

値を示した。しかしながら、全体としては血清中 sCTLA-4 値は  $4.6 \pm 1.4$  年のフォローアップ期間後、正常範囲の中で低下した。これらの患者の罹病期間は先に述べた 2 群と比べてやや長かった ( $2.7 \pm 2.7$  年) ことから、これらの患者はもっと早期で測定したならば血清中 sCTLA-4 値は高値を呈していた可能性が考えられた。すべての患者で皮膚硬化は経過中改善した。すべての患者で少量のステロイド内服が開始され、7 例ではそれに加えて D-ペニシラミンも投与されていた。

最後に、ISSc 患者 10 例全例で初診時血清中 sCTLA-4 値は正常であり、 $5.2 \pm 1.4$  年のフォローアップ期間中も正常範囲内にとどまった (図 3D)。このように、概して血清中 sCTLA-4 値は皮膚硬化の改善に平行して低下し、さらに経過中に血清中 sCTLA-4 値が高値にとどまった症例の一部では皮膚硬化の改善は認められなかった。

#### D. 考 案

sCTLA-4 は B7 分子に結合することによって CD28 や CTLA-4 と B7 の結合を阻害することから、免疫反応の制御に重要な役割を演じていると考えられている (5, 6, 8, 9)。sCTLA-4 は免疫反応を抑制することも、あるいは増強することもあり得る。この sCTLA-4 の相反する機能は、関与する T 細胞の活性化状態に依存する (5-9)。T 細胞が膜結合型 CTLA-4 を発現していない免疫反応の初期では、sCTLA-4 は B7-CD28 の結合を阻害し、それによって T 細胞活性化を抑制する。これと合致するように、レコンピナ

ント sCTLA-4 は *in vitro* でのリンパ球混合反応を抑制することが報告されている (5)。

一方、T 細胞が活性化しその表面に膜結合型 CTLA-4 を発現するようになると、sCTLA-4 は B7-膜結合型 CTLA-4 の結合を阻害することによって T 細胞による反応を増強・持続させる。さらに、T 細胞上の膜結合型 CTLA-4 は T 細胞に免疫学的アナジーを誘導するため、sCTLA-4 はこのアナジーの誘導を抑制し、T 細胞による自己反応性を増強させる可能性がある (3)。これに合致して、実験的自己免疫性脳脊髄炎が進行している最中に、抗 CTLA-4 抗体を投与することによって B7-膜結合型 CTLA-4 の結合を抑制すると、実験的自己免疫性脳脊髄炎は増悪することが報告されている (10)。本研究における血清中 sCTLA-4 値が SSc の疾患重症度や活動性と相関するという所見は、sCTLA-4 が B7-膜結合型 CTLA-4 の結合を抑制し、その結果 T 細胞の活性化や自己反応性の増強を来している可能性を示唆している。あるいは、血清中 sCTLA-4 値の上昇は、B7-CD28 の結合を阻害することによって防御的に働いている可能性も考えられる。

今回の研究では、血清中 IgG 値と抗トポイソメラーゼ I 抗体力価が血清中 sCTLA-4 値と正の相関を示した。このことは sCTLA-4 が SSc の液性免疫の異常にも関わっている可能性を示している。実際、CTLA-4 の発現を欠損したマウスでは B 細胞は活性化しており、その数も増加し、血清中 IgG 値は約 100 倍増加することが報告されている (11, 12)。加えて、膜結合型 CTLA-4 は活性化 B 細胞

にも発現し、抗体で膜結合型 CTLA-4 を架橋するとB細胞による IgG 産生は抑制される (4)。それ故、CTLA-4 欠損マウスにおける IgG 値の上昇は、ヘルパーT細胞やB細胞へ伝えられるべき、CTLA-4 による抑制シグナルの欠如によると考えられる。このように、sCTLA-4 は SSc にみられる高 $\gamma$ -グロブリン血症や自己抗体産生にも関与している可能性が示唆された。

## E. 結 論

sCTLA-4 の機能的な意義については不明であるが、sCTLA-4 は SSc の疾患活動性および重症度と相関し、さらに、sCTLA-4 は SSc の免疫学的異常に関与していることが示唆された。

## F. 文 献

1. Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14:233.
2. Thompson, C. B., and J. P. Allison. 1997. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7:445.
3. Carreno, B. M., F. Bennett, T. A. Chau, V. Ling, D. Luxenberg, J. Jussif, M. L. Baroja, and J. Madrenas. 2000. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J. Immunol.* 165:1352.
4. Pioli, C., L. Gatta, V. Ubaldi, and G. Doria. 2000. Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor. *J. Immunol.* 165:5530.
5. Oaks, M. K., K. M. Hallett, R. T. Penwell, E. C. Stauber, S. J. Warren, and A. J. Tector. 2000. A native soluble form of CTLA-4. *Cell. Immunol.* 201:144.
6. Oaks, M. K., and K. M. Hallett. 2000. a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J. Immunol.* 164:5015.
7. Liu, M. F., C. R. Wang, P. C. Chen, and L. L. Fung. 2003. Increased expression of soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 molecule in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 57:568.
8. Wang, X. B., M. Kakoulidou, R. Giscombe, Q. Qiu, D. Huang, R. Pirskanen, and A. K. Lefvert. 2002. Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. *J. Neuroimmunol.* 130:224.
9. Magistrelli, G., P. Jeannin, N. Herbault, A. Benoit De Coignac, J. F. Gauchat, J. Y. Bonnefoy, and Y.

- Delneste. 1999. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur. J. Immunol.* 29:3596.
10. Hurwitz. A. A., T. J. Sullivan, M. F. Krummel, R. A. Sobel, and J. P. Allison. 1997. Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 73:57.
11. Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone, and A. H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541.
12. Waterhouse. P., J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser, and T. W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 270:985.

