

(DNAプール)PLACE-SSCP法による自己免疫疾患の病因遺伝子の網羅的探索

●堀内孝彦¹⁾ ◆林 健志²⁾

1) 九州大学大学院病態修復内科学分野 2) 九州大学生体防御医学研究所

〈研究の目的と進め方〉

私どもは2000年から2004年までの5年間、本領域の公募研究に参加させていただき、主として全身性エリテマトーデス (SLE) の病因遺伝子の探索を行なった。全身性エリテマトーデスは、若年女性に発症する自己免疫疾患の代表とも言える疾患であり、多彩な自己抗体を生じて、全身の慢性炎症を惹起する。厚生労働省の特定疾患に指定される難病である。

本研究の目的は、我々が開発した新しい解析システム (DNAプール)PLACE-SSCP法を用いて、自己免疫疾患の病因遺伝子を明らかにすることにより、病態解明を行い、最終的にはその知見を疾患特異的な治療法開発、難治病態の効果的な制御へと応用することにある。(DNAプール)PLACE-SSCP法は、数百人規模の検体について、一気に、迅速かつ正確なアレル頻度の解析が可能であり、多数の疾患候補遺伝子について、網羅的な疾患関連解析を行う本研究の目的に適している。

研究の進め方として、まず候補遺伝子を選択することが重要であるが、後述するような多くの遺伝子について、その遺伝子の機能、過去の関連の報告、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスでの全身性エリテマトーデス様症状の出現の有無、などを参考にした。

最終的に、TNFRSF6/Fas, TNFSF6/FasL, Fli1, TNFSF10/TRAIL, TNFSF12/TWEAK, Bcl-2, PTEN, FADD, TRADD, CDKN1A, TNFRSF1A/TNFR1, TNFRSF4/OX40, TNFSF4/OX40L, TNFSF5/CD40L, TNFSF13B/BAFF, ICOS, CTLA4, CD28, FYN, G2A, CR2, PTPRC/CD45, CD22, CD19, Lyn, PDCD1, PTPN6, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, CD3Z, DNASE1, APCS, MERTK, C3, C1QA, C1QB, C1QG, C2, MBL2, IGHM, IL-1, IL-4, IL-10, IFNG, TNFa, MAN2A1, TNFRSF11A/RANK, TNFRSF11B/OPG, TNFSF11/OPGLの遺伝子を解析の対象とした。

〈研究開始時の研究計画〉

1) アポトーシス関連分子、TNF/TNF受容体関連分子、サイトカイン、細胞増殖、リンパ球シグナル伝達、免疫複合体除去に関与する分子について全エクソン領域、プロモーター領域 (転写開始点から1.5kb上流部分まで) について、特異的なプライマーを作成し、PLACE-SSCP法によりSNPの同定を進める。

2) 全身性エリテマトーデス患者11名、健常人コントロール1名について、まずSNPの有無を検討する。

3) 得られたすべてのSNPについて、(DNAプール)PLACE-SSCP法を用いて、全身性エリテマトーデス患者ならびに対照群それぞれについてアレル頻度を決定し、有意差を検討する。

4) Single locus association study と haplotype-based association studyをおこなう。

5) アミノ酸の変化を伴うSNPについて、完全長cDNAを分離して、哺乳細胞に遺伝子導入して機能解析を行う。

6) 疾患に関連したSNPを有する全身性エリテマトーデス患者について、臨床症状、検査所見、末梢血リンパ球についての機能解析を行い、そのSNPと病態との関連を明らかにする。

7) 血中濃度がSNPによって変わることが予想される分子については、ELISAにて検討する。

8) 機能解析については、RNAiを用いたIn vitroの解析、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いたin vivoの解析を進める。

9) 全身性エリテマトーデス患者以外の自己免疫疾患、すなわち、関節リウマチ、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、混合性結合組織病、結節性多発動脈炎/ウエゲナー肉芽腫症/チャグストラウス症候群などの血管炎症候群、ベーチェット病、成人スチル病などについても、同意を得て検体を収集する。その後、case-control studyをおこなってこれらの疾患についても疾患感受性遺伝子を同定する。

