

ある。

TNPのポートカテーテルは刺入後6.1年継続可能であったが感染が稀に合併する可能性があり指導を継続する必要がある。

E. 結論

重症腸管病変合併強皮症の予後は極めて悪いと報告されている。腸管蠕動促進薬は症状発現し5年程度で偽性腸閉塞を繰り返してTPNを導入し経口摂取も継続、薬剤療法も併用するもTNPを完全中止できた症例はなかった。またTNPに伴う合併症の危険もある。カテ感染の危険はありまた静脈閉塞により再挿入が必要な症例がある。看護職も含めた指導管理が重要である。しかし自然経過を変える治療法はまだなく今後も研究を進める必要がある。

F. 文献

1. Sjogren, RW : Gastrointestinal motility disorders in scleroderma, *Arthritis Rheum*,37,1265-1282,1994.
2. 石川守、岡田純、石川章、近藤啓文、偽性腸閉塞を合併した全身性強皮症例の検討、*リウマチ*、39、768-779、1999.

3. Sallam, H., Mcnearney TA, Chen H., Systemic review : pathophysiology and management of gastrointestinal dysmotility in systemic sclerosis(scleroderma), *Alimentary Pharmacology Therapeutics*,23,691-712,2005.

4. LoCW, Paris PW, Clements TL, Holick MF, Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes, *Am J Clin Neut*,42,644-649,1985.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
① 遠藤平仁、膠原病における難治性消化管病変—とくに強皮症の重症消化管障害—、シポジウム膠原病の難治性病態 第21回日本臨床リウマチ学会

H. 知的所有権の出願、登録状況

なし

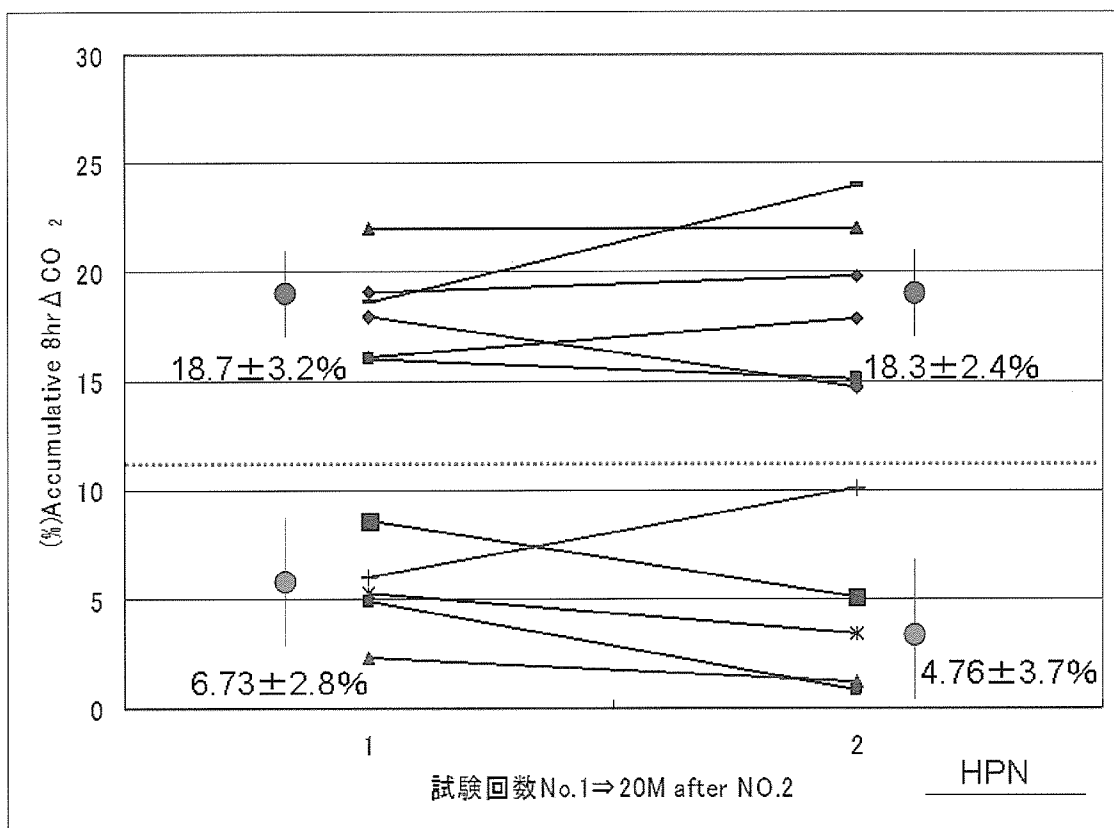


図1. ¹³C脂肪酸吸収呼気試験を用いた強皮症に合併した腸管病変の吸収機能の変動（平均20.2か月間隔をあけて測定した）

表1. 8症例のTPN導入に至った強皮症患者の導入までの使用薬剤

	Patients								% of patients
	1	2	3	4	5	6	7	8	
I The prokinetic drugs									
Cisapride	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Methoclopramide	+	+	-	+	+	-	-	+	75
Octreotide	-	-	+	+	+	+	-	-	50
Erythromycin	+	-	+	-	+	+	-	-	50
Dinoprost	+	+	+	+	+	+	+	+	100
II Antibiotics									
Kanamycin etc.	+	+	-	-	+	+	+	+	75
III Corticosteroids									
Prednisolone (maximum dose) mg/day	-	-	+	+	-	-	+	+	50
			(5)	(30)			(30)	(30)	

表2. TPN導入SSc患者の合併症

SSc patients	HPN duration (M)	Catheter infection : Sepsis(frequency)	Superior venous obstruction	heart failure (frequency)
1	57	+ (5)	-	+ (2)
2	50	+ (5)	-	+ (2)
3	97	+ (3)	+	-
4	18	+ (2)	-	-
5	70	+ (1)	+	-
6	27	+ (1)	-	-
7	30	-	-	-
8	54	+ (1)	-	+ (1)
68.4 ±48.0(M) Catheter-use days 17260		18/17260 (0.10%)	2/17260 (0.01%)	5/17260 (0.028%)

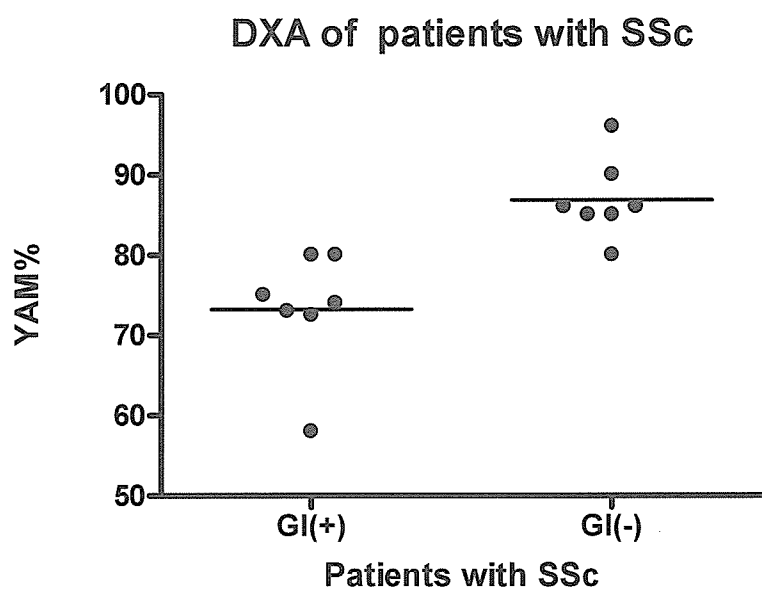


図2. TPN導入SSc患者の骨密度 DXA YAM%

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可溶性 CD1d 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 CD1d アイソフォームの中で特に可溶性 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、細胞外へと分泌される可溶性の分子であることが既に確認されている。健常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 法にて測定したところ、強皮症患者血清において可溶性 CD1d 蛋白の発現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るため、可溶性 CD1d の発現ベクターを作成し、リコンビナント可溶性 CD1d を大量に作成し、可溶性 CD1d の NKT 細胞に対する機能の解析を行っている。また最近、関節炎を始めとする自己免疫疾患で注目を浴びている IL-17 は、強皮症でも重要な役割を担っているとするほうこくがあるが、今回我々の研究により NKT 細胞が IL-17 産生に重要な役割を担っている可能性がしきされた。IL-17 産生に対する可溶性 CD1d の役割に関しても、今後、解析する必要がある。

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とは異なり、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。実際、これまでの研究から、可溶性 CD1d は蛋白質として発現し得る分子であり、予想通り細胞外へ分泌される可溶性分子であることが確認されている。

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、他の膠原病での研究結果に基づき、特に可溶性 CD1d に着目し、強皮症患者における NKT 細胞と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) 免疫ブロット法

ヒトリコンビナント His タグ付き完全型 CD1d、可溶性 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 His 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。

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常人 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) マウス

C57BL/6 マウスは Charles River Japan より購入し、NKT 細胞欠損マウスとして用いた $J\alpha 281^{-/-}$ マウスは理研 (谷口克博士) より供与いただいた。

6) 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/ $200 \mu\text{l/well}$ 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。

7) Flow Cytometric Analysis

NKT 細胞の検出の為に APC-CD1d tetramer、Cy5 anti-mouse CD3、FITC anti-mouse CD4 の各種抗体を使用し、FACS Calibur (BD pharmingen, CA, USA) にて解析を行った。

8) 細胞内サイトカイン染色法

細胞表面マーカーを初めに染色した後、Cytofix/Cytoperm 溶液 (BD pharmingen) で処理し、PE anti-mouse IL-17 (BD pharmingen) か、isotype rat IgG 抗体 (BD pharmingen) にて細胞内を染色した。

C. 研究結果

1) 末梢血単核球での可溶性 CD1d-mRNA 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、健常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 1)。

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 名と健常人 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常人と比較し、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 2)。

3) リコンビナント可溶性 CD1d の合成

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、先ずリコンビナント可溶性 CD1d 発現ベクターを作成し、合成に性こうしている。今後、これを利用して NKT 細胞への抗原刺激による細胞増殖能やサイトカイン産生に対する可溶性 CD1d を介したシグナルの影響を調べる予定である。

4) NKT 細胞による IL-17 産生

関節炎を中心とする自己免疫疾患に IL-17 が深く関与していることが報告^{8,9}されているが、2000 年倉沢らは強皮症の病態形成に IL-17 が深く関与している可能性を報告している¹⁰。

そこで今回、まず NKT 細胞と IL-17 の関係を明らかとするため、C57BL/6 マウスの脾臓細胞を用い、NKT 細胞特異的な抗原である α -GalCer で刺激することにより、NKT 細胞活性化が IL-17 産生に影響するか否かを検討した。対照をして NKT 細胞欠損マウスの $J\alpha 281^{-/-}$ マウスの脾臓細胞を用いた。

その結果、野生型 C57BL/6 では α -GalCer 刺激により IL-17 産生が増えるが、NKT 細胞が欠損しているマウスでは、IL-17 産生増加は認められないことが確認された。(図 3) また、細胞内サイトカイン染色法により、NKT 細胞自身が IL-17 を産生していることが確認された。(図 4)

今後は、NKT 細胞が分泌すると言われていた Th1 型サイトカインや Th2 型サイトカインのみならず、IL-17 産生にも、可溶性 CD1d 分子がいかに関与しているか検討する必要があると考えられる。

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、可溶性 CD1d が自己免疫疾患と健常人との間で 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。

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。

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。現段階の ELISA システムにて測定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。

今後、定量 PCR 法での mRNA 測定法と ELISA 法での蛋白検出に関して、さらに測定法の改良と検体数を増加により、信頼度を増していくことが必要と考えている。

さらに今回、強皮症と IL-17 との関連を示唆する文献から、NKT 細胞が IL-17 産生に関与している可能性を考慮して、NKT 細胞活性化による IL-17 産生への影響に関して検討を行ったところ、NKT 細胞が活性化することにより IL-17 産生が増加し、さらに、NKT 細胞自身が IL-17 を産生することが初めて確認された。この IL-17 産生に可溶性 CD1d がどのように関与しているか非常に興味深いところである。

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、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た。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、各種臓器病変の有無) の違いによる、可溶性 CD1d の発現の差異に関して検討する必要があると考える。

可溶性 CD1d に関して、NKT 細胞にどのよ

うな影響を与えているのか、その機能についても未だ不明のままである。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の分泌調節を行っているのかである。NKT 細胞は Th1 型サイトカイン、Th2 型サイトカイン、いずれも分泌する能力を有することが良く知られており、可溶性 CD1d がどの型のサイトカインを分泌するかを調節している可能性を考えている。

そして、今回新たに Th17 が分泌すると言われている IL-17 を、NKT 細胞も分泌することが初めて確認された。このサイトカインは関節炎をはじめとする自己免疫疾患や強皮症の病態形成でも注目されており、可溶性 CD1d が NKT 細胞の IL-17 産生にも関与している可能性もある。

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。

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 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. Nakae S. et al.: Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol.* 171: 6173, 2003
9. Lubberts E. et al.: Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 50: 650, 2004
10. Kurasawa K. et al.: Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 43: 2445, 2000
11. Dapeng Z. et al.: Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells. *Science* 306: 1786, 2004

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Goto D, Yoshiga Y, Kojo S, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: The Expression and Function of CD1d Variants in Patients with Autoimmune Disease. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:S405-406

2) Goto D, Yoshiga Y, Kojo S, Mamura M, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. : Discussion about immune-control system by NKT cells that stimulated by variant CD1d in the patients with autoimmune disease. *Mod Rheumatol.* 2006; 16(supp.): 107-108

2. 学会発表

1) The expression and function of CD1d variants in patients with autoimmune disease.

Goto D, Yoshiga Y, Segawa S, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2006

2) The Expression and Function of CD1d Variants in Patients with Autoimmune Disease. Goto D, Yoshiga Y, Kojo S, Matsumoto I, Ito S, Tsutsum A, Sumida T.

ACR 70th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, USA, 2006

3) 自己免疫疾患患者における変異型 CD1d 刺激を介した NKT 細胞による免疫制御機構に関する検討

後藤大輔、吉賀洋平、香城 諭、真村瑞子、松本 功、伊藤 聡、堤 明人、住田孝之
第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会/
第 15 回国際リウマチシンポジウム、長崎、2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

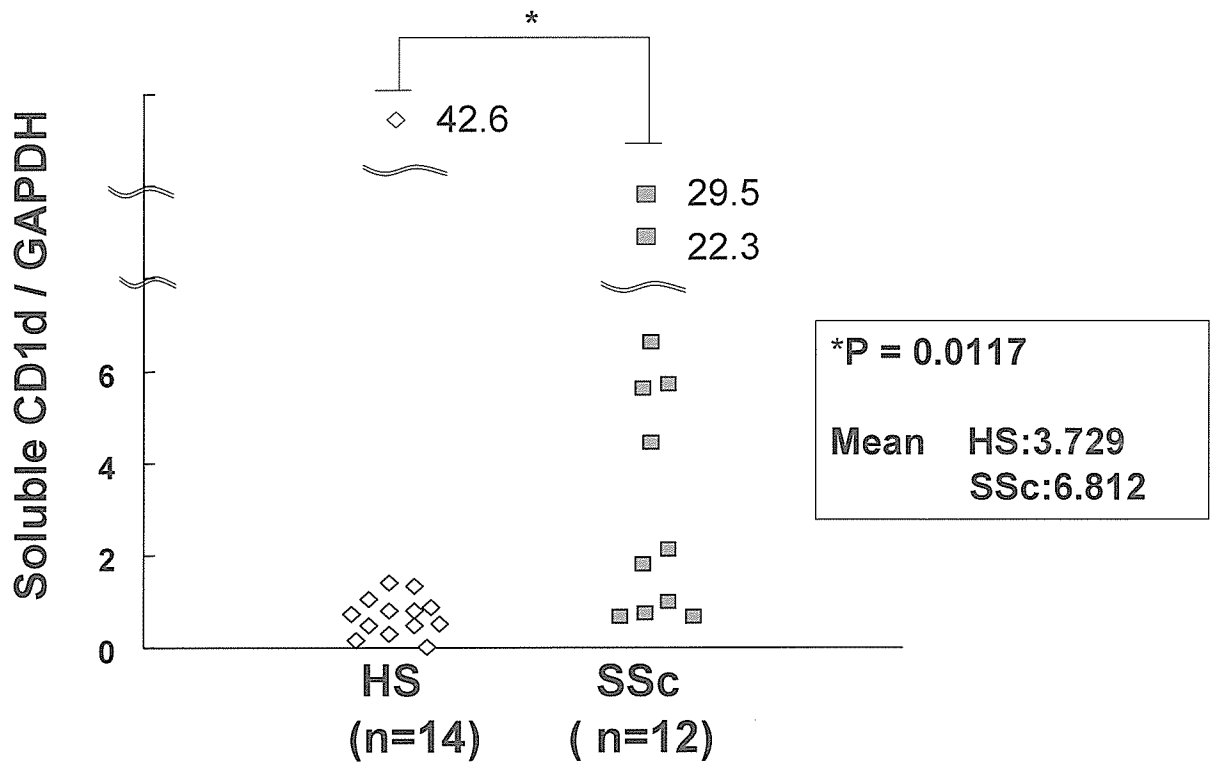


図1：定量PCR法を用いた健常人と強皮症患者での末梢血単核球での可溶性CD1d-mRNAの発現量の比較。GAPDH-mRNAの発現量で標準化し、定量を行った。それぞれの平均値 (mean) は図に示す通りである。標準偏差 (S. D.) はそれぞれ11.201、9.332であった。

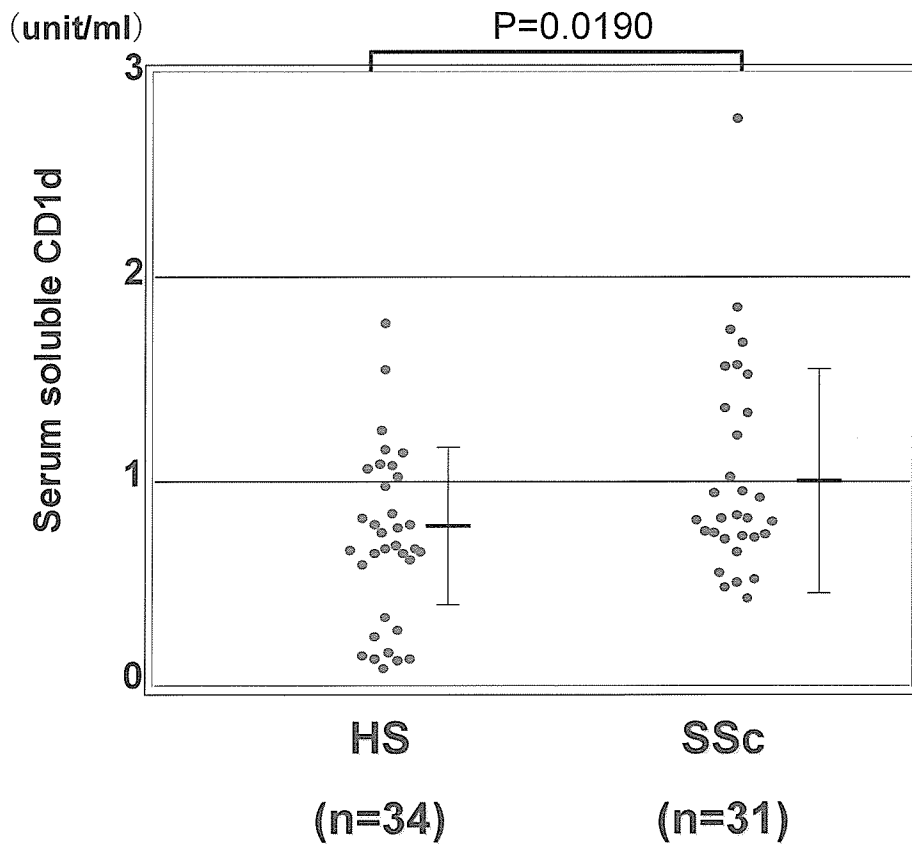


図2：健常人と強皮症患者での血清中可溶性CD1d蛋白の発現量の比較。作製した抗可溶性CD1dポリクローナル抗体と抗CD1dモノクローナル抗体とのサンドイッチELISA法にて、測定した。特定の健常人の血清中可溶性CD1d測定時のELISAでの吸光度を、仮のunit/mlとした。図中の各棒は中央の横棒が平均、上下の横棒は標準偏差を示す。

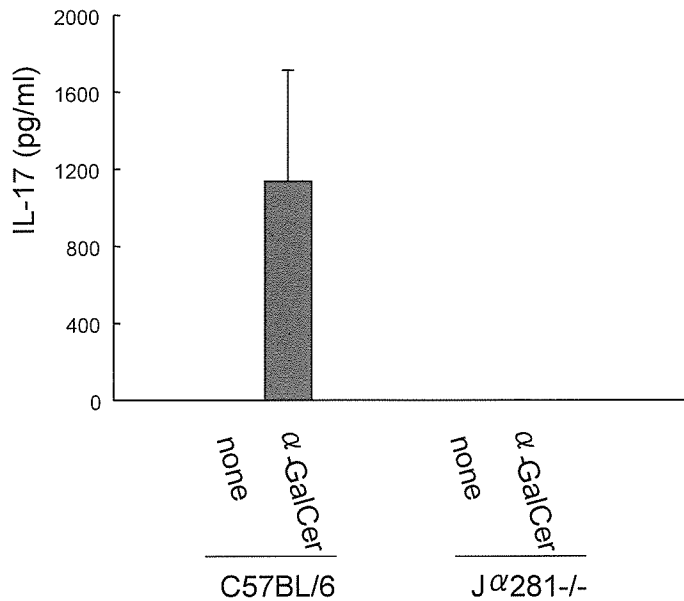


図3： NKT細胞の活性化によるIL-17の産生。未刺激の野生型B6マウスとNKT細胞欠損マウスのJa281-/-マウスから脾臓細胞を採取し、 α -GalCerの刺激の有無による72時間培養後の上清中のIL-17濃度の違いを示す。IL-17濃度はELISA法にて測定した。

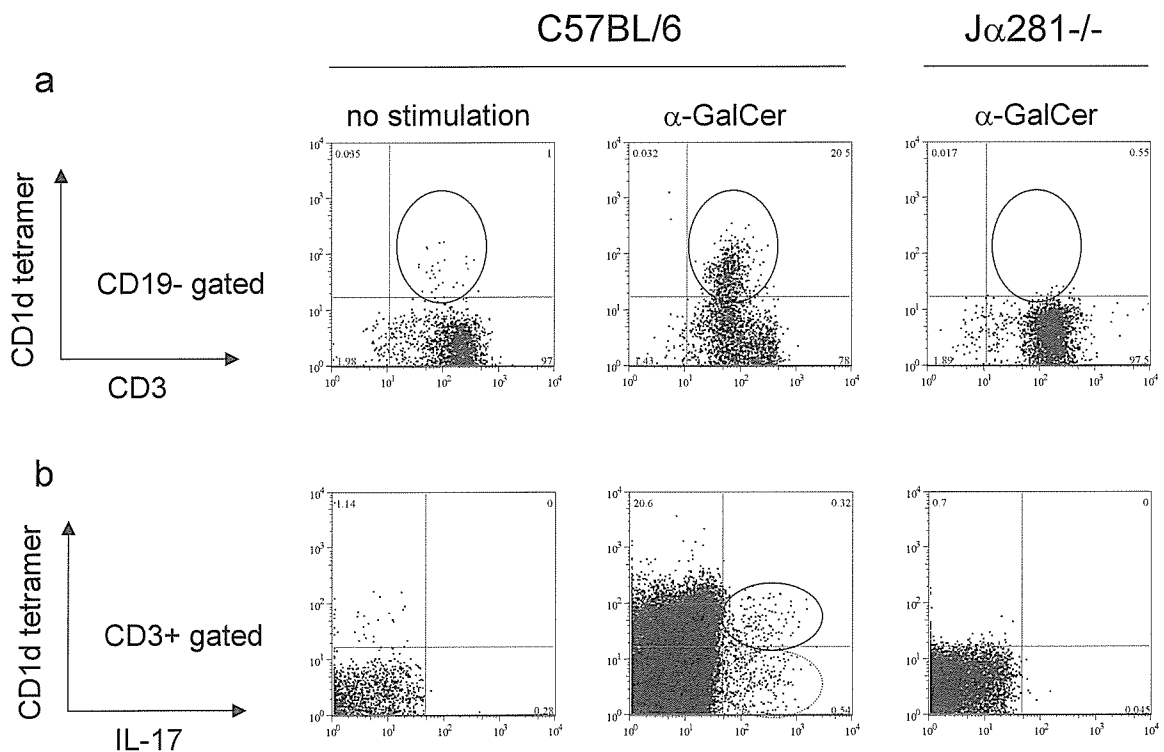


図4： NKT細胞によるIL-17産生。(a) B6マウスから脾臓細胞を採取し、 α -GalCerの刺激の有無による72時間培養後のNKT細胞群を示す。CD19-群 (B細胞を除いた群) の中から、CD3+CD1d tetramer+の細胞群 (NKT細胞) を楕円の中に示す。(b) CD3+群 (T cell receptorを有する細胞群) の中から、CD1d tetramer+IL-17+の細胞群 (IL-17産生NKT細胞群) を細胞内サイトカイン染色法にて検出 (実線の楕円の中) している。波線の楕円の細胞群は、CD1d tetramer-T細胞。

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

BAFF アンタゴニストによる強皮症モデルマウスの治療

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	金沢大学医学部附属病院皮膚科助手
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・分化に非常に重要な分子である。我々はこれまでに強皮症患者の血清 BAFF 値は皮膚硬化の重症度と相関して上昇しており、経時的に皮膚硬化や内臓病変の活動性を反映していることを報告している。今回、tight skin (TSK/+)マウスにおける血清 BAFF 値を測定したところ野生型マウスと比べ有意に上昇していた。さらに TSK/+マウスに BAFF アンタゴニストを投与したところ皮膚硬化が有意に減弱し、また高 γ グロブリン血症および自己抗体の産生も阻害された。また TSK/+マウスのB細胞ではBAFFの刺激により野生型マウスのB細胞よりもIL-6を有意に多く産生した。BAFFを介したシグナルがTSK/+マウスの病態に関与しているおり、BAFFをターゲットとした分子標的薬が人の強皮症の治療にも有用であ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%以上に陽性であり、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 (TSK/+)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く。

近年、B細胞は自己抗体産生細胞としてだけでなく、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 が発見されて以来, 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[11-15]。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たし, 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 TSK/+マウスにおける BAFF の発現異常を解析し, BAFF シグナルをターゲットとした分子標的療法が TSK/+マウスの治療において有用であるかを検証した。

B. 研究方法

1) マウス

TSK/+マウス, 野生型マウス (C57BL/6) マウスを使用。生後 1 週より BAFF-R-Ig (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) ないし Control Fc protein を腹腔内投与 (2 µg/g i.p. 3 times/week) 開始し, 生後 8 週の時点でマウス背部皮下疎性結合織の厚さを測定した。

2) ELISA

血清 BAFF 値は ELISA キット (Apotech, Epalinges, Switzerland) を用いて測定した。

3) Real time RT-PCR

各マウス皮膚より mRNA を抽出し, サイトカインの発現量を real-time RT-PCR にて定

量した。

4) フローサイトメトリー

抗 IgM (R6-60.2), B220 (RA3-6B2), CD21 (7G6), CD23 (B3B4), CD24 (M1/69), BAFF-R (7H22-E16), TACI (166010), or BCMA (161616) 抗体にて細胞を染色し FACScan flow cytometer (BD PharMingen, San Diego, CA, USA)にて測定した。

5) 自己抗体, 免疫グロブリン測定

ELISA 法によりマウス血清中の抗トポイソメラーゼ I 抗体, 免疫グロブリンを測定した。

6) B 細胞のサイトカイン産生能

マウス脾臓から B 細胞を抽出し, 0.01% *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC; Sigma St. Louis, MO) と 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の recombinant human BAFF (R&D systems) の存在下にて培養した。その培養上清中の IL-6, IL-10 を ELISA にて測定した。

7) 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。

C. 研究結果

1) Tsk/+マウスにおける血清 BAFF 値

SLE のモデルマウスとして知られる NZB/NZW F1 マウスでは SLE 様症状の発症とともに血清 BAFF 濃度の上昇が知られている。Tsk/+マウスにおける血清 BAFF 濃度を ELISA にて測定したところ, 野生型マウスと比べ Tsk/+マウスでは生後 4 週, 8 週と有意に血清 BAFF 濃度の上昇を認めた(図 1A)。次に B 細胞の 3 つの BAFF 受容体の発現を調べた。しかしながら, Tsk/+マウスに

おける BAFF-R, TACI, BCMA の発現はいずれも野生型マウスと同程度であった(図 1B)。

2) BAFF アンタゴニストによる Tsk/+マウスの治療

BAFF の阻害方法としては, BAFF の受容体である, BAFF-R を IgG の Fc 部分と結合させた BAFF-R-Ig を用いた。この BAFF-R-Ig を新生児マウスの時点から腹腔内投与を開始し, 8 週齢の時点で解析した。野生型マウスと比べ TSK/+マウスでは皮膚疎性結合組織が増生しているが, BAFF 阻害により, 有意に減弱した(図 2)。

3) BAFF アンタゴニストによる B 細胞分化の阻害

B 細胞は骨髄で Pro/Pre B cell から Immature B へと分化し脾臓へ移行するにつれ transitional type 1 (T1)から T2 へ, さらに Follicular ないし marginal zone B 細胞へと分化する。BAFF は特に T1 から T2 への移行において重要であり, 実際に BAFF 阻害により T2, Follicular および marginal zone B 細胞の減少が認められ, B 細胞の分化成熟が阻害された(図 3)。

4) BAFF アンタゴニストによる高 γ グロブリン血症, 自己抗体の産生の阻害

TSK/+マウスで認められる, 高 γ グロブリン血症および自己抗体の産生が BAFF 阻害により抑制された(図 4)。

5) BAFF アンタゴニストによるサイトカインバランスの変化

TSK/+マウスの皮膚では繊維化促進作用のある Th2 サイトカインが有意であることが知られている。マウス皮膚より mRNA を抽出

し、各サイトカインを real time RT-PCR にて測定したところ、TSK/+マウスで発現亢進している Th2 サイトカインが BAFF 阻害により減弱し、反対に Th1 サイトカインが亢進した(図 5).

6) BAFF 刺激による B 細胞のサイトカイン産生能

B 細胞のサイトカイン産生能に対する BAFF の作用を解析するため、脾臓由来 B 細胞を BAFF と BCR シグナルを誘導する SAC の存在下にて培養し上清のサイトカインを ELISA にて測定した。適切な BAFF 刺激にて B 細胞は IL-6 と IL-10 を産生することが示された。特に、野生型マウスと比べ TSK/+マウスでは線維化を促進するサイトカインである IL-6 の産生が有意に亢進していた(図 6).

D. 考案

TSK/+マウスでは血清 BAFF 値が上昇していた。さらに TSK/+マウスに BAFF アンタゴニストを投与したところ皮膚硬化が有意に減弱し、また高 γ グロブリン血症および自己抗体の産生も阻害された。また TSK/+マウスの B 細胞では BAFF の刺激により野生型マウスの B 細胞よりも IL-6 を有意に多く産生した。BAFF を介したシグナルが TSK/+マウスの病態に関与していることが示された。

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、T2 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, 16, 17]。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, 18]。さらに、SSc 患者においても血清 BAFF 値の上昇が報告されている[15]。

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、TSK/+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 B 細胞の IL-6 産生を増強すること(図 6)より、皮膚硬化の進展に関与している可能性が示された。

E. 結論

SSc 同様に TSK/+マウスにおいても BAFF の発現異常が示された、さらに BAFF 阻害により皮膚硬化が減弱したことより、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 *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 *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 *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 *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 *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 *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 *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

- 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 *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 *et al*: B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3475-86.
15. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S: Elevated Serum BAFF Levels in Patients with Systemic Sclerosis (SSc): Enhanced BAFF Signaling in SSc B Lymphocytes. *Arthritis Rheum*:: in press.
16. Mackay F, Woodcock SA, Lawton P *et al*: Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 1999; 190:1697-710.
17. Khare SD, Sarosi I, Xia XZ *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.
18. Mariette X, Roux S, Zhang J *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.

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・登録状況

なし

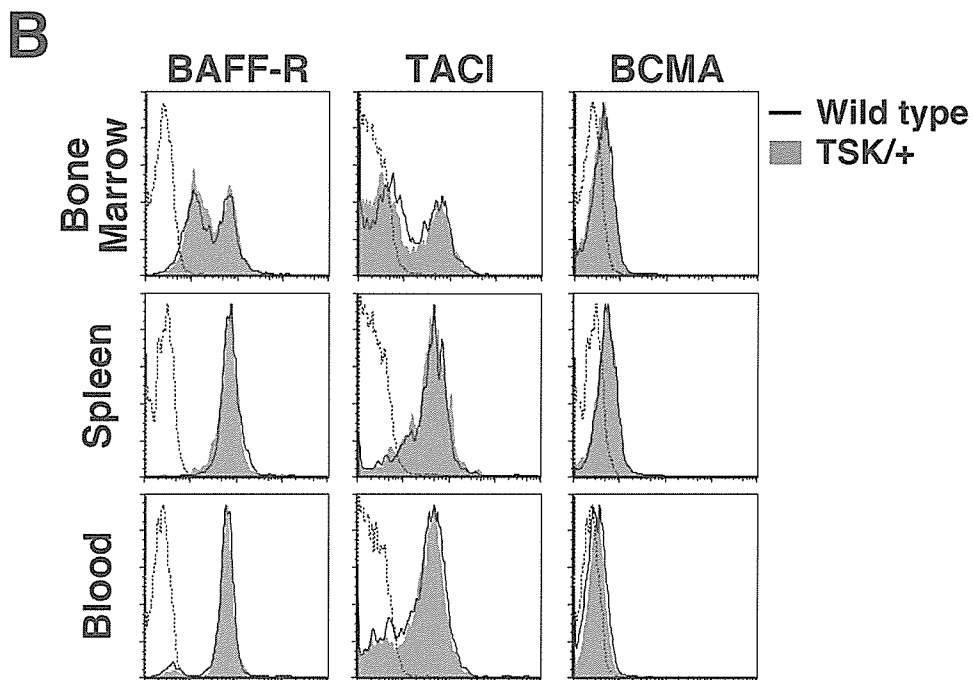
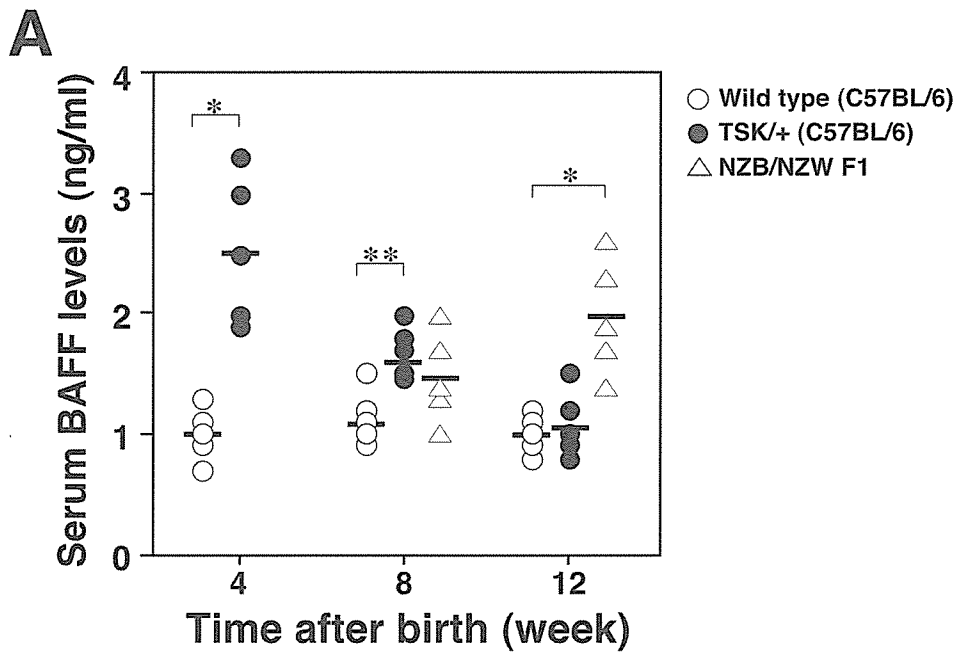


図1： (A) 血清BAFF値をELISAにて測定。
(B) BAFF受容体をフローサイトメトリーにて解析。

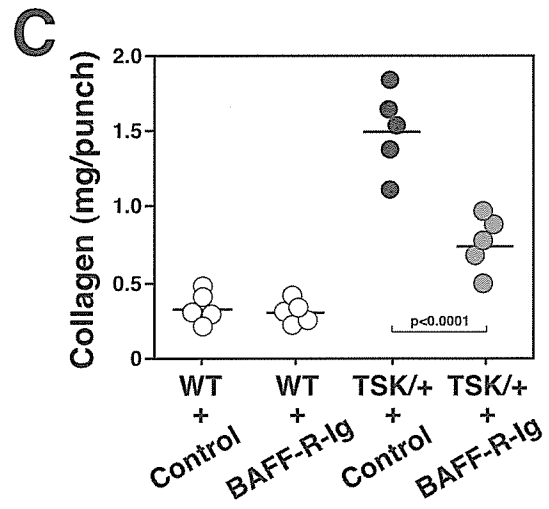
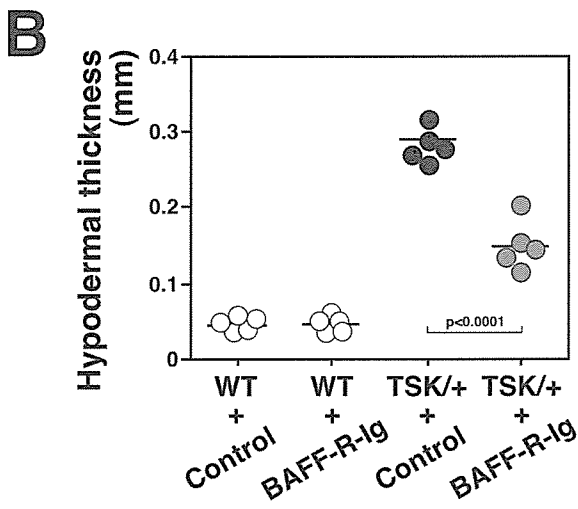
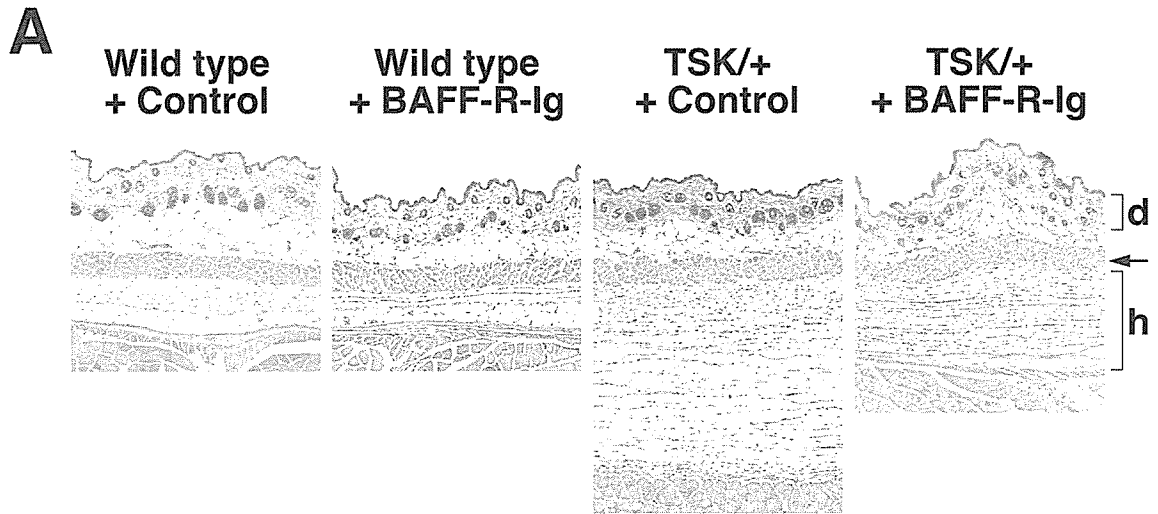


図2： 8週雌マウスにおける皮膚厚さの比較。
 (A) H&E染色, (B) Hypodermal thickness, (C) コラーゲン定量