

ポト-シス誘導には AII の合成と AT₁ 受容体への結合が関与し¹¹⁾, AT₁ 受容体阻害薬 (losartan) は肺胞上皮細胞のアポト-シスおよび BLM による肺線維化も抑制することが報告されている^{8),12)}. したがって, 単なる炎症の抑制の結果として線維化を抑制するのみならず, AT₁ 受容体阻害薬は肺線維化の様々な細胞および過程に作用し抑制していることが推測される.

E. 結 論

ACE阻害薬およびAT₁受容体阻害薬は, 肺線維症の治療薬としての可能性を有していると考えられた.

E. 文 献

1. Newman RA *et al* : Assessment of bleomycin lung toxicity using angiotensin-converting enzyme in pulmonary lavage. *Cancer Research* 1980, 40:3621-3626
2. Specks U *et al* : Bronchoalveolar lavage fluid angiotensin-converting enzyme in interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 1990, 141:117-123
3. Idell S *et al* : Angiotensin converting enzyme in bronchoalveolar lavage in ARDS. *Chest* 1987, 91:52-56
4. Wang R *et al*. Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L143-L151,2000
5. Ward WF *et al*. radiation pneumotoxicity in rats : modification by inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 22:623-625,1992
6. Otsuka M *et al*. Reduction of bleomycin-induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an antgiotensin II type I receptor antagonist. *Thorax* 2004, 59:31-38
7. Marshall RP *et al*. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 286:L156-L164
8. Li X *et al*. Essential roles for angiotensin receptor AT1a in bleomycin-induced apoptosis and lung fibrosis in mice. *Am J Pathol* 2003, 163:2523-2530
9. Bullock GR *et al* : Distribution of type-1 and type-2 angiotensin receptors in the normal human lung and in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histochem Cell Biol* 115:117-124,2001
10. Kuwano K *et al* : Attenuation of bleomycin-induced penumopathy in mice by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, 280:L316-L325
11. Wang R *et al* : Fas-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires ANGIO generation and receptor interaction. *Am J Physiol* 1999, 277:L1245-L1250
12. Li X *et al* : Bleomycin-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires angiotensin synthesis de nove. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 284:L501-L507

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録

なし

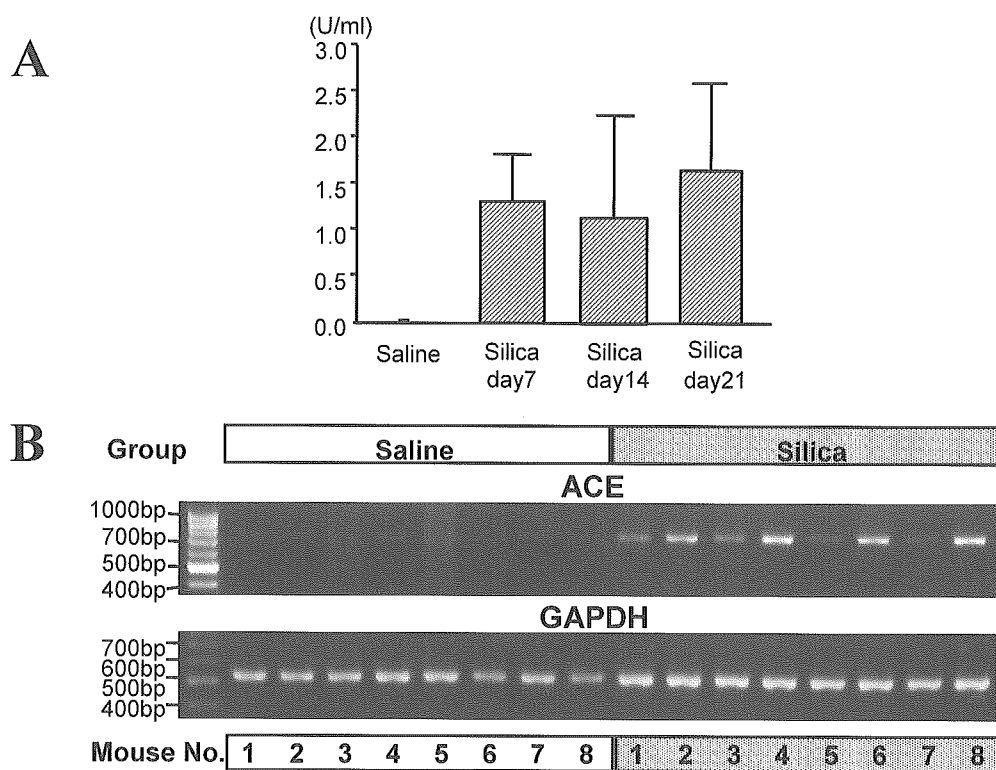


図1 シリカ肺線維症モデルにおけるBALF中ACEの活性(A)とmRNA(B)

