

させることを証明している⁷⁾。抗U1RNP抗体を各構成成分に対する抗体に分けて検討すれば、その内皮細胞傷害活性はより明らかになる可能性もある。今後、特定の蛋白を認識する抗U1RNP抗体IgGサブクラスを精製し、肺動脈に与える影響を検討することは抗U1RNP抗体陽性患者に多いPHの発症機序を明確にするためにも意義深いことと考えている。

なお、IgGサブクラスに関しては他の自己抗体でも検討されている。IgG2型の抗カルジオリピン抗体陽性患者で動脈血栓症が高頻度⁹⁾、抗 β 2-GPI抗体はIgG2あるいはIgG3型が高頻度で静脈血栓症や子宮内胎児死亡と関連⁹⁾、あるいはMPO-ANCAはIgG1型が多い¹⁰⁾など病態と直接関連する自己抗体の主要IgGサブクラスが同定されている。また全血清でなく一部のサブクラスIgG自己抗体が病態の予測に役立つ可能性も示唆されている。SLEでは、IgG3型の抗ヌクレオソーム抗体が疾患活動性と並行する¹¹⁾、IgG2型の抗nucleohistone抗体とIgG1型の抗dsDNA抗体がループス腎炎の再燃に関与する¹²⁾など活動性指標として有用とする報告がある。これらの自己抗体に比し、抗U1RNP抗体のサブクラス反応性は未だ不明な点が多いが、今回の成績からSLEやMCTDの疾患活動性と相関する抗U1RNP抗体IgGサブクラスが存在する可能性があり、今後より詳細な臨床データとの関連を追求する予定である。

E. 結論

1. 抗U1RNP抗体において各構成成分に対する抗体を検討すると、疾患活動性と相関するIgGサブクラスが存在する。
2. PH発症に関し、IgG3型抗A抗体、抗70K抗体、あるいはIgG1型抗C抗体のFc部を介する補体活性化やFcレセプターを有する細胞の関与を検討する必要がある。

文献

1. 三森 経世. 主要疾患の歴史. 混合性結合組織病. 日本内科学会雑誌 91 : 2676-82, 2002.
2. Murakami A, Kojima K, Ohya K, et al. A new conformational epitope generated by the binding of recombinant 70-kd protein and U1RNA to anti-U1RNP autoantibodies in sera from patients with mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 46: 3273-82, 2002.
3. Alarcon-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, and Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates

live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature* 271: 67-9, 1978.

4. Ma J, Chapman GV, Chen SL, et al. Antibody penetration of viable human cells. I. Increased penetration of human lymphocytes by anti-RNP IgG. *Clin Exp Immunol* 84: 83-91, 1991.
5. Ma J, King N, Chen SL, et al. Antibody penetration of viable human cells. II. Anti-RNP antibodies binding to RNP antigen expressed on cell surface, which may mediate the antibody internalization. *Clin Exp Immunol* 93: 396-404, 1993.
6. Takatsuji O, Aotsuka S, Uwatoko S, et al. Enhanced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes cultured in the presence of autoantibodies against U1-ribonucleoprotein and/or negatively charged molecules: Implication in the pathogenesis of pulmonary hypertension in mixed connective tissue disease (MCTD). *Clin Exp Immunol* 98: 427-33, 1994.
7. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Fujinami M, et al. Up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ECAM-1) and class II MHC molecules on pulmonary artery endothelial cells by antibodies against U1-ribonucleoprotein. *Clin Exp Immunol* 116: 174-80, 1999.
8. Sammaritano LR, Ng S, Sobel R, et al. Anticardiolipin IgG subclasses: association of IgG2 with arterial and/or venous thrombosis. *Arthritis Rheum* 40: 1998-2006, 1997.
9. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, et al. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: Antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43: 76-84, 2000.
10. Bijl M, Dijkstra HM, Oost WW, et al. IgG subclass distribution of autoantibodies differs between renal and extra-renal relapses in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 41: 62-7, 2002.
11. Samarkos M, Davies KA, Gordon C, et al. IgG subclass distribution of antibodies against β 2-GPI and cardiolipin in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, and their clinical associations. *Rheumatology* 40: 1026-32, 2001.
12. Manolova I, Dancheva M, and Halacheva K. Prevalence of IgG1 and IgG3 subclasses of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 21: 227-33, 2002.

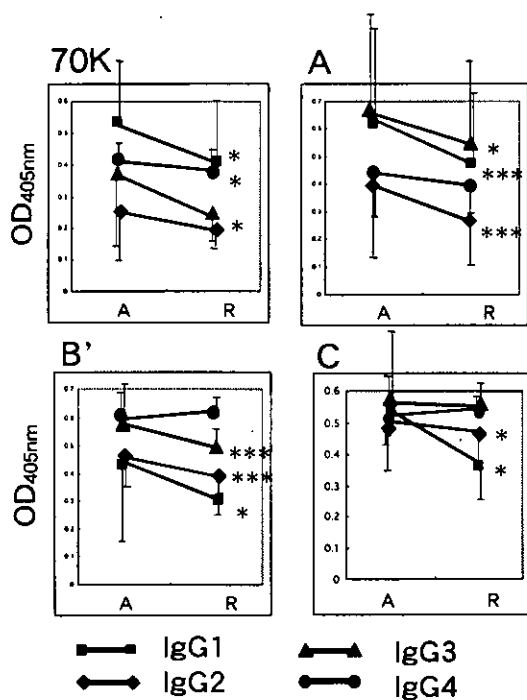


図1. SLEの疾患活動性と各構成成分を認識するIgGサブクラスSLE 16例につき、急性期(A)と寛解期(R)血清において検討した。抗70K抗体ではIgG1、IgG2、IgG4が、抗A抗体ではIgG1、IgG2、IgG3が、抗B₁/B抗体ではIgG1、IgG2、IgG3が、抗C抗体ではIgG1とIgG3が寛解期に有意に低下していた。
*P<0.05、***P<0.005

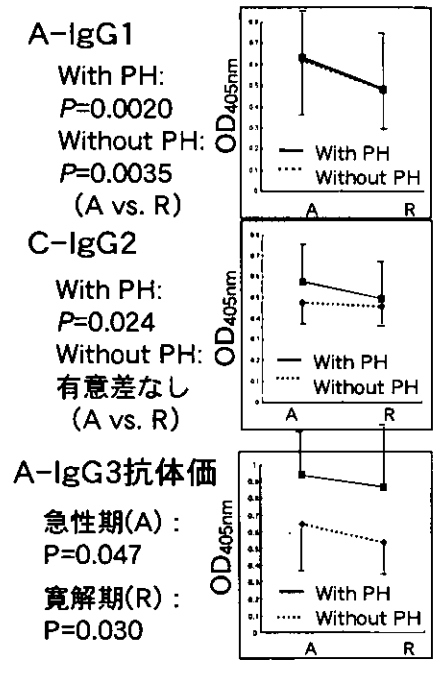


図2. PH合併例と非合併例の抗U1RNP抗体IgGサブクラスの比較PH合併例(3例)ではIgG1型の抗A抗体とIgG2型の抗C抗体のみが原疾患活動性と相関して低下していた。特にIgG2型の抗C抗体では同様の変動はみられず、PH合併例における特徴として注目された。また原疾患の活動性とは関連がなかったが、IgG3型の抗A抗体は急性期、寛解期ともにPH合併例で有意に高力価であった。

ASSOCIATION BETWEEN IgG SUBCLASSES REACTIVE WITH U1RNP PARTICLES AND DISEASE ACTIVITY IN SERA FROM PATIENTS WITH RHEUMATIC DISEASES

Takao Fujii, Yoshimasa Fujita, 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', or C) in sera from 23 patients with rheumatic diseases (SLE 15, MCTD 4, SSc 1, SLE+PM 1, SSc+PM 1, RA 1) and examined the association between antibody reactivity and disease activity. Whereas the titers of anti-A IgG1/IgG2 and anti-B'/B IgG2/IgG3 were significantly correlated to disease activity in SLE, titers of anti-A and anti-C IgG1 were correlated in MCTD. In sera from 3 patients with pulmonary hypertension (PH) (MCTD, SLE and SSc+PM), titer of anti-A IgG3 was markedly higher than that in sera from 20 patients without PH both in acute phase and remission, suggesting that the subclass may be involved in PH. Additionally, the titers of anti-70K IgG3 and anti-C IgG1 were decreased along with the amelioration of PH. These results encourage the future study for anti-U1RNP antibody-mediated pulmonary artery immunomodulation.

膠原病患者末梢血単核細胞による自己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 国立国際医療センター研究所部長

研究協力者：大川（高辻）雅子 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(PBMC)のspontaneousな自己抗体産生について、また、この系における免疫抑制剤；ミゾリピン(MZR)添加の影響を検討した。患者PBMCを無刺激で培養し、その上清中に自己抗体、抗U1-RNP抗体、抗Sm抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体が産生されるかどうかを検討した。また、その産生に対するMZRの作用を検討するため、種々の濃度の薬剤を培養に添加して7日間培養し、上清中の自己抗体を酵素抗体法で測定した。血中抗U1-RNP抗体価高値の患者から得たPBMCは、spontaneousな培養の上清中に抗U1-RNP抗体を有意に産生し、血清中の抗体価と培養上清中の抗体量は有意に相関した。抗SS-A抗体、抗Sm抗体、抗SS-B抗体産生は、抗U1-RNP抗体量に比較して低値であったが、血清中の当該の抗体価と関連する傾向にあった。また、血清中、および培養上清中の抗U1-RNP抗体と抗Sm抗体、抗SS-A抗体と抗SS-B抗体は有意に相関が認められ、自己抗体の対応抗原が同じRNAに乗っていることと矛盾しないと考えられる。

抗U1-RNP抗体産生PBMCにMZRを添加した場合、その産生は有意に抑制されたが、抗Sm抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体は、産生量が低値でもあったことから、MZR添加による変化は認められなかった。今回の検討により試験管内におけるPBMC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MZR添加で抗体が有意に抑制され、臨床的效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。昨年度の第二報として、症例数を増やし、検討する抗ENA抗体の種類を増やした。

B. 対象と方法

血清中抗U1-RNP抗体高値の膠原病患者17例(MCTD; 2例、SLE; 7例、SS; 6例、SSc; 2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12例(SS; 10例、SLE; 1例、RA 1例)を対象とした。また、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Sm抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体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17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12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PBMC培養上清中の抗ENA抗体
血清中の抗U1-RNP抗体が陽性の17例から得たPBMCをspontaneousに培養した上清中の抗ENA抗体は、抗U1-RNP抗体、抗SS-A抗体産生は、健常人に比較して有意に高値であったが、一方、抗Sm抗体、抗SS-B抗体は健常人との差は認められず、低値であった(図2A)。また、血清中抗U1-RNP抗体陰性の12例から得たPBMCをspontaneousに培養した培養上清中の抗ENA抗体は、陽性血清の患者に比較して低値であったが、抗U1-RNP抗体、抗SS-A抗体産生

がわずかに認められた (図 2B)。

3) 膠原病患者血清中の抗 ENA 抗体と、培養上清中の当該の抗 ENA 抗体との関連。

膠原病患者 29 例の血清中の抗 ENA 抗体と、無刺激 PBMC を培養して得た上清中の抗 ENA 抗体との関連を検討した (表 1)。抗 U1-RNP 抗体、抗 Sm 抗体、抗 SS-B 抗体は、血清中抗体濃度と培養上清中抗体濃度との間に有意な相関が認められた (図 A, B, D)。抗 SS-A 抗体については、有意ではなかったが、関連する傾向を認めた (図 C)。

4) 膠原病患者血清中の抗 ENA 抗体間の関連。

膠原病患者 29 例の血清中の抗 ENA 抗体間の関連を検討した (表 2)。その結果、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 (図 A)。抗 SS-A 抗体と抗 SS-B 抗体も有意ではなかったが、関連する傾向が認められた (図 B)。

5) 膠原病患者 PBMC 培養上清中の抗 ENA 抗体間の関連。

膠原病患者 29 例の PBMC 培養上清中の抗 ENA 抗体間の関連を検討した (表 3)。その結果、抗 Sm 抗体と抗 SS-B 抗体の ELISA での吸光度は低値だったものの、血清と同様の傾向が認められ、抗 U1-RNP 抗体と抗 Sm 抗体との間、抗 SS-A 抗体と抗 SS-B 抗体との間に有意な関連が認められた (図 A, B)。

6) 膠原病患者の PBMC による spontaneous な抗 ENA 抗体産生陽性例に対する MZR 添加の影響。

膠原病患者の PBMC による spontaneous な抗 ENA 抗体産生が陽性の場合の、MZR 添加の影響を検討した (図 3)。陽性は、健常人 PBMC 産生自己抗体の平均値 + 2SD 以上とした。抗 U1-RNP 抗体陽性 PBMC の場合 OD450 は 0.100 ~ 0.700 で、MZR が 0 μ g/ml 時を 100% コントロールとして表した。培養上清中抗 U1-RNP 抗体が陽性の 8 例について MZR 添加の影響を検討した結果、MZR 2.5、25、250 μ g/ml を添加した場合、Wilcoxon T test で 1% 以下の危険率で抗 U1-RNP 抗体産生が有意に抑制された (図 3A)。抗 Sm 抗体、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体の場合、MZR 添加による抑制は認められなかった。 (図 3B、C、D)。図 3B ~ D は OD450 の値を示した。

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^{1,2)}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 ENA 抗体高値の患者 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。しかし、培養上清中の抗体産生は抗 U1-RNP 抗体と抗 SS-A 抗体産生量に比較して、抗 Sm 抗体、抗 SS-B 抗体産生量は微量であった。これらは ELISA で測定したが、陽性コントロールは十分発色しており、測定の手技上の問題ではなく、産生量が少ないことを示していると思われる。

また、血清中および培養上清中の当該の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。

患者血清中の抗 U1-RNP 抗体と抗 Sm 抗体、抗 SS-A 抗体と抗 SS-B 抗体の間、および、患者 PBMC 培養上清中の抗 U1-RNP 抗体と抗 Sm 抗体、抗 SS-A 抗体と抗 SS-B 抗体の間には、関連が認められ、このことは、抗 U1-RNP 抗体と抗 Sm 抗体の対応抗原が同じ U1-RNA (68K、A 鎖、C 鎖と B' /B、D) に乗っていること、抗 SS-A 抗体と抗 SS-B 抗体の対応抗原が同じ Y-RNA に乗っていることと関連があることを示唆している。

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。

MZR の作用機序については、細胞増殖の抑制^{3,4)}とヘルパー T 細胞の活性抑制⁵⁾などが報告されている。我々は MZR 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⁶⁾。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 による spontaneous な抗 SS-A 抗体、抗 Sm 抗体、抗 SS-B 抗体産生量は微量で、MZR の抑制作用を確認できなかったが、抗 U1-RNP 抗体は培養上清中に有意に産生し、免疫抑制剤 MZR により濃度依存性に抑制され、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。

E. 結論

1) 血清中の抗 U1-RNP 抗体陽性の膠原病患者 PBMC の spontaneous な抗 U1-RNP 抗体産生、抗 SS-A 抗体産生を以前に確認し報告したが、今回は、抗 Sm 抗体、抗 SS-B 抗体を測定した。その結果、血清中と培養上清陽性例では、MZR の添加によりその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

- Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Uwatoko S *et al.*: Monocyte-mediated suppression of rheumatoid factor production in normal subjects. *Clin Immunopathol* 46, 195-204, 1988.
- 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.
- 加村ひろみ、他: Bredinin および Cyclosporine A の作用機序に関する基礎的研究。移植、17(Suppl)579, 1982.
- 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.
- 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.
- 齊塚新一、大川雅子: 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。厚生労働科学研究費、混合性結合組織病に関する研究。平成 14 年度報告書。P22-27, 2003.

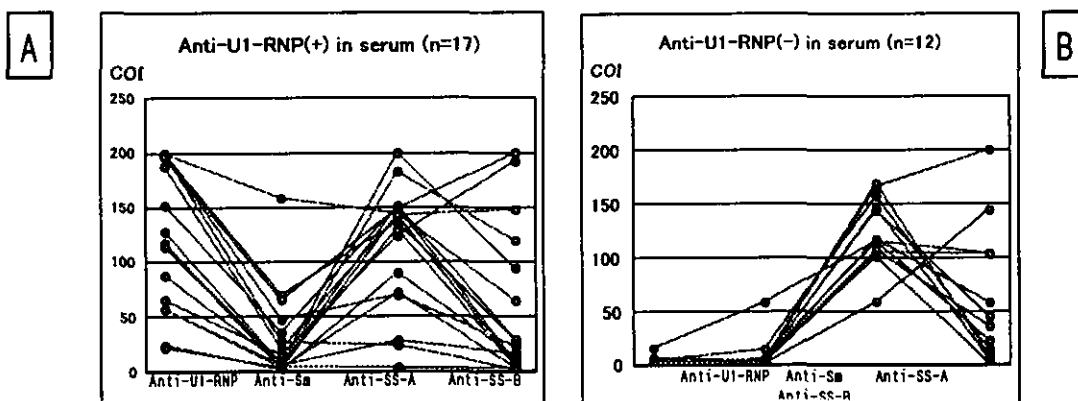


図1. 患者血清中の抗 ENA 抗体。A: 血清中抗 U1-RNP 抗体陽性群 (n=17)。B: 血清中抗 U1-RNP 抗体陰性かつ抗 SS-A 抗体陽性群の抗 ENA 抗体 (n=12)。

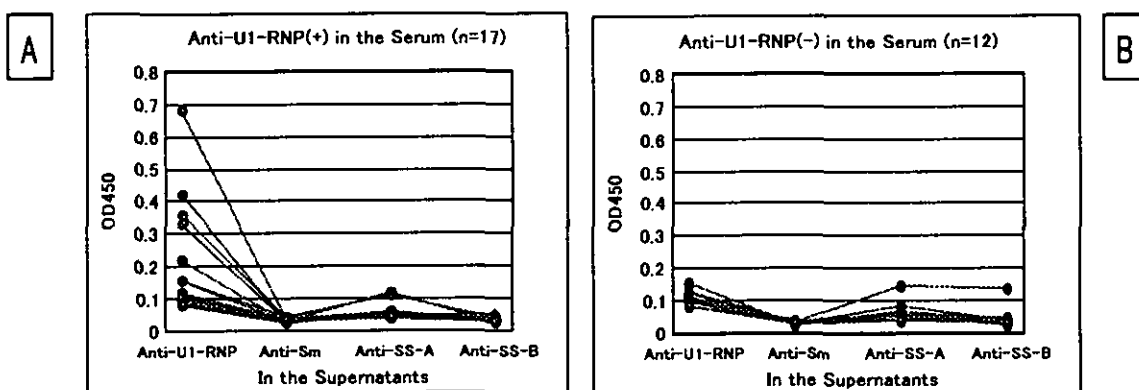


図2. 患者単核細胞培養上清中の抗 ENA 抗体。A: 血清中抗 U1-RNP 抗体陽性群の培養上清中抗 ENA 抗体 (n=17)。B: 血清中抗 U1-RNP 抗体陰性かつ抗 SS-A 抗体陽性群の培養上清中抗 ENA 抗体 (n=12)。

表1. 膠原病患者血清中の自己抗体と、
培養上清中の当該の自己抗体との関連。(n=29)。

n=29	Anti-U1-RNP in sup	Anti-Sm in sup	Anti-SS-A in sup	Anti-SS-B in sup
Anti-U1-RNP in sera	*** r=0.672, A	×	×	×
Anti-Sm in sera		** r=0.474, B	×	×
Anti-SS-A in sera			r=0.306, C	×
Anti-SS-B in sera				* r=0.415, D

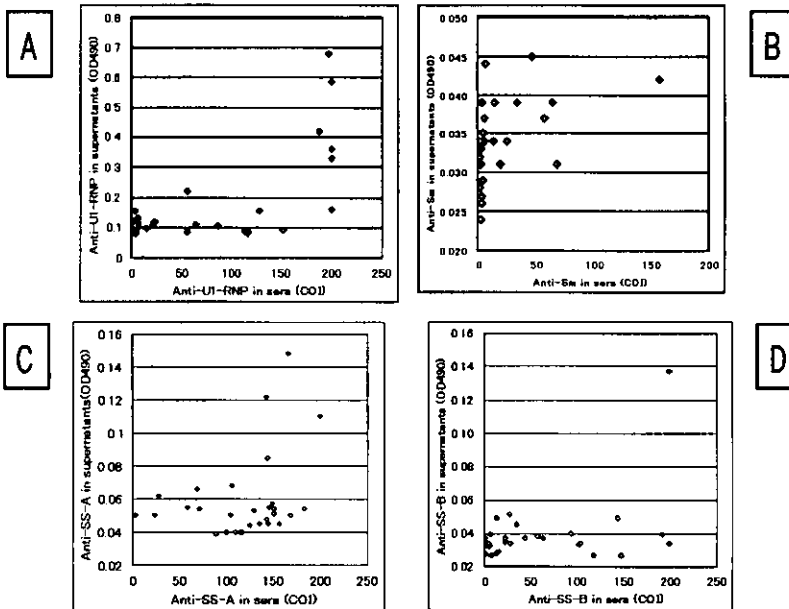


表2. 血清中抗ENA抗体間の関連

n=29	Anti-U1-RNP in sera	Anti-Sm in sera	Anti-SS-A in sera	Anti-SS-B in sera
Anti-U1-RNP in sera	-	*** r=0.610, A	r=0.028	r=0.044
Anti-Sm in sera		-	r=0.103	r=0.070
Anti-SS-A in sera			-	r=0.303, B
Anti-SS-B in sera				-

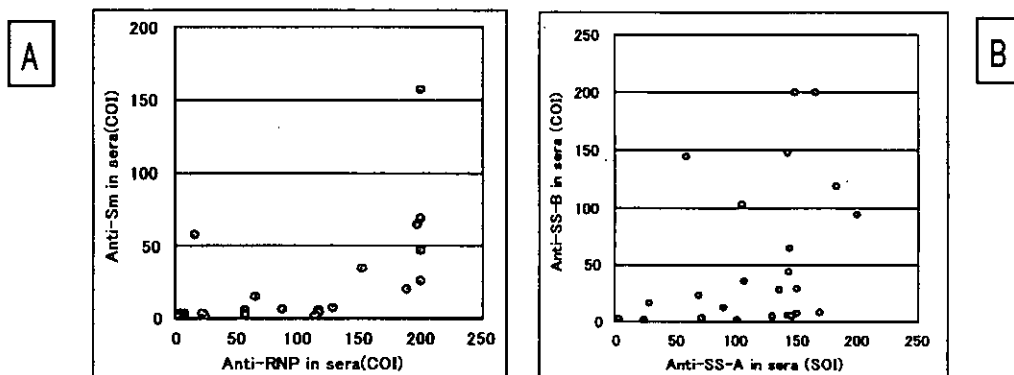


表3. 膠原病患者単核細胞培養上清中抗ENA抗体間の関連

n=29	Anti-U1-RNP in sup	Anti-Sm in sup	Anti-SS-A in sup	Anti-SS-B in sup
Anti-U1-RNP in sup	-	* r=0.411, A	r=0.199	r=0.105
Anti-Sm in sup		-	r=0.011	r=0.008
Anti-SS-A in sup			-	*** r=0.601, B
Anti-SS-B in sup				-

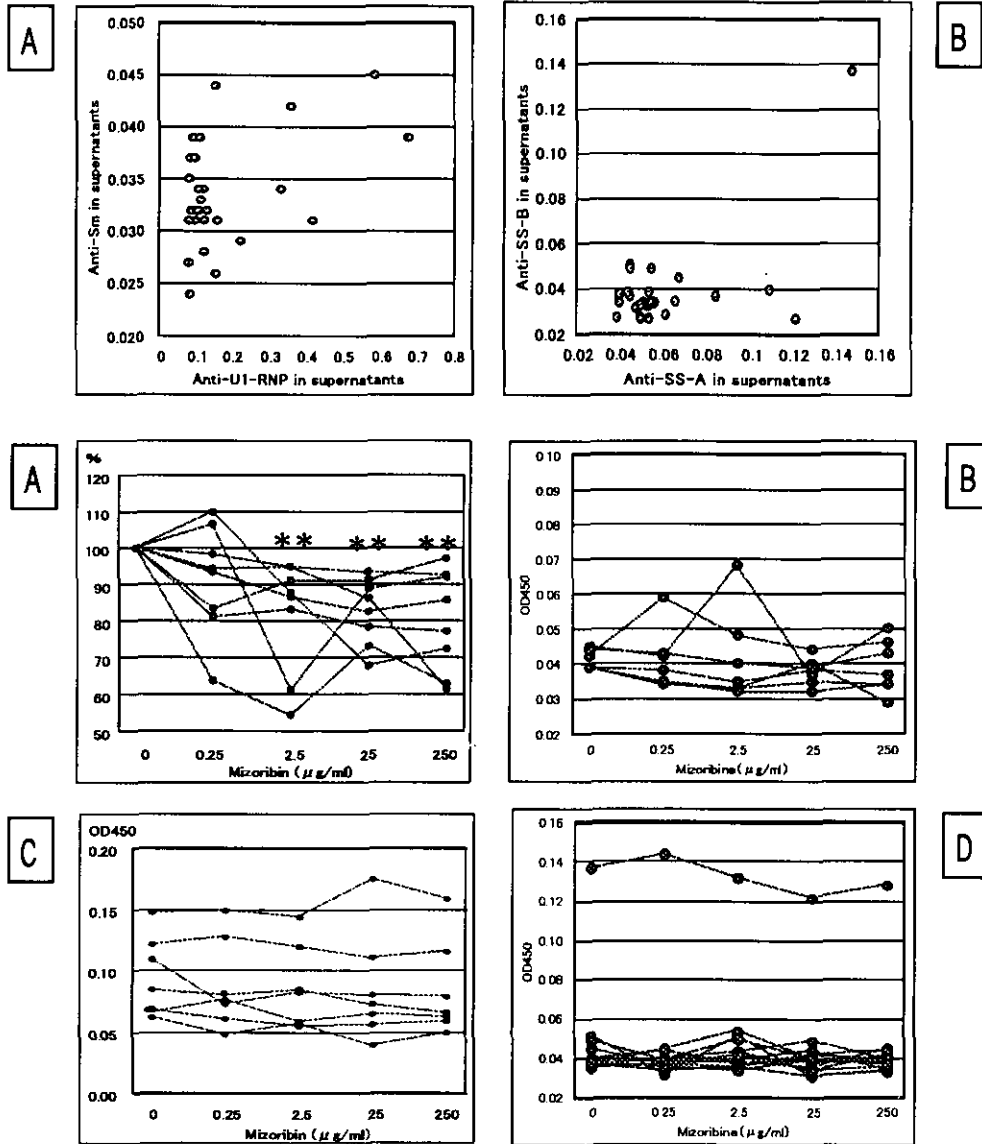


図3. 膠原病患者の単核細胞による spontaneous な自己抗体産生陽性例に対するミゾリビン添加の影響。

健康人MNC産生自己抗体の平均値+2SD以上を陽性とした。

A: 抗U1-RNP抗体陽性単核細胞の場合(n=8, **=p<0.01)。

OD450は0.100~0.700で、MZRが0 $\mu\text{g/ml}$ 時を100%コントロール

として表した。B: 抗Sm抗体陽性単核細胞の場合(n=7)。

C: 抗SS-A抗体陽性単核細胞の場合(n=7)。D: 抗SS-B抗体陽性単核細胞の

場合(n=14)。B~DはOD450の値を示した。

**SPONTANEOUS PRODUCTION OF AUTOANTIBODIES
BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS
FROM PATIENTS WITH CONNECTIVE TISSUE DISEASE:
EFFECT OF IMMUNOSUPPRESSANT ON THEIR PRODUCTIONS**

Shinichi Aotsuka and Masako Okawa-Takatsuji

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

Spontaneous production of autoantibodies against U1-ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SS-A and SS-B by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with connective tissue diseases (CTD) was investigated. Moreover, the effect of an immunosuppressant (Mizoribin, MZR) on the autoantibody production was also examined. PBMCs were spontaneously cultured for 7 days in the absence or the presence of various concentration of MZR and the culture supernatants were assayed for IgG autoantibodies against U1-RNP, Sm, SS-A and SS-B by enzyme-linked immunosorbent assay. PBMCs obtained from CTD patients with positive serum anti-U1-RNP antibodies were able to produce significant amounts of anti-U1-RNP antibodies in their culture supernatants, and levels of anti-U1-RNP antibody in the culture supernatants were correlated significantly with those in sera. Although the levels of antibodies against Sm, SS-A or SS-B in culture supernatant of PBMCs were lower than those of antibodies against U1-RNP, they tended to be correlated with the levels of respective antibodies in patient's sera. Moreover, the levels of antibodies against U1-RNP in the culture supernatants were correlated significantly with those against Sm, and those against SS-A were correlated significantly with those against SS-B, indicating the concept of the epitope-spreading on the basis from the fact that antigens were present on the same RNA molecules. Addition of MZR to the cultures significantly inhibited the production of antibodies against U1-RNP, but did not that of antibodies against neither Sm, SS-A nor SS-B. This is the first report that demonstrates the spontaneous *in vitro* production of autoantibodies against U1-RNP, Sm, SS-A and SS-B by PBMCs from patients. The result also suggests that MZR is able to suppress the production of anti-U1-RNP autoantibodies *in vivo*.

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

混合性結合組織病(MCTD)発症年齢の数理統計学的解析からの発症機構へのアプローチ

分担研究者：岡本 尚 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学（分子遺伝学）教授
研究協力者：北郡宏次、高橋なを子 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学（分子遺伝学）
研究協力者：岡田 純、近藤啓文 北里大学医学部内科

研究要旨

MCTD研究班班内調査症例299例を対象として、推定発症年齢分布を解析した。MCTD発症年齢分布はワイブル分布に近似した。ワイブル分布による累積ハザード・モデル解析の結果より、実際の分子・細胞レベルでの発症から臨床的にMCTDの症状がでるまでの1～2年間の潜伏期間をへて、およそ3段階の独立な事象（遺伝子変異など）が起こっていることが示唆された。

A. 研究目的

MCTDやSLEを始めとする自己免疫疾患は、免疫監視機構を司るBおよびTリンパ球レベルでの多重な異常が蓄積された結果発症すると考えられている。しかしながら、これらのリンパ球の機能異常の表現型は根底にあるリンパ球機能を支える分子機構の異常から二次的に発生するものである可能性がある。その背景には遺伝子レベルの異常（遺伝子の変異もしくはエピジェネティックな異常、遺伝子発現調節機構の恒常的な異常、など）があると考えられる。遺伝子異常の蓄積に基づく発症過程が患者発症年齢分布の解析より求められることを、すでに成人T細胞白血病発症年齢分布の数値解析を行なっている（Okamotoら、Jpn. J. Cancer Res 80: 191-195, 1989）。そこで、今回はMCTDの患者の推定発症年齢より同様の解析を実施した。

B. 研究方法

対象は平成10年度の「混合性結合組織病に関する研究班」の班内調査対象例304例のうち、発症年齢の推定が可能であった299例を対象とした（近藤啓文ら 混合性結合組織病の臨床経過についてのプロジェクト研究「厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班 混合性結合組織病分科会平成10年度報告書」より）。発症年齢は8歳から63歳に及び、平均34歳、中央値34歳であった。なお、女性例297例、

男性例12例であり、男性例数が少なく、性別での比較はできなかった。

MCTDの多段階発症モデルの検討は、Okamotoら（1989）の方法により行なった（詳しい原理・方法論については原著論文を参照のこと）。対象患者の年齢別発症数、次いで累積発症分布を求め、発症年齢分布がワイブル分布に従うか否かを検討した。ワイブル分布による累積ハザード・モデル解析結果をもとに、MCTDの発症機構モデルを求めた。

C. 研究結果

図1にMCTD299例の5歳毎の年齢別発症数の度数分布と累積発症分布を示す。発症年齢度数分布において25～30歳のグループに凹みが見られるが、その原因は不明であった。

次いで、累積発症分布をMCTD発症のハザードモデルとみなし、ワイブル確率紙へプロットしたところ、図2の結果を得た。ここでは、MCTD発症要因が全てそろった時にただちに臨床的症状が出現したと仮定したところ、MCTD発症が3～4段階の過程を経て起こると推定されたことになる。しかしながら、実際にはMCTD発症要因がそろってから臨床症状が出現するまでの間には一定の「潜伏期」に相当する期間が存在すると考えられるので、この期間を0～5年までの間として、それぞれのモデルについて検討した。

これらの結果の一部を図4および図5で示す。また、

図中でモデルの妥当性を示すKS検定での信頼範囲を主モデルのワイブル方累積分布を示す直線の周囲に示した。この中で、最もよく近似されたのは潜伏期間を2年とした場合であった。また、この時、発症に必要なステップ数はおよそ3と推定された。以上、今回対象とした厳選された299例のMCTD患者の推定発症年齢の解析より、MCTDの発症はおよそ2年間の潜伏期間を持ち、3段階の独立な事象が累積された結果生じる、と推定された。

D. 考察

MCTDやSLEを始めとする膠原病ではしばしば家族内発症がみられる。また主にマウスを中心とする自己免疫疾患発症モデル動物での遺伝解析からも特定の遺伝子が発症に関連することが示唆されている。例えば、遺伝的背景でSLE様症候群を引き起こすNZB/W F1マウスの遺伝解析から、non-MHC疾患感受性遺伝子が少なくとも12遺伝子存在すると推定されている。ただし、これらの遺伝子間には相互作用(epistasis)や連鎖不均衡の存在を考慮しなくてはならないので、遺伝子変異と発症との間には乖離があり、遺伝学的penetranceは必ずしも100%にはならないことから、単一の遺伝子を追求することの問題点が指摘できる。さらに、MCTDやSLEの疾患概念は、診断基準より規定されるものであるため、必ずしも均質な疾患単位でなく、実際には複数疾患の混合したものと捉えることもできる。実際にMCTDでは、特定の自己抗体(U1 RNP抗体)を持つことを主体とし、SLE、PSS、PMの3疾患の病像を併せ持つこと、また、SLEにおいても自己抗体の出現様式によってその病像・病態・合併症が異なることが観察されること、などから膠原病の背景となっている分子機構には複数のカスケードが関与してことが示唆される。

今回、MCTDについて解析し、明らかになったことより、MCTDにおいてはおそらく3つの独立な事象が関与し、その累積が発症に導くことが示唆された。ここで「独立の事象」とは、遺伝子の構造変異のみならず、不可逆的なエピジェネティックな変化、なども含まれると考えられる。もしも、多段階発症の実態が遺伝子変異であるならば、我々が現在追究している53BP2/ASPP2などのアポトーシス誘導因子や細胞(リンパ球)増殖関連遺伝子などの関与が考えられるが、発症関連遺伝子の組み合わせは症例ごとに様々であることが予測される。

また、これらの分子病理機構がそろっても直ちに臨床

的に病像が完成するのではなく、臨床症状として患者および医療機関によって把握されるまでの間に一定の期間(今回の解析ではおよそ2年)が必要であろうと推定されたことは、日常臨床で患者診療に当たっていても了解できることであろうと思われる。例えば自己抗体産生が主たる病因であるという立場に立った場合にも、一般に抗原暴露から抗体が十分に増えてくるまでの間に数ヶ月を要すること、などからも一定の潜伏期間の存在することは容易に理解できることであろう。

