

いる。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1.論文発表

1、Tonami, H., Higashi, K., Matoba, M., Yokota, H., Yamamoto, I., Sugai, S. : A comparative study between MR sialography and salivary gland scintigraphy in the diagnosis of Sjogren syndrome. J Comput Assist Tomogr. 25(2):262-8. 2001

2、Sugai, S. : Systemic manifestations in Sjogren's syndrome. Intern Med. 40(4):269-70. 2001

3、Katano, K., Kawano, M., Koni, I., Sugai, S., Muro, Y. : Clinical and laboratory features of antcentromere antibody positive primary Sjogren's syndrome. J Rheumatol. 28(10):2238-44. 2001

2.学会発表

1、小川法良、下山久美子、岡田 順、唐澤博美、金 昌基、川端 浩、正木康史、和野雅治、菅井 進。シェーグレン症候群唾液腺培養上皮細胞を用いたサイトカイン、ケモカインの検討。第45回日本リウマチ学会総会 東京、2001年。リウマチ 41:2, 443.

2、高田由紀子、小川法良、菅井 進。シェーグレン症候群唾液腺培養上皮細胞における組織障害関連分子の発現。第31回日本免疫学会総会 大阪、2001年12月。日本免疫学会総会学術集会記録 31:65.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

Figure 1

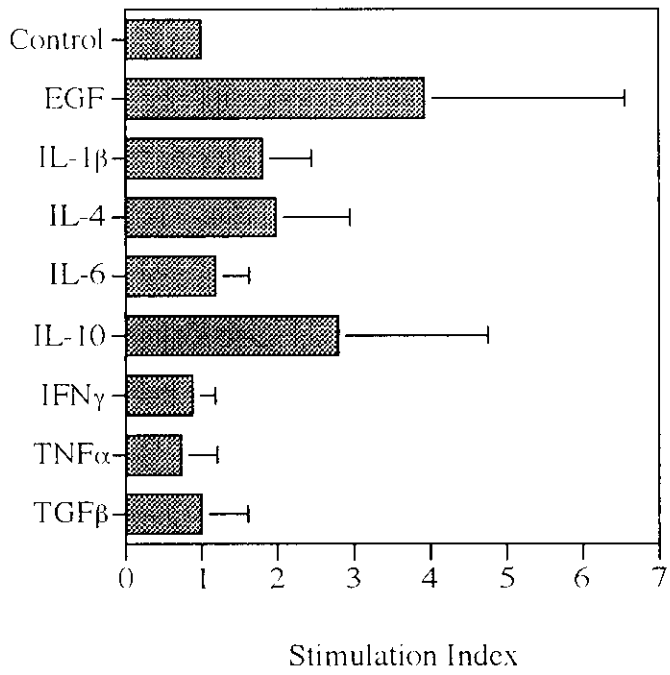


Figure 2

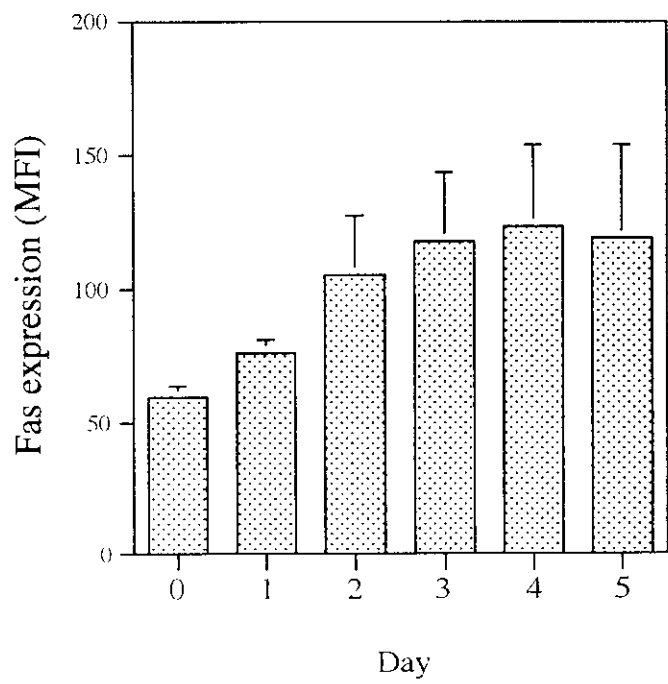


Figure 3

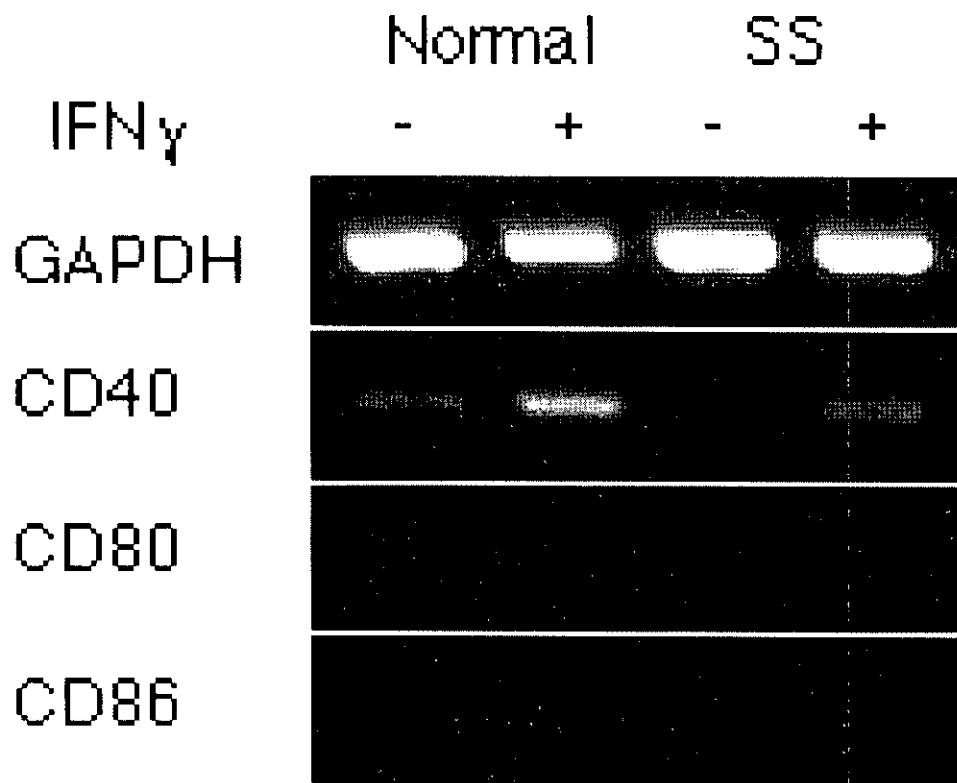
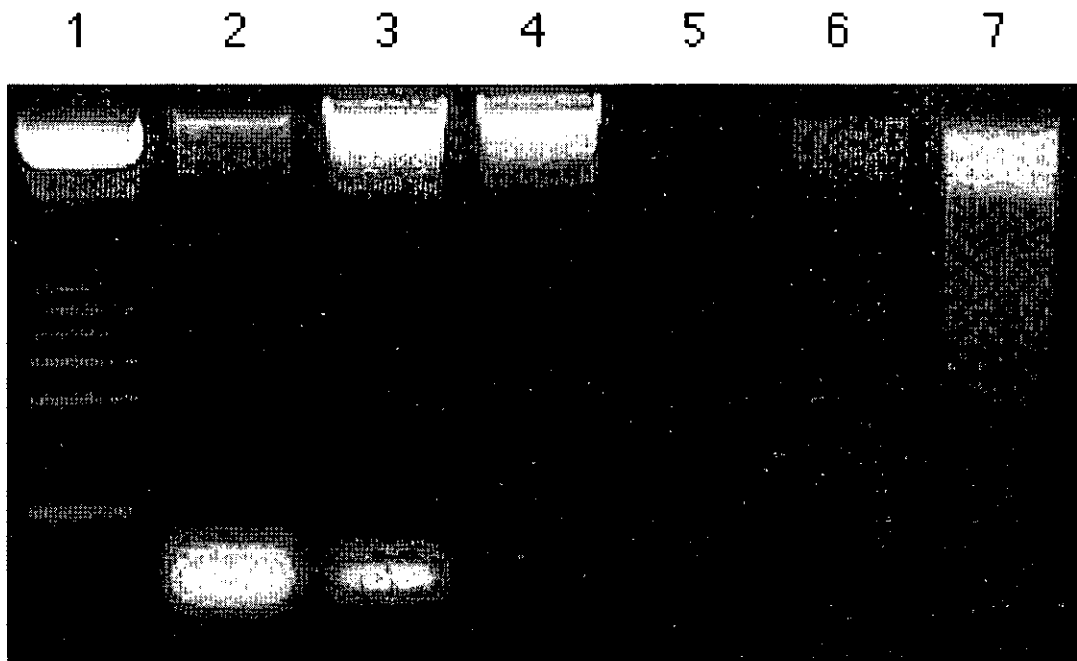
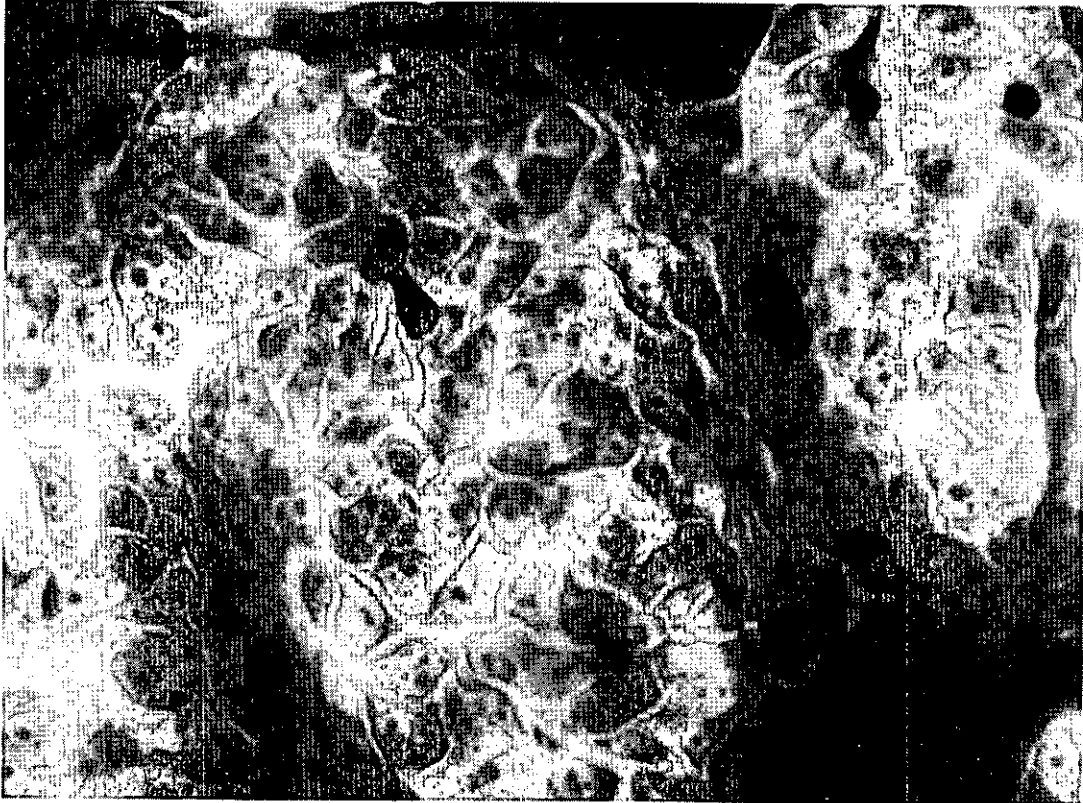


Figure 4



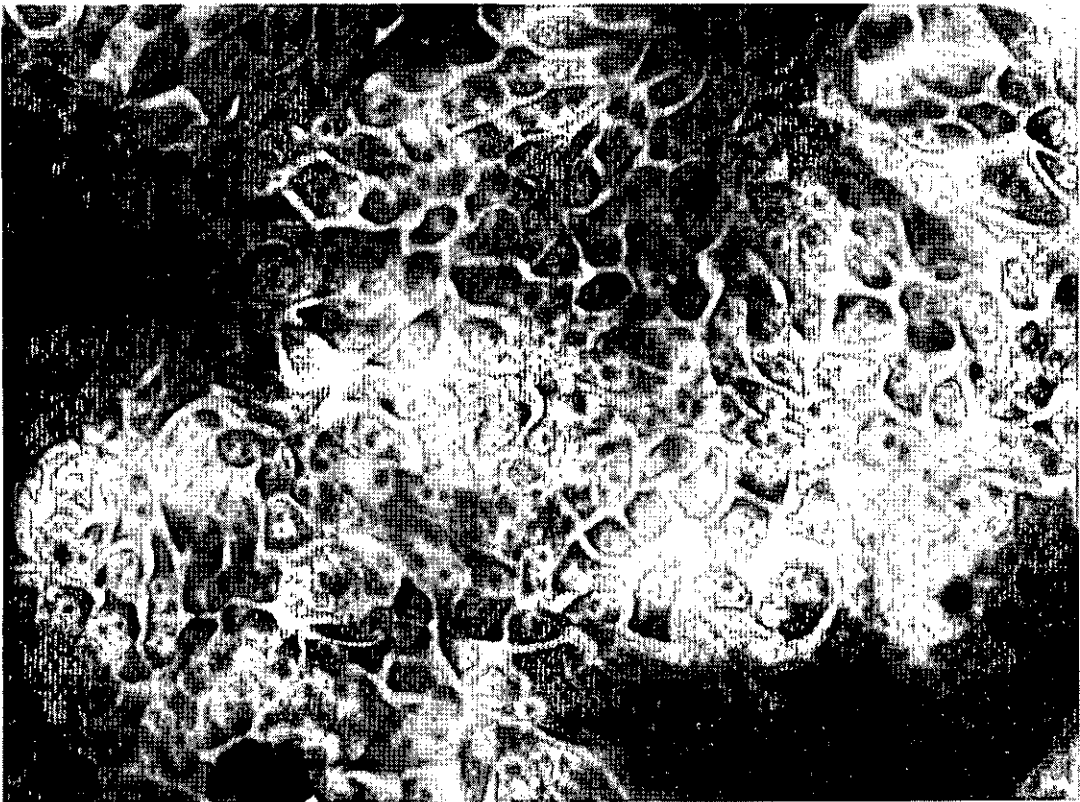
1. MW marker
2. Media Control
3. Anti- CD40 (+)
4. Anti- CD40 (+) Anti- Fas (+)
5. IFN γ (+) Anti- Fas (+)
6. IFN γ (+) Anti- CD40 (+) Anti- Fas (+)
7. IFN γ (+) Anti- CD80 (+) Anti- Fas (+)

Figure 5 A



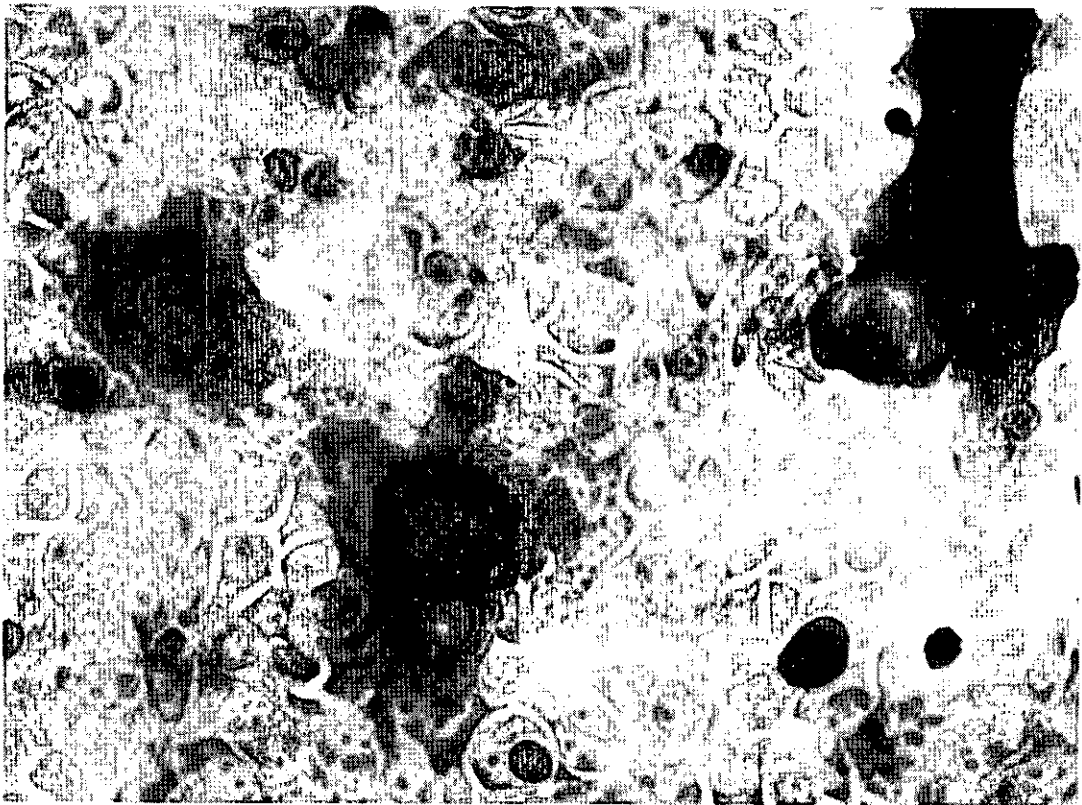
Control

Figure 5 B



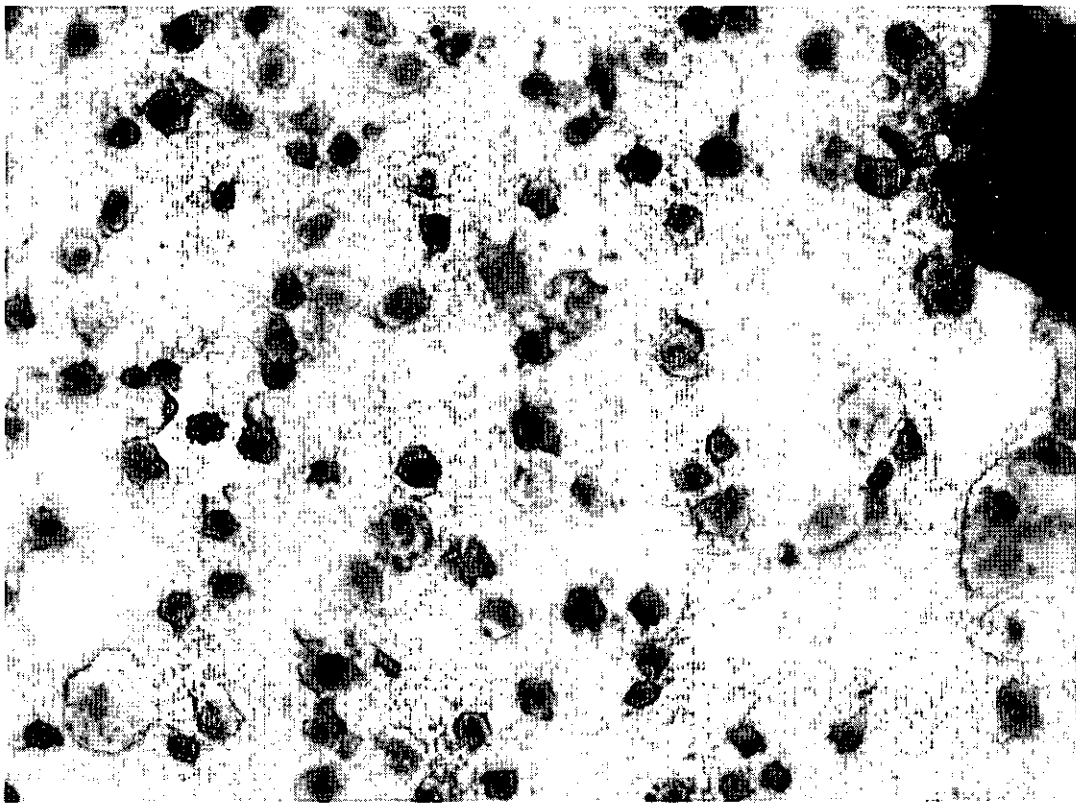
Anti-CD40

Figure 5 C



Anti-CD40+Anti-Fas

Figure 5 D



IFN γ +Anti-CD40+Anti-Fas

シェーグレン症候群の発症および進展機序に関する研究

江口勝美（長崎大学医学部内科学第一講座）

研究要旨

シェーグレン症候群（SS）の発症および進展機序について研究した。疫学的に HTLV-I は SS 発症に関与することが立証されているが、HTLV-I tax 遺伝子導入細胞を用いた検討ではこれら細胞は種々のアポトーシス刺激（細胞死受容体依存性および細胞死受容体非依存性のアポトーシス刺激）に抵抗性を示した。また、HTLV-I 関連脊髄症（HAM）患者は高率に SS を合併するが、HAM 患者末梢血 CD4+T 細胞自身はアポトーシス刺激には抵抗性を示すも、Fas 陽性細胞への細胞傷害性を強く保持していた。次に抗 HTLV-I 抗体陽性 SS および抗 HTLV-I 抗体陰性 SS 群間に差異が認められるか否かを検討した。生検小唾液腺組織のアポトーシス関連蛋白の発現（免疫組織染色）および IL-10 プロモーター領域の遺伝子多型（末梢血からの直接シークエンス法および RFLP 法）を検討したが、SS ではコントロール群に比べアポトーシス関連蛋白の強い発現および ACC haplotype の低頻度が認められたが、抗 HTLV-I 抗体の有無で分けた 2 群間では有意な差異は検出できなかった。以上より、HTLV-I 感染はアポトーシス関連蛋白発現およびサイトカインプロファイル（IL-10）を調節し SS の発症・進展のリスクファクターとなりうるものの、これら SS の発症機序には HTLV-I 感染以外の多くのファクターの存在が示唆された。

A.研究目的

SS の発症および進展にはウイルス感染の関与が示唆されている。私たちは HTLV-I が SS の病因ウイルスの一つであることを疫学的に証明した。SS の発症・進展機序の一つとして、アポトーシスの制御異常やサイトカインプロファイルの変化が考えられているが、今回 HTLV-I tax 遺伝子導入細胞、生検小唾液腺組織および末梢血由来ゲノム DNA の IL-10 プロモーター領域遺伝子多型を検討し、HTLV-I 感染と SS の相関について研究した。

B.研究方法

HTLV-I tax 遺伝子導入細胞としては JPX-9 細胞を用い（東北大学菅村教授より御供与）、ヒト由来の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、以下の実験に使用した。

1. JPX-9 細胞を用いた検討：JPX-9 細胞

に CdCl₂ を添加し tax を発現させ、その後、細胞死受容体アポトーシス刺激（TRAIL および抗 Fas 抗体）および細胞死受容体非依存性アポトーシス刺激（PDTC、エトポシドおよびスタウロスポリン）を加えアポトーシスを誘導し、tax 発現の有無でその程度が変化するかどうかを検討した。アポトーシス関連蛋白の発現はウエスタンブロットで評価した。

2. HAM 患者 CD4+T 細胞を用いた検討：HAM 患者末梢血より CD4+T 細胞を単離し、アポトーシスをエトポシドで誘導した。Fas 陽性細胞への傷害性は 51Cr release assay で、また、アポトーシス関連蛋白の発現はウエスタンブロットで評価した。

3. 生検小唾液腺組織を用いた検討：生検口唇小唾液腺組織切片を用い、種々のアポトーシス関連蛋白に対する抗体でこれらの組織学的発現を評価した。

4. IL-10 プロモーター領域遺伝子多型の検討：末梢血からゲノム DNA を抽出後、IL-10

プロモーター領域 (-1082A/G、-819C/T、-592A/C) 遺伝子多型を直接シークエンス法または RFLP 法で解析した。

C. 研究結果

1. JPX-9 細胞を用いた検討：tax の発現

(-) では JPX-9 細胞は TRAIL、抗 Fas 抗体、PDTC、エトポシドおよびスタウロスポリン添加により速やかにアポトーシスが惹起されたが、tax を発現させると JPX-9 細胞はこれらすべてのアポトーシス刺激に抵抗性を示した (図 1)。アポトーシス関連蛋白の発現では tax 発現により、JPX-9 細胞の Bcl-xL 発現が増大した。

2. HAM 患者 CD4+T 細胞を用いた検討：

健常人末梢血 CD4+T 細胞に比べ、HAM 患者末梢血 CD4+T 細胞はエトポシドで誘導されるアポトーシスに顕著な抵抗性を示す (図 2) と共に、Fas 陽性細胞への細胞傷害性は有意に増大していた。tax (+) JPX-9 細胞と同様に、HAM 患者末梢血 CD4+T 細胞の Bcl-xL の発現は健常人末梢血のそれより有意に増強していた。

3. 生検小唾液腺組織を用いた検討：腺房細胞および導管上皮細胞において、Fas、Fas ligand に加え、FADD および TRADD の発現は SS 症例で強く検出された。また、SS 症例で小唾液腺組織に浸潤する単核球には強い Bcl-xL の発現が認められたが、これらアポトーシス関連蛋白の発現は抗 HTLV-I 抗体陽性 SS および抗 HTLV-I 抗体陰性 SS 群間に差異はなかった。

4. IL-10 プロモーター領域遺伝子多型の検討：各 IL-10 プロモーター領域遺伝子多型の allele 頻度は SS 症例と健常人群で差異はなかったが、ACC haplotype (-1082A、-819C、-592C) の頻度は SS 症例で有意に低頻度であった (29% vs 18%、 $p=0.037$)。また、ACC carrier の頻度も SS 症例で低頻度であった (51% vs 33%、 $p=0.033$)。さらに、40 歳以下で発症した SS 症例は 40 歳以上で発症した患者よりさらに ACC haplotype が低頻度であった (4% vs 28%、 $p=0.012$)。抗 HTLV-I 抗体陽性 SS 群は抗 HTLV-I 抗体陰性 SS 群より ACC haplotype が低い傾向にあったが

有意差は認められなかった。

D. 考察

HTLV-I 感染により感染細胞には tax を介して抗アポトーシス作用がある Bcl-xL の発現が誘導され、種々のアポトーシス刺激への抵抗性が惹起されると考えられた。それに加え、これら感染 T 細胞の細胞傷害性 (Fas 依存性アポトーシス誘導能) も増強していた。SS 唾液腺組織において、浸潤リンパ球のアポトーシス抵抗性と腺房細胞および導管上皮細胞のアポトーシス感受性の亢進が SS の病態形成に重要とされるが、HTLV-I 感染はこれら病態を惹起し SS を発症させうると考えられた。抗炎症作用を持つ IL-10 のプロモーター領域遺伝子多型もコントロール群間と差異があり、これも SS 発症に関与することが示唆された。

E. 結論

以前の疫学的研究に加え、これら培養細胞、生検唾液腺組織および遺伝子多型を用いた検討により、HTLV-I 感染は SS の発症・進展へのリスクファクターであることが考えられる。しかしながら、これら患者サンプルを用いた検討において、抗 HTLV-I 抗体陽性 SS と抗 HTLV-I 抗体陰性 SS 群間で明確な差異は認められず、HTLV-I 以外の発症因子 (他のウイルスなど) も同様の機序で SS を発症させうることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki S, Kawakami A, Nakashima T, Nakamura H, Kamachi M, Honda S, Hirai Y, Hida A, Ida H, Migita K, Kawabe Y, Koji T, Furuichi I, Aoyagi T, Eguchi K. 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 (7): 678-684, 2001.
2. Migita K, Yamasaki S, Kita M, Ida H, Shibatomi K, Kawakami A, Aoyagi T, Eguchi

- K. Nitric oxide protects cultured rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis by inhibiting caspase-3. *Immunology* 103: 362-367, 2001.
3. Honda S, Migita K, Hirai Y, Origuchi T, Yamasaki S, Kamachi M, Shibatomi K, Fukuda T, Kita M, Hida A, Ida H, Aoyagi T, Kawakami A, Kawabe Y, Oizumi K, Eguchi K. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol* 126: 131-136, 2001.
 4. Migita K, Tanaka F, Yamasaki S, Shibatomi K, Ida H, Kawakami A, Aoyagi T, Kawabe Y, Eguchi K. Regulation of rheumatoid synoviocyte proliferation by endogenous p53 induction. *Clin Exp Immunol* 126: 334-338, 2001.
 5. Migita K, Eguchi K. FK506-mediated T-cell apoptosis induction. *Transplant P* 33: 2292-2293, 2001.
 6. Hashimoto Y, Matsuoka N, Kawakami A, Tsuboi M, Nakashima T, Eguchi K, Tomioka T, Kanematsu T. Novel immunosuppressive effect of FK506 by augmentation of T cell apoptosis. *Clin Exp Immunol* 125: 19-24, 2001.
 7. Hirai Y, Migita K, Honda S, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, Kamachi M, Kawakami A, Ida H, Kita M, Fukuda T, Shibatomi K, Kawabe Y, Aoyagi T, Eguchi K. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci* 68: 913-920, 2001.
 8. Migita K, Yamasaki S, Shibatomi K, Ida H, Kita M, Kawakami A, Eguchi K. Impaired degradation of serum amyloid A (SAA) protein by cytokine-stimulated monocytes. *Clin Exp Immunol* 123: 408-411, 2001.
 9. Shibatomi K, Ida H, Yamasaki S, Nakashima T, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Kawabe Y, Tsujihata M, Anderson P, Eguchi K. A novel role for interleukin-18 in human natural killer cell death. *Arthritis Rheum* 44 (4): 884-892, 2001.
 10. Migita K, Eguchi K. Induction of apoptosis: How do tacrolimus and ciclosporin compare? Mechanistic differences of cornerstone immunosuppressants 14-19, 2001.
 11. Kawakami A, Eguchi K. Role of HTLV-I infection in the pathogenesis of Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 11: 87-90, 2001.
 12. Nagayama Y, Kita-Furuyama M, Nakao K, Ando T, Eguchi K, Niwa M. A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing thyrotropin receptor. *J Immunol*, in press, 2002.
 13. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune disease. *Internal Med* 40 (4): 275-284, 2001.
 14. Urayama S, Kawakami A, Nakashima T, Yamasaki S, Hida A, Ida H, Kamachi M, Nakamura H, Origuchi T, Migita K, Kawabe Y, Eguchi K. 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.
 15. Sera N, Kawakami A, Nakashima T, Nakamura H, Imaizumi M, Koji T, Abe Y, Usa T, Tominaga T, Ejima E, Ashizawa K, Yokoyama N, Ishikawa N, Ito K, Eguchi K. Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 124: 197-207, 2001.
 16. Takeda Y, Nakao K, Nakata K, Kawakami A, Ida H, Ichikawa T, Shigeno S, Kajiya Y, Hamasaki K, Kato Y, Eguchi K. 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.
 17. Kamachi M, Kawakami A, Yamasaki S, Hida A, Nakashima T, Ida H, Furuyama M, Nakashima K, Shibatomi K, Miyashita T, Migita K, Eguchi K. 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.

18. Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, Migita K, Eguchi K. Functional change of rheumatoid fibroblast-like synovial cell through activation of PPAR γ -mediated signaling pathway. *Clin Exp Immunol*, in press, 2002.
 19. Kawakami A, Eguchi K. Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. *Med Electorn Microsc*, in press, 2002.
 20. 川上純, 山崎聡士, 宮下賜一郎, 飛田あゆみ, 江口勝美. NF- κ B と炎症. 炎症と免疫 9 (6): 77-84, 2001.
 21. 川上純, 江口勝美. T 細胞特異的 NF- κ B 阻害薬によるコラーゲン誘発関節炎発症阻止. *臨床免疫* 36 (3): 444-448, 2001.
 22. 川上純, 江口勝美. A20 欠損マウスにおける TNF 誘導 NF- κ B 発現およびアポトーシス異常. *臨床免疫* 36 (5): 802-805, 2001.
 23. 江口勝美. 炎症における HTLV-I 感染の役割. *血液・免疫・腫瘍* 6 (2): 61-71, 2001.
 24. 江口勝美. 自己免疫疾患におけるアポトーシス. *MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW* 46: 309-330, 2001.
 25. 川上純, 江口勝美. 血管内皮細胞. *臨床免疫* 35 (1): 69-74, 2001.
 26. 川上純, 江口勝美. 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 (1): 11-17, 2001.
 27. 右田清志, 江口勝美. RA 治療における新しい免疫抑制薬 (レフルノミド, シクロスポリン, タクロリムス). *Pharma Medica* 19 (7): 67-72, 2001.
2. 学会発表
1. 川上 純, 江口勝美. HTLV-I 感染によるシェーグレン症候群発症機序の検討. 第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p244, 2001.
 2. 川上 純, 山崎聡士, 宮下賜一郎, 飛田あゆみ, 柴富和貴, 喜多雅子, 井田弘明, 折口智樹, 右田清志, 江口勝美. HTLV-I Tax の抗アポトーシス作用の検討. 第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p385, 2001.
 3. 中島コト, 川上 純, 山崎聡士, 宮下賜一郎, 飛田あゆみ, 柴富和貴, 喜多雅子, 井田弘明, 折口智樹, 右田清志, 江口勝美. FADD および IAP ファミリー蛋白のシェーグレン症候群唾液腺組織での発現. 第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p478, 2001.
 4. 宮下賜一郎, 川上 純, 山崎聡士, 中島友紀, 井田弘明, 右田清志, 江口勝美. RA 滑膜炎における osteoprotegerin (OPG) の関与. 第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p427, 2001.
 5. 右田清志, 山崎聡士, 柴富和貴, 喜多雅子, 宮下賜一郎, 折口智樹, 川上 純, 河部庸次郎, 青柳孝彦, 江口勝美. NO 関連分子の RA 滑膜細胞 COX-2 発現に及ぼす影響. 第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p371, 2001.
 6. 川上 純, 山崎聡士, 宮下賜一郎, 飛田あゆみ, 柴富和貴, 喜多雅子, 井田弘明, 折口智樹, 右田清志, 江口勝美. スフィンゴ糖脂質 (GSL) 合成阻害剤による血管内皮細胞機能の調節. 第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p386, 2001.
 7. 井田弘明, 柴富和貴, 山崎聡士, 宮下賜一郎, 飛田あゆみ, 喜多雅子, 川上 純, 右田清志, 江口勝美. セリンプロテアーゼインヒビター (Serpin) PI-9 によるサイトカイン産生の制御: 慢性関節リウマチ (RA) 患者由来培養滑膜細胞の検討. 第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p427, 2001.
 8. 川上 純, 山崎聡士, 宮下賜一郎, 飛田あゆみ, 井田弘明, 折口智樹, 右田清志, 江口勝美. TGF- β 1 の滑膜細胞増殖およびアポトーシス抵抗性誘導の検討. 第 22 回日本炎症・再生医学会プログラム予稿集 p475, 2001.
 9. 宮下賜一郎, 川上 純, 山崎聡士, 井田弘明, 右田清志, 江口勝美. OPG による滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスの抑制. 日

本免疫学会総会・学術集会記録 p59、2001.

10. Yamasaki S, Miyashita T, Kawakami A, Migita K, Eguchi K. Multilineage mesenchymal differentiation of fibroblast-like cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44 (9), Supplement, S159, 2001.
11. Osteoprotegerin (OPG) is a natural inhibitor for tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in synovial cells. Miyashita T, Kawakami A, Yamasaki S, Migita K, Eguchi K. *Arthritis Rheum* 44 (9), Supplement, S360, 2001.
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図1: HTLV-I tax 発現による آپトオーシス抵抗性の誘導

DNA fragmentation による評価

アプトオーシス刺激

TNF- α anti-Fas TRAIL Etoposide Staurosporine

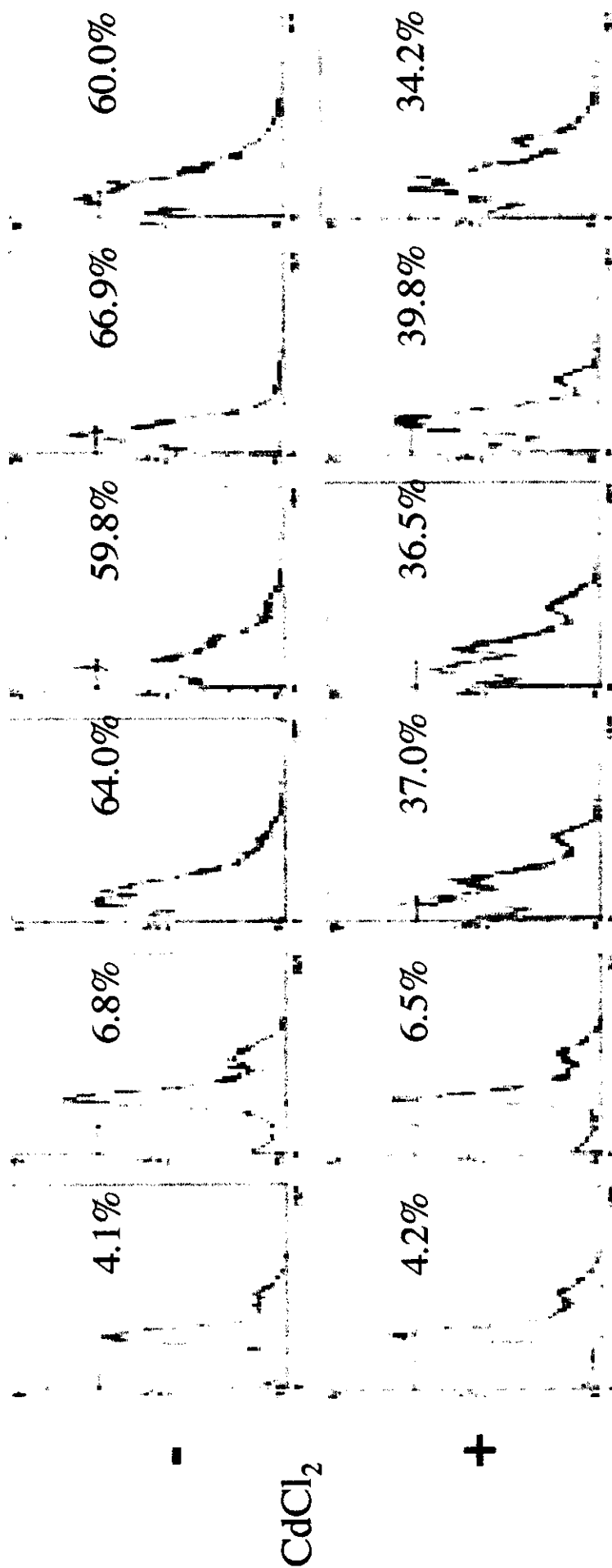
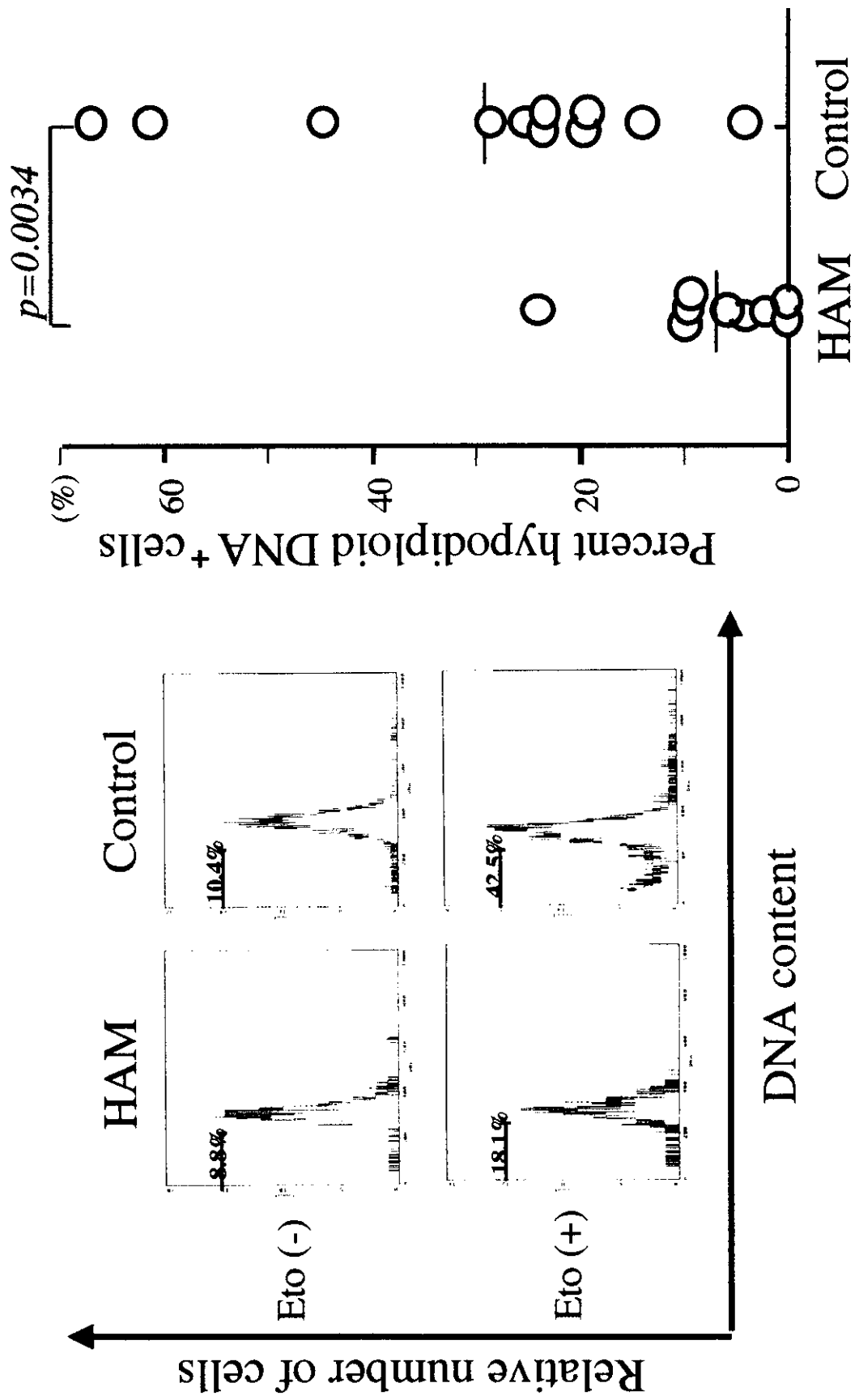


図2:HAM症例CD4⁺T細胞のアポトーシス抵抗性



FcγRIIB 分子の発現制御に関わるプロモーター領域多型

広瀬幸子（順天堂大学医学部・第二病理）

研究要旨

B 細胞上に発現している重要な免疫抑制分子である FcγRIIB1 分子をコードする FcγRIIB 遺伝子のプロモーター領域には、SLE 自然発症マウス系に共通して 13 塩基と 3 塩基の欠損が認められる。この欠失に相関して、脾臓リンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞上での FcγRIIB1 分子の発現低下と IgG 抗体応答の亢進が認められる。今回、ルシフェラーゼレポーター法およびゲルシフト法を用いて、FcγRIIB 遺伝子の転写制御部位ならびに転写制御に働く核蛋白の同定を行い、SLE 自然発症マウス系に共通して見られるプロモーター領域欠失部位が転写制御に必須の部位であること、この部位に AP-4 蛋白が結合することを明らかにした。

A. 研究目的

FcγRIIB 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 FcγRIIB1 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、全身性エリテマトーデス(SLE)自然発症マウス系(NZB, BXSB, MRL)には共通して FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域に 13 塩基と 3 塩基の欠失を伴う多型が存在することを見出した。今回は、このプロモーター領域多型が、実際に FcγRIIB1 分子の発現低下をきたし、その結果 B 細胞の機能亢進を誘発し、SLE における高 IgG 血症の原因となっていることを確認するために、FcγRIIB 遺伝子の転写制御機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) Plasmid construction と塩基配列解析：FcγRIIB 遺伝子の転写開始点から上流 302 塩基から下流 599 塩基までの領域を、報告されている配列を参考にプライマーを設定して PCR で増幅し、これらをルシフェラーゼ遺伝子につないで、pGL3-Basic vector に挿入した。塩基配列の解析は、これらの plasmid を用いて、Taq dye primer cycle sequence kit により行った。

(2) ルシフェラーゼレポーター解析：B

細胞株 Bal17 およびマクロファージ細胞株 P388D1 に、作製した plasmid の 2.9 kb の Sal I/SacI fragment をトランスフェクトして、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(3) 核蛋白の抽出とゲルシフト法：P388D1 細胞の核から Schreiber らの方法に従って核蛋白を抽出した。プローブは合成オリゴマーを用い、³²P]γ-ATP でラベルした。得られた核蛋白とプローブを混合し、4.5% アクリルアミドゲルで電気泳動し、autoradiography にて解析した。

(4) Southwestern blot 法：核蛋白を 10%-SDS アクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF 膜に transfer 後、ラベルプローブと反応させ、autoradiography にて解析した。

C. 研究結果

(1) FcγRIIB 遺伝子制御領域の解析：図 1 にプロモーター領域に欠失を持たない BALB/c マウスの FcγRIIB 遺伝子上流領域を用いたルシフェラーゼアッセイの結果を示した。以前の報告に反して、Bal17 および P388D1 いずれの細胞株においても、転写開始点上流 302 塩基から第 1 エキソンの 76 塩基までの領域では、ルシフェラーゼ活性が得られなかった。そこで、遺伝子領域をのぼして活性が得られる領域を検索した結果、転写開始点から 585 塩基下流の第 3

エキソンの途中までの領域が転写に必要であることが判明した。

(2) 転写制御領域の遺伝子多型の解析：転写に必要な領域の塩基配列を、NZB と BALB/c マウスで解析した。その結果、図 2 に示すように、NZB では BALB/c に比較して、プロモーター領域に AP-4 結合および S-box 想定領域を含む 13 塩基およびそれよりやや下流に 3 塩基の欠失が見られ、その他に 1 個の SNP も認められた。また第 1 イントロンに 16 塩基の挿入が認められた。

(3) 転写制御部位ならびに転写制御蛋白の同定：図 3 に BALB/c および NZB マウスの FcγRIIB 遺伝子上流域の-302 塩基から+585 塩基までを用いたルシフェラーゼアッセイの結果を示した。図からも明らかのように、BALB/c で認められる活性が、NZB では認められないことが示された。

次に、図 4 に示すように、NZB で欠失したプロモーター領域を含む部分について BALB/c 型および NZB 型のプローブを作製し、核蛋白との結合活性をゲルシフト法を用いて解析した。その結果、BALB/c のプローブで認められた核蛋白との結合による特異バンドは、NZB のプローブでは認められなかった。第 1 イントロンの NZB での挿入部位についてもゲルシフト法を行ったが、挿入部位に特異的に結合する核蛋白の存在は認められなかった。

プロモーター領域の BALB/c 型のプローブに結合する核蛋白が AP-4 か否かを解析する目的で、核蛋白を電気泳動後、AP-4 結合オリゴマープローブあるいは BALB/c 型プローブと反応させて分子量を比較した結果、同一の約 50Kda の分子量を示したことから、これが AP-4 であると推定された。NZB 型プローブでは、反応が認められなかった。

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、FcγRIIB 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、FcγRIIB 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 FcγRIIB1 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、その転写制御蛋白は AP-4 であることが示された。この多型により、SLE 自然発症系マウスでは、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る。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 166: 4780-4787, 2001
2. 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

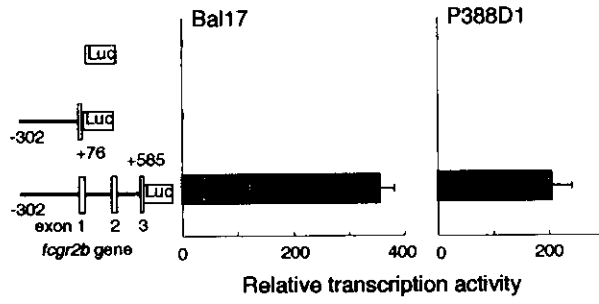
- related phenotypes in a KK/Ta mouse model. *Diabetes* 50: 1943-1948, 2001
3. Hirose, S.: Genetic study of SLE: lessons from mouse models. *Mod. Rheumatol.* 11:262, 2001
 4. Jiang, Y., Ohtsuji, M., Abe, M., Li, N., Xiu, Y., Wen, X., Shirai, T., Hirose, S.: Polymorphism and chromosomal mapping of the murine gene for B cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF) and association with the autoimmune phenotype. *Immunogenetics* 53: 810-813, 2001
 5. Kuroda, Y., Nakata, M., Hirose, S., Shirai, T., Iwamoto, M., Izui, S., Kojima, N., Mizuochi, T.: Abnormal IgG galactosylation in MRL-*lpr/lpr* mice: pathogenic role in the development of arthritis. *Pathol. Int.* 51: 909-915, 2001
 6. Shirai, T., Nishimura, H., Jiang, Y., Hirose, S.: Genome screening for susceptibility loci in systemic lupus erythematosus. *Am. J. Pharmacogenomics* 2: 1-12, 2002
 7. Fujii, H., Ajioka, Y., Kazumi, S., Takagaki, T., Zhu, X-G., Hirose, S., Watanabe, H., Shirai, T.: Loss of heterozygosity in the clonal evolution of flat colorectal neoplasias. *J. Pathol.*, in press.
 8. Fujii, H., Matsumoto, T., Yoshida, M., Furugen, Y., Takagaki, T., Iwabuchi, K., Nakata, Y., Takagi, Y., Moriya, T., Kadowaki, N., Ohtsuji, M., Hirose, S., Shirai, T.: Genetics of synchronous uterine and ovarian endometrioid carcinoma: combined analyses of loss of heterozygosity, *PTEN* mutation and microsatellite instability. *Human Pathol.*, in press
 9. Miyamoto, A., Nakayama, K., Hirose, S., Jiang, Y., Abe, M., Tsukiyama, T., Nagahama, H., Ohno, S., Nakayama, K.: Increased proliferation of B cells and autoimmune disease in protein kinase C- δ -deficient mice. *Nature*, in press.
 10. Hirose, S., Jiang, Y., Hamano, Y., Nishimura, H.: Genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Drug of Today, Prous Science, S.A. International Publishers, Barcelona, Spain*, in press.
2. 学会発表
 1. Hirose, S.: Genetic study of SLE: Lessons from mouse models. The 10th International Rheumatology Symposium in Tokyo - 2001 Frontier of Rheumatology - March 23-24, 2001, Tokyo
 2. 広瀬幸子、大辻希樹、阿部雅明、白井俊一 Fcgr2b 遺伝子プロモーター領域多型と免疫応答 第90回日本病理学会総会 2001、4月5-7日。東京ビッグサイト
 3. Hirose, S., Jiang, Y., Shirai, T.: Genetic polymorphisms in the regulatory regions and SLE-susceptibility. International Symposium: Recent Advances in SLE Research 第45回日本リウマチ学会総会・学術集会 2001、5月14-16日 東京
 4. 姜 奕、広瀬幸子、白井俊一 B細胞活性化から見た膠原病の遺伝子解析 シンポジウム 20:リウマチ・膠原病の遺伝子解析 第45回日本リウマチ学会総会・学術集会 2001、5月14-16日 東京
 5. Hirose, S., Jiang, Y., Li, N., Yan, Xiu., Nakamura, K., Shirai, T.: Fc γ RIIB regulatory region polymorphisms as one plausible autoimmune susceptibility allele. Satellite meeting of the 11th International Congress of Immunology [B cells and autoimmunity: New concepts and therapeutic perspectives] 19th-21th July 2001, Bergen, Norway
 6. Hirose, S., Jiang, Y., Li, N., Xiu, Y., Shirai, T.: IgG Fc receptor IIB regulatory region polymorphisms and autoimmune susceptibility. The 11th International Congress of Immunology. 22nd-27th July 2001, Stockholm, Sweden
 7. Hirose, S., Jiang, Y., Xiu, Y., Nishimura, H., Shirai, T.: Transcriptional regulation by Fc γ RIIB regulatory region polymorphisms and its possible contribution to SLE susceptibility. Lupus Genetics Conference 8th-9th September 2001, Oklahoma City, USA
 8. Hirose, S., Jiang, Y., Li, N., Xiu, Y., Nakamura, K., Abe, M., Ohtsuji, M., Shirai, T.: SLE susceptibility and IgG Fc

