

- ・吉田俊治、片山雅夫、深谷修作、大島久二、鳥飼勝隆：DMARDs 併用療法の是非 内科の立場から。中部リウマチ 2001;32:103-104.
 - ・加藤賢一、片山雅夫、吉田俊治、大島久二、鳥飼勝隆：脳血流 SPECT でびまん性脳血流低下を認めた高安動脈炎の1例。中部リウマチ 2001;129-130.
 - ・吉田俊治、片山雅夫；肺高血圧症を呈する主要疾患とその病態 膠原病性肺高血圧症。日本臨床 2001;59:1164-1167.
 - ・吉田俊治：診断基準の進歩。医学のあゆみ 2001；
 - ・吉田俊治：非ステロイド性抗炎症薬 高齢者に対する使い方の要点。治療薬； 2001；
- 3.学会発表
- ・吉田秀雄、佐藤実、吉田俊治、他：NOD マウスに及ぼす環境因子の影響。第 45 回日本リウマチ学会総会、2001、東京
 - ・吉田秀雄、佐藤実、吉田俊治：サイトカインを介した特異自己抗体産生の制御 SLE 自然発症及び免疫不全マウスの自己抗体特異性へのプリスタンの影響。第 45 回日本リウマチ学会総会、2001、東京
 - ・加藤賢一、深谷修作、吉田俊治、他：慢性関節リウマチにおける少量ステロイド療法の臨床的分析 特に関節破壊抑制との関連。第 45 回日本リウマチ学会総会、2001、東京
 - ・深谷修作、吉田俊治、鳥飼勝隆、他：MCTD と overlap 症候群 MCTD 及びその他の膠原病における肺高血圧症。第 45 回日本リウマチ学会総会、2001、東京
 - ・田口博章、小松八千代、吉田俊治、他：顕微鏡的多発血管炎により Weber 症候群を呈した 1 例。第 45 回日本リウマチ学会総会、2001、東京
 - ・竹田洋祐、片山雅夫、吉田俊治、他：モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルを用いたステロイド大量療法の PH 発症にかかわる諸因子に及ぼす影響についての組織化学的検討。第 45 回日本リウマチ学会総会、2001、東京
 - ・吉田俊治、田口博章、鳥飼勝隆：JRA から RA へ 小児期から発症した成人の関節炎。第 45 回日本リウマチ学会総会、2001、東京

29. 血管内皮細胞による抗体分子の貪食：新たな血管障害機序としての位置づけ

分担研究者 能勢真人 愛媛大学医学部病理学第二講座

研究要旨：従来、抗体分子が血管を傷害する機構は、抗血管内皮細胞抗体として作用する II 型アレルギー、あるいは免疫複合体として作用する III 型アレルギーの範疇で考えられてきた。ところが、以前我々が腎炎原性抗体として MRL/lpr ループスマウスの脾細胞からクローニングした IgG3 抗体産生ハイブリドーマの抗体分子は、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) と共培養すると、明らかな抗体活性を示さないにも関わらず、HUVEC に貪食機序により積極的に取り込まれ、しかも、この分子機構には、fibronectin/integrin あるいは proteoglycan を介した、少なくとも 2 つの貪食経路が存在することが明らかとなった。これらのあらたな血管内皮細胞との相互作用は、血管炎、特に microscopic polyangitis の発症機序にも関与する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

ループス腎炎は、抗 ds-DNA 抗体に代表される自己抗体の上昇に伴って発症し、形態的には、メサンギウムの増殖、炎症細胞の浸潤による管内増殖型病変、好酸性の系蹄壁肥厚を伴うワイヤループ型病変、また、血管腔内沈着物である hyaline thrombi など多様な組織像を呈する。なかでも電子顕微鏡にて認められる糸球体血管内皮細胞下の electron dense deposit (=subendothelial deposit) は、ワイヤループ型病変への進展を規定するループス腎炎の病変のプロトタイプとされている。

その発症と進展には抗体の糸球体への沈着がクリティカルに働くと考えられており、DNA-抗 DNA 抗体などの血中免疫複合体 (circulating immune complex) の沈着、あるいは基底膜に沈着した抗原への結合という III 型アレルギーと、糸球体の成分への抗体の直接の結合という II 型アレルギーの機序が考えられている。これらの概念のもと、今までループス腎炎原性抗体の標的 (= 自己抗原) については多くの研究がなされているが、これらの抗体がどのような経路を通過して血管腔内より糸球体基底膜に到達するかについてはほとんど言

