総 説

関節リウマチの根治的治療を目指して—Epstein-Barr ウイルスと
感染制御遺伝子 (SAP) の応用の可能性武井正美^{*1}, 北村 登^{*1}, 白岩秀隆^{*1}, 猪股弘武^{*1}, 野崎高正^{*1}
桑名慶和^{*1}, 塩崎昌亮^{*1}, 澤田滋正^{*1}, 石渡哲義^{*2}The possible curative therapy for rheumatoid arthritis—EBV infection control gene
SAP and its applicationMasami TAKEI^{*1}, Noboru KITAMURA^{*1}, Hidetaka SHIRAIWA^{*1}, Hiromu INOMATA^{*1}, Takamasa NOZAKI^{*1},
Yosikazu KUWANA^{*1}, Masaaki SHIOZAKI^{*1}, Shigemasa SAWADA^{*1} and Tetsuyoshi ISHIWATA^{*1}^{*1}Division of Hematology and Rheumatology Department of Medicine, Nihon University School of Medicine^{*2}Kyowa Hakko Chemical Co., LTD Tokyo Research Laboratories

(Received April 14, 2008)

summary

Epstein-Barr virus (EBV) belong to herpes virus group. This virus is transmitted by human contact and cause primary infection and may exist even for years in a latent state in healthy individuals. This virus may be reactivated by the dysregulation of the host immune system or possibly by virus mutation. Here we have firstly demonstrated the host defense of EBV infection and association of EBV with rheumatoid synovitis, and then discussed our own ideas of the possible treatment in near future. The key points of this new therapy are SAP (signaling lymphocytic-activation molecule associated protein) or SH2D1A (Src homology 2 domain-containing protein). SAP (or SH2D1A), an adaptor-like molecule expressed in immune cells, is composed almost exclusively of a Src homology 2 (SH2) domain. In humans, SAP is mutated and either absent or non-functional in X-linked lymphoproliferative (XLP) syndrome (Duncan disease), a disease characterized by an inappropriate response to EBV infection. SAP is essential for late B cell help and the development of long-term humoral immunity. New approach to the therapeutic method for EBV might be opened by the regulation of this molecule (SAP)

Key words—Epstein-Barr virus; signaling lymphocytic-activation molecule associated protein (SAP); rheumatoid arthritis; therapy

抄 録

Epstein-Barr ウイルス (EBV) はヘルペスウイルス群に属し, 感染後潜在化し, 一生を終わる. 免疫抑制剤などで再活性化し, 生体に重篤な状態を起こす. EBV 関連疾患群である難病の病態に再活性化を起こし関与している可能性がある. 関節リウマチ (RA) 滑膜炎での EBV の関与について最初に述べ, 根治的治療の可能性について考察する. 新たな治療戦略のキーワードは我々が発見し, クローニングした SAP (signaling lymphocytic-activation molecule associated protein) または, SH2D1A (Src homology 2 domain-containing protein) である. SAP (SH2D1A) は Src homology 2 (SH2) を持つアダプター分子として免疫細胞で働き, EBV の感染防御, 液性免疫に深く関与し, SLE の原因遺伝子としても注目されている. SAP 遺伝子の異常は EBV の致死的な感染を起こす X-linked lymphoproliferative (XLP) syndrome (Duncan disease) の原因遺伝子としても報告された. この稿では SAP の機能を簡単に述べ, 新たな RA の根治的治療に向けての治療戦略を考察する.

I. はじめに

ウイルスは感染防御機構を逃れるため, CMV (cytomegalovirus) のように transporter in antigen

processing (TAP) 機能抑制によりウイルス抗原が MHC クラス I と結合し細胞表面に表現できずウイルス特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) が誘導されないようにする機序を有していたり, HIV (human immunodeficiency virus) などのように, nef 蛋白による MHC classI の発現抑制, 突然変異により

^{*1}日本大学医学部内科学系血液膠原病内科分野^{*2}協和発酵工業株式会社 東京研究所

CTL の抗原認識逃れる機構を有している。また、アポトーシスを誘導する caspases 活性化の抑制を HIV の nef 蛋白による細胞表面の TNF receptor family や、EBV (Epstein-Barr virus) 関連蛋白の LMP-1 (latent membrane protein-1) や EBER (EBV encoded small RNA) により誘導される Bcl-2 family により惹起したり、Kaposi 肉腫を起こす HHV-8 (human herpes virus-8) では caspases8 抑制因子である vFLIP を産生する。HIV, HTLV-1 (human T cell leukemia virus-1), CMV, 麻疹ウイルス等は、FasL や TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) を介して、CTL にアポトーシスを誘導し、感染防御から逃れる。

自己免疫疾患を代表として様々な疾患でこのような感染防御をくぐり抜けたウイルスの持続感染が関与している可能性が示唆されている。EBV と関節リウマチ (RA) の関与については Tan 等が RA 患者末梢血中に EBV 感染細胞核成分に対する抗体: RA nuclear antigen 抗体 (RANA) を発見¹⁾して以来 RA との関わりが 4 半世紀前より指摘されている。最近では、抗 circled citrullinated protein (CCP) 抗体が EBNA (EBV determined nuclear antigen)-1 の glycine-arginine の繰り返し構造の arginine が citrulline に変換し viral citrullinated peptides となり交差反応することが判明し²⁾, RA の病態と EBV の関連を考えさせ上で新しい知見が加わった。

