

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に關与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚搔痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療 への応用に関する研究

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 大川原 明子

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 免疫部 赤川 清子
- (2) 国立感染症研究所 細菌部 倉 文明
- (3) 国立感染症研究所 生物活性物質部 鈴木 和男
- (4) 帝国臓器製薬株式会社 佐久間 秀樹
- (5) 日本化薬株式会社 根本 久一、雑賀 寛
- (6) 北里大学 薬品製造化学 砂塚 敏明
- (7) 仙台社会保険病院 腎センター 堀田 修
- (8) 横浜市立大学 木原生物学研究所 荒谷 康昭

要旨

ELISA 法によるヒト MPO-ANCA のエピトープ解析を基に MPO-ANCA 関連腎疾患およびモデルマウスの病態への炎症細胞活性化の関与、治療法について検討した。一方、MPO を遺伝的に欠損したマウスを用いて感染防御における好中球の役割を個体レベルで明らかにした。また、エリスロマイシン誘導体によるマクロファージ分化誘導活性等の構造活性について検討した。さらに、マクロファージの HIV の増殖抑制機構について検討した。

1. 研究目的

1) MPO-ANCA 自己抗体の解析とその応用に関する研究

- ① MPO-ANCA 自己抗体の解析 血管炎、腎炎等の自己免疫疾患の発症機序を解析し、治療薬を開発するための基礎として各疾病の MPO-ANCA エピトープの分析をする。すなわち MPO heavy chain の細フラグメントのリコンビナントあるいは合成たんぱくを用いて ELISA 法によるピンポイントエピトープ解析を行い治療法への応用を目指す。
- ② 腎炎モデルマウスを用いた腎炎発症への MPO、好中球の関与 半月体形成性糸球体腎炎を自然発症する SCG/kj マウスを用いて腎炎発症・進行への活性化好中球、MPO-ANCA の関与について明らかにする。
- ③ 腎炎モデルマウスを用いた腎炎治療の試み 免疫抑制剤デオキシスパガリン(DSG)による SCG/kj マウスの腎炎治療、またヒト好中球 MPO 放出阻害効果を有するアセアノスタチン (ai-15:0) による SCG/kj マウス好中球活性化の抑制効果について検討する。

2) 真菌等感染の生体防御における好中球、MPO の役割に関する研究

- ① 好中球細胞死における MPO の役割 MPO ノックアウトマウスの好中球を用いて、好中球の細胞死における HOC1 の役割を明らかにする。
- ② MPO ノックアウトマウスを用いた感染症発症の解析 MPO 産物である HOC1 より活性酸素系列において上流にあたるスーパーオキシドの産生酵素である NADPH oxidase ノックアウトマウスを MPO ノックアウトマウスと組み合わせ、種々の病原体における MPO の寄与を検討する。

3) ヒトマクロファージに関する研究

- ① 腎炎における単球表面抗原および機能解析と病態との関連 腎疾患、血管炎における単球/マクロファージ上の機能分子の発現と病態との関係を明らかにし、病態に即した有効な治療法を確立する。今年度は、腎糸球体疾患に特徴的な尿中マクロファージ様の大型細胞を giant macrophage(GM)と名付けその起源、病的意義を明らかにする。
- ② マクロライド誘導体の合成とそれらの免疫担当細胞への影響 ヒト T 細胞増殖応答、単球のマクロファージへの分化増強に対するエリスロマイシンの構造活性相関について各種誘導体を用いて明らかにする。
- ③ HIV 感染におけるマクロファージの役割 HIV 初期感染の成立と ARS 期での病態の進行に深く関与するマクロファージ指向性ウイルスの感染、増殖および増殖抑制機構を解明する。

2. 研究方法

1) MPO-ANCA 自己抗体の解析とその応用に関する研究

- ① ヒト MPOIII の精製：ヒト好中球を CETAB 抽出、DEAE セファロース、CM セファロースカラムにて粗精製した後、CM-HPLC にて精製した。ネフロスカラー・MPO-ANCA 試薬（ネフロ試薬）と MPOIII-ANCA 試薬（TZ 試薬）との比較：ネフロ試薬及び TZ 試薬を用いて ANCA 関連疾患患者 52 例の血清中 MPO-ANCA を測定した。すなわち、MPOIII をコーティングしたプレートを用い希釈液で 30 倍に希釈した血清検体（1 を 100 μ l 加え、室温で 2 時間インキュベーション、洗浄後、100 倍に希釈した AP 標準抗ヒト IgG を加え室温で 2 時間インキュベーション、洗浄後 1 mg / ml に調製した基質溶液 100 μ l を加え室温で 30 分インキュベートし、吸光度 (OD405 / 650) を測定した。なお、TZ 試薬の標準品にはグロブリン製剤を用い、定量値はグロブリン製剤 1 mg / mL に相当する MPOIII-ANCA の濃度を 1 TZU として算出した。ネフロ試薬を用いた測定は添付書に従って行った。臨床検体のエピトープ解析：MPOIII あるいはそのフラグメント（H4a、H4b、H5、H6、H7、H10、H11）をコーティングしたプレートを用い、希釈した血清検体（107 例）の MPO-ANCA 値を測定した。
- ② 病理学的検査：マウスの腎臓（両側）を切り出し、パラフィン包埋後薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色および PAS 染色をした。好中球浸潤は一個体あたり 20 系球体についての合計とした。腎臓傷害のグレードは WHO の基準に従い、一個体あたり 20 系球体のグレードの総計とした。MPO-ANCA 値の測定：腹部大動脈より採血し、血清を分離しヒト MPOIII を抗原とした ELISA 法にて MPO-ANCA 値を測定した。
- ③ 尿試験紙により潜血が陽性（+または++）を示した時点から投与を開始した。DSG は 3.0 及び 6.0 mg/kg を腹腔内投与で、プレドニゾロンは投与量 120 mg/kg を腹腔内投与で、シクロフォスファミド（CYC）は投与量 12 mg/kg を経口投与で、21 日間連投した。また、投与期間中急性腎不全による死亡例があり、このサンプルを採取するために、BUN 値が 100 以上を示した時点で投与を終了とした。尿検査及び腎機能検査：尿試験紙により、タンパク尿は -/+ から +++ の、潜血は - から +++ の 4 段階で評価した。腎機能検査はドライケムスライド BUN-P II を測定器 DRI-CHEM5500 のスライドカートリッジにセットし、血漿または希釈血漿 10 μ l を載せ、測定した。病理学的検査：採取された腎臓は一晚ホルマリン緩衝液で固定後、PAM 染色及び HE 染色を行った。マウス 1 個体あたり 20 個の系球体の病理学的変化（硝子様血栓及び半月体形成）を観察した。各病理変化について、形成に対する作用として、[ステージ 1] + [ステージ 2] の系球体数 / 全系球体数の割合、進展に対する作用として、[ステージ 2] の系球体数 / 全系球体数の割合を求めた。MPO 放出におよぼすアセアノスタチンの効果：終濃度 5 μ g/ml のアセアノスタチンをマウス好中球に反応させ、MPO 放出への阻害効果を調べた。

