

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

自己免疫疾患に関する調査研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18年3月

主任研究者 山 本 一 彦

I. 総括研究報告

自己免疫疾患の調査研究

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

研究要旨 全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus, SLE）、多発性筋炎・皮膚筋炎（polymyositis/dermatomyositis, PM/DM）、シェーグレン症候群（Sjogren's syndrome, SS）、成人スティル病（adult onset Still disease, AOSD）などの自己免疫疾患は、原因が不明で、適切な治療法がなく、いわゆる難治性疾患とされている。本研究では、共同研究事業として、これら疾患の原因研究を目的としたゲノムの解析の為のサンプル収集、SLEの活動性を的確に表す指標の検討、新規治療法の導入のための臨床治験の推進を行い、さらに個別研究としてSLE、PM/DMを中心とした病態解明、先端的治療法の開発などの研究を推進した。

分担研究者	加藤智啓 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 生体機能・プロテオーム制御部門 助教授
渥美達也 北海道大学大学院医学研究科 病態内科学 講師	山田 亮 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター疾患ゲノム疫学解析分野 助教授
佐々木毅 東北大学大学院医学系研究科 免疫血液病学分野 教授	西本憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科 免疫抑制学講座 教授
簗田清次 自治医科大学内科学講座 アレルギー-膠原病学部門 教授	能勢真人 愛媛大学医学部病因・病態学講座 ゲノム病理学分野 教授
伊藤 聡 筑波大学大学院人間総合科学研究科 臨床免疫学 講師	田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授
三村俊英 埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科 教授	江口勝美 長崎大学大学院医歯学総合研究科 病態解析・制御学講座 教授
竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センター リウマチ・膠原病内科 教授	
高田和生 東京医科歯科大学医学部附属病院 膠原病・リウマチ内科助手	A. 研究目的 当研究事業の対象とする疾病は、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性筋炎・皮膚筋炎（PM/DM）、シェーグレン症候群（SS）、成人発症スティル病である。
三森明夫 国立国際医療センター第一病棟 部長	研究内容は大きく、これら自己免疫疾患、特にSLEの遺伝要因の研究、T細胞、樹状細胞などの免疫担当細胞の研究、自己抗体などの液性因子の研究、疾患活動性に関する研究、新しい
平形道人 慶應義塾大学医学部内科 講師	
深沢 徹 順天堂大学医学部膠原病リウマチ内科 講師	
広瀬幸子 順天堂大学医学部病理学第二講座 助教授	
首藤紘一 財団法人乙卯研究所 所長	
三宅幸子 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 室長	

治療法に関する研究に分けることができる。

B. 研究方法 及び C. 研究結果

1. 自己免疫疾患の遺伝要因の研究

広瀬分担研究者は、多くの臓器特異的自己免疫疾患において、Th1 型 T 細胞が病態発症に寄与し、Th2 型がそれを抑制する可能性から、SLE の腎炎であるループス腎炎のモデルにおいて、これを検討した。Th2 の代表的サイトカインである IL-4 は IL-4 受容体 α 鎖遺伝子多型により規定されることを見いだし、さらに BXSB マウスのループス腎炎は、IL-4 低産生性の IL-4 受容体 α 鎖遺伝子多型と相関することを見いだした。しかし、別の NZB/W のループス腎炎では相関が見られず、均一な病態でないことが示唆された。一方、能勢分担研究者は、MRL/lpr マウスのループス腎炎に関して、疾患感受性を示すオステオポンチンの遺伝子多型について検討した。脾細胞に IgG3 抗体産生を誘導し、炎症性サイトカインの発現を亢進させる多型による機能的差異の一つとして、RGDS モチーフ近傍にあるアミノ酸置換が関与することを見いだした。

山田分担研究者は、SLE の疾患感受性遺伝子検索の為に、連鎖不平衡マッピングによるケース・コントロール関連解析の重要性をシミュレーションから示し、来年度に向けたサンプル収集体制の構築についての準備状況を報告した。深沢分担研究者は、第 1 染色体について、1615 個のマイクロサテライトマーカーを用いた関連解析の結果、候補領域を特定した旨、報告した。

SLE の病態に関係したスプライシングについては、江口分担研究者は、末梢血単核細胞において、抗アポトーシス効果を有する caspase-8 のスプライスバリエーションである caspase-8L が強発現しており、急性増悪 SLE ではこの発現現象

から、リンパ球のアポトーシス亢進と活性化が引き起こされ、病態形成に関与している可能性を示した。尚、RNA のスプライシングには phosphatase と kinase の活性化制御が重要な役割を果たしていることも報告した。竹内分担研究者は以前より、SLE では T 細胞受容体のゼータ鎖のスプライスバリエーションが高頻度に見いだされることを報告している。今回、これらのバリエーションを遺伝子導入した場合に 2 次的に見られる遺伝子発現を高密度マイクロアレイにて検索し、syndecan-1 や $\beta 7$ インテグリンなどの接着分子や granzymeA などの細胞傷害顆粒が高発現することを見いだした。

2. 免疫担当細胞の研究

山本分担研究者は、SLE モデルマウスにおける腎炎と強い関連があるヌクレオソームに対する免疫応答について検討した。ヌクレオソームに対する T 細胞認識機能を、遺伝子導入により再構築するシステムを用い、脾臓でも特にマクロファージを中心とした貪食細胞が、IL-1 の発現とともにヌクレオソームを抗原提示していることを突き止め、これをクロドロネート・リポゾームにより除去することで腎炎が抑制されることを示した。

伊藤分担研究者は MRL/lpr ループスモデルの腎炎とヒトループス腎炎について、浸潤 T 細胞に発現している遺伝子を調べる目的で laser-microdissection 法を用いた研究を行った。特に発現サイトカインについては、糸球体病変では Th1 タイプが、血管炎病変では Th2 タイプが多く発現していることが判明した。三村分担研究者は、SLE における樹状細胞機能の研究を行い、健常者由来の樹状細胞に比べて endocytosis 能が低下していることを見いだした。三宅分担研究者は、リンパ球の免疫寛容に重要な分子として同定された GRAIL に注目し、

その機能を調べる為に、基質の同定、ノックアウトマウスの作成などの実験を進めた。

3. 自己抗体などの液性因子の研究

渥美分担研究者は、SLE で高頻度に見られる抗リン脂質抗体症候群の責任自己抗体を検討する目的で、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の機能を検討し、モノクローナル抗体を用いた研究により、条件により抗凝固と向凝固の双方に働く可能性を示した。平形分担研究者は、多発性筋炎に見られるシグナル認識粒子(SRP)に対する自己抗体について検討し、(d)7SL-RNA と幾つかのポリペプチドに対する免疫学的多様性を持つこと、筋炎はもつが皮膚筋炎のような皮疹や悪性腫瘍を持たない患者群にこのような自己抗体が見られることを見いだした。

