

末梢血単核球 (PBMC) を用いた微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) および全身性エリテマトーデス (SLE) の病因の解析*

小松田 敦

秋田大学大学院医学系研究科血液・腎臓・膠原病内科学講座

(平成 21 年 5 月 1 日掲載決定)

Analysis of mRNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal change nephrotic syndrome and systemic lupus erythematosus

Atsushi Komatsuda

Department of Hematology, Nephrology, and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine, Akita 010-8543, Japan

キーワード : CCL13, HSPC159, MCNS, realtime PCR, SLE, TRAIL

1. はじめに

ネフローゼ症候群は、大量の蛋白尿により低蛋白血症となり、その結果浮腫や高脂血症を生じる病態である。その原因は多彩で、原因が明らかでない原発性ネフローゼ症候群と、他の全身性疾患から引き起こされる続発性ネフローゼ症候群に大別される。近年、分子生物学的手法により原発性ネフローゼ症候群の中の先天性ネフローゼ症候群で、糸球体上皮細胞や足突起間のスリット膜に発現している nephrin, podocin, actinin-4 や CD2 関連蛋白などの遺伝子異常がネフローゼ症候群の原因になることが次々と報告され、これらの蛋白質が糸球体濾過バリアの維持に重要であることが明らかとなってきている。一方、後天性の微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) は、腎臓病理学的に糸球体の変化が微小であり、ステロイド薬が奏功する疾患である。その病因として、末梢血リンパ球が糸球体基底膜透過性亢進因子を産生し糸球体濾過バリアを破

綻するためと考えられているが、その因子は未だ不明である (図 1)^{1,2)}。

全身性エリテマトーデス (SLE) は、皮膚病変がオオカミに噛まれた痕のような紅斑であることから紅斑性狼瘡 : lupus erythematosus と呼ばれていた。1851 年、フランスの皮膚科医 Kaposi が³⁾、皮膚だけでなく全身の臓器を侵す全身性の疾患として systemic lupus erythematosus を報告した。1948 年、Hargraves らにより SLE 患者の血中に LE 細胞が見だされ、1957 年には Friou らにより抗核抗体が発見された³⁾。それ以来、免疫異常が病態形成に重要な役割を持つと考えられ、病態・病因の解明のため免疫学的検討が続けられている。現在まで報告されている病因は多岐にわたり、末梢トレランスの破綻やリンパ球のアポトーシス不全により自己抗体が産生され、免疫複合体 (IC) の沈着や排除障害で組織が障害されるが、それらの詳細はなお不明である^{4,5)}。

我々は、MCNS と SLE の病因・病態の背景に患者末梢血単核球 (PBMC) の異常があることを想定し、患者 PBMC を用いて MCNS や SLE の病因の検討を行っている。本稿では、秋田医学会学術賞講演での講演内容を中心に、これまで我々が見だした MCNS と SLE の病因に関する知見について概説する⁶⁻⁸⁾。

Correspondence : Atsushi Komatsuda
Department of Hematology, Nephrology, and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6116
Fax : 81-18-836-2613
E-mail : komatsud@med.akita-u.ac.jp

