

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究

関節リウマチ関連遺伝子の同定と  
その機能解析、相互関連の研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 本 一 彦

平成20年3月



# I. 総括研究報告

## 関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析、相互関連の研究

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

**研究要旨** 患者個人と社会に重大な影響を与えている関節リウマチの疾患感受性遺伝子をゲノムワイドの一塩基多型（SNP）関連解析で進めた結果、複数の遺伝子を同定できた。これらの遺伝子の機能を詳細に分析することが、RAの病因の検索、新しい治療法の開発、オーダーメイド医療を推進するために重要と考えられる。そこで個々の遺伝子の機能を解析することを中心に研究を進め、さらに患者情報との対比、遺伝子同士の相互作用などを検討するためのサンプル収集も進めた。

### 分担研究者

井上 和彦 東京女子医科大学東医療センター  
整形外科 教授

山田 亮 東京大学医科学研究所附属  
ヒトゲノム解析センター ゲノム機能  
解析分野 准教授

高地 雄太 理化学研究所横浜研究所  
遺伝子多型研究センター 研究員

岩倉 洋一郎 東京大学医科学研究所ヒト疾患モ  
デル研究センター細胞機能研究分野  
教授、センター長

沢田 哲治 東京大学医学部附属病院  
アレルギーリウマチ内科 助教

川畑 仁人 東京大学医学部附属病院  
アレルギーリウマチ内科 助教

神田 浩子 東京大学医学部附属病院  
アレルギーリウマチ内科 助教

藤尾 圭志 東京大学医学部附属病院  
アレルギーリウマチ内科 助教

く示唆されている。遺伝的要因ではHLA-DRの解析が進んでいるが、これは全遺伝的要因の約1/3程度を説明するだけであり、それ以外の複数の遺伝的要因が関与していることが示唆されている。これらの遺伝的要因の解明がRAの病態や新しい治療法の開発につながると期待されている。しかし、種々の制約によりそれらを同定することは容易でなく、一般的な候補遺伝子のアプローチの限界も指摘されている。この点で、仮説なしの全ゲノム解析が1つの方向とされており、特にケース（患者集団）とコントロール（健常人集団）での多型頻度を比較する関連解析が今後の多因子疾患の解析に有望視されており、2007年には生命科学の最も著しいブレークスルーの分野の1つとされている（Science 318:1842, 2007）。

我々はゲノムワイドに一塩基多型（SNP）での関連解析を推進している理化学研究所遺伝子多型研究センターと共同で、RA関連遺伝子としてPADI4, SLC22A4, RUNX1, FCRL3などを同定し報告した（Nature Genetics 34:395-402, 2003. Nature Genetics 35:341-348, 2003. Nature Genetics 37:478-485, 2005.）。しかし、これまでの研究は

### A. 研究目的

関節リウマチ（RA）は原因不明の多発関節炎を主体とした全身性疾患であり、遺伝的影響が強

RAに関係する遺伝子の重要性を明らかにした  
だけであり、どうしてRAの病態と関係があるの  
か、複数の関連遺伝子間に相互作用があるのか  
、これらの遺伝子多型の組み合わせでRAの疾病  
としてタイプが異なるのか、治療薬に対する反  
応に違いがあるのか、などについては不明のま  
まである。

そこで本研究では、まず、それぞれの遺伝子  
の機能を詳細に探索し、その機能に関連する分  
子群とその遺伝子多型を明らかにすることを  
第1の目標とした。細胞への遺伝子移入や  
siRNAによる機能抑制実験に加えて、トランス  
ジェニックマウスやノックアウトマウスの作  
成を進めた。さらに発症から経過が十分に把握  
できている症例のDNAサンプルを収集するこ  
とを含めて、複数の関連遺伝子間の相互作用、  
HLA-DR 遺伝子型との関係を明らかにし、RA  
の疾患としてのタイプ分け、治療薬との反応な  
ど、ゲノム情報を今後のRA診療に直結させる  
システムを構築することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 同定したRA関連遺伝子機能解析

#### 1) PADI4 遺伝子とRAの関係についての機能 解析

PADI4がシトルリン化する蛋白を同定する  
目的でcDNAライブラリーのスクリーニングな  
どを行い、数個の候補分子を同定した。また  
PADI4のノックアウトマウスの作成、B6へのバ  
ッククロスを進めた。さらに、ノックアウトマ  
ウスを用いてコラーゲン誘発関節炎モデルを作  
成し、その病変を解析した。また、このマウス  
を用いて抗PADI4モノクローナル抗体を作成す  
ることを試みた。これを用いてPADI4を標的と  
した治療試薬として使用可能か否かを検討す  
る予定である。さらに、PADI4の細胞内での役  
割を細胞生物学的手法を中心に研究した。

#### 2) SLC22A4とRA炎症に関する機能解析

平成17年度に抗酸化物質であるエルゴチ  
オネインがSLC22A4によりトランスポートさ  
れることがドイツのグループより報告された。  
エルゴチオネインは抗酸化作用により、細胞内  
のNF- $\kappa$ Bを中心としたシグナル伝達に強く影響  
を与えることが予想される。そこで、SLC22A4  
を強発現する細胞株、siRNAにより発現抑制さ  
れた細胞株を数種作成することに成功した。さ  
らに細胞外に一定量のエルゴチオネインを添  
加することで、細胞の反応性と細胞内のエルゴ  
チオネイン濃度の相関を検討した。標的細胞と  
して単球を中心とした免疫担当細胞を用い、  
TNFなどの外部刺激によりIL-8などの遺伝子発  
現がどのように影響を受けるかを解析するこ  
とで、SLC22A4の発現量と炎症、免疫応答の関  
係を明らかにすることを目標とした。

