

はこの仮説を検証した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象患者は SSc 57 例 (女性 51 例、男性 6 例) であり、年齢は  $44 \pm 16$  歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 33 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 24 例であった。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 23 例、抗セントロメア抗体陽性例が 24 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 3 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 1 例、抗 U3RNP 抗体が 1 例、残り 5 例は抗核抗体は陽性であったが、特異抗体は検出されなかった。

### 2) ELISA

MMP-1 に対する自己抗体は ELISA 法にて検出した。96 穴のマイクロタイタープレートを  $1 \mu\text{g/ml}$  のヒトレコンビナント MMP-1 (Techne Corp., Minneapolis, MN) でコートし、2%のウシ血清アルブミンと 1%のゼラチンにてブロッキングした後、100 倍に希釈した血清と室温で、90 分間反応させた。検出にはアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgM あるいは IgG 抗体を用いた。自己抗体の相対レベルを患者血清と健常人血清の間で直接比較する目的で、それぞれプールした血清を log インターバルで希釈し (1:10-1:10<sup>5</sup>)、吸光度に対して希釈度数 (log スケール) をプロットすることによって、自己抗体の相対レベルを測定した。最大吸光度の 50%となる血清の希釈度数を求め、これを仮の U/ml とした。

### 3) 免疫プロット法

ヒトレコンビナント MMP-1 ( $0.1 \mu\text{g/レーン}$ ) を 10-20%グラジエントゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は 50 倍に希釈した血清と一晚反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いて発色させた。

### 4) MMP-1 コラゲナーゼ活性の測定

ヒト protein G を表面に結合させたマグネット・ビーズを用いて、血清から IgG を分離精製した。MMP-1 コラゲナーゼ活性はキット (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) を用いて測定した。P-aminophenylmercuric acetate によって活性化させた MMP-1  $4.5 \text{ ng}$  と、 $40 \mu\text{g}$  の精製 IgG とを 20 分間、室温で反応させた。MMP-1 の酵素活性はビオチン化されたウシコラーゲンを基質として用い測定した。MMP-1 によって分解されたコラーゲン断片はビオチン結合性 96 穴マイクロタイタープレートに移し、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体によって検出した。

## C. 研究結果

### 1) ELISA による抗 MMP-1 抗体

MMP-1 に対する自己抗体のレベルは、ヒトレコンビナント MMP-1 を抗原に用いた ELISA によって測定した (図 1)。dSSc における IgG 型抗 MMP-1 抗体価は、lSSc、SLE、皮膚筋炎、健常人と比較して有意に高値であった。lSSc でも、dSSc ほどではないもの、抗体価は健常人と比較して有意に高値であった。一方、IgM 型抗 MMP-1 抗体は lSSc では健常人と比較して有意差は認められなかった

が、dSSc では有意に高値を示した。このように、SSc、特に dSSc で抗 MMP-1 抗体価が上昇していた。

ELISA による IgG 型抗 MMP-1 抗体の陽性率を、健常人の平均値+2SD をカット・オフ値として算出した (表 1)。抗 MMP-1 抗体は dSSc で 75% に検出されたが、ISSc では 15% と低率であった。SLE、皮膚筋炎、健常人では数%の陽性率であった。

#### 2) 抗 MMP-1 抗体と臨床症状との相関

次に臨床症状との相関を検討した (図 2)。IgG 型抗 MMP-1 抗体価は modified Rodnan total skin thickness score と正の相関を示した。腎臓間動脈の血管抵抗の指標である、腎ドプラー・エコー法による pulsatility index 値も抗 MMP-1 抗体価と正の相関が認められた。さらに、肺線維症の重症度を表す%DLco および%VC とは負の相関が認められた。従って、IgG 型抗 MMP-1 抗体は皮膚硬化、血管抵抗、肺線維症の程度と直接相関していることが明らかとなった。

#### 3) 免疫プロット法による抗 MMP-1 抗体の検出

抗 MMP-1 抗体の存在を確認するため、ヒトレコンビナント MMP-1 を抗原に用いた免疫プロット法を行った (図 3)。金コロイドによる蛋白染色では、約 52kDa の MMP-1 によるバンドが認められた (レーン 1)。ELISA にて抗 MMP-1 抗体が陽性であった SSc 血清は、すべて MMP-1 との反応性が観察された (レーン 2-4)。ELISA にて抗 MMP-1 抗体が陰性であったが、抗トポイソメラーゼ I 抗体が陽性であった SSc 血清では、MMP-1 と

の反応性は認められなかった (レーン 5)。健常人血清では、MMP-1 のバンドはみられなかった (レーン 6)。このように、SSc における抗 MMP-1 抗体の存在は免疫プロット法にても確認された。

#### 4) 抗 MMP-1 抗体による MMP-1 酵素活性の抑制

抗 MMP-1 抗体が MMP-1 のコラゲナーゼ活性を抑制するかどうかを検討した (図 4)。患者血清より IgG を分離して、それを MMP-1 と反応させた後、MMP-1 の活性をビオチン化したコラーゲンを基質として測定した。健常人血清では MMP-1 活性の抑制は認められなかったが、SSc 患者血清は有意に MMP-1 活性を抑制した。ELISA にて抗 MMP-1 抗体が陰性であり、抗トポイソメラーゼ I 抗体など他の自己抗体が陽性であった SSc 血清では MMP-1 活性の抑制は認められなかったことから、この抑制は抗 MMP-1 抗体以外の他の自己抗体によるものではないと考えられた。このように、SSc 由来の抗 MMP-1 抗体は、実際に MMP-1 の酵素活性を抑制することが示された。