*第 19 回秋田医学会学術賞

(10) 末梢血単核球を用いた微小変型ネフローゼ症候群および全身性エリテマトーデスの病因の解析

リンパ球から糸球体基底膜、スリット膜、ポドサイトを障害する何らかの因子が分泌されているが未だ不明？

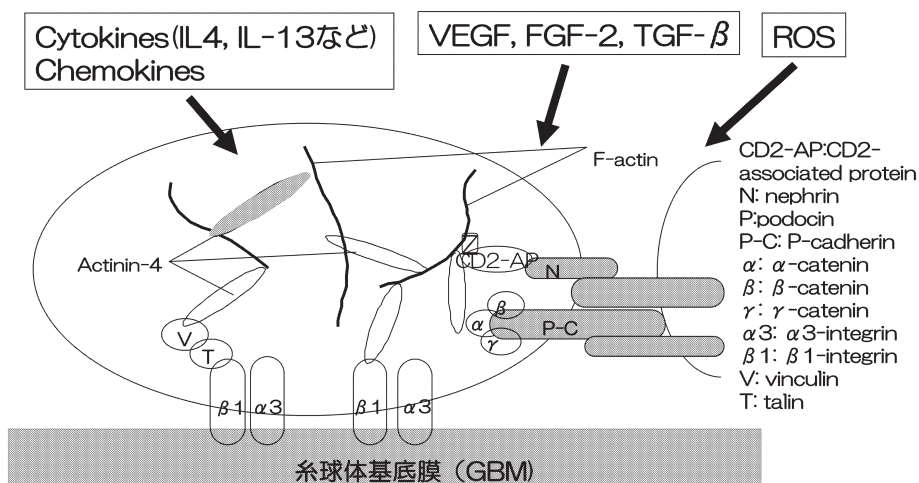


図1. 微小変型ネフローゼ症候群 (MCNS) の病因

2. MCNS の病因について

MCNS の病因は未だ明らかでないが、MCNS 患者の PBMC と T 細胞のハイブリドーマを作製し、その分泌物をラットに投与したところ蛋白尿を来したこと⁹⁾、MCNS 患者の血清をラットの糸球体上皮細胞の単層培養に添加したところ、アルブミンの透過性が亢進したこと¹⁰⁾、難治性 MCNS 患者の死体腎臓 2 個を 2 人のレシピエントに移植したところいずれのレシピエントでも蛋白尿が改善した症例報告¹¹⁾ などから、末梢血単核球、特に T リンパ球から糸球体基底膜透過性亢進因子が産生され糸球体濾過バリアを破綻すると考えられている。

この未知の因子を同定するため、2 例の MCNS 患者のネフローゼ期と寛解期の PBMC を採取し、それぞれの遺伝子発現を 24,446 遺伝子が含まれる cDNA microarray を用いて比較検討した。その結果ネフローゼ期に 2 倍以上過剰発現している遺伝子が 171 個認められた。それらは主に転写因子、サイトカインや炎症に関連する遺伝子であった(表 1)。それらの中から、血清中に分泌されると予想される chemokine ligand 13 (CCL13) と ガレクチン関連蛋白質 (HSPC159 また

は GRP) を選択した。

MCNS 24 例のネフローゼ期と寛解期、ネフローゼ期の膜性腎症 (MN) 10 例、正常コントロール群 24 人から PBMC を分離し、各々 mRNA を抽出し cDNA を作成した。CCL13 と HSPC159 特異的プライマーをそれぞれ作成後、それらを用いて real-time PCR 法で CCL13 と HSPC159 mRNA を定量化した。CCL13 と HSPC159 mRNA 値と正常コントロール群の差を Mann-Whitney U-test で検討した。CCL13 と HSPC159 はともに、MCNS のネフローゼ期で寛解期より有意に発現が亢進していた(図 2, 3)。次にネフローゼ期の MCNS 群と、MN 群、正常コントロール群での PBMC における CCL13 と HSPC159 の発現量を比較検討した。ネフローゼ期の MCNS 患者群で、MN 群、正常コントロール群に比較して CCL13 と HSPC159 の有意な発現亢進が認められた(図 4, 5)。以上より、CCL13 と HSPC159 はネフローゼ期 MCNS の PBMC に特異的に発現が亢進していることが明らかになった⁵⁾。

CCL13 遺伝子は、染色体 17q11.2 にあり、monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4) とも呼ばれている^{12,13)}。樹状細胞、内皮細胞、気道上皮細胞に発現し、

表 1. ネフローゼ期の MCNS で高発現している遺伝子

Gene Name	Symbol	Gene expression ratio (onset or relapse/remission)
Signal transduction		
Colony stimulating factor 1 (macrophage)	CSF1	2.75
Cyclin A2	CCNA2	2.58
Cyclin B2	CCNB2	2.84
Cyclin D1	CCND1	2.52
Cyclin K	CCNK	2.40
Glucocorticoid receptor	NR3C1	2.68
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	MAP3K12	2.11
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1	MAP4K1	2.37
Peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	PPIC	2.80
Phospholipase A2, group IIA	PLA2G2A	2.24
Phospholipase C, beta 4	PLCB4	2.62
Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma	PKIG	2.44
Protein kinase, AMP-activated, gamma 1	PRKAG1	2.34
Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	PRKAR2B	2.48
Protein kinase, cGMP-dependent, type I	PRKG1	2.20
Rho guanine nucleotide exchange factor 17	ARHGEF17	2.76
Chemokine (C-C motif) ligand 13	CCL13	2.38
Cytokines/inflammation		
Galectin-related protein, HSPC159	HSPC159	2.11
Interleukin 1, alpha	IL1A	3.22
Interleukin 6 receptor	IL6R	2.30
Platelet-derived growth factor beta polypeptide	PDGFB	2.41

