

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

前年度に cDNA を用いて全身性エリテマトーデス(SLE)との関連を検出した *FCGR2B*-I232T について、ゲノム DNA を用いたタイピング系を作製し、SLE193 例、対照健常者 303 例について、*FCGR2A*, *2B*, *3A*, *3B* の遺伝子型を決定した結果、*FCGR2B*-232T/T 遺伝子型と、*FCGR3A*-176F/F 遺伝子型のいずれもが、SLE との関連を有することを見出した。また、*BLYS* の上流領域に 4 個所の単一塩基多型(SNP)を見出し、それらによって精製されるハプロタイプの一つが単球の *BLYS* mRNA 量と関連し、抗 Sm 抗体陽性 SLE 患者に増加傾向があることを検出した。さらに、一般集団中に *NKG2C* 遺伝子を欠失したアレルが高頻度に存在することを見出した。

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、欧米における genome-wide の連鎖解析の結果、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が、感受性遺伝子として多くの研究者のコンセンサスが得られているのは、HLA-DRB1, C4 など、ごく少数である。SLE のような多因子疾患では、個々の遺伝子の寄与は弱いものと想定されるが、このような弱い寄与の感受性遺伝子を検出するためには、高い検出力を持つ、候補遺伝子アプローチが適切とされる。

本研究において、われわれは、候補遺伝子の多型スクリーニングおよび関連分析により、SLE の疾患感受性遺伝子の検出を試みた。本年度は、以下に述べる背景のもとに、Fcγ受容体、BLyS, NKG2C, CD94 を候補遺伝子として、解析を行った。

ヒトの低親和性 Fcγ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、研究者間で必ずしも一致した結果が得られていない。われわれは昨年度、cDNA を用いた解析から、*FCGR2B* 遺伝子に非同義置換 I232T をコードする多型を検出し、SLE との関連を検出した。本年度は、ゲノム DNA を用いたタイピング法を作製し、より多数の検体の解析を行うとともに、*FCGR2A*, *3A*, *3B* 多型との関連を検討した。

BLyS (BAFF, TALL-1, TNFSF13B) は、B 細胞に活性化、増殖、生存シグナルを誘導する分子で、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。また、*BLYS* 遺伝子が位置する 13q32-34 は、連鎖解析から示された候補領域の一つである。こ

これらの理由から、*BLYS* は有力な候補遺伝子と考えられ、多型スクリーニングの対象とした。

さらに、*NKG2C* は、ヒトレクチン型 NK 受容体のひとつで、*CD94* とヘテロダイマーを形成し、活性化型シグナルを誘導する。これらの遺伝子は、やはり SLE の感受性候補領域の一つである 12p13 に位置する。SLE における NK 細胞の機能的な重要性も考慮し、*NKG2C*、*CD94* の多型スクリーニングを行った。

B. 研究方法

FCGR2A、*2C* との高度の相同性のため、ゲノム DNA を用いた *FCGR2B* タイピング系は、*2B* 特異的な配列である exon 7 に一方のプライマーを設定した long PCR で 4.3 kb の断片をまず増幅し、次に、nested PCR により多型部位を含む 863bp の断片を増幅し、LightCycler™ (Roche) をもちいた蛍光ハイブリダイゼーションにより、タイピングを行った。

BLYS については、データベースに登録された mRNA 配列とこの領域のゲノム配列のアラインメントから exon – intron 構造を推測し、intron および上流領域に設定したプライマーを用いて、すべての exon と -1320bp までの上流領域の多型スクリーニングを施行した。

NKG2C については、多型スクリーニングの途中で、複数のプライマーセットを用いても増幅が得られない検体が見出されたため、*NKG2C* 遺伝子の欠失を疑い、*NKG2C* probe を用いた Southern blotting によってゲノム構造上の異常について、RT-PCR により、*NKG2C* 発現の有無について検討した。

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。本研究は、東京大学医学部・大学院医学系研究科および順天堂大学医学部の研究倫理審査委員会の承認のもとに、対象者のインフォームド・コンセントを得、検体の匿名化

ののちに行われた。

C. 研究結果

FCGR2B

Nested PCR と LightCycler™ を用いた蛍光ハイブリダイゼーションにより、ゲノム DNA を用いた *FCGR2B*-I232T 多型の検出系を作製し、SLE 193 例、健常対照群 303 例の検討を行った。表 1 に示すように、232T/T 遺伝子型が、SLE 群に有意に増加していた。同じ検体セットを用いて *2A*、*3A*、*3B* の検討を加えたところ、*3A*-176F/F 遺伝子型の有意な関連も検出された (表 2)。これら 2 つのアレルには、連鎖不平衡が存在したが、two-locus analysis により、*2B*-232T と *3A*-176F のいずれもが SLE 感受性に関連することが示された (図 1)。

BLYS

BLYS の多型スクリーニングの結果、promoter 領域に 4 個所の SNP、翻訳領域に 1 個所の非同義置換をコードする稀な変異が新たに見出された。Promoter 領域の SNP は、3 種のハプロタイプを形成して存在することが示された (表 3)。うち、一つのハプロタイプを持つ健常者においては、持たない群と比較して、末梢血単球の *BLYS* mRNA レベルの有意な上昇を認めた。SLE の発症との関連は検出されなかった (表 4) が、抗 Sm 抗体陽性の SLE 群に、このハプロタイプをホモ接合で持つものが多い傾向が認められた (表 5)。

NKG2C、*CD94*

NKG2C の変異スクリーニングの過程で、*NKG2C* 内の複数の primer set を用いた PCR により、いずれも増幅産物が得られない例が見出された。*NKG2C* probe を用いた Southern hybridization により、本領域のゲノム構造の変化が示唆され、RT-PCR により、*NKG2C* 転写産物の欠如が確認された。このことから、こ

これらの個体では、*NKG2C* 遺伝子が欠失していることが強く示唆された。

NKG2C 欠失をホモ接合で持つものは、一般集団中 4.3%に存在し、SLE との関連は検出されなかった (表6)。

CD94 には、3'非翻訳領域に1箇所、SNP が検出されたが、これも SLE との関連は検出されなかった。

D. 考察

今回われわれは、昨年度 cDNA を用いた nested PCR により見出した、SLE との関連を有する *FCGR2B* 多型について、ゲノム DNA を用いたタイピング系を作製した。本遺伝子は、*FCGR2A*, *2C* との顕著な相同性のために、これまでゲノム多型の解析が困難であった遺伝子であるため、今回解析系が確立したことは、今後の本遺伝子の研究上、重要な進歩である。

今回の研究結果から、日本人 SLE では、*FCGR2B*-232T と *FCGR3A*-176F のいずれもが疾患感受性に関連することが強く示唆された。*FcγRIIIa* はマクロファージ、NK 細胞などに主に発現する *Fcγ*受容体で、176F は 176V と比較して、IgG に対する親和性が弱い。このため、NK 細胞活性化、ADCC、免疫複合体クリアランスなどの機能が低下すると考えられる。一方、*FcγRIIb* は、B細胞、単球の活性化制御機能を介して SLE と関連すると想定されるが、今回の多型による機能的な変化については、現在 transfectant を作製して検討中である。

*BlyS*は、最近、種々の自己免疫疾患における関連が注目されている分子である。ヒトにおいても、SLE, RA, Sjögren 症候群において、血清あるいは関節液中の *BlyS*濃度の上昇、特に、抗DNA抗体やリウマトイド因子との関連が報告されている。今回、予備的な成績ではあるが、promoter活性の高い可能性がある多型が同定され、そのホモ接合体が抗Sm抗体陽性例に多い傾向が見られたことは、自己抗体産生パターンにゲノム

