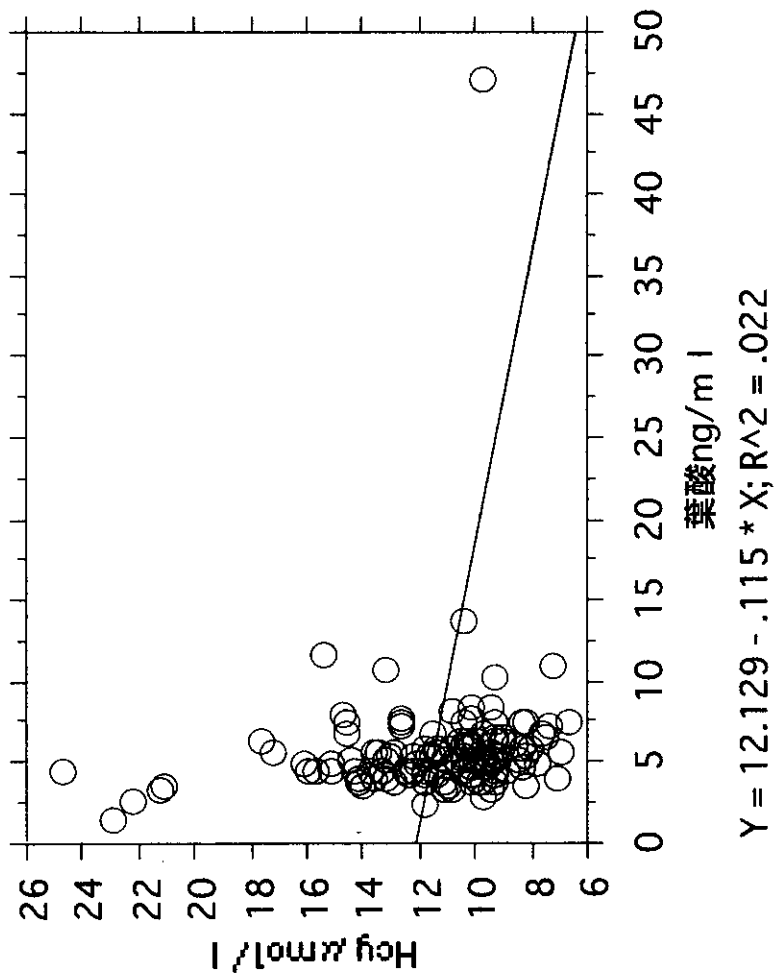
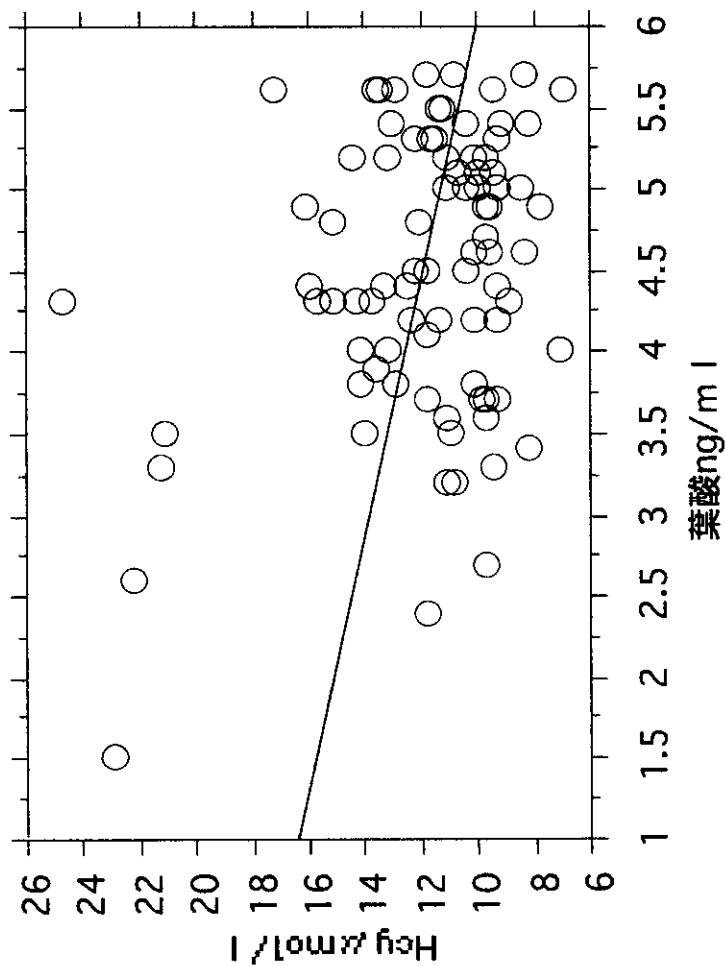
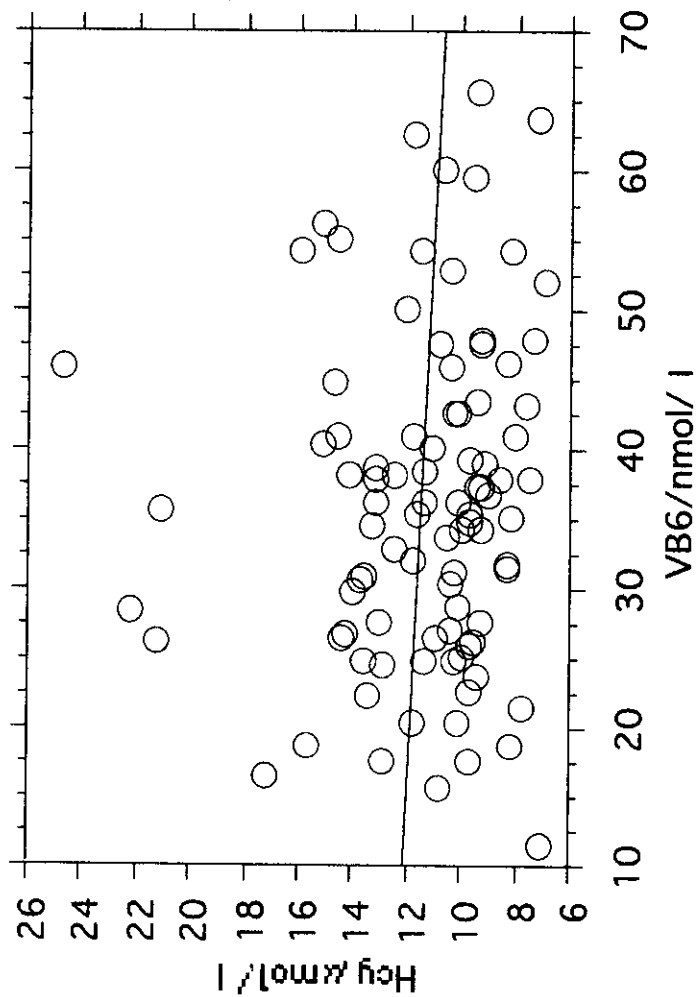


