

- Kaneda M, Ontachi Y, Mizutani T, Ito T, Asakura H, Nakao S: High incidence of arterial thrombosis due to antiphospholipid antibodies in patients with Evans' syndrome; significance of detecting lupus anticoagulant as a predictor. *Lupus* 11(9): 607, 2002. (10th International Congress on antiphospholipid antibodies. 29th Sept-3rd Oct., 2002, Sicily, Italy)
4. Yamazaki M, Takami A, Asakura H, Nakao S: Rituximab reduces antiphospholipid antibody (APA) titers and improves hypercoagulability in patients with antiphospholipid syndromes (APS). *Blood* 100(11): 269a, 2002. (43rd American Society of Hematology, Philadelphia, USA).
 5. 山崎雅英、酒井果奈子、朝倉英策、中尾眞二。Evans 症候群における抗リン脂質抗体症候群の陽性率と臨床的意義。第 99 回日本内科学会総会、2002 年 3 月 28 日—30 日、名古屋)
 6. 山崎雅英。抗リン脂質抗体症候群の最新の知見と治療法(シンポジウム I 「自己免疫疾患の治療指針」)。第 53 回日本皮膚科学会中部支部総会・学術大会。2002 年 9 月 15 日—16 日、岐阜)
 7. 山崎雅英、高見昭良、吉田知孝、奥村広和、朝倉英策、中尾眞二。NHL に対する Flu+CY 療法後発症した抗リン脂質抗体陽性血小板減少症に対する抗 CD20 抗体(Rituximab)の効果。第 64 回日本血液学会総会、2002 年 9 月 12 日—15 日、東京)
 8. 山崎雅英。全身性強皮症における抗リン脂質抗体陽性率と臨床的特徴について。平成 14 年度厚生労働省「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」研究班班会議、2003 年 1 月 18 日、東京)

表 1. rituximab 投与前後の抗リン脂質抗体価、凝血学的マーカーの変化

症例	年齢	性	原疾患 R の効果	aCL-IgG	aCL-IgM	aPT/PS-IgG	aPT/PS-IgM	APTT	LA	Plts	F ₁₊₂	
				(GPL)	(MPL)	(U/μL)	(U/μL)	(sec.)	(× 10 ³ /μL)	(nM)		
1	50	M	NHL good PR	<5 <5	24.4 <5	20.4 5.4	86.5 17.5	68.3 41.2	+ +	32 119	1.82 0.77	Tx 前 R 投与終了直後
2	78	F	NHL early relapse	78.2 12.8	42.8 7.3	32.4 12.4	8.5 7.8	5.6 49.5	+ +	167 175	2.65 0.57	Tx 前 R 投与終了直後
3	45	F	ITP NR	18.5 <5	32.9 8.6	25.4 11	42.8 6.8	72.8 55.4	+ +	6 6	2.11 0.85	Tx 前 R 投与終了直後

aCL-IgG; IgG 型抗カルジオリピン抗体、aCL-IgM; IgM 型抗カルジオリピン抗体、aPT/PS-IgG; IgG 型フォスファチジルセリン依存性抗プロトンピン抗体、aPT/PS-IgM; IgM 型フォスファチジルセリン依存性抗プロトンピン抗体、APTT; 活性化部分トロンボプラスチン時間、LA; ループスアンチコアグラント、Plts; 血小板数、F1+2; プロトンピンフラグメント 1+2。
M; 男性、F; 女性。NHL: 非ホジキンリンパ腫、ITP; 特発性血小板減少性紫斑病。

抗リン脂質抗体症候群の診断における抗プロトロンビン抗体の測定意義について

小池隆夫(北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座・第二内科)

研究要旨

抗プロトロンビン抗体は重要な抗リン脂質抗体のひとつであるが、APS の臨床症状との相関が疑問視され、APS の診断には採用されていなかった。しかし抗プロトロンビン抗体は測定法によって結果がまったく異なっている。我々のこれまでの検討から、ホスファチジルセリンを固相化してカルシウムの存在下でプロトロンビンとの複合体をつくってこれを抗原とするホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(APS/PT)が APS のマーカーとなりうるということがわかった。今回、昨年よりさらに APS 患者数を増やして、APS/PT の測定意義、モノクローナル APS/PT を使用した半定量的ループスアンチコアグラント(LA)を検討した。IgG APS/PT は APS と診断された患者の 63%に検出され、非 APS 患者の 8%に比べて有意に高頻度であった。半定量 LA で基準値(健常人 30 例の平均+2SD)を超えたものは APS 患者 52 人中 49 人(94%)で、非 APS 患者 29/137(21%)より有意に高かった。APT/PS は APS の臨床症状に特異性の高いマーカーとしての役割をもつ可能性が示された。また、おそらく LA の補助診断として有用である。モノクローナル APS/PT をもちいた半定量 LA をおこなうと著しく高い感度で APS のスクリーニングが可能である。

A. 研究目的

本研究班の目的のひとつは、抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断基準(改訂)と治療指針を作成することである。1998 年に APS の診断基準案が国際抗リン脂質抗体シンポジウムにて提案され(Sapporo-Criteria)、これをもとに我が国での診断基準を整備する予定である。この診断基準案のなかで、APS の診断のために IgG または IgM の β 2-グロブリン I 依存性抗カルジオリピン抗体、あるいはループスアンチコアグラント(LA)陽性を証明することが必須となっている。しかし、比較的標準化がすすんでいる前者にくらべて LA の判断基準は各施設でまちまちで、結果の解釈に大きな差異がでる。LA 判定のためのガイドライン作成は現在血栓止血学会、検査血液学会と本研究班が共同でとりこんでいる。抗プロトロンビン抗体は重要な抗リン脂質抗体のひとつであるが、APS の臨床症状との相関が疑問視され、APS の診断には採用されていなかった。しかし抗プロトロンビン抗体は測定法によって結果がまったく異なっている。国際血栓止血学会の標準化検討委員会

(ISTH-SSC)でも抗プロトロンビン抗体がとりあげられ、その標準化につき議論されたているが、APS のマーカーとしての意義については未解決のままである。SSC でとりあげられたのはプロトロンビンを抗原として直接 ELISA プレートに固相化する方法(APT-A: anti-prothronbin alone、リン脂質を用いずプロトロンビンのみを用いるので、この略語を用いる)のみであったが、我々のこれまでの検討か

ら、ホスファチジルセリン(PS)を固相化してカルシウムの存在下でプロトロンビンとの複合体をつくってこれを抗原とするホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(APS/PT)が APS のマーカーとなりうるということがわかった。今回、昨年よりさらに APS 患者数を増やして、APS/PT の測定意義、モノクローナル APS/PT を使用した半定量的 LA、また APS 患者から作成したヒト型のモノクローナル APS/PT の特性を検討した結果をふまえて、現在の APS 診断における抗プロトロンビン抗体測定の意義につき考察する。

