

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 $\alpha$  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

7. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. Discontinuation of infliximab therapy is possible after acquiring remission in patients with rheumatoid arthritis (RA): first report on RRR (remission induction by remicade in RA) study. The Annual European Congress of Rheumatology 2009, Copenhagen 平成 21 年 6 月

8. Y. Tanaka, M. Suzuki, H. Nakamura, S. Toyozumi, S. H. Zvillich. The oral Jak inhibitor CP-690,550 in combination with methotrexate is efficacious, safe and well tolerated in Japanese patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to MTX alone. The Annual European Congress of

Rheumatology 2009, Copenhagen 平成 21 年 6 月

9. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Sawda T, Kohsaka H, Matsumoto I, Saito K, Koike T. A 2 year-extended follow-up of the phase I/II trial of rituximab for treatment of refractory systemic lupus erythematosus. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2008, Paris 平成 20 年 6 月 11-14 日

10. Tanaka Y, Tokunaga M, Nawata M, Iwata S, Nakano K, Yamaoka K, Mima T, Nishimoto N, Saito K. Different mechanisms are involved in different organ manifestation in SLE: learning from treatments with rituximab (anti-CD20) therapy. The 72nd National Meeting of American college of Rheumatology, San Francisco. 平成 20 年 10 月 25-29 日

### 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

住田 孝之

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. 総合研究報告

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

研究代表者 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 全身性エリテマトーデス（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 3 つの細胞集団、(1)臓器障害性 T 細胞、(2) 制御性 T 細胞および(3) plasmacytoid DC (pDC) について解析を行った。

(1) 腎炎発症早期 MRL/lpr マウス腎臓の CD4 陽性 T 細胞を解析したところ、CD5<sup>high</sup>TCR<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞集団は IFN- $\gamma$  発現細胞を含んでいた。単一細胞解析により 2 組の IFN- $\gamma$  発現 CD4<sup>+</sup> T 細胞の TCR  $\alpha/\beta$ 鎖(MLK2 と MLK3)を同定した。試験管内でこれらの TCR 機能を再構築した CD4<sup>+</sup> T 細胞は、脾臓樹状細胞に反応し増殖した。MLK3 再構築 CD4<sup>+</sup> T 細胞を腎炎発症前 MRL/lpr マウスに養子移入すると脾臓で増殖し、自己抗体価を上昇させることなく腎炎発症を促進した。この実験結果は、腎炎発症早期の MRL/lpr マウス腎臓に浸潤する IFN- $\gamma$  発現 CD4<sup>+</sup> T 細胞が腎炎の進展に関与していることを示唆した。

(2) 分担研究者らはこれまでに IL-10 を高産生する CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞を同定し、この細胞集団がマウスの腸炎を抑制する活性をもつ新たな制御性 T 細胞であることを見出した。腎炎発症前 NZB/W F<sub>1</sub> マウス及び NZW マウスにおいて、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞の減少がみられ、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞の数は NZW マウス由来の遺伝子により遺伝的に規定されている可能性が考えられた。SLE モデルマウスにおける CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>細胞の機能解析は、SLE の病態解明への新たなアプローチとなる可能性があると考えられた。

(3) 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

(1) 全身性エリテマトーデス(SLE)において CD4<sup>+</sup> T 細胞は自己免疫応答形成に重要な役割を担うが、腎臓に浸潤する CD4<sup>+</sup> T 細胞の腎炎への直接の関与は未だ明らかでない。腎臓に存在するサイトカイン発現 CD4<sup>+</sup> T 細胞は病態形成に重要な役割を果たすと考えられ、その反応性および病原性の解析は、SLE の病因解明や治療法開発に有益と考えられる。SLE モデルマウス MRL/lpr を用い、SLE 発症早期に腎臓に浸潤する CD4<sup>+</sup> T 細胞に腎炎に対する病原性があるかどうか検討した。

(2) SLE モデルマウスの自己免疫応答形成において、新しい制御性 T 細胞サブセット IL-10 産生

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞の数的・質的異常が寄与している可能性がある。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞の細胞数・発現遺伝子を検討することによりこの点を検証する。