2) 真菌等感染の生体防御における好中球、MPO の役割に関する研究

- ① 3% チオグリコレート溶液 1ml をマウス腹腔注射し、4 時間後に好中球を回収した。単離した好中球に PMA または H_2O_2 もしくはその両薬剤を添加し、37°C でインキュベートした。一部の実験ではヒト MPO 精製標品あるいは HOCl を添加した。一定時間インキュベート後にギムザ染色し、核凝縮を起こしている細胞数を顕微鏡下で測定した。さらに蛍光標識されたアネキシン V で染色し、野生型好中球と MPO 欠損好中球のアネキシン V 陽性率を比較した。核凝縮、アネキシン V 陽性の好中球をアポトーシスを起こした細胞と判定した。
- ② SPF 条件下で飼育した約 12 週齢の MPO 欠損 C57BL/6 系統、NADPH oxidase 欠損 C57BL/6 系統 (gp91phox-)、両方の欠損マウス (Double Knockout: DKO) およびその対照となる野生型マウスを使用した。麻酔したマウスの鼻腔内に生理食塩水に懸濁した日和見感染の起炎菌として重要な真菌 *Candida albicans*、*Aspergillus fumigatus*、細菌 *Legionella pneumophila* を 40 μ l 投与した。30 分、48 時間、144 時間後に種々の臓器を摘出し生理食塩水でホモジネートし、適当に希釈してそれぞれの病原体に適切な寒天プレートに接種した。孵卵器の中でプレートを培養し、コロニーを計数して種々の臓器中の生菌数を求めた。また、*Candida albicans*、*Aspergillus fumigatus* では、生存率のタイムコースを観察した。

3) ヒトマクロファージに関する研究

- ① 各種腎疾患における腎生検標本を用い GM の存在の有無とその程度、ならびに GM の発現する抗原を検索した。また尿中の GM の存在とその数、ならびに尿中 GM が発現する抗原について解析した。尿中落下細胞を培養し培養細胞における CD68 抗原の発現の有無を検索した。さらに尿中微量コレステロール（主体は HDL コレステロール）を測定し尿中 GM との関連について解析した。
- ② エリスロマイシン (EMA) 誘導体の作製は、EMA を出発材料として、抗菌活性と消化管運動促進活性（モチリン活性）の両方を有する EMA、抗菌活性のみを有する EMA、EMA の 6 位と 9 位で環化したモチリン活性のみを有する EM201、モチリン活性と抗菌活性の両者を有する EM202、及び EM201 のジメチルアミノを

変換した EM522 と EM574 等の誘導体を用いた。ヒト末梢血単核球(PBMC) は、バフィーコートよりリンホブレットにて分離した。MACS により抗ヒト CD14 抗体マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用い CD14 陽性の細胞を PBMC よりポジティブセクションして回収し、その後プレートに付着させ純度の高い (>96%) CD14 陽性単核球画分を得た。CD4 陽性 T 細胞は、CD14 陰性 PBMC より抗ヒト CD4 抗体マイクロビーズを用いて MACS でポジティブセクションした。単核球及び T HP-1 細胞をエリスロマイシン及びその誘導体と 7 日間培養後 (T HP-1 の場合は 2 μ g/ml の PMA 存在下) 粘着性のマクロファージへの分化した細胞数をセタブロン法、または MTT 法で測定した。単核球の樹状細胞への分化は、GM-CSF 及び IL-4 存在下に 7 日間培養により誘導し、CD1 等の樹状細胞特異的表面抗原の発現を FACS で解析した。ヒト T 細胞の増殖応答は、PBMC をマイトゲン PHA あるいは結核菌抗原である PPD で刺激し 3 日後あるいは 6 日後の細胞増殖を LDH の活性測定で調べた。T 細胞の初期活性化は、CD4 陽性 T 細胞を抗原提示細胞存在下 PHA で刺激 14 時間後の CD69 の発現を Fast Immune Assay System (Becton Dickinson)を用い、FACS で測定した。活性化 T 細胞は、CD4 陽性 T 細胞を PHA で刺激し、その後 PHA を除去し、IL-2 を添加して増殖維持を行った。

③ HIV-1 のマクロファージへの感染は、ヒト単核球より、M-CSF および GM-CSF にて分化誘導した M 型マクロファージ (M-M ϕ) 及び GM 型マクロファージ (GM-M ϕ)、ヒト肺胞マクロファージ (肺胞 M ϕ) に、マクロファージ指向性ウイルス株である BaL を 2 時間接触感染させた後、7-14 日間にわたって培養した。宿主遺伝子上でのウイルス DNA の発現は、LTR-gag 遺伝子のプライマーをもちいた nested-PCR 法にて解析した。ウイルスの増殖は、感染後培養上清中に放出されるウイルス粒子を p24 抗体を用いた ELISA 法により検討した。Hck 及び C/EBP β のアンチセンス (AS)、これらに対応したセンス (S) 及び転写翻訳に無関係なノンセンス (NS) オリゴヌクレオチドプローブは、無血清培地に溶解したカチオン剤 (Lipofectin) に室温で 30 分間溶解した後、10% FCS を含む RPMI1640 培地と共にマクロファージに添加し 37 $^{\circ}$ C、24 時間培養した。Hck 及び c/EBP β タンパクの発現は、ウエスタンブロット法にて検討した。

3. 研究成果

1) MPO-ANCA 自己抗体の解析とその応用に関する研究

① ネフロ試薬と TZ 試薬との比較：MPO-ANCA 定量値 6 ~ 9 EU 範囲での相関係数は 0.52 (Fig.1a)、10 ~ 99 EU 範囲では 0.33 (Fig. 1b)、100 EU 以上では 0.76 (Fig. 1c) であった。いずれの範囲においても全例による相関 (Fig. 1d)に比較すると相関は減少した。臨床検体のエピトープ解析：MPO-ANCA 定量値と H10 fragment 定量値との相関係数については、MPO-ANCA 定量値が 0.4 未満の範囲では相関係数 = 0.56 であった。MPO-ANCA 定量値が 0.4 以上の範囲では相関係数 = 0.81 と、両者の定量値は相関性を示した。

