

(金) 神戸ポートアイランド

6. 佐藤 利行, 有戸 光美, 永井 宏平, 黒川 真奈絵, 岡本 一起, 末松 直也, 加藤 智啓. 関節リウマチ特異的に糖鎖構造変異を有する糖タンパク質の探索 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月7日(火)~12月10日

(金) 神戸ポートアイランド

7. 永井 宏平, 黒川 真奈絵, 岡本 一起, 内田 貞輔, 高桑 由希子, 大岡 正道, 有戸 光美, 佐藤 利行, 末松 直也, 加藤 智啓. 自己抗原 U1-small nuclear ribonucleoprotein 68k subunit における疾患特異的翻訳後修飾亜型の解析

第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月7日(火)~12月10日

(金) 神戸ポートアイランド

8. 小坂橋 賢一郎, 岡本 一起, 有戸 光美, 佐藤 利行, 永井 宏平, 黒川 真奈絵, 末松 直也, 安田 隆, 木村 健二郎, 加藤 智啓. 腎生検1検体から単離した糸球体抽出タンパク質の2次元電気泳動~糸球体腎炎研究への応用~

第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月7日(火)~12月10日

(金) 神戸ポートアイランド

9. 野口美和, 黒川真奈絵, 宇田川至, 永井宏平, 有戸光美, 佐藤利行, 末松直也, 岡本一起, 山口登, 加藤智啓. アルツハイマー病に関与する血清ペプチドの探索

10. 日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオーム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

11. 永井宏平, 黒川真奈絵, 岡本一起, 内田貞輔, 高桑由希子, 大岡正道, 有戸光美, 佐藤利行, 末松直也, 加藤智啓. 自己抗原蛋白質 U1-small nuclear ribonucleoprotein 68k subunit における疾患特異的翻訳後修飾の解析

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオーム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

12. 高桑由希子, 黒川真奈絵, 大岡正道, 永井宏平, 有戸光美, 佐藤利行, 末松直也, 岡本一起, 永渕裕子, 湯村和子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 石

津明洋, 須賀万智, 尾崎承一, 加藤智啓

顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索 日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオーム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

13. 野口陽平, 黒川真奈絵, 奥瀬千晃, 松本伸行, 松永光太郎, 永井宏平, 有戸光美, 佐藤利行, 末松直也, 岡本一起, 伊東文生, 加藤智啓

血清ペプチドプロフェイルによる、C型慢性肝炎のペグインターフェロン・リハビリン併用療法の効果予測

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオーム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

14. 小坂橋賢一郎, 岡本一起, 有戸光美, 佐藤利行, 永井宏平, 黒川真奈絵, 末松直也, 安田隆, 木村健二郎, 加藤智啓. 腎生検検体からの糸球体の単離と、その抽出蛋白質の2次元電気泳動

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオーム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

15. 吉岡拓也, 黒川真奈絵, 佐藤利行, 永井宏平, 有戸光美, 末松直也, 岡本一起, 鈴木登, 加藤智啓. ベーチェット病患者末梢血単核球における発現蛋白質の網羅的検討

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオーム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

16. 有戸光美, 永井宏平, 高桑由希子, 大岡正道, 黒川真奈絵, 増子佳世, 岡本一起, 末松直也, 加藤智啓. 「アセチル化」プロテオミクスによる関節リウマチ(RA)関連分子の探索

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオーム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

17. 加藤智啓, 永井宏平, 有戸光美, 佐藤利行, 黒川真奈絵, 末松直也, 岡本一起. リウマチ性疾患における蛋白質翻訳後修飾

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオーム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

18. 増子佳世, 村田三奈子, 遊道和雄, 別府諸兄,

中村 洋、加藤智啓. ヒト関節軟骨細胞における CTGF/CCN2 のプロスタグランジンによる制御
第 5 4 回日本リウマチ学会総会・学術集会／第 1 9 回国際リウマチ学会 2010/4/22-2010/4/25、神戸ポートピアホテル

西本 憲弘 (研究分担者)

1. 李 慧敏, 杉野英彦, 安達康雄, 青木千恵子, 西本憲弘. DNA チップによる SLE の遺伝子発現解析-光感受性遺伝子の発現異常- 第 54 回日本リウマチ学会. 神戸. 2010. 4. 22
2. Lee H, Sugino H, Aoki C, Adachi Y, Shimaoka Y, Ochi T, Nishimoto N. Gene expressions in the immune response- and cell cycle-networks of bone marrow cells from patients with rheumatoid arthritis as revealed by DNA microarray analysis. EULAR2010. Roma. 2010.6.17
3. Lee H, Sugino H, Adachi Y, Aoki C, Nishimoto N. Up-regulation of homophilic and heterophilic cell adhesion-related molecules in peripheral blood cells from patients with rheumatoid arthritis as revealed by DNA microarray analysis APLAR2010. Hong Kong. 2010.7.12
4. Lee H, Sugino H, Aoki C, Adachi Y, Nishimoto N. DNA microarray analysis revealed mitochondrial dysfunction and underexpressions of excision repair cross-complementing genes in peripheral blood cells from patients with systemic lupus erythematosus. International Immunology 2010. Kobe. 2010.8.24

田中 良哉 (研究分担者)

1. Y. Tanaka. Clinical development and Phase III studies of tocilizumab. 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia. 平成 22 年 5 月 5 - 9 日
2. Y Tanaka, M Suzuki, H Nakamura, S Toyozumi, SH Zwillich. The oral JAK inhibitor tasocitinib (CP-690,550 (CP)) in combination with methotrexate (MTX) is efficacious in a dose-dependent manner in active rheumatoid arthritis (RA). The Annual European Congress of Rheumatology 2010, Rome, Italy. 平成 22 年 6 月 15 - 19 日

3. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. The possibility of maintaining low disease activity after discontinuation of infliximab in RA patients: An interim report for the second year of the RRR study. The Annual European Congress of Rheumatology 2010, Roma, Italy, 平成 22 年 6 月 15 - 19 日

4. Tanaka Y. Paradigm shift of the treatment of rheumatoid arthritis by TNF-targeting biologics. The 14th International Congress of Immunology (ICI), Kyoto. 平成 22 年 8 月 22-27 日

5. Tanaka Y. B cell depletion in systemic lupus erythematosus. The 14th International Congress of Immunology (ICI), Kyoto, 平成 22 年 8 月 22-27 日

6. Y Tanaka, M Harigai, T Takeuchi, H Yamanaka, N Ishiguro, K Yamamoto, TMU Rahman, T Yoshinari, N Miyasaka, T Koike. Golimumab, a Human Anti-TNF α Monoclonal Antibody Administered Subcutaneously Every Four Weeks in Patients with Active Rheumatoid Arthritis Despite Methotrexate Therapy: 24-Week Results of Clinical and Radiographic Assessments. The 74th National Meeting of American College of Rheumatology, Atlanta, USA, 平成 22 年 11 月 6 - 12 日

3. 書籍

石井 智徳 (研究分担者)

張替秀郎、石井智徳

炎症、アレルギー疾患 上月正博編

薬・栄養・運動の知識 内部障害のケアのため

南江堂 200-211, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

住田 孝之 (研究分担者)

申請準備中

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

II. 研究分担報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

自己免疫疾患における抗原提示細胞およびT細胞の役割と新規治療法の開発に関する研究

研究分担者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授
研究協力者 岡本 明子、岡村 僚久、瀬理 祐、藤尾 圭志
東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学