(3) 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

(1) 腎臓および脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞の IFN- $\gamma$  発現と細胞表面の CD5 分子発現の相関をフローサイトメトリーで解析した。腎炎発症早期マウスの腎臓 CD5<sup>high</sup>TCR<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の単一細胞解析を行った。cDNA を合成後、nested PCR により IFN- $\gamma$  発現 CD5<sup>high</sup>TCR<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の TCR  $\alpha/\beta$ 鎖を同定した。レトロウイルスベクターを用いてこれらの TCR を再構築した CD4<sup>+</sup>T 細胞を、腎炎発症前 MRL/lpr マウスに移入した。

(2) NZB/W F<sub>1</sub>マウス、NZB マウス、NZW マウスの CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞を分離し、フローサイトメトリーおよび定量 PCR を用いて解析を行った。

(3) 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常人、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)

実験動物に対しては過度の苦痛を与えないなど、動物愛護上の十分な配慮を行った。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

(1) 腎炎発症早期 MRL/lpr マウス腎臓の CD5<sup>high</sup>TCR<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞集団には IFN- $\gamma$  分泌細胞が含まれていた。単一細胞解析を行い、2 組の IFN- $\gamma$  発現 CD4<sup>+</sup>T 細胞の TCR  $\alpha/\beta$ 鎖(MLK2 と MLK3)を同定した。in vitro で MLK2 と MLK3 再構築 CD4<sup>+</sup>T 細胞は脾臓の樹状細胞に反応した。MLK3 再構築 CD4<sup>+</sup>T 細胞は腎炎発症前 MRL/lpr マウスの脾臓で増殖した。この再構築した細胞を腎炎発症前 MRL/lpr マウスに養子移入すると、自己抗体価を上昇させることなく腎炎発症が促進された。

(2) 若齢および腎炎発症前 NZB/W F<sub>1</sub>マウスでは、C57BL/6 マウスと比較して脾臓の

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞が有意に減少していた。NZW マウスの CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞も有意に減少していた。C57BL/6 マウスと若齢 NZB/W F<sub>1</sub> マウスの CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞の mRNA 発現パターンは同様であり、明らかな質的差異を認めなかった。

(3) 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。健常人、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 と関連していたが、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

(1) 腎炎早期に腎臓で刺激を受けサイトカインを分泌する CD4<sup>+</sup>T 細胞の TCR を再構築した細胞は、腎炎発症前の脾臓で刺激を受け、腎炎発症を促進した。実際に生体内の炎症局所に浸潤する自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞の動態の解析は、自己免疫現象の解明および新規治療法の開発に有用と考えられる。

(2) 腎炎発症前 NZB/W F<sub>1</sub>マウス及び NZW マウスにおいて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞の減少がみられ、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>T 細胞の数は遺伝的に規定されている可能性が考えられた。

(3) 今回の結果から可溶性 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。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

(1)腎炎発症前の脾臓で刺激を受けサイトカインを分泌する CD4<sup>+</sup>T 細胞が腎炎の病態形成に関与する可能性が示唆された。

(2) NZB/W F<sub>1</sub>マウスにおける CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の減少は、NZW マウス由来の遺伝子により規定されていると考えられた。今後この

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>制御性T細胞の減少がループスの病態に寄与するか検討が必要である。

(3) 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<sup>+</sup> 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.
9. Okamura T, Fujio K, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, Sakaguchi S, Yamamoto K. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci USA*.106:13974-79, 2009.
10. Okada Y, Yamada R, Suzuki A, Kochi Y, Shimane K, Myouzen K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. Contribution of a haplotype in the HLA region to anti-cyclic citrullinated peptide antibody positivity in rheumatoid arthritis, independently of HLA-DRB1. *Arthritis Rheum*. 60:3582-3590, 2009.
11. Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. *J Autoimmun*. 32:158-62, 2009.
12. Shimane K, Kochi Y, Yamada R, Okada Y, Suzuki A, Miyatake A, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. A single nucleotide polymorphism in the IRF5 promoter region is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis*. 68:377-83, 2009.
13. Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, Kamatani Y, Mori M, Shimane K, Takahashi A, Tsunoda T, Miyatake A, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional SNPs in CD244 gene increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nat Genet*. 40:1224-9, 2008.
14. Okamoto A, Fujio K, van Rooijen N, Tsuno NH, Takahashi K, Tsurui H, Hirose S, Elkon KB, Yamamoto K. Splenic phagocytes promote responses

to nucleosomes in (NZB x NZW) F1 mice. J Immunol. 181:5264-71, 2008.

