

## 12. ELISA 及び PCR 法を用いた MCTD における *Chlamydia pneumoniae* 感染の比較検討

分担研究者 : 北里 英郎<sup>1</sup>  
研究協力者 : 岡田 純<sup>2</sup>、近藤 啓文<sup>2</sup>  
所属施設 : <sup>1</sup>北里大学医学部微生物  
<sup>2</sup>北里大学医学部内科

### 研究要旨

混合性結合組織病 (MCTD) は、肺高血圧症を特徴的病変とする疾患であり、近年、虚血性疾患、脳卒中、高血圧症との関連が注目されている、*Chlamydia pneumoniae* 感染との関連を明らかにすることは、きわめて重要と考えられる。

そこで昨年度報告した ELISA 法による *Chlamydia pneumoniae* 抗体価の測定に加え、PCR 法による核酸の検出を試みた。

### A. 研究目的

MCTD における肺高血圧症合併は、重篤な状態をもたらすため、*Chlamydia pneumoniae* 感染との関連が明らかにされることは、合併する機序を解明するためにも重要であると考えられる。そこで、近年、報告された末梢血単核球より PCR 法にて *Chlamydia pneumoniae* 遺伝子を増幅させる方法と ELISA 法を併用し *Chlamydia pneumoniae* 感染と MCTD の関連性を検討した。

### B. 研究方法

北里大学医学部膠原病内科外来に通院する MCTD 患者 7 例、他の膠原病患者 3 例から同意書を得た上で、血液を得た。血清は、日立化成のヒタザイム C、ニューモニエを用いて抗 *Chlamydia pneumoniae* IgG および IgA 抗体を測定した。血液は、リンフォブレップ (ニコムド) を用いて末梢血単核球を調整し、DNAeasy および RNAeasy (キアゲン) を用いて DNA もしくは RNA を抽出した。抽出した RNA に関しては、Omniscript (キアゲン) を用いて cDNA を

合成した上で RT-PCR 法にて *Chlamydia pneumoniae* 転写物の増幅を試みた。又、DNA に関しては PCR 法にて遺伝子の増幅を試みた。RT-PCR および PCR に使用した primer は、immunodominant antigen (53-kDa) を標的とする CP53-1/CP53-2 (1) および major outer membrane protein gene (ompA) を標的とする CP1/CP2 (2,3) である。CP53-1/CP53-2 にて増幅された PCR 産物に関しては、DIG (Roche) により 3' 末端標識された oligo probe を用いた PCR Southern Hybridization を行った。CP1/CP2 PCR に関しては、Touch Down PCR を行った後に、反応液の 2/50 量を用いて CPC/CPD primer (2,3) を用いた Nested PCR を行った。Control primer として、GAPDH primer (4) を用い、抽出された核酸を確認した。又、MCTD 患者一例より得られた肺動脈剖検検体については、ドライアイス/エタノールを用いて凍結したまま粉末化し、フェノール/Proteinase K 法を用いて高分子 DNA を抽出後、*Chlamydia pneumoniae* 遺伝子の増幅を試みた。

## C. 研究結果

### 1. 肺動脈剖検検体に関する臨床・病理・血清学的・分子生物学的診断

剖検例：69歳女性（平成12年7月15日死亡）

臨床診断：MCTD、シェーグレン症候群、肺高血圧症、血小板減少症

病理診断：

a)肺

肺内肺動脈の高度拡張

b)その他

食道の著名な拡張、多発筋炎、血小板減少症紫斑病、大量の消化管出血

血清学的診断：

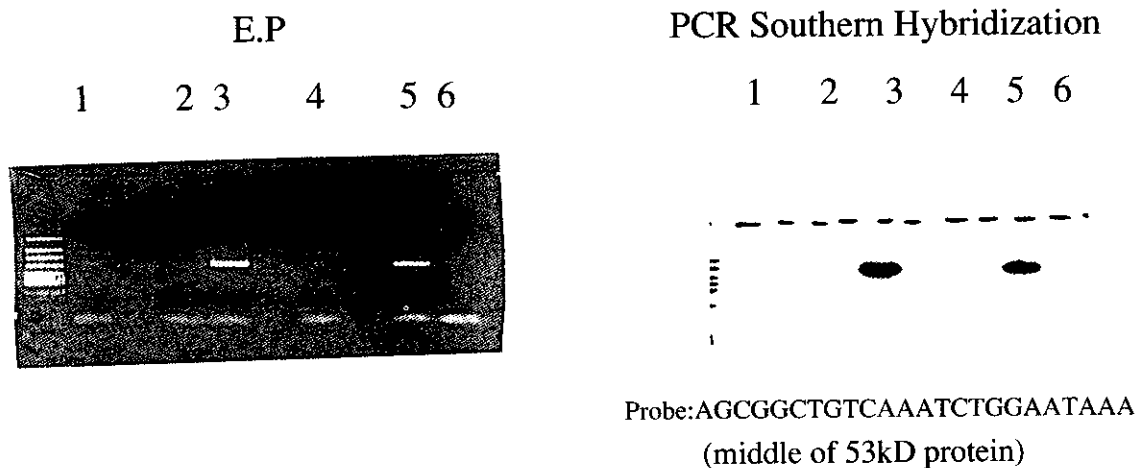
Table1.

No.	Sampling	IgG index	IgA index	Diagnosis
171-C-7	1984.2.21	0.38	2.16	MCTD
202-F-1	1985.6.18	0.50	2.60	MCTD
424-D-5	1998.11.11	0.02	0.11	MCTD

上記に示すよう、抗 *Chlamydia pneumoniae* 抗体とくに IgG の値は低かった。

分子生物学的診断：

#### 1. CP53 DNA PCR (Fig.1)



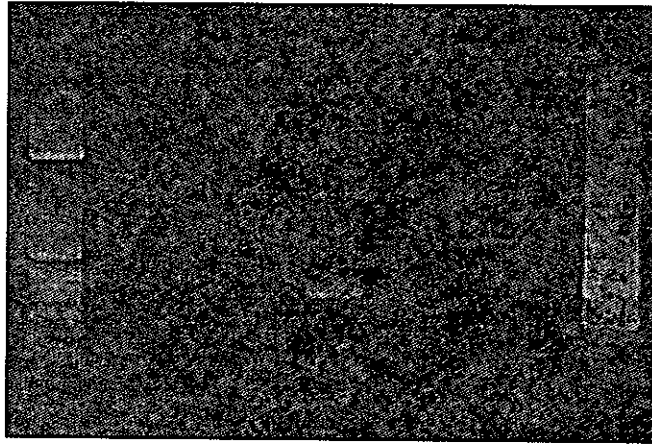
1:剖検検体 100ng      4:剖検検体 200ng

2:陰性コントロール      5:陰性コントロール

3:陽性コントロール      6:陽性コントロール

## 2.Touch Down PCR (Fig.2)

Touch Down PCR      Nested PCR  
 1    2    3                    4    5    6



1,4:剖検検体、2,5:陰性コントロール、3,6:陽性コントロール

## 2. 他の血液検体における血清学的診断及び分子生物学的診断

血清学的診断：

Table2.

No	Sampling	IgG index	IgA index	Diagnosis
1	9.21.2000	0.05	0.09	MCTD
2	12.7.2000	0.89	1.53	SLE+PH
3	12.7.2000	1.25	2.45	PH, PE, SLE/APS
4-1	3.28.2000	2.31	6.20	MCTD+lupus
4-2	12.5.2000	1.56	4.85	
5	5.16.2000	2.06	2.17	MCTD
6	5.16.2000	0.81	4.33	MCTD
7	6.30.2000	1.17	5.50	MCTD
8	6.19.2000	2.35	1.87	PSS
9	9.18.2000	3.75	3.29	MCTD

分子生物学的診断：

Table3.