及されていない。

MRL/lpr, MRL/gld マウスは, Fas 介在性アポトーシス不全により, 糸球体腎炎, 血管炎, 唾液腺炎などを自然発症する自己免疫病モデルマウスである²⁾³⁾。中でも糸球体腎炎は病理組織像がヒトループス腎炎と類似し, 抗 DNA 抗体の上昇をはじめとする血清学的異常も伴うことからその発症機序を考える上でループスマウスとして用いられている。以前我々は, MRL/lpr マウスの糸球体腎炎の責任蛋白質は主として IgG3 アイソタイプに属することを示した⁴⁾。また, IgG3 サブクラスの抗体を産生し, SCID マウスに移入することによりループス腎炎のワイヤーループ型病変に類似する糸球体病変を誘導するクローン 7B6.8⁵⁾を MRL/lpr より, 17H8a⁶⁾を MRL/gld マウスより樹立した。これらの糸球体病変の電子顕微鏡像において, 抗体の subendothelial deposit に加えて, 糸球体血管内皮細胞の胞体内に electron dense body が認められた。この所見から, 血中抗体分子が糸球体基底膜に沈着する, すなわち subendothelial deposit 形成過程において, まず糸球体血管内皮細胞が抗体分子を取り込むこと, さらにこれらを transcytosis し, 基底膜側に放出するという段階があるという仮

説をたてた。以上から本研究では, 血管内皮細胞による腎炎原性抗体の取り込み能, 取り込み機序の解析を行った。

B. 研究方法

培養上清より精製したモノクローナル抗体を必要に応じて FITC 標識し, passage 3 から 6 のヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) と共培養後, 各顕微鏡にて検鏡した。また, FITC 標識した抗体を HUVEC と種々の条件下で共培養後, flow cytometry にて抗体の取り込み量を定量した。

C. 研究結果

精製した抗体は凝集しやすく, クリオグロブリン活性を有していた。HUVEC は FITC 標識された 7B6.8, 17H8a 抗体を著明に取り込んだ。また, 取り込まれた抗体の一部はライソゾーム酵素であるカテプシン D と融合し, その取り込みにはアクチン線維の重合を伴っていた。電子顕微鏡にて, 細胞胞体内への electron dense な物質の取り込み像と 1 μ m 以上の抗体粒子を HUVEC の形質膜の伸展 (pseudopod) が取り囲む像が認められた。これら両抗体の取り込みは RGDS 合成ペプチド, 抗フィブロネクチン抗体, 抗 β 1 インテグリン抗体にて阻害されたが, 7B6.8 抗

体の取り込み阻害は 17H8a 抗体に比べて弱かった。陽性荷電 (pI=8.1) を持つ 7B6.8 抗体の取り込みはグリコサミノグリカンであるコンドロイチン硫酸 A, 硫酸化阻害剤である chlorate にて阻害された。一方中性荷電 (pI=7.3) の 17H8a 抗体の取り込みはほとんど阻害されなかった。

D. 考察

SCID マウスに移入することにより、腎糸球体にワイヤーループ型病変, subendothelial deposit を形成するハイブリドーマクローン 7B6.8, 17H8a の産生する抗体はクリオグロブリン活性を有し, HUVEC の細胞体内に著明に取り込まれた。また, その取り込みにはアクチン重合, pseudopod の伸展を伴っていたことから phagocytosis による取り込みであると結論した。HUVEC によるこれら抗体の取り込みは RGDS ペプチド, 抗フィブロネクチン抗体, 抗 β 1 インテグリン抗体により阻害された。クリオグロブリンは凝集することによりフィブロネクチンと associat することが報告されており⁷⁾, 本抗体も HUVEC により分泌されたフィブロネクチンを介して細胞膜表面のインテグリンレセプターと相互作用を起こし, phagocytosis されると考えられた。これらによる 7B6.8

