解析・診断治療方法の開発のためにプロテオミクスを積極的に利用していくことは、本研究で示した自己抗体の探索のほか、プロテオームプロファイルの診断への応用、あるいは薬剤反応性・副作用発現の予測などにも用いられうることから、大きな発展性が見込まれる。
- ⑥ SLE 患者リンパ球の多剤耐性遺伝子 (MDR-1) と P-糖蛋白質を薬剤抵抗性の臨床指標としたテーラーメイド医療が確立できる。また、薬剤抵抗性を克服する薬剤の開発し、新規治療法としての有用性を評価する臨床研究を実

践する必要がある。

- ⑦ 難治性間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性については本疾患における有用性の評価を速やかに進めるためにも、目標登録症例数の一日でも早い達成が望まれる。従って今後は、より膠原病の中で合併する間質性肺炎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た多施設臨床治験を行い速やかな評価をすすめるべく計画している。

4) 研究内容の効率性について

3 年間という限られた期間で、基礎的検討から臨床研究まで効率良く遂行できた。特にゲノムワイドな SLE 感受性遺伝子の解析には多量のサンプルの収集が必要となるが、班員各位の協力で、多量の検体を収集できた。その一方で、タクロリムスの間質性肺炎の治験では希少疾患ゆえの、患者登録における効率性が問題点としてあげられた

E. 結論

1. 自己抗体の産生とトレランス異常の関係が明らかになった。また、自己抗体の性状を検索することにより、どのようなトレランスの異常があるのかを診断することが可能になった。
2. SLE のシグナル伝達分子の機能異常の一部が明らかとなった。
3. 免疫調整分子としての PD-1 の重要性が明らかになった。
4. 抗リン脂質抗体症候群における対応抗原の解析を含めた病態解明が飛躍的に進んだ。
5. 抗リン脂質抗体症候群の治療指針 (案) を作製した。
6. 抗リン脂質抗体の測定系の標準化をモノクローナル抗体を用いて実現した。
7. PM/DM の間質性肺炎に対する新しい画像評価法やタクロリムスや抗 IL-6 受容体抗体を用いた治療法の可能性が示された。

8. SLE の遺伝子異常の解析が全国規模の試料収集により進展した。
9. SLE におけるステロイド抵抗性と多剤耐性遺伝子の関係が明確になった。
10. SJS の組織障害の機序の解析が進展した。
11. タクロリムス、スタチン等、既存薬で自己免疫疾患の治療に使用可能なものが明らかになってきた。

ループスアンチコアグラント・スクリーニング試験の標準化

研究要旨

本研究班の全体研究の目的のひとつは、抗リン脂質抗体症候群 (APS) の診断基準と治療指針の整備である。APS は血栓症/妊娠合併症などの臨床症状と、抗リン脂質抗体の存在によって診断される。抗リン脂質抗体は免疫学的検出法 (ELISA) と凝血学的検出法 (ループスアンチコアグラント:LA) とがあるが、特に LA は疾患を定義する検査でありながら、その標準化は困難でありこの分野の長期の課題であった。本研究班では、血栓止血学会学術専門委員会抗リン脂質抗体標準化検討部会および検査血液学会との合同で LA のわが国での標準化にとりくんだ。全国の主要施設に LA の実施法についてサーベイをおこない、その結果にもとづいて LA スクリーニング用の候補試薬を選定した。11 施設に試薬と LA サンプルを送付して凝固検査をやっていただきその結果を集計した。スクリーニング試薬の標準品としての条件は、①廉価である、②入手しやすい、③感度が高い、④測定結果の施設間差が少なく判定の一致率の高いこと、である。6 試薬の比較から、PTT-LA をスクリーニング標準品とした。

ただしこのことは、他の試薬を排除するものでなく、あくまである試薬を「LA スクリーニングの標準品」とすることによって検査の標準化をはかる、ということであり、他の試薬を用いる場合は標準品との比較検討をふまえたうえでおこなうのであれば LA の診断に何ら問題がないものとする。