B. 研究方法

当科自己免疫疾患患者あわせて189人を対象とした。このうち52人がSapporo-Criteriaを満たしてAPSと診断された。APS/PTは、PSをELISAプレートに固相化後、5mM CaCl₂の存在下でプロトロンビンを加え、PS-プロトロンビン複合体をプレート上の抗原として測定した。

次に、マウス抗ヒトプロトロンビン抗体を作成した。得られたクローンのうち231DはAPS/PT活性をもつが、プロトロンビンをELISAプレートに直接固相化した場合は結合せず、したがってAPT-A活性をもたないAPS/PTであり、APS患者にみられるAPS/PTと類似していた。また、231Dはプロトロンビナーゼの存在下のトロンビン生成を強く抑制し、抗凝固活性をもつことが示された。231Dを正常血漿に50-2・g/mlに加えるとLAスクリーニング検査(希釈aPTT、dRVVTおよびKCT)で濃度依存性に凝固時間延長を示した。サンプル血漿を同じ正常血漿で1:4に希釈し、上記3法でLAテストをおこなって、231Dの段階希釈で作成した標準曲線から231D 1.0・g/mlに相当するサンプル血漿の抗凝固活性を1.0 ACUとして半定量化した。使用した試薬のいずれかで健常人30人のACUの平均+2SDを超えるとき、LA陽性とした。

今回さらにAPS患者末梢血B細胞にEBウイルスをトランスフォームしてAPS/PTアッセイでスクリーニングし、ハイブリドーマを樹立した。これらのモノクローナル自己抗体を使用して、自己抗体としての抗プロトロンビン抗体の免疫学的特性を検討した。

(倫理面への配慮)

この研究には倫理的問題は特に含まれない、

C. 研究結果

本研究の対象群における各種抗リン脂質抗体のAPS診断における意義を表1にまとめた。

IgG APS/PTはAPSと診断された患者の64%に検出され、非APS患者の8%に比べて有意に高頻度であった。同じ検体でβ2GPI依存性抗カルジオリピン抗体を測定したところ、APS患者では54%、非APS患者では14%に陽性となり、APS/PTのAPS診断における意義は感度、特異度とも抗カルジオリピン抗体と同等かそれより勝る結果であった。

非自己免疫疾患でワーファリンを使用中の患者血漿、すなわち凝固因子欠乏状態の血漿を用いて検証したが、凝固因子欠乏状態はミキシングテストにもとづくこの半定量LAでは偽陽性はなかった。ACUが基準値を超えたものは

APS患者52人中49人(94%)で、非APS患者29/137(21%)より有意に高かった。

半定量LAとAPS/PT、抗カルジオリピン抗体との関係を表2に示した。APS/PTのLAに対する陽性予測値(APS/PTが陽性のときLAが陽性である確立)は84%であり、抗カルジオリピン抗体の72%より高かった。

4つのヒトAPS/PTクローンが患者2人から樹立され、標準プレートにプロトロンビンを直接コーティングするといずれのクローンも結合しなかった。酸化ELISAプレートにプロトロンビンをコーティングする抗プロトロンビン抗体アッセイ(APT-A)では、1クローンに弱い結合がみられたが、その他の3クローンはこの酸化プレート上のプロトロンビンには結合しなかった。精製したモノクローナル抗体を正常血漿に添加しても凝固時間の変化はなかったが、高感度のトロンビン精製を検出するクロモジェニックアッセイでは4クローン中3クローンにトロンビン生成抑制作用、すなわちループスアンチコアグラント様活性がみられた。

D. 考察

APT/PSはAPSの臨床症状に特異性の高いマーカーとしての役割をもつことが確認された。現在のAPSの定義はLAと抗カルジオリピン抗体のみでなされているが、APS/PTの意義が多施設で確認されれば再度検討されるべきである。また、APS/PTのLAに対する高い陽性予測値から、APS/PTは少なくともLAの補助検査としての意義は高い。LAの判断は、典型的なパターンをとるものは別にして、通常は容易とはいえない。また良質な血漿サンプルがないと信頼できる結果が得られない。APS/PTが陽性なら高い確立でLA陽性であるといえるので、ワーファリンやヘパリンなどの抗凝固療法を施行中でLAアッセイに向かない患者の場合、あるいは何らかの理由により血漿サンプルが得られないとき、などにはAPS/PTアッセイの価値は高い。

一方、抗カルジオリピン抗体とAPS/PTのELISA法だけではすべてのAPSを診断することはできないので、LAアッセイは依然として必要である。モノクローナルAPS/PTである231Dを用いればLAの半定量化が可能となり、よりの確なLA判定が行える。この方法でLAをおこなうと著しく高い感度でAPSのスクリーニングが可能である。ただし、LAはいろいろな対応抗原に対する抗体群がもつ、抗凝固活性という共通の機能を検出しているため、その感度は必然的に高くなるが、APS以外の患者でも陽性率が高く(21%)、注意が必要である。

また、ヒトモノクローナル APS/PT は LA 活性をもち、APS/PT が LA の責任抗体であることが証明された。ヒトの自己抗体である APS/PT クローンには APT-A 活性をもつものもたないものがあり、APS/PT の免疫学的な多様性もあわせて確認された。

これらのアッセイをどのような順番でどのように組み合わせてAPSを効率よく診断するかをさらに詳細に検討する予定である。

E. 結論

APS/PTおよびモノクローナルAPS/PTを用いた半定量LA検査はAPSの診断に有用な方法であると考えられる。

F. 健康危険情報

本年度の研究からは該当無し。

G. 研究発表

①. 国外発表

1. Koike, T. : " Anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibodies: application in the clinic" 3rd International Congress on Autoimmunity, Geneva, Switzerland, February, 20~24, 2002.
2. Koike, T. : " Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis." 1st Tuzing Antiphospholipid, Conference, Tuzing, Germany, April , 22~25, 2002.
3. Koike, T. : " Anti-prothronbin antibodies; pathogenesis and specificity." 6th Dresden symposium on Autoantibodies, Dresden, Germany, September , 4~7, 2002.