レベルでの *BlyS*多型が関連する可能性を初めて示したものである。

NKG2 には、機能的遺伝子産物をコードする遺伝子に *NKG2A*, *C*, *E* の少なくとも3種があり、遺伝子重複、不均等交叉などを経て生成された遺伝子ファミリーと考えられる。一般集団中に *NKG2C* 欠失アリルが高頻度に存在することは、欠失アリルが不均等交叉によって生じたものであることを示唆する。同様の欠失アリルは、*HLA*, *FCGR*, *KIR* などにおいて存在が知られている。

今回の知見は、また、*NKG2C* が生存に必須ではないことを示唆するものである。これは、*NKG2C* 同様、活性化シグナルを伝達する *NKG2E* が存在するためである可能性が考えられる。しかし、今後、ウイルス感染など、ほかの疾患に対する感受性との関連の検討が必要である。

最後に、現在大規模な SNP の登録と、大量の SNP を用いた genome-wide association study の可能性が論じられているが、今回検討した遺伝子のうち、*FCGR*, *NKG2C* は、いずれもほかの遺伝子との高度の相同性のため、単純な SNP タイピングが困難であった例である。特に相同性の高い遺伝子ファミリーを形成する遺伝子群については、本研究のような、丹念な多型解析系が今後とも有用であることが示唆された。

E. 結論

SLE の疾患感受性候補遺伝子として、*FCGR* 遺伝子群、*BlyS*, *NKG2C*, *CD94* の解析を行い、*FCGR2B*, *FCGR3A* の関連を確認した。また、*BlyS* promoter の新たな多型、*NKG2C* 欠失アリルの一般集団中における高頻度の存在を検出した。

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

1. Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Leelayuwat C, Kashiwase K, Tanaka H, Moriyama S, Nakajima F, Park MH, Jia GJ, Ching N-O, Sideltseva EW, and Juji T: Wide distribution of the MICA - MICB null haplotype in East Asian. *Tissue Antigens* 57(1): 1-8, 2001.
2. Lee J, Kotliarova SE, Ewis AA, Hida A, Shinka T, Kuroki Y, Tokunaga K, and Nakahori Y: Y chromosome compound haplotypes with the microsatellite makers DXYS265, DXYS266, and DXYS241. *J. Hum. Genet.* 46(2): 80-84, 2001.
3. Kanai T, Fujii T, Yamashita T, Hyodo H, Miki A, Unno N, Kozuma S, Taketani Y, Keicho N, and Tokunaga K: Polymorphism of human leukocyte antigen-E gene in the Japanese population with or without recurrent abortion. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 45(3): 168-173, 2001.
4. Chida S, Hohjoh H, Hirai M, and Tokunaga K: Haplotype-specific sequence encoding protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator (PRKRA) in the human leukocyte antigen (HLA) class II region. *Immunogenet.* 52: 186-194, 2001.
5. Hohjoh H, Terada N, Honda Y, Juji T, and Tokunaga K: Negative association of the HLA-DRB1*1502-DQB1*0601 haplotype with human narcolepsy. *Immunogenet.* 52: 299-301, 2001.
6. Hohjoh H, Terada N, Miki T, Honda Y, and Tokunaga K: Haplotype analyses with the human leukocyte antigen (HLA) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) genes in narcolepsy families. *Psychiat. Clin. Neurosci.* 55: 37-39, 2001.
7. Nieda M, Kikuchi A, Nicol A, Koezuka Y, Ando Y, Ishihara S, Lapteva N, Yabe T, Tokunaga K, Tadakoro K, and Juji T: Dendritic cells rapidly undergo apoptosis in vitro following culture with activated CD4+ α 24 natural killer T cell expressing CD40L. *Immunology* 102(2): 137-145, 2001.
8. Wakui M, Yamaguchi A, Sakurai D, Ogasawara K, Yokochi T, Tsuchiya N, Ikeda Y, and Tokunaga K: Genes highly expressed in the early phase of murine graft-versus-host reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282(1): 200-206, 2001.
9. Lin M, Chu CC, Chang SL, Lee JH, Loo HH, Akaza T, Juji T, Ohashi J, and Tokunaga K: The origin of Minnan and Hakka, the so-called Taiwanese, inferred by HLA study. *Tissue Antigens* 57(3): 192-199, 2001.
10. Hohjoh H, Terada N, Nakayama T, Kawashima M, Miyagawa T, Honda Y and Tokunaga K: Case-control study with narcoleptic patients and healthy controls who, like the patients, possess both HLA-DRB1*1501 and -DQB1*0602. *Tissue Antigens* 57(3): 230-235, 2001.
11. Nieda M, Nicol A, Koezuka Y, Kikuchi A, Lapteva N, Tanaka Y, Tokunaga K, Suzuki K, Kayagaki N, Yagita H, Hirai H, and Juji T: TRAIL expression by activated human CD4(+) α 24 NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 97(7): 2067-2074, 2001.
12. Hagiwara K, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Kitamura S, Iwadare J, Sahara R, Yamamoto K, and Tokunaga K: Identification of genes upregulated in the inflamed colonic lesions of Crohn's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283(1): 130-135, 2001.
13. Ohashi J, Yamamoto S, Tsuchiya N, Hatta Y, Komata T, Matsushita M, and Tokunaga K: Comparison of statistical power between 2 \times 2 allele frequency and allele positivity tables in case-control studies of complex diseases genes. *Ann. Hum. Gene.* 65(2): 197-206, 2001.
14. Hohjoh H and Tokunaga K: Allele-specific

- binding of the ubiquitous transcription factor OCT-1 to the functional single polymorphism (SNP) sites in the tumor necrosis factor- α gene (TNFA) promoter. *Genes Immun.* 2: 105-109, 2001.
15. Honda M, Honda Y, Uchida S, Miyazaki S, Tokunaga K: Monozygotic twins incompletely concordant for narcolepsy. *Biol. Psychiat.* 49(1): 943-947, 2001.
 16. Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Nakata K, Watanabe J, Takahashi Y, and Tokunaga K: Recombination and gene conversion-like events may contribute to AB O gene diversity causing various phenotypes. *Immunogenet.* 53(3): 190-199, 2001.
 17. Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Yamamoto K, and Tokunaga K: Expression of ID family genes in the synovia from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284(2): 436-442, 2001.6
 18. Tarasenko O, Ohashi J, Kitaev M, Razorilova S, Ardiyants A, Kutukeev T, Alishevov A, Toktorgazieva K, and Tokunaga K: HLA-DRB1 gene polymorphism in the Kyrgyz population. *MHC* 8(1): 40-46, 2001.
 19. Lapteva N, Nieda M, Ando Y, Ide K, Hatta-Ohashi Y, Dymshits G, Ishikawa Y, Juji T, and Tokunaga K: Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285(4): 1059-1065, 2001.
 20. Lapteva N, Ando Y, Nieda M, Hohjoh H, Okai M, Kikuchi A, Dymshits G, Ishikawa Y, Juji T, and Tokunaga K. Profiling of genes expressed in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells using cDNA expression array. *Br. J. Haematol.* 114(1): 191-197, 2001.
 21. Ohashi J and Tokunaga K: The power of genome-wide association studies of complex disease genes: Statistical limitations of indirect approaches using SNP markers. *J. Hum. Genet.* 46(8): 478-482, 2001.
 22. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, and Tokunaga K: Absence of association of the allele coding methionine at position 29 in the N-terminal domain of ICAM-1 (ICAM-1^{K311A}) with Severe Malaria in the northwest of Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54(3): 114-116, 2001.
 23. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, and Tokunaga K: Presence of four major haplotypes in human BCMA gene: Lack of association with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2(5): 276-279, 2001.
 24. Hananantachai H, Patarapotikul J, Looareesuwan S, Ohashi J, Naka I, and Tokunaga K: Lack of association of -308A/G TNFA promoter and 196R/M TNFR2 polymorphisms with disease severity in Thai adult malaria patients. *Am. J. Med. Genet.* 102(4): 391-392, 2001.
 25. Tokunaga K, Ohashi J, Bannai M, and Juji T: Genetic link between Asians and Native Americans: Evidence from HLA genes and haplotypes. *Hum. Immunol.* 62(9): 1001-1008, 2001.
 26. Chu CC, Lin M, Nakajima F, Lee HL, Chang SL, Juji T, and Tokunaga K: Diversity of HLA among Taiwan's indigenous tribes and the Ivatans in the Philippines. *Tissue Antigens* 58(1): 9-18, 2001.
 27. Tsuchiya N, Kawasaki A, Tsao BP, Komata T, Grossman J M, and Tokunaga K: Analysis of the association of HLA-DRB1, TNF α promoter and TNFR2 (TNFRSF1B) polymorphisms with SLE using transmission disequilibrium test. *Genes Immun.* 2(6): 317-322, 2001.
 28. Lapteva N, Nieda M, Ando Y, Nicol A, Ide K, Yamaura A, Hatta-Ohashi Y, Egawa K, Juji T, and Tokunaga K: Gene expression analysis in human monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 289(2): 531-538, 2001.
 29. Yamanouchi Y, Takano T, Hamaguchi H, and Tokunaga K: A novel apolipoprotein E5 variant with a 24-bp insertion causing hyperlipidemia. *J. Hum. Genet.* 46(11): 633-639, 2001.
 30. Sato M, Yabe T, Ohashi J, Tsuchiya N, Tadokoro K, Hanaoka K, and Tokunaga K, and Juji T: Identification of novel single nucleotide substitutions in the NKp30 gene expressed in human natural killer cells. *Tissue Antigens* 58(4): 255-258, 2001.
 31. Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K, Ra C, Yoshie O, Yamamoto K, Tsuchiya N, Tokunaga K, and Hirai K: Variation in the human CC chemokine eotaxin gene. *Genes Immun.* 2(8): 461-463, 2001.
 32. Kawashima M, Hohjoh H, Terada N, Komata T, Honda Y, and Tokunaga K: Association

- studies of the tumor necrosis factor-alpha (TNFA) and its receptor 1 (TNFR1) and 2 (TNFR2) genes with human narcolepsy. *Korean J, Genetics* 23(4): 365-370, 2001.
33. Matsumoto S, Sasaki T, Imamura A, Matsuo K, Kayashima T, Tsujita T, Matsumoto S, Nakane Y, Tokunaga K, and Okazaki Y: HLA-class I distribution in Japanese patients with schizophrenia. *Am. J. Med. Genet.* (in press)
 34. Kyogoku C, Dijstelboem M.H, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen D.M, Hashimoto H, Winkel G.J. J, Kallenberg G. M. C, and Tokunaga K: Association of Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to the genetic susceptibility to SLE. *Arthritis Rheum.* (in press)
 35. Sirikong M, Tsuchiya N, Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Suthipitnitharm S, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Siribonrit U, and Tokunaga K: Association of HLA-DRB1*1502 - DQB1*0501 haplotype with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* (in press)
 36. Matsushita I, Hasegawa K, Nakata K, Yasuda K, Tokunaga K, and Keicho N: Genetic variations of human beta defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press)
2. 学会発表
1. 京極千恵子、土屋尚之、徳永勝士、山口晃弘、深沢徹、橋本博史：ヒト Fcγ受容体 IIB(FCGR2B)多型と全身性エリテマトーデスの関連。日内会誌 90(Suppl.): 175, 2001.
 2. 土屋尚之、徳永勝士：候補遺伝子アプローチによる SLE 感受性遺伝子の検討。リウマチ 41: 336, 2001.
 3. 市川奈緒美、小竹茂、箱田雅之、樋上謙士、川崎綾、土屋尚之、徳永勝士、鎌谷直之：日本人慢性関節リウマチ(RA)患者における TNFα-promoter 領域の多型について。リウマチ 41: 484, 2001.
 4. 山口晃弘、土屋尚之、山本一彦、徳永勝士：慢性関節リウマチ患者滑膜における Id 遺伝子の発現。リウマチ 41: 507, 2001.
 5. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：BCMA(TNFRSF17)の変異解析と SLE および RA との関連の検討。リウマチ 41: 509, 2001.
 6. 京極千恵子、土屋尚之、山口晃弘、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：ヒト Fcγ受容体 IIB(FCGR2B)多型と全身性エリテマトーデス(SLE)の関連。リウマチ 41: 510, 2001.
 7. 氷上光輝、土屋尚之、屋部登志雄、徳永勝士：ヒト NKG2-A 遺伝子の変異解析とリウマチ性疾患との関連の検討。リウマチ 41: 510, 2001.
 8. 徳永勝士：遺伝子多型・変異と疾患感受性。第 53 回日本産科婦人科学会学術講演会 札幌、2001.5.12
 9. Tokunaga K : HLA profiles and affinities of Asian populations. The 5th Tokyo International Symposium on Cord Blood Transplantation - Placental/umbilical cord and regenerative medicine - Tokyo, 2001.6.23
 10. 徳永勝士：HLA 遺伝子から見た日本人の形成。日本学術会議第四紀研究委員会公開シンポジウム「日本人と日本文化の源流」東京 2001.7.27
 11. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Presence of four major haplotypes in human BCMA gene: lack of association with SLE and RA. Presented at "B cells & Autoimmunity: New concepts & therapeutic perspectives" 19th - 21st July, Bergen, Norway. Abstract 48, p109.
 12. Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Kano H, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K. Association of CD19 polymorphisms with SLE in Japanese. Presented at "B cells & Autoimmunity: New concepts & therapeutic perspectives" 19th - 21st July, Bergen, Norway. Abstract 29, p71.
 13. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ: Association of Fcγ receptor IIB polymorphism with the susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). Presented at "B cells & Autoimmunity: New concepts & therapeutic perspectives" 19th - 21st July, Bergen, Norway. Abstract 30, p73.
 14. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Lack of association of human BCMA polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 54, Supplement 1, Tue512, 2001.
 15. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ: Association of Fcγ receptor IIB polymorphism with the susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). *Scand. J. Immunol.* 54, Supplement 1, Tue523, 2001.
 16. Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K: New variations of human NKG2 and CD94