No	CP53 DNA PCR	Touch Down DNA PCR	CP53 RT-PCR	PCR Southern	Touch Down RT-PCR	GAPDH PCR
1			+/-	-	-	+
2			+/-	-	-	+
3			+/-	-	-	+
4-1	-	-		-		+
4-2			+/-	-	-	+
5	-	-				+
6	-	-				+
7			+/-	-		+
8			+/-	-		+
9			+/-	-	-	+

結果：Fig1,2. に示すよう剖検検体 DNA からは、CP53 PCR, PCR Southern hybridization, Touch Down-Nested PCR においても *Chlamydia pneumoniae* DNA は増幅されなかった。

結果：Table 3 に示したよう、samples 4,5,8,9 に関しては比較的高い抗IgG抗体価を示したが、Table 4 に示したよう、GAPDH PCR 陽性にもかかわらず、CP53 PCR, PCR Southern hybridization, Touch Down-Nested PCR いずれも陰性であった。

#### D. 考察

剖検検体は、臨床診断において肺高血圧症を伴う

MCTD と診断され、病理診断からも、肺動脈の拡張などがみられ *Chlamydia pneumoniae* の検出が予測されたが、*Chlamydia pneumoniae* DNA は見出されなかった。このことは、血清学的診断における抗 *Chlamydia pneumoniae* 抗体の IgG, IgA 価が低いことから *Chlamydia pneumoniae* 感染がなかったと推測された。文献 2 においては、Table 4 に示すよう腹腔大動脈瘤組織を用いた *Chlamydia pneumoniae* Touch Down-Nested PCR により 41 例中 17 例において陽性であり、その内 16 例に関しては末梢単核球からの PCR においても陽性であった。

今後、MCTD 班員からの協力を得て、ELISA 法にて抗 *Chlamydia pneumoniae* 抗体価の高いものについて、分子生物学検討および他の方法による *Chlamydia pneumoniae* 感染の検討を行いたい。

Table4. (文献 2 より引用)

Serology results	PBMC PCR	Artery PCR	No. of patients
Positive	Positive	Positive	16
Positive	Positive	Negative	3
Negative	Negative	Positive	1
Positive	Negative	Negative	7
Negative	Negative	Negative	14
			41

## 文 献

1. Y. Kubota. A new primer pair for detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *Micriobiol. Immunol.*, 40 (1), 27-32, 1996.
2. F Blasi, J, Boman, G. Esposito, et al. *Chlamydia pneumoniae* DNA detection in peripheral blood mononuclear cells is predicitive of vascular infection. *J. Infec Dis.*, 180, 2074-6, 1999.
3. CYW Tong, M Sillis. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittachi* in sputum samples by PCR. *J Clin Pathol.*, 46, 313-7, 1993.
4. J Y Tso, XH Sun, T Kao, KS Reece, R Wu. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucl Acids Res.*, 13, 2485-2502. 1985.

## DETECTION OF *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* IN MCTD PATIENTS USING PCR AND ELISA.

Hidero Kitasato<sup>1</sup>, Jun Okada<sup>2</sup>, Hirobumi Kondo<sup>2</sup>

Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine<sup>1</sup>

Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine<sup>2</sup>

*Chlamydia pneumoniae* PCR and ELISA assays were carried out for 7 and 3 samples derived from MCTD and other collagen disease patients, respectively. One sample derived from pathological anatomy was also subjected to those assays. Neither *Chlamydia pneumoniae* DNA nor RNA was observed in those samples including anatomical one. In addition, only one MCTD sample was positive for anti- *Chlamydia pneumoniae* Ig G ELISA test. We hope to get more samples showing positive for ELISA test and try to detect *Chlamydia pneumoniae* antigen by PCR.

### 13. モノクローナルマウス抗トロンボモジュリン抗体の 血管内皮細胞に及ぼす影響

分担研究者 : 吉尾 卓  
研究協力者 : 奈良 浩之, 簗田 清次  
所属施設 : 自治医科大学アレルギーリウマチ科

#### 研究要旨

抗トロンボモジュリン抗体 (anti-TM) が抗血管内皮細胞抗体 (AECA) の1つであり、膠原病に伴う肺高血圧症 (PH) の発症・進展に関与している可能性を報告している。今回、モノクローナルマウス anti-TM (MMoanti-TM) を用いてヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞 (EC) の cytokine 分泌・接着分子発現に及ぼす影響を検討した。トロンボモジュリン (TM) EGF ドメインの異なる部位を認識する3種類の MoManti-TM (21-5D2; protein-C 結合部位と thrombin 結合部位の両方から離れた部位を認識, 21-4G3; thrombin 結合部位を認識, 21-9H12; protein-C 結合部位を認識) を用いた。陽性対照として IL-1  $\beta$ , 陰性対照として mouseIgG1, mouseIgG2a を用いた。3種類の MoManti-TM はほぼ濃度依存性に mouseIgG1, mouseIgG2a に比べてより強く EC に結合した。mouseIgG1, mouseIgG2a は EC からの IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8 分泌を増強しなかったが、3種類の MoManti-TM は濃度依存性に、時間経過と共に IL-1  $\beta$  と同様に EC からの IL-6, IL-8 分泌を増強した。IL-1  $\beta$  分泌を認めなかった。mouseIgG1, mouseIgG2a は EC の接着分子 (ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1) 発現を増強しなかった。3種類の MoManti-TM は濃度依存性に、IL-1  $\beta$  と同様に4時間をピークとする ELAM-1, 8時間をピークとする VCAM-1, 時間経過と共に増加する ICAM-1 の発現を増強した。3種類の MoManti-TM の間でこれらの結果に差を認めなかった。膠原病症例血清中に存在する anti-TM が肺動脈 EC 表面上に豊富に存在する TM に結合し、IL-1 非依存性に EC からの IL-6, IL-8 分泌, EC 表面上の接着分子発現を増強することにより PH 発症・進展に関与している可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

我々は前年度膠原病症例血清中に anti-TM が存在し、AECA の1つである可能性、膠原病に伴う PH の発症・進展に関与している可能性を報告している<sup>1)</sup>。そこで、TM の EGF ドメインの異なる部位を認識する3種類の MMoanti-TM を用いて EC の cytokine 分泌・接着分子発現に及ぼす影響を検討した。

#### B. 研究方法

1. MoManti-TM : TM の EGF ドメインの異なる部位を認識する3種類の MoManti-TM (21-5D2 [サブクラ

ス IgG1] : protein C 結合部位と thrombin 結合部位の両方から離れた EGF ドメインに結合, 21-4G3 [IgG2a] : thrombin-binding site を認識, 21-9H12 [IgG1] : protein C-binding site を認識) (富士薬品工業 (株) 供与) を用いた。

2. MoManti-TM の EC への結合 : 2 継代目のヒト臍帯静脈由来 EC を 5% gelatin 前処置 96 穴平底 plate に  $10^5$  cells/well ずつ播種した。2 日後 EC が平底全体に confluent で monolayer となった段階で、培養液を除き、異なる濃度の MoManti-TM (最大 IgG 濃度 : 10  $\mu$ g/ml) を添加し、37°C 60 分間培養した。培養終了後、抗体希釈液を捨て、1% FCS・M199 で 2 回洗浄し、

1% paraformaldehyde・PBSで10分間ECを固定した。固定後PBSで2回洗浄し、well内面を3% BSA・PBSでcoatした。peroxidase 標識抗 mouseIg (1%BSA・PBSで1000倍希釈)を添加し、室温で60分間培養した。終了後1% BSA・PBSで5回洗浄し、発色反応を行い吸光度450nmでO.D.値を測定した。陰性対照として mouseIgG1, mouseIgG2aを用いた。