② 国内発表

4. 小池隆夫：「抗リン脂質抗体症候群：最近の話題」第166回日本内科学会東北地方会生涯教育講演会、仙台市、2002年2月9日
5. 小池隆夫：「膠原病と幹細胞移植」厚生労働省ヒトゲノム・再生医療等研究事

業五班合同公開シンポジウム会、東京都、2002年2月16日

6. 小池 隆夫：「1型糖尿病と研究の流れと問題点」第45回日本糖尿病学会、東京都、2002年5月16-19日
7. 小池 隆夫：「抗リン脂質抗体症候群：自己抗体による血栓症と動脈硬化」国立国際医療センター研究所第9回箱根山セミナー、東京都、2002年6月10日
8. 小池 隆夫：「抗リン脂質抗体症候群」第32回日本臨床免疫学会学術総会、東京都、2002年12月4~6日

H. 知的財産権の出願・登録

該当無し

- I. 謝辞 本研究は、北海道大学大学院医学研究科・分子病態制御学、渥美達也講師の御協力でおこなわれたので深謝する。

表1 各抗リン脂質抗体のAPSの診断的意義。数字はそれぞれのアッセイの陽性患者数。

アッセイ	APS (n=52)	非APS (n=137)	感度	特異度
IgG APS/PT	29	8	56 %	94 %
IgG/M APS/PT	33	11	63 %	92 %
IgG aCL	26	15	50 %	89 %
IgG/M aCL	28	19	54 %	86 %
ループスアンチコアグulant	49	29	94 %	79 %

表2 APS/PTのループスアンチコアグulantに対する陽性予測値。数字はそれぞれのアッセイの陽性患者数。

アッセイ	LA (n=78)	非LA (n=111)	陽性予測値
IgG/M APS/PT	36	7	84 %
IgG/M aCL	34	13	72 %
IgG/M APS/PTまたは aCL	50	17	75 %

SLEをはじめとするリウマチ性疾患 感受性遺伝子に関する研究

徳永 勝士(東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学)

研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)および関節リウマチ(RA)を中心とするリウマチ性疾患の疾患感受性遺伝子を見出す目的で、本年度は、LIR1(ILT2, LILRB1), BAFF-R 遺伝子の多型スクリーニングと関連解析を施行し、LIR1の細胞外領域多型がHLA-DRB1 shared epitope 陰性の関節リウマチ(RA)と有意な関連を示し、細胞内領域多型が SLE と関連する傾向を示すこと、BLyS と BAFF-R の遺伝子型の組み合わせが RA と関連することを見出した。さらに、以前 SLE との関連を報告した HLA-DRB1 および Fcγ受容体 IIb 遺伝子の関連をタイ人集団において検討し、それぞれ *DRB1*1502*, *FCGR2B-232T* および *3B-NA2* の関連が検出された。これらの知見と日本人集団との比較は、疾患感受性遺伝子をさらなる限局化や、疾患との関連の機序の検討のうえで、有用な情報を与えると考えられる。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)や関節リウマチ(RA)の病因は未解明であるが、ある程度の遺伝的背景が存在することが知られており、病因・病態の解明上、現在のゲノム解析のアプローチの有用性が期待される。

われわれは、これまで、多数の候補遺伝子について、系統的な変異スクリーニングを施行し、多数の新規多型を記載するとともに、*TNFR2-M196R*, *CD19 3' 非翻訳領域の GT リピート多型*, *FCGR2B-1232T* と SLE との新規の関連を報告した。

今回の研究班では、このようなアプローチをさらに継続するとともに、これまでに統計学的な関連を検出した多型について、機能解析や、他集団における共通性の検討を通じて、疾患感受性遺伝子であることの確立や、疾患発症に関連する機序を解明することを目的とする。

本年度は、新たな候補遺伝子として、leukocyte immunoglobulin-like receptor 1 (LIR1, LILRB1, ILT2) および BAFF-R 遺伝子の解析を行った。LIR1 は、血球系細胞に広範に発現し、HLA-class I 抗原を認識する抑制性受容体であ

る。SLE の感受性候補領域の一つでもある 19q13.4 にクラスターを形成する leukocyte receptor complex (LRC) 内に遺伝子座が存在する。

BAFF-R は、単球や樹状細胞に主に発現し、B細胞の生存、分化にきわめて重要な役割を果たし、近年 SLE, RA や Sjögren 症候群の病態における関与が大きな注目を集めている BLyS (BAFF) の主要な受容体であり、遺伝子座は 22q13.2 に位置する。なお、われわれはすでに BLyS の多型解析を終了し、プロモーター領域に mRNA レベルとの関連が存在する多型 (-871C>T) を報告している。

あわせて、過去に日本人 SLE との関連を報告した HLA-DRB1 および Fcγ受容体遺伝子群について、他集団における関連を検討する目的で、タイ集団の検討を施行した。

B. 研究方法

LIR1 および *BAFF-R* の多型スクリーニングは、直接塩基配列決定法および PCR-SSCP 法を用いて行った。*LIR1* については、家系検体を用いて、ハプロタイプを決定した。検出された多型部

位については、非血縁患者・健常者検体を用い、患者対照法による関連分析を施行した。

タイ患者・健常者の *HLA-DRB1*, *DQB1* は PCR-SSOP (sequence-specific oligonucleotide probing)法により、*FCGR2A*は PCR-RFLP, *2B*は、nested PCR 産物を LightCycler™ (Roche Diagnostics) を用いた ASO 法により、*3A* は PCR-SSCP 法により、*3B* は PCR-SSP 法により、それぞれ、遺伝子型を決定した。

(倫理面への配慮)

これらの研究は、東京大学大学院医学系研究科および共同研究施設の研究倫理審査委員会の承認を得た研究計画に従って、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、試料提供者の同意のもとに、匿名化した検体を使用して行われた。

C. 研究結果

1) *LIR1*

系統的多型スクリーニングにより、*LIR1* 遺伝子に17個所の SNP が検出され、うち5個所は非同義置換であった。家系試料を用いた検討から、これらの細胞外領域のアミノ酸置換を伴う SNPs が主として3種類のハプロタイプを形成して存在することが見出され、これらを暫定的に、*LIR1.01*, *.02*, *.03* と命名した。これらのうち、*LIR1.01/01* 遺伝子型のホモ接合体が、*HLA-DRB1* の疾患感受性アリルを有しない群 (shared epitope 陰性群)において、RA に有意に増加していた ($P=0.037$) (表1)。SLE との有意な関連は検出されなかった。

2) *BAFF-R*

多型スクリーニングにより、5個所の変異が検出され、うち2個所は一般集団における頻度が高く、多型と考えられた。これらは単独では SLE, RA との関連が見られなかったものの、過去に報告した、発現量との関連が示唆される *BLYS*-871C>T との組み合わせを検討すると、*BLYS*-871T 非保有者において、*BAFF-R*の3'非翻訳領域(UTR) c*120 T>C の保有者が RA に有意に少ないことが示された(表2)。

3) タイ人集団における SLE と *HLA-DRB1*,

FCGR 遺伝子群の関連分析

タイ人集団においては、SLE に *DRB1*1501*, *1502*, *1602* の増加が見出されたが、これらのうち、多重検定の補正を行っても有意差が保たれたのは、*DRB1*1502* のみであった。*DQB1* では、*DRB1*1502* と連鎖不平衡にある *DQB1*0501* の増加が認められた(表3)。

FCGR に関しては、日本人集団同様、*FCGR2B* と *3B* の強い連鎖不平衡が見られ、*FCGR2B-232T*, *3B-NA2* の有意な関連が検出された。*3A* についても関連が検出されたが、これは、*2B*, *3B* との連鎖不平衡による二次的な関連と考えられた(表4)。

