

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishio J, Suzuki M, Nanki T, Miyasaka N and Kohsaka H. Development of TCRB CDR3 length repertoire of human lymphocytes. *Int Immunol* 16(3), 423-431, 2004.

Liu T, Kohsaka H, Suzuki M, Takagi R, hashimoto K, Uemura Y, Ohyama H, and Matsushita S. Positional effect of amino acid replacement on peptide antigens for the increased IFN-g production from CD4 T cells. *Allergol Int* (in press)

2. 学会発表

・杉原毅彦、関根知世子、針谷正祥、松本 陽、宮坂信之、上阪 等：多発性筋炎のモデルマウスの作成。第 25 回日本炎症・再生医学会、東京、2004 年 7 月

・杉原毅彦、関根知世子、針谷正祥、神山邦子、松本陽、宮坂信之、上阪 等：多発性筋炎の新規モデルマウスの作成。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004 年 12 月

8 知的財産権の出願・取得状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

多発性硬化症における NKT 細胞の変調と病態への関与

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経家研究所 部長
研究協力者 三宅 幸子 同 室長
J. Ludovic Croxford 同 研究員

研究要旨

インバリエント TCR を発現する調節性細胞として、CD1d 拘束性 NKT 細胞の研究が進んでいるが、最近インバリエント AV19-AJ33 TCR アルファ鎖（ヒト V α 7.2-J α 33）を発現する T 細胞の存在が明らかにされ、“第二の NKT 細胞”として注目されている。我々はこれまでに、多発性硬化症（multiple sclerosis, MS）の脳脊髄液や剖検脳病変において、インバリエント V α 7.2-J α 33 TCR の発現が認められることを示し、自己免疫病態の一翼を担う重要な T 細胞である可能性を示唆した。本年度は、マウス AV19-AJ33 TCR アルファ鎖を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、MS の動物モデル EAE の発症が抑制されることを示した。トランスジェニックマウスでは、感作抗原 MOG に対する増殖反応は保たれていたが、Th2 偏倚の傾向が明らかであった。インバリエント AV19-AJ33T 細胞が粘膜免疫に限らず、自己免疫の制御においても重要な役割を果たす制御細胞であることが示唆された。

A.研究目的

インバリエント TCR を発現する調節性細胞として、CD1d 拘束性 NKT 細胞の研究が進んでいるが、最近インバリエント AV19-AJ33 TCR アルファ鎖（ヒト V α 7.2-J α 33）を発現する T 細胞の存在が注目されている。Lantz らは、同細胞が MHC クラス I 様抗原である MR1 分子に拘束されることや、消化管粘膜上皮に多いことを明らかにし、消化管免疫の制御に重要な役割を果たす可能性を示唆した（*Nature* 422: 164, 2003）。また、島村道夫らは、この細胞が CD1d ノックアウトマウス由来の NK 陽性 T 細胞ハイブリドーマの半数程度を占めることを示し、第二の NKT 細胞集団として把握すべきことを示唆している。我々は、多発性硬化症（multiple sclerosis, MS）の脳脊髄液や剖検脳病変において、インバリエント V α 7.2-J α 33 TCR の発現が認められることを示し、自己免疫病態の一翼を担う重要な T 細胞である可能性を示唆した（Illes et al. *Int. Immunol.* 16: 223-230, 2004）。しかし、MR1 拘束性 T 細胞が、免疫病態にどのように関与するかは、明らかになっていない。本研究では、島村によって作製された AV19-AJ33 アルファ TCR トランスジェニックマウス、および Gilfillan による MR1 ノックアウトマウスを利用し、EAE の誘導における MR1 拘束性 T 細胞の役割を検討する。

B.研究方法

島村博士より、B6 背景の AV19-AJ33 トランスジェニックマウスおよび CD1d KO 背景の同トランスジェニックマウスの提供を受け、コロニーとして確立した。B6 背景の MR1 ノックアウトは、Gilfillan 博士より入手した。EAE は完全フロイント・アジュバントと混和した MOG35-55 ペプチドの接種により、常法のごとく誘導した。感作後 10 日目の所属リンパ節細胞を調製し、MOG35-55 ペプチドで刺激し、Thymidine の取込みにより細胞増殖反応を測定した。また、培養上清中のサイトカイン濃度を、ELISA および CBA 法により測定した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、国立精神・神経センターの動物実験倫理規定に則り、あらかじめ動物実験委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

1) 定量的 PCR 法により、肝臓および脾臓におけるインバリエント TCR mRNA の発現を測定し、TCR トランスジェニックマウスにおけるインバリエント TCR の過剰発現を確認した。2) つぎに EAE の誘導実験を行った。その結果、野生型 B6 マウスおよび B6 littermate

では、それぞれ全例 (10/10) で EAE 発症を見た (ピーク時の EAE スコア 3.0) が、一方、B6 背景のトランスジェニックマウスでは発症は 13 例中 10 例にとどまり、ピーク時の EAE スコアは約 1.0 と、EAE の抑制が見られた。また、CD1d 拘束性 NKT 細胞を欠損する CD1d 欠損マウスにおいても、ほぼ同様の結果 (TCR トランスジェニックにおける EAE 抑制) が得られた。3) 感作リンパ球の MOG35-55 ペプチドに対する増殖反応については、トランスジェニックマウスと対照マウスで差が見られず、トランスジェニックマウスにおける EAE の抑制は、感作 T 細胞の誘導の抑制によるものではないと理解した。4) 培養上清中のサイトカイン濃度については、トランスジェニックマウスにおける炎症性サイトカイン (IFN- γ 、IL-2 および TNF- α) 産生の有意の抑制が見られた。

D. 考察

Lantz らは、MR1 拘束性 T 細胞の解剖学的な偏在より、mucosal associated invariant T cells (MAIT) と呼称することを提唱している。しかし、我々は、粘膜免疫に関係なく、より広い領域で免疫制御を担当する細胞であると推測してきた。今回の一連の結果から、MR1 拘束性 T 細胞が Th1 細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制し、EAE を制御することが明らかになった。

E. 結論

Th1 細胞の介在する自己免疫疾患 EAE において、インバリアント AV19-AJ33T 細胞が制御細胞として働くことが示された。同細胞が粘膜免疫に限らず、自己免疫の制御においても重要な役割を果たすことが支持される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文原著

Oki, S., A. Chiba, T. Yamamura and S. Miyake: The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J. Clin. Invest.* 113:

1631-1640, 2004

Satoh, J-i., T. Yamamura, and K. Arima: The 14-3-3 protein ϵ isoform, expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis, binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. *Am. J. Pathol.* 165: 577-592, 2004

Rosen, D.B., M. Araki, J.A. Hamerman, T. Chen, T. Yamamura and L.L. Lanier: A structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *J. Immunol.* 173: 2470-2478, 2004

Takahashi, K., T. Aranami, M. Endoh, S. Miyake, and T. Yamamura: The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 127: 1917-1927, 2004

Nakai, Y., K. Iwabuchi, S. Fujii, N. Ishimori, N. Dashtsoodol, K. Watano, T. Mishima, C. Iwabuchi, S. Tanaka, J.S. Bezbradica, T. Nakayama, M. Taniguchi, S. Miyake, T. Yamamura, A. Kitabatake, S. Joyce, L. Van Kaer, and K. Onoe: Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood* 104: 2051-2059, 2004

Mizuno, M., M. Masumura, C. Tomi, A. Chiba, S. Oki, T. Yamamura and S. Miyake: Synthetic glycolipid OCH prevents insulinitis and diabetes in NOD mice. *J. Autoimmun.* 23:293-300, 2004

Hashimoto, D., S. Asakura, S. Miyake, T. Yamamura, L. Van Kaer, C. Liu, M. Tanimoto, and T. Teshima: Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J. Immunol.* 174: 551-556, 2005

Ueno, Y., S. Tanaka, M. Sumii, S. Miyake, S. Tazuma, M. Taniguchi, T. Yamamura and K. Chayama: Single dose of OCH improves mucosal T helper type 1/T helper type 2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of V α 14 natural killer T cells in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 11:35-41, 2005

