

Glu-Arg-Met-Glu-Arg-Lys-Arg-Arg-Glu-Lys-Ile-Lys-Arg-Arg-Gln-Gln-Glu)を作成し、ELISAにてそれに対する反応性を検討した。

C. 研究結果

1)U1 RNA/70 kDa蛋白複合体を認識する抗U1 RNP抗体

二重免疫拡散法に加え、R-ELISAにて抗U1 RNP抗体が陽性であった185例のうち、13例がP-ELISAにて陰性となった(表1)。

この13血清のU1 RNA/70 kDa蛋白複合体およびU1 RNA/A蛋白複合体への反応性をIPで検討した結果、すべての血清がU1 RNA/70 kDa蛋白複合体と反応し、U1 RNAの沈降を示した(図1A)。このうち、U1 RNA/A蛋白複合体とも反応を示していたのは1血清のみであった(図1B, lane 4)。

2)70SPを認識する抗U1 RNP抗体

上述の13血清を含む96検体について70SPとの反応性を検討した結果を表2に示す。MCTD患者では39.5%の血清が70SPとの反応を示したが、同じ抗U1 RNP抗体陽性血清でもSLE患者の場合は10.7%が反応するのみで有意に低率となっていた。また、U1 RNA/70 kDa蛋白複合体に対する反応性を有する血清は70SPとは反応しなかった。

3)U1 RNA/70 kDa蛋白複合体および70SPに反応する抗U1 RNP抗体陽性例の臨床的特徴

U1 RNA/70 kDa蛋白複合体および70SPに反応する抗U1 RNP抗体陽性MCTD患者の各膠原病に対する診断基準の満足度を比較検討すると(表3)、U1 RNA/70 kDa蛋白複合体に反応する抗U1 RNP抗体陽性MCTD患者前者では69.2%がSLE、23.1%がSSc、15.4%がPM/DMの診断基準を満たし、二つ以上の基準を同時に満たすいわゆるoverlap症候群が30.8%と比較的高いのにに対し、いずれの診断基準も満たさない群が7.7%と低率となっていた。一方、70SPに反応を示す抗U1 RNP抗体陽性群はSLE、PM/DM、overlap症候群の基準を満たす群が相対的に低いのにに対し(順に28.9%、2.6%、18.4%)、SScが42.1%と高く、さらにいずれの基準も満たさない群が26.3%と高率となっていた。

さらに、これらの症例の臨床像を比較検討すると(表4,5)、U1 RNA/70 kDa蛋白複合体を認識する抗U1

RNP抗体陽性例では70SPを認識する抗U1 RNP抗体陽性例に比較して、malar rash、alopecia、CNS involvement、thrombocytopenia、抗dsDNA抗体陽性、血清低補体価などSLEに関連する病像および検査所見の出現頻度が高率となっていた。また、diffuse type sclerodermaおよび高CK血症の頻度も高く、上述の診断基準の満足度に相関する所見が認められた。

以上の結果より、両抗体陽性例の病態には相違が認められ、一方はSLE様病像と関連しながらoverlap症候群と、他方はいずれの基準も満たさない定型的なMCTDと相関していることが示唆された。

D. 考察

抗U1 RNP抗体はU1 RNPを構成するU1 RNAと70 kDa, A, B/B', C,D,E,F, およびGの9個の蛋白のうち、主として70kDa, AおよびC蛋白と反応する¹⁾。これに加え、U1 RNA自体に反応する抗体も存在することが知られていたが、我々は最近U1 RNA/70 kDa蛋白およびU1 RNA/A蛋白の複合体が形成する特異なエピトープを認識する抗U1 RNP抗体が存在することを明らかにした²⁾。これらの報告に加え、各蛋白上のエピトープの分析も行われ、マウスレトロウイルスp30^{RAK}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³⁾。

一連の各蛋白や個々の蛋白上のエピトープに対する反応性と疾患特異性の検討が行われ、MCTDにおける抗U1 RNP抗体はSLEのそれに比べて70 kDa蛋白に高率に反応することや、A蛋白上のU1 RNA結合部位のアミノ酸配列に対する反応性がMCTDに対する特性が高いことなどが報告されている^{3,4)}。これらの報告に準じ、U1 RNA/70 kDa蛋白複合体に対する反応性のみを有する抗U1 RNP抗体と70SPに反応する抗U1 RNP抗体陽性例の臨床的特徴を検討したところ、U1 RNA/70 kDa蛋白複合体反応群ではSLEに特徴的な病像に相関しながらSLEの診断基準を満たす症例が比較的高率に認められ、70SP反応群がこれまで報告されているような他の膠原病の診断基準を満たさないより定型的なMCTDと相関するのと対照的な結果が得られた。

これらの結果より、U1 RNAと70 kDa蛋白の結合によって生じるエピトープは70SPに対する反応性も含めてこれまで報告されたエピトープと異なり、SLEへの特異性が高く、今後、MCTDの病型分類などに有用と思われた。

E. 結論

これまでの報告に加え、ここで検討した異なる二つのエポトープに対する反応性の相違はMCTDとSLEの鑑別や病型分類に有用であることが示唆された。

文献

- 1) Murakami A, Kojima K, Ohya K, Imamura K, Takasaki Y. A new conformational epitope generated by the binding of recombinant 70-kd protein and U1 RNA to anti-U1 RNA

autoantibodies in sera from patients with mixed connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 46: 3273-82, 2002

- 2) Query CC, Keene JD: A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of homology that is cross-reactive with retroviral p30gag antigen. *Cell* 51(2):211-20, 1987
- 3) Barakat S, Briand JP, Abuaf N, van Regenmortel MH, Muller S. Mapping of epitopes on U1 snRNP polypeptide A with synthetic peptides and autoimmune sera. *Clin Exp Immunol* 86:71-8, 1991
- 4) Smolen JS, Steiner G. Mixed connective tissue disease. To be or not to be? *Arthritis Rheum* 41: 768-77, 1998

表1. 各種膠原病患者血清のリコンビナント70kD, AおよびC蛋白のみを用いたELISA (P-ELISA) とU1RNPを加えたELISA (R-ELISA) に対する反応性

Disease	Number	R-ELISA	P-ELISA
MCTD	185	99.5 %	93.0%
SLE	119	42.0	32.8
SJS	25	16.0	4.0
SSc	20	5.0	10.0
PM/DM	25	4.0	4.0
RA	33	0.0	0.0

R-ELISA: ELISA using U1 RNA and 70kD, A and C proteins
P-ELISA: ELISA using 70kD, A and C proteins

表2. ELISAによるMCTD患者血清の70SPに対する反応性の検討

	Number of patients	Frequency of anti-70SP in ELISA	
MCTD	96	39.5 %	} P < 0.05
SLE	56	5.4	
SLE with Anti-U1 RNP	28	10.7	

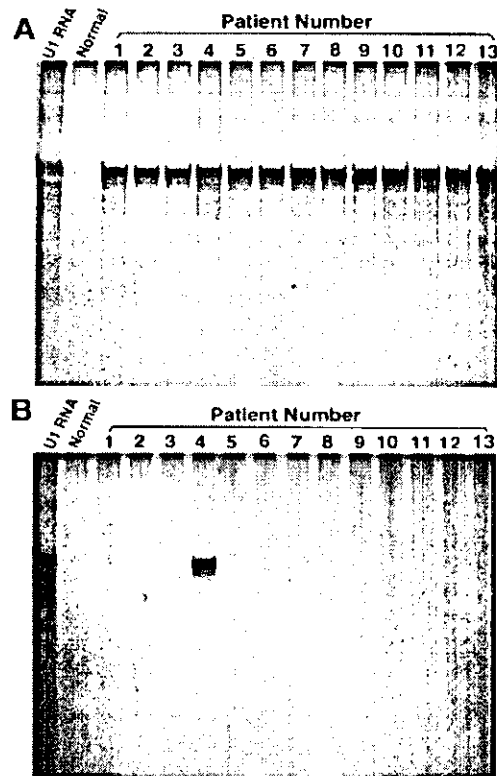


図 1.

表3. 膠原病の診断基準の満足度の比較検討

病型	Patients with anti-U1 RNP antibodies	
	recognizing only U1 RNA/70kDa complex (N=13)	recognizing 70SP (N=38)
SLE	69.2%	28.9%
SSc	23.1	42.1
PM/DM	15.4	2.6
いずれの基準も満足しない	7.7	26.3
Overlap	30.8	18.4

表4. U1RNP/70kDa蛋白結合体および70SPを認識する抗U1RNP抗体陽性患者の臨床像 I

Clinical features	Patients with anti-U1 RNP antibodies	
	recognizing only U1-RNP/A complex (N=13)	recognizing 70SP (N=38)
Raynaud's phenomenon	100 %	97.3 %
Swollen fingers/hands	100	86.8
Photosensitivity	23.0	7.9
Malar rash	38.5	15.7
Alopecia	15.4	5.2
Arthritis	100	81.5
Pleuritis	7.7	5.2
Pericarditis	7.7	0
Lymphadenopathy	23.1	26.3
CNS involvement	23.1	2.6
Proteinuria	46.2	15.7
Hemolytic anemia	7.7	0
Leukopenia	69.2	54.1
Lymphopenia	38.5	42.1
Thrombocytopenia	15.4	5.2
Muscle weakness	23.1	31.5
Myalgia	53.8	42.1
Increased level of CK	69.2	31.5

表5. U1RNP/70kDa蛋白結合体および70SPを認識する抗U1RNP抗体陽性患者の臨床像 II

Clinical features	Patients with anti-U1 RNP antibodies	
	recognizing only U1-RNP/A complex (N=13)	recognizing 70SP (N=38)
Sclerodactyly	46.2%	44.7%
Diffuse scleroderma	15.4	7.9
Digital ulcer	7.7	5.3
Dilatation of esophagus	7.7	13.1
Lung fibrosis/Interstitial pneumonitis	30.8	31.5
Pulmonary hypertension	0	2.6
%VC < 80%	23.1	34.2
%DLco < 70%	38.7	42.1
Hyper-globulinemia	76.9	78.9
Anti-dsDNA Ab	69.2	18.4
Anti-Sm Ab	7.7	10.5
Anti-SS-A Ab	23.1	18.4
Anti-SS-B Ab	0	0
Hypocomplementemia	23.1	13.2
Rheumatoid factor	30.8	42.1

CLINICAL SIGNIFICANCE OF ANTI-U1 RNP ANTIBODIES RECOGNIZING THE CONFORMATION-STRUCTURE ON U1 RNA/70 kDa PROTEIN COMPLEX AND AMINO ACIDS SEQUENCE HOMOLOGOUS TO RETROVIRAL p30^{gag} ANTIGEN.