- gene: lack of association with RA or SLE. *Scand. J. Immunol.* 54, Supplement 1, Tue532, 2001.
17. Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Kano H, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K. Association of *CD19* polymorphisms with SLE in Japanese. *Scand. J. Immunol.* 54, Supplement 1, Tue534, 2001.
 18. 氷上光輝、土屋尚之、屋部登志雄、徳永勝士：ヒト NKG2/CD94 遺伝子の変異スクリーニングと、リウマチ性疾患との関連の解析。日本人類遺伝学会第46回大会、p89, 2001.
 19. 櫻井大祐、山口晃弘、土屋尚之、山本一彦、徳永勝士：慢性関節リウマチ患者滑膜における FOSB 遺伝子の発現。日本人類遺伝学会第46回大会、p146, 2001.
 20. 京極千恵子、Deijstbloem HM, 土屋尚之、八田陽子、加藤仁、山口晃弘、深沢徹、Jansen MD, 橋本博史, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM, 徳永勝士：日本人全身性エリテマトーデスにおける Fcy 受容体遺伝子群多型の解析：*FCGR2B* と *FCGR3* の関連。日本人類遺伝学会第46回大会、p151, 2001.
 21. 徳永勝士：HLA 遺伝子群からみた人類の移動と拡散。アンデス文明研究会、東京、2001.10.20
 22. Tokunaga K: Search for susceptibility genes to SLE. The fourth cardiovascular genomics symposium "Cardiovascular Genetics". Seoul, Korea, 2001.10.26
 23. 徳永勝士、土屋尚之：多因子疾患における HLA と non-HLA 遺伝子の相互効果。第10回日本組織適合性学会大会、福岡、2001.11.2
 24. Tokunaga K, Kyogoku C, and Tsuchiya N: Lessons from associations between FCGR gene family and systemic lupus erythematosus (SLE). The 1st Hakone-yama Symposium. Tokyo. 2001.11.20
 25. Tokunaga K, Tsuchiya N: Search for susceptibility genes to SLE. The fourth cardiovascular genomics symposium. P19. 2001. 10.26. (Seoul)
 26. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM, Tokunaga K: Association of Fcy receptor gene polymorphisms in the Japanese patients with SLE: Independent contributions from *FCGR2B* and *FCGR3A*. *Arthritis Rheum* 44 (Suppl.): S179, 2001.
 27. Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Yamamoto K, Tokunaga K: Expression of ID family genes in the synovia from patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 44 (Suppl.): S181, 2001.
 28. 関谷剛、宮増美里、義江修、土屋尚之、徳永勝士、羅智靖、松島綱治、山本一彦、平井浩一：CCL17:TARC (thymus and activation-regulated chemokine) & CCL22:MDC (macrophage-derived chemokine)の遺伝子多型解析。日本免疫学会総会学術集会記録 31: 32, 2001.
 29. 櫻井大祐、山口晃弘、土屋尚之、山本一彦、徳永勝士：慢性関節リウマチ患者滑膜における FOSB 遺伝子の発現。日本免疫学会総会学術集会記録 31: 57, 2001.
 30. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、徳永勝士：BCMA(TNFRSF17)、BLyS(TNFSF13B)の変異解析と SLE および RA との関連の検討。日本免疫学会総会学術集会記録 31: 59, 2001.
 31. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM, Tokunaga K: Fcy receptor gene polymorphisms in the Japanese patients with SLE: Association of *FCGR2B* and *FCGR3A*. 日本免疫学会総会学術集会記録 31: 66, 2001.
 32. Kuroki K, Tsuchiya N, Fujimoto M, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Association of dinucleotide repeat polymorphism within the CD19 3'UTR with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. 日本免疫学会総会学術集会記録 31: 73, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

表1 日本人健常者およびSLE患者におけるFCGR2B-I232T遺伝子型

	SLE (n=193)	健常対照群 (n=303)	χ^2 value	P value	オッズ比 (95%信頼区間)
遺伝子型頻度					
232 I/I	106 (54.9)	183 (60.4)	5.6	0.06 ^a	1.0
232 I/T	66 (34.2)	104 (34.3)			1.1 (0.7-1.6) ^c
232 T/T	21 (10.9)	16 (5.3)			2.3 (1.1-4.5)^d
アリル陽性率					
I present	172 (89.1)	287 (94.7)	5.4	0.02^b	
T present	87 (45.1)	120 (39.6)	1.5	0.23 ^b	
アリル頻度					
I allele	278 (72.0)	470 (77.6)	3.9	0.05^b	
T allele	108 (28.0)	136 (22.4)			

() % . 有意差は太字で示す。

^a 3×2 分割表による χ^2 検定 (df=2).

^b 2×2 分割表による χ^2 検定(df=1).

^c $\chi^2=0.2$, P=0.65

^d $\chi^2=5.6$, P=0.018

表2. 日本人 SLE および対照者のFCGR2A, FCGR3A, FCGR3B 遺伝子型

	SLE (n=193)	健常対照者 (n=303)	χ^2 value	P value ^a	オッズ比 (95%信頼区間)
FCGR2A	131 R/R	8 (4.1)	11 (3.6)	2.1	0.35
	131 R/H	72 (37.3)	95 (31.4)		
	131 H/H	113 (58.5)	197 (65.0)		
FCGR3A	176 F/F	110 (57.0)	145 (47.8)	6.8	0.03 2.8 (1.2-6.5)^b
	176 V/F	76 (39.4)	132 (43.6)		2.1 (0.9-5.1) ^c
	176 V/V	7 (3.6)	26 (8.6)		1.0
FCGR3B	NA 2/2	33 (17.1)	42 (13.9)	2.3	0.32
	NA 1/2	98 (50.8)	145 (47.8)		
	NA 1/1	62 (32.1)	116 (38.3)		

() % . 有意差は太字で示す。

^a 3×2 分割表による χ^2 検定 (df=2).

^b $\chi^2=5.8$, P=0.016, ^c $\chi^2=3.0$, P=0.09

表3. 本研究で見出された *BLYS* promoter haplotype

	position			
	-1283	-871	-514	-353
<i>BLYS.01</i>	G	C	T	G
<i>BLYS.02</i>	G	T	T	G
<i>BLYS.03</i>	A	C	C	C

表4 日本人 SLE, 対照群の *BLYS* プロモータ・ディプロタイプ頻度

	SLE (n=165)	健常対照群 (n=226)
01/01	30 (18.2)	43 (19.1)
01/02	61 (37.0)	81 (36.0)
01/03	23 (13.9)	31 (13.8)
02/02	30 (18.2)	46 (20.4)
02/03	16 (9.7)	22 (9.8)
03/03	5 (3.0)	2 (0.9)

表5 抗 Sm 抗体陽性および陰性 SLE における *BLYS* プロモータ・ディプロタイプ頻度

	抗 Sm 抗体陽性 (n=34)	抗 Sm 抗体陰性 (n=118)
02/02	10 (29.4) ^a	19 (16.1)

(): %

^a P=0.082 (抗 Sm 抗体陽性 SLE vs 陰性 SLE)

表6 SLE および対照群における *NKG2C* 欠失アリルホモ接合体の頻度

	SLE (n=117)	健常対照群 (n=210)
<i>NKG2C</i> del/del	7 (6.0)	9 (4.3)

(): %, NS

<i>FCGR3A</i> <i>FCGR2B</i>	176V/V		176V/F		176F/F	
	SLE	対照	SLE	対照	SLE	対照
232 I/I	6 (3.1)	21 (6.9)	47 (24.4)	79 (26.1)	53 (27.5)	83 (27.4)
	OR ^a : 1.0		OR: 2.1 ^c 95%CI ^b : 0.8-5.4		OR: 2.2 ^d 95%CI: 0.9-5.8	
232I/T	1 (0.5)	5 (1.7)	18 (9.3)	45 (14.9)	47 (24.4)	54 (17.8)
			OR: 1.4 ^e 95%CI: 0.5-4.0		OR: 3.0 ^f 95%CI: 1.2-7.9	
232T/T	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (5.7)	8 (2.6)	10 (5.2)	8 (2.6)
			OR: 4.8 ^g 95%CI: 1.4-16.8		OR: 4.4 ^h 95%CI: 1.2-15.5	

図1 *FCGR2B* と *3A* の二座位検定。

それぞれの遺伝子型の組み合わせを持つ患者群(総数 193)、対照群 (303)の数と、% [()内] を示す。

^aOR, オッズ比。オッズ比は、*FCGR2B*-232I/I, *FCGR3A*-176V/V の組み合わせに対して計算されている。有意差は、太字で示す。

^b95%CI, 95% 信頼区間

P value (χ^2 value) : ^c P=0.14 (2.2), ^d P=0.10 (2.7), ^e P=0.53 (0.4), ^f P=0.02 (5.2), ^g P=0.01 (6.1), ^h P=0.02 (5.2).

ステロイド抵抗性 SLE 患者リンパ球における多剤耐性遺伝子の関与に関する研究

田中良哉（産業医科大学医学部第一内科学講座）

研究要旨

多剤耐性遺伝子 MDR-1 の産物である P-糖蛋白質 P-gp は、細胞内薬物を細胞外に能動排出して多剤抵抗性を齎す。ステロイド薬長期連用全身性エリテマトーデス SLE 患者末梢血リンパ球でも、MDR-1 特異的転写因子 YB-1 の細胞内発現と P-gp の細胞膜上での発現が増強し、細胞内ステロイド濃度が減少した。また、シクロスポリン (CyA) は、SLE 患者リンパ球では P-gp と拮抗的に結合し、ステロイド薬の細胞外排出を抑制し、細胞内濃度を維持した。実際、ステロイド薬を長用量使用し、臨床的にステロイド薬耐性を有すると考えられた SLE 及び MCTD 患者 27 症例に CyA の併用投与を行った結果、22 例で臨床症候、検査所見等の改善を認め、ステロイド薬維持量の減量を可能にした。一方、IL-2 などの添加によりリンパ球を活性化すると YB-1 の核内移行と P-gp の発現が誘導され、P-gp を介する薬剤不応性を引き起こす可能性が示された。以上、SLE に於ける長期薬物連用によるステロイド耐性獲得に P-gp が関与すること、CyA によって拮抗的に薬剤耐性を克服しうること、さらに、疾患活動性が高い SLE の活性化リンパ球ではすでに P-gp が発現し、治療不応性を齎すこと等が示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)の治療は、ステロイド薬や免疫抑制薬の長期連用を主体とする。しかし、薬物耐性や治療不応性の獲得により治療に難渋する症例をしばしば経験し、重要課題である。一方、多剤耐性遺伝子 MDR-1 の産物 P-糖蛋白質 P-gp は、抗癌剤等の細胞障害性薬物投与により細胞膜に発現し、細胞内薬物を細胞外に能動排出して多剤耐性を齎す。多剤抵抗性の克服は、癌の化学療法分野では飛躍的に進歩したが、膠原病・リウマチ性疾患治療分野では殆ど検討成されていない。SLE 患者におけるステロイド耐性、および、不応性獲得機序の解明とその制御を主目的として、SLE 患者末梢血リンパ球を用いて、P-gp の発現と細胞内ステロイド排出の制御機構を解明する。さらに、臨床的にステロイド薬耐性を有すると考えられる SLE 6 症例に対して、薬剤耐性の克服の可能性を追求する。

B. 研究方法

1. 健常人、未治療またはステロイド薬治療開始後 1 カ月以内の早期 SLE 患者、および、1 年以上ステロイド薬にて治療された SLE 患者の末梢血よりリンパ球を得、以下の解析に用いた。
2. [³H]-デキサメサゾンと[¹⁴C]-ブタノールを用いて、リンパ球の細胞内外のステロイド濃度比を測定した。
3. リンパ球の P-gp の細胞膜上発現や YB-1 の細胞内発現は、特異抗体で染色してフローサイトメーターで解析した。
4. YB-1 や YB-1 アンチセンスの遺伝子導入は、リポフェクチン法で行った。
5. YB-1 の核内移行は、リンパ球を抗体で染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

ステロイド薬を長用量使用し、臨床的にステロイド薬耐性を有すると考えられた SLE (一部 MCTD) 27 症例に CyA の併用投与を行った。症例は、①1 年以上に亘りステロイド薬減量不能、②骨粗鬆症、糖尿病、高脂血症

等の副作用の為減量を要する、③肝、腎障害などの臓器障害が少ない、④インフォームドコンセントを得る、の条件を全て満たす症例を選択した。CyA 血中濃度は、50～150 ng/mlを保つよう設定した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、患者からインフォームドコンセントを得た上で、所属機関の倫理委員会規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全のセキュリティシステムをもって厳重に管理する。患者は、経済的負担を始め如何なる不利益も被らない事を明確にする。

C. 研究結果

1. ステロイド薬長期連用 SLE 患者末梢血 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞では、未治療又は早期 SLE 患者及び健常人に比べ、YB-1 の細胞内発現と P-gp の細胞膜上での発現が増強した。
2. ステロイド長期連用 SLE 患者リンパ球では、細胞内ステロイド濃度が有意に低下した
3. 健常人リンパ球に IL-2 または IL-4 を添加すると、YB-1 の核内移行、MDR-1 の転写、P-gp の細胞表面発現が誘導された。
4. 健常人リンパ球における IL-2 による P-gp 発現誘導は、YB-1 のアンチセンスをあらかじめ遺伝子導入することにより抑制された。
5. SLE 患者リンパ球の細胞内ステロイド濃度低下は、シクロスポリン CyA やタクロリムス、ベラパミル等の P-gp 拮抗分子での細胞前処理により健常人レベルにまで回復した。
6. 健常人リンパ球の YB-1 遺伝子導入により齎される細胞内ステロイド濃度低下も CyA 処理で回復した。
7. ステロイド薬を長用量使用し、臨床的にステロイド薬耐性 SLE (一部 MCTD を含む) 27 症例に、CyA の併用投与を行った結果、22 例で臨床症状、所見、免疫学的検査所見等の改善を認め、18 例でステロイド薬維持量減量を可能にした。

8. CyA 有効症例では、末梢血リンパ球における YB-1 の細胞内発現と P-gp の細胞膜上での発現が増強した。

D. 考察

ステロイド薬長期連用 SLE 患者リンパ球では、MDR-1 転写因子 YB-1 と P-gp の発現増強により、ステロイド薬の細胞外排出が促進して細胞内ステロイド濃度が減少し、ステロイド薬耐性の原因となり得る事が明らかとなった。一方、CyA は、NFAT 阻害活性を有する免疫抑制薬であるが、SLE 患者リンパ球では P-gp と拮抗的に結合する事により、ステロイド薬の細胞外排出を抑制し、細胞内濃度維持作用を呈した。

これらの基礎的理論に基づき、ステロイド薬耐性を呈する SLE 長期罹患症例に対する CyA 併用療法により、約 80% の症例で臨床症候、免疫学的検査所見等の改善を認め、ステロイド薬維持量減量を可能にした。また、CyA 有効症例では、末梢血リンパ球における YB-1 の細胞内発現と P-gp の細胞膜上での発現が増強した。以上より、薬物耐性を獲得した SLE 症例では、P-gp を介するステロイド薬等の多剤抵抗性改善を目的として CyA の使用を考慮する価値があると考えられた。

一方、正常リンパ球に、IL-2 や IL-4 添加により YB-1 の核内への移行と P-gp の細胞膜上での発現が増強し、その結果、ステロイドの細胞外排出が亢進した。実際、一部の SLE 症例では、疾患早期から活性化リンパ球における P-gp の発現亢進が観察された。これらの結果は、疾患活動性の高い SLE 症例に見られる活性化リンパ球に於ける薬物不応性獲得の機序を示唆するものである。また、斯様な早期からステロイド不応性を呈する症例でもシクロスポリンの併用を検討する必要性が示唆された。

MDR-1 は、抗癌剤抵抗性の獲得機序において注目され、その対策が開始されている。しかし、SLE 等の自己免疫疾患における MDR-1 の関与については既報がない。今回の結果より、長期ステロイド連用によるステロイド耐性、或いは、疾患活動性の高い症例に於けるステロイド不応性の獲得機序に於いて

て、MDR-1 遺伝子表現型である P-gp の関与が示唆された。さらに、ステロイド耐性、或いは、不応性を獲得した SLE 症例では、P-gp を介するステロイド薬抵抗性改善を目的として CyA 使用を考慮する価値があると考えられた。

E. 結論

SLE に於ける長期薬物連用によるステロイド耐性獲得に P-gp が関与すること、CyA によって拮抗的に薬剤耐性を克服しうること、さらに、疾患活動性が高い SLE の活性化リンパ球ではすでに P-gp が発現し、治療不応性を齎すこと等が示唆された。疾患活動性が高くステロイド薬単独では疾患制御が困難、或いは、不応性を呈する SLE 症例、および、長期ステロイド薬連用により耐性を獲得した SLE 症例の双方に於いて、P-gp を介するステロイド薬抵抗性改善を目的として CyA の使用を考慮する価値があると考えられた。

F.健康危険情報

該当事項なし

G.研究発表

1. 論文発表

該当事項なし

2. 学会発表

辻村静代, 齋藤和義, 中塚敬輔, 中山田真吾, 中野和久, 徳永美貴子, 田中良哉: 膠原病疾患に於けるシクロスポリン療法の理論と実際. 第 29 回日本臨床免疫学会総会 (大阪) 平成 13 年 12 月

SLE における病像・病態の規定因子に関する研究

橋本博史（順天堂大学 膠原病内科）

研究要旨

昨年までの研究で SLE の病像の規定因子の一つとして Th1/Th2 バランスの重要性を指摘してきたが、血中と T 細胞とで差違を認める問題があり、原因の究明のため、IL-13 を用いた細胞内染色とリンパ球の IL-13 産生能について検討した。IL-13 を用いた細胞内染色では Th1・Th2 に差はなく、これまでの IL-4 を用いた Th1 優位の結果と異なっていた。また、無刺激培養の系での検討から IL-13 はリンパ球以外の細胞の産生の可能性が出てきた。これらの結果は血中と T 細胞の差違が IL-4 を用いた細胞内染色と非リンパ球の Th2 サイトカインの産生に起因することを示唆していた。一方、この Th1/Th2 バランスの他、腎症に関連する B 細胞上の CD72 及び、重症度に関連する IL-15 も病像を規定する新たな因子として加えられた。

A. 研究目的

SLE の病像の規定因子として、古くは自己抗体、最近では HLA Type、活性化リンパ球の分画や IgG サブクラス等が報告されてきた。本研究はさらに、病像・病態を規定する因子を検索する目的で始まった。まず、初年度に病像が SLE の長期予後に密接に関連し、初期治療において病型を的確に判断することが重要であることを示すと同時に、前述の活性化リンパ球の分画や IgG サブクラスの背景には Th1/Th2 バランスが関与することを示した。次年度ではその Th1/Th2 バランスを調節するサイトカインとしての IL-12・IL-18 の重要性を示すと同時に、病像の局所の規定因子についても検討し、その中でも重篤な CNS ループスに関与する局所因子としてのモノアミンの重要性を示した。今年度は最終年度としてまだ未解決の問題を解決するため、以下に示す問題点に絞って検討してみた。すなわち、#1 Th1/Th2 バランスに関しては、① Th1/Th2 バランスの血清（Th2 優位）と細胞（Th1 優位）の差違②治療との関連につ

いて検討してみた。さらに#2 細胞表面分子の病像への関与#3 病像の重症化の因子についても検討してみた。

B. 研究方法

1. Th1/Th2 バランス

①血清と細胞の差違の原因検索

この問題の原因として、細胞の Th1/Th2 バランスの検討に IL-4 を用いていることが原因の一つと考えられることから、血清中でも高い IL-13 を用いて再度検討した。対象は急性期 SLE30 例で、過去の報告に準じてリンパ球を PMA・Ionomycin で 4 時間刺激した後、細胞内染色を行った。また、Th2 サイトカイン T 細胞以外の産生や IL-18 の Mφ 以外の細胞からの産生の可能性があることから、急性期 SLE 患者 13 例のリンパ球を付着細胞を除去した後、5 日間無刺激培養して、前及び 1 日目-5 日目の培養上清の IL-13、IL-18 を ELISA 法で測定し、その最高値を産生能とした。

②治療と関連の検討

①で示した IL-13 を用いた細胞内染色の系をステロイド治療前と 4 週間後で比較検討した。

2. 細胞表面分子

T 細胞・B 細胞反応に関わる因子として、CD11a/CD54, CD28/CD80/86, CD154/CD40, CD27/70, CD100/CD72 について、FACS で解析した。

3. 重症度の因子

各種因子のうち IL-15 が特に重症例で高値であることに着目し、急性期 SLE の他、他の膠原病の急性期を対象に IL-15 を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

1. Th1/Th2 バランス

① IL-13 を用いた細胞内染色

急性期 SLE 患者 CD4 陽性 T 細胞の Th1/Th2 をまず IFN γ /IL-4 で検討すると過去の報告通り、SLE で高値 (IFN 高値) を示したが、IL-4 の代わりに IL-13 で検討すると正常人と差を認めなかった。ただ、急性期でも初発例と再発例で差を認め、前述の IFN γ /IL-4 の高値は初発例に限られ、再発例では IFN γ /IL-13 は正常人より低値 (Th2 優位) の傾向を示した。治療との関連を IFN γ /IL-13 で検討すると、IL-13 陽性 CD4 陽性 T 細胞は治療後低下、IFN γ 陽性 CD4 陽性 T 細胞は増加傾向を示し、IFN γ /IL-13 は低下する症例が多かった。

②末梢血リンパ球の IL-13・IL-18 産生

末梢血リンパ球を無刺激下に培養したところ、症例により i) IL-13・IL-18 両方産生 ii) IL-13 のみ産生 iii) IL-18 のみ産生 iv) いずれも産生せずの 4 つのパターンに分かれた。このうち、ii) iii) が初発例に多い傾向を認めた。

3. 細胞表面分子

急性期 SLE では T 細胞では CD11a, CD70 B 細胞では CD54, CD86, CD27・70 の発現亢進を認めたが、特定の病像との関連はなか

った。一方、B 細胞の CD72 は腎症のある症例で発現が低下していた。

4. IL-15

急性期膠原病では PM/DM, SSc, PAN で高値を示した。病態との関連では血球貧食症候群・間質性肺炎・血管病変といった重篤な病態で高値を示した。予後との関連では IL-15 高値の症例では死亡率が高かった。

