

【平成10年度業績】

1. Haruta K, Kobayashi S, Hirose S, Horiai A, Ohyanagi M, Tanaka M, Kawano T, Shirai T, Takasaki Y, Hashimoto H: Monoclonal anti-cardiolipin antibodies from New Zealand black x white F1 mice react to thrombomodulin. *J Immunol* 160:253-258, 1998.
2. Schmitt W.H, Cermok E, Kobayashi S, Klinkenborg A, Gross W.L: Churg-Straub-Syndrome(CSS) : Serum markers of lymphocyte activation and endothelial damage. *Arthritis Rheuma* 41:445-452, 1998.
3. Ikawa T, Ikeda M, Yamaguchi A, Tsai WC, Tamura N, Seta N, Trucksess M, Raybourne RB, Yu DT et al: Expression of arthritis causing HLA-B27 on Hela cells promotes of c-fos in response to in vitro invasion by *Salmonella typhimurium*. *J Clin Invest* 101:263-272, 1998.
4. Takasaki Y, Ohgaki M, Abe K, Takeuchi K, Ando S, Tokano T, Kobayashi S, Sekigawa I, Tsuda H. Hashimoto H: The expression of costimulatory molecule CD80 on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, in press
5. Ogiwara T, Ando S, Kobayashi S, Hishikawa T, Takasaki Y Hashimoto H: A case of intestinal Behcet's disease in association with HLA-B27 and HLA-B51. *Jpn J Rheumatol* 8:89-92, 1998
6. 小林茂人、橋本博史: 膠原病が引き起こす末梢循環障害. *Pharma Medica* 16: 117-122, 1998
7. 坂東秀明、小林茂人: 血管炎症候群の末梢神経障害. *リウマチ科* 19:463-467, 1998
8. 小林茂人、橋本博史: 悪性関節リウマチの概念と治療 *リウマチ科* 19:517-523, 1998
9. 小林茂人: 膠原病・アレルギー学、慢性関節リウマチ、日医事新報3851:10-12, 1998
10. 小林茂人: 反応性関節炎-最近の知見、日内会雑誌 87:1388-1394, 1998
11. 小林茂人: 患者のQOLを考慮した私の第一選択薬 ライター症候群 治療844-845, 1998
12. 藤井猛土、小林茂人: 高安動脈炎(大動脈炎症候群) 「外来診療のすべて」改訂第2版 監修高久史磨、溝口 秀昭、矢崎義雄、狩野庄吾、武藤徹一, pp796-797, メジカルビュー社, 1999
13. 海老塚岳彦 小林茂人: 関節外症状の治療: 慢性関節リウマチの診療, 永井書店, 1999出版予定
14. 小林茂人、橋本博史. Seronegative RAについて, 日本医事新報3904:106-108, 1999
15. 小林茂人. 血管炎症候群の臨床的分類, 治療学33:31-36, 1999
16. 小林茂人、橋本博史. 血管炎症候群, 日本臨牀 57:388-392, 1999
17. 小林茂人、橋本博史. 血管炎症候群 日本臨牀57:388-392, 1999
18. 小林茂人, フェルティ症候群、乾癬性関節炎、成人発症スチル病、回帰性リウマチ、好酸球性筋膜炎 家庭医学館、2051-2054, 小学館, 1999
19. 小林茂人、春田和彦、坂東秀明, 抗血管内皮細胞抗体と血管炎血管障害, *BIO linica* 14:347-352, 1999
20. Tamura N, Kobayashi S, Bando H, Haruta K, Akimoto T, Sugimoto K, Takasaki Y, Hashimoto H: Elevated levels of soluble CD40 ligand in the serum of patients with rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum*, vol 41 (9), Suppl, s312. 1998

10. 壊死性血管炎感受性遺伝子の解析

寺嶋一夫 (順天堂大学第二病理)

姜 奕 (順天堂大学第二病理)

濱野慶朋 (順天堂大学第二病理)

広瀬幸子 (順天堂大学第二病理)

鈴木和男 (国立感染症研究所生体防御物質室)

【キーワード】 壊死性血管炎、マイクロサテライト、(NZB x NZW)F1 マウス

【目的】 (NZB x NZW)F1 マウスモデルに発症する壊死性血管炎の感受性遺伝子を明らかにし、ヒト血管炎の成因を解明する。【方法】 (NZB x NZW)F1 x NZW 退交配雌マウスの全ゲノムを cover する 148 個の多型マイクロサテライトを用い、組織学的に確認された血管炎との相関を検索した。【結果】 退交配雌マウス中組織学的に検索された 112 例につき、NZB と NZW マウスの間に多型のあるマイクロサテライトと壊死性血管炎の有無との相関を genome wide に検索、血管炎主要感受性遺伝子領域が 2 つ推定された。第一は、第 3 染色体遠位側 D3MIT31 に連鎖した領域、第二は、第 6 染色体 D6MIT40 に連鎖した領域であった。各領域には血管炎と関連している可能性のある候補遺伝子が存在するので、今後検討していく。【結論】 壊死性血管炎の成因に 2 個の主要感受性遺伝子座が推定された。

Mapping of genes for necrotizing vasculitis in a model of (NZB x NZW) F1 mice

Kazuo Terashima, Yi Jiang, Yoshitomo Hamano, Sachiko Hirose (Department of Pathology, Juntendo University School of Medicine), Kazuo Suzuki (Laboratory of Biodefense, National Institute of Infectious Disease)

【Purpose】 Analysis of susceptibility genes for necrotizing vasculitis in a model of (NZB x NZW) F1 mice. 【Methods】 Female 112 (NZB x NZW) F1 x NZW backcross mice were subjected to histological analysis for vasculitis and genome wide scans for 148 microsatellite markers polymorphic between NZB and NZW mouse strains. Linkage analyses were performed using χ^2 test and the MAPMAKER/QTL. 【Results】 In linkage analyses between the histologically determined vasculitis and microsatellite

markers, we identified two major loci responsible for the vasculitis, one which is linked to D3MIT31 on chromosome 3 and the other linked to D6MIT40 on chromosome 6. Studies on potentially important candidate genes are ongoing. [Conclusion] Two major chromosomal loci for necrotizing vasculitis in a model of (NZB x NZW) F1 mice were identified.

【研究要旨】壊死性血管炎の発症を左右する遺伝的因子を明らかにするために、(NZB x NZW)F1 マウスモデルの血管炎に関与する NZB 感受性遺伝子の染色体分布を、112 匹の(NZB x NZW)F1×NZW 退交配雌マウスについてマイクロサテライト法で genome-wide に解析した。その結果、血管炎の判定基準により多少の違いはあったが、第3、4、5、6 染色体に有意の連鎖をしめすマイクロサテライト座が発見された。この中で、主要感受性遺伝子は第3 染色体 D3MIT31 と第6 染色体 D6MIT40 に連鎖して存在すると考えられた。現在、候補遺伝子の検索を行っている。

【研究目的】血管炎自然発症系の純系マウスが存在するという事実はある種の血管炎の発症に遺伝的要因が関与していることを端的に示している。(NZB x NZW)F1 や NZB マウス系には加齢とともに壊死性血管炎が自然発症する (1)。これらのマウスには MPO-ANCA が検出されるので、ANCA 関連血管炎のモデルと考えられる。ヒトの MPO-ANCA 関連壊死性血管炎にも遺伝的要因が関与している可能性があるが、ヒトの場合遺伝的多型が多いため、genome-wide に感受性遺伝子を解析する事は難しい。本研究では、先ずモデル系から感受性遺伝子を推定し、その知見をもとにヒト壊死性血管炎感受性遺伝子を同定することを目的とした。

