

図1 実験方法 (マウス)

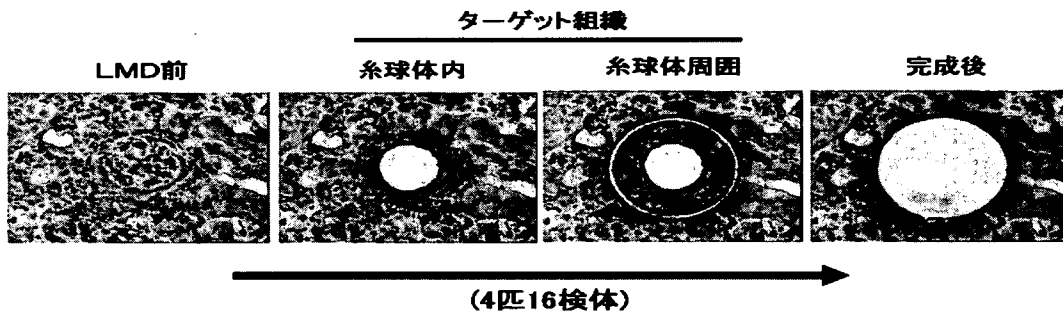


図2 系球体周囲浸潤細胞のLMDによる採取 (マウス)

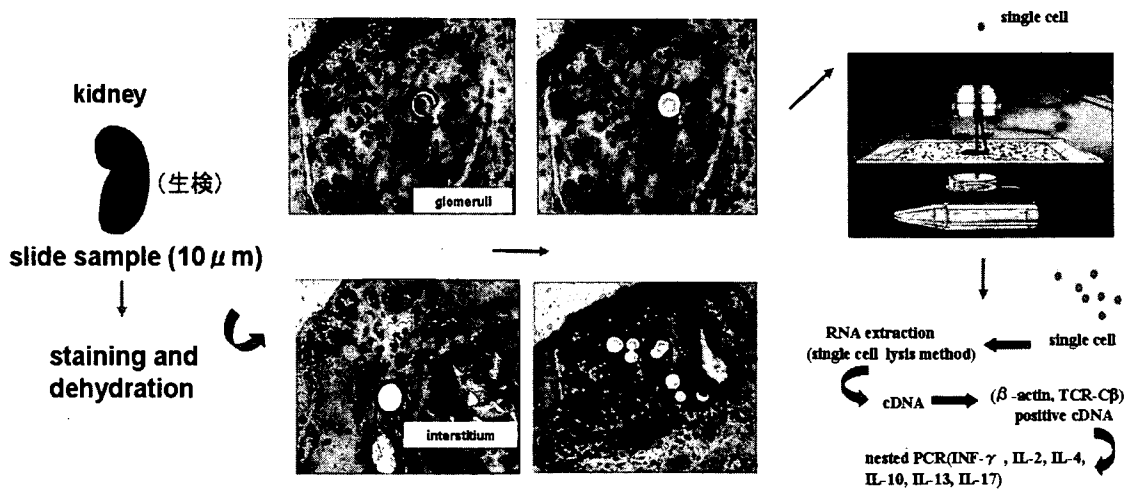


図3 実験方法 (ヒト)

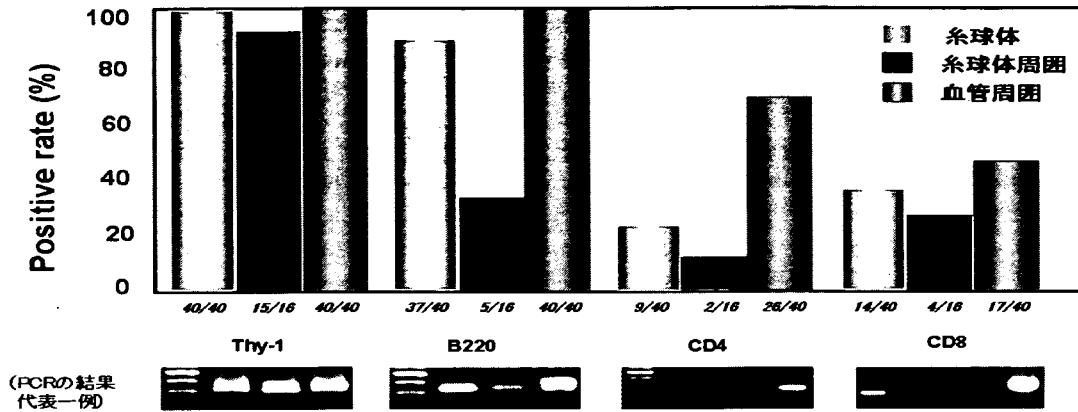


図4 T細胞 phenotype (マウス)

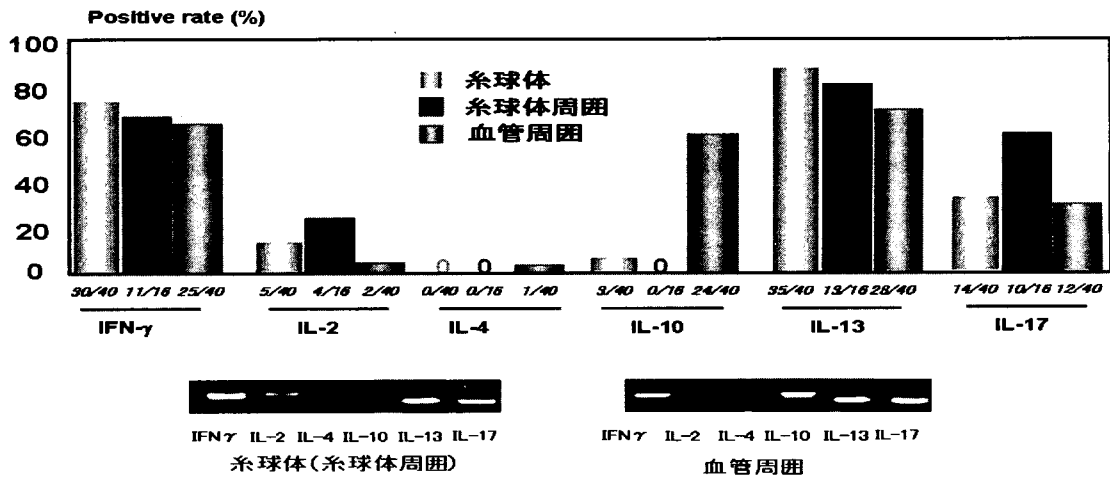


図5 サイトカイン mRNA expression (マウス)

