

図 1

1. Medium control
2. IFN $\gamma$  + anti-Fas
3. IFN $\gamma$  + anti-CD40
4. IFN $\gamma$  + anti-Fas + anti-CD40
5. IFN $\gamma$  + anti-Fas + anti-CD40 + SB203580 (10  $\mu$ M)
6. SB203580 (10  $\mu$ M)

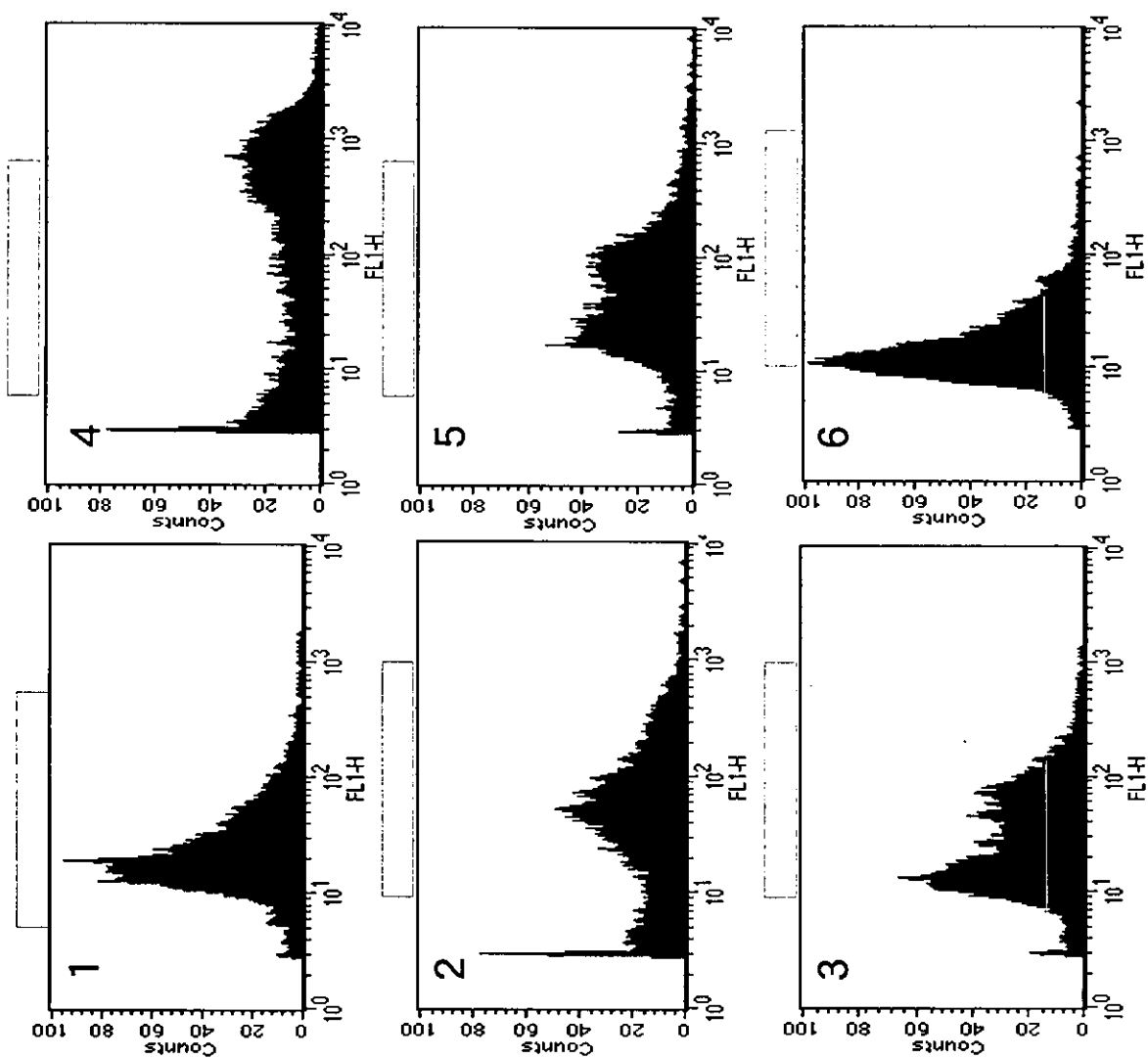
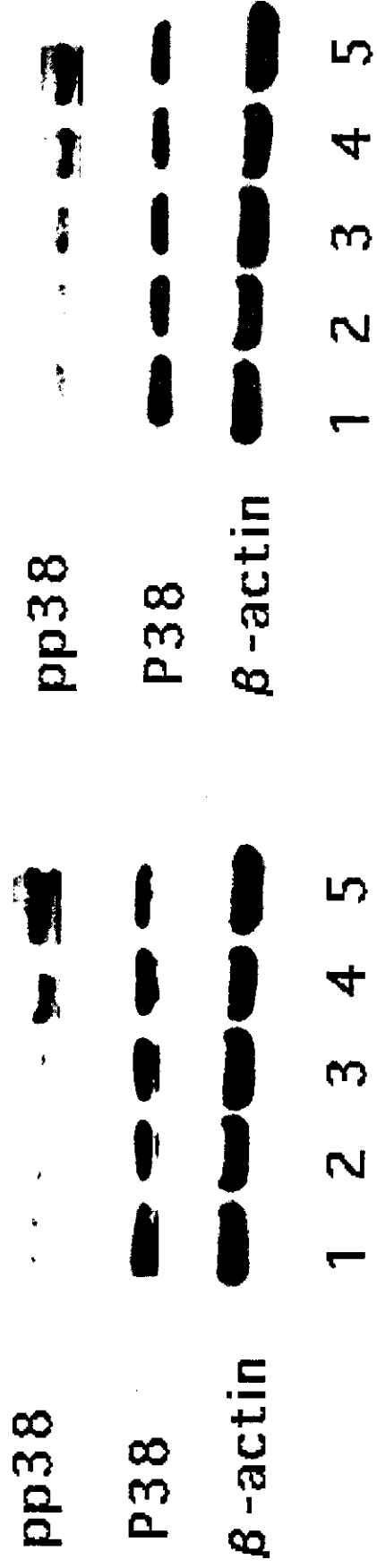