### D. 考 案

今回の検討では、ELISA で IgG 型抗 MMP-1 抗体は SSc、特に dSSc で有意に高値であり、皮膚、肺、血管の線維化の程度と相関していた。さらに、抗 MMP-1 抗体は SLE や皮膚筋炎には検出されなかったことから、SSc に特異的であると考えられた。IgG 型抗 MMP-1 抗体の存在は免疫プロット法にても確認された。また、IgG 型抗 MMP-1 抗体は MMP-1 の

コラゲナーゼ活性を抑制した。以上より、抗 MMP-1 抗体は MMP-1 のコラゲナーゼ活性を抑制し、細胞外基質のターン・オーバーを減少させることによって、線維化の進展に寄与している可能性が示唆された。

抗核抗体は SSc の 90%以上の患者で検出されることから、自己抗体の存在は SSc の大きな特徴の一つである。加えて、抗トポイソメラーゼ I 抗体力価が SSc の疾患活動性や重症度と相関することも報告されている<sup>6</sup>。しかしながら、SSc における自己抗原は一般的に細胞分裂に必須の核内成分であり、これら自己抗原に対する抗体は SSc の組織障害に関与していないと考えられていることから、全身性自己免疫と、皮膚硬化や内蔵の線維化といった SSc の病態との関連性については不明である。今回の検討では全身性自己免疫は抗 MMP-1 抗体産生を介して線維化の進展と関連することが示唆された。同様に、疾患の発病において病原性自己抗体が重要な役割を担っていることが、全身性自己免疫のマウスモデルで明らかにされてきた。つまり、ヒト関節リウマチのモデルである、K/BxN マウス由来の自己抗体を健常マウスに投与するだけで、関節炎を誘導しうることが報告された<sup>7</sup>。さらに、我々は最近ヒト SSc のモデルである tight-skin マウスで、自己抗体を除去すると、皮膚硬化も減弱することを見出した<sup>8</sup>。このように、本研究により抗 MMP-1 抗体は、SSc の発症における全身性自己免疫の役割を理解するための鍵となる可能性が示された。

## E. 結 論

SSc で産生される、抗 MMP-1 抗体は MMP-1 の酵素活性を阻害したことから、実際に MMP-1 を抑制し、コラーゲン分解が低下した結果、組織にコラーゲンの異常沈着がおこる可能性が示唆された。このように、抗 MMP-1 抗体の存在は従来不明であった全身性自己免疫と線維化を結びつけるモデルとなりうる可能性があり、今後同様の視点からの研究が期待される。

## F. 文 献

1. Nagase H, Woessner JF, Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999, 274:21491-21494
2. Jimenez SA, Hitraya E, Varga J: Pathogenesis of scleroderma: collagen. *Rheum Dis Clin Nor Am* 1996, 22:647-674
3. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y: Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994, 103:359-363
4. Kikuchi K, Kadono T, Furue M, Tamaki K: Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997, 108:281-284
5. Mattila L, Airola K, Ahonen M, Hietarinta M, Black C, Saarialho-Kere U, Kahari VM: Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998, 110:416-421

6. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K: Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels by ELISA in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2001, 40:1135-1140
7. Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, Maurice M, Simmons B, Brenner M, Mathis D, Benoist C: How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* 2002, 3:360-365
8. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, Nagaoka T, Takehara K, Tedder TF, Sato S: CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002, 109:1453-1462

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*, in press.

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 1. ELISA による抗 MMP-1 抗体の頻度

	Anti-MMP-1 Ab		
	IgG	IgM	IgG or IgM
SSc (n=57)	23 (40)	13 (23)	28 (49)
ISSc (n=33)	5 (15)	6 (18)	10 (30)
dSSc (n=24)	18 (75)	7 (29)	18 (75)
SLE (n=19)	1 (5)	2 (11)	3 (16)
DM (n=16)	1 (5)	1 (6)	2 (13)
Normal (n=30)	1 (3)	0	1 (3)

