

한국인 무릎 골관절염 환자들의 임상 양상과 Apo-1/Fas (CD95) 유전자 다형성과의 상관관계에 관한 연구

¹경희대학교 의과대학 내과학교실, ²경희대학교 고헌의학연구소, ³가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

홍승재¹ · 양형인¹ · 임성빈² · 정주호² · 정영옥³ · 김호연³

Apo-1/Fas (CD95) Gene Polymorphism in Korean Knee Osteoarthritis Patients

Seung-Jae Hong¹, Hyung-In Yang¹, Sung-Vin Yim², Joo-Ho Chung², Young-Ok Jung³ and Ho-Youn Kim³

¹Department of Internal Medicine, College of Medicine, KyungHee University, ²Kohwang Medical Research Institute, KyungHee University, ³Department of Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Apoptosis has been implicated in pathogenesis of various disease. Apo-1/Fas (CD95) is one of the main pathway of apoptosis. To examine the possible relationship between Apo-1/Fas (CD95) and primary knee osteoarthritis, MvaI restriction length polymorphism (RFLP) in human Apo-1/Fas (CD95) gene was assessed. **Methods:** Genotype and allele frequencies in promoter region in the Apo-1/Fas (CD95) gene were studied by PCR-RFLP in 226 Korean controls and 148 Korean patients with primary knee osteoarthritis. **Results:** No statistically significant difference in the genotypic distribution and allelic frequencies was found between the control and the knee osteoarthritis patients. But in the severe grade (grade 3, 4) Kellgren-Lawrence score patients, the frequency of MvaI*1 (G) allele was significantly decreased ($P=0.0392$) and the of MvaI*2 (A) allele frequency was significantly increased ($P=0.0473$) compared to the normal controls. **Conclusion:** Apo-1/Fas (CD95) gene polymorphism is a part a determinant factor of severity in knee osteoarthritis, the patients with MvaI*2 (A) allele is more severe radiologic progression. Further substantiation studies are needed in larger patient samples and various other apoptosis related genes to elucidate the mechanism of osteoarthritis, including the Fas ligand gene analysis. (*Immune Network* 2003;3(2):145-149)

Key Words: Knee osteoarthritis, Apo-1/Fas (CD95), polymorphism, PCR-RFLP

서 론

현재까지 알려진 Apoptosis 기전은 Apo-1/Fas (CD95)와 그 수용체의 리간드 결합을 통한 세포자살 신호의 전달을 통한 경로와 세포 내 p53을 경유하는 두 가지 기전이 대표적이다(1,2). 이 중에 Apo-1/Fas (CD95) 단백질은 tumor necrosis factor receptor family의 하나로 death 수용

체를 경유하는 apoptosis를 매개하며, 면역세포와 섬유아세포, 연골세포 등 많은 세포에서 발현되고 구조 및 기능이 비교적 잘 알려져 있는 막단백질이다(3). 여러 질환에서 이들 경로와 관련된 단백질과 유전자의 이상이 보고되었는데, 이러한 Apo-1/Fas (CD95) 변이는 세포의 apoptosis 과정에 변화를 일으켜 정상적인 세포의 성장과 apoptosis 사이의 불균형을 유발하고 궁극적으로는 암, 자가 면역질환, 퇴행성 뇌질환(neurodegenerative diseases), 발달장애 등 많은 질병을 유발한다(4).

Apo-1/Fas (CD95) 유전자는 염색체 10q23에 위치하고 있으며 Cheng 등(5)에 의하여 그 구조가 밝혀지고 Huang

책임저자 : 김호연, 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실
☎ 137-040, 서울특별시 서초구 반포동 505
Tel: 02-590-2702, Fax: 02-537-4673
E-mail: ho@cmc.cuk.ac.kr

등(6)에 의하여 promoter region에 MvaI 제한효소에 의하여 발생하는 제한효소절편길이다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)이 존재함이 밝혀졌다. 이 유전자는 promoter region의 -670번 염기가 GA에서 GG로 치환되는 경우 MvaI 제한효소에 의하여 절단된다는 것이 밝혀졌고, 이를 이용하여 전신성 홍반성 낭창과 다발성 경화증 환자에서 Apo-1/Fas (CD95) 유전자와 이들 질병과의 연관성이 밝혀졌다(7,8).