佐々木分担研究者は、SLE に特徴的な抗 DNA 抗体に注目し、その細胞内への侵入とその生物学的意義を検討した。抗 DNA 抗体は単球由来樹状細胞に侵入し細胞内ライゾゾームまでは到達したが、核内移行は確認できなかった。このような抗体は侵入することで、細胞は活性化され、細胞表面抗原の発現、IL-12 などのサイトカイン産生が亢進するなどの免疫機能変化をもたらされることを示した。加藤分担研究者は、患者の血清中に存在する短いペプチドの同定とその意義を検討するため、MALDI-TOF/TOF 型質量分析計を用いたシステムを構築すべく検討を進めた。

4. 新しい治療法に関する研究

田中分担研究者は自己抗体を産生する B 細胞の表面抗原である CD20 に対するモノクローナル抗体を SLE の治療に用いる試みを推進した。この抗体は B 細胞リンパ腫を対象に認可されているリツキシマブであり、世界的にも SLE と関

節リウマチでの治療の可能性が検討されているものである。田中分担研究者はパイロットスタディで、副作用なく著効を示したことから現在第 I/II 相の臨床試験を開始している。西本分担研究者は、自身らのグループにより関節リウマチの為に開発中の抗 IL-6 受容体抗体を用い、SLE に対して探索的治療を行い、さらにその治療の前後で発現量の変化する遺伝子を DNA チップで解析した。

首藤分担研究者は Th1 優位の自己免疫疾患に効果が期待される合成レチノイド Am80 の有用性を動物実験で示し、ヒトへの応用の可能性を検討した。高田分担研究者は PM/DM の難治性病態である間質性肺炎に対してタクロリムスの研究者主導の開発を進めた。箕田分担研究者はスタチン類が滑膜細胞に対してアポトーシス誘導能のあることを示した。

三森分担研究者は SLE の治療の為にステロイドをいかに維持し、減量・中止するかの指標を検討し、疾患活動性の既存の指標が不完全であり、より適切な基準が必要であることを示した。

D. 考察 及び E. 結論

平成 17 年度は、新しい研究体制での初年度であり、今後の方向性に関する議論を多く行った。平成 18 年度に向けて、研究組織を挙げて、SLE を中心としたゲノム解析の為に DNA の収集を行うことが了承された。さらに、SLE の病勢把握の適切な指標が必要であることなどから、共通の作業班を組織することなどの必要性が議論された。平成 18 年度には個別の研究を推進するだけでなく、このような共通の課題を推進する必要があると考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

山本 一彦 (主任研究者)

1. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, Bae SC, Tokuhira S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman KM, Kang CP, Kang C, Otsubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, Yamamoto K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genet.* 37:478-485, 2005.
2. Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Komagata Y, Nagatani K, Nagatani K, Tanaka R, Miyazaki J, Yamamoto K. In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation¹. *J Immunol.* 174:6955-6966, 2005.
3. Shiratori I, Yamaguchi M, Suzukawa M, Yamamoto K. Lanier LL, Saito T, Arase H. Down-regulation of basophil function by human CD200 and human herpesvirus-8 CD200. *J Immunol.* 175:4441-4449, 2005.
4. Nagai T, Arinuma Y, Yanagida T, Yamamoto K. Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody in human systemic lupus erythematosus up-regulates the expression of proinflammatory cytokines by human peripheral blood monocytes. *Arthritis Rheum.* 52:847-855, 2005.
5. Sagawa K, Nagatani K, Komagata Y, Yamamoto K. Angiotensin receptor blockers suppress antigen-specific T cell responses and ameliorate collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.*

52:1920-1928, 2005.

渥美 達也(分担研究者)

1. 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; 212-8, 2005
2. Bohgaki T, Amasaki Y, Nishimura N, Bohgaki M, Yamashita Y, Nishio M, Sawada K, Jodo S, Atsumi T. Koike T. Upregulated expression of tumour necrosis factor- α converting enzyme in peripheral monocytes in patients with early systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 64; 1165-73, 2005
3. Fukae J, Amasaki Y, Yamashita Y, Bohgaki T, Yasuda S, Jodo S, Atsumi T. Koike T. Butyrate Suppresses Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) Production by Regulating Specific mRNA Degradation Mediated Through a cis-acting AU-rich Element. *Arthritis Rheum* 52; 2697-707, 2005

佐々木 毅 (分担研究者)

1. Munakata Y, Saito-Ito T, Ishii K.K, Huang J, Kodera T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *BLOOD.* 106(10):3449-3456, 2005
2. Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T. Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *BLOOD.* 106:2627-2633, 2005
3. Munakata Y, Kodera T, Saito T, Sasaki T.

Rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, and Graves' disease after acute parvovirus B19 infection. *Lancet*. 366:780, 2005

簗田 清次 (分担研究者)

1. Yoshio T, Onda K, Nara H, Minota S. Association of IgG Anti-NR2 glutamate receptor antibodies in cerebrospinal fluid with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 54: 675-678, 2006.

2. Okamoto H, Iikuni N, Kamitsuji S, Yoshio T, Minota S, Kamatani N. IP-10/MCP-1 ratio in CSF is an useful diagnostic maker of neuropsychiatric lupus patients. *Rheumatol*. 45: 232-234, 2006.

3. Nagashima T, Okazaki H, Yudoh K, Matsuno H, Minota S. Apoptosis of rheumatoid synovial cells by statins through the blocking of protein geranylgeranylation: a potential therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 54: 579-586, 2006.

伊藤 聡 (分担研究者)

1. Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Altered peptide ligands regulate muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells of patients with Sjogren's Syndrome. *Ann. Rheum. Dis*. 65:269-271, 2006

2. Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, Goto D, Sugiyama T, Matsumura R, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Muscarinic acetylcholine receptor auto antibodies in patients with Sjogren's Syndrome. *Ann Rheum Dis* 64:510-511, 2005

三村 俊英 (分担研究者)

1. Sato K, Tateishi S, Kubo K, Mimura T, Yamamoto K, Kanda H. Downregulation of IL-12 and a Novel Negative Feedback System Mediated by CD25⁺CD4⁺ T cells *Biochem Biophys Res Commun*. 330; 226-232, 2005

2. Satoh, K., Satoh, U., Tateishi, S., Kubo, K.,

Horikawa, R., Mimura, T., Yamamoto, K., and Kanda, H. Aire downregulates multiple molecules that have contradicting immune-enhancing and immune-suppressive functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 318, 935-940, 2004

竹内 勤 (分担研究者)

1. Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. A splice variant of the TCR ζ mRNA lacking exon7 leads to the downregulation of the TCR ζ , TCR/CD3 complex and IL-2 production in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol* 174:3518-25, 2005.

2. Shiraishi K, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Critical role of the 5th domain of E-cadherin for heterophilic adhesion with α E β 7, but not for homophilic adhesion. *J Immunol* 175:1014-1021, 2005.

3. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. DNA microarray gene expression profile of T cells with splice variants of TCR ζ mRNA observed in SLE. *J Immunol* 176:949-56, 2006.

高田 和生 (分担研究者)

1. Takada, K., K. Nagasaka, N. Miyasaka, Polymyositis/Dermatomyositis and interstitial lung disease; A new therapeutic approach with T-cell-specific immunosuppressants. *Autoimmunity*, 38 (5): 383-92, 2005.

三森 明夫 (分担研究者)

1. Aotsuka S, Okawa-Takatsuji M, Nagatani K, Nagashio C, Kano T, Nakajima K, Ito K, Mimori A. A retrospective study of the fluctuation in serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 23(4):475-81, 2005.

平形 道人 (分担研究者)

1. Sato S, Hirakata M, Kuwana M, Suwa A, Inada S, Mimori T, Nishikawa T, Oddis CV, Ikeda Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 52(5):1571-1576, 2005.

2. Kaneko Y, Tanaka K, Yoshizawa A, Yasuoka H, Suwa A, Toru Satoh T, Shiro Iwanaga S, Satoshi Ogawa S, Ikeda Y, Hirakata M. Successful treatment of recurrent intracardiac thrombus in Behcet's disease with immunosuppressive therapy. *Clin Exp Rheumatol* 23(6):885-887, 2005

広瀬 幸子 (分担研究者)

1. Suzuki H, Suzuki Y, Yamanaka T, Hirose S, Nishimura H, Toei J, Horikoshi S, Tomino Y: Genome-wide scan in novel IgA nephropathy model identifies susceptibility locus on murine chromosome 10, in a region syntenic to human IGAN1 on chromosome 6q22-23. *J Am Soc Nephrol*, 16:1289-1299, 2005

2. Qi Z, Wang J, Sun Z, Ma F, Zhang Q, Hirose S, Jiang Y: Polymorphism of the mouse gene for the interleukin 10 receptor alpha chain (Il10ra) and its association with the autoimmune phenotype. *Immunogenetics* 57:697-702, 2005.

首藤 紘一 (分担研究者)

1. Sanda T, Tkuwano T, Nakao T, Iida S, Ishida T, Komatsu H, Shudo K, Kuwano M, Ono M, Ueda R. Antimyeloma effects of a synthetic retinoid Am80 (Tamibarortene) through inhibition of angiogenesis. *Leukemia* (2005) 19, 901-909

2. Fujiu K, Manabe I, Ishihara A, Oishi Y, Iwata H, Nishimura G, Shindo T, Maemura K, Kagechika H, Shudo K, Nagai R. Synthetic retinoid Am80 suppresses smooth muscle phenotypic modulation and in-stent neointima formation by inhibiting

KLF5. *Circ. Res.* 25;97(11):1132-41, 2005

三宅 幸子 (分担研究者)

1. Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto M and Teshima T. Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducible Th2 polarization of donor T cells. *J.Immunol.* 174(1): 551-6, 2005

2. Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fjiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, and Porcellini SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acylvariants of α -galactosylceramides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 102(9): 3383-8, 2005

3. Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. IFN- γ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. *Blood*, 106(1): 184-92, 2005

加藤 智啓 (分担研究者)

1. Karasawa R, Ozaki S, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to Peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases. *Microbiol. Immunol.* 49(1): 57-65. 2005

2. Orita M, Masuko-Hongo K, Yotsuyanagi H, Matsui T, Suzuki-Kurokawa M, Nishioka K, Kato T. Molecular Transplantation: Delivery of membranous proteins onto live cells. *Anal Biochem.* 340: 184-186. 2005

山田 亮 (分担研究者)

1. Ohtsubo S, Iida A, Nitta K, Tanaka T, Yamada R, Ohnishi Y, Maeda S, Tsunoda T, Takei T, Obara W, Akiyama F, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Yumura W, Ujiie T, Nagane Y, Miyano S, Suzuki Y, Narita I, Gejyo F, Fujioka T, Nihei H, Nakamura Y. Association of a single-nucleotide polymorphism

in the immunoglobulin μ -binding protein 2 gene with immunoglobulin A nephropathy. *J. Hum. Genet.* 50: 30-35, 2005

2. Nakayama M, Horiguchi A.S, Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, Ono M, Kasuya A, Furukawa H, Yamada R, Yamamoto K. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327:192-200, 2005

3. Yamada R. Peptidylarginine deiminase type 4, anticitrullinated peptide antibodies, and rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 4:201-206, 2005

西本 憲弘 (分担研究者)

1. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Santis,GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad, E,Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Renz H, Neurath MF, Galle PR, Finotto S. The IL-6 α chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J. Clin. Invest.* 115: 313-325, 2005.

2. Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T. Therapeutic Efficacy of Humanized Recombinant Anti-IL 6-Receptor Antibody for Children with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum.* 52: 818-825, 2005.

3. Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman's disease.

Blood 106:2627-2632, 2005.

能勢 真人 (分担研究者)

1. Komori, H, Furukawa, H, Mori, S, Ito, M R, Terada, M, Zhang, M C, Ishii, N, Sakuma, N, Nose, M, Ono, M.: A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Fas^{lpr} lupus mice. *J Immunol* 176: 395-400, 2006.

2. Inoue A, Hasegawa H, Kohno M, Ito MR, Terada M, Imai T, Yoshie O, Nose M, Fujita S.: Antagonist of fractalkine (CX3CL1) ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 52: 1522-33, 2005.

3. Oishi H, Miyazaki T, Mizuki S, Kamogawa J, Lu L-M, Tsubaki T, Arita N, Ono M, Yamamoto H, Nose M.: Accelerating effect of an MRL gene locus on the severity and onset of arthropathy in DBA/1 mice. *Arthritis Rheum* 52: 959-66, 2005.

田中 良哉 (分担研究者)

1. Tanaka Y, Tokunaga M. Rituximab reduces both quantity and quality of B cells in SLE. *Rheumatology* (2006) 45: 122-123

2. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of expression of P-glycoprotein on peripheral lymphocytes to steroid-resistance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2005) 52, 1676-1683

3. Nakayamada S, Kurose K, Saito K, Mogami A, Tanaka Y. Small GTP-binding protein rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* (2005) 7, 476-484

江口 勝美 (分担研究者)

1. Iwanaga N, Kamachi M, Aratake K, Izumi Y, Ida H, Tanaka F, Tamai M, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A, Eguchi K. Regulation of alternative splicing of caspase-2 through an

intracellular signaling pathway in response to pro-apoptotic stimuli. J Lab Clin Med. 145 :105- 110, 2005.