数値は陽性数 (%) を表す。

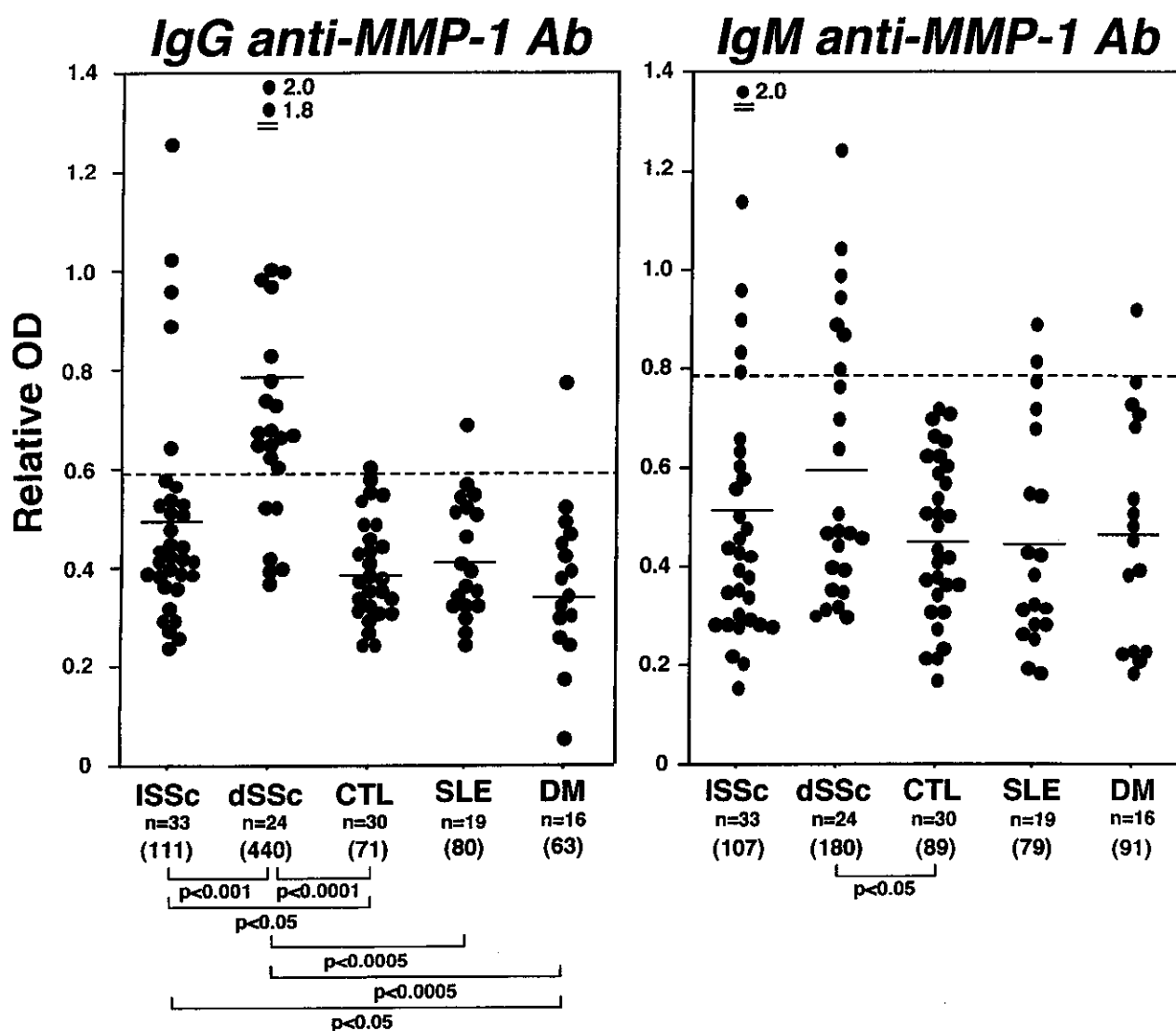


図 1 : ELISA による抗 MMP-1 抗体の力価。波線は健常人の平均値+2SD のカット・オフ値を示す。括弧にくくった数字は ELISA にて最大吸光度の 50% を示す、プールした血清の希釈度数 (仮の U/ml) を表し、患者と健常人の抗体価を直接の比較するために測定した。

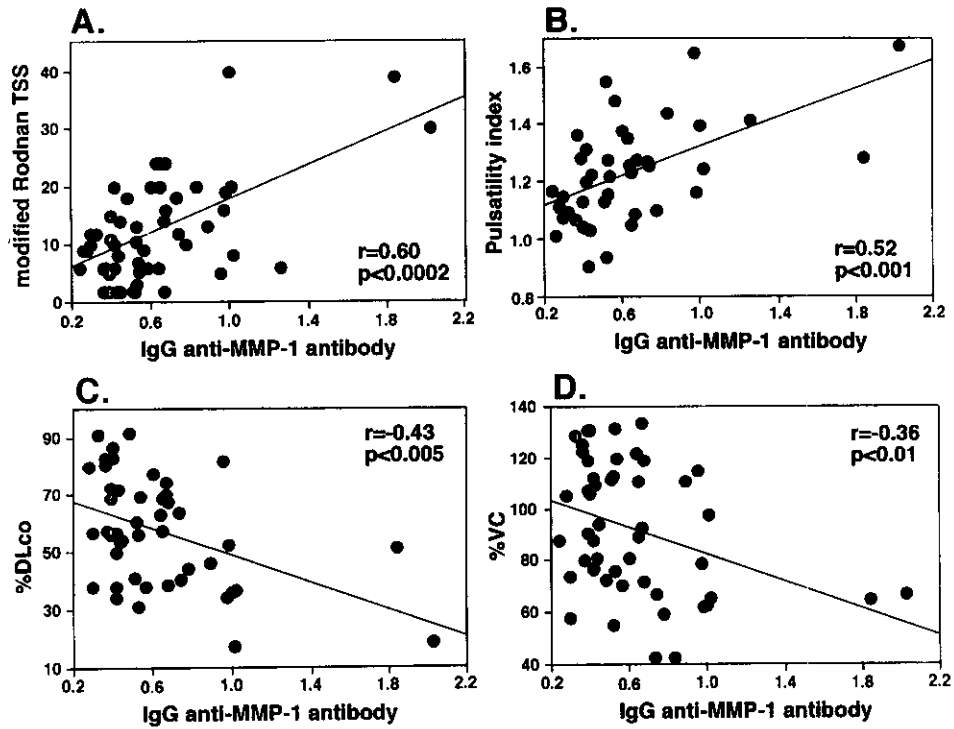


図 2 : IgG 型抗 MMP-1 抗体と皮膚 (A)、腎血管 (B)、肺 (C、D) の線維化の程度との相関。

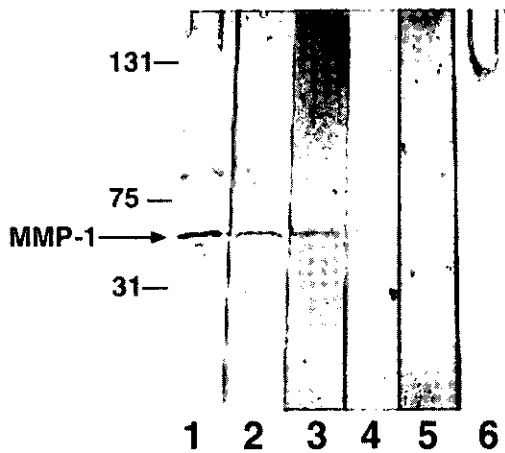


図 3:免疫ブロット法による IgG 型抗 MMP-1 抗体の検出。レーン 1 は金コロイド染色による MMP-1、レーン 2-4 は ELISA にて IgG 型抗 MMP-1 抗体が陽性であった SSc 患者血清、レーン 5 は ELISA にて IgG 型抗 MMP-1 抗体が陰性であるも、抗トポイソメラーゼ I 抗体は陽性であった SSc 患者血清、レーン 6 は健康人由来血清。

