

汎発性強皮症は皮膚および内臓諸臓器における硬化性変化を主徴とし、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの過剰な沈着がその原因と考えられている。

汎発性強皮症皮膚線維芽細胞は、正常皮膚線維芽細胞と比較して主な細胞外マトリックスであるI型コラーゲン遺伝子の発現が亢進し、その異常は転写レベルの異常であることが知られている。

我々は、ヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写制御について検討するために、同遺伝子のプロモーター領域について解析を行ってきた。これまでの解析から-300bp領域にはGC-boxが存在し転写活性化領域として機能すること、-160bp領域には転写抑制領域が存在すること、-125bp領域にはTCCTCC motifからなる転写活性化領域が存在し、この3つの領域には転写因子Sp1/Sp3が結合することを明らかとし、また両転写因子がヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写制御において重要な役割を果たしていることを報告してきた。

今回の検討では、強皮症皮膚線維芽細胞および正常皮膚線維芽細胞を用いて転写因子Sp1およびSp3の発現量、DNA結合性について検討した。

材料と方法

免疫プロット法およびnorthern blot法 皮膚線維芽細胞をconfluentまで培養し、24時間無血清の状態にし、従来の方法で細胞核抽出液を得た。7.5% SDS ポリアクリルアミドゲルにて泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体と反応後、抗ウサギIgG抗体と反応させ、chemiluminescent法にて検出した。またtotal RNAを抽出後ナイロン膜に転写し、ヒト $\alpha 2(I)$ collagen, Sp1, Sp3, GAPDHプローブとハイブリダイズし、検出した。

DNA mobility shift assays 結合反応は20 μ lの試薬に核抽出液とプローブを加え、30分間反応させた。放射能標識したfree DNAとDNA-蛋白質複合体の分離は5%ポリアクリルアミドゲル、0.5X TBS bufferを用いて行った。

免疫沈降法 皮膚線維芽細胞をPBSにて洗浄後、lysis bufferにて溶解し、30分間反応させた。遠心後上清を分離し、20 μ lのprotein A-Sepharose beadsに付着した抗Sp1抗体にてovernight反応。免疫沈降物を7.5% SDSポリアクリルアミドゲルにて泳動後抗リン酸化セリン抗体にて検出した。

皮膚線維芽細胞における転写因子Sp1とSp3の発現量について

TGF- β およびoncostatin Mはヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の発現を亢進させることが知られている。無刺激下、TGF- β あるいはoncostatin M刺激下のヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン、転写因子Sp1, Sp3遺伝子の発現量をnorthern blot法にて検討した。Fig 1に示すように無刺激下では強皮症皮膚線維芽細胞は、正常皮膚線維芽細胞と比較して3倍程度 $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子を発現していた。正常皮膚線維芽細胞ではTGF- β あるいはoncostatin M刺激によってコラーゲン遺伝子の発現が2-3倍亢進したが、強皮症皮膚線維芽細胞ではこれらのサイトカイン刺激によって $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の発現量に変化しなかった。

Fig 2に示すようにSp1遺伝子の発現は無刺激下では強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞において差はなく、TGF- β あるいはoncostatin M刺激によってSp1遺伝子の発現量に変化は無かった。

Fig 3に示すように、無刺激下では強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞においてSp3遺伝子の発現量に変化はなく、TGF- β 或いはoncostatin M刺激下でSp3遺伝子の発現量に変化は無かった。

Sp1およびSp3の蛋白量を強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞において検討した。Fig 4に

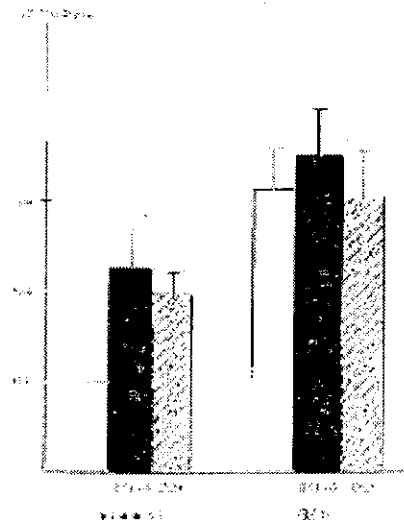


Fig1. 無刺激下、TGF- β 刺激下、あるいはoncostatin M刺激下におけるヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子の強皮症皮膚線維芽細胞および正常皮膚線維芽細胞における発現量

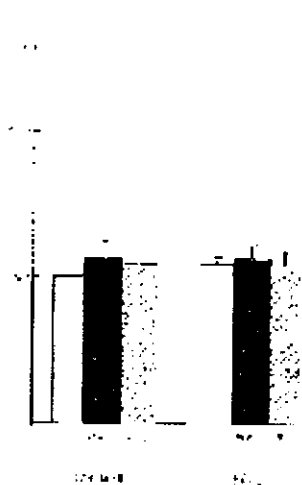


Fig 2. 強皮症皮膚線維芽細胞および正常皮膚線維芽細胞における転写因子 Sp1 の発現量

示すように、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞において Sp1 と Sp3 の蛋白量に有意な差は無かった。また TGF- β あるいは oncostatin M 刺激にて Sp1, Sp3 蛋白の発現に変化は無かった。

Sp1, Sp3 の DNA 結合性について

強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞における Sp1, Sp3 の DNA 結合性を DNA mobility shift assay にて検討した。強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞の核抽出液を用いて、ヒト $\alpha 2$

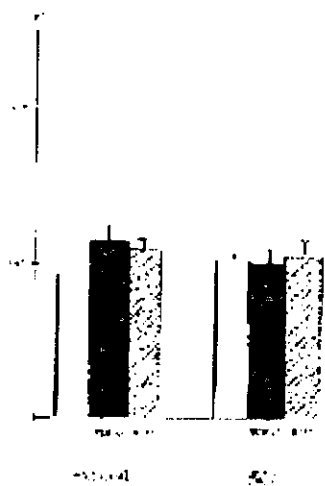


Fig 3. 強皮症皮膚線維芽細胞および正常皮膚線維芽細胞における転写因子 Sp3 遺伝子の発現量

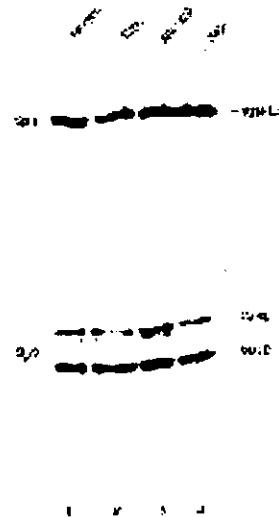


Fig 4. 強皮症皮膚線維芽細胞および正常皮膚線維芽細胞における Sp1 および Sp3 蛋白質発現量

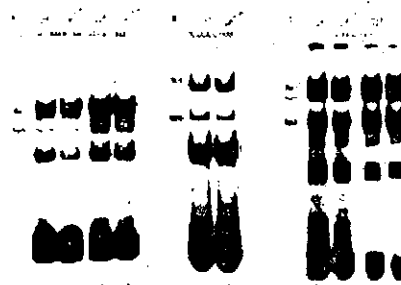


Fig 5. ヒトコラーゲン遺伝子プロモーター領域に対する Sp1 および Sp3 の DNA 結合性

(I)コラーゲン遺伝子プロモーターの Sp1/Sp3 結合領域をプローブとして DNA mobility shift assay を行った。Fig 5 に示すように GC-box, TCCCCC motif, TCCTCC motif に対する転写因子 Sp1, Sp3 の結合性は強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞において有意な差は認められなかった。

Sp1 のセリンリン酸化について

近年、他の遺伝子で Sp1 の量的変化や DNA 結合性ではなく、Sp1 のセリンリン酸化の程度の変化により転写が制御されているという報告がなされている。抗 Sp1 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗セリンリン酸化抗体にて検出し、強皮症皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞における Sp1 のセリンリン酸化の程度を検討した。

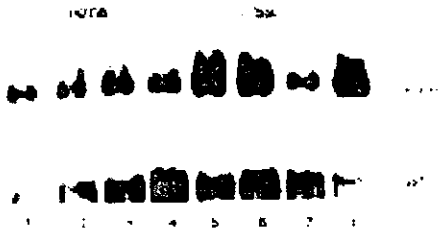


Fig 6. 強皮症皮膚線維芽細胞および正常皮膚線維芽細胞におけるSp1のセリンリン酸化の程度の解析

Fig 6に示すように、強皮症皮膚線維芽細胞においては正常皮膚線維芽細胞と比較してSp1のリン酸化の程度が亢進していた。この結果は、強皮症皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子発現異常にSp1が関与していることを示唆するものと考えられた。

Mithramycinによるコラーゲン遺伝子の発現抑制について

強皮症皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子発現異常にSp1が関与している点をさらに明らかにするためにSp1の結合阻害剤であるmithramycinを皮膚線維芽細胞に投与し、コラーゲン遺伝子のコ発現量をnorthern blot法で検討した。

Fig 7に示すように、mithramycinは正常皮膚線維芽細胞において30%程度コラーゲン遺伝子の発現を量依存性に抑制した。強皮症皮膚線維芽細胞においては正常皮膚線維芽細胞と比較して3倍程度コ



Fig 7. 強皮症皮膚線維芽細胞および正常皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子発現に対するmithramycinの影響

ラーゲン遺伝子の発現が亢進していたが、mithramycin添加によりコラーゲン遺伝子発現量は著明に抑制され、500nMのmithramycin添加により正常皮膚線維芽細胞と同程度になった。この結果は、強皮症皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子発現異常にSp1が関与することを示唆し、さらにmithramycinの皮膚硬化に対する臨床応用の可能性を示唆するものと考えられた。

ヒト $\alpha 2(I)$ collagen 遺伝子転写制御における 転写因子 Sp1 および Sp3 の機能について

研究協力者： 伊 浩信 (東京大学 皮膚科)

共同研究者： 玉置邦彦 (東京大学 皮膚科)

Transcriptional Regulation of The Human $\alpha 2(I)$ collagen gene by Sp1 and Sp3

Hironobu IHN, Kunihiro TAMAKI

Department of Dermatology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Summary

In this study, we investigated the role of Sp1 and Sp3 in regulating the transcription of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene. We showed that Sp1 and Sp3 specifically bind to three of the previously characterized cis-acting elements in this promoter, including two positive cis-acting elements between -303 and -271 and -128 and -123, and a repressor site between -164 and -159, but do not bind to the fourth cis-element bound by CBF. Functional analyses of Sp3 and Sp1 in *Drosophila* cells indicate that each protein transactivates the human $\alpha 2(I)$ collagen promoter with equal potency and, when tested together, have an additive effect on the promoter activity. Furthermore, in vitro transcription assays demonstrated that both Sp1 and Sp3 are capable of supporting transcription from the collagen promoter independently of each other. However, when activities of both Sp1 and Sp3 are blocked with specific antibodies, in vitro transcription from this promoter is almost completely abolished. The results of this study demonstrated that Sp3 is as potent an activator of the human $\alpha 2(I)$ collagen promoter as is Sp1 and that a transcriptional activity of the human $\alpha 2(I)$ promoter is dependent on both proteins.

はじめに

汎発性強皮症は皮膚および内臓諸臓器における硬化性変化を主徴とし、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの過剰な沈着がその原因と考えられている。

汎発性強皮症皮膚線維芽細胞は、正常皮膚線維芽細胞と比較して主な細胞外マトリックスであるI型コラーゲン遺伝子の発現が亢進し、その異常は転写レベルの異常であることが知られている。

我々は、ヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写制御について検討するために、同遺伝子のプロモーター領域について解析を行ってきた。これまでの解析から-300bp領域にはGC-boxが存在し、転写因子Sp1が結合すること、-160bp領域には転写抑制領域が存在すること、-125bp領域にはTCCTCC motifからなる転写活性化領域が存在し、-80bp領域には転写因子CBFが結合することが明らかとなっている。

今回の検討では、これらのcis-acting elementに結合する転写因子を明かとし、その機能について検討した。

材料と方法

DNA transfectionおよびchloramphenicol acetyltransferase assays (CATアッセイ)

SL2細胞を直径100mm dishに107個播種し、24時間後リン酸カルシウム法にて10 μ gの種々のコラーゲンプロモーター/CAT遺伝子と種々の量のpPac0 (ベクターのみ)、pPacSp1, pPacUSp3, pPacSp3発現プラスミドをトランスフェクションした。pPacUSp3では高分子量Sp3蛋白質だけが発現する。細胞は48時間培養し、その後凍結融解にて破碎した。不溶分画は10分間、2000G遠心にて除去した。Bio-Rad蛋白質濃度測定試薬を用いて上清の蛋白質量を測定し、butyryl-Coenzyme Aと[14C]Chloramphenicolとともに37 $^{\circ}$ C、90分間反応させた。ブチル化したchloramphenicolは無機溶媒(tetramethylpentadecaneとxyleneを混合)にて抽出し、シンチレーションにて定量化した。

DNA mobility shift assays

ヒト皮膚線維芽細胞およびSL2細胞の核抽出液は以下のように行った。Confluentの細胞をPBSにて洗浄後、氷冷した試薬A (10mM HEPES pH7.9, 1.5mM MgCl₂, 1.0 IgM MKC1, 1mM DTT, 1mM sodium orthovanadate) 1mlにて集め、氷上にて反応。遠沈後上清を除去した。沈渣を80 μ lの試薬Cにて溶解し、20分間氷上にて反応。遠沈し、

上清を細胞核抽出液として得た。ProbeはPCRあるいは直接末端標識して作製した。結合反応は20 μ lの試薬に5 μ gの核抽出液を加え30分間反応させた。ポリクローナル抗Sp1, 抗Sp2, 抗Sp3, 抗Sp4抗体はSanta Cruz社から購入した。放射能標識したfree DNAとDNA-蛋白質複合体の分離は5%ポリアクリルアミドゲル, 0.5X TBS bufferを用いて行った。

In vitro transcription

50 μ gの細胞核抽出液, 1 μ gの鋳型DNA, 20mM HEPES, 100mM KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 12% glycerol, 600 μ M ATP, GTP, CTP, UTPを混合して作製した。細胞核抽出液は抗Sp1抗体または抗Sp3抗体と4 $^{\circ}$ C, 1時間反応後in vitro transcription液と反応させた。新しく合成された転写産物を検出するために、CAT遺伝子の配列に対応するantisense primerを作製し、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて末端標識し、in vitro転写産物とハイブリダイズさせavian myeloblastosis virus reverse transcriptaseにて延長した。延長されたprimer産物は8%ポリアクリルアミド, 7M尿素ゲルにて解析した。

結果と考察

転写因子Sp1とSp3はヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーター領域に結合する

GC-boxをプローブとしてDNA mobility shift assayを行った。皮膚線維芽細胞の核抽出液と反応させたところ4つのDNA-蛋白質複合体が形成され、抗Sp1抗体の添加によりcomplex 2がsuper-shiftした (Fig 1)。また抗Sp3抗体の添加によりcomplex 3の形成が阻害された。さらに抗Sp1抗体と抗Sp3抗体を同時に添加するとcomplex 1, 2, 3の形成に影響を与え、これらの結果は、Sp1とSp3は独立してGC-boxと結合してcomplex 2と3を形成し、協調してcomplex 1を形成するものと考えられた。なお抗Sp2抗体と抗Sp4抗体は影響を与えなかった。

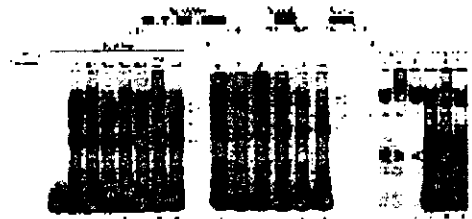


Fig 1. Sp1とSp3はヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーター領域に結合する

この領域には3つのGC-boxが存在するため各部位の転写因子結合性を明らかにするため、各GC-boxに部位特異的変異を導入し、DNA mobility shift assayを行った。個々のGC-boxにおける変異あるいは2つのGC-boxの変異では転写因子の結合性に変化は認められず、3つのGC-box全てに変異を導入した場合、complex 1, 2, 3の形成は阻害された。この結果より、Sp1およびSp3は3つのGC-box各々に結合すると考えられた。

さらに、-125bp領域においても同様の検討を行い、抗Sp1抗体はcomplex 1, 2に影響を与え、抗Sp3抗体はcomplex 3の形成に影響を与えたことより同領域にもSp1とSp3が結合することが結合することが明かとなった。また-160bp領域においても同様な検討を行い、Sp1およびSp3が結合することが明かとなった。

転写因子Sp1とSp3のヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子転写制御における機能について

ヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子転写制御におけるSp1とSp3の機能を明らかにするため、Sp1およびSp3を発現しないDrosophila SL2細胞に、Sp1あるいは2つのSp3を発現するベクターとヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーターを導入し検討した。まずSL2細胞にSp3を発現するベクターを導入し、その発現を免疫ブロット法にて確認した (Fig 2)。

Fig 2 に示すようにpPacSp3では低分子量のSp3

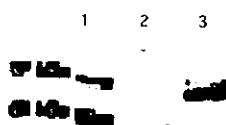


Fig2. Expression of Sp3. Lane 1, nuclear extract; Lane 2, pPacSp3; Lane 3, pPacUSp3

が主に発現され、pPacUSp3では高分子量のSp3が発現されることが明かとなった。

Fig 3に示すように、Sp1と高分子量のSp3は同程度ヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写活性を量依存性に亢進した。またFig 4に示すように低分子量のSp3もコラーゲン遺伝子の転写活性を活性化させたが、高分子量のSp3と比較して、その程度は低いことが示された。

さらにSp1とSp3の相互作用について検討したが、Fig 5に示すようにSp1と高分子量Sp3を同時

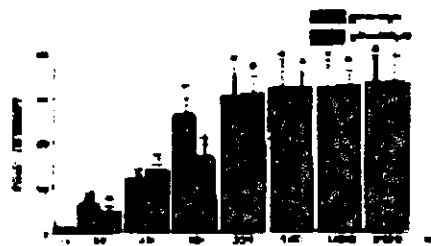


Fig 3. Sp1および高分子量Sp3はヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写活性を亢進する。

に発現させた場合相加的に転写活性を亢進させることが明かとなった。

転写因子Sp1とSp3のヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーターにおける作用部位について

次にヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーター領域の4つのcis-acting elementに単一の部位特異的変異あるいは同時に2つの領域に部位特異的変異を導入し、Sp1, Sp3のコラーゲン遺伝子プロモーターの転写活性に対する機能について検討した。Sp1あるいはSp3発現ベクターと種々の部位特異的変異を導入したコラーゲンプロモーターをco-transfectionし、CATアッセイを行った。

Fig 6に示すように、変異を導入しなかった場合と比較して、GC-boxあるいはTCCTCC motifへの変異の導入にて50%程度転写活性が低下した。転写抑制部位あるいはCBF結合部位への変異の導入にて50%程度転写活性が低下した。転写抑制部位あるいはCBF結合部位への変異の導入によってSp1あるいはSp3による転写活性化作用に変化は見られなかった。GC-boxおよびTCCTCC motifに同時に変異を導入した場合、Sp1あるいはSp3の転写活

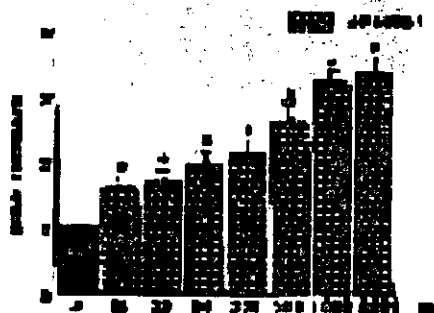


Fig 4. 低分子量Sp3もコラーゲン遺伝子の転写活性を亢進する。

性化作用は完全に失われたが、GC-boxと転写抑制部位に同時に変異を導入した場合あるいはTCCTCC motifと転写抑制部位に同時に変異を導入した場合、Sp1あるいはSp3の転写活性化作用は50%程度低下し、この変化はGC-boxあるいはTCCTCC motifに変異を導入した場合と同程度で

あった。

In vitro transcription assayによるSp1およびSp3の機能の解析

SL2細胞における解析の結果はSp1とSp3がヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子プロモーター活性に同程度関与していることを示唆している。

ヒト皮膚線維芽細胞ではSp1とSp3を発現しているので、同様のシステムで解析することは適当ではないと考えられたため、in vitro transcription assayを行った。特異的抗体を加えてSp1またはSp3を細胞核抽出液から除いた場合の転写活性をこれらの転写因子を除かない場合の転写活性と比較した。Fig 7に示すように抗Sp1抗体あるいは抗Sp3抗体を加えた場合、in vitro 転写活性は各々32%、25%低下した。両抗体を同時に加えた場合、in vitro 転写活性はほぼ完全に阻害された。ウサギのIgGを加えた場合転写活性に変化はなかった。

以上の結果はSp1とSp3の両転写因子は、皮膚線維芽細胞においてヒト $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子の転写に重要な活性化因子として関与していると考えられた。

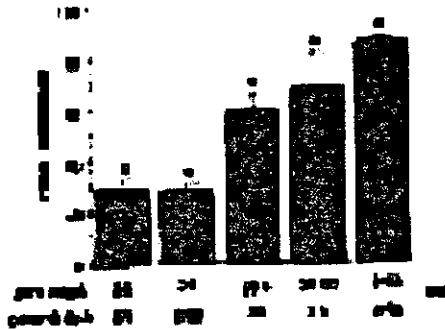


Fig 5. Sp1とSp3は相加的にヒトコラーゲン遺伝子の転写活性を亢進する

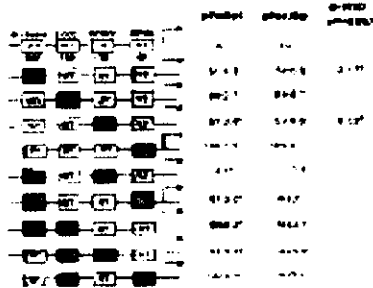


Fig 6. Sp1とSp3のコラーゲン遺伝子プロモーターにおける作用部位

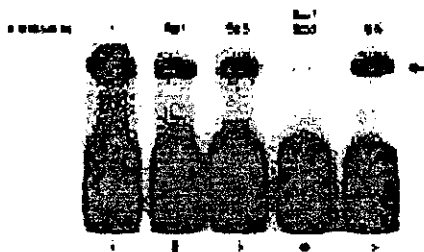


Fig 7. In vitro transcription assayによるSp1とSp3の機能についての検討

全身性強皮症患者における遺伝子的背景

班 員: 畑 隆一郎 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 成人疾患研究部門)
共同研究者: 赤井 潤、木村 彰方 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 成人疾患研究部門) 石川 治 (群馬大学 医学部 皮膚科) 桑名 正隆 (慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所 細胞情報部門)
新海 滋 (千葉大学 医学部 皮膚科)

ASSOCIATION OF FUNCTIONAL MICROSATELLITES IN THE HUMAN TYPE I COLLAGEN $\alpha 2$ CHAIN (*COL1A2*) GENE WITH SYSTEMIC SCLEROSIS

Ryu-Ichiro HATA, Jun AKAI, Akinori KIMURA (Division of Adult Diseases, Medical Research Institute, Tokyo Medical & Dental University) Osamu ISHIKAWA (Department of Dermatology, School of Medicine, Gunma University), Masataka KUWANÁ (Division of Cellular Signaling, Institute for Advanced Medicine, Keio University School of Medicine), Hiroshi SHINKAI (Department of Dermatology, School of Medicine, Chiba University)

Summary

Systemic sclerosis (scleroderma; SSc) is a generalized disorder of connective tissue characterized by fibrosclerosis and degenerative changes in the skin, synovium, muscles, and certain internal organs, notably the gastrointestinal tract, lung, heart, and kidney. Although there is occasionally inflammatory changes in the early stage of the disease, the hallmark of the disease is skin thickening caused by excessive accumulation of connective tissue components dominated by type I collagen which is encoded by the *COL1A1* and *COL1A2* genes. To investigate the possible disease susceptible genes for SSc, we examined the association of the disease with various combinations (haplotypes) of microsatellites that showed combination-dependent transcriptional stimulation of the *COL1A2* gene. The gene containing a specific combination of the two dinucleotide repeats, that is, haplotype 5'-(CA)₁₃CGCACA(CG)₆(CA)₈-(GT)₁₂-3', {(13,6,8)-12}, homozygously, was found in significantly higher frequency ($P=0.029$, Relative Risk, $RR>6.93$) in SSc patients than in controls, and the association was increased ($P=0.0042$, $[RR]>32.0$) in the male patients positive for SSc-specific antinuclear antibodies (ANAs). The combination of the dinucleotide repeats having higher frequency in the SSc patients showed the highest stimulative activity for the transcription of the *COL1A2* promoter among the reporter gene constructs tested. These results indicate that the patients having a specific combination of the dinucleotide repeats homozygously and expressing the ANAs have a higher risk for SSc than those individuals with other combinations of the repeats and suggest that the genotype of the *COL1A2* gene determines susceptibility to SSc in some of the patients and that development of the ANAs raises susceptibility to the disease.

はじめに

全身性強皮症 (SSc) は全身の皮膚、内臓の線維化を主徴とする疾患であり、患者の皮膚などにI型コラーゲンを主成分とする結合組織が異常蓄積する。強皮症の発症には多因子が関与すると考えられる。我々は硬化組織に異常蓄積するI型コラーゲンの遺伝子の発現に着目して研究を進めてきた。

我々はI型コラーゲンを構成するCOL1A2鎖遺伝子の転写制御配列に2つのマイクロサテライトの存在を見出した先に報告した¹⁾。また、これらのマイクロサテライトの生理的機能を明らかにするために、種々の反復配列の組合せを持つ発現ベクターを作成しヒト皮膚線維芽細胞にトランスフェクトしてこれらの転写促進活性を調べた。その結果、これらの反復配列がCOL1A2鎖遺伝子の転写を活性化し、また、2つのマイクロサテライトの組合せによりCOL1A2鎖遺伝子の転写の活性化の程度が異なること、即ち転写活性化の程度に個人差があることを発現実験により明らかにした²⁾。今回、強皮症患者のゲノムのマイクロサテライトの解析から、転写促進活性が最大の組合せの反復配列をホモに持つものは強皮症患者にのみ存在し、対照には存在しなかった。以上の結果からこれらの患者ではCOL1A2鎖遺伝子の転写制御配列の特異性が強皮症発症のリスクファクターの一つである可能性を示している。

材料と方法

1. 対象

健常人211例、及びアメリカリウマチ協会の診断基準を満たす強皮患者93例、拡張型心筋症患者92名の末梢血から常法によりゲノムDNAを分離して解析を行った。

2. マイクロサテライトの解析

ゲノムDNAを鋳型としてヒトCOL1A2鎖遺伝子の転写開始点上流と第1イントロンの反復配列をPCR法で増幅後、SDS/ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、及びPCR-DNA高次構造多型 (DNA conformation polymorphism; DCP) 法により解析した。さらに、代表例について373 Automatic DNA Sequencer (Applied Biosystems) で直接塩基配列の決定を行い、反復配列の解析を行った³⁾。

3. 発現ベクターの作製とトランスフェクション

反復配列を含む、あるいは含まない種々の長さのヒトCOL1A2鎖遺伝子断片をホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子とするPGVB2ベクター

を用いてクローニングし、塩基配列の確認後、トランスフェクション効率の補正のためのシーパンジー ルシフェラーゼ遺伝子とともにジーントランスファー、またはFuGENE6を用いてヒト皮膚線維芽細胞に既報の方法⁴⁾によりトランスフェクトした。

4. 遺伝子発現活性の測定

遺伝子発現活性はピッカジーンデュアルキット (東洋インキ) を用い、LUMINOUS CT-9000D ルミノメーター (ダイアヤトロン) で測定をした⁵⁾。

結果

1. 強皮症患者における反復配列の解析

SSc患者93例のゲノムの解析をしその2つの反復配列の組合せを調べると、健常人で一番多く検出される遺伝子上流の反復配列の(1, m, n,) が(14, 6, 8)で第一イントロンのGTの反復数が17の組合せを持つアレルはSSc患者では少なかった。しかし、この解析では有意差は検出出来なかった ($P>0.05$)。SSc患者は女性に多いことから、女性の患者では発症に関与する大きな因子が存在することが予想され、そのために他の因子の作用が検出し難いことが考えられる。そこで男性患者で抗核抗体を有する患者について再度解析を行った。この患者群では我々が発現活性の測定を行ったコンストラクトで最大の転写促進活性を示す上流の(1, m, n,) が(13, 6, 8)で第一イントロンのxが12の反復数を持つアレルが対照群より有意 ($P<0.02$) に多く存在した。そこで、これらのアレルをホモにもつ個体についてさらに解析した。

2. 反復配列をホモにもつ個体の解析

対照群209名では上流の反復配列が(14, 6, 8)、第一イントロンの反復数が17のアレル、および上流の反復配列が(15, 7, 8)、第一イントロンの反復数が12のアレルをホモにもつ個体のみが存在した。一方、強皮症患者ではこれらのアレルをホモにもつ患者は少なく、対照には存在しなかった上流の反復配列が(13, 6, 8)、第一イントロンの反復数が12のアレルをホモにもつ患者が3例存在した。この配列をもつ個体の強皮症にかかる危険率は6.9倍以上であった (Table 1)。さらに日本人患者に多く観察される抗核抗体 (抗DNAトポイソメラーゼI抗体、抗セントロメア抗体、抗U1-リボヌクレオプロテイン抗体) を発現している男性患者では有意差がさらに上昇し ($P=0.0042$)、危険率も上昇した ($RR>32$) (Table 1)。

Table 1 Association of homozygous haplotypes (functional microsatellites) in the human COL1A2 gene with systemic sclerosis (SSc).

Haplotype	Healthy Controls (N=209) *1	SSc (N=93)	*2 SSc (TCR+) (N=68)	SSc(Male) (N=23)	SSc(Male) (TCR+) (N=15)
Total	36 (0.172) *3	12 (0.129)	10 (0.147)	5 (0.261)	4 (0.266)
P*4		0.437	0.766	0.380	0.189
RR*5		0.711	0.829	1.330	2.130
<hr/>					
(14,6,8)-17					
Frequency	25 (0.120)	6 (0.065)	4 (0.059)	3 (0.130)	2 (0.133)
P		0.206	0.111	0.549	0.565
RR		0.505	0.458	1.098	1.126
<hr/>					
(15,7,8)-12					
Frequency	11 (0.052)	3 (0.032)	3 (0.044)	0 (0)	0 (0)
P		0.326	0.536	0.308	0.458
RR		0.600	0.831	0	0
<hr/>					
(14,6,8)-17+					
(15,7,8)-12					
Frequency	36 (0.172)	9 (0.097)	7 (0.103)	3 (0.130)	2 (0.133)
P		0.127	0.238	0.435	0.515
RR		0.510	0.551	0.721	0.739
<hr/>					
(13,6,8)-12					
Frequency	0 (0)	3 (0.032)	3 (0.044)	2 (0.087)	2 (0.133)
P		0.029 #	0.014 #	0.0095 #	0.0042 #
RR		>6.93	>9.60	>19.81	>32.00
<hr/>					
Upstream repeat					
(l,m,n)=(13,6,8)					
Frequency	2 (0.010)	4 (0.043)	4 (0.058)	2 (0.087)	2 (0.133)
P		0.075	0.034 #	0.050	0.023 #
RR		4.63	6.44	9.81	15.85
<hr/>					
Intron repeat					
(x) =12					
Frequency	51 (0.245)	26 (0.280)	22 (0.323)	7 (0.304)	5 (0.333)
P		0.625	0.266	0.713	0.651
RR		1.19	1.47	1.35	1.54

*1 Number of subjects examined in each group. *2 SSc patients positive for anti-DNA topoisomerase I antibody, anti-centromere antibody, or anti-U1ribonucleoprotein antibody. *3 Frequency relative to total number of subjects. *4 P values were calculated by Chi-square analysis with Yate's correction, and Fisher's exact probability test was employed when the case number in any given cell was less than 5.

*5 Relative risk(RR) was calculated by the method of Woolf. Unity was tentatively used when the case number in any given cell was null.

Significantly different from controls.

3. 機能的反復配列と強皮症との相関

さらに強皮症とこれらのアレルの相関が疾患とCOL1A2遺伝子そのものとの相関を示すのか、あるいは2つの反復配列と連鎖不平衡を示す他の遺伝子との相関を示すのかを明らかにするために、上流の反復配列および第一イントロンの配列をホモにもつ個体について比較した。(13,6,8)の上流反復配列をホモにもつ患者は対照より多く存在したが、その頻度

は(13,6,8)-12のアレルをホモにもつ患者より常に頻度は低く、また、第一イントロンの反復配列が12の個体は対照と患者で有意な差は存在しなかった(Table 1)。これらの結果は強皮症の感受性と相関するのは(13,6,8)-12のアレルで規定される遺伝子、即ちCOL1A2遺伝子そのものであることが判明した。これらのアレルの機能を明らかにするために、対照及び患者でホモに存在したアレルを含むルシ

フェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子とするコンストラクトを作製し、ヒト線維芽細胞にトランスフェクトし、その発現活性を調べた。その結果強皮症に有意に多く存在した(13,6,8)-12のアリルを含むコンストラクトは他のコンストラクトより有意に転写促進活性が高かった。また、(15,7,8)-12、(14,6,8)-17のアリルをもつ個体より強皮症に対する感受性は43倍以上であった(Fig.1)。

クロサテライトであることを明らかにした²⁾。特に遺伝子の上流に存在するマイクロサテライトは多型性が高く、また、SSc患者における反復配列の分布が健常人の分布と異なっていることを明らかにした。これらのマイクロサテライトは多型性が高いため、遺伝形質の解析に有用であると思われる。一方、I型コラーゲン遺伝子の発現制御は遺伝子の転写レベルの制御が重要であることが明らかにされてい

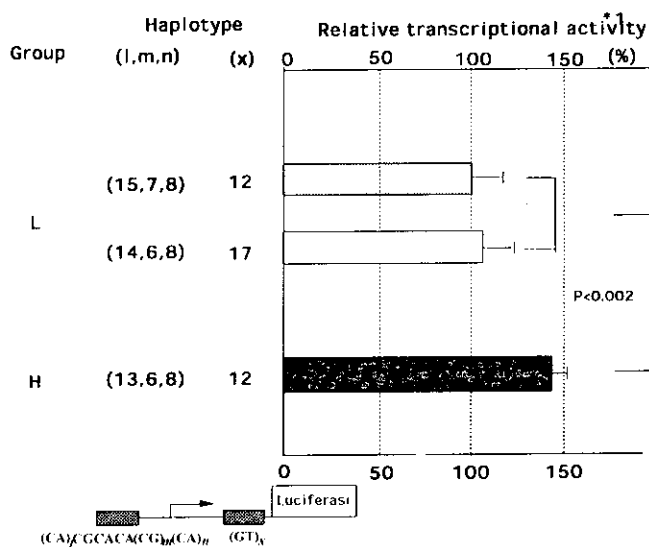


Figure 1. Relationship between frequency of homozygous haplotypes and their transcription-stimulating activities.

*1 Transcriptional activity was measured by luciferase activity after transfection of human fibroblasts with the constructs containing various haplotypes.

*2 Male patients positive for the ANAs.

*3 Subjects containing haplotypes with low transcription-stimulating activities. $P=0.53$

*4 Subjects homozygous for the haplotype (13,6,8)-12. $P=0.0042$

*5 Relative risk was calculated by the method of Woolf. Unity was tentatively used when the case number in any given cell was null.

考案

SSc患者真皮におけるI型コラーゲンの異常蓄積の原因を明らかにするために、我々は健常人及びSSc患者線維芽細胞を用いて、その主要遺伝子産物であるI型コラーゲンの代謝制御機構の研究を行ってきた。

I型コラーゲンは2本の $\alpha 1$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖から構成されている。我々は先にヒトCOL1A2遺伝子の転写制御に関与すると考えられる遺伝子の転写開始点近傍の塩基配列を決定し、遺伝子の上流及び第1イントロンに2塩基の反復配列を見いだした¹⁾。また、これらの反復配列について211人の健常人ゲノムを用いて詳細な解析を行い、両者が典型的なマイ

る。そこで、これらの反復配列の生理的意義を明らかにするために、種々の反復配列を含む、あるいは含まないレポーター遺伝子コンストラクトを作成し、ヒト皮膚線維芽細胞にトランスフェクトして発現活性を調べたところ、これらの2つの反復配列の共存によってCOL1A2遺伝子の転写活性が促進され、かつ、反復配列の組合せにより、発現活性促進の程度が異なることを明らかにした。この結果はCOL1A2鎖遺伝子の発現活性が個人により異なる可能性を示している。また、男性の抗核抗体陽性のSSc患者におけるCOL1A2遺伝子の2つの反復配列の組合せの分布が健常人と異なり、転写促進活性の一番高い組合せ{(13,6,8)と(12)}をホモにもつ患者が有意に多かった。この2つの反復配列の

個々のものについては健常人と患者群では有意差が検出出来なかったことから、2つの反復配列の組合せ、あるいは2つの反復配列そのもの、即ちCOL1A2遺伝子がSScの発症と相関していると考えられる。これらの結果はSScは後天性疾患であり、明確な遺伝性は示さないが、男性患者の一部においてはCOL1A2遺伝子の転写制御領域の塩基配列がSSc発症のリスクファクターの一つを形成している可能性を示している。

文 献

- 1) Akai J., Kimura A., Arai K., Uehara K. and Hata R.: Fine structural analysis of the unique 5' region of the human COL1A2 gene containing two regions of dinucleotide repeats adjacent to the transcriptional start site. *Connect Tiss* 1998; 30 : 1-6.
- 2) Akai J., Kimura A. and Hata R.: Transcriptional regulation of the human type I collagen $\alpha 2$ (*COL1A*) gene by the combination of dinucleotide repeats. *Gene* 1999; 65-73.
- 3) Hata R : Transfection of normal human skin fibroblasts with human $\alpha 1(I)$ and $\alpha 2(I)$ collagen gene constructs and evidence for their coordinate expression. *Cell Biol Int* 1995; 19 : 735-741.
- 4) 畑 隆一郎：デュアルルシフェラーゼアッセイ。In：畑隆一郎，新井克彦，服部俊治（編集）細胞外マトリックス研究法 III 部 遺伝子解析法 コラーゲン技術研修会，pp.138-142.

強皮症血清に認識される RNA ポリメラーゼ I/III の サブユニットの同定

班 員：桑名正隆（慶應義塾大学 先端医科学）

Identification of Antigenic Subunits of RNA Polymerase I/III Complexes Recognized by Systemic Sclerosis Sera

Masataka KUWANA

Institute for Advanced Medical Research, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Summary

Autoantibody reactive with RNA polymerase I/III (RNAPI/III) is specific to systemic sclerosis (SSc) and is associated with a unique subset of diffuse cutaneous SSc having rapidly progressive skin thickening and a high frequency of renal crisis. The clinical usefulness of anti-RNAP I/III antibody is widely accepted, but practical assays to detect this antibody are not established yet. Both RNAP I and RNAP III are complex molecules consisting of at least 10 independent polypeptides, and antigenic subunits recognized by anti-RNAP I/III antibody have not been identified to date. To determine the subunits recognized by anti-RNAP I/III antibody in SSc sera, RNAP I/III preparation affinity-purified from HeLa cell extract was used in immunoblots as an antigen source. When 28 SSc sera positive for anti-RNAP I/III antibody were analyzed, at least 15 different polypeptides were bound by anti-RNAPI/III-positive sera in various combinations. The largest subunit of RNAP III (RPC155) and 62-kDa polypeptide (RPC62) were recognized by 28 (100%) and 26 (93%) sera, respectively, indicating that major antigenic epitopes were located on these subunits. By using RT-PCR using specific primer sets, we have successfully obtained cDNA encoding the entire open-reading frame of RPC62 from K562 cell line. When recombinant RPC62 fusion protein was expressed and used as an antigen source in immunoblots, 16 of 20 anti-RNAP I/III-positive sera recognized recombinant RPC62. Our results indicate that recombinant RPC62 is one of candidate antigens used in solid-phase assay for detection of anti-RNAP I/III antibody.

はじめに

強皮症患者血清中にはトポイソメラーゼIやセントロメアなど重要な生物活性を持つ核蛋白に対する自己抗体が高頻度に検出される¹⁾。これら自己抗体は強皮症に特異的であるのみならず、強皮症の特定の病型と関連する。例えば、抗トポイソメラーゼI抗体陽性例はdiffuse型が多く、肺線維症を高頻度に伴う。また、抗セントロメア抗体陽性例はlimited型で内臓病変の頻度が少ない²⁾。したがって、これら強皮症関連自己抗体を検出することは強皮症の診断、病型分類、症状出現や予後の予測にきわめて有用である。

我々は強皮症に特異的な新たな自己抗体として、複数のRNAポリメラーゼ(RNAP)を同時に認識する自己抗体を報告した³⁾。RNAPはRNAの転写を触媒する酵素であり、RNAPIはリボソームRNA、RNAPIIはmRNA、RNAPIIIはtRNAなどの低分子RNAをそれぞれ転写する。強皮症患者血清中にはRNAPIとRNAPIIIを同時に認識する抗体(抗RNAPI/III抗体)が検出され、そのうち一部はRNAPIIIとも反応する。抗RNAPI/III抗体は強皮症に特異性が高く、強皮症以外の疾患での報告はない。抗RNAPI/III抗体は急速に皮膚硬化が進行するdiffuse型に高頻度に検出され、強皮症腎を高率に併発し、予後の悪い病型と関連する³⁾。我々のこれらの成績は、その後欧米の施設からの報告でも確認されている⁴⁾。日本人における陽性頻度は5%と少ないが、欧米白人では20%前後で抗トポイソメラーゼI抗体の頻度に匹敵する⁵⁾。近年、抗RNAPI/III抗体が検出された強皮症患者では、強皮症腎を早期に発見するため血圧自己測定を徹底させることが勧められている。その結果、早期にACE阻害薬による治療を開始することで、強皮症腎の生命予後の著明な改善が得られたことも示されている。したがって、抗RNAPI/III抗体は強皮症の診断、病型分類、治療方針に決定に際してきわめて有用な自己抗体であることは広く認識されている。しかし、現時点では大量のアイソトープと培養細胞を用いる煩雑な免疫沈降法が抗RNAPI/III抗体を検出する唯一の検出法である。そのため、一般検査室での抗RNAPI/III抗体の検出は困難であり、臨床的にきわめて有用なマーカーであるにもかかわらず、広く普及していないのが現状である。したがって、抗RNAPI/III抗体の簡便な検出法の開発が急務である。

抗RNAPI/III抗体は従来行われてきた自己抗体の検出法である二重免疫拡散法やcrudeな抗原を用いた免疫プロット法では検出できない。細胞内の分子

数も少なく、培養細胞からの大量のRNAPI/III抗原の精製も困難である。RNAPI、IIIはいずれも10以上のサブユニットから構成される複合体である。この中で強皮症患者血清中の抗RNAPI/III抗体により認識されるエピトープを含むサブユニットが同定できれば、そのサブユニットを分子生物学的手法を用いて大量に発現させ、酵素免疫測定法(ELISA)などのsolid-phase assayの抗原として利用できる可能性がある。そこで、本研究では強皮症患者血清中の抗RNAPI/III抗体により高頻度に認識されるサブユニットを同定し、それらをリコンビナント抗原として発現させることを試みた。

材料と方法

対象 免疫沈降法で抗RNAPI/III抗体陽性が確認されている強皮症患者28例、同抗体陰性強皮症患者10例、健常人10例の血清を対象とした。抗RNAPI/III抗体陽性血清はこれまで我々が同定した86血清の中から無作為に選んだ。

免疫沈降法 ³⁵Sメチオニンで標識したHeLa細胞の可溶性細胞抽出物を抗原とした免疫沈降法を行った。抗RNAPI/III抗体はRNAPIの高分子サブユニット(190-kDa蛋白と126-kDa蛋白)とRNAPIIIの高分子サブユニット(155-kDa蛋白と138-kDa蛋白)の沈降により同定した³⁾。

精製ヒトRNAP抗原を用いた免疫プロット法

抗RNAPI/III抗体高力価陽性患者KA血清(抗RNAPIII抗体も陽性)³⁾のIgG分画をプロテインA-アガロースビーズ(GIBCO BRL, Grand Island, NY)に吸着させ、さらに6.1 mg/ml dimethyl pimelimidate (Pierce, Rockford, IL)でcrosslinkさせた。IgG結合ビーズをHeLa細胞の可溶性細胞抽出物を反応させ、結合したRNAP分画を3M MgCl₂で抽出後、トリクロロ酢酸で沈降させた⁷⁾。精製RNAP分画は7.5%または10%ポリアクリルアミド-SDS電気泳動で分画後、ニトロセルロース膜に転写した。500倍希釈した血清、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(1:10,000)と反応させ、最終的にケミルミネッセンスの発色を検出した。

RNAPサブユニットをコードするcDNAの分離

Genbankに登録されている既知の塩基配列をもとに、目的とするRNAPサブユニットに特異的なプライマーを合成した(RPC155: sense 5'-aggatgacgcggattatgctcgc-3', antisense 5'-

ctatgtgacaagggggatgtggaattc-3', RPC62: sense 5'-ctcagactccccagtaacaatgactcaa-3', antisense 5'-ccaggcaccctctttatgttgetttcc-3'). K562細胞から poly A⁺ の mRNA をマグネティックビーズ結合oligo (dU)₂₅ (宝酒造, 東京) を用いて分離し, AMV の reverse transcriptase により一本鎖 cDNA へと変換した。これをテンプレートとして PCR を行い, 目的とする cDNA を増幅した。得られた DNA は pGEM-Tベクター (Promega, Madison, WI) にサブクローニングし, T7 および SP6 プライマーを用いて塩基配列を決定した。

RNAPサブユニットのリコンビナント蛋白の発現

RNAPサブユニットのcDNAをアミノ酸のframeを合わせて pMal-c2 ベクター (New England Biolabs, Beverly, MA) の MalE 遺伝子の下流にサブクローニングした。0.3 mM IPTG の添加により, RNAPサブユニットのリコンビナント蛋白を maltose-binding protein (MBP) との融合蛋白として発現させた。リコンビナント蛋白を発現させた大腸菌の可溶成分を抗原とした免疫ブロット法により RNAPサブユニットに対する抗体を検出した。血清は250倍に希釈し, あらかじめリコンビナント蛋白を発現しない大腸菌の可溶成分と反応させることにより抗大腸菌抗体を除去した。

結果と考察

抗 RNAPI/III 抗体により認識される RNAP のサブユニット

抗 RNAPI/III 抗体陽性 28 血清は精製 RNAP 抗原に含まれる少なくとも 15 の蛋白を様々な組み合わせで認識した。表 1 に各サブユニットに対する反応性の陽性頻度をまとめた。RNAPIII の高分子サブユニットである 155-kDa 蛋白は全 28 血清により認識された。ついで, 62-kDa 蛋白に対する反応性は 26 血清 (93%) で検出された。したがって, これらサブユニットは強皮症患者血清中の抗 RNAPI/III 抗体により高頻度に認識される主要なエピトープを含むと考えられた。その他, 138-kDa 蛋白, 27-kDa 蛋白は抗 RNAPI/III 抗体陽性血清によりそれぞれ 61%, 75% と高頻度に認識された。RNAPII の高分子サブユニットである 240-kDa, 220kDa, 145kDa 蛋白に対する反応性はいずれも免疫沈降法で RNAPI/III に加えて RNAPII を沈降した血清にのみ検出された。84-kDa 蛋白は RNAPIII の構成成分として報告されているが, 抗 RNAPI/III 抗体陽性血清のみなら

Table 1. Reactivity to individual RNAPsubunits in 28 SSC sera positive for anti-RNAP I/III antibody

RNAP subunit	RNAP class	Positive reactivity	
		Number	Frequency
240-kDa	II	5	18%
220-kDa	II	5	18%
190-kDa	I	8	29%
155-kDa	III	28	100%
145-kDa	II	2	7%
138-kDa	III	17	61%
126-kDa	I	8	29%
84-kDa	III	28*	100%*
62-kDa	III	26	93%
43-kDa	I, III	7	25%
34-kDa	?	9	32%
32-kDa	?	15	54%
27-kDa	III	21	75%
23-kDa	?	2	7%
21-kDa	?	4	14%

*Reactivity to 84-kDa protein was also detected in normal control sera and may represent non-specific reactivity in some sera.

ず抗 RNAPI/III 抗体陰性強皮症血清および健常人血清とも反応し, 非特異的反應である可能性が考えられた。ただし, 84-kDa 蛋白との強い反応性を示したのは抗 RNAPI/III 抗体陽性の 10 血清のみであった。抗 RNAPI/III 抗体陰性強皮症 10 例および健常人 10 例は 84-kDa 蛋白との弱い反応性のみで, 他のサブユニットとは反応しなかった。以上の成績より, 精製 RNAP 抗原に含まれる 155-kDa 蛋白と 62-kDa 蛋白が強皮症患者血清中の抗 RNAPI/III 抗体により高頻度に認識されるサブユニットであり, solid-phase assay に用いる抗原の候補と考えられた。

RPC155 リコンビナント蛋白に対する反応性

ニトロセルロース膜から溶出した 155-kDa 蛋白と反応する抗体は, 免疫沈降法で RNAPIII のみを沈降した⁷⁾。また, その分子量より 155-kDa 蛋白は RNAPIII の最も分子量の大きなサブユニットである RPC155(IIIa) と考えられた, RPC155 の全 open reading frame を含む cDNA の塩基配列が最近明らかにされた⁸⁾。そこで, k562 細胞株由来の cDNA をテンプレートとした PCR により, RPC155 をコードする cDNA の部分断片の増幅を試みた。その結果, アミノ酸残基 1092-1391 をコードする 905bp の DNA が増幅された。この DNA を pMal-c2 にサブクローニングし, MBP との融合蛋白として発現さ

せ、抗RNAPI/III抗体陽性強皮症10例、抗RNAPI/III抗体陰性強皮症5例、健常人5例の血清との反応性を免疫プロットで調べた。しかし、いずれの血清との反応も見られず、RPC155のC末端側には抗RNAPI/III抗体により認識されるエピトープが存在しないと考えられた。今後、RPC155の全長をカバーするcDNAを分離し、他の部分に対する反応性の検討が必要と考えられた。

RPC62リコンビナント蛋白に対する反応性

ニトロセルロース膜から溶出した62-kDa蛋白特異抗体は、免疫沈降法ではRNAPIIIのみを沈降し⁷⁾、RNAPIII固有のサブユニットとして報告されているRPC62と考えられた⁹⁾。最近、RPC62をコードする全長cDNAがクローニングされ、その塩基配列も決定された⁹⁾。同様にk562細胞株由来のcDNAから特異的プライマーを用いたPCRによりRPC62をコードするcDNAの増幅を試みた。その結果、約1.7kbと1.6kbの二つのDNAが得られた。シーケンスの結果、1.7kbのDNAは従来報告されていたRPC62の全open reading frameを含む1684bpのDNAであった。一方、1.6kbのDNAはRPC62のアミノ酸残基62-99に相当する113bpが欠失しており、RPC62のalternative splicing産物と考えられ、RPC62-delと名付けた。RPC62-delでは、113bpの部分欠失の直後がframe shiftのため終始コドンとなっており、塩基配列から予想されるアミノ酸はRPC62の533個に比べてわずか62個であった。RT-PCRによる解析では、K562以外の腫瘍細胞株HeLa、HepG2、skmel23でもRPC62とRPC62-delの両方のmRNA発現を認め、現時点ではRPC62-delの生理的活性については不明である。RPC62とRPC62-delのDNAをpMal-c2にサブクローニングし、MBPとの融合蛋白として発現させた。塩基配列からの予測通り、RPC62では約100 kDa、RPC62-delでは約50 kDa (MBPの分子量は43 kDa)の融合蛋白の発現を確認した(図1)。RPC62融合蛋白に対する反応性は、抗RNAPI/III抗体陽性強皮症20例の血清中16例(80%)で検出された(図1)。抗RNAPI/III抗体陰性強皮症5例、健常人5例の血清ではRPC62融合蛋白との反応性を認めなかった。一方、抗RNAPI/III抗体の有無にかかわらず強皮症および健常人血清はRPC62-del融合蛋白とは反応しなかった。

抗RNAPI/III抗体検出のためのELISAへの応用

今回、精製抗原を用いた免疫プロット法により、

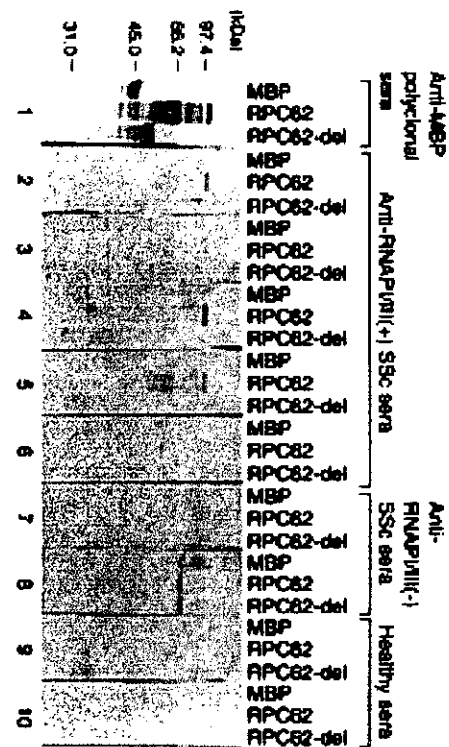


Figure 1. Immunoreactivities to recombinant RPC62 and RPC62-del fusion proteins in anti-RNAPI/III-positive sera. Recombinant RPC62 and RPC62-del were probed with rabbit anti-MBP polyclonal serum (lane 1), 5 anti-RNAPI/III-positive sera (lane 2-6), 2 anti-RNAPI/III-negative sera (lanes 7 and 8), and 2 healthy sera (lanes 9 and 10). RPC62 was specifically recognized by 3 of 5 anti-RNAPI/III-positive sera, but not by anti-RNAPI/III-negative serum or healthy control serum.

強皮症血清中の抗RNAPI/III抗体がRNAPの多くのサブユニットと反応することが明らかにされた。これまでのcrudeな抗原を用いた免疫プロット法による検討では抗RNAPI/III抗体と反応するサブユニットの検出が困難であったことから、その原因としてRNAP抗原絶対量が少ない、または抗RNAPI/III抗体がRNAP複合体上の高次構造を認識する可能性が推測されてきた。今回の成績より、強皮症患者血清中の抗RNAPI/III抗体はSDS存在下で変性したRNAPサブユニットとも反応することが明らかとなった。したがって、大腸菌で発現させた単一のサブユニットでも抗RNAPI/III抗体を検出するアッセイ法の抗原として用いることができることが示された。

今回の成績では、強皮症血清中の抗RNAPI/III抗

体の多くがRPC62融合蛋白と反応したことから、RPC62融合蛋白が抗RNAPI/IIIを検出するELISAの抗原の候補の一つと考えられた。ただし、RPC62融合蛋白単独では特異性は高いものの、検出感度が80%と低かった。今後、RPC62にRPC155や他のRNAPサブユニットのリコンビナント抗原を加えることで、検出感度を上昇させることを検討する予定である。

文 献

- 1) Okano Y: Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:709-35.
- 2) Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M: Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37:75-83.
- 3) Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M: Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993;91: 1399-404.
- 4) Okano Y, Steen VD, Medsger TA Jr: Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1993;119: 1005-13.
- 5) Harvey GR, Rands AL, McHugh NJ: Anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis (SSc). *Clin Exp Immunol* 1996;105:468-74.
- 6) Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Tojo T, Medsger TA Jr: Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1994;37: 902-6.
- 7) Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Medsger TA Jr, Wright TM: Autoantibodies to RNA polymerases recognize multiple subunits and demonstrate cross-reactivity with RNA polymerase complexes. *Arthritis Rheum* 1999;42:275-84.
- 8) Sepehri S, Hernandez N: The largest subunit of human RNA polymerase III is closely related to the largest subunit of yeast and Trypanosome RNA polymerase III. *Genome Res* 1997;7:1006-19.
- 9) Wang Z, Roeder RG: Three human RNA polymerase III-specific subunits from a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev* 1997;11:1315-26.

全身性強皮症患者およびシェーグレン症候群患者の マイクロキメリズム

班 員：石川 治（群馬大学 皮膚科）

共同研究者：遠藤雪恵、根岸 泉（群馬大学 皮膚科）

Microchimerism in Patients with Systemic Sclerosis or Sjögren's Syndrome

Osamu ISHIKAWA, Yukie ENDO, Izumi NEGISHI

Department of Dermatology, Gunma University School of Medicine

Summary

Microchimerism of fetal cells occurs during most pregnancies, and fetal progenitor cells have been reported to persist in the maternal circulation. Recent studies showed a greater number of non-self circulating fetal cells in the women with systemic sclerosis (SSc). Anti-maternal graft versus host reaction by fetal cells may be implicated in the pathogenesis of certain autoimmune diseases.

To explore this hypothesis, we carried out a polymerase chain reaction (PCR) analysis to identify Y-chromosome sequence in DNA extracted from peripheral blood cells (PBC) or affected minor salivary glands of the women with SSc or Sjögren's syndrome (SjS). Y-chromosome sequence should be derived from male fetuses since we chose female patients or healthy women who had delivered at least one son. First, we examined PBC of healthy women and women with SSc. Y-chromosome sequence was detected in 4 out of 22 (18%) female patients with SSc (limited cutaneous type: 2/16, diffuse cutaneous type: 2/6) and unexpectedly, in 10 out of 20 (50%) healthy women. Second, we studied 12 samples of affected minor salivary glands of women with SjS. Y-chromosome sequence was amplified in 9 cases (75%), in 3 of which we detected Y-chromosome bearing mononuclear cell infiltrates in the minor salivary glands with in situ hybridization assay. In PBC of women with SjS, 2 out of 6 patients were positive for Y-chromosome by PCR method.

It is hard to conclude that circulating fetal cells in peripheral blood directly cause the diseases. The infiltration of Y-chromosome bearing cells in minor salivary glands suggests that microchimerism of fetal cells might have partial involvement in pathogenesis of SjS. It is, however, of great importance to further elucidate whether microchimerism is disease specific or ubiquitous phenomenon in certain diseases.

はじめに

骨髄移植、輸血、臓器移植後にはレシビエントと遺伝的背景が異なるドナー細胞が共存したキメラ状態が生じる。キメラ状態が単一の細胞小集団に限局している場合、特にマイクロキメリズムと呼ばれる。最近では母体と胎児の血液が胎盤を経由して相互に交通することにより、妊娠後にも母親と児においてキメリズムが成立することが明らかになってきた¹⁾。

慢性移植片対宿主反応 (graft versus host disease; GVHD) は、全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) ならびにシェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; SjS) に類似した症状を呈することが知られている²⁾。また、SScやSjSの発症は男性に比べて女性に有意に多く、発症年齢も30-50歳台と出産後の年齢層に集中している³⁾。これらの観点から、Nelsonら⁴⁾とArlettら⁵⁾はSScの病因論として、妊娠中に母体に移入した胎児由来細胞によるGVHDを想定した。そこで、私たちはSScのはかSjSについても同様の発症機序を考えて解析を行った。

一般に、骨髄移植患者などのキメリズムを調べるには、HLAが非常に有効なマーカーである。もちろん、HLAは母親細胞と児由来細胞の識別にも有効であるが、マーカーとして使用するには事前に親子のHLAタイピングを必要とする。時間とコストを考慮すると、男児出産歴のある女性という制約はあるものの、男児と母親由来の細胞を識別するにはY染色体が非常に簡便で有効なマーカーである。

材料と方法

1. 対象および検体

末梢血は、群馬大学医学部附属病院皮膚科外来に通院中の男児出産歴のあるSSc患者22名、SjS患者6名および正常人20名より採取した。また、11歳小唾液腺は臨床的にSjSを疑って11歳生検を施行した患者のうち男児出産歴があり、Chishiolo⁶⁾ およびMassonによるグレード分類でグレード2以上のリンパ球浸潤を認めた12名の生検材料を用いた。

2. Polymerase Chain Reaction (PCR) を用いたY染色体陽性細胞の検出

患者および正常人から末梢血20mlを採取し、DNAを抽出した。また、ホルマリン固定、パラフィン包埋の小唾液腺薄切組織 (10 μ m) 約10枚から塩化ナトリウム-エタノール沈殿法を用いてDNAを抽出した。Y染色体特異配列を検出するために、Y染色体上に存在するsex-determining region (SRY) の一部を増幅させるSRYプライマーと、そのすぐ内側のインナープライマー-SRY⁷⁾ を用いてnested PCR法を行った。まず、denaturation 94° 2分、annealing 55° 2分、extension 72° 2分の反応を30サイクル、続いてその1 μ lを用いてdenaturation 94° 1分、annealing 55° 1分30秒、extension 72° 2分の反応を30サイクルを行った。また、増幅されたPCR産物がSRY遺伝子であることを確認する目的で、同遺伝子内に消化部位を持つ制限酵素Xba I およびPvu IIを用いて消化を行った。

3. in situ ハイブリダイゼーションを用いたY染色体陽性細胞の検出

PCR法でY染色体特異配列を認めた小唾液腺について、パラフィン切片上でY染色体特異プローブを用いたin situ ハイブリダイゼーションを行った。0.1% ペプシンで蛋白消化を行った後、ジゴキシゲ

表1 女性強皮症およびシェーグレン症候群患者のマイクロキメリズム

		Mean age	Sample No.	Y-chromosome positive (%)	
				PCR	ISH
peripheral blood	SSc	60.1	22	4 (18.2)	ND
	limited type	58.9	16	2 (18.2)	
	diffuse type	65.7	6	2 (33.3)	
	SjS	62.1	6	2 (33.3)	ND
	normal control	42.5	20	10 (50.0)	ND
salivary gland	SjS	56.3	12	9 (75.0)	

ニン標識-Y染色体特異プローブ (2 ng/μl) を用いて48°でハイブリダイゼーションを行った。続いて抗ジゴキシゲニン-アルカリフォスファターゼによりプローブの検出を行った。

結果

1. 末梢血細胞の解析 (表1)

男児出産歴を有する女性SSc患者22例中4例(18%)にY染色体配列を検出した(図1)。サブタイプ別に見ると、limited cutaneous type 16例中2例、diffuse cutaneous type 6例中2例にY染色体配列が陽性であった。また、男児出産歴を有する女性SjS患者6例中2例(33%)にY染色体配列を認めた。予想に反して、男児出産歴のある健康女性20例中10例(50%)にもY染色体配列が検出された(図1)。消化酵素Xba IおよびPvu IIを用いた

消化の結果、増幅されたすべてのPCR産物で予想される2本のバンドを認めた(図2)。

2. 小唾液腺浸潤細胞の解析 (表1)

男児出産歴のあるSjS患者12例中9例(75%)の生検小唾液腺組織から抽出したDNAにY染色体配列をPCR法にて検出した(図3)。このY染色体陽性の9例についてin situハイブリダイゼーション法を施行したところ、3例で小唾液腺導管周囲の浸潤単核球細胞中にY染色体陽性細胞が混在して認められた(図4)。

考 按

健康な母親の末梢血中にもしばしば胎児由来細胞が認められ、最長では出産27年後でも検出された例が報告されている²⁾。Nelsonら⁹⁾、Artlettら¹⁰⁾は

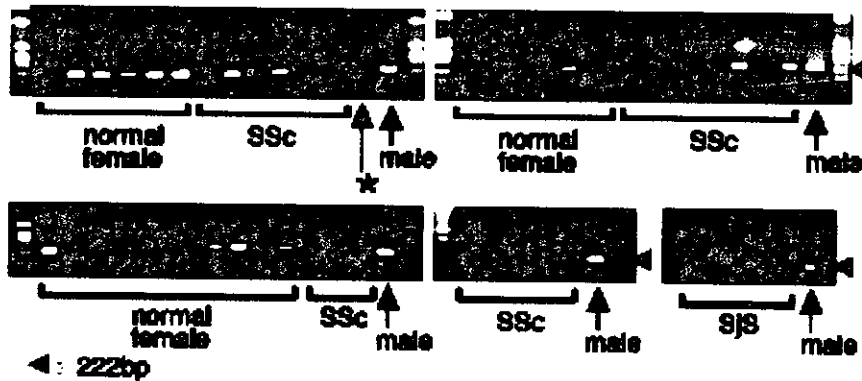


図1 末梢血由来DNA中のY染色体特異配列のPCR解析 男児出産歴のある女性強皮症患者(SSc)4名、シェーグレン症候群患者(SjS)2名、正常人女性10名でY染色体に特異的な222bpのバンドを認めた。*: 男児出産歴のない女性強皮症患者

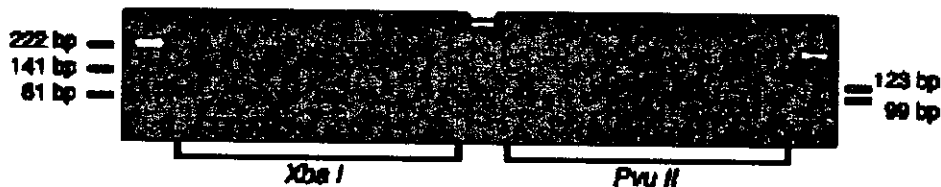


図2 制限酵素Xba I、Pvu IIによるPCR産物の消化 各々予想される141bp、81bpおよび123bp、99bpのバンドを認めた。両端のバンドは未消化の222bpのバンドである。なお、ここには図1のSSc、SjS、maleについての結果を示す。