

患遺伝子解析についても、プロトコールを長崎大学遺伝子解析倫理委員会に提出し既に承認を得ている (021008-1: 遺伝子多型による関節リウマチ臨床経過分類の prospective study: 関節リウマチの疾患感受性遺伝子の解析研究)。

C. 研究結果

RA 早期鑑別診断の検討

フォローアップにより、診断が確定した RA 早期症例 65 名と non-RA 21 名で多変量解析 (ロジスティック回帰分析) を行うと、抗 CCP 抗体もしくは IgM-RF 陽性 (血清マーカー)、対称性手・指滑膜炎陽性 (MRI)、骨浸食陽性 (MRI) の 3 項目が鑑別に有用なマーカーとして抽出された (表 1)。相対危険度より、抗 CCP 抗体もしくは IgM-RF 陽性を 2 点、対称性手・指滑膜炎陽性を 1 点、骨浸食陽性を 2 点とするスコアリングを行った。スコア 3 点以上を早期 RA と診断した場合、感度 81.5%、特異度 95.2% の診断確度で RA を早期診断できた (表 2)。

表1 ロジスティック回帰分析で検出された早期RAと非RAの鑑別に有意なデータ

項目	Odds ratio	Coefficient	Standard error	P値	Weighted score
抗CCP抗体 もしくはIgM-RF	10.42	2.34	0.68	0.0006	2
対称性手・指滑膜炎	4.28	1.46	0.68	0.03	1
骨浸食	16.54	2.81	1.14	0.01	2

表2 スコアリングによる早期RAの診断

トータルスコア	感度 (%)	特異度 (%)
1	93.8	38.1
2	89.2	71.4
3	<u>81.5</u>	<u>95.2</u>
4	40.0	100.0
5	35.4	100.0

早期 RA 層別化の検討

抗 CCP 抗体の有無で早期 RA を 2 群に

分けると、抗 CCP 抗体陽性者は抗 CCP 抗体陰性者と比較して、CRP 定量、MMP-3 定性、滑膜炎の程度 (滑膜炎数と E-rate; 関節局所の vascularity の程度) には差異はないも、骨髄浮腫は前者で有意に強く認められた (表 3)。IgM-RF でも同様の傾向が認められたが、有意差はなかった (表 4)。これらに HLA-DRB1*0405 allele の検討を加えた。骨髄浮腫の陽性率および数は、HLA-DRB1*0405 allele 陽性・抗 CCP 抗体陽性群では 76.9%、3.69 ± 3.98 個、HLA-DRB1*0405 allele 陰性・抗 CCP 抗体陰性群では、25.0%、0.69 ± 1.99 個と、より顕著な差異が認められた。

表3. 抗CCP抗体の有無による早期RAの層別化の検討

検討項目	抗CCP抗体陽性 (n=54)	抗CCP抗体陰性 (n=26)	p value
CRP (mg/ml)	1.34 ± 2.03	2.19 ± 3.33	P = 0.39*
MMP-3 (%)	50.0 %	38.5 %	P = 0.33**
滑膜炎数	12.2 ± 6.4	10.3 ± 6.4	P = 0.30*
平均E-rate	7.65 ± 2.97	7.37 ± 2.89	P = 0.67*
骨髄浮腫 (%)	64.8 %	38.5 %	P = 0.03**
(number)	2.81 ± 3.53	1.11 ± 2.34	P = 0.01*

Data are mean ± SD.
*By Mann-Whitney U test.
**By Chi-Square test.

表4. IgM-RFの有無による早期RAの層別化の検討

variables	IgM-RF+ (n=54)	IgM-RF- (n=26)	p value
CRP (mg/ml)	1.45 ± 2.12	1.97 ± 3.26	P = 0.96*
MMP-3 (%)	51.9 %	34.6 %	P = 0.23**
滑膜炎数	12.1 ± 5.6	10.6 ± 7.8	P = 0.22*
平均E-rate	7.56 ± 3.20	7.58 ± 2.31	P = 0.58*
骨髄浮腫 (%)	63.0 %	42.3 %	P = 0.08**
(number)	2.67 ± 3.48	1.42 ± 2.69	P = 0.07*

Data are mean ± SD.
*By Mann-Whitney U test.
**By Chi-Square test.

D. 考察

血清マーカー、MRI での早期骨関節画像所見および HLA-DRB1* allele の解析は、RA 早期鑑別診断と関節破壊の予後予測に有用と考えられた。

E. 結論

関節炎患者の初回検査時のデータで、

RA 早期鑑別診断が可能であることが示唆された。抗 CCP 抗体、骨髄浮腫および HLA-DRB1*SE は関節破壊の予後不良因子とされ、今回の初回検査時のデータでも、これらには相関があると考えられた。今後はフォローアップにより、今回のデータを単純骨 X 線所見を含めて検討し、関節破壊予後のスコアリングも検討したい。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiraishi H, Motomura M, Yoshimura T, Fukudome T, Fukuda T, Nakao Y, Tsujihata M, Vincent A, Eguchi K. Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann Neurol* 57 (2): 289-293, 2005.
- 2) Sun F, Kawasaki E, Akazawa S, Hishikawa Y, Sugahara K, Kamihira S, Koji T, Eguchi K. Apoptosis and its pathway in early post-implantation embryos of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 67 (2): 110-118, 2005.
- 3) Matsumoto K, Ishikawa H, Nishimura D, Hamasaki K, Nakao K, Eguchi K. Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 40 (1): 252-259, 2004.
- 4) Ishida Y, Migita K, Izumi Y, Nakao K, Ida H, Kawakami A, Abiru S, Ishibashi H, Eguchi K, Ishii N. The role of IL-18 in the modulation of matrix metalloproteinases and migration of human natural killer (NK) cells. *FEBS Lett* 569 (1-3): 156-160, 2004.
- 5) Nishiura Y, Nakamura T, Fukushima N, Moriuchi R, Katamine S, Eguchi K. Increased mRNA expression of Th1-cytokine signaling molecules in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Tohoku J Exp Med* 204 (4): 289-298, 2004.
- 6) Ando T, Latif R, Daniel S, Eguchi K, Davies TF. Dissecting linear and conformational epitopes on the native thyrotropin receptor. *Endocrinology* 145 (11): 5185-5193, 2004.
- 7) Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Kobayashi M, Fukushima T, Takahashi R, Kuwahara H, Kita A, Oshima K, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes. *J Autoimmun* 22 (1): 73-78, 2004.
- 8) Ishida-Takahashi R, Uotani S, Abe T, Degawa-Yamauchi M, Fukushima T, Fujita N, Sakamaki H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. Rapid inhibition of leptin signaling by glucocorticoids in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 279 (19): 19658-19664, 2004.
- 9) Kawasaki E, Abiru N, Eguchi K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of beta cell damage. *Diabetes Res Clin Pract* 66 (Suppl 1): S27-32, 2004.
- 10) Tanaka F, Migita K, Kawabe Y, Aoyagi T, Ida H, Kawakami A, Eguchi K. Interleukin-18 induces serum amyloid A (SAA) protein production from rheumatoid synovial fibroblasts. *Life Sci* 74 (13): 1671-1679, 2004.
- 11) Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, Miyashita T, Tanaka F, Ida H, Migita K, Origuchi T, Eguchi K. Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells. *Rheumatology (Oxford)* 43 (4): 448-452, 2004.
- 12) Miyashita T, Kawakami A, Nakashima T, Yamasaki S, Tamai M, Tanaka F, Kamachi M, Ida H, Migita K, Origuchi T, Nakao K, Eguchi K. Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of