한편 골 관절염의 발병기전의 하나로 관절 연골세포에서 apoptosis와의 연관성을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 일부에서 연골세포에서 apoptosis가 증가되어 있다는 보고들이 있었다(9-12). 하지만 아직도 골 관절염 관절 연골세포에서 apoptosis를 일으키는 정확한 기전은 분명하지 않으며, 골 관절염 환자들에서 apoptosis 유전자에 대한 연구도 없는 실정이다. 따라서 저자들은 apoptosis관련 유전자 중 가장 중요한 것으로 알려진 Apo-1/Fas (CD95) 유전자의 MvaI 제한효소에 의한 제한효소 절편길이다형성을 한국인의 일차성 무릎 골 관절염 환자에서 조사하고 이를 정상 대조군과 비교하여 골 관절염의 발병기전에 Apo-1/Fas (CD95) 유전자의 다형성이 연관되어 있는지 알아보고, 이를 토대로 골 관절염의 발생에 영향을 미치는 유전적인 소인을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

연구 대상. 환자군은 미국 류마티스학회의 일차성 무릎 골 관절염의 진단 기준(13)을 기초로 경희대병원 류마티스 내과 외래에 내원한 148명의 환자를 대상으로, 환자들에게 유전자 연구에 대한 동의서를 받고 연구를 진행하였다. 각각의 환자들에 대해서 나이, 성별, 내원 시 질병의 이환기간, Body mass index (BMI)를 측정하였고, 방사선학 검사로 Kellgren-Lawrence grade (14), 임상적인 기능 평가로 Lequesne's indices 등(15)을 측정하였다. 정상 대조군은 226명의 건강검진 수진자로 건강검진 결과 무릎 관절염의 임상적, 방사선학적 특이 사항이 없는 경우 대조군에 포함시켰다.

연구 방법.

혈액 채취: 정상 대조군과 일차성 무릎 골 관절염 환자군에서 정맥혈을 채혈하여 EDTA 튜브에 넣어 응고를 방지한 후 DNA를 추출하기 전까지 -70°C에서 보관하였다.

DNA의 분리와 중합효소 연쇄반: DNA의 추출은 DNA isolation kit for mammalian blood (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 각 DNA sample은 농도 측정 후에 -20°C에 보관하여 준비하였다. Apo-1/Fas (CD95) 유전자의 promoter region 중, MvaI 제한효소에 의하여 절단되는 부위를 증폭

Table I. Primer sequences for MvaI RFLP for Apo-1/Fas (CD95) gene

	Apo-1/Fas gene primer sequence	Size
Sense	5'-CTACCTAAGAGCTATCTACCGTTC-3'	233 bp
Antisense	5'-GGCTGTCCATGTTGTGGCTGC-3'	

시키기 위하여 Genbank의 염기서열을 참고하여 다음과 같은 primer를 합성하였다(Table I). Apo-1/Fas (CD95) 유전자의 MvaI 제한효소절편길이다형성의 분석은 Huang 등(6)의 방법에 따랐다. 즉 증폭된 염기서열 부위는 인간 Apo-1/Fas (CD95) 유전자의 promoter region을 포함하고 있다. 중합효소 연쇄반응의 과정은 다음과 같다. 총 30µl의 반응 용액에 1µl의 DNA (농도 20~100 ng/µl), 완충용액 (pH 8.3, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl2) 3µl, 2.5 mM dNTP 1µl, 10 pmol primer 1µl와 Taq DNA polymerase (Takara shuzo, Shiga, Japan) 0.2µl (5 U/µl)를 넣어, Perkin Elmer GeneAmp PCR system 9600 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA)을 이용하여 시행하였다. 반응 조건은 다음과 같다. 94°C에서 5분간 denaturation한 후, 94°C에서 denaturation 30초, 58°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 30초의 과정을 40회 반복 한 후, 72°C에서 1분간의 extension을 시행하였다. 증폭된 염기서열은 233 bp의 크기로 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후, UV transilluminator 위에서 확인하였다.

