

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業

人工ポリクローナルFv グロブリン製剤の 開発に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成13年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
人工ポリクローナル F _v グロブリン製剤の開発に関する研究 鈴木和男	1
II. 分担研究報告	
1. MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作成に関する研究 新井孝夫	11
2. 自己抗体を誘発する真菌由来糖構造解析 大野尚仁	15
3. MPO に対する単クローン抗体の作製 佐々木次雄	31
4. 人工抗体に関する研究 内田隆史	67
5. ANCA 関連腎炎及び血管炎の好中球機能の検討とγグロブリン療法の効果に関する研究 武曾恵理	69
6. 特発性肺胞蛋白症の抗 GM-CSF 自己抗体のエピトープ決定 中田 光	89
7. MPO の立体構造に関する研究 田之倉優	95
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	99
IV. 研究成果の刊行物・別刷	101

人工ポリクローナル Fv グロブリン製剤の開発に関する研究

主任研究者： 鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨：

自己免疫疾患の治療は、ステロイドの免疫非特異的抑制や、対応分子の感作療法によっており、ガンマグロブリン製剤による治療の有効性が実証されている自己免疫疾患もあることから、疾患特異的な人工化免疫グロブリン製剤としての ScFv 抗体開発することを本研究の目的とした。本年度は、2班に分け検討した。1) 抗体作成班：MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製を検討し、本年は、ヒト MPO とマウス MPO でそれぞれ免疫した正常と MPO ノックアウトマウスの B 細胞を材料として、抗 MPO モノクローナル抗体を作製した。また、MPO の完全分子を用いてそれらに特異的な mAb の確立を試みた。人工抗体の作成の準備については、ScFv 抗体作製技術の検討とマウス MPO 抗体の cDNA ライブラリーを作製することができた。さらに、病因にかかわる抗体抗原反応の解析について、抗体と反応する MPO 部位の立体構造を解析した。2) 臨床研究・モデル動物作成班：自己抗体性血管炎をつくるモデルマウスに MPO 欠損遺伝子を導入し、MPO-ANCA 関連血管炎は、MPO が主因となっていることが明らかにした。また、真菌由来糖構造解析し、高頻度で心冠状動脈並びに大動脈起始部に血管炎の発症が認められた。臨床班では、自己抗体産生とガンマグロブリン製剤の有効な症例について、好中球機能を予備的に検討し、腎炎患者では MPO release は炎症性反応の程度に応じて高値を示した。活性酸素産生は、活動型病変発症例ではむしろ低下していた。GM-CSF 自己抗体が誘導する特発性肺胞蛋白症について、ガンマグロブリン製剤の有効性を検討する疾患の基礎研究を行った。初年度の研究目標は達成できた。

A. 研究目的

高度高齢社会に入ったわが国では、生活習慣病に加えて、アレルギー、リウマチなど生体防御異常による自己免疫疾患の増加が懸念

されている。自己免疫疾患は、神経系疾患、橋本病、糖尿病、自己免疫性肝炎、血管炎、肺胞症、シェーグレンなど様々な難病疾患としてあらわれる。これら疾患は、炎症を伴い、

好中球やマクロファージを主体とした炎症性細胞の浸潤が組織にみられる一方、患者の血中に存在する対応分子の抗体との免疫複合体の形成によって、自然免疫細胞を活性化し、疾患が重篤化の方向に進展する。これらの疾患の治療には、ステロイドの免疫非特異的抑制や、最近の対応分子（抗原）の感作療法によっているのが現状であり、非特異性の問題から、新たな抗炎症薬の開発が強く望まれている。川崎病ではガンマグロブリン製剤による治療の有効性が実証されており、他の自己免疫疾患へのグロブリン製剤の利用も検討されはじめている。また、ヨーロッパでは、好中球抗体 MPO-ANCA 関連血管炎のを示す自己免疫疾患でもグロブリン製剤が使用されはじめ、好成績を得ている。しかし、その治癒機転は不明なところがあり、解決しなければならない問題も多く残っている。一部明らかになってきた自己抗体の性状に MPO-ANCA がある。MPO の特定のエピトープに結合した MPO-ANCA のみが病因性が高く、他の MPO 部位に結合したものは病因性が弱いことが知られている。そこで、申請者の鈴木らは、製剤中のポリクローナル MPO-ANCA が、特定の病因性を生じるエピトープを示す MPO-ANCA モノクローナル抗体との結合を阻害により病因性を弱めると推定している。この考えのもとに、本研究では、疾病特異的モノクローナル抗体治療を目的として、ScFv 抗体を使った人工免

疫グロブリン製剤の開発することを目的とした。ScFv は一本鎖化可変部断片で、人に投与しても抗原性が低く安全性が高い。ScFv は、抗体遺伝子を操作して ScFv 遺伝子を調製、発現させる。マウスの抗自己抗体モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の mRNA をもとに ScFv を作成、可溶性 ScFv を得る。本方法により ScFv を大量にしかも品質を一定にして調整することが可能となり、グロブリン投与よりも安全でかつ高い薬効が期待できる。また、将来医薬品とし供給は容易であり、実用的な方法である。班構成を、抗体作成班、モデル動物作製・臨床班の 2 班とした。12 年度は、自己免疫疾患の標的分子のマウスモノクローナル抗体を作製する。全体の計画では、13 年度は、モノクローナル抗体の結合と拮抗する抗体を作成し、そのハイブリドーマの遺伝子から人工グロブリンを設計・作製する。14 年度は、1) MPO-ANCA および GM-CSF 抗体マウスにて治療予備試験を行う。

主任者は、全体の総括とともに、動物モデルの作成とリコンビナントの高原 (myeloperoxidase) を作製した。

B. 研究方法

- 1) 血管炎モデルマウスの調整: 本疾患モデルは、川崎病リスクの冠状動脈炎発症モデルとして作られ、罹患児糞便から分離した *C. albicans* 由来物質によ