- fibroblast-like synovial cells. *Clin Exp Immunol* 137 (2): 430-436, 2004.
- 13) Migita K, Miyashita T, Ishibashi H, Maeda Y, Nakamura M, Yatsuhashi H, Ida H, Kawakami A, Aoyagi T, Kawabe Y, Eguchi K. Suppressive effect of leflunomide metabolite (A77 1726) on metalloproteinase production in IL-1beta stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 137 (3): 612-616, 2004.
- 14) Ida H, Kawasaki E, Miyashita T, Tanaka F, Kamachi M, Izumi Y, Huang M, Tamai M, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Motomura M, Yoshimura T, Eguchi K. A novel mutation (T61I) in the gene encoding tumour necrosis factor receptor superfamily 1A (TNFRSF1A) in a Japanese patient with tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) associated with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 43 (10): 1292-1299, 2004.
- 15) Hida A, Kawakami A, Miyashita T, Yamasaki S, Nakashima K, Tanaka F, Izumi Y, Tamai M, Huang M, Ida H, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Eguchi K. Nitric oxide acts on the mitochondria and protects human endothelial cells from apoptosis. *J Lab Clin Med* 144 (3): 148-155, 2004.
- 16) Ishida Y, Migita K, Izumi Y, Nakao K, Ida H, Kawakami A, Abiru S, Ishibashi H, Eguchi K, Ishii N. The role of IL-18 in the modulation of matrix metalloproteinases and migration of human natural killer (NK) cells. *FEBS Lett* 569 (1-3): 156-160, 2004
- 17) Migita K, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yoshida Y, Yokoyama T, Daikoku M, Ueki T, Takii Y, Yano K, Yastuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A (SAA) synthesis in human hepatocytes in vitro. *FEBS Lett* 569 (1-3): 235-239, 2004.
- 18) Kawakami A, Urayama S, Yamasaki S, Hida A, Miyashita T, Kamachi M, Nakashima K, Tanaka F, Ida H, Kawabe Y, Aoyagi T, Furuichi I, Migita K, Origuchi T, Eguchi K. Anti-apoptogenic function of TGFbeta1 for human synovial cells: TGFbeta1 protects cultured synovial cells from mitochondrial perturbation induced by several apoptogenic stimuli. *Ann Rheum Dis* 63 (1): 95-97, 2004.
- 19) 江口勝美. 膠原病の早期診断とその問題点. *内科* 95 (3): 410-416, 2005.
- 20) 江口勝美, 折口智樹. 多発性筋炎・皮膚筋炎. *毎日ライフ* 36 (4): 32-37, 2005.
- 21) 折口智樹, 江口勝美. 接着分子. *日本臨床* 63 (増刊号): 200-207, 2005.
- 22) 川上 純, 田中史子, 玉井慎美, 中村英樹, 江口勝美. 病態形成とアポトーシス. *日本臨床* 63 (増刊号): 100-105, 2005.
- 23) 江口勝美. ヒト抗 TNF α 抗体アダリムマブを用いた関節リウマチの治療. *炎症と免疫* 12 (1): 70-77, 2004.
- 24) 江口勝美. シェーグレン症候群, 今日の治療指針, 医学書院, p575-577, 2004.
- 25) 江口勝美. 関節リウマチの合併症の治療. *臨床と研究* 81 (2): 27-33, 2004.
- 26) 江口勝美. RA の病態と最新の薬物療法. *骨・関節・靭帯* 17 (2): 149-159, 2004.
- 27) 江口勝美. 関節リウマチ. リウマチ・膠原病診療チェックリスト, 文光堂, p180-187, 2004.
- 28) 江口勝美. 関節リウマチ/シェーグレン症候群/血管炎症候群/ベーチェット病/抗リン脂質抗体症候群. 免疫学コア講義, 南山堂, p230-245, 2004.
- 29) 江口勝美, 折口智樹. 混合性結合組織病 (MCTD). リウマチ・膠原病診療実践マニュアル, 文光堂, p227-228, 2004.
- 30) 江口勝美, 折口智樹. 膠原病重複症候群 (overlap 症候群). リウマチ・膠原病診療実践マニュアル, 文光堂, p229, 2004.
- 31) 江口勝美, 折口智樹. サルコイドーシス. リウマチ・膠原病診療実践マニ

- ュアル, 文光堂, p230-231, 2004.
- 32) 江口勝美, 折口智樹. 皮膚筋炎, 多発性筋炎. リウマチ・膠原病診療実践マニュアル, 文光堂, p232-234, 2004.
 - 33) 江口勝美. 全身性エリテマトーデス. EBM 内科処方指針, 中外医学社, p821-831, 2004.
 - 34) 江口勝美. RA の診断における抗 CCP 抗体の有用性. リウマチ科 31 (4): 379-386, 2004.
 - 35) 江口勝美. RA の診断・早期診断. 内科診療 Q & A 39: 74-77, 2004.
 - 36) 江口勝美. 関節リウマチの早期診断は可能か. 医学のあゆみ 209 (10): 802-808, 2004.
 - 37) 江口勝美. 自己抗体からみた早期診断. 関節外科 23 (8): 20-27, 2004.
 - 38) 川上 純, 玉井慎美, Hashmi Rashid, 上谷雅孝, 青柳 潔, 江口勝美. MRI の進歩. 内科 93 (2): 229-231, 2004.
 - 39) 川上 純, 玉井慎美, 中村英樹, Hashimi Rashid, 上谷雅孝, 青柳 潔, 江口勝美. 関節リウマチの骨破壊と MMP-3. RA Letter 4, 2004.
 - 40) 川上 純, 玉井慎美, 中村英樹, Hashimi Rashid, 青柳 潔, 上谷雅孝, 江口勝美. MRI と血清マーカーによる関節リウマチの早期診断. 「DIASAT ANTI-CCP」 Topics, 2004.
 - 41) 上谷雅孝, 川上 純, 玉井慎美, 江口勝美. 早期関節リウマチの画像診断. 九州リウマチ 24 (1): 1-5, 2004.
 - 42) 川上 純, 玉井慎美, 中村英樹, Hashimi Rashid, 青柳 潔, 上谷雅孝, 江口勝美. MRI と血清マーカーによる関節リウマチの早期診断. 自己抗体と自己免疫, 医学生物学研究所, p23-26, 2004.
 - 43) 川上 純, 江口勝美. Adalimumab. Current Therapy 22 (1): 44-47, 2004.
- ## 2. 学会発表
- 1) 川上 純, 江口勝美他. 自己抗体, MRI 画像, 疾患遺伝子からみた早期診断と臨床経過の予知 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p117, 2004.
 - 2) 上谷雅孝, 江口勝美他. 早期関節リウマチにおける滑膜炎と骨変化: MRI による検討 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p116, 2004.
 - 3) 玉井慎美, 江口勝美他. 関節リウマチ早期診断における MRI と血清マーカーの意義 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p216, 2004.
 - 4) 玉井慎美, 江口勝美他. MRI と血清マーカーによる関節リウマチの早期診断 日本内科学会雑誌 93, Supplement 146: 2004.
 - 5) 川上 純, 江口勝美他. 滑膜細胞における TRAIL を介したアポトーシス誘導の分子機序: サイトカイン成長因子による修飾 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p93, 2004.
 - 6) 川上 純, 江口勝美他. PDGF による滑膜細胞 TRAIL 依存症アポトーシスの制御 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p159, 2004.
 - 7) 田中史子, 川上 純他. 血管内皮細胞の TRAIL 依存症アポトーシスへの IFN gamma の作用機序 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p174, 2004.
 - 8) 川上 純, 江口勝美他. シェーグレン症候群唾液腺組織における Toll-like receptors (TLRs) 発現の検討 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p199, 2004.
 - 9) 玉井慎美, 江口勝美他. IFN gamma による滑膜細胞 TRAIL 依存症アポトーシス制御機序の検討 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p279, 2004.
 - 10) 宮下賜一郎, 江口勝美他. Lipid raft 阻害による血管内皮細胞 TRAIL 誘導性アポトーシス感受性の増強 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p280, 2004.
 - 11) 玉井慎美, 江口勝美他. IFN gamma による滑膜細胞 TRAIL 依存症アポトーシス制御機序の検討 日本臨床免疫学会誌 27: p256, 2004.

