

Exp Rheumatol. 27: 587-593(2009)

- 11) Sato Y, Kurose A, Ogawa A, Ogasawara K, Traganos F, Darzynkiewicz Z and Sawai T: Diversity of DNA damage response of astrocytes and glioblastoma cell lines with various p53 status to treatment with etoposide and temozolomide. *Cancer Biol Ther.* 8: 1-6(2009)
  - 12) Watabe D, Kanno H, Inoue-Narita T, Onodera H, Izumida W, Kowada S, Sawai T and Akasaka T: A case of primary cutaneous natural killer/T-cell lymphoma, nasal type, with indolent clinical course: monoclonal expansion of Epstein-Barr virus genome correlating with the terminal aggressive behavior. *Br J Dermatol.* 160(1): 205-207(2009)
  - 13) 鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志: MCTD患者に合併する肺高血圧症の病変とその発症機序の解析. 自己抗体と自己免疫2009: 31-35(2009)
  - 14) Shimizu N, Yoshikawa N, Wada T, Handa H, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Sawai T, Morimoto C and Tanaka H: Tissue- and context-dependent modulation of hormonal sensitivity of glucocorticoid-responsive genes by hexamethylene bisacetamide-inducible protein 1. *Mol Endocrinol.* 22(12): 2609-23(2008)
  - 15) 澤井高志、三浦康宏、宇月美和: 学会発表講座リウマチ性疾患における病理組織画像のプレゼンテーション. *Frontiers in Rheumatology&Clinical Immunology.* 2(3): 168-73(2008)
  - 16) 澤井高志: RAの関節破壊における病理学的特徴. *Frontiers in Rheumatology&Clinical Immunology.* 2(3): 124-7(2008)
  - 17) 宇月美和、佐々木喜子、澤井高志: RAにおける骨・軟骨破壊の病理学的特徴. *Rheumatology Clinical Update.* 15: 7-10(2008)
  - 18) 佐々木信人、馬場俊右、高橋 進、伊藤晴方、古和田浩子、鹿内俊樹、中村 豊、山内広平、井上洋西、澤井高志: 人工流産および薬疹後に全身性エリテマトーデスが発症した1例. *アレルギー.* 57(7): 872-877(2008)
- ## 2. 学会発表
- 1) 澤井高志: RAにおける骨・軟骨破壊の病理. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会/第19回国際リウマチシンポジウム. 2010年4月. 神戸.

- 2) 村上賢也、澤井高志、鎌滝章央、嶋村 正: 関節リウマチの慢性化機構におけるCD14陽性細胞の役割. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会/第19回国際リウマチシンポジウム. 2010年4月. 神戸.
- 3) 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、嶋村 正、澤井高志: IL-6刺激によりRA患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞におけるADAMTS-4の発現が亢進した. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会/第19回国際リウマチシンポジウム. 2010年4月. 神戸.
- 4) 宇月美和、澤井高志、益田郁子: CPPD結晶沈着症患者の関節組織におけるANK陽性細胞の特徴. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会/第19回国際リウマチシンポジウム. 2010年4月. 神戸.
- 5) 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、嶋村 正、澤井高志: Bv8の関節リウマチ滑膜における発現解析. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会/第19回国際リウマチシンポジウム. 2010年4月. 神戸.
- 6) 中川倫代、菅野祐幸、澤井高志: EBウイルス小RNA発現T細胞株の培養血管内皮への接着. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会/第19回国際リウマチシンポジウム. 2010年4月. 神戸.
- 7) 佐々木信人、山内広平、長島広相、古和田浩子、中館俊英、中村 豊、内海 裕、鈴木奈緒美、秋山貞親、小林 仁、井上洋西、澤井高志: アレルギー性血管炎における血管リモデリングに対するイマチニブの効果. 第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月. 京都.
- 8) 菅野祐幸、中川倫代、澤井高志: EBウイルス小RNA発現T細胞株の培養血管内皮への接着. 第99回日本病理学会総会. 2010年4月. 東京.
- 9) 三浦康宏、千葉隆史、二宮由香里、澤井高志: Sjögren症候群の小唾液腺組織の炎症学的指標と臨床検査項目との検討. 第99回日本病理学会総会. 2010年4月. 東京.
- 10) 澤井高志: RAにおける骨・軟骨破壊の病理学的機序. 第18回リウマチ診療研究会・仙台. 2010年9月. 仙台.
- 11) 村上賢也、鎌滝章央、嶋村 正、澤井高志: 関節リウマチにおけるCD14陽性細胞の役割 —蛍光二重染色および電子顕微鏡学的解析—. 第17回自己免疫疾患研究会. 2010年11月. 盛岡.
- 12) 鎌滝章央、石田睦子、村上賢也、宇月美和、澤

井高志：ゼラチンコートフィルムを用いた関節液の包括的なゼラチン分解活性測定法の開発。第25回日本臨床リウマチ学会。2010年11月。東京。

13) 鎌滝章央、佐々木信人、畠山 明、澤井高志：混合性結合組織病患者における抗内皮細胞抗体の抗原の探索。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会。2009年4月。東京。

14) 佐々木信人、山内広平、井上洋西、二宮由香里、鎌滝章央、澤井高志：アレルギー性肉芽腫性血管炎肺血管障害マウスモデルにおけるモンテルカストによる炎症の抑制。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会。2009年4月。東京。

15) 澤井高志：膠原病にみられる肺高血圧症の病理学的特徴－混合性結合組織病（MCTD）の解析を中心に－。第24回日本臨床リウマチ学会。2009年11月。盛岡。

16) Yoshida W, Numata N, Kikuchi T, Shimamura T, Sawai T: Rapid destruction of the hip joint in mixed connective tissue disease. 13<sup>th</sup> congress of the asia pacific league of associations for rheumatology (APLAR 2008)Sep 23-27, 2008, Yokohama.

17) Kamataki A, Sasaki N, Hatakeyama A, Sawai T: Identification of autoantigen targeted by anti-endothelial cell antibody from patients with MCTD. 13<sup>th</sup> congress of the asia pacific league of associations for rheumatology (APLAR 2008)Sep 23-27, 2008, Yokohama.

18) Itoh Y, Uzuki M, Sawai T, Kamataki A: Connective tissue growth factor (CTGF), a key cytokine that induces synovial cell growth, especially in early stage of RA. 13<sup>th</sup> congress of the asia pacific league of associations for rheumatology (APLAR 2008)Sep 23-27, 2008, Yokohama.

#### 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

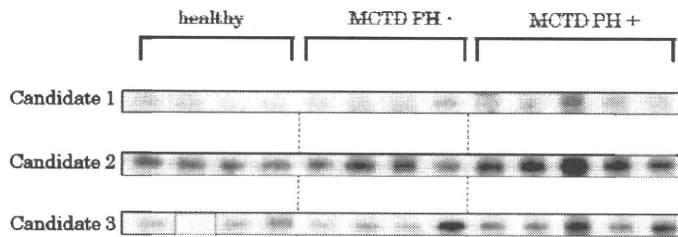


図1 2Dウエスタンと質量分析により得られた抗原候補組換え蛋白質と患者血清の反応性の確認

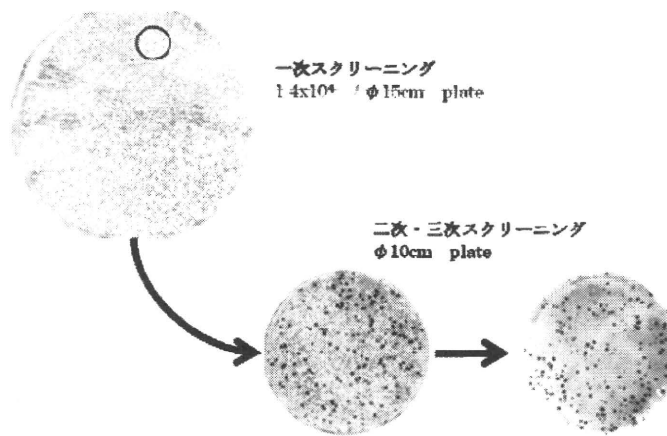


図2 SEREXの概要

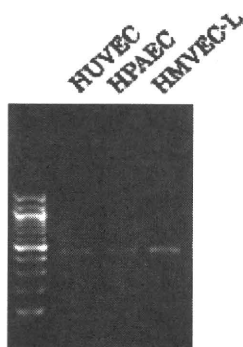


図3 SEREXにより得られた抗原候補の様々な血管内皮細胞における発現の解析



図4 SEREXにより得られた抗原候補組換え蛋白質と患者血清の反応性の確認

## マウスモデルを用いた抗RNP抗体産生機序の解明(平成20-22年度)

研究分担者： 川畑 仁人 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科・特任講師

### 研究要旨

混合性結合組織病は抗核抗体である抗RNP抗体の出現を特徴としており、抗RNP抗体出現機序の解明は混合性結合組織病の病態理解と治療への応用に重要と考えられるが、解析に適した動物モデルを欠くためその検討が困難であった。そこで本研究班にてまずヌードマウスへのT細胞移入による抗核抗体産生系を樹立し、その系を用いて抗RNP抗体の産生機序の研究を行った。平成20年度は、本系を用いて核酸受容体であるtoll様受容体の自己抗体産生への関わりを検討した。平成21年度は、抗RNP抗体産生の産生に関わるT細胞の同定を行い、リンパ球減少下ではCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞は新たなfollicular helper T細胞サブセットと考えられるCXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞に分化しうること、それに伴いgerminal centerが形成され、抗RNP抗体などの自己抗体産生が惹起されることを明らかにした。平成22年度は、この新たなT細胞サブセットの分化制御機構の解明を試みた。本研究により明らかとなった自己免疫関連follicular helper T細胞サブセットの同定とその分化経路の解明は、病態理解だけでなく今後、混合性結合組織病に対する分子標的治療の開発にも重要と考えられた。

### A.研究目的

難治性合併症を有する混合性結合組織病(MCTD)の治療開発には病態の解明が必須だが、それには疾患概念に密接に関連する抗RNP抗体の産生機序解明が重要である。本研究は、既に抗RNP抗体産生を認めるマウスモデルを開発しており、この系の誘導条件を変更することにより、抗RNP抗体産生機構の検討が可能となっている。そこで、本系を用いて、自己抗体産生に関わる分としてtoll様受容体の関与の解析、その後重要な細胞群として新たなfollicular T細胞サブセットおよびその分化制御機構の解析を行い、抗RNP抗体産生に関わる分子や細胞群を明らかにすることを目的として本研究を行った。

### B.研究方法

#### (1) 抗RNP抗体産生マウスモデル

抗RNP抗体をマウスに誘導するために、CD4<sup>+</sup>T細胞やCD4 T細胞サブセットを分離し、ヌードマウスへ移入した。その後、経時的に血清採取を行い、抗核抗体や抗RNP抗体の測定を行った。方法の詳細は以下の通りである。

#### マウス

7-8週齢のBALB/c マウスとBALB/c ヌードマウスを使用した。すべてのマウスはSpecific Pathogen Free環境で飼育された。

#### T細胞分離

CD4<sup>+</sup>T細胞の分離は、脾細胞をビオチン標識抗B220(RA3-6B2)、抗CD8a(53-6.7)、抗CD11b(M1/70)、抗CD49b(DX5)、抗I-Ab/d(25-9-17)、抗Ly-6G/Ly-6C(Gr-1:RB6-8C5)と反応後、streptavidin-conjugated microbeads(Miltenyi Biotec)を結合させ、これをMACSにてネガティブセレクションを行い分離した。また最初の抗体反応時にビオチン標識抗CD25 抗体(PC61)を加えることにより、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞を分離した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞は、上述の方法でCD4<sup>+</sup>細胞を回収したのち、PE結合抗CD25 抗体と反応させ、anti-PE microbeadsと反応後にポジティブセレクションを行い分離した。

CD8<sup>+</sup>T細胞の分離では、マウス脾細胞をビオチン結合抗CD8a抗体(53-6.7)と反応させた後にstreptavidin-conjugated microbeadsを結合させ、ポジティブセレクションを行い分離した。

#### T細胞の移入

前述の方法により分離したCD4<sup>+</sup>T細胞を $2.5 \times 10^6$

個/匹、BALB/c ノードマウスに腹腔内注射にて移入した。

#### 蛍光抗体法による抗核抗体の検出

抗核抗体の検出には、フルオロ HEPANA Test Kit (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan)内のHEp-2細胞基質スライドを用いた。PBSを用いてマウス血清を40、80、160、320、640、1280、2560、5120倍希釈し、器質スライドの各wellに40  $\mu$  lずつ30分間反応させた。その後PBSで洗浄し、二次抗体として2  $\mu$  g/mlに希釈したanti-mouse IgG-Alexa 488を40  $\mu$  lずつ遮光下で30分間反応させた。これをPBSで洗浄した後に、蛍光顕微鏡で観察した。

#### ELISA

抗RNP抗体測定のため、Scipac社のU1A、U1-70K抗原蛋白を用いてELISAを行った。抗原をpH 9.6、0.03 M carbonate buffer に4  $\mu$ g/mlに希釈し、96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に、4°C一晩静置して個層化した。洗浄後に1% BSA-0.05% Tween20-PBSで2時間ブロッキングし、50倍に希釈したマウス血清50  $\mu$  l/wellを常温、1時間反応させた。二次抗体にHRP結合抗mouse IgG 抗体を用い、3,5,3',5'-tetramethylbenzidine (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)で発色させ、リン酸で発色を止め、波長450nmで吸光度を測定した。

#### (2)抗RNP抗体産生マウスにおけるリンパ球の解析

抗核抗体産生マウス脾臓リンパ球を以下のようにflow cytometry及び蛍光免疫染色にて検討した。

#### Flow cytometry

表面分子の染色は、細胞を4°Cに保ちつつ染色を行った。反応時のバッファーは3%bovine serum albumin, 0.05%NaN<sub>3</sub>-PBSを用いた。抗体添加後30分で洗浄し測定した。使用した抗体を以下に示す：  
B220(RA3-6B2)、CD4(GK1.5)、CD8a(53-6.7)、CD21(7E9)、CD23(B3B4)、CXCR4(2B11)、CXCR5(2G8)、Fas(Jo2)、T- and B-cell activation antigen(GL7)、ICOS(C398.4A)、PD-1(RMP1-30)。

#### 組織の蛍光免疫染色

マウスの脾臓をOCTコンパウンド(サクラファイブテック, 日本)に包埋したのち、液体窒素で急速に凍結した。これを薄切シヤセトンで固定した。Protein Block serum-free(Dako, Real carpinteria, CA)と10分ほど反応させた後、一次抗体をAntibody Diluent with

Background Reducing Components(Dako)で5  $\mu$ g/mlに希釈し室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、Dylight488またはDylight594標識二次抗体(Jackson laboratories, Baltimore, PA)を250倍に希釈し反応させた。二重染色では二次抗体の蛍光色を変えて同様の過程をもう一度行った。その後、Vectashield(Vector laboratories, Burlingame, CA)を用いて封入し、蛍光顕微鏡で観察した。染色に使用した抗体はCD4(RM4-5)、CD19(1D3)、Ig-D(11-26c.2a)、MAdCAM-1(MECA367)、PDCA-1(120G8)、PD-1(RMP1-30)。他にビオチン化PNA(Vector laboratories Burlingame, CA)も用いた。

#### (3)抗RNP抗体産生におけるTLRの関与の検討

自己抗体産生に関わる可能性が示唆される、核酸受容体であるTLR、特にRNA受容体であるTLR7と、DNA受容体であるTLR9を検討の対象とした。これらを阻害する核酸やコントロール用の核酸を、ノードマウスへのCD4+CD25-T細胞移入時及び一週間ごとに投与し、経時的にレシピエントから血清採取を行った。それらの血清の抗RNP抗体や抗ヌクレオソーム抗体、抗二本鎖DNA抗体の測定を行った。TLR7を阻害するDNA、TLR9を阻害するDNA、コントロール用のDNAとも既に複数の論文で使用され、TLR7阻害phosphorothioate DNAはIRS661、TLR9阻害phosphorothioate DNAはIRS869として報告されているものである。また、阻害DNAのレシピエントへの投与経路の検討もすでに他論文で検討されており、それをもとに腹腔内投与とした。

#### (4)抗RNP抗体産生マウスにおけるT細胞機能解析

抗核抗体誘導マウスにおけるT細胞の発現分子(Bcl6、IL-21)および抗体産生誘導能の検討を以下の方法で行った。

#### PCR

リンパ球サブセットを分離後、RNeasy mini kit(QIAGEN, Valencia, CA)を用いてRNAを精製し、SuperScript™ III Reverse Transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてcDNAを作成した。Primerは、GAPDH-forward, 5'-GAAGGTCGGTGTGAACGGA-3'、GAPDH-reverse, 5'-GTTAGTGGGGTCTCGCTCCT-3'、Bcl6-forward, 5'-GCCCCACTGACCCGAAAGCC-3'、Bcl6-reverse, 5'-GCCTGCCAGGGACCTGTTAC-3'、

IL-21-forward,  
5'-ATCCTGAACTTCTATCAGCTCCAC-3'  
IL-21-reverse,  
5'-GCATTTAGCTATGTGCTTCTGTTTC-3'を用いた。

#### 共培養

BALB/cマウスの脾細胞をビオチン標識抗CD19(1D3)抗体とインキュベートした後、ストレプトアビジンマイクロビーズと反応させてMACSによりポジティブセレクションしB細胞を分離した。また、Tc移入BALB/cヌードマウスの脾細胞をFITC標識抗CD4抗体とインキュベートした後、Anti-FITC MultiSort Kit(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いてCD4+細胞をポジティブセレクションした後CD4+細胞からビーズを外した。この細胞とビオチン標識抗PD-1抗体をインキュベートした後ストレプトアビジンマイクロビーズと反応させMACSによりCD4+PD1+T細胞とCD4+PD1-T細胞を分離した。

培養には96well-round bottomのプレートを用い、培養液には10%FCS-RPMIを用いた。各wellにおいてB細胞 2×10<sup>5</sup>、T細胞 2×10<sup>4</sup>を混合し、37度、CO<sub>2</sub> 5%で96時間培養した。T細胞の刺激は、プレート固相化10 μg/mlの抗CD3抗体と、培養液中加入した5 μg/ml抗CD28抗体で行った。ICOSの阻害は、抗ICOS抗体(7E.17G9; BioLegend, San Diego, CA)を5 μg/mlで加え、IL-21阻害には抗IL-21抗体(R&D systems, Minneapolis, MN)を10 μg/mlで加えた。培養96時間後に上清を回収し、IgGの測定を行った。

#### 培養液中のIgGの測定

Affinipure Donkey anti-mouse IgG(H+L)(Jackson Immunoresearch, Baltimore, PA)をPBSで1.3 μg/mlに希釈し、50 μlづつ96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に分注し、4℃一晩静置し固相化した。洗浄後1% BSA-0.05% Tween20-PBSで2時間ブロッキングした後、培養上清を50 μl/wellで常温、1時間反応させた。濃度測定のためのスタンダードには Chromopure Mouse IgG(Jackson Immunoresearch, Baltimore, PA)を用いた。二次抗体に10000倍希釈したPeroxidase-conjugated Affinipure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-mouse IgG Fc γ Fragment-specific(Jackson Immunoresearch)を用いた。

### (5) 抗RNP抗体産生マウスにおける follicular helper T細胞(Tfh)の分化に関わる因子の解析

#### Cognateな抗原認識の関与

ニワトリ卵白アルブミン (OVA) を認識する単一T細胞受容体を発現するRag2<sup>-/-</sup>DO11.10マウスのT細胞2.5×10<sup>6</sup>個/匹を、ヌードマウスや、TCRα<sup>-/-</sup>マウス(ヌードマウス同様にB細胞は存在しているがαβT細胞がないマウス)やTCRα<sup>-/-</sup>Ld-nOVAマウス(ヌードマウス同様にB細胞は存在しているがαβT細胞がないOVA発現マウス)に移入。ヌードマウスへの移入実験では、レシピエントの腸炎発症を体重や組織学的に検討した。TCRα<sup>-/-</sup>マウスへの移入実験では、germinal center形成やTfh細胞の出現をFACSや免疫蛍光法により検討した。

#### Foxp3陽性細胞の関与

Foxp3陽性細胞がTfhに分化するとの報告から機能的Foxp3が誕生しないRag2<sup>-/-</sup>DO11.10Foxp3<sup>sf/sf</sup>マウスT細胞をTCRα<sup>-/-</sup>マウスやTCRα<sup>-/-</sup>Ld-nOVAマウスに移入し、germinal center形成やTfh細胞の出現をFACSや免疫蛍光法により検討した。

#### Homeostatic proliferationの関与

Homeostatic proliferationとTfhへの分化の関連を明らかにするためCD4+CD25-T細胞やRag2<sup>-/-</sup>DO11.10T細胞を1 μM CFSEで37度15分染色した後、ヌードマウスに移入し、5日後の細胞分裂数とCD4+PD-1+細胞の出現との関連をFACSで観察した。

#### ICOSの関与

ヌードマウスにCD4+CD25-T細胞を移入(day0)後、day2、day4、day7、day10に抗ICOS抗体(7E.17G9)100 μg/匹/回を腹腔内投与し、day5、day14にTfhおよびgerminal centerの形成をFACSにて解析した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育や実験は、大学動物実験施設規定に従い適切に行われている。

### C.研究結果

#### (1) 抗RNP抗体産生へのTLRの関与

細胞移入時およびその後各週ごとに、TLR7とTLR9それぞれに対する阻害DNAをレシピエントに投与した。

抗U1RNP-70K抗体に関しては、コントロールDNA投与群では一週目より徐々に抗体価が上昇していくが、TLR7やTLR9阻害DNA投与群では、当初より継続的に抗体価抑制効果を認めることができた。特にTLR7阻害DNAの投与の場合にその効果は顕著であった(図1)。抗dsDNA抗体はTLR9阻害DNA投与により抗体産生が抑制された。

## (2) 抗RNP抗体産生マウスにおけるリンパ球の解析

本研究班におけるこれまでの検討から、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞の移入をうけたヌードマウスでは、短期間に高率に高抗体価のIgGタイプの抗RNP抗体をはじめとする抗核抗体が誘導されることが明らかになっている。従って、クラススイッチが生じる場として重要なgerminal center形成と、それに関わる重要なヘルパーT細胞サブセットであるfollicular helper T細胞(Tfh)の誘導について検索を行った。

T細胞移入後5日目の脾臓より凍結切片を作製して、蛍光抗体法により組織学的変化を観察した(図2)。その結果、Tregを含むCD4<sup>+</sup>T細胞移入群と比較し、Tregを含まないTc移入群において、MAdCAM-1により境界されるリンパ濾胞拡大、抗IgD抗体で染色されるB細胞濾胞内へのCD4陽性細胞の局在、pDCの増加が認められた。

これらの結果から、Tc移入群ではgerminal centerが誘導されている可能性が示唆されるため、その存在を免疫蛍光法及びflow cytometryにて確認した。Tc群における脾臓の組織染色を行うと、PNAで染まるgerminal centerの出現が認められ、これはB細胞濾胞をしめすIgD染色域内に存在する事が判明した(図3)。また、CD4<sup>+</sup>細胞とPNA染色部位との関係を見ると、CD4<sup>+</sup>細胞はT細胞ゾーンに多く存在していたが、germinal center内にも多数存在し、それらはPD-1<sup>+</sup>細胞であることが判明した(図3)。

更にgerminal center B細胞はGL-7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>細胞であることから、レシピエントの脾細胞における、これらの細胞表面分子の発現をflow cytometryで解析した。その結果、Tc群ではTc+Treg群と比較しGL-7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>細胞が明らかに増加しており、germinal center形成が促進されていることが明らかとなった(図4A)。実際にGerminal centerの形成に重要な役割を担い、同領域内に局在するT細胞サブセットとしてTfhが知られており、一般的に

CXCR5<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞として同定されている。Tc移入群ではgerminal centerの形成が顕著に認められ、内部にCD4<sup>+</sup>T細胞が局在したことより、Tfhのフェノタイプを有するT細胞が存在しているか検討した。TcまたはTc+Treg移入群後5日目の脾細胞において、これらの表面マーカーについてflow cytometryで解析したところ、Tc移入群においてCXCR5の発現は低かったがCXCR4、ICOS、PD-1を発現する細胞が存在していた(図4B)。同一の細胞がこれらが発現していることは、flow cytometryにおける多重染色にて確認しており、CXCR5<sup>-</sup>CXCR4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞が存在していることが明らかとなった。更に本系で認めたCXCR4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞におけるCXCR5発現の有無を、陽性コントロールとしてKLHで免疫したマウスCD4<sup>+</sup>T細胞と比較しても陰性であることが確認できた(図4C)。

ここまでの検討においてはT細胞移入群後5日の早い段階での変化を解析してきたため、次にこれらの変化が移入早期の一過的な変化ではなく、長期的に持続するものか検討した。移入4週間後の脾細胞を解析した結果、germinal center B細胞、CXCR4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞ともに消失せずに保たれており、移入早期のみではなく長期間持続する変化であることが確認できた(図5)。

以上より、ヌードマウスにTcを移入するとCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞は、CXCR4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞に分化し、同時にgerminal centerが形成されることが明らかとなった。また、TcとともにTregを移入した群ではこの分化が抑制されていた。つまり、リンパ球減少下において、TcはCXCR4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞に分化しうる可能性を内在しているが、Tregが存在するとこの分化が抑制されると考えられた。

## (3) 抗RNP抗体産生マウスにおけるT細胞機能解析

抗核抗体産生マウスに誘導されている

CXCR5<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞における、Tfhのmaster遺伝子Bcl6や機能分子IL-21の発現や、実際の抗体誘導能を評価した。移入前のTc細胞、移入後のCD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>PD1<sup>-</sup>細胞の計3群におけるBcl6やIL-21の発現をPCRで検討すると、Bcl6は移入後のCD4+PD1+細胞、CD4+PD1-細胞の両群において発現を認めたが、IL-21はCD4+PD1+細胞でのみ発現

を認めた(図6)。

次に移入後のCD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>PD1<sup>-</sup>細胞をBALB/cマウスのB細胞と共培養することで、これらのT細胞の抗体産生誘導能を評価した(図7A)。その結果、CD4<sup>+</sup>PD1<sup>-</sup>細胞に比較してCD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>細胞において、B細胞に対する強いIgG産生誘導能が認められた。更にこのCD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>細胞のIgG産生誘導能に対するICOSとIL-21の関与を、阻害抗体を加えた培養により検討した(図7B)。その結果、ICOS、IL-21のいずれを阻害してもIgG産生亢進能が低下し、両者を阻害すると相加的にIgG産生が低下した。以上より、CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>細胞にはB細胞のIgG産生を促進する作用があり、その機序にICOS、IL-21が関与していることが判明した。これまでの結果からCXCR4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞は、Bcl6を発現し、germinal centerに局在して、B細胞のIgG抗体産生誘導能を有していること、また、その機序にICOSやIL-21が関係している事が判明したため、この細胞はTfhと考えた。従って、自己抗体産生マウスで誘導されているこの細胞群は、CXCR5陰性の新たなTfhサブセットと考えられた。

#### (4) 抗RNP抗体産生マウスにおけるfollicular helper T細胞の分化に関わる因子の解析

次に自己抗体産生マウスで誘導されているTfhサブセットの分化に関わる因子を解析した。まず、TfhサブセットにおけるT細胞受容体(TCR)のcognateな抗原認識が抗核抗体産生に必要か否か検討した。ヌードマウスにTcを移入する系では抗核抗体産生のほか腸炎の発症も認めるが、OVAを認識する単一TCR発現トランスジェニックマウスRag2<sup>-/-</sup>DO11.10由来CD4<sup>+</sup>T細胞(Tregを含んでいない)を移入した際には、抗核抗体産生は認めるものの(図8A)、腸炎は発症しないことが体重変化(図8B)や腸の組織学的検討(図8C)により明らかとなった。このことから、ヌードマウスでは腸炎と異なるT細胞の反応により抗核抗体の誘導が行われていることが明らかとなった。更に、ヌードマウスと同様B細胞は存在しているものの $\alpha\beta$ T細胞は存在しないTCR $\alpha^{-/-}$ マウスおよびOVAを全身的に発現しているTCR $\alpha^{-/-}$ Ld-nOVAマウスに、Rag2<sup>-/-</sup>DO11.10由来CD4<sup>+</sup>T細胞を移入し、cognateな抗原認識がTfhの分化に必要か否かflow cytometryにて検討した(図8D)。その結果、むしろOVAを発現するレシピエントではTfhやgerminal

centerの誘導が低い傾向があり、これらの結果からTfh誘導にcognateな抗原認識は必要がないことが明らかとなった。また、TregがTfhに分化しうることが報告されているため、図8Dの実験において、Foxp3<sup>sf/sf</sup>Rag2<sup>-/-</sup>DO11.10マウス由来CD4<sup>+</sup>T細胞の移入も同時に行った。このT細胞は移入前だけではなく移入後も機能的Foxp3が誘導されることはなく、Tfh誘導におけるFoxp3の役割を明らかにできる。その結果、自己抗体産生マウスに誘導されているTfh分化に、Foxp3は必要ではないことが判明した。これまでの結果からもむしろFoxp3はこの分化過程に抑制的である。

また本系はリンパ球減少下のマウスにTcを移入することでTfhが誘導されているが、実際にこの現象で生じるhomeostatic proliferationが分化に必要なのか否か検討した(図9)。このためにCFSEという色素で染めたTcをヌードマウスに移入し、5日目の脾細胞をflow cytometryにより解析を行った。細胞が一回分裂するとCFSEの信号強度が半減する現象を利用し、分裂回数が明らかとなる。その結果、分裂回数が多い細胞群でTfhに分化しているが明らかとなった。ICOSを強発現しているTfhの出現にはICOSが重要な役割を担っているとの報告がある。本系の抗核抗体産生を誘導したマウスにおけるTfhの分化においても、ICOSの関与を検討するため、ICOS/ICOSLを阻害する抗体を投与した。その結果、この阻害抗体によりTfh分化やgerminal centerの形成が障害されることが判明した(図10)。従って、本系におけるTcのTfh分化にICOSからのシグナルが重要な役割を担っていることが明らかとなった。

以上の結果から、本系ではヌードマウスへのCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞移入により、germinal center形成とともに抗体のクラススイッチが亢進し、IgGタイプの抗RNP抗体をはじめとする抗核抗体産生を認め、この過程には、移入T細胞が分化したCXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>細胞が関与していることが明らかとなった。本細胞群はgerminal centerに存在し、IL-21発現を認め、B細胞のIgG産生を促進したことから、濾胞ヘルパーT細胞の新規サブセットと考えた。また、制御性T細胞は、本細胞群の分化を抑制し異常なB細胞応答を制御していた。



## D. 考察

### (1) 抗RNP抗体産生制御に関わる分子

抗RNP抗体の対応抗原は核酸蛋白複合体の構成成分であることから、核酸受容体であるtoll様受容体と抗RNP抗体との関連がtoll様受容体欠損ループスマウスを用いた研究より示唆されている。そこで、本研究においても、核酸蛋白複合体であるRNPに対する自己抗体産生に、核酸受容体が関与しているかどうかを検討するため、RNA受容体であるTLR7、DNA受容体であるTLR9を阻害するDNAを本系に投与し、その後の抗RNP抗体の推移を検討した。TLR7阻害DNA投与により抗U1RNP-70K抗体価の低下を認めたことより、TLR7が抗RNP抗体産生過程に関与していることが推測された。

TLR9阻害DNAでもある程度の抗RNP抗体産生抑制が認められたが、これに関しては、本実験ではCD4+CD25-T細胞を移入したため種々の自己抗体が産生されており、TLR9も関与した抗原提示細胞の活性化や抗体産生が生じている可能性があると考えられた。抗dsDNA抗体はTLR9阻害DNA投与によりその抗体価が低下し、DNAに対する抗体にはDNA受容体であるTLR9が関与していることが示唆された。

### (2) Tfh分化と抗RNP抗体との関連に関する考察

今回の研究により、抗RNP抗体産生マウスにおいて、Tfhが出現しgerminal centerが形成されていることが明らかとなった。移入CD4<sup>+</sup>T細胞のTfhへの分化とレシピエントの異常なB細胞応答との関連については、本研究データとともに、これまで施行した検討において、1)CD8T細胞はCD4T細胞と同様homeostatic proliferationを生じるが、移入しても顕著なgerminal center形成や抗核抗体価の上昇を認めないこと、2)CFSEで標識したT細胞が分裂してTfhに分化していることから、ヌードマウスに存在している胸腺外T細胞が分化している可能性は否定的であること、などのデータにより示されている。

本研究で解析しているマウスは、抗RNP抗体を産生するが、同時に種々の抗核抗体も産生することから、より抗RNP抗体産生に関わる因子の解析も今後更に重要と考える。そのためにも、マウスの系をC57BL/6に変更するなどの遺伝的背景の変更や、レシピエントマウスにtoll様受容体欠損マウスを用いるなどの検討が必要と考えられる。抗RNP抗体産生に

関わるtoll様受容体が、B細胞や樹状細胞、T細胞など、どの細胞群にどのように関わっているか、誘導条件を様々に変更できる本系を用いることで、自然発症ループスマウスでは判明できなかった事実が明らかになると考える。

### (3) Tfhの誘導分化に関する考察

Homeostatic proliferationと新たなTfhサブセットの分化については本研究で示された。Homeostatic proliferationには、これまでの報告から、早い分裂と遅い分裂にわかれ、前者はエフェクターT細胞に分化すること、その過程は制御性T細胞により抑制されることが示されており、本系で明らかにしたTfhサブセットの分化過程とその制御機構に合致している。しかし新たなTfhサブセットに関してはこれまで全く報告がなく新規のものである。

Homeostatic proliferationのTfh分化誘導機構に関しては不明な点が多い。これまでの報告から、IL-21の機能として、homeostatic proliferationの促進、Tfhの分化に重要な役割を担っていることが示されており、両者のIL-21を介した密接な関連が示唆され、生理的な現象であるhomeostatic proliferationが誘導される際に亢進するIL-21産生が、Tfhの誘導を促している可能性がある。

Toll様受容体とTfh分化との関連に関しても不明である。Toll様受容体は主にB細胞応答に関わっているのか、Tfh分化にも関わるのかについては、前述のようにtoll様受容体欠損マウスを用いた本系の解析により、今後明らかになると考えられる。

### (4) 混合性結合組織病治療への応用に関する考察

混合性結合組織病の治療は、現在、ステロイドや免疫抑制剤以外に有効な薬剤に乏しく、難治性病態の治療や薬剤副作用の軽減においては新たな治療が求められている。本研究により明らかとなった自己抗体産生を含む異常B細胞応答を惹起する経路は、今後新たな分子標的治療の候補として有用となる可能性がある。例えば、TLRと自己抗体との関連、ICOSやIL-21とTfh分化との関連が報告されているが、本系でもこれらの分子が新たなTfhサブセットの分化やB細胞抗体産生に影響を及ぼしていることを明らかにしており、分子標的薬の候補として検討に値すると考える。

## E. 結論

本研究によりヌードマウスにCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞を移入することで、homeostatic proliferationの存在下に新たなTfhサブセットに分化しgerminal centerが形成され、抗RNP抗体産生など異常なB細胞応答が生じることが明らかとなった。これらの過程にTLRやICOSからのシグナルが関与する一方、制御性T細胞は抑制的に作用し、全身性自己免疫を制御していることが明らかとなった。したがって、今後、新たなTfhサブセットへの分化経路を標的とした治療の自己免疫病態への有効性を検討していくことは、抗RNP抗体産生が主要な病態である混合性結合組織病に対する分子標的治療を開発する上で重要と考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kawahata, K, Kanzaki K, Imamura M, Akahira L, Michishita K, Dohi M, Yamamoto K. Regulatory T cells in the control of T cell homeostasis. *Inflammation and Regeneration*. 2010;30:502-506

### 2. 学会発表

1. 第38回日本免疫学会総会・学術集会(2008年)  
神崎健仁、川畑仁人、山本一彦；新たな抗核抗体産生誘導の系の評価と応用
2. 第30回日本炎症・再生医学会（国際炎症学会合同開催）(2009年)  
神崎健仁、川畑仁人、山本一彦；Re-evaluation of lymphopenic mouse transfer model for the study of antinuclear autoantibodies
3. 第37回日本臨床免疫学会総会(2009年)  
神崎健仁、川畑仁人、山本一彦；全身性自己免疫マウスモデルを用いた抗核抗体制御機構の検討；日本臨床免疫学会誌,2009;32:364
4. 第39回日本免疫学会総会・学術集(2010年)  
神崎健仁、川畑仁人、山本一彦；全身性自己免疫マウスモデルを用いた抗核抗体制御機構の検討,
5. 第31回日本炎症・再生医学会(2010年)  
神崎健仁、川畑仁人、山本一彦；Homeostatic proliferationによるCD4<sup>+</sup> T細胞のfollicular helper T細胞

胞(Tfh) への分化と自己免疫への関与  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

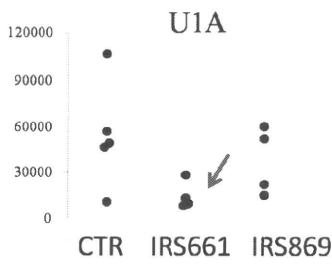


図1、抗RNP抗体産生へのTLR7の関与

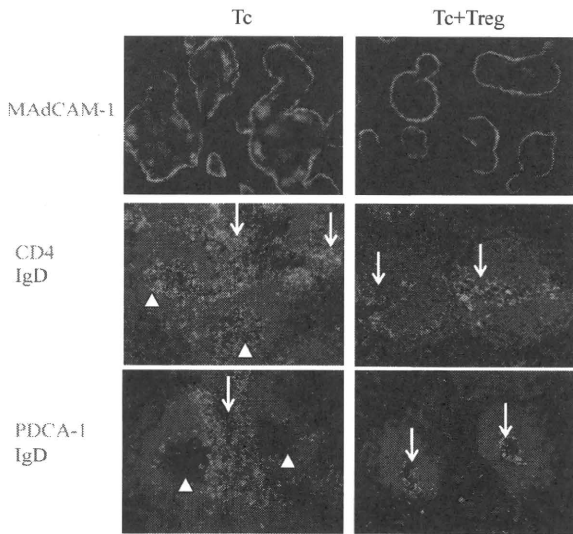


図2、抗核抗体産生マウス脾臓における組織学的変化

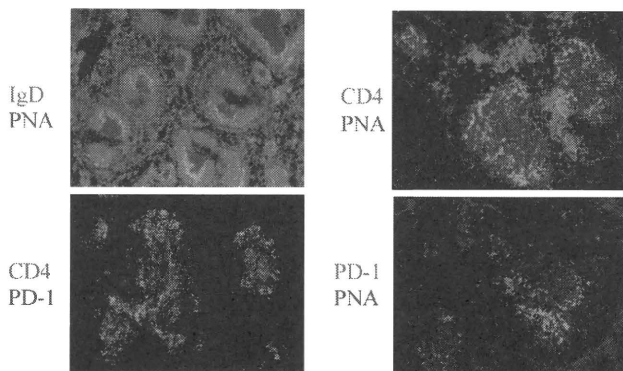
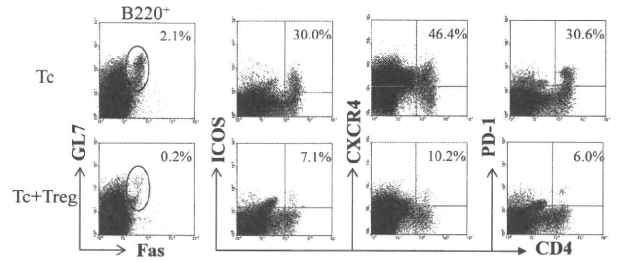


図3、抗核抗体産生マウスにおけるgerminal centerの形成とPD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の局在

A



B

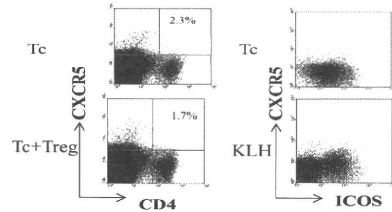


図4、抗核抗体産生マウスにおけるCXCR5<sup>-</sup>CXCR4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の出現

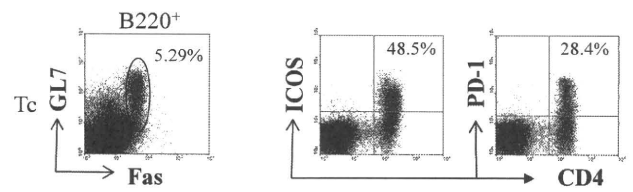


図5、germinal centerおよびICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>T細胞の長期間の持続

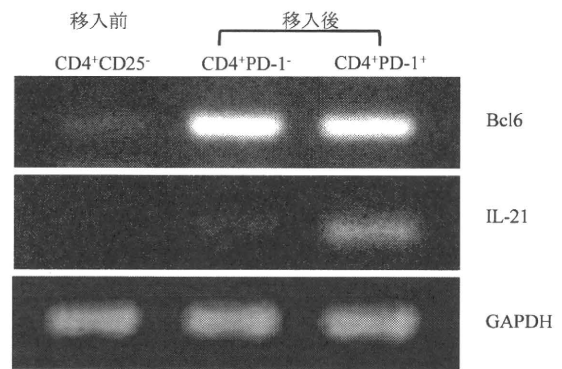


図6、CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>細胞のIL-21産生

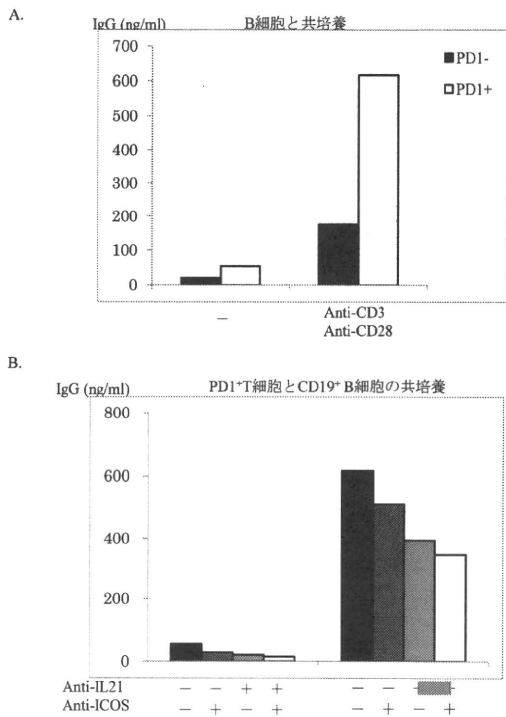


図7、CD4+PD-1+細胞によるB細胞抗体産生誘導

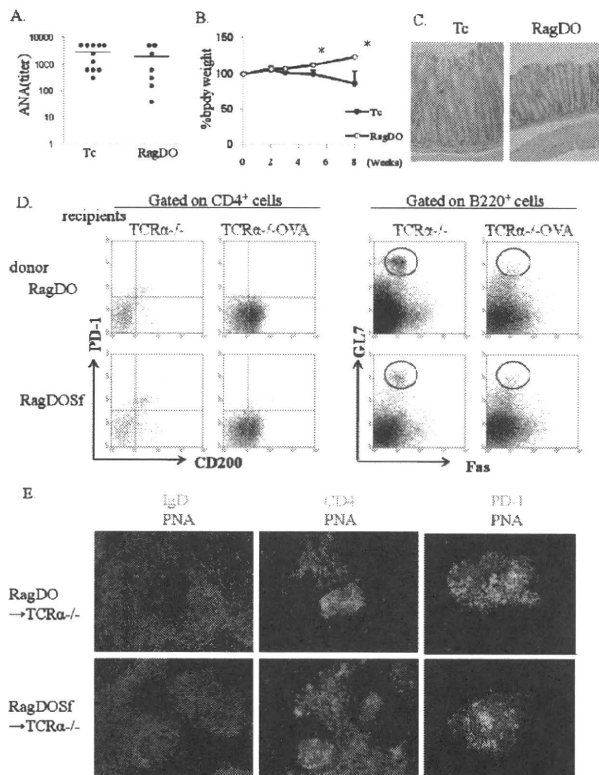


図8、CD4+PD-1+細胞分化にT細胞受容体のcognateな抗原認識は必要としない

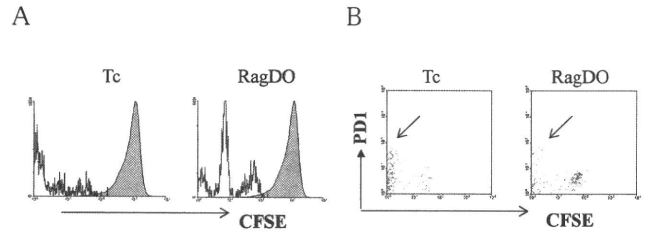


図9、CD4+PD-1+細胞分化における細胞分裂の影響

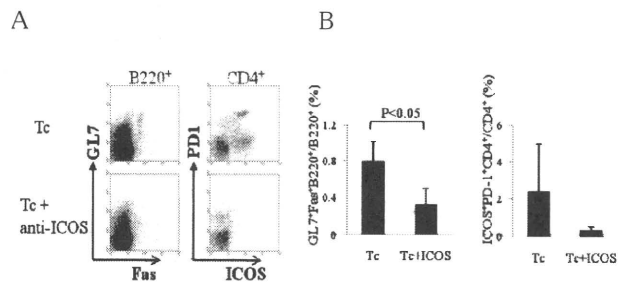


図10、CD4+PD

**MCTDの肺動脈性肺高血圧症の発症予測因子、NOS2遺伝子多型の前向き研究**  
**3年間の総括**

研究分担者： 川口 鎮司 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター・准教授

**研究要旨**

混合性結合組織病(MCTD)は、全身性エリテマトーデス、炎症性筋症、全身性強皮症の症状を併せもち、抗U1-RNP抗体が陽性となる膠原病の1疾患である。膠原病類縁疾患のなかでは比較的予後良好であるが、他の膠原病と比較し肺動脈性肺高血圧症(PAH)を合併する頻度が高い。そのため、PAHが生命予後を決定する非常に重要な因子となっている。近年、PAHの治療薬がめざましい発展をとげ、多くの新規治療方法が提唱されている。これらの薬剤は、早期PAH症例への有効性が高い。しかし、PAH発症を早期に予測する方法は確立されていない。血管拡張因子である一酸化窒素(NO)は、以前の我々の検討で、MCTDにおいて血清中で増加しているが、PAHを合併した症例では、NOの増加が認められなかった。このNO産生量の違いにNO合成酵素であるinducible NO synthase (NOS-2) の遺伝子多型の関与があることを本研究班にて報告してきた。今回の研究は、前向き研究であり、発症4年以内のPAHを合併していないMCTD患者を登録し、PAHの発症にNOS2遺伝子多型が関連するかを検討した。26名の患者が登録され7名のPAH発症が認められた。NOS2遺伝子多型のCCCTTT繰り返し配列が少ないことはPAH発症と関連していた。NOS2遺伝子多型は、PAH発症の遺伝子学的指標となる可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、混合性結合組織病(MCTD)の生命予後を決定する重要な病態である。我々は、レイノー現象を有するMCTDでは、血管の異常収縮・攣縮が生じており、その病態にエンドセリン-1(ET-1)が重要な働きをしていることを報告した。近年、エンドセリン受容体拮抗薬がこの病態に有効であることがわかってきており、ET-1の病態形成におよぼす重要性が再確認されている。同様に、PAH合併MCTD患者でも、血漿中ET-1濃度が著明に高値であった。一方、血管拡張因子である一酸化窒素(NO)は、ET-1により誘導されることがわかっている。つまり、ET-1により血管収縮が生じるとその刺激がNO合成酵素(NOS-2)の誘導を介してNO合成を増加させる。この結果に一致して、レイノー現象を有するMCTD患者では、NOの血清中での上昇が認められた。しかし、我々の結果では、PAHを併発した症例においては、ET-1の亢進にもかかわらず、血清中NO濃度は、健常人と差が認められなかった。この結果から、我々はPAH合併MCTD患者ではET-1によ

るNOS-2を介したNO合成過程に異常があると仮定した。そこで、本研究班にてNOS-2遺伝子の5'-UTRに存在する遺伝子多型を検索し、PAHの発症にNOS2遺伝子多型が関与していることを後ろ向き研究にてみいだした。今回の研究では、前向きにMCTDの症例を登録し、NOS2遺伝子多型とPAH発症の関連を検討する。

**B. 研究方法**

**1) 対象患者**

東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターに通院中の患者で、厚生労働省研究班による混合性結合組織病診断の手引き（1996年改訂）によりMCTDと診断でき、MCTD診断後4年以内の症例を対象とした。症例は、2005年11月から2009年10月までに同意を得て登録した26名であった。

**2) 肺動脈性肺高血圧症患者の診断**

心臓超音波検査にて、RVSP (right ventricular systolic pressure) が、40 mmHg以上の疑わしい症例にて、右心カテーテル検査を行い、平均肺動脈圧が、

25 mmHg以上で、肺動脈楔入圧が15 mmHg以下の症例をPAHとした。さらに、重度の肺線維症や心疾患、肺動脈血栓塞栓症による2次性のPHが否定された症例とした。

3) 血中エンドセリン-1および一酸化窒素の定量  
エンドセリン-1 (ET-1) は、患者血漿中の濃度をELISA法 (R & D systems) にて定量した。一酸化窒素 (NO) は、NOの代謝産物であるNitriteとNitrateの総和を比色法 (Cayman Chemical) にて定量した。

4) マイクロサテライト (CCTTT repeat) の繰り返し回数同定

東京女子医大倫理委員会の承認を経て、informed consentを行い、患者より末梢血を採血し、genomic DNAを抽出した。NOS2遺伝子の-2.5 kb近傍に存在するCCTTT repeat microsatelliteを解析するため、蛍光ラベルしたプライマーを用いgenomic DNAを鋳型としてPCRを行い、PCR産物をABI 7900を用いて泳動し、GeneScan法にて繰り返し回数を決定した。

(倫理面への配慮)

東京女子医科大学の倫理委員会にて審議し、承認を得て行っており、患者からのDNA取得には、文書で同意を取得している。DNAは、匿名化番号を付記して、検査を行い、最後に、患者臨床データと連結を行っている。患者のデータの漏洩はない。

## C. 研究結果

### 1) 症例

2005年11月から2009年10月の登録を行い、26例のMCTDを登録した。26例、全例女性で、年齢の中央値は、40歳であった。そのうち、7例においてPAHが認められた(表1)。26例での罹病期間の平均値は62ヶ月であった。MCTD診断からPAH発症までの期間は、平均値で24ヶ月であった。MCTDと診断されて早期にPAHと診断された症例が多かった(表2)。

### 2) 患者血中エンドセリン-1 (ET-1)および一酸化窒素の代謝産物(NO)の検討

MCTD患者26例と健常人との検討では、ET-1およびNOの有意な増加が認められた ( $p < 0.01$ , 図1)。経過観察中にPAHを発症した7症例では、NO/ET-1比が低下していた。その7症例とその他の19症例を比較した結果、表3に示すように、NO/ET-1 ratioは、有意

差をもってPAH発症群で低下していた。

### 3) CCTTTの繰り返し配列の遺伝子多型の検討

26症例のCCTTT繰り返し配列の回数を測定し、2つの染色体上のCCTTT配列の繰り返し数の和を検討した。繰り返し配列を23未満と、23以上に分けて検討した結果、CCTTT繰り返し配列の数が少ないことは、PAHの発症と有意な相関が認められた(表4)。

## D. 考察

我々は、これまで、MCTDと全身性強皮症 (SSc) に合併したPAH症例では、NOの血清中での上昇がみられないことを報告してきた。一方、MCTDでは、病初期に、血清NO代謝産物が上昇することが認められた。この現象は、MCTDの病変局所で増加している炎症性サイトカインやET-1によるNOS-2誘導が関与していると考えられる。つまり、血管収縮因子であるET-1の作用に拮抗するためにNO合成が促進されていると考えられる。しかし、PAH合併例では、PAH発症早期から、NO産生の増加が認められない。このことより、我々は、PAH合併例では、血管拡張因子の誘導に異常があり、それが、病態に重要であると推定した。NOS2遺伝子多型の検討の結果、PAH合併症例は、NOS-2の転写活性が低下する遺伝子型を有していた。その結果、NOS2産生の低下に伴うET-1とNOの不均衡が続くことにより、PAHの病態が形成される可能性を我々は提唱している。今回の研究では、発症早期のMCTD患者を登録して、NOS2遺伝子多型を調べ、5年間の観察期間でPAH発症との関与を前向き研究にてしらべた。今までの、検討の結果では、26例中7例にてPAHの合併が観察されており、NOS2遺伝子多型CCTTT repeatの回数の少ない症例であった。また、今までの検討結果と一致して、NO/ET-1比の低下が認められた。CCTTT repeatの回数の総和を指標とし、総和が22以下の症例と、23以上の症例の2群におけた検討では、22以下の群では、有意にPAHの発症と関連が認められた。CCTTT repeatの回数は、前向き検討においても、PAHの発症を予測する有用な遺伝子マーカーとなる可能性が示唆された。

PAHに対する経口内服薬での新たな治療法が開発され、有効性を示す臨床報告が多数みられている。1つは、エンドセリンの作用を抑制するエンドセリ

ン受容体拮抗薬で、肺高血圧症や末梢の循環不全ばかりでなく、間質性の肺病変にも有効とする報告がある。エンドセリンがMCTDや全身性強皮症の病態に重要な働きをしていることが、このことから明らかとなった。2つめの薬剤は、ホスホジエステラーゼ5阻害剤 (PDE5I)である。血管平滑筋細胞内のcGMPの分解を抑制することにより、NO作用を高め、血管拡張を引き起すとされている。半減期が短い薬剤であるが、1日3回の投薬でPHに対し有効性が報告されている。やはりPDE5Iも、末梢循環不全に有効性があり、レイノー現象の改善が報告されている。NOS2遺伝子変異があり、PHの発症頻度が高いと推定された症例にNO活性を高める効果のあるPDE5Iを投与することは、発症の抑制に有効である可能性がある。

#### E. 結論

NOS2遺伝子の転写調節領域に存在するCCTTT繰り返し配列の数が2つの染色体をあわせて22以下の症例では、高頻度にPAHを合併する。MCTDでCCTTT繰り返し配列の少ない症例では、PAHの発症を予防することが重要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sugiura T, Kawaguchi Y, Soejima M, Katsumata Y, Gono T, Baba S, Kawamoto M, Murakawa Y, Yamanaka H, Hara M: Increased HGF and c-Met in muscle tissues of polymyositis and dermatomyositis patients: Beneficial roles of HGF in muscle regeneration. **Clin Immunol** 136:387-399, 2010
2. Gono T, Kawaguchi Y, Satoh T, Kuwana M, Katsumata Y, Takagi K, Masuda I, Tochimoto A, Baba S, Okamoto Y, Ota Y, Yamanaka H: Clinical Manifestation and prognostic factor in anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 antibody-associated interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. **Rheumatology** 49:1713-1719, 2010
3. Gono T, Kawaguchi Y, Hara M, Masuda I, Katsumata

- Y, Shinozaki M, Ota Y, Ozeki E, Yamanaka H: Increased ferritin predicts development and severity of acute interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. **Rheumatology** 49:1354-1360, 2010
4. Katsumata Y, Okamoto Y, Shinozaki M, Kawaguchi Y, Yamanaka H: Dramatic amelioration of pneumatosis cystoides intestinalis in systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 62:1468, 2010
  5. Gono T, Kawaguchi Y, Sugiura T, Furuya T, Kawamoto M, Hanaoka M, Yamanaka H: Interferon-induced helicase (*IFIH1*) polymorphism with systemic lupus erythematosus and dermatomyositis/polymyositis. **Modern Rheumatol** 20:466-470, 2010
  6. Ota Y, Kawaguchi Y, Takagi K, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Gono T, Masuda I, Ikari K, Momohara S, Yamanaka H: Single nucleotide polymorphisms of *CD244* gene predispose to renal and neuropsychiatric manifestations with systemic lupus erythematosus. **Modern Rheumatol** 20:427-431, 2010
  7. Gono T, Kawaguchi Y, Sugiura T, Ichida H, Takagi K, Katsumata Y, Hanaoka M, Okamoto Y, Ota Y, Yamanaka H: Interleukin-18 is a key mediator in dermatomyositis: potential contribution to development of interstitial lung disease. **Rheumatology** 49:1878-1881, 2010
  8. Shen N, Fu Q, Deng Y, Qian X, Zhao J, Kaufman KM, Tang Y, Chen J-Y, Yang W, Wong M, Kawasaki A, Tsuchiya N, Sumida T, Kawaguchi Y, Yu C-Y, Howe HS, Mok MY, Bang SY, Liu F-L, Chang D-M, Takasaki Y, Hashimoto H, Harley JB, Guthridge JM, Grossman JM, Cantor RM, Song YW, Bae S-C, Chen S-L, Hahn BH, Lau YL, Tsao BP: Gender Specific Association of X-linked TLR7 with Male Systemic Lupus Erythematosus. **Proc Natl Acad Sci USA** 107:15838-15843, 2010
  9. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N: Association of the FAM167A-BLK region with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 62:890-895, 2010
  10. Nishimoto K, Kochi Y, Ikari K, Yamamoto K,

- Suzuki A, Shimane K, Nakamura Y, Yano K, Iikuni N, Tsukahara S, Kamatani N, Okamoto H, Kaneko H, Kawaguchi Y, Hara M, Toyama Y, Horiuchi T, Tao K, Yasumoto K, Hamada D, Yasui N, Inoue H, Itakura M, Yamanaka H, Momohara S. Association study of TRAF1-C5 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. *Ann Rheum Dis* 69:368-373, 2010
11. Katsumata Y, Harigai M, Kawaguchi Y, Fukasawa C, Soejima M, Kanno T, Nishimura K, Yamada T, Yamanaka H, Hara M: Diagnostic reliability of magnetic resonance imaging for central nervous system syndromes in systemic lupus erythematosus: a prospective cohort study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 11:13, 2010
12. Kawaguchi Y, Ota Y, Kawamoto M, Ito I, Tsuchiya N, Sugiura T, Katsumata Y, Soejima M, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kuwana M, Yamanaka H, Hara M: Association study of a polymorphism of the *CTGF* gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis* 68:1921-1924, 2009
13. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara N. Muscarinic-3 Acetylcholine Receptor Autoantibody in Patients with Systemic Sclerosis: Contribution to Severe Gastrointestinal Tract Dysmotility. *Ann Rheum Dis* 68:710-714, 2009
14. Tsuchiya N, Kawasaki A, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Hara M, Sato S: Association of STAT4 polymorphism with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 68:1375-1376, 2009
15. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Hikami K, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N: Association of a functional polymorphism in IRF5 region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 60:1845-1850, 2009
16. Sumita Y, Sugiura T, Kawaguchi Y, Baba S, Soejima M, Murakawa Y, Hara M, Kamatani N: Genetic polymorphisms in the surfactant proteins in systemic sclerosis in Japanese: T/T genotype at 1580 C/T (Thr131Ile) in the SP-B gene reduces the risk of interstitial lung disease. *Rheumatology* 47:289-291, 2008
17. Kobayashi S, Ikari K, Kaneko H, Kochi Y, Yamamoto K, Shimane K, Nakamura Y, Toyama Y, Mochizuki T, Tsukahara S, Kawaguchi Y, Terai C, Hara M, Tomatsu T, Yamanaka H, Horiuchi T, Tao K, Yasutomo K, Hamada D, Yasui N, Inoue H, Itakura M, Okamoto H, Kamatani N, Momohara S: Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. *Arthritis Rheum* 58:1940-1946, 2008
18. Oishi T, Iida A, Otsubo S, Kamatani Y, Usami M, Takei T, Uchida K, Tsuchiya K, Saito S, Ohnisi Y, Tokunaga K, Nitta K, Kawaguchi Y, Kamatani N, Kochi Y, Shimane K, Yamamoto K, Nakamura Y, Yumura W, Matsuda K. A functional SNP in the NKX2.5-binding site of ITPR3 promoter is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *J Human Genet* 53:151-162, 2008
19. Kamatani Y, Matsuda K, Ohishi T, Ohtsubo S, Yamazaki K, Iida A, Hosono N, Kubo M, Yumura W, Nitta K, Katagiri T, Kawaguchi Y, Kamatani N, Nakamura Y. Identification of a significant association of a single nucleotide polymorphism in TNXB with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *J Human Genet* 53:64-73, 2008
2. 学会発表
1. 川口鎮司 炎症性筋疾患 間質性肺病変 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 312, 2010
2. 川口鎮司 全身性強皮症における肺動脈性肺高血圧症の診断と治療方法 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 422, 2010
3. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Ota Y, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara M. Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 58 (Supplement):S375, 2009
4. Ota Y, Kawaguchi Y, Masuda I, Kawamoto M, Sugiura T, Fukasawa C, Takagi K, Nishimagi E, Ichida H, Soejima M, Masako H, Kamatani N. Association between a polymorphism of the *CTGF* gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese



population. Arthritis Rheum 58 (Supplement):S927, 2009

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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

表1 患者背景

- 
- 26症例、全例女性
  - 平均発症年齢： 39歳（15-68）
  - 臨床症状
    - ◆ レイノー現象 26例
    - ◆ 間質性肺病変 8例
    - ◆ 皮膚硬化範囲 diffuse 9例、limited 17例
    - ◆ 筋炎 8例
    - ◆ 血球減少 4例
    - ◆ 抗U1-RNP抗体 26例、抗セントロメア抗体 1例、抗dsDNA抗体 4例
- 

表2 観察結果

- 
- 観察期間 2005年11月から2011年2月
  - 最終観察期間 平均値 56ヶ月
  - 最終罹病期間 平均値 64ヶ月
  - MCTD診断からPAH発症までの期間 平均値 26ヶ月
  - PAH発症年齢 平均値 34歳
- 

表3 NO/ET-1比とPAH発症の関連

---

	NO/ET-1比
PAH発症群	39*
PAH非発症群	122

---

\*: P < 0.0001 by Student's t-test

NO: 一酸化窒素、ET: エンドセリン、PAH: 肺動脈性肺高血圧症

表4 CCTTT repeatとPAH発症の関連

PAH	CCTTTの和	
	2 3 未満	2 3 以上
合併有り	6例	1例
合併無し	4例	15例

P = 0.01 by Fisher exact test, RR: 20 (1.8-223)

PAH: 肺動脈性肺高血圧症

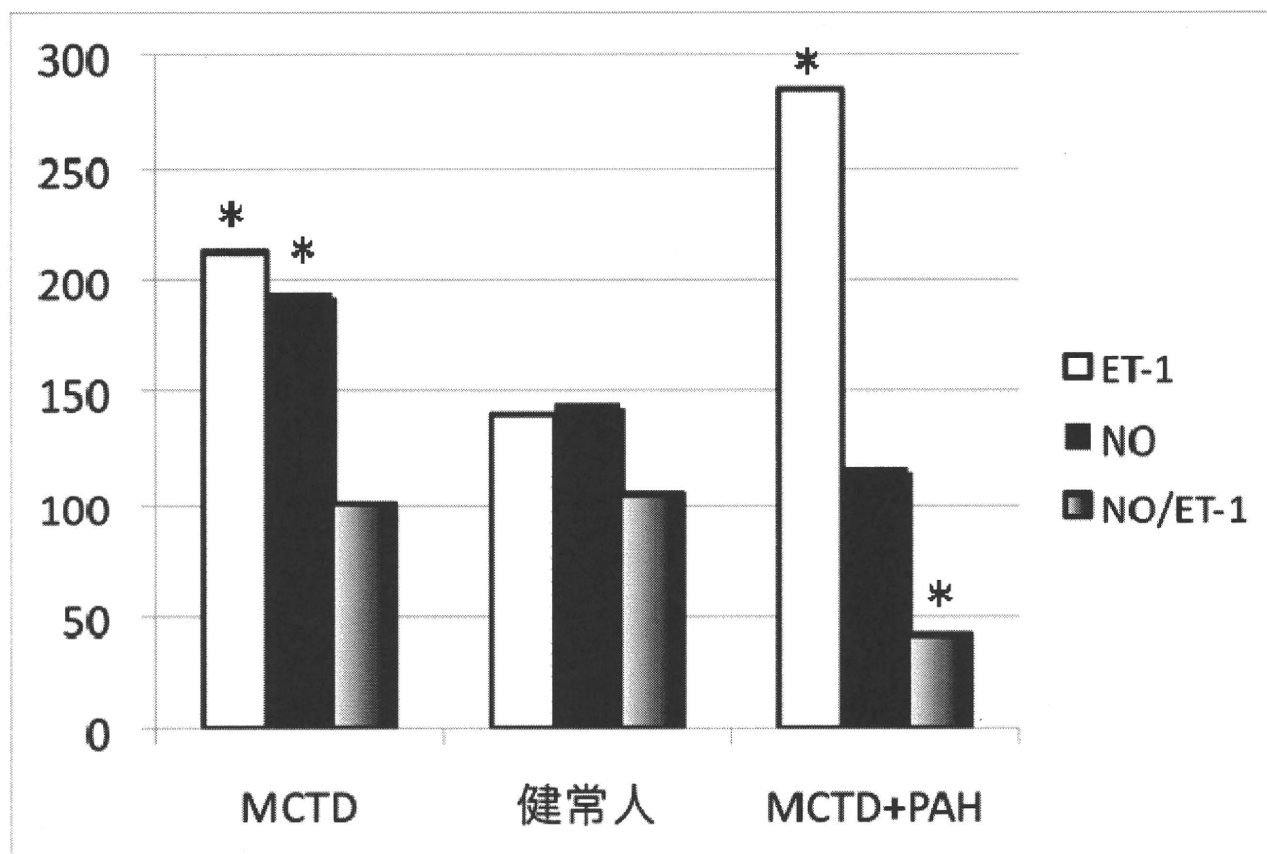


図1 エンドセリン(ET)-1、一酸化窒素(NO)の血中濃度

健常人との比較で、MCTDはET-1およびNOが有意に上昇(\* P < 0.01)、PAH合併MCTDは、ET-1の有意な上昇とNO/ET-1比の有意な低下が認められた

## 肺高血圧症に合併する心血管系のリモデリングの病態解明と治療法開発に関する研究

研究分担者： 田中 廣壽 東京大学医科学研究所・准教授  
研究協力者： 吉川 賢忠 東京大学医科学研究所・助教  
研究協力者： 清水 宣明 東京大学医科学研究所・特任研究員  
研究協力者： 佐野 元昭 慶応義塾大学医学部再生医学教室・講師  
研究協力者： 福田 恵一 慶応義塾大学医学部再生医学教室・教授

### 研究要旨

混合性結合組織病（MCTD）をはじめとする膠原病患者における肺高血圧（PH）とそれに合併する右心肥大の発症や治療法開発におけるHEXIM1の意義を明らかにし、新規治療法開発の基盤をつくることを目的とした。HEXIM1とその変異体を心筋組織特異的に発現させるトランスジェニックマウスを作成した。HEXIM1トランスジェニックマウス（Tg）では、HIF-1 $\alpha$ をはじめとした転写因子や増殖因子関連分子のmRNAが低下していたが、心筋を含めて現時点では異常所見は認めなかった。低酸素負荷によるPHモデルでは、野生型マウスでは右心肥大の指標である右室/左室+心室中隔重量比は有意に増加したが、心筋特異的HEXIM1過剰発現マウス（HEXIM1Tg）では変化がなかった。心病理組織学的解析によっても、HEXIM1Tgにおいて右室心筋細胞の肥大が抑制されていることが確認された。したがって、個体レベルにおいて、HEXIM1はPHに伴うRVH進展抑制に関与する可能性が示唆された。新生仔ラット心筋培養細胞を用いて心筋肥大におけるHEXIM1の役割を、野生型とP-TEFb抑制活性消失変異体HEXIM1dNを対比して解析した。HEXIM1野生型過剰発現下では、エンドセリン1（ET-1）による心筋細胞肥大作用、心肥大マーカー遺伝子のmRNA発現増加は抑制されたが、HEXIM1dNは影響を与えなかった。また、P-TEFb活性化に伴うRNAポリメラーゼII（RNAPII）のリン酸化も、HEXIM1過剰発現下でのみ抑制された。低酸素培養における低酸素誘導性転写因子HIF-1の標的遺伝子群のmRNA発現増加に対しても、HEXIM1は抑制的に働いた。したがって、HEXIM1は心筋肥大刺激によるP-TEFb/RNAPII活性化や心筋リモデリングあるいは低酸素応答に関与する各種の遺伝子発現を抑制することによって、PHに伴うRVH進展抑制に関与する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

肺高血圧症（PH）は混合性結合組織病（MCTD）の予後規定因子であるが、その病態はいまだに明らかではなく、根本的治療法もない。とくに、肺血管抵抗の増大と低酸素血症による右心負荷の増大は右心肥大、肺性心を招来し、予後をさらに悪化させる。

最近、エンドセリン1（ET-1）などによる血管平滑筋増殖や心肥大病態は、cyclin T1とともにP-TEFb複合体を構成するCDK9活性の上昇に引き続くRNAポリメラーゼII（RNAPII）のリン酸化亢進によることが明らかになった（Sano, M., et al., Nat Med, 2002）。一方、HEXIM1は、P-TEFbを抑制して転写伸長反応を負に制御し（Yik, J., et al., Mol Cell, 2004）、心

管内分泌制御に関与する転写因子活性を阻害する核蛋白質であり（Ouchida, R., et al., Genes Cells, 2003, Shimizu, N., et al., Mol Endocrinol, 2009）、そのノックアウトマウスは心肥大を呈し胎生致死である（Huang, F., et al., Mech Dev, 2004）。したがって、HEXIM1は、PHに引き続く右心肥大の発症に関与している可能性がある。そこで、かかる病態におけるHEXIM1の意義を明らかにし新規治療法開発の基盤をつくることを目的とした。

### B. 研究方法

1) 心筋特異的HEXIM1発現トランスジェニックマウス（HEXIM1Tgマウス）：loxP-HEXIM1（野生

型、各種変異体) トランスジェニックマウスと alphaMHC-Cre トランスジェニックマウスを交配させ、心筋特異的に HEXIM1 を発現する トランスジェニックマウス (HEXIM1Tg マウス) を慶応義塾大学医学部再生医学教室 佐野元昭講師の協力によって作成した。

- 2) 低酸素負荷 PH マウスモデル: 野生型ならびに HEXIM1Tg マウスを低酸素分圧下 (10%O<sub>2</sub>) で 8 週間飼育した。
- 3) 心臓病理組織・心筋細胞径解析: マウスをソムノペンチル麻酔下に開胸し、左室穿刺によりマウス全身をホルマリン液還流し、心臓を摘出後ホルマリンで再固定した。右室乳頭筋起始部近傍の横断面を HE 染色し、長軸に沿って断面が見えている細胞を抽出し、核に対し垂直かつ核の中心を通る細胞短径を測定解析した。
- 4) 血行動態解析: イソフルレン麻酔下にマウス気管を人工呼吸器に接続して開胸し、21G 針で右室を直接穿刺し圧トランスデューサー (Micro-Tip Catheter transducer SPR-671, Millar Instruments, Houston, TX) を挿入して右室収縮期圧を測定した。
- 5) 心臓超音波解析: イソフルレン麻酔下にマウスをヒートステージに固定し、心拍数を 400-500/分になるように麻酔を調節して心臓超音波解析 (Vevo 2100®, VisualSonics, Toronto, Canada) を行い、左室駆出率 EF、右室拡張期終末径 RVdD を測定した。
- 6) ET-1 の ELISA: ソムノペンチル麻酔下に開腹し、下大静脈より血漿を採取し、血漿中した (Big Endothelin-1 EIA kit, Enzo Life Sciences International, Inc., Plymouth Meeting, PA)。
- 7) 心肥大における HEXIM1 の意義を明らかにするため、Cre-loxP で制御可能な HEXIM1 発現アデノウイルス (野生型および P-TEFb 抑制活性消失変異体 HEXIM1dN) の系を樹立した。新生仔ラット培養心筋細胞を ET-1 で処理した際の、HEXIM1 野生型あるいは HEXIM1dN の過剰発現の影響を、心筋細胞肥大 (免疫染色法)、遺伝子発現 (定量的 RT-PCR)、RNAPII リン酸化 (ウエスタンブロット法) を指標に解析した。

## 倫理面への配慮

全ての動物実験、遺伝子組換え実験は東京大学医科学研究所ならびに慶応義塾大学が定める動物実験規定、遺伝子組換え生物の使用等に関する規定に従い、機関承認を受けて行われた。

## C. 研究結果

- 1) 野生型マウスでは正常酸素分圧下飼育に比し低酸素分圧下飼育において右室/体重比が有意に増加したが、HEX-Tg では増加しなかった。一方、左室/体重比は酸素分圧、HEXIM1 発現量のいずれの影響をも受けなかった。
- 2) 野生型マウスでは正常酸素分圧下飼育に比し低酸素分圧下飼育において RVdD が有意に増加したが、HEX-Tg では増加しなかった。
- 3) 低酸素分圧下飼育により野生型マウス、HEX-Tg ともに RVSP が有意に増加したが、両者の RVSP には差がなかった。
- 4) 酸素分圧、HEXIM1 発現量にかかわらず各マウスの EF に変化は認められなかった。
- 5) 低酸素分圧下飼育により野生型マウス、HEX-Tg ともに全肺組織中の ET-1 遺伝子発現ならびに血漿中 ET-1 濃度が有意に増加したが、両者には差が認められなかった。
- 6) 野生型マウスでは正常酸素分圧下飼育に比し低酸素分圧下飼育において心筋細胞径が有意に増加したが、HEX-Tg では増加しなかった。左室心筋細胞径はいずれのマウスにおいても変化がなかった。
- 7) 心筋選択的に HEXIM1 野生型あるいは HEXIM1dN を内因性 HEXIM1 の 4-5 倍高発現するマウスの樹立に成功した。かかる Tg マウスはいずれも正常に生まれ、通常の飼育環境下においては成長速度、体重、など、コントロールのマウスとの間には明らかな違いは認められなかった。16 週で屠殺後の病理組織学的検討でも異常所見はなかった。
- 8) 野生型 HEXIM1Tg マウスの心筋における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより検討した。Tg マウスでは、Hif1a、Cebpd、Klf9、Thrb、Klf15、Pparg1a などの転写因子の遺伝子発現が低下していた。