【研究方法】血管炎を発症する(NZB x NZW)F1 と発症しない NZW とを交配した(NZB x NZW)F1×NZW 退交配雌マウスについて、全ゲノムをカバーし、しかも NZB と NZW マウス間に多型のある 148 個のマイクロサテライトマーカーについて、PCR 法により各マウスの genotype を決定し、組織学的に確認された血管炎との相関を χ^2 検定と MAPMAKER/QTL による QTL 解析(2, 3)で解析した。血管炎の病理組織学的判定については、(1) フィブリノイド変性を伴う病変のみを血管炎とし他を陰性とする判定、また、(2) 血管の硝子様変性をフィブリノイド変性の前駆病変としてともに血管炎とし他を陰性とした判定、(3) フィブリノイド変性群を 2、硝子様変性群を 1、他を 0 とした量的形質判定を行った。

【結果と考案】112 匹の(NZB x NZW)F1×NZW 退交配♀マウスについて病理組

織解析を前述した基準で行ない、血管炎の有無と各マイクロサテライトの多型との相関を χ^2 検定した結果、各々第3、4、5、6染色体に連鎖するマイクロサテライト座が見いだされた。このうち、各基準による成績を総合してNZBマウスの各々D3Mit31と第6染色体のD6MIT40に強く連鎖した領域に主要感受性遺伝子が存在することが推定された (polyarteritis necrotizing-1 and -2; *Pan-1* と *Pan-2*)。interval mapping を行ってみると第3染色体ではD3MIT31とD3Nds2との間に、また、第6染色体ではD6MIT40とD6MIT9との間に各々*Pan-1*と*Pan-2*が存在する可能性が示された。

D3MIT31近傍にはEGF、MTP、NF κ B1など遺伝子が存在するが、この領域は先にWangと能勢ら(2)が、MRL/lprマウスの肉芽腫性血管炎に関連した遺伝子座 (*Lprm2*)としてmapしたlocusの近傍である。アレルギー性肉芽腫性血管炎と壊死性血管炎にはともにMPO-ANCAが高率に出現するという共通性があるし、これらのモデルである各々MRL/lprマウスと(NZB x NZW) F1マウスにも共通して、MPO-ANCAが出現するので、*Pan-1*はこの両血管炎に共通した遺伝的要因と関連している可能性がある。一方、D6MIT40の近傍には転写因子を制御しているとされる*EGR4* (early growth response gene)や*Tgfa*, *Anx4*(annexin IV)がmapされている。今後、これらの遺伝子について、その多型性を調べ血管炎との関連を検討することが必要と思われる。

【結論】壊死性血管炎モデルマウス系を用いた解析で、最低2個の感受性遺伝子座が明らかとなった。今後、各遺伝子座から推定される候補遺伝子について検索を進めていく。

【参考文献】

1. Shirai, T., Hirose, S., Okada, T. & Nishimura, H.: Immunology and immunopathology of the autoimmune disease of NZB and related mouse strains. In Immunological Disorders in Mice. (Eds. Rihova, E.B. & Vetvicka, V.) CRC Press, Inc., N.W. Boca Raton, Fla., 95-136, 1991.
2. Ida, A., Hirose, S., Hamano, Y., Kodera, S., Jiang, Y., Abe, M., Zhang, D., Nishimura, H. & Shirai, T.: Multigenic control of lupus-associated antiphospholipid syndrome in a model of (NZB x BXSB)F1 mice. Eur. J. Immunol. 28: 2694-2703, 1998.
3. Hamano, Y., Hirose, S., Ida, A., Abe, M., Zhang, D., Kodera, S., Jiang, Y., Shirai, J., Miura, Y., Nishimura, H. & Shirai, T.: Susceptibility alleles for aberrant B-1 cell proliferation involved in spontaneously occurring B-cell chronic lymphocytic leukemia in model of New Zealand mice. Blood, 92: 3772-3779, 1998.

4. Wang, Y., Nose, M., Kamoto, T., Nishimura, M. & Hiai, H.: Host modifier genes affect mouse autoimmunity induced by the *lpr* gene. *Am. J. Pathol.* 151: 1791-1798, 1997.

【平成10年度研究成果】

1. Ida A, Hirose S, Hamano Y, Kodera S, Jiang Y, Abe M, Zhang D, Nishimura H. & Shirai T.: Multigenic control of lupus-associated antiphospholipid syndrome in a model of (NZB x BXSB)F1 mice. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2694-2703.

2. Hamano Y, Hirose S, Ida A, Abe M, Zhang D, Kodera S, Jiang Y, Shirai J, Miura Y, Nishimura H. & Shirai T.: Susceptibility alleles for aberrant B-1 cell proliferation involved in spontaneously occurring B-cell chronic lymphocytic leukemia in model of New Zealand mice. *Blood* 1998; 92: 3772-3779.

3. Fujimura T, Hirose S, Yi J, Kodera S, Ohmuro H, Zhang D, Hamano Y, Ishida H, Furukawa S. & Shirai T.: Dissection of effects of tumor necrosis factor- α and class II gene polymorphisms within the major histocompatibility complex on a murine systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* 1998; 10: 1467-1472.

4. Hirose S, Jiang Y, Hamano Y. & Shirai T.: Multigenic control of B1 cell proliferation and maturation as related to autoimmune disease and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int. Rev. Immunol.* in press.

11. 膠原病疾患群の発病・進展機構におけるオステオポンチン遺伝子多型の役割

能勢 真人 (愛媛大学医学部第二病理)
宮崎 龍彦 (愛媛大学医学部第二病理)
曲 衛敏 (愛媛大学医学部第二病理)
寺田 美穂 (愛媛大学医学部第二病理)
西原 美由紀 (愛媛大学医学部第二病理)
鴨川 淳二 (愛媛大学医学部第二病理)
森 士朗 (東北大学歯学部口腔外科)

KEYWORD = 背景遺伝子, MRL/lprマウス, 遺伝子多型, 疾患感受性遺伝子, オステオポンチン

【研究要旨】 膠原病疾患群の病像はきわめて多様で、かつ個々の疾患に類似性を有し、その遺伝要因にはポリジーン系が関わりと目されるも、その実体は明らかでない。この疾患群ときわめて類似した病像を発症するMRL/lprマウスは、この遺伝様式の解明に絶好のモデルと思われる。我々は、これらの発症機序を遺伝的基盤に立って検討するとともに、膠原病疾患群を発症しないC3H/lprマウスとの戻し交配系を用いて血管炎感受性遺伝子座を解析し、膠原病疾患群における血管炎の位置づけを行ってきた。その中で、MRL/lprマウスの肉芽腫性動脈炎にはFas欠損遺伝子*lpr*のみでは不十分で、MRL系マウス固有の背景遺伝子群の存在が必須であること、個々の疾患に対応する遺伝的に分離可能な疾患感受性遺伝子および疾患抑制遺伝子群が存在することを明らかにしてきた。今回は、候補因子の一つであるオステオポンチン(OPN)の構造遺伝子多型と各疾患の発症・進展との関連を解析した。発症月齢のMRL/lpr x (MRL/lpr x C3H/lpr)F1 (N2マウス)および(MRL/lpr x C3H/lpr)F2マウス群を対象に、各個体の血管炎、糸球体腎炎、関節炎、唾液腺炎の有無を組織学的に個別的形質として判定し、OPN遺伝子型と各疾患発症・進展の関連を解析したところ、F2マウス群において糸球体腎炎発症との間にのみ有意な関連を認めた。一方、既知のオステオポンチン受容体遺伝子座と各疾患発症頻度の間には関連を認めなかった。OPN遺伝子は自己免疫性糸球体腎炎の疾患感受性遺伝子の一つであり、遺伝子多型によるOPNの構造・機能の差異が疾患感受性を規定していることが示唆された。