今後は、このような解析の対象例をさらに増やし、対象症例を様々な因子によって層別化して、個別に同様な解析を行ない、相互に比較することによって、背後に潜む要因を解明することが必要である。このような層別化「要因」として、性、家族内発症の有無、などが挙げられる。また、同時に、候補となる遺伝子異常の有無につき、特に家族内発症例などを対象に検索を進める必要がある。

E. 結論

MCTDの発症年齢分布の解析より、発症には3段階の過程が存在すること、分子・遺伝子レベルでの条件が満たされてから臨床症状が把握されるまでにおよそ2年間の期間がかかる可能性があること、などが示唆された。

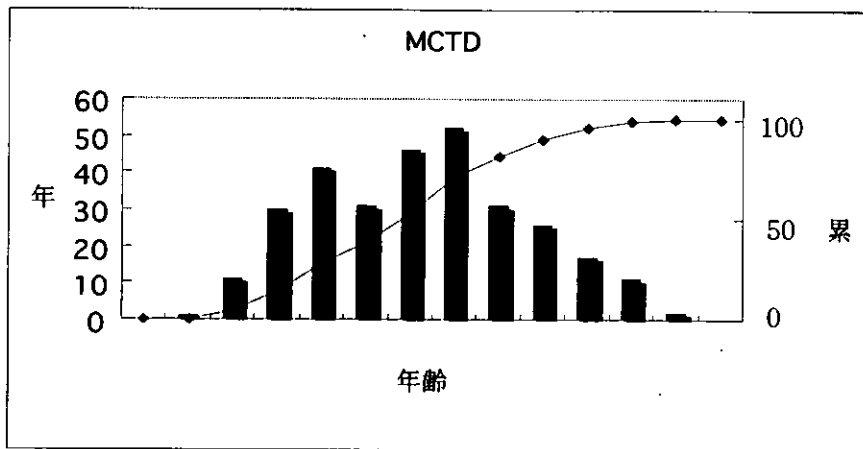


図1. MCTD299例の発症年齢別度数分布と累積発症率

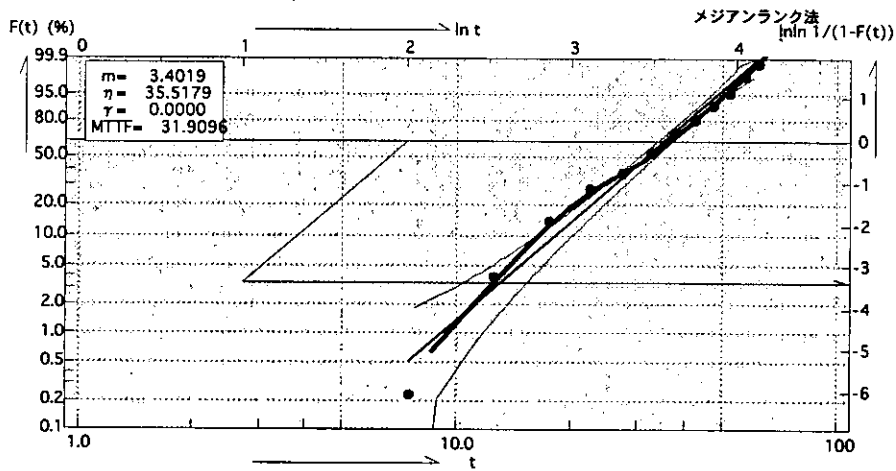


図2. MCTD 対象例のワイブル確率紙へのプロットと発症段階数の推定。「潜伏期間(γ)」を0年とした時の結果。

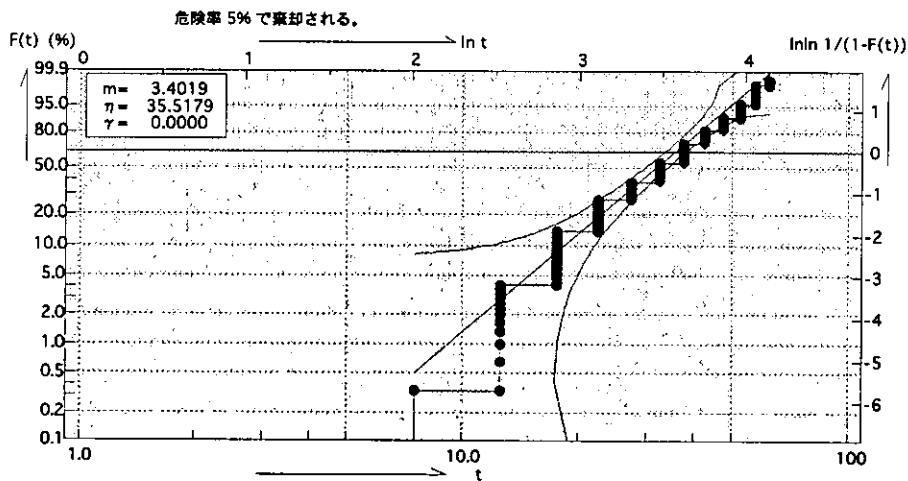


図3. 図2の結果のK-S検定。高年齢者の領域がモデルに適合しない。

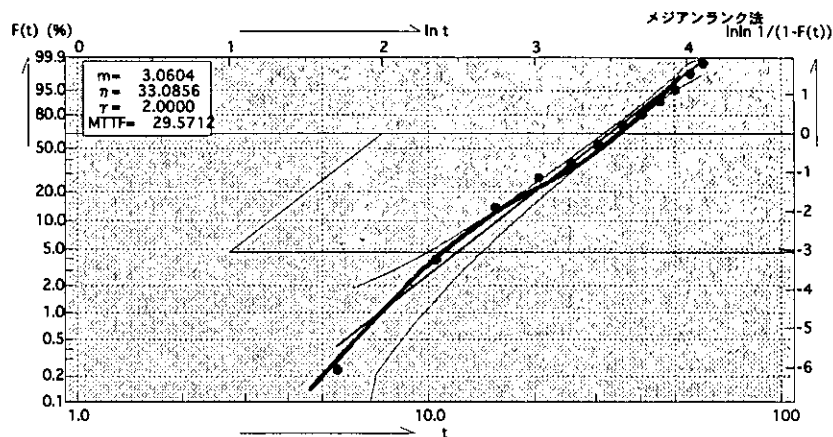


図4. 分子レベルの発症から臨床的に把握されるまでの「潜伏期間」を2年間と仮定したときのワイブル・モデル

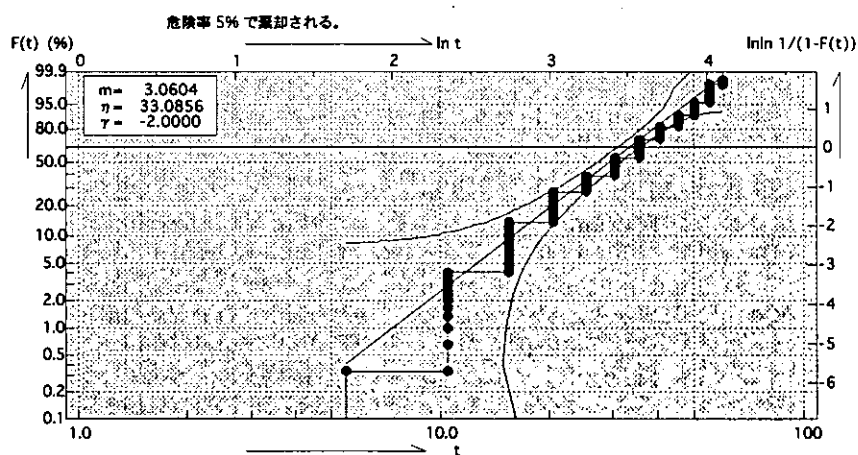


図5. 図4の結果のK-S検定の結果。
図3の高齢者領域のずれが補正されているが完全ではない。

MATHEMATICAL APPROACHES TO THE PATHOGENESIS OF MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE BASED ON THE AGE DISTRIBUTION OF DISEASE ONSET

Takashi Okamoto¹⁾, Kouji Kitagori¹⁾, Naoko Takahashi¹⁾, Jun Okada²⁾, Hirobumi Kondo²⁾

¹⁾Department of Molecular and Cellular Biology, Nagoya City University
Graduate School of Medical Sciences

²⁾Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine.

To elucidate molecular and genetic background for the pathogenesis of MCTD, we have carried out a mathematical approach based on the age distribution of 299 MCTD cases who were enrolled in the nationwide multi-institutional survey of MCTD in Japan (1999). The age distribution of onset age and the cumulative incidence curve of MCTD have fit the theoretical Weibull distribution model with shape parameter of 3 and position parameter of 2, indicating that MCTD may arise based on accumulation of three independent events, either genetic or epigenetic, and that there may be a delay of approximately 2 years between the establishment of molecular and genetic events and the manifestation of clinical symptoms of MCTD.

U1-snRNP・A 遺伝子の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析

分担研究者：大久保光夫 埼玉医大総合医療センター 輸血・細胞治療部講師
研究協力者：岡田純、近藤啓文 北里大学医学部内科

研究要旨

従来はU1-snRNP・A (RNPA) 遺伝子にvariationはないとされてきた。我々は前年度までの解析でRNPAにSNPが存在している事を報告している。前年度までに我々が報告したSNPも含めて、現在明かとなっているRNPAのSNP 47箇所のうち、11箇所についてSNPのminor alleleの頻度を健常人（男女別）とRNP抗体陽性症例において解析した。その結果、（1）症例では健常人と比較してRNPA geneにおいて有意差をもつSNPが存在した。（2）RNPAの5'側 inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C 遺伝子に近づくにつれてminor alleleの頻度は健常人と症例ともに高くなる傾向があった。（3）RNPAの5'側では頻度の高いalleleをもつ症例は他のSNPでも頻度の高いalleleをもつ傾向が強かった（ハプロタイプを形成）。これらの結果から、抗U1-snRNP抗体をもつ症例は特定の遺伝子変異を有する限られた集団である可能性が示された。

A. 研究目的

U1-snRNP・A（以下RNPA）蛋白はMCTDの疾患特異的な自己抗原である。また、RNPA遺伝子はヒト自己抗原遺伝子では塩基配列が決定している数少ない遺伝子でもある。従来、RNPAはユビキタスな蛋白でありその遺伝子にはvariationはないとされてきた。しかし、近年のヒト全ゲノム解析プロジェクトの進展により、ゲノムには少なくとも600-1,000bp毎にsingle nucleotide polymorphism（以下SNP）が存在している事が明かとなった。我々は前年度までの解析でRNPAにもSNPが存在している事を報告している。また、公開されたdatabaseにもRNPAにSNPを見る事ができる。しかし、この自己抗原遺伝子上のSNPが患者と健常人ではどのように異なるかについての解析は行われていない。もし、患者と健常人でSNPの頻度等に差異があれば、RNPAのSNPは疾患標識あるいは抗体産生機序解析の一助となる可能性がある。

B. 研究方法

RNPAのSNPを含む部位（表1）にTaqman PCR 蛍光primerを設定して、抗U1-snRNP自己抗体陽性の無名化症例（以下症例）32例および無名化さらにランダムに抽出した健常人女性34例、男性34例の

genomic DNAに対して、ABI prism 7700にてPCRを行った。その後SDS解析ソフトでAllele頻度を計算した。今回の解析では、遺伝子解析における個人情報への配慮のために、対照となる症例のDNAは倫理委員会の審査を経て、同意のもとに協力を受け、サンプルは無名化してから解析を行った。

C. 研究結果

前年度までに我々が報告したSNPも含めて、現在（2004年2月）明かとなっているRNPAのSNP 47箇所（表1参照）のうち、11箇所について症例のSNPのminor alleleの頻度を健常人（男女別）との比較で解析した。その結果（1）第6 exon直前のSNPのminor alleleの頻度が健常人（男女）と比較して統計学的有意差をもって増加していた（表1*）。（2）RNPAの5'側 inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C（以下ITPKC）遺伝子に近づくにつれてminor alleleの頻度は健常人と症例ともに高くなる傾向があった。（3）RNPAの5'側では頻度の高いalleleをもつ症例は他のSNPでも頻度の高いalleleをもつ傾向が強かった（ハプロタイプ形成）。（4）Alleleをそれぞれhomo.あるいはhetero.に持つ頻度を比較すると、症例（全員女性と推定される）は健常人女性とは異なる頻度を示した（表2、図1）。

D. 考察

今回はじめて、健常人との比較によりRNPAにおいて頻度に有意差をもつSNPが存在する事が明かとなった。このSNPはiSNPと呼ばれ、mRNAやアミノ酸配列には影響を与えないものと推定されるものの、疾患標識としての意味をもつと考えられる。また、RNPA 5'側のSNPは同じ染色体上でそれぞれが独立した頻度で存在しているわけではなく、一種の連鎖不平衡にあることが示された。この結果は、本症例群はある特定の遺伝子(変異)を持つひとつの集団である可能性を示している。

RNPA 5'側のSNPをallele頻度で比較すると今回解

析したRNPA上に存在するSNPは健常人群と症例では差のないものが多い。しかし、遺伝子をheterogeneousで持つかhomogenousで持つかで比較すると、本症例群は健常人女性とは異なるパターンを示していた。この事も、症例が特定の遺伝子変異をもつ集団である可能性を示している。

SNPはRNPAの5'側ITPKC遺伝子に近付くにつれてminor alleleの頻度が高くなる傾向があることから、ITPKC遺伝子かその上流の遺伝子の変異とRNPAのSNPに関連が有ることも否定できない。今後はRNPA遺伝子の上流のSNPについても解析して行く必要があると考えられた。

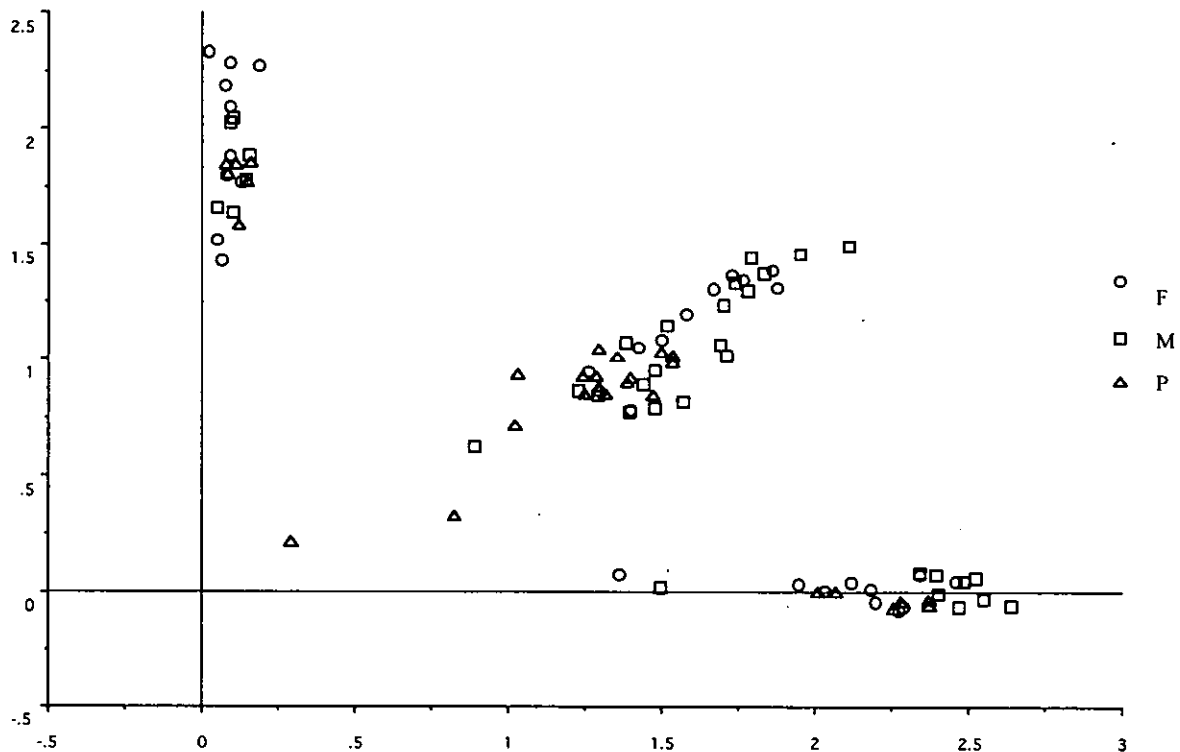


図1. Taqman PCRの結果解析例

(X軸VIC, Y軸FAM, F: woman, M: man, p: anti-RNP ab positive case)

配列AGGGACCCAGGGCTAAAGATTCGGA[G/T]AACTTAGGTTTCAGTACCCCCTCACA

表 1. RNPA gene の SNP (2004 Feb 時点)と今回解析した部位, 配列および頻度結果

位置+60bp 以内	SNP (major/minor)	NCBI ID number	備考	Allele frequency 各 64 中 (女性, 男性, 症例)		
13523851	G	2254338	5'			
13524031	G	4802088	INTRON			
13524151	G	2254326	INTRON			
13524152	T	4803364	INTRON			
13524391	G/T	1870087	INTRON	0.5	0.456	0.5
13524631	C/T	1869710	INTRON	0.031	0.031	0.031
13524731	T/G	1870086	INTRON	0.517	0.468	0.467
13525291	T	1455434	mRNA start			
13525411	T	1457141	INTRON			
13525651	C/T	NCBI ID なし	INTRON	0.276	0.2	0.2
13526091	A	2604874	INTRON			
13526631	A	10408452	INTRON			
13526751	C	9676480	INTRON			
13526911	A	10409683	INTRON			
13526912	T	10409130	INTRON			
13528231	G	10422828	INTRON			
13529091	C	2607416	INTRON			
13530411	G	7259158	INTRON			
13530931	A	2607415	INTRON			
13531631	T	2604875	INTRON			
13532271	T	10153483	INTRON			
13532331	C	10153478	INTRON			
13533412	C	207688	INTRON			
13533471	A	736625	INTRON			
13533991	A	897810	INTRON			
13534931	C	7247628	INTRON			
13535391	G	2607414	INTRON			
13536451	A	2607413	INTRON			
13536511	G	2607412	INTRON			
13536811	T	2607411	INTRON			
13537051	C/T	2305798	EXON	0	0	0.031
13537331	G	2305797	INTRON			
13537511	G	2279011	INTRON			
13537631	G	4803365	INTRON			
13537751	A/G	2249854	EXON	0	0.031	0
13537991	G	2249835	INTRON			
13538031	G	2249835	INTRON			
13538291	T/C	4802089	INTRON	0.093	0.093	0.219*
13539111	A/G	10412175	EXON	0	0	0.016
13539111	C/T	NCBI ID なし	EXON	0.016	0.031	0.016
13539111	T/C	NCBI ID なし	EXON	0	0	0.0467
13539411	G	1058852	INTRON			
13539531	T	4803366	mRNA end			
13541691	G/C	NCBI ID なし	INTRON	0	0	0.031
13541692	A	10607629	INTRON			
13541693	A	10607629	INTRON			
13541931	G	7254192	3'			

* $p < 0.01$

表2. SNPのhomo:heteroの人数比

位置	SNP		homo 対 hetero 対 homo の人数比		
			(女性)	男性	症例)
13524391 ~ 450	G /T	TT:GT:GG	10:10:10	6:19:09	6:16: 6
13524731 ~ 90	T/G	GG:TG:TT	10:10:09	6:18:08	5:18: 7
13525651 ~ 710	C/T	TT:TC:CC	1:14:14	1:11:20	2: 8:20

Single Nucleotide Polymorphism on U1-snRNP · A gene.

Mitsuo Okubo¹, Jun Okada², Hirobumi Kondo²

¹ Transfusion Medicine & Cell Therapy, Saitama Medical School,
² Department of Internal Medicine, Kitasato University

We detected single nucleotide polymorphism (SNP) within U1-snRNP-A (RNPA) gene. Eleven SNPs were analyzed by Taqman PCR system for 32 anti-RNP ab positive cases and 64 healthy donors. Allele frequencies of a SNP near exon 6 of healthy women, healthy men, and the cases were 0.093, 0.093, and 0.219, respectively. There was significant increased frequency of the SNP in the cases compared with healthy donors. Minor allele frequencies on 5'-terminus of RNPA were increased and showed a haplotype. Based on these SNP studies, it is possible that anti-RNP ab positive cases have a genetic diversity.

抗 RNP 抗体とマンノース結合レクチンの関連に関する研究

分担研究者：堤明人 筑波大学臨床医学系助教授

共同研究者：高橋令子、後藤大輔、松本功、伊藤聡、住田孝之 筑波大学臨床医学系

共同研究者：大谷克城、若宮伸隆 旭川医科大学

研究要旨

【目的】マンノース結合レクチン(MBL)は自然免疫で重要な役割を果たすが、遺伝子多型による血中濃度の低下と自己免疫疾患との関連が指摘されている。MCTD患者をふくむ抗RNP抗体陽性自己免疫疾患患者のMBL遺伝子多型を検討した。また、MBLに対する自己抗体の存在の有無を検討した。

【方法】患者血液よりゲノムDNAを調整し、PCR-RFLP法によりMBL遺伝子のコドン54多型の判定を行った。また、固相酵素抗体法により、血中MBL濃度、および血中抗MBL自己抗体の有無の検索をおこなった。

【結果】解析終了患者112名のうち正常型ホモ(AA)は70名、ヘテロ(AB)は37名、少数型ホモ(BB)は5名であった。Bアレルの頻度は21.0%であり、健常人とほぼ同じであった。BBである頻度は健常人よりやや高い傾向であったが有意差はみられなかった。MBLに対する自己抗体の存在が推測されたが症例数が少なく病態との関連は明らかでなかった。

【結語】MBL遺伝子多型と血中MBL濃度の間に明らかな関連が見られたが、MBL遺伝子型、血中MBL濃度、抗MBL抗体と病態との関連の解析にはさらなる症例の蓄積が必要と思われた。

A. 研究目的

マンノース結合レクチン(MBL)は補体C1q類似の構造をもち、その欠損により幼少期に反復する感染を繰り返すなど、自然免疫で重要な役割を果たすことが知られている。日本人ではMBL遺伝子の第1エクソンのコドン54に遺伝子多型が存在し、多数型ホモ(AA)に対し、ヘテロ(AB)では血中MBL濃度は著明に低下、少数型ホモ(BB)ではさらに低下することが知られている。反復感染、慢性ウイルス感染症、さらには自己免疫疾患との関連も指摘されている¹⁻³⁾。本研究では混合性結合組織病(MCTD)の特徴である抗RNP抗体の存在とMBL遺伝子多型、患者の病態との関連を検討し、MBL遺伝子多型もしくは血中濃度の測定がMCTD診療に有用であるかを検討することを目的とした。

さらに、MBLは全身性エリテマトーデス(SLE)患者の腎組織などに沈着していることも知られている。従って、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、すでに沈着しているMBLに結合して組織障害を助長したりすることが想像される。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。

B. 研究方法

研究は筑波大学倫理委員会および班員の所属する研究施設にて遺伝子解析の承認をうけた試料にておこない、試料の採取に当たってはすべて文書による遺伝子解析に対する同意を得た。遺伝子多型解析をおこなうため、まず患者もしくは健常人末梢血リンパ球よりゲノムDNAを調整し、多型性存在部分を挟むプライマーを用いてPCR反応により多型性存在部分を増幅した。多型のうち少数型(B)アレルのみを切断する制限酵素BamIにてPCR産物を処理し、アガロース電気泳動にてパターンを確認すること(PCR-RFLP法)により遺伝子型を決定した。

血中MBL濃度はラビット抗ヒトMBL抗体を用いた固相酵素抗体法により測定した。

抗MBL自己抗体を測定するため、新たに固相酵素抗体法を用いた測定系を作成した。MBLを固相化したプレートに、カルシウム依存性にMBLがIgGの糖鎖に結

合することを阻害するために EDTA 存在下に希釈した血清を反応させた。酵素標識二次抗体を用いて MBL と反応した IgG を検出した。これらのデータを患者・健康人間で比較するとともに、患者の臨床所見との関連を検討した。今回は患者 112 名 (SLE51、MCTD53、強皮症 8)、健康人 134 名の試料を使用した。

C. 研究結果

抗 RNP 抗体陽性者における MBL 遺伝子のアリアル頻度は A が 177 (79.0%)、B が 47 (21.0%) であり、健康人における 214 (79.8%) と 54 (20.2%) と比較してほぼ同等であった。遺伝子型は抗 RNP 抗体陽性者で AA70、AB37、BB5 に対し健康人では AA82、AB50、BB2 であり、患者群でやや BB が多かったが有意差はなかった (表)。各遺伝子型と血中 MBL 濃度との間には従来よりの報告と同様の強い関連が見られたが、肺高血圧症等 MCTD に関連した諸症状と MBL 遺伝子多型との関連は現時点では明らかになっていない。

抗 MBL 自己抗体を MCTD を含む自己免疫疾患患者血清で測定したところ、SLE 患者で抗体価の高いとおもわれる患者がみられた。抗体価の高い患者血清を用い、液相に MBL を追加した inhibition assay とペプシン処理による Fc 部分の除去実験をおこない、血清中の IgG が抗原抗体反応により特異的に MBL に結合していることを確認した。現在までに抗 RNP 抗体陽性患者 26 名の抗 MBL 抗体の測定をおこなったが抗体価の非常に高い患者はみられていない (図 1)。しかし抗 MBL 抗体の価と抗 RNP 抗体の価を比較したところ、有意差はなかったが正の相関をする傾向が見られ、抗 MBL 抗体が抗 RNP 抗体陽性者の血中に存在していることが示唆された (図 2)。

D. 考案

MBL は自然免疫による感染防御に深く関わるほか、自己免疫疾患の発症や進行に関与が指摘されている。自己免疫疾患に関わるメカニズムは明らかではないが、何らかの環境因子の排除に役立っている可能性や、アポトーシス細胞の処理に MBL が有用でその減少や欠損が自己抗原の増加から自己抗体産生につながる可能性が考えられる。従って MBL の遺伝子多型や血中濃度と抗 RNP 抗体をはじめとする自己抗体の産生、また病態との関連を検討していくことは重要と思われる。また、自己免疫疾患の治療に当たってはステロイドをはじめとした免疫抑制剤が使用されるため、通常成人では問題とな

らない MBL 減少や欠損による感染症の増加が問題になる可能性もある。骨髄移植にともなう感染症の増加と MBL 遺伝子多型の関連が報告されており、われわれも SLE 患者において MBL 遺伝子型と感染症のリスクに関連があることを示唆するデータを得ている。自己免疫疾患における免疫抑制療法と MBL との関連をさらに多くの症例により解明していくことは重要であると思われる。

今回の検討では抗 RNP 抗体陽性者における MBL 少数型アリアル (B アリアル) の頻度は健康人と大差なく、BB ホモの頻度は健康人よりやや多い傾向が見られたが BB ホモの患者は SLE 患者が主体であった。従って B アリアルの存在が直接 MCTD 発症の危険因子になっている可能性は低いものと考えられた。また、これまでの報告と同様、抗 RNP 抗体陽性者においても MBL 遺伝子多型と血中 MBL 濃度との強い関連が確認できたが、病態との関連は明らかではなかった。患者の病態との関連の検討は未だ不十分であり、今後解析をおこなう予定である。

また、MBL に対する自己抗体は現在のところ検討症例がわずかであるが、抗 RNP 抗体と抗体価が関連する傾向が見られ、実際に抗 MBL 自己抗体が抗 RNP 抗体陽性者に存在している可能性が示唆された。前述したように抗 MBL 抗体が存在する場合、自己免疫疾患の病態に様々な影響を及ぼすことも想定される。今後より多くの患者について抗 MBL 抗体の存在の有無を検索し、存在する場合はその臨床的意義を明らかにしていく予定である。

文献

- 1 Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N et al. Mannose binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 35: 960-5, 2000.
- 2 Tsutsumi A, Sasaki K, Wakamiya N et al. Mannose binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Genes Immun* 2:99-104, 2001.
- 3 Tsutsumi A, Ikegami H, Takahashi R, Murata H, Goto D, Matsumoto I, Fujisawa T, Sumida T. Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. *Hum Immunol* 64:621-624, 2003.

表 1. 全身性エリテマトーデス、混合性結合組織病、強皮症、健常人におけるマンノース結合レクチン遺伝子型

	SLE	MCTD	SSc	計	健常人	
AA	35	30	5	70	82	
AB	12	22	3	37	50	
BB	4	1	0	5	2	A:MBL 多数型アリール
	51	53	8	112	134	B:MBL 少数型アリール

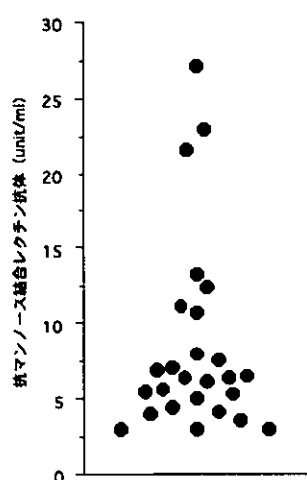


図 1. 抗 RNP 抗体陽性者における抗 MBL 抗体価

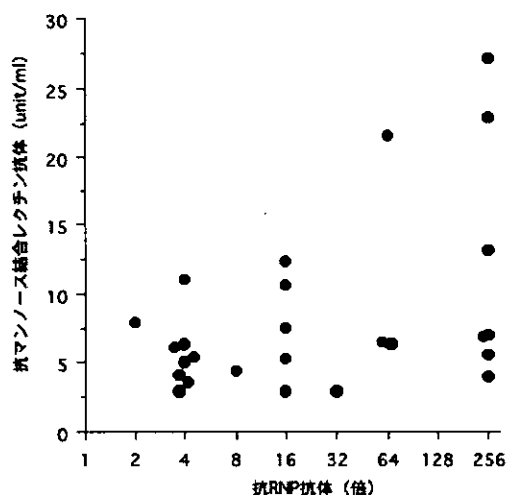


図 2. 抗 RNP 抗体価と抗 MBL 抗体価の関連

ASSOCIATION BETWEEN ANTI-RNP ANTIBODIES AND MANNOSE BINDING LECTIN

Akito Tsutsumi¹⁾, Reiko Takahashi¹⁾, Daisuke Goto¹⁾, Katsuki Ohtani²⁾, Isao Matsumoto¹⁾, Satoshi Ito¹⁾, Nobutaka Wakamiya²⁾, Takayuki Sumida¹⁾

Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba¹⁾.
Department of Microbiology, Asahikawa Medical College²⁾.

To clarify the association between the presence of anti-RNP antibodies and mannose binding lectin (MBL), a key molecule of innate immunity, we analyzed the codon 54 polymorphism of the MBL gene, serum MBL concentration and titers of anti-MBL autoantibodies in patients positive for anti-RNP antibodies. Among the 112 anti-RNP positive patients, 70 were homozygous for the majority allele, 37 were heterozygous and 5 were homozygous for the minority allele. The frequency of individuals homozygous for the minority allele were higher than that in healthy controls (2 among 134), but without statistical significance. Serum MBL concentrations were significantly associated with the MBL genotypes, individuals homozygous for the minority allele being the lowest. Relationships between genotypes or serum MBL concentrations and characteristics of MCTD were not evident. Titers of anti-MBL antibodies had a tendency toward having a positive relationship with those of anti-RNP antibodies. Titers of anti-MBL antibodies were studied in only 26 anti-RNP positive patients at this time. It is necessary to measure this autoantibody in a large number of patients to determine whether presence of this autoantibody is related to some clinical features of anti-RNP positive patients.

MCTDにおけるアンギオポエチン1 (ANG-1) 遺伝子の スプライスバリエーションに関する研究

研究協力者：塩沢和子 甲南病院加古川病院リウマチ科副院長

共同研究者：駒井浩一郎、塩沢俊一 神戸大学医学部保健学科膠原病学講座

研究要旨

私どもが見出した関節リウマチ(RA)の疾患遺伝子、第1染色体の death receptor 3 (DR3)、第8染色体のアンギオポエチン-1 (ANG-1)、およびX染色体の DBL の遺伝子多形 (遺伝子変異) の中で、ANG-1 遺伝子変異は血管新生を促進する遺伝子変異であり、また MCTD 等では血管内皮および血管周皮細胞の増殖・活性化が病的に重要である可能性が高いことから、今回私どもはANG-1の本症における遺伝子多型を知る前提として、ANG-1 mRNAのスプライシングバリエーションについて検索した。その結果、RAにおいて有意に増加が認められた269Gly挿入型変異 (mtと記載) が、MCTDにおいても4/12 (33.3%)に認められ、ヘテロ変異型は4/12(33.3%)、正常型と考えられる269Gly欠失型変異は4/12(33.3%)に認められ、MCTDでは血管新生促進型の269Gly挿入型変異が多くみられた。ANG-1遺伝子多型とMCTDの症状・所見との関わりについて、私どもはヒト関節滑膜にはAng-1のリガンドであるTie-2が発現しており、ヒト滑膜細胞においてTie-2を介するAng-1シグナルが、PI3Kinase (PK/Akt)経路およびMAPkinase (MEK/ERK)経路の両経路をへて伝達され、かつこれら両経路が独立に作動する系であることを見出した。このことから、MCTDでは遺伝素因として、血管新生が促進される傾向のあることが示唆された。

A. 研究目的

自己免疫疾患は、遺伝素因に環境要因 (引き金) が加わって発症する。自己免疫疾患の一つである関節リウマチの遺伝素因について、マイクロサテライトマーカーを用いた家系解析を用いて、家系に罹患同胞を含む41家系の関節リウマチ多発家系を調査した。この結果、疾患感受性遺伝子座を第1染色体D1S214/253、第8染色体D8S556、X染色体DXS1232/984の3箇所にて同定し、この結果を踏まえて、当該部位に位置する疾患感受性遺伝子として、第1染色体に位置する疾患遺伝子として細胞死誘導受容体FasのファミリーであるDR3遺伝子の変異、第8染色体に位置する疾患遺伝子としてアンギオポエチン1 (ANG-1) 遺伝子の変異、そしてX染色体に位置する疾患遺伝子として細胞の遊走性に関わる低分子量G蛋白に対するGEFであるDBLプロトオンコジーンの変異をそれぞれ同定した。以上の結果から、関節リウマチについては膠原病の遺伝素因が細胞増殖あるいは細胞死に関わるごく日常的に重要な分子の遺伝子多型によって形作られてい

ることが示唆される。

今回、私達は血管新生に関わるANG-1遺伝子多型の有無を、血管内皮および血管周皮細胞の増殖・活性化が病的に重要であると考えられるMCTDについて調査した。すなわち、私どもではすでに関節リウマチにおいてANG-1の269GlyをコードするGGT挿入型mRNA発現が有意に多いことを見出していることを踏まえて、今回MCTD患者群のGGT挿入型ANG-1 mRNAスプライスバリエーションの頻度解析を行った。

B. 研究方法

甲南病院加古川病院及び神戸大学医学部附属病院免疫内科において採血されたMCTD患者末梢血から常法によりトータルRNAを単離した。ANG-1エクソン4-5にかけて設定したプライマーによるRT-PCR法 (F2-2/R1186後F2-4/R1186のセミネストPCR) を行い、得られた遺伝子断片 (101bp) をF2-4プライマーによるダイレクトシーケンスにより解析した (図1)。