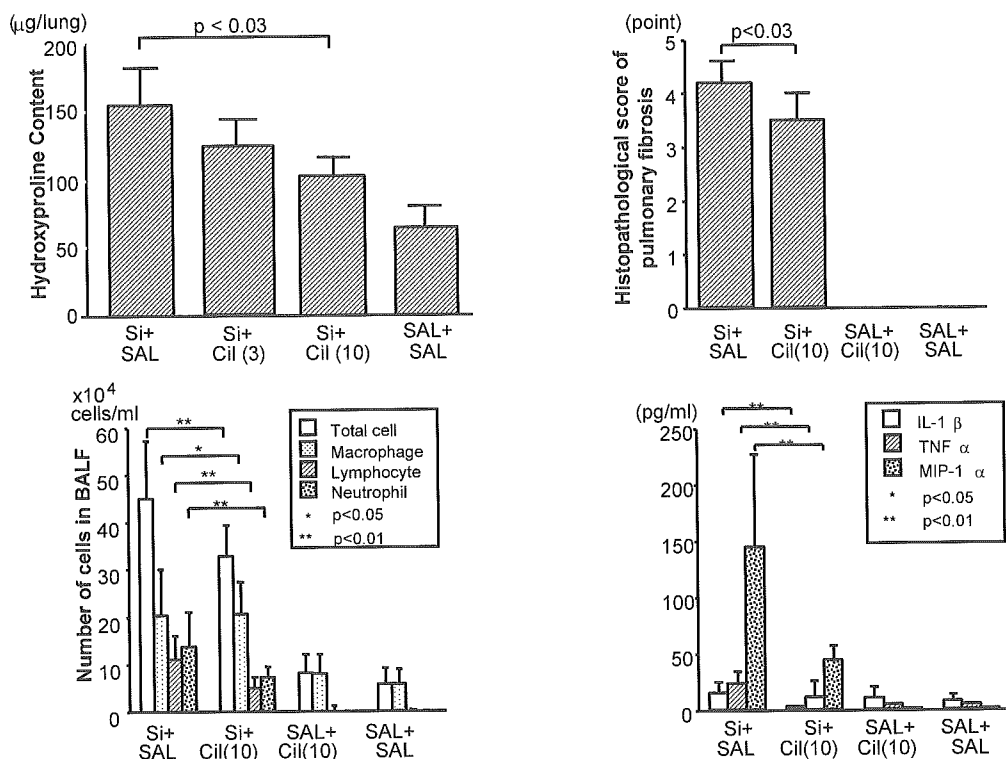


図2 シリカ肺線維症モデルに対するアンジオテンシン変換酵素阻害薬の効果

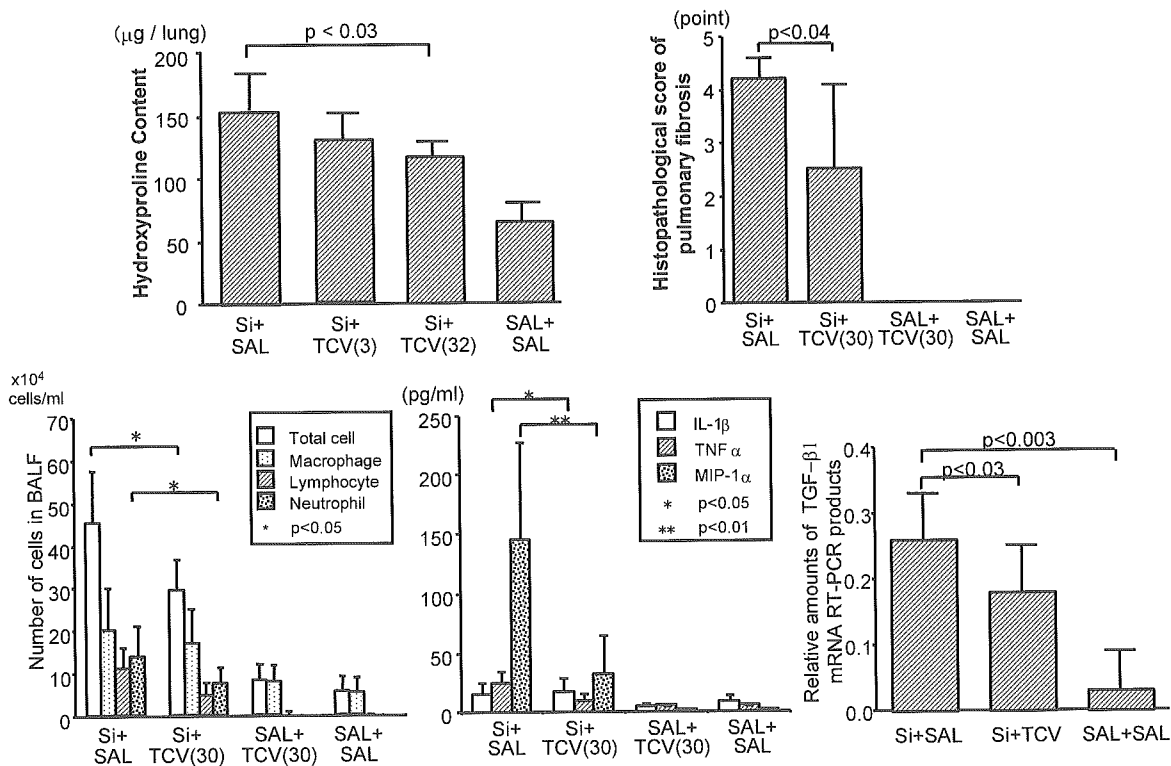


図3 シリカ肺線維症モデルに対するアンジオテンシンタイプ1受容体拮抗薬の効果

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

強皮症患者における CD1d アイソフォームと
NKT 細胞反応性の解析

分担研究者	後藤大輔	筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻臨床免疫学講師
協力者	松本 功	筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻臨床免疫学講師
	伊藤 聡	筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻臨床免疫学講師
	堤 明人	筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻臨床免疫学助教授
	住田孝之	筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻臨床免疫学教授

研究要旨

NKT 細胞と強皮症をはじめとする自己免疫疾患との関係は以前から数多くの報告があるも、その原因に関しては不明のままである。今回、当教室で見出した可溶性 CD1d 分子に着目し、研究を行った。可溶性 CD1d は蛋白として発現しうる分子であり、予想通り細胞外へと分泌される可溶性の分子であった。健康人および強皮症患者、それぞれの末梢血単核球での CD1d アイソフォームの発現量を測定するため、mRNA の発現を定量 PCR 法にて測定したところ、強皮症患者の可溶性 CD1d の発現が有意に増加していた。さらに抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体を作製し、これを用いて CD1d アイソフォームの血清中の蛋白発現量を ELISA 法にて測定を行った。この手法により、強皮症患者血清において蛋白としての可溶性 CD1d 量も有意に増加していた。さらに、可溶性 CD1d 分子が NKT 細胞に及ぼす影響をみてみると、可溶性 CD1d 過剰投与により、NKT 細胞の増殖を抑制する傾向が認められた。このことより、強皮症において NKT 細胞が減少しているのは、可溶性 CD1d 分子により NKT 細胞の増殖が抑制されていることによる可能性が示唆された。

A. 研究目的

Natural Killer T 細胞(NKT 細胞)は、第四のリンパ球とも呼ばれ、比較的新しい T 細胞集団とし

て報告されている。この細胞は、多様性を欠いた

T Cell Receptor (TCR) を発現するユニークな集団で、また、認識抗原として通常の TCR がペプ

チド抗原を認識するのは異なり、CD1d 上の糖脂質抗原を認識することも特徴とされている細胞群である¹。

NKT 細胞はまた、自己免疫病モデルマウス²や強皮症をはじめとする自己免疫病患者³⁻⁶において、選択的に減少していることも我々の以前の発表も含め、数多く報告されている。

また、我々が強皮症をはじめとした自己免疫疾患患者と健常人での NKT 細胞数を検討したデータにおいても、やはり強皮症をはじめとする種々の自己免疫疾患で、健常人と比較して NKT 細胞が有意に減少している結果を得ている。

強皮症をはじめとする自己免疫疾患において、NKT 細胞が減っている原因を模索する間に、我々は新たな知見として、CD1d 分子に選択的スプライシングによる複数の変異型(アイソフォーム)が存在する可能性を見出した。具体的には変異型 CD1d は、variant (V)1 から V8 まで 8 つのバリエーションが存在する可能性が示唆され、中でも抗原結合部位を完全に保存している V1 と V2 に関しては、何らかの機能を有する可能性が有ると考えられた⁷。また、V2 に関しては膜貫通部位が欠損していることから、可溶性の CD1d であることが予想された。

そこで本研究では、強皮症患者における NKT 細胞の増殖能の低下の原因として、完全型 CD1d 分子と2種類の抗原結合部位の保たれているアイソフォームである V1、V2、他の膠原病での研究結果に基づき、特に可溶性 CD1d と予想される V2 に着目し、NKT 細胞の動態との関連性について検討を行い、さらに可溶性 CD1d の NKT 細胞への作用を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 定量 PCR 法

末梢血単核球から抽出した mRNA を用いて cDNA を作製し、これらを鋳型として以前の報告⁷を参照し、定量 PCR を行った。測定は ABI Prism 7300 (Applied Biosystems Japan K.K.) を使用し、数値は 3 回測定したものの平均値とした。定量値の標準化のためにグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の発現量も同時に測定した。

2) 免疫プロット法

ヒトリコンビナント Flag タグ付き完全型 CD1d、変異型 CD1d をそれぞれ 12% ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は一次抗体として抗 Flag 抗体、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を用いて発色させた。また、可溶性 CD1d 作製時の実験においては、ペルオキシダーゼ標識抗 Flag 抗体を用いた。

3) ELISA

血清中の可溶性 CD1d の測定は ELISA 法にて行った。96 穴の ELISA 用プレートを $1 \mu\text{g/ml}$ の我々が作製した抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体にて固相化し、PBS にて 8 倍希釈した BlockAce (Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Sapporo, JPN) にてブロッキングした後、TBS/TC にて 8 倍希釈した血清を入れ、 37°C で 1 時間反応させた。検出には、抗 CD1d モノクローナル抗体 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) とペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を用いた。このシステムに関しては、更に感度等上げるよう改良中である。抽出した健常人の血清中可溶性 CD1d 測定時の吸光度を仮の

unit/mlとした。

4) 対象患者

対象は可溶性 CD1d の mRNA 量の測定と血清中の蛋白発現量の測定に分けて行い、それぞれ厚生省強皮症調査研究班(1989)による強皮症の診断基準を満たす、当院通院中の強皮症患者 12 名、31 名とボランティアとして参加した健康人 14 名、34 名とした。いずれも本研究にあたり、書面にて同意を頂いた上で、対象とした。