【研究目的】 系統的血管炎はSLEや慢性関節リウマチに代表される膠原病疾患群にしばしば合併する。従来、この合併症はこれらの疾患病態の延長上での重症型としてとらえられ、その発症機序に免疫複合体や自己抗体の関与が重要視されてきた。しかし一方で、これらの合併症を有する症例が別の疾患カテゴリーに属するとの捉え方もなされており、未だ結論を見ない。¹⁾²⁾³⁾

Fasの欠損変異遺伝子*lpr*を有するMRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/lpr)マウスは、多発性動脈炎を自然発症する数少ないモデルマウスであるが、このマウスは、糸球体腎炎、関節炎をも同一個体に発症し、膠原病疾患群のポリジーン遺伝の解析において絶好のモデルとなると思われる⁴⁾。この動脈炎の発症機序は、他の二疾患同様、主として免疫複合体、自己抗体を軸とするアレルギー反応を共通基盤とする概念の中で論じられてきたが⁵⁾⁶⁾⁷⁾、近年我々は、この疾患群の多様性の起源

が、MRL系マウスが有するところの背景遺伝子組み合わせに基づくことを示唆した⁸⁹⁾。既に我々は、戻し交配による背景遺伝子のrecombinationを通じて、動脈炎のみを発症する系統マウスの作出に成功し、その解析などから、これらの疾患群が、少なくとも腎炎、血管炎、関節炎に関する限り、各々の疾患に固有な、かつ遺伝的に分離可能な背景遺伝子に基づくことを明らかにしてきた¹⁰⁾¹¹⁾。さらに、MRL/lpr x (MRL/lpr x C3H/lpr)F1マウスを用いた膠原病疾患群の遺伝様式と個々の疾患感受性遺伝子の解析により、血管炎に特有の感受性および抵抗性候補遺伝子座を明らかにした¹²⁾。今回、候補因子の一つと目してきたオステオポンチンの遺伝子多型と、各疾患の発症・進展の関連を解析した。

【研究方法】 マウス：MRL/MpJ-*lpr/lpr* (MRL/lpr)、C3H/HeJ-*lpr/lpr* (C3H/lpr)、MRL/MpJ-+/+マウスは合衆国ジャクソン研究所より購入後、東北大学部動物実験施設にて維持、繁殖し、これらからMRL/lpr x (MRL/lpr x C3H/lpr)F1 (N2マウス)および(MRL/lpr x C3H/lpr)F2 (F2マウス)を作出し、N2マウス179匹、F2マウス269匹を実験に供した。

組織病理学的解析：4-5ヶ月例に達した各群マウスの諸臓器をホルマリン固定後、パラフィン包埋した組織標本をHE染色、エラスティカ・マッソン染色、PAS染色し、光学顕微鏡下に動脈炎、関節炎、糸球体腎炎の有無を判定した。なお、動脈炎は、外膜側における肉芽腫形成に伴う外弾性板の破壊、あるいはこれに続く中膜の変性と内膜肥厚や内弾性板の破壊像を呈するものを、関節炎は、足関節滑膜の絨毛状の肥厚、あるいはパンプス形成を呈するものをそれぞれ陽性個体とした。また、糸球体腎炎は、少なくとも管内増殖型病変を有する糸球体が50%以上を占めるものを陽性個体とした。

オステオポンチン遺伝子型のPCR-RFLP解析：すでに我々はMRL-Mp系とC3H-HeJ系にオステオポンチンの遺伝子多型のシークエンス解析から、一カ所のsubstitutionがNde-1による切断サイトとなっていることを明らかにしている¹³⁾。各個体の肝あるいは尻尾より抽出したDNAを用いて、オステオポンチン遺伝子に対するプライマーでPCRを行い、このPCR産物をNde-1で切断したものをアクリルアミドゲルで電気泳動し、その泳動パターンより各個体のOPN遺伝子型(MRL/MRLホモあるいはMRL/C3HヘテロとC3H/C3Hホモ)について、疾患陽性個体数と、陰性個体数間での2x2分割表を用いたカイ二乗検定を行い、これらマウスのOPN遺伝子型と各疾患発症頻度の関連を解析した。OPN領域に一致する多型マイクロサテライトマーカーD5Mit115を用いたPCR法によるハプロタイプと各疾患発症頻度の関連解析も並行して行った。

5番染色体における疾患感受性遺伝子座の解析：常染色体を約10cM断片レベルでカバーする多型性マイクロサテライトマーカー(Research Genetics社より購入)を選び出し、上述のDNAを用いてPCR法によるゲノムワイドスキャンを行い、個々のマーカー位置における遺伝子型と各疾患発症頻度の関連について解析した。

既知のオステオポンチンレセプター遺伝子座のマーカー遺伝子型と疾患発症の関連解析：

上記と同様の手法により、既知のオステオポンチンレセプター遺伝子座(CD51; Chr.2 46cM, CD61; Chr.11 68cM, CD44; Chr.2 56cM)につき、この部位の多型マイクロサテライトマーカーを用いて、その個々の遺伝子型と疾患発症頻度の関連を解析した。

オステオポンチンmRNA発現量の半定量的解析：F2マウスの脾細胞よりmRNAを抽出し、定法によりcDNAを作成し、OPNのexon5からexon6の領域に設定したspecific primerを用いてRT-PCRを行い、HPRTを内部コントロールとしてその電気泳動バンドを半定量的に解析した。

【結果と考察】RFLPによるOPNの遺伝子型は、多型マイクロサテライトマーカーD5Mit115のそれと完全に一致した。F2マウスにおいて、OPN遺伝子型と糸球体腎炎の発症・進展の間にE. Landerらの定義¹⁴⁾によるsuggestive linkageに相当する有意な関連(P=0.00079)を認めた。5番染色体におけるゲノムワイドスキャンの結果、OPN遺伝子型が糸球体腎炎の発症・進展との間にもっとも高い関連を示した。(図-1)そのほかの疾患の発症・進展の間には有意な関連を認めなかった。また、既知のオステオポンチンレセプターのマーカー遺伝子型と各疾患の発症頻度の間には関連を認めなかった。これらのことから、のOPN遺伝子座(Spp-1)のMRL型はC3H型のそれに対し、優性に糸球体腎炎感受性を規定していることが示唆された。