Yoshinari Takasaki, Naoko Fruhata, Masakazu Matsushita, Hiroshi Yamada, Masuyuki Nawata, Keigo Ikeda, Ran Matsudaira, Kazuhiko Kaneda, Hiroshi Hashimoto

Department of Internal Medicine and Rheumatology, Juntendo University School of Medicine

Anti-U1 RNP antibodies recognizing the conformation-structure on U1 RNA/70 kDa protein complex were detected by ELISA using U1 RNP 70 kDa, A and C proteins (P-ELISA), and ELISA using U1 RNA in addition to the proteins (R-ELISA). At the same time, anti-U1 RNP antibodies reactive with the amino acids sequence homologous to retroviral p30^{gag} antigen were also detected by ELISA using synthetic peptide (70SP), and clinical characteristics associated with two different types of anti-U1 RNP antibodies were compared.

Thirteen sera from 185 patients with MCTD (7%) were positive in R-ELISA but negative in P-ELISA, and the specific reactivity of those sera to the conformation-structure on U1 RNA/70 kDa protein complex was confirmed by immunoprecipitation using the complex as antigen source. In contrast, anti-U1 RNP antibodies reactive with 70 SP were detected in 39.5% of MCTD patients. The clinical characteristics of these two different groups were studied, and it was shown that 13 patients with anti-U1 RNP antibodies reactive with only the U1 RNA/70 kDa protein complex had the higher frequencies of clinical features associated with SLE such as malar rash, alopecia, CNS involvement, thrombocytopenia, anti-dsDNA antibody positive and low serum level of CH50 comparing with the patients positive for anti-U1 RNP antibodies reactive with 70SP. In addition, the patients with antibodies to the complex highly fulfilled the ACR criteria for lupus patients (69.2%), and the number of patients who did not fulfill any other criteria for connective tissue diseases was lower than the patients with the antibodies reactive with 70SP (7.7% vs 26.3%). These results suggest that the different reactivity to the two different epitopes are useful for classification MCTD patients or differential diagnosis between MCTD and SLE.

抗U1-RNP抗体陽性膠原病患者における唾液中抗U1-RNP抗体の 免疫グロブリンクラス別測定

分担研究者：青塚新一 国立国際医療センター研究所部長

研究協力者：大川（高辻）雅子 国立国際医療センター研究所

研究要旨

血清抗U1-RNP抗体が陽性の膠原病患者で、唾液腺における抗U1-RNP抗体の局所産生の頻度と可能性を評価する事を目的とした。血清抗U1-RNP抗体陽性の膠原病患者15例（全身性エリテマトーデス6例、シェーグレン症候群5例、混合性結合組織病3例、強皮症1例）と正常人10例から、血清と唾液を採取した。抗体の測定は、酵素抗体法（ELISA）により行った。今回検討した血清抗U1-RNP抗体陽性の膠原病患者15例は、全例、シェーグレン症候群を合併していた。膠原病患者における血清および唾液中のIgG、IgM、IgA抗U1-RNP抗体の陽性率は、それぞれ、100%、80%、100%と93%、67%、87%であった。IgG、IgM、IgA抗U1-RNP抗体とも、血清の抗体価と唾液中の抗体価は有意に相関した（いずれも、 $p < 0.01$ ）。相関図で分布をみると、IgG抗U1-RNP抗体は血清中で優位であるのに対して、IgA抗U1-RNP抗体は、唾液中で優位であった。分泌型IgAに対する抗体を用いたELISAにより、分泌型IgAの形の抗U1-RNP抗体の唾液中における存在が判明し、それらの唾液腺における局所産生が確認された。この所見のシェーグレン症候群発症における病因的意義との関連の解明は今後の課題である。

A. 研究目的

膠原病の患者血清中には、抗U1-RNP抗体が高頻度に出現する。特に、混合性結合組織病（MCTD）において、本抗体は、単独で陽性となる事が多く、疾患のマーカー抗体とされている。一方、抗U1-RNP抗体陽性膠原病患者では、シェーグレン症候群を伴う頻度も高い。そこで、抗U1-RNP抗体が、唾液腺の炎症に関与する可能性を検討する目的で、唾液中における抗U1-RNP抗体の出現を検討した。

抗U1-RNP抗体は、IgGクラス以外にIgAやIgMクラスにも分布すると想定される。以前の検討で、MCTDの患者血清中には、IgAクラスの抗U1-RNP抗体が高頻度に出現することを報告した¹⁾。外分泌腺である唾液腺から出る唾液の中にはIgAクラスの抗U1-RNP抗体が出現する可能性が容易に推測される。

シェーグレン症候群の特異抗体である抗SS-A抗体、抗SS-B抗体については、患者唾液中にIgAとIgGクラスの抗SS-A抗体、抗SS-B抗体が出現する事、特

に、唾液中ではIgAクラスの抗体が優位である事を、すでに報告した²⁾。

今回の検討では、抗U1-RNP抗体陽性の膠原病患者において、血清中と唾液中の抗U1-RNP抗体と抗Sm抗体を、IgG、IgA、IgMのクラス別に酵素抗体法（ELISA）で測定し、それらの関係の比較を行い、シェーグレン症候群との関係を議論する。

B. 対象と方法

1) 対象患者と血清および唾液の採取：

インフォームドコンセントを得た後、血清中の抗U1-RNP抗体が陽性の膠原病患者15例（全例女性、年齢の平均±標準偏差：56.8±11.2才、範囲：35-69才）から唾液と血清を採取した（表1）。膠原病患者の内訳は、SLE 6例、原発性シェーグレン症候群（SS）5例、混合性結合組織病（MCTD）3例、強皮症（SSc）1例である。対照として、正常人10人（女性9例、男性1例、年齢の平均±標準偏差：44.9±14.1才、範囲：26-

58才)からも血清と唾液を採取した。

混合唾液は、2mlの生理的食塩水で2分間、ウガイした後、収集した。すべてのサンプルは、4°Cにおいて、3000回転/分で、5分間、遠心した。上清を採取し、2mlの30%ウシ胎児血清-RPMIを添加した。これらのサンプルは、0.22 μmのミリポアフィルター(Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)を通し、凍結し、解析時まで、-80°Cに保存した。

2) 抗U1-RNP抗体および抗Sm抗体のELISA:

血清と唾液中のIgG、IgM、IgAクラスの抗U1-RNP抗体および抗Sm抗体は、市販の酵素抗体法のキット(MBL社、名古屋)を一部変更して、測定した。0.15Mのトリス塩酸緩衝液に1%のウシ血清アルブミンを入れたもの(BSA-TB)で希釈した100 μlのサンプル(唾液1:2希釈、血清1:100希釈)を室温で1時間、4°Cで一晩、反応させた。0.5%のTween 20を含むトリス緩衝生理食塩水で3回洗浄後、2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識F(ab)₂ヤギ抗ヒトIgG、IgM、またはIgA抗体を添加し室温で1時間反応させた。発色は、2.5 M H₂SO₄ 100 μlを添加して停止させた。490 nmの吸光度(A490)をELISA測定器で測定した。結合活性は、以下に示す式で計算し、Indexで表現した。

$$\text{Index} = (\text{sample}(A490) - \text{negative control}(A490)) \times 100 / (\text{positive control}(A490) - \text{negative control}(A490))$$

3) 唾液中分泌型IgA抗U1-RNP抗体のELISA:

唾液中分泌型IgA抗U1-RNP抗体の測定も、市販の酵素抗体法のキット(MBL社、名古屋)を一部変更して行った。0.15Mのトリス塩酸緩衝液に1%のウシ血清アルブミンを入れたもの(BSA-TB)で1:2に希釈した唾液100 μlを室温で1時間、4°Cで一晩、反応させた。0.5%のTween 20を含むトリス緩衝生理食塩水で3回洗浄後、1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト分泌型IgA抗体を添加し室温で1時間反応させた。以下の、発色、吸光度測定、Indexの計算は、上記と同様に行った。

4) 統計:

結果は、正常人の平均値 + 2SD以上の時、陽性と判定した。相関は、スピアマンの順位相関検定で行った。

C. 結果

1) 患者背景:

血清中抗U1-RNP抗体陽性膠原病患者15例について、年齢、性別、診断名、シェーグレン症候群の合併の有無、血清中IgG抗U1-RNP抗体価、血清中IgG抗Sm抗体価を、表1に示した。

2) 血清中抗U1-RNP抗体価:

膠原病患者と正常人の血清中IgG抗U1-RNP抗体価の平均 ± SD (Indexで示した)と範囲(括弧内)は、100.9 ± 51.9 (30.0-198.4)と3.0 ± 0.8 (1.8-4.5)(表2)であった。陽性率は、膠原病患者で100%、正常人で0%であった。膠原病患者と正常人の血清中IgM抗U1-RNP抗体価の平均 ± SDと範囲は、45.8 ± 59.1 (1.6-200.0)と3.3 ± 1.3 (1.4-5.3)(表2)であった。陽性率は、膠原病患者で80%、正常人で0%であった。膠原病患者と正常人の血清中IgA抗U1-RNP抗体価の平均 ± SDと範囲は、35.5 ± 51.5 (2.0-199.9)と1.1 ± 0.4 (0.4-1.5)(表2)であった。陽性率は、膠原病患者で100%、正常人で0%であった。

3) 血清中抗Sm抗体価:

