

図1. 骨髓浮腫と各項目との相関

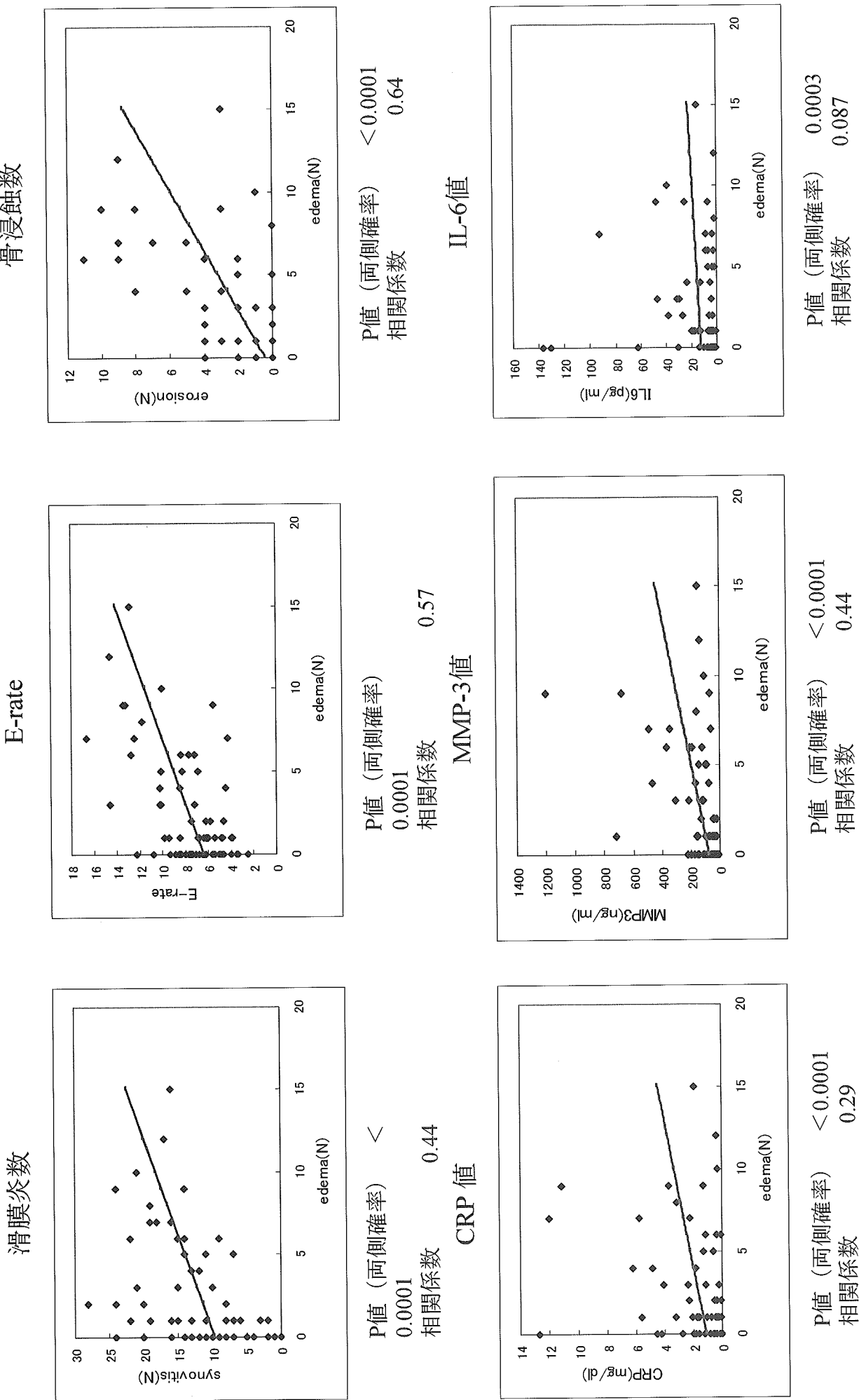


表4. HLA-DRB1*0405 alleleと骨髄浮腫との相関

項目	HLA-DRB1*0405陽性 (n=36)	HLA-DRB1*0405陰性 (n=44)	p value
CRP (mg/ml)	2.00 ± 2.84	1.30 ± 2.24	P = 0.13
MMP-3 (%)	47.2 %	43.2 %	P = 0.45
抗CCP抗体 (%)	72.2 %	63.6 %	P = 0.28
IgM-RF (%)	75.0 %	61.4 %	P = 0.15
滑膜炎数	12.9 ± 5.7	10.5 ± 6.8	P = 0.09
30関節の平均E-rate	7.73 ± 3.23	7.43 ± 2.69	P = 0.91
骨髄浮腫 (%) (個数)	72.2 % 3.17 ± 3.75	43.2 % 1.52 ± 2.66	<u>P = 0.008**</u> <u>P = 0.008*</u>
骨浸蝕 (%) (個数)	47.2 % 2.25 ± 3.04	43.2 % 1.23 ± 2.50	P = 0.45 P = 0.23

表5. HLA-DRB1*0405 alleleと抗CCP抗体の組み合わせによる早期RAの層別化

項目	HLA-DRB1*0405+ 抗CCP抗体+ (n=26)	HLA-DRB1*0405+ 抗CCP抗体- (n=10)	HLA-DRB1*0405- 抗CCP抗体+ (n=28)	HLA-DRB1*0405- 抗CCP抗体- (n=16)	p value
CRP (mg/ml)	1.86 ± 2.46	2.37 ± 3.79	0.86 ± 1.42	2.07 ± 3.14	P = 0.90
MMP-3 (%)	53.9 %	30.0 %	46.4 %	43.8 %	P = 0.38
滑膜炎数	13.0 ± 5.9	12.7 ± 5.6	11.4 ± 6.8	8.9 ± 6.6	P = 0.06
30関節の平均E-rate	7.93 ± 3.03	7.21 ± 3.82	7.40 ± 2.95	7.46 ± 2.26	P = 0.76
骨髓浮腫 (%) (個数)	76.9 % 3.69 ± 3.98	60.0 % 1.80 ± 2.78	53.6 % 2.00 ± 2.91	25.0 % 0.69 ± 1.99	P = 0.0013** P = 0.0007*
骨浸蝕 (%) (個数)	50.0 % 2.38 ± 3.21	40.0 % 1.90 ± 2.64	42.9 % 1.61 ± 3.03	43.8 % 0.56 ± 0.73	P = 0.47 P = 0.17

アミロイドーシス合併 RA 患者における HLA 遺伝子の解析に関する研究

分担研究者：右田清志
長崎医療センター・免疫研究部長

研究要旨

関節リウマチ (RA) の疾患感受性遺伝子のひとつである HLA-DRBI と二次性アミロイドーシスとの関連を検討する目的で、アミロイドーシス合併 RA 患者で、HLA-DRBI 遺伝子多型を検討した。アミロイドーシス合併 RA 患者 33 名と、アミロイドーシス非合併 RA 患者 91 名で、SAA1、及び HLA-DRBI 遺伝子の多型を調べた。SAA1.3 の保有率は、ア症合併例で 48.5%、ア症非合併例で 36.5%と、ア症合併 RA 患者で増加していた。shared epitope (SE) 陽性率は、ア症合併 RA 患者で 57.6%、ア症非合併 RA 症例で 44.5%と、ア症合併 RA 患者で増加していた。さらに DR4 の SE を 2 つ有する比率は、ア症合併 RA 患者で 36.4%、RA 患者で 9.9%と、ア症合併 RA 患者で有意に増加していた。HLA-DRBI 遺伝子は、RA の疾患感受性、RA の重症化のみならず、アミロイドーシス合併にも関連していることが示唆された。

A. 研究目的

RA に続発して起こる二次性アミロイドーシスは、多臓器障害をきたし、その予後を悪化させる。二次性アミロイドーシスに対する根本的治療はなく、その予防が肝要である。二次性アミロイドーシスの発症には、原因蛋白である AA 蛋白の前駆蛋白である血清アミロイド A 蛋白 (SAA) の上昇が必要条件であるが、本症は SAA 高値例の一部に発症することより、遺伝的要因の関与が考えられている。HLA 遺伝子は、RA の疾患感受性、あるいは重症化に関与している。特に RA の遺伝的要因としての HLA-DRBI 対立遺伝子の重要性が示唆されている。今回、我々は、二次性アミロイドーシス合併 RA 患者で、HLA-DRBI の遺伝子多型を検討した。

B. 研究方法

対象：IC の得られた ARA の診断基準を満たす RA 患者 124 名 (男:女比=23:101)。これら 124 名の RA 患者の中でアミロイドーシス合併 RA 患者 33 名 (男:女比=8:25) を認めた。

方法：SAA1 遺伝子多型は PCR-RFLP

法で行った。HLA-DRBI の遺伝子型の解析は、PCR-SSOP 法で行った。

C. 研究結果

アミロイドーシス合併 RA 患者(ア群) 33 名 (平均年齢 63.0±9.7 歳) アミロイドーシス非合併 RA 患者(RA 群) 91 名 (平均年齢 61.9±14.1 歳) で SAA1 遺伝子多型、HLA-DRBI 遺伝子多型を比較した。平均患病期間は、ア群で 14.0±11.1 年、RA 群で 14.1±10.2 年、RF の陽性率は、ア群で 90.3%、RA 群で 87.7%、検査時の CRP 値はア群 3.6±2.4mg/dl、RA 群で 2.0±1.9mg/dl と、これら臨床指標に、両群間の有意差は認めなかった。SAA1 遺伝子多型は、健常人 1.1(25.4%)、1.3(36.5%)、1.5(38.1%)、RA 群 1.1(35.2%)、1.3(32.4%)、1.5(32.4%)、ア群 1.1(27.3%)、1.3(48.5%)、1.5(24.2%)であった。アミロイドーシス患者で多いとされている 1.3 は今回の検討でもア群で多い傾向にあったが、有意差は認めなかった。しかし、1.3 アリルをホモに持つ症例は、RA 群 8.8%、ア群 24.2%とア群で多かった。shared epitope (SE)陽性者は、健常人で 26.2%、RA 群 44.5%、ア群 57.6%と増加

した。*0405 陽性者は、健常人 14.3%、RA 群 29.1%、ア群 42.4%と増加した。さらに、DR4 の SE を 2 つ有する比率は、RA 群で 9.9%、ア群で 36.4%とア群で有意に増加していた (表 1)。

D. 考察

RA の遺伝的要因としての DRBI 対立遺伝子の関与が明らかにされ、RA 感受性 DRBI 遺伝子 (shared epitope, SE) と RA への感受性あるいは重症化との関連が明らかにされている。今回、RA の最も重篤な関節外症状の一つである二次性アミロイドーシスと、HLA-DRBI 遺伝子との関連を検討した。その結果、アミロイドーシス合併症では、SE を二つ保有する頻度が、非合併例に比べ有意に高いことが判った。さらに、SE を保有しているアミロイドーシス合併 RA 症例は、全例*04 (*0401 *0404*0405 *0410) を有していた。DR4 とアミロイドーシスの合併との関連は、過去にも報告されており、今回 DR4 の SE とアミロイドーシスの関連が示唆された。アミロイドーシスの合併は、RA の慢性化、重症化に加え、遺伝的要因の関与が示唆されている。今回の検討結果では、SAA1 遺伝子多型の解析より、SAA1.3 の比率が、アミロイドーシス合併 RA 症例で高いことが、確認された。SAA1 遺伝子多型に加え、HLA-DRBI 遺伝子の解析はアミロイドーシス合併のリスクを考える上で有用と思われる。さらに、炎症が遷延化している RA 症例で、これらリスクファクターを有する症例においては、生物学的製剤を含めた積極的治療で、RA の緩解を目指し、アミロイドーシスの原因蛋白である SAA の産生を抑制し、アミロイドーシスを予防する必要性が示唆された。

E. 結論

HLA-DRBI 遺伝子の遺伝子多型が、RA 患者における、アミロイドーシス合併のリスクファクターの 1 つになってい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) Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. An active metabolite of leflunomide, A77 1726, inhibits the production of serum amyloid A protein in human hepatocytes. *Rheumatology* 44 (4):443-8, 2005.
- 2) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, Daikoku M, Yano K, Matsumoto T, Migita K, Yatsushashi H, Ito M, Masaki N, Adachi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Saoshiro T, Sodeyama T, Koga M, Shimoda S, Ishibashi H. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 42 (3):386-92, 2005.
- 3) Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, Yano K, Nagaoka S, Matsumoto T, Nakao K, Hamasaki K, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection--association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 42 (4):505-10, 2005.
- 4) Amenomori M, Migita K, Miyashita T, Yoshida S, Ito M, Eguchi K, Ezaki H. Cytomegalovirus-associated hemophagocytic syndrome in a patient with adult onset Still's disease. *Clin Exp Rheumatol* 23 (1):100-2, 2005.
- 5) Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A, Shimizu-Yoshida Y, Nakao R, Kusumoto K, Nagaoka S, Yano K, Abiru S, Ueki T, Matsumoto T, Daikoku M, Taniguchi K, Fujioka H, Migita K,