研究要旨 SLEは難治性の全身性自己免疫疾患であるが、その病態は良く分かっていない。本研究ではSLEの病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる plasmacytoid DC (pDC) と関連する疾患活動性マーカーについて解析を行った。マウス・ヒトの血液中には可溶性LAG3が存在し、その由来はpDCであることが知られている。分担研究者らはSLEと可溶性LAG3の関連を検討したところ、SLE患者血清では可溶性LAG3濃度が上昇していることを見出した。さらにこの可溶性LAG3濃度はSLEの活動性指標であるSLEDAIと相関していたが、SLEDAI=0の症例でも可溶性LAG3濃度が上昇している症例を認めた。これらのことから可溶性LAG3はSLEにおける新たな疾患活動性マーカーであると考えられ、pDCの活性化の指標となる可能性も想定された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）では末梢血単核球でI型インターフェロンにより誘導される遺伝子の発現が亢進しており、I型インターフェロンの病態への関与が想定されている。I型インターフェロン産生細胞は通常 plasmacytoid DC (pDC)であり、SLEにおけるpDCの活性化を示唆する報告があるが、まだ詳細ははっきりとは分かっていない。また日常臨床でI型インターフェロン誘導遺伝子の発現を確認することは困難である。本研究ではpDCが産生するとされる可溶性LAG3を、SLE患者血清で測定し、可溶性LAG3がSLEの疾患活動性の指標となりうるかどうか検討した。

B. 研究方法

SLE患者45例の血清中の可溶性LAG3をELISA法により測定した。コントロールとして健康人、関節リウマチ（RA）、筋炎、血管炎の患者血清を測定した。

（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた研究計画については、東京大学医学部倫理審査委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

SLE患者の約40%で血清中の可溶性LAG3濃度が上昇していることを見出した。健康人、RA、血管炎では上昇はみられなかった。筋炎では軽度の可溶性LAG3濃度の上昇が認められた。さらにこの可溶性LAG3濃度はSLEの活動性指標であるSLEDAIと相関していたが、SLEDAI=0の症例でも可溶性LAG3濃度が上昇している症例を認めた。

D. 考察

これらのことから可溶性LAG3はSLEにおける新たな疾患活動性マーカーであり、pDCの活性化の指標となる可能性が考えられた。今後は可溶性LAG3とSLEの病型との関連や、SLE患者末梢血中のI型インターフェロン誘導遺伝子発現との関連を検討する予定である。I型インターフェロン誘導遺伝子発現と可溶性LAG3に強い相関があれば、可溶性LAG3をI型インターフェロン誘導遺伝子発現の指標として使用できる可能性がある。また今回筋炎でも可溶性LAG3の上昇が認められたが、筋炎もI型インターフェロンの関与が報告されている疾患であり、可溶性LAG3は筋炎の病型分類にも有用である可能性が考えられた。

E. 結論

可溶性 LAG3 は従来知られていた指標と異なる新たな疾患活動性マーカーである可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, Okada Y, Daha NA, Toes REM, Huizinga TWJ, Myouzen K, Kubo M, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2010 in press.
2. Okada Y, Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Shimane K, Myouzen K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. HLA-DRB1*0901 lowers anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 69:1569-70, 2010.
3. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum*. 62:574-579, 2010.
4. Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 6:290-5, 2010.
5. Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, Ikari K, Terao C, Takahashi A, Yamazaki K, Hosono N, Myouzen K, Tsunoda T, Kamatani N, Furuichi T, Ikegawa S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Iwamoto T, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat Genet*. 42:515-9, 2010.

6. Myouzen K, Kochi Y, Shimane K, Fujio K, Okamura T, Okada Y, Suzuki A, Atsumi T, Ito S, Takada K, Mimori A, Ikegawa S, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*. 19:2313-20, 2010.

7. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The family of IL-10 secreting CD4+ T cells. *Advances in Immunology*. 105:99-130, 2010.

8. Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K. The future of lupus therapy modulating autoantigen recognition. *Lupus* 19:1474, 2010.

2. 学会発表

1. Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K.

Identification of a disease-promoting CD4+ T cell clone from MRL/lpr kidney using single cell analysis.

14th International Congress of Immunology
PP-017-28

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

「抗リン脂質抗体スコア」と血栓症発症リスクに関する研究

研究分担者 渥美 達也 北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 准教授
研究協力者 大友 耕太郎 北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科

研究要旨 抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断には Sapporo 分類基準シドニー改変を用いるが、抗体の陰性または陽性の定性的評価のみで、抗体価の大小や抗体の多寡という定量的評価は行われなかった。我々は多数の抗リン脂質抗体を同時に測定し、それらを一元的に定量化(点数化)した「抗リン脂質抗体スコア(aPL-S)」を定義し、APS 診断マーカーとして有用であることを示した。また、別の後ろ向き研究で aPL-S が血栓症リスクを示すマーカーとなる可能性について示した。今回我々は既存の抗リン脂質抗体検査と血栓症リスクとの関連を調査し、aPL-S の血栓症予後予測の可能性について検討した。対象は 2002 年から 2003 年に当科を受診し、抗リン脂質抗体を測定した患者 411 名。2009 年まで後ろ向き追跡し、血栓症等について調査した。2 年以上フォロー可能であった症例は 302 名(73.4%)であり、平均観察期間は 67.7±14.9 月であった。期間中に 32 名が血栓症を発症した。ループスアンチコアグラント(LAC)陽性または IgG 型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)陽性患者の血栓症相対リスクは有意に高かった(オッズ比[95%CI] / LAC: 3.26 [1.55 - 6.90, p=0.001]、IgG aPS/PT: 4.80 [2.03 - 11.04, p=0.0001])。aPL-S≥1、≥10、≥30、≥50 の患者群を aPL-S=0 群と比較したところ、いずれの群も有意に血栓症の相対リスクが高く、オッズ比は点数に依存して上昇した(≥1: 2.40 [1.13 - 5.06, p=0.019], ≥10: 3.21 [1.42 - 7.25, p=0.004], ≥30: 5.61 [2.32 - 13.75, p<0.0001], ≥50: 6.88 [2.19 - 21.60, p=0.002])。aPL-S 高得点群の陽性適中率(PPV)は既存の単独アッセイより高値であり、aPL-S の得点に伴って血栓症のオッズ比が上昇した。これらの検討から aPL-S は包括的かつ定量的な血栓症予後予測のマーカーとなる可能性が示された。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体は多様な自己抗体群である。抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断には通常 Sapporo 分類基準シドニー改変を用いる。抗リン脂質抗体には非特異的な抗体も多く含まれ、「1つかそれ以上の抗リン脂質抗体が陽性」で APS を定義することに多くの問題点が指摘されている。我々は多数の抗リン脂質抗体を同時に測定し、それらを一元的に定量化(点数化)した「抗リン脂質抗体スコア(aPL-S)」を定義し APS 診断における有用性を示した。今回我々は既存の抗リン脂質抗体検査と血栓症リスクとの関連を調査し、aPL-S の血栓症予後予測の可能性について検討することとした。

B. 研究方法

対象は 2002 年から 2003 年に当科を受診し、抗リン脂質抗体を測定した患者 411 名。2009 年まで後ろ向き追跡し血栓症発症について調査した。全患者の

ループスアンチコアグラント(LAC) (aPTT 法、ラッセル蛇毒凝固時間法、カオリン凝固時間法)、IgG/M 抗カルジオリピン抗体、IgG/M 抗β2-グリコпротеイン I (β2-GPI)抗体、IgG/M 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)を測定し、個々の抗リン脂質抗体アッセイと血栓症との関連を調べ、aPL-S と比較した。2 年以上追跡可能な症例を有効症例とした。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

有効症例は 296 名(72.0%)であり、平均観察期間は 67.7±14.9 月であった。期間中に 32 名が新規血栓症を発症した。LAC 陽性または IgG aPS/PT 陽性患者の血栓症相対リスクは有意に高かった(オッズ比 [95%CI] / LAC: 3.26 [1.55 - 6.90, p=0.001]、IgG aPS/PT: 4.80 [2.03 - 11.04, p=0.0001])。aPL-S≥1、≥10、≥30、≥50 の患者群を aPL-S=0 群と比較したところ、

いずれの群も有意に血栓症の相対リスクが高く、オッズ比は点数に依存して上昇した(≥ 1 : 2.40 [1.13 - 5.06, $p=0.019$], ≥ 10 : 3.21 [1.42 - 7.25, $p=0.004$], ≥ 30 : 5.61 [2.32 - 13.75, $p<0.0001$], ≥ 50 : 6.88 [2.19 - 21.60, $p=0.002$])。Kaplan-Meier 法を用いた検討では LAC 陽性、IgG aPS/PT 陽性、aPL-S ≥ 30 、aPL-S ≥ 50 の患者群で有意に血栓症が多かった(Log-Rank test : それぞれ $p<0.01$)。aPL-S ≥ 30 、aPL-S ≥ 50 の Positive predictive value (PPV)は 30.8%, 35.3%であり既存のすべての検査より高く、Negative predictive value (NPV)は 90.7-92.9%であり既存の検査と同レベルであった。

D. 考察

aPL-S 高得点群の PPV は既存の単独アッセイより高値であり、aPL-S の得点に伴って血栓症のオッズ比が上昇した。これまでの検討から aPL-S は包括的かつ定量的な血栓症リスクのマーカーとなる可能性が示された。後ろ向き検討のため、真の予後(リスク)と aPL-S の関係を論じるためには今後の前向き検討が必要である。本スコアを普及させ、一般診療に応用するためには、個々の抗リン脂質抗体検査の標準化が必須であり、コストや汎用性と効率を考えたスコア自体の再編も必要と考えている。

E. 結論

aPL-S は血栓症発症リスクのマーカーであり、抗リン脂質抗体症候群の予後を推定させる可能性が示唆された

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, Kobayashi K, Ieko M, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Nicked beta2-glycoprotein I binds angiostatin4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its anti-angiogenic property. *Blood* 114, 2553-9, 2009.
2. Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. Anti-beta2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced

hypertension: a case-control study. *J Reprod Immunol* 84, 95-99, 2010

3. Bohgaki M, Matsumoto M, Atsumi T, Kondo T, Yasuda S, Horita T, Nakayama KI, Okumura F, Hatakeyama S, Koike T. Plasma gelsolin facilitates interaction between $\beta 2$ glycoprotein I and $\alpha 5\beta 1$ integrin. *J Cell Mol Med* (in press)
4. Suzuki E, Amengual O, Atsumi T, Oku K, Hashimoto T, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Ieko M, Fukushima K, Koike T. Increased expression of Phospholipid Scramblase 1 in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 37, 1639-45, 2010
5. Shimada S, Yamada H, Atsumi H, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. Intravenous immunoglobulin therapy for aspirin-heparinoid -resistant antiphospholipid syndrome. *Reproductive Medicine and Biology* (in press)
6. Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibody: why do we need more assays? *Lupus* 19, 436-9, 2010
7. Ieko M, Yoshida M, Naito S, Nakabayashi T, Kanazawa K, Mizukami K, Mukai M, Atsumi T, Koike T. Increase in plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor may not contribute to thrombotic tendency in antiphospholipid syndrome because of inhibitory potential of antiphospholipid antibodies toward TAFI activation. *Int J Hemato* 91, 776-83, 2010

2. 学会発表

1. Otomo K, Atsumi T, Fujieda Y, Kato M, Amengual O, Horita T, Yasuda S, Koike T. Antiphospholipid Score (aPL-S): A Comprehensive Predictive Marker of Developing Thrombosis in Autoimmune Diseases. The 74th annual meeting of the American College of Rheumatology, Atlanta, Georgia, USA, 7-11 Nov. 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

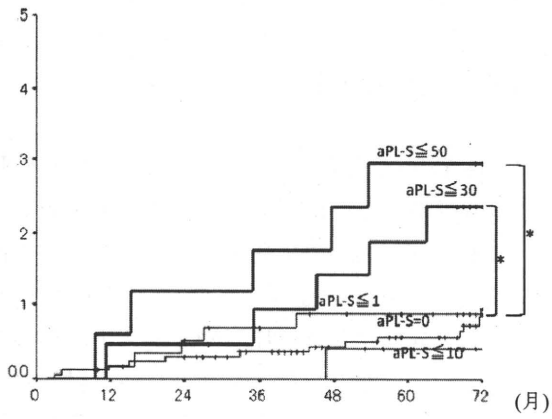


図1 aPL-S 得点群別血栓症発症率のカプランマイヤー法を用いた検討

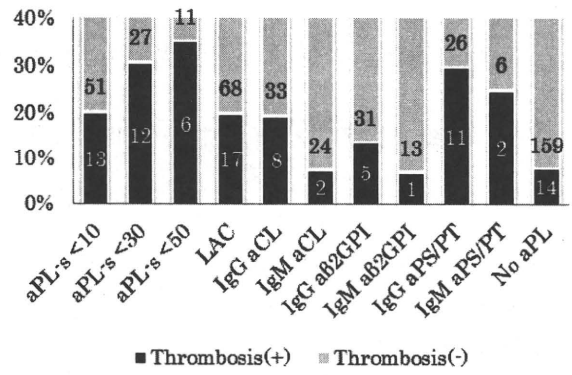


図3 aPL-S 各得点群および既存の抗リン脂質抗体検査における血栓症発症の陽性的中率

	Cut off	Positive patients	New development of thrombosis	Odds ratio (95%CI)	p value
aPL-S	10<	64	13	2.8580 (1.325-6.164)	0.0060
	30<	39	12	5.2670 (2.322-11.95)	0.0001
	50<	17	6	5.3080 (1.814-15.53)	0.0008
LAC	8<	41	17	3.7670 (1.544-6.895)	0.0010
IgG-aCL	18.5<	41	8	2.3330 (0.968-5.622)	0.0530
IgM-aCL	7<	25	2	0.6670 (0.150-2.963)	0.5920
IgG-aβ2GPI	2.2<	36	5	1.3290 (0.499-3.880)	0.5260
IgM-aβ2GPI	6<	14	1	0.6230 (0.079-4.925)	0.6510
IgG-aPS/PT	2<	37	11	4.7950 (2.028-11.04)	0.0001
IgM-aPS/PT	9.2<	8	2	2.8670 (0.554-14.84)	0.1900

表2 aPL-S の得点群、および既存の抗リン脂質抗体検査における血栓症発症のオッズ比

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

膠原病関連クリオグロブリン血症の病態発生に必要な免疫シグナルに関する研究

研究分担者 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

A. 研究目的

クリオグロブリン (CrG) は膠原病やC型肝炎ウイルスに関連して発生する特殊な免疫グロブリンであり、血管炎や腎炎の病態に関わる病原性を有することがある。本研究では、CrG 血症をSLE様症状に伴って発症する膠原病モデルマウスを用いて、CrG 血症に関連する遺伝的要因についての解析を行う。昨年度は、最も強い関連を示したX染色体領域の遺伝子について報告した。今年度は、他の染色体領域について、全ゲノム解析の結果を報告する。

B. 研究方法

CrG 血症を発症する MRL/lpr と同遺伝背景に signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP) 遺伝子欠損を持つ MRL/rpl マウス、ならびに正常対象とした MRL/+マウス、Fas 遺伝子欠損を持ちながら背景遺伝子を異にする C3H/lpr マウス、さらには、MRL/rpl と C3H/lpr の交配から生じた F2 マウスの血清を採取し、そこから出井らの方法に準じて、低温条件下でクリオグロブリン分画と上清分画を分離した。ELISA 法により各分画の IgG 量を測定した。また、F2 マウスを用いて CrG 発症に関連する染色体領域を、全ゲノムを対象としたマイクロサテライト多型連鎖解析により求めた。

C. 研究結果

5 番染色体 19 cM (MRL 優性) と 10 番染色体 51 cM (MRL 劣性) 上に弱い連鎖傾向を認めた。しかし、各座に関して統計的有意性は確認されなかった。

D. 考察

CrG は免疫グロブリン (Ig) 組成により 3 タイプに分けられる。そのうちタイプ II とタイプ III は非単

クローン性 Ig を成分とするもので、膠原病や C 型肝炎ウイルス感染と関係が深いとされる。本研究に観察した CrG モデルは、SLE 病態に合併するタイプ III CrG に相当するとされる。前回までに、タイプ III CrG 発生に SAP を介したリンパ球 (間) シグナルを必要としていることを報告した。今回は、SAP 以外の遺伝的関連を明らかにするために、全ゲノム解析を行った。その結果、5 番染色体と 10 番染色体上に弱い連鎖傾向を認めたが、統計学的有意性は確認されなかった。その要因として、解析個体数 (108 匹) が少なかったことが挙げられる。同様のマウス系統を用いた過去の研究によると、今回の研究で着目した 10 番染色体上の遺伝子座は、MRL/lpr マウスの病的表現形質の中でも唾液腺炎の関連遺伝子座にはほぼ一致する。その病態発生と CrG 発生のメカニズムとの間の関連性については、今回の解析対象群の唾液腺病理評価を加え、さらに考察する必要がある。

E. 結論

全ゲノム解析から、SAP 遺伝子以外で、5 番と 10 番染色体上に CrG 血症の発症に関連傾向を示す遺伝子座を認めた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 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

全身性エリテマトーデス患者血清由来の抗血管内皮細胞抗体の対応抗原に関する研究

研究分担者 石井 智徳 東北大学医学部血液免疫科 准教授

研究要旨 抗血管内皮細胞抗体(AECA)は各種血管炎での出現と、血管内皮細胞に対する傷害作用や病的活性が報告されている。プロテオミクス解析を用いた対応抗原同定が行われてきたが、主に細胞質蛋白が同定され、その病的意義は明らかとなっていない。我々はレトロウィルスベクターによる蛋白発現系(retrovirus vector expression cloning system)を用い、ヒト臍帯静脈内皮細胞由来（以下 HUVEC） cDNA library から全身性エリテマトーデス（以下 SLE）患者血清中に存在する抗血管内皮細胞抗体（以下 AECA）の対応抗原を検索し、膜型蛋白 fibronectin leucin-rich transmembrane 2 (FLRT2)を血管内皮細胞に対する新規自己抗原候補として同定した。retrovirus vector expression cloning system はプロテオミクス解析では困難であった膜蛋白自己抗原の同定に有用であると考えられる。また、抗 FLRT2 抗体高値例は SLE に特異的であることから、AECA の対応抗原は各疾患や病態毎に異なるものと考えられた。このシステムを用いて種々の病態での AECA 対応抗原同定を行うことで、AECA による新たな血管炎の分類や病態形成能、新規治療介入分子の解明につなげることができる可能性がある。

A. 研究目的

SLE をはじめとする自己免疫疾患の一主要病態である血管炎では、抗血管内皮細胞抗体(以下 AECA)の出現が指摘されてきた。しかし、これまでに同定された自己抗原はほとんどが細胞内蛋白であり、その病的意義は未だ明確となっていない。SLE 患者血清中に、AECA 活性を持つ抗体が存在することは以前より知られているが、その対応抗原についてはコンセンサスが得られているものはない。本研究では、SLE 患者血清中の AECA、特に血管内皮細胞表面に結合する抗体を用いて、膜表面存在する自己抗原を同定することを目的とした。

B. 研究方法

(1)患者血清のスクリーニング：SLE 患者血清中 IgG もしくは血清から精製した IgG のヒト臍帯静脈内皮細胞（以下 HUVEC）への結合を、FITC-anti-human IgG を 2 次抗体として染色し FACS で検討した。結合の強い血清を prototype AECA として、以下の expression cloning に用いた。

(2)Expression cloning ; HUVEC より cDNA library を作成し、レトロウィルスベクター(pMx)に組み込んだ。それらを rat myeloma cell line に遺伝子導入後、

上記 prototype AECA IgG が結合する細胞を FACS Area を用いてソーティングし、限界希釈法によりクローニングした。

(3)クローニングされた細胞に挿入された cDNA の同定；(i)クローニング細胞より genomic DNA を抽出、レトロウィルスベクター-cDNA 挿入部の 5'、3' 側配列をプライマーとし polymerase chain reaction (PCR)を施行、発現 RNA を同定した。(ii)ソーティング前の細胞、クローニング細胞より RNA を抽出し各々の mRNA 発現の変化を microarray にて検討した。

(4)同定蛋白質のクローニング細胞、HUVEC での発現を FACS、western blotting、蛍光免疫法で確認後、同定蛋白質の発現ベクターを作成し HEK293T 細胞に強制発現させ、prototype AECA との結合を確認した。

(5)抗同定蛋白質抗体のスクリーニング；レトロウィルスベクター (pMx-IRES-GFP)へ同定蛋白質 cDNA 配列を挿入、HEK293T に感染させ、同定蛋白質を安定的に発現する細胞を作成し、患者血清を用いて細胞を染色、同定蛋白質への結合を測定、抗同定蛋白質抗体の臨床的特徴を検討した。

(6)AECA の病的機能活性の検討；抗対応抗原抗体、

isotype を用いて下記の assay を行った。(i) cell proliferation assay ; cell count, WST-1 を用いて細胞増殖の変化を検討。(ii) cell cycle progression assay ; CFSE を用いて細胞分裂能、PI を用いて cell cycle の変化を検討。(iii) apoptosis assay ; annexin V、7-AAD にて apoptosis の変化を検討。(iv) Adhesion assay ; E-selectin、ICAMI、VCAMI に対し、定量 PCR(qRT-PCR)にて mRNA、FACS にて蛋白レベルの変化を検討。(v) activation assay ; IL-1b、IL-6、IL-8、MCP-1、TNF α に対し、qRT-PCR にて mRNA、cytometric beads assay (CBA)にて分泌蛋白の変化を検討。(vi) tube formation assay ; マトリゲルを用いて HUVEC の血管新生能の変化を検討。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、当研究科倫理委員会の承認を受けた。受付番号(2009-477)

C. 研究結果

(1)昨年までの研究にて、強い AECA 活性を示したループス腎炎患者(WHOIV型)血清 (E10-19)を見出し、これを prototype AECA とし以後の実験に使用し、AECA 対応抗原を発現する rat myeloma cell 2 クロオンを単離した。これらクロオンを用い DNA シークエンスおよびマイクロアレイ双方にて、異なる 2 クロオン間で強く発現する膜蛋白、fibronectin leucine-rich transmembrane 2 (FLRT2)の導入を確認、その後、両クロオン、HUVEC における FLRT2 の蛋白レベルでの発現を FACS、免疫染色、Western blotting にて確認、更に FLRT2 強制発現 HEK293T 細胞に E10-19 IgG が結合することを確認した。以上より、SLE 患者血清における AECA の新規対応自己抗原として膜蛋白 FLRT2 を同定した。

(2)FLRT2 非発現細胞に対する FLRT2 発現細胞への患者血清の結合を MFI の変化率にて定量し、control における平均+3SD をカットオフとすると、SLE では 23%で陽性を認めた(control 血清との有意差 $p<0.0001$)。他膠原病での出現頻度を検討したところ、関節リウマチ、炎症性筋疾患、強皮症、MCTD、シェーグレン症候群、抗リン脂質抗体症候群、側頭動脈炎、高安動脈炎、ベーチェット病では control に比べ有意な出現は認めなかった。一方、結節性多

発動脈炎、Churg-Strauss 症候群、Wegener 肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎では低値陽性がみられた。SLE における抗 FLRT2 抗体陽性と陰性患者の比較では、発症年齢が高く、腎症が多く、皮膚粘膜症状が少ない傾向にあった。陽性患者において有意に漿膜炎が少なく、抗 RNP 抗体陽性例が多く認められた。抗 FLRT2 抗体と抗 dsDNA 抗体、血清補体値、Serum amyloid A (SAA)との相関はみられなかった。

(3)抗 FLRT2 抗体による HUVEC への機能を検討すべく、種々の assay を行った。抗 FLRT2 抗体は R&D 社のモノクローナル、ポリクローナル抗体を使用した。各アッセイにおいて control IgG と抗 FLRT2 抗体での有意な変化は認めなかった。

D. 考察

AECA は各種自己免疫疾患で検出され、疾患活動性との相関が報告されている。AECA 検出には cell ELISA が頻用されるが、細胞表面に対する自己抗体の検出としては FACS による検出が有用であると考えられる。対応抗原同定に対するプロテオミクス解析の難点として、膜蛋白対応の可溶化やゲル間の比較方法、スポット選択法など種々の要因が挙げられる。retrovirus vector expression cloning system でも良質の cDNA 作成、希少細胞集団の FACS sorting などの技術的困難性が想定されたが、いずれも適切に対応できるものと考えられた。以上より retrovirus vector expression cloning system はプロテオミクス解析では困難であったと考えられる膜蛋白自己抗原の同定に有用である。

抗 FLRT2 抗体の高力価陽性は SLE に特異的であり、AECA が高率に陽性を示す炎症性筋疾患や高安動脈炎では抗 FLRT2 抗体は検出されないことより、AECA の対応抗原は各疾患や病態毎に異なって存在するものと考えられた。小・中型血管炎で抗 FLRT2 抗体の低値陽性を認めており、SLE を含め、抗 FLRT2 抗体がこれら小・中型血管炎へ関連する可能性が推測された。

SLE における抗 FLRT2 抗体陽性患者の有意な臨床的差異は漿膜炎が少なく、抗 RNP 抗体高率陽性であった。SLE は多彩な臨床徴候を示すため、検討事項を細分化することにより、AECA の特徴を決定づけることができる可能性はあるものと考えられ

る。抗 dsDNA 抗体や補体価と相関関係を認めないことから、SLE 全体の活動性との相関は低いものと考えられる。

膜蛋白である FLRT2 の生理機能はあまり明確となっていない。細胞接着や cell sorting、fibroblast growth factor receptor (FGFR) との相互作用の可能性が指摘されており、FLRT2 単独または FGFR を介したシグナル伝達が行われる可能性がある。市販の抗 FLRT2 抗体を用いた検討では、HUVEC に対する有意な機能的活性を実証することはできなかったが、抗体自体の差異も考えられるため、患者血清由来の抗 FLRT2 抗体を用いた検討が必要であると考えられる。

E. 結論

我々は AECA の膜蛋白対応抗原を同定すべく retrovirus vector expression cloning system を構築した。ループス腎炎患者血清を用いた検討により、SLE における AECA の対応抗原として膜蛋白 FLRT2 を同定した。抗 FLRT2 高力価陽性は SLE に特異的であった。この方法を用いて種々の病態での膜蛋白対応抗原同定を行うことで、自己抗体による新たな血管炎の分類や病態形成能、新規治療介入分子の解明につながることを期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okuzaki T, Fukushima T, Tougan T, Ishii T, Kobayashi S, Yoshizaki K, Akita T, Nojima H. GenopalTM: A Novel Hollow Fibre Array for Focused Microarray Analysis. DNA RESEARCH 17:369-79 2010.
2. Watanabe R, Ishii T, Harigae H. Churg-strauss syndrome with exophthalmos and orbital bone destruction. Intern Med 49:1263-4, 2010.
3. Watanabe R, Ishii T, Harigae H. Severe pharyngeal edema in systemic lupus erythematosus. Intern Med 49:1263-4, 2010.
4. Watanabe R, Shirai T, Tajima Y, Ohguchi H, Onishi Y,

Fujii H, Takasawa N, Ishii T, Harigae H. Pregnancy-associated thrombotic thrombocytopenic purpura with anti-centromere antibody-positive Raynaud's Syndrome. Intern Med 49:1229-32, 2010.

5. Shirai T, Hirabayashi Y, Watanabe R, Tajima Y, Fujii H, Takasawa N, Ishii T, Harigae H. The use of tacrolimus for recurrent lupus enteritis: a case report. J Med Case Reports 24: 150, 2010.

6. Irie E, Shirota Y, Suzuki C, Tajima Y, Ishizawa K, Kameoka J, Harigae H, Ishii T. Severe hypogammaglobulinemia persisting for 6 years after treatment with rituximab combined chemotherapy due to arrest of B lymphocyte differentiation together with alteration of T lymphocyte homeostasis. Int J Hematol 91:501-8, 2010.

7. Hirabayashi Y, Oka Y, Ikeda T, Fujii H, Ishii T, Sasaki T, Harigae H. The endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, is a potential triggering antigen for anti-DNA response. J Immunol. 184: 3276-83, 2010.

8. Hirabayashi Y, Ishii T. Clinical efficacy of tocilizumab in patients with active rheumatoid arthritis in real clinical practice. Rheumatol Int 30: 1041-8, 2010.

9. 渡部龍, 石井智徳, 張替秀郎.

当科における Churg-Strauss 症候群 12 例の臨床病理学的検討. 臨床リウマチ in press 2011.

10. 渡部龍, 石井智徳, 張替秀郎.

肺高血圧症の臨床における最新薬物治療 膠原病専門医が診る肺高血圧症 ボセンタンと免疫抑制療法が奏功した原発性シェーグレン症候群にともなう肺動脈性肺高血圧症の 1 例

モダンフィジシャン臨時増刊 30: 66-68, 2010.

11. 田島結実, 工藤正孝, 村上治, 森本玲, 石井智徳, 宇留野晃, 菅原明, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉
SLE に合併した自己免疫性下垂体炎の 2 例
ACTH related peptides vol.21 p113-116

2. 学会発表

1. 田島結実, 工藤正孝, 村上治, 森本玲, 石井智徳, 宇留野晃, 菅原明, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉
SLE に合併した自己免疫性下垂体炎の 2 例

第21回 間脳・下垂体・副腎系研究会 (旧:CRH・ACTH研究会) 2010

2. 田島結実、渡部龍、白井剛志、藤井博司、高澤徳彦、石井智徳、張替秀郎

当院における SLE 合併肺高血圧症 10 例の臨床的検討

第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010

3. 渡部龍、石井智徳

当科における Churg-Strauss 症候群 12 例の臨床病理学的検討

第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010

4. 白井剛志、石井智徳

多量腹水、下腿浮腫、血小板低下を呈した血栓性微小血管障害症(TMA)の一例

第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010

5. 白井剛志、石井智徳

当科膠原病診療における PR3-ANCA 陽性患者の検討

第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010

6. 渡部龍、石井智徳

当科における Churg-Strauss 症候群 12 例の臨床病理学的検討

日本末梢神経学会 2010

7. 渡部龍、石井智徳

SLE における HBs 抗体及び HBe 抗体の保有率および免疫抑制療法の安全性～当科における 248 例の検討

第 20 回日本リウマチ学会 北海道・東北支部学術集会 2010

8. 白井剛志、石井智徳

非結核性抗酸菌感染症による皮膚瘻孔を合併した Wegener 肉芽腫症の一例

第 24 回日本臨床リウマチ学会 2009

9. Tajima Y, Ishii T et al

The role of angiotensin II on human lymphocytes
International Symposium on Aldosterone and Related Substances in Hypertension 2010

10. Tajima Y, Ishii T et al

The role of angiotensin on human lymphocytes
14th International Congress of Immunology 2010

11. Shirai T, Fujii H, Ono M, Ishii T, Watanabe R, Tajima Y, Takasawa N, Harigae H. Retrovirus vector system identified fibronectin leucine-rich transmembrane 2 (FLRT2) as a novel cell surface

autoantigen against anti-endothelial cell antibodies in lupus. Fourth International Conference on "B cells and Autoimmunity" 19th - 21st August, 2010

3.書籍

張替秀郎、石井智徳

炎症、アレルギー疾患 上月正博編

薬・栄養・運動の知識 内部障害のケアのため
南江堂 200-211 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

自己免疫疾患、リウマチ疾患における interleukin 33 / ST2L システムの役割

研究分担者 岡崎 仁昭 自治医科大学医学教育センター・内科学講座アレルギー膠原病部門 教授

研究要旨 マクロファージにおける、interleukin 33 (IL-33) / ST2L による炎症促進と ST2 による炎症抑制が確認され、IL-33 / ST2L がアレルギー疾患のみならず様々な疾患へ関連することが推測された。IL-33 / ST2L は関節リウマチ、全身性エリテマトーデスの疾患活動期に発現が亢進しており、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 interleukin 1 (IL-1) 受容体ファミリーに属するタンパク質の一つで、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、IL-33 が ST2L のリガンドであることが報告され、IL-33 / ST2L システム（炎症促進）と分泌型 ST2（炎症抑制）との役割が、基礎的な研究により明らかになってきた。IL-33 / ST2L システムはアレルギー疾患との関連が当初より注目され、Th2 細胞、好酸球、好塩基球、肥満細胞における特異性が強調されていたが、我々はマクロファージ（MΦ）との関連に着目して研究を行った。また、患者検体を用いて、IL-33 / ST2L の臨床的意義を解明することを試みた。

B. 研究方法

マウスの腹腔内に thioglycollate (TG) または IL-33 を投与して得られた滲出性 MΦ を用いて、IL-33 / ST2L によるサイトカイン産生と可溶性デコイ受容体 ST2 による抗炎症作用とを、FACS、ELISA、realtime PCR、western blotting などで解析した。

関節リウマチ (RA)、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者を中心に、血清・関節液中の IL-33 濃度や、末梢血単核球 (PBMC)、関節液中の細胞における ST2L の発現を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究に関しては、平成 20 年 8 月までに自治医科大学疫学研究倫理審査委員会および実験医学センター運営委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

MΦ において、IL-33 / ST2L を介した MAPK、NFκB の活性、IL-6、TNFα などのサイトカイン産生、ST2 による IL-33 シグナルの抑制を確認した。また、IL-33 誘導 MΦ における M2 表現型へのシフトを確認した。

RA 患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) において IL-1β、TNFα による IL-33 mRNA、タンパク質の発現を認めた。RA 血清と関節液との比較では後者でより高値を示しており、罹患関節数、腫脹関節数が多い症例で IL-33 濃度が高値を示した。また、活動期 SLE においても血清 IL-33 濃度が軽度ながら上昇する症例が存在した。RA では関節液中の細胞における ST2L の発現を認めた。SLE では RA に比較して PBMC での ST2L 発現が高い可能性が示唆された。

D. 考察

我々が報告した MΦ だけでなく、近年、血管内皮細胞、好中球および破骨細胞における IL-33 / ST2L 活性が報告されており、

IL-33 / ST2L は広範な免疫応答に関与していることが予測された。RA では主として罹患関節に、SLE では全身性に IL-33 / ST2L 活性の影響を受けることが予測された。

E. 結論

MΦにおける IL-33 / ST2L による炎症促進と ST2 による炎症抑制が確認された。

IL-33 / ST2L は RA、SLE の疾患活動期に発現が亢進しており、病態への関連が示唆された。

F. 健康危機情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuyama, Y., Nagashima, T., Honne, K., Kamata, Y., Iwamoto, M., Okazaki, H., Sato, K., Ozawa, K., Minota, S. Successful treatment of a patient with rheumatoid arthritis and IgA-kappa multiple myeloma with tocilizumab. Intern. Med. (in press).

2. 学会発表

1. 松山泰、岡崎仁昭、木村洋貴、永谷勝也、釜田康行、長嶋孝夫、岩本雅弘、吉尾卓、簗田清次。リウマチ血清および関節液での IL-33 測定系の確立と疾患活動性との相関・第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、2010 年 4 月 24 日。(抄録集 P533, 2010)

2. 松山泰、岡崎仁昭、為本浩至、富永眞一、簗田清次。自己免疫疾患における血清 IL-33、ST2 濃度の変化・第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会、京都、2010 年 5 月 8 日。(会誌 59 ; 432, 2010) (ポスター大賞受賞)

3. Matsuyama, Y., Okazaki, H., Hoshino, M., Ohnishi, S., Iwamoto, M., Ozaki, H., Tamemoto, H., Tominaga, S., Minota, S.

Elevated serum IL-33 levels in patients with refractory rheumatoid arthritis to anti-TNF therapy. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan, August 24, 2010. (抄録集 P98, 2010)

4. Matsuyama, Y., Okazaki, H., Hoshino, T., Onishi, S., Ohto-Ozaki, H., Tamemoto, H., Tominaga, S., Minota, S. Sustained elevation of interleukin-33 in serum and synovial fluid is associated with a poor response of rheumatoid arthritis to anti-tumor necrosis factor therapy. 第 83 回日本生化学会大会、神戸、2010 年 12 月 9 日。(抄録集 P365, 2010)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
研究分担報告書

M3R を分子標的とした自己免疫性唾液腺炎に関する研究

研究分担者 住田 孝之 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授
研究協力者 飯塚 麻菜、坪井 洋人、松尾 直美、中村 友美、松本 功
筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学

研究要旨 シェーグレン症候群(SS)患者血清中にムスカリン作働性アセチルコリン受容体 3(M3R)に対する自己抗体が存在すること、末梢血単核球に M3R 反応性 CD4+T 細胞が存在することを明らかにしてきた。本研究では、M3R 分子に対する免疫応答が自己免疫性唾液腺炎発症を誘導するか否かを検討する事を目的とした。M3R-/-マウスに M3R ペプチドを免疫しその脾細胞を Rag-1-/-マウスに経静脈的に細胞移入した。その結果、1) M3R-/-→Rag-1-/-マウスにおいて唾液腺炎が認められた、2)M3R 反応性 T 細胞により唾液腺炎が誘導された、3)唾液腺に INF- γ および IL-17 発現が認められ、M3R 反応性 T 細胞から IFN- γ および IL-17 が有意に産生されていた。4) M3R-/-xIFN- γ -/-→Rag-1-/-マウスでは唾液腺炎スコアが有意に低下していた。一方、M3R 反応性 T 細胞からの IL-17 は有意に増加していた。5) M3R-/-xIL-17-/-→Rag-1-/-マウスに関しては解析中。6) ROR γ t トランスジェニックマウスにおいて、唾液腺炎と涙腺炎が自然発症し、IL-17 産生 M3R 反応性 T 細胞、抗 M3R 抗体が検出されたこと、などを明らかにしてきた。以上の研究成果から、M3R を認識する T 細胞が SS 類似の自己免疫性唾液腺炎発症に重要であることが判明した。今後、M3R の T 細胞エピトープを決定しアナログペプチドによる自己免疫性唾液腺炎の抗原特異的制御法を開発する。

A. 研究目的

免疫難病の一つであるシェーグレン症候群(SS)の発症機序に、唾液腺に浸潤した自己反応性 T 細胞が重要な役割を果たしている。特に、ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 M3 (M3R) に対する T 細胞は唾液腺破壊に関わるばかりでなく、サイトカイン産生を介して抗 M3R 自己抗体を誘導している。本研究では、M3R 分子を標的とした免疫応答がシェーグレン症候群様の自己免疫性唾液腺炎を誘導するか否かを検討する事を目的とした。

B. 研究方法

1) M3R-/-マウス(B6 バック)に、M3R の各領域をコードした合成アミノ酸、N 領域(67AA)、細胞外第一ドメイン(17AA)、細胞外第二ドメイン(25AA)、細胞外第三ドメイン(14AA)を合成して day0 および day10 に腹腔内に免疫した。初回免疫 20 日後の脾細胞を Rag1-/-マウス (B6 バック)に経静脈的に投与した。M3R-/-→Rag-1-/-マウスから day45 に唾液腺を取り出し H-E 染色により組織学的解析、さらに、抗体 (Thy-1, B220, CD4, CD8, IgG) を用いて免疫組織化学的解析を施行した。2)M3R-/-マウスより採取した脾細胞を flowcytometry で CD3+細胞と CD3-細胞とに分離し、それぞれを Rag-1-/-マウスに細胞移入して唾液腺炎の有無について検討した。3)M3R-/-→Rag-1-/-マウスの唾液腺における INF- γ 、IL-17 発現を IF で検討した。さらに in vitro

で M3R ペプチドと共培養して産生サイトカインを ELISA 法で測定した。4)M3R-/-xIFN- γ -/-→Rag-1-/-マウスにおいて唾液腺組織の解析、および M3R 反応 T 細胞からの IFN- γ 、IL-17 産生を検討した。5)現在、M3R-/-xIL-17-/-→Rag-1-/-マウスにおいて唾液腺炎を解析した。6)ROR γ t トランスジェニックマウスにおける唾液腺炎の組織学解析、M3R 反応性 T 細胞からのサイトカイン産生を解析した。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体を使用する際には、大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者さんにインフォームド・コンセントを施行し、十分に研究内容を理解してもらい、本人の同意を得た上で研究を実行した。マウスの実験においては疼痛を与えないために麻酔科で対処した。

C. 研究結果

1)単核球を主体とした細胞浸潤、唾液腺腺房の破壊が認められた。浸潤細胞の多くは、Thy-1+CD4+T 細胞であり、一部に B 細胞浸潤および IgG の沈着が認められた。2)CD3+細胞を単独移入したマウスにおいて有意な唾液腺炎が認められたが、CD3-細胞のみの細胞移入マウスでは唾液腺炎は認められなかった。3)唾液腺に INF- γ および IL-17 発現が認められ、M3R 反応性 T 細胞から IFN- γ および IL-17 が有意

に産生されていた。4) M3R-/-xIFN- γ -/-Rag-1-/-マウスでは唾液腺炎スコアが有意に低下していた。一方、M3R反応性T細胞からのIL-17は有意に増加していた。5) M3R-/-xIL-17-/-Rag-1-/-マウスに関しては解析中。6) ROR γ tトランスジェニックマウスにおいて、唾液腺炎と涙腺炎が自然発症していた。IL-17産生M3R反応性T細胞の存在、抗M3R抗体が検出された。

D. 考察と結論

M3R-/-とRag-1-/-の二つのノックアウトマウスを使用することにより、シェーグレン症候群様の自己免疫性唾液腺炎を惹起する事に成功した。M3R分子に対するT細胞応答は自己免疫性唾液腺炎発症に必須であり、INF- γ およびIL-17の両方がその発症に関わっている事が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Horikoshi, M., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. NK1.1+ gdT cells attenuates IL-18 plus IL-2-induced murine interstitial lung disease. *Am. J. Res. Cell. Mol. Biol.* (in press)
2. Hikami, K., Kawasaki, A., Koga, M., Ito, S., Hayashi, T., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Kusaoi, M., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Arinami, T., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of a functional polymorphism in the 3' untranslated region of SP11 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* (in press)
3. Kawasaki, A., Ito, S., Furukawa, H., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ohashi, J., Graham, R.R., Matsuta, K., Behrens, T.W., Tohma, S., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study. *Arthritis Reas. Ther.* 2010 Sep 17;12(5):R174. [Epub ahead of print]
4. Iizuka, M., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Tsuboi, H., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive immune response induces Sjogren's syndrome-like sialoadenitis. *J. Autoimmunity* 35: 383-389, 2010.
5. Shen, N., Fu, Q., Deng, Y., Qian, X., Zhao, J., Kaufman, K.M., Tang, Y., Chen, J-Y, Yang, W., Wong, M., Kawasaki, A., Tsuchiya,

N., Sumida, T., Kawaguchi, Y., Yum C-Y, Takasaki, Y., Hashimoto, H., Harley, J.B., Guthridge, J.M., Grossman, J.M., Cantor, R.M., Song, Y.W., Bae, S., Cehn, S, Hahn, B.H., Lau, Y.L., and Tsao, B.P. Gender specific association of X-linked TLR7 with male systemic lypus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10715838-43, 2010.

6. Tsuboi, H., Matumoto, I., Wakamatsu, E., Iizuka, M., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. The new epitopes of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 162:53-61,2010.

7. Sumida, T., Tsuboi, H., Iizuka, M., Nakamura, Y., and Matsumoto, I. Functionla role of M3 muscarinic acetylcholine receptor (m3R) reactive T cells and anti-M3R autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Autoimmunity Reviews* 9:615-617,2010.

8. Tashiro, T., Nakagawa, R., Inoue, S., Omori-Miyake, M., Chiba, T., FUjii, S-I, Shimizu, K., Mori, K., Yoshiga, Y., Sumida, T., Watarai, H., and Taniguchi, M. Induction of Th1-biased cytokine production by a-carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for natural killer T cells. *Int. Immunol.* 22:319-28. Epub 2010 Feb 24.

9. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Ito, S., and Sumida, T. Inhibition of TGF-b signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease. *Clin. Exp. Immunol.* 160: 394-402. Epub 2010 Jan 19.

10. Chen, Q., Lamphier, M., Muramoto, K., Ding, Y., Ynag, H., Mackey, M., Li, W., Liu, D., Inoue, Y., Massaki, N., Patel, T., Groom, A., Reynolds, D., Perron, S., Shiota, H., Matsumoto, I., Sumida, T., Spyvee, M., Schiller, S., ZGusovsky, F., and Marc, K. Prostaglandin E2 stimulation of EP4 promotes Th1 differentiation and Th17 expansion and is critical for autoimmune disease. *Br. J. Pharmacol.* 160: 292-310, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
申請準備中
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

図1 M3R^{-/-}→Rag1^{-/-}マウスにおける唾液腺組織 (H-E 染色)

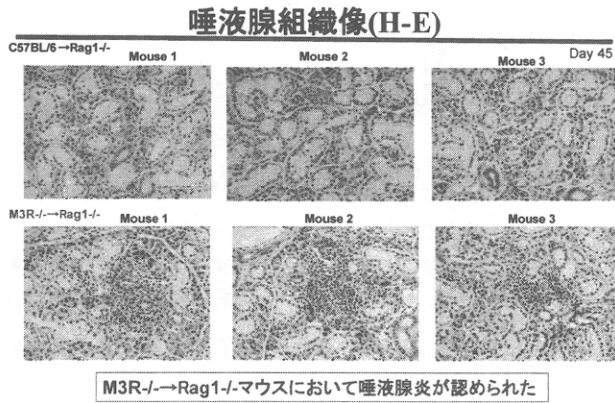


図2 M3R^{-/-}→Rag1^{-/-}マウス唾液腺組織の免疫化学染色像

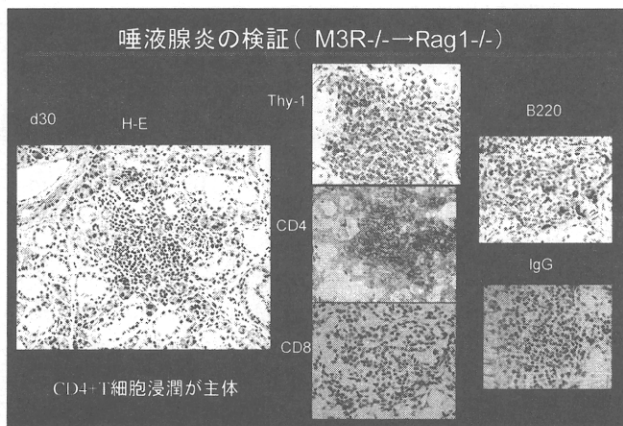


図3 M3R^{-/-}→Rag1^{-/-}マウス唾液腺組織における IL-17、IFN- γ 発現

IFN- γ および IL-17が自己免疫性唾液腺炎に認められる

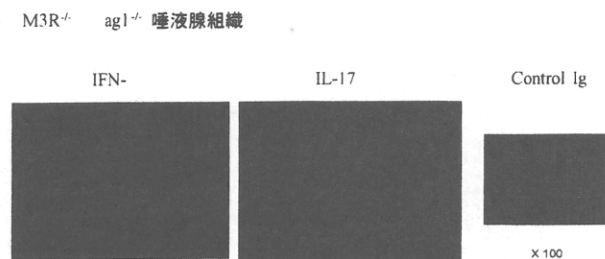


図4 M3R^{-/-}→IFN- γ マウスにおける唾液腺組織 (H-E 染色) およびM3R 反応性T細胞からの サイトカイン産生

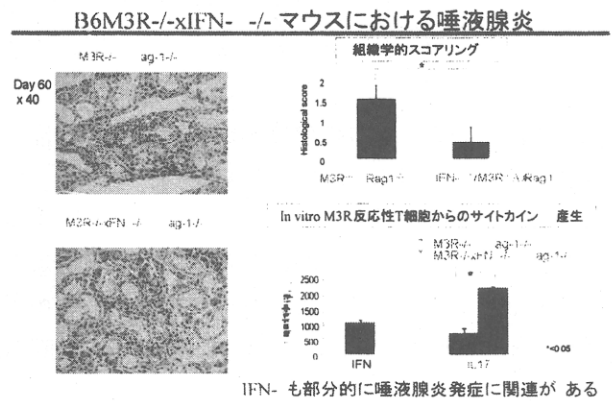


図5 M3R^{-/-}→CD3⁺→Rag1^{-/-}マウスにおける唾液腺 組織像 (H-E 染色、免疫化学染色、Tunel 染色)

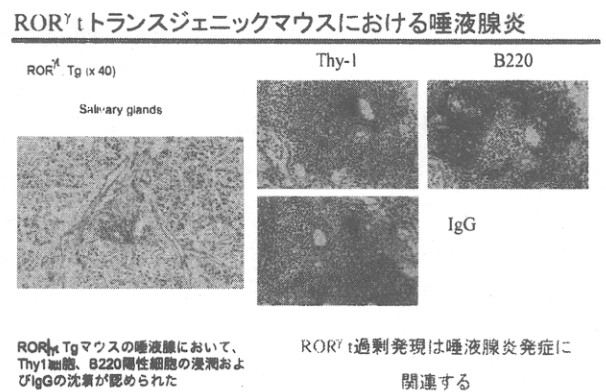
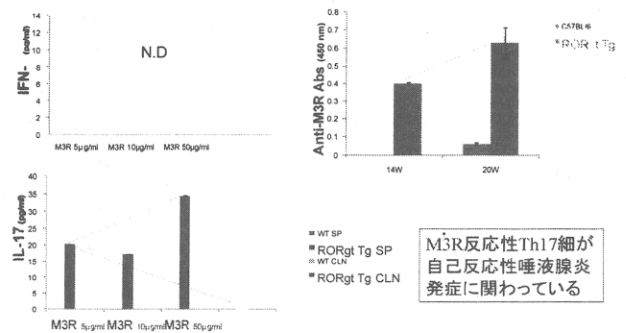


図6 ROR γ t 転写因子マウスにおいて IL-17 産生 M3R 反応性T細胞および抗 M3R 抗体が 検出された。

ROR γ tTgにおいてM3R反応性T細胞および抗M3R抗体が検出



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

リウマチ性疾患に伴う腎障害におけるポドサイト障害の研究

研究分担者 三村 俊英 埼玉医科大学病院リウマチ膠原病科 教授
研究協力者 梶山 浩 埼玉医科大学病院リウマチ膠原病科 助教

研究要旨 近年、進行性腎障害における関与が注目されている腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）の障害による自己免疫疾患関連腎障害を明らかにするため、培養マウスポドサイトによる基礎的実験、患者尿中ポドサイト、および尿中ポドカリクシン濃度など臨床検体を求めて解析した。androgen receptor mRNA の発現量は障害マウスポドサイトにおいて増加していた。また IL-17 添加によりポドサイト障害が抑制された。全身性エリテマトーデスの腎障害の有無によって、尿中ポドサイト数には有意差が見られた。以上のことから、ポドサイトの新たな biology および pathology が明らかになり、疾患との関係が示唆された。

A. 研究目的

腎糸球体臓側上皮細胞ポドサイト (pod) 障害は病的蛋白尿、腎機能低下の原因になる。一方、免疫学的ストレスによる膠原病での pod 障害機序は不明な点が多く、且つ、最近の腎硬化症に関連する MYH9、APOL1 susceptible allele の一連の研究報告から、免疫学的ストレスによる pod 障害機序は高血圧や糖尿病によるものと異なる可能性が推測される。

本研究ではリウマチ性疾患で出現する腎障害機序解明のため、基礎実験的手法、臨床疫学的手法を用いて pod 障害を解析する。

B. 研究方法

最近我々が樹立したマウス pod 細胞株を用いて、cDNA microarray を昨年行い遺伝子発現解析を行った。また障害ポドサイトおよび正常ポドサイトにおける、サイトカインによる刺激実験を行った。ループ腎炎(LN)や顕微鏡的多発血管炎(MPA)、強皮症(SSc)、関節リウマチ(RA)で腎症のある患者、腎症のない患者に於いて、経時的に尿中 pod 数(U-pod)、尿中ポドカリクシン/尿中クレアチニン比(U-PCX/U-Cr)を測定し、腎症と pod 障害の関連を解析した。

(倫理面への配慮)

全ての研究は、学内倫理委員会および病院 institutional review board (IRB)にて承認を受け、患者サンプルを用いる場合には事前に文書および口

頭にて説明した上で患者自由意志にて同意を得ている。

C. 研究結果

cDNA microarray 実験で、障害マウス pod で androgen receptor (AR) mRNA 発現が 2.4-4.8 倍亢進していた。正常培養マウス pod、障害培養マウス pod から別途 cDNA を調整、SYBR Green-based qPCR で、障害 pod で正常マウス pod に比べ AR の mRNA 発現が 30 倍亢進していた事を確認した。

マウス培養 pod での IL17RA, IL17RC の mRNA 発現は確認できたため、培養マウス pod IL17 刺激実験を行ったところ、1-100ng/mL の mouse recombinant IL17 で、ウイルス蛋白による pod 細胞死が抑制され、正常 pod においては、高濃度の IL17 で増殖する傾向がみられた。

尿中 pod 関連バイオマーカーの検討では、患者登録数は現在、SLE で腎症(-)が 10 例、腎症(+)が 11 例、MPA が腎症(-) 2 例、腎症(+)が 4 例、強皮症で腎症(+) 2 例、RA で腎症(+)が 10 例。全疾患をまとめた検討では、U-pod は、腎症(+)群で有意に高値であった(Mann-Whitney P=0.01) (図 1)。U-PCX/U-Cr は、腎症(+)で高い傾向があったが、2 群間に有意差は無かった。同一症例で時間経過を追って検討すると、腎症の改善に伴い、U-pod が早く改善し、U-PCX/U-Cr が早く改善する傾向があった。

D. 考察

AR が pod 障害分子機序に関与する可能性がある。LN, MPA の腎生検標本で、AR の蛋白発現を今後確認する。IL17 が糸球体上皮増殖性疾患に関与する可能性が示され、詳細を検討中である。尿中バイオマーカーに関しては、現存する腎障害との関連のみならず、腎機能予後との検討を行う目的に、更に検討期間を延長し、症例数を増やし検討する予定である。

E. 結論

培養 pod を用いた基礎的な検討と、尿中 pod バイオマーカーによる臨床研究は、リウマチ性疾患に於ける pod 障害の機序の解明に有用である。

F. 健康危機情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kazuhiro Yokota, Fumihiko Miyoshi, Kojiro Sato, Yu Asanuma, Yuji Akiyama and Toshihide Mimura. Geranylgeranyl-pyrophosphate Regulates Secretion of Pentraxin 3 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 from Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes in Distinct Manners. Clin. & Experiment. Rheumatol. In print

2. Tanaka J, Oda H, Mimura T, Honda C, Oohara H, Kawasaki H, Kondo A, Wada Y. Innovative radiographic system to improve the sharpness of radiographs: could a phase-shift effect contribute to improved image-quality for plain computed radiographs for general use? Jpn J Radiol. 28:79-85, 2010.

2. 学会発表

1. 梶山浩、山本晃範、太田宗夫、島田祐樹、坂本真裕子、吉田佳弘、中嶋京一、佐藤浩二郎、浅沼ゆう、秋山雄次、三村俊英. リウマチ性疾患の腎障害における尿中ポドサイト数及び尿中ポドサイトマーカーの検討. Modern Rheumatol. 20 S354, 2010 (日本リウマチ学会総会、神戸、2010)

2. 梶山 浩、坂入 徹、阿部 祥英、Kopp Jeffrey、

三村 俊英. Lifeact-mEGFPによる培養マウスポドサイトの actin live imaging. Clinical Experimental Nephrol.14 S275, 2010 (日本腎臓学会総会、神戸、2010)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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. 尿中 podocyte と腎障害の有無