제한효소절편길이다형성(Restriction fragment length polymorphism, RFLP): Apo-1/Fas (CD95) 유전자의 MvaI 제한효소의 절단에 의한 제한효소절편길이다형성에 의해 나타나는 유전자형의 감별을 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 총 30µl의 반응액에 증폭된 DNA 10µl, 제한효소 MvaI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) 0.5 units, 효소완충액 3µl를 혼합하여 37°C에서 1시간 반응하여 ethidium bromide가 포함된 3% agarose gel에서 전기영동하여 UV transilluminator 위에서 DNA 밴드의 크기를 비교 관찰하였다.

Apo-1/Fas (CD95) 유전자는 -670부위에서 A→G로 치환유무에 따라 2개의 대립유전자인 G (allele *1) type과 A (allele *2) type을 나타내었다(6). 유전자 형은 동형 접합자(homozygote)의 경우 MvaI 제한효소에 의하여 모두 절단되는 경우(*1/*1 or G/G)에는 188 bp, 99 bp, 44 bp의 삼중밴드를 나타내었고, 모두 절단되지 않는 경우(*2/*2 or A/A)에는 233 bp, 99 bp의 이중밴드를 나타내었다. 이형접합자는(heterozygote) 233 bp, 188 bp, 99 bp, 44 bp의 사중밴드가 동시에 나타나는(*1/*2 or G/A) 3가지

형태의 유전자형이 나타남을 알 수 있었다(Fig. 1).

통계 처리. 골 관절염 환자군과 정상 대조군 사이에 Apo-1/Fas (CD95) 유전자의 유전자형과 대립유전자형의 발현 빈도에 대한 유의성 검정을 위하여 Chi-square 검증을 시행하였다. 유전자형의 발현빈도에 대한 유의성 검증은 3×2 contingency table을 이용하였고, 대립유전자의 발현빈도에 대한 유의성 검증은 2×2 contingency table을 이용하였다. 통계처리는 SAS program을 이용하였고, p < 0.05를 유의수준으로 채택하였다.

결 과

병원 내원 시 정상 대조군과 골 관절염 환자들의 임상적인 특징은 Table II와 같다. 골 관절염환자들의 평균나이는 58.7±9.4세로, 41세에서 82세까지의 분포를 보였다. 환자들의 남 : 녀 비는 40 : 108로 여자 환자가 약 2.5 배 많았으며, BMI는 25.2±3.0 kg/cm²로 측정되었다. 한편 정상 대조군의 평균나이는 55.4±6.7세였고, 남녀비는 72 : 154명이었으며 BMI는 24.7±2.6 kg/cm²로 나타나, 정상 대조군과 환자군 간에 유의성있는 차이는 없었다(p > 0.05).

정상 대조군과 일차성 무릎 골 관절염환자군 사이의 Apo/Fas (CD 95) 유전자형의 분포(Fig. 1)와 대립유전자 발현 빈도는 Table III과 같다. 대립유전자 *1만을 갖는 동형접합자의 빈도는 정상 대조군에서 45명(19.9%)이었고, 골 관절염 환자군에서는 27명(18.2%)이었다. 대립유전자 *2만을 갖는 동형접합자의 빈도는 정상 대조군에서 71명(31.4%)이었고, 골 관절염 환자군에서는 39명(26.4%)였다. 이형접합자(*1/*2)의 빈도는 정상 대조군에서 110명(48.7%)이었으며, 골 관절염 환자군에서는 82명(55.4%)였다. 따라서 정상 대조군과 환자군 간에 유전자형의 분포는 유의성있는 차이가 없었다(p > 0.05). 한편

대립유전자의 발현 빈도를 살펴보면 *1 (G)는 대조군의 경우 44.3%였으며, 골관절염 환자군의 경우는 45.9%였다. 대립유전자 *2 (A)의 발현 빈도는 정상 대조군에서 55.7%, 골 관절염 환자군에서 54.1%로 나타났다. 따라서, odds ratio (OR)와 95% confidence interval (CI)를 이용한 대립유전자형의 발현 빈도 역시 유의한 차이를 보이지 않았다(p > 0.05). 두 대립유전자의 carriage rate는 *1 (G)는 대조군의 경우 68.6%였으며, 골 관절염 환자군의 경우는 73.6%였다. 대립유전자 *2 (A)의 경우에는 정상 대조군에서 80.1%였으며, 골 관절염 환자군에서는 81.8%로 나타나 역시 유의한 차이를 보이지 않았다(p > 0.05).

