

日本人集団における関節リウマチ発症および臨床経過関連遺伝子の検討

分担研究者：土屋尚之

筑波大学大学院人間総合科学研究科社会環境医学専攻 教授

研究要旨

関節リウマチ(RA)の滑膜組織の包括的遺伝子発現解析から、RA の血管内皮細胞における発現を見出した Id (inhibitor of differentiation/DNA binding)1, Id3 の gene silencing により、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(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。前年度までに、HLA-DRB1 shared epitope 陰性 RA 群における *LILRB1* 遺伝子ハプロタイプの関連を報告したが、本研究では、そ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。

また、免疫系遺伝子多型と RA の臨床病型や臨床経過との関連を検討したところ、*HLA-DRB1* shared epitope, *FCGR3A*, *LILRA2*, *LILRB4*, *IL10* プロモーターと Steinbrocker 病期分類や手術歴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、今後、前向き研究にて臨床経過との関連を検討する必要があると考えられた。

また、RA と HLA-DR との関連を抗 CCP 抗体陽性群、陰性群別に検討したところ、ヨーロッパ系集団同様、HLA-DR shared epitope との関連は抗 CCP 抗体陽性群においてのみ認められた。興味深いことに、日本人集団において、抗 CCP 抗体陰性 RA では、アジア集団においては頻度が高いものの、ヨーロッパ系集団にはほとんど存在しない、*HLA-DRB1*0901* との有意な関連が認められた。

A. 研究目的

ゲノム解析に基づき、関節リウマチ(RA)の診断、臨床経過予測、治療法の選択、創薬などに有用な情報を得ることを目的として、本研究では、以下の点につき検討した。

- 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、RA の病態における重要性を考慮し、Id1, Id3 gene silencing が、TNF α や IL-1 β による HUVEC 活性化をも抑制しうるか否かを検討した。
- 2) Leukocyte Ig-like receptor (LILR) は、免疫グロブリン様受容体ファミリーに属する多重遺伝子ファミリーで、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。これらのうちで、抑制型受容体であり、前年度までに *HLA-DRB1* shared epitope 陰性群において RA との関連を見出した *LILRB1(ILT2, LIR1)* の多型につき、機能解析を行った。
- 3) RA の予後予測因子を見出す目的で、これまでに RA やほかのリウマチ性疾患との関連を見出してきた遺伝子多型、ならびに、ヨーロッパ系集団において RA の発症や重症度、TNF 阻害療法の有効性との関連の報告が複数なされている IL-10 プロモーター多型と RA の重症度との関連を検討した。
- 4) 近年、ヨーロッパ系集団において、*HLA-DRB1* shared epitope と RA の関連は、

主として抗 CCP 抗体陽性 RA 群において観察され、抗 CCP 抗体陰性 RA では、日本人集団にはきわめてまれである HLA-DR3 との関連が報告されている。本研究では、日本人における CCP 抗体と HLA との関連を、東京女子医大古谷らとの共同研究により検討した。

B. 研究方法

- 1) 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ス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。
- 3) これまで、われわれが RA や全身性エリテマトーデスとの関連を報告してきた *LILRB1*, *LILRB4*, *LILRA2*, *FCGR2B*, *FCGR3A*, *HLA-DRB1*, *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。また、東京都赤十字血液センター・湧永製薬が共同開発した Luminex システムを用いた新規タイピング法により、*IL10* 遺伝子プロモーター多型(-1082A>G, -819T>C, -592A>C)の遺伝子型を決定し、発症、Steinbrocker 分類、関節手術歴との関連を症例対照研究により検討した。
- 4) 東京女子医大における前向き研究に参加した発症 1 年以内の早期 RA 110 例において、抗 CCP 抗体を ELISA(DIASTAT anti-CCP)にて測定し、*HLA-DRB1* 遺伝子型との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学、東京女子医大をはじめとする、研究参加施設の倫理審査委員会の承認を得た研究計画に則り、研究協力者のインフォームド・コンセントのもとに、匿名化された試料を用いて施行された。

C. 研究結果

- 1) 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。
- 3) *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)。

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、RA 発症との関連も検出される *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ていた($P=0.019$) (表 3)。

IL-10 プロモーターでは、3 箇所の多型部位により、3 種類のハプロタイプ GCC, ACC, ATA が形成され、RA 発症との有意な関連は認められなかったが、Steinbrocker stage III または IV と診断された患者群において、stage I または II の患者群及び健常対照群と比較して、ACC/ACC ディプロタイプ頻度の上昇が認められた($P=0.023$ [stage I - II vs stage III-IV], $P=0.038$ [stage III-IV vs 健常群]) (表 4)。また、関節手術歴を有する症例における ACC/ACC ディプロタイプ頻度は、健常対照群と比較して有意に上昇していた($P=0.0051$) (表 5)。

- 4) 早期 RA コホート 110 例中 82 例(74.5%)に抗 CCP 抗体が陽性であった。*HLA-DRB1**0405 陽性率は抗 CCP 抗体陽性群では増加していた($P=1.8 \times 10^{-6}$ vs 健常対照群, $P=0.012$ vs 抗 CCP 抗体陰性群)ものの、抗 CCP 陰性群では、健常対照群との間に有意差が認められなかった。同様に、*HLA-DRB1* shared epitope 陽性率は、抗

CCP 抗体陽性群に増加していたが ($P = 1.6 \times 10^{-7}$ vs 健常対照群、 $P = 0.008$ vs 抗 CCP 抗体陰性群)、抗 CCP 抗体陰性群では、健常対照群との間に有意差を認めなかった (表 6)。