Yu, K.O.A., J.S. Im, A. Molano, Y. Dutronc, P.A. Illarionov, C. Forestier, N. Fujiwara, I. Arias, S. Miyake, T. Yamamura, Y-T. Chang, G.S. Besra, and S.A. Porcelli: Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of α -galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3383-3388, 2005

Satoh, J-i., M. Nakanishi, F. Koike, S. Miyake, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kukuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Kanda, T. Fukazawa and T. Yamamura: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol. Dis.* (in press)

Ota, T., K. Takeda, H. Akiba, Y. Hayakawa, K. Ogasawara, Y. Ikarashi, S. Miyake, H. Wakasugi, T. Yamamura, M. Kronenberg, D.H. Raulet, K. Kinoshita, H. Yagita, M.J. Smyth, and K. Okumura: IFN- γ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. *Blood* (in press)

Chiba, A., S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura and S. Miyake: The involvement of V α 14 NKT cells in the pathogenesis of murine models of arthritis. *Arthr. Rheumat.* (in press)

和文原著

荒木 学、三宅幸子、山村 隆：多発性硬化症におけるNKT細胞減少は長期ステロイド治療により補正される。神経免疫学 12:175-179, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願なし。

MRL/Mp-Fas^{lpr} マウスにおける自己反応性 Th1 細胞ワクチネーションに関する研究
-膠原病患者血清中における抗自己反応性 T細胞レセプター抗体の測定-

分担研究者 三森 経世

協力研究者 藤井 隆夫

研究施設 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

われわれは本研究班で、SLE のモデル動物である MRL/Mp-Fas^{lpr} (MRL/lpr) マウスにおける自己反応性 Th1 クローンを用いた T細胞ワクチネーションの有効性を検討してきた。昨年までに抗 dsDNA 抗体産生とループス腎炎発症に関与する自己反応性 CD4⁺αβTh1 クローン (dna51) のワクチネーションにより MRL/lpr マウスのループス腎炎が軽症化し、抗 dsDNA 抗体の上昇が抑制されることを報告したが、その免疫調節機序のひとつとしてワクチン細胞に対する抗体 (抗イディオタイプ抗体) の誘導を確認した。なおこの抗イディオタイプ抗体は dna51 の T細胞レセプター-CDR3 (TCR-CDR3) と反応し、クローン dna51 を特異的に認識していた。また抗 dna51 TCR-CDR3 抗体は、抗原提示細胞の存在下で dna51 の増殖を抑制し、自己反応性 T細胞抑制性であった。この抗 dna51 TCR-CDR3 抗体は、健康人や関節リウマチ患者に比し膠原病 (全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎) 患者で陽性率が高く、さらに SLE 患者の 44% (16 例中 7 例) ではその抗体価が抗 DNA 抗体価や SLEDAI と負の相関を示した。今後このような抑制性自己抗体が自己免疫疾患に与える影響を検討する必要がある。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (以下 SLE) は、種々の抗核抗体の産生とループス腎炎や血管炎など免疫複合体による病態を特徴とする。Ben-Nun と Cohen らは myelin basic protein (MBP) 特異的な T細胞株を放射線照射やマイトマイシン処理して不活化した後、マウスに投与しておくと、その後 MBP 感作で誘導される実験自己免疫性脳髄膜炎 (EAE) の発症が抑制されることを見だし、T細胞ワクチネーションとして報告した。現在までループスモデルマウスにおける非特異的 T細胞を用いたワクチネーションの報告はあるが、EAE のように自己抗原反応性のクローンを用いたワクチネーションの検討はない。

われわれは本研究班で、放射線照射したループ

ス自己抗原反応性 T細胞ワクチネーションにより、MRL/lpr マウスにおけるループス腎炎治療の可能性を示してきた。さらにその免疫調節機序として 1) ワクチン細胞に対する抑制抗体 (抗 dna51 TCR-CDR3 抗体) の誘導、2) ワクチン細胞がヘルプする B細胞数の減少、さらに 3) ワクチン細胞傷害性 T細胞の誘導を報告した。本研究の最終目的はこのような自己免疫反応の制御システムを膠原病患者において誘導することである。そこで本年度は抗 dna51 TCR-CDR3 抗体が膠原病患者、特に全身性エリテマトーデス (SLE) 患者で認められるか否かを確認した。

B. 研究方法

SLE 58 例、SSc (強皮症) 37 例、PM/DM (多発性筋炎/皮膚筋炎) 41 例、MCTD (混合性結

合組織病) 14 例、RA (関節リウマチ) 31 例を対象とした。また健常人 14 例をコントロールとした。血清は 100 倍希釈し、MRL/*lpr* マウス自己反応性 Th1 クローン dna51 の TCR-CDR3 の合成ペプチド (dna51 TCR-CDR3) を固相化した ELISA で抗ペプチド抗体を測定した。

また SLEDAI が異なる時期の少なくとも 2 血清が保存されていた患者については、抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価と抗 dsDNA 抗体価あるいは SLEDAI との相関を調べた。なお抗 dna51 TCR-CDR3 抗体および抗 dsDNA 抗体は、高力価陽性血清を用いて標準化した。

(倫理面への配慮)

患者血清においては、自己免疫に関連する抗体の分析に用いることを了承された患者血清のみを使用した。

C. 研究結果

全身性リウマチ性疾患患者血清中における抗 dna51 TCR-CDR3 抗体を測定したところ、健常人、RA、MCTD 患者に比し SLE、SSc、PM/DM 患者では有意に高力価であったが MCTD と RA では差を認めなかった (図 1)。また健常人の平均値+2SD をカットオフ値とした場合、SLE (66%)、SSc (46%)、PM/DM (49%) で高頻度に認められ、RA (19%) と MCTD (14%) に比し有意差を認めた。すべての SLE 患者検体について抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価と抗 dsDNA 抗体価との関連を調べたが有意な正または負の有意な相関は認めなかった。

なお経時的に血清を採取できた SLE 患者 16 例のうち 7 例 (44%) で抗 dsDNA 抗体価と抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価が負の相関を示した (図 2)。

D. 考察

われわれは本研究の前に、*in vitro* で抗 DNA 抗体の産生を刺激し TCR β 鎖に陰性荷電アミノ酸を含む CD4⁺V β 8.3⁺Th1 クローン dna51 を MRL/*lpr* マウス脾細胞から分離し、それを放射線照射のち移入することで (移入クローンを i-dna51 と命名した) MRL/*lpr* マウスにおける血清中抗 DNA 抗体価の上昇が抑制され、腎障害 (免疫複合体性糸球体腎炎) が軽症化することを示してきた。またその免疫調節機序に移入クローン dna51 と同じ表面マーカーを有する CD4⁺V β 8.3⁺T 細胞と B 細胞数の減少が関与していることを示した。昨年度の本研究班において、移入クローン dna51 の CDR3 のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体 (自己抗体) である抗 dna51 TCR-CDR3 抗体が誘導されることを見だし、それが APC 存在下における dna51 の増殖を阻害する抑制性の抗体であることを示した。さらに本年度、同抗体がヒト全身性リウマチ性疾患患者血清中にも認められ、特に SLE、SSc、PM/DM で高頻度であることを示した。以前より、健常人血清中には TCR β 鎖の一部に対する自己抗体が存在し、その抗体は SLE や RA 患者においてより高力価であることが報告されている。しかしそれらの抗体が反応する詳細な部位については不明で、その抗体の機能についても解明されていない。今回認められた抗 dna51 TCR-CDR3 抗体が陽性者において免疫調節性の効果を有しているのかを調べる必要がある。

興味深いことに、一部の SLE 患者において抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価が、抗 dna51 抗体価および SLEDAI と逆相関していた。臓器特異的自己免疫疾患である重症筋無力症患者で、HLA-DR3 をもち病因的な抗アセチルコリンレセプター抗体 (抗 AchR 抗体) の産生に関与する V β 5.1 陽性 T 細胞に対する抗体を有する場合にはその疾患重症度が低下すると報告されている。抗 dna51 TCR-CDR3 抗体が SLE において同様のマーカー抗体になるかは今後検討が必要である。そのためにはまず、ヒト膠原病患者 (特に

SLE)において、dna51と同様の細胞が存在し、疾患活動性と相関してその活性化が認められるか、また *in vitro* において患者血清中に認められた同抗体が自己反応性 T 細胞傷害性を有するかを確認することが必須である。

E. 結論

MRL/*lpr* マウスで認められた自己反応性 T 細胞抑制性の自己抗体が膠原病患者血清でも認められた。

F. 研究発表

- 1) Kaneko Y, Hirakata M, Suwa A, Satoh S, Nojima T, Ikeda Y, Mimori T: Systemic lupus erythematosus associated with recurrent lupus enteritis and peritonitis. *Clin Rheumatol* 23: 351-354, 2004.
- 2) Miyachi K, Hirano Y, Horigome T, Mimori T, Miyakawa H, Onozuka Y, Shibata M, Hirakata M, Suwa A, Hosaka H, Matsushima S, Komatsu T, Matsushima H, Hankins RW, Fritzler MJ: Autoantibodies from primary biliary cirrhosis patients with anti-p95c antibodies bind to

recombinant p97/VCP and inhibit *in vitro* nuclear envelope assembly. *Clin Exp Immunol* 136(3):568-573, 2004.

- 3) Furuya T, Hakoda M, Tsuchiya N, Kotake S, Ichikawa N, Nanke Y, Nakajima A, Takeuchi M, Nishinarita M, Kondo H, Kawasaki A, Kobayashi S, Mimori T, Tokunaga K, Kamatani N: Immunogenetic features in 120 Japanese patients with idiopathic inflammatory myopathy. *J Rheumatol* 31(9):1768-74, 2004.

- 4) Kawabata D, Tanaka M, Fujii T, Umehara H, Fujita Y, Yoshifuji H, Ozaki S, Mimori T: Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36/FSTL1 on joint inflammation in a mouse model of arthritis. *Arthritis Rheum* 50(2):660-668, 2004.

G. 知的所有権の出願・取得状況
なし

図 1. 全身性リウマチ性疾患患者血清中の抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価 (上)

抗 dna51 TCR-CDR3 抗体は、健常人、MCTD、RA 患者に比し、SLE、SSc、PM/DM 患者血清中で高力価であった。ただし SLE と SSc あるいは PM/DM とで有意差は認めなかった。かっこ内は症例数を示す。* $P < 0.001$

図 2. 抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価と抗 dsDNA 抗体価あるいは SLEDAI との相関 (下)

16 例の SLE 患者のうち、7 例 (44%) で抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価と抗 dsDNA 抗体価が負の相関を示した。またそれらの患者では抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価が高力価になるとともに SLEDAI は低下していた。代表 2 例を図に示す。しかし一方で他の 5 例 (31%) では抗 dna51 TCR-CDR3 抗体価と抗 dsDNA 抗体価は正の相関を示し、4 例 (25%) では相関はなかった。

図 1

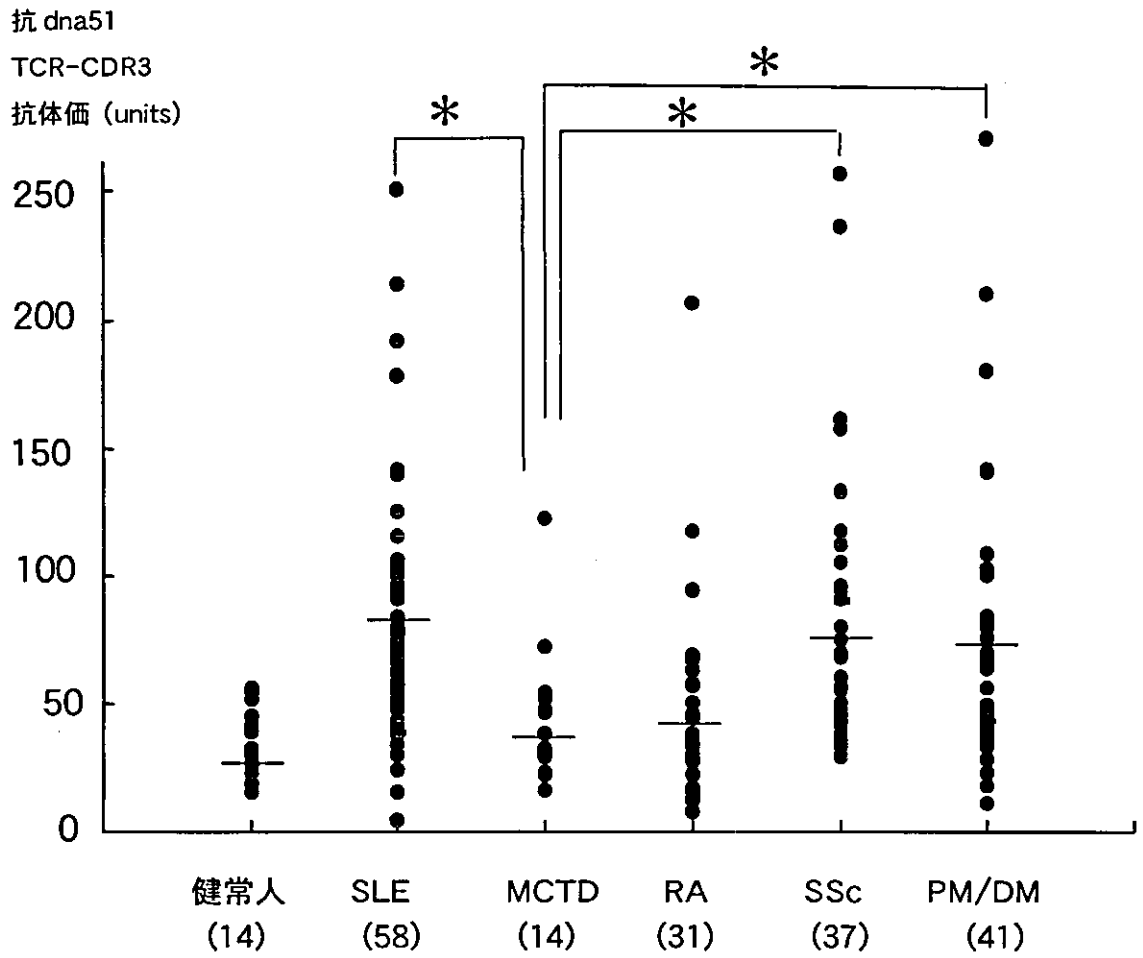
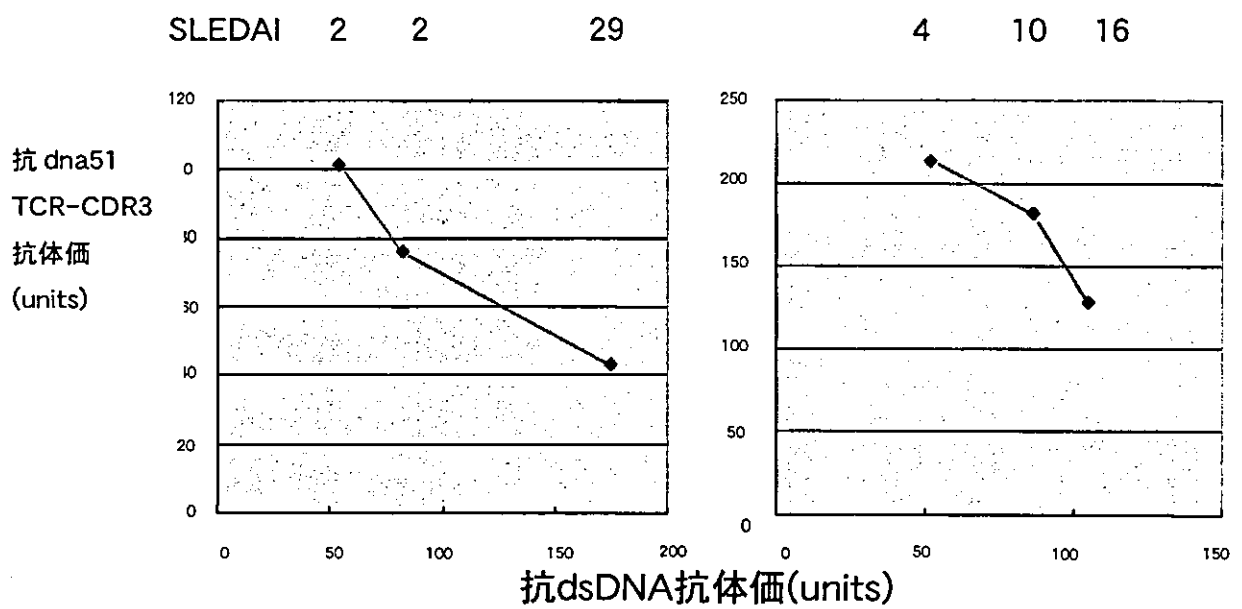