り誘導した。

- 2) マウスのリコンビナント MPO の調整：マウスのリコンビナント MPO は、ヒトのリコンビナント MPO と同様に作成した。
- 3) マウス血清中の MPO-ANCA 値：ヒトおよびマウス MPO の ELISA により測定した。
- 4) MPO-KO の MPO-ANCA 産生と血管炎発症の検討：CADS 誘導の血管炎率と血清中の MPO-ANCA 値について野生型のそれと比較した。MPO-KO 群、C57BL/6 (対照群) (4 週、雄、各 5) について、CADS を 5 日間腹腔接種し、3 週間のインターバル後再び同様に接種した。3 週後心採血にて屠殺、病理標本を作製し血管炎の評価をした。MPO-ANCA はヒト MPO-III を抗原とする ELISA 法にて測定した。

C. 研究結果

1. 総括

1) 抗体作成班

主任者補佐である分担者の新井と分担者の佐々木は、共同して、MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製を検討した。まず、本年は、ヒト MPO とマウス MPO でそれぞれ免疫した正常と MPO ノックアウトマウスの B 細胞を材料として、抗 MPO モノクロ

ーナル抗体を作製した。また、遺伝子導入法として開発されたカチオン性脂質法が、モノクローナル抗体の生細胞への効率的な導入にも適用できることをはじめて示した。以上のことは、MPO ノックアウトマウスを中心に用いる新たな研究の展開と簡便な治療効果を検討する系の開発の可能性を示唆する。一方、佐々木は、MPO-ANCA をモデルとして、自己免疫疾患の治療に有効な単クローナル抗体 (mAb) の作製を担当した。今年度は、MPO の完全分子を用いてそれらに特異的な mAb の確立を試みた。更に、mAb を臨床に適用する際の国際的規制 (WHO, FDA, ICH, CPMP) 内容を整理し、今後の臨床応用に備えることにした。

本課題のキーである人工抗体の作成の準備は完了した。担当した分担者内田は、ScFv 抗体作製技術の検討とマウス MPO 抗体の cDNA ライブラリーを作製した。今後は、最終的目標の MPO の多様なエピトープに対応する各種 ScFv 抗体を作成する。さらに、病因にかかわる抗体抗原反応の解析について、分担者の田之倉は、抗体と反応する MPO 部位の立体構造を解析した。本研究は、治療のためのブロック抗体の開発に資するために、MPO 分子の立体構造上の特徴と MPO フラグメントのリスクの実験結果と比較して、MPO 上の MPO-ANCA との分子間相互作用部位の可能性について検討した結果、MPO の

MPO-ANCA 結合部位は MPO の活性部位周辺で、MPO-ANCA が MPO の活性部位を覆うようにして結合する可能性が高いと結論された。

2) 臨床研究・モデル動物作成班

主任者をはじめ、分担者の大野、協力者の高橋が中心になって治療検討を目的としてモデル動物を作成してきている。主任者の鈴木は、*Candida albicans* - derived substances (CADS)誘導の血管炎をつくるモデルマウスに MPO 欠損遺伝子を導入し、CADS 誘導の冠状動脈血管炎発症に伴う血中 MPO-ANCA 値の上昇は、MPO-KO マウスでは野生型マウスに比べ低下し、血管炎の頻度も低下した。これらの結果から、CADS 誘導による MPO-ANCA 関連血管炎は、MPO が主因となっていることが明らかにした。

大野と高橋は、自己抗体を誘導する真菌由来糖構造解析を行った。*C. albicans* から様々な画分を作成し、血管炎誘発活性並びに炎症・免疫パラメータの変化を比較検討した。その結果、CADS および CaNaClO 画分、CAWS のいずれの画分でも高頻度で心冠状動脈並びに大動脈起始部に血管炎の発症が認められた。これらのことから、自己抗体産生血管炎誘発には誘導物質ならびに宿主の応答性の両面の特徴が重要であることが示唆された。

一方、臨床班では、分担者武曾と主任者

が共同して自己抗体産生とガンマグロブリン製剤の有効な症例について、好中球機能を予備的に検討した。腎炎患者では MPO release は炎症性反応の程度に応じて高値を示した。MPO release は組織活動性と相関するが、O₂-産生は重篤な活動型病変発症例ではむしろ低下しており、好中球の過刺激後の産生枯渇状態を推測させ、組織学的活動期以前のより早期における O₂-産生過剰が存在していたことが示唆された。さらに、GM-CSF 自己抗体が誘導する特発性肺胞蛋白症について分担者の中田が検討し、ガンマグロブリン製剤の有効性を検討する疾患の基礎研究を行った。患者の肺胞及び血液中に抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) 中和自己抗体が大量に存在することを発見した。マウスモノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗体と競合実験を行った結果、アミノ末端より78番目から96番目までを認識する抗体ともっともよく競合し、GM-CSF の高次構造を認識していることを予想している。

2. 主任者の結果：

1) マウス MPO(mMPO)の特異的抗体を作成するため、マウスリコンビナント MPO に対する抗体を作成し、mMPO 特異的抗体を得た。また、コンビナント mMPO 分子は作成により mMPO 特異的抗体を作成でき、抗体の標準化

が確認できた。

2) CADS 誘導の冠状動脈血管炎に伴い MPO-ANCA 値は、MPO-KO マウスでは、野生型マウスに比べ抑制された。CADS 誘導の血管炎発症率と血清中の MPO-ANCA 値について野生型のそれと比較した結果、血管炎の発症率は、MPO-KO 群では 40%と対照群 100%より激減した。一方、血清 MPO-ANCA 値は MPO-KO 群では、95.8hEU で、対照群の 234.1hEU と比較して有意に抑制されていた (図)。