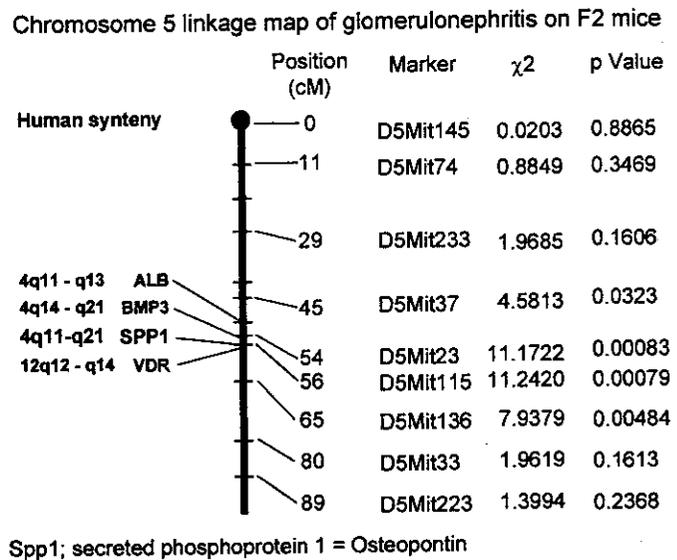


図 1

脾細胞におけるOPNmRNAの発現量と、疾患発症またはOPN遺伝子型との間には明らかな関連を認めなかった。

オステオポンチンは、RGDSモチーフを持つCa結合蛋白で細胞外マトリクス蛋白としてのみならず、元来、リケッチア感染に対する感受性・抵抗性を規定する形質*Ric S* および*Ric R*に関連して研究されたことから明らかなように、免疫能に関与することが示唆されてきた¹⁶⁾¹⁶⁾。また、その機能としてマクロファージの遊走、マクロファージ存在下でのポリクローナルなB細胞活性化を誘導し、抗体産生の亢進を誘導することや¹⁷⁾、MRL/lprで異常に増殖するCD4/CD8⁺ T細胞に産生されることが報告されており、自己免疫疾患の発症に関与する可能性が示唆されている¹⁸⁾。近年、ラットにおいて、局所における発現動態の解析から半月体形成性糸球体腎炎に関与することも示唆されている¹⁹⁾。これらの報告においては、オステオポンチンの局所における発現量の多寡が自己免疫疾患または自己免疫状態に関連するという考えに基づくものであるが、今回の我々の研究結果においては、量的形質としてのOPNmRNA発現量と疾患発症の間には関連を認めなかった。一方で、我々はすでにオステオポンチンのMRL系とC3H系間での遺伝子多型が少なくとも10カ所のアミノ酸のsubstitutionを含み、そのうち7カ所が構造変異を誘導する可能性があることを明らかにしており、さらにこれらの中にはRGDSモチーフのごく近傍に位置するものや、機能性結合サイト内のももある¹⁸⁾。本研究の結果をこれらと考えあわせ、図-2に示すごとく、オステオポンチンの遺伝子多型による構造・機能の差

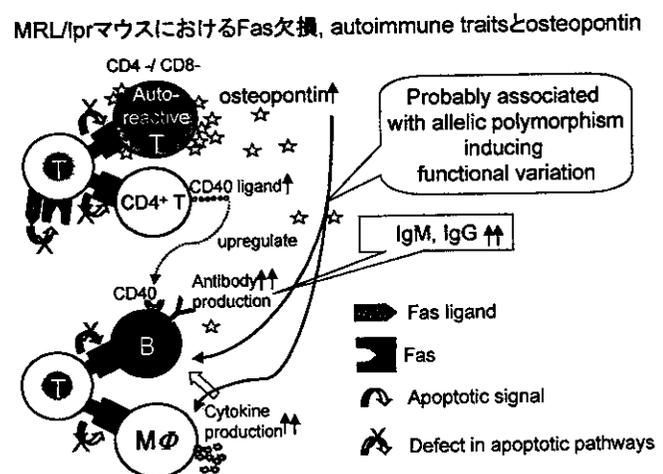


図 2

異が糸球体腎炎発症・進展に関与している可能性が示唆された。

【結論】 オステオポンチンは自己免疫性糸球体腎炎の疾患感受性遺伝子の一つであり、遺伝子多型によるOPNの構造・機能の差異が疾患感受性を規定していることが示唆された。しかし、血管炎発症との関連は明らかでなかった。

【参考文献】

- 1) Fauci AS. The spectrum of vasculitis: Clinical, pathological, immunologic and therapeutic considerations. *Ann. Intern. Med.* 1978;**89**:660-75.
- 2) Arend WP. Vasculitis and immune complex disease. In: Cohen AS, Benett JC, editors. *Rheumatology and Vasculitis*. Orland: Grune Stratton Inc., 1986:469-74.
- 3) Goronzy JJ, Weyand CM. Vasculitis in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1994;**6**:290-4.
- 4) Murphy ED, Roths JB. Autoimmunity and lymphoproliferation induction by mutant gene *lpr* and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB mice. In: Rose NR, Bigazzi PE, Warner NL, editors. *Genetic control of autoimmune disease*. New York: Elsevier North Holland, 1978:207-21.
- 5) Harper JM, Lockwood CM, Cooke A. Anti-neutrophil cytoplasm antibody in MRL-*lpr/lpr* mice. *Clin. Exp. Immunol.* 1993;**93**:22.
- 6) Berden JHM, Hang L, McConahey PJ, Dixon FJ. Analysis of vascular lesions in murine SLE. I. Association with serologic abnormalities. *J Immunol.* 1983;**130**:1699-705.
- 7) Reininger L, Berney T, Shibata T, Spertini F, Merino R, Izui S. Cryoglobulinemia induced by a murine mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990;**87**:10038-42.
- 8) Nose M, Nishimura M, Kyogoku M. Analysis of granulomatous arteritis in MRL/Mp autoimmune disease mice bearing lymphoproliferative genes. The use of mouse genetics to dissociate the development of arteritis and glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 1989;**135**:271-80.
- 9) Nose M. Genetic Basis of Vasculitis in Lupus Mice. In: Tanabe T, editor. *Intractable Vasculitis Syndromes*. Sapporo: Hokkaido University Press, 1993:145-53.
- 10) Takahashi S, Nose M, Sasaki J, Yamamoto T, Kyogoku M. IgG3 production in MRL/*lpr* mice is responsible for development of lupus nephritis. *J. Immunol.* 1991;**147**:515-9.
- 11) Nose M, Nishimura M, Ito MR, Toh J, Shibata T, Sugisaki T. Arteritis in a novel congenic strain of mice derived from MRL/*Lpr* lupus mice: genetic dissociation from glomerulonephritis and limited autoantibody production. *Am. J. Pathol.* 1996;**149**:1763-9.
- 12) Wang Y, Nose M, Kamoto T, Nishimura M, Hiai H. Host modifier genes affect mouse autoimmunity induced by the *lpr* gene. *Am. J. Pathol.* 1997;**151**:1791-8.
- 13) Ono M, Yamamoto T, Nose M. Allelic difference in the nucleotide sequence of the *Eta-1/Op* gene transcript. *Mol. Immunol.* 1995;**32**:447-8.
- 14) Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.* 1995;**11**:241-7.

- 15) Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, et al. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J. Exp. Med.* 1989;**170**:145-61.
- 16) Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit. Rev. Immunol.* 1993;**13**:225-46.
- 17) Singh RP, Patarca R, Schwartz J, Singh P, Cantor H. Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. *J. Exp. Med.* 1990;**171**:1931-42.
- 18) Patarca R, Wei FY, Singh P, Morasso MI, Cantor H. Dysregulated expression of the T cell cytokine Eta-1 in CD4-8-lymphocytes during the development of murine autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1990;**172**:1177-83.
- 19) Yu XQ, Nikolic Paterson DJ, Mu W, Giachelli CM, Atkins RC, Johnson RJ, et al. A functional role for osteopontin in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 1998;**110**:50-64.

