

表 1. 対象患者の臨床的特徴

	LA positive	Arterial thrombosis	Venous thrombosis
SLE n=16 (M1,F15)	n=5 (31.3%) (M0,F5)	n=3 (18.6%) (M0,F3)	n=5 (31.3%) (M0,F5)
PAPS n=7 (M2,F5)	n=7 (100%) (M2,F5)	n=6 (85.7%) (M2,F4)	n=7 (100%) (M2,F5)
SSc n=77 (M12,F65)	n=27 (35.1%) (M5,F22)	n=22 (28.6%) (M3,F19)	n=15 (19.5%) (M2,F13)

(SLE; systemic lupus erythematosus, PAPS; primary antiphospholipid syndrome, SSc; systemic scleroderma. LA; lupus anticoagulant, M; male, F; female).

表 2. SLE, PAPS 群における両キット aPS/PT 抗体の有無の一致率

		コスミック社 aPS/PT	
		陽性	陰性
MBL 社 aPS/PT	陽性	11	0
	陰性	2	10

表 3. SSc 群における両キット aPS/PT 抗体の有無の一致率

		コスミック社 aPS/PT	
		陽性	陰性
MBL 社 aPS/PT	陽性	0	13
	陰性	0	64

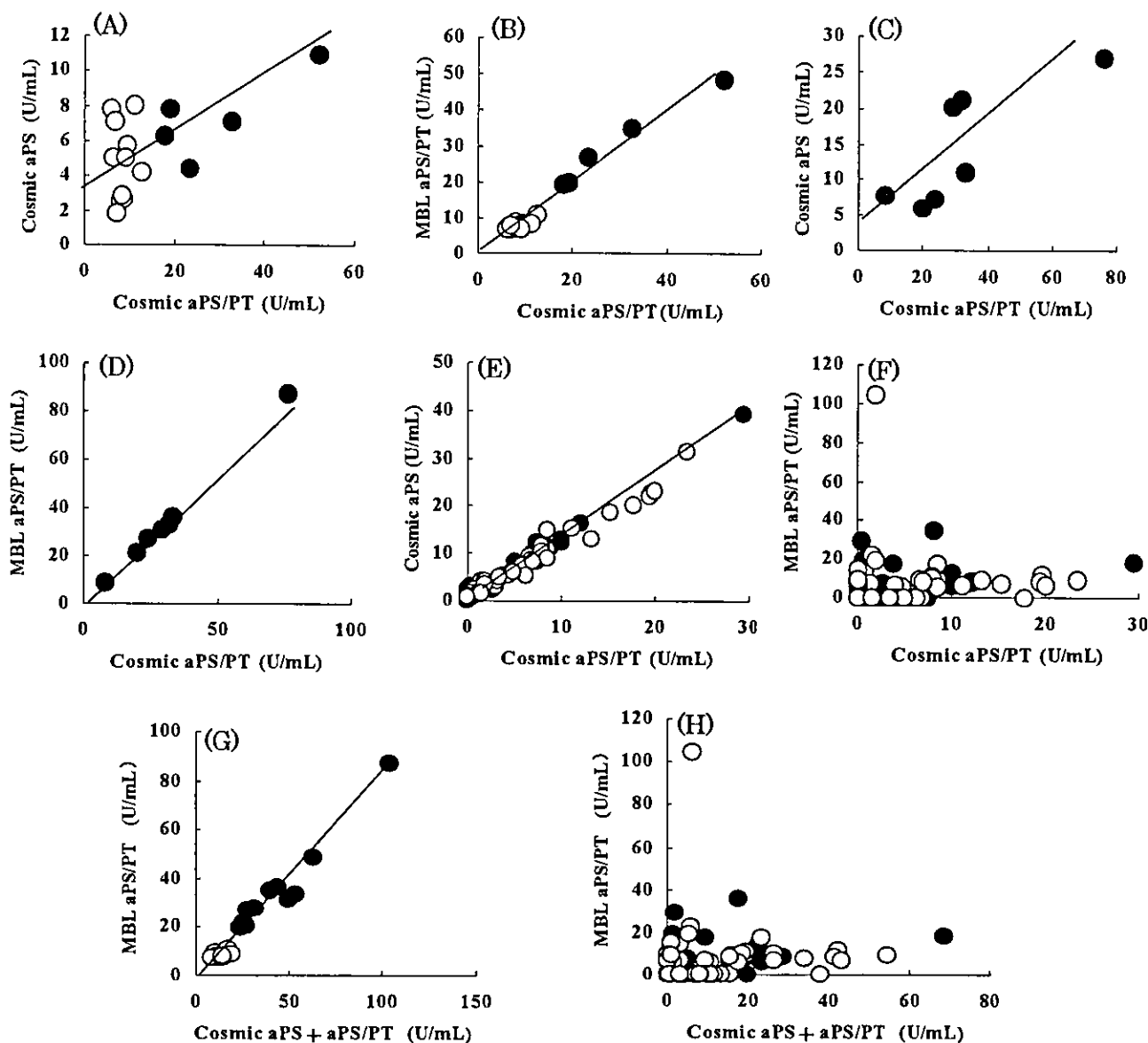


図 1. 各抗体測定値間の相関

(A) SLE 患者群におけるコスミック社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS 値の相関 ($y=0.124x+3.79$, $r=0.614$, $n=16$, $p=0.011$) ; (B) SLE 患者群におけるコスミック社 aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の相関 ($y=0.979x+0.413$, $r=0.988$, $n=16$, $p<0.001$) ; (C) PAPS 群におけるコスミック社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS 値の相関 ; ($y=0.312x+4.50$, $r=0.807$, $n=7$, $p=0.028$), (D) PAPS 群におけるコスミック社 aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の相関 ($y=1.15x-1.25$, $r=0.999$, $n=7$, $p<0.001$) ; (E) SSc 群におけるコスミック社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS 値の相関 ($y=1.21x+0.564$, $r=0.987$, $n=77$, $p<0.001$) ; (F) SSc 群におけるコスミック社 aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の相関 ($y=0.149x+6.86$, $r=0.070$, $n=77$, $p=0.544$) ; (G) SLE/PAPS 群におけるコスミック社 aPS+aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の相関 ($y=0.831x-2.38$, $r=0.982$, $n=23$, $p<0.001$) ; (H) SSc 群におけるコスミック社 aPS+aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の相関 ($y=0.0852x+6.62$, $r=0.0893$, $n=77$, $p=0.440$). ● : LA 陽性, ○ : LA 陰性. SLE : systemic lupus erythematosus (SLE), PAPS : primary antiphospholipid syndrome, SSc : systemic scleroderma, aPS/PT : phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody, aPS : antiphosphatidylserine antibody, LA : lupus anticoagulant.

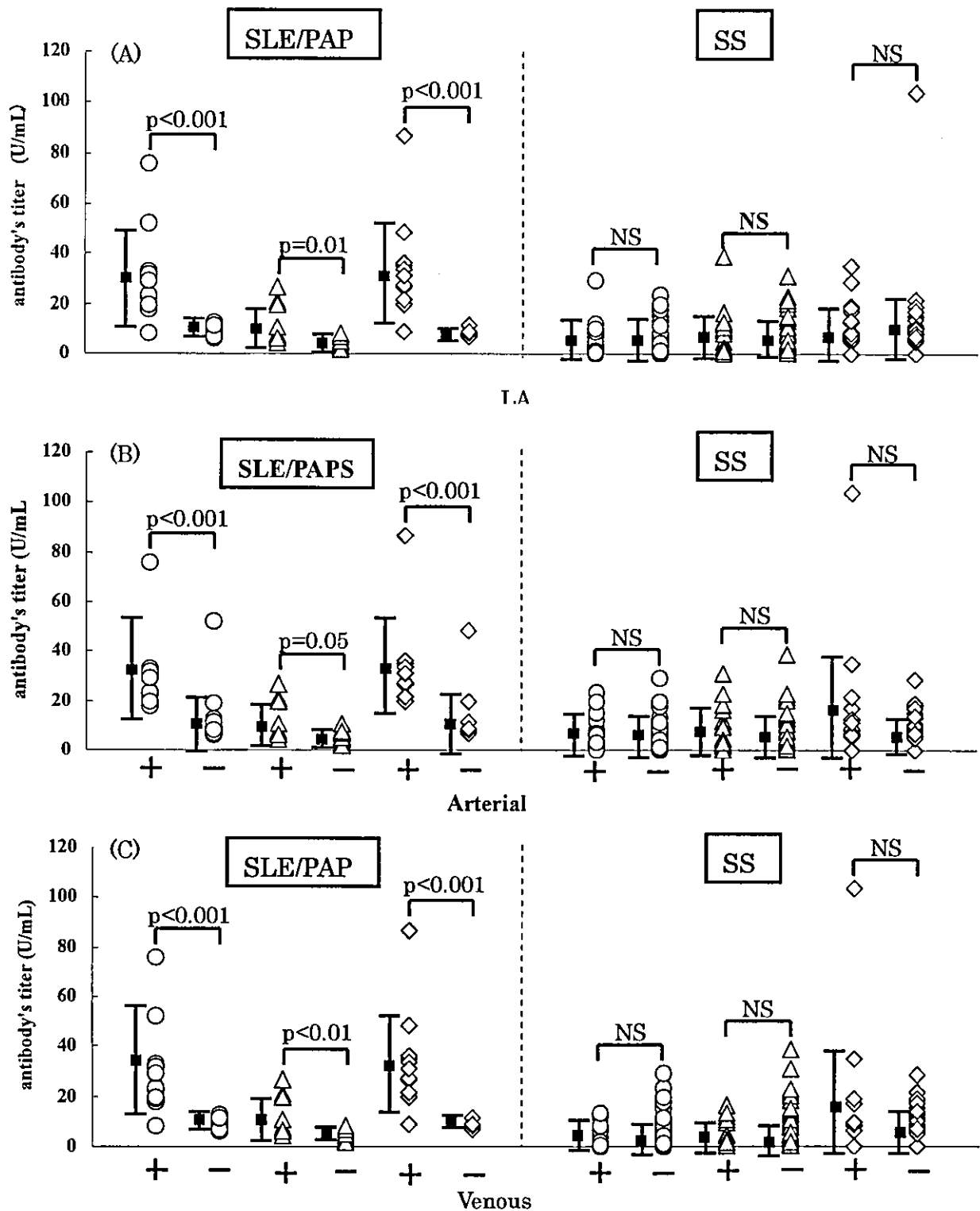


図2. LA、動脈・静脈血栓症の有無による各抗体価の相違

(A) LAの有無による各抗体価の相違；(B) 動脈血栓症の有無による各抗体価の相違；(C) 静脈血栓症の有無による各抗体価の相違. ○：コスミック社 aPS/PT 抗体価，△：コスミック社 aPS 抗体価，◇：MBL 社 aPS/PT 抗体価. SLE：systemic lupus erythematosus (SLE)，PAPS：primary antiphospholipid syndrome，SSc：systemic scleroderma，aPS/PT：phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody，aPS：antiphosphatidylserine antibody，LA：lupus anticoagulant.

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 B 細胞機能分子多型の検討

研究協力者	土屋尚之	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野助教授
協力者	黒木喜美子	九州大学生体防御医学研究所 ワクチン開発構造生物学分野非常勤研究員
協力者	人見祐基	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野大学院生
研究分担者	藤本 学	東京大学大学院医学系研究科皮膚科助手
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分野教授
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
研究分担者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚病態学教授

研究要旨

昨年度までに強皮症との関連を報告した CD19 遺伝子プロモーター領域の単一塩基多型(SNP) -499G>Tにつき、臨床病型との関連を検討したところ、関連は抗セントロメア抗体陽性群、限局性皮膚硬化型強皮症(lcSSc)群において顕著に認められ、統計学的有意差に到達した(オッズ比 2.82, P=0.0008)。抗トポイソメラーゼI抗体陽性群、広汎性皮膚硬化型強皮症(dcSSc)群においても関連の傾向は認められたものの、有意差に到達しなかった。また、強皮症と関連する-499Tアリル陽性強皮症患者群においては、ナイーブB細胞、メモリーB細胞のいずれにおいても、-499T 陰性患者群と比較して、CD19 発現強度が有意に増強していた。以上の結果から、少なくとも一部の症例では、遺伝的に規定された CD19 発現増強自体が強皮症の発症に寄与することが示唆された。一方、B細胞の抑制型受容体であるCD22の翻訳領域の同義置換をコードするアリルがlcSScと関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

われわれはこれまでに、ヒト全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)患者末梢血B細胞におけるCD19の発現が、ナイーブおよびメモリーB細胞のいずれにおいても増強していること(1,2)、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(3)。

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、CD19をはじめとする多数のB細胞機能分子につき、新規多型や疾患との関連を報告してきた(4,5)。

SScの発症に遺伝素因が存在することが、発症率の集団差(6)、家系内集積性(7)などの情報から強く示唆されている。以上の背景から、われわれは昨年度の当研究班において、CD19多型とSScとの関連を検討し、プロモーター領域の単一塩基多型-499G>Tと強皮症との関連を報告した。本年度は、SScの臨床病型との関連、CD19発現強度との関連を検討した。

また、B細胞の抑制シグナル伝達分子であるCD22, CD72多型とSScの関連についても検討した。

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遺伝子プロモーター領域のSNP-499G>Tの遺伝子型を決定し、臨床病型との関連を χ^2 検定により検討した。また、40例のSSc患者(G/G遺伝子型15例、G/T遺伝子型23例、T/T遺伝子型2例)の末梢血単核球を、phycoerythrin標識抗CD19抗体とFITC標識抗CD27抗体により二重染色し、フロー・サイトメトリーにより、ナイーブ(CD19⁺CD27⁻)およびメモリー(CD19⁺CD27^{med})B細胞のCD19発現強度を測定し、遺伝子型との関連をStudent's t-testを用いて検討した。

また、われわれが過去に報告したCD22多型(8)のうち、マイナーアレル頻度が3%以上である3個所の多型部位の遺伝子型を決定し、SScとの関連を検討

した。さらに、CD72多型のスクリーニングを施行し、SScとの関連を検討した。

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

CD19-499Tの関連は、lcSSc群、抗セントロメア抗体陽性群に顕著に認められ、統計学的有意差に到達した。dcSSc群、抗トポイソメラーゼI抗体陽性群においても-499Tアレル陽性率の増加傾向は認められたが、統計学的有意差には到達しなかった(表1)。

末梢血B細胞表面におけるCD19発現強度と遺伝子型との関連を検討したところ、-499Tアレル陽性患者では、陰性患者と比較して、ナイーブB細胞、メモリーB細胞いずれにおいても、約19%のCD19発現強度の増強が認められた。患者40例中17例は低用量のステロイド(プレドニン 2-15mg/day)を服用していたが、ステロイド使用量とCD19発現強度に有意な相関は認められなかった(図1)。

CD22には、マイナーアレル頻度3%以上のSNPが3個所存在し、これらについて関連研究を施行したところ、exon 13に位置する同義置換(c.2304C>A)のA/A遺伝子型がSSc群のみに6例(4.8%)に認められた(P=0.025)。興味深いことに、これら6例のすべてがlcSScであった(lcSSc vs 対照群 P=0.007)(表2)。

CD72には10個所の変異が検出され、うち、4個所が多型に相当する頻度のものであった。これら4個所は、日本人集団では、2種の主要ハプロタイプを構成して存在していた。これらのうち、第8イントロンの13塩基の反復配列数(1回あるいは2回)による多型をタグ多型として解析したところ、強皮症群でヘテロ接合体が多い結果が観察された(表3)。

D. 考案

昨年度の研究班において報告した CD19 -499T アリルとの関連は、臨床病型別の検討により、抗セントロメア抗体陽性の、lcSSc においてより顕著に認められることが明らかになった。また、-499T アリル陽性者において、ナイーブ、メモリーいずれのB細胞においても CD19 発現強度の増強が認められた。このことから、過去に報告された SSc における CD19 発現増強の一つの要因は、CD19 遺伝子自体の多型であることが強く示唆された。

また、抑制性シグナル伝達分子である CD22 多型が、CD19 同様、lcSSc に関連する可能性が示唆された。本多型はアミノ酸置換を伴わない多型であり、また、CD22 のアミノ酸置換を伴う、頻度の高い多型には関連が認められなかったため、今後、この多型を含むハプロタイプが CD22 発現量に影響する可能性を検討する必要がある。また、CD19 同様、この多型が lcSSc と関連する可能性が示されたことは、lcSSc の病因・病態にB細胞が深く寄与する可能性を示唆するものと考えられる。この点についても、今後、一層の検討が必要と思われる。

一方、CD72 多型については、新たに見出されたスプライシング・アイソフォームとの関連と、SLE 疾患感受性における *FCGR2B* 多型の関連の修飾因子であることが見出された(9)。強皮症群においては、ヘテロ接合体が多く、遺伝子型頻度の解析において有意差が検出されたが、いずれのホモ接合体ともに対照群より低頻度であり、検体数が少ないためのバイアスである可能性が高いと考えられた。

E. 結論

CD19 プロモーター領域の -499G>T 多型が

CD19 発現強度の増強を介して、特に抗セントロメア抗体陽性の lcSSc 感受性に関連することが示唆された。また、CD22 と lcSSc の関連の可能性も示唆された。

F. 文献

1. 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.
2. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* 2004;50:1918-1927.
3. 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.
4. Tsuchiya N, Ohashi J, Tokunaga K. Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders. *Immunol Rev* 2002, 190: 169-181.
5. 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.
6. 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.

7. 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.
8. Hatta Y, Tsuchiya N, Matsushita M, Shiota M, Hagiwara K, Tokunaga K: Identification of the gene variations in human *CD22*. *Immunogenetics* 1999, 49: 280-286.
9. 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* 2004, 13: 2907-2917.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K. Association of Fcy receptor IIA, but not of IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A family-based association study in Caucasians. *Arthritis Rheum* 2004, 50:671-673.
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* 2004, 173:5801-5809.

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* 2004, 13: 2907-2917.
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* 2004, 50: 4002-4007.

2. 学会発表

1. 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。
2. 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。
3. 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。

4. 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。

5. 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。

6. 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、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 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)。

7. 土屋尚之、黒木喜美子、村上善則、藤本学、Tedder TF, 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)。

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 黒木喜美子、土屋尚之、白石充典、ラズバラリンド、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.

14. 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.

15. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、鈴木毅、深沢徹、Bejrachandra S, Chandadnayingyong 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

16. 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.

17. 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).

18. 黒木喜美子、白石充典、ラズバラリダ、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. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

表1 CD19-499T アリルとの関連は、抗セントロメア抗体陽性、限局性皮膚硬化型強皮症群に、より顕著に認められる。

	n	-499T 陽性率 n (%)	オッズ比 (95%信頼区間)	P
強皮症群全体	134	71 (53.0)	2.18 (1.31-3.86)	0.003
限局性皮膚硬化型	82	48 (58.5)	2.82 (1.54-5.17)	0.0008
広汎性皮膚硬化型	52	23 (44.2)	1.59 (0.79-3.17)	NS
抗セントロメア抗体陽性	61	34 (55.7)	2.51 (1.31-4.85)	0.006
抗トポソメラーゼ I 抗体陽性	37	17 (45.9)	1.70 (0.79-3.68)	NS
健常対照群	96	32 (33.3)	-	-

各群における-499T アリル陽性率を健常対照群と比較した。

表2 強皮症における CD22 多型

SNP	強皮症群全体		限局性皮膚硬化型		広汎性皮膚硬化型		健常対照群	
IVS11-14C>T (intron 11)								
T/T	9	(7.1)	3	(3.8)	6	(12.8)	8	(8.8)
C/T	56	(44.4)	36	(45.6)	20	(42.6)	40	(44.0)
C/C	61	(48.5)	40	(50.6)	21	(44.6)	43	(47.2)
c.2234G>A(G745D) (exon 13)								
A/A	2	(1.6)	1	(1.3)	1	(2.1)	0	(0)
A/G	29	(23.0)	20	(25.3)	9	(19.1)	31	(33.3)
G/G	95	(75.4)	58	(73.4)	37	(78.8)	62	(66.7)
c.2304C>A(P768P) (exon 13)*								
A/A	6	(4.8)	6	(7.6)	0	(0)	0	(0)
A/C	25	(19.8)	15	(19.0)	10	(21.3)	18	(19.4)
C/C	95	(75.4)	58	(73.4)	37	(78.7)	75	(80.6)

()内に%を示す。

*c.2304 AA 対 (AC + CC)の比較において、強皮症群全体と健常対照群間に P=0.025, 限局性皮膚硬化型強皮症群と健常対照群間に P=0.007 の有意差が検出された。

表3 強皮症における CD72 第8イントロン多型の検討

アリル	強皮症群全体		限局性皮膚硬化型		広汎性皮膚硬化型		健常対照群	
IVS8VNTR								
*1/*1	28	(21.4)	21	(26.6)	7	(13.5)	32	(33.0)
*1/*2	82	(62.6)	47	(59.5)	35	(67.3)	40	(41.2)
*2/*2	21	(16.0)	11	(13.9)	10	(19.2)	25	(25.8)

第8イントロンに存在する13塩基 (AGGGACTCAGAGC) の反復回数が1回であるアリル(*1)と2回であるアリル(*2)を、CD72 全長を含むハプロタイプのタグとしてタイピングした。強皮症群におけるヘテロ接合体の増加が認められたが、いずれのホモ接合体も健常者群より低頻度であり、検体数が少ないためのバイアスである可能性が高いと考えられた。

