

SLE 難治性病態に対する新規治療法の臨床開発・評価に関する研究
—無治療、初発、活動期 SLE 末梢血単核球の網羅的発現解析—

研究分担者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授

研究協力者 吉本桂子 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 研究員

研究要旨 SLE の全身性難治性病態形成に関与する末梢血リンパ球の役割を明らかにする事を目的として、無治療活動期 SLE 症例の末梢血より、各リンパ球細胞サブセットを分離し、それら組織群の RNA 網羅的発現解析を施行し、I 型インターフェロンをはじめとする興味深い分子群の発現異常を明らかにした。

A. 研究目的

SLE の全身性難治性病態形成に関与する末梢血リンパ球の役割を明らかにする事を目的として、初発、無治療、活動性、症例に焦点を当て、末梢血から CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、CD19+B 細胞、CD14+単球を分離し、各細胞分画に発現される

B. 研究方法

1) 対象：初発、無治療、活動性 SLE 3 例（症例 1：19 歳女性、ループス腎炎 WHOIII+CNS ループス+ループス腹膜炎、殊鈴 2：29 歳女性、ループス腎炎 WHOII+多発関節炎、症例 3：75 歳男性、CNS ループス+胸膜炎）

2) 各細胞分画の分離：Ficoll-Hypaque 法によって末梢血より単核球を分離し、引き続いて、FACS Aria で、CD3+CD4+T 細胞、CD3+CD8+T 細胞、CD19+B 細胞、CD14+単球を分離。

3) mRNA 発現解析：各細胞分画から RNA を抽出し、cDNA に変換後、Affimetrix Human Genome U133 plus2.0 アレイを用いて、健常人 6 名のコントロールに対する変動遺伝子を抽出する。

C. 研究結果

1) 細胞分離：SLE 3 症例から、CD4+T 細胞 $5.0\sim 9.4\times 10^5$ 、CD8+T 細胞 $4.0\sim 8.6\times 10^5$ 、CD19+B 細胞 $2.9\sim 6.5\times 10^5$ 、CD14+単球 $2.0\sim 7.2\times 10^5$ と十分量を回収し、その純度はいずれも 95%以上であった（図 1）。

2) mRNA 発現：発現亢進している遺伝子群は、全細胞サブセットで I 型インターフェロン関連遺伝

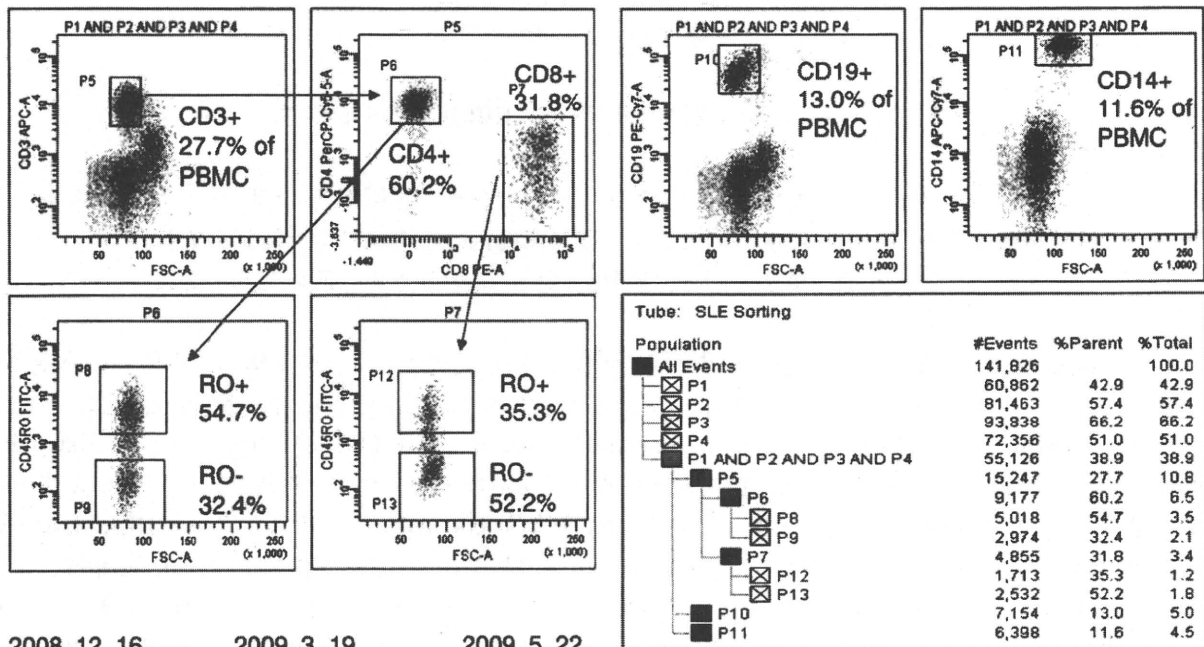
子 (IFI27, ISG15, IFIT1, IFIT4, OAS1, IRF4, Mx1, etc) が検出された。CD4+T, CD8+T, CD19+B 細胞で発現亢進しているものとして IL-8, CD4+T, CD8+T 細胞で LY-6E, EGR2, CD38, TNF-alpha, IFN-gamma, CD4+T 細胞で、IL-22, FCRH3, IL-12RB2, PBEF, CD8+T 細胞で b-glucan receptor, CD70, LAG3, truncated ZAP70, ZAP70, CD19+B 細胞で thrombospondin 1, C5R1, MCP-1, CD36, GRO3, TLR8, CD14+単球では、thrombomodulin, coagulation factor III, endothelin 1, integrin p150/95, FcGRT, GRO3, integrin-beta7, IL-1R1 が抽出された。一方、発現低下するものとして、TCR-delta, CD94, NKG-2D, KLRF-1, Granulysin など gd-T 細胞、NK 細胞関連のものが抽出された。

D. 考察/結論

無治療、活動期 SLE 症例の末梢血リンパ球には、各細胞分画に特徴的なもの、全細胞に及ぶものなど、このスクリーニングで興味深い遺伝子群の発現が明らかになった。mRNA 発現量の詳細な解析、蛋白発現・機能解析などを通して、病態形成に関与する責任分子の同定につながる事が期待される。

F. 健康危機情報

特になし



2008. 12. 16.	2009. 3. 19.	2009. 5. 22.
Recovered Cell #	Recovered Cell #	Recovered Cell#
CD4+: 5.0x10 ⁵	CD4+: 9.4x10 ⁵	CD4+: 9.2x10 ⁵
CD8+: 8.6x10 ⁵	CD8+: 4.0x10 ⁵	CD8+: 5.2x10 ⁵
CD19+: 6.5x10 ⁵	CD19+: 2.9x10 ⁵	CD19+: 6.5x10 ⁵
CD14+: 5.0x10 ⁵	CD14+: 2.0x10 ⁶	CD14+: 7.2x10 ⁵

図1：3例の無治療活動期SLE患者の末梢血単核球からFACSAを用いてCD4+T細胞、CD8+T細胞、CD19+B細胞、CD14+単球を分離した。その収量は、5x10⁵~2.9x10⁶であった。各細部群についてAffymetrix Human Genome133を用いて網羅的発現解析を行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ogawa H, Kameda H, Amano K, and Takeuchi T. Efficacy and safety of cyclosporine A in patients with refractory systemic lupus erythematosus in a daily clinical practice. *Lupus* 19:162-169, 2010.
- Suzuki K, Tamaru J, Okuyama A, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Nishi, E, Yoshimoto K, Setoyama Y, Kaneko K, Osada H, Honda N, Yasaki Y, Itoyama S, Tsuzaka K, and Takeuchi T. IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome manifesting as chronic symmetrical sclerosing dacryo-sialo-adenitis with subsequent secondary portal hypertension and remarkable IgG4-linked IL-4 elevation. *Rheumatology*, 49:1789-91, 2010.
- Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takeii H, Nishi E, Okuyama A, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Single center prospective study of tacrolimus efficacy and safety in the treatment of various manifestations in

systemic lupus erythematosus. *Rheumatology Int*, in press.

- Yoshimoto K, Setoyama Y, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Reduced expression of TCR zeta is involved in the abnormal production of cytokines by peripheral T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. in press.