5) 細胞調整と NKT 細胞の刺激

C57BL/6 マウスの脾臓細胞を RPMI1640(10% 血清)で、96 穴プレートにて 2×10^5 細胞/200 μ l/well で培養。NKT 細胞の増殖刺激のため、抗原の α -galactosylceramide (α -GalCer)を 100ng/ml で共培養した。

6) FACS

NKT 細胞の検出の為に Dimer XI: Recombinant Soluble Dimeric Mouse CD1d、PE-Cy5 anti-mouse CD3e、PE anti-mouse IgG₁ (BD pharmingen, CA, USA)を使用し、EPICS XL (Beckman Coulter, Inc., CA, USA)にて解析を行った。

C. 研究結果

1) 末梢血単核球での可溶性 CD1dmRNA 量の測定

末梢血単核球を用いて、可溶性 CD1d の mRNA 発現を、定量 PCR 法を用いて測定した。

その結果、強皮症患者での可溶性 CD1d の mRNA 発現は、健康人と比較して有意に ($P=0.0117$) 増加していることが明らかとなった(図 2)。

2) 血清可溶性 CD1d 量の測定

以前、我々が作製したと報告した抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体を用いて、血清中の可溶性 CD1d 蛋白量を ELISA 法により測定するシステムを確立した。

この方法を用いて、強皮症患者 31 名と健康人 34 名とで、血清中の可溶性 CD1d の蛋白量に差があるか否かを検討した。その結果、強皮症患者群において健康人と比較し、血清中に可溶性 CD1d が有意に ($P=0.0190$) 多く存在することが明らかとなった(図 3)。

4) 可溶性 CD1d の NKT 細胞に対する影響

それでは可溶性 CD1d は NKT 細胞に対してどのような影響を及ぼすのか。この点を明らかにするために、先ず NKT 細胞の抗原刺激による増殖能に対する可溶性 CD1d の影響を調べた。

C57BL/6 マウスの脾臓細胞を用いて、抗原である α -GalCer で NKT 細胞を増殖させ、それに対する可溶性 CD1d 過剰投与時の反応をみた。まだ予備実験の段階だが、通常の CD1d を介した NKT 細胞の増殖は、過剰量の可溶性 CD1d が共存することにより、容量依存性に増殖を抑制する傾向が認められた(図 4)。

D. 考察

強皮症をはじめとした自己免疫疾患患者において NKT 細胞が減少していることは以前より、数多く報告されているが、その原因に関しては不明のままである。その手がかりの一つとして、当教室において幾つかの変異型 CD1d を見出し、研究を進めている。以前行った実験から、自己免疫疾患において可溶性 CD1d (V2) に関しては、健康人との間で mRNA の発現量に差が認められた⁷ため、本研究では可溶性 CD1d 分子に注目

して実験を行った。

まず、可溶性 CD1d の発現ベクターを作製し蛋白発現を見たところ、可溶性 CD1d は蛋白として発現し、さらに、予想通り可溶性分子として細胞外に分泌されることも確認された。これにより、蛋白として可溶性 CD1d が生体内に存在し、さらに、可溶性分子として抗原提示細胞外に分泌され、血液、組織中に存在する可能性が示唆された。

この結果を受けて、まず末梢血単核球での可溶性 CD1d の発現量の差違を健常人と強皮症患者にて定量 PCR 法にて検討した。その結果、強皮症患者において可溶性 CD1d の mRNA 発現が有意に増加しているという結果が得られた。今後さらに測定法の改良と検体数の増加により、信頼度を増していくことが必要と考えている。

次に、血清中の可溶性 CD1d を ELISA 法にて測定すべく、既に作製している抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体を用いて、ELISA 法での測定方法を確立しつつある。

この方法にて強皮症患者と健常人の血清可溶性 CD1d 蛋白量を測定したところ、有意に強皮症患者血清において可溶性 CD1d が増えていた。

さらに、抗原刺激による NKT 細胞の増殖に対して、可溶性 CD1d を過剰に共存させることにより、NKT 細胞の増殖が抑制された。このことより、可溶性 CD1d は NKT 細胞の増殖を抑制する作用があることが示唆された。

以上より、可溶性 CD1d の mRNA の発現と血清中の蛋白量の解析結果、そして増殖抑制機能の存在の可能性を示す結果より、強皮症患者においては、血清可溶性 CD1d が増加することにより、NKT 細胞が減少している可能性が示唆されている。すなわち、血清中の可溶性 CD1d が単独、あ

るいは何らかのほかの分子と共に、NKT 細胞の増殖を抑制していると考えられる。

今後は、自己抗体の発現の有無や、症状 (diffuse 型か limited 型か) の違いによる、可溶性 CD1d の発現の差異に関しても検討する必要があると考える。

可溶性 CD1d に関しては、もう一つ重要な機能の確認が残されている。すなわち、可溶性 CD1d 分子が NKT 細胞に対して、どのようなサイトカイン調節を行っているのか。また、抗原は完全型 CD1d 分子と同様に α -GalCer などの糖脂質を介して、NKT 細胞の TCR を認識しているのか。今後さらなる研究を進めることが必要であると考える。

最近 NKT 細胞に関する研究も盛んに行われており、今まで生体内でのリガンドは不明とされていたが、2004 年に初めて isoglobotrihexosylceramide (iGb3) が生体内で免疫系の調節も含めた作用を持つリガンドとして報告⁸されている。そして強皮症をはじめとする自己免疫疾患と NKT 細胞との研究も盛んに報告されているが、病因の解明には至っていない。今後、可溶性 CD1d 分子に関する本研究のさらなる成果により、NKT 細胞を制御することで、強皮症をはじめとする自己免疫疾患の治療も可能となると考える。

E. 結論

強皮症患者において、NKT 細胞が減少している原因として、可溶性 CD1d の増加が関与している可能性が示唆された。可溶性 CD1d を介した NKT 細胞に対する刺激のメカニズムを解析することにより、今後 NKT 細胞減少している強皮症を

はじめとした自己免疫疾患発症のメカニズムが明らかとなるとともに、新たな治療法の手がかりとなることも期待される。

F. 文献

1. Bendelac, A. et al.: Mouse CD1-specific NK1 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 535, 1997
2. Mieza, M.A. et al.: Selective reduction of V α 24⁺ NKT cells associated with disease development in autoimmune-prone mice. *J. Immunol.* 156:4035, 1996
3. Sumida, T. et al.: Selective reduction of T cells bearing invariant V α 24J α Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J. Exp. Med.* 182:1163, 1995
4. Kojo, S. et al.: Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18⁺, BV11⁺ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 44:1127, 2001
5. Illes, Z. et al.: Differential expression of natural killer T cell V α 24J α Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Immunol.* 164:4375, 2000
6. Yanagihara, Y. et al.: Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* 118:131, 1999
7. Kojo, S. et al.: Low expression levels of

soluble CD1d gene in patients with Rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 30: 2524, 2003