【平成10年度の研究成果の刊行に関する一覧表】

1. Nose M. Genetic basis of collagen disease in MRL mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis: Dissection of the complex pathological manifestations. *Connective Tissue* 1998;**30**:297-300
2. Nose M, Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Mori S, et al. Vasculitis-susceptible genes in mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis. *Int. J. Cardiol.* 1998;**66**:S37-41
3. Murakami K, Ohsawa M, Hu SX, Kanno H, Aozasa K, Nose M. A case of large vessel arteritis associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Arthritis. Rheum.* 1998;**41**:369-373
4. 能勢真人. 血管炎の遺伝的要因:モデル動物からのアプローチ. *病理と臨床* 1998;**16**: 292-299
5. 能勢真人. 膠原病疾患群における血管炎の遺伝的基盤:MRL/lpr モデルマウスからのアプローチ. *最新医学* 1998;**53**:1454-1465
6. 能勢真人. 血管炎モデルマウス(MRL系). *Mol. Med.* 1998;**35**:261-265
7. 宮崎龍彦, 能勢真人. 血管炎症候群 —その発症進展の分子メカニズム—. *実験医学* 1998;**16**:750-757

12. HTLV-I LTR-env-pX ラットの血管炎の解析

吉木 敬 (北海道大学医学部第一病理)

柴田 雅彦 (北海道大学医学部第一病理)

菅谷 壽晃 (北海道大学医学部第一病理)

富居 一範 (北海道大学医学部第一病理)

池田 仁 (北海道大学医学部第一病理)

KEYWORD=血管炎, 膠原病, 動物モデル, HTLV-I, トランスジェニックラット

[目的] 血管炎発症 HTLV-I LTR-env-pX トランスジェニックラット(env-pX ラット)について、血管炎を組織病理学的に分類する。正常ラットとの骨髄あるいは脾細胞移入後の血管炎の組織像を検討し、その発症病態を明らかとする。[方法] env-pX ラットの血管炎を発生部位や組織学的特徴で分類する。env-pX ラットと正常ラット間で骨髄細胞および脾細胞移入を行い、血管炎を分類に沿って検討する。[結果] env-pX ラットの血管炎を4種類に分類した。細胞移入では env-pX ラット脾細胞を正常ラットに移入した群と正常骨髄細胞で骨髄置換した env-pX ラット群でコントロール群と同様の血管炎を発症した。[結論] env-pX ラットの血管炎は組織学的にはヒトの PN、Wegener 肉芽腫症、膠原病の血管炎に類似していた。どの血管炎発症にも、リンパ球成熟組織での env-pX 遺伝子が重要であると考えられた。

Vasculitis in an HTLV-I LTR-env-pX transgenic rat model of collagen vascular diseases.

Takashi Yoshiki, Masahiko Shibata, Toshiaki Sugaya, Kazunori Fugo, Hitoshi Ikeda
Hokkaido University School of Medicine, Department of Pathology

[Purpose] To investigate the vasculitis in a transgenic rat model carrying HTLV-I LTR-env-pX gene (env-pX rats), we classified the vasculitis according to the histopathology of vasculitis in humans. Also, we examined histopathologically the vasculitis which developed in rats with bone marrow or spleen cell transfer experiments. [Methods] The histopathological examination was done to each series of sections which were prepared from env-pX rats at various ages and wild-type / env-pX chimeric rats at 6 months after bone marrow or spleen cell transfer experiments. [Results] Four histopathological types of vasculitis were observed in env-pX rats. All types of vasculitis developed in wild-type rats received with spleen cells of env-pX rats and in env-pX rats reconstituted the bone marrow with bone marrow cells of wild type. [Conclusion] Vasculitis in env-pX rats resembled polyarteritis nodosa, Wegener's granulomatosis, or vasculitis with other collagen diseases. Results of cell transfer experiments suggest that the effective expression of env-pX gene in the process of lymphocyte maturation may generate vasculitis in env-pX rats.

【研究要旨】 血管炎発症 HTLV-I LTR-env-pX トランスジェニックラット(env-pX ラット)について、血管炎の組織の組織像を詳細に検討、再評価を加え、4種類に分類した。また、ヒト血管炎との組織学的比較により結節性多発性動脈炎、Wegener 肉芽腫症、膠原病に伴う血管炎に類似した組織像を呈している血管炎が存在することが判明した。正

常ラットとの間での骨髄あるいは脾細胞移入後の血管炎の組織像を検討したところ、env-pX ラット脾細胞を正常ラットに移入した群と正常骨髄細胞で骨髄置換した env-pX ラット群で陽性コントロール群と同様の血管炎を発症していたが、ほかの組み合わせにはどのタイプの血管炎も発症していなかった。したがって、env-pX ラットに発症する血管炎はどのタイプの組織像を呈する、リンパ球成熟組織での env-pX 遺伝子が重要であると考えられた。

【研究目的】

我々は HTLV-I の LTR をプロモーターに env-pX 遺伝子を発現する WKAH 系 HTLV-I env-pX トランスジェニックラット (env-pX ラット) を作製し、これまでに血管炎をはじめ様々な collagen vascular diseases の発症や免疫異常の存在を報告してきた¹⁾。本年度は、env-pX ラットに認める血管炎について、より詳細な病理組織学的検討を行い、その血管炎を分類する。また、正常ラットとの間で行なった骨髄細胞あるいは脾細胞移入によっても発症する血管炎についても再評価し、血管炎の発症にはどの組織、細胞での導入遺伝子の発現が最も重要かを明らかにする。

【研究方法】

以前に作製された種々の週齢の env-pX ラットから血管炎発生頻度の高かった心臓、肺、胸腺周囲脂肪組織、後腹膜、腸間膜、精巣周囲組織を中心に多数片の切片を作製、血管炎の病理組織学的分類を行った。また、細胞移入実験は以下の要領で行った。生後 6 週令の env-pX ラットおよび正常同系統ラット (WKAH ラット) に 12Gy の放射線を照射後、生後 6~8 週令の env-pX ラットおよび正常ラットから採取した骨髄細胞あるいは脾細胞を 1×10^8 個を尾静脈より静注することにより、計 4 群の骨髄あるいは脾細胞移入ラットを作製した。5~6 ヶ月観察後犠牲死させ発症した血管炎について上記での分類に従い検討した。

【結果と考察】

env-pX ラットに発生した血管炎を組織病理学的に詳細に検討した結果、以下の組織像が含まれていた。1) 血管壁にフィブリノイド壊死を主体として認めるもの(図 1a)、2) 血管内に血栓を伴う動脈炎を示すもの(図 1b)、3) 毛細血管炎で肉芽腫形成を伴うもの(図 1c)、4) 多核巨細胞を含む肉芽腫を形成するもの(図 1d)である。

フィブリノイド壊死を主体とするものは肺動脈、冠動脈、腹腔動脈などの中~小型の筋性動脈に、血栓性の肉芽腫性炎を示すのは冠動脈に、毛細血管炎は後腹膜、腸間膜、精巣周囲組織内に、巨細胞を伴う肉芽腫炎は肺末梢に認められた。一方、骨髄細胞移入、脾細胞移入のそれぞれの組み合わせで血管炎を含むさまざまな疾患の発症をみたが、血管炎は env-pX ラットの骨髄細胞移入では正常ラットに誘導はできなかったが、脾細胞を移入することにより誘導できた (SCT)。また、正常ラット脾細胞を env-pX ラットに移入することによって血管炎を含むほとんどすべての疾患の発症を抑制できたが、骨髄細胞移入ではいくつかのほかの疾患と同様に血管炎の発生を抑制できなかった (BMT)。この血管炎がみられた二つ群での血管炎像は陽性コントロール (PC) である env-pX ラットから env-pX ラットへの細胞移入で見られたものとほぼ同様のパターンであった (表 1)。