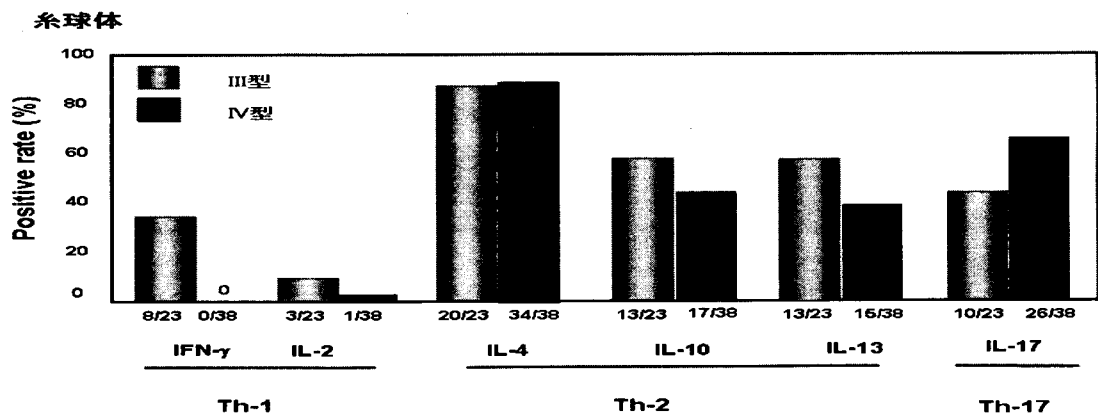


図6 サイトカイン mRNA expression (ヒト、系球体)

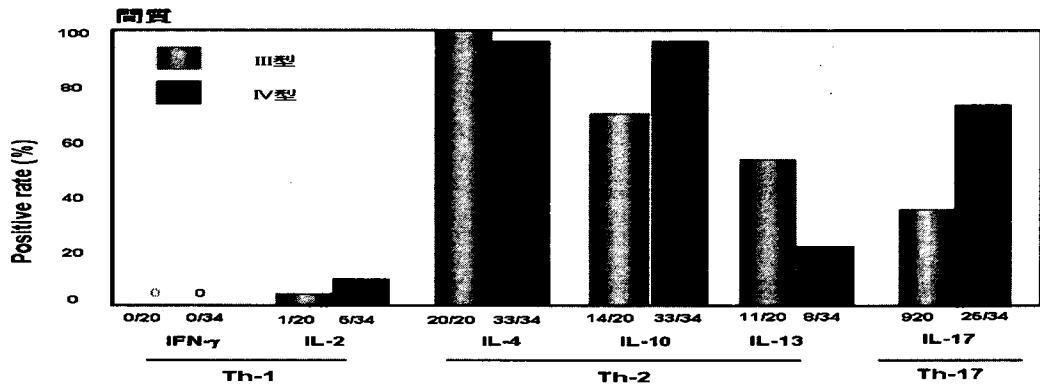


図7 サイトカイン mRNA expression (ヒト、間質)

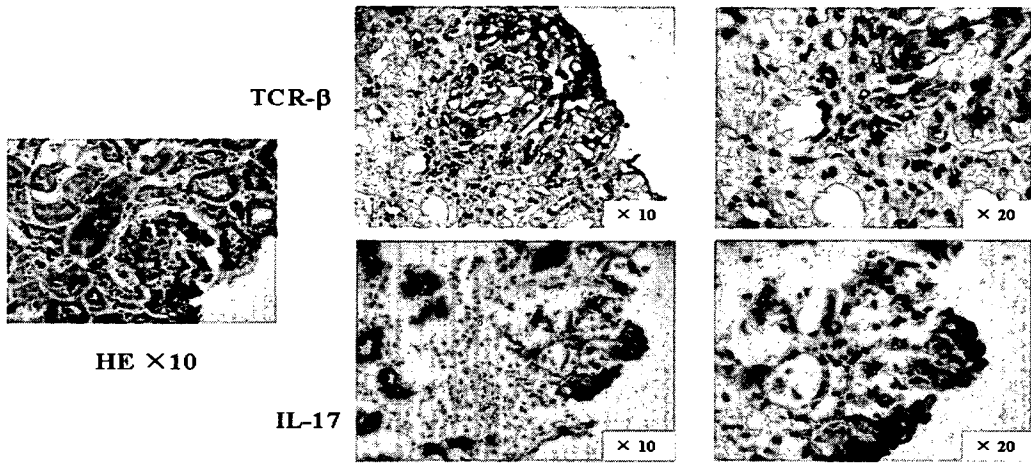


図8 免疫組織染色 TCR- β IL-17 (ヒト)

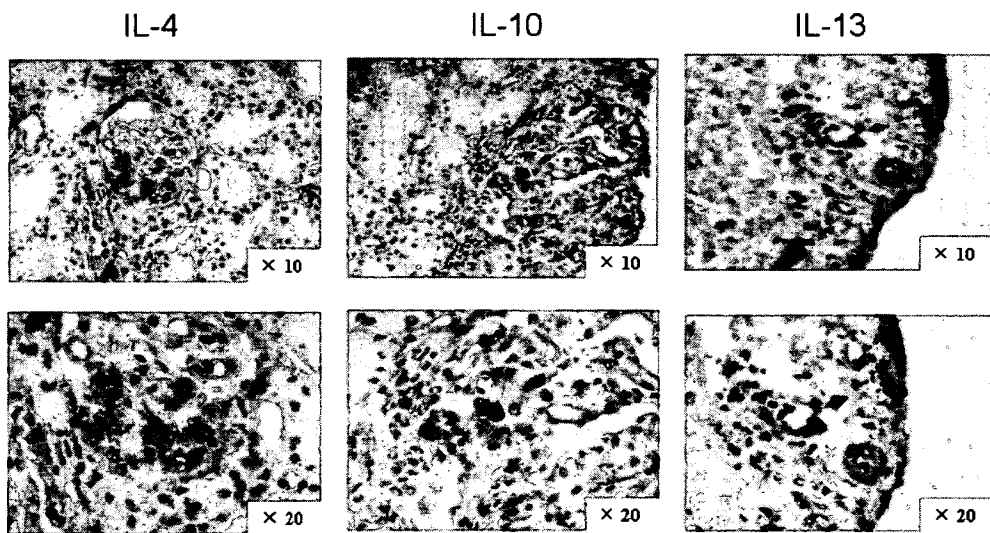


図9 免疫組織染色 IL-4, IL-10, IL-13 (ヒト)

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

研究協力書 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 新規ヘルパーT細胞 Th17 の存在が最近報告される様になり世界的に注目を集めている。本研究においては、Th17 を含めた3つの Th サブセットの比率を末梢血において解析することを目的とし、その結果この解析が可能になった。そこで、全身性エリテマトーデス（SLE）その他膠原病における 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。Th17 は、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

新規ヘルパーT細胞サブセットとして、Th17 が報告されるようになり、免疫学的疾患分類は、以前の Th1 と Th2 のバイアスによる2元的背反論の考え方から脱却し、Th1、Th2 および Th17 のバランス破綻による偏位という新たな局面を迎えると予想される。そこで、末梢血単核細胞における Th1/Th2/Th17 各サブセットの相対的測定法を樹立することを目的とした。そして、その方法を用いて、全身性エリテマトーデス（SLE）その他膠原病における 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相対的比率の測定を行う。また未だ不明な部分の多い Th17 分化に関与する機構の解明を行うことも本研究の目的とした。

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細胞を T 細胞刺激条件下で培養し、

IL-17、IFN-g、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ー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細胞を PMA + ionomycin にて刺激したところ、IFN-g、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、Th1 < Th17