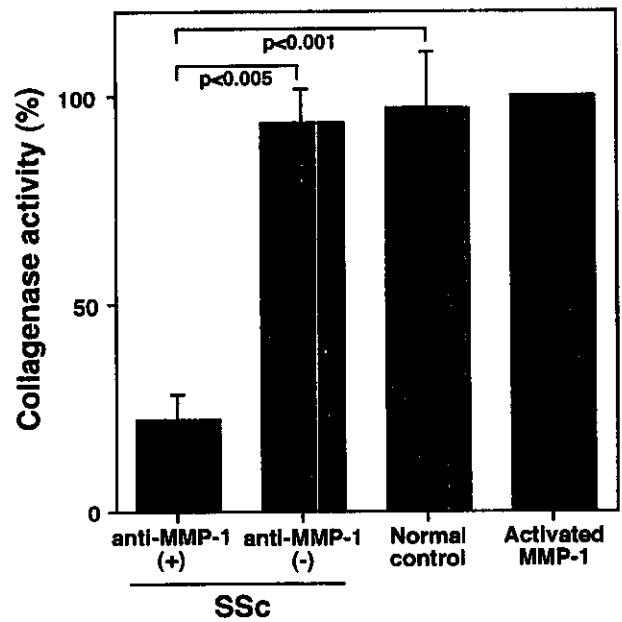


図 4:抗 MMP-1 抗体による、MMP-1 コラゲナーゼ活性の抑制。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

日本人全身性硬化症患者におけるマイクロキメリズムの定量解析と HLA との相関

分担研究者 村田秀行 筑波大学臨床医学系内科膠原病リウマチアレルギー講師  
協力者 後藤大輔 筑波大学臨床医学系内科膠原病リウマチアレルギー助手

研究要旨

全身性硬化症(systemic sclerosis: SSc)の発症に、母体中に存続している胎児細胞による GVHD 様反応、すなわち、胎児性マイクロキメリズムの関与が考えられ、またその存続に母児の HLA が関与している可能性が報告されている。今回、Y 染色体特異的配列 DYZ1 の定量 PCR 法を用いた胎児性マイクロキメリズムの定量解析を行い、男児出産歴を有する日本人健常人女性に比べ、男児出産歴を有する日本人 SSc 患者では、男性 DNA が量的に多いことが判明した。また、HLA に関しては、HLADRB1 については、胎児性マイクロキメリズムの存続と HLA との相関はみられなかった。以上より、胎児細胞の数が、すなわち胎児性マイクロキメリズムの量が、日本人 SSc 患者の発症に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性硬化症 (systemic sclerosis: SSc) は、皮膚の腫脹・硬化を来し、臓器病変も起こし得る原因不明の自己免疫疾患である。この疾患が出産年齢以後の女性に多いこと、慢性の移植片対宿主拒絶病 (graft versus host disease: GVHD) と臨床的および病理組織学的に類似性があること、胎児幹細胞が出産後何年間も母体循環中に存在する知見より、近年、SSc の発症機構について、母体中に存続している胎児細胞による GVHD 様反応という胎児性マイクロキメリズム説が提唱されている<sup>1</sup>。現在、世界中のいくつかの施設で、SSc の末梢血中<sup>2,3</sup>または病変皮膚<sup>3</sup>における胎児性マイクロキメリズムの存在が検討されている。我々

は、日本人 SSc 患者末梢血での検討を行った。すなわち、男児出産歴を有する日本人 SSc 患者を対象として、Y 染色体特異的配列 DYZ1 をマーカーとした nested PCR 法により、対照の男児出産歴を有する日本人健常人女性群との間で、胎児性マイクロキメリズムの存続は、頻度的には差がないことを報告した<sup>4</sup>。

そこで、本研究では SSc の発症機構をさらに解明するために、定量 PCR 法により胎児性マイクロキメリズムの定量解析を行った。

SSc と HLA との関係に関しては、SSc 家系での HLA 研究にて、SSc の発症と、HLA class I とは相関はみられなかったが、class II の DRB1 とは相関がみられることが報告されている<sup>2</sup>。また SSc 患者胎児性マイクロキメリズ

ムの存続と母児の HLADQA1\*0501 との相関がみられる報告がある<sup>5)</sup>。日本人 SSc と HLA の関係では、抗トポイソメラーゼ 1 抗体陽性 SSc 患者と HLADRB1\*1502、DQB1\*0601 と<sup>6)</sup>、抗セントロメア抗体陽性 SSc 患者と HLADRB1\*0101、DQB1\*0501 とに相関がみられることが報告されている<sup>7)</sup>。そこで、本研究では、日本人 SSc 患者胎児性マイクロキメリズムの存続と患者の HLA-DR との関連を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象患者は、筑波大学附属病院膠原病リウマチアレルギー内科受診中で、ACR 診断基準を満たす男児出産歴を持つ SSc 女性患者 28 名であった。このうち病型分類では、diffuse cutaneous type が 15 名、limited cutaneous type が 13 名で、自己抗体の分類では、抗トポイソメラーゼ 1 抗体陽性が 7 名、抗セントロメア抗体陽性が 9 名、抗 U1-RNP 抗体陽性が 3 名であった。また対照として男児出産歴を持つ健常人女性 13 名、未出産健常人女性 12 名について検討した。