図 2



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

G P I と自己抗体制御に関する研究

分担研究者 松本 功（筑波大学 講師）

研究要旨

関節リウマチの病因については未だ不明な点が多いが、解糖系酵素G P Iに対する抗体が単独で関節炎を誘導できることがマウスで明らかになっている。我々は日本人RA患者において抗G P I抗体を保持する患者が多いことを明らかにしてきたが、これらヒトG P I抗体の関節炎源性の有無を明らかにし、抗体依存性の関節炎のメカニズムについて探求していく。また抗G P I抗体などを保持する自己免疫疾患患者の免疫系を他の動物の生体内で制御調整することにより、新規治療法の開発をめざす。

A.研究目的

関節リウマチ (RA) は発症頻度が高い自己免疫疾患であるが、その病因については未だ不明な点が多い。我々は解糖系酵素 glucose-6-phosphate isomerase (G P I) に対する免疫応答が単独で関節炎を惹起することを明らかにしてきた。また、このG P I抗体が何故関節炎だけを引き起こすのかについても我々は明らかにしており、抗原の関節軟骨表面での強発現がヒトでも重要であることが判明している。RA患者でこの抗体が高頻度で認められることはすでに報告されているが、ヒトリコンビナントG P I蛋白を用いて行った我々の研究では、Schallerらが報告した頻度よりは低い、関節炎患者に多く発現しており、日本でも十数名の抗G P I抗体強陽性者を確認している。そこでRA患者におけるG P I抗体誘導性関節炎の探索と、その制御機構の解明を目的として研究を進める。本研究では、1) ヒト抗G P I抗体とFcγレセプターの遺伝子多系との関係 2) GPI免疫にて誘導されるマウス関節炎のメカニズム解析とヒトへの応用を目的とする。

B.研究方法

1) ヒトでアフィニティーの変化が起こるポリモルフィズムがすでに同定されている2つの刺激性Fcγレセプター (FcγRIIIa-158V/F, FcγRIIa-131H/R) に注目し、そのポリモルフィズムをRFLP法を用いて比較検討した。対象として172人のRA (うち19人が抗G P I抗体陽性)、145人のHS (うち7人が抗G P I抗体陽性) のゲノム解析をおこなった。
2) DBA/1マウスに300μgのリコンビナントヒトGPI-GST融合抗原を免疫し、対照として100μgのGST蛋白を免疫したDBA/1マウス、及び強化アジュバントで同量のGPI免疫をしたC57/BL6マウスを用いて関節炎の発症検討を行った。また組織学的に関節、脾臓、肺、腎、顎下腺について比較検討した。抗GPI抗

体価についても解析を行った。3) GPI免疫マウスの脾臓とコントロールマウスの脾臓を用いて、アフィニティメトリクス社のGeneChipで比較解析した。

(倫理面への配慮)

動物内にヒトの血球を投与する際、感染症のチェック (HBs抗原、HCV抗体、HTLV-I抗体、ワ氏) をしている。また、被験者の血球成分などを動物に投与するという作業に懸念をもつ方がいる可能性があるが、十分な説明と、有効な治療法の開発を副作用なく検討できる旨説明し、納得していただけるよう配慮する。筑波大学の医の倫理特別委員会はすでに承認済みであり、研究の説明文、同意書を渡し同意を得ている。

C.研究結果

1) 抗GPI抗体陽性HSでは7人すべてがアフィニティーの弱い158Fのホモであった。一方、抗GPI抗体陽性RA患者では158Vを持つ患者が6割であり、有意差をもって検定された ($p=0.0298$)。一方抗GPI抗体陰性群のRA,HSの比較では差が認められなかった。2) GPIを免疫したDBA/1マウスではわずか7日目で関節炎が誘導された。しかし、GSTを免疫したDBA/1マウス、及び強化アジュバントを用いてGPI免疫を行ったマウスでは関節の変化はまったく認められなかった。GPI免疫マウスの5週後の腎、肺などの臓器解析においては明らかな異常が認められず、血管炎の所見も認められなかった。3) GPI免疫マウスの脾臓において強発現する遺伝子がいくつか同定され、その中にマウスFcγRIIIやPADI4などが候補遺伝子として含まれていた。

D.考察 E.結論

日本人においてFcγRIIIa-158Fは関節炎原生抗体の防御因子である可能性が示唆された。また、ヒトGPIを免疫して誘導される関節炎モデルが明らかにされ、そのモデルにおいてもFcγRIIIの発現異常が認められることより、FcγRIII分子の制御

による関節炎の病態修飾の可能性が示唆された。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Murata H, Adachi Y, Ebisuka T, Chino Y, Takahashi R, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Akaza H, Sumida T. Reiter's syndrome following intravesical Bacille bilie de Calmette-Guerin treatment for superficial bladder carcinoma. Report of six cases *Mod. Rheumatol.* 2004; 14: 82-86.
2. Muraki Y, Tsutsumi A, Takahashi R, Suzuki E, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, Sumida T. Polymorphisms of IL-1b gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 2004; 31: 720-725.
3. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Wakamiya N, and Sumida T. Anti-mannose binding lection antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin.Exp.Immunol.* 2004; 136: 585-590.
4. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Muraki Y, Goto D, Matsumoto I, Wakamiya N, and Sumida T. Association of mannose-binding lection(MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis* 2005; 64:311-314.
5. Tsutsumi A, Suzuki E, Adachi Y, Murata H, Goto D, Kojo S, Matsumoto I, Zhong L, Nakamura H, and Sumida T. Expression of tristetraprolin (GOS24) mRNA, a regulator of tumor necrosis factor-a production, in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2004; 31: 1044-1049.
6. Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, Goto D, Sugiyama T, Matsumura R, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Muscariinic acetylcholine receptor auto antibodies in patients with Sjogren's Syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 2005;64:510-511.
7. Muraki Y, Matsumoto I, Chino Y, Hayashi T, Suzuki E, Goto D, Ito S, Murata H, Tsutsumi A, Sumida T. Glucose-6-phosphate isomerase variants play a key role in the generation of anti-GPI antibodies. Possible mechanism of autoantibody production. *Biochem. Biophys. Research. Commun.* 2004; 323:518-522.
8. Tomoo T, Tsutsumi A, Yasukochi T, Ikeda T, Ochiai N, Ozawa K, Shibana Y, Ito S, Matsumoto I, Goto D, Sumida T. Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis-coupled subtractive hybridization technique. *Int. J. Mol. Med.* 2005;15:453-457.
9. 松本功 肥満細胞—自己抗体と関節炎のつなぎ役 臨床免疫 2003; 598-603.
10. 松本功 関節炎の動物モデルとヒトの関節リウマチ *Pharma Medica* 2003; 21(12): 15-17.
11. 松本功 抗 GPI 抗体による関節炎発症機構 カレントセラピー2003; 22(1): 72-75.
12. 松本功 第10回自己抗体と自己免疫シンポジウム講演録集 2003; 35-41.
13. 松本功 解糖系酵素に対する自己抗体と RA 免疫2004; 291-296.
14. 松本功 自己抗体が何故関節炎を誘導するのか 内科 2004; 93(2): 204-207.
15. 松本功 自己抗体により誘導される関節炎の発症機序 臨床免疫 2004; 41(3): 271-275.
16. 松本功, 住田孝之 関節リウマチにおける新しい病因的自己抗体 臨床検査 2004; 48(3): 279-282

