

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・第二内科 講師

研究要旨 抗リン脂質抗体症候群（APS）患者にみられるループスアンチコアグラントの主要な責任自己抗体のひとつは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)である。本研究では aPS/PT の病原性を検討するため、モノクローナル aPS/PT を作成し(231D)、その *in vitro* での向血栓細胞への効果を調べた。はじめに *in vitro* におけるプロトロンビン生成に与える効果を検討した。231D はプロトロンビナーゼのうちの活性化第 V 因子が低濃度のときはプロトロンビン生成を促進し、高濃度のときは逆に抑制した。この現象は、条件によっては aPS/PT がプロトロンビン生成亢進をもたらすことを示す。次に、231D を単球にプロトロンビンの存在下で加えたところ、231D はプロトロンビンに依存して単球に結合し、しかも組織因子 mRNA を誘導した。この単球活性化は、p38MAPK を特異的に使用していることがわかった。以上のように、APS 患者の血栓傾向の一部は、抗プロトロンビン自己抗体の多様な血栓原性作用によることが明らかとなった。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)は血栓傾向を主症状とする自己免疫疾患で、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いる。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原は β 2-グロブリン I とプロトロンビンであり、とりわけ抗プロトロンビン抗体は *in vitro* で抗凝固活性を示すループスアンチコアグラントの責任抗体であるとされる。分担研究者は、ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを認識する「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)」が血栓症の存在と強く相関し、真の血栓原性抗体である可能性を示してきた。

本研究では、モノクローナル aPS/PT を作成して、その作用を検討することにより、抗プロトロンビン自己抗体の血栓原性、すなわち APS の血栓形成機序を明らかにすることをこころみた。

B. 研究方法

Balb/c マウスをヒトプロトロンビンで免疫して、aPS/PT アッセイでスクリーニングし、モノクローナル aPS/PT である 231D を樹立した。次に、ヒトプロトロンビンをプロトロンビン処理して切断し、イオン交換クロマトグラフィーで分離してプロトロンビンの

リン脂質結合ドメインを欠くプロトロンビン-1 を調整した。同様に Balb/c マウスをプロトロンビン-1 で免疫し、リン脂質の関与なしにプロトロンビンに結合するモノクローナル抗体 51A6 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 のプロトロンビン生成に対する効果について検討した。

次に、単球系細胞株である RAW264.7 と 231D および 51A6 との反応性をフローサイトメトリーで検討した。そして、健常人の末梢血単核細胞 (PBMC) 及びマウス単球細胞株 (RAW264.7) をプロトロンビン、CaCl₂ の共存下に 231D で刺激した。組織因子 mRNA は real time PCR で定量した。MAPK の活性化を Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array Kit を用いスクリーニングし、リン酸化を認めた分子は、cellular activation of enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) Kit により特異性を詳細に検討した。更に、aPS/PT の TF 誘導における p38 阻害剤 (SB203580) の効果も検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた *in vitro* の実験によるもので、倫理的な問題は少ない。

C. 研究結果

231D, 51A6ともaPS/PT活性をもったが、231Dが51A6よりも強くホスファチジルセリン-プロトロンビン複合体(PS/PT)に結合した。一方、プロトロンビンを直接酸化ELISAプレートに固相化した場合は、51A6が231Dに比べて強く結合した(図1)。231DはPS/PT上でAPS患者のIgGとの結合と競合したが、51A6は競合しなかった。ウエスタンブロットでは51A6はプロトロンビンに結合したが、231Dはしなかった。231Dは正常血漿に混合すると非常に強いループスアンチコアグラント活性を有し、それは51A6に比べて強かった。

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%までプロ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%までプロトロンビン生成を阻害した(図2)。

231Dはプロトロンビンとカルシウム(2.5mM)の存在下でのみ単球系細胞と強く結合した。51A6も結合を示したが、231Dより結合は弱かった(図3)。

PBMCおよびRAW264.7における組織因子mRNA発現は、PTの存在下で231Dにより増強された。Proteome Arrayでは231Dによりp38 MAPKのリン酸化を認めたが、JNK、ERK1/2のリン酸化に変化を認めなかった。Cell ELISAでは231Dによってリン酸化p38MAPK抗原の増強が認められ、それはプロトロンビン及びCaCl₂両者の存在に依存していた(図4)。SB203580を加えることにより、231Dによる組織因子mRNA発現は抑制された(図5)。

D. 考察

231Dは、PS/PTへの結合性やループスアンチコアグラント活性に関して、APS患者にみられるaPS/PTと共通の特徴を有している。患者IgGとのPS/PT上での部分的な競合は、231Dが一部aPS/PT自己抗体とエピトープをシェアしていることを示す。すなわち、231DはAPS患者にみられるaPS/PTの免疫学的および凝血学的性質を代表していると考えられる。

3年間の検討で、通常はプロトロンビン生成を抑制する(すなわちループスアンチコアグラント活性をもつ)モノクローナルaPS/PTである231Dが、条件によってはプロトロンビナーゼによるプロトロンビン生成を増強することが示された。さらに、昨年の検討で

は231Dが直接向血栓細胞に対応抗原であるプロトロンビンを介して結合し、刺激的に作用して組織因子を誘導し、血栓傾向となる可能性が示された。抗プロトロンビン抗体の結合は、231Dと51A6の反応性を考慮すると、細胞表面ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを介していることが推定された。231Dはホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンに比較的選択的に結合すること、LSCR1を強く誘導するインターフェロン α がこの作用を増強すること(データは示さず)から、細胞表面のホスファチジルセリンの適量の存在が一連の231Dの向血栓作用に重要であると考えられた。

231Dがp38MAPKを特異的にリン酸化して向血栓細胞を活性化することが示された。この経路は、抗 β 2-グリコプロテインI抗体(抗カルジオリピン抗体)による向血栓細胞活性化のときと共通である。まったく異なる対応抗原をもつ2種類の自己抗体が共通の機序で細胞の活性化と症候群(臨床症状)をおこすことは非常に興味深い。

E. 結論

APS患者において、抗プロトロンビン自己抗体の多様な病原性と、その機序の一部が明らかとなった。これらの成果は、現在抗血栓療法にとどまっているAPSの治療法のあらたな戦略開発に貢献すると考える。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Atsumi T, Horita T, Minori T, Koike T. Exchange of information in Rheumatology between East and West : From Man'yo-shu to the Future. *Arthritis Rheum* (in press)