### 2) 男性 DNA の定量 PCR

Y 染色体特異的 DYZ1 領域に、primer および定量 PCR 用の TaqMan probe を設計した。まず SSc 患者、健常人女性から採取した末梢血 2ml より genomic DNA を抽出する。次に genomic DNA に対して、DYZ1 特異的な primer と probe を用い、ABI 7700 sequence detector にて定量 PCR を施行した。標準曲線作成のため、一人の健常人男性末梢血中の genomic DNA を用い、また internal control として GAPDH を用いた。

### 3) HLA typing

Dynal ReLI SSO HLA-DRB kit (Dynal Biotech) による PCR-SSOP (sequence-specific oligonucleotide probes) typing 法を用いて、HLA-DR の解析を行った。

### 4) 倫理面への配慮

血液提供患者、血液提供健常人全員に、研究の目的と意義を十分に説明し、同意を得て、インフォームド・コンセントを行った。また得られた結果を研究の目的以外には使用せず、本人及びその家族、血縁者その他関係者の人権及び利益の取扱いについて十分に配慮した。

## C. 研究結果

### 1) 胎児性マイクロキメリズムの定量解析

一人の健常人男性末梢血中の genomic DNA 10ng 中の Y 染色体特異的配列の量を基準値として便宜上  $10^7U$  とした時の各サンプルでの末梢血中の同配列の相対量を用いると、男児出産歴を有する健常人女性では、 $1.6 \pm 2.5U$  であるのに対して、男児出産歴を有する SSc 患者女性群では、 $13.1 \pm 31.8U$  と健常人女性に比量的に多い傾向にあった (図 1)。

### 2) 胎児性マイクロキメリズムの存続と HLA-DRB1 との関係

HLA-DRB1\*1502 は、男児出産歴を有する SSc 患者群では、胎児性マイクロキメリズムの存続あり例で 12 例中 3 例 (25%)、存続なし例で 15 例中 3 例 (20%) と両者に差はみられなかった (表 1、3)。男児出産歴を有する健常人女性群では、存続あり例で 5 例中 1 例 (20%)、存続なし例で 8 例中 2 例 (25%) であった (表 2、3)。また、HLA-DRB1\*0101 は、男児出産歴を有する SSc 患者群で、胎児性マイクロキメリズムの存続あり例で 12 例中 1 例 (8%)、存続なし例で 15 例中 2 例 (13%)



と両者に差はみられなかった（表1、3）。男児出産歴を有する健常人女性群では、存続あり例で5例中0例（0%）、存続なし例で8例中0例（0%）であった（表2、3）。以上より、少例数ではあるが、日本人SSc患者において、胎児性マイクロキメリズムの存続とHLA-DRとの相関はみられなかった。

#### D. 考案

以前われわれがY染色体特異的配列DYZ1をマーカーとしたnested PCR法を用いた日本人SSc患者末梢血の検討では、Y染色体特異的配列を男児出産歴を有する日本人SSc女性患者13例中7例、61.5%に検出し得たが、男児出産を有する健常人女性でも、12例中6例、50%に同配列を検出し、両群に有意な差は認めなかった。よって、胎児性マイクロキメリズムの存続は、男児出産歴を有するSSc女性患者、男児出産歴を有する健常人女性ともに認められ、両群間に頻度的には差がみられなかった。これら胎児性マイクロキメリズム陽性例に対する、定量PCR法による胎児性マイクロキメリズム定量解析では、少数例であるが、男児出産歴を有するSSc女性患者では、胎児細胞の数の増加がみられた<sup>8</sup>。そこで、今回の検討では、より多くの例について、定量PCR法による胎児性マイクロキメリズム定量解析を施行した。その結果、胎児由来DNA量は、男児出産歴を有する健常人女性（ $1.6 \pm 2.5U$ ）に比べ、男児出産歴を有するSSc患者（ $13.1 \pm 31.8U$ ）に多くみられた。すなわち胎児細胞数、すなわち胎児性マイクロキメリズムの量がSSc患者に多い傾向にあった。仮に、この系で未出産健常人女性の量の平均+3SD以上を陽性と判定すると、男児出産歴を有する健常人女性13例中5例、38.4%が陽

性であるのに対して、男児出産歴を有するSSc患者では、28例中13例、46.4%が陽性であり、両群間に頻度的には差がみられなかった。以上より、胎児性マイクロキメリズムの量が、日本人SSc患者の発症に関与する可能性が示唆された。

HLAと胎児性マイクロキメリズムの存続に関しては、日本人SSc患者において、抗トポイソメラーゼ1抗体例、抗セントロメア抗体陽性例との相関がそれぞれ報告されている、HLA-DR B1\*1502とDRB1\*0101に関して検討したが、胎児性マイクロキメリズムの存続とは明らかな相関はみられなかった。今回のSSc患者群で特定のHLAについて検討する場合、例数が極めて少なくなるため、今後さらに例数を増やす必要がある。

#### E. 結論

日本人SSc患者の発症に、胎児性マイクロキメリズムが関与している可能性が示され、特に、胎児細胞の数、すなわち胎児性マイクロキメリズムの量が、SScの発症に関わっている可能性が示唆された。

#### F. 文献

- 1) Nelson JL. : Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: Is some autoimmune disease auto- alloimmune or allo- autoimmune? *Arthritis Rheum* 1996, 39:191-4
- 2) Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW.: Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in