17. 松本功 関節炎と抗 glucose-6-phosphate isomerase 抗体 リウマチ科 2004; 31(4): 393-398.
18. 内藤祐介、松本功、住田孝之 シェーグレン症候群と M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体 シェーグレン症候群への strategy 2004; 5: 35-40.
19. 松本功 G P I に対する免疫応答と関節炎分子リウマチ 2004; 1(4): 36-40.
20. 松本功 K/BxN マウス 日本臨床 in press
21. 松本功 Guideline 膠原病・リウマチ 再発性多発軟骨炎 in press

厚生科学研究費補助金 (免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

β 2-グリコプロテイン I の新たな生物学的意義：ニック β 2GPI

分担研究者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 教授
研究協力者 渥美 達也 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 講師
保田 晋助 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 助手

研究要旨

抗リン脂質抗体の主要対応抗原である β 2 グリコプロテイン I (β 2GPI)はリン脂質結合能を介して凝固・線溶反応を多彩に制御しているが、 β 2GPIはプラスミン等の作用で第 V ドメイン Lys-317/Thr-318 が切断され、そのリン脂質結合能を消失する(ニック β 2GPI)。ニック β 2GPI の新たな機能と臨床的意義につき検討した。ニック β 2GPI と plasminogen の結合を検討した。次に、ニック β 2GPI の線溶系における機能を plasminogen-fibrin 結合アッセイおよび in vitro の plasmin generation の評価によっておこなった。また、脳ドック受診者および脳梗塞患者の血漿中ニック β 2GPIを測定し、血中ニック β 2GPIの意義を併せて検討した。Intact β 2GPIは plasminogen に結合しなかったが、ニック β 2GPIは結合を示し、plasminogen 上の結合部位は第 V クリングルドメインのリジン結合部位で、その解離定数 (K_d)は 0.37×10^{-6} M であった。ニック β 2GPIは plasminogen と fibrin との結合、および plasminogen から t-PA の存在下でのプラスミン生成を抑制した。特に本年は、plasminogen から派生する血管新生抑制物質である angiostatin との相互作用を検討したが、ニック β 2GPI はこれに結合することが示され、血栓局所において血管新生に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。intact β 2GPIにはこの結合活性はみられなかった。およびラクナ梗塞を有する者では脳 MRI 正常人にくらべて血漿ニック β 2GPI 値は著しく高く、他のトロンビン・プラスミン生成のマーカ―と比べて臨床所見との相関が明らかに高かった。すなわちニック β 2GPI 新たな線溶インヒビターであり、外因系線溶の negative feedback を担うことが示された。ニック β 2GPIは、angiostatin との結合を介して血栓局所で血管新生に対して促進的に作用する可能性が考えられ、今後検討を行ってゆきたい。

A. 研究目的

β 2 グリコプロテイン I (β 2GPI) は抗リン脂質抗体症候群にみられる抗カルジオリピン抗体の対応抗原である。 β 2GPI はリン脂質と結合することにより凝固・線溶反応を多様に制御しているが、 β 2GPI をプラスミンで処理すると第 V ドメインの Lys-317/Thr-318 が切断され (ニック β 2GPI)、そのリン脂質結合能が欠落し、 β 2GPI の機能は消失すると考えられる。また、抗 β 2GPI 自己抗体と β 2GPI の結合には β 2GPI とリン脂質の相互作用が必須、すなわち β 2GPI のエピトープ発現にはリン脂質等の関与が必要であるので、 β 2GPI がニック β 2GPI に変換されると抗原抗体反応がおこらなくなる。このことはプラスミンによる自己抗原の限定分解が生体自らの抗リン脂質抗体症候群という自己免疫異常からの回避の順序である可能性を示唆する。

これらのことより、ニック β 2GPI は凝血的にも免疫学的にも抗リン脂質抗体症候群の病態においては「老廃物」的な位置付けにあり、ニック β 2GPI 自体の意義については報告はなかった。今回、プラスミンで処理、調整してニック β 2GPI を精製し、その

新たな機能につき検討した。また、脳梗塞患者および脳ドック受診者の血漿中ニック β 2GPI を測定し、その意義について検証をおこなった。

B. 研究方法

ヒト血漿より β 2GPI を精製し、プラスミン処理してニック β 2GPI を調整した。インタクト β 2GPI とニック β 2GPI の glu-plasminogen への結合を ELISA 法および optical biosensor にて比較検討した。ニック β 2GPI の glu-plasminogen の結合部位をリジン誘導体である ϵ アミノカプロン酸、および glu-plasminogen のフラグメント(ミニプラスミノゲン [クリングル V + Catalytic Domain]、クリングル IV およびクリングル I+II+III) による inhibition assay により決定した。また、線溶の第一段階である glu-plasminogen のフィブリンへの結合をニック β 2GPI が阻害するかどうか検討するために、固相化したフィブリンにニック β 2GPI とブレインキュベートしたビオチン化 glu-plasminogen を加え、結合した glu-plasminogen を streptavidin を用いて検出した。

次に、ニック β 2GPI の線溶系における機能を in

vitro での plasmin generation の評価によっておこなった (fibrin-plate assay)。すなわち、異なる濃度のサンプル (ニック β 2GPI、インタクト β 2GPI) に、組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA; 15mU/ml)、glu-plasminogen (70 μ g/ml) を混和し、fibrin plate 上で 37°C 36時間インキュベートした。その後、生じた溶解輪を測定、tPA の段階希釈で得られた標準曲線より plasmin 産生を tPA 活性として表現した。

angiostatin は plasminogen からプロセスを受けて生ずる血管新生抑制物質であり様々なアイソフォームが存在するが、生体内ではクリングル 1-4 および 5 の大部分を有するアイソフォームが検出される。我々は、BIACORE X を用いてニック β 2GPI と angiostatin との相互作用を検討した。

また、ニック β 2GPI を特異的に認識するモノクローナル抗体および抗ヒト β 2GPI ポリクローナル抗体を使用してサンドイッチ ELISA をおこない、ニック β 2GPI 濃度および total β 2GPI 濃度を測定し、その ratio (ニック β 2GPI / total β 2GPI \times 1000) を検討した。対象は、性別、年齢をマッチさせた 62 名の脳梗塞患者、および脳ドックを受診した健康人 130 名で、後者はラクナ梗塞を有する 52 名と正常所見である 78 名に分けられた。これらの 3 グループ間での血漿中のニック β 2GPI ratio を比較検討し、in vivo におけるニック β 2GPI の意義を考察した。また、ニック β 2GPI の凝固線溶系のマーカーとしての意義を検討するため、D-dimers (DD), plasmin-plasmin inhibitor complex (PPI), および thrombin-antithrombin-complex (TAT) を測定した。

(倫理面への配慮)

この研究には倫理的問題は特に含まれない。

C. 研究結果

インタクト β 2GPI は glu-plasminogen に結合しなかったが、ニック β 2GPI は結合を示した (図 1A)。その解離定数を検討した結果、 $K_D = 0.37 \times 10^{-6} M$ と、比較的強固な結合であることが示された (図 1B)。glu-plasminogen フラグメントを用いた inhibition assay では、ミニプラスミノゲンでは glu-plasminogen のニック β 2GPI への結合が抑制されたのに対し、クリングル IV およびクリングル I+II+III では抑制がかからず、したがってニック β 2GPI への結合部位は glu-plasminogen の第 V クリングルドメインリジン結合部位であることがわかった (図 2A & B)。また、この結合は ϵ アミノカプロン酸によって強く抑制されたので、glu-plasminogen 上のニック β 2GPI 結合の領域はリジン結合部位であることが証明された。

ニック β 2GPI は、glu-plasminogen の第 V クリングルドメインを介したフィブリンへの結合を阻害することも示された (図 3A)。ニック β 2GPI は tPA およびフィブリンの存在下で glu-plasminogen からのプラスミン生成を有意に抑制し、この抑制効果はインタクト β 2GPI にはみられなかった (図 3B)。また、ニック β 2GPI は angiostatin に結合し、その $K_D = 0.31 \times 10^{-6} M$ であったが、インタクト β 2GPI にはこの作用はみられなかった (図 4)。

