

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) 唾液分泌量は有意に減少していた。

3) 抗 M3R 抗体は有意に増加していた。

4) 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。

5) 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。

6) M3R-/-xIFN- γ -/- \rightarrow 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-/- \rightarrow Rag-1-/-マウスに関しては解析中。

8) 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 lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10715838-43, 2010.

6. Tsuboi, H., Matsumoto, 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. Functional 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- β 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.
11. Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Minami, R., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Nishimura, Y., and Sumida, T. Altered peptide ligands inhibit glucose-6-phosphate isomerase (GPI) peptide-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11:R167. Epub 2009 Nov.
12. Wang, Y., Ito, S., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., Tsutsumi, A., Uchida, K., Usui, J., Yamagata, K., and Sumida, T. Analysis of cytokine balance in lupus nephritis by laser-microdissection. *Clin. Exp. Immunol.* 159:1-10. Epub 2009 Oct 6.
13. Inoue, A., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. Role of tumor necrosis factor- α -induced adipose-related protein in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum. Ther.* 11:R118. Epub 2009 Aug 6.
14. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Hayashi, T., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. The decrement of soluble CD1d proteins affects the function of NKT cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 24:481-486, 2009.
15. Tanaka, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. B cells have crucial role as autoantibody producers in arthritis mediated by glucose-6-phosphate isomerase. *Clin. Exp. Immunol.* 155:285-294, 2009.
16. Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Hom, G., Graham, R.R., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Ohashi, J., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Replication of the association between C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* 60: 553-558, 2009.
17. Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Arthrogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10:R130. Epub 2008. Nov.7.
18. Kawasaki, A., Ito, I., Hikami, K., Ohashi, J., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Koga, M., Arinami, T., Graham, R. R., Hom, G., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of STAT4 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Res. Ther.* 10:R113, Epub 2008 Sep9.
19. Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi, T., Iwanami, K., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Therapeutic effects of antibodies to TNF α and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10: Epub 2008 Jun 5, 2008.
20. Yoshiga, Y., Goto, D., Segawa, S., Ohnishi, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Taniguchi, M., and Sumida, T. NKT cells are novel accelerator of IL-17 in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 22: 369-374, 2008.
21. Iwanami, K., Matsumoto, I., Watanabe, Y., Mihara, M., Ohsugi, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Kishimoto, T., and Sumida, T. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. *Arthritis Rheum.* 58:754-763, 2008.
22. Matsui, H., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Suzuki, T., Iwanami, K., Kohno, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. Expression of Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67:571-572, 2008.
23. Nakamura, Y., Wakamatsu, E., Tomiita, M., Kohno, Y., Yokoka, J., Goto, D., Ito, S., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., and Sumida, T. High prevalence of autoantibodies to muscarinic 3 acetylcholine receptor in patients with juvenile Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 67:136-137, 2008

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)

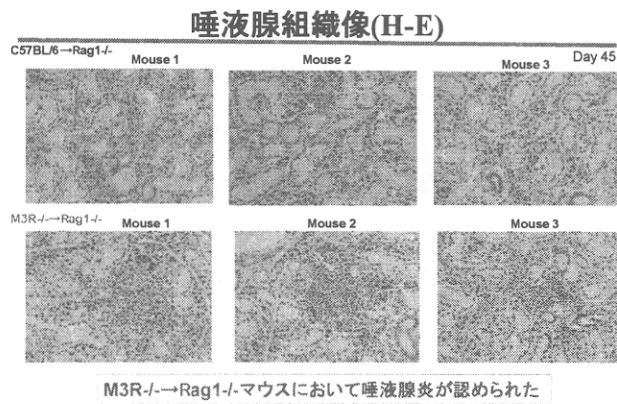


図2 M3R^{-/-}→Rag1^{-/-}マウスにおける唾液量
唾液分泌量の測定

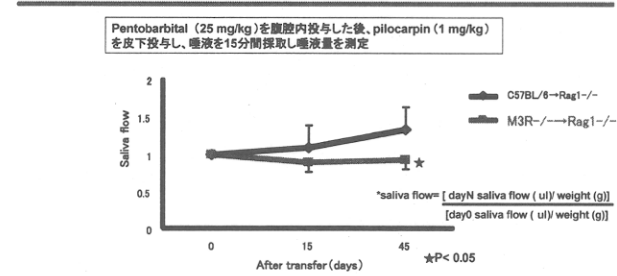


図3 M3R^{-/-}→Rag1^{-/-}マウスにおける抗M3R抗体価

抗M3R抗体

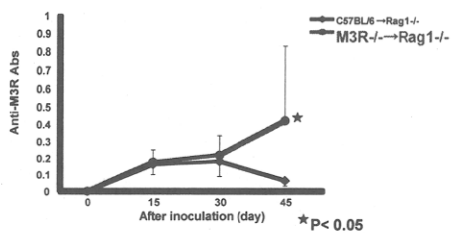


図4 M3R^{-/-}→Rag1^{-/-}マウス唾液腺組織の免疫化学染色像

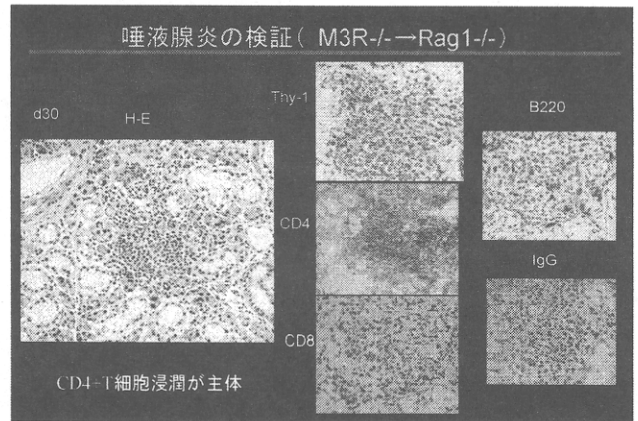


図5 M3R^{-/-}→Rag1^{-/-}マウス唾液腺組織におけるIL-17、IFN- γ 発現

IFN- および IL-17が自己免疫性唾液腺炎に認められる

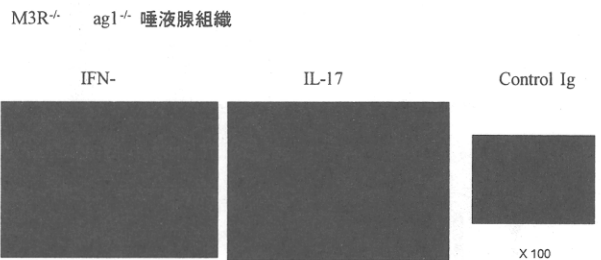


図6 M3R^{-/-}xIFN- γ ^{-/-}マウスにおける唾液腺組織 (H-E 染色) および M3R 反応性 T 細胞からのサイトカイン産生

B6M3R^{-/-}xIFN- γ ^{-/-}マウスにおける唾液腺炎

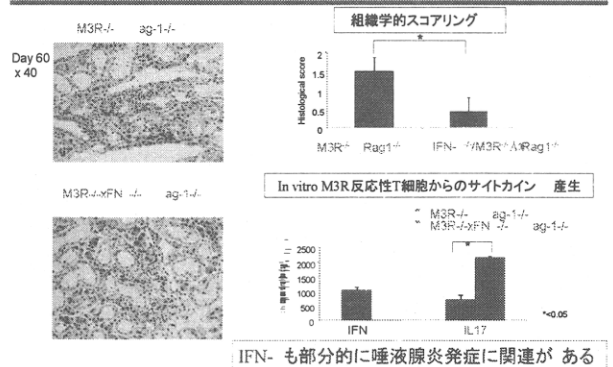
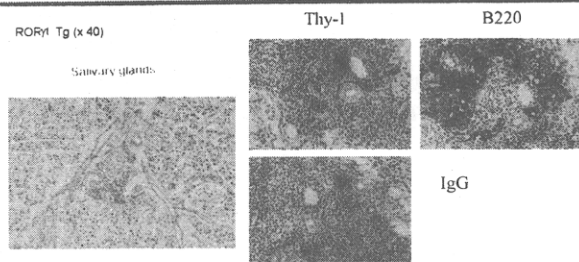


図 7 M3R-/-CD3+→Rag-1-/-マウスにおける唾液腺組織像 (H-E 染色、免疫化学染色、Tunel 染色)

ROR γ t 転写因子トランスジェニックマウスにおける唾液腺炎

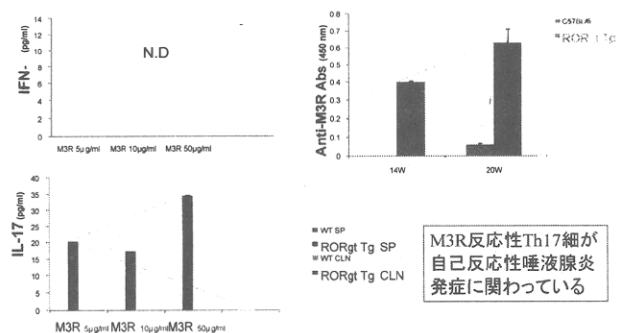


ROR γ t Tg マウスの唾液腺において、Thy1 陽性細胞、B220 陽性細胞の浸潤および IgG の沈着が認められた

ROR γ t 過剰発現は唾液腺炎発症に
関連する

図 8 ROR γ t 転写因子トランスジェニックマウスにおいて 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 t Tg において M3R 反応性 T 細胞および抗 M3R 抗体が検出



M3R 反応性 Th17 細胞が自己反応性唾液腺炎発症に関わっている

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、正常および障害培養マウスポドサイトを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。また、臨床的な観点から、全身性エリテマトーデス（SLE）、血管炎症候群および関節リウマチ患者の尿中ポドサイト、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。cDNA microarray 解析から androgen receptor mRNA の発現量が障害マウスポドサイトにおいて増加していた。また障害ポドサイトに見られた細胞死は、IL-17 添加により抑制された。全身性エリテマトーデスにおける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、microarray、遺伝子発現解析、サイトカインによる刺激実験を行った。ループス腎炎 (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。腎生検施行症例で、増殖型ループス腎炎 (III 型および IV 型) 症例は U-PCX/U-Cr 高値であった (図 2)。また、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

本来、男性は女性に比して進行性腎障害リスクが高いとされており、AR の発現が障害ポドサイトにおいて増加していたことは興味深い。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など、研究を進めたい。炎症性サイトカインとして自己免疫疾患への関与が近年注目されている IL17 が糸球体上皮増殖性疾患に関与する可能性が示され、自己免疫疾患とそれに関連した腎障害との関係において重要な役割を担う可能性もあり、今後の検討が必要と考える。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, et al. 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.

3. Yamamoto A, Sato K, Miyoshi F, Shindo Y, Yoshida Y, Yokota K, Nakajima K, Akiba H, Asanuma Y, Akiyama Y, Mimura T. Analysis of cytokine production patterns of peripheral blood mononuclear cells from a rheumatoid arthritis patient successfully treated with rituximab. Mod Rheumatol. 2009 Nov 7. [Epub ahead of print]

4. Yokota K, Akiyama Y, Asanuma Y, Miyoshi F, Sato K, Mimura T. Efficacy of tacrolimus in infliximab-refractory progressive rheumatoid arthritis.: Rheumatol Int.. 29:459-61, 2009.

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)

3. Kajiyama H, Abe Y, Sakairi T, et al. HIV1 accessory protein Vpr disrupts cytoskeletal structure of mouse podocytes in vitro. J Am Soc Nephrol. 20 (アメリカ腎臓学会, San Diego, 2009)

4. Hiroshi Kajiyama, Ken Kasahara, Sachiya Yamamoto, Jeffrey B. Kopp, Toshihide Mimura. A Genetic Approach for Generating Cyclosporin A Derivatives with Protective Effects on Podocytes. . J Am Soc Nephrol. 20, 2009 (アメリカ腎臓学会, San Diego, 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

図1. 尿中 podocyte 検出と腎障害の有無

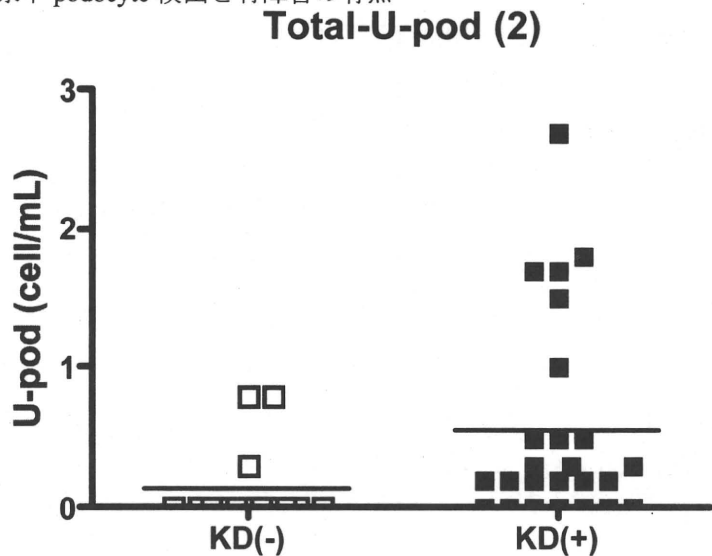
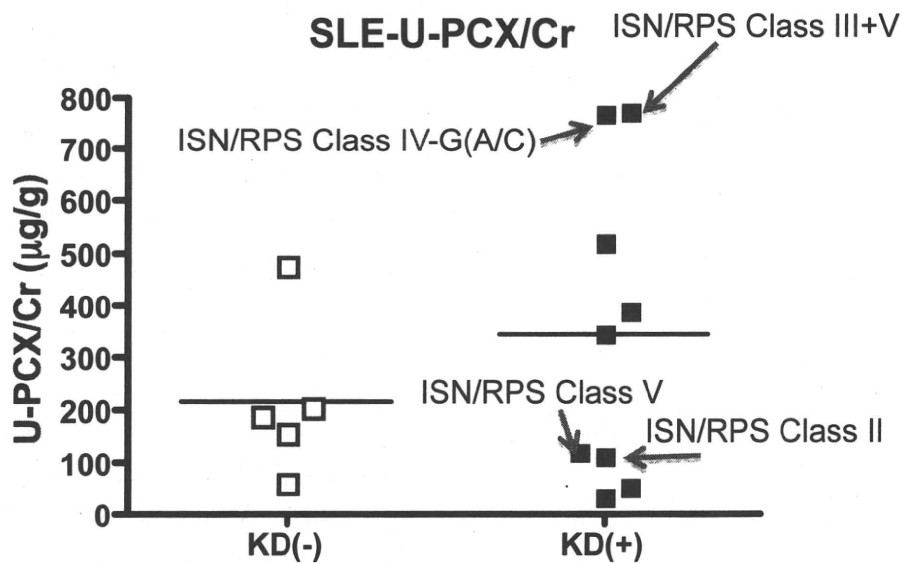


図2. 尿中ポドカリクシン相対的濃度と腎障害



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

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 津坂憲政 東京歯科大学市川総合病院内科 准教授
飯塚 篤 埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科非常勤医師
近藤恒夫 埼玉医科大学大学院医学研究科臨床医学研究系内科学大学院生
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、網羅的遺伝子発現解析並びに候補分子解析を行なった。TCR ゼータ鎖の発現異常に加え、網羅的発現会席で I 型インターフェロンの発現亢進が示された。これら分子間の関連を検討する事は、真の分子機序を追求する上で、興味深く今後の解析が期待される。

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 mRNA を網羅的に発現解析する。同時に、これまでの研究によって明らかとなった TCR ゼータ鎖、aEb7 インテグリン分子の異常との関連について解析し、SLE の分子標的としての各分子の役割について評価した。

B. 研究方法

- 1) 網羅的発現解析：
 - a. 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）。
 - b. 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。
 - c. 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。
- 2) TCR ゼータ鎖の発現異常の解析

- a. 3'-UTR 部位特異的欠失変異細胞株野生型 3'-UTR を有する TCR ゼータ鎖を 3'側より 100bp 程度短い 7 変異株を作成。同時に、保存領域 CS-1 および CS-2 を欠失させた変異株を作成。SLE 患者から樹立された short-3'-UTR とともに、ゼータ欠損マウス T 細胞ハイブリドーマ 2B4 にトランスフェクとして、そのゼータ鎖発現、サイトカイン産生能などを検討。
- b. In vivo 免疫学的解析 カルシニューリン阻害薬としてシクロスポリン A、タクロリムスが投与される直前、そして投与後の患者末梢血を対象として、FACS 免疫プロットによって蛋白発現を検討。
- c. 臨床的検討 投与前、投与後の臨床的活動性を評価し、同時に、薬物血中濃度を測定。

C. 研究結果

- 1) 網羅的発現解析
 - a. 細胞分離 SLE 3 症例から、CD4+T 細胞 5.0~9.4x10⁵、CD8+T 細胞 4.0~8.6x10⁵、CD19+B 細胞 2.9~6.5x10⁵、CD14+単球 2.0~7.2x10⁵ 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）。
 - b. 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, GR03, TLR8, CD14+ 単球では、thrombomodulin, coagulation factor III, endothelin 1, integrin p150/95, FcGRT, GR03, 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。

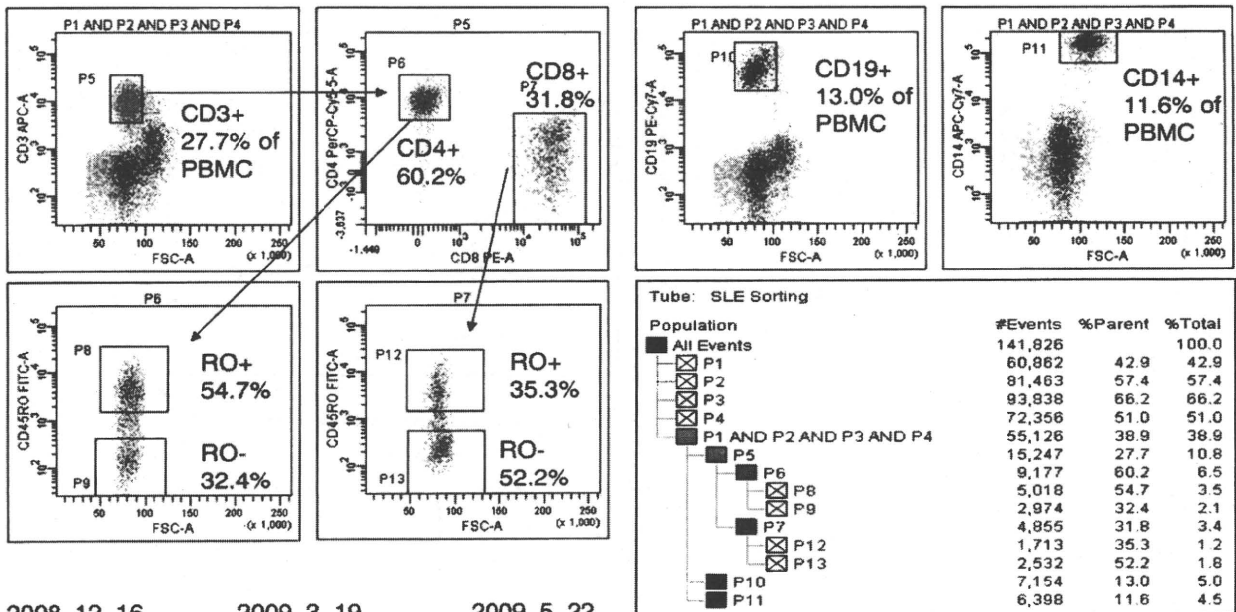
2) TCR ゼータ鎖発現異常

a. ゼータ鎖蛋白発現に影響を及ぼす 3'非翻訳領域 (3'-UTR) 3'UTR の欠失変異株 7 クローンでの解析から、+871~+950 および +950~+1070 の領域でゼータ蛋白発現の低下が見られ、この間に蛋白発現に関与する重要な領域が存在する可能性が考えられた。この領域は、種で保存された CS-1、CS-2 に相当している事から、CS-1、CS-2 の欠失変異株を作成して、これを検証した。その結果、CS-1、CS-2 共に、ゼータ蛋白発現が著明に低下し、この 2 領域が中心的な

役割を担っている事が判明した。この 2 つの欠失変異株のゼータ鎖 mRNA 安定性は低下し、IL-2 産生能も低下する事から、CS-1、CS-2 は mRNA 安定性を介してゼータ鎖蛋白発現を制御する重要な領域である事が明らかとなった。

b. TCR ゼータ鎖の発現が低下した SLE 患者における治療後の変化 シクロスポリン A、タクロリムスが投与された症例の投与前末梢血 T 細胞では、健康人コントロールに比して有意な TCR ゼータ鎖発現低下が認められ、以前からの報告が再度、確認された。投与、4~12 週間後の末梢血 T 細胞では、一部の症例で低下していたゼータ発現が回復していた。この発現回復は、一部の細胞サブセットのみならず T 細胞全体として観察された。以上より、カルシニューリン阻害薬は、一部の SLE 症例の高度に発現低下した TCR ゼータ鎖の蛋白発現を正常化させる作用を有する事が明らかとなった。

3) TCR ゼータ発現低下と網羅的発現解析で明らかになったインターフェロン発現亢進との関連 in



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 FACR Aria 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、5 x10⁵~2.9x10⁶ 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。

in vitro インターフェロン-ガンマ産生との関連を解析した結果、両者には有意の逆相関が存在することが明らかとなった(図2)。網羅的発現解析で明らかとなったIFI27を初めとする1型インターフェロンとの関連を明らかにする必要がある。

D. 考察と結論

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。一方、従来の解析で明らかになった TCR ゼータ鎖の発現低下は、カルシニューリン阻害薬によって一部の症例で回復が認められ、その分子機序の追求が必要である。網羅的発現解析で明らかとなった1型インターフェロンと TCR ゼータ鎖の異常との関連は、真の分子機序を追求する上で、興味深く今後の解析が期待され

る。

健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 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.

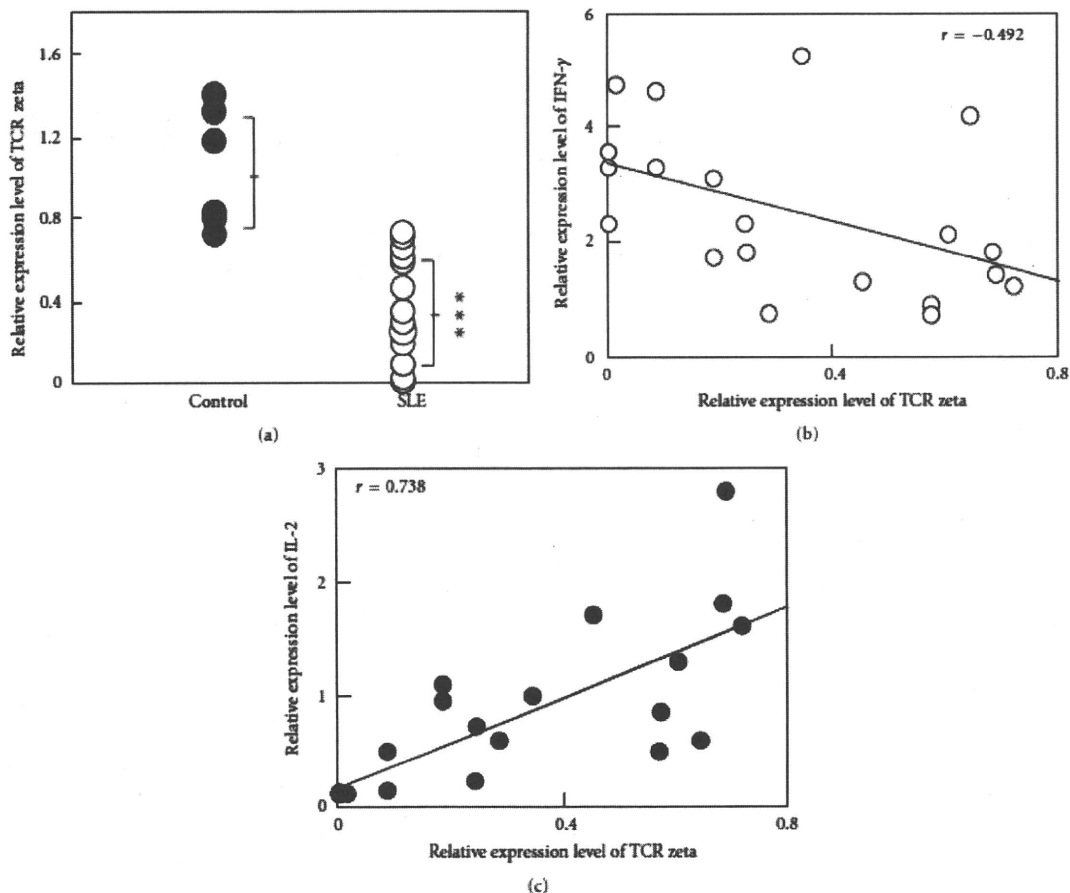


図2 TCR ゼータ鎖発現と in vitro インターフェロンガンマ産生との相関

3. 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.
 4. 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-sialoadenitis with subsequent secondary portal hypertension and remarkable IgG4-linked IL-4 elevation. *Rheumatology*, 49:1789-91, 2010.
 5. Suzuki K, Kameda H, Kondo K, Tanaka Y, and Takeuchi T. Sever acute thrombotic exacerbation in two cases with of anti-phospholipid syndrome after retreatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory systemic lupus erythematosus.. *Rheumatology* 48: 198-199, 2009
 6. Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Sekiguchi H, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Single Center Prospective Study for Efficacy and Safety of Tacrolimus in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology Int* 29:431-6, 2009.
 7. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, and Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin(IL)-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis* 68: 1580-84, 2009.
 8. Takeuchi T, Miyasaka N, Inoue K, Abe T, and Koike T. Impact of through serum level on Radiographic and Clinical Response to Infliximab plus Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis: results from the RISING Study. *Mod Rheumatology* 19:478-87, 2009.
 9. Tanino M, Matoba R, Nakamura S, Kameda H, Amano K, Okayama T, Nagasawa H, Suzuki K, Matsubara K, and Takeuchi T. Prediction of efficacy of anti-TNF biologic agent, infliximab, for rheumatoid arthritis patients using a comprehensive transcriptome analysis of white blood cells. *Biochem Biophys Research Comm* 387: 261-265, 2009.
 10. Tsuzaka K, Itami Y, Kumazawa C, Suzuki M, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. The conservative sequences in 3'UTR of TCR ζ mRNA regulate the production of TCR ζ and TCR/CD3 complex in SLE T cells. *Biochemical Biophysical Research Communications* 367: 311-317, 2008
 11. Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T: Effect of Interleukin 2 on synthesis of B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) in human peripheral blood mononuclear cells, *Cytokine*, 44(1):44-8, 2008
2. 学会発表
1. K. Yoshimoto, C. Kumazawa, K. Tsuzaka, T. Abe, T. Takeuchi. The expression of an integrin $\alpha E\beta 7$ may induce abnormal T cell activation. 9th annual meeting for European League Against Rheumatism, 2008
 2. Tsuzaka K, Itami Y, Kumazawa C, Tanak M, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T: 14-kD Protein binds to the conservative region in TCR zeta mRNA 3'UTR and regulates the production of TCR zeta and TCR/CD3 complex. The EULAR annual congress of rheumatology. June. 2008, Paris, France, Abstract presentation.
 3. Kondoh T, Suzuki K, Kameda H, Nagasawa H, Nishimura K, Kurasawa T, Okuyama A, Nishi E, Sekiguchi N, Takei H, Abe H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T: Safety and efficacy of oral pulse cyclophosphamide (OPCY) for systemic rheumatic diseases. *APLAR*, Sep 26, 2008, Poster presentation
 4. 竹内 勤: 免疫難病における新しいターゲット分子と制御 シンポジウム 第 37 回日本臨床免疫学会総会. 2009 年 11 月、東京.
- 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

ループス腎炎治療成績の後ろ向き調査と SLE 診断法の開発

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 高橋 裕子 同膠原病科 医員、
川田 英明 同研究所難治性疾患研究部 流動研究員、
石坂 幸人 同研究部 部長

研究要旨 I) ループス腎炎の後ろ向き研究：本班研究（19年度まで）で SLE「初期発症腎炎」の予後良好、「遅発腎炎」の予後不良を見出した（G 文献 8）。20年度にシクロホスファミド反復静注（IVCY）の有効性（不可逆腎障害に至った率）を、同調査集団で検討した。初期発症腎炎は IV 型でも、ステロイド単独治療で予後良好であり、IVCY 併用群と差がなかった。遅発腎炎群では、IVCY 併用群がステロイド単独群に比べ、有意に予後良好だった。IVCY 併用例の殆どが再発・再々発でも治療に反応した。したがって治療法の効果判定に際し、腎病理分類だけでなく、「初期発症腎炎」「遅発腎炎」を区分し、同一区分の中で比較するのが有意義と考えられた。

II) SLE の血清診断マーカーの探索：random peptide display library 法で患者および健常血清と反応するペプチドを得て、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。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-class I-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

I) ループス腎炎の後ろ向き研究：本班研究（19年度まで）でループス腎炎の「初期発症腎炎」の予後良好、「遅発腎炎」の予後不良を見出した（G 項、文献 8）。

II) SLE の血清診断マーカーの探索：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。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

I) 自施設・患者団体・班 10 施設のループス腎炎（計 380 人）について、シクロホスファミド反復静注（IVCY）の有効性を検討した。

a) 班 10 施設では、腎炎の初回治療で IVCY が併用

された例が多かったので、初回 IVCY 治療の長期予後成績を「初期発症腎炎」「遅発腎炎」それぞれでステロイド単独治療（一部の症例にタクロリムス、シクロスポリン、ミゾリピン併用あり）と比較した。b) 自施設病歴および患者団体集計では、IVCY 併用は初期発症腎炎での使用例が稀で、おもに遅発腎炎に使われ、しかも初回治療でなく、再燃を反復した状況での使用がほとんどであった。その理由は、これらの集団では IVCY 使用が近年になって行われ、初期発症腎炎の初回治療という比較的古い時期には使用されていないためである。

そこで重症腎炎に対し、IVCY 併用がステロイド単独に優ったかどうか、下記の症例群を選定し比較した：「遅発腎炎」かつ「ネフローゼ、RPGN、腎組織 III、IV、V のいずれか」を呈したものとし、さらに

「治療介入されないまま腎障害が固定した例を除く」した。48例がこれに該当した。

II) Random peptide display library 法で患者 & 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か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-class I (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)

I, II の研究ともに、自施設倫理審査会(臨床研究および検体利用委員会)で承認された。

C. 研究結果

I) ループス腎炎の後ろ向き研究:

a) ループス腎炎の初回治療: IVCY が使用されたのは、殆どが IV 型症例であった。

最終観察時に不可逆腎障害(慢性腎不全または持続ネフローゼ)に至った率は;

「初期発症腎炎」IV 型において、

IVCY なし群 4/29 (14%)、IVCY 併用群 3/18 (17%) と同程度であり、IVCY 併用の利点が見出せなかった。

「遅発腎炎」では、IV 型において、

IVCY なし群 5/7 (71%)、IVCY 併用群 1/4 (25%)

($p=0.18$)、腎組織・生検有無によらない集計で、

IVCY なし群 10/25 (40%)、IVCY 併用群 1/11 (9%)

($p=0.06$) であり、有意差はないが、IVCY 併用

群で低い傾向がみられた。

b) 自施設病歴および患者団体集計の、「遅発腎炎」かつ「ネフローゼ、RPGN、腎組織 III、IV、V のいずれか」: この群の治療成績について、不可逆腎障害に至った率は、

IVCY なし群 21/37 (58%)、IVCY 併用群 2/11 (18%)

($p=0.023$) と、IVCY 併用群で有意に低かった。

IVCY なし群のうち、寛解または軽度尿蛋白を示した群では、経過中の腎炎再発が、患者の 4/16 (25%; 平均観察期間 21.8 ± 8.5 年) にみられ、不可逆腎障害に至った群では 19/21 (90%; 平均観察期間 24.5 ± 9.4 年) にみられた、という当然予想される差を示した。両群の平均観察期間に差はなく、不可逆腎障害に至った時期は、最終観察時よりも平均 9.8 ± 6.8 年前(すなわち SLE 発症から平均 14.7 年後)であった。

IVCY は、前述のようにほとんどが再発を反復した後の最終腎炎再発時に併用されていたが、改善群において、IVCY 使用から最終観察時まで 1-7 年(平均 3.8 ± 1.9 年)の時点で、腎寛解 4 例 + 軽度尿蛋白 5 例、改善比率 9/11 (82%) と良好な成績が示唆された。

IVCY 併用群の(SLE 発症から測った)観察平均期間は 16.5 ± 8.0 年であり、併用なし群の 23.3 ± 9.0 年より短かったが、これは IVCY 使用例が近年増したためである。IVCY なし群で、不可逆腎障害に至るまでの平均期間が、上記 14.7 年であったことと比べると、IVCY 併用群に不可逆腎障害が少なかった理由が、観察期間の短さのためではないことも示唆される。

II) SLE の血清診断マーカーの探索:

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 2011, 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

I) ループス腎炎の後ろ向き研究：

従来の文献で、IV 型ループス腎炎に対する、シクロホスファミド反復静注 (IVCY) の有効性が確立した根拠は、ステロイド単独治療では腎不全が高率だが、IVCY 併用によって腎不全率を減らせる、ということであった。しかし現在までのところ、IVCY を含むどの治療試験でも、ループス腎炎の発症時期は考慮されず、病理型分類のみに注目されてきた。諸報告の患者背景をみると、SLE 発症と腎炎発症の時間間隔は幅広く、初期発症型と遅発型が混合されていると考えられる。さらに殆どの場合、初回治療か再発時治療かの区別も明示されていないのが、ループス腎炎治療の文献の現状である。

我々の今回の研究では、ループス腎炎の治療法の効果判定に際し、既存の腎病理の分類だけでなく、「初期発症腎炎」「遅発腎炎」を区分し、同一区分の中で比較評価することが有意義と考えられた。すなわち IVCY の併用効果は、予後の悪い遅発腎炎群にお

いて明瞭となり、予後のよい初期発症腎炎での利点は明らかでない。

II) SLE の血清診断マーカーの探索：

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 (G 項、文献 5)、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、それらの中の一つである。

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

I) ループス腎炎に対するシクロホスファミド併用治療は、遅発した腎炎に明確な適応がある。

II) “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探索法は、有効と考えられる。この方法で SLE に新規自己抗体、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。

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
8. Takahashi Y, Mizoue T, Suzuki A, Yamashita H, Kunimatsu J, Itoh K, Mimori A : Time of initial appearance of renal symptoms in the course of systemic lupus erythematosus as a prognostic factor for lupus nephritis. *Modern Rheumatol* 19:293-301, 2009
9. Kubota K, Ito K, Morooka M, Mitsumoto T, Kurihara

K, Yamashita H, Takahashi Y, Mimori A. Whole-body FDG-PET/CT on rheumatoid arthritis of large joints. *Ann Nucl Med*. 23:783-91, 2009

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

- 1~40. 日本リウマチ学会総会 (30題)、日本リウマチ学会関東支部会 (5)、日本内科学会関東地方会 (5)

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.
4. Yamashita H, Kubota K, Takahashi Y, Kunimatsu J, Shimizu A, Eri T, Itoh K, Mimori A: Value of PET/CT in clinical practice in patients with possible spondyloarthropathy. The 77th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Philadelphia, Oct, 2009

5. Takahashi Y, Haga S, Yamashita H, Ishizaka Y, Mimori A: Autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with rheumatic diseases. The 77th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Philadelphia, Oct, 2009

6. Kunimatsu J, Itoh K, Yanai A, Shimizu A, Takahashi Y, Suzuki A, Yamashita H, Mimori A: Quantitative assessment of cerebral blood flow in patients with polymyalgia rheumatica with mood disorder. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2008, Paris, Jun, 2008

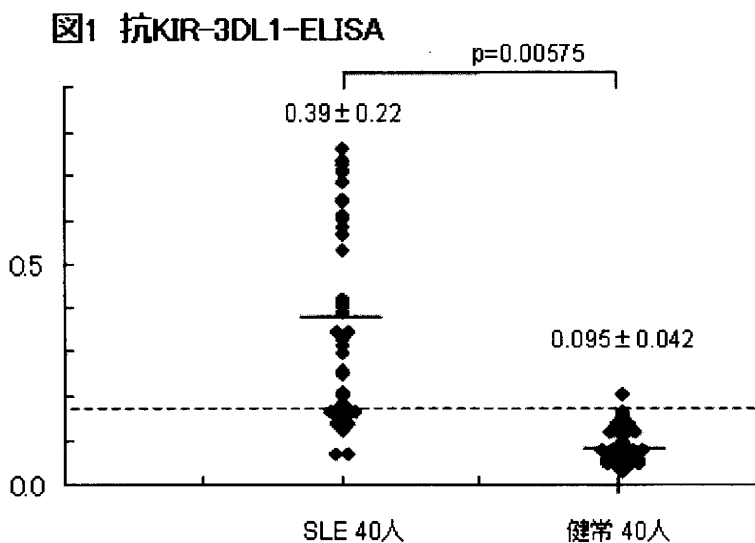
7. Shimizu A, Itoh K, Kunimatsu J, Takahashi Y, Suzuki A, Yamashita H, Mimori A: Efficacy of combination therapy of TNF inhibitors and bisphosphonates on radiographic progression of rheumatoid arthritis.

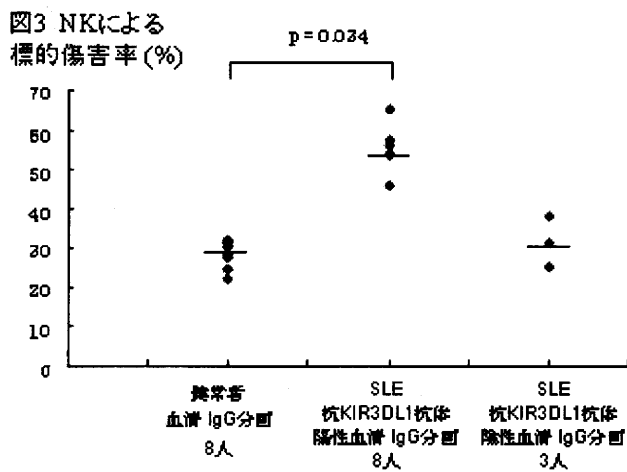
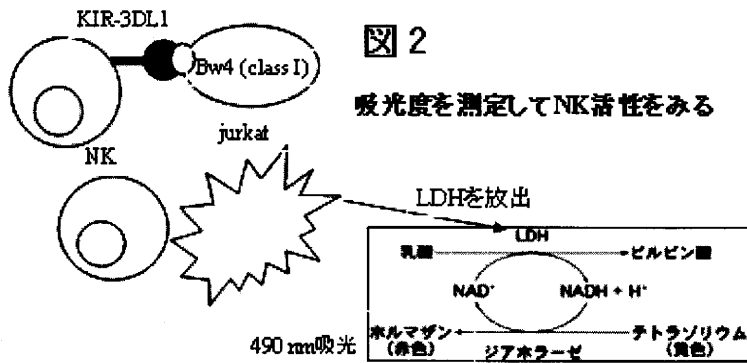
APLAR, Scientific Meeting, Yokohma, Sept, 2008

8. Takahashi Y, Sugiyama H, Kunimatsu J, Shimizu A, Eri T, Itoh K, Mimori A: A risk assessment of nontuberculous mycobacteriosis during TNF blocking therapy for rheumatoid arthritis. The 76th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, San-Fransisco, Oct, 2008

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





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

A: jurka細胞が自然放出する培養上清のLDH値

B: jurka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）
総合研究報告書

筋炎特異自己抗体の臨床・免疫遺伝学的特徴とその臨床的有用性に関する研究

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 本研究は、筋炎特異自己抗体である抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体、抗 SRP 抗体と関連する臨床病態と免疫遺伝学的特徴を追究するとともに、新たな抗 SRP 抗体測定法を開発した。1) 抗 ARS 抗体{HisRS (Jo-1), AsnRS(KS), AlaRS(PL-12), GlyRS(EJ), ThrRS(PL-7), IleRS(OJ):}が同定された 48 例を対象とし、かかる症例の臨床像と免疫遺伝学的背景との関連を検討した。筋炎併発 22 例中 15 (Jo-1:8, EJ:5, PL-7:1, PL-12:1)例(68%)が DRB1*0405-DQA1*0303-DQB1*0401 を持ち、健常人コントロール 22% に比べ、高頻度であった (OR = 7.7, P=0.003)。筋炎非合併 26 例中 16(KS:8, PL-12:5, PL-7:2, EJ:1)例(62%)が DR2 (DRB1*1501/1502)を持ち、健常人コントロール 33% に比べ、高頻度であった(OR=3.3, P=0.01)。2)免疫沈降法で抗 SRP 抗体が検出された全 18 例血清が、SRP-54 kDa 蛋白を抗原とした Elia 法で高力価陽性を示した。18 例中 16 例(89%)が筋炎を持ち、14 例中 9 例(64%)がステロイド療法抵抗性筋炎であった。筋組織を詳細に検討し得た全 8 例が炎症性細胞浸潤のない壊死性筋炎の所見を示した。DR8 (DRB1*0802/*0803)が健常人に比し、高頻度であった(44%vs.20%)。3)抗 PL-12 抗体陽性 8 例中、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。間質性肺炎を全 8 例に認め、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 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)。

A. 研究目的

多発性筋炎・皮膚筋炎(polymyositis/dermatomyositis:PM/DM)患者血清中には、特異自己抗体が見出され、それぞれ特徴的臨床像と密接に関連し、診断、病型分類、臨床経過の予測など臨床的有用性が報告されている。しかし、その関連病態、免疫学的性状、産生機序などは未だ不明な点も多い。また、かかる自己抗体の検出は、煩雑な技術を要する RNA 免疫沈降法により行われ、その測定は一部の研究施設に限られている。本研究は、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(aminoacyl tRNA synthetase: ARS)抗体、抗シグナル認識粒子(Signal Recognition Particle: SRP)抗体の臨床的意義、免疫遺伝学的特徴を追究するとともに、臨床的に有用な新たな抗 SRP 抗体測定法を開発すること、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、患者末梢白血球より抽出した genomic DNA を PCR-RFLP などを用い、検討した。4) Sf9 細胞/baculovirus システムにより発現した、リコンビナント SRP-54kDa 蛋白(Direct AG, Germany)をビオチン化した後、抗原とした酵素免疫測定法(SRP-Elia)、免疫プロット法により、抗 SRP 抗体陽性血清と対照血清(PM を含む他の膠原病患者血清、健常人血清)を測定し、従来の免疫沈降法と比較検討した。5) 抗 ARS 抗体、抗 SRP 抗体などの筋炎特異自己抗体陽性例の臨床症状、臨床検査所見などを歴史的に検討した。

C. 研究結果

【抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体の臨床像と免疫遺伝学的背景との関連】

1) 抗 ARS 抗体陽性全 48 例が ILD、22 例が筋炎を持っていた。2) 筋炎併発 22 例中 15 (Jo-1:8, EJ:5, PL-7:1, PL-12:1) 例 (68%) が DRB1*0405-DQA1*0303-DQB1*0401 を持ち、健常

人コントロール 22% に比べ、高頻度であった (odds ratio (OR) = 7.7, P=0.003)。3) 筋炎非合併 26 例中 16(KS:8, PL-12:5, PL-7:2, EJ:1)例(62%)が DR2 (DRB1*1501/1502)を持ち、健常人コントロール 33% に比べ、高頻度であった(OR=3.3, P=0.01)。さらに、抗 EJ 抗体陽性 7 例中 4 例(57%)が DRB1*0901-DQA1*0302-DQB1*03031 ハプロタイプを持ち、健常人コントロール 28% に比べ、高頻度であった。

【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】1) 全 18 対象例血清が、SRP-54 kDa 蛋白を抗原とした Elia 法で高力価陽性を示し、免疫プロット法でも確認された。一方、抗 ARS 抗体や抗 U1 RNP 抗体など他の筋炎特異自己抗体陽性血清を含む対照血清は陰性を示した。2) 18 例中 16 例(89%)が筋炎を持ち、14 例中 9 例(64%)がステロイド療法抵抗性筋炎であった。3) 筋組織を詳細に検討し得た全 8 例が炎症性細胞浸潤のない壊死性筋炎の所見を示した。4) 免疫遺伝学的背景の検討では、DR8 (DRB1*0802/*0803)が健常人に比し、高頻度であった(44%vs.20%)。

【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】

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。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。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。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。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)。

D. 考察

【抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体の臨床像と免疫遺伝学的背景との関連】

抗 ARS 抗体が ILD を合併する筋炎という均質な病像と関連することが報告されてきた。しかし、我々は抗 KS 抗体が抗 Jo-1 抗体などより筋炎のない ILD とより密接に関連するなど、各抗 ARS 抗体の関連臨床像の多様性について明らかにしてきた。本研究により、抗 ARS 抗体陽性例において、筋炎併発 ILD

例と DR4、筋炎非併発 ILD 例と DR2、との関連が明らかとなった。これまで、抗 Jo-1 抗体と DR4、抗 SRP 抗体と DR8 との相関など、筋炎特異自己抗体と HLA との関連が示されてきたが、抗 ARS 抗体関連臨床像の発症に対し、抗体特異性より、むしろ免疫遺伝学的背景の関与が示された。

【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】

抗 SRP 抗体の検出は、煩雑な技術を要する RNA 免疫沈降法における 7SL-RNA との反応性により行われ、その測定は一部の研究施設に限られてきた。しかし、本研究により、SRP-54 kDa 蛋白を抗原とする酵素免疫測定法(SRP-Elia)が、簡便なスクリーニング検査として有用であることが確認された。また、本法で同定された抗 SRP 抗体陽性例は、ステロイド療法に抵抗性を示す壊死性筋症サブセットと関連し、従来報告と一致し、その臨床的有用性も明らかとなった。今後、本測定法により、多数の膠原病例のスクリーニング検査とともに、抗 SRP 抗体価の定量的測定が可能となり、同抗体と関連する新たな臨床像や病態の解析に役立つことが期待される。また、本研究では主要エпитープが存在するとされる 54kDa 蛋白を抗原として用いたが、免疫沈降法でより高頻度の反応性を示す、他の SRP サブユニット蛋白を抗原とした測定系との比較検討も重要な課題と考えられる。

【抗 PL-12 抗体の臨床的意義と免疫遺伝学的背景に関する研究】

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 を高頻度を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 KS 抗体、抗 PL-12 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。

E. 結論

【抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体の臨床像と免疫遺伝学的背景との関連】

抗 ARS 抗体の主要な関連病態である、筋炎をILDの発症が免疫遺伝学的背景により規定される可能性が示唆された。

【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】新たな SRP-Elia は、簡便なスクリーニング検査に適していると考えられた。さらに、ステロイド療法抵抗性の壊死性筋炎サブセットを形成する症例を同定し、その臨床的有用性が示された。

【抗 PL-12 抗体の臨床的意義と免疫遺伝学的背景に関する研究】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. Takada T, Hirakata M, Suwa A, Kaneko Y, Kuwana K, Ishihara T, Ikeda Y: Clinical and histopathological features of myopathies in Japanese patients with anti-SRP autoantibodies. *Mod. Rheumatol.* 19(2): 156-164, 2009.
2. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada 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):574-579, 2010.
3. Kaneko Y, Suwa A, Hirakata M, Ikeda Y, Kuwana M: Clinical associations with autoantibody reactivities to individual components of U1 small nuclear ribonucleoprotein. *Lupus*19(3):307-312, 2010.
4. Suwa A, Hirakata M, Kaneko M, Sato M, Suzuki Y, Kuwana M: Successful treatment of refractory polymyositis with the immunosuppressant mizoribine: Case report. *Clinical Rheumatology* 28(2):227-229,

2009.

5. Tokuda H, Sakai F, Yamada H, Johkoh T, Imamura A, Dohi M, Hirakata M, Yamada T, Kamatani N, Kikuchi Y, Sugii S, Takeuchi T, Tateda K, Goto H: Clinical and radiological features of pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis, in comparison with methotrexate pneumonitis and pneumocystis pneumonia in acquired immunodeficiency syndrome: a multicenter study. *Intern Med.* 47(10):915-23, 2008.
6. Takizawa Y, Inokuma S, Tanaka Y, Saito K, Atsumi T, Hirakata M, Kameda H, Hirohata S, Kondo H, Kumagai S, Tanaka Y: Clinical characteristics of cytomegalovirus infection in rheumatic diseases: Multicenter survey in a large patient population. *Rheumatology* 47(9):1373-1378, 2008.
7. 平形道人: 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体は筋炎と関連しているか. *分子リウマチ治療* 3(1):1-6, 2010.
8. 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.
9. 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.
10. 平形道人, 諏訪昭: 抗 Ku 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))*:572-574, 2010.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 平形道人: 抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体とその臨床的意義-抗 ARS 抗体関連肺病変など-. *日本胸部臨床* 67(5):359-369, 2008.
15. 平形道人: 薬の選び方・使い方のエッセンス/多発性筋炎・皮膚筋炎. *治療(4 月増刊号)*91:1185-1191, 2009.
16. 平形道人: 最新・自己免疫疾患 Update-研究と治療の最前線/多発性筋炎・皮膚筋炎. *医学のあゆみ*