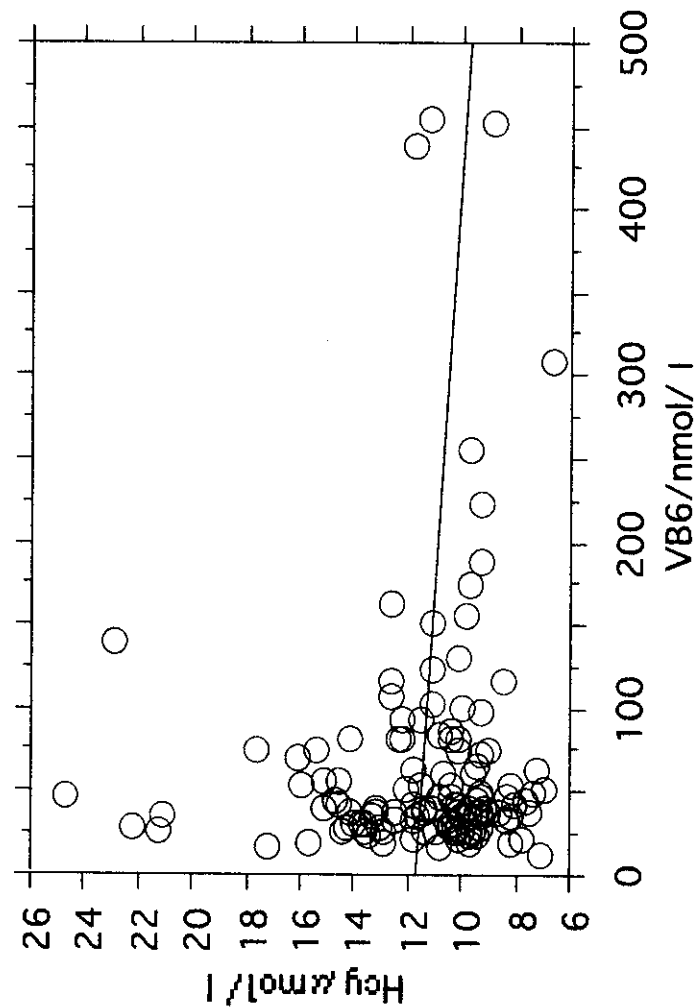
# コントロールにおける 葉酸-ホモステインの関係



# コントロールにおける VB6-ホモシステインの関係

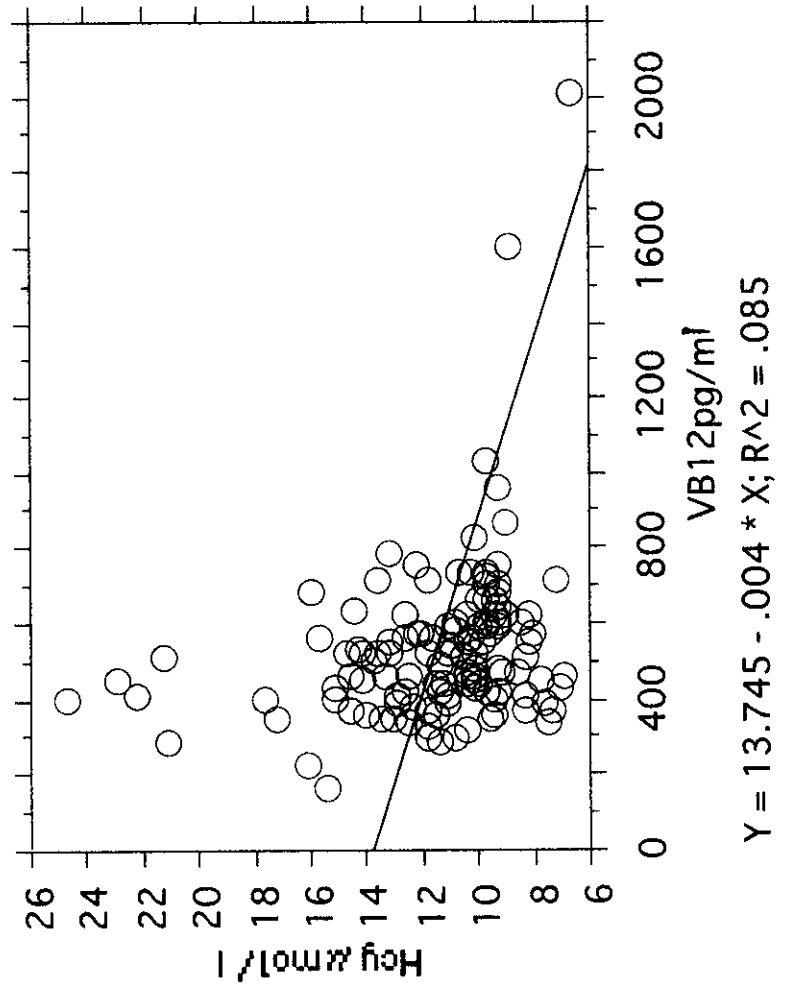
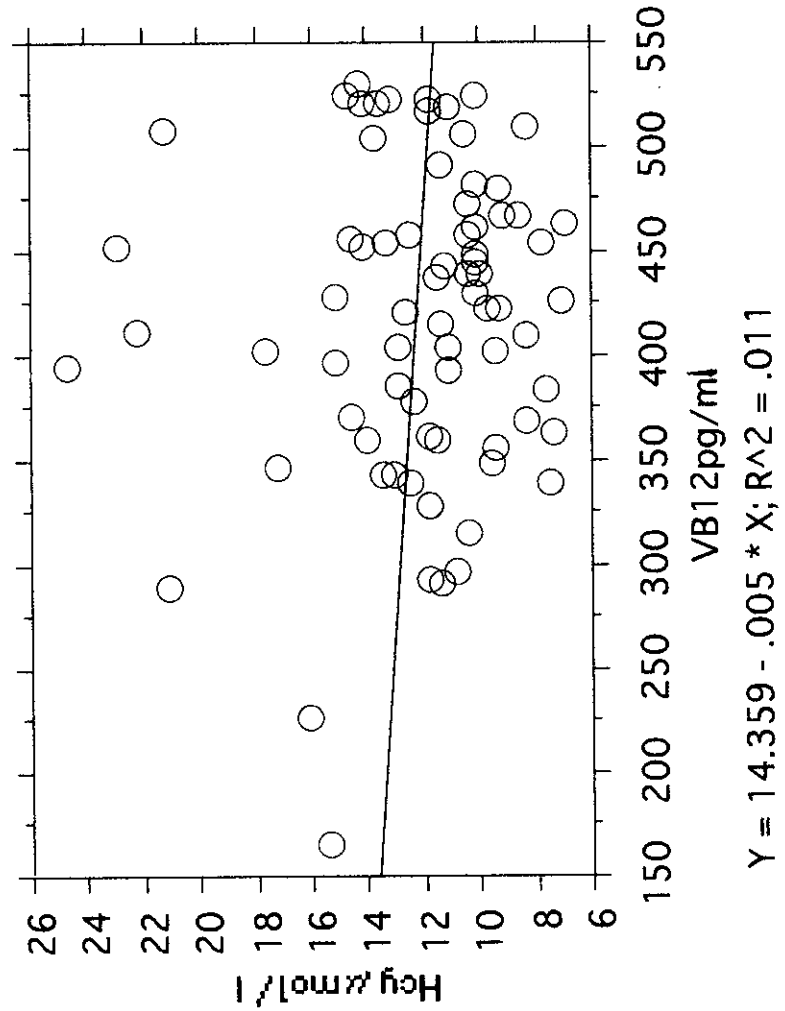


