

## U1RNP 蛋白核酸複合体細胞内取り込みによる樹状細胞活性化に関する研究

分担研究者：三崎 義堅 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科講師  
研究協力者：山本 一彦 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科

### 研究要旨

U1RNPなどの自己抗原は、蛋白核酸複合体であることが多い。核酸に対する細胞反応は生体防御機構の一翼を担い、少なくともその一部はToll様受容体Myd88を介することが明らかになってきた。そこで、U1RNPの樹状細胞刺激能を観察した。U1RNA、U1Aと会合させた再構成U1RNPをマウス脾臓由来樹状細胞の細胞内に移入すると、U1RNAだけでも約20倍のIFN $\alpha$ 上昇が観察された。mRNAは、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ ともU1RNA刺激でそれぞれ約2500倍、約40-50倍と顕著に増加した。これに伴い樹状細胞は成熟した。一方、Myd88信号伝達系の下流であるIL-6、TNF、IL-12の産生亢進は軽度にとどまった。この機構は本来は、RNA蛋白複合体であるウィルスに対する防御免疫応答だと考えられるが、自己抗原U1RNPは樹状細胞内に取り込まれたときに、細胞刺激活性を発揮し、自己抗体産生と病態への関与に繋がる可能性が考えられた。

### A. 研究目的

近年、HSP70、HMGB1、Uric Acidなど細胞内分子が免疫系を刺激する例が報告されている<sup>1-3)</sup>。これはアポトーシスに陥った細胞がTGF- $\beta$ やIL-10などの免疫抑制的なサイトカイン産生を誘導するのに対して、ネクローシスに陥った細胞及び組織が発する危険信号の一つだと理解されている。核酸もこうした役割を担うのでは、と想像される。

我々は、昨年までの研究で、U1RNAを細胞内に移入すると樹状細胞のインターフェロン産生を刺激することを報告してきた。この、抗U1RNP抗体に認識されるU1RNPが免疫系を活性化できることが、関節炎、レイノー症候群、手指腫脹、筋炎などが特徴的な抗U1RNP抗体症候群やMCTDの病態に関与しているのではないかと推察できた。今年度は、さらに樹状細胞の抗原提示能に関わる分子の挙動を中心に観察した。

### B. 研究方法

大腸菌にて発現させ、精製したU1Aリコンビナント蛋白をカラムにて、endotoxinを除去した。このリコンビナントU1Aをマイクロビーズに固相化し、さらにin vitroで転写したU1RNAと結合させ、U1RNA/

U1-A複合体を作成した。

樹状細胞は、マウス脾臓より、MACSを用いてCD11c positive selectionにて精製した。

U1RNA/U1-A複合体或いはU1RNA単独にてリポフェクションにて樹状細胞内に導入刺激し、刺激24時間後の上清IFN $\alpha$ をELISAにて測定した。また、刺激後の樹状細胞からRNAを調整し、QuantiTect Kit (QIAGEN社)とiCycler (Bio-Rad社)を用いて定量的PCRを行いIFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IL-1、IL-6、CD40、CD86、CD80、IL-10、IL-12p40、TNF $\alpha$ のmRNA量を測定した。

マウス飼育とその実験方法については、東京大学医学部動物実験施設が定める指針に基づいて行った。

### C. 研究結果

マウス脾臓樹状細胞の細胞内にU1RNAを導入すると、IFN $\alpha$ 蛋白量が約20倍、mRNAレベルでは、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ ともU1RNA刺激でそれぞれ約2500倍、約40-50倍と顕著に増加する。Toll様受容体は、Myd88依存性の信号伝達を行うことが多いので、その経路の下流であるIL-6、TNF $\alpha$ 、IL-12の発現を解析した。IL-12はU1RNAの細胞内導入により約8-10倍の増加

を示した (図1)。しかし、これに対してIL-1, IL-6, TNFalpha はmRNA量でも2倍くらいの増加に留まり、タイプI IFNの著明な産生亢進と比べて解離が観察された。

Th1型の免疫応答を誘導するIL12の産生が増加するので、抗原提示能に関与するCD86, CD80, CD40を解析した。共刺激分子のCD86, CD80, CD40も軽度ながら増加が認められ、樹状細胞が活性化されていることが判明した (表1)。意外にも、樹状細胞成熟を妨げるIL10の産生も刺激されているのが観察された。in vitro実験系では、樹状細胞の成熟を促すタイプI IFNやIL-12と同時にIL-10も産生するので、培養系の中で干渉しあい、樹状細胞の成熟現象が顕著に観察できない可能性が考えられた。

U1RNP複合体摂取に近づけるため、ビーズに固相化したU1-AとU1RNAが形成した複合体を樹状細胞に取り込ませる実験系で、IL-6産生を報告した<sup>4)</sup>。以上の解析により、U1RNA細胞内導入にてIL-6産生よりもむしろ顕著なタイプI IFN産生が観られるので、この実験系で改めて、タイプI IFNの産生が亢進していることを確認した。

## D. 考察

U1RNPなどの自己抗原は、mRNAスプライシング関与という細胞生物学的役割以上の機能をこれまで想像もされてこなかった。この研究で始めて、U1RNAの樹状細胞活性化作用が判明した。2本鎖RNAに免疫賦活作用があることはよく知られていたが、U1RNAは一本鎖RNAである。しかし、この活性化能は、U1RNA固有のものではなく、control RNA (luciferase mRNA)にも存在するので一本鎖RNAに共通の可能性はある。

こうした免疫系に対する意外な刺激特性が、DNAヌクレオソームにも見出され、自己抗体出現という視点から注目され始めている。リウマトイド因子活性を持つ抗原レセプターを発現するB細胞が、おそらく死細胞由来ヌクレオソームを抗DNA抗体存在下にとりこんで増殖する事が報告された<sup>4)</sup>。これは、近年外来微生物病原体特有の分子パターンを認識することで益々興味を持たれているToll-Like receptor (TLR)ファミリーに属するTLR9依存性と考えられている。

TLR9は、Myd88依存性の信号伝達を行うことが判明している。この実験で、その経路の下流であるIL-6, TNF, IL-12の発現を解析したが、IFN産生亢進と

比べると、その増加は軽度に留まった。従って、このU1RNAによる樹状細胞活性化は、TLR9とは異なる経路による可能性が示唆された。

## E. 結論

MCTDと類縁ではあるが、異なる疾患カテゴリーである全身性エリテマトーデスは、抗DNA抗体の存在を特徴としている。従って、SLEで生じる免疫複合体はDNAヌクレオソーム複合体を主体として含むことになる。これに対してMCTDのそれはRNA蛋白複合体であることが、異なる免疫活性化の様式を呈し、その特徴的な病態を誘導している可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

### 文献

1. Asea A, Kraeft SK, Calderwood SK et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* 6:435-42, 2000.
2. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418:191-5, 2002.
3. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 425:516-21, 2003.
4. 三崎義堅. 厚生労働省特定疾患対策研究事業混合性結合組織病に関する研究班平成14年度報告書. p10-12.

表 1.

U1RNA による樹状細胞刺激時の各分子の発現挙動

(3+:2<sup>5</sup>、2+:2<sup>3-4</sup>、1+:2<sup>2-3</sup>、polyICintra : polyIC 細胞内導入、  
polyICextra : polyIC 細胞外添加)

|          | U1RNA | polyICintra | polyICextra |
|----------|-------|-------------|-------------|
| IFNalpha | 3+    | 3+          | 2+          |
| IfNbeta  | 3+    | 3+          | 2+          |
| IL12     | 2+    | 2+          | 2+          |
| IL6      | 1+    | 1+          | 1+          |
| TNFalpha | -     | -           | 1+          |
| IL10     | 1+    | 2+          | 1+          |
| CD40     | 1+    | 1+          | 1+          |
| CD86     | 1+    | 1+          | 1+          |
| CD80     | 1+    | 1+          | 1+          |

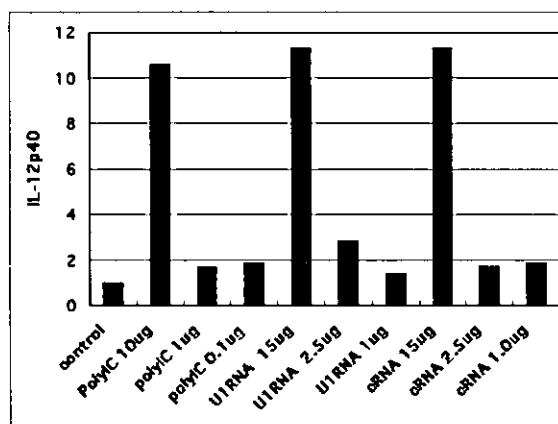


図 1

## INTRACELLULAR INGESTION OF U1RNP COMPLEX INDUCES TYPE I INTERFERON PRODUCTION AND MATURATION IN DENDRITIC CELLS.

Yoshikata Misaki, Kazuhiko Yamamoto.

Department of Allergy and Rheumatology, University of Tokyo School of Medicine.

Accumulating evidences suggest that intracellular molecules can work as a danger signal for the immune system. We have found that U1RNA, a single-stranded RNA, is able to stimulate type I interferon production in splenic dendritic cells. Following this finding, we investigated various cytokine expression and dendritic cell maturation. The production of IL-12 increases up to around 8-12 folds, whereas that of IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  increases less than 3 folds. The expression of co-stimulatory molecules including CD40, CD86, CD80, also exhibited a slightly increase. The increase of IL-10 production might interfere the distinct maturation of dendritic cells. Since U1RNP is a RNA/protein complex, the adjuvant effect of U1RNP may mimic viral infection. These results suggest that the ingestion of U1RNP by DCs as an immune complex, eg, activates the immune system, contributing in autoantibdy production and in the pathogenesis of MCTD.

## MCTDの発症機構と53BP2によるアポトーシス誘導機構

分担研究者：岡本 尚 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学教授

研究協力者：高橋なを子、小林真哉 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学

### 研究要旨

MCTDやSLEを始めとする自己免疫疾患の成り立ちには自己反応性リンパ球のアポトーシスによる排除障害が関連している。SLE疾患感受性遺伝子座位が染色体1q42.1近傍に存在し、この位置にアポトーシス誘導因子53BP2遺伝子が存在することからの自己免疫疾患との関連が示唆される。これらの自己免疫疾患の分子生物学的理解に重要な情報を提供するためにも53BP2によるアポトーシス機構の研究の意義は大きい。今回の研究結果より、53BP2によるアポトーシスはミトコンドリア経由のカスケードによることが明らかになった。

### A. 研究目的

MCTDやSLEを始めとする自己免疫疾患の成り立ちには自己反応性リンパ球の存在が重要である。通常はリンパ球レパートリーがそろった段階で自己反応性リンパ球はアポトーシスにより排除されるが、このアポトーシスによる排除機構が障害されることにより自己免疫疾患の第一段階が準備されると考えられる。昨年度の我々の研究よりMCTDおよびSLEではおよそ3回の独立な事象が蓄積されることが示唆されているが（平成16年度厚労省科学研究費補助金混合性結合組織病班報告書）、アポトーシス機構の異常はそのひとつを成していると考えられる。

53BP2は最初は癌抑制遺伝子産物p53結合蛋白として同定され、その後アポトーシスを誘導することが明らかになった<sup>1,2)</sup>。p53のコアドメインに存在する53BP2結合領域は進化の過程で保存されているが、ヒトの癌ではしばしば変異がみられる<sup>1,3)</sup>。また53BP2はp53だけでなくBcl2やNF- $\kappa$ Bのサブユニットp65とも結合することが明らかになった<sup>2,4)</sup>。53BP2蛋白は染色体1q42.1に存在する単一遺伝子TP53BP2から転写翻訳される<sup>5)</sup>。最近になり、その遺伝子からalternative splicingで2つのmRNAが転写され2つの蛋白、53BP2 (53BP2S)とASPP2 (53BP2L)が翻訳される事が分かった<sup>6)</sup>。ASPP2はN-末端に123アミノ酸長い蛋白であるが、その123アミノ酸には機能的なモチーフは見られない。ASPP2もアポトーシスを誘導することが報告されている<sup>7)</sup>。われわれは53BP2で

誘導されるアポトーシスのメカニズムについて検討した。

### B. 研究方法

最初に、53BP2に対する抗体を用いた蛍光抗体法でconfocal顕微鏡を用いて53BP2の局在を調べた。またponA処理で53BP2が発現誘導される組み換え細胞の蛋白を、細胞分画法により核、細胞質、ミトコンドリア分画に分離して抗-53BP2抗体を用いたウエスタンブロット法にて53BP2の局在を調べた。53BP2及びASPP2で誘導されるアポトーシスはFACScanを用いて観察・定量した。さらにアポトーシス・カスケードにより活性化されるcaspasesやPARPに対するそれぞれの抗体を用いたウエスタンブロット法にて53BP2で誘導されるアポトーシスのメカニズムをさらに詳しく検討した。

### C. 研究結果

図1Aは2つの53BP2蛋白（53BP2S、53BP2L/ASPP2）の構造、図1Bは内在性の53BP2を蛍光抗体法で調べた結果を示す。これらの53BP2蛋白はいずれもほぼ同様の強さでアポトーシスを誘導した（図1C,D）。

53BP2をtransientに発現させた細胞では53BP2は細胞質内全般に瀰漫性に局在したが、特にミトコンドリア膜近傍に顕著に局在していることがわかった（図2A）。次いで、ponAで53BP2Sを誘導する細胞を用い

て細胞質、ミトコンドリア、核蛋白を抽出しウエスタンブロットを行った結果、実際にミトコンドリア分画に53BP2Sの一部が検出された(図2B)。またponA処理にて53BP2Sを強発現している細胞とponA処理していない細胞間では、53BP2Sを誘導させた細胞でのミトコンドリア膜電位( $\Delta\psi_m$ )の低下が観察された(data not shown)。

ponA処理にて53BP2Sを強発現している細胞を用いてintrinsic death pathwayでみられるcaspasesやPARPの活性を調べた結果、caspase-9の活性化がみられたが、caspase-8の活性化は起こらなかった(図3)。以上のことから、53BP2Sによるアポトーシスはミトコンドリア由来のカスケードによるものと考えられた。

#### D. 考察

MCTDやSLEを始めとする膠原病ではしばしば家族内発症がみられる。また主にマウスを中心とする自己免疫疾患発症モデル動物での遺伝解析からも特定の遺伝子が発症に関連することが示唆されている。MCTDやSLEの疾患概念は、診断基準より規定されるものであるため、必ずしも均質な疾患単位でなく、実際には複数疾患の混合したものと捉えることもできる。実際にMCTDでは、特定の自己抗体(U1 RNP抗体)を持つことを主体とし、SLE、PSS、PMの3疾患の病像を併せ持つこと、また、SLEにおいても自己抗体の出現様式によってその病像・病態・合併症が異なることが観察されること、などから膠原病の背景となっている分子機構には複数のカスケードが関与してことが示唆される。

SLE感受性遺伝子が染色体1q42.1近傍に存在することからアポトーシス誘導因子53BP2の自己免疫疾患との関連が示唆され、これらの疾患の分子生物学的理解に重要な情報を提供するためにも53BP2によるアポトーシス機構の研究の意義は大きい。

今回、53BP2がアポトーシスを引き起こす機構が明らかになったが、自己免疫発症に先立って、53BP2の遺伝子変異(家族性)もしくは胸腺局所でのアポトーシス抑制因子の活性化(散発性)が起こっていることが示唆される。すでに我々は53BP2によるアポトーシスがNF- $\kappa$ Bの活性化により抑制されること(Yang et al., 1999)を報告し、最近Bcl-2やBclXLでも同様の作用があることを見いだした(in revision)。

他方、発症年齢分布よりMCTDにおいてはおそらく3つの独立な事象が関与し、その累積が発症に導くことが示唆された。ここで「独立の事象」とは、遺伝子の構

造変異のみならず、不可逆的なエピジェネティックな変化、なども含まれると考えられる。多段階発症の実態が遺伝子変異であるならば、我々が現在追究している53BP2/ASPP2などのアポトーシス誘導因子や細胞(リンパ球)増殖関連遺伝子などの関与が考えられるが、発症関連遺伝子の組み合わせは症例ごとに様々であることが予測される。

今後は、MCTD患者リンパ球におけるNF- $\kappa$ BやBcl-2/Bcl-xLの活性化、家族性発症例ではgerm lineの53BP2遺伝子の変異などを調べるとともに、第2、第3の発症過程に関わる遺伝子および細胞因子を同定してゆく作業が必要である。また、それと同時に、これらの発症メカニズムをもとにした新たな治療法と発症予防法(特に多発家系)の開発が急がれる。

#### E. 結論

53BP2はミトコンドリア・カスケードを活性化してアポトーシスを起こすことが明らかになった<sup>8)</sup>。今後MCTDやSLEの発症機構とのより直接的な関連をさらに追求してゆく必要がある。

#### 文献

1. Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R and Fields S: Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 6098-6102, 1994.
2. Yang JP, Hori M, Takahashi N, Kawabe T, Kato H and Okamoto T: NF- $\kappa$ B subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2. Oncogene 18, 5177-5186, 1999.
3. Gorina S and Pavletich NP: Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. Science 274, 1001-1005, 1996.
4. Naumovski L and Cleary ML: The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. Mol. Cell. Biol. 16, 3884-3892, 1996.
5. Yang JP, Ono T, Sonta S, Kawabe T and Okamoto T: Assignment of p53 binding protein (TP53BP2) to human chromosome band 1q42.1 by in situ hybridization. Cytogenet. Cell Genet. 78, 61-62, 1997.
6. Takahashi N, Kobayashi S, Jiang X, et al.: Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from TP53BP2 gene by alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun 315, 434-438, 2004.
7. Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, et al.: ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. Mol. Cell 8, 781-794, 2001.
8. Kobayashi S, Kajino S, Takahashi N, et al.: 53BP2 induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. Genes to Cells (in press) 2005.

