

図1

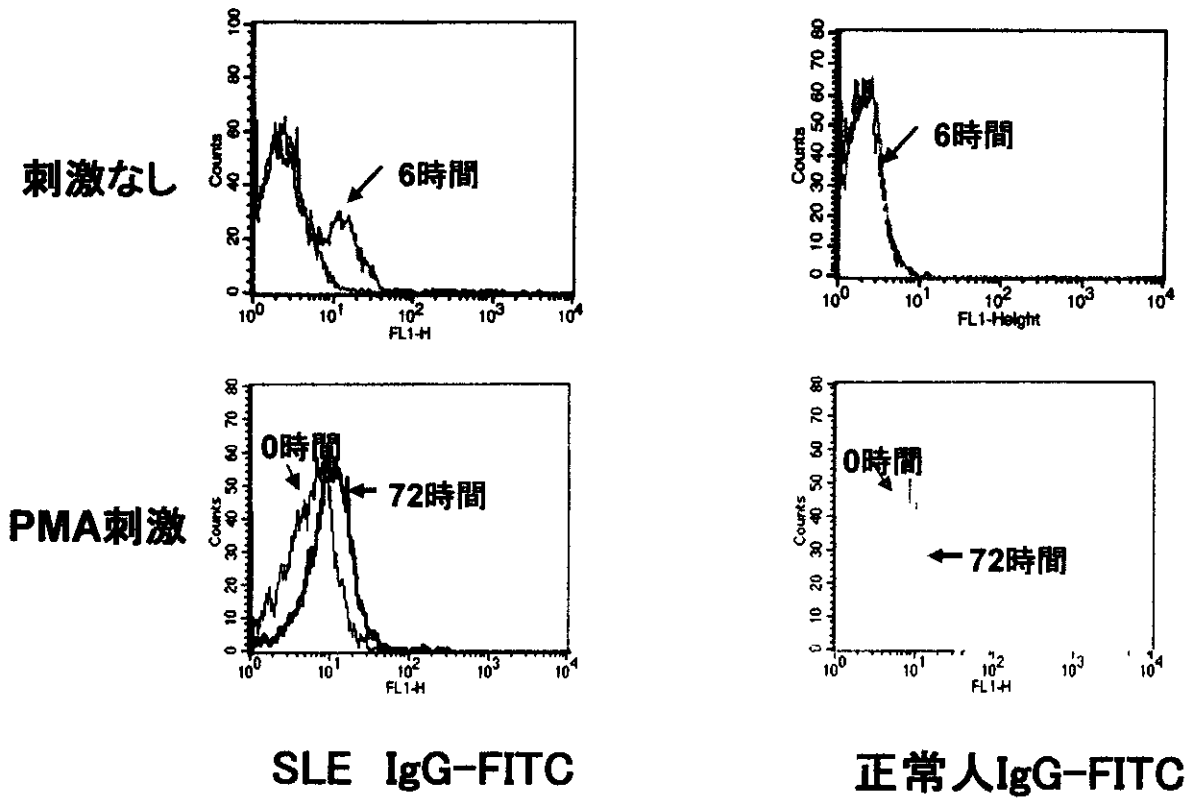
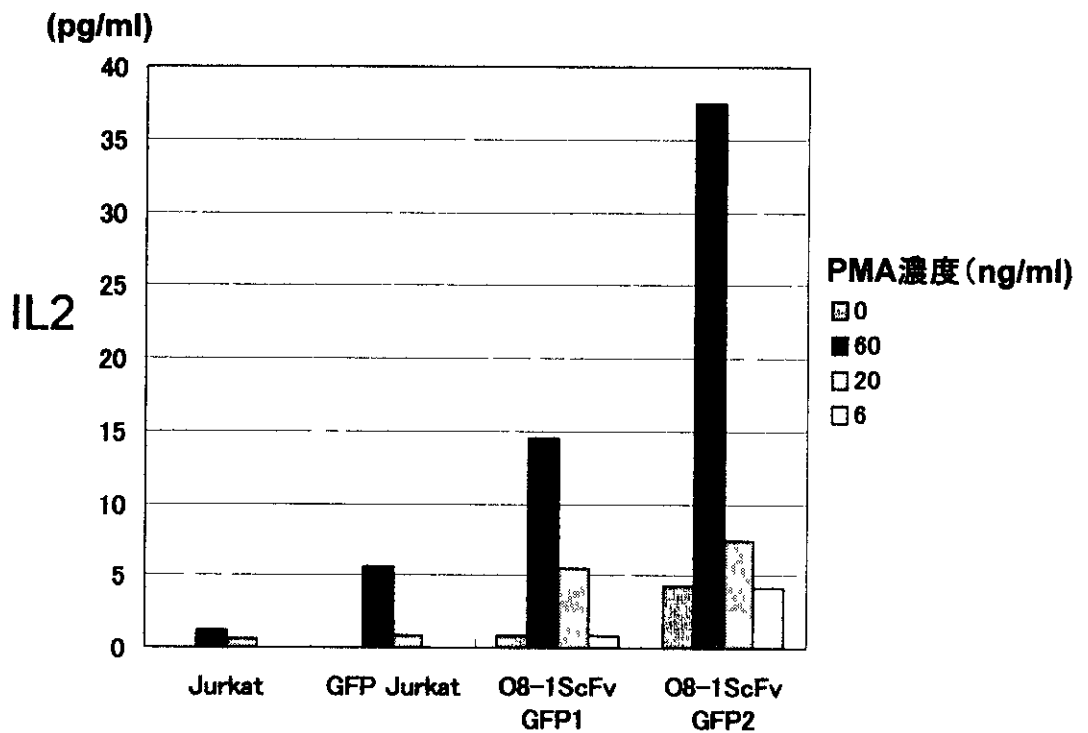


図2



## SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御

分担研究者 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

### 研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)の治療は、薬物療法を主体とするが、薬剤抵抗性とその克服は重要な課題である。薬剤抵抗性は、長期間の薬剤投与による薬剤耐性、高い疾患活動性による薬剤不応性に大別される。昨年度、長期治療後の SLE 患者末梢血リンパ球では、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、活動期 SLE 症例に於ける治療不応性の機序、並びに、その克服の可能性を検討し、以下の結果を得た。健康人末梢血リンパ球は P 糖蛋白質を発現しなかったが、SLE リンパ球は、P 糖蛋白質発現率が高く、活動期症例で高度で、SLEDAI と正相関した。また、発現量は、ステロイド薬 0.5mg/kg 以上に不応性の活動期で高値だった。リンパ球を IL-2 や IL-4 等で刺激すると、MDR1 特異的転写因子 YB-1 の核内移行、MDR-1 転写、P 糖蛋白質発現、細胞内ステロイド濃度低下が誘導された。また、ステロイド不応性の活動期 SLE の P 糖蛋白質発現は、パルス療法を含む強化療法の反復にて減弱し、治療反応性や臨床症状改善が得られた。以上、疾患活動性の高い SLE 患者リンパ球は、活性化刺激により P 糖蛋白質が誘導されて治療不応性に陥るが、パルス療法や免疫抑制薬等による強化治療により P 糖蛋白質抑制を介して治療不応性の解除が可能であり、P 糖蛋白質発現の評価は、薬剤不応性の予測、治療方針決定に有用であると考えられた。

### A. 研究目的

薬剤抵抗性は、様々な機序で齎されるか、抗癌剤による化学療法の分野では予後決定の最重要因子であり、その解明に精力が注がれてきた。多剤耐性遺伝子(multidrug-resistance, MDR-1)がコートする細胞膜 P-糖蛋白質は、抗癌剤を始めとする種々の薬剤を細胞外に能動排出するポンプとして機能し、抗癌剤抵抗性獲得に到ることが解明された。その後、ステロイド薬を含む種々の薬剤も、P-糖蛋白質によって細胞外へ排出される事が判ってきた。MDR-1 の転写は、Sp1、NF-IL-6、EGR1 などの転写因子や p53 や活性化 Ras によって調節される事が報告される。また、MDR-1 遺伝子上流域には、転写活性に必須な Y ホックスが存在し、YB-1 が特異的転写因子として結合する。さらに、シクロスポリン誘导体や新規キノリン化合物等の様々な P 糖蛋白質拮抗阻害薬を用いた抗癌剤耐性克服を目的とした臨床試験がなされる。しかし、全身性エリテマトーデス(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。

SLE は代表的な全身性自己免疫疾患であるか、免疫担当細胞を標的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。今年度は、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. 方法

健常人 20 例、SLE 患者 100 例の末梢血リンパ球を用いた。SLE 症例は、SLEDAI および厚生省疾患活動性基準で判定した活動期 SLE 患者 69 例、非活動期 31 例を含んだ。リンパ球の P-糖蛋白質発現は、抗 P-糖蛋白質抗体 MRK16 を用いてフローサイトメーターで解析した。活性化リンパ球の MDR-1 特異的転写因子 YB-1 の核内移行を共焦点レーザー顕微鏡や EMSA で、MDR-1 の転写を PCR 法で解析した。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、<sup>3</sup>H-デキサメサゾンと <sup>14</sup>C-ブタノールで標識して測定した。

### (倫理面への配慮)

被験者およびその関係者の尊厳、人権および利益を保護することを目的とし、厚生科学審議会において作成された「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」の中の第二群試料等提供者を対象とする。同審議会の手引きに沿って、1) 遺伝子の分析を行うこと、2) 研究協力の任意性と撤回の自由、3) 研究目的、4) 研究方法、5) 研究計画書等の開示試料提供者にもたらされる利益および不利益、6) 個人情報保護、7) 遺伝子解析結果の開示、8) 研究成果の公表、9) 研究から生じる知的財産権の帰属、10) 遺伝子解析研究終了後の試料等の取扱の方針、11) 費用負担に関する事項、12) 遺伝カウンセリングの体制などの点を具体的に説明し、同意を得た。また、患者の個人情報が所属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、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た。

## C. 結果

健常人 20 例、SLE 患者 100 例の末梢血リンパ球の P-糖蛋白質の細胞膜上での発現を解析した。リンパ球の P-糖蛋白質は、健常人の CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>細胞では発現しないが、SLE 症例では P-糖蛋白質の発現率、発現量共に有意に高値を呈した。SLE 患者 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>細胞の P-糖蛋白質発現率は、リンパ球採取時の

SLEDAI と有意な相関を示した。また、SLE 患者リンパ球上の P-糖蛋白質の発現強度は、プレドニゾロン (PSL) 0.5mg/kg 以上の治療に対して低反応性の SLE 症例では高度で、逆に、高反応群では軽度であった。

一方、リンパ球を IL-2 や IL-4 などて活性化すると、MDR-1 特異的転写因子 YB-1 の核内移行、MDR-1 遺伝子の転写活性部位 Y ホックスへの結合、MDR-1 の転写、P-糖蛋白質の発現が誘導され、それに伴い、細胞内ステロイド濃度は低下した。即ち、P-糖蛋白質を介する薬剤抵抗性は、リンパ球活性化によっても齎された。さらに、活性化リンパ球を P-糖蛋白質拮抗薬 (シクロスポリン、PSC 833、タクロリムス、MS-209) で前処理すると、細胞内ステロイド濃度の低下は回復した。

実際、P-糖蛋白質の過剰発現を呈する活動期 SLE 症例では、既存のステロイド薬治療では制御不十分で、ステロイドパルス療法、シクロホスファミドパルス療法 (IV-CY)、シクロスポリンなどの免疫抑制強化療法を要し、疾患活動性の改善に伴い P-糖蛋白質の発現は健常人レベルにまで低下し、治療反応性が回復した。

## D. 考察

薬剤抵抗性は、疾患活動性が高いために治療に反応しない薬剤不応性と、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、SLE の治療耐性獲得には、長期薬剤連用によるリンパ球の P-糖蛋白質の発現誘導が関与する事を報告した。一方、今年度は、疾患活動性が高いために薬剤不応性を示す難治性の SLE 症例に於いても、リンパ球の P-糖蛋白質の発現誘導を認め、P-糖蛋白質発現率は SLEDAI などの疾患活動性指数と相関し、SLE 患者リンパ球上の P-糖蛋白質の発現強度は、プレドニゾロン (PSL) 0.5mg/kg 以上の治療に対して低反応性の SLE 症例では高反応群に比へ有意に高度であった。

その機序として、活性化リンパ球から産生される IL-2 や IL-4 等によって、MDR-1 の転写、さらに、P-糖蛋白質の発現が誘導される事が解明され、さらに、カルシニューリン拮抗作用を介する免疫抑制薬であるシクロスポリンやタクロリムスの

有する P-糖蛋白質拮抗阻害作用を介して、P-糖蛋白質を介する薬剤排出が阻害される事を認めた。実際、P-糖蛋白質の過剰発現を呈する活動期 SLE 症例では、既存のステロイド薬治療では制御不十分で、免疫抑制強化療法を要し、疾患活動性の改善に伴い P-糖蛋白質の発現は健常人レベルにまで低下し、治療反応性が回復した。即ち、SLE 患者リンパ球の P-糖蛋白質の発現の検索により、難治性(薬剤不応性)症例の識別が可能であり、IV-CY や免疫抑制薬、更には新規治療法の適応評価に於いて有用であり、さらに、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。

## E. 結論

リンパ球を IL-2 や IL-4 等で刺激すると、MDR1 特異的転写因子 YB-1 の核内移行、MDR-1 転写、P 糖蛋白質発現、細胞内ステロイド濃度低下が誘導された。また、健常人末梢血リンパ球は P 糖蛋白質を発現しなかったが、SLE リンパ球は、P 糖蛋白質発現率が高く、活動期症例で高度で、SLEDAI と正相関し、P 糖蛋白質発現量は、ステロイド薬 0.5mg/kg 以上に不応性の活動期で高値だった。さらに、ステロイド不応性の活動期 SLE の P 糖蛋白質発現は、パルス療法を含む強化療法の反復にて減弱し、治療反応性や臨床症状改善が得られた。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 Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tokunaga M, Tsukada J, Tanaka Y Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement *Lupus* (2003) **12**, 798-800
- 2 Fujii Y, Fujii K, Nakano K, Tanaka Y Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1 *FEBS Letters* (2003) **539**, 45-50
- 3 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* (2003) **48**, 1239-1248
- 4 Yamamoto A, Fukuda A, Seto H, Miyazaki T, Kadono Y, Sawada Y, Nakamura I, Katagiri H, Asano T, Tanaka Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated dominant-negative Ras gene transfer to synoviocytes and osteoclasts *Arthritis Rheum* (2003) **48** 2682-2692
- 5 Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y  $\beta$  1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand on osteoblast and osteoclast maturation *J Biol Chem* (2003) **278** 45368-45374
- 6 Nakayamada S, Saito K, Nakatsuka K, Nakano K, Tokunaga M, Sawamukai N, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y Efficacy of mizoribine treatment in patients with Sjogren's syndrome an open pilot trial *Mod Rheumatol* (2003) **13**, 339-345
- 7 Nakatsuka K, Saito K, Kohshi K, Konda I, Tanaka Y Severe skin ulceration associated with Wegener's granulomatosis Successful treatment with hyperbaric oxygen and prostaglandin E<sub>1</sub> *Mod Rheumatol* (2003) **13**, 346-349
- 8 Nakayamada S, Okada S, Saito K, Tanaka Y Etidronate prevents high-dose glucocorticoid-induced bone loss in premenopausal individuals with systemic autoimmune diseases *J Rheumatol* (2004) **31**,

- 9 Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tokunaga M, Tsujimura S, Nakatsuka K, Adachi T, Tanaka Y Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in patients with connective tissue diseases Reevaluation of clinical features of *P. carinii* pneumonia in rheumatic diseases *Rheumatology* (in press)
- 10 Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y Fibroblast growth factor-2 induces receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression and osteoclast maturation by binding to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts *Arthritis Rheum* (in press)
- 11 田中良哉 SLE一病態に応じた急性期治療と維持治療の実際 *Medical Practice* (2003) **20**, 568-576
- 12 田中良哉 リウマトイド血管炎 診断と治療 (2003) **91**, 839-844
- 13 田中良哉 サイトカイン・サイトカインレセプター 日本内科学会雑誌 (2003) **92**, 1969-1976
- 14 田中良哉 全身性エリテマトーデス 今月の治療 (2003) **11**, 1238-1245
- 15 田中良哉 生物製剤の使い方 *Mebio* (2003) **20**, 46-52
- 16 田中良哉 リウマチ・膠原病 内科(2003) **92**, 1143-1148
- 17 田中良哉、齋藤和義、名和田雅夫、徳永美貴子、塚田順一 抗CD20抗体 臨床免疫 (2003) **40**, 536-543
- 18 田中良哉 抗CD20抗体 *Current Therapy* (2004) **22**, 53-58
- 19 名和田雅夫、齋藤和義、藤井幸一、徳永美貴子、塚田順一、田中良哉 抗CD20抗体療法 内科 (2004) **93**, 319-325
- 20 田中良哉 免疫学的生物製剤をいかに膠原病に適応するか *Molecular Medicine* (2004) **41**, 204-209
- 21 田中良哉 CD20を標的としたSLE等の自己免疫疾患の分子治療 医学のあゆみ (2004) **208**, 349-354
- 22 辻村静代、田中良哉 多剤耐性遺伝子を標的とする新規治療 リウマチ科 (2004) **31**,

## 2. 学会発表

- 1 田中良哉 リウマチ・膠原病 一治療の新展開一 第26回日本医学会総会 (教育講演) 福岡, 平成15年4月
- 2 田中良哉 ステロイド抵抗性疾患に対するシクロスポリン療法の戦略 第46回日本腎臓学会学術総会 (ランチオンセミナー) 東京, 平成15年5月
- 3 田中良哉 生物製剤 第18回日本臨床リウマチ学会総会 (シンポジウム) 札幌, 平成15年10月2-3日
- 4 田中良哉 ステロイド性骨粗鬆症の薬物療法 第5回日本骨粗鬆症学会総会 (シンポジウム) 福岡, 平成15年10月
- 5 田中良哉 免疫学的ツールの臨床応用 第31回日本臨床免疫学会総会 (シンポジウム) 東京, 平成15年10月
- 6 田中良哉 免疫シグナルと続発性骨粗鬆症の病態機構 第18回日本整形外科学会基礎学術集会 (教育研修講演) 北九州, 平成15年10月
- 7 田中良哉 Targeting cell surface molecules in autoimmune diseases 第33回日本免疫学会総会学術集会 (シンポジウム) 福岡, 平成15年12月
- 8 田中良哉 抗リウマチ薬が効かなくなる原因とは? 厚生労働省「厚生科学研究公開シンポジウム」東京, 平成16年2月
9. 田中良哉 抗リウマチ薬 平成15年度厚生労働省免疫アレルギー疾患予防・治療研究推進事業リウマチ・アレルギーシンポジウム Part 2 (シンポジウム) 東京, 平成16年2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。

## ループス腎炎 WHO IV 型における Th1 細胞の動態

橋本博史、森本真司、仲野総一郎、片桐彰、満尾晶子、戸叶嘉明  
順天堂大学医学部膠原病内科

### 研究要旨

ループス腎炎 WHO IV 型における Th1 細胞を IFN $\gamma$ /IL-13 の細胞内染色により識別し、その動態を血中の CD62L の発現、MCP-1 の測定、*in vitro* における IFN $\gamma$  の産生を測定することにより検討した。WHO IV 型では血中の Th1 細胞が増加していたが、Th1 サイトカインの IFN $\gamma$  は増加していなかった。血中の CD62L 陽性細胞は増加しておらず局所嗜好性を示し、MCP-1 は高値であり局所への移行の可能性が示唆された。*in vitro* での IFN $\gamma$  は認めなかったか今後、刺激条件等を再検討していくことにより産生する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

ループス腎炎の予後は近年、著しく改善し、なかでも腎不全への移行率が高い WHO IV 型においては、シクロフォスファミド大量療法 (IVCY) の導入かその予後の向上に貢献してきた。しかしながら、ステロイド剤、IVCY の両者に治療抵抗性を示す例は依然として存在し、いまた WHO IV 型は临床上重要な病態であると考えられる。これまで腎症の発症には自己抗体を中心とした、液性因子の病態への関与が考えられてきた。しかしながら、近年、液性因子のみならず、細胞性因子も病態形成に密接に関与しているとの報告がなされており、我々も SLE における Th1 細胞の増加を報告している。

今回、ループス腎炎 WHO IV 型における Th1 細胞の動態を、CD4 陽性細胞の IFN $\gamma$  または IL-13 の細胞内染色、局所嗜好性のマーカーである血中 CD62L の発現、細胞遊走を誘導するケモカインの一種である MCP-1 の測定、*in vitro* における Th1 サイトカインである IFN $\gamma$  の産生を測定することにより検討した。

### B. 研究方法

#### 1 対象

血中の IFN $\gamma$ /IL-13 の細胞内染色はループス腎炎 WHO IV 型 9 例、IV 型以外の腎症 5 例、腎症を有さない SLE 25 例、血中 CD62L の発現は WHO IV 型 10 例、健常人 10 例、血中の MCP-1 濃度は WHO IV 型 12 例、IV 型以外の腎症 6 例、*in vitro* における IFN $\gamma$  の産生は WHO IV 型 5 例、健常人 5 例で行われた。

#### 2 細胞内染色

IFN $\gamma$  または IL-13 の細胞内染色は末梢血よりリンパ球を分離し、PMA・Ionomycin で 4 時間刺激後、PE 標識抗 CD4 抗体で細胞膜を染色、FITC 標識抗 IFN $\gamma$  または抗 IL-13 抗体で細胞内染色し FACS にて解析した。

#### 3 CD62L 発現の解析

末梢血よりリンパ球を分離し、抗 CD4, IL-12R, CD62L 抗体で 3 重染色し、FACS にて解析した。

#### 4 血中 MCP-1 の測定

2種類モノクローナル抗ヒト MCP-1 抗体を用いた sandwich ELISA 法で測定した。

#### 5 in vitro における IFN $\gamma$ 産生

ループス腎炎患者および正常対照より末梢血単核細胞を採取し、リンパ球分離液にてリンパ球を分離。プラスチックディッシュにリンパ球を注入し、CO<sub>2</sub> インキュベーターにて1時間静置。非付着細胞を回収し96穴プレートに1wellあたり細胞  $1 \times 10^6$ /ml になるように調整。リコンヒナント IL-12 を 20ng/ml/well 添加または非添加し5日間培養。培養上清を回収し、sandwich ELISA 法にて IFN $\gamma$  を測定した。

#### (倫理面への配慮)

検体採取者には、実験以外に血液の使用をしない事、実名が公表されない事、遺伝子実験を行わない旨、インフォームトコンセントを行ったうえ同意の得られたもののみ検体採取した。

### C. 研究結果

#### 1 細胞内染色

以前、我々は IFN $\gamma$  と IL-4 を用い細胞内染色を行い SLE において Th1 細胞が増加している事を報告した。しかしながら IL-4 は血清中にほとんど検出されず細胞内染色との差異を認めため、今回、IL-13 を用い再検討した。表1に示すように WHO IV 型では初発、再発例共に Th1 優位の結果が得られたか、それ以外は Th2 優位であった。また、図1に示すように WHO IV 型の血中サイトカインは IL-2, IFN $\gamma$  といった Th1 サイトカインの増加を認めなかった。以上の結果より WHO IV 型では末梢血中に IFN $\gamma$  を中心とする Th1 サイトカイン非分泌の Th1 細胞が存在し、腎局所に移行し作用する可能性が考えられた。

#### 2 CD62L の発現

次に、Th1 細胞が局所嗜好性かリンパ組織嗜好性かを調べる為、その陰性細胞が局所に集積する CD62L の発現を Th1 細胞で検討した。その結果、図2に示すように正常対照では Th1

細胞の CD62L 陰性細胞の比率が高く、SLE では若干 CD62 陽性細胞の比率が高かったか正常対照との間に有意差を認めなかった。

#### 3 血中 MCP-1 濃度

上記の結果より、元来 Th1 細胞は炎症部位嗜好性であるものの、外因物質によりさらに局所に移行する可能性が示唆された。外因物質としてケモカインに着目し、腎炎モデルマウスで抗 MCP-1 抗体投与により腎症が軽減されたとの報告があることより血中の MCP-1 を測定したところ、WHO IV 型では IV 型以外の腎症と比し有意に高値であった (図3)。

#### 4 in vitro における IFN $\gamma$ 産生能

以上の結果より SLE の Th1 細胞が腎臓に移行し局所の IL-12 存在下で IFN $\gamma$  を分泌できるか否かを in vitro の実験で検討した。図4に示すように正常対照では IL-12 刺激で IFN $\gamma$  を産生したが、SLE では産生を認めなかった。

### D. 考察

我々は本研究班における分担研究課題として“膠原病(主に SLE)の長期予後に影響を及ぼす病態とその対策”をテーマとして掲げてきたが、今年度は腎不全への移行率も高く、未だステロイド剤、免疫抑制剤両者に治療抵抗性を示すことの多い、臨床上重要な病態であるループス腎炎 WHO IV 型の病態形成における Th1 細胞の関与を検討した。これまで腎症の病態形成は自己抗体、特に抗 DNA 抗体を中心とした液性因子が深く関与すると考えられてきた。しかしながら近年、細胞性因子の関与を示す報告がなされてきており、我々も IFN $\gamma$  と IL-4 を用い細胞内染色を行い、SLE において血中 Th1 細胞が増加する事を報告をしている。しかし IL-4 を用いた実験では血清中の IL-4 濃度と解離が見られたため今回、IFN $\gamma$ , IL-13 を用いて再検討した。その結果この系を用いても WHO IV 型血中に Th1 細胞が増加していることが明らかとなった。しかしながら、血中の Th1 サイトカインは上昇しておらず、Th1 細胞が腎局所において作用していることか考えられたため CD62L の発現を調べたところ

ろ、SLE、正常対照ともに CD62L 陰性細胞の比率が高値であった。この事より Th1 細胞が炎症局所嗜好性であることが示唆されたが、SLE においてさらに Th1 細胞を局所に誘導する外因物質としてケモカイン、なかでも腎症の発症との関与が報告されている MCP-1 に着目し測定したところ、WHO IV 型において高値を示した。この結果より WHO IV 型においては Th1 細胞が MCP-1 により腎局所に移行している可能性が示唆された。さらに、移行した Th1 細胞が腎局所において作用しているかどうかを検討するため、*in vitro* において Th1 細胞の IFN $\gamma$  産生を検討したところ、正常対照においては IL-12 刺激により IFN $\gamma$  の産生を認めたか、SLE では認めなかった。予想とは異なる結果になったか、以下の可能性が示唆された。すなわち、全例ステロイド治療開始後であったこと、今回結果には示さなかったが、SLE では IL-12 非存在下では Th2 優位に働く IL-18 が高値であること、SLE においては有意差はないものの正常対照に比し CD62L 陽性細胞の増加を認めたことより central memory の比率が高いことか関与している可能性かあると考えられた。今後、IL-12 添加濃度の再検討、IL-12/IL-18 刺激での実験、未治療例での検討、CD62L との詳細な関連の検討を行い、今回の結果を検討していく。さらに腎局所での IL-12 の作用を検討するためメサングウム細胞の cell line を用いた IL-12 産生の検討、SLE で高値を示す可溶性 CD40L 等の局所 IL-12 刺激因子との関連について検討を加えていく予定である。

## E. 結論

- 1 ループス腎炎 WHO IV 型において IFN $\gamma$  を産生しうる Th1 細胞は増加していたか、血中の IFN $\gamma$  濃度は上昇していなかった。
- 2 Th1 細胞は正常対照、SLE 共に局所嗜好性であった。
- 3 WHO IV 型の末梢血中 IFN $\gamma$  非分泌 Th1 細胞はケモカイン等の外因性物質により腎局所に移行し、局所において IFN $\gamma$  を産生

し作用している可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Sugimoto K, Morimoto S, Kaneko H, Nozawa K, Tokano Y, Takasaki Y, Hashimoto H Decreased IL-4 producing CD4+ T cells in patients with active systemic lupus erythematosus-relation to IL-12R expression *Autoimmunity* 35 381-7, 2002
- 2 Morimoto S, Tokano Y, Kaneko H, Nozawa K, Amano H, Hashimoto H The increased interleukin-13 in patients with systemic lupus erythematosus relations to other Th1-, Th2-related cytokines and clinical findings *Autoimmunity* 34 19-25, 2001

### 2. 学会発表

- 1 森本真司、鈴木淳、満尾晶子、名切裕、戸叶嘉明、橋本博史 全身性エリテマトーデスにおける IL-13, IL-18 の役割 リウマチ 43 306, 2003 (第 47 回日本リウマチ学会抄録集)
- 2 戸叶嘉明、名切裕、満尾晶子、鈴木淳、森本真司、橋本博史 急性期 SLE 患者における Th1/Th2 ハランス IL-13 の細胞内染色による検討 リウマチ 43 306, 2003 (第 47 回日本リウマチ学会抄録集)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

### 1. 免許取得

特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし。



表1 <SLEにおけるIL-13 Cytoplasmic Staining>

	IFN $\gamma$ /IL-13	Significance
WHO IV (n=9)	11.2 $\pm$ 6.4 $\mu$ g	p<0.05 (vs without nephropathy)
Fresh (n=5)	11.6 $\pm$ 5.2 $\mu$ g	
Relapse (n=4)	10.8 $\pm$ 8.7 $\mu$ g	
Nephropathy without WHO IV (n=5)	3.5 $\pm$ 1.7	
Fresh (n=2)	4.6 $\pm$ 3.1	
Relapse (n=3)	2.8 $\pm$ 0.9	
Without Nephropathy (n=25)	5.9 $\pm$ 4.0	
Fresh (n=13)	6.9 $\pm$ 3.2	
Relapse (n=12)	4.9 $\pm$ 4.8	

図1 <WHO IV型における血中サイトカインプロファイル>

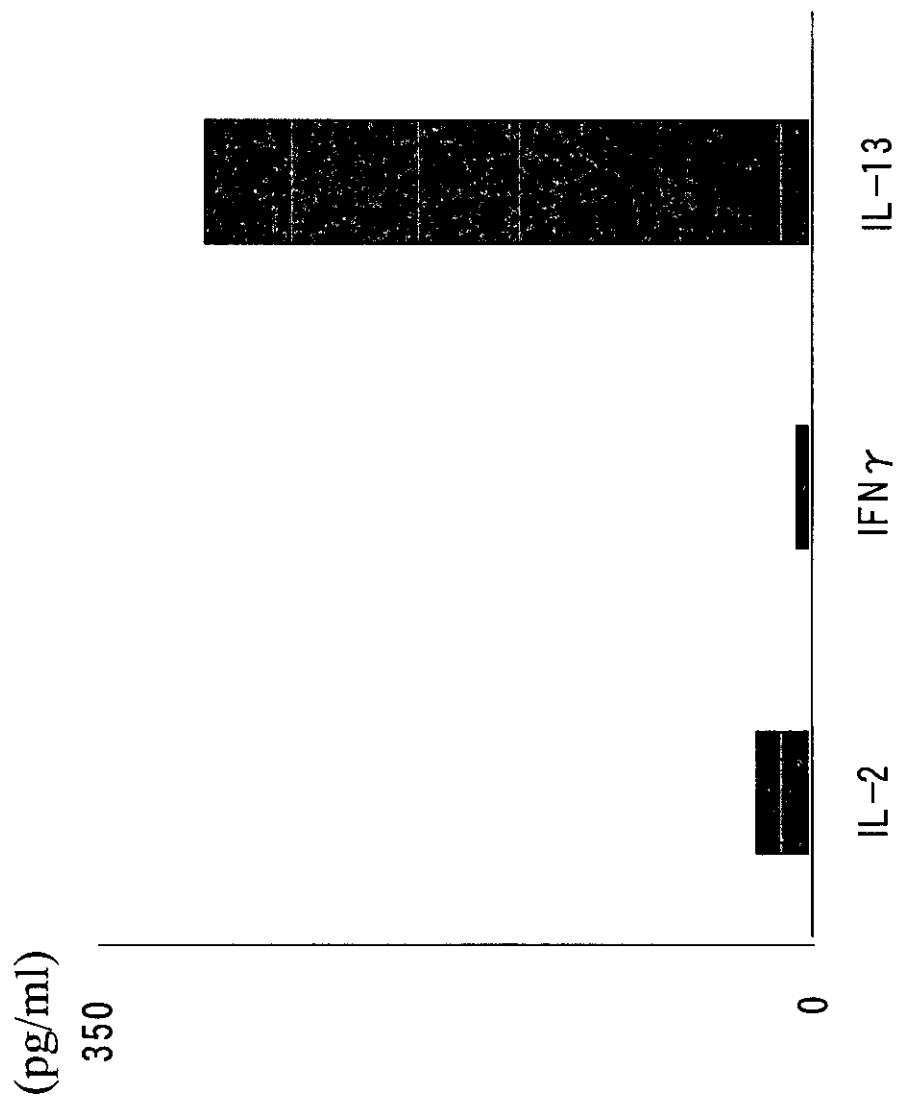


図2 <Th1様細胞におけるCD62Lの発現>

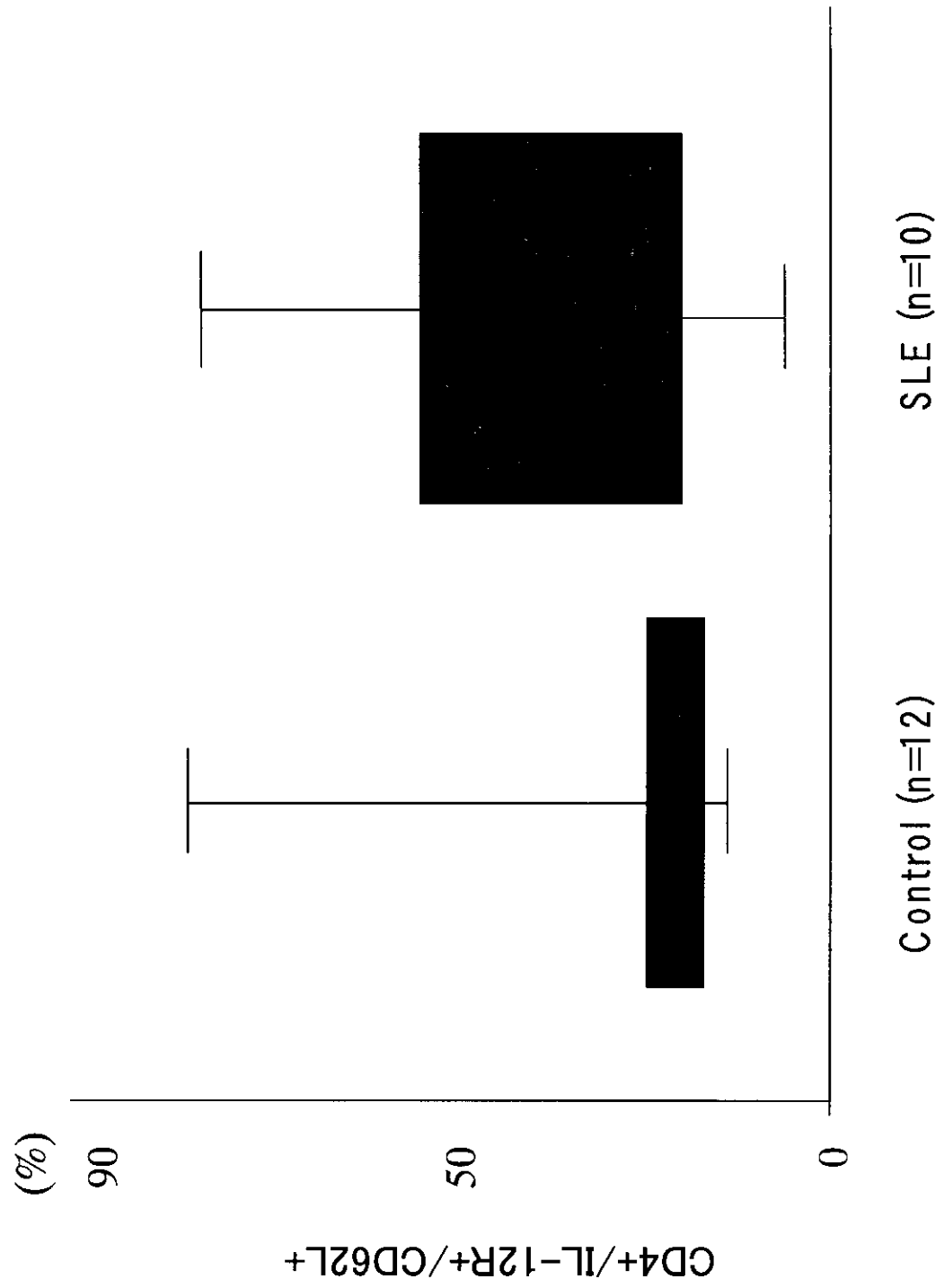


図3 <グループス腎炎患者における血中MCP-1濃度>

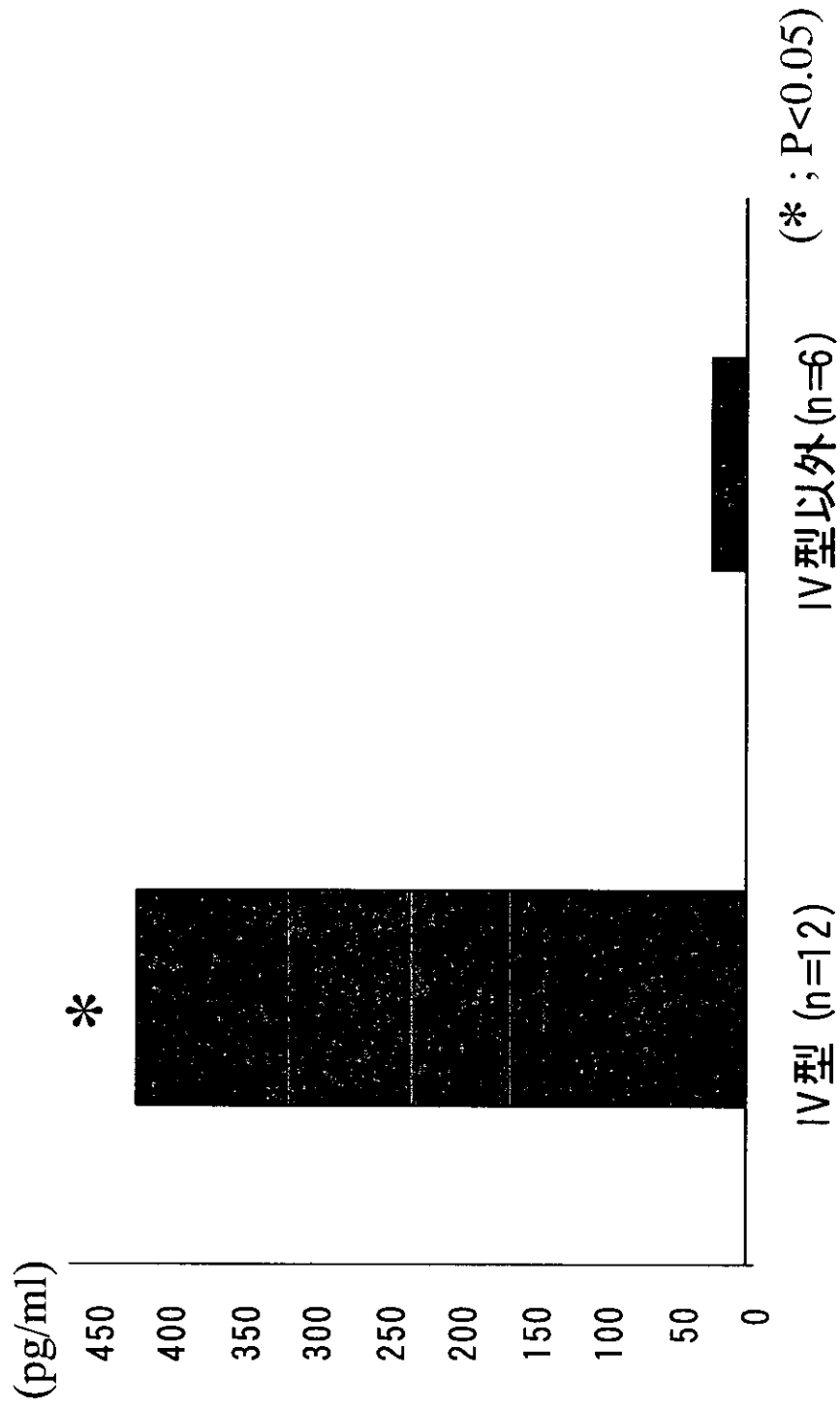
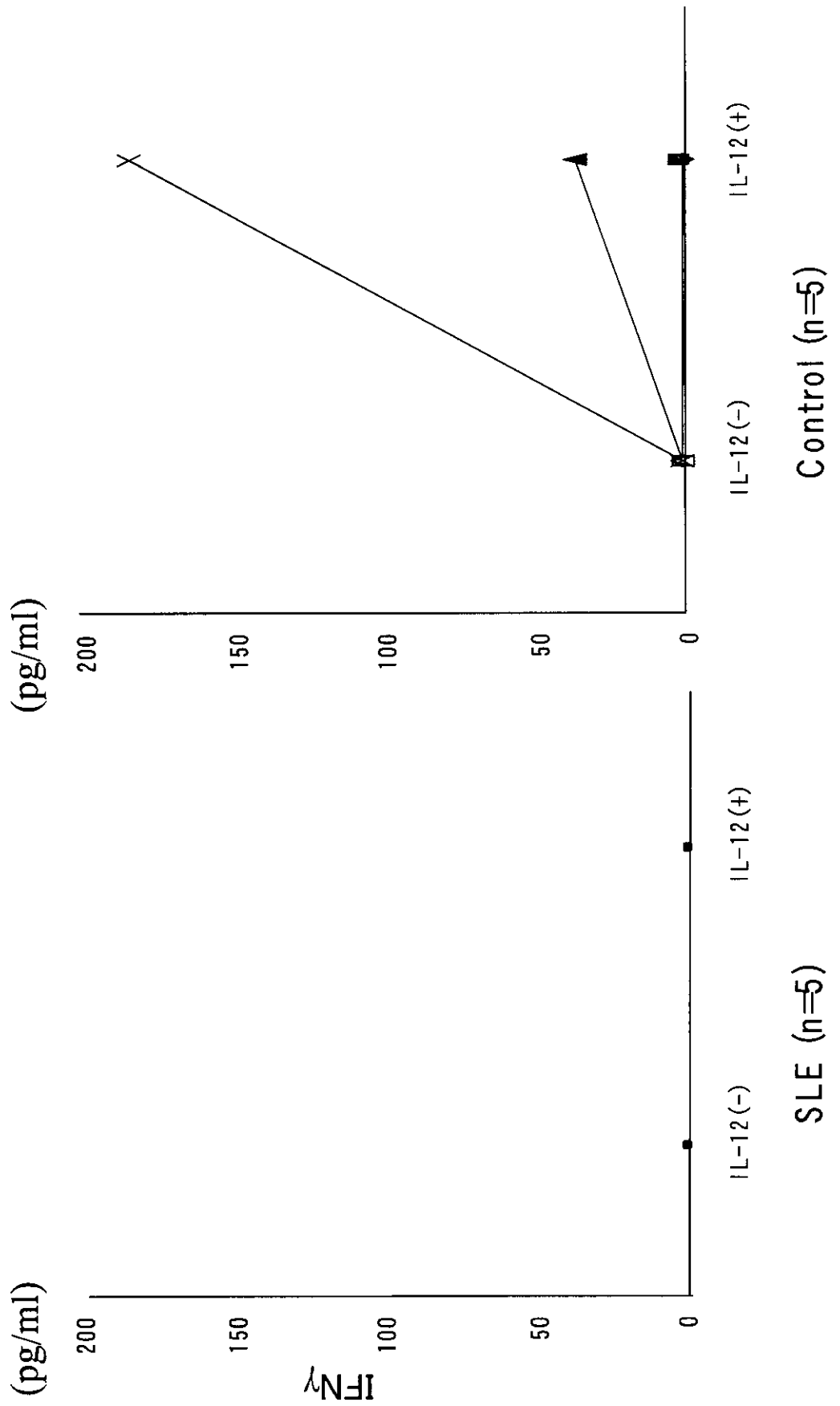


図4 <IL-12添加によるin vitroにおけるIFN $\gamma$ 産生能>



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

スタチン類の自己免疫疾患に対する治療に関する研究

養田清次（自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学講座）

**研究要旨**

スタチン類の多面的効果としての免疫抑制作用の解析について、今回はループスモデルマウス（MRL-lpr/lpr）に対して治療効果を示すか否かを検討した。フルバスタチン投与開始8週後ではコントロール群と比較して生存率の延長、尿一般検査で蛋白尿と潜血反応との改善、さらに血清BUNの正常化が認められた。フルバスタチンは、少なくとも短期的にはMRL-lpr/lprマウスに対して治療効果を示した。

**A 研究目的**

我々は自己免疫疾患に対する新たな治療薬の探究としてリンパ球にアポトーシス誘導作用を持つFTY720に着目し、ループスモデルマウスに投与したところ、治療効果を示したことを報告した（J Rheumatol 2002,29 707-16）。

スタチン類はHMG-CoA還元酵素抑制によるコレステロール低下作用以外にも様々な多面的効果（pleiotropic effect）を持ち、近年、免疫抑制作用を有すること注目されている。その機序としてMHC class IIの発現低下やLFA-1とICAM-1結合阻害を介する副刺激シグナルの抑制に基づくことが報告されている。我々はスタチン類の免疫抑制作用の機序をアポトーシス誘導作用の観点から研究を進め、脂溶性スタチンのフルバスタチンは活性化T細胞に対して*in vitro*でアポトーシス誘導能を有し、その機序としてprotein farnesylation阻害に基づくことを見い出した。今回はスタチン類かループスモデルマウス（MRL-lpr/lpr）に対して治療効果を示すか否かを検討した。

**B. 研究方法**

既に自己免疫病を発症している生後4か月齢のMRL-lpr/lprマウス計60匹をコントロール群、フルバスタチン投与群（10 mg/kg）、副腎皮質ステロイド投与群（10 mg/kg）の3群に分け、週3回腹腔内継続投与した。効果判定は生存率、尿一般検査（蛋白、潜血反応）、血清生化学検査（BUN、Cr、AST、ALT、CPK、T-chol）、血清Th1/Th2サイトカイン濃度、血清抗ds-DNA抗体価を指標にした。

**C 研究結果**

投与開始8週後の生存率はコントロール群（70%）、フルバスタチン投与群（95%）、副腎皮質ステロイド投与群（90%）であった。フルバスタチン投与群はコントロール群と比較して、尿検査で蛋白尿と潜血反応とか改善し、さらにコントロール群でみられた血清BUN上昇も観察されなかった。また血清INF- $\gamma$ の低下が認められた。今後はさらに経時的な腎機能検査、Th1/Th2サイトカイン定量、血清抗ds-DNA抗体価、さらに腎臓の病理組織学的検査を施行予定である。

## D 考察

フルハスタチンのループモデルマウス (MRL-lpr/lpr) に対する投与実験を遂行し、解析中である。投与8週後の観察では、生存率の上昇、腎機能障害の改善が認められた。副腎皮質ステロイド薬で治療中のリウマチ膠原病症例は高脂血症や動脈硬化を合併しやすく、予後に重大な影響を及ぼすことから、臨床的にスタチン類を併用することが多い。スタチン類の免疫抑制作用の解析により、スタチン類を自己免疫疾患に対する補助的な免疫調整薬として使用を試みる根拠となりうる。

## E . 結論

フルハスタチンは、少なくとも短期的にはループモデルマウス(MRL-lpr/lpr)に対して治療効果を示した。

## F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

## G 研究発表

### 1 論文発表

Horie, S , Nakada, K , Minota, S , Kano, S  
High proliferative potential  
colony-forming cells (HPP-CFCs) in the  
peripheral blood of rheumatoid arthritis  
patients with interstitial lung disease  
Scand J Rheumatol 32 273-276, 2003  
Yokota, S , Kubota, H , Matsuoka, Y ,  
Naitoh, M , Hirata, D , Minota, S ,  
Takahashi, H , Fujii, N , Nagata, K  
Prevalence of HSP47 antigen and  
autoantibodies to HSP47 in the sera of  
patients with mixed connective tissue  
disease Biochem Biophys Res Commun  
303 413-418, 2003

### 2. 学会発表

Nagashima, T , Okazaki, H , Hirata, D ,  
Iwamoto M , Matsuno, H , Kano, S , Minota,  
S Apoptosis of rheumatoid synovial cells  
by statins through blocking

protein-geranylgeranylation 第47回日本  
リウマチ学会総会、東京、平成15年4月24  
日

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

### 1 特許取得

特記すべきことはない。

### 2 実用新案登録

特記すべきことはない。

### 3. その他

(5) 研究成果の刊行に関する一覧表



## 6 研究成果に関する刊行物の一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuda S, Atsumi T Ieko M Matsuura E Kobayashi K Inagaki J Kato H, Tanaka H, Yamakado M Akino M Saitou H Amasaki Y Jodo S Amengual O, Koike T	Nicked beta2 glycoprotein I A marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis	Blood		in press	2004
Das H Atsumi T Fukushima Y Shibuya H, Ito K Amasaki Y Ichikawa K, Yamada Y, Koike T	Specificity of anti-agalactosyl IgG antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis	Clin Rheumatol		in press	2004
Sanchez ML Katsumata K Atsumi T Romero FI Bertolaccini ML Funke A Amengual O Kondeates E Vaughan RWW, Cox A Khamashta MA Hughes RV	Association of HLA DM polymorphism with the production of antiphospholipid antibodies	Ann Rheum Dis		in press	2004
Hashimoto S Kawata T Schnermann J Koike T	Chloride channel blockade attenuates the effect of angiotensin II on tubuloglomerular feedback inWKY but not spontaneously hypertensive	Kidney Blood Press Res	27	35-42	2004
Shimizu C Koike T	Double pituitary adenomas with distinct histological features and immunophenotypes	J Neurology Neurosurgery & Psychiatry	75	140	2004
Kubo M Shimizu C Kijima H Na gai S Koike T	Alternate promoter and 5' Untranslated exon usage of the mouse adrenocorticotropin receptor gene in adipose tissue	Endocrine J	51	25-30	2004
Li, N Nakamura K Jiang, Y, Tsurui H Matsuoka S Abe M Ohtsui M Nishimura H Kato K Kawai T At sumi T, Koike, T Shirai T Ueno H Hirose S	Gain of function polymorphism in mouse and human Ltk implications for the pathogenesis of lupus erythematosus	Hum Mol Genet	13	171-179	2004
Shimizu, C, Koike, T Sawamura, Y	Double pituitary adenomas with distinct histological features and immunophenotypes	J Neurosurg Psychiatry	75	140	2004
Endo T Nakao, S Koizumi, K, Nish io M Fujimoto K Sakai T Kuwan o K Obara M Koike T	Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein Barr virus and monoclonal gammopathy in a post -nonmyeloblastic stem cell transplant patient	Ann Hematol	83	114-116	2004
Nagasaka, K, Harigai M Tateishi M , Hara, M, Yoshizawa, Y, Koike, T, Miyasaka, N	Efficacy of combination treatment with cyclosporin A and corticosteroids for acute interstitial pneumonitis associated with dermatomyositis	Mod Rheumatol	13	231-238	2003
Amengual O Atsumi T Koike T	Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies	Arthritis Rheum	48	886-895	2003
Hashimoto S Shiroshita K Sakurai T, Takeda A, Kawata T, Koike T Sato H, Ueda T	Unilateral renal cortical necrosis with contralateral hydronephrosis after surgery for uterus carcinoma	Clin Exp Nephrol	7		2003
Higuchi M Ishizu A Ikeda H Hayase H Fugo K, Tsuji M, Abe A Sugaya T Suzuki A Takahashi T Koike T Yoshiki T	Functional alteration of peripheral CD25(+)CD4(+) immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases	J Autoimmun	20	43-49	2003
Kawakubo K Endo T Koizumi K, Nishio M Fujimoto K Sakai T Sawada K Koike T	Granular lymphocyte proliferative disorder after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma	Eur J Haematol	71	124-127	2003
Kobayashi K Kishi M Atsumi T	Circulating oxidized LDL forms	J Lipid Res	44	16-26	2003

Bertolaccini ML, Makino H, Sakari N, Yamamoto I, Yasuda T, Khamashta MA, Hughes GR, Koike T, Voelker DR, Matsuura E	complexes with beta2-glycoprotein I implication as an atherogenic autoantigen				
Koizumi K, Nakao S, Haseyama Y, Kato H, Ohi M, Motohara T, Endo T, Sawada K, Koike T	Severe aplastic anemia associated with thymic carcinoma and partial recovery of hematopoiesis after thymectomy	Ann Hematol	82	367-370	2003
Oku K, Atsumi T, Furukawa S, Horita T, Sakai Y, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Amengual O, Koike T	Cerebral imaging by magnetic resonance imaging and single photon emission computed tomography in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement	Rheumatology	42	73-777	2003
Sakai Y, Atsumi T, Itoh T, Koike T	Uveitis, pancarditis, haemophagocytosis and abdominal masses	Lancet	361	834	2003
Shoenfeld Y, Krause I, Kvapil F, Sulkes J, Lev S, Landenberg P, Font J, Zaech J, Cervera R, Piette J, Boffa M, Khamashta M, Bertolaccini M, Hughes G, Youinou P, Meroni P, Pengo V, Alves J, Tincani A, Szegedi G, Lakos G, Sturfelt G, Jonsen A, Koike T, Sanmarco M, Ruffatti A, Ulcova-gallova Z, Praprotnic S, Rozman B, Lorber M, Vriezman V	Prevalence and Clinical Correlations of Antibodies Against Six $\beta$ 2 Glycoprotein I Related Peptides in the Antiphospholipid Syndrome	J Clin Immunol	23	375	2003
Wu R, Shoenfeld Y, Sherer Y, Patnaik M, Matsuura E, Gilburd B, Koike T, Peter JB	Anti-idiotypes to oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations: possible immunomodulation of atherosclerosis	Autoimmunity	36	91-97	2003
Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T	TCR $\alpha$ mRNA with an alternatively spliced 3' untranslated region detected in systemic lupus erythematosus patients leads to the down regulation of TCR $\alpha$ and TCR-CD3 complex	J Immunol	171	2496-2503	2003
Suzuki A, Kaisho T, Ohishi M, Tsukio-Yamaguchi M, Tsubata T, Konishi P, Sasaki T, Mak TW, and Nakano T	Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination	J Exp Med	197	657-667	2003
Hokazono Y, Adachi T, Wabl M, Tada N, Amagasa T, and Tsubata T	Inhibitory co-receptors activated by antigens but not by anti-immunoglobulin heavy chain antibodies install requirement of co-stimulation through CD40 for survival and proliferation of B cells	J Immunol	171	1835-1843	2003
Hirai H, Adachi T, and Tsubata T	Involvement of cell cycle progression in survival signaling through CD40 in B lymphocyte line WEHI-231	Cell Death Differ	11	261-269	2004
Kawamura T, Kanai T, Dohi U, Uraushihara K, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Nakamura T, Higuchi T, Aiba Y, Tsubata T, and Watanabe M	Ectopic CD40 ligand expression on B cells triggers intestinal inflammation	J Immunol		In press	2004
Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N	Anti-interleukin 6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor (VEGF) production in rheumatoid arthritis	Arthritis Rheum	48	1521-1529	2003
Goya S, Matsuoka H, Mori M, Morishita H, Kida H, Kobashi Y, Kato T, Taguchi Y, Osaki T, Tachibana I, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kawase I, Hayashi S	Sustained interleukin 6 signaling leads to the development of lymphoid organ-like structures in the lung	J Pathol	200	82-87	2003

Nishimoto N Yoshizaki K Maeda K Kuritani T Deguchi H, Sato B Imai N Suemura M Kakei T Takagi N Kishimoto T	Toxicity, Pharmacokinetics, and Dose Finding Study of Repetitive Treatment with the Humanized Anti-Interleukin 6 Receptor Antibody MRA in Rheumatoid Arthritis	J Rheum	30	1426-1435	2003
Saeki Y, Mima T, Ishii T Ogata A Kobayashi H Oshima S Ishida I Tabunoki Y Kitayama H, Mizuki M, Takada Y, Asaoku H, Kitano M Nishimoto N Yoshizaki K Maeda M Kon S Kinoshita N Uede T Kawase I	Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathogenic implications	Br J Haematol	123	263-270	2003
Ito H Takazoe M Fukuda Y Hibi T Kusugami K Andoh A Matsumoto T Yamamura T, Azuma J Nishimoto N Yoshizaki K Shimoyama T Kishimoto T	A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin 6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease	Gastroenterol		in press	2004
Nishimoto N Yoshizaki K Miyasaka N Yamamoto K Kawai S Takeuchi T Hashimoto J Azuma J Kishimoto T	Treatment of Rheumatoid Arthritis with Humanized Anti-interleukin 6 Receptor Antibody	Arthritis Rheum		in press	2004
Mihara M Shiina M Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Akamatsu K	Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits murine AA amyloidosis	J Rheum		in press	2004
Kobayashi, M, Kimura, H, Liao, J, Abe, M, Hirose S, Tomino Y	Measurement of mouse urinary typeIV collagen using time resolved fluoroimmunoassay	Anal Science	19	205-210	2003
Matsuoka S Tsurui H Abe M Terashima, K, Nakamura, K, Hamano Y Ohtsui, M, Honma N, Saitzawa, I, Ishii, Y, Takiguchi, M, Hirose, S, Shirai, T	A monoclonal antibody to the $\alpha 2$ domain of murine major histocompatibility complex class I that specifically kills activated lymphocytes and blocks liver damage in the concanavalin A hepatitis model	J Exp Med	198	497-503	2003
Nakamura K, Xiu, Y, Ohtsui, M, Sugita G, Abe, M Ohtsui, N Hamano Y Jiang Y Takahashi N Shirai T Nishimura H Hirose, S	Genetic dissection of anxiety in autoimmune disease	Hum Mol Genet	12	1079-1086	2003
Fujimura S Kuwahara K Ezaki T Tomita K Hirose S Sakaguchi N	Spontaneous increase of plasma like cells with high GAMP expression in the extrafollicular region of lymphoid organs of autoimmune prone mice	Autoimmunity	20	291-301	2003
Iwai H Abe M Hirose S Tsushima, F Tezuka K Akiba H Yagita, H, Okumura K Miyasaka N Azuma M	Involvement of inducible costimulator B7 homologous protein costimulatory pathway in murine lupus nephritis	J Immunol	171	2848-2854	2003
Tsushima, F, Iwai, H, Otsuki N, Abe, M Hirose S, Yamazaki, T, Akiba H, Yagita, H Takahashi, Y Omura K Okumura K Azuma M	Preferential contribution of B7 H1 to programmed death—1 mediated regulation of hapten specific allergic inflammatory responses	Eur J Immunol	33	2773-2782	2003
Li N Nakamura K Jiang Y Tsurui H, Matsuoka S Abe, M Ohtsui, M, Nishimura H, Kato, K Kawai T Atsumi T Koike T Shirai T Ueno H Hirose S	Gain of function polymorphism in mouse and human <i>Ltk</i> implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus	Hum Mol Genet	13	171-179	2004
Tanimoto H, Shimoda S Nakamura M Ishibashi H Kawano A, Kamihira T Matsushita S Gershwin, M E and Harada M	Promiscuous T cells selected by E. coli antigen in primary biliary cirrhosis	J Autoimmunity	20	255-263	2003

Shimoda,S ,Nakamura,M , Ishibashi,H ,Kawano,A ,Kamihira T ,Sakamoto,N ,Matsushita,S , Tanaka,A ,Worman H J , Gershwin, M E and Harada, M	Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis	Gastroenterology	124	1915 1925	2003
Meguro,M ,Nishimura,F ,Ohyama H ,Takashiba,S ,Murayama Y and Matsushita, S	Ligation of HLA DR Molecules on Fibroblasts Induces Rantes Expression via c Jun N-terminal Kinase (JNK) Pathway	Cytokine	22	107-115	2003
Ohyama H Takeuchi,K ,Yamada H ,Uemura,Y and Matsushita,S	SNPs on IL 12 receptor gene associated with the susceptibility to leprosy	In US Japan Cooperative Medical Science Program	38	105-110	2003
Y Nonomura, H Kohsaka K Nagasaka, N Miyasaka	Gene transfer of a cell cycle modulator exerts anti-inflammatory effects in treatment of arthritis	J Immunol	171	4913- 4919	2003
K Nagasaka, M Harigai M Tateishi, M Hara Y Yoshizawa T Koike, N Miyasaka	Efficacy of combination treatment with cyclosporin A and corticosteroids for acute interstitial pneumonitis associated with dermatomyositis	Mod Rheumatol	13	231-238	2003
K Tsuchiya Y Kawano, T Kojima K Nagata, T Takao, M Okada, H Shinohra, K Maki, N Toyama Sorimachi, N Miyasaka, M Watanabe, H Karasuyama	Molecular cloning and characterization of TPP36 and its isoform TPP32, novel substrates of Abl tyrosine kinase	FEBS Letters	537	203-209	2003
H Iwai, M Abe, S Hirose F Tsushima K Tezuka, H Akiba H Yagita, K Okumura H Kohsaka, N Miyasaka M Azuma	Involvement of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulatory pathway in murine lupus nephritis	J Immunol	171	2848- 2854	2003
K Yamamoto, M Yamaguchi N Miyasaka, O Miura	SOCS-3 inhibits IL 12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor $\beta$ 2	Biochem Biophys Res Commun	310	1188 1193	2003
Higuchi, M Ishizu A , Ikeda, H , Hayase, H Fugo, K , Tsuji, M , Abe A Sugaya, T , Suzuki, A Takahashi T Koike, T , Yoshiki, T	Functional alteration of peripheral CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases	J Autoimmun	20	43-49	2003
Ishizu, A Tsuji T Abe, A , Saito, S Takahashi, T , Ikeda, H , Meruelo, D , Yoshiki T	Transduction of dominant negative ATF 1 suppresses the pX gene expression in joint fibroblastic cells derived from HTLV I transgenic rats	Exp Mol Pathol	74	309-313	2003
Kawada, M Ikeda, H , Takahashi, T , Ishizu A Ishikura, H , Katoh H , Yoshiki T	Vaccination of fusion cells of rat dendritic and carcinoma cells prevents tumor growth in vivo	Int J Cancer	105 4	520-526	2003
Nakaya, H Ishizu, A , Ikeda, H , Tahara M , Shundo, J , Itoh R Takahashi, T , Asaka, M , Ishikura, H Yoshiki, T	In vitro model of suicide gene therapy for alpha fetoprotein producing gastric cancer	Anticancer Res	23	3795- 3800	2003
Tsuchikawa, T , Ikeda, H , Kikuchi K , Tsuji, T , Baba T Ishizu A , Tanaka, Y , Kato, H , Yoshiki T	Hematopoietic progenitor cells as possible origins of epithelial thymoma in a human T lymphocyte virus type I pX gene transgenic rat model	Lab Invest	84	245-252	2004
Kazama JJ, Takahashi N, Ito Y Watanabe Y, Ino N Iguchi S, Oyanagi A, Obayashi H, Ito S, Maruyama H, Narita I, Yamamoto S, Sato Y Tsuchiya A, Ichida T, Gejyo F	Successful perioperative blood purification therapy in patients with maintanance hemodialysis therapy who underwent living donor liver transplantation	Clini Nephrol	59	229-233	2003
Kobayashi T, Ito S Yamamoto K, Hasegawa H, Sugita N, Kuroda T Kaneko S, Narita I Yasuda K Nakano M, Gejyo F, Yoshie H	Risk of Periodontitis in Systemic Lupus Erythematosus is Associated with Fcg Receptor Polymorphisms	J Periodontology	74	378-384	2003