2. Aratake K, Kamachi M, Iwanaga N, Kawasaki E, Izumi Y, Ida H, Tanaka F, Tamai M, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A, Eguchi K. A cross-talk between RNA splicing and signaling pathway alters Fas gene expression at post-transcriptional level: alternative splicing of Fas mRNA in the leukemic U937 cells. J Lab Clin Med. 146:184-191, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 名称：強皮症の診断方法、強皮症の診断薬
及び強皮症診断マーカー

出願番号：特願 2006-3783

出願日：平成 18 年 1 月 11 日

出願者：加藤 智啓

2)名称： Fas 抗原発現増強剤

出願番号：特開 2003-171282

出願者：田中 良哉

3)名称： Akt シグナル経路の活性化阻害を目的として使用するレフルノミド

出願番号：特願 2005-81972

出願者：田中 良哉

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

II. 分担研究報告

自己免疫疾患における抗原提示細胞および T 細胞の役割と 新規治療法の開発に関する研究

分担研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

研究要旨 全身性エリテマトーデス（SLE）モデルマウスにおいて、重要な自己抗原であるヌクレオソームに特異的な T 細胞を高効率レトロウイルスベクターにより再構築し、ヌクレオソームの局在を検討した。ヌクレオソーム提示は脾臓に優位であった。さらに脾臓抗原提示細胞のうち、F4/80 陽性マクロファージと CD11b 陽性樹状細胞は腎炎発症前からヌクレオソームを提示していた。F4/80 陽性マクロファージは脾臓において最も豊富な抗原提示細胞で、IL-1 β を強く発現していた。クロドロネート・リポソーム静注による脾臓貪食細胞除去によって、脾臓におけるヌクレオソーム提示は減弱し、抗ヌクレオソーム抗体および蛋白尿発症率も低下した。したがって、貪食細胞における核抗原の提示は、自己抗体産生を促すことにより自己免疫疾患の病態形成に関与していると考えられる。

A. 研究目的

貪食細胞においてアポトーシス細胞断片を除去する機能が低下した場合に、全身性エリテマトーデス（SLE）様の病態を呈することは報告されているが、SLE における自己抗原提示能については未だにほとんど解析されていない。そこで、SLE モデルマウスを用い重要な自己抗原であるヌクレオソームの提示について検討を行った。

B. 研究方法

高効率レトロウイルスベクターシステムを用いてヌクレオソーム特異的 T 細胞を再構築し、NZB/W F₁ および SNF₁ マウスに移入して抗原提示の局在を検討した。脾臓における各抗原提示細胞サブセットを分離し、ヌクレオソーム特異的 T 細胞の増殖を検討した。腎炎発症前からヌクレオソームを提示している脾臓貪食細胞を、クロドロネート・リポソーム静注により生体内で除去し、抗原提示、自己抗体価および蛋白尿発症率を検討した。

（倫理面への配慮） 研究対象者には人権擁護上の配慮を行った上で、研究方法による不利益、危険性とそれらを排除する方法等について十分なインフォームドコンセントを行った。実験動物に対しては

過度の苦痛を与えないなど、動物愛護上の十分な配慮を行った。

C. 研究結果

SLE モデルマウスにおいて、ヌクレオソーム特異的 T 細胞は腎炎発症前から脾臓で優位に刺激されていた。中でも脾臓の F4/80⁺マクロファージと CD11b⁺樹状細胞はヌクレオソーム特異的 T 細胞を強く刺激していた。SLE モデルマウスの脾臓において、F4/80⁺マクロファージは最も豊富な抗原提示細胞サブセットであり、IL-1 β を強く発現していた。生体内でクロドロネート・リポソーム静注により F4/80⁺マクロファージを主とした脾臓貪食細胞を除去したところ、脾臓におけるヌクレオソーム提示は減弱し、抗ヌクレオソーム抗体価および蛋白尿発症率も低下した。しかし、クロドロネート・リポソーム静注による全般的な免疫抑制は認めなかった。

D. 考察

貪食細胞における核抗原の提示が異常な免疫応答の引き金となり、自己免疫疾患を惹起する可能性が考えられる。貪食細胞により T 細胞に自己抗原が提示されること自体が異常なのか、それとも自己抗原

提示に続いて起こる T 細胞や B 細胞の活性化が異常なのかという問題に関しては今後更なる検討が必要である。

E. 結論

SLE モデルマウスにおいて、脾臓貪食細胞は自己抗原を提示し、自己抗体産生を促すことにより病態形成に関与する。貪食細胞における自己抗原提示の抑制は、病態に即した SLE の新たな治療アプローチとなりうる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, Bae SC, Tokuhiko S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman KM, Kang CP, Kang C, Otsubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, Yamamoto K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genet.* 37:478-485, 2005.
2. Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Komagata Y, Nagatani K, Nagatani K, Tanaka R, Miyazaki J, Yamamoto K. In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation¹. *J Immunol.* 174:6955-6966, 2005.
3. Shiratori I, Yamaguchi M, Suzukawa M, Yamamoto K, Lanier LL, Saito T, Arase H. Down-regulation of basophil function by human CD200 and human herpesvirus-8 CD200. *J Immunol.* 175:4441-4449, 2005.
4. Nagai T, Arinuma Y, Yanagida T, Yamamoto K, Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody in human systemic lupus erythematosus up-regulates the expression of proinflammatory cytokines by human peripheral blood monocytes. *Arthritis Rheum.* 52:847-855, 2005.

5. Sagawa K, Nagatani K, Komagata Y, Yamamoto K. Angiotensin receptor blockers suppress antigen-specific T cell responses and ameliorate collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 52:1920-1928, 2005.

6. Kanda H, Kubo K, Tateishi S, Sato K, Yonezumi A, Yamamoto K, Mimura T. Antiproteinuric effect of ARB in lupus nephritis patients with persistent proteinuria despite immunosuppressive therapy. *Lupus.* 14:288-292, 2005.

7. Sato K, Tateishi S, Kubo K, Mimura T, Yamamoto K, Kanda H. Downregulation of IL-12 and a novel negative feedback system mediated by CD25+ CD4+ T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 330:226-232, 2005.

8. Takizawa Y, Sawada T, Suzuki A, Yamada R, Inoue T, Yamamoto K. Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 34:212-215, 2005.

9. Okazaki Y, Sawada T, Nagatani K, Komagata Y, Inoue T, Muto S, Itai A, Yamamoto K. Effect of Nuclear Factor- κ B Inhibition on Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes and Collagen Induced Arthritis. *J Rheumatol.* 32:1440-1447, 2005.

10. Kawai S, Yamamoto K. Safety of tacrolimus, an immunosuppressive agent, in the treatment of rheumatoid arthritis in elderly patients. *Rheumatology.* 2005.

