

慢性関節リウマチの病因解明
に関する研究

目次

リウマチ膠原病部門

| | | |
|--|--------------------------------|--------------|
| 慢性関節リウマチの病因解明に関する研究 | 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 教授 | 西岡久寿樹 (285) |
| 慢性関節炎におけるサイトカインの役割 | 東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル 研究センター 教授 | 岩倉 洋一郎 (291) |
| 慢性関節リウマチの滑膜増殖機構と疾患遺伝子の研究 | 神戸大学医学部保健学科病理解析学 教授 | 塩澤 俊一 (294) |
| 慢性関節リウマチ骨髄病態に関する研究ーナース細胞の樹立と関節破壊への 関与ー | 大阪大学医学部整形外科 助手 | 富田 哲也 (297) |
| 核内アセチル化制御によるリウマチ性疾患制圧法の開発 | 筑波大学応用生物科学系 講師 | 中島 利博 (299) |
| 慢性関節リウマチモデルのゲノム解析 マウスコラーゲン関節炎とMRL系自然発症関節炎との遺伝的関連 | 愛媛大学医学部病理学第二講座 教授 | 能勢 真人 (300) |
| $\beta 1$ インテグリンシグナル伝達分子Cas-Lの機能及び慢性関節リウマチの病 態における意義の研究 | 東京大学医科学研究所 教授 | 森本 幾夫 (304) |
| TNF受容体ファミリー分子を介したシグナル伝達に関する研究 | 順天堂大学医学部免疫学 助教授 | 八木田 秀雄 (308) |
| 自己免疫疾患におけるレトロウイルスの病因論的関与に関する研究 | 北海道大学医学部病理学第一講座 教授 | 吉木 敬 (311) |
| 慢性関節リウマチの発症に関わるFasを介するアポトーシス誘導システムに 関する研究 | 京都大学ウイルス研究所 教授 | 米原 伸 (314) |

慢性関節リウマチの病因解明に関する研究

主任研究者 西岡久寿樹

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 教授

<研究要旨> 慢性リウマチの病因について、昨年度に引き続き今年度は次の諸点を明らかにした。

滑膜細胞の増殖機構

RAの病変である滑膜増殖のメカニズムを解析することが、慢性関節リウマチ（以下RA）の病因を説明する最も直接的な方法であると考え、滑膜細胞の増殖と細胞死の二つの視点から分子機構を解析し、次のような成果が得られた。

- ①形態形成遺伝子であるHomeobox遺伝子群のうち、HoxD9遺伝子がCBP等の転写因子を介して、滑膜増殖と分化を調節している遺伝子であること、HoxDの遺伝子がRAの滑膜細胞の増殖のプロセスを制御している。さらに、本遺伝子座は第2染色体に存在しており、その近傍に転写系および四肢形成に重要な役割を為す種々の形態形成遺伝子の存在が明らかにされており、この領域の遺伝子座を中心としてHox遺伝子導入マウスを作製した。
- ②RAの滑膜細胞には、腫瘍細胞に類似した性質を有する単一細胞由来の細胞群が存在することを明らかにした。この細胞は、X染色体の解析から遺伝的に単一細胞由来であり、自律増殖能を有し、特に骨破壊と密接に関連するいわゆるパンヌス領域に高密度に分布することが解明された。また、これらの細胞群ではc-fosの強発現p53の変異も一部確認されたが、これらの変異が一次的なものか種々のサイトカインの影響により変異したものかについての研究をすすめた結果、現時点では二次的なものであると判断した。
- ③感染要因に関与する遺伝子として我々の研究班で、初めて明らかにされたHTLV-I tax 遺伝子が挙げられるが、その産物である可溶性タンパクであるTaxタンパクが内因性物質である種々のサイトカインと同様に滑膜細胞の増殖に重要な役割を担うことが明らかにされた。

滑膜細胞の細胞死の分子機構

- ①今年度はRA滑膜細胞におけるFas分子の細胞内伝達機構としてFLICEとFLIPの役割が解明された。
- ②Fas分子によるアポトーシスを誘導するサイトカインと逆に阻害するサイトカインの二系統のサイトカイン群によって、滑膜細胞は増殖とアポトーシスに陥ることが解明された。この事実、サイトカイン標的治療戦略を構築する上でも極めて重要な示唆を与えている。
- ③アポトーシスを調節する鍵のプロテアーゼであるカスパーゼ8と会合するFLASHの役割の解明が進んだ。

滑膜T細胞の役割と自己抗原の解析

- ①滑膜T細胞の受容体のβ鎖におけるclonalityの解析の結果、一定のT細胞クローンの増殖が明らかにされてきているが、特定の抗原分子について研究班では、YKL39、CLIP等の他、type II collagenを構成している分子の関与の解明を検討した。その成果に基づいて新しい特異抗原によって誘発される動物モデルが開発された。

動物モデル

動物モデルもさらに研究は進展し、次の成果が得られた。

- ①HTLV-I tax 遺伝子導入マウスおよびHTLV-I env PX 導入遺伝子ラットを初めとして、RAに酷似した全身的な免疫異常を有する骨・関節破壊のRAモデルが広く確立されている。
- ②IL-1、リセプターアンタゴニストノックアウトマウス（IL-1 KO マウス）が新たに確立された。
- ③RAの自然発症マウスであるSKGマウスを用いた解析が進んだ。
- ④YKL39、SCIDRA、CLIPマウス等、リウマチの種々の病態を反映する動物モデルが開発された。

RA病因遺伝子の解析

今年度の研究班では、家族性のRA、RA動物モデルおよびRA滑膜細胞に関与する転写因子をコードする遺伝子座の解析という3つの方法にRAの病因遺伝子の解析が進んでいる。

今年度の成果は、マイクロサテライトマーカーによる疾患遺伝子解析システムを通して、第1、第8、X染色体の疾患遺伝子座が特定されている。さらに、Homeobox に結合する転写因子の解明から、第2染色体の一部にもRAの疾患遺伝子が存在することが強く示唆された。

<分担研究者>

| | |
|-------|---------------|
| 岩倉洋一郎 | 東京大学医科学研究所教授 |
| 塩澤 俊一 | 神戸大学保健学科教授 |
| 冨田 哲也 | 大阪大学整形外科学助手 |
| 中島 利博 | 筑波大学応用生物化学 |
| 能勢 真人 | 愛媛大学第二病理学教授 |
| 森本 幾夫 | 東京大学医科学研究所教授 |
| 八木田秀雄 | 順天堂大学免疫学助教授 |
| 吉木 敬 | 北海道大学第一病理学教授 |
| 米原 伸 | 京都大学ウイルス研究所教授 |

A. 研究目的

慢性関節リウマチの病因については、ここ数年大きな進展をみせているが、RAという疾患の臨床的多様性から、ヒトのRAを対象とした研究ではこれまでの班の研究成果を踏まえて、今年度は次の4つの重点研究課題に絞り込んだ。

①RAの主病変である滑膜組成を構成する滑膜細胞の増殖および細胞系を調節している分子群とその細胞間伝達機構および転写調節の解明、特にTNFa、FGFの役割とCBPと結合する転写因子の解析。

②滑膜細胞T細胞の認識している自己抗原の絞り込みと、T細胞への関節内遊走の分子機構。

③種々の動物モデルを確立し、それをヒトのRAの多様性と対応させることの試み、すなわち、早期RAに対応するRAの動物モデルや末期のRAである骨破壊の動物モデルと対応させるという画期的な成果が得られた。

④RAの疾患遺伝子坐の解析

マイクロサテライトマーカーによる遺伝子解析およびRAの関節という病変の「場」を決定している遺伝子を解明するため、形態形成遺伝子群に注目し、解析を進めた。

⑤感染性要因

レトロウイルスおよびフラビウイルス遺伝子由来のタンパクが、内因性サイトカインであるIL-1やIL-6、TNFaなど同様の滑膜増殖能を有する事を明らかにし、また免疫応答にどのように分子レベルで関与しているかを検討した。

B. 研究方法および結果

RA滑膜細胞および滑膜T細胞、動物モデル、感染性、病因遺伝子坐の解析の手法は、本研究班の昨年度の報告書で述べた点と大きな変化はない。すなわち、滑膜細胞の研究では、患者の手術時に得られた生体試料を中心に、その増殖およびアポトーシスの分子機構の解明を行なった。また、ハツカネズミの関節系統発生を調節している形態形成遺伝子群の解析を行ない、その形態形成遺伝子の塩基配列は、種を越えて共通の配列を有している。その特性を利用してRAの滑膜増殖の調節機構にどのように関わっ

ているかを解析した。

また、種々の滑膜増殖性サイトカインやプロトオンコジーンと転写因子の関連を究明した結果、CBPと結合している形態形成遺伝子の一つであるHoxD9およびHTLV-I tax遺伝子など、これまでRAの病因と深く関わりを有する遺伝子群が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。滑膜アポトーシスについても大きく研究の進展がみられた。すなわち、Fasのシグナル伝達機構が解明され、Fas/FasL → FADD → caspase8 → PARP 経路が解明され、特にcaspase に会合するFLIP、FLASHなどの新しいアポトーシス関連分子の調節障害がRAの病因、特に滑膜細胞の変異と密接に関連していることが明らかにされた。現在、動物モデルでもこれらの経路の分子レベルでの解明を検討している。