2. Koike T, Atsumi T. "Resurrection of Thrombin" in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 56; 393-394, 2007

3. Amengual O, Atsumi T, Komano Y, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. A polymorphism in the Human

Platelet Antigen 6b represents a risk factor for thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 56; 2803-9, 2007

4. Horita T, Ichikawa K, Kataoka H, Yasuda S, Atsumi T, Koike T. Human monoclonal antibodies against the complex of phosphatidylserine and prothrombin from patients with the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 16; 509-516, 2007

5. Yasuda S, Stevens RL, Terada T, Horita T, Kataoka H, Takeda M, Fukae J, Atsumi T, Koike T. Defective Expression of Ras Guanine Nucleotide Releasing Protein 1 in a Subset of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 179; 4890-4900, 2007

6. Atsumi T. Therapeutic targets for antiphospholipid syndrome. *Blood* 110; 4141, 2007

7. Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Development of multiple autoimmune diseases after CD34+-selected autologous hematopoietic stem cell transplantation in a patient with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 357; 2734-2736, 2007

8. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHWM, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 4; 295-306, 2006

9. 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

10. 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

11. Fukae J, Amasaki Y, Yamashita Y, Bohgaki T, Yasuda S, Jodo S, Atsumi T, Koike T. Butyrate Suppresses Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) Production by Regulating Specific mRNA Degradation Mediated Through a cis-acting AU-rich Element. *Arthritis Rheum* 52; 2697-707, 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

I. 謝辞

本研究は、北海道大学大学院医学研究科・病態内科学、酒井良江、奥健志両大学院生、オルガアメンタル研究員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。

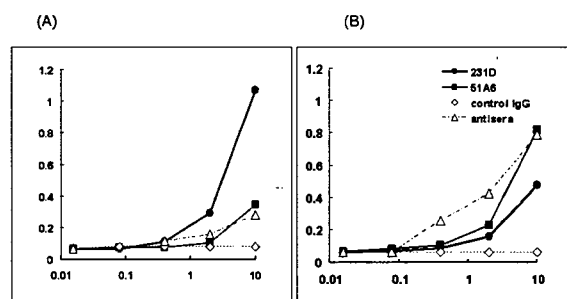


図1 231Dと51A6の反応

231Dと51A6の結合をELISAで調べた。

(A) ホスファチジルセリン-プロトロンビン複合体への結合

(B) プロトロンビン単独(酸化プレート)への結合

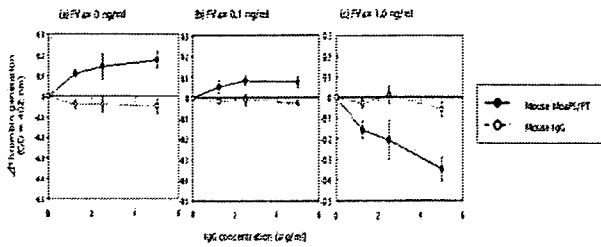


図2 231D のトロンビン生成に与える効果
 231D と正常 IgG を、異なる濃度の活性化第 V 因子を含むプロトロンビナーゼ複合体に加えた。縦軸はトロンビン生成を示す。
 活性化第 V 因子は非存在 (左)、低濃度 (中央) 高濃度 (右)。

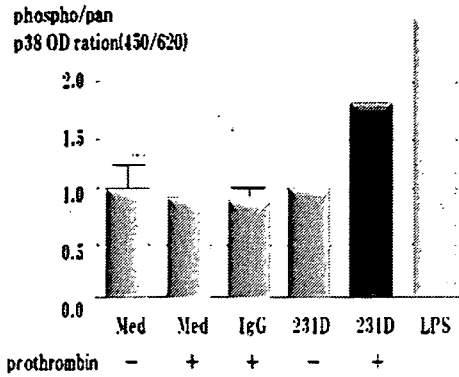


図4 cellular activation of enzyme-linked immuno sorbent assay
 231D をプロトロンビンとカルシウムの存在下で RAW264.7 に加え、Cell ELISA によりリン酸化 p38MAPK 抗原を定量した。

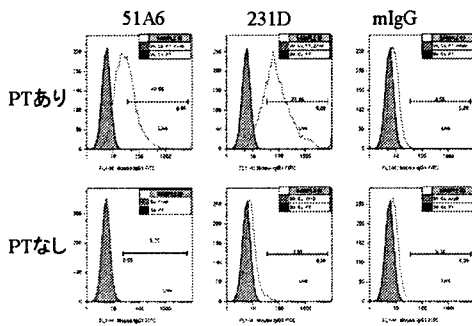


図3 フローサイトメトリによる検討
 231D および 51A6 の RAW264.7 への結合をフローサイトメトリで検討した。上段はプロトロンビンの存在下、下段は非存在下。

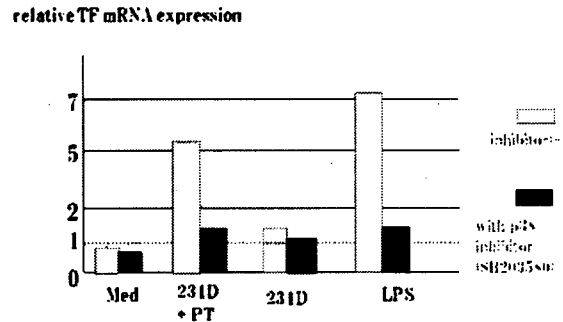


図5 組織因子 mRNA の発現における p38MAPK インヒビターの効果
 231D をプロトロンビンとカルシウムの存在下で RAW264.7 に加え、組織因子 mRNA 発現に対する SB203580 の効果をリアルタイム PCR で検討した。

SAP 遺伝子多型と SLE 発症の関連についての研究

分担研究者 小野 栄夫 東北大学大学院医学系研究科病理形態学分野 教授

研究要旨 SLE 疾患モデル動物を用いて、SLE 病態発生に関わる SLAM-associated protein (SAP) 分子機能を解明すること、ヒトゲノム検体を用いて、SAP 遺伝子多型とヒト SLE 発症の関連性を解明することを目的に研究を行った。その結果、SLE モデルマウスにおいては、SAP を解したシグナルが SLE 症状の発症に必要なこと、SAP 遺伝子多型が若年発症 SLE に関連することが明らかとなった。SAP シグナルを標的とした SLE 治療の可能性が示唆される。