抗体の取り込み阻害は 17H8a 抗体の取り込みに比べて弱く, 7B6.8 抗体の取り込みには別の経路の関与が示唆された。7B6.8 抗体は pI=8.1 の陽性荷電抗体であり, その取り込みは硫酸化阻害剤である chlorate, コンドロイチン硫酸 A により阻害されたことから, 7B6.8 抗体の取り込みには, 細胞膜表面のグリコサミノグリカンを介してプロテオグリカンと相互作用を起こし phagocytosis されるという経路も存在すると考えられた。インテグリン, プロテオグリカンの両分子は共に細胞外マトリックスへの接着に関与し, clustering を起こすことによりアクチン線維の重合を起こすことが知られている^{8) 9) 10)}。凝集した抗体がこれらのレセプター分子と相互作用を起こした結果, レセプターの clustering, アクチンの重合が起こり, 抗体粒子は pseudopod により取り囲まれ, 最終的に細胞帯内に取り込まれると考えられた (図 1)

血中循環抗体が基底膜に沈着する機序, すなわち subendothelial deposit の形成機序として, 抗体が糸球体を循環中に限外濾過により血漿成分の濃縮が起こり, その結果クリオグロブリンの凝集が起こる。続いて, 先に述べるような機序により糸球体内皮細胞が抗体凝集物を

図1 phagocytosisのプロセス

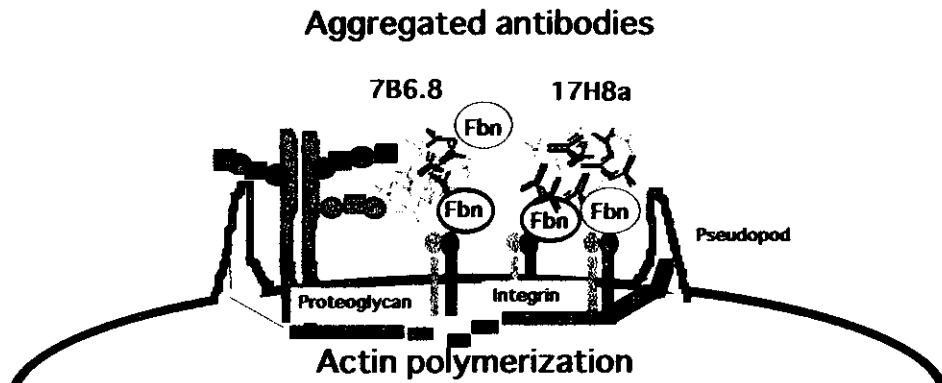


図1. phagocytosisのプロセス

- ①凝集した抗体はフィブネクチンを介してインテグリンと相互作用を起こす。一部の抗体は細胞膜プロテオグリカンとも相互作用を起こす。
- ②インテグリン、プロテオグリカンのclusteringが起こる。
- ③シグナル伝達、アクチン重合が起こる。
- ④抗体凝集物に沿って細胞突起の伸展が起こる(pseudopod)。細胞膜突起は凝集物を包み込んでいき、凝集物は最終的に細胞にphagocytosisされる。

図2 subendothelial depositのプロセス

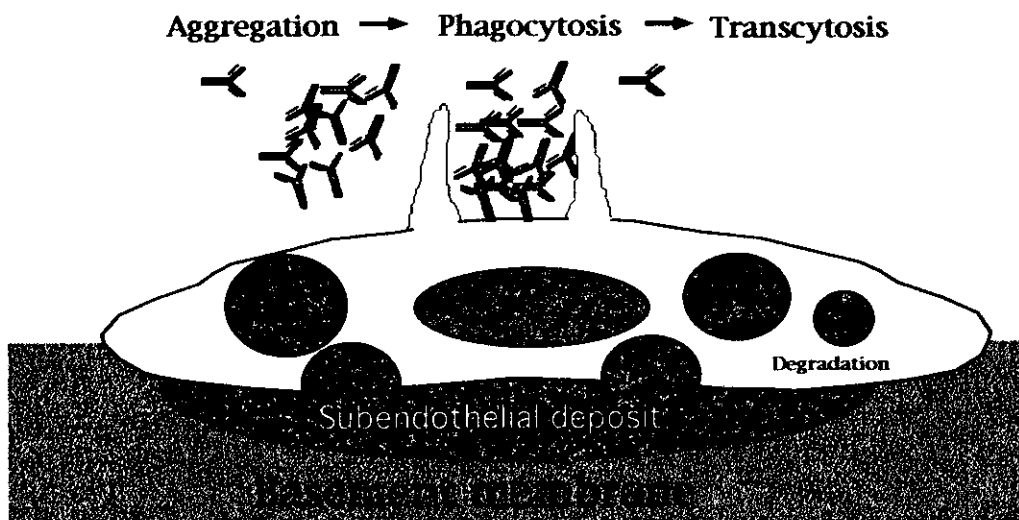


図2. subendothelial depositのプロセス

- ①糸球体灌流中に限外濾過により血漿成分の濃縮が起こり、抗体の凝集が起こる。
- ②凝集した抗体と糸球体内皮細胞膜表面の相互作用が起こり、上述の機序で抗体が内皮細胞にphagocytosisされる。
- ③取り込まれた抗体の一部は消化され、残りはtranscytosisされる。
- ④抗体は基底膜側に放出され、subendothelial depositを形成する。