#### 3) FCRL3と自己免疫に関する解析

FCRL3の機能を明らかにするため、FCRL3の  
トランスジェニックマウスおよびノックアウ  
トマウスを作成した。これらのマウスの免疫機  
能を詳細に調べた。またFCRL3に対するモノク  
ローナル抗体により免疫応答の阻害が可能か、  
自己免疫疾患モデルが治療可能かを検討した。  
また、細胞へのシグナルを検討するため、細胞  
表面部分を機能の判明しているFc $\gamma$ RIIB分子と  
して、細胞内部分をFCRL3とするキメラ分子を  
作成し、細胞内へのシグナルの詳細を検討した。

### 2. 遺伝子相互作用の研究

2つ以上の遺伝子の組み合わせによる関連  
を検討した。具体的には既にゲノムワイドスク  
リーニングのケース・コントロールで検出され  
ている複数のSNPについて、それぞれの遺伝子  
型の複数の組み合わせで形成される遺伝子多  
型頻度をケース・コントロールで比較する作  
業を行い、疾患関連遺伝子として検出されうる多

型の組み合わせを検討した。HLA-DRの遺伝子型についてもこれに加えて相互作用を解析した。

### 3. 臨床情報との関係の研究

新たなRA患者のDNAサンプルの収集の為に組織作りと倫理委員会への申請を行った。申請した研究計画に従い、RA発症より10年以上経過したRA患者群を対象に、リウマトイド因子、シトルリン化蛋白抗体(抗CCP抗体)、滑膜炎の指標であるMMP-3などの検査データ、X線検査による骨破壊の程度の評価、治療反応性などの臨床データとともにDNAサンプルの提供を受け、これらの層別化と遺伝子多型の比較を行う予定である。

#### 倫理面への配慮

研究対象者には人権擁護上の配慮を行った上で、研究方法による不利益、危険性とそれらを排除する方法等について十分なインフォームドコンセントを行った。実験動物に対しては過度の苦痛を与えないなど、動物愛護上の十分な配慮を行った。なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究、免疫研究、並びに臨床研究に関する倫理指針等は徹底して遵守した。

### C. 研究結果

#### 1. 同定したRA関連遺伝子機能解析

ライブラリーを用いたPADI4がシトルリン化する蛋白を同定では、細胞外蛋白のI型コラーゲン、核内の転写因子であるeIF4G1など複数の蛋白を同定した。これらのリコンビナント蛋白を作成し、RA患者との反応を検討したところ、感度はそれぞれ50%程度であったが、特異度は90%以上であり、既に市販されているシトルリン化環状ペプチドと同等の特異度を示し、これらの蛋白が実際の免疫応答の標的になっ

ていることが示された。

PADI4のノックアウトマウスはほぼB6へのバッククロスが完成した。II型コラーゲンでの免疫を行ったが、現在のところ関節炎の頻度にコントロールと比較して差が見いだせていない。今後、各種パラメータを用いて、検討する予定である。

SLC22A4に関しては、日本人の別の大規模コホートでのRAとの関連を追認した(論文投稿中)。しかし、機能研究については、遺伝子導入細胞の不安定性によると思われる細胞内シグナルの結果のばらつきがあり、現在のところ明確な結論に到達できていない。

FCRL3については、細胞外を既にリガンドが分かっているFcγRIIBに置き換えたキメラ分子を作成し、細胞内ドメインのシグナル機能を検討した。その結果、FCRL3の細胞内ドメインは、B細胞受容体(BCR)とコライゲートした場合、主としてITIMとして働きBCRシグナルを抑制することで、Ca<sup>2+</sup>イオンの流入を抑制やアポトーシスを抑制していることが判明した(論文投稿中)。

ヒトFCRL3と相同の分子はマウスのFcr15と考えられることから、この遺伝子のトランスジェニックマウスとノックアウトマウスを作成した。トランスジェニックマウスでは、T細胞依存のおよび非依存の抗原に対するIgMの免疫応答が亢進していた。現在、ノックアウトマウスが完成し、B6にバッククロスしている。

#### 2. 遺伝子相互作用の研究

複数の遺伝子多型について試行をおこなったが、現存のプログラムとコンピュータでは解析時間が遅く、現実的でないことが判明、より良いシステムの開発が必要であることが判明した。

### 3. 臨床情報との関係の研究

DNA サンプルの充実、種々の患者の情報とともにリウマトイド因子、抗 CCP 抗体、HLA-DR のタイピングについて情報の充実を進めている。現在、RA のサンプルは 2000 以上となっている。

#### D. 考察

RA の遺伝要因の検索は世界的に進められており、候補遺伝子解析だけでなく全ゲノムを対象とした疾患遺伝子解析の必要性が提唱されている。これに関して、一遺伝子多型 (SNP) の解析を主体としたケース・コントロールの関連解析が注目され始め、ハプロタイプブロック解析などを加えながら、種々の疾患について世界的に解析が進められている。この患者集団と対照集団での頻度の差を解析する関連解析は、集団全体の組み換え情報が反映されるので、かなり狭い領域に責任領域を特定出来る可能性がある。この方法を用いて、我々は世界に先駆けて RA 関連遺伝子を複数見だし報告している。

以上のようにケース・コントロール関連解析の有用性が最近 3 年ほどの間に世界的にも認識され、欧米でも政府プロジェクト、ベンチャーなどで盛んに行われるようになってきた。ただし、この方法は、ケースとコントロールの両集団が遺伝的に同質でないと偽陽性を生む可能性が高くなる。この点でわが国は比較的均一のゲノム構造であることが我々の試算でも明らかであり、欧米に比べて解析に有利であろうと考えられる。またこのように検出される疾患関連遺伝子には民族差があることも重要で、例えば PADI4 は日本、韓国では我々とは独立した研究組織による追試で確認されているが、英国では頻度差はあるが統計学的有意差を示すデータが得られていない。逆に米国から発表され

た RA 関連遺伝子 PTPN22 遺伝子多型は、日本人、中国人では多型そのものが存在しない。このような民族間の相互比較情報は重要である。そこで、米国、韓国、オランダなどの研究者とともに共同研究で短時間に情報交換するシステムを立ち上げつつある。