<滑膜T細胞>

1) 滑膜T細胞の受容体が一定のclonalityをもつ局所で増殖していることを明らかにし、そのT細胞集団が特定のペプチドを認識していることをペプチドライブラリーを用いて明らかにした。この解析からcathepsin群、type II collagenなどが重要な病因peptideであることが明らかにされた。さらにsingle cell PCRを用いてα鎖のclonalityを検討している。また、それらのT細胞の多くはFas感受性であることも解明された。

2) HTLV-I 関節炎では、HTLV-I envP40Xが主要な自己抗原であり、その抗原認識のプロセスを解明した。これは、感染性レトロウイルスが、RAの免疫応答に直接関与している事を明らかにしたものと極めて興味深い。

3) T細胞に関する特異的な活性化機構がインテグリンFamilyのシグナル伝達機構から解明されているRAの滑膜の炎症局所にはCD29/VLA型がみられ、T細胞が密接にそのリガンドであるVCAM-1 発現が滑膜細胞および血管または細胞で認められた。また、RANTESなどのbケモカインがT細胞の病巣局所へ密接に関与している。

4) RA発症における遺伝的解析としてHLA-DR4 (H2-DQB1*0405)が遺伝的要因の1つであることを明確にする上で、次の点を明らかにした。すなわち、健常人のDRB1*0405ホモ抗体及びDRB1*0405陰性RA滑膜T細胞よりDRB1*08032特異的アロ反応T細胞株の樹立及びその細胞clone認識するDRB10405ペプチドの解明。

5) TNF受容体ファミリー分子を介して、シグナル伝達に関する研究がRAの滑膜細胞を中心に研究が進められ、滑膜細胞のactivation processにおいてTRAF → NIK → IKKというNfb 活性に機序することが明らかにされた。

<動物モデル及び病因遺伝子の解明>

1) RA動物モデルとしてHTLV-1 Tax遺伝子導入マウス及び同ラットでの病態解析が進み、RAの炎症の解明にとって滑膜細胞及び免疫担当細胞の役割及び両者の分子間反応を介在する種々のサイトカインの役割が明らかにされた。また、種々のサイトカインノックアウトマウスが提示された。特に、IL-1Rアンタゴニストノックアウトマウスは、今回新たに確立された。RAとこれらの二系統の動物モデルは全体の免疫異常の強い、ヒトのRAに類似した動物モデルとして興味深い。また、taxのみを発現する遺伝子にfms及びCD4プロモーターの下流に結合してLTR-CD4-tax-LTR及びLTR-fms-tax-LTR-CD4-tax-LTR及びLTR-fms-tax-LTRのplasmidを遺伝子導入したCD4-Tax, fms-Taxマウス

(CH3/HeNマウス)が作製された。3ヵ月齢でそれぞれ50%, 100%に関節炎を発症することが明らかにされた。これらの動物モデルマウスの意義は、T細胞介路及びマクロファージ介路によるRA発症のモデルマウスとして確立された点である。

2) ヒトのRAに酷似した、自然発症モデル (SKG) マウスが確立され、その病因論的解析を加えている。このマウスは、単一遺伝子の変異によって発症している可能性が高く、RAの病因遺伝子を解明して行く上で極めて重要なものであると考え、さらに、遺伝子レベルからの解析を進めている。すなわち、SKGマウスはBALB/cバックグラウンドの単一遺伝子ミュータントマウスであり、その関節炎は常染色体性遺伝を示す。遺伝的浸透度は通常の飼育環境で6ヵ月齢で判定した場合、ほぼ100%である。関節腫脹は、生後2ヵ月頃から主として前足指骨間関節にほぼ左右対称性に始まり、その後、手関節、足関節に及ぶ。雌雄とも関節腫脹は慢性に進行するが、雌の方が若干進行が早く、重症度も高い傾向がある。病理組織学的に、滑膜の増殖、滑膜下組織への炎症性細胞浸潤から始まり、関節周囲炎、パンヌスの形成、軟骨・軟骨下骨組織の破壊、線維化へと進み、関節強直に到る。関節外病変としては、間質性肺炎、皮膚炎、血管炎がみられる。血清中には、IgM型リウマチ因子、抗II型コラーゲン抗体、結核菌熱ショック蛋白70と反応する抗体が検出できる。以上の免疫病理学的所見は、このモデルがヒトのRAと酷似し、さらに、SKGマウスの関節炎は、未梢CD4+T細胞によって正常BALB/cヌードマウスに移入できる。従って、SKGマウスの関節炎は、T細胞性自己免疫によるものであり、関節炎を起すCD4+T細胞は、関節内正常自己抗原を認識し、攻撃すると考えられた。現在さらに本モデルについては、より詳細な解析が進んだ。

<RA病因遺伝子の解析>

RAの病因遺伝子については、動物モデル、RAの宿主由来のDNAを用いて、マクロサテライトマーカーによる宿主解析および関節病変を同定している形態形成遺伝子の解析からRA病因遺伝子として、第1、第2、第8、X染色体のそれぞれの染色体の特定の部位が候補遺伝子として特定されつつある。

C. 考察

1) 今年度の結果は、昨年度に引き続き大きな成果が得られた。特にRAの主病巣である滑膜組織の増殖と細胞死の分子及び遺伝子レベルの解明は、また総合報告書で述べたように3年度のまとめの年あたり、今後遺伝子レベルから本症の発症に本質的に関わる鍵となる研究である。

2) 滑膜細胞増殖、アポトーシスおよびRAの基礎疾患である免疫系に関与する転写因子の異常解明へ向け昨年度より研究が進展してきた。

3) 滑膜T細胞ライブラリーを用いた研究では、カテプシンや一部の変性軟骨由来のペプチドが自己抗原として作用しており、今後さらに分子生物学的手法で解明されると考えられる。これらの自己抗原ペプチドの投与により、動物モデルの確立とともにリウマチ発症患者にトレランスを誘導し、その予防や症状の進展を抑制する特異的免疫療法への戦略が確立された。

4) 動物モデル「方法」のところでも述べたように、HTLV-I tax TGマウスとヒト破壊性関節炎 cfos-tax TGマウスと増殖性滑膜炎、HTLV-I env PX TGラットと血管炎を主体とするRA (MRA) などといったように、動物モデルとヒトのRAのsubset または臨床経過の一部が対応されだしたことは極めてその意義が大きい。

5) T細胞を中心とする抗原ペプチドの解明もHTLV-I 関節炎では、その原因ウイルスの遺伝子産物が病巣局所で自己抗原として作用していることが解明された。

6) リウマチの病因は、T細胞介路とマクロファージ介路の二つの経路が現在提唱されているが、CD4-tax, fms-tax トランスジェニックマウスの確立により、この二つの経路が分子レベルで解明された。また、新たに関節軟骨破壊の動物モデルが開発された。

7) SKGマウスは、ヒトRA病因遺伝子の究明に大きな示唆を与えるモデル動物であると考え。感染性要因としては、Tax類似の機能を有するレトロウイルス由来の産物がCREB結合タンパク (CBP) と結合している可能性が極めて強くなり、現在その解析を進めている。

8) RAの病因遺伝子として、ヒトの染色体のうち、第1、第2、第8、X染色体のある対象の部分が、絞り込まれつつあり、Homeobox の一群のうち、

第2染色体上に位置するHoxD9のRAの病因への関与を解明した意義は大きい。

D. 結論

- 1) RAの主病巣である滑膜細胞の増殖と細胞死 (apoptosis) の分子機構が解明された。また、軟骨細胞の細胞生物学的研究が、今年度は大きく進展した。
- 2) 滑膜細胞の分化において形態形成遺伝子であるHox遺伝子 (HoxD9) が関与しており、この遺伝子群の一部がRAの発病に密接に関与していることが *in vivo* でも明らかにされた。
- 3) RAの病巣局所のT細胞の解析から病因ペプチドが数種分離されたが、その多くが軟骨細胞由来であることが解明された。
- 4) RAの病因および病態形成を解明するため、これまでのモデルに加えて新しい動物モデルが確立された。
- 5) RAの疾患遺伝子として、いくつかの染色体の特定の部位が解明されつつある。

以上の結果、RAの病因が病因遺伝子、病因ペプチド及び宿主の感受性因子、感染性の要因という4つの方向から解明されつつあり、昨年に引き続き1年間で大きな成果を挙げた。

<付記>

ヒト滑膜細胞等、生体試料を用いた実験は、すべてそれぞれの研究班の所属する機関の倫理委員会等で承認され、患者の同意を得ることを前提としている。

E. 発表論文

1. Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T, Hasunuma T, Kato T, Hamada H, Nishioka K. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes by TNF alpha and bFGF is associated with the expression of apoptosis-related molecules. 2000 Arthritis Rheum. (in press)
2. Okamoto K, Kobayashi T, Kobata T, Hasunuma T, Kato T, Sumida T, Nishioka K. FADD is a Fas-mediated Apoptosis Modulator in Synoviocytes. 2000 Rheumatology. (in press)
3. W. Yin, Nishioka K, et al. Synovial hyperplasia in HAAP is induced by TNF alpha produced by HTLV-I infected CD68+ cells. 2000 J. Rheumatol. (in press)
4. Sekine T, Nishioka K, et al. Expansion of identical T cell clonotypes in bilateral thyroid lobes in Graves' disease. 2000 Endocr J. (in press)
5. Nakazawa M, Hasunuma T, Oshima T, Kobata T, Nishioka K, Nakajima T. CBP: a target molecule of HTLV-I tax in synoviocytes activation. 2000 BBRC. (in press)
6. Tsuji H, Mukaida N, Harada A, Kaneko S,

