

15. 高安動脈炎における抗内皮細胞抗体(抗 74kDa 抗体)の対応抗原の分析

吉田俊治 (藤田保健衛生大学感染症リウマチ内科)
田口博章 (藤田保健衛生大学感染症リウマチ内科)
鳥飼勝隆 (藤田保健衛生大学感染症リウマチ内科)

KEY WORDS=高安動脈炎, 抗内皮細胞抗体, Western blot 法, 2次元電気泳動法

[研究要旨]

血管炎症候群で抗好中球細胞質抗体に次いで高率に認められる自己抗体である抗内皮細胞抗体(AECA)の中で、高安動脈炎患者血清に高率に高い特異性で検出された抗 74kDa 抗体の対応抗原を 2次元電気泳動法を用いてほぼ同定した。一方、一健常人血清に見られた本抗体と近い分子量のバンドを形成する抗体の対応抗原は、2次元電気泳動法で異なる部分にスポットを形成した。今後、対応抗原の分析により高安動脈炎の診断や治療に有用な情報を与えるものと考えられる。

Analysis of the corresponding antigens against anti-endothelial cell antibodies (anti-74kDa antibodies) in Takayasu arteritis.

Shunji Yoshida(Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine)
Hiroaki Taguchi(Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine)
Katsutaka Torikai (Department of Internal Medicine, Fujita Health University School of Medicine)

Last year we found anti-74kDa antibodies specific for Takayasu arteritis using the cell membrane preparation from human pulmonary artery endothelial cells. This year we seemed to detect the corresponding antigens on the nitrocellulose membrane by 2 dimensional electrophoresis plus Western blotting. One normal serum showed similar band by Western blotting technique, but the corresponding antigens on the nitrocellulose membrane by 2 dimensional electrophoresis plus Western blotting technique was quite different from those of anti-74kDa antibodies. Analysis of the corresponding antigens will give valuable information on the diagnosis and treatment of Takayasu arteritis.

[研究目的]

抗内皮細胞抗体(AECA)は、血管炎症候群で抗好中球細胞質抗体に次いで高率に認められる自己抗体である。前年度までの検討¹⁾で、Western blot 法により、抗 74kDa 抗体が高安動脈炎患者血清に高率に高い特異性で検出されたが、健常人血清 1 例に類似の抗体が検出された。そこで今年度は、本抗体の対応抗原の分析および健常人血清に見られた類似の抗体の対応抗原の分析を目的とした。

[研究方法]

AECA 測定に用いた Western blot 法では、肺動脈内皮細胞から JM van der Zee の方法²⁾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。

対応抗原の分析のため行った 2次元電気泳動法は、アマシャム・ファルマシア社のシステムを用いた。具体的には、まず pH3-10 の 1次元目等電点ゲルに肺動脈内皮細胞由来の細胞膜分画を添加し、マニュアル通りの条件で電気泳動した。そのゲルを SDS-PAGE 用

ゲルである Excel gel において、2次元目の電気泳動を行った。一部はこのままクマシーブルー染色を行い、一部はニトロセルロース膜に転写して、Western blot を行った。

[結果]

2次元電気泳動を行ったゲルをクマシーブルー染色すると、いくつかのスポットが見られた(図 1)。またニトロセルロース膜に転写後、抗 74kDa 抗体陽性の高安動脈炎患者血清を用いた Western blot 法により、70kDa 付近に pI5 前後のスポットが見られた(図 2)。一方、抗 74kDa 抗体に近似する抗体が見られた 1 健常人血清を用いた Western blot 法では、全く異なるスポットが検出された。

[考案]

前年度の血管内皮細胞膜を抗原とした Western blot 法による検討で、高安動脈炎に特異性の高い抗 74kDa 抗体の対応抗原が、2次元電気泳動法と Western blot 法を用いてほぼ同定された。まだ蛋白量が微量のため、粗精製の方法を工夫して、早急にそのスポットの蛋白を集めて、アミノ酸分析を行いたい。またこの抗 74kDa 抗体と近似する分子量のバンドが 1 健常人血清に見られたが、今回の検討で、2次元電気泳動法と Western blot 法を用いると、検出される対応抗原のスポットが全く異なっていることが示された。Eichhorn ら³⁾は EIA 法で AECA が高安動脈炎に特異性の高いことを報告しており、この抗体と抗 74kDa 抗体との関連を調べてみたい。

そして抗 74kDa 抗体の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。

[参考文献]

1. 吉田俊治、片山雅夫、深谷修作、大島久二、鳥飼勝隆：血管炎症候群における抗内皮細胞抗体（抗 74kDa 蛋白抗体）に関する検討。厚生省厚生科学特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究班平成 11 年度研究報告書、2000；107-109.
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. Eichhorn J, Sima D, Thiele B, et al: Anti-endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. Circulation 1996; 94:2396-2401.

図1 2次元電気泳動図 (クマシーブルー染色)

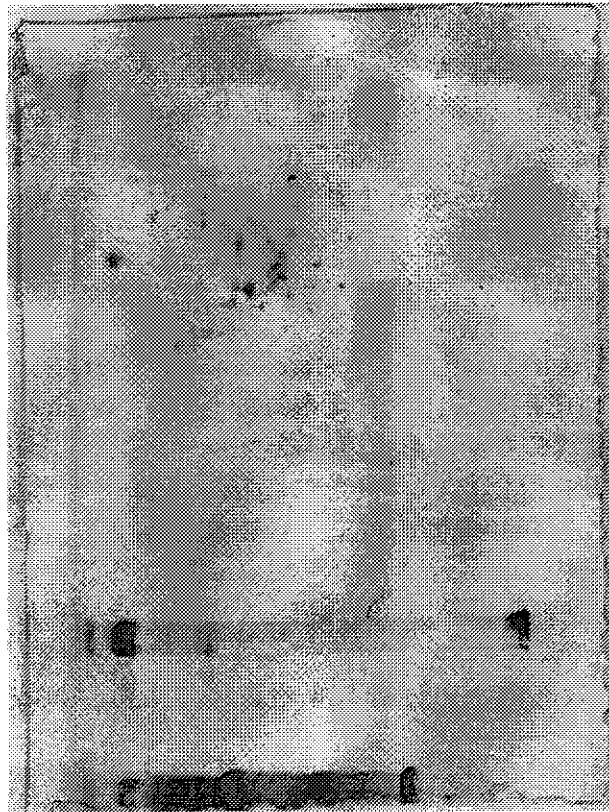
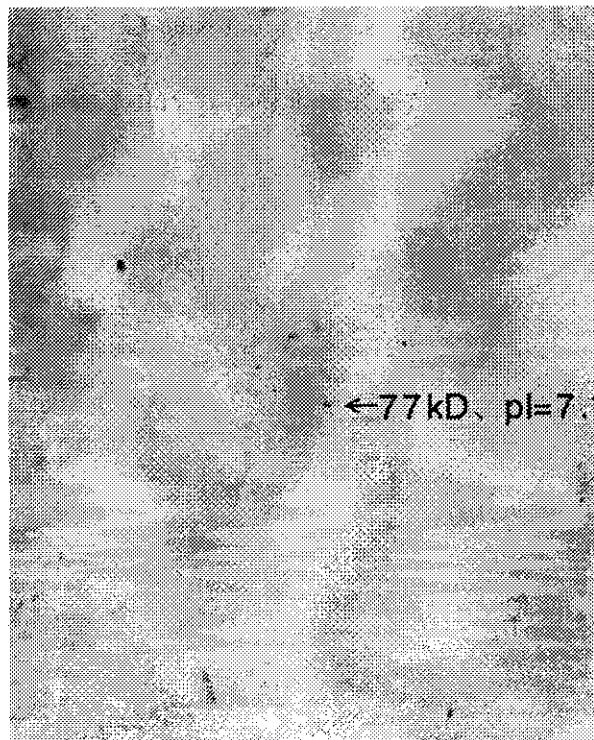