8. Dapeng Z. et al.: Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells. *Science* 306: 1786, 2004

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 関節炎モデルマウスにおける NKT 細胞の役割

吉賀洋平、後藤大輔、大西康之、堤 明人、松本 功、伊藤 聡、住田孝之

第 49 回日本リウマチ学会学術総会・学術集会 / 第 14 回国際リウマチシンポジウム、横浜、2005

2) 自己免疫疾患患者における可溶性 CD1d 遺伝子の発現に関する検討

後藤大輔、吉賀洋平、香城 諭、松本 功、伊藤 聡、堤 明人、住田孝之

第 49 回日本リウマチ学会学術総会・学術集会 / 第 14 回国際リウマチシンポジウム、横浜、2005

3) 自己免疫疾患患者における CD1d 分子変異体と NKT 細胞反応性の解析

後藤大輔、吉賀洋平、香城 諭、松本 功、伊藤 聡、堤 明人、住田孝之

第 35 回日本免疫学会総会・学術集会、横浜、2005

4) コラーゲン誘導関節炎マウスにおける NKT 細胞の役割

吉賀洋平、後藤大輔、大西康之、松本 功、
 伊藤 聡、堤 明人、住田孝之
 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会、横浜、
 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

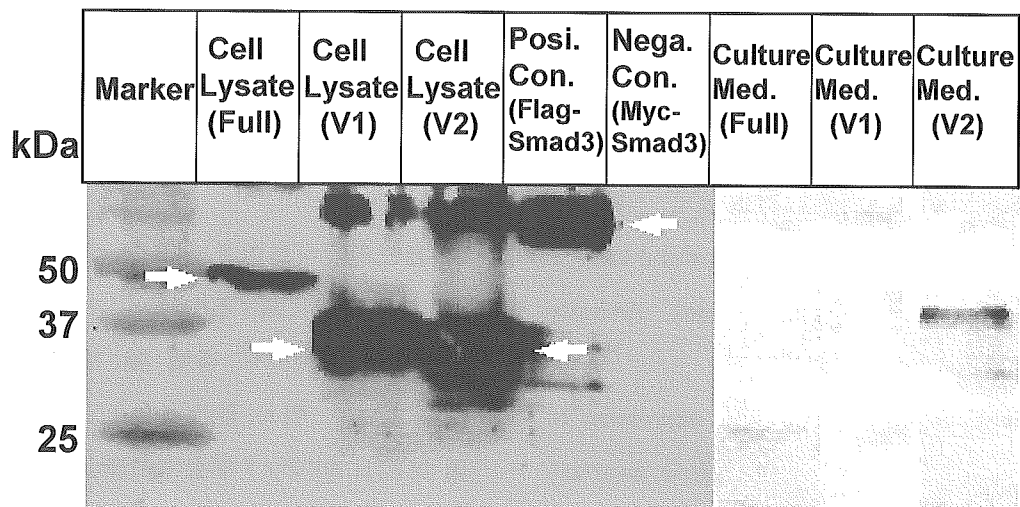


図 1：免疫ブロット法による変異型 CD1d 分子の発現の確認。Cos1 細胞に完全型 CD1d と変異型 CD1d の Flag タグ付きの発現ベクターを形質導入し、その発現を細胞溶解液 (cell lysate) と培養上清 (culture medium) に分けて確認した。抗 Flag 抗体を蛋白検出のために使用した。

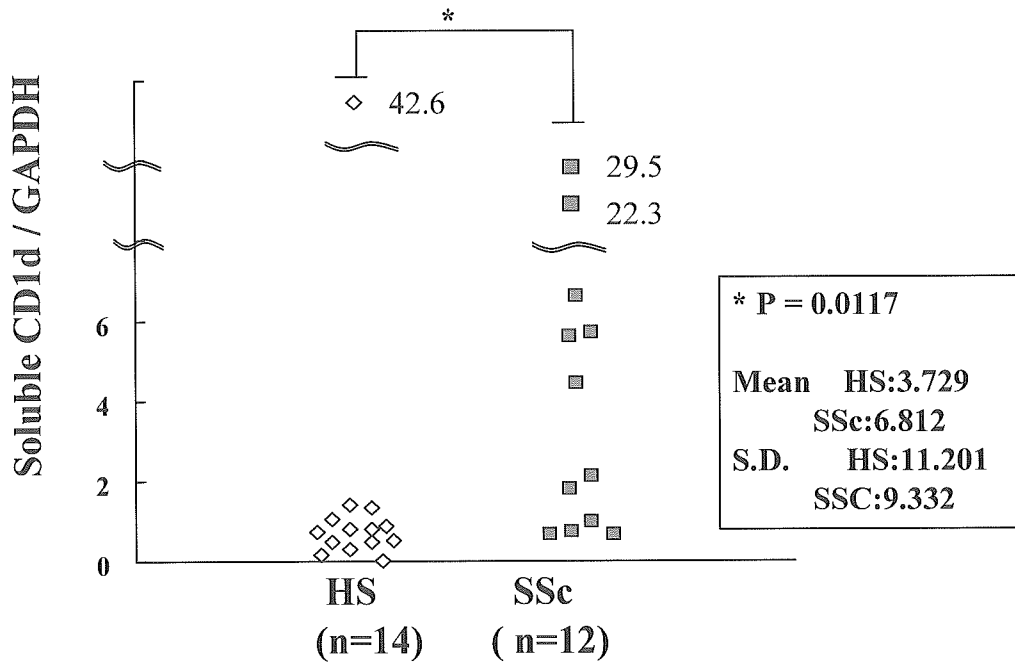


図 2：定量 PCR 法を用いた健常人と強皮症患者での末梢血単核球での可溶性 CD1d-mRNA の発現量の比較。GAPDH-mRNA の発現量で標準化し、定量を行った。それぞれの平均値 (mean) と標準偏差 (S.D.) は図に示す通りである。

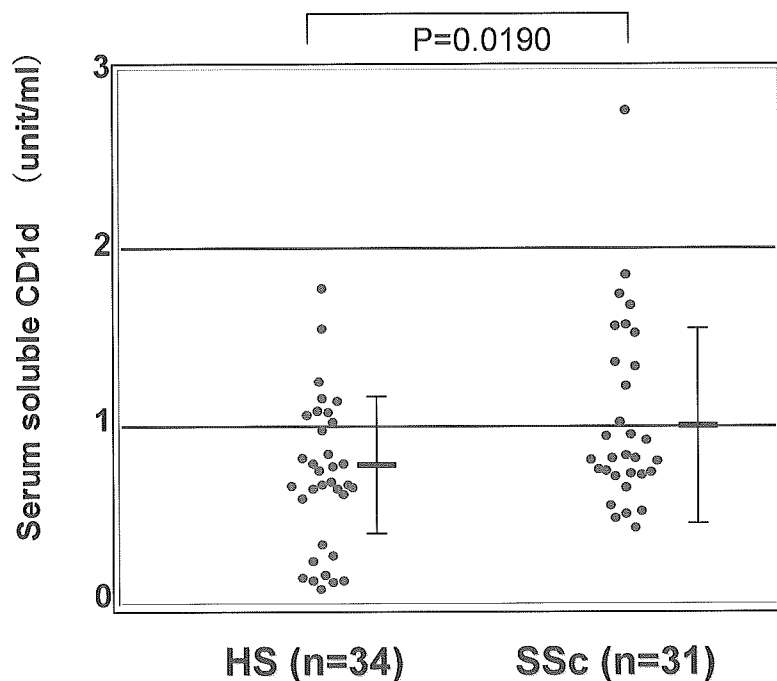


図 3：健常人と強皮症患者での血清中可溶性 CD1d 蛋白の発現量の比較。作製した抗可溶性 CD1d ポリクローナル抗体と抗 CD1d モノクローナル抗体とのサンドイッチ ELISA 法にて、測定した。特定の健常人の血清中可溶性 CD1d 測定時の ELISA での吸光度を、仮の unit/ml とした。図中の各棒は中央の横棒が平均、上下の横棒は標準偏差を示す。

