

200306'15

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

全身性自己免疫疾患における
難治性病態の診断と治療法に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年3月

主任研究者 三 森 経 世

目 次

I. 総括研究報告書	
全身性自己免疫疾患における難治性病態の診断と治療法に関する研究	1
三森 経世	
II. 分担研究報告	
1. 難治性病態の早期診断, 予後推定, 治療方針確立における自己抗体の意義に関する 多施設共同研究	5
三森 経世, 田中 真生	
2. 難治性自己免疫疾患の予後予測因子と遺伝子多型性に関する研究	8
堤 明人	
3. AA-アミロイドーシスの遺伝的要因, 病態, 治療に関する研究	12
寺井 千尋	
4. 抗リン脂質抗体と prothrombin の遺伝子多型に関する研究	15
市川 健司	
5. 線維化病態における CD40-CD154 シグナルを介した線維芽細胞と T 細胞の協調作用 に関する研究	19
桑名 正隆	
6. 膠原病上皮傷害における接着分子の役割: $\alpha_E\beta_7$ が認識する E-cadherin 上の エピトープの検討	22
津坂 憲政	
7. 抗 SRP 抗体の臨床免疫学的意義に関する研究	26
平形 道人	
8. 難治性筋炎における T 細胞リクルートメント制御機構とその人為的制御	29
南木 敏宏	
9. 中枢神経ループスの病態形成における抗リボソーム P 抗体の役割の解析に関する研究	32
広畑 俊成	
10. 実験的肺線維症モデルにおける、IL-10 の治療効果に関する研究	35
土肥 眞	
11. 皮膚筋炎/多発性筋炎に合併する間質性肺炎の長期予後に関する研究: シクロホスファミド間歇静注療法の有用性の検討	37
山田 秀裕	
12. 膠原病性肺高血圧症の頻度と病態の解析	40
吉田 俊治	
13. ループス腎炎における流血中自己抗原 (PCNA 複合体) の病因的意義の検討	44
高崎 芳成	
14. ^{13}C 標識脂肪酸吸収呼吸試験を用いた全身性強皮症の腸管病変の評価に関する研究	48
遠藤 平仁	
15. 関節リウマチにおける抗 FRP 抗体と治療抵抗性の関連の検討	50
田中 真生	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
IV. 平成 15 年度構成員名簿	67

I. 総括研究報告

全身性自己免疫疾患における難治性病態の診断と治療法に関する研究

主任研究者： 三森 経世（京都大学大学院医学研究科臨床免疫学・教授）

研究要旨

全身性自己免疫疾患の難治性病態の治療についてはまだ確固たる方針が定まっておらず、症例報告やパイロットスタディの成績を参考にしながら試行錯誤で対処していかなくてはならないのが現状である。膠原病の生命予後をさらに改善し、QOLを改善してより良いライフスタイルを確立するためには、このような難治性病態を解明して有効な診断と治療法を開発することが急務である。本年度は、全身性自己免疫疾患における難治性病態として、線維化病態、上皮障害、難治性・治療抵抗性筋炎、間質性肺炎、肺高血圧症、腎障害、消化管病変、中枢神経症状、二次性アミロイドーシス、血栓形成病態をとりあげ、実態調査、病態解明、新たな診断方法の開発による早期診断の確立、従来の治療法の整備とプロスペクティブスタディによる新たな治療法の確立を目指し、それぞれ一定の成果が得られつつある。かかる各分担研究の成果を取り入れ、さらにエビデンスに基づく治療（EBM）を重視したわが国における難治性病態の治療ガイドラインの作成を行なう。

分担研究者

市川健司（国立療養所西札幌病院・医長）
遠藤平仁（北里大学内科・講師）
桑名正隆（慶應義塾大学先端医学研究所・講師）
高崎芳成（順天堂大学膠原病内科・助教授）
田中真生（京都大学大学院臨床免疫学・助手）
津坂憲政（埼玉医大総合医療センター第二内科・講師）
堤 明人（筑波大学膠原病リウマチアレルギー内科・助教授）
寺井千尋（東女医大膠原病リウマチ痛風センター・助教授）
土肥 眞（東京大学アレルギー・リウマチ内科・助手）
南木敏宏（東医歯大膠原病・リウマチ内科・助手）
平形道人（慶應義塾大学内科・講師）
広畑俊成（帝京大学内科・助教授）
山田秀裕（聖マリアリウマチ膠原病アレルギー内科・助教授）
吉田俊治（藤田保衛大リウマチ感染症内科・教授）

A. 研究目的

膠原病を中心とする全身性自己免疫疾患はいわゆる「難病」を代表する疾患群であり、かつては不治の病とされてきた。近年の治療

の進歩、診断技術の向上に伴い膠原病の生存率は年代とともに向上してきた一方で、依然として治療法が確立していないために死亡率が高く、または重い障害を残すような病態が認められている。このために、膠原病の長期予後は必ずしも満足すべきものではなく、むしろ長期生存例が増えるにつれてかかる難治性病態が一層クローズアップされるようになった。

かかる難治性病態の治療についてはまだ確固たる方針が定まっていないものが多く、症例報告やパイロットスタディの成績を参考にしながら試行錯誤で対処していかなくてはならないのが現状である。膠原病の生命予後をさらに改善し、QOLを改善してより良いライフスタイルを確立するためには、このような難治性病態を解明して有効な診断と治療法を開発することが急務と考える。そこで、本計画は膠原病難治性病態について疾患横断的に病態解明、診断法の確立、新たな治療法の開発を通じて、わが国における治療ガイドラインの構築をめざすものである。

本研究では、全身性自己免疫疾患における難治性・治療抵抗性の筋炎、心肺病変、腎炎、消化管病変、中枢神経症状、二次性アミロイドーシス、血栓形成病態、線維化病態について、実態調査、病態解明、新たな診断マーカーの開発による早期診断法の確立、従来の治療法の整備と新たな治療法の実施を行うことを目的とした。最終的には各分担研究の成果を取り入れ、さらにエビデンスに基づく治療（EBM）を重視したわが国における難治性病態の治療ガイドラインの作成を行なう。

B. 研究方法

1. 動物モデルおよびin vitro系を用いた病態解明と治療法の開発（桑名，津坂，南木，土肥）
2. 難治性病態における疾患感受性遺伝子の同定と予後の予測（堤，寺井，市川）
3. 自己抗体による難治性病態の診断と予後予測（三森，平形，田中，広畑，高崎）
4. アンケート調査による難治性病態の全国調査（吉田，遠藤）
5. プロスペクティブ研究による難治性病態の治療（山田）
6. 過去のEBM文献の集積・解析と各難治性病態の診断と治療ガイドラインの作成（三森および全員）

本年は前年度の成果を踏まえてこれらの研究をさらに発展させることに主眼を置いた。

（倫理面の配慮）

患者からの検体採取および新たな治療法の臨床応用に際しては、各施設の倫理委員会の承認を受けるとともに、患者より文書同意を取得することを前提とした。

C. 研究結果

1. 難治性病態の病態形成機序，予後予測因子，診断に関する研究
- 1-1. 自己抗体による難治性自己免疫疾患の診断と予後予測（三森，田中）： 分担研究施設よりインフォームドコンセントを得て採取したSLE，SSc，PM/DM，RAの入院患者血清

204例について、全身性自己免疫疾患に見出される自己抗体を主任研究者が開発した免疫沈降法を用いて測定し、疾患および難治性病態との関連性を検討した。抗アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)抗体はPM/DMに特異性が高く間質性肺炎を高頻度に合併すること、抗Sm抗体はSLEに特異性が高く腎炎が高頻度であることが確認された。今後さらに血清を集積し、症例を追跡することにより、難治性病態と相関性の高い自己抗体の感度・特異度ならびに早期診断、予後予測における意義を検討する。

- 1-2. 難治性自己免疫疾患の予後予測因子と遺伝子多型性（堤）： 病態と関連しうる遺伝子多型として注目されるMannose Binding Lectin (MBL)遺伝子のコドン54多型は、SLE146例中正常型ホモAA84例、ヘテロAB型49例、異常型ホモBB型13例で、異常型の頻度が健常人よりも高かった。またBB型SLEでは血中MBL濃度の低値を認め、入院を要する感染症を併発する頻度も高かった。また、抗MBL抗体がSLE患者116例中9例に検出された。SLEにおけるMBL遺伝子型判定は感染症のリスク判定に有用と考えられた。

- 1-3. AA-アミロイドーシス（ア症）の遺伝的要因，病態，治療に関する研究（寺井）： ア症には人種差，地域差が報告されているため、本年度はフィンランド，トルコ，日本の3地域における遺伝的要因を比較解析した。SAA遺伝子のSAA1.3 (SAA1 γ) アレル，SAA1遺伝子プロモーター領域の-13T，および5つのSNPsのうちのCTGCCハプロタイプが日本人ア症発症の危険因子であったが、フィンランド人とトルコ人ではこれらとの相関は見られず、SAA1.1 (SAA1 α) が危険因子であった。

- 1-4. 抗リン脂質抗体とprothrombin (PT) の遺伝子多型に関する研究（市川）： 昨年度行った劇症型APS患者の実態調査ではループス抗凝固因子（LA）が全例に出現しており、病態との関連が示唆された。LAの主要対応抗原はPTと考えられるため、その遺伝子多型を検討したところ、6種類のSNPsのうちrs5896T/Tの頻度がLA陽性例で多い傾向が認められ、LA産生とPT遺伝子多型の関連が示唆

された。

1-5. 膠原病における線維化病態の機序解明

(桑名) : 膠原病類似の臨床症状を呈する慢性GVHD患者の涙腺組織の初期病変としてT細胞と線維芽細胞との相互作用が見られ、T細胞由来の表面分子間シグナルが線維化形成に重要と考えられた。そこでCD40を強制発現させた線維芽細胞を抗CD40モノクローナル抗体や可溶性CD40L/CD154で刺激すると、III型コラーゲンおよびPDGFレセプター α の発現亢進が認められた。この結果はCD40を介するシグナルが線維化病変に重要であり、CD40-CD154シグナルを標的とした治療が抗線維化療法として新たな治療ターゲットとなりうる可能性を示唆する。

1-6. 膠原病の上皮障害における接着分子の役割 (津坂) : 膠原病の上皮障害のメカニズムとして、T細胞が接着分子を介して標的細胞にアポトーシスを誘導するという新たな組織障害機序が注目されており、特に間質性肺炎に伴う上皮障害では $\alpha_E\beta_7$ /E-cadherin接着が重要と考えられる。E-cadherin細胞外領域を構成する5つの免疫グロブリン様構造 (CAD1-5)のうち、CAD3およびCAD4と $\alpha_E\beta_7$ の接着が最も強いことが明らかとなった。接着分子の上皮障害に関与するエピトープの解明により、膠原病の上皮障害機序とその治療応用が期待される。

2. 難治性神経筋疾患に関する研究

2-1. 難治性筋炎における自己抗体の臨床免疫学的意義 (平形) : 筋炎特異自己抗体の臨床意義として、本年度は抗SRP抗体とプリスタン投与マウスにおける同抗体産生誘導を検討した。抗SRP抗体はPMに特異性が高く、HLA-DR8と相関し、半数がステロイド治療抵抗性を示し、筋生検組織で筋線維の変性壊死は強いが炎症細胞浸潤に乏しいという特徴が見出された。また種々の系統の正常マウスにプリスタンを投与すると抗SRP抗体が産生されることを見出し、同抗体産生に環境要因の関与が示唆された。

2-2. 難治性筋炎の炎症細胞浸潤におけるケモカインの関与 (南木) : ケモカイン・ケモ

カインレセプターは炎症細胞浸潤に重要であり、難治性筋炎の病態形成に深く関与すると考えられる。ミオシンで免疫を繰り返した自己免疫性筋炎マウスの骨格筋にはヒトPM/DMと類似の炎症細胞浸潤が見られ、MIP-1 α 、MCP-1、RANTES、fractalkineなどのケモカインと、CCR2、CCR5、CX3CRなどのケモカインレセプターのmRNA発現が炎症部位で上昇していた。そこで、筋炎マウスに抗フラクタルカイン抗体を投与すると、筋組織への炎症細胞 (マクロファージおよびCD8+T細胞) の浸潤が抑制されることを確認し、かかるケモカインのブロックが筋炎の治療として有用である可能性を示唆した。

2-3. 中枢神経ループスの病態形成における抗リボゾームP抗体(抗P抗体)の役割の解析 (広畑) : 抗P抗体がCNSループスの病態形成に果たす役割について、活性化末梢血単球からの炎症性サイトカイン産生に与える影響を検討した。精製抗P抗体は、IFN- γ 存在下あるいは非存在下で、末梢血単球のTNF α およびIL-6産生を亢進させることを明らかにした。抗P抗体はかかる細胞より昨年度に報告したVEGFとともにTNF α とIL-6の産生を増強することで、SLEの中枢神経内へのリンパ球侵入や免疫異常の発生に関与する可能性が示唆された。

3. 難治性心肺病変に関する研究

3-1. 実験的肺線維症モデルにおけるIL-10の治療効果に関する研究 (土肥) : 間質性肺炎・肺線維症は自己免疫疾患患者の生命予後を決定する重要な因子だが、治療法が確立されていない。ブレオマイシン惹起肺線維症モデルマウスに対してIL-10 cDNAを組み込んだプラスミドベクターを投与したところ、肺ヒドロキシプロリン含量、線維化の程度、BALF中のTGF- β 濃度が有意に低下した。IL-10は肺のTGF- β 産生を抑制することで肺の線維化を抑制することが示唆された。

3-2. PM/DMの間質性肺炎に対するシクロホスファミド間歇静注療法の有用性の検討 (山田) : PM/DM急性期死亡の要因として、抗Jo-1抗体陰性DMで発症1ヶ月以内のAaDO₂が

40torr以上の呼吸不全, 先行する発熱と咽頭痛, HRCTでの広範囲なスリガラス陰影が抽出された. また, 免疫抑制薬併用群で日和見感染に対する予防投与を行った症例での死亡は皆無であった. そこで, PM/DMの間質性肺炎(IP)に対するEBM確立のため, 予後不良因子を1つ以上持つ症例を対象とし, ステロイド大量投与に加えCPAパルス療法とシクロスポリン経口投与の無作為割付比較対照試験のプロトコールをデザインした.

3-3. 膠原病性肺高血圧症 (PH) の実態調査

(吉田) : 膠原病に合併し予後を悪化させるPHの正確な頻度, 病態や治療反応性の異なる1次性と2次性の区別, 外科的治療の可能なマクロ血栓性PHの頻度は不明である. 各分担研究施設に通院する膠原病患者の数人に一人の割合で心臓超音波検査と胸部X線撮影, 心電図検査を行った. 2施設140例の検討では, SLE72例中9例, 強皮症26例中4例, MCTD12例中3例, PMDM15例中0例に心エコー上PHを認め, 膠原病での高率なPH併発が確認された.

4. 流血中PCNA蛋白複合体と腎病変 (高崎)

: SLEの代表的な臓器病変である重症ループス腎炎と関連する抗PCNA抗体の病態形成における意義を明らかにするため, SLE患者末梢血中の抗原を定量したところ, 流血中のPCNA複合体はSLEの65%に検出され, その全例でPCNA陽性活性化単核球が検出された. 血漿交換療法後には流血中の抗原濃度が低下することも確認された. さらに, PCNA複合体の成分としてGAPDHが同定され, SLE患者の45%に抗GAPDH抗体が検出された.

5. ¹³C標識脂肪酸吸収呼吸試験を用いた全身性強皮症腸管病変の評価 (遠藤) : 強皮症における消化管病変の機能的診断と評価のため, ¹³C標識脂肪酸吸収呼吸試験により強皮症の腸管病変のモニター法を検討した. 偽性腸閉塞の既往ある症例では¹³C脂肪酸の吸収ピーク値は低下し, HPN導入患者では著明な低下を示した. 吸収ピーク時間, 8時間累積回収率も腸管病変を有する強皮症患者で有意の低下を認めた. 同法は強皮症腸管病変のモニターに有用な簡便で皮疹集的検査法と考えられ

た.

6. 関節リウマチにおける抗FRP抗体と治療抵抗性の関連の検討 (田中) : 抗ホリスタチン関連蛋白 (FRP) 抗体は, 疾患活動性に相関してRA患者血清中に検出される自己抗体である. 経過1年の治療歴を比較した履歴研究より抗FRP抗体はRAにおける治療抵抗性の指標となる可能性が考えられた. この仮説を検証するため, 症例を登録し経過を1年ごとに記録する追跡研究を開始した. さらに抗FRP抗体を多検体で効率よく検出するELISAの開発にも着手している.

7. 診断と治療ガイドラインの作成 (全員)

本年度よりエビデンスを重視した難治性病態の治療ガイドラインの作成に取り掛かっており, 原稿 (ドラフト) がほぼ完成している. ワークショップを開いて広く意見を集積し, 別途印刷物を作成の予定である.

D. 考察および結論

全身性自己免疫疾患の難治性病態の治療にはまだ確固たる方針が定まっておらず, 症例報告やパイロットスタディの成績を参考にしながら試行錯誤で対処していかなくてはならないのが現状である. 膠原病の生命予後をさらに改善し, QOLを改善してより良いライフスタイルを確立するためには, このような難治性病態を解明して有効な診断と治療法を開発することが急務である. 本研究は, 全身性自己免疫疾患における線維化病態, 上皮障害, 難治性・治療抵抗性筋炎, 間質性肺炎, 肺高血圧症, 腎障害, 消化管病変, 中枢神経症状, 二次性アミロイドーシス, 血栓形成病態について, 実態調査, 病態解明, 新たな診断マーカーの開発による早期診断法の確立, 従来の治療法の整備とプロスペクティブスタディによる新たな治療法の確立を目指し, それぞれ一定の成績が得られつつある. これらの成果は, エビデンスを重視した難治性病態の診断と治療ガイドラインの作成に生かしたい.

E. 健康危険情報

なし

II. 分担研究報告

**難治性病態の早期診断、予後推定、治療方針確立における自己抗体の意義に関する
多施設共同研究**

主任研究者： 三森 経世（京都大学大学院医学研究科臨床免疫学・教授）
研究協力者： 吉藤 元，田中 真生（京都大学大学院医学研究科臨床免疫学）

研究要旨

難治性病態を呈する全身性自己免疫疾患患者において種々の自己抗体を測定し、その特異性・治療反応性・転帰との関連を明らかにして、早期診断・予後推定・治療方針の指標の確立を目指す多施設共同プロジェクト研究を立ち上げた。2003年12月までに各分担研究施設8施設より305例を登録した（疾患の内訳は、SLE129例、SSc42例、PM/DM34例、RA85例、これらのOverlap症候群15）。検索が完了した239例の血清について、RNA免疫沈降法による自己抗体を検索した。抗U1RNP抗体と抗SS-A/Ro抗体は各疾患に広く出現し、抗Sm抗体はSLEに、抗ARS抗体と抗SRP抗体はPM/DMに特異性が高いことを確認した。2004年3月までの入院患者をさらに登録し、ELISA法による他の自己抗体を検索するとともに、今後これらの症例を追跡調査して難治性病態との関連を追及する。

A. 研究目的

自己抗体は全身性自己免疫疾患で特異的に見出される血清マーカーであり、既に疾患の補助診断など臨床的に活用されている自己抗体は多い。しかし、臨床経過や重症度、治療反応性と自己抗体との関連性は必ずしも明らかにはされていない。また測定法がルーチン化されておらず、一般施設では測定不能の抗体も多い。そこで、多施設共同プロジェクト研究により、難治性病態を呈する全身性自己免疫疾患患者において種々の自己抗体を測定し追跡調査によって、その特異性・治療反応性・転帰との関連を明らかにして、早期診断・予後推定・治療方針の指標を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象： 各分担研究者の施設に2003年4月から2004年3月までの1年間に入院した、1) 全身性エリテマトーデス(SLE), 2) 強皮症(SSc), 3) 多発性筋炎および皮膚筋炎(PM/DM), 4) 関節リウマチ(RA)のすべての患者を登録した。

2. 追跡調査： 登録された症例の臨床症状、検査成績、治療およびその反応性、転帰を追跡調査した。

3. 検体の採取： 登録症例より文書によるインフォームドコンセントを得て、血清および白血球DNAを採取し保存した。この件については各施設の倫理委員会の認可を得た。

4. 自己抗体の測定： 本年度はまず各血清よりRNA免疫沈降法によって、抗U1RNP抗体、抗Sm抗体、抗SS-A/Ro抗体、抗SS-B/La抗体、抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体(ARS)抗体、抗SRP抗体、抗U3RNP抗体、抗7-2RNP抗体、抗リボゾーム抗体を測定した。HeLa細胞抽出物を抗原に用い、我々が開発した免疫沈降されたRNA成分をUrea-PAGEで電気泳動後に銀染色する方法により、RNA蛋白複合体を対応抗原とする自己抗体を同定した。

（倫理面への配慮） 施設の倫理委員会へ申請するフォーム、対象患者への説明文書および同意文書、登録調査票および経過調査票を作成した。

表 1. RNA免疫沈降法で検出された自己抗体（抗リボ核蛋白抗体）の頻度

自己抗体	SLE (106)	SSc (39)	PM/DM (20)	RA (61)	Overlap (13)
抗UIRNP	47(44%)	10(26%)	1(5%)	5(8%)	7(54%)
抗SS-A/Ro	37(35)	11(28)	4(20)	7(11)	2(15)
抗Sm	17(16)	2(5)	0(0)	0(0)	2(15)
抗ARS	0(0)	0(0)	5(25)	0(0)	0(0)
抗SRP	0(0)	0(0)	2(10)	1(2)	0(0)
抗7-2RNP	1(1)	0(0)	1(5)	0(0)	0(0)
その他	10(9)	1(3)	0(0)	2(3)	2(15)

表 2. 疾患別合併症頻度

RA (73例)	%	SLE (113例)	%	SSc (44例)	%	PM/DM (35例)	%
眼病変	3	末梢神経障害	2	難治性皮膚病変	18	ステロイド抵抗性	
皮膚血管炎	5	中枢神経障害	19	重症肺線維症	7	筋炎	14
多発性単神経炎	10	肺胞出血	2	肺高血圧症	14	嚥下筋障害	11
肺臓炎	16	間質性肺炎	7	重症強皮症腎	2	心臓伝導障害	9
胸膜炎	8	ネフローゼ症候群	27	重症下部消化管		間質性肺炎	59
心膜炎	1	高度腎障害	0	障害	18	難治性皮膚潰瘍	9
冠動脈炎	0	劇症型APS	0	心筋障害	2	悪性腫瘍	0
消化管梗塞	1	血小板減少症	9				
腎障害	14						
アミロイドーシス	7						
全身性感染症	5						

C. 研究結果

主任研究施設（京都大学）における倫理委員会の認可が得られたため、分担研究者へ文書を送付し、各施設の倫理委員会の認可を進めてもらい、2003年12月までに8施設より305例を登録した。疾患の内訳は、SLE129例、SSc42例、PM/DM34例、RA85例、これらのOverlap症候群15例であった。検索が完了した239例の血清について、自己抗体の各疾患における頻度を表1に示した。また、各疾患における合併症の頻度を表2に示した。

D. 考 察

かかる研究班は全国規模での自己抗体の臨床的意義の再評価とともに、特に重症度や難治性病態、治療反応性などこれまで明らかにされていなかった自己抗体の意義を明確にす

る絶好の機会と考え、このようなプロジェクトを立ち上げることとした。昨年度にはPM/DMを対象にしたpreliminary studyで筋炎関連自己抗体と筋炎および間質性肺炎の臨床経過と治療反応性に相関性が認められ、早期診断や治療方針の選択に自己抗体測定が有用であることが示唆された。この結果はわが研究班が計画しているプロジェクト研究の妥当性を裏付けるものと考えられる。今回のデータはまだ中間報告ではあるが、各自己抗体の臨床的意義が確認された。今後さらに症例を増やし（登録期間2004年3月まで）、他の自己抗体と病態との関連についても検討を加え、転帰を追跡する予定である。

E. 結 論

難治性病態を呈する全身性自己免疫疾患患

者において種々の自己抗体を測定し、その特異性・治療反応性・転帰との関連を明らかにして、早期診断・予後推定・治療方針の指標の確立を目指す多施設共同プロジェクト研究を立ち上げた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka M, Ozaki S, Kawabata D, Kishimura M, Osakada F, Okubo M, Murakami M, Nakao K, Mimori T: Potential preventive effects of follistatin-related protein/TSC-36 on joint destruction and antagonistic modulation of its autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Intl Immunol* 15:71-77, 2003
- 2) Yoneda O, Imai T, Nishimura M, Miyaji M, Mimori T, Ozaki T, Domae N, Fujimoto H, Minami Y, Kono T, Bloom ET, Umehara H: Membrane-bound form of fractalkine induces IFN- γ production by NK cells. *Eur J Immunol* 33:53-58, 2003
- 3) Fujii T, Mimori T, Kimura N, Satoh S, Hirakata M: Pseudoscleroderma associated with transforming growth factor β 1-producing advanced gastric carcinoma: comment on the article by Varga. *Arthritis Rheum* 48:1766-1768, 2003
- 4) Ida H, Huang M, Hida A, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Tsujihata M, Mimori T, Eguchi K: Characterization of anticytoplasmic antibodies in patients with systemic autoimmune diseases. *Mod Rheumatol* 13: 333-338, 2003
- 5) Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K: High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 32:197-204, 2003
- 6) Kawabata D, Tanaka M, Fujii T, Umehara H, Fujita Y, Yoshifuji H, Mimori T, Ozaki S:

Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36/FSTL1 on joint inflammation in a mouse model of arthritis. *Arthritis Rheum* 50:660-668, 2004

- 7) 三森経世: 自己抗体. *Medico* 34: 128-13, 2003
- 8) 三森経世: 関節リウマチの新しい自己抗体. *炎症と免疫* 11: 358-362, 2003
- 9) 三森経世: 関節リウマチの早期診断における抗フィラグリン/CCP抗体の意義. *臨床免疫* 40:185-189, 2003
- 10) 三森経世: 膠原病診療における臨床検査. *日本内科学会雑誌* 92: 1901-1903, 2003
- 11) 臼井崇, 三森経世: 免疫疾患の病態解明と治療戦略の進歩. *Molecular Medicine* 40(臨時増刊号): 268-274, 2003
- 12) 三森経世: 自己抗体の測定法と対応抗原の分析. *臨床検査* 47:1619-1625, 2003
- 13) 三森経世: 関節リウマチの新しい血清マーカー—シトルリン化タンパクに対する自己抗体—. *Pharma Medica* 21: 33-37, 2003
- 14) 三森経世: 関節リウマチの新たな自己抗体—抗シトルリン化タンパク抗体. *内科* 93: 233-236, 2004

2. 学会発表

- 1) Mimori T, et al: Newly identified pathogenic autoantibodies in rheumatoid arthritis (in Symposium "Autoimmunity and Autoantibody Measurements"). The 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyoto, 2002 October.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

難治性自己免疫疾患の予後予測因子と遺伝子多型性に関する研究

分担研究者： 堤 明人（筑波大学臨床医学系・助教授）

研究要旨：【目的】Mannose Binding Lectin (MBL)は自然免疫に重要な役割を果たす一方、その欠損と自己免疫疾患発症の関連が示唆されている。日本人で多いMBLコドン54遺伝子多型およびMBL血中濃度と全身性エリテマトーデス (SLE) の発症・病勢・病態との関連を検討し、これらの測定がSLE診療に有益な情報を提供するか明らかにすることを目的とした。さらにSLE患者の血中にMBLに対する抗体が検出されるか検討した。【方法】末梢血よりゲノム遺伝子を調整し、MBLコドン54遺伝子多型をPCR-RFLP法により判定した。血中のMBL濃度および抗MBL自己抗体は固相酵素抗体法により測定した。【結果】SLE146名につき遺伝子多型を解析し、多数型ホモ(AA)は84名、ヘテロ (AB)は54名、血中MBL濃度の著明な低下を伴う少数型ホモ(BB)は9名であった。BB患者はAAおよびAB患者に比し発症年齢が低い傾向が見られ、経過中に入院を要する感染症を併発する頻度も高い傾向が見られた。AA患者においては血中MBL濃度と補体CH50との間には有意の正の相関が見られた。SLE患者9名で抗MBL抗体値が健常人平均+2SDを超えていた。【結語】SLE患者においてMBL遺伝子多型性がBBである比率は健常人より高頻度であった。血中MBL濃度はSLEの病勢にともない変動し、血中CH50と相関したが、特定の病態と関連する等一定の傾向は見られなかった。ただし、遺伝子型がBBであるとSLE治療中の感染症合併が有意に高頻度であった。抗MBL自己抗体の臨床的意義に関しても今後検討が必要と思われた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE)、混合性結合組織病、シェーグレン症候群 (SS) など全身性自己免疫疾患患者の合併症、予後の予測に役立つ因子を解析し、同一疾患患者の中でも特定の合併症、臓器病変などを発症しやすい群を選別しうるパラメーターを解明することを目的とする。本研究では特にMannose binding lectin (MBL)に注目して検討を行っている。MBLは自然免疫に重要な役割を果たす一方、その欠損と自己免疫疾患発症の関連が示唆されている。日本人においてはコドン54に遺伝子多型があることが知られており、少数型アリール(Bアリール)保持者では多数型アリール(Aアリール)ホモ保持者に比しMBL血中濃度は著明に低下、少数型ホモである場合にはほぼ測定感度以下にまで低下する。昨年に引き続きMBL遺伝子多型とSLEの発症・病勢

・病態との関連を検討した。

また、MBLと類似した構造を持つ補体C1qにたいする自己抗体が存在し、SLEの病態と関連していることが報告されている。MBLに対する自己抗体が存在する場合、MBLの機能を阻害したり、元々Bアリール保持者でMBL血中濃度が低い場合、さらにその濃度を低下させることが想定される。さらに、MBLはSLE患者の腎組織などに沈着していることも知られており、抗MBL自己抗体が沈着しているMBLに結合して組織障害を助長する可能性も考えられる。このような可能性を考え、実際MBLに対する自己抗体が存在している可能性があるか固相酵素抗体法による抗MBL自己抗体測定系を用いて検討を行った。

本研究では、MBL遺伝子多型を含め、発症早期より特定の合併症、病態を予測しうる因子を解明し、あらかじめ対処することにより、

患者の予後を改善させることを最終目的とする。

B. 研究方法

MBL遺伝子多型性解析にあたっては、まず患者および健常人末梢血よりゲノム遺伝子を調整した。MBL遺伝子多型はすでにSLEとの関連が指摘されているコドン54多型をPCR-RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) 法により判定した。PCR-RFLP法の妥当性は、ランダムに選択した検体のいくつかをシーケンシングすることにより確認した。

血中のMBLは固相酵素抗体法により測定した。

抗MBL自己抗体測定は新たに開発した固相酵素抗体法によりおこなった。まず、プレートに精製したMBLを固層化させた。ブロック後希釈した血清を反応させた。この際、MBLは糖鎖とカルシウム依存性に結合する性質を持つことから、このような結合を阻害するため、血清希釈にEDTAを含むバッファーを用いた。反応後酵素ラベル二次抗体を用いてMBLに結合したIgGを検出した。さらに、強い結合を示した一部の検体を持ち、ペプシン処理によりIgGから糖鎖結合部位を含むFc部分を分離させて同様の測定をおこない、ほぼ同等の結合が検出されることを確認した。

(倫理面への配慮)

検体はすべて書面による患者もしくは健常人の同意を得た上採取したものをを用いた。遺伝子解析に関しては筑波大学倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

SLE146名につきMBL遺伝子多型の解析を行い、正常型ホモ(AA)は84名、ヘテロ(AB)は54名、血中MBL濃度の著明な低下を伴う異常型ホモ(BB)は9名であった。BBである比率は健常人の160名中2名に比し有意に高頻度であった($p = 0.0218$)。各遺伝子型と血中MBL濃度との間

には明らかな関連を認め、AB患者ではAA患者より有意に低濃度、BB患者ではさらに低濃度となっていた。BB患者はAAおよびAB患者に比しSLE発症年齢はAA患者で 35.52 ± 14.82 歳、AB患者では 30.66 ± 15.23 歳、BB患者で 23.44 ± 13.30 歳であり、BB患者で低い傾向が見られたが有意差はなかった。また、経過中に入院を要する感染症を併発する頻度はBB患者では8名中5名とBB以外の患者140名中40名に比し有意に高頻度であった($p = 0.0287$)。SLEの治療に伴い血中MBL濃度はやや低下する傾向が見られたが、上昇する例も見られた。AA患者において、血中MBL濃度と補体CH50の間には有意の正の相関が見られた。現時点では皮膚症状、中枢神経症状、腎症状、漿膜炎等特定の症状とMBL遺伝子多型、もしくは血中濃度との明確な関連は見られていない。

抗MBL自己抗体は検索した111名のSLE患者のうち9名で血清中の価が健常人平均+2SDを超えており、健常人の113人中2名より有意に高頻度であった。抗体価とMBL遺伝子多型との関連を調べたところ、AB、BBなど血中のMBL濃度の低くなる遺伝子型をもつ個人でも抗MBL抗体価が高い場合があり、一定の傾向は見られなかった。また、抗MBL抗体価と補体、抗DNA抗体価などとの関連を検討したが優位な関連は今のところみられていない。しかしながら、抗MBL抗体陽性者には抗DNA抗体陰性者や間質性肺炎発症者などが含まれ、やや非典型的な経過をとる患者が多いように思われた。

D. 考察

MBL遺伝子多型性では血中MBL濃度低下の原因となるBアレルとSLE発症との関連が指摘されている。今回の検討にてもSLE患者がBBホモである頻度は健常人に比し有意に高頻度であった。分担研究者は以前に別の日本人のコホートについて検討をおこなっており、そのコホートにおけるBBホモの頻度はSLE患者で157名中10名、健常人で129名中2名であった。今回の結果と合算するとFisher直接確率法によるp値は0.0023となり、日本人SLE患者では

健常人に比しBB保有者が多いと考えられた。また、血中MBL濃度はSLEの病勢にともない変動する傾向が見られ、血中CH50とも有意に相関したが、現在のところ特定の病態と関連する等一定の傾向は見られず、さらに検討が必要と思われた。

MBLは自然免疫に重要であり、骨髄移植時の感染症の合併とMBL遺伝子多型との関連も指摘されている。SLEをはじめとする全身性自己免疫疾患では治療時に強い免疫抑制をかけることが多いため、感染症合併は患者の予後を左右する重大な問題である。今回の検討でMBL遺伝子多型と感染症合併との関連が示唆され、より多くの症例で関連の有無を明らかにして行くべきであると思われた。SLEの病態との関連を統計学的に明らかにするためにもより多くの症例数が必要である。また、血中のMBL濃度を測定することにより日和見感染の危険性を評価することができれば、遺伝子解析をおこなわずに患者の予後改善に役立てることができる可能性がある。このことについても今後検討を加えるべきであると考えられる。

一方、抗MBL自己抗体はSLE患者で健常人に比し有意に高頻度に検出された。上述したようにMBLに対する自己抗体が存在すればSLEの病態に影響を与える可能性が考えられる。現時点では抗体価高値の患者が9名と少数であるため病態や検査所見との関連は明らかではなく、統計学的解析もおこなえない。今後症例を蓄積して病態との関連の有無を明らかにしたい。

なお、全身性自己免疫疾患の病態に影響を与える分子をさらに検索するため、昨年引き続きIn-gel competitive reassociation (IGCR)法による発現遺伝子解析法の確立を行っている。本法では2つの検体間で発現の異なる遺伝子の選別が可能であり、現在関節リウマチ (RA) 患者関節滑膜と変形性関節症患者関節滑膜間で比較を行い、RA患者関節滑膜に発現が増強していると思われる遺伝子のクローニングを行っている。今後SLEなどの自己免疫疾患に応用し、これらの疾患の病態の解析

を進める予定である。

E. 結論

MBL遺伝子多型はSLE発症との関連が指摘されており、治療にともなう日和見感染と血中濃度の低下をともなう遺伝子型との関連も疑われる。昨年検討を行ったIL-1 β 遺伝子多型はSS発症との関連が考えられたが特定の病型との関連は明らかでなかった。今後さらに検討をすすめるとともに、IGCR法の確立によりより多くの候補遺伝子を見いだす必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Muraki Y, Tsutsumi A, Takahashi R, Suzuki E, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, Noguchi E, Sumida T. Polymorphisms of the IL-1 β gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome and systemis lupus erythematosus. J Rheumatol in press

2. 学会発表

1) 高橋令子、堤明人、村木祥文、鈴木英二、林太智、千野裕介、後藤大輔、松本功、村田秀行、大谷克城、若宮伸隆、住田孝之：Mannose binding lectin (MBL) 遺伝子の多型性と全身性エリテマトーデスの発症、病態、病勢の関係

第47回日本リウマチ学会総会学術集会 (東京)、4月24-26日、2003

2) 村木祥文、堤明人、高橋令子、鈴木英二、林太智、千野裕介、後藤大輔、松本功、村田秀行、住田孝之：日本人シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ患者のIL-1 β 遺伝子多型性と疾患の関連

第47回日本リウマチ学会総会学術集会 (東京)、4月24-26日、2003

3) Reiko Takahashi, Akito Tsutsumi, Yoshifumi Muraki, Daisuke Goto, Isao

Matsumoto, Katsuki Ohtani, Nobutaka
Wakamiya, Takayuki Sumida. : Association of
Mannose-binding lectin (MBL) gene
polymorphism and serum MBL concentration
with characteristics and progression of
systemic lupus erythematosus.

67th Annual Scientific Meeting of the
American College of Rheumatology 10月26
日、2003

4) 高橋令子、堤明人、後藤大輔、松本功、大
谷克城、若宮伸隆、住田孝之：全身性エリテ
マトーデス患者における抗mannose binding
lectine (MBL) 抗体の検討

第33回日本免疫学会（福岡）、12月9日、2003

5) 友尾孝、堤明人、安河内孝徳、後藤大輔、
松本功、住田孝之：IGCR(In-gel competitive
reassociation)法による関節リウマチ滑膜に
おける発現異常遺伝子の解析

第33回日本免疫学会（福岡）、12月9日、2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

AA-アミロイドーシスの遺伝的要因、病態、治療に関する研究

分担研究者： 寺井 千尋（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター助教授）

研究要旨

日本、フィンランド、トルコのAA-アミロイドーシスおよび正常コントロール群を対象に、これまでアミロイドーシス発症の危険因子として報告されたSAA1遺伝子のexon 3多型とプロモーター部の-61C/G、-13C/T、-2G/A SNPsにつきAA-アミロイドーシス発症との関連につき検討した。SAA1遺伝子の-13TおよびSAA1.3 (SAA1 γ) は日本人ではアミロイドーシス発症の危険因子であったが、フィンランド人、トルコ人では危険因子ではなかった。これらの人種ではSAA1.1 (SAA1 α) がアミロイドーシス発症の危険因子であった。調べた範囲では共通の疾患感受性遺伝子座は存在しなかった。

A. 研究目的

続発性アミロイドーシス (AA-アミロイドーシス) は長期間にわたり活動性の関節炎が持続したRA患者の一部に発症する難治性、致命的な合併症である。日本ではRA死因の上位 (第3-4位) をしめる。発症頻度には人種差、地域差が報告され、遺伝的要因が関与すると考えられる。我々は日本人のRA続発性アミロイドーシスの遺伝子解析から、SAA1.3 (SAA1 γ) およびSAA1遺伝子のpromotor部-13Tが発症の危険因子であることを報告した。

今回アミロイドーシスの頻度が高いトルコとフィンランドの研究者と共同研究を行った。日本を含めたこの3つの地域のアミロイドーシス患者と対照群の遺伝子を解析し、アミロイドーシス発症の遺伝的要因、地域差をもたらす要因につき検討することで、本症発症のメカニズムを追究することを目的とした。

B. 研究方法

対象はフィンランド、トルコ、日本より得たそれぞれ54例、45例、59例のアミロイドーシス群、およびそれぞれ100例、50例、58例の対照群である。フィンランド、トルコのサンプルは匿名化され、日本のサンプルは患者同意のもとに採取した。日本とフィンランドのア

ミロイドーシスは全例RA続発性アミロイドーシスであるが、トルコの検体は30例の家族性地中海熱に続発したアミロイドーシスを含む。SAA1遺伝子のプロモーター領域とexon 3の5 SNPs (-61A/G、-13C/T、-2G/A、2995T/C、3010C/T) の多型を検討し、共通の疾患感受性遺伝子座がないかを検討した。また、それぞれのhaplotypeをLD support softwareにて解析した。

C. 研究結果

SAA1遺伝子の2995T/Cと3010C/Tにより規定される Exon 3多型は各人種でSAA1.1、SAA1.3 およびSAA1.5がみられた。日本人でアミロイドーシス発症の危険因子であるSAA1.3 (SAA1 γ) alleleの頻度はフィンランド、トルコ、日本の対照群でそれぞれ0.11、0.06、0.39で、アミロイドーシス群ではそれぞれ0.03、0.03、0.58であり、日本人のみで、有意差 (オッズ比2.15、 $p < 0.005$) がみられた。SAA1.1 (SAA1 α) の頻度はフィンランド人では対照群の0.64に対しアミロイドーシス群では0.87 (オッズ比3.87、 $p < 0.0001$) であり、トルコ人においても対照群0.46に対しアミロイドーシス群で0.74 (オッズ比、3.32、 $p < 0.0002$) と有意に増加していた。-13Tの頻度は日本人では対照群0.44に対し

アミロイドーシス群0.67 (オッズ比2.59、 $p < 0.002$)であったが、フィンランド人では対照群0.11に対しアミロイドーシス群0.05、トルコ人では対照群0.05に対しアミロイドーシス群0.01と少なかった。一方、トルコ人では-61Cの頻度がアミロイドーシス群で対照群よりも増加していた。

5つのSNPsのハプロタイプ解析では、日本人対照群では”CTGCC”がもっとも多く(0.38)、アミロイドーシス群ではさらに多く見られた(0.57)。これに対しフィンランド、トルコ人ではハプロタイプ”CCGTC”が対照群でもっとも多く(各0.61と0.43)、アミロイドーシス群ではさらに高頻度であった(各0.85と0.65)。一方、このハプロタイプは日本人対照群では2番目に多い(0.30)が、アミロイドーシス群ではむしろ減少(0.10)していた。

D. 考察

我々は先にSAA1遺伝子のプロモーター-13Tが日本人ではSAA1.3 (SAA1 γ)以上に強い続発性アミロイドーシス発症の危険因子であることを報告した¹⁾。その後、日本人とAmerican Caucasianで検討で-13Tの関与を支持する報告²⁾と、イスラエルの家族性地中海熱続発性アミロイドーシスで検討し関連なしとする報告³⁾がなされた。今回の検討ではフィンランド人、トルコ人でアミロイドーシス発症と-13Tの関連は見られなかった。フィンランド人、トルコ人、ユダヤ人ともアミロイドーシスの頻度が高いが、遺伝学的に比較的孤立した集団であることが知られており、独自の危険因子をもつ可能性や独特のハプロタイプをもつ可能性も考えられる。AA-アミロイドーシスの疾患感受性遺伝子についてはさらに範囲を拡げて探索する必要がある。

E. 結論

SAA1遺伝子の-13Tは日本人ではアミロイドーシス発症の危険因子であるが、フィンランド人、トルコ人では危険因子ではなかった。これらの人種ではSAA1.1 (SAA1 α)がアミロ

イドーシス発症の危険因子であった。今回の検討で調べたSAA1遺伝子領域では共通の疾患感受性遺伝子座は存在しなかった。

参考文献

- 1) Moriguchi M, Terai C, Kaneko H, Koseki Y, Kajiyama H, Uesato M, Inada S, and Kamatani N. A novel single-nucleotide polymorphism at the 5'-flanking region of SAA1 associated with risk of type AA Amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 44(6), 1266-1272, 2001
- 2) Yamada T, Okuda Y, Takasugi K, Wang L, Marks D, Benson MD, Kluge-Beckerman B. An allele of serum amyloid A associated with amyloidosis in both Japanese and Caucasians. *Amyloid*, 10, 7-11, 2003
- 3) Gershoni-Baruch R, Brik R, Zacks N, Shinawi M, Lidar M, Livneh A. The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*, 48(4), 1149-1155, 2003

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. 寺井千尋:アミロイドーシス。診断と治療 91: 851-855, 2003
 2. 寺井千尋: 遺伝子多型と疾患感受性。炎症と免疫 11: 211-215, 2003
2. 学会発表
 1. Koseki Y, Terai C, Kajiyama H, Ito M, Nakajima A, Yamanaka H, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N. Study of effect of inflammation on lipid metabolism in patients with rheumatoid arthritis using a large cohort. 67th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct., 2003.
 2. 梶山浩、寺井千尋、金子裕隆ほか. 関節リウマチ(RA)続発AA-amyloidosis(ア症)におけるRAGE geneのSNPs解析。第47回日本リウマチ

学会総会. 東京

3. 小関由美、寺井千尋、梶山浩ほか. 大規模患者調査 (J-ARAMIS) を用いたRA患者における炎症と脂質代謝に関する検討。第47回日本リウマチ学会総会. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

その他

特記事項なし

抗リン脂質抗体とprothrombinの遺伝子多型に関する研究

分担研究者： 市川 健司（国立療養所西札幌病院リウマチ科医長）

研究要旨 本邦における劇症型抗リン脂質抗体症候群の疫学的調査では、ループスアンチコアグラント(LA)が全例に出現しており、その病態との関連が示唆された。LAの主要な対応抗原はphosphatidylserineに結合したprothrombin (PS/PT)と考えられている。本研究ではProthrombinの遺伝子多型と、aPS/PTの出現、病態との関連を検討した。prothrombinには6種類のSNPsを多型が登録されており、アミノ酸変異を伴う多型は、rs5896, rs5897の2種である。全身性エリテマトーデス(SLE)患者より、採取した末梢血よりgenomic DNA精製した。SLEにおける前2者の遺伝子変異についてTaqMan MGB probeを用いて検討した。患者血清中のaPS/PT抗体活性と抗カルジオリピン抗体(aCL)活性は、固相酵素抗体法で測定した。LAは、健常人血漿と混和後活性化部分トロンボプラスチン法、ラッセル蛇毒凝固時間法(RVVT)、希釈RVVT、およびカオリン凝固時間にて凝固時間を測定し検出した。aPS/PT陽性者にrs5896 T/Tが多い傾向があり、逆に、rs5896 T/TのSLE患者に、Cアレルを持つ患者よりも高率にaPS/PTが出現する傾向があり、rs5896 T/TとaPS/PT陽性との関連が示唆された。aCLでは、このような傾向が認められなかったことより、この関連は、aPS/PTに特異的である可能性がある。LAは、aPS/PTと同様にT/Tの表現型を持つSLE患者に多く出現し、逆にLA陽性者にはT/Tであることが多い。この結果は、LAの主要な対応抗原がphosphatidylserineとprothrombinの複合体であると考えられており、aPS/PTとrs5896 T/Tが関連することを反映していると考えられる。rs5897は、SLE患者、健常人とも全員C/Cのホモ接合であった。本研究において、SLE患者における、prothrombinのSNP rs5896の多型性とaPS/PT産生との関連が示唆され、自己抗体の産生機構に、対応抗原の多型性が影響を与える可能性が示された。今後、症例の集積を行うとともに、遺伝的素因の、自己抗体産生に及ぼす影響を解析し、遺伝子解析によってSLE患者の中からハイリスクグループを同定してゆける可能性が考えられた。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群とは、多彩な動・静脈血栓症、習慣流産および血小板減少を主要徴候として、抗リン脂質抗体が血中に出現することを特徴とする難治性の自己免疫疾患である。抗リン脂質抗体は、リン脂質そのものに対する抗体ではなく、リン脂質に結合した凝固線溶に関与する蛋白に対する抗体と考えられており、代表的なものとして、 β 2-グリコプロテインI (β 2-GPI)依存性抗カルジオリピン抗体 (aCL)、ループスアンチコアグラント (LA)がある。抗リン脂質抗体の中に、細・小血管の多発性血栓による多臓器不全を呈する難治

性の予後不良な患者群があり、これらの患者群は、1992年に、Ashersonにより劇症型抗リン脂質抗体症候群と名付けられた。本邦における劇症型抗リン脂質抗体症候群の疫学的調査では、ループスアンチコアグラント(LA)が全例に出現しており、その病態との関連が示唆された。LAの主要な対応抗原はphosphatidylserineに結合したプロトロンビン (PS/PT)と考えられており抗PS/PT抗体 (aPS/PT)が临床上重要と考えられる。

aCL陽性患者には陰性患者や健常人に比して有意にV(247)変異 β 2-GPI遺伝子を持つ頻度が高いことが報告されている。aPS/PTの産生

が、抗 β 2-GPI抗体と同様に、標的分子であるプロトロンビンの遺伝子多型に基づく抗原性の違いにより影響される可能性がある。

プロトロンビンの遺伝子多型に関しては、dysprothrombinemiaを起こす遺伝子変異が報告されている。しかし、プロトロンビン(PT)の抗原性、および遺伝子多型と、aPS/PTの出現や、抗リン脂質抗体発症のリスクファクターになるか否かに関する検討は報告されていない。

本研究ではProthrombinの遺伝子多型と、aPS/PTの出現、病態との関連を検討する。これにより抗リン脂質抗体症候群ハイリスクグループを推定することができる可能性があり、それが個々の症例における適切な治療方針を決定する上で重要となると考えられる。

B. 研究方法

患者血清並びにゲノム遺伝子： 全身性エリテマトーデス患者より、インフォームドコンセントを行い、末梢血を採取した。採取した末梢血よりgenomic DNA精製した。各患者の経過を、診療録より調査した。

SNPsの検索： プロトロンビンのSNPsをNCBI SNPs data base で検索すると、表1に示す6種類の多型が登録されている。その内アミノ酸変異を伴う多型は、rs5896, rs5897の2種であり、他の4種のSNPsはアミノ酸変異を伴わなかったため、SLE、抗リン脂質抗体症候群患者における前2者の遺伝子変異について検討した。これらのSNPsの検出には、蛍光色素を標識した各変異に特異的な合成DNA、TaqMan MGB probeと対応するPCR primerを設計し合成し、添加して被検DNAをABI PRISM 7000を用いて増幅し、蛍光強度を測定し、アレルを判定した。

フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の検出： 患者血清中のaPS/PT抗体活性は、固相酵素抗体法で測定した。96穴ポリスチレンプレートにフォスファチジルセリンを固相化させた後、非特異的な結合を防ぐために1%ウシ血清アルブミンと5 mMの塩化カルシウムを含んだTBSでブロックした。10

$\mu\text{g/ml}$ のヒトPTを50 μl 添加し反応させた後、被検血清50 μl を加え反応させた。血清中の免疫グロブリンのプレートへの結合を、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgGあるいはIgM抗体にて検出した。

ループスアンチコアグラントの検出： 被検血漿を健常人血漿と混和後活性化部分トロンボプラスチン法、ラッセル蛇毒凝固時間法(RVVT)、希釈RVVT、およびカオリン凝固時間にて凝固時間を測定し、凝固時間の延長がみられた検体をLA陽性とした。

抗カルジオリピン抗体の測定： 患者血清中の抗カルジオリピン抗体は、固相酵素抗体法にて測定した。96穴ポリスチレンプレートにウシ心臓より抽出したカルジオリピンを固相化し、非特異的免疫グロブリンの吸着をウシ胎児血清 10%を含む10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4にてブロックした後、被検血清を添加し反応させた。プレートを洗浄後、被検血清中の免疫グロブリンのカルジオリピンへの結合をヒト免疫グロブリンの各クラスに特異的なアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト免疫グロブリン抗体を反応させて検出した。

(倫理面の配慮)

サンプルの採取に当たり文書にて患者にインフォームドコンセントを行い同意を得た。

C. 研究結果

日本人における翻訳領域におけるPTのアミノ酸置換を伴うSNPsの頻度： 全身性エリテマトーデス患者137名のrs5896, rs5897変異を検討した。Rs5896は、SLE患者では、T/T, C/C, T/C各々51例 (37.2%)、14例 (10.2%)、72例 (52.6%)であり、これらより推定されたアレルの頻度は、T, Cは0.64と0.36であった。健常人38名中、T/T, C/C, T/Cは、各々18例 (47.4%)、3例 (7.9%)、17例 (44.7%)でありT, Cアレルの頻度は、0.70, 0.30でありSLE患者と、健常人でアレル頻度に有意の差はなかった。Rs5897は、SLE患者、健常人とも全員C/Cのホモ接合であった。抗リン脂質抗体、aPS/PT、LA、抗カルジオリピン抗