$$Y = 12.281 - .023 * X; R^2 = .007$$

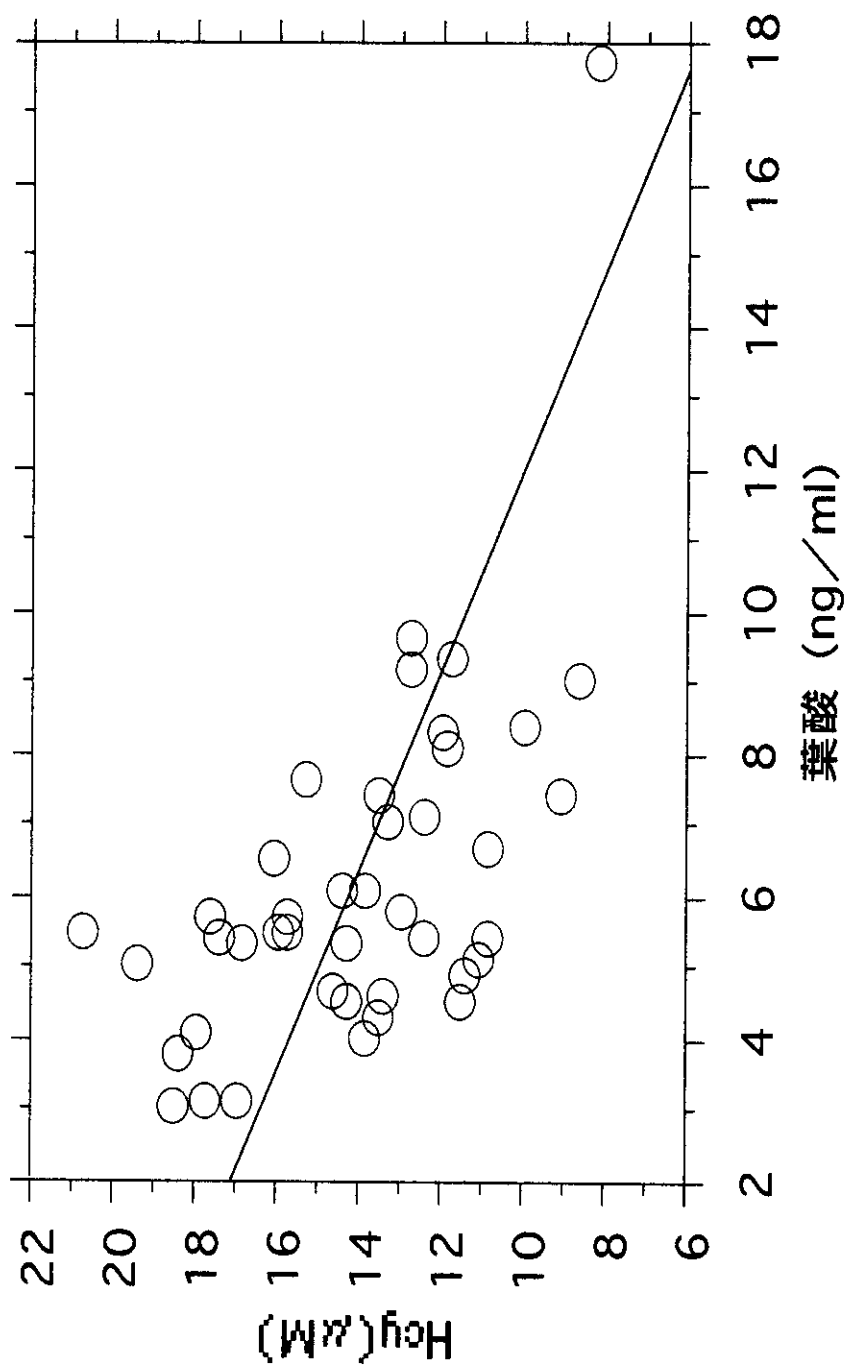


$$Y = 11.733 - .004 * X; R^2 = .009$$

# コントロールにおける VB12-ホモシステインの関係

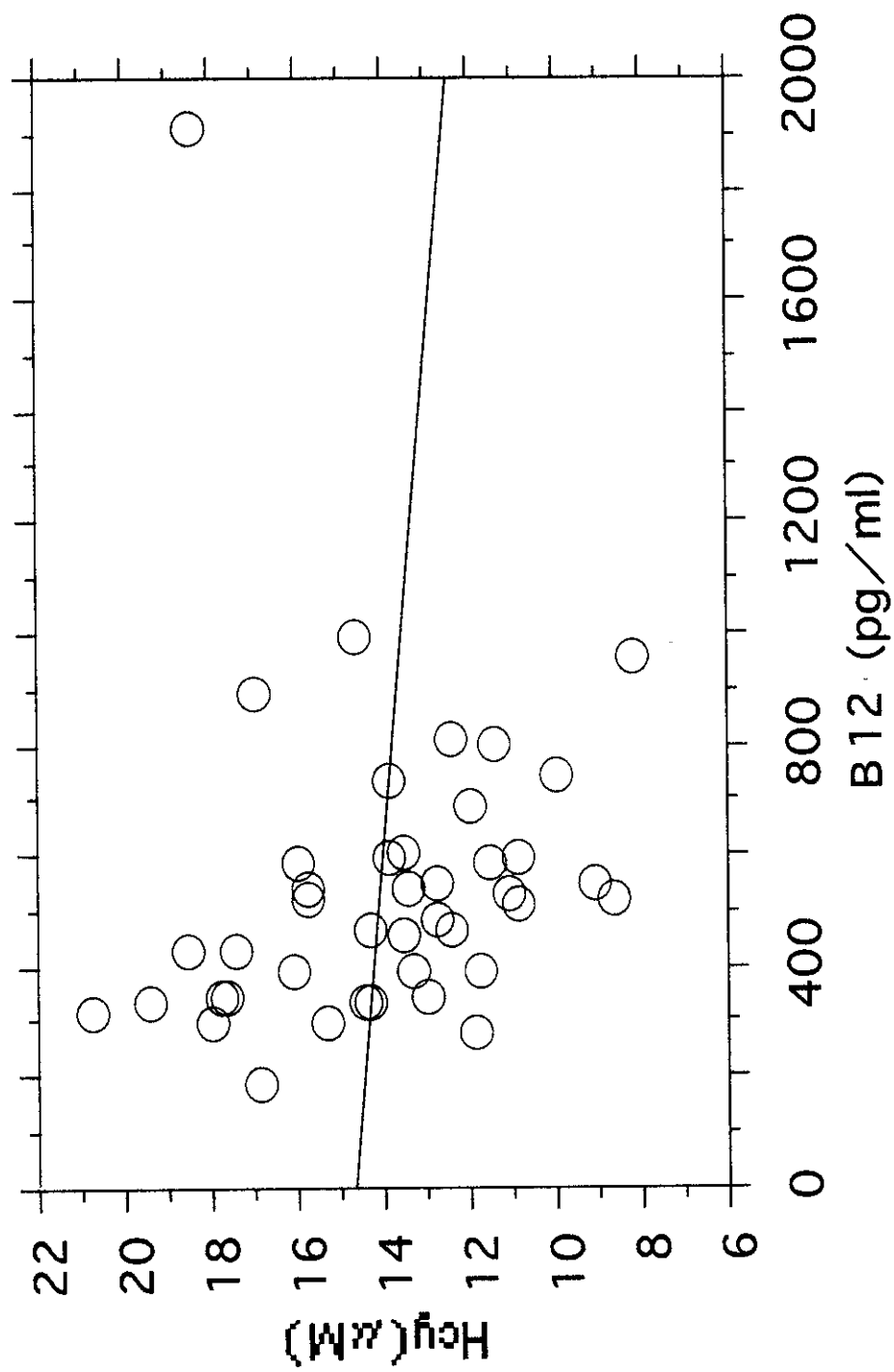


# Buerger病患者における 葉酸-ホモシステインの関係



$$Y = 18.474 - .706 * X; R^2 = .347$$

# Buerger病患者における Hcy-V B12の関係



## 5. 重症虚血肢に対する血管新生因子 (VEGF、FGF2) 遺伝子導入の効果とその意義

米満吉和<sup>1</sup>、真崎一郎<sup>1</sup>、居石克夫<sup>1</sup>  
福村正之<sup>2</sup>、長谷川護<sup>2</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院 病理病態学