2. 学会発表

1. Okamoto A, Fujio K, Kitamura T, Yamamoto K. Macrophages stimulate nucleosome-specific T cells and express Interferon- α in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* 52:S624, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

抗プロトロンビン自己抗体の血栓原性に関する研究

分担研究者 渥美 達也 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座 講師

研究要旨 [はじめに] 抗リン脂質抗体症候群 (APS) は血中に抗リン脂質抗体が検出され、各種動静脈血栓症や習慣流産などの妊娠合併症をはじめとする多彩な臨床症状を呈する疾患である。APS では *in vivo* で血栓症、*in vitro* においてはループスアンチコアグラント作用つまり凝固延長を呈するというパラドックスが存在するが、*in vivo* においても *in vitro* においてもホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) がプロトロンビン生成におよぼす効果については解明されていない。[材料と方法] aPS/PT 陽性 APS 患者と健常人の非血栓時の血清凝固・線溶マーカーを測定し、*in vivo* での aPS/PT とプロトロンビン生成との関連について検討した。また、PS/PT を特異的に認識し LA 活性をもつマウスモノクローナル aPS/PT をもちいて、*in vitro* におけるプロトロンビン生成に対する効果について検討した。[結果] aPS/PT 陽性患者では、健常人に比し凝固線溶マーカーの血漿レベルでの上昇がみられた。マウスモノクローナル抗プロトロンビン抗体は、factor Va と Factor Xa の濃度バランスによって、プロトロンビン生成亢進と抑制の二相性の効果を示した。[考察] 今回我々は、非血栓時においても aPS/PT 陽性患者において血漿中プロトロンビン生成および線溶亢進マーカーが上昇していることを確認した。これより、aPS/PT の存在は向凝固状態に関連していると考えられた。さらに、マウスモノクローナル aPS/PT、231D は、APS 患者 aPS/PT と類似の特性を持ち、*in vitro* において、プロトロンビン生成にたいし重要な効果を与えることを確認した。すなわち、231D は Factor Va と Factor Xa の相対的濃度によってプロトロンビン生成に対し亢進と抑制の二相性の効果を示し、プロトロンビンに対する抗体が直接プロトロンビン生成を亢進させられることを示した。231D の二相性の効果が、APS の *in vivo* と *in vitro* のパラドックスにかかわっている可能性が考えられる。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体 (APS) は血栓傾向を主症状とする自己免疫疾患であり、それ単独で存在、または全身性エリテマトーデスの代表的な合併症のひとつでもある。APS 患者に存在する抗リン脂質抗体は血栓症をひきおこす病原性自己抗体と考えられており、リン脂質を直接認識するのではなくリン脂質表面に親和性を持つ血漿蛋白に対する抗体の一群である。

プロトロンビンは 1959 年に Loeliger らによって初めてループスアンチコアグラントの cofactor として提唱され、1988 年には抗プロトロンビン抗体がループスアンチコアグラントの責任抗体であることが確認された。さらに、Bervers らは LA 活性を有する抗プロトロンビン抗体は直接リン脂質を認識

するのではなく、ヒトプロトロンビンとリン脂質の結合によって表出されるエピトープを認識することを示唆した。分担研究者は、抗プロトロンビン抗体は陰性荷電照射プレート上のプロトロンビンも認識するが、ホスファチジルセリンと結合したプロトロンビン (ホスファチジルセリン/プロトロンビン複合体) をより効率よく認識することを示してきた。さらに、ホスファチジルセリン/プロトロンビン複合体に対する抗体、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) の検出方法について報告し、この抗体が APS の臨床症状と相関することを示した。また、aPS/PT はループスアンチコアグラントと相関が強く、aPS/PT が APS のマーカーとなりうることを示唆した。aPS/PT は APS の診断において β 2GPI 依存性抗カルジオリピン抗体と同程度の感度と特異度をもっており、APS の診断

において有用な手段と考えられる。

APS 患者においては、*in vitro* においてループスアンチコアグラントは抗凝固を示すが、*in vivo* においては向凝固をしめすというパラドックスが存在する。しかし、*in vivo* においても *in vitro* においても、aPS/PT がトロンビン生成におよぼす効果については解明されていない。また、aPS/PT が向凝固作用にかかわるというデータは限られている。APS 患者における aPS/PT の血栓生成に対する効果について検討するため、研究分担者は aPS/PT 陽性の APS 患者と健常人におけるトロンビン生成および線溶マーカーを測定した。さらに、*in vitro* のアッセイにおいてマウスモノクローナル aPS/PT をもちいてトロンビン生成に対する効果について検討した。

B. 研究方法

36名の aPS/PT 陽性 APS 患者につき非血栓時の凝固・線溶マーカー (Plasma prothrombin Fragment 1+2 (F1+2), Trombin-antithrombin III complex (TAT), soluble Fibrin monomer, D-dimer and fibrin/fibrinogen degradation products (FDP)) を測定し、131人の健常人コントロールと比較して aPS/PT と *in vivo* でのトロンビン生成との関連について検討した。

次に、ヒトプロトロンビンを Balb/c ヌードマウス腹腔内に接種し、PS/PT を特異的に認識し LA 活性をもつマウスモノクローナル aPS/PT (231D) を得た。ヒト精製凝固因子によるプロトロンビナーゼ複合体 [phospholipid, CaCl₂, human purified factor Va (FVa), human factor Xa (FXa), and human purified prothrombin] をもちいたクロモジェニックアッセイで、*in vitro* における 231D のトロンビン生成に対する効果について検討した。

また、231D と APS 患者血清中 aPS/PT の、PS/PT 上のエピトープの共有について検討した。APS 患者 aPS/PT の PS/PT への結合を 231D が阻害するかにつき ELISA をもちいた競合アッセイにより検討した。
(倫理面への配慮) 本年の研究には特に倫理的に問題となる課程は含まれない。

C. 研究結果

aPS/PT 陽性患者では、aPS/PT 単独陽性群、aPS/PT と抗カルジオリピン抗体の両者陽性群ともに健常人に比し F1+2、SF、D-dimer、FDP の血漿レベルの上昇がみられた(図 1a-d)。

マウスモノクローナル抗プロトロンビン抗体、231D は、ホスファチジルセリン結合プロトロンビンのみを認識したが、ホスファチジルセリン単独またはプロトロンビン単独は認識せず、APS 患者でみとめる aPS/PT と同様の特徴を持っていた。APS 患者 IgG と PS/PT の結合は、231D によって抑制され、231D は APS 患者 IgG と PS/PT 上のエピトープを部分的に共有していた。精製凝固因子をもちいたクロモジェニックアッセイにおいて、factor Va が存在しないあるいはきわめて低濃度(0.1 ng/ml)のとき、231D は濃度依存性に最大 87%までトロンビン生成を亢進させた。反対に、高濃度の FVa (1.0 ng/ml) が存在するとき 231D は最大 35%までトロンビン生成を阻害した (図 2a-c)。FVa が一定濃度のとき、FXa によって 231D のトロンビン生成に対する効果は生成亢進に傾いた (図 3a,b)。231D は *in vitro* のアッセイにおいてトロンビン生成亢進と抑制の二相性の効果を持っていた。