次に、血漿ニック β 2GPI ratio を測定した。脳 MRI 正常人での平均値 + SD を正常上限とした場合、異常

高値を示す者の割合は、正常人で 8%、ラクナ梗塞群で 27%、脳梗塞患者では 63% であり、脳 MRI 異常者では、正常者と比較して統計学的に有意に高い血漿ニック β 2GPI ratio を認めた (図 5A)。他の線溶系マーカーとの比較では、DD, PPI, TAT と比較してニック β 2GPI ratio にはより強い脳 MRI 所見との相関を認めた (図 5B)。

D. 考察

ニック β 2GPI の構造についてはこれまで報告されてきたが、その機能については全く報告がない。

本研究では以下のことを明らかにした。ニック β 2GPI は glu-plasminogen に結合してプラスミン生成を抑制した。この作用はインタクト β 2GPI にはみられなかった。すなわち β 2GPI は新たな線溶インヒビターであるニック β 2GPI の前駆体であり、 β 2GPI は外因系線溶の negative feedback を担うことが示された。外因系線溶には組織プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1)、 α 2 アンチプラスミンなどの様々なインヒビターが知られているが、negative feedback 機構としてのインヒビターはこのニック β 2GPI がはじめての報告である。また、ニック β 2GPI が angiostatin に結合することでどのような生理活性をもつか今後検討の必要があるが、血栓局所で血管新生に何らかの影響を及ぼす可能性があると考えられた。

ニック β 2GPI は無症候性を含む脳梗塞患者血中で高値であり、in vivo でも出現、機能している可能性が示された。また、これまでに知られている凝固線溶系のマーカーと比較してニック β 2GPI はより脳梗塞との相関が強かった。すなわちニック β 2GPI は、おそらく生体内でのプラスミン生成を反映しており、血栓傾向あるいは動脈硬化の鋭敏なマーカーとなりうることを意味する。

E. 結論

抗リン脂質抗体の主要な対応抗原である β 2GPI とその生成物であるニック β 2GPI の、外因系線溶抑制というあらたな機能を明らかにした。また、血漿ニック β 2GPI 測定の抗リン脂質抗体症候群や血栓疾患での臨床的意義を示した。血漿ニック β 2GPI 高値は少なくとも脳梗塞のマーカーとなる可能性を示した。また、ニック β 2GPI が angiostatin に結合することを示した。

F. 健康危険情報

本年度の研究からは該当無し。

G. 研究発表

主な国内学会での研究発表

1. 小池隆夫:「難治性の膠原病における医療の取り組み」第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、岡山市、2004 年 4 月 15 日～17 日
2. 小池隆夫:「Pathogenesis of Antiphospholipid Syndrome: p38 MAPK as a possible therapeutic target」第 3 4 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌市、2004 年 12 月 1 日～3 日

主な国外学会での研究発表

1. Koike, T.: "Antiphospholipid Syndrome" 7th International Congress SLE and Related conditions,

- New York, U.S.A., May 9-13, 2004
2. Koike, T. : " Antiphospholipid Syndrome, mechanism of thrombus and complication of reproductive system" 11th European Congress on Reproductive Immunology, Praha, Czech, June 30-July 3, 2004
 3. Koike, T. : " Antiphospholipid Syndrome, mechanism of thrombus and complication of reproductive system" 11th Asia Pacific League Associations for rheumatology Congress, Jeju, Korea, September 11-September 15, 2004
 4. Koike, T. : " Antiprothrombin-is it worth assaying? " 11th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Sydney, Australia, 12-19, November, 2004
 5. Koike, T. : " Pathogenesis of antiprothrombin antibody " 4th International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 3-7, November, 2004

論文発表

1. Li, N., Nakamura, K., Jiang, Y., Tsurui, H., Matsuoka, S., Abe, M., Ohtsui, M., Nishimura, H., Kato, K., Kawai, T., Atsumi, T., Koike, T., Shirai, T., Ueno, H., Hirose, S. Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 13:2 171-179.2004
2. Shimizu, C., Koike, T., Sawamura, Y. Double pituitary adenomas with distinct histological features and immunophenotypes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75.140.2004
3. Endo, T., Nakao, S., Koizumi, K., Nishio, M., Fujimoto, K., Sakai, T., Kuwano, K., Obara, M., Koike, T. Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein-Barr virus and monoclonal gammopathy in a post-non myeloblastic stem cell transplant patient. *Ann Hematol* 83. 114-116.2004
4. Koizumi, K., Fujimoto, K., Haseyama, Y., Endo, T., Nishio, M., Yokota, K., Itoh, K., Sawada, K., Koike, T. : Effective high-dose chemotherapy combined with CD34+ -selected peripheral blood stem cell transplantation in a patient with cutaneous involvement of nasal NK/T-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 72.140-144. 2004
5. Nagai, S., Shimizu, C., Umetsu, M., Taniguchi, S., Endo, M., Miyoshi, H., Yoshioka, N., Kubo, M., Koike, T.: Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element within the murine perilipin gene. *Endocrinology* 145. 2346-2356.2004
6. Yasuda, S., Atsumi, T., Ieko, M., Matsuura, E., Kobayashi, K., Inagaki, J., Kato, H., Tanaka, H., Yamakado, M., Akino, M., Saitou, H., Amasaki, Y., Jodo, S., Amengual, O., Koike, T.: Nicked β_2 -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood* 103:10. 3766-3772.2004
7. Kubo, M., Shimizu, C., Kijima, H., Nagai, S., Koike, T.: Alternate promoter and 5'-Untranslated exon usage of the mouse adrenocorticotropin receptor gene in adipose tissue. *Endocrin J* 51.25-30. 2004
8. Yamamoto, S., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Zhang, Y., Chamoto, K., Kosaka, A., Togashi, Y., Sekikawa, K., Sawada, K., Takeshima, T. Koike, T., Nishimura, T.: Unexpected role of TNF- α in graft versus host reaction (GVHR): donor-derived TNF- α suppresses GVHR via inhibition of IFN- γ -dependent donor type-1 immunity. *Int Immunol* 16: 811-817. 2004
9. Endo, T., Mogi, Y., Koizumi, K., Nishio, M., Fujimoto, K., Sakai, T., Kumano, K., Obara, M., Ikeda, H., Koike, T.: Peripheral blood stem cell mobilization following plus rituximab therapy combined with G-CSF in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transpl* 33.703-707. 2004
10. Hashimoto, S., Kawata, T., Schnermann, J., Koike, T.: Chloride Channel Blockade Attenuates the Effect of Angiotensin II on Tubuloglomerular Feedback in WKY but not Spontaneously Hypertensive Rats. *Kidney Blood Press R* 27:35-42.2004
11. Yasuda, S., Ogura, N., Horita, T., Yasuda, I., Hioka, T., Kon do, N., Fujisaku, A. Abacterial prostatitis and primary biliary cirrhosis with Sjogren's syndrome. *Mod Rheumatol* 14:70-72.2004
12. Das, H., Atsumi, T., Fukushima, Y., Shibuya, H., Ito, K., Yamada, Y., Amasaki, Y., Ichikawa, K., Amengual, O., Koike, T.: Diagnostic value of antiagalactosyl IgG antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 23:218-222.2004
13. Ieko, M., Tarumi, T., Takeda, M., Nito, S., Nakabayashi, T., Koike, T.: Synthetic selective inhibitors of coagulation factor Xa strongly inhibit thrombin generation without affecting initial thrombin forming time necessary for platelet activation in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2: 612-622.2004
14. Amengual, O., Atsumi, T., Koike, T.: Antiprothrombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol* 112: 144-149.2004
15. Suzuki, F., Shimizu, C., Umetsu, M., Nagai, S., Takeuchi, J., Endo, M., Miyoshi, H., Yoshioka, N., Mitsumasa, K., Koike, T.: Adult-onset idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to isolated pituitary gonadotropin deficiency. *Internal med* 43:7. 571-574.2004
16. Endo, T., Koizumi, K., Nishio, M., Fujimoto, K., Sakai, T., Kumano, K., Obara, M., Minauchi, K., Koike, T.: Localized relapse in bone marrow of extremities after allogeneic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* 76: 279-282.2004
17. Yang, L., Hakoda, M., Iwabuchi, K., Takeda, T., Koike, T., Kamatani, N., Takada, K.: Rheumatoid Factors Induce Signaling from B cells, leading to Epstein-barr virus and B-cell activation. *J Virol* 78:18. 9918- 9923.2004
18. Kataoka, H., Koike, T. :Lupus mortality in Japan. *Autoimmun Rev* 3: 421- 422.2004