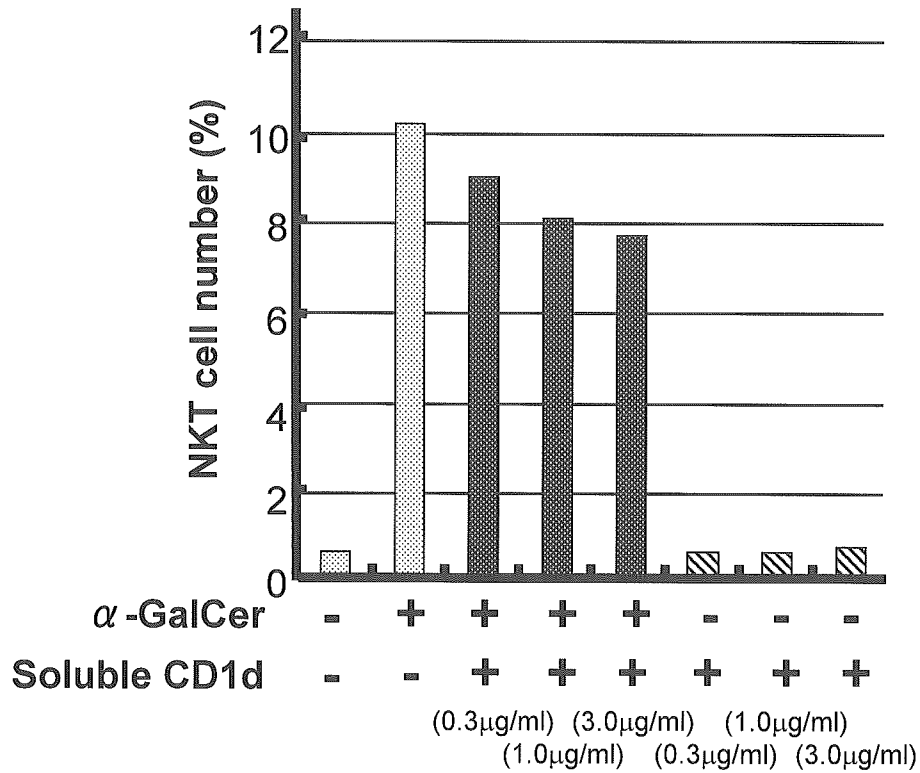


図 4 : 抗原刺激による NKT 細胞の増殖に対する可溶性 CD1d の影響。C57BL/6 マウスの脾臓細胞を用いて、抗原 α -GalCer (100ng/ml) で NKT 細胞を 72 時間刺激し増殖させた。NKT 細胞の測定は FACS にて行い、全細胞数の何%を NKT 細胞が占めるかを示した。NKT 細胞は、 α -GalCer/CD1d dimer 陽性+CD3 陽性細胞で検出した。NKT 細胞は抗原刺激により割合が約 10 倍に増えるが、共存させるリコンビナント可溶性 CD1d 量を振ることにより、共存量依存性に増殖抑制が掛かる傾向を認めた。

全身性強皮症における BAFF の発現異常

分担研究者	長谷川稔	金沢大学医学部附属病院皮膚科講師
協力者	松下貴史	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
協力者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
分担研究者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family)は B 細胞の生存・分化に重要な分子である。今回我々は、全身性強皮症(systemic sclerosis; SSc)患者の血清 BAFF 値を ELISA で測定した。強皮症患者の血清 BAFF 値は皮膚硬化の重症度と相関して上昇しており、経時的には皮膚硬化や内臓病変の活動性を反映した。また強皮症患者皮膚では BAFF mRNA の発現増強が認められた。さらに強皮症患者の B 細胞では BAFF 受容体の発現が亢進しており、BAFF の刺激により健常人 B 細胞よりも IgG と IL-6 を有意に多く産生した。BAFF を介したシグナルが強皮症の病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症(systemic sclerosis; SSc)は、その発症に免疫異常が重要であることがわかっており、T 細胞および B 細胞の異常が報告されている(1)。自己抗体は SSc 患者の 90%以上は陽性であり、抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 RNA ポリメラーゼ I/III 抗体、抗セントロメア抗体などが検出される。また SSc 患者では高 γ グロブリン血症や B 細胞異常活性化を認める(2, 3)。さらに SSc のモデルマウスである tight-skin マウスでも B 細胞の慢性的活性化を認め、B 細胞が自己抗体産生のみならず皮膚硬化にも寄与していることが示

されている(4)。SSc の病因は解明されていないものの、自己抗体産生や異常活性化を介して B 細胞が SSc の発症に重要であることがわかっている。

近年、B 細胞は自己抗体産生細胞としてだけではなく、その抗原提示能や B 細胞由来のサイトカイン産生、T-B 細胞相互作用を介してリウマチ性疾患の病態形成に強く関与していることが明らかにされてきた。さらにリウマチ性疾患で抗 CD20 抗体などの B 細胞をターゲットとした治療の有効性が相次いで報告され、成因・治療における B 細胞の重要性が示された。1999 年に BAFF が発

見られて以来, B 細胞の生存・分化, 末梢トレランス破綻に BAFF (B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family)が非常に重要であることが明らかにされた(5). BAFF は TNF ファミリーに属する分子で単球, マクロファージ, 樹状細胞の細胞膜上に発現され, 可溶型として分泌される. BAFF の受容体には BAFF-R (BAFF receptor), BCMA (B-cell maturation antigen)および TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor)の 3 種類が知られておりいずれも B 細胞の広範な分化段階において発現がみられる. BAFF シグナルは主に BAFF-R を介して伝えられ(6), TACI は抑制性のシグナルを伝達している(7). BAFF は B 細胞上の受容体との結合により未熟 B 細胞の生存と分化, 成熟 B 細胞の増殖, 自己反応性 B 細胞の生存を制御する. BAFF 過剰発現マウスでは全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)や Sjögren 症候群に類似した症状を呈する(8). さらに SLE 自然発症モデルマウスや関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)モデルマウスであるコラーゲン誘導関節炎において BAFF アンタゴニストの投与にて症状が改善することが明らかにされた(8-10). そして SLE や RA, Sjögren 症候群, 全身性強皮症の患者において血清 BAFF 値の上昇が報告されている(11-14). BAFF は末梢性 B 細胞の分化・生存に影響することから, BAFF/BAFF 受容体の異常が末梢性トレランスの破綻を来し, リウマチ性疾患の発症に関与していると推測される. 近年 SLE や RA において B 細胞をターゲットとした治療が脚光を浴びており, BAFF が有望な治療標的となることが期待されて

いる. そこで, 今回 SSc おける BAFF の発現異常を解析した.

B. 研究方法

1) 対象患者

対象は SSc 患者 83 例(女性 70 例, 男性 13 例)であり年齢は 53(20-80)歳であった. 罹病期間は 2.3(0.2-30) 年であった. 病型別では diffuse cutaneous SSc (dSSc)が 45 例, limited cutaneous SSc (lSSc)が 38 例であった. 初診時 5 例の SSc 患者で少量のステロイド(プレドニゾン 5-20 mg/日)が投与されており, 8 例の SSc 患者で少量の D-ペニシラミン(100-300 mg/日)が投与されていた. 初診時, 他の免疫抑制剤にて治療された患者はいなかった. 25 例の SLE 患者, 25 例の皮膚筋炎患者および 25 例の健常人をコントロールとして用いた.

