



生原因のひとつに、抗リン脂質抗体が関与した可能性が示唆される。先に引用した心エコーによって心機能を測定した論文でも、SLE 症例で左室機能異常が見られたもの全例に抗リン脂質抗体が認められたとしており(3)、心筋の異常には抗リン脂質抗体が深く関連している可能性がある。

一方、心筋内線維化が見られるものに心筋内血管に多発する血栓が見られたこと、また線維化の病態が虚血による心筋の脱落を示唆するようなものであることは、病変の形成に血栓が関与していることを示唆するものであろう。そしてこの血栓形成には抗リン脂質抗体が関与した可能性がある(5)。しかし、抗リン脂質抗体を持つもの全例に血栓が認められたわけではないこと、また、血栓が認められた症例では抗リン脂質抗体の検査がなされていないことなど、抗リン脂質抗体と心筋内血栓を強く結びつける証拠にはまだ乏しいのが現状である。

4. 冠状動脈硬化、腎、肺の変化: SLE の症例では対照例に比し冠状動脈硬化度が強いものが多い傾向にあったが、心筋内線維化との間には相関は認められなかった。また、腎系球体病変や肺病変と心筋内線維化には関連は認められなかった。

【結論】 SLE では高頻度に心筋内の小線維化巣が認められ、そのうちいくつかの症例ではその発生に抗リン脂質抗体ならびに心筋内小血管の血栓との関連が示唆された。しかしながら、心筋の線維化を示すものでも血栓を認めない症例もあり、また抗リン脂質抗体が未測定な症例も多く、全ての心筋内線維化の原因を抗リン脂質抗体と血栓で説明できるかどうかには問題が残る。今後さらに詳細な検討が必要であろう。

#### 参考文献

- 1) Fukumoto S, Tsumagari T, Kinjo M, Tanaka K: Coronary atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus at autopsy. *Acta Pathologica Japonica* 37(1):1-9, 1987
- 2) Hosenpud JD, Montanaro A, Hart MV, Haines JE, Specht HD, Bennett RM, Kloster FE: Myocardial perfusion abnormalities in asymptomatic patients with systemic lupus erythematosus. *American Journal of Medicine* 77(2):286-92, 1984
- 3) Nihoyannopoulos P, Gomez PM, Joshi J, Loizou S, Walport MJ, Oakley CM: Cardiac abnormalities in systemic lupus erythematosus. Association with raised anticardiolipin antibodies. *Circulation* 82(2):369-75, 1990
- 4) Leung WH, Wong KL, Lau CP, Wong CK, Cheng CH, Tai YT: Doppler echocardiographic evaluation of left ventricular diastolic function in patients with systemic lupus erythematosus. *American Heart Journal* 120(1):82-7, 1990
- 5) Hughson MD, McCarty GA, Brumback RA: Spectrum of vascular pathology affecting patients with the antiphospholipid syndrome. *Human Pathology* 26(7):716-24, 1995

1. Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, et al. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ. Res.*1998;82(2):147-156
2. Matsumoto T, Komori K, Yonemitsu Y, et al. Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene transfer of endothelial cell nitric oxide synthase inhibits intimal hyperplasia of canine vein grafts under conditions of poor runoff. *J. Vasc. Surg.*1998;27(1):135-144
3. Nakayama Y, Sueishi K, Oka K, et al. Stromal angiogenesis in human glioma: A role of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Surg. Neurol.*1998;49(2):181-188
4. Namoto M, Yonemitsu Y, Nakagawa K, et al. Heterogenous induction of apoptosis in colon cancer cells by wild-type p53 gene transfection. *Int. J. Oncol.*1998;12(4):777-784
5. Sueishi K, Ichikawa K, Kato K, et al. Atherosclerosis: Coagulation and fibrinolysis. *Semin. Thromb. Hemost.*1998;24(3):255-260
6. 中川和憲、市川晃治郎、加藤和彦、他. 動脈硬化と外因系凝固ー動脈硬化内膜における凝固関連因子の発現とその意義ー. *動脈硬化.*1998;25(6/7):215-219
7. 中島豊、隈本正人、陳永祥、他. 動脈硬化巣における血管新生とプラーク破裂. *動脈硬化.*1998;25(6/7):263-268
8. 中島豊、市川晃治郎、加藤和彦、他. Plaqueと組織因子. *動脈硬化.*1998;26(1):33-36
9. 中島豊、陳永祥、居石克夫. 大動脈解離の病態. *Pathology of Aortic Dissection and Related Diseases.* *脈管学.*1998;38(11):743-747
10. Chen Y-X, Nakashima Y, Tanaka K, et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor /vascular permeability factor in atherosclerotic intimas of human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19(1):131-139

## 18. 高安動脈炎における抗内皮細胞抗体の検討

吉田 俊治(藤田保健衛生大学医学部内科)  
片山 雅夫(藤田保健衛生大学医学部内科)  
水谷 昭衛(藤田保健衛生大学医学部内科)  
大島 久二(藤田保健衛生大学医学部内科)  
鳥飼 勝隆(藤田保健衛生大学医学部内科)

KEYWORD=抗内皮細胞抗体、高安動脈炎、EIA、Western blot

### 【研究要旨】

[目的] 高安動脈炎の診断に有用な抗内皮細胞抗体の測定方法確立を目的とした。

[方法] 対象として各種患者血清を用いた。内皮細胞を抗原としたEIA法(E法)と、ヒト臍帯静脈内皮細胞膜を用いたウェスタンブロット法(ウ法)で検討した。一部の被検血清では、健常人末梢血単核球で非特異的な抗細胞膜抗体を吸収して用いた。

[結果] E法では、各種血管炎症候群において、種々の頻度で本抗体が検出され、古典的膠原病患者では陽性率・抗体価ともに低値であった。ウ法では、高安動脈炎8例中5例で74kDaのバンドが検出され、他の疾患では見られなかった。

[結論] 抗74kDa蛋白抗体が高安動脈炎に感度・特異性の高いことより、本疾患の診断に有用なばかりではなく、その対応抗原の解析により病態の追求や治療への応用にも役立つと期待される。

### Anti-endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis.

Shunji Yoshida(Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

Masao Katayama(Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

Akiei Mizutani(Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

Hisaji Oshima(Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

Katsutaka Torikai(Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

[Purpose] We attempted to establish a useful method for detecting anti-endothelial cell antibodies (AECA) in patients with Takayasu arteritis.

[Method] AECA were detected by enzyme immunoassay (EIA) using endothelial cells from the human umbilical vein (HUVEC) as antigens. Non-specific anti-cell membrane antibodies were absorbed from some sera by normal human peripheral mononuclear cells. AECA were also detected by Western blotting technique using

the cell membrane preparation from HUVEC as antigens. [Results] By EIA method, AECA were detected at various frequencies in patients with several vasculitis syndrome and connective tissue diseases, the positivity and titer of AECA were tended to be lower in patients with classic connective tissue diseases than in vasculitis syndrome. Absorption of non-specific anti-cell membrane antibodies resulted in some decrease of the titer of the antibodies, but a useful measurement condition for Takayasu arteritis cannot be found.

By Western blotting technique, 5 out of 8 sera with Takayasu arteritis showed 74kDa band, which was not detected in any other patient sera as well as normal controls. [Conclusion] Anti-74kDa antibodies seemed to be a sensitive and specific marker for Takayasu arteritis. These antibodies are expected to be a useful marker for diagnosing Takayasu arteritis as well as to be useful for pursuing the pathogenesis and developing proper treatment by the analysis of the corresponding antigens.

#### 【研究目的】

昨年までの検討<sup>1)</sup>で、EIA法を用いた抗内皮細胞抗体(AECA)が各種血管炎症候群に種々の頻度で見られることを報告した。高安動脈炎に特異性の高い検出法を確立するため、4種類の内皮細胞を用い、glutaraldehydeでの固定の有無も検討したが、有用なものは見いだせなかった。そこで本年度は、内皮細胞への特異性を高めるため、他の細胞で吸収した血清を用いたEIA法を行い、またWestern blot法での検討も行い、高安動脈炎に特異性の高いAECAの検出法確立を目的とした。

#### 【研究方法】

対象として、高安動脈炎、その他の血管炎症候群(悪性関節リウマチ(MRA)、ベーチェット病、結節性多発動脈炎(PN)、アレルギー性肉芽腫性血管炎(AGA)、ウェジナー肉芽腫症)、その他の膠原病(全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎、慢性関節リウマチ、混合性結合組織病、シェーグレン症候群)、コントロールとして健常人の血清を用いた。

AECA測定に用いたEIA法では、EIAプレートにヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)をconfluentに培養し、glutaraldehydeで固定した。その後、被検血清を添加、アルカリフォスファターゼ標識抗IgG抗体を添加し、PNPPの発色を405nmで測定した。抗体価を見るためEIA ratio (ER)として被検血清のODから培地のみを入れたwellのODを引いたものを分子とし、健常人血清のODから培地のみを引いたものを分母とした。健常人末梢血から比重遠心法で分離した単核球を一部の被検血清に混和し、37度2時間、4度2時間静置した後、遠心してその上清を単核球吸収血清としてEIAプレートに加えた。

AECA測定に用いたWestern blot法では、HUVEC、大動脈由来内皮細胞、ヒト単核球

からJM van der Zeeの方法<sup>2)</sup>で精製した細胞膜分画を抗原とした。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写後、被検血清を添加してアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体を2次抗体とし、BCIP-NBTで発色させた。

### 【結果と考察】

HUVECを抗原としたEIA法では、各種血管炎患者血清で抗体価の高いものが見られ、古典的膠原病患者血清では抗体価の低い傾向が見られた。一方、ヒト単核球を抗原としたEIA法では、むしろ古典的膠原病患者血清の方が高い抗体価を示した。そこでヒト単核球で吸収した血清を用いてHUVECを抗原としたEIA法を行ってみた。しかしながら吸収前後で、ERで見る限りそれほど陽性率に変動は見られなかった。つまりHUVECを抗原としたEIA法では、比較的内皮細胞に特異的な抗体を検出していることが示唆された。EIA法では、前年度の検討で、4種類の内皮細胞を用い、細胞固定の有無についても検討を行い、各種血管炎症候群に高頻度に抗体が見られたが、高安動脈炎に特異性の高い条件は見いだせなかった。高安動脈炎におけるAECAの報告については、Simaら<sup>3)</sup>は、HUVECを用いたEIAで18例の高安動脈炎患者血清中17例に高力価のAECAが検出され、40例の健常人ではすべて陰性であり、FACSでリンパ球や顆粒球には反応せず、18例の患者では抗ENA抗体、抗カルジオリピン抗体、抗核抗体、抗DNA抗体、免疫複合体はすべて陰性であったと報告している。同じ施設では、さらにcell sorterや共焦点顕微鏡なども用い、その特異性を確認している<sup>4)</sup>。ただ彼らは、他の血管炎症候群については全く検討されておらず、この抗体の疾患特異性については不明である。今年度の検討でも単核球で吸収した血清を用いても高安動脈炎に特異性の高いAECAを検出する方法は見いだせなかった。各種血管炎症候群においてAECAが検出されたが、疾患により対応抗原は異なっている可能性は考えられる。そこで、Western blot法による検討を行った。HUVEC細胞膜を抗原としたものを図1に示した。各種血清において数本のバンドが見られるが、高安動脈炎患者血清では、8例中5例に74kDaのバンドが見られ、他の患者血清や健常人血清には同バンドは見られなかった。なお同じ条件下で大動脈由来内皮細胞細胞膜を用いても同様のバンドが見られたが、ヒト単核球細胞膜を用いた場合は、ほとんどバンドが見られなかった。高安動脈炎におけるAECAについて、EIA法とWestern blot法の抗体価を比較してみた。便宜的に後者の抗体価を、バンドの程度から(-)、(±)、(1+)、(2+)に分けてみた。図2のように、EIA法で高値の3例はいずれもWestern blot法で陽性となっており、ある程度の相関が見られた。Western blot法によるAECAでは、van der Zeeら<sup>2)</sup>やJiann-Shyongら<sup>5)</sup>が全身性エリテマトーデスで15-200kDaのバンドを認めているが、他の疾患では検討していない。Hillら<sup>6)</sup>も強皮症患者で検討しているが、他の膠原病関連疾患では検討していない。今後、この抗74kDa抗体について、その疾患特異性の確認や経時的変化、さらに対応抗原の分析をすることにより、高安動脈炎の診断や病態の追求にも役立つものと思われる。