アトピー性皮膚炎や気管支喘息などのアレルギー性疾患との関連が報告されている^{14,15)}。以前から MCNS の発症にアレルギーが関連することが報告されており、MCNS における CCL13 の発現亢進もアレルギー反応に関連している可能性を示唆していると考えられる。

HSPC159 の機能は明らかでないが、新規のガレクチンファミリーの一つである¹⁶⁾。ガレクチンファミリーは免疫調節や Th1/Th2 バランスに関連することが報告されている¹⁷⁾。ガレクチンファミリーは3つのグループに分類されている。第1のグループは、糖鎖と結合する部分（糖鎖結合ドメイン: carbohydrate recognition domain, CRD）を1つ持っているプロトタイプ (proto-type)、2番目は1個の糖鎖結合ドメインに糖鎖とは結合しない別のドメインが繋がった構造を持つキメラタイプ (chimera-type)、3番目は2つの糖鎖結合ドメインから成るタンデムリピートタイプ (tandem-repeat-type) である。HSPC159 は第1グルー

プに属する。第1グループの機能として、活性化 T 細胞のアポトーシス誘導、細胞増殖、mRNA スプライシング神経軸索の再生（酸化型 Galectin-1）、アレルギー反応の関与が報告されている。

今後は、CCL13 と HSPC159 の遺伝子発現亢進と MCNS 発症との直接的な因果関係を明らかにするため、蛋白質レベルで CCL13 や HSPC159 が直接糸球体上皮細胞を障害するのか、免疫反応にいかに関連するのか、検討を進める予定である。

3. SLE の病因について

SLE の病因に関しては、遺伝的因子、内分泌的因子、免疫学的因子および環境因子が複合的に関連し発症する、多因子疾患と考えられている。免疫学的因子には、細胞障害性 T 細胞の低下やヘルパー T 細胞の増加、B 細胞の活性化および自己抗体産生の亢進、アポトーシ

