

8. Bonfa E, Llovet R, Elkou K. Immunoblot analysis of IgG subclasses of multiple lupus autoantibodies. *J Immunol* 1988; 140: 2231-6.
9. Rubin RL, Tang FL, Chan EK, et al. IgG subclasses of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome, and drug-induced autoimmunity. *J Immunol* 1986; 137: 2528-34.
10. Yount WJ, Cohen P, Eisenberg RA. Distribution of IgG subclasses among human autoantibodies to Sm, RNP, dsDNA, SS-B, and IgG rheumatoid factor. *Monogr Allergy* 1988; 23: 41-56.
11. Eisenberg RA, Dyer K, Craven SY, et al. Subclass restriction and polyclonality of the systemic lupus erythematosus marker antibody Sm. *J Clin Invest* 1985; 75: 1270-7.
12. Murakami A, Kojima K, Ohya K, et al. A new conformational epitope generated by the binding of recombinant 70-kd protein and U1RNP to anti-U1RNP autoantibodies in sera from patients with mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3273-82.
13. Ishizuka A. The inductive effect of interleukin 4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 392-6.
14. Kawano Y, Noma T. Role of interleukin-2 and interferon-gamma in inducing production of IgG subclasses in lymphocytes of human newborns. *Immunology* 1996; 88: 40-8.
15. Fujieda S, Sieling PA, Modlin RL, et al. CD1-restricted T-cells influence IgG subclass and IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 545-51.

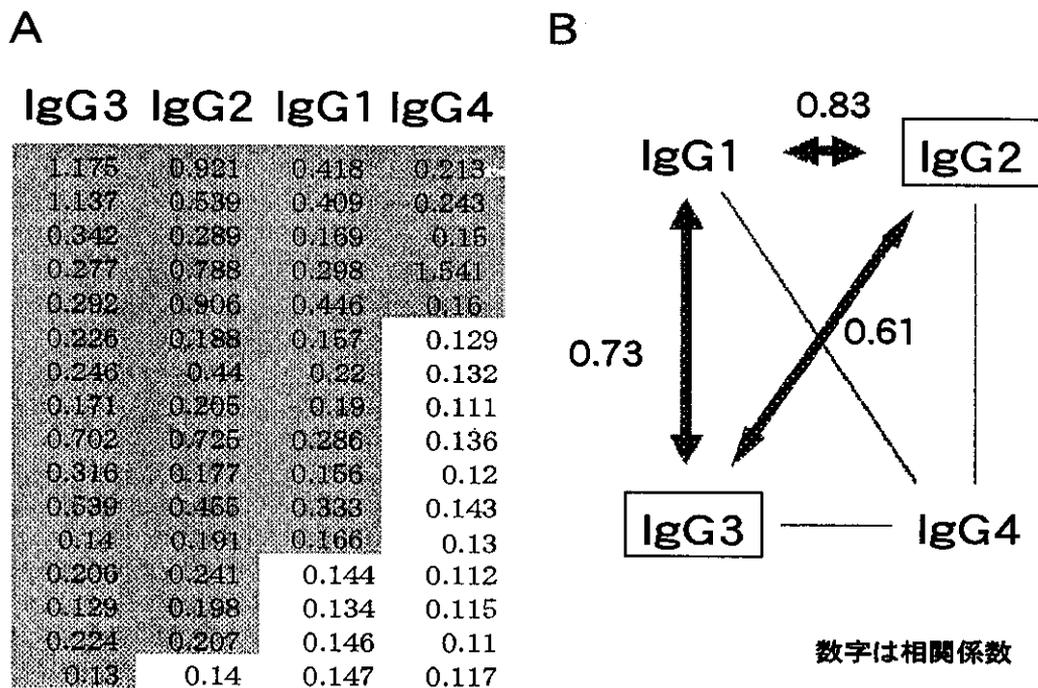


図1. 抗D抗体のIgGサブクラス

(A) 抗D抗体陽性例全例のOD_{405nm}値で、各サブクラスごとの陽性値を網かけで示した。

(B) それぞれのサブクラスOD_{405nm}値の相関を計算した。IgG1、IgG2、IgG3は互いに相関していたがIgG4は他のどのサブクラスとも相関がなかった。

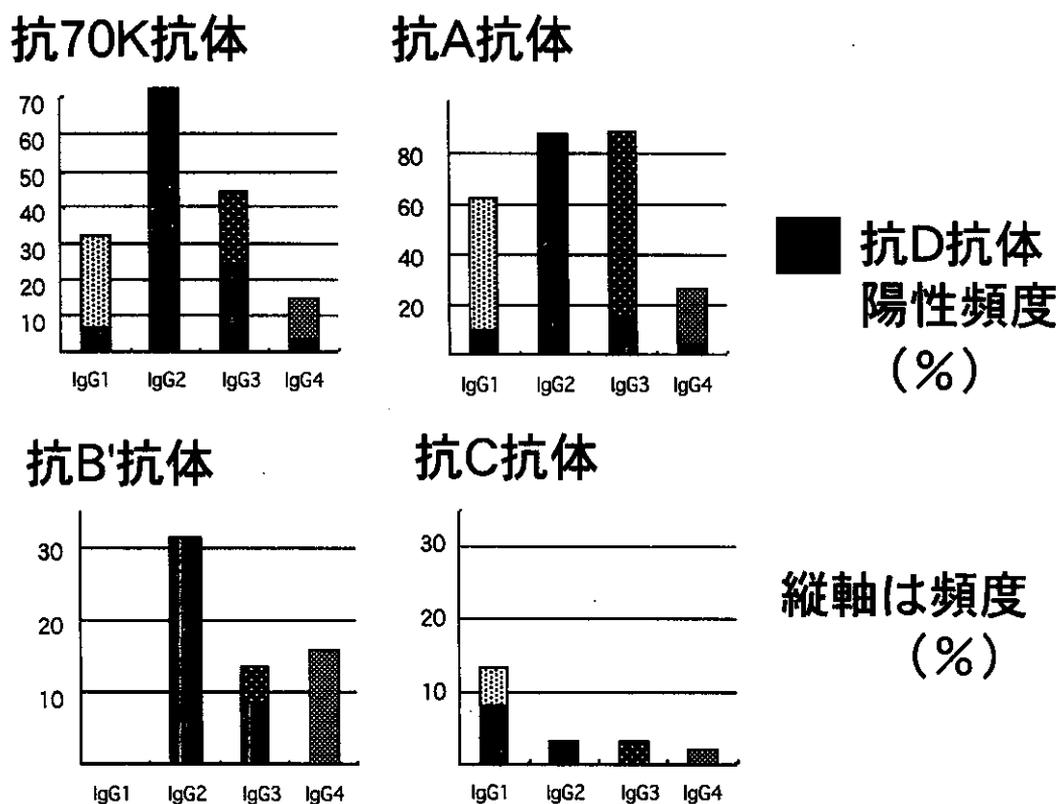


図2. 各サブクラスにおけるU1RNPに特異的な構成蛋白に対する自己抗体あるいは抗B'抗体と抗D抗体の併存
 抗70KではIgG2あるいはIgG3、抗A抗体ではIgG2、抗B'抗体ではIgG2あるいはIgG3、抗C抗体ではIgG1
 において、それぞれ同じサブクラスの抗D抗体と併存率が高かった。しかしOD_{405nm}値が相関したのはIgG3型
 抗70K抗体、IgG2型抗B'抗体、IgG1型抗C抗体のみであった。

DETECTION OF IgG SUBCLASS REACTIVE WITH U1RNP PARTICLES IN SERA FROM PATIENTS WITH RHEUMATIC DISEASES

Takao Fujii, Yoshitaka Imura, and Tsuneyo Mimori

Department of Rheumatology and Clinical Immunology
 Kyoto University Graduate School of Medicine

We determined IgG subclasses that recognized each U1RNP particle (70K, A, B', C, or D) in sera from patients with rheumatic diseases. In 64 anti-U1RNP or anti-Sm antibody-positive sera, IgG2 was the most frequently detected in anti-70K and anti-B' antibodies, whereas IgG2 and IgG3 were equally observed in anti-A and anti-D antibodies. In anti-C antibodies, IgG1 appeared to be the major subclass. Additionally, the titer of anti-70K antibodies correlated with anti-D antibodies in IgG3, whereas the titer of anti-C antibodies correlated with anti-D antibodies in IgG1. These results suggested that Th1 response might be involved in anti-U1RNP/Sm antibody production and the genesis of anti-Sm antibody was closely associated with the increased titer of autoantibodies against the unique particles of U1RNP in a certain IgG subclass.