- scleroderma. Lancet 1998, 351: 559-62 .
- 3) Artlett CM, Smith JB & Jimenez SA. : Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. N Engl J Med 1998, 338:1186-91
  - 4) Murata H, Nakauchi H, Sumida T. : Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. Lancet 1999, 354: 220
  - 5) Lambert NC, Evans PC, Hashizumi TL, Maloney S, Gooley T, Furst DE, Nelson JL.: Cutting Edge: Persistent fetal microchimerism in T lymphocytes is associated with HLA-DQA1\*0501: Implications in autoimmunity. J Immunol 2000, 164: 5545-48
  - 6) Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Inoko H, Tsuji K.: The HLA-DR and DQ genes control the autoimmune response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis (scleroderma). J Clin Invest 1993,92:1296-301
  - 7) Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Inoko H.: HLA class II genes associated with anticentromere antibody in Japanese patients with systemic sclerosis Ann Rheum Dis 1995,54:983-7
  - 8) Murata H, Sumida T.: Quantitative analysis of fetal microchimerism in Japanese women with systemic sclerosis. Mod. Rheumatol. 2001,11:259-260

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1 SSc患者におけるHLA-DRB1

Microchimerism		HLA-DRB1		Microchimerism		HLA-DRB1	
SSc 1	+	1302	0802	SSc14	-	1502	14A
SSc 2	+	1302	0803	SSc15	-	1602	1602
SSc 3	+	1201	0803	SSc16	-	14A	1302
SSc 4	+	1502	4B	SSc17	-	1101	1201
SSc 5	+	1502	4B	SSc18	-	0101	4D
SSc 6	+	14A	1301	SSc19	-	1501	0901
SSc 7	+	4D	4B,4C,4D	SSc20	-	4D	0901
SSc 8	+	1602	0802	SSc21	-	1501	0802
SSc 9	+	-	-	SSc22	-	1602	0901
SSc10	+	14B	0401	SSc23	-	1502	0401
SSc11	+	1501	0901	SSc24	-	0101	14A
SSc12	+	4D	1502	SSc25	-	1501	1501
SSc13	+	0101	4B	SSc26	-	0901	0901
				SSc27	-	0901	1502
				SSc28	-	1302	1202

4B: 0403, 0406, 0407 4C: 0404 4D: 0405, 0410 14A: 1401, 1407 14B: 1402, 1406

表2 健康人女性におけるHLA-DRB1

Microchimerism		HLA-DRB1		Microchimerism		HLA-DRB1	
Healthy 1	+	1501	1502	Healthy 6	-	1502	1101
Healthy 2	+	14A	0901	Healthy 7	-	1302	1101
Healthy 3	+	1501	4B	Healthy 8	-	0405	1202
Healthy 4	+	4D	1302	Healthy 9	-	4B	4D
Healthy 5	+	0901	1302	Healthy10	-	0802	0803
				Healthy11	-	0802	1502
				Healthy12	-	4D	14B
				Healthy13	-	4D	0803

4B: 0403, 0406, 0407 4D: 0405, 0410 14A: 1401, 1407 14B: 1402, 1406

表3 SSc患者におけ胎児性マイクロキメリズム存続と HLA-DRB1 \*0101,\*1502の関係

DRB1	patients with SSc microchimerism		Healthy women microchimerism	
	(+)	(-)	(+)	(-)
0101	8 (1/12)	13 (2/15)	0 (0/5)	0 (2/8)
1502	25 (3/12)	20 (3/15)	20 (1/5)	25 (2/8)