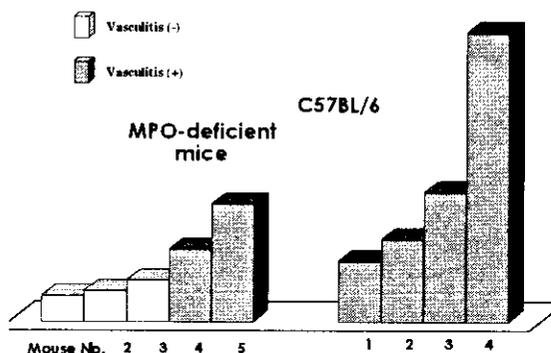


図. MPO-KO マウスにおける冠状動脈血管炎誘導と MPO-ANCA 値

3) MPO-KO マウスでは CADS 誘導の冠状動脈血管炎が激減した。CADS 誘導の冠状動脈血管炎に伴い MPO-ANCA は、MPO-KO マウスでは、野生型マウス比し著しく抑制された。MPO-KO マウスでは CADS 誘導の冠状動脈血管炎が激減した (図)。

D. 考察

主任研究者らは、自己免疫疾患の病因に関して研究し、患者血清中の自己抗体の病因性エピトープの同定および自己抗体産生のモデルマウスを開発してきた。そのエピトープを解析した結果、主として MPO の H 鎖の N および C 末端に単独で反応するエピトープをもつ MPO-ANCA 抗体が重症化と関連し、特定の反応部位が病態と関連することを認めた。この結果から、MPO-ANCA のクロナリテーターは血管炎疾患および病態と関連があることが示唆され、新しい治療・病態評価法の指針を確立した (Tomizawa et al., J. Clin. Immunol, 1999; Fujii et al, Clin Neph, 2000)。一方、モデル動物としては、NZB/WF1、MRL、SCG、IRF-8/ICSBP マウスおよび *Candida albicans* 由来物質誘発の冠状動脈炎マウスなどの自己免疫疾患モデルマウスに MPO がどの様に関与しているかを解明するため、MPO ノックアウトマウスを作製してきた (Aratani et al., Infection & Immunity, 1999)。本年度には、新たに、MPO-ANCA 産生モデルマウスの作成およびヒト型モノクローナル抗体を作成した。さらに、MPO 欠損マウスを用いてマウス型 MPO 抗体を作成している。また、本研究の重要課題である人工ガンマグロブリン作成のための ScFv 遺伝子を発現させる系を確立した。この様に、当初の目的は、ほぼ達成できて

いる。

一方、主任者の研究成果は以下のものである。MPO 欠損マウスは、照群 100%より激減し、血清 MPO-ANCA 値は MPO-KO 群では、有意に抑制されていた。この様に、CADs 誘導の冠状動脈血管炎に伴い MPO-ANCA は、MPO-KO マウスでは、野生型マウス比し著しく抑制された。MPO-KO マウスでは CADs 誘導の冠状動脈血管炎が激減した。野生型マウスにおいて、冠状動脈血管炎発症率と MPO-ANCA 値に、正の相関が認められた。また、MPO 欠損マウスにおいて *C. albicans* 抽出物誘導の冠状動脈血管炎の発症の低下と関連して MPO-ANCA が低値を示した個体が多かった。このことは、MPO が抗原になっていることを示している。しかし、MPO-ANCA 産生には、MPO 以外の抗原の存在も示唆された。

E. 結論

自己免疫疾患の治療にガンマグロブリン製剤の有効性が実証されており、本研究では、疾病特異的モノクローナル抗体治療を目的として、ScFv 抗体を使った人工免疫グロブリン製剤の開発することを目的とし、12 年度は、自己免疫疾患の標的分子のマウスモノクローナル抗体を作製することを中心に計画した。抗 MPO モノクローナル抗体を作製し、MPO の完全分子を用いてそれらに

特異的な mAb の確立を試みた。人工抗体の作成の準備については、ScFv 抗体作製技術の検討とマウス MPO 抗体の cDNA ライブラリーを作製することができた。さらに、病因にかかわる抗体抗原反応部位の MPO の立体構造を解析した。MPO-ANCA 関連血管炎は、MPO が主因となっていることを MPO-KO マウスにより明らかにした。また、真菌由来糖構造解析から高頻度で心冠状動脈並びに大動脈起始部に血管炎の発症が認められた。臨床班では、自己抗体産生とガンマグロブリン製剤の有効性が予測される症例として腎炎患者の好中球機能異常を観察した。GM-CSF 自己抗体が誘導する特異性肺胞蛋白症についてもガンマグロブリン製剤の有効性を検討する疾患の基礎研究を行った。初年度の研究目標は達成できた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujii, A., Tomizawa, K., Arimura, Y., Nagasawa, T., Y-Ohashi, Y., Hiyama, T., Mizuno, S. and K. Suzuki. Epitope analysis of myeloperoxidase-specific anti-neutrophil Cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated glomerulonephritis. Clin. Nephrology 53, 242-252, 2000.