今後は、さらに多施設による検討、また確認試験の標準化をすすめる必要がある。

A. 研究目的

本研究班の全体研究の目的のひとつは、抗リン脂質抗体症候群 (APS) の診断基準と治療指針の整備である。

APS は血栓症/妊娠合併症などの臨床症状と、抗リン脂質抗体の存在によって診断される。抗リン脂質抗体は免疫学的検出法 (ELISA) と凝血学的検出法 (ループスアンチコアグラント:LA) とがある。国際的に利用されている APS の分類基準案 (Sapporo Criteria) では、IgG または M 型 β 2-グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体陽性または LA 陽性が検査項目として必須となっている。前者は比較的標準化がすすんでおり、測定キットが普及している。一方、LA は 1995 年に国際血栓止血学会の標準化委員会が、①リン脂質依

存性凝固時間でスクリーニング、②ミキシングテストでインヒビターであることを確認、③リン脂質添加試験で凝固時間異常が是正されることを確認、という手順で検出することを推薦しているが、用いる凝固時間試薬や測定条件によって結果が大きくなり、施設間差が極めて大きい難しい臨床検査と認識されている。

本研究班では血栓止血学会学術専門委員会抗リン脂質抗体標準化検討部会および検査血液学会との合同で LA のわが国での標準化にとりくんだ。

B. 研究方法

当研究班員、血栓止血学会および検査血液

学会評議員の計 284 人に、LA のスクリーニング試薬として何を使用しているか、という設問を含めたアンケート調査をおこなった。返答のあった 59 施設で使用されている試薬のうち、多く使用されている、入手しやすい、廉価である、を条件として 4 試薬を選定した。サンプルとともにこれらの試薬を 11 施設に送付し、凝固時間を測定いただいた。

標準化で用いたサンプルを表 1 に示す。いずれもインフォームドコンセントの得られた患者あるいは健常人から採取、調整した。人工的 LA 血漿は、当班研究で作成した強い LA 活性をもつホスファチジルセリン依存性モノクローナル抗プロトンピン抗体 (aPS/PT) である 23-1D を正常血漿に加えて作成した。高力価 LA 血漿は 50 µg/ml、低力価 LA 血漿は 10 µg/ml に 23-1D を調節した。

APTT については、スクリーニング時に施行されている希釈 APTT (オーレンバッファーを同時に送付して APTT 試薬を 25 倍希釈して凝固時間を測定) を施行いただいたが、PTT-LA はすでにリン脂質濃度が低く設定されているため PTT-LA を用いた希釈 APTT はおこなわなかった。表 2 に示すように、4 試薬 6 アッセイで結果を比較した。

凝固時間の正常値は健常人 22 人の平均プラス 2SD で定義した。11 施設で測定したそれぞれのサンプルの凝固時間を集計し、パラメータとして、1) それぞれの試薬ごとに感度 (LA サンプルすべて、低力価 2 サンプル、高力価 3 サンプルでそれぞれ計算)、2) 特異度、3) 平均正答率: A-H のサンプル毎の 11 施設における正答率を平均した数値 (高いほど正確)、4) SD index: A-H のサンプルの 11 施設での凝固時間 SD/凝固時間平均×100 を 8 サンプルで平均した数値 (施設間での当該サンプルの凝固時間測定値のばらつきをあらわす)、を計算した。

C. 研究結果

サンプルごとの 11 施設で測定した凝固時間を試薬別にまとめた (表 3)。凝固時間の平均と SD、また括弧内には 11 施設での正答率を示した。

試薬ごとの感度、特異度、平均正答率、SD-index を表 4 に示した。

D. 考察

スクリーニング試薬の標準品としての条件は、①廉価である、②入手しやすい、③感度が高い、④測定結果の施設間差が少なく判定の一致率の高いこと、と考えられる。基本的に凝固検査は LA のスクリーニング検査としては現時点で健保適応はない。各施設で検討のうえ LA スクリーニング検査を施行していると考えられる。実際に使用されている試薬をアンケート調査でしらべて、廉価で入手しやすい試薬を標準試薬の候補として選定した。