## 【結論】

今年度の検討では、EIA法では、単核球による吸収操作を行っても高安動脈炎に感度特異性の高い抗内皮細胞抗体検出法は確立できなかった。しかしながら内皮細胞膜分画を用いたWestern blot法では、抗74kDa抗体が高安動脈炎に高感度で特異性の高い抗内皮細胞抗体として検出された。

## 【参考文献】

1. 吉田俊治: 高安病における抗内皮細胞抗体の検討。厚生省特定疾患免疫疾患調査研究班難治性血管炎分科会平成9年度研究報告書、1998; 120-124.
2. van der Zee JM, Siegert CEH, de Vreede TA, Daha MR, Breedveld FC: Characterization of anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 1991; 84:238-244.
3. Sima D, Thiele B, Turowski A, et al.: Anti-endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum.* 1994; 37:441-443.
4. Eichhorn J, Sima D, Thiele B, et al.: Anti-endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. *Circulation* 1996; 94: 2396-2401.
5. Jiann-Shyong, Ming-Fei Liu, Huan-Yao Lei: Characterization of anti-endothelial cell antibodies in the patients with systemic lupus erythematosus: a potential marker for disease activity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1996; 79: 211-216.
6. Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ, et al.: Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Eur. J. Immunol.* 1996; 106: 491-497.