2. 学会発表

なし

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

SLE における自己抗体標的の探索と抗 KIR 抗体の生物活性

研究分担者 三森 明夫 国立国際医療研究センター膠原病科 副院長
研究協力者 川田 英明 同センター研究所難治性疾患研究部 流動研究員、
高橋 裕子 同膠原病科 医員、石坂 幸人 同研究部 部長

研究要旨 random peptide display library 法で患者および健常血清と反応するペプチド構造を得て、所属蛋白名を同定するコンピュータアルゴリズム（BLAST 検索で患者選択的に頻出する蛋白名を選別する方法）を確立した。得られた候補のひとつ “killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR/CD158) -3DL1” の膜表出部分を発現させ抗原とした ELISA で、抗 KIR-3DL1 抗体の陽性率（健常血清ベースラインを越えた率）は SLE で 65%（26/40, 健常者 1/40）であった。次に、NK 細胞の抑制性受容体 KIR-3DL1 と、そのリガンド HLA-classI-Bw4 の相互作用に対する、患者血清 IgG 分画による阻害作用を調べた。ヒト KIR 欠損 721.221 NK 細胞株、HLA-class I 欠損 jurkat 細胞株（NK の標的として使用）に、それぞれ KIR-3DL1、Bw4 を遺伝子導入で発現させると、欠損細胞どおしでは NK が標的を“破壊”し、発現細胞どおしで“破壊抑制”、抗 KIR-3DL1 抗体陽性 IgG 分画の添加で“抑制解除”、対照 IgG 分画では“影響なし”が確認された。すなわち SLE 血清中に、生物活性をもちうる新規自己抗体（抗 KIR-3DL1 抗体）が同定できた。

A. 研究目的

SLE 患者における新規自己抗体の標的を同定し、診断と病態分類に役立てる。本年度は、我々が同定した抗 KIR 抗体について、SLE での出現頻度と生物活性を検定した。

B. 研究方法。

昨年度の報告書に記した方法（Random peptide display library）で患者& 健常対照の血清 IgG と反応するクローンを拾い、そのアミノ酸配列を同定した。それらの配列が属する蛋白名を、蛋白データベース BLAST 検索する。1 回の施行 500 クローンから相同性をもつ蛋白名約 20 万が得られた。患者に頻繁に出て対照に出ない蛋白名をコンピュータ抽出する algorithm で候補を絞る（偶然の相同が多い巨大蛋白、普遍配列が排除される）。次に、他の患者でも同様に行ない患者間に共通する蛋白名を得た。

候補名のひとつ killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR = CD158) のサブタイプ 3DL1 が、真の抗原かどうかを、組み替え蛋白を作製して患者血清で ELISA 検定した（2011 年 1 月班会議報告で 200 倍希釈血清の結果を呈示したが、1000 倍希釈で再検した結果を示す）。

上記の方法で同定した、抗 KIR-3DL1 抗体の in vitro 生物活性：NK 細胞の抑制性受容体である KIR

(3DL1) と、そのリガンドである HLA-classI (Bw4) の反応を、患者血清中の IgG 分画すなわち自己抗体（抗 KIR-3DL1 抗体）が遮断するかどうかを検定した。

（倫理的配慮）

本研究は、自施設倫理審査会（検体利用委員会）で承認された。

C. 研究結果

SLE における抗 KIR-3DL1 抗体の出現頻度：

上記 algorithm で、検討した 3 患者のすべてに頻繁に現れ、健常者で現れなかった蛋白名 killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)-3DL1 を得た。その cDNA の膜表出部分を 293FS 細胞で発現させ、Step-tag/Strep-Tactin system で精製した組み替え蛋白を抗原とする ELISA 系を確立した。健常者の ELISA 値 0.095 ± 0.042 (n=40) より、 $\text{mean} + 2\text{SD} = 0.18$ をカットオフ値とすると、SLE で陽性者 (>カットオフ値) の率は、26/40 (65%) と高率であった（図 1）。

SLE 血清は、疾患活動性、臓器病態分布を問わずランダムに収集した。現在の解析段階で、本自己抗体の陽性は、SLE 活動性と相関がみられない。

抗 KIR-3DL1 抗体の in vitro 生物活性：

1) ヒト KIR 欠損 721.221 NK 細胞株と、ヒト

HLA-class I 欠損 jurkat 細胞株を混合培養した。NK による標的 (jurkat) 破壊を、LDH アッセイキット (図 2) で検出した。

2) 721.221 NK 細胞株に KIR-3DL1 遺伝子を導入し、jurkat 細胞株に HLA-Bw4 遺伝子を導入し、発現を、Western blot で確認した。これらの発現細胞どおしで上記と同様の反応をみた。

3) 健常者 8 人、抗 KIR-2DL1 抗体陽性の SLE 8 人、同抗体陰性の SLE 3 人から、それぞれ血清 IgG 分画を抽出し、2) の実験系に加えた結果、KIR の class I 認識による、NK の標的破壊抑制が、抗 KIR-3DL1 抗体陽性の IgG 分画でのみ、解除された (図 3)。すなわち、同抗体が KIR による NK 細胞への抑制作用を解除することが確認された。

SLE における、KIR 以外の自己抗体標的候補：

本 algorithm を用いて、KIR と同等以上の頻度で患者選択的に現れる新規抗原候補は現在までに、免疫関連蛋白だけで 40 種以上得られた (本班 1/14 会議で供覧)。今後、それらの蛋白発現系で ELISA 検定を行なう。

D. 考察

従来、膠原病血清中の抗核抗体の標的エピトープ探索においてリニアペプチドが殆どみつからないことが知られている。実際、我々の本検索 (リニアペプチドから候補を捜す) 方法でも、抗 U1-RNP 抗体高値の血清と反応した候補蛋白の BLAST 検索一覧の中に、U1-RNP 名はみつからなかった。

一方、我々が別研究でみつけた抗 ACE2 抗体については、本検索法で ACE2 のリニアペプチドエピトープが 2 つ同定でき、同ペプチドが抗 ACE2 抗体価、ACE2 阻害効果の両方を吸収することを実証できた (投稿準備中)。

さらに、本報告の如く抗 KIR-3DL1 抗体を同定できた。抗 KIR-3DL1 抗体は、Matsui らの既報 (Arthritis Rheum 2001, 44:384-8) の抗 KIR-2DL1 および-2DL3 抗体と標的サブタイプが異なり、SLE での陽性率が高かった。陽性率の高い抗体が得られた理由のひとつは、「反応したペプチド構造を含む相同検索で、患者選択的に現れる蛋白名を求め、その中から複数の患者に共通した蛋白名を選ぶ」という方法にあり、偶然の同定ではないと考える。また in vitro 実験で、抗 KIR-3DL1 抗体は、NK 細胞の自己反応性を高める可能性が示された (投稿準備中)。KIR には 15 種

以上のサブタイプに加えアロタイプが知られている。本検索法で得た SLE 血清中の抗 KIR 抗体の標的候補では、日本人で保有頻度の高いサブタイプ名が頻出していた (データ示さず)。3DL1 は、それらの中のひとつである。

今後、KIR 以外の自己抗原候補をさらに確定する予定である。

E. 結論

SLE に出現する新規自己抗体、抗 KIR-3DL1 抗体を見出し、この抗体が NK 細胞の抑制性受容体の作用を in vitro で阻害することを示した。

“Random peptide display library + BLAST 検索 + 我々のコンピュータ algorithm” による自己抗体標的の探索法は、有効と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Muto G, Takahashi Y, Yamashita H, Mimori A. A patient with intravascular lymphoma presenting with cerebral infarction and a high serum MPO-ANCA level. Mod Rheumatol 2010 Oct 8 [Epub ahead of print]
2. Kobayashi M, Takahashi Y, Yamashita H, Kaneko H, Mimori A. Benefit and a possible risk of tocilizumab therapy for adult-onset Still's disease accompanied by macrophage-activation syndrome. Mod Rheumatol. 2010 Aug 26. [Epub ahead of print]
3. Okudaira N, Iijima K, Koyama T, Minemoto Y, Kano S, Mimori A, Ishizaka Y. Induction of long interspersed nucleotide element-1 (L1) retrotransposition by 6-formylindolo [3,2-b] carbazole (FICZ), a tryptophan photoproduct. Proc Natl Acad Sci USA. 107: 18487-92, 2010.
4. Testempassi E, Kubota K, Ito K, Morooka M, Ito K, Masuda-Miyata Y, Yamashita H, Itoh K, Mimori A, Kuroki H. Constrictive tuberculous pericarditis diagnosed using 18F-fluorodeoxy- glucose positron emission tomography: a report of two cases. Ann Nucl Med. 24(5):421-425, 2010
5. Takahashi Y, Haga S, Ishizaka Y, Mimori A. Autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. Arthritis Res Ther. 2010 12 (3) :R85.
6. Ito K, Kubota K, Morooka M, Hasuo K, Kuroki H, Mimori A. Clinical impact of 18F-FDG PET/CT on the

management and diagnosis of infectious spondylitis. Nucl Med Commun. 31(8):691-698, 2010

7. 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

和文誌

1. 上田洋、高橋裕子、山下裕之、金子礼志、三森明夫：ループス腎炎に対する免疫抑制治療中に発症し、ボセンタンが有効であった SLE 肺動脈性高血圧症の一例。日臨免会誌 2011（印刷中）
2. 高橋裕子、越智久さこ、柳井敦、山下裕之、伊藤健司、三森明夫：10 年間持続した活動性が Tocilizumab 治療で寛解した成人発症 Still 病の 1 例。日内会誌 99:130-132,2010

2.学会発表

国内

1-16. 第 54 日本リウマチ学会総会(13 題)、第 21 回日本リウマチ学会関東支部会(2 題)など計 16 題

海外

1. Takahashi Y, Yamashita H, Ueda Y, Yoshida Y, Kaneko H, Mimori A. Incidence of progressive

interstitial pneumonia in patients with rheumatoid arthritis. The 78th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Atlanta, Nov, 2010.