<sup>2</sup>ディナビック (DNAVEC) 研究所

**Key Words=** センダイウイルスベクター、バージャー病、重症虚血肢、遺伝子治療  
FGF2

### [研究要旨]

欧米ではバージャー病などの重症虚血肢に対する血管新生因子VEGFを用いた遺伝子治療臨床試験の治療効果が報告されている。しかし有効域と中毒域などに関する情報は未だない。今回組換えセンダイウイルスベクター (SeV) を用いて、1) 重症虚血肢への救肢効果、2) VEGFの安全性についてFGF2と比較検討した。

種々の培養細胞では、SeV-VEGF165、SeV-FGF2ともに高い蛋白の分泌を認めたがVEGF投与群の筋肉は広汎な壊死に陥ると共に導入遺伝子発現の著明な低下を認めた。一方FGF2群では高い救肢効果が得られた。

VEGFの過剰発現は下肢の壊死をむしろ促進し、これはVEGFの強い血管透過性亢進作用が一因であると考えられる。一方FGF2は高い救肢効果を示し、血清中に検出されないことから、他臓器への影響が少なく安全域が高いことが示唆された。以上から、SeV-FGF2を用いた虚血肢への遺伝子治療は、安全かつ効果的な遺伝子治療系と成り得ると考えられた。

## **Therapeutic Roles of Intramuscular Gene Transfer of Angiogenic Factors (VEGF and FGF2) to Treat Critical Limb Ischemia**

Yoshikazu Yonemitsu, Ichiro Masaki, Kastuo Sueishi

Division of Pathophysiology and Experimental Pathology  
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Masayuki Fukumura, Mamoru Hasegawa

DNAVEC Research Inc.

## ABSTRACT

Emerging evidence suggests the therapeutic effect of intramuscular vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer in human subjects with critical limb ischemia, however, little information is available regarding the related adverse effects due to overexpression of VEGF. Here we show that the intramuscular injection of recombinant Sendai virus vector strongly boosted fibroblast growth factor-2 (FGF2), and showed therapeutic effects in limb salvage with increased blood perfusion associated with endogenous VEGF expression in mouse models of critical limb ischemia. VEGF165-overexpression, in contrast, strongly evoked endogenous VEGF in muscles, resulting in an extensive muscle damage, and accelerated limb amputation without significant recovery of blood perfusion. Interestingly, viable muscles of either VEGF165- or FGF2-treated ischemic limbs showed similar CD31-positive capillary densities, suggesting less blood perfusion ability of newly formed vasculature induced by VEGF165. Further, therapeutic effects of FGF2 were completely diminished by anti-VEGF neutralizing antibody *in vivo*, indicating that VEGF significantly contributes to *in vivo* effect of FGF2. These results suggest that VEGF is necessary, but should be delicately regulated to treat ischemic limb. A broader safety range and therapeutic effect of FGF2, associated with harmonized angiogenic effect seen with endogenous VEGF, provide important insight into therapeutic angiogenesis.

### [目的]

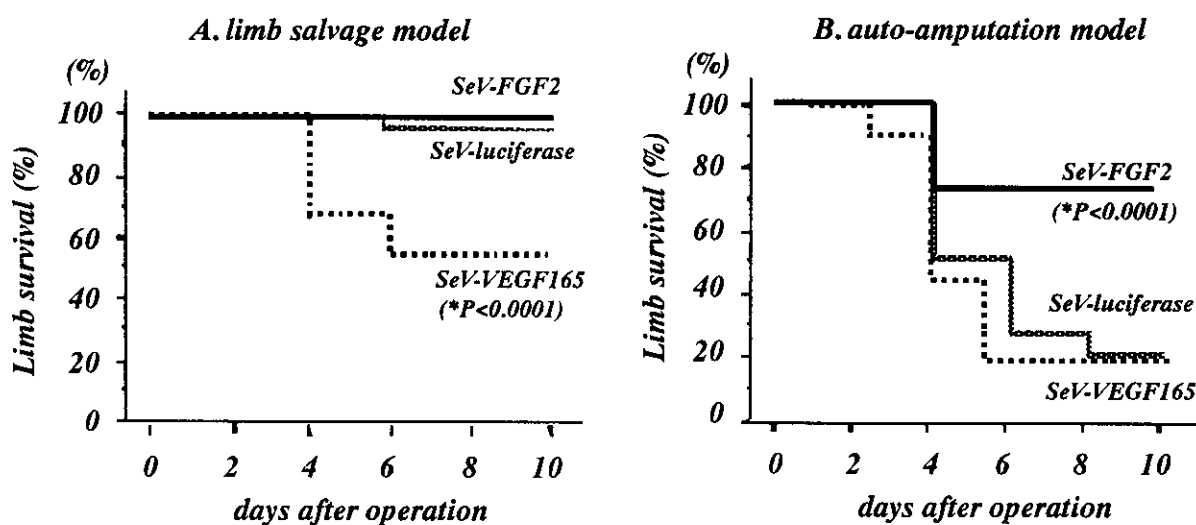
欧米ではバージャー病、閉塞性動脈硬化症などの重症虚血肢に対する血管新生因子VEGFを用いた遺伝子治療臨床試験の良好な治療効果が報告されている。しかし plasmidの遺伝子発現レベルは低く、有効域と中毒域、および重篤な急性動脈閉塞などに対する有効性は未だ不明である。我々は全く新しい組換えセンダイウイルスベクター (SeV) の開発に成功し、筋肉を含む種々の臓器で高い遺伝子発現を得ることに成功した。今回SeVを用いて、1) 重症虚血肢への救肢効果、2) VEGFの安全性についてFGF2と比較検討した。

## [方法]

Balb/c nu/nu マウス下肢脱落モデル (amputation)、下肢脱落に至らないC57BL/6 マウスモデル (salvage) を用いた。VEGF165、FGF2を発現するベクターを構築し、虚血手術時大腿筋・下腿筋に投与、下肢の状態を経時的に観察した。

## [結果]

種々の培養細胞では、SeV-VEGF165、SeV-FGF2ともに高い蛋白の分泌を認めたが、VEGF投与群の筋肉は広汎な壊死に陥ると共に導入遺伝子発現の著明な低下を認めた。salvageモデルではVEGF群のみで半数の個体の下肢が脱落し、amputationモデルではFGF2群でのみ高い救肢効果が得られた。



## [考察および結論]

VEGF遺伝子導入は下肢の壊死をむしろ促進し、VEGFの強い血管透過性亢進作用が一因であると考えられる。一方、FGF2は高い救肢効果を示し、血清中に検出されないことから、他臓器への影響が少なく安全域が高いことが示唆された。以上から、SeV-FGF2を用いた虚血肢への遺伝子治療は、安全かつ効果的な遺伝子治療系と成り得ると考えられた。



[参考論文]

1. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, Isner JM.  
Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg.* 1999;68:830-836.
2. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Mayskiy M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation.* 1998;98:2800-2804.
3. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF.  
Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg.* 1998; 28:964-973.
4. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM.  
Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation.* 1998; 97:1114-1123.
5. Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T, Taiji M, Noguchi H, Takeshita S, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T.  
Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension.* 1999; 33:1379-1384.
6. Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S, Farley R, Griesenbach U, Dian J, Steel R, Phillippe S, Zhu J, Jeffery PK, Kato A, Hasan MK, Masaki I, Nagai Y, Fukumura M, Hasegawa M, Geddes DM, Alton EFWF.  
Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nature Biotech* 2000;18: 970-973.
7. Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K, Ueno H, Nakashima Y, Nakagawa K, Fukumura M, Kato A, Hasan MK, Nagai Y, Sugimachi K, Hasegawa M, Sueishi K.  
Recombinant Sendai Virus-mediated Gene Transfer to Vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system.  
*The FASEB Journal* (in press).
8. Li H-O, Zhu Y-F, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee Y-S, Fukumura M, Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M. A cytoplasmic RNA vector derived from non-transmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J. Virol.* 2000;74, 6564- 6569.

## 6. ANCA 関連血管炎における HLA-DRB1, TNF $\alpha$ promoter, TNF receptor II 遺伝子多型の解析

徳永勝士 (東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室)

川崎 綾 (東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室)

土屋尚之 (東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室)

KEY WORDS = P-ANCA, 顕微鏡的多発血管炎(MPA)、HLA-DRB1, TNF $\alpha$  promoter, TNFR2, SNP, 疾患感受性

【研究要旨】 P-ANCA 陽性者 53 例 (顕微鏡的多発血管炎[MPA] 37 例、Churg-Strauss 症候群 6 例、Wegener 肉芽腫症[WG] 3 例、その他 7 例) について *HLA-DRB1*, *TNFA* promoter, *TNFR2* (*TNFRSF1B*)-196M/R 多型の遺伝子型を決定し、健常者 265 例の結果を対照として比較した。P-ANCA 陽性者の 50.9%、MPA 患者の 54.1%に *HLA-DRB1\*0901* が陽性で、健常者の 29.1%と比較して有意に高率であった(P =0.002)。また、MPA 患者において *DRB1\*1302* の有意な減少を認めた(P=0.04)。 *TNFA* promoter, *TNFR2* については、有意な関連は検出されなかった。過去に日本人および他集団において WG および MPO-ANCA 関連腎炎と *DRB1\*0901* の関連が報告されているが、本研究で MPA との関連がより多くの症例数で確認された。また、過去にヨーロッパ系集団で報告された *DRB1\*13* との負の関連が、日本人 MPA において初めて検出された。

### ***HLA-DRB1*, TNF $\alpha$ (*TNFA*) promoter and *TNFR2* genotypes in ANCA-associated vasculitis.**

Katsushi Tokunaga (Department of Human Genetics, The University of Tokyo), Aya Kawasaki (Department of Human Genetics, The University of Tokyo), Naoyuki Tsuchiya (Department of Human Genetics, The University of Tokyo)

Fifty-three Japanese individuals with P-ANCA (microscopic polyangiitis [MPA] 37, Churg-Strauss 6, Wegener's granulomatosis [WG] 2, others 7) were genotyped for *HLA-DRB1*, *TNFA* promoter, *TNFR2* (*TNFRSF1B*)-196M/R polymorphisms, and the genotypes were

compared with those of 265 healthy Japanese individuals. *HLA-DRB1\*0901* was positive in 50.9% of individuals with P-ANCA and in 54.1% of patients with MPA, which were significantly higher compared with healthy individuals (29.1%) (P=0.002). In addition, *DRB1\*1302* was significantly decreased in MPA (P=0.04). No association was detected for *TNFA* promoter and *TNFR2*. Our present data confirmed the previous observations which suggested the association of DR9 with ANCA-associated in a substantial number of patients and controls. In addition, a negative association with DR\*13, previously reported in Europeans, was detected in the Japanese subjects for the first time.

【研究目的】HLA-class II 抗原はヘルパー T 細胞への抗原提示を介して抗体産生を調節しうることから、自己抗体と密接な関連を有する ANCA 関連血管炎との関連が想定される。ANCA 関連血管炎と HLA との関連に関して、過去にいくつかの報告があり<sup>1)7)</sup>、集団間で必ずしも一致した結果ではないが、複数の報告において DR4<sup>12)</sup>、DR9<sup>5)7)</sup>が増加傾向を、DR13<sup>2)4)</sup>が減少傾向を示しており、共通の傾向の存在がうかがわれる。

HLA 領域には TNF $\alpha$ 遺伝子もコードされているが、TNF $\alpha$ が血管炎症候群において重要な役割を果たす可能性は多くの報告から示唆されている。例えば、TNF は血管内皮細胞に作用し、他の proinflammatory cytokine 産生、接着分子の発現、凝固因子や iNOS 産生を刺激する。また、好中球や単球は TNF $\alpha$ 刺激を受けると ANCA 対応抗原を細胞表面に発現する<sup>8)</sup>。これに抗体(cANCA)が Fab 部分で結合し、かつ同じ抗体の Fc 部分が同じ細胞の Fc $\gamma$ 受容体に結合することにより、活性酸素やサイトカイン産生が誘導されることが報告されている<sup>9)</sup>。TNF $\alpha$ には、転写活性に影響をおよぼす可能性が指摘されているプロモーター領域の多型が存在することから、ひとつの可能性として、過去に報告された HLA との関連は、TNF $\alpha$ プロモーターとの連鎖不平衡による二次的な関連である可能性が存在する。

筆者らは日本人集団において、TNF $\alpha$ プロモーター上流領域(-1031/-863/-857)に4種類のアリルが存在し、DR4, DR9, DR13 がそれぞれ別のアリルと連鎖不平衡を示すこと<sup>10)11)</sup>、また、Crohn 病では、この多型が HLA-DRB1 と独立の関連を示すこと<sup>12)</sup>を報告した。本年度の研究において、筆者らは、ANCA 関連血管炎患者について、*HLA-DRB1* と TNF $\alpha$ プロモーター多型をあわせて解析し、その関連と独立性について検討した。

一方、TNF の受容体のひとつである *TNFR2(TNFRSF1B)*の過剰発現マウスにおいて、全身性の血管炎様の表現型が報告されている<sup>13)</sup>。ヒトではこの遺伝子は第一染色体短腕の 1p36 に位置するが、筆者らは *TNFR2* position 196 にアミノ酸置換を伴う多型

(M196R)を見出し、SLE 患者において 196R アリルが有意に増加していることを報告した<sup>14)</sup>。前述のマウスにおける関連からも、TNFR2 も血管炎との関連が想定される遺伝子であることから、今回、あわせて TNFR2 多型との関連も検討した。

【研究方法】研究協力施設より送付された 59 例の内訳と、臨床情報を表 1 に示す。末梢血よりゲノム DNA を抽出し、HLA-DRB1 遺伝子を PCR-microtitre plate hybridization (MPH)法<sup>15)</sup>、TNFA プロモータ上流領域および TNFR2-196M/R 多型を LightCycler™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いた FRET 法(Tsuchiya et al., submitted)にて遺伝子型を決定した。対照群として、東京近郊在住非血縁健常日本人 265 例について、過去に決定した遺伝子型のデータを使用した。患者群と対照群の遺伝子型の有意差を $\chi^2$ 検定あるいは Fisher の直接確率検定法を用いて検討した。

表 1 平成 12 年 12 月までに送付された 59 検体の内訳

| 臨床診断                | n  | age          | P-ANCA+ | C-ANCA+ |
|---------------------|----|--------------|---------|---------|
| 顕微鏡的多発血管炎 (疑いを含む)   | 37 | 65.1 (35-83) | 37      | 2       |
| Churg-Strauss 症候群   | 7  | 66.2 (52-80) | 6       | 0       |
| Wegener 肉芽腫症        | 4  | 47.7 (15-69) | 3       | 3       |
| 古典的結節性多発動脈炎 (疑いを含む) | 4  | 73.7 (63-80) | 1       | 0       |
| 急速進行性糸球体腎炎          | 1  | 67           | 0       | 1       |
| 上強膜炎、筋炎             | 1  | 18           | 1       | 0       |
| 蚕食性角膜潰瘍             | 1  | 64           | 1       | 0       |
| 慢性腎不全               | 1  | 61           | 1       | 0       |
| メサンジウム増殖性腎炎         | 1  | 70           | 1       | 0       |
| 分類不能血管炎             | 1  | 50           | 1       | 0       |
| 無症状 (P-ANCA 高値のみ)   | 1  | 61           | 1       | 0       |

#### 【結果】

送付された検体全てについて遺伝子型解析を行ったが、疾患との関連分析は、解析に十分な検体数が確保された顕微鏡的多発血管炎(microscopic polyangiitis, MPA)群 (n=37)、および、P-ANCA 陽性群(n=53)について行った。

表 2 に HLA-DRB1 の解析結果を示す。

表2 MPA 群、P-ANCA 陽性血管炎群および健常対照群における *HLA-DRB1* 陽性率

| DRB1   | MPA(%) |        | P-ANCA+(%) |        | controls (%) |        | MPA vs controls |      | P-ANCA+ vs controls |      |
|--------|--------|--------|------------|--------|--------------|--------|-----------------|------|---------------------|------|
|        | (n=37) |        | (n=53)     |        | (n=265)      |        | P               | Pc   | P                   | Pc   |
| 0101   | 4      | (10.8) | 6          | (11.3) | 26           | (9.8)  | NS              |      | NS                  |      |
| 0401   | 1      | (2.7)  | 2          | (3.8)  | 6            | (2.3)  | NS              |      | NS                  |      |
| 0403   | 2      | (5.4)  | 3          | (5.7)  | 13           | (4.9)  | NS              |      | NS                  |      |
| 0405   | 6      | (16.2) | 9          | (17.0) | 65           | (24.5) | NS              |      | NS                  |      |
| 0406   | 1      | (2.7)  | 3          | (5.7)  | 19           | (7.2)  | NS              |      | NS                  |      |
| 0407   | 3      | (8.1)  | 4          | (7.5)  | 6            | (2.3)  | 0.08            | NS   | 0.07                | NS   |
| 0410   | 1      | (2.7)  | 1          | (1.9)  | 5            | (1.9)  | NS              |      | NS                  |      |
| 0802   | 4      | (10.8) | 5          | (9.4)  | 18           | (6.8)  | NS              |      | NS                  |      |
| 0803   | 7      | (18.9) | 9          | (17.0) | 37           | (14.0) | NS              |      | NS                  |      |
| 0901   | 20     | (54.1) | 27         | (50.9) | 77           | (29.1) | 0.0023          | 0.05 | 0.0019              | 0.04 |
| 1101   | 2      | (5.4)  | 4          | (7.5)  | 5            | (1.9)  | NS              |      | 0.05                | NS   |
| 1201   | 1      | (2.7)  | 1          | (1.9)  | 19           | (7.2)  | NS              |      | NS                  |      |
| 1202   | 1      | (2.7)  | 1          | (1.9)  | 11           | (4.2)  | NS              |      | NS                  |      |
| 1302   | 2      | (5.4)  | 5          | (9.4)  | 51           | (19.2) | 0.038           | NS   | NS                  |      |
| 1401   | 0      | (0)    | 1          | (1.9)  | 13           | (4.9)  | NS              |      | NS                  |      |
| 1403   | 2      | (5.4)  | 3          | (5.7)  | 10           | (3.8)  | NS              |      | NS                  |      |
| 1405   | 0      | (0)    | 7          | (2.6)  | 17           | (6.4)  | NS              |      | 0.016               | NS   |
| 1406   | 0      | (0)    | 0          | (0)    | 7            | (2.6)  | NS              |      | NS                  |      |
| 1501   | 5      | (13.5) | 7          | (13.2) | 29           | (10.9) | NS              |      | NS                  |      |
| 1502   | 7      | (18.9) | 7          | (13.2) | 54           | (20.4) | NS              |      | NS                  |      |
| 1602   | 0      | (0)    | 0          | (0)    | 8            | (3.0)  | NS              |      | NS                  |      |
| others | 1      | (2.7)  | 1          | (1.9)  | 13           | (4.9)  |                 |      |                     |      |

表に示したように、MPA 群、P-ANCA 陽性群のいずれにおいても、DRB1\*0901 の有意な増加が見出された。この関連は、比較されたアリル数によって補正しても、有意性が保たれていた。また、MPA 群において DRB1\*1302 の、P-ANCA 陽性群において DRB1\*1405 の減少傾向が検出されたが、アリル数で補正すると有意差には到達しなかった。

表3 MPA 群、P-ANCA 陽性血管炎群および健常対照群における *TNFA* プロモータ  
アリル頻度とアリル陽性率

| アリル             | MPA (%)<br>(n=37) |        | P-ANCA + (%)<br>(n=53) |        | 対照群 (%)<br>(n=265) |        | P  |
|-----------------|-------------------|--------|------------------------|--------|--------------------|--------|----|
| アリル陽性率          |                   |        |                        |        |                    |        |    |
| <i>TNFA-U01</i> | 34                | (91.9) | 49                     | (92.5) | 232                | (87.5) | NS |
| <i>TNFA-U02</i> | 12                | (32.4) | 16                     | (30.2) | 83                 | (31.3) | NS |
| <i>TNFA-U03</i> | 7                 | (18.9) | 10                     | (18.9) | 69                 | (26.0) | NS |
| <i>TNFA-U04</i> | 2                 | (5.4)  | 3                      | (5.7)  | 14                 | (5.3)  | NS |
| アリル頻度           |                   |        |                        |        |                    |        |    |
| <i>TNFA-U01</i> | 51                | (68.9) | 75                     | (70.8) | 349                | (65.8) | NS |
| <i>TNFA-U02</i> | 13                | (17.6) | 17                     | (16.0) | 94                 | (17.7) | NS |
| <i>TNFA-U03</i> | 8                 | (10.8) | 11                     | (10.4) | 73                 | (13.8) | NS |
| <i>TNFA-U04</i> | 2                 | (2.7)  | 3                      | (2.8)  | 14                 | (2.6)  | NS |

( ): %

表4 MPA 群、P-ANCA 陽性血管炎群および健常対照群における *TNFR2-196M/R* 遺  
伝子型

| アリル            | MPA (%)<br>(n=37) |        | P-ANCA + (%)<br>(n=53) |        | 対照群 (%)<br>(n=265) |        | P  |
|----------------|-------------------|--------|------------------------|--------|--------------------|--------|----|
| 遺伝子型頻度         |                   |        |                        |        |                    |        |    |
| <i>196 R/R</i> | 0                 | (0)    | 0                      | (0)    | 3                  | (1.1)  | NS |
| <i>196 M/R</i> | 7                 | (18.9) | 11                     | (20.8) | 54                 | (20.4) |    |
| <i>196 M/M</i> | 30                | (81.1) | 42                     | (79.2) | 205                | (78.5) |    |
| アリル陽性率         |                   |        |                        |        |                    |        |    |
| <i>196 R</i>   | 7                 | (18.9) | 11                     | (20.8) | 57                 | (21.5) | NS |
| <i>196 M</i>   | 37                | (100)  | 53                     | (100)  | 262                | (98.9) | NS |
| アリル頻度          |                   |        |                        |        |                    |        |    |
| <i>196R</i>    | 7                 | (9.5)  | 11                     | (10.4) | 60                 | (11.3) | NS |
| <i>196M</i>    | 67                | (90.5) | 95                     | (89.6) | 470                | (88.7) |    |

( ): %

*TNFA* プロモータ (表3)、*TNFR2-196M/R* (表4) については、有意差は検出されなかった。

#### 【考察】

ANCA 関連血管炎と HLA-DR との関連については、過去に、WG を主体とする Caucasian 集団における報告で、DR4<sup>1)</sup>あるいは DR1<sup>3)</sup>との正の関連、DR3<sup>1)</sup>あるいは DR13<sup>2)</sup>との負の関連が報告されている。日本人においては、WG 16例、MPO-ANCA 関連糸球体腎炎 12例という、それぞれ比較的少数例の検討において、DR9 の正の関連が報告されている。今回、MPA 37例において、HLA-DRB1\*0901 の有意な関連が確認されたことは、ANCA 関連血管炎における HLA-DRB1\*0901 の意義を確立した知見と考えられる。HLA-DRB1\*0901 はアジア系以外の集団には少ないアリルであり、日本における研究が病因・病態解明に重要な役割を果たす可能性を示唆する知見であると考えられる。また、今回 DRB1\*1302 と MPA に負の関連の傾向が検出されたが、DRB1\*1302 が何らかの機序で WG, MPA 双方に抑制的に働く可能性を示唆している。

HLA-DRB1\*0901 がいかなる機序で疾患に関連するかについては、現状では推測の域を出ない。ひとつの可能性として考えられたのは、*TNFA* プロモーター多型に一義的な意義があり、HLA との関連はこれとの連鎖不平衡によって生じたというものであるが、今回の *TNFA* プロモーターの解析結果から、このような可能性は否定される。DRB1\*0901 との関連が、MPA 全例および他疾患 16例から構成される P-ANCA 陽性例においても検出されたことは、ひとつの可能性として、DRB1\*0901 が MPO などの自己抗原に由来するペプチドを効率よく T細胞に提示することが考えられる。DRB1\*0901 が P-ANCA 産生に関連するのか、それ以外の MPA の病態に関連するのかについては、MPA 以外の P-ANCA 陽性例が少ないため、現状では結論づけることは困難である。

*TNFR2-196M/R* については、今回の研究では関連の傾向は検出できず、本遺伝子が MPA や ANCA 関連血管炎の感受性遺伝子である可能性は否定的であった。

#### 【参考文献】

1. Spencer SJW, Burns A, Gaskin G, et al. HLA class II specificities in vasculitis with antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. *Kidney Int.* 1992; 41, 1059-1063.
2. Gencik M, Borgmann S, Zahn R, et al. Immunogenetic risk factors for anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 117, 412-417.

3. Papiha SS, Murty GE, Ad'Hia A, et al. Association of Wegener's granulomatosis with HLA antigens and other genetic markers. *Ann. Rheum. Dis.* 1992; 51, 246-248.
4. Hagen EC, Stegeman CA, D'Amaro J, et al. Decreased frequency of HLA-DR13DR6 in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.* 1995; 48, 801-805.
5. Nakamaru Y, Maguchi S, Takizawa M, et al. The association between human leukocyte antigens (HLA) and cytoplasmic-antineutrophil cytoplasmic antibody (cANCA)-positive Wegener's granulomatosis in a Japanese population. *Rhinology* 1996; 34, 163-165.
6. Cotch MF, Fauci AS, Hoffman GS. HLA typing in patients with Wegener's granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* 1995; 122, 635.
7. Fujii A, Tomizawa K, Arimura Y, et al. Epitope analysis of myeloperoxidase-(MPO) specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in MPO-ANCA-associated glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 2000; 53, 242-252.
8. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87, 4115-4119.
9. Ralston DR, Marsh CB, Lowe MP, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3,  $\alpha$ 1-antitrypsin, and Fc $\gamma$  receptors. *J. Clin. Invest.* 1997; 100, 1416-1424.
10. Matsushita M, Tsuchiya N, Nakayama T, et al. Allele typing of human TNFA 5'-flanking region using polymerase chain reaction-preferential homoduplex formation assay (PCR-PHFA): linkage disequilibrium with HLA class I and class II genes in Japanese. *Tissue Antigens* 1999; 54, 478-484.
11. Shibue T, Tsuchiya N, Komata T, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  5'-flanking region, tumor necrosis factor receptor II, and HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43, 753-757.
12. Kawasaki A, Tsuchiya N, Hagiwara K et al. Independent contribution of *HLA-DRB1* and TNF $\alpha$  promoter polymorphisms to the susceptibility to Crohn's disease. *Genes Immun.* 2000; 1, 351-357.
13. Douni E, Kollias G. A critical role of the p75 tumor necrosis factor receptor (p75TNF-R) in organ inflammation independent of TNF, lymphotoxin  $\alpha$ , or the p55TNF-R. *J. Exp. Med.* 1998; 188, 1343-1352.
14. Komata T, Tsuchiya N, Matsuishita M, et al. Association of tumor necrosis factor receptor 2 (*TNFR2*) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1999; 53, 527-533.



15. Kawai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, et al. Routine low and high resolution typing of the HLA-DRB gene using the PCR-MPH (microtitre plate hybridization) method. *Eur. J. Immunogenet.* 1996; 23, 471-486.

## 7. 自然発症モデルマウスにおけるMPO-ANCA産生感受性遺伝子の解析

濱野慶朋 (順天堂大学医学部・第二病理)  
姜 奕 (順天堂大学医学部・第二病理)  
広瀬幸子 (順天堂大学医学部・第二病理)  
鈴木和男 (国立感染研究所・生物防御物質)

KEY WORDS=多発性動脈炎、全身性ループスエリテマトーデス(SLE)、New Zealand マウス、(NZB x NZW) F1マウス、MPO-ANCA、マイクロサテライトマーカー、連鎖解析、quantitative trait locus (QTL)

MPO-ANCAはヒト多発性動脈炎の発症や活動性と相関する。(NZB x NZW) F1マウスには多発性動脈炎の発症とMPO-ANCAの産生が認められるので、今回我々は(NZB x NZW) F1 x NZW退交配マウスを用い、血清ANCA力価を形質としてその感受性遺伝子のマッピングを行った。雌(NZB x NZW) F1 x NZW退交配マウス220匹を作製し、8ヶ月齢の血清抗ヒトMPO-ANCAおよび抗マウスMPO-ANCAをELISAにて測定し、148個のマイクロサテライトマーカーを用いてタイピングを行い、MapManager QTソフトによるマッピングを行った。その結果、(1)抗ヒトおよび抗マウスMPO-ANCA力価は有意に相関した。(2)第7染色体に抗ヒトMPO-ANCA産生感受性領域の存在が示唆されたが、抗マウスMPO-ANCA産生感受性領域の存在は認められなかった。(3)抗マウスMPO-ANCAは他のIgMクラス自己抗体レベルと相関した。抗マウスMPO-ANCA産生感受性領域の同定には、退交配マウスの個体数の追加や抗原エピトープの工夫が必要と思われる。

### Mapping of a QTL predisposing to MPO-ANCA in a model of arteritis prone-(NZB x NZW) F1 mice

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

MPO-ANCA has been reported not only to play an important role in pathogenesis but also to associate with disease activity in polyarteritis in human patients. (NZB x NZW) F1 mice represent polyarteritis as well as other autoimmune phenotypes resembling human SLE. Since MPO-ANCA is spontaneously produced in (NZB x NZW) F1 mice, we investigated major quantitative trait loci contributing to high serum levels of ANCA to human and murine MPO. Serum titers of MPO-ANCA were examined in 220 female (NZB x NZW) F1 x NZW backcross mice at 8 months of age. Anti-murine MPO-ANCA level was significantly correlated with several IgM class autoantibody levels, and most strongly correlated with anti-human MPO-ANCA levels. The genome-wide scan with 148 polymorphic microsatellite markers revealed a QTL for anti-human, but not anti-murine, MPO-ANCA on centromeric region of murine chromosome 7. For identification of susceptibility loci for anti-murine MPO-ANCA production, murine MPO antigen epitopes should be improved and significant number of backcross progeny should be added.

## [研究目的]

抗好中球細胞質自己抗体 (ANCA) は、P-ANCAとC-ANCAに分類される。前者は対応抗原として好中球中のmyeloperoxidaseが同定されて、現在MPO-ANCAとして定量測定されている。MPO-ANCAは当初、多発性動脈炎、特に顕微鏡的多発性動脈炎の発症との関連が重視されていたが、最近ではそれらに加え半月体形成性腎炎の一部や川崎病、SLEに伴う動脈炎との関連が注目されている。一方、New Zealand Black (NZB)マウスでは自己抗体の産生や自己免疫性溶血性貧血といった自己免疫現象が認められるが、NZBとNew Zealand White (NZW)との雑種第一代 (NZB x NZW) F1マウスでは、ヒトのSLEに酷似した病態を示すことが知られている。興味深いことに (NZB x NZW) F1マウスはIgGクラス抗DNA抗体の産生やループス腎炎に加え、多発性壊死性動脈炎もしばしば合併し、しかも血清MPO-ANCAが高値を示す。これらはいずれも遺伝的に規定され自然発症する形質なので、New Zealandマウスのゲノムには動脈炎発症やMPO-ANCA産生の関連遺伝子が存在すると考えられる。今回我々は、ヒトおよびマウスのMPOを標的とした血清MPO-ANCAレベルを形質とし、連鎖解析によりMPO-ANCA関連遺伝子のマッピングを試みた。

## [研究方法]

- (1)雌 (NZB x NZW) F1 x NZW退交配マウス220匹を作製し、8ヶ月齢で末梢血を採取し、白血球数を測定した後、血清を採取した。
- (2)血清MPO-ANCA値はELISAにて測定した。即ち96穴プレートに鈴木らにより作製されたヒトまたはマウスのMPO抗原を固相化し、50倍希釈した血清を室温で1時間反応させた。洗浄後、alkaline phosphataseを結合した抗マウスIgG抗体と反応させ、さらに洗浄後、p-nitrophenylphosphate disodiumを加え検出した。スタンダードとして10倍希釈した8か月齢の (NZB x NZW) F1マウス血清を用いた。ANCAレベルはスタンダードを1000unit/mlとした。
- (3)血清自己抗体 (IgMおよびIgGクラスの抗dsDNA抗体、抗ssDNA抗体、抗クロマチン抗体) 力価をELISAで測定した。
- (4)NZBとNZWの間に多型の存在するマイクロサテライトマーカー (プライマー対) 148個を用い、隣接するマーカー間が20センチモルガン以下になるよう計画して全ゲノムスキャンを行った。
- (5)遺伝子型と形質、および形質相互の統計解析にはStatViewソフトを、QTLマッピングにはMapManager QTソフトを用いた。

## [結果]

- (1)8ヶ月齢の退交配マウスの血清抗ヒトMPO-ANCAレベルは $61.3 \pm 187$  unit/mlであった。また、抗マウスMPO-ANCAレベルは $95.7 \pm 336$  unit/mlであった。
- (2)図1に示すように、血清抗ヒトMPO-ANCAレベルを量的形質とし、220匹の退交配マウスと148個のマーカーによりQTL解析をMapManager QTソフトを用いて行ったところ、第7染色体セントロメアに存在するD7MIT21の座位に尤度比のピークを認め、10を底とした尤度比対数スコアは2.2であった。しかし抗マウスMPO-ANCAを形質とした同様の解析では、形質感受性遺伝子は認められなかった。
- (3)(2)で検出されたマウス第7染色体セントロメアに存在するマーカー (D7MIT21) の遺伝子型により、退交配マウスをWW型 (NZW/NZWホモ型) とBW型 (NZB/NZWヘテロ型) の2群に分類したところ、WW型群退交配マウスで有意に高い ( $P < 0.005$ ) ANCAレベルを示した。
- (4)抗マウスMPO-ANCAはIgMクラス抗dsDNA抗体 ( $P < 0.0001$ ,  $r = 0.447$ )、IgMクラス抗ssDNA抗体 ( $P < 0.0001$ ,  $r = 0.377$ )、IgMクラス抗クロマチン抗体 ( $P < 0.0001$ 、

r=0.346)と有意に相関を示した。また、抗ヒトMPO-ANCAとは最も良好な相関( $P<0.0001$ ,  $r=0.531$ )を示した(図2)。

#### [考察]

(NZB x NZW) F1マウスには、高力価のIgGクラス自己抗体の産生やループス腎炎の発症など、ヒトのSLEに類似した自己免疫現象が認められるが、血管周囲の炎症細胞浸潤、細動脈の硝子様変性・PAS陽性物質の沈着、フィブリノイド変性、癍痕化などを特徴とする多発性動脈炎も自然発症する。一方、ANCAはヒトの血管炎の発症との関連性が認められ、現在その力価は病勢の指標としても重要視されている。モデルマウスにおいても、血管炎及び半月体形成性腎炎の病因としてANCAが示唆されている<sup>2)</sup>。我々は、(NZB x NZW) F1マウスにもANCAの産生が認められることを見いだしたので、その産生感受性遺伝子の同定と、これと動脈炎発症との関連の有無を調べるため本研究を計画した。MPO-ANCAは、ヒトMPOおよびマウスMPOを抗原としたものを同一の検体を用いて測定した。Lander<sup>2)</sup>らの区間マッピングに基づいた量的遺伝子解析ソフトMapManager QTを用いて、血清ANCAを量的形質として全ゲノムを検索したところ、ヒトMPOを標的としたときNZWの第7染色体セントロメア側に尤度比対数スコア(ロッドスコア)2.2のピークを認めた。この領域にANCA関連遺伝子の存在する可能性は、この遺伝子領域を持つ退交配マウスに有意にANCAレベルが高いという事実で裏付けられた。この座位の近傍には位置的候補遺伝子として*Cd22*、*Tgfb1*、*Il11*、*Cd79a*、*Idd7*などの免疫調節性遺伝子や自己免疫疾患関連遺伝子が存在するので、今後動脈炎やANCAとの関係の検索が必要である。一方、マウスMPOを抗原とした抗マウスMPO-ANCAを形質としてQTL解析を行ったが、その産生感受性遺伝子は見い出せず、第7染色体上のロッドスコアも1に満たなかった。そこで、抗マウスMPO-ANCAと自己抗体を含む他の形質との関連を解析したところ、主にIgMクラスの自己抗体レベルと有意な相関を認めた。(NZB x NZW) F1マウスでは自己免疫疾患をひきおこす高力価のIgGクラス自己抗体が産生される前段階で、B細胞の全般的な活性化がおこり、まずIgMクラスの自己抗体が産生されるが<sup>3)</sup>、抗マウスMPO-ANCAもこうしたB細胞の活性化を反映して他の(IgMクラス)自己抗体と平行して産生されるのかもしれない。しかし自己抗体の中でも抗ヒトMPO-ANCAとの相関が最も強いことから、マウスMPOの抗原性を改善することや、退交配マウスの個体数を追加することで、MPO-ANCA産生感受性遺伝子の同定も可能であろう。

#### [文献]

- 1.Kinjoh K, Good RA, Jennette JC et al. SCG/Kj mice develop crescentic glomerulonephritis, vasculitis, and MPO-specific P-ANCA. Clin Exp Immunol 1995;101(suppl): 53.
- 2.Lander ES and Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 1989; 121:186-199.
3. Hirose S, Jiang Y, Hamano Y and Shirai T. Genetic Aspects of Inherent B-cell abnormalities associated with SLE and B-cell malignancy: lessons from New Zealand mouse models. Intern Rev Immunol 2000;19:389-421.