一方、抗 CCP 抗体陰性群では、*DRB1*0901* 陽性率が抗 CCP 抗体陽性群と比較して有意に増加し ($P = 0.013$)、健常対照群と比較しても、有意差には到達しないものの ($P = 0.058$)、増加傾向が認められた (表 6)。*DRB1*0901* アリル頻度の比較では、抗 CCP 抗体陰性群 (26.8%) において、抗 CCP 抗体陽性群 (11.0%, オッズ比 (OR) 3.0, $P = 0.0042$)、健常対照群 (14.5%, OR 2.2, $P = 0.016$) と比較して、有意な増加が観察された。

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。また、*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。

臨床経過との関連では、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。*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。IL-10 プロモーターハプロタイプと RA の発症や臨床経過との関連は、ヨーロッパ系集団において報告されているが、日本人においても臨床経過との関連が示唆された。また、IL-10 プロモーターハプロタイプと IL-10 産生量との関連は確立しておらず、今後、ACC ハプロタイプの機能を明らかにすることにより、治療に結びつける必要がある。これらの臨床経過関連遺伝子は、今後、前向き研究において検証する必要がある

と考えられた。

近年、ヨーロッパ系集団において、*HLA-DRB1* shared epitope と RA との関連は、抗 CCP 抗体陽性 RA においてのみ検出されるなどの報告が見られるが、日本人においても同様の結果が観察された。一方、*HLA-DRB1*0901* と RA との関連が抗 CCP 抗体陰性群においてのみ検出されたことは、今回新規に得られた知見である。*HLA-DRB1*0901* はアジア集団には高頻度であるがヨーロッパ系集団には稀な対立遺伝子である。一方、ヨーロッパ系集団に多く、アジア系集団にはほとんど存在しない *HLA-DRB1*0301* は、ヨーロッパ系集団において抗 CCP 抗体陰性 RA と関連する。今回の知見は、日本人集団において、抗 CCP 抗体陰性の関節炎症例が、将来 RA に進展するか否かを推測する上で、*HLA-DRB1*0901* が有用なマーカーとなる可能性を示唆し、日本人を含むアジア集団の RA のゲノム医療を考える上で、有用な知見を提供すると思われる。

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。

HLA-DRB1, *FCGR3A*, *LILRB4*, *IL10* プロモーター多型と RA の重症度との関連が示唆された、また、日本人集団において、抗 CCP 抗体陽性 RA は *HLA-DRB1* shared epitope と、抗 CCP 抗体陰性 RA は *HLA-DRB1*0901* と関連することが示された。

(共同研究者：櫻井大祐 (獨協医大)、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、江原幸和、徳永勝士 (東大人類遺伝)、松下正毅、宮城徹、岡孝紀 (湧永製薬)、松多邦雄 (松多内科医院)、古谷武文、小竹茂、鎌谷直之 (東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター)、箱田雅之 (安田女子大学)、柏瀬貢一、佐竹正博 (東京都赤十字血液センター))

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) Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens* 63: 21-27, 2004.
- 2) 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.
- 3) Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIA, but not of IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A family-based association study in Caucasians. *Arthritis Rheum* 50: 671-673, 2004.
- 4) 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.
- 5) Sato-Takeda M, Ihn H, Ohashi J, Tsuchiya N, Satake M, Arita H, Tamaki K, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T. The human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) haplotype is associated with the onset of postherpetic neuralgia after herpes zoster. *Pain* 110: 329-336, 2004.
- 6) Furuya T, Hakoda M, Tsuchiya N, Kotake S, Ichikawa N, Nanke Y, Nakajima A, Takeuchi M, Nishinarita M, Kondo H, Kawasaki A, Kobayashi S, Mimori T, Tokunaga K, Kamatani N. Immunogenetic features in 120 Japanese patients with idiopathic inflammatory myopathy. *J Rheumatol* 31: 1768-1774, 2004.
- 7) Mori K, Kizawa H, Ushiyama T, Chano T, Inoue H, Tsuchiya N, Matsusue Y, Okabe H, Ikegawa S. Association of CYP17 with HLA-B27-negative seronegative spondyloarthritis in Japanese males. *Am J Med Genet* 130A: 169-171, 2004.
- 8) 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.
- 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* 13: 2907-2917, 2004.
- 10) Akasaka T, Lee SG, Ohashi J, Bannai M, Tsuchiya N, Yoon Y, Tokunaga K, Song K. Comparative study of the haplotype structure and linkage disequilibrium of chromosome 1p36.2 region in the Korean and Japanese populations. *J Hum Genet* 49: 603-609, 2004.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Tanaka G, Matsushita I, Ohashi J, Tsuchiya N, Ikushima S, Oritsu M, Hijikata M, Nagata T, Yamamoto K, Tokunaga K, Keicho N. Evaluation of microsatellite markers in association studies: a search for an immune-related susceptibility gene in sarcoidosis. *Immunogenetics* 56: 861-870, 2005.
- 15) 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.
- 16) Tsuchiya N, Kyogoku C: Role of Fcγ receptor