phagocytosis し、一部は内皮細胞内で分解されるものの、残りは基底膜側に放出され、subendothelial deposit の形成に至るというプロセスが考えられた (図 2)。この様々な機序は、全身の微小血管でも怒りうると考えられ、従来のⅡ型Ⅲ型アレルギーのいずれにも属さない、抗体分子による新たな血管炎発症機序となりうると考えられた。

E. 結論

1. 特定の抗体は血管内皮細胞に phagocytosis される。
2. その phagocytosis の過程には、血管内皮細胞膜プロテオグリカンとインテグリンの両者、あるいはインテグリンとの相互作用を介するという少なくとも2つの経路が存在する。
3. この phagocytosis から、transcytosis へのプロセスへの進展が抗体分子の微小血管障害機序に関与すると考えられた。

〔共同研究者〕

藤井博司、中谷公彦、有田典正、寺田美穂、岩崎美津子、宮崎龍彦、小野栄夫 (愛媛大学医学部病理学第二講座)

〔参考文献〕

1. Foster-MH.: Nephritogenic

properties of lupus autoantibodies
In Lupus Nephritis, edited by Lewis EJ, Oxford University Press, 1999, pp 22-78.

2. Theofilopoulos AN, Dixon FJ.: Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 1985, 37 : 269-390.

3. Ito MR, Terasaki S, Itoh J, Katoh H, Yonehara S, Nose M.: Rheumatic diseases in an MRL strain of mice with a deficit in the functional Fas ligand. *Arthritis Rheum* 1997, 40:1054-1063.

4. Takahashi S, Nose M, Sasaki J, Yamamoto T, Kyogoku M.: IgG3 production in MRL/lpr mice is responsible for development of lupus nephritis. *J Immunol* 1991,147 : 515-519.

5. Itoh J, Nose M, Takahashi S, Ono M, Terasaki S, Kondoh E, Kyogoku M.: Induction of different types of glomerulonephritis by monoclonal antibodies derived from an MRL/lpr lupus mouse. *Am J Pathol* 1993, 143:1436-1443.

6. Nose M, Ito MR, Ono M, Terasaki S, Miyazawa M, Mori S.: Vascular lesions in mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis and their transfer. *Int J Cardiol* 1996,

54:S11-S20.

7. Levo Y.: Presence of fibronectin in cold precipitates of patients with cryoimmunoglobulinemia. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1982, 8:179-181.

8. Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada KM.: Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* 1995 267:883-885.

9. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M.: Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999, 729-777.

10. Couchman JR, Woods A.: Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J Cell Sci* 1999, 3415-3420.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuroda Y, Nakata M, Nose M, Kojima N, Mizuochi T.: Abnormal IgG galactosylation and arthritis in

MRL-Fas lpr of *MRL-FasL gld* mice are under the control of the MRL genetic background. *FEBS Letters* 507:210-214, 2001.

2. Mori H, Kitazawa R, Mizuki S, Nose M, Maeda S, Kitazawa S.: RANK Ligand, RANK and OPG expression in type II collagen induced arthritis mouse. *Histochem Cell Biol*, in press.

3. Takahashi S, Araki K, Araki M, Ito MR, Nakatani K, Fujii H, Izui S, Zassalli P, Nose M.: Suppression of experimental lupus nephritis by aberrant expression of the soluble E-selectin gene. *Pathol Int*, in press.

4. Kamogawa J, Terada M, Mizuki S, Nishihara M, Yamamoto H, Mori S, Abe Y, Morimoto K, Nakatsuru S, Nakamura Y, Nose M.: Arthritis in *MRL/lpr* mice is under the control of multiple gene loci with an allelic combination derived from the original inbred strains. *Arthritis Rheum*, in press.