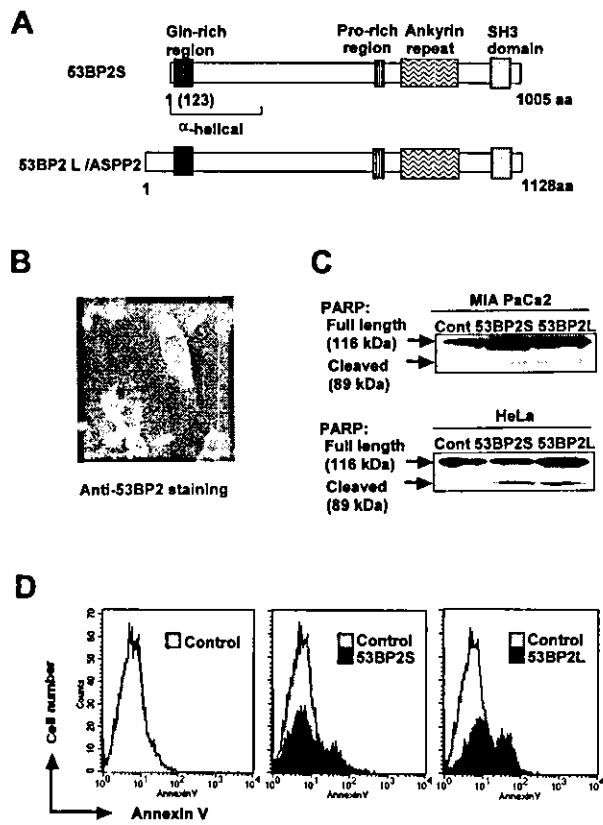


図 1 . 53BP2 蛋白で誘導されるアポトーシス

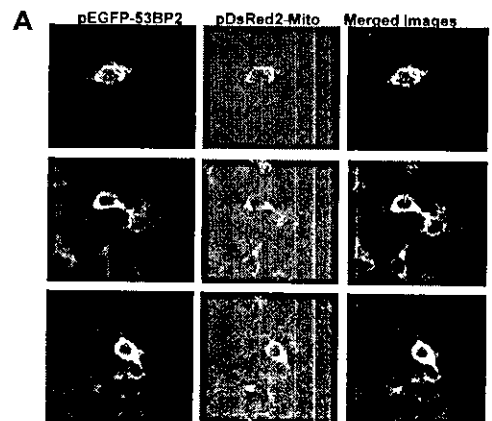


図 2 . 53BP2S の細胞内の局在

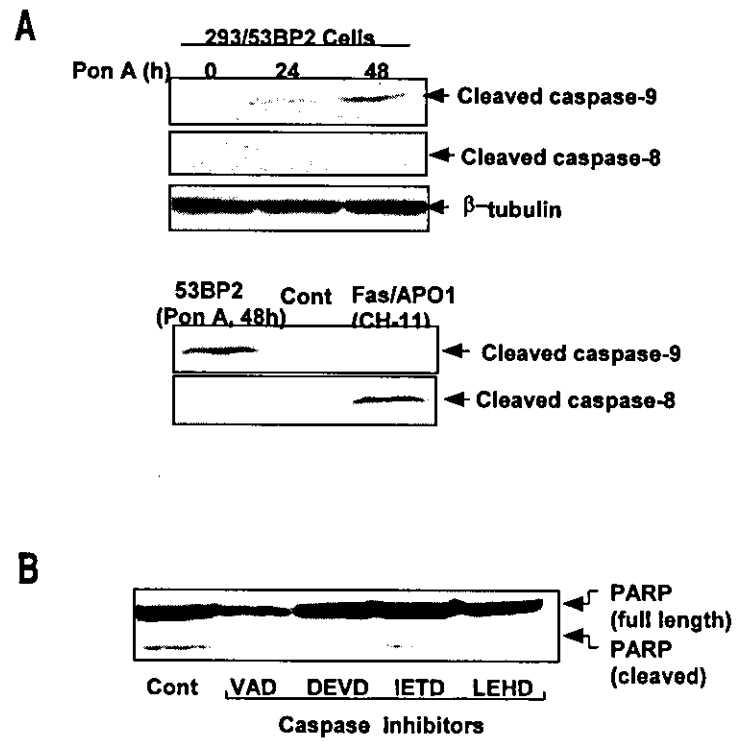
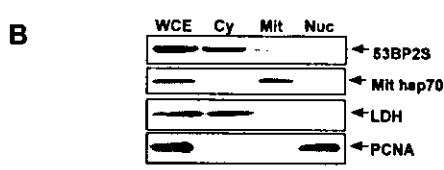


図 3 . 53BP2S で誘導されるアポトーシスには caspase-9 が関与する

## **PROAPOPTOTIC ACTIONS OF 53BP2 AND POSSIBLE PATHOGENESIS OF MCTD**

Takashi Okamoto Naoko Takahashi Shinya Kobayashi

Department of Molecular and Cellular Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

The impairment of the mechanism that is involved in elimination of autoreactive lymphocytes is implicated in the pathogenesis of autoimmune diseases such as MCTD and SLE. We previously found that the chromosomal location of proapoptotic protein 53BP2 is in a vicinity of 1q42.1, which was identified as a putative genetic locus of SLE. Here we show that 53BP2 proteins induce apoptosis as demonstrated by cleavage of poly-ADP ribose polymerase (PARP) and annexin V staining. We also demonstrate that 53BP2 is located in the mitochondria and induces apoptosis associated with depression of the mitochondrial trans-membrane potential and activation of caspase-9. From these findings we conclude that 53BP2 induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. Further genetic studies are needed to find a link between 53BP2 and autoimmunity.

## U1-snRNP・A 遺伝子の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析 (3年間のまとめ)

分担研究者：大久保光夫 埼玉医大総合医療センター 輸血・細胞治療部助教授

研究協力者：今井厚子、関さおり、平田蘭子、前田平生 埼玉医大総合医療センター 輸血・細胞治療部

研究協力者：岡田純、近藤啓文 北里大学医学部内科

### 研究要旨

ヒトゲノムには300～1000万のSingle Nucleotide Polymorphism (SNPs)が存在すると言われている。しかし、これらのSNPsで臨床的意義を持つことが示されたものは少ない。U1-small nuclear ribonucleoprotein A (RNPA) は、ヒト自己免疫疾患のmixed connective tissue disease (MCTD)の対応抗原である。このRNPA遺伝子にもSNPsが存在している。そこで、RNPA geneのSNPsをRNPA自己抗体陽性者（症例）と健常人を対象として解析し、この疾患におけるSNPの意義を求めた。予備実験による塩基配列決定法の結果とdata baseから得られたSNPsを含む配列にprimerを設定しTaqman PCRを行いSNPsを検出した。また、健常人DNAプールを準備し、症例と比較した。その結果、(1) 5'-UTRのallele頻度は高く、ハプロタイプを形成していた。(2) Exon 6 #1006のSNP C/Tのallele頻度は症例では0.22に対し健常女性は0.09で $p < 0.01$ と有意差を認めた。(3) 3'-UTRのSNPsはccttcあるいはccttt motivesのくり返し部位に存在しており、この影響で、症例群の一部は繰り返しが健常人より少なかった。このccttcあるいはccttt motive配列はmRNAの安定性に作用しているため、抗原の構造や量の変化などにより抗RNPA自己抗体産生の一因となる可能性がある。