- Matsushita E, Nakamura Y, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kobayashi K, and Matsushima K. Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in Propionibacterium acnes-primed IFN-gamma-deficient mice by a concomitant reduction of TNF- α , IL-12 and IL18 production. J.Immunol 162:1049-1055,1999.
7. Kotani M, Tagawa Y, and Iwakura Y. Involvement of autoimmunity against type II collagen in the development of arthritis in mice transgenic for the human T cell leukemia virus type I tax gene. J.Immunol 29:54-64,1999.
 8. Habu K, Nakayama-Yamada J, Asano M, Saijo S, Itagaki K, Horai R, Yamamoto H, Sekiguchi T, Nosaka T, Hatanaka M, and Iwakura Y. The HTLV-I-tax gene is responsible for the development of both inflammatory polyarthropathy resembling rheumatoid arthritis and non-inflammatory ankylosing arthropathy in transgenic mice. J.Immunol 162:2956-2963,1999.
 9. Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, Hiroishi K, Takeda K, Akira S, Tagawa Y, Iwakura Y, Kayagaki N, Yagita H, Kurimoto M, Okamura H, Nakanishi K, and Higashino K. Interleukin 18 upregulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin mRNA expression by binding to constitutively expressed IL-18R. J.Immunol 162:1662-1668,1999.
 10. Sawai N, Kita M, Kodama T, Tanahashi T, Yamaoka Y, Tagawa Y, Iwakura Y, and Imanishi J. The role of interperon-gamma in Helicobacter pylori-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. Infect. Immun 67:279-285,1999.
 11. Komai K, Hikasa M, Kawasaki H, Murata M, Konishi Y, Kitagawa M, Shiozawa K, Shiozawa S. Arthritis Rheum. 42(9)Suppl. S392, 1999.
 12. Konishi Y, Mukae N, Hayashi S, Yamamoto E, Komai K, Kawasaki H, Miura Y, Shiozawa K, Shiozawa S. Arthritis Rheum. 42(9)Suppl. S393, 1999.
 13. Shiozawa S, Komai K, Konishi Y, Hikasa M, Kitagawa M, Shiozawa K, Mukae N, Kawasaki H. Rev. Immunogenet 2:133-139, 2000.
 14. Shimizu K, Kawasaki H, Morisawa T, Nakamura M, Yamamoto E, Yoshikawa N, Doita M, Shiozawa K, Yonehara S, Shiozawa S. Ann. Rheum. Dis., in press.
 15. Kawasaki H, Suzuki G, Chihara K, Tokuhisa T, Shiozawa S. Int. Immunol. 12:1873-1880, 1999.
 16. Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, Oku H, Kaneko M, Takano H, Sugamoto K, Ohzono K, R Suzuki, Ochi T. Establishment of nurse-like stromal cell lines from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology 38:854-863, 1999
 17. Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Hashimoto H, Kaneko M, Takano H, Sugamoto K, Suzuki R, Ochi T. Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with RA. Arthritis Rheum,

42:221-228, 1999

18. Pitkaenen J, Doucas V, Sternsdorf T, Nakajima T, Aratani S, Jensen K, Will H, Vaehaemurto P, Ollila J, Vihinen M, Scott HS, Antonarakis SE, Kudoh J, Shimizu N, Krohn K, Peterson P. APECED protein AIRE has transcriptional transactivating properties and interacts with common co-activator CBP. *J. Biol. Chem.* in press.
19. Nakazawa M, Hasunuma T, Ohshima, Kobata T, Nishioka K, Nakajima T. CBP: a target molecule of HTLV-I Tax in synoviocyte activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press.
20. Miyagishi M, Ohshima T, Ishida J-I, Fujii R, Nakajima T, Fukamizu A. Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/Capsulin. *Molecular and Cellular Biochem.* in press.
21. Koya D, Dennis J.W., Warren C.E., Lin Y-W., Schoen F.J., Nishio Y, Nakajima T, Takahara N, Lipes M, Montimny M.R., King G.L. Overexpression of Core 2 N -acetylglucosaminyltransferase Enhanced Cytokine Actions and Induced Hypertrophic Myocardium in Transgenic Mice. *FASEB. J.* 13:2329-2337, 1999.
22. Kawahara K-I, Watanabe S, Ohshima T, Soejima Y, Oishi T, Aratani S, Amano T, Fujii R, Hagiwara M, Fukamizu A, Nakajima T. Hypernuclear acetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 266:417-424, 1999.
23. Nakatsuru S, Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Q WM, Morimoto K, Yazawa C, Ogasawara H, Abe Y, Fukui K, Ichien G, Ito RM, Mori S, Nakamura Y, Nose M. Genetic dissection of the complex pathological manifestations of collagen disease in MRL/lpr mice. *Pathology International* 49:974-982, 1999.
24. Nishihara M, Terada M, Kamogawa J, Ohashi Y, Mori S, Nakatsuru S, Nakamura Y, Nose M. Genetic basis of autoimmune sialoadenitis in MRL/lpr lupus mice: additive and hierarchical properties on polygenic inheritance. *Arthritis & Rheumatism* 42:2616-2623, 1999.
25. Iwata S, Yamaguchi N, Munakata Y, Ikushima H, Lee JF, Hosono O, Schlossman SF, and Morimoto C. CD26/DPPIV differentially regulates the chemotaxis of T cells and monocytes toward RANTES. *Int. Immunol* 11:417-426, 1999.
26. Munakata Y, Umezawa Y, Iwata S, Dong R-P, Yoshida S, Ishii T, and Morimoto C. Specific inhibition of Th2 type cytokine production from human peripheral T cells by terfenadine in vitro. *Clin. Exp. Allergy* 29:1281-1286, 1999.
27. Hosono O, Homma T, Kobayashi H, Munakata Y, Nojima Y, Iwamoto A, and Morimoto C. Decreased dipeptidyl peptidase IV enzyme activity of plasma soluble CD26 and its inverse correlation with HIV-1 infected individuals. *Clin. Immunol.* 91:283-295, 1999.
28. Mukasa R, Homma T, Ohtsuki T, Hosono O, Souta A, Kitamura T, Fukuda M, Watanabe S, and Morimoto C. Core 2-containing O-glycans on CD43 are preferentially expressed in the memory subset of human CD4 T cells. *Int. Immunol* 11:259-268, 1999.
29. Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Serizawa R, Ikeda J, Morimoto C, Yasunaga K, Yamaji N, Tadokoro K, Juji T, and Takahashi T. CC chemokine receptors, CCR-1 and CCR-3, are potentially involved in antigen-presenting cell function of human peripheral blood monocyte derived dendritic cells. *Blood* 93:34-42, 1999.
30. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Kawasaki A, Akiba H, Okumura K, and Yagita H. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol* 162:2639-2647, 1999.
31. Shimozato O, Takeda K, Yagita H, and Okumura K. Expression of CD30 ligand (CD153) on murine activated T cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 256:519-526, 1999.
32. Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H, Koga M, Sakisaka S, Honda J, Yang N.D, Kayagaki N, Okumura K, and Nonaka K. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84:2896-2902, 1999.
33. Kim Y-H, Kim S, Kim K-A, Yagita H, Kayagaki N, Kim K-W. and Lee M-S. Apoptosis of pancreatic beta-cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes. *Eur. J. Immunol* 29:455-465, 1999.
34. Kawamura T, Azuma M, Kayagaki N, Shimada S, Yagita H, and Okumura K. Fas/Fas ligand-mediated elimination of antigen-bearing Langerhans cells in draining lymphnodes. *Brit. J. Dermatol* 141:201-205, 1999.
35. Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Koya Y, Takemura F, Hirokawa K, Yoshiki T, Tanaka Y, Fujii M, Kannagi M. Induction of adult T-cell leukemia-like lymphoproliferative disease and its inhibition by adoptive immunotherapy in T-cell-deficient nude rats inoculated with syngeneic human T-cell leukemia virus type 1-immortalized cells. *J. Virol* 73:6031-6040, 1999.
36. Katsumata K, Ikeda H, Sato M, Ishizu A, Kawarada Y, Kato H, Wakisaka A, Koike T, Yoshiki T. Cytokine regulation of env gene expression of human endogenous retrovirus-R in human vascular endothelial cells. *Clin. Immunol* 93:75-80, 1999.
37. Hanabuchi S, Ohashi T, Koya Y, Kato H, Takemura F, Hirokawa K, Yoshiki T, Yagita H, Okumura K, Kannagi M. Development of human T-cell leukemia virus type 1-transformed tumours in rats following suppression of T-cell immunity by CD80 and CD86 blockade. *J. Virol* 74:428-435, 2000.
38. Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N,

- Sakamaki K, and Yonehara S. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398:777-785,1999.
39. Kazama H, Yonehara S. Oncogenic K-Ras and basic FGF prevent Fas-mediated apoptosis in fibroblasts through activation of MAP kinase. *J. Cell. Biol* 148:557-566,2000.
40. Yonehara S. Effect of anti-Fas antibodies on lymphocytes and other organs: Preparation of original and new monoclonal antibodies and amelioration of systemic autoimmune disease. *Intern. Rev. Immunol* 18:329-345,1999.
41. Inazawa Y, and Yonehara S. Fas-induced in vivo apoptosis in bone marrow: Anti-Fas mAb-induced elimination and successive proliferation of Fas-expressing cells especially those of myeloid lineage. *Cell Struct. Funct* 24:151-159,1999.
42. Tsukumo S, and Yonehara S. Requirement of cooperative functions of two repeated death effector domains in caspase-8 and in MC159 for induction and inhibition of apoptosis, respectively. *Genes Cells* 4: 541-549,1999.