D. 考察

今回 RA との関連が検出された *LIR1* アリルは、関連の見られないアリルと比較して、細胞外領域、特に *HLA-class I* との結合部位近傍に、3個所のアミノ酸置換を伴うものである。これらのアミノ酸置換により、*HLA-class I* との親和性に変化が生じ、*LIR1* が伝達する抑制型シグナルに何らかの変化が生じる可能性が考えられる。ただし、*LIR1* は、ほかの *LIR* ファミリーがクラスターを形成して縦列する染色体領域に位置することから、隣接する *LIR* 遺伝子との連鎖不平衡による二次的な関連である可能性も考えられ、現在、隣接する遺伝子群の多型解析を進めている。

当初、SLE における役割が注目された *BLYS* は、最近では、RA の病態における関与を示唆する報告もあり、今回、*BAFF-R* 多型との組み合わせが RA との関連を示したことも興味深い。*BLYS* 系は、*BLYS*, *APRIL* という2つのリガンドと、現在知られているだけで *BAFF-R*, *TACI*, *BCMA* という3つの受容体が存在する複雑な系であり、われわれはこれまでに *BLYS*, *BCMA* 多型の解析を終了している。今後、*TACI*, *APRIL* についても検討したうえで、最終的に、これらの多型の組み合わせと疾患感受性との関連を評価したい。

疾患感受性遺伝子を限局化していく上で、連鎖不平衡が異なる可能性がある複数の集団を比較して、共通性を探ることは、一つの有用な手段である。今回、タイ人集団において、*HLA-DRB1*

とFCGRにつき、日本人SLEと類似しているが異なる関連が観察された。すなわち、HLA-DRB1においては、日本人集団ではDRB1*1501の関連が見られたのに対し、タイ人では、DRB1*1502がもっとも強く関連していた。過去の報告では、DRB1*1501は、東アジアを含め、ほぼ世界中でSLEとの関連が報告されているのに対し、DRB1*1502は、台湾において関連が報告されている。この結果から、DRB1*1502は、東南アジアにおけるSLEの感受性アリルである可能性が示唆される。一方、FCGRについては、われわれ自身の先行研究で、日本人ではFCGR2B, 3Aがそれぞれ独立にSLEに関連する可能性が示唆されたが、今回、タイ人集団では、互いに連鎖不平衡にある2B, 3Bの関連が検出され、3Aの関連は二次的と思われた。この結果から、FCGRクラスターには、複数の疾患感受性遺伝子座があり、少なくともアジア集団においては、その一つはFCGR2Bである可能性が強く示唆される。今後、多型の機能解析を含め、さらに検討を進める予定である。

E. 結論

LIR1, BAFF-Rに多数の新規多型を検出し、ともに、他の遺伝子多型で層別化した場合に、RAとの関連が検出された。また、タイ人SLEにおいて、HLA-DRB1*1502, FCGR2B, 3Bの関連を見出し、日本人との比較を通じて、一義的な疾患感受性遺伝子を同定するための有用な情報を得た。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sirikong M, Tsuchiya N, Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Siriboonrit U, Tokunaga K: Association of HLA-DRB1*1502 – DQB1*0501 haplotype with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue*

Antigens 59: 113-117, 2002.

2) 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 Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: Contribution of FCGR2B to the genetic susceptibility to SLE. *Arthritis Rheum* 46: 1242-1254, 2002.

3) Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hagiwara K, Kano H, Takazoe M, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K: Polymorphisms of human CD19 gene: Possible association with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun* 3 Suppl 1:S21-30, 2002.

4) Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 3: 424-429, 2002.

5) Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Kashiwase K, Ishikawa Y, Arita H, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T: Association of HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302 haplotype, but not of TNFα promoter and NKp30 polymorphism, with postherpetic neuralgia (PHN) in the Japanese population. *Genes Immun* 3: 477-481, 2002.

6) Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, Tokunaga K: Studies on the association of Fcγ receptor IIA, IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with rheumatoid arthritis in Japanese: Evidence for a genetic interaction between HLA-DRB1 and FCGR3A. *Genes Immun* 3: 488-493, 2002.

7) Tsuchiya N, Ohashi J, Tokunaga K. Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders. *Immunol Rev* 190: 169-181, 2002.

8) Kyogoku C, Tsuchiya N, Shibue T, Tokunaga K, Matsuta K. TNFR2 position 196 polymorphism in Japanese patients with

rheumatoid arthritis: comment on the article by Dieudé et al [letter]. *Arthritis Rheum* 48: 273-274, 2003.

9) Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K. Variations of human killer cell lectin-like receptors : common occurrence of *NKG2-C* deletion in the general population. *Genes Immun* (in press)

10) Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, Katsushi Tokunaga K, Hashimoto H. Genetic background of Japanese patients with ANCA-associated vasculitis: Association of *HLA-DRB1*0901* with microscopic polyangiitis. *J. Rheumatol.* (in press)

11) Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Fujiwara K, Chandanayingyong D, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* (in press).

2. 学会発表

1) 土屋尚之、京極千恵子、黒木喜美子、氷上光輝、川崎綾、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：全身性エリテマトーデス疾患感受性遺伝子の検討。リウマチ 42: 237, 2002.

2) 山口晃弘、櫻井大祐、土屋尚之、徳永勝士、山本一彦：慢性関節リウマチ滑膜における特異的発現遺伝子の検討。リウマチ 42: 285, 2002.

3) 京極千恵子、土屋尚之、松多邦雄、徳永勝士：日本人慢性関節リウマチ患者におけるFcγ受容体遺伝子群多型の解析。リウマチ 42: 363, 2002.

4) 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：BLyS(TNFSF13B)の変異解析とSLEおよびRAとの関連の検討。リウマチ 42: 367, 2002.

5) 黒木喜美子、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：ヒトCD19遺伝子3'非翻訳領域内反復配列多型と日本人SLE感受性との関連。リウマチ 42: 367, 2002.

6) 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。リウマチ 42: 424, 2002.

7) Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Kashiwase K, Ishikawa Y, Arita H, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T: HLA haplotype, A*3303-B*4403-DRB1*1302 associates with postherpetic neuralgia (PHN). *Tissue Antigens* 59 (Suppl): 67, 2002.

8) Wakui M. Yamaguchi A, Sakurai D, Ogasawara K, Yokochi T, Hatta-Ohashi Y, Karaki S, Kurata K, Nishida N, Suyama A, Ikeda Y, Tsuchiya N, Tokunaga K: Differential display method-based gene expression analysis and development of a novel oligonucleotide array assay in GvHR. *Tissue Antigens* 59 (Suppl): 141, 2002.

9) Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Tsuno N, Okaji Y, Tokunaga K: Induction of proliferation and activation of human endothelial cells by overexpression of *ID* gene. *Arthritis Rheum* 46 (Suppl): S43, 2002.

10) Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, Shibue T, Tokunaga K: Analyses on the association of Fcγ receptor family and *TNFR2 (TNFRSF1B)* polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis in Japanese. *Arthritis Rheum* 46 (Suppl): S98, 2002.

11) Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, Tokunaga K, Hashimoto H: Genetic background of Japanese patients with ANCA-associated vasculitis: Association of *HLA-DRB1*0901* with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 46 (Suppl): S188, 2002.

12) Siriboonrit U, Kyogoku C, Sirikong M, Tsuchiya N, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Chandanayingyong D, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Arthritis Rheum* 46 (Suppl): S287, 2002.

13) Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T,

- Hashimoto H, Tokunaga K: Studies on the association of human *BLYS* (*BAFF*, *TNFSF13B*) and *BAFF-R* polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46 (Suppl): S288, 2002
- 14) Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Tokunaga K: Elevated level of FosB mRNA and FosB/DeltaFosB ratio in the synovial tissues of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46 (Suppl): S502, 2002.
- 15) Kuroki K, Tsuchiya N, Matsuta K, Fukazawa T, Juji T, Hashimoto H, Tokunaga K: Association of leukocyte immunoglobulin-like receptor 1 (LIR1, ILT2, LILRB1) polymorphism with susceptibility to rheumatoid arthritis in Japanese. *Arthritis Rheum* 46 (Suppl): S550, 2002.
- 16) Furuya T, Kotake S, Hakoda M, Ichikawa N, Nanke Y, Yamanishi Y, Kawasaki A, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani N: TNFA 5'-flanking region polymorphisms in 84 Japanese patients with myositis. *Arthritis Rheum* 46 (Suppl): S611, 2002.
- 17) 京極千恵子、土屋尚之、松多邦雄、渋谷司、徳永勝士:日本人関節リウマチ(RA)におけるFcγ受容体ファミリーおよび *TNFR2*(*TNFRSF1B*) 遺伝子多型の関連研究。日本人類遺伝学会第47回大会(2002年11月13日-15日、名古屋)。P113, 2002.
- 18) 黒木喜美子、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、十字猛夫、橋本博史、徳永勝士:Leukocyte immunoglobulin-like receptor 1 (LIR1)多型と日本人関節リウマチ疾患感受性との関連。日本人類遺伝学会第47回大会(2002年11月13日-15日、名古屋)。P115, 2002.
- 19) 宮下リサ、土屋尚之、氷上光輝、黒木喜美子、屋部登志雄、徳永勝士:ヒトNKG2-C遺伝子欠失の分子遺伝学的解析。日本人類遺伝学会第47回大会(2002年11月13日-15日、名古屋)。P141, 2002.
- 20) 櫻井大祐、山口晃弘、大梶祐頼、津野寛和、土屋尚之、徳永勝士:ID 遺伝子強制発現による血管内皮細胞の活性化および増殖誘導。日本人類遺伝学会第47回大会(2002年11月13日-15日、名古屋)。P172, 2002.
- 21) 宮下リサ、土屋尚之、黒木喜美子、屋部登志雄、徳永勝士:ヒト NKG2-C 遺伝子欠失の分子遺伝学的解析。日本免疫学会総会学術集会記録 32: 136, 2002.
- 22) 川崎綾、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、長谷英徳、小端哲二、橋本博史、徳永勝士: BLYS(TNFSF13B), BAFF-R 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 32: 210, 2002.
- 23) Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, Shibue T, Tokunaga K: Analyses on the association of Fcγ receptor family and *TNFR2* (*TNFRSF1B*) polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis in Japanese. 日本免疫学会総会学術集会記録 32: 298, 2002.
- 24) Kuroki K, Tsuchiya N, Matsuta K, Fukazawa T, Juji T, Hashimoto H, Tokunaga K: Association of leukocyte immunoglobulin-like receptor 1 (LIR1, ILT2, LILRB1) polymorphism with susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in Japanese. 日本免疫学会総会学術集会記録 32: 298, 2002.
- 25) Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Tsuno N, Okaji Y, Tokunaga K: Induction of proliferation and activation of human endothelial cells by overexpression of *ID* gene. 日本免疫学会総会学術集会記録 32: 301, 2002.
- 26) 山口晃弘、櫻井大祐、土屋尚之、田中良哉、徳永勝士、山本一彦:関節リウマチにおける follistatin related protein の滑膜線維芽細胞増殖への関与。日本免疫学会総会学術集会記録 32: 298, 2002.

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

表1 LIR1 細胞外領域ハプロタイプと関節リウマチとの関連

グループ	SE	LIR1 (.01/.01)	RA (n=559)	(%)	健常者 (n=409)	(%)	odds ratio (OR)	95%CI
A	+	+	59	(10.7)	18	(6.0)	3.77	2.17-6.54
B	+	-	320	(57.9)	101	(33.6)	3.64	2.67-4.98
C	-	+	34	(6.1)	21	(7.0)	1.86	1.04-3.34
D	-	-	140	(25.3)	161	(53.5)	1.0	

SE: HLA-DRB1 shared eiptope, CI: confidence interval

SE 陽性群 A vs B: $\chi^2 = 0.013$, $P = 0.91$, OR = 1.04, 95%CI: 0.57 - 1.87

SE 陰性群 C vs D: $\chi^2 = 4.36$, $P = 0.037$, OR = 1.86, 95%CI: 1.04 - 3.34

表2 RA および SLE における BLYS, BAFF-R 遺伝子多型の組み合わせ

	<i>BLYS</i> -871T positive					<i>BLYS</i> -871T negative						
	RA (n=132)	(%)	SLE (n=102)	(%)	control (n=149)	(%)	RA (n=64)	(%)	SLE (n=47)	(%)	control (n=68)	(%)
<i>BAFF</i> -R c.*120T>C												
T/T	108	(81.8)	87	(85.3)	120	(80.5)	59	(92.2)	31	(66.0)	50	(73.5)
T/C	23	(17.4)	15	(14.7)	29	(19.5)	4	(6.2)	15	(31.9)	16	(23.5)
C/C	1	(0.8)	0	(0)	0	(0)	1	(1.6)	1	(2.1)	2	(2.9)
C+	24	(18.2)	15	(14.7)	29	(19.5)	5	(7.8) ^a	16	(34.0)	18	(26.5)

^a P=0.006 (Fisher's exact test) vs. control.