- 2) Y. Kawai, A. Ishida-Okawara, H. Okuyama, F. Kura, K. Suzuki. Modulation of chemotaxis, O₂-production and myeloperoxidase release from human polymorphonuclear leukocytes by the ornithine-containing lipid and serineglycine-containing lipid of *Flavobacterium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28, 205-209, 2000.
 - 3) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda and M. Koyama. "Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J. Infectious Diseases* 182, 1276-1279, 2000.
 - 4) K. Suzuki, H. Nunoi, M. Miyazaki, F. Koi Book : The Peroxidase Multigene Family of Enzymes. Springer-Verlag: Berlin; 2000 Chapter 20 in Petrides P.E., Nauseef W.M. (Eds). "Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan"
 - 5) 鈴木和男 特集「血管炎の基礎と臨床」血管炎と自己抗体—抗好中球細胞質抗体を中心に— 最新医学 55; 2636-2646, 2000
2. 学会発表
- 1) Kazuo Suzuki, Akiko Ishida-Okawara, Yuki Hashimoto, Toshikazu Shirai, Hiroshi Hashimoto. Risk epitope of MPO of vasculitis in Japanese population. 第9回国際血管炎 ANCA Workshop 4月12日—15日, グロニンゲン・オランダ
 - 2) Kei Takahashi, Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Yuki Hashimoto, Shiro Naoe, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Kazuo Suzuki. MPO is not antigen for MPO-ANCA in candida extract (CE)-induced vasculitis: Observation using MPO-KO mice. 第9回国際血管炎 ANCA Workshop 4月12日—15日, グロニンゲン・オランダ
 - 3) T. Ihara, E. Muso, S. Sasayama, A. Ishida-Okawara, Y. Hashimoto, K. Suzuki. Studies on Neutrophil Function and Glomerulonephritis. 第9回国際血管炎 ANCA Workshop 4月12日—15日, グロニンゲン・オランダ
 - 4) 鈴木和男 シンポジウム「深在性真菌の発症機序とその対策—アスペルギルス症を中心として：真菌感染成立に関与する好中球機能」第74回日本感染症学会、4月20日—21日
 - 5) 鈴木和男 シンポジウム「自己免疫抗原：血管炎の病態に関連する MPO-ANCA のリスクエピトープ」第44回日本リウマチ学会、5月13日—15日
 - 6) 鈴木和男 「血管炎における MPO-ANCA」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
 - 7) 大川原明子、雑賀 寛、根本久一、鈴木和男「SCG/kj マウスの糸球体腎炎の発症・進行における活性化好中球の役割」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
 - 8) 猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、橋本ゆき、大川原明子、鈴木和男 「糸球体腎炎における好中球機能についての検討」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
 - 9) 大原関利章、大川原明子、高橋 啓、荒谷康昭、橋本ゆき、若山 恵、渋谷和俊、村田久雄、直江史郎、鈴木和男 「カンジダ菌抽出物を用いた川崎病血管炎モデルにおける MPO-ANCA の検討：MPO ノックアウトマウスを用いた解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
 - 10) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男 「ミエロ

- ペルオキシダーゼ欠損マウスの真菌および細菌に対する感染防御能の解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 11) 倉 文明、後藤紀久、前川純子、塚野尋子、Dinauer MC、荒谷康昭、小山秀機、鈴木和男「Lgnlr あるいは NADPH oxidase によるマウスの致死性レジオネラ肺炎の防御」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
 - 12) 亀岡洋祐、安谷屋正明、鈴木和男「新規MPO完全欠損患者の遺伝子解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
 - 13) 松岡俊行、橋本ゆき、大川原明子、Keiko Ozato、新井孝夫、鈴木和男「ICSBP/IRF-8 ノックアウトマウスにおける好中球およびMPO-ANCA産生に関する解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
 - 14) Kazuo Suzuki Geneva Biology of Ageing Workshop 2000: Phagocytes, Inflammation and Ageing. September 1-2, 2000 in Geneva 加齢生物学ワークショップ ジュネーブ2000: 食細胞、炎症および加齢
 - 15) Kazuo Suzuki, Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki Hashimoto, Yosuke Kameoka, Takeshi Saito, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe A Role of myeloperoxidase (MPO) for production of MPO-ANCA in *Candida albicans*-derived substances (CADS)-induced vasculitis in the coronary arteries using MPO-deficient mice and recombinant mouse MPO. The peoxidase superfamily II of animal and human enzymes: Biochemical basis and clinical application. September 3-8, 2000 in Vienna
 - 16) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda, and H. Koyama. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research, Oct. 16-20, Kyoto
 - 17) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能の低下 第73回日本生化学会大会 10月11—14日、横浜
 - 18) 鈴木和男 血管炎における好中球とMPO-ANCAの役割 第5回血管炎研究会 10月13—14日、東京
 - 19) 大原関利章、大川原明子、高橋 啓、荒谷康昭、直江史郎、鈴木和男 カンジダ菌体抽出物誘導の血管炎モデルマウスにおける血管炎とMPO-ANCAの相関(2)—MPO ノックアウトマウスを用いた解析— 5回血管炎研究会、10月13—14日、東京
 - 20) 荒谷康昭、倉文明、鈴木和男、小山秀機 MPOノックアウトマウスの真菌・細菌に対する感染防御能の低下 第30回日本免疫学会、11月14日—16日、仙台
 - 21) 大原関利章、大川原明子、高橋 啓、荒谷康昭、直江史郎、鈴木和男 カンジダ菌体抽出物誘導の血管炎モデルマウスにおける血管炎とMPO-ANCAの相関(2)—MPO ノックアウトマウスを用いた解析— 第30回日本免疫学会、11月14日—16日、仙台
 - 22) 大川原明子、大原関利章、高橋 啓、橋本ゆき、荒谷康昭、直江史郎、代田和恵、鈴木和男 カンジダ菌体抽出物(CADS)誘導の血管炎モデルマウスにおける血管炎とMPO-ANCAの相関—MPO ノックアウトマウスを用いた解析— 第23回日本分子生物学会、12月13日—16日、神戸

- 23) 亀岡洋祐、Amanda Persad、安谷屋正
明、鈴木和男 新規MP0 完全欠損患者
の遺伝子解析 第23回日本分子生
物学会、12月13日~16日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究

分担研究者 新井孝夫 東京理科大学理工学部教授

研究要旨：ヒト MPO とマウス MPO でそれぞれ免疫した正常と MPO ノックアウトマウスの B 細胞を材料として、抗 MPO モノクローナル抗体を作製した。また、遺伝子導入法として開発されたカチオン性脂質法が、モノクローナル抗体の生細胞への効率的な導入にも適用できることをはじめて示した。

