

図1 permutation テスト

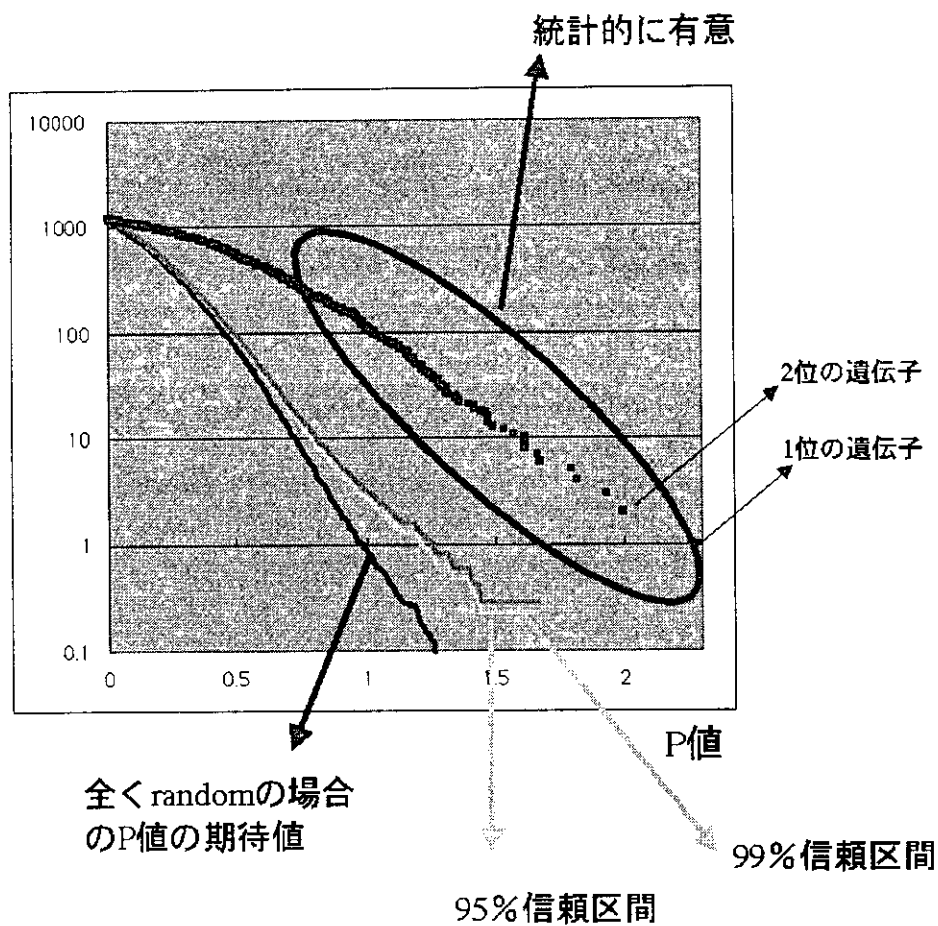


図2 肝炎ウイルスによる識別

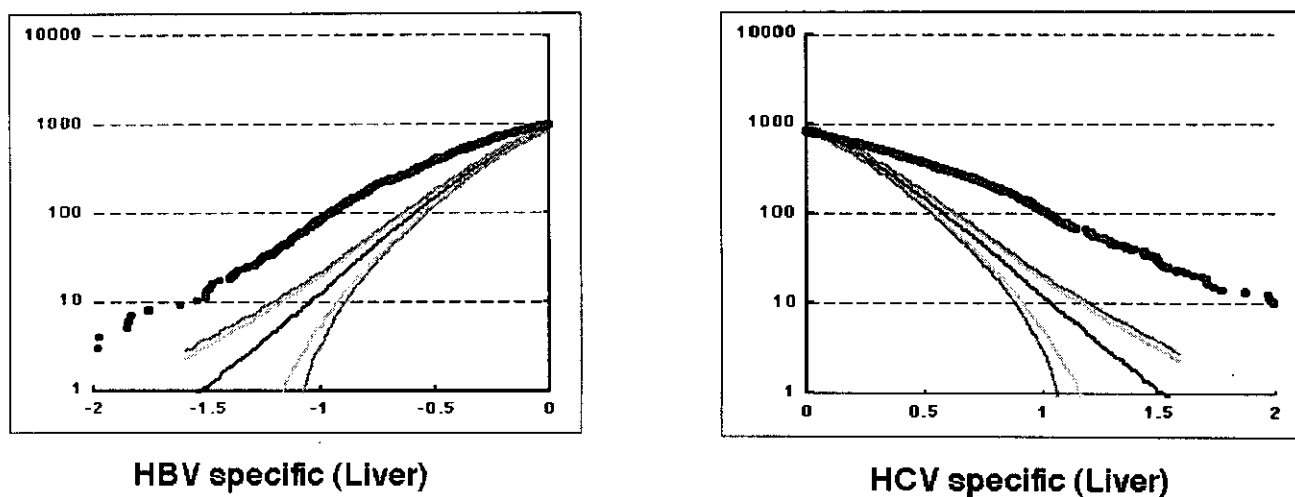


表1 リウマチ組織で発現が低下する遺伝子

Probe Set Name	OA	RA1			RA2				
		RA1	Diff Call	Fold Change	Sort Score	RA2	Diff Call	Fold Change	Sort Score
35000_at	103.5	4.4	D	~-6.0	-1.7	12.8	D	~-5.7	-1.58
37459_at	651	43.2	D	-15.1	-10	186.4	D	-3.5	-1.95
37513_at	69.9	-29.5	D	~-5.4	-1.1	5.9	D	~-3.9	-0.63
38965_at	1402	270.6	D	-4.9	-4.8	270.8	D	-4.7	-4.37
39206_s_at	885.8	196.2	D	-4.5	-3.5	145.3	D	-6.1	-5.17
39207_r_at	291.3	-93.6	D	~-21.1	-9.9	-107	D	~-21.2	-9.95
39618_at	143	15.9	D	~-6.8	-2.3	34.6	D	-5.3	-1.74
39632_at	34.9	-2.9	D	~-2.7	-0.2	-8.4	D	~-2.8	-0.21
41433_at	311.7	60.4	D	-6	-3	49.6	D	-6.3	-3.17
41717_at	318	168.1	D	-2.5	-0.7	68.5	D	-6	-2.87
41718_g_at	905.7	426.4	D	-2.1	-0.8	242.7	D	-3.7	-2.58
41719_i_at	644.3	228.6	D	-2.8	-1.3	53.8	D	-9.7	-6.43
41720_r_at	311.6	136.4	D	-2.3	-0.5	67.9	D	-4.6	-2.09
31888_s_at	591.9	187.9	D	-3.2	-1.5	364.7	D	-1.6	-0.25
33787_at	191.4	93.8	D	-2.6	-0.5	72.7	D	-3	-0.83
35172_at	378.7	150.1	D	-2.5	-0.8	134.3	D	-2.8	-0.98
36861_at	709	279.6	D	-2.6	-1.2	199.5	D	-3.6	-2.1
37188_at	142.3	-4.8	D	~-7.6	-2.6	32.8	D	-4.3	-1.29
37611_at	117.1	45.5	D	-2.6	-0.4	85.3	D	-1.9	-0.19
37892_at	284.8	8.2	D	~-15.0	-7.1	0.8	D	~-13.8	-6.42
37906_at	1073	659.6	D	-1.9	-0.6	649.6	D	-1.9	-0.59
37984_s_at	404	249.4	D	-1.8	-0.3	252.6	D	-1.8	-0.28
38299_at	218.5	41.1	D	-5.3	-2.2	87.7	D	-2.5	-0.56
38700_at	617	197.9	D	-3.1	-1.5	361.4	D	-1.7	-0.31