II. EBV 関連疾患群

近年、小児期での生活衛生環境の改善などから成人でのヘルペスウイルス感染の重症化、HIV 感染症、臓器移植や抗癌剤、膠原病リウマチ疾患などへの免疫抑制薬の使用によるヘルペスウイルス関連疾患の発症が日常の臨床の場でも直面することが多くなっている。ヘルペスウイルス群の EBV は伝染性単核球症の原因として知られ、主に B リンパ球に感染し、Burkitt リンパ腫や上咽頭癌を引き起こす。その他にも EBV 関与の腫瘍は多く報告されており、Hodgkin 病、B-lymphoproliferative disease、Oral hairy leukoplakia、EBV 関連胃癌などがある。日本人成人では 80% 以上既感染となる。EBV は固形臓器移植後の重要な病原体である。移植後ウイルス感染症の多くは移植後 180 日以内に生じるが、30-180 日の中間期は、ドナーの臓器、血液製剤によるウイルス再活性化がある。EBV, CMV, 水

表 1 Epstein-Barr ウイルス関連疾患群

B 細胞リンパ増殖性疾患

伝染性単核球症 Gianotti-Crosti 症候群 移植後リンパ増殖性障害 老人性リンパ増殖性疾患 膿胸関連リンパ腫 Burkitt リンパ腫

T/NK 細胞リンパ増殖性疾患

血球貪食症候群 慢性活動性 EBV 感染症 鼻型 NK/T リンパ腫 蚊刺過敏症 慢性顆粒リンパ球増多症 末梢 T 細胞種痘様水泡症様皮疹

その他 EBV 関連疾患

直接関与の可能性

Hodgkin 病 胃癌 上咽頭癌

間接的関与の可能性

関節リウマチ 全身性エリテマトーデス Sjogren 症候群 IgA 腎症 多発性硬化症

痘・带状疱疹ウイルス (VZV: Varicella zoster virus) はこの時期に発生が一度ピークとなる。また、180 日以降の後期にも CMV 感染症は再び発生のピークがある。この時期に EBV 関連の移植後リンパ球増殖性疾患 (PTLD: post-transplant lymphoproliferative disorder) も見られる。移植後数年で起こる遅発例もある。このように EBV は移植などの免疫不全状態での再活性化などにより様々な病態に深く関与している。

その他、関節リウマチ、多発性硬化症、IgA 腎症、SUE や小児の EBV の重篤な感染を特徴とする免疫不全症候群 (X 連鎖リンパ球増殖症候群: XLP または、Duncan 病) などがある。慢性活動性 EBV 感染症も知られており、重篤な血球貪食症候群を起こすこともある (表 1)。

III. EBV 関連疾患としての RA

前述したように、1978 年に、Tan らにより RA 患者末梢血中に EBV 感染細胞核成分に対する抗体 (RANA: RA nuclear antigen) が発見され、EBV と RA の関係が注目された¹⁾。RANA 抗体が認識する主なエピトープは、EBNA (EBV determined nuclear antigen)-1 の glycine-alanine 構造であった³⁻⁵⁾。RA 滑膜には、EBNA-1 と一部構造が似ている蛋白が報告されており^{6,7)} molecular-mimicry (分子相同性) の機序が病因として重要な働きをしている可能性がある。さらには、RA 疾患感受性ハプロタイプである HLA-DR4, DR1 の $\beta 1$ 鎖超可変領域 3 のアミノ酸 QKRAA, QRRRAA と EBV の

gp110 の一部に相同性のある部分があることが報告され shared epitope として知られ⁷⁾, RA の抗原提示の際の免疫機構に EBV が何らかの影響を及ぼす可能性も示されている。

IV. RA 滑膜炎と EBV

前述したように RA と EBV の関与は様々な点から検討されてきた。しかし、これまで RA の病変の主体である滑膜表層細胞に EBV が存在することは否定的であった⁸⁾。

我々は polymerase chain reaction (PCR) と in situ hybridization 法を用いて, RA の滑膜に EBV が存在することを初めて報告した。患者末梢血より抽出した DNA を用い PCR 法により EBV DNA の検出を行った。RA, SLE, シェーグレン症候群, 正常者ともほぼ全例が陽性であり, そのコピー数にも差を認めなかった。末梢単核球と同様にして滑膜より抽出した DNA を用い PCR 法で検討をしたところ RA7 例中 6 例, 変形性関節炎 3 例中 2 例に EBV DNA が検出され, 1 例の SLE には認めなかった。この結果は 2 つの研究成果により確認された^{9,10)}。PCR 法で検出できたとしても浸潤しているリンパ球に存在している可能性があり病態との関連を類推することができなかったため, RA 滑膜を使用し EBER-1 を in situ hybridization 法により検出を試みた。変形性関節症の滑膜の検討では全例陰性であったが RA の一部の症例の滑膜細胞が絨毛上に増殖のみられる先端のところに陽性であった (図 1)。組織型ではリンパ球, 形質細胞浸潤の多い type に EBER-1 陽性の頻度が高い傾向があった。我々の研究では形態のみの検討でありはっきりした細胞の起原は示していないが, リンパ球と思われる小単核球と明かに違う核のサイズの大きな細胞に EBER を検出した。EBV 関連抗原の LMP-1 の発現は同一患者の EBER-1 が発現していた場所と一致し, EBER 陽性 8 例中 3 例で陽性であり陰性例 5 例は全て LMP-1 の発現は認めなかった (図 1)。CD21, EBNA-2 の発現は今回検討した全ての症例で同部位には認めなかった。抗 LMP-1 単クローン性抗体はイムノグロブリンのアイソタイプの異なる 2 種類のものを使用し同じ結果であった¹¹⁾。EBV の滑膜中での存在部位が特定でき, 滑膜細胞の絨毛状増殖を示す先端の部位に EBV の存在を認めた。この結果は, これまで数多くの研究で EBV と RA との関連が間接的に報告されていたが直接的に証明

Detection of EBV LMP-1 in synovial lining cells from the patients with RA

	EBER-1(8/32)	
	positive	negative
LMP-1	3/8	0/5

Takei M et al International Immunology 9(5): 739-743, 1997

図 1 関節リウマチ滑膜細胞内の EB ウイルス

EBER-1 in-situ hybridization で小リンパ球様細胞と明らかにそれとは違う核の大きい細胞に EBER-1 のシグナルを検出した。酵素はアルカリホスファターゼを使用した。抗 LMP-1 単クローン性抗体は免疫グロブリンのアイソタイプの違う 2 種類を使用し (IgG1, IgG2a) 両者とも陽性であった。EBER-1 陽性部位と同じ部位, 患者に発現していた。EBNA-2 は陰性であった。酵素はペルオキシダーゼを使用した。

がされておらず, RA の病因論で大きな疑問となっていた問題に明快な示唆を与える所見となった。北大の Takeda 等も RA 滑膜細胞での EBER-1 や EBV DNA の in situ hybridization 法での発現を報告し¹²⁾, Saal 等は HLA-DRB1*0401, 0404, 0405, 0408 を有する RA が高率に EBV DNA や EBER-1 が検出されることを RT-PCR や PCR 法で報告し, その危険度が 41 倍であると正常者との比較で推定した¹⁰⁾。兵庫医大の岩田, 立石等は RA 軟骨下骨部の単核球に EBV の存在を in situ hybridization 法, 免疫組織染色で証明した (第 43 回日本リウマチ学会総会 F84-4, 1999)。更に, Mahraein 等も滑膜表層細胞に EBER1/2 と LMP-1 の発現を報告した¹³⁾。彼らの報告では, 滑膜表層細胞と間葉系細胞に感染細胞が存在することを RA29 例中 5 例 (17.2%) に報告しており, その内 3 例は表層細胞を主体に局限していた。RA 滑膜間葉系細胞での EBV 感染報告は初めてであるが, Koide らは RA 滑膜からの EBV 陽性繊維芽細胞株の報告ではあるが¹⁴⁾, RA 由来リンパ球や表層細胞以外での報告がされている。また, 前述した Takeda 等の報告で検出していた EBV 再活性化で発現される BZLF-1 は RA と

表2 RA 滑膜組織中の EBV の存在を認めた報告

	TAKEI (11)	EDGINGER (9)	SAAL (10)	岩田, 立石	BLASCHKE (18)	NIEDOBI- TEK (16)	TAKEDA (12)	MAHRAEIN (13)
	1997 Int Immun Japan	1999 J Immunol USA & France	1999 Arth Rheum Germany	1999 学会報告 日本	2000 J Rheum Germany	2000 Arth Rheum Germany	2000 Arth Rheum Japan	2006 Modern Patol Germany
PCR								
DNA	positive	positive	positive	positive	positive	n.d	positive	n.d
EBER-1	n.d	positive	positive	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
in situ								
EBER-1	positive	n.d	n.d	positive	positive	positive	positive	positive
DNA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	positive	n.d
histochemistry								
LMP-1	positive	n.d	n.d	n.d	n.d	negative	negative	positive
lytic infection								
BZLF1	n.d	RTPCR positive	n.d	n.d	n.d	negative	immunohist. Positive	positive but rare
BMLF1	n.d	negative	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
BALF2	n.d	negative	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
BHRF1	n.d	negative	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
gp350/220	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	immunohist. Positive	n.d
synovial lin- ing cell	positive	n.d	n.d	pannus positive	synovial sublining layer	negative (表層細胞増 殖部所見示し ていない)	positive	positive

乾癬性関節炎の 1/29 例, 1/26 例の間葉系細胞に極わずかに発現している細胞がある程度で主な感染形式は潜在化の状態であるとした。また, Brousset 等は滑膜での EBV の存在はリンパ球さえも in situ hybridization で当初否定的であった¹⁵⁾が我々の報告の後に 5 例症例を増やして再検し, Niedobitek 等¹⁶⁾の報告のコントロールの滑膜組織には EBER の存在を認めないが, RA 滑膜表層細胞ではなく 7/37 例の滑膜 B 細胞に存在しその内 2 例は絨毛部位に存在するとの報告に対するコメントの中に EBV の存在がリンパ球にはあると修正し, BZLF-1 などの再活性化を示す分子の発現には否定的な報告をした (Arth & Rheum. Vol. 43, pp 2614, 2000)。Mahraein 等の報告では, さらに乾癬性関節炎や反応性関節炎でもそれぞれ 1/6 例, 1/26 例で滑膜表層細胞に EBV 感染細胞が検出した¹³⁾。すなわち, RA 以外の炎症性関節炎の中にも頻度は低いが EBV 関連関節炎が存在する可能性があると考えられる。

RA と EBV に関する報告が多くなされている。その報告には RA と EBV の関連を否定的に捉えるものと, 積極的に捉えられるものがある。しかし, 殆どの報告は RA 滑膜に PCR, RT-PCR, in situ

hybridization, 免疫組織染色によって存在は肯定しており, その事実は確かとなって来ているものと考ええる。それぞれの違いは滑膜のどの細胞が主体なのかということである。in situ hybridization 法での報告ではリンパ球以外の滑膜表層細胞に EBV が存在することは大勢となっていると考えられるが (表 2), 滑膜細胞の由来がまだ議論されている段階では, 明確な答えが導かれるのには, もう少し時間が必要かも知れない。

V. RA 滑膜における EBV 感染経路

EBV のレセプターとしては CD21 (C3d レセプター) が知られているが EBV 陽性滑膜表層細胞は連続切片の組織染色法では CD21 陰性であり未知の感染経路を使用している可能性がある。近年注目されている EBV 陽性上咽頭癌, 胃癌細胞も CD21 陰性であり, その感染機序は明らかではないが, 感染 B 細胞との細胞融合説や CD21 のリガンドであるウイルスのエンベロープ蛋白 (gp350/220) に対する polymeric IgA 抗体を介し上皮細胞に感染しうるとの報告もある。また, 絨毛上に増殖のみられる先端部位の細胞の由来は不明であり, 単球由来の末梢からリクルートされて来た細胞との考えも有る。RA

滑膜組織より得られた線維芽細胞株に EBV が陽性であったとの報告¹³⁾や Hirohata 等による RA 骨髄細胞にも EBV が関与している可能性も報告された¹⁷⁾。滑膜増殖部で感染を受けたのではなく、何処かで感染していた非リンパ球系の細胞が例えば骨髄よりリクルートされ絨毛上に増殖していることも考えられる。Blashket 等は滑膜細胞の単層の表層細胞の直下に EBV 陽性の細胞が集簇していることを EBER-1/2 の in situ hybridization 法で報告した¹⁸⁾。この発見は前述した仮説を裏付けるもので滑膜の多層性の絨毛状に増殖する過程を捉えているとも考えられる。

VI. EBV 感染による RA 炎症性滑膜炎の病態

図 1 に示すように我々の症例では EBV は RA 滑膜の絨毛状に増殖した先端の滑膜表層細胞に認められた。この部位は RA 滑膜が腫瘍状に最も増殖を起こしている場所と推定できる。我々の得た所見では EBV の EBER-1, LMP-1 が同部位に発現しており EBNA2 は陰性であった。LMP-1 は細胞障害性 T 細胞の標的分子であり、通常の免疫機能を有していれば個体から排除されてしまう。上咽頭癌の様に LMP-1 に変異があり免疫監視機構から逃れている可能性がある。また、RA の EBV 特異的 CTL 活性が低いとの報告もあり¹⁹⁾、RA 滑膜でこのような細胞の存在を許している可能性もある。LMP-1 は多様な機能を有しており、核内蛋白の転写活性化因子の NF- κ B (nuclear factor- κ B) の活性を上昇させ Bcl-2 や A20 の産生を増加させ、アポトーシスを抑制する^{20,21)}。また、ヒトのケラチノサイト類やラットの線維芽細胞を悪性転化する^{22,23)}。近年、抗 TNF α 抗体が RA に使われ劇的に関節炎に効果があることが経験されている。NF- κ B は TNF α の産生を増加させることも知られており、RA 滑膜の腫瘍性増殖や疾患の修飾にこのような機能がなんらかの影響を及ぼしている可能性もある。

VII. EBV 感染制御遺伝子 (SAP/SH2D1A) : Dunchan 病 (X-linked lymphoproliferative syndrome ; XLP) 原因遺伝子と RA

我々は協発酵東京研究所の石渡博士らとの共同研究で EBV 関連疾患としても知られている IgA 腎症の末梢白血球の RNA を用いた fluorescein differential display 法による解析で偶然にこの遺伝子を発見し全 cDNA の sequence を行っていた (1.

USA patent 番号 6828428 7th Dec. 2004. 2. USA patent 番号 6962984 8th Nov. 2005. 3. EU (5 か国) patent 番号 915156 31st May. 2006. 4. 710525456 二本出願)。計らずもこの遺伝子が 1998 年 12 月に Nature で Sayo らの報告した小児期に EBV の致死感染症を起こすことで知られている X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) の原因遺伝子と全く同一のものであった²⁴⁾。XLP では signaling lymphocytic-activation molecule (SLAM) associated protein (SAP) の cDNA の一部に mutation と deletion が存在し SAP の機能が働かず EBV に対する特異的抑制性 T 細胞の誘導ができないと考えられた。

SAP 遺伝子は X 染色体の短腕 25 (Xq25) に位置し、Src homology 2 (SH2) ドメインを 1 個と 26 アミノ酸からなる短い蛋白で発見当時はシグナル伝達に関与する蛋白であるとの予想はしていたがその機能に関しては不明であった。機能としてはその名の示すごとく SLAM の細胞内ドメインと相互作用を及ぼし T 細胞の活性化を調節している。この経路で SAP に異常があり機能しなかったり、その発現が少なかったりすると T 細胞の活性化が阻害され EBV の感染制御に異常を来たすと考えられている。SLAM は EBV 感染細胞に強く発現していることが知られており、RA の滑膜組織中の T 細胞にもやはり発現の亢進が報告されている²⁵⁾。

SLAM は SLAM 同士で認識し、細胞内にシグナルを伝達することが知られており、SAP 蛋白の異常が EBV 特異的に感染制御に関与する原因となっている可能性が考えられている。我々は、SAP mRNA の発現の定量法を PE-ABI 7700 を使用し、real time PCR 法で確立した。RA 患者末梢白血球の SAP mRNA の定量でその発現が低いことが分かった (図 2)。SAP はその殆どが T 細胞に発現しているが Raji B 細胞株や NK 細胞でも存在することが分かっている。

我々は RA 末梢血 T 細胞を分離して SAP RNA の定量を行った。その結果 SAP mRNA の発現は正常者に比較し有意に低下を示した。次に、SAP cDNA に XLP のような変異が存在する可能性を考え、5 例の RA 患者末梢白血球から mRNA を抽出し、その cDNA の全長配列を決定した。この 5 例の SAP cDNA には全く変異を認めなかった。以上のことから、RA で EBV に対する感染防御機構が異常を起こす原因として、SAP 分子の機能異常が

RAのSAP /SH2D1A cDNAには変異欠失は存在しない

```

1  gtgtgtgact tgtgctggtg tgcagtagca gggcatctc cettgcacag ttctctct
61  cgagctgccc aagagtcac cagccatgg acgagtggtg tgtgtatcat ggcaaaata
121 gcagggaagc cggcgagaag ctctctgttg ccactgggtt ggaaggcagc tattgtcga
181 gggacacaga gagcgtgcca ggcgtgtact gcctatgtgt gctgtatcac ggtaacattt
241 atacataccg agtgcctcag acagaaacag gttctggag tctgagagca gcactctggg
301 tacataaaag atatttcggg aaaaataaaa atctcatttc agcatttcag aagccagatc
361 aaggcattgt aatacctctg cagtatccag ttgagaagaa gtcctcagct agaagtacac
421 aaggctactc agggataaga gaagatctcg atgtctgctt gaaagcccca tgaagaaaaa
481 taaaacacac tgtaactttt ttctataat ttaaatatat gctaagtctt atatatgtta
541 gataatacac ttcgggtgagc tacaaatgca ttctaaage cattgtagtc ctgtaatgga
601 agcactctagc atgtctgcaa agctgaaatg gactttgtta catagtggag agctttgaaa
661 cgaggattgg gaaaaagtaa ttccttaggt tattttcagt tattatattt acaaatggga
721 aacaaaaggt aatgaatact ttataagga ttaagtcaa ttcttgcaca atataataa
781 aaataactct cagtttttgt gttttttttt tttttttt

```

(Takei, M. et al. *International Immunology* 13:559-565, 2001)

図2 関節リウマチ末梢 T 細胞の SAP mRNA の発現と cDNA 配列

ABI7700 を使用し, TaqMan probe と primer を設計し, RA 末梢血 CD2T 細胞の SAP mRNA の発現を検討した. この結果から RA 末梢 CD2T 細胞での SAP mRNA の発現が統計学的に有意に低かった (国際公開番号 WO 00/075313). 5 例の SAP cDNA の DNA 配列には塩基の変異や欠失は認めなかった.

その原因の一つとして関与する可能性のあることが判明した²⁶⁾. Komori 等は自己免疫発症マウスである MRL/lpr で自然に SAP 遺伝子が欠落したマウスが SLE により起こる臓器障害の発症を抑制すると報告し²⁷⁾, Hron 等は SAP ノックアウト Balb/c マウスに脂質であるプリスチンを腹腔内投与にて誘導する自己免疫疾患を抑制できる事を報告しており²⁸⁾, SAP が自己免疫疾患に深く関与する可能性を示唆している.

最近, EBV 感染細胞に対する NK 細胞の活性に SAP 分子と NK 細胞のシグナル伝達に関与する 2B4 分子が SLAM でのシグナル伝達と同様に関与する可能性が次々に報告されてきている^{29,30)}. さらに EBV 関連蛋白である LMP-1 が SAP mRNA

の発現を抑制しているとの報告もなされ³¹⁾, SAP mRNA の発現低下が EBV 感染細胞に対する細胞傷害性 T 細胞と NK 細胞の活性化の障害を RA で引き起こしている可能性が考えられる. RA の滑膜炎に対する EBV の役割を推察すると, RA の滑膜に EBV が存在し, 滑膜表層細胞に発現した LMP-1 が SAP の機能を抑制し, 正常な EBV に対する感染防御機構に破たんをを起こさせ, EBV の活性化をさらに惹起し, 滑膜細胞の増殖や炎症に寄与し, RA の滑膜炎の形成に深く関与している可能性が考えられた (図 4).

VIII. RA の根治に向かっての新たな治療戦略

生体は体内に進入した外来微生物を記憶し, 再度の侵入に対して免疫記憶の機構を駆使して即座に対応して防御を果たしている. この長期免疫機構を支える新しい遺伝子が前述した SAP/SH2D1A である. この遺伝子の欠損は小児の EB ウイルスの致死的な感染症を特徴とする免疫不全症候群 (X 連鎖リンパ球増殖症候群: XLP または Dunchan 病) を惹起することで初めて報告された²⁴⁾.

SAP は SH2 ドメインのみを有するアダプター蛋白 (128 アミノ酸) で進化の過程で生き残ってきた natural regulator ともいえるもので, シグナル伝達の制御ポイントとしては重要な役割を果たしている. T 細胞と NK 細胞のみで選択的に発現し, SLAM (signaling lymphocyte activation molecules, CD150)-family receptor (CD2 サブファミリー; SLAM, 2B4 (CD244), LY9 (CD229), CD84, NTB-A) の細胞内リン酸化チロシン (TYYXXV) に結合し, SRC キナーゼのリクルートによる SLAM (CD150)-family receptor のシグナル伝達を制御している^{32,33)}. SLAM は, 麻疹ウイルスのレセプターであり, 関節リウマチや多発性硬化症にも関与していることが報告されている.

SAP には dual functional role が報告されている. T 細胞受容体と co-stimulation receptor を介した信号により IL-2 と IFN- γ を産生するが, SAP が阻害因子として働く機序として考えられるものに, T 細胞への刺激で T 細胞の SLAM の発現が高まると SLAM などの刺激により細胞質内の SAP と SLAM の強い結合が SLAM のチロシンで起こり, フォスファターゼである SHP-2 に対して SAP の SH2 ドメインの phosphotyrosine-binding motif を介して SLAM の細胞内ドメインのチロシンリン酸化部位

Kim E. Nichols et al. Nature Immunology 2, 665 (2001)改変

Chan B., et al.: NATURE CELL BIOLOGY, 5, 155 (2003)改変

図3 SAP/SH2D1A の dual functional role

T細胞受容体と co-stimulation receptor を介した信号により IL-2 と IFN- γ を産生する。SAP が阻害因子として働く機序として考えられるものに、T細胞への刺激でT細胞のSLAMの発現が高まるとSLAMなどの刺激により細胞質内のSAPとSLAMの強い結合がSLAMのチロシンで起こり、フォスファターゼであるSHP-2に対してSAPのSH2ドメインのphosphotyrosine-binding motifを介してSLAMの細胞内ドメインのチロシンリン酸化部位で阻害因子として働きIFN- γ の産生を抑制する。

B. SAPにはdual functional roleが報告されており、SAPのSH2ドメインのphosphotyrosine-binding motifとは異なる78番目のアルギニン残基を有するsecond regionを介してSrc family kinaseでprotein-tyrosine kinase (PTK)のFynTのSH3ドメインと相互作用し、FynTのSLAMへのリクルートを促進するアダプターとしての役割(SLAM-SAP-FynT complexを形成→FynTのリン酸化機能の構造的なマスキングが解除、リン酸化機能が活性化され下流にシグナル伝達)を果たしている。SAPは、細胞内においてDok1 (RAS-GAP, CSK, NCKと相互作用する)とも会合し、GATA-3のupregulationからNF- κ Bの活性化に関与しTH2サイトカインIL4やIL13の産生を亢進している可能性が報告されている。

図4 RA滑膜炎とEBVと感染防御遺伝子SAP

RAの滑膜にEBVが感染し、滑膜細胞に発現したLMP-1がSAPの機能を抑制し、正常なEBVに対する感染防御機構に破たん起こさせ、EBVの活性化をさらに惹起し、滑膜細胞の増殖や炎症に寄与し、RAの滑膜炎の形成に深く関与している可能性が考えられる。

で阻害因子として働き IFN- γ の産生を抑制する³⁴⁾. SAP の SH2 ドメインの phosphotyrosine-binding motif とは異なる 78 番目のアルギニン残基を有する second region を介して Src family kinase で protein-tyrosine kinase (PTK) の FynT の SH3 ドメインと相互作用し, FynT の SLAM へのリクルートを促進するアダプターとしての役割 (SLAM-SAP-FynT complex を形成→FynT のリン酸化機能の構造的なマスキングが解除, リン酸化機能が活性化され下流にシグナル伝達) を果たしている³⁵⁻³⁹⁾. SAP は, 細胞内において Dok1 (RAS-GAP, CSK, NCK と相互作用する) とも会合し, GATA-3 の upregulation から NF- κ B の活性化に関与し TH2 サイトカイン IL4 や IL13 の産生を亢進している可能性が報告された⁴⁰⁾ (図 3). また, SAP は長期的な体液性免疫を維持するために必要であることが発見された⁴¹⁾. 長期間生存するプラズマ細胞やメモリー B 細胞は長期的な体液性免疫の主要な細胞成分であり, またそれ自体ほとんどのワクチンがもたらす防護作用にとって極めて重要なものである. SAP ノックアウトマウスのモデル系を使って免疫反応における SAP の役割が解析されている. SAP の発現を欠くマウスでは, ウイルス感染の後, 激しい急性の IgG 抗体反応は起こるが, ウイルス特異的な長期生存プラズマ細胞およびメモリー B 細胞がほぼ完全に欠失し, 体液性免疫の長期維持に障害を起こすことが判明している. 養子移入実験では, SAP 欠損 B 細胞は正常であり, 欠陥は CD4+T 細胞にあることが示されている. SAP は, 初期段階における B 細胞に対する補助やクラススイッチには不要であるが, 後期段階の B 細胞に対する補助や長期的な体液性免疫の成立には不可欠であることがわかっている. このように SAP は, 免疫記憶の発達に中心的な役割を果たしている. 他の報告では, SAP 遺伝子欠損 B 細胞も正常な免疫グロブリンのクラススイッチができないことが報告されている⁴²⁾. また, SAP は Th1 への分化を抑制し, Th2 への分化を誘導すると報告された. SAP のノックアウトマウスでは, CD4+T 細胞からの IFN- γ 産生が高まり, いわゆる Th1 細胞への分化が観察された. 一方, SAP のトランスジェニックマウスでは, IL-4 産生が高まり, Th2 細胞への分化が認められた⁴³⁾. 以上から SAP は, ヘルパー T 細胞機能の重要な役割を担っていると考えられる. SAP は NK 細胞にも 2B4 (CD244) を介して同様に細胞障害性の調節や

IFN γ の産生の調節を行っている^{44,45)}. 最近の報告では, SLAM-SAP の関与は T 細胞受容体からの刺激により誘導された PKC θ を介して NF- κ B を活性化して Th2 サイトカインの調節を行っている可能性が示された⁴⁶⁾. SAP-FynT とは別に SAP-PIX (PAK interacting exchange factor) は異なった SH3 で結合し, T 細胞活性化を行うらしい⁴⁷⁾. また, SAP は FynT と SLAM と関連せずヘルパー T 細胞活性化, 液性免疫の維持に関与すると報告もある⁴⁸⁾. さらに, SAP は SLAM family だけでなく Trk family の signal にも同様にチロシンのリン酸化の抑制により SH2B と Shc の働きを抑制することも報告されており⁴⁹⁾, SAP に多彩な機能がある可能性が示され, 免疫機構において重要な働きを有している.

このような多彩な免疫機構に対する働きを保つ SAP 遺伝子を造血幹細胞や血液細胞に導入する遺伝子治療や SLAM (CD150)-family receptor (SLAM, 2B4, CD48, LY9, CD84) のシグナル伝達を +/- に制御する薬剤 (Th1/2 バランス制御薬), SAP 機能の促進剤は, ヘルパー T 細胞からの IL-4 の産生を高めナイーブ Th0 細胞の Th2 細胞への分化を誘導し, Th1/Th2 バランスを Th2 へ傾ける薬剤となり, 液性免疫の強化剤, EBV 関連疾患の治療薬, 予防薬としての開発が考えられる.

HSV や CMV などのヘルペスウイルス急性感染症に対する治療は抗ウイルス薬や免疫グロブリンでの治療が確立されているが, EBV に対する治療法はまだ, 確立されたものはない. 近年 EBV に対するワクチンの開発⁵⁰⁾の報告や EBV の細胞障害性 T 細胞を *in vitro* で誘導して患者に戻す養子免疫療法などの報告⁵¹⁾が散見され, 様々な EBV 関連疾患の一つである RA の根治的な治療法として有力な候補となる可能性がある.

IX. おわりに

EBV 関連疾患は悪性リンパ腫や胃癌から血球貪食症候群, 臓器移植後日和見腫瘍, 膠原病 (RA, 全身性エリテマトーデス, Sjogren 症候群など) など多岐に渡りこれらの治療予防を開発することは RA のみならずこれらの疾患の根治的治療に結びつく可能性があり, XLP (Duncan 病) の疾患原因遺伝子 (SAP) の発見から端を発した液性免疫記憶の機序の解析はこれら疾患の新たな治療の開発につながるものと考えられる.

我々は RA 滑膜炎に EBV が関与していることが当時は否定的であった時代から関連を主張してきたが、EBV の感染防御に関わる遺伝子 (SAP) を発見し、クローニングを偶然にも行い知的財産権を得ていることはこの疾患の根治的治療を目指す上で大きな力になるものと考え検討を行っている⁵²⁻⁵⁵⁾。

文 献

- 1) Alsbaugh, M.A. et al. : Lymphocyte transformed by Epstein-Barr virus : induction of nuclear antigen reactive with antibody in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, **147** : 1018-1027, 1978.
- 2) Anzilotti C. et al. : Antibodies to viral citrullinated peptide in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, **33** : 647-51, 2006.
- 3) Billings, P.B. et al. : Antibodies to the Epstein-Barr virus nuclear antigen and to rheumatoid arthritis nuclear antigen identify the same polypeptide. *Proc Natl Acad Sci*, **80** : 7104-7108, 1983.
- 4) Rhodes, G. et al. : Human immune response to synthetic peptides from the Epstein-Barr virus nuclear antigen. *J Immunol*, **134** : 211-216, 1985.
- 5) Rumpold, H. et al. : The glycine-alanine repeating region is the major epitope of the Epstein-Barr nuclear antigen-1 (EBNA-1). *J Immunol*, **138** : 593-599, 1987.
- 6) Fox, R. et al. : Rheumatoid arthritis synovial membrane contains a 62000-molecular-weight protein that shares an antigenic epitope with the Epstein Barr virus encoded associated nuclear antigen. *J Clin Inv*, **77** : 1539-1547, 1986.
- 7) Roudier, J. et al. : The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*, **27** : 367-371, 1988.
- 8) Fox, R.I. et al. : Lack of reactivity of rheumatoid arthritis synovial membrane DNA with cloned Epstein-Barr virus DNA probes. *J Immunol*, **137** : 498-501, 1986.
- 9) Edinger, J.W., et al. : EBV gene expression not altered in rheumatoid synovia despite the presence of EBV antigen-specific T cell clones. *J Immunol*, **162** : 3694-3701, 1999.
- 10) Saal, J.G. et al. : Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum* **42** : 1485-1496, 1999.
- 11) Takei, M. et al. : Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients. *Int Immunol* **9** : 739-743, 1997.
- 12) Takeda, T. et al. : Lytic Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43** : 1218-1225, 2000.
- 13) Mehraein Y. et al. : Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA- in situ hybridization. *Mod Pathol.* **17** : 781-9, 2004.
- 14) Koide, J. et al. : Spontaneous establishment of an Epstein-Barr virus-infected fibroblast line from the synovial tissue of a rheumatoid arthritis patient. *J Virol*, **71** : 2478-7481, 1990.
- 15) Brousset P. et al. : Absence of Epstein-Barr virus carrying cells in synovial membranes and subcutaneous nodules of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **52** : 608-609, 1993.
- 16) Niedobitek G. et al. : Lack of evidence for an involvement of Epstein-Barr virus infection of synovial membranes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43** : 151-154, 2000.
- 17) Hirohata, S. et al. : Bone marrow CD34+ progenitor cells from rheumatoid arthritis patients support spontaneous transformation of peripheral blood B cells from healthy individuals. *Rheum Int* **19** : 153-159, 2000.
- 18) Blaschke S. et al. : Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheum and atol* **27** : 866-873, 2000.
- 19) Tosato, G., Steinberg, A.D., Blaese, R.M. : Defective EBV-specific supressor T-cell function in rheumatoid arthritis. *N Eng J Med*, **19** : 1238-1243, 1981.
- 20) Hammarskjold, M-L. & Simurda M.C. : Epstein-Barr virus latent membrane protein transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through induction of NF- κ B activity. *J Virol*, **66** : 6496-6501, 1992.
- 21) Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., et al. : Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr

- virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, **65** : 1107–1115, 1991.
- 22) Wang, D., Liebowitz, D., & Kieff, E. : An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43** : 831–840, 1985.
 - 23) Fahaeus, R. Rymo, L., Rhim, J.S. : Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature* **345** : 447–449, 1990.
 - 24) Sayos, J. et al. : The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395** : 462–469, 1998.
 - 25) Isomaki, P. et al. : Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. *J Immunol* **159** : 2986–2993, 1997.
 - 26) Takei, M. et al. : Decreased expression of signaling lymphocytic-activation molecule associated protein (SAP) transcripts in T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunol*. **9** : 739–743, 1997.
 - 27) Komori H. et al. : A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Faslpr lupus mice. *J Immunol*. **1** ; **176** : 395–400, 2006.
 - 28) Hron J.D. et al. : SH2D1A regulates T-dependent humoral autoimmunity. *J Exp Med*. **19** ; **200**(2) : 261–266, 2004.
 - 29) Tangye, S.G. et al. : Cutting edge : human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J. Immunol*. **162** : 6981–6985, 1999.
 - 30) Brown, M.H. et al. : 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med*. **188** : 2083–2090, 1998.
 - 31) Chuang H.C. et al. : Epstein-Barr virus LMP1 inhibits the expression of SAP gene and upregulates Th1 cytokines in the pathogenesis of hemophagocytic syndrome. *Blood* **106** : 3090–3096, 2005.
 - 32) Sayos, J. et al. : The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395** : 462–469, 1998.
 - 33) Sayos J. et al. : Links Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* **97** : 3867–3874, 2001.
 - 34) Nichols KE et al. : SAP: natural inhibitor or grand SLAM of T cell activation? *Nature Immunology* **2** : 665–666, 2001.
 - 35) Chan B et al. : SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol*. **5** : 155–160, 2003.
 - 36) Li C et al. : Dual functional roles for the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP/SH2D1A in signaling through the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family of immune receptors. *J Biol Chem*. **7** ; **278** : 3852–3859, 2003.
 - 37) Latour S et al. : Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol*. **5** : 149–154, 2003.
 - 38) Engel P et al. : The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol*. **3** : 813–821, 2003.
 - 39) Davidson D et al. : Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity*. **21** : 707–717, 2004.
 - 40) Nichols KE et al. : Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*. **203** : 180–199, 2005.
 - 41) Crotty S. et al. : SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* **16** ; **421** : 282–287, 2003.
 - 42) Al-Alem U et al. : Impaired Ig class switch in mice deficient for the X-linked lymphoproliferative disease gene Sap. *Blood*. **106** : 2069–2075, 2005.
 - 43) Wu C et al. : SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat Immunol*. **2** : 410–414, 2001.
 - 44) Chen R et al. : Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol Cell Biol*. **24** : 5144–5156, 2004.
 - 45) Roncagalli R et al. : Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol*. **6** : 1002–1010,

- 2005.
- 46) Cannons JL et al. : SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC- θ -mediated activation of NF- κ B1. *Immunity*. **21** : 693–706, 2004.
- 47) Gu C et al. : The X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP associates with PAK-interacting exchange factor and participates in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103** : 1447–1452, 2006.
- 48) McCausland MM et al. : SAP regulation of follicular helper CD4 T cell development and humoral immunity is independent of SLAM and Fyn kinase. *J Immunol*. **178**(2) : 817–828, 2007.
- 49) Lo KY et al. : SLAM-associated protein as a potential negative regulator in Trk signaling. *J Biol Chem*. **280** : 41744–41752, 2005.
- 50) Sokal E.M. et al. : Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled a. trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J Infect Dis*. **196** : 1749–1753, 2007.
- 51) Lucas K.G. et al. : A phase I–II trial to examine the toxicity of CMV- and EBV-specific cytotoxic T lymphocytes when used for prophylaxis against EBV and CMV disease in recipients of CD34-selected/T cell-depleted stem cell transplants. *Hum Gene Ther*. **11** : 1453–1463, 2000.
- 52) Sawada S, Takei M. (First two are equal contributors) Epstein-Barr virus etiology in rheumatoid synovitis. *Autoimmun Rev*. **4** : 106–110, 2005.
- 53) Sawada S. Takei M. et al. : (First two are equal contributors) What is after cytokine blocking therapy, a novel therapeutic target-synovial Epstein-Barr virus for rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. **6** : 126–130, 2007.
- 54) Sawada S, Takei M, et al. : (First two are equal contributors). SLAM-associated protein solves a mystery of autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. **1109** : 19–30, 2007.
- 55) Sawada S, Takei M. et al. : (First two are equal contributors). SAP discovery: the sword edges-beneficial and harmful. *Autoimmun Rev*. **6** : 444–449, 2007.