表3 タイ人における SLE と *HLA-DRB1*, *DQB1* 遺伝子型との関連

<i>HLA</i>	SLE (2n=170)	(%)	controls (2n=374)	(%)	P	Pc	OR	95% CI
<i>DRB1</i>								
*1501	22	(12.9)	25	(6.7)	0.016	NS	2.08	1.15-3.78
*1502	41	(24.1)	46	(12.3)	0.0005	0.009	2.27	1.43-3.59
*1602	16	(9.4)	16	(4.3)	0.018	NS	2.32	1.15-4.67
<i>DQB1</i>								
*0501	37	(21.8)	37	(9.9)	0.0002	0.002	2.53	1.56-4.11
<i>DRB1-DQB1</i>								
*1502-*0501	33	(19.4)	29	(7.8)	0.0001	0.002	2.87	1.70-4.83

OR: odds ratio, CI confidence interval

表4 タイ人における SLE と *Fcγ*受容体遺伝子群の関連

gene	SLE (n=79)	(%)	controls (n=165)	(%)	χ^2	P	OR	95%CI
<i>FCGR2B</i>								
allele frequency								
232T	53	(33.5)	80	(24.2)	4.66	0.03	1.58	1.04-2.38
232I	105	(66.5)	250	(75.8)				
allele carrier frequency								
232T+	41	(51.9)	68	(41.2)	2.47	0.12		
232I+	67	(84.8)	153	(92.7)	3.78	0.05	0.44	0.19-1.01
<i>FCGR3B</i> (n=87) (n=187)								
allele carrier frequency								
NA2 +	57	(65.5)	102	(54.6)	2.94	0.09		
NA1 +	69	(79.3)	167	(89.3)	4.97	0.03	0.46	0.23-0.91

*FCGR3B*については、null allele, 2つの *FCGR3B* loci を含む haplotype が存在するため、allele carrier frequency のみを示す。

OR: odds ratio, CI: confidence interval

実験的自己免疫性筋炎(EAM)の作製と免疫学的解析に関する研究

分担研究者 原 まさ子(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授)
研究協力者 勝又 康弘(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 助手)
研究協力者 針谷 正祥(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 講師)
研究協力者 杉浦 智子(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 研究生)

研究要旨

多発性筋炎の優れた実験モデル動物作製の報告は少ないが、近年、ミオシン分画中に含まれる C-protein に強い筋炎惹起性があることが報告され、新しい筋炎モデルとして注目を集めている。本研究では、Lewis ラットへの C-protein の免疫にて、明らかな実験的自己免疫性筋炎(experimental autoimmune myositis, EAM)を誘導できることが確認された。筋炎組織には CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、およびマクロファージが浸潤していた。また、浸潤単核細胞あるいは血管内皮細胞は、MCP-1 とそのレセプター、IFN- γ 、ICAM-1、および integrin α 4 を発現していた。これらの分子が、本筋炎モデルにおける病態形成に関与していると考えられた。

A.研究目的

従来、多発性筋炎の優れた実験モデル動物作製の報告は少なく、骨格筋由来/ミオシン分画の免疫による実験的自己免疫性筋炎(experimental autoimmune myositis, EAM)が主に報告されている。最近、ミオシン分画中に含まれる C-protein に、精製ミオシンよりも強い筋炎惹起性があることが、我々の共同研究者である東京都神経科学総合研究所の松本陽らによって報告され、新しい筋炎モデルとして注目を集めている。骨格筋や心筋では、ミオシン分子が重合して thick filament を形成する。C-protein は、骨格筋や心筋の thick filament 内に存在する 140kd のポリペプチド鎖である。その生理学的役割は不明であるが、筋収縮時の thick filament の構造支持と立体的変化における働きが示唆されている。本研究では、C-protein による EAM をラットで作製し、免疫学的病態の解析を行い、将来的には新規治療法の開発に役立てることを目的とした。

B.研究方法

動物は、6 週齢の雌 Lewis ラットを用いた。Lewis ラット 4 匹に、リコンビナント C-protein 各 100 μ g を完全フロイドアジュバント(CFA)と共に、週 1 回、計 3 回免疫した(day 0、7、14)。また、百日咳菌毒素(PT)各 2 μ g を、ブースターとして免疫時に腹腔内投与した(day 0、7、14)。この群を C-protein ラットと称した。対照群としては、まずアジュバント・ラットとして、生理食塩水と CFA のみを免疫し、かつ PT を投与したラットを 4 匹、また、コントロール・ラットとして、無処置ラットを 5 匹用いた。最終免疫の 1 週間後に、エチルエーテルにて安楽死させ、後肢筋肉を採取した(day 28)。

組織学的検討として、大腿四頭筋と前脛骨筋の一部をホルマリン固定し、3 μ m の厚さでパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、鏡検した。炎症の程度(炎症スコア)は次のように規定した。即ち、Grade 1 は、1.4

個の筋線維周囲に炎症細胞が浸潤している場合。Grade 2 は、5.30 個の筋線維周囲に炎症細胞が浸潤している場合。Grade 3 は、1 つの筋束全体に炎症細胞が浸潤している場合。Grade 4 は、1 つの筋束を越えて広範囲に炎症細胞が浸潤している場合とした。これらの病変が、1 つの切片内で複数認められた場合は、更に 0.5 を加えた。

免疫組織学的検討としては、大腿四頭筋と前脛骨筋の一部を、液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結させ、クライオスタットで 5 μ m の厚さで連続切片にした。得られた切片で、ABC 法にて免疫染色を行い、マイヤーのヘマトキシリン液で対比染色後、鏡検した。1次抗体としては、マウス・モノクローナル抗体として、抗 T cell receptor $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$) 抗体 (R73)、抗 CD4 抗体 (OX-35)、抗 CD8 抗体 (OX8)、抗 CD11b 抗体 (OX42)、ヤギ・ポリクローナル抗体として、抗 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 抗体 (R17)、抗 chemokine receptor-2B (CKR-2B) 抗体 (C20)、抗 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 抗体 (M19)、抗 integrin α 4 抗体 (Y18)、ウサギ・ポリクローナル抗体として、抗 interferon- γ (IFN- γ) 抗体を用いた。

C. 研究結果

C-protein ラットの HE 染色にて、筋線維の大小不同、壊死再生線維、筋線維間や筋束周囲および血管周囲への単核細胞の浸潤といった筋炎所見を認めた。一方、対照群にては、アジュバント・ラットの一部の切片上にて筋線維間への僅かな単核細胞の浸潤を認めたのみで、明らかな筋炎所見を認めなかった。

炎症の程度(炎症スコア)を各群間で比較したところ、C-protein ラットにおいては、大腿四頭筋と前脛骨筋のいずれにおいても、対照群のアジュバント・ラットやコントロール・ラットに比べて、有意に強い炎症所見を認めた(図 1)。

免疫組織学的検討では、筋炎組織に浸潤した単核細胞に、TCR $\alpha\beta$ 、CD4、CD8 陽性細胞が多数認められた。また、筋炎組織に浸潤した単核細胞に CD11b 陽性のものが多数認められ、それら

はマクロファージと考えられた。筋組織への細胞浸潤に関与するケモカインとしては、筋組織に浸潤した単核細胞と、血管内皮細胞の一部に、MCP-1 が発現し、そのレセプターである CKR-2B は、浸潤単核細胞の一部に発現が認められた。筋組織への細胞浸潤に関与する接着分子としては、ICAM-1 は、血管内皮細胞、浸潤単核細胞の一部に発現していた。integrin α 4 の発現を筋束内血管周囲浸潤細胞および、筋組織の間質内の血管内皮細胞に認めた。筋線維間浸潤単核細胞の一部に、代表的な Th1 サイトカインの 1 つである IFN- γ の発現が認められた。

D. 考察

Lewis ラットにおいて、C-protein を免疫した群は、下肢近位および遠位の筋肉に、アジュバント群やコントロール群に比べて有意に強く炎症を生じていた。また、C-protein を免疫した群においては、どのラットも少なくとも 1 つ以上の筋肉標本に炎症を生じており、この系における EAM 誘導性は非常に高いと考えられた。

また、連続切片で比較評価すると、TCR 陽性細胞と同一と考えられる浸潤単核細胞に CD4 あるいは CD8 が発現しており、これらは CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞と考えられた。また、マクロファージも筋炎局所に多数浸潤していた。これらに加え、筋炎局所への浸潤細胞は、MCP-1 とそのレセプターである CKR-2B、IFN- γ 、ICAM-1、および integrin α 4 を発現していた。この系の EAM の病態形成には、これらの分子が関与していると推定された。

人間の多発性筋炎では、ICAM-1-LFA-1、VCAM-1-VLA4、CD40-CD154 などのリガンド・レセプターペア、炎症性サイトカイン/ケモカインの炎症局所での発現が報告されている。今後は、これらの分子のうち、今回できなかったものについて免疫染色を行い、本モデルにおいても同様な分子が病態形成に関与しているかについての検討を進める予定である。また、同様の方法を用いてマウスの EAM を作製し、より詳細な免疫学的・遺伝学的検討を行う予定である。更に、臨床への応用としては、このモデル動物を用い、大量

SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御に関する研究

田中良哉 (産業医科大学内科)

研究要旨

全身性エリテマトーデスSLEの治療に於いては、ステロイド薬や免疫抑制薬を用いた薬物療法を主体とするが、これらの薬剤に対する抵抗性獲得とその克服は、重要な問題点である。ステロイド薬抵抗性は、疾患活動性が高いためにステロイド薬に反応しない不応性と、長期間の薬剤投与による薬剤耐性(二次無効)に大別される。昨年度までは、長期治療を受けた SLE 患者末梢血リンパ球に於いて、多剤耐性遺伝子MDR-1の転写を介して細胞膜上にP糖蛋白質が発現し、薬物の細胞外への能動輸送により細胞内薬物濃度を低下させる事を報告した。今年度は、リンパ球に於ける薬剤不応性機序を検討し、IL-2等のサイトカイン刺激により活性化されたリンパ球で、YB-1の核内移行とP糖蛋白質の発現が顕著に誘導される事を認めた。実際、ステロイド不応性活動期 SLE 症例では、リンパ球上のP糖蛋白質発現が亢進し、ステロイド不応性が示唆され、斯様な症例では、免疫抑制薬やパルス療法を含む強力な初期治療によりP糖蛋白質過剰発現を抑制し、不応性を解除することが可能であった。以上、疾患活動性が高いSLEの活性化リンパ球では既にP糖蛋白質が発現し、治療不応性を齎す事が示された。即ち、リンパ球上のP糖蛋白質発現の評価は、薬剤耐性や不応性の臨床的指標として治療方針決定において有用であり、P糖蛋白質特異的拮抗薬による不応性解除によるテーラーメイド医療の実践の可能性が示唆された。

A.研究目的

SLEは代表的な全身性自己免疫疾患であるが、免疫異常と炎症病態の制御を目的として、免疫担当細胞をターゲットとしたステロイド薬や免疫抑制薬などの薬物療法が治療の中心をなす。しかし、SLEの治療の過程に於いて、これらの薬剤に対する治療抵抗性、即ち、疾患活動性が高いためにステロイド薬などの薬物療法に反応しない不応性、及び、長期間の薬剤投与による薬剤耐性(二次無効)、並びに、これらの薬剤不応性・耐性の克服は、内科臨床に於ける重要な課題である。特に、急性期に於いて薬剤不応性を呈する際には、生命的予後に直結する故に、重大な問題であるが、これまでその機序は不詳であった。

薬物不応性の機序として、①吸収障害、②代謝異常、③細胞内輸送・核内移行の障害、④受容体の異常、⑤細胞外排出機構の異常等が挙げられるが、癌に対する化学療法の分野では、多剤耐性遺伝子MDR-1の表現型として細胞膜に発現するP糖蛋白質による薬物細胞外排出促進作用を介した抗癌剤耐性獲得機序が解明された。さらに、シクロスポリン、シクロスポリン誘導體や新規キノリン化合物等の様々なP糖蛋白質拮抗的阻害薬を用いた抗癌剤耐性克復を目的とした臨床試験がなされる。しかし、正常リンパ球やSLE患者リンパ球におけるMDR-1の発現機序や薬物不応性獲得の機構については全く不詳である。

MDR-1は、第7染色体上に存在するP糖蛋白質

質の責任遺伝子である。MDR-1 遺伝子上流域には、転写活性に必須な Y ボックス(CTGATTGGCT) が存在し、NF-Y と YB-1 が特異的転写因子として結合する。YB-1 は、抗癌剤投与や紫外線照射によって核内に移行し、転写活性を発揮する。また、MDR-1 の転写は、Sp1、NF-IL-6、EGR1 などの転写因子や p53 や活性型 Ras によっても調節される事が報告される。

一方、疾患活動性の高い SLE 患者では、活性化されたリンパ球より過剰に産生される自己抗体とそれによる免疫複合体が介在したⅢ型アレルギー病態が齎される。斯様なリンパ球活性化には、サイトカインや細胞表面機能分子の関与が示される。今回、サイトカインなどによるリンパ球活性化によって、MDR-1 の転写が誘導される事、並びに、疾患活動性の高い SLE 患者リンパ球では MDR-1 の転写を介して薬剤不応性誘導に関与しうる事を解明した。

B.研究方法

健常人と SLE 患者より採取した末梢血リンパ球に発現する P 糖蛋白質、並びに、細胞内に発現する MDR-1 特異的転写活性因子 YB-1 を抗体で染色し、フローサイトメーター、及び、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。リンパ球の細胞内外のステロイド濃度比は、リンパ球を *in vitro* で、³H-デキサメサゾンと ¹⁴C-ブタノールで標識して測定した。

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、本学の倫理委員会規約を遵守し、学内の現有設備を用いて行った。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した。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し、研究結果を患者に報告することを基本的義務とした。