〈研究期間の成果〉

1) 合計61個の遺伝子についてその全エクソン領域ならびにプロモーター領域について、プライマーの設定を行った。全身性エリテマトーデス患者11名、健常人1名についてPLACE-SSCP法、塩基配列決定を行ってSNP同定を進めた。

2) 61遺伝子のうち8遺伝子は、SSCPパターンなどから、SNPの同定、解析が困難であった。

3) 残りの53遺伝子を列記する。
TNFRSF6/Fas, TNFSF6/FasL, Fli1, TNFSF10/TRAIL, TNFSF12/TWEAK, Bcl-2, PTEN, FADD, TRADD, CDKN1A, TNFRSF1A/TNFR1, TNFRSF4/OX40, TNFSF4/OX40L, TNFSF5/CD40L, TNFSF13B/BAFF, ICOS, CTLA4, CD28, FYN, G2A, CR2, PTPRC/CD45, CD22, CD19, Lyn, PDCD1, PTPN6, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, CD3Z, DNASE1, APCS, MERTK, C3, C1QA, C1QB, C1QG, C2, MBL2, IGHM, IL-1, IL-4, IL-10, IFNG, TNFa, MAN2A1, TNFRSF11A/RANK, TNFRSF11B/OPG, TNFSF11/OPGL。

これら遺伝子について1056 STSを作成し、その解析をすべて終了した。

解析した遺伝子領域の長さは、全部で200kbの長さであった。これらの遺伝子の全エクソン、プロモーター領域を解析した結果、合計314のポリモルフィズムを同定した。ほとんどが、SNPであったが、うち15はins/delであ

った。エクソンの解析に際しては、隣接するイントロン部にプライマーを設定しているため、一部イントロンも解析している。

4) TNFRSF6/Fas, TNFSF6/FasL, Fli1, TNFSF10/TRAIL, TNFSF12/TWEAK, Bcl-2, PTEN, FADD, TRADD, CDKN1A, TNFRSF1A/TNFR1, TNFRSF4/OX40, TNFSF4/OX40L, TNFSF5/CD40L, TNFSF13B/BAFF, ICOS, CTLA4, CD28, FYN, G2A, CR2, PTPRC/CD45, CD22, CD19, Lyn, PDCD1, PTPN6, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, CD3Z, DNASE1, APCS, MERTK, C3, C1QA, C1QB, C1QG, C2, MBL2, IGHM, IL-1, IL-4, IL-10, IFNG, TNFa, MAN2A1, TNFRSF11A/RANK, TNFRSF11B/OPG, TNFSF11/OPGLの各遺伝子に同定したSNP(ごく一部ins/delを含む)は、プロモーター領域に103個、5'UTRに19個、翻訳領域に72個、3'UTRに54個、イントロンに66個で合計314個であった。

このうちの約半数が、dbSNPに登録のない新規のSNPであった。翻訳領域の72個のSNPのうち28個はアミノ酸の変化をとまなうnon-synonymousなものであった。

5)各遺伝子別のSNP数の内訳は、アルファベット順で表記する。

APCSは6SNP、Bcl2は7SNP、C1QAは12SNP、C1QBは2SNP、C1QGは4SNP、C2は5SNP、C3は21SNP、CD19は5SNP、CD22は2SNP、CD28は9SNP、CD3zは12SNP、CDKN1Aは8SNP、CR2は7SNP、CTLA4は1SNP、DNASE1は5SNP、FADDは1SNP、Fli-1は9SNP、FYNは6SNP、G2Aは4SNP、ICOSは7SNP、IFNGは0SNP、IGHMは6SNP、IL10は5SNP、IL2は2SNP、IL4は3SNP、LYNは3SNP、MAN2Aは8SNP、MBL2は20SNP、MERTKは7SNP、PDCD1は6SNP、PTENは2SNP、PTPN6は8SNP、PTPRCは11SNP、TRADDは1SNP、TGFB1は2SNP、TGFB2は4SNP、TGFB3は4SNP、TGFBR1は3SNP、TGFBR2は8SNP、TGFBR3は5SNP、TNFは1SNP、TNFRSF11Aは5SNP、TNFRSF11Bは3SNP、TNFRSF1Aは11SNP、TNFRSF4は3SNP、TNFRSF6は9SNP、TNFSF10は12SNP、TNFSF11は11SNP、TNFSF12は4SNP、TNFSF13Bは4SNP、TNFSF4は8SNP、TNFSF5は2SNP、TNFSF6は1SNPであった。IFNGには、minor allele frequency>0.1のSNPを見出さなかった。補体関連の分子はSNPを多く認めた。

