

Thesis

全身性エリテマトーデス患者におけるカルシニューリン阻害薬投与による
T細胞受容体 ζ 鎖の発現回復と臨床効果に関する研究

臨床医学研究系 内科学 リウマチ・膠原病内科学

近藤 恒夫

【背景と目的】全身性エリテマトーデス (SLE) の病因として、我々はT細胞の近位部シグナル伝達異常に注目し、T細胞受容体 ζ 鎖 (TCR ζ 鎖) の発現低下を報告してきた。T細胞の活性化を抑制するカルシニューリン阻害薬 (CNI) であるタクロリムスがループス腎炎に有効で使用されているが、CNIがSLE患者T細胞のTCR ζ 鎖発現に与える影響については報告がない。さらにTCR ζ 鎖発現と臨床効果との関連に関しても不明であるため、これらを明らかにすることを目的とした。

【方法】対象は1997年のアメリカリウマチ学会のSLEの分類基準を満たし、新規にCNIを投与された26症例。CNI投与前と投与後で、TCR ζ 鎖の発現を免疫ブロット法で測定し、年齢、性がマッチした健康者11人と比較検討した。SLEの活動性評価は、SLEDAIと、主治医が1つ以上の病態で有効と判断した症例の割合 (主治医評価) の2つの方法で行った。

【結果】26例中20症例はタクロリムスを、6症例はシクロスポリンが投与された。男女比3:23、平均年齢44.7歳で、ステロイド併用率は88.5%、ステロイド量はプレドニゾロン換算で平均21.0 mg/日であった。治療対象病態は、関節炎9例、血球減少7例、腎症7例、発疹6例の順で多く、投与前のSLEDAIは平均 6.0 ± 4.9 と比較的低かった。CNI投与前のTCR ζ 鎖発現は全26症例中、20症例 (77%) で低下、平均発現量は健康者の55%であった。CNI投与後には、投与前にTCR ζ 鎖の発現が低下していた20症例中10症例 (全体の38%) で回復した ($P < 0.01$)。SLEDAIは投与前平均 6.0 ± 4.9 が、投与後 3.3 ± 3.4 と改善した ($P < 0.05$)。また主治医評価で有効症例は58%であった。TCR ζ 鎖の変化と臨床病態の改善との関連を検討したところ、TCR ζ 鎖非回復群では投与前後のSLEDAIに有意差は認めなかったが ($P = 0.56$)、TCR ζ 鎖回復群においては、SLEDAIは投与前 7.4 ± 2.1 、投与後は 2.1 ± 0.7 と有意に低下した ($P < 0.05$)。主治医評価でも、TCR ζ 鎖回復群において有効率は80%と高く、TCR ζ 鎖非回復群に比べ高かった ($P < 0.05$)。

【結論】SLE末梢血T細胞において発現低下しているTCR ζ 鎖がCNIの投与により回復しうることを初めて明らかにした。これはCNIがカルシニューリンを阻害しT細胞活性化を抑制するだけでなく、TCR ζ 鎖の発現を回復させる別の機序を有する可能性が考えられた。さらにTCR ζ 鎖発現の回復と臨床病態の改善との間に関連を認め、TCR ζ 鎖発現がSLEの病態に関与する可能性が示唆された。

緒言

全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus, SLE) は多種多様な臨床像を認め、自己免疫性疾患の原型と考えられている¹⁾。多彩な自己抗体とそれに伴う免疫複合体は、糸球体腎炎などに代表される組織障害を引き起こす^{2,3)}。SLEの病因は、他の疾患と同様に遺伝因子および環境因子の相互作用によると考えられているが、とりわけT細胞が重要

な役割を果たしていると考えられている^{2,4)}。さらに最近では、インターフェロン α などのタイプIインターフェロンがSLEの病態形成に重要であるとの報告もなされている⁵⁻⁷⁾。両者の相互作用が想定されるが、その関連は明らかではない。

SLE患者のT細胞では、*in vitro*および*in vivo*において、T細胞抗原受容体 (T Cell antigen receptor, TCR) -CD3複合体からの刺激に対し、T細胞の活性化能やサイトカイン産生能の低下を認める^{8,9)}が、近位部シグナルをシャントしたホルボールエステルやイオノマイシンによるプロテインキナーゼC (protein

kinase C, PKC) の直接刺激では健常者と同等のT細胞機能があることから⁹⁾, T細胞のシグナル伝達の近位部に異常が推察された. SLE患者のT細胞において, TCR ζ鎖 (CD3 ζ (zeta) 鎖, CD247) 発現の低下が報告された¹⁰⁻¹²⁾. 悪性腫瘍, 感染症, 関節リウマチなどの自己免疫疾患では, 一過性の低下を認めることがある¹³⁾が, SLE患者では半数以上の例で, 経過全体において低下を認めていた¹⁴⁻¹⁶⁾.

TCR ζ鎖が低下する機序については, これまでに転写能の低下¹¹⁾, メッセンジャーRNAのスプライシングバリエーションの生成^{10, 17-19)}, ユビキチン化の亢進²⁰⁾, カスパーゼ3依存性のタンパク分解²¹⁾, 酸化還元反応²²⁾, 酸化ストレス²³⁾, 熱刺激²⁴⁾, 慢性的な炎症状態²⁵⁾, 活性化マクロファージへの直接コンタクト²⁶⁾などが考えられている. このTCR ζ鎖の発現の低下がSLEを引き起こす機序は十分明らかではないものの, T細胞シグナル伝達においてTCR ζ鎖の下流にあるZeta-chain-associated protein kinase 70 (ZAP70) のミューテーションを持つ関節リウマチの自然発症モデルであるSKGマウスの例²⁷⁾が知られている. またTCR ζ鎖を含む10個の免疫受容体活性化型チロシンモチーフ (immunoreceptor tyrosine based activation motif, ITAM) を1つずつ欠損させたマウスにおける検討では, ITAMを4個欠損させるとSLE様の自己免疫疾患を引き起こし, さらにヒトのSLEと類似するIFN-γ, IL-2の産生も示すことから, T細胞近位部のシグナル伝達異常が自己免疫疾患を引き起こしうることが示唆されている²⁸⁻³⁰⁾. その機序としては, TCRからのシグナル伝達が弱まることにより胸腺内でのネガティブセレクションを通り抜け, 自己反応性T細胞が成熟し末梢循環に入り, 自己抗体産生, 免疫複合体形成などの免疫異常を来すことにより臓器障害が引き起こされると考えられている²⁹⁾.

TCR ζ鎖の発現低下と臨床兆候および症状との関連については, 頬部紅斑, 抗リン脂質抗体陽性, 血管炎所見と関連したとの報告¹⁴⁾, また他のグループからは, 口腔内潰瘍, 抗2本鎖DNA抗体, 血球異常と関連が報告されている¹²⁾. また, SLE患者へのステロイド投与量とTCR ζ鎖発現に関して関連は認めなかった¹⁴⁾.

カルシニューリン阻害薬は比較的新しいT細胞を主な標的とした免疫抑制剤である. イムノフィリンに結合し, カルシニューリンと相互作用してその脱リン酸化酵素の活性を阻害する. その結果, 活性化T細胞核内因子 (Nuclear Factor of Activated T-cells, NFAT) の核内移行が抑制され, NFATによって誘導される典型的なT細胞増殖分化因子であるIL-2の遺伝子をはじめとする多くのサイトカイン遺伝子の発現を抑制するT細胞特異的な免疫抑制作用をもっている³¹⁾.

2006年, 本邦においてタクロリムス (tacrolimus) が,

ループス腎炎 (ステロイド剤の投与が効果不十分, 又は副作用により困難な場合) に対して適応承認を受けた. 以前より, ネフローゼ症候群 (副腎皮質ホルモン剤に反応はするものの頻回に再発を繰り返す患者, 又は副腎皮質ホルモン剤治療に抵抗性を示す患者に限る) に対して, 適応承認されているシクロスポリン (cyclosporin) の2種のカルシニューリン阻害薬 (Calcineurin inhibitor, CNI) が, 実臨床で使用されている^{32, 33)}.

そこで我々は, T細胞異常が多く報告されているSLE患者において, CNIによるTCR ζ鎖発現への影響とその臨床効果との関連に関して全く不明であるため検討することとした.

方 法

対象

埼玉医科大学総合医療センター リウマチ・膠原病内科を受診し, 1997年のアメリカリウマチ学会のSLEの分類基準を満たし, 新規にCNIを投与されたSLE患者を対象とし, CNI投与前と投与後 (1-3ヶ月) の2ポイントで末梢血を採取した. また, 健常者11人を対照とし, 末梢血を採取した.

本研究は, 埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会の承認 (通知番号637) を得て実施した.

末梢血単核球の分離, 調整

対象者より採取されたヘパリン添加末梢血をphosphate buffered saline (PBS, SIGMA, MO, USA) で1:1の比率で希釈した後, Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, London, UK) の上層に充填, 400 gで30分間遠心し, 末梢血単核球 (peripheral blood mono-nuclear cell, PBMC) 分画を回収し, PBSで洗浄し調整した.

免疫ブロット法によるタンパク発現量解析

PBMCの一部をlysis buffer (M-PER, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) に溶解し, BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて蛋白量を測定した. TCR ζ鎖測定に際しては, 1レーンに5-10 ng, βアクチン測定に際しては1レーンに2 ngのタンパクを含む細胞溶解液を使用した. 細胞溶解液は2×SDS-loading bufferと還元剤である2-Mercaptoethanol (2-ME, Sigma, MO, USA) に混合した後, 95℃で5分間加熱処理し, 15%のSDS-ポリアクリルアミドゲル (PAGE) に充填し, 電気泳動を行った. 続いてPVDFメンブレンフィルター (Millipore, MA, USA) に転写した. メンブレンは, BlockAce Powder 4 g/100 mlH₂O (DS Biomedical, 大阪, 日本) で4℃, 12時間ブロッキングした後, 抗TCR ζ鎖モノクローナル抗体 (TIA2, Beckman Coulter, CA, USA), 抗β-アクチン抗体 (A5441, SIGMA, MO, USA) を1,000倍希釈にて, 一晩4℃でインキュベートした. 翌日, メンブレンをWashing Buffer (20 mM Tris-HCl

pH7.4, 0.1% Tween 20, 2.44% Block Ace) で洗浄した後, HRP 結合二次抗体 (ECL anti mouse-IgG, Horse Radish Peroxidase linked whole antibody, GE Healthcare, London, UK) を加えて室温で 60 分間インキュベートした. 最終的に ECL system (GE Healthcare, London, UK) を使用して発色を行い, ChemiDoc XRS plus (Bio Rad, CA, USA) を用いて測定した. TCR ζ 鎖タンパク濃度は, β -アクチンのタンパク濃度で補正し, 健常者平均を 1 とした相対比とした.

臨床情報の収集と SLE の活動性評価

臨床症状, 兆候, 診察所見および臨床検査結果等の臨床情報をカルテより収集し, その評価を行った. 疾患の活動性評価は全身性エリテマトーデス疾患活動性指数 (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, SLEDAI) と主治医評価の 2 つの方法で行った. SLEDAI はカルテ記載や臨床データを参照して算出した. 主治医評価は, 主治医が 1 つ以上の臨床病態が改善したと判断した症例を有効とし, その割合で評価した. 治療対象となった各病態の有効基準を以下のようにした.

精神症状: 精神症状の消失

関節炎: 半数以上の関節炎の改善

筋炎: 筋把握痛の消失, CK が正常範囲に回復, または 1/2 以下に低下

腎症: 尿蛋白, 尿潜血, または尿円柱のいずれかの消失

発疹: 消失, または病変面積が 1/2 以下に改善

口腔内潰瘍: 口腔内潰瘍の消失

胸膜炎: 胸部レントゲン, または胸部 CT による胸水の低下

発熱: 体温 37 度以下に低下

抗 2 本鎖 DNA 抗体: 正常範囲に回復, または 1/2 以下に低下

血球減少, 補体: 正常範囲に回復, または 2 倍以上に増加

統計解析

統計的有意差は paired two-tailed Student t test にて検討し, $p < 0.05$ で有意差ありと判定した.

結 果

新規に CNI を投与され, 同意を得られた SLE26 例を対象とし, 性別, 年齢を適合させた 11 人の健常者と比較し評価を行った. そのうち, 20 症例はタクロリムスを投与され, 6 症例はシクロスポリンを投与された (表 1). 2 剤の選択に関しては, 各主治医の判断により決定された.

SLE26 例の患者背景をみると, 男女比 3:23, 平均年齢 44.7 歳で, ステロイド併用率は, 26 症例中 23 症例 (88.5%) と高かった. ステロイドを併用されなかった残りの 3 例は寛解導入目的に単剤投与され

ていた. ステロイド平均投与量もプレドニゾロン換算で 21.0 mg/日と比較的多い量であった. CNI の平均投与量は, それぞれ, タクロリムス 2.5 mg/日, シクロスポリンは 130 mg/日であった. 男女比, 平均年齢, ステロイド併用割合および投与量, 投与前 SLEDAI は, 薬剤間で有意差は認めなかった.

治療の対象になった病態は, 関節炎 9 例, 血球減少 7 例, 腎症 7 例, 発疹 6 例の順で多く (一部重複を含む), SLEDAI はタクロリムスで 6.7, シクロスポリンで 2.9 と比較的低かった. CNI 投与前と投与後の間隔は, 4.5 ± 2.8 週であった. 観察期間内において有害事象に伴う CNI の中止例は認めなかった.

CNI 投与前の TCR ζ 鎖発現は健常者に比し低下し, 投与後に改善した (図 1A, B). 平均発現量でみると健常者の 55% に減少していた ($P < 0.001$ vs. 健常者, 図 1B). CNI 投与後には, 投与前に TCR ζ 鎖が低下していた 20 症例中 10 症例 (低下例のうち 50%, 全体の 38%) で TCR ζ 鎖発現が回復した ($P < 0.01$). 投与後の TCR ζ 鎖発現の平均値は健常者と有意差なく同程度であった (図 1B).

全 26 例の SLEDAI に含まれる臨床所見と TCR ζ 鎖発現の低下とその回復について表 2 にまとめた. 各臨床所見と TCR ζ 鎖低下と関連をみると, 関節炎のみが有意に関連した ($P < 0.05$). TCR ζ 鎖の低下と投与前ステロイド量, SLEDAI には, 有意な相関はなかった ($P = 0.29, 0.28$).

次に, 活動性の変化, すなわち CNI による臨床効果との関連に注目し検討した. SLEDAI は投与前平均 6.0 ± 4.9 が, 投与後 3.3 ± 3.4 と有意に改善した ($P < 0.05$, 図 2A). 今回, 平均約 4.5 週後での SLEDAI 低下率は 55% であったが, 当教室が以前に報告したタクロリムス投与 SLE 21 例における 4 週後の SLEDAI の低下率は 64% でほぼ同様の結果であり, 過去の CNI の効果を傍証できた⁵²⁾. また, 主治医評価では, タクロリムスで 55% (11/20 症例), シクロスポリンで 67%

表 1. 対象患者の背景と治療標的病態

	計 (n=26)	タクロリムス [Tac] (n=20)	シクロスポリン [CsA] (n=6)	P 値
平均年齢: 歳 (range)	44.7 (17-75)	43.8 (19-75)	47.8 (17-75)	0.63
性別 (男性: 女性)	3:23	2:18	1:5	0.67
カルシニューリン阻害薬 投与量: mg/日 (range)		2.5 (1-3)	130 (75-175)	
ステロイド併用割合: %	88.5 (23/26)	90.0 (18/20)	83.3 (5/6)	0.73
平均量: mg/日 (range)	21.0 (0-60)	21.4 (0-50)	19.6 (0-60)	0.85
治療対象病態	関節炎 (n=9) 血球減少 (n=7) 腎症 (n=7) 発疹 (n=6)	関節炎 (n=7) 血球減少 (n=6) 発疹 (n=5) 腎症 (n=4)	腎症 (n=3) 関節炎 (n=2)、 発疹 (n=1) 血球減少 (n=1)	
投与前 SLEDAI* (range)	6.0 (0-20)	6.7 (0-20)	2.9 (0-6)	0.17

* SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (全身性エリテマトーデス疾患活動性指数)

(4/6症例)が有効であった(図2B)。

TCR ζ 鎖の発現量とCNIによる治療後の変化により、3群に分けて検討した(図3A)。健常者平均 $\pm$ SD未満のものをTCR ζ 鎖低下ありとし、それ以上のものをTCR ζ 鎖低下なしとした。後者を「TCR ζ 鎖非低下群」と定義した。また、前者のTCR ζ 鎖の低下を認める症例のうち、CNI投与後にTCR ζ 鎖の発現量が1.5倍以上になった群を「TCR ζ 鎖回復群」とし、1.5倍未満の群を「TCR ζ 鎖非回復群」と定義した。TCR ζ 鎖回復群は10症例、非回復群は10症例、非低下群は6症例であり、3群間の患者背景に有意差はなかった(性別:P=0.11, 年齢:P=0.32, タクロリムス投与量:P=0.16, シクロスポリン投与量:P=0.28, 併用ステロイド量:P=0.75, 治療前SLEDAI:P=0.59)。TCR ζ 鎖非低下群では投与前のSLEDAIは 3.2 ± 1.4 , 投与後は 2.0 ± 1.4 , TCR ζ 鎖非回復群では投与前のSLEDAIは 6.6 ± 1.4 , 投与後は 5.2 ± 1.4 と両者とも有意差は認めなかった(P=0.56, 0.51)。一方、TCR ζ 鎖回復群においては、投与前 7.4 ± 2.1 で、投与後は 2.1 ± 0.7 と有意な低下を認めた(P<0.05,

図3B)。同様に、主治医評価による有効例の割合は、非低下群で67%(4/6症例)、非回復群で30%(3/10症例)、回復群で80%(8/10症例)と、TCR ζ 鎖回復群で有効例が有意に多かった(P<0.05, 図3C)。さらにTCR ζ 鎖回復と各病態との関係について検討したところ、関節炎に対する臨床効果においてTCR ζ 鎖回復群と非回復群の間に有意差を認めた(P<0.05, 図4)。血球減少、腎炎、発疹に関しては、TCR ζ 鎖の回復の有無と臨床効果に有意な関連は認められなかった(P=0.17, 0.54, 0.54)。

考 察

投与薬剤と治療病態の選択バイアス

対象となった症例のCNIの選択は、タクロリムス20例、シクロスポリン6例と差があった。前者はループス腎炎の保険適応があるものの、後者は日本ではネフローゼ症候群には保険適応があるが、ループス腎炎、SLEに対しては保険適応となっていないこと、タクロリムスの方が容量調節において簡便であることが症例数の違いになったと考えられる。今回症例数

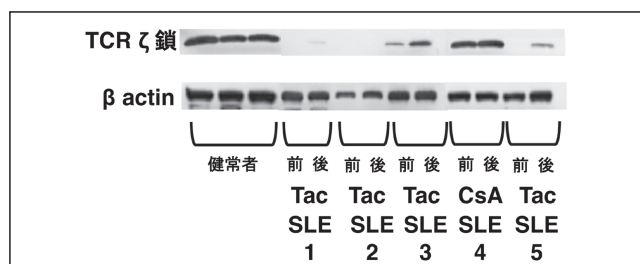
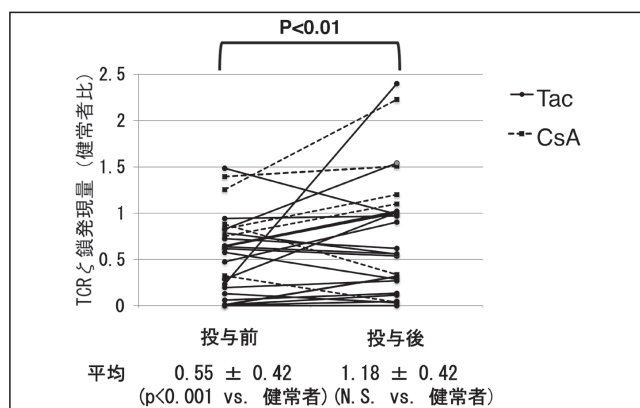


図1. TCR ζ 鎖発現とカルシニューリン阻害薬(CNI)投与に伴う変化。(A)免疫ブロット法によるTCR ζ 鎖発現の比較。前;投与前, 後;投与後。TCR ζ 鎖:T細胞受容体 ζ 鎖, Tac:タクロリムス, CsA:シクロスポリン。PBMC分離後, M-PERに溶解し, タンパク濃度を一定とし, 15% SDS-PAGEで電気泳動を行い, PVDFメンブレンに転写した。その後, ブロッキングし1次抗体(抗TCR ζ 鎖モノクローナル抗体;TIA-2, 抗 β アクチンモノクローナル抗体), その後2次抗体を抗マウスポリクローナル抗体で免疫ブロットを行った。代表的な結果として, 健常者3名とSLE1-5の5症例を示す。



(B) CNI投与前後のTCR ζ 鎖発現量の比較。全26症例において, 免疫ブロット法で得られたバンドをImage Lab™2.0ソフトウェアで定量化し, β アクチンで補正し, 健常者を1として比で示している。

に差があるものの、患者背景に関しては大きな差はなかった(表1)。男女比、投与平均年齢をみる限り、実臨床を反映する症例が対象とされていた。CNI治療の対象病態は、関節炎、血球減少、腎症、発疹の順に多く、投与前のSLEDAI平均6.0と比較的軽度の症例が多く、これは過去のタクロリムスの臨床効果報告と類似した結果であった³⁴⁾。これは、SLEにおいて、より重篤の病態、例えば重症ループス腎炎、中枢神経病変、血管炎などの生命予後やADLに大きく関わるような病態では、より効果が確実で、エビデンスが確立しているステロイド治療や、ステロイドにシクロフォスファミドを加えた併用療法など^{35, 36)}が選択されている可能性があった。

CNI投与前TCR ζ 鎖の発現量と臨床兆候

CNI投与前TCR ζ 鎖の発現量と、ステロイド量の相関は認めなかった(表2)。また、SLEDAIとの相関も認めず、これまで報告と類似した結果であった¹⁴⁾。TCR ζ 鎖と臨床症状との関係に関して、過去のTCR ζ 鎖の低下と臨床的特徴として、口腔内潰瘍、抗2本鎖DNA抗体、血球異常や¹²⁾、頬部紅斑、抗リン脂質抗体陽性、血管炎所見¹⁴⁾が報告されているが、今回の検討では関節炎のみ有意であった。この相違は、今回の研究ではCNIが対象病態にもつSLE患者のみがエントリーされ、関節炎があった患者が比較的多く、過去に報告があった病態の症例が少なかったためと考えられる。

SLE患者におけるTCR ζ 鎖発現の低下とCNI投与による回復

SLE患者でのTCR ζ 鎖発現の低下は過去に報告があり^{10-12, 14)}、今回免疫ブロット法で再確認された

(図1A, B)。以前我々はSLE44症例において、25症例(57%)のTCR ζ 鎖発現低下を認めた¹⁴⁾が、今回の結果では26症例中20症例(77%)と高率であった。これは、以前の検討では非活動性SLEがエントリーされていたが、今回は活動性がある症例のみがエントリーされたためと考えられた。

そして、今回そのTCR ζ 鎖発現の低下がCNI投与に伴い回復を認めた。そのTCR ζ 鎖回復の機序は今回の検討ではわかっていない。CNIであるタクロリムスは12キロダルトンFK506結合タンパク質(12-kDa FK506-binding protein; FKBP-12, K506はタクロリムスの開発時の名称)と、シクロスポリンはシクロフィリンと異なるイムノフィリンと結合し、カルシニューリンを阻害しNFAT産生を抑制、結果としてT細胞の活性化を抑え、臨床効果を発揮していると考えられている³¹⁾が、この従来から考えられている機序ではTCR ζ 鎖回復の機序は説明できない。SLEにおけるTCR ζ 鎖の回復に関して、シロリムス(ラパマイシン[®])で1論文報告がある³⁷⁾。シロリムスはタクロリムスと同じイムノフィリンであるFKBP-12と複合体形成するもののカルシニューリンの活性には作用せず、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mammalian target of rapamycin: mTOR)と結合し、細胞周期の進行のG1期からS期への移行に作用し代謝拮抗薬と考えられている³⁸⁾。Fernandezらはシロリムス投与により、最終的にリソソームに作用しTCR ζ 鎖を回復するという機序を報告している³⁷⁾。シロリムスの免疫の調節作用に関して単一の機序ではなく、いくつかの機序が考えられているが³⁹⁾、タクロリムス、シクロスポリンのCNIでも同様に

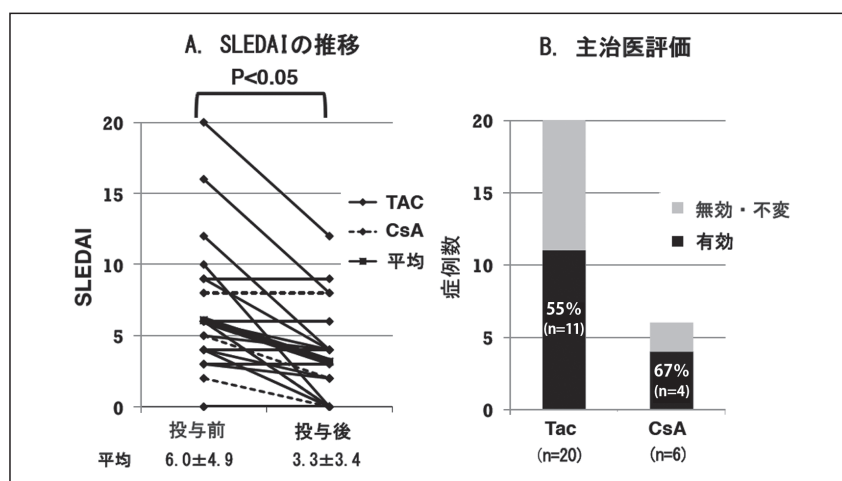


図2. 臨床効果. (A) SLEDAIの推移. SLEDAI: 全身性エリテマトーデス疾患活動性指数. 全26症例と平均の治療前と治療後(平均4.5 ± 2.8週後)のSLEDAIの推移を示した. (B) 主治医評価. 主治医が少なくとも1つの病態が改善したものを有効、それ以外のものを無効・不変とし定義し、タクロリムス、シクロスポリンで分けて評価した. 全体では、有効が26症例中15例(58%)、無効・不変が26症例中11症例(42%)であった。

複数の機序によるT細胞を抑制，調節している可能性がある。TCR ζ 鎖発現の低下の機序は複数考えられており^{10, 11, 17-25)}，CNI投与前後においてそれらの変化の検討が必要である。

CNI投与によるTCR ζ 鎖発現回復と臨床病態の改善の相関

今回CNI投与に伴うTCR ζ 鎖の回復を認めたが，そのTCR ζ 鎖の回復と臨床病態について検討した

ところ，TCR ζ 鎖発現の回復群において臨床病態の改善が有意に認められ(図3, 4)，CNI投与に伴うTCR ζ 鎖発現の回復が臨床病態の改善に寄与する可能性が示唆された。過去の報告¹⁴⁾や今回のCNI投与前の1時点(表2左部分)でのTCR ζ 鎖発現と臨床病態の症例間における解析では，TCR ζ 鎖の発現低下は疾患活動性であるSLEDAIと相関は認めない。しかし，今回各々の症例においてCNI投与前後という経過で

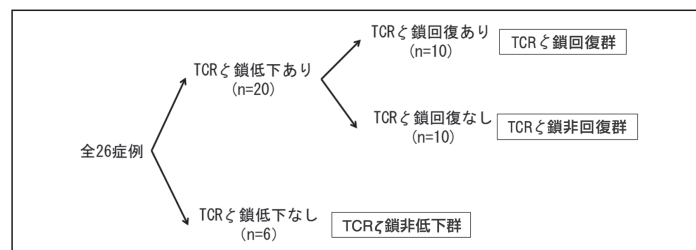
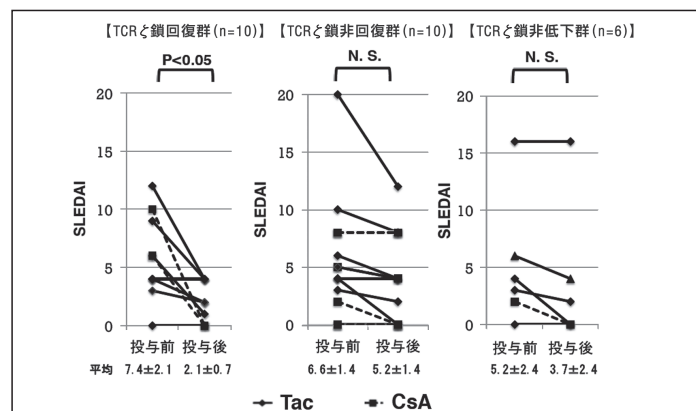
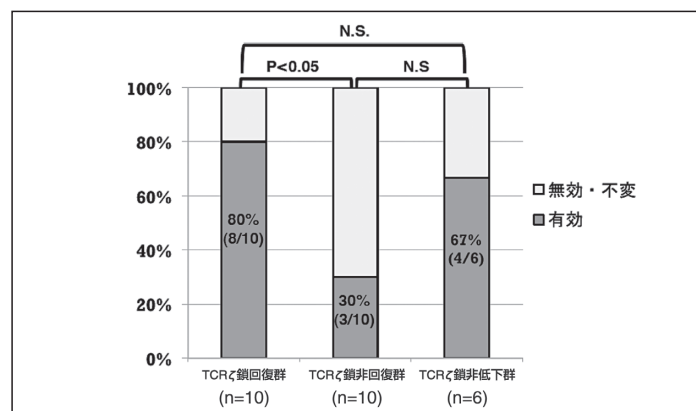


図3. TCR ζ 鎖回復と臨床効果の関連. (A) TCR ζ 鎖推移による分類. 健常者平均 $\pm$ SD未満のものをTCR ζ 鎖低下ありとし，それ以上のものをTCR ζ 鎖低下なしとした。後者を「TCR ζ 鎖非低下群」と定義した。また，TCR ζ 鎖の低下を認める症例のうち，TCR ζ 鎖の発現量が1.5倍以上になった群を「TCR ζ 鎖回復群」とし，1.5倍未満の群を「TCR ζ 鎖非回復群」と定義した。



(B) SLEDAIの推移. TCR ζ 鎖回復群 (n = 10), TCR ζ 鎖非回復群 (n = 10), TCR ζ 鎖非低下群 n = 6) の3群において，SLEDAIの変化により臨床効果を比較した。それぞれの群で背景に有意差は認めなかった。



(C) 主治医評価. 前述のように主治医が少なくとも1つの病態が改善したものを有効，それ以外のものを無効・不変と定義し，TCR ζ 鎖回復群，非回復群，非低下群の3群に分けて評価を行った。

評価した場合、発現回復と臨床効果は相関を認めた。このことは、SLE 全症例に TCR ζ 鎖発現と臨床病態に相関があるのではなく、SLE の中に TCR ζ 鎖と臨床病態が密接に相関する病態が混在している可能性を示唆する。今回、活動性 SLE26 症例の 77% (20 症例) において TCR ζ 鎖低下を認め (TCR ζ 鎖発現低下あ

り症例)、その半数の 10 症例 (全体の 38%) で CNI 投与によって TCR ζ 鎖の回復を認め (TCR ζ 鎖回復群)、さらにその TCR ζ 鎖回復 10 症例のうち 8 症例 (全体の 30%) で臨床病態も改善 (主治医評価) していた。このことから、少なくとも今回の症例の 30%, 8 症例において CNI で改善する TCR ζ 鎖低下の機序を有し、

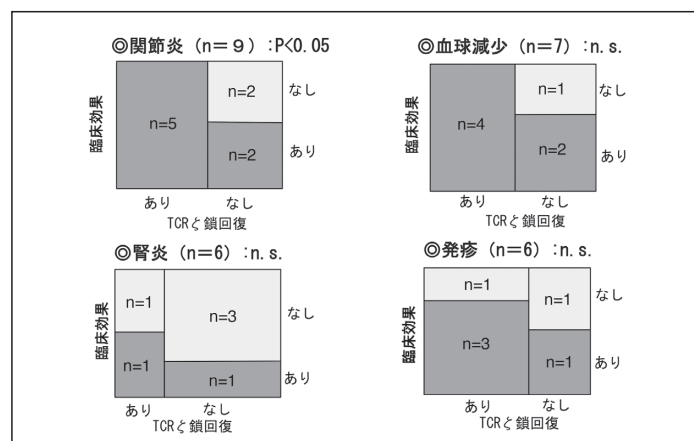


図 4. TCR ζ 鎖回復と各病態の関連。それぞれの病態を TCR ζ 鎖回復の有無で治療反応率を比較した。

表 2. 治療前後の SLEDAI と TCR ζ 鎖発現

患者	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
年齢	68	27	53	21	28	55	50	47	75	73	41	40	58	22	33	40	49	19	74	34	60	36	75	23	44	17
性別	男	女	女	女	女	女	女	女	女	女	女	女	男	女	女	女	女	女	女	女	女	女	男	女	女	女
カルシニューリン阻害薬*	C	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	C	C	C	C
痙攣 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
精神症状 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
脳炎 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
血管炎 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
関節炎 (4)	0	4	0	0	4	0	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	4	4
筋炎 (4)	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
尿円柱 (4)	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
血尿 (4)	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	4	0
蛋白尿 (4)	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	4
膿尿 (4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
発疹 (2)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
脱毛 (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
口腔内潰瘍 (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
胸膜炎 (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
心膜炎 (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
補体低下 (2)	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	0	2	2	2	0	2	0	2	0	0	0	0	2	2	0	0
抗 DNA 抗体高値 (2)	2	2	0	0	2	2	0	2	2	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
発熱 (1)	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
血小板減少 (1)	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
白血球減少 (1)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SLEDAI (治療前)	2	12	4	4	9	4	4	20	5	3	6	5	7	6	4	8	10	16	8	0	0	4	3	6	8	10
(治療後)	0	4	2	4	4	0	4	12	4	2	0	4	7	4	0	8	8	16	8	0	0	4	2	0	8	0
PSL (mg/day)	3	0	40	50	50	3	5	10	60	0	20	5	5	9	20	10	50	40	12	10	15	50	30	20	5	0
TCR ζ 鎖低下	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
TCR ζ 鎖回復 (>1.5 倍)	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+

*T: タクロリムス, C: シクロスポリン

TCR ζ 鎖低下は、健常者平均 $\pm$ SD 以下のものを + とし、それ以外を - とした。また、TCR ζ 鎖回復は、TCR ζ 鎖の低下がある症例の中で、TCR ζ 鎖のタンパク量が 1.5 倍以上になったものを +、それ未満を - とした。

それが臨床病態と密接に関わっていた可能性が示唆された。一方、TCR ζ 鎖が低下していたがCNI投与でTCR ζ 鎖が回復しなかった10症例とTCR ζ 鎖の回復があったが臨床病態の改善と相関がはっきりしない2症例においてはTCR ζ 鎖低下が病態を引き起こしている可能性は考えられるものの、CNIが十分量であるか、ステロイドをはじめとした他の薬剤ではどうか、現行の薬剤では回復できないTCR ζ 鎖低下の機序を有している可能性はどうか、などを検討する余地を残した。また、症例は少ないもののTCR ζ 鎖非低下群 ($n = 6$) では、TCR ζ 鎖回復群に比べCNIの有効性に明確ではないことも併せて考慮すると、CNIがSLEの病態に効果を示す主要の機序としてTCR ζ 鎖の回復が関与している可能性が示唆され今後検討の余地を残した。

今回の研究で、CNI投与によるTCR ζ 鎖発現回復と臨床病態の改善の相関を認める結果から、SLEのTCR ζ 鎖発現低下がSLEの原因や病態に深く関与している可能性が示唆された。

SLEの現状とTCR ζ 鎖回復の意義

SLEの治療に関しては、ステロイド抵抗例や減量困難例、それに伴う副作用など多々の課題が残されている。現在、新規治療薬として、TまたはB細胞レベルで抑える治療、細胞内のシグナルを抑える治療、サイトカインを抑える治療など様々のアプローチで新規治療薬が考えられている⁴⁰⁾。今回、われわれはCNIにより、臨床症状の改善とともに、病因の一部の可能性のあるTCR ζ 鎖発現の回復を確認し、その相関を認めた。この発現回復の機序、その回復と臨床症状の改善の関係を解明することで、SLEの病因の解明と、より特異的な新規治療薬の開発につながると考えられる。

結 論

本研究は、SLE末梢血T細胞において発現低下しているTCR ζ 鎖がカルシニューリン阻害薬の投与により回復しうることを初めて明らかにした。さらにこのTCR ζ 鎖発現の回復と臨床病態の改善との間に関連を認めたことから、TCR ζ 鎖発現が、SLEの病態への関与の可能性をも示唆するものと考えられた。そして、カルシニューリン阻害薬のSLEにおける作用機序として、カルシニューリンを阻害することによりT細胞活性化を抑制するという従来の機序に加えて、本研究よりカルシニューリン阻害薬がTCR ζ 鎖発現を回復させることにより、正常なT細胞シグナル伝達へと回復させる新たな機序も考えられた。

TCR ζ 鎖発現回復の詳細な機序については今後の検討課題として残されたものの、本研究はSLEの治療薬であるカルシニューリン阻害薬の新たな効果を明らかにした点において意義があるものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました埼玉医科大学総合医療センター リウマチ・膠原病内科 天野宏一先生、慶應義塾大学リウマチ内科 竹内勤先生、鈴木勝也先生、実際の実験テクニックをご指導いただいた慶應義塾大学リウマチ内科 吉本桂子先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Mills JA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1994;330(26):1871-9.
- 2) Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001;345:340-50.
- 3) Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2008;358(9):929-39.
- 4) Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T, Yoshimoto K, Shiraishi K, Kameda H, et al. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2005;38(5):339-46.
- 5) Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(5):2610-5.
- 6) Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003;197(6):711-23.
- 7) Crow MK. Interferon-alpha: a new target for therapy in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum* 2003;48(9):2396-401.
- 8) Kammer GM, Perl A, Richardson BC, Tsokos GC. Abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2002;46(5):1139-54.
- 9) Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T. Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* 2004;3(3-4):273-91.
- 10) Takeuchi T, Tsuzaka K, Pang M, Amano K, Koide J, Abe T. TCR zeta chain lacking exon 7 in two patients with systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 1998;10(7):911-21.
- 11) Liossis SN, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* 1998;101:1448-57.

- 12) Li R, Yang W, Zhang J, Hirankarn N, Pan HF, Mok CC, et al. Association of CD247 with systemic lupus erythematosus in Asian population. *Lupus* 2012 Jan;21(1):75-83.
- 13) Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 2004;4(9):675-87.
- 14) Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Amano K, Abe T, et al. Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor zeta chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* 2002;129(1):160-8.
- 15) Brundula V, Rivas LJ, Blasini AM, Paris M, Salazar S, Stekman IL. Diminished levels of T cell receptor zeta chains in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:1908-16.
- 16) Nambiar MP, Mitchell JP, Ceruti RP, Malloy MA, Tsokos GC. Prevalence of T cell receptor zeta chain deficiency in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2003;12(1):46-51.
- 17) Nambiar MP, Enyedy EJ, Warke VG, Krishnan S, Dennis G, Kammer GM, et al. Polymorphisms/mutations of TCR-zeta-chain promoter and 3' untranslated region and selective expression of TCR zeta-chain with an alternatively spliced 3' untranslated region in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity* 2001;16(2):133-42.
- 18) Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, et al. TCR zeta mRNA with an alternatively spliced 3'-untranslated region detected in systemic lupus erythematosus patients leads to the down-regulation of TCR zeta and TCR/CD3 complex. *J Immunol* 2003;171(5):2496-503.
- 19) Tsuzaka K, Onoda N, Yoshimoto K, Setoyama Y, Suzuki K, Pang M, et al. T-cell receptor zeta mRNA with an alternatively spliced 3' untranslated region is generated predominantly in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. *Mod Rheumatol* 2002;12:167-73.
- 20) Nambiar MP, Krishnan S, Warke VG, Tsokos GC. TCR zeta-chain abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Med* 2004;102:49-72.
- 21) Krishnan S, Kiang JG, Fisher CU, Nambiar MP, Nguyen HT, Kyttaris VC, et al. Increased caspase-3 expression and activity contribute to reduced CD3zeta expression in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol* 2005;175(5):3417-23.
- 22) Maurice MM, Nakamura H, van der Voort EA, van Vliet AI, Staal FJ, Tak PP, et al. Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1997;158:1458-65.
- 23) Gringhuis SI, Papendrecht-van der Voort EA, Leow A, Nivine Levarht EW, Breedveld FC, Verweij CL. Effect of redox balance alterations on cellular localization of LAT and downstream T-cell receptor signaling pathways. *Molecular & Cellular Biology* 2002;22:400-11.
- 24) Nambiar MP, Fisher CU, Enyedy EJ, Warke VG, Krishnan S, Tsokos GC. Heat stress downregulates TCR zeta chain expression in human T lymphocytes. *J Cell Biochem* 2000;79:416-26.
- 25) Isomaki P, Panesar M, Annenkov A, Clark JM, Foxwell BM, Chernajovsky Y, et al. Prolonged exposure of T cells to TNF down-regulates TCR zeta and expression of the TCR/CD3 complex at the cell surface. *J Immunol* 2001;166:5495-507.
- 26) Aoe T, Okamoto Y, Saito T. Activated macrophages induce structural abnormalities of the T cell receptor-CD3 complex. *J Exp Med* 1995;181:1881-6.
- 27) Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 2003;426(6965):454-60.
- 28) Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, et al. A splice variant of the TCR zeta mRNA lacking exon 7 leads to the down-regulation of TCR zeta, the TCR/CD3 complex, and IL-2 production in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol* 2005;174(6):3518-25.
- 29) Holst J, Wang H, Eder KD, Workman CJ, Boyd KL, Baquet Z, et al. Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* 2008;9(6):658-66.
- 30) Yoshimoto K, Setoyama Y, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Reduced expression of TCR zeta is involved in the abnormal production of cytokines by peripheral T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010. pii: 509021.
- 31) Seibchrer SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992;13(4):136-42.

- 32)Ogawa H, Kameda H, Amano K, Takeuchi T. Efficacy and safety of cyclosporine A in patients with refractory systemic lupus erythematosus in a daily clinical practice. *Lupus* 2010;19(2):162-9.
- 33)Germano V, Picchianti Diamanti A, Ferlito C, Podestà E, Salemi S, Migliore A, et al. Cyclosporine A in the long-term management of systemic lupus erythematosus. *J Biol Regul Homeost Agents* 2011;25(3):397-403.
- 34)Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, 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;31(6):757-63.
- 35)Hahn BH. Targeted therapies in systemic lupus erythematosus: successes, failures and future. *Ann Rheum Dis* 2011;70(Suppl 1);i64-6.
- 36)Houssiau FA, Vascounelos C, D'Cruz D, Cosyns JP, Cervera R. The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide; *Arthritis Rheum* 2002;46(8):2121-31.
- 37)Fernandez DR, Telarico T, Bonilla E, Muller-Esterl W, Perl A. Activation of mammalian target of rapamycin controls the loss of TCRzeta in lupus T cells through HRES-1/Rab4-regulated lysosomal degradation. *J Immunol.* 2009;182(4):2063-73.
- 38)Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Lane WS, Schreiber SL, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994;369(6483):756-8.
- 39)Fernandez D, Perl A. mTOR signaling: a central pathway to pathogenesis in systemic lupus erythematosus? *Discov Med* 2010;9(46):173-8.
- 40)Lo MS, Tsokos GC. Treatment of systemic lupus erythematosus: new advances in targeted therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1247(1):138-52.