PADI1 はペプチド中のアルギニンをシトルリンに変換する酵素である。一方我々の解析とは別に欧州の研究者が抗シトルリン化自己抗体が RA に非常に特異性が高いことを報告していた。これら 2 つの研究から、現在では蛋白のシトルリン化とそれに対する免疫応答が RA の原因または増悪と密接に結びついていることが世界的にも認識されている。この分子と RA との関連を詳細に検討することが、RA の病因・病態を解析する上で極めて重要になると考えられる。

第 1 染色体の 1q23 領域に FCRL3 遺伝子を同定、報告した (Nature Genetics 37:478-485, 2005)。この遺伝子産物は成熟 B 細胞、特にリンパ節の胚中心のセントロサイトに強く発現している。プロモーターに存在する遺伝子多型が発現量と相関し、これが自己抗体産生と強く関係していることが判明した。さらに RA だけでなく、全身性エリテマトーデスや自己免疫性甲状腺炎など複数の自己免疫疾患と関連していることが明らかになっている。今後、ノックアウトマウスの解析を加えて、より詳細な機能を明らかにしている必要がある。

#### E. 結論

患者個人と社会に重大な影響を与えている RA の疾患感受性遺伝子として、ゲノムワイドの一塩基多型 (SNP) 関連解析で進めた複数の遺伝子について遺伝子の機能を詳細に分析した。RA の病因の検索、新しい治療法の開発、オーダーメイド医療を推進するために重要と考えら

れる。さらに患者情報との対比、遺伝子同士の相互作用などを検討するためのサンプル収集も進めた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ・ Yamamoto K, Okamoto A, Fujio K. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 7:359-367, 2007.
- ・ Suzuki M, Komiya A, Yoshimura-Uchiyama C, Kawakami A, Koketsu R, Nagase H, Iikura M, Yamada H, Ra C, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. IgE- and FcεRI-mediated enhancement of surface CD69 expression in basophils: role of low-level stimulation. *Int Arch Allergy Immunol*. 143:56-59, 2007.
- ・ Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Shima Y, Takada K, Matsumoto I, Saito K, Koike T. A multicenter phase I/II trial of rituximab for refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 17:191-197, 2007.
- ・ Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci*. 1108:323-339, 2007.
- ・ Takizawa Y, Kanda H, Sato K, Kawahata K, Yamaguchi A, Uozaki H, Shimizu J, Tsuji S, Misaki Yoshikata, Yamamoto K. Polymyositis associated with focal mesangial proliferative glomerulonephritis with depositions of immune complexes. *Clin Rheumatol*. 26: 792-796, 2007.
- ・ Okunishi K, Dohi M, Fujio K, Nakagome K, Tabata Y, Okasora T, Seki M, Shibuya M, Imamura M, Harada H, Tanaka R, Yamamoto K. Hepatocyte

growth factor significantly suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol*. 179:5504-5513, 2007.

- ・ Fujio K, Okamura T, Okamoto A, Yamamoto K. T cell receptor gene therapy for autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 10:222-232, 2007.
- ・ Yamamoto K, Yamada R. Lessons from a Genomewide Association Study of Rheumatoid Arthritis. *N.Engl.J.Med*. 357:1250-1251, 2007.
- ・ Fujio K, Okamura T, Okamoto A, Yamamoto K. T cell receptor and anti-inflammatory gene modulated T cells as therapy for auto immune diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 1110:222-232, 2007.
- ・ Shoda H, Fujio K, Yamamoto K. Rheumatoid Arthritis and Interleukin-32. *Cell Mol Life Sci*. 30:398-403, 2007.
- ・ Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Interleukin-17B and interleukin-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol*. 179: 7128-36, 2007.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## II. 分担研究報告

## 関節リウマチの生物学的製剤による滑膜組織および骨軟骨組織に関する研究

分担研究者 井上 和彦 東京女子医科大学東医療センター 整形外科 教授

**研究要旨** 関節リウマチ(RA)に対して近年、生物学的製剤による治療が行なわれているが、滑膜組織の変化および骨破壊抑制効果について明らかでない。インフリキシマブを使用中関節鏡下滑膜切除術および人工関節置換術時に採取した滑膜および骨軟骨組織を免疫組織学的に解析した。インフリキシマブ効果減弱例における滑膜組織は血管新生性に富み、TNF $\alpha$  はほぼ完全に抑制され、IL-6 の発現は増加していた。MMP-3 は滑膜表層に CD20 は滑膜間質に発現していた。骨髄組織においてインフリキシマブ使用により細胞成分に富む隔壁の肥厚がみられ、type I collagen、RANKL、OPG、OPN 陽性であり、特に CD68 の増加が認められた。以上よりインフリキシマブを使用の RA の滑膜では TNF $\alpha$  は抑制されるが効果減弱においては IL-6 の発現がみられ、骨髄変化では隔壁の肥厚を伴う骨髄幹細胞の組織球分化促進が考えられた。さらにインフリキシマブで治療した関節リウマチ 245 例において 21 例にインフリキシマブ投与中止した寛解となった(8.6%)うち 1 例の滑膜組織では IL-6 の発現は増加していなかった。寛解における骨破壊抑制効果はレントゲン上手指関節において改善傾向があったが骨組織においても骨梁の再生が認められた。

### A. 研究目的

RA の治療は近年寛解を目標とすることが叫ばれており、従来の抗リウマチ薬にない治療効果、特に骨関節破壊抑制さらには改善効果が臨床で認められている。RA は発症から 5 年で 75% が骨関節破壊がおこるとされており、これをいかに防止するかが RA の治療では重要である。欧米で広く用いられている臨床評価 Disease Activity Score (DAS) 28 をにより寛解の指標が獲得できる。こうした中で我が国では 2003 年 7 月より RA に対してインフリキシマブの使用が開始された。インフリキシマブは、ヒト TNF $\alpha$  をマウスに免疫し、マウスが産生した抗ヒト TNF $\alpha$  抗体の V 領域の遺伝子とヒト IgG1 $\kappa$  鎖の C 領域の遺伝子を連結し作成されたキメラ