图 2



1. Control

2. IFN  $\gamma$  for 72h

3. IFN  $\gamma$  & anti-CD40 for 6 h

4. IFN  $\gamma$  & anti-CD40 for 12 h

5. IFN  $\gamma$  & anti-CD40 for 24 h

1. Control

2. IFN  $\gamma$  at 1000 U/ml for 72h

3. IFN  $\gamma$  1000 U/ml & anti-CD40 600ng/ml

4. IFN  $\gamma$  1000 U/ml & anti-CD40 1000ng/ml

5. IFN  $\gamma$  1000 U/ml & anti-CD40 1500ng/ml

图 3

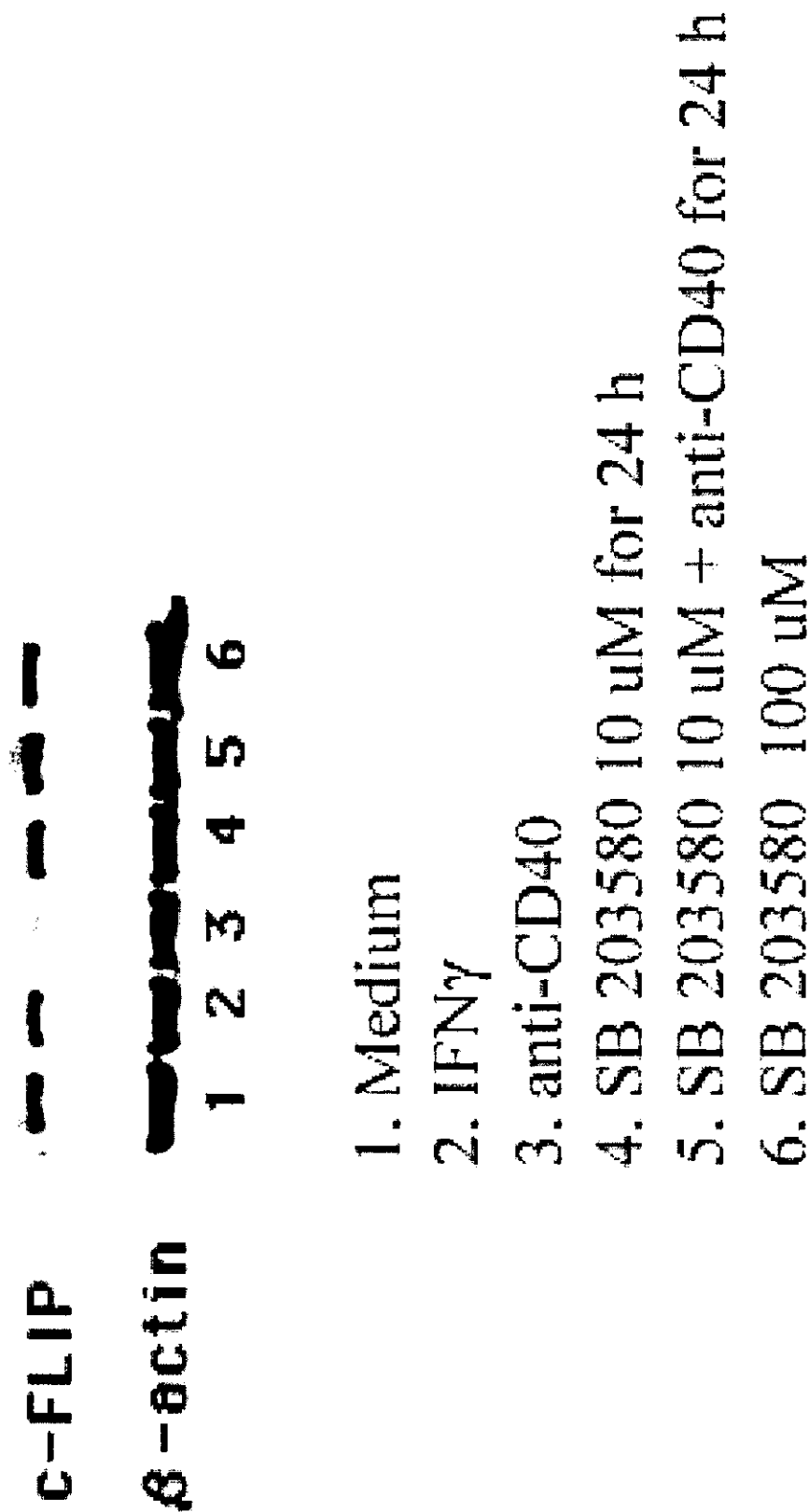
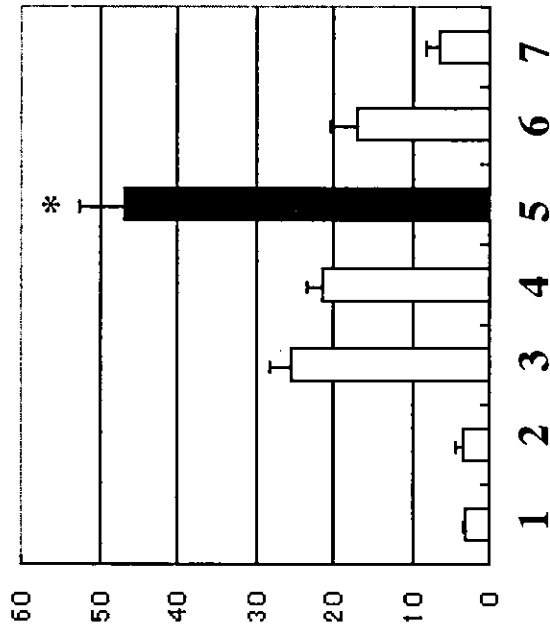
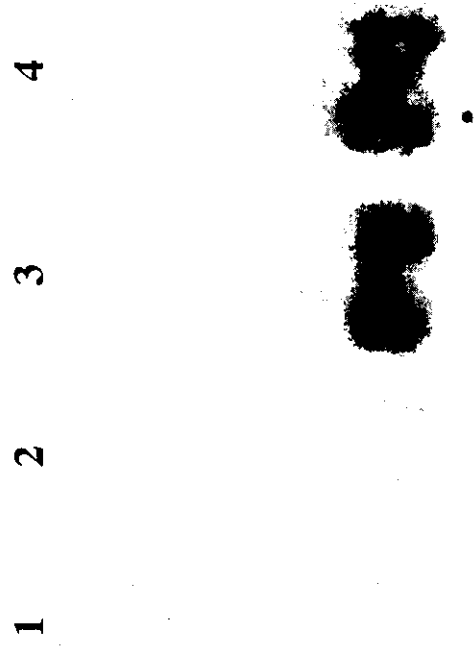