以上のことは、MPO ノックアウトマウスを中心に用いる新たな研究の展開と簡便な治療効果を検討する系の開発の可能性を示唆する。

A. 研究目的

本研究は、MPO-ANCA 自己免疫疾患のモデルマウスを対象にして、その治療に有効な人工グロブリン製剤を開発するプロジェクトの一環として計画された。MPO-ANCA の自己免疫疾患の治療にポリクローナル抗体が有効であるという証拠が累積しているが、治療に有効なのは①特定の抗原に対応しない免疫グロブリンである、②抗 MPO 抗体であるというふたつの考えがある。本研究は後者の考えに立ち、多数の抗 MPO モノクローナル抗体を作製するとともに、それらを組み合わせて、治療に有効な抗体標品を作ることを目的にした。なお前者の考えに立った研究は、他の分担者が行っている。

目的の抗体作製にとって最も重要なことは、治療効果を調べる系である。実験動物の選択と何をもって効果ありとする基準については、臨床班が分担しているが、ここでは、細胞レベルの簡便な系の確立を視野に入れて、生きている細胞に抗体を導

入する方法についても検討した。

B. 研究方法

モノクローナル抗体は、2つの方法により作製した。第一は、市販のヒト MPO を足跡に3日毎に3回注射する方法で免疫した。第二は、MPO ノックアウトマウスに主任研究者が作成したマウスリコンビナント MPO を注射する方法で行った。前者からはリンパ節と脾臓を、後者からは脾臓のみを採取し、これらから調製した B 細胞とミエローマ細胞 PAI をポリエチレングリコール法で融合した。ハイブリドーマは、ヒト MPO でコートしたプレートを用いた ELISA 法によりスクリーニングした。

4種のカチオン性脂質(リポフェクトアミン、リポフェクチン、セルフェクチン、DMRIE-C) をもちいて、抗チューブリンモノクローナル抗体 E1 の生細胞への導入効率を Cell ELISA 法により検討した。なお、細胞は、褐色腫瘍細胞株 PC12、繊維芽細胞株 3Y1、初代培養グリア細胞を用いた。

(倫理面への配慮)

実験動物の動物愛護上の配慮は、本大学

C. 研究結果

正常マウスに対するヒト MPO の免疫 (方法 1)、MPO ノックアウトマウスに対するマウス MPO の免疫 (方法 2) によるモノクローナル抗体の作製結果 (一次スクリーニング) を表 1 にまとめた。方法 1 の陽性率は低くはなかったが、親和性の高い抗体は少なかった (最終的には 1)。それに対し、方法 2 は、陽性率も親和性の高い抗体も多かった (最終的には 8)。

表 1. 抗 MPO モノクローナル抗体の作製

	総 ウェル	陽性 ウェル	陽性率
方法 1	864	48	5.6%
方法 2	1,536	144	9.4%

4 種のカチオン性脂質のうち、最も抗体の導入効率の良かったのは、リポフェクトアミンであった。この脂質を用いることにより、3 種の生きている 3Y1 細胞、PC12 細胞、グリア細胞に、それらの増殖能力に影響を与えることなく、抗体を導入できた (参考論文参照)。

D. 考察

方法 1 については、注射する抗原量を变化させるなどの工夫をする必要があると思われる。今後は、一度に数匹のマウスに免疫し、抗体価の高いマウスのみをハイブリドーマの作製に用いるつもりである。方法 2 については、期待以上に親和性の高い抗体が多数得られた。この結果は、今後の研究の展開に新しいアプローチの有効性

実験施設の指針に基づいて行った。

を示唆している。すなわち、MPO ノックアウトマウスの抗血清から調製した免疫グロブリンが正常マウスに自己免疫疾患を引き起こすのか、疾患モデルマウスの治療効果を持つのかを検討することからはじめる。疾患を引き起こすのであれば、作製したモノクローナル抗体の中から同様の活性をもつものをスクリーニングする。治療効果があれば、複数のモノクローナル抗体を組み合わせ、同様の効果をもつ標品を調製する。これが、できれば、本プロジェクトのはじめの目標は達成される。

現段階では、抗マウスモノクローナル抗体のスクリーニングに問題がある。リコンビナントは不溶性なので、プレートに吸着させるのが極めて煩雑で、今回は、ヒト MPO と交叉反応するもののみを選んだ。吸着法を工夫して、マウス MPO に対する反応性でスクリーニングしたい。

E. 結論

MPO ノックアウトマウスは、親和性の高いマウス MPO に対するモノクローナル抗体が効率的に作製できるので、本研究には極めて有用である。また、カチオン性脂質により抗体が効率良く導入できることを示したことで、抗体の効果を細胞レベルで判定する簡便法の開発に道を拓くことができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuroiwa, K., Li, H., Arai, T. *et al.* Construction of ELISA system to quantify human ST2 protein in sera of patients. *Hybridoma*, 19, 151-159 (2000)

Tokoyoda, K., Takemoto, Y., Arai, T. *et al.* Synergism between the calmodulin-binding and autoinhibitory domains on calcineurin is essential for the induction of their phosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 11728-11734 (2000)

Li, H., Tago, K., Arai, T. *et al.* The cloning and nucleotide sequence of human ST2L cDNA. *Genomics*, 67, 284-290 (2000)

Ohuchi, T., Fukushima, T., Maruyama, T., Arai, T. Application of cationic liposomes to introduction of monoclonal antibodies into live cells. *Bioimages*, 8, 57-64 (2000)

2. 学会発表

Maruoka, S., Shimada, T., Sunabori, T., Maruyama, K., Ohuchi, T., and Arai, T. Establishment of quantitative assay procedures for NGF-induced PC12 cell differentiation and their application for characterization of anti-Thy-1 antibody-induced PC12 cell differentiation. International Congress on Differentiation and Cell Biology, Gold Coast, Austraria September 25, 2000

Ohuchi, T., Fukushima, T., Matsuda, A., Kajino, M., and Arai, T. Application of cationic liposomes to transduction of

monoclonal antibodies into live cells.