5. 岩政貴久恵、小森浩章、新谷泰成、長谷川均、酒井郁也、藤田繁、吉田美奈子、能勢真人 : Calf Pain で発症したミエロペルオキシダーゼに対する抗好中球細胞質抗体 (MPO-ANCA) 弱陽性 polyarteritis Nodosa の 1 症

- 例. リウマチ 41 : 875-879, 2001.
6. 能勢真人 : 膠原病の感受性遺伝子 : MRL/lpr モデルのトータルゲノム解析. 炎症と免疫 34 : 408-416, 2001.
7. 能勢真人 : モデル動物におけるリウマチ・膠原病のゲノム解析とヒトへの応用. リウマチ科 26 : 216-224, 2001.
2. 学会発表
1. 能勢真人 : リウマチ性疾患の病理 : ゲノム解析の展望. 第 12 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会教育講演 松山 2001.10.27
2. 能勢真人 : 膠原病の病像多様性のゲノム起源. 第 51 回日本アレルギー学会総会シンポジウム 福岡 2001.10.29
3. 能勢真人 : Positional candidate genes for systemic lvasculitis on pathogenomics of murine lupus. International symposium on genomics and phenomics of vasculitis and atherosclerosis. Urayasu 2001.12.4
4. 能勢真人 : モデルマウスに学ぶ多因子疾患のゲノム病理学. 第 42 回日本組織細胞化学回総会シンポジウム 東京 2001.12.6
5. 能勢真人 : 多因子病としてのリウマチ性疾患の原因遺伝子 : モデルマウスゲノムからのアプローチ. 第 29 回日本臨床免疫学会総会シンポジウム 大阪 2001.12.10
6. 宮崎龍彦, 能勢真人 : 腎炎感受性遺伝子とオステオポンチン蛋白多型. 第 90 回日本病理学会総会 東京 2001.4.6
7. 路靈敏, 中谷公彦, 宮崎龍彦, 寺田美穂, 能勢真人 : 野生マウスに見出されたループス腎炎抵抗性遺伝子座と補体制御因子 CD59. 第 90 回日本病理学会総会 東京 2001.4.6
8. 有田典正, 岡田和代, 能勢真人 : PM/DM に結合した急速進行性間質性肺炎における HCMV の役割についての考察. 第 90 回日本病理学会総会 東京 2001.4.7
9. 山田明弘, 宮崎龍彦, 曲衛敏, 路靈敏, 恩地森一, 能勢真人 : 腎内皮血管のキャリパーに基づく血管炎感受性遺伝子の解析 : 血管炎の病像多様性の起源. 第 45 回日本リウマチ学会総会 東京 2001.5.15
10. 岩崎美津子, 工藤恵, 有田典正, 大石久史, 宮崎龍彦, 能勢真人 : 肺動脈炎をきたした全身性サルコイドーシスの一例. 第 12 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会 松山 2001.10.27
11. 大石久史, 鴨川淳二, 水木伸一, 椿崇仁, 宮崎龍彦, 小野栄夫, 山本晴康, 能勢真人 : 関節炎自然発症モデルマウスを用いた関節炎のポリジー

ン遺伝の解析：DBA/1 自然発症マウスに対する MRL マウス背景遺伝子の促進効果. 第 31 回日本免疫学会総会 大阪 2001.12.11

12 藤井博司、中谷公彦、宮崎龍彦、有田典正、小野栄夫、佐々木毅、能勢真人：血管内皮細胞による抗体分子の phagocytosis：ループス腎炎の新たな発症機序. 第 31 回日本免疫学会総会 大阪 2001.12.11

13. Miyazaki T, Qu WM, Maune M, Sawasaki T, Endo Y, Nose M.: A novel susceptible locust lupus nephritis in MRL/lpr mice: Implication of allelic opolymorphism of osteopontin.

XI th International Congress of Immunology, Stockholm, 2001.7

14. Nose M., Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Qu WM, Lu LM, Mori S, Nakatsuru S.:

Complex pathological manifestations of autoimmune diseases in MRL/lpr mice are under the control of a different combination of polygenes. XIth International Congress of Immunology, Stockholm, 2001.7

15. Fijii H, Natakani K, Miyazaki T, Arita N, Sasaki T, Nose M.: A novel mechanism of glomerular injury by antibodies in a lupus model:

Endocytosis of cationic antibodies by endothelial cells. XIth International Congress of Immunology, Stockholm, 2001. 7

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

30. 低酸素・再酸素化関連分子と血管新生との関連性 についての検討

分担研究者 由谷親夫 国立循環器病センター臨床検査部病理

[研究論旨]

