



全身性エリテマトーデスの抗 DNA 抗体 産生における CD43 分子の役割

大野基樹 船内正憲

近畿大学医学部第3内科学教室

抄 録

全身性の自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) と接着分子の関係について、抗体産生における接着分子の役割を検討した。なかでも、intercellular adhesion molecule-1 のリガンドであり、最近、マウスで抗 DNA 抗体産生 B 細胞亜群の表面マーカーの一つとして報告されている CD43 分子について、ヒトの SLE の病態における意義を検討した。CD43 分子の発現は抗 DNA 抗体が高値の症例で、増加していた。また、活動期 SLE 症例の B 細胞のうち、CD5(-)CD43(+)細胞が高率に IgG クラスの抗 DNA 抗体を産生していた。一方、健常人および SLE 症例の末梢単核細胞の IgG および IgM 産生量は抗接着分子抗体の添加によって減少した。また、SLE 症例の末梢単核細胞の IgG クラスの抗 DNA 抗体の産生量は抗 CD43 抗体の添加によって減少した。以上のことから B 細胞上の CD43 分子は、単なる活性化のマーカーではなく、抗 DNA 抗体産生に深く関与していると考えられた。

Key words: systemic lupus erythematosus, anti DNA antibody, adhesion molecule, CD43, antibody production

緒 言

自己免疫疾患は自己の成分を抗原として抗体が出現する全身性あるいは臓器特異性の慢性炎症を主体とした疾患である。これらの炎症部位に浸潤している単核細胞に関連する接着分子が病像形成に大きな役割を果たしていると考えられており、その機序が徐々に解明され始めている。また近年、T-B 細胞間相互作用における抗体産生に接着分子が関与する可能性も追究されている。一方、自己免疫疾患の代表的疾患とされている全身性エリテマトーデス systemic lupus erythematosus (SLE) においては、B 細胞のどのような亜分画群から抗 DNA 抗体が産生されているかは明らかでない。近年、SLE のモデル動物である New Zealand black/white F1 (NZB/W F1) マウスでは、CD5 陰性 CD43 (マウスでは Lp-3) 陽性の B 細胞亜群が IgG クラスの抗 DNA 抗体を産生していることが報告された¹⁾。また最近、接着分子である intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) のリガンドとして CD43 分子が知られている²⁾。本研究では、SLE の抗 DNA 抗体産生に接着

分子がどのように関与しているかを明らかにし、さらに、CD43 陽性 B 細胞の抗 DNA 抗体産生における役割を検討した。

対象および方法

1. 対象

対象はアメリカリウマチ協会の1982年改訂 SLE 分類基準³⁾ の4項目以上を満たす SLE 症例12例 (抗 DNA 抗体価 ≤ 7 IU/ml: 4例, > 7 IU/ml: 8例)、健常人5例である。抗 DNA 抗体高値例は未治療の SLE 2例が含まれている。対象とした SLE 症例を厚生省研究班による SLE の活動性判定基準⁴⁾ で評価すると、抗 DNA 抗体価正常例は全例非活動性であり、高値例は8例中4例が活動性であった。また、治療薬は未治療の2例以外は副腎皮質ステロイド薬をプレドニゾロンで5~30 mg/日服用していた。対象となる症例には内容を説明し承諾を得ている。

2. 末梢単核細胞上の CD43 分子発現量の観察
ヘパリン加末梢血, 100 μ l に phycoerythrin (PE) 標識抗 CD19 モノクローナル抗体 (Becton-Dickinson, San Jose, USA), fluorescein isoth-

iocyanate (FITC) 標識抗 CD43 モノクローナル抗体 (Serotec, Oxford, England) をそれぞれ 1 μ g 添加し, 4 $^{\circ}$ C, 30分インキュベート後, 0.83%塩化アンモニウム溶液を用いて赤血球を溶血させ, Cytorton (Ortho Diagnostic Systems, Tokyo, Japan) によって観察した。