图 4

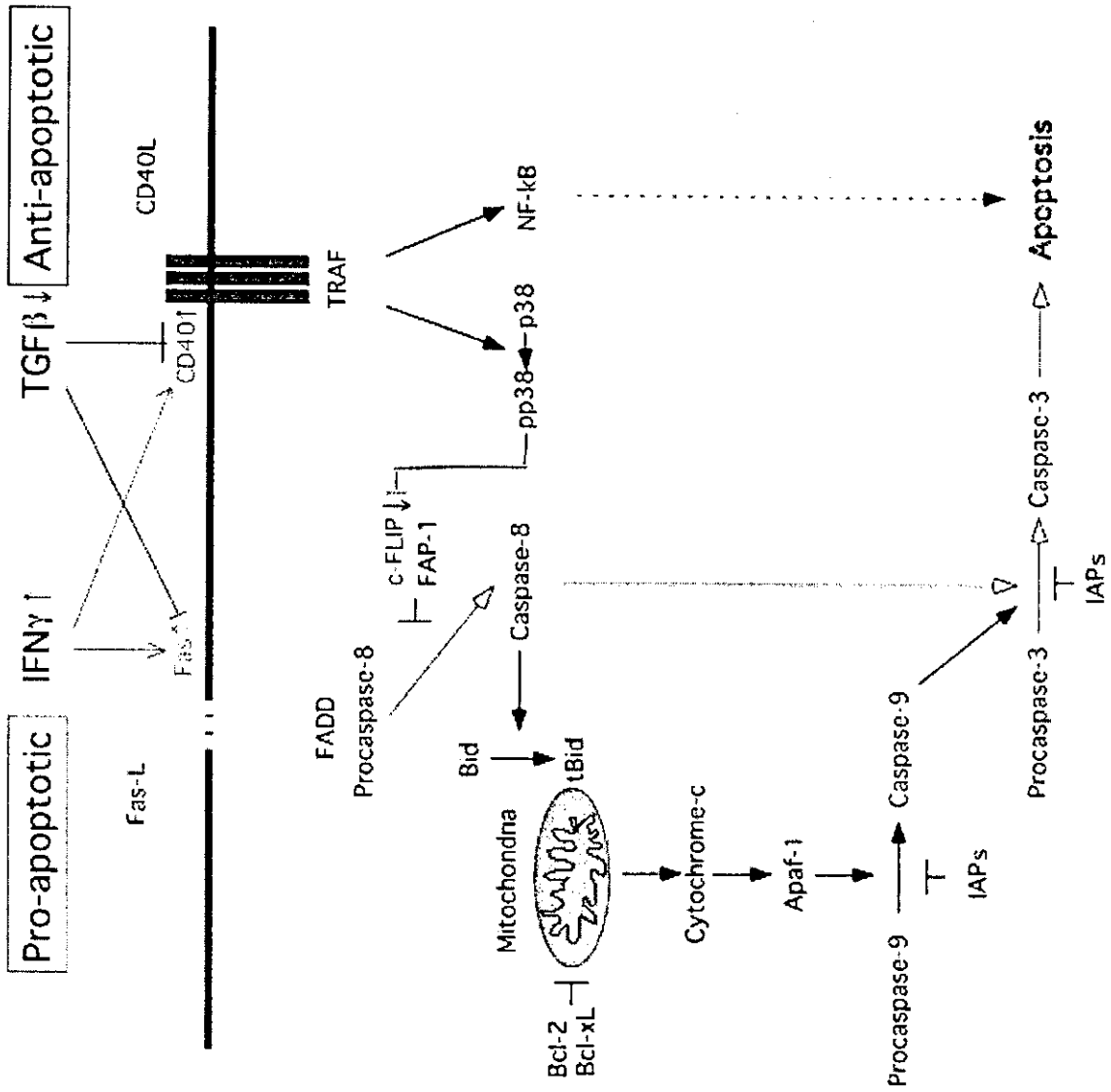


- N=6, \*p<0.01 vs medium control
1. Medium control
  2. IFN $\gamma$  for 24h
  3. IFN $\gamma$  + anti-Fas for 24h
  4. IFN $\gamma$  + anti-CD40 for 24h
  5. IFN $\gamma$  + anti-Fas + anti-CD40 for 24h
  6. IFN $\gamma$  + anti-Fas + anti-CD40 + CAPE for 24h
  7. CAPE only for 24h

图 5



- 1. Probe alone
- 2. Medium control
- 3. Anti-CD40 for 2h
- 4. Anti-CD40 for 4h



## 自己反応性 B 細胞に対する MHC クラス II 亜領域による制御機構の解析

分担研究者 広瀬幸子 順天堂大学医学部・病理学第二講座 助教授

### 研究要旨

SLE は多くの感受性遺伝子が関与する代表的多遺伝子疾患である。主要組織適合遺伝子複合体(MHC)は主要な感受性遺伝子の一つであるが、MHC 領域内には複数の遺伝子が存在するため、実際にどの遺伝子が SLE 発症に関わっているかを明らかにする必要がある。今回我々は、クラス II 分子をコードする MHC 亜領域の役割を明らかにするために、MHC クラス II 亜領域内に recombination を起こさせた SLE 自然発症 New Zealand マウス系を樹立し、自己反応性 B 細胞の活性化に係わる MHC クラス II 亜領域の役割を解析した。その結果、クラス IIA 領域は自己抗体の産生を増強し SLE 発症を促進するのに対して、クラス IIE 領域は自己抗体産生を抑制し、SLE 発症の抑制に働いていることが示された。

### A.研究目的

SLE の発症は、MHC の特定のハプロタイプに拘束されることはよく知られているが、その機序に関しては不明である。その原因の一つに、MHC 領域内にはクラス I、クラス II、クラス III に加え、サイトカイン遺伝子や抗原の提示能に関わる遺伝子など複数の遺伝子が含まれ、さらにこれらの遺伝子が連鎖不平衡の状態にあるため、実際にどの遺伝子が作用しているのかを特定することが困難な点がある。今回我々は SLE におけるクラス II 分子の役割を明らかにするために、クラス IIE 亜領域内に recombination を起こさせた SLE 自然発症 New Zealand マウス系を樹立して、クラス II 遺伝子領域以外は同じ遺伝型の条件下で、クラス IIA 領域が d/d 型でありながら、クラス II の *Ea* 亜領域の異なるマウス系を用いて、自己反応性 B 細胞の活性化および SLE 病態に及ぼす A および E 分子の影響を明らかにすることを目的とした。

### B.研究方法

(1) B10.GD マウスの H-2<sup>b2</sup> (マウス MHC)を NZB および NZW に導入した NZB.GD および NZW.GD コンジェニックマウス系を樹立した。また、NZB.GD と NZB の交配マウス約 3000 匹の中から、*Ea* と *Tnfa* 亜領域の間で recombination を起こした NZB.GDr コンジェニックマウス系を樹立した。これらを組み合わせて、A 領域が d/d ホモ型でありながら、*Ea* 領域の遺伝子型のみが異なる(NZB x NZW) F1 マウス系を作製して、SLE 自然発症(NZB x NZW) F1 マウスの病態に対する *Ea* 領域の影響を解析した。樹立したマウス系の H-2 型を表 1 に示した。

(2) H-2 タイピングは、抹消血リンパ球を FITC 標識した抗 E 抗体(ISCR)、抗 A<sup>d</sup> 抗体(K24-199)、抗 D<sup>d</sup> 抗体(T19-191)、抗 Db 抗体(H141-30)で染色し、FACS にて解析した。また、*Tnfa* のタイピングは、5'-GGACAGAG AAGAAATGGGTTTC-3' および 5'-TCGAA TCTGGGGCCAATCAGGAGG G-3' プライマ

一を用いた PCR 産物の塩基数の差を利用して行った。

(3)蛋白尿の測定は2週に一度行い、尿蛋白量が 111mg/100ml 以上を陽性とした。抗 DNA 抗体価は ELISA にて測定した。

(4)脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化による CD69 の発現および TCRV $\beta$  repertoire の解析は FACS を用いて行った。

(論理面への配慮) マウスの実験は、本研究施設の定める動物実験指針に基づいて行った。

### C. 研究結果

(1) 表1に今回樹立した H-2 コンジェニックおよび recombinant コンジェニック NZB, NZW 系とこれらを交配した F1 マウスの H-2 型を示した。図1にはこれら F1 マウスの抹消血リンパ球上のクラス II の A<sup>d</sup> 分子、E 分子、クラス I の D<sup>d</sup> および D<sup>b</sup> 分子の発現レベルを示した。F1 マウスは全て A<sup>dd</sup> 型で、同レベルの A<sup>d</sup> 分子を発現しているが、E $\alpha$  領域が b 型の場合は遺伝子異常により E $\alpha$  分子が形成されないため H-2<sup>g2/g2</sup> F1 では E 分子の発現が認められない(E<sup>0</sup>)。一方、H-2<sup>dd</sup> F1 では E 分子の発現が充分認められ(E<sup>1</sup>)、また E $\alpha$  領域が d/b ヘテロ型である H-2<sup>d/g2</sup> および H-2<sup>g2r/g2</sup> F1 の場合はその半分のレベルの発現が見られる(E<sup>1/2</sup>)。

(2) これら4種類の F1 マウスの蛋白尿累積出現率と、血中 IgG クラス抗 DNA 抗体価のレベルを比較した。その結果、E 分子の発現レベルに相関して、病態の改善が認め

表1 樹立したコンジェニックNZマウス系のH-2ハプロタイプ

Strains	H-2	K	Ab	Aa	Eb	Ea	TNFA	D
NZB	d	d	d	d	d	d	d	d
NZB GD	g2	d	d	d	d	// b	b	b
NZW GD	g2	d	d	d	d	// b	b	b
NZB GD <sup>r</sup>	g2 <sup>r</sup>	d	d	d	d	// b	b	b
NZW.H-2 <sup>d</sup>	d	d	d	d	d	d	d	d
(NZB x NZW H-2 <sup>d</sup> )F1	d/d	d	d	d	d	d	d	d
(NZB x NZW.GD)F1	d/g2	d	d	d	d	d/b	b	d/b
(NZB.GD <sup>r</sup> x NZW.GD)F1	g2 <sup>r</sup> /g2	d	d	d	d	d/b	b	b
(NZB.GD x NZW.GD)F1	g2/g2	d	d	d	d	b	b	b

//, intra-H-2 recombination site between d and b haplotype.

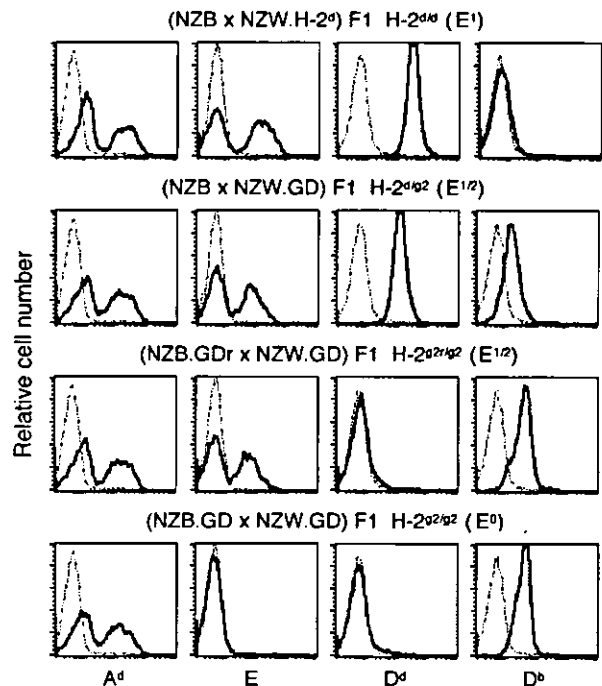


図1 各 F1 マウスの抹消血リンパ球におけるクラス II A<sup>d</sup>, E, クラス I の D<sup>d</sup> および D<sup>b</sup> 分子の発現の FACS 解析。

られた(図2)。表1および図1から明らかな様に、H-2<sup>g2/g2</sup> F1 と H-2<sup>g2r/g2</sup> F1 の病態の差は、E 分子の発現の有無のみに依存している。

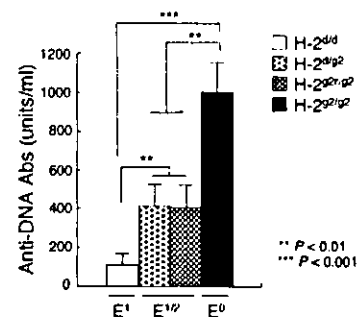
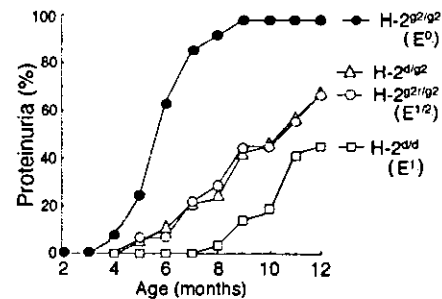


図2 各 F1 マウスの蛋白尿の累積出現率と6ヶ月齢における血中 IgG 抗 DNA 抗体価の比較。



(3) 次に各 F1 マウスにおける脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化の状態を、CD69 分子の発現レベルを指標に比較した。その結果、図 3 に示す様に、E 分子の発現レベルが低下するに従って、CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化が起きていることが示された。また、図 4 には、脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞の TCR V $\beta$  repertoire の解析結果を示した。図からも明らかな様に、E 分子の発現により、V $\beta$ 11 および V $\beta$ 12 repertoire が負の選択を受けていることが明らかとなった。

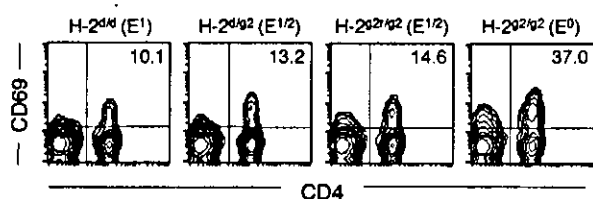


図 3 4 種類の H-2 ハプロタイプの F1 マウスの 6 ヶ月齢における脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞での CD69 陽性活性化細胞の比率の比較。

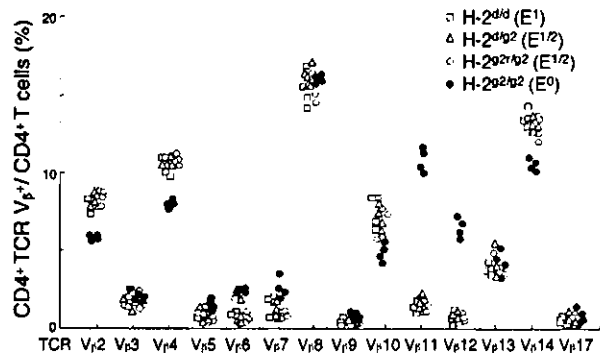


図 4 4 種類の H-2 ハプロタイプの F1 マウスの 3 ヶ月齢における脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞の TCR V $\beta$  repertoire の比較。

#### D. 考察

ヒト SLE における MHC 亜領域の役割を個別に解析することは極めて困難である。我々は、3000 匹のマウスの中から、MHC クラス II*Ea* および *Tnfa* 領域の間に recombination を起こした New Zealand マウス系を樹立し、*Ea* 亜領域以外は同じハプロタイプの (NZB x NZW) F1 マウスを作成し、これらの F1 マウスの病態を比較することで、*Ea* 亜領域の SLE における役割を

解析した。*Ea* 遺伝子が b 型では、E $\alpha$ 鎖が形成されないため、*Ea* 亜領域が d 型あるいは b 型であることは、直接 MHC クラス II の E 分子が発現するかしないかに関わってくる。また、*Ea* 亜領域が d/b ヘテロ型の場合には E 分子の発現量が半減する。今回の解析から、A<sup>d</sup>分子は自己抗原を提示して、自己反応性 B 細胞を活性化し、自己抗体産生を増強する能力を有しているが、E 分子の発現が加わることで、この機能が抑制されることが示された。E 分子の発現は、おそらく胸腺における自己反応性 T 細胞の負の選択に関わっており、従って、E 分子の発現が欠損した胸腺では、TCR V $\beta$ 11 や V $\beta$ 12 などの自己反応性 T 細胞 repertoire が除去されずに抹消に出て、自己反応性の B 細胞の活性化をもたらす可能性が示された。

今回の解析で、ヒト MHC クラス II の DP, DQ, DR 領域が SLE 発症に各々異なる影響を与えている可能性が示された。E 分子による自己抗体産生の抑制機序を解明できれば、SLE 治療法の開発に結びつく新たな情報が得られると期待される。

#### E. 結論

クラス II 亜領域内に recombination を起こさせたマウス系の樹立により、MHC クラス A 分子は SLE の発症に関わり、E 分子の発現は病態を軽減させることが示された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Li N, Nakamura K, Jiang Y, Tsurui H, Matsuoka S, Abe M, Ohtsujii M, Nishimura H, Kato K, Kawai T, Atsumi T, Koike T, Shirai T, Ueno H, Hirose S: Gain-of-function polymorphism in mouse and human *Ltk*: implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Hum Mol

Genet, 13:171-179, 2004

Fujio K, Okamoto A, Tahara H, Abe M, Jiang Y, Kitamura T, Hirose S, Yamamoto K: Nucleosome-specific regulatory T cells engineered by triple gene transfer suppress a systemic autoimmune disease. *J Immunol*, 173:2118-2125, 2004.

Wen X, Zhang D, Kikuchi Y, Jiang Y, Nakamura K, Xiu Y, Tsurui H, Takahashi K, Abe M, Ohtsuji M, Nishimura H, Takatsu K, Shirai T, Hirose S: Transgene-mediated hyperexpression of IL-5 inhibits autoimmune disease, but increases the risk of B-cell chronic lymphocytic leukemia in a model of murine lupus. *Eur J Immunol*, 34:2740-2749, 2004.

Zhang D, Fujio K, Jiang Y, Zhao J, Tada N, Sudo K, Tsurui H, Nakamura K, Yamamoto K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S: Dissection of the role of MHC class II A and E genes in autoimmune susceptibility in murine lupus models with intragenic recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:13838-13843, 2004.

Suzuki H, Suzuki Y, Yamanaka T, Hirose S, Nishimura H, Toei J, Horikoshi S, Tomino Y: Genome-wide scan in novel IgA nephropathy model identifies susceptibility locus on murine chromosome 10, in a region syntenic to human *IGAN1* on chromosome 6q22-23. *J Am Soc Neph*, in press.

## 2. 学会発表

Xiu Y, Nakamura K, Wen X, Jiang Y, Matsuoka S, Shirai T, Hirose S: Transcriptional regulation by polymorphic *Fcgr2b* promoter region and contribution to humoral immune response. The 33th Midwinter Conference of Immunologists, January 2004, Asilomar, CA, USA.

Hirose S, Tsukamoto K, Matsuoka S: Genetic dissection of autoimmune disease and NKT cell function. [Recent Progress in Neuroimmunology and NKT cell research] Special symposium supported by Japan Multiple Sclerosis Society, March 2004, Tokyo

Hirose S: "Gain-of-function polymorphism of *Ltk* and autoreactive B cell activation" The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Workshop on Autoimmunity. July 11, 2004, Tokyo

広瀬幸子 「遺伝子多型と SLE」、兵庫県リウマチ登録医の会（リウマチ医の会）学術集会 2004年10月30日 神戸

広瀬幸子、藤尾圭志、鶴井博理、中村和裕、山本一彦、西村裕之、白井俊一 MHC クラス II A および E 分子による自己免疫応答の制御 第34回日本免疫学会・学術集会 2004/12/1-3 札幌

鶴井博理、奥村 康、白井俊一、広瀬幸子 Phagocytosis 特異的自発蛍光によるマウスマクロファージ食作用の解析第34回日本免疫学会・学術集会 2004/12/1-3 札幌

藤井琢磨、斉藤滋、桐栄純一、小寺洋、松島瑞子、稲田祐二、広瀬幸子、修岩、中村和裕、白井俊一、西村裕之 New Zealand Black マウスにおける免疫寛容誘導能欠如の遺伝支配 第34回日本免疫学会・学術集会 2004/12/1-3 札幌

大辻希樹、中村和裕、鶴井博理、白岩和香苗、大辻奈穂美、笹原圭一、西村裕之、白井俊一、広瀬幸子 ループス腎炎発症における G-CSF の役割 第34回日本免疫学会・学術集会 2004/12/1-3 札幌

塚本和行、大辻希樹、中村和裕、三宅幸子、山村隆、広瀬幸子 NKT 細胞の SLE 病態における役割 第34回日本免疫学会・学術集会 2004/12/1-3 札幌

林青順、修岩、大辻希樹、鶴井博理、中村和裕、木下勝之、広瀬幸子 BXSb の SLE 病態における IgG Fc receptor の役割 第34回日本免疫学会・学術集会 2004/12/1-3 札幌

白岩和香苗、林青順、大辻希樹、鶴井博理、西村裕之、白井俊一、木下勝之、広瀬幸子 (NZB x NZW) F1 マウスにおける SLE 発症への estrogen の影響 第34回日本免疫学会・学術集会 2004/12/1-3 札幌

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

特になし

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

全身性エリテマトーデス疾患感受性遺伝子に関する研究

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

B細胞の抑制型受容体である CD72 遺伝子の第8イントロンに13塩基の反復配列と4塩基挿入を持つハプロタイプが、選択的スプライシングの結果細胞外領域の約40アミノ酸が変化するアイソフォームの産生増加と関連し、かつ、SLE における腎症合併に対し抵抗性に働くことを見出した。さらに、この多型は、やはりB細胞の抑制型受容体であり、われわれが過去に SLE との関連を報告した Fcγ受容体 IIb(*FCGR2B*)-232Thr 多型の SLE 発症リスクを、遺伝子間相互作用により有意に減少させることを見出した。また、ミニジーン・アッセイにより、*CD72* 第8イントロンに存在する13塩基の反復配列と4塩基挿入のいずれもがスプライシング効率に関与することを見出した。また、*APRIL*(*TNFSF13*)の c.199A/A(p.67Arg/Arg)遺伝子型の SLE における有意な減少が観察され、Koyama ら(九大)による先行研究の結果を独立に確認し得た。さらに、3' 非翻訳領域に SNP(c.\*263C>T)が検出され、SLE 群における T アリルの増加傾向が観察され、抗 Sm 抗体陽性群では有意差に到達した。c.\*263T アリルの mRNA 量は、C アリルと比較して有意に増加していた。今回の結果と以前に報告した BLyS(*BAFF*)多型と *APRIL* の結果を考え合わせると、SLE、特に抗 Sm 抗体産生における *APRIL*/*BLyS* 系の重要性が示唆された。

A.研究目的

われわれは、昨年度までに、B細胞の抑制型受容体である FcγRIIB の膜貫通領域にアミノ酸置換を伴う多型 Ile232Thr(I232T)を見出し、232T アリルが日本人、タイ人、中国人集団において全身性エリテマトーデスと関連する一方、ヨーロッパ系アメリカ人集団ではアリル頻度が低く、関連も確認されないことを報告した。また、機能的・位置的候補遺伝子である BLyS(*BAFF*), *TNFSF13B*) 関連遺伝子群について、系統的な多型解析と関連研究を施行してきた。

本年度は、FcγRIIB 同様、B細胞の抑制型受容体である CD72 の多型解析と関連研究を、FcγRIIB との遺伝子間相互作用を念頭におきつつ解析し、さらに、CD72 多型の機能についても検討した。また、BLyS の類縁分子である *APRIL*(*TNFSF13*)については、Koyama ら(九州大学)により、Gly67Arg と SLE との関連が報告されている(*Rheumatology* 2003)。*APRIL* は細胞内

で切断され、分泌される分子であるが、当該多型部分は細胞内に残存する部分であるため、このアミノ酸置換自体が受容体との相互作用に影響することは考えにくく、近傍の第一義的に病態に関与する多型部位との連鎖不平衡によって関連が検出された可能性や、Gly67Arg が発現量、切断の効率に影響する可能性が考えられる。本研究では、これらの可能性を検討するために、染色体上隣接して位置し、TNF スーパーファミリーに属する遺伝子で、*APRIL* との遺伝子間スプライシングにより融合遺伝子 *TWE-PRIL* を形成しうる *TWEAK*(*TNFSF12*)を含めた系統的な多型解析により、さらなる解析を試みた。また、疾患関連多型が遺伝子発現におよぼす影響を検討した。

このような研究は、SLE の病因・病態解明を介して診断・治療に貢献しうるとともに、日本人を対象とした個別化医療の実現の基礎となるものである。

## B. 研究方法

CD72 の関連解析は、日本人 SLE 患者160例、対照健常者277例、タイ SLE 患者87例、対照健常者187例につき、患者対照法で施行した。

末梢血単核球より得た RNA を RT-PCR にて検討し、CD72 のスプライシング・アイソフォームを存在と、その通常型との相対的な量比を解析した。

CD72 第8イントロン多型と選択的スプライシングとの関連を明らかにするために、第7エクソンから第9エクソンまでの遺伝子断片を組み込んだミニジーンを作製し、COS-7 細胞に導入し、RT-PCR によりスプライシング産物を解析した。

通常型(common)および選択的スプライシング型(alternatively spliced, AS)アイソフォームの蛋白産物の存在を、両者に相当する cDNA を COS-7 細胞に導入し、両者に共通する細胞内領域に対する抗体を用いた western blotting で解析した。

APRIL および TWEAK については、日本人 SLE157 例、健常者 168 例を用いた患者対照研究を施行した。また、ヘテロ接合体供血者の末梢血を用いた RNA difference plot (RDP)法により、mRNA 量をアリル特異的に比較した。さらに、フローサイトメリーにより、細胞内 APRIL タンパク量と遺伝子型との関連を検討した。

### (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) CD72

CD72 には10個所の変異が検出され、うち4個所が多型の定義に相当する頻度で認められた。これら4個所の多型部位は、ほぼ完全な連鎖不平衡にあり、日本人集団では2種の主要ハプロタイプを形成して存在した(図1)。以後の解析では、ハプロタイプ・タグ多型として、第8イントロンの13塩基反復配列(1回を\*1, 2回を\*2)を利用した。

SLE との関連解析では、SLE 全体との関連は検

出されなかったが、SLE 群を腎症の有無により層別化すると、腎症を有する群において、\*2 アリルおよび\*2/\*2 ハプロタイプの有意な減少が認められた(表1)。タイ人集団においても、ほぼ同様の傾向が検出された。

4個所の多型部位のうちの2個所(13塩基反復配列、4塩基欠失)が第8イントロンに位置していたため、これらの多型がスプライシングに影響する可能性を、末梢血単核球を用いた RT-PCR 法により解析したところ、第8エクソンを欠失した新規スプライシング・アイソフォーム(AS 型)が検出された。AS 型は、通常型アイソフォームにおいてはストップコドンをもつ第8エクソンの欠失により、C末端側42アミノ酸が、新たな49アミノ酸に変化した蛋白をコードすると予測され、実際に蛋白として翻訳されることが、AS 型 cDNA 導入 COS-7 細胞において確認された(図2)。

次に、遺伝子型とスプライシング効率の関連を検討したところ、腎症抵抗性の\*2 ハプロタイプに、遺伝子量依存的に AS 型 mRNA が増加することが見出された(図3)。第7エクソンから第9エクソンまでの遺伝子断片導入 COS-7 細胞を用いたミニジーン・アッセイにより、第8イントロンの13塩基反復配列、4塩基欠失のいずれもがスプライシング効率に影響することが確認された。

最後に、CD72 同様 B 細胞の抑制型受容体である Fcγ 受容体 IIb (FCGR2B) 遺伝子において、われわれが昨年度までに SLE との関連を報告した c.695T>C (Ile232Thr) について、CD72 多型との遺伝子間相互作用を検討したところ、CD72 の\*2 アリル陽性例では、FCGR2B-232Thr 多型による発症リスクが有意に減弱することが見出された(表2)。

### 2) APRIL

翻訳領域に既報の2個所の非同義置換 c.199G>A (Gly67Arg)、c.287A>G (Asn96Ser) が検出され、さらに、プロモータ領域、非翻訳領域、イントロンに計4個所の多型が検出された。67Arg/Arg 遺伝子型の有意な減少が観察され、Koyama ら(2003)の報告を独立に確認し得た。臨床病型との関連を検討したところ、抗 Sm 抗体陽

性 SLE 群において、3' 非翻訳領域に位置する c.\*263T の有意な増加が観察された。

TWEAK には6個所の多型部位が検出され、APRIL 多型との間に連鎖不平衡が認められたが、SLE との有意な関連は認められなかった。

APRIL 多型と mRNA 発現量の関連を検討したところ、c.\*263T アリルの mRNA 量が、C アリルに対し有意に増加していた。一方、c.199G>A については、mRNA レベルでも、細胞内 APRIL 蛋白量にも、多型との有意な関連が検出されなかった。

#### D. 考察

本研究は、転写後修飾に影響するゲノム DNA 多型が、遺伝子多型間相互作用を介して疾患感受性を修飾する、という2点において、ポスト・シーケンス時代の疾患研究におけるゲノム・ネットワーク解析の重要性を象徴的に示したものと言える。

CD72 と FcγRIIb はいずれも B 細胞受容体 (BCR) からのシグナルに抑制的に作用する分子であるが、FcγRIIb 活性化のためには BCR からの活性化シグナルが必要であるため、CD72 の AS 型アイソフォーム産物が BCR 近位において BCR シグナルを抑制することにより、FcγRIIb 多型の効果を消失させる可能性が考えられる。CD72 は II 型膜結合蛋白であるため、AS 型産物では、細胞外領域の42アミノ酸が全く新たな49アミノ酸に置換される。これがリガンドとの結合や細胞における局在に影響し、抑制効果増強する可能性を、現在検討中である。

APRIL-Gly67Arg 多型と SLE との関連は、Koyama ら(九大)によって2003年に報告されている。今回、われわれの研究により、独立に確認されたことにより、日本人集団における SLE 感受性遺伝子の一つである可能性がきわめて高くなったと考えられる。当該部位は、APRIL 分泌時に、切断され、細胞側に残る部分であるために、その機能的意義は不明である。今回、連鎖不平衡の可能性も考え、隣接する TWEAK をも含めた多型解析を行ったが、Gly67Arg 自体が第一義的である可能性が高いという結論に至った。興味深いことに、Gly67Arg とは連鎖不平衡にない 3' 非翻

訳領域の SNP が、mRNA 量の増加を介して、抗 Sm 抗体陽性 SLE と有意に関連することが示された。われわれは以前、BLyS mRNA レベルの増加に関連する SNP がやはり抗 Sm 抗体陽性群に増加傾向にあることを報告しており(Kawasaki et al., 2002)、今回の結果を考え合わせると、APRIL/BLyS 系が Sm 抗体産生に重要な寄与を有する可能性が示唆されるとともに、今後、この系を標的とした生物学的製剤の開発において、BLyS のみならず、APRIL を考慮に入れることの重要性を示唆するものと考えられる。

#### E. 結論

CD72 イントロン多型が、スプライシング効率に影響することにより、細胞外領域に位置する約40アミノ酸の置換を伴う新たなアイソフォームの産生を増加させ、それ自体で腎症抵抗性に関連し、かつ、遺伝子間相互作用により、FCGR2B 多型の SLE 発症リスクを修飾することが明らかになった。また、APRIL と SLE との既報の関連が確認され、さらに、新たな APRIL 多型と臨床病型との関連が示唆された。

(研究協力者) 人見祐基、川崎綾、大橋順、徳永勝士(東大人類遺伝)、京極千恵子(ミネソタ大医学部)、鈴木毅、河野肇、本田善一郎(東大アレルギーリウマチ内科)、深沢徹、草生真規雄、橋本博史(順天堂大膠原病内科)、村上善則(国立がんセンター研究所)、Sasitorn Bejrachandra, Usanee Siriboonrit, Dasnayanee Chandanayingyong, Puan Suthipinittharm (マヒドン大学)、Betty P. Tsao (UCLA)

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S. Association of functional *CD19* polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50: 4002-4007, 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 K, 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. Tsuchiya N, Kyogoku C: Role of Fcγ Receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: Insights from Asia. *Autoimmunity* (in press)
8. 土屋尚之、京極千恵子: SLE疾患感受性と Fcγ 受容体 IIb 多型の関連。 *臨床免疫* 42:435-441, 2004.
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.

## 2. 学会発表

1. 土屋尚之: 顕微鏡的多発血管炎の疾患感受性遺伝子解析。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p105. 2004年4月15日~17日、岡山。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 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)。
9. 土屋尚之、黒木喜美子、村上善則、藤本学、Thomas F. Tedder, 徳永勝士、竹原和彦、佐藤伸一：CD19の機能的多型と全身性強皮症との関連。日本人類遺伝学会第49回大会抄録集 p148 (2004年10月12日～15日)。
10. Tsuchiya N, Kuroki K, Murakami Y, Fujimoto M, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S: Association of functional *CD19* promoter polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S125, 2004.
11. 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.
12. 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.
13. Kusaoi M, Fukazawa T, Hirashima M, Morita Y, Morita T, Tsuchiya N, Tokunaga K, Inoko H, Hashimoto H: Genomic screening with high density microsatellite markers for systemic lupus erythematosus on chromosome 1. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S121, 2004.
14. 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.
15. 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.
16. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士 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.
17. 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.
18. 土屋尚之、黒木喜美子、藤本学、Tedder TF, 徳永勝士、佐藤伸一 ヒトCD19多型と強皮症との関連。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p284), 2004.
19. 宮下リサ、土屋尚之、屋部登志雄、小林茂人、橋本博史、尾崎承一、徳永勝士 KIR 遺伝子多型と顕微鏡的多発血管炎(MPA)との関連の検討。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p284), 2004.
20. 屋部登志雄、宮下リサ、八幡真人、八幡信代、Parham P, 土屋尚之、徳永勝士 ヒトNK細胞受容体KIR, LIR多型性と骨髄移植成績への影響。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p331), 2004.
21. 草生真規雄、深沢徹、平島美賀、守田優子、頭山尚子、土屋尚之、徳永勝士、猪子英俊、橋本博史 高密度のマイクロサテライトマーカーを用いた1番染色体における全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子の解析。第34回日本免疫学会(学術集会記録 p256), 2004.

22. 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.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。



表1 日本人 SLE および健常対照者における CD72 遺伝子型

	全 SLE (n=160)		腎症合併 SLE(n=92)		腎症非合併 SLE (n=65)		健常対照群 (n=277)	
遺伝子型頻度								
*1/*1	51	(31.9)	34	(37.0)	16	(24.6)	98	(35.4)
*1/*2	82	(51.3)	47	(51.1)	33	(50.8)	125	(45.1)
*2/*2	27	(16.9)	11	(12.1)	16	(24.6)	54	(19.6)
アリル頻度								
*1	184	(57.5)	115	(62.5)	65	(50.0)	321	(57.8)
*2	136	(42.5)	69	(37.5)	65	(50.0)	233	(42.2)
アリル保有者頻度								
*1	133	(83.1)	81	(88.0)	49	(75.4)	223	(80.5)
*2	109	(68.1)	58	(63.0)	49	(75.4)	179	(64.6)

腎症合併 SLE と腎症非合併 SLE の比較::

遺伝子型頻度:  $\chi^2=5.08$ ,  $P=0.024$  (Armitage's test for trend), アリル頻度:  $\chi^2=4.87$ ,  $P=0.027$ ,

\*1 アリル陽性率:  $\chi^2=4.29$ ,  $P=0.038$ .

表2 CD72 と FCGR2B の遺伝子型の組み合わせによる SLE 感受性。

FCGR2B	CD72		
	*1/*1	*1/*2	*2/*2
Thr/Thr	4.63(1.47-14.6)	1.60(0.67-3.86)	1.58(0.32-7.90)
Ile/Thr	0.80(0.41-1.55)	1.33(0.73-2.42)	0.77(0.26-2.34)
Ile/Ile	0.89(0.49-1.61)	0.91(0.52-1.58)	1

日本人集団、タイ人集団におけるデータをメタアナリシスの方法で統合した。表の数値は、FCGR2B-Ile/Ile, CD72 \*2/\*2 の組み合わせと比較した場合の、各遺伝子型の組み合わせのオッズ比と 95%信頼区間である。いずれの集団においても FCGR2B Thr/Thr 遺伝子型は単独で有意な関連を示すが、CD72 遺伝子型と組み合わせた場合、関連は CD72 \*1/\*1 の存在下においてのみ有意差に到達する。

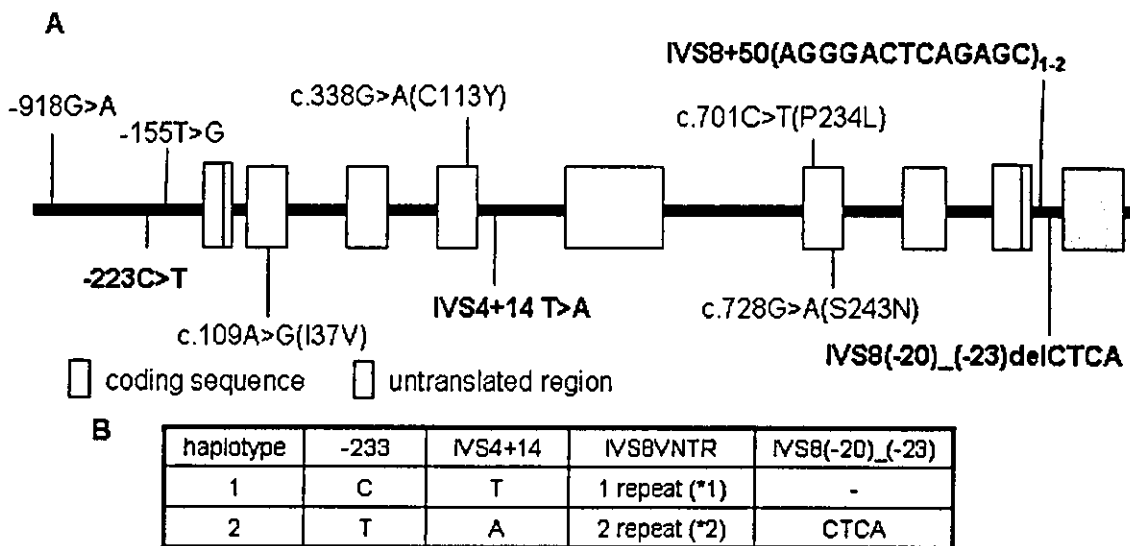


図1 (A) ヒト *CD72* に検出された変異。太字は多型に相当する頻度で認められたもの。  
 (B) 4個所の多型部位によって形成されるハプロタイプ。日本人 *CD72* 遺伝子型は、大部分がこの2つの主要ハプロタイプによって説明された。