2. 学会発表

1. 岡本明子、藤尾圭志、岡村僚久、山本一彦  
NZB/W F<sub>1</sub> SLE モデルマウスにおける CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>  
LAG-3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の修飾因子の検討  
Inflammation and regeneration 30: 344,2010.

2. Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K.  
Identification of a disease-promoting CD4<sup>+</sup> T cell  
clone from MRL/lpr kidney using single cell analysis.  
14<sup>th</sup> International Congress of Immunology,  
PP-017-28

3. Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K.  
Analysis of Kidney CD4<sup>+</sup> T cells in lupus-prone mice.  
The 53<sup>rd</sup> Annual General Assembly and Scientific  
Meeting of Japan Collage of Rheumatology, IW1-1

4. Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K,  
Yamamoto K.  
Analysis of Kidney CD4<sup>+</sup> T cells in lupus-prone mice.  
Imflammation Research. 58:S168, 2009.

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

「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の有用性を検討した。膠原病患者 233 名で後ろ向き検討したところ、aPL-S は中央値 0[0-83]に分布し ROC 曲線は上に凸を描いた。ROC 曲線の AUC は 0.735(0.643-0.826)で APS 国際分類基準の AUC0.676(0.586-0.766)よりも高値だった。以上から aPL-S は診断に有用であることを示した。次に aPL-S および既存の抗リン脂質抗体検査単独と血栓症リスクとの関連を後ろ向き調査し、aPL-S の血栓症予後予測の可能性について検討した。2001 年から 2002 年に抗リン脂質抗体検査を行った膠原病患者 411 名について 2009 年まで後ろ向き追跡し、新規血栓症について調査したところ、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 型フォ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 $\geq$ 1、 $\geq$ 10、 $\geq$ 30、 $\geq$ 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( $\geq$ 1: 2.40 [1.13 - 5.06, p=0.019],  $\geq$ 10: 3.21 [1.42 - 7.25, p=0.004],  $\geq$ 30: 5.61 [2.32 - 13.75, p<0.0001],  $\geq$ 50: 6.88 [2.19 - 21.60, p=0.002])。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 (研究①) および aPL-S の血栓症予後予測の可能性 (研究②) について検討することとした。

B. 研究方法

研究①の対象は'06/10 月～'07/4 月に当科を受診した患者 233 名。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)、抗カルジオリピン抗体(aCL)、抗  $\beta$  2-GP I 抗体( $\alpha$   $\beta$  2GPI)、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)を測定した。各 aPL の APS 症状に対する相対危険度(オッズ比)をもとに各 aPL を 1-20 で配点し合計を「抗リン脂質抗体スコア(aPL-S)」と定義した。全患者の APS 症状 (血栓症および妊娠合併症) を調査し aPL-S が診断に有用か検討した。

研究②の対象は 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 LAC、IgG/M aCL 抗体、IgG/M  $\alpha$   $\beta$  2-GPI 抗体、IgG/M aPS/PT 抗体を測定し、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

(研究①) aPL-S は中央値 0[0-83]に分布し ROC 曲線は上に凸を描いた。ROC 曲線の AUC は

0.735(0.643-0.826) で APS 国際分類基準の AUC0.676(0.586-0.766)よりも高値だった。aPL-S のカットオフを 30 点に設定すると相対危険度は 11.9[95%CI:4.70- 30.3] で APS 国際分類基準の 4.38[2.23- 8.61]よりも高かった。

(研究②) 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

研究①の ROC 曲線による検討から aPL-S は定量的、総合的な APS 診断マーカーであることが示された。研究②では 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。以上より 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の検討も必要である。