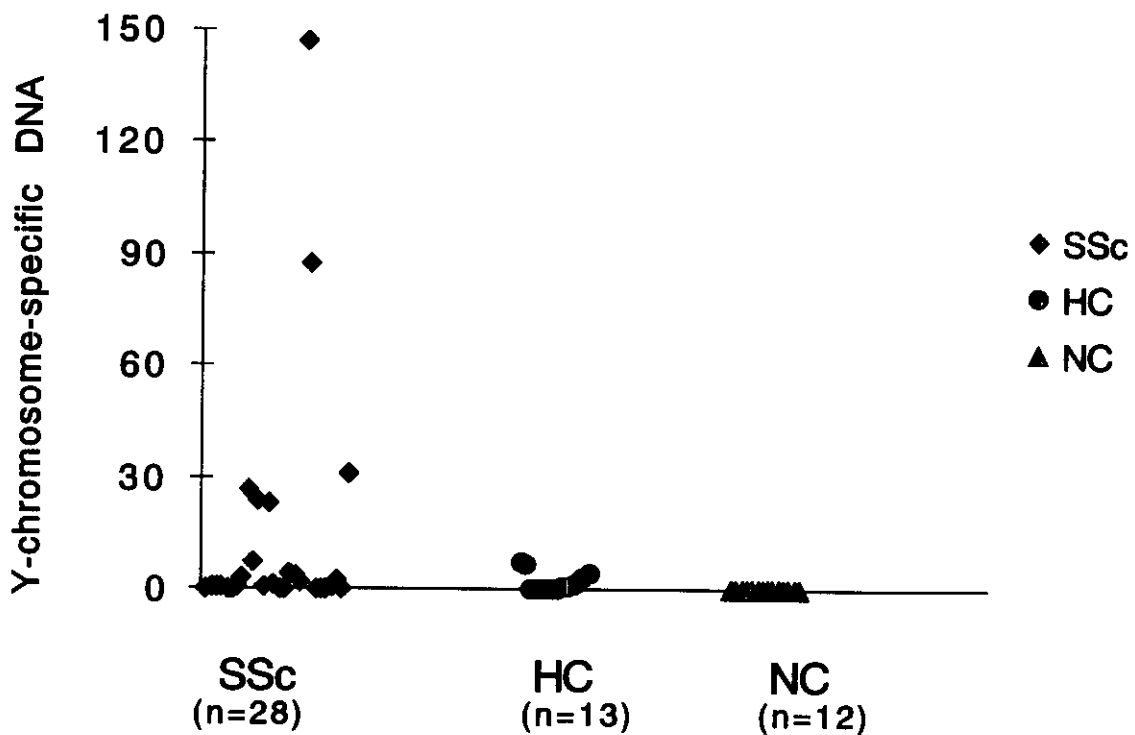


図1：男性 DNA の定量解析

男児出産歴を有する SSc 患者 (SSc)、男児出産歴を有する健常人女性(HC)、未出産健常人女性(NC) 末梢血中の男性 DNA 量。縦軸は、一人の健常人男性末梢血中の genomicDNA10ng 中の Y 染色体特異的配列の量を基準値として便宜上  $10^7$  とした時の各サンプルでの末梢血中の同配列の相対量を示す。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

全身性強皮症における CD19 多型の解析

研究協力者	土屋尚之	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学助教授
協力者	黒木喜美子	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学大学院生
分担研究者	佐藤伸一	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
分担研究者	藤本 学	国立国際医療センター研究所室長
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
協力者	徳永勝士	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教授

研究要旨

われわれは、これまでに、全身性強皮症(SSc)における末梢血B細胞の CD19 発現強度の増強、tight-skin マウスにおける CD19 依存性 B 細胞シグナル伝達の増強と、CD19 遺伝子欠損の導入による皮膚病変と自己抗体産生の抑制を報告した。一方、ヒト CD19 遺伝子の多型スクリーニングにより、多数の新規の多型を見出し、全身性エリテマトーデスとの関連を報告した。本研究では、ヒト CD19 多型が SSc の発症と関連が見られるかどうかを検討した。3' 非翻訳領域およびプロモーター多型において、SSc 群と健常対照群に有意差が検出されたものの、患者群のなかで、北陸在住者とそれ以外の群に遺伝子型の有意差が検出されたため、地域差による影響の可能性が除外できなかった。次年度以降、北陸在住患者群、健常者群において比較を行う予定である。

A. 研究目的

全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)の発症に遺伝素因が存在することが、発症率の集団差<sup>1</sup>、家系内集積性<sup>2</sup>などの情報から強く示唆されており、これまでに、HLA-class II をはじめとして、いくつかの遺伝子多型と疾患感受性との関連が報告されている。

われわれは、これまでに、ヒト SSc 患者末

梢血B細胞におけるCD19の発現強度が約20%増強していること、同程度の過剰発現が、マウスにおいて抗核抗体をはじめとする種々の自己抗体産生を誘導することを報告した<sup>3</sup>。さらに、SSc モデルマウスである tight-skin マウスにおいて、CD19 分子のチロシンリン酸化と、CD19 依存性B細胞シグナルの増強が見られること、CD19 遺伝子欠損の導入により、皮膚病変と自己抗体産

生の抑制が見られることを報告した<sup>4</sup>。これらの結果から、ヒトにおいても、CD19 過剰発現が SSc の病因・病態に重要な関連を有する可能性が示唆された。

一方、われわれは、これまで、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)、関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)を主要な対象として、広範な候補遺伝子の多型スクリーニングと関連解析により、疾患感受性遺伝子の検出を試みてきた<sup>5</sup>。この一環として、CD19 遺伝子の多型スクリーニングを行い、計10個所の多型部位を検出し、3'非翻訳領域(UTR)の GT リピート多型と SLE との関連を報告した<sup>6</sup>。

以上の背景から、本研究では、CD19 多型と SSc 発症との関連を検討した。

## B. 研究方法

金沢大学附属病院皮膚科受診中の SSc 患者88例について、CD19 遺伝子 3'UTR の GT リピート多型、および、プロモーター領域の SNP のうちで、高頻度に検出される -499G>T の遺伝子型を決定し、既報<sup>6</sup>の東京近郊在住健常者 247 例の遺伝子型と比較した。

GTリピート多型は GeneScan<sup>TM</sup>ソフトウェア (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いた PCR 産物の解析により、-488G>T 多型は、PCR-single strand conformation polymorphism 法を用いてタイピングを行った。統計学的解析は、 $\chi^2$  検定を用いて施行した。

## C. 研究結果

3'UTR では(GT)<sub>14</sub> リピートが(表1)、プロモーター領域では、-499T アリルが(表2)、SSc に有意に増加していた。これらのアリルは、互いに連鎖不平衡にあった。

次に、-499G>T 多型につき、患者群を北陸(石川、福井、富山、新潟各県)在住者と、他県在住者に分けて比較したところ、両群に有意差が検出された(表3)。

## D. 考察

以上の結果から、患者群と健常者群に検出された有意差は、患者群が主として北陸在住であるのに対し、健常者群が東京近郊在住であることによる偽陽性である可能性が除外できなかった。ただし、患者群の遺伝子型頻度分布は、通常、一般集団において観察されるはずの Hardy-Weinberg 平衡から有意にゆがんでおり(P=0.009)、SSc と CD19 多型に何らかの関連が存在する可能性が示唆された。

今回の研究結果から、北陸在住患者・健常者間における比較が必須であると考えられたため、金沢大学及び東京大学の研究倫理審査委員会に承認を得、現在、北陸在住健常者を中心に、試料収集を行っている。

## E. 結論

SSc 患者と健常者間に、CD19 遺伝子型の有意差が検出されたが、両群の地域差

による偽陽性の可能性が除外できず、現在、北陸在住患者・健常者試料の再収集を行っている。

#### F. 文献

- 1) Silman AJ. Scleroderma. In *Epidemiology of the Rheumatic Diseases (second edition)*, Edited by Silman AJ and Hochberg MC. Oxford University Press, Oxford, 2001: 141-162.
- 2) Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001; 44, 1359-1362.
- 3) Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000, 165: 6635-6643.
- 4) Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, Nagaoka T, Takehara K, Tedder TF, Sato S. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002, 109: 1453-1462.
- 5) 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* 2002, 3 Suppl 1:S21-30.