D. 考察

今回、非血栓時においても aPS/PT 陽性患者において血漿中トロンビン生成および線溶亢進マーカーが上昇していることを確認した。これより、aPS/PT の存在は向凝固状態に関連していると考えられた。さらに、マウスモノクローナル aPS/PT、231D は、APS 患者 aPS/PT と類似の特性を持ち、*in vitro* において、トロンビン生成にたいし重要な効果を与えることを確認した。すなわち、231D は Factor Va と Factor Xa の相対的濃度によってトロンビン生成に対し亢進と抑制の二相性の効果を示し、プロトロンビンに対する抗体が直接トロンビン生成を亢進させられることを示した。231D の二相性の効果が、APS の *in vivo* と *in vitro* のパラドックスにかかわっている可能性が考えられ、同時に aPS/PT の血栓原性の存在を示唆する。

E. 結論

aPS/PTはトロンビン生成と相関しており、APS患者では抗プロトロンビン抗体が逆説的にトロンビン生成亢進すなわち血栓原性をもつ可能性が示唆された。

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

1. 論文発表

1. Atsumi T, Amengual O. Genetics of antiphospholipid syndrome, In: Khamashta MA, editor. Hughes Syndrome. London: Springer (in press)
2. 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; 212-8, 2005
3. Bertolaccini ML, Atsumi T, Koike T, Hughes GRV, Khamashta MA. Antiprothrombin antibodies detected in two different assay systems: prevalence and clinical significance in systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 93; 289-97, 2005
4. Atsumi T, Furukawa S, Koike T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus* 14; 499-504, 2005
5. Bohgaki T, Amasaki Y, Nishimura N, Bohgaki M, Yamashita Y, Nishio M, Sawada K, Jodo S, Atsumi T, Koike T. Upregulated expression of tumour necrosis factor- α converting enzyme in peripheral monocytes in patients with early systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 64; 1165-73, 2005
6. Fukae J, Amasaki Y, Yamashita Y, Bohgaki T, Yasuda S, Jodo S, Atsumi T, Koike T. Butyrate Suppresses Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) Production by Regulating Specific mRNA Degradation Mediated Through a cis-acting AU-rich Element. *Arthritis Rheum* 52; 2697-707, 2005

7. Koike T, Atsumi T. Antiphospholipid Antibodies and Cell Activation -crucial role of p38 MAPK pathway-. *Lupus* 14:799-801, 2005

8. Atsumi T, Amengual O, Yasuda S, Matsuura E, Koike T. Research around beta2-glycoprotein I: a major target for antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity* 38; 377-81, 2005

9. Kasahara H, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Kobayashi K, Inagaki J, Ichikawa K, Tsutsumi A, Yasuda S, Atsumi T, Yasuda T, Koike T. Antigenic structures recognized by anti-beta2- glycoprotein I autoantibodies. *Int Immunol* 17:1533-42, 2005

2. 学会発表

1. Atsumi T, Amengual O, Sakai Y, Horita T, Yasuda S, Koike T. Induction of Tissue Factor by Monoclonal Phosphatidylserine Dependent Antiprothrombin Antibody. American College of Rheumatology 69th National Scientific Meeting, San Diego, USA. 12-17 November 2005

2. Sakai Y, Atsumi T, Amengual O, Yasuda S, Ieko M, Koike T. Effects of Phosphatidylserine Dependent Antiprothrombin Antibody on Thrombin Generation *In Vitro*. American College of Rheumatology 69th National Scientific Meeting, San Diego, USA. 12-17 November 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

謝辞

本研究は、北海道大学大学院医学研究科・病態内科学の大学院生、酒井良江先生の御協力および小池隆夫教授の御指導でおこなわれた。各先生に深謝する。

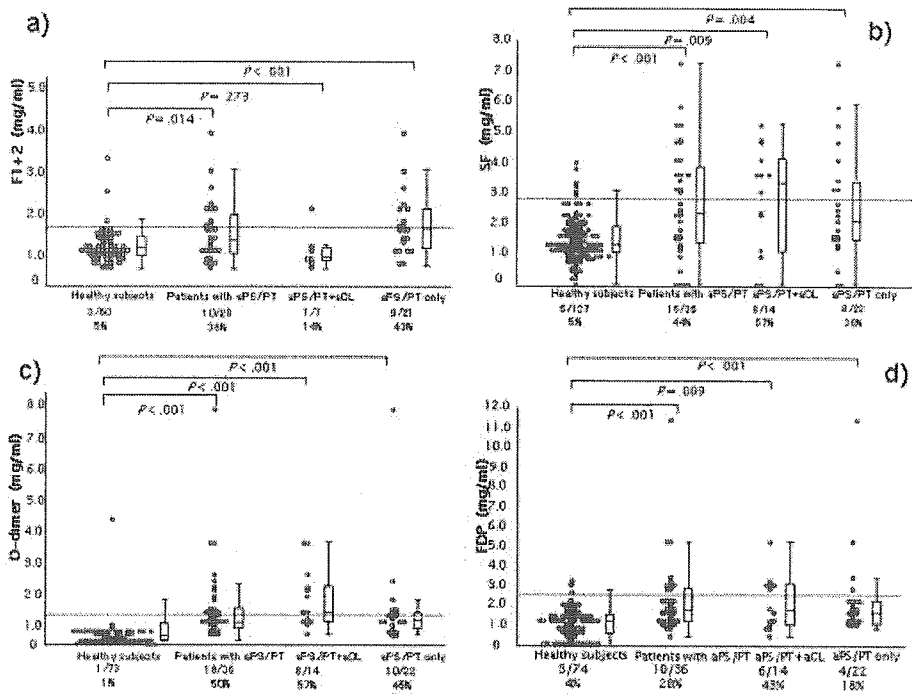


図1 血漿中の凝固・線溶亢進マーカー
 健康人、aPS/PT単独陽性APS患者、aPS/PTおよびaCL陽性患者における、血漿中凝固線溶マーカー。a) F1+2、b) フィブリンモノマー、c) Dダイマー、d) FDP。

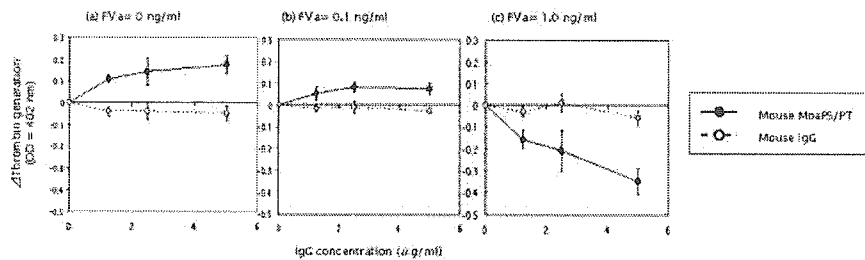


図2 トロンビン生成に対するモノクローナルaPS/PTの効果
 精製凝固因子からトロンビンが生成される系にマウスモノクローナルaPS/PT(281D)を加えてトロンビン生成に対する効果を検討した。