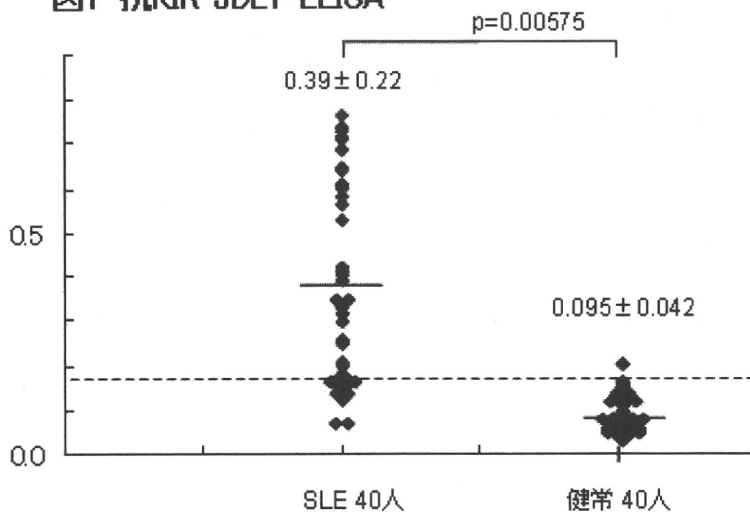
2. Yamashita H, Kubota K, Takahashi Y, Kaneko H, Mimori A. Enthesopathy detected by 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with polymyalgia rheumatica. The 78th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Atlanta, Nov, 2010.

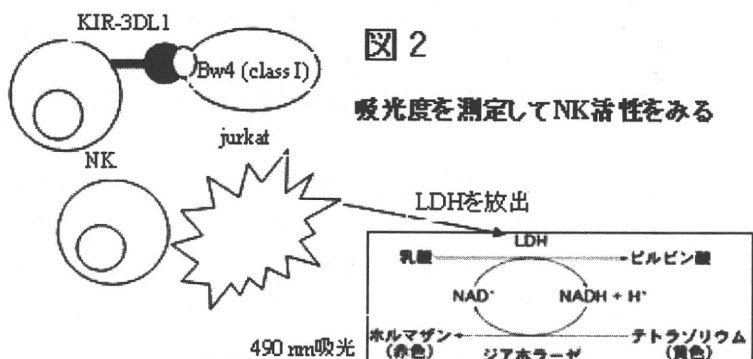
3. Yoshida Y, Takahashi Y, Yamashita H, Toshiki E, Ueda Y, Kobayashi M, Kaneko H, Mimori A. Different prognosis of Pneumocystis pneumonia in rheumatoid arthritis (RA) and non-RA patients. The 14th congress of asia pacific league of associations for rheumatology, Hong Kong, July, 2010.

H.知的財産権の出願・登録状況

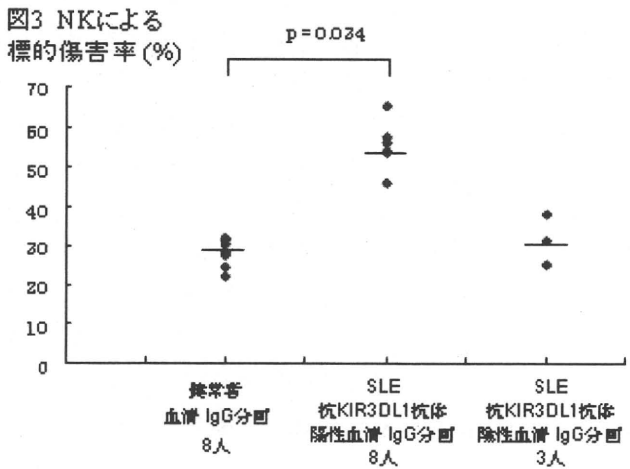
1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

図1 抗KIR-3DL1-ELISA





細胞破壊 → LDH放出 → 乳酸脱水素化によりピルビン酸とNADH生成 → NADH + ジアホラーゼがテトラゾリウムを還元 → ホルマザン色素を形成: LDH活性を490 nmの吸光度増大で測定する。



LDHアッセイ; 細胞傷害率(%) = $\frac{\text{実験値} - A}{B - A}$

A: jurkat細胞が自然放出する培養上清のLDH値
 B: jurkat細胞をTritonX100で完全破壊したときのLDH値

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 PL-12（アラニル tRNA 合成酵素）抗体の臨床的意義と免疫遺伝学的背景に関する研究

研究分担者 平形 道人 慶應義塾大学医学部医学教育統轄センター 准教授

研究要旨【目的】抗 PL-12 抗体は、代表的な筋炎特異自己抗体である抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体の一つであるが、本邦における同抗体と関連する臨床病態は不明である。本研究は、その臨床的意義と免疫遺伝学的背景を追究することを目的とした。【方法・結果】多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM/DM) を含む膠原病患者 16,000 例血清中、免疫沈降法により、抗 PL-12 抗体陽性 8 例が見出された。6 例が特発性間質性肺炎 (iILD)、2 例が限局型強皮症であった。iILD 1 例に CK 上昇を認めたが、筋力低下はなく、PM/DM と診断されなかった。間質性肺炎を全例に認めたが、その臨床経過は慢性型であった。多発関節炎、レイノー現象を各 5 例、発熱を 6 例に認めた。HLA クラス II の検討では、5 例 (63%) が DRB1*1501 -DQA1*0102-DQB1*0602 を持ち、健常人 (9%) に比し、高頻度であった ($p < 0.01$, OR 17.5)。【結論】抗 PL-12 抗体は、抗 KS 抗体と同様、多発関節炎などの肺外症状を持つ間質性肺炎と密接に関連し、その発症に免疫遺伝学的背景の関与が示唆された。

A. 研究目的

抗 Jo-1 抗体などの 8 種類の抗アミノアシル tRNA 合成酵素 (aminoacyl tRNA synthetase: ARS) 抗体は、筋炎特異自己抗体として見出され、筋炎、間質性肺炎 (ILD)、関節炎などとの密接な関連が報告され、その臨床的有用性が認められている。抗 PL-12 抗体はアラニル tRNA 合成酵素に対する自己抗体であるが、本邦における同抗体と関連する臨床病態は未だ不明である。本研究は、その臨床的意義と免疫遺伝学的背景を追究することを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象：多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM/DM)、全身性エリテマトーデス、強皮症、関節リウマチ、膠原病の診断基準を満たさない間質性肺炎 (iILD) など 16,000 例を対象とした。2) 自己抗体は、HeLa 細胞抽出物を用いた免疫沈降法により同定した。3) HLA クラス II 遺伝子は、患者末梢血白血球より抽出した genomic DNA を PCR-RFLP などを用い、検討した。4) 抗 PL-12 抗体陽性例の臨床特徴 (臨床症状・検査所見など)、免疫遺伝学的背景を検討した。
(倫理面への配慮)

すべての臨床試験はヘルシンキ宣言を遵守し、患者よりの検体採取に際しては倫理審査委員会の承認を得るとともに患者より文書同意を取得して行

うことを前提とする。

C. 研究結果

1) 8 例血清が tRNA^{ala} と 110kDa 蛋白を免疫沈降し、抗 PL-12 抗体陽性と同定された (図 1)。2) 診断は、6 例が特発性間質性肺炎 (iILD)、2 例が限局型強皮症であった。iILD 1 例に軽度の CK 上昇を認めたが、筋力低下はなく、PM/DM と診断されなかった (表 1)。3) 間質性肺炎を全例に認めたが、その臨床経過は慢性型であった (表 1)。4) 多発関節炎、レイノー現象を各 5 例 (63%)、発熱を 6 例 (75%) に認めた (表 2)。5) HLA クラス II の検討では、8 例中 5 例 (63%) が DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 を持ち、健常人 (9%) に比べ、高頻度であった ($p < 0.01$, OR 17.5) (表 3)。