그래서 골 관절염 환자들을 내원 시 시행한 진찰과 검사한 임상양상을 가지고 subgroup으로 나누어 각각의 유

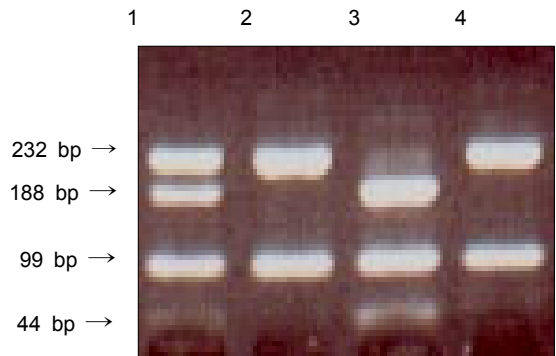


Figure 1. Genotype analysis of MvaI RFLP in Apo-1/Fas (CD95) promoter region. The PCR products were digested with MvaI and subjected to electrophoresis in a 3% agarose gel, followed by ethidium bromide staining. Lane 1. *1/*2 heterozygote (232/188/99/44 bp); Lane 2 & 4. *2/*2 homozygote (232/99 bp); Lane 3. *1/*1 homozygote (188/99/44 bp). 44 bp bands in lane 2, 4 were not shown.

Table II. Clinical characteristics of the 226 controls and 148 korean patients with knee osteoarthritis included in the study

	Controls (n=226)	Patients (n=148)	P value
Age, mean SD± years	55.4±6.7	58.7±9.4	NS
No. of female/males	154/72	108/40	NS
Body mass index, mean±SD kg/cm ²	24.7±2.6	25.2±3.0	NS
Duration of osteoarthritis, mean±SD years		6.8±5.9	
Kellgren-Lawrence grade, No I		8	
		81	
		55	
		4	
Lequesne's indices, mean±SD years		10.1±2.4	

Table III. The MvaI polymorphism in genotype, corresponding allele frequencies and carriage rate between korean control group and knee osteoarthritis patients

Fas gene	Controls n=226 (%)	Patients n=148 (%)	P value
*1/*1 (G/G)	45 (19.9)	27 (18.2)	NS
*1/*2 (G/A)	110 (48.7)	82 (55.4)	
*2/*2 (A/A)	71 (31.4)	39 (26.4)	
Allele frequency (%)			
*1 (G)	200 (44.3)	136 (45.9)	NS
*2 (A)	252 (55.7)	160 (54.1)	
Carriage rate (%)			
*1 (G)	155 (68.6)	109 (73.6)	NS
*2 (A)	181 (80.1)	121 (81.8)	

Table IV. The MvaI polymorphism in genotype and allele frequencies among clinical subtypes (K-L grade; Kellgren-Lawrence grade, L-indices; Lequesne's indices)

Clinical subtypes	N	Genotype			P value ^c	Allele frequency (%)		P value ^d
		*1/*1	*1/*2	*2/*2		*1	*2	
Male	40	7	21	12	NS	43.7	56.3	NS
Female	108	20	61	27	NS	46.8	53.2	NS
BMI ^a ≥ 25	66	16	31	19	NS	47.7	52.3	NS
Onset age ^b < 52	71	14	40	17	NS	47.9	52.1	NS
Onset age ≥ 52	77	13	42	22	NS	44.2	55.8	NS
K-L grade, mild	89	18	51	20	NS	48.9	51.1	0.0392 ^e
K-L grade, severe	59	9	31	19	NS	41.5	58.5	0.0473 ^f
L-indices, good	80	16	45	19	NS	48.1	51.9	NS
L-indices, poor	68	11	37	20	NS	43.4	56.6	NS