② 腎臓への好中球浸潤と MPO-ANCA 値は相関し (Fig.2)、さらに腎の傷害性と正の相関を認めた (Fig. 3)。

③ DSG 投与によって生存率の改善が認められた (Fig. 4)。媒体投与群は漸次死亡し、投与終了時には生存率は 47.2%であったのに対し、DSG 6 mg/kg、3 mg/kg、プレドニゾロン 120 mg/kg 及び CYC 12 mg/kg 投与群の投与終了時の生存率は 75.6、77.6、60.8 及び 71.7%であった (Fig. 4)。タンパク尿及び潜血、血中尿素窒素値(BUN)いずれも DSG 投与による効果が認められた。さらに、半月体進展、硝子様血栓に関して DSG は形成及び進展をともに抑制した。一方、SCG/kj マウスにおいては正常マウスとは異なり、末梢好中球の活性化が示唆されたことから (昨年度報告)、in vitro の assay でヒト MPO 放出阻害効果を示したアセアノスタチン (合成 ai-15:0) の効果について検討をしたところ、SCG/kj マウスでは FMLP による刺激なしに活性化されている MPO 放出の阻害効果を認めた。また、FMLP の刺激に対する好中球の MPO 放出については正常マウス、SCG/kj マウスいずれについても阻害効果を認めた。

2) 真菌感染等の生体防御における好中球、MPO の役割

① 採取した腹腔浸出好中球のおよそ 25%は既に核凝縮を起こしていた。刺激によって腹腔内に浸出した際にアポトーシスを起こしたものと考えられる。野生型好中球を PMA と H₂O₂ で活性化させると核凝縮を起こした細胞数が急速に増加し、1 時間後にはほとんどすべての細胞で核凝縮が認められた (Fig. 5)。またこれらの細胞数はアネキシン V 陽性細胞数とほぼ一致したことから、核凝縮をおこした細胞はアポトーシスによって死にいたった細胞であると判定した。しかし、MPO 欠損好中球では 1 時間以内に核凝縮を起こす細胞は全く増加しなかった (Fig. 5)。一方、PMA と H₂O₂ で活性化した MPO 欠損好中球にヒト由来 MPO を添加すると、1 時間後の核凝縮細胞が野生型好中球で観察された細胞数と同程度まで回復した (Fig.5)。さらに HOCl を外から加えることによって MPO 欠損好中球のアポトーシスが增加したことから MPO による HOCl 産生がアポトーシスをコントロールしていることが示唆された。

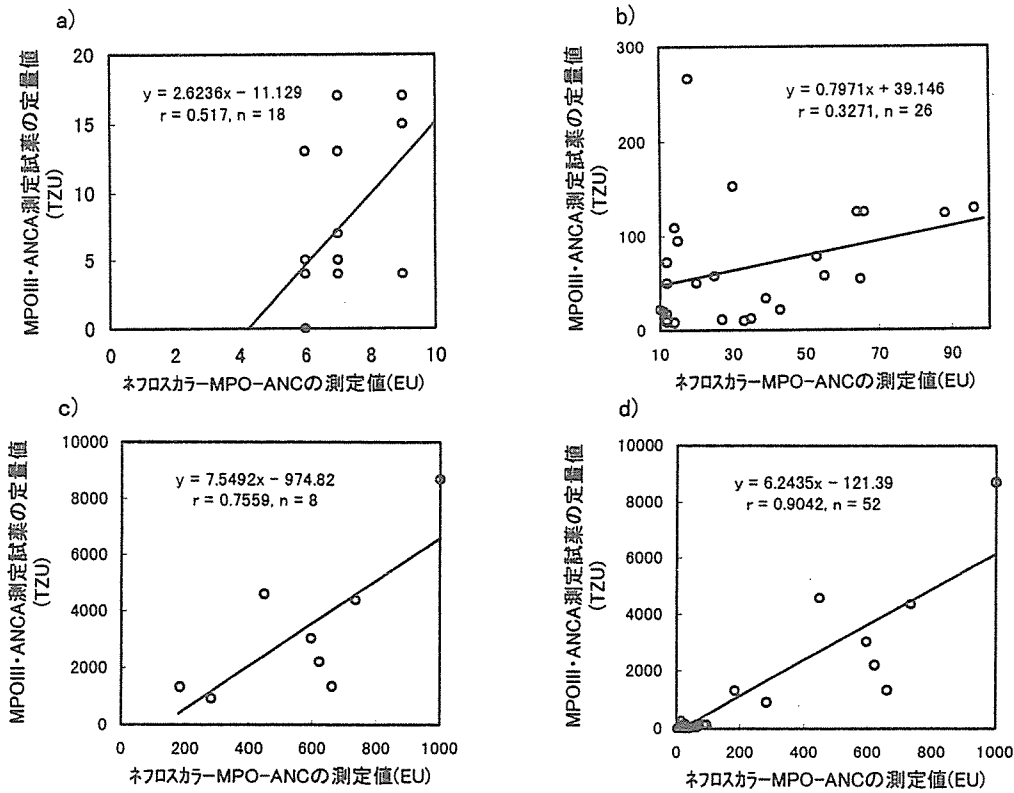


Fig.1 Correlation between the proposed assay and Nephroscholar・MPO-ANCA
 a) The measured value of Nephroscholar・MPO-ANCA < 10 EU
 b) $10 \text{ EU} \leq$ The measured value of nephroscholar・MPO-ANCA < 100 EU
 c) The measured value of Nephroscholar・MPO-ANCA ≥ 100 EU
 d) all region

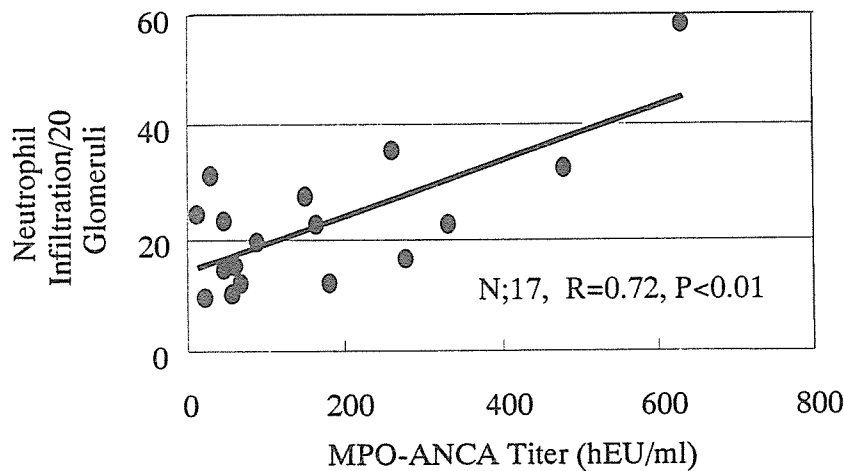


Fig. 2 Correlation of Neutrophil Infiltration and MPO-ANCA Titer (SCG/kj, 14-16W)