- 12) 川上 純、江口勝美他. シェーグレン症候群唾液腺組織における Toll-like receptors (TLRs)発現の検討 日本臨床免疫学会会誌 27: p248, 2004.
- 13) 玉井慎美、江口勝美他. 関節リウマチ早期診断におけるMRIと血清マーカーの意義 日本臨床免疫学会会誌 27: p261, 2004.
- 14) 田中史子、川上 純他. IFN γ による滑膜細胞 TRAIL 依存症アポトーシス制御機序の検討 日本免疫学会総会・学術集会記録 p247, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

コンパクト MRI および NKT 細胞を用いた関節リウマチの 早期診断法の確立に関する研究

分担研究者 住田孝之 (筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 教授)

研究要旨

関節リウマチの早期診断方法を確立することを目的として、コンパクト MRI および可溶性 CD1d(sCD1d)発現について検討した。その結果、コンパクト MRI は、省スペース、造影剤不用、X 線で解析不明の軟部組織の異常を明らかにすることができ、関節リウマチの早期診断に有用であることが判明した。sCD1d も早期リウマチの血清中に増加しており、疾患特異性は確立していないが、関節リウマチの早期診断に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の早期診断は早期に治療を開始する上で不可欠である。1)X 線上の骨破壊を生じない早期の段階で RA を診断するためには、造影剤も不用でしかも時間のかからない手軽なコンパクト MRI による診断が望ましい。本研究では、コンパクト MRI による RA の早期診断の可能性について検討することを一つの目的とした。2) 早期 RA においても調節性 T 細胞の一つである NKT 細胞が減少していることが判明してきた。そこで、本研究では、NKT 細胞数低下の原因の一つと考えられる可溶性 CD1d 分子について、蛋白レベルで定量するシステムを構築し RA の早期診断に役立てることをもう一つの目的とした。

B. 研究方法

- 1) インフォームド・コンセントを取得した当科進行 RA 患者(発症後 1 年以上)5 名、早期関節リウマチ患者 (発症後 1 年以内) 9 名、健常人 12 名の罹患手を対象とした。(1)従来の X 線装置、(2)小型 MRI(磁石の重量が 1400kg)による画像診断をおこなった。
- 2) 19 名の RA と 34 名の健常人の血清中

の可溶性 CD1d 分子(sCD1d)を蛋白レベルで測定するために、ウサギにキャリア蛋白をつけた合成ペプチド (QDLWTSGSQDFSPG) を免疫しポリクローナルな抗体を作成した。Western ブロット法にてポリクローナル抗体の抗原特異性を検定した後、モノクローナル抗 CD1d 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法にて sCD1d 蛋白を測定した。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体を使用する際には、大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者さんにインフォームド・コンセントを施行し、十分に研究内容を理解していただき、ご本人の同意を得た上で研究を実行した。

C. 研究結果

- 1) (1)健常人 12 名を対象としてコンパクト MRI を施行した結果、造影剤を用いなくても、骨、滑膜などの軟部組織の解析が可能であることが判明した。(2) 進行 RA(stage II-IV)においては、滑膜炎、骨の erosion, cyst, 骨髄浮腫、亜脱臼、脱臼、などが明瞭に認められた (図 1)。特に、滑膜炎などの軟部組織の

炎症、骨髄浮腫などは X 線検査では認められない所見であった。(3)早期リウマチにおいては、滑膜炎、骨髄浮腫など従来の X 線検査では明らかにされなかった早期炎症所見が認められた(図 2)。

- 2) 早期 RA の血中 sCD1d 濃度は 1.48 ± 1.00 であり、健常人 (0.74 ± 0.42) と比較して有意に sCD1d が高いことが明らかになった ($p < 0.0005$) (図 3)。

D. 考察

- 1) コンパクト MRI は小型であるため大きなスペースを必要としないし、造影剤を使用する必要もないので簡便である。さらに、X 線では判明しない滑膜炎、骨髄浮腫などの軟部組織の炎症性変化を解析することができた。このことは、コンパクト MRI が関節リウマチの早期診断に有用であることを示している。
- 2) 早期 RA では、血中 sCD1d が増加していることが明らかとなり、疾患特異性に関する結果が待たれるが、RA の早期診断に有用な指標の一つと考えられた。単核球中における sCD1d mRNA 量は、蛋白量とは異なり RA において減少していることがすでに報告されている。この事実は、過剰に産生された sCD1d 蛋白によるネガティブフィードバック機構により細胞内の mRNA 合成が抑制されているためと考えられる。

E. 結論

- 1) コンパクト MRI は関節リウマチの早期診断において X 線検査より有用である。
- 2) 血中 sCD1d の測定は関節リウマチの早期診断に有用であるが、疾患特異性に関する今後の検討が必要である

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsutsumi, A., Takahashi, R., and Sumida, T. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. (in press)
- 2) Ohnishi, Y., Tsutsumi, A., Goto, D., Itoh, S., Matsumoto, I., Taniguchi, M., and Sumida, T. TCRVa14+ NKT cells function as effector T cells in collagen-induced arthritis mice. *Clin. Exp. Immunol.* (in press)
- 3) Tomoo, T., Tsutsumi, A., Yasukochi, T., Ikeda, K., Ochiai, N., Ozawa, K., Shibana, Y., Ito, S., Matsumoto, I., Goto, D., and Sumida, T. Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis-coupled subtractive hybridization technique. *Int. J. Mol. Med.* (in press)
- 4) Naito, Y., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Goto, D., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheu. Dis* (in press)
- 5) Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Muraki, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Wakamiya, N., and Sumida, T. Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheu. Dis.* 64:311-314, 2005.
- 6) Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Wakamiya, N., and Sumida, T. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 585-590, 2004
- 7) Kato, T., Asahara, H., Kurokawa, MS, Fujisawa, K., Hasunuma, T., Inoue, H., Tsuda, M., Takahashi, S., Motokawa, S., Sumida, T., and Nishioka, K. HTLV-I env protein acts as a major antigen in patients with HTLV-I-associated arthropathy. *Clin.*

- Rheumatol. 23:400-409, 2004.
- 8) Muraki, Y., Matsumoto, I., Chino, Y., Hayashi, T., Suzuki, E., Goto, D., Ito, S., Murata, H., Tsutsumi, A., and Sumida, T. GPI variants play a key role in the generation of anti-GPI Abs: possible mechanism of autoantibody production. Biochem. Bioph. Res. Co. 60:1316-1324, 2004.
- 9) Tsutsumi, A., Adachi, Y., Murata, H., Kojo, S., Shibuya, K., Nakamura, H., and Sumida, T. GOS24, a gene that regulates TNFa production, is highly expressed in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 31:1044-1049, 2004
- 10) Muraki, Y., Tsutsumi, A., Takahashi, R., Suzuki, E., Hayashi, T., Chino, Y., Goto,

D., Matsumoto, I., Murata, H., and Sumida, T. Polymorphisms of IL-1b gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol. 31:720-725, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1. 進行関節リウマチにおけるコンパクトMRI解析

Radiocarpal, distal radioulnar, ulnar styloidにerosion、ulnar styloid周囲には滑膜増生と思われるsoft tissueが認められる。手根骨, carpometacarpal jointにも多数の虫食い状のerosionが認められ、関節裂隙は狭小化している。

STIRでは、第2MCPが高信号、T1WIで低信号を呈し高度なerosionがある。

第3,4,5MCPにもerosion。

PIP,第1指MCPにもerosion。

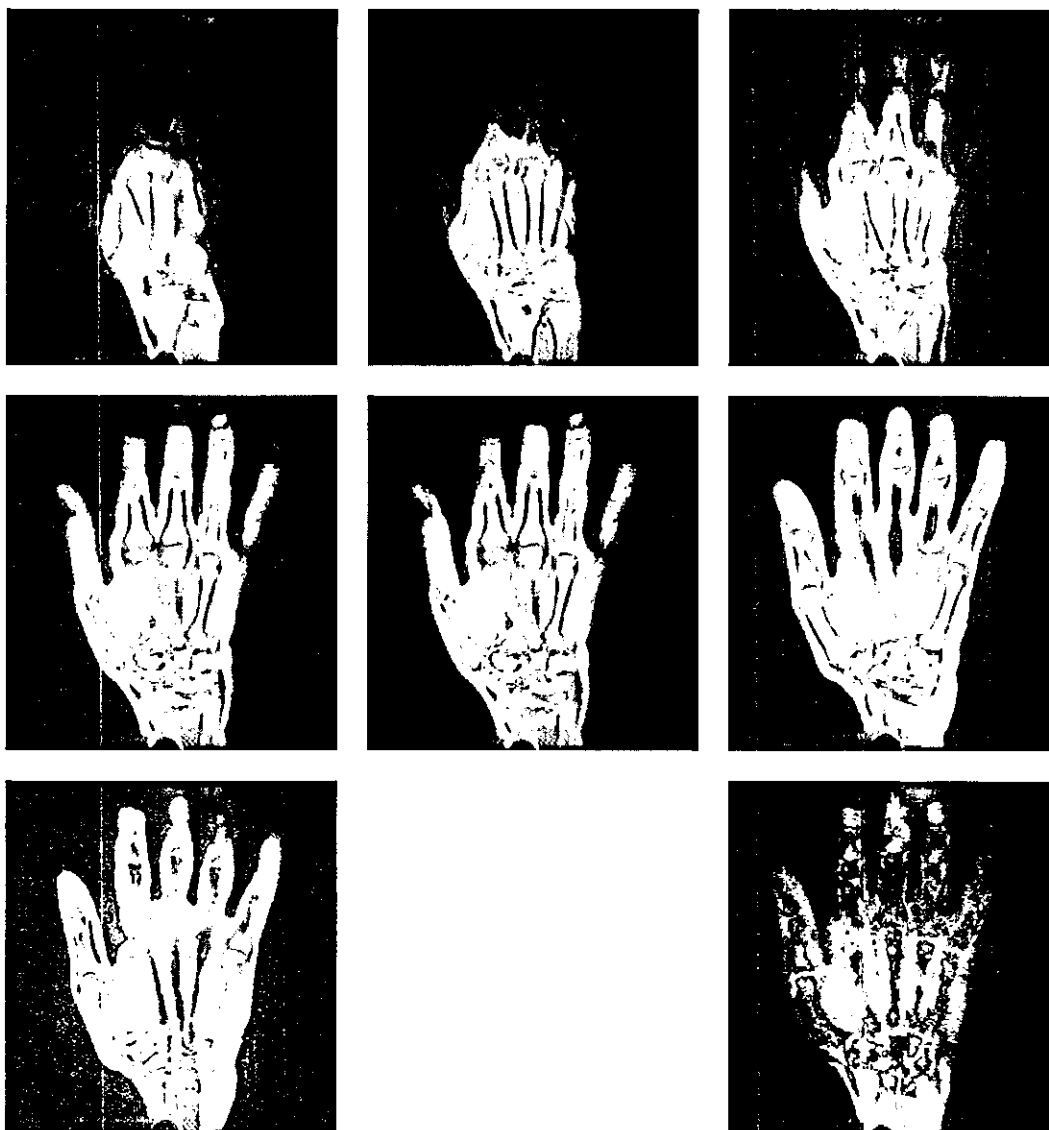


図2. 早期関節リウマチにおけるコンパクトMRI解析

第1指屈筋腱に沿ってSTIRで高信号
→tenosynovitis

尺骨茎状突起周囲に軟部組織の低信号
→synovitis

尺骨頭に小 erosion

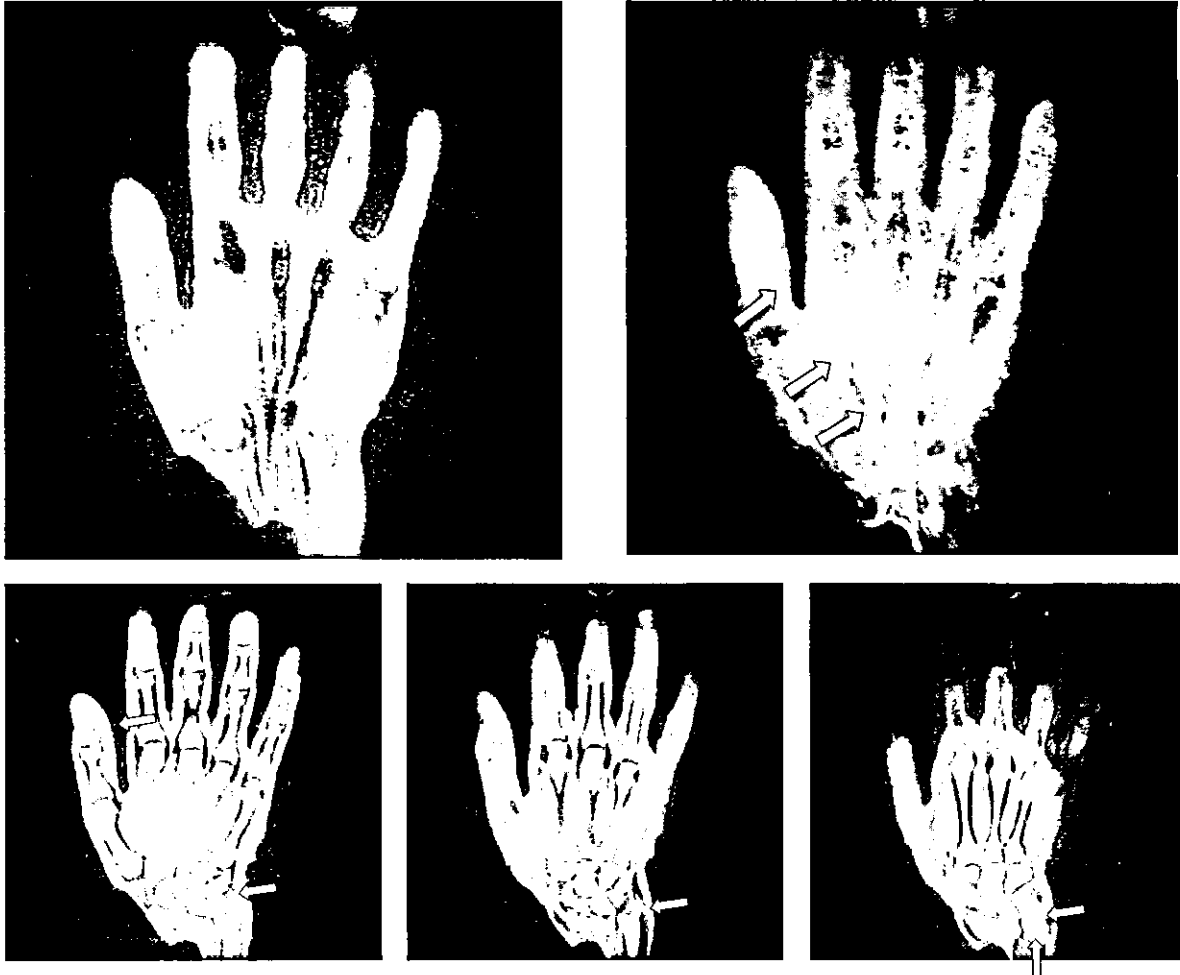
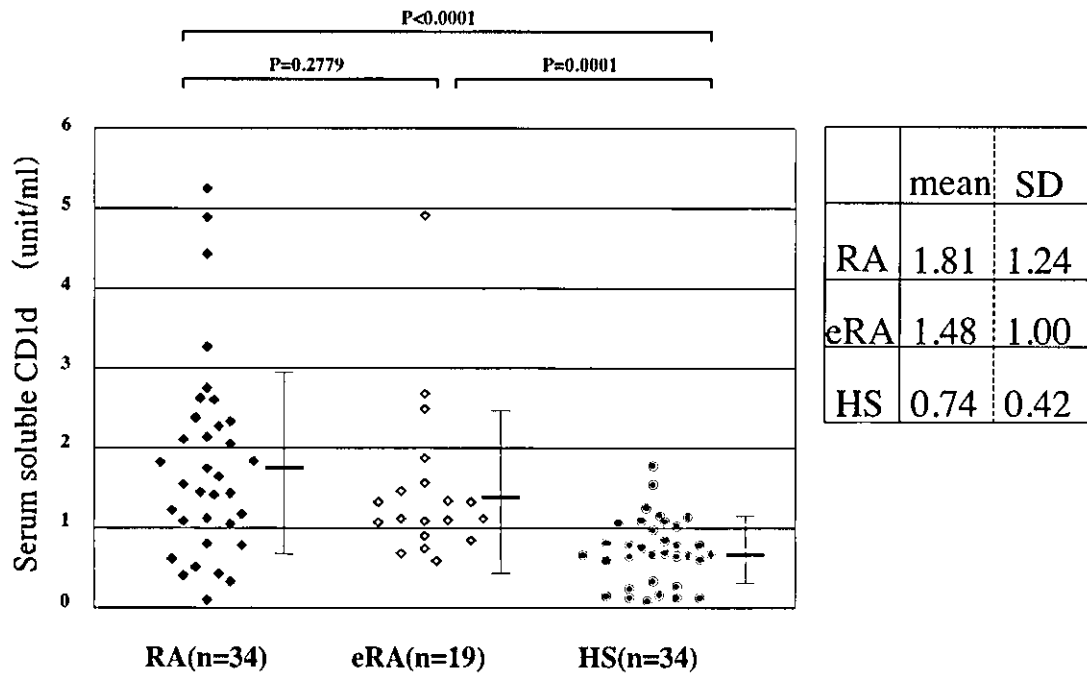


图 3. 血中可溶性 CD1d 蛋白

Serum soluble CD1d concentration at the patients with RA and early RA



CIITA トランスジェニックマウスによる実験的関節リウマチ発症モデル

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 教授)
共同研究者 金澤 智 (同 学内講師)

研究要旨

リウマチ発症に遺伝的背景として主要組織適合性複合体クラス II (MHC クラス II) が関与している。そこで MHC クラス II 遺伝子群の転写活性化因子 class II transactivator (CIITA) をコラーゲン II 型 (Col2) プロモーターを用いて関節局所に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作成した。本 Tg マウス は、関節炎を自然発症しないものの、col2 誘導性関節炎 (CIA) に対し高い感受性を示した。すなわち野生型マウスでは関節炎を誘導できないような低濃度 Col2 に対して Tg マウスは RA に類似した関節炎の発症を示した。この 関節炎は、通常の CIA に比べて発症が徐々に起こるが、その炎症過程は慢性かつ進行性であり、最終的には関節破壊を起こした。病理組織学的にもヒト RA に酷似し、滑膜細胞の異常増殖、びまん性の炎症性細胞浸潤、パンヌス形成が観察された。また CIA 等の RA モデルマウスではこれまで検出されていない抗 CCP 抗体も陽性であった。従って、これまで CIA 等で観察され難かった関節リウマチ様病変の進行過程の解析が本 Tg マウスで可能となり、その発症過程、特に早期における分子病態を探るのに有用なモデルであると考えられた。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) の発症には、遺伝的背景、感染病原体、環境要因の 3 者が深く関わっているが、その実体はいまだ十分に明らかになっていない。他方、遺伝的背景および分子レベルでの病態解析から、研究の突破口となりうる知見が集積されつつある。例えば、MHC クラス II とりわけ DR1 および DR4 等が RA 発症に深く関与することが示されている。また、関節局所における異所的な MHC クラス II の発現が報告されており、病変局所における MHC クラス II の関与する抗原提示能の亢進が示唆された。このことは、RA における免疫制御機構の破綻の解明の端緒となりうる可能性を秘めている。さらに、転写活性化因子のひとつ class II transactivator (CIITA) が MHC クラス II の発現を制御するマスタースイッチとして働くことが明らかにされた。CIITA およ

び関連遺伝子は原発性免疫不全症候群のひとつである bare lymphocyte syndrome の原因遺伝子として知られており、免疫異常との関連も示唆されている。そこで、我々は CIITA をコラーゲン II 型 (Col2) プロモーター下におくことで、MHC クラス II を関節局所に発現する CIITA トランスジェニック (CIITA Tg) マウスを作成した。すなわち、MHC クラス II の過剰産生による抗原提示能の亢進によりコラーゲン II 型などの抗原に対する感受性を高めることにより RA 様病変を惹起する実験モデルの創出を試みた。

B. 研究方法

Col2 プロモーターを用い CIITA マウスを作製した。各 Tg マウスを DBA マウス (H-2^d バックグラウンド) に 10 世代以上バッククロスさせた。それぞれのマウスは、RA を自然発症しなかった。そこで単純な

完全アジュバントの関節附近への注射を行なうと、Tg マウスにおいて炎症を誘発できることが明らかとなった。一方 WT マウスでは完全アジュバントにより一過性に腫脹が見られたが、その後すみやかに寛解した。そこで、様々な濃度の Col2 を常法に従い皮下注射し、CIA の誘発を試みた。低い Col2 濃度（通常の濃度の 1/20）で本 Tg マウスのみ RA に類似した関節炎が発症した。そこで低濃度 Col2 誘導により誘発される CIA の炎症性細胞浸潤、パンプス形成、破壊関節局所関節破壊等の解析を行なった。