International Congress on Differentiation and Cell Biology, Gold Coast, Austraria

September 28, 2000

丸山清稔、嶋田稔彦、大内敬、新井孝夫。活性酸素類により誘導される神経細胞死を回避する物質の探索。第53回日本細胞生物学会大会、福岡、2000年10月

大内敬、福島隆宏、丸山清稔、新井孝夫。カチオン性脂質を用いた抗体の生細胞導入法の検討。第53回日本細胞生物学会大会、福岡、2000年10月

Iwatsubo, T., Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Watanabe, A., Hosoda, R., Arai, T., Mann, D.M.A., and Takio, K. Identification of a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane collagen-like protein. 北米ニューロサイエンス学会

Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Watanabe, T., Hosoda, R., Arai, T., Miyagawa, T., Takio, K., Mann, D., M., A., and Iwatsubo, T. Secretion of a novel collagen-like Alzheimer amyloid plaque component from its precursor is mediated by furin convertase. 北米ニューロサイエンス学会

松岡俊行、橋本ゆき、大川原明子、Keiko Ozato、新井孝夫、鈴木和男。IRF-8 / ICSBP ノックアウトマウスにおける好中球及びMPO-ANCA産生に関する解析。第30回日本免疫学会学術集会、11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

12年度の段階では、特許取得の予定は

ない。13年度に、免疫疾患を引き起こす抗体、治療に有効な抗体が得られれば、特許出願を行うつもりである。

厚生科学研究費補助金（高度医療研究事業）

分担研究報告書

自己抗体を誘導する真菌由来糖構造解析

分担研究者 大野尚仁 東京薬科大学 薬学部 教授

研究要旨：*Candida albicans* のアルカリ抽出物（CADS）をマウスに腹腔内に投与すると川崎病類似の冠状動脈炎を誘発することが報告されている。本研究では、*C. albicans* から様々な画分を作成し、血管炎誘発活性並びに炎症・免疫パラメータの変化を比較検討した。

検体として CADS、アルカリ抽出残渣の次亜塩素酸 Na 可溶化物 CaNaClO、培養濾液の EtOH 沈殿物 CAWS を用いた。各画分の主要構成成分は CADS はマンナン並びにタンパク、CaNaClO は β グルカン、CAWS はマンナン、 β グルカン、タンパクであった。C3H/HeN マウスの腹腔内に各画分（4mg/mouse）を 1 週目と 5 週目に連日 5 回投与し、9 週目に組織標本を作製し、HE 染色後に観察した。その結果、CADS、5/10（匹）、CaNaClO、5/10、CAWS、9/9 といずれの画分でも高頻度で心冠状動脈並びに大動脈起始部に血管炎の発症が認められた。これらのことから、*C. albicans* の様々な成分で血管炎が誘発されている可能性のある事が示唆された。また、血管炎誘発過程について、血管炎高誘発系統の C3H/HeN と低誘発系統の DBA/2 を用いて比較検討した結果、両マウスではインターフェロン γ 産生能に著しい差を認めた。以上のことから、血管炎誘発には物質ならびに宿主の応答性の両面の特徴が重要であることが示唆された。

A. 研究目的

人工ポリクローナル Fv グロブリン（人工 Ig）の有用性評価には、種々の実験モデルでの基礎的研究が必要である。川崎病の治療には高濃度 γ グロブリン製剤が使用され、効果をあげていることから、川崎病類似の血管炎モデルを用いることは有用であると考えられる。東邦大学の直江教授らは、川崎病患児から分離された *Candida albicans* のアルカリ抽出多糖画分（CADS）を用いることで、マウスに川崎病類似の血管炎を誘発できることを報告しており、本モデルを人工 Ig の評価法に応用することは、川崎病治療法の向上の面からも重要であると考えられる。しかし、本モデルは、誘発物質の化学的本態の解明がなされていない点、誘発機序が不明である点など、未解決な点を含んでいる。そこで、本研究は、上記 2 点の解明を目的として開始した。

B. 研究方法

（1）誘発物質の解析

菌体多糖の抽出 *C. albicans* 菌体のアルカリ抽出物並びに残渣は、東邦大学、直江教授より、分与を受けた。菌体のアルカリ抽出残渣は 0.1N NaOH に懸濁し、1/10 量の次亜塩素酸 Na 試薬を加えて、4℃で一夜放置し、可溶化画分を得た。この画分を十分透析後、凍結乾燥して可溶性多糖画分（CaNaClO）を得た。

菌体外多糖（CAWS）の調整 *C. albicans* を完全合成培地に培養し、培養外液をエタノール沈殿することで、菌体外多糖画分（CAWS）を得た。

多糖の分析 糖含量は Phenol-H₂SO₄ 法、タンパク含量は BCA 法、糖組成は Alditol-acetate 誘導体の GLC 法、NMR 分析は Bruker AM400 装置を用い DMSO-d₆ 溶媒、70℃で、各々行った。

（2）誘発機序の解析

MPO reagent の調整

3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine (TMB; SIGMA) を発色試薬とし、クエン酸緩衝液 (pH5.4) 中で反応させた。

Alkaline phosphatase (ALP) 活性 RPMI に懸濁した細胞を凍結融解する事で cell lysate を調整した。p-nitrophenylphosphate を基質とした。

血管炎誘発の投与計画 1 週目に、誘発画分 (4mg/mouse) を腹腔内より C3H/HeN マウスに 5 日間連続投与した。更に 5 週目に、同画分 (4mg/mouse) を 1 週目と同様に投与し、9 週目にマウスを屠殺し、心冠状動脈の組織切片を HE 染色した。