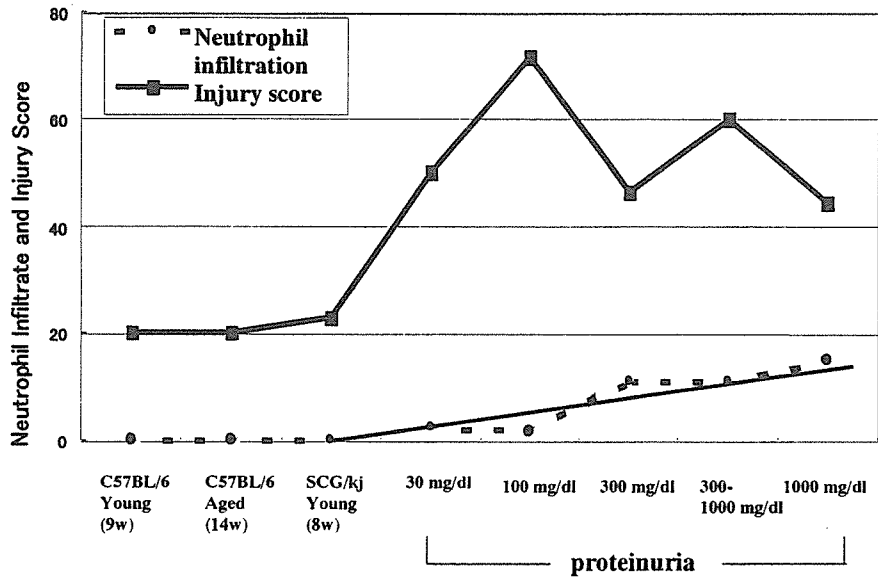


Fig. 3 Correlation of Neutrophil Infiltration and Kidney Lesion

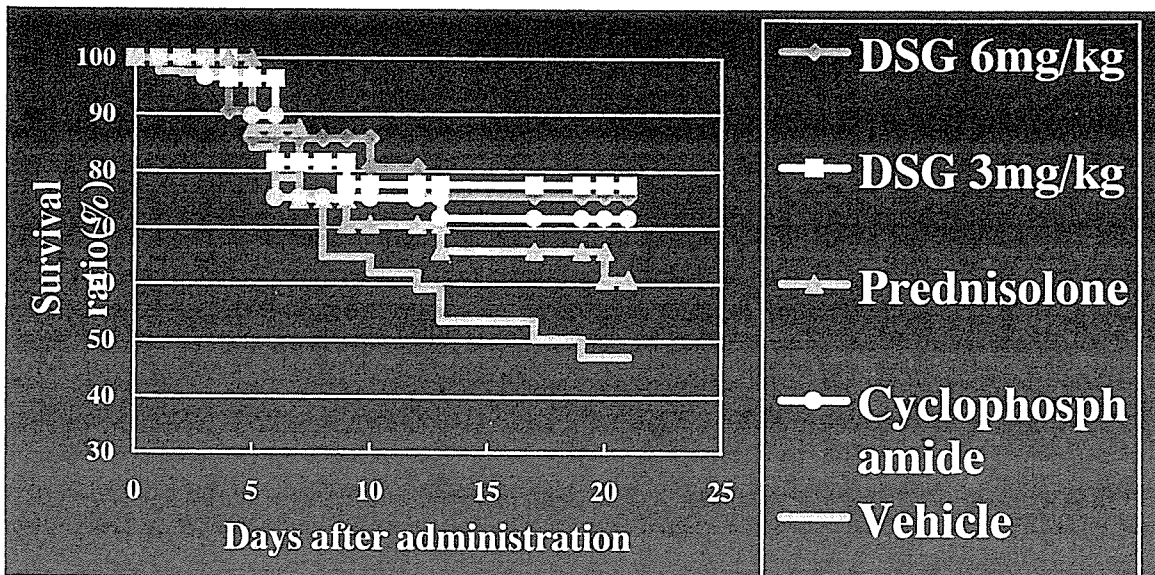


Fig. 4 Effect of DSG on Survival of SCG/kj mice

② *Candida albicans* は、MPO 欠損マウスの肺を始めとする各臓器で菌が排除されず、野生型に比べ著しく菌が残存したが、gp91phox 欠損マウスおよび DKO マウスでは菌が時間とともにさらに増加した (Fig. 6)。これに対応して、gp91phox 欠損マウスおよび DKO マウスは、MPO 欠損マウスより短時間でマウスが死亡した。144 時間後の各種臓器の生菌数は、MPO 欠損マウスでは生菌数が野生型に比べ増加していたが、gp91phox 欠損マウスおよび DKO マウスではさらに生菌数が増加していた (Fig. 6)。 *Aspergillus fumigatus* は、MPO 欠損マウスで肺の菌の排除が遅れたが死亡率は低かった。一方 gp91phox 欠損マウスおよび DKO マウスでは短時間で同様に死亡した。 *Legionella pneumophila* は、48 時間後に gp91phox 欠損マウスおよび DKO マウスで肺の生菌数が野生型マウスに比べ同程度に増加したが、MPO 欠損マウスでは野生型マウスと同様に菌が増加しなかった。

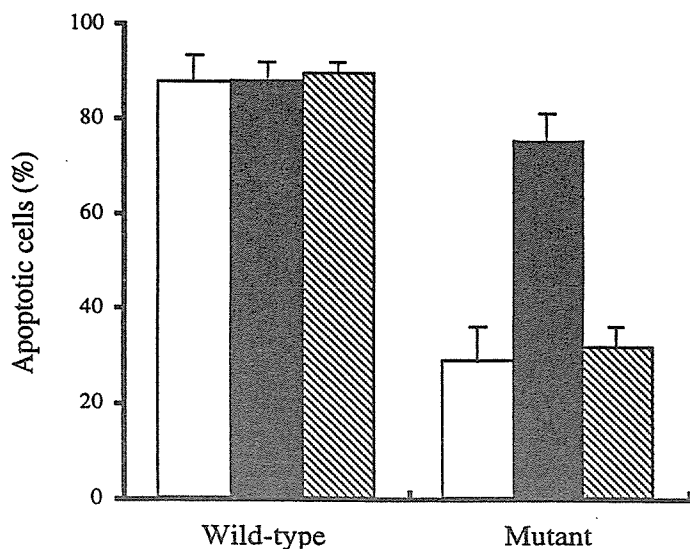


Fig. 5 Nuclear condensation of neutrophils activated by PMA and H₂O₂. Wild-type and MPO-deficient mutant neutrophils were incubated with PMA and H₂O₂ for 1 hr in the absence (white bars) and presence of native (black bars) and heat-denatured (stripped bars) human MPO enzyme, and the number of cells displaying apoptotic morphology was counted. Data are expressed as mean \pm SD from three different experiments.