^aBody mass index (BMI) was calculated by kg/m² and suggested obesity that the cut-off value is ≥25, ^bThe mean age at onset in the OA patients was 52 yr, ^cThe χ^2 test (3×2 contingency) was performed to compare the distribution of MvaI genotype in OA patients or subtypes with that in the normals. The P value was calculated at 2 degrees of freedom. ^dThe χ^2 test (2×2 contingency) was performed to compare the frequency of MvaI alleles in OA patients or subtypes and the controls, ^eOR (95% CI) is 1.203 (1.009 to 1.435), ^fOR (95% CI) is 1.196 (1.002 to 1.427).

전자형의 분포와 대립유전자 빈도를 파악하여 정상 대조군과 비교하였다. Table IV에서 보듯이 환자들은 남녀 성별에 따른 차이를 발견할 수 없었고, 비만의 기준으로 정한 BMI ≥ 25인 경우와 평균 발병연령인 52세를 기준으로 나누어 비교했을 때도, 유의성있는 차이를 발견할 수 없었다. 하지만, 방사선학적으로 무릎 골 관절염의 진행 정도를 표시하는 기준인 Kellgren-Lawrence grade를 가지고 비교하였을 때, mild group (grade 1, 2)에서는 MvaI*2 (A) allele의 빈도가 유의하게 감소하는 것을 볼 수 있었고(p=0.0392, OR=1.203, 95% CI=1.009~1.435), severe group (grade 3, 4)에서 정상 대조군에 비해서, MvaI*2 (A) allele의 빈도가 유의성있게 증가한 것을 관찰할 수 있었다(p=0.0473, OR=1.196, 95% CI=1.002~1.427). 한편 두 군 간에 임상양상을 비교했을 때, mild group에서는 평균 나이가 58.1세, 남 : 녀 비가 25 : 64명이었고, BMI는 25.3 kg/cm²로 측정되었으며, Severe group에서는 평균나이가 59.3세, 남 : 녀 비가 16 : 43명, BMI는 25.0 kg/cm²로 측정되어 두 군 간에 차이가 없어서, 골 관절염에 영향을 줄 수 있는 다른 임상적인 요소를 배제할 수 있었다.

고 찰

최근에 여러 면역질환과 종양 질환에서 apoptosis에 대한 관심이 높아지면서, 질환의 병인과 진행에 대한 apoptosis 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 낭창과 같은 면역질환에서 Apo-1/Fas (CD95) 유전자의 핵심적인 역할이 보고되면서, human Apo-1/Fas (CD95) 유전

자의 MvaI RFLP가 주목을 받고 있다(6-8). 하지만 아직까지 이들 연구에서조차 질병의 병인과 MvaI RFLP와의 연관성이 뚜렷하게 정립되어 있지는 않다.

한편 몇몇 연구들에 의하면 골 관절염 연골세포에서 apoptosis가 항진되어 있는 것이 관찰되고 있어서, 그 기전을 찾는 연구가 있었지만, 아직까지는 apoptosis 유전자에 대한 연구가 없었기 때문에 저자들은 대표적인 apoptosis에 관련된 유전자인 Apo-1/Fas 유전자를 가지고 한국인의 일차성 무릎 골 관절염 환자와 정상인에게서 이 유전자의 분포 양상과 발현빈도를 살펴봄으로써 골 관절염에서 apoptosis가 항진되어 있는 원인을 찾고, 골 관절염의 위험인자로서의 유전적인 소인을 알아보려고 하였다.

결과에서 보듯이 정상 한국인에 있어서 Apo-1/Fas (CD95) MvaI polymorphism의 유전자의 분포는 서양인에 비해서 유의성있는 차이가 없었지만, 서양인에서는 *1/*1 대립유전자가 *2/*2 대립유전자에 비해 더 많은 반면(7), 한국인에서는 *2/*2 형이 더 많이 나타났고 일본에서도 우리의 결과와 유사한 결과를 보였다(16-18). 이는 단일 염기 유전자 다형성이 인종적인 차이를 갖는다는 사실을 뒷받침하는 결과이다.