6)Non-synonymousのSNPを有していた遺伝子は、C1QA, C1QB, C1QG, C2, CD19, CDKN1A, CR2, CTLA4, DNASE1, IGHM, LYN, MAN2A, MBL2, MERTK, PDCD1, PTPRC, TGFB1, TGFBR2, TGFBR3, TNFRSF11A, TNFRSF11Bであり、MAN2A, MERTKは最多の3個ずつ有していた。

7) 全身性エリテマトーデス患者264名(女性95%)、対照269名(女性100%)について、それぞれDNAをプールしてPLACE-SSCP法で解析し、314 SNPすべてのアレル頻度を決定して、疾患との関連を検討した。またさらに別の対照426名についてもアレル頻度を各SNPについて決定し、全身性エリテマトーデス患者と比較した。

8)いくつかのSNPについて有意な全身性エリテマトーデスとの関連を見出した。結果的には3種類の遺伝子について、全身性エリテマトーデスとの関連を見出した。

9)single locus association studyとhaplotype-based association studyを3遺伝子について行ない、全身性エリテマトーデスと有意に関連するhaplotypeを見出した。

10)見い出された3つの遺伝子について、機能解析を行った。

11)九州、山口、広島大学の、基幹病院、ならびに韓国、台湾の複数の大学とEast Asian Study Group for Autoimmune diseases (EASTAD)を作り、全身性エリテマトーデス患者について、遺伝子解析を行なうネットワークを構築した(EASTAD home page: <http://www.med.kyushu-u.ac.jp/weil/index.html>)。日本人検体については、各施設の倫理委員会を経た上で採取を行ない、合計600名の患者DNAと性別をあわせた同数の健康人コントロールを収集することを完了した。

韓国、台湾においても倫理委員会の承認を得て全身性エリテマトーデス患者の検体の集積が進んでいる。

12) 解析結果は、われわれのSNPデータベース(dbQSNP)において公開している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

1) 解析方法に先進性かつ独自性がある。(DNAプール)PLACE-SSCP法は、PCR産物を蛍光標識し、キャピラリー電気泳動装置で分離する(PCR products are post-labeled and are analyzed by an automated capillary electrophoresis (PLACE) using single-strand conformation polymorphism (SSCP) conditions)。分離された一本鎖のDNAを蛍光の強度として定量的に検出し、配列の変化を蛍光のピークのリテンションタイムの変化として検出する高度に自動化されたものであり、極めて効率良くSNP頻度を決定できる点で他に類をみない特徴を有する。

この方法がMinor allele frequencyが0.1以上であれば極めて正確にアレル頻度を決定することができることは既に報告している(Am J Hum Genet 2001)。

2) 疾患遺伝子の同定についても世界的な水準にあると思われる。すでにDNaseI(Nat Genet 2001)をはじめ、いくつかの全身性エリテマトーデス関連の遺伝子を同定している。

3) 全身性エリテマトーデスは、自己免疫疾患の代表とも言える疾患であるが、患者数は全国で5万人と推定される。我々はすでに600名の遺伝子を有しており、さらにその数を増やしている状況である。本邦はもちろんのこと、世界的に見ても、我々のグループは屈指の患者検体数を有している。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1)全身性エリテマトーデス患者以外の自己免疫疾患患者の検体を集めることがほとんどできなかった。