(12) 末梢血単核球を用いた微小変化型ネフローゼ症候群および全身性エリテマトーデスの病因の解析

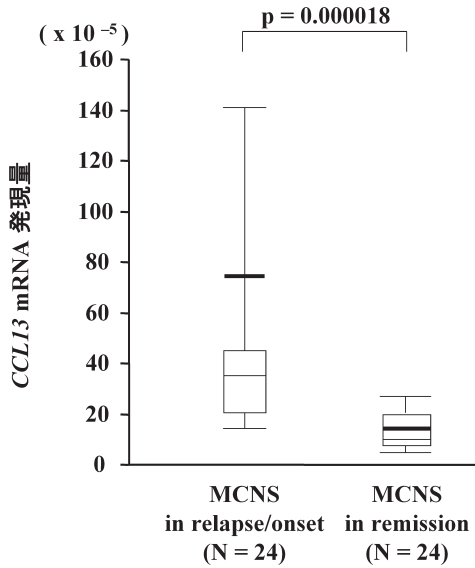


図2. MCNS 症例における発症期と寛解期の CCL13 mRNA の発現

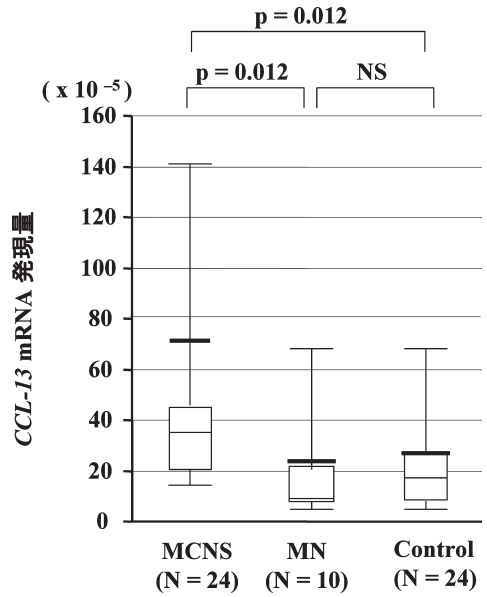


図4. MCNS 症例, 膜性腎症症例および健常者の CCL13 mRNA の発現

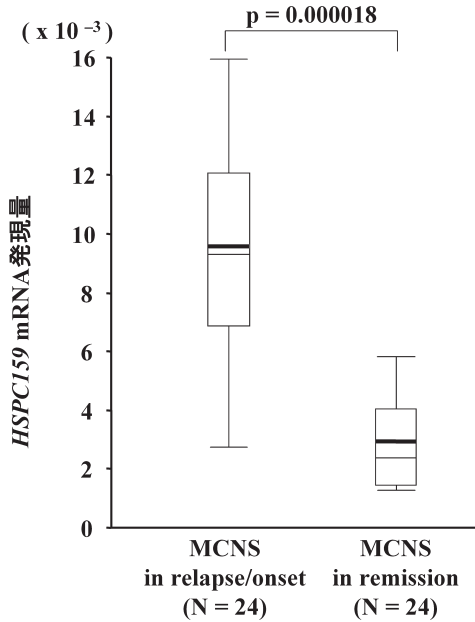


図3. MCNS 症例における発症期と寛解期の HSPC159 mRNA の発現

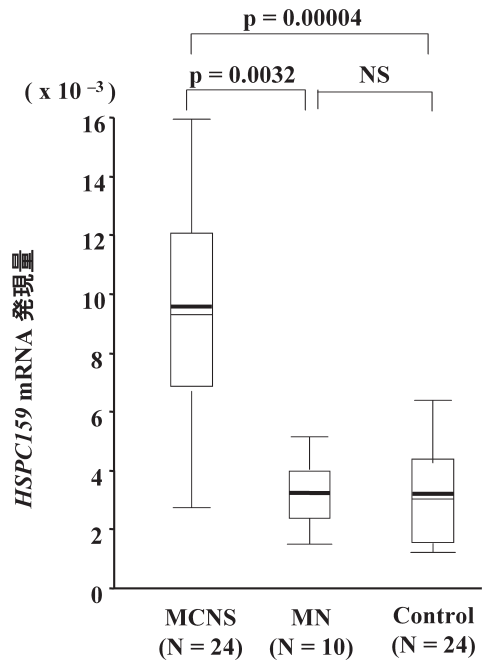
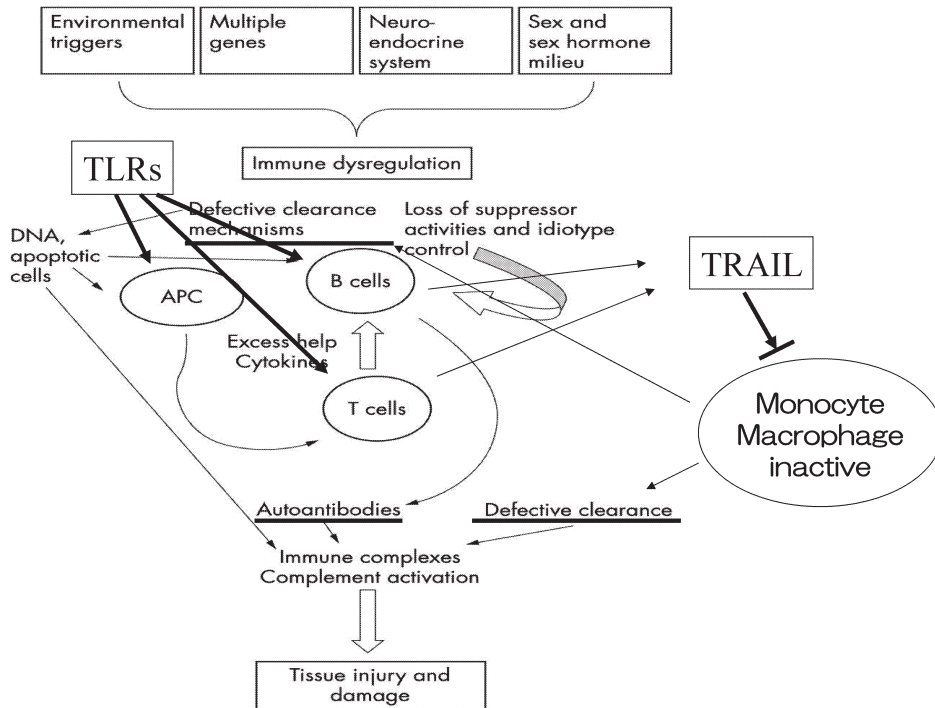