4. U1 RNP70-Kd 蛋白と U1 RNA の結合により生じる立体構造を認識する抗 U1 RNP 抗体の臨床的意義の検討

分担研究者：高崎芳成

研究協力者：縄田益之、松下雅和、山田浩史、池田圭吾、

松平 蘭、金田和彦、橋本博史

所属施設：順天堂大・膠原病内科

研究要旨

U1 RNP70-Kd 蛋白と U1 RNA の結合により生じる立体構造を認識する抗 U1 RNP 抗体の臨床的意義について検討した。自験 MCTD186 例を対象とし、リコンビナント 70-Kd、A および C 蛋白を抗原源とした ELISA (P-ELISA) とそれに U1 RNA を添加した ELISA (R-ELISA)、および 70-Kd、A 蛋白に U1 RNA を結合させた抗原を用いた免疫沈降法 (IP) で U1 RNP 70-Kd、および A 蛋白と U1 RNA の結合により生じる立体構造を認識する抗 U1 RNP 抗体を検出した。その結果、186 例中 13 例が P-ELISA で陰性、R-ELISA で陽性となった。これらの血清の反応性を 70-Kd と A 蛋白に U1 RNA を結合させた抗原を用いた IP で検討すると、すべての血清が U1 RNP 70-Kd 蛋白と U1 RNA の結合により生じる立体構造を認識する事が示された。この 13 例の臨床像について他の 172 例と比較すると、2 例は死亡し、SLE 様の病態が著明で特異な臨床像を有していることが示唆された。以上より、U1 RNA/70-Kd 蛋白複合体の立体構造を認識する抗 U1 RNP 抗体陽性例は通常 MCTD と異なる病態を有することが示唆された。

A. 研究目的

MCTD 患者の診断において必須条件となる抗 U1 RNP 抗体の測定にはこれまでの二重免疫拡散法 (DID) に換わり、酵素免疫法 (ELISA) が用いられるようになってきた。しかし、これまでの U1 RNP を構成する蛋白成分のみを用いた ELISA では DID 陽性の約 5-8% の症例が陰性となることが知られていた。そこでこの問題を解決する目的で 70Kd、A、および C 蛋白に加え、U1 RNA を添加した測定系が開発された。その結果、U1 RNP 70-Kd 蛋白と U1 RNA の結合により生じる立体構造を認識する抗 U1 RNP 抗体が MCTD 患者血清に検出される事が明らかとなった。今回は、この特異な抗 U1 RNP 抗体陽性 MCTD 患者の臨床的特徴について解析を加えた。

B. 対象および研究方法

自験 MCTD186 例を対象とし、リコンビナント 70-Kd、A および C 蛋白を抗原源とした P-ELISA とそれ

らに U1 RNA を添加した R-ELISA、および 70-Kd、A 蛋白に U1 RNA を結合させた抗原を用いた免疫沈降法 (IP) で U1 RNP 70-Kd、および A 蛋白と U1 RNA の結合により生じる立体構造を認識する抗 U1 RNP 抗体を検出した。U1 RNA と 70-Kd および A 蛋白の結合は蛋白に付随する His tag に対する抗体を用いた IP、U1 RNP に対する各血清の特異性の確認は HeLa 細胞抽出液を抗原源とした IP にて行った。検体の使用については承諾を得、倫理的な問題点は特にない。

C. 研究結果

1) MCTD 患者血清の P-ELISA と R-ELISA に対する反応性

MCTD 患者 186 例中、P-ELISA では 93.0% のみが抗 U1 RNP 抗体陽性であったのに対し、R-ELISA では 99.5% が陽性となり (表 1)、二重免疫拡散法 (DID) にても陰性であった一例を除いた 185 例のうち 13 例で両者に対する反応性の相違が認められた。そこで、これ

らの血清の特異性をHeLa細胞を抗原源としたIPで検討すると、いずれもU1 RNAを沈降し、抗U1 RNA抗体陽性であることが確認された(図1 A、表1)。R-ELISAにはP-ELISAには添加されていないU1 RNAが加えられていることから、この13血清のU1 RNA自体に対する反応性をU1 RNA自体を抗原としたELISAとIPで検討した。その結果、13血清の内、3血清がELISAもしくはIPにてU1 RNAと反応するものの、他の血清は反応しないことが明らかとなった(表2)。

2)U1 RNA/70-Kd 蛋白複合体に対する反応

U1 RNAに対する反応性からR-ELISAにおける反応性の向上は、ただ単にU1 RNAを添加したことに依存していないことが明らかとなった。そこで抗His-tag抗体を用いたIPにてU1 RNAとの特異な結合を確認したU1 RNP/70-Kd蛋白複合体を抗原としたIPにて13血清の反応性を検討すると全て陽性となることが示された(図1B、代表的な10例の結果を示す)。同様にU1 RNP/A蛋白複合体について検討すると、3例のみが陽性となっていた。

2)U1 RNA/70-Kd蛋白複合体上のエピトープを特異的に認識する抗U1 RNP抗体陽性例の臨床像

U1 RNA/70-Kd蛋白複合体を特異的に認識する抗U1 RNP抗体陽性13例の臨床的特徴について検討を加えると、SLEの基準を高率に満たし、どの診断基準もみたさない定型的なMCTDは少ない傾向にあった(表3)。個々の臨床像について検討を加えると、強皮症様症状が低率で、SLEおよび筋炎に関連する所見の出現率が高く、特にCNSループスと抗dsDNA抗体が有意に高率に出現していた。

D. 考察

今回の検討で、これまでU1 RNPの蛋白成分のみを用いたELISAで陰性となるU1 RNA/70-Kd蛋白複合体の立体構造を認識する抗U1 RNP抗体陽性例の臨床像が明らかとなった。これらの患者ではSLE様の病変が前景に出ている傾向があり、特に、一連の症例では抗dsDNA抗体が高率に出現しているのにも関わらず抗Sm抗体の出現率が低く、それとの相関が指摘されているCNSループスが高率に認められた点が注目された²⁾。また、本抗体陽性の2例はCNSループスとtoxic epidermal necrolysisに引き続く感染症で死亡し、予後も悪いことが示唆された。今後、MCTDの病型を考える上で意義ある所見と考えられた。

文献

- 1.Murakami A, Kojima K, Ohya K, Imamura K, Takasaki Y: A new conformational epitope generated by the binding of recombinant 70-kd and U1 RNA autoantibodies in sera from patients with mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 46: 3273-3282, 2002
- 2.Tan EM: Antinuclear antibodies; Diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology. *Adv Immunol* 44: 93-151, 1989

F. 健康危険情報

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

図 1.

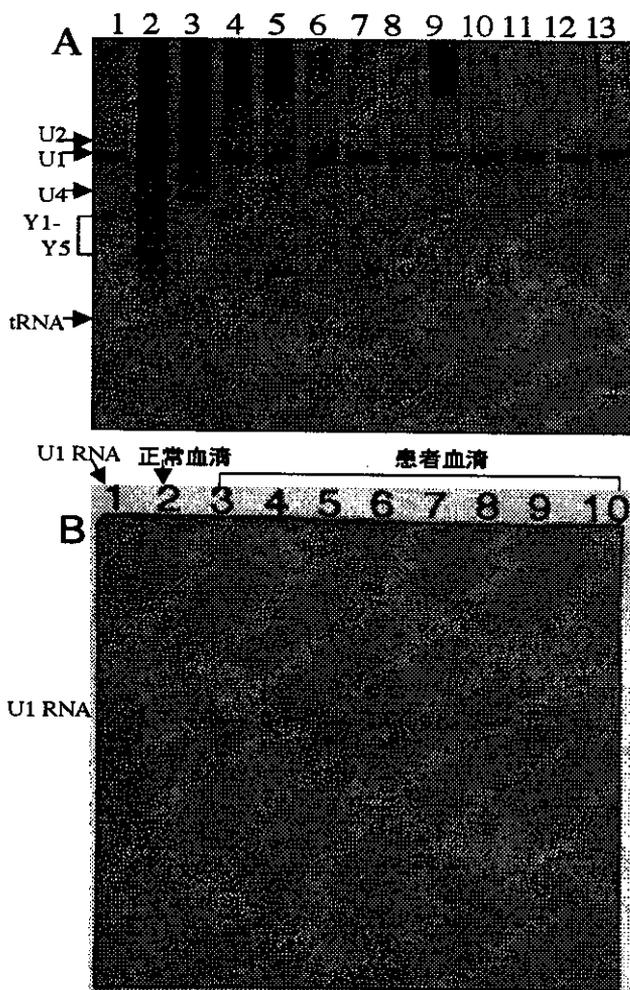


表1 各種膠原病患者血清のリコンビナント70 Kd, A およびC蛋白のみを用いたELISAとU1 RNAを加えたELISAに対する反応性

Disease	Number	R-ELISA	P-ELISA
MCTD	186	99.5 %	93.0%
SLE	119	42.0	32.8
SJS	25	16.0	4.0
SSc	20	5.0	10.0
PM/DM	25	4.0	4.0
RA	33	0.0	0.0

R-ELISA: ELISA using U1 RNA and 70kD, A and C proteins
P-ELISA: ELISA using 70kD, A and C proteins

表3 膠原病の診断基準の満足度の比較検討

病型	Patients with anti-U1 RNP antibodies	
	recognizing only U1 RNA/A complex (N=13)	recognizing 70k, A and/or C proteins (N=172)
SLE	69.2%	58.7 %
SSc	23.1	34.9
PM/DM	15.4	5.2
いずれの基準も満足しない	7.7	16.9
Overlap	30.8	30.8

表4 U1 RNA/70 Kd蛋白複合体を特異的に認識する抗体陽性の患者群の臨床像

Clinical features	Patients with anti-U1 RNP antibody	
	recognizing only U1-RNP/A complex (N=13)	recognizing 70k, A and/or C proteins (N=172)
Raynaud's phenomenon	100 %	99.4 %
Swollen fingers/hands	100	85.6
Photosensitivity	23.0	12.8
Malar rash	38.5	22.1
Alopecia	15.4	5.8
Arthritis	100	79.7
Pleuritis	7.7	5.8
Pericarditis	7.7	5.2
Lymphadenopathy	23.1	28.3
CNS involvement	23.1*	2.9
Proteinuria	46.2	45.9
Hemolytic anemia	7.7	3.5
Leukopenia	69.2	54.1
Lymphopenia	38.5	48.3
Thrombocytopenia	15.4	11.1
Muscle weakness	23.1	35.5
Myalgia	53.8	49.4
Increased level of CK	69.2	45.9
Sclerodactyly	46.2	50.6
Diffuse scleroderma	15.4	18.0
Digital ulcer	7.7	15.7
Dilatation of esophagus	7.7	14.5
Lung fibrosis/interstitial pneumonitis	30.8	40.0
Pulmonary hypertension	0	15.1
%VC < 80%	23.1	36.6
%DLco < 70%	38.7	44.8
Hyper-globulinemia	76.9	79.7
Anti-dsDNA Ab	69.2*	33.7
Anti-Sm Ab	7.7	21.5
Anti-SS-A Ab	23.1	25.0
Anti-SS-B Ab	0	4.7
Hypocomplementemia	23.1	34.9
Rheumatoid factor	30.8	55.2