ラッセル蛇毒時間はかつては試薬の調整が煩雑であったが、現在はキットとして発売され、そのうちのひとつは LA 確認試験として保険適応となっている。キットは入手が容易であり、その中にある試薬のひとつはスクリーニングとしても適している可能性があるが、本試薬はきわめて高価であること、ラッセル蛇毒試薬間での比較ができないことから、今回は検討しなかった。

カオリン凝固時間は APTT と同様に内因系凝固反応のインヒビターを検出する。しかし試薬にリン脂質が含まれず、血漿に内因性のリン脂質をもちいて反応がすすむので反応は遅くて不安定である。今回の検討でも施設間差が大きく、標準品にはむかえないと考えられる。

APTT 試薬についても、われわれの予想よりかなり施設間差がみられた。希釈すると LA 検出感度があがるはずであるが、試薬に含まれる凝固安定剤も希釈されてしまうため反応が不安定になりやすい。そのため健常人の凝固時間のばらつきが大きくなって正常値の設定がむずかしくなる。結果として、希釈 APTT はかならずしも感度があがらず、施設間差が大きいという結果となった。

今回の検討で、上記の条件をもっとも満たすのが PTT-LA 試薬と考えられる。そこで PTT-LA を LA スクリーニングと標準品として設定し、アッセイのプロトコール、および確認試験の標準化へと検討をすすめるべきである。

E. 結論

PTT-LA 試薬を LA スクリーニングのための標準試薬として、より標準化された LA 検査の確立をめざす。

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）

本研究のアッセイにご協力いただいた以下の皆様に深謝する。

川合陽子先生、島田舞先生
（慶應義塾大学中央臨床検査部）
阪田敏幸先生
（国立循環器センター臨床検査部）
佐野雅之先生（佐賀医科大学血液内科）
程原佳子先生（滋賀医科大学輸血部）
吉田孝先生（同検査部血液部門）
瀧正志先生（聖マリアンナ大学小児科）
山崎哲先生（同臨床検査部）
松林秀彦先生（東海大学産婦人科）
川田勉先生（同臨床検査科）
杉浦真弓先生（名古屋市立大学産婦人科）
家子正裕先生（北海道医療大学内科）
内藤澄悦先生（同検査部）
和田英夫先生（三重大学臨床検査医学）

表1 測定検体

検体	期待されるスクリーニング検査結果
A 低力価 LA 患者血漿 (ワーファリン使用なし)	陽性
B 健常人血漿	陰性
C モノクローナル aPS/PT 添加低力価 LA 血漿	陽性
D 高力価 LA 患者血漿 (ワーファリン使用)	陽性
E LA 陰性患者血漿 (ワーファリン使用)	(偽) 陽性
F モノクローナル aPS/PT 添加高力価 LA 血漿	陽性
G 高力価 LA 患者血漿 (ワーファリン使用なし)	陽性
H 健常人血漿	陰性

表2 使用した試薬

試薬名	発売元	凝固検査法
プラテリン LS	オルガノンテクニカ	APTT
希釈プラテリン LS	オルガノンテクニカ	希釈 APTT
トロンボチェック	国際試薬	APTT
希釈トロンボチェック	国際試薬	希釈 APTT
PTT-LA	ロシュダイアグノスティックス	(希釈) APTT
カオリン溶液	ベーリンガーマンハイム	KCT

表3 結果のまとめ

	プラテリン LS	希釈プラテリン LS	トロンボチェック	希釈トロンボチェック	PTT-LA	カオリン
正常	38±13	125±58	34±8	137±77	47±11	184±67
A	53±20(55)	168±145(18)	39±10(18)	271±161(73)	65±13(91)	376±173(91)
B	42±15(73)	115±66(100)	35±7(100)	139±80(100)	48±12(100)	259±139(55)
C	47±18(36)	185±151(46)	37±9(9)	203±134(36)	60±11(55)	284±116(60)
D	94±58(100)	243±196(73)	62±14(100)	680±325(100)	114±25(100)	800±404(100)
E	66±12(100)	188±146(46)	67±28(100)	263±153(73)	95±40(100)	251±140(36)
F	52±15(64)	223±225(46)	43±13(64)	263±184(73)	75±17(100)	402±174(100)
G	59±25(64)	168±149(18)	41±12(46)	306±164(82)	80±17(100)	473±171(100)
H	43±14(91)	160±163(82)	35±7(100)	181±106(82)	55±10(82)	242±138(64)