免疫・炎症パラメーター解析のための CAWS 投与計画 CAWS (0, 2, 4mg/mouse) を腹腔内より DBA/2, C3H/HeN マウスに 5 日間連続投与した。最終投与 90 分, 1 週間, 3 週間, 5 週間後に、各臓器を取りだし、細胞懸濁液の調整 (1×10^7 cells/mL) を行い、24 穴プレートに 1mL ずつまき、37°C, 5%CO₂ インキュベーターにて 24 時間培養した。

サイトカインの測定 サイトカインは 2 抗体を利用したサンドイッチ ELISA 法を用いた。抗体、標準品は全て Pharmingen 社より購入し、同社の標準プロトコールに従った。

細胞ポピュレーションの検討 rat anti-mouse CD16/CD32 (Fc γ R III/II) を加え水中 30 分間 blocking した後、それぞれの抗体 (hamster anti-mouse CD3 ϵ mAb, rat anti-mouse CD45R/B220 mAb, rat anti-mouse CD4, rat anti-mouse CD8 α (Ly-2) mAb, rat anti-mouse Ly-6G (Gr-1) mAb, rat anti-mouse CD11b (Mac-1)) (Pharmingen) を加え 30 分間水中で incubate した。洗浄後 FACSCalibur を用いて測定した。

有意差検定 本研究における有意差検定は、すべて Student's *t*-test によって行い、 $P < 0.05$ のものを「有意差あり」と判定した。

C. 研究結果

(1) 誘発物質の解析

本研究においては誘発画分として、従来から使用されてきたアルカリ抽出画分 (CADS) 並びに、本研究で作成した次亜塩素酸 Na 可溶性画分 (CaNaClO) 並びに菌体外多糖画分 (CAWS) を

使用した。方法に示した標準誘発方法に従って、マウスを処置し、冠状動脈の組織像を観察した。その結果、CADS では 10 匹中 5 匹に、CaNaClO では 10 匹中 5 匹に、CAWS では 9 匹中 9 匹全例に血管炎が誘発された。さらに、化学分析の結果、CADS 並びに CAWS はマンナンを主成分にするのに対し、CaNaClO は、 β 1, 6-グルカンを主構成成分とすることが C13-NMR によって明らかとなった (Fig.1)。また、CaNaClO のタンパク含量は検出限度以下であり、除タンパクされていた。以上のことから、血管炎誘発は複数の成分によって誘発される可能性のあることが強く示唆された。

(2) 誘発機序の解析

既に CADS による血管炎の誘発には系統差が存在し、発症しないマウス (DBA/2) と発症するマウス (C3H/HeN) が報告されている。そこで CAWS の生体に及ぼす影響、とくに免疫・炎症パラメーターの変化について DBA/2, C3H/HeN を用いて検討した。

その結果、脾臓細胞を用いた in vitro の系において①Lipopolysaccharide の mitogen 活性抑制作用 (Fig.2)、②Concanavalin A による interferon gamma (IFN- γ) 産生抑制作用 (Fig.3) が観察され、③ propidium iodide 染色法を用いた FACS 解析により、それらの抑制作用は CAWS の直接的なリンパ球障害作用に依存している事 (Figs. 4,5) が判明した。しかし、この評価系に関する限り、系統差は認められなかったことから、本活性は間接的な要因である可能性がある。

また in vivo の系において①腹腔への細胞浸潤並びに脾腫が観察され、投与 5 週間後でも脾腫は持続し (Figs. 6,7)、②各種サイトカイン産生能を比較したところ、DBA/2 の脾臓細胞培養上清中に高濃度の IFN- γ の産生が観察された (Fig.8)。③また、初期の脾臓細胞培養上清中には Myeloperoxidase の放出が観察されたが、それらは 1 週目には消失した (Fig.9)。一方、細胞懸濁液中の MPO 活性は 5

週間後でも観察され(Fig.10), それらの結果は脾臓への好中球浸潤を反映しているものであることがFACS解析(Figs. 11, 12)によって支持された。以上, in vivoの系において, 系統差が最も強く認められた活性は脾細胞のインターフェロン γ 産生能であった。

D. 考察

誘発物質：これまでCADSを中心に, 誘発試験並びに各種パラメータ測定が行われてきた。本画分はマンナン, タンパクを主成分としているが, アルカリ処理で得たものであることから, 特に, タンパク成分に関しては変性を受けている可能性が高い。これらを考慮すると, 所謂, 活性タンパクの精製手法を本画分の画分に応用した場合, 予期せぬ挙動をする可能性が高いことは, 容易に推測できる。そこで, 本研究においては, 化学処理による除タンパク, 並びに関連画分を用いた活性成分の類推を行うこととした。また, 本評価系はマウスの冠状動脈炎の有無を評価するという厳しい条件のもとで行われ, 近交系マウスを用い, かつ, 総投与量が80mg/mouseと多量であるにも係わらず, 発症率は必ずしも高くない。今回, 除タンパクした β グルカン画分CaNaClO, 並びに菌体外多糖画分CAWSが活性を示したことから, 誘発活性を示す物質は複数存在する可能性が高い。また, 今回, 菌体外多糖画分CAWSは誘発率が極めて高いことがわかった。本物質をあわせて検討することで活性本態が解明しうるものとする。詳細については, 更に継続して検討中である。

誘発機序：活性物質の特定が不十分であるため, 誘発にかかわる種々のパラメータ解析に曖昧さが残されているのが現状である。本研究においては, CAWSを用いて, 誘発過程の炎症・免疫パラメータの変化について検討した。高誘発並びに低誘発の2系統のマウスを用い, 同時並行して種々の解析を行った。予想されたことではあるが,