* P < 0.001

表2 P-ELISA陽性R-ELISA陽性13MCTD血清の各種抗原を用いたELISAおよびIPによる分析

PT No.	ELISA			IP	
	R-ELISA	P-ELISA	U1 RNA ELISA	HeLa cell	U1 RNA
1	+	+	-	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+
4	+	-	-	+	-
5	+	-	+	+	+
6	+	-	-	+	-
7	+	-	-	+	-
8	+	-	-	+	-
9	+	-	-	+	-
10	+	-	-	+	-
11	+	-	-	+	-
12	+	-	-	+	-
13	+	-	-	+	-

(): index

CLINICAL SIGNIFICANCE OF ANTI-U1 RNP ANTIBODIES RECOGNIZING THE CONFORMATION-STRUCTURE ON U1 RNA/70-KD PROTEIN COMPLEX

Yoshinari Takasaki, Masuyuki Nawata, Hiroshi Yamada, Keigo Ikeda, Ran Matsudaira, Kazuhiko Kaneda, Hiroshi Hashimoto

Department of Internal Medicine and Rheumatology, Juntendo University School of Medicine

Anti-U1 RNP antibodies recognizing the conformation-structure on U1 RNA/70-Kd protein were detected by ELISA using U1 RNP 70-Kd, A and C proteins (P-ELISA), and ELISA using U1 RNA in addition to the proteins (R-ELISA). And the clinical significance of those antibodies in MCTD patients was studied.

Thirteen sera from 186 patients with MCTD were positive in R-ELISA but negative in P-ELISA, and the specific reactivity of those sera to the conformation-structure on U1 RNA/70-Kd protein complex was confirmed by immunoprecipitation using the complex as antigen source.

The clinical characteristics of 13 patients with anti-U1 RNP antibodies reactive with only the U1 RNA/70-Kd protein complex was studied comparing with clinical features of other 172 MCTD patients. The patients with antibodies to the complex highly fulfilled the ACR criteria for lupus patients (69.2%), and the number of patients who did not fulfill any other criteria for connective tissue diseases was lower than other 172 MCTD patients (7.7% vs 16.9%). In addition, the frequencies of clinical features associated with lupus were higher, and CNS lupus and positive for anti-dsDNA antibodies significantly-highly occurred in the 13 patients.

Those results suggested that the MCTD patients with anti-U1 RNP antibodies that specifically recognize the conformation-structure on U1 RNA/70-Kd protein complex have characteristic clinical features strongly associated with lupus, and belong to different subset of the disease.

5. 膠原病患者末梢血単核細胞による抗U1-RNP抗体産生と免疫抑制剤添加の影響について

分担研究者：青塚新一

研究協力者：大川（高辻）雅子

所属施設：国立国際医療センター研究所

研究要旨

膠原病患者末梢血単核細胞による抗U1-RNP抗体産生および抗SS-A抗体産生を検討した。また、この系における免疫抑制剤（ミゾリピン）添加の影響を検討した。患者末梢血単核細胞(PBMC)を無刺激あるいは種々の濃度の免疫抑制剤を添加して7日間培養し、上清中のIgG抗U1-RNP抗体、IgG抗SS-A抗体、免疫グロブリン(IgG)を酵素抗体法で測定した。血中抗U1-RNP抗体価および抗SS-A抗体価高値の患者から得たPBMCは、培養上清中にそれらの抗体を有意に産生した。抗U1-RNP抗体産生単核細胞にミゾリピンを添加した場合、その産生は有意に抑制されたが、抗SS-A抗体産生単核細胞にミゾリピンを添加した場合、その産生は抑制されなかった。今回の検討により、試験管内における単核細胞によるspontaneousな抗U1-RNP抗体、および抗SS-A抗体産生が確認でき、抗U1-RNP抗体陽性例ではミゾリピン添加で抗体が有意に抑制され、臨床的効果を予測できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

膠原病患者末梢血単核細胞（PBMC）によるspontaneousな抗体産生を検討すると同時に、免疫抑制剤添加の影響を検討した。

B. 対象と方法

血清中抗U1-RNP抗体高値の膠原病患者16例（MCTD;2例、SLE;7例、SS;6例、SSc;1例）、および、血清中抗U1-RNP抗体陰性で抗SS-A抗体が高値の患者8例（SS;7例、SLE;1例）を対象とした。健常人6例を対照にした。患者および健常人からPBMCを分離し、無刺激あるいは種々の濃度の免疫抑制剤を添加して7日間培養、その上清中の抗U1-RNP抗体、抗SS-A抗体、免疫グロブリンを酵素抗体法で測定した。

C. 研究結果

1) 膠原病患者血清中の抗ENA抗体

血清中の抗U1-RNP抗体陽性16例(22COI以上)のうち、抗U1-RNP抗体が高値の患者は、血清中のその他の抗体、抗Sm抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体も高値である傾向があった(図1A)。また、抗U1-RNP抗体陰性で抗SS-A抗体が陽性(30COI以上)の8例については、抗U1-RNP抗体陰性の患者は、抗Sm抗

体も陰性だった(図1B)が、抗SS-A抗体が陽性、抗SS-B抗体は高値の例も低値の例も認められた。

2) 膠原病患者血清中抗U1-RNP抗体価によるグループ別の培養上清中抗U1-RNP抗体価

健常人の血清中の抗U1-RNP抗体価の平均値+2SD以上を陽性として、陽性群、陰性群のグループに分け、無刺激PBMCを培養して上清中抗U1-RNP抗体を測定した。培養上清中抗U1-RNP抗体産生は、血清中抗体陽性群では、16例中7例が陽性、血清中抗体陰性群では8例中1例が陽性であった(図2)。

3) 膠原病患者血清中抗SS-A抗体価によるグループ別の培養上清中抗SS-A抗体価

抗U1-RNP抗体と同様に、血清中の抗SS-A抗体価でグループ分けをし、PBMCの培養上清中抗SS-A抗体の値を測定した。培養上清中抗SS-A抗体産生は、血清中抗体陽性群では、21例中6例が陽性、血清中抗体陰性群では3例中1例が陽性であった(図3)。

4) 膠原病患者PBMC培養上清中抗U1-RNP抗体産生、total IgG産生に対するミゾリピン添加の影響

患者PBMCを無刺激あるいは種々の濃度の免疫抑制剤:ミゾリピンを添加して7日間培養し、上清中の抗

U1-RNP抗体、total IgGを酵素抗体法で測定した。

PBMCの無刺激培養上清中抗U1-RNP抗体が陽性の8例について、2.5、25、250 $\mu\text{g/ml}$ を添加した場合、Wilcoxon T testで1%の危険率で抗U1-RNP抗体産生が有意に抑制された(図4A、ミジリオン $10\mu\text{g/ml}$ を100%として計算した)。

同じ症例の培養上清中total-IgGは、0.25、250 $\mu\text{g/ml}$ で有意差が認められたが($p<0.05$)、抗U1-RNP抗体産生に対する抑制効果の方が高いと判断できた(図4B)。

5) 膠原病患者PBMC培養上清中抗SS-A抗体産生に対するミジリオン添加の影響

一方、培養上清中の抗SS-A抗体陽性の7例についてミジリオン添加の影響を見ると、ミジリオンによる抑制効果はほとんど認められなかった(図5)。

6) 血清中およびPBMC培養上清中の抗ENA抗体の関連

血清中の抗U1-RNP抗体と培養上清中の抗U1-RNP抗体との間には、有意な相関が認められ($n=24$ 、 $r=0.628$ 、 $p<0.01$ 、図6A)、血清中の抗SS-A抗体と培養上清中の抗SS-A抗体との間にも、関連する傾向が認められた($n=24$ 、 $r=0.342$ 、図6B)。その他、血清中の抗U1-RNP抗体と抗Sm抗体との間には、有意な相関が認められた($n=24$ 、 $r=0.670$ 、 $p<0.01$ 、図6C)。

7) 患者のミジリオン治療経過中の抗U1-RNP抗体、抗SS-A抗体の動き

免疫抑制剤の自己抗体産生との関連について検討した。患者はSLEにシェーグレンを合併した症例で、今回、in vitroで自己抗体産生に対するミジリオンの影響について検討するきっかけになった。血清中抗U1-RNP抗体、抗SS-A抗体の値が高く、ステロイド5mgの維持量投与中であった。ミジリオン150mgを投与してから、血清中の抗U1-RNP抗体、抗SS-A抗体は、経過と共に低下しているのが分かる。一方、total-IgGの変化はなく、特異自己抗体だけ低下していた。患者はこの治療で、レイノー現象の改善が認められた(図7)。

D. 考察

これまで、膠原病患者および健常人PBMCによるspontaneousな自己抗体産生(リウマトイド因子、抗DNA抗体)を報告し、患者末梢血Bリンパ球のプレアクチベーションを確認してきた¹²⁾が、今回、抗U1-RNP抗体、抗SS-A抗体の産生について検討した。その結果、血清中の抗U1-RNP抗体高値、抗SS-A抗体高値の患

者のPBMCは、培養上清中にspontaneousにそれぞれの自己抗体を産生している事を確認した。また、血清中の抗U1-RNP抗体と培養上清中の抗体量、血清中の抗SS-A抗体と培養上清中の抗SS-A抗体量はそれぞれ関連していることが分かり、培養細胞の抗体産生が生体内の病態を反映すると考えられた。

同じU1-RNA上のペプチドを認識する抗U1-RNP抗体(対応抗原:68K、A鎖、C鎖)と抗Sm抗体(対応抗原:B'/B、D)は血清中で有意な関連が認められ、Y-RNA上のペプチドを認識する抗SS-A抗体(対応抗原:Ro)、抗SS-B抗体(対応抗原:La)も、血清中の抗体価が関連する傾向を確認した。これらの抗原は本来、細胞の核質内にあり、それぞれの抗原に対しどのように抗体が作られるのかについては明らかではない。これらの自己抗体産生の機序として、アポトーシスを起こした細胞膜表面上にできたブレブの中に、RNPのフラグメントが含まれ、抗U1-RNP抗体がそれを認識できるという報告があり³⁾、抗SS-A抗体についても、同様の可能性が考えられる。

ミジリオンの作用機序については、細胞増殖の抑制⁴⁾⁵⁾とヘルパーT細胞の活性抑制⁶⁾などが報告されている。我々はミジリオン添加による細胞数の変化を検討していないが、total IgG産生量を変化させずに抗U1-RNP抗体産生を有効に抑制したことから、細胞数の抑制はなかったと推測される。しかし、抗体産生抑制の作用機序については不明である。

血清中抗U1-RNP抗体高値の患者から得たPBMCは、培養上清中に抗U1-RNP抗体を産生し、免疫抑制剤ミジリオンにより濃度依存性に抑制されることを確認した。しかし、IgGに対する抑制は認められず、薬剤が自己抗体産生に対して有効に働いている可能性が示唆された。抗SS-A抗体産生に対するミジリオンの抑制は認められなかった。また、症例検討から、この薬剤投与により、血中の抗U1-RNP抗体を有意に減少させ、レイノー現象の改善が認められたことから、ミジリオンは自己抗体産生を抑制し、臨床的な効果をもたらすのに有効であると考えられた。また、in vitroでの抗体産生抑制効果の結果から、臨床的な効果を予測できる可能性が示唆された。

E. 結論

1) 血清中の抗U1-RNP抗体が陽性の膠原病患者単核細胞は、培養上清中にspontaneousに抗U1-RNP抗体、抗SS-A抗体を産生した。

2) 血清中抗U1-RNP抗体が陽性の患者で、培養上清中抗体産生が高値の例が認められた。同様に、血清中抗SS-A抗体が陽性の患者で、培養上清中抗体産生が高値の例が認められた。

3) in vitroでの単核細胞による抗U1-RNP抗体産生陽性例では、免疫抑制剤:ミゾリビンの添加によりその抗体産生が有意に抑制され、臨床的な効果との関連を予測できる可能性が示唆された。

文献

1. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Shu Uwatoko et al.: Monocyte-mediated suppression of rheumatoid factor production in normal subjects. Clin Imm Immunopathol 46, 195-204, 1988.
2. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Yokohari R et al.: Monocyte-mediated suppression of anti-DNA antibody production in healthy subjects. Clin Exp Immunol 77, 403-409, 1989.
3. Biggiogera M, Bottone MG, Martin TE et al.: Still immunodetectable nuclear RNPs are extruded from the cytoplasm of spontaneously apoptotic thymocytes. Exp Cell Res 234, 512-520, 1997.
4. 加村ひろみ, 他: BredininおよびCyclosporin Aの作用機序に関する基礎的研究。移植, 17(Suppl.)579, 1982.
5. 渡辺 幹生, 他: HE-69(Mizoribin)のヒトリンパ球機能抑制作用に関する研究。臨床免疫, 16(3), 259, 1984.
6. 吉沢宗敏, 他: Mizoribin(Bredinin)の免疫抑制作用に関する基礎的研究。2. 体液性および細胞性免疫応答に対する抑制作用。臨床免疫, 14(6), 561, 1982.

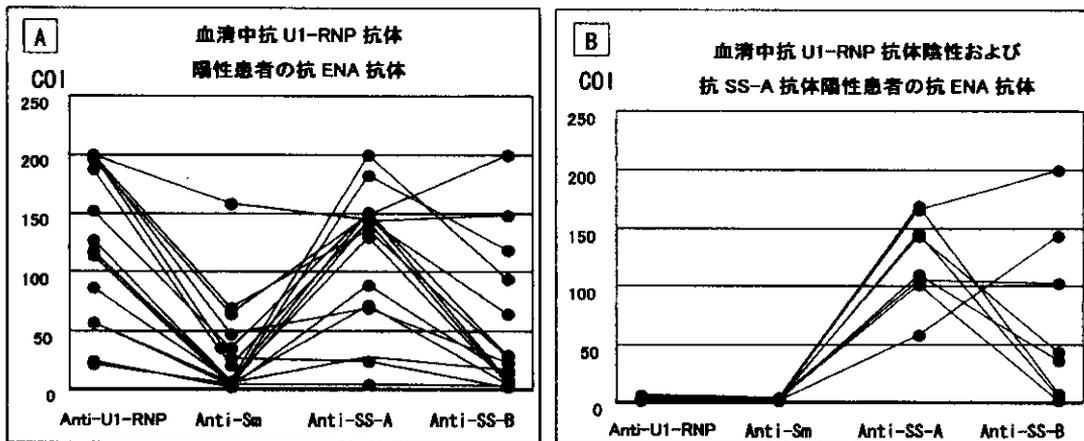


図1. 患者血清中の抗ENA抗体。

A: 血清中抗U1-RNP抗体陽性群 (n=16)。B: 血清中抗U1-RNP抗体陰性かつ抗SS-A抗体陽性群(n=8)。

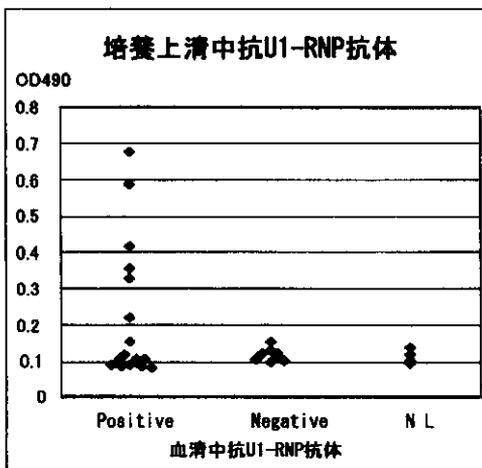


図2. 患者MNCの培養上清中抗U1-RNP抗体。健康人 (n=6) の平均値 + 2SD以上を陽性とする。培養上清中の抗U1-RNP抗体陽性数は血清中抗体陽性群では7/16、血清中抗体陰性群では1/8であった。