図2 2次元電気泳動図 (Western blot 法)



16. 好中球の L-selectin に対する Pentoxifylline の影響についての検討

小林茂人 (順天堂大学医学部膠原病内科)
田嶋美智子 (順天堂大学医学部膠原病内科)
春田和彦 (順天堂大学医学部膠原病内科)
田村直人 (順天堂大学医学部膠原病内科)
橋本博史 (順天堂大学医学部膠原病内科)

KEY WORDS= neutrophil, cell adhesion molecule, methylxanthine, cAMP, shedding

【研究要旨】

Pentoxifylline (PTX) はメチルキサンチン誘導体のひとつであり、ホスフォジエステラーゼを阻害することが知られている。臨床面では脳循環改善薬として知られているが、炎症作用もある。また、実験面では好中球の接着、脱顆粒、スーパーオキシド産生を抑制することが知られている。今回の研究においてメチルキサンチン誘導体では PTX のみ L-selectin の発現が down-regulation した。このことから、PTX がおよぼす好中球上の接着因子に対する影響、その作用機序について検討した結果、PTX の作用はアデノシン A₂ レセプター刺激作用とホスフォジエステラーゼ阻害作用の両作用により発現することが示唆された。

Pentoxifylline induces the shedding of L-selectin on polymorphonuclear cells

MICHIKO TAJIMA, KAZUHIKO HARUTA, SHIGETO KOBAYASHI, NAOTO TAMURA,
HIROSHI HASHIMOTO

Department of Rheumatology and Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine

Abstract We investigated the effects of pentoxifylline (PTX) on the expression of L-selectin on polymorphonuclear leukocytes (PMN). PTX induced the down-regulation of L-selectin expression in dose- and time-dependent manner. The measurement of soluble L-selectin in the culture medium by ELISA indicated that the down-regulation of L-selectin expression by PTX was due to the shedding of L-selectin from PMN. The mechanism by which PTX induced the shedding of L-selectin was investigated. The concentration of intracellular cyclic AMP (cAMP) was increased after treatment of PMN with PTX. However, an elevation of cAMP induced by dibutyryl cAMP (dbcAMP) as well as other methylxanthine derivatives (caffeine, aminophylline and theophylline) did not induce the shedding of L-selectin. Although stimulation to the adenosine receptor with 5'-N-ethylcarboxamido-adenosine (NECA) or 5'-(N-cyclopropyl)-carboxamido-adenosine (CPCA), adenosine receptor agonists did not induce the shedding of L-selectin, shedding of L-selectin was demonstrated only when PMN was incubated simultaneously with rolipram, a

phosphodiesterase (PDE) inhibitor and CPCA. Moreover, shedding of L-selectin induced by PTX was attenuated by aminophylline, an adenosine receptor antagonist. These results indicated that PTX induces the shedding of L-selectin on PMN by stimulating via adenosine receptor as well as inhibition of PDE.

【研究目的】

PTX が及ぼす好中球上の接着因子に対する影響、その作用機序について検討した。

【材料と方法】

健常人の末梢血をヘパリン加採取し、分離溶液で好中球画分を得た。メチルキサンチン誘導体やその他の薬剤と反応させ、好中球の接着因子発現量を Flow cytometry にて解析した。培養液中の可溶性 L-selectin、細胞内 cAMP を ELISA にて測定した。薬剤刺激処理条件は 37°C、30 分とした。

【実験結果】

1. PTX の好中球接着分子に及ぼす用量依存的影響

PTX は好中球上の L-selectin の発現を用量依存的に減少させた。CD11b、CD18 について変化は認められなかった。他のキサンチン誘導体である aminophylline, caffeine, theophylline では接着分子の発現量の変化は認められなかった (Fig. 1)。

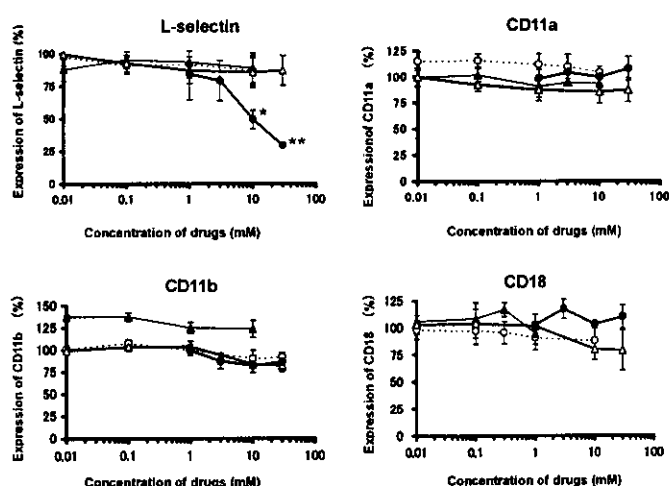


Fig. 1. Effects of methylxanthine derivatives on the expression of CAM on PMN.