19. Endo, T., Sato, N., Koizumi, K., Nishio, M., Fujimoto, K., Yamamoto, S., Sakai, T., Bohgaki, T., Sawada, K., Koike, T.: A preliminary analysis of the balance between Th1 and Th2 cells after CD34+ cell-selected autologous PBSC transplantation. Cytotherapy 6:4.337- 343.2004
20. Xiao, S., Deshmukh, S.U., Jodo, S., Koike, T., Sharma, R., Furusaki, A., Sung, J.S., Ju, Shyr-Tu.: Novel negative regulator of expression in Fas Ligand(CD178)Cytoplasmic tail:Evidence for Translational Regulation and against Fas Ligand Retention in secretory lysosomes. J Immunol 173: 5095- 5102.2004
21. Yasuda, S., Atsumi, T., Ieko, M., Koike, T.: β 2-glycoprotein I, anti- β 2-glycoprotein I, and fibrinolysis. Thromb Res 114: 461- 465.2004
22. Atsumi, T., Amengual, O., Yasuda, S., Koike, T.: Antiprothrombin antibodies-are they worth assaying? Thromb Res 114: 533-538.2004
23. Hashimoto, S., Ogawa, Y., Ishida, T., Mochizuki, T., Koike, T., Sato, H., Ueda, T.: Steroid-sensitive nephrotic syndrome associated with positive C1q immunofluorescence. Clin Exp Nephrol 8: 266-269.2004
24. Bohgaki, M., Atsumi, T., Yamashita, Y., Yasuda, S., Sakai, Y., Furusaki, A., Bohgaki, T., Amengual, O., Amasaki, Y., Koike, T.: The p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK)pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti- β 2Glycoprotein I antibodies. Int Immunol 16:11. 1633-1641.2004
25. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K, Koike T. Significance of valine/leucine²⁴⁷ polymorphism of β 2-glycoprotein I in antiphospholipid

syndrome: increased reactivity of anti- β 2-glycoprotein I autoantibodies to the valine²⁴⁷ β 2-glycoprotein I variant. Arthritis Rheum 52:1.212-218

—Books—

1. Atsumi, T., Matsuura, E., Koike, T.: Immunology of anti-phospholipid antibodies and cofactors. Systemic Lupus Erythematosus 3rd edition. Lahita RG ed. Harcourt Brace & Company. 1081-1105. 2004

H. 知的財産権の出願・登録
該当無し

(謝辞)

本研究は北海道大学大学院医学研究科、渥美達也講師および保田晋助助手の協力によりおこなわれたので深謝する。

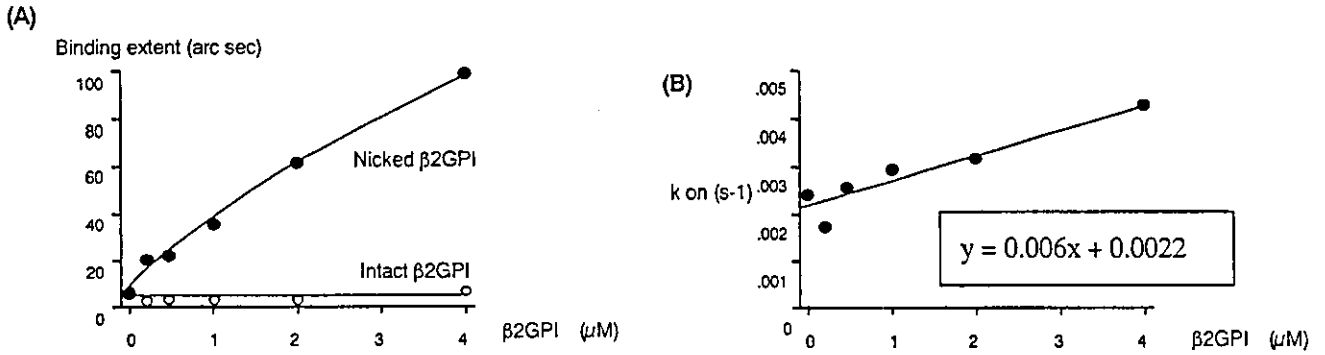


図1 glu-plasminogen へのニック・2GPI の結合。

(A) IAsys を用いた、ビオチン化 glu-plasminogen に対するへのニックおよびインタクト・2GPI の結合

(B) IAsys を用いた、ニック・2GPI と glu-plasminogen の結合の kinetics ($k_{on} = k_{diss} + k_{ass} [ligand]$, $K_p = k_{diss}/k_{ass}$)

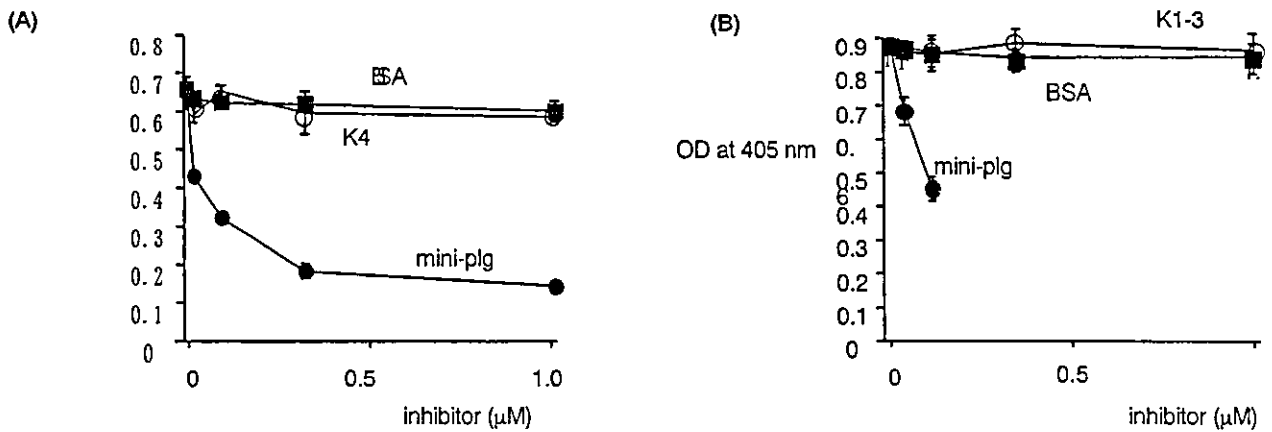


図2 Inhibition ELISA による、glu-plasminogen 上のニック・2GPI の結合部位の決定。ニック・2GPI を固相化し、plasminogen fragment とインキュベートした後に glu-plasminogen を反応させ、(A)では anti-K1-3 Ab を、(B)では anti-K4 Ab を用いて結合した plasminogen を検出した。