D. 考察

抗 ARS 抗体陽性例は、「ILD を合併する筋炎」という均一の病像と関連するとされてきたが、教室では従来の研究で、抗 EJ 抗体と皮膚筋炎、抗 KS 抗体と ILD との密接な関連など、各抗 ARS 抗体の臨床特異性を明らかにしてきた。本研究により、抗 PL-12 抗体陽性例が筋炎より慢性型 ILD とより密接に関連し、免疫遺伝学的背景として DRB1*1501 (DR2)-DQA1*0102-DQB1*0602 を高頻度に

持つことが明らかとなった。これまでの検討で、抗 Jo-1 抗体と DR4 との相関を報告してきたが、ILD と関連する抗 PL-12 抗体、抗 KS 抗体と DR2 との関連が注目された。抗 ARS 抗体関連臨床像の発症に対し、抗体特異性だけでなく、免疫遺伝学的背景の関与が示唆された(図 2)。

E. 結論

抗 PL-12 抗体は、抗 KS(アスパラギン tRNA 合成酵素)抗体と同様、多発関節炎などの肺外症状を持つ間質性肺炎と密接に関連し、その発症に免疫遺伝学的背景の関与が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 平形道人: 抗 Jo-1(ヒスチジル tRNA 合成酵素)抗体. 日本臨床. 68 巻増刊 6(血液・尿化学検査, 免疫学的検査第 7 版(3)): 551-554, 2010.
2. 平形道人: 抗 PL-7 抗体、抗 PL-12 抗体およびその他の抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体. 日本臨床. 68 巻増刊 6(血液・尿化学検査, 免疫学的検査第 7 版(3)): 555-559, 2010.
3. 平形道人: 炎症性筋疾患における血清中 BAFF の臨床的意義. リウマチ科. 43(5):521-525, 2010.
4. 平形道人: 重要な臨床病態と適切な治療/多発性筋炎・皮膚筋炎. カレントセラピー 28(10):31-38, 2010.
5. 平形道人: 筋疾患の治療/多発性筋炎・皮膚筋炎. からだの科学 265:180-185, 2010.
6. 平形道人: 重要な臨床病態と適切な治療/多発性筋炎・皮膚筋炎. カレントセラピー 28(10):31-38, 2010.

2. 学会発表

1. 平形道人, 高田哲也, 金子祐子, 竹内 勤: 新たな抗 SRP 抗体測定法の開発とその臨床的有用性に関する研究. 第 53 回 日本リウマチ学会総会, 2010 年 4 月, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

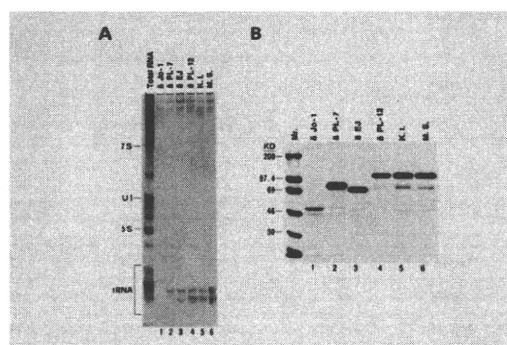


図1. 抗PL-12抗体が免疫沈降する核酸成分のUrea-PAGE (A)と蛋白成分のSDS-PAGE (B): 抗PL-12抗体陽性代表血清(レーン5)は、抗Jo-1抗体(レーン1)、抗PL-7抗体(レーン2)と異なり、抗PL-12抗体陽性血清(レーン4)と同様の、tRNA^{Asp}と110 kDa蛋白を免疫沈降した。

表1. 抗PL-12抗体陽性例の臨床特徴 (I)

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8
Age at onset(y/o)	47	42	55	50	50	60	61	34
Muscle Weakness	No	Yes	No	No	No	No	No	No
CK (IU/l)	63	110	24	64	28	69	93	77
DM Rash	No	No	No	No	No	No	No	No
Cancer	No	No	No	No	No	No	No	No
Cardiac Involvement	No	Yes	No	No	No	No	No	No
ILD	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Restrictive pattern(%VC)	56%	52%	77%	65%	50%	70%	65%	58%
Diagnosis	ILD	SSc	ILD	SSc	ILD	ILD	ILD	ILD

表3. 抗PL-12抗体陽性例のHLAクラスII遺伝子

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8
HLA DR	8/11<>	14<D>/15<D>	15<D>/15<D>	1/4	4/4	13<D>/15<D>	14<D>/15<D>	15<D>/9
HLA DRB1	0802/1101	1401/1501	1501/1502	0101/0410	0405/0407	1302/1501	1401/1501	1501/0901
HLA DQA1	0401/0501	0101/0102	0102/0103	0101/0302	0301/10302	0102/0102	0104/0102	0102/0302
HLA DQB1	0301/0402	0502/0602	0602/0601	0402/0501	0302/0401	0604/0602	05031/0602	0602/03032
HLA DPB1	N.A.	0402/0501	0501/0901	0402/0601	0301/0402	1401/0501	0501/1301	N.A.

N.A.=information is not available

図2. 抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体の臨床スペクトラム

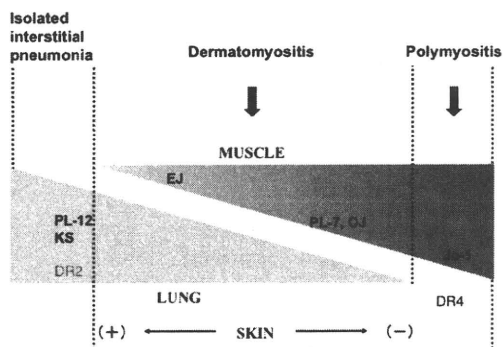


表2. 抗PL-12抗体陽性例の臨床特徴 (II)

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8
Fever	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No
Arthritis	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	No
Raynaud's phenomenon	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
Scierodactyly	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No
Rheumatoid factor	Yes	No	Yes	No	No	N.A.	No	No
Antinuclear antibody	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No

N.A.=information is not available

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

多発性筋炎・皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性の検討

研究分担者 高田 和生 東京医科歯科大学医歯学融合教育支援センター 特任准教授

研究要旨 多発性筋炎・皮膚筋炎には間質性肺炎が高頻度に合併するが、唯一適応承認を持つ糖質コルチコイドの有効性は極めて低い一方、初期治療開始後早期よりの免疫抑制薬併用が生命予後を改善しうることが示唆されている。本疾患罹患部肺胞・間質に浸潤しており、病態への関与が示唆されている T リンパ球に対する特異的免疫抑制薬であるタクロリムスの本疾患における有効性を示唆する報告が蓄積されつつあり、新規治療薬候補として期待されている。不採算性などのため製薬会社主導開発の可能性はなく、従って我々は研究者主導にてタクロリムスの有用性を検討している。本研究班に属する分担研究者所属医療機関を中心とした全 11 施設の協力のもと効能追加申請のためのデータ取得を目的とした GCP 準拠の多施設共同第 II/III 相臨床試験を継続した。本試験は多発性筋炎・皮膚筋炎合併間質性肺炎の初発または安定化後の再発のために治療を必要とする症例を対象とし、生存率を主要評価項目としたタクロリムスおよび糖質コルチコイド併用の単群によるオープンラベル臨床試験（パート A）、糖質コルチコイドのみによる初期治療が行われた症例よりなる歴史的比較対照群（パート B）、そしてパート A との比較可能性が担保できる範囲でのパート B 選択除外基準緩和により拡大される歴史的比較対照群（パート B'）のデータ抽出を行い、パート A と B および A と B' データを比較解析し、タクロリムスの本疾患における治療的位置づけを検討するとういものである。2007 年 7 月の被験者登録開始後計 26 例が登録され、2009 年 12 月末日に症例登録を打ち切った。除外基準抵触の 1 例を除く 25 例に治験薬が投与され（皮膚筋炎 13 例、clinically-amyopathic dermatomyositis (CADM) 5 例、多発性筋炎 7 例）、2011 年 1 月最終被験者最終観察終了した。25 例のうち、女性 19 例（76%）、年齢 55.4±2.4 歳（平均±標準誤差）、治療開始前 KL-6 1134.7±178IU/mL（同）、%VC 69.8±3.3（同）であった。平均評価項目達成例数は、主要評価項目（死亡）については 3 例到達（皮膚筋炎 1 例（6 週）、CADM 2 例（21 週および 46 週）、副次的評価項目の増悪については現時点で 5 例到達（皮膚筋炎 3 例（3 日、4 週、36 週）、CADM 1 例（16 週）、多発性筋炎 1 例（52 週））が判明している。また重篤な有害事象は 16 件であり、うち 4 件が感染症であった。一方パート B および B' 症例数は少数にとどまり、パート A とのデータ比較解析は技術的調整をもってしても極めて難しいと判断される。そしてその原因は、初期治療として糖質コルチコイド単独投与が行われる症例が極めて少ない医療環境が形成されてしまっているからであると考察され、効能追加申請資料作成には更なる考察を要する。予後不良で現在限られたエビデンスのもと免疫抑制薬が適切な用法用量設定も行われていないまま適応外使用されている本疾患において、注目されている新規治療法候補の有用性の、取得しうる最善のデータをもつての検討を引き続き行う。