BAFF の経時的変化の検討においては 21 例の SSc (dSSc 14 例, lSSc 7 例)患者血清を使用した. 女性 16 例, 男性 5 例であり, 年齢は 54 (20-68) 歳であった. 罹病期間は 3.0 (0.2-10)年で, 6.0 (2-6)年間フォローアップされた. 初診時 2 例の SSc 患者で少量のステロイド(プレドニゾン 5-20 mg/日)が投与されており, 経過中に 11 例の SSc 患者が少量のステロイドを投与された(プレドニゾン 5-20 mg/日). 初診時 2 例の SSc 患者で少量の D-ペニシラミン(100-300 mg/日)が投与されており, 経過中に 1 例の SSc 患者が少量の D-ペニシラミンを投与された(200 mg/日). また, 経過中他の免疫抑制剤による治療は行われなかった.

2) ELISA

血清 BAFF 値は ELISA キット(R&D systems,

Minneapolis, MN, USA)を用いて測定した。

3) Real time RT-PCR

発症3年以内と発症6年以上の dSSc 患者、肥厚性癬痕患者の病変皮膚および健常人の皮膚より mRNA を抽出し、BAFF mRNA の発現量を real time RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)にて測定した。

4) フローサイトメトリー

抗 BAFF-R 抗体-PE 標識と抗 CD19 抗体-FITC 標識にて SSc 患者および健常人の B 細胞上の BAFF-R の発現を FACScan flow cytometer (BD PharMingen, San Diego, CA, USA)にて測定した。

5) B 細胞のサイトカイン, IgG 産生能

SSc 患者および健常人の末梢血単核球から B 細胞を抽出し(B cell Isolation Kit II, human, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 0.01% *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC; Sigma St. Louis, MO) と 1 µg/ml の recombinant human BAFF (Peprotech, London, UK)の存在下にて培養した。その培養上清中の IL-6, IL-10 および IgG を ELISA にて測定した。

6) 統計学的検討

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。p<0.05 を有意とした。数値は断りのない限り中央値 (範囲)で示した。

C. 研究結果

1) SSc における血清 BAFF 値

SSc, SLE, 皮膚筋炎患者群の血清 BAFF 値は、健常人群よりも有意に上昇しており、なかでも SLE 患者群での上昇は、これまで報告されているように顕著であった(図 1)。dSSc 患者群の血清

BAFF 値は、ISSc よりも有意に上昇しており SLE と同程度であった。

健常人の平均値 + 2SD (1.245 ng/ml) をカットオフ値とすると、SSc 全体では 52% (43/83) で血清 BAFF 値が上昇していた。

2) SSc における血清 BAFF 値と臨床所見との相関

初診時における血清 BAFF 値と臨床所見との相関を表 1 に示す。血清 BAFF 値が高値であった SSc 患者では、血清 BAFF 値が正常であった SSc 患者と比較して、modified Rodnan total skin thickness score (modified Rodnan TSS)が高値で、関節炎、筋炎、%VC の低下、赤沈の上昇がより高率に認められた。さらに、血清 BAFF 値は modified Rodnan TSS, 赤沈値と有意な正の相関を示した(図 2)。

3) SSc における血清 BAFF 値の経時的変化の検討

BAFF の経時的変化の検討においては SSc 患者 21 例の 6.0 (2-6)年間のフォローアップ中に、7 例で血清 BAFF 値の減少、3 例で血清 BAFF 値の上昇が認められ、残りの 11 例では明らかな変動が認められなかった(図 3)。

血清 BAFF 値の減少が認められた 7 例全てが dSSc 患者で、罹病期間 2.0 (0.2-3.0)年と早期例であった。初診時ステロイドにて治療されていた患者はいなかったが、経過中に全例で少量のステロイドが投与された(プレドニゾン 5-20 mg/日)。また経過中、血清 BAFF 値の減少と相関するように modified Rodnan TSS の減少を認めた(図 3A)。

血清 BAFF 値が不変であった 11 例は、dSSc 患者が 4 例で、ISSc 患者が 7 例であった。罹病期

間は 5.0 (1.0-10) 年で, 初診時 1 例の dSSc 患者で少量のステロイド(プレドニゾン 10 mg/日)が投与されており, 経過中に 3 例の dSSc 患者が少量のステロイドを投与された(プレドニゾン 5-20 mg/日) (図 3B).

血清 BAFF 値の上昇が認められた 3 例全てが dSSc 患者で, 罹病期間 1.5 (0.3-8) 年であった. 1 例目は血清 BAFF 値の上昇後, 間質性肺炎の亜急性増悪を認めステロイドパルスおよびプレドニゾン 40 mg/日にて治療するも死亡された. 2 例目はステロイド剤の治療歴はなく, 強皮症腎を発症し血清 BAFF 値が最高値の時に心タンポナーゲにて死亡された. 3 例目はプレドニゾン 20 mg/日にて治療され, 間質性肺炎とそれに伴う 2 次性肺高血圧症を発症し血清 BAFF 値が最高値の時に死亡された.

このように, 概して血清 BAFF 値は皮膚硬化の改善に平行して低下し, さらに経過中に血清 BAFF 値が上昇する例では臓器病変の新たな出現や増悪を認めた.

4) dSSc 患者皮膚での BAFF mRNA 発現量.

発症 3 年以内の early-stage の dSSc 患者皮膚と発症 6 年以上経過した late-stage の dSSc 患者皮膚での BAFF mRNA を real-time RT-PCR にて定量した. BAFF mRNA は early-stage の dSSc 患者で高発現されており, late-stage では発現が低下していた. 皮膚線維化の疾患コントロールとして肥厚性癬痕患者の病変皮膚の BAFF mRNA の発現を検討したが健常皮膚と同程度の発現であった.

5) B 細胞の BAFF-R 発現

SSc 患者由来 B 細胞では BAFF-R の発現が健常人 B 細胞よりも有意に亢進していた.

6) B 細胞のサイトカイン, IgG 産生能

SSc 患者および健常人の末梢血単核球から B 細胞を抽出し recombinant human BAFF と 0.01% SAC の存在下にて培養したところ, IL-10 産生は差がなかったものの SSc 患者由来 B 細胞では IL-6 産生および IgG 産生が健常人 B 細胞よりも有意に亢進していた.

D. 考案

SSc 患者の血清 BAFF 値は上昇しており, 皮膚硬化の指標である modified Rodnan total skin thickness score との相関を認めた(図 1, 2, 表 1). また血清 BAFF 値の経時的解析を行うと皮膚硬化の改善とともに BAFF 値の低下を認め, 経過中に BAFF 値が上昇する例では臓器病変の新たな出現や増悪を認めていること(図 3)より, 血清 BAFF 値は SSc において活動性を反映する指標となりうることを示唆された.