또한 정상 대조군과 골 관절염 환자군 사이에 유전자형의 분포와 대립유전자 빈도와 연관도에는 유의성있는 차이를 관찰할 수 없었지만, 임상양상에 따라 골 관절염 환자들을 나누어 보았을 때, 내원 시 방사선학적으로 심한 경우에 *1 (G)형의 빈도가 유의성있게 적고, *2 (G)형의 빈도가 더 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이것은 *2 대립유전자를 많이 가지고 있는 골관절염 환자에

서 관절 연골세포의 apoptosis가 더 많이 항진되어 있을 가능성을 시사하는 의미있는 결과라고 할 수 있겠다. 기존의 보고 중에서 MvaI *2 대립유전자에 대한 것을 살펴 보면, Lee 등(17)은 전신성 홍반성 낭창환자에서 anti-RNP 항체가 양성의 빈도와 *2 형이 연관성이 있다고 보고하였고, Huang 등(7)은 전신성 홍반성 낭창 환자에서 *2/*2 형을 carriage하는 경우에 광과민성과 구강 궤양이 의미있게 높게 나타났다고 보고하였다. 이를 볼 때 Apo-1/Fas (CD95) MvaI polymorphism에 있어서 *2 대립 유전자는 질환의 중증성(severity)에 영향을 끼치는 것을 알 수 있으며, 이에 대해서 많은 수를 대상으로 하는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 결론적으로 골 관절염 환자에서 Apo-1/Fas (CD95) 유전자의 MvaI polymorphism을 측정하는 것은 부분적으로 골 관절염의 진행을 예측하는 지표가 될 수 있고, 골 관절염의 위험인자로서 역할을 할 수 있다고 생각된다.

감사의 글

실험에 도움을 주신 고령의학연구소 연구원 선생님들께 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, Jiang RF, Markos K, Davidson W, Scott DW, Shi YF: Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* 88;333-347, 2000
- Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ Jr: Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17;3287-3299, 1998
- Nagata S: Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci* 345;281-287, 1994
- Müllauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A: Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 488;211-231, 2001
- Cheng J, Liu C, Koopman WJ, Mountz JD: Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region. *J Immunol* 154;1239-1245, 1995
- Huang QR, Morris D, Manolios N: Identification and characterization of polymorphism in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Molecular immunology* 34; 577-582, 1997
- Huang QR, Danis V, Lassere M, Edmonds J, Manolios N: Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* 38;645-651, 1999
- Huang QR, Teutsch SM, Buhler MM, Bennetts BH, Heard RN, Manolios N, Stewart GJ: Evaluation of the apo-1/Fas promoter mva I polymorphism in multiple sclerosis. *Mult Scler* 6;14-18, 2000
- blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F: Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: a possible pathway for arthritis pathology. *Arthritis Rheum* 41;284-289, 1998
- Vaishnav AK, McNally JD, ElKon KB: Apoptosis in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 40;1917-1927, 1997
- Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, Lotz M: Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 40;1749-1755, 1997
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M: Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41;1632-1638, 1998
- Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K: Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 29;1039-1049, 1986
- Kellgren JH, Lawrence DM: Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 16;494-502, 1957
- Lequesne M, Méry C, Samson M, Gérard P: Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. *Scand J Rheumatol* 65 Suppl;85-89, 1987
- Lee YH, Ji JD, Sohn J, Song GG: Polymorphism of CTLA-4 exon 1 +49, CTLA-4 promoter -318 and Fas promoter -670 in spondyloarthropathies. *Clin Rheumatol* 20;420-422, 2001
- Lee YH, Kim YR, Ji JD, Sohn J, Song GG: Fas promoter -670 Polymorphism is associated with development of anti-RNP antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 28;2008-2011, 2001
- Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Tashiro K: An examination of the Apo-1/Fas promoter MvaI polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *BMC Neurology* 2;8-13, 2002