

- T.Sasaki.: Anti-K-ras rybozyme induces a growth inhibition and an increased chemosensitivity of human colon cancer cells. *Cancer Gene Therapy*, 7: 495-500, 2000
5. S.Fujimaki, T.Funato, H.Harigae, M.Imaizumi, H.Suzuki, Y.Kaneko, Y.Miura, T.Sasaki.: A quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method for the detection of leukaemic cells with t(8;21) in peripheral blood. *Eur J Haematology*, 64: 252-258, 2000
6. S.Takahashi, K.Furuyama, A.Kobayashi, S.Taketani, H.Harigae, M.Yamamoto, K.Igarashi, T.Sasaki, N.Hayashi.: Cloning of a coproporphyrinogen oxidase promoter regulatory element binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273: 596-602, 2000
7. T.Miura, T.Funato, S.Yabuki, T.Sasaki, M.Kaku.: Detection of monoclonal proteins by capillary electrophoresis using a zwitterion in the running buffer. *Clinica Chimica Acta*, 299: 87-99, 2000
8. T.Funato, Y.Nishiyama, N.Ioritani, R.Matsuki, K.Yoshida, M.Kaku, T.Sasaki, H.Ideguchi, J.Ono: Detection of mutations in adenine phosphoribosyltransferase (APRT) deficiency using the LightCycler system. *J Clin Lab Anal* 14:274-279, 2000
9. C.Bona, S.Saito: Fibrillin-1 protein in tight skin mice and scleroderma. *Clin Rev Allergy Immunol* 8:119-126, 2000
10. T.Ishii, H.Ikushimam, Y.Munakata, S.Iwata, et al: Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation. *Proc natl Acad Sci* 97:8439-8444, 2000
11. Y.Munakata, S.Iwata, J.Dobers, T.Ishii, et al: Novel in vitro effects of Bucillamine. *Arth Rheum* 43:1616-1623, 2000
12. T.Yokozawa, K.Miyamura, R.Fujino, et al: Gelatin beads as platforms for targeting molecule and anti-Fas antibody. Two major properties of cytotoxic T lymphocytes. *Exp Hematol* 28:1129-1136, 2000
13. K.Miyamura, M.Hamaguchi, H.Taji, et al: Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors. *Bone Marrow Transplant* 25:545-548, 2000
14. S.Takahashi, K.Furuyama, A.Kobayashi, S.taketani, H.Harigae, M.Yamamoto, K.Igarashi, T.Sasaki, N.Hayashi: Cloning of a coproporphyrinogen oxidase promoter regulatory element binding protein. *Biochem biophys Res Commun* 273:596-602, 2000
15. T.Funato, N.Satou, D.Abukawa, J.Satou, Y.Abe, K.Kumura Ishii, K.Iinuma, M.Kaku, T.Sasaki: Quantitative evaluation of cytomegalovirus DNA in infantile hepatitis. *J Virol Hepat* in press, 2000
16. J.Kameoka, T.Funato, Y.Obara, I.Kadowaki, H.Yokoyama, T.Kimura, Y.tomiya, M.Yamada, I.Ishikawa, M.takagawa, O.Sasaki, J.Kimura, H.Harigae, I.Miura, K.Meguro, M.Kaku, T.Sasaki: Clonal evolution from trisomy into tetrasomy of chromosome 8 associated with the development of acute myeloid leukemia from myelodysplastic syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics* in press, 2000
17. M.Takahashi, T.Funato, K.Kumura Ishii,

M.Kaku, T.Sasaki: Measurement of TNF α messenger RNA in synovial fibroblasts by real-time quantitative RT-PCR. J Lab Clin Med, 2000

18. J.Satoh, T.Funato, N.Satoh, Y.Abe, K.K.Ishii, T.Sasaki, M.Kaku: Detection of human cytomegalovirus DNA from blood cells by quantitative PCR. J Clin Lab Anal in press, 2001

19. 佐々木毅：ヒトパルボウイルス B19 と慢性関節リウマチ、リウマチ、39:867-873, 2000

20. 石井恵子、高橋裕一、賀来満夫、佐々木毅：ヒトパルボウイルス感染と慢性関節、リウマチ、27:419-425, 2000

21. 藤巻慎一、船渡忠男、藤原淳子、佐藤淳子、三浦利彦、賀来満夫、遠宮靖雄、佐々木毅：定量 RT-PCR における RNA 基準量の設定に関する検討、臨床病理、48:54-59, 2000

22. 佐々木毅：リウマチ性疾患の診療に有用な検査、リウマチ科、23:282-286, 2000

23. 佐々木毅：リウマチ性疾患の診断と治療プロセス、内科、86:218-224, 2000

(2) 学会発表

1. 石井恵子、齋藤貴子、宗像靖彦、佐々木毅：ヒトパルボウイルス B19 の Tリンパ球への感染、第 48 回日本ウイルス学会、2000 年 11 月三重県津市

2. 宗像靖彦、齋藤貴子、石井恵子、高澤徳彦、佐々木毅：ヒトパルボウイルス B19 の T 細胞への感染と慢性関節リウマチ、第 30 回日本免疫学会、2000 年 11 月、福島県郡山市

3. 加藤一郎、宗像靖彦、齋藤貴子、石井恵

子、渡辺美紀、齋藤真一郎、平林泰彦、柴田忍、鈴木隆城、佐々木毅：ヒトパルボウイルス B19 に罹患し、急性増悪との鑑別を要した SLE の 1 例、第 44 回日本リウマチ学会、2000 年 5 月、横浜

4. 高澤徳彦、齋藤貴子、宗像靖彦、石井恵子、加藤一郎、渡辺美紀、齋藤真一郎、平林泰彦、柴田忍、佐々木毅：M 蛋白が出現したヒトパルボウイルス B19 慢性関節炎の一例、第 44 回日本リウマチ学会、2000 年 5 月、横浜

5. 齋藤貴子、宗像靖彦、畠山百合子、石井恵子、賀来満夫、佐々木毅：血清検査、DNA 検査に基づくヒトパルボウイルス感染の特徴、第 47 回日本臨床病理学会、2000 年 11 月、福島県郡山市

6. Y.Munakata, K.Ishii, T.Sasaki: The role of human parvovirus B19 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. 1st International seminar on immunology--Pathogenesis and regulation of immunological refractory diseases--. Tokyo, Nov. 2000.

7. Y.Munakata, T.Saito, K.Ishii, T.Sasaki: Human parvovirus B19 infection to macrophage-like cells and its role for inflammatory cytokine production. Experimental Biology 2001 (Annual Meeting of American Society of Immunology) Orland, U.S.A., March, 2001.

8. T.Sasaki, Y.Suzuki, T.Funato, Y.Munakata, K.Sato, Y. Hirabayashi, T.Ishii, N.Takasawa, T.Ootaka, T.Saito: CHEMICALLY MODIFIED RIBOZYME TO V GENE INHIBITS ANTI-DNA PRODUCTION AND THE FORMATION OF IMMUNE DEPOSITS CAUSED BY LUPUS LYMPHOCYTES. 2000 Ann. Sci. Meeting of ACR. Philadelphia, Oct.

2000

9. M.Takahashi, T.Funato, Y.Munakata, K.Ishii,
M.Kaku, Y.Hirabayasi, T.Sasaki: SPECIFIC
MANIPULATION OF INFLAMMATORY
CYTOKINES BY RIBOZYME AND DNA
ENZYME TO TNF- α mRNA. 2000 Ann. Sci.
Meeting of ACR. Philadelphia, Oct. 2000

Fc γ RIIB 遺伝子プロモーター領域多型の免疫応答における役割

広瀬幸子（順天堂大学医学部・第二病理）

研究要旨

SLE の特徴的病態である高 IgG 血症の感受性遺伝子として、B 細胞の活性化を抑制する Fc γ RIIB1 分子をコードする Fc γ RIIB 遺伝子の制御領域多型が関与していることが、遺伝的解析から推定された。今回、Fc γ RIIB 遺伝子プロモーター領域の転写制御部位を含む一部欠損を伴う遺伝子多型が、IgG 抗体応答能を亢進させる機構を、keyhole limpet hemocyanin (KLH) を免疫したマウス系を用いて解析した。その結果、この多型をもつマウス系では、免疫後に形成されるリンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞における Fc γ RIIB1 の発現抑制と、この現象に相関した IgG 抗 KLH 抗体価の上昇をきたすことが明らかとなった。また、ルシフェラーゼレポーター法での解析で、実際に多型を示すプロモーター領域が転写制御に関わっていることが示された。本研究によって、Fc γ RIIB 遺伝子プロモーター領域多型は免疫制御遺伝子としての役割を担っており、感染防御の面から有益な形質として保持された多型である一方で、SLE 感受性遺伝子の一つとして機能していることが示唆された。

A. 研究目的

IgG Fc receptor のうち、低親和性の Fc γ RIIB 分子はその細胞内に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) 分子を有しており、細胞の活性化の抑制に働くことが知られている。Fc γ RIIB 分子にはいくつかのアイソフォームが存在し、そのうち B 細胞上に発現する Fc γ RIIB1 アイソフォームは、B 細胞抗原受容体 (BCR) からの活性化シグナルを制御する B 細胞の key inhibitor である。我々は、高 IgG 血症を病態の特徴とする全身性エリテマトーデス (SLE) における B 細胞異常活性化の感受性遺伝子解析を行い、Fc γ RIIB1 分子をコードする遺伝子の制御領域多型が関与すると考えられる結果を得た。塩基配列解析の結果、多型部位はプロモーターおよび第 3 インترونに存在し、おのおのいくつかの塩基欠損部位が認められた。特に、SLE 自然発症マウス系ではプロモーター領域に

13 塩基と 3 塩基の欠損部位が見られ、13 塩基欠損部位には AP-4 binding site ならびに S box の consensus 配列が存在している。従って、このプロモーター領域多型に基づく Fc γ RIIB1 分子の発現低下が、B 細胞の機能亢進をきたし、SLE 感受性遺伝子の一つとなる可能性が考えられる。本研究では、プロモーター領域多型が B 細胞上の Fc γ RIIB1 分子の発現レベル、ならびに IgG 抗体応答に及ぼす影響を *in vivo* の系で解析すると共に、ルシフェラーゼレポーター法を用いた *in vitro* の系で、プロモーター領域多型部位の転写制御に及ぼす影響を確認することを目的とした。

B. 研究方法

(1) Fc γ RIIB 遺伝子プロモーター領域の塩基配列解析：報告されている塩基配列を参考に数種類のプライマーを合成し、マウスゲノム DNA の Fc γ RIIB 遺伝子プロモ-

ター領域の塩基配列を解析した。

(2) NZB, BALB/c および(BALB/c x NZB) F1 マウスを、KLH で 8 週齢、10 週齢で 2 回免疫後、12 週目のマウスの脾臓 B 細胞における Fc γ RIIB1 分子の発現レベルを、NZB および BALB 型の Fc γ RIIB1 分子を各々特異的に区別できるモノクローナル抗 Ly17.1 抗体および抗 Ly17.2 抗体を用いて、flow cytometry にて解析した。

(3) (BALB/c x NZB) F2 マウスを作製し、同様に KLH を免疫後、脾臓 B 細胞における Fc γ RIIB1 分子の発現レベルと、血中 IgG 抗 KLH 抗体価を測定した。次にこれら F2 マウスのゲノム DNA を抽出し、Fc γ RIIB 遺伝子プロモーター領域についての遺伝子型を決定し、遺伝子型による影響を検討した。

(4) NZB 型と BALB 型のプロモーター領域を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の上流につなぎ、P388D1 細胞にトランスフェクトして、ルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果

(1) 図 1 に SLE 自然発症マウス系の NZB および正常マウス系の BALB/c の Fc γ RIIB 遺伝子プロモーター領域の塩基配列を比較して示した。NZB には AP-4 binding site ならびに S box の consensus 配列を含む 13 塩基と 3 塩基の 2 つの欠損部位が見られた。

(2) KLH 免疫後の (BALB/c x NZB) F1 マウスの脾臓 B 細胞における Fc γ RIIB1 分子の発現レベルは、図 2 に示すように、非胚中心 B 細胞(Non-GC B)では NZB 型および BALB 型両方の Fc γ RIIB1 分子が発現しているが、胚中心の活性化 B 細胞(GC B)では NZB 型の Fc γ RIIB1 分子の発現は消失し、BALB 型のみが発現していた。親系の NZB では Non-GC B でのみ発現が認められ、BALB/c では Non-GC B, GC B の両方に同レベルの発現が認められた。このこ

とから、NZB 型 allele の発現のみが GC B で抑制されることが解る。

(3) (BALB/c x NZB) F2 マウスの KLH 免疫後の胚中心 B 細胞上の Fc γ RIIB1 分子の発現レベルと、血中 IgG 抗 KLH 抗体価を、プロモーター領域が NZB/NZB 型, NZB/BALB 型, BALB/BALB 型の 3 群に分けて比較した結果を、図 3 に示した。NZB 型の多型を有するマウスで、Fc γ RIIB1 分子の発現レベルの低下と、血中 IgG 抗 KLH 抗体価の上昇が認められた。

(4) P388D1 細胞を用いたルシフェラーゼレポーター法の解析で、NZB 型のプロモーター領域を導入した場合には、BALB 型の場合に比較して、有意にルシフェラーゼ活性が低かった。

D. 考察

SLE を代表とする自己免疫疾患は複数の遺伝要因の関与する多遺伝子疾患で、これらの遺伝要因は免疫応答分子の異常に関連した遺伝子と考えられる。従って、自己免疫疾患の発症を遺伝学的に解析することは、本質的病因を解明するための重要な研究テーマである。しかしながら、ヒト遺伝子は多型性および多様性が極めて高度で、解析にはかなりの困難が伴う場合が多く、モデルマウスでの解析が有用な情報を提供する。実際にマウスの解析に基づき、Fc γ RIIB 遺伝子の存在する第 1 染色体テロメア領域にヒト SLE 感受性遺伝子の存在が示唆されており、Fc γ RIIB 制御領域多型とヒト SLE との相関の検討が急がれる。制御領域多型の解析は、多遺伝子疾患感受性遺伝子解析において不可欠で、特に Fc γ RIIB1 のように免疫応答の抑制に関わる分子の制御領域多型は、免疫寛容の破綻を原因とする自己免疫疾患の最も可能性のある候補遺伝要因と考えられる。

E. 結論

今回の解析から、13塩基および3塩基の欠損を伴う NZB 型の FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域多型が実際に転写制御に関わっており、この多型によりリンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞での FcγRIIB1 分子の発現抑制、B 細胞の異常活性化、ならびに IgG 免疫応答の亢進がもたらされるものと考えられた。FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域多型は一種の免疫制御遺伝子として機能しており、B 細胞の異常活性化を病因とする SLE の感受性遺伝子の一つとして機能すると考えられる。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Ochiai, K., Ozaki, S., Tanino, A., Watanabe, S., Ueno, T., Mitsui, K., Toei, J., Inada, Y., Hirose, S., Shirai, T. and Nishimura, H. :Genetic regulation of anti-erythrocyte autoantibodies and splenomegaly in autoimmune hemolytic anemia-prone New Zealand Black mice. *Int. Immunol.* 2000, 12, 1-8.
2. Nakajima, A., Hirai, H., Kayagaki, N., Yoshino, S., Hirose, S., Yagita, H. and Okumura, K. :Treatment of lupus in NZB/W F1 mice with monoclonal antibody against Fas ligand. *J. Autoimmunity* 2000, 14, 151-157.
3. Jiang, Y., Hirose, S., Abe, M., Sanokawa-Akakura, R., Ohtsuji, M., Mi, X., Na, L., Xiu, Y., Zhang, D., Shirai, J., Hamano, Y., Fujii, H. and Shirai, T. :Polymorphisms in IgG Fc receptor IIB regulatory regions associated with autoimmune susceptibility. *Immunogenetics* 2000, 51, 429-435.
4. Tsurui, H., Nishimura, H., Hattori, S., Hirose,

S., Okumura, K. and Shirai, T. :Seven color fluorescence imaging of tissue samples based on Fourier spectroscopy and singular value decomposition. *J. Histochem. Cytochem.* 2000, 48, 653-662.

5. Hirose, S., Jiang, Y., Hamano, Y. and Shirai, T. :Genetic aspects of inherent B-cell abnormalities associated with SLE and B-cell malignancy: Lessons from New Zealand mouse models. *Int Rev.Immunol.* 2000, 19, 389-421.
6. Shirai, T. and Hirose, S. :Genetics of SLE; A sine qua non for identification. *Int Rev.Immunol.* 2000, 19, 289-295.
7. Hida, S., Ogasawara, K., Sato, K., Abe, M., Takayanagi, H., Yokochi, T., Sato, T., Hirose, S., Shirai, T., Taki, S. and Taniguchi, T. :CD8⁺ T cell-mediated transcriptional attenuator of interferon- α/β signaling. *Immunity* 2000, 3, 643-655.
8. Hamano, Y., Hirose, S. : Microsatellite method. In *Laboratory Techniques in Renal Cell and Molecular Biology*. Edited by Tomino, Y. KARGER, 2000, p156-161.
9. Takasaki, Y., Kogure, T., Takeuchi, K., Kaneda, K., Yano, T., Hirokawa, K., Hirose, S., Shirai, T. and Hashimoto, H. : Reactivity of anti-PCNA murine monoclonal antibodies and human autoantibodies to thr PCNA multiprotein complexes involved in cell proliferation. *J. Immunol.* 2001, in press.
10. Shike, T., Hirose, S., Kobayashi, M., Funabiki, K., Shirai, T. and Tomino, Y. : Susceptibility and negative epistatic loci contributing to type 2 diabetes mellitus and related phenotypes in a KK/Ta mouse model. *Diatetes* 2001, in press.

2. 学会発表

1. Sachiko Hirose, Reiko Sanokawa-Akakura,

Masaaki Abe, Xiaoyi Mi, Na Li, Jun Shirai and Toshikazu Shirai Genetically-determined aberrant down-regulation of FcγRIIB1 in germinal center B cells associated with hyper-IgG and IgG autoantibodies in murine systemic lupus erythematosus. The 29th Midwinter Conference of Immunologists, January 2000, Asilomar, CA, USA.

2. 広瀬幸子 遺伝学かみた免疫疾患 第12回メディカルサイエンスセミナー (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団主催) 2000、2月 東京
3. 広瀬幸子、大辻希樹、阿部雅明、鶴井博理、白井俊一 高 IgG 抗体応答と FcγRIIB 遺伝子制御領域多型 第89回日本病理学会総会 2000、4月 11-13日、大阪
4. 広瀬幸子 多遺伝子疾患としての SLE とその感受性遺伝子解析 シンポジウム9 「リウマチ性疾患の病因と新しい治療戦略」 第44回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2000、5月 13-14日、横浜
5. 広瀬幸子 NZB/W F1 モデルのトータルゲノム解析 ワークショップ3 「難治性炎症疾患のゲノム解析-モデルマウスからヒトへ-」 第21回 日本炎症学会 2000、7月 4-5日、京王プラザホテル、東京
6. 広瀬幸子 SLE の素因遺伝子 ワークショップ17 「自己免疫疾患の遺伝要因」 第28回 日本臨床免疫学会 2000、8月 28-30日、日本都市センター、東京
7. 修 岩、李 娜、文 香淑、阿部雅明、大辻希樹、中村和裕、下川敏文、羅 智靖、姜 奕、広瀬幸子、白井俊一 SLE 感受性を規定する Fcgr2b 遺伝子プロモーター多型の解析 第30回日本免疫学会・学術集会 2000、11月 14-16日、仙台
8. 李 娜、修 岩、文 香淑、阿部雅明、大辻希樹、佐野川玲子、姜 奕、広瀬幸子、白井俊一 免疫応答遺伝子としての Fcgr2b 遺伝子制御領域多型 第30回日本免疫学会・学術集会 2000、11月 14-16日、仙台
9. 小野栄夫、広瀬幸子、高井俊行 リンパ節胚中心 B 細胞における抑制性 Fc 受容体 FcγRIIB の発現低下が抗体応答に及ぼす影響 第30回日本免疫学会・学術集会 2000、11月 14-16日、仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

該当なし

ヒト全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子検出に関する研究

徳永 勝士 （東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室）

研究要旨

近年のゲノム医学の進展を背景に、全身性エリテマトーデス(SLE)の病因・病態をより明らかなものとし、診断や治療のターゲットの設定に向けての応用を目的として、当研究室では、SLE の疾患感受性遺伝子の検出を試みている。本年度は、CD19, FCGR2B, BCMA, NKG2A の解析を行い、多数の新たな多型部位を見出すとともに、CD19 の 3'非翻訳領域の反復配列多型、FCGR2B 翻訳領域の非同義置換と SLE との新たな関連を検出した。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)の発症には遺伝素因が関与することが知られている。これまで、欧米において genome-wide の連鎖解析が数施設から報告され、染色体上の多数の領域が候補領域として報告されている。一方、SLE のような多因子疾患では個々の遺伝子の寄与は比較的小さいと推測され、高い検出力を有する候補遺伝子アプローチによる関連分析が有用性を発揮する。また、連鎖解析から候補領域をしぼるにせよ、最終的には候補遺伝子の関連分析によって疾患感受性遺伝子を決定する必要がある。これらの理由から、連鎖解析を利用する位置的アプローチと候補遺伝子アプローチは平行して

進められる必要がある。

われわれは、他集団における連鎖解析からの位置情報、病態上の重要性、動物モデルにおける重要性などの情報から候補遺伝子を設定し、その変異スクリーニングおよび関連分析による疾患感受性遺伝子の検出を目的とした研究を施行しており、これまでに約 20 の遺伝子の解析を終了した。本年度は、以下に述べる背景のもとに、CD19, FCGR2B, BCMA, NKG2A を候補遺伝子として、解析を行った。

CD19 は B 細胞のシグナル伝達分子であり、過剰発現マウスでは抗 DNA 抗体やリウマトイド因子の産生が、欠損マウスでは免疫グロブリンレベルの低下が報告されている。染色体上、Caucasian に

において慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) や Crohn 病の感受性候補領域と示唆されている 16p11.2 に位置する。

ヒトの低親和性 IgG Fc 受容体は、1q23 にクラスターを形成して存在する *FCGR2A*, *2B*, *2C*, *3A*, *3B* にコードされ、主として好中球・単球活性化、ADCC, 免疫複合体のクリアランスに関与する分子群であるが、FcγRIIB は B 細胞・単球において抑制性シグナルを伝達することが知られ、IIB 欠損マウスでは自己免疫疾患が見られることが報告されている。1q23 領域は他集団における複数の連鎖解析により SLE の候補領域であることが示され、また、候補遺伝子アプローチによる関連分析により、*FCGR2A*, *3A* の関連が報告されているが、結果は必ずしも追認されていない。われわれは日本人における *FCGR2A*, *3A*, *3B* の検討を行い、他集団における報告と異なり、*3B* のみに有意な関連を検出した。このような結果の集団差が生じる理由のひとつの可能性として考えられるのは、本質的な疾患感受性遺伝子は当該領域に位置する別の遺伝子であり、他の遺伝子との関連は、連鎖不平衡によって見かけ上生じる関連であるという可能性である。われわれは、前述のような機能的な重要性から、*FCGR2B* が SLE におけるこの領域の感受性遺伝子である可能性を考え、本研究における解析対象とした。

また、*BCMA*(*TNFRSF17*)は、B 細胞の

増殖と生存に関与する BLyS (BAFF, TALL-1)の受容体のひとつであることが最近明らかになった分子で、BLyS 過剰発現マウスにおいて SLE 様病態の出現すること、SLE モデルマウスにおける BLyS シグナルの遮断が治療効果を有することから、SLE の病態に重要な関与を有することが推測される。

さらに、*NKG2A* は、ヒトレクチン型 NK 受容体のひとつで、抑制性シグナルを伝達することから、多型と自己免疫との関連に興味を持たれる。

B. 研究方法

CD19, *BCMA*, *NKG2A* については、promoter 領域と全ての exon および exon-intron junction について、ゲノム DNA を用いた変異スクリーニングを行い、見出された変異部位について、SLE との関連を検討した。*FCGR2B* については、intron も含め、きわめて *FCGR2A* および *FCGR2C* との相同性が高いため、cDNA をテンプレートとし、*FCGR2B* 特異的な配列を用いた nested PCR により解析した。変異スクリーニングは主として PCR-SSCP にておこない、見出された変異の塩基配列を直接塩基配列決定法にて決定した。見出された多型部位の遺伝子型決定は、PCR-SSCP, PCR-RFLP, FRET 法などを適宜用いて行った。

SLE との関連の解析は、東京近郊在住 SLE 患者と非血縁日本人対照者を用

いた患者対照法にて行った。

C. 研究結果

CD19

CD19 の変異スクリーニングの結果、promoter 領域に 4 個所、翻訳領域に 3 個所（うち 1 個所がアミノ酸置換を伴う非同義置換）、intron に 2 個所の単一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP) と、3'非翻訳領域に GT 反復配列多型が 1 個所検出された。

これらすべてについて関連分析を施行したところ、翻訳領域の同義置換をコードする c.705G>T、イントロン内の SNP である IVS14+30C>T の陽性率が、SLE において有意に低下していた。

一方、3'非翻訳領域(untranslated region, UTR)の反復配列については、(GT)₁₅₋₁₈ アリルの陽性率が SLE において有意に増加していた（表 1）。

また、これら 3 個所の多型部位の間には、相互に連鎖不平衡が認められた。

FCGR2B

cDNA を用いた nested PCR により、FCGR2B 膜貫通領域にアミノ酸置換を伴う多型 (I232T) が検出された。SLE、対照群における遺伝子型の比較により、SLE 群における 232T/T の有意な増加が検出された（表 2）。同じセットの検体間で FCGR2B と 3B の関連の比較したところ、この検体数では FCGR3B の関連

は有意差に到達せず、2B のほうが関連が強いことが明らかになった。また、日本人集団において FCGR2B と 3B は連鎖不平衡にあり、過去に観察された 3B の有意な関連は、2B との連鎖不平衡による二次的な関連の可能性が高いことを示唆する結果を得た。

BCMA

BCMA の変異スクリーニングの結果、promoter 領域に 4 個所、5'UTR に 2 個所、翻訳領域に 3 個所（うちひとつが非同義置換）、3'UTR に 3 個所の系 1 2 個所の多型部位が新たに見出された。うち 8 個所が頻度の高い SNP であり、これらの組み合わせによる 4 種のアリルによって、ほとんど全ての日本人の遺伝子型が説明されることが見出された。SLE の発症との関連は検出されなかった。

NKG2A

NKG2A の変異スクリーニングの結果、promoter 領域に 1 個所、翻訳領域に 1 個所（非同義置換）、intron に 3 個所、3'UTR に 3 個所の多型部位を見出した。SLE 発症との関連は検出されなかった。

D. 考察

CD19 は B 細胞に発現し、B 細胞受容体からのシグナルを顕著に増幅する分子である。今回検出された多型のうち、互いに連鎖不平衡にある 3 部位と SLE と

の関連が見出されたが、翻訳領域の同義置換、イントロン内の SNP が CD19 に機能的な変化を来すことは考えにくく、3'UTR の反復配列の延長が、おそらく mRNA 安定性の変化を介して CD19 発現レベルを制御し、SLE と関連する可能性が推測された。末梢成熟 B 細胞における CD19 発現量の増加があれば、弱い親和性の自己抗原に結合する B 細胞

一方、FcγRIIB は B 細胞や単球に発現する抑制性受容体であり、欠損マウスにおける自己免疫との関連、染色体上近傍に位置するヒト Fcγ受容体と SLE との関連から、SLE との関連が注目されつつも、他の Fcγ受容体との顕著な相同性から、多型解析が困難であった遺伝子である。今回、われわれは、cDNA を用いた nested PCR により、FCGR2B 多型を見出し、SLE との関連を検出した。この多型部位は、膜貫通領域のアミノ酸置換を伴う多型であるが、膜貫通領域は B 細胞の apoptosis シグナルの伝達に重要とする報告があり、このシグナル伝達に何らかの変化が生じて自己反応性 B 細胞の残存がもたらされる可能性が考えられる。また、マウスでは FCGR2B promoter 領域の多型と自己免疫との関連が報告されており、ヒトにおいても、promoter 領域の多型の検討が今後必要である。

BCMA は、最近マウスの SLE おける重要な関与が明らかになった BlyS (BAFF, TNFSF13B)の受容体のひとつで

受容体を持った B 細胞の活性化閾値の低下がもたらされる可能性があり、一方、骨髄における未熟 B 細胞における CD19 発現レベルの低下があれば、骨髄における自己反応性 B 細胞の除去が不完全となり、末梢における自己反応性 B 細胞の残存がもたらされる可能性がある。現在、GT repeat 多型と CD19 発現量の関連を解析中である。

ある。今回、多数の多型部位が新たに見出されたが、SLE との関連は検出されず、本遺伝子が SLE の疾患感受性遺伝子である可能性は低いと考えられた。今後、リガンドである BlyS と、そのもう一つの受容体である TACI の変異解析を施行する予定である。

NKG2A は、SLE や RA の感受性候補領域のひとつである 12p13 に位置する NK 受容体遺伝子のひとつであり、従来多型性に乏しいことが示唆されていた。今回、比較的多数の新たな多型が検出されたが、SLE との関連は認められなかった。今後、同領域に存在する NKG2C, CD94 などの解析を加える予定である。

E. 結論

SLE の疾患感受性候補遺伝子として、今年度は FCGR2B, CD19, BCMA, NKG2A の解析を行い、FCGR2B, CD19 に新たな SLE との関連を見出した。

F. 健康危険情報

多数の遺伝子と後天的要因との相互作用によって発症する多因子疾患である SLE において、本研究で見出された遺伝子多型と SLE との関連は、現時点ではただちに発症高危険群の特定に結びつくものではない。究極的に、あらゆる感受性遺伝子が同定され、それぞれの遺伝子の寄与率が明らかにされれば、個々の遺伝子型によりどの程度発症リスクが上昇するかを評価し得るようになる可能性があるが、そのような際には、十分な倫理的配慮のもとに遺伝子研究・診療をすすめる必要がある。現時点では、かかる難病における疾患感受性遺伝子研究は、疾患の病因・病態の理解と、創薬上のターゲットの設定上の有用性を評価すべきと思われる。

(謝辞 本研究は、東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室の大学院生、研究員、および、順天堂大学医学部膠原病内科をはじめとする共同研究施設の共同によってなされたものである。)

G. 研究発表

1. 論文発表

Shibue T, Tsuchiya N, Komata T, Matsushita M, Shiota M, Ohashi J, Wakui M, Matsuta K, Tokunaga K: Tumor necrosis factor _ 5'-flanking region, TNF receptor II and HLA-DRB1 polymorphisms in the Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000, 43: 753-757.
Kato H, Tsuchiya N, Tokunaga K: Single

nucleotide polymorphisms in the coding regions of human CXC-chemokine receptors *CXCR1*, *CXCR2*, and *CXCR3*. *Genes Immun.* 2000, 1: 330-337.

Kawasaki A, Tsuchiya N, Hagiwara K, Takazoe M, Tokunaga K. Independent contribution of *HLA-DRB1* and TNF_promoter polymorphisms to the susceptibility to Crohn's disease. *Genes Immun.* 2000, 1: 351-357.

Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K: New polymorphisms of human *CD80* and *CD86*. Lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2000, 1: 428-434.

Tsuchiya N, Komata T, Matsushita M, Ohashi J, Tokunaga K: New single nucleotide polymorphisms in the coding region of human *TNFR2*. *Genes Immun.* 2000, 1: 501-503.

Hikami K, Tsuchiya N, Tokunaga K: New variations in human *OX40 ligand (CD134L)* gene. *Genes Immun.* 2000, 1: 521-522.

Lin M, Chu CC, Lee HL, Chang SL, Ohashi J, Tokunaga K, Akaza T, Juji T: Heterogeneity of Taiwan's indigenous population: possible relation to prehistoric Mongoloid dispersals. *Tissue Antigens* 2000; 55 : 1-9.

Uchigata Y, Hirata Y, Omori Y, Iwamoto Y, Tokunaga K: Worldwide differences in the incidence of insulin autoimmune syndrome (Hirata disease) with respect to the evolution of HLA-DR4 alleles. *Hum. Immunol.* 2000; 61: 154-157.

Bannai M, Ohashi J, Harihara S, Takahashi Y, Juji T, Omoto K, Tokunaga K: Analysis of HLA genes and haplotypes in Ainu (from Hokkaido, northern Japan) supports the premise that they descent from Upper Paleolithic populations of East Asia. *Tissue Antigens* 2000; 55:128-139.

- Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park MH, Inoko H, Tokunaga K, Kudoh S: Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66: 501-507.
- Ohashi J, Yoshida M, Ohtsuka R, Nakazawa M, Juji T, Tokunaga K: Analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Gidra living in South New Guinea. *Hum. Biol.* 2000; 72 : 337-347.
- Yanagisawa H, Bundo M, Miyashita T, Okamura-Oho Y, Tadokoro K, Tokunaga K, Yamada M: Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 1433-1442.
- Ohashi J, Tokunaga K: Sojourn times and substitution rate at overdominant and linked neutral loci. *Genetics.* 2000; 155: 921-927.
- Narita K, Sasaki T, Akaho R, Okazaki Y, Kusumi I, Kato T, Hashimoto O, Fukuda R, Koyama T, Matsuo K, Okabe Y, Nanko S, Hohjoh H, Tokunaga K: HLA-DR1 and season of birth in Japanese patients with schizophrenia. *Am. J Psychiatry* 2000; 157: 1173-1175.
- Ihara Y, Aoki K, Tokunaga K, Takahashi K, Juji T: HLA and human mate choice: tests on Japanese couples. *Anthrop. Sci.* 2000; 108: 199-214.
- Shishikura K, Hohjoh H, Takahashi Y, Honda Y, Tokunaga K: Novel allele containing a 190C>T nonsynonymous substitution in the N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Human Mutat.* 2000; 15: 581.
- Umino Y, Hohjoh H, Tokunaga K: Novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) at positions 497 (T/G) and 829 (T/C) in the human c-FOS gene and haplotype association. *Human Mutat.* 2000; 16: 279.
- Wu M-S, Tani K, Sugiyama H, Hibino H, Izawa K, Tanabe T, Nakazaki Y, Hohjoh H, Iseki T, Tojo A, Nakamura Y, Tanioka Y, Tokunaga K, Asano S: MHC (Major Histocompatibility Complex)-DRB genes and polymorphisms in common marmoset. *J. Mol. Evol.* 2000; 51: 214-222.
- Tarassenko O, Ohashi J, Kitaev M, Alisherov A, Tyurebaeva B, Kutukeev T, Tokunaga K: Polymorphisms of HLA-A and -B genes in the Kyrgyz population. *Anthrop. Sci.* 2000; 108: 293-303.
- Miyagawa T, Hohjoh H, Honda Y, Juji T, Tokunaga K: Identification of a telomeric boundary of HLA region having potential for the predisposition to human narcolepsy. *Immunogenetics* 2000; 52:12-18.
- Akaho R, Matsushita I, Narita K, Okazaki Y, Matsushita M, Hohjoh H, Tokunaga K, Sasaki T: Support for an association between HLA-DR1 and schizophrenia in the Japanese population. *Am. J. Med. Genet.* 2000; 96: 725-727.
- Kasai F, Takahashi E, Koyama K, Terao K, Suto Y, Tokunaga K, Nakamura Y, Hirai M: Comparative FISH mapping of the ancestral fusion point of human chromosome 2. *Chromosome Res.* 2000; 8: 727-735.
- Ohashi J, Yamamoto S, Tsuchiya N, Hatta Y, Komata T, Matsushita M, Tokunaga K: Comparison of statistical power between 2 x 2 allele frequency and allele positivity tables in case-control studies of complex disease genes. *Ann Hum Genet* (in press).
- Wakui M, Yamaguchi A, Sakurai D, Ogasawara K, Yokochi T, Tsuchiya N, Ikeda Y, Tokunaga K: Upregulated genes in the early phase of murine graft-versus-host reaction. *Biophys Biochem Res Commun* (in press)
2. 学会発表
Tokunaga K, Kuroki K, Tsuchiya N,

Yamaguchi A, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hashimoto H: Significant association between CD19 polymorphism and systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2000, 67(Suppl.2): 353.

Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Association of CD19 polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE). *Hum Immunol* 2000, 61(Suppl.2): S70.

Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Yamamoto K, Tokunaga K: Expression of Id family genes in the synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2000, 61(Suppl.2): S71.

Kawasaki A, Tsuchiya N, Hagiwara K, Takazoe M, Tokunaga K: Independent contribution of HLA-DRB1 and TNFA promoter polymorphisms to the susceptibility to Crohn's disease in Japanese. *Hum Immunol* 2000, 61(Suppl.2): S71.

Kuroki K, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Association of CD19 polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000, 43(Suppl.): S55.

Yamaguchi A, Sakurai D, Tsuchiya N, Yamamoto K, Tokunaga K: Expression of ID family genes in the synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43(Suppl.): S59.

Ichikawa N, Kotake S, Hakoda M, Higami K, Kawasaki A, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani N: Association of tumor necrosis factor _ 5'-flanking region polymorphism with Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43(Suppl.): S71.

Yamaguchi A, Sakurai D, Tsuchiya N, Yamamoto K, Tokunaga K: Expression of ID family genes in the synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis*

Rheum 2000, 43(Suppl.): S159.

Kuroki K, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Association of CD19 polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000, 43(Suppl.): S325.

Tsuchiya N, Tokunaga K: A search for the susceptibility genes to rheumatic diseases through the candidate gene approach. The 13th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [II]. November 8-11, 2000, Shonan Village Center, p38-39.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

SLE における病像・病態の規定因子に関する研究（第二報）：サイトカインの
関与について

橋本 博史（順天堂大学 膠原病内科）

研究要旨

急性期 SLE 患者 CD4 陽性 T 細胞 Th1/Th2 を IL-13 を用いた細胞内染色で検討した。その結果、IL-4 を用いた時と同様、Th1 優位であった。この比率は症例によりばらつきはあったが、病気が軽快した状態でも Th1 優位を示した。また、IL-12 とともに Th1 誘導因子である IL-18 を急性期 SLE 患者で測定すると、有意に高値を示し、Th1・Th2 両方のサイトカインに関連していた。一方、局所におけるサイトカインの病態との関与を検討するために、CNS ループスの髄液中の IFN α とモノアミンとの関連を検討した。その結果、脳器質症候群を呈する症例で IFN α とモノアミンの変動を認め、両者の病態への関与が示唆された。

A. 研究目的

SLE の多彩な病像を規定する因子としては、これまで指摘された特定の自己抗体の他、我々は HLA、IgG サブクラス、可溶性活性化マーカー等との関連も報告してきた。昨年までの研究ではこの病像が長期予後に関係することを明らかにしながら、初期治療における病像の把握の重要性を強調すると同時に、前述の IgG サブクラス・活性化マーカーとも密接に関与する Th1・Th2 関連サイトカインが病像と関連することを報告した。具体的には、前者に関しては初回診断時に WHO III 型腎症・ネフローゼ・Organic brainsyndrome (OBS)・間質性肺炎・リン脂質抗体症候群 (APS) が主病変の症例は予後不良であることを示した。

後者に関しては血清中のサイトカインは IL-6・IL-13 を中心とする Th2 関連サイトカインが高値を示した症例は腎病変が

多いのに対して、Th1 関連サイトカインも増加している症例は非腎症特に肺病変が多く、IL-12 も高値であることを示すと同時に、細胞内染色での検討では Th1 細胞の比率は非腎症の症例が多く、胸水中に Th1 細胞の浸潤を認めることも示した。しかしながら、以下の問題が課題として残された。

#1 前述の Th1/Th2 バランスの結果が血清と細胞内染色で差違が見られた。

#2 Th1/Th2 の調節因子として、前述の IL-12 以外に因子がないか？

#3 サイトカインを含めたこれらの病像の規定因子が実際に病態局所でどのように関わっているか？

今回はこの #1-3 の問題を検討する目的で以下の研究を行った。

#1 に対して→これまで細胞内染色に Th2 サイトカインとして用いられた IL-4 を IL-13 に変更して検討しながら、治療による

変動についても検討した。

#2 に対して→ IL-12 と共に、Th1 細胞の誘導因子として知られる IL-18 を測定した。
#3 に対して→各種病像の中でも特に重篤な CNS ループスの局所の病態を検討する目的で、髄液中のモノアミンを測定し、サイトカイン特に IFN α との関与も検討した。

B. 研究方法

1. Th1/Th2 サイトカインの細胞内染色

末梢血リンパ球を PMA・イオノマイシンで4時間刺激の後、IL-4・IL-13 及び IFN γ に対するモノクローナル抗体で細胞内染色を行い、FACS で解析した。

2. 血中 IL-18、IL-12、IL-13、IFN γ の測定

SLE 患者の血清を採取し、それぞれのサイトカインに対するモノクローナル抗体をいた Sandwich ELISA 法で測定した。

3. CNS ループス患者における髄液中モノアミン及び IFN α の測定

CNS ループス患者の急性期の髄液を採取し、主に HPL-C を用いてモノアミン (HVA: カテコールアミン代謝産物, 5-HIAA: トリプトファン代謝産物, MHPG: ノルアドレナリン代謝産物) を測定し、IFN α は高感度 ELISA 法で測定した。正常人の髄液は腰椎麻酔を行う症例から採取された。なお、患者・正常人ともインフォームドコンセントを取ってからこの研究が行なわれた。

C. 研究結果

1. IL-13 を用いた Th1/Th2 バランスの検討

IL-4 の代わりに IL-13 を Th2 サイトカインとして用いて、急性期 SLE 患者 CD4 陽性細胞の細胞内染色での IFN γ との比率で Th1/Th2 を求めた。その結果、表 1 に示すように、Th1/Th2 は IL-4 を用いた

時よりは低値を示したが、Th1 が優位であることには代わりがなかった。

一方、治療前後で比較してみると、症例によりばらつきが見られたが、概して IFN γ /IL-4 及び IFN γ /IL-13 が低値の症例は増加、高値の症例は減少傾向を示し、Th1 優位の状態で病気が収束する傾向が見られた。

(1) IL-18 の測定

急性期 SLE 患者の血清を用いて、IL-18 を測定してみると、図 1 に示すように、正常人に比し優位に高値を示した。このうち、約 70% の症例は正常人の平均値 + 2 標準偏差以上の数値を示した。SLEDAI、補体価、抗 DNA 抗体価との相関は認められなかったが、治療前後の検討では図 2 に示すように低下傾向を示し、また発病前の血清の検討では図 3 に示すように、IL-18 の増加とともに再燃する傾向を示し、IL-18 が急性期に増加することが裏付けられた。また、病型との関連も検討したが、特定の病型との関連は認めなかった。さらに、他のサイトカインとの関連を検討してみると、患者平均値より高い群を高値群として比較検討した時に、高値群では IL-12 が低値群に比し有意に高値を示した。しかしながら、IFN γ 、IL-13 との関連はなかった。

一方、発病前の血清でこの関係を検討してみると、IL-18 が IL-12 とのみ連動する症例 (図 4)、IL-13 とのみ連動する症例 (図 5)、両方と連動する症例 (図 6) と様々であった。

3. 髄液中モノアミン・IFN α

髄液モノアミンを測定してみると、表 2 に示すように、脳器質症候群 (OBS) では HVA、5-HIAA、MHPG とも正常人に比し、高値を示し、MHPG に関しては鬱病及び IFN α 投与後の鬱病と同様の結果を示した。また、OBS では髄液中の IFN α も高値を示した。

一方、Psychosis では HVA が、IFN α 投与症例と同様に低値を示したが、IFN α は増加していなかった。

D. 考案

今回の結果は前述のような前回の報告で浮彫りにされた問題点を中心に更なる検討を加えた。まず、T 細胞の Th1/Th2 バランスに関しては、前回の報告では IL-4 を Th2 サイトカインとして用いて検討した結果、CD4 陽性細胞に関しては、Th1 優位との結論を得たが、IL-13、IL-6 を始めとする Th2 サイトカインが優位との血清の結果とは異なっていた。ここで、問題になったのは血清中の IL-4 が高値でなかったことから、血中で比較的高値を示す IL-13 を用いると結果が変わってくる可能性が考えられた。しかしながら、結果的にはその結果、Th1 優位は変らなかった。このことは Th2 サイトカイン、特に IL-13 の産生が T 細胞以外で産生されていることを示唆し、今後、さらにこの点を明らかにする予定である。また、この Th1/Th2 バランスの治療により変動についても検討したが、確かに治療により変動することが判明した。ただし、症例によりばらつきがあり、この変動の変化は評価が難しかった。ただ、全体的には Th1/Th2 高値例は減少、Th1/Th2 低値例は増加し、病態の是正とともに Th1 優位で収束する傾向が見られ、これは治療効果の指標となりうる可能性が出てきた。

一方、最近我々は SLE 様の病態を起す、Chronic GVH マウスでキラー活性の乏しい CD8 陽性が出現して、主に CD8 陽性細胞で機能する分子である CD137 に対する抗体で処理して、細胞数を減少させることにより病気が悪化することを見出した。この結果は SLE の CD8 陽性細胞の中に病気を沈静化させる調節機能を持った群が存在す

る可能性を示唆しているが、今回 Th1 優位で病気が収束するという結果は Th1 が CD8 陽性細胞を誘導する機能を持っていることより、関連がある可能性はあり、今後はこの観点から検討を進めていきたい。

一方、昨年報告で Th1/Th2 バランスにおける IL-12 の重要性を示したが、今回はさらに IL-12 とともに Th1 サイトカインの誘導因子として知られる IL-18 を測定した。その結果、IL-18 は急性期 SLE 患者で高値を示し、一部の症例では IL-12 も高値を示した。このことは、IL-18 が IL-12 と連動して Th1 サイトカインの誘導に関与し、前述の T 細胞レベルでの Th1 優位に関与している可能性が示唆された。しかしながら、Th1 サイトカインが高値でなく、Th2 サイトカインだけが高値の症例でも高値を示し、一部の症例では IL-18 が IL-13 と連動することから、IL-18 が Th2 サイトカインの動態にも関与する可能性も示唆された。このように、IL-18 は SLE の多数の症例で増加して、Th1/Th2 に幅広く関わる可能性があり、病像の規定因子というよりは病態形成に重要なキーサイトカインと考えられ、このサイトカインの制御が治療に応用できる可能性が出てきた。

さらに、今回の研究では、これまで挙げてきた病像規定因子、特にサイトカインが局所でどのように関わるかを検討することにし、IFN α 投与で鬱病になる症例で髄液のモノアミンが変動する報告があることに着目して CNS ループス患者の IFN α とモノアミンとの関連を検討をした。その結果、CNS ループスの中でも最も重篤な病態である OBS において、IFN α の増加とともに HVA, 5-HIAA, MHPG の増加を認め、この結果は MHPG に関しては IFN α を使用した鬱病の症例に似ていた。

一方、鬱状態を呈しやすい、Psychosis

タイプでは HVA に関して IFN α を投与した患者の結果に似ていたが、IFN α の増加を示した。これらの結果から、CNS ループスにおけるモノアミンの変動は鬱病や IFN α 投与後の鬱病とは別の変動をとるものの、サイトカイン特に IFN α の変動が局所でモノアミンを誘導し、病態を形成する可能性が示唆された。この結果は比較的重篤度の高い CNS ループスの病態解明の手がかりになると思われると、同時にモノアミンが CNS ループスの診断へ応用される可能性も示唆された。

E. 結論

1. 急性期 SLE 患者の CD4 陽性細胞は Th1 優位で、回復期も変動はあるが同様の結果で収束していた。
2. 急性期 SLE 患者では IL-18 が高値で Th1/Th2 両方に関与していた。
3. OBS では髄液中の IFN α の増加とともに、モノアミンの変動が病態に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morimoto S, Hashimoto H, Yamanaka K, et al. : Multicenter cooperative study of HLA class II alleles in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Mod Rheumatol 10 : 235 - 239, 2000.
- 2) Morimoto S, Tokano Y, Kaneko H, et al. : The increased interleukin-13 in patients with systemic lupus erythematosus : relations to other Th1 - /Th2 - related cytokines and clinical findings. Autoimmunity in press, 2001.

2. 学会発表

- 1) 杉本和則、金子博行、野澤和久他 :

細胞内サイトカインの測定による膠原病における Th1/Th2 バランスの解析. リウマチ 39 : 280 (第 43 回日本リウマチ学会総会、札幌) 1999.

- 2) 山田雅人、高梨剛、平島美賀他 : 全身性エリテマトーデス患者における Th1/Th2 バランスの検討. リウマチ 39 : 451 (第 43 回日本リウマチ学会総会、札幌) 1999.
- 3) 満尾晶子、戸叶嘉明、小林茂人他 : 精神症状または神経症状を呈した SLE 患者における、髄液、脳波、画像検査に関する考察. リウマチ 40 : 511 (第 44 回日本リウマチ学会総会、横浜) 2000.
- 4) 戸叶嘉明、鈴木淳、天野浩文他 : SLE における IL-18 の検討. 日本臨床免疫学会誌 23 : 320 (日本臨床免疫学会総会 東京), 2000.

ループス腎炎における尿中 wt1 mRNA 検出の意義

三村俊英（東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科）

研究要旨

全身性エリテマトーデス（SLE）における腎障害（ループス腎炎）の発症機序の解明と糸球体障害の程度および予後の推測のため、患者尿沈渣から得られた RNA から RT-PCR 法を用いて、進行性腎障害との関連の可能性がある wt1 遺伝子の解析を行った。その結果、尿中に wt1 を検出と尿蛋白の程度に関連が認められることが示された。

A.研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）は、全身の諸臓器が傷害される自己免疫疾患の典型である。SLE においては特に、腎臓が傷害されることが多く、糸球体腎炎の形態（ループス腎炎；LN）をとり、現在の適切な治療にも関わらず長期的には腎不全状態となる事が知られている。実際に、本邦において毎年新規透析導入されている3万人の1%強は、原疾患がループス腎炎であり、同じく本邦の慢性維持透析患者20万人の1.1%が原疾患をループス腎炎とすることが知られており、4~5万人と考えられるSLE患者の5%以上に相当することから、SLEにおけるQOLを考える上で重要な合併症である。LNの発症機序には抗DNA抗体や抗nucleosome抗体の関与はあるとされてい

るが、異なる患者間で同様な抗体を血清中に認めてもループス腎炎発症の有無および重症度は同様ではなく、発症・進展機序には未だに不明な点が多い。成人の尿路系においては糸球体上皮細胞のみに発現するWilms' tumor抑制蛋白（WT1）をコードする遺伝子（wt1）の変異およびisoformの不均衡は、早期腎不全を来すことが知られている。我々は、wt1のmRNAを尿沈渣中からnested RT-PCR法にて再現性良く検出するシステムを確立し、糖尿病性腎症、腎障害のない糖尿病および慢性糸球体腎炎を含む337例の患者と健常者対照群において、その尿中への発現およびisoformの発現パターンを検討した。その結果、糖尿病性腎症および慢性糸球体腎炎患者の30%弱、蛋白尿のない糖尿病患者の5%、健常者の0%に尿

中 wt1 を検出した (図 1)。尿中 wt1 陽性腎障害患者においては蛋白尿の程度が優位に高く、糖尿病性腎症患者においては、尿中 wt1 陽性患者の血清クレアチニン (Cr) 値が優位に高値を示した。さらに、38 例の尿中 wt1 陽性患者の中で、alternative splicing を来す exon5 の発現を特異的 primer を用いて検討した結果、9 例で exon 5 を含まない isoform のみを発現していた。これら 9 例の腎障害患者は、exon 5 を含む isoform を尿中に発現する患者に比して血清 Cr が優位に低値であった。これらのことは、尿中における wt1 検出が進行性腎障害を示すマーカーになりうること、および wt1 の isoform 異常が糸球体における細胞機能異常に関与する可能性を示しており、腎臓側の細胞機能異常が腎障害発症の感受性に影響する可能性を示唆している。そこで、LN においても、同様の機序により wt1 の異常が腎障害感受性に関与する可能性があると考え、LN における尿中 wt1 の発現を検討し、臨床像、組織型との関係などを解析することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

改訂 ACR による SLE の分類基準を満たし、informed consent により同意の得られた 42 人の SLE 患者の新鮮随時尿を用いた。これらのうち、14 例が腎生検その他により LN と診断されている。前述したように wt1 は、患者尿沈渣から acid

guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 法にて RNA を採集し、cDNA に置き換えて wt1 特異的プライマーを用いて増幅すること (nested RT-PCR 法) でアガロースゲル上にて検出した。

C. 研究結果

蛋白尿を有さない 28 例と 21 例の健康者には尿中 wt1 は検出されなかった。一方、14 例の LN のうち、3 例 (21.4%) に尿中 wt1 mRNA を検出した (図 2)。組織型は、WHO の class 分類の III、IV+V、V 型がそれぞれ 1 例ずつであった。尿中 wt1 検出の有無で血清 Cr 値には有意差はなかったが、蛋白尿の程度は wt1 陽性例で有意に高度であった (表)。exon 5 の有無による isoform の発現は、1 例において exon 5 を含まない isoform のみを認めたが、臨床的な相違は明らかではなかった。

D. 考察

尿中 wt1 の検出は、重症 LN に認められた。isoform の解析に関しては、例数が少なく十分な臨床意義の検討は出来なかった。今後さらに症例数を増やして検討する必要があるが、LN においても、尿中 wt1 の解析が腎臓の状態を把握する上で安全でかつ有効な検査法となり、経時的・即時的に腎に関する状態や進行性腎機能低下の危険が高いかどうかの予後判定を行うことが可能となり、進行性腎障害の