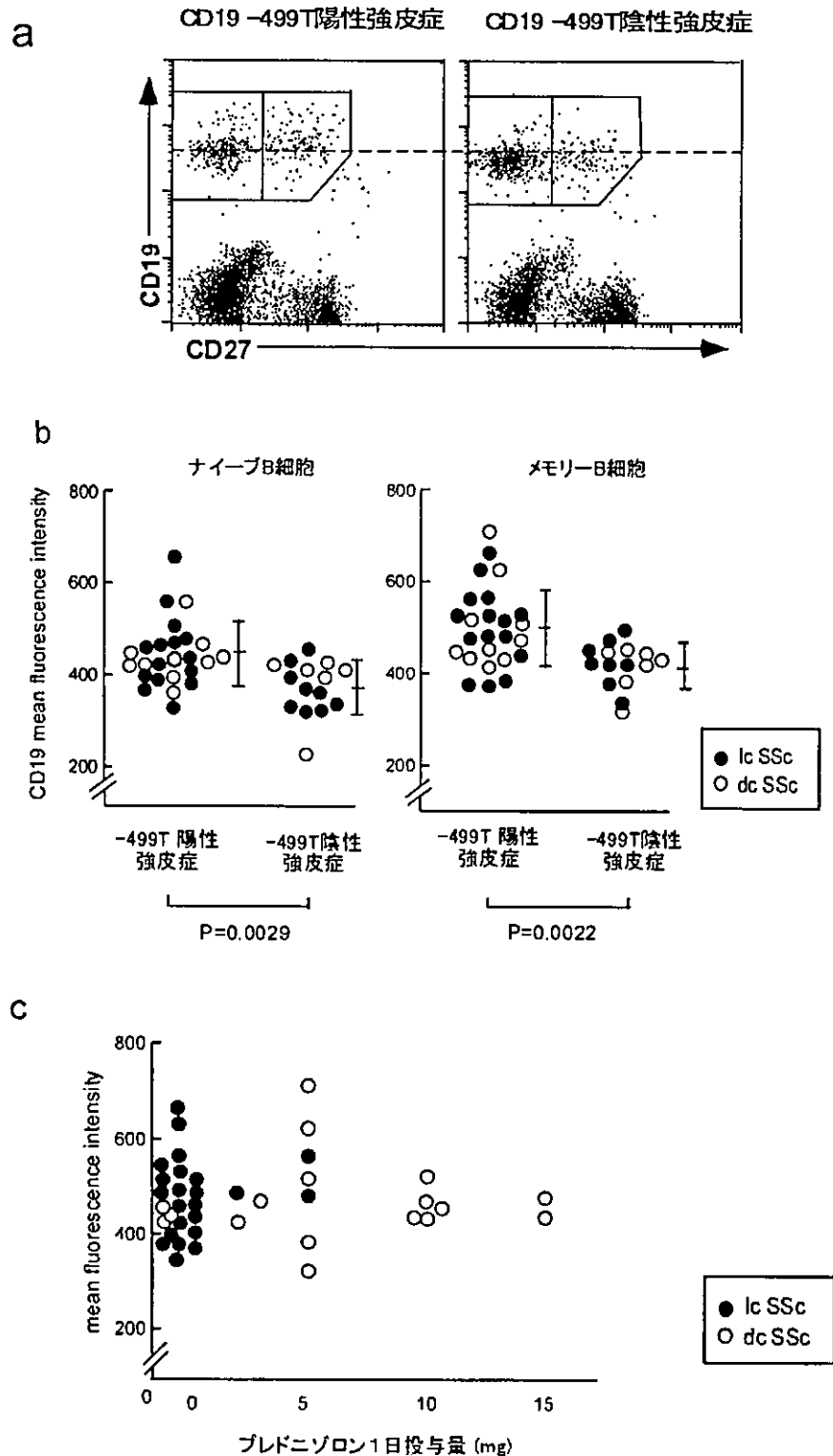


図1 CD19-499G>T遺伝子型と強皮症患者末梢血B細胞表面のCD19発現強度との関連
 (a) 典型的な2症例のフローサイトメトリープロファイル。CD19⁺CD27^{low}分画がナイーブ、CD19⁺CD27^{med}がメモリーB細胞に相当する。(b) -499T陽性強皮症患者25例、-499陰性強皮症患者15例における末梢血B細胞CD19発現強度。ナイーブB細胞、メモリーB細胞のいずれにおいても、-499T陽性群においてCD19発現強度が有意に増強していた。(c) B細胞におけるCD19発現強度とステロイド投与量との間に有意な相関は認められなかった($r=0.22$, $P=0.90$)。lcSSc: 限局性皮膚硬化型強皮症、dcSSc: 広汎性皮膚硬化型強皮症。

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parvovirus B19 component gene構成の変化について

研究協力者 大塚 勤 獨協医科大学越谷病院皮膚科助教授
協力者 山崎雙次 獨協医科大学皮膚科教授

研究要旨

human parvovirus B19は2種のcapsid proteins (VP1, VP2)と一種のnonstructural protein (NS1)をcodeする一本鎖DNAより成るウイルスである。96例の正常人および48例の(SSc)において、全身性強皮症(SSc)皮膚におけるhuman parvovirus B19由来遺伝子であるVP1,NS1,VP2遺伝子の発現率を検討した。その結果、SScにおけるVP1およびNS1遺伝子の発現率(36/48, 31/48)が正常人のそれ(51/97 43/97)と比較して有意に上昇していた($P<0.01$, $P<0.05$)。また、SScにおけるVP1陽性者のVP2発現率(31/36, 86.1%)は正常人のそれ(51/51, 100%)と比較して有意に低下していた($P<0.01$)。以上の結果より、SScにおけるparvovirus B19 DNAの構成はその急性感染と異なっており、この変化がSScの皮膚病変形成の関与している可能性が示された。

A. 的研究目

human parvovirus B19 (HPV-B19) は2種のcapsid proteins (VP1, VP2) と一種のnonstructural protein (NS1)をcodeする一本鎖DNAより成る小さなウイルスである。erythema infectiosumや溶血性貧血におけるtransient aplastic crisisの原因ウイルスであり、胎児死亡、関節炎や慢性貧血との関連が指摘されている(1)。その急性感染においてはimmunoglobulin M抗体の測定が信頼性のある検査とされてきた(2,3)。しかし、慢性感染の診断においてはその測定は必ずしも十分ではない。HPV-B19は慢性関節リウマチの原因である可能性が指摘されており(4)、急性多発性関節炎の原因の可能性も指摘されている(6)。HPV-B19による多発性関節炎はアメリカリウマチ学会の慢性関節リウマチの診断基準を満

たす症例の存在も指摘されている(7)。近年、全身性強皮症(SSc)の原因である可能性も指摘されている(8,9)。今回の検討では、HPV-B19 component geneが急性感染と異なるかどうかについて検討した。

B. 研究方法

研究対象

アメリカリウマチ学会の診断基準(10)を満たす48例のSSc患者(男性6例、女性42例、年齢31-75歳、平均52.2歳)について検討した。対照は97例の健常者(男性23例、女性74例、年齢24-74歳、平均55.3歳)とした。SScのうち31例がlimited type、17例がdiffuse typeであった(11)。また、47例が抗核抗体陽性、11例が抗topoisomerase I抗体陽性、19例が抗centromere抗体陽性であった。発症年齢は20

から73歳、平均40.7歳であった。前腕背側より皮膚生検を施行した。97例の健常人は自己免疫疾患の既往はなかった。

DNA抽出およびpolymerase chain reaction QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて皮膚組織より DNA を抽出した。polymerase chain reaction(PCR)は 10 mmol/l potassium chloride, 1.5 mmol/l magnesium chloride, 100 ml/l gelatin, 200 mmol/l の4種の deoxynucleotide triphosphates mixture, 1.25 U/□l AmpliTaqGold polymerase (Applied Biosystems, CA, USA), 20 pmol の primer を含む buffer を用いて行った。VP1, VP2, NS1 の検出にはすべて nested PCR を用いた。用いた primer set は Table 1 に示すとおりである(12,13)。PCR の反応は既出の条件に従った(12,13)。

統計処理

出現率の検定には χ^2 検定を用いた。

C. 研究結果

皮膚組織における人parvovirus B19 component geneの検出結果

図1はVP1 DNAの検出結果を示す。陽性の結果は391-bpとして検出された。図2はNS1 DNAの検出結果を示す。陽性の結果は437-bpとして検出された。図3はVP2 DNAの検出結果を示す。陽性の結果は387-bpとして検出された。

健常人および全身性強皮症における人parvovirus B19 component geneの検出率

SScにおけるVP1 DNAの検出率(36/48, 75%)は健常人のそれ(51/97, 52.6%)と比較して有意に上昇していた($P<0.01$)(Table 2)。SScにおけるNS1 DNAの検出率(31/48, 64.6%)は健常人

のそれ(43/97, 44.3%)と比較して有意に上昇していた($P<0.05$)。SScにおけるVP2 DNAの検出率(31/48, 64.6%)は健常人のそれ(51/97, 52.6%)と比較して有意差がなかった。

VP1 DNA陽性者におけるNS1 and VP2 DNAの検出率について検討した(Table 3)。その結果、SScにおけるNS1 DNAの検出率(31/36, 86.1%)は健常人のそれと比較して有意差がなかった。SScにおけるVP2 DNAの検出率(31/36, 86.1%)は健常人のそれ(51/51, 100%)と比較して有意に低下していた($P<0.01$)。

D. 考案

今回の検討ではVP1およびNS1 DNAの検出率がSScにおいて上昇していることが示されが、VP1陽性者におけるNS1の検出率は健常人とSScでは差がなかった。この結果は、人皮膚組織においてはVP1は常に安定して検出されるが、それ以外のDNAはしばしば検出されないという以前の報告と一致している(13)。また、VP1陽性者におけるVP2 DNAの検出率はSScにおいて低下していた。この結果はSSc皮膚組織がHPV-B19に持続感染していてもVP2 component genesがしばしば欠損していることを示す。

HPV-B19の構成タンパクであるVP1およびVP2はそれぞれ同一のopen reading frameであるnucleotides2444-4786 および3125-4786にコードされており、84kDaおよび58 kDaのタンパクを生成する(14)。VP1およびVP2タンパクはほぼ同等であるが、VP1のアミノ末端には227個のアミノ酸が追加している点が異なる。このunique VP1 regionに対する抗体はウイルスを沈殿させ、その活性を中和する。このregionはerythroid cultureにおいてウイルスが細胞内に入り込むことを促進するが、そのメ

カニズムはウイルスの細胞への接着であると報告されている(15)。HPV-B19は約96%のVP1および4%のVP2の60コピーより成る正20面体である(16)。この割合はVP1翻訳の不十分さによっている。従って、SSc皮膚組織におけるVP2 geneの低下はHPV-B19 virusの構成、形態を変化させていると考えられる。

持続感染後の再活性化がウイルス感染の臨床症状発現機序と考えられている。正常人における骨髓細胞での再活性化が急性感染後の数年にわたる定期的検討により示されている(17)¹。また、acute lymphocytic leukemia の4歳男児例においてHPV-B19 virus再活性化が示されている(18)。潜伏感染しているHPV-B19 virusが、ストレスや免疫抑制状態など状態において再活性化される可能性が指摘されている(18)。この再活性化が、線維化を含めたSScの皮膚病変形成に関与している可能性が指摘される。

E. 結論

SScにおけるparvovirus B19 DNAの構成はその急性感染と異なっており、この変化がSScの皮膚病変形成に関与している可能性が示された。

F. 文献

1. Anderson LJ. 1990. Human parvovirus B19. *J Infect Dis* 161: 603.
2. Cohen BJ, Mortimer PP, Pereira MS. 1983 Diagnostic assays with monoclonal antibodies for the human serum parvovirus-like virus (SPLV). *J Hyg* 91: 113.
3. Anderson LJ, Tsou C, Parker RA, Chorba TL, Wulff H, Tattersall P, Mortimer PP. 1986 Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 24: 522.
4. Takahashi Y, Murai C, Shibata S *et al.* 1998 Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 82227.
5. Takahashi Y, Murai C, Ishii T, Sugamura K, Sasaki T. 1998 Human parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. *Int Rev Immunol* 17: 309.
6. Naides SJ, Scharosch LL, Foto F, Howard EJ. 1990 Rheumatologic manifestations of human parvovirus B19 infection in adults: initial two-year clinical experience. *Arthritis Rheum* 33: 1297.
7. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS *et al.* 1988 The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315.
8. Ferri C, Longombardo G, Azzi A, Zakrzewska K. 1999 Parvovirus B19 and systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 17: 267.
9. Altschuler EL. 2001 The historical record is consistent with the recent finding of parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol* 19: 228.
10. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. 1980 Preliminary criteria for

- the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 23: 581.
11. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, Rowell N, Wollheim F. 1988 Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 15: 202.
 12. Hokynar K, Brunstein J, Soderlund-Venermo M, Kiviluoto O, Partio EK, Konttinen Y, Hedman K. 2000 Integrity and full coding sequence of B19 virus DNA persisting in human synovial tissue. *J General Virol* 81: 117.
 13. Hokynar K, Soderlund-Venermo M, Pesonen M, Ranki A, Kiviluoto O, Partio EK, Hedman K. 2002 A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology* 302: 224.
 14. Blundell MC, Beard C, Astell CR. 1987 In vitro identification of a B19 parvovirus promoter. *Virology* 157: 534.
 15. Rosenfeld SJ, Yoshimoto K, Kajigaya S, Anderson S, Young NS, Field A, Warrenner P, Bansal G, Collett MS. 1992 Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J Clin Invest* 89: 2023.
 16. Kajigaya S, Shimada T, Fujita S, Young NS. 1989 A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7601.
 17. Sasaki T, Murai C, Muryoi T, Takahashi Y, Munakata Y, Sugamura K, Abe K. 1995 Persistent infection of human parvovirus B19 in a normal subject. *Lancet* 346: 851.
 18. Coulombel L, Morinet F, Mielot F. 1989 Parvovirus infection, leukaemia, an immunodeficiency. *Lancet* 1: 101.
- G. 研究発表**
- 1.論文
Tutomu Ohtsuka, Soji Yamazaki. Alteration of human parvovirus B19 component gene in systemic sclerosis skin tissue. *Br J Dermatol*, in press.
 - 2.学会発表
なし
- H. 知的所有権の出願・登録状況**
なし

Table 1 Primers used in this study. The location of each primer within the sequence of the B19 is shown.

Primer	Sequence	Location
VP1 PCR		
P6	GGAGAATCATTGTCGGAAG	2086-2105
P3	CTTCTGCAGAAATTAAGTGAAGTC	3149-3127
P8	TGTGCTTACCTGTCTGGATTG	2407-2427
P5	AGGCTTGTGTAAGTCTTCAC	2797-2777
NS1 PCR		
NSofwd	ATGGAGCTATTTAGAGGGGTG	436-459
NSorev	TTTGCAATCCAGACAGGTAAGC	2431-2410
NSifwd	ATCGGTTGTGTGAAAACAGAGTG	1097-1119
NSirev	TTTTCTGCTACATCATTAAATGG	1533-1510
VP2 PCR		
VP2ofwd	TGACTTCACTTAATTCTGCAGAAAG 3126-3149	
VP2orev	TGGGTGCACACGGCTTTTGG	4783-4764
VP2ifwd	CTAGAATATCCTTACGCCCTGG	4095-4116
VP2irev	GTGGCTGATGCATAACCCCATC	4481-4461

Table 2 The prevalence of parvovirus B19 component gene in skin tissues of normal subjects and patients with systemic sclerosis

Subjects	Total number	VP1	NS1	VP2
Normal controls	97	51(52.6%)#	43(44.3%)	
	51(52.6%)			
Systemic sclerosis	48	36(75%)*	31(64.6%)*	31(64.6%)
Total	145	87(60.0%)	74(51.0%)	82(56.6%)

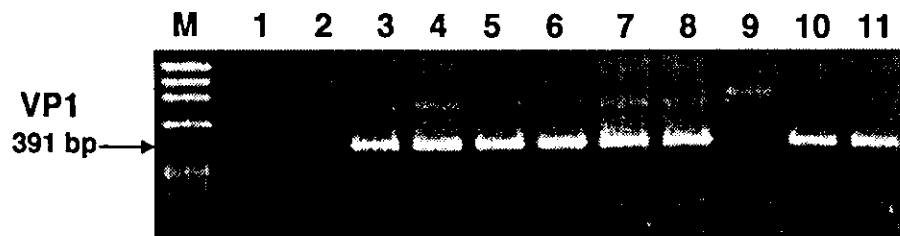
#: The numbers in the parentheses show occurrence rates, *: P<0.05 vs. normal controls, ***: P<0.01 vs. normal controls (chi-square analysis).

Table 3 The prevalence of parvovirus B19 component gene in VP1 positive subjects of normal subjects and patients with systemic sclerosis

Subjects	Total number	NS1	VP2
Normal controls 51(100%)		51	43(84.3%)#
Systemic sclerosis	36	31(86.1%)	31(86.1%)*
Total	87	74(85.1%)	82(94.3%)

#: The numbers in the parentheses show occurrence rates, ***: P<0.01 vs. normal controls (chi-square analysis).

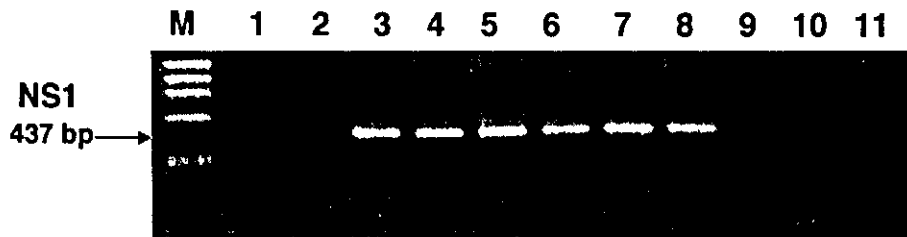
Figure 1. The result of polymerase chain reaction for the detection of VP1 component of human parvovirus B19 DNA in skin tissues



M: molecular weight marker, lane 1-6: normal controls, lane 7-11: patients with systemic sclerosis, positive peaks (391bp) for VP1 component of human parvovirus B19 DNA's were detected in lane 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 and 11.

Figure 1 The result of polymerase chain reaction for the detection of VP1 component of human parvovirus B19 DNA in skin tissues. M: molecular weight marker, lane 1-6: normal controls, lane 7-11: patients with systemic sclerosis, positive peaks (391bp) for VP1 component of human parvovirus B19 DNA's were detected in lane 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 and 11.

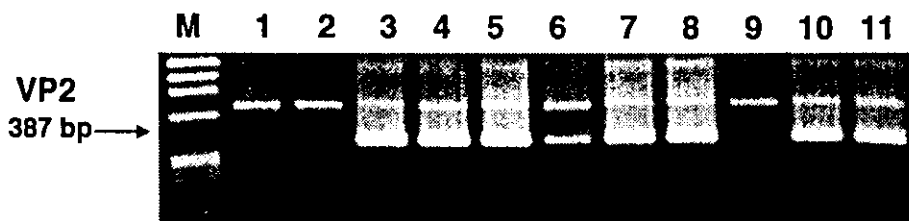
Figure 2. The result of polymerase chain reaction for the detection of NS1 component of human parvovirus B19 DNA in skin tissues



M: molecular weight marker, lane 1-6: normal controls, lane 7-11: patients with systemic sclerosis, positive peaks (437bp) for NS1 component of human parvovirus B19 DNA's were detected in lane 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 11.

Figure 2 The result of polymerase chain reaction for the detection of NS1 component of human parvovirus B19 DNA in skin tissues. All the 11 samples are the same as those in figure 1. M: molecular weight marker, lane 1-6: normal controls, lane 7-11: patients with systemic sclerosis, positive peaks (437bp) for VP1 component of human parvovirus B19 DNA's were detected in lane 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 11.

Figure 3. The result of polymerase chain reaction for the detection of VP1 component of human parvovirus B19 DNA in skin tissues



M: molecular weight marker, lane 1-6: normal controls, lane 7-11: patients with systemic sclerosis, positive peaks (387bp) for VP2 component of human parvovirus B19 DNA's were detected in lane 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 and 11.

Figure 3 The result of polymerase chain reaction for the detection of VP2 component of human parvovirus B19 DNA in skin tissues. All the 11 samples are the same as those in figure 1. M: molecular weight marker, lane 1-6: normal controls, lane 7-11: patients with systemic sclerosis, positive peaks (387bp) for VP2 component of human parvovirus B19 DNA's were detected in lane 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 and 11.

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

TGF- β シグナルの抑制型 Smad による調節機構

分担研究者 宮園 浩平 東京大学大学院医学系研究科分子病理学教授
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教授

研究要旨

TGF- β (transforming growth factor- β) は組織の線維化を促進する因子であることから強皮症の病因との関わりが注目されている。TGF- β の細胞内シグナルは Smad ファミリーのタンパク質によって伝達されるが、抑制型 Smad である Smad7 は TGF- β シグナルを抑制することからその作用の詳細な研究が重要である。我々は HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼである Smurf1 が抑制型 Smad と結合し TGF- β レセプターを分解することによって、Smad7 による TGF- β シグナルの抑制作用を増強することを明らかにして来た。今回、我々は HECT 型 E3 リガーゼ WWP1 と NEDD4-2 も Smurf1 と同様に Smad7 による TGF- β シグナルの抑制作用を増強することを明らかにした。一方、RING finger 型 E3 リガーゼである Arkadia は抑制型 Smad と結合してその分解を促進するが TGF- β レセプターの分解を促進せず、Smad7 による TGF- β シグナルの抑制作用を減弱させることを明らかにした。以上から、種々の E3 リガーゼの作用によって、TGF- β の強度が正と負に調節されていることが明らかとなった。

A. 研究目的

TGF- β は増殖抑制因子であると同時に、組織の線維化を促進する因子である。TGF- β は細胞内で Smad を介してシグナルを伝えるが、抑制型 Smad は TGF- β シグナルを負に調節するきわめて重要な因子で (1, 2)、強皮症との関連でも最近注目されている (3)。これまで我々は HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼである Smurf1 が抑制型 Smad と結合して、これを核内から細胞質へ移行させ、レセプターの分解を介して、TGF- β シグナルの抑制作用を増強することを明らかにして来た

(1)。本研究では Smad7 に結合し、その作用を調節する新たな HECT 型 E3 リガーゼ WWP1 と NEDD4-2、及び RING finger 型 E3 リガーゼ Arkadia の作用の研究を行った。

B. 研究方法

1) WWP1、NEDD4-2、Arkadia 遺伝子にさまざまな変異を導入し、哺乳類細胞にこれらの遺伝子を導入し、そのシグナル伝達能を調べた。また small interfering RNA (siRNA) を作成して細胞内でのこれらの遺伝子の発現をノックダウンして、その作用を検討した。

2) Smad の転写活性は p3TP-Lux などの特異的リポーター遺伝子を用いて行った。Smad の細胞内局在は共焦点顕微鏡を用いて行った。

3) タンパク質同士の結合は目的の遺伝子を COS 細胞などに導入し、免疫沈降したタンパク質に結合してきたタンパク質をイムノブロットングで確認した。タンパク質のユビキチン化は HA-tag のついたユビキチン遺伝子を導入し、目的タンパク質の SDS-PAGE でのスメアー形成の有無で確認した。タンパク質の安定性・分解は ^{35}S でラベルしたタンパク質をパルスチェイス解析で検討した。

4) HECT 型 E3 リガーゼの発現は種々の正常組織や癌細胞から得た mRNA を用いてリアルタイム PCR で確認した。

本研究で用いた細胞は市販のもののみを用い、患者由来のサンプルは用いていない。本研究では動物実験は行っていない。

C. 研究結果

1) HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ WWP1 および NEDD4-2 の作用

TGF- β シグナルを制御する因子を探索し、新規 Smad7 結合蛋白質として HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ WWP1 と NEDD4-2 を同定した。WWP1 と NEDD4-2 はともに、Smurf1 や Smurf2 と構造が類似していた。そこで WWP1 と NEDD4-2 が TGF- β や BMP シグナルに与える影響を調べたところ、ともに濃度依存的に TGF- β や BMP のシグナルを抑制したが、その作用は Smurf1 よりやや弱い傾向が見られた。一方、類似した因子である NEDD4 は TGF- β や BMP シグナルに影響を

与えなかった。また WWP1 と NEDD4-2 は Smurf1/2 同様に、核内の Smad7 と結合しそれを核外へ移行させ、膜表面の TGF- β レセプターへとリクルートし、レセプターの分解を促進することが明らかとなった。さらに、NEDD4-2 は Smurf2 と同様に Smad2 に結合し、その分解を促進したが WWP1 は Smad2 の分解には影響を与えなかった。また、Smurf2 と異なり、WWP1 と NEDD4-2 は SnoN の分解には関与しなかった。以上の結果から NEDD4-2 は Smurf1/2 と類似するが異なる機序を持つ新たな TGF- β のシグナル調節因子であることが分かった。これらのユビキチンリガーゼの発現を種々の組織で検討したところ、それぞれの発現パターンが異なっていることが確認された。

2) Arkadia の TGF- β シグナル増強作用

我々はマウスの発生において TGF- β スーパーファミリーのひとつである Nodal の作用を増強する核蛋白質として報告された Arkadia について、その作用の分子機構を解析した。Arkadia mRNA は発生初期のみでなくヒトの種々の正常組織や細胞株に広くその発現を認めた。Arkadia の作用はその C 端の RING ドメイン依存的に、TGF- β および BMP による転写活性を増強した。Arkadia は Smad ファミリーのうち抑制型 Smad である Smad6 や Smad7 と結合し、そのユビキチン化と分解を促進することが確認された。しかし Smurf1 と異なり、Arkadia は I 型 TGF- β レセプターのユビキチン化・分解を促進しなかった。内因性 Arkadia の発現を siRNA で抑制す