我々は、以前より虚血および低酸素でのストレス応答を細胞レベルで解析し、病態との関連性を検討してきた。その過程で低酸素誘導分子として ORP150 を、また低酸素・再酸素化誘導分子として RA301/Tra2 β を見いだした。以前より双方の分子に関連して血管炎との関連性を検討してきたが、今回は、低酸素により誘導されると考えられる血管新生との関連性について ORP150 を中心として検討した。

A. 研究目的

我々は、虚血および低酸素でのストレス応答を細胞レベルで解析し、病態との関連性を検討してきた。その過程で2つの分子 ORP150 および RA301/Tra2 β を見いだした。150 kD oxygen-regulated protein (ORP150) は、まずラット・アストロサイトの低酸素負荷により誘導される蛋白として同定され、動脈硬化巣におけるマクロファージおよび平滑筋細胞、腫瘍細胞における発現が確認された。また、虚血に伴う細胞死の防御因子としての役割も培養系で確認された。脳神経系での検討では、神経細胞の虚血における保護因子としての役割が認められた。

また一方、RA301 は、rat astrocytes を低酸素暴露し、再酸素化した直後に誘導される遺伝子として同定され、RNA splicing factor としての motif を有し、Drosophila の性決定遺伝子である Tra2 homologue の一つである Tra2 β と同一のものである。Human Tra2 β は、RA301 と同一であり、RNA

splicing factor としての活性が証明された。血管病変における発現を検討したところ、ヒト動脈硬化巣の平滑筋の一部とラット血管障害モデルにおける新生内膜に発現を認めた。また、培養細胞レベルでは、平滑筋細胞においてラジカルおよび増殖因子の刺激により MAP kinase cascade が動き、その下流で RA301/Tra2 β が増殖に関与することが判明した。従来より、低酸素により血管新生が誘導される事はよく知られている。そこで、まず、低酸素にて誘導される ORP150 と血管新生との関連を検討した。同時に、早期再酸素化の指標である RA301/Tra2 β についても血管新生との関連性を考察した。

B. 研究方法

1) 血管新生のモデルとして腫瘍および創傷治癒の系を考えた。まず、血管に富む腫瘍としてヒト膠芽腫の標本で ORP150 および VEGF の局在を免疫免疫染色で検討した。双方の局在は非常に似通っていたため、培養系での検討を行った。ラット脳腫瘍

glioma 細胞を用いた。C6 glioma に ORP150 sense/antisense 遺伝子を導入し、VEGF の細胞内輸送および分泌におよぼす影響の検討を行った。また、遺伝子導入した細胞を移植して造腫瘍性を検討した。

さらにヒト培養マクロファージに ORP150 sense/antisense 遺伝子を導入した場合も VEGF の細胞内輸送および分泌におよぼす影響の検討を行った。同時に動物の創傷治癒モデルにおける治癒過程と ORP150 との関連性を検討した。

2) RA301/Tra2 β は、培養細胞における検討により、細胞増殖との密接な関係が示唆された。そこで、血管内皮に注目して、腫瘍・創傷治癒・器質化血栓等のヒト標本を用いて発現の検討を行った。

C. 研究結果

1) ORP150 および VEGF は、ヒト脳腫瘍およびヒト創傷治癒組織において局在の類似性をみた。C6 glioma において低酸素状態において ORP150 の発現を抑えると、VEGF の小胞体における局在が増強し、細胞外への分泌が抑制されることが判明した。また、造腫瘍性の検討では、ORP150 の発現を抑えることにより、移植後しばらくたってからの血管新生の抑制とともに腫瘍の退縮をみた。ヒト培養マクロファージにおいても低酸素状態において ORP150 および VEGF は、密接な関係にあり、ORP150 の発現により VEGF の細胞内輸送および分泌が促進されることが示された。さらにその作用は NO 存在化で増強されることも証明された。続いて創傷治癒モデルにおいては、ORP150 の発現を抑えることにより治癒は遷延化し、発現の増強により、早期の治癒をおこした。

2) 培養血管内皮細胞においては、低酸素・再酸素化により細胞増殖が著明に惹起され、同時に、RA301/Tra2 β が mRNA および蛋白レベルで誘導されることが示されているが、腫瘍・創傷治癒・器質化血栓等の血管内皮の増殖が観察されるヒト標本を用いて RA301/Tra2 β の発現の検討を行ったところ、血管内皮細胞に著明な免疫原性をみた。