3. 末梢単核細胞およびB細胞の培養

ヘパリン加末梢血から Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いた比重遠心法⁵ によって単核細胞を分離した。さらにプラスチック非附着性細胞にEロゼット法⁶ による処理を行い, ロゼット非形成細胞を得た。この分画中 CD19 陽性細胞は80%以上であった。次に PE 標識抗 CD5 モノクローナル抗体 (Becton-Dickinson, Son Jose, USA) および FITC 標識抗 CD43 モノクローナル抗体で二重染色を施し, FACStar (Becton-Dickinson, Son Jose, USA) を用いて CD5(-)CD43(+)細胞と CD5(-)CD43(-)細胞を単離した。得られた細胞は, 10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum 以下, FCS, 日令, 東京) 加 RPMI に 2.5×10^6 /ml の濃度で浮遊させ, 96穴マイクロプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に 200 μ l/well ずつ加え, 5% CO₂, 湿度100%37 $^{\circ}$ Cで6日間培養した。これらの培養上清中の IgG 産生量と IgG クラス抗 DNA 抗体価を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって測定した。対象として健康人の CD19 陽性細胞を用いた。また, 末梢単核細胞 5×10^5 /200 μ l に抗接着分子抗体である抗 ICAM-1 (CD54) 抗体 (Serotec, Oxford, England), 抗 lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) (CD11a) 抗体 (Serotec, Oxford, England), 抗 CD43 抗体, コントロールとして, 各抗体と同じクラスの免疫グロブリンである抗マウス

IgG₁ 抗体 (PharMingen, San Diego, USA) を 5 μ g/ml の濃度で添加して6日間培養し, 上清中の免疫グロブリン量を非添加時と比較した。添加した抗体の濃度は, 細胞障害性のない最も高濃度であることを確認し決定した。

4. ELISA による抗体価の測定

96穴平底プレートの各 well に 50 μ g/ml, poly L-lysine HBr. (Miles-Yada, Israel) を加え, 1時間処理した。さらに 0.1 M Tris HCl buffer (THB) で洗浄後ウシ胸腺由来 DNA (Sigma, St. Louis, USA) を加えて12時間4 $^{\circ}$ Cで静置してDNAを固相化した。同様に, 免疫グロブリンの測定はプレートに IgG (Cappel, West Chester, USA), IgM (Dako, Glostrup, Denmark) を固相化した。0.05% Tween20 加 THB で洗浄後, 3%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma, St. Louis, USA) を加え, 1時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし, 洗浄後検体200 μ l を各 well に加えて1時間37 $^{\circ}$ Cで静置した。さらに, alkaline phosphatase (ALP) 結合ヤギ抗ヒト IgG (Cappel, West Chester, USA), ALP 結合ウサギ抗ヒト IgM (Dako, Glostrup, Denmark) を加え, 遮光して反応させた後, 492 nm の吸光度で OD 値を測定した。抗体は, 濃度既知の IgG, IgM 溶液, あるいは日常の臨床検査法として用いられている radioimmunoassay によって測定した抗 DNA 抗体力価既知の血清から得られた標準曲線で直線部分の濃度のものを用いた。

5. 統計学的検討

免疫グロブリン値, 抗 DNA 抗体価, および CD43 陽性率の比較は, Student's t 検定によって行った。

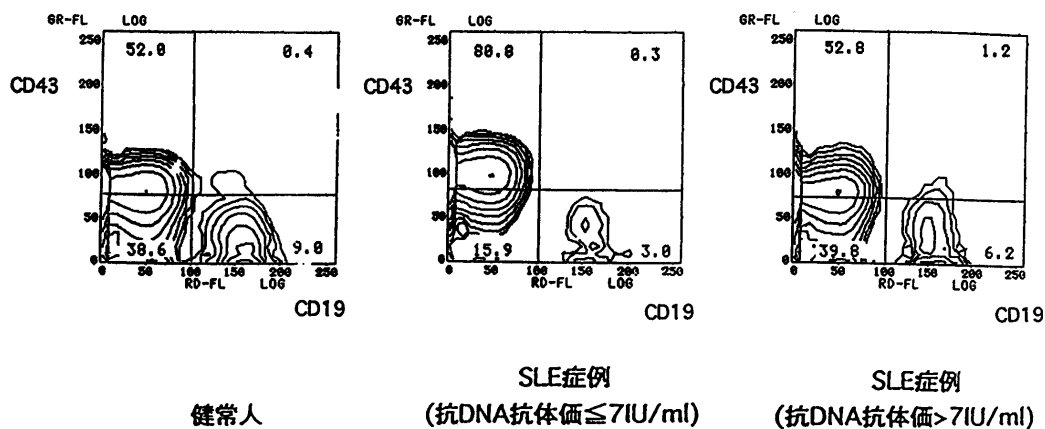


図1 Flow cytometer による末梢単核細胞亜分画分析 CD19 と CD43 の二重染色の結果である。各分画の数字はパーセントを示す。

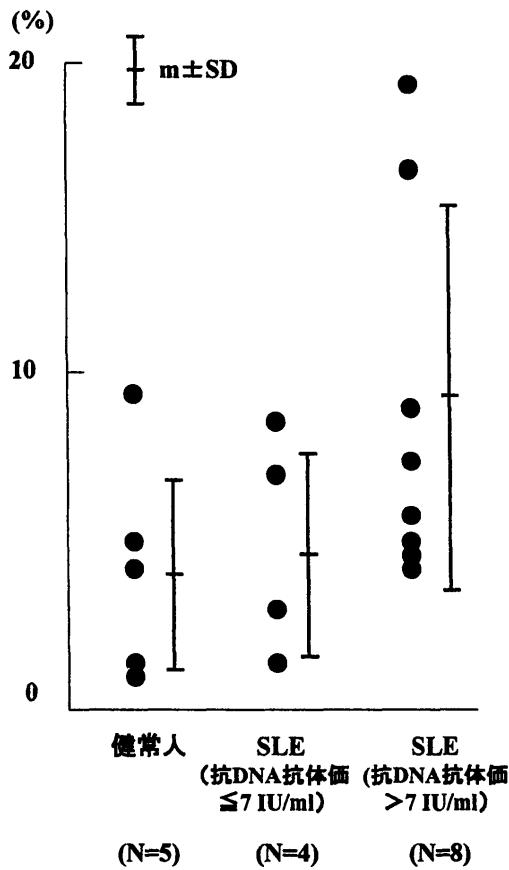


図2 CD19 陽性細胞の CD43 陽性率
各症例の末梢血 B 細胞中の CD43 陽性細胞のパーセントを示す。

結 果

1. 末梢単核細胞表面の CD43 分子の発現率
図1に健康人および SLE 症例の末梢単核細胞を抗 CD43 と抗 CD19 モノクローナル抗体で二重染色

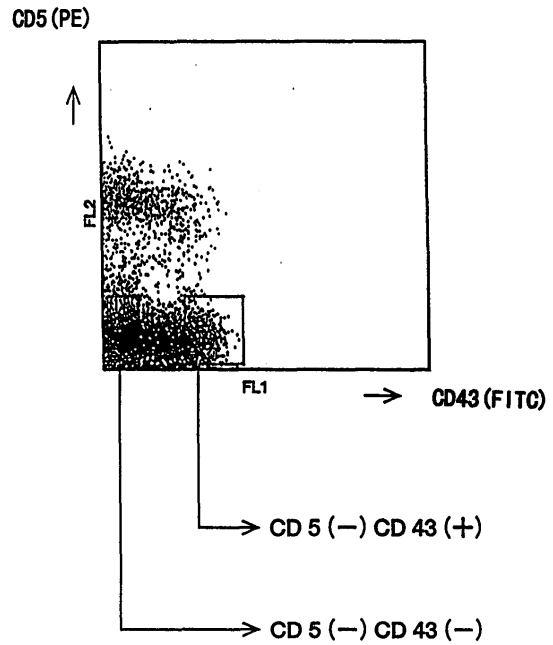


図3 SLE 症例の Cell sorting
末梢血 B 細胞で上記のように囲んだ部分を Sorting した。

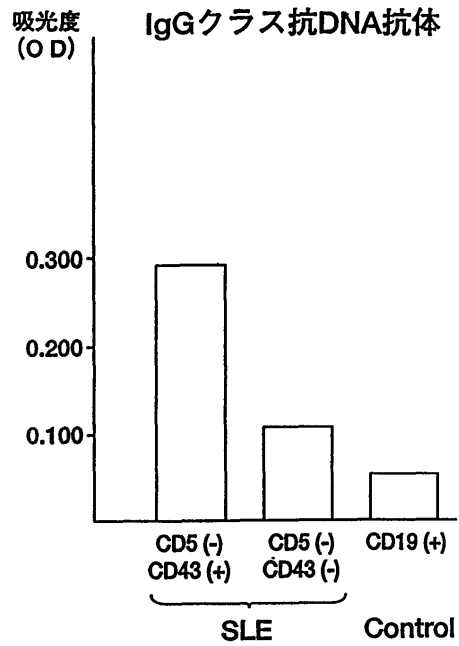
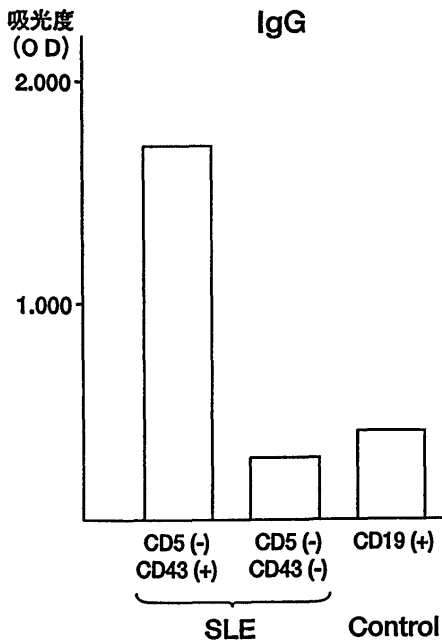


図4 SLE 症例末梢単核細胞亜分画別抗体産生量
単離した細胞を培養し、その上清中の抗体産生量を ELISA で測定した。

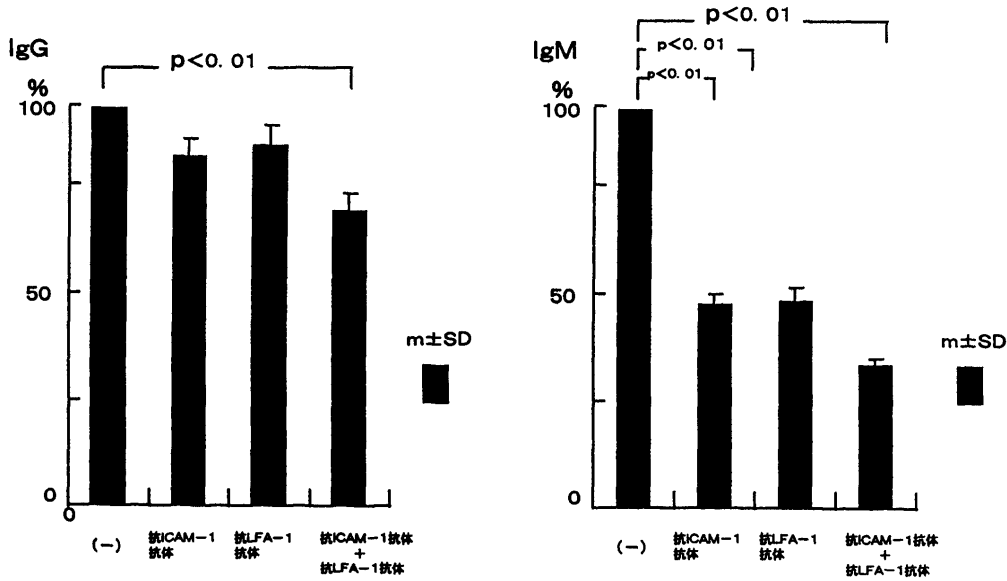


図5 健康人末梢単核細胞の免疫グロブリン産生におよぼす抗接着分子抗体の影響
健康人末梢単核細胞に各種抗体を添加培養し、その上清中の抗体産生量を比較した。

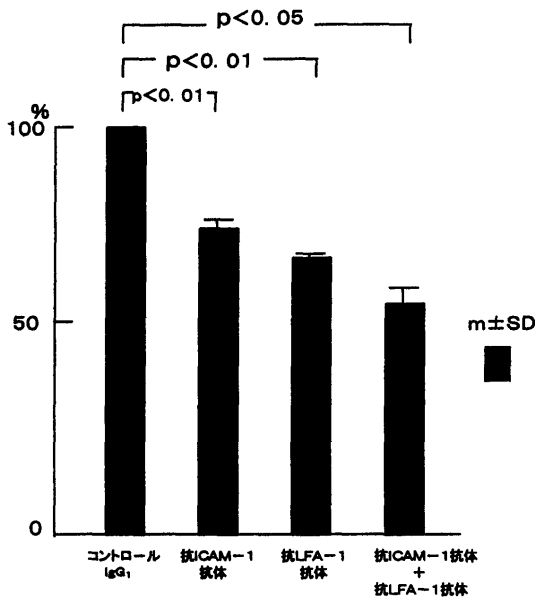


図6 SLE症例末梢単核細胞のIgGクラス抗DNA抗体産生におよぼす抗接着分子抗体の影響
SLE症例末梢単核細胞に各種抗体を添加培養し、その上清中の抗体産生量を比較した。

した結果を示した。抗DNA抗体価が高値を示す症例では、正常例に比べてCD19陽性CD43陽性細胞の増加を認めた。図2にCD43陽性細胞数のCD19陽性細胞数に対する比率を算出し得た健康人5例、抗DNA抗体正常のSLE症例4例、抗DNA抗体が高値のSLE症例8例の結果を示した。抗DNA抗体

高値のSLE症例は、健康人あるいは抗DNA抗体価正常のSLE症例に比べてB細胞中のCD43陽性細胞は増加する傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった。

2. CD43発現の有無によるB細胞の抗体産生能の比較

図3に示したように、右のCD5陰性CD43陰性細胞およびCD5陰性CD43陽性細胞をFACStarによってsortingし、10%FCS加RPMIに浮遊した。さらに6日間培養後、上清中のIgG濃度およびIgGクラス抗DNA抗体価の一例を図4に示した。IgG、IgGクラス抗DNA抗体ともに、CD43陽性細胞群で産生量が高値を示したのに対し、CD5陰性CD43陰性細胞群では、健康人のCD19陽性細胞による値と同様であった。

3. 抗接着分子抗体の抗体産生におよぼす影響

図5に健康人の末梢単核細胞に抗ICAM-1およびLFA-1抗体を添加し、6日間培養後の上清のIgG、IgM濃度の、非添加時に対する百分率を示した。培養後のviabilityは90%以上を示した。抗ICAM-1抗体、あるいは抗LFA-1抗体単独の添加で低下傾向を示し、抗ICAM-1抗体と抗LFA-1抗体の両者の添加で有意に低下した。図6にSLE症例末梢単核細胞のIgGクラス抗DNA抗体産生におよぼす抗接着分子抗体の影響を示した。抗DNA抗体価は、抗ICAM-1抗体、抗LFA-1抗体の添加で有意(p<0.01)に低下し、両者の添加でさらに低下した(p<0.05)。図7にSLE症例の末梢単核細胞

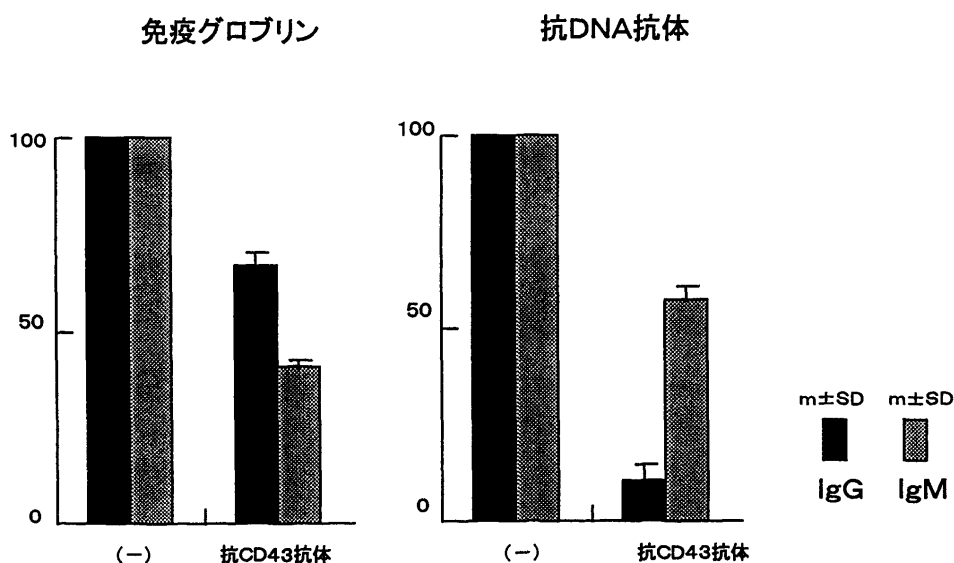


図7 SLE 症例末梢単核細胞の抗体産生におよぼす抗 CD43 体の影響
SLE 症例末梢単核細胞に抗 CD43 モノクローナル抗体を添加培養し、その上清中の抗体産生量を比較した。

の抗体産生におよぼす抗 CD43 抗体の結果を示した。抗 CD43 抗体の添加によって、非添加時に比べて IgG は 65% に、IgM は 47% に低下したが、IgG クラス抗 DNA 抗体は 12% に、IgM クラス抗 DNA 抗体は 59% に低下した。免疫グロブリン、抗 DNA 抗体ともに産生は低下した。

考 察

SLE をはじめとする自己免疫疾患は自己の成分を抗原とする全身性あるいは臓器特異性の慢性炎症を主体とした疾患であるが、その炎症部位への炎症細胞浸潤の機序に接着分子が関与していると考えられる。また、近年接着分子を介した刺激伝達の解析が進んでいる。今回、接着分子の一つとして ICAM-1 のリガンドである CD43 分子に注目した。CD43 分子は Wiskott-Aldrich 症候群のリンパ球膜蛋白の解析で、欠損または減少する蛋白として同定された^{7,8}。胸線細胞、T 細胞、一部の B 細胞、骨髄細胞、および血小板などにその発現が認められている⁹。B 細胞のうち、静止期 B 細胞上には発現せず、活性化 B 細胞上にその発現が認められている¹⁰。ヒト CD43 分子は細胞内領域、膜貫通領域、細胞外領域から構成されている¹¹。細胞内領域はリン酸化をうける部位をもっており、細胞外領域はムチン様の分子構造となっている¹²。現在、CD43 分子と SLE の間には以下のようなことが知られている。SLE のモデルマウスである NZB/W F1 マウスは高力価の抗 DNA 抗体を産生し、若齢期には IgM クラスであるが、5～6 カ月頃から IgG クラスも出現し、7 カ月齢以降

は IgG クラス優位となる。IgM クラスの抗体は CD5(+)CD43(-)、IgG クラスの抗体は CD5(-)CD43(+) 亜群の B 細胞から産生されると報告されている¹。一方、ヒトの SLE では、CD5(-) B 細胞から IgG クラスの抗 DNA 抗体が産生されることが報告されている^{13,14}。

本研究ではヒトの SLE でも、B 細胞中に CD5(-)CD43(+) の亜群が存在し、抗 DNA 抗体価の高い症例では CD43 分子の陽性率が高い傾向が認められた。また、ヒト SLE 症例において CD5(-)CD43(+) B 細胞亜群から IgG クラス抗 DNA 抗体が産生されていた。これらを考え併せると、抗 DNA 抗体産生細胞と CD43 分子との関連性が示唆されたが、活性化 B 細胞表面の CD43 分子の発現率は高いことから、単に、SLE 末梢 B 細胞の活性化を示すものとも考えられた。しかしながら、SLE 症例の末梢単核細胞に抗 CD43 抗体を添加して培養した結果、IgG、IgM 産生量がともに低下したが、その程度に比べて IgG クラスの抗 DNA 抗体の産生量が著しく低下したことから、IgG クラスの抗 DNA 抗体の産生に CD43 分子が深く関与していることが示唆された。

最近、T-B 細胞間の相互作用の上で物理的な接着が重要視されており¹⁵、ICAM-1/LFA-1 は、接着を強固にして他の分子からのシグナル伝達の調整に関与すると考えられている。また、CD43 分子は構造上、細胞内シグナル伝達に関与することが想定されている¹⁶。本研究では、抗 ICAM-1、抗 LFA-1 抗体の添加よりも、抗 CD43 抗体添加の方が高度に抗体産生が抑制されることを認めたが、このことから

B細胞上の CD43 分子が単なる活性化のマーカーではなく、細胞間刺激伝達に関与していることが示唆された。今後 CD43 分子のシグナル伝達機構が解明されれば、治療への応用の可能性もありうると思われる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました近畿大学医学部第3内科学教室堀内篤教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究に御協力頂きました教員各位に心から感謝いたします。

本論文の要旨は、April, 1996, 8th APLAR Congress of Rheumatology (Melbourne, Australia), 平成8年5月、第40回リウマチ学会総会(福島)において発表した。

本研究は大阪府特定疾患研究会の調査研究費(会員堀内篤)の補助をうけた。

文 献

- Okada T, Abe M, Takiura F, Hirose S, Shirai T (1990) Distinct surface phenotypes of B cells responsible for spontaneous production of IgM and IgG anti-DNA antibodies in autoimmune-prone NZB×NZW F1 mice. *Autoimmunity* 7: 109-120
- Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ (1991) CD43, a molecule defective in Wiscott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 354: 233-235
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 25: 1271-1277
- 横張龍一 (1986) SLE 活動性判定基準。厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班昭和60年度研究業績: 50-57
- 長沢正之 (1994) ヒトリンパ球の調整法。リンパ球機能検索法, 矢田純一, 藤原道夫編著。改訂版。東京: 中外医学社, pp. 3-5
- 新保敏和 (1994) E ロゼット法。リンパ球機能検索法, 矢田純一, 藤原道夫編著。改訂版。東京: 中外医学社, pp. 60-67
- Parkman R, Kenney DM, Remold-O' Donnell E, Perrine S, Rosen S (1981) Surface protein abnormalities in lymphocytes and platelets from patients with Wiscott-Aldrich syndrome. *Lancet* II: 1387-1389
- Remold-O' Donnell E, Kenney DM, Parkman R, Cairns L, Savage B, Rosen FS (1984) Characterization of a human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiscott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* 159: 1705-1723
- Remold-O' Donnell E, Zimmerman C, Kenny D, Rosen F (1987) Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiscott-Aldrich syndrome. *Blood* 70: 104-109.
- Wiken M, Bjozck P, Axelsson B, Perlmann P (1988) Induction of CD43 expression during activation and terminal differentiation of human B cells. *Scand J Immunol* 28: 457-464
- Cyster JC, Shotton DM, Williams AF (1991) The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J* 10: 893-902
- Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Rosen FS (1989) Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiscott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2819-2823
- Casali P, Burastero SE, Balow JE, Notkins AL (1989) High affinity antibodies to ssDNA are produced by CD⁻B cells in systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 143: 3476-3483
- Noboru S, Tsuyoshi S, Engleman EG (1990) Anti-DNA antibody production by CD5⁺ and CD5⁻ B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 85: 238-247.
- 野々山恵章 (1994) B細胞の補助。臨床免疫 26: 850-856
- Chatila TA, Geha RS (1988) Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J Immunol* 140: 4308-4314