#### E. 結論

aPL-S は抗リン脂質抗体症候群の診断マーカーとして有用であり、血栓症発症リスクの定量的、包括的なマーカーとな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. 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)

2. 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)

3. 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

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. Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibody: why do we need more assays? *Lupus* 19, 436-9, 2010

6. 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

7. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 68 ; 1030-5, 2009

8. Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S, and Koike T. STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 68, 1366-7, 2009



9. Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H. Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. *J Reprod Immunol* 79, 188-95, 2009.
10. Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. The effects of phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum* 60, 2457-67, 2009
11. 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.
12. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost* 34; 335-9, 2008

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

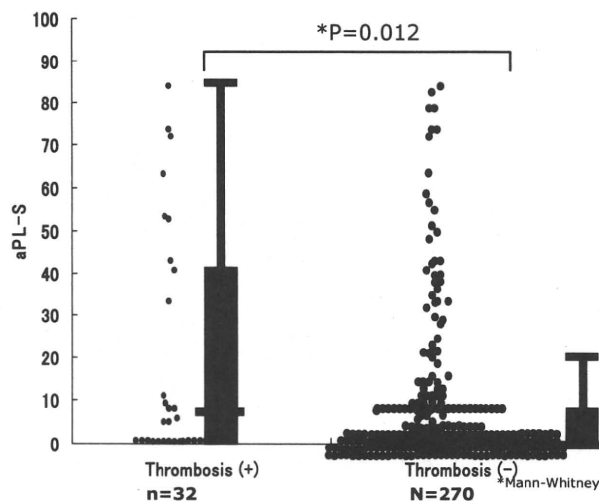


図1 抗リン脂質抗体の症状を有する患者（32名）と有さない患者（270名）の抗リン脂質抗体スコア（sPL-S）の分布。

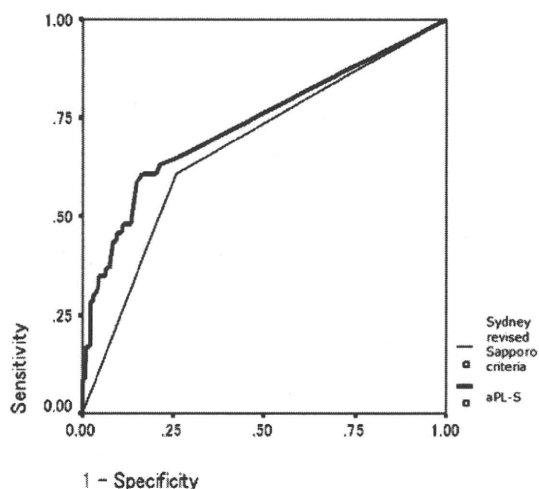


図2 抗リン脂質抗体スコアおよび札幌分類基準シドニー改変のROC 曲線

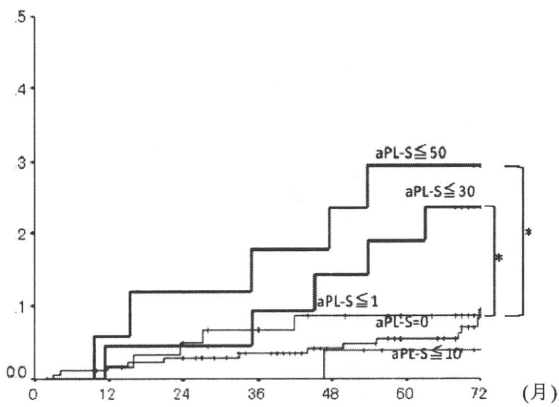


図3 aPL-S 得点群別血栓症発症率のカプランマイヤー法を用いた検討

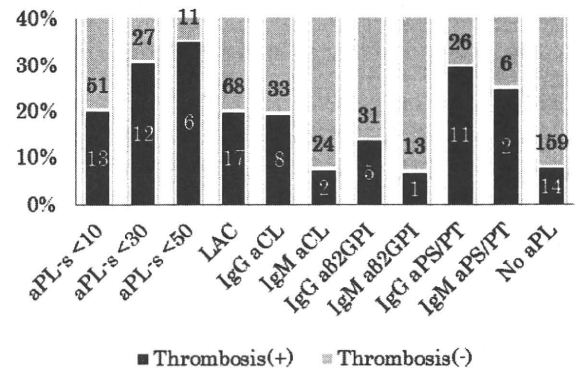


図5 aPL-S 各得点群および既存の抗リン脂質抗体検査における血栓症発症の陽性的中率

	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		85	17	3.2670(1.543-6.895)	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<	30	5	1.4740(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(2.023-11.04)	0.0001
IgM-aPS/PT	9.2<	8	2	2.8670(0.554-14.84)	0.1900

表4 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

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 発症に 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ほぼ一致する。その病態発生と CrG 発症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。これまでプロテオミクス解析を用いた AECA 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。我々はレトロウイ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 AECA の対応抗原を検索し、膜型蛋白 fibronectin leucine-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 は単一ではなく 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。AECA は血管内皮細胞と直接接触するため病因的意義も高いと考えられており、細胞傷害性に加え、血管内皮細胞の炎症性サイトカイン分泌の亢進、接着分子発現の亢進、血液凝固能の亢進、血管内皮細胞のアポトーシス誘導作用が報告されている。このような機能を有する AECA の対応抗原同定のために主にプロテオミクス解析が精力的に行われている。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。我々はレトロウイルスベクター、flow cytometry (以下 FACS)を用いた expression cloning system を構築し、SLE 患者血清中に認められる AECA の対応膜蛋白自己抗原の同定を目的とした。

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、レトロウイルスベクター(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、レトロウイルスベクター-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；レトロウイルスベクター (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 $\alpha$  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)FACS を用いたスクリーニングでは、AECA 活性を有する血清は、特に SLE、炎症性筋疾患、高安動脈炎で高率であった。FACS にて計測される平均蛍光強度(MFI)を定量化し、control 血清における平均+3SD をカットオフとすると、SLE における AECA 陽性率は 43%であった (n=110)。そのなかで特に強い AECA 活性を示したループス腎炎患者(WHOIV型)血清 (E10-19) を prototype AECA とし以後の実験に使用した。

(2) E10-19 血清より精製した IgG を用いて、HUVEC cDNA を stable に発現する細胞を染色し、陽性分画の cell sorting を施行した。2 回の sorting にて、E10-19 IgG に結合する細胞が濃縮され、得られた cell line より限界希釈法にて異なる 2 クロオンを単離した。

(3)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) の導入が確認された。

(4)両クローン、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。

(5)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。

(6)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。これまで AECA 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ていた。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り、今回我々は、これまでの AECA 対応候補のタンパク質とは性質が異なる新

規自己抗原候補タンパク質である FLRT2 を同定できた。患者血清より得られた抗 FLRT2 抗体の高力価陽性は SLE に特異的であり、通常 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。

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。一方、SLE 以外の自己免疫疾患では、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。

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, Shiota 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. Shirai T, Takahashi R, Tajima Y, Kohata K, Yamamoto J, Fujii H, Takasawa N, Ishizawa K, Ichinohasama R, Ishii T, Harigae H. Peripheral T cell lymphoma with a high titer of proteinase-3-antineutrophil cytoplasmic antibodies that resembled Wegener's granulomatosis. Intern Med 48:2041, 2009.
9. Hirabayashi Y, Ishii T. Clinical efficacy of tocilizumab in patients with active rheumatoid

arthritis in real clinical practice. Rheumatol Int 30:1041-8, 2010.

10. Oka Y, Kameoka J, Hirabayashi Y, Takahashi R, Ishii T, Sasaki T, Harigae H. Reversible bone marrow dysplasia in patients with systemic lupus erythematosus. Intern Med 47:737-42, 2008.

11. 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

12. 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

13. 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 HBc 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, Sendai

10. Tajima Y, Ishii T et al

The role of angiotensin on human lymphocytes

14<sup>th</sup> 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

12. 白井剛志, 田島結実, 高橋令子, 藤井博司, 高澤徳彦, 石井智徳, 張替秀郎

眼球突出, PR3 ANCA 高値を呈し Wegener 肉芽腫との識別を要した T 細胞リンパ腫の一例

第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 18 回国際リウマチシンポジウム 2009

13. 高澤徳彦, 白井剛志, 田島結実, 高橋令子, 藤井博司, 石井智徳, 張替秀郎

心筋, 大動脈壁に病変を呈した特発性好球增多症候群の 1 例

第 53 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 第 18 回国際リウマチシンポジウム 2009

14. 渡部龍, 白井剛志, 田島結実, 藤井博司, 高澤徳彦, 大口裕人, 大西康, 石井智徳, 張替秀郎  
妊娠に合併した TTP の 1 例

日本内科学会東北支部主催 第 189 回東北地方

会 2009

15. 高澤徳彦、白井剛志、田島結実、高橋令子、藤井博司、石井智徳、張替秀郎

心筋、大動脈壁に病変を呈した特発性好酸球増多症候群の1例

第19回 日本リウマチ学会 北海道・東北支部学術集会 2009

16. 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

SLE経過中、急速進行性の肺高血圧症を呈し、シクロホスファミド、ボセンタン、プロスタグランジン製剤による加療が奏効した一例

第24回日本臨床リウマチ学会 2009

17. TAJIMA Y, ISHII T, WATANABE R, SHIRAI T, FUJII H, TAKASAWA N, HARIGAE H

自己免疫疾患患者リンパ球におけるアンギオテンシン受容体の発現 / Angiotensin II Receptor expression on human lymphocytes in autoimmune diseases.

第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009

18. 石井智徳、白井剛史、藤井博司、張替秀郎  
膠原病の病態解明と治療最前線 大型血管の画像診断

第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008

19. Kobayashi M, Irie E, Shirota Y, Suzuki C, Onishi Y, Okitsu Y, Yamamoto J, Ishizawa K, Kameoka J, Ishii T, Harigae H

Severe hypogammaglobulinemia after rituximab chemotherapy due to the arrest of B cell differentiation

第71回日本血液学会学術集会 2008

20. 渡辺龍、白井剛志、田島結実、藤井博司、高澤徳彦、大口裕人、大西康、

石井智徳、張替秀郎

産褥期にTTPを発症した抗セントロメア抗体陽性の一例

第19回日本リウマチ学会 北海道・東北支部学術集会 2009

### 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、新たな分子標的治療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) を中心に、様々な自己免疫疾患・リウマチ疾患における血清・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 および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 や健康成人に比較して 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 活性による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. Matsuyama, Y., Okazaki, H., Tamemoto, H., Kimura, H., Kamata, Y., Nagatani, K., Nagashima, T., Hayakawa, M., Iwamoto, M., Yoshio, T., Tominaga, S., Minota, S. Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. J Rheumatol 37: 18-25, 2010.
3. Matsumoto, K., Nagashima, T., Takatori, S., Kawahara, Y., Yagi, M., Iwamoto, M., Okazaki, H., Minota, S. Glucocorticoid and cyclosporine refractory adult onset Still's disease successfully treated with tocilizumab. Clin Rheumatol 28: 485-7, 2009.
4. Nagashima, T., Hoshino, M., Shimoji, S., Morino, N., Kamimura, T., Okazaki, H., Minota, S. Protein-losing gastroenteropathy associated with primary Sjögren's syndrome: a characteristic oriental variant. Rheumatol Int 29: 817-20, 2009.
5. Aoki, Y., Iwamoto, M., Kamata, Y., Nagashima, T., Yoshio, T., Okazaki, H., Minota, S. Prognostic indicators related to death in patients with pneumocystis pneumonia associated with collagen vascular diseases. Rheumatol Int 29: 1327-30, 2009.
6. Shiraiishi, Y., Shibahara, H., Koriyama, J., Hirano, Y., Okazaki, H., Minota, S., Suzuki, M. Incidence of antisperm antibodies in males with systemic autoimmune diseases. Am J Reprod Immunol 61: 183-9, 2009.
7. Hayakawa, M., Hayakawa, H., Matsuyama, Y., Tamemoto, H., Okazaki, H., Tominaga, S. Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated

cleavage in vivo. Biochem Biophys Res Commun 387: 218-22, 2009.

8. 木村洋貴、岡崎仁昭. 総合内科専門医の育成のために リウマチ膠原病を守備領域にするために (解説). 日内会誌 98: 1417-23, 2009.
9. Kamata, Y., Iwamoto, M., Aoki, Y., Kishaba, Y., Nagashima, T., Nara, H., Kamimura, T., Tanaka, A., Yoshio, T., Okazaki, H., Minota, S. Massive intractable pericardial effusion in a patient with systemic lupus erythematosus treated successfully with pericardial fenestration alone. Lupus 17: 1033-5, 2008.
10. Nagashima, T., Okubo-Fornbacher, H., Aoki, Y., Kamata, Y., Kimura, H., Kamimura, T., Nara, H., Iwamoto, M., Yoshio, T., Okazaki, H., Minota, S. Increase in plasma levels of adiponectin after administration of anti-tumor necrosis factor agents in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 35: 936-8, 2008.
11. 岡崎仁昭. 生涯教育の担い手としての総合内科専門医. 日内会誌 97: 1922-9, 2008.

##### 2. 学会発表

1. 松山泰、岡崎仁昭、木村洋貴、長嶋孝夫、蓑田清次. 全身性エリテマトーデスにおける ST2 および ST2L の解析・第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京, 2008 年 6 月 13 日. (会誌 57 ; 417, 2008)
2. 松山泰、岡崎仁昭、長嶋孝夫、岩本雅弘、吉尾卓、蓑田清次. 血清 ST2 濃度は様々な自己免疫性疾患で上昇するが、経時的変化は疾患によって異なる・第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008 年 11 月 28 日. (会誌 57 ; 1503, 2008)
3. 松山泰、岡崎仁昭、為本浩至、早川盛禎、岩本雅弘、富永眞一、蓑田清次. Increased levels of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with active rheumatoid arthritis・第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 10 日. (プログラム 307, 2009)
4. 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、蓑田清次. 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)

5. 松山泰、岡崎仁昭、為本浩至、富永眞一、蓑田清次. 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)

6. 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)

7. 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)  
総合研究報告書

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-/-→Rag-1-/-マウスにおいて唾液量が減少していた、3)血清中に抗 M3R 抗体が検出された、4)M3R 反応性 T 細胞により唾液腺炎が誘導された、5)唾液腺に INF- $\gamma$  および IL-17 発現が認められ、M3R 反応性 T 細胞から IFN- $\gamma$  および IL-17 が有意に産生されていた。6) M3R-/-xIFN- $\gamma$ -/-→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。7) M3R-/-xIL-17-/-→Rag-1-/-マウスに関しては解析中。8) ROR $\gamma$ 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) (N1: MTLHNNSTTSPLFPNISSSWIHSPSDAGLP, 2: IHSPSDAGLP PGTVT HFGSYNVSRAAGNFS, N3: NVSRAAGNFSSPDGTTDDPLGGHTVWQV)、細胞外第一ドメイン(17AA): FTTYIIMNRWALGNLACDLW、細胞外第二ドメイン(25AA): KRTVPPGECF IQFLSEPTITFGTAI、細胞外第三ドメイン(14AA): VLVNTFCDSICPKTFWNLGY 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)唾液分泌量を測定した。
- 3)血清中の抗 M3R 抗体価を ELISA 法で解析した。
- 4)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。
- 5)M3R-/-→Rag-1-/-マウスの唾液腺における IFN- $\gamma$ 、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。
- 6)M3R-/-xIFN- $\gamma$ -/-→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- $\gamma$ 、IL-17 産生を検討した。
- 7)現在、M3R-/-xIL-17-/-→Rag-1-/-マウスにおいて唾液腺炎を解析した。
- 8)ROR $\gamma$ 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施行した。マウスの実