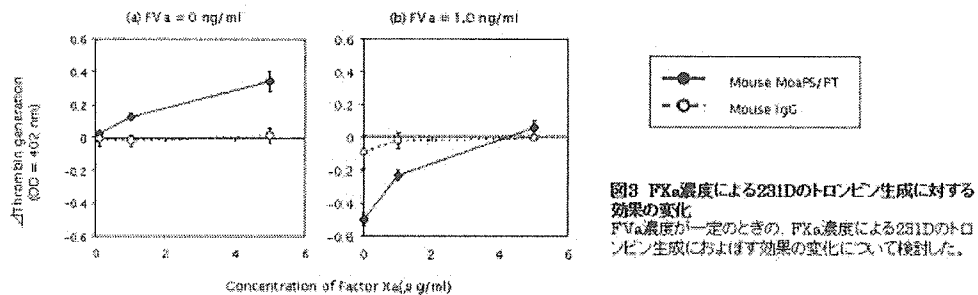


図3 FXa濃度による281Dのトロンビン生成に対する効果の変化
 FVa濃度が一定のときの、FXa濃度による281Dのトロンビン生成におよぼす効果の変化について検討した。

抗 DNA 抗体の細胞侵入による樹状細胞機能異常

分担研究者 佐々木 毅 東北大学大学院医学系研究科免疫血液病学分野 教授

研究要旨 抗 DNA 抗体が直接的に末梢血免疫系細胞に侵入して SLE での免疫異常を生じる事を示した。侵入抗体は細胞内ライソゾームに到達し、樹状細胞では形態学的変化、表面 CD83, CD1a, HLA-DR の発現誘導, IL12 の産生の惹起、同種混合リンパ球反応や、自己混合リンパ球反応における T 細胞の活性化を誘導した。これらの成績は抗 DNA 抗体による未知であった SLE 免疫異常の誘発機序を示唆する。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) は抗 DNA 抗体を代表する多彩な各種自己抗体が出現するが、特に抗 DNA 抗体は免疫複合体を形成し (III 型アレルギー機序)、各臓器 (腎糸球体など) に沈着して臓器障害を生じる。また、自己抗体は細胞表面の自己抗原と反応し細胞やレセプター機能障害を生じて自己免疫性血小板減少症や重症筋無力症等を引き起こす (II 型アレルギー機序)。この他にも自己抗体は、抗原抗体反応の機序を経ず、直接的に生細胞内に侵入しうるのではないかと示唆されている。しかし、細胞内侵入抗体が生体での機能、特に SLE 特有の自己免疫異常や臓器障害との関連では未知である。本研究では、SLE 例の血流中に存在する自己抗体が生体内の免疫系細胞に直接侵入できるか、このことと SLE 特有の免疫異常と関連しうるのかにつき明らかとする事を目的とした。

B. 研究方法

1) 症例および血清

非活動期 SLE10 例、活動期 SLE10 例、性、年齢相当健常人 10 例より血清を得た。SLE 症例における活動性は SLEDAI にて評価した。当研究は東北大学医学研究論理委員会で承認され、各症例における血清検体の使用に際しては各例よりインフォームドコンセントを得た。

2) 抗体の精製および Fluorescence isothiocyanate (FITC) 標識

血清よりプロテイン A/G カラムにて、更に DNA セルロースカラムにて免疫グロブリン (IgG) 及び

抗 DNA IgG を精製した。各々の精製 IgG (1mg/ml) を FITC で標識した。FITC 標識し、PBS (pH7.5) にて透析し以後の実験に使用した。

3) 末梢血リンパ球 (PBL) への FITC 標識免疫グロブリン (IgG)、抗 DNA IgG の侵入の検出

FITC 標識 IgG (10 μ g/ml) と PBL (1 \times 10⁶/ml) は 37 $^{\circ}$ C にて 0, 3, 6, 12, 24 時間共培養行った。共培養後 10mM クエン酸バッファー (pH3) にて PBL を処理し、その後、Phycoerythrin (PE) 標識した抗 CD3 抗体の抗体で 2 重染色を行い FACScaliber にて解析した。

4) 単球由来樹状細胞 (MDDC) の誘導及び検索

磁気ビーズ標識抗 CD14 抗体 (MACS) を用い MACS に分離した単球を、GM-CSF (30 及び IL4) 存在下に 10 日間培養した。単球由来樹状細胞 (MDDC) 1 \times 10⁵ を LPS (1 μ g/ml) あるいは抗 DNA IgG (1 μ g/ml) と 6 日間共培養し刺激し、FACScaliber にて細胞表面抗原の変化を検出した。培養上清は IL10、IL12 を測定した。また、単球由来樹状細胞を抗 DNA IgG (1 μ g/ml) と刺激後に 2400Rad 照射し、同種あるいは自己 T 細胞混合培養を行った。混合培養し、³H-thymidine を添加による T 細胞活性を検索した。

C. 研究結果

1. 活動期 SLE 血清由来精製 IgG および抗 DNA IgG の PBL 侵入

活動期 SLE IgG は 90% のサンプルが PBL 侵入を示した。一方、正常人 IgG は全てが陰性で、非活動期 SLE は 10% のみが生細胞内侵入を示した。IgG 侵入 PBL より細胞内 IgG を抽出し、ウェスタ

ンプロットにて IgG を証明できた。侵入 IgG は抗 DNA 抗体活性を示した。

IgG 侵入細胞は CD45RA+CD8+細胞、B 細胞、CD14 陽性細胞、CD56 陽性細胞であった。CD14 陽性の単球、樹状細胞では正常 IgG でも侵入を認めたと、侵入する IgG 量は少なかった。後者は Fc レセプターを介することが証明された。しかし、抗 DNA 抗体の細胞内侵入には FC レセプター以外の機序で、DNA も関与する事を認めた。

2. 抗 DNA IgG の PBL への侵入の時間経過及び細胞内分布

SLE 由来 IgG の細胞内侵入は共培養後 30 分ですでに始まり侵入のピークは 6 時間であった。6 時間を越すと細胞内抗体は減少し 24 時間後には trace となった。IgG は共培養 6 時間後には細胞質内に顆粒状に分布しており、細胞内小器管の分布に一致し、細胞内侵入 IgG の多くはライソゾームの分布に一致する形で存在した。しかし、核内へは移行せず 24 時間後には細胞内から消失した。

3. 樹状細胞に対する侵入抗 DNA IgG の作用

単球より GM-CSF 及び IL4 にて未熟単球由来樹状細胞(MDDC)を誘導し、各種のIgGと共培養して MDDC の形態的变化を追及した。健常人由来 IgG、非活動期 SLE 由来 IgG 添加は形態的な変化を誘導しなかった、が、抗 DNA IgG 侵入 MDDC は互いに凝集し、突起が太く長く伸びた。そこでは CD83 の発現増強、CD1a、HLA-DR の発現増強を認めた。また、抗 DNA IgG 侵入 MDDC に限局して IL-12 産生が、増加した。