D. 考察

本研究では SLE における多様な病像・病態の規定因子の重要性を探求してきた。これまで、SLE で病像・病態が多様なのは知られていたが、これが臨床的にどの程度重要性を持つかは Evidence がなかった。初年度の研究ではこれをまず明らかにするために、病型別の長期予後を検討し、確かに病型により予後が明らかに異なることを示し、SLE 患者を病型別に分けて捉えて、治療しておくことの重要性が改めて認識された。そして、この病像を規定する因子の探求の重要性も判明した。これまで我々は病像に規定因子として、活性化リンパ球のサブセット及び IgG サブクラスを挙げてきたが、この背景にサイトカイン特に Th1/Th2 バランスが存在する可能性を推定していた。初年度の研究では、確かに Th1・Th2 サイトカインがそれぞれ異なった病像を規定することを示し、病像の規定因子の新しい候補として Th1/Th2 バランスが挙げられるようになってきた。さらに、次年度では Th1/Th2 バランスがいかなるもので調節しているかを検討し、Th1 を誘導する IL-12, IL-18 の重要性及び Th2 の誘導にも関与する IL-18 の重要性が示唆された。しかしながら、Th1/Th2 バランスも血液中 (Th2 優位) と産生する T 細胞のレベル (Th1 優位) では内容が異なるという問題が発生し、病像の規定因子として挙げる以上は解決せざるをえなくなってきた。そこで、今年度我々は 2 つのアプローチでの問題の解決を試みてみた。1 つはこれまで血中で Th2 優位と言われた根拠の

サイトカインがIL-6, IL-13であるのに対して、Th1 優位と言われているT細胞ではIL-4をTh2 サイトカインの代表として使用している点に着目した。実際、Th2細胞としてIL-13を用いて検討すると決してTh1 優位ではないことが判明した。一方、IL-13はT細胞から産生されると言われているが、SLEで増加するTh2 サイトカインのIL-6, IL-10はマクロファージやB細胞から産生されることがすでに判明しており、IL-13についても同様に可能性がある。T細胞がTh2 優位でなくても、これらの細胞から産生されるTh2 サイトカインが血中はTh2 優位と言う状況を作り出している可能性がある。これを証明するために無刺激培養下で、IL-13の産生能を検討すると、症例によってはリンパ球が産生しないこともあり、非リンパ球のIL-13産生の可能性が出てきた。今後、さらに細胞を分けて検討していく予定であるが、これまでの結果はTh1/Th2 バランスを多角的に見て、サイトカインネットワークとして病像を規定するという考え方が重要であるということを示している。一方、前述のIL-18はSLEの多くの症例で増加し、Th1・Th2 どちらのバランスにも関与していることが判明している。IL-18はマクロファージ系の細胞で産生されるが、SLEではこの機能が低下しているという過去の報告と相反することになる。今回、この事実を探求するため、IL-13同様、無刺激培養で測定すると、これまで報告の出たないリンパ球での産生の可能性が出てきた。これも今後さらに煮詰めなくてはならないが、SLEの免疫異常が通常の人では出現しないサイトカイン異常を持つ可能性がでてきた。このように、SLEの病像規定因子の候補であるTh1/Th2 バランスの背景には、複雑なサイトカインネットワークの異常が絡んでいることがわかってきた。一方、サイトカインと並んで細胞性免疫で重要な因子は細胞表面分子である。我々は最後の本年度の研究で、この細胞表面分子も病像の規定因子になり得るか

どうかについても検討した。しかしながら、SLEで発現の亢進する因子は病像に関連なく、ほとんどの症例で出現する結果になった。ただし、B細胞上に発現するCD72は腎症の症例で発現が低下することが判明した。この意味付けは不明で、今後の検討課題として残った。一方、病像にとってさらに重要なのが、局所で中心に関与する因子がないかどうかという点と、病態を重要化する因子がないかどうかと言う点である。前者に関しては昨年度、最も重篤な病変であるCNSループスでモノアミンが局所症状に誘発に重要であることを報告した。今年度は重症化する因子の候補として、IL-15を検討して見た。その結果、IL-15高値例では予後不良で死亡率が高いことが判明した。これはSLEよりも他の膠原病で顕著で、臨床的に予後の予測因子としてのIL-15に期待が持てるかもしれない。以上、3年間で病像の新たな規定因子の発見や、病像の形成のより詳しい部分が判明してきた。しかしながら、課題としていくつか残した問題点もあり、今後もこの問題点の解決のためにさらなる検討が必要である。

E. 結論

SLEの病像の新たな規定因子としてTh1/Th2 バランスが重要であることが判明したが、これは複雑なサイトカインネットワークの一翼に過ぎず、結果を多角的に捉えることが重要と思われた。また、重篤な中枢神経病変の局所の因子としてのモノアミン、重症度を規定するIL-15も別の角度で病像の規定因子の候補と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, J., Morimoto, S., Amano, H., Tokano, Y., Takasaki, Y., Hashimoto H.: Serum level of interleukin 15 in patients with rheumatic disease. *J. Rheumatol.* 28 : 2389-2391, 2001.
 2. Tokano, Y., Suzuki, J., Amano, H., Nozawa, K., Morimoto, S., Hashimoto, H.: Increased levels of interleukin-18 in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheum.* in press, 2002.
- 2. 学会発表**
1. 戸叶嘉明、鈴木淳、森本真司、橋本博史 : SLE 末梢血 CD4 陽性 T 細胞の IFN γ / IL-13 の検討. *日本臨床免疫学会誌* 24 : 258、2001.
 2. 鈴木淳、森本真司、満尾晶子、戸叶嘉明、橋本博史 : SLE 患者における CD72 及び CD100 の発現の検討. *日本臨床免疫学会誌* 24 : 245、2001.

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

全身性エリテマトーデス（SLE）例の活動期、臓器障害発現と食事要因の関連する研究

佐々木 毅（東北大学大学院医学研究科免疫・血液病制御学、血液・免疫科）

研究要旨

非活動期の女性 SLE 患者集団を 4 年間追跡調査し、活動期及び臓器障害発現と食事要因との関連を調べた。活動期発現に関する分析には比例ハザードモデルを用い、交絡要因を補正した上で各食事要因の相対危険度を算出した。その結果、ビタミン C 摂取が活動期発現のリスクを有意に低下させていた (p for trend=0.005)。また、血管性臓器障害を発症した患者では、発症しなかった患者に比べてベースライン時の植物性脂肪摂取量が有意に多かった ($p=0.04$)。これらの結果は、食事要因が SLE の予後に影響を与えることを示しており、食事療法の可能性が示唆された。

A.研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）の進展と食事要因との関連がいくつかの動物実験や小規模臨床試験から示唆されている。特に、過度の脂肪摂取により生存期間が短縮するとのマウスモデルでの観察結果や、魚油 fish oil によって血液データに改善がみられるとの臨床試験での報告などから脂肪摂取と SLE の経過予後との関連が注目されてきた。しかし、これらの関連はこれまで疫学研究では確認されたことがなく、また、脂肪以外の食事要因に関する知見はほとんどない。そこで、本研究では SLE 患者集団の前向き調査を行ない、各種栄養素摂取と活動期及び臓器障害発現との関連を調べた。