### A. 研究目的

ヒト全ゲノム解析プロジェクトにより、ゲノムには少なくとも600-1,000bp毎にsingle nucleotide polymorphism (以下SNPs)が存在している事が明らかとなった。U1-snRNP・A (以下RNPA) 蛋白はMCTDに特徴的な自己抗体の対応抗原であり、かつ、抗原塩基配列が決定している数少ない自己抗原である。従来のcDNA解析では、RNPA geneにはvariationはないとされてきた。しかし、我々は前年度までの解析でRNPAにもSNPsが存在している事を確認した。そこで、この研究では、RNPA抗体陽性者（以下症例と略す）に特徴的なSNPsを同定する事を目的とする。その際に、従来のヒトゲノム解析のdata baseでは、健常人RNPA gene解析数が少なく、日本人人種背景に合っていないため、患者と健常人のallele frequencyの比較解析のために健常人遺伝子プールを準備する。この結

果から、SNPsが抗RNP抗体産生に関与している可能性があるかどうかを考察する。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

対象は抗RNP抗体陽性の登録患者32例。同意を得て末梢血から抽出されたDNAを用いる。健常人は遺伝子研究に協力することを文書で同意した者で、別に疾患を排除する（健常人であることを証明する）面接と臨床検査を行った後、血液サンプルの残りからDNAを抽出する。コントロールとなるこれらの検体数は100を目標として集める。

#### 2. 倫理的配慮

本解析の協力に関しては、埼玉医大倫理委員会において承認を受けた説明文と同意書を用いている。また、



解析では、遺伝子解析における個人情報への配慮のために、サンプルは無名化してから解析を行っている。

### 3. SNPs 解析

U1-snRNP・A gene の Chr19 13,520,000-13,540,000 を対象として exon 1-6 (UTR を含む) 部分を 6 本に分けて、PCR 用プライマーを設定し、症例については DNA を増幅して TA-cloning とダイレクトシーケンス法で塩基配列を解析した。Exon に SNPs が存在した場合、および data base に報告されている SNPs に関して、全症例および健常人の genomic DNA を対象として、Taqman PCR を行った。その後 SDS 解析ソフトで allele 頻度を計算した。

## C. 研究結果

### 1. 健常人 DNA コントロール

健常人 DNA は 121 名から提供を受ける事ができた。健常人であることを示すスクリーニング検査等を表 1 に示す。尚、対象外となったのは説明の後の拒否: 2 名。高脂血症: 1 名。抗アレルギー剤内服: 1 名。WBC 増多: 1 名。RA テスト陽性: 1 名。抗核抗体 (160 倍以上): 5 名。HCV 抗体陽性: 1 名。その他 2 名である。これらの DNA 96 サンプルと昨年までに準備した症例の DNA 32 サンプルについて解析をおこなった。

### 2. SNPs 頻度

MCTD の自己抗原である U1-snRNP A の遺伝子において、SNPs の頻度解析が、同意を得た健常人との比較によって、今回はじめて行われた。我々が報告した SNPs も含めて、現在 (2004 年 12 月) 明らかとなっている RNPA の SNP 43 箇所 (表 2) のうち、11 箇所について症例の SNPs の minor allele の頻度を健常人 (男女別) と比較した。その結果 (1) U1-snRNP A gene の SNPs は非翻訳領域 (5' -UTR と 3' -UTR) に遍在していた。(2) 第 6 exon の SNP の minor allele の頻度が健常人 (男女) と比較して統計学的有意差をもって増加していた (表 2\*)。(3) RNPA の 5' 側の SNPs 頻度は高いが、健常人と症例で差はない。(4) この 5' -UTR 側の SNPs はハプロタイプを形成していた。(5) 3' -UTR における SNPs は cctt motif のくり返し数に関与していた。健常人が 6 回繰り返してであるのに対して、患者群の一部は 5 回繰り返してであった (図 2)。

## D. 考察

今回はじめて、健常人コントロールとの SNPs 頻度比較により RNPA において頻度に有意差をもつ SNP が存在する事が明らかとなった。この SNP は iSNP と呼ばれ、mRNA やアミノ酸配列には影響を与えないものの、疾患標識としての意味をもつと考えられる。また、RNPA 5' -UTR の SNP は同じ染色体上でそれぞれが独立した頻度で存在しているわけではなく、一種の連鎖不平衡にあることが示された。この結果は、本症例群はある特定の遺伝子 (変異) を持つひとつの集団である可能性を示している。

3' -UTR は mRNA の細胞骨格への局在に重要な役割を果たすことが報告されている。従って、RNPA の 3' -UTR に存在する SNPs は、RNPA 抗原の発現量や高次構造の変化を引き起こし、自己抗体産生の原因となる可能性があると考えられる。また、(c/t)cctt は Topoisomerase 認識配列であることから、この疾患では遺伝子修復のシステムに異常がある可能性もあると考えられた。

ヒト全ゲノム解析プロジェクトの成果により、ヒトゲノムには全体で 300 万から 1000 万の SNP が存在する事が明らかとなっている。しかし、これらの SNPs がどのような臨床的意義を持つかについて示されたものは少ない。本研究は、「全ヒトゲノム解析プログラム」の成果をいち早く患者様に還元する方法のひとつとして有益であると考えられる。

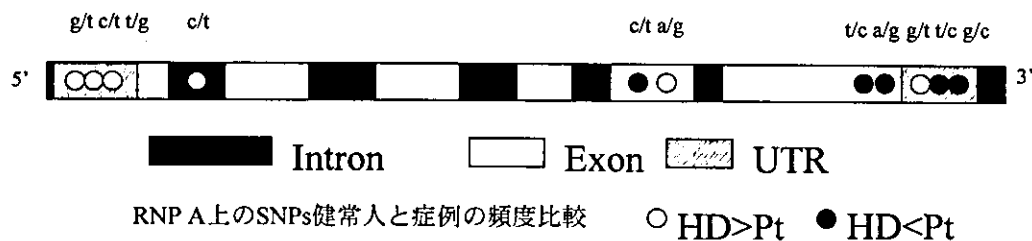
表1. SNPs解析に同意を得た健康人ドナーDNAプール

| スクリーニング項目   | 対象     | 対象外となった例とその人数 |    |
|---|--------|---------------|----|
| <b>面接</b>   |        |               |    |
| 1) 倫理委員会審査承認済みの説明   | 同意     | 拒否            | 2名 |
| 2) 現病歴  | なし     | 高脂血症          | 1名 |
| 3) 内服薬  | なし     | 抗アレルギー剤       | 1名 |
| <b>血液検査</b>   |        |               |    |
| 1) 血算, 分画   | 正常     | WBC増多         | 1名 |
| 2) AST値   | 正常     |               |    |
| 3) クレアチニン値  | 正常     |               |    |
| 4) RAテスト  | 陰性     | 陽性            | 1名 |
| 5) 抗核抗体   | 160倍以下 | 陽性            | 5名 |
| 6) Hbs抗原  | 陰性     |               |    |
| 7) HCV抗体 (第3世代)   | 陰性     | 陽性            | 1名 |
| 対象121名 女性52人; med 24.5歳 (22-56歳), 男性69人; med 25.5歳 (22-51歳) |        |               |    |

表2. RNPA gene SNPs 部位, 配列および頻度結果 3年間のまとめ

| 位置+60bp<br>以内 | SNP<br>(major/minor) | NCBI<br>ID number | 備考     | Allele frequency<br>(女性:94 男性:98 症例: 64) |      |       |
|---------------|----------------------|-------------------|--------|--|------|-------|
|               |                      |                   |        |  |      |       |
| 13523851      | G                    | 2254338           | 5'     |  |      |       |
| 13524031      | G                    | 4802088           | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13524151      | G                    | 2254326           | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13524152      | T                    | 4803364           | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13524391      | G/T                  | 1870087           | UTR    | 0.5                                      | 0.47 | 0.5   |
| 13524631      | C/T                  | 1869710           | UTR    | 0.03                                     | 0.03 | 0.03  |
| 13524731      | T/G                  | 1870086           | UTR    | 0.52                                     | 0.47 | 0.47  |
| 13525411      | T                    | 1457141           | INTRON | 0  |      | 0     |
| 13525651      | C/T                  | NCBI ID なし        | INTRON | 0.28                                     | 0.2  | 0.2   |
| 13526091      | A                    | 2604874           | INTRON | 0  |      | 0     |
| 13526631      | A                    | 10408452          | INTRON | 0  |      | 0     |
| 13526751      | C                    | 9676480           | INTRON | 0  |      | 0     |
| 13526911      | A                    | 10409683          | INTRON | 0  |      |       |
| 13526912      | T                    | 10409130          | INTRON | 0  |      |       |
| 13528231      | G                    | 10422828          | INTRON | 0  |      |       |
| 13529091      | C                    | 2607416           | INTRON | 0  |      |       |
| 13530411      | G                    | 7259158           | INTRON | 0  |      |       |
| 13530931      | A                    | 2607415           | INTRON | 0  |      |       |
| 13531631      | T                    | 2604875           | INTRON | 0  |      |       |
| 13532271      | T                    | 10153483          | INTRON | 0  |      |       |
| 13532331      | C                    | 10153478          | INTRON | 0  |      |       |
| 13533412      | C                    | 207688            | INTRON | 0  |      |       |
| 13533471      | A                    | 736625            | INTRON | 0  |      |       |
| 13533991      | A                    | 897810            | INTRON | 0  |      |       |
| 13534931      | C                    | 7247628           | INTRON | 0  |      |       |
| 13535391      | G                    | 2607414           | INTRON | 0  |      |       |
| 13536451      | A                    | 2607413           | INTRON | 0  |      |       |
| 13536511      | G                    | 2607412           | INTRON | 0  |      |       |
| 13536811      | T                    | 2607411           | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13537051      | C/T                  | 2305798           | EXON 5 | 0  | 0    | 0.03  |
| 13537331      | G                    | 2305797           | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13537511      | G                    | 2279011           | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13537631      | G                    | 4803365           | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13537751      | A/G                  | 2249854           | EXON 5 | 0  | 0.03 | 0     |
| 13537991      | G                    | 2249835           | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13538031      | G                    | 2249835           | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13538291      | T/C                  | 4802089           | EXON 6 | 0.09                                     | 0.09 | 0.22* |
| 13539111      | A/G                  | 10412175          | EXON 6 | 0  | 0    | 0.02  |
| 13539211      | G/T                  | NCBI ID なし        | UTR    | 0.02                                     | 0.03 | 0.02  |
| 13539311      | T/C                  | NCBI ID なし        | UTR    | 0  | 0    | 0.05  |
| 13539531      | T                    | 4803366           | UTR    | 0  | 0    | 0     |
| 13541691      | G/C                  | NCBI ID なし        | UTR    | 0  | 0    | 0.03  |
| 13541791      | A                    | 10607629          | INTRON | 0  |      | 0     |
| 13541891      | A                    | 10607629          | INTRON | 0  | 0    | 0     |
| 13541931      | G                    | 7254192           | 3'     |  |      |       |

\* p<0.01 未記入は not done



Data baseに報告があっても本研究での頻度が0のものは示していない

図1 . MCTDにおけるU1-snRNP・A遺伝子のSNPs存在位置と頻度比較模式図

```

tagcacctttttccccccatgcctgccccttccccttgttctggggc
caccccttttcccccttggctcagccccctgaaggtaagtccccc
ttgggggcctttcttggagccgtgtgtg

```

| (cctt)n | 繰り返し数 | 対象    | 頻度 (人数あたり) |
|---------|-------|-------|------------|
| n=5     |       | 症例群   | 10%        |
| n=6     |       | 健常人女性 | 100%       |
| n=7     |       | 健常人男性 | 20%        |

図2 . U1-snRNP A gene の3'-UTR配列とSNPs (SNPを斜文字で表示、ccttは下線で表示)

## Comparison of SNPs frequency of U1-snRNP・A gene between healthy donors and patients with anti-RNP autoantibody.

Mitsuo Okubo<sup>1</sup>, Atsuko Imai<sup>1</sup>, Saori Seki<sup>1</sup>, Ranko Hirata<sup>1</sup>, Hiroo Maeda<sup>1</sup>,  
Jun Okada<sup>2</sup>, Hirobumi Kondo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Transfusion Medicine & Cell Therapy, Saitama Medical School,  
<sup>2</sup> Department of Internal Medicine, Kitasato University

We analyzed frequency of single nucleotide polymorphism (SNP) of U1-snRNP-A (RNPA) gene in 96 healthy donors and 32 patients with anti-RNP antibody. Allele frequency of a SNP in exon 6 of healthy women, healthy men, and the patients were 0.09, 0.09, and 0.22, respectively. There was a significant increased frequency of SNPs in the patients compared with those of healthy donors. Minor allele frequencies in 5'-UTR of RNPA were increased and showed a haplotype. SNPs in 3'-UTR of RNPA were consisted of (cctt)n repeated motives. Number of repeated motives in the patients and the healthy donors were n=5 (10%) and n=6 (100%), respectively. From these results, it is possible that anti-RNP antibody positive MCTD patients have a genetic diversity which might affect autoantibody production.

## 抗 RNP 抗体とマンノース結合レクチンの関連に関する研究

分担研究者： 堤明人 筑波大学大学院人間総合科学研究科応用先端医学専攻臨床免疫学助教授  
研究協力者： 高橋令子、後藤大輔、松本功、伊藤聡、住田孝之  
筑波大学大学院人間総合科学研究科応用先端医学専攻臨床免疫学  
研究協力者： 大谷克城、若宮伸隆 旭川医科大学微生物学講座

### 研究要旨

【目的】マンノース結合レクチン(MBL)は自然免疫で重要な役割を果たすが、遺伝子多型による血中濃度の低下と自己免疫疾患との関連が指摘されている。MCTD患者をふくむ抗RNP抗体陽性自己免疫疾患患者のMBL遺伝子多型を検討した。また、MBLに対する自己抗体の存在の有無を検討した。

【方法】患者血液よりゲノムDNAを調整し、PCR-RFLP法によりMBL遺伝子のコドン54多型の判定を行った。また、固層酵素抗体法により、血中抗MBL自己抗体の有無の検討をおこなった。

【結果】抗RNP抗体陽性自己免疫疾患患者のMBL遺伝子多型はアリアル頻度、遺伝子型とも健常人と有意な差は見られなかった。抗MBL抗体陽性者が3例みられ、その中に間質性肺炎、肺高血圧症、感染症既往を持つ例が見られた。

【結語】MBL遺伝子多型と抗RNP抗体との間に明らかな関係は見られなかった。陽性例が少なく結論はでないが抗MBL抗体陽性者では本自己抗体が病態に何らかの影響を与えている可能性も考えられた。

### A. 研究目的

マンノース結合レクチン(MBL)は補体C1q類似の構造をもち、その欠損により幼少期に反復する感染を繰り返すなど、自然免疫で重要な役割を果たすことが知られている。日本人ではMBL遺伝子の第1エクソンのコドン54に遺伝子多型が存在し、多数型ホモ(AA)に対し、ヘテロ(AB)では血中MBL濃度は著明に低下、少数型ホモ(BB)ではほぼ検出不可能となる。血中MBL濃度をきたす遺伝子型と小児期あるいは免疫能低下時の反復感染、慢性ウイルス感染症、自己免疫疾患などとの関連も指摘されており、我々も関連した研究を行ってきた。このようにMBLは自己免疫疾患発症に対して防衛的に働いているのではないかと思われる一方で、MBLは補体レクチン経路を活性化するため組織に沈着して組織障害を助長する可能性も考えられる。本研究では混合性結合組織病(MCTD)の特徴である抗RNP抗体の存在と

MBL遺伝子多型、患者の病態との関連を検討し、MBL遺伝子多型もしくは血中濃度の測定がMCTD診療に有用であるかを検討することを目的とした。

また、補体C1qに対する自己抗体が全身性エリテマトーデス(SLE)患者で高率に検出されること、補体C1q欠損者にはSLE様症状が出現することが知られている。補体C1qに類似した構造と機能をもつMBLに対し自己抗体が存在し、血中のMBL濃度を低下させて自己免疫疾患の発症を促進する可能性、すでに組織に沈着しているMBLに結合して組織障害を助長する可能性などを想定してMBLに対する自己抗体の測定を試みた。

### B. 研究方法

研究は筑波大学倫理委員会および班員の所属する研究施設にて遺伝子解析の承認をうけた試料にておこない、試料の採取に当たってはすべて文書による遺伝子解析に対する同意を得た。遺伝子多型解析は患者もしくは健常

人末梢血リンパ球よりのゲノムDNAをもちい、PCR反応により多型性存在部分を増幅後、少数型(B)アリアルのみを切断する制限酵素BanIにてPCR産物を処理し、アガロース電気泳動にてパターンを確認する PCR-RFLP法によりおこなった。

血中MBL濃度はラビット抗ヒトMBL抗体を用いた固相酵素抗体法により測定した。

抗MBL自己抗体測定には固相酵素抗体法を用いた。ポリスチレンプレートにリコンビナントヒトMBLを固着化し、1%BSAでブロックをおこなった。カルシウム依存性にMBLがIgGの糖鎖に結合することを阻害するためにEDTA存在下に1:50に希釈した血清を反応させたのち、アルカリフォスファターゼ酵素抗ヒトIgG抗体を用いてMBLと反応したIgGを検出した。抗MBL自己抗体高値のSLE患者よりの血清を標準血清として標準曲線を作成し、標準血清中の抗体価を100ユニットとして検体の抗MBL抗体価を半定量した。これらのデータを患者・健常人間で比較するとともに、患者の臨床所見との関連を検討した。

### C. 研究結果

抗RNP抗体陽性者におけるMBL遺伝子のアリアル頻度、遺伝子型とも健常人と有意な差は見られなかった。血中MBL濃度はMBL遺伝子型を既報告のように反映していたが、肺高血圧症等MCTDに関連した諸症状とMBL遺伝子多型との関連は現時点では明らかになっていない。また、感染症との関連についても、現在病歴を追跡できているMBL遺伝子型BBの抗RNP抗体陽性患者が2例と少ないこともあって明らかな関連は見られなかった(表)。

抗RNP抗体陽性患者42名の血中抗MBL自己抗体の測定をおこなったところ、3例で高値であった(図1)。抗MBL抗体の価と抗RNP抗体の価を比較したところ、有意差はなかったが正の相関をする傾向が見られた(図2)。陽性者3例はいずれもレイノー症状がみられ、1名に感染症にともなう入院歴1回、1名に原因のはっきりしない発熱で入院し、抗生物投与後解熱したエピソードが2回みられた。また、1名に肺高血圧症、1名に間質性肺炎の合併が見られた。

### D. 考案

MBLは自然免疫のkey moleculeであり感染防御に深く関わるほか、自己免疫疾患の発症の防止に有用である可能性が指摘されている。自己免疫疾患に関わる

メカニズムについては、感染症を含む何らかの環境因子の排除に役立っている可能性や、アポトーシス細胞やDNAの処理にMBLが有用でその減少や欠損が自己抗原の増加、さらには自己抗体産生につながる可能性が考えられる。一方、MBLが組織あるいは組織に沈着したタンパクの糖鎖に結合し、補体系を活性化して組織障害を助長する可能性も考えられている。実際組織の虚血再灌流をおこなった動物モデルではMBLの存在が組織障害を悪化させることが示されている。MBL欠損と動脈血栓症、動脈硬化との関連も指摘されている。さらに、自己免疫疾患の治療に当たってはステロイドをはじめとした免疫抑制剤が使用されるため、通常成人では問題とならないMBL減少や欠損による感染症の増加が問題になる可能性もある。骨髄移植にともなう感染症の増加とMBL遺伝子多型の関連が報告されており、われわれもSLE患者においてMBL遺伝子型と感染症のリスクに関連があることを示唆するデータを得ている。従ってMBLの遺伝子多型や血中濃度、抗MBL自己抗体の存在と病態や合併症との関連を検討していくことは重要と思われる。

今回の検討では抗RNP抗体陽性者におけるMBL少数型アリアル(Bアリアル)の頻度は健常人と大差なく、BBホモの頻度は健常人よりやや多い傾向が見られたがBBホモの患者はSLE患者が主体であった。MCTD患者で遺伝子型BBであるのは1名のみであり、MBL欠損が直接MCTD発症の危険因子になっている可能性は低いと考えられた。

抗MBL自己抗体は検討した症例中3例で陽性と思われた。また、抗RNP抗体と抗MBL抗体価が関連する傾向が見られた。今後より多くの患者について抗MBL抗体の存在の有無を検索し、存在する場合はその臨床的意義を明らかにしていく予定である。また、最近MBLと同様コレクチンファミリーに一員であるSP-D(surfactant protein D)がDNAに結合してその排除に役立ち、自己免疫疾患発症の防止に有用であることを示唆する研究が報告された。固相酵素抗体法あるいはほかの方法を使用してSP-Dに対する自己抗体が存在するかどうか検討したい。

### 文献

1. Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N et al. Mannose binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. Scand J Gastroenterol 35:960-5,2000.
2. Tsutsumi A, Sasaki K, Wakamiya N et al. Mannose binding

lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Genes Immun* 2:99-104,2001.

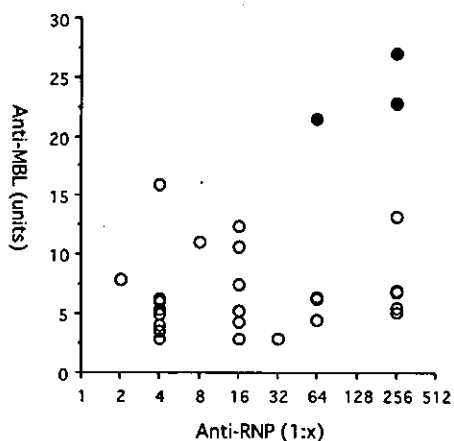
3. Tsutsumi A, Ikegami H, Takahashi R, Murata H, Goto D, Matsumoto I, Fujisawa T, Sumida T. Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. *Hum Immunol* 64:621-624,2003.
4. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Wakamiya N, Sumida T. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 136:585-590,2004.
5. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Muraki Y, Goto D, Matsumoto I, Wakamiya N, Sumida T. Association of mannose-binding lectin(MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 64:311-314,2005.

表1. 抗RNP抗体陽性者の感染症既往と MBL遺伝子型の関連

|     | 感染症既往 |    | 計  |
|-----|-------|----|----|
|     | あり    | なし |    |
| A A | 7     | 26 | 33 |
| A B | 5     | 11 | 16 |
| B B | 1     | 1  | 2  |
|     | 12    | 38 | 50 |

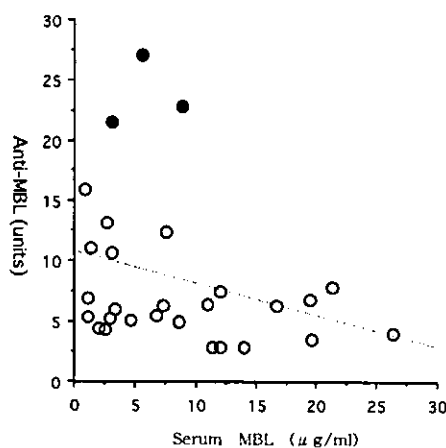
A:MBL多数型アレル

B:MBL少数型アレル



P = 0.0918 by Spearman's rank correlation

図1. 抗RNP抗体陽性者における抗MBL抗体価



P = 0.1225 by Spearman's rank correlation

図2. 抗RNP抗体価と抗MBL抗体価の関連

## **ASSOCIATION BETWEEN ANTI-RNP ANTIBODIES AND MANNOSE BINDING LECTIN**

Akito Tsutsumi<sup>1</sup>), Reiko Takahashi<sup>1</sup>), Daisuke Goto<sup>1</sup>), Katsuki Ohtani<sup>2</sup>), Isao Matsumoto<sup>1</sup>), Satoshi Ito<sup>1</sup>),  
Nobutaka Wakamiya<sup>2</sup>), Takayuki Sumida<sup>1</sup>)

Division of Clinical Immunology, Major of Advanced Biomedical Applications,  
Graduate School of Comprehensive Human Science, University of Tsukuba<sup>1</sup>),  
Department of Microbiology, Asahikawa Medical College<sup>2</sup>).

To clarify the association between the presence of anti-RNP antibodies and mannose binding lectin (MBL), a key molecule of innate immunity, we analyzed the codon 54 polymorphism of the MBL gene, serum MBL concentration and titers of anti-MBL autoantibodies in patients positive for anti-RNP antibodies. The allele and genotype frequency did not significantly differ between patients and healthy controls. Serum MBL concentrations were significantly associated with the MBL genotypes, individuals homozygous for the minority allele being the lowest. Relationships between genotypes or serum MBL concentrations and characteristics of MCTD were not evident. Three patients showed positive for anti-MBL autoantibody. Among these 3 patients, 2 had episodes suggestive of infection, 1 had pulmonary hypertension, and 1 had interstitial pneumonia. Titers of anti-MBL antibodies had a tendency toward having a positive relationship with those of anti-RNP antibodies. Anti-MBL autoantibody may have some roles in the pathogenesis of autoimmune diseases.

肺高血圧症を有する抗 U1RNP 抗体陽性患者 IgG の  
肺動脈血管内皮細胞に及ぼす影響

分担研究者：三森 経世 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学教授  
研究協力者：藤井 隆夫、藤田 義正 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学

研究要旨

われわれは膠原病患者血清中の抗 U1RNP 抗体のサブクラスを調べ、IgG3 型の抗 A 抗体が MCTD 患者で有意に高頻度で、肺高血圧症 (PH) 合併例で高力価の傾向を認めることを報告した。そこで抗 U1RNP 抗体陽性で PH を有する患者 IgG を用い、肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC) に与える影響を *in vitro* で検討した。Protein G カラムにより PH 合併抗 U1RNP 抗体陽性の 3 患者血清から IgG を精製し、HPAEC の培養上清に加え、HPAEC より分泌される sICAM-1、sVCAM-1、RANTES、IL-6 を測定した。補体存在下において各患者 IgG は健常人 IgG に比し、HPAEC からの sICAM-1 分泌を増加させた。また 3 例中 2 例の患者 IgG が RANTES の分泌を有意に刺激し、補体存在下でその効果が増強した。IL-6、sVCAM-1 は補体存在下でも患者 IgG により分泌が刺激されることはなかった。以上から、抗 U1RNP 抗体陽性 PH 患者血清中に肺動脈血管内皮細胞に影響を及ぼす IgG が存在することが示唆された。

A. 研究目的

抗 U1RNP 抗体は混合性結合組織病 (以下 MCTD)、全身性エリテマトーデス (以下 SLE) をはじめとしてリウマチ性疾患患者血清中に高頻度に見いだされる代表的な抗核抗体である<sup>1)</sup>。しかし抗 DNA 抗体と異なり抗 U1RNP 抗体価とその原疾患活動性とは必ずしも相関せず、病因的意義も明らかではない。本邦において抗 U1RNP 抗体陽性患者で肺高血圧症 (以下 PH) の合併が多いこと、PH 合併例では生命予後がきわめて悪いこと、また本班研究において PH を診断基準に含めるか否かに関し議論されており、MCTD など膠原病の合併症として PH の重要性は高い。われわれは昨年度の本研究班で抗 U1RNP 抗体陽性膠原病患者 23 例の血清中における U1RNP 構成蛋白 (70K、A、B、C) を認識する IgG サブクラスと疾患活動性および PH との関連を調べた。SLE では特に IgG1/IgG2 型の抗 A 抗体、IgG2/IgG3 型の抗 B<sub>1</sub>/B 抗体の低下が著明であった。MCTD では IgG1 型の抗 A、抗 C 抗体が寛解後に低下していた。一方 PH との関連において、PH 症例 (SLE、MCTD、SSc+PM 各 1 例) は非 PH 症例に比し、急性期、寛

解期ともに IgG3 型の抗 A 抗体が高力価であった。また PH 症例では IgG1 型の抗 A 抗体、IgG2 型の抗 C 抗体が原疾患活動性と相関した。以上から抗 U1RNP 抗体の一部のサブクラスは疾患活動性あるいは PH と関連する可能性がある<sup>2)</sup>と結論した。そこで本年度は、それら PH 患者血清中の IgG を精製し、肺動脈血管内皮細胞に与える影響を *in vitro* で検討した。

B. 研究方法

本研究に対して充分理解・同意された上で採血され、RNA 免疫沈降法により抗 U1RNP 抗体陽性と判断された当院通院中の PH 合併膠原病患者 3 血清 (SLE 1、MCTD 1、SSc+PM 1) を対象とした。患者血清はプロテイン G カラム (ImmunoPure<sup>®</sup> G IgG purification Kit, Pierce 社) を用いて精製し、その後 PBS により透析を行った。また精製 IgG の濃度を測定した上で濃縮を行い、コントロールの抗核抗体陰性の健常人 IgG を含め、10 mg/ml および 1 mg/ml IgG 溶液を作成した。培養細胞はクラボウ社のヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC) を用いた。24 穴のカルチャープレートを用い、HPAEC がサブコンフルエントとなった状態で培養



上清に患者IgGを加え（終濃度として1mg/dlあるいは0.1mg/dl）、さらに一部のウェルには補体を添加した。その状態で48時間培養を継続し、その培養上清中のIL-6 (Biosource社)、sICAM-1 (R&D社)、sVCAM-1 (R&D社)、RANTES (R&D社) をELISAにより測定した。なお培養上清の希釈などはそれぞれのキットのプロトコールに従った。

また患者IgGがHPAECに直接結合しているか否かを確認するため、患者IgGと反応させた後、2次抗体としてFITC標識抗ヒトIgG抗体を用い、フローサイトメトリーでHPAEC上のIgGを確認した。

### C. 研究結果

昨年度われわれはPHと抗U1RNP抗体IgGサブクラスとの関連を調べ、PH患者における原疾患活動性と関連する抗U1RNP抗体IgGサブクラスとして抗A IgG1と抗C IgG2を抽出した。しかしPHの進行は原疾患の活動性と必ずしも一致しないことから、PH合併例と非合併例で原疾患活動性とは無関係に抗体価に差のあるサブクラスを調べたところ、PH合併例において非合併例に比し抗A IgG3が高値の傾向を示すことが確認された。さらにその後の検討で、SLE患者に比しMCTD患者で抗A IgG3が有意に高頻度であることが判明した。

次に、PHを有する抗U1RNP抗体陽性（抗A IgG3抗体陽性）患者（YY）IgGが、HPAECに対し影響を及ぼすか否かに関し検討した。HPAECからのIL-6とsVCAM-1分泌はPH患者由来のIgGで全く誘発されなかった（図は省略）のに対し、RANTESは1 mg/mlの患者IgGでその分泌が刺激された（図）。また補体を添加することでその刺激が増強した。図には示していないが、RANTESと同様、sICAM-1の分泌も刺激された（図は省略）。

今回精製した3例の抗U1RNP抗体陽性PH患者血清由来IgGがHPAECに及ぼす影響を表にまとめた。高濃度（1 mg/ml）IgGおよび補体の存在下では、全例でsICAM-1の分泌が刺激され、うち2例でRANTESの分泌が刺激された（表）。

なおこのHPAECに対する影響は、患者IgGとRNP抗原を含む可溶性核抗原（ENA）をpreincubationしても変化することはなかった。なおフローサイトメトリーによる検討では抗血管内皮細胞抗体<sup>9)</sup>などHPAECの表面に結合する抗体は陰性であった。

### D. 考察

われわれは抗U1RNP抗体陽性のPH合併膠原病患者血清から精製したIgGがin vitroにおいてHPAECを刺激することを示した。現在までICAM-1やELAM-1などの内皮細胞マーカーが活性化されることは抗U1RNP抗体においても示されていた<sup>3)</sup>が、PHと関連するケモカインが刺激されること示した報告はない。

今回分泌が亢進したRANTESは、血小板第4因子（PF4）スーパーファミリーに属し、メモリーT細胞（CD45RO）に対するchemotactic activityを有するケモカインである<sup>4)</sup>。アレルギー性あるいは自己免疫性の炎症局所を説明するケモカインとして重要であり、SLEにおいてもその活動性やループス腎炎の病態との関与が報告されている<sup>5)7)</sup>。また一方で、原発性肺高血圧症（PPH）患者の肺動脈血管内皮細胞においてRANTESが高発現し、肺高血圧症の病態に関与すると考えられている<sup>8)</sup>。なおその機序としてendothelin-converting enzyme-1やET-1の誘導が推定されている<sup>9)</sup>。したがってこれらの活性化が示されれば今回検討した2名の患者IgGに含まれる自己抗体がHPAECからのRANTES分泌刺激を介し、肺高血圧症を誘発している可能性がある。

しかしまだ少数例での検討であるため、PPH患者IgGでも同様な結果が得られるのか、またPHを合併しない膠原病患者における抗U1RNP抗体でも同様の成績が得られるのかは現時点で不明である。特に抗U1RNP抗体の関与については今回の成績からは否定的と考えられるが、その点を明確にするためには抗U1RNP抗体を精製するか、より特異的なRNP抗原（たとえばA蛋白）とのpreincubationで阻害を試みるなどの詳細な検討が必要である。

しかし今回の結果からはRANTESのみが活性化されIL-6が全く検出されなかったことから、自己抗体のターゲットがRANTESの調節に密接に関与する液性因子である可能性も否定できない。RANTESの刺激因子としてTNF $\alpha$ やIFN $\gamma$ などが関与し、IL-4やIL-13といったTh2サイトカインは抑制的に働くと考えられている<sup>10)</sup>。今後これらのサイトカインや他の調節因子を認識する自己抗体の検討を行う予定である。

### E. 結論

抗U1RNP抗体陽性PH合併患者IgGがHPAECを刺激し、RANTESの分泌を亢進させることを示した。

文献

1. 三森 経世. 主要疾患の歴史. 混合性結合組織病. 日本内科学会雑誌 91: 2676-82, 2002.
2. 佐々木 信人, 黒瀬 顕, 井上 洋西, 澤井 高志. 混合性結合組織病に合併する肺高血圧症に対する抗内皮細胞抗体の関与について. リウマチ 42:885-894, 2002.
3. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Fujinami M, et al. Up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ECAM-1) and class II MHC molecules on pulmonary artery endothelial cells by antibodies against U1-ribonucleoprotein. Clin Exp Immunol 116:174-80, 1999.
4. 齋藤 紀先, 荻原 順一. ケモカイン(RANTES, eotaxin など). 日本臨床 59: 1990-1905, 2001.
5. Kaneko H, Ogasawara H, Naito T, et al. Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 26:568-573, 1999.
6. Eriksson C, Eneslatt K, Ivanoff J, Rantapaa-Dehlqvist S, Sundqvist KG. Abnormal expression of chemokine

receptors on T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 10:766-774, 2003.

7. Furuichi K, Wada T, Sakai N, et al. Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. Am J Nephrol 20:291-299, 2000.
8. Dorfmueller P, Zarka V, Durand-Gasselini I, et al. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Crit Care Med 165:534-539, 2002.
9. Molet S, Furukawa K, Maghazechi A, et al. Chemokine- and cytokine-induced expression of endothelin 1 and endothelin-converting enzyme 1 in endothelial cells. J Allergy Clin Immunol 105:333-338, 2000.
10. Marfaing-Koka A, Devergne O, Gorgone G, et al. Regulation of the production of RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN  $\gamma$  plus TNF  $\alpha$  and inhibition by IL-4 and IL-13. J Immunol 154:1870-1878, 1995.

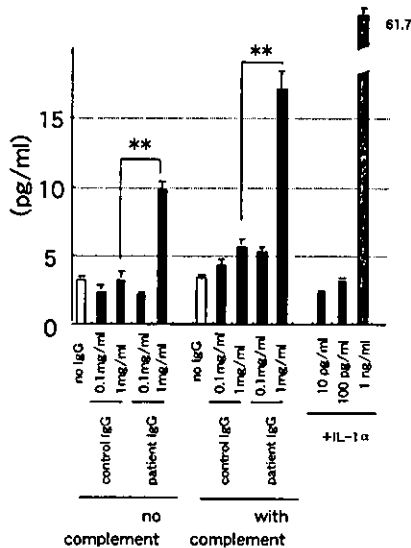


図1. 抗U1RNP抗体陽性PH患者 (YY) IgGにより刺激されたHPAECからのRANTES分泌

健常人の精製IgGは、1mg/mlの濃度においてRANTESの分泌を刺激した。また補体添加によりその刺激は増強されると考えられた。

\*\* P < 0.01

表1. 抗U1RNP抗体陽性PH患者3例のIgGによるHPAECの刺激

|         | YY     | FT      | YC      |
|---------|--------|---------|---------|
| sICAM-1 | - / +* | +* / +* | +* / +* |
| sVCAM-1 | - / -  | - / -   | - / -   |
| RANTES  | - / +* | +* / +* | - / -   |
| IL-6    | - / -  | - / -   | - / -   |

低濃度IgG (0.1mg/ml) / 高濃度IgG (1mg/ml)

\* 補体添加により、分泌刺激の増強あり

# **THE STIMULATORY EFFECTS OF PURIFIED IgG FROM SERA IN ANTI-U1 RNP ANTIBODY-POSITIVE PATIENTS WITH SYSTEMIC RHEUMATIC DISEASES ON HUMAN PULMONARY ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS**

Takao Fujii, Yoshimasa Fujita, and Tsuneyo Mimori

Department of Rheumatology and Clinical Immunology  
Kyoto University Graduate School of Medicine

Pulmonary hypertension (PH) sometimes occurs in Japanese patients with anti-U1RNP antibodies. In the present study, we tried to examine possible mechanisms of anti-U1RNP antibody-mediated pulmonary endothelial dysfunction. The stimulatory effects of purified IgG from sera in 3 patients with PH (SLE 1, MCTD 1, SSc+PM 1) on human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) were evaluated by measurement of sICAM-1, sVCAM-1, chemokine RANTES, and IL-6 concentrations in culture supernatant. In *in vitro* experiments, sICAM-1 secretion from HPAEC was significantly increased by addition of purified IgG (1mg/ml) from sera in anti-U1RNP-positive patients with PH in comparison with by addition of IgG from normal human serum (NHS). Moreover, IgG (1mg/ml) derived from 2 of 3 patients with PH significantly increased the concentration of RANTES in culture supernatant of HPAEC in comparison with IgG from NHS. The addition of freshly prepared guinea pig complement into culture media increased the purified IgG-mediated sICAM-1 and RANTES secretion from HPAEC. IL-6 and sVCAM-1 secretion from HPAEC were not induced by any purified IgG from sera in patients with PH. By flow cytometric analysis, anti-endothelial cell antibodies were not detected in sera from 3 patients with PH. The present study suggested that pulmonary endothelial dysfunction mediated via ICAM-1 and chemokine RANTES activation may be induced by IgG purified from sera in patients with anti-U1RNP antibodies.

U1 RNA/70 kDa 蛋白複合体とマウスレトロウイルス p30<sup>gag</sup>  
と相同性を有する 70kDa 合成ペプチドを認識する  
抗 U1 RNP 抗体の臨床像の比較検討

分担研究者：高崎芳成 順天堂大学医学部膠原病内科助教授

研究協力者：古幡直子、松下雅和、山田浩史、縄田益之、池田圭吾、  
松平 蘭、金田和彦、橋本博史 順天堂大学医学部膠原病内科

研究要旨

抗U1 RNP抗体はU1 RNPを構成する9個の蛋白のうち70(68) kDa, AおよびC蛋白上の複数のエピトープと反応するが、70 kDa 蛋白上のマウスレトロウイルス p30<sup>gag</sup> と相同性を有するアミノ酸配列よりなる一次構造も代表的なエピトープの一つであることが知られている。一方、我々は、このU1 RNP 70 kDa 蛋白とU1 RNAの結合により生じる立体構造を認識する抗U1 RNP抗体が存在することを見だし、報告した。そこで、今回はこの70 kDa 蛋白に関連する一次構造と立体構造を認識する抗U1 RNP抗体が相関する臨床像を比較検討した。自験MCTD185例を対象とし、U1 RNA、リコンビナント70 kDa, AおよびC蛋白を抗原源としたELISAと免疫沈降法でU1 RNP 70 kDa 蛋白とU1 RNAの結合により生じる立体構造を認識する抗U1 RNP抗体を検出した。また、U1 RNP 70 kDa 蛋白上の23個のアミノ酸配列よりなるマウスレトロウイルス p30<sup>gag</sup> と相同性を有する合成ペプチド、70SPを作成し、ELISAにてそれに対する反応性を検討した。その結果、MCTD患者血清中7%がU1 RNA/70 kDa 蛋白複合体を特異的に認識し、70SPとの反応は39.5%に認められることが確認された。また、両抗体を同時に有している症例はないことが明らかにされた。それぞれに相関する臨床像を検討すると、前者はSLE様病態との相関を認めるのに対し、後者はSLE様病態の出現率が有意に低率となっていた。これらの結果から両抗原への反応性の相違はSLEとMCTDを鑑別するのに有用と思われた。

A. 研究目的

U1 RNP 70 kDa 蛋白とU1 RNAの結合により生じる立体構造を認識する抗U1 RNP抗体と70 kDa 蛋白上のマウスレトロウイルス p30<sup>gag</sup> と相同性を有する合成ペプチドを認識する抗体の臨床像の比較検討。

B. 対象および研究方法

1)対象

自験混合性結合組織病(MCTD)185例、関節リウマチ(RA)33例、全身性エリテマトーデス(SLE)119例、強皮症(SSc)20例、多発性筋炎(PM)/皮膚筋炎(DM)25例、およびシェーグレン症候群(SJS)25例を対象とした。

2)方法

U1 RNA、リコンビナント70 kDa, AおよびC蛋白を抗原源としたELISA(R-ELISA)および3種のリコンビナント蛋白のみを抗原源としたELISA(P-ELISA)でU1 RNAとU1 RNP構成蛋白の結合によって生じる立体構造を認識する抗U1 RNP抗体をスクリーニングした。さらにそれらの血清をU1 RNA/70 kDa 蛋白複合体およびU1 RNA/A蛋白複合体に反応させ、U1 RNAを検出する免疫沈降法(IP)にて各複合体への特異性を確認した。

また、U1 RNP 70 kDa 蛋白上の23個のアミノ酸配列よりなるマウスレトロウイルス p30<sup>gag</sup> と相同性を有する合成ペプチド、70SP(Arg-Ala-Glu-Thr-Arg-