S. Sato, M. Fujimoto, M. Hasegawa, K. Komura, K. Yanaba, I. Hayakawa, T. Matsushita, and K. Takehara: Serum soluble CTLA-4 levels are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Rheumatology* 43:1261-1266,2004.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

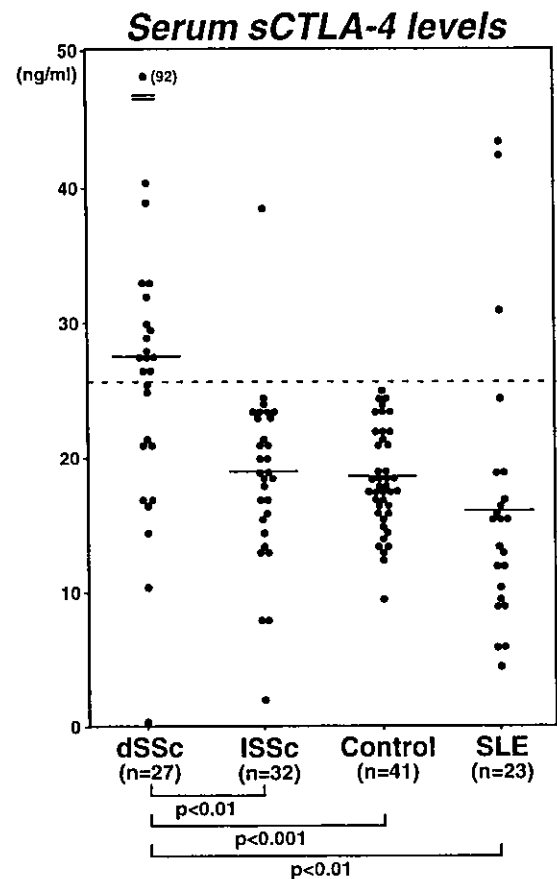


図 1: dSSc、ISSc、SLE、および健常人 (Control) における血清中 sCTLA-4 値。点線は健常人の平均値 + 2SD に設定したカットオフ値を表す。

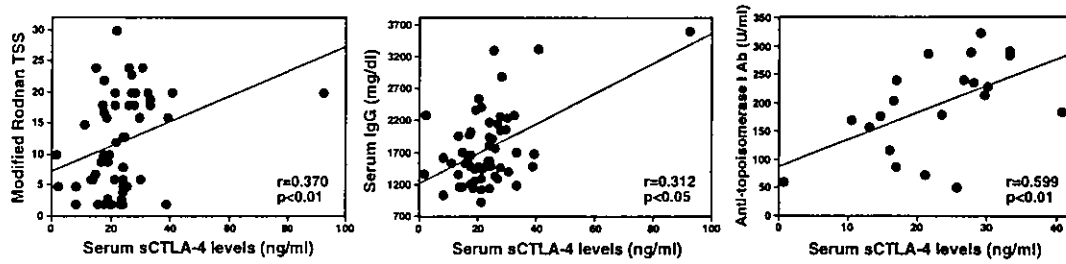


図 2 : SSc における、初診時の血清中 sCTLA-4 値と modified Rodnan total skin thickness score (modified Rodnan TSS)、血清中 IgG 値、抗トポイソメラーゼ I 抗体力価との相関。

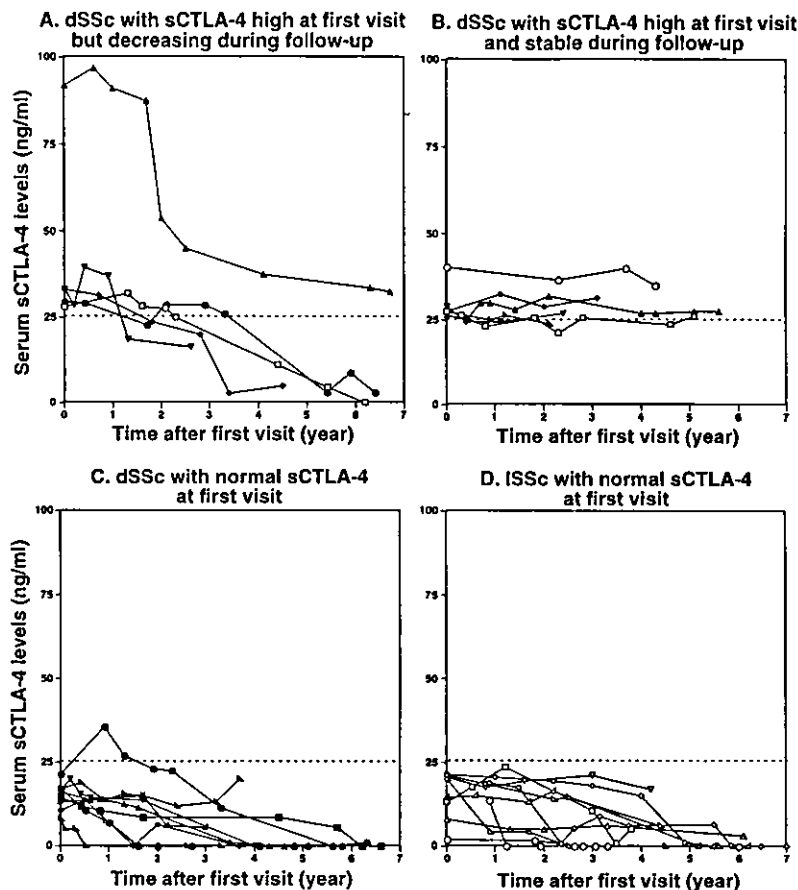


図 3 : 初診時血清中 sCTLA-4 値が高値であった dSSc 患者 (A, B)、初診時血清中 sCTLA-4 値が正常であった dSSc 患者 (C)、初診時血清中 sCTLA-4 値が正常であった ISSc 患者 (D) における、経過中の血清中 sCTLA-4 値の経時的変化。点線はカットオフ値を表す。黒丸と白丸はそれぞれ、少量のステロイド治療を受けた患者、受けなかった患者を表す。

表 1. SSc における血清中 sCTLA-4 値と臨床所見との相関

	sCTLA-4 高値例 (n = 16)	sCTLA-4 正常例 (n = 43)
発症時年齢 (年、mean ± SD)	40 ± 22	46 ± 15
性 (男性 : 女性)	2:14	5:38
罹病期間 (年、mean ± SD)	2.0 ± 6.5*	6.5 ± 8.0
臨床所見		
dSSc	94**	28
ISSc	6**	72
指尖部虫喰状癬痕	75**	23
手指屈曲拘縮	81**	37
びまん性色素沈着	81*	37
臓器病変		
肺	63*	29
%VC の低下	64**	23
%DLco の低下	93	66
肺高血圧症	21	16
食道	69	43
心	19	12
腎	6	0
関節	25	19
筋肉	25	21

表中の数字は特に示さない限り%を表す。

\*p<0.05、\*\*p<0.01 (血清中 sCTLA-4 値が正常の SSc 患者に対して)

## 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

## 抗 RNA ポリメラーゼ III (RNAPIII) 抗体 ELISA の有用性の検討

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  
協力者 田中庸子 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所研究員  
協力者 岡野 裕 岡野内科医院