図1 env-pX ラットに発症する血管炎の種類

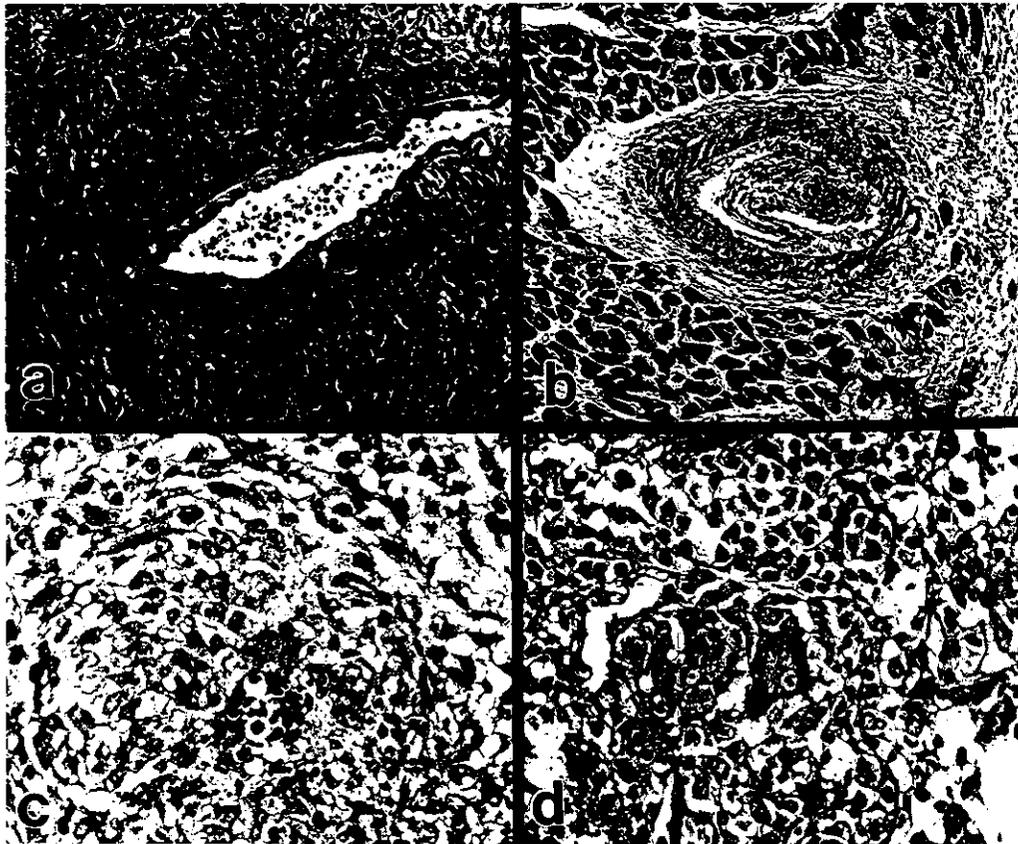


表1 env-pX ラットおよび細胞移入後のラットに発生する血管炎の部位と組織学的種類

	env-pX	Tg/Tg (PC)	Tg/non-Tg (SCT)	non-Tg/Tg (BMT)
冠動脈				
フィブリノイド壊死	1/4	0/3	0/9	0/7
血栓性閉塞性動脈炎	2/4	0/3	0/9	0/7
肺動脈				
フィブリノイド壊死	1/4	0/3	0/9	0/7
末梢肉芽腫	4/4	2/3	3/9	3/7
後腹膜～腸間膜				
脂肪織炎	4/4	2/3	3/9	1/7
腹腔動脈				
フィブリノイド壊死	1/4	0/3	0/9	0/7
精巣周囲脂肪織炎	ND	2/3	3/9	2/7
胸腺周囲小動脈				
フィブリノイド壊死	0/4	0/3	1/9	0/7

ND: not done

ヒト血管炎はその病理組織像が多彩で疾患によって侵される血管の種類や部位の異なることが知られている。したがって、その成因には多種多様な因子が関連していると考えられるが、自己免疫疾患の多くで血管炎を伴うことや血管炎動物モデルの解析 2), 3)から、各種のアレルギーなど免疫学的機序が血管炎発症に深く関与していることは間違いない。一方、以前から血管炎を含む種々の自己免疫疾患の病因としてウイルスが注目されている。ヒト成人T細胞白血病の原因ウイルスとして同定された HTLV-I は、白血病以外にも慢性関節リウマチ類似の関節炎や Sjögren 症候群類似の唾液腺炎、筋炎、皮膚炎などさまざまな自己免疫疾患類似の病態形成に関与していることが明らかになってきている 4)。我々は HTLV-I の env および pX 領域を LTR プロモーターとともに WKAH ラットに導入した env-pX ラットを作製し、ヒト HTLV-I 関連疾患と同様の関節炎、唾液腺炎、筋炎などのほか血管炎を含む種々の疾患の発症、抗核抗体やリウマトイド因子、抗リン脂質抗体の出現といった自己抗体の産生、炎症局所での CD4 陽性 T 細胞主体の細胞浸潤を認め、自己免疫疾患のモデルともなることを報告してきた 1)。いままでの研究から、このラットの末梢 T 細胞は免疫学的易反応状態にあり、炎症局所浸潤細胞の主体が CD4 陽性 T 細胞であることや血管壁に IgG や補体成分の有意な沈着はないことより env-pX ラットの血管炎は細胞性免疫主体の IV 型アレルギー機序によって発症すると思われる。実際、このラットでは免疫複合体形成が関与する糸球体腎炎は発症しないし、病理組織像も血管炎の発生部位としては中～小型の筋性動脈あるいは細小血管から毛細血管で、フィブリノイド壊死を伴うもののほか血栓性閉塞性動脈炎あるいは肉芽腫形成性毛細血管炎や巨細胞を伴う肉芽腫である。

env-pX ラットと正常ラットの間での骨髄細胞あるいは脾細胞移入実験の結果、血管炎は env-pX ラットの成熟したリンパ球を含む脾細胞移入で正常ラットに発症誘導が可能であるが、未熟なリンパ球主体の骨髄細胞では発症しなかった。一方、正常ラット骨髄細胞は env-pX ラットの血管炎発症を抑制できないが、正常ラット脾細胞は完全に抑制した。すなわち、この血管炎の発症する組み合わせに共通するのは、いずれの場合も env-pX 遺伝子の存在する組織内でリンパ球が成熟していることである。細胞移入実験は他の疾患についても検討したが、この血管炎と同じ組み合わせで発症する疾患はなく、env-pX ラットの血管炎は他の疾患とは独立して発症している可能性が示唆される。さらに、細胞移入実験で発症した血管炎は陽性コントロールである env-pX ラット同志の細胞移入で発症するすべての組織型の血管炎を含んでおり、いずれの組織型の血管炎にもリンパ球成熟組織での導入 env-pX 遺伝子の発現が重要であると考えられた。

【結論】

env-pX ラットに発生する血管炎について、詳細な病理組織学的検討を加えた結果、このラットに発生する血管炎はヒト結節性多発性動脈炎、Wegener 肉芽腫症あるいは膠原病に伴う血管炎と類似性があり、ヒト難治性血管炎の動物モデルと言える。一方、これらの血管炎は env-pX ラットの骨髄細胞および脾細胞移入実験の結果からほかの疾患とは独立したパターンで発生しており、特に env-pX 遺伝子の発現した組織でのリンパ球の成熟がいずれの組織像の血管炎においても重要と考えられた。今後、env-pX 遺伝子のリンパ球成熟過程でどのような影響を及ぼしているかを解明することによって、ヒト難治性血管炎の発症機構の解明のモデルとなる可能性が高い。

【参考論文】

- 1) Yamazaki H, Ikeda H, Ishizu A, et al: A wide spectrum of collagen vascular and autoimmune diseases in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T lymphocyte virus type I. *Int Immunol* 1997; 9: 339.
- 2) Yoshiki T, Mellors RC, Strand M, et al: The viral envelope glycoprotein of murine leukemia virus and the pathogenesis of immune complex glomerulonephritis of New Zealand mice. *J Exp Med* 1974; 140: 1011.
- 3) Yoshiki T, Hayasaka T, Fukatsu R, et al: The structural proteins of murine leukemia virus and the pathogenesis of necrotizing arteritis and glomerulonephritis in SL/Ni mice. *J Immunol* 1979; 122: 1812.
- 4) Hollsberg P, Hafler DA: Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. *N Engl J Med* 1993; 328:1173.