型抗 TNF $\alpha$  モノクローナル抗体である。TNF $\alpha$  は単球やマクロファージから産生され TNF $\beta$  は主にリンパから産生される。TNF $\alpha$  は細胞膜上の TNF レセプターである p55 と p75 に結合し NF $\kappa$ B を介して炎症性サイトカインが産生される。インフリキシマブはこの TNF $\alpha$  と特異的に結合することにより、TNF $\alpha$  が標的細胞上の TNF $\alpha$  レセプターである p55 と p75 に結合するのを阻害し、結果的に TNF $\alpha$  の生物学的作用を抑制する。こうした分子生物学的作用により临床上インフリキシマブ投与により 2 週間で 97.5%の症例で c-reactive protein (CRP)が 50%以下に減少する。現在、骨関節破壊抑制効果については現在のところ報告は少ない。当施設においてインフリキシマブを使用して治療した 245

例のうち寛解に至ってインフリキシマブを中止した症例は 21 例であり、このうち中止時に MMP-3 陽性や RAPA 高値の 4 症例は CRP の陽性となり再燃した。寛解に至らない症例についてもレントゲン上骨破壊抑制さらには改善まで認めている症例がある。こうした生物学的製剤の骨破壊抑制効果の機序解明は RA の病態を治療の側から解明する一つの手段として期待できる。インフリキシマブの投与により骨および軟骨の修復について現在のところ詳細な研究報告はない。本研究は RA に対するインフリキシマブによる骨軟骨修復機所を臨床的評価、画像評価、手術時標本による組織学的評価、分子生物学的手法を用いて統計学的に解明することを目的とする。

## B. 研究方法

RA においてインフリキシマブで治療した症例の臨床評価 DAS28, CRP(dl/ml), 抗リウマチ因子 (RAPA)、血清サイトカイン IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6、を計測し両手単純レントゲン写真を van der heijde Sharp score (van der Heijde. J Rheumatol 2000;27:261-3)にて比較検討を行う。インフリキシマブ投与中に施行した人工関節置換術においてインフォームドコンセントを得た上で滑膜、骨、軟骨を採取し組織学的にサイトカイン発現、類骨増生、破骨細胞、骨芽細胞の増加の有無、軟骨損傷部の修復の有無を TNF- $\alpha$ 、IL-6、OPG、RANKL、CD20、MMP-3、type I collagen、CD68、TRAP の免疫染色および Alizarin-red 染色にて Ca 沈着を調べる。

## C. 研究結果

RA に対して生物学的製剤を用いて治療した患者血清中の IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  濃度は IL-1 $\beta$ 、

TNF- $\alpha$  は有意な変化を認めなかったが、IL-6 は生物学的製剤投与前と比べて有意に減少を認めた。これは抗 TNF- $\alpha$  抗体による治療により TNF- $\alpha$  の濃度は血清中では変化せず IL-6 のみ炎症反応改善に関与していたことを示している。この IL-6 の変化は CRP の炎症反応の有意な減少と相関を認めた。インフリキシマブ効果減弱例における滑膜組織は血管新性に富み、TNF $\alpha$  はほぼ完全に抑制され、IL-6 の発現は増加していた。MMP-3 は滑膜表層に CD20 は滑膜間質に発現していた。骨髄組織においてインフリキシマブ使用により細胞成分に富む隔壁の肥厚がみられ、type I collagen、RANKL、OPG、OPN 陽性であり、特に CD68 の増加が認められた。以上よりインフリキシマブを使用の RA の滑膜では TNF $\alpha$  は抑制されるが効果減弱においては IL-6 の発現がみられ、骨髄変化では隔壁の肥厚を伴う骨髄幹細胞のマクロファージ分化促進が考えられた。さらにインフリキシマブで治療した関節リウマチ 245 例において 21 例にインフリキシマブ投与中止した寛解となった(8.6%)うち 1 例の滑膜組織では IL-6 の発現は増加していなかった。

## D. 考察

RA の治療においてインフリキシマブにより効果減弱症例では滑膜組織から IL-6 の増加がみられた。このことは IL-6 を抑制する治療の併用が有効であることを示唆している。また、B リンパ球マーカーで CD20 の増加は効果減弱症例における HACA の増加や RAPA の増加など抗原抗体反応の活性化を意味しており免疫陽性薬の併用などの有効性も考えられた。骨髄組織における細胞成分に富む隔壁の肥厚は CD68 の発現細胞増加があり、骨髄幹細胞から組織球系細胞への分化促進が考えられた。TRAP 陽性

細胞は少なく破骨細胞の増加は認めなかった。Type I collagen はよく染まっており Alizarin-red 染色にて Ca 沈着を認めた。以上よりインフリキシマブにおいて骨組織の代謝促進がみられ組織球の増加を特徴としていることは、RA の病態の場が関節だけでなく骨髄にもあり組織球増加により免疫反応促進とも考えられる。

## E. 結論

インフリキシマブを使用の RA の滑膜では T 効果減弱例においては  $\text{NF-}\alpha$  は抑制されるが IL-6 の発現がみられ、B リンパ球増加を伴っていた。骨髄変化では隔壁の肥厚を伴う骨髄幹細胞の組織球分化促進が認められた。

## F. 健康危惧情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・ Histological changes in bone marrow after treatment of infliximab for rheumatoid arthritis.

Kanbe K, Inoue K, Inoue Y, Suzuki Y.

Clin Rheumatol. 2007 Nov 27.

・関節リウマチに対するインフリキシマブによる寛解導入療法。

神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、鈴木祐孝。

日本リウマチ・関節外科学会誌  
26:393-401, 2007.

### 2. 学会発表

・神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、鈴木祐孝。関節リウマチに対する生物学的製剤と手術治療。日本リウマチ学会2007. 4. 26-29. パシフィコ横浜

・神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、高山篤、早田浩一朗。関節リウマチに対するインフリキシマブによる治療成績。日本リウマチ学会2007. 4. 26-29. パシフィコ横浜

・神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、鈴木祐孝。関節リウマチに対するインフリキシマブ使用における手術治療の意義。日本リウマチ・関節外科学会2007.11.9-10.品川プリンス

・ K. Kanbe, K. Inoue, J. Chiba, Y. Inoue.

RISK FACTORS OF INFECTION AFTER ORTHOPAEDIC SURGERY WITH INFLIXIMAB FOR RHEUMATOID ARTHRITIS.

EULAR, Barcelona, Spain, 13-16, June 2007.

・ K. Inoue, K. Kanbe, J. Chiba, Y. Inoue.

EFFICACY OF ARTHROSCOPIC SYNOVECTOMY FOR THE EFFECT ATTENUATION CASES OF INFLIXIMAB IN RHEUMATOID ARTHRITIS.

EULAR, Barcelona, Spain, 13-16, June 2007.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## 複合遺伝性疾患としての関節リウマチの遺伝因子解析の理論研究とその実践的活用

分担研究者 山田 亮

東京大学 医科学研究所 附属ヒトゲノム解析センター ゲノム機能解析分野 准教授

**研究要旨** 関節リウマチには有力な疾患感受性遺伝子とそのリスク多型が報告されている。本研究において、それら複数の疾患感受性遺伝子の複合効果の解析手法を研究し、関節リウマチの病理を遺伝学の立場から解明するとともに、関節リウマチ以外の複合遺伝性疾患における感受性遺伝子の相互作用に関する解析手法を開発・実装に関する研究を行った。

### A. 研究目的

関節リウマチの発症リスク多型はその相対危険度がたかだか 1.5 程度のものが複数あり、それらのいくつかは、レプリケーションスタディによって確かめられてきている。これらのリスク多型のリスクの強さは民族差があることも判明してきた。本研究では、今年度の課題として、リスクの強さに差がある場合を含めた、複数の関連検定データを統合する手法のゲノムワイドアソシエーションスタディ文脈での検討と、ツールの実装を行うこととした。疾患関連遺伝子マッピングに用いる多型として一塩基多型（SNP）に加えて、コピーナンバー多型（CNP）の重要性の認識が大きくなったことを受け、CNP 用の関連検定手法についての検討も加えることとした。

### B. 研究方法

既存の分割表検定手法とそれを統合するメタ・アナリシス手法の一塩基多型ケース・コントロールスタディデータ形式（2 x 3 分割表）での挙動を、シミュレーションデータを用いて検討し、その検討結果を反映させたツールを実装する。

CNP データの関連検定手法については、SNP データにおける変数の扱いを一般化することで、手法を拡張し、その適切性をシミュレーションデータを用いて行う。

（倫理面への配慮）

解析ツールの開発にあたり、個人識別情報の漏洩に配慮し、匿名化後データのみを用いた解析環境を想定した開発を行った。

### C. 研究結果

2 x 3 分割表関連検定にあたっては、遺伝モード（優性、劣性、アディティブ）に関する自由度 1 の検定と、モデルフリーの自由度 2 の検定の間の相互関係を漸近近似検定と正確確率検定の両方について、その統計量特性について検討した。それにより、遺伝モードに依存しない関連検定を SNP ごとにただひとつ選択する可能性が示唆された。

メタ・アナリシスに関しては、民族横断的なデータ統合においては、相対危険度の異質性を考慮した手法の採用が主流となるが、多型構造が特に多様な領域のマーカーにおけるデータを統合する場合には、従前の相対危険度異質性の考慮のみでは不十分である可能性を示唆する予備的データを得た。

CNP データにおけるケース・コントロール関連検定においては、SNP における、アディティブモデルのトレンド検定を拡張した形式の検定手法が有用であることが示唆されたが、その検定手法と、既発表の CNP 関連検定手法との特性比較を行い、解析モデルとして、トレンド検定（拡張型）の有用性を示唆する予備的データを得た。

SNP・CNP とともに、これらを用いた連鎖不平衡マッピングにおいては、連鎖不平衡を利用することから、これを数理的に取り扱う手法の開発も有用である。本研究課題では、関節リウマチ関連遺伝子連鎖不平衡マッピングのための解析手法の開発の一環として、連鎖不平衡状態の幾何学的取り扱いに関して検討した。

これらの検討結果を踏まえた解析手法は、デー

タ解析用ツールとして実装し、広く一般にも利用できるよう、研究室の情報公開用サーバにて、Java Applet として公開するとともに、配布可能な形式 (Java Application) としても公開した。

#### D. 考察

SNP および CNP を用いた疾患遺伝子解析はますます盛んである。その解析手法には、従来の統計検定手法を遺伝疫学・多型マッピングに適した形式に修正して使用することが望ましい。本研究では、その修正に関して、体系的に検討を加え、適切な修正を加えた上で、一般に公開し、広く、遺伝疫学研究者の便宜を図っていると考えられる。

#### E. 結論

疾患関連遺伝子マッピングのためのケース・コントロール関連検定手法を体系的に検討し、ツールの開発・公開に到った。

#### F. 健康危機情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Yamamoto, K. & Yamada, R. Lessons from a Genomewide Association Study of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 357:1250-1251, 2007.

・ Yamada, R. & Yamamoto, K. Mechanisms of disease: genetics of rheumatoid arthritis--ethnic differences in disease-associated genes. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 3:644-50, 2007.

・ Suzuki, A., Yamada, R. & Yamamoto, K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1108: 323-39, 2007.

・ Ryo Yamada, F.Matsuda. A novel method to express SNP-based genetic heterogeneity,  $\Psi$ , and its use to measure linkage disequilibrium for multiple SNPs,  $D_g$ , and to estimate absolute maximum of haplotype frequency. *Genetic Epidemiology.* 31: 709-726, 2007.

##### 2. 学会発表

・ Ryo Yamada SNP-pair Tetrahedron: Geometric Presentation of Haplotype Space of Pairwise SNPs

#### International Genetic Epidemiology Meeting

(2007)York, Great Britain

・ 岡田随象・ 山本一彦・ 山田亮 集団構造化補正、Genomic Control 法のフィッシャー正確確率検定への応用 日本人類遺伝学会(2007) 東京

廣澤 桂 山田 亮 松田文彦 一塩基多型 (SNP)を用いた有意検定における、観測ジェノタイプ情報の組み込みに関する検討 日本人類遺伝学会(2007) 東京

#### 3. 成果公開

研究室ウェブサーバにて、ツール公開 (平成 19 年度より)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。

## 関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析，相互関連の研究

分担研究者 高地 雄太

独立行政法人理化学研究所遺伝子多型研究センター研究員

**研究要旨** 関節リウマチは、他の多くの自己免疫疾患と同様に、遺伝因子と環境因子が複雑に関与して発症する多因子疾患である。我々は、ホールゲノムに分布する一塩基多型（SNPs）を用いた患者対照関連解析により、関節リウマチ（RA）、全身性エリテマトーデス（SLE）、自己免疫性甲状腺炎（AITD）の疾患感受性に関連する FCRL3（Fc receptor-like 3）遺伝子の多型同定を行った。これまでに、FCRL3 遺伝子多型以外にも、PTPN22 遺伝子、CTLA4 遺伝子等の遺伝子多型が、複数の自己免疫疾患感受性に関連することが報告されている。したがって、RA 以外の自己免疫疾患の感受性遺伝子を候補遺伝子として、RA 感受性との関連を検討することによって、新たな RA 感受性遺伝子の同定が可能であると考えられる。我々は IRF5 遺伝子（SLE 感受性遺伝子）、STAT4 遺伝子（欧米人における RA-SLE 感受性遺伝子）、ZFAT 遺伝子（AITD 感受性遺伝子）の多型に注目し、日本人 RA 検体を用いた関連解析を行うことにより、これらの遺伝子多型が日本人の RA 感受性遺伝子であることを明らかにした。また、IRF5 遺伝子多型は、RA の最大の遺伝因子である HLA-DRB1 遺伝子多型のうち、RA 感受性アレルを持たない患者群において、疾患感受性に対して、より強く寄与することが明らかになった。このことは、これらの 2 遺伝子間の相互関連の存在、および、RA の亜病態の遺伝的背景に、異なった遺伝因子の組み合わせが存在することを示唆する。

### A. 研究目的

これまで、自己免疫疾患感受性との関連が報告されている ZFAT、IRF5、STAT4 遺伝子の遺伝子多型に注目し、日本人における関節リウマチ（RA）感受性との関連および他の遺伝子多型との相互関連について検討を行う。

### B. 研究方法

RA 患者 1943 人、および対照群 1598 人の末梢血由来の DNA を用いて、SNP のジェノタイピングを行った。ジェノタイピングには、TaqMan 法を用いた。患者・対照群の対立遺伝子（アレル）頻度、および遺伝子型（ジェノタイプ）頻度を比較検定し、疾患感受性との関連の検討を行った。また、HLA-DRB1 のジェノタイプ別に、患者群を層別化し、

同様に、患者・対照群間の関連解析を行った。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（厚生労働・文部科学・経済産業 3 省合同指針）に基づき研究計画を策定し、理化学研究所倫理委員会の審査を経た上で、研究を行った。DNA 検体および臨床情報は、連結可能匿名化を行い、研究者とは独立した個人情報管理者による対応表の管理を行った。

### C. 研究結果

患者・対照関連解析の結果、ZFAT、IRF5、STAT4 のいずれの多型においても、関節リウマチ感受性との関連を認めた（下表）。

遺伝子	dbSNP ID	アレル頻度		遺伝形式	オッズ比 (95%CI)	P 値
		患者	対照			
ZFAT	rs16905194	0.494	0.476	優性	1.18 (1.01-1.37)	0.035
IRF5	rs729302	0.750	0.711	優性	1.67 (1.29-2.16)	0.000075
STAT4	rs7574865	0.629	0.690	劣性	1.48 (1.13-1.94)	0.00029

HLA-DRB1 のジェノタイプ別に, shared epitope<sup>註)</sup>陽性群 (SE+群) および陰性群 (SE-) 群に層別化し, それぞれの遺伝子多型のアレル頻度の評価を行った. その結果, IRF5 遺伝子多型のうち, 感受性アレルの頻度が, SE+群で 0.74, SE-群で 0.80 と, SE-群で, 有意に高いことが明らかになった (P=0.02). それぞれの群で, アレル頻度比較による患者・対照関連解析を行ったところ, SE+群でオッズ比 1.11, SE-群でオッズ比 1.50 であり, IRF5 多型が, SE-群で, より高く寄与していることが考えられた.

(註) SE ; \*0405, \*0401, \*0410, \*0101, \*1001, \*1402  
いずれも, RA 感受性アレル)

#### D. 考察

ZFAT 遺伝子多型, IRF5 遺伝子多型, STAT4 遺伝子多型は, いずれも, RA 以外の自己免疫疾患感受性との関連が報告されている遺伝子多型である. 今回, 我々の行った, 患者・対照関連解析において, これらの遺伝子多型と日本人の RA の感受性との有意な関連を認めたことから, これらの遺伝子多型は, 複数の自己免疫疾患の感受性に共通に関連する遺伝子多型であることが考えられた.

ZFAT 遺伝子多型は, B 細胞に発現する転写因子 ZFAT の発現に影響を与える機能性多型であり. したがって, ZFAT の発現量を介して, 他の遺伝子産物の発現を左右し, 自己免疫応答に関与していることが考えられる.