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

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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* 2002, 46: 1242-1254.

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* 2002, 3 Suppl 1:S21-30.

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* 2002, 3: 424-429.

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

Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, Nagaoka T, Takehara K, Tedder TF, Sato S. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002, 109: 1453-1462.

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* 2002, 3: 488-493.

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* 2003, 48: 273-274.

## 2. 学会発表

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 2002, 42: 237.

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 2002, 42: 363.

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 2002, 42: 367.

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 2002, 42: 367.

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* 2002, 46 (Suppl): S98.

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* 2002, 46 (Suppl): S188.

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* 2002, 46 (Suppl): S287.

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* 2002, 46 (Suppl): S288

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* 2002, 46 (Suppl): S550.

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、名古屋)。

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、名古屋)。

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、名古屋)。

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.

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.

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.

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.

表1 強皮症患者群および健常対照群における CD19 3'非翻訳領域 GT リピート多型

c.*132(GT)n	SSc (n=88)		Controls (n=247)		P
アリル陽性率					
12 (+)	80	(90.9)	227	(91.9)	0.005
13 (+)	10	(11.1)	46	(18.6)	
14 (+)	39	(43.3)	69	(27.9)	
15 (+)	3	(3.3)	3	(1.2)	
18 (+)	7	(8.0)	17	(6.9)	
アリル頻度					
12	114	(64.8)	353	(71.5)	0.01
13	11	(6.3)	47	(9.5)	
14	41	(23.3)	74	(15.0)	
15	3	(1.7)	3	(0.6)	
18	7	(4.0)	17	(3.4)	

( )%

表2 強皮症患者群および健常対照群における CD19 -499G>T 多型

-499G>T	SSc (n=88)		Controls (n=247)		P
遺伝子型頻度					
G/G	36	(40.9)	138	(55.9)	0.05
G/T	47	(53.4)	100	(40.5)	
T/T	5	(2.7)	9	(3.6)	
アリル陽性率					
G(+)	83	(94.3)	238	(96.4)	0.016
T(+)	52	(59.1)	109	(44.1)	
アリル頻度					
G	119	(67.6)	376	(76.1)	0.028
T	57	(32.4)	118	(23.9)	

( )%

表 3 強皮症患者群居住県別の CD19 -499G>T 多型

-499G>T	石川、富山、福井、新潟 (n=74)		他県*1 (n=14)		P
遺伝子型頻度*2					
G/G	26	(35.1)	10	(71.9)	0.03
G/T	44	(59.5)	3	(21.4)	
T/T	4	(5.4)	1	(7.1)	
アリル陽性率					
G(+)	70	(94.6)	13	(92.9)	0.01
T(+)	48	(64.9)	4	(28.6)	
アリル頻度					
G	96	(64.9)	23	(82.1)	
T	52	(35.1)	5	(17.9)	

( )%

\*1 福島、埼玉、神奈川、岐阜、三重、大阪、島根

\*2 北陸4県在住患者の遺伝子型頻度は、Hardy-Weinberg 平衡から、有意にゆがんでいた(P=0.009)。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

強皮症動物モデルである Tight-skin マウスにおける  
B リンパ球シグナル伝達異常の解析

分担研究者 藤本 学 国立国際医療センター研究所  
細胞組織再生医学研究部細胞修飾生体反応研究室長  
分担研究者 佐藤伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授  
協力者 大河内仁志 国立国際医療センター研究所  
細胞組織再生医学研究部長  
協力者 浅野典子 国立国際医療センター研究所  
細胞組織再生医学研究部流動研究員

### 研究要旨

全身性強皮症の動物モデルとして用いられている Tight skin (TSK/+) マウスは皮膚および皮下に著明な皮膚の線維化を主徴とし、強皮症に類似した免疫異常も認められる。われわれは、TSK/+マウスを対象に B リンパ球の抗原受容体を介するシグナル伝達に異常が存在するかどうかを検討した。TSK/+マウス由来の B 細胞は抗原受容体刺激に対して過剰な反応性を示し、これは主として CD22 の機能が障害されていることによると考えられた。

### A. 研究目的

Tight skin (TSK) マウスは皮膚および皮下に皮膚の著明な線維化を主徴とする突然変異マウスで(1)、全身性強皮症の動物モデルとして用いられている(2)。この変異は常染色体優性遺伝で、ホモ接合体 (TSK/TSK) は子宮内で致死となるため、線維化を呈するマウスはヘテロ接合体 (TSK/+) である。TSK/+マウスの呈する症状は強皮症と全く同一ではないが、皮膚硬化のみならず強皮症と類似の免疫異常も認められることは大きな特徴である。例えば、全身性強皮症で特異的に検出される

抗トポイソメラーゼ I 抗体や抗 RNA ポリメラーゼ抗体などは TSK/+マウスでも出現することが知られている。TSK/+マウスの責任遺伝子は Fibrillin I と報告されているが(3)、まだ明らかになっていない部分も多い。いずれにしても TSK/+マウスが全身性強皮症と共通ないし類似した皮膚硬化と免疫異常をもつことは、本症の発症機序を研究する上で示唆に富むモデルであるといえる。

全身性強皮症をはじめとする自己免疫疾患では、リンパ球の異常な活性化が認められることが大きな特徴のひとつである。実際に、