抗 DNA 抗体侵入 MDDC での同種混合リンパ球反応、及び自己血清中で自己 MDDC と自己 T 細胞との反応を検索するにおける関与を検索した。その結果、96 時間後に同種混合リンパ球反応 さらに自己リンパ球混合反応共に増強が生じる事を認めた。

D. 考察

自己抗体が生細胞に侵入するとする報告は in vitro で細胞内 IgG が陽性という観察事実のみに基づいている。が、細胞表面での非特異的吸着抗体分子の関与の可能性等が残っていた。本研究では反応でのクエン酸緩衝液 (pH3.0) 処理、共焦点顕微鏡解析での細胞内での抗 DNA 活性を有する IgG 分子の証明を行い、SLE 由来 IgG 及び抗

DNA IgG が末梢循環血中の免疫系細胞に直接的に侵入しうる事を示した。抗 DNA 抗体が細胞内に侵入する機序には DNA が関与し、Calreticulin、Ribosomal P、Myosin1、 α -Actin、Fibronectin 等の関連が注目されるが現時点で証明はできていない。

抗 DNA 抗体が侵入できるのは、特定の免疫系細胞であった。CD8+CD45RA+T 細胞で抗 DNA 抗体が取り込まれたが、この細胞集団は、外来抗原に対してはナイーブな細胞で、自己混合リンパ球反応を起こす細胞である(29)。SLE では自己混合リンパ球反応の異常があり、これが自己免疫異常と関連も指摘されており、SLE 病態との関連が注目される。今回は、未熟な単球由来樹状細胞 (MDDC) が抗 DNA 抗体を取り込むことによって成熟化、MDDC の活性化がおこり実際に CD83、HLA-DR の強い発現増強、IL-12 の産生増加も認めた。更に、抗 DNA 抗体侵入により活性化した MDDC は、同種反応を増強するだけでなく自己に対する T 細胞反応をも強力に誘導できる事を示した。侵入抗 DNA 抗体がどのような機序で MDDC での IL12 産生、自己 MLR の誘導などを惹起するかは不明である。

今回見出した知見は SLE でも代表的な自己抗体である抗 DNA 抗体の免疫系細胞への関与であるために、SLE の病態形成との関連で興味深い。すなわち、SLE では貪食能、インターフェロン産生、MHC 表現量、アポトーシス細胞処理能他のマクロファージ、樹状細胞 (MDDC を含む) に関する多彩な機能異常が指摘されている (33-38)。これらは前述した樹状細胞を介した自己免疫異常に直結しうる問題とされるが、この樹状細胞異常を誘起する一因として何らかの原因で出現した抗 DNA 抗体が樹状細胞に直接侵入する事が挙げられる。これは SLE の未知とされる病態機序の存在を示唆している。

E. 結論

抗 DNA 抗体が直接的に末梢血免疫系細胞に侵入して SLE での免疫異常を生じる事を示した。侵入抗体は細胞内ライソゾームに到達し、樹状細胞では形態学的変化、表面 CD83、CD1a、HLA-DR の発現誘導、IL12 の産生の惹起、同種混合リンパ球反応や、自己混合リンパ球反応における T 細胞

の活性化を誘導した。これらの成績は抗 DNA 抗体による未知であった S L E 免疫異常の誘発機序を示唆する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T.Fujiwara, R.Ichinohasama, I.Miura, T.Sugawara, H.Harigae, H.Yokoyama, S.Takahashi, Y.Tohmiya, M.Yamada, K.Ishizawa, J.Kameoka, T.Sasaki. Primary effusion lymphoma of the pericardial cavity carrying t (1; 22)(q21; q11) and t (14;17)(q32;q23). *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 156: 49-53, 2005
2. S.Takahashi, H.Harigae, K.K.Ishii, M.Inomata, T.Fujiwara, H.Yokoyama, K.Ishizawa, J.Kameoka, J.D.Licht, T.Sasaki, M.Kaku. Over-expression of Flt3 induces NF- κ B pathway and increases the expression of IL-6. *Leukemia Research*. 29:893-899, 2005
3. S.Takahashi, H.Harigae, J.Kameoka, T.Sasaki, M.Kaku. AML1B transcriptional repressor function is impaired by the Flt3-internal tandem duplication. *British Journal of Hematology*. 130:428-436, 2005
4. H.Ohguchi, J.Kameoka, H.Harigae, M.Yamada, Y.Tomiya, S.Takahashi, K.Ishizawa, N.Sano, H.Sekine, T.Sasaki. Can the Helicobacter pylori Eradication Regimen Induce Platelet Recovery in H.pylori-Negative Patients With Idiopathic Thrombocytopenic Purpura? *Am J Hematol*. 78:164-5, 2005
5. I.Kadowaki, R.Ichinohasama, H.Harigae, K.Ishizawa, Y.Okitsu, J.Kameoka, T.Sasaki. Accelerated lymphangiogenesis in malignant lymphoma: possible role of VEGF-A and VEGF-C. *British Journal of Haematology*. 130:869-877, 2005
6. Y.Munakata, T.S.Ito, K.K.Ishii, H.Jie, T.Kodera, T.Ishii, Y.Hirabayashi, Y.Koyanagi, T.Sasaki. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *BLOOD*, 106(10):3449-3456
7. S.Chen, N.Ishii, S.Ine, S.Ikeda, T.Fujimura, LC Ndhlovu, P.Soroosh, K.Tada, H.Harigae, J.Kameoka,

N.Kasai, T.Sasaki, K.Sugamura. Regulatory T cell-like activity of Foxp3⁺ adult T cell leukemia cells. *International Immunology Advance Access published December 16, 2005*

8. N.Nishimoto, Y.Kanakura, K.Aozasa, T.Johkoh, M.Nakamura, S.Nakano, N.Nakano, Y.Ikeda, T.Sasaki, K.Nishioka, M.Hara, H.Taguchi, Y.Kimura, Y.Kato, H.Asaoku, S.Kumagai, F.Kodama, H.Nakahara, K.Hagihara, K.Yoshizaki, T.Kishimoto. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *BLOOD*, 106:2627 - 2633, 2005
9. Y. Munakata, T. Kodera, T. Saito, T. Sasaki. Rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, and Graves' disease after acute parvovirus B19 infection. *Lancet*, 366:780, 2005
10. T.Fujiwara, H.Harigae, S.Takahashi, K.Furuyama, O.Nakajima, J.Sun K.Igarashi, M.Yamamoto, S.Sassa, M.Kaku, T.Sasaki. Differential gene expression profiling between wild-type and ALAS2-null erythroblasts: Identification of novel heme-regulated genes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 340:105-110, 2006
11. Y.Munakata, I.Kato, T.Saito, T.Kodera, K.K.Ishii, and T.Sasaki. Human parvovirus B19 infection to monocytic cell line U937 and antibody dependent enhancement. *Virology*. 345:251-257, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし