

機能の異常を検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は SSc 41 例（女性 39 例、男性 2 例）であり、年齢は 47 ± 13 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 19 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 22 例であった。15 例の dSSc と 2 例の lSSc 患者には、少量のステロイド内服（平均 8.9 mg/日）が行われていた。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 12 例、抗セントロメア抗体陽性例が 18 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 3 例、抗 U3RNP 抗体陽性例が 3 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 3 例、Th/To 抗体が 1 例、残り 1 例では抗核抗体は陰性であった。18 例の SLE 患者および 18 例の健常人をコントロールとして用いた。

2) フローサイトメトリー

PE 標識抗 CD19 抗体 (B4, Beckman Coulter Inc., Miami, FL) と FITC 標識抗 CD27 抗体 (M-T271, BD PharMingen, San Diego, CA) を用いて 2 重染色を行った。活性化マーカーの解析には、peridinin chlorophyll protein 標識抗 CD19 抗体 (Leu-12, BD PharMingen)、FITC 標識抗 CD27 抗体 (M-T271, BD PharMingen)、PE 標識抗 CD80 抗体 (MAB104, Beckman Coulter, Inc.)、抗 CD86 抗体 (Ancell, Bayport, MN) あるいは抗 CD95 抗体 (UB2, Beckman Coulter, Inc.) を用いた 3 重染色を行った。

ヘパリン存在下で全血を採取し、4℃にて上記抗体と 20 分間反応させた。赤血球は Coulter Whole Blood Immuno-Lyse キット (Beckman Coulter, Inc.) にて溶解した。染色した細胞は FACScan flow cytometer (BD PharMingen) にて解析した。CD95 発現の解析には 15 例の SSc 患者 (lSSc 11 例、dSSc 4 例) および 14 例の健常人、CD80、CD86 発現解析には 11 例の SSc 患者 (lSSc 8 例、dSSc 3 例) および 9 例の健常人を用いた。これらの患者にはステロイド、免疫抑制剤、D-ペニシラミンの投与はなかった。

3) B 細胞アポトーシスの検出

早期のアポトーシスはアネキシン V による染色で検出した (BD PharMingen)。末梢血単核球を分離し、10% 仔牛血清を含んだ RPMI 1640 で 37℃、5 あるいは 24 時間培養した。回収した細胞は PE 標識アネキシン V、peridinin chlorophyll protein 標識抗 CD19 抗体 (Leu-12, BD PharMingen)、FITC 標識抗 CD27 抗体 (M-T271, BD PharMingen) にて 3 重染色を行った。対象は無治療の 6 例の SSc 患者 (lSSc 3 例、dSSc 3 例) および 6 例の健常人とした。

4) IgD⁻メモリー B 細胞の分離

IgD⁻ B 細胞は B cell negative isolation キット (Dynal Inc., Lake Success, NY) および抗 IgD 抗体 (IA6-2, BD PharMingen) にて単離した。IgD⁻ B 細胞は CD27⁺メモリー B 細胞の約 70% を占め、IgM⁺ IgD⁻、IgG⁺ IgD⁻、および IgA⁺ IgD⁻メモリー B 細胞を含むが、IgM⁺ IgD⁺メモリー B 細胞は含まない¹⁾。

5) IgD⁻メモリーB細胞によるIgG産生

精製したIgD⁻メモリーB細胞を0%仔牛血清を含んだRPMI 1640で37°C、8日間培養した。IgD⁻メモリーB細胞は0.01% *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC)とIL-2 (50 U/ml)あるいは抗CD40抗体(1 µg/ml; mAb89, Beckman Coulter, Inc.)とIL-10 (50 ng/ml)で刺激した。培養上清中のIgG濃度はELISAにて測定した。対象は無治療の6例のSSc患者 (ISSc 3例, dSSc 3例) および6例の健常人とした。

C. 研究結果

1) SScにおけるB細胞頻度と絶対数 (図1)

ステロイド内服によるB細胞ホメオスタシスに対する影響を評価するために、SSc患者は3群に分類された。すなわち、7例の無治療dSSc患者、17例の無治療ISSc患者、17例の少量ステロイド内服SSc患者 (dSSc 15例, ISSc 2例) に分類した。無治療のdSSc, ISSc患者のB細胞頻度および絶対数は健常人に比べ有意に増加していた。dSScとISScの間に差はなかった。ステロイド内服は無治療患者と比較して、B細胞頻度および絶対数を有意に減少させた。SLE患者ではB細胞の頻度は正常であったが、リンパ球減少によってB細胞数も有意に減少していた。このように、SScではB細胞数が軽度増加していた。

2) SScにおける各B細胞サブセットの頻度と絶対数 (図2、3)

無治療のdSSc, ISSc患者のCD27^{hi}ナイーブB細胞の頻度および絶対数は、健常人より有意に増加していた。ステロイド内服は無治

療患者と比較して、ナイーブB細胞頻度には影響を与えなかったが、絶対数を有意に減少させた。SLE患者ではナイーブB細胞の頻度は正常であったが、B細胞数減少によってナイーブB細胞数は有意に減少していた。

ナイーブB細胞とは対照的に、無治療のdSSc, ISSc患者のCD27^{med}メモリーB細胞の頻度および絶対数は、健常人より有意に減少していた。ステロイド内服によっても、無治療患者と比較して、メモリーB細胞頻度は減少したままであったが、絶対数はさらに減少した。SLE患者ではメモリーB細胞の頻度は正常であったが、メモリーB細胞数は有意に減少していた。

メモリーB細胞と同様に、無治療のdSSc, ISSc患者のCD27^{hi}プラズマプラストの頻度および絶対数は、健常人より有意に減少していた。ステロイド内服によって、無治療患者と比較して、プラズマプラスト頻度は有意に増加したが、その絶対数は減少したままであった。SLE患者ではプラズマプラストの頻度は健常人と比較して有意に増加していたが、プラズマプラスト数は減少したままであった。無治療のISSc患者と無治療のdSSc患者の間には、各B細胞サブセットの頻度、絶対数について有意な差は認められなかった。このように、SScではナイーブB細胞の頻度が増加しており、一方メモリーB細胞やプラズマプラストの頻度は減少していた。

3) B細胞サブセット上のCD19発現量の解析 (図2、4)

CD19はB細胞受容体からのシグナルを増強するシグナル伝達分子である⁹⁾。以前

に SSc 由来 B 細胞上の CD19 発現量は増加しており、同程度に CD19 の発現量を増加させた CD19 トランスジェニックマウスでは、様々な自己抗体の産生がみられることが報告されている¹⁰⁾。さらに、SSc のモデルマウスでも CD19 の、自己免疫と皮膚硬化への関与が示唆されている¹¹⁾。そこで、各 B 細胞サブセットにおける CD19 発現量を解析した。

治療の有無に拘わらず、dSSc、ISSc 患者のナイーブ B 細胞およびメモリー B 細胞上の CD19 発現量は、健常人より有意に増加していた。対照的に、SLE 患者ではナイーブ B 細胞およびメモリー B 細胞上の CD19 発現量は有意に低下していた。プラズマブラスト上の CD19 発現量は、ナイーブ B 細胞およびメモリー B 細胞と比較して減少していたが、その発現量は無治療の dSSc 患者、無治療の ISSc 患者、ステロイド治療を受けている SSc 患者、SLE 患者の間で有意な差はなかった。さらに、各群において、メモリー B 細胞における CD19 発現量は、ナイーブ B 細胞と比較して、10~15%増加していた。このように、SSc ではメモリー B 細胞でも CD19 発現量が亢進していた。

4) メモリー B 細胞上の活性化マーカーの発現量の解析 (図 5)

SSc 由来メモリー B 細胞が in vivo で活性化されているかどうかを、CD80、CD86、CD95 などの活性化マーカーの発現量を検討することによって解析した。無治療の SSc 患者では、CD27⁺ B 細胞 (CD27^{med} メモリー B 細胞の約 95%を占める)における、CD80、

CD86、CD95 陽性細胞の頻度は、健常人と比較して有意に増加していた。対照的に CD23、CD62L、CD69、HLA-DR の発現量は正常であった。従って、SSc 由来メモリー B 細胞は in vivo で活性化していると考えられた。

5) メモリー B 細胞のアポトーシス (図 6)

CD95 発現量は B 細胞の活性化とともに増加し、T 細胞上の FasL と結合することによって、B 細胞に CD95 を介するアポトーシス (activation-induced cell death) が誘導され、これは過剰な B 細胞活性化を抑制するために重要なフィードバック機構であることが知られている¹²⁾。SSc 由来メモリー B 細胞上の CD95 発現量が増加していたことから、SSc 由来メモリー B 細胞ではアポトーシスが亢進しており、その結果、血液中のメモリー B 細胞が減少した可能性が考えられた。そこで、無刺激下で SSc 由来メモリー B 細胞のアポトーシスが亢進しているかどうかを検討した。5 時間後のアポトーシスについては、SSc と健常人の間で差はなかったが、24 時間後では SSc 由来メモリー B 細胞でアポトーシスの頻度が有意に増加していた。従って、SSc 由来メモリー B 細胞ではアポトーシスが亢進していることが明らかとなった。

6) メモリー B 細胞による IgG 産生 (図 7)

SSc では高 γ -グロブリン血症はしばしば認められる免疫学的異常である¹³⁾。そこで、SSc ではメモリー B 細胞は減少しているものの、その IgG 産生能は亢進しているかどうかを解析した。SAC と IL-2、抗 CD40 抗体と IL-10 のいずれで刺激した場合でも

SSc 由来メモリーB細胞は健常人と比較して IgG 産生は増強していた。従って、SSc 由来メモリーB細胞はその数は減少していたものの、IgG 産生は亢進しているため、SSc では高 γ -グロブリン血症を来すものと考えられた。

D. 考 案

以上の結果より SSc におけるB細胞サブセットおよびその機能異常を以下にまとめた。SSc ではメモリーB細胞は CD19 や活性化マーカーである CD80、CD86 の発現が増加し、慢性的に *in vivo* で活性化していた。さらに、メモリーB細胞による IgG 産生も亢進していた。このため、SSc ではメモリーB細胞やプラズマブラストが減少しているにも拘わらず、高 γ -グロブリン血症が生じると考えられた。通常、B細胞が活性化すると、異常な活性化を抑制するため、CD95 の発現が増強しアポトーシスが誘導されることが知られている¹²⁾。同様に、SSc 由来B細胞でも CD95 の発現が増加し、その結果アポトーシスが強く誘導されていた。SSc で血液中のメモリーB細胞が減少していたのは、このアポトーシスが亢進しているためと考えられた。また、SSc ではメモリーB細胞とプラズマブラストが減少しているため、骨髄よりナイーブB細胞の供給が増加し、その結果ナイーブB細胞の増加が生じたものと考えられた。このように、SSc 由来B細胞ではそのホメオスタシスや機能に異常が認められることが明らかとなり、これは SSc においてB細胞が治療のターゲットとなりうる可能性を示唆し

ている。

E. 結 論

SSc には CD19 発現亢進に基づくと考えられる内在性のB細胞サブセットや機能の異常が存在しており、その病態形成にB細胞の関与が示唆された。

F. 文 献

1. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers. 1998. Human immunoglobulin (Ig)M⁺IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* 188:1679.
2. Agematsu, K., S. Hokibara, H. Nagumo, and A. Komiyama. 2000. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol. Today* 21:204.
3. Tangye, S. G., Y. J. Liu, G. Aversa, J. H. Phillips, and J. E. de Vries. 1998. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* 188:1691.
4. Odendahl, M., A. Jacobi, A. Hansen, E. Feist, F. Hiepe, G. R. Burmester, P. E. Lipsky, A. Radbruch, and T. Dorner. 2000. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic

- lupus erythematosus. *J. Immunol.* 165:5970.
5. Arce, E., D. G. Jackson, M. A. Gill, L. B. Bennett, J. Banchereau, and V. Pascual. 2001. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 167:2361.
 6. Jacobi, A. M., M. Odendahl, K. Reiter, A. Bruns, G. R. Burmester, A. Radbruch, G. Valet, P. E. Lipsky, and T. Dorner. 2003. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48:1332.
 7. Hansen, A., M. Odendahl, K. Reiter, A. M. Jacobi, E. Feist, J. Scholze, G. R. Burmester, P. E. Lipsky, and T. Dorner. 2002. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 46:2160.
 8. Bohnhorst, J. O., M. B. Bjorgan, J. E. Thoen, J. B. Natvig, and K. M. Thompson. 2001. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* 167:3610.
 9. Tedder, T. F., M. Inaoki, and S. Sato. 1997. The CD19/21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 6:107.
 10. Sato, S., M. Hasegawa, M. Fujimoto, T. F. Tedder, and K. Takehara. 2000. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J. Immunol.* 165:6635.
 11. Saito, E., M. Fujimoto, M. Hasegawa, K. Komura, Y. Hamaguchi, Y. Kaburagi, T. Nagaoka, K. Takehara, T. F. Tedder, and S. Sato. 2002. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J. Clin. Invest.* 109:1453.
 12. Wang, J., and T. Watanabe. 1999. Expression and function of Fas during differentiation and activation of B cells. *Intern. Rev. Immunol.* 18:367.
 13. Fleischmajer, R., J. S. Perlish, and J. R. T. Reeves. 1977. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum.* 20:975.

G. 研究発表

1. 論文発表

S. Sato, M. Fujimoto, M. Hasegawa, and K. Takehara: Altered Blood B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Sclerosis: Expanded Naive B Cells and Diminished but Activated Memory B cells. Arthritis Rheum. (in press).

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

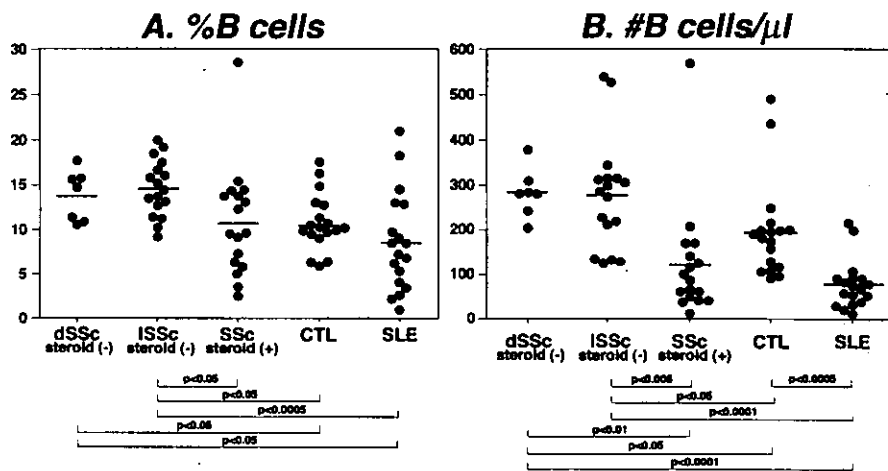


図1：無治療 dSSc、無治療 ISSc、ステロイド少量内服を受けている SSc、SLE、健常人 (CTL) における B 細胞頻度と絶対数

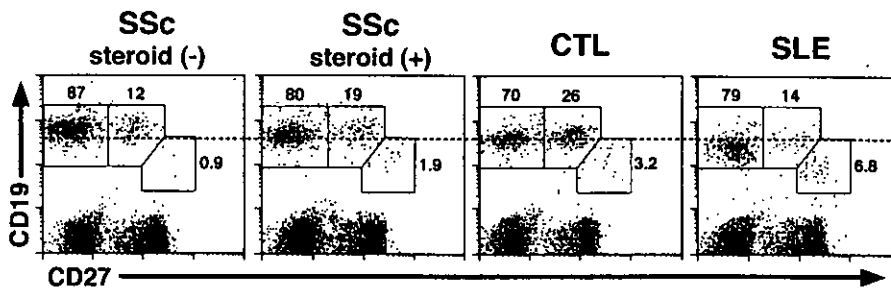


図2：無治療 dSSc、無治療 ISSc、ステロイド少量内服を受けている SSc、SLE、健常人 (CTL) における各 B 細胞サブセットの頻度および CD19 発現量 (点線を参照) の比較

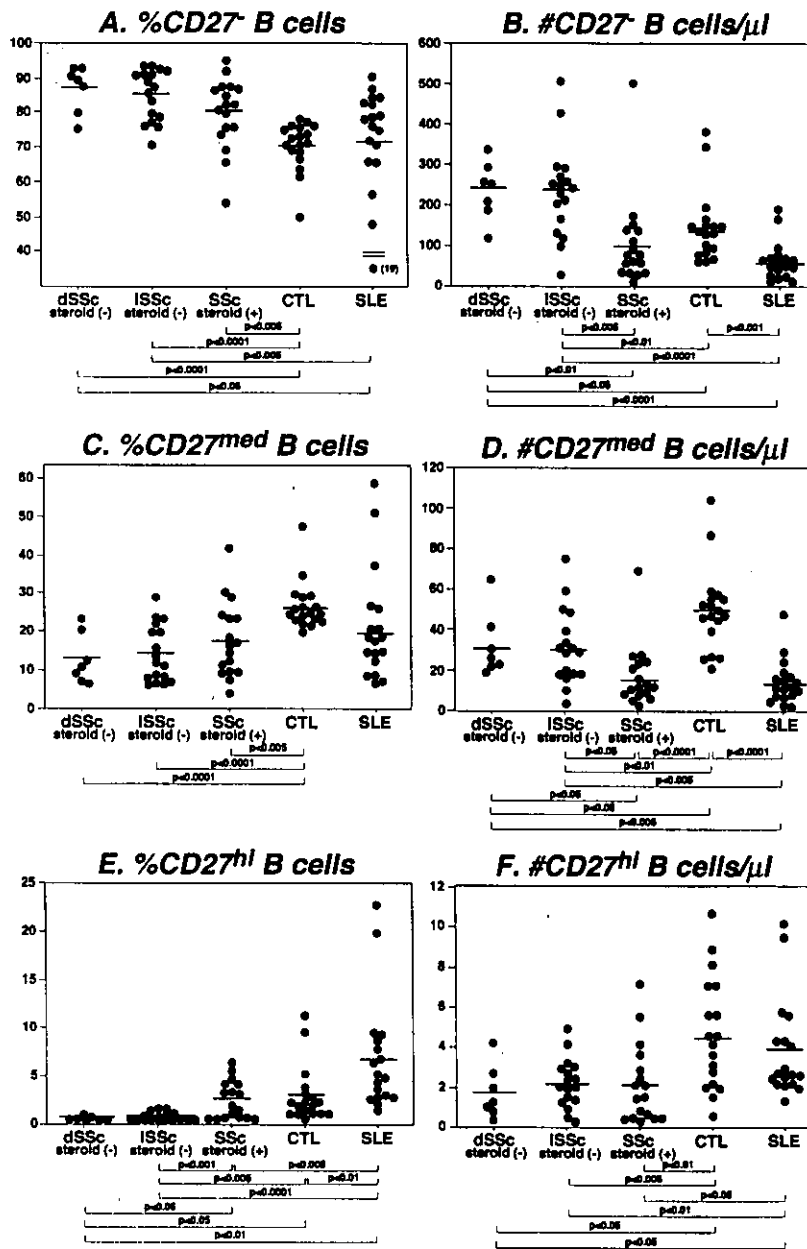


図3：無治療 dSSc、無治療 ISSc、ステロイド少量内服を受けている SSs、SLE、健常人 (CTL) における各 B 細胞サブセットの頻度と絶対数

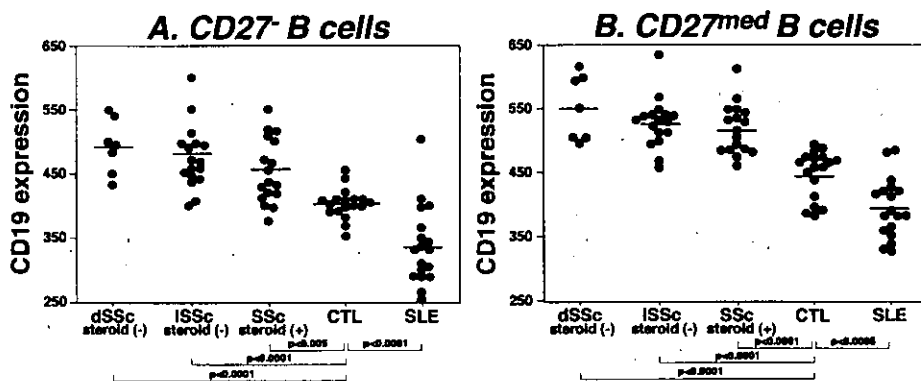


図4：無治療 dSSc、無治療 ISSc、ステロイド少量内服を受けている SSs、SLE、健常人 (CTL) における、ナイーブ B 細胞およびメモリー B 細胞の CD19 発現量

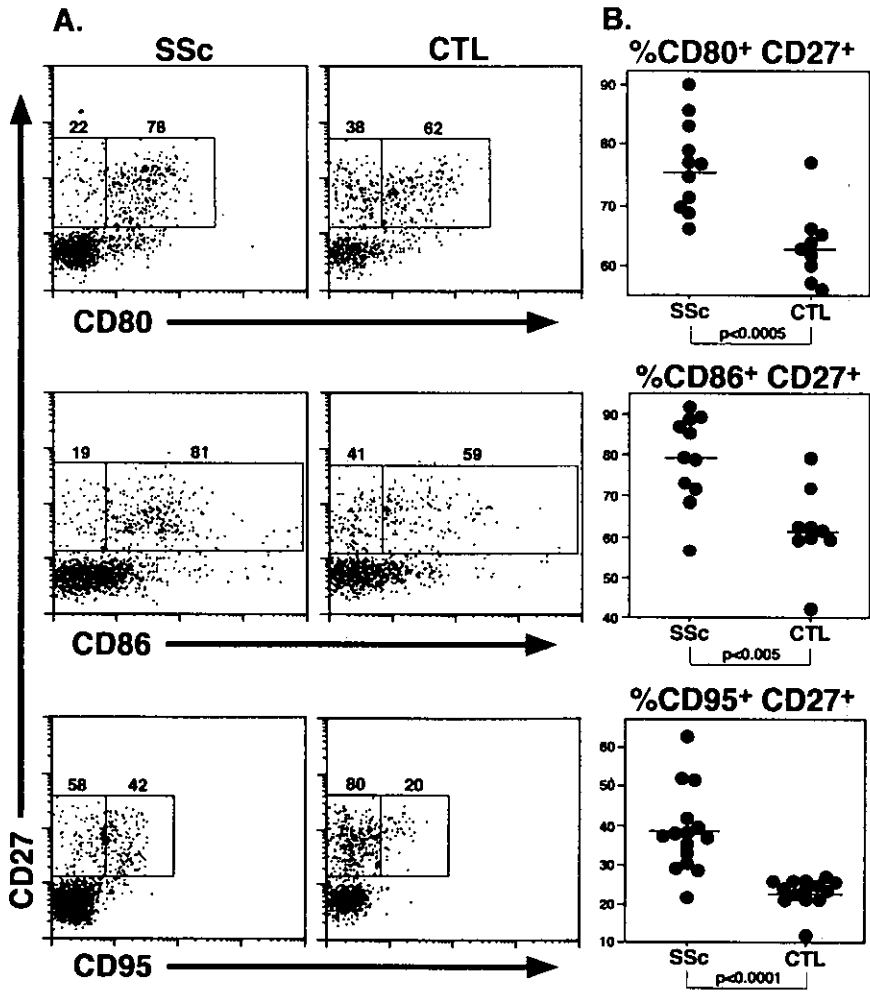


図5：無治療SSc、健常人 (CTL) のメモリーB細胞におけるCD80、CD86、CD95の発現量

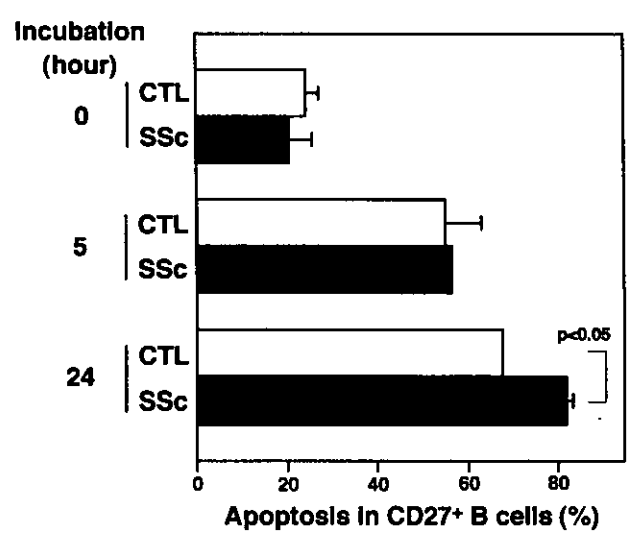


図6：無治療SSc、健常人 (CTL) のメモリーB細胞におけるアポトーシスの頻度

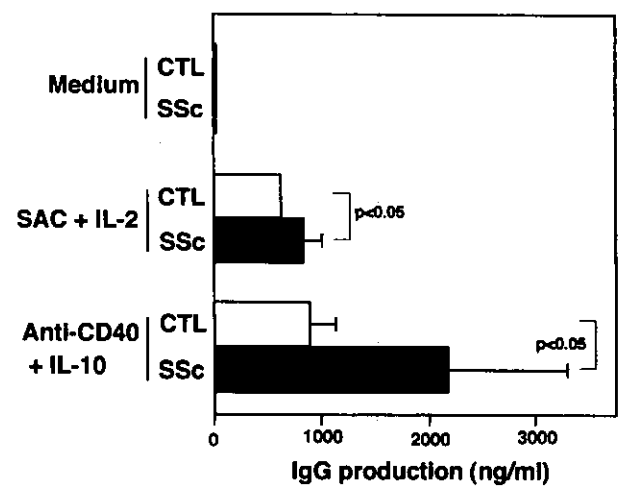


図7：無治療SSc、健常人 (CTL) のメモリーB細胞によるIgG産生能

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

B リンパ球における RP105 シグナル伝達経路の解析

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 矢澤徳仁 東京大学医学部附属病院皮膚科助手

協力者 審良静男 大阪大学微生物学研究所教授

協力者 三宅健介 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

強皮症をはじめとする自己免疫疾患では自己反応性リンパ球や自己抗体の出現が認められ、リンパ球シグナルの質的な異常の存在が示唆されている。中でも RP105 の発現の異常が全身性エリテマトーデスなどで注目されている。RP105 は TLR ファミリーに属する分子で、B 細胞における LPS の認識とシグナル伝達に重要な役割をもっている。そこで RP105 のシグナル伝達分子メカニズムを検討した。RP105 シグナルには CD19 が重要な役割を担っており、CD19 は Lipid rafts 内で RP105 受容体依存性で Toll-like receptor 4 受容体非依存性にチロシンリン酸化され、さらに Lyn と Vav の活性化を増幅することによって JNK 活性化を特異的に制御し、LPS による B 細胞活性化を調節していることが示された。

A. 研究目的

強皮症をはじめとする自己免疫疾患では自己反応性リンパ球や自己抗体の出現が認められ、リンパ球の質的な異常の存在が示唆されている。リンパ球は抗原受容体からのシグナルに反応して活性化されるが、その反応性は同時に入力される他のシグナルにより規定される。近年、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患で B 細胞表面分子である RP105 の発現異常が注目されている^{1,2}。RP105 は TLR ファミリーに属する分子で、B 細胞における LPS の認識に重要な役割をもっていると考え

られている。RP105 (CD180) は 105kDa の I 型膜蛋白で、放射線によるアポトーシスに抵抗性を示す (radio protective) B 細胞表面分子として三宅らにより同定された³。RP105 は細胞表面で MD1 と複合体を形成しており、MD1 は RP105 の発現および LPS の認識に重要な役割をもっている⁴。RP105 は TLR ファミリーに特徴的な細胞外領域構造であるロイシンリッチリピートを有しているが、細胞内領域には他の TLR がもつような細胞内シグナル伝達に関与している IL-1 レセプター類似の TIR ドメインをもたず、細胞内領域は非

常に短く 11 アミノ酸基のみからなっている。このため、他の TLR ファミリーとは異なる細胞内シグナル伝達経路を有することが予想されていた。B 細胞を抗 RP105 抗体で刺激すると Src ファミリーチロシンキナーゼである Lyn の活性化が誘導されることから、CD19 や Btk など B 細胞抗原受容体 (BCR) シグナル伝達にかかわる分子が活性化される可能性が考えられる。そこで、LPS シグナルを担い自己免疫病態に関与する可能性のある RP105 の細胞内シグナル伝達機構を検討した。

B. 研究方法

1) 動物

動物は C57BL/6 マウス, CD19 ノックアウトマウス (C57BL/6 系統), C3H/HeJ, C3H/HeN マウスを使用した。マウスは当研究所の動物施設において specific pathogen free の環境で飼育し, 8 週齢のマウスを実験に用いた。B 成熟リンパ球の形質をもつリンパ芽球細胞の cell line である A20 細胞株は, 10%FCS、抗生物質、グルタミン、2 メルカプトエタノール加 RPMI1640 培地にて培養した。

2) B 細胞の精製, 活性化, 免疫沈降

B 細胞は脾臓からの single cell suspension より, 抗 Thy1.2 抗体がコートされた磁気ビーズを用いて T 細胞を除去することにより精製した。B 細胞の精製率はフローサイトメトリーにて 95%以上 (B220 陽性細胞) であった。

B 細胞は RPMI1640 培地中で 37°C に加温した後, 抗マウス RP105 抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) で一定時間刺激し, 4°C で細胞を遠心, 溶解バッ

ファー (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Na orthovanadate, 2 mM EDTA, 50 mM NaF および蛋白分解酵素阻害剤) にて細胞を溶解した。溶解液は SDS-PAGE あるいは免疫沈降に用いた。免疫沈降は, 細胞溶解液をマウスないしウサギ IgG およびプロテイン G 結合アガロースビーズで非特異反応を吸収した後, 適当な抗体とプロテイン G ビーズを混合し, 4~6 時間程度反応させた。ついで, ビーズを溶解バッファーにて 4 回洗浄し, SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解した。CD19 の免疫沈降には抗マウス CD19 モノクローナル抗体を Affi-gel (Bio-Rad 社) に結合させたものを使用した。

4) 免疫プロット法

細胞溶解液あるいは沈降させた蛋白は SDS-PAGE により分離し, ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜はペルオキシダーゼ標識抗リン酸化チロシン抗体 (4G10: Upstate Biotechnology 社; PY99: Santa Cruz Biotechnology 社) または適当な抗体とペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス/ウサギ IgG 抗体で反応させた。これらのプロットは enhanced chemiluminescence キット (Pierce 社) を用いて発色させた。各レーンの蛋白量が等しいことを確認するため, あるいは結合している別の蛋白を検出するために, プロット後抗体をはがし, 適当な抗体で再度プロットを行った。

5) 細胞内カルシウム濃度測定

脾細胞に 1 μM の indo-1-AM ester (Molecular

Probes) を 37°C で 30 分間とりこませた後、FITC 標識抗 B220 抗体と 15 分間反応させた。UV レーザーで励起したときの B220 陽性細胞における蛍光波長の比 (488/407 nm) を Epics Altra flow cytometer (Beckman Coulter) で測定した。測定開始 1 分後に抗マウス RP105 抗体 (10 µg/ml) を添加した。結果は 15 秒間の蛍光比の平均を求めることにより表わした。

6) 統計

サンプル間の平均値の差の有意差の検定には Student's *t* test を用いた。

C. 研究結果

B 細胞には LPS 受容体として Toll-like receptor 4 (TLR4) と RP105 (CD180) の二つが発現していることがこれまでに知られている。TLR4 シグナルを制御する分子 MyD88 を欠損した B 細胞は LPS 刺激に対しては増殖反応が消失していたのに対し、RP105 刺激に対しては正常な反応を示した (図 1)。一方、CD19 欠損 B 細胞は LPS 刺激と RP105 刺激の両者に対して同程度に減弱した反応を呈した (図 1)。そこで CD19 は RP105 を介して LPS シグナルを制御しているという仮説のもとにそのシグナル伝達機構を解析した。CD19 は野性型 B 細胞において LPS, 抗 RP105 抗体のどちらの刺激によってもチロシンリン酸化が誘導された (図 2)。このリン酸化は、LPS の RP105 への結合を競合的に阻害する抗 MD1 抗体によって完全に抑制されたが (図 2)、一方 TLR4 受容体に変異があり TLR4 を介した活性化が完全に障害されている

C3H/HeJ マウス由来の B 細胞では正常に認められた。したがって、CD19 のリン酸化は TLR4 非依存性で RP105 依存性であることが明らかになった。CD19 のチロシンリン酸化は刺激後約 20 分で最大に達し、その後も長時間にわたりリン酸化が残存した。また、スクロースによる密度勾配遠心法により CD19 と RP105 はともに刺激後に Triton X 不溶性画分に検出され、刺激に伴って Lipid rafts に移行することが示された。

さらに、CD19 のチロシンリン酸化の意義について解析した。CD19 陰性 A20 細胞では抗 RP105 抗体刺激によって誘導される細胞内チロシンリン酸化が全体として減弱しており、特に Src-family チロシンキナーゼの Lyn の活性化および Vav のチロシンリン酸化が野生型に比べ著明に減弱していた (図 3)。さらに、CD19 ノックアウトマウス脾臓 B 細胞および CD19 陰性 A20 細胞ではそれぞれ野性型細胞に比べて MAP キナーゼのファミリーである Extracellular-signal regulated kinase (ERK) の活性化は正常に誘導されたが、一方 c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が著明に障害されており、CD19 は LPS 刺激において RP105 受容体を介しておこる JNK の活性化経路を制御していることが示された (図 4)。

次に抗 RP105 抗体刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を解析した。抗 RP105 刺激により B 細胞の細胞内カルシウム濃度は徐々に増加し、約 5 分で最高に達し、その濃度が維持される。この反応パターンは LPS あるいは抗 RP105 抗体刺激で Syk の活性化

が誘導されないことを反映していると考えられる。CD19 ノックアウトマウス由来の B 細胞では抗 RP105 抗体架橋による細胞内カルシウム濃度の上昇が野生型にくらべて緩徐であり、最高濃度に達するまでに約 8 分を要した、最終的には野生型と同じレベルにまで達した。一方、この細胞内カルシウム濃度上昇は野生型、CD19 欠損 B 細胞ともに PI3 キナーゼの阻害剤である Wortmannin および LY294002 により完全に抑制された (図 5)。しかしながらこれらの阻害剤は JNK の活性化には全く影響を与えなかった。他方、CD19 欠損細胞では Akt の活性化はほぼ正常であり、CD19 と PI3 キナーゼは独立した経路を制御していることが示唆された。野生型マウス B 細胞に比べて細胞内カルシウム濃度の上昇が約 50%大きくなっていった。

D. 考案

B 細胞に発現する LPS 受容体として、TLR4 と MD2 の複合体および Toll-like receptor family に属する RP105 と MD1 の複合体が知られている。TLR4/MD2 複合体はマクロファージをはじめとした種々の細胞に共通して発現するが、RP105/MD1 複合体は B 細胞に特異的に発現している。TLR4 ノックアウトマウス由来の B 細胞では LPS に対する応答が全く欠落し、RP105 ノックアウトマウス由来の B 細胞でも著明に障害される。TLR4 からのシグナルを伝達する経路として、アダプター蛋白の MyD88 および IRAK を介する経路や別のアダプター蛋白である TIRAP を介する経路が知られているが、本研究により膜局

在アダプター蛋白として働く B 細胞特異的分子の CD19 は LPS による B 細胞活性化を RP105 からのシグナル伝達に関与することにより制御していることが明らかになった。B 細胞シグナル分子の欠損マウス、例えば PI3 キナーゼ、Btk, BLNK, PLC γ 2 などの欠損マウス B 細胞は種々の程度で LPS に対する応答性が低下していることがこれまでに示されているが、これらの分子も CD19 と同様に RP105 からのシグナル伝達に関与している可能性が強く示唆される。しかしながら、その経路について CD19 は JNK 活性化を、PI3 キナーゼは細胞内カルシウム動員というように異なる経路を独立して制御していることが明らかになった。もちろん CD19 欠損細胞ではカルシウム濃度の上昇が遅延していたことは CD19 も独自のメカニズムでカルシウム調節に関与していることを示唆している。

B 細胞抗原受容体シグナル伝達においても、PI3 キナーゼ、Btk, BLNK, PLC γ 2 はいわゆる "signalosome" としてカルシウムの調節に必須の役割をもつ一連の分子群であり、一方 CD19 は Lyn や Vav, CD22 などの活性化を制御することにより B 細胞活性化閾値を設定する働きがあるが⁵、LPS シグナルにおいてもこれらの分子は類似した役割分担をしている可能性が考えられる。このように B 細胞特異的 LPS 受容体である RP105 は、MyD88 などを用いる universal な TLR4 シグナル経路と異なり、B 細胞特異的分子を利用していることは非常に興味深い。

B 細胞においては RP105 は強く発現しているが、TLR4 の発現は非常に弱い。にもかか

わらず、TLR4 欠損 B 細胞では LPS による細胞増殖が消失していることから、この二つの LPS 受容体は重複した機能をもっているのではなく、むしろ双方の存在がどちらも必要であり、一方が欠けた状態では正常にシグナルが伝達されないと考えられる。今後、この分子メカニズムについてさらに明らかにする必要がある。

E. 結論

B 細胞は抗原受容体を介した抗原認識による獲得免疫において主要な役割を果たすとともに、自然免疫においても Toll-like receptor を介した菌体成分認識機構により迅速な IgM 産生が可能となり、自然免疫においても重要な役割を担っている。B 細胞には LPS を認識する受容体として TLR4 の他に B 細胞特異的な RP105 を発現しており、その両者が協調して作用すると推定される。本研究により特にその RP105 受容体のシグナル伝達が CD19 により担われていることがはじめて明らかにされた。CD19 は補体受容体である CD21 と複合体を形成し、補体シグナルをも制御していることから、in vivo では抗原、LPS などのいわゆる pathogen-associated molecular pattern, 補体などが互いに作用しながら B 細胞の活性化を規定すると考えられる。今後 B 細胞における TLR 受容体を介するシグナル伝達機構についてさらに詳細な解析をおこないたい。

F. 文献

1. Koarada S, Tada Y, Ushiyama O, Morito F, Suzuki N, Ohta A, Miyake K, Kimoto M,

Nagasawa K. B cells lacking RP105, a novel B cell antigen, in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2593-2600.

2. Kikuchi Y, Koarada S, Tada Y, Ushiyama O, Morito F, Suzuki N, Ohta A, Miyake K, Kimoto M, Horiuchi T, Nagasawa K. RP105-lacking B cells from lupus patients are responsible for the production of immunoglobulins and autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 2002;46:3259-3265

3. Miyake K, Yamashita Y, Ogata M, Sudo T, Kimoto M. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J Immunol.* 1995;154:3333-3340.

4. Nagai Y, Shimazu R, Ogata H, Akashi S, Sudo K, Yamasaki H, Hayashi S, Iwakura Y, Kimoto M, Miyake K. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood.* 2002;99:1699-1705.

5. Fujimoto M, Poe JC, Hasegawa M, Tedder TF. CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification. *Immunol Res.* 2001;22:281-298.

G. 研究発表

1. 論文発表

Yazawa N, Fujimoto M, Sato S, Miyake K, Asano N, Takeuchi O, Takeda K, Akira S, Tedder TF, Tamaki K. CD19 regulates innate immunity by Toll-like receptor RP105 signaling in B

Lymphocytes. *Blood*, 2003 102: 1374-1380.

2. 学会発表

Fujimoto M, Yazawa N, Tedder TF, Tamaki K.
 CD19 Regulates Innate Immunity by the Toll-Like Receptor RP105 Signaling in B Lymphocytes. 67th annual meeting American College of Rheumatology, Orlando, FL

H. 知的所有権の出願・登録状況
 なし

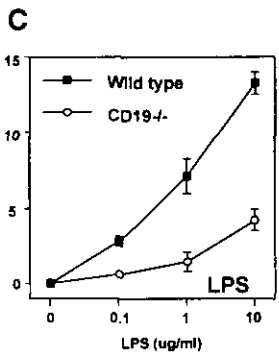
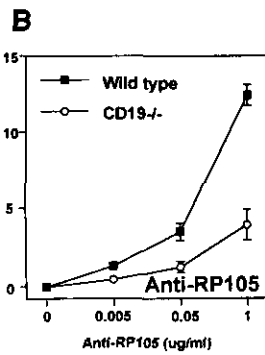
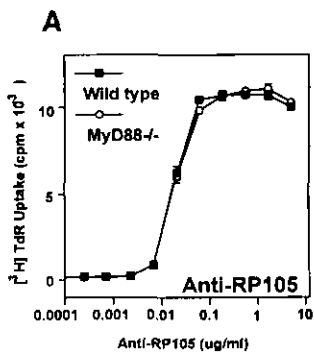
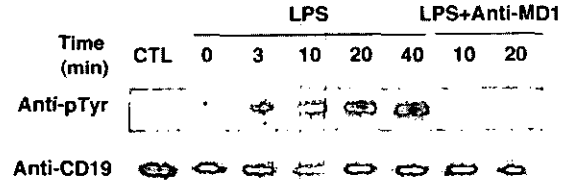


図1 MyD88 ノックアウトマウス, CD19 ノックアウトマウス B 細胞の抗 RP105 抗体, LPS 刺激に対する増殖反応

A. CD19 Immunoprecipitation



B. CD19 Immunoprecipitation

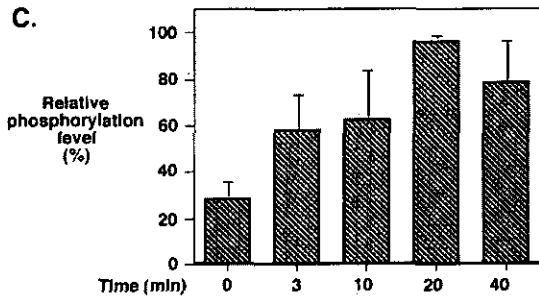
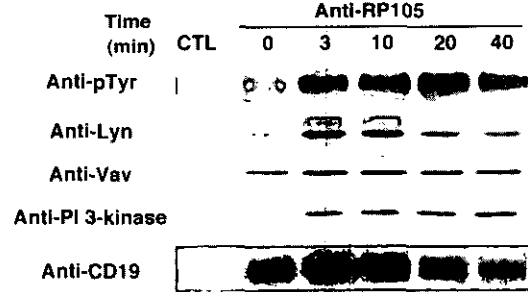


図2 A20 細胞における LPS(A)あるいは抗 RP105 抗体(B)刺激による CD19 のチロシンリン酸化。B では Lyn, Vav, PI3 キナーゼの各抗体による会合をも示した。B に代表的なプロットを, C に3回の実験の定量の平均を示した。

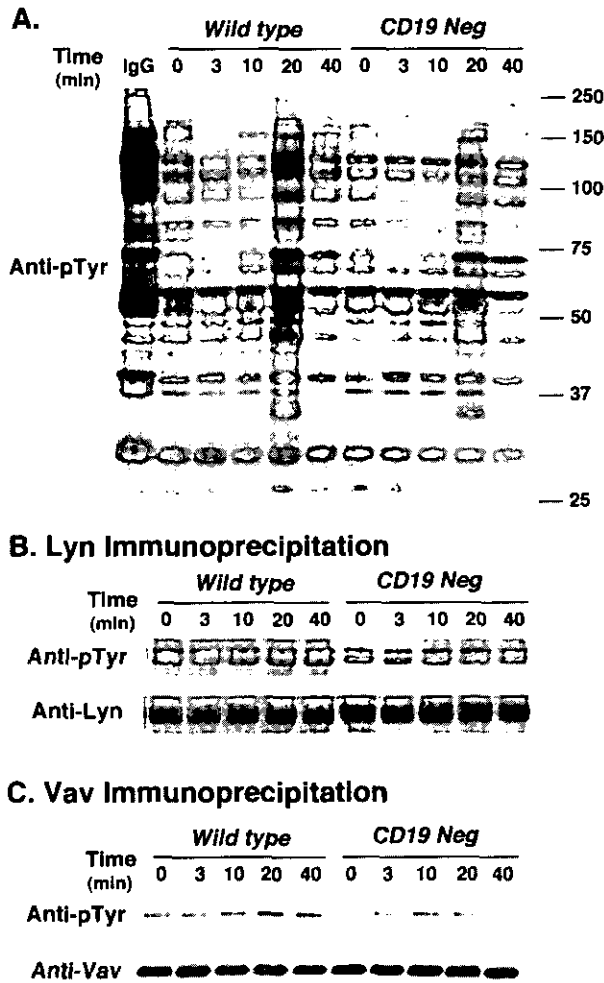


図3 野生型および CD19 陰性 A20 細胞において、抗 RP105 抗体刺激に誘導される細胞内チロシンリン酸化(A), Lyn (B) および Vav (C) のチロシンリン酸化。

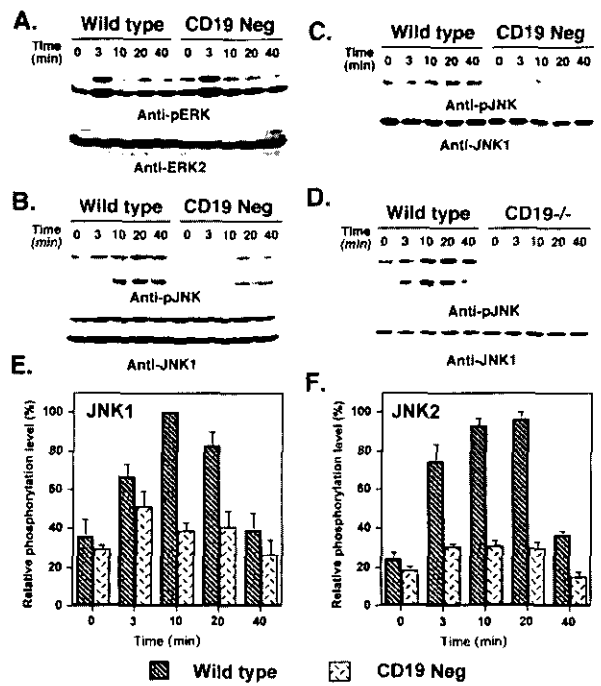


図4 抗 RP105 抗体刺激(A, B, D, E, F)および LPS 刺激(C)による ERK および JNK の活性化(リン酸化)。A, B, C, E, F は A20 細胞, D はマウス脾臓細胞を用いた結果を示す。A20 細胞における JNK の活性化は B に代表的なプロットを、E および F は定量による結果を示している。E および F では野生型の最大リン酸化レベルを 100%と定義し、その相対的なリン酸化レベルを求めた。

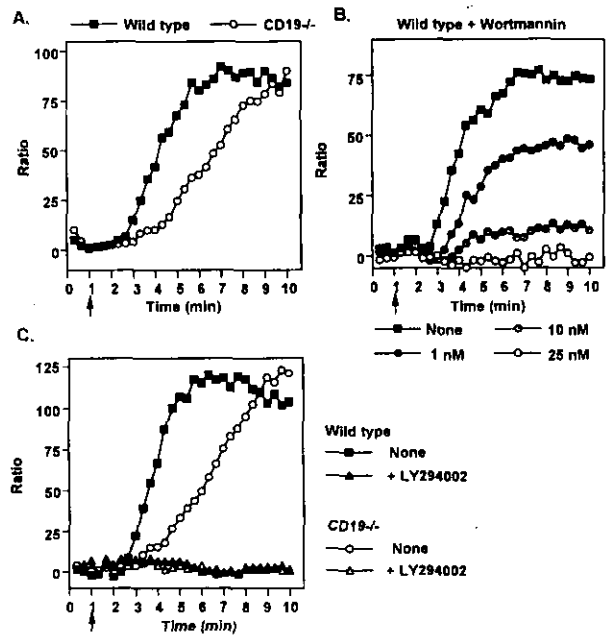


図5 抗 RP105 抗体で誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇。CD19 ノックアウトマウス B 細胞では野生型に比べて上昇が遅延している(A)。PI3 キナーゼ阻害剤(Wortmannin)ではカルシウム上昇が完全に阻害される(B, C)。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

全身性強皮症における CD19 多型の検討

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細胞組織再生医学研究部室長
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

金沢大学にて収集された患者対照群を用いて、CD19 遺伝子多型と強皮症の疾患感受性との関連研究を行った。プロモーター領域-499G>T (P=0.003, オッズ比 2.18)および 3' 非翻訳領域の(GT)_n(P=0.03, オッズ比 1.86) アリルの強皮症における有意な増加が検出された。これらのアリル間には有意な連鎖不平衡が認められたが、少なくとも-499T アリルは単独で強皮症発症に関連することが示された。

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¹、家系内集積性²などの情報から強く示唆されている。一方、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 の発現が増強していること³、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⁴。

一方、われわれは、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、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⁵。これまでに、CD19 遺伝子の 3' 非翻訳領域(UTR)の GT リピート多型⁶や、Fcγ受容体 IIb 多型と SLE との関連を報告した⁷。

以上の背景から、本研究では、CD19 を中心とした B細胞機能分子多型と強皮症の遺伝素因との関連を検討している。本年度は、CD19 に関する解析を行った。

B. 研究方法

本研究への試料提供の同意が得られた金沢大学附属病院皮膚科受診中の SSc 患者および健常対照者について、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 -499G>T の遺伝子型を決定した。GT リピート多型は GeneScan™ 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、-499G>T 多型は PCR-single strand conformation polymorphism 法により、タイピングを行った。統計学的解析は、 χ^2 検定を用いて施行した。

本研究は、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た研究計画に基づき、インフォームド・コンセントを得て施行した。

C. 研究結果

SSc 群において、CD19 -499T(表1)および3' UTR (GT)₁₄ リピート(表2)の有意な増加が検出された。これらのアレル間には、有意な連鎖不平衡が認められた(表3)ため、次に、互いの寄与の独立性について検討した。表4に示すように、-499T 陽性、(GT)₁₄ 陰性群においても、-499T 陰性、(GT)₁₄ 陰性群と比較して、有意な疾患感受性が認められたことから、少なくとも-499T は独立な寄与を有することが示された。

D. 考察

昨年度、北陸在住患者群と、東京近郊在住対照群との間に検出された CD19 遺伝子型頻度の差が、北陸在住患者対照群間において確認された。

SSc において増加していた対立遺伝子は、われわれが SLE との関連を報告した対立遺伝子とは異なるが、これは、SLE 末梢血B細胞における CD19 発現強度は減少しており、SSc では増強していることに対応する可能性が示唆される^{3,6}。

2個所の多型部位のうち、少なくとも、-499G>T は単独で SSc 感受性に寄与することが示された。一方、顕著な連鎖不平衡のために、(GT)₁₄ 単独の寄与の有無については十分な結論が得られなかったが、-499T 陽性群において、(GT)₁₄ 陽性群と陰性群の間

にオッズ比の差が認められなかったことは、少なくとも-499T 存在下においては、(GT)₁₄ の寄与は認められないと解釈される。

-499 は、転写因子結合部位と予想される部位ではないが、今後、G>T 多型と CD19 発現量との関連の検討が必要である。

E. 結論

CD19 プロモーター領域の -499G>T 多型が SSc 感受性に関連することが見いだされた。

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) Tsuchiya N, Ohashi J, Tokunaga K. Variations in immune response genes and their associations with

multifactorial immune disorders. *Immunol Rev* 2002, 190: 169-181.

6) 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.

7) 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.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekiya T, Tsunemi Y, Miyamasu M, Ohta K, Morita A, Saeki H, Matsushima K, Yoshie O, Tsuchiya N, Yamaguchi M, Yamamoto K, Tamaki K, Hirai K: Variations in the human Th2-specific chemokine *TARC* gene. *Immunogenetics* 54: 742-745, 2003.

2. Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K: Variations of human killer cell lectin-like receptors : common occurrence of *NKG2-C* deletion in the general population. *Genes Immun* 4: 160-167, 2003.

3. Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Fujiwara K,

Chandanayingyong D, Tokunaga K: Association of Fcγ receptor IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 61: 374-383, 2003.

4. 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. *J Rheumatol* 30:1534-1540, 2003.

5. Karassa FB, Bijl M, Davies KA, Kallenberg CGM, Khamashta MA, Manger K, Michel M, Piette J-C, Salmon JE, Song YW, Tsuchiya N, Yoo D-H, Ioannidis JPA: The role of the FcγRIIA polymorphism in the antiphospholipid syndrome. An international meta-analysis. *Arthritis Rheum* 48:1930-1938, 2003.

6. Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K: Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens* 63:21-27, 2004.

7. Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, Kuroki K, Fukazawa T, Bijl M, Kallenberg CGM, Hashimoto H, Yabe T, Tokunaga K: Molecular genetic analyses of human *NKG2C (KLRC2)* gene deletion. *Int Immunol* 16:163-168, 2004.

2. 学会発表

1. 徳永勝士、橋本博史、土屋尚之：膠原病感受性遺伝子の探索。第26回日本医学会総会。2003年4月、福岡。(要旨p179)

2. Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Tokunaga K. Induction of proliferation of activation of endothelial cells by overexpression of *ID3* gene. *リウマチ* 43:252, 2003.
3. Kuroki K, Tsuchiya N, Matsuta K, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K. Association of Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor 1 (LIR1, ILT2, LILRB1) polymorphism with susceptibility to RA and SLE in Japanese. *リウマチ* 43:254, 2003.
4. 京極千恵子、河野肇、土屋尚之、鈴木毅、山本一彦、徳永勝士、本田善一郎：SLE に関連する FcγRIIB 多型の B 細胞受容体シグナル抑制機能の検討。 *リウマチ* 43:304, 2003.
5. 川崎綾、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：BAFF-R、TACI 遺伝子の多型解析と SLE および RA との関連の検討。 *リウマチ* 43:307, 2003.
6. 宮下 リサ、土屋尚之、氷上光輝、黒木喜美子、徳永勝士：ヒト NKG2C 遺伝子欠失の分子遺伝学的解析。 *リウマチ* 43:319, 2003.
7. Furuya T, Kotake S, Hakoda M, Ichikawa N, Nanke Y, Kawasaki A, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani N. TNF 5'-flanking region polymorphisms in 84 Japanese patients with myositis. *リウマチ* 43:255, 2003.
8. 櫻井大祐、土屋尚之、大槻祐頼、津野寛和、高橋孝喜、徳永勝士：血管内皮細胞活性化および血管新生誘導における Id 遺伝子の役割。第62回日本癌学会総会、2003年9月25日～27日、名古屋。
9. 櫻井大祐、土屋尚之、山口晃弘、大槻祐頼、津野寛和、高橋孝喜、徳永勝士：Crucial role for Id in the induction of activation and angiogenic property of endothelial cells. 日本人類遺伝学会第48回大会抄録集 p118 (2003年10月21日～24日、長崎)
10. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、深沢徹、松多邦雄、Betty Tsao, 橋本博史、徳永勝士：ヒト CD72 遺伝子の多型解析と、全身性エリテマトーデスおよび関節リウマチとの関連の検討。日本人類遺伝学会第48回大会抄録集 p139 (2003年10月21日～24日、長崎)
11. 江原幸和、土屋尚之、櫻井大祐、山口晃弘、徳永勝士：ヒト follistatin-related protein (FRP) 遺伝子多型の関節リウマチとの関連の検討。日本人類遺伝学会第48回大会抄録集 p139 (2003年10月21日～24日、長崎)
12. 宮下リサ、土屋尚之、屋部登志雄、徳永勝士；関節リウマチにおける KIR 遺伝子プロファイルの解析。日本人類遺伝学会第48回大会抄録集 p139 (2003年10月21日～24日、長崎)
13. 黒木喜美子、土屋尚之、前仲勝実、Linda Rasubala, 白石充典、山下由美、松多邦雄、深沢徹、神田大輔、小池隆夫、十字猛夫、橋本博史、徳永勝士：Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LIR) 遺伝子群多型と日本人 RA, SLE との関連。日本人類遺伝学会第48回大会抄録集 p140 (2003年10月21日～24日、長崎)
14. Furuya T, Kotake S, Hakoda M, Ichikawa N, Nanke Y, Takeuchi M, Nishinarita M, Kondo H, Kawasaki A, Kobayashi S, Mimori T, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani N. Clinical, serologic, and immunogenetic features in 120 Japanese patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* 48 (Suppl); S103, 2003.
15. Kusaoi M, Fukazawa T, Hirashima M, Morita Y, Morita T, Okamoto K, Ikuta T, Tamiya G, Tsuchiya N, Tokunaga K, Inoko H, Hashimoto H.

- Genome-wide association study of systemic lupus erythematosus on chromosome 1. *Arthritis Rheum* 48 (Suppl); S226, 2003.
16. Kuroki K, Tsuchiya N, Maenaka K, Rasubala L, Shiroishi M, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kohda D, Koike T, Juji T, Hashimoto H, Tokunaga K. Distinct associations of the leukocyte immunoglobulin-like receptor (*LIR*)1 and *LIR6* polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 48 (Suppl); S197, 2003.
17. Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K. Association of Fc gamma receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations? *Arthritis Rheum* 48 (Suppl); S380, 2003.
18. Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIA, but not of IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Caucasians: a family-based association study. *Arthritis Rheum* 48 (Suppl); S380, 2003.
19. Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Tsuno NH, Okaji Y, Tokunaga K, Takahashi K. Crucial role for Id in the induction of activation and angiogenic property of endothelial cells. *Arthritis Rheum* 48 (Suppl); S340, 2003.
20. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Matsuta K, Hase H, Kobata T, Hashimoto H, Tokunaga K. Association of *TACI* polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48 (Suppl); S383, 2003.
21. Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, Kuroki K, Fukazawa T, Bijl M, Kallenberg CGM, Hashimoto H, Yabe T, Tokunaga K. Molecular genetic analyses of human *NKG2C* gene deletion. *Arthritis Rheum* 48 (Suppl); S473, 2003.
22. Kyogoku C, Kono H, Tsuchiya N, Suzuki T, Yamamoto K, Tokunaga K, Honda Z-I. SLE-associated polymorphism of FcγRIIB Ile232Thr affects localization at lipid rafts and attenuation of BCR signaling. *Arthritis Rheum* 48 (Suppl); S647, 2003.
23. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、深沢徹、松多邦雄、Betty Tsao、橋本博史、徳永勝士: ヒト CD72 遺伝子の多型解析と、全身性エリテマトーデスおよび関節リウマチとの関連の検討。日本免疫学会総会学術集会記録 33:196, 2003.
24. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、松多邦雄、長谷英徳、小端哲二、橋本博史、徳永勝士: TACI, APRIL 遺伝子多型と RA および SLE 疾患感受性の関連。日本免疫学会総会学術集会記録 33:196, 2003.
25. 河野肇、京極千恵子、鈴木毅、土屋尚之、山本一彦、徳永勝士、本田善一郎: SLE に関連するヒト FcγRIIB 多型の脂質ラフト会合および B 細胞受容体信号伝達抑制への影響。日本免疫学会総会学術集会記録 33:197, 2003.
26. 宮下リサ、土屋尚之、松多邦雄、屋部登志雄、徳永勝士: 日本人関節リウマチと KIR 遺伝子多型との関連の検討。日本免疫学会総会学術集会記録 33:213, 2003.
27. Kuroki K, Tsuchiya N, Maenaka K, Rasubala L, Shiroishi M, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kohda D, Koike T, Juji T, Hashimoto H, Tokunaga