図5. MCNS 症例, 膜性腎症症例および健常者の HSPC159 mRNA の発現

全身性エリテマトーデス (SLE) の病因



参考文献4から (改変)

図6. 全身性エリテマトーデス (SLE) の病因

ス細胞や細胞の残骸の除去不全などの単球系の機能障害など、多くの異常が報告されている^{4,5)} (図6)。

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は癌細胞には apoptosis を来たすが、正常細胞には起こさない¹⁸⁾。この性質から、癌治療に有望な薬剤として期待されている。一方、TRAIL と SLE との関連として、SLE 患者の PBMC の TRAIL mRNA 発現が亢進している^{19,20)}、血清中の TRAIL 濃度が上昇している^{21,22)}、T cell の表面に TRAIL の発現が亢進している²³⁾、血清中の TRAIL 濃度と末梢血好中球数が相関する²⁴⁾、ことが報告されており、TRAIL が SLE の病態に関連すると考えられている。

一方、Toll-like receptor (TLR) は、病原体 (細菌、ウイルス等) の認識に必須の受容体で、細菌の脂質や蛋白質、ウイルスの RNA や DNA を認識し、自然免疫に重要な役割を持つ²⁵⁾。哺乳動物では 12 種類の TLRs がある。また、TLRs を介したシグナルにより、炎症性サイトカインおよび補助機能分子の発現を誘導

し、自然免疫系活性化から獲得免疫系活性化への橋渡しをし、後天性免疫や自己免疫疾患にも深く関与することが報告されている²⁶⁾。病原体の構成成分である lipopolysaccharoid (LPS) や CpG DNA などは、樹状細胞上の TLRs を刺激し、炎症性サイトカインおよび補助機能分子が、提示された抗原とともに T 細胞を活性化させ Th1 細胞への分化を誘導することも報告されている。SLE では TLRs の刺激で自己反応性 B 細胞や樹上細胞が活性化され、動物モデルでは TLR-7、-9 の発現亢進で SLE が発症すること^{26,27)}、ヒト SLE では PBMC の TLR-9 の発現が亢進し、血清 IFN- α や γ の高値が認められる^{28,29)}。

以上から、TRAIL や TLRs が SLE の病態と関連することが示唆されているが、PBMC の TRAIL や TLRs の mRNA 発現量と SLE の臨床症状、活動性、データとの関連は明らかでない。そこで、治療前の活動性 SLE 患者の PBMC における TRAIL と TLRs の mRNA 発現量を real-time PCR 法で定量化し、SLE の臨床症

(14) 末梢血単核球を用いた微小変化型ネフローゼ症候群および全身性エリテマトーデスの病因の解析

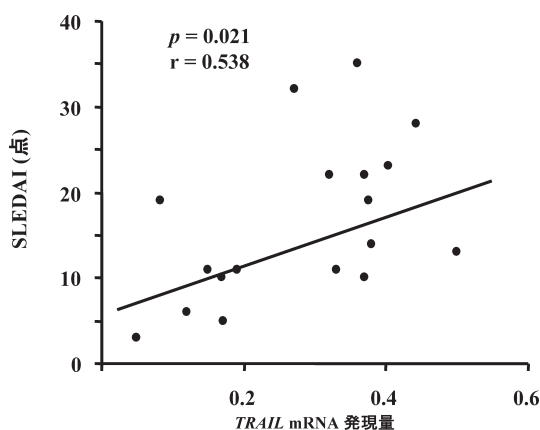


図7. SLE症例におけるTRAIL mRNA発現量とSLEDAIとの相関

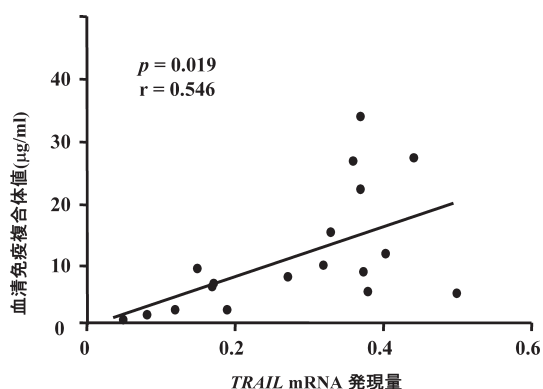


図8. SLE症例におけるTRAIL mRNA発現量と血清免疫複合体値との相関

表2. TRAILとTLRs mRNA発現 (control vs SLE patients)