11 施設で凝固時間を測定：平均±SD 秒（11 施設での正答率 %）

表4 パラメータの比較

試薬	感度			特異度	平均正答率*	SD index**
	全体	低力価	高力価			
プラテリン LS	70	46	66	82	70.5	27.9
希釈プラテリン LS	44	32	36	91	53.4	43.2
トロンボチェック	53	14	62	100	67.0	13.8
希釈トロンボチェック	73	55	66	91	73.9	34.7
PTT-LA	91	77	100	86	90.1	11.6
カオリン溶液	82	76	84	59	75.9	27.9

*平均正答率：A-H のサンプル毎の 11 施設における正答率を平均した数値

**SD index: A-H のサンプルの 11 施設での凝固時間 SD/凝固時間平均×100 を 8 サンプルで平均した数値で、施設間での当該サンプルの凝固時間測定値のばらつきをあらわす

抗リン脂質抗体症候群の治療指針(案)

研究要旨

【目的】抗リン脂質抗体症候群の治療指針を提案する

【方法】本研究班員にアンケート調査をおこない、抗リン脂質抗体症候群の治療指針案を作成した

【結果と結語】動脈血栓症、静脈血栓症および妊娠合併症について、それぞれ異なった対応が必要である可能性が示唆された

A.研究目的

抗リン脂質抗体症候群 (APS) を定義する臨床症状は、動脈血栓症、静脈血栓症および妊娠合併症がある。当班では、対象疾患のうち治療ガイドラインのない APS に対して治療指針試案を作成、公開し、我が国での臨床的検討のうえ本試案の効果を評価することを目標のひとつとしている。

静脈血栓症、流産に対しては、欧米でおこなわれている治療が適応可能と考える。しかし、APS の血栓症は静脈のみならず動脈にもおこることが特徴となっており、欧米では APS の血栓再発予防には、たとえ動脈血栓症の患者に対してももっぱらアスピリンとワーファリンが用いられている。動脈血栓の再発予防にはワーファリンを INR3 を超える高用量で使用しなければ効果がないという論文

(1)に基づいて、高用量のワーファリンを使用し、その結果出血合併症の率が極めて高いという現状となっている。過凝固状態によるフィブリン血栓を病態とする静脈血栓症の再発予防にはワーファリンによる抗凝固療法は理にかなっているが、おもに血小板の粘着、凝集、活性化が原因の血小板血栓を病態の基本とする動脈血栓症に対しては、高用量ワーファリンで血小板血栓に続発するフィブリン血栓形成を抑制するというよりも抗血小板療

法が第一選択と考えられる。アスピリンのみでは再発率が高いので、有効な血小板凝集抑制剤を使用することが予後改善に貢献すると考える。欧米では血小板凝集抑制剤が我が国ほど普及しておらず、それが欧米でアスピリンとワーファリンに治療が限定されている最大の理由のひとつであると解釈される。このことはワーファリンの使用を否定するわけではないが、抗血小板剤を動脈血栓再発予防の中心とした治療指針案を考案する。

B.研究方法

はじめに北海道大学医学部附属病院第2内科でおこなっている治療指針をおもに各班員へ配付し、それについてのアンケート形式による訂正・加筆を依頼した。そして、研究班会議において問題点をディスカッションし、治療指針試案としてまとめた。

C.研究結果

表1に当班でまとめた現時点での治療指針試案を示す。

D.考察

これはあくまで試案であり、エビデンスに基づいた治療指針ではない。この試案をもとに、現在多施設共同によって実際の治療効果、

すなわち血栓や妊娠合併症の予防効果について検討するための比較対象試験を実施中である。

E.結論

現時点での APS 治療指針試案を作成した。これに対する客観的な評価のため、プロスペクティブ多施設比較対照試験を実施中である。

F.参考文献

1. Khamashta MA, Cuadrado MA, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GRV. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:993-7.