研究業績一覧

1. Saito K, Ishikura H, Kishimoto T, et al. Interleukin-6 produced by pancreatic carcinoma cells enhances humoral immune responses against tumor cells: a possible event in tumor regression. *Int. J. Cancer* 1998;75:284-289.
2. Nakagawa I, Murakami M, Ijima K, et al. Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. *Human Gene Therapy* 1998;9:1739-1745.
3. Katsumata K, Ikeda H, Sato M, et al. Tissue-specific high-level expression of human endogenous retrovirus-R in the human adrenal cortex. *Pathobiology* 1998;66:209-215.
4. Yamazaki H, Kunisada T, Ishizu A, et al. Promotion of early osteoclastogenesis and B lymphopoiesis in the bone marrow of transgenic rats with the env-pX gene of human T-cell lymphotropic virus type I. *Oncogene* 1998;17:2955-2960.
5. Kasai T, Ikeda H, Tomaru U, et al. A rat model of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) infection: in situ detection of HTLV-I provirus DNA in microglia/macrophages in affected spinal cords of rats with HTLV-I-induced chronic progressive myeloneuropathy. *Acta Neuropathol.* 1999;97(2):107-112.
6. 池田 仁, 吉木 敬. HTLV-I 関連疾患の疾患モデル動物. *病理と臨床* 1998;16(1):65-71.
7. 菅谷壽晃, 吉木 敬. 自己免疫疾患の新しい動物モデル. *リウマチ科* 1998;19(2):179-186.
8. 吉木 敬. HAM/TSP モデル—HTLV-I. 感染症 1998;28(2):29-39.
9. 田中 敏, 吉木 敬. ウイルスと血管炎. *病理と臨床* 1998;16(3):286-291.
10. 池田 仁, 吉木 敬. モデル動物と自己免疫病 (血管炎). *最新医学* 1998;53(supple):130-138.
11. 吉木 敬. HAM/TSP モデル—HTLV-I. 感染症 1998;28(2):33-39.
12. 吉木 敬. HAM/TSP の動物モデル. *日獨医報* 1998;43(2):68-77.
13. 柴田雅彦, 吉木 敬. 血管炎のモデル動物. *リウマチ科* 1998;20(5):429-436.
14. 池田 仁, 吉木 敬. ウイルスと自己免疫疾患. *内科* 1999;83(1):113-115.

13. Nuc 遺伝子ノックアウトで PN様血管炎を高率に発症する 自己免疫マウスの病態解析

金井 芳之 (東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター)

三浦 恵二 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫部門)

KEYWORD = ヌクレオバインデイン、MRL/lprマウス、結節性多発動脈炎、免疫複合体

[目的] MRL/lprマウス (野生型マウス) のNuc遺伝子をノックアウト (KO) して生じたマウス (Nuc-KOマウス) はとPN様血管炎の発症頻度・重症度ともに野生型マウスを凌駕する。本血管炎病態の解析でヒト難治性血管炎患者のGOLの向上に貢献しうる新知見をみいだすこと。[方法] Nuc-KOマウスの血清および腎由来の免疫複合体 (IC) の正体をSDS-PAGE, 二次元電気泳動、ウエスタンブロット及びアミノ酸配列決定により解析した。[結果] Nuc-KOマウスは野生型マウスに対してICの著明な上昇が見られた。腎ICの解析の結果、新しい自己抗原としてアルギノコハク酸合成酵素 (arginino succinate synthase, ASS) を同定した。さらに血清抗ASS抗体価は血管炎の活動性をよく反映した。[結論] Nuc-KOマウスで見いだされた新しい自己抗体抗ASSは少なくともマウスのPN様血管炎診断上のよきマーカーとなる。

Antibody against arginino-succinate synthase, a key enzyme in ornithine cycle is an predictor of the early lesions of immune-based necrotizing vasculitis: Studies on lupus-prone mice.

Yoshiyuki Kanai (Center for Experimental Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo), Keiji Miura (Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University)

Previously, we have reported that autoimmune MRL/lpr mice, rendered genetically deficient for nucleobindin(Nuc), which is known to augment anti-DNA antibody production, developed periarteritis nodosa(PN)-like ANCA-positive necrotizing vasculitis accompanying crescentic glomerulonephritis(CrGN) at high frequency.

The characteristic was that the Nuc-deficient MRL/lpr mice(-/-) produced immune complexes(IC) in the serum 3 times as much as those in wild MRL/lpr mice(+/+). Thus, we analyzed the components of IC in kidneys of the -/- mice by SDS-PAGE under native conditions. A major band at 45 kd region on the gel, which was electrophoretically transferred onto a PVDF membrane, was processed for amino-acid sequencing. It turned out to be argininosuccinate synthase(ASS), and was further confirmed by 2-dimensional electrophoresis. IC also contained actin to some extent as shown in the previous meeting. The content of ASS was 10 times as much as that of actin, as far as judged from staining intensity. Accordingly, we produced recombinant mouse ASS for ELISA. As was expected, the level of anti-ASS antibodies in the -/- mice was significantly higher than those of the +/+ mice. Of note was that the level was associated well with the presence of early lesions comparable to the stage from I to II of human classical PN but not with the severity of vasculitis (stage III and IV) and/or GN. A novel antigen-antibody system revealed in this experiment using animal model for PN or microscopic polyangiitis (MPA) will be of use for an early prediction of the fatal disease such as MPA in humans.

[はじめに]

SLE病態に特徴的な抗DNA抗体の実験的産生は、DNAをそれ自身色々修飾しても不可能である。以前金井らはこの産生には蛋白性のヘルパー因子が必要と考え、SLEモデルであるMRL/lprマウスの腫脹リンパ節細胞からその因子を同定し、それをヌクレオバインデイン(Nuc)と命名した(1)。cDNAクローニングの結果Nucは抗DNA抗体の増強を説明しうる分子構造、即ち、ロイシンジッパー、NLSを含む塩基性ドメイン、とその因子が分泌性であることを証明するシグナルペプチド(SP)を有することが明らかにされた(2)。さらにNucはCa²⁺結合モチーフであるEF-handも二つ持つことがわかり(3)、SPを考慮するとNucは転写因子とは異なる新規活性物質であることが示唆された。組換え(r)Nucは生体内・外で天然Nuc同様抗DNA抗体産生増強活性を持つことが明らかにされた(4)のを契機にMRL/lprマウスのNuc遺伝子をKOしてMRL/lprマウスの自己免疫病態の軽減を試みた。結果は、予想に反して腎炎・血管炎の著しい増悪であった。今回このような背景でつくられた高頻度、重症度の高いNuc-KOマウスを特徴づける病態の解析が行なわれた。

[方法]

MRL/lprマウスNuc遺伝子 (nuc) を直接KO出来ないため、最初にC57BL6(B6)マウスnucをKOし、各々の交配・戻し交配を繰り返しB6からMRL/lpr背景に可及的近づけ、nuc欠損の効果を調べた。戻し交配三代目で約70%が6ヶ月齢でPN様血管炎を呈したが、今回は四代目マウスの6ヶ月齢でのPN様血管炎の病理組織像を調べた。腎ICは極めて温和な腎中性抽出液から終濃度2%PEG沈降物として回収し、それを12.5% SDS-PAGE, pI.4-7の二次元電気泳動, さらにウエスタンブロットでPVDF膜に転写し、染色バンドから直接アミノ酸配列の解析を行なった。rASSはマウスcDNAライブラリーから、ASSの既知のアミノ酸配列をもとに大腸菌に発現させた。マウス血清抗rASS抗体は精製rASSをマイクロタイタープレートにコートしたELISA法にて測定した。

[結果] 24週齢のNuc-Koマウス40匹の病理組織学検索でヒトの古典的PNの組織分類に該当する1. 変性期 2. 急性炎症期 3. 肉芽期 4. 瘢痕期の何れかの所見が主に腎にみられた(図1)。また当該マウス腎由来ICのSDS-PAGEで約42kDのバンドが検出された(図2)。PVDF膜転写バンドのアミノ酸配列決定の結果、ASSと判明した。ASSの存在は二次元電気泳動でも確認され、さらにアクチンの存在も明らかになった。ICの中に見いだされたこれらの抗原に対する血清抗体の存在も明らかになり(図3)、特に抗ASS抗体価は血管炎の活動性(急性炎症期)をよく反映した。

[考案]

血管炎モデルとしてMRL/lprマウスが以前からよく知られている。それらは自然発症的であり、発症率は25-75%のようである。然るにNuc-KoMRL/lprマウスは6ヶ月齢で古典的PN様血管炎を>90%発症する。病理形態学的には古典的PNに酷似するが、発症部位は圧倒的に腎であることが古典的PNとは異なる。一方で当該マウスはANCA陽性(~70%)、半月体形成性腎炎も高頻度(~50%)に伴うところから顕微鏡的多発血管炎(MPA)の病態を反映しているとも考えられる。当該マウスの腎ICの解析から自己抗原としてアクチンとASSが同定され、ASSは新規の自己抗原であることが分かった。アクチンはアポトーシスの際のキャスパースの標的分子で、DNase Iの阻害剤でもある。また、ASSは血管代謝に不可欠なNO産生に関与することが知られている。血管炎はアポトーシスやNO産生と密接に関連することから、当該マウスの解析から明らかになった新し抗原-抗体系は今後の血管炎病態解明に寄与すると考えられる。

[結論]

新たに見いだされた抗ASS抗体はマウスのみならず、ヒト壊死性血管炎の疾患活動性の判定にも有用になる可能性がある。

[参考文献]

1. Kanai, Y. and Tanuma, S. : Purification of a novel B cell growth and differentiation factor associated with lupus syndrome. *Immunol Lett.* 32:43-48, 1992
2. Miura, K. Titani, K. Kurosawa, K. and Kanai, Y. : Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:375-380, 1992
3. Miura, K. Kurosawa, K. and Kanai, Y. : Calcium-binding activity of nucleobindin mediated by an EF-hand moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:1388-1393, 1994
4. Kanai, Y. Takeda, O., Kubota, T. Amagai, M. et al. : Induction of autoantibodies in normal mice by injection of nucleobindin and natural occurrence of antibodies against nucleobindin in the sera of autoimmune MRL/lpr mice. *Immunol Lett.*, 45:35-42, 1995

[研究実績]

1. Abe, M., Ishikawa, O., Miyachi, O. and Kanai, Y. : In vitro spontaneous and UVB-induced lymphocyte apoptosis are not specific to SLE. *Photoderma.. Photoimmuno. Photomed.* 13 : 204-207, 1997
2. Kubota, T., Miyauchi, M., Hirokawa, G., Awaya, A., Miyasaka, N., Kanai, Y. and Maruyama, K. : Up-regulation of nucleobindin expression in human lymphocytes and non-Hodgkins lymphoma. *Pathology International*, 48:22-28, 1998
3. Watanabe, N., Kubota, T., Miyasaka, K. and Kanai, Y. Enhancement of hydroxyl radical cleavage by serum anti-dsDNA antibodies in SLE. *Lupus*, 7: 108-112, 1998
4. Kanai, Y. and Miura, K. High expression and detection of gamma actin in the lymph nodes and in the immune complexes in association with crescentic

glomerulonephritis and/or periarteritis nodosa-like vasculitis in lupus-model mice. *Arthritis Rheum.*, 40: S165, 1997

5. Kanai, Y and Miura, K. Antibody against arginino-succinate synthase, a key enzyme in ornithine cycle, is an indicator of the early lesion of immune-based necrotizing vasculitis :Studies on gene-manipulated pre-existing autoimmune MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.*, 41: S176, 1998

6 金井芳之：ヌクレオバインデインとPN様血管炎。腎と透析 4 5：221-228

1998

7 金井芳之、三浦恵二：結節性多発動脈炎と免疫複合体。腎臓 20：164-165, 1998

8 金井芳之、三浦恵二：壊死性糸球体腎炎と免疫複合体。腎臓 21:161-164, 1998

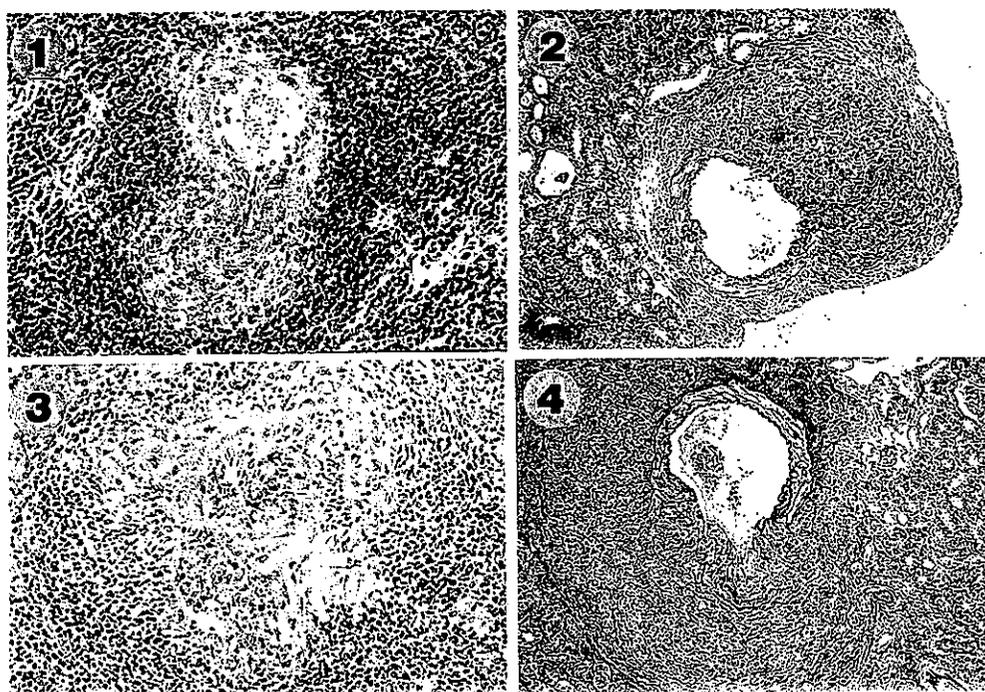


図 1 : Nuc-Koマウスに見られる血管炎の病理組織像。1. 変性期、2. 急性炎症期、3. 肉芽期、4. 瘢痕期。1-3、ヘマトキシリン、エオジン染色、4、エラスチカーワンギーソン染色