関節リウマチについてはある程度の患者数を確保することが出来、また遺伝子解析結果を報告することが出来た。関節リウマチの患者さんは全国で70万人程度いると考えられ、比較的困難は少ないと考えられた。

しかしながら、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、混合性結合組織病、結節性多発動脈炎/ウエゲナー肉芽腫症/チャーグストラウス症候群などの血管炎症候群、ベーチェット病、成人スチル病などについては、ほとんど

検体を集めることができなかつた。各疾患の患者数が全身性エリテマトーデスと比べても、さらに少ないこと(たとえば強皮症は全国で5000名程度と考えられる)。

その他の疾患についても強皮症と同数かそれ以下と考えられる)、各疾患について、それぞれ各施設で倫理委員会を通す必要があり、手続きが煩雑であったことなどが挙げられると思われる。

2)解析結果を創薬まで発展させることができなかつた。

最終目的は、患者特異的な治療法の開発であり、得られた結果を創薬まで発展させるきっかけを作りたいかつたが、検体の収集、遺伝子解析と機能解析までで終わってしまい、マウスを含めたin vivoの解析まで進むことができなかつた。

〈今後の課題〉

1) 疾患関連解析の精度をあげるためにも、できるだけ多くのSLE患者検体を集める必要がある。現在のネットワークは九州、西中国を中心にしたものであるが、今後、四国、西日本にネットワークを拡大することが必要であると思われる。

2) さらに候補遺伝子の解析を進める。場合によっては染色体の全領域を網羅的に解析する方法も行なう必要がある。

3) 全身性エリテマトーデスの多発家系を集積して、linkage analysisへと展開していくことも必要と考えられる。また、sib-pair analysis、transmission disequilibrium test (TDT)も考慮する。

4) 候補遺伝子の解析結果をmeta-analysisすることによって解析する必要もある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

原著論文

1. Kojima T, Horiuchi T, Nishizaka H, Sawabe T, Higuchi M, Harashima S, Yoshizawa S, Tsukamoto H, Nagasawa K, Niho Y: Analysis of Fas ligand gene mutation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43: 135-139, 2000
2. Higuchi M, Horiuchi T, Ishibashi N, Yoshizawa S, Niho Y, Nagasawa K: Anticentromere antibody as a risk factor for cancer in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 19: 123-126, 2000
3. Inazuka M, Tahira T, Horiuchi T, Harashima S, Sawabe T, Kondo M, Miyahara H, Hayashi K: Analysis of p53 tumor suppressor gene somatic mutations in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 39: 262-266, 2000
4. Horiuchi T, Himeji D, Tsukamoto H, Harashima S, Hashimura C, Hayashi K: Dominant expression of a novel splice variant of caspase-8 in human peripheral blood lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 877-881, 2000
5. Uwai M, Terui Y, Mishima Y, Tomizuka H, Ikeda M, Itoh T, Mori M, Ueda M, Inoue R, Yamada M, Hayasawa H, Horiuchi T, Niho Y, Matsumoto M, Ishizaka Y, Ikeda K, Ozawa K, Hatake K: A new apoptotic pathway for

the complement factor B-derived fragment Bb. *J Cell Physiol* 185: 280-292, 2000

6. Horiuchi T, Tsukamoto H, Morita C, Sawabe T, Harashima S, Nakashima H, Miyahara H, Hashimura C, Kondo M: Mannose binding lectin (MBL) gene mutation is not a risk factor for systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) in Japanese. *Genes Immun* 1: 464-466, 2000

7. Haro T, Shimoike E, Horiuchi T, Maruyama T, Niho Y: Severe thrombocytopenia caused by digitoxin intoxication in a patient with heart failure associated with Sjogren's syndrome. *Jpn Circ J* 64: 309-311, 2000

8. Horiuchi T, Tsukamoto H, Sawabe T, Harashima S, Morita C, Kashiwagi Y, Himeji D, Masumoto K, Otsuka T, Kusaba T, Nagasawa K: Behcet's disease associated with complement component 9 (C9) deficiency. *Mod Rheumatol* 10: 276-278, 2000

9. Kondo H and Hayashi K. Microsatellite genotyping of post-PCR fluorescence labeled markers. *BioTechniques* 29: 868-872, 2000.

10. Eguchi K, Yao T, Konomoto T, Hayashi K, Fujishima M, Tsuneyoshi M. Discordance of p53 mutations of synchronous colorectal carcinomas. *Mod. Pathol.* 13: 131-139, 2000.

11. Saito T, Oda Y, Sakamoto A, Tamiya S, Kinukawa N, Hayashi K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Prognostic value of the preserved expression of E-cadherin and catenin families of adhesion molecules and beta-catenin mutations in synovial sarcoma. *J. Pathol.* 192(3): 342-350, 2000.

12. Harashima S, Horiuchi T, Hatta N, Morita C, Higuchi M, Sawabe T, Tsukamoto H, Tahira T, Hayashi K, Fujita S, Niho Y: Outside-to-inside signal through the membrane TNF- α induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells. *J Immunol* 166: 130-136, 2001

13. Sawabe T, Horiuchi T, Nakamura M, Tsukamoto H, Nakahara K, Harashima S, Tsuchiya T, Nakano S: Defect of Ick in a patient with common variable immunodeficiency. *Int J Mol Med* 7: 609-614, 2001

14. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, Kuroda Y: Mutation in DNASE I in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 28: 313-314, 2001

15. Kikuchi Y, Koarada S, Tada Y, Ushiyama O, Morito F, Suzuki N, Ohta A, Horiuchi T, Miyake K, Nagasawa K: Difference in B cell activation between dermatomyositis and polymyositis: analysis of the expression of RP105 on peripheral blood B cells. *Ann Rheum Dis* 60: 1137-1140, 2001

16. Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hatta N, Kikuchi

- Y, Arinobu Y, Otsuka T, Sawabe T, Harashima S, Nagasawa K, Niho Y: Association of TNF receptor type II polymorphism 196R with systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum* 44: 2819-2827, 2001
17. Kondo H, Ohno K, Tahira T, Hayashi H, Oshima K, Hayashi K. Delineation of the critical interval for the familial exudative vitreoretinopathy gene by linkage and haplotype analysis. *Hum Genet.* 108:368-375, 2001
18. Suzuki A, Maruno A, Tahira T, Hayashi K. Polar alteration of short tandem repeats (STRs) in mammalian cells. *Mut. Res.* 474: 159-168, 2001.
19. Sasaki T, Tahira T, Suzuku A, Higasa K, Kukita Y, Baba S, Hayashi K. Precise estimation of allele frequencies of single nucleotide polymorphisms by a quantitative SSCP analysis of pooled DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 214-218, 2001.
20. Hayashi K, Wenz H-M, Inazuka M, Tahira T, Sasaki T, Atha DH. SSCP analysis of point mutations by multi-color capillary electrophoresis. in *Methods in Molecular Biology* vol 163, K.Mitchelson and J. Cheng eds. pp 109-125, Humana Press, NJ, USA, 2001
21. Himeji D, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hayashi K, Watanabe T, Harada M: Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood* 99: 4070-4078, 2002
22. Horiuchi T, Nishimukai H, Okiura T, Nishimura K, Nishizaka H, Kojima T, Tsukamoto H, Hayashi K, Harada M: Molecular bases for human complement C7 polymorphisms, C7*3 and C7*4. *Biochem Biophys Res Commun* 29: 450-455, 2002
23. Kikuchi Y, Koarada S, Tada Y, Ushiyama O, Morito F, Suzuki N, Ohta A, Miyake K, Kimoto M, Horiuchi T, Nagasawa K: RP105-lacking B cells from lupus patients are responsible for the production of immunoglobulins and autoantibodies. *Arthritis Rheum* 46: 3259-3265, 2002
24. Tahira T, Suzuku A, Kikuta Y, Hayashi K. SNP detection and allele frequency determination by SSCP. in *Methods in Molecular Biology, Vol.212 "Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols"* pp. 37-46, P-Y Kwok ed. Humana Press, NJ, USA, 2002.
25. Higasa K and Hayashi K. Ordered catenation of sequence-tagged sites and multiplexed SNP-genotyping by sequencing. *Nucleic Acids Res.* 30: e11, 1-14, 2002.
26. Kukita Y and Hayashi K. Multicolor post-PCR labeling of DNA fragments with fluorescent dideoxynucleotides. *BioTechniques* 33: 502-506, 2002.
27. Kukita Y, Higasa K, Baba S, Nakamura M, Manago S, Suzuki A, Tahira T, Hayashi K. A high throughput single-strand conformation polymorphism analysis method using capillary-array electrophoresis system. *Electrophoresis* 23: 2259-2266, 2002.
28. Fukuda S, Yamasaki Y, Iwaki T, Kawasaki H, Akieda S, Fukuchi N, Tahira T Hayashi K. Characterization of the biological function of a transcription factor, c-myc intron binding protein 1 (MIBP1). *J. Biochem.* 131: 349-357, 2002.
29. Yoshimoto K, Iwaki T, Inamura T, Fukui M, Akieda S, Fukuchi N, Tahira T, Hayashi K. Multiplexed analysis of post-PCR Fluorescence-labeled microsatellite alleles and statistical evaluation of their imbalance in brain tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* 93: 284-290 2002
30. Kukita Y, Manago S, Baba S, Hayashi K. Hemi-stranded SSCP analysis of single-nucleotide polymorphism in short sequence-tagged sites. *BioTechniques* 33: 1118-1121, 2002.
31. Sawabe T, Horiuchi T, Koga R, Tsukamoto H, Kojima T, Harashima S, Kikuchi Y, Otsuka J, Mitoma H, Yoshizawa S, Niho Y, Watanabe T: Aberrant HS1 molecule in a patient with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 4: 122-131, 2003
32. Koyama T, Tsukamoto H, Masumoto K, Himeji D, Hayashi K, Harada M, Horiuchi T: A novel polymorphism of human APRIL gene is associated with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 42: 980-985, 2003
33. Baba S, Kukita Y, Higasa K, Tahira T, Hayashi K. Single-stranded conformational polymorphism analysis using automated capillary electrophoresis apparatus. *BioTechniques* 34: 746-750 2003.
34. Kondo H, Tahira T, Mizota A, Adachi-Usami E, Oshima K, Hayashi K. Diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa by linkage-based exclusion screening with multiple locus-specific microsatellite markers. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 44: 1275-1281, 2003.
35. Horiuchi T, Tsukamoto H, Mitoma H, Miyagawa H, Tamimoto Y, Yoshizawa S, Harada M, Okamura S. Novel mutations in TNFRSF1A in patients with typical tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome and with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Int. J. Mol. Med.* 14(5): 813-818, 2004
36. Otsuka J, Horiuchi T, Yoshizawa S, Tsukamoto H, Sawabe T, Kikuchi Y, Himeji D, Koyama T, Mitoma H, Watanabe T, Harada M. Association of a four-amino acid residue insertion polymorphism of the HS1 gene with SLE. *Arthritis Rheum.* 50(3): 871-881, 2004.
37. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H. Binding activities of infliximab and etanercept to transmembrane tumor necrosis factor (TNF)- α . *Gastroenterology* 126(3): 934-936, 2004.
38. Harashima S, Tsukamoto H, Horiuchi T. Osteoprotegerin and RANKL expression on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis and osteoarthritis

patients. *Rheumatology (Oxford)* 43: 396-397 2004.