A. 研究目的

多発性筋炎・皮膚筋炎には間質性肺炎が高頻度に合併するが、唯一適応承認を持つ糖質コルチコイドの有効性は極めて低く、短期死亡率が極めて高く予後不良である。一方、糖質コルチコイドによる初期治療開始後早期に免疫抑制薬を併用した場合には短期死亡率が改善されることが示唆されており、臨床の現場ではシ

クロスポリリンやシクロホスファミドなどの免疫抑制薬が、限られたエビデンスに基づき適切な用法用量設定もされないまま適応外で糖質コルチコイド開始時より併用されているのが現状である。本疾患の病態には、肺胞・間質に多数浸潤している活性化 T リンパ球の強い関与が示唆されており、T リンパ球特異的免疫抑制薬であるタクロリムスの本疾患における有効

性を示唆する報告が蓄積されてきており、新規治療薬候補として期待されている。しかし不採算性などのため製薬会社主導開発の可能性はなく、従って我々は多発性筋炎・皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に対するタクロリムスの有効性及び安全性を検討することを目的とし、研究者主導でその開発を進めた。

B. 研究方法

多発性筋炎・皮膚筋炎合併間質性肺炎の初発または安定化後の再発のために治療を必要とする症例を対象とし、生存率を主要評価項目としたタクロリムス（基準開始用量として0.075mg/kg/日分2、血中濃度5~10ng/mLの範囲で投与量調節可）および糖質コルチコイド（プレドニゾロン1mg/kg/日で開始後漸減）併用の単群によるオープンラベル臨床試験（目標解析対象例20例、評価観察期間52週）（パートA）に加え、糖質コルチコイドのみによる初期治療が行われた症例よりなる Historical control 群（パートB）、そしてパートAとの比較可能性が担保できる範囲でのパートB選択除外基準緩和により拡大される Historical control 群（パートB'）のデータ抽出を行い、パートAとBおよびAとB'データを比較解析し、タクロリムスの本疾患における治療的位置づけを検討する。

パートA、B、B'は、日本医師会治験促進センター（治験推進研究事業採択課題）のサポートを受け、本研究班に属する分担研究者所属医療機関を中心とした全11施設の協力のもと効能追加申請のためのデータ取得を目的としたGCP準拠の多施設共同第II/III相臨床試験を既に2007年7月より症例登録開始にて施行しており、それを継続した。

また、全国の医療機関／診療科に対してアンケートを行い、2008年4月以降アンケート記入時点までの期間に経験された本疾患症例で、パートB症例選定における疾患活動性基準を満たした症例の初期治療法についての情報を求めた。

（倫理面への配慮）

「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令」（平成20年度厚生労働省令第24号、平成20年2月29日公布、「改正GCP省令」）に準拠し、治験に参加することによって生じる被験者への不利益を最小限にとどめ、被験者の得る利益を最大限にするよう治験計画において配慮し、また被験者には倫理審査委員会の承認を得た同意文書及びその他の説明文書を使用して十分説明した後、自由意志による試験参加の同意を本人から文書で得ることとした。

C. 研究結果

（パートA）

2007年7月より被験者登録を開始し、合計26例登録され、2009年12月末日に症例登録を打ち切った。除外基準抵触の1例を除く25例に治験薬が投与され（皮膚筋炎13例、clinically-amyopathic dermatomyositis（CADM）5例、多発性筋炎7例）、2011年1月最終被験者最終観察終了した。25例のうち、女性19例（76%）、年齢 55.4 ± 2.4 歳（平均 \pm 標準誤差）、治療開始前KL-6 1134.7 ± 178 IU/mL（同）、%VC 69.8 ± 3.3 （同）であった。平均評価項目達成例数は、主要評価項目（死亡）については3例到達（皮膚筋炎1例（6週）、CADM2例（21週および46週）、副次的評価項目の増悪については現時点で5例到達（皮膚筋炎3例（3日、4週、36週）、CADM1例（16週）、多発性筋炎1例（52週））が判明している。また重篤な有害事象は16件であり、うち4件が感染症であった。

（パートBおよびB'）

パートAとの比較においては Indication bias が存在するため Propensity score を用いたマッチングを行うべく計画しており、その観点から Historical control 群症例数はパートA群の2倍以上が適切と考えられているが、治験実施計画書で規定される適格性を満足する症例は最終的に5例にとどまり、またパートB'は11例であった。そのため、パートAとの比較解析は、Indication bias の影響を縮小するための

Matching 手法などを用いた技術的調整をもつてしても不可能であると考察された。

(筋炎合併活動性間質性肺炎に対する初期治療に関するアンケート調査)

全国の医療機関／診療科に対してアンケートを行い、2008年4月以降アンケート記入時点までの期間に経験された本疾患症例で、本臨床試験パートB症例選定における疾患活動性基準を満たした症例の初期治療法についての情報を求めた。回答が得られた444例のうち、糖質コルチコイド単独投与が行われたのは160例(36.0%)にすぎず、一方272例(61.3%)では糖質コルチコイドに加え免疫抑制薬が治療開始時から併用されていた。

D. 考察

パートA症例集積は症例登録期間を12カ月延長したが目標が達成された。選択除外基準や様々なバイアスの存在により単純な比較はできないが、パートAデータは、文献上参考にできる糖質コルチコイド単独治療データと比較して、生存率でみた有効性においては、少なくとも劣らない。一方パートBおよびB'症例数は少数にとどまり、パートAとのデータ比較解析は技術的調整をもってしても極めて難しいと判断される。そしてその原因は、アンケート結果にもみられるように、免疫抑制薬の適応外使用による糖質コルチコイドとの併用療法が既に一般化しており、初期治療として糖質コルチコイド単独投与が行われる症例が極めて少ない医療環境が形成されてしまっているからであると考察する。

E. 結論

多発性筋炎・皮膚筋炎合併間質性肺炎におけるタクロリムスの有用性の評価を行うべくGCP準拠の多施設共同試験を医師主導で実施した。一定の症例選定基準を満たす本疾患症例において一定の用法用量基準にもとづくタクロリムスおよび糖質コルチコイドの併用治療を行った場合に期待される臨床反応および安全性に関する客観的データを提供するもので

あり、免疫抑制薬が適切な用法用量設定もされないまま適応外で使用されている臨床の現場に対して大きな意義を持ち、医師および患者に対して有用な情報を提供したと考える。一方、糖質コルチコイド単独治療による対照群データ収集には限界があり、効能追加申請資料作成には更なる考察を要する。希少疾患における医師主導臨床研究であるが、研究班を中心とした協力により前向き試験は症例集積目標が達成され、このような領域・分野の臨床研究における研究班体制の必要性と有用性が示された。

F. 健康危機情報

治験中の重篤な有害事象に関しては関連法規に基づき厚生労働大臣に報告されている。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

BXSB マウスに対する FTY720 の免疫学的効果に関する研究

研究分担者 天野 浩文 順天堂大学医学部膠原病内科 准教授
研究協力者 高崎 芳成 順天堂大学医学部膠原病内科 教授
安藤 誠一郎 順天堂大学医学部膠原病内科

研究要旨 FTY720 はリンパ球を2次リンパ組織に隔離することで免疫抑制効果を発揮する新規免疫抑制剤として知られている。今回の報告は、SLE モデルマウスである BXSB 雄マウスを用いて FTY720 の免疫複合体形成自己免疫性腎炎への治療効果を観察した。FTY720 治療により、末梢血リンパ球分画は著明に減少したが、単球増加に対する影響は認めなかった。FTY720 治療は脾臓内 MZB 細胞の増加と、濾胞内への局在変化をもたらしたが、血清中抗 ds-DNA IgG 及び IgM 抗体価に対する影響は見られなかった。FTY720 治療群において、糸球体への免疫複合体の沈着が非治療群と同様に認められたが、興味深いことに、FTY720 治療群では糸球体腎炎の最終段階を呈さず、病的蛋白尿、生存率が著明に改善した。今回の我々の報告で、FTY720 は免疫複合体の糸球体沈着に続いて起こる、腎炎の最終段階への進展を阻害することで、ループス腎炎に治療効果を及ぼすことが示唆された。