- Iib polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus. *Insights from Asia. Autoimmunity* 38: 347-352, 2005.
- 17) Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, Tsuchiya N, Honda H, Yamamoto K, Tokunaga K, Honda Z. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet* 14: 2881-2892, 2005.
 - 18) Tsuchiya T, Okaji Y, Tsuno NH, Sakurai D, Tsuchiya N, Kawai K, Yazawa K, Asakage M, Yamada J, Yoneyama S, Kitayama J, Osada T, Watanabe T, Tokunaga K, Takahashi K, Nagawa H. Targeting Id1 and Id3 inhibits peritoneal metastasis of gastric cancer. *Cancer Sci* 96: 784-790, 2005.
 - 19) Tsuchiya N, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K. Association of HLA-DRB1*0901-DQB1*0303 haplotype with microscopic polyangiitis in Japanese. *Genes Immun* 7: 81-84, 2006.
 - 20) Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 54: 992-997, 2006.
 - 21) Okaji Y, Tsuno NH, Kitayama J, Sakurai D, Tsuchiya N, Saito S, Takegami K, Tsuchiya T, Kawai K, Yazawa K, Asakage M, Yoneyama S, Yamada J, Tokunaga K, Takahashi K, Nagawa H. Effects of Id (inhibitor of DNA binding / differentiation) gene down-regulation in human colorectal cancer cells on early steps of haematogenous metastasis. *Eur J Cancer* 42: 668-673, 2006.
 - 22) Tsuchiya N, Honda Z, Tokunaga K. Role of B cell inhibitory receptor polymorphisms for systemic lupus erythematosus: a negative times a negative makes a positive. *J Hum Genet* 51: 741-750, 2006.
 - 23) Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kobashigawa T, Tokunaga K, Tsuchiya N, Kamatani N, Kotake S. Differential association of HLA-DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. *Clin Exp Rheumatol*, in press.
 - 24) Hitomi Y, Tsuchiya N, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga K, Sato S. Association of human CD22 gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis. *Tissue Antigens*, in press.
 - 25) Kawasaki A, Tsuchiya N, Ohashi J, Murakami Y, Fukazawa T, Kusaoi M, Matsuta K, Hashimoto H, Tokunaga K. Role of APRIL (TNFSF13) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology*, in press.
 - 26) Tsuchiya N, Kyogoku C, Miyashita R, Kuroki K. Diversity of human immune system multigene families and its implication in the genetic background of rheumatic diseases. *Curr Med Chem*, in press.
 - 27) 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.
 - 28) 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.
 - 29) 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.
 - 30) 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.
 - 31) 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.
 - 32) 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.
 - 33) 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.
 - 34) 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): 1357-1366, 2005.
 - 35) 土屋尚之. ANCA関連血管炎疾患感受性遺伝子解析の現状. *医学のあゆみ* 214: 63-66, 2005.
 - 36) 土屋尚之. 病因: (1)遺伝. (長澤俊彦編「新しい診断と治療のABC 31 ANCA関連腎炎」). *最新医学 別冊* 46-54, 2005.
 - 37) 土屋尚之. 多因子遺伝病としてのリウマチアレルギー疾患: 全身性エリテマトーデス. *最新医学* 60 (9月増刊号): 2120-2130, 2005.
 - 38) 土屋尚之, 本田善一郎. 目で見えるバイオサイエンス: 全身性エリテマトーデスに見られる遺伝子多型. *内科* 96: 1115-1119, 2005.
 - 39) 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.

- 40) 土屋尚之. 強直性脊椎炎. リウマチ基本テキスト(第2版)日本リウマチ財団教育研修委員会, pp374-377, 2005.
- 41) 土屋尚之. SLE および SLE モデルマウスにおける疾患感受性遺伝子解析. リウマチ・膠原病最新トピックス 変わりゆく研究と診療(竹原和彦、佐藤伸一、桑名正隆編), 診断と治療社, pp.34-37, 2005.
- 42) 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 97: 735-737, 2006.
- 43) 土屋尚之. 関節リウマチ重症度と関連する免疫系機能遺伝子多型. リウマチ科 36: 294-298, 2006.
- 44) 土屋尚之, 宮下リサ. 顕微鏡的多発血管炎の疾患感受性とKIR-HLA遺伝子相互作用. リウマチ科 36: 514-521, 2006.
- 45) 土屋尚之. 全身性エリテマトーデスのゲノム医学. 「臨床ゲノム科学入門」(永井良三監修、徳永勝士、大木秀一、田中紀子編), 杏林図書, pp.192-205, 2007.
- 46) 土屋尚之. 全身性エリテマトーデス-疾患感受性遺伝子探索の最近の進歩-. リウマチ科, 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) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.): S203, 2004.
- 11) 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.
- 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Suzuki T, Fukazawa T, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K. Epistatic interaction between *CD72* and *FCGR2B* polymorphisms in conferring susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). *Modern Rheumatol* 15 (Suppl): S216, 2005.
 - 24) 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.
 - 25) 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.
 - 26) 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.
 - 27) Kusaoi M, Fukazawa T, Hirashima M, Morita Y, Touyama S, Tsuchiya N, Tokunaga K, Inoko H, Hashimoto H. Genome-wide screening of systemic lupus erythematosus on chromosome 1 using high dense microsatellite markers. *Modern Rheumatol* 15 (Suppl): S105, 2005.

- 28) Kobayashi S, Tamura N, Ihara T, Muso E, Suzuki K, Yoshida M, Nakabayashi N, Tsuchiya N, Korosawa M, Inaba Y, Fujimoto S, Nunoi H, Hashimoto H. Prevalence of microscopic polyangiitis/ Wegener's granulomatosis and the ratio of MPO, PR-3-ANCA in patients with ANCA-associated vasculitis in Japan. The 12th International Vasculitis and ANCA Workshop, Heidedlberg, Germany, June 15-18, 2005 (Abstract published in *Kidney & Blood Pressure Research*, 2005: 28, 190-191).
- 29) Hitomi Y, Tsuchiya N, Suzuki T, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Toru Fukazawa T, Bejrachandra S, Siriboonrit U, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K. Role of *CD72* polymorphisms for the regulation of alternative splicing and for susceptibility to systemic lupus erythematosus. The Henry Kunkel Society Annual Meeting 2005, Cambridge, England, August 3-7, 2005.
- 30) 人見祐基, 土屋尚之, 長谷川稔, 藤本学, 竹原和彦, 佐藤伸一, 徳永勝士. ヒト *CD22* 遺伝子多型と全身性強皮症との関連. 日本人類遺伝学会第 50 回大会抄録集 p148, 2005 年 9 月 19 日~22 日, 倉敷.
- 31) 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.
- 32) 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. 顕微鏡的多発血管炎の疾患感受性における *KIR*-*HLA* 遺伝子間相互作用の検討. 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.
- 33) 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 28: 216, 2005. 第 33 回日本臨床免疫学会, 2005 年 10 月 28 日~29 日, 京都.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 人見祐基, 土屋尚之, 長谷川稔, 藤本学, 佐藤伸一, 徳永勝士. ヒト *CD22* 遺伝子多型と全身性強皮症との関連. 日本免疫学会総会・学術集会記録 35: 200, 2005.
- 40) 土屋尚之. リウマチ性疾患の遺伝素因. 第 42 回宮城リウマチ外科研究会特別講演, 2006 年 2 月 18 日, 仙台.
- 41) 土屋尚之. 遺伝子多型解析に基づく全身性エリテマトーデス発症分子機序の検討(シンポジウム). 第 50 回日本リウマチ学会, 2006 年 4 月 23 日~26 日, 長崎(抄録集 p22).
- 42) 宮下リサ, 土屋尚之, 小林茂人, 橋本博史, 尾崎承一, 徳永勝士. 顕微鏡的多発血管炎(MPA)の疾患感受性における *KIR* (killer cell Ig-like receptor)-*HLA* 遺伝子間相互作用の検討. 第 50 回日本リウマチ学会, 2006 年 4 月 23 日~26 日, 長崎(抄録集 p19).
- 43) 人見祐基, 土屋尚之, 長谷川稔, 藤本学, 竹原和彦, 佐藤伸一, 徳永勝士. ヒト