3.MoManti-TMのECのcytokine分泌及び接着分子発現に及ぼす影響：2継代目のヒト臍帯静脈由来ECを5%gelatin前処置96穴平底plateに $10^5$ cells/wellずつ播種した。2日後ECが平底全体にconfluentでmonolayerとなった段階で異なる濃度のMoManti-TM(最大IgG濃度:10 $\mu$ g/ml)を添加し、37 $^{\circ}$ C種々の時間培養した。培養終了後、培養上清を回収し、1%FCS・M199で2回洗浄し、1%paraformaldehyde・PBSで10分間ECを固定した。固定後PBSで2回洗浄し、well内面を3%BSA・PBSでcoatした。biotin標識モノクローナルマウス抗ELAM-1, ICAM-1或いはVCAM-1抗体(全て1%BSA・PBSで100倍希釈)を添加し、室温で60分間培養した。終了後1%BSA・PBSで5回洗浄し、peroxidase標識streptavidin(1%BSA・PBSで1000倍希釈)を添加し、室温で60分間培養した。終了後1%BSA・PBSで5回洗浄し、発色反応を行い吸光度450nmでO.D.値を測定した。回収した培養上清を-30 $^{\circ}$ Cで保存し、後日培養上清中のIL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8濃度を各々のELISA kitを用いて測定した。陽性コントロールとしてrecombinant IL-1 $\beta$  (rIL-1 $\beta$ ) (5U/ml)を、陰性コントロールとしてmouseIgG1, mouseIgG2aを用いた。

## C. 研究結果

1.MoManti-TMのECへの結合(Fig. 1.): mouseIgG1, mouseIgG2a(Fig. not shown)はIgG濃度依存性に極く軽度の増加を伴うECへの結合を認めたが、3種類のMoManti-TMはmouseIgG1, mouseIgG2aに比してより強くほぼIgG濃度依存性にECに結合した。

2.MoManti-TMのECのcytokine分泌に及ぼす影響：24時間培養にて陰性コントロールのmouseIgG1, mouseIgG2aをECに反応させても、IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8の分泌増加を認めなかったが、rIL-1 $\beta$  (5U/ml)は著明にIL-6, IL-8分泌を増強した。24時間培養にて3種類のMoManti-TMはIgG濃度依存性にIL-6,

IL-8分泌を増強したが、特にIL-1 $\beta$ を分泌しなかった。次にrIL-1 $\beta$  (5U/ml)及び各々のMoManti-TM, mouseIgG1, mouseIgG2aを10 $\mu$ g/mlの濃度でECに反応させ、時間経過にてECからのIL-6及びIL-8分泌を検討した(Fig.2., Fig.3.)。mouseIgG1, mouseIgG2a(Fig. not shown)によるIL-6, IL-8分泌は培養液のみ(1%FCS・M199 alone)とほぼ同程度であった。rIL-1 $\beta$  (5U/ml)は時間経過と共に著明にECからのIL-6, IL-8分泌を増強した。3種類のMoManti-TMも時間経過と共にECからのIL-6, IL-8分泌を増強した。3種類のMoManti-TMの間でECからのIL-6, IL-8分泌量に差を認めなかった。

3.MoManti-TMのECからのECの接着分子発現に及ぼす影響：mouseIgG1, mouseIgG2aはIgG濃度を増加させてもECのELAM-1(4時間培養), VCAM-1(8時間培養), ICAM-1(24時間培養)の発現を増強しなかったが、rIL-1 $\beta$  (5U/ml)は発現を増強した。3種類のMoManti-TMはIgG濃度依存性に発現を増強した。次にrIL-1 $\beta$  (5U/ml)及び各々のMoManti-TM, mouseIgG1, mouseIgG2aを10 $\mu$ g/mlの濃度でECに反応させ、時間経過にてECのELAM-1, VCAM-1及びICAM-1発現を検討した(Fig.4., Fig.5., Fig.6.)。mouseIgG1, mouseIgG2a(Fig. not shown)による接着分子発現は培養液のみ(1%FCS・M199 alone)とほぼ同程度でしかなかった。3種類のMoManti-TMはrIL-1 $\beta$  (5U/ml)と同様に4時間をピークとするELAM-1, 8時間をピークとするVCAM-1, 時間経過と共に増加するICAM-1の発現を増強した。3種類のMoManti-TMの間で接着分子の発現に差を認めなかった。

## D. 考察

今回の検討により、MoManti-TMはEC表面上のTMに結合することによりIL-1非依存性にECからのIL-6, IL-8分泌を増強し、またECの接着分子発現も増強した。これらの作用はMoManti-TMによるTMのEGFドメインの認識部位で差を認めなかった。anti-TMがTMに結合することにより何らかの機序でNF-kBにシグナルが入り、NF-kBが活性化されることにより、ECからのIL-6, IL-8分泌増加、ECの接着分子発現増強につながったことが推測される。今後、実際にEC内でNF-kBの活性化が出現しているか否かをNF-kB核移行等で検討する必要があると思われる。

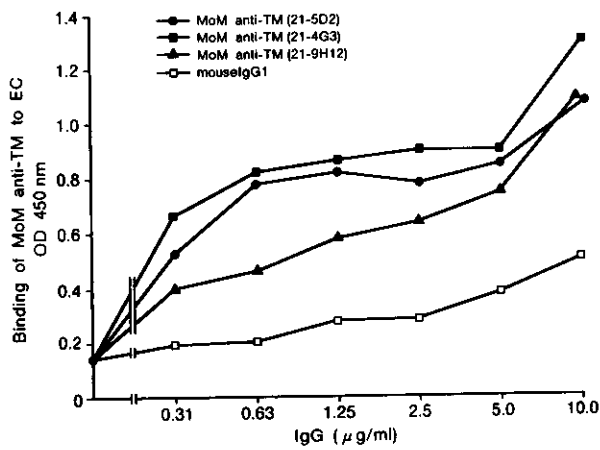


Fig. 1. MoMantiTMのECへの結合

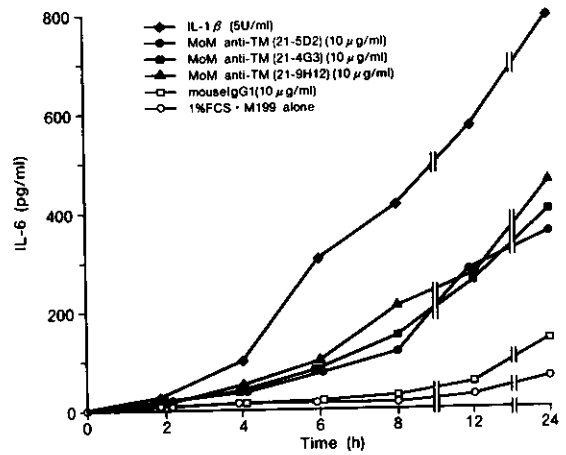


Fig. 2. MoMantiTMによるECからのIL-6分泌刺激の時間経過

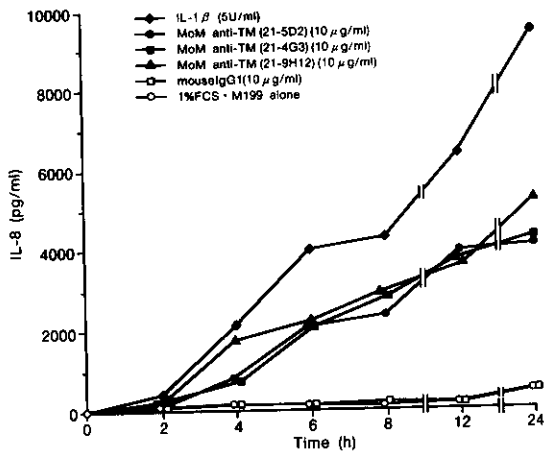


Fig. 3. MoMantiTMによるECからのIL-8分泌刺激の時間経過

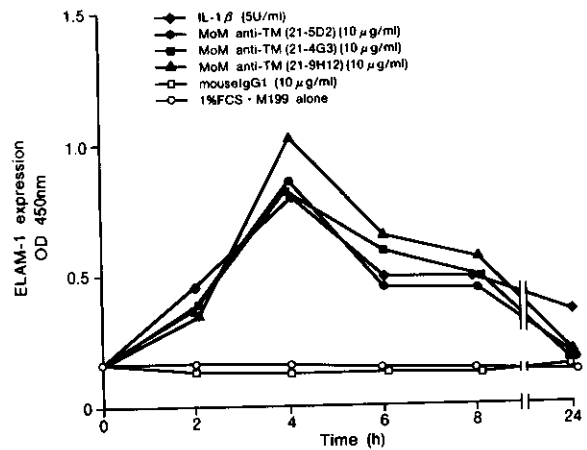


Fig. 4. MoMantiTMによるECのELAM-1発現増強の時間経過

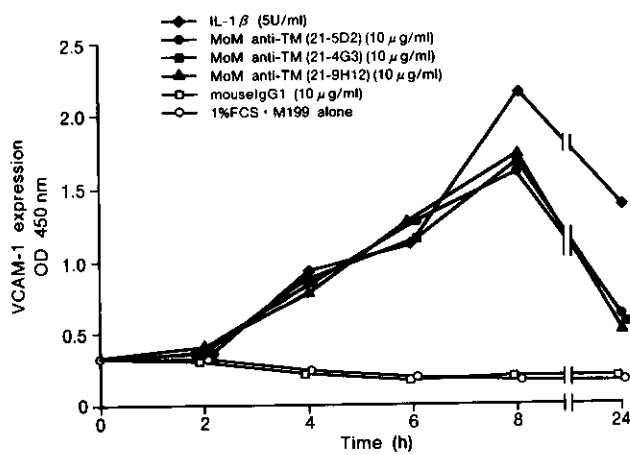


Fig. 5. MoMantiTMによるECのVCAM-1発現増強の時間経過

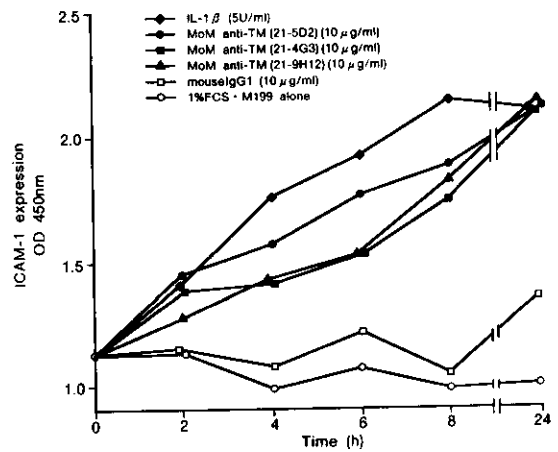


Fig. 6. MoMantiTMによるECのICAM-1発現増強の時間経過



我々は膠原病症例血清中に anti-TM が存在することを報告している<sup>1)</sup>。現在我々は recombinant TM (rTM)-Sephalyse HP カラムを用いて膠原病症例血清から IgG anti-TM を精製し、精製 IgG anti-TM が固相化した rTM に結合することを確認している (未発表)。膠原病症例血清中の anti-TM が in vivo において豊富に TM を発現している肺動脈内<sup>2)</sup>で TM に結合することにより上記の様な EC からの cytokine 分泌、接着分子発現を増強し、更に好中球、単球、リンパ球などの炎症細胞が EC に接着し、活性化され、血管壁への浸潤が促進される。このような経過で肺動脈の血管内皮障害、血管炎が出現し、更に PH の出現につながる事が推測される。今後、膠原病に伴う PH 症例由来の精製 IgG anti-TM が MoM anti-TM と同様の作用を有しているか否かを更に検討していく必要があると思われる。

## 文 献

1. 吉尾 卓, 奈良浩之, 金子尚子, 狩野庄吾, 簗田清次: 膠原病に伴う肺高血圧症例の抗トロンボモジュリン抗体, 抗アネキシン V 抗体の検討. 厚生省特定疾患対策研究事業混合性結合組織病に関する研究班-混合性結合組織病の病態, 治療と抗 U1RNP 抗体に関する研究-平成 11 年度研究報告書 pp40-4, 2000
2. Maruyama I, Bell CE, Majerus PWJ. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol* 1985 ; 101: 363-71

## MONOCLONAL MOUSE ANTI-THROMBOMODULIN ANTIBODIES BIND TO ENDOTHELIAL CELLS IN VITRO AND INDUCE CYTOKINE SECRETION AND ADHESION MOLECULE EXPRESSION

Taku Yoshio, Hiroyuki Nara, and Seiji Minota  
Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Department of Medicine,  
Jichi Medical School

We have reported the possibility that IgG anti-thrombomodulin antibodies (anti-TM) might be related with the pathogenesis of collagen-disease-related pulmonary hypertension (PH), so we investigated the ability of monoclonal mouse anti-TM (MoM anti-TM) to bind to endothelial cells (EC) derived from human umbilical veins and induce cytokine secretion and adhesion molecule expression. Three kinds of MoM anti-TM, that react with different sites of thrombomodulin (TM) EGF domains, were used. Recombinant interleukin-1  $\beta$  (rIL-1  $\beta$ ) and mouse IgG1 and IgG2a were used as positive and negative control, respectively. Three MoM anti-TM bound to EC monolayers in a IgG-dose-dependent manner more than mouse IgG1 and IgG2a did. Three MoM anti-TM augmented IL-6 and IL-8 secretion from EC in a IgG-dose- and time-dependent manner in the almost same way as rIL-1  $\beta$ , but did not IL-1  $\beta$  secretion. Mouse IgG1 and IgG2a were without effect. Three MoM anti-TM up-regulated the expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 on EC monolayers in a IgG-dose-dependent manner and in the same time course as rIL-1  $\beta$ . These results did not significantly differ among 3 MoM anti-TM. These results suggested the possibility that anti-TM in patients with collagen-disease-related PH might bind EC surface of pulmonary arteries, on which TM exist abundantly, and induce cytokine secretion and adhesion molecule expression, facilitating leukocyte recruitment. Such events on pulmonary arteries might lead to vascular damage and vasculitis, resulting in PH.

## 14. MCTD患者と胎児由来細胞の19番染色体上のRNP-A塩基配列の解析

分担研究者 : 大久保 光夫

所属施設 : 埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療

### 研究要旨

MCTDを含む自己免疫疾患の病因には複数の遺伝子異常が関与し個人ごとに関与する遺伝子が異なる可能性もある。最近Genome projectの成果が一部利用できるようになり、個人の複数の遺伝子異常を横断的に解析できるようになった。そこで、MCTD患者の19番染色体上のC3、ICAM-1、RNP-A、RNP-70をコードする領域の塩基配列解析を試行した。(同意を得た) 健常人およびヒト卵巣癌細胞株、子宮癌細胞株は解析した範囲(exon1~6とその近傍のintron)での塩基配列同一であったが、(同意を得た) MCTD患者由来の塩基配列はexon 1のleader segmentに相当する部位においてCTGACTTCがCGATTCへとdeletionしていた。同患者ではRNP-Aのexon5と6の間のintronと上流のC3(補体)のexonにも変異が認められた。RNP-Aのtranscription start pointのCTTCC motif内にdeletionがあったことから、RNP-Aのtranscriptionに影響を与えている可能性があり、C3の異常と合わせてMCTDの病因に関与していると推定された。

### A. 研究目的

従来の病因遺伝子の解析では、特定の疾患が集積している家系や集団のgenomeから、共通した異常をもつ範囲を遺伝子地図上に特定する方向で研究が進められてきた。しかし、MCTDを含む自己免疫疾患の病因には複数の遺伝子異常が関与し、個人ごとに関与する遺伝子が異なる可能性もある。最近human genome project、いわゆるヒト全塩基配列解明研究、の成果が一部利用できるようになってきた。これらの解析結果を利用すると、個人の複数の遺伝子異常を横断的に解析できる。そこで、我々はこれらの遺伝子情報から得られる利益を、いち早く患者に還元するために、診断基準がすでに確立し、しかも医療機関で把握されているこのMCTDにおいて、個人の複数の遺伝子異常の解析のためにdatabaseを利用することとした。本年度は1名のMCTD患者と各種cell line由来のgenomic DNAを用い、19番染色体上のC3、ICAM-1、RNP-A、RNP-70をコードする領域の塩基配列の解析を試行した。

### B. 研究方法

解析対象は同意を得て採血され、倫理面での配慮の

ために無名化されて提供されたMCTD患者1名の末梢単核球由来のgenomic DNAと健常人1名のgenomic DNAとヒト卵巣癌細胞株、子宮癌細胞株、胎児線維芽細胞由来のgenomic DNA。解析対象遺伝子は第19番染色体上のC3、ICAM-1、snRNPA、snRNP-70である。各遺伝子の塩基配列はGenbankのdataを用いた。第19番染色体遺伝子地図-および全塩基配列はNCBIにより公開されている塩基配列情報を使用した(文献1)(図1)。

解析の方法は全遺伝子配列上に存在する(機能)遺伝子のexonとintronのすべてについての配置と塩基配列をdata baseで確認した後、intron内に3'側5'側の両方から500から2000bp程度の長さについてPCRできるようなプライマーを設定して増幅する(図2)。このPCR fragmentを、ABI 377 オートシーケンサーにてDirect Sequenceして塩基配列をdata baseと比較する。これをC3、ICAM-1、RNP-A、RNP-70機能遺伝子およびその前後のintronで繰り返し行う。塩基配列に差違があった場合には、その部分の別のfragmentで確認するとともに、別の施設に依頼して確認する。

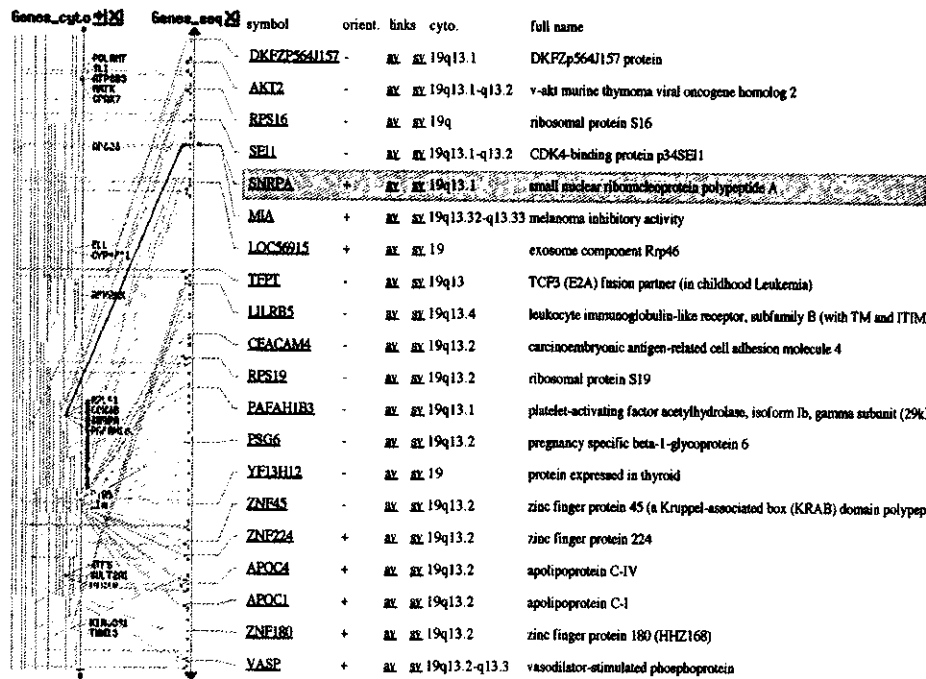


図1 NCBIが公表している第19番染色体地図（一部）とU1-snRNP-A geneの存在位置

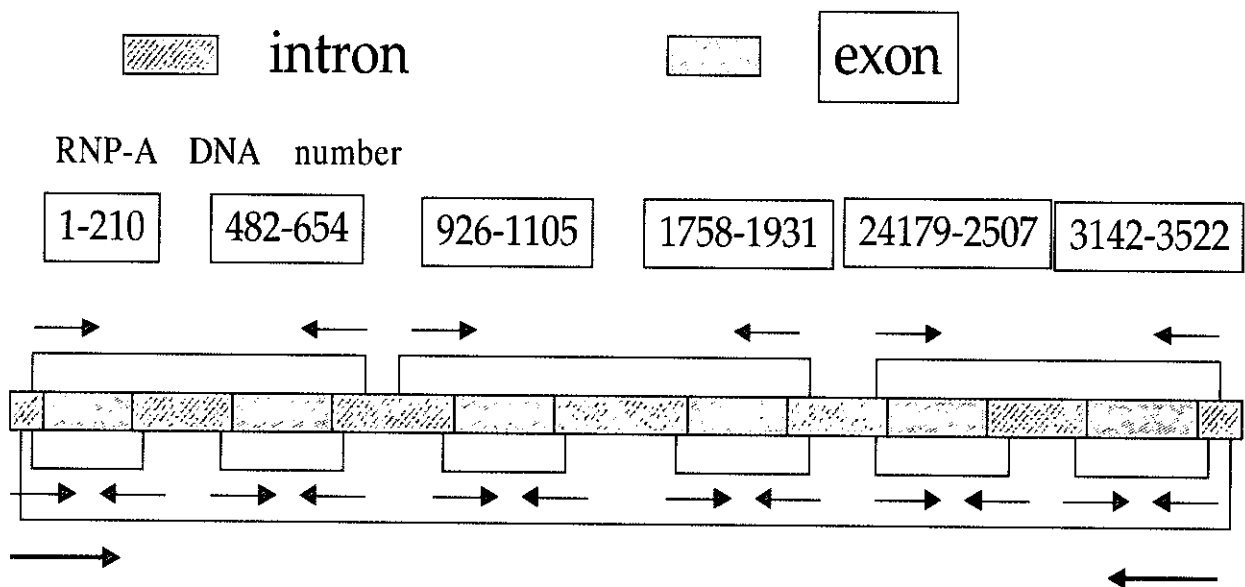


図2 第19番染色体上のRNP-A遺伝子のexonとintronの位置とPCRプライマーの設定位置

DNA from a healthy donor

CCTTCCCCTACTCCCGCCTTACCTGACTTCCTTTTCGGAGGAAGATCCTTGAGCAGCCG

DNA from an MCTD

CCTTCCCCTACTCCCGCCTTACC GA TTC TTTTCGGAGGAAGATCCTTGAGCAGCCG

DNA from an embryonic fibroblast

CCTTCCCCTACTCCCGCCTTACC GA TTCCTT CGGAGGAAGATCCTTGAGCAGCCG

図3 塩基配列解析結果例

下線はCTTCC motif。2番目のCTTCC motifにMCTD由来のgenomic DNAではT、C、Cのdeletionが認められる。ある線維芽細胞でも同じ位置にT、C、Tのdeletionが認められた

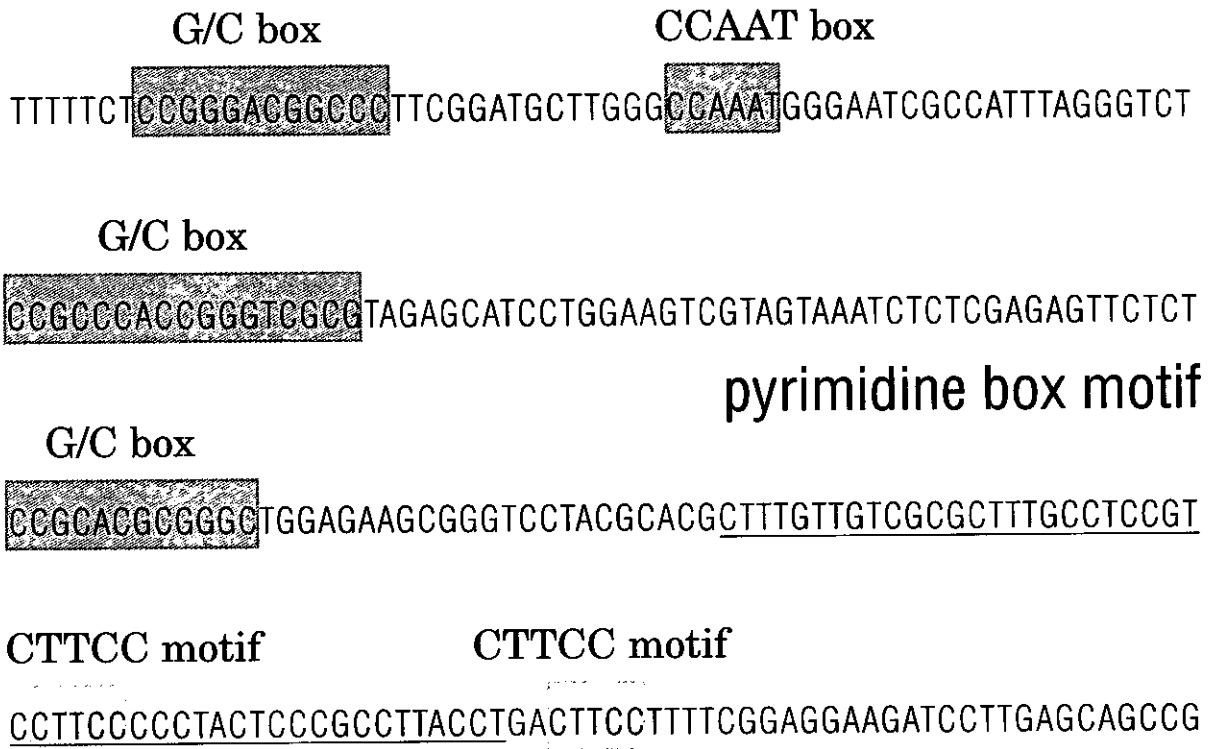


図4 RNP-A gene 5' flanking region の特徴ある配列

### C. 研究結果

1991年にVenrooijらにより報告された teratocarcinoma clone由来の genome 塩基配列 (文献2) と健康人およびヒト卵巣癌細胞株、子宮癌細胞株は解析した範囲 (exon1~6とその近傍の intron) での塩基配列同一であったが、(同意を得た) MCTD患者由来の塩基配列は exon 1 の leader segment に相当する部位において CTGACTTCがCGATTCへと deletion していた (図3)。同患者では RNP-A の exon5 と 6 の間の intron と上流の C 3 (補体) の exon にも変異が認められた。

### D. 考察

RNP-AのCTTCC motif内にdeletionが認められた。また、胎児線維芽細胞由来の genomic DNA でも同部位に類似したdeletionがあり、この部分は変異のhot spotかも知れない。CTTC motifは多くの機能遺伝子、たとえばHSP 47などに存在することが知られていて、この motif は transcription site である可能性が高いと報告されている (図4)。したがって、この部位の塩基配列の deletion は RNP-A の transcription に影響を与えている可能性があり、細胞内でのRNP-Aの発現量に影響を与え

ているのかも知れない。また、C 3 の異常 (ヘテロのため、補体欠損とは臨床的に認知されないが) と合わせて MCTD の病因に関与していると推定された。このように、MCTD では自己抗原そのものに関与する遺伝子と補体などの機能遺伝子などひとつの染色体上の少なくとも複数の変異があり、これが病因あるいは病態を形成している可能性があるため、今後も genome database を利用した MCTD 患者の遺伝子の横断的な解析が重要な研究課題になると考えられる。

### 文 献

1. International human genome project collaborators. Toward the complete sequence of the human genome. Homo sapiens chromosome 19 working draft sequence segment, complete sequence. NCBI, 2000 Nov.
2. Nelissen RL, Sillekens PT, Beijer RP, et al. Structure, chromosomal localization and evolutionary conservation of the gene encoding human U1 snRNP-specific A protein. Gene 102, 189-196, 1991.

## GENE SEQUENCE ANALYSIS ON THE HUMAN 19th GENOME FROM AN MCTD PATIENT COMPARISON WITH THE GENOME DATABASE

Mitsuo Okubo, Hiroo Maeda  
Transfusion Medicine and Cell Therapy, Saitama Medical Center,  
Saitama Medical School

Human genomic sequence databases, such as NCBI databases, are now partially available in analysis of individual genome. We analyzed and compared the 19th genomic sequence from an MCTD patient to the genomic databases. Preliminarily, gene regions including C3, ICAM-1, RNP-A, and RNP-70 were analyzed for an MCTD patient. DNA of a healthy donor, of 4 carcinoma cell lines, and of a normal embryonic fibroblastic cell line were analyzed. In leader segment of exon 1 of RNP-A, two nucleotides were deleted, that was CTGACTTCC to C\_GA\_TTCC. We also observed there was one nucleotide mutation in the intron between exon 5 and exon 6 of RNP-A. Moreover, there was a point mutation in exon of C 3 gene. The leader segment of exon 1 of RNP-A is including transcription start point, CTTCC motif. deletion in this functional segment might be caused transcription disorder of RNP-A.



[Ⅲ]

平成12年度業績目録

## 1.雑誌

著者名	論文課目	雑誌名	巻：頁，西暦年号
<u>Kondo H</u>	CREST SYNDROME: CHANGING CLINICAL syndrome	Intern Med	39:437, 2000
Liu J, Akahoshi T, Jiang S, Namai R, Klitasato H, Endo H, Kameya T, <u>Kondo H</u> .	Induction of neutrophil death resembling neither apoptosis nor necrosis by ONO-AE-248, a selective agonist for PGE2 receptor subtype 3.	J Leukocyte Biol	68:187-193, 2000
Liu J, Akahoshi T, Namai R, Matsui T, <u>Kondo H</u> .	Effect of auranofin, an anti rheumatic drug, on neutrophil apoptosis.	Inflamm Res	49:445-451, 2000
Sato H, Hashimoto A, Araki S, Nishibayashi Y, Hoshi K, Kutsuna T, Shino Y, Ishihara Y, Tsuboi S, Fuzhimori J, <u>Kondo H</u> , Akizuki M, Moroi Y, Yoshida S, Yokoyama K.	Validity and reliability of a revised Japanese version of the Arthritis Impact Measurement Scales versions(AIMS2)	Mod Rheumatol	10:247-255, 2000
Kurihara Y, Endo H, <u>Kondo H</u> .	Induction of IL-6 via the EP3 subtype of prostaglandin E receptor in rat adjuvant-arthritis synovial cells.	Inflamm.res.	50:1-5, 2001
Kurihara Y, Endo H, Akahoshi T, <u>Kondo H</u> .	Up-regulation of prostaglandin E receptor EP2 and EP4 subtypes in rat synovial tissues with adjuvant arthritis.	Clin Exp Immunol	123:323-330, 2001
Ishikawa M, Okada J, <u>Kondo H</u> .	Pulmonary hypertension in patients with anti-centromere antibody.	北里医学	30:345-353, 2000
ラナ 美代子、遠藤 平仁、西村 明人、 <u>近藤啓文</u>	慢性関節リウマチ滑膜炎におけるプロスタグランジンE受容体EP4サブタイプの組織内分布と発現調節機序の解析	北里医学	30:231-239, 2000
遠藤 平仁、ラナ 美代子、栗原 タ子、西村 明人、 <u>近藤啓文</u>	炎症性関節炎滑膜炎におけるperoxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )の発現とその意義	炎症・再生	21:71-77, 2001
橋本明、佐藤元、西村保朗、椎野泰明、忽那龍雄、石原義恕、星恵子、藤森十郎、坪井声示、 <u>近藤啓文</u> 、秋月正史、諸井泰興、吉田俊治	RA患者のQOL:AIMS改訂 日本語版調査書を用いた多施設共同調査成績 -1.肢体不自由に関する諸因子の解析-	リウマチ	41, 2001
岡田 純、是洞桂子、 <u>近藤啓文</u>	MCTDと肺高血圧症 日本臨床免疫学会シンポジウム 混合性結合組織病並びに関連する疾患の難治性病態とその治療	日臨免誌	23:643-646, 2000
Uchiyama,M., Akahosi,T, Matsui,T., Watabe,H., Koreda,K., Tanaka,S.,Matsuo,T., Tatsumi,H., Kamata,K., Kobayashi,Y., <u>Kondo,H</u> .	Crescentic glomerulonephritis with anti-myeloperoxidase antibodies developing during the course of IgA nephropathy in a patient with rheumatoid arthritis.	Modern Rheumatol.	11:76-79, 2001
<u>近藤啓文</u> 、渡部 洋行	強皮症（全身性硬化症、全身性強皮症）	治療	83:1180-1183, 2001
<u>近藤啓文</u> 、渡部 洋行	混合性結合組織病	Mebio	18:90-93, 2001
<u>近藤啓文</u> 、石川 章	本邦で使用できるDMARDs	カレントセラピー	19:448-451, 2001
<u>近藤啓文</u>	慢性関節リウマチの薬物療法 -DMARDsを中心に	中部リウマチ	32:6-9, 2001



近藤啓文、内山真主美	新しいリウマチ性疾患治療薬	臨床医	26:371-373, 2000
近藤啓文、小林茂人、田中清介、柏崎禎夫、市川陽一、竹内勤、立石博臣、広畑俊成、藤井克之、星恵子	委員会報告 日本リウマチ学会による早期慢性関節リウマチの診断基準-3. 診断基準の検証	リウマチ	40:54-59, 2000
近藤啓文	基本的な薬の使い方：抗リウマチ薬	診断と治療	88:431-436, 2000
近藤啓文、石川 章	抗リウマチ薬 (DMARD)最前線 2000；ネオーラル	リウマチ科	23(6):539-546, 2000
近藤啓文	好中球浸潤阻害による慢性関節リウマチの治療法の開発に関する研究	平成11年度厚生科学研究費補助金 免疫・アレルギー等研究事業 研究報告書	334-336, 2000
近藤啓文	Evidenceに基づく内科的治療の進め方；強皮症	最新医学 2000年	6:1457-1465, 2000
近藤啓文	第一回ステロイド治療研究会 慢性関節リウマチにおけるステロイド療法と臨床試験の提案	炎症と免疫	8(4):455-458, 2000
近藤啓文	回帰性リウマチ 内科治療のグローバルスタンダード	臨床医	26:1415-1416, 2000
近藤啓文	抗TNF $\alpha$ 抗体およびsTNF受容体・Fc融合タンパク質の臨床効果と問題点	最新医学 別冊	2000:156-166, 2000
近藤啓文	薬物治療の基本的な考え方 -NSAIDsとDMARDsの位置づけ-	Clinician	47:137-141, 2000
近藤啓文、ラナ 美代子	リウマチ性疾患の疫学像：全身性硬化症（強皮症）	リウマチ科	24:243-248, 2000
近藤啓文、石川 章	疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs)	医学ジャーナル	36:3101-3105, 2000
Misaki Y., Ezaki I, Ariga T, Kawamura N, Sakiyama Y, Yamamoto K.	Gene-transferred oligoclonal T cells predominantly persist in peripheral blood from an adenosine deaminase deficient patient during gene therapy.	Molecular Therapy	3(1)24-27, 2001
Nakamura M, Shiokawa S, Miyazaki Y, Kita H, Setoguchi K, Kawahata K, Misaki Y., Yamamoto K, Nishimura J.	Diffuse intervertebral disk calcification in a patient with rheumatoid arthritis.	J Med Invest.	47(3-4):152-4, 2000
Miyamasu M, Misaki Y., Yamaguchi M, Yamamoto K, Morita Y, Matsushima K, Nakajima T, Hirai K.	Regulation of human eotaxin generation by Th1-/Th2-derived cytokines.	Int Arch Allergy Immunol.	122 Suppl 1:54-8, 2000
Setoguchi K, Misaki Y., Araki Y, Fujio K, Kawahata K, Kitamura Tyamamoto.	Antigen-specific T cells transduced with interleukin-10 ameliorate experimentally induced arthritis without impairing the systemic immune response to the antigen.	J Immunol	15;165(10):5980-6, 2000
Fujio K, Misaki Y., Setoguchi K, Morita S, Kawahata K, Kato I, Nosaka T, Yamamoto K, Kitamura T.	Functional reconstituion of class II restricted T cell immunity mediated by retroviral transfer of $\alpha / \beta$ T cell receptor complex.	J Immunol.	1;165(1):528-32.,2000

三崎義堅、瀬戸口京吾、荒木靖人、藤尾圭志、川畑仁人、北村俊雄、山本一彦	IL-10遺伝子導入抗原特異的T細胞を用いた実験的関節炎の治療	日本臨床免疫学会誌	23 (6) 538-541, 2000
永井立夫、田中良一、山口晃弘、三崎義堅、山本一彦、織田弘美	出産後に仙腸関節炎を発症した潰瘍性大腸炎の一例	臨床リウマチ	12(3):283-288, 2000
中村教泰、宮崎吉孝、喜多宏人、塩川左斗志、瀬戸口京吾、川畑仁人、三崎義堅、山本一彦、西村純二	下腿圧痕浮腫を伴ったリウマチ性多発筋痛症の一例.	九州リウマチ	19 :97-100, 2000
三崎義堅	免疫異常の遺伝的背景	炎症と免疫	18 (6):660-666, 2000.
三崎義堅	Sjogren症候群の診断基準	内科	85(6):1470-1472, 2000
三崎義堅、山本一彦	核内自己抗原に対する免疫学的寛容の成立と破綻	Molecular Medicine	37 (8):872-879, 2000
三崎義堅、山本一彦	自己免疫疾患の発症メカニズム	内分泌・糖尿病科	10 (2) 183-190, 2000
三崎義堅、山本一彦	核内自己抗原に対する免疫寛容の成立と破綻	炎症と免疫	8 (3) 246-252, 2000
三崎義堅	抗リン脂質抗体症候群	内科	85 (4) 705-709, 2000
三崎義堅	トランスジェニックを用いたトレランスの解析	組織培養工学	26 (3) 96-101,2000
Hattori N, Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Ikeda Y, Kawakami Y	Identification of autoreactive T cells to b2-glycoprotein I that mediate antiphospholipid antibody production.	Arthritis Rheum	43(1):65-75, 2000
Nojima T, Hirakata M, Sato S, Fujii T, Suwa A, Mimori T, Ikeda Y	A case of polymyositis associated with hepatitis B infection.	Clin Exp Rheumatol.	18(1):86-88, 2000
Kanazawa Y, Kaneshiro Y, Sawa M, Yasuoka H, Nojima T, Ohosone Y, Mimori T	Domain reactivity of autoantibodies to calpastatin in patients with systemic rheumatic diseases.	Mod Rheumatol	10(1):38-44, 2000
Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T	Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis.	Arthritis Rheum.	43(5):1074-1084, 2000
Suwa A, Hirakata M, Satoh S, Ezaki T, Mimori T, Inada S	Systemic lupus erythematosus associated with Down syndrome.	Clin Exp Rheumatol.	18(5):650-651, 2000
Kajihara M, Kuwana M, Tokuda H, Yamane K, Kubo M, Hirakata M, Mimori T	Myositis and interstitial lung disease associated with autoantibody to a transfer RNA-related protein Wa.	J Rheumatol.	27(11):2707-2710, 2000
三森経世	Ku抗原とDNA依存性プロテインキナーゼ.	最新医学	55(1):123-131, 2000
三森経世、安岡秀剛	Case study-SLE.	臨床医	26(3):349-352, 2000
三森経世	自己抗体と病態形成.	Modern Physician	20(1):31-34, 2000
三森経世	多発性筋炎・皮膚筋炎	内科	84(4):696-700, 2000
諏訪昭、三森経世	ヒト化モノクローナル抗体.	臨床検査	44(4):417-421, 2000

三森経世	リウマチ性多発筋痛症.	「内科治療のグローバルスタンダード」. 臨床医	26(増刊号):689-691, 2000
三森経世	自己免疫発症のメカニズム.	日本医師会雑誌	123(11):1747-1757, 2000
三森経世	多発性筋炎・皮膚筋炎の診断基準・病型分類.	内科	85(6):1465-1469, 2000
藤井隆夫, 三森経世	強皮症の肺・心病変.	治療学	34(11):1206-1209, 2000
三森経世	多発性筋炎, 皮膚筋炎.	「免疫症候群(上巻)」 日本臨床別冊	pp422-426, 2000
安岡秀剛, 三森経世	自己免疫疾患と免疫不全—全身性エリテマトーデスを中心に.	「免疫症候群(下巻)」 日本臨床別冊	pp428-432, 2000
三森経世, 平形道人	膠原病におけるトランスフェラーRNA関連自己抗体とその対応抗原.	臨床化学	29(4):146-152, 2000
三森経世, 安岡秀剛, 鈴木美佐子, 野島崇樹, 佐藤慎二, 藤井隆夫, 諏訪昭, 平形道人	混合性結合組織病の髄膜炎.	日本臨床免疫学会誌	23(6):647-651, 2000
Ogasawara H, Kaneko H, Hishika-wa T, Sekigawa I, Takasaki Y, Ha-shimoto H, Hirose S, Kaneko H, Maruyama N	Molecular mimicry between human endogenous retrovirus clone 4-1 and HLA class I antigen: with reference to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus	Rheumatology	38 : 1163-1164, 1999
Tanaka M, Kobayashi S, Kungai Y, Ebisuka T, Matsumoto T, Takasaki Y, Hashimoto H	Scleroderma: report of a case	Mod Rheumatol	10 : 51-53, 2000
Amano H, Morimoto S, Kaneko H, Tokano Y, Takasaki Y, Hashimoto H	Effect of intravenous cyclophosphamide in systemic lupus erythematosus: relation to lymphocyte subsets and activation markers	Lupus	9 : 26-32, 2000
Takasaki Y, Kaneda K, Takeuchi K, Yano T, Hashimoto H	Antibodies to PCNA and Ki - A linked set of autoimmune response associated with cellular function of target antigens	AAA	1:88-109, 2000
Takasaki Y, Kogure T, Takeuchi K, Kaneda K, Yano T, Hirokawa K, Hirose S, Shirai T, Hashimoto H	Reactivity of anti-proliferating cell nuclear antigen(PCNA) murine monoclonal antibodies to the PCNA multiprotein complexes involved in cell proliferation	J Immunol	In press
高崎芳成, 村上明弘, 小島和夫, 矢野哲朗, 官川 薫, 金田和彦, 川口里江子, 竹内健, 橋本博史	MESACUP-2 RNPによる抗U1 RNP抗体の測定-MESACUP RNP IIとの比較検討	医学と薬学	44:599-609, 2000
Tan EM, Smolen JS, McDougal JS, Klippel JH, Frizler MJ, Gordon T, Hardin JA, Kalden JR, Lahita RG, Maini RN, Rothfield NF, Takasaki Y, Wiik A, Willson M, Koziol JA	A clinical evaluation of enzyme immunoassay kits for detection of antinuclear antibodies of defined specificities. II. Potential for quantitation of antibody content	Arthritis & Rheum	投稿中
高崎芳成, 山本一彦, 三森明夫	膠原病の臓器障害とその治療	治療学	34:69-80, 2000
高崎芳成	Sweet病, 処方—私の考え方	臨床と研究	77:121-122, 2000

高崎芳成	SLEからの移行例, RA臨床のQ&A	RA & セラピー	6:52-53, 2000
高崎芳成	免疫抑制剤の適応と投与法	モダンフィジシャン	20:69-73, 2000
高崎芳成	膠原病肺	産婦人科の世界	53:93-99, 2001
岡田 純、是洞桂子、近藤啓文	MCTDと肺高血圧症 日本臨床免疫学会シンポジウム 混合性結合組織病並びに関連する疾患の難治性病態とその治療	日臨免誌	23:643-646, 2000
岡田 純	再発性多発軟骨炎	日本内科学会雑誌	89:63-67, 2000
岡田 純	混合性結合組織病	Medical Practice	17:1679-1684, 2000
田村大輔、岡田 純、東原正明、柳沢信之、岡安 勲	習慣性流産、胃ポリポーシスを合併し、腸管梗塞で死亡した抗リン脂質抗体症候群の1例	内科	85:361-370, 2000
岡田 純	抗リン脂質抗体症候群	臨床リハ	20:137, 2001
岡田 純	老人にみられるシェーグレン症候群について	老年病診療Q & A	35:6-11, 2001
Nanke Y, Kotake S, Akama H, Shimamoto K, Hara M, Kamatani N.	Raised plasma adrenomedullin in patients with systemic sclerosis complicated by pulmonary hypertension.	Ann Rheum Dis	59(6):493-494, 2000
Matsuda Y, Harigai M, Nakajima H, Terazima H, Yamada T, Fukasawa C, Takeuchi M, Hara M, Kamatani N.	Dermatomyositis with splenic and renal infarctions during corticosteroid therapy.	Intern Med.	39(6):512-516, 2000
Nakane Y, Kotake S, Shimamoto K, Fukasawa C, Hara M, Kamatani N.	Systemic lupus erythematosus with myocardial dysfunction due to microvasculopathy	Lupus	9:464-467, 2000
Nakajima H, Harigai M, Hara M, Hakoda M, Tokuda H, Sakai F, Kamatani N, Kashiwazaki S.	KL-6 as a novel serum marker for interstitial pneumonia associated with collagen diseases.	J Rheumatol.	27:1164-1170, 2000
Sugiura T, Kawaguchi Y, Harigai M, Takagi K, Ohta S, Fukasawa C, Hara M, Kamatani N.	Increased CD40 expression on muscle cells of polymyositis and dermatomyositis: Role of CD40-CD40 ligand interaction in IL-6, IL-8, IL-15, and monocyte chemoattractant protein-1 production.	J Immunol	164:6593-6600, 2000
Nanke Y, Akama H, Yamanaka H, Hara M, Kamatani N.	Progressive appearance of overlap syndrome together with autoantibodies in a patient with fatal thrombotic microangiopathy	Amer J Med Sci	320(5):348-351, 2000
原まさ子	妊娠時の薬物療法の注意点	Modern Physician	20(1):83-85, 2000
針谷正祥、原まさ子、鎌谷直之、柏崎禎夫	多発性筋炎、皮膚筋炎に伴う間質性肺炎に対するシクロスポリンA療法に関するアンケート調査	日本リウマチ学会誌	39(6):819-828, 2000
原まさ子	慢性関節リウマチ-up to date-診断の進め方-類似疾患との鑑別	クリニシャン	47(488):13-17, 2000
原まさ子	皮膚筋炎、多発性筋炎の病態と治療	臨床医	26(3):42-49, 2000