表2 リウマチ組織で発現が増加する遺伝子

	RA1					RA2			
	OA	RA1	diff. Call	fold change	sort score	RA2	diff. Call	fold change	sort score
31508_at	133.6	252.9		1.9	0.28	302.2		2.3	0.52
34936_at	183.2	689.2		3.1	1.45	448.7		2	0.39
31855_at	199.1	967.9		4.3	3.14	336.6		2.1	0.47
36834_at	25.7	144.5		5.6	1.87	133.2		5.2	1.62
38631_at	93.3	196.8		2.1	0.35	195.2		2.1	0.34
40069_at	51.7	325.6		6.3	3.25	178.1		3.4	0.99
40818_at	241.4	591.3		2.2	0.69	547		2.1	0.52
32846_s_at	190.5	444.7		2.3	0.68	400.8		2.1	0.49
33364_at	27.3	265.3		~11.9	5.42	68.5		~3.1	0.49
33440_at	32.5	227.1		6.1	2.44	102.9		3.2	0.64
34378_at	217.9	709.6		3.3	1.79	402.6		1.8	0.33
36686_at	44.1	105.8		3.2	0.75	187.3		3.8	1.15
32521_at	0.8	54.9		~3.0	0.32	121		~6.2	1.92
1814_at	377.1	974.3		2.6	1.29	1491.6		3.4	2.59
1815_g_at	242.6	662.7		2.7	1.21	648.6		2.7	1.14
1016_s_at	7.7	116		~5.8	1.74	269.4		~12.4	5.69
770_at	44.6	683.7		16.3	11.22	130.2		2.9	0.61

抗リウマチ薬代謝酵素の遺伝子多型を用いた薬剤効果と副作用発現の予測

分担研究者 山中 寿 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター・助教授
協力者 田中栄一・浦野和子・谷口敦夫・鎌谷直之

研究要旨

抗リウマチ薬の代謝酵素に関連したゲノム情報がRA治療における薬剤の有効性や副作用発現と関連することが明らかになり、臨床情報とSNP情報を遺伝統計学的に解析して患者に還元するというテーラーメイド医療が重要になることを示した。

A. 研究目的

慢性関節リウマチは、抗リウマチ薬の長期間にわたる服用が不可欠であるが、薬剤の反応性や副作用の発現を臨床的に予測する手段はなく、試行錯誤が繰り返されてきたのが現状である。近年、遺伝子に関する情報が急速に増大し、DNA多型情報を薬物治療の反応予測に用いることが可能になってきた。そこで我々は、薬物代謝に関連する遺伝子の多型を解析することによる抗リウマチ薬の治療反応性や副作用発現の予測を検討した。

B. 研究方法

東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターに通院中のRA患者でメトトレキサート製剤(MTX)服用歴のある106例、およびスルファサラジン製剤(SASP)服用歴のある144例を対象としてゲノムDNAを患者の同意を得て抽出し、MTX服用例では葉酸代謝の主要な酵素である5,10-Methylenetetra-hydrofolate reductase(MTHFR)の遺伝子型、SASP服用例では代謝酵素の一つであるN-acetyltransferase-2(NAT2)の遺伝子型をPCR-RFLP法にて決定した。さらに、EMアルゴリズムに基づ

く maximum likelihood estimation を応用して独自に開発した解析プログラムを用いてハプロタイプ、ディプロタイプ形を決定した。その上で、RAにおけるMTX、SASPの有効性や副作用出現との関与を解析した。

倫理面への配慮に関しては、東京女子医科大学倫理委員会に提出した「慢性関節リウマチ患者の病態、予後、治療への反応性などへ影響を与える遺伝子の同定」にて承認を受けた。

C. 研究結果

MTX服用患者のsingle locus analysisの結果、1298Cを有する症例は他の症例に比してMTX用量が有意に少量であった($p < 0.05$, $RR = 2.18$, $95\%CI = 1.17-4.06$)。一方、677Tを有する症例は他の症例に比してMTXにおける副作用発現が有意に高率であった($p < 0.05$, $RR = 1.25$, $95\%CI = 1.05 - 1.49$)。ハプロタイプ頻度の解析から、677C-1298Cハプロタイプの症例は他の症例に比してMTX用量が有意に少量であり($p < 0.05$, $RR = 2.14$, $95\%CI = 1.13-4.06$)、677T-1298Aハプロタイプの症例は他の症例に比してMTXにおける副作用発現が有

意に高率であった($p < 0.05$, $RR = 1.42$, $95\%CI = 1.11 - 1.82$)。

SASP服用患者のハプロタイプの検討では、72%が野生型であり、この結果、ディプロタイプ形では135例がrapid acetylator、9例がslow acetylatorであった。対象症例で認められた副作用を示す。副作用は16例に認められ、このうち13例で投薬が中止、4例が入院加療を必要とした。

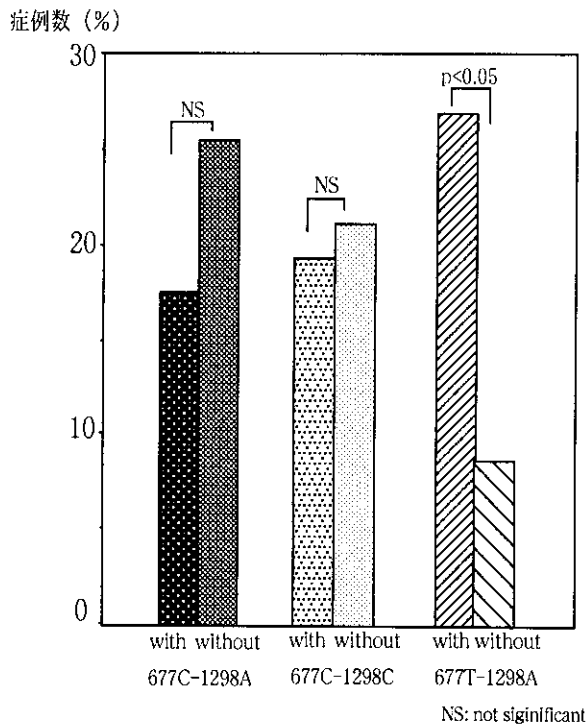


図 MTHFR遺伝子ハプロタイプとMTXの副作用

副作用の有無とハプロタイプの間接関係を見たところ、副作用出現群ではM2ハプロタイプが有意に多かった。次いで、ディプロタイプ形との関連では、野生型を持つ個体(すなわちrapid acetylator)では8.1%であるのに対して、持たない個体(slow acetylator)では62.5%と有意に高頻度であり(Odds ratio = 7.73, 95% confidence intervals = 3.54 - 16.86)、さらに入院加療を要する重篤な副作用では野生型を持つ個体(すなわちrapid acetylator)では1.5%であるのに対して、持たない個体(slow acetylator)では25%と有意に高頻度であった。

D. 考察

本研究により、RA治療薬であるMTXおよびSASPの代謝(関連)酵素の遺伝的多型が臨床的に見た有効性や副作用の頻度と関連することが示されたが、不完全な情報であるsingle locusの検討よりも完全情報であるハプロタイプ型、ディプロタイプ型の検討が、より良く臨床像を反映した。今後の遺伝子多型の検討にはこのような遺伝統計学的な解析手法が不可欠になると考えられる。

E. 結論

抗リウマチ薬によるRA治療においてもpharmacogenomicsは副作用の軽減などによるより良い治療法の開発に有効であることが示された。今後、臨床情報とSNP情報を遺伝統計学的に解析して患者に還元するというテーラーメイド医療が益々進歩するものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wako Urano, Atsuo Taniguchi, Hisashi Yamanaka, Eiichi Tanaka, Hiroshi Nakajima, Yuko Matsuda, Hideto Akama, Yutaka Kitamura and Naoyuki Kamatani: Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. Pharmacogenetics in press

2. 学会発表

1) 浦野和子、谷口敦夫、田中栄一、中島洋、松田祐子、中島亜矢子、山中寿、鎌谷直之 慢性関節リウマチに対するMTXの効果・副作用発現とMTHFR遺伝子多型との関連 第44回日本リウマチ学会総会 リウマチ 40:395, 2000

2) 田中栄一、山中寿、谷口敦夫、大塚早苗、
仙道和子、中島洋、岡本完、松田祐子、赤
真秀人、岩谷征子、齋藤輝信、鎌谷直之
慢性関節リウマチ(RA)におけるN-アセチ
ルトランスフェラーゼ-2(NAT-2)遺伝子型
から見たサラゾスルファピリジン(SASP)
の効果と副作用 第45回日本リウマチ学会
総会 リウマチ 41:434, 2001

慢性関節リウマチ患者骨髄幹細胞における遺伝子発現の異常に関する研究

分担研究者	小林 茂人	順天堂大学医学部膠原病内科	講師
研究協力者	池田 真	順天堂大学医学部膠原病内科	研究生
	田嶋美智子	順天堂大学医学部生化学第二	助手
	田村直人	順天堂大学医学部膠原病内科	助手
	橋本博史	順天堂大学医学部膠原病内科	教授
	野沢雅彦	順天堂大学医学部整形外科	助教授
	前沢克彦	順天堂大学医学部整形外科	助手
	松田圭二	順天堂大学医学部整形外科	助手
	黒澤 尚	順天堂大学医学部整形外科	教授
	安田勝彦	静岡県厚生連中伊豆温泉病院	内科医長
	勝部定信	静岡県厚生連中伊豆温泉病院	院長

研究要旨

慢性関節リウマチ(RA)における骨髄幹細胞の病因的役割に関して分子生物学的方法を用いて検討する。これまで、cDNA アレイ法を用いた動物のタイプII コラーゲン誘発関節炎における骨髄由来樹状細胞のmRNA発現解析の結果ではMIP2、SP2等の遺伝子の発現の増強が認められた。現在RA,SLEなどの骨髄細胞を約50検体採取し、cDNAアレイ法による研究を進めている。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の炎症の主座は、関節滑膜であるが、その免疫学的異常が骨髄細胞にあることが従来推定されている。つまり、滑膜のAおよびB細胞はともに骨髄由来であることが報告された。さらに動物のタイプII コラーゲン誘発関節炎では、関節炎に先行して骨髄内の炎症性サイトカインの濃度が上昇し、関節炎持続期間高値を示すこと、骨髄単核球の異常細胞の存在、nurse-like cellが骨髄およ

び滑膜で存在し、RAの関節炎に関与していることなどが報告されている。また、難治性RAに対して血液幹細胞の移植による治療が行われはじめ、その有効性についても発表されている。以上の事実から、慢性関節リウマチにおいて骨髄細胞に免疫学的異常が存在し、その骨髄細胞の遺伝子の異常を検討することは、末梢血、関節滑膜などの免疫異常と深く関わると考え、検討を開始した。

B. 研究方法

RA患者から関節手術時骨髓液を採取、マグネットビーズ法にてCD34陽性細胞を分離した後、RNAを抽出し、cDNAアレイ法にて骨髓細胞における遺伝子の発現状況を解析した。また、対照群として、外傷、変形性関節炎、大腿骨頭壊死症患者骨髓細胞を解析し、RAの特異的遺伝子発現を検討する。また、定量的PCR法にて遺伝子発現を確認する。

(倫理面への配慮)

検体は本来術後に廃棄されるものを利用するため、患者さんに対する不利益は生じない。また、本研究は本学の倫理委員会に申請し、すでに承認されている。患者さんのインフォームド・コンセントの下で検体の採取および研究を行う。患者さんは検体の提供を拒否しても診療や治療に影響を及ぼさない。

C. 研究結果

現在、対照疾患患者を含めて骨髓細胞は約50検体収集済みである。RA患者検体を増やして、現在解析を進めている。これまで、cDNAアレイ法を用いた動物のタイプIIコラーゲン誘発関節炎における骨髓由来樹状細胞のmRNA発現解析の結果ではMIP2、SP2等の遺伝子の発現の増強が認められ、技術的な問題点などは解決された。

D. 考案

全体の検体をプールしたものについての結果をRA群と対照群と比較し、RA群に特異的な骨髓幹細胞遺伝子の検討を行う。各症例ごとに病期・病態、活動性、治療法の種類などと遺伝子マーカーを比較検討する。

E. 結論

本研究は現在進行中であるが、本研究により、骨髓レベルでのRA発症の機序が解明される可能性が考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究報告

1. 論文発表

- 1) Tamura N, Kobayashi S, Hashimoto H. Anricardiolipin antibody in post streptococcal reactine arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2002 (in press).
- 2) Tamura N, Kobayashi S, Kato K, Bando H, Haruta K, Oyanagi M, Kuriyama M, Kipps TJ, Hashimoto H. Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis. *J Rheumatol*. 2001 Dec;28(12):2583-90.
- 3) Haruta K, Kobayashi S, Tajima M, Sakai A, Tamura N, Bando H, Hara M, Kawashima S, Takasaki Y, Hashimoto H. Effect of immune complexes in serum from patients with rheumatoid vasculitis on the expression of cell adhesion molecules on polymorphonuclear cells. *Clin Exp Rheumatol*. 2001 Jan-Feb;19(1):59-68.
- 4) Tajima M, Haruta K, Kobayashi S, Tamura N, Hashimoto H. Pentoxifylline induces the shedding of L-selectin on polymorphonuclear cells by stimulation via adenosine receptor as well as by the inhibition of phosphodiesterase. *Mod Rheumatol* 2001 11:65-71.
- 5) Kobayashi S, Yano T, Ebisuka T, Yoshioda M, Nakabayashi K, Matsumoto Y, Hashimoto H. Recent clinico-epidemiological manifestations of primary vasculitides. *Intern Med* 2002,41(1);49-51.

- 6) 藤井猛土・田村直人・池田真・栗山磨紀代・海老塚岳彦・田嶋美智子・鍾 彬彬・秋元智博・小林茂人・橋本博史. 慢性関節リウマチにおける血清中マトリックスメタロプロテアーゼ-3(MMP-3)測定の診断的有用性に関する検討. リウマチ科 2001; 26(1):97-104.
- 7) 藤井猛土, 小林茂人. 血管炎症候群の治療, 内科, 2001, 89(2)283-287.
- 8) 浅川順一, 小林茂人, 橋本博史. 診断の実際 膠原病を疑い, 診断しえたケース 慢性関節リウマチ, 臨床と薬物治療 2001. 20(6):601-603.
- 9) 栗山磨紀代, 小林茂人. 多臓器疾患としてのRA RAと血管炎. 多臓器疾患としてのRA RAと血管炎. *Medicina*, 2001, 38(3), 410-413.
- 10) 吉田雅治, 小林茂人, 橋本博史. 自己免疫疾患 血管炎症候群. *最新医学*, 2001, 55,1466-1472.
- 11) 小林茂人. 血管炎症候群 分子レベルの解析から臨床まで 血管炎症候群の基本的疫学像と治療・予後, *日本内科学会雑誌*, 2001, 90:84-85.
- 12) 小林茂人. 他の膠原病の伴う血管炎の病態と治療, *最新医学* 2000.55:2706-2711.
- 13) 栗山磨紀代・小林茂人. RAと血管炎. *Medicina*, 2001, 38 (3);410-414.

2. 学会発表

- 1) Akimoto K, Kobayashi S, Kawano T, Bando H, Tamura N, Tanaka M, Osawa T, Hashimoto H. Antiphospholipid antibodies and risk factors in patients with systemic lupus erythematosus -multivariate anelysis. The 4th Korea-Japan Combined Meeting of Rheumatology. March 25th, 2001 Hongo, Tokyo.
- 2) Shigeto Kobayashi, Naoto Tamura, Makoto Ikeda, Tetsuro Yano, Yoshifuji Matsumoto, Hiroshi Hashimoto. Clinical and epidemiologi-

cal analysis of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in Japan in 1997.: the first government supported nationwide survey. ACR 65th Annual Scientific meeting, San Francisco, 2001

- 3) Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Yosida M, Nakabayashi K, Hashimoto H.

Clinical and epidemiological analysis of the patients with ANCA-associated vasculitis from a nationwide survey. 第45回日本リウマチ学会総会・学術集会, 4月, 東京, 2001

- 4) 井上恵美, 岡崎宇宏, 戸叶嘉明, 小林茂人, 橋本博史. 赤芽球癆を合併したSLEの一例, 第11回膠原病リウマチ懇談会 平成13年6月2日

5) 藤井猛土, 岡崎宇宏, 深沢徹, 田中光彦, 戸叶嘉明, 小林茂人, 高崎芳成, 橋本博史 血小板減少, ネフローゼ症候群を呈した Castleman病を合併したシェーグレン症候群の剖検例, 第494回日本内科学会関東地方会 平成13年10月13日

- 6) 河本敏雄, 藤井猛土, 深沢徹, 戸叶嘉明, 小林茂人, 橋本博史.

赤芽球癆(PRCA)を認めたSLEの一症例, 第12回日本リウマチ学会関東地方会 H13年12月8日

- 7) 駿河幸男, 金田和彦, 田村直人, 戸叶嘉明, 小林茂人, 高崎芳成, 橋本博史, 坂本直人, 小林修, 佐藤信紘. 関節炎症状が先行し, 経過中にCrohn病が発症した Sjogren症候群の一例, 日本内科学会関東地方会 490回, 2001, 17.

8) 金井美紀, 小林茂人, 竹内健, 戸叶嘉明, 津田裕士, 高崎芳成, 橋本博史. 慢性関節リウマチの治療:DMARDsの追加療法・併用療法 抗リウマチ剤(DMARDs)の併用療法の副作用頻度の検討.: 誌 28(1), 65, 2001 リウマチ 2001. 41(2);274.

- 9) 金井美紀, 小林茂人, 竹内 健, 戸叶嘉明, 津田裕士, 高崎芳成, 橋本博史. 抗

リウマチ剤(DMARDs)の併用療法の副作用頻度の報告. 第45回日本リウマチ学会総会・学会、4月、東京、2001

10) 木村 桂、近藤伊都子、梁 広石、田村直人、加藤和則、小林茂人、津田裕士、橋本博史. SLEのsCD154の検討, 第29回日本臨床免疫学会総会, 大阪、平成13年.

11) 小林茂人. 全国膠原病友の会の求めるよりよい医療; 医師かわのコメント. 都民公開講座: リウマチ・膠原病のよりよい医療を目指して、平成13年5月16日 京王プラザホテル エミネンスホール

12) 栗山磨紀代、田村直人、池田 真、小林茂人、梁 広石、津田裕士、橋本博史. 全身性エリテマトーデス患者末梢血T細胞におけるCD154発現異常についての解析、リウマチ 41(2):461,2001

13) 田村直人、加藤和則、小林茂人、木村 桂、梁 広石、津田裕士、橋本博史、血漿交換療法と細胞療法 全身性エリテマトーデス患者における血漿中sCD154値の検討 病因的および血漿交換療法の試み リウマチ 41(2):308,2001.

14) 細川理恵、清水公也、本間啓蔵、上野博史、小林茂人. 再発性多発軟骨炎、神奈川会誌 28(1), 65,2001

15) 田村直人、小林茂人、栗山磨紀代、橋本博史、加藤和則、Kipps Thomas J. 血管炎を伴った慢性関節リウマチの可溶性CD154の意義、内科会誌 90:174,2001

著 書

1) 小林茂人、海老塚岳彦. 顕微鏡的多発血管炎、血管炎、長澤俊彦監修、橋本博史編集、朝倉書店、東京、228-234,2001.

2) 小林茂人. 乾癬性関節炎. 今日の治療指針 2001年度. 多賀須幸男、尾形悦郎、山口徹、北原光夫総編集、医学書院、東京、633-634、2001.

3) 田村直人、小林茂人. 抗リン脂質抗体症

候群、わかりやすい内科学、井村裕夫、文光堂、東京、353-356,2002.

4) 小林茂人、側頭動脈炎 (巨細胞性血管炎)、難病の診断と治療指針、疾病対策研究会 編集、六法出版社、東京、47-54,2001

5) 小林茂人、抗リン脂質抗体症候群、難病の診断と治療指針、疾病対策研究会 編集、六法出版社、東京、55-65,2001

6) 田嶋美智子、小林茂人、リウマトイド因子、臨床検査診断マニュアル. 古澤新平、金山正明、橋本博史 編集、永井書店 324-326, 2001

7) 池田 真、小林茂人、抗リウマチ薬副作用モニター. 抗リウマチ薬 使用マニュアル、医薬ジャーナル社 西岡久寿樹、中村洋編 176,2001

8) 栗山磨紀代、小林茂人、強直性脊椎骨増殖症、リウマチナビゲーター. 中村耕三、山本一彦、原まさ子 編集、メディカルレビュー社、168-169,2001

9) 小林茂人、田村直人、HLA-B27関連脊椎関節炎、Expert 膠原病・リウマチ、住田孝之編集 診断と治療社 346-357,2001

C. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

内在性レトロウイルス周辺ゲノム転写活性化領域マッピングの臨床応用に関する研究

沢田 哲治（東京大学医学部アレルギーリウマチ内科）

研究要旨

内在性レトロウイルス（HERV）はゲノム上に散在しており、遺伝的マーカーとしての有用性のみならず、免疫複合体形成や自身のプロモーター活性による周辺遺伝子の活性化等により、自己免疫疾患の病因・病態形成に関与する可能性がある。一方、CpG島におけるシトシン残基の脱メチル化は遺伝子の転写活性と関連することが知られている。今回、HERV周辺のゲノムDNAメチル化プロファイルのSuppression PCR法による解析を試みた。メチル化感受性酵素HpaIIで完全に消化したDNA断片にアダプターを付与し、アダプター内のプライマーとHERVに普遍的な蛍光標識プライマー（U5領域、U3領域）を用いてsuppression PCRを行い、HERV配列を含むHpaIIフラグメントの増幅を行った。比較のため、同一の塩基配列を認識するメチル化非感受性酵素MspIのフラグメントも増幅し、フラグメント長を自動シーケンサーで解析した。異なる症例から採取した好中球とリンパ節組織のパターンを比較したところ、MspIフラグメントはほぼ同一であり、症例間でMspI/HpaIIによる遺伝多型は検出されなかった。一方、HpaIIフラグメントのパターンは両者で異なっており、ゲノムDNAのメチル化（Epigenetic factor）の相違を反映するものと考えられた。Suppression PCRは簡便であり、今後、多くの自己免疫疾患症例を対象にしたHERV周辺ゲノムDNAメチル化パターンの検出に有用であると考えられる。

A. 研究目的

近年SNPなど大規模ゲノム研究が進められる過程で、集中的に解析すべきゲノム領域を設定することの必要性が認識されつつある。CpG islandsにおけるシトシンの脱メチル化は遺伝子の転写活性化と関連するが、自己免疫疾患におけるゲノムDNAのメチル化パターンの詳細は明らかにされていない。本研究の目的は、慢性関節リウマチ（RA）の病因・病態と関連する脱メチル化領域を内在性レトロウイルス（HERV）を指標として同定し、RAに特異的な転写活性化領域を明らかにし、RAのSNP研究における疾患感受性や薬剤反応性の候補遺伝子に関する基礎情報を提供することにある。

B. 研究方法

患者ゲノムDNAをメチル化感受性制限酵素（HpaII）で切断した断片にアダプターを付与し、アダプタープライマーとHERVのLTR（Long terminal repeat : U5・U3）領域に設定した普遍プライマー（蛍光標識）を用いたSuppression PCRにより、HERV配列を含むHpaIIフラグメントの増幅を行った。得られたHpaIIフラグメントを自動シーケンサーを用いて展開し、Gene Scanにて解析することにより、HERV周辺遺伝子のメチル化パターンを検討した。HpaII認識部位における遺伝的多型の有無を同定するために、メチル化非感受性制限酵素であるMspIのフラグメントも解析し、比較検討した。

C. 研究結果

アダプタープライマーやHERV 普遍プライマー単独ではPCRによる増幅はなく、両プライマーの共存下でのみフラグメントの増幅があり、Suppression PCRの至適条件設定が可能であった。次に予備実験として、異なる症例から採取した好中球とリンパ節組織の展開パターンを比較したところ、メチル化非感受性制限酵素MspIによるフラグメントは両者でほぼ同一であり、今回検討したサンプル間ではMspI/HpaIIによる遺伝的多型(SNPによるgenetic difference)は検出されなかった。しかし、HpaIIフラグメントの展開パターンは両者で大きく異なっていた。これは組織の違いによる、HERV 周辺ゲノムDNAのメチル化パターンの相違を反映するものと考えられる(Epigenetic difference)。RAに関する予備実験として、同一RA症例の末梢血と関節液とでHpaIIフラグメントのパターンを比較したところ、末梢血と関節液に共通のフラグメントの他に各々に特徴的なHpaIIフラグメントの出現を認めた。また、抗TNF- α 療法が奏功する前後でのRA患者末梢血のHpaIIフラグメントの解析により、抗TNF- α 療法により消失するHpaIIフラグメントや誘導されるフラグメントが検出された。

D. 考察

SNPなど大規模ゲノム研究による網羅的スクリーニングのみでは、RAの発症や薬剤感受性に関与する病因遺伝子を直接同定することは困難であり、スクリーニングで得られる候補遺伝子周辺の詳細なマッピングが更に必要となる。その際、スクリーニングで得られる候補遺伝子がある程度絞り込む必要がある。現状では、DNAアレイやSAGEを用いてmRNAレベルで滑膜や免疫担当細胞で多く発現する

遺伝子群が選択されている。本研究ではRAゲノム特異的脱メチル化領域をRAの病因遺伝子候補として着目し、研究を進めている。今後RAに特異的なフラグメント、あるいは抗TNF製剤をはじめとする治療によって変化するフラグメントの塩基配列を決定し、RAと関連するHERV及びその周辺遺伝子の同定を行う予定である。RA特異的なこれらの脱メチル化領域はRAにおけるゲノムの転写活性化領域に位置する可能性があり、RAの病因や病態解明での有用性のみならず、RAのSNP研究において集中的に解析すべきゲノム領域の選択にも有用であると考えられる。

E. 結論

Suppression PCRによりHERV 周辺ゲノムのメチレーションを解析することが可能であり、RAの病因・病態解明や薬剤反応性の研究、SNP研究に応用可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

健康危険情報に関して、特記すべき事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada R, Tanaka T, Unoki M, Nagai T, Sawada T, Ohnishi Y, Tsunoda T, Yukioka M, Maeda A, Suzuki K, Tateishi H, Ochi T, Nakamura Y, Yamamoto K. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *Am J Hum Genet.* 68 (3) 674-685, 2001.

2. 学会発表

沢田哲治、山本一彦、土肥 眞、田中良一：
免疫担当細胞を用いた免疫疾患特異的な
転写活性化領域マッピングの試み 特定
領域研究C「ゲノム」4領域 2001年度
合同班会議 Page 135 (ゲノム医科学 公
募研究)

CX3CL1/CX3CR1相互作用による慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織へのT細胞浸潤に関する研究

南木敏宏（東京医科歯科大学 生体応答調節学）

研究要旨

慢性関節リウマチ(RA)の滑膜組織へのT細胞浸潤に關与するケモカイン・ケモカインレセプターを解析した。CX3CL1/CX3CR1相互作用が、RA滑膜組織へのCX3CR1陽性T細胞浸潤に關与し、その浸潤したT細胞はRAの病態形成に關わっていることが示唆された。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の滑膜組織には著明な炎症細胞浸潤がみられ、その炎症細胞浸潤にはケモカイン・ケモカインレセプター相互作用が深く關与していると考えられている。しかしながら、どのケモカイン・ケモカインレセプターがRAの病態形成に重要であるかについては不明な点が多い。RAに關与するケモカイン・ケモカインレセプターを解明し、そのケモカイン・ケモカインレセプターとRAに対する治療との關連を解析することにより、治療薬の選定、新規治療薬の開発につながることを期待される。

今回、RA滑膜へのT細胞浸潤におけるCX3CL1 (fractalkine)/ CX3C chemokine receptor-1 (CX3CR1)相互作用の重要性について検討した。

B. 研究方法

RA患者の末梢血CD4, CD8 T細胞上のCX3CR1の発現頻度をフローサイトメ-

ターで解析し、健常者と比較した。また、CX3CR1の発現とT細胞の分化段階との關連が指摘されているCD27, CD28の発現との關連を検討した。末梢血CX3CR1陽性T細胞のサイトカイン(IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α)の産生能をPMA+ionomycin刺激後に解析し、また細胞障害性分子(granzyme A, perforin)の発現をフローサイトメーターにて解析した。RA滑膜組織のT細胞におけるCX3CR1の発現、RA滑膜組織でのCX3CL1の発現を免疫組織染色にて解析した。また、RA滑膜線維芽細胞様滑膜細胞からのCX3CL1の発現をELISAにて解析した。細胞遊走能は、ECV304をコートしたtranswellを用いてmigration assayを行い、遊走した細胞は、フローサイトメーターにて細胞数をカウントした。

滑膜組織、末梢血等の臨床検体は、研究目的などを説明の上、患者より了承を得て、使用した。また、本研究は東京医科歯科大学倫理審査委員会にて承認されている。

C. 研究結果

末梢血 T細胞のCX3CR1の発現頻度を、RA患者と健常者と比較したところ、CD4、CD8 T細胞ともに、RA患者でその発現頻度は上昇していた(図1)。しかしながら、抗CD3抗体またはPMAで末梢血 T細胞を刺激すると、CX3CR1の発現は消失した。

大部分の末梢血 CX3CR1 陽性 T細胞では、CD27、CD28は陰性であった。末梢血 CX3CR1陰性、陽性 T細胞に分離後、PMA、ionomycinで刺激し、細胞内サイトカイン産生を解析したところ、CD4 T細胞では、CX3CR1陽性 T細胞で、IFN- γ 、TNF- α の産生頻度が上昇し、IL-2の産生頻度は低下、IL-4は有意差がなかった。また、CD8 T細胞では、CX3CR1陽性 T細胞で、IFN- γ の産生頻度が上昇し、IL-2、IL-4の産生頻度が低下していた(図2)。また、末梢血 CX3CR1陽性 T細胞では、granzyme A、perforinを発現していた(図3)。

免疫組織染色にて、RA滑膜組織の血管周囲のCD3陽性細胞にてCX3CR1が陽性であった。また、変形性関節症(OA)患者の滑膜では、CX3CR1の発現は軽微であった。RA滑膜組織において、血管内皮細胞、線維芽細胞様滑膜細胞にてCX3CL1の発現がみられた。OA滑膜では、CX3CL1の発現はほとんどみられなかった。

RA滑膜のT細胞表面のCX3CR1の発現をフローサイトメーターで解析したところ、その発現は軽微であり、末梢血T細胞と比較し優位に低下していた。

末梢血T細胞における、CX3CL1による遊走能を解析した。可溶性CX3CL1で、末梢血CD4、CD8 T細胞は遊走された。しかし、滑膜T細胞では遊走がみられなかった。また、膜結合型CX3CL1は、RANTESによる末梢血T細胞の遊走を促進した。

D. 考察

以上の結果より、末梢血CX3CR1陽性T細胞がCX3CL1との相互作用によりRA滑膜に浸潤していると考えられる。

Th1型T細胞がRAの病態形成に関与していると考えられているが、末梢血CX3CR1陽性T細胞は主にTh1またはTc1型のサイトカインを産生し、また細胞障害性分子を発現している。RA患者の末梢血で増加しているCX3CR1陽性CD4、CD8 T細胞は、RA滑膜組織に浸潤し、IFN- γ 、TNF- α を産生し、また、細胞障害性分子を産生している可能性がある。そのIFN- γ 、TNF- α はRA滑膜組織の血管内皮細胞を刺激し、血管内皮上にCX3CL1の産生を誘導し、それがCX3CR1陽性T細胞の浸潤を誘導していることが疑われる。また、同様にIFN- γ 、TNF- α はRA滑膜線維芽細胞様滑膜細胞からのCX3CL1の発現も誘導している。これらのことより、CX3CL1/CX3CR1相互作用は、RA滑膜へのTh1型T細胞の遊走・集簇に深く関与していると考えられる。

滑膜組織のT細胞は、細胞表面にCX3CR1が発現していないが、組織染色では血管周囲のT細胞にCX3CR1の発現がみられる。末梢T細胞は刺激後にCX3CR1の発現が低下することより、滑膜組織に浸潤したT細胞は、抗原刺激を受け細胞表面のCX3CR1の発現が低下していると考えられる。

CD27、CD28陰性T細胞は、それぞれRA滑膜、末梢血で増加していることが報告されており、それらの細胞はCX3CR1陽性であることより、本研究は以前の研究結果と合致する結果である。また、末梢血でCX3CR1陽性T細胞が産生しているgranzyme Aを産生するT細胞の頻度は末梢血と比べRA滑膜組織で増加していた。これらのことよりも、CX3CL1/CX3CR1相

相互作用がRA滑膜細胞へのT細胞浸潤に重要であると考えられる。

E. 結論

RA滑膜に浸潤するCX3CR1陽性T細胞は、CX3CL1/CX3CR1相互作用により遊走されたものであり、浸潤したT細胞はRAの病態形成に深く関与していると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

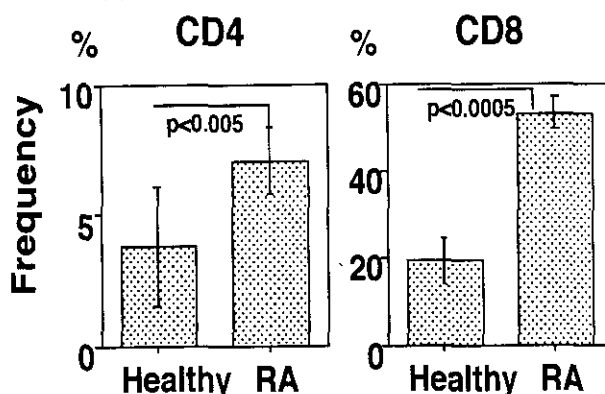
Toshihiro Nanki, Kenji Nagasaka, Kenji Hayashida, Yuji Saita, Nobuyuki Miyasaka. Chemokines Regulate IL-6 and IL-8 Production by Fibroblast-like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* 167(9): 5381-5385, 2001.

2. 学会発表

* 南木敏宏、今井俊夫、長坂憲治、野々村美紀、谷口顕、宮坂信之。Th1またはTc1型サイトカイン、およびgranzyme Aを産生する末梢血CX3CR1陽性T細胞は慢性関節リウマチ滑膜組織に浸潤している。第31回日本免疫学会総会。2001。

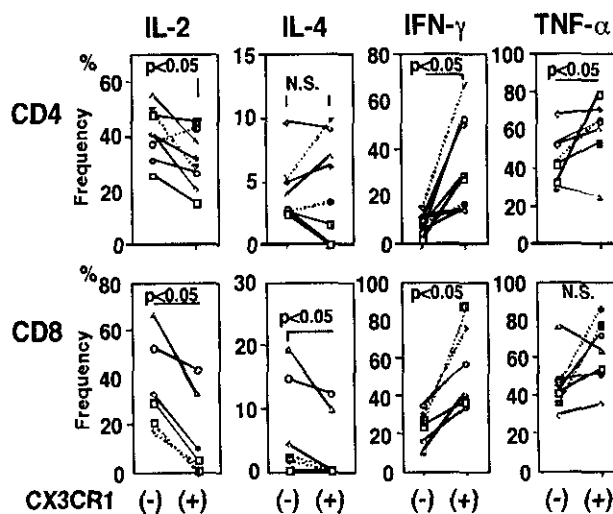
* Toshihiro Nanki, Kenji Nagasaka, Kenji Hayashida, Yuji Saita, Nobuyuki Miyasaka. Chemokines Regulate IL-6 and IL-8 Production by Fibroblast-like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. 第65回アメリカリウマチ学会。2001。

図1 末梢血T細胞におけるCX3CR1の発現頻度



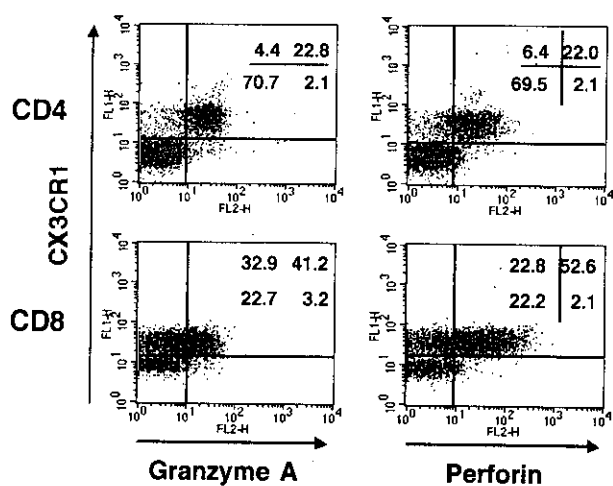
末梢CD4, CD8 T細胞におけるCX3CR1の発現頻度をFACSで解析し、健常者とRA患者で比較した。縦軸は、CX3CR1の発現頻度。

図2 末梢血CX3CR1陽性T細胞のサイトカイン産生能



末梢血CX3CR1陰性、陽性T細胞に分離後、PMA+ionomycinで刺激し、IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α の産生をFACSで解析した。上段はCD4, 下段はCD8 T細胞。縦軸は、各種サイトカインの発現頻度。

図3 末梢血 CX3CR1 陽性 T 細胞における granzyme A, perforin 産生



末梢血 CX3CR1 陽性 T 細胞における granzyme A, perforin 産生を FACS で解析した。上段は CD4, 下段は CD8 T 細胞。

滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスの検討に関する研究

川上 純（長崎大学医学部内科学第一講座助手）

研究要旨

滑膜細胞のアポトーシス制御機構として tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) の関与を検討した。滑膜細胞には TRAIL のレセプターである death receptor5 (DR5) が発現し TRAIL 添加によりアポトーシスが誘導された。滑膜細胞は同時に TRAIL の可溶性デコイレセプターの osteoprotegerin (OPG) を産生し、この OPG は滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスの内因性阻害物質と考えられた。滑膜細胞の成長因子とされる IL-1 β は滑膜細胞の OPG 産生を顕著に増強することでこれら細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスを抑制し、IL-1 β の慢性関節リウマチ (RA) 滑膜組織増殖作用の一つとして、OPG 産生増強を介する滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスの抑制作用が示唆された。

A. 研究目的

破骨細胞形成抑制因子 (OPG) は receptor activator nuclear factor κ B ligand (RANKL) のデコイレセプターとして機能し、単球系細胞からの破骨細胞形成などの RANK を介するシグナリングを抑制するが免疫系への作用については不明な点が多い。それに加え OPG は TRAIL のデコイレセプターとしても作用し、collagen-induced arthritis においては TRAIL/death receptor (DR) シグナルを抑制することで関節炎が増悪することも報告されている。本研究では RA 滑膜増殖における OPG の関与、特に滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスへの抑制効果について検討した。

B. 研究方法

実験に使用したサンプルはすべてイン

フォームドコンセント下に採取した。培養 RA 滑膜細胞 (滑膜線維芽細胞) は整形外科手術時に得られた滑膜組織を細切して得た。RA 関節液および滑膜細胞培養上清中の OPG および IL-1 β 蛋白濃度は ELISA 法で測定した。培養滑膜細胞の膜型 TRAIL レセプターの発現は DR4、DR5 (機能性レセプター)、decoy receptor 1 (DcR1) および DcR2 (デコイレセプター) をウエスタンブロットにて評価した。培養滑膜細胞の増殖能は ^3H -thymidine の取り込みで検討し、これら細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスは soluble TRAIL (sTRAIL) 添加により誘導し、 ^{51}Cr release assay と Hoechst 33258 dye staining を用いて評価した。

C. 研究結果

RA 関節液中には全例で OPG が検出さ

れ、この濃度はRA関節液中のIL-1 β 濃度と正の相関を示した。OPGは滑膜細胞培養上清中にも検出され、その蛋白濃度はIL-1 β 添加により顕著に増強した。次にOPGの滑膜細胞への作用を検討した。OPGは滑膜細胞の増殖能へは影響しなかったため、OPGの滑膜細胞TRAIL誘導性アポトーシスへの効果を検討した。滑膜細胞にはDR5が発現し、sTRAIL添加により滑膜細胞にはアポトーシスが誘導され、このTRAIL誘導性アポトーシスはOPGの同時添加でほぼ抑制された。sTRAILによるアポトーシス誘導効果は滑膜細胞の培養上清を置換しない場合には抑制され、特にIL-1 β 刺激滑膜細胞で培養上清を置換しない場合にはsTRAIL誘導性アポトーシスは著明に抑制された。IL-1 β 刺激は滑膜細胞のDR5発現には影響せず、また、培養上清を置換した場合のIL-1 β 刺激滑膜細胞のsTRAIL誘導性アポトーシス感受性は無刺激滑膜細胞のそれと差異はなかった。以上よりIL-1 β は滑膜細胞のTRAIL誘導性アポトーシス感受性自体には影響しないが、滑膜細胞からのOPG産生増強を介しTRAIL誘導性アポトーシスを抑制することが考えられた。ウエスタンブロットによる検討ではDR5以外の機能性TRAILレセプターであるDR4、およびTRAILの膜型デコイレセプターであるDcR1とDcR2の発現は検出されなかった。

D. 考察

DR5はRA滑膜細胞に発現する機能性TRAILレセプターであること、また、OPGは滑膜細胞TRAIL誘導性アポトーシスの主要なデコイレセプターとして機能しRA滑膜細胞の増殖を正に制御していることが示唆された。IL-1 β はRA滑膜増殖を惹起する代表的なサイトカインだが、その一因としてOPG産生増強を介するこれら

細胞のTRAIL誘導性アポトーシスへの抑制効果が考えられた。

E. 結論

OPGはRANKLの作用を中和してRAの骨破壊を抑制すること（破骨細胞の機能抑制）が強く示唆されるが滑膜細胞にはTRAILへの中和作用を介しこれら細胞の増殖を促進すると考えられ、RAの滑膜増殖および骨・軟骨傷害へのOPGの関与は多様であると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawakami A. & Eguchi K. (筆頭著者): Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. *Med Electorn Microsc*, in press.
2. Yamasaki S., Kawakami A. (他6名、3番目): Functional alterations of rheumatoid fibroblast-like synovial cells through activation of PPAR γ -mediated signaling pathway. *Clin Exp Immunol*, in press.
3. Kamachi M., Kawakami A. (他11名、2番目): Regulation of apoptotic cell death by cytokines in a human salivary gland cell line: Distinct and synergistic mechanisms in apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Lab Clin Med* 139: 13-19, 2002.
4. Yamasaki S., Kawakami A. (他13名、2番目): Importance of NF- κ B in rheumatoid synovial tissues: in situ NF- κ B expression and in vitro study using cultured synovial cells. *Ann Rheum Dis* 60: 678-684, 2001.
5. Kawakami A. & Eguchi K. (筆頭著者): Role of HTLV-I infection in the pathogenesis of

- Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* 11: 87-90, 2001.
6. Urayama S., Kawakami A. (他10名、2番目): New disease-modifying antirheumatic drug 2 acetylthiomethyl-4-(4-methylphenyl)-4-oxobutanoic acid (KE-298) selectively augments activation-induced T cell death. *J Lab Clin Med* 138: 11-17, 2001.
7. Sera N., Kawakami A. (他13名、2番目): Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 124: 197-207, 2001.
8. Hashimoto Y., Kawakami A. (他6名、3番目): Novel immunosuppressive effect of FK506 by augmentation of T cell apoptosis. *Clin Exp Immunol* 125: 19-24, 2001.
9. Shibatomi K., Kawakami A. (他5名、6番目): A novel role for interleukin-18 in human natural killer cell death: high serum levels and low natural killer cell numbers in patients with systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 44: 884-892, 2001.
10. Migita K., Kawakami A. (他5名、6番目): Impaired degradation of serum amyloid A (SAA) protein by cytokine-stimulated monocytes. *Clin Exp Immunol* 123: 408-411, 2001.
11. Honda S., Kawakami A. (他13名、13番目): Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol* 126: 131-136, 2001.
12. Hirai Y., Kawakami A. (他13名、8番目): Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci* 68: 913-920, 2001.
13. Migita K., Kawakami A. (他6名、6番目): Nitric oxide protects cultured rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis by inhibiting caspase-3. *Immunology* 103: 362-367, 2001.
14. Migita K., Kawakami A. (他7名、6番目): Regulation of rheumatoid synovial cell proliferation by endogenous p53 induction. *Clin Exp Immunol* 126: 334-338, 2001.
15. Takeda Y., Kawakami A. (他9名、4番目): Geranylgeraniol, an intermediate product in mevalonate pathway, induces apoptotic cell death in human hepatoma cells: death receptor-independent activation of caspase-8 with down-regulation of Bcl-xL expression. *Jpn J Cancer Res* 92: 918-925, 2001.
16. Hamasaki S., Kawakami A. (他7名、4番目): Resistance of CD4-positive T lymphocytes to etoposide-induced apoptosis mediated by upregulation of Bcl-xL expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 117: 143-148, 2001.
17. 川上 純、江口勝美 (筆頭著者、他4名): アポトーシス誘導療法、内科89: 309-312, 2002.
18. 川上 純、江口勝美 (筆頭著者): カスパアーゼカスケード、炎症と免疫10: 106-107, 2002.
19. 宮下賜一郎、川上 純 (2番目、他2名): OPG/OPGリガンド、臨床免疫37: 191-196, 2002.
20. 川上 純、江口勝美 (他3名、筆頭著者) NF- κ Bと炎症、炎症と免疫9: 77-84, 2001.
21. 川上 純、江口勝美 (筆頭著者) HTLV-I感染によるシェーグレン症候群・慢性関節リウマチの発症機序、臨床リウマチ13: 11-17, 2001.
22. 川上 純、江口勝美 (筆頭著者): NF- κ B活性制御における炎症の治療、臨床免疫36: 890-894, 2001.
23. 川上 純、江口勝美 (筆頭著者) A20欠損マウスにおけるTNF誘導性NF- κ B発現およびアポトーシス異常、臨床免疫36: 802-805, 2001.
24. 川上 純、江口勝美 (筆頭著者) T細胞特異的NF- κ B阻害薬によるコラーゲン誘