

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

B 細胞免疫寛容破綻における Fc γ RIIB 発現欠損と *Slam* 遺伝子多型との相補作用

研究分担者 広瀬幸子
研究協力者 西村裕之

順天堂大学大学院医学研究科分子病理病態学
桐蔭横浜大学医用工学部

准教授
教授

研究要旨

大量の外来抗原の前投与によって、同抗原に対する免疫応答が抑制される現象は、従来から high dose tolerance として知られており、自己に対する免疫寛容破綻との関連性が示唆されてきた。しかしながら、その真偽については明らかではない。我々は、B 細胞活性化抑制分子である Fc γ RIIB の発現欠損、ならびに T 細胞-B 細胞の相互作用に関与すると考えられる SLAM 分子をコードする遺伝子の多型に着目し、B 細胞免疫寛容破綻における役割を解析した。その結果、Fc γ RIIB 発現欠損の単独効果ではみでは、B 細胞免疫寛容破綻は起こらないが、Fc γ RIIB 発現欠損と SLAM 遺伝子多型との相互作用で、外来抗原に対する high dose tolerance の破綻および自己抗体の産生が誘導されることが明らかとなった。すなわち、外来抗原に対する寛容破綻と自己寛容破綻には共通の免疫機序が関わっていることが始めて明らかにされた。

A. 研究目的

Fc γ RIIB は代表的な B 細胞活性化抑制分子で、その遺伝子発現欠損は B 細胞の免疫寛容破綻を誘導すると考えられている。*Fcgr2b* 遺伝子の近傍には SLAM family をコードする *Slam* 遺伝子群が存在し、B6 マウスと 129 マウスの間には *Fcgr2b* 遺伝子および *Slam* 遺伝子の両方に多型が存在する。この *Fcgr2b* 遺伝子および *Slam* 遺伝子を含む 129 マウス由来の領域は *Sle16* と名付けられており、この領域を B6 マウスに導入すると、自己抗体産生が誘導されると報告されている。その原因は、129 マウス型 *Slam* 遺伝子多型によることが示唆されている。本研究では、*Fcgr2b* 遺伝子欠損マウスの B 細胞機能に対する 129 マウス型 *Slam* 遺伝子多型の影響を解析することを目的とした。

B. 研究方法

129 マウス由来の ES 細胞を用いて *Fcgr2b* 遺伝子を欠損させ、B6 マウスに戻し交配して、2 種類の *Fcgr2b* 遺伝子欠損 B6 マウス系(KO1, KO2 と命名)を樹立した。KO1 マウスは *Fcgr2b* 遺伝子下流に 129 由来 *Sle16* 領域を含

み、KO2 マウスはこの領域が B6 由来に置き換わっている(図 1)。これらのマウス系を用いて、high dose tolerance 誘導の有無、血中自己抗体レベル、IgG recall response の程度を比較解析した。

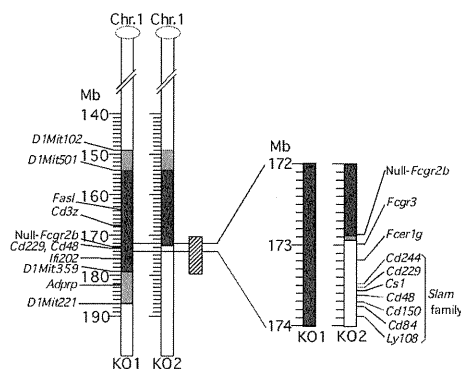


図 1 KO1 と KO2 マウスの第 1 染色体テロメア領域の遺伝子型。黒は 129 マウス由来、白は B6 マウス由来、灰色はリコンビナント領域を示す。斜線の部分は 129 マウスの *Sle16* 領域を示した。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は、本研究施設の定める動物実験指針に基づいて行なった。

C. 研究結果

1) High dose tolerance: 牛 γ プロブリン(BGG)を超遠心にかけて、凝集蛋白を取り除いた非凝集 BGG (DBGG)を正常マウスに大量に前投与

すると、その後の BGG 免疫による IgG 抗体応答が高度に抑制され、免疫寛容が誘導される。この現象は古くから high dose tolerance として知られている。KO2 マウスでは、正常 B6 マウスの場合と同様に、大量の DBGG を前投することで、その後の BGG 免疫による IgG 抗体応答が高度に抑制されたが、KO1 マウスでは tolerance の破綻が起こっており、高い抗体応答が認められた (図 2)。

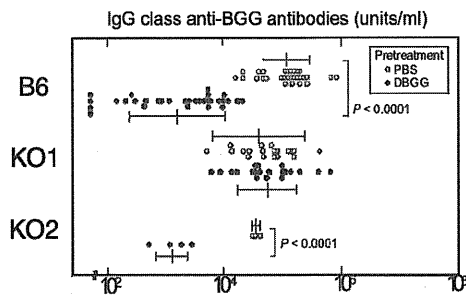


図 2 B6, KO1 および KO2 マウスに大量の DBGG を前処理した場合 (●) と DBGG の代わりに PBS を投与した場合 (○) の BGG 免疫後 1 週間後の血中 IgG 抗 BGG 抗体価の比較。

2) 血中 IgG 抗 DNA 抗体: KO1 マウスでは 6 ヶ月齢において自己抗体である抗 DNA 抗体産生が認められたが、B6 および KO2 マウスでは、認められなかった (図 3)。

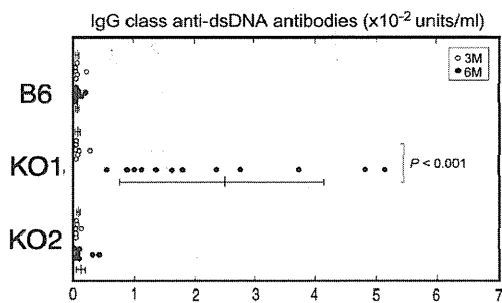


図 3 B6, KO1 および KO2 マウスの 3 ヶ月齢 (○) および 6 ヶ月齢 (●) における血中 IgG 抗 DNA 抗体価の比較。

3) IgG recall response: KLH を CFA と共に 1 次免疫し、3 週後に IFA と共に 2 次免疫し、その後 1 週目および 2 週目の血中 IgG 抗 KLH 抗体価を比較した。KO1 マウスでは、B6 および KO2 マウスに比較して、有意に高力価の抗体産生が認められた (図 4)。

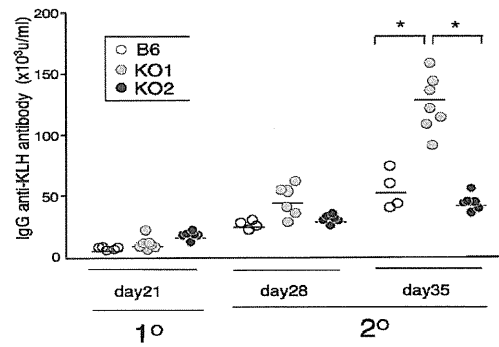


図 4 B6, KO1 および KO2 マウスにおける KLH の 1 次免疫 3 週後、および 2 次免疫の 1 週目と 2 週目における血中 IgG 抗 KLH 抗体価の比較。* $P < 0.001$

D. 考察

B6 マウスの遺伝背景においては、B 細胞免疫寛容破綻は $Fc\gamma RIIB$ 発現欠損のみでは誘導されず、 $Fc\gamma RIIB$ 発現欠損と *Sle16* 領域内の多型遺伝子との相補作用により誘導されることが明らかとなった。*Sle16* 領域内には *Slam* 遺伝子群が存在している。SLAM family 分子は濾胞胚中心 T 細胞 (T_{FH}) の分化や、T 細胞と B 細胞の cognate interaction の強弱に関与すると考えられているので、相補作用を示す候補遺伝子として *Slam* 遺伝子多型が関与する可能性が高い。

E. 結論

$Fc\gamma RIIB$ 発現欠損と *Slam* 遺伝子多型との相補作用が B 細胞免疫寛容破綻および外来抗原に対する recall response の増強に関与する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sato-Hayashizaki A, Ohtsuji M, Lin Q, Hou R, Ohtsuji N, Nishikawa K, Tsurui H, Sudo K, Ono M, MD, Izui S, Shirai T, Takai T, Nishimura H, and Hirose S. Presumptive role of 129 strain-derived *Sle16* locus for rheumatoid arthritis in a new mouse model with $Fc\gamma RIIB$ -deficient C57BL/6 genetic background. *Arthritis Rheum.* 63:2930-2938, 2011.

Fujii T, Hou R, Sato-Hayashizaki A, Obata M, Ohtsuji M, Ikeda K, Mitsui K, Kodera Y, Shirai T, Hirose S and Nishimura H. Susceptibility loci for the defective foreign protein-induced tolerance in NZB mice: Implication of epistatic effects of *Fcgr2b* and *Slam* family genes. *Eur. J. Immunol.* 41:2333-2340, 2011.

Cao Y, Zhang L, Kamimura Y, Ritprajak P, Hashiguchi M, Hirose S, and Azuma M. B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin. *Cancer Res.* 71:1235-1243, 2011.

2. 学会発表

安藤誠一郎、天野浩文、天野恵理、箕輪健太郎、渡邊 崇、仲野 総一郎、森本真司、戸叶嘉明、林 青順、侯 蓉、大辻希樹、広瀬幸子、高崎芳成 FTY720 治療後の BXS マウス腎炎における腎臓局所サイトカイン・ケモカイン発現の変化: 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 493 頁 2011/7/17-20 神戸

Rong Hou, QingShun Lin, Aya Sato, Katsuko Sudo, Sachiko Hirose. Role of leptin in the B cell function: 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 612 頁 2011/7/17-20 神戸

Hirofumi Amano, Shinya Kawano, Toshiyuki Kaneko, Aya Sato-Hayashizaki, Lin Quigshun, Yoshinari Takasaki, Sachiko Hirose. *Yaa*-mutation induces phenotype shift from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus in *FcγRIIB*-deficient B6 mice. The American College of Rheumatology, November 5-9, 2011, Chicago

広瀬幸子 全身性自己免疫疾患の疾患特異性に関わる遺伝要因の解析 第 57 回日本病理学会秋期特別総会 2011 年 11 月 17 日 東京

(日本病理学会誌 第 100 巻 第 2 号 16 頁, 2011)

林 青順、大辻希樹、佐藤 綾、大辻奈穂美、西川桂子、鶴井博理、須藤カツ子、西村裕之、小野栄夫、白井俊一、広瀬幸子 SLE における SLAM シグナルの役割 : 第 40 回日本免疫学会学術集会・学術集会記録 84 頁 2011/11/27-29 千葉幕張

鶴井博理、広瀬幸子 String model と Miyazawa-Jernigan matrix に基づく TCR-pMHC 相互作用評価法の特徴: 第 40 回日本免疫学会学術集会・学術集会記録 140 頁 2011/11/27-29 千葉幕張

佐藤 綾、大辻希樹、林 青順、大辻奈穂美、西川桂子、鶴井博理、小野栄夫、白井俊一、高井俊行、西村裕之、広瀬幸子 関節リウマチ発症に与える *Sle16* 領域の影響: 第 40 回日本免疫学会学術集会・学術集会記録 153 頁 2011/11/27-29 千葉幕張

藤原 龍、尾畑賢臣、藤井琢磨、大辻希樹、小寺 洋、広瀬幸子、西村裕之 ポリエチレングリコール修飾抗原により誘導される Th 細胞免疫寛容の機序: 第 40 回日本免疫学会学術集会・学術集会記録 96 頁 2011/11/27-29 千葉幕張

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Fc γ レセプターIIIB 欠損マウスにおける *Yaa* 遺伝子変異の与える影響

研究分担者	天野 浩文	順天堂大学	膠原病内科	准教授
研究協力者	高崎 芳成	順天堂大学	膠原病内科	教授
	広瀬 幸子	順天堂大学	分子病理病態学	准教授
	河野 晋也	順天堂大学	膠原病内科	
	金子 俊之	順天堂大学	膠原病内科	
	林崎 綾	順天堂大学	分子病理病態学	

研究要旨

(背景) Fc γ RIIB は、B 細胞の活性化を負にフィードバックする重要な免疫制御分子である。この Fc γ RIIB を野生型 C57BL/6(B6)マウスで欠損した B6.Fc γ RIIB^{-/-}マウスでは、リウマトイド因子(RF)の出現と関節破壊を伴う関節リウマチ(RA)の病態を呈した(Sato-Hayashizaki ら Arthritis Rheum 2011)。我々はこのマウスに Toll 様受容体(TLR)7 の重複である *Yaa* 遺伝子を導入することで病態の変化が生じるかを確認する目的で B6.Fc γ RIIB^{-/-}*Yaa* マウスを作製し解析した。(方法) 血清中の RF、抗 ds-DNA 抗体を ELISA で測定し、腎臓の免疫組織学的検査を行い、さらに脾臓細胞についてフローサイトメトリーで解析した。(結果) B6.Fc γ RIIB^{-/-}*Yaa* マウスは B6.Fc γ RIIB^{-/-}、B6、B6.*Yaa* マウスと比較し有意に抗 ds-DNA 抗体の上昇を認めた。RF は B6 マウスと比較して上昇していたが、B6.Fc γ RIIB^{-/-}、B6.*Yaa* マウスと同程度であった。6 ヶ月齢で半数が蛋白尿を認め、50%生存率は約 7 カ月であった。腎臓では SLE 様の糸球体腎炎を呈した。脾臓では CD69 陽性 B 細胞の増加と ICOS⁺PD-1⁺T 細胞の増加を認めた。(考察) RA と SLE では、共通の遺伝子背景が存在し TLR の刺激など、エピジェネティックな作用が加わることが自己免疫疾患の発症における疾患特異性を決定している可能性がある。

A. 研究目的

IgG 型免疫グロブリンの Fc 部分を認識する受容体である Fc γ 受容体は、ほとんどが免疫応答を活性化させる方向に働くが、Fc γ RIIB は唯一抑制性のシグナルを伝える Fc γ 受容体である。この Fc γ RIIB を野生型マウスである C57BL/6(B6)マウスで欠損した B6.Fc γ RIIB^{-/-}マウスでは、全身性エリテマトーデス(SLE)に類似した腎炎を発症すると報告されている(Ravetch ら Immunity 2000)。一方、広瀬らは B6.Fc γ RIIB^{-/-}マウスで SLE の病態を発症することはなく、リウマトイド因子(RF)の出現とともに関節破壊と変形を伴う関節リウマチの病態を呈したと報告している(Sato-Hayashizaki ら Arthritis Rheum 2011)。今回我々は、関節リウマチを自然発症する B6.Fc γ RIIB^{-/-}マウスを用いて SLE を誘導し Toll like receptor (TLR)7 の重複を認める *Yaa* 遺伝子を導入することで病態の変化が生じるかを確認する目的で B6.Fc γ RIIB^{-/-}*Yaa* マウスを作製し解析した。

B. 研究方法

交配により B6.Fc γ RIIB^{-/-}*Yaa* マウスを作製し 2 ヶ月、6 ヶ月齢での血清中の RF、抗 ds-DNA 抗体、抗クロマチン抗体を ELISA で測定した。さらに

腎臓の免疫組織学的検査を行った。脾臓細胞についてフローサイトメトリーを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

B6.Fc γ RIIB^{-/-}*Yaa* マウスは 2 ヶ月齢で B6.Fc γ RIIB^{-/-}マウス、B6 マウス、B6.*Yaa* マウスと比較し有意に抗 ds-DNA 抗体、抗クロマチン抗体の上昇を認めた。RF は B6 マウスと比較して上昇していたが、B6.Fc γ RIIB^{-/-}マウス、B6.*Yaa* マウスと比較し変化を認めなかった。6 ヶ月齢の時点で蛋白尿を認めるマウスは 50%であり、50%生存率は約 7 カ月であった。腎臓組織では、ループス様糸球体腎炎の像を呈し、腎糸球体では免疫グロブリンの沈着を認めた。脾臓の B 細胞では CD69 陽性細胞および CD138 陽性細胞の増加を認め、マージナルゾーン B 細胞の低下を認めた。さらに ICOS 陽性

PD-1 陽性 T 細胞の著明な増加を認めた。

D. 考察

RA と SLE では、共通の遺伝子背景が存在し TLR の刺激など、エピジェネティックな作用が加わることが自己免疫疾患の発症における疾患特異性を決定している可能性がある。

E. 結論

B6.Fc γ RIIB^{-/-}Yaa マウスは SLE の病態を示し、脾臓リンパ球においては活性化フェノタイプを呈した。RA と SLE では共通の疾患関連遺伝子が存在し、他の自己免疫感受性遺伝子の異常が加わることがそれらの疾患特異性を決定している可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Minowa K, Amano H, Nakano S, Ando S, Watanabe T, Nakiri Y, Amano E, Tokano Y, Morimoto S, Takasaki Y. Elevated serum level of circulating syndecan-1 (CD138) in active systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 44(5):357-62, 2011
- 2) Ikeda T, Toyama S, Ogasawara M, Amano H, Takasaki Y, Morita H, Ishizuka T. Rheumatoid arthritis complicated with immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders during treatment with adalimumab. *Mod Rheumatol*. 2011 in press.
- 3) Ogasawara M, Tamura N, Kageyama M, Onuma S, Kusaoi M, Toyama S, Sekiya F, Matsudaira R, Nawata M, Tada K, Matsushita M, Kempe K, Amano H, Morimoto S, Yamaji K, Takasaki Y. Single-center, retrospective analysis of efficacy and safety of tacrolimus as a second-line DMARD in combination therapy and the risk factors contributing to adverse events in 115 patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 31(2):251-7, 2012

総説

- 4) 天野浩文. SLE の病態と自然免疫 - Toll-like receptor を中心に. *リウマチ科*, 46(2):117-22, 2011
- 5) 天野浩文. Fc γ レセプターと全身性自己免疫疾患. *日本臨床免疫学会会誌*. 34(1): 1-7, 2011

2. 学会発表

1. 箕輪健太郎、天野浩文、仲野総一郎、安藤誠一郎、渡邊崇、名切裕、天野恵理、戸叶嘉明、森本真司、高崎芳成. 活動期 SLE 患者において血清中 sCD138 は高値を示す. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸 2011.7.17-20.
2. 土江健太郎、野澤和久、寶達桂、李鐘碩、天野浩文、田村直人、高崎芳成. 後腹膜線維症を呈した IgG 関連疾患の比較検討. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸 2011.7.17-20.
3. 渡邊崇、仲野総一郎、安藤誠一郎、箕輪健太郎、天野浩文、森本真司、戸叶嘉明、高崎芳成. 成人 still 病の治療法についての検討. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸 2011.7.17-20.
4. 安藤誠一郎、天野浩文、天野恵理、箕輪健太郎、渡邊崇、仲野総一郎、森本真司、戸叶嘉明、林青順、侯 蓉、大辻希樹、広瀬幸子、高崎芳成. FTY720 治療後の BXS B マウス腎炎における腎臓局所サイトカイン・ケモカインの発現の変化. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸 2011.7.17-20.
5. 森本真司、仲野総一郎、渡邊崇、天野浩文、高崎芳成. 当科におけるループス腎炎 V 型の治療と予後の検討. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸 2011.7.17-20.
6. Amano H, Kawano S, Kaneko T, Sato-Hayashizaki A, Lin Q, Takasaki Y and Hirose S. *Yaa*-Mutation Induces Phenotype Shift From Rheumatoid Arthritis to Systemic Lupus Erythematosus in Fc γ RIIB-Deficient B6 Mice. The 75th National Meeting of American College of Rheumatology. Chicago 2011. 11.5-9.

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

アンジオテンシン変換酵素 2 を阻害する自己抗体の病原性に関する研究

研究分担者 三森 明夫（国立国際医療研究センター 副院長）

研究協力者 高橋裕子（同・膠原病科）、芳賀しおり（同・難治研研究員）、石坂幸人（難治研部長）

研究要旨

我々が同定した、抗 ACE2 阻害自己抗体について、病原性と治療モデルを検討する。血清抗 ACE2 抗体は、膠原病の収縮性血管病態（末端壊死、肺動脈性肺高血圧症）で疾患横断的に、高率に陽性だった。さらに、抗 ACE2 抗体は、活動期 SLE の検討例で高率に陽性だったが、それらは ACE2 を阻害しなかったため、ACE2 を阻害する抗 ACE2 抗体だけが、血管収縮病態に関連する可能性が示唆された。抗 ACE2 抗体が、ステロイド治療で低下することは、膠原病 PAH にステロイド治療が効く理由を示唆する。小分子 XNT による ACE2 活性上昇は、阻害抗体による活性抑制に打ち勝つ場合があると示唆された。阻害抗体のレパートリーをエピトープ分類する意義がある。

A. 研究目的

我々が同定した、抗 ACE2 阻害自己抗体について、病原性および治療モデルを検討する。

背景：ACE2 は血管床に発現、循環し、Ang II を血管拡張因子 Ang (1-7) に変換して、ACE に拮抗し、血管保護・増殖抑制に働く。我々は、膠原病（SLE, SSc, MCTD）の収縮性血管病態（pulmonary arterial hypertension/ PAH, 末端壊死）が、ACE2 障害に関連する可能性を推定し、（ACE2 を介して肺感染する）SARS virus 研究に精通した当センター石坂研と共同を始めた。我々の既報（Arthritis Res Ther, 2010）：抗 ACE2 抗体 ELISA 値：血管病態 18 人中 17 人で高値、非血管病態（対照）膠原病 24 人で低値、健常 28 人は陰性。血管病態患者では、血清 IgG 分画が in vitro ACE2 活性を抑制し、血清 ACE2 活性と抗 ACE2 抗体価が逆相関した。その後、さらに検体を増やすと、非血管病患者でも、抗 ACE2 抗体価高値例がみつき、すべてが、活動期 SLE であったが、それらの IgG 分画は、in vitro ACE2 活性を阻害しなかった。SLE 末端壊死の抗 ACE2 阻害抗体陽性者 1 人の血清と random peptide library の反応で ACE2 上エピトープ候補を 2 つ同定し、該当ペプチドを合成した。同配列による吸収は、上記患者＋他 4 人中 3 人の血清抗体価を低下させ（ $p < 0.05$ ）、IgG 分画による in vitro ACE2 抑制幅を減少させた（ $p < 0.05$ ）（MCTD 班、平成 22 年度報告書に記載）。

B. 研究方法

- 1) 今回さらに、PAH, 末端壊死、対照患者の血清 ELISA 検討例を追加した（精製 recombinant ヒト ACE2 を用い、毎回、健常対照血清と同時アッセイした）。
- 2) ACE2 活性増強因子（米国グループが見いだした）

XNT の in vitro 作用を検討した：PAH, 末端壊死患者の血清 IgG 分画が、in vitro ACE2 活性を抑制する系に、XNT を添加して活性変化をみた。

（倫理面への配慮）

院内倫理審査会で承認されている。

C. 研究結果

抗 ACE2-ELISA 陽性率（健常対照者の mean + 2SD = カットオフ値）

血管病変とは、末端壊死、肺動脈性肺高血圧症 PAH, 強皮症腎である。レイノー症状は、血管病変に含めていない。

・健常（28 人）、血管病変のない RA（44 人）では、血清抗 ACE2 抗体価が陰性、SLE（77 人）では、血管病変患者と活動期 SLE で高率に陽性を示した（図 1）。

抗 ACE2 抗体陽性者の一部で、血清 IgG 分画による in vitro ACE2 活性への影響をみると、血管病変患者では阻害作用あり（4/4）、血管病変のない患者では阻害活性が殆どなかった（1/11： $p = 0.00096$ ）。

・MCTD（15 人：図 2）、強皮症（40 人：図 3）でも、血管病変患者において、高率に抗 ACE2 抗体が出現し、調べた範囲で、IgG 分画による ACE2 活性阻害作用を示した。

・SLE において、抗 ACE2 抗体価は、ステロイド治療によって低下することが示された（図 4）。

・ACE2 活性増強因子 XNT を、IgG 分画による in vitro ACE2 活性の抑制系に共存させると、ACE2 活性増強がみられる例があった（図 5）。我々が見出した ACE2 活性増強分子（特許出願中）も類似の効果を示した（データ示さず）。

D. 考察

抗 ACE2 抗体は、SLE を含む膠原病一般の、PAH, 末

端壊死で高率に陽性、強皮症腎でも陽性であり、検討した患者の殆どで血清 IgG 分画が in vitro ACE2 活性を阻害した。さらに抗 ACE2 抗体は、活動期 SLE の検討例で高率に陽性だったが、それらは ACE2 を阻害しなかったため、ACE2 を阻害する抗 ACE2 抗体だけが、血管収縮病態に関連する可能性が示唆された。阻害抗体の持続陽性者の観察から、抗体の存在+付加要因が、収縮性血管病イベントをおこす可能性が、想像される。

抗 ACE2 抗体が、ステロイド治療で低下することは、膠原病 PAH にステロイド治療が効く理由を示唆する。

小分子 XNT による ACE2 活性上昇は、阻害抗体による活性抑制に打ち勝つ場合があると示唆された。阻害抗体のレパートリーをエピトープ分類する意義がある。

E. 結論

抗 ACE2 阻害自己抗体は、SLE を含む膠原病の収縮性血管病態に関連する可能性がある。PAH および末端壊死に対する、ACE2 活性増強小分子の治療効果を検討する意義がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita H, Takahashi Y, Ishiura H, Kano T, Kaneko H, Mimori A: Hypertrophic pachymeningitis and tracheobronchial stenosis in immunoglobulin G4- related disease: case presentation and literature review. Intern Med 2012 (in press)
2. Yamashita H, Kubota K, Takahashi Y, Minamoto R, Morooka M, Ito K, Kano T, Kaneko H, Takashima H, Mimori A: Whole-body fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in patients with active polymyalgia rheumatica: evidence for distinctive bursitis and large-vessel vasculitis. Mod Rheumatol. 2011 Dec 29. [Epub ahead of print]
3. Mori S, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, Mimori A, Nishimoto N, Tasaka S, Hatta K, Matsushima H, Kaise S, Kaneko A, Makino S, Minota S, Yamada T, Akagawa S, Kurashima A and the NTM-BIORA (NTM infection in Biologic-treated RA patients) Study Investigators: Radiological features and therapeutic responses of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in rheumatoid arthritis patients receiving biological agents: a retrospective multicenter study in Japan. Mod Rheumatol. 2011 Dec 30. [Epub ahead of print]
4. Yoshida Y, Takahashi Y, Minemura N, Ueda Y, Yamashita H, Kaneko H, Mimori A. Prognosis of

pneumocystis pneumonia complicated in patients with rheumatoid arthritis (RA) and non-RA rheumatic diseases. Mod Rheumatol. 2011, Oct 5. [Epub ahead of print]

5. Matsuki Y, Yamashita H, Takahashi Y, Kano T, Shimizu A, Itoh K, Kaneko H, Mimori A. Diffuse alveolar damage in patients with dermatomyositis: a six-case series. Mod Rheumatol. 2011, Sep 9. [Epub ahead of print]
6. 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 2011 21(2):207-10.
7. 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. 2011, 21(1):92-6.
8. Kubota K, Ito K, Morooka M, Minamoto R, Miyata Y, Yamashita H, Takahashi Y, Mimori A. FDG PET for rheumatoid arthritis: basic considerations and whole-body PET/CT. Ann N Y Acad Sci. 2011, 1228:29-38

国内

1. 高橋裕子、三森明夫、関谷文男、松平蘭、山路健、田村直人、高崎芳成：混合性結合組織病に対する初期ステロイド治療の意義：順天堂医学 2012, 58(1)：2月29日掲載予定
2. 津野宏隆、高橋裕子、吉田祐志、新井憲俊、中村洋介、八代成子、牧角祥美、山下裕之、金子礼志、狩野俊和、三森明夫：早期治療介入により寛解の得られた Cogan 症候群の 1 例。日臨免会誌 2012, (印刷中)
3. 山下裕之、高橋裕子、狩野俊和、金子礼志、三森明夫：不明熱・不明炎症の原因としての悪性リンパ腫の重要性。日臨免会誌 2012 (印刷中)
4. 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, 34(2):99-104
5. 上田洋、山下裕之、吉田裕志、高橋裕子、三森明夫：播種性トリコスポロン症を発症した関節リウマチの 1 例。感染症学会誌 2011, 85(5):532-536

2. 学会発表

1. Haga S, Takahashi Y, Ishizaka Y, Mimori A: Responsible epitopes of autoantibodies inhibiting angiotensin-converting enzyme 2 in patients of systemic lupus erythematosus with vasculopathies. European League of Rheumatoid Arthritis, Londn, May, 2011
2. Kawada H, Takahashi Y, Ishizaka Y, Mimori A: Novel autoantibodies to killer cell

immunoglobulin-like receptor-3DL1 are prevalent in patients with rheumatic diseases. European League of Rheumatoid Arthritis, Londn, May, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

- 1 特許取得 なし (出願中)
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

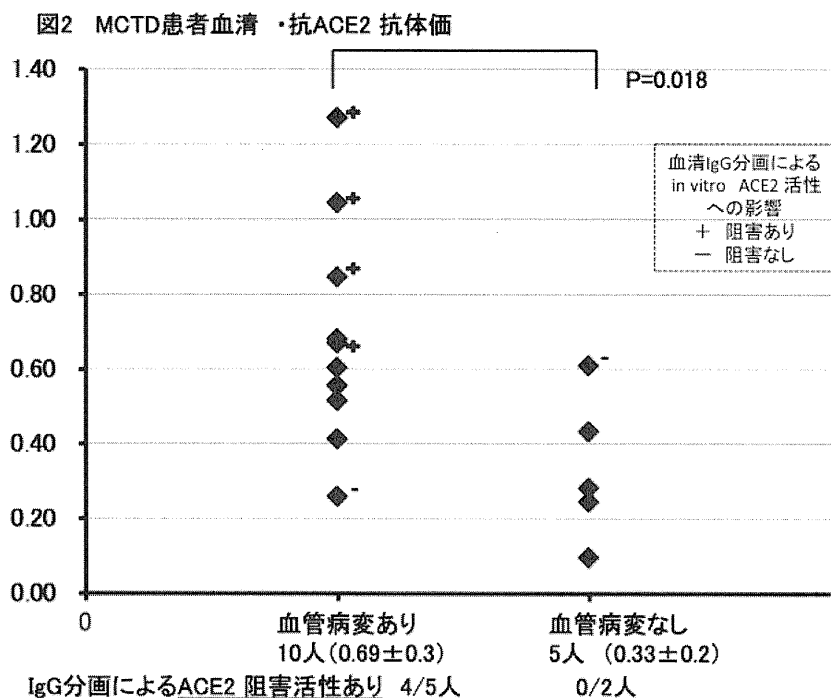
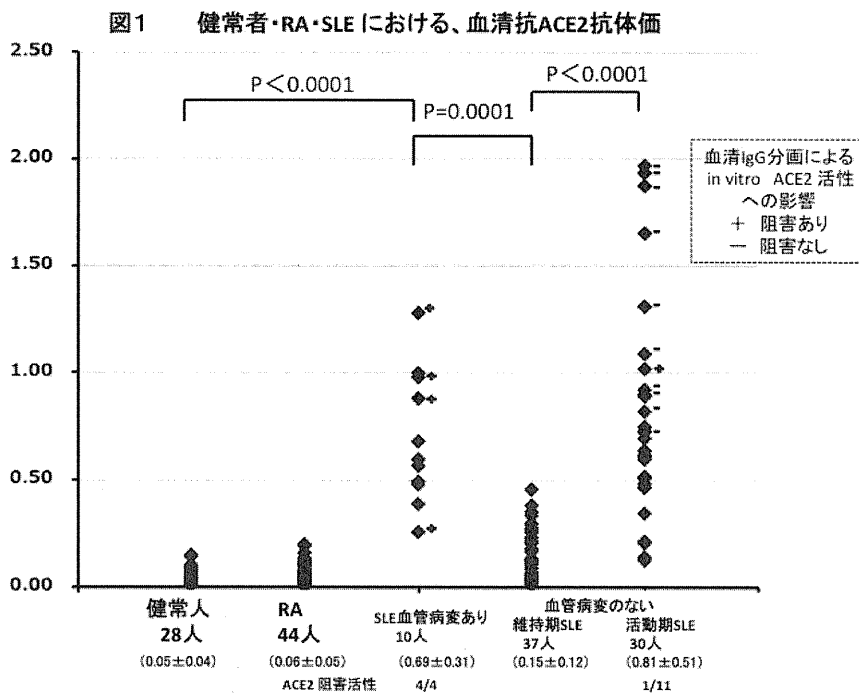


図3 強皮症患者・血清抗ACE2抗体価

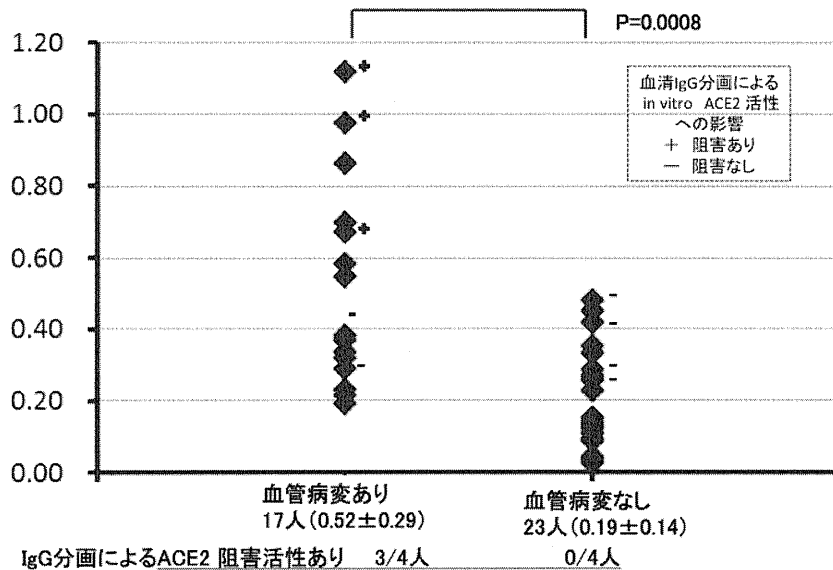


図4 血管病変のないSLE ステロイド治療前後の抗ACE2 抗体価

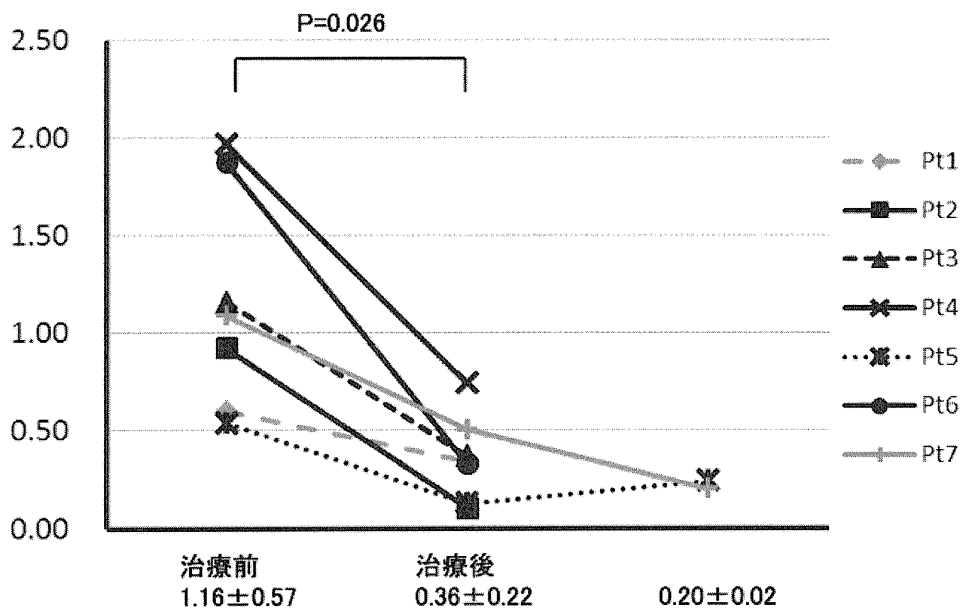
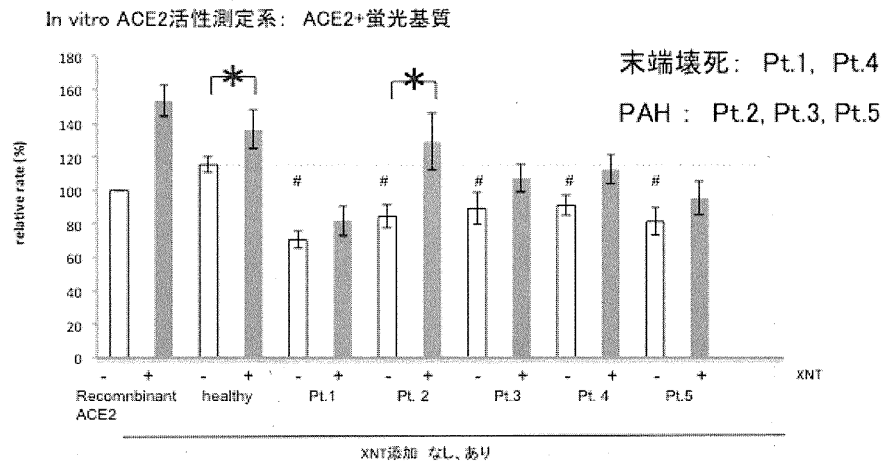


図5 (Pt1~5は、図4のPtとは異なる)

Constrictive vasculopathy 患者の血清IgG 分画によるACE2活性の抑制と、
ACE2 activator (XNT) の in vitro 効果: ACE2活性の上昇



解析した全ての患者IgGは、(健常者IgGと比較して)ACE2活性を、有意に(#)抑えた。
健常者とPatient 2では、XNT添加によりACE2活性が、有意に(*)上昇した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

全身性エリテマトーデスにおける MAIT 細胞の解析に関する研究

研究分担者 三宅 幸子 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長
研究協力者 千葉 幸子 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 研究員

研究要旨

新規 Natural Killer T (NKT) 細胞集団である Mucosal Associated Invariant T (MAIT) 細胞の全身性エリテマトーデス (SLE) における役割を検討した。MAIT 細胞は、健康人末梢血の $\alpha\beta$ T 細胞の数% ~10% を占める大きな細胞集団であり、主に CD8 陽性もしくは CD4 陰性 CD8 陰性の double negative 細胞であった。ケモカイン受容体は、CCR5, CCR6 を発現し、IL-12, IL-18 存在下で IFN- γ を産生した。SLE 患者末梢血においてはその頻度が多くは 1% 以下と著減しており、MAIT 細胞は MS の病態に關与する重要な細胞集団であると考えられた。今後は SLE 病態における役割を中心とした解析が重要である。

A. 研究目的

Mucosal associated invariant T (MAIT) 細胞は、MR1 分子に拘束され T 細胞受容体にインバリアントな α 鎖 (マウス $V\alpha 19 J\alpha 33$ 、ヒト $V\alpha 7.2 J\alpha 33$) を発現する T 細胞である。我々は MAIT 細胞を欠損する MR1^{-/-}マウスを用い、コラーゲン関節炎ならびに抗体誘導関節炎が軽症化する一方、実験的自己免疫性脳脊髄炎は悪化することを報告し、MAIT 細胞は自己免疫病態の増悪にも抑制にも關与しうる可能性を示してきた。本研究では、SLE における MAIT 細胞の動態を明らかにし、病態における關連を明らかにする。

B. 研究方法

健康人ならびに SLE 患者末梢血の MAIT 細胞の頻度を抗 $V\alpha 7.2$ 抗体にて染色後に Flowcytometer を用いて解析する。また、Cell sorter を用いて、末梢血の抗 $V\alpha 7.2$ 抗体陽性細胞の single cell sorting を行い、invariant $V\alpha 7.2 J\alpha 33$ を発現する MAIT 細胞かどうかを検討する。MAIT 細胞のケモカイン受容体の発現を Flowcytometer を用いて解析する。MAIT 細胞のサイトカイン産生について、細胞内染色を行い Flowcytometer を用いて解析する。

(倫理面への配慮)

対象より血液サンプル採取は、文書を用いて説明し、同意を得た上で行った。その他個人情報の管理を含めて国立精神・神経センターの倫理規定に従った。

C. 研究結果

健康人においては、抗 $V\alpha 7.2$ 抗体陽性の MAIT 細胞は末梢血の $\alpha\beta$ T 細胞の数% ~10% を占め、主に CD8 陽性もしくは CD4 陰性 CD8 陰性の double negative 細胞であった。SLE 患者末梢血においては、その頻度が多くは 1% 以下と著減していた。MAIT 細胞は、IL-12, IL-18 存在下で IFN- γ を産生した。ケモカイン受容体は、CCR5, CCR6 を発現していた。

D. 考察

MAIT 細胞は、健康人末梢血の $\alpha\beta$ T 細胞の数% ~10% を占める大きな細胞集団であった。SLE では 1% 以下と著減していた。他の自己免疫疾患と比較すると、関節リウマチや多発性硬化症では軽度低下していたが、B 細胞の關与が強い視神経脊髄炎においては SLE と同様に著明に減少していたことから、B 細胞異常との關連が推定される。また、MAIT 細胞は、T 細胞受容体からの刺激では増殖やサイトカイン産生が惹起されなかったが、IL-12, IL-18 といったサイトカイン刺激に反応がみられ、病態下でのサイトカイン産生についての解析が重要である。さらに、B 細胞と相互作用も重要な検討課題と考えられる。

E. 結論

MAIT 細胞の頻度は、SLE 患者末梢血において著明に減少していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. **Proc Natl Acad Sci USA** 108(9):3701-3706, 2011

2) Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T: Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. **Int Immunol** 23(9):529-535, 2011

3) Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. **Arthritis Rheum** 64(1):153-61, 2011

4) Ichikawa D, Mizuno M, Yamamura T, Miyake S: Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) regulates cytoskeletal reorganization through ubiquitination and degradation of Arp2/3-5 and coronin A. **J Biol Chem** 286(50):43465-74, 2011

5) Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Koen Vandebroek, Miyake S: A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. **Arthritis Res Ther** 14(1):R9, 2012

2. 学会発表

1) Miyake S: Innate lymphocytes in autoimmune diseases. Autoimmunity Congress Asia. Singapore, 18 November, 2011

2) 三宅幸子: 自己免疫疾患における MAIT 細胞. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会 6 学会合同特別シンポジウム、東京、9 月 16 日、2011

3) 三宅幸子: 腸管免疫の視点から: 腸管リンパ球と多発性硬化症. 第 23 回日本神経免疫学会総会、東京、9 月 17 日、2011

4) 千葉麻子、三宅幸子: マスト細胞の活性阻害を介した関節炎の抑制. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、7.19, 2011

5) 千葉麻子、田村直人、松平欄、頭山尚子、高崎芳成、山村隆、三宅幸子: 膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011

6) 山村隆、荒浪利昌、大木伸司、三宅幸子: 多発性硬化症: 自己免疫病仮説の再検証. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会 6 学会合同特別シンポジウム、東京、9.16, 2011

7) 林幼偉、三宅幸子、山村隆: EAE の寛解維持機構: 'armoured' Treg の誘導. 第 23 回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.15, 2011

8) 能登大介、三宅幸子、高橋和也、山村隆、山田正仁: マウス及びヒトにおける末梢血単球からミクログリアへの分化誘導. 第 23 回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011

9) 富田敦子、佐藤和貴郎、市川大樹、林幼偉、岸田日帯、三宅幸子、小川雅文、岡本智子、村田美穂、黒岩義之、荒浪利昌、山村隆: メタロプロテイナーゼとオステオポンチンを高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の MS 病態への関与. 第 23 回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011

10) 千葉麻子、田村直人、松平欄、高崎芳成、山村隆、三宅幸子: 膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、千葉、11.27, 2011

G. 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.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

全身性エリテマトーデス患者血清における可溶性 LAG3 濃度に関する研究

研究分担者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギーリウマチ学 教授
研究協力者 瀬理 祐、Tanita Noor、藤尾 圭志
東京大学大学院医学系研究科内科学専攻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) の病態形成において Type I Interferon (Type I IFN) とそれを産生する plasmacytoid dendritic cell (pDC) の重要性が示唆されているが、現時点では SLE 患者での pDC の活性化を示す直接的な証拠は示されていない。マウス pDC は細胞表面に抑制性の CD4 類似分子である LAG3 (lymphocyte activation gene 3) を発現し、TLR 刺激を加えると培養上清中に高濃度の soluble lymphocyte activation gene 3 (sLAG3) を産生する。またマウス血清中 sLAG3 は pDC 由来であるとされている。そこで、我々は SLE 患者 60 人と関節リウマチ (RA) 患者、健常コントロールを対象として血清 sLAG3 濃度を ELISA で測定した。血清 sLAG3 濃度は健常人コントロールでは 0.130 ± 0.075 ng/ml, RA で 0.173 ± 0.100 ng/ml であったが SLE で 4.71 ± 2.80 ng/ml と SLE で著明な上昇を認めた。健常人コントロールの血清 sLAG3 濃度は既報と同等であったが、SLE 患者の sLAG3 の測定値が広範な分布を示したため、以降は sLAG3 測定値を対数化した値を解析した。SLE 患者血清 sLAG3 濃度は SLEDAI との相関を示した。ただし SLEDAI=0 の患者でも sLAG3 が上昇している例がみられた点は、注目すべきと考えられた。多変量解析においては特に血球、腎障害との関連が示唆され、その odds ratio は抗 ds-DNA 抗体よりも高かった。その一方で皮膚症状、中枢神経症状との関連は見られなかった。さらに、SLE 患者の血清 sLAG3 濃度は、末梢血単核球の Type I IFN signature との相関も認めた。以上より、SLE 患者における血清 sLAG3 濃度は、Type I IFN signature を反映する SLE の新たな疾患活動性のマーカーとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) の活動性を示す指標について確立されたものはない。SLE の病態形成において Type I Interferon (Type I IFN) とそれを産生する plasmacytoid dendritic cell (pDC) の重要性が示唆されている。しかし SLE 患者における pDC の数は増加しているとの報告もあるが、減少しているとの報告もあるなど、現時点では SLE 患者で pDC の活性化を示す直接的な証拠は示されていない。マウス pDC は細胞表面に抑制性の CD4 類似分子である LAG3 (lymphocyte activation gene 3) を発現し、TLR 刺激を加えると培養上清中に高濃度の soluble lymphocyte activation gene 3 (sLAG3) が産生される。興味深いことにマウス血清中では sLAG3 が検出されるが、T 細胞・B 細胞を欠損する RAG ノックアウトマウスでも、野生型マウスと同等の血清 sLAG3 濃度を示すことから、血清中 sLAG3 は pDC 由来であるとされている。今回我々は、SLE 患者血清中の sLAG3 濃度が上昇しているかどうか、上昇していた場合に臨床症状と関連があるかどうか、また sLAG3 濃度が SLE 患者末梢血単核球 (PBMC) でみられる type I IFN signature gene の発現と関連があるかどうか、を検討することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

SLE 患者 60 人と関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) 患者、健常コントロールを対象として血清 sLAG3 濃度を ELISA で測定した。SLE 患者については、SLEDAI, SLAM-R, SLICC/ACR damage index を臨床情報として回収し、sLAG3 濃度との関連を SPSS Statistics 19 で解析した。SLE 患者 PBMC から QIAGEN RNAeasy Mini Kit を用いて cDNA を合成し、BIO-RAD iCycler および QIAGEN SybrGreen を用いた定量 PCR により、ISG15, Mx-1 などの type I IFN signature gene の発現量を評価した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた研究計画については、東京大学医学部倫理審査委員会の承認を受け、解析症例に対しては事前に説明文書を用いて研究内容を説明し、同意文書を取得した。

C. 研究結果

血清 sLAG3 濃度は健常人コントロールでは 0.130 ± 0.075 ng/ml, RA で 0.173 ± 0.100 ng/ml であったが SLE で 4.71 ± 2.80 ng/ml と SLE で著明な上昇を認めた。健常人コントロールの血清 sLAG3 濃度は既報と同等であったが (Cancer Letters 2006;235:147-153)、SLE 患者の sLAG3 の測定値が広範な分布を示したため、以降は sLAG3 測定値を対数

化した値を解析した。血清 sLAG3 濃度は SLEDAI と有意な相関を示した。しかし、SLEDAI=0 の患者でも sLAG3 が上昇している例がみられた。血清 sLAG3 濃度は多変量解析において血球減少、腎障害との関連を示し、その odds ratio は抗 ds-DNA 抗体よりも高かった。その一方で皮膚症状、中枢神経症状との関連は見られなかった。さらに、SLE 患者の血清 sLAG3 濃度は PBMC の Type I IFN signature の Mx-1 発現との有意な相関を認めた。ISG15 発現との相関は有意差には至らなかったが (P=0.07)、相関する傾向を認めた。

D. 考察

SLE 患者では血清 sLAG3 濃度は上昇しており、疾患活動性、臓器障害との関連があった。さらに SLEDAI=0 の患者でも sLAG3 が上昇している例がみられた事は興味深い。血清 sLAG3 濃度が血球減少、腎障害という重要な臓器障害と関連を示したことは、Type I IFN signature gene 発現と臓器障害の関連を示したこれまでの報告と一致するものと考えられる。実際に血清 sLAG3 濃度は PBMC の Type I IFN signature gene 発現との相関を示した。今後 sLAG3 濃度が上昇している SLE 患者において、pDC の LAG3 発現が上昇しているかどうか、sLAG3 が実際に pDC の活性化を反映しているかどうかなどを検討する必要がある。

また sLAG3 二量体は免疫応答へのアジュヴァント作用がある事が報告されており、今回測定した sLAG3 単量体の免疫応答に対する作用も検討する必要がある。我々が最近同定した制御性 T 細胞である CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、自己抗体産生抑制活性を発揮し、SLE モデルマウスに対する治療効果を持つが、この細胞がナイーブ T 細胞を抑制する際には LAG3 が関与することが分かっている。そこで sLAG3 が CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞に及ぼす機能についても解析する予定である。具体的には B6 マウスや SLE モデルマウスに、sLAG3 の単量体や二量体を投与し、自己抗体産生、腎炎発症、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞への影響などを評価する実験を検討している。

E. 結論

Type I IFN signature は SLE 患者のすべてに認められるわけではなく、特に I 型 IFN 経路が活性化している SLE 患者亜群の存在が推定されていた。この亜群の同定は、臨床評価、治療法の選択に大きく寄与すると思われるが、これまでは簡便な検査法がなかった。SLE 患者における血清 sLAG3 濃度は、Type I IFN signature を反映する、SLE の新規で簡便な疾患活動性マーカーとなる可能性が示唆された。また sLAG3 のより詳細な機能解析により、SLE の病態形成の理解や新しい治療法の開発につながる可能性があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed O W, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese PLoS Genet. in press

Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Role of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. Ann Rheum Dis in press

Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, Okada Y, Dahan 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, 70:512-5, 2011.

Shoda H, Fujio K, Shibuya M, Okamura T, Sumitomo S, Okamoto A, Sawada T, Yamamoto K. Detection of autoantibody to citrullinated BiP in rheumatoid arthritis patients and pro-inflammatory roles of citrullinated BiP in collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 13:R191, 2011.

2. 学会発表

瀬理祐、藤尾圭志、庄田宏文、岡村僚久、岡本明子、住友秀次、澁谷美穂子、岩崎由希子、山本一彦 全身性エリテマトーデス患者血清における可溶性 LAG3 濃度の上昇 第 55 回日本リウマチ学会学術集会 ワークショップ 2011 年 7 月 20 日

G. 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）
分担研究報告書

リウマチ性疾患に伴う腎障害におけるポドサイト障害に関する研究

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 リウマチ膠原病科 助教

研究要旨

免疫学的ストレスによるポドサイト (pod) 障害の機序を解析する目的で、全身性エリテマトーデス、顕微鏡的多発血管炎、強皮症腎、関節リウマチで腎症を合併する症例、合併しない症例において、尿中へ脱落した pod 数 (U-pod)、pod マーカーであるポドカリキシン (U-PCX/U-Cr) を測定し、臨床像、長期腎機能予後との関連を解析した。ループス腎炎では、組織学的活動性が高い症例で、U-pod、U-PCX/U-Cr とともに高値。1年後の腎機能予後との関連は無く、治療後 U-pod は早期改善、U-PCX/U-Cr の改善は遷延する事が明らかになった。

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。pod 障害は、高血圧、糖尿病性腎症などの二次性腎障害や慢性糸球体腎炎では既に多くの報告があり、その障害機序も明らかにされつつある。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 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は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、臨床疫学的手法を用いて pod 障害を解析する。

B. 研究方法

ループス腎炎 (LN) や顕微鏡的多発血管炎 (MPA)、強皮症 (Scc)、関節リウマチ (RA) で腎症のある患者 (蛋白クレアチニン比 >0.5 または $eGFR < 60 \text{ mL/min. / } 1.73 \text{ m}^2$)、腎症の無い患者に於いて、経時的に尿中 pod 数 (U-pod)、尿中ポドカリキシン/尿中クレアチニン比 (U-PCX/U-Cr) を測定し、組織学的活動性、長期腎機能との関連を解析した。関連データは全て匿名化して保存した。本研究は、埼玉医科大学病院 IRB にて承認を受け、全ての患者から口頭および文書にて説明後に文書にて同意を得た。

C. 研究結果

U-pod は腎症合併例で有意に高値、U-PCX/U-Cr は腎症合併例で有意差は無いものの高値である傾向を示した (図)。ループス腎炎の組織活動性が高い症例では U-pod が高い傾向、U-PCX/U-Cr は統計学的有意に高値を示した。登録後 6 ヶ月間の 3 時点で測定した U-pod 値の総和は、登録後 1 年間の eGFR 変化と有為な相関は示さなかった。治療後 pod は速やかに正常値に改善するものの、U-PCX/U-Cr の改善は遷延した。

D. 考察

U-pod、U-PCX/U-Cr はループス腎炎組織学的活動性と関連が有る可能性がある。今回の SLE 症例の検討では、1年後の腎機能低下と U-pod の総和値との相関は不明。U-PCX/U-Cr が持続高値であっても、U-pod が異常値でなければ腎機能悪化は認めない事から、U-PCX/U-Cr は可逆的な pod 障害、U-pod は不可逆的な pod 障害を示す可能性が考えられた。また、治療により U-pod が速やかに改善することから、免疫学的機序によると想定される腎組織内における炎症状態が pod に細胞死や基底膜からの剥離を来するような強いストレスを直接与えている可能性が考えられた。一方、治療による U-PCX/U-Cr の改善は遷延したことから、軽度の pod 障害は持続すると思われ、蛋白尿の遷延機序を検討する上で意味のある結果であると考えられる。今後更に症例を増やし、ループス腎炎のみならず、他疾患でも同様の解析を行い、各疾患に合併する腎障害、ポドサイト障害、腎機能予後を診断する上でこれらポドサイト関連マーカーの実臨床での有用性を検討したい。

E. 結論

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り、将来的には腎障害治療に新たな方向を示す可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) リウマチ性疾患におけるポドサイトの研究
日本臨床免疫学会会誌, 34 巻 1 号, 40-48, 2011
- 2) The pattern-recognition receptor NOD1 promotes production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Yokota K, Miyazaki T, Hemmatazad H, Gay RE, Kolling C, Fearon U, Suzuki H,

Mimura T, Gay S, Ospelt C. Arthritis Rheum. 2011 Dec 5. doi: 10.1002/art.34318. [Epub ahead of print]

3) Tocilizumab improved both clinical and laboratory manifestations except for interleukin-18 in a case of multiple drug-resistant adult-onset Still's disease. Yoshida Y, Sakamoto M, Yokota K, Sato K, Mimura T. Intern Med. 2011;50(16):1757-60.

4) Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. Sato K, Miyoshi F, Yokota K, Araki Y, Asanuma Y, Akiyama Y, Yoh K, Takahashi S, Aburatani H, Mimura T. J Biol Chem. 2011 Apr 29;286(17):14963-71.

5) Geranylgeranyl-pyrophosphate regulates secretion of pentraxin 3 and monocyte chemoattractant protein-1 from rheumatoid fibroblast-like synoviocytes in distinct manners. Yokota K, Miyoshi F, Sato K, Asanuma Y, Akiyama Y, Mimura T. Clin Exp Rheumatol. 2011 Jan-Feb;29(1):43-9.

2. 学会発表

1) SLE15 例に於ける尿中ポドサイトマーカースの経時的検討 梶山浩, 和田琢, 山本晃範, 島田祐樹, 進藤靖史, 吉田佳弘, 横田和浩, 荒木靖人, 秋葉春彦, 中嶋京一, 佐藤浩二郎, 浅沼ゆう, 秋山雄次, 三村俊英

第55回日本リウマチ学会総会・学術集会 第20回国際リウマチシンポジウム(2011年7月18日)抄録集, 2011:P286

2) SLE15 例に於ける尿中ポドサイトマーカースの経時的検討 梶山浩, 黒澤寛之, 小笠原真也, 平山吉朗, 関根盛, 原正則, 三村俊英. 第54回日本腎臓学会学術集会(2011年6月15日)日本腎臓学会誌, 2011;53(3):P404

3) 慢性腎臓病を合併したRA治療の疫学的検討 梶山浩, 山本晃範, 進藤靖史, 吉田佳弘, 横田和浩, 荒木靖人, 秋葉春彦, 中嶋京一, 佐藤浩二郎, 浅沼ゆう, 秋山雄次, 三村俊英. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会 第20回国際リウマチシンポジウム(2011年7月20日)抄録集, 2011:P646

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

1. 特許取得

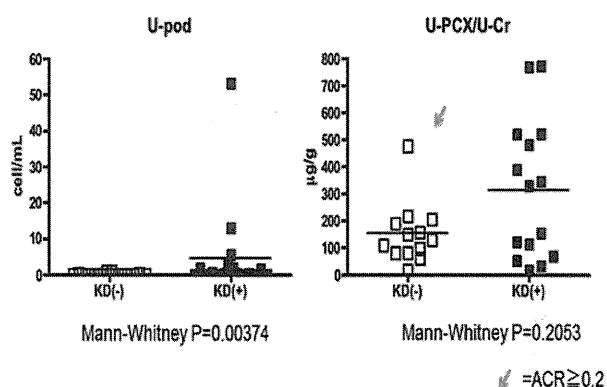
現在は予定無し。

2. 実用新案登録

現在は予定無し。

3. その他

特に無し。



図；腎障害の有無による尿中バイオマーカーの変化

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

全身性エリテマトーデス難治性病態の
治療標的分子探索に関する研究に関する研究

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 鈴木勝也 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 特任助教

研究要旨

未治療活動性 SLE の末梢血の亜分画における遺伝子発現を網羅的に定量し、最新のバイオインフォマティックスの手法を用いて統合解析を行うことにより、新たな治療標的の探索を試みた。SLE 患者群の遺伝子発現は、健常人と比較して IFN signature を含め多数の差異が認められた。統合解析結果の一例としては、SLE 患者群の CD14+および CD19+の亜分画では、プロテアソーム関連遺伝子群、HLA クラス I 遺伝子群、熱ショック蛋白ファミリー群の統計学的に有意な発現上昇が認められた。未治療活動性 SLE の検体を用いて亜分画ごとの遺伝子発現を統合解析することにより、末梢血全体での一般的な解析では埋もれてしまっていた本疾患の特徴の一端を明らかにできた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) は、診断および治療の進歩により短期的予後は改善されたとの報告もあるが、1) 難治性病態が存在すること。2) 長期予後が十分とはいえないこと。3) 妊娠可能な若年女性に多いこと、4) 治療による副作用も少なくないことなど、依然として克服すべき課題は数多い。

近年の SLE に対する生物製剤学的製剤による臨床試験の結果が、関節リウマチほどのインパクトがない一因は、病態が未解明で、治療に有用な標的分子が絞り込めていないことが考えられる。これまでに治療標的分子探索を目的とした SLE 活動期の末梢血の遺伝子発現の研究が行われ、IFN signature などの異常が報告されているが、多種の細胞が混在するために各細胞群の寄与度が明らかでない点、治療修飾を排除できない点などが課題であった。

この点を克服するために、未治療活動性 SLE の末梢血の亜分画における遺伝子発現を網羅的に定量し、最新のバイオインフォマティックスの手法を用いて統合解析を行うことにより、新たな治療標的の探索を試みた。

B. 研究方法

未治療活動性 SLE 3 例、健常人 2 例の計 5 例の末梢血を CD4+、CD8+、CD19+、CD14+細胞に分離後、DNA マイクロアレイを用いて、網羅的に遺伝子発現量を同定した。クラスター解析、差次的遺伝子発現解析、Gene Ontology 解析、パスウェイ解析、ネットワーク解析を施行した。

(倫理面への配慮)

倫理委員会承認の同意書の取得が得られた検体を用い、連結可能匿名化状態で解析施行。

検体提供者のプライバシーについて最大限配慮を行った。

C. 研究結果

SLE 患者群の遺伝子発現は、健常人と比較して IFN signature を含め多数の差異が認められた。

IFN 誘導遺伝子の発現を亜分画別に比較すると、上昇する遺伝子の種類が大きく異なっていたことから、SLE 活動期において誘導されている経路が、細胞群により異なる可能性が示唆された。

次に Gene Ontology 解析を行ったところ、各亜分画において免疫系に関与する遺伝子群を中心に多数抽出された。統合解析結果の一例としては、SLE 患者群の CD14+および CD19+の亜分画では、プロテアソーム関連遺伝子群、HLA クラス I 遺伝子群、熱ショック蛋白ファミリー群の統計学的に有意な発現上昇が認められた。(表 1)

D. 考察

SLE 末梢血 CD14+および CD19+細胞では、IFN シグナルの活性化に続き、プロテアソームにより内因性抗原の分解が促進され、HLA クラス I 分子による抗原提示の誘導が亢進していることが示唆された。発現上昇を認めたプロテアソー

Category	GO ACCESSION	GO Term	CD4_up	CD8_down	CD8_up	CD14_down	CD14_up	CD19_down	CD19_up
MHC関連	GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I					CD14_up		CD19_up
	GO:0042824	MHC class I peptide loading complex					CD14_up		
	GO:0042612	MHC class I protein complex							CD19_up
	GO:0032393	MHC class I receptor activity					CD14_up		CD19_up
熱ショック蛋白	GO:0031072	heat shock protein binding					CD14_up		
プロテアソーム	GO:0043161	proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process					CD14_up		
	GO:0000502	proteasome complex					CD14_up		
ユビキチン	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process					CD14_up		CD19_up

表1 SLE末梢血におけるプロテアソーム関連遺伝子群、HLAクラスI遺伝子群、熱ショック蛋白ファミリー群の発現比較 Gene OntologyのEnrichment analysisの結果、下記のGO termに関する遺伝子を抽出。これらのGO termで、チップに搭載されているプロテアソーム関連、HLAクラス1、熱ショック蛋白遺伝子群を網羅。CD14+およびCD19+群でSLEの患者で発現が亢進。

ムには、構成型プロテアソームに加え、免疫プロテアソームも含まれ、SLEにおける抗原のプロセッシングの質的变化をきたす一因として関与している可能性も考えられた。

発現が亢進していたプロテアソームは、新たな治療標的分子の候補として期待されるが、今後さらに症例数を増やした解析や蛋白レベルの検討が必要と考えた。

E. 結論

未治療活動性SLEの検体を用いて亜分画ごとの遺伝子発現を統合解析することにより、末梢血全体での一般的な解析では埋もれてしまっていた本疾患の特徴の一端を明らかにできた。このアプローチがもたらす情報は、SLEの難治性病態の解明およびその治療標的を考える上で有用と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1: Yoshimoto K, Tanaka M, Kojima M, Setoyama Y, Kameda H, Suzuki K, Tsuzaka K, Ogawa Y, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T. Regulatory mechanisms for the production of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2011 Oct 21;13(5):R170. [Epub ahead of print]

2: Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Decreased mRNA expression of two FOXP3 isoforms in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Jan-Mar;24(1):7-14.

3: Okuyama A, Nagasawa H, Suzuki K, Kameda H, Kondo H, Amano K, Takeuchi T. Fcγ receptor IIIb polymorphism and use of glucocorticoids at baseline are associated with infusion reactions to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Feb;70(2):299-304..

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, Sasaki Y, Itoyama S, Tsuzaka K, Takeuchi T. IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome manifesting as chronic symmetrical sclerosing dacryo-sialadenitis with subsequent secondary portal hypertension and remarkable IgG4-linked IL-4 elevation. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Sep;49(9):1789-91.

5: Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takei H, Nishi E, Okuyama A, Tsuzaka K, Takeuchi T. Single center prospective study of tacrolimus efficacy and safety in the treatment of various manifestations in systemic lupus erythematosus. Rheumatol Int. 2011 Jun;31(6):757-63.

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

抗リン脂質抗体症候群における血栓傾向のメカニズムに関する研究

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 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

【目的】抗リン脂質抗体症候群（APS）は、血栓性疾患である。抗カルジオリピン抗体（aCL）とその対応抗原の β 2グロブリン I（ β 2GPI）がAPSの病原性に強く関与する。プロテオミクス的手法を用いて血清 β 2GPI 関連タンパクの同定を行い、APSの血栓病態を明らかにすることを本研究の目的とした。【方法】精製FLAG- β 2GPIをヒト血清中に混和し抗FLAG抗体でアフィニティー精製したものをSDS-PAGEで分離、online-nano LC-MS/MS法で解析した。【結果】同定された血清蛋白はApoB100（APOB）であり、酸化low density lipoprotein（LDL）中に含まれる β 2GPIのLigand（=Ox-Lig1）を介して、 β 2GPIと酸化LDLが血清中で結合している可能性が示唆された。マウス単球系細胞では、WBCAL-1抗体（モノクローナル抗CL/ β 2GPI抗体）および酸化LDLの同時存在下でTF mRNA発現が亢進した。【結論】プロテオミクス解析から β 2GPIのヒト血清中における主要な結合タンパクは酸化LDLと考えられた。酸化LDLが抗リン脂質抗体症候群における血栓形成病態に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデスにしばしば合併する抗リン脂質抗体症候群（APS）は、血栓性疾患である。APSの代表的なマーカー抗体である抗カルジオリピン抗体（aCL）とその対応抗原の β 2グロブリン I（ β 2GPI）がAPSの病原性に強く関与する。向血栓傾向の病態において単球における組織因子（TF）の発現誘導は特に重要だが、aCLと β 2GPIの向血栓細胞活性化はin vitroでは培養液中の血清濃度に依存していた。血清中に β 2GPIと結合する分子があり、この分子が単球系のTF発現に関与すると考え、プロテオミクス的手法を用いてこのタンパクの同定を行い、APSの血栓病態を明らかにすることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

β 2GPIに結合する血漿中分子を検索するため、まずFLAGタグ付き β 2GPI Fusion proteinを作成した。FLAG- β 2GPI vectorを作成し、HEK293T細胞にトランスフェクトし上清分泌タンパクをウェスタンブロットで確認した。精製FLAG- β 2GPIをヒト血清中にインキュベートし、抗FLAG抗体でアフィニティー精製したものをSDS-PAGE後、銀染色した。ゲル上に分離したいくつかの候補蛋白をonline-nano LC-MS/MSおよびnrNCBI database MASCOT algorithmによって解析し、 β 2GPI結合蛋白を検索した。

（倫理面への配慮）
患者検体を使用した全ての実験はヘルシンキ宣

言および「臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日改訂）」に従い、すべての対象者から書面にて事前にインフォームドコンセントを取得した。

C. 研究結果

同定された蛋白のうち、血清中蛋白はApoB100（APOB）のみであり、ほかには細胞内シャペロンや夾雑物と考えられた。APOBと β 2GPIの直接結合はELISAで確認できず、酸化LDL中に含まれる β 2GPIのLigand（=Ox-Lig1）を介して、 β 2GPIと酸化LDLが血清中で結合している可能性が示唆された。

抗CL/ β 2GPI抗体の単球におけるTF発現に酸化LDLが関与するか調べるため、マウス単球系細胞（RAW264.7）を用い、WBCAL-1抗体（モノクローナル抗CL/ β 2GPI抗体）および酸化LDLの存在、非存在下でのTF mRNA発現をRealtime RT-PCRで検討した。酸化LDLおよびWBCAL-1抗体の同時存在下で非常に強いTF mRNAの発現亢進を認めた（図）。この発現亢進は、APS患者（aCL陽性）の血清IgGによる刺激でも確認された。また、このTFの発現誘導は酸化LDLの主要なレセプターであるスカベンジャー受容体（SR-A, CD36, LOX-1）の阻害抗体により有意に抑制されることがわかった。