B.方法

宮城県内の 23 医療機関（福島県 1、岩手県 2 を含む）に 1995 年 6 月から 9 月にかけて来院した女性 SLE 患者 279 名を対象に食物頻度摂取調査を含む自記式質問紙調査を

行ない、主要栄養素の摂取量と生活習慣に関する情報を得た。さらに、医療機関の担当医にこれらの患者の 1999 年末までの経過観察を依頼し、観察期間内の活動期発現（LACC : Lupus activity criteria count により判定）と臓器障害発生に関する情報を得た。今回の研究では、このうちのベースライン調査時に非活動期でかつ食物頻度摂取調査からの栄養素摂取量データが完全であった者を対象とした。

活動期発現と食事要因との関連の解析には比例ハザードモデルを用いた。エネルギー調整栄養素摂取量をパーセント点で 3 群に分け、最下位を基準に交絡要因（年齢、病悩期間、臓器障害スコア、ステロイド投与量、教育歴、肥満度）を補正した各群の活動期発現のリスクを算出した。臓器障害発現と食事要因との関連の解析は、3 つの血管性臓器障害（狭心症、心筋梗塞、脳血管障害）進展のみを対象とした。臓器障害のイベント数が少なかったため、1995 年ベー

スライン時のデータをクロス集計し、 χ^2 検定、T検定により比較することとした。

C. 結果

活動期発現と食事要因との関連の解析は、216名の1995年時非活動期の患者を対象とした。1999年末までに9,966 person-monthが蓄積され、43名が活動期へ移行した。脂肪摂取と活動期発現との関連は認められなかったが、ビタミンC摂取が活動期発現のリスクを有意に低下させていた(最上位の相対危険度0.26, 95%信頼区間:0.10-0.67, p for trend=0.005)。また粗繊維摂取とリスク低下との関連も示唆された(p for trend=0.06)。

血管性臓器障害の進展と食事要因との関連の解析は、196名の血管性臓器障害既往のない非活動期患者を対象とした。このうち血管性臓器障害を発症したのは7名で、これらの患者は発症しなかった患者に比べてベースライン時のエネルギー摂取量や糖類摂取量は少なめだが、脂肪摂取量、特に植物性脂肪の摂取量が多かった(p=0.04)。

D. 考察

本研究では、前向き調査により女性SLE患者の食事要因と予後を調べ、関連要因を補正した各種栄養素摂取のリスク評価を試みた。SLEの病像や経過は多彩であるが、いくつかの食事要因(栄養素)がSLEの予後(活動期発現、血管性臓器障害の進展)に影響を与えることが示された。

1. 活動期発現と食事要因との関連

有意な関連が示されたビタミンCは抗酸化ビタミンであり、免疫系や炎症反応を調節する働きがあることが知られている。こ

れらが活動期発現に抑制的に作用している可能性がある。Vegetarian dietによりSLEの臨床所見が改善したとの症例報告もあり、今回の結果はこれを支持するものである。

2. 血管性臓器障害の進展と食事要因との関連

今回の研究では3つの異なる疾患をまとめて分析しており、今後、個別の疾患に関する分析が必要である。但し、一般人口を対象とした先行研究の結果も考慮すると、血管性臓器障害の進展を防ぐためには、脂肪摂取を適正にすることが大変重要であると思われる。

E. 結論

SLEの治療においては、ステロイドなどの長期服用による副作用が大きな問題である。今回の研究はSLEの食事療法の可能性を示唆しており、臨床への応用が期待できるとと思われる。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Y. Minami, T. Sasaki, Y. Arai, T. Hosokawa, S. Hisamichi, The Miyagi Lupus Study Group.: Psychological profiles and health status in Japanese female patients with systemic lupus erythematosus: The Miyagi Lupus Collaborative Study. *J Epidemiol* (in press)
2. Y. Fu, K. K. Ishii, Y. Munakata, T. Saitoh, M. Kaku, and T. Sasaki.: Regulation of human TNF α promoter by parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J. Virology* in press, 2002
3. M. Takahashi, T. Funato, Y. Suzuki, H. Fujii, K. Kumuraishi, M. Kaku, and T. Sasaki : Chemically modified Ribozyme Targeting TNF- α

- mRNA regulates TNF- α and IL-6 Synthesis in Synovial Fibroblasts of Patients with Rheumatoid Arthritis. J.Clin. Immunol in press, 2002
4. O.Sasaki, K.Meguro, Y.Tohmiya, T.Funato, S.Shibahara, and T.Sasaki: Structural alteration of retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene, RIZ, in human leukaemia. Tohoku. J. Exp. Med in press, 2002
 5. H.Harigae, R.Ichinohasama, I.Miura, J.Kameoka, K.Meguro, K.Miyamura, O.Sasaki, I.Ishikawa, S.Takahashi, M.Kaku, and T.Sasaki: Primary marginal zone lymphoma of the thymus accompanied by chromosomal anomaly, 46X, dup(X)(P11P22). Cancer Genetics cytogenetics in press, 2002
 6. M.Takahashi, T.Funato, K.Kumuraishi, M.Kaku, and T.Sasaki: measurement of tumor necrosis factor- α messenger RNA in synovial fibroblasts by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J.Lab Clin Med 137:101-106, 2001
 7. T.Funato, N.Satou, D.Abukawa, J.Satou, Y.Abe, K.K.Ishii, K.Iinuma, M.Kaku, and T.Sasaki: Quantitative evaluation of cytomegalovirus DNA in infantile hepatitis. Infantile CMV hepatitis 217-222, 2001
 8. M.Rahman, Y.Hirabayashi, T.Ishii, T.Kodera, M.Watanabe, N.Takasawa, T.Sasaki: A repressor element in the 5' -untranslated region of human Pax 5 exon 1A. Gene 263 :59-66
 9. M.Rahman, Y.Hirabayashi, T.Ishii, M.Watanabe, L.Malton and T.Sasaki: Prednisolone sodium succinate down-regulates BSAP/Pax5 and causes a growth arrest in the nalm6 pre-B cell line. Tohoku.J.Exp.Med. 193:237-244, 2001
 10. N.Takasawa, N.Ishii, N.Higashimura, K.Murata, Y.Tanaka, M.Nakamura, T.Sasaki, and K.Sugamura: Expression of gp34(OX40 Ligand) and OX40 on Human T cell clones. Jpn.J.Cancer Res. 92:377-382, 2001
 11. S.Takahashi, H.Harigae, H.Yokoyama, M.Kaku, T.Sasaki: Genomic structure and regulation of a novel human gene, Klp1¹. Biochim.Biophys Acta 91600:1-5, 2001.
 12. S.Fujimaki, H.Harigae, T.Sugamura, N.Takasawa, T.Sasaki, and M.Kaku: Decreased expression of transcription factor GATA-2 in haematopoietic stem cells in patients with aplastic anaemia. British Journal of Haematology. 113:53-57, 2001
 13. J.Satou, T.Funato, N.Satoh, Y.Abe, K.K.Ishii, T.Sasaki, and M.Kaku: Quantitative PCR determination of Human Cytomegalovirus in Blood Cells. Journal of Clinical Laboratory Analysis 15:122-126, 2001
 14. 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, and 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. 124:159-164, 2001
 15. 松木寮子、小澤鹿子、西山悠子、藤巻慎一、船渡忠男、吉田克巳、佐々木毅、賀来満夫：Light Cycler システムによる