慢性関節炎におけるサイトカインの役割

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター教授）

研究要旨

関節リウマチの病因を明らかにする試みの1つとして、関節炎における炎症性サイトカインの役割について検討してきた。本年度はIL-1に焦点を絞って検討を加え、IL-1レセプターアンタゴニスト (ra) 欠損マウスが自己免疫性の関節炎を発症することを明らかにした。この結果は、ヒトでもIL-1、あるいはIL-1ra遺伝子の異常が、関節リウマチの原因になっている可能性を示唆する。

A. 研究目的

我々は先に HTLV-I の *tax* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (HTLV-I-Tg マウス) を作製し、このウイルスがヒトの慢性関節リウマチによく似た慢性関節炎を引き起こすことを示した。これまでの解析から、このマウスの関節炎の発症にはT細胞に依存した自己免疫が関与すること、IL-1やIL-6などのサイトカインが病態形成に関与していること、を明らかにした。本研究では、そのうちIL-1の果たす役割について検討した。

IL-1は炎症のメディエーターとして知られているが、他にも免疫系の調節や、中枢神経系の調節、内分泌系の調節など、多面的な役割を果たしているものと考えられている。IL-1には α 、 β の二種の分子種が知られており、同じレセプターに結合する。一方、IL-1raは同じレセプターに結合し、IL-1の作用を阻害することから、その調節因子と考えられている。本研究ではIL-1ファミリー遺伝子を欠損させ、その免疫系に及ぼす影響を検討した。

B. 方法

ノックアウト (KO) マウス: IL-1 α 、お

よびIL-1 β は、それぞれエクソン5およびエクソン3-5内にハイグロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子を挿入して失活させた。また、IL-1 α / β ダブルKOマウスは、ES細胞の段階で両遺伝子に上記の変異を導入し、作製した。IL-1raKOマウスは、エクソン1-4をネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより、作製した。これらのマウスはいずれもBALB/cAマウスに6世代以上戻し交配し、実験に供した。なお、マウスの飼育は全てSPF環境下で行った。

C. 結果

1. IL-1KOマウスはSRBCに対する免疫応答が低下しており、IL-1が免疫応答の調節因子として重要な役割を果たしていることが示された。
2. IL-1KOマウスの、コラーゲン誘導関節炎やHTLV-I誘導関節炎に対する感受性を検討したところ、低感受性を示し、IL-1がこれらの病態形成に重要な役割を果たしていることが分かった。
3. IL-1ra欠損マウスは、5週齢頃から複数の関節の腫脹が認められ、12週齢で100%関節炎を発症する事が分かった(1)。

関節の病理像は関節リウマチに酷似しており、リウマチ因子、抗2型コラーゲン抗体などの自己抗体価が亢進していた。また、関節では、IL-1 β や、IL-6などの発現が亢進していた。

D. 考察

以上の結果は、この関節炎が自己免疫性のものであることを示唆しており、IL-1raは恒常的に発現される低レベルのIL-1の作用を抑制することにより、免疫系の恒常性を保っていることが示唆された。

E. 結論

我々は、IL-1が発熱やグルココルチコイドの分泌においても重要な役割を果たしていることを既に報告した。従って、IL-1は単に局所の炎症反応のみならず、免疫系、神経系の調節因子として、関節リウマチの病態形成に重要な役割を果たしていることが示された。今後、実際この遺伝子の異常によって関節リウマチを発症している患者がいるかどうかを明らかにする予定である。

F. 研究発表

Tsuji, H., Mukaida, N., Harada, A., Kaneko, S., Matsushita, E., Nakanuma, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Kobayashi, K., and Matsushima, K. Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Propionibacterium acnes*-primed IFN- γ -deficient mice by a concomitant reduction of TNF- α , IL-12 and IL-18 production. *J. Immunol.*, **162**, 1049-1055 (1999).

Kotani, M., Tagawa, Y., and Iwakura, Y. Involvement of autoimmunity against type II collagen in the development of arthritis in mice transgenic for the human T cell leukemia virus type I *tax* gene. *Eur. J. Immunol.*, **29**, 54-64 (1999).

Habu, K., Nakayama-Yamada, J., Asano, M., Saijo, S., Itagaki, K., Horai, R., Yamamoto, H., Sekiguchi, T., Nosaka, T., Hatanaka, M., and Iwakura, Y. The HTLV-I-*tax* gene is responsible for the development of both inflammatory polyarthropathy resembling rheumatoid arthritis and non-inflammatory ankylosing arthropathy in transgenic mice. *J. Immunol.*, **162**, 2956-2963 (1999).

Hyodo, Y., Matsui, K., Hayashi, N., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Yamauchi, H., Hiroishi, K., Takeda, K., Akira, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., Kurimoto, M., Okamura, H., Nakanishi, K., and Higashino, K. Interleukin 18 upregulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin mRNA expression by binding to constitutively expressed IL-18R. *J. Immunol.*, **162**, 1662-1668 (1999).

Sawai, N., Kita, M., Kodama, T., Tanahashi, T., Yamaoka, Y., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Imanishi, J. The role of interferon- γ in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect. Immun.*, **67**, 279-285 (1999).

Igarashi, I., Suzuki, R., Waki, S., Tagawa, Y., Seng, S., Tum, S., Omata, Y., Saito, A., Nagasawa, H., Iwakura, Y., Suzuki, N., Mikami, T., and Toyoda, Y. Roles of CD4+ T cells and IFN- γ in protective immunity against *Babesia microti* infection in mice. *Infection and Immunity*, **67**, 4143-4148 (1999).

Kotani, N., Asano, M., Iwakura, Y., and Takasaki, S. Impaired β 1, 4-galactosylation of core 2 O-glycans in erythrocytes of β 1, 4-galactosyl-transferase knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 94-98 (1999).

He, J., Ichimura, H., Iida, T., Minami, M., Kobayashi, K., Kita, M., Sotozono, C., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Imanishi, J. Kinetics of

- cytokine production in the cornea and trigeminal ganglion of C57BL/6 mice after corneal HSV-1 infection. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**, 609-615 (1999).
- Kawakami, K., Miyazato, A., Iwakura, Y., and Saito, A. Induction of lymphocytic inflammatory changes in the lung interstitium by human T lymphotropic virus type I. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **160**, 995-1000 (1999).
- Shimada, S., Kawaguchi-Miyashita, M., Kushi, A., Sato, T., Nanno, M., Sako, T., Matsuoka, Y., Sudo, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Ohwaki, M. Generation of polymeric immunoglobulin receptor-deficient mouse with marked reduction of secretory IgA. *J. Immunol.* **163**, 5367-5373 (1999).
- Saijo, S., Kotani, M., Habu, K., Ishitsuka, C., Yamamoto, H., Sekiguchi, T. and Iwakura, Y. Bone marrow derived cells are responsible for the development of autoimmune arthritis in HTLV-I transgenic mice and those of normal mice can suppress the disease. *J. Immunol.*, **163**, 5700-5707 (1999).
- Kobayashi, M., Aosai, F., Hata, H., Hye-Seong, M., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Yano, A. *Toxoplasma gondii*: Difference of invasion into tissue of digestive organs between susceptible and resistant strain and influence of IFN- γ in mice inoculated with the cyst per orally. *J. Parasitology*, **85**, 973-975 (1999).
- Kido, M., Asano, M., Iwakura, Y., Ichinose, M., Miki, K., and Furukawa, K. Normal levels of serum glycoproteins maintained in β -1, 4-galactosyltransferase I-knockout mice. *FEBS Letters*, **464**, 75-79 (1999).
- Takikawa, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Yoshida, R., and Truscott, R. J. Interferon-gamma-dependent/independent expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Studies with interferon-gamma-knockout mice. *Adv Exp Med Biol*, **467**, 553-557 (1999).
- Hino, A., Igarashi, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Nariuchi, H. Interferon- γ priming is not critical for IL-12 production of murine spleen cells. *Cytokine*, **12**, 12-20 (2000).
- Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M., and Iwakura, Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.*, **191**, 313-320 (2000).
- Tagawa, Y., Matthys, P., Heremans, H., Dillen, C., Zaman, Z., Iwakura, Y., and Billiau, A. Bimodal role of endogenous interleukin-6 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *J. Leukocyte Biology*, **67**, 90-96 (2000).
- Miyazato, A., Kawakami, K., Iwakura, Y., and Saito, A. Chemokine synthesis and cellular inflammatory changes in lungs of mice bearing *p40tax* of human T cell leukemia virus type I. *Clinical and Experimental Immunology*, in press.
- Okusu, N., Iwakura, Y., and Nakanishi, K. Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for the treatment and prevention of *Leishmania major* infection. *Infect. Immun.*, in press.
- Ozaki, H., Tanaka, J., Yasuda, J., Horai, R., Tagawa, Y., Asano, M., Saijo, S., Imai, M., Sekikawa, K., Kopf, M., and Iwakura, Y. LPS-induced HIV-1 expression in transgenic mice is mediated by TNF- α and IL-1, but not by IFN- γ nor IL-6. *AIDS*, in press.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

インターロイキン-1 関連疾患モデルノックアウト動物
特願平 11-130789

分担研究報告書

慢性関節リウマチの滑膜増殖機構と疾患遺伝子の研究

分担研究者 塩沢俊一 神戸大学医学部保健学科教授

研究要旨 慢性関節リウマチ（RA）の発症に関わる環境因子と遺伝素因について、抗原に対する免疫応答の中心である T 細胞と関節破壊に直接関与する滑膜間葉系細胞の二つが重要である。これに関して私どもは、*c-fos* 遺伝子の過剰発現が滑膜間葉系細胞を活性化させて関節破壊を増強させることを指摘してきたが、今回 *c-Fos/AP-1* の過剰発現が細胞分裂のキイとなる MPF (mitosis promoting factor) を抑制する *wee 1 kinase* の転写を促進し、*wee 1 kinase* の亢進が RA 滑膜において DNA 合成が過剰である反面、細胞分裂が抑制されて 4 倍体の異常な細胞周期の営まれている原因の一つであることを見出した。これは RA 滑膜における腫瘍様増殖を説明する結果である。またこれに並行して RA の遺伝要因に関して、私どもは先に RA の疾患感受性遺伝子として、第 1 染色体 D1S253/214、第 8 染色体 D8S556、X 染色体 DXS1232 の 3 つがあることを指摘し、当該遺伝子を順に *RA1*, *RA2*, *RA3* と命名した。今回、詳細なマッピングおよびゲノムウォークの結果、第 1 染色体に位置する疾患感受性遺伝子として細胞死に関わる *death receptor 3 (DR3)* 分子を候補と考えられた。また、X 染色体については従来の DXS1232 から 0.1cM 近傍の DXS984 に新たに Lod 値が 2.03 の頂値域を見出し、これを radiation hybrid 法とシークエンスにより解析した結果、低分子量 G 蛋白に対する GEF (GTP exchange factor) である *Dbl* プロトオンコジーンが RA の疾患遺伝子 *RA3* であることを確定した。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ（RA）の発症には、環境と遺伝の二つの要因が関与する。前者には、免疫応答の中心である T 細胞と、関節破壊に直接関与する滑膜間葉系細胞の二つが重要である。血流に乗って関節に到達した抗原は、関節滑膜表層の fibroblast-like または macrophage-like の間葉系細胞に補足されて抗原提示され、T 細胞による免疫応答が関節局所で開始する。滑膜間葉系細胞は抗原を提示する他、パンヌスとして関節破壊に直接関与する。パンヌスの一見腫瘍様の強い滑膜増殖や RA 特有の骨粗鬆症状態は、増殖関連 *c-fos* 遺伝子を滑膜細胞や骨芽細胞に過剰発現させることにより実験的に作成できる。また抗原特異的 T 細胞に *c-fos* 遺伝子が過剰発現すると、T 細胞は *c-fos* 遺伝子の高発現下にアネルギーになり難く応答が亢進し、細胞周期の 4C(G2/M)へと移行して腫瘍にも似た異常な細胞周期を営む。今回私どもはこの異常な細胞周期の原因に *c-Fos/AP-1* による *wee 1 kinase* の転写活性化のあることを見出し、同じ現象が RA 滑膜に

も存在して RA 特有の滑膜増殖に関係していることを新たに見出した。

また私どもは先に RA の遺伝素因について、全染色体に分布する総計 358 箇所のマイクロサテライトマーカー部位を指標にマイクロサテライトマーカーによる家系解析を行い、Lod 値が 3 を越えて有意である第 1 染色体 D1S214、第 8 染色体 D8S556、X 染色体 DXS1232 の合計 3 つに RA の疾患遺伝子座位を特定したが、今回は同一手法により部位を詳細に特定し、さらに第 1 染色体と X 染色体に位置する遺伝子を同定を試みた。

B. 研究方法

c-fos 過剰発現抗原特異的 T 細胞クローンを長期培養し、長期培養下に 4C 周期に移行したクローンを限界希釈法で取り出し、抗 CD3 で刺激後、*c-fos*, *cdc2*, *cyclin B*, *cdc25B*, *wee1*, *chk1*, *p21*, *CBP* の mRNA 発現を定量 RT-PCR/PCR (ABI7700)法にて、また蛋白をウエスタンブロットとゲルシフト法により調べた。*wee1* のプロモーターは、アダプターを付加した

ヒトゲノムDNAからPCRでwee1 kinaseの5'非翻訳領域を単離し塩基配列を決定した。また転写の確認にはnuclear run-on assayを用い、ゲルシフト法およびルシフェラーゼレポーターアッセイにより遺伝子プロモーターの活性化を検定した。またX染色体領域の不十分であった位置の同定を、該当範囲のより詳細な遺伝子マッピングをマイクロサテライトマーカー解析を用いて行い、クロモゾームウオークによってcDNAおよびゲノムDNAのレベルで疾患遺伝子を検索した。エキソンスキッピングの存在についてはエキソントラッピング法によって検定した。

C. 研究結果

c-fos 過剰発現 T 細胞とくに 4C クロームは、対照に比してc-fos, wee1 およびCBPのmRNA発現量および蛋白量が高く、p21が減少していた。ヒトおよびマウスのwee1のプロモーター配列を新たに決定したところAP-1 サイトが存在していた。このAP-1 サイトを用いたゲルシフトアッセイによりwee1のAP-1 サイトに対する結合活性のあることが示され、さらにAP-1 サイトの変異導入やプロモーターの部分切断端をつないだルシフェラーゼレポーターアッセイによって、c-fos 遺伝子過剰発現時におけるwee1 亢進はc-Fosのwee1 プロモーターへの直接作用であることが示された。

RAの疾患遺伝子については、第1染色体の遺伝子としてG4 radiation hybrid mappingの結果、D1S214とD1S253の間に細胞死を誘導するdeath receptor DR3 遺伝子が位置していた。サザンブロット法でEcoRI 切断によると、健常者では9kbのバンドが見られたのに対してRAでは9kbの他に7kbのバンドが認められた。DraI 切断によると、プローベを細胞外部分に当てると2kb弱のバンドがRAでのみ検出されたのに対して、プローベが細胞内部分であるときはRAと健常者の双方にバンドが検出され、RAでは細胞外部分のみのtruncated moleculeのあることが示唆された。さらにABI7700を用いて定量RT-PCR法によると、transmembrane portionを含む細胞外領域のmRNA量はRAの方が健常者の2倍量存在していたが、細胞内部分には差がなかった。実際RA患者の白血球ではカスパー8の分解が阻止されていた。この結果よりRAではDR3分子の細胞外部分のみのtruncated moleculeが増えている、このため細胞死のシグナルが適切に伝達されないで自己免疫状態が惹起されるものと考えられた。

X染色体については、マイクロサテライトマーカー

の再解析の結果、従前のDXS1232から0.1cM離れたDXS984にMLSが2を超える単独頂値域が見出された。G3 radiation hybrid mappingの結果、この部位にDblプロトオンコジーンが見出された。CDNAを調べると3'端近くに223bpの欠損が疾患特異的に見出された。この欠損は第23, 24エキソンスキッピングの結果であり、この基盤としてDNAイントロン上にnt2522+394(C→T)が見出され、この変異をもつイントロンをエキソントラッピング法でみると確かに上記エキソンスキッピングが生じた。Dblは低分子量G蛋白のGEF(GTP exchange factor)であるから、Dblの変異はその直下にあるRac, cdc42, rhoなど細胞運動機能に影響することが考えられ、また好中球の活性酸素生成能は生成に関わるNADPH オキシダーゼの構成成分としてRacがあることから、Dbl機能異常が活性酸素生成を阻害すると推定できる。このことから、私どもは好中球の活性酸素生成能を調べたところ、Dbl変異のあるRA患者において特異的に活性酸素生成が低下していた。

D. 考察

疾患遺伝子座として先に特定した遺伝子をDNAレベルで検索して、疾患遺伝子候補を見出した。第1染色体にある疾患遺伝子として推定しているDR3は細胞死に関わるFasのファミリーに属する第3番目のdeath receptorとしてdeath receptor 3(DR3)と命名された経緯があるように、機能的death receptorであり、リンパ系細胞にのみ表出されているのが大きな特徴である。細胞死が適切に生じないとリンパ系細胞の過剰増殖によって自己免疫を来すことはFasの発見以来有名な事実であるが、私どもの知見が真実であるならばDR3分子はヒトのFas欠損型に相当するといえよう。X染色体にある疾患遺伝子としては、私どもはこれが低分子量G蛋白に対するGEFであるDbl遺伝子であることをDNAレベルで確定した。この分子の生理機能はまだ未開の部分が少ないが、細胞運動や活性酸素生成など重要な生物学的機能を営む分子群の一つであり、我々の知見を端緒としてこの分野の研究が進むことが期待され、好中球という炎症においては古い細胞が、今や古くして新しい細胞として注目されるべきことが示唆される成績といえよう。

E. 結論

RAにおけるc-Fos/AP-1の過剰発現が細胞分裂のキイとなるMPF(mitosis promoting factor)を抑制

する wee 1 kinase の転写を促進し、wee 1 kinase の亢進が、RA 滑膜において DNA 合成が過剰である反面、細胞分裂が抑制されて4倍体の異常な細胞周期の営まれている原因の一つであることを見出した。このことは、RA の半ば増殖性の強い増殖を説明する結果と考えられた。また、RA の疾患感受性遺伝子として、第1染色体 D1S253/214 にある death receptor 3 (DR3)分子を、そしてX染色体の疾患遺伝子として、低分子量G 蛋白に対する GEF (GTP exchange factor) である *Dbl*プロトオンコジーンを見出した。

F.研究発表

Komai K, Hikasa M, Kawasaki H, Murata M, Konishi Y, Kitagawa M, Shiozawa K, Shiozawa S. *Arthritis Rheum.* 42(9)Suppl. S392. 1999.

Konishi Y, Mukae N, Hayashi S, Yamamoto E, Komai K, Kawasaki H, Miura Y, Shiozawa K, Shiozawa S. *Arthritis Rheum.* 42(9)Suppl. S393. 1999.

Shiozawa S, Komai K, Konishi Y, Hikasa M, Kitagawa M, Shiozawa K, Mukae N, Kawasaki H. *Rev. Immunogenet* 2:133-139.2000.

Shimizu K, Kawasaki H, Morisawa T, Nakamura M, Yamamoto E, Yoshikawa N, Doita M, Shiozawa K, Yonehara S, Shiozawa S.

Ann. Rheum. Dis., in press.

Kawasaki H, Suzuki G, Chihara K, Tokuhisa T, Shiozawa S. *Int. Immunol.* 12:1873-1880, 1999.

Tanaka R, Iijima K, Inoue Y, Xu H, Murakami R, Nakamura H, Shirakawa T, Shiozawa S, Yoshikawa N. *Am. J. Kidney Dis.* 34:289-295, 1999.

Yanagihara Y, Shiozawa S, Shiozawa K, Takai M, Kyogoku M. *Clin. Exp. Immunol.* 118:131-136, 1999.

Shiozawa S, Hayashi S, Tsukamoto Y, Shiozawa K. *J. Clin. Rheumatol.* 4:156-158, 1998.

Shiozawa S, Hayashi S, Tsukamoto Y, Goko H, Kawasaki H, Wada T, Shimizu K, Yasuda N, Kamatani N, Takasugi K, Tanaka Y, Shiozawa K, Imura S. *Int. Immunol.* 10:1891-1895, 1998.

Xu H, Iijima K, Shiozawa S, Tanaka R, Inoue Y, Shirakawa T, Nishiyama K, Miwa M, Nakamura H, Yoshikawa N. *Kidney Int.* 54: 1867-1871, 1998.

Shiozawa S, Tanaka Y, Shiozawa K. *J. Interferon Cytokine Res.* 18:255-262, 1998.

慢性関節リウマチ骨髄病態に関する研究
- ナース細胞の樹立と関節破壊への関与 -

富田哲也、竹内英二、高野裕史、前田朋子*、金子元春、史賢林、
高樋康一郎、坪井秀規、吉川秀樹、鈴木隆二*、越智隆弘

大阪大学医学部整形外科、*塩野義医科学研究所

研究要旨

我々は、従来慢性関節リウマチ (RA) の主病巣と考えられている関節病巣は、二次的に骨髄病巣と同じ環境が関節内に形成されるものであり、RA の原因病巣は造血系の骨髄であると考え研究を行ってきた。骨髄中で病態形成に重要な役割を果たす細胞としてナース細胞を樹立した。骨髄ナース細胞とほぼ同様の機能を有する細胞を RA 滑膜からも樹立し、骨髄病巣、滑膜病巣が共通の機序で形成されていることを示した。RA ナース細胞は病態形成に関与するのみならず、関節破壊にも直接的に関与することが示された。

A. 研究目的

我々は従来、慢性関節リウマチ (RA) の主病巣と考えられている関節の増殖滑膜は二次的に骨髄病巣と同環境が関節内に作られたものであり、RA の原因病巣は造血系の骨髄であると考え、RA の骨髄病態について解析してきた。RA 造血系骨髄では健常人には認められない様々な異常細胞や造血系細胞の機能亢進が認められることが明らかとなった。RA 骨髄におけるこのような異常な病態形成に重要な役割を果たしているのはナース細胞であることが明らかとなってきた。今回はこの RA 特異的なナース細胞の樹立及びその特性と関節破壊への関与について検討した。

B. 研究方法

1. RA 骨髄由来ナース細胞株の樹立：RA 患者よりインフォームドコンセントを得た上で手術時に全身造血系である腸骨及び罹患関節部骨端部骨髄として脛骨より骨髄血を採取し、比重分離法にて単核細胞分画を得、長期培養系にて大型の付着系細胞を得た。single cell culture にてクローニングし細胞株を樹立した。この様にして得られた細胞株について細胞正面マーカーの検索、産生サイトカイン、リンパ球の抱き込み能 (psuedoemperipolesis 能) について検討した。
2. RA ナース細胞による pseudoemperipolesis に関与する分子機構の解明：RA ナース細胞はリンパ球を抱き込み維

持、活性化する機能が特徴的である。本機序を解明するため psuedoemperipolesis に関与する接着分子について解析した。すなわちナース細胞とリンパ球系細胞との共培養系に種々の接着分子に対する阻害抗体を共存させ psuedoemperipolesis に対する効果を判定した。

3. RA ナース細胞の骨・関節破壊への関与：psuedoemperipolesis 能が認められた細胞株をナース細胞として用いた。RA 関節滑膜組織より滑膜ナース細胞に依存性に増殖する B 細胞株を樹立した。象牙切片上或いは osteologic (人工骨) 上で RA ナース細胞を 24 時間培養後、B 細胞株を添加し、14 日間培養後象牙切片上或いは osteologic 上のナース細胞および B 細胞を剥離し、骨吸収窩の形成について調べた。チャンバースライドを用い RA ナース細胞と B 細胞の共培養系を経時的に H&E 染色及び TRAP 染色し破骨細胞の出現について検討した。これら共培養系における proteinase 産生につき ELISA で検討した。

C. 研究結果

1. RA 骨髄病巣を形成する間質 (ナース) 細胞：

RA 骨髄付着性細胞より得られた細胞株はリンパ球を抱き込み維持させる機能 (ナース機能) を有していた。ナース細胞とは Wekerle によりマウス胸腺内で未熟な胸腺細胞を抱き込み (pseudoemperipolesis) その分化成熟を促す機能を有する細胞として報告された (Nature,

1980)。RA 骨髄由来細胞株はヒト B、T 細胞を抱き込むことが明らかとなった。すなわちナース機能が認められた。健康人骨髄由来のストローマ細胞ではこのような性質はほとんど認められなかった。骨髄ナース細胞は CD44、54、58、HLA-DR が陽性であったが健康人骨髄由来ストローマ細胞とその発現パターンはほぼ同様であった。サイトカインはの産生が認められた。RA 骨髄ナース細胞には IL-6、-7、-8、GM-CSF やヒアルロン酸の産生能が認められた。骨髄ナース細胞は未分化な細胞を抱き込むことにより活性化され活性因子、ヒアルロン酸の産生能は顕著に増加し、単独培養では検出されない IL-1 β 、TNF α の産生が認められた。また RA 滑膜からも間質細胞を樹立したが細胞表面マーカーの発現やサイトカイン産生などで若干の差異があるものの骨髄間質細胞と基本的にはほぼ同様の特徴を有していた。

2. RA ナース細胞による pseudoemperipolesis に関する分子機構の解明：

Pseudoemperipolesis は抗 CD29 および抗 CD49d 抗体で約 50-60% の抑制が認められた。B リンパ球株である MC/car の C3 処理では濃度依存性に pseudoemperipolesis の抑制が認められた。抗 CD49d 抗体処理あるいは C3 処理により pseudoemperipolesis が抑制される条件において IL-6、-8 の産生上昇は抑制されなかった。

3. RA ナース細胞による骨・関節破壊の可能性：

RA ナース細胞と B 細胞の共培養系では、象牙切片上に骨吸収窩が認められた。osteologic 上でも人工骨の吸収窩が認められた。RA ナース細胞単独培養ではこの様な骨吸収窩は認められなかった。RA ナース細胞と B 細胞の共培養を経時的に検討したが、多核細胞や TRAP 陽性細胞の出現は認められなかった。すなわち破骨細胞によらない骨吸収機序が示唆された。RA ナース細胞単独でも MMP-1 (53.9ng/ml \pm 15.4)、MMP-2 (150.0ng/ml \pm 6.2)、MMP-3 (102.4ng/ml \pm 12.5)、cathepsin B (1.7ng/ml \pm 1.3)、L (5.1ng/ml \pm 2.4) を産生したが、B 細胞と共培養することにより MMP-1 (123.9ng/ml \pm 12.1)、MMP-3 (220.0ng/ml \pm 18.5) の

産生は有意に増加した (P<0.05)。in vitro では少なくとも一ヶ月は MMP-1、-2、cathepsin B、L の産生は認められた。また mRNA レベルでは MMP-9、cathepsin K の発現が認められた。

D. 考察および結論

RA 造血系骨髄ではナース機能を有する付着系細胞がその病態形成には重要な役割を果たしていると考えられ、RA 滑膜組織からも同様の細胞が樹立されたことより骨髄・滑膜共通の病態形成機序が考えられた。また RA ナース細胞は直接的に骨・軟骨破壊にかかわるのみならず間接的には破骨細胞の誘導に関与するなど RA で临床上大きな問題となる関節破壊の進行にも重要な役割を果たすと考えられた。

E. 研究発表

1. Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, Oku H, Kaneko M, Takano H, Sugamoto K, Ohzono K, R Suzuki, Ochi T. Establishment of nurse-like stromal cell lines from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38:854-863, 1999
2. Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Hashimoto H, Kaneko M, Takano H, Sugamoto K, Suzuki R, Ochi T. Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with RA. *Arthritis Rheum*, 42:221-228, 1999

核内アセチル化制御によるリウマチ性疾患制圧法の開発

中島 利博 筑波大学・応用生物科学系

慢性関節リウマチ症をはじめとする種々の難治性疾患の病巣形成細胞の転写制御の恒常性の破綻が、特に個々の転写活性化因子のレベルで解析・報告されている。一方、最近、殆どのシグナル依存的転写活性化因子と複合体を形成し、個々のシグナルを統合し標的遺伝子の転写を活性化する CREB binding protein(CBP)/p300に代表されるコアクチベーター分子群がヒストンをはじめとする種々の核内蛋白質のリジン残基に対するアセチル基転移酵素であることが証明された。わたしは転写コアクチベーターを切り口としてリウマチ滑膜細胞の"転写制御の恒常性の破綻"を解析している。今回、抗アセチル化リジン抗体を作製し、同抗体によりリウマチ病巣滑膜細胞の核内蛋白質のアセチル化が亢進 (hypernuclear acetylation : HNA) していることを発見した。さらに、そのシグナル伝達経路の解析を行った。

A. 研究目的

関節滑膜細胞の増殖と活性化は、慢性関節リウマチ症 (RA) の病巣の形成に非常に重要である。それらの分子機構の解明はRAの発症さらには治療法・予防法の開発に大きく貢献すると考えられる。また、これまでリウマチ滑膜細胞の転写制御の恒常性の破綻が、特に個々の転写活性化因子のレベルで解析・報告されている。

一方、我々をはじめとする幾つかのグループにより CREB binding protein(CBP)/p300に代表される"コアクチベーター"分子群が殆どすべての転写活性化因子と複合体を形成し、個々のシグナルを統合していることが明らかとなった。また、その際に増殖性サイトカイン、ステロイド剤の標的分子であることも報告された。さらに、コアクチベーター分子がヒストンをはじめとする種々の核内蛋白質のリジン残基に対するアセチル基転移酵素であることが証明された。我々は転写コアクチベーターを切り口として関節滑膜細胞の"転写制御の恒常性の破綻"を解析している。本研究は同細胞での転写コアクチベーター機能をアセスメントすることを目的としている。

B. 方法

インフォームドコンセントを得た後、定法により得られた RA由来の病巣滑膜組織、および培養滑膜細胞を用いた。核内アセチル化活性の定量は上記アセチル化リジン抗体に加え、ヒストンに対するアセチル化の活性を指標として検出した。

C. 結果

リウマチ病巣パンスの滑膜の核は抗アセチル化リジン抗体で濃染されていた (本現象を hypernuclear acetylation : HNA と名付けた)。さらに、RA由来の培養滑膜細胞は"autonomous"な核内アセチル化の亢進を認めた。骨関節症由来の培養滑膜細胞の培養上清に TNF α を添加することにより同様の現象を惹起することが可能であった。

D. 考察

これらの結果はリウマチ滑膜細胞の転写亢進状態に転写コアクチベーターレベルでの機能異常が関与していることをはじめを示すものである。また、これまで報告されている転写活性化因子レベルでの機能異常との相互作用が同細胞の転写亢進状態を形成していることが推測される。今後、転写コアクチベーターのこれらの機能を標的とすることにより RAをはじめとする難治性疾患の制御法の開発を目指したい。

E. 結論

転写コアクチベーターの機能異常 (HNA) が RA の病巣滑膜のみならず培養リウマチ滑膜細胞では autonomous に、対象として用いた骨関節症由来滑膜細胞では TNF α で刺激することにより同様の現象を再現することに成功した。今後、本再構成系を用い、より詳細な HNA の分子機構、その病理的意義の解明、さらには転写コアクチベーターを標的としたリウマチ性疾患の制御法の開発への展開が見込まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Jukka Pitkanen, Vassilis Doucas, Thomas Sternsdorf, Toshihiro Nakajima, Satoko Aratani, Kirsten Jensen, Hans Will, Perttu Vahamurto, Juha Ollila, Mauno Vihinen, Hamish S. Scott, Stylianos E. Antonarakis, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Kai Krohn, and Pärt Peterson. "APECED protein AIRE has transcriptional transactivating properties and interacts with common co-activator CBP." *J. Biol.Chem.* in press

2. M. Nakazawa, T. Hasunuma, T. Ohshima, T. Kobata, K. Nishioka, T. Nakajima. "CBP: a target molecule of HTLV-1 Tax in synovial cell activation." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press
3. M. Miyagishi, T. Ohshima, J-I. Ishida, R. Fujii, T. Nakajima, A. Fukamizu. "Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/Capsulin." *Molecular and Cellular Biochem.* in press.
4. D. Koya, J. W Dennis, C. E. Warren, Y-W. Liu, F. J. Schoen, Y. Nishio, T. Nakajima, N. Takahara, M. Lipes, M. R. Montminy, G. L. King. "Overexpression of Core 2 N-acetylglucosaminyltransferase Enhanced Cytokine Actions and Induced Hypertrophic Myocardium in Transgenic Mice." *FASEB. J.* 13 2329-2337 1999.
5. K-I. Kawahara, S. Watanabe, T. Ohshima, Y. Soejima, T. Oishi, S. Aratani, T. Amano, R. Fujii, M. Hagiwara, A. Fukamizu, T. Nakajima. "Hypernuclear acetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 266 417-424 1999.
6. K.P. Sarker, K. Abeyama, J. Nishi, M. Nakata, T. Tokioka, T. Nakajima, I. Kitajima, I. Maruyama. "Inhibition of Thrombin-induced Neuronal Cell Death by Recombinant Thrombomodulin and E5510, a Synthetic Thrombin Receptor Signaling Inhibitor." *Thrombosis and Haemostasis* 82 1071-1077 1999.
7. M. Miyagishi, T. Nakajima, A. Fukamizu. "Molecular characterization of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/capsulin." *International Journal of Molecular Medicine* 5 27-31 1999.
8. T. Ohshima, T. Nakajima, S. Aratani, T. Ohishi, A. Fukamizu, K-I. Yagami. "CRM1 mediates nuclear export of parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS2." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 264 155-160 1999.
9. K. P. Sarker, T. Uchimura, T. Nakajima, M. Sorimachi, I. Kitajima I. Maruyama. "Inhibition of Nitric oxide (NO)-induced Neuronal Cells Death by Epinephrine." *Neurosci. Res. Commun.* 25 79-88 1999.
10. K. P. Sarker, M. Nakata, T. Nakajima, I. Kitajima, I. Maruyama. "Increased Production of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Angiotensin II in Neuro-2a cells." *Neurosci. Res. Commun.* 26 157-162 1999.
11. H. Shio, I. Kitajima, T. Nakajima, Q. Shao, T. Tokioka, I. Takasaki, N. Hanyu, T. Kubo, I. Maruyama. "Thrombin receptor mediated signals induce expression of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- κ B activation in synovial fibroblasts." *Annals of the Rheumatic Diseases* 58 55-60 1999.
12. J. Ishida, S. Asada, H. Daitoku, K. Fujiwara, Y. Kon, K. Murakami, T. Nakajima, Y. Kasuya, A. Fukamizu. "Expression and characterization of mouse angiotensin II type 1a receptor tagging hemagglutinin epitope in cultured cells." *International Journal of Molecular Medicine* 3 263-270 1999.
13. F. Ukaji, I. Kitajima, T. Kubo, C. Shimizu, T. Nakajima, I. Maruyama. "Serum samples of patients with rheumatoid arthritis contain a specific autoantibody to "denatured" aldolase A in the osteoblast-like cell line, MG-63." *Annals of the Rheumatic Diseases* 58 169-174 1999.

2. 学会発表

本研究に関してはありません。

G. 知的所有権の取得情報

本研究に関してはありません。

慢性関節リウマチモデルのゲノム解析
マウスコラーゲン関節炎と MRL 系自然発症関節炎との遺伝的関連

分担研究者 能勢真人 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) は多因子疾患とされているが、その遺伝的要因の実態はいまだ明らかではない。RA モデルとしての、マウスコラーゲン関節炎 (CIA) 高感受性の DBA/1 マウスと、CIA 抵抗性だが固有の関節炎感受性遺伝子座がマップされている MRL/+マウスとの交配系を対象としてゲノム解析を行った。MHC 以外に、マウス第 5 染色体上に新たな CIA 発症感受性遺伝子座がマップされた。また、CIA 重症度と MRL 系マウス関節炎感受性遺伝子座との関連は認められず、両関節炎の発症病理はゲノムレベルで異なっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、その発症に遺伝的要因と環境的要因とが複雑に関わりあふ多因子疾患であり、いわゆるポリジーン遺伝による疾患と考えられている。近年、その遺伝的要因として MHCをはじめ、その他 T 細胞受容体、免疫グロブリンやサイトカインなどのさまざまな遺伝子の多型が報告されているが、個々のポリジーンを連鎖解析のみで明らかにするのは困難である。そこで、RA の相同疾患としての関節炎を発症する種々のモデル動物を用いた解析が有用である。

マウスコラーゲン誘導関節炎 (collagen-induced arthritis, CIA) は II 型コラーゲンを感作することで誘導される自己免疫性多関節炎である。その発症は MHC に加えて補体成分や T 細胞受容体 $V\alpha$ 、 β 鎖など MHC 以外の遺伝子 (non-MHC 遺伝子) が関与しているとされており、RA の non-MHC 遺伝子を求める上で有用なモデルである。一方、MRL/lpr マウスの関節炎の発症は、促進要因としての *lpr* 遺伝子に加え MRL/+マウス固有の背景遺伝子群が必要とされている。実際、我々はこれまでに MRL/lpr x (MRL/lpr x

C3H/lpr) F1 バッククロスマウスを用いた解析でいくつかの関節炎感受性遺伝子座をマップしている。

本研究では CIA 高感受性系統である DBA/1 マウスと抵抗性系統である MRL/+マウスとの交配系を作製し、F2 マウスを対象にゲノムワイドスクリーニングを行い、CIA 感受性遺伝子座を求めた。また、同時に、CIA 感受性と MRL 系マウス関節炎感受性の遺伝的関連を検討した。

B. 研究方法

DBA/1 (マウス MHC: H-2^b) と MRL/+ (H-2^k) とを交配させ、F1 及び F2 世代を作製した。8 週齢のマウスを、ウシ関節由来 II 型コラーゲンで感作し CIA を誘導した。週 1 回、関節炎の臨床的重症度を肉眼的に観察し、4 段階 (0-3 点) で評価した。各個体の CIA 重症度として、各関節の点数を肢別に合計し観察期間中の最高点を合計した点数 maximum arthritis score (MAS) を解析に用いた。

CIA 感受性遺伝子座の探索は、simple sequence length polymorphism を利用してゲノムワイドスクリーニングを行った。すな

わち、57 個の多型マイクロサテライトマーカーを用いて、F2 マウスのうち MAS が極端に高い個体と低い個体の計 92 匹を対象に、いわゆる selective genotyping を行った。高い関連を認めた染色体に関しては、QTL 解析を行った。

C. 結果

ゲノムワイドスクリーニングでは、第 5 および第 17 染色体で高い関連が認められた。第 5 染色体の QTL 解析により、セントロメアより 35 cM 近傍に自由遺伝様式で lod score 6.4 の significant linkage を認め、この領域を CIA 感受性遺伝子座としてマップした。第 17 染色体上の *MHC* の遺伝子型と CIA 重症度 MAS との間には強い関連が認められた。*MHC* と第 5 染色体上の CIA 感受性遺伝子座は、互いに独立して働くと考えられた。MAS に関しては、MRL 系マウス関節炎感受性遺伝子座との関連は明らかではなかった。

D. 考察

本研究では、第 5 染色体上セントロメアより 35 cM 近傍に CIA 感受性遺伝子座をマップした。近年、ゲノムワイドスクリーニングによってマウス CIA 感受性遺伝子を同定する試みがいくつか報告されており、(DBA/1 x SWR) F2 (全て H-2^a) を用いた報告では第 2 と第 6 染色体上に、また、(B10RIII x RIIS/J) F2 (全て H-2^f) の解析では第 3、第 13 染色体上にマップされている。また、ラット CIA においては、*MHC* の他 7 つの non-*MHC* 遺伝子座が報告されている。しかしながら、本研究でマップした領域は、これらのいずれとも一致しない新たな CIA 感受性遺伝子座であった。この領域は、Vidal らが (MRL/lpr x B6/lpr) F2 を用いた解析から抗 double strand DNA 抗体の産生に関わる遺伝子座として報告した *Lmb2* を含んでおり、また、Vingsbo-Lundberg らが報告したラットプリステン誘導関節炎の慢性化に関わる遺

伝子座 *Pia 6* (ラット第 14 染色体) とは相同領域として一致した領域である。このことは、この領域に、動物種や疾病の種類を超えて、自己免疫現象や自己免疫病に関する遺伝子が存在している可能性を示している。

この領域には、その他いくつかの興味深い候補遺伝子が存在している。*Pdgfra* (platelet derived growth factor receptor, alfa polypeptide) は、RA 滑膜での発現が亢進しており、滑膜細胞の情報伝達と増殖に関与している。*Ugdh* (UDP glucose dehydrogenase) は、関節や細胞外マトリックスのグルコサミノグリカン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸の主要な成分である UDP gluconate を合成する酵素である。*Cd38* (CD38) は RA 滑膜では形質細胞上に発現され、またヒアルロン酸との結合能もあるとされている。また、ヒト染色体相同領域 (シンテニー) として、ヒト第 4 染色体 (4p15-p15, 4q11-q12) が相当するが、今後これらマウス CIA 感受性遺伝子を解析することでヒト RA の原因遺伝子に到達できると考えている。

MHC と第 5 染色体上の CIA 感受性遺伝子座とは、互いに独立して働くと考えられ、関節炎が *MHC* だけでなく non-*MHC* 遺伝子によっても発症がコントロールされることをシミュレートした。最近、Yuasa らは、CIA 低感受性の H-2^b ハプロタイプの B6 マウスでも *FcγRIIB* 遺伝子をノックアウトすると CIA 高感受性になることを見出している。この事実は、CIA が *MHC* のみに規定されないという、ゲノム交雑より得た本研究結果を支持するものであろう。

今回の解析で、CIA 重症度と MRL 系マウス関節炎感受性遺伝子座との間に関連を認めなかった。CIA と MRL 系マウス関節炎とは、臨床的、病理組織学的に多くの相違点を有しているが、本研究の結果は両関節炎の病理発生が異なることをゲノムサイドから明らかにしたことになる。

E. 共同研究者

水木伸一、寺田美穂、鴨川淳二、路靈敏、大石久志（愛媛大学医学部病理学第二講座）

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakatsuru S, Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Q WM, Morimoto K, Yazawa C, Ogasawara H, Abe Y, Fukui K, Ichien G, Ito RM, Mori S, Nakamura Y, Nose M. : Genetic dissection of the complex pathological manifestataions of collagen disease in MRL/lpr mice. *Pathology International* 49 : 974-982, 1999.

2. Nishihara M, Terada M, Kamogawa J, Ohashi Y, Mori S, Nakaturu S, Nakamura Y, Nose M.: Genetic basis of autoimmune sialoadenitis in MRL/lpr lupus mice: additive and hierarchical properties on polygenic inheritance. *Arthritis & Rheumatism* 42:2616-2623, 1999.

3. 能勢真人 : 血管炎の遺伝要因—モデルマウスのゲノム解析—治療学 33 : 152-156, 1999.

4. 鴨川淳二、寺田美穂、西原美由紀、水木伸一、森士朗、中鶴修一、中村祐輔、能勢真人: RA モデルマウスの疾患感受性遺伝子座、日本臨床免疫学会会誌 22(6)487-490, 1999.

5. 能勢真人 : 血管炎モデルマウスのゲノム解析 : *Bio Clinica* 14 : 320-322, 1999.

6. 能勢真人 : 自然発症疾患モデル動物 : 血管炎 ; *MoLecular Medicine*, 36:32-36, 1999.

3. 学会発表

1. 西原美由紀、寺田美穂、森士朗、能勢真人 : 膠原病疾患群モデルマウスへの IRF-1 遺伝子導入による唾液腺炎好発マウスの樹立とその病態解析。第 88 回日本病理学会、東京、1999. 4. 8.

2. 宮崎龍彦、曲衛敏、寺田美穂、路靈敏、森士朗、能勢真人 : 自己免疫性糸球体腎炎の発症・進展におけるオステオポンチン遺伝子多型の役割。第 88 回日本病理学会、東京、1999. 4. 8.

3. 路靈敏、曲衛敏、宮崎龍彦、鴨川淳二、水木伸一、西原美由紀、寺田美穂、能勢真人 : QTL analysis of susceptibility loci to lupus-like glomerulonephritis in MRL/lpr mice. 第 88 回日本病理学会、東京、1999. 4.8.

4. 能勢真人、宮崎龍彦、寺田美穂、西原美由紀、鴨川淳二、水木伸一、曲衛敏、路靈敏、森士朗、日合弘、中鶴修一、中村祐輔 : 膠原病疾患群モデルマウスにおける血管炎感受性遺伝子の解析。第 43 回日本リウマチ学会総会、札幌、1999.6.3.

5. 鴨川淳二、寺田美穂、水木伸一、西原美由紀、森士朗、奥村秀雄、日合弘、中鶴修一、中村祐輔、能勢真人 : MRL マウスの関節炎感受性遺伝子郡の解析。第 43 回日本リウマチ学会総会、札幌、1999.6.4.

6. 能勢真人 : 膠原病疾患群とポリジーン 第 15 回奈良セミナー、奈良、1999.7.10.

7. 宮崎龍彦、宮崎龍彦、路靈敏、寺田美穂、能勢真人 : 自己免疫性糸球体腎炎の発症・進展機構におけるオステオポンチン遺伝子多型の役割。第 29 回日本免疫学会、京都、1999. 12.1.

8. 西原美由紀、曲衛敏、宮崎龍彦、寺田美穂、森士朗、大橋裕一、加藤秀樹、能勢真人 : 膠原病疾患群モデルマウスのポリジーン系遺伝の環境要因による修飾 : IRF-1 遺伝子強制発現による選択的疾患抑制機構の解析。第 29 回日本免疫学会、京都、1999.12.1.

9. 大石久志、水木伸一、鴨川淳二、寺田美穂、西原美由紀、奥村秀雄、能勢真人 : 膠原病疾患群モデルマウスの像多様性における TCR レパートリの役割 : 滑膜炎局所における TCR レパートリの特異性の解析。第 29 回日本免疫学会、京都、1999.12.2.

10. 水木伸一、鴨川淳二、大石久志、寺田美