39. Horiuchi T, Gondo H, Miyagawa H, Otuka J, Inaba S, Nagafuji K, Takase K, Tsukamoto H, Koyama T, Mitoma H, Tamimoto Y, Miyagi Y, Tahira T, Hayashi K, Hashimura C, Okamura S, Harada M. Association of MBL gene polymorphism with major bacterial infection in patients treated with high-dose chemotherapy and autologous PBSCT. *Genes Immun.* 6: 162-166, 2005

40. Tsukamoto H, Horiuchi T, Kokuba H, Nagae S, ishizaka H, Sawabe T, Harashima S, Himeji D, Koyama T, Otsuka J, Mitoma H, Kimoto Y, Hashimura C, Kitano E, Kitamura H, Furue M, Harada M. Molecular analysis of a novel hereditary C3 deficiency with systemic lupus erythematosus. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 330: 298-304, 2005

41. Mitoma H, Horiuchi T, Hatta N, Harashima S, Tsukamoto H, Harada M. Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF- α . *Gastroenterology* 128(2): 376-392, 2005

42. Koyama T, Tsukamoto H, Miyagi Y, Himeji D, Otsuka J, Miyagawa H, Harada M, Horiuchi T. Raised serum APRIL levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 64 :1065-1067, 2005

43. Mitoma H, Horiuchi T, Kimoto Y, Tsukamoto H, Uchino A, Tamimoto Y, Miyagi Y, Harada M. Decreased expression of interleukin 21 receptor on peripheral lymphocyte in systemic lupus erythematosus. *Int. J. Mol. Med.* 16: 609-614, 2005

44. Nagasawa K, Tada Y, Koarada S, Horiuchi T, Tsukamoto H, Murai K, Ueda A, Yoshizawa S, Ohta A. Very early development of steroid-induced osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: prospective study by MRI. *Lupus* 14: 385-390, 2005

45. Horiuchi T, Tsukamoto H, Miyagawa H, Otsuka J, Nagafuji K, Okamura S, Harada M. Association of MBL gene polymorphisms with major bacterial infection in patients treated with high-dose chemotherapy and autologous PBSCT. *Genes Immun.* 6: 162-166, 2005

46. Kukita Y, Miyatake K, Stokowski R, Hinds D, Higasa K, Wake N, Hirakawa T, Kato H, Matsuda T, Pant K, Cox D, Tahira T, Hayashi K. Genome-wide definitive haplotypes determined using a collection of complete hydatidiform moles. *Genome Res.* 15: 1511-1518, 2005

47. Tahira T, Baba S, Higasa K, Kukita Y, Suzuki Y, Sugano S, Hayashi K. dbQSNP a database of SNPs in human promoter regions with allele frequency information determined by SSCP-based methods. *Hum. Mutat.* 26: 69-77, 2005.

48. Mitoma H, Horiuchi T, Kimoto Y, Tsukamoto H, Uchino A, Tamimoto Y, Miyagi Y, Harada M. Decreased expression

of interleukin-21 receptor on peripheral B lymphocytes in systemic lupus erythematosus. *Int J mol Med* 16: 609-614, 2005.

49. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Miyamoto T, 他 11名 (3番目) A phase I/II trial of autologous peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of refractory autoimmune disease. *Ann. Rheum. Dis.* 2006 in press.

50. Horiuchi T, Morita C, Tsukamoto H, Mitoma H, Sawabe T, Harashima S, Kashiwagi Y, Okamura S. Increased expression of membrane TNF- α on activated peripheral CD8+ T cells in systemic lupus erythematosus *Int J Mol Med* 2006 in press

その他印刷物

1. 堀内孝彦 Mutation of DNase I in people with systemic lupus erythematosus. *ゲノムニュース* No.2 p.20-21, 2002 (文部科学省 科学研究費 特定領域「ゲノム」4領域 広報委員会編)

2. 堀内孝彦 Caspase-8の新しいisoform, caspase-8Lによるアポトーシスの抑制とその機序 *ゲノムニュース* No.4 p.17-19, 2002 (文部科学省 科学研究費 特定領域「ゲノム」4領域 広報委員会編)

3. 堀内孝彦 全身性エリテマトーデスにおける疾患感受性遺伝子探索 *臨床免疫* 44(4): 389-394, 2005