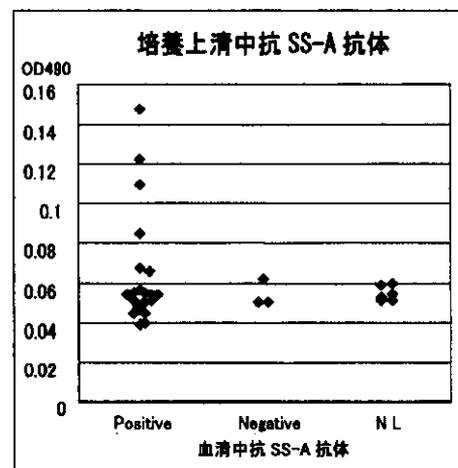


図3. 患者MNCの培養上清中抗SS-A抗体。培養上清中の抗SS-A抗体陽性数は血清中抗体陽性群では7/21、血清中抗体陰性群では、1/3であった。

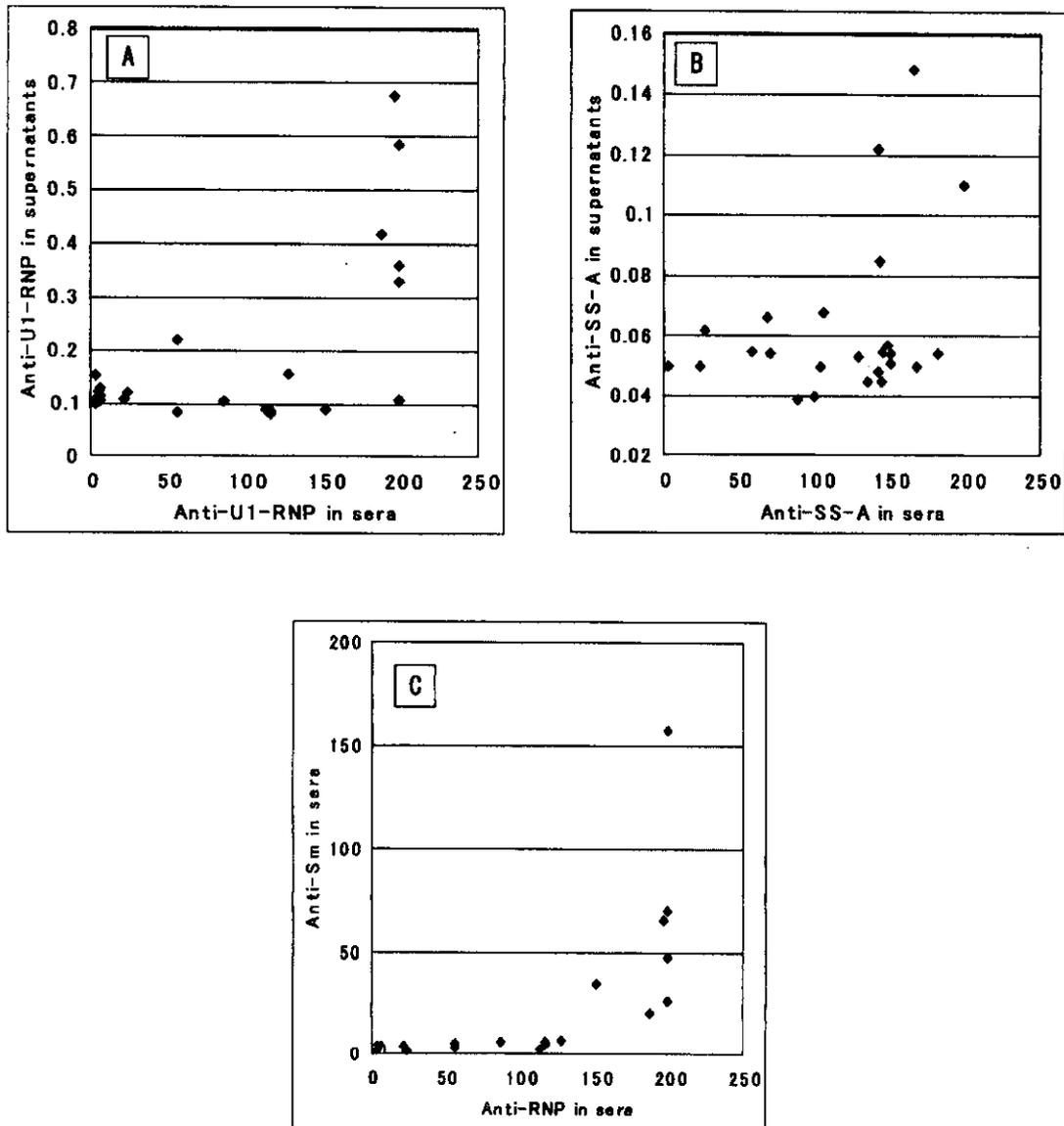


図6. 血清中およびPBMC培養上清中の自己抗体の関連。A: 血清中の抗U1-RNP抗体と培養上清中の抗U1-RNP抗体との間には、有意な相関が認められた ($r=0.628$, $p<0.01$)。B: 血清中の抗SS-A抗体と培養上清中の抗SS-A抗体との間にも関連する傾向が認められた($r=0.342$)。C: 抗U1-RNP抗体と抗Sm抗体との間に有意な相関が認められた ($r=0.670$, $p<0.01$)。

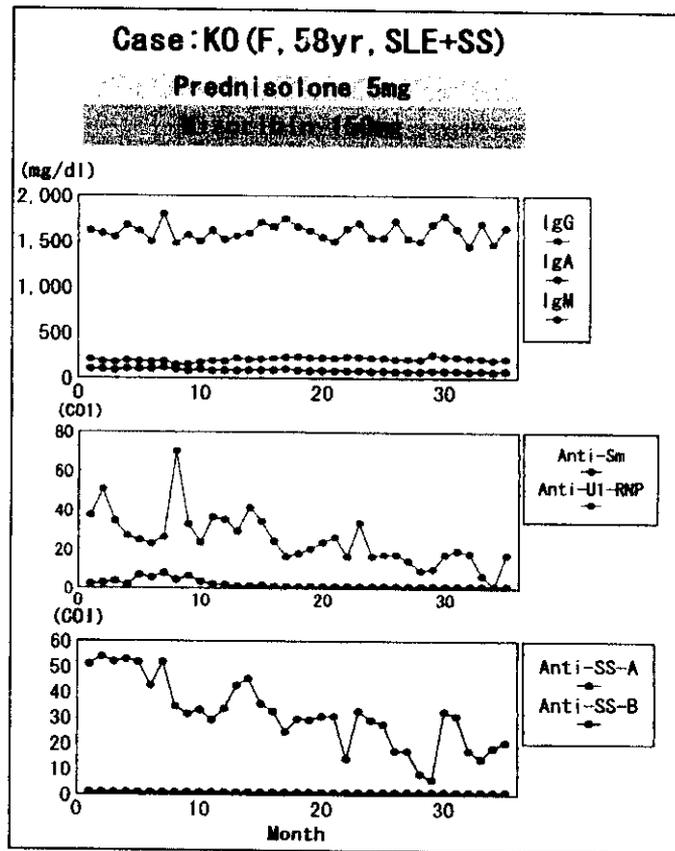


図7. 患者のミゾリピン治療経過中の抗U1-RNP抗体、抗SS-A抗体の動き

SPONTANEOUS PRODUCTION OF AUTOANTIBODIES AGAINST U1-RIBONUCLEOPROTEIN AND SS-A BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM PATIENTS WITH CONNECTIVE TISSUE DISEASE: EFFECTS OF MIZORIBIN ON THEIR PRODUCTIONS

Shinichi Aotsuka and Masako Okawa-Takatsuji

Division of Clinical Immunology, Clinical Research Institute,
International Medical Center of Japan

To investigate a spontaneous production of autoantibodies against U1-ribonucleoprotein (U1-RNP) and SS-A by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with connective tissue diseases (CTD). Moreover, the effects of an immunosuppressant (Mizoribin, MZR) on autoantibody production were also examined. PBMC were spontaneously cultured for 7 days in the absence or the presence of various concentrations of MZR and culture supernatants were assayed for IgG autoantibodies against U1-RNP or SS-A and total IgG using enzyme-linked immunosorbent assay. As a result, most of PBMC obtained from CTD patients who have high titer of serum IgG anti-U1-RNP antibodies or IgG anti-SS-A antibodies were significantly produced those antibodies in the culture supernatants. The addition of MZR to the cultures inhibited the production of only IgG anti U1-RNP antibodies. This is the first report that demonstrates the spontaneous production of anti-U1-RNP and anti-SS-A autoantibodies by PBMC in vitro. The result also suggested a possibility that MZR could suppress the production of anti-U1-RNP autoantibodies in vivo.

6. MCTDにおけるリンパ節腫脹および自己抗体産生に関わるシグナル伝達機構

分担研究者 : 岡本 尚
共同研究者 : 姜 旭、高橋なを子、手塚俊文
所属施設 : 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学

研究要旨

MCTDにおける自己抗体産生に細胞内シグナル伝達系の異常の関与が強く示唆されてきた。本研究では、近年のヒトゲノム計画の成果のひとつとして新たに見つかったTNFファミリーに属すBlyS/BAFF/TALL-1およびこのものと同じ細胞内シグナル伝達系を使用するLTシグナルの詳細を調べた。その結果、このシグナル伝達系では選択的にNIKとIKK α が用いられNF- κ B活性化を引き起こしていること、またその活性化機構は既知のものとは異なりIkBリン酸化・分解やNF- κ Bの核移行を伴わないものであること、NF- κ Bのp65サブユニットのC末端側の転写活性化部位の選択的リン酸化であることを明らかにした。これらの成果は、MCTDにおける自己抗体産生およびリンパ節腫脹のメカニズムの理解を一步すすめて、新たな治療法開発に重要な情報を提供した。

A. 研究目的

MCTDでは高力価の抗RNP抗体の産生と多臓器障害が特徴的であるが、その背景に全身の免疫異常を伴っている。かかる免疫異常は、2次リンパ装置の増生を伴い、しばしば全身リンパ節腫脹として臨床的に観察される。他方、ヒトゲノム解析の成果のひとつとして、TNFファミリーの新たなメンバーが同定された。BlyS (BAFF, TALL-1) はそのようなサイトカインの一種で、B細胞からの抗体産生やリンパ節などの2次リンパ装置の形成に、やはりTNFファミリーのメンバーであるリンフォトキシン (LT) とともに、重要な役割を演じていること。実際にこれらのサイトカイン遺伝子のトランスジェニックマウスは自己免疫を起こし、ヒトの自己免疫疾患 (SLE, SjS, RA など) の患者血清中に高濃度に存在することからMCTDなどの自己免疫疾患の病態形成における役割が注目される。BlySとLTは細胞に作用すると最終的にNF- κ Bを活性化するが、その作用の仕方についてはまだ明らかにはなっていない。過去8年間の研究成果の集積より、これらのシグナルは、NF- κ B inducing kinase (NIK)およびIkB kinase α (IKK α)を介することがノックアウトマウス等の実験から強く示唆される。そこで、本研究ではLT β RシグナリングでのNF- κ B活性化機構における

NIKとIKK α の役割について検討した。

B. 研究方法

- (1) 発現プラスミッドの作成: 発現プラスミッド pM-p65, pM-p65(1-286), pM-p65(286-551), pM-p65(286-551: Δ 443-476), pM-p65(286-520), pM-p65(431-551), pM-p65(521-551), pM-p65(521-551:S529A), pM-p65(521-551:S536A), pcDNA3.1(-)-FLAG-p65, pcDNA3-NIK, pcDNA3-NIK(KM), pcDNA3-IkB Δ N, pcDNA3-IkB (S32A/S36A), pCR-2FL-IKK α , pCR-2FL-IKK α (KM), pCR-2FL-IKK β およびpCR-2FL-IKK β (KM) の作成は既に報告した方法(Jiang et al, J. Biol. Chem. 278:919-926, 2003)に拠った。
- (2) 細胞株およびトランスフェクション: 293細胞とLT β Rを発現するHT29細胞を用いた。プラスミッドを細胞への導入にはFuGENE6 transfection reagent (Roche Molecular Biochemicals)およびLipofectAMINE(Invitrogen)を用いた。
- (3) Luciferase検定: Luciferase(Luc)遺伝子発現プラスミッドとエフェクタープラスミッドを細胞へ導入し、48時間後、細胞から蛋白を抽出、Luc活性を測定した。
- (4) 免疫組織化学染色法: p65の核移行を解析するた

め、HT29細胞を10ng/ml濃度のTNFで15分にまた2ug/ml濃度のLTβR agonistic抗体で40分に刺激し、細胞を固定し、p65に対する抗体 (Santa Cruz Biotechnology) で染色した。

(5) ウェスタンブロット法：細胞抽出液の作成およびウェスタンブロット法は既に報告した方法 (Jiang et al, J. Biol. Chem. 278:919-926, 2003) に拠った。

(6) 共免疫沈降法：p65のLTβRシグナリングにより誘導したリン酸化を確認するため、HT29細胞にFLAG標識したp65 (FLAG-p65) を発現した後、FLAGに対する抗体 (anti-FLAG M2 affinity gel (Kodak)) で共免疫沈降し、沈降された蛋白をp65の536番セリンのリン酸化に認識する特別抗体 (anti-phospho-p65 NF-κB (ser536) antibody (Cell Signaling)) 用いてウェスタンブロット法で解析した。

C. 研究結果

(1) LTβRシグナリングでのNF-κB活性化はIκBリン酸化およびp65の核移行に依存しない (図1)：293とHT29細胞に様々なNF-κB活性因子 (TNF、LTβR、NIK、IKKα、IKKβなど) を導入し、これらの因子により誘導されたκB転写活性をみたところ、TNF、LTβRおよびNIKはκB転写活性を誘導したが、IKKαまたIKKβ単独ではκB転写活性を誘導することができなかった。さらに、TNF、LTβRシグナリングにおいてIκBのリン酸化をウェスタンブロット法で調べたところ、TNFはIκBのリン酸化を誘導したが、LTβRシグナリングではIκBリン酸化を誘導しないことがわかった。この結果を確認するため、細胞免疫組織化学染色法でp65の核移行を解析した。その結果、LTβRシグナリングにおけるNF-κB活性化においてはp65の核移行を伴わないでNF-κB依存性転写を活性化することがわかった。

(2) NF-κB活性化に関わる因子の相互作用：293とHT29細胞に様々なNF-κB活性化因子とそれらのdominant negative変異体を導入し、Luciferase assayでその作用を解析した。TNFにより誘導されたκB活性はNIK、IKKαまたIKKβのdominant negative変異体によって抑制された。しかし、LTβRシグナリングにより誘導されたNF-κB活性ではNIKとIKKαの変異体によって抑えられたが、IKKβ変異体により抑えられなかった。さらに、これらの因子の共同作用をみたところ、TNFはNIK、IKKβとの共同作

用がみられたが、IKKαとではみられなかった。一方、LTβRシグナリングはIKKβではなく、IKKαまたNIKとの間で共同作用がみられた。以上の結果から、TNFシグナリングは主にIKKβ、すなわちIκBリン酸化cascadeを使うが、LTβRシグナリングは主にNIK、IKKα cascadeを使っていることがわかった。さらに、NIKで誘導したNF-κB活性におけるIKKα、IKKβとその変異体の作用を確認した。NIKはIKKα、IKKβ両方とも共同作用がみられたが、IKKα、IKKβの変異体を導入すると、NIK誘導したκB活性はIKKα変異体によって抑制されたが、IKKβによっては抑制されなかった。これらの結果からNIKの作用はIKKβでなく主にIKKαと連携していることが示唆された。

(3) NIK-IKKαの作用部位の同定：NIK-IKKαの作用機構をさらに確認するため、p65 wild-typeと様々な変異体のGal4融合蛋白の発現プラスミドを作成した。これらプラスミドを細胞に導入し、Luciferase assayでこれらGal4融合蛋白のNIKにより誘導される転写活性を比較した。その結果、p65のTA1領域だけが含まれたGal4-TA1融合蛋白はNIKに対して一番高い反応性を示した (図2)。さらにTA1領域の529番また536番セリンをアラニンに変換した変異体を細胞に導入し、NIKにより誘導される転写活性を比較したところ、TA1の転写活性は536番セリンの変異によって明らかに抑制された (図3)。これらの結果からp65のC-末端TA1領域、特にセリン536がNIKとIKKαの標的であることが示唆された。

(4) LTβRシグナリングにおけるp65の536番セリンのリン酸化：細胞にFLAG標識したp65 (FLAG-p65) を発現し、LTβRシグナリングで誘導したp65セリン536のリン酸化を共免疫沈降法でp65を沈降しさらにウェスタンブロット法でp65セリン536リン酸化抗体を用いて確認した (図4)。また、このリン酸化はNIK、IKKα変異体またIκBの発現によって抑制された。以上より、LTβRシグナリングにおけるNF-κB活性化はp65セリン536のNIKおよびIKKαを介したリン酸化に依存していることが明らかになった。

D. 考察

今回の研究から、LTβRシグナリングにおけるNF-κB活性化はp65セリン536のNIKおよびIKKαを介したリン酸化に依存していることが確認された。リンフォトキシンfamilyはリンパ節の形成、炎症部位の新

生リンパ節の生成などに深く関与している。LT β RはTNFR、B-cell-activating-factor-receptor (BAFF-R)、CD40などと共にTNF Receptor super-familyに属している。最近の報告からLT β Rシグナリングは我々が今回研究対象としたNIK-IKK α を介したp65のリン酸化 cascade 以外に、もうひとつの cascade、すなわちNIK-IKK α を介したp100-p52 processing、を誘導することが明らかになった。またBlyS (BAFF)、TALL-1およびCD40も同様にNIK-IKK α cascadeを使ってp100-p52 processingを誘導することが証明された。興味深いことには、BAFFはB細胞活性化因子として当初見いだされたが、最近の報告からBAFFは脾臓B細胞の成熟、T細胞の活性化、骨髄細胞/プラズマ細胞の survival などにも重要な役割を果たしていることがわかった。さらに自己免疫疾患 (SLE、RA、

Sjögren's syndrome、myasthenia gravis など) 患者の血清中のBAFF濃度は顕著に高く、またRA患者の関節液中にも高濃度のBAFFが存在することも明らかになった。さらにBAFFの遺伝子組み換え動物ではSLEのような自己免疫疾患を発症することが最近の研究によるわかった。これらの現象のメカニズムの詳細はまたわかっていないが、NIK-IKK α cascadeを介してのNF- κ B活性化が関与していることが強く示唆される。以上、今回の研究結果より、NF- κ Bは炎症・免疫応答の制御だけではなく、免疫系の生成、自己免疫応答にも積極的な役割を果たしていることが示唆された。この一連の研究から、MCTDを始めとする膠原病の病態とりわけ自己抗体産生におけるNIK-IKK α cascadeの重要性が改めて注目される。

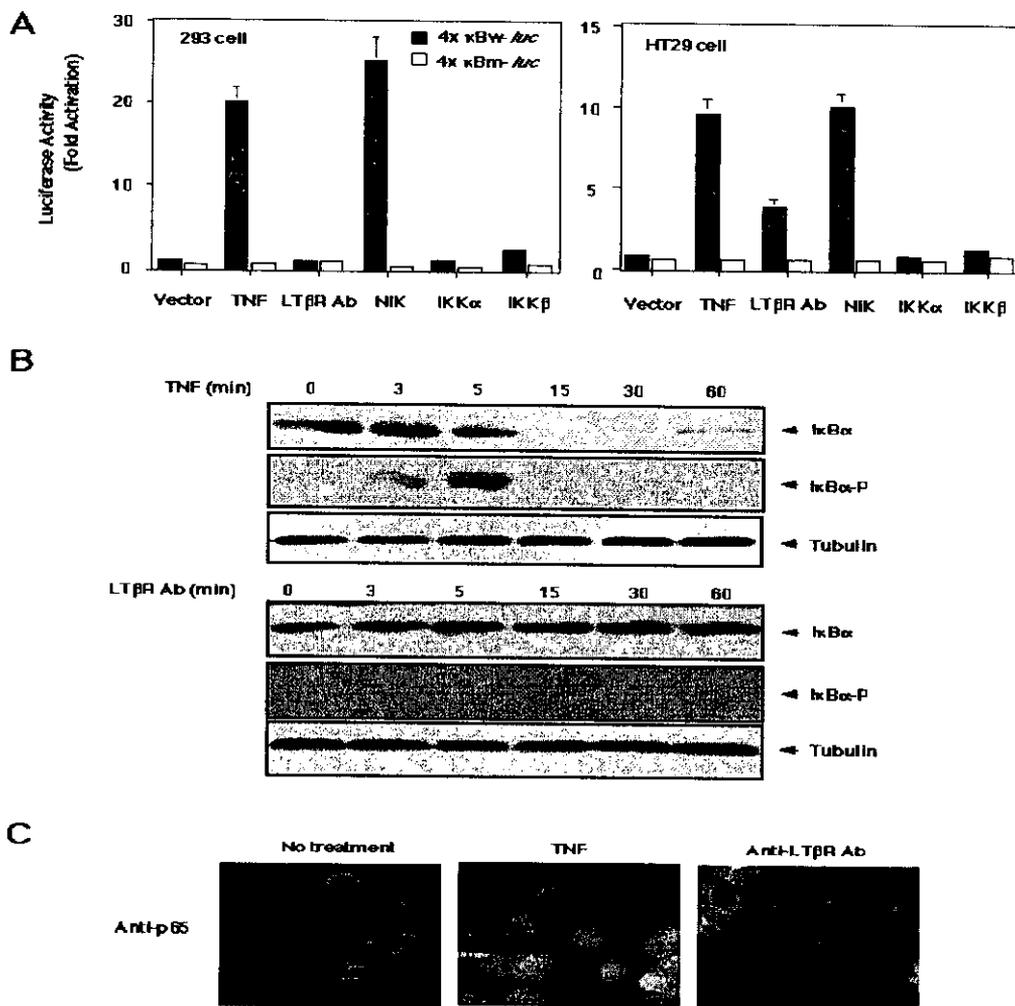


図 1. The distinct NF- κ B activation cascades by TNF and LT β R signaling. (A) The effects of TNF, agonistic anti-LT β R mAb, NIK, IKK α , and IKK β on the NF- κ B-dependent luciferase (luc) gene expression. (B) Phosphorylation and degradation of I κ B α induced by TNF but not by agonistic anti-LT β R mAb. (C) Nuclear localization of p65 in HT29 cells induced by TNF but not by anti-LT β R mAb.

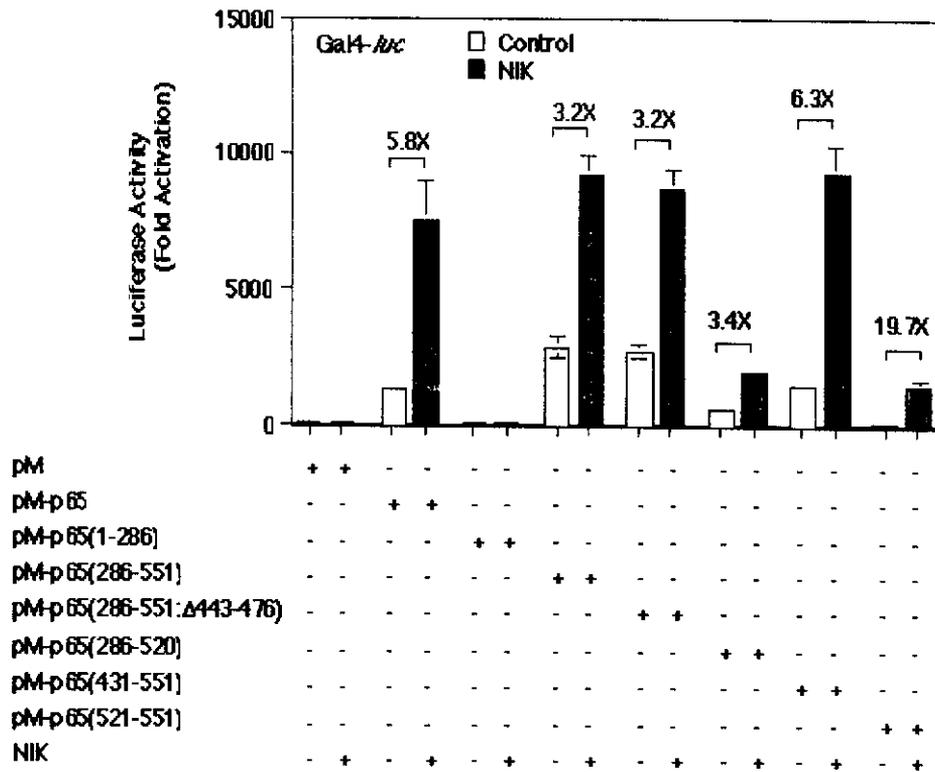
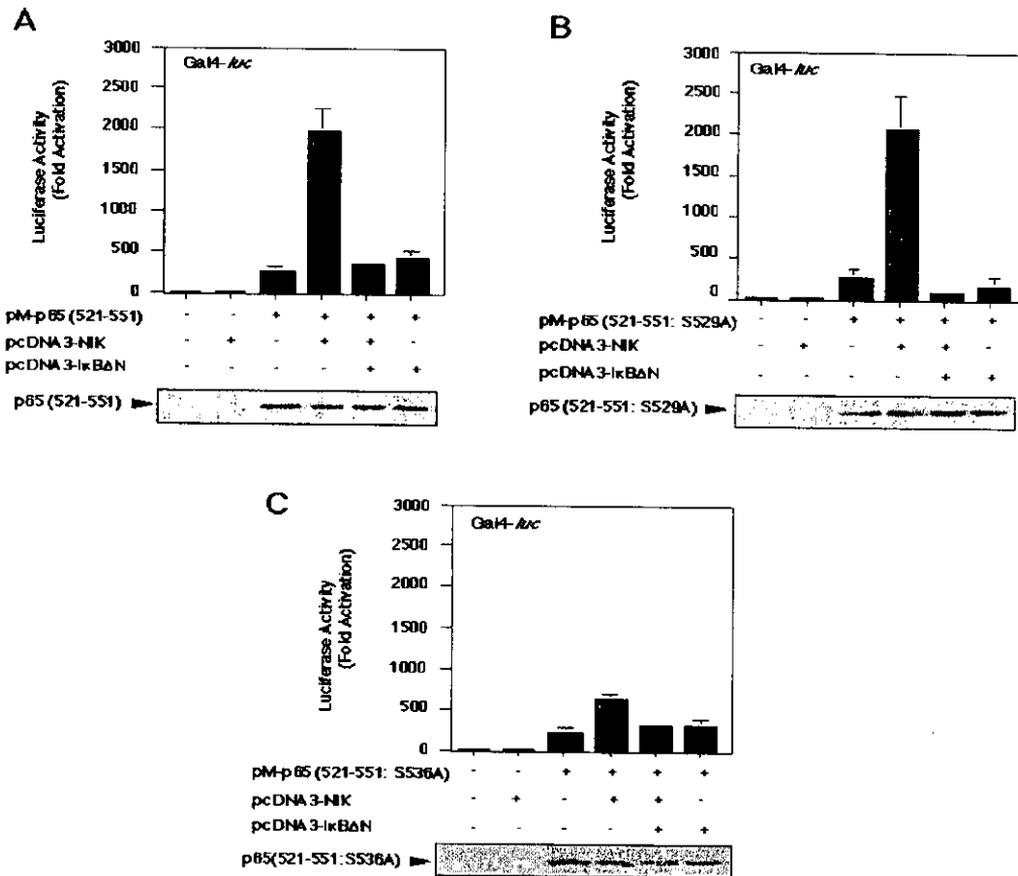


Fig. 2. The determination of the target region within p65 in the NF- κ B activation mediated by NIK-IKK α . The effect of NIK on the Gal4-dependent gene expression driven by various p65 fusion proteins with the Gal4 DNA-binding domain. 293 cells were transfected with 5x Gal4-TATA-*luc* reporter plasmid (Gal4-*luc*) in the presence (closed bar) or absence (open bar) of pcDNA3-NIK together with various pM-p65 constructs. The data are presented as the fold increase in luciferase activities (mean \pm S.D.) relative to control transfection of three independent experiments.



3. Involvement of Ser536 located in p65 TA1 in the NIK-mediated transcriptional activation. Effects of mutations of Ser529 and Ser536 in TA1 domain of p65 were examined on the NIK-mediated induction of the transcriptional activity of Gal4-p65 TA1 fusion protein. 293 cells were transfected with Gal4-*luc*, pcDNA3-NIK, and various pM-p65 TA1 constructs including pM-p65(521-551) (A), pM-p65(521-551: S529A) (B), and pM-p65(521-551: S536A) (C). Effects of IκBΔN were also examined. Lower panels show the results of Western blotting using anti-Gal4 antibody indicating that equivalent amounts of pM-p65 TA1 and its mutants were expressed in each transfection irrespective of the cotransfection with pcDNA3-NIK or pcDNA3-IκBΔN.

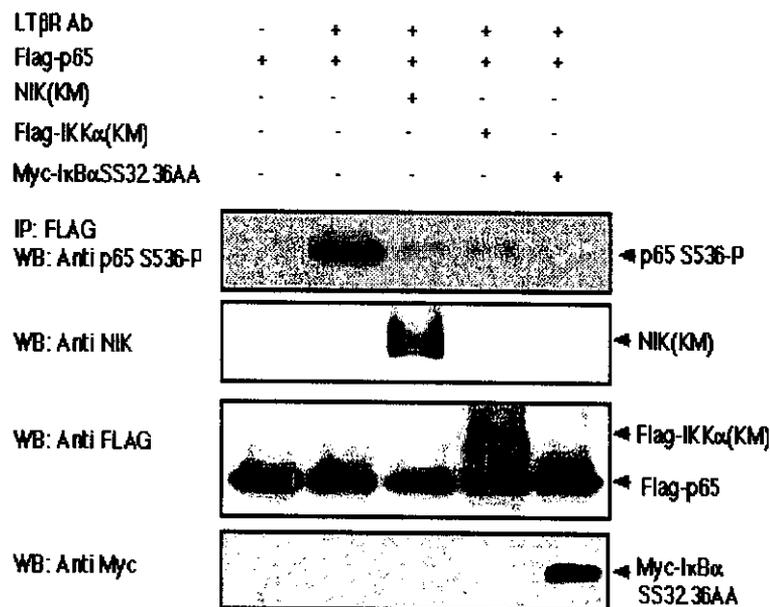


Figure 4. Phosphorylation of p65 at Ser 536 during the LTβR signaling.

Phosphorylation of p65 at Ser536 by the LTβR signaling. HT29 cells were co-transfected with various combinations of plasmids expressing Flag-tagged p65 (Flag-p65), NIK(KM), Flag-tagged IKKα(KM) and Myc-tagged IκBα (SS32.36AA)(IκBα mutant in which phosphorylation target Ser residues were substituted by Ala). After stimulation with agonistic anti-LTβR mAb for 40 min, cell extracts were prepared and immunoprecipitated with anti-Flag M2 affinity gel. The immunoprecipitates were fractionated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phospho-p65 NF-κB (Ser536) antibody (upper panel). Lower panels show the immunoblotting detection of NIK(KM), p65, IKKα(KM), and IκBα(SS32.36AA) proteins by respective antibodies. Results of p65 detection indicate that equivalent amounts of Flag-p65 were expressed in each transfection. Note the detection of the phosphorylation of p65 at Ser536 upon LTβR signaling and its abrogation by overexpression of NIK(KM) or IKKα(KM), kinase-deficient mutants of the corresponding effector kinases, or phosphorylation-defective IκBα(IκBαSS32.36AA).

SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY LEADING TO AUTOANTIBODY PRODUCTION AND LYMPHADENOPATHY IN PATIENTS WITH MCTD

Takashi Okamoto, Xu Jiang, Naoko Takahashi, Toshifumi Tetsuka

Department of molecular and Cellular Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

It has long been suggested that aberration of the signal transduction pathway is involved in autoantibody production in patients with MCTD like other systemic autoimmune diseases including SLE, RA, and SjS. In this study, a novel signal transduction has been elucidated in response to novel TNF family members, BlyS/BAFF/TALL-1 and lymphotoxin beta receptor signaling. We found that this signaling involves NF-κB activation without IκB phosphorylation and its degradation or the nuclear translocation of NF-κB. In stead, we found that this signaling involves the specific Ser phosphorylation at the C-terminal transactivation domain of p65 subunit of NF-κB. These findings have clarified the mechanism by which lymphadenopathy and autoantibody is mediated and suggest a novel therapeutic strategy for the treatment of systemic autoimmune diseases such as MCTD.

7. 自己抗原 RNP-A 遺伝子の SNP 解析とその対象となる日本人健常人 DNA バンクの必要性

分担研究者 : 大久保 光夫

所属施設 : 埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部

研究要旨

RNP-A 遺伝子の変異が RNP の発現と安定性に影響し、蛋白抗原としての RNP-A の構造および量に変化して、これが抗 RNP 抗体産生の一因となる可能性があるとの仮説に基づき、RNP-A gene の塩基配列の解析を行っている。その結果 5' -UTR deletion あるいは C/G の SNP を認めた。また、RNP-A gene の 3' UTR にある pyrimidine rich resion にも SNP を認めた。しかし、これらの SNP が疾患と相関するものか、健常人群にも一定の割合で存在するものかは明らかではない。そこで、今年度末からは日本人健常人（抗 RNP 抗体陰性）対照群の DNA についての解析を進めている。

A. 研究目的

MCTD は対照となる自己抗原が特定されている数少ないヒト自己免疫疾患のひとつである。自己免疫疾患の病因には複数の遺伝子異常が関与していると推定されているが、抗原そのものの遺伝子の変異に関して解析はなされていない。そこで、抗 RNP 抗体陽性患者遺伝子の塩基配列とくに RNP-A をコードする領域の SNP 解析を行なった。近年のヒトゲノム解析の進展により、ユビキタスな蛋白にも SNP が存在していることが報告されている。しかし、SNP は人種によって異なる可能性があること、現在報告されている SNP は、未だ研究室レベル（少数例で頻度が未確定）あることから、日本人の患者と健常者群との比較が急務である。

B. 研究方法

1) 昨年に引き続き、第 19 番染色体上の U1 snRNP-A の解析を行った。方法は対象遺伝子配列上に存在する exon の外と intron の内に 3' 側 5' 側の両方から 500 から 2000bp 程度の長さについて PCR 増幅できるようなプライマーを設定して増幅する。この PCR fragment を SSCP 法にて電気泳動し、泳動距離に差異が認められたものを TA クローニング法にてクローニングした後 ABI 377 オートシーケンサーにて塩

基配列を決定する。尚、昨年までに明かとなった SNP のうち対立遺伝子として Taqman PCR primer が設定できる部位に関してはこれを行うことで塩基配列決定法を省略する。

2) 医学倫理的配慮について（埼玉医大倫理委員会承認済）

研究の対象となる個人の人権の擁護：個人情報への保護：個人情報は決して外部に漏れることがないように厳重に管理する。その方法は、提供血液は遺伝子解析を行う前にランダム番号をつけ、以後の研究は全て個人情報と切り離し、血液や DNA が誰のものかわからない状態で行う。遺伝子解析結果の取り扱い：遺伝子解析の結果は、特定できないように健常人群データとして、無名化された状態で解析する。

対象者に理解を求め同意を得る方法：同意していただくために同意説明文を作成し、これを用いてよく説明し、ご理解されたことを確認した後、本人の自由意思で「同意書」に署名を頂く。尚、拒否されても不利益にならない事も説明する。

研究等によって生ずる個人への不利益及び危険性：提供いただいた血液サンプルと個人情報は連結できないので、個人情報が利用され不利益を生じることはない。提供者の採血による危険性は、採血に熟達した医師が

10-15ml程度の少量の採血を十分に注意して行う事により、献血あるいは健康診断等で行われる採血の危険性と同程度以下であり治療を要する副作用が生ずる可能性は低い。採血、検査等で御本人が負担する費用はない。

C. 研究結果

本年までの解析では抗RNP抗体陽性の患者群において図1に示す4ヶ所にSNPが認められた。詳細とその頻度は表1, 2に示す。特にexon6に多い。この3'-UTRのSNPは世界のdata baseでも健常人に存在することが報告されている。尚, 3'-UTRのSNPは健常人で報告されているものとは異なっている。我々が認めたSNPはUTRと呼ばれる領域に集中しているが、セラ社のdata base (塩基配列は公開されていない) ではintronにも存在している。

D. 考察

昨年度までの解析でRNP-AのCTTCC motif内にdeletionが認められた。このmotifはtranscription siteである可能性が高い。したがって、この部位の塩基配列のdeletionはRNP-Aのtranscriptionに影響を与えている可能性があり、細胞内でのRNP-Aの発現量に影響を与えていると考えられた。また、RNP-A geneの3' UTRにあるpyrimidine rich regionにSNPが認められた。さらに、3' UTR U1-RNAにRNPが結合すると想定されるAG配列にもSNPを認めた。これらの変異は結果として蛋白抗原としてのRNP-Aの構造および量を変化させ、これが抗RNP抗体産生の一因となる可能性がある。

今年度の解析では新たなSNPは認められなかった。また、最も重要な課題である健常人でのRNP遺伝子のSNP alleleの頻度について、倫理審査を受けるために時間を費やして解析が進まなかった。従来は各研究室が所持していた患者または健常人のDNAを用いて、新たな解析や比較検討の対照としてきたが、近年、倫理的配慮からそのような検体を使用することが出来ずに新たに健常人DNAを揃えることとなった影響が有る。そこで、健常人DNAプールを10月に埼玉医大の倫理委員会に申請し、平成14年12月に承認をうけ、比較の解析を開始した。尚、このDNAはの提供者からは、

複数の膠原病の(倫理委員会審査済みの)研究計画の対照としての利用できることの同意を得ている。

MCTDでは自己抗原そのものに関与する遺伝子と補体などの機能遺伝子などひとつの染色体上の少なくとも複数の変異があり、これが病因あるいは病態を形成している可能性があるため、今後も患者のgenomeの横断的な解析と健常者の比較による遺伝子解析が重要である。この解析はいわゆるゲノムプロジェクトの成果を患者にいち早く還元する手段として優れていると考えられる。

E. 結論

抗RNP抗体陽性患者RNP-A geneの5'-UTRとRNP-A geneの3'-UTRにSNPを認めた。これらの結果からRNP-A遺伝子の変異がRNPの発現と安定性に影響し、蛋白抗原としてのRNP-Aの構造および量に変化して、抗RNP抗体産生の一因となる可能性がある。今後、これらのSNPが疾患特異的であることを示すためには日本人健常人群でのallele頻度との比較が必要である。

文献

1. Nelissen RL, Sillekens PT, Beijer RP, et al. Structure, chromosomal localization and evolutionary conservation of the gene encoding human U1 snRNP-specific A protein. *Gene* 102, 189-196, 1991.
2. Frankel AD, Mattaj JW, and Rio DC. RNA-protein interactions. *Cell*; 67,1041-1046,1991.
3. Locksley RM, Killeen N., and Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integration mammalian biology. *Cell*; 104,487-501,2001.
4. Boelens W., Scherly D., Jansen EJR., et al., Analysis of in vitro binding of U1-A protein mutants to U1anRNA. *Nucleic Acids Res*; 19,4611-4618,1991.

F. 研究発表

- 1) ○大久保光夫, 平田蘭子, 前田平生: キーとなる臨床検査移植検査. *現代医療*, 2001, 33 (283-287)
- 2) ○大久保光夫, 前田平生: MCTD患者と胎児由来細胞の19番染色体上のRNP-A塩基配列の解析. 混合性結合組織病に関する研究班 平成12年度研究報告書, 2001, (66-69)
- 3) 大久保光夫: 血液型判定・交差試験・輸血, 救急医療パーフェクトマニュアル, 2002, (195-203), 羊土社 東京 志賀元, 森脇龍太郎編。
- 4) 大木浩子, 今井厚子, 鈴木宏昌, 渡辺敬依子, 藤井由紀子, 阿南昌弘, 穴倉祐子, 大久保光夫, 前田平生, 榎本隆行, 石島あや子, 湯浅晋治: 保存血清によりTja陰性を確認し得た当院二例