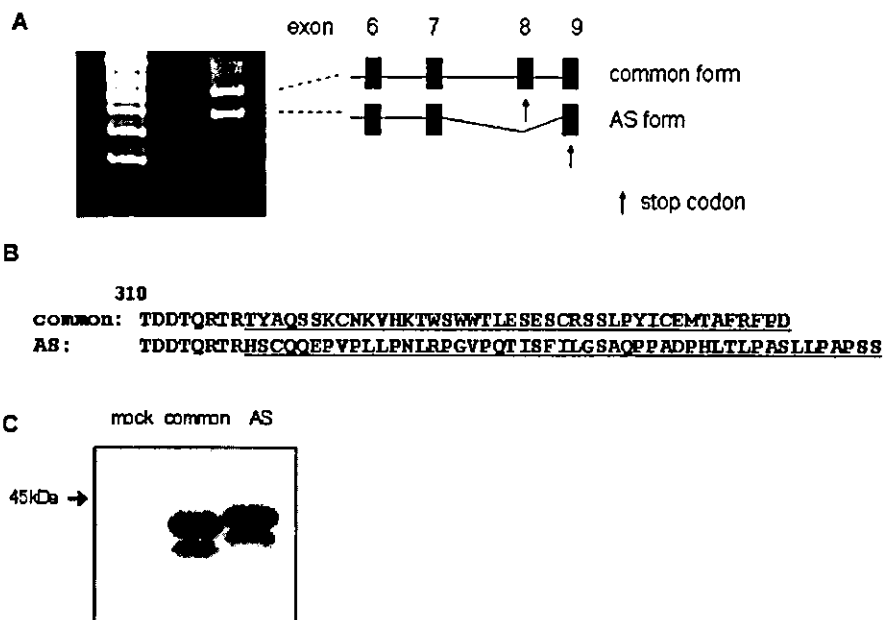


図2 *CD72* に見出された新規のスプライシング・アイソフォーム。(A) ヒト末梢血単核球の由来の RNA を用いた RT-PCR。短い断片の塩基配列決定により、第8エクソンを欠失したアイソフォームであることが確認された。(B) 通常型および第8エクソン欠失型(AS型)アイソフォームの予測されるアミノ酸配列。置換される部分を下線で示す。(C) 通常型およびAS型 *CD72* cDNA 全長を COS-7 細胞に導入し、細胞質領域を認識する抗体による免疫プロット法で蛋白産物を確認した。それぞれの2本のバンドは、糖鎖修飾の違いによるものと思われる。

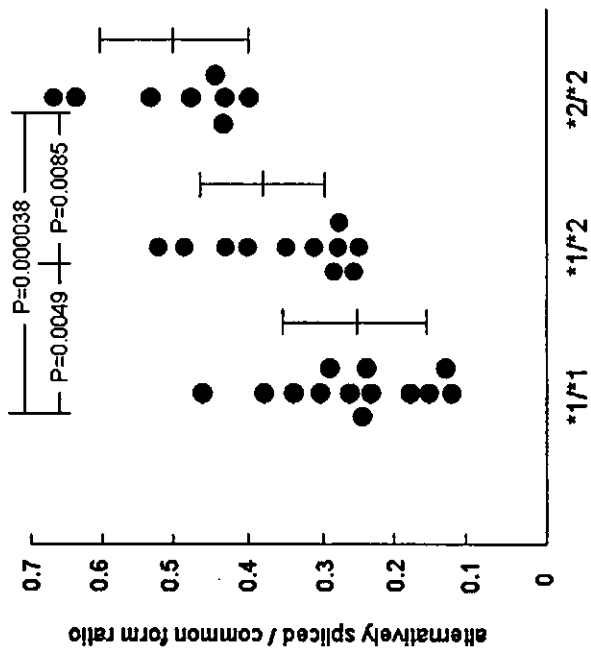


図3 *CD72* 遺伝子型とスプライシング効率の関連。末梢血単核球の RT-PCR により、AS 型/通常型比を算出し、プロットした。

## SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御

分担研究者 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

### 研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)の治療は、薬物療法を主体とするが、薬剤抵抗性とその克服は重要な課題である。薬剤抵抗性は、長期間の薬剤投与により齎される薬剤耐性(二次無効、エスケープ現象)、疾患活動性が高いために薬剤に反応しない薬剤不応性(難治性)に大別される。これまで、長期治療後の SLE 患者末梢血リンパ球では、多剤耐性遺伝子 MDR-1 の転写を介して細胞膜上に P 糖蛋白質が発現し、薬物の細胞外への能動輸送により細胞内薬物濃度を低下させる事を報告した。今年度は、疾患活動性の高い SLE 患者リンパ球でも P-糖蛋白質の発現率が高い事を認め、さらに、抹消リンパ球の P-糖蛋白質の発現量は、疾患活動性指数 SLEDAI と正相関した。その機序として、リンパ球を IL-2 や IL-4 等で刺激すると、MDR-1 特異的転写因子 YB-1 の核内移行、MDR-1 転写、P-糖蛋白質発現、細胞内ステロイド濃度低下が誘導されたことから、疾患活動性の亢進に伴うリンパ球活性化が存在する事が示唆された。斯様な症例に対して、パルス療法を含む強化療法の反復により、リンパ球の P-糖蛋白質の発現量は減弱し、治療反応性や臨床症状が改善した。即ち、疾患活動性の高い SLE 患者リンパ球は、活性化刺激により P-糖蛋白質が誘導されて治療不応性(難治性)に陥るが、パルス療法や免疫抑制薬等による強化治療による P-糖蛋白質抑制を介した治療不応性の解除が示唆された。以上、SLE 患者のリンパ球の P-糖蛋白質の発現が、薬剤抵抗性の臨床的指標として普及すれば、SLE の治療のアルゴリズムに於いて、P-糖蛋白質が高発現する薬剤不応性の症例に対しては強化療法(ステロイドパルス療法や生物学的製剤)、薬剤耐性の症例には P-糖蛋白質拮抗薬(シクロスポリンなど)の併用療法などの次の治療手段の選択に重要な根拠を提供するはずで、薬剤抵抗性の観点からのテーラーメイド医療の具現化を可能とするものであると考えられた。

### A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)の治療は、薬物療法を主体とするが、薬剤抵抗性とその克服は重要な課題である。薬剤抵抗性は、長期間の薬剤投与により齎される薬剤耐性(二次無効、エスケープ現象)、疾患活動性が高いために薬剤に反応しない薬剤不応性(難治性)に大別される。薬剤抵抗性は、様々な機序で齎されるが、抗癌剤による化学療法の分野では予後決定の最重要因子であり、その解明に精力が注がれてきた。多剤耐性遺伝子(multidrug-resistance; MDR-1)がコードする細胞膜 P-糖蛋白質は、抗癌剤を始めとする種々の薬剤を細胞外に能動排出するポンプとして機能し、抗癌剤抵抗性獲得に到ることが解明された。

しかし、SLE 患者リンパ球における MDR-1 の発現機序や薬物不応性獲得の機構については全く不詳である。これまで、長期治療後の SLE 患者末梢血リンパ球では、多剤耐性遺伝子 MDR-1 の転写を介して細胞膜上に P 糖蛋白質が発現し、薬物の細胞外への能動輸送により細胞内薬物濃度を低下させる事を報告した。今年度は、SLE 患者リンパ球の P-糖蛋白質発現と臨床的特徴(治療抵抗性、疾患活動性、罹患期間等)との関連性、殊に、リンパ球 P-糖蛋白質の発現が、長期間多剤使用した症例の薬剤耐性(二

次無効)、並びに、疾患活動性が高く既存治療では制御困難な薬剤不応性の重要な臨床指標となる事を実証し、SLE 患者リンパ球の P-糖蛋白質を薬剤抵抗性の臨床指標としたテーラーメイド医療の確立を主目的とする。

### B. 方法

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

### (倫理面への配慮)

被験者およびその関係者の尊厳、人権および利益を保護することを目的とし、厚生科学審議会において作成された「遺伝子解析研究に付随する倫理問題