

抗DNA抗体の産生機序に関する研究

分担研究者 平林 泰彦 東北大学大学院医学系研究科 講師

研究要旨 本研究はループス腎炎に直接関与している抗DNA抗体の産生機序を追求することにより全身性エリテマトーデス（SLE）の発症機序の解明を目指すものである。正常マウスに腎障害性抗DNA抗体を惹起しうる自己抗原である小胞体ストレス応答蛋白Herpは活動期SLE患者末梢血リンパ球において強く発現しており、また、患者末梢血中の抗DNA抗体産生クローンを抗原刺激できた。これに基づき、Herp上のDNAと分子相同性を持つと考えられるエピトープを探索し同定した。このエピトープを含むペプチドはSLE患者血清中の抗dsDNA抗体と特異的に結合した。また、Herpが実際に生体内で抗原として認識される機序について検討し、細胞内蛋白であるHerpがアポトーシス細胞表面のプレブに発現される事、EBウイルス感染細胞の中で溶解感染を生じるような細胞でHerpが発現している事、EBウイルス感染細胞の膜分画を正常マウスに免疫すると抗dsDNA抗体が産生され腎糸球体にIgGが沈着する個体が得られる事を明らかにした。以上より、ウイルス感染、紫外線、薬物など様々な環境要因（細胞ストレス）により生体内でHerpが産生され、Herp上のdsDNAと分子相同性を持つエピトープが認識されて抗Herp/dsDNA交差抗体が産生されるというモデルが考えられた。

A. 研究目的

抗DNA抗体は全身性エリテマトーデス（SLE）に特徴的でループス腎炎の成立に直接的に関与していると理解されている。したがって、抗DNA抗体の産生機序を明らかにする事はSLEの発症機序の解明につながると考えられる。免疫グロブリン遺伝子の解析から、ヒト腎障害性抗DNA抗体は抗原刺激による親和性成熟により形成されたと考えられるが、DNAそのものには免疫原性がほとんど無い。抗DNA抗体の産生の「引き金となる抗原」をまず明らかにし、それをもとにSLE発症に至る特異的機序を解明することを最終目的とする。

私達はこれまで、①ヒトIgMモノクロナル抗ds/ssDNA抗体O-81が小胞体ストレス応答性蛋白Herpに結合する事、②HerpをBALB/cマウスに免疫すると抗dsDNA抗体が産生され腎糸球体にIgGが沈着する事、③活動期SLEの末梢血単核球（PBMC）においてHerp蛋白が長時間強発現していること、④Herp蛋白が抗dsDNA抗体産生クローンを刺激増殖

できる事を報告し、Herpに抗dsDNA抗体産生誘導能と生体内での免疫原性がある事を示唆した。

今回の目的は、Herp蛋白上のDNAと分子相同性を持つと考えられるエピトープの同定と生体内でHerpが免疫原として認識される機序を明らかにする事である。

B. 研究方法

（1）Herp遺伝子の3'側を欠失した3種類のdeletion mutantを作成した（sHerp 1-335 a. a. , Δ 2 1-258 a. a. , Δ 3 1-191 a. a.）。これらに対するO-81抗体の結合性をELISA法で検証した。O-81抗体が結合する領域を推定し、その領域をカバーするように25アミノ酸長のペプチドライブラリーを作成した。このペプチドライブラリーに対するO-81抗体および正常人由来IgMの結合性をELISA法で検討した。

（2）SLE患者血清および正常人血清よりプロテインA/GにてIgGを精製した。ペプチドライブラリーに対するSLE患者由来IgGおよび正

常人由来 I g G の結合性について E L I S A 法で検討した。なお、本研究は当大学の倫理委員会の承認を受け、ヒト由来の生体試料を用いる際には本人に説明し承諾を得た。

(3) S L E 患者由来 I g G より d s D N A セファロースを用いて I g G 抗 d s D N A 抗体を精製した。この際、d s D N A セファロースに結合しない I g G も回収した (S L E 患者由来 DNA 非結合性 I g G)。上記 (1) (2) で O-81 抗体および S L E 患者由来 I g G に結合し、正常人 I g M および正常人 I g G に結合しないペプチドを O-81 エピトープペプチドとし、このペプチドに対する I g G 抗 d s D N A 抗体および S L E 患者由来 DNA 非結合性 I g G の結合性を E L I S A 法で検討した。

(4) O-81 抗体の O-81 エピトープペプチドへの結合性について競合阻害 E L I S A を行った。抗原を O-81 エピトープペプチドとし、これに対する O-81 抗体の結合を s s D N A および d s D N A で濃度依存的に阻害できるか検討した。また、抗原を s s D N A あるいは d s D N A とし、これらに対する O-81 抗体の結合を O-81 エピトープペプチドが濃度依存的に阻害できるかも検討した。

(5) 細胞内蛋白である H e r p が抗原認識される機序の検討として、アポトーシス細胞における H e r p の局在を検討した。H e l a 細胞にタバシガーギンを加えて一晚培養し、小胞体ストレスによりアポトーシスに陥った細胞を固定せずに Qdot655 標識モノクロナル抗 H e r p 抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

(6) E B ウイルス形質転換 B 細胞株あるいは活動期 S L E 患者 P B M C を Qdot655 標識モノクロナル抗 H e r p 抗体およびマウス I g G モノクロナル抗 B Z L F 1 抗体-F I T C 標識抗マウス I g G 抗体で共染色した。

(7) E B ウイルス形質転換 B 細胞株の膜分画を精製し B A L B / c マウス (6 週齢雌) にアジュバント無しで 10 日間隔で 3 回免疫した。得られた血清の H e r p あるいは d s D N A に対する結合性を E L I S A 法で検討した。また、腎組織を凍結切片とし、I g G の糸球体への沈着の有無を検討するため F I T C 標識抗マウス I g G 抗体で染色した。

C. 研究結果

(1) O-81 抗体は s H e r p に良く結合し、 $\Delta 2$ や $\Delta 3$ への結合は低下した。これより 258-335 a. a. の領域に O-81 抗体に結合する主要部分があると考えられた。また、H e r p を two-hybrid 法で同定した際に O-81 抗体が 191-304 a. a. の領域に結合する事が推測されていたので、これと矛盾しないと考えられた。そこで 191-304 a. a. の領域をカバーするように作成した 25 アミノ酸長のペプチドライブラリーの中で O-81 抗体結合/正常ヒト I g M 結合の比が最も高いものとして 249-273 a. a. のペプチドを O-81 エピトープペプチドの候補とした。

(2) (1) と同様に、S L E 患者由来 I g G 結合/正常人 I g G 結合の比が最も高いものとして、やはり 249-273 a. a. のペプチドが候補となった。

(3) 上記 (1) (2) より 249-273 a. a. のペプチドを O-81 エピトープペプチドとした。I g G 抗 d s D N A 抗体は O-81 エピトープペプチドに結合したが、S L E 患者由来 DNA 非結合性 I g G は結合しなかった。

(4) O-81 抗体の O-81 エピトープペプチドへの結合を s s D N A および d s D N A は濃度依存的に阻害した。また、抗原を s s D N A あるいは d s D N A とし、これらに対する O-81 抗体の結合を O-81 エピトープペプチドは濃度依存的に阻害した。

(5) 小胞体ストレスによりアポトーシスに陥った細胞表面のブレブが抗 H e r p 抗体で染色された。

(6) E B ウイルス形質転換 B 細胞株や活動期 S L E 患者 P B M C の中に、抗 H e r p 抗体および抗 B Z L F 1 抗体で共染色される細胞が認められた。

(7) E B ウイルス形質転換 B 細胞株の膜分画を免疫した B A L B / c マウスの血清は無処理のマウス血清と比較して有意に H e r p に結合した。また、8 匹の免疫マウスの中で抗 d s D N A 活性を示すものが 2 匹認められた。無処理マウスでは抗 d s D N A 活性は認められなかった。また、抗 d s D N A 活性を示した 2 匹のマウスの腎糸球体には I g G の沈着が認められた。