いっぽう, STAT4 遺伝子多型が, STAT4 遺伝子に与える影響は未知である. STAT4 遺伝子は, IL-12 などのサイトカインのシグナルに関与するアダプター分子であり, RA の病態に深く関与しているものと考えられる. 今後, STAT4 遺伝子の発現や機能に影響を与える, 機能性遺伝子多型の同定が必要である.

IRF5 遺伝子多型は, IRF5 遺伝子の発現量に影響を与えることが報告されている. IRF5 は, RA の病態に重要な役割を果たしていると考えられる. TNF $\alpha$ , IL-6 等の炎症性サイトカインの発現を制御する重要な転写因子である. したがって, IRF5 遺伝子多型は, これらのサイトカインの発現になんらかの影響を与え, 疾患発症に関与していると考えられる. 興味深いことに, 今回, HLA-DRB1 のジェノタイプによって, IRF5 遺伝子多型の疾患への寄

与が異なることが明らかになった. このことは, この 2 遺伝子間で, 相互関連が存在することを示唆する. HLA-DRB1 のうち, 疾患と関連する SE アレルは, なんらかの自己抗原を, T 細胞に提示する際に関与するものと考えられている. 最近, SE 陽性患者で, シトルリン化ペプチドに対する自己抗体 (抗 CCP 抗体) が, 高い陽性率を示すことが報告されたことから, シトルリン化タンパクを介した, 自己応答性 T 細胞の活性化が, 病態の背景に存在するものと考えられる. いっぽう, IRF5 遺伝子多型が, SE 陰性患者で, より強く, 疾患感受性に寄与していることから, これらの SE 陰性患者においては, IRF5 遺伝子によって制御される, TNF $\alpha$  等の炎症性サイトカインが, 病態においてより重要な役割を果たしているものと考えられた.

#### E. 結論

自己免疫性疾患感受性遺伝子として報告されている ZFAT, IRF5, STAT4 各遺伝子の遺伝子多型は, RA の感受性とも関連している. 中でも, IRF5 遺伝子多型は, HLA-DRB1/SE 陰性患者で, より強い関連を示した.

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(英文)

・Kobayashi S, Ikari K, Kaneko H, Kochi Y, Kazuhiko Y, et al. Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. Arthritis Rheum, in press.

・Oishi T, Iida A, Otsubo S, Kamatani Y, Usami M, Takei T, Uchida K, Tsuchiya K, Saito S, Ohnisi Y, Tokunaga K, Nitta K, Kawaguchi Y, Kamatani N, Kochi Y, Shimane K, Yamamoto K, Nakamura Y, Yumura W, Matsuda K. A functional SNP in the NKX2.5-binding site of ITPR3 promoter is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese population. J Hum Genet 53:151-162, 2008.

(和文)

・島根謙一, 高地雄太, 山本一彦

疾患ゲノム研究の現況：関節リウマチ

Clinical Calcium. 18(2):169-175, 2008

## 2. 学会発表

・高地 雄太

自己免疫疾患感受性遺伝子 FCRL3

第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会

・高地 雄太

ホールゲノム関連解析による関節リウマチ関連遺

伝子の同定

第 52 回日本人類遺伝学会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## Fcrl5 遺伝子欠損マウスの作成

分担研究者 岩倉洋一郎

東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター細胞機能研究分野 教授、センター長

**研究要旨** 関節リウマチ（RA）は関節病変を主徴とする全身性の自己免疫疾患であり、発症の原因の一つとして遺伝的素因が考えられ、一塩基多型（SNP）を用いた、ケース・コントロール関連解析から、Fc receptor-like 3（*FCRL3*）遺伝子の遺伝子発現を制御している領域に存在する SNP が、RA 発症と強く関連していることが見出された。しかしながら、*FCRL3* 遺伝子の機能についてはまだ不明な点が多く残されていた。そこで本研究では、*FCRL3* 遺伝子の生理機能を詳細に解析することを目的として、マウスオーソログである *Fcrl5* 遺伝子の欠損マウスの作製を試みた。*Fcrl5* 遺伝子ターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、相同組み換えクローンを単離した。これらのクローンについてキメラマウス作製を行い、*Fcrl5* 遺伝子欠損マウスの樹立に成功した。*FCRL3* 遺伝子を標的とした予防・治療薬の副作用を予測する上で、*Fcrl5* 遺伝子欠損マウスの表現型解析は重要な意味を持つと考えられる。

### A. 研究目的

関節リウマチ（RA）は関節病変を主徴とする全身性の自己免疫疾患であり、人口の約 1%が罹患する重要な慢性疾患である。発症の原因の一つとして、遺伝的素因があり、一塩基多型（SNP）を用いた、ケース・コントロール関連解析による RA 関連遺伝子探索が進められている。その中で、Fc receptor-like 3（*FCRL3*）遺伝子の、遺伝子発現を制御している領域に存在する SNP が、RA 発症と強く関連していることが見出された。しかしながら、*FCRL3* 遺伝子の機能についてはまだ不明な点が多く残されていた。そこで本研究では、*FCRL3* 遺伝子の生理機能を詳細に解析することを目的として、マウスオーソログである

*Fcrl5* 遺伝子の欠損マウスの作製を行なった。

### B. 研究方法

*Fcrl5* 遺伝子欠損マウスを作製するために、開始コドンを含むエクソン 1 を完全に欠損するようターゲティングベクターを構築した。マウス ES 細胞に直鎖化したターゲティングベクターを導入・薬剤選抜を行った後、サザンハイブリダイゼーション法および PCR 法により相同組み換え体の同定を行なった。相同組換えクローンについては、C57BL/6 x BDF1 由来の 8 細胞期胚と ES 細胞を 1 晩共培養することによりキメラ胚盤胞を形成させる「アグリゲーションキメラ法」を用いてキメラマウスを作出した。その後、