(倫理面への配慮)

以上の実験計画のうちヒトからの細胞組織および遺伝子を用いる実験については、患者および家族より自由意志のもとでインフォームド・コンセントを取得し、科学技術会議生命倫理委員会の「ヒトゲノム研究に関する基本原則」と名古屋市立大学倫理委員会および遺伝子解析研究倫理審査委員会の規約を遵守し、学内委員会の承認のもとに実施した。また動物の取り扱いに関しては、名古屋市立大学実験動物施設、動物取り扱いの指針を遵守し、実施した。

C. 研究結果

本 Tg マウスにおける関節炎は、通常の CIA に比べて徐々に起こるが、その炎症過程は慢性かつ進行性で最終的には関節破壊を起こした。この経過は関節での激しい急性炎症に関節破壊が合併する通常の高 Col2 濃度での CIA とは著しく異なっていた (図 1)。病理組織学的にもヒト RA により酷似し、滑膜細胞の異常増殖、びまん性の炎症性細胞浸潤、パンプス形成を伴う軟骨および骨破壊が観察された (図 2)。また、破壊関節局所において肥満細胞の浸潤や局所的な肉芽腫様病変の形成も見られた。さらに、CIA 等の RA モデルマウスではこれまで検出されていない抗 CCP 抗体も陽性であった。

Clinical scoreの経時的变化

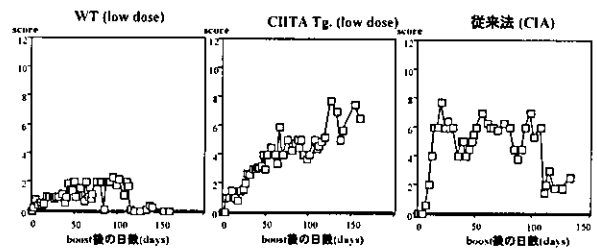


図 1 Clinical score の経時的变化
関節炎発症時期は、従来法では追加免疫後約 1 週であるのに対比、CIITA Tg.を用いた場合 low dose (従来法の 1/20) では 5-6 週と遅く、徐々に症状が進行していた。また症状の持続期間は CIA では 100 日前後で消退するのに対し、CIITA Tg.を用いた場合では 150 日以上も持続した。

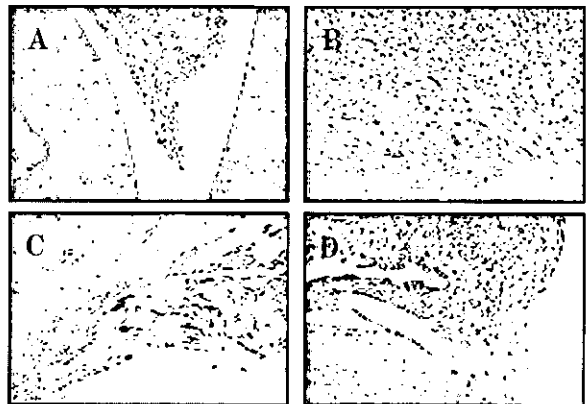


図 2 CIITA Tg. の病理組織像
CIITA Tg.は、ヒトと RA に酷似した特徴を示す。それぞれ CIA 誘導後 1 週 (A)、4 週 (B)、10 週 (C)、15 週 (D) の HE による組織染色像を示す。

D. 考察

今回新たに開発した CIITA Tg マウスは、関節を主座とする慢性炎症から関節破壊に至る長期間に渡る RA に酷似した病変を臨床的および病理組織学的にも呈し、RA における免疫制御系の破綻の分子機構を解析する為の適切なモデル動物であることが明らかとなった。従来の CIA とは病態推移のみならず病理組織像および抗 CCP 抗体の出現など多くの点で異な

っていた。これまでリウマチのモデルマウスとして CIA 誘導マウス、glucose-6-phosphate isomerase 反応性 T cell receptor Tg マウス、SKG マウス等があるが、MHC クラス II 等抗原提示機能に着目したモデルマウスの報告はない。また病態の変化を段階的にモニターできるようなモデルマウスの報告はない。このため本研究の新規性およびリウマチ研究における有用性は高く、医薬品開発など産業面における波及効果も高いと考えられる。

E. 結論

CIITA Tg は RA を自然発症しないものの、CIA 誘導に用いられる通常の濃度の 1/20 の ColII 濃度で RA に酷似した慢性進行性かつ破壊性の関節炎を誘導できた。今後このマウスでの滑膜組織について、Notch シグナルや NF- κ B シグナルの活性化、相互間の cross-talk、さらにこれらに関連して滑膜細胞の異常などを調べることにより、特に RA の初期過程の分子機構と免疫応答制御機構の破綻のメカニズムの解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi, N., Kobayashi, S., Jiang, X., Kitagori, K., Imai, K., Hibi, Y., and Okamoto, T. : Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from TP53BP2 gene by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:434-438, 2004.
- 2) Tetsuka, T., Uranishi, H., Sanda, T., Asamitsu, K., Yang, J-P., Wong-Staal, F. and Okamoto, T. : RNA helicase A interacts with nuclear factor-kappa B p65 and functions as a transcriptional coactivator. *Eur. J. Biochem.* 271: 3741-3751, 2004.
- 3) Tozawa, K., Okamoto, T., Kawai, N., Hashimoto, Y., Nagata, D., Hayashi, Y. and Kohri, K. : Positive correlation between sialyl Lewis X expression and pathological findings in renal cell carcinoma. *Kidney Int.* 2005. (in press)
- 4) Sanda, T., Iida, S., Ogura, H., Asamitsu, K., Murata, T., Bacon, K.B. Ueda R. and Okamoto, T.: Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Clin. Can. Res.* 2005 (in press)
- 5) Kobayashi, S., Kajino S., Takahashi, N., Kanazawa, S., Imai, K., Hibi, Y., Ohara, H., Itoh M. and Okamoto, T. : 53BP2 induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. *Genes Cells* 2005 (in press)
- 6) Okamoto, T.: The epigenetic alteration of synovial cell gene expression in rheumatoid arthritis and the roles of NF- κ B and Notch signaling pathways. *Modern Rheum.* 2005 (in press)
- 7) Ota, S., Kanazawa, S., Kobayashi, M., Otsuka, T. and Okamoto, T.: Establishment of a simple and quantitative immunospot assay for detecting anti-type II collagen antibody using infrared fluorescence imaging system (IFIS). *J. Immunol. Methods.* 2005 (in press)

2. 学会発表

- 1) 岡本 尚、安藤喜一郎、渡邊宣之、太田周介、金澤 智 : Gene expression profile analysis of rheumatoid arthritis(RA):Activation of Notch signaling and its pathophysiological implications. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2004 年 4 月 15 日～17 日、岡山
- 2) 太田周介、金澤 智、関根知代子、小林正明、大塚隆信、岡本 尚 : 関節リウマチ症状を示す新規 CII TA トランスジェニックマウス 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2004 年 4 月 15 日～17 日、岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

- 1) 岡本 尚、田中清隆、長谷川順一:
NF- κ B 活性化抑制剤 (特願
2004-3727) (特願 2004-3728)
- 2) 金澤 智、岡本 尚: ヒト関節リウ
マチの病態を再現するトランスジェ
ニック非ヒト哺乳動物 (特願
2004-66218)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

遺伝子多型解析および発現解析による関節リウマチ関連遺伝子の検討

分担研究者 土屋尚之 (東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野 助教授)

研究要旨

昨年度までに、関節リウマチ(RA)の滑膜組織の血管内皮細胞に Id (inhibitor of differentiation/DNA binding)1, Id3 が強発現し、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC)の VEGF 誘導性増殖、活性化、血管新生に必須の因子であること報告した。今年度の研究では、Id1, Id3 の機能に微妙な違いがあること、また、Id1, Id3 の gene silencing により、HUVEC における TNF α 誘導性 E-selectin 発現が抑制されることを見出した。Id は今後の RA 治療のための興味深い標的と考えられる。免疫グロブリン様受容体ファミリーに属する *LILR(ILT, LIR)* 遺伝子群は、免疫制御のみならず、破骨細胞分化における役割も示唆されている。本年度は、昨年度までに HLA-DRB1 shared epitope 陰性 RA 群における関連を報告した *LILRB1* 遺伝子ハプロタイプの機能解析を施行した。RA 関連 *LILRB1* ハプロタイプ産物では、リガンドである HLA-class I との結合性に有意な差は認められなかったが、ハプロタイプ陽性者では、末梢血単核球表面における *LILRB1* 発現の低下が認められた。*LILRB1* は HLA-class I を認識する抑制型情報伝達分子であり、発現強度の低下が免疫系細胞の活性化制御異常に結びつく可能性が示唆された。

A. 研究目的

ゲノム DNA 多型解析により、関節リウマチ(RA)疾患感受性や臨床病型と関連する遺伝子を、また、包括的遺伝子発現解析により、病態と関連する遺伝子を検出し、診断、臨床経過予測、治療法の選択、創薬などに有用な情報を提供することを全体の目的として、本年度は、以下の具体的な点につき検討した。

1) 前年度までに RA 滑膜組織の包括的遺伝子発現解析により、血管内皮における Id1, Id3 の過剰発現を見出し、Id3 過剰発現によりヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)の増殖、活性化、血管新生が誘導されること、RNAi を用いた Id1, Id3 の gene silencing により、VEGF 誘導性 HUVEC 増殖、活性化、血管新生がほぼ完全に抑制されることを報告した。本年度は、Id1, Id3 の効果の違いを検討するとともに、Id1, Id3 gene silencing が TNF α や

IL-1 β による HUVEC 活性化をも抑制するか否かを検討した。

2) これまでに 30 以上の HLA 領域以外の候補遺伝子につき、多型スクリーニングと RA 発症との関連を検討し、5 個の遺伝子につき、関連を示唆する知見を得た。本年度は、これらのうち、免疫制御のみならず、マウスの ortholog 遺伝子では破骨細胞分化における役割も示唆されている、免疫グロブリン様受容体ファミリーに属する *LILRB1(ILT2, LIR1)* の多型につき、機能解析を加えるとともに、新たに数遺伝子の関連解析を行った。

B. 研究方法

1) HUVEC に Id1 あるいは Id3 を遺伝子導入により過剰発現させ、増殖、活性化、血管新生を検討した。また、HUVEC に Id1, Id3 shRNA を導入し、TNF α , IL-1 β 刺激に対する応答を検討した。

2) *LILRB1* 各ハプロタイプのリガンド結合部位を含む組み換え型蛋白を作製し、結晶構造、熱安定性を測定するとともに、HLA class I 抗原との結合性を表面プラズモン共鳴法にて解析した。また、*LILRB1* 遺伝子型と細胞表面発現強度との関連を、フロー・サイトメトリーにて検討した。また、新規候補遺伝子として、*LILRA2*, *APRIL* の解析を行った。

(倫理面への配慮)

これらの研究は、東京大学大学院医学系研究科および共同研究施設の研究倫理審査委員会の承認を得た研究計画に従い、匿名化した検体を用いて行われた。

C. 研究結果

1) Id1 と Id3 の強制発現は、いずれも HUVEC に増殖、活性化、血管新生を誘導したが、ICAM-1 誘導は Id1、E-selectin 誘導は Id3 刺激時に、より顕著に観察された。また、Id3 は血清飢餓により誘導されるアポトーシスを阻害したが、Id1 では阻害は観察されなかった。Id1 および Id3 shRNA 導入 HUVEC では、TNF α 誘導性 E-selectin 発現誘導の阻害が見られたが、IL-1 β 誘導性 ICAM-1 発現の阻害は認められなかった。

2) HLA-DRB1 shared epitope 陰性群における RA 感受性 *LILRB1* ハプロタイプ産物は、非感受性ハプロタイプ産物と比較して、結晶構造、熱安定性、リガンドである HLA-class I との結合性に、顕著な差は認められなかった。一方、本ハプロタイプ保有者において、末梢血単核球表面における *LILRB1* 発現強度の有意な低下が認められた。*LILRA2*, *APRIL* 多型と RA の間には有意な関連は検出されなかった。

D. 考察

Id ファミリーには発現分布や機能の異なる Id1-4 の 4 遺伝子が存在し、最近、Id2 の滑膜細胞における発現と骨破壊への関与が報告されている。血管内皮、滑膜細胞双方に対する効果を考慮すると、Id は

今後の RA 治療上興味深い標的と考えられる。

また、*LILRB1* は HLA-class I を認識する抑制型情報伝達分子であり、発現強度の低下が免疫系細胞の活性化制御異常に結びつく可能性が示唆された。

E. 結論

Id の抑制は、VEGF のみならず、TNF α による HUVEC 活性化をも抑制することが示唆された。また、*LILRB1* 多型は、発現低下による免疫系制御不全を介して RA 感受性に関連する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, Tsuchiya N, Tokunaga K, Masawa N, Azuma M, Okumura K, Kobata T: BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell co-receptor complex. *Blood* 103:2257-2265, 2004.
- 3) Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno NH, Kobata T, Takahashi K, Tokunaga K: Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *J Immunol* 173:5801-5809, 2004.
- 4) Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Siriboonrit U, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K. *CD72* polymorphisms associated with alternative splicing modify

- susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with *FCGR2B*. *Hum Mol Genet* 13: 2907-2917, 2004.
- 5) Ehara Y, Sakurai D, Tsuchiya N, Nakano K, Tanaka Y, Yamaguchi A, Tokunaga K: Follistatin-related protein gene (FRP) is expressed in the synovial tissues of rheumatoid arthritis, but its polymorphisms are not associated with genetic susceptibility. *Clin Exp Rheumatol* 22: 707-712, 2004.
 - 6) Okaji Y, Tsuno NH, Kitayama J, Saito S, Takahashi T, Kawai Km, Yazawa K, Asakage M, Tsuchiya T, Sakurai D, Tsuchiya N, Tokunaga K, Takahashi K, Nagawa H. A novel method for isolation of endothelial cells and macrophages from murine tumors based on Ac-LDL uptake and CD16 expression. *J Immunological Methods* 295:183-193, 2004.
 - 7) 土屋尚之：関節リウマチの環境要因。医学のあゆみ 209: 760-764, 2004.
 - 8) 土屋尚之：疾患感受性遺伝子検索の現状。(日本臨床増刊号「関節リウマチ」) 日本臨床 63 Suppl 1: 111-116, 2005.
 - 9) 土屋尚之：候補遺伝子アプローチによる解析。ゲノム医学 5: 39-44, 2005.
 - 10) 申栄吉、土屋尚之：BAFF(BLyS)とその受容体の生理的役割と病態との関連。臨床免疫 43: 47-54, 2005.
 - 11) 土屋尚之：血清反応陰性脊椎関節症の発症機序。NEW MOOK 整形外科14「リウマチ類縁疾患」(越智隆弘、菊池臣一編) 金原出版。pp82-86, 2004.
 - 12) 土屋尚之：免疫疾患の疾患感受性遺伝子。シミュレーション内科「リウマチ・アレルギー疾患を探る」(山本一彦編) 永井書店。(印刷中)
- ## 2. 学会発表
- 1) 江原幸和、土屋尚之、櫻井大祐、山口晃弘、松多邦雄、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。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p152. 2004年4月15日～17日、岡山。
 - 2) 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、深沢徹、松多邦雄、Betty P. 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。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p175. 2004年4月15日～17日、岡山。
 - 3) 黒木喜美子、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、十字猛夫、橋本博史、徳永勝士：白血球免疫グロブリン様受容体 LILRA1(LIR6) 遺伝子多型と日本人 SLE との関連。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p175. 2004年4月15日～17日、岡山。
 - 4) 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、徳永勝士：APRIL 遺伝子多型と関節リウマチ、全身性エリテマトーデスとの関連の検討。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p181. 2004年4月15日～17日、岡山。
 - 5) 申栄吉、櫻井大祐、土屋尚之、川崎綾、小端哲二、徳永勝士：ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞における BLyS(BAFF) 発現。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p284. 2004年4月15日～17日、岡山。
 - 6) 櫻井大祐、土屋尚之、山口晃弘、小端哲二、徳永勝士：VEGF 誘導性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48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p299. 2004年4月15日～17日、岡山。
 - 7) 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、京極千恵子、大橋順、鈴木毅、深沢徹、Sasitorn Bejrachandra, Dasnayanee Chandanayingyong, Puan Suthipinittharm, Betty P. Tsao, 橋本博史、本田善一郎、徳永勝士：SLE 感受性におけるヒト CD72 遺伝子多型およびヒト FcγR2B 遺伝子多型の遺伝子間相互作用。日本人類遺伝学会第49回大会抄録集 p107 (2004年10月12日～15

- 日)。
- 8) Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Matsuta K, Murakami Y, Hashimoto H, Tokunaga K. APRIL (TNFSF13) polymorphisms: in systemic lupus erythematosus: Independent confirmation of association with susceptibility and new association with clinical characteristics. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S120, 2004. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S203, 2004.
- 9) Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K: Epistatic interaction between *CD72* and *FCGR2B* polymorphisms in conferring susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S120, 2004.
- 10) 申栄吉、土屋尚之、櫻井大祐、長谷英徳、津野寛和、高橋孝喜、小端哲二、徳永勝士: 血管内皮細胞および血管平滑筋細胞における BAFF(BLyS)発現。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p162), 2004.
- 11) 黒木喜美子、土屋尚之、白石充典、ラズバラリンダ、山下由美、小池隆夫、神田大輔、徳永勝士、前仲勝実: 関節リウマチ (RA) 関連 Leukocyte Immunoglobulin-like receptor (LIR) 1 ハプロタイプの構造・発現解析。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p162), 2004.
- 12) 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士 (2004) APRIL(TNFSF13)遺伝子多型と SLE 発症および病態との関連の解析。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p279), 2004.
- 13) 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、鈴木毅、深沢徹、Bejrachandra S, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, 橋本博史、本田善一郎、徳永勝士: SLE 感受性におけるヒト *CD72* 遺伝子多型およびヒト *FCGR2B* 遺伝子多型の遺伝子間相互作用。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p279), 2004.
- 14) 黒木喜美子、白石充典、ラズバラリンダ、土屋尚之、徳永勝士、神田大輔、前仲勝実: 関節リウマチ (RA) 関連 Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor (LIR) 1 ハプロタイプの構造・発現解析。第27回日本分子生物学会(抄録集 p995, 3PB-407), 2004.
- 15) 土屋尚之: 遺伝子多型解析および発現解析による関節リウマチ関連遺伝子の検討。厚生労働科学研究費補助金免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業リウマチ研究班合同公開シンポジウム。2005年2月8日、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

関節リウマチの疾患遺伝子から見た病態に関する研究

分担研究者 塩沢俊一 (神戸大学医学部保健学科 教授)

研究要旨

関節リウマチ(RA)の疾患遺伝子として見出したそれぞれアポトーシスシグナル受容体 DR3 遺伝子、血管新生に関わるアンギオポエチン 1 遺伝子、及び Rho 等に対する GEF 活性をもつ *Dbl* プロトオンコジーン遺伝子変異の分子機構および病態への寄与を検討した。今回新たに、デスドメインを欠く DR3 遺伝子変異型が生成する機構として仮想エクソンに結合するスプライシングサイレンサーを同定した。DR3 遺伝子変異型について臨床およびトランスジェニックマウスを用いた分子機構研究によると DR3 遺伝子変異が関節破壊を推進する疾患増悪遺伝子であることが見出された。また、第 8 染色体に位置する疾患遺伝子 *ANG-1* は、関節滑膜の増殖を支持し同時にアポトーシスを抑制することによって RA の滑膜増殖に寄与している可能性が指摘された。X 染色体上の疾患遺伝子 *DBL* 変異によって白血球および滑膜細胞のアクチン重合化に不具合の生じることが見出された。

A. 研究目的

私達は多発家系のマイクロサテライトマーカー解析により、関節リウマチ(RA)の疾患遺伝子座として、第 1 染色体 D1S214/253、第 8 染色体 D8S556、X 染色体 DXS1232/984 の 3 カ所を同定し、これを踏まえて、RA の疾患遺伝子としてそれぞれアポトーシスシグナル受容体 DR3 遺伝子、血管新生に関わるアンギオポエチン 1 遺伝子、及び Rho 等に対する GEF 活性をもつ *Dbl* プロトオンコジーン遺伝子変異を確定した。見出された疾患遺伝子が、実際に疾患に寄与するか否かについては、単に遺伝子頻度の有意差に拠るのではなく、遺伝子転写及び蛋白の機能の変異を示し、さらにこれが疾患を引き起こすことを示す必要がある。この目的をもって行なった研究成果を次の通り報告する。

B. 研究方法

見出された各疾患遺伝子の機能を mRNA 発現、蛋白発現、蛋白の機能、及び変異の病態への寄与を、それぞれ前者は各プロテイング操作、*in vivo* と *in vitro* における遺伝子発現系などの分子生物学的手法および後者は臨床疫学的手法によ

り検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は神戸大学大学院医学系研究科遺伝子倫理委員会の許可の下に行なわれている。

C. 研究結果

1) DR3 遺伝子上に見出された nt564(A to G); Asp159Gly, nt630+622(del14), nt631-538 (C to T), nt631-391(A to T), nt631-243(A to G) の SNP 4 箇所および核酸欠損 1 箇所の変異に起因する変異型 DR3 分子 (デスドメインを持たない) は正常 DR3 分子とヘテロ三量体を形成し、変異 DR3 分子は、DNA 上の変異のためにイントロン 5 の一部がエクソンとして読まれ、このためフレームシフトにより早期にストップコドンが入ってデスドメインを欠く変異体が生成することを見出した。さらにこの際、イントロン 5 部分がエクソンとして読まれる部分に本来ならばスプライシングサイレンサーが結合して、この機構によってイントロンがイントロンとして翻訳されないのであるが、サイレンサーの結合サイト nt631-391(A to T) 変異があると、サイレンサーが結合出来なくなる。そして私達はイントロン