D. 考察

Herp蛋白上にdsDNAと免疫学的に分子相同性を持つエピトープ(O-81エピトープ)を同定した。Herp蛋白は定常状態ではほとんど発現しておらず、小胞体ストレス時のみ発現が誘導されるので、このO-81エピトープに対しては免疫寛容の成立が不十分である可能性がある。SLE患者ではこのエピトープが認識される事により抗Herp/dsDNA交叉結合抗体が産生される機序が考えられた。

また、Herpが生体内で免疫系に認識される機序として、細胞がストレスを受けてHerpを高発現し、その後アポトーシスに至った際にアポトーシス細胞表面プレブに局在する事が考えられた。このモデルとしてEBウイルス形質転換細胞を検討した。ウイルス蛋白を複製して溶解感染に至る最初の段階で発現するBZLF1蛋白が陽性の細胞でHerpも陽性であった。このような細胞は活動期SLE患者PBMCの中にも認められた。つまり、ウイルス蛋白合成により小胞体ストレスが生じてHerpが産生され、そのような細胞が溶解したりアポトーシスを生じたりすれば、産生されたHerpが免疫原になる機会が生じるとの仮説が考えられた。そこでEBウイルス形質転換細胞の膜分画をBALB/cマウスに免疫したところHerpに対する抗体価が上昇した。その中には抗dsDNA活性を持つ個体が認められ、上記の仮説を支持するものと考えられた。

今後、Herpによって産生誘導された抗dsDNA抗体がどのように腎障害性を獲得していくかを追求することによりSLEの発症機序の解明に寄与できると思われる。

E. 結論

Herp蛋白上にDNAと分子相同性を持つエピトープが存在し、SLE患者血清中の抗dsDNA抗体はこれに結合する事、ウイルス感染などでアポトーシスを生じた細胞が産生したHerpを免疫系に呈示する事を示した。この結果から、ウイルス感染、紫外線、薬物などにより生じる小胞体ストレスがHerp蛋白の産生を亢進させ、産生されたHerpがDNAとの分子相同性を介して抗DNA抗体の産生誘導抗原となる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oka Y, Kameoka J, Hirabayashi Y, Takahashi R, Ishii T, Sasaki T, Harigae H. Reversible Bone Marrow Dysplasia in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Internal Medicine. 2008 in press.
- 2) Hirabayashi Y, Oka Y, Tada M, Takahashi R, Ishii T. A potential trigger of nephritogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis. Annals of the New York Academy of Sciences. 1108:92-95, 2007.
- 3) Oka Y, Hirabayashi Y, Ishii T, Takahashi R, Sasaki T. A monoclonal antibody against human homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (Herp): a useful tool for evaluating endoplasmic reticulum stress. Tohoku Journal of Experimental Medicine. 212: 431-437, 2007.
- 4) Kudoh K, Shibata C, Funayama Y, Fukushima K, Takahashi K, Ogawa H, Sagami Y, Hirabayashi Y, Moriya T, Sasaki I. Gastrojejunostomy and duodenojejunostomy for megaduodenum in systemic sclerosis sine scleroderma: report of a case. Digestive Diseases and Sciences. 52: 2257-2260, 2007.
- 5) 岡友美子, 平林泰彦. ストレス蛋白と抗DNA抗体産生. 臨床免疫・アレルギー科. 47: 517-522, 2007.

2. 学会発表

- 1) Hirabayashi Y, Oka Y, Takahashi R, Takasawa N, Ishii T. A potential immunogen responsible for producing human lupus anti-DNA autoantibodies. 2007 Annual European Congress of Rheumatology, Barcelona, Spain, Jun. 13-16.
- 2) 平林泰彦, 岡友美子, 高橋令子, 高澤徳彦, 井智徳, 佐々木毅. 地域医療における生物学的製剤使用の問題点と対策. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会.

- 4) 高橋令子、伊藤貴子、石井智徳、岡友美子、高澤徳彦、石井恵子、平林泰彦、佐々木毅、張替秀郎. 関節リウマチ患者関節滑膜組織におけるヒトパルボ B19 ウイルスと樹状細胞の関係の解明. 第 35 回日本臨床免疫学会総会.
- 5) 岡友美子, 平林泰彦, 多田真知子, 渡辺秀子, 高橋令子, 石井智徳, 張替秀郎. ヒト由来抗 DNA 抗体の, Herp 蛋白上に存在するエピトープに関する解析. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会.
- 6) 平林泰彦. 抗 DNA 抗体の産生機序に関する研究. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 自己免疫に関する調査研究班班会議

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
モノクロナール抗ヒトホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白 Herp 抗体 (特願 2008-016602)
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

膠原病における IL-33/ST2L 分子に関する研究

分担研究者 岡崎 仁昭 自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学講座 准教授

研究要旨 膠原病の中で少なくとも SLE において血中での分泌型 ST2 蛋白の上昇と T 細胞上の ST2L の発現増強とが観察された。IL-33/ST2 システムの役割が解明されれば、新たな分子標的療法のターゲットになる可能性を秘めている。

A. 研究目的

ST2 はインターロイキン 1 (IL-1) 受容体ファミリーに属する蛋白の一つでスプライシングの違いにより分泌型 ST2 と膜貫通受容体型 ST2L が存在する。最近、新たに発見された IL-1 ファミリーのサイトカインである IL-33 の受容体が膜貫通受容体型 ST2L であることが報告された。IL-33/ST2L (Th2 応答) と分泌型 ST2 (抑制的作用) との役割が、基礎的な研究により明らかになってきた。

今回、我々は膠原病における IL-33/ST2L システムの役割を解析し、新たな分子標的療法に成り得るか否かを探索する。

B. 研究方法

血中の IL-33、分泌型 ST2 濃度は ELISA 法とリアルタイム PCR 法とで、また末梢血単核球分画の ST2L の発現は FACS 法にて測定した。測定は経時的に行い、疾患活動性などとの相関を検討した。

(倫理面への配慮)

当大学の規定に沿ってきちんと行った。

C. 研究結果

55 例の SLE、11 例の RA、12 例の SSc、8 例の Wegener 肉芽腫症、3 例の Behçet 病、99 例の健常者の血清中の分泌型 ST2 蛋白を測定したところ、SLE、RA、Wegener 肉芽腫症において有意な上昇が観察された。SLE において分泌型 ST2 蛋白濃度は SLEDAI と相関性が観察さ

れた。

10 例の SLE 患者の末梢血 T 細胞上の ST2L の発現は、健常者と比較して有意に増強していた。

D. 考察

膠原病の中で少なくとも SLE において血中での分泌型 ST2 蛋白の上昇と T 細胞上の ST2L の発現増強とが観察された。現在、血中 IL33 の検討を含め、IL33/ST2 蛋白/ST2L システムの SLE における役割を解析中である。

E. 結論

膠原病における IL-33/ST2 システムの役割が解明されれば、新たな分子標的療法のターゲットになる可能性を秘めている。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Kamata Y, Takahashi Y, Iwamoto M, Matsui K, Murakami T, Muroi K, Ikeda U, Shimada K, Yoshio T, Okazaki H and Minota S. Local implantation of autologous mononuclear cells from bone marrow and peripheral blood for treatment of ischaemic digits in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology* 46:882-884, 2007.

・岡崎仁昭。リウマチ・膠原病患者の貧血の診かた。
治療 89:2495-2498, 2007.

・岡崎仁昭。リウマチ性疾患に対するスタチンの効果
とその機序。分子リウマチ 4:73-79, 2007.

2. 学会発表

・木村洋貴、岡崎仁昭、長嶋孝夫、簗田清次。免疫修飾薬 FTY720 の関節リウマチ患者由来ヒト滑膜細胞での MAPK 活性を介するアポトーシス誘導について。第 51 回日本リウマチ学会総会、平成 19 年 4 月 28 日、横浜

・木村洋貴、岡崎仁昭、長嶋孝夫、簗田清次。免疫修飾薬 FTY720 の関節リウマチ患者由来ヒト滑膜細胞でのアポトーシス誘導作用について。第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 19 年 11 月 3 日、横浜

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

Laser-microdissection(LMD)法を用いた ループス腎炎浸潤 T 細胞の解析に関する研究

分担研究者 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 准教授

研究要旨 Laser-microdissection(LMD)法と RT-PCR 法を用いて、マウス、ヒトのループス腎炎浸潤 T 細胞のサイトカイン産生について解析した。1) マウス: MRL/lpr マウスでは、糸球体、糸球体周囲、血管周囲炎すべてで IFN- γ 、IL-13、IL-17 の発現を認めたが、IL-10 は血管周囲炎でしか発現しておらず、糸球体腎炎と血管周囲炎の機序は異なると考えられた。2) ヒト: 糸球体、間質ともに、Th2 サイトカイン(IL-4、IL-10、IL-13)と IL-17 の発現が強く認められた。International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) 分類の III 型主体のループス腎炎の糸球体における T 細胞は、IFN- γ を発現していたが、IV 型主体の糸球体では、IFN- γ の発現は認められず、ループス腎炎の病型によりサイトカインバランスが異なる可能性が考えられた。3) マウス、ヒトともに、近年自己免疫疾患において注目されている IL-13、IL-17 がループス腎炎の病態形成に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

マウス、ヒトのループス腎炎のサイトカインバランスを Laser-microdissection(LMD) 法と RT-PCR 法を用いて明らかにする。

2) 免疫組織染色

ヒトでは、TCR- β 、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17 の染色を行った。

(倫理面への配慮)

筑波大医の倫理委員会の承認を得て、研究方法、発表形式について患者に説明を行い、文書で同意を得た。

B. 研究方法

マウス: 糸球体腎炎、血管周囲炎を発症した 10 匹の雌 MRL/lpr マウスの腎標本を解析した。

ヒト: ISN/RPS 分類の III 型 1 例、III+V 型 2 例、IV 型 4 例、IV+V 型 3 例の計 10 例で糸球体、間質の解析を行った

1) LMD と RT-PCR

マウスでは、糸球体、糸球体周囲の浸潤細胞をくりぬきプールした。また、血管周囲炎においても同じサイズでカットを行った(図 1、2)。

ヒトループス腎炎では、糸球体、間質の浸潤 T 細胞を単細胞レベルでくりぬいて解析した(図 3)。マウス、ヒトともに、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17 の発現を RT-PCR 法を用いて解析した。

C. 研究結果

1) マウス:

糸球体におけるサイトカイン遺伝子発現は、糸球体: IFN- γ : 75%、IL-2: 12.5%、IL-4 陰性、IL-10: 7.5%、IL-13: 87.5%、IL-17: 35%であり、糸球体周囲: IFN- γ : 68.8%、IL-2: 25%、IL-4 と IL-10 は陰性、IL-13: 81.3%、IL-17: 62.5%、血管周囲では、IFN- γ : 62.5%、IL-2: 5%、IL-4: 2.5%、IL-10: 60%、IL-13: 70%、IL-17: 30%であった(図 4)。

2) ヒト:

a) (ISN/RPS) 分類の III 型主体(III、III+V) 3

例では、糸球体:IFN- γ : 34.8%、IL-2: 13%、IL-4: 87%、IL-10: 56.5%、IL-13: 56.5%、IL-17: 47.5%、間質:IFN- γ : 陰性、IL-2: 5%、IL-4: 100%、IL-10: 70%、IL-13: 55%、IL-17: 45%であった(図5、図6)。
b) IV型主体(IV、IV+V)7例では、糸球体:IFN- γ : 陰性、IL-2: 2.6%、IL-4: 89.5%、IL-10: 44.7%、IL-13: 39.5%、IL-17: 68.4%、間質:IFN- γ : 陰性、IL-2: 14.7%、IL-4: 97.1%、IL-10: 97.1%、IL-13: 23.5%、IL-17: 73.5%であった(図5、図6)。
c) 免疫組織染色で、細胞内のTCR- β 、IL-4、IL-10、IL13、IL-17産生が確認された(図7、図8)。

D. 考察

近年自己免疫疾患で注目されているIL-13、IL-17は、MRL/lprマウスの糸球体、糸球体周囲、血管周囲すべてで発現していた。しかしIL-10は血管周囲でのみ高頻度に発現しており、糸球体腎炎と血管周囲炎の発症機序は異なる可能性が示唆された。ヒトでは、糸球体、間質ともに、Th2サイトカイン(IL-4、IL-10、IL-13)とIL-17の発現が強く認められた。ISN/RPS分類のIII型主体のループス腎炎の糸球体におけるT細胞は、IFN- γ を発現していたが、IV型主体の糸球体では、IFN- γ の発現は認められず、ループス腎炎の病型によりサイトカインバランスが異なる可能性が考えられた。

E. 結論

1)マウス、ヒトともに、腎炎の発症にIL-13、IL-17が関与していることが示唆された。
2)MRL/lprマウスの糸球体腎炎と血管周囲炎の発症機序は異なる可能性が示唆された。
3)ヒトループス腎炎はTh2、Th17有意であるが、III型主体の糸球体では、IFN- γ も産生されており、ループス腎炎の病型によりサイトカインバランスが異なる可能性が考えられた。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwanami K, Matsumoto I, Watanabe Y, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T, Sumida T. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. Arthritis Rheum. in press
2. Kohno M, Tsutsumi A, Matsui H, Sugihara M, Suzuki T, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Suguro T, Sumida T. Interleukin 17 gene expression in patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. in press
3. Ishii W, Ito S, Kondo Y, Tsuboi H, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Okoshi Y, Hasegawa Y, Kojima H, Sakashita S, Aita K, Noguchi M, Sumida T. Intravascular large B-cell lymphoma with acute abdomen as a presenting symptom in a patient with systemic lupus erythematosus. J Clin Oncol. in press
4. 伊藤 聡. Laser microdissection法による疾患発症関連分子解析の試み 分子リウマチ 4:63-67, 2007.
5. Kobayashi T, Ito S, Yasuda K, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, Tai H, Narita I, Gejyo F, Yoshie H. The Combined Genotypes of Stimulatory and Inhibitory Fc γ Receptor Associated with Systemic Lupus Erythematosus and Periodontitis in Japanese. J Periodontology 78: 467-474, 2007.
6. Kuroda T, Hirose S, Tanabe N, Sato H, Nakatsue T, Ajiro J, Wada Y, Murakami S, Hasegawa H, Ito S, Sakatsume M, Nakano M, Gejyo F. Mizoribine therapy for patients with lupus nephritis: the association between peak mizoribine

concentration and clinical efficacy. Mod Rheumatol 17:206-212, 2007.

7. Enaami T, Suzuki T, Ito S, Yoshimi A, Sugihara M, Mamura M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, and Sumida T. Successful treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura with cyclosporine and corticosteroids in a patient with systemic lupus erythematosus and antibodies to ADAMTS13. Intern Med 46:1033-1037, 2007.

2. 学会発表

1. 王 英歌、伊藤 聡 千野裕介、後藤大輔、松本 功、堤 明人、住田孝之: Analysis of T cells infiltrating in kidneys of lupus nephritis patients by Laser-microdissection method. 第37回日本免疫学会、2007年

2. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T: Analysis of T cells infiltrating in kidneys of MRL/lpr mouse by Laser-microdissection method. 第71回アメリカリウマチ学会, 2007

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。

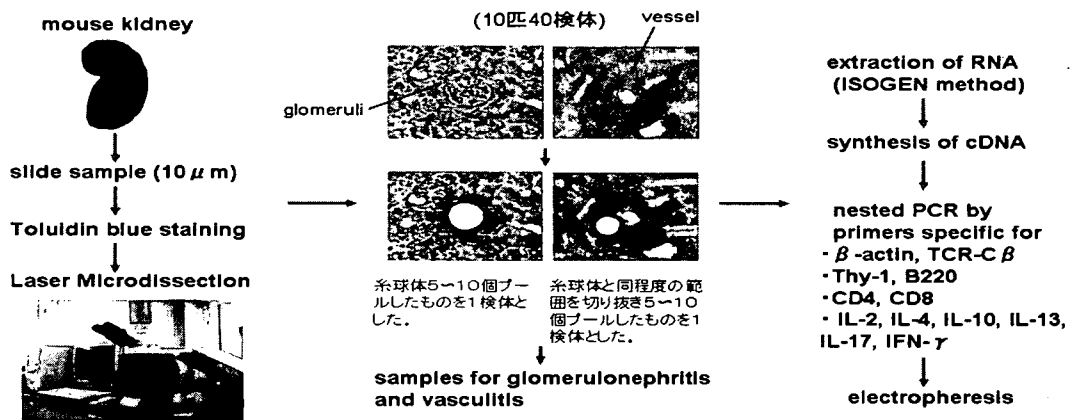


図1 実験方法 (マウス)

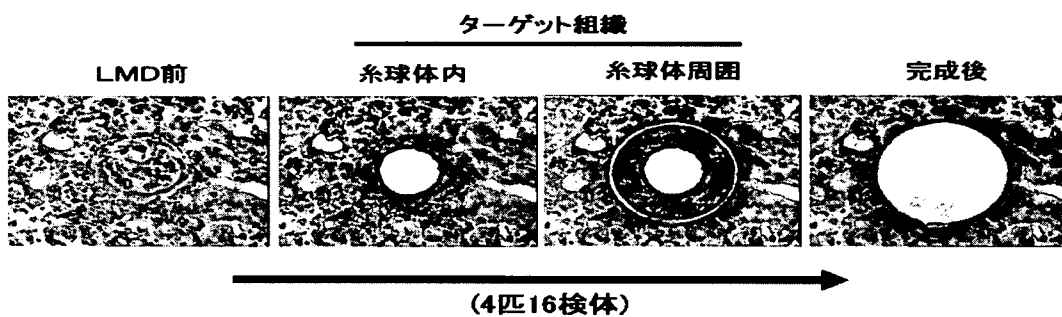


図2 系球体周囲浸潤細胞のLMDによる採取 (マウス)

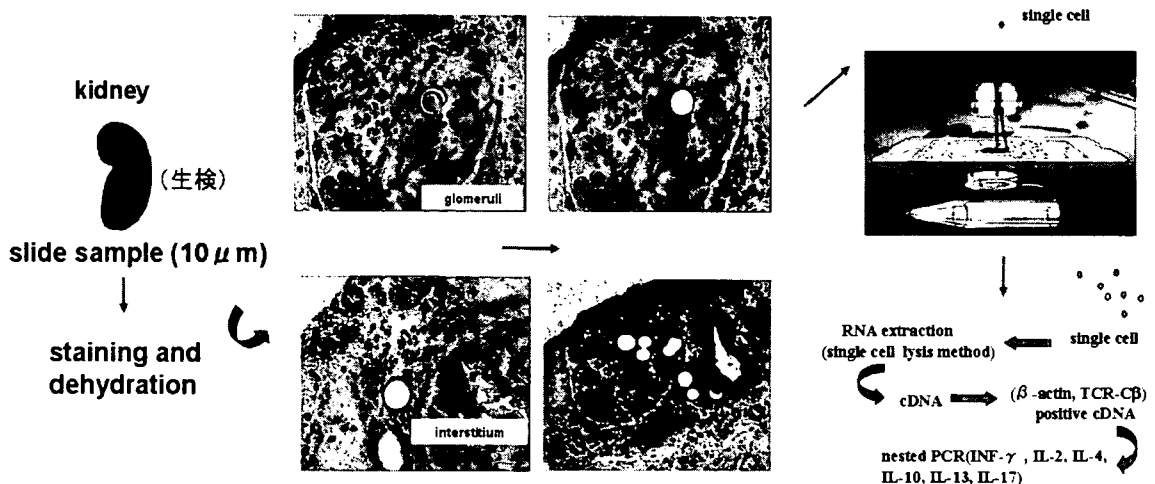


図3 実験方法 (ヒト)

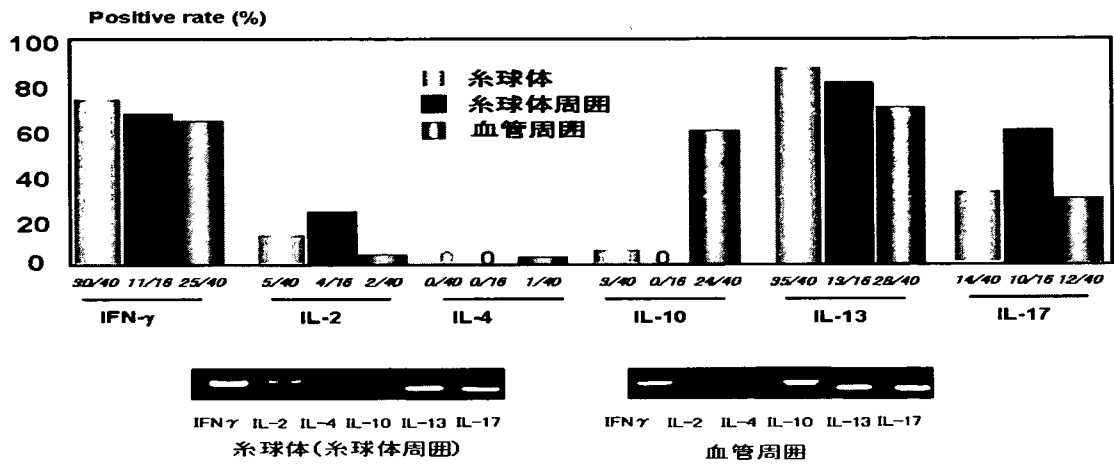


図4 サイトカイン mRNA expression (マウス)

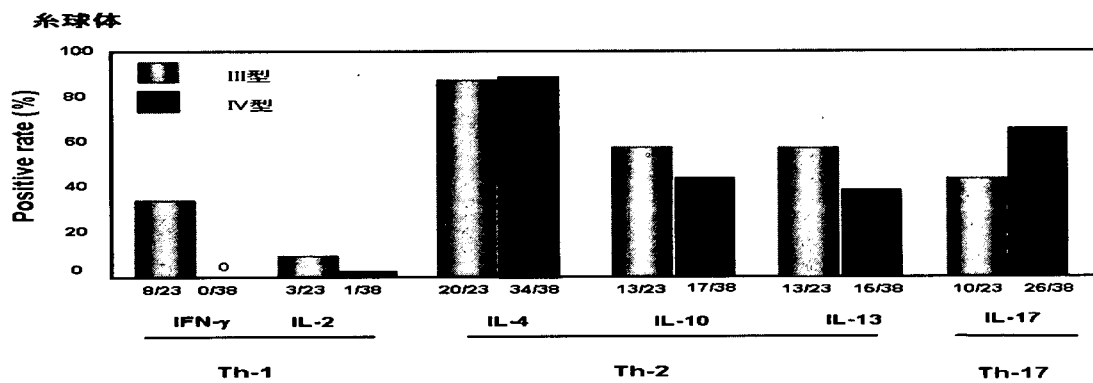


図5 サイトカイン mRNA expression (ヒト、系球体)

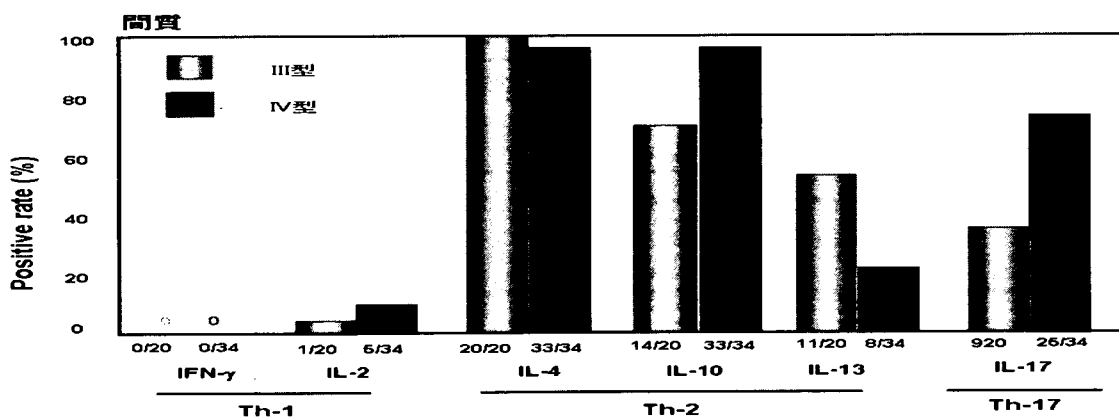


図6 サイトカイン mRNA expression (ヒト、間質)

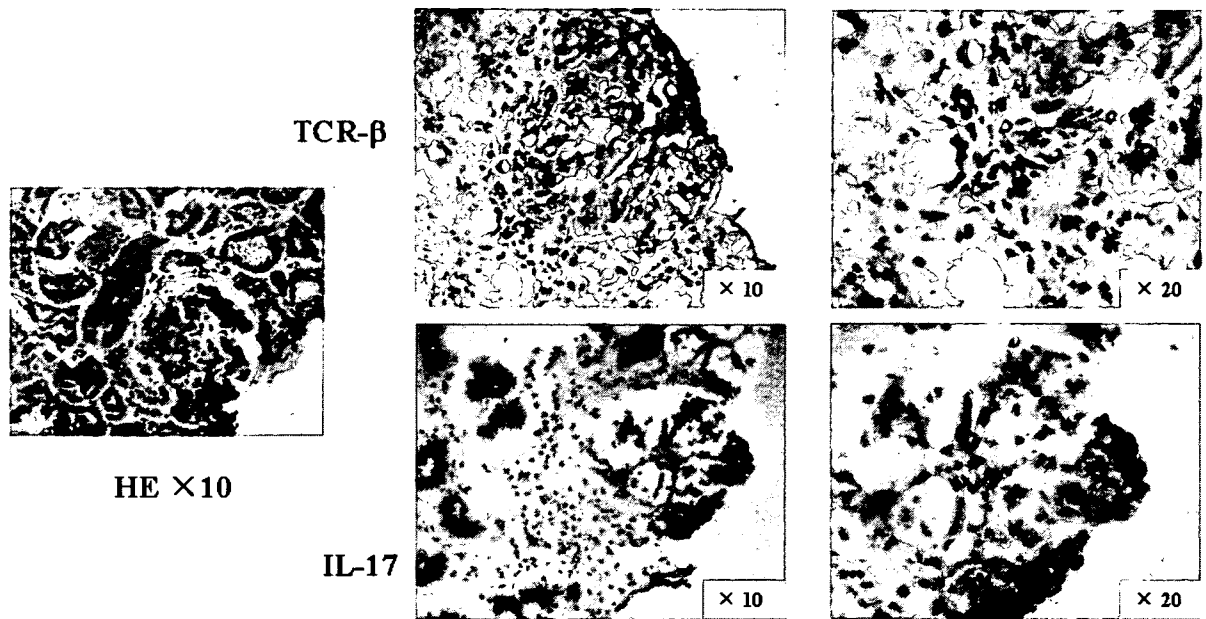


図7 免疫組織染色 TCR-β IL-17 (ヒト)

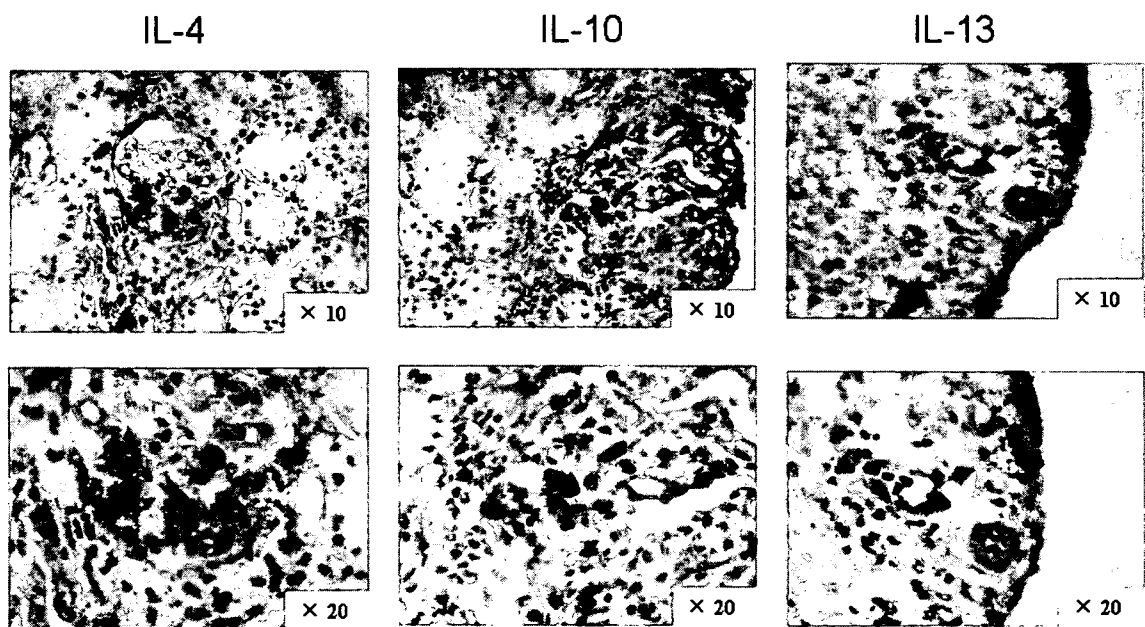


図8 免疫組織染色 IL-4, IL-10, IL-13 (ヒト)

全身性エリテマトーデスおよびその他膠原病における Th17 の関与に関する研究

分担研究者 三村 俊英 埼玉医科大学リウマチ膠原病科 教授
研究協力者 佐藤浩二郎 埼玉医科大学リウマチ膠原病科 講師
三由文彦 埼玉医科大学リウマチ膠原病科 リサーチフェロー
油谷浩幸 東京大学先端科学技術研究センター 教授

研究要旨 全身性エリテマトーデス（SLE）その他膠原病において新規ヘルパーT細胞 Th17 の病態への関与を知るため末梢血における他のヘルパーT細胞サブセットとの比率の測定を行った。その結果、SLEにおいてTh17サブセットの比率が増加している事が判明した。一方、マウスT細胞を用いて、Th17分化・増殖に関与する転写因子を探索した。その結果、既知転写因子であるROR γ 以外にTh2分化に働くとされているc-Mafの関与が示唆された。

A. 研究目的

前年度における本研究結果で測定する事が可能となった、末梢血単核細胞分画における、Th1/Th2/Th17の比率測定法を用いて、全身性エリテマトーデス（SLE）その他膠原病において新規ヘルパーT細胞 Th17 の病態への関与を知るため末梢血における他のヘルパーT細胞サブセットとの比率を検討する。またTh17の分化に関与する機構の解明を行う。

B. 研究方法

当院 IRB にて承認されたプロトコールに従い、インフォームドコンセントにて同意を得たSLE、関節リウマチ（RA）およびその他の膠原病患者末梢血単核球をT細胞刺激条件下（PMA+ionomycin）で培養し、IL-17、IFN- γ 、IL-4に関してreal-time PCRを用いてmRNA発現量およびELISAにて培養液中の濃度測定を行った。またフローサイトメトリ法を用いてそれぞれのサイトカインの産生細胞を同定した。一方、Th17細胞分化増殖に関わる転写因子を探索するため、マウス脾細胞由来CD4+T細胞を、Th1、Th2およびTh17分化条件にて刺激した後、RNAを抽出し、GeneChipを用いてトランスクリプ

トーム解析を行った。

（倫理面への配慮）

当院 IRB にて承認された研究であり、患者インフォームドコンセントは、口頭および文章にて確認してある。また、患者個人情報は匿名化を行う事で漏洩の心配は無い。遺伝子解析は行っていない。

C. 研究結果

患者および健常者の末梢血から採取した単核球をPMA+ionomycinにて刺激したところ、IFN- γ 、IL-4 およびIL-17のmRNAならびに蛋白レベルで発現を測定することが出来た。健常対照者およびRAに比してSLEにおいては、Th2 < Th17の傾向が認められた（図）。マウスCD4+T細胞の刺激により、Th17分化刺激下において強く発現を認める転写因子は、既知ROR γ 以外に新たなものとしてTh2分化に関わるとされているc-Mafを確認した。

D. 考察

Th17は、多発性硬化症の動物モデルとされる実験的アレルギー性脳炎（EAE）の病態において重要である事が知られている。さらに、Th17の産生するサイトカインIL-17は、関節リウマチ

滑液に豊富に存在し、好中球遊走を促進するとともに、炎症に関与することが知られている。SLE患者末梢血においてTh17の比率が高いことは、臨床症状との詳細は不明であるが、局所での炎症以外にも全身的に構成的症状などの病態に関与する可能性が考えられた。また、既に報告されているTh17分化に関与するとされる転写因子ROR γ 以外に、Th2分化において需要であるc-MafがTh17分化刺激によって発現が増加したことから、c-MafがTh17分化に関わる可能性がある。Th17分化増殖の複雑な機序の一端が明らかになった。

E. 結論

SLE患者末梢血においてTh17の病態への関与の可能性が示唆された。また、Th17分化機序の複雑さの一端が示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yokota, K., Miyoshi, F., Miyazaki, T., Sato, K., Yoshida, Y., Asanuma, Y., Akiyama, Y., and Mimura, T.: High Concentration Simvastatin Induces Apoptosis in Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* in press

2) Kanda H, Yokota K, Kohno C, Sawada T, Sato K, Yamaguchi M, Komagata Y, Shimada K, Yamamoto K, Mimura T.: Effects of low-dosage simvastatin on rheumatoid arthritis through reduction of Th1/Th2 and CD4/CD8 ratios. *Mod. Rheumatol.* 17:364-8, 2007.

2. 学会発表

1) 佐藤浩二郎、他；膠原病患者由来単核球のサイトカインプロファイル解析及びマウスTh17細胞のトランスクリプトーム解析、日本免疫学会、2007、横浜

2) Yu Asanuma, et al., Increased Concentration

of Pentraxin 3 in Rheumatoid Arthritis: Relationship to Chronic Inflammation, Bone Destruction and Atherosclerosis, America College of Rheumatology, 2007, Boston

3) Kazuhiro Yokota, et al. Simvastatin Inhibits Production of Pentraxin 3 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis., America College of Rheumatology, 2007, Boston

4) 三村俊英: シンポジウムS-1 生物学的製剤を用いた炎症の抑制。S1-1 生物学的製剤と炎症制御—特にTNF阻害療法を中心に— 第28回日本炎症・再生医学会、2007 8

5) Yoshihiro Yoshida, et al.: Effects of histone deacetylase inhibitor, suberoyl bis-hydroxamic acid, on human monocyte-derived dendritic cells. 10th International Workshop on Langerhans Cells, 2007 9

6) Yu Asanuma et al.: Increased concentration of pentraxin 3 in rheumatoid arthritis: relationship to chronic inflammation and cardiovascular risk factors. The Second East Asian Group of Rheumatology Meeting, 2007 5

7) Kazuhiro Yokota, et al.: High Concentration Simvastatin Induces Apoptosis in Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. The Second East Asian Group of Rheumatology Meeting, 2007 5

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

膠原病診断方法

(特願2007-222082)

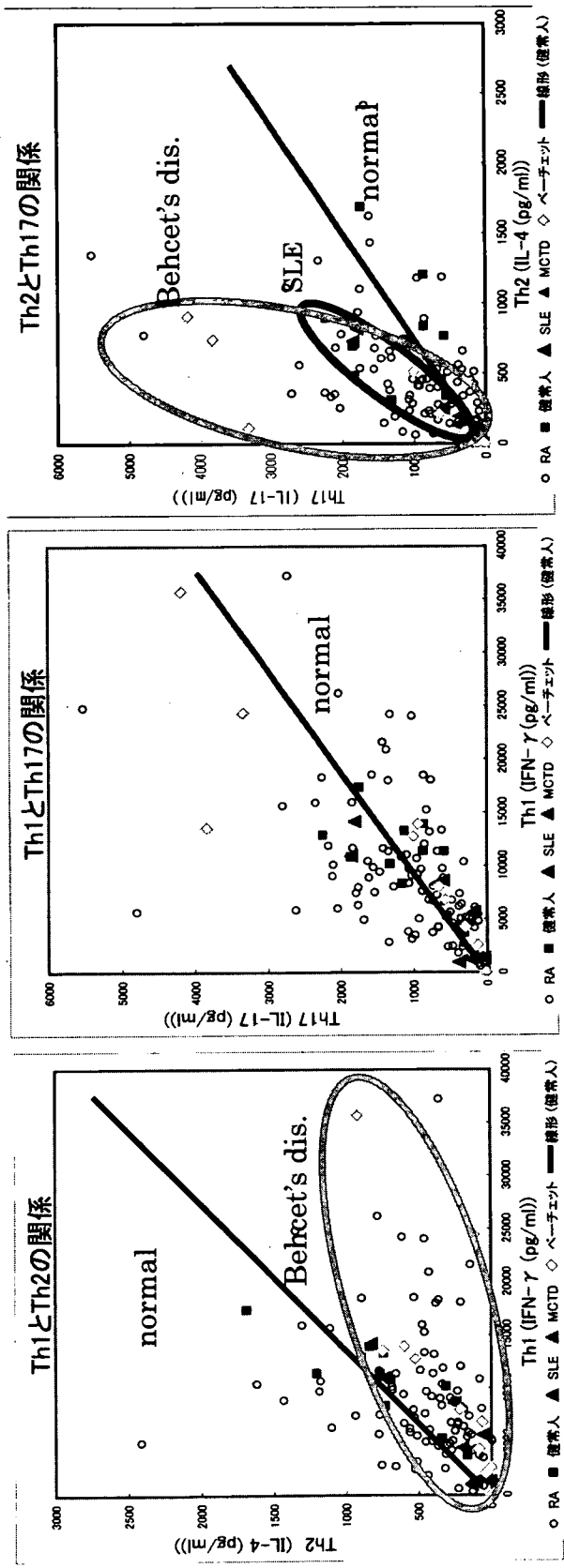
2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図；全身性エリテマトーデスおよびベーチェット病 末梢血 T ヘルパー細胞サブセットの比率



SLE 難治性病態に対する新規治療法の臨床開発・評価に関する研究-タクロリムスの SLE T 細胞機能異常に対する作用および臨床的有用性の検証

分担研究者 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
研究協力者 鈴木 勝也 埼玉医科大学総合医療センター リウマチ・膠原病内科 助教

研究要旨 SLE の難治性病態の 1 つであるループス腎炎の治療成績をまとめ、最近承認されたカルシニューリン阻害薬の有用性について検証した。その作用機序に関して *in vitro* 免疫学的解析、DNA マイクロアレイ解析を行い、新たな作用メカニズムについての検討を報告する。

A. 研究目的

SLE の約半数には難治性病態が合併し、予後に直結する重要な病変である。副腎皮質ステロイド薬の有効性は約 40% で、同薬剤単独での治療には限界がある。タクロリムスは、07 年 4 月にループス腎炎に適応追加されたが、その位置づけに関してはコンセンサスが十分得られているとは言い難い。その作用点はカルシニューリンと明確であるが、機能異常を呈する SLE T 細胞に対してこれら薬剤がどのように作用するかは明らかでない。そこで、免疫薬理学的アプローチによって検討を加え、利用可能な臨床的効果や安全性データを基に、これら薬剤の有用性を検証する。

B. 研究方法

- 1) 臨床的検討：ACR 分類基準を満足し、その腎所見項目を有するループス腎炎を対象とし、治療薬剤の効果と安全性を検証する。ループス腎炎治療の (A) 寛解導入、(B) 維持治療、における有用性は、NIH ループス腎炎治療反応性基準を用いて判定する。
- 2) *In vitro* 免疫学的解析：健常人および SLE 患者から分離した T 細胞を用い *in vitro* で抗 CD3+抗 CD28 刺激を加える。T 細胞活性化エフェクター機能の指標として各種サイトカイン産生、制御性機能の指標として CD4+CD25+ Foxp3+Treg 細胞数および細胞内 Foxp3 発現量をフローサイトメーターで測定。Foxp3 およびそのアイソフォームの mRNA 発現を定量 PCR で測定。これらの系に各種濃度のタクロリムス等の薬剤を添加しその影響

を検討。同時に遺伝子チップを用いてタクロリムスによって変動する遺伝子群を網羅的に解析する。

- 3) DNA マイクロアレイ解析：健常人末梢血から CD4+CD25+CD127-細胞分画を分取し、これにタクロリムス 10ng/ml を添加し、非添加細胞との遺伝子発現レベルを解析。

C. 研究結果

：1) ループス腎炎に対する治療成績：埼玉医科大学総合医療センターに通院し、ACR1982 年分類基準を満足し、腎生検あるいは臨床的に腎障害を認めたループス腎炎の治療について後ろ向きに臨床データを解析した。1985 年から 2001 年までに治療を開始した 63 例のループス腎炎の治療成績は、副腎ステロイド大量投与で 40% が寛解あるいは改善、免疫抑制薬併用で 26%、34% は、いずれによっても寛解・改善を導入出来なかった。この免疫抑制薬併用群では、アザチオプリン 50-100mg/d、経口シクロフォスファミド 50-100mg/d、点滴シクロフォスファミドが使用されていた。ネフローゼ症候群に対して適応を有するシクロスポリンの治療効果を検証するため、上記免疫抑制薬不応性のループス腎炎 9 例に対してシクロスポリンを投与し、血清トラフ値 100-200ng/ml に維持した。投与 2 週間後には、蛋白尿は約 50% に有意な低下を示し、30 週で 67% に低下した。この間、併用投与されたプレドニゾロン量は、21.1mg/d から 11.6mg/d へと有意の低下を示し、シクロスポリンのステロイド減量効果が明らかになった。副作用は、1 例に軽度の高血圧

が認められたが、その他、腎機能障害を含めた副作用は認めなかった。最終的な治療効果は、完全寛解2例、部分寛解4例、不変3例で、67%の有効性を示した(1)。これに引き続き、2007年ループス腎炎に適応追加されたタクロリムスの治療効果を検討した。シクロスポリンと同様、複数の免疫抑制薬抵抗性のループス腎炎に有効である事が確認された(2)。

2) In vitro 免疫学的解析：健常人7名、RA36名、SLE9名の末梢血中細胞サブセットを解析した。%CD4+CD25+Foxp3+/CD4+T細胞は、3群間で有意差はなく、SLEでむしろ若干高い傾向を示した。Foxp3には、野生型に加えエクソン2(-)のスプライス・ヴァリエントが知られている。そこで、これらのreal time PCRでmRNAを定量化したところ、健常人に比べ、RAならびにSLEで有意の低下を示した。特に、RAにおいては、エクソン2(-)ヴァリエントがほとんど検出されなかった。SLEにおいても、野生型、エクソン2(-)ヴァリエント共に、有意な低下を示した。そこで、MACSによってCD4+CD25+およびCD4+CD25-細胞を分取し、これを種々の割合で添加し抗CD3+CD28抗体ビーズで3日間刺激した。CD4+CD25+細胞サブセットの抑制機能を解析し、健常人に比べ、SLEで有意な低下を確認した。Foxp3+CD62Llow誘導Treg活性アッセイ系に、タクロリムスを添加して、その効果を解析したところ、タクロリムスは1-10ng/mlの範囲で用量依存的に誘導Treg活性をブロックした。

3) DNAマイクロアレイ解析：健常人末梢血よりFACSによってCD4+CD25+CD127-細胞をソーティングし、これにタクロリムス10ng/ml添加、非添加にて培養し、そのmRNAを抽出しアジレント44kチップにて解析した。非添加に比べ1.5倍以上/以下の変動した遺伝子を検索したところ、高発現遺伝子661、低発現遺伝子360が明らかになった。

D. 考察、E 結論

考察と結論：ループス腎炎に対する治療は、副腎皮質ステロイド薬では40%の寛解・改善導入率にとどまるが、これに加えて免疫抑制薬を併用することでさらなる治療効果が期待される。最近導入されたT細胞シグナル伝達阻害薬は、これまでにない安全性プロフィールを有し、その2剤シク

ロスポリン、タクロリムスの臨床的有効性が確認された。このうちタクロリムスの作用機序、個々の症例における治療反応性を検討するため、in vitro細胞機能に及ぼす影響を検討したところ、タクロリムスは、カルシニューリンを介したエフェクターT細胞機能抑制ばかりではなく、誘導Tregに対しても抑制的に作用している可能性が明らかとなった。

F. 健康危機情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuzaka K, Itami Y, Kumazawa C, Suzuki M, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. The conservative sequences in 3'UTR of TCR ζ mRNA regulate the production of TCR ζ and TCR/CD3 complex in SLE T cells. *BBRC* 367:311-317, 2008.
2. Tsuzaka K, Matsumoto Y, Sasaki Y, Abe T, Tsubota K, and Takeuchi T. Down-regulation of Fas-ligand mRNA Shogren' syndrome patients with enlarged exocrine glands. *Autoimmunity* 40:497-502, 2007.
3. Ogawa H, Kameda H, Nagasawa H, Sekiguchi N, Takei H, Tsuzaka K, Amano K, and Takeuchi T. Prospective study of low dose cyclosporine A in patients with refractory lupus nephritis. *Mod Rheum* 17:92-7, 2007.
4. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Shima Y, Takada K, Matsumoto I, Saito K, and Koike T. A multicenter phase I/II trial of rituximab for refractory systemic lupus erythematosus. *Mod Rheum* 17:191-7, 2007.
5. Kameda H, and Takeuchi T. Platelet-Derived Growth Factor as a Therapeutic Target for systemic autoimmune diseases. *Drug Target Insight* 2:1-9, 2007.
6. Suzuki K, Takei H, Kameda H, Nagasawa H,

Sekiguchi N, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T. Efficacy and Safety of Tacrolimus in Patients with rheumatoid arthritis in clinical practice: Significant role of blood concentration measurement for preventing severe adverse events. Arthritis Rheum. S35 CRC03, 2007.

2. 学会発表

1. Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Sekiguchi N, Takei H, Nishi E, Okuyama A, Ogawa H, Tsuzaka K, Takeuchi T. Efficacy and safety of tacrolimus in patients with rheumatic disease: Appropriate clinical application for various rheumatic conditions. 71st Annual Meeting, Boston, U.S.A., November, 2007.
2. Tsuzaka K, Itami Y, Kumazawa C, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. 14-kd protein binds to the conservative region in TCR zeta mRNA 3' UTR and regulates the production of TCR zeta and TCR/CD3 complex. 71st Annual Meeting, Boston, U.S.A., November, 2007.
3. Yoshimoto K, Setoyama Y, Tsuzaka K, Ogawa Y, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T. Possible involvement of MMP-9 in the production of BAFF in T cells. 71st Annual Meeting, Boston, U.S.A., November, 2007.
4. Tsuzaka K, Itami Y, Kumazawa C, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. Decreased expression of the glycosylated syndecan 4 accompanied with down-regulation of TCR zeta in SLE patient T cells. 71st Annual Meeting, Boston, U.S.A., November, 2007.
5. Kumazawa C, Shiraishi K, Tsuzaka K, Takeuchi T. A negative role of a unique integrin alphaEbeta7 on proliferative capability of human T cell line. The EULAR annual congress of rheumatology, Barcelona, Spain, June, 2007.
6. Yoshimoto K, Takahashi Y, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T.

Possible involvement of MMP in the production of soluble BAFF in human T cells. The EULAR annual congress of rheumatology, Barcelona, Spain, June, 2007.

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

ループス腎炎の治療：標準化に関する研究

分担研究者 三森 明夫 国立国際医療センター膠原病科 第一病棟 部長

研究協力者 高橋 裕子 同上（臨床指導医）、溝上哲也 同センター研究所（疫学統計研究部長）、アンケート調査協力施設（50音順）協力者（敬称略）：慶応大（平形 道人）、産業医大（田中 良哉）、順天堂大（天野 浩文）、自治医大（岡崎 仁昭）、筑波大（伊藤 聡、林 太智）、東京医科歯科（高田 和生、宮坂 信之）、東大（山本 一彦）、東北大（平林 泰彦、石井 智徳）、長崎大（蒲池 誠）、北大（渥美 達也、奥 健志）

研究要旨 昨年度の班研究で、平均観察20年にわたる自施設SLE病歴の時系列解析を行ない、SLE初発時に発症した腎炎（初期発症腎炎）と遅発腎炎を区分すると、治療反応性と予後の差が明確に分離されることを報告した。今回、これを基に作成した調査項目の「患者団体への調査および多施設調査」2集団での追試を企画した。結果は自施設調査を含む3集団で一致した。初期発症腎炎では、Kaplan-Meier曲線上50-55%が初回治療後に再発なし、再発者の再治療で5年寛解率55-62%であるのに比べ、遅発腎炎の初回治療5年寛解率は24-35%と低かった（ $p < 0.05-0.001$ ）。最終観察時の不可逆腎障害（持続ネフローゼまたは腎不全）は、初期発症腎炎群6-8%に比べ、遅発腎炎群は27-51%（ $p < 0.001$ ）と明確に高く、IVCYが併用された遅発腎炎例で低い傾向があった。腎組織IV型は、初期発症腎炎群で腎不全率にわずかに寄与し、遅発腎炎では、様々な腎組織型から（組織移行が一部の症例で確認され）不可逆的腎障害に至った。したがってSLE治療方針について以下のことが示唆される。

結論：強力な治療（高用量ステロイド+IVCY）は、経過中新たに発生した尿所見（遅発腎炎）一般に適応があり、腎病理で危険安全を区分しにくい。初期発症腎炎の予後はIV型を含め良好で、遅発腎炎と同等な治療を要さず、その寛解者はステロイドを安全に減量しうる有力候補である。逆に腎炎のないSLEでは、不可逆腎障害の発生確率が（腎炎発生率 $>50\%$ x 障害率27-51%） $>14-26\%$ と算定され、ステロイド中止可能群といえない。

A. 研究目的

SLEの治療を標準化するための基礎となる、レトロスペクティブ病歴調査を行ない、統計的根拠に基づく臨床指針を求める。

（外来での維持ステロイド量増量はイベントとみなさなかった）。イベント時系列と治療介入の関係を統計ソフトStataでコンピュータ解析した。

得られた結果を他の患者集団で追試するため、時系列情報の内容を定義したアンケート調査を、下記のように行なった。

B. 研究方法

1) 自施設病歴（18年度報告）：罹病5年以上のSLE 154例（観察平均 21 ± 9 年、3169人年）について、発症、すべての治療介入（イベント）、最終観察時における、病態と治療内容を記入したデータベースを作成した。LN 85例、総イベント455回が算定された

2) 膠原病友の会（殆どが外来通院者）：調査の趣意書を添え、記入法を定義した病歴時系列票を、会報に折り込み、購読者5000人に配布した。完全匿名、任意郵送（無料）の方法で、友の会事務局に返送された回答を回収した。解析結果は、その後の会報

(2008年, No148, p35)において報告した。

約200人の回答から、無効票(他疾患など)約50、LNなし7人、SLE罹病5年未満10人を除き、LN合併SLE125人の十分な情報を得た。自分の病歴を周知し、任意返送することが強いバイアスとなり、有効情報の提供者が効率よく選別されたと考えられる。本回答者群の服薬コンプライアンスは、極めて良好であった。

質問事項がおもにLNに関連したため、LNなしのSLEは回答者に少なく、LNのないSLE群という背景の中からLNが発生する確率(自施設調査での主要データのひとつ)については、この集団で解析対象外となった(下記3についても同様である)。また腎生検分類は、記載が19人のみであり、解析対象外とした。

3)本研究班10大学のLN症例(外来通院者):上記と類似の調査票または病歴サマリーにより、標記の諸施設から195例の情報が得られ、SLE初発時のLN有無不明、最近のLN発症(いずれも評価不能)を除外した後、173例となった。さらに治療効果の評価不能例(無治療のまま悪化など;後述)を除外し、解析可能166例(腎生検病理の情報120例)を得た。

(倫理的配慮)

病歴に基づくレトロスペクティブ解析であり、アンケート調査は完全匿名化した資料のみを用いた。

C. 研究結果

3集団(方法の項1,2,3)における、SLE初発時のLN有無による区分(初期発症LN vs 遅発LN)、LN再発の時系列、治療介入後のLN寛解率、最終観察時(近接3年)でのLN状態を記す。遅発LNの発生確率は自施設で、腎生検病理型と予後の関係は、自施設、10大学で分析した。

初期発症LNの定義:SLE発症の記載または病歴上診断基準を満たしたと判定される時点における、LNありの記載、または病歴上の尿蛋白ないし血清Cr上昇の記載。さらに次のような記載のある症例を含めた:SLE軽症病態(LNなしと記載あり、またはLNの記載なし)に対し、無治療または少量ステロイドで

経過観察され、その後(症例によっては年余の後に)LNを生じ初めて中等量(プレドニゾン/PSL20mg/d相当)以上のステロイド治療介入または入院治療がなされた症例。このような例は、本群の約10%を占めた。

遅発LNの定義:上記に対応し「LNなしと記載されたSLE病態に、中等量以上のステロイド治療介入または入院治療がなされて改善した後の、再発SLEに伴って出現したLN所見」と定義した。中等量以上のステロイド治療介入は、必ずしもSLE初発時になされてはいない。

一方、LN所見のないSLEの初回治療中に、悪化とともにLN所見が出現した例は、本群ではなく「初期発症LN」に分類した。

除外症例:無治療のまま悪化ないし慢性腎不全(CRF)に至った例は、LN再発曲線、治療反応評価、予後評価から除外した。10大学調査集団から除外した7例を以下に例示する:1.尿蛋白+に無治療、4年後の初診時CRF。2.尿蛋白+から8年後に治療、その後中止、Cr上昇から3年後に再診時CRF。3.IV型LNが改善し治療中止、不明の理由で10年間PSLなくCRF。4.尿蛋白0.6-2g/dの過去情報から18年後の初治療時IV型。5.LN再発時の服薬拒否ないし中断、PSL60mg/dの説得に20mg/dで妥協。6.V型に対し過去記録上の最大治療量PSL14mg、その後無治療で尿蛋白持続。7.IV型寛解後、服薬中止、悪化後の2年間PSL内服3-4日に一度のみ、PSL20mgdで介入した後CRF。

以上はすべて、初期発症LNに属し、殆どが服薬コンプライアンス不良例である。この種の症例はレトロスペクティブ調査に常に混入し、適切な予後評価を妨げると考えられた。一方、初診時に腎病態がまだ固定していなかった例は、治療不十分の履歴があっても除外する根拠はないので解析対象に入り(たとえば10大学調査例における、4年間治療拒否の後RPGNで初回治療介入など)、前述の定義から、初期発症LNに区分される。

SLE発症年令、LN発症年令、最終観察までのLN罹