### 研究要旨

抗 RNA ポリメラーゼ (RNAP) I/III 抗体の検出は強皮症の診断や病型分類に有用である。我々は抗 RNAP III 抗体により認識される主要なエピトープ部位をコードするリコンビナント蛋白を用いた酵素免疫測定法 (ELISA) を開発した。本年度は抗 RNAPIII 抗体 ELISA の有用性を検討するため、抗 RNAPI/III 抗体陽性 120 例を含む強皮症 534 例を対象として ELISA により抗 RNAPIII 抗体を測定した。その結果、特異度 99%、感度 91%、陽性適中度 96%、陰性適中度 97%と良好であった。免疫沈降法で抗 RNAPI/III 抗体が陰性の疾患対照 192 例および健常人 48 例における偽陽性率はわずか 1%であった。抗 RNAPI/III 抗体陽性例を ELISA による抗体価が高値と低値の 2 群に分けたところ、高値群は低値群に比べてスキンスコアの最高値が高く、腱摩擦音の陽性頻度が高かった。経時的な抗 RNAPIII 抗体価の検討では、抗体価はスキンスコアと相関し、上昇時期に強皮症腎を併発する傾向が見られた。以上より、我々が開発した ELISA は免疫沈降法に代わる正確な抗 RNAPIII 抗体検出法であり、定量的な結果は疾患重症度や強皮症腎の予測に有用な可能性が示された。

### A. 研究目的

強皮症患者血清中にはトポイソメラーゼ I やセントロメアなど重要な生物活性を持つ核蛋白に対する自己抗体が高頻度に検出される。これら自己抗体は強皮症の診断に有用であるのみならず、病型分類や予後の予測にも用いられている<sup>1)</sup>。我々は 1993 年に複数の RNA ポリメラーゼ (RNAP) を同時に認識する自己抗体が強皮症患者血清中に特異的に検出されることを報告した<sup>2)</sup>。強皮症患者血清中には RNAP I と RNAP III を同時に認識する抗体 (抗 RNAP I/III 抗体) が検出される。抗 RNAP I/III 抗体は強皮症に特異性がきわめて高く、急速に皮膚硬化が進行

する diffuse 型に高頻度に検出される。特に同抗体陽性例は強皮症腎を高率に併発する。強皮症腎は適切な治療が早期に開始されないと腎不全、悪性高血圧を併発して予後が悪い。日本人強皮症患者における抗 RNAP I/III 抗体の陽性頻度は 5%程度と少ないが、欧米の白人強皮症患者での頻度は約 20%と高い<sup>3)</sup>。したがって、抗 RNAP I/III 抗体は強皮症の診断、病型分類、治療方針の決定に際してきわめて有用な自己抗体である。しかし、大量のアイソトープと培養細胞を用いる煩雑な免疫沈降法が唯一の検出法であったため、一般検査室での抗 RNAP I/III 抗体の検出は困難であった。そこで、我々は抗

RNAPI/III 抗体により高頻度に認識されるエピトープを RNAPIII サブユニット上に同定し、同部位を発現するリコンビナント蛋白を抗原とした酵素免疫測定法 (ELISA) を開発した<sup>4)</sup>。本研究では様々な民族背景を有する多数の強皮症患者血清を用いて抗 RNAPIII 抗体 ELISA の臨床検査として有用性を検討した。さらに、ELISA による抗体価が抗 RNAPI/III 抗体陽性例の臨床症状と関連するかどうかを調べた。

## B. 研究方法

### 1) 対象

アメリカリウマチ学会による分類予備基準<sup>5)</sup>を満たす強皮症患者 534 例を対象とした。265 例は慶應義塾大学、196 例は米国サウスカロライナ大学、73 例は米国ピッツバーグ大学から提供を受けた。慶應義塾大学とピッツバーグ大学の強皮症患者では、臨床症状に関するデータの入手が可能であった。また、対照として全身性エリテマトーデス (SLE) 82 例、多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) 24 例、関節リウマチ (RA) 54 例、原発性シェーグレン症候群 (p-SS) 32 例の疾患対照血清および健常人 48 例の血清を用いた。患者血清の使用については各施設での倫理委員会で承認を受け、文書による同意を得た上で採取した。

### 1) 抗 RNAPI/III 抗体の同定

患者血清中の抗 RNAPI/III 抗体同定のため、HeLa 細胞の可溶性細胞抽出物を抗原とした蛋白の免疫沈降法を行った<sup>2)</sup>。RNAP I の高分子サブユニット (190-kD と 126-kDa 蛋白) と RNAP III の高分子サブユニット (155-kDa と 138-kDa 蛋白) のすべてを沈降した血清を抗 RNAPI/III 抗体陽性とした。

### 3) 抗 RNAPIII 抗体 ELISA

ELISA による抗 RNAPIII 抗体の検出は既報に従った<sup>4)</sup>。全ての検体は 2 ウェルで測定し、その平均を求めた。抗 RNAP I/III 抗体高力価陽性血清の希釈系列による標準曲線から各検体の吸光度を unit に換算し、4.15 unit をカットオフとした。

### 1) 統計学的解析

2 群間の頻度および平均値はカイ二乗検定、Student t-test により比較した。

## C. 研究結果

### 1) 強皮症における免疫沈降法と ELISA の比較

免疫沈降法により、強皮症 534 例中 120 例 (22%) で抗 RNAPI/III 抗体が陽性であった。ELISA により測定した抗 RNAPIII 抗体の結果を免疫沈降法と比較すると、特異度 99%、感度 91%、陽性適中度 96%、陰性適中度 97% と良好な結果が得られた (表 1)。

### 2) 対照疾患における特異度

抗 RNAPIII 抗体 ELISA が強皮症の診断に有用かを検討するため、免疫沈降法で抗 RNAPI/III 抗体が陰性の疾患対照 192 例および健常人 48 例の血清を用いて ELISA を行った。その結果、RA 2 例と p-SS 1 例の計 3 例 (1%) で偽陽性結果が得られた。これら血清の反応はいずれも弱く、カットオフをわずかに越えた値 (<5.0 unit) であった。

### 3) 抗 RNAPIII 抗体価と臨床症状

抗 RNAPI/III 抗体陽性 90 例を ELISA による抗体価により高値、低値の 2 群に分類した。境界値は抗 RNAPI/III 抗体陽性全例の抗 RNAPIII 抗体価の平均 (15.2 unit) とした。高値群 32 例では低値群 58 例に比べてスキンスコアの最高値が高く (23.8±8.3 vs 18.3±8.5, P=0.005)、腱摩擦音の頻度が高かった (88% vs 53%、