- CD22 遺伝子多型と全身性強皮症との関連. 第 50 回日本リウマチ学会, 2006 年 4 月 23 日～26 日, 長崎 (抄録集 p218) .
- 44) 川崎綾, 古川宏, 土屋尚之, 草生真規雄, 深沢徹, 松多邦雄, 橋本博史, 小野栄夫, 徳永勝士. SH2D1A (SLAM-associated Protein) 遺伝子多型と若年発症全身性エリテマトーデスの関連. 第 50 回日本リウマチ学会, 2006 年 4 月 23 日～26 日, 長崎 (抄録集 p220) .
- 45) 古谷武文, 市川奈緒美, 箱田雅之, 樋上謙士, 南家由紀, 八子徹, 小橋川剛, 土屋尚之, 徳永勝士, 鎌谷直之, 小竹茂. 早期 RA 患者における骨破壊の進行と HLA-DRB1 遺伝子型および抗 CCP 抗体との関連. 第 50 回日本リウマチ学会, 2006 年 4 月 23 日～26 日, 長崎 (抄録集 p122) .
- 46) 土屋尚之. ヒト免疫系多重遺伝子ファミリーにおける copy number polymorphism と疾患感受性. 日本進化学会 2006 年大会シンポジウム「多重遺伝子ファミリーの進化: 遺伝子の生成と消滅のダイナミズム」, 2006 年 8 月 29 日～31 日, 東京 (要旨集 p45) .
- 47) 江原幸和, 松下正毅, 土屋尚之, 柏瀬貢一, 宮城徹, 松多邦雄, 草生真規雄, 深沢徹, 橋本博史, 高崎芳成, 佐竹正博, 岡孝紀, 徳永勝士. 蛍光ビーズ法を用いた新規タイピングシステムによる *IL-10* 遺伝子プロモーター多型とリウマチ性疾患との関連の検討, 日本組織適合性学会, 2006 年 9 月 24 日～26 日, 東京.
- 48) 土屋尚之. 遺伝子解析に基づくリウマチ・膠原病の病因・病態解析. 日本人類遺伝学会シンポジウム, 2006 年 10 月 17 日～20 日, 米子 (抄録集 p100) .
- 49) 江原幸和, 松下正毅, 土屋尚之, 柏瀬貢一, 宮城徹, 松多邦雄, 草生真規雄, 深沢徹, 橋本博史, 高崎芳成, 佐竹正博, 岡孝紀, 徳永勝士. 蛍光ビーズ法を用いた新規タイピングシステムによる *IL-10* 遺伝子プロモーター多型とリウマチ性疾患との関連の検討. 日本人類遺伝学会, 2006 年 10 月 17 日～20 日, 米子 (抄録集 p155) .
- 50) Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kobashigawa T, Inoue E, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani K, Kotake S. Differential association of HLA-DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. American College of Rheumatology 2006 Annual Scientific Meeting.
- 51) Kawasaki A, Tsuchiya N, Kyogoku C, Hashimoto H, Takasaki Y, Behrens, T.W., Tokunaga K. Association of interferon regulatory factor 5 (IRF) SNPs with systemic lupus erythematosus in Japanese. 2006 年日本免疫学会総会, 2006 年 12 月 11 日～13 日, 大阪 (抄録集 p101) .
- 52) 江原幸和, 土屋尚之, 松多邦雄, 橋本博史, 高崎芳成, 徳永勝士. 蛍光ビーズ法を用いた新規タイピングシステムによる *IL-10* 遺伝子プロモーター多型とリウマチ性疾患との関連の検討. 2006 年日本免疫学会総会, 2006 年 12 月 11 日～13 日, 大阪 (抄録集 p286) .
- 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 病期分類

HLA-DRB1 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)

* Stage IVにおいて、SE を2コピー持つ群が、stage I-IIIと比較して有意に増加($P=0.009$)

Stage III-IVにおいて、SEを持たない群が、stage I-IIと比較して有意に増加($P=0.045$)

表2 LILRB4 -965 遺伝子型と手術回数

LILRB4	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で、A/G, G/Gが増加 ($P_{trend}=0.027$)

表3 FCGR3A 多型と Steinbrocker 病期分類

FCGR3A	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 III-IVでI-IIと比較してV/Vが有意に減少($P=0.019$)

表4 IL-10 プロモーター -1082, -819, -592 ハプロタイプと Steinbrocker 病期分類

	RA (Steinbrocker stage)				健常対照群	
	stage I-II (n=131)		stage III-IV (n=346)			
GCC/GCC	1	(0.8)	1	(0.3)	2	(0.3)
GCC/ACC	1	(0.8)	7	(2.0)	15	(2.2)
GCC/ATA	11	(8.4)	24	(6.9)	55	(8.0)
ACC/ACC*	6	(4.6)	40	(12.0)	52	(7.6)
ACC/ATA	57	(44.0)	113	(33.0)	250	(36.4)
ATA/ATA	55	(42.0)	161	(47.0)	312	(45.5)