BAFF およびその受容体の遺伝子改変マウスを用いた実験により BAFF と自己免疫性疾患との関連が示されている(5). BAFF 過剰発現マウスでは末梢 B 細胞数の増加, transitional type 2 B 細胞・marginal zone B 細胞の増加による脾腫大, T 細胞非依存性・依存性抗体産生の増強を認め, SLE でみられる様な高 γ グロブリン血症, 抗二本鎖 DNA 抗体や免疫複合体の産生, 腎臓に免疫グロブリンの沈着, そして蛋白尿が出現する(8, 15, 16). さらに BAFF アンタゴニストの投与にて SLE 自然発症モデルマウスや RA モデルマウスであるコラーゲン誘導関節炎の症状が改善することより, リウマチ性疾患において BAFF システムの異常が重要な役割を果たしていると考えられている. 実際, SLE や RA, Sjögren 症候群の患者

において血清 BAFF 値の上昇が報告されており、それぞれ抗二本鎖 DNA 抗体, リウマチ因子, 抗 SS-A 抗体との相関関係が認められる(11, 12, 17). 今回, SSc においても血清 BAFF 値の上昇が確認された. さらに RA 患者関節液中の BAFF 値は血清 BAFF 値よりも高濃度であり, 局所的な BAFF の産生が RA の関節炎の形成に関与していることが示唆されており(11), 我々の検討でも SSc 患者皮膚局所での BAFF mRNA 発現を確認している(図 4).

early-stage の SSc 患者血清では IL-6 の上昇が報告されている(18). さらに IL-6 は SSc 患者由来線維芽細胞において用量依存性に膠原線維の産生を増強する. また, tight-skin マウスは B 細胞由来の IL-6 産生低下とともに皮膚硬化の改善が認められている(4). このことより IL-6 は SSc の線維化において促進的役割を果たしているサイトカインと考えられている. BAFF は, その刺激により SSc 患者由来 B 細胞の IL-6 産生を増強すること(図 5)より, 皮膚硬化の進展にも関与している可能性が示された.

E. 結論

近年, リウマチ性疾患において治療ターゲットとしての B 細胞に脚光が集まっている. BAFF/BAFF 受容体の異常が SSc において示されたことより, 今後 BAFF をターゲットとした分子標的薬が SSc の新規治療薬となりうることが示唆された.

F. 文献

1. White B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:695-708.
2. Famularo G, Giacomelli R, Alesse E, Cifone MG, Morrone S, Boirivant M, et al. Polyclonal B lymphocyte activation in progressive systemic sclerosis. *J Clin Lab Immunol*. 1989;29:59-63.
3. Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JRT. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum*. 1977;20:975-84.
4. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002;109:1453-62.
5. Mackay F, Browning JL. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:465-75.
6. Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 2001;293:2108-11.
7. Yan M, Wang H, Chan B, Roose-Girma M, Erickson S, Baker T, et al. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol* 2001;2:638-43.
8. Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell

- autoimmune disease. *Nature* 2000;404:995-9.
9. Kayagaki N, Yan M, Seshasayee D, Wang H, Lee W, French DM, et al. BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity* 2002;17:515-24.
 10. Wang H, Marsters SA, Baker T, Chan B, Lee WP, Fu L, et al. TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice. *Nat Immunol* 2001;2:632-7.
 11. Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2001;44:1313-9.
 12. Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcon GS, Fessler BJ, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:6-10.
 13. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 2002;109:59-68.
 14. Stohl W, Metyas S, Tan SM, Cheema GS, Oamar B, Xu D, et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis Rheum* 2003;48:3475-86.
 15. Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 1999;190:1697-710.
 16. Khare SD, Sarosi I, Xia XZ, McCabe S, Miner K, Solovyev I, et al. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3370-5.
 17. Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, et al. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003;62:168-71.
 18. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998;25:308-13.

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, and Sato S: Elevated Serum BAFF Levels in Patients with Systemic Sclerosis (SSc): Enhanced BAFF Signaling in SSc B Lymphocytes. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 192-201.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

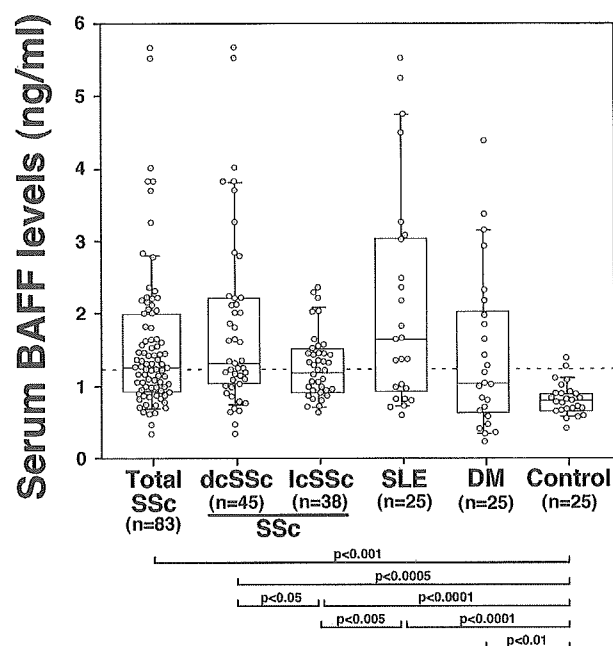


図1: 血清 BAFF 値を ELISA にて測定した。点線は健康人の平均値+2SD に設定したカットオフ値。箱の中央線は中央値, 箱の上端は 75 パーセンタイル, 下端は 25 パーセンタイル, 箱の上方の横線は 90 パーセンタイル, 箱の下方の横線は 10 パーセンタイルを示した。

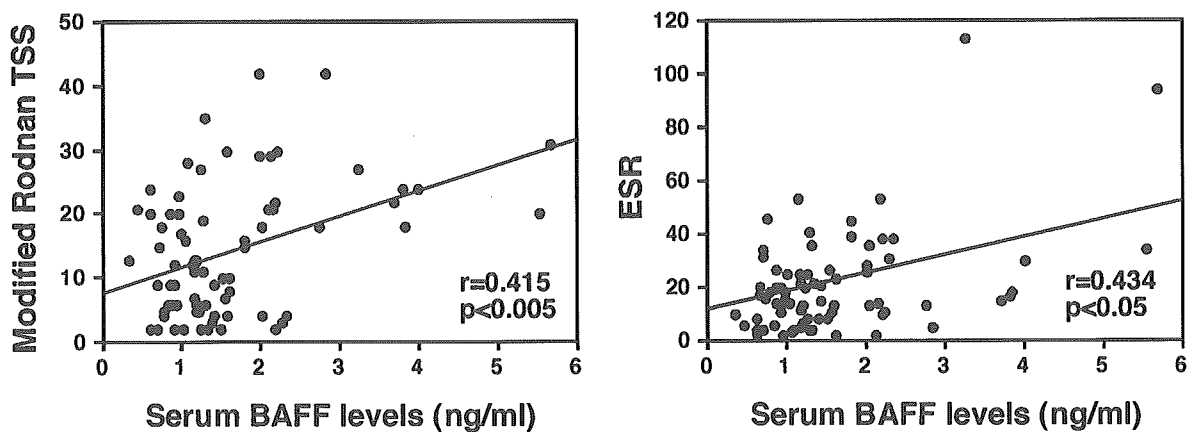


図2: SSc 患者における血清 BAFF 値と modified Rodnan TSS, 赤沈(erythrocyte sedimentation rates; ESR)との相関関係を示した。