C.研究結果

健常人の末梢血 CD4、CD8、CD19 陽性リンパ球には、細胞膜上の P 糖蛋白質、並びに、細胞質内の YB-1 の発現を認めないが、0.5mg/kg 以上のステロイド薬に不応性を呈する活動期 SLE 患者 CD4、CD8、CD19 陽性リンパ球では、P 糖蛋白質を高度に発現し、反応性患者リンパ球上に比し有意に高値を示した。一方、正常リンパ球を IL-2 や IL-4 で刺激すると、MDR1 特異的転写因子 YB-1 の核内移行と MDR-1 転写が誘導された。IL-2 による P 糖蛋白質の発現誘導は、YB-1 のアンチセンスを予め遺伝子導入することにより抑制された。さらに、低分子量ヒアルロン酸による CD44 刺激やフィブロネクチンによる $\beta 1$ インテグリン刺激によりリンパ球を更に活性化すると、IL-2 刺激による YB-1 の核内移行、MDR-1 転写、P 糖蛋白質発現がさらに増強し、細胞内ステロイド濃度は低下した。また、活性化リンパ球で低下した細胞内ステロイド濃度は、シクロスポリンやその誘導體 PSC833 等の P 糖蛋白質拮抗薬で処理すると回復した。実際、ステロイド不応性を呈した活動期 SLE 症例の P 糖蛋白質発現は、ステロイドパルス療法を含む強化療法の反復にて減弱し、その後急速に治療反応性が回復し、臨床症状の改善が得られた。さらに、健常人、活動期および非活動期 SLE 患者のリンパ球上の P 糖蛋白質発現量と細胞内ステロイド濃度とは逆相関を呈した。

D.考察

リンパ球に於ける薬剤不応性機序を検討し、*in vitro* で健常人リンパ球に IL-2 または IL-4 を添加すると、YB-1 が細胞質から核内へ効率的に移行する事が共焦点レーザー顕微鏡で観察された。また、これらの刺激により MDR-1 mRNA の転写や細胞表面の P 糖蛋白質の発現が誘導された。さらに、インテグリン $\beta 1$ などの刺激を介して、YB-1 の核内への移行や P 糖蛋白質の発現が誘導され、IL-2 との共存下で細胞内ステロイド濃度は低下した。これらの結果は、長期治療による薬剤抵抗性のみならず、疾患活動性の高い SLE の活性化リンパ球に於いても、P 糖蛋白質の発現を介する

ステロイド薬不応性の存在を示唆するものである。

実際、ステロイド不応性活動期 SLE 症例では、リンパ球上の P 糖蛋白質発現が亢進し、ステロイド不応性が示唆され、斯様な症例では、免疫抑制薬やパルス療法を含む強力な初期治療により P 糖蛋白質過剰発現を抑制し、不応性を解除することが可能であった。以上の結果より、疾患活動性が高い SLE の活性化リンパ球では既に P 糖蛋白質が発現し、治療不応性を齎す事が示唆された。即ち、リンパ球上の P 糖蛋白質発現の評価は、薬剤耐性や不応性の臨床的指標として治療方針決定において有用であり、P 糖蛋白質特異的拮抗薬による不応性解除によるテーラーメイド医療の実践の可能性が示された。

癌の化学療法では、薬剤抵抗性の克服は予後改善の為に最重要課題で、P 糖蛋白質と拮抗的阻害薬が注目される。免疫抑制薬であるタクロリムスやシクロスポリン、キニジン等の抗不整脈薬等が知られるが、最近では本来の作用を有さず抵抗性克服効果を前面にしたシクロスポリン誘導体 PSC833 や新規キノリン化合物 MS-209 等の臨床試験が、造血器腫瘍等の患者を対象に進行している。膠原病の治療分野では、斯様な観点からのアプローチはなされていない。申請者らは、SLE 患者リンパ球をシクロスポリンを用いて *in vitro* で処理し、低下していた細胞内ステロイド濃度が健常人の濃度にまで改善する事を認めた。シクロスポリンやタクロリムスのような P 糖蛋白質拮抗薬は、現時点では SLE に対しては保険未収載であるが、本来の免疫抑制作用のみならず、ステロイド薬不応性克服作用を期待して、疾患活動性が高く、且つ、治療反応性が悪い SLE 症例に用いる事も考慮する価値があるものと思われた。

E. 結論

サイトカイン刺激などによるリンパ球活性化は、リンパ球上 P 糖蛋白質過剰発現と細胞内ステロイド濃度低下を齎し、ステロイド不応性に関与する

事が示された。ステロイド不応性を呈した疾患活動性の極めて高い SLE 症例のリンパ球に於いて、P 糖蛋白質による薬剤細胞外排出亢進が認められ、さらに、パルス療法を含む強力な初期治療により P 糖蛋白質過剰発現が抑制され、不応性を解除することが示唆された。以上より、SLE 患者末梢血リンパ球上 P 糖蛋白質発現の評価は、治療不応性や疾患活動性の臨床的指標として薬剤不応性の予測や治療方針決定において有用であり、テーラーメイド医療の実践の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasuda M, Nakano K, Yasumoto K, Tanaka Y: CD44: functional relevance to inflammation and malignancy. *Histol Histopathol* (2002) **17**, 945-950
2. Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y: Autocrine induction of the human prointerleukin 1 β gene promoter by interleukin 1 β in monocytes. *J Immunol* (2002) **168**, 1984-1991.
3. Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y: Hypoxia-inducible factor-1 α induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells* (2002) **7**, 143-149.
4. Tanaka Y, Nakayamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami Y: H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J Biol Chem* (2002) **277**, 21446-21452.
5. Kamizono J, Okada Y, Shirahata A, Tanaka Y: Bisphosphonate induces remission of

- refractory osteolysis in Langerhans cell histiocytosis. *J Bone Miner Res* (2002) **17**, 1926-1928.
6. Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y: $\beta 1$ integrin-mediated signaling induces ICAM-1 and Fas and Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells. *Arthritis Rheum* (in press)
 7. Fujii Y, Fujii K, Nakano K, Tanaka Y: Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1. *FEBS Letters* (in press)
 8. 田中良哉, 辻村静代, 河野公俊. 膠原病に於けるステロイド薬抵抗性の分子機構とその対策. *内科* (2002) **89**, 216-220.
 9. 田中良哉, 辻村静代, 齋藤和義, 河野公俊. 膠原病・リウマチ性疾患に於けるシクロスポリン療法の理論と実際. *日本臨床免疫学会雑誌*(2002) **25**, 110-114.
 10. 田中良哉: 全身性エリテマトーデスとサイトカイン. 新・膠原病: 診断と治療の最新のポイント; 皮膚から内臓へ. 竹原和彦, 桑名正隆, 宮地良樹編, 診断と治療社: 14-15 頁, 2002. 東京

2.学会発表

1. 田中良哉: 炎症細胞の遊走機序. 第 52 回日本アレルギー学会総会(教育講演)横浜, 平成 14 年 11 月
2. Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tsukada J, Tanaka Y: Effective combination therapy of cyclophosphamide, vincristine and prednisolone for refractory lupus nephritis. 26th International Congress of Internal Medicine, Kyoto, 平成 14 年 5 月
3. 田中良哉, 徳永美貴子, 辻村静代, 高澤

(小野) 亜希子, 齋藤和義. SLE の B 細胞異常とその制御. 第 46 回日本リウマチ学会総会(シンポジウム)神戸, 平成 14 年 4 月

4. 田中良哉. 関節リウマチの病態と治療の最近の考え方. 第 25 回日本内科学会九州支部生涯教育講演会(教育講演)福岡, 平成 14 年 4 月

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。