交配により *Fcrl5* 遺伝子欠損マウスの系統・樹立を行った。

(倫理面への配慮) *Fcrl5* 遺伝子欠損マウスについては、東京大学医科学研究所組み換え DNA 実験安全委員会ならびに動物実験委員会の承認と指針に基づいて取り扱った。

### C. 研究結果

*Fcrl5* 遺伝子ターゲティングベクターをマウス 129/Ola 由来 ES 細胞株 E14.1 に導入し、最終的に相同組み換え体を 2 クローン同定した。これらのクローンについてキメラマウス作製を行い、17B6 クローンより生殖系列キメラが得られた。交配によりヘテロ欠損マウスが得られ、現在、さらにヘテロ欠損マウス同士を交配しているところであり、近々ホモ変異マウスが得られる予定である。

### D. 考察

ヒトにおける *FCRL3* 遺伝子の高発現量が関節リウマチ発症に関連していると予想される。*FCRL3* 遺伝子を標的とした予防・治療薬の副作用を予測する上で、*Fcrl5* 遺伝子欠損マウスの表現型は重要な意味を持つと考えられることから、ホモ欠損マウスが得られ次第、早急に表現型の解析を行なう予定である。

### E. 結論

ヒトにおける関節リウマチの疾患関連遺伝子と考えられる *FCRL3* 遺伝子のマウスオーソログ *Fcrl5* 遺伝子の変異マウスの作製を試み、生理機能の解析に必須の *Fcrl5* 遺伝子欠損マウスの樹立に成功した。

### F. 健康危機情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

・ Okumura, A., Saito, T., Otani, I., Kojima, K., Yamada, Y., Ishida-Okawara, A., Nakazato, K., Asano, M., Kanayama, K., Iwakura, Y., Suzuki, K., and Yamagoe, S. Suppressive role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, in press.

・ Yoshimura, T., Sonoda, K., Miyazaki, Y., Iwakura, Y., Ishibashi, T., Yoshimura, A., and Yoshida, H. Differential roles for IFN- $\gamma$  and IL-17 in experimental autoimmune uveoretinitis. *Int. Immunol.*, in press.

・ Fujikado, N., Saijo, S., Yonezawa, T., Shimamori, K., Ishii, A., Sugai, S., Kotaki, H., Sudo, K., Nose, M., and Iwakura, Y. DCIR deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nat. Med.* in press.

・ Pichavant, M., Goya, S., Meyer, E. H., Johnston, R. A., Kim, H. Y., Matangkasombut, P., Zhu, M., Iwakura, Y., Savage, P. B., DeKruyff, R. H., Shore, S. A., and Umetsu, D. T. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of Natural Killer T cells and IL-17. *J. Exp. Med.*, in press.

・ Nakae, S., Iwakura, Y., Suto, H., and Galli, S. J. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell-differentiation

by IL-17. *J. Leu. Biol.*, 81:1258-1268, 2007.

• Ashino, T., Arima, Y., Shioda, S., Iwakura, Y., Numazawa, S., and Yoshida, T. Effect of interleukin-6 on CYP3A11 and metallothionein-1/2 expression in arthritic mouse liver. *Eur. J. Pharm.*, 558: 199-207, 2007.

• Onodera, S., Ohshima, S., Tohyama, H., Yasuda, K., Nishihira, J., Iwakura, Y., Matsuda, I., Minami, A., and Koyama, Y. A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.*, 56: 521-530, 2007.

• Kagari, T., Tanaka, D., Doi, H., Iwakura, Y., and Shimozato, T. Anti-type II collagen antibody accelerates arthritis via CXCR2-expressing cells in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, 37: 2753-2763, 2007.

• Chida, D., Nakagawa, S., Nagai, S., Sagara, H., Katsumata, H., Imaki, T., Suzuki, H., Mitani, F., Ogishima, T., Shimizu, C., Kotaki, H., Kakuta, S., Sudo, K., Koike, T., Kubo, M., and Iwakura, Y. Melanocortin receptor 2 is required for adrenal gland development, steroidogenesis and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 18205-18210, 2007.

• Chida, D., and Iwakura, Y. Peripheral TNF $\alpha$ , but not peripheral IL-1, requires endogenous IL-1 or TNF $\alpha$  induction in the brain for the febrile response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 364: 765-770, 2007.

• Noguchi, D., Wakita, D., Tajima, M., Ashino, S., Iwakura, Y., Zhang, Y., Chamoto, K., Kitamura, H.,

and Nishimura, T. Blocking of IL-6 signaling pathway prevents CD4<sup>+</sup> T cell-mediated colitis in a Th17-independent manner. *Int. Immunol.*, 19: 1431-1440, 2007.

## 2. 学会発表

• Noriyuki Fujikado, Shinobu Saijo, Yoichiro Iwakura. 「Identification of dendritic cell immunoreceptor as a novel arthritis-related gene by transcriptome analysis of rheumatoid arthritis model mice.」第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2007 年 4 月、横浜、口頭発表

• Noriyuki Fujikado, Shinobu Saijo, Kazusuke Shimamori, Katsuko Sudo, Masato Nose, Yoichiro Iwakura. 「Identification of a novel arthritis-related gene by transcriptome analysis of arthritis model mice.」第 54 回日本実験動物学会総会、2007 年 5 月、船堀、口頭発表

• Yoichiro Iwakura (Invited) 「The role of cytokines in the development of autoimmune arthritis.」The 2<sup>nd</sup> East Asian Group of Rheumatology Meeting (EAGOR 2007) May 19, 2007, Seoul, 招待講演

• Yoichiro Iwakura 「Rheumatoid arthritis models generated by using transgenic techniques.」19<sup>th</sup> Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) May, 2007, Seoul, 招待講演

• Yoichiro Iwakura 「The role of cytokines in the development of autoimmune arthritis.」The 4<sup>th</sup> International Leukocyte Signal Transduction Workshop: Clinical Implications of Signaling Pathways June, 2007, Rhodes, 招待講演

• 藤門範行、西城忍、島森一輔、須藤カツ子、