様々な変化や活性が両系統で観察された。これらのことから, 血管炎誘発の有無は, 宿主に様々な変化が出る中で, 何らかの分岐点となる反応が誘発されるか否かで方向付けられている可能性がある。本研究においては, 脾細胞のインターフェロン産生において両系統で著しい差を生じ, 血管炎高誘発系ではインターフェロン産生が低かった。本活性が最も重要な分岐点か否かは, 今後更に検討の必要があるが, 分岐点の近傍にある可能性は極めて高い。今回得た結果は, 全身レベルでの変化を扱っており, 冠状動脈局所の反応ではない。今後更に局所での変化にも目を向けて検討を重ねたい。

E. 結論

血管炎誘発に係わる, 物質側並びに宿主側の変化を解析した。誘発物質は複数存在する可能性があること, 誘発機序にはインターフェロン産生が関与している可能性のある事が示唆された。今後は, 物質間での作用の差異, インターフェロンを中心とした, 血管炎発症機序の解析を進めたい。

F. 健康危険情報

*C. albicans*は常在菌であり, 健康人に対する病原性は問題とならない。生物試験は全て動物試験であり, 本学の倫理規定に則って行った。

G. 研究発表

1. 論文発表, 準備中
2. 学会発表

第44回 日本医真菌学会総会, 長崎市ブリックホール, 平成12年11月25日~26日
カンジダ可溶性多糖画分(CAWS)によるマウスへの実験的血管炎の誘発, 栗原 清, 大野尚仁,

三浦典子，安達禎之，宿前利郎，高橋 啓，大原
関利章，直江史郎（東京薬大・薬・第一微生物，
東邦大医・大橋・病理）

第 23 回日本分子生物学会年会，神戸国際会議場
および国際展示場，平成 12 年 12 月 13 日～16 日
カンジダ菌体成分によるマウスへの実験的血管
炎の誘発，大野尚仁，栗原 清，三浦典子，安達
禎之，宿前利郎，高橋 啓，大原関利章，直江史
郎，大川原明子，鈴木和男（東京薬大・薬・第一
微生物，東邦大医・大橋・病理，国立感染研・生
物活性）

H.知的財産権の出願・登録状況，なし

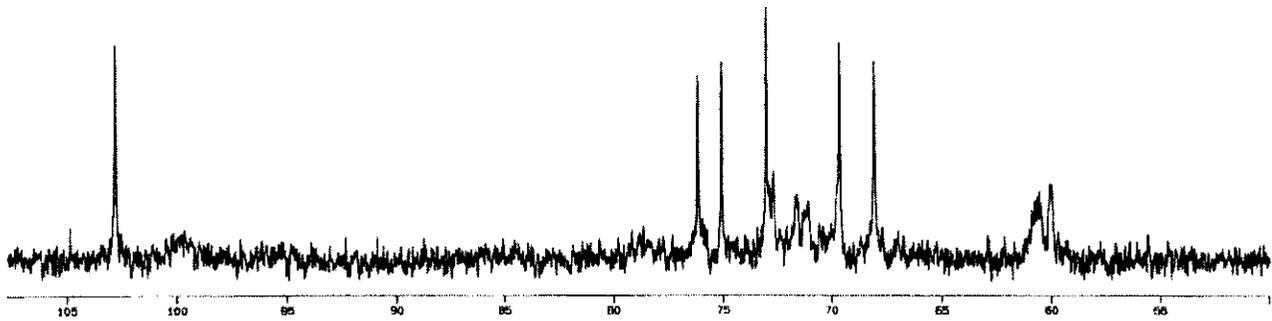


Fig.1. C13-NMR spectrum of CaNaClO in DMSO-d6

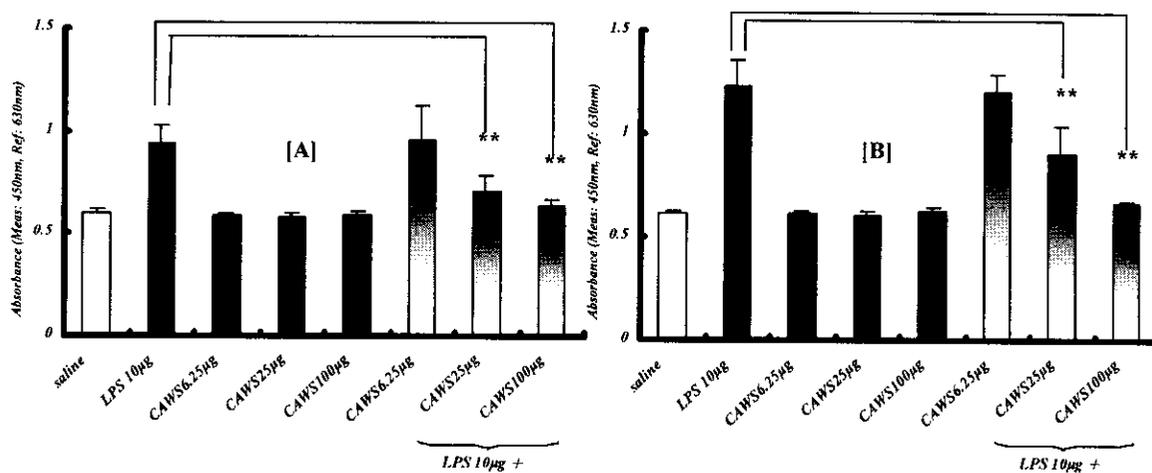


Fig. 2 Alkaline phosphatase activity of splenocyte stimulated with LPS and CAWS in vitro

Splenocyte (1×10^6) was stimulated by LPS and CAWS in vitro. After 72hr incubation, splenocyte was collected and measured alkaline phosphatase activity as described in materials & methods. The results shown represent the mean \pm S.D. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.005$ compared with control (LPS; $10 \mu\text{g/mL}$). [A]: DBA/2. [B]: C3H/HeN