* ACC/ACCがstage III-IVにおいて増加(stage I-IIとの比較で $P=0.023$, 健常対照群との比較で $P=0.038$)

表5 IL-10 プロモーターハプロタイプと手術歴との関連

	RA				健常対照群	
	手術歴なし(n=204)		手術歴あり(n=116)			
GCC/GCC	2	(1.0)	0	(0)	2	(0.3)
GCC/ACC	5	(2.5)	1	(0.9)	15	(2.2)
GCC/ATA	16	(7.8)	8	(6.9)	55	(8.0)
ACC/ACC*	18	(8.8)	18	(15.5)	52	(7.6)
ACC/ATA	70	(34.3)	45	(38.8)	250	(36.4)
ATA/ATA	93	(45.6)	44	(37.9)	312	(45.5)

*手術歴あり群で ACC/ACC が増加 (健常対照群との比較で、 $P=0.011$)

表6 抗 CCP 抗体陽性および陰性 RA における *HLA-DRB1* 陽性率

<i>DRB1</i>	抗 CCP 抗体陽性 RA (n=82)		抗 CCP 抗体陰性 RA (n=28)		健常対照群 (n=265)	
0405	43	(52.4%) ¹	7	(25.0%)	65	(24.5%)
shared epitope	58	(70.7%) ²	12	(42.9%)	100	(37.7%)
0901	18	(22.0%)	13	(46.4%) ³	77	(29.1%)

¹ 健常対照群との比較：オッズ比(OR) 3.4 (95% 信頼区間[95% CI] 2.0 - 5.7), $P = 1.8 \times 10^{-6}$

抗 CCP 抗体陰性 RA との比較： OR 3.3 (95% CI 1.3 - 8.6), $P = 0.012$

² 健常対照群との比較： OR 4.0 (95% CI 2.3 - 6.8), $P = 1.6 \times 10^{-7}$

抗 CCP 抗体陰性 RA との比較： OR 3.2 (95% CI 1.3 - 7.8), $P = 0.0081$

³ 抗 CCP 抗体陽性 RA との比較： OR 3.1 (95% CI 1.2 - 7.6), $P = 0.013$

健常対照群との比較： OR 2.1 (95%CI 0.97-4.59), $P=0.058$

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

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学 助手

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マウス(DICC マウス)を作成し、Col2 接種による関節炎(CIA)誘導能を解析した。DICC マウスは、関節炎を自然発症しないものの、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、DICC 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、DICC 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。加えて我々のこれまでの研究より RA の病態形成に NF- κ B シグナルが重要な役割を演じていることが明らかになっている。そこで、抗 NF- κ B 活性を持ち抗リウマチ薬として使用されているサラゾスルファピリジン(SASP)を DICC マウスに投与し、関節炎症状を検討した。この結果 SASP は、RA 様の病態進行を抑えることが明らかとなり、DICC マウスにおける関節炎に NF- κ B 活性化経路が関わる事が明らかとなった。

A. 研究目的

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 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 Col2(or CII)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マウス (DICC マウス; DBA/1, CII promoter/enhancer-driven CIITA) 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 Col2 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。この DICC マウスは、RA 疾患で観察される種々の特徴を示した。また、我々のこれまでの研究より RA の病態形成に NF- κ B シグナルが重要な役割を演じていることが明らかになっている。そこで、抗 NF- κ B 活性を持ち抗リウマチ薬として使用されている SASP を DICC マウスに投与し、関節炎症状を調べた。

B. 研究方法

DICC マウス作製: Col2 プロモーターを用い

DICC マウスを作製した。DICC マウスを DBA マウス (H-2^dバックグランド) に 15 世代以上バッククロスさせた。本研究では全ての実験においてヘテロマウスを使用した。マウスの遺伝子型同定は、PCR 法を用いた。また使用した全てのマウスは specific pathogen free の環境下で飼育された。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、DICC 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 Col2 を常法に従い皮下注射し、CIA の誘発を試みた。この際 DICC マウスは、Col2 抗原に対し高い感受性を持つため、通常の濃度の 1/20 (10 μ g, low dose) という低い Col2 濃度により慢性進行性の関節炎を惹起した。

RA 様症状の解析：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、関節局所における関節破壊等の解析は CIA の評価方法による肉眼的所見および HE 組織染色等により解析した。

CIA の評価方法：関節炎の重症度の評価は、一肢ずつ次の 4 段階で点数化した。0=所見なし；1=1 関節または 2 関節の軽度の発赤、腫脹；2=3 関節以上の中等度の発赤、腫脹；3=一肢全体の重度の発赤、腫脹と機能障害。四肢の合計点数を最大 12 点 (3 点 x4 肢) としスコアとした。関節炎の発症日は、初回免疫からの日数で表し、スコアが 3 点以上となった時点で発症したものと判定した。

DICC マウスへの SASP 投与：Col2 抗原接種後生じる RA 様の症状が、抗リウマチ薬、SASP により症状の改善を図れるのか否かについて検討した。Col2 の 2 次免疫直後より、経口投与 20mg/kg (低容量群)とその倍量にあたる 40mg/kg (高用量群)を開始し、その後 12 週間に渡り投与を続けた。SASP は原末を乳鉢でパウダー状になるまで充分すりつぶし、1%メチルセルロース溶液に必要量をそれぞれのマウスに接種した。

(倫理面への配慮)

DICC マウスの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

DICC 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。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、従来法では追加免疫後約 1 週であるのに比べ、DICC マウスを用いた場合 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 週間でほぼ完全に消退するのに対し、DICC マウスでは 13 週以上持続した (図 2)。

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、DICC 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 DICC マウス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 DICC マウスで観察された (図 3)。

図 1. DICC マウスにおける腫脹およびサーモグラフィーによる熱感の測定

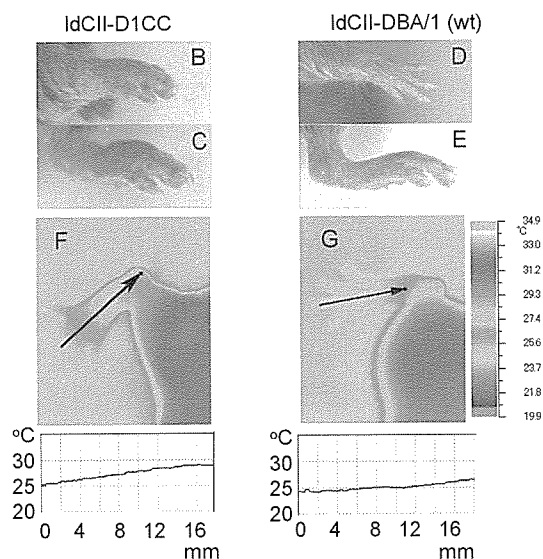


図2. Clinical score の経時的変化

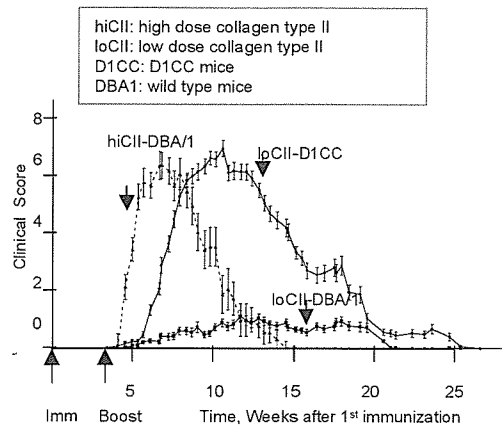
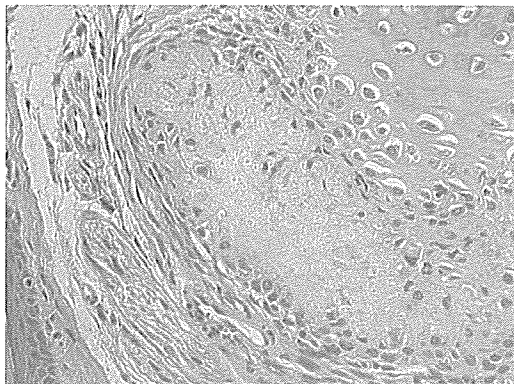


表1 炎症性関節炎の発症頻度

誘導:	CFA	CFA/loCII	CFA/hiCII
追加:	IFA	IFA/loCII	IFA/hiCII
wild type	0%	0%	57.1%
CIITA Tg	0%	88.9%	90.5%

図3 D1CCマウスに見られたリウマトイド結節様病変

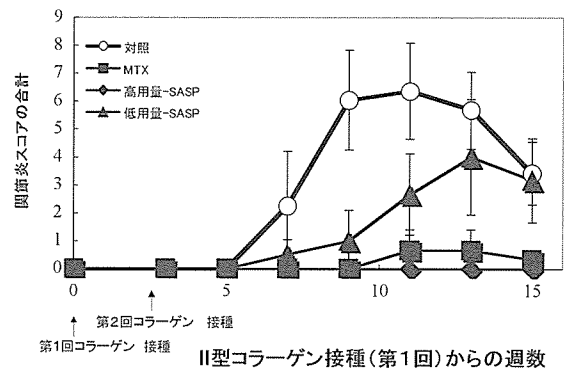


免疫学的特徴としては、D1CCマウスを用いたCIAは、高力価抗Col2抗体の出現に加え、従来のCIAやアジュバント関節炎モデルではこれまで検出されていない抗CCP抗体が高頻度に陽性となった。

D1CCマウスを用いた低濃度Col2によるCIA誘導では、関節炎の進行がRA並に緩やかで、その症状の持続時間が2倍ほど長くより慢性性の経過をとることを特徴とする。このため抗リウマチ薬の治療評価モデルとして利用できるのか否かを検討した。近年RA治療薬を用いた治療法は大きく変化している。当初の非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の使用を中心とした治療から、効果が比較的緩やかな疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARDs)を早期において投与するという治療法へと変化した。SASPは、もともと潰瘍性大腸炎やクロー

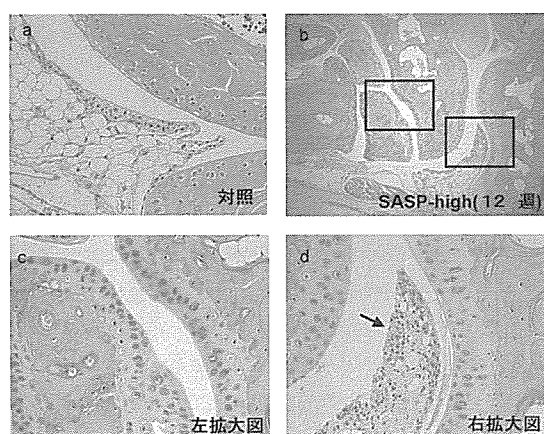
ン病などの炎症性腸疾患の特効薬として用いられていた薬剤である。しかし特にRAの骨破壊を阻止する作用があることから急速にRA治療薬として用いられるようになり、現在はDMARDsの中でも代表的な薬剤の一つとして使用されている。興味深いことに、SASPは、RAの病態の中核を担う複数の炎症応答関連遺伝子の共通の転写因子であるNF-κBに対する抑制作用のあることが報告されている。SASPの投与開始はCol2の追加接種の直後より開始し、マウス用経口ゾンデを用いて12週間に渡り投与を続けた。その結果マウスの関節炎発症率は、対照群; 83% (6匹中5匹)、SASP高用量群; 0% (6匹中0匹)、SASP低用量群; 50% (6匹中3匹)であった(図4)。SASP高用量群では、著明に関節炎の発症が抑制された(カイ2乗検定、 $p < 0.001$)。なお、SASP低用量群においても、対照群と比較すると、関節炎の発症が抑制される傾向にあった(カイ2乗検定、 $p < 0.250$)。

図4 関節炎スコアの経時的変化



初回免疫後12週目の時点での対照群、SASP処理群の各関節組織のHE染色を行ない、組織学的な関節炎の評価を行った(図5)。SASP高用量投与群のマウスでは、正常マウスと同様、明らかな炎症細胞浸潤は認められず、軟骨細胞表面も保たれている(図5a, b, c; cはbにおける関節部強拡大)。しかしながら、滑膜部分に着目すると、SASP高用量群においても、軽度の滑膜細胞肥厚が認められた(図5d)。

図5. D1CC マウスにおけるコラーゲン誘発関節炎の病理組織像



D. 考察

D1CC 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。

現在抗リウマチ薬として使用されている SASP を実際に投与すると関節炎の病態進行が大きく改善された。病理学的な解析から、炎症細胞浸潤や関節軟骨部における破壊が見られないことが明らかとなった。一方滑膜部においては、若干の肥厚が残る事も明らかとなった。この様に D1CC マウスを用いることで、抗リウマチ薬の具体的な効果を評価するモデル動物として利用できることが示唆された。

今後は、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ことが期待される。

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。

E. 結論

D1CC マウスは 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 Col2 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が誘導された。今後このマウスでの滑膜組織について、NF- κ B などを始めとする免疫・炎症応答シグナルの活性化、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。

SASP を含む DMARDs 系の薬剤は関節破壊の進行を防止する作用もみられることから、骨びらんが出現する以前での投与、または RA の罹患期間が短いほど、DMARDs の効果が高いことが示されている。D1CC マウスは、従来法である CIA と比べ、炎症期間が長く続き、DMARDs 等の遅延性の抗リウマチ薬の効果の検討に使用し易い事が明らかとなった。また SASP は抗体産生を強く抑制する作用を持たず、免疫応答から炎症応答、および滑膜細胞の増殖に到る過程に作用している事が示唆された。

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) Tetsuka T, Uranishi H, Sanda T, Asamitsu K, Yang J-P, Wong-Staal F, Okamoto T. RNA helicase A interacts with nuclear factor- κ B p65 and functions as a transcriptional coactivator. *Eur J Biochem* 271: 3741-3751, 2004.
- 2) Sanda T, Iida S, Ogura H, Asamitsu K, Murata T, Bacon KB, Ueda R, Okamoto T. Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Clin Can Res* 11: 1974-1982, 2005.
- 3) Ota S, Kanazawa S, Kobayashi M, Otsuka T, 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* 299: 189-198, 2005.
- 4) Tanaka K, Hasegawa J, Asamitsu K, Okamoto T. Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor κ B inhibitor parthenolide. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 624-630, 2005.
- 5) 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* 15: 79-86, 2005.
- 6) Okamoto T, Sanda T, Asamitsu K. NF- κ B signaling and carcinogenesis. *Curr Pharm Design*, in press.
 - 7) Sanda T, Asamitsu K, Ogura H, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R, Okamoto T. Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Leukemia* 20: 590-598, 2006.
 - 8) Victoriano AFB, Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Barzaga NG, Okamoto T. Inhibition of HIV-1 replication in latently infected cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 547-555, 2006.
 - 9) Kanazawa S, Ota S, Sekine C, Tada T, Otsuka T, Okamoto T, Sonderstrup G, Peterlin BM. Aberrant MHC class II expression in mouse joints leads to arthritis with extra-articular manifestations similar to rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 39: 14465-14470, 2006.
 - 10) Okamoto T. NF- κ B and rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6 (4): 359-372, 2006.
- ## 2. 学会発表
- 1) Takashi Okamoto. International Meeting of the Institute of Human Virology, 2005年8月29日～9月2日, Baltimore, USA.
 - 2) 寺西太, 竹山廣光, 赤毛義実, 金澤智, 真辺忠夫, 岡本尚. 腹膜中皮細胞表面の接着分子ヒアルロン酸が膵癌細胞の運動能と浸潤能に及ぼす促進効果と分子標的としてのPI3Kの役割. 第64回日本癌学会学術総会, 平成17年9月14日～16日, 札幌.
 - 3) 高橋なを子, 小林真哉, 梶野真一, 友田圭介, 金澤智, 今井健一, 岡本尚. 53BP2蛋白によるアポトーシスはミトコンドリア経路を介する. 第64回日本癌学会学術総会, 平成17年9月14日～16日, 札幌.
 - 4) 三田貴臣, 飯田真介, 上田龍三, 岡本尚. 成人T細胞白血病に対する新規IKK阻害剤の抗腫瘍作用. 第64回日本癌学会学術総会, 平成17年9月14日～16日, 札幌.
 - 5) Ann-Florence B Victoriano, Kaori Asamitsu, Yurina Hibi, Kenichi Imai, Nina G. Barzaga, and Takashi Okamoto. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in latently infected cells by a novel IKK inhibitor. 第53回日本ウイルス学会, 平成17年11月20日～22日, 横浜.
 - 6) 今井健一, 岡本尚. 転写因子AP-4によるHIV発現抑制機構. 第53回日本ウイルス学会, 平成17年11月20日～22日, 横浜.
 - 7) 今井健一, 岡本尚. 転写因子AP-4によるHIV発現抑制機構. 第19回日本エイズ学会学術集会・総会, 平成17年12月1日～3日, 熊本.
 - 8) 今井健一, 朝光かおり, 石橋高宏, 岡本尚. 転写因子AP-4によるHIV発現抑制機構. 第28回日本分子生物学会年会, 平成17年12月7日～12月10日, 福岡.
 - 9) Okamoto T. Cytokine Synthesis Inhibitors/Modulators. The 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2005年12月15日～20日, ハワイ.
 - 10) Okamoto T. Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoageing by NF κ B inhibitors. The Program of the Vth International Symposium on Aesthetic Medicine, 2006年2月18日, ロシア.
 - 11) 金澤智, 太田周介, 関根知世子, 大塚隆信, 岡本尚. 関節リウマチ様病変を示す新規トランスジェニックマウス(D1CCマウス)の解析. 日本分子生物学会2006フォーラム, 2006年12月6日～8日, 名古屋.
- ## 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)
 - 3) 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2006-510787) 出願中
 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と新規治療薬に関する研究