D. 考察

ORP150 は、小胞体の分子シャペロンであるが、とくに低酸素状態では、VEGF の細胞内輸送を増強することで血管新生を促進していると考えられる。RA301/Tra2 β に発現は、細胞増殖と関連し、血管内皮の増殖にも関及していると考えられる。

E. 結論

腫瘍における血管新生および創傷治癒における血管新生の双方の面から検討し、VEGF の小胞体からの細胞内輸送を介した血管新生における役割が判明した。低酸素により誘導される血管新生において、ORP150 が VEGF の chaperone として非常に重要な役割を果たしており血管新生の新しい標的となりうることを示唆された。RA301/Tra2 β については、今後、血管新生を含めた組織修復との関連性について検討を行って行きたい。

F. 参考文献

- 1) Tamatani M, Matsuyama T, Yamaguchi A, Mitsuda N, Tsukamoto Y, Taniguchi M, Che YH, Ozawa K, Hori O, Nishimura H, Yamashita A, Okabe M, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S, Tohyama M: ORP150 protects against

- hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nat Med* 2001;7:317-323
- 2) Ozawa K, Tsukamoto Y, Hori O, Kitao Y, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S: Regulation of tumor angiogenesis by ORP150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone. *Cancer Res* 2001;61:4206-4213
 - 3) Ozawa K, Kondo T, Hori O, Kitao Y, Stern DM, Eisenmenger W, Ogawa S, Ohshima T: Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin Invest* 2001;108:41-50
 - 4) Semenza GL: Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest* 2001;108:39-40
 - 5) Matsuo N, Ogawa S, Imai Y, Takagi T, Tohyama M, Stern D, Wanaka A: Cloning of a novel RNA binding polypeptide (RA301) induced by hypoxia/reoxygenation. *J Biol Chem* 1995, 270:28216-28222
 - 6) Tacke R, Tohyama M, Ogawa S, Manley JL: Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing. *Cell* 1998, 93:139-148
 - 7) Tsukamoto Y, Matsuo N, Ozawa K, Hori O, Higashi T, Nishizaki J, Tohnai N, Nagata I, Kawano K, Yutani C, Hirota S, Kitamura Y, Stern DM, Ogawa S: Expression of a novel RNA-splicing factor, RA301/Tra2beta, in vascular lesions and its role in smooth muscle cell proliferation. *Am J Pathol* 2001;158:1685-1694
- G. 健康危険情報
なし
- H. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Saito F, Nakazato M, Akiyama H, Kitahara Y, Date Y, Iwasaki Y, Harasawa S, Hisaki R, Horie T, Kinukawa N, Watanabe T, Sakamaki T, Yagi H, Hoshi Y, Yutani C, Kanmatsuse K: A case of late onset cardiac amyloidosis with a new transthyretin variant (lysine 92). *Hum Pathol* 32:237-239, 2001
 - 2) Yoshihara F, Nishikimi T, Okano I, Horio T, Yutani C, Matsuo H, Takishita S, Ohe T, Kangawa K: Alterations of intrarenal adrenomedullin and its receptor system in heart failure rats. *Hypertension* 37:216-222, 2001
 - 3) Zhou R-H, Kokame K, Tsukamoto Y, Yutani C, Kato H, Miyata T: Characterization of the human NDRG4, is specifically expressed in brain and heart. *Genomics* 73:86-97, 2001
 - 4) Imakita M, Yutani C, Strong JP, Sakurai I, Sumiyoshi A, Watanabe T, Mitsumata M, Kusumi Y, Katayama S, Mano M, Baba S, Mannami T, Masuda J, Sueishi K, Tanaka K: Second nation-wide study of atherosclerosis in infants, children and young adults in Japan. *Atherosclerosis* 155:487-497, 2001

- 5) Ikeda Y, Yutani C, Huang Y, Masuda H, Yuasa T, Kawaguchi O, Hunyor SN: Histological remodeling in an ovine heart failure model resembles human ischemic cardiomyopathy. *Cardiovascular Pathology* 10:19-27, 2001.
 - 6) Tsukamoto Y, Matsuo N, Ozawa K, Hori O, Higashi T, Nishizaki J, Tohnai N, Nagata I, kawano K, Yutani C, Hirota S, Kitamura Y, Stern DM, Ogawa S: