

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

自己免疫疾患に関する調査研究

研究代表者 住田孝之
筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー） 教授

研究要旨

自己免疫疾患の発症機序はいまだに明らかにされていないために、副腎皮質ホルモンや免疫抑制薬による治療が中心である。その結果、感染症、腫瘍などの副作用により、患者の生命予後やQOLの低下、医療費の高騰化が社会問題となっている。

本研究プロジェクトにおいては、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)/成人ステイプル病(AOSD)、皮膚筋炎・多発性筋炎(PM/DM)、シェーグレン症候群(SS)に焦点を当て、疫学調査、予防因子・予後予測因子の提唱、病因・病態解明、診断基準作成・改訂、診療ガイドライン作成、新規治療法の開発・検定を目的とした。本研究成果により、効率的で安全性の高い医療が普及することとなり、患者の予後、QOLの改善、医療費の節約化につながると期待される。

本研究プロジェクトでは、疾患ごとに三つ分科会にわけて研究を進めた。具体的には、1)SLE/AOSD分科会：山本研究分担者をリーダーとしてSLEを中心に(1)疫学調査、(2)予防因子・予後予測因子解析、(3)ゲノムワイド関連解析、(4)分子免疫学的解析、(5)診療ガイドライン作成、(6)新規治療法の検討、などを推進した。AOSDは、同様の手法で上記(1)～(6)を推進した。2)PM/DM分科会：上阪研究分担者をリーダーとして、(1)疫学調査、(2)予防因子・予後予測因子解析、(3)ゲノム解析、(4)発症の分子機構解析、(5)国際診断基準の検定、(6)診療ガイドラインの作成、(7)新規治療戦略の開発などをめざした。3)SS分科会では住田が中心となり、(1)疫学調査、(2)予防因子・予後予測因子解析、(3)ゲノム解析、(4)分子レベルでの病因・病態解析、(5)国際診断基準の検証と標準化、(6)診療ガイドラインの作成、(7)免疫細胞、免疫分子を標的とした新規治療法の検定などを推進した。

本研究の特色は、自己免疫疾患を疾患別に三つの研究ユニットに分けて、それぞれの専門家による体制を構築し、有効で建設的な組織構成を目指した点である。さらに、研究内容は疫学から病因・病態、診断、治療と多岐に渡り疾患特異的な総合的研究を推進することができる点である。

研究分担者

山本一彦	東京大学大学院医学系研究科 教授	三宅幸子	順天堂大学医学部免疫学 教授
上阪 等	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授	山田 亮	京都大学大学院医学研究科附属 ゲノム医学センター 教授
竹内 勤	慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授	三森経世	京都大学大学院医学研究科 教授
田中良哉	産業医科大学医学部第一内科学講座 教授	神田 隆	山口大学大学院医学系研究科 教授
渥美達也	北海道大学大学院医学研究科 教授	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科学 教授
天野浩文	順天堂大学膠原病・リウマチ内科 准教授	川口鎮司	東京女子医科大学リウマチ科 臨床教授
広瀬幸子	順天堂大学大学院医学研究科 准教授	室 慶直	名古屋大学大学院医学系研究科 准教授
三森明夫	国立国際医療研究センター 副院長	清水 潤	東京大学医学部附属病院神経内科 講師
三村俊英	埼玉医科大学 教授	石原正一郎	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 助教

太田晶子	埼玉医科大学医学部公衆衛生学教室 講師
神人正寿	熊本大学大学院生命科学研究部 講師
梅原久範	金沢医科大学血液免疫内科学 教授
川上 純	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
佐野 統	兵庫医科大学内科学講座リウマチ膠原病科 主任教授
坪田一男	慶應義塾大学医学部眼科学教室 教授
斎藤一郎	鶴見大学歯学部口腔病理学講座 教授
中村誠司	九州大学大学院歯学研究院 教授
高村悦子	東京女子医科大学医学部医科学眼科 臨床教授
坪井洋人	筑波大学医学医療系 講師

A . 研究目的

自己免疫疾患に関して、1)実態把握のために必須な疫学調査、2)疫学調査の統計学的病態解析による予防因子・予後予測因子の提唱、3)病因・病態解明のためにゲノム、ポストゲノム、免疫学的解析に関する国内・国際共同研究、4)実践的かつ国際的視野に立った診断基準の検定・改訂、5)臨床現場で活用できる治療ガイドラインの作成、6)発症機序に基づく新規治療薬の開発などを目的とした。自己免疫疾患の医療の向上、患者のQOLの改善を目指すために必要不可欠な研究プロジェクトである。

本研究の特色は、発症機序、臨床病態の異なる自己免疫疾患を対象としているため、三つの分科会から構成されている点である。1)SLE・AOSD、2)PM/DM、3)SS を対象とし、各分野の専門家から研究体制を構築し、効率のよい建設的な研究班を組織、運営する。

具体的には、(1)SLE/AOSD 分科会は山本研究分担者をリーダーとして専門医・研究者から構成され、上記研究プロジェクト1)～6)などを施行した。(2)PM/DM 分科会では上阪研究分担者を軸に膠原病内科、神経内科、皮膚科の専門医から構成され、上記研究プロジェクト1)～6)などを旨とした。(3)SS 分科会では住田が中心に内科医、眼科医、歯科口腔外科医から構成され、上記研究プロジェクト1)～6)などを推進した。

山本らによるゲノムワイド関連解析は、すでに関節リウマチなどで多くの成果を発表し世界的拠

点の一つとなっている。国際共同研究も視野にいれたSLEの病因解明が期待できる。上阪らは動物モデルを用いた自己免疫性筋炎解析の第一人者であり発症機序に基づいた治療戦略の開発が期待される。さらに国際診断基準策定(IMACCP)の委員でもあり診断基準制定に適任である。住田らは、SS発症の分子機構についてT細胞と対応抗原を中心に解析を進め世界的に高く評価されている。梅原らはSSの国際診断基準作成委員であり、国際診断基準の検定および国内診断基準の改訂を目指す。このように3つの分科会において構成員はいずれもその分野における世界の第一人者であり、ユニークかつ独創的な研究成果が期待できる。

B . 研究方法

1. SLE/AOSD 分科会：山本チームリーダーのもと以下の研究を遂行した。

(1)疫学調査：

A)SLE 患者の実態把握のために、2003 から 2010 年度の合計 256,999 人/年の SLE 患者データを臨床調査個人票の全国調査データを集計し統計解析した。(山田)

B)AOSD の全国疫学一次調査に関しては、全国内科診療科 2,586 施設、アレルギー・膠原病内科 936 施設における AOSD の症例数を調査した。(三村、坪井、住田)

(2)予防因子・予後予測因子の解析：

A)SLE の発症予測因子・予後予測因子等を明らかにするために、GWAS 解析の遂行および 2003～2010 年度の臨床調査個人票を対象として、体系的集計解析を施行した。さらに、臨床所見・検査項目と遺伝因子との多因子情報が得られた際に、その情報を総合的に解釈して疾患を持つか否かの尤度判定をするための手法として、多因子空間の分布をグラフ理論的に捕捉しグラフ上での尤度比を算出する手法を考案し解析した。(山田)

B)AOSD における発症予測因子・予後予測因子の解析に関しては、全国疫学二次調査を施行し、患者 168 症例のデータを臨床項目別について解析した。(三村、坪井、住田)

(3)ゲノムワイド解析：

日本人 AOSD 患者の疾患集積家系におけるエクソーム解析を施行するために、症例検索およびサンプルの収集を開始した。(山本、山田、全班員)

(4)分子免疫学的解析：

1)B 細胞の抑制分子である FcγIIb 解析(広瀬)：C57BL/6 (B6)マウスを用いて、全ての細胞系で FcγR B 発現を欠損するマウス系、B 細胞のみで FcγR B 発現を欠損するマウス系、樹状細胞のみで FcγR B 発現を欠損するマウス系、myeloid 系

細胞で FcγR B 発現を欠損するマウス系を作製した。

これらのマウスに Yaa 遺伝子を導入した系を用いて自己免疫疾患発症の有無に関して検討した。

2) Fcγレセプター IIB 欠損 Yaa 遺伝子変異における SLE 病態解析(天野): (1)(K01xNZW)F1 マウスおよび (K01xNZW)F2 マウスの病態を解析した。(2)(K01xNZW)F2 マウスを用いてループス腎炎および RA の発症に関わる原因遺伝子のマッピングを行った。

3) 抗 ACE2 抗体の機能解析(三森明): SLE-PAH/末端壊死の患者血清 IgG 分画(抗 ACE2 抗体含有)による、in vitro ACE2 抑制を検討した。angiotensin II (Ang II) が、Ang 1-7 に変換される、生理的反応そのものを HPLC で解析する方法を試みた。

4) MAIT 細胞による SLE 制御機構(三宅): (1) SLE 患者末梢血の MAIT 細胞の頻度を抗 V 7.2 抗体にて染色後に Flowcytometer を用いて解析した。(2) Cell sorter を用いて、末梢血の抗 V 7.2 抗体陽性細胞の cell sorting を行い、増殖能、細胞死、発現遺伝子の解析を行った。

5) 転写因子 Egr2 の機能解析と誘導機構(山本): (1) CD4 陽性 T 細胞の IL-10 産生を誘導する IL-27 による Egr2 誘導を解析した。(2) クロマチン免疫沈降法とルシフェラーゼアッセイにより Egr2 が Blimp-1 のプロモーターに結合するか否かを解析した。(3) T 細胞特異的 Egr2/3 ダブルノックアウトマウスを作製して SLE の phenotype に関して検討した。

6) 難治性病態における治療標的分子探索(竹内): SLE3 症例の末梢血より Total RNA を抽出。Total RNA から poly A 鎖(+)RNA を精製および数百 bp 程度に断片化した後、ランダムヘキサマーを用いて 2 本鎖 cDNA を合成。両末端に解析用のアダプターを付加し、鋳型となる cDNA ライブラリーを作製。Genome Analyzer IIX(Illumina)を用いて、ペアエンドシーケンシングを行った。塩基配列データを取得し、ヒトゲノム配列をリファレンス配列としてマッピングした。データはゲノムブラウザにインポートし、周辺の既公開ゲノムアノテーションとともにマッピングし比較解析を行った。

7) 抗リン脂質抗体陽性 SLE における血栓形成機序解析(渥美): Ribophorin II (RPN2) が細胞膜表面に存在することを Flowcytometry (FCM)、間接蛍光抗体法を用いて確認した。単球の活性化に候補タンパクが関与していることを検討するために、RNA 干渉 (siRNA) を用いて、マウスモノクローナル aPS/PT (231D) で誘導される組織因子 (TF) の発現をリアルタイム PCR によって確認した。

8) 尿中ポトサイトマーカに関する研究(三村):

関節蛍光抗体法で、尿沈渣中の尿中 PCX 陽性陽性細胞 (U-Pod) をカウントした。尿中 PCX は、sandwich ELISA 法にて測定し、得られた値を ELISA で決定した尿中 Cr 濃度で補正した (U-PCX/UCr)。1997 年の分類基準で 2009 年 10 月から 2013 年 3 月までに SLE と診断された患者 83 人を登録。尿タンパククレアチニン比 (PCR) が 0.2 以上でかつ/または概算 GFR が 60 mL/min./1.73m² 未満を KD(+), それ以外を KD(-) とした。

(5) 診療ガイドライン作成:

2010 年に本班で作製した「SLE 治療の手引き」を発展させ、さらに日常診療に役立つ「診療ガイドライン」を作成することを企画した。方法としては、2003~2010 年度の SLE 患者臨床調査個人票の統計学的解析から作成することとしてデータ解析を進めた。(山本、山田)

(6) 新規治療法の検討(田中):

健常人と SLE 患者から末梢血単核球を分離し、8 カラーフローサイトメトリー (FACSVerse) を用いて、T 細胞、B 細胞のケモカイン受容体による細分類を試み、各サブセット間および患者背景との相関を検討した。ヒト末梢血 CD19 陽性 B 細胞を BCR 架橋、sCD40L、各種サイトカイン (IL-6, IL-21, IFN- γ ,) で刺激し、ケモカイン受容体、転写因子 Bcl-6、T-bet などの発現を検討した。

2. PM/DM 分科会: 上阪チームリーダーのもと以下の研究を遂行した。

(1) 疫学調査:

2010 年度の全国臨床調査個人票に基づく統計学的解析を施行し PM/DM の患者数を明らかにすることを目的とした。(太田、石原)

(2) 予防因子・予後予測因子の解析:

診断根拠を明らかにするために、2003~2012 年度の個人票の入力率を確認し、入力率の高い 2011 年度の新規受給者で発病後 1 年未満の者について、1992 年厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班作成の診断基準に基づいて、PM の診断基準、DM の診断基準それぞれを満たす者に分けて、臨床症状の有所見割合を求めた。(太田、石原、上阪)

(3) ゲノムワイド解析:

日本人 PM/DM 患者のゲノムワイド解析を施行するために、症例検索およびサンプルを収集した。(上阪、山本、山田、全班員)

(4) 分子機構解析:

1) microRNA 解析(神人): DM に特徴的な microRNA-target の組み合わせを見いだすために、DM 皮膚における microRNA 発現プロファイルと質量分析を解析した。

2) 多発筋炎マウスモデルにおける L-selectin の

役割(藤本): (1) 野生型マウス、L-selectin 欠損マウス(L-selectin^{-/-})、ICAM-1 欠損マウス(ICAM-1^{-/-})、L-selectin と ICAM-1 の両者を欠損したマウス(L-selectin^{-/-}ICAM-1^{-/-}) に C タンパクを免疫して筋炎を誘導し、筋炎の重症度、炎症細胞浸潤について検討した。(2)L-selectin と P-selectin の活性を阻害する化合物である dPGS による筋炎抑制効果についても検討した。

3)DM における抗 MDA5 抗体の臨床的意義に関する研究(三森経): 抗 MDA5 抗体測定 ELISA を用いて IP を合併した抗 MDA5 抗体陽性 DM/CADM 症例を対象に抗体価の推移と予後との関連について解析した。

4)DM における疾患マーカー自己抗体研究(室): アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)に対する 6 種類の自己抗体のうち抗体 EJ 抗体価を ELISA 法で測定し、臨床像との関連性を検討した。

5)自己抗体の微小血管校正細胞への影響(神田): (1)樹立した TY10 と HPPCT に急性期 DM 患者 3 例の血清を作用させ、37 °C で 24 時間 incubation を行った。血清を作用させた後、TY10 細胞株から RNA を抽出し、タイトジャンクション(TJ)構成分子(claudin-5, occludin, Zonula Occludens(ZO-1))の発現を real time PCR を用い解析した。(2)血清作用後の HPPCT から RNA を抽出し、基底膜の構成因子(collagen type 及び fibronectin)の発現を real time PCR で解析した。

6)自己抗体と組織所見との関連解析(清水): 406 例の筋炎症例で筋炎自己抗体(抗 ARS, 抗 Mi-2, 抗 SRP, 抗 TIF1- β , 抗 MDA5, 抗 PM/Sci 100)を測定し、筋炎組織との関連を検討した。

7)細胞傷害性 T 細胞阻害による PM/DM 治療戦略(上阪): (1)マウス C2C12 筋芽細胞、同細胞由来筋管における CD226 リガンド発現を、抗 CD112 抗体、抗 CD155 抗体による免疫染色法により検討した。(2)抗 CD226 抗体である Tx42 の invitro 活性をマウス脾臓由来 CD8T 細胞を抗 CD3 抗体、Tx42 を固相化したマイクロウエル内で培養し、培養上清のインターフェロン γ を定量した。Tx42 からは、ペプシン処理により F(ab')₂ 部分のみからなる Tx42 F(ab')₂ を調整した。(3)CIM 治療には、C タンパク断片による免疫で筋炎を誘導する前、筋炎発症後の 7 日後から Tx42 あるいは Tx42 F(ab')₂ を隔日腹腔投与した。筋炎の活動性は、免疫 14 日後に下肢筋群を組織学的に評価した。

8)MDACS による疾患活動性評価(川口): 72 症例を研対象とし、患者による疾患全般評価(PGA: VAS10cm)、医師による疾患全般評価(EGA: VAS10cm)、徒手筋力テスト(MMT8: 8 部位で評価。80 点満点)、J-HAQ-DI、医師による筋外病変の活動性評価

(MYOACT: VAS10cm)を用いた。

(5)国際診断基準の検定:

PM/DM 患者を対象として、国際診断基準案(IMCCP 案、2012 年 8 月)の妥当性を検討することを目的とする疫学調査を開始した。対象は、本班員の施設で診断された PM/DM 患者、および PM/DM との鑑別を要する非 PM/DM 患者を対象とした。既存の臨床データ(診療録)から、患者の性別、生年月、診断時年月、診断名、診断に関する所見などを収集する。目標症例数は PM/DM 患者 800 例(PM350 例、DM400 例(ADM50 例含む)、その他 50 例)、非 PM/DM 患者 800 例。(石原、太田、神人、上阪)

(6)診療ガイドラインの作成:

PM/DM の診断基準の検定および治療ガイドラインの制定を目的とした。診断および治療の検定に関しては、2003~2010 年度の全国臨床調査個人票を有効活用した。

(7)新規治療戦略の開発:

IL-6 を標的とした生物学的製剤による PM/DM の治療プロトコールを作成し、パイロット臨床試験を施行することにより、効果と安全性を確認する。(上阪)

3.SS 分科会: 住田のもと以下の研究を遂行した。

(1)疫学調査:

全国の 4,729 施設(内科、眼科、耳鼻咽喉科、アレルギー・膠原病内科、口腔外科)を対象として SS 患者症例数について調査を実施した。(坪井、住田)

(2)予防因子・予後予測因子の解析:

SS における発症予測因子・予後予測因子の解析に関しては、214 施設を対象として全国疫学二次調査を施行し、その結果(患者数 2,195 症例)を用いて臨床的要素の解析をおこなった。(坪井、住田)

(3)ゲノムワイド解析:

日本人 SS 患者のゲノムワイド解析を施行するために、症例検索およびサンプルを収集した。(住田、坪井、山本、山田、全班員)

(4)病因・病態解析:

1)M3R を分子標的とした自己免疫性唾液腺炎(MIS)の解析(住田): M3R^{-/-}マウスに M3R を免疫しその脾細胞を Rag-1^{-/-}マウスに細胞移入することにより自己免疫性唾液腺炎が発症した。その発症機序を解明するために、M3R^{-/-}xIFN- γ ^{-/-}マウスおよび M3R^{-/-}xIL-17^{-/-}マウスを使用した。さらに MIS を発症する M3R の T 細胞エピトープおよびアナログペプチド解析を行った。

2)TLR3 シグナル解析(川上): 唾液腺上皮細胞に

おける TLR3 誘導アポトーシス機序を解析することを目的として、唾液腺上皮細胞を対象として TRIF、下流シグナル (RIPK, FADD, caspase 8 等) リン酸化 Akt 発現について IF、ウエスタンブロット法、EGF 刺激後抗体アレイ法を用いて解析した。

3) 唾液腺組織におけるサイトカイン解析 (中村): SS の病態形成と TH2 誘導サイトカインの一つである IL-33 との関連を明らかにする事を目的とした。SS 患者由来血清中 IL-33 と臨床検査値との関連を検討した。

4) 唾液中 EGF 解析 (佐野): SS 患者唾液中の EGF 量と口腔内 QOL の関連性を明らかにするために、唾液中 EGF を ELISA 法で測定し口腔内 QOL (OHIP-J) との相関を 3 年間検討した。

5) エストロゲンによる EB ウイルスの再活性化制御 (斎藤): ヒト唾液腺上皮細胞の HSY を用いてエストロゲン受容体 (ER) を介した EB ウイルス再活性化の指標である BZLF1 の転写活性化の制御について、BZLF1 遺伝子のプロモーターアッセイを行った。

6) GVHD モデルマウスにおける病態解析 (坪田): 8 週齢 B10.D2 (H-2d) マウスの全骨髄細胞を採取し、BALB/c(H-2d) マウスに移植して GVHD マウスモデルを作成した。移植後レシピエントにおける涙液産生能、涙腺組織の酸化ストレスマーカーと老化マーカーの発現を検討した。

7) 唾液腺上皮細胞におけるケモカイン、サイトカイン発現 (梅原): SS および non-SS 由来ヒト口唇小唾液腺培養細胞を用い、SS における慢性炎症の継続に中心的な役割を果たす IFN と、その誘導により産生されるケモカインおよびサイトカインについて検討を行った。

8) SS 診断におけるドライアイ診断精度の検討 (高村): ドライアイの自覚症状を呈する初診外来患者 34 名を対象として、自覚症状アンケート、ドライアイ検査 (シルマー試験 I 法、涙液膜破壊時間: BUT)、血液検査、ドライマウス検査、生検病理検査、を前向きに検討した。

(5) 診断基準の検定:

1999 年の旧厚生省診断基準 (現行)、アメリカヨーロッパ基準 (2002 年)、ACR 基準 (2012 年、旧 SICCA 基準) について、本班 SS 分科会を中心とした 10 施設の SS 患者 (476 例) および非 SS 患者 (218 例) 総計 694 症例を対象として特異度、感度等に関して比較検討した。(坪井、住田、班員全員)

(6) 診療ガイドライン作成:

全国疫学二次調査 (214 施設) による 2,195 症例を対象とした患者データを統計解析し、SS の予防因子・予後予測因子の提唱、治療ガイドライン作成する準備を進めた。(坪井、住田)

(7) 新規治療法の検討:

T 細胞を標的とした生物学的製剤 (CTLA-4-Ig) による治療効果を検討するためにパイロット研究を開始した。(住田、坪井、川上、田中)

(倫理面への配慮)

ヒトの検体を用いる研究に関しては、各施設における倫理委員会での承諾を得た上で、患者および健康者に十分なインフォームド・コンセントを行い、理解と同意を得る。動物実験においては、過度の苦痛や恐怖を与えないように配慮する。遺伝子改変マウスを用いた実験では、当該施設の組換え DNA 実験および動物実験の学内規定を遵守して行う。なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究、免疫研究、並びに臨床研究に関する倫理指針等は徹底して厳守した。

C. 研究結果

1. SLE/AOLS 分科会:

(1) 疫学調査:

A) SLE 臨床調査個人票の疫学解析: 男女別有病率、発病年齢分布、項目別陽性率とその性別、項目陽性のクラスター、患者のクラスターを投稿中である。(山田)

B) AOSD の全国疫学調査: AOSD の全国症例 4,760 名の臨床データを解析し、論文投稿中である。(三村、坪井、住田)

(2) 予防因子・予後予測因子の解析:

A) SLE: 臨床調査個人票のデータを分析し、SLE 発症の予測因子、予防因子、予後予測因子の選定に関する基盤研究を進めた。(山田)

B) AOSD: 疫学二次調査データを分析し、AOSD 発症の予測因子、予防因子、予後予測因子の選定に関する基盤研究を推進した。(三村、坪井、住田)

(3) ゲノムワイド解析:

日本人 AOSD 患者の疾患集積家系におけるエクソーム解析を施行するために、各施設における倫理委員会の承認後、サンプルを収集中。(山本、山田)

(4) 分子免疫学的解析:

1) B 細胞の抑制分子である Fcγ11B 解析 (広瀬): 自己抗体産生には、B 細胞上での FcγR B 発現欠損が必須であるが、高度のループス腎炎発症には、B 細胞以外の細胞上での FcγR B 発現欠損が必要であり、その候補として単球上の FcγR B 発現欠損が関与する可能性を得た。

2) Fcγ レセプター 11B 欠損 Yaa 遺伝子変異における SLE 病態解析 (天野): (1) (K01xNZW) F1 マウスにおいて 6~8 ヶ月齢においてループス腎炎に類似し

た糸球体腎炎を発症した。血清中抗 ds-DNA 抗体は、B6、K01 マウスと比較して有意に上昇していた。(K01xNZW)F2 マウスの解析では、ループス腎炎が約 33.7%、唾液腺炎が約 27.6%に認められ、これらの病態を重複して発症するマウスの存在も認められた。(2)F2 マウスを用いた QTL マッピングでは、第 1、4、7、9、13、17 番染色体の領域にループス腎炎に関連した遺伝子群を認め、第 12 番染色体領域にループス腎炎、唾液腺炎を合併する遺伝子がマップされた。

3)抗 ACE2 抗体の機能解析(三森明):血清 IgG による、ACE2 活性阻害すなわち Ang(1-7)消失は、SLE-血管病変群 5/5 vs 対照 SLE 群 2/22 ($p = 0.00026$; Fisher's exact probability)にみられた。

4)MAIT 細胞による SLE 制御機構(三宅):(1) SLE 患者末梢血においてはその頻度が 1%以下と著減していた。(2)SLE 患者においては、CD3+CD28 刺激および IL-15 刺激による増殖反応は低下していた。(3)SLE 患者 MAIT 細胞では、Fas の発現が高く、活性型カスペース 3 および 7AAD 陽性細胞も増加しており、細胞死が亢進していた。(4)SLE 患者で MAIT 細胞はほぼ全てエフェクターメモリの表現型を呈し、長期培養で増加しなかった。

5)転写因子 Egr2 の機能解析と誘導機構(山本):

(1)IL-27 だけが CD4 陽性 T 細胞の Egr2 と LAG3 発現を誘導し、IL-27 による Egr2 誘導は STAT3 依存性であった。(2) Egr2 が Blimp-1 のプロモーターに結合した。(3)T 細胞特異的 Egr2/3 ダブルノックアウトマウスにおいて 4 か月という早期に SLE 様を呈した。T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスの CD4 陽性 T 細胞では Egr3 の発現が亢進していた。

6)難治性病態における治療標的分子探索(竹内):SLE3 例から総リードペア 5000-6000 万リードのデータが取得でき、平均 depth も 30 前後と十分なカバレッジを持つデータが得られた。各リードよりアダプター配列をトリミングの後、TopHat によりヒトゲノム(UCSC hg19)にマッピング。エキソン情報は、UCSC RefGene (RefSeq 由来)を参照し、エキソンごとサンプルごとにリードカバレッジを算出したところ、SLE サンプルに特異的な遺伝子が抽出された。さらに SLE 特異的なアイソフォームを抽出された。

7)抗リン脂質抗体陽性 SLE における血栓形成機序解析(渥美):RPN2 が PBMC および RAW264.7 の細胞表面に存在することを確認した。RPN2siRNA でノックダウンした RAW264 細胞を PT および 231D で刺激したところ、TFmRNA 発現が有意に低下した。

8)尿中ポトサイトマーカに関する研究(三村):

(1)U-Pod、U-PCX/Cr は、KD(-)よりも KD(+)で有意に高値であった。(2)IV 型病変(+)症例にて IV 型病変(-)症例に比べ U-Pod は有為に高値だが U-PCX/Cr は 2 群間で有意差無し。(3)V 型病変(+)症例にて、V 型病変(-)症例に比べ、U-PCX/Cr は高い傾向。U-Pod は 2 群間で有意差無しであった。(4)ROC curve 解析では、U-Pod cutoff >0.9 cells/mL で、sensitivity 81.0%, specificity 71.4%で pure IV 型を予測($P=0.004$)、U-Pod cutoff <1.25 cells/mL かつ U-PCX cutoff >686.0 μ g/gCr で、sensitivity 60.0%、specificity 96.7%で pure V 型を予測した。

(5)診療ガイドライン作成:

SLE 患者に関する臨床調査個人票(2003 年~2010 年)を集計、統計解析することにより、上記(2)の臨床情報をえる事ができた。この情報に基づき診療ガイドラインを作成する。(山本、山田)

(6)新規治療法の検討:

1)活動期 SLE では、CXCR5 陰性 CXCR3 陽性の effector memory B 細胞が有意に増加し、疾患活動性と相関すること、2)この B 細胞サブセットの割合が、末梢血における活性化 Tfh 細胞の割合と正の相関をすること、3)Tfh 細胞が産生する IL-21 と IFN- γ の刺激が B 細胞の分科誘導とエフェクター機能を協力的に誘導する事、を明らかにした。

2.PM/DM 分科会:

(1)疫学調査:

2009 年度の臨床調査個人票を解析した結果から、患者数、有病率、罹患率を明らかにした。(太田、石原)

(2)予防因子・予後予測因子の解析:

2011 年度新規受給、発病後 1 年未満の者は 1,001 人、うち PM の診断基準を満たす者は 352 人で、DM の診断基準を満たす者は 557 人あった。有所見割合は、筋力低下や筋原性酵素上昇所見などでは、PM の診断基準を満たす者、DM の診断基準を満たす者の間で大きな差はなかったが、その他の所見の有所見割合では違いが認められた。(太田、石原、上阪)

(3)ゲノムワイド解析:

日本人 PM/DM 患者のゲノムワイド解析を施行するために、各施設における倫理委員会の承認後、サンプルを収集した(2013 年 12 月時点で 552 検体)。現在、GWAS 解析中。(上阪、山本)。

(4)分子機構解析:

1)microRNA 解析(神人):miR-125-5p の減少および PSMB9 の発現増加を認めた。

2)多発筋炎マウスモデルにおける L-selectin の

役割 (藤本): (1)L-selectin^{-/-}マウス、L-selectin^{-/-}ICAM-1^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べ、筋炎は有意に抑制されていた。ICAM-1^{-/-}マウスでも野生型マウスに比べ筋炎の重症度は低下していたが、有意差はなかった。野生型マウスのT細胞を移入したL-selectin^{-/-}マウスは筋炎を発症した。(2)dPGSを投与した群では、コントロールを投与した群に比べ筋炎の重症度は低下していた。

3)DMにおける抗MDA5抗体の臨床的意義に関する研究(三森経): (1)治療前および治療導入後の抗MDA5抗体の抗体価において、死亡群では治療前で有意に高く、治療導入によっても低下しない傾向にあった。(2)生存群では全例で抗体価が治療導入後に低下した。(3)強力な免疫抑制療法に治療抵抗性を示した症例に対して血漿交換療法を併用施行したところ、速やかに血清フェリチン値の改善、IPの病勢コントロールが可能となった。

4)DMにおける疾患マーカー自己抗体研究(室): 抗EJ抗体はDM、PM、ILDのいずれの症例にも存在したが、抗体価との関連ではILDとの関係が示された。

5)自己抗体の微小血管校正細胞への影響(神田): DM患者血清を作用させたTY10細胞では、claudin-5のmRNA発現レベルに有意な差はなかったが、occludin及びZO-1のmRNA発現が低下していた。(2)DM患者血清はHPPCTのcollagen type IVとfibronectinのmRNA発現レベルには有意な影響を及ぼさなかった。

6)自己抗体と筋炎組織との関連解析(清水): 筋束周辺部萎縮所見を有する27例中22例(抗Tif1 9例, 抗Jo1 7例, 抗Mi-2 5例, 抗MDA5 1例), 筋内鞘血管補体沈着所見を有する49例中33例(抗Tif1 24例, 抗Jo1 2例, 抗MDA5 4例, 抗OJ 1例, 抗SRP 1例, 抗Mi-2 1例)で筋炎自己抗体陽性であった。壊死性筋症43例中33例で抗SRP抗体が陽性であった。CD8陽性細胞による非壊死筋線維アタック像は検討抗体と関連は乏しかった。

7)細胞傷害性T細胞阻害によるPM/DM治療戦略(上阪): (1)マウスC2C12筋芽細胞および筋幹細胞はCD112陰性でCD155陽性であった。(2)脾臓由来CD8T細胞の固相化抗CD226抗体による刺激は、抗CD3抗体による刺激がある時にのみIFN産生を亢進させた。(3)発症前、発症後から治療投与しても、Tx42 F(ab')₂が筋炎を抑制した。一方、無処理Tx42は抑制しなかった。

8)MDACSによる疾患活動性評価(川口): 平均PGA(標準偏差)は25(24)mmで、0mmであったのは症例の1割のみであった。一方、平均EGA(標準偏差)は5(7)mmで、半数の症例で0mmであった。

J-HAQ上、半数で身体機能障害を認めた。J-HAQ上身体機能障害を認めた群では、発症年齢が高く、罹病期間に有意差を認めずPGA(P<0.0001)は高く、MMT8(P=0.008)が低かった。

(5)国際診断基準の検定:

調査項目として、IMCCP data collection sheet記載の109項目から68項目を選択した。今後、収集データを用いて、国際診断基準案(IMCCP案)他、現在わが国で使用されている診断基準等のSensitivity、Specificity、その他診断基準の性能を示す指標を求め、診断基準の妥当性を検討し、改善方法を提案する。(石原、太田、神人、上阪)

(6)診療ガイドライン作成:

PM/DM患者に関する臨床調査個人票(2003~2011年度)を集計、統計解析することにより、上記(2)の臨床情報をえる事ができた。(上阪、太田)

(7)新規治療法の検討:

IL-6を標的としたトシリズマブによる治療プロトコルを作成中。(上阪)

3.SS分科会:

(1)疫学調査:

2010年度の全国患者数調査によって、患者数が66,317名であることが判明し、論文誌上で報告した。(坪井、住田)

(2)予防因子・予後予測因子の解析:

二次調査では98診療科から2195例のSS患者の調査票を回収した。平均年齢は60.8±15.2歳、男性/女性の比率は1/17.4、病型は一次性/二次性SSが58.5%/39.2%、一次性SSのうち腺型/腺外型は69.1%/24.7%(不明6.2%)であった。JPN基準の満足度は53.8%、AECG基準は47.7%、ACR基準は49.6%であった。ステロイドは34.3%(752/2195例)、免疫抑制薬は16.3%(358/2195例)、生物学的製剤は3.1%(68/2195例)、唾液分泌刺激薬は31.7%(695/2195例)で投与されていた。

SSに関する全国疫学調査(一次調査、二次調査)により、本邦におけるSSの頻度、病型、腺外病変、診断および分類基準の満足度、治療の現状が明らかとなった。

(3)ゲノムワイド解析:

日本人SS患者のゲノムワイド解析を施行するために、各施設における倫理委員会の承認後、644サンプル(2013年12月現在)を収集した。現在、GWAS解析中。(住田、坪井、山本)

(4)病因・病態解析:

1)M3Rを分子標的とした自己免疫性唾液腺炎(MIS)の解析(住田): M3R反応性TH1細胞およびTH17細胞がともに自己免疫性唾液腺炎発症に関与して

いることを明らかにした。さらに、MIS 発症に係わる M3R の T 細胞エピトープが N1 および細胞外第一ドメインであること、そのアナログペプチドを明らかにした。N1 領域の APL7(AA15S N) 投与により in vivo において MIS の優位な抑制を認めた。

2) TLR3 シグナル解析(川上): SS における TLR3 に関連する唾液腺細胞死関連蛋白のうち、p-FADD/caspase-8 以下のシグナル減弱、RIPK3/p-FADD の増強が認められた。さらに、抗アポトーシス分子として HO-2、HSP27、リン酸化 Akt 発現が増加していた。

3) 唾液腺組織におけるサイトカイン解析(中村): 血清中 IL-33 値は、SS 患者、自己抗体価、悪性リンパ腫発現、他の膠原病の併発と関連していることが明らかになった。

4) 唾液中 EGF 解析(佐野): 唾液中 EGF の低下と口腔内 QOL の低下に強い相関が認められた。

5) エストロゲンによる EB ウイルスの再活性化制御(斎藤): エストロゲン、大豆イソフラボンは TPA により活性化される BZLF1 プロモーター活性を抑制した。

6) GVHD モデルマウスにおける病態解析(坪田): GVHD モデルマウスと老齢マウスの涙腺組織において、類似した線維化の進行を認めた。涙腺における酸化ストレスマーカーを発現するマクロファージおよび老化マーカー(p16)を発現した炎症細胞の浸潤を認めた。

7) 唾液腺上皮細胞におけるケモカイン、サイトカイン発現(梅原): SS 唾液腺培養上皮細胞では、免疫調節性サイトカインである TGF- β 産生能が non-SS 細胞に比べ低下し、IFN 刺激による IP-10, Mig, IL-6 の過剰産生が引き起こされることを明らかにした。

8) SS 診断におけるドライアイ診断精度の検討(高村): シルマー値の平均は、SS で 3.5 ± 4.64 mm、シェーグレン症候群以外(non-SS)では 7 ± 3.42 mm であった。12 例中シルマーテスト 5mm 以下(陽性)は 9 例(90%)であった。10mm 以上を呈した 3 例は、血液検査、唾液腺生検で SS と診断されたが、ドライアイの検査では、BUT は 5 秒以下、角結膜染色スコアは陽性であった。

(5) 診断基準の検定:

旧厚生省基準の感度は 79.6%、特異度は 90.4%、アメリカヨーロッパ基準の感度は 78.6%、特異度は 90.4%、ACR 基準の感度は 77.5%、特異度は 83.5% であった。その結果、日本人 SS 患者に関しては、旧厚生省基準(現日本基準)が感度、特異度ともに最も優れている事が判明した。本結果を論文誌上で報告した(坪井、住田、全班員)

(6) 診療ガイドライン作成:

SS 患者に関する疫学二次調査結果を集計、統計解析することにより、上記(2)の臨床情報をえる事ができた。(住田、坪井)

(7) 新規治療法の検討:

RA を合併した SS 患者 17 症例を対象として、T 細胞を標的とした CTLA-4-Ig による治療効果を検討した結果、治療開始 24 週において、患者 VAS、サクソテスト、シャーマー試験の改善が認められた。

D. 考察

1. SLE/AOSD 分科会

(1) 疫学調査:

A) SLE: 臨床個人調査票(2003 年~2010 年)の解析から、臨床的特徴を明らかにした。(山田)

B) AOSD: 疫学一次調査により AOSD の症例数を明らかにした。(三村、坪井、住田)

(2) 予防因子・予後予測因子の解析:

A) SLE: 2003~2010 年度の臨床調査個人票の解析データから、予防因子・予後予測因子の提唱が可能となった。(山田、山本)

B) AOSD: 疫学二次調査による患者データから症状、検査結果、治療、予後に関する統計解析がなされ、予防因子・予後予測因子の提唱が可能となった。(三村)

(3) ゲノムワイド解析:

日本人 SLE 患者を対象とした GWAS 解析により疾患感受性遺伝子候補が明らかとなった(ProsGene)。一方、AOSD においては、家族発症例を対象としたエクソーム解析を推進する。(山本、山田、住田)

(4) 分子免疫学的解析:

1) 広瀬: SLE 発症には、B 細胞及び樹上細胞以外の細胞、特に単球系細胞上の Fc γ RIIB 発現低下が重要である可能性が示唆された。

2) 天野: 第 1 染色体 Fc γ RIIB の欠損に加え、NZW 系遺伝子が加わることで SLE 類似の病態が出現してくることが判明した。

3) 三森明: SLE の収縮性血管病態(PAH または末端壊死)と強く相関する ACE2 阻害自己抗体の存在は、AngII Ang (1-7)の変換阻害方法で、明瞭に同定できた。

4) 三宅: MAIT 細胞が SLE 患者抹消血において著減しており、その原因として細胞死の亢進が考えられた。

5) 山本: Egr2 だけでなく Egr3 も協働することで自己免疫応答が抑制されていることを示唆した。

6) 竹内: 細胞亜分化化と高密度解析の 2 種類の網羅的遺伝子解析法により、SLE の遺伝子発現の特徴の一端を明らかにすることができた。これらの

情報は SLE の病態解明、治療法の確立に寄与するものと考えられた。

7) 渥美：プロテオミクス解析からプロトロンビン結合タンパクとして RPN2 が同定された。RPN2 は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。

8) 三村：SLE の腎障害では U-Pod, U-PCX/Cr は高値を示し、病態に関与すると共に、両者を用いてループス腎炎の組織型を予測できる可能性が示唆された。

(5) 診療ガイドライン作成：

A) SLE 患者に関する臨床調査個人票(2003~2010 年度)の解析データを基に診療ガイドラインを作成する。(山本、山田)

B) AOSD 患者に関する疫学二次調査(2010 年度)の解析結果を基に診療ガイドラインを作成する。(三村)

(6) 新規治療法の検討：

SLE の病態形成において B 細胞と Tfh 細胞の相互作用が重要であり、両細胞を標的とした新規治療薬の開発が必要であろう。(田中)

2. PM/DM 分科会：

(1) 疫学調査：

2003~2011 年度の臨床調査個人票の解析により患者数などの実態を明らかにする事ができた。(太田、石原)

(2) 予防因子・予後予測因子の解析：

本研究成果は、診療ガイドライン作成および PM/DM の国際診断基準の妥当性評価の参考資料となると考えられた。(太田、石原、上阪)

(3) ゲノムワイド解析：

PM/DM を対象とした GWAS 解析を推進する。(上阪、山本)

(4) 分子機構解析：

1) 神人：DM 皮膚における miR-125p の減少、PSMB9 の増加が発症と関わっている可能性が示唆された。

2) 藤本：L-selectin は ICAM-1 よりも C タンパク誘発筋炎モデルにおいて重要な役割を果たしていると考えられ、L-selectin は多発筋炎の治療標的となり得る可能性があると考えられた。

3) 三森経：治療抵抗性を示す症例において血漿交換療法が救命率を向上させる可能性が示唆された。以上から、抗 MDA5 抗体自身が病原性を持つ可能性が考えられた。

4) 室：アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)に対する自己抗体と臨床像との関連が明らかとなった。

5) 神田：DM 患者の血清に含まれる液性因子により筋内微小血管の occludin と ZO-1 の発現が低下し、

TJ が破綻することが DM の病態に関与していることが推察された。

6) 清水：筋炎の特徴的組織所見と筋炎自己抗体の関連性が明らかになった。

7) 上阪：筋細胞が CD226 リガンドである CD155 を表出し、活性化を阻害する抗 CD226 抗体投与が多発性筋炎モデルである CIM を軽快させることが明らかとなった。抗 CD226 抗体は新たな治療薬となると期待される。

8) 川口：PM/DM 外来患者の半数以上身体機能障害を認め、それは、不可逆的蓄積障害を反映している可能性がある。

(5) 国際診断基準の検定：

IMCCP 案の国内での検定を行い、PM/DM の新診断基準を提唱する。(石原、太田、神人、上阪)

(6) 診療ガイドライン作成：

2003~2011 年度の PM/DM 患者の臨床調査個人票からの臨床データ解析結果を基に診療ガイドラインを作成する。(上阪、太田)

(7) 新規治療法の検討：

PM/DM に対するトシリズマブ治療のパイロット研究を開始する。(上阪)

3. SS 分科会：

(1) 疫学調査：

SS の総患者数は 66,713 名であることを明らかにした。(坪井、住田)

(2) 予防因子・予後予測因子の解析：

SS に関する全国疫学調査(一次調査、二次調査)により、本邦における SS の頻度、病型、腺外病変、診断および分類基準の満足度、治療の現状が明らかとなった。本データは貴重であり予防因子・予後予測因子の提唱に有用である。(坪井、住田)

(3) ゲノムワイド解析：

SS を対象とした GWAS 解析結果から、病因関連遺伝子、発症予測因子、予後予測因子等を明らかにした。(住田、坪井、山本)

(4) 病因・病態解析：

1) 住田：自己免疫性唾液腺炎発症に Th1 および Th17 細胞が必須であること、M3R の主要 T 細胞エピトープとアナログペプチド候補を明らかにした。

2) 川上：SS 唾液腺では、細胞死を抑制する機構が働いている事を示唆した。

3) 中村：SS 患者血清中 IL-33 が自己抗体産生やリンパ腫発生に関与している事を明らかにした。

4) 佐野：唾液中 EGF 低下により口腔内病変が悪化し口腔内 QOL が低下することを示した。

5) 斎藤：エストロゲンにより EBV の活性化が抑制されていることが判明した。

6)坪田：GVHDによるドライアイおよび涙腺炎症の解析により、老化マクロファージが繊維化および慢性炎症に関与していることを明らかにした。

7)梅原：IL-6 産生亢進/TGF- β 産生能低下によるTreg 細胞/Th17 細胞への分化のバランスの偏りが、唾液腺局所での炎症の一因の可能性が示された。

8)高村：SS の病態を反映する涙液分泌型ドライアイ診断における角結膜染色、涙液検査の適切な評価法を検討することが必要である。

(5)国際診断基準の検定：

3 つの診断基準のうち、感度、特異度は旧厚生省基準（現日本基準）が最も優れていた。（坪井、住田、全班員）

(6)診療ガイドライン作成：

SS患者の全国疫学二次調査の臨床データ解析結果を基に診療ガイドラインを作成する。（住田、坪井）

(7)新規治療法の検討：

T 細胞を標的とした新規治療法の効果を検定する。

E . 結論

1. SLE/AOSD 分科会：

A)SLE に関する臨床調査個人票(2003～2010 年度)の解析から予防因子・予後予測因子候補を提唱した。ゲノムワイド関連解析、分子免疫学的解析を推進した。診療ガイドライン作成および新規治療戦略の準備を進めた。診療ガイドライン作成および新規治療戦略の準備を進めた。

B)AOSD に対する全国疫学二次調査（2010 年度）結果から予防因子・予後予測因子候補を提唱した。ゲノム解析、分子免疫学的解析を推進した。診療ガイドライン作成および新規治療プロトコルの作成を進めた。

2. PM/DM分科会：

臨床調査個人票(2003～2011年度)の解析から臨床的特徴、予防因子・予後予測因子候補を提唱した。発症の分子機構解析、ゲノム解析を推進した。診療ガイドライン作成と国際診断基準の検定を進めた。

3. SS分科会：

全国疫学二次調査（2010年度）結果から予防因子・予後予測因子候補を提唱した。分子レベルでの病因・病態解析、ゲノム解析、3つの診断基準の検定を推進した。診療ガイドライン作成および免疫細胞、免疫分子を標的とした新規治療法の評価を進めた。

F . 健康危険情報

特記すべき事項なし

G . 研究発表

分担研究報告書参照

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

分担研究報告書参照