	Control	SLE	P value*
TRAIL	0.143±0.06	0.281±0.13	0.004
TLR2	0.082±0.045	0.119±0.058	0.019
TLR3	1.801±2.137	2.609±2.069	0.089
TLR4	3.035±1.505	4.407±2.239	0.051
TLR5	0.243±0.184	0.269±0.132	0.279
TLR7	1.365±1.171	1.872±0.756	0.011
TLR8	3.658±1.854	3.473±1.985	0.741
TLR9	1.477±1.883	2.791±1.914	0.007
IFN-alpha	0.037±0.045	0.069±0.059	0.033

Abbreviations: TRAIL; tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TLR; toll-like receptors, IFN; interferon

*P value was estimated by Mann-Whitney U-test.

状、活動性、データと比較し、SLEとの関連を検討した。

治療前のSLE患者からPBMCを分離し、各々mRNAを抽出しcDNAを作成した。TRAILおよびTLRs特異的プライマーをそれぞれ作成後、それらを用いてreal-time PCR法でTRAILとTLRsのmRNAを定量化した。TRAILおよびTLRs mRNA値と正常コントロール群の差をMann-Whitney U-testで検討した。TRAILおよびTLRs mRNA値とSLE活動性(SLE disease activity index, SLEDAI³⁰⁾)と血清学的データの相関をSpearman's correlation法で検討した。

結果として、SLE症例はコントロール群に比較し、PBMCのTRAIL mRNAの発現亢進が認められた(表

2)。PBMCのTRAIL mRNA発現量とSLE活動性および血清免疫複合体(IC)値との正相関が認められた(図7, 8)。

TRAILはapoptosisに関連する分子だが、これまで活動性SLE患者PBMCのTRAIL mRNA発現量と疾患活動性(SLEDAI)の関連性の報告はない。我々は、活動性SLE患者PBMCのTRAIL mRNA発現量がSLEDAIやIC値と正相関することを初めて見出した。その機序として、高発現したTRAILが貪食細胞機能を抑制することによりICの処理を障害し、SLEの病態の悪化・持続に関連する可能性を示した(図6)。

TLRsの検討では、SLE症例はコントロール群に比較し、PBMCのTLR-2, -7, -9, およびIFN- α のmRNA

表3. SLEにおけるIFN- α mRNA発現量とTLRs mRNAの発現量との相関

	Result of Spearman's correlation	
	P value	r
TLR2	0.089	0.381
TLR3	4.45×10^{-5}	0.770
TLR4	0.129	0.342
TLR5	0.002	0.626
TLR7	0.014	0.528
TLR8	0.005	0.584
TLR9	0.001	0.645

Abbreviations: TLR; toll-like receptors, IFN; interferon

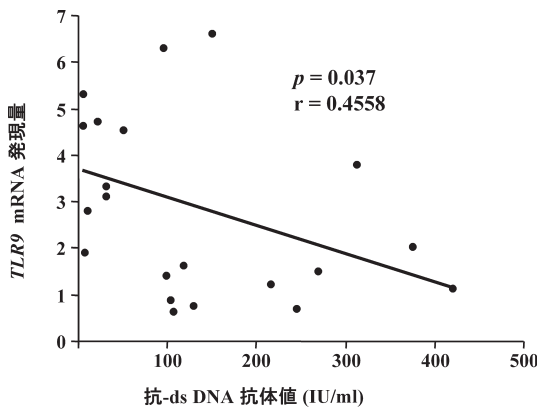


図9. SLE症例における抗-dsDNA抗体値とTLR9 mRNA発現量との相関

の発現亢進が認められた(表2)。PBMCのTLR-3, -5, -7, -8, -9のmRNA発現量とIFN- α のmRNA発現量に正相関が認められた(表3)。

PBMCのTLR-9とIFN- α のmRNA発現量と抗dsDNA抗体価とに負の相関が認められた(図9, 10)。以上より、SLE群はコントロール群に比較し、PBMCでのTLR-2, -7, -9およびIFN- α のmRNA発現が亢進することを見いだした。また、TLR-3, -5, -7, -8, -9とIFN- α のmRNA発現量が正相関し、SLEではTLRsの刺激がIFN- α の発現亢進に寄与し、高発現したIFN- α がSLEの自己反応性B細胞を活性化し自己抗体産生を促進する病態に関連すると考えられる。一方、TLR-9とIFN- α のmRNA発現量が抗dsDNA抗体価と負相関することを見出した。この機序として、SLEの活動期、自己の細胞から放出されたDNAの刺

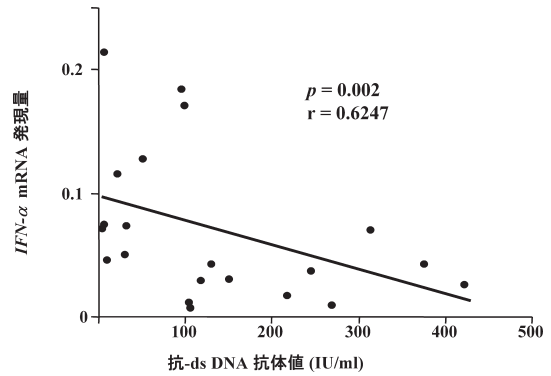


図10. SLE症例における抗-dsDNA抗体値とIFN- α mRNA発現量との相関

激でTLR-9やIFN- α の発現が亢進し、また抗dsDNA抗体価も上昇する。その上昇した抗dsDNA抗体とfree DNAが結合し、血中のfree DNAが減少するためTLR-9とIFN- α のmRNA発現量が低下すると考えた。

以上より、活動性SLE症例PBMCではTRAILやTLRsのmRNAの発現亢進が認められ、それらの発現量がSLEDAIや検査値と相関することから、それらがSLEの病態に重要な役割を持つことが示唆された。

4. まとめ

PBMCを用いたMCNSおよびSLEの病因について、我々の研究成果を中心に概説した。MCNSの原因物質は未だ同定されておらず、またSLEの病因も多岐にわたるが、今後も病因の本質に迫る研究を進めたいと考えている。

5. おわりに

謝辞

本研究のご指導とご協力をいただきました血液・腎臓・膠原病内科学分野の澤田賢一教授、浦井秀樹准教授、並びにともに診療を行い研究活動に協力いただいた腎臓グループの皆様、検体の処理、real-time PCRの測定等にご協力いただいたバイオセンター岩本恵子氏、血液・腎臓・膠原病内科学分野研究室職員の方々に感謝の意を表します。

(16) 末梢血単核球を用いた微小変化型ネフローゼ症候群および全身性エリテマトーデスの病因の解析

参考文献

- 1) Falk, R.J., Jennette, J.C. and Nachman, P.H. (2004) Primary glomerular disease. In Brenner, B.M. (ed) : *Brenner & Rector's The Kidney*. ed 7, Saunders, Philadelphia, pp. 1293-1380.
- 2) Mathieson, P.W. (2003) Immune dysregulation in minimal change nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **18** (Suppl 6), vi26-vi29.
- 3) Mallavarapu, R.K. and Grimsley, E.W. (2007) The history of lupus erythematosus. *South. Med. J.*, **100**, 896-898.
- 4) Mok, C.C. and Lau, C.S. (2003) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathol.*, **56**, 481-490.
- 5) D'Cruz, D.P., Khamashta, M.A. and Hughes, G.R.V. (2007) Systemic lupus erythematosus. *Lancet*, **369**, 587-596.
- 6) Komatsuda, A., Wakui, H., Iwamoto, K., Harada, M., Okumoto, Y. and Sawada, K. (2008) Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal change nephrotic syndrome by cDNA microarrays. *Am. J. Nephrol.*, **28**, 539-547.
- 7) Komatsuda, A., Wakui, H., Iwamoto, K., Togashi, M., Maki, N., Masai, R., Hatakeyama, T. and Sawada, K. (2007) Up-regulation of TRAIL mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with active systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.*, **125**, 26-29.
- 8) Komatsuda, A., Wakui, H., Iwamoto, K., Ozawa, M., Togashi, M., Masai, R., Maki, N., Hatakeyama, T. and Sawada, K. (2008) Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, **152**, 482-487.
- 9) Koyama, A., Fujisaki, M., Kobayashi, M., Igarashi, M. and Narita, M. (1991) A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas. *Kidney Int.*, **40**, 453-460.
- 10) Pegoraro, A.A., Singh, A.K., Arruda, J.A.L., Dunea, G. and Bakir, A.A. (2000) A simple method to detect an albumin permeability factor in the idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int.*, **58**, 1342-1345.
- 11) Ali, A.A., Wilson, E., Moorhead, J.F., Amlot, P., Abdulla, A., Fernando, O.N., Dorman, A. and Sweny, P. (1994) Minimal-change glomerular nephritis : normal kidneys in an abnormal environment ? *Transplantation*, **58**, 849-852.
- 12) Garcia-Zepeda, E.A., Combadiere, C., Rothenberg, M.E., Sarafi, M.N., Lavigne, F., Hamid, Q., Murphy, P.M. and Luster, A.D. (1996) Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J. Immunol.*, **157**, 5613-5626.
- 13) Naruse, K., Ueno, M., Satoh, T. et al. (1996) A YAC contig of the human CC chemokine genes clustered on chromosome 17q11.2. *Genomics*, **34**, 236-240.
- 14) Nomura, I., Gao, B., Boguniewicz, M., Darst, M.A., Travers, J.B. and Leung, D.Y.M. (2003) Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis : a gene microarray analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **112**, 1195-1202.
- 15) Kalayci, O., Sonna, L.A., Woodruff, P.G., Camargo, Jr. C.A., Luster, A.D. and Lilly, C.M. (2004) Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4 ; CCL-13) : a biomarker of asthma. *J. Asthma.*, **41**, 27-33.
- 16) Rabinovich, G.A. and Gruppi, A. (2005) Galectins as immunoregulators during infectious processes : from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol.*, **27**, 103-114.
- 17) Cooper, D.N.W. (2002) Galectinomics : finding themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1572**, 209-231.
- 18) Falschlehner, C., Emmerich, C.H., Gerlach, B. and Walczak, H. (2007) TRAIL signaling : decisions between life and death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 1462-1475.
- 19) Rus, V., Atamas, S.P., Shustova, V., Luzina, I.G., Selaru, F., Magder, L.S. and Via, C.S. (2002) Expression of cytokine- and chemokine-related genes in peripheral blood mononuclear cells from lupus patients by cDNA array. *Clin. Immunol.*, **102**, 283-290.
- 20) Bennett, L., Palucka, A.K., Arce, E., Cantrell, V., Borvak, J., Banchereau, J. and Pascual, V. (2003) Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J. Exp. Med.*, **197**, 711-723.
- 21) Lub-de Hooge, M.N., de Vries, E.G.E., de Jong, S.

- and Bijl, M. (2005) Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, **64**, 854-858.
- 22) Rus, V., Zernetkina, V., Puliaev, R., Cudrici, C., Mathai, S. and Via, C.S. (2005) Increased expression and release of functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by T cells from lupus patients with active disease. *Clin. Immunol.*, **117**, 48-56.
- 23) Kaplan, M.J., Lewis, E.E., Shelden, E.A., Somers, E., Pavlic, R., McCune, W.J. and Richardson, B.C. (2002) The apoptotic ligands TRAIL, TWEAK, and Fas ligand mediate monocyte death induced by autologous lupus T cells. *J. Immunol.*, **169**, 6020-6029.
- 24) Matsuyama, W., Yamamoto, M., Higashimoto, I. *et al.* (2004) TNF-related apoptosis-inducing ligand is involved in neutropenia of systemic lupus erythematosus. *Blood*, **104**, 184-191.
- 25) Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) Pathogen reaction and innate immunity. *Cell*, **124**, 783-801.
- 26) Marshak-Rothstein, A. (2006) Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 823-835.
- 27) Christensen, S.R. and Shlomchik, M.J. (2007) Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. *Semin. Immunol.*, **19**, 11-23.
- 28) Papadimitraki, E.D., Choulaki, C., Koutala, E. *et al.* (2006) Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum.*, **54**, 3601-3611.
- 29) Migita, K., Miyashita, T., Maeda, Y., Nakamura, M., Yatsushashi, H., Kimura, H., Ishibashi, H. and Eguchi, K. (2007) Toll-like receptor expression in lupus peripheral blood mononuclear cells. *J. Rheumatol.*, **34**, 493-500.
- 30) Bombardier, C., Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Caron, D. and Chang, C.H. (1992) Derivation of the SLEDAI. a disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.*, **35**, 630-640.