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

RA の病態の本質は、(1)過剰増殖機転、より本質的には(2)炎症が遷延化して変質性転化を遂げる機転にある。RA は抗原特異的に惹起されるが、炎症・関節破壊の進行には関節局所の滑膜間葉系細胞が重要で、*c-fos* 遺伝子の発現亢進に駆動されて関節基質を破壊する。*c-Fos* は *c-Jun* とダイマーを作り遺伝子プロモーターの AP-1 サイトに結合して遺伝子を発現させるが、この際 *c-Fos* の支配下にある遺伝子のほぼ全てが RA に必須の $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 等の炎症性サイトカインと関節破壊に不可欠の MMP である点が注目され、実際 *c-Fos* は RA の関節で増加し、作用点 (AP-1 サイト) を拮抗的に阻害すると関節炎は抑制される。すなわち、*c-Fos/AP-1* 過剰が滑膜の腫瘍様増殖と骨粗鬆症など RA に特徴的病変を形作る。そこで私達は、RA の疾患遺伝子を見つける研究と RA の病態の本質をなす *c-fos/AP-1* に対する低分子阻害剤の開発研究を行なった。

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 13.9 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 上の仮想エキ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 エキソン、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。

c-Fos の DNA への結合の溶液中 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薬物をコンピュータ上で CADD (computer-assisted drug design) により、分子設計した薬剤はマウス II 型コラーゲン関節炎(CIA)をその発症前及び発症後いずれの投与においても最大 30mg/Kg の用量で完全に抑制した。とくに関節破壊は発症前投与で 100%防止された。IL-1 β 等の炎症性サイトカイン及び関節破壊に関わる MMP3 等は血中で蛋白と mRNA レベルで、関節局所で mRNA レベルで関節炎に比例して抑制された。T-5224 は *in vitro* で滑膜細胞 SW982 の主要産物 MMP-1、MMP-3、IL-6、 $\text{TNF}\alpha$ 及び軟骨細胞 SW1353 の主要産物 MMP-3、MMP-13 を IC50 7.1~12.4 μM にて抑制された。抑制はルシフェラーゼアッセイ下に AP-1 特異的で、使用用量を超えて副作用を認めなかった。本研究から、関節炎初期には IL-1 β が作動するのであり、*c-Fos/AP-1* 阻害はこの IL-1 β と MMP を炎症初期に特異的に阻害する初めての薬剤であること

が分かった。IL-1 β の特異的阻害作用を有する c-Fos/AP-1 阻害剤には、直接 MMP に作用する点からしても、RA の治療薬として臨床的著効が期待される。

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ジオポエチン 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。

こうした遺伝学研究とは別に、RA の病態の本質は、(1)過剰増殖機軸、より本質的には(2)炎症が遷延化して変質性転化を遂げる機軸にある。RA は抗原特異的に惹起されるが、炎症・関節破壊の進行には関節局所の滑膜間葉系細胞が重要で、滑膜細胞は炎症性サイトカ

インを産生する他、パンヌスの構成要素²⁻⁴⁾として RA の軟骨表面に沈着したフィブロネクチンに誘導されて、或いはまた内的に *c-fos* 遺伝子の発現亢進に駆動されて関節基質を破壊する。こうした過剰増殖は *c-fos/AP-1* の発現亢進により惹起される。*c-fos* 遺伝子は増殖性のリンパ系細胞の G1 期に一過性に増加するほか間葉系細胞に持続的に発現している。c-Fos は c-Jun とダイマーを作り遺伝子プロモーターの AP-1 サイトに結合して遺伝子を発現させる。注目すべきは、c-Fos の支配下にある遺伝子のほぼ全てが RA に必須の TNF α 、IL-1 β 、IL-6 等の炎症性サイトカインと関節破壊に不可欠の MMP である点で、実際 c-Fos は RA の関節で増加し、作用点 (AP-1 サイト) を拮抗的に阻害すると関節炎は抑制される。*c-fos* の過剰は骨粗鬆症を誘導し、より本質的には炎症を変質性転化させる。すなわち、c-Fos の過剰が直接 Wee1 kinase を増加させて細胞分裂の開始シグナル MPF (mitosis promoting factor) を抑制して増殖するが分裂しない腫瘍様増殖 (変質性転化) を形作る。私達は炎症性サイトカイン及び関節破壊に必須の MMP を亢進させる扇の要に位置し、且つ RA の病態の本質をなす *c-fos/AP-1* に対する経口投与可能な低分子阻害剤を開発した。

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。また、私達と北里大学・広野修一教授、富山化学工業 (株) は共同研究 (科学技術振興機構 20 億円) で、c-Fos の DNA への結合の溶液中 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薬物をコンピュータ上で CADD (computer-assisted drug design) により分子設計した。

(倫理面への配慮)

研究は本学医学研究倫理委員会および遺伝子研究倫理委員会の承認の元に行われた。

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13.9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った。

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 (*Arthritis Rheum* 50(Suppl9): S351,2004)、デスドメインを欠く変異DR3分子が生成することを見出した。

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NF κ B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、治療的に正に視点から、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クローン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 (PKC/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遺伝子が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)TNFα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