膠原病患者と正常人の血清中IgG抗Sm抗体価の平均 ± SD (Indexで示した)と範囲(括弧内)は、46.2 ± 59.1 (1.5-200.0)と2.6 ± 0.6 (1.9-3.9)(表2)であった。陽性率は、膠原病患者で87%、正常人で0%であった。膠原病患者と正常人の血清中IgM抗Sm抗体価の平均 ± SDと範囲は、15.5 ± 33.7 (1.4-119.2)と3.3 ± 0.7 (2.6-5.0)(表2)であった。陽性率は、膠原病患者で27%、正常人で10%であった。膠原病患者と正常人の血清中IgA抗Sm抗体価の平均 ± SDと範囲は、21.6 ± 53.2 (0.4-198.5)と1.0 ± 0.4 (0.4-1.5)(表2)であった。陽性率は、膠原病患者で60%、正常人で0%であった。

4) 唾液中抗U1-RNP抗体価:

膠原病患者と正常人の唾液中IgG抗U1-RNP抗体価の平均 ± SD (Indexで示した)と範囲(括弧内)は、32.0 ± 39.3 (1.4-135.2)と0.7 ± 0.6 (0.0-1.7)(表2)であった。陽性率は、膠原病患者で93%、正常人で0%であった。膠原病患者と正常人の唾液中IgM抗U1-RNP抗体価の平均 ± SDと範囲は、17.9 ± 28.9 (0.8-82.5)と1.4 ± 0.5 (0.8-2.6)(表2)であっ

た。陽性率は、膠原病患者で67%、正常人で10%であった。膠原病患者と正常人の唾液中IgA抗U1-RNP抗体価の平均 ± SD と範囲は、57.4 ± 48.7 (1.2-200.0) と 2.8 ± 2.6 (0.0-7.2) (表2)であった。陽性率は、膠原病患者で87%、正常人で0%であった。

5) 唾液中抗 Sm 抗体価 :

膠原病患者と正常人の唾液中IgG抗Sm抗体価の平均 ± SD (Indexで示した) と範囲 (括弧内) は、17.1 ± 33.2 (1.7-105.3) と 1.6 ± 0.3 (0.9-1.9) (表2)であった。陽性率は、膠原病患者で67%、正常人で0%であった。膠原病患者と正常人の唾液中IgM抗Sm抗体価の平均 ± SDと範囲は、1.9 ± 2.2 (0.2-7.3) と 1.2 ± 0.4 (0.4-1.6) (表2)であった。陽性率は、膠原病患者で27%、正常人で0%であった。膠原病患者と正常人の唾液中IgA抗Sm抗体価の平均 ± SD と範囲は、10.7 ± 13.5 (1.0-48.4) と 2.4 ± 1.4 (0.4-4.9) (表2)であった。陽性率は、膠原病患者で40%、正常人で0%であった。

6) 血清中と唾液中抗 U1-RNP 抗体価間の相関 :

血清中と唾液中抗 U1-RNP 抗体価間にはIgGクラスで、rs=0.901 (p<0.01、図5 A)、IgMクラスで、rs=0.720 (p<0.01、図5 B)、IgAクラスで、rs=0.835 (p<0.01、図5 C) と、いずれも有意の相関を認めた。相関図で見ると、IgGクラスは、血清中優位で、IgAクラスは、唾液中優位である傾向を認めた。

7) 唾液中抗 U1-RNP 抗体価の IgG、IgM、IgA クラス間の相関 :

唾液中IgG、IgM、IgAクラス抗U1-RNP抗体価間にはIgGとIgMクラス間で、rs=0.626 (p<0.01、図6 A)、IgGとIgAクラス間で、rs=0.778 (p<0.01、図6 B)、IgMとIgAクラス間で、rs=0.762 (p<0.01、図6 C) といずれも有意の相関を認めた。

8) 血清中と唾液中抗 Sm 抗体価間の相関 :

血清中と唾液中抗 Sm 抗体価間にはIgGクラスで、rs=0.825 (p<0.01、図7 A)、IgMクラスで、rs=0.569 (p<0.01、図7 B)、IgAクラスで、rs=0.561 (p<0.05、図7 C) と、いずれも有意の相関を認めた。

9) 唾液中抗 Sm 抗体価の IgG、IgM、IgA クラス間の

相関 :

唾液中IgG、IgM、IgAクラス抗Sm抗体価間には、IgGとIgAクラス間で、rs=0.660 (p<0.01、図8 B) と有意の相関を認めた。

10) 唾液中 IgA 抗 U1-RNP 抗体価と分泌型 IgA 抗 U1-RNP 抗体価間の相関 :

唾液中IgA抗U1-RNP抗体価と分泌型IgA抗U1-RNP抗体価の間には、rs=0.653 (p<0.01、図9) と有意の相関を認めた。

D. 考察

抗U1-RNP抗体陽性の膠原病患者において、血清中と唾液中抗U1-RNP抗体と抗Sm抗体を、IgG、IgA、IgMのクラス別に測定し、正常人との関係の比較を行った。これらの膠原病患者における唾液中の抗U1-RNP抗体の陽性率は、IgGで93%、IgMで67%、IgAで87%であり、比較的、全免疫グロブリンクラスに分布することが判明した。また、これらの膠原病患者における唾液中の抗Sm抗体の陽性率は、IgGで67%、IgMで27%、IgAで40%であり、主に、IgGクラスに分布することが判明した。さらに、唾液中の抗U1-RNP抗体価および抗Sm抗体価は、IgG、IgM、IgAとも当該の免疫グロブリンクラスの血清中抗体と相関した。このことは、全身免疫状態が粘膜免疫状態と関連することを示唆するものである。

しかし、相関図で分布をみると、IgG抗U1-RNP抗体は唾液中よりも血清中で優位で、逆にIgA抗U1-RNP抗体は血清中よりも唾液中で優位の傾向を認めた。このことは、粘膜免疫においては、自己抗体もIgAクラスが優位であることを示唆するものである。さらに、唾液中IgA抗U1-RNP抗体価は、唾液中分泌型IgA抗U1-RNP抗体価と有意の相関を示したことから、IgA抗U1-RNP抗体の局所産生が確認された。

抗U1-RNP抗体は、MCTDの患者血清中に特徴的に存在すると報告されてきた。しかしながら、抗U1-RNP抗体は、全身性エリテマトーデス、強皮症、原発性シェーグレン症候群や多発性筋炎/皮膚筋炎のようなその他の膠原病の患者血清中にもしばしば検出される³⁾。MCTDでは、その他の自己抗体を伴わず、抗U1-RNP抗体が単独で高力価に出現するとされている。

MCTDにおいては、シェーグレン症候群を伴う事が多いとされているが、その頻度は、報告によりまちま

ちである(30-77%)^{4,5)}。抗U1-RNP抗体が出現する場合、抗SS-A抗体や抗SS-B抗体の出現頻度も高いことを経験している。実際、今回検討した抗U1-RNP抗体陽性の膠原病患者15例では、抗SS-A抗体は、12/15(80%)で陽性で、抗SS-B抗体は、7/15(47%)で陽性であった。

これまでに、唾液中の自己抗体を測定した論文は、我々のそれ²⁾を含めても、数が少ない。それらの論文では、主に、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体が測定されているが、イムノプロテイングで抗U1-RNP抗体が出現するという報告もある⁶⁾。

そこで、抗U1-RNP抗体が、唾液腺の炎症に関与する可能性を検討する目的で、唾液中における抗U1-RNP抗体の出現を検討した。唾液中に高頻度に検出されたIgG、IgM、IgAクラスの抗U1-RNP抗体が、腺組織の破綻等の何らかの機序で血清中から漏れだしたものである可能性は残る。しかし、今回の実験において、特にIgAクラスの抗U1-RNP抗体に関しては、分泌コンポーネントを伴う分泌型IgAの形で反応しうることを確認したが、これは、初めての報告である。このような抗U1-RNP抗体が直接、シェーグレン症候群の発症に至る機序に関与しているのか、それとも、共存する抗SS-A抗体や抗SS-B抗体を介して作用しているかについての解明は、今後の課題である。

E. 結論

1) 抗U1-RNP抗体陽性の膠原病患者15例(SLE 6例、SS 5例、MCTD 3例、SSc 1例)、正常人10例において、血清中と唾液中抗U1-RNP抗体と抗Sm抗体を、IgG、IgA、IgMのクラス別に測定し、それらの関係の

比較を行なった。

2) 膠原病患者における唾液中の抗U1-RNP抗体の陽性率は、IgGで93%、IgMで67%、IgAで87%、唾液中の抗Sm抗体の陽性率は、IgGで67%、IgMで27%、IgAで40%であった。

3) 唾液中の抗U1-RNP抗体価および抗Sm抗体価は、IgG、IgM、IgAとも当該の免疫グロブリンクラスの血清中抗体と相関した。

4) IgG抗U1-RNP抗体は血清中で優位で、IgA抗U1-RNP抗体は唾液中で優位の傾向を認めた。

5) 唾液中IgA抗U1-RNP抗体価は、唾液中分泌型IgA抗U1-RNP抗体価と有意の相関を示し、局所産生が確認された。

文献

1. 青塚新一、大川雅子、上床周、木下牧子、横張龍一：抗RNP抗体の免疫グロブリンクラスとその臨床的意義。厚生省特定疾患混合性結合組織病調査研究班、昭和59年度研究報告書、p134-138、1985。
2. Iwasaki K, Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Ono T: Detection of anti-SS-A/Ro and anti-SS-B/La antibodies of IgA and IgG isotypes in saliva and sera of patients with Sjögren's syndrome. *Jpn J Clin Immunol* 26, 346-354, 2003.
3. 三森経世：MBL自己免疫レポート、No. 31、医学生物学研究所、2004。
4. Kotajima L, Aotsuka S, Sumiya M, Yokohari R, Tojo T, Kasukawa R: Clinical features of patients with juvenile onset mixed connective tissue disease: analysis of data collected in a nationwide collaborative study in Japan. *J Rheumatol* 23, 1088-1094, 1996.
5. 三森明夫：膠原病診療ノート(第2版)、10. 混合性結合組織病、日本医事新報社、p269-273、2003。
6. Sreebny LM, Zhu WX: The use of whole saliva in the differential diagnosis of Sjögren's syndrome. *Adv Dent Res* 10, 17-24, 1996.

表1. 膠原病患者の年齢、性別、診断名、シェーグレン症候群合併の有無、
血清IgG抗U1-RNP抗体価、血清中IgG抗Sm抗体価

Patient	Age/Sex	Diagnosis	Complication of SS	IgG Anti-U1-RNP (Index)*	IgG Anti-Sm (Index)#
1	69/F	SS	Yes	198.4	9.2
2	58/F	SLE	Yes	196.8	200.0
3	72/F	SS	Yes	162.9	128.4
4	35/F	MCTD	Yes	118.7	20.5
5	41/F	MCTD	Yes	113.9	111.6
6	68/F	SS	Yes	112.6	82.0
7	35/F	SLE	Yes	106.0	45.4
8	54/F	SLE	Yes	88.4	19.9
9	56/F	MCTD	Yes	80.5	1.5
10	66/F	SS	Yes	78.5	4.0
11	55/F	SS	Yes	73.9	45.7
12	63/F	SLE	Yes	63.6	6.0
13	58/F	SSc	Yes	46.0	5.4
14	62/F	SLE	Yes	43.8	9.7
15	60/F	SLE	Yes	30.0	3.7

F: female, SS: Sjögren's syndrome, SLE: systemic lupus erythematosus, MCTD: mixed connective tissue disease, SSc: systemic sclerosis, * normal range: < 4.8 Index, # normal range: < 3.9 Index.

表2. 膠原病患者および正常人の血清中および唾液中におけるIgG、IgM、IgA
クラス別の抗U1-RNP抗体価と抗Sm抗体価

	CTD (n=15)		NV (n=10)	
	mean \pm SD (Index)	(% positive)	mean \pm SD (Index)	(% positive)
Serum				
IgG anti-U1-RNP	100.9 \pm 51.9	(100%)	3.0 \pm 0.8	(0%)
IgM anti-U1-RNP	45.8 \pm 59.1	(80%)	3.3 \pm 1.3	(0%)
IgA anti-U1-RNP	35.5 \pm 51.5	(100%)	1.1 \pm 0.4	(0%)
IgG anti-Sm	46.2 \pm 59.1	(87%)	2.6 \pm 0.6	(0%)
IgM anti-Sm	15.5 \pm 33.7	(27%)	3.3 \pm 0.7	(10%)
IgA anti-Sm	21.6 \pm 53.2	(60%)	1.0 \pm 0.4	(0%)
Salivary				
IgG anti-U1-RNP	32.0 \pm 39.3	(93%)	0.7 \pm 0.6	(0%)
IgM anti-U1-RNP	17.9 \pm 28.9	(67%)	1.4 \pm 0.5	(10%)
IgA anti-U1-RNP	57.4 \pm 48.7	(87%)	2.8 \pm 2.6	(0%)
IgG anti-Sm	17.1 \pm 33.2	(67%)	1.6 \pm 0.3	(0%)
IgM anti-Sm	1.9 \pm 2.2	(27%)	1.2 \pm 0.4	(0%)
IgA anti-Sm	10.7 \pm 13.5	(40%)	2.4 \pm 1.4	(0%)

CTD: connective tissue disease, NV: normal volunteers

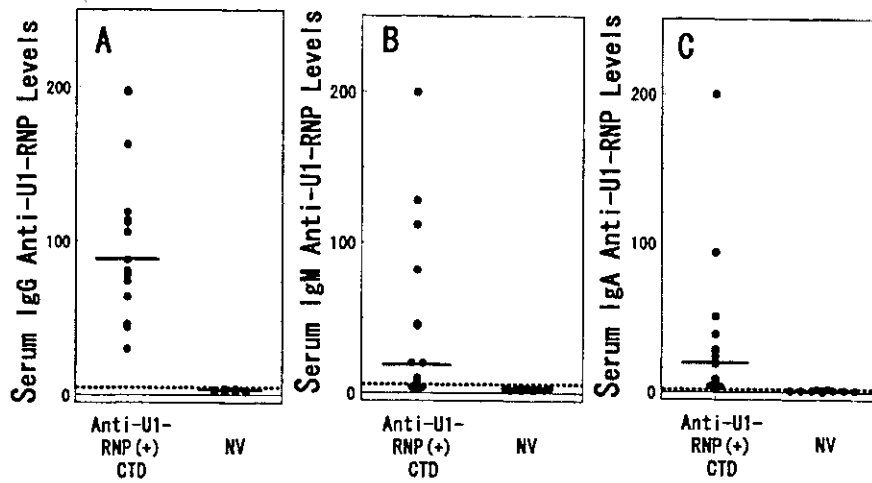


図1. 抗U1-RNP抗体陽性膠原病患者と正常人における血清中抗U1-RNP抗体価

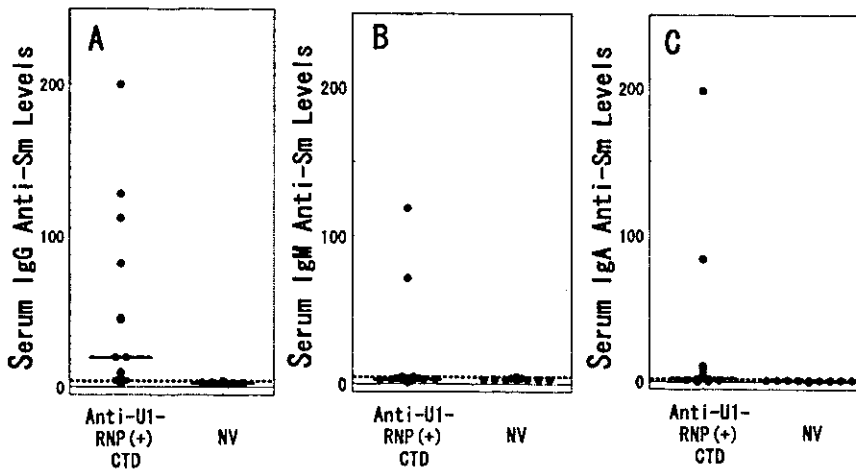


図2. 抗U1-RNP抗体陽性膠原病患者と正常人における血清中抗Sm抗体価

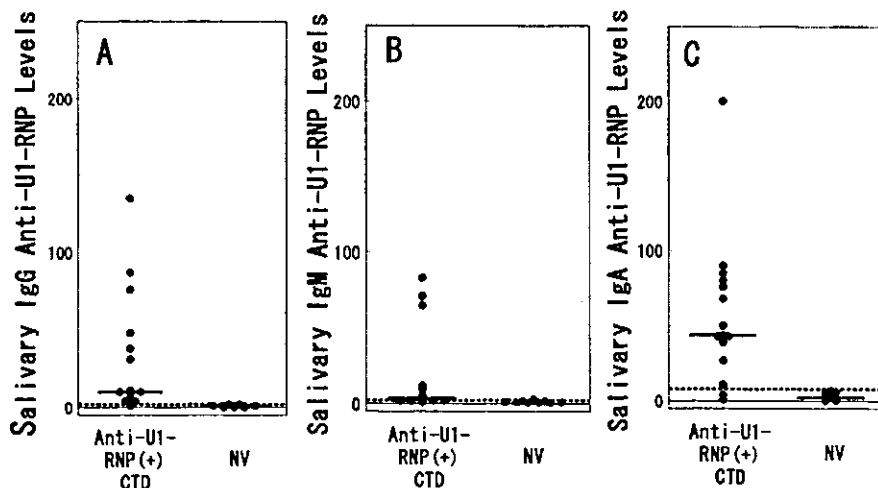


図3. 抗U1-RNP抗体陽性膠原病患者と正常人における唾液中抗U1-RNP抗体価

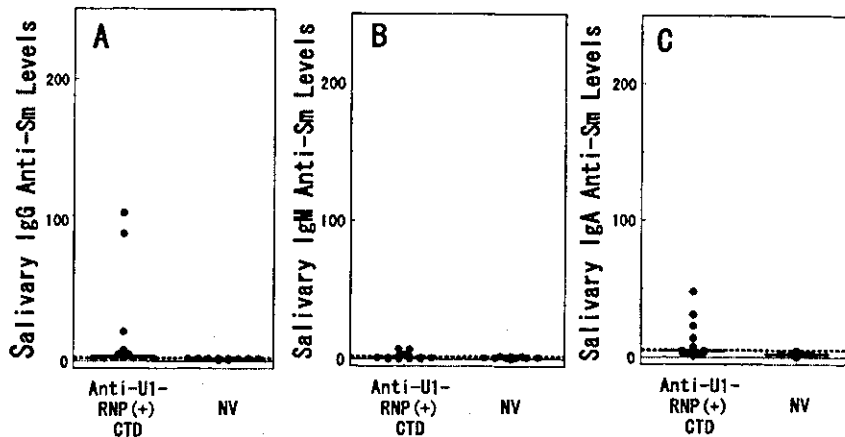


図4. 抗U1-RNP抗体陽性膠原病患者と正常人における唾液中抗Sm抗体価

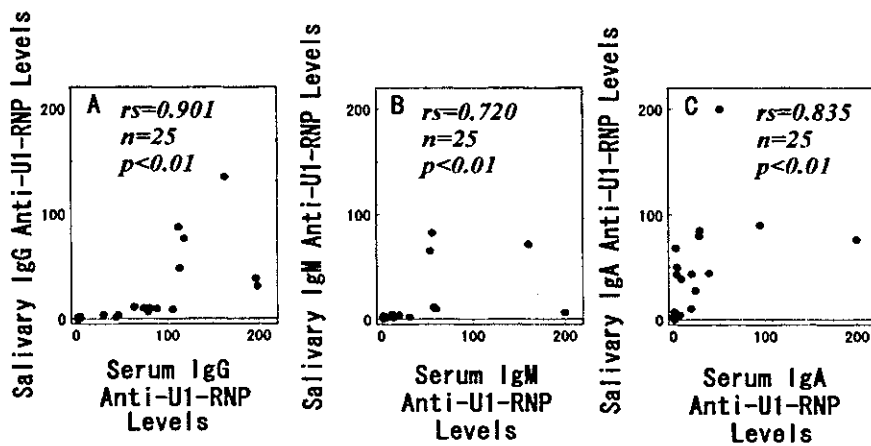


図5. 血清中と唾液中抗U1-RNP抗体価間の相関

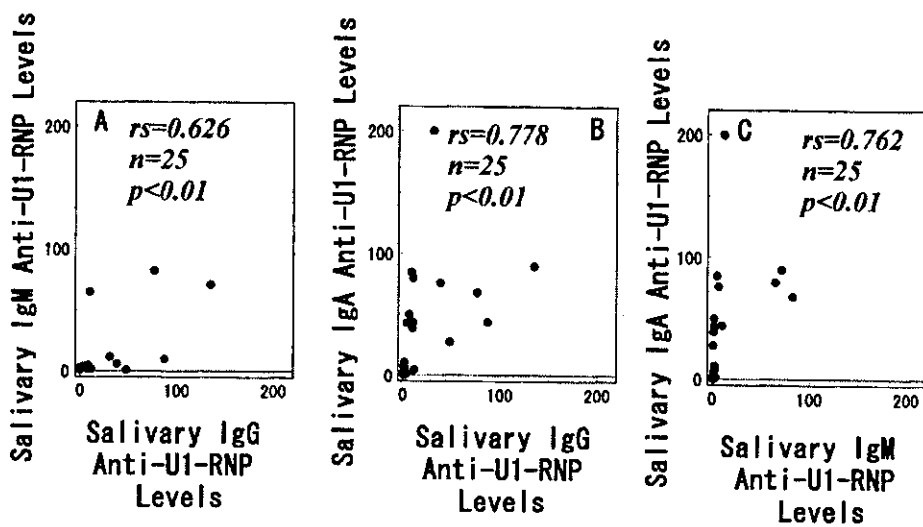


図6. 唾液中抗U1-RNP抗体価のIgG、IgM、IgAクラス間の相関

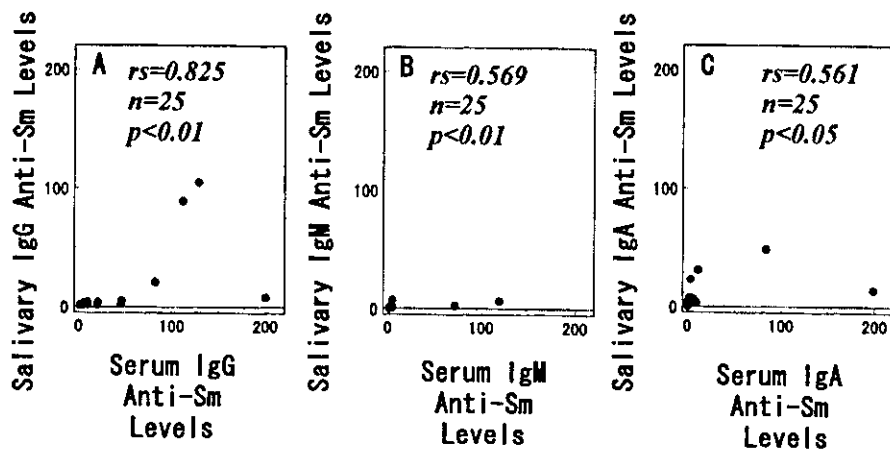


図7. 血清中と唾液中抗Sm抗体価間の相関

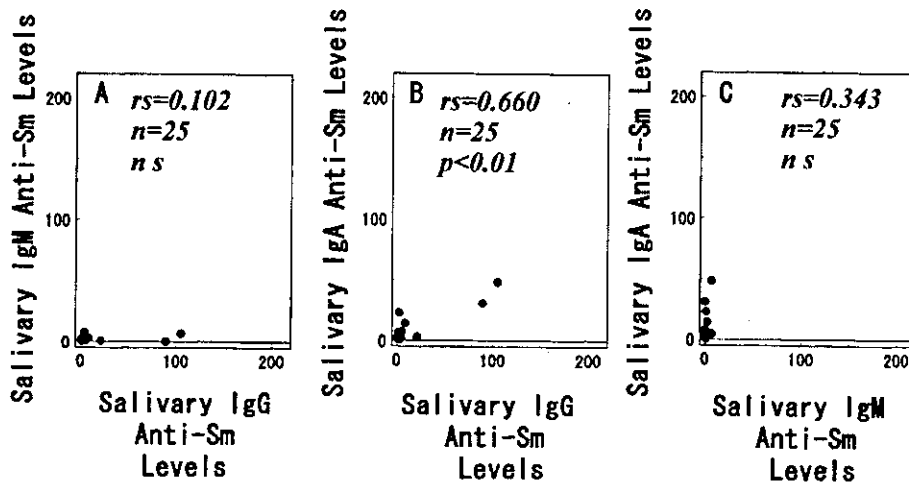


図8. 唾液中抗Sm抗体価のIgG、IgM、IgAクラス間の相関

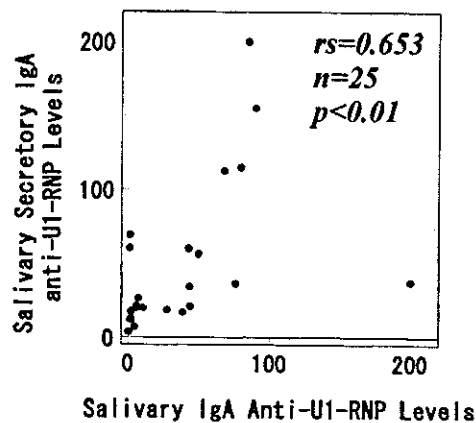


図9. 唾液中IgA抗U1-RNP抗体価と分泌型IgA抗U1-RNP抗体価間の相関

**DETECTION OF ISOTYPE-SPECIFIC AUTOANTIBODIES AGAINST
U1-RIBONUCLEOPROTEIN IN SALIVA OF CONNECTIVE TISSUE DISEASE
PATIENTS WITH SERUM AUTOANTIBODIES AGAINST
U1-RIBONUCLEOPROTEIN**

Shinichi Aotsuka and Masako Okawa-Takatsuji

Division of Clinical Immunology, Clinical Research Institute,
International Medical Center of Japan

The purpose of this study was to assess the frequency and the possibility of local production of autoantibodies against U1-ribonucleoprotein (U1-RNP). Serum and saliva samples were obtained from patients with connective tissue diseases (CTDs) and serum autoantibodies against U1-RNP, and 10 healthy volunteers. There were 15 CTD patients (6 systemic lupus erythematosus, 5 primary Sjögren's syndrome, 3 mixed connective tissue disease and 1 systemic sclerosis). All CTD patients included in this study were complicated with Sjögren's syndrome. Autoantibodies were detected using enzyme-linked immunosorbent assay. The frequencies of anti-U1-RNP antibody in IgG, IgM and IgA isotypes in serum were 100%, 80%, and 100%, respectively. The corresponding frequencies for those in saliva from CTD patients were 93%, 67%, and 87%, respectively. Significant correlations were found between serum and salivary levels of anti-U1-RNP antibodies in IgG, IgM, and IgA isotypes ($p < 0.01$, $p < 0.01$, and $p < 0.01$, respectively). Moreover, the scattergram revealed that anti-U1-RNP antibodies in IgA isotype were predominant in saliva by comparison with sera. IgA anti-U1-RNP antibodies accompanying secretory component were found to be present in saliva from CTD patients. This further suggests the local production of these antibodies and indicates some pathogenetic roles in sicca syndrome found in these CTD patients.

抗血管内皮細胞抗体(AECA)による血管内皮細胞(EC)活性化機序の検討

分担研究者：吉尾 卓 自治医科大学アレルギー膠原病学部門助教授

研究協力者：岡本 完 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター

研究協力者：奈良浩之、釜田康行、大久保光、簗田清次 自治医科大学アレルギー膠原病学部門

研究要旨

AECAがEC活性化(ECからのIL-6、IL-8産生、EC表面上の接着分子発現、及び白血球接着増強)することを見いだしている。今回、EC活性化がnuclear factor (NF)- κ B活性化によるものか否かを検討した。AECAモデルとしてマウスモノクローナル抗トロンボモジュリン(TM)抗体(MoaTM)をヒト臍帯静脈由来ECに反応させて、NF- κ B核移行を免疫染色で、inhibitory κ B(I κ B)崩壊を免疫プロットで検討した。TMの結合部位の異なる3種類のMoaTMは濃度依存性にNF- κ B核移行とI κ B崩壊を促進した。全身性エリテマトーデス由来の精製IgG抗リボソームP蛋白抗体(anti-P)がEC表面に結合し、EC活性化を誘導することを報告している。そのanti-PもECのNF- κ B核移行を促進した。MoaTMやanti-PのECとの反応の際、培養上清中にはIL-1 β 、TNF- α は検出されなかった。AECAとEC表面上の抗原との結合がIL-1、TNF- α などのNF- κ B活性化誘導因子を介さずに直接NF- κ Bの活性化を誘導し、それがEC活性化に繋がり、血管炎などの血管炎症や血管障害を引き起こしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々はAECAモデルとしてEC表面上に豊富に存在するTMに対するマウスモノクローナル抗トロンボモジュリン(TM)抗体(MoaTM)を用いて、EC活性化(ECからのIL-6、IL-8産生増強、EC表面上の接着分子発現増強)することを報告している¹⁾。更に最近、SLE症例由来の精製IgG抗リボソームP蛋白抗体(anti-P)がEC表面に結合し、同様のEC活性化を引き起こすことも報告している²⁾。今回、これらのEC活性化がNF- κ B活性化によるものか否かを検討した。

B. 研究方法

1. 抗体：MoaTMは以前報告した様にTM EGFドメインの異なる部位を認識する3種類のMMoaTMを用いた¹⁾。IgG anti-P陽性SLE症例血清より、以前報告した様にIgG anti-Pを精製した²⁾。

2. ECのNF- κ B核移行の検討：2継代目のヒト臍帯静脈由来ECを8ウエル collagen type I coated chamber slidesに 4×10^5 cells/wellずつ播種した。2

日間の培養で confluent で monolayer となった EC に、異なる濃度の MoaTM、mouse IgG1、IgG2a、精製IgG anti-P、正常人精製IgG、IL-1 β (5U[=17.9pg]/ml)及び培養液のみ(1% FCS 添加 M199 溶液)の各々を 600 μ l ずつウエルに添加し、37 $^{\circ}$ C 1時間培養した。その後の方法に関しては以前報告された様に行い³⁾、peroxidase発色染色キットを用いて、NF- κ B核移行陽性細胞を検出した。MoaTM、mouse IgG1、IgG2a、及び1% FCS 添加 M199 溶液に関しては各ウエルの異なる10領域の30細胞、計300細胞におけるNF- κ B核移行陽性細胞をカウントし、%陽性率として算出した。

3. inhibitory κ B (I κ B) 崩壊：I κ B α の崩壊をモニターするために、異なる濃度の MoaTM、mouse IgG1、IgG2a、IL-1 β (10ng/ml) 及び培養液のみをECに37 $^{\circ}$ C 30分間反応させた。その後の方法に関しては以前報告された様に行った⁴⁾。

4. ECからのIL-1 β 、TNF- α 分泌に及ぼす影響：以前報告したように¹⁾、confluentでmonolayerとなったECに異なる濃度のMoaTM、mouse IgG1、IgG2a、精

製IgG anti-P、正常人精製IgG (最大IgG濃度: 20 μ g/ml)、培養液のみを添加し、37°C、異なる時間で培養した。培養終了後、培養上清を回収し、培養上清中のIL-1 β 、TNF- α 濃度を各々のELISA kitを用いて測定した。

C. 研究結果

1. MoaTMによるECのNF- κ B核移行(図1.): 同じ実験を6回行い、6回の平均を示している。mouseIgG1、IgG2a(図での表示無し)はほとんどNF- κ B核移行を誘導せず、NF- κ B核移行率は培養液のみとほぼ同じであった。IL-1 β (5U/ml)によるNF- κ B核移行率は29.3 \pm 3.29%であった。3種類のMoaTMはmouseIgG1、IgG2aに比してより強くIgG濃度依存性にNF- κ B核移行を増加させた。

2. I κ B α 崩壊(図2.): IL-1 β (10ng/ml)はECのI κ B α 崩壊を促進し、I κ B α のバンドは消失した。3種類のMoaTMのI κ B α のバンドは培養液のみに比較してIgG濃度依存性に薄くなっていた。3種類のMoaTMがIgG濃度依存性にI κ B α 崩壊を促進させることが示唆された。mouse IgG1、IgG2aに関してはI κ B α 崩壊を促進しなかった(図での表示無し)。

3. MoaTMのECからのIL-1 β 、TNF- α 分泌に及ぼす影響: 3種類のMoaTM、精製IgG anti-Pは何れのIgG濃度に関しても24時間までの経時測定においてIL-1 β 、TNF- α を分泌しなかった(図での表示無し)。

4. SLE症例由来精製IgG anti-PによるECのNF- κ B核移行(図3.): SLE症例由来精製IgG anti-P (20 μ g/ml)、正常人精製IgG (20 μ g/ml)、IL-1 β (5U/ml)をMoaTMと同様にECに反応させて、NF- κ B核移行を検討したところ、IL-1 β 刺激ECと同様に精製IgG anti-Pは正常人精製IgGに比較してNF- κ B核移行陽性細胞を増加させた。他のSLE 3症例由来の精製IgG anti-Pも同様の結果を示した(図での表示無し)。

D. 考察

今回の検討ではMoaTMがECのI κ B崩壊とNF- κ B核移行を促進した。高安動脈炎及びSLE症例由来のモノクローナルAECAによるECのNF- κ B活性化はこれらのAECAによるECから分泌されたIL-1 β によるautocline効果が推測されている^{5,6)}。今回の検討ではIL-1 β やTNF- α を全然検出出来なかった。これらの作用はMoaTMによるTM EGFドメインの認識部位でほとんど差を認めなかった。MoaTMとEC表面上のTM

EGFドメインとの結合によるsignalingが直接I κ B崩壊を促進し、それが更にNF- κ B核移行につながった可能性が示唆された。TMレクチン様ドメインはNF- κ B活性化による好中球組織障害を抑制することが報告されている⁷⁾。MoaTMとEC表面上のTM EGFドメインとの結合はこの作用を減弱するのかもしれない。今回の検討ではIgG anti-PもNF- κ B核移行を促進することが示唆された。IgG anti-PもECからIL-1 β やTNF- α を分泌しなかった。これらの結果はAECAによるEC活性化はECからのIL-1 β やTNF- α 産生を介さずにAECAが直接NF- κ Bを活性化することにより引き起こされ、そのようなEC活性化が血管障害や血管炎に繋がる可能性が示唆された。

我々はrecombinantTM(rTM)を抗原としたELISAにてSLEやMCTDなどの膠原病症例血清中に抗TM抗体が存在することを報告している⁸⁾。更にこれらの血清からrTM-Sephalose HPカラムを用いて精製したIgG抗TM抗体が固相化したrTMに結合することを確認している(未発表)。更に最近、抗リン脂質抗体症候群(APS)症例に存在する抗cardiolipin(CL)抗体やNZB/WF1 mouse由来のモノクローナル抗CL抗体がTMに結合することが報告されている^{9,10)}。膠原病症例血清中のTMに反応する抗CL抗体の様な抗体が*in vivo*において豊富にTMを発現している肺動脈内¹¹⁾でTMに結合し、直接ECのNF- κ B活性化を促進することにより、凝固能促進だけではなくECの血管炎症も増強することが推測された。このような過程で肺動脈の血管内皮障害、血管炎が出現し、更に肺高血圧症の出現につながる可能性が示唆された。

E. 結論

AECAとEC表面上の抗原との結合がIL-1、TNF- α などのNF- κ B活性化誘導因子を介さずに直接NF- κ Bの活性化を誘導し、それがECの活性化に繋がり、血管炎などの血管炎症や血管障害を引き起こしている可能性が示唆された。

文献

1. 吉尾卓, 奈良浩之, 簗田清次: モノクローナル抗トロンボモジュリン抗体の血管内皮細胞に及ぼす影響。厚生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-混合性結合組織病の病態, 治療と抗U1RNP抗体に関する研究-平成12年度研究報告書 pp62-65, 2001.

2. 吉尾卓, 平田大介, 奈良浩之, 狩野庄吾, 箕田清次: 全身性エリテマトーデス (SLE) 由来抗リポソームP蛋白抗体 (anti-P) の抗血管内皮細胞抗体活性 (AECA). リウマチ43: 274, 2003.
3. Yoshida S, Katoh T, Tetsuka T, Uno K, Matsui N, Okamoto T. Involvement of thioresdoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF-alpha-induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts. J Immunol 163: 351-8, 1999.
4. Jiang X, Takahashi N, Matsui N, Tetsuka T, Okamoto T. The NF-kappa B activation in lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. J Biol Chem 278: 919-26, 2000.
5. Blank M, Krause I, Goldkorn T, Praprotnik S, Livneh A, Langevitz P, et al. Monoclonal anti-endothelial cell antibodies from a patient with Takayasu arteritis activate endothelial cells from large vessels. Arthritis Rheum 42: 1421-32, 1999.
6. Yazici ZA, Raschi E, Patel A, Testoni C, Borghi MO, Graham AM, et al. Human monoclonal anti-endothelial cell IgG-derived from a systemic lupus erythematosus patient binds and activates human endothelium in vitro. Int Immunol 13: 349-57, 2001.
7. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. J Exp Med 196: 565-77, 2002.
8. 吉尾卓, 奈良浩之, 金子尚子, 狩野庄吾, 箕田清次: 膠原病に伴う肺高血圧症例の抗トロンボモジュリン抗体, 抗アネキシンV抗体の検討. 厚生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-混合性結合組織病の病態, 治療と抗U1RNP抗体に関する研究-平成11年度研究報告書 pp40-4, 2000
9. Ruiz-Arguelles GJ, Ruiz-Arguelles A, Deleze M, Alarcon-Segovia D. Acquired protein C deficiency in a patient with primary antiphospholipid syndrome: relationship to reactivity of anticardiolipin antibody with thrombomodulin. J Rheumatol 16: 381-3, 1989.
10. Haruta K, Kobayashi S, Hirose S, Horiai A, Ohyanagi M, Tanaka M, et al. Monoclonal anti-cardiolipin antibodies from New Zealand black x New Zealand white F1 mice react to thrombomodulin. J Immunol 160: 253-8, 1998.
11. Maruyama I, Bell CE, Majerus PWJ. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. J Cell Biol 101: 363-71, 1985.

図1. 3種類のMoaTM、mouse IgG1、IL-1 β (5U/ml)及び培養液のみによる %NF- κ B核移行率(peroxidase免疫染色法)

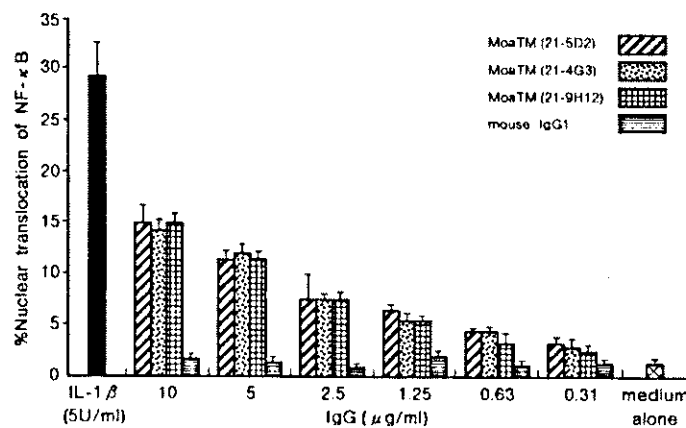


図2. 3種類のMoaTM、IL-1 β (20ng/ml) 及び培養液のみによるI κ B崩壊(免疫プロット)

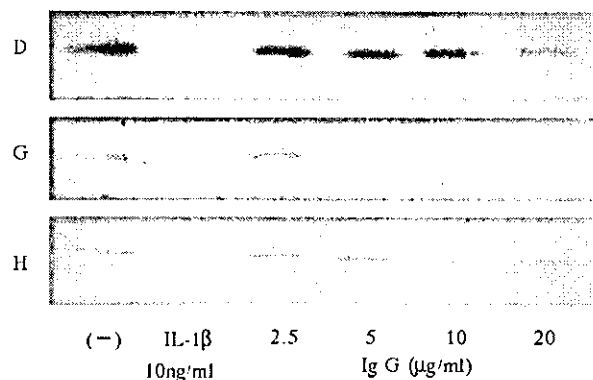
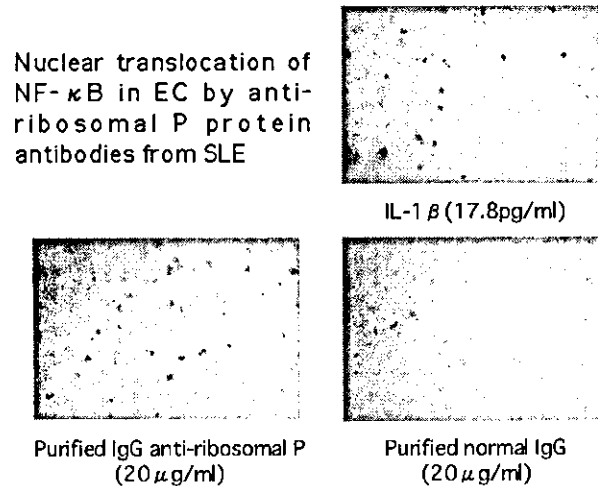


図 3. SLE 由来精製 IgG anti-P(20 μ g/ml)、IL-1 β (5U/ml)及び
 正常人精製 IgG (20 μ g/ml)による NF- κ B 核移行
 (peroxidase 免疫染色法)



ANTI-ENDOTHELIAL CELL ANTIBODIES ACTIVATE ENDOTHELIAL CELLS THROUGH NUCLEAR FACTOR-KAPPA B ACTIVATION IN VITRO

Taku Yoshio¹⁾, Hiroshi Okamoto²⁾, Hiroyuki Nara¹⁾, Yasuyuki Kamata¹⁾, Hikaru Okubo¹⁾, and Seiji Minota¹⁾

Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Jichi Medical School¹⁾
 The Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University²⁾

To clarify the mechanism of endothelial cell (EC) activation by antiendothelial cell antibodies (AECA), mouse monoclonal anti-human thrombomodulin (TM) antibodies (MoaTM), that react TM present on EC surface, and IgG anti-ribosomal P protein antibodies (anti-P), that were purified from sera of patients with systemic lupus erythematosus and react with EC surface, were used as AECA.

Three kinds of MoaTM, that react with different sites of TM EGF-like domain, were tested for their ability to stimulate the degradation of cytoplasmic inhibitory κ B ($I\kappa$ B), resulting in nuclear translocation of nuclear factor (NF)- κ B in EC. Purified IgG anti-P were also done for their ability to stimulate nuclear translocation of NF- κ B in EC. Recombinant human interleukin (IL)-1 β , mouse IgG1 and IgG2a, and IgG purified from normal controls were also, respectively, used as positive and negative control.

Three MoaTM stimulated nuclear translocation of NF- κ B in EC and the degradation of cytoplasmic $I\kappa$ B α with IgG-dose-dependence in the same way as IL-1 β . Mouse IgG1 and IgG2a did not have such effects. Purified IgG anti-P stimulated nuclear translocation of NF- κ B in EC in the same way as IL-1 β . IgG of normal controls did not have such effects. These antibodies did not release IL-1 β or tumor necrosis factor- α from EC.

These results suggest the possibility that AECA might bind to EC surface and activate EC by stimulation of nuclear translocation of NF- κ B through the degradation of cytoplasmic $I\kappa$ B. Such events on EC might lead to vascular inflammation and damage in patients with connective tissue diseases and vasculitis in which AECA are present.

Prostaglandin E₂ による Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) の発現制御に関する研究

分担研究者：北里英郎 北里大学医療衛生学部微生物学教授

研究協力者：村上洋介 北里大学医学部微生物学

研究協力者：遠藤平仁、近藤啓文 北里大学医学部内科学

研究協力者：林 泉 北里大学医学部薬理学

研究要旨

TREM-1は、好中球、Mφの細胞表面に発現するレセプターで、微生物感染によりその発現が誘導されることが明らかとなっている。また、TREM-1のアゴニストとなるモノクローナル抗体で細胞を刺激すると炎症性サイトカインを産生し、炎症の進展に重要な役割を果たしている。MCTDでは腫脹と疼痛を伴う関節炎が認められ、PGE₂は痛みを惹起することが知られている。しかし、PGE₂がTREM-1に及ぼす作用は明らかではない。そこでPGE₂によるTREM-1の作用を解析したところ、PGE₂はPBMCsやMφであるJ774.1のTREM-1発現を誘導した。また、EP2/4のアゴニストはJ774.1のTREM-1発現を誘導した。PGE₂で前培養したPBMCをTREM-1のアゴニスト抗体で刺激するとTNFαの産生が増強した。このことから、PGE₂がMφのTREM-1発現を誘導し、MCTDにおける関節炎の病態増悪に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

Triggering expressed on myeloid cells-1 (TREM-1)は、好中球、マクロファージの細胞表面に発現する分子量約30kDaのレセプターである¹⁾。TREM-1はImmunoglobulin super familyに属し、細菌や真菌感染においてlipoteichoic acidやlipopolysaccharide (LPS)などの微生物構成成分の刺激により発現が誘導される。生体内におけるTREM-1のリガンドは現在も不明である。しかし、TREM-1に対しアゴニストとして作用するモノクローナル抗体を作製すると、TREM-1と結合することにより、炎症性サイトカインやケモカイン、接着分子などの発現を増強し、多彩な炎症反応を引き起こすことが報告されている¹⁻³⁾。一方、微生物感染が認められない潰瘍性大腸炎や乾癬、免疫複合体による血管炎などの炎症性疾患では、TREM-1の発現がほとんど検出されない²⁾。また、微生物感染においては、好中球やマクロファージのTREM-1発現が亢進するだけでなく、可溶性のTREM-1が体液中に増加することが明らかにされた^{4,5)}。以上の結果は、血清や肺胞

洗浄液中における可溶性TREM-1の検出が微生物感染の有無を診断する指標として有用である可能性を示唆している。このように、TREM-1は微生物による炎症反応に重要な役割を果たしていることが報告されているが、微生物が関与しない炎症性疾患におけるTREM-1の発現とその意義は十分には検討されていない。混合性結合組織病 (MCTD) では、腫脹と疼痛を伴う関節炎が約7割の例で認められるが⁶⁾、関節炎の発症機序は明らかではない。MCTDの関節炎は関節リウマチ (RA) に比べて程度は軽いが、中にはRAと同様に高度の関節破壊を呈する例も認められる。これまでの報告で腫脹と疼痛には、Prostaglandin E₂ (PGE₂) の関与していることが明らかとなっている⁷⁾。しかし、PGE₂がTREM-1発現に及ぼす作用は明らかではない。そこで本研究では、PGE₂によるTREM-1発現に及ぼす作用について検討を行った。

B. 研究方法

健常人より分離した末梢血単核球 (PBMC) もしくは

マウスマクロファージ細胞 (J774.1) をPGE₂で刺激し、TREM-1およびTREM-1 spliced valiant (TREM-1sv) の発現を real-time PCR法で検討した。PGE₂ レセプターである EP レセプターの agonist (EP1-4) で J774.1 細胞を刺激し、TREM-1 の発現を解析した。また、cAMP の作用を検討するため、cAMP のアナログである 8-Br-cAMP で J774.1 を刺激し、TREM-1 の発現を検討した。さらに、PGE₂ による TREM-1 の発現誘導機序を解明するため、PKA inhibitor で培養した J774.1 を PGE₂ で刺激した、TREM-1 の発現に及ぼす PKA の作用を検討した。PGE₂ により誘導される TREM-1 が機能的に作用しているか検討するため、PGE₂ で PBMC を前培養した。この細胞を TREM-1 の agonist 抗体 (anti-TREM-1 mAb) でコートしたプレートで 24 時間培養し、培養上清中の TNF α 、IL-8 を ELISA で測定した。

C. 研究結果

種々の prostaglandin で PBMC を刺激すると、PGE₂ の刺激によって TREM-1 の発現が強く誘導された (図 1)。また、PGE₂ は J774.1 やヒト単球である U937 においても TREM-1 の発現を強く誘導した。J774.1 において、PGE₂ は刺激から 3 時間後に最も強く TREM-1 の発現を誘導し、その後 TREM-1 の発現は低下した。さらに、PGE₂ の濃度依存的に TREM-1 発現が誘導された (図 2B)。PGE₂ は EP1-4 のいずれかのレセプターを介して細胞に作用することが明らかとなっているため、EP1-4 の agonist で J774.1 をそれぞれ刺激したところ、EP2/4 agonist の刺激によって TREM-1 の発現が誘導された (図 3)。EP2/4 の活性化は細胞内の cAMP 濃度を上昇させ、増加した cAMP は PKA を活性化することが知られている。このため、8-Br-cAMP (cAMP のアナログ) で J774.1 を刺激したところ、TREM-1 の発現が誘導された (図 4)。また、PKA inhibitor である H89 で J774.1 を培養し、PGE₂ で刺激すると TREM-1 の発現は低下した。これらのことから、PGE₂ によって誘導される TREM-1 の発現機序は、EP2/4 を介して上昇した cAMP が PKA を活性化し、TREM-1 の発現を誘導する機序が明らかとなった。PGE₂ によって誘導される TREM-1 の生物活性を検討するため、PGE₂ で前処理した PBMC を anti-TREM-1 mAb で刺激すると、vehicle で処理した PBMC と比較して、TNF α 、IL-8 の産生が著明に誘導された (図 5)。また、LPS で刺激すると、vehicle もしくは PGE₂ 処理した PBMC における