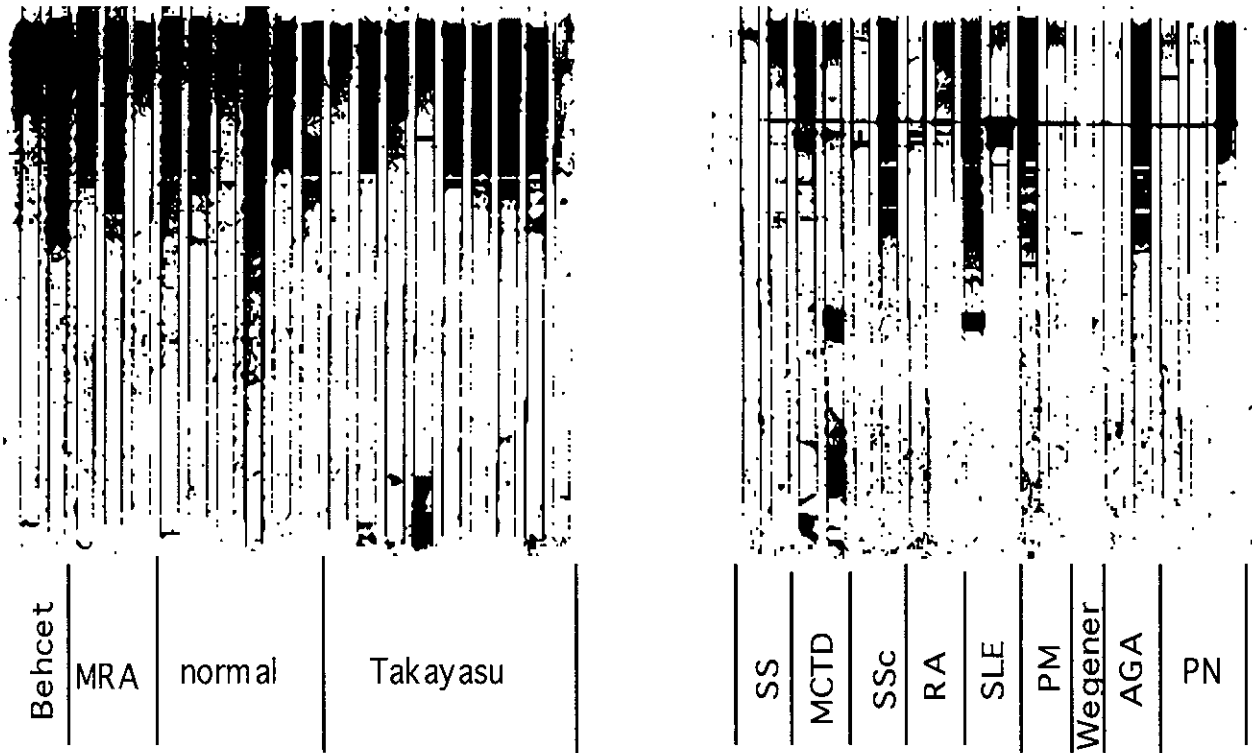


図1 Western blot法におけるAECA

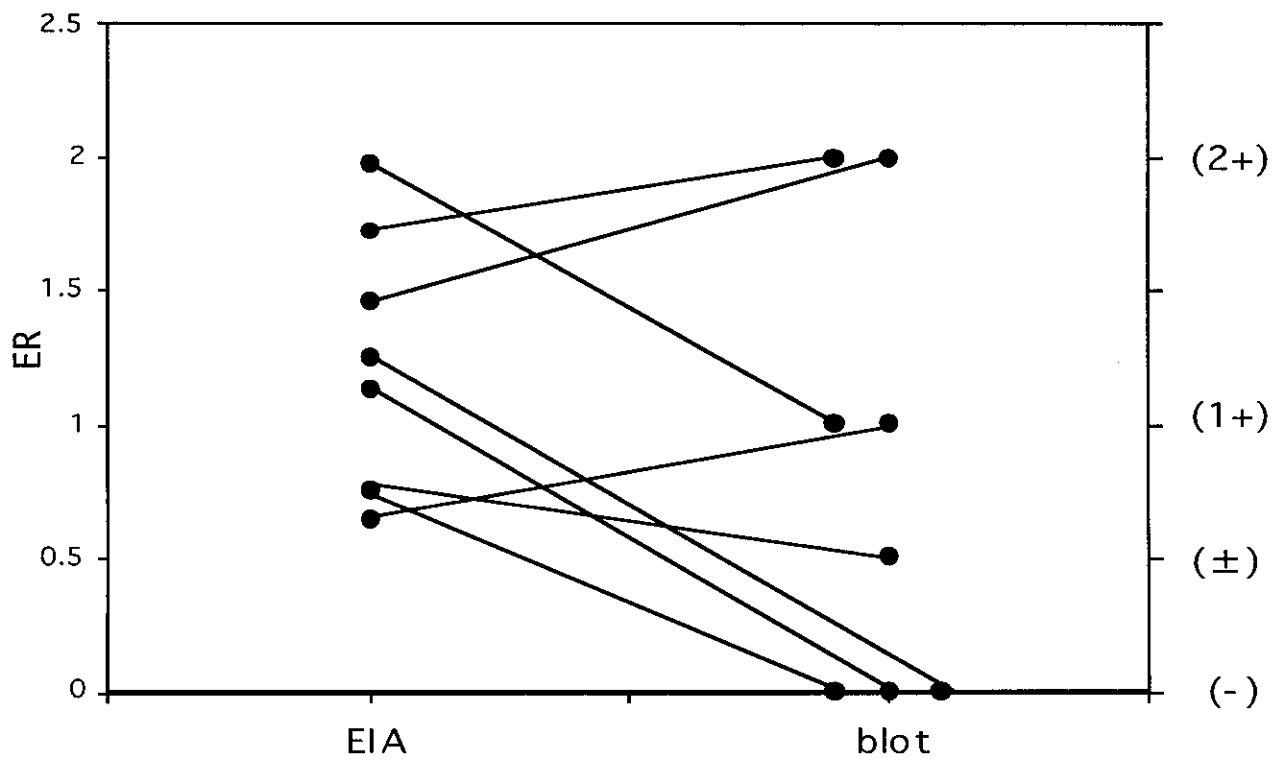


図2 EIAとWestern blotとの比較



## 19. 血管炎の動物モデルと病因に関する小委員会報告

委員長 吉木 敬

北海道大学医学病理学第一講座

これまでに当小委員会で明らかにされた研究成果をまとめ、残された重点課題について述べる。

能勢ら（愛媛大学）は膠原病疾患群を自然発症するMR L/Mp-lpr/lprマウスにおいて、血管炎感受性遺伝子（第4染色体、25-43cM、Lprm 1）および抑制遺伝子（第3染色体、64-73cM、Lprm 2）の存在することを明らかとしてきた。その他、候補因子の一つであるオステオポンチン（OPN）の遺伝子多型と糸球体腎炎の発症との間に有意な関連を認めた。血管炎発症に係わる遺伝子の染色体上での絞り込みとヒト血管炎での適応が今後の課題である。

金井ら（東大医科研・ヒト疾患モデル研究センター）はMR L/lprマウスの抗DNA抗体産生増強因子として同定されたヌクレオバインデイン遺伝子（Nuc）をノックアウト（Nuc-KOマウス）すると、PN様血管炎の高頻度発症（>90%）がみられた。Nuc欠損による血管炎発症促進機序の解明が待たれる。

亀山ら（慶応大病理診断部）は血管炎病態形成機構に関する研究として蒐集した皮膚血管炎症例で特にIV型コラーゲン分解能を有するMMP-2について検討し、蛋白レベル、mRNAレベルでの発現を一部に認めた。また新たに開発したFilm in situ zymographyで血管壁障害とMMP活性の関連を示した。Film in situ zymographyは血管炎の種々の形態像とMMP活性の有無、局在を知る上で極めて有用なテクニックである。種々の血管炎について今後の解析が待たれる。

寺嶋ら（順天堂大第二病理）は（NZBXNZW）F1マウスの眼底網膜病変の検索、マウス好中球ペルオキシダーゼに対する血清抗体価をELISA法を用いて測定し疾患発症に関与する因子を検索した。（NZBXNZW）F1xNZW退交配マウスにおいてマイクロサテライト法により、第3、第7、第9染色体上に各1個の壊死性血管炎感受性遺伝子座の存在を同定した。それぞれの遺伝子座近傍には様々な免疫制御に関わる分子をコードする遺伝子座が存在し、今後の遺伝子同定が待たれる。

吉田ら（藤田保健衛生大内科）は抗内皮細胞抗体（AECA）が各種血管炎症候群で高

率に検出されることを明らかにした。高安病を中心として、被検血清を用いたELISA法、内皮細胞膜抽出物を抗原とした免疫ブロット法を用いて対応抗原を検索するとヒトリンパ球と内皮細胞の両者に共通する抗原と内皮細胞にのみ存在する74kDaの対応抗原を検出した。今後の解析が望まれる。

吉木ら（北大第一病理）は壊死性血管炎からRAをはじめ多彩な膠原病を引き起こすHTLV-1 env-pXトランスジェニックラットを樹立した。病理組織学的に筋型動脈から小動脈の太さの血管にフィブリノイド動脈炎や肉芽腫性血管炎を認めた。ヒトPNやWegener肉芽腫症、膠原病に伴う血管炎の新しい動物モデルとして重要である。T細胞の非特異的高反応性、病変部へのCD4陽性T細胞の浸潤がみられた。また骨髄および脾細胞移植実験を通じて自己反応性T細胞の血管病変形成への関連が示唆された。胸腺の役割、エフェクター細胞や抑制性細胞の解析、血管炎および肉芽腫形成機序の解析が今後の課題である。

居石ら（九大第1病理）はCMV-IEやp53遺伝子を血管内皮細胞・血管平滑筋へ導入し、CMV-IEが平滑筋細胞増殖に関することやp53遺伝子が平滑筋のアポトーシスや成熟に関することを示した。またSLE剖検症例における心筋線維と、抗リン脂質抗体症候群との関連性を指摘した。

小出、津坂ら（埼玉医科大総合医療センター-2内）はRA患者の滑膜に対するモノクローナル抗体の作製やヒト抗MPO抗体産生細胞の分離を試み自己免疫疾患の病態解明を進めている。またSLE患者において血管炎陽性例、抗リン脂質抗体陽性例で有意に末梢血T cell receptor $\zeta$ 鎖の発現を認めた。 $\zeta$ 鎖の発現低下例ではexon8上の560bpがsplice outされた短い $\zeta$ 鎖mRNAが優位に認められた。今後は家族の遺伝学的解析、in vitroでの $\zeta$ 鎖発現抑制実験を進める予定である。

## 20. Proteinase 3キメラ蛋白の作成とc-ANCA血清の反応性

鈴木 登(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター)  
武半優子(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター)  
坂根 剛(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター)  
吉田雅治(東京医科大学八王子医療センター)

KEYWORD=c-ANCA, Proteinase3, Wegener症候群, エピトープ

[研究要旨]

Wegener症候群患者c-ANCA陽性血清のProteinase3の認識エピトープを同定する目的で、Proteinase3のdeletion mutantを作成したが患者血清は反応しなかった。そこでProteinase3とHLEとのキメラ蛋白を作成し、患者抗Proteinase3自己抗体のエピトープ決定を行なった。真核細胞発現ベクターを用いてProteinase3分子とHLEのキメラ蛋白をCOS細胞に発現させた。Proteinase3分子とHLE分子はその構造が類似しており、これらのキメラ蛋白も自己抗体に認識されうる高次構造をとる可能性が示唆された。真核細胞発現ベクターに1.PR 3cDNA全長 2. 5'Proteinase3cDNA/ 3'HLEcDNA 3.5'HLEcDNA/ 3'Proteinase3cDNA, 4.HLEcDNA全長を組み込み、COS細胞に発現させた。現在までのところ患者c-ANCAの全例が2又は3のキメラ蛋白のいずれかに反応した。少数例の検討ではあるものの、患者c-ANCAのProteinase3の反応エピトープが二種類以上あることが示唆された。

### **Production of Proteinase 3/human leucocyte elastase chimeric proteins and their reactivity against c-ANCA positive sera**

Noboru Suzuki<sup>1</sup>, Yuko Takeba<sup>1</sup>, Tsuyoshi Sakane<sup>1</sup>, and Masaharu Yoshida<sup>2</sup>

Institute of Medical Science, St.Marianna University School of Medicine<sup>1</sup> and Tokyo Medical College<sup>2</sup>

We have made recombinant proteinase 3 in E. coli to characterize c-ANCA antibody of patients with Wegener syndrome. We found that c-ANCA antibodies did not recognize the recombinant proteinase 3. This is probably because c-ANCA antibodies recognize conformational epitopes on the native proteinase 3. To define epitopes of proteinase 3 recognized by the c-ANCA antibodies, we have constructed mammalian expression vectors harboring chimeric proteinase 3 cDNA/human leucocyte elastase cDNA. It is known that both molecules show similar tertiary structure. We have prepared expression vectors for #1. whole PR 3cDNA, #2. 5'Proteinase3 cDNA/ 3'HLEcDNA, #3.5'HLEcDNA/3'Proteinase3c DNA, #4. whole HLEcDNA, and expressed them in COS cells. We found that each c-ANCA antibody reacted with, at least, one of the chimeric proteins. These results

suggest that c-ANCA antibodies recognize more than two epitopes on the native proteinase3.

#### [研究目的]

Wegener症候群は、現在ではANCA関連血管炎として認識され、多くの症例で抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasm antibody; ANCA)陽性となる(1)。その後、c-ANCAの対応抗原が好中球の持つproteinase3であることが報告された(2)。しかし、自己抗体としてのc-ANCAの産生機序やc-ANCAが実際に病変を惹起する機序の詳細は不明な点が多い。そこで遺伝子組換えproteinase3分子を作成し、これを用いてc-ANCAの認識する抗原エピトープを同定し、Wegener症候群の病態を理解する事を目的とする。中でもWegener症候群患者のc-ANCAでは認識するエピトープが患者間で同一であるのか、或いはエピトープが患者により異なっているのか、そしてそれらは臨床像と関連するのかを明らかにする。

#### [研究方法]

##### 大腸菌発現用および真核細胞発現用ベクター

昨年度に作成したヒトProteinase3cDNAを組み込んだ大腸菌発現ベクターpQE30,あるいは真核細胞発現ベクターpME18S(東大医科研丸山博士より供与)を用いた。

##### トランスフェクションと免疫組織染色

サル腎細胞由来COS細胞に電気穿孔法を用いてトランスフェクションを行い、ガラスプレート(チャンバースライド)上で2日間培養した。患者血清を用いてDAKO社LSABキットを用いて免疫組織法を行った。対比染色にはヘマトキシリン法を用いた。

##### Proteinase3/好中球エラスターゼキメラ(HLE)蛋白の作成

Proteinase3cDNAとHLEcDNAの様々な部位にPCR用のプライマーを設定し、これを用いて種々のPCR断片を作成した。これらのPCR断片を組み合わせ、これをpME18Sベクターに組み込んだ。これらをCOS細胞にトランスフェクトしproteinase3分子と好中球エラスターゼのキメラ蛋白を数種類発現させた。

#### [結果と考察]

##### 患者c-ANCA陽性血清と遺伝子組換えproteinase3との反応性に関する検討

これまでに大腸菌や昆虫細胞に作らせた遺伝子組換えproteinase3は患者c-ANCA陽性血清とは反応しないと報告されている(3,4)。これはproteinase3に対する患者自己抗体はproteinase3分子上のconformationalなepitopeを認識するためであると考えられている。さらに天然型proteinase3を界面活性剤で処理したり、加熱変性させることでc-ANCAに対する反応性が消失することも報告されている。Specksらはヒトマスト細胞株を用いることで初めて蛋白分解酵素としての酵素活性を持ち、患者c-ANCA陽性血清により認識される遺伝子組換えproteinase3の作製に成功したと報告している(5)。我々もc-ANCA陽性患者血清中の抗proteinase3抗体が実際に変性させたproteinase3を認識できるのかを検討した。高度に精製した白血球由来proteinase3を加熱変性させたサンプルをSDS-PAGE後ウエスタンブロットし、c-ANCA陽性患者血清で検出しところ、精製白血球

proteinase3は加熱処理によりproteinase3に対する患者自己抗体に反応せず、患者抗proteinase3自己抗体がproteinase3の高次構造を認識していることが示唆された。

まず正常者PMA刺激顆粒球からRT-PCR法をもちいてproteinase3cDNAを増幅した。これを大腸菌用発現ベクターに組み込み、大腸菌M15細胞に組換え蛋白を発現させた。クマーシーブルー染色を行なうと組換え蛋白が検出できた。しかし、大腸菌を用いて作製した全長の遺伝子組換えproteinase3分子は、この高次構造がもはや保たれていない、あるいは糖鎖の付加のないことなどから、ウエスタンブロット法をはじめどのような方法を用いてもc-ANCA陽性血清の大部分は反応しないことが明らかになった(成績は示されていない)。

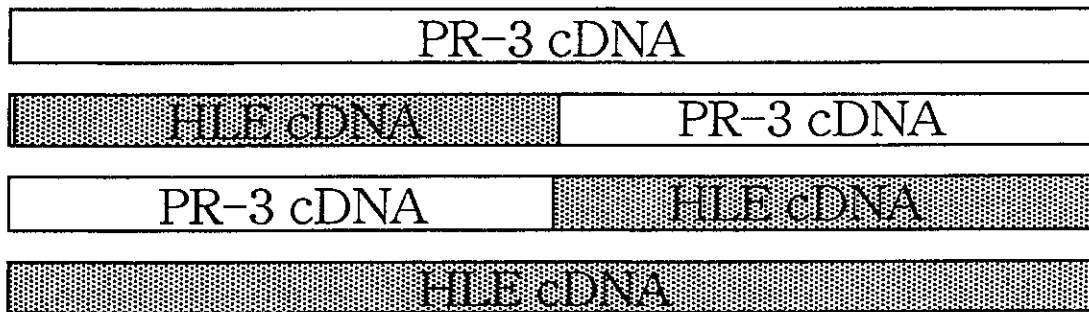
そこで、高次構造を保ち、さらに糖鎖の付加も期待できる真核細胞発現ベクターを用いてCOS細胞に発現させた遺伝子組換えproteinase3分子を発現させた。COS細胞に発現させた遺伝子組換えproteinase3分子を用いてもウエスタンブロット法では患者自己抗体は反応しなかった。

次にproteinase3発現ベクターをトランスフェクトしたCOS細胞をチャンバースライドで48～64時間培養し免疫組織染色を行った。この方法では患者血清を用いることで抗proteinase3抗体陽性細胞を認め、真核細胞に発現させた遺伝子組み換えproteinase3には患者自己抗体が反応することが明らかになった。一方、c-ANCA陽性血清の中にも遺伝子組み換えproteinase3を発現するCOS細胞と反応しない症例も認めた。我々の成績は、c-ANCA(抗proteinase3自己抗体)がproteinase3蛋白の一次構造を認識しているのではないとする、欧米からの報告と一致した成績である(6-8)。これまで合成ペプチドを用いて、c-ANCA(抗proteinase3自己抗体)の認識するproteinase3蛋白の一次構造を決定しようとする報告が2報存在する(6,7)。しかし、彼ら自身が報告しているように、ウエスタンブロット法での患者自己抗体の反応は検討したWegener症候群患者22例中4例にしか認められず、これらの成績は一般化できない。また本邦で、我々が検討した10例中にはウエスタンブロット法での陽性例は存在していない。さらにマウスモノクローナル抗proteinase3抗体を作成し、このモノクローナル抗体と患者抗proteinase3自己抗体とのcompetition assayで、患者抗proteinase3自己抗体の認識エピトープを推定しようとの報告もあるが、一般化していない(8)。

#### Proteinase3/好中球エラスターゼキメラ蛋白の作成

患者抗proteinase3自己抗体のエピトープを決定することの重要性を考え、proteinase3分子と相同性の高い分子とのキメラ蛋白を作成し、これを用いて、患者自己抗体のエピトープ決定を行うこととした。そこで、proteinase3と相同性の高い酵素として、好中球エラスターゼを選択した。まず、真核細胞発現ベクターを用いてproteinase3分子と好中球エラスターゼのキメラ蛋白を数種類作製した(図)。

図. ヒトProteinase3とヒト好中球エラスターゼとのキメラ蛋白の作成



Proteinase3分子も好中球エラスターゼもその構造は類似しており、これらのキメラ蛋白も自己抗体に認識されうる高次構造をとることが期待できると考えた。

そこで、真核細胞発現ベクターに#1. proteinase3cDNA全長, #2. 5'(N端)proteinase3cDNA/3'(C端)好中球エラスターゼcDNA, #3. 5'(N端)好中球エラスターゼcDNA/3'(C端)proteinase3cDNA, #4. 好中球エラスターゼcDNA全長を組み込み、COS細胞に発現させた。現在までのところ検討を加えた患者c-ANCAの全例が#1に反応したが#4には反応しなかった。キメラ蛋白である#2には多くの症例が反応したが、#3と反応した患者血清は少数であった。これらの成績から患者c-ANCAのproteinase3の反応エピトープが少なくとも二種類以上あることが示唆された。現在は患者c-ANCAの反応性の検出に免疫組織染色法を用いているため、手技が煩雑でかつ時間がかかり多数例の検討には適していない。今後は検出法を免疫蛍光染色法とフローサイトメーターを用いる方法に変え多数例の検討を行う必要がある。さらに患者c-ANCAの大部分と反応しエピトープの推定が可能な方法ができたので、Wegener症候群患者で認識するproteinase3分子上のエピトープが同一であるのか、或いはエピトープが患者により異なっているのかを解析し、これらに差異がある場合には患者の臨床症状と認識エピトープとの間に関連がないかを検討する必要がある。

[文献]

1. Jennette JC, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases: a review. *Am J Kidney Dis* 1990;15:517-529
2. Ludemann J, Utecht B, Gross WL. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 1990;171:357-362
3. Witko-Sarsat V, Halbwachs-Mecarelli L, Almeida RP, Nusbaum P, Melchior M, Jamaledine G, Lesavre P, Descamps-Latscha B, Gabay JE. Characterization of a recombinant proteinase 3, the autoantigen in Wegener's granulomatosis and its reactivity with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *FEBS Lett* 1996;382:130-136
4. Szymkowiak CH, Johnston TW, Csernok E, Gross WL. Expression of the human autoantigen of Wegener's granulomatosis (PR3) in a baculovirus expression system. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:283-289
5. Specks U, Fass DN, Fautsch MP, Hummel AM, Viss MA. *FEBS Lett* 1996;390:265-270
6. Chang L, Binos S, Savige J. Epitope mapping of anti-proteinase 3 and anti-myeloperoxidase antibodies. *Clin Exp Immunol* 1995;102:112-119

7. Williams RC Jr, Staud R, Malone CC, Payabyab J, Byres L, Underwood D. *J Immunol* 1994;152:4722-4737
8. Sommarin Y, Rasmussen N, Wieslander J. Characterization of monoclonal antibodies to proteinase-3 and application in the study of epitopes for classical anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Exp Nephrol* 1995;3:249-256

## 21. 血管炎における好中球抗体MPO-ANCAのリスクエピトープのピンポイント解析およびアセアノスタチン投与によるMPO-ANCA産生抑制効果

鈴木和男 (国立感染症研究所)

大川原明子 (国立感染症研究所)

橋本ゆき (国立感染症研究所)

### [要旨]

血管炎の重篤化重篤化には、MPO-ANCAの対応分子MPOに対するエピトープの関与が示唆され、そのエピトープの特定により血管炎の病態解析および治療への応用を目指すことを目的とした。リコンビナントMPO断片のセットをELISAに利用したエピトープ解析法を確立した。関連施設から収集した血清のエピトープを解析し、疾患によるエピトープの差が認められたことから、さらにH鎖N末端領域を10アミノ酸ずつからなる断片と合成し、血管炎の病態との関連をしらべた結果、特定領域に反応した。一方、MPO-ANCAの値を下げる事ができれば、血管炎の軽減に役立つことが考えられ、MPO-ANCAの軽減について検討下。抗炎症作用を検討するモデル動物のアジュバント誘導の関節リウマチ発症ラットの高値の血中MPO-ANCAは、好中球からのMPOの放出を阻害する物質アセアノスタチンを投与することにより、血中のMPO-ANCA値を低下させることが出来た。

### Analysis of disease activity-related epitopes of autoantibody MPO-ANCA in patients with intractable vasculitis.

Kazuo Suzuki (Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases)

### Abstract

Autoantibody, myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA) has been detected in vasculitis. However, it appears that the titer of MPO-ANCA does not always reflect the activity of the diseases. This apparent inconsistency may be mainly attributed to different epitope of MPO-ANCA among sera



of these patients. The epitope analysis of MPO-ANCA may explain the correlation between the disease activity and the production of MPO-ANCA(1). In order to analyze the epitopes, we collected the sera of patients with intractable vasculitis from members in Intractable Vasculitis Research Group. Epitopes of MPO-ANCA contained in these sera were analyzed by an ELISA system, which has been established in this project. The system employed a panel set of recombinant deletion mutants of MPO, which we have prepared for this assay(2). Most of sera reacted with the specific regions of the heavy chain of MPO: Either of the region of N- or C-terminus of the heavy chain, whereas no serum reacted with the light chain regions. The epitope profiles showing the oligo-clonal recognition sites were classified, suggesting that it may have relationship to the clinical features. In addition, these observations suggest that MPO-ANCA recognizes MPO molecule on the surface of neutrophils with specific epitope and stimulates them through FcR2, resulting in intractable vasculitis(3).

**【研究目的】** 血管炎において、好中球抗体MPO-ANCAはリスクとして病態に関連していることが明らかになってきている。しかし、MPO-ANCAの値が、必ずしも血管炎の病態を反映していない場合もあり、MPO-ANCAが高値であっても重篤化と関連しないことから、MPO-ANCA値は、血管炎の1つのリスクと考えるのが妥当ではないかと考えられる(1)。重篤化には、MPO-ANCAの対応分子MPOに対する反応部位が関係している可能性があった。そこで、MPO-ANCAの対応分子MPOに対する反応部位（エピトープ）を特定することで、MPO-ANCAの血管炎の病態への関与について明らかにし、病態の把握および治療への応用を目指した。さらに、10アミノ酸以下の反応部位を検索し、治療応用への可能性について検討した。一方、血管炎には、好中球抗体MPO-ANCAが病態に関連していることが明らかにされ、MPO-ANCA高値と好中球機能の亢進が病因に関与していることが推定されている。実際、MPO-ANCA関連疾患の患者の好中球機能は亢進している(1)、(2)。もし、MPO-ANCAの値を下げることであれば、血管炎の軽減に役立つことが考えられる。そこで、MPO-ANCAの軽減について、抗炎症作用を検討するモデル動物のアジュバント誘導の関節リウマチ発症ラットを用いて検討した。アジュバント誘導の関節リウマチ発症ラットの血中MPO-ANCAは、高値であることが明らかになった。血中のMPO-ANCAの高値は、好中球から放出されたMPOが関与していることが予想されており、MPO-ANCA値を下げるには、好

中球からのMPOの放出を阻害する物質を投与することが、その1つの可能性として考えられた。これまで、われわれはin vitroにおける好中球からのMPO放出を阻害する物質を見出し、アセアノスタチンと命名した(3)。このアセアノスタチンをアジュバント誘導の関節リウマチ発症ラットに投与することによって、血中のMPO-ANCA値を低下させる効果があるかどうかを検討した。

## [研究方法]

### 1) 10細フラグメントの合成

H鎖N末端領域の細フラグメントであるH4p1~H4p10を合成した。残基中に存在している8個のシステインは、アラニンに置き換え合成した。合成は、Fmoc (9-fluorenylmethyl-oxycarbonyl) 法による自動固相合成機 (MilliGen/Biosearch 9050 Peptid Synthesizer) で行った。アミノ酸樹脂は Fmoc-Amino acid-PEG-PSを使用した。これならの合成断片を血清と1時間前に前反応させ、エピトープ解析用のELISAに供し、その阻害から反応部位をしらべた。

### 2) アセアノスタチン投与によるMPO-ANCA産生抑制効果

Lewis系ラットにアジュバントを接種し、同日より18日間アセアノスタチンを経口あるいは腹腔に投与した。経時的に採取した血漿中のMPO-ANCAおよびMPO活性を、それぞれELISA法およびTMB法でそれぞれ測定した。

## [結果と考察]

### 1) 10細フラグメントの合成

自動固相合成は問題なく進行した。脱保護、脱樹脂後のクルードな状態の HPLC パターンも比較的きれいであった。各細フラグメントの収量は、1 - 22 mg程度であった。各細フラグメントのアミノ酸解析の結果、ほぼ理論値とよく一致した。これらを用いた阻害実験の結果、4番目の細フラグメントが、最も阻害効果が高かった。治療への応用に当たり、各細フラグメントのMPO-ANCAへの親和力は重要な因子であり、有用な細フラグメントを特定したい。

### 2) アセアノスタチン投与によるMPO-ANCA産生抑制効果

アジュバント誘導の関節リウマチ発症ラットでは、アジュバント投与後18日目で、血漿中のMPO-ANCAが著しく増加した。アセアノスタチンを経口あるいは腹腔投与したラットの血漿中のMPO-ANCA値は、対象群のアジュバント非投与ラットの血漿レベルまで減少した。また、MPO活性は、アジュバント非投与ラットのそれと有意な差はなかった。一方、関節の腫脹、血清中の炎症たんぱく量の変化などを指標とした関節炎の症状の軽減に対するアセアノスタチン投与の効果は弱かった。以上の様に、アセアノスタチンの投与が、好中球の活性化の指標と考えられ

ているMPO-ANCAの減少をもたらすことが示された。しかし、アセアノスタチンによる関節炎の治療効果の可能性については弱く、別途軽減物質について検討する必要性が残った。

**【結論】** 10細フラグメントの合成は、問題なく遂行できた。各細フラグメントの収量もよかった。阻害効果は、第4番目細フラグメント最も強かった。治療への応用に向けた有用な細フラグメントを特定する予定である。また、アセアノスタチン投与によるMPO-ANCA産生抑制効果においては、関節炎ラットの血漿中のMPO-ANCAの高値は、アセアノスタチン投与により非投与ラットの血漿レベルまで減少した。しかし、関節炎の治療にはいたらなかった。

#### **【参考文献】**

(1) 鈴木和男 MPO-ANCA：好中球細胞質自己抗体 好中球—機能低下と機能亢進—笹田昌孝編 医薬ジャーナル社 194-219, 1998.

(2) Minoshima, S., Arimura, Y., Nakabayashi, K., Kitamoto, K., Nagasawa, T., Ishida-Okawara, A. and Suzuki, K. Increased release of myeloperoxidase in vitro from neutrophils of patients with myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA) related glomerulonephritis. *Nephrology* 3, 527-534, 1997

(3) Ishida-Okawara, A., Tsuchiya, T., Nuno, H., Mizuno, S., and Suzuki, K. Modulation of degranulation and superoxide generation in human neutrophils by unsaturated fatty acids of odd carbon numbers. *Biochim. Biophys. Acta* 1314, 239-246, 1996

#### **【研究業績】**

(1) Otani, I., Ishida-Okawara, A., Yamagoe, S., Miyoshi-Koshio, T., Arimura, Y., Nagasawa, T., Mizuno, S. and Suzuki, K. Myeloperoxidase (MPO) fragments reacting with a serum of patient with MPO-ANCA positive glomerulonephritis. *J. Infection and Chemother.* 3, 164-169, 1997.

(2) Tomizawa, K., Mine, E., Fujii, A., Ohashi, Y., Yamagoe, S., Ishida-Okawara, A., Hashimoto, Y., Ito, M., Tanokura, M., Yamamoto, T., Arimura, Y., Nagasawa, T.,

Mizuno, S. and Suzuki, K. A panel set for epitope analysis of myeloperoxidase (MPO)-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody MPO-ANCA using recombinant hexamer histidine-tagged MPO deletion mutants. *J Clin. Immunol.* 18, 142-152, 1998.

(3) Minoshima, S., Arimura, Y., Nakabayashi, K., Kitamoto, K., Nagasawa, T., Ishida-Okawara, A. and Suzuki, K. Increased release of myeloperoxidase in vitro from neutrophils of patients with myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA) related glomerulonephritis. *Nephrology* 3, 527-534, 1997