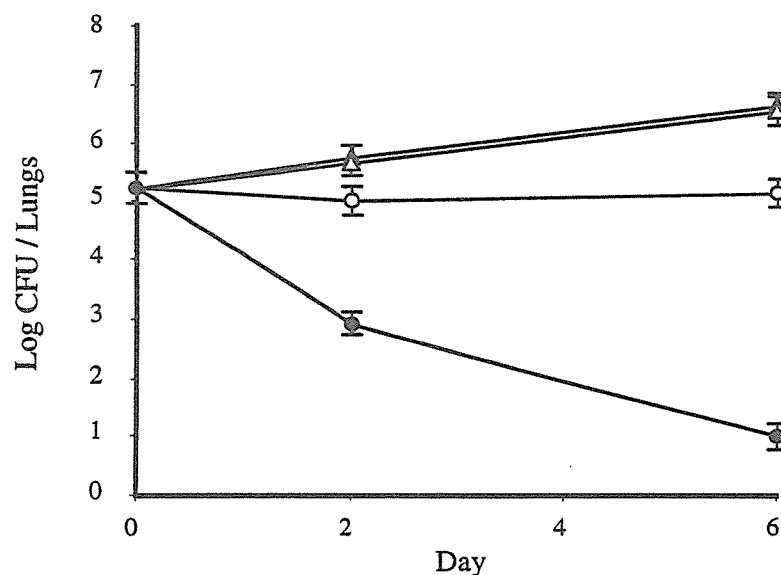


Fig. 6 Time course of colony forming units in mouse lungs after intranasal *Candida albicans* infection (wild, closed circles; MPO^{-/-}, open circles; gp91phox^{-/-}, closed triangles; DKO, open triangles.)

3) ヒトマクロファージに関する研究

- ① 正常腎組織には GM は存在せず、非選択的蛋白尿を有する症例において尿細管腔内を中心に GM をみとめた。症例の一部では尿細管上皮細胞の一部、Bowman's capsule の一部、糸球体上皮細胞の一部に CD68 の陽性所見をみとめた。腎組織の GM は CD68、25F9、vimentin 陽性で cytokeratin 陰性、胞体内にしばしば脂肪球を有する。腎組織中の単位尿細管腔数当たりの GM 数は非選択的蛋白尿の程度と相関した。尿中 GM の大半は脂肪を含有し CD68 に加え 25F9、vimentin 陽性であり、cytokeratin 陰性であったが、一部の GM は CD68 と cytokeratin の両者が陽性であった。尿中 GM の排泄量は非選択的蛋白尿の程度と相関した (Fig. 7)、大量の尿中 GM 排泄が認められる症例は腎機能の低下速度が速かった (Fig. 8)。
- ② EM 及びその誘導体のいくつかは、濃度依存的に PHA あるいは特異抗原 PPD の刺激による T 細胞増殖を抑制すると共に、IL-2 レセプターよりも先に発現することが知られている初期活性化マーカー CD69 の発現を増殖抑制活性の程度に応じて抑制した (Fig. 9 左)。またこれらの薬剤は、既に IL-2 レセプター (IL-2R) を発現した活性化 T 細胞の IL-2 依存的増殖応答も抑制した (Fig. 9 右)。しかし、活性化 T 細胞上に発現した IL-2R の発現には影響を与えなかった。静止期 T 細胞と活性化 T 細胞の生存に対する EM 誘導体の影響を検討した結果、静止期 T 細胞の生存に対しては、いずれの薬剤もほとんど影響を示さなかったが、活性化 T 細胞に対しては、それぞれの T 細胞増殖応答抑制活性の程度に応じて細胞死を誘導した。以上述べた抑制活性は、EM に比べ EM201、EM522、EM574 などの誘導体で強く、一方、EM202 はほとんど抑制作用を示さなかった。
- ③ チロシンキナーゼ Hck は、HIV-1 の Nef 蛋白と親和性が高く、HIV-LTR プロモーター活性を亢進することが報告されている。Hck は M-Mφ では発現が強く GM-Mφ では発現は低いが、HIV-1 感染により M-Mφ の Hck 発現は増強したが、GM-Mφ や肺胞 Mφ ではさらに発現が低下した。そこで、Hck に対するアンチセンスを添加する事で、M-Mφ の Hck の発現を抑制し、ウイルスの産生を制御できるか否か検討をした。Hck に対するアンチセンス (Hck-AS) を添加した M-Mφ では、有意に Hck の発現が低下した (約 10 分の 1) (Fig. 10)。センスプローブ (Hck-S) および無関係なプローブ (Hck-NS) の添加では、Hck の発現に変化を認めなかった。HIV-1 感染後の M-Mφ では、Hck-AS を添加した群でのみ長期にわたって Hck 蛋白の発現が低下すると同時に、培養上清中の p24 抗原量が完全に抑制された (Fig. 10)。この抑制効果は他のプローブ添加時には認められなかった。

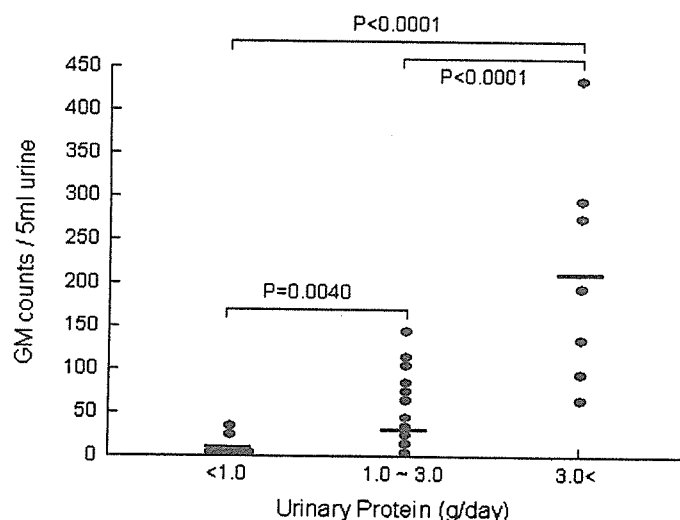


Fig.7 Relationships between the urinary lipid-laden CD68⁺ cell counts and magnitude of proteinuria