A. 研究目的

これまでに我々は、SLE モデルマウス MRL/lpr の「脱疾患」突然変異種を見出し、その原因が signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP) の機能欠損変異であることを明らかにした。さらに、この変異が膠原病関連組織病変ならびに自己抗体産生など自己免疫病態の発現に必須であると結論付けた (Komori ら, *J Immunol* 2006)。本研究では、SAP 遺伝子機能とヒト SLE 発症との関連性を明らかにするため、SAP 遺伝子多型とヒト SLE 発症の遺伝的関連を調査した。

B. 研究方法

- 1) 関連解析 (SNP 解析) : SNP 遺伝子の全塩基配列を正常検体 20 名 (日本人) で調べ、出現頻度が 10% 以上の SNP を抽出した。これらの SNP に対して、SLE 発症群と非発症群の多型を調べ、各 SNP 多型と SLE 発症の関連を調べた。関連性はカイ二乗検定で行った。P < 0.05 を有意関連と判断した。
- 2) 遺伝子多型の機能解析 : SLE 発症に関連する SNP 多型を含む遺伝子領域 (第二イントロン) の転写関連活性をルシフェラーゼアッセイにより評価する。
(倫理面への配慮) SAP 多型の研究は、土屋尚之教授 (筑波大学社会環境医学) との共同研究で行われ、ヒトゲノム DNA の使用ならびに情報の提供については、当大学倫理委員会の承諾が得られている。

C. 研究結果

イントロンに存在する c.201+317G>T と SLE 発症年齢との関連を認めた。20 歳未満発症の SLE 患者では

c.201+317T アリルが 18.4% (14/76) であったが、20 歳以上発症 SLE 患者や健常人ではそれぞれ 7.2% (13/181, $p = 0.0073$, odds ratio = 2.92) と 6.6% (15/229, $p = 0.0022$, odds ratio = 3.22) であった。同部位を含む領域の転写促進活性を調べたところ、c.201+317T アリルが c.201+317G アリルの 1.9 倍の転写促進活性を示した。

D. 考察

SAP 遺伝子多型と若年発症の SLE の間に関連を認められたが、壮年発症の SLE との間には関連を認めなかった。若年発症の SLE では SAP の c.201+317T アリルが感受性遺伝因子として関与している事が予想される。また、若年発症の SLE では SAP 分子が病態発生に重要な役割を果たしている事が推測される。

E. 結論

SAP 遺伝子の多型 c.201+317T アリルがヒト SLE の若年発症に寄与している可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

該当情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang MC, Mori S, Date F, Furukawa H, Ono M. A non-MHC locus determines tissue-specificity in the pathogenic process underlying synovial proliferation in a mouse arthropathy model. *Ann Rheum Dis* 66:242-5, 2007.
- 2) Misu N, Zhang MC, Mori S, Miyazaki T, Furukawa H, Sasaki T, Nose M, Ono M. Autosomal loci

associated with sex-related difference in the development of autoimmune phenotypes in a lupus model. *Eur J Immunol* 37:2787-96, 2007.

- 3) Nakatani K, Qu WM, Zhang MC, Fujii H, Furukawa H, Miyazaki T, Iwano M, Saito Y, Nose M, Ono M. A genetic locus controlling aging-sensitive regression of B lymphopoiesis in an autoimmune-prone MRL/lpr strain of mice. *Scand J Immunol* 66:654-61, 2007.
- 4) Komori H, Furukawa H, Mori S, Ito MR, Terada M, Zhang MC, Ishii N, Sakuma N, Nose M, and 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.
- 5) Mori S, Zhang MC, Tanda N, Date F, Nose M, Furukawa H, and Ono M. Genetic characterization of spontaneous ankylosing arthropathy with unique inheritance from Fas-deficient strains of mice. *Ann Rheum Dis* 65:1273-8, 2006.
- 6) Yoshida M, Saiga K, Hato T, Iwaki S, Niiya T, Arita N, Komori H, Tsubaki T, Furukawa H, Terada M, Maeyama K, Nemoto K, Nose M, and Ono M. Cappuccino mutation in an autoimmune-prone strain of mice suggested a role of platelet function in the progression of immune-complex crescentic glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* 54:2934-43, 2006.
- 7) Saiga K, Tokunaka K, Ichimura E, Toyoda E, Abe F, Yoshida M, Furukawa H, Nose M, and Ono M. NK026680, a novel suppressant of dendritic cell function, prevents the development of rapidly progressive glomerulonephritis and perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (pANCA) in SCG/Kj mice. *Arthritis Rheum* 54:3707-3715, 2006.

2. 学会発表

- 1) 鎌尾 知行、曾我 美子、小森 浩章、寺田 美穂、小野 栄夫、宮崎 龍彦、能勢 真人：膠原病モデルマウスにおける唾液腺炎と涙腺炎の遺伝的独立性。第96回日本病理学会総会 2007年 大阪。
- 2) 宮崎 龍彦、田中 ゆき、小森 浩章、小野 栄夫、

能勢 真人：オステオポンチン蛋白多型による接着因子結合アフィニティーの差異に関する解析。第96回日本病理学会総会 2007年 大阪。

- 3) 古川 宏、北沢 博、小野 栄夫：ConA 肝炎におけるSAP分子の役割。第96回日本病理学会総会 2007年 大阪。
- 4) 北沢 博、古川 宏、小野 栄夫：全身性受動的アナフィラキシー反応の感受性を規定する遺伝的要因の解析。第37回日本免疫学会総会 2007年 東京。
- 5) M. RABIEYOUSSEFI, S. PEJMAN, H. FURUKAWA, N. ISHII, K. SUGAMURA, M. ONO：A spontaneous model for pulmonary arterial hypertension associated with OX40 ligand overexpression and genetic background in mice. 第37回日本免疫学会 2007年 東京。
- 6) 北沢 博、古川 宏、小野 栄夫：マウス Concanavalin A 誘導肝炎の重症化を規定する遺伝的要因の全ゲノム解析。第51回日本リウマチ学会 2007 横浜。
- 7) 古川 宏、北沢 博、小野 栄夫：ConA 肝炎の発症におけるSAP分子の役割。第51回日本リウマチ学会 2007 横浜。
- 8) 川崎 綾、古川 宏、小野 栄夫、土屋尚之：SH2D1A 遺伝子多型と若年発症全身性エリトマトーデスの関連。第50回日本リウマチ学会 2006年 長崎。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当事項なし。
2. 実用新案登録
該当事項なし。
3. その他
該当事項なし。

抗DNA抗体の産生機序および組織障害機序に関する研究

分担研究者 平林 泰彦 東北大学大学院医学系研究科 講師 (平成18年途中～平成19年)
分担研究者 佐々木 毅 東北大学大学院医学系研究科 教授 (平成17年～18年途中まで)

研究要旨 本研究はループス腎炎に直接関与している抗dsDNA抗体の産生機序と組織障害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。ヒトモノクロナル抗ss/dsDNA抗体O-81が特異的に交叉結合する蛋白として小胞体ストレス応答蛋白Herpを同定した。SLE患者血清中の抗Herp抗体はdsDNAに結合し、抗dsDNA抗体はHerpに結合した。Herpは活動期SLE患者末梢血単核球(PBMC)において強く発現しており、また、患者末梢血中の抗dsDNA抗体産生クローンを抗原刺激できた。加えてHerp免疫 BALB/c マウスでは抗dsDNA抗体が産生され、腎糸球体にIgGが沈着した。dsDNAと分子相同性を持つエピトープがHerp上には存在すると想定されたので、これを探索し同定した。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。

次に、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。

さらに、抗DNA抗体の組織障害機序として、抗DNA抗体が直接的に末梢血単核球(PBMC)に取り込まれてSLEでの免疫異常を生じる事を示した。取り込まれた抗体は細胞内ライゾソームに移動し、樹状細胞ではその形態学的変化、表面CD83、CD1a、HLA-DRの発現誘導、IL12の産生を生じた。また、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。つまり、抗DNA抗体の細胞内への取り込みにより免疫担当細胞の活性化が生じる事を示した。

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。産生された抗dsDNA抗体は免疫複合体を形成するのみならず、免疫担当細胞に取り込まれて直接的にそれらを活性化させて組織障害に関与する、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、D

NA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」を明らかにすることはSLEの病因を解明する上で極めて重要である。我々はこれまでヒトモノクロナル抗ss/dsDNA抗体O-81が小胞体ストレス応答性蛋白Herpに結合する事、Herp免疫BALB/cマウスでは抗dsDNA抗体が産生され、腎糸球体にIgGが沈着する事を報告しており、Herpを一つの候補と考えている。

また、抗dsDNA抗体は組織障害機序を明らかにすることはSLEの病態を理解する上で必須である。抗dsDNA抗体は免疫複合体を形成し各臓器(腎糸球体など)に沈着してⅢ型アレルギー機序による組織障害を生じたり、細胞表面の自己抗原と反応してⅡ型アレルギー機序による細胞障害を生じたりする。この他にも抗dsDNA抗体は直接的に生細胞内に取り込まれることが報告されている。しかし、これによる細胞障害やSLE特異的な免疫異常との関連は明らかにされていない。

本研究の最終目的はSLEの病因・病態の解明であるが、本研究期間内はHerpが生体内で抗原認識されて抗dsDNA抗体の産生を誘導する機序と抗dsDNA抗体の細胞内への取り込みによる組織障害への関与を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

(1) SLE患者血清よりプロテインA/Gカラムを用いてIgGを精製した。このIgGよりdsDNAセファロースカラムを用いて抗dsDNA抗体を精製した。また、同様にリコンビナントHerp蛋白固相化カラムを用いて抗Herp抗体を精製した。Herp蛋白あるいはS1ヌクレアーゼ処理牛胸腺dsDNAを抗原とし、上記精製抗DNA抗体および抗Herp抗体の結合性を競合阻害ELISA法で検証した。

(2) 活動期SLE患者、非活動期SLE患者、および健常人の末梢血単核球(PBMC)におけるHerpの発現様式を、我々が樹立したマウスモノクロナル抗Herp抗体を用いた間接免疫蛍光染色法にて検討した。SLE症例における活動性はSLEDAIにて評価した。

(3) 活動期SLE患者、非活動期SLE患者、および健常人のPBMCにHerp蛋白を添加して6日間培養し、抗DNA抗体産生細胞が出現あるいは増加するかどうかdsDNAを抗原としたELISPOT法で検討した。

(4) 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.,

Δ2 1-258 a.a., Δ3 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。

(5) 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IgGの結合性についてELISA法で検討した。

(6) SLE患者由来IgGより抗dsDNA抗体を精製する際、dsDNAセファロースに結合しないIgGも回収した(SLE患者由来DNA非結合性IgG)。上記(4)(5)でO-81抗体およびSLE患者由来IgGに結合し、正常人IgMおよび正常人IgG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IgG抗dsDNA抗体およびSLE患者由来DNA非結合性IgGの結合性をELISA法で検討した。

(7) 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ELISA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ssDNAおよびdsDNAで濃度依存的に阻害できるか検討した。また、抗原をssDNAあるいはdsDNA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についても検討した。

(8) 細胞内蛋白であるHerp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Herpの局在を検討した。Hela細胞にタブ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Herp抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

(9) EBウイルス形質転換B細胞株あるいは活動期SLE患者PBMCをQdot655標識モノクロナル抗Herp抗体およびマウスIgGモノクロナル抗BZLF1抗体-FITC標識抗マウスIgG抗体で共染色した。

(10) EBウイルス形質転換B細胞株の膜分画を精製しBALB/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HerpあるいはdsDNAに対する結合性をELISA法で検討した。また、腎組織を凍結切片とし、IgGの糸球体への沈着の有無を検討するためFITC標識抗マウスIgG抗体で染色した。

(11) FITC標識した精製抗dsDNA抗体(10 µg/ml)をPBMC(1x10⁶/ml)に加え、0、3、6、12、24時間培養した。PBMCを10 mMクエン酸バッファー(pH3)にて処理し、Phycoerythrin(PE)標識抗CD3抗体で染色を行いFACS caliberにて解析した。

(12) 磁気ビーズ標識抗CD14抗体(MACS)を用いて分離した単球をGM-CSFおよびIL4存在下に10日間培養し、単球由来樹状細胞(MDDC)とした。MDDC 1x10⁵/mlにLPS(1µg/ml)あるいは抗dsDNA抗体(1µg/ml)を加えて6日間培養し、FACS caliberにて細胞表面抗原の変化を検出した。加えて、培養上清中のIL10、IL12を測定した。また、MDDCを抗dsDNA抗体(1µg/ml)存在下に培養した後、2400Rad照射し、同種あるいは自己Tリンパ球との混合培養を行い、³H-thymidine添加によりT細胞活性を評価した。

(13) 本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に基づき実施し、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。

C. 研究結果

(1) SLE患者より精製したIgG抗DNA抗体の一部はHerp蛋白に結合し、その結合はHerp蛋白およびdsDNAで競合阻害された。また、IgG抗Herp抗体はdsDNAに結合し、その結合はHerpおよびdsDNAによって競合阻害された。

(2) モノクロナル抗Herp抗体による間接免疫蛍光染色において、活動期SLE患者PBMCではHerp

蛋白の発現が強く見られるものを多く認めた。非活動期SLE患者や健常人のPBMCではHerp蛋白の発現は弱いかほとんど見られなかった。また、タブンゲイン処理にて小胞体ストレスを加えると、Herp健常人PBMCでもHerp蛋白が発現するが72時間後には発現は低下した。しかし、Herp蛋白を強く発現した活動期SLE患者PBMCでは、無処理で72時間培養してもHerp蛋白を強く発現している細胞を多く認めた。

(3) 活動期SLE患者PBMCにHerp蛋白を加えて抗原刺激したところ、抗dsDNA抗体を産生するB細胞クローンの出現あるいはクローン数の増加が認められた。dsDNAや鶏卵リゾチームの添加ではこのような変化は認められなかった。また、血清抗DNA抗体が陰性化している非活動期SLE患者のPBMCや健常人のPBMCではHerpを添加しても抗dsDNA抗体産生クローンは検出されなかった。

(4) O-81抗体はsHerpに良く結合し、 Δ 2や Δ 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、Herp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IgM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。

(5) (4)と同様に、SLE患者由来IgG結合/正常人IgG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。

(6) 上記(4)(5)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。IgG抗dsDNA抗体はO-81エピトープペプチドに結合したが、SLE患者由来DNA非結合性IgGは結合しなかった。

(7) O-81抗体のO-81エピトープペプチドへの結合をssDNAおよびdsDNAは濃度依存的に阻害した。また、抗原をssDNAあるいはdsDNA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。

(8) 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プレブが抗Herp抗体で染色された。

(9) EBウイルス形質転換B細胞株や活動期SLE患者PBMCの中に、抗Herp抗体および抗BZLF1抗体で共染色される細胞が認められた。

(10) EBウイルス形質転換B細胞株の膜分画を免疫したBALB/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Herpに結合した。また、8匹の免疫マウスの中で抗dsDNA活性を示すものが2匹認められた。無処理マウスでは抗dsDNA活性は認められなかった。また、抗dsDNA活性を示した2匹のマウスの腎糸球体にはIgGの沈着が認められた。

(11) 活動期SLE血清由来IgGのうち、90%のサンプルがPBMC内へ取り込まれた。一方、正常人由来IgGは全てが陰性で、非活動期SLE由来IgGは10%のみがPBMC内へ取り込まれた。IgGが取り込まれたPBMCより細胞質蛋白を抽出し、ウェスタンブロットにてIgGの存在を証明できた。また、細胞内に取り込まれたIgGは抗DNA活性を示した。IgGが取り込まれた細胞はCD45RA+CD8+細胞、B細胞、CD14陽性細胞、CD56陽性細胞であった。CD14陽性の単球や樹状細胞では正常人由来IgGの取り込みをも認めたが、その量は少なかった。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抗体の細胞内への取り込みにはFcレセプター以外の機序で、DNAも関与する事を認めた。

(12) 活動期SLE血清由来IgGの細胞内への取り込みは培養30分後で認められ、ピークは6時間後であった。6時間以降では細胞内IgGは減少し24時間後にはほぼ消失した。取り込まれたIgGは培養6時間後には細胞質内に顆粒状に分布しており、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、核内への移行は認められなかった。

(13) MDCCに各IgGを加えて培養し、そ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MDCCに形態的な変化を生じな

かったが、抗dsDNA抗体を取り込んだMDCCは互いに凝集し突起が太く長く伸びた。そのようなMDCCではCD83、CD1a、HLA-DRの発現増強を認めた。また、抗dsDNA抗体を取り込んだMDCCのみでIL-12産生が増加した。抗dsDNA抗体を取り込んだMDCCと同種あるいは自己Tリンパ球との反応を見ると、96時間後に同種および自己Tリンパ球の反応が増強する事を認めた。

D. 考察

これまで抗DNA抗体に交叉結合する分子はいくつか報告されているが、人工的なペプチドであったり、抗原性が不明であったりし、また、SLEの病因との関連を想定するのも困難であった。本研究ではHerp蛋白上の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が免疫原になる可能性が考えられた。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、上記の可能性を支持するものと考え

られた。

さらに、本研究では抗dsDNA抗体の組織障害の新たな機序として、抗dsDNA抗体が免疫担当細胞内に取り込まれる事によりそれらを活性化する可能性を示した。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IgG型抗dsDNA抗体が末梢循環血中の免疫系細胞に直接取り込まれる事を示した。抗DNA抗体が細胞内に取り込まれる機序にはDNAが関与し、Calreticulin、Ribosomal P、 α -actin、Myosin 1、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抗体が取り込まれるのは特定の免疫系細胞であった。CD8+CD45RA+T細胞に抗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。SLEは自己混合リンパ球反応の異常があり、これとの関連が注目される。また、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形態変化し、CD83、CD1a、HLA-DRの発現を増強する、つまり成熟化および活性化がおこる事を示した。更に、抗DNA抗体を取り込んで活性化したMDDCは、同種反応を増強するだけでなく自己のT細胞に対する反応をも誘導できる事を示した。細胞内に取り込まれた抗DNA抗体がどのような機序でMDDCでのIL12の産生や自己リンパ球混合反応の誘導などを惹起するかは不明であるが、細胞内に取り込まれた抗DNA抗体はライソゾームに分布することよりToll-like受容体9を介する可能性が考えられる。

これらの結果からSLEにおける抗DNA抗体の産生から組織障害までの機序として、「ウイルス感染、紫外線、薬物などが細胞に小胞体ストレスを負荷してHerp蛋白が産生され、それらの細胞がアポトーシスに陥ると細胞表面プレブ上に産生されたHerpが呈示される。Herp上のDNAと分子相同性を持つエピトープが認識されると抗DNA抗体が産生さ

れる。産生された抗DNA抗体はDNAと結合して免疫複合体を形成するのみならず、免疫担当細胞などに取り込まれて直接的にそれらを活性化する事により組織障害に関与する。これら一連の反応が一回ではなく繰り返されることにより次第にSLEとしての病態が確立されていく。」というモデルを想定している。抗DNA抗体はヘテロな集団であり、Herpに結合しない抗DNA抗体もあることより、Herp以外にもこのような役割をする分子があると推測され、今後それらの探索も含め上記モデルについて検証を進めていく予定である。

E. 結論

HerpがSLE患者の抗dsDNA抗体産生クローンを抗原刺激できる事、SLE患者血清中の抗dsDNA抗体はHerp蛋白上のDNAと分子相同性を持つエピトープに結合する事、細胞ストレスによりアポトーシスを生じた細胞が産生したHerpを免疫系に呈示しうる事を示した。

また、抗DNA抗体が直接的に末梢血免疫系細胞に取り込まれてSLEでの免疫異常を生じる事を示した。取り込まれた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の発現増強、IL12産生、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。

さまざまな細胞ストレスが抗DNA抗体の産生の誘因となりSLEの病態を形成していく、という一連の過程を分子レベルで説明しうる初めてのモデルと考えられた。

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.
 - 6) Chen S, Ishii N, Ine S, Ikeda S, Fujimura T, Ndhlovu LC, Soroosh P, Tada K, Harigae H, Kameoka J, Kasai N, Sasaki T, Sugamura K. Regulatory T cell-like activity of Foxp3+ adult T cell leukemia cells. *International Immunology*. 18: 269-277, 2006.
 - 7) Fujiwara T, Harigae H, Takahashi S, Furuyama K, Nakajima O, Sun J, Igarashi K, Yamamoto M, Sassa S, Kaku M, Sasaki T. 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.
 - 8) Ohguchi H, Hirabayashi Y, Kodera T, Ishii T, Munakata Y, Sasaki T. Q fever with clinical features resembling systemic lupus erythematosus. *Internal Medicine*. 45: 3232-3236, 2006.
 - 9) Munakata Y, Kato I, Saito T, Kodera T, Ishii KK, Sasaki T. Human parvovirus B19 infection of monocytic cell line U937 and antibody-dependent enhancement. *Virology*. 345: 251-257, 2006.
 - 10) 平林泰彦. 自己抗体と細胞ストレス: 抗DNA抗体産生における小胞体ストレス応答性蛋白の役割. *日本臨床免疫学会会誌*. 29: 65-72, 2006.
 - 11) 平林泰彦. 抗DNA抗体産生における小胞体蛋白の意義. *臨床免疫*. 45: 650-655, 2006.
 - 12) Fujiwara T, Ichinohasama R, Miura I, T.Sugawara, Harigae H, Yokoyama H, Takahashi S, Tohmiya Y, Yamada M, Ishizawa K, Kameoka J, Sasaki T. 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.
 - 13) Takahashi S, Harigae H, Ishii KK, Inomata M, Fujiwara T, Yokoyama H, Ishizawa K, Kameoka J, Licht JD, Sasaki T, Kaku M. Over-expression of Flt3 induces NF- κ B pathway and increases the expression of IL-6. *Leukemia Research*. 29: 893-899, 2005.
 - 14) Takahashi S, Harigae H, Kameoka J, Sasaki T, Kaku M. AML1B transcriptional repressor function is impaired by the Flt3-internal tandem duplication. *British J Hematology*. 130: 428-436, 2005.
 - 15) Ohguchi H, Kameoka J, Harigae H, Yamada

- M, Tomiya Y, Takahashi S, Ishizawa K, Sano N, Sekine H, Sasaki T. Can the Helicobacter pylori Eradication Regimen Induce Platelet Recovery in H.pylori-Negative Patients With Idiopathic Thrombocytopenic Purpura? American J Hematology. 78: 164-165, 2005.
- 16) Munakata Y, Ito TS, Ishii KK, Jie H, Kodera T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. Blood 106: 3449-3456, 2005.
- 17) Tazawa R, Hamano E, Arai T, Ohta H, Ishimoto O, Uchida K, Watanabe M, Saito J, Takeshita M, Hirabayashi Y, Ishige I, Eishi Y, Hagiwara K, Ebina M, Inoue Y, Nakata K, Nukiwa T. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. American J Respiratory and Critical Care Medicine. 171: 1142-1149, 2005.
- 18) 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.
- 19) Munakata Y, Kodera T, Saito T, Sasaki T. Rheumatoid arthritis, type 2 diabetes, and Graves' disease after acute parvovirus B19 infection. Lancet 366: 780, 2005.
- 20) Kadowaki I, Ichinohasama R, Harigae H, Ishizawa K, Okitsu Y, Kameoka J, Sasaki T. Accelerated lymphangiogenesis in malignant lymphoma: possible role of VEGF-A and VEGF-C. British J Haematology. 130: 869-877, 2005.
- ## 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, 2007.
- 2) 平林泰彦、岡友美子、高橋令子、高澤徳彦、石井智徳、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. 2007.
- 3) 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. 2007.
- 4) Oka Y, Hirabayashi Y, Takasawa N, Takahashi R, Ishii T, Sasaki T. Can viral infection be a trigger of anti-DNA antibody production through endoplasmic reticulum stress? 70th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Washington DC, USA. 2006.
- 5) Hirabayashi Y, Oka Y, Takahashi R, Ishii T, Sasaki T. A potential trigger of nephritogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis. 5th International Congress on Autoimmunity, Sorrento, Italy. 2006.
- 6) 平林泰彦、岡友美子、高橋令子、石井智徳、佐々木毅. ウイルス感染による小胞体ストレスと抗DNA抗体産生との関連について. 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2006.
- 7) 岡友美子、石井恵子、高橋令子、石井智徳、平林泰彦、佐々木毅. 関節リウマチ発症時におけるヒトパルボ B19 感染の有無による臨床病

態への影響. 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2006.

- 8) 岡友美子、平林泰彦、高橋令子、石井智徳、佐々木毅. 腎障害性抗DNA抗体に結合する小胞体ストレス蛋白 Herp はヒト抗DNA抗体産生の trigger となりうるか? 第36回日本免疫学会総会・学術集会. 2006.
- 9) 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. 2007.
- 10) 宗像靖彦、石井智徳、平林泰彦、山下雅大、佐々木毅. 歯周炎関連と推定された反応性関節炎. 第 102 回日本内科学会総会. 2005.
- 11) 岡友美子、石井智徳、亀岡淳一、山下雅大、宗像靖彦、平林泰彦、佐々木毅. Bone marrow dysplasia in systemic Lupus Erythematosus. 第 102 回日本内科学会総会. 2005.
- 12) 岡友美子、平林泰彦、石井智徳、佐々木毅. 抗DNA抗体産生における小胞体ストレス蛋白 Herp の役割 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会. 2005.
- 13) 平林泰彦. 抗DNA抗体の産生機序. 第 33 回日本臨床免疫学会. 2005.
- 14) 周穎哲、石井智徳、平林泰彦、佐々木毅. 抗DNA抗体の細胞侵入とSLE病態への関与. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会. 2005.
- 15) 岡友美子、石井智徳、亀岡淳一、山下雅大、宗像靖彦、平林泰彦、佐々木毅. SLEにおける骨髓細胞の異型性 第 49 回日本リウマチ学会総会学術集会 第 14 回リウマチシンポジウム. 2005.
- 16) 周穎哲、石井智徳、平林泰彦、宗像靖彦、山下雅大、岡友美子、佐々木毅. 抗DNA抗体のT細胞への取り組み SLEの未知の病態, 第 49 回日本リウマチ学会総会学術集会 第 14 回リウマチシンポジウム. 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
モノクローナ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

脂質関連物質の免疫抑制作用と 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 ①FTY720 (Sphingosine 1-phosphate receptor modulators) は培養関節リウマチ由来滑膜細胞に対してアポトーシスを誘導した。FTY720 にみられる抗リウマチ作用機序の1つとして、増殖滑膜細胞への直接作用の存在が示唆された。②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

我々はスタチン類の免疫抑制作用の機序をアポトーシス誘導作用の観点から研究を進め、脂溶性スタチンのフルバスタチンは活性化 T 細胞に対して *in vitro* だけでなく *in vivo* でもアポトーシス誘導能を有し、その機序として protein farnesylation 阻害に基づくことを見出した。またスタチン類 (Arthritis Rheum 2006; 54:579-86) や骨粗鬆症治療薬である bisphosphonates にも *in vitro* で培養 RA 由来滑膜細胞に対してアポトーシス誘導作用を有することを明らかにした。

平成 17-18 年度は新しい免疫修飾薬 FTY720 (Sphingosine 1-phosphate receptor modulators) の培養 RA 由来滑膜細胞に対するアポトーシス誘導能の有無を細胞内シグナル伝達系を含めて検討することを目的とした。

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。

平成 19 年度は膠原病における 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

得るか否かを探索した。

B. 研究方法

平成 17-18 年度：アポトーシスは Annexin V を用いた染色法と propidium iodode を用いた DNA loss の定量をフローサイトメーターにて解析した。ルミノメータで各 caspase の酵素活性を、ウエスタンブロットで MAPK に属する蛋白のリン酸化量を測定した。

平成 19 年度：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

平成 17-18 年度：FTY720 は濃度、時間依存性に培養 RA 由来滑膜細胞に対してアポトーシスを誘導した。一方、培養 OA 由来滑膜細胞に対しては明らかでなかった。そのアポトーシスはミトコンドリア経路を介し、caspase 依存性であった。FTY720 は、MAPK ファミリーの中で JNK 経路と p38 経路中の蛋白リン酸化を促進した。さらに JNK 抑制薬や p38 抑制薬は FTY720 誘導性アポトーシスを抑制した。

平成 19 年度：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

平成 17～18 年度：FTY720 は RA 由来滑膜細胞に対してアポトーシスを誘導し、JNK や p38 経路の活性化に基づくことが推定された。FTY720 現在、臓器移植領域で臨床治験が行われており、動物実験ではアジュバント関節炎やループモデルマウス (J Rheumatol 2002; 29:707-16) に対して治療効果を示すことが報告されている。FTY720 の RA 由来滑膜細胞に対するアポトーシスを誘導作用の解析により、FTY720 を関節リウマチなどの自己免疫疾患に対する補助的な治療薬として使用を試みる根拠となりうる。

平成 19 年度：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

平成 17～18 年度：FTY720 (Sphingosine 1-phosphate receptor modulators) は培養 RA 由来滑膜細胞に対してアポトーシスを誘導した。FTY720 にみられる抗リウマチ作用機序の 1 つとして、増殖滑膜細胞への直接作用の存在が示唆された。

平成 19 年度：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

1. 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.
2. Nagashima T, Okazaki H, et al. Apoptosis of rheumatoid synovial cells by statins through the blocking of protein geranylgeranylation. A potential therapeutic approach to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 54:579-586, 2006.
3. Kamata Y, Iwamoto M, Nara H, Kamimura T, Takayashiki N, Yamamoto H, Sugano K, Yoshio T, Okazaki H and Minota S. A case of rheumatoid arthritis with protein losing enteropathy induced by multiple diaphragmatic strictures of the small intestine: successful treatment by bougieing under double-balloon enteroscopy. *GUT* 55:1372, 2006.
4. Kamata Y, Kamimura T, Haneda K, Masuyama J, Okazaki H and Minota S. Striking fall of the arterial oxygen pressure induced by positional change in a case of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 14:641-642, 2005.
5. Kamimura T, Hatakeyama M, Tirigoe K, Nara H, Kaneko N, Satou H, Yoshio T, Okazaki H and Minota S. Muscular polyarteritis nodosa as a cause of fever of undetermined origin: a case report and review of the literature. *Rheumatol Int.* 25:394-397, 2005.

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、横浜、平成 19 年 4 月 28 日

・木村洋貴、岡崎仁昭、長嶋孝夫、箕田清次。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、横浜、平成 19 年 11 月 3 日

・釜田康行、岩本雅弘、吉尾卓、岡崎仁昭、箕田清次。膠原病に伴う重症レイノー現象に対する PDE-5 阻害薬の有効性の検討：Sildenafil vs Valdenafil。第 35 回日本臨床免疫学会総会、東京、平成 19 年 10 月 2 日

・青木葉子、岩本雅弘、釜田康行、長嶋孝夫、奈良浩之、上村健、吉尾卓、岡崎仁昭、箕田清次。膠原病治療中の Pneumocystis 肺炎の生命予後因子の検討。第 34 回日本臨床免疫学会総会、東京、平成 18 年 10 月 2 日

・釜田康行、岩本雅弘、吉尾卓、岡崎仁昭、箕田清次。膠原病に伴うレイノー現象に対するシルデナフィルの有効性の検討。第 34 回日本臨床免疫学会総会、東京、平成 18 年 10 月 2 日

大西佐和子、長嶋孝夫、奈良浩之、上村健、釜田康行、岩本雅弘、吉尾卓、岡崎仁昭、箕田清次。高度の好酸球性脂肪織炎を伴い、Wells 症候群と好酸球性血管浮腫の鑑別が困難であった高齢男性例。第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、平成 18 年 11 月 4 日

・長嶋孝夫、上村健、奈良浩之、岩本雅弘、岡崎仁昭、箕田清次。手指壊疽を来した木村病の 1 例。第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、平成 17 年 6 月 3 日

・釜田康行、上村健、金敷絵里子、中村謙一、岩本雅弘、吉尾卓、岡崎仁昭、森田辰男、箕田清次。リン酸エストラムチンナトリウムと ACE 阻害薬の併用により舌腫脹を繰り返した 1 例。第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、平成 17 年 10 月 25 日

・Okazaki H, Nagashima T, Minota S. Pleiotropic effects of cholesterol synthesis inhibitors,

statins: a potential therapeutic approach to rheumatoid arthritis. The 14th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2005, Saitama, Japan, June 4, 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。

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。

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。

2) 免疫組織染色

マウスでは、Thy1、B220、Mac-1、CD4、CD8 について、免疫組織染色で局在を確認した。

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。

C. 研究結果

1) マウス:

a) 免疫組織染色では、Thy1、B220、Mac-1 は糸球体、糸球体周囲、血管周囲すべてに存在していたが、Thy1 陽性細胞、Mac-1 陽性細胞は主に糸球体周囲に存在し、B220 陽性細胞は主に糸球体内に存在していた。CD4、CD8 陽性細胞は糸球体、糸球体周囲、血管周囲すべてに認めたが、特に糸球体周囲に多かった。

b) RT-PCR で、 β -actin は単細胞レベルで確認できたが、それ以上の解析は不可能であり、以後は糸球体 5 ケから 10 ケ、その周囲の浸潤細胞、あるいはそれに相当する範囲の血管周囲浸潤細胞のプールを使用した。糸球体では、Thy1+細胞: 100%、B220+細胞: 92.5%、CD4+細胞: 22.5%、CD8+細胞: 35%であり、糸球体周囲では、Thy1+細胞: 91.7%、B220+細胞: 41.7%、CD4+細胞: 12.5%、CD8+細胞: 25%であった。血管周

囲では、Thy1+細胞：100%、B220+細胞：100%、CD4+細胞：65%、CD8+細胞：42.5%であった（図4）。

c) 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5）。

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6、図7）。

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6、図7）。

c) 免疫組織染色で、細胞内の TCR- β 、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17 産生が確認された（図8、図9）。

D. 考察

マウス：RT-PCRの結果からは、MRL/lpr マウスの糸球体内浸潤 T 細胞、糸球体周囲の浸潤細胞は、double negative (CD4 陰性 CD8 陰性) T 細胞が多く、一方、血管周囲では CD4 陽性あるいは CD8 陽性 T 細胞が多かった。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：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

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, et al. 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, et al. Interleukin 17 gene expression in patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol (in press)
3. Ishii W, Ito S, et al. 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, et al. 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, et al. 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, et al. 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.

8. Ito S, et al. Rheumatology in Japan, Germany, and Egypt: Comparison of Medical Practices. *Acta Med Biol* 54:51-58, 2006.

9. Tsutsumi A, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Ito S, et al. Significance of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: clinical evaluation of the antiprothrombin assay and the antiphosphatidylserine/prothrombin assay, and comparison with other phospholipids antibody assays. *Mod. Rheumatol* 16:158-164, 2006.

10. Miyahara S, Ito S, et al. Two cases of systemic lupus erythematosus complicated with colonic ulcers. *Intern Med* 44: 1298-1306, 2005.

11. Suzuki E, Hayashi T, Ito S, et al. A Case of Pulmonary Hypertension Associated with Systemic Lupus Erythematosus without Anti-ribonucleoprotein Antibodies. *Acta Med Biol* 53: 87-93, 2005.

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

3. 千野裕介、伊藤 聡、他 Laser-microdissection(LMD)法を用いた MRL/lpr マウスの腎浸潤T細胞の解析 第50回日本リウマチ学会、2006年

4. 王 英歌、伊藤 聡、他 Analysis of T Cells Infiltrated in Kidneys of MRL/lpr Mouse by Laser-Microdissection (LMD) Method 第36回日本免疫学会、2006年

5. 千野裕介、伊藤 聡、他 Laser-microdissection(LMD)法によるループス腎炎モデルマウス (MRL-lpr マウス) の腎浸潤 T細胞の解析 第49回日本リウマチ学会、2005年

6. Chino Y, Ito S, et al. Analysis of T cells infiltrating in the kidney of MRL-lpr mouse by Lasermicro dissection. The First East Asian Group of Rheumatology (EAGOR) meeting, 2005

7. 千野裕介、伊藤 聡、他 Laser-microdissection(LMD)法による MRL/lpr マウスの腎浸潤 T細胞の解析 第35回日本免疫学会、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。