The expression of CAM on PMN incubated with methylxanthine derivatives for 30 min was determined by flow cytometry as described in *Materials and methods*. Results are presented as mean \pm standard deviation (SD) of data from nine independent experiments.

PTX ; ● theophylline ; ○ , caffeine ; ▲, aminophylline ; ◇. * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$.

2. 可溶性 L-selectin (sL-selectin) の測定

PTX による L-selectin の減少が down-regulation によるものか検討するため、可溶

性 L-selectin (sL-selectin) の測定をした。その結果、TNF α と PTX いずれも sL-selectin の濃度が高かった (Table 1.)。培養液中の可溶性 L-selectin 量を測定した結果、L-selectin の down-regulation は shedding によるものと判明した。

Table 1. Measurement of soluble L-selectin in culture medium of PMN

		sL-selectin (ng / mL)
PTX	0 mM	18 \pm 1.3
PTX	10 mM	38 \pm 4.7
PTX	30 mM	56 \pm 3.7
PTX	100 mM	78 \pm 1.7
TNF α	100 ng / mL	70 \pm 1.1

PMN, polymorphonuclear leukocyte; sL-selectin, soluble L-selectin; PTX, pentoxifylline; TNF α , tumor necrosis factor alpha. Each value is mean \pm standard deviation of data from four independent experiments.

3. PTX の好中球接着分子に及ぼす時間依存的影響

L-selectin を減少させる TNF α と PTX を比較したところ、TNF α では処理では処理 5 分後には急速に shedding されたが、PTX 処理では緩やかな shedding が見られた (Fig. 2)。

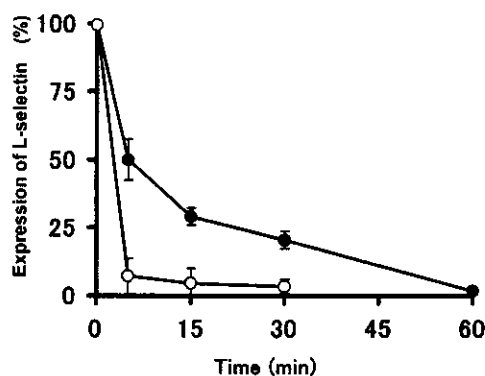


Fig. 2. Kinetic analysis of the expression of L-selectin on PMN.

The expression of L-selectin on PMN after incubation with PTX (30 mM, ●) or TNF α (100 ng/mL, ○) was determined by flow cytometry as described in *Materials and methods*. Each value is the mean \pm SD of data from three independent experiments.

4. 細胞内 cAMP の上昇と L-selectin の shedding の関係

4-1. L-selectin を down-regulation が、細胞内 cAMP の濃度変化(上昇)により生ずるのか検討するため、cAMP の測定を行った。その結果、PTX 処理で有意な cAMP 濃度の上昇が認められたが、L-selectin を down-regulation させない aminophylline でもかなり高濃度の

cAMPの上昇が認められた(Table 2)。

Table 2. Measurement of cAMP in PMN

		cAMP (pM / 10 ⁶ cells)
Unstimulated		0.15 ± 0.01
PTX	30mM	0.32 ± 0.03*
Aminophylline	30mM	1.19 ± 0.03**

cAMP, cyclic adenosinemonophosphate; pM, pico molar; PTX, pentoxifylline. Each value is mean ± standard deviation of data from four independent experiments. * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$ compared with unstimulated PMN

4-2. cAMP が L-selectin を shedding させるのか検討するため、cAMP アナログである dbcAMP(dibutyl cAMP)で好中球を処理した。その結果、L-selectin の shedding は認められなかった(Fig.3)。

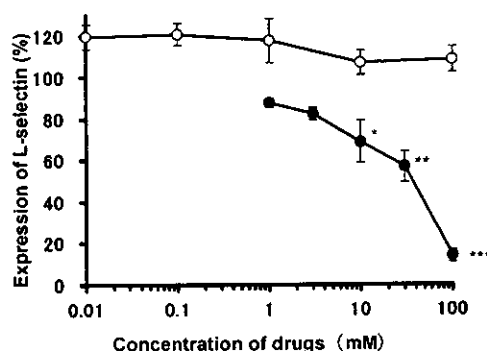


Fig. 3. Effects of dbcAMP on the expression of L-selectin on PMN.

The expression of L-selectin on PMN incubated with PTX (●) or dbcAMP (○) for 30 min was determined by flow cytometry as described in *Materials and methods*. Each value is the mean ± SD of data from three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

5. PTXのアデノシンレセプターへの作用

好中球にアデノシンA 2レセプターアゴニストであるCPCAやホスフォジエステラーゼ阻害薬である rolipram いずれも単独処理では L-selectin 発現には変化が見られなかったが、両者を同時に処理させた結果、L-selectin の shedding を認めた。また、PTX の作用はアデノシン受容体A 1アンタゴニストである 8-phenyltheophylline にて促進され、アデノシン受容体A 1およびA 2に非特異的なアンタゴニストの aminophylline では抑制された (Table 3, Fig. 4.)。

Table 3. Effects of shedding of L-selectin on PMN induced by PTX
 PMN, polymorphonuclear leukocyte; NECA, 5[′]-N-ethylcarboxainidoadenosine;

		% stimulated / unstimulated
NECA	0.1mM	99.5 ± 2.9
CPCA	1mM	87.3 ± 11.5
Rolipram	10mM	80.2 ± 9.8
Rolipram 10mM + CPCA 1mM		37.8 ± 7.8 **
PTX	30mM	44.6 ± 7.0 *
PTX 30mM + Aminophylline 10mM		68.6 ± 6.2
PTX 30mM + Aminophylline 100mM		73.3 ± 10.8
8-Phenyltheophylline 30 μ M + PTX 30mM		28.7 ± 0.6 **

PTX, pentoxifylline; CPCA, 5[′]-(N-cyclopropyl)-carboxamidoadenosine.

Each value is mean ± standard deviation of data from four independent experiments.

P < 0.01; ** *P* < 0.001 compared with unstimulated PMN

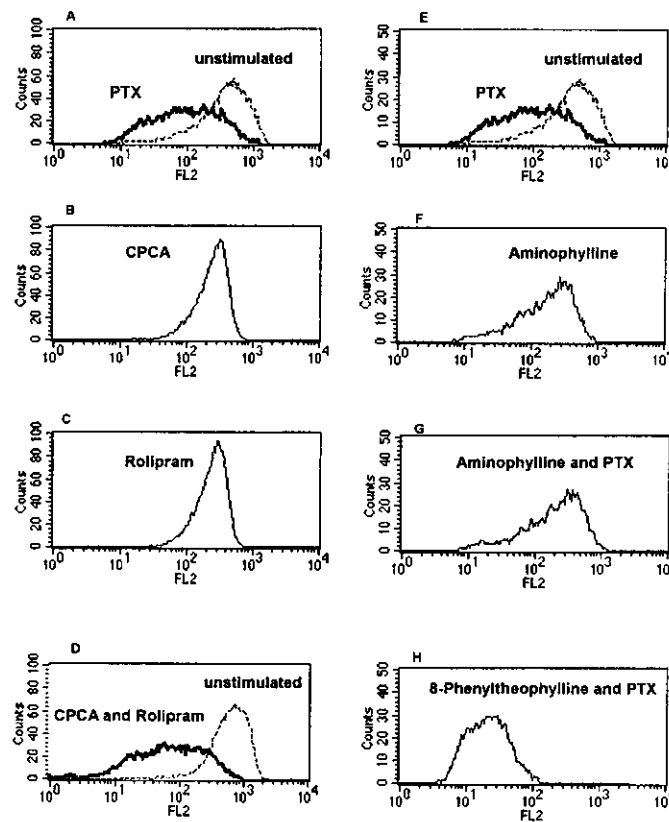


Fig. 4. Effects of L-selectin on PMN by PDE inhibitor, adenosine receptor agonist and antagonist. All experiments were incubated on PMN for 30min and the expression of L-selectin on PMN were determined by flow cytometry as described in *Materials and methods*.

A and E, Unstimulated PMN (···) and treatment with PTX (·). B, Treatment with CPCA (adenosine A₂ agonist). C, Treatment with rolipram (PDE inhibitor). D, Treatment with both CPCA and rolipram (·), and unstimulated PMN (···). F, Treatment with aminophylline (adenosine nonselective antagonist, PDE inhibitor). G, Treatment with both aminophylline and PTX. H, Treatment with both 8-phenyltheophylline (adenosine A₁ antagonist) and PTX

【考案】

PTXによる好中球上L-selectinのdown-regulationはsL-selectinの測定結果からsheddingによることが判明した。しかし、TNF α の作用とは異なることが時間的依存性の実験より推定された。PTXはホスフォジエステラーゼ阻害によって細胞内cAMPを上昇させる。しかし、cAMPを増加させるaminophyllineでもL-selectinのsheddingは認めず、dbcAMPでも同様であった。次に、好中球上のアデノシン受容体に注目したところ、PTXの作用はアデノシン受容体A₁のアンタゴニストで促進され、アデノシン受容体A₁およびA₂に非特異的なアンタゴニストでは抑制された。また、PDE阻害剤とA₂アゴニストの両者の作用によって初めて細胞外プロテアーゼが刺激され、L-selectinのsheddingが生ずることが推定された。このことから、PTXは①PDE阻害作用、かつアデノシンA₂レセプター刺激作用が必要であることが示唆された。

【結論】

PTXはL-selectinのsheddingを起こし、抗炎症作用を有することが明らかとなった。このsheddingには、PDE阻害作用、かつアデノシン受容体A₂刺激作用が必要であることが示唆された。

References

1. Johnston Jr RB, Keele Jr BB, Misra HP, Lehmeyer JE, Webb LS, Baehner RL, et al. The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes. *J Clin Invest* 1975; 55: 1357-72.
2. Cronstein BN., Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 147-57.
3. Díaz-González F, González-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Muñoz C, et al. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1995; 95: 1756-65.
4. Samlaska MCP, Winfield CEA. Pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol.* 1994; 30: 603-21.
5. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A₁ receptors and inhibited via adenosine A₂ receptors. *J Immunol* 1992; 148: 2201-6.
6. Wollner A, Wollner S, Smith JB. Acting via A₂ receptors, adenosine inhibits the up regulation of Mac-1 (CD11b/CD18) expression on fMLP-stimulated neutrophils. *Cell Mol*

- Biol 1993; 9: 179-85.10.
7. Firestein GS, Bullough DA, Erion MD, Jimenez R, Ramirez-Weinhouse M, Barankiewicz J, et al. Inhibition of neutrophil adhesion by adenosine and an adenosine kinase inhibitor. *J Immunol* 1995; 154: 326-34.
 8. Daly JW, Bruns RF, Snyder SH. Adenosine receptors in the central nervous system: relationship to the central actions of methylxanthines. *Life Sci* 1981; 28: 2083-97.
 9. Zhang Y, Raud J, Hedqvist P, Fredholm BB. Propentofylline inhibits polymorphonuclear leukocyte recruitment in vivo by a mechanism involving adenosine A2a receptors. *Eur J pharmacol* 1996; 313: 237-42.
 10. Watoson SR, Fennie C, Lasky LA. Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimaera. *Nature* 1991; 349: 164-7.
 11. Doyle NA, Bhagwan SD, Meek BB, Kutkoski GJ, Steeber DA, Tedder TF, et al. Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 526-33.
 12. Borland G, Murphy G, Age A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *J Biol Chem* 1999; 274: 2810-5.
 13. Maksymowych WP, Avina-Zubieta A, Luong MH, Russel AS. An open study of pentoxifylline in the treatment of severe refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; 22: 625-9.
 14. Huizinga TW, Dijkmans BAC, Velde EA, Kraan TCTM, Verweij CL, Breedveld FC. An open study of pentoxifylline and thalidomide as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 833-6.
 15. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T. Pentoxifylline delays the onset of experimental allergic encephalomyelitis in mice by modulating cytokine production in peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacol* 1996; 35: 141-8.
 16. Tajima M, Haruta K, Kobayashi S, Tamura N, Hashimoto H. Pentoxifylline induces the shedding of L-selectin on polymorphonuclear cells by stimulation via adenosine receptor as well as by the inhibition of phosphodiesterase. *Modern Rheumatology* 2001; 11: in press

17. 病因・病態に関する小委員会報告

病因・病態に関する小委員会

委員長 吉木 敬 (北海道大学大学院医学研究科 病態・分子病理)
由谷 親夫 (国立循環器病センター臨床検査部病理)
津坂 憲政 (埼玉医科大学総合医療センター第二内科)
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)
尾崎 承一 (京都大学医学研究科臨床病態医科学)
濱野 慶朋 (順天堂大学医学部第二病理)
能勢 真人 (愛媛大学医学部第二病理)
東 みゆき (東京医科歯科大学大学院分子免疫分野)

KEY WORDS=動物モデル、遺伝子解析、ANCA

血管炎の病因・病態の解明にあたっては、血管炎感受性遺伝子やANCA産生感受性遺伝子などの遺伝子解析、血管炎の発症や病態に関わる新しい分子についての解析、抗クロマチン抗体やANCAなど自己抗体の解析、T細胞や胸腺などが関与する主として細胞性免疫異常など、様々な観点からの研究が行われている。

【血管炎の発症・病態に関与する遺伝子の解析】

膠原病モデルマウスMRL/lprを用いて、血管炎のキャリアー特異的的感受性遺伝子の解析を行った。その結果、腎血管炎は他の膠原病とは遺伝的に分離して発症すること、また、少なくとも第4染色体上の2つの感受性遺伝子座Arvm1、Arvm2と第3染色体上の1つの抵抗性遺伝子座に支配されており、一方、大動脈主分枝の大型血管炎はArvm1にのみ感受性を有することが明かとなった。(能勢)

(NZBxNZW) F1xNZW退交配マウスを用い、ヒトMPOとマウスMPOを標的としたMPO-ANCA感受性遺伝子のマッピングを行った。その結果、マウス第7染色体のセントロメア側にMPO-ANCA産生感受性領域の存在が示唆された。(濱野)

【血管炎の発症・病態に関与する新しい分子の解析】

新しいB7ファミリー分子B7h、B7-H1の血管内皮細胞(HUVEC)における発現と機能について検討した。HUVECにより誘導されるSEB刺激CD4陽性T細胞の増殖反応は、B7hのリガンドであるICOSに対する抗体で抑制されることから、ICOS-B7hがT細胞と血管内皮細胞との相互反応に関与している可能性が示された。(東)

低酸素関連分子ORP150、低酸素・再酸素化関連分子RA301/Tra2 β の血管病変における発現について検討した。その発現形式は炎症との関連性を示し、これらの分子が血管病変の形成に関与している可能性が示唆された。（由谷）

【血管炎の発症・病態に関与する自己抗体の解析】

壊死性血管炎・糸球体腎炎モデルマウス（Nuc-KO）では、抗ヒストンH3ダイマー（H3D）抗体は血管炎発症直前の12週齢で増強され、さらにその直前に抗サブヌクレオソーム（SNS）抗体の増加が認められた。一方、血管炎の主要組織である腎から抽出した抗体は経時的に増加し、なかでも増強をみたアイソタイプはG3であった。血管炎病態におけるH3DとSNSの関与が示唆された。（金井）

MRL-lprマウス血清でのP-ANCA力価と抗HMG1/HMG2抗体価とは有意の相関を示し、血清をあらかじめHMG1/HMG2で吸収するとP-ANCAの力価の減弱が認められた。以上より、MRL-lprマウスでの主要な対応抗原がHMG1/HMG2であることが明らかとなり、MRL-lprマウスでみられる血管炎の発症機序がヒトANCA関連血管炎と異なることが示唆された。（尾崎）

【血管炎の発症・病態に関与する細胞性免疫異常の解析】

血管炎合併SLE患者T細胞では、短い3' UTRをもつ ζ 鎖mRNAが優位に発現するために ζ 鎖mRNAの安定性、輸送、あるいは局在に異常が生じ、 ζ 鎖の発現低下がおこると考えられる。 ζ 鎖発現低下に伴うシグナル伝達異常によって活性化されたVLA-4などの接着分子により血管炎病態が惹起されている可能性がある。（津坂）

HTLV-I env-pXトランスジェニックラットと正常同系ラットとの間で、胸腺置換と骨髄移植を組み合わせ、胸腺のフレームワークにのみenv-pX遺伝子を発現するラットを作製したところ、このラットに血管炎の発症を認めた。従ってenv-pXラットの血管炎は、リンパ球が胸腺で分化する過程において、env-pX遺伝子を発現する胸腺フレームワークを通過することにより、自己の血管構成分子に対する反応性を有した状態で末梢に出現するため発症する自己免疫疾患と考えられた。（吉木）

18. MRL-lpr マウスの P-ANCA 対応抗原の解析

尾崎 承一 (京都大学医学研究科臨床生体統御医学講座)
馬 衛 (京都大学医学研究科臨床生体統御医学講座)
傍島 淳子 (京都大学医学研究科臨床生体統御医学講座)
上杉 裕子 (京都大学医学研究科臨床生体統御医学講座)
中尾 一和 (京都大学医学研究科臨床病態医科学講座)
三森 経世 (京都大学医学研究科臨床生体統御医学講座)
吉田 充輝 (東京理科大学基礎工学部生物工学科)

KEYWORD=ANCA, MRL-lprマウス, target antigens, HMG1/HMG2

[研究要旨]

血管炎モデルマウスである MRL/Mp-lpr/lpr (MRL-lpr) マウスにおける抗好中球細胞質抗体 (ANCA) の陽性率は 24 週例で 57% であった。その対応抗原を同定するために、myeloperoxidase (MPO、ヒト)、cathepsin G (CaG、ヒト)、high mobility group 1/2 (HMG1/HMG2、ウシ) を抗原とし、マウス由来の各モノクローナル抗体を陽性対照 (100U/ml) とする ELISA を樹立した。24 週令の C57BL/6 マウスの抗体価の mean+3SD 以上を陽性とした結果、24 週令 MRL-lpr マウスの 57% で抗 HMG1/HMG2 抗体が陽性となり、それらの抗体活性はすべて HMG1/HMG2 で吸収された。一方、抗 MPO 抗体、抗 CaG 抗体の陽性率はそれぞれ 14%、7% であり、かつ低力価であり、さらにそれらの抗体活性は対応抗原で吸収されなかった。抗 HMG1/HMG2 抗体は MRL-lpr マウスの 8 週令より検出され始め、加齢と共に P-ANCA の陽性率とほぼ平行して陽性率の増加が見られた。個々の 24 週令 MRL-lpr マウス血清での P-ANCA 力価と抗 HMG1/HMG2 抗体価とは有意の相関を示し、血清をあらかじめ HMG1/HMG2 で吸収すると P-ANCA の力価の減弱が認められた (Autoimmunity 32: 281-291, 2000)。これらの結果より、MRL-lpr マウスでの P-ANCA の主要な対応抗原が HMG1/HMG2 であることが明かとなり、MRL-lpr マウスでみられる血管炎の発症機序が ヒト ANCA 関連血管炎と異なることが示唆された。

Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in MRL/Mp-lpr/lpr mice and analysis of their target antigens

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) have been widely studied and recognized to be clinically very important for some human diseases including systemic rheumatic diseases. We analyzed ANCA response and their target antigens in MRL/Mp-lpr/lpr (MRL-lpr) mice, an animal model of systemic rheumatic disease. P-ANCA was detected in 57% of the mice. Antibodies to the known P-ANCA target antigens at the same age were examined. Among these, antibodies to high mobility group (HMG) proteins HMG1 and HMG2 were detected in 57% of the mice, 75% of which were also positive for P-ANCA. These anti-HMG1/HMG2 activities were absorbed by preincubation with a mixture of HMG1 and HMG2. In contrast, antibodies to myeloperoxidase and cathepsin G were detected in 14% and 7%, respectively, but these activities were not inhibited by preincubation with corresponding antigens. In addition, the titers of P-ANCA and anti-HMG1/HMG2 antibodies in MRL-lpr mice were significantly correlated with each other. Thus, HMG1 and HMG2 were considered to be significant target antigens of P-ANCA in MRL-lpr mice.

[研究目的]

血管炎症候群におけるP-ANCAの主要な対応抗原はmyeloperoxidase (MPO)であり、抗MPO抗体は顕微鏡的多発血管炎の50~75%に検出されるが、古典的多発動脈炎での陽性率は低い。一方、我々がP-ANCAの対応抗原として同定したHMG1/HMG2に対する抗体は古典的多発動脈炎の一部に検出されるが、顕微鏡的多発血管炎では全く出現しない。また、全身性リウマチ性疾患の中では抗HMG1/HMG2抗体は、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、強皮症などの41~48%に検出される。本研究では、血管炎やリウマチ性疾患のモデル動物であるMRL-lprマウスにおけるANCAの頻度およびその主要な対応抗原の同定を目的とした。

[研究対象]

MRL-lpr、MRL-+/+、BALB/c、C57BL/6の各8~24週齢マウスを用いた。

[研究方法]

ANCAはエタノール固定ヒト好中球を基質とした間接蛍光抗体法で行った。P-ANCAを呈したものは、さらに、ホルマリン固定好中球を基質とした間接蛍光抗体法でC-ANCA型に変化することを確認した。抗核抗体はHEp-2を基質とした間接蛍光抗体法で型通り行った。P-ANCAの対応抗原に対する抗体はELISAにて行った。対応抗原として、myeloperoxidase (MPO、ヒト)、cathepsin G (CaG、ヒト)、high mobility group 1/2 (HMG1/HMG2、ウシ)を用い、陽性コントロールとしてマウス由来の各モノクローナル抗体を用いてELISAを構築した。陽性対照を100U/mlとして、24週令のC57BL/6マウスの抗体価のmean+3SD以上を抗体陽性とした。

[結果]

24週齢における4群のマウスでは、MRL-lprマウスにのみANCAが検出され、その陽性率は57%で、いずれもP-ANCAであった。同時期にMRL-lprマウスの抗核抗体の陽性率は100%であった。

24週齢における4群のマウスにおける抗HMG1/HMG2抗体、抗MPO抗体、抗CaG抗体の力価を図1に示す。各点は個々のマウスの価であり、水平の点線はcut-off pointである。ANCAと同様にMRL-lprマウスの57%で抗HMG1/HMG2抗体が陽性となり、それらの抗体活性はすべてHMG1/HMG2で吸収された。一方、MRL-lprマウスにおける抗MPO抗体、抗CaG抗体の陽性率はそれぞれ14%、7%であり、かつ低力価であり、さらにそれらの抗体活性は対応抗原で吸収されなかった。

表1に、各MRL-lprマウスのANCA、抗HMG1/HMG2抗体、抗MPO抗体、抗CaG抗体の力価をまとめて示す。後3者では下線を引いた価が陽性検体である。P-ANCAの出現と最もよく関連したのが抗HMG1/HMG2抗体であった。個々の24週令MRL-lprマウス血清でのP-ANCA力価と抗HMG1/HMG2抗体価とは有意の相関を示した(図2)。これらの血清をあらかじめHMG1/HMG2で吸収するとP-ANCAの力価の減弱が認められた。

経時的な観察において、抗HMG1/HMG2抗体はMRL-lprマウスの8週令より検出され始め、加齢と共にP-ANCAの陽性率とほぼ平行して陽性率の増加が見られた(図3)。24週例での抗MPO抗体、抗CaG抗体は、前述のごとく陽性率は低く、かつ非特異的であった(*で示す)。

[考察]

MRL-lprマウスでは24週例で約6割にP-ANCAが陽性であった。その主要な対応抗原がMPOではなくHMG1/HMG2であることが明かとなり、MRL-lprマウスでみられる血管炎の発症機序がヒトANCA関連血管炎と異なることが示唆された。

[参考文献]

1. Sobajima J, Ozaki S, Okazaki T et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in ulcerative colitis: anti-cathepsin G and a novel antibody correlate with refractory type. *Clin Exp Immunol* 1996; 105:120-125.
2. Sobajima J, Ozaki S, Osakada F et al. Novel autoantigens of pANCA in ulcerative colitis: non-histone chromosomal proteins, HMG1 and HMG2. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 107: 135-140.
3. Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H et al. Prevalence and characterization of P - ANCA directed against HMG1 and HMG2 in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 1998; 111:402-407.
4. Uesugi H, Ozaki S, Sobajima J, et al. Prevalence of anti-HMG1/HMG2 antibodies in rheumatic diseases. *J Rheumtol* 1998; 25: 703-9.
5. Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H et al. High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* 1999; 44: 867-73. 274 (22): 15701-15705, 1999.
6. Ozaki S, Uesugi H, Sobajima J, Osakada F, Kishimura M, Yoshida M, Nakao K: How do high mobility group non-histone chromosomal proteins HMG1/HMG2 act as P-ANCA target antigens? *Arthritis Rheum.* 42(9): s112, 1999.
7. 尾崎承一：High mobility group 蛋白質HMG1/HMG2：その自己抗体の臨床的意義。日本臨床免疫学会誌 21(3):95-107, 1998.
8. 尾崎承一：新しいP-ANCA対応抗原の同定。炎症と免疫7 (1) :53-61, 1999.
9. 尾崎承一、傍島淳子、上杉裕子、中尾一和：新規のP-ANCA—抗HMG1/HMG2抗体—その炎症性疾患における意義。炎症 19(1):25-30, 1999.
10. 尾崎承一：血管炎とANCA。診断と治療 87 (5) :774-778, 1999.
11. Ma W., Ozaki S., Sobajima J., Uesugi H., Murakami M., Tanaka M., Kozuki M., Hashimoto H., Fujita Y., Kawabata D., Osakada F., Shirakawa H., Yoshida M., Hayami M. and Nakao K.: Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in MRL/Mp-lpr/lpr mice and analysis of their target antigens. *Autoimmunity* 32: 282-291, 2000.

表1 MRL-lprマウスの抗体力価

Mouse	Sex	ANCA (titer)	antibodies to (U/ml)		
			HMG1/HMG2	MPO	CaG
1	♀	P (1:2560)	<u>25.2</u>	<u>10.2</u>	4.5
2	♀	P (1:1280)	<u>34.7</u>	2.5	4.6
3	♀	P (1:1280)	<u>44.4</u>	1.3	4.4
4	♀	P (1:160)	<u>6.3</u>	1.7	6.1
5	♀	-	1.9	1.0	1.1
6	♀	-	<u>7.3</u>	3.5	7.2
7	♀	P (1:1280)	<u>23.9</u>	1.5	1.4
8	♂	P (1:160)	2.6	0.1	0.7
9	♂	P (1:640)	<u>14.3</u>	<u>10.1</u>	1.8
10	♂	P (1:40)	1.2	0.1	0.3
11	♂	-	4.6	1.0	0.6
12	♂	-	4.8	1.2	<u>15.5</u>
13	♂	-	<u>11.9</u>	2.2	2.2
14	♂	-	3.1	1.7	1.0

下線は陽性検体を示す（研究方法の項を参照）

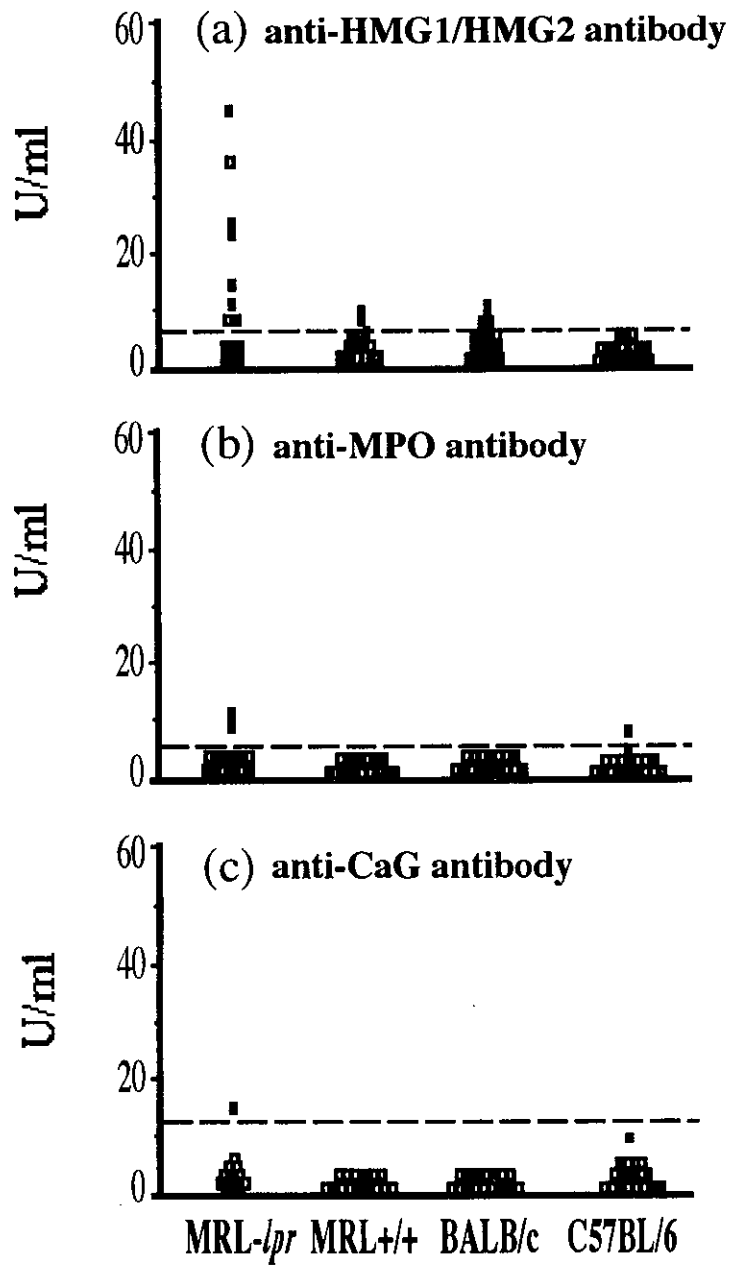


図1. 各マウスにおける抗体力価(水平線は正常上限)

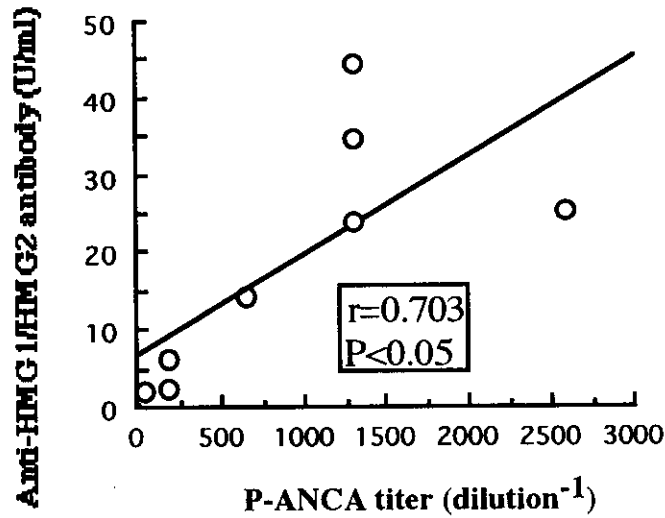


図2. MRL-lprマウスにおける抗HMG1/HMG2抗体価とP-ANCA力価との間の相関

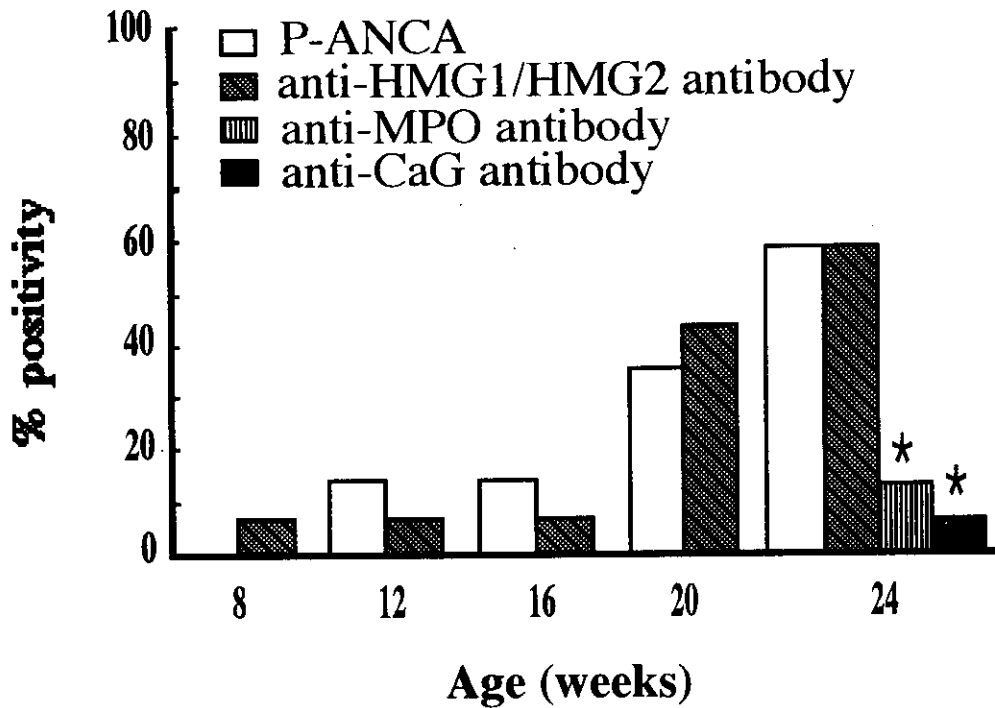


図3. MRL-lprマウスにおける各抗体陽性率の経時的変化

19. 血管炎病態に関与する MPO-ANCA：動物モデルを用いた解析

分担者： 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：血管炎に伴い、血中に MPO-ANCA が上昇するモデルマウスの血清中の値、その対応分子 MPO の自己抗原としての関与と血管炎の発症との関係について解析する。ヒトと同様にマウス MPO(mMPO)を *E. coli* に発現させ、リコンビナント mMPO(rmMPO)を精製した。また、native mMPO もマウス腹腔より調整した。*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、血清中の MPO-ANCA 値を ELISA 法により測定した。rmMPO が得られた。その rmMPO に対する抗体を作成し、mMPO 特異的抗体を得た。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 マウスにおいて、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なった。このことは MPO が MPO-ANCA 産生に関与し、さらに血管炎発症を誘導していることを強く示唆している。

A. 研究目的

MRA などの顕微鏡所見では多くの好中球浸潤が認められることがあるなど、血管炎の病態に炎症細胞が関与していることが病理所見から観察されている。しかし、関与の状態がどのようなかについては、ほとんど推定の範囲を越えていない。血管炎の組織には、マイクロファージ、好中球、リンパ球の炎症細胞の浸潤が観察される。本来、炎症細胞は外来異物などを排除する生体防御機能として

作用するが、血管傷害もひきおこしていると推定されている。これと関連して、血管炎患者には血清中に好中球抗体 ANCA(anti-neutrophil cytoplasmic antibody)が上昇するや、好中球抗体と好中球が血管炎に関与していることが明らかになってきたことや、好中球浸潤のある血管炎が認められている。したがって、好中球がその抗体 ANCA とともに血管炎に関与していることが容易に想像できるようになってきた。

これまで、血管炎の病因がかかわるリスク因子としては、ANCA および、それ以外の自己抗体、IL-8 や TNF α などの炎症性サイトカイン、内皮細胞の活性化、接着分子、内膜・中膜・外膜あるいは細胞外マトリックスの反応系などがあり、それらの因子がトリガーとして連鎖していると推定されている。一方、血管炎の患者の血中には、高い MPO の酵素活性とともに、活性化された好中球が血液中を循環していることが明らかになっている。その活性化好中球が、血管炎の発症と病態の進行に関与していると推定されている(1,2)。この時、好中球は、Fc γ レセプターを介して活性化されていることが示されており、Fc γ レセプターが関与して自己抗体 MPO-ANCA 抗体が好中球を活性化しているのではないかとされている。この様にして、生体側に不利な細胞傷害を引き起こす好中球の活性化には、その抗体 ANCA が深く関わっていることが報告されてきている。特に、MPO-ANCA の関与についての解析が進んでいる。

血管炎疾患の患者の血清中の MPO-ANCA の抗体価の変動だけでは、必ずしも疾患の病態と連動していないことがわかってきており、病態と密接に関与する MPO-ANCA について検討することが重要になってきている。MPO-ANCA は、その抗原分子(MPO)と抗体の反応つづく免疫複合体によって、好中球を活性化する。その状態が

持続することによって、病態の重篤化を招くのではないかと考えられている。この病態と関連した MPO-ANCA の関与を解明するには、抗体による MPO 分子との反応部位(エピトープ)を特定することと、反応性、血管傷害に関わる抗体を特定することが重要である。このため、血管炎の病態を判定するための MPO-ANCA エピトープ解析用パネルを作成して解析してきた(3)。特に、PN および MPA 患者の血清は、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モノ(あるいはオリゴ)クローナル抗体が関わっており、他の血管炎の血清の MPO-ANCA は、末端ではない部位のエピトープ、2つ以上、すべてに反応するエピトープを示した(4)。以上から、クロナリテイは血管炎疾患および病態と関連があることを示唆している。これらの結果は、治療による病態の評価基準作成や血管炎の重症度の評価に重要であると考えられる。昨年度までに予備的に検討した血管炎モデルマウスにおいて、血管炎発症にどのように対応分子の MPO が関与しているのかどうか検討する。一方、対応分子となる MPO は、マウスとヒトでは、その分子構造の homology は高いが、抗体のクロス反応性が悪いいため全長のリコンビナント MPO を作製し、ポリクローナル抗体を作製する必要がある。また、昨年までに検討してきた *Candida albicans* derived substances (CADS) の