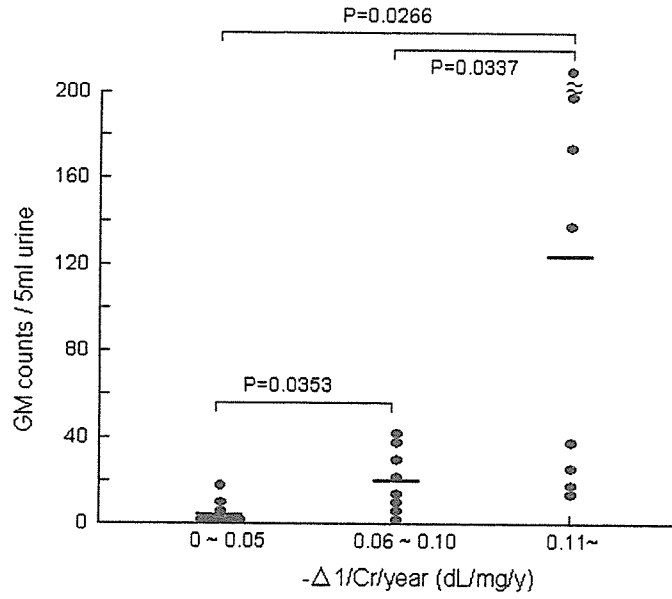


Fig.8 Relationships between the urinary lipid-laden CD68⁺ cell counts and decline in renal function identified by reciprocal serum creatinine level

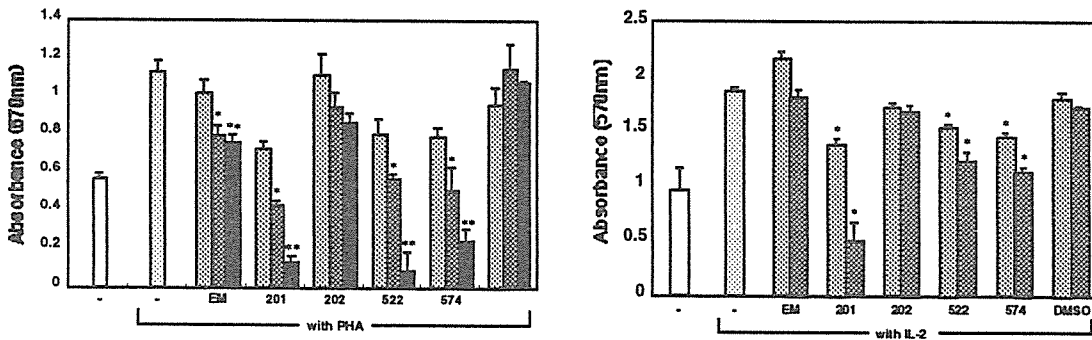


Fig.9 エリスロマイシン誘導体のヒト T 細胞の PHA 刺激 (左図) 及び活性化 T 細胞の IL-2 刺激 (右図) による増殖応答に対する影響

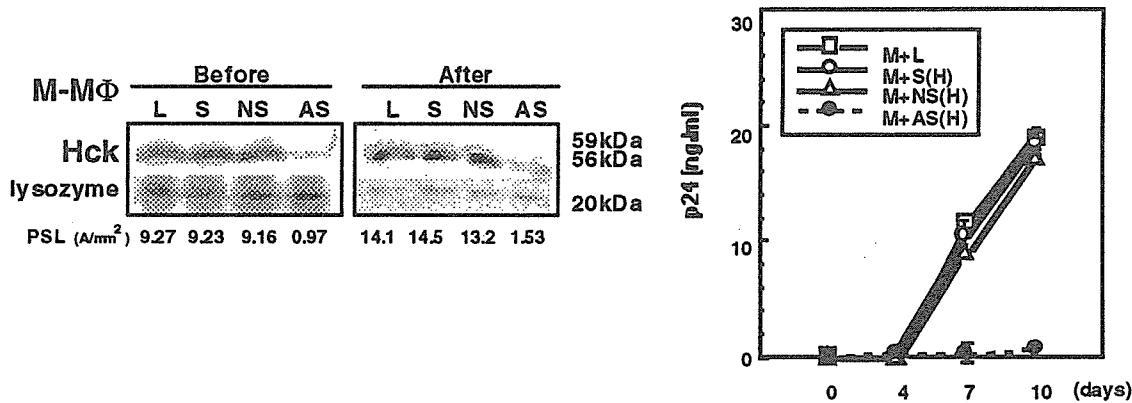


Fig.10 Hck のアンチセンス処理による-Mp の Hck 発現の抑制と HIV-1 増殖抑制

4. 考察

1) MPO-ANCA 自己抗体の解析とその応用に関する研究

① ELISA 法の抗原である MPOIII の安定供給を目指し、ヒト好中球から MPOIII を精製することを試みた。ヒト血液 1.25 L より、純度の高い MPOIII-ANCA が 1.581 mg 得られ、MPOIII の安定供給の見通しが立った。MPOIII の重要なフラグメントである H5、H6 及び H7 フラグメントの組換え cDNA 分子の塩基配列を解析した結果、GenBank に登録されているヒト MPO cDNA の塩基配列と、いずれとも完全に一致していた。これら組換え cDNA 分子から得られたリコンビナントたん白質は、エピトープ解析のための精度高い抗原であると考えられた。ネフロ試薬による MPO-ANCA 定量値と TZ 試薬による MPO-ANCA 定量値との相関性は MPO-ANCA の定量値によって異なった。用いた抗原の違いによると考えられる。そして、ネフロ試薬と TZ 試薬の臨床的意義も異なる可能性が示唆された。MPO-ANCA 定量値と H10 フラグメント-ANCA 定量値との相関係数は、MPO-ANCA 定量値が 0.4 未満の範囲及び MPO-ANCA 定量値が 0.4 以上の範囲で、それぞれの相関係数は 0.56 及び 0.81 であった。MPO を 9 フラグメントに分け、それぞれのフラグメントを ELISA 法の抗原として MPO-ANCA を定量する意義が再確認された。各フラグメントと疾患との関連は、今後解析していかなければならない。

② SCG/kj マウスでは、MPO 放出を指標とした好中球の活性化が認められたことから、腎炎進行への活性化好中球の関与が示唆された（昨年度報告）。また、尿たんぱく質 300 mg/dl 以下の腎炎発症早期には無刺激でも MPO 易放出性が認められたことから（昨年度データ）、好中球活性化が病態を進行するひとつの重要な引き金となっていることが示唆された。ヒトの腎炎の発症、進行を解析するための有用なモデルのひとつと考えることができる。

③ DSG は SCG/kj マウスの蛋白尿及び潜血を改善し、BUN を減少させた。したがって、DSG は腎機能の悪化を改善することにより、SCG/kj マウスの死亡を抑制していることが考えられる。また、DSG の作用の特徴として、半月体形成の進展を抑制することが明らかとなった。投与時には、主に 1 層の細胞性半月体が形成されていることから、形成されていた半月体の多層化及び線維化に対する抑制作用を示すことが考えられる。一方、アセアノスタチンは、SCG/kj マウスにおいて FMLP の刺激とは関係なく MPO 易放出性阻害効果を示したことから、活性化好中球が関与する腎炎治療の可能性が示唆された。

2) 真菌等感染による生体防御における好中球、MPO の役割

① PMA で活性化された MPO 欠損好中球のアポトーシスの速度が野生型好中球よりも遅く、しかもこの現象は、PMA に加えて H₂O₂ が共存しているとさらに顕著になることを発見した。また、そのアポトーシスの遅延は精製 MPO または HOCl を添加することで解消されることも観察できた。これらの結果から、MPO の触媒によって好中球から産生される HOCl が、好中球のアポトーシスに少なくとも部分的に関与していることを示している。H₂O₂、O₂⁻、OH⁻、そして HOCl などの各活性酸素種がどのように相互作用し、どのような機構で好中球の

アポトーシスを制御しているのか、さらには MPO の欠損にともなって好中球のアポトーシスが遅れることが実際に生体内の各種炎症性疾患にどのような影響を及ぼすのか、これらの疑問に答えるためには今後の研究を待たなければならない。好中球は病原微生物を殺傷すると同時に正常組織の傷害を引き起こし、これが血管炎、動脈硬化、虚血再灌流傷害、リウマチ、腎炎などの炎症性疾患の引き金になっている可能性がある。我々が世界で初めて作製した MPO ノックアウトマウスは、MPO-H₂O₂-Cl⁻系と炎症性疾患との因果関係を個体レベルで解析し、また炎症性疾患の発症機構を究明し、およびそのような疾患の治療薬を開発するのにも有用である。

② 好中球の機能低下をきたす MPO 欠損症は人においては、2000 人から 1 万人に一人の出現頻度と考えられている。しかしながら、主として食細胞の機能欠損である NADPH オキシダーゼ欠損の慢性肉芽腫症に比べて重い感染症はこれまで報告されていない。我々は、遺伝子操作により作成された MPO の欠損マウスおよび gp91phox 欠損マウスを使用することにより、今回初めて、MPO の感染抵抗性における役割を、他の NADPH oxidase との比較において個体レベルで明らかにした。真菌については、深在性真菌症で頻度の高いカンジダ、アスペルギルスについて検討した。細菌については、温泉、24 時間風呂、冷却塔などの人工環境水のアメーバの中で増殖して肺炎をひきおこすレジオネラについて検討した。カンジダ、アスペルギルスなどは非特異的防御機構により生体から排除されると考えられている。この防御機構は、活性化された肺胞マクロファージと局所に浸潤した好中球がその主役をなして、好中球の減少がこれらの病原体による感染症に対しての危険因子となっている。一方、レジオネラは肺胞マクロファージと局所に浸潤した好中球の他に、Th1 細胞主導型の抗原特異的防御機構により生体から排除され、その際 IFN- γ や IL-12 などのサイトカインが重要であると考えられている。今回の実験結果では、MPO と NADPH oxidase の役割が、鼻腔内感染する病原体の種類により異なった。すなわち、*Candida albicans* の殺菌には、MPO 産物が重要であり、その基質である過酸化水素は大部分 NADPH oxidase から供給されていると考えられた。一方、*Aspergillus fumigatus* の鼻腔内感染では、殺菌に NADPH oxidase が第一義的に重要で、MPO は補助的な役割を果たし、次亜塩素酸以外の活性酸素で十分に殺菌されていると考えられた。このことは、マクロファージや単球で増殖するレジオネラにおいてさらに著しかった。

3) ヒトマクロファージに関する研究

① GM は成熟型 macrophage の形質を有するがその由来は protein-loading cytopathy(HDL が関与?)を受けた上皮細胞(尿管上皮細胞、Bowman 上皮細胞、糸球体上皮細胞)である。尿中 GM の解析は非選択的蛋白尿に伴う protein-loading cytopathy の視標となり予後の推定、治療効果の評価に有用である。

② EM 各種誘導体による T 細胞増殖応答抑制は、CD69 の発現抑制と、IL-2R を既に発現している活性化 T 細胞の IL-2 依存性の増殖応答の抑制にみるように、初期の活性化と後期の T 細胞増殖の二つの過程に対して抑制的に作用した結果であることが知られた。炎症性疾患は T 細胞の過剰な活性化がその一因となっているため、活性化 T 細胞の細胞死を誘導して T 細胞の増殖を抑制する薬剤は有効な抗炎症剤となりうる。EM およびその誘導体は静止期 T 細胞の細胞死は誘導せず活性化 T 細胞の細胞死のみを強く誘導したこと、そして既に報告したように単球の場合も細胞死ではなく逆にその生存とマクロファージへの分化を誘導したことから、これらの薬剤が抗炎症剤として非常に有望であることがうかがえる。EM 各種誘導体の T 細胞増殖抑制活性は既に述べた単球のマクロファージへの分化誘導活性とお互い相関するが、抗菌活性やモチリン活性とは関連しないことが知られた。今回 EM の誘導体で EM 以上に強い活性が認められたことより、今後これらの薬剤を使用することにより、ターゲット分子の同定やより詳細な作用機作の解明を行うとともに、それをベースにした抗菌活性やモチリン活性を欠損したより活性の強い新たな誘導体の開発の可能性が示唆された。

③ M-M ϕ と GM-M ϕ の HIV-1 感染感受性の違いは、チロシンキナーゼ Hck 及び転写因子 c/EBP β のこれらマクロファージにおける発現の違いと関係することを昨年までに明らかにしたが、今回 Hck に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブを用いて人工的にその発現を制御する事により、HIV の感染感受性を交換させることに成功した。この結果は、M-M ϕ での HIV-1 の増殖には、Hck 蛋白の発現が必須であることを示している。ヒト単球由来マクロファージ内での HIV-1 の増殖及び増殖抑制機構の解析は、マクロファージをターゲットにした HIV-1 のあらたな治療薬の開発を検討する上でも有用な系であることが明らかになった。

5. まとめ

1) MPO-ANCA 自己抗体の解析とその応用に関する研究

① MPOIII のヒト好中球からの精製を行った。ELISA 法に必要なすべての抗原の安定供給の見通しがたった。

ネフロ試薬と TZ 試薬とは、臨床的意義に差がある可能性が示唆された。MPO を 9 フラグメントに分けそれぞれのフラグメントを ELISA 法の抗原として MPO-ANCA を定量する意義が再確認された。

② SCG/kjマウスの腎炎発症、進行に好中球の活性化が関与している可能性が示唆された。

③ DSGは、半月体が形成されているSCG/kjマウスに対して、生存率、タンパク尿、潜血、BUN値のいずれにおいても有意な効果が認められ、半月体の多層化及び線維化への進展及び硝子様血栓の形成を抑制し、治療効果を発揮した。一方、アセアノスタチン（合成 a-15:0）を尿たんぱく質陽性SCG/kjマウス末梢好中球に反応させることにより、FMLPによる刺激に関係なくMPO放出は阻害された。

2) 真菌感染等の生体防御における好中球、MPOの役割

①微生物感染などによって活性化された好中球は、殺菌の役目を終えた後は速やかにアポトーシスを起こして死に至ると言われている。この現象は、活性化された好中球による各種炎症を極力回避するために好中球に装備された重要な性質であると解釈されている。好中球のアポトーシスを制御する一因子として活性酸素が注目されているが、どの活性酸素種がどのように関与しているかは明らかではない。本研究では、MPO ノックアウトマウスの好中球を用いて、好中球から産生される HOCl が好中球自身のアポトーシスにどのように関与しているのかを探った。その結果、PMA で活性化された好中球が死に至る過程の初期段階に HOCl が関与しており、MPO を欠損しているために HOCl を産生できない好中球は、初期段階でのアポトーシスの速度が野生型好中球に比べて顕著に遅れることを明らかにした。

② 日和見感染の重要な起炎菌である真菌の *Candida albicans*、*Aspergillus fumigatus* および細菌の *Legionella pneumophila* をマウスに鼻腔内感染した。MPO 欠損マウス、gp91phox 欠損マウスを使用し、*Candida albicans* の殺菌には、MPO 産物次亜塩素酸が重要でその基質である過酸化水素は NADH oxidase により供給されていると考えられた。一方、*Aspergillus fumigatus* や *Legionella pneumophila* は次亜塩素酸以外の、スーパーオキシドおよびそれから由来する活性酸素で充分殺菌されると考えられた。

3) ヒトマクロファージに関する研究

①尿中に出現する大型のmacrophage様細胞（我々はGiant Macrophage, GMと名づけた）の形質的特徴、ならびに臨床的意義について検討した。尿中GMはCD68、25F9陽性で成熟型macrophageの形質を有する。また、GMは細胞質に脂肪を含みいわゆる脂肪球と相同である。一方、GM一部は上皮細胞の形質であるcytokeratin陽性である。尿中落下細胞から得た尿細管上皮細胞はculture 状態下でCD68抗原の発現を認める。正常腎組織ではGMは存在しないが、非選択的蛋白尿を有する進行性糸球体疾患では主に尿細管腔内に存在し、一部の尿細管上皮細胞、Bowman's capsule上皮細胞、糸球体上皮細胞陽性である。臨床的には腎症の進行速度ならびに非選択的蛋白尿の尿中排泄の程度と有意な相関を認めた。以上より、GMはprotein-loading cytopathyにともない、上皮系細胞が形質転換し成熟型macrophageの形質を有するに至ったものと考えられる。また、尿中のGMの解析はprotein-loading cytopathyの評価に役立つ。

② EMおよびその誘導体は、ヒトT細胞増殖抑制活性を有すること、これらの活性はお互い相関するが、抗菌活性やモチリン活性とは関連しないことが知られた。T細胞の増殖抑制活性は、これら薬剤がT細胞の初期の活性化（CD69の発現）および活性化T細胞のIL-2依存性の増殖の二つの過程に対して抑制的に作用した結果である。活性化T細胞のIL-2依存性の増殖抑制は、活性化T細胞の細胞死の誘導とIL-2Rを介したシグナル伝達機構の抑制が示唆された。

③ アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて Hck 蛋白の発現を特異的に抑制することにより、M-Mφでのウイルス産生を完全に抑制する事ができた。このことより、Hck 蛋白は HIV-1 の増殖に必須であり、その発現を制御する事でウイルス産生を抑制できることが明らかになった。

6. 研究発表

1) Yoko Kawai, Akiko Ishida-Okawara, Hidetoshi Okuyama, Fumiaki Kura and Kazuo Suzuki:

Modulation of chemotaxis, O₂⁻ production and myeloperoxidase release from human Polymorphonuclear leukocytes by the ornithine-containing lipid and the serine-glycine-Containing lipid of Flavobacterium. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 205-209, 2000

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

3) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Maeda, N., & Koyama, H: Differential Host Susceptibility to Pulmonary Infections with Bacteria and Fungi in Mice

Deficient in Myeloperoxidase, J Infect Dis 182: 1276-1279 (2000).

- 4) Hotta O, Yusa N, Kitamura H, Taguma Y: Urinary macrophages as activity markers of renal injury. Clinica Chemica Acta 2000:297:123-133
- 5) Oohori, M., Otoguro, K., Suzuki, K., Sunazuka, T., Obata, R., Iwai, Y. & Omura, S. ラット白血球遊走に対する14員環マクロライド系化合物の影響. J. J. Antibiotics, 53, suppl. A 85-88, 2000
- 6) Desaki, M., Takizawa, H., Ohtoshi, T., Kasama, T., Kobayashi, K., Sunazuka, T., Omura, S., Yamamoto, K. & K. Ito, Erythromycin Suppresses Nuclear Factor- κ B and Activator Protein-1 Activation in Human Bronchial Epithelial Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 267, 124-128, 2000
- 7) M. Oohori, K. Otoguro, K. Suzuki, T. Sunazuka, R. Obata, Y. Iwai, S. Omura Effects of 14-member cyclic macrolide compounds on rat leukocyte chemotaxis. J. Antibiot. 53, 1219-1222, 2000
- 8) K. Suzuki, H. Nunoi, M. Miyazaki, F. Koi Prevalence of inherited myeloperoxidase deficiency in Japan Chapter 20 in Petrides P. E., Nauseef W. M. (Eds) The peroxidase Multigene Family of Enzymes. Springer-Verlag: Berlin; 2000
- 9) 赤川清子、小室 巖、持田恵子：単球由来マクロファージの多様性、炎症と免疫 Vol. 8 360-366, 2000
- 10) 稲澤浩子、赤川清子、大堀雅子、砂塚敏明、乙黒一彦、大村 智、ヒト末梢血由来の免疫担当細胞に対するマクロライド系抗生物質の作用、The Japanese Journal of Antibiotics Vol.54 Suppl.A、139-142, 2001

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社