- receptor IIB regulatory region polymorphisms. The 7th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity 26th-29th September 2001, Awaji island, Hyogo, Japan
9. 広瀬幸子: SLE における B 細胞異常活性化の分子機構 ワークショップ 12 疾患モデル 第 29 回日本臨床免疫学会総会 2001, 12 月 10-11 日 大阪
 10. 佐野川玲子、文 香淑、姜 奕、阿部雅明、広瀬幸子、白井俊一: B1 細胞の Fas 抵抗性に関わる Fas 遺伝子多型の影響 ワークショップ 12 疾患モデル 第 29 回日本臨床免疫学会総会 2001, 12 月 10-11 日 大阪
 11. 張 丹青、富田英明、中村和裕、三浦右子、趙 京元、大辻希樹、津田裕士、橋本博史、姜 奕、広瀬幸子、白井俊一: C1q 遺伝子多型部位の同定とループス腎炎発症への影響 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 12. Takahashi, K., Abe, M., Tsurui, H., Waldschmidt, T., Hirose, S., Shitrai, T.: Analysis of marginal zone B cells in autoimmune-prone NZB/W F1 mice. 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 13. 修 岩、中村和裕、李 娜、文 香淑、阿部雅明、大辻希樹、下川敏文、羅 智靖、姜 奕、広瀬幸子、白井俊一: 自己免疫モデルマウスにおける Fcgr2b 遺伝子発現調節機構の解析 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 14. 文 香淑、張 丹青、阿部雅明、松岡周二、浜野慶朋、姜 奕、高津聖志、広瀬幸子、白井俊一: IL-5 トランスジェニック New Zealand マウスの B 細胞機能の解析 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 15. 姜 奕、大辻希樹、阿部雅明、李 娜、修 岩、文 香淑、白井俊一、広瀬幸子: BAFF 遺伝子のマッピングとその多型による自己免疫病態への影響 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 16. 蓬田雅人、松井友吾、藤井琢磨、桐栄純一、小寺 洋、黒沢 大、松島瑞子、稲田祐二、石川 昌、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之: New Zealand マウスにおける T 細胞サブセット構成異常の連鎖解析 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 17. 藤井琢磨、松井友吾、蓬田雅人、桐栄純一、黒沢 大、小寺 洋、松島瑞子、稲田祐二、尾崎承一、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之: SLE モデルマウスにおける内在性レトロウイルスに対する自己免疫応答の遺伝的解析 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 18. 中村和裕、修 岩、西村裕之、広瀬幸子、白井俊一: 自己免疫疾患モデルマウスにおける新規脳機能異常 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 19. 佐野川玲子、文 香淑、姜 奕、阿部雅明、大辻希樹、長田重一、広瀬幸子、白井俊一: Fas 遺伝子多型による Fas 発現レベルの制御と疾患との関連 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 20. 松岡周二、鶴井博理、阿部雅明、滝口雅文、石井保之、本間央之、大辻希樹、広瀬幸子、白井俊一: 新しいタイプの細胞死を導く抗ヒト抗体の作製 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 21. 肥田重明、伊藤 守、広瀬幸子、白井俊一、斉藤 隆、滝 伸介: IRF-2 欠損における炎症性皮膚疾患に対する感受性を決定する遺伝的要素 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 22. 鶴井博理、広瀬幸子、奥村 康、白井俊一: 超多色蛍光イメージングによるマウス脾臓白脾髄の構造の検索 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪
 23. 浜野慶朋、広瀬幸子、白井俊一: B 細胞性慢性リンパ性白血病の発症機序の解析 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 2001, 12 月 11-13 日 大阪

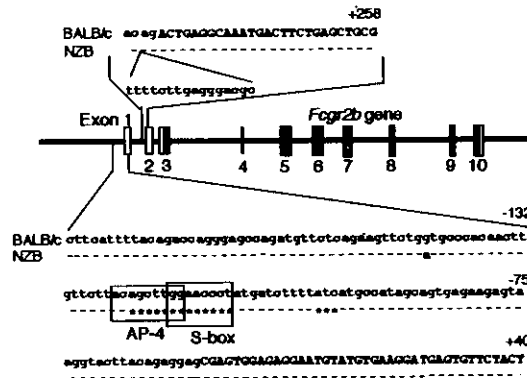
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

該当なし

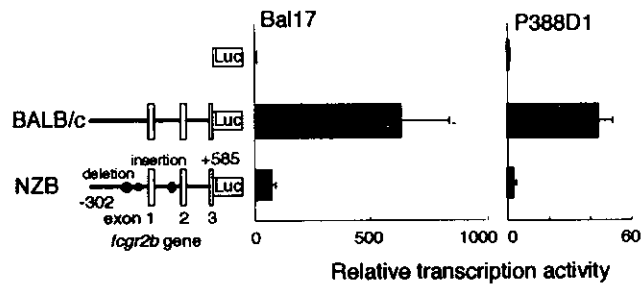
☒ 1



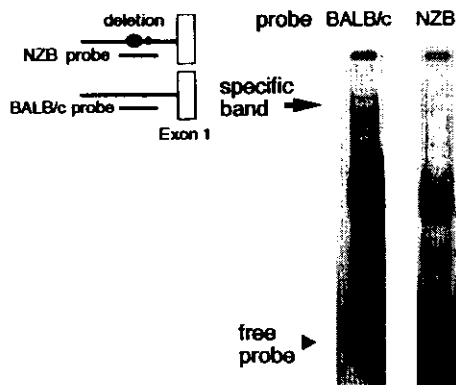
☒ 2



☒ 3



☒ 4



☒ 5