- Yatsushashi H, Nakashima M, Harada M, Ishibashi H. Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 85 (7):908-20, 2005.
- 6) Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Aoyagi T, Kawabe Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. FK506 suppresses the stimulation of matrix metalloproteinase 13 synthesis by interleukin-1beta in rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett* 98 (2):194-9, 2005.
- 7) Kogawa H, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Nakao M, Miyashita T, Kimura H, Ezaki H, Nakamura M, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Idiopathic portal hypertension associated with systemic sclerosis and Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 24 (5):544-7, 2005.
- 8) Migita K, Maeda Y, Abiru S, Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Peroxynitrite-mediated matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 579 (14):3119-25, 2005.
- 9) Migita K, Uono M, Kinoshita A, Osumi M, Ito M, Miyashita T, Hamada H, Ezaki H, Eguchi K, Mukobara S. Lupus erythematosus and sarcoidosis. *Clin Rheumatol* 24(3):312-3, 2005.
- 10) Wang AP, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H. Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 25 (1):85-91, 2005.
- 11) Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Kimura H, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Reduced blood BDCA-2+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 142 (1):84-91, 2005.
- 12) Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Mori T, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Immunosuppressant FK506 inhibits matrix metalloproteinase-9 induction in TNF-alpha-stimulated human hepatic stellate cells. *Life Sci* in press
- 13) Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T, Shimizu-Yoshida Y, Koyabu M, Matsuyama M, Mori T, Kamihira T, Daikoku M, Migita K, Yatsushashi H, Nozaki N, Shimoda S, Ishibashi H. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 26 (2):138-45, 2006.
- 14) Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, Matsumoto T, Takii Y, Kusumoto K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 26 (1):32-8, 2006.
- 15) Yamanaka F, Migita K, Ichinose K, Ohno N, Kimura H, Ishimaru H, Matsuoka Y, Eguchi K, Ezaki H. Catastrophic transverse myelitis in a patient with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 15:130-133, 2005.

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

[表 1]

**Frequency of shared epitope alleles among
RA patients with or without amyloidosis and health controls**

Genotype	Healthy controls n=63	RA n=91	RA+amyloidosis n=33	<i>p</i>	odds(95%CI)
2 SE alleles					
*04/*04	1(1.6)	9(9.9)	12(36.4)	0.01	4.0 (1.94~13.99)
*04/SE	1(1.6)	8(8.8)	1(3.0)	0.45	
SE/SE	1(1.6)	0(0)	0(0)		
1 SE alleles					
*04/ X	18(28.6)	36(39.6)	13(39.4)	0.99	
SE/ X	9(14.3)	10(11.0)	0(0)	0.12	

*04= DRB1 04 shared epitope (*0401 *0404 *0405 *0410)

SE= non-04 shared epitope (*0101 *1001 *1406)

X= non-SE allele

All odds ratio (OR), 95% confidence interval (95%CI) and *p* values were calculated by RA group and RA plus amyloidosis group.

関節リウマチの発症・臨床経過関連遺伝子多型に関する研究

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

新規の候補遺伝子として、*KIR*, *SH2D1A(SAP)*, *TNFSF12(TWEAK)*の多型解析と関連研究を施行したが、関節リウマチ(RA)発症との関連は検出されなかった。一方、これまでに検討した候補遺伝子とRAの臨床経過との関連を検討したところ、*HLA-DRB1 shared epitope*, *FCGR3A*, *LILRA2*とSteinbrocker病期分類、*LILRB4*と手術回数との有意な関連あるいは関連の傾向が検出され、これらが臨床経過予測因子として有用である可能性が示唆された。今後、これらの遺伝子と臨床経過との関連を前向き研究によって検討するとともに、関節破壊との関連の機序を検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

われわれは、免疫系制御上重要な役割を果たす遺伝子群を候補遺伝子と考え、多型解析とリウマチ性疾患との関連研究を進めてきた。本年度は、以下の点について検討した。

1) Leukocyte receptor complex は、ヒト染色体 19q13.4 に位置し、killer cell immunoglobulin - like receptor (*KIR*)、leukocyte immunoglobulin-like receptor (*LILR*, *ILT*, *LIR*)遺伝子ファミリーを含む遺伝子群である。*KIR*はNK細胞やT細胞、*LILR*は血球系細胞に広汎に発現し、活性化型、抑制型、分泌型受容体をコードし、免疫制御上重要な役割を果たすと同時に、塩基配列レベルのみならず、遺伝子座の有無(copy number polymorphism)をも含めた顕著な多型が存在し、免疫応答の個体差を規定する一つの因子として注目される。われわれはこれまでに、抑制型受容体である*LILRB1(ILT2, LIR1)*多型と関節リウマチ(RA)との関連を報告し(Kuroki et al., 2005)、*LILRB4*とRA、*LILRA2*とSLEとの関連も検出した。本年度は、*KIR*遺伝子群とRAとの関連を解析した。

2) 新規の候補遺伝子として、X連鎖リンパ増殖症候群の責任遺伝子である*SH2D1A(SAP)*、炎症性サイトカインや血

管新生を誘導する*TNFSF12 (TWEAK)*について多型解析と関連研究を施行した。3) これまでにリウマチ性疾患との関連が検出された9遺伝子および*HLA-DR*につき、臨床経過との関連を検討した。

B. 研究方法

*KIR*遺伝子群のlocus typingにより、各遺伝子座の有無とRAとの関連を検討した。また、*KIR3DL1*につき、塩基配列レベルの多型を検討するallele typingを行い、関連を検討した。*SH2D1A*, *TWEAK*については、多型スクリーニングを行い、患者対照関連研究を施行した。また、過去にRAやSLEとの関連が検出された*LILRB1*, *LILRB4*, *LILRA2*, *FCGR2B*, *FCGR3A*, *TNFRSF1B(TNFR2)*, *CD72*, *TNFSF13B (BLyS)*、*CTLA4*多型について、X線病期分類や手術回数との関連を後向き研究により検討した。

(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) 新規の疾患感受性遺伝子の探索

KIR, SH2D1A(SAP), TNFSF12 (TWEAK) 多型と RA との関連は検出されなかった。

2) 臨床経過との関連

HLA-DRB1 shared epitope を 2 つ持つ群が、Steinbrocker Stage I-III と比較して Stage IV において有意に増加($P=0.009$)し、shared epitope を持たない群が、stage III-IV において stage I-II と比較して有意に減少していた($P=0.045$) (表 1)。

HLA 以外の遺伝子では、RA 群を複数回手術を受けた群とそれ以外の群に分けたとき、以前 RA 発症との関連が見出された *LILRB4* -965G アリルが、複数回手術群において増加していた(trend test $P=0.027$) (表 2)。G アリル陽性者では、形質細胞様樹状細胞における *LILRB4* 発現強度の減少が観察された。

さらに、Stage III-IV において、Stage I-II と比較して、*FCGR3A*-176V/V 遺伝子型が有意に減少し($P=0.019$)、*LILRA2* c.1256-1 G>A に増加傾向が観察された($P=0.055$) (表 3)。

D. 考察

本研究では、過去の報告同様、HLA -DRB1 shared epitope と関節破壊の重症度との関連が確認された。

LILR 遺伝子群は、免疫系細胞の活性化制御のみならず、破骨細胞において機能する可能性も示唆されている。RA との関連が検出された *LILRB4* 多型が、複数回の手術を受けた群においてさらに強い関連を示したことは、この遺伝子が、発症のみならず骨破壊とも関連する可能性を示唆する。

FCGR3A は、たびたび RA との関連が示唆されてきた遺伝子であるが、今回の成果から、関節破壊との関連の可能性が示された。

今回関連あるいはその傾向が検出された遺伝子は、臨床経過予測因子となる可能性が示唆され、今後、前向き研究による検討とともに、関連の分子機構を検討することが必要と考えられる。

E. 結論

免疫グロブリン様受容体遺伝子群が RA の発症や骨破壊に寄与する可能性が示唆された。

(共同研究者：黒木喜美子 (九大)、京極千恵子 (ミネソタ大)、宮下リサ、川崎綾、人見祐基、豆ヶ野剛一、徳永勝士 (東大人類遺伝)、渋谷司(MIT)、松下正毅 (湧永製薬)、松多邦雄 (松多内科医院))

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) Kuroki K, Tsuchiya N, Shiroishi M, Rasubala L, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kusaoi M, Murakami Y, Takiguchi M, Juji T, Hashimoto H, Kohda D, Maenaka K, Tokunaga K: Extensive polymorphisms of *LILRB1* (*ILT2*, *LIR1*) and their association with HLA-DRB1 shared epitope negative rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 14: 2469-2480, 2005.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 土屋尚之：RA関連遺伝子解析の最近のトピックス。Medical Practice 22: 445-447, 2005.
- 5) 土屋尚之：自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子-最近の話題-。最新医学 60 (6月増刊号) :1357-1355, 2005.
- 6) 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。pp7-10, 2005.
- 7) 土屋尚之：TOPICS: TNF阻害薬抵抗性の関節リウマチに対する abatacept (CTLA4-Ig) の有効性。内科 (印刷中)。

2. 学会発表

- 1) 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。
 - 2) Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Kusaoi M, Hashimoto H, Tokunaga K: Studies on the role of APRIL (TNFSF13) and TWEAK (TNFSF12) polymorphisms for SLE. *Modern Rheumatol* 15(Suppl): S217, 2005.
 - 3) Mamegano K, Tsuchiya N, Kusaoi M, Fukazawa T, Hashimoto H, Matsuta K, Tokunaga K: Association of *LILRA2* (*ILT1*, *LIR7*) polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Modern Rheumatol* 15(Suppl): S217, 2005.
 - 4) Kuroki K, Shiroishi M, Rasubala L, Tsuchiya N, Kohda D, Tokunaga K, Maenaka K: Structural and expression analyses on *LILRB1* haplotypes associated with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatol* 15(Suppl): S246, 2005.
 - 5) 豆ヶ野剛一、土屋尚之、草生真規雄、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、徳永勝士：LILRA2 (ILT1, LIR7) 遺伝子多型と全身性エリテマトーデスとの関連。日本人類遺伝学会第50回大会抄録集 p149. 2005年9月19日～22日、倉敷。
 - 6) 土屋尚之：ヒトリウマチ性疾患の遺伝子解析による病態関連分子の検出(シンポジウム)。日本臨床免疫学会会誌 28:216, 2005. 第33回日本臨床免疫学会、2005年10月28日～29日、京都。
 - 7) Kuroki K, Tsuchiya N, Shiroishi M, Rasubala L, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kusaoi M, Murakami Y, Takiguchi M, Juji T, Hashimoto H, Kohda D, Maenaka K, Tokunaga K. Extensive polymorphisms of *LILRB1* (*ILT2*, *LIR1*) and their association with HLA-DRB1 shared epitope negative rheumatoid arthritis. NK Hawaii. 9th Meeting of the Society for Natural Immunity, November 2005, Hawaii.
 - 8) Kawasaki A, Furukawa H, Tsuchiya N, Kusaoi M, Fukazawa T, Matsuta K, Ono M, Hashimoto H, Tokunaga K: Association of human SH2D1A (SLAM-associated Protein) polymorphism with early-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52(suppl):S240, 2005.
 - 9) Furuya T, Ichikawa N, Hakoda M, Higami K, Nanke Y, Matsuda Y, Yago T, Kobashigawa T, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani N, Kotake S: Associations of HLA-DRB1 genotypes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides with disease severity of early rheumatoid arthritis in Japanese patients. *Arthritis Rheum* 52 (suppl): S151, 2005.
 - 10) Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K: Association of genetic interaction between killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) and HLA-B genes with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 52(suppl):S649, 2005.
 - 11) Kawasaki A, Furukawa H, Tsuchiya N, Kusaoi M, Fukazawa T, Matsuta K, Ono M, Hashimoto H, Tokunaga K. Association of human SH2D1A (SLAM-associated protein) polymorphism with early-onset systemic lupus erythematosus. 日本免疫学会総会・学術集会記録 35:198, 2005.
- 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

表 1 *HLA-DRB1* shared epitope の数と Steinbrocker の病期分類

<i>HLA-DRB1</i> shared epitope	Stage IV	Stage III	Stage II	Stage I	健常対照群
2	43 (20.1)*	11 (11.2)	9 (13.4)	3 (6.7)	13 (4.9)
1	106 (49.5)	59 (60.2)	31 (46.3)	24 (53.3)	92 (34.7)
0	65 (30.4)#	28 (28.6)#	27 (40.3)	18 (40.0)	150 (56.6)

* Shared epitope を 2 つ持つ群 : Stage IV vs Stage I-III $P=0.009$

Shared epitope を持たない群 : Stage III-IV vs Stage I-II $P=0.045$

表 2 *LILRB4* -965 遺伝子型と手術回数

<i>LILRB4</i>	RA (手術 2 回以上)	RA (手術 1 回以下)	健常対照群
A/A	7 (30.4)	66 (49.3)	209 (53.5)
A/G	10 (43.5)	54 (40.3)	143 (36.6)
G/G	6 (26.1)	14 (10.4)	39 (10.0)

2 回以上の関節手術を受けた群と手術 1 回以下の群の比較により、 $P_{trend}=0.027$

表 3 *FCGR3A* 多型と Steinbrocker 病期分類

<i>FCGR3A</i>	Steinbrocker III-IV	Steinbrocker I-II	健常対照群
F/F+F/V	176 (95.1)	51 (85.0)	277 (91.4)
V/V	9 (4.9)	9 (15.0)	26 (8.6)

Stage I-II と III-IV の比較により、 $P=0.019$

表 4 *LILRA2* 多型と Steinbrocker 病期分類

<i>LILRA2</i>	Steinbrocker III-IV	Steinbrocker I-II	健常対照群
G/G	81 (54.0)	28 (48.3)	153 (53.7)
G/A	51 (34.0)	28 (48.3)	112 (39.7)
A/A	18 (12.0)	2 (3.4)	20 (7.0)