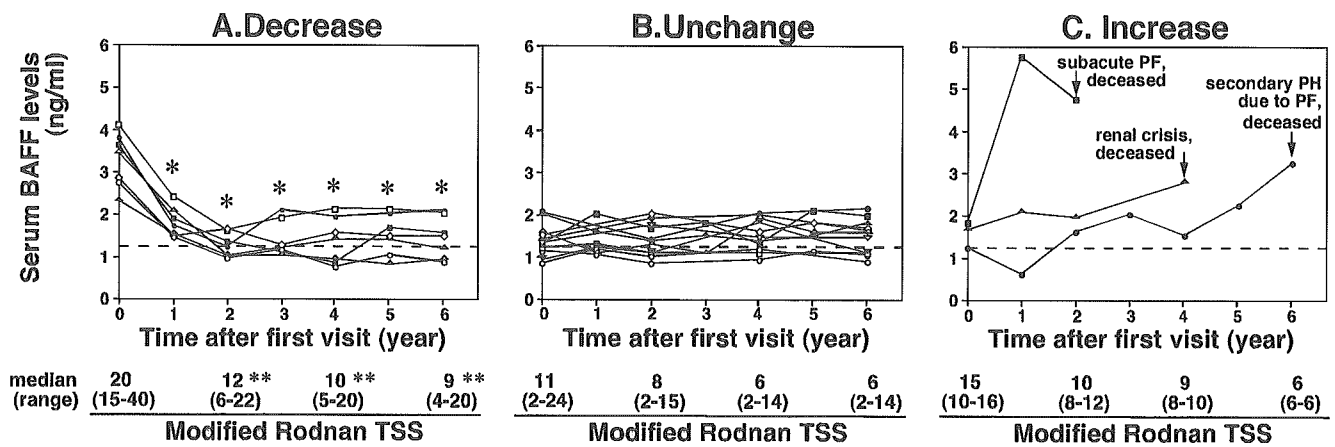


図3: 血清 BAFF 値と modified Rodnan TSS の経時的変化。

上段, (A)血清 BAFF 値が初診時と比べ経過中 50%以上減少した群, (B) 血清 BAFF 値が初診時と比べ経過中 50%以下の変動に止まった群, (C) 血清 BAFF 値が初診時と比べ経過中 50%以上増加した群。

点線は健常人の平均値+2SDに設定したカットオフ値. * $P<0.005$ は初診時の血清 BAFF 値との比較。

下段, 皮膚硬化の程度を初診時, 2年, 4年, 6年経過時に modified Rodnan TSS にて評価した. ** $P<0.05$ は初診時の modified Rodnan TSS との比較。

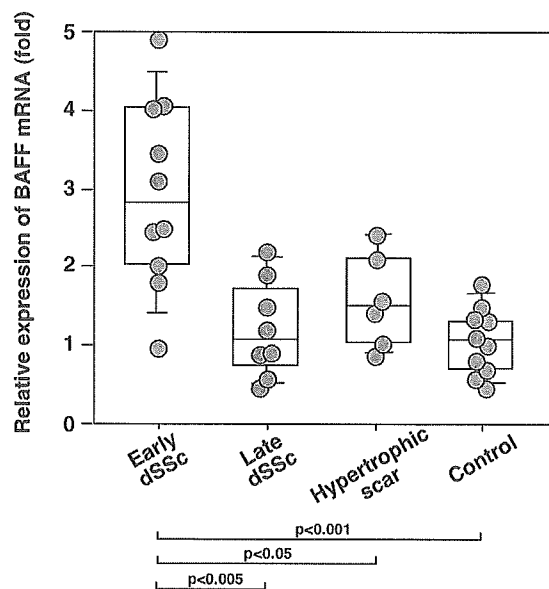


図4: dSSc 患者皮膚での BAFF mRNA 発現量. BAFF mRNA は real-time RT-PCR にて測定した. 発症 3 年未満を early dSSc, 発症 6 年以降を late dSSc とし, 対照として肥厚性瘢痕患者病変部皮膚, 健常皮膚を使用した. 箱の中央線は中央値, 箱の上端は 75 パーセントイル, 下端は 25 パーセントイル, 箱の上方の横線は 90 パーセントイル, 箱の下方の横線は 10 パーセントイルを示した。

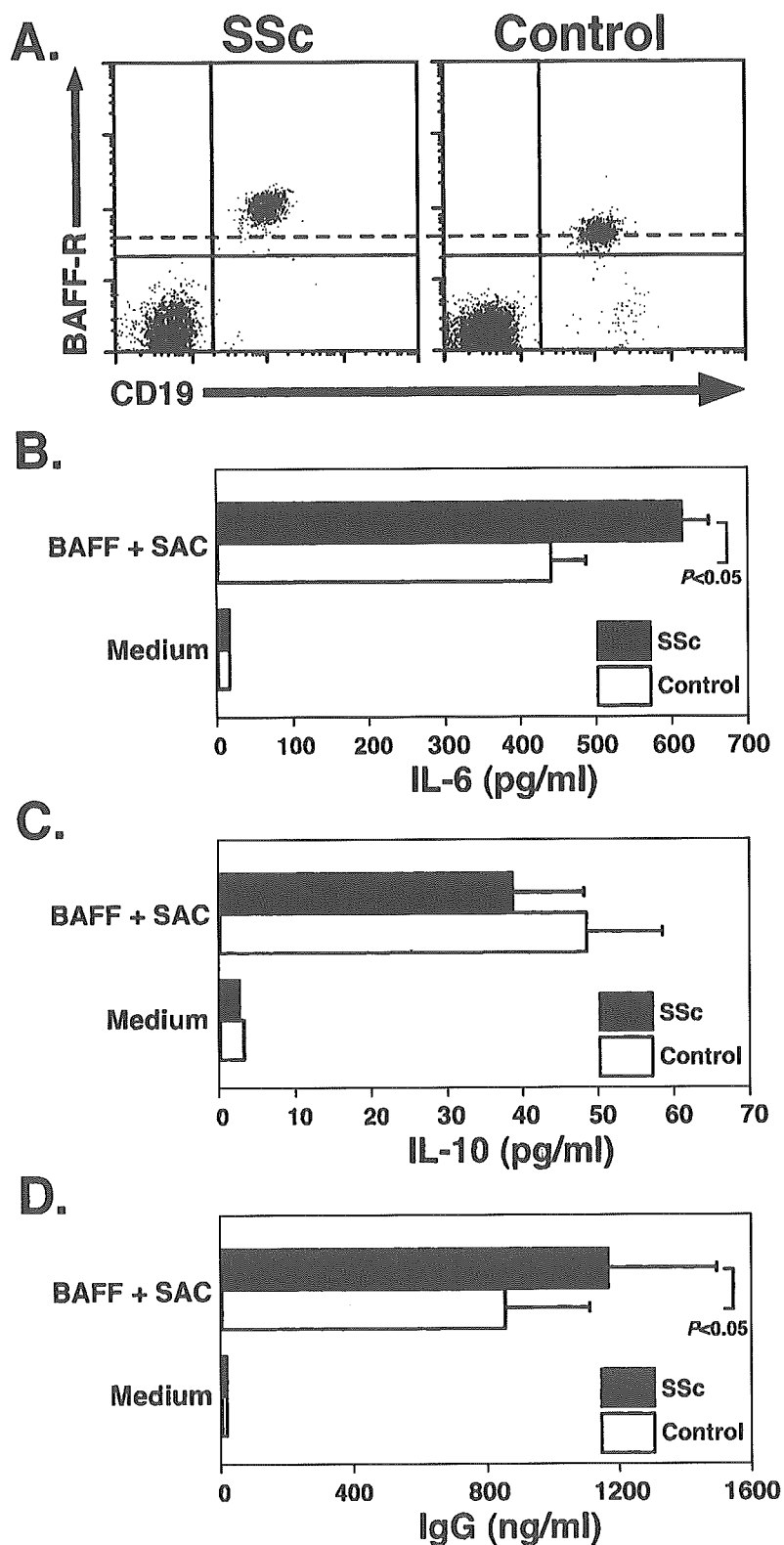


図5 : B細胞上のBAFF-Rの発現, B細胞のサイトカインおよびIgG産生能.
 (A)CD19⁺B細胞上のBAFF-Rの発現をフローサイトメトリーにて測定した.末梢血単核球よりB細胞を分離し recombinant human BAFFと *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC)にて刺激し,その培養上清中のIL-6 (B), IL-10 (C), およびIgG (D)を測定した.