A. 研究目的

FTY720 はリンパ球を2次リンパ組織に隔離することで免疫抑制効果を発揮する新規免疫抑制剤として知られている。その大きな特徴は、リンパ球を2次リンパ組織に隔離することで炎症局所へのリンパ球の浸潤を抑制することで効果を示すことである。全身性エリテマトーデス (SLE) モデルの一つである BXSB マウスでは *Yaa* 遺伝子の影響を受け、脾臓ではマージナルゾーン B (MZB) 細胞が減少し、末梢血では単球が増加することが知られている。今回我々は BXSB マウスに対する FTY720 の効果および MZB 細胞や末梢血単核球に与える影響について検討した。

B. 研究方法

BXSB マウス 3 ヶ月齢より蒸留水または FTY720 1.0mg/kg の経口投与を行い、生存率、蛋白尿、抗 ds-DNA 抗体価、抗 Sm 抗体価を調べ、更に末梢血単核球のサブセットについてフローサイトメトリーで解析を行った。また6ヶ月齢の時点で腎臓、脾臓細胞を免疫病理組織およびフローサイトメトリーで解析した。

(倫理面への配慮)

今回の研究で用いたマウスは順天堂大学疾患モデル研究センターで飼育し、「順天堂大学医学部動物実験に関する指針」もとづき、動物福祉の観点から実験を行っており、実験動物委員会にて審査、承認を受けている。

C. 研究結果

FTY720 投与により、末梢血リンパ球では CD4, CD8, B220 陽性細胞が著明に減少したが、CD11b 陽性単球に対する影響は認めなかった。さらに脾臓内 MZB 細胞の増加を認め、濾胞内への局在変化をもたらした。血清中抗 ds-DNA 抗体および抗 Sm 抗体の抗体価は、非投与群と比べて有意な低下は認めなかった。糸球体への免疫複合体の沈着は FTY720 投与群においても非投与群と同様に認められたが、FTY720 投与群では CD4 陽性細胞と CD11b 陽性細胞の浸潤は著明に抑制されていた。さらに FTY720 投与群では病的蛋白尿の出現率は有意に抑制され、生存率は有意に上昇していた。

D. 考察

FTY720 は免疫複合体の糸球体への沈着に続いて起こる、腎炎の最終段階への進展を阻害することで、ループス腎炎の抑制効果を及ぼすことが示唆された。

E. 結論

新規免疫抑制剤である FTY720 は BXSB マウスに対してリンパ球の分布に影響を与えることで、蛋白尿の減少と生存期間の延長効果を及ぼした可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

今回の実験では、ウイルス、放射性物質等を用い

ず、健康面での危機は極めて少ないと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Lin Q, Hou R, Sato A, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Nishikawa K, Tsurui H, Amano H, Amano E, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. Inhibitory IgG Fc receptor promoter region polymorphism is a key genetic element for murine systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 34(4):356-63, 2010
2. Morimoto S, Watanabe T, Lee S, Amano H, Kanamaru Y, Ohsawa I, Tomino Y, Takasaki Y. Improvement of rapidly progressive lupus nephritis associated MPO-ANCA with tacrolimus. *Mod Rheumatol*. 20(3):291-4, 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(2):574-9, 2010
4. Ando S, Amano H, Amano E, Minowa K, Watanabe T, Nakano S, Nakiri Y, Morimoto S, Tokano Y, Lin Q, Hou R, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, Takasaki Y. FTY720 exerts a survival advantage through the prevention of end-stage glomerular inflammation in lupus-prone BXSB mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 394(3):804-10, 2010
5. Nakano S, Morimoto S, Suzuki S, Watanabe T, Amano H, Takasaki Y. Up-regulation of the endoplasmic reticulum transmembrane protein UNC93B in the B cells of patients with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 49(5):876-81, 2010
6. Santiago-Raber ML, Amano H, Amano E, Fossati-Jimack L, Swee LK, Rolink A, Izui S. Evidence that Yaa-induced loss of marginal zone B cells is a result of dendritic cell-mediated enhanced activation. *J Autoimmun*. 34(4):349-55, 2010
7. Matsuyama N, Morimoto S, Tokano Y, Amano H, Nozawa K, Isonuma H, Hashimoto H, Takasaki Y. The long-term prognosis of lupus nephritis patients treated with intravenous cyclophosphamide. *Intern Med*. 49(9):823-8, 2010

2. 学会発表

1. Amano H, Amano E, Ando S, Minowa K, Watanabe T, Nakano S, Morimoto S, Hirose S, Takasaki Y, Izui S. The role of complement and B cell antigen receptor on the development of marginal zone B cells in lupus-prone mice. 14th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2010) Hong Kong. 2010. 7. 11-15
2. Minowa K, Amano H, Nakano S, Ando S, Watanabe T, Ishihara N, Nakiri Y, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. The hidden activation of plasma cell in SLE patients detected by soluble CD138. 14th International Congress of Immunology Kobe, 2010. 8. 22-27
3. Amano H, Amano E, Ando S, Minowa K, Morimoto S, Hirose S, Izui S, Takasaki Y. The role of complement and B cell antigen receptor on the development of marginal zone B cells in lupus-prone mice. 14th International Congress of Immunology Kobe, 2010. 8. 22-27
4. 天野浩文、天野恵理、安藤誠一郎、箕輪健太郎、森本真司、戸叶嘉明、広瀬幸子、高崎芳成. SLEモデルマウス脾臓辺縁帯B細胞形成における補体とB細胞抗原受容体の関与 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸 2010.4.22-25.
5. 天野浩文、天野恵理、安藤誠一郎、箕輪健太郎、森本真司、戸叶嘉明、広瀬幸子、高崎芳成. SLEモデルマウス脾臓辺縁帯B細胞形成における補体とB細胞抗原受容体の関与. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸 2010.4.22-25.
6. 天野浩文、李鐘碩、森本真司、田村直人、高崎芳成. シェーグレン症候群に伴う間質性腎炎に対して柴苓湯が有効であった症例. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸 2010.4.22-25.
7. 安藤誠一郎、天野浩文、天野恵理、渡邊崇、名切裕、森本真司、戸叶嘉明、林青順、大辻希樹、広瀬幸子、高崎芳成. FTY720によるBXSBマウスのループス腎炎抑制機序の解析. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸 2010.4.22-25.

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

全身性エリテマトーデスにおける SLAM シグナルの役割

研究分担者 広瀬 幸子 順天堂大学大学院医学研究科分子病態病理学 准教授

研究要旨 第1染色体テロメアには全身性エリテマトーデス(SLE)感受性遺伝子が複数存在し、中でも *Fcgr2b* および *Slam* 遺伝子多型の関与が注目される。*Slam* 遺伝子は複数の SLAM family 分子をコードする遺伝子群で、これらの分子を介したシグナルは、T細胞においては SLAM-associated protein (SAP)を介して伝達される。本研究では、SLAM シグナルが SLE 発症に与える影響を、SAP 欠損 BXSB マウス系の作製により解析することを目的とする。

A. 研究目的

我々は、BXSB マウスの SLE 型 *Fcgr2b* 多型と SLE で、後者を正常マウス型に入れ換えても高度の自己抗体産生に変化が見られなかったことから、BXSB においては、SLE 型 *Fcgr2b* が B 細胞免疫寛容破綻の主要因であるという結果を得た。

しかしながら、SLE 型 *Slam* 多型の影響がないことは、SLAM シグナルが不要であることを意味するものではない。実際に、SLAM シグナル分子である SAP を欠損させることで、T 細胞依存性 SLE を発症する MRL/lpr マウスや sanroque マウスの病態を、ほぼ完全に抑制することが報告されている。これに対して、B 細胞依存性に SLE を自然発症する BXSB マウスの SLE 病態に、SAP 欠損がいかなる影響を与えるかは明らかではない。

本研究では、この点を明らかにするために、SAP 欠損 BXSB マウスを作製し、その病態を解析することを目的とする。

B. 研究方法

1) BXSB マウスに SAP 欠損遺伝子を導入したコンジェニックマウスを樹立した。SAP 欠損遺伝子は、東北大学の小野博士により見出された、MRL/lpr マウスに自然発症した変異遺伝子で、この欠損は *rpl* (regression of phenotype associated with *lpr*) 遺伝子と名付けられている。これに習い、樹立したマウスを BXSB. *rpl* と命名した。

2) BXSB. *rpl* マウスの SLE 病態を、本来の BXSB マウスの病態と比較した。ループス腎炎の程度は、病変なしを 0、糸球体病変の程度に応じて 1、2、

型 *Slam* 多型のうち、前者を正常マウス型に入れ換えると、自己抗体産生が抑制されたのに対し 3 とスコア化し、一匹あたり 30 個の糸球体の平均スコアで評価した。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は、本研究施設の定める動物実験指針に基づいて行なった。

C. 研究結果

1) BXSB. *rpl* マウスでは、血中 IgG 抗 DNA 抗体価およびループス腎炎は、本来の BXSB マウスに比較して抑制される傾向にあったが、統計学的な有意性は見られなかった (図 1 A, B)。

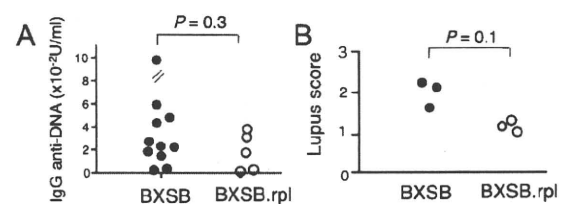


図1 BXSB および BXSB. *rpl* マウスの血中 IgG 抗 DNA 抗体価(A)およびループス腎炎の程度(B)の6ヶ月齢における比較。

2) 6ヶ月齢における脾臓の重量を比較した。その結果、BXSB. *rpl* にも脾腫が認められ、BXSB との間に脾重量の差は見られなかった (図2)。

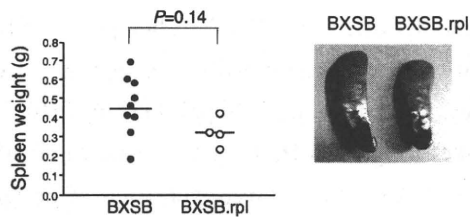


図2 BXSB および BXSB.rpl の脾重量の比較。右には代表的な肉眼像を示した。

3) 脾臓の胚中心形成および follicular T helper (T_{FH}) 細胞の分化程度を、6ヶ月齢の BXSB と BXSB.rpl の間で比較した。図3には、B220⁺peanut agglutinin (PNA)⁺の胚中心 B 細胞の全 B 細胞における比率と、PD1⁺CXCR5⁺T_{FH} 細胞の全 T 細胞における比率を、flow cytometry により解析した結果を示した。図に示すように両マウス間で差は認められなかった。

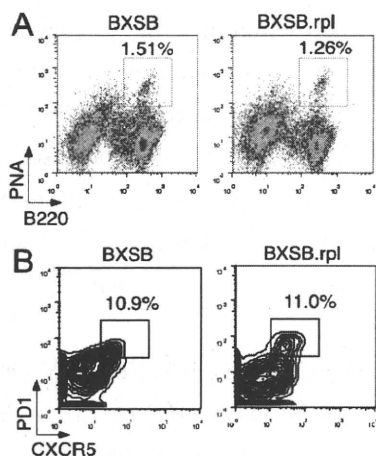


図3 BXSB および BXSB.rpl の胚中心 B 細胞(A)および T_{FH}細胞(B)の比率を flow cytometry で解析した代表的なプロファイルを示した。

D. 考察

T 細胞における SLAM 分子のシグナルは SAP を介して伝達され、SAP は Fyn をリクルートすることで、TCR のシグナルを制御している。近年、SAP 欠損マウスの解析で、T 細胞依存性抗原でマウスを免疫した時に形成される胚中心の形成や、これに伴う T_{FH}細胞の分化が高度に抑制されることが示されている。また、T 細胞依存性の SLE 病態は、SAP

欠損により、ほぼ完全に抑制されると報告されている。我々が SAP 欠損遺伝子として BXSB マウスに同化した rpl 遺伝子は、実際に MRL/lpr の SLE 病態を抑制する自然発生の突然変異遺伝子として、東北大学の小野博士が見出した遺伝子である。

BXSB ♂ マウスは、Y chromosome-linked autoimmune acceleration)Yaa 変異遺伝子の影響で♂に高度の SLE が発症するモデルである。Yaa は、TLR7 コード遺伝子を含む X 染色体の一部が Y 染色体上に重複して生じた変異で、Yaa の自己免疫促進効果は B 細胞の活性化を通してもたらされる。今回の解析から、この B 細胞依存性の SLE 病態に対する SAP 欠損の効果は、T 細胞依存性の SLE の場合に比較して、あまり顕著ではないことが明らかとなった。さらに驚くべきことは、BXSB マウスに自然に形成される胚中心形成や、これに伴う T_{FH}細胞の分化に、SAP 欠損が影響を与えないという点である。SAP 欠損は、T 細胞と B 細胞の結合力を低下させるため、BXSB マウスでは、胚中心が形成されるが、T-B 細胞相互作用が低下するために、IgG 自己抗体産生が低下する可能性が考えられる。今後、この点を明らかにしたい。

E. 結論

T 細胞依存性 SLE が SAP 欠損でほぼ完全に抑制されるのに対して、B 細胞依存性の BXSB マウスの SLE では、SAP 欠損によって、自己抗体の産生、ループス腎炎の程度は抑制傾向にあったが、SAP 欠損のない BXSB マウスとの間に、有意差は見られなかった。また、脾腫、胚中心形成、T_{FH}細胞分化には、差は認められなかった。今後、マウスの数を増やして、SAP 欠損が BXSB マウスの SLE 病態に対する影響を、細胞・分子レベルで詳細に確認する予定である。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Lin Q, Hou R, Sato A, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Nishikawa K, Tsurui H, Amano H, Amano E, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. Inhibitory IgG Fc

receptor promoter region polymorphism is a key genetic element for systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 34: 356-363, 2010.

2. Shimura E, Hozumi N, Kanagawa O, Chambon P, Freddy Radtke F, Hirose S, Nakano N. Epidermal precancerous cellular dysregulation triggers inhabitant $\gamma\delta$ T cells to initiate immune responses. *Int. Immunol.* 22:329-340, 2010.

3. Ando S, Amano H, Amano E, Minowa K, Watanabe T, Nakano S, Nakiri Y, Morimoto S, Tokano Y, Lin Q, Hou R, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, Takasaki Y. FTY720 exerts a survival advantage through the prevention of end-stage glomerular inflammation in lupus-prone BXSB mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:804-810, 2010.

2. 学会発表

1. 広瀬幸子 教育講演 SLE 感受性遺伝子による正と負の制御：第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 198 頁 2010/4/22-25 神戸

2. 林 青順、大辻希樹、天野浩文、白井俊一、広瀬幸子 *Fcgr2b* および *Slam* 遺伝子多型と SLE 感受性との解析：第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 454 頁 2010/4/22-25 神戸

3. 王 英歌、伊藤 聡、鈴木穂積、千野裕介、杉原誠人、林 太智、後藤大輔、松本 功、広瀬幸子、林 青順、住田孝之 Laser-microdissection 法による腎内浸潤 T 細胞の解析：第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 450 頁 2010/4/22-25 神戸

4. 天野浩文、天野恵理、安藤誠一郎、箕輪健太郎、森本真司、戸叶嘉明、広瀬幸子、高崎芳成 SLE モデルマウス脾臓辺縁帯 B 細胞形成における補体と B 細胞抗原受容体の関与：第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 564 頁 2010/4/22-25 神戸

5. 安藤誠一郎、天野浩文、天野恵理、渡邊 崇、名切 裕、森本真司、戸叶嘉明、林 青順、大辻希樹、広瀬幸子、高崎芳成 FTY720 による BXSB マウスループス腎炎抑制機序の解析：第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 565 頁 2010/4/22-25 神戸

6. Hou R, Sato A, Lin Q, Ohtsuji M, Adachi T, Hirose S, and Tsubata T. Effect of CD72^c allotype on SLE susceptibility. 14th International Congress of Immunology. *Int. Immunol.* 22 (Suppl. 1):i126, 2010.

7. Kitabatake M, Igarashi H, Toda T, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, Sakaguchi N. Over-expression of protein phosphatase subunit G5PR that suppresses JNK-mediated apoptosis caused the increase of B-1 cells associated with autoimmunity. 14th International Congress of Immunology. *Int. Immunol.* 22 (Suppl. 1):i119, 2010.

8. Amano H, Amano E, Ando S, Minowa K, Morimoto S, Hirose S, Izui S, Takasaki Y. The role of complement and B cell antigen receptor on the development of marginal zone B cells in lupus-prone mice. 14th International Congress of Immunology. *Int. Immunol.* 22 (Suppl. 1):i124, 2010.

9. Hirose S, Lin Q, Sato A, Hou R, Ohtsuji M, Tsurui H, Nishimura H, Shirai T. Genetic dissection of the effect of *Fcgr2b* polymorphism on systemic lupus erythematosus. 14th International Congress of Immunology. *Int. Immunol.* 22 (Suppl. 1):i125, 2010.

10. Tsurui H, Hirose S. Phagocytosis specific autofluorescence in marginal metallophilic macrophage and marginal zone macrophage. 14th International Congress of Immunology. *Int. Immunol.* 22 (Suppl. 1):iii39, 2010.

11. Obata M, Fujiwara R, Fujii T, Kodera Y, Ohtsuji M, Shirai T, Hirose S, Nishimura H. Mechanism of Th-cell tolerance induced with the tolerogenic protein antigen conjugated with polyethylene glycol. 14th International Congress of Immunology. *Int. Immunol.* 22 (Suppl. 1):iv56, 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

全身性エリテマトーデスのゲノムワイドアソシエーションスタディ

～平成 17-19, 20-22 年度検体・臨床情報収集に基づく臨床系班員による共同研究～

研究分担者 山田 亮 京都大学大学院医学研究科 教授

なお、以下に示す機関に所属する、当研究班班員による共同研究である

各機関の班員名は当報告書の当該機関所属者を参照のこと

[機関名]

北海道大学・東北大学・東京大学・慶應義塾大学・順天堂大学・産業医科大学・筑波大学・
東京医科歯科大学・国立国際医療センター・長崎大学・大阪大学/和歌山県立医科大学・自治医科大学

研究要旨 全身性エリテマトーデス(SLE)の発病遺伝因子探索のため、自己免疫疾患に関する調査研究班により SLE 患者ゲノム並びに臨床情報を収集し、ゲノムワイドアソシエーションスタディ(GWAS)を実施した。その結果、SLE 関連遺伝子として、他民族と共通のものが複数個、確認されるとともに、新規座位の同定するに至った。

A. 研究目的

全身性ループスエリテマトーデス(SLE)の発病感受性遺伝子多型をゲノムワイドケースコントロール関連解析(GWAS)にて探索する。

B. 研究方法

本研究班の臨床系機関所属班員に広く協力を呼びかけ、6年間にわたり、SLE患者DNAを収集した。また、臨床情報に関しては、特定疾患臨床調査個人票を活用し、その登録項目に則り情報を収集した。コントロールにはバイオバンクジャパン検体を用いた。1塩基多型のタイピングはイルミナ社のGWAS用SNPチップを用いて、GWASを行った。解析にあたっては、個々のSNPにつき、発病との関連(GWAS)ならびに、近傍遺伝子の発現量との関連(eQTL)とを組み合わせるスクリーニングし、検出多型に関してレプリケーション関連解析を実施した。レプリケーション解析には、班とは別に収集された国内検体を用いた。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理

指針に準拠した。

C. 研究結果

全 1392 検体の DNA サンプルを収集し、このうち 974 名分の臨床情報を収集した。GWAS には、このうち 891 名のサンプルを利用した。SLE 関連多型として、既報の(STAT4, HLA 領域, TNFAIP3, HIP1, IRF5, BLK)が GWAS において日本人においても強く関連することを確認した。また、そのうちの半数は、eQTL において遺伝子発現に影響することを確認した。SLE の発病関連領域として既報領域以外に 1 領域を同定した。

D. 考察

日本人における SLE の初めての大規模 GWAS を実施した結果、コーカソイド・漢民族と共通して複数の遺伝子領域が SLE の発病と関与することが確認できた。また、日本人スタディによって初めて検出された関連領域も認められた。

E. 結論

SLE の DNA 検体を班という組織を活用することにより、1000 検体以上収集することがで

きた。また、それらを遺伝子解析することが容易な形で管理・保管する体制を達成した。また、同時に、特定疾患臨床調査個人票による定点観測という仕組みを活用することで、SLE の臨床情報を体系的に収集できた。さらに、それを解析できるよう、電子情報化した。これは、本研究が GWAS を施行し、そこから得た科学的知見とは別に、SLE 研究のための貴重かつ将来にわたって有効な資産であると位置づけられ、本研究の成果として意義深い。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 62:574-9, 2010.
2. Hirose K, Kawaguchi T, Matsuda F, Yamada R. Estimation of P-value of MAX test with double triangle diagram for 2 x 3 SNP case-control tables. *Genet Epidemiol.* 34:543-51, 2010.
3. Takahashi, M., Saenko, V. A., Rogounovitch, T. I., Kawaguchi, T., Drozd, V. M., Takigawa-Imamura, H., Akulevich, N. M., Ratanajaraya, C., Mitsutake, N., Takamura, N., Danilova, L. I., Lushchik, M. L., Demidchik, Y. E., Heath, S., Yamada, R., Lathrop, M., Matsuda, F., Yamashita, S. The FOXE1 locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum Mol Genet.* 19: 2516-23, 2010.

4. Nakanishi, H., Hayashi, H., Yamada, R., Yamashiro, K., Nakata, I., Shimada, N., Ohno-Matsui, K., Mochizuki, M., Ozaki, M., Yoshitake, S., Kuriyama, S., Saito, M., Iida, T., Matsuo, K., Matsuda, F., Yoshimura, N. Single Nucleotide Polymorphisms in Promoter Region of Matrix Metalloproteinase 1, 2, and 3 in Japanese with High Myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4432-6, 2010.

2. 学会発表

1. Yamada R. Calculation of MAX test P value with geometric characterization of 2x3 table tests 2010 Joint Statistical Meetings Vancouver, Canada
2. 山田 亮・川口 喬久 多次元楕円の正球化座標変換を利用した分割表検定のパーミュテーションテスト効率改善について 統計関連学会連合大会 2010年度 東京
3. Yamada R., Kawaguchi T. Contingency table test for multiple-categories with arbitrary weights on the cells. ASHG 60th Annual Meeting, Washington DC, USA

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

GRAIL による免疫応答調節機構の解析

研究分担者 三宅 幸子 国立精神・神経センター 神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨 全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患においては、自己応答性リンパ球の自己寛容破綻が病態に重要である。我々は、免疫寛容に重要な分子として注目されている E3 リガーゼのひとつである GRAIL について、Coronin 1a, Arp2/3 complex を基質として新たに同定した。特にこれらの分子は、免疫シナプスの形成に関与し、GRAIL の T 細胞機能抑制の機序として、免疫シナプス形成の阻害が重要であると考えられた。GRAIL ノックアウトマウスでは、B6 バックグラウンドでは T 細胞では増殖反応の亢進が見られ、NOD マウスにバッククロスしたものは、野生型に比較して早期に糖尿病を発症した。

A. 研究目的

SLE などの自己免疫疾患においては、自己応答性リンパ球の自己寛容破綻が病態に重要である。我々は、免疫寛容に重要な分子として注目されている E3 リガーゼのひとつである GRAIL について、新たな基質を同定し、その機能を検討したので報告する。

B. 研究方法

DO11.10 の脾臓細胞を OVA 蛋白で刺激し、10 日後に Ionomycin 処理することによって誘導したアナジー T 細胞において蛋白発現が低下していた分子の中で、GRAIL の基質として同定した Arp2/3-5 ならびに coronin 1A について、DO11.10 CD4⁺ T 細胞と OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドをパルスした A20 B 細胞との間に形成される免疫シナプスについて、その形成に与える影響を検討した。また、GRAIL の遺伝子欠損マウスを作製し、フェノタイプならびに自己免疫モデルについて解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

C. 研究結果

アナジー T 細胞では、免疫シナプスにおける F-アクチンの集積が低下し、Arp2/3-5 ならびに coronin 1A の集積も低下していた。GRAIL を T 細胞

に強制発現させると、やはり免疫シナプスにおいて F-アクチンと同時に Arp2/3-5 ならびに coronin 1A の集積が低下し、免疫シナプス形成が阻害された。Arp2/3-5 または coronin 1A の T 細胞における発現を siRNA を用いて低下させると、免疫シナプスにおけるラメリポディア形成を阻害した。GRAIL を強制発現すると、免疫シナプスにおけるラメリポディア形成を阻害した。また、GRAIL ノックアウトマウスについては、NOD マウスにバッククロスすると、野生型に比較して早期に糖尿病を発症した。

D. 考察

GRAIL は、同定された基質から、細胞骨格系の制御に重要な E3 キナーゼであると考えられた。そして、Arp2/3-5 や coronin1a といったアクチン再構成に関与する蛋白質が T 細胞アナジーの誘導及び維持に関与していることが明らかとなった。特にこれらの分子は、免疫シナプスの形成に関与し、GRAIL の T 細胞機能抑制の機序として、免疫シナプス形成の阻害が重要であると考えられた。GRAIL ノックアウトマウスでは、B6 バックグラウンドでは T 細胞では増殖反応の亢進が見られ、NOD マウスにバッククロスしたものは、野生型に比較して早期に糖尿病を発症した。