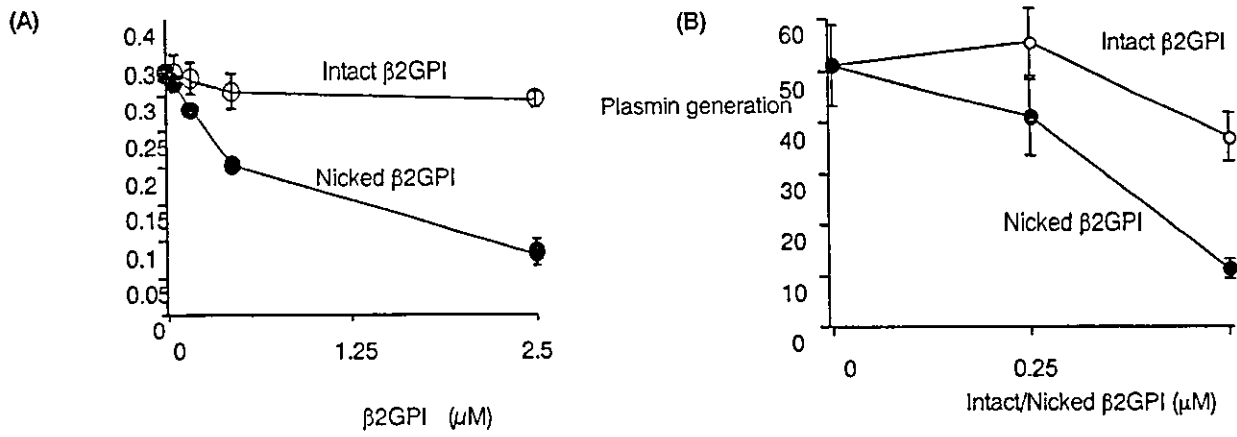


図3

(A) glu-plasminogen の固相化 fibrin への結合にたいし、ニック・ $\beta 2\text{GPI}$ の及ぼす影響を、ELISA にて検討した。
 (B) tPA, glu-plasminogen, fibrin の存在下において、インタクトおよびニック・ $\beta 2\text{GPI}$ が plasmin generation に及ぼす影響を、fibrin-plate assay を用いて検討した。

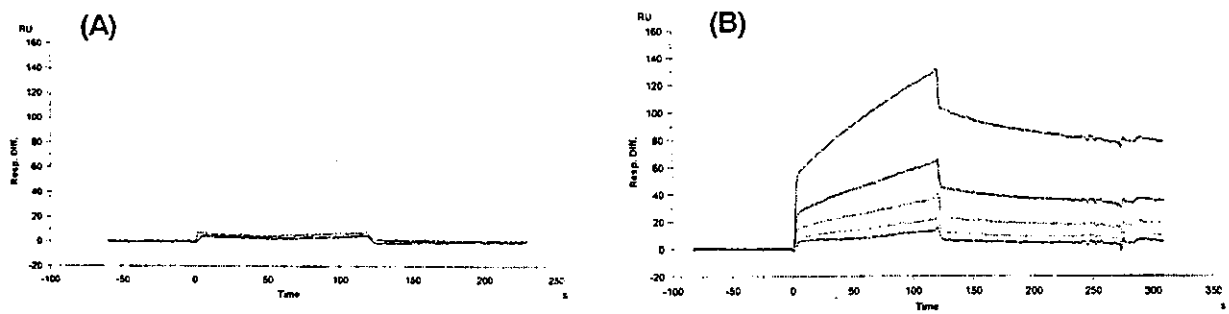


図4

(A) BIACORE X を用いた、angiostatin (1-5) とインタクト・ $\beta 2\text{GPI}$ との結合
 (B) BIACORE X を用いた、angiostatin (1-5) とニック・ $\beta 2\text{GPI}$ との結合

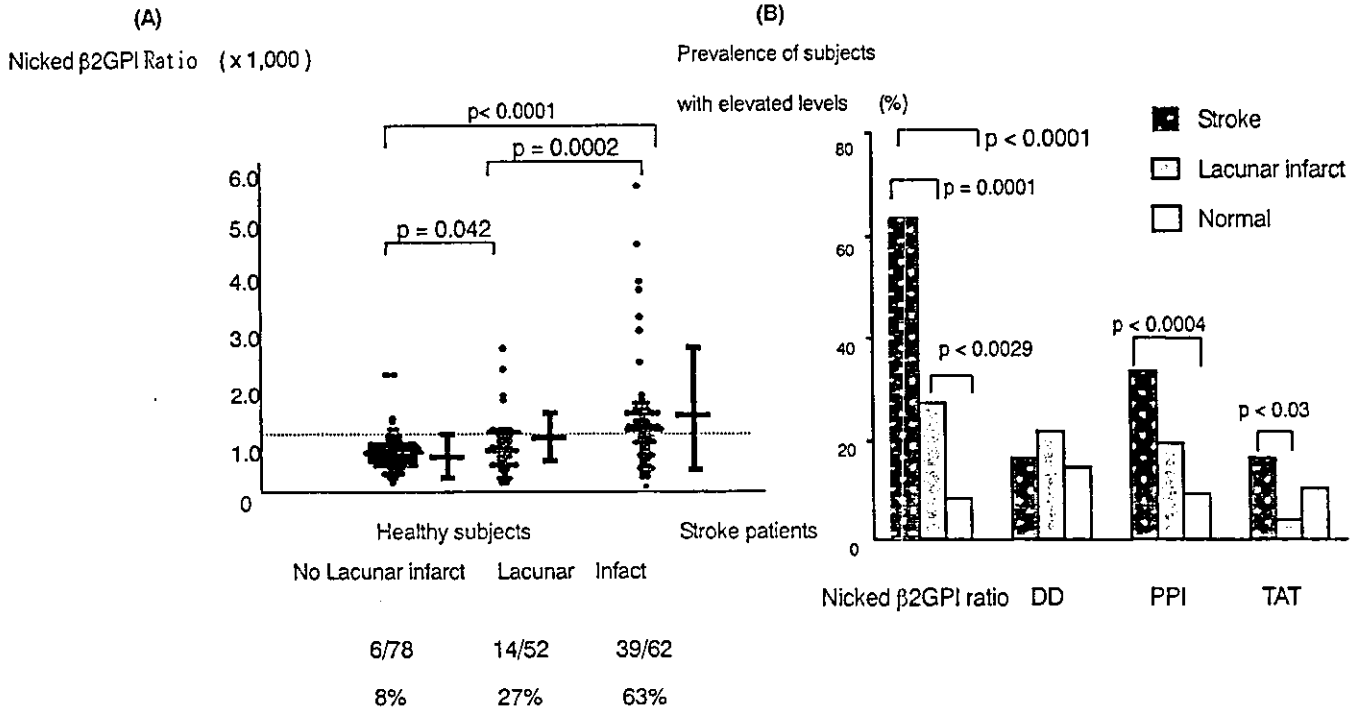


図 5

(A) 脳MRI 正常健常人、ラクナ梗塞を有する健常人、脳梗塞患者における、血漿ニック・2GPI ratio の比較。
 (B) 同グループにおける、血漿ニック・2GPI ratio と、他の凝固、線溶マーカーとの比較。DD:d-dimers, PPI: plasmin-plasmin inhibitor complex, TAT: thrombin-antithrombin complex

IV 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsutsumi, A., Takahashi, R., and <u>Sumida, T.</u>	Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease.	Autoimmunity Reviews			in press
Ohnishi, Y., Tsutsumi, A., Goto, D., Itoh, S., Matsumoto, I., Taniguchi, M., and <u>Sumida, T.</u>	TCRV α 14+ NKT cells function as effector T cells in collagen-induced arthritis mice.	Clin. Exp. Immunol.			in press
Tomoo, T., Tsutsumi, A., Yasukochi, T., Ikeda, K., Ochiai, N., Ozawa, K., Shibanaka, Y., Ito, S., Matsumoto, I., Goto, D., and <u>Sumida, T.</u>	Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis-coupled subtractive hybridization technique.	Int. J. Mol. Med.	15	453-457	2005
Naito, Y., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Goto, D., Tsutsumi, A., and <u>Sumida, T.</u>	Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome.	Ann. Rheu. Dis	64	510-511	2005
Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Muraki, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Wakamiya, N., and <u>Sumida, T.</u>	Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus.	Ann. Rheu. Dis.	64	311-314	2005
Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Wakamiya, N., and <u>Sumida, T.</u>	Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus.	Clin. Exp. Immunol.	136	585-590	2004
Kato, T., Asahara, H., Kurokawa, MS, Fujisawa, K., Hasunuma, T., Inoue, H., Tsuda, M., Takahashi, S., Motokawa, S., <u>Sumida, T.</u> , and Nishioka, K.	HTLV-I env protein acts as a major antigen in patients with HTLV-I-associated arthropathy.	Clin. Rheumatol.	23	400-409	2004