P=0.003)。一方、腎を含む個々の臓器病変の頻度に有意な差はなかった。

#### 4) 抗 RNAPIII 抗体価の推移と臨床症状

図 1 に経時的に抗 RNAPIII 抗体価を検討し得た 6 例の経過を示す。Case#6 を除く全例で、抗 RNAPIII 抗体価とスキンスコアが相関した。Case#6 ではスキンスコアが改善するにもかかわらず抗 RNAPIII 抗体価が高値であったが、経過中に進行性の肺線維症を認めた。Case#4 と Case#5 は経過中に強皮症腎を発症したが、いずれも抗 RNAPIII 抗体価が急速に上昇する時期であった。

### D. 考案

抗 RNAP III 抗体 ELISA の有用性を様々な民族背景を有する強皮症患者多数例を用いて検討した。その結果、抗 RNAPI/III 抗体検出法の gold standard の免疫沈降法と比較し、特異度 99%、感度 91%、陽性適中度 96%、陰性適中度 97%と良好な結果を示した。また、対照疾患における偽陽性の頻度も 1%程度であり、ELISA は抗 RNAPIII 抗体を正確に評価できるアッセイであることが確認された。したがって、我々が開発した抗 RNAPIII 抗体 ELISA は煩雑な免疫沈降法に代わる簡便な検出法としてきわめて有用と考えられた。

ELISA を用いる長所のひとつに定量的な結果が得られることがある。今回の検討で、抗 RNAPIII 抗体価高値例は皮膚、腱病変が重症な症例が多いことが明らかとなった。ただし、抗 RNAPI/III 抗体の特徴である強皮症腎の頻度は関連なかった。一方、経時的な抗体価の推移を調べると、症例数は少ないものの抗体価の上昇は皮膚硬化の進行や強皮症腎の発症と関連する可能性が示された。今後、多数例を用いた前向

き試験により確認する必要がある。

### E. 結論

抗 RNAPIII 抗体 ELISA は免疫沈降法に代わる正確なアッセイ法であることが確認された。また、ELISA による抗 RNAPIII 抗体価は重症度や疾患活動性の評価に有用な可能性が示された。

### F. 文献

1. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M: Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37:75-83.
2. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M: Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993;91: 1399-1404.
3. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Tojo T, Medsger TA Jr: Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1994;37: 902-906.
4. Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y: Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 2002;46:2742-2747.
5. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr, Altman RD, D'Angelo WA, Fries JF, et al: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*



1980;23:581-590.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

桑名正隆: 抗 RNA ポリメラーゼ抗体と強皮症.  
炎症と免疫 2004; 12: 48-55.

### 2. 学会発表

桑名正隆: 強皮症における世界の最新治療. 第  
55 回日本皮膚科学会中部支部学術大会(金沢).  
2004. 9.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 1. 強皮症における抗 RNAPIII 抗体 ELISA の感度、特異性、陽性適中度、陰性適中度

施設、国	解析血清数	感度 (%)	特異度 (%)	陽性適中度 (%)	陰性適中度 (%)
慶應義塾大学、日本	265	100	99	85	100
サウスカロライナ大学、アメリカ	196	93	99	97	99
ピッツバーグ大学、アメリカ	73*	88	—	—	—
合計	534	91	99	96	97

\*全て抗 RNAPIII 抗体陽性例。

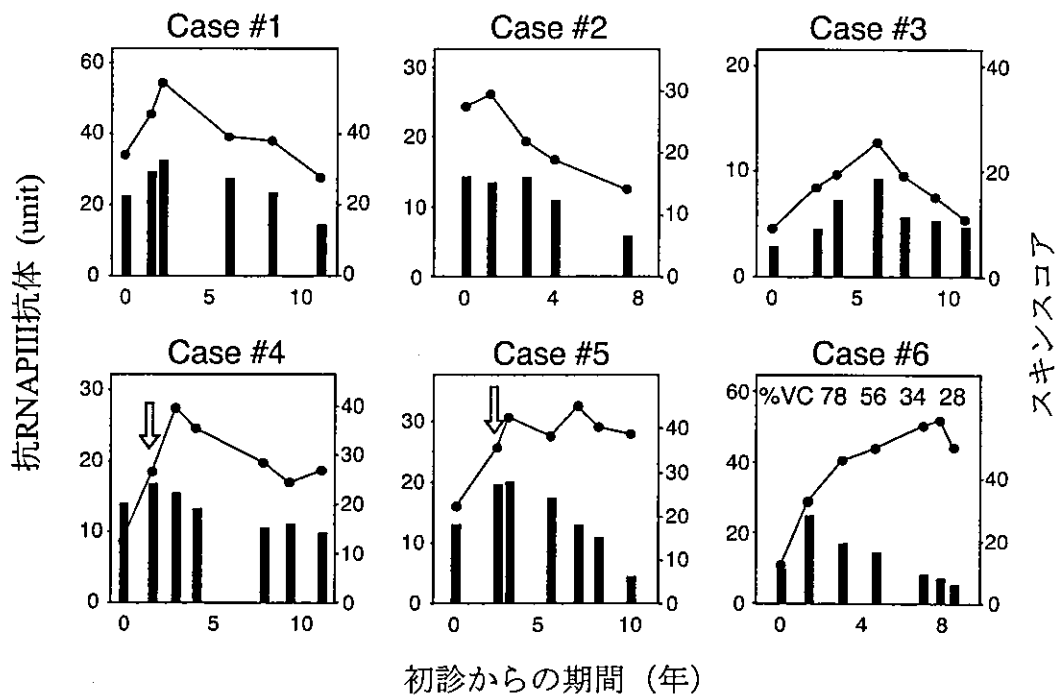


図 1：強皮症 6 例における ELISA による抗 RNAPIII 抗体価の経時的変化。折れ線は抗 RNAPIII 抗体価（左）、バーはスキンスコア（右）、Case#4 と Case#5 における矢印は強皮症腎の発症を示す。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

全身性強皮症における抗 KRMP1 抗体

分担研究者 室 慶直 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚結合組織病態学助教授  
協力者 富田 靖 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学教授

研究要旨

全身性強皮症では各種の疾患特異性を有する抗核抗体が陽性になるが、セントロメアを始めとする細胞分裂に関する分子に対する自己抗体が散見される。我々が全身性強皮症患者血清を用いてクローニングした蛋白 KRMP1 は細胞分裂の遂行に必須の蛋白分子であり、強皮症における同蛋白に対する抗体の頻度について他の膠原病と比較検討した。変異削除株による4種のリコンビナント蛋白を作成し反応性を調べた結果、他の膠原病では殆ど同抗体陽性者が存在しなかったのに対して、強皮症では約1割の患者に陽性で、蛋白のコイルドコイル構造部分が自己抗体に認識されていることが判明した。

A. 研究目的

全身性強皮症(Systemic sclerosis: SSc)では各種自己抗体の存在が特徴的であり、その対応抗原は topoisomerase I や 染色体セントロメアを構成する蛋白など、生命機能に必須の役割を持つ分子が多い。我々は以前、ある SSc 患者血清を用いて自己抗原 KRMP1 の全長クローニングに成功した<sup>1)</sup>。KRMP1 は N 末端にキネシンモータードメインを有し、C 末端の tail ドメインにおいて分裂期進行の制御因子である Pin1<sup>2)</sup> と結合することから kinesin-related motor interacting with Pin1 より命名された蛋白である。

一方、KRMP1 は分裂期リン酸化蛋白を認識するモノクローナル抗体を用いてクローニングされた MPP1 (M phase phosphoprotein

1)<sup>3)</sup> と同一蛋白でもあり、Fritzler らは、idiopathic ataxia の患者血清を利用して KRMP1/MPP1 の C 末端部分をクローニングしている<sup>4)</sup>。彼らによれば、クローニング部分の蛋白に対する抗体が idiopathic ataxia の患者 25 人中 10 人に存在した。今回、KRMP1/MPP1 蛋白の全長を4分割するリコンビナント蛋白を使用し、各種膠原病における抗体陽性率を調べ、強皮症における抗 KRMP1 抗体の重要性を検討した。

B. 研究方法

KRMP1 はアミノ末端より head と呼ばれるモータードメイン(1-503 アミノ酸残基)、中央のコイルドコイルを形成する stalk ドメイン(504-1519)、球状構造 tail ドメイン(1520-1780)

の3つのドメイン構造からなる。Head、stalkのN末端(504-1003)、stalkのC末端(1004-1519)、tailの4種のリコンビナント断片蛋白をコードするDNAをそれぞれPCRで作成し(図1)、pGEX5X3ベクターに導入した。GSTとの融合蛋白として大腸菌内で発現、グルタチオンセファロースにて精製し、血清との反応をイムノブロット法にて検討した。対象とした血清は、強皮症130例、全身性エリテマトーデス(SLE)77例、シェーグレン症候群41例、皮膚筋炎/多発性筋炎(DM/PM)30例、混合性結合組織病(MCTD)5例、オーバーラップ症候群4例、モルフェア7例、健常人20例である。

## C. 研究結果

### 1) イムノブロット法による各種疾患における反応性

Head、stalkのN末端(stalk 1)、stalkのC末端(stalk 2)、tailの4種のリコンビナント断片蛋白の発現、精製が抗GST抗体を利用したイムノブロットにて確認された(図2)。4種の蛋白に対して対象の計314血清の反応性を調べたところ、headとtail部分に反応したものはなく、stalk1に対して反応したものが、強皮症12例、SLE1例、MCTD1例、モルフェア1例で、stalk2に対して反応したものが、強皮症10例、SLE1例、MCTD1例であった。stalk2に対して反応した血清は全てstalk1に対して反応した。よって、各種疾患における抗体陽性率は強皮症9.2%(12/130)、SLE1.3%(1/77)、シェーグレン症候群0%、DM/PM0%、MCTD20%(1/5)、オーバーラップ症候群0%、モルフェア14%(1/7)、健常人0%であった。

### 2) 抗KRMP1抗体陽性強皮症の特徴

抗体陽性12例の強皮症のうち、10例がlimited type、2例がdiffuse typeであった。limited typeのうち、4例が抗セントロメア抗体陽性、2例が抗核小体抗体陽性であった。diffuse typeの2例は抗topoisomerase I抗体の併存例であった。なお、抗体陽性の15例の患者にはataxiaを疑わせる神経症状は存在しなかった。

## D. 考察

当初KRMP1蛋白のC末端部分配列を利用したペプチド抗体や遺伝子過剰発現系を利用した実験結果から、KRMP1の主たる局在は細胞質であると考えられたが、その後の研究により、KRMP1は間期においては核質に存在し、その発現はG2期にピークに達し、分裂期においては細胞質を経て最終的にmidbodyに移行するcytokinesisに必須の蛋白であることが判明した<sup>5</sup>。

今回の多検体の検討により、膠原病、特に強皮症において抗KRMP1抗体は決して稀ではない自己抗体であることが判明した。約一割の強皮症に抗体陽性例が存在し、陽性強皮症はlimited typeが多数であったことは、セントロメアやセントリオールといった細胞分裂に関与する蛋白に対する抗体がlimited typeの強皮症に多く見られることを考えると興味深い。また、強皮症以外の抗体陽性例3例中2例がMCTDとモルフェアであったことも2疾患が強皮症関連疾患であり、やはり同抗体と強皮症との関連を示唆している。

さらに特筆すべき結果として、抗体陽性血清が認識したKRMP1の自己免疫エピトープはコイルドコイルドメインに限られていたことで

ある。コイルドコイルは蛋白分子の多量体形成に関与する構造ドメインで、実際に KRMP1 分子の相互においてこのドメインを介して結合が起きることが示されている<sup>1)</sup>。自己抗原のゴルジ体を構成する多くの蛋白や NuMA、CENP-F といった自己抗原がコイルドコイル構造を有している<sup>5)</sup>。このようなコイルドコイル蛋白群が如何にして自己免疫のターゲットになっているかの解明も今後の課題である。

## E. 結 論

我々がクローニングした KRMP1 は強皮症の自己抗原蛋白であり、その特異なエピトープの存在や limited type の強皮症に多く見られたことより、密接に強皮症の病因と関連することが示唆される。今後、セントロメアや KRMP1 のような細胞分裂装置が、なぜ強皮症患者のターゲットとなるかを明らかにする必要がある。

## F. 文 献

1. Kamimoto T, Zama T, Aoki R, Muro Y, Hagiwara M.: Identification of a novel kinesin-related protein, KRMP1, as a target for mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *J Biol Chem.* 2001, 276:37520-37528.
2. Lu KP.: Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel cell cycle regulatory mechanism. *Prog Cell Cycle Res.* 2000, 4:83-96.
3. Westendorf JM, Rao PN, Gerace L.: Cloning of cDNAs for M-phase phosphoproteins

recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994, 91:714-718.

4. Fritzler MJ, Kerfoot SM, Feasby TE, Zochodne DW, Westendorf JM, Dalmau JO, Chan EK.: Autoantibodies from patients with idiopathic ataxia bind to M-phase phosphoprotein-1 (MPP1). *J Investig Med.* 2000, 48:28-39.
5. Nozawa K, Fritzler MJ, von Muhlen CA, Chan EK.: Giantin is the major Golgi autoantigen in human anti-Golgi complex sera. *Arthritis Res Ther.* 2004, 6:95-102.

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
第8回強皮症研究会議

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Four constructs of recombinant protein &  
coiled-coil formation of KRMP1

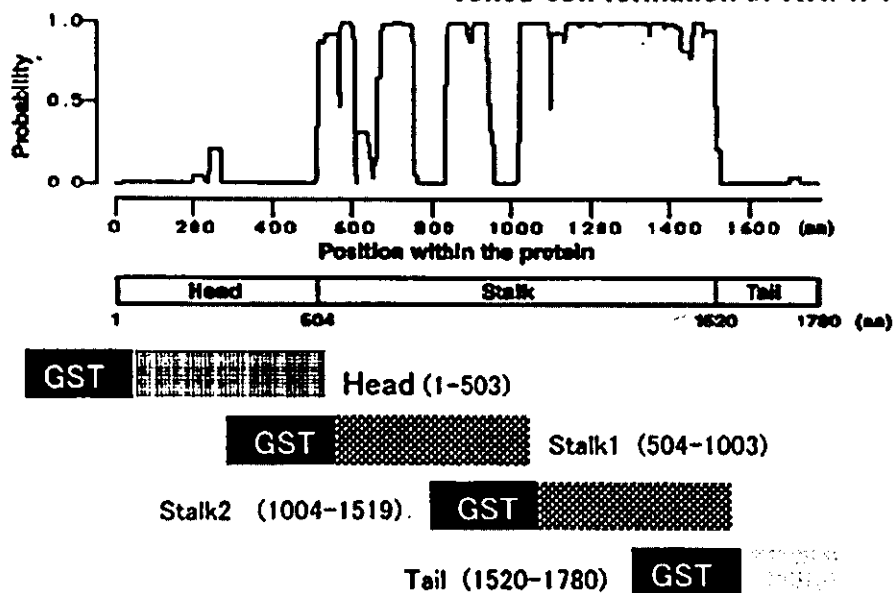


図1 : KRMP1 のドメイン構造とリコンビナント蛋白。図の上段は Lupas アルゴリズムによる coiled-coil 構造の予測と head、stalk、tail の3ドメインの一次構造上の位置を示す。下段はエピトープマッピングに用いたリコンビナント蛋白のアミノ酸領域。

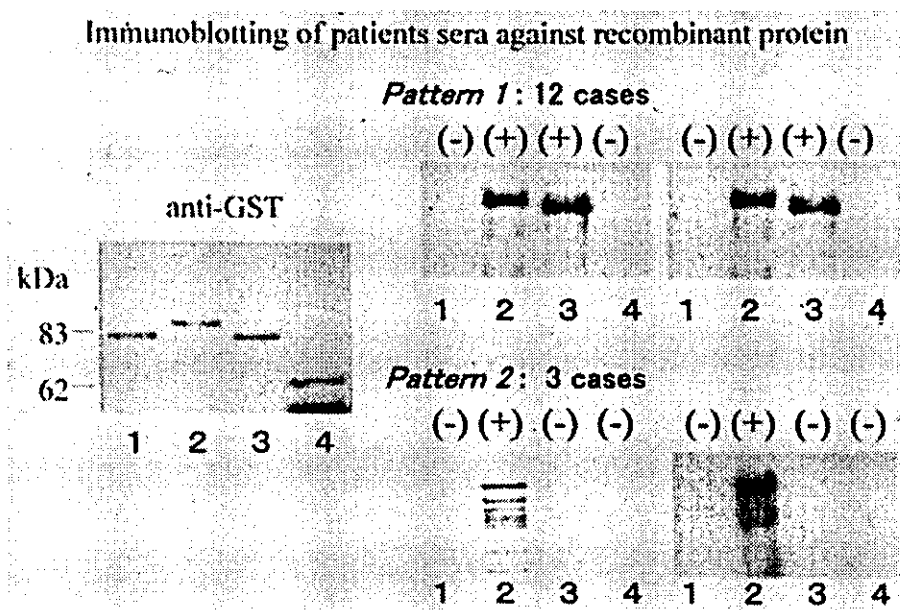


図2 : イムノブロットによるエピトープマッピング。レーン1は head、レーン2は stalk 1、レーン3は stalk 2、レーン4は tail のリコンビナント蛋白で、12例で stalk 1 と stalk 2 が、2例で stalk 1 のみが反応した。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

全身性強皮症における抗 lipoprotein lipase 抗体

分担研究者 佐藤伸一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授  
協力者 小寺雅也 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生  
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症 (SSc) の血管病変は小血管が主体であるが、近年脂質代謝異常を伴う大血管障害も認識されつつある。すでに全身性エリテマトーデス (SLE) では高トリグリセライド (TG) 血症を伴った動脈硬化性の大血管障害が臨床上大きな問題となっている。さらに最近の研究では TG の分解酵素である lipoprotein lipase (LPL) に対する自己抗体の存在が SLE 患者で証明され、高 TG 血症との関連が示唆されている。本研究では SSc 患者において抗 LPL 抗体の頻度および、臨床症状との相関について検討した。SSc 130 名、SLE 21 名、皮膚筋炎 21 名、健常人 41 名の血清で抗 LPL 抗体を ELISA 法で測定し、酵素活性阻害は LPL 活性キットを用いて測定した。SSc の 35% に抗 LPL 抗体が検出された。SSc 患者の 39% に高 TG 血症を認め、IgG 型抗 LPL 抗体との相関がみられた。抗 LPL 抗体の存在は免疫プロット法でも証明された。高 TG 血症を合併し、IgG 型抗 LPL 抗体を有する SSc 患者血清は LPL の酵素活性を阻害した。以上より、SSc 患者において抗 LPL 抗体が LPL 活性を阻害することにより高 TG 血症を生じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (SSc) とは、皮膚や全身の諸臓器に過度の線維化をきたす全身性結合組織病であり、様々な自己抗体が 90% 以上の SSc 患者に検出される。さらに指尖部潰瘍、肺高血圧症、強皮症腎などを生じる微小血管障害も SSc の主要な病態である。一方、SSc 患者における動脈硬化性の大血管障害も近年認知されるようになってきた<sup>1-5</sup>。すでに、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者では動脈硬化性の大血管障害が臨床上大きな問題となっており、その頻度は年齢、性別、肥満、喫煙、高血圧などの古典的な動脈硬化の危険因子だけでは

説明できない程度である<sup>6</sup>。最近、Reichlin らは、中性脂肪 (TG) の加水分解酵素である Lipoprotein lipase (LPL) に対する自己抗体を SLE 患者の 47% に認め、高 TG 血症との相関を認め、この自己抗体による高 TG 血症が動脈硬化を増加させる一因となっていると考えることができると報告している<sup>7</sup>。しかし、この自己抗体が実際に LPL 活性を阻害しているかどうかは不明であり、また、SSc 患者におけるその存在や頻度、臨床症状との相関は未知である。これらの点を明らかにするため本研究を施行した。

## B. 研究方法

### 1. 対象患者

対象患者は SSc130 例 (女性 114 例、男性 16 例) であり、年齢は平均  $45 \pm 15$  歳であった。

病型別では limited cutaneous SSc (lcSSc) が 75 例、diffuse cutaneous SSc (dcSSc) が 55 例であった。自己抗体別では抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 38 例、抗セントロメア抗体陽性例が 52 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 5 例、その他が 35 例であった。コントロールとして、健常人 41 例、SLE 患者 21 例、皮膚筋炎 (DM) 患者 21 例について検討した。

### 2. ELISA

bovine milk より精製された LPL (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) を抗原とし、通常の方法で ELISA を施行した。各血清を 100 倍希釈し、alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG および IgM 抗体 (cappel, Durham, NC) を二次抗体とし、p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich Co) を基質とした。

### 3. 免疫プロット法

免疫プロット法は bovine milk より精製された LPL (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) を用いて施行した。alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG を二次抗体とし、5-bromo-4-chloro-3-indrolyl phosphate および nitro blue tetrazolium (Sigma-Aldrich Co.) で発色させた。ELISA にて抗 LPL 抗体陽性であった SSc 患者 10 例、抗 LPL 抗体陰性であった SSc 患者 9 例、健常人 9 例について検討した。

### 4. LPL 活性測定

LPL 活性は市販の LPL activity kit (Roar Biomedical, Inc., New York, NY) を用いて測定した。

磁気ビーズにて各血清より IgG を精製し、LPL (Sigma-Aldrich Co) とともにインキュベートした後、LPL 活性を測定した。ELISA にて抗 LPL 抗体陽性および高 TG 血症を認める SSc10 例、ELISA にて抗 LPL 抗体陽性であるが TG 正常範囲内である SSc10 例、ELISA にて抗 LPL 抗体陰性の SSc10 例、健常人 10 例について検討した。

## C. 研究結果

### 1. ELISA による抗 LPL 抗体価

SSc、SLE、DM および健常人における血清中の抗 LPL 抗体価を図 1 に示す。また、それぞれ患者群および健常人群の抗体価を直接比較できるようにそれぞれの群の血清を集め、希釈列を作成し検討した half-maximal OD 値を表 1 に示す。dcSSc、lcSSc 患者ともに健常人に比較し、有意に IgG および IgM 抗 LPL 抗体価は高値を示した。dcSSc、lcSSc の患者群間では、IgG および IgM 抗 LPL 抗体価は差がなかった。SLE、DM 患者ともに健常人に比較し、有意に IgG および IgM 抗 LPL 抗体価は高値を示した。SLE 患者では、dcSSc、lcSSc 患者よりも抗 LPL 抗体価は高値であったが、IgG 抗 LPL 抗体価においては、SLE と dcSSc 患者群では差が認められなかった。

健常人における抗 LPL 抗体価の平均値プラス 2SD を本研究において cut off 値とし、それ以上を抗 LPL 抗体陽性とした。結果を表 2 に



示す。IgG もしくは IgM 抗 LPL 抗体は SSc 患者の 35%に認められ、SLE 患者群では 67%に認められた。健常人では 10%にしか認められなかった。

## 2. 抗 LPL 抗体価と臨床症状との相関

血清中の TG の高値は SSc 患者の 39%に認められた。IgG 抗 LPL 抗体陽性群、陰性群における TG 上昇の頻度には差がみられなかったが (表 3)、TG 値では IgG 抗 LPL 抗体陽性群が陰性群に比較し有意に高値であった (図 2)。その他、臨床症状との相関を表 3 に示す。IgG 抗 LPL 抗体陽性群が陰性群に比較し、modified Rodnan total skin thickness score、肺線維症の頻度、心病変の頻度、抗 Topoisomerase I 抗体の陽性頻度のそれぞれにおいて有意に高値であった。抗 Topoisomerase I 抗体と抗 LPL 抗体の間に交差反応はみられなかった。

## 3. 免疫プロット法

LPL の計算上の分子量は 60kDa であるが、デグラデーションし、55kDa 蛋白として検出されると報告されている。IgG 抗 LPL 抗体陽性の SSc 患者では 10 例全例で 55kDa 蛋白と反応した (図 3、レーン 2-5)。一方、IgG 抗 LPL 抗体陰性の SSc 患者 9 例 (図 3、レーン 6)、健常人 9 例 (図 3、レーン 7) では反応がみられなかった。

## 4. IgG 抗 LPL 抗体による LPL 活性の阻害

健常人血清より精製した IgG では LPL 活性は阻害されなかったが、IgG 抗 LPL 抗体陽性で TG 高値の患者群の血清より精製した IgG では、健常人群に比較し 47%も LPL 活性を阻害した。IgG 抗 LPL 抗体陰性患者群の血清より

精製した IgG は LPL 活性を阻害しなかった (図 4)。

## D. 考案

本研究では SSc 患者の 24%に抗 LPL 抗体が検出された。これは以前、Reichlin らが<sup>7</sup>報告している 42%より低値であったが、Reichlin らの報告では SSc の患者群の詳細が不明であるため、その理由は明らかでない。しかし、本研究における SLE および DM 患者の抗 LPL 抗体陽性率は、Reichlin らの報告と同程度であり、さらに dcSSc 患者における IgG 抗 LPL 抗体で検討するならば、その陽性率は SLE の陽性率より低いものの、dcSSc 患者における IgG 抗 LPL 抗体価は SLE と同程度であった。以上より、抗 LPL 抗体は SLE にのみ特異的なものでなく、SSc 患者においても検出された。本研究では、IgG 抗 LPL 抗体を有する SSc 患者血清より分離した IgG によって LPL 活性を阻害されることを明らかにした。家族性 LPL 欠損症の患者では血清中の TG 値がきわめて高値になることから<sup>8</sup>、SSc 患者における IgG 抗 LPL 抗体の存在と高 TG 血症との関連が推測された。しかし、高 TG 血症を有する SSc 患者の 30%にしか抗 LPL 抗体は検出されておらず、この抗体が SSc 患者における脂質代謝異常のすべてを説明できるものではない。また、抗 LPL 抗体を有する SSc 患者の 20%では TG 値が正常であり、この抗体の heterogeneity が推測された。

最近の研究では、全身性の炎症性疾患では、肝における TG の過剰産生が生じるとの報告が散見されるが<sup>9-12</sup>、本研究の SSc 患者群では TG 値と血清炎症マーカーである C-

reactive protein、tumor necrosis factor- $\alpha$ 、interleukin-6 との間に相関は認められなかった。

議論の余地はあるものの、最近の研究では動脈硬化の成因に TG が深く関与していることが大規模試験等で証明されてきている<sup>13-18</sup>。

さらに、近年 SSc 患者における動脈硬化性病態の存在が数多く報告されている<sup>1-5, 19</sup>。本研究では 39%の SSc 患者に高 TG 血症が検出されており、その脂質代謝異常の一部の病態に抗 LPL 抗体が関与している可能性が示唆された。

## E. 結論

SSc 患者において抗 LPL 抗体が LPL 活性を阻害することにより高 TG 血症を生じている可能性が示唆された。

## F. 文献

1. Veale DJ, Collidge TA, Belch JJ. Increased prevalence of symptomatic macrovascular disease in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:853-5.
2. Stafford L, Englert H, Gover J, Bertouch J. Distribution of macrovascular disease in scleroderma. *Ann Rheum Dis* 1998;57:476-9.
3. Ho M, Veale D, Eastmond C, Nuki G, Belch J. Macrovascular disease and systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000;59:39-43.
4. Youssef P, Brama T, Englert H, Bertouch J. Limited scleroderma is associated with increased prevalence of macrovascular disease. *J Rheumatol* 1995;22:469-672.
5. Wan MC, Moore T, Hollis S, Herrick AL. Ankle brachial pressure index in systemic sclerosis: influence of disease subtype and anticentromere antibody. *Rheumatology* 2001;40:1102-5.
6. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, du Berger R, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;44:2331-7.
7. Reichlin M, Fesmire J, Quintero-Del-Rio AI, Wolfson-Reichlin M. Autoantibodies to lipoprotein lipase and dyslipidemia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46:2957-63.
8. Schaefer EJ, Levy RI. Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *N Engl J Med* 1985;312:1300-10.
9. George J, Harats D, Gilburd B, Levy Y, Langevitz P, Shoenfeld Y. Atherosclerosis-related markers in systemic lupus erythematosus patients: the role of humoral immunity in enhanced atherogenesis. *Lupus* 1999;8:220-6.
10. Melnick JL, Adam E, Debakey ME. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl K:30-8.
11. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmaki E, Ekman MR, Manninen V, et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med*

1992;116:273-8.

12. Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 3:S462-72.

13. Austin MA. Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991;11:2-14.

14. Hodis HN, Mack WJ. Triglyceride-rich lipoproteins and the progression of coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 1995;6:209-14.

15. Bissett JK, Wyeth RP, Matts JP, Johnson JW. Plasma lipid concentrations and subsequent coronary occlusion after a first myocardial infarction. The POSCH Group. *Am J Med Sci* 1993;305:139-44.

16. Sacks FM, Pfeffer MA, Moya LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335:1001-9.

17. Assmann G, Schulte H. Role of triglycerides in coronary artery disease: lessons from the Prospective Cardiovascular Munster Study. *Am J Cardiol* 1992;70:10H-3H.

18. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated

lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol* 1996;77:1179-84.

19. Montisci R, Vacca A, Garau P, Colonna P, Ruscazio M, Passiu G, et al. Detection of early impairment of coronary flow reserve in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:890-3.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

KODERA M, HAYAKAWA I, KOMURA K, YANABA K, HASEGAWA M, TAKEHARA K, SATO S: Anti-lipoprotein lipase antibody in systemic sclerosis; association with elevated serum triglyceride levels. *Journal of Rheumatology*, in submitted

### 2. 学会発表

American College of Rheumatology 68<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting

「Anti-lipoprotein lipase antibody in systemic sclerosis: association with elevated serum triglyceride levels」

平成16年10月20日

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

**表 1** Relative OD values and arbitrary units per milliliter of anti-LPL Ab levels in collagen diseases and normal controls.

	IgG anti-LPL Ab		IgM anti-LPL Ab	
	Relative OD*	Arbitrary U/ml**	Relative OD	Arbitrary U/ml
SSc	1.132 ± 0.525	58	0.685 ± 0.505	51
ISSc	1.072 ± 0.509	41	0.698 ± 0.525	52
dSSc	1.253 ± 0.542	68	0.690 ± 0.482	50
CTL	0.750 ± 0.304	19	0.448 ± 0.234	24
SLE	1.415 ± 0.531	81	1.000 ± 0.618	89
DM	1.304 ± 0.509	74	0.822 ± 0.564	66

\* Values are relative OD (mean ± SD) determined by ELISA using purified LPL.

\*\* Values represent the dilutions of pooled sera giving half-maximal OD values in ELISA using purified LPL, which were determined by linear regression analysis to generate arbitrary units per milliliter that could be directly compared between patients and controls.

**表 2** Frequency of anti-LPL Ab positivity in collagen diseases and normal controls\*.

	Anti-LPL Ab		
	IgG**	IgM	IgG or IgM
SSc (n=130)	31 (24)	27 (21)	45 (35)
dSSc (n=55)	18 (33)	11 (20)	21 (38)
ISSc (n=75)	13 (17)	16 (21)	24 (32)
SLE (n=21)	10 (48)	10 (48)	14 (67)
DM (n=21)	9 (43)	4 (19)	9 (43)
Normal (n=41)	2 (5)	2 (5)	4 (10)

\*Values are the number (%) of patients with anti-LPL Ab that was determined by ELISA using purified LPL.

\*\*Isotypes (IgG or IgM) of anti-LPL Ab were determined using isotype-specific anti-human Ig Abs.