Stage I-II と III-IV の比較により、 $P=0.055$

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膠原病学講座 教授

研究要旨

RA の疾患遺伝子のうち、第一染色体上の *DR3* (death receptor 3) 遺伝子変異、g.1667A>G; Asp159Gly; g.2369_2382delT14; g.2443C>T; g.2590A>T; g.2738A>G は、日本 2、韓国 1、合計 3 つの独立した遺伝疫学調査において、健常者 1,271 例中 4 例 (0.31%)、RA 2,480 例中 79 例 (3.19%) に見出され、 $p=0.00000000012$ 、オッズ比 10.42 であった。変異の結果、デスドメインを欠いた truncated *DR3* が生成し、これが正常型 *DR3* 分子と細胞表面でヘテロ 3 量体を形成してアポトーシスが阻害され、また実際、ヒト変異 *DR3* 保有例における疫学調査及び変異 *DR3* トランスジェニックマウスによる実験的研究のいずれにおいても関節炎が有意に促進された。

変異型 *DR3* 生成の理由として、*DR3* 遺伝子イントロン 5 上の仮想エクソンに本来結合するべきスプライシングサイレンサーが結合サイト g.2590A>T 変異のため結合出来なくなり、truncated *DR3* 分子が生成することが見出された。また *DR3* 遺伝子には遺伝子重複があり、プロモーターが RA の関節滑膜で高度メチル化されている等、RA の疾患遺伝子が遺伝子重複及び中立突然変異の集積という進化の一過程に生じた現象である可能性が指摘され、さらに *DR3* 変異の末梢血における Fas との分布の異動などから、病因上 *DR3* 変異の重要性が指摘された。

第 8 染色体上の疾患遺伝子 *ANG-1* (Angiopoietin 1) は、269Gly を伴う 3 塩基 GGT 挿入変異体で、変異は血管新生を促進し、滑膜増殖と関節破壊を促進する一方、膠原病性肺高血圧症の原因遺伝子である可能性が示唆された。

X 染色体上の疾患遺伝子は、*Dbl* 遺伝子 3' 端近くの 223bp、第 23, 24 エクソン、のスキッピング変異で、変異が PH (prextrin homology) ドメインの末尾にあることから、*Dbl* 支配下の低分子量 G 蛋白 *cdc42* に対する GEF 機能および好中球 NADPH オキシダーゼ産生が低下していた。また、変異型保有例及び実験的変異導入細胞の好中球と滑膜細胞でアクチン重合が阻害されていた。さらに変異型 *Dbl* の直接の影響下にある *cdc42* の直接のエフェクター分子の同定、*Dbl* のマウスホモログ *Mcf-2* をクローニングしノックアウトマウスを作成している。

A. 研究目的

私達は多因子遺伝が関わる難治性疾患の研究を行なう中で、疾患多発家系のマイクロサテライトマーカー解析を用いて、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同定した。

最近疾患遺伝子発見の報告は多くみられるが、この中で実際の疾患遺伝子として確定しているものは必ずしも多くない現状である。このことは、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、疾患遺伝子が遺伝子転写及び蛋白の機能の変異

を示し病変を引き起こすとする証明が必ずしも容易でないことが原因であること考えられる。

こうした現状に鑑みて、私達は以下の方針のもとに遺伝学研究を含む膠原病解明のための研究を進めてきた。

- 1) 見出した3疾患遺伝子のそれぞれについてその生理的および病態における作用機序を明らかにし、病態の治療的制御の方策を探せる方向の研究を進める。
- 2) 膠原病発症のホストにおける病因には共通した面が少なくないとの想定の下に、RAで見出された疾患遺伝子が膠原病の種々の病態にどう寄与するかを広く内科疾患の視点から究明する。
- 3) 疾患遺伝子とは別にRAなどの病態の主軸をなす病変に着目し、病変の機軸を握る分子の制御をもって疾患の治療を計る。
- 4) 膠原病の病態の種々の側面を解明し患者のADLの改善につなげる努力をする。

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)

研究はすべて本学倫理委員会の承認の下に行われた。

C. 研究結果

ゲノムワイドの家系解析の結果見出されたRAの疾患遺伝子のうち、第一染色体に見出されたDR3 (death receptor 3) 遺伝子変異 g.1667A>G; Asp159Gly; g.2369_2382delT14; g.2443C>T; g.2590A>T; g.2738A>Gを見出した。この変異が、遺伝疫学的に人類集団の中でRAに集積して存在していることを日本

2、韓国1、合計3つの独立した遺伝疫学調査により示した(*Arthritis Rheum* 52 (9 Suppl): S421,2005)。すなわち、合計するとDR3遺伝子変異の頻度(Mt/+)は、健常者1,271例中4例(0.31%)、RA 2,480例中79例(3.19%)に見出され、 $p=0.00000000012$ 、オッズ比10.42を示し、DR3遺伝子変異が高い寄与度で疾患の発症に寄与することが明確に示された。この知見は、これまで遺伝学理論によれば疾患全体の基盤をなす疾患遺伝子は低頻度で見出されるが高いオッズ比をもつとの指摘に合致する所見であり、これを踏まえて現在、他の膠原病ないし膠原病病態におけるDR3遺伝子変異の寄与についても研究を進めている。

見出された DR3 遺伝子上の5つの変異 g.1667A>G; Asp159Gly; g.2369_2382delT14; g.2443C>T; g.2590A>T; g.2738A>G の結果、DR3 遺伝子の後半部分すなわちデストドメインを含む領域を含まない *truncated molecule* が生成し、これが正常型 DR3 分子と細胞表面でヘテロ3量体を形成するため、DR3 を介する正常のアポトーシスシグナルが伝達されず、従って DR3 変異を有する個体のリンパ球等はアポトーシス不全に陥ることを示した。それではどのようにして *truncated molecule* が生成するかの分子機構を調べる中で、私達は DR3 遺伝子イントロン5上の仮想エキソンに本来結合するベキスプライシングサイレンサーが結合サイト g.2590A>T 変異のため結合出来なくなり (*Arthritis Rheum* 50(Suppl9):S351,2004)、デストドメインを欠く変異 DR3 分子が生成することを見出した。現在このスプライシングサイレンサーの単離同定を進めているが、この遺伝子転写ポイントでの分子拮抗阻害薬が RA など膠原病の治療薬としての標的になると考えている。

見出された変異型 DR3 がどのようにして関節炎を惹起するかの分子機構を調べる目的で、私達はヒト変異 DR3 分子をマウスに発現させたトランスジェニックマウス TG を作成し(*Arthritis Rheum*

52 (9 Suppl): S156, 2005)これにII型コラーゲン関節炎を誘導したところ、関節炎の程度でなく関節炎が有意に早期に発症することを見出した。変異型TGは一方でNFκBを活性化して細胞増殖を促進し、他方で同時にアポトーシスを抑制して、両者の作用によって過剰増殖方向に向かわせる疾患遺伝子であると考えられた。この中で、発症は早めさせるという実験結果は特に重要で、このことからDR3遺伝子が発症に関わる疾患遺伝子であると判断された。これに関しては、本遺伝子の遺伝子診断がRA発症への予防の視点から意義があると考えられた。

次いで、治療的是正に視点から、DR3遺伝子変異の結果アポトーシスが抑制されてT細胞と滑膜細胞の過剰増殖を来して関節炎が悪化する結果を踏まえると、治療としてはこの弱いDR3受容体シグナルを増強してやれば病態が改善できるはずであり、実際DR3の生理的リガンドTL1Aを投与して減弱したDR3からのシグナルを増強することにより実際実験関節炎の抑制を試みたところよく奏功した(*Arthritis Rheum* 50:S354,2004; *Arthritis Rheum* 50:S569,2004)。

さらにDR3遺伝子には遺伝子重複が存在し(Osawa K et al. *Gene Immunity* 5:439-43, 2004)、さらに遺伝子プロモーター領域がRA疾患特異的に関節滑膜において高度メチル化されていた(Takami N et al. *Arthritis Rheum*, 文献リスト)。重複遺伝子は元のDR3遺伝子から200kbセントロメア側に位置し、ほぼ同一長(数箇所塩基置換がある)を有していることを、FISH・fiber FISH法、BAC, PACクロームのシーケンシング繋ぎ合わせ法、及びRA特有のSNPを指標にした変異型・正常型遺伝子のPCR増幅効率の比較法に3つから証明したのであるが、この結果は、遺伝学的には、進化の前提が遺伝子重複gene duplicationにあり重複遺伝子上に中立突然変異が集積しこれにより遺伝子が進化するとする大野乾、木村資生(文化勲章受賞)の進化学説に合致している。すなわち、重複したDR3遺伝

子の片方に中立突然変異が入るという200万年を経て重複遺伝子が淘汰されるその過程をみているのが現段階でのRAの疾患遺伝子の姿であると考えられる。他方、医学的にみると、遺伝子が重複していてもメチル化されている知見は、DR3遺伝子シグナルがRAにおいてとくに伝達され難くなっていることを示し、この知見もやはりRAでアポトーシスシグナルが阻害されていることを支持している。

ヒト末梢血リンパ球におけるデスレセプターであるDR3とFasの分布を比較すると、両者は大きく異なり、DR3遺伝子はナイーブT細胞の大部分をしめ、エフェクターおよびメモリーT細胞においては両者のいずれかが発現していた。この知見はリンパ球の生育と外部刺激に対する応答においてDR3とFasが大きくことなり、DR3遺伝子は単にRAの疾患遺伝子であるに止まらずヒトの免疫応答においてより重要な役割をなしている可能性が指摘され、事実患者群においてこのデス受容体分布に大きなポピュレーションの偏りが見出されている。

RAの疾患遺伝子として私達が見出した第8染色体上の疾患遺伝子ANG-1(Angiopoietin 1)は、269Glyを伴う3塩基GGT挿入変異体で、挿入変異型をmt、非挿入変異型を+と表示した場合、Gly+/+, Gly mt/+, Gly mt/mtの頻度は健常者で11.9%, 78%, 10.1%、RAで46.2%, 23%, 30.8%と両者間に有意差があった。また、挿入型遺伝子変異は血管新生を促進し、ヒト関節滑膜には実際Ang-1のリガンドであるTie-2からのシグナルが、PI3Kinase (PDK/Akt)経路とMAPkinase (MEK/ERK)経路の両経路をそれぞれ独立に活性化させ、NFκBを活性化すると同時にAktからCaspaseへの抑制系を介してアポトーシスを抑制することを見出した(Sakai C et al. *Arthritis Rheum* 50(Suppl9):S655,2004)ことから、ANG-1遺伝子の変異によって滑膜増殖と滑膜による関節破壊を促進する方向に作用することが示された。

これに関連して広く膠原病をみると、この3塩基挿入変異はMCTD/SScに多く集積しており、中でも肺高血圧症と有意に関連があることが見出された(*Arthritis Rheum* 52 (9 Suppl): S283, 2005)。この疫学的関連性はRAより数桁高いもので、私達はANG-1遺伝子が血管申請に関連して膠原病性肺高血圧症の疾患遺伝子である可能性を強く考えている。

私達の研究室では、疾患遺伝子ANG-1とは別に分子シャペロンであるHsp90がRAの滑膜増殖と関節破壊に重要であることを示している(Hashiramoto A et al. *Arthritis Rheum* 50:S567,2004)が、他の報告を総合してみると、最近はこのHsp90とAng1シグナルが共同してRAの病態を悪化させる可能性が見出されている。私達がHsp90に着目したのは、後述するようにRAの関節炎で主要な役割を演じている*c-fos*プロトオンコジーンがG1早期に直接Wee1 kinase 遺伝子転写をスイッチオンして(EMBO J 20:4618-27,2001)、c-Fosに連動したWee1の持続発現が、一方で細胞を過剰増殖させると同時に他方で細胞分裂(MPF; mitosis promoting factor)を抑制して、いわば腫瘍様の強い滑膜増殖を惹起すること(*Oncogene* 22:6839-44,2003)から、Wee1のクリアントをTwo hybrid法で調べた結果Hsp90が見出されたことに因っている。

私達が見出したX染色体上の疾患遺伝子は、Dbl遺伝子3'端近くの223bp(第23, 24エキソン)のエキソンスキッピング変異で、変異部位がPH (prextrin homology)ドメインの末尾に存在することから、Dbl分子のGEF機能への影響が示唆され後述の通りの異常が見出されている。この変異を来すDNA上の変異は、とくにRAの多発家系に非常に有意に多く集積しており、散発例においても有意差が少ないもののRAにおいて増加して見出されている。分子動態の解析の結果、この変異はDbl支配下の低分子量G蛋白cdc42に対するGEF機能を低下させた(Komai K et al. *BBRC* 299:455,2002)。また、cdc42及びRac1が関わる好中球の

NADPH オキシダーゼ産生が明らかに低下していたが、白血球の遊走反応には差が見出されなかった。このことは、Dblの異常が後述の通り確かにアクチンにも作用するが、アクチンそのものよりも細胞膜のラフリングに関与するからであると私達は考えている。アクチンへの影響についてみると、変異型保有の臨床例及び変異遺伝子導入例の好中球と滑膜細胞ではアクチン重合が阻害されていた。さらに、私達は変異型Dblの直接の影響下にあるcdc42の直接のエフェクター分子として、新たにWASPを含む2つの新規の蛋白を見出した(Komai K et al. *Arthritis Rheum* 50(Suppl9):S152, 2004; *Arthritis Rheum* 52 (9 Suppl): S576, 2005)。現在私達は、DblのマウスホモログMcf-2をクローニングしMcf-2とDblの構造的類似性を確認した(Komai K et al. *BBRC* 309:906, 2003)、これを踏まえて現在分子のノックアウトマウスを作成している。

私達は上述の遺伝解析とは別に、RAの関節炎において主役を演じるキイ分子を追求する中で、*c-fos*遺伝子の過剰発現が、DNAに結合するAP-1サイトに作用して(1)TNF α 等の炎症性サイトカイン及び(2)関節破壊に必須のコラゲナーゼ(現在MMPと略称される)を増加させて、関節破壊進展の主軸をなすことを見出した(関連業績省略; 下記のKawasaki, 2001参照)。*c-fos*遺伝子過剰発現はさらに、Wee1 kinaseの転写を直接促進して細胞分裂を制御するMFP (mitosis promoting factor)活性を抑制し、強い増殖(c-fos亢進による)の反面細胞分裂しない(Wee1亢進による)いわばRAの病態を特徴付ける「腫瘍様の滑膜増殖」を誘導した(Kawasaki H et al. *EMBO J* 20:4618-27,2001; *Oncogene* 22:6839-44,2003)。このように、*c-fos*遺伝子の過剰によって病態のほぼ全てが説明できることから、私達は、平成13年から科学技術振興機構の助成(20億円)を受けてCADD (computer-assisted drug design)による医薬分子設計の最初

の試みとして、AP-1 サイトへの c-Fos の結合を競合的に阻害する薬剤を c-Fos の溶液中の 3 次元構造を分子シミュレーションで算出し立体構造を鍵穴として、鍵（薬物分子）をコンピュータ上で論理的に設計した(J Med Chem 47:4239-46, 2004; J Med Chem 49:80-91, 2006)。本剤は動物実験で現行のメトトレキサートを凌駕して奏功し関節炎をほぼ完全に抑制する。これから本学及び関連施設で臨床試験に入る。

D. 考察

私どもが見つけているRAの疾患遺伝子のうち、いずれについても5年間の研究で遺伝子変異が引き起こす分子病態を解明記載するのが関の山であるように思われる。今後、各疾患遺伝子についての治療的制御を分子立体構造の面から追及ができると考えている。

E. 結論

私達が見出した3つの疾患遺伝子の病態における特徴的寄与について検討を進め、それぞれ疾患に関連した異常を見出すことが出来た。

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) Takami N, Osawa K, Miura Y, Komai K, Taniguchi M, Shiraishi M, Sato K, Iguchi T, Shiozawa K, Hashiramoto A, Shiozawa S. The promoter region of death receptor 3 (DR3) is specifically hypermethylated in rheumatoid synovial cells. *Arthritis Rheum*, in press.
- 2) Kitagawa A, Miura Y, Saura R, Mitani M, Ishikawa H, Hashiramoto A, Yoshiya S, Shiozawa S, Kurosaka M. Anchorage on fibronectin via VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$ integrin) protects rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis. *Ann Rheum Dis*, in press.

- 3) Tsuchida K, Chaki H, Takakura T, Kotsubo H, Tanaka T, Aikawa Y, Shiozawa S, Hirono S. Discovery of nonpeptidic small-molecule AP-1 inhibitors: Lead hopping based on 3D pharmacophore model. *J Med Chem* 49:80-91, 2006
- 4) Tamiya G, Shinya M, Imanishi T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, Furugaki K, Matsumoto T, Mano S, Ando S, Nozaki Y, Yukawa W, Nakashige R, Yamaguchi D, Ishibashi H, Yonekura M, Yoshikawa Y, Fujimoto K, Oka A, Chiku S, Linsen SEV, Giphart MJ, Hoshina Y, Suzuki Y, Hotta T, Mochida J, Minezaki, Komai K, Shiozawa S, Taniguchi A, Yamanaka H, Kamatani N, Gojobori T, Bahram S, Inoko H. Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27039 microsatellites. *Human Mol Genet* 14:2305-2321, 2005.
- 5) Murata M, Miura Y, Hashiramoto A, Kitamura H, Kawasaki H, Shiozawa K, Yoshiya S, Baba H, Chihara K, Shiozawa S. Heat shock protein 90 is required for increased DNA binding activity of activator protein-1, a heterodimer of Fos/JunD, in rheumatoid synovial cells under inflammatory stimuli. *Int J Mol Med*, 15:645-653, 2005.
- 6) Mitani M, Miura Y, Saura R, Kitagawa A, Fukuyama T, Hashiramoto A, Shiozawa S, Kurosaka M, Yoshiya S. Estrogen specifically stimulates expression and production of osteoprotegerin from rheumatoid synovial fibroblasts. *Int J Mol Med*, 5:827-32, 2005.
- 7) Shiozawa K, Tanaka Y, Yoshihara R, Imura S, Murata M, Yamane T, Miura Y, Hashiramoto A, Shiozawa S. Serum levels and pharmacodynamics of methotrexate and its metabolite 7-hydroxy methotrexate in Japanese patients with rheumatoid arthritis treated with 2-mg capsule of methotrexate three times per week. *Mod Rheumatol*

15:405-409, 2005.

2. 学会発表

- 1) Tanaka K, Miura Y, Hashiramoto A, Shiozawa S. The Truncated DR3 Molecule Lacking Death Domain and Transmembrane Domain Negatively Regulates TL1A-Induced Apoptosis Signaling. *Arthritis Rheum* 52 (9 Suppl): S156, 2005. American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting, San Diego, Nov. 12-17, 2005.
- 2) Shiozawa K, Tanaka Y, Yoshihara R, Hashiramoto A, Komai K, Shiozawa S. Contribution of Mutation in Angiopoietin-1 (ang1) Gene to the Clinical Presentation of Patients with Mixed Connective Tissue Disease (mctd) and Systemic Sclerosis (ssc): Genetic Association with Pulmonary Hypertension. *Arthritis Rheum* 52 (9 Suppl): S283, 2005. American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting, San Diego, Nov. 12-17, 2005.
- 3) Shiozawa S, Komai K, Matsuda S, Hashiramoto A, Shiozawa K, Yoon CH, Park S-H, Kim H-Y. Variant Haplotype of Death Receptor 3 (dr3) Gene Encoding Dr3 Molecule Lacking Death Domain is Prevalent in Rheumatoid Arthritis Patients in Japan and Korea and Predisposes to Rheumatoid Joint Destruction. *Arthritis Rheum* 52 (9 Suppl): S421, 2005. American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting, San Diego, Nov. 12-17, 2005.
- 4) Arakawa A, Komai K, Osawa K, Gake M, Shiozawa K, Shiozawa S. Dbl Proto-Oncogene Splicing Variant That Genetically Associates with Rheumatoid Arthritis (RA) Down-Regulates Rho, Rac1 and Cdc42 to Inhibit Reorganization of F-Actin in Rheumatoid Synovial Cell. *Arthritis Rheum* 52 (9 Suppl): S576, 2005. American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting, San Diego,

Nov. 12-17, 2005.

- 5) Hashiramoto A, Miura Y, Sakai C, Komai K, Shiozawa K, Shiozawa S. Biological Functions of Angiopoietin-1 on Cartilage Destruction in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 52 (9 Suppl): S579, 2005. American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting, San Diego, Nov. 12-17, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

- 1) 名称：関節リウマチの発症に關与するポリヌクレオチドおよびその利用、出願番号：特願 2004-297965、出願日：H16.4.20、取得日：日本国特許 3710809、発明者：塩澤俊一、大澤佳代、高見希、内容：アポトーシス誘導受容体 DR3 プロモーターのメチル化が関節リウマチ特異的にみられ、関節リウマチの診断と治療に有用であること。
- 2) 名称：自己免疫疾患の発症に關与する因子の発現を判定する方法およびその利用、出願番号：特願 2004-124706、出願日：H16.4.20、発明者：中嶋淑絵、塩澤俊一、内容：抗原の遷延感作により自己抗体が生成する発見が膠原病発症の診断と治療に有用であること。
- 3) 名称：DR3 遺伝子の d 領域に結合するポリペプチドおよびその利用、出願番号：特願 2004-252358、出願日：H16.8.31、発明者：塩澤俊一、北村仁美、内容：DR3 遺伝子の d 領域に結合してエクソン発現を抑制しているサイレンサーポリペプチドにおいてこれに競合する製剤が関節リウマチの診断と治療に有用であること。
- 4) 名称：シグナル伝達阻害剤およびその利用、出願番号：特願 2004-299147、出願日：H16.10.13、発明者：柱本照、三浦靖史、塩澤俊一、内容：ゲルダナマイシンが Akt および MAPK シグナルを抑制することが関節リウマチの診断と治療に有用であること。
- 5) 名称：関節炎を治療または予防するた

めの薬学的組成物、出願番号：特願 2004-302118、出願日：H16.10.15、発明者：三浦靖史、清水真希子、柱本照、塩澤俊一、内容：疾患遺伝子 DR3 に起因するアポトーシス不全を DR3 リガンドの TL1A 刺激で是正できてこれが関節リウマチの治療に有用であること。

- 6) 名称：肺高血圧症発症関連遺伝子を用いた肺高血圧症の診断および治療、出願番号：特願 2005-047344、出願日：H17.2.23、発明者：塩澤和子、駒井浩一郎、塩澤俊一、内容：関節リウマチで見出した疾患遺伝子アンギオポエチン 1 遺伝子変異が膠原病性肺高血圧症の診断と治療に特異的に有用であること。
- 7) 名称：自己免疫疾患の発症抗原およびその利用、出願番号：特願 2005-079615、出願日：H17.3.18、発明者：塩澤俊一、積山賢、松山浩子、井坂小枝子、内容：抗原の遷延感作によって実際の膠原病が実験的に作成できたことが膠原病の診断と治療に有用であること。
- 8) 名称：自己免疫疾患誘導剤およびその利用、出願番号：特願 2005-328040(特願 2005-079615 の国内優先権主張出願)、出願日：H17.11.11、発明者：塩澤俊一、柱本照、積山賢、松山浩子、井坂小枝子、内容：抗原の遷延感作によって実際の膠原病が実験的に作成できたことの特許を踏まえて NKT 細胞の特異的活性化剤が発症のキイを握ることからこれらの薬剤が膠原病の診断と治療に有用であること。
- 9) 名称：糖尿病性網膜症の診断および予防、出願番号：特願 2005-155937、出願日：H17.5.27、発明者：塩澤俊一、柱本照、駒井浩一郎、内容：関節リウマチで見出した疾患遺伝子アンギオポエチン 1 遺伝子変異が糖尿病性網膜症の診断と治療に有用であること。
- 10) 名称：関節リウマチおよび関節リウマチの睡眠障害の発症または発症可能性の判定方法並びにその利用、出願番号：特願 2005-375979、出願日：

H17.12.27、発明者：塩澤俊一、柱本照、山根隆志、内容：関節リウマチの活動性を支配する c-fos および Wee1 遺伝子の過剰発現が関節リウマチの睡眠障害に直接関わっているとする発見が本症の診断と治療に有用であること。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究要旨

関節リウマチ(RA)発症の遺伝的背景として主要組織適合性抗原クラス II (MHC クラス II) の関与が明らかになっていることから、疾患感受性を持つ個体では特定の抗原に対する免疫応答が想定される。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、II 型コラーゲン(col2)接種による関節炎(CIA)誘導能を解析した。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。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 の接種によっても、本 Tg マウスでは RA に類似した関節炎を発症した。この 関節炎は、通常の CIA に比べて発症過程は徐々であるが、その炎症過程は慢性かつ進行性であり、最終的には著明な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、パンプ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、本 Tg マウスは、RA 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。通常の濃度の 1/20 という低い Col2 濃度で接種したところ、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、パンヌス形成、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)

動物取り扱いに関しては、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)。

関節炎発症時期は、従来法では Boost 追加免疫後約 1 週であるのに比べ、CIITA Tg を用いた場合 low dose (従来法の 1/20 量) では 3-6 週と遅く、症状の進行も徐々に起こった。またスコア 2 以上の関節炎の持続は CIA では約 6 週間、100 日前後ではほぼ完全に消退するのに対し、CIITA Tg では 13 週以上に及び 180 日以上持続した。

また、表 1 は両マウスでの炎症性関節炎発症頻度を比較したものである。いずれのグループも 14-21 匹のマウス個体数で行った結果であるが、低濃度 Col2 接種では野生型 (DBA/1) での発症率は 0% であったのに対し、CIITA Tg マウスでは約 89% であった。高濃度 Col2 を用いた実験でも、炎症性関節炎の発症頻度は CIITA Tg がはるかにまさっていた。

さらに、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、パンヌス形成を

伴う軟骨および骨破壊が観察された。また、興味深いことに、リウマトイド結節類似の病変や間質性肺炎も CIITA Tg マウスで観察された (図 2)。

免疫学的特徴としては、本 CIITA Tg マウスを用いた CIA は、高力価抗 Col2 抗体の出現に加え、従来 CIA やアジュバント関節炎モデルではこれまで検出されていない抗 CCP 抗体が高頻度に陽性となった。

表 1 炎症性関節炎の発症頻度

誘導 :	CFA	CFA/ldCol2	CFA/hdCol2
追加 :	IFA	IFA/ldCol2	IFA/hdCol2
wild type	0%	0%	57.1%
CIITA Tg	0%	88.9%	90.5%

CFA, complete adjuvant; IFA, incomplete adjuvant; ldCol2, low dose col2; hdCol2, high dose col2.

D. 考察

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た。さらに、免疫学的異常も見られることから、RA における免疫制御系の破綻の分子機構を解析するための適切なモデル動物であることが明らかとなった。従来 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。

今後は、RA 治療薬を用いた実験治療モデルとしての有用性を探ると共に、抗 Col2 抗体や抗 CCP 抗体の出現と関節局所の免疫担当細胞の動態および組織病理学的変化を解析することにより、リウマトイド炎症における免疫学的発症機構の解明が可能となる。

さらに、滑膜増殖期と関節破壊期が分離できるため、病態の変化を段階的にモニターできる。このため本マウスは、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。