TNF α 、IL-8 産生に大きな影響はなかった。つまり、このサイトカイン産生増強は PGE₂ によって直接誘導された結果ではなく、PGE₂ によって誘導された TREM-1 の作用によることが明らかとなった。

D. 考察

MCTD では患者の 7 割に細胞浸潤や腫脹、疼痛を伴う関節炎の発症が認められる⁶⁾。また、重篤な骨破壊や炎症細胞の浸潤が認められる RA も MCTD の病態を形成する一つの要素として考えられているが、これら関節炎の原因は現在も明らかではない。これまでに、PGE₂ は腫脹や疼痛に関与していることが示されている⁷⁾。また、関節炎では PGE₂ の産生が亢進しており、関節炎の病態形成の一端を担っていることが示唆されるが、その詳細な機序は明らかではない。TREM-1 は、微生物感染症においてその発現が誘導され、微生物感染において重要な役割を果たしていることが報告されている。リガンドは明らかとなっていないが、TREM-1 の agonist mAb と結合することにより、炎症性サイトカインの産生や細胞表面分子の発現増強など多彩な炎症反応を惹起する¹⁻³⁾。しかしながら、微生物が関与しない炎症性疾患における TREM-1 の解析は不十分で、その役割は明らかではない。また、TREM-1 発現に及ぼす PGE₂ の作用は検討されていないことから、我々は PGE₂ による TREM-1 発現に及ぼす作用を解析したところ、PGE₂ は PBMC をはじめとして様々な単球系細胞の TREM-1 の発現を強く誘導することが認められた。このことは、TREM-1 が微生物感染以外の炎症性疾患に関与していることを示唆するものと考えられる。さらに PGE₂ による発現誘導機序を解析したところ、PGE₂ は EP2/4 を介して cAMP 濃度を上昇させ、cAMP が PKA を活性化することで、TREM-1 の発現を制御していることが明らかとなった。さらに、PGE₂ によって誘導される TREM-1 は、agonist mAb と結合することにより、TNF α 、IL-8 の産生を著明に増強したことから、PGE₂ は機能的な TREM-1 の発現を誘導していることが明らかとなった。また、この結果は PGE₂ によって誘導される TREM-1 が炎症性サイトカインの産生を増強し、炎症反応の進展に関与していることが示唆された。

E. 結論

PGE₂ は TREM-1 の発現を誘導することで、炎症性サイトカイン産生を誘導し、炎症反応を進展させるこ

とが示唆された。このことはPGE₂による関節炎の進展機序の一端を説明する新たな知見と思われる。また、この実験事実は、TREM-1がMCTDの関節炎やRAにおける有用な標的治療分子となる可能性を示している。

文献

1. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 164;4991-5, 2000.
2. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature.* 410;1103-7, 2001.
3. Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, Sieling PA, Stenger S, Colonna M, Modlin RL. A role for triggering receptor
4. Gibot S, Cravoisy A, Levy B, Bene MC, Faure G, Bollaert PE. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N Engl J Med.* 350;451-8, 2004.
5. Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Cravoisy A, Levy B, Faure GC, Bollaert PE. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann Intern Med.* 141:9-15, 2004.
6. Bennett RM, O'Connell DJ. The arthritis of mixed connective tissue disease. *Ann Rheum Dis.* 37;397-403, 1978.
7. Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 966;343-54, 2002.

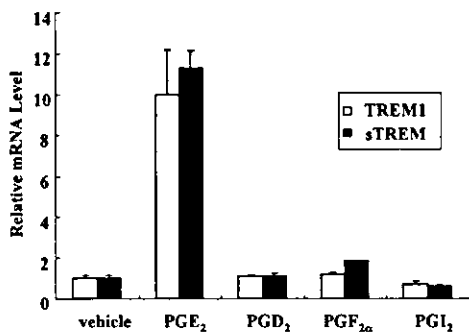


図1. TREM-1の発現に及ぼす Prostaglandinsの作用

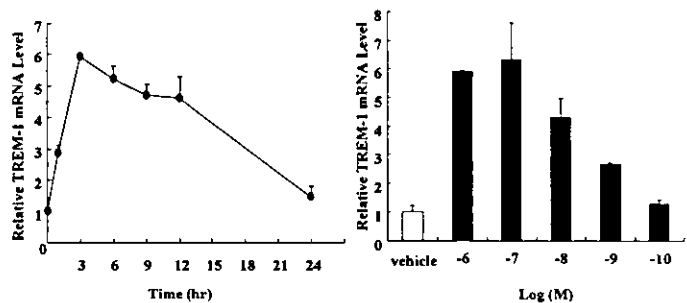


図2. PGE₂によるTREM-1の発現誘導

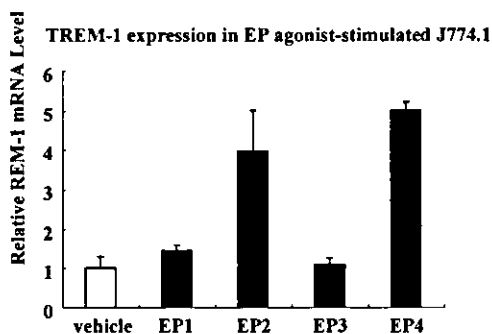


図3. EP agonistによるTREM-1の発現誘導

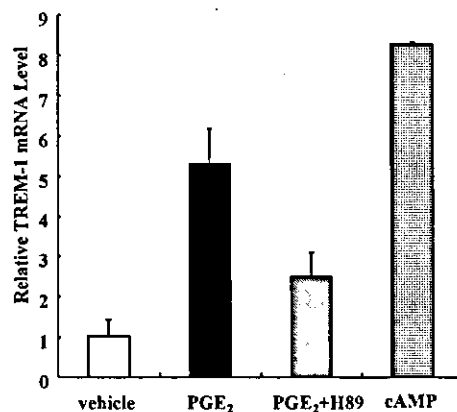


図4. TREM-1発現誘導機序における cAMPおよびPKAの役割

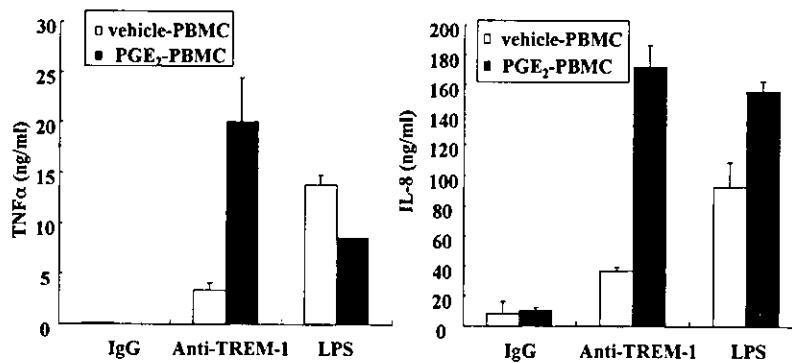


図5. PGE₂ 誘導 TREM-1 のサイトカイン産生に及ぼす影響

A ROLE OF TRIGGERING RECEPTOR EXPRESSED ON MYELOID CELLS-1 IN ARTICULAR INFLAMMAION WITH MCTD OR RA.

Hidero Kitasato⁴⁾, Yousuke Murakami¹⁾⁵⁾, Izumi Hayashi²⁾, Hirahito Endo³⁾, and Hirobumi Kondo³⁾

Departments of Microbiology¹⁾, Pharmacology²⁾, Internal Medicine³⁾, Kitasato University School of Medicine.

Department of Microbiology, Kitasato University School of Allied Health⁴⁾.

Japan Health Sciences Foundation⁵⁾

Prostaglandin E₂ (PGE₂) plays an important role in articular inflammation in patients with MCTD or rheumatoid arthritis (RA). Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) -1 is a recently discovered cell surface molecule that has been identified on monocytes. Although TREM-1 amplifies inflammatory responses, the role of PGE₂-mediated TREM-1 is poorly understood. Therefore, in this study, we examined biological role of PGE₂ focused on TREM-1 expression.

PBMCs or macrophage cell line, J774.1 cells cultured with presence or absence of various PGs, were subjected to the analysis of TREM-1 expression by quantitative real-time PCR. Similarly, J774.1 cells were cultured with EP-1 to -4 agonists and subjected to the analysis. In addition, in order to evaluate increased cAMP on TREM-1 expression, J774.1 cells were cultured with 8-br-cAMP, and subjected to the analysis. In order to evaluate biologic functions of PGE₂-induced TREM-1, PBMCs were pretreated with PGE₂, then incubated in the presence of anti-TREM-1 agonist mAbs, and those TNF α production were analyzed by ELISAs.

PGE₂ but not other PGs, including PGF₂ α, PGD₂, and PGI₂ significantly induced TREM-1 expression in PBMCs and J774.1 cells. EP2 or EP4 agonists were able to up-regulate the TREM-1 expression in J774.1 cells whereas EP1 and EP3 agonists were not. 8-Br-cAMP as well as PGE₂ dramatically induced mTREM-1 expression by J774.1 cells. In addition, TNF α production was significantly increased approximately 6-fold in PGE₂-pretreated PBMCs cultured with anti-TREM-1 agonist mAbs in comparison with the cells cultured with anti-TREM-1 alone.

These finding indicated that PGE₂ may contribute, at least in part, to amplify in articular inflammation in patients with MCTD or RA.