および 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の網羅的解析によって、既知である ROR γ が認められた。さらに、ROR γ 以外に今まで報告されていない新たなものとして Th2 分化に関わるとされている c-Maf の高発現を確認した。

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。末梢血単核細胞における Th17 の比率は再現性よく、mRNA 発現量とともに蛋白量としても測定する事が可能になった。このシステムを用いて、膠原病患者由来末梢血単核細胞における、Th1/Th2/Th17 の比率を求めた。興味深い事に今までは Th2 型疾患と考えられていた SLE 患者末梢血においては、Th2 に比べて Th17 の比率が高いことが明らかになった。このことは、局所での炎症以外にも構成的症状などの全身的な病態形成に Th17 が関与する可能性を示唆するものと考えられた。また、Th2 分化において需要である c-Maf が Th17 分化に関わる可能性があることが明らかになったが、このような報告は世界的に見ても新規なもので、Th17 分化および増殖の研究において、本研究が貢献出来たものと考ええる。また、このことは、Th17 の分化・増殖における複雑な機序が存在することを示唆しており、今後さらに発展する研究であるものと確信する。

E. 結論

ヘルパーT細胞における Th17 を含む新たなサブセット分類の概念から、膠原病の分類を試みた。その結果、SLE は Th2 では無く Th17 優位の疾患であり、Th17 の病態への関与の可能性が示唆された。また、Th17 分化・増殖に関与する転写因子として、未だ報告の無い c-Maf の関与を示す事が出来たとともに、その機序の複雑さの一端を示した。

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.
- 3) Yokota, K., Miyazaki, T., Hirano, M., Akiyama, Y., Mimura, T. Simvastatin Inhibits Production of IL-6 and IL-8 and Cell Proliferation Induced by TNF- α in the Fibroblast-Like Synoviocytes from Rheumatoid Arthritis Patients. *J. Rheumatol.* 33:463-71, 2006.
- 4) Keisuke Ishizawa, Daisuke Adachi, Kouetue Kuboi, Takashi Yamaguchi, Tomoko Mitsuhashi, Yoshihiko Shimizu, Toshihide Mimura, Shigeyuki Nishimura, Michio Shimizu, Takanori Hirose: Multiple organ Involvement In eosinophilic polymyositis: an autopsy report. *Human Pathology*, 37:231-235, 2006.
- 5) Takeishi, M., Akiyama, Y., Akiba, H., Adachi, D., Hirano, M. and Mimura, T. Leflunomide-induced acute interstitial pneumonia. *J. Rheumatol.* 32; 1160-1165, 2005.

- 6) Sato K, Tateishi S, Kubo K, Mimura T, Yamamoto K, Kanda H. Downregulation of IL-12 and a Novel Negative Feedback System Mediated by CD25⁺CD4⁺ T cells Biochem Biophys Res Commun. 330; 226-232, 2005.
- 7) Kanda, H., Kubo, K., Tateishi, S., Sato, K., Yonezumi, A., Yamamoto, K., and Mimura, T. Antiproteinuric effect of ARB in lupus nephritis patients with persistent proteinuria despite immunosuppressive therapy. Lupus14; 288-292, 2005.

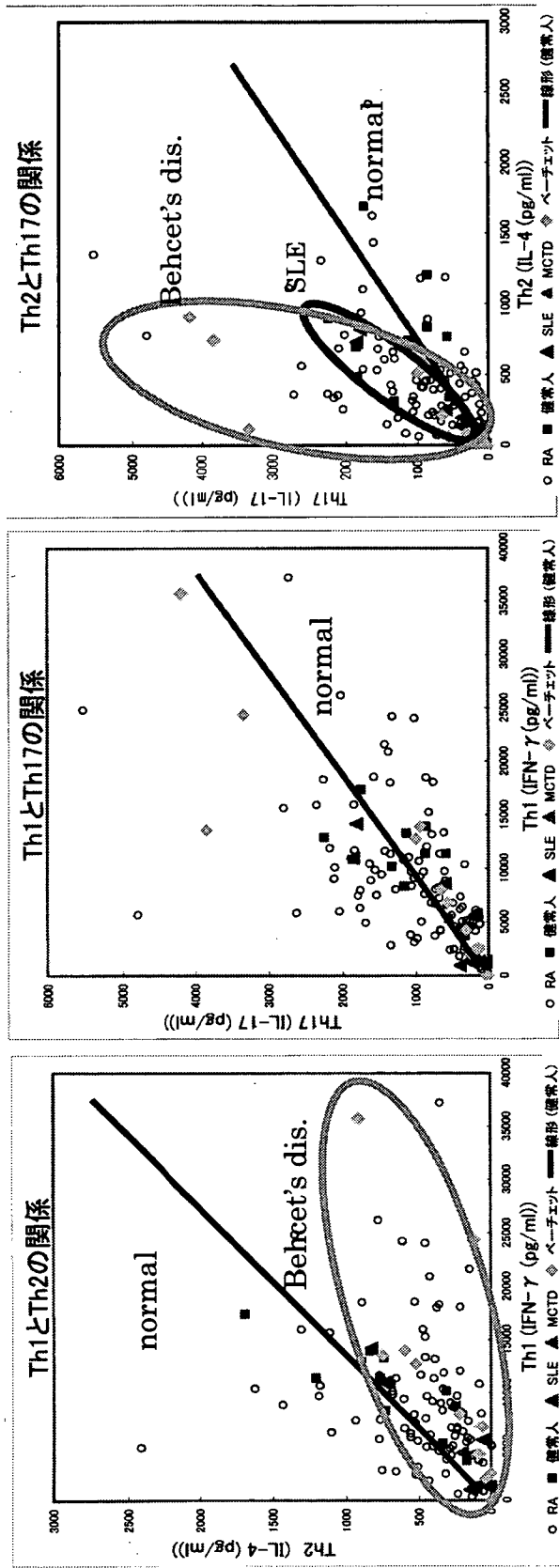
2. 学会発表

- 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
- 8) Kazuhiro Yokota, et al. : Simvastatin Inhibits Production of Interleukin-6 and Interleukin-8 and Cell Proliferation Promoted by Tumor Necrosis Factor-Alpha or Induces Apoptosis in Fibroblast-Like Synoviocytes From Patients with Rheumatoid Arthritis. American College of Rheumatology (Washington DC), 2006 11
- 9) SATO Kojiro, et al. : Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that is responsible for inflammatory bone destruction. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 2006 12
- 10) 横田和浩、他：シンバスタチンによる関節リウマチ滑膜繊維芽細胞の細胞増殖抑制、及びにアポトーシス誘導作用。第 50 回日本リウマチ学会総会、2006 4
- 11) 秋山雄次、他：関節リウマチ (RA) に対する Infliximab の臨床的検討 (第 I 報)。第 50 回日本リウマチ学会総会、2006 4
- 12) 横田和浩、他：Simvastatin Inhibits Production of IL-6 and IL-8 and Cell Proliferation Induced by TNF- α in the Fibroblast-like synoviocytes from RA Patient. 第 33 回日本臨床免疫学会総会、2005 10

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 T細胞に発現される病態関連分子の探索と新治療法の開発に関する研究

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 の難治性病態に対する新たな治療薬開発を見据えて、その病態と関連する分子を明らかにし、それを標的とした新治療法を確立するための基礎的、臨床的検討を行った。病態と関連する分子としてT細胞受容体近位部シグナル伝達分子であるTCR ζ 鎖、T細胞-上皮細胞接着に関与する $\alpha E\beta 7$ インテグリンに着目し、その制御法についてスプライス・バリエーション生成、ドメイン構造の変化に伴う機能変容について解析を加えた。また、新たな治療薬として期待されているT細胞細胞カルシニューリン阻害薬について臨床的有用性、新たな作用機序解明を目指した。アプローチについて報告する。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (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。そこで、より病態・病因に関連した分子を明らかにし、それを標的とした治療法の開発が望まれる。そこで、SLE T細胞における分子異常ならびに病態関連分子を探索し、それらの情報から既存薬剤の新たな作用機序の解析、新規薬剤開発に向けた検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法 C. 研究結果

SLE は自己免疫疾患のプロトタイプで、多彩な自己抗体産生と全身所蔵器の組織障害を特徴とする。組織障害には、B細胞の自己抗体産生とそれに引き続く免疫複合体形成やT細胞による標的細胞障害などが関与する。一方、これらのエフェクター活性をコントロールすべき制御性T細胞の機能不全は、病態の上流で重要な役割を演じている。このT細胞機能不全の本態の一つに、早期シグナル伝達分子の機能異常が想定されていた。我々は、TCRからのシグナル伝達で中心的役割を演じているTCR ζ 鎖の蛋白発現が低下し、そのmRNAに異常が存在する事を明らかにした。特に、SLE患者のみに認められるスプライス・バリエーションとして、エクソン7 (-) バリエーション、短3' -UTR バリエーションの2種類を報告した。これらスプライス・

バリエーションの生成機序を解明すると共に、どのような機構を介して病態形成に結びついているのかを明らかにする必要がある。一方、このような制御機能不全によって病態形成に直接関与するエフェクターT細胞が誘導され、サイトカインあるいは細胞表面上の機能分子を介して、組織障害を惹起する。そこで、これら病態形成分子の役割を解析し、新規薬剤開発への展開を計る必要がある。最後に、これら情報を踏まえて、臨床現場に導入された新たな治療薬剤の臨床的有効性や、その作用機序、個々の症例の治療反応性に関する検討を進める。この3つの過程を進める事によって、SLEの新たな治療法開発を目指した。

1) SLE T細胞機能不全に関連する分子解析：SLE患者T細胞の70%には、TCRからのシグナル伝達で中心的役割を演じているTCR ζ 鎖の蛋白発現低下が認められ、その原因としてmRNAの不安定性を惹起するスプライス・バリエーションが関与する。そこで患者T細胞に見られるスプライス・バリエーションの分子機序を解析した。

患者T細胞におけるTCR ζ 鎖スプライス・バリエーションの発現：3'非翻訳領域(UTR)を含むエクソン8が正常の910bpに比べ560bp短い、短3' -UTRバリエーションは、SLE患者7例で、short exon8バリエーションが野生型よりも優位に検出され、特に5例のSLE患者では、野生型が検出不能な程度まで発現低下していた。一方、36bpのエクソン7は、シグナル伝

達機能に必須の ITAM-3 の N 末端側チロシン残基を含む機能上重要な部位であるが、このエクソンを欠いたエクソン 7(-) ヴァリアントは、SLE 2 例に見いだされた (図 1)。

短 3' -UTR ヴァリアントにおける mRNA 不安定性を規定する部位の検索 : 短 3' -UTR ヴァリアントでは、その mRNA の安定性が低下することによって TCRz 鎖の蛋白発現低下を来す。この mRNA 不安定性を来す責任部位を明らかにするため、deletion mutant を作製し、蛋白発現レベルを比較した。その結果、 ζ mRNA 3' UTR 内の領域 736-816 が ζ 鎖発現を、領域 936-1001 が TCR/CD3 複合体発現を規定していると考えられた。とくに領域 936-1001 には種を超えてヌクレオチド配列が保存されている conservative region が存在し、SLE 患者 T 細胞における ζ 鎖発現低下機序を考える上で重要と思われた。

TCRz 鎖スプライス・ヴァリアント遺伝子導入 T 細胞株の樹立 : これら TCRz 鎖スプライス・ヴァリアントの蛋白発現低下および T 細胞機能に及ぼす影響を検討するため、レトロウイルスベクターに wild 型あるいはヴァリアント TCRz 鎖遺伝子を組み込み、TCRz 鎖欠損マウス T 細胞ハイブリドーマ MA5.8 にトランスフェクトして細胞株を樹立した。短 3' -UTR 株、エクソン 7(-) 株共に、wild TCRz 株に比し、TCRz の表面発現が低下し、同時に CD3e 鎖の発現も低下していた。免疫プロットによって蛋白合成を検討したところ、short 3' -UTR 株、エクソン 7(-) 株の CD3e 鎖は wild 株と同等であることが確認され、CD3e 鎖の表面発現低下は TCRz 鎖の産生低下による 2 次的現象と考えられた。アクチノマイシン処理によって TCRz 鎖 mRNA 安定性を検討したところ、short 3' -UTR 株、エクソン 7(-) 株では wild 株に比べ mRNA の消滅は明らかで、安定性が低下していることが明らかとなった。一方、CD3e 鎖の安定性はヴァリアント株でむしろ亢進し、この安定性低下は TCRz 鎖 mRNA に特異的なものであった。従って、2 種類の異なる TCRz 鎖ヴァリアントの蛋白発現低下は、類似した mRNA 不安定性に起因しているものと考えられた。

マイクロアレイを用いたヴァリアント TCRz 鎖導入 T 細胞株の網羅的遺伝子発現解析 : SLE の病態形成において鍵を握る分子を探索するため、スプライス・ヴァリアント TCRz 鎖を遺伝子導入し TCRz 鎖蛋白発現低下を来した 2 つのクローンを用いて、両者に共通する分子異常を網羅的に解析した。agilent 社のマイクロアレイによって 8691 遺伝子の発現解析を行なったところ、短 3' -UTR で 3 倍以上に発現亢進していた遺伝子は 48 (0.6%) で、エクソン 7 (-) では 88 (1.0%) であった。両者に共通して正常の 3 倍以上に発現亢進する分子は、WASP, granzyme A, syndecan-1, TXK などの興味深い遺伝子群であった (表 1)。一方、短 3' -UTR で 1/3 以下に発現低下していた遺伝子は 187 (2.2%) で、エクソン 7 (-) では 189 (2.2%) であった。両者に共通して正常の 1/3 倍以下に発現低下する分子は、IL-2, TGF β 2 などの種々のサイトカインであった。

RT-PCR による確認実験 : マイクロアレイの成績を基に、各々の遺伝子について、RT-PCR で確認したところ、表 2 に示すよう、二つのスプライス・ヴァリアントに共通して発現亢進、発現低下する遺伝子群が確認された。表 2 に RT-PCR によって発現亢進が確認された遺伝子を示す。

二つのスプライス・ヴァリアント発現 T 細胞株で発現亢進が確認された遺伝子の蛋白発現レベル : 以上のような検討で、スプライス・ヴァリアント導入によって 2 次的に発現変動した遺伝子群が、実際に蛋白レベルの発現変動に反映されているかどうか解析した。免疫プロット法、FACS 解析のいずれによっても、マイクロアレイ、RT-PCR で明らかにされた発現亢進遺伝子である syndecan-1, pvr12, granzyme A の発現亢進が示された。

2) SLE T 細胞の病態形成に関連する分子解析 : TCR 直下の早期シグナル分子異常に引き続いて、エフェクター機能と関連し病態形成に重要な役割を演ずる種々の機能分子が発現される。その中で、T 細胞-上皮細胞のヘテロ接着に関与し自己免疫性上皮障害と密接に関わる分子として aE β 7 (CD103) インテグリンに着目して、その接着の分子機構、およびシグナル伝達機構について解析した。

T細胞-上皮細胞ヘテロ接着：Eカドヘリン⁺L細胞と aEb7⁺K562細胞は2：1で混合し旋回培養、Eカドヘリン⁺L細胞と aEb7⁺K562細胞は接着し aggregate を形成した。このヘテロ接着は抗 aEb7mAb により著しく阻害された。一方、上皮細胞同士のホモ接着は阻害を受けなかった。そこで Eカドヘリン⁺L細胞と aEb7⁺K562細胞を4時間混合培養したものを接着サンプル、分離培養したものを非接着サンプルとし、両者を比較することでヘテロ接着に特異的な反応を解析した。E-カドヘリンのD1からD5をそれぞれ欠失したミュータントを用いて、ヘテロ接着に重要な部位を探索したところ、D5(-)E-カドヘリンのみが、ホモ接着に影響を与えないまま、ヘテロ接着が起らなかった。従って、T細胞-上皮細胞ヘテロ接着に関与するE-カドヘリンは、ドメイン5が重要な役割を果たしていることが初めて明らかにされた。

2) ヘテロ接着後のチロシンリン酸化：aEb7-Eカドヘリンを介したヘテロ接着後にどのようなシグナルが各々の細胞に誘導されるか検討した。抗Eカドヘリン抗体で免疫沈降を行い、沈降物のリン酸化について調べたところ、接着サンプルにおいてEカドヘリンのリン酸化が著しく低下した。逆にEカドヘリンの細胞内結合タンパク質であるβカテニンと、未同定の結合タンパク質のリン酸化は亢進。次に抗チロシンリン酸化抗体で免疫沈降を行い、同抗体で免疫ブロットを行ったところ、接着24時間で亢進する複数のバンドが存在した。

3) チロシンリン酸化タンパク質のプロテオーム解析：抗Eカドヘリン抗体及び抗チロシンリン酸化抗体による免疫沈降物を、SDA-PAGEで展開し銀染色したところ、イムノブロットで認められた複数のバンドを検出。これらのバンドを切り出し、PMF解析を行った。抗チロシンリン酸化抗体沈降物のうち、2つのタンパク質が ephrin 受容体及び SHIP と同定された。

これらのタンパク質は、EGFで誘導される細胞増殖と生存のシグナルを、ダウンレギュレーションすることが知られている。今回の実験では制御の証拠は得られなかったが、接着後の経時的なEカドヘリン発現の増加は、ephrinの結合性を高めると推察される。

3) T細胞カルシニューリンを標的とした治療薬剤

の効果と作用機序の解析：シクロスポリン、タクロリムスは、TCRシグナル伝達系下流に位置し、IL-2などの主要なサイトカイン産生の鍵を握る重要な分子である。その機能を強力に抑制する薬剤として移植領域で使用されてきた薬剤は、シクロスポリンのネフローゼ症候群の適応追加に続いて、タクロリムスが07年4月にループス腎炎に適応追加された。しかし、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。また、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。

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、血清ドラフ値10-100-200ng/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。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。

T細胞カルシニューリン阻害薬の In vitro 免疫学的機能に及ぼす影響：健康人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、健康人に比べ、RAならびにSLEで有意な低下を示した。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、健康人に比べ、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：健康人末梢血より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. 研究結果、E. 考察

長い間分子機序の不明であったSLEにおいて、シグナル伝達分子の機能異常に焦点を当て解析した結果、その中心の一つであるTCR ζ 鎖発現異常の機序の一端が明らかとなった。TCR ζ mRNA スプライスバリエントが発現されたT細胞ではTCR ζ 発現低下に伴い、接着分子や細胞傷害性顆粒を含む膜タンパクの発現が亢進していた。この研究で示された異常分子生成機構、あるいは2次的発現誘導分子を指標、標的とした発症前診断、原因療法の開発についてさらに追求して行く必要がある。

早期シグナル伝達異常に引き続いて惹起される分子異常に、接着分子の高発現があるが、その中で上皮細胞E-カドヘリン接着に関与し自己免疫

性上皮障害を引き起こすaEb7(CD103)インテグリンの接着部位を世界で初めて明らかにした。これを標的として、またそのシグナル伝達経路の特異的なキー分子を標的とした治療薬の開発が期待される。最後に、最近導入されたT細胞シグナル伝達の下流に位置し転写因子NFATの活性化に関わるカルシニューリンを阻害する薬剤は、これまでにない安全性プロファイルを有し、その2剤のシクロスポリン、タクロリムスのループス腎炎に対する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。

今後、このような情報を収集し、新規薬剤の開発を進めると共に、個々の症例に適した治療戦略の構築を目指して行く必要がある。

F. 健康危機情報

特記すべき事なし。

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
 7. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. DNA microarray gene expression profile of T cells with splice variants of TCRz mRNA observed in SLE. *J Immunol* 176:949-56, 2006.
 8. Kameda H, Ishigami H, Suzuki M, Abe T, and Takeuchi T. Imatinib mesylate inhibits proliferation of rheumatoid synovial fibroblast-like cells and phosphorylation of Gab adaptor proteins activated by platelet-derived growth factor. *Clin Exp Immunol* 144: 335-41, 2006.
 9. Yoshimoto K, Takahashi Y, Ogasawara M, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Aberrant expression of BAFF in T cells of systemic lupus erythematosus, which is recapitulated by a human T cell line, Loucy. *Int Immunol* 18: 1189-96, 2006.
 10. Kameda H, and Takeuchi T. Recent advance in the treatment of interstitial lung disease in patients with polymyositis/dermatomyositis. *Endocrine, metabolic & Immune disorders- Drug Targets*. 6:409-15, 2006.
 11. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Abe T, and Takeuchi T. TCRz mRNA splice variant forms observed in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Springer Seminars in Immunopathology* 28:185-93, 2006.
 12. Takeuchi T, Tsuzaka T, Kameda H, and Amano K. Molecular abnormalities of T cells in systemic lupus erythematosus. *APLAR journal of Rheum* 9: 365-71, 2006..
 13. Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. A splice variant of the TCRz mRNA lacking exon7 leads to the downregulation of the TCRz , TCR/CD3 complex and IL-2 production in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol* 174:3518-25, 2005.
 14. Takeuchi T, Tsuzaka K, Kameda H, and Amano K. Therapeutic targets in misguided T cells in systemic lupus erythematosus. *Current Drug Target* 4: 295-298, 2005.
 15. Shiraishi K, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Critical role of the 5th domain of E-cadherin for heterophilic adhesion with aEb7, but not for homophilic adhesion. *J Immunol* 175:1014-1021, 2005.
 16. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T, Yoshimoto K, Shiraishi K, Kameda H, and Amano K. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 38:339-346, 2005.
 17. Kameda H, Nagasawa H, Ogawa H, Sekiguchi N, Takei H, Tokuhira, Amano K, and Takeuchi T. Combination therapy with corticosteroids,

cyclosporine A and intravenous pulse cyclophosphamide for acute/subacute interstitial pneumonia in patients with dermatomyositis. *J Rheum* 32:1719-26, 2005.

2. 学会発表

1. Tsutomu Takeuchi : Signaling defects and the consequences in Lupus T cells. 2007 CIS School in Systemic Autoimmune Diseases. Santa Fe, New Mexico. 3.14-18, 2007.
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. Tsutomu Takeuchi : Efficacy and Safety of Tacrolimus in Patients with rheumatoid arthritis in clinical practice: Significant role of blood concentration measurement for preventing severe adverse events. 70th ACR Annual Meeting. 2006.11. Washington DC, USA
9. Tsutomu Takeuchi : Responsible region in 3' UTR of TCRz mRNA for producing TCR/CD3 including TCRz in SLE T cells. 16th European Congress of Immunology. 2006.09.
10. Yoshimoto K, Takahashi Y, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Aberrant expression of BAFF in SLE T cells. The EULAR annual congress of rheumatology, Amsterdam, Holland, June, 2006
11. 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. 70th Annual Meeting, Washington, D.C., U.S.A., November, 2006
12. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Setoyama Y, Shiraishi K, Abe T, Takeuchi T. Responsible region in 3' UTR of TCRz mRNA for producing TCR/CD3 including TCRz in SLE T cells. 16th European Congress of Immunology, Paris, France, September, 2006.
13. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Setoyama Y, Shiraishi K, Abe T, Takeuchi T. The conservative region in 3' UTR of TCRz mRNA regulates the production of TCRz in SLE T cells. 69th Annual Meeting, San Diego, U.S.A., November, 2005 (Arthritis Rheum

- 52: S489, 2005)
14. Yoshimoto K, Ogasawara M, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. BAFF and IFN-gamma may cooperatively regulate production of IgG from B cells. The EULAR annual congress of rheumatology, Vienna, Austria, June, 2005
 15. Tsutomu Takeuchi : Molecular characterization and targeted intervention of the human autoimmune diseases. 第4回RCGMフロンティアシンポジウム「ホルモンとゲノム医学国際会議」創立30周年記念講堂 2005. 5. 23
 16. Tsuzaka K, Itami Y, Kumazawa C, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. TCR ζ and TCR/CD3 expression from the TCR ζ mRNA with deleted form of the conservative sequences in 3' UTR is down-regulated due to its instability. 第37回日本免疫学会総会、2007年11月
 17. 鈴木勝也、亀田秀人、天野宏一、長澤逸人、武井博文、関口直哉、西英子、奥山あゆみ、小川祥江、津坂憲政、竹内 勤: リウマチ性疾患に対するタクロリムス治療の安全性と有効性、第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。平成19年4月27日、横浜、ワークショップ、口演。
 18. 津坂憲政、熊澤千佳、白石清乃、瀬戸山由美子、吉本桂子、安倍達、竹内 勤。SLE患者T細胞におけるシンデカン分子糖鎖発現異常。。第51回日本リウマチ学会総会、2007年4月
 19. 鈴木勝也、瀬戸山由美子、鈴木美由紀、吉本桂子、亀田秀人、津坂憲政、天野宏一、竹内 勤: T細胞活性化阻害薬およびTNF阻害薬の末梢制御性T細胞に対する影響、第35回日本臨床免疫学会総会、大阪、ポスター、平成19年10月19日
 20. 鈴木勝也、武井博文、亀田秀人、長澤逸人、関口直哉、西英子、小川祥江、津坂憲政、天野宏一、竹内勤: リウマチ性疾患におけるタクロリムスの有用性、第50回日本リウマチ学会総会・学術集会ワークショップ、平成18年4月25日、長崎
 21. 野崎杏子、津坂憲政、熊澤千佳、瀬戸山由美子、白石清乃、吉本桂子、鈴木勝也、安倍達、竹内 勤。SLE患者TCR ζ 鎖産生制御に関わるTCR ζ mRNA 3' UTR内領域の解析。第50回日本リウマチ学会総会、2006年4月
 22. 熊澤千佳、白石清乃、野崎杏子、津坂憲政、安倍達、竹内勤。インテグリン alphaEbeta7のサイトカインによる発現調節とEカドヘリンへの接着活性の解析。第50回日本リウマチ学会総会、2006年4月
 23. 吉本桂子、小笠原未恵、高橋康恵、瀬戸山由美子、鈴木勝也、津坂憲政、小川葉子、坪田一男、安倍達、竹内勤。シェーグレン症候群患者末梢T細胞におけるBAFF産生制御機構の検討。第50回日本リウマチ学会総会、2006年4月
 24. 白石清乃、熊澤千佳、野崎杏子、津坂憲政、安倍達、竹内勤。インテグリン alphaEbeta7とEカドヘリンの接着におけるチロシンリン酸化の検討。第50回日本リウマチ学会総会、2006年4月
 25. Shiraishi K, Kumazawa C, Nozaki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Identification of tyrosine-phosphorylated proteins induced by alphaEbeta7 binding to E-cadherin. 第36回日本免疫学会総会、2006年12月
 26. Yoshimoto K, Takahashi Y, Setoyama Y, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Possible mechanism of production of soluble BAFF in human T cells. 第36回日本免疫学会総会、2006年12月
 27. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Abe T, Takeuchi T. Decreased expression of glycosylated syndecan families due to reduced production of EXTL2 in SLE patient T cells. 第36回日本免疫学会総会、2006年12月
 28. 吉本桂子、高橋康恵、瀬戸山由美子、鈴木勝也、津坂憲政、安倍達、竹内勤。ヒトT細胞BAFF産生制御機構におけるMMPの関与。

- 第34回日本臨床免疫学会総会。2006年10月。
29. 高橋康恵, 吉本桂子, 津坂憲政, 安倍達, 竹内勤。単球におけるBAFF産生機構の検討。第34回日本臨床免疫学会総会。2006年10月。
30. Suzuki K, Setoyama Y, Suzuki M, Yoshimoto K, Kameda H, Tsuzaka K, Amanok, Takeuchi T: Reguratory T cells and FOXP3 isoform expression in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: 第37回日本免疫学会学術集会、平成17年11月21日、東京、ポスター
31. 小川祥江, 亀田秀人, 武井博文, 関口直哉, 長澤逸人, 鈴木勝也, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤: 全身性エリテマトーデス患者における cyclosporin A 長期投与の有用性と安全性の検討; 第102回日本内科学会講演会、平成17年4月、大阪、ポスター
32. 鈴木勝也, 瀬戸山由美子, 吉本桂子, 津坂憲政, 安倍達, 竹内勤, 末梢血単核球分画におけるBAFF産生の炎症性サイトカインによる影響、第49回日本リウマチ学会学術集会、平成17年4月19日、横浜、ポスター
33. 津坂憲政, 野崎杏子, 熊澤千佳, 瀬戸山由美子, 吉本桂子, 白石清乃, 鈴木勝也, 安倍達, 竹内勤。SLE患者に認められる splice variant form TCR ζ mRNA を発現したT細胞の遺伝子発現プロファイル解析。第49回日本リウマチ学会総会, 2005年4月
34. 吉本桂子, 小笠原未恵, ぬで島麻衣, 瀬戸山由美子, 鈴木勝也, 津坂憲政, 小川葉子, 坪田一男, 安倍達, 竹内勤。シェーグレン症候群患者 PBL からの IgG 産生更新とサイトカインの関与。第49回日本リウマチ学会総会, 2005年4月
35. 白石清乃, 津坂憲政, 熊澤千佳, 野崎杏子, 安倍達, 竹内勤。 $\alpha E\beta 7$ とのヘテロフィリック接着における E カドヘリンドメイン5 の役割。第49回日本リウマチ学会総会, 2005年4月
36. 鈴木勝也, 瀬戸山由美子, 吉本桂子, 津坂憲政, 安倍達, 竹内勤。末梢血単核球分画におけるBAFF産生のサイトカインによる影響。第49回日本リウマチ学会総会, 2005年4月
37. 吉本桂子, 小笠原未恵, 瀬戸山由美子, 鈴木勝也, 津坂憲政, 安倍達, 竹内勤。シェーグレン症候群患者T細胞におけるBAFF産生制御機構の検討。第33回日本臨床免疫学会総会。2005年10月
38. 野崎杏子, 津坂憲政, 熊澤千佳, 瀬戸山由美子, 白石清乃, 安倍達, 竹内勤。SLE患者TCR ζ 鎖産生制御に関わるTCR ζ mRNA 3' UTR 内領域の解析。第33回日本臨床免疫学会総会。2005年10月
39. Nozaki K, Tsuzaka K, Kumazawa C, Setoyama Y, Shiraishi K, Abe T, Takeuchi T. Responsible region in 3' UTR of TCR ζ mRNA for regulating the production of TCR ζ in SLE T cells. 第35回日本免疫学会総会、2005年12月
40. 吉本桂子, 小笠原未恵, 瀬戸山由美子, 津坂憲政, 安倍達, 竹内勤。ヒトT細胞におけるBAFF産生機序の検討。第35回日本免疫学会総会、2005年12月

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）、
鈴木暁岳 同上（臨床指導医）

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 ループス腎炎はSLE予後を規定する。現行治療の主流は、ステロイド薬にcyclophosphamide
（IVCY）適宜併用であるが、併用基準は不明瞭であり、ステロイド中止基準は未知である。ループス腎
炎の重症度を予測する指標は生検病理であるが、予測は確実ではなく、病理型の移行もある。本報告で
は、これらの諸問題に対し、新規の考え方を提示する。方法は、平均観察20年にわたる自施設SLE病
歴の時系列解析、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、計3集団のループス腎炎約380例の経過分析による。

結果：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、結果は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（ $p < 0.05-0.001$ ）。腎炎のないSLEには、50%以上のKaplan-Meier確率で腎炎
が遅発し、その半数が10病年以後に生じ、発生は20年以降も続いた。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。

研究経過：本研究初年度に、自施設SLE病歴から、

SLE病態の内容と再発頻度、最終観察時ステロイド
量と病態、経過中の最低ステロイド量と再発の有無、
初発時SLEDAI値、経過中のSLEDAI最大値、という
諸要素の関係を分析した。得られた結果は、病態別
にみたとき、精神症状・ループス腸炎/膀胱炎の存

在のみが、高頻度再発に弱く相関することであり、ループス腎炎 (LN) の存在は、いずれの要素とも相関しなかった (本研究班 17 年報告書)。SLEDAI 値も、いずれの要素とも相関しなかった。

その後、SLE イベントの時系列表を作成したところ、SLE 病態全般の再発が少ない一群の存在が明らかになり、それは SLE 初回治療の標的が LN だった症例群であった。したがって、以後の分析の焦点を LN の時系列解析とした。

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 (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。

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 SLE 125 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/PSL 20mg/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 PSL 14mg、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、PSL 20mgd 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 罹病期間 (表 1)：3 集団で類似した。10 大学例では、LN 罹病 (観察) 期間がやや短く、したがって観察時年令も若い傾向があった。外来症例の収集と

いうバイアスがかかった可能性がある。

SLE 発症から遅発 LN 発症までの平均年数も、3 集団で類似し 7-9 年だった。これらの平均年数は、自施設集団での遅発 LN 発生曲線 (図 1) にみられる「遅発 LN の発生速度がほぼ一定で、約半数が 10 病年までに生じる」観察事実と矛盾しない。

初期発症 LN、初回治療後の無再発率 (図 2)：3 集団の Kaplan-Meier 曲線は、極めてよく類似し、50-55%の症例が LN 無再発を達成することが示された。また 10 病年以後の LN 再発は、低頻度と算定された。

LN 治療介入後の 5 年寛解率：定義、および初期発症 LN と遅発 LN での比較 (図 3)：初期発症 LN の第 1 回再発に対する治療と、遅発 LN の LN 初回治療は、ともに SLE 再発時の治療という点で比較する意味がある。ただしこの再々発パターンを、再発時を出発点とした観察期間不均一な Kaplan-Meier 法で分析するのは適切でない。そこで治療介入から 5 年間で区切って評価した。この期間に LN 再発なし、持続ネフローゼなし、慢性腎不全 (主治医の記載または血清 Cr>1mg/dl のデータ) なし、をすべて満たすものを 5 年寛解と定義した。観察時までには 5 年経過していない例、再発時に治療介入がなされなかった例は、計算から省いた。

図 3 のように、初期発症 LN は再発時の再治療においても初回治療時と類似の寛解率を示し、遅発 LN の寛解率より有意に高かった (友の会；18/29=62% vs 12/34=35%、10 大学；18/33=55% vs 9/37=24%)。(自施設；5/6=83% vs 15/45=33%は症例不足で有意差なし)

最終観察時の腎病態 (表 2)：最終 LN 再発から (無再発者なら LN 初発時から)、最終観察までの平均期間は、最も短かった 10 大学調査集団においても、初期発症 LN 群で 12.0±8.0 年、遅発 LN 群で 8.5 年±4.9 年と十分長かったので、定常状態に近い観

察と考えられた。最終観察近接3年未満のLN新規発症例は、予め集計から除外してある。

初期発症LN群は、腎寛解者71-74%、不可逆的腎障害者6-8%と、3集団で極めて類似し、良好な予後が示された。遅発LN群では不可逆的腎障害者が51%、48%、27%と高率であった。10大学集団での値が27%と相対的に低い理由の考察は、後述する。

最終観察時の腎病態とLN初回治療前の生検腎病理の関係(図4a, b) : 自施設、10大学の全調査例の結果を示した。IV+Vは、図でIVとした。

初期発症LN群(図4a)において、不可逆腎障害(持続ネフローゼまたはCRF)に至った率は、10大学調査でII型1/19、IV型7/47(15%)、自施設病歴でIV型0/14であり、IV型に多い傾向があるが、3つの数値間に有意差がない。(自施設II型から透析に至った例では、TTPによる腎不全と同定された。)

遅発LN群(図4b)では、10大学・自施設ともにIV型の半数が、不可逆腎障害に至ったが、その率は型による有意差がなく、自施設集団では、ほかの型から不可逆腎障害に至った率と類似した。

以上のことは、腎生検が腎予後に関係しないことを意味するわけではなく、少なくとも自施設遅発LN群で、IV以外から2度目の生検でIVへの移行が確認された6例中、5例が不可逆腎障害に至ったので、IV型の予後が悪いのは明らかである(18年度報告書に記した:そこでは無治療で初診時CRFの例も記載し、ネフローゼをMPDに区分していたが、本稿では改訂してある)。

すなわち本結果は、初回治療前の腎生検が必ずしも長期的な腎予後を予測しない、という周知の経験事実を統計的に再確認したといえるのであるが、図4a、図4bを比較すれば、初期発症LNと遅発LNの区分に、強い予後予測価値があることが分かる。

D. 考察

LN発症時期による、治療方針の区分:

初期発症LNは、初回治療後の無再発Kaplan-Meier確率が50-55%であり、再発しても再治療後の5年寛解率が、遅発LNの初回治療後のそれより高い、集計時の持続ネフローゼ+CRFの率は、初期発症LNに低く、遅発LNに高い、という結果は、3つの調査集団で一致したので信頼性が高い。

したがって、免疫抑制治療の内容を上記2種のLNで区分し、遅発LNに対して治療を強化するのが妥当と思われる。SLEの外来管理中に、わずかな尿所見が初めて出現した場合、ほかのデータ異常がなければ経過観察、あれば腎生検、というのが一般的な対応と想像される。しかし、本結果からは、腎生検またはほかのデータ異常によらず、警戒すべきことが示唆される。

初期発症LN群の腎予後がよい理由について、SLE初発時のステロイド治療が遅発LN群より高用量だったことが、自施設集団から推定されたが、友の会集団では用量に有意な群間差がなかった(10大学集団は未解析)。

ステロイド中止基準:

初期発症LN群における、LN無再発率-50%、不可逆腎障害率6-8%という結果は、この群の寛解者が、ステロイドを安全に減量ないし中止できる候補であることを示唆している。逆に、LNのないSLEに不可逆腎障害を生じる確率は、50%以上(図1) x 27-51%(表2)から14-25%以上と算定され、LN遅発は20病年後も続くので、この群はステロイド中止可能な群とはいえない。

遅発LNから不可逆腎障害に至った比率:

10大学集団で11/41=27%、自施設集団で25/49=51%($p < 0.05$; 図4b)の差があった理由は、治療内容による可能性がある。自施設病歴においては、腎所見悪化時の治療介入が不十分な(IV型に対し、PSL 20mg/dなどの)履歴をもつ症例が同定された(18年度報告書では、これらを除いたものを真のステロイド抵抗性LNと区分したが、区分に

は恣意性があり、またアンケート調査集団と比較しにくいので、本稿では区分していない)。図 4b に示したように、LN に対する初回治療に IVCY が併用された例が、10 大学集団で多かった (LN 再発時に併用された例は、図に示していない)。

ほかの理由として、自施設集団は、死亡 18 人、透析 15 人を含む全例調査であり、明らかに重症 SLE が集積しているため、その影響も考えられる。アンケート群 (外来通院者) に死亡例は入らず、透析例の収集は 1 例のみだった。

3 集団における初期発症 LN/遅発 LN の集計比 :

表 1 のように、自施設 31/49 (0.63)、友の会 89/33 (2.7)、10 大学 125/41 (3.0) であった。重症例が集積する調査法で遅発 LN の比率が増加したことは、遅発 LN が予後不良群であることの裏付けと考えられる。

治療研究について示唆される問題 :

初期発症 LN と遅発 LN の治療反応の差は明確なので、薬物治療の比較試験を行なうとき、両者を区分するのが適切と考えられる。LN に対し cyclophosphamide 治療の有効性が確立された主要文献においても、患者背景の記載をみると、SLE 発症平均年齢と LN 発症平均年齢に差があり、治療群間での差も均一でないため、2 種の LN が様々な程度に混在している可能性がある。

E. 結論

ループス腎炎に対する免疫抑制薬併用の必要性、経過中の治療強化の必要性、ステロイドを中止してよい SLE 症例は、いずれも腎炎の発症時期に基づいて判別できる可能性があり、新規の診療指針になりうる。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

国内

1. 高橋裕子、森口正人、住永佳久、長汐千秋、狩野俊和、鈴木暁岳、国松淳和、浅尾りん、山下裕之、伊藤健司、三森明夫. Arterial mediolysis の一例. 日臨免会誌 30(3):193-197, 2007.

海外

1. Nagatani K, Itoh K, Nakajima K, Kuroki H, Katsuragawa Y, Mochizuki M, Aotsuka S, Mimori A: Rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes express BCMA and are stimulated by APRIL. Arthritis Rheum. 56:3554-3563, 2007.
2. Nakajima K, Itoh K, Nagatani K, Okawa M, Fujii T, Kuroki H, Katsuragawa Y, Aotsuka S, Mimori A: Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 36:365-372, 2007.
3. Okawa-Takatsuji M, Nagatani K, Nakajima K, Itoh K, Kano T, Nagashio C, Takahashi Y, Aotsuka S, Mimori A: Recruitment of immature neutrophils in peripheral blood following leukocytapheresis therapy for rheumatoid arthritis. J Clin Apheresis. 22:323-329, 2007.
4. Soejima M, Sugiura T, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Katsumata Y, Takagi K, Nakajima A, Mitamura T, Mimori A, Hara M, and Kamatani N: Association of the diplotype configuration at the N-acetyltransferase 2 gene with adverse events with co-trioxazole in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther. 9: R23, 2007.
5. Itoh K, Kano T, Nagashio C, Mimori A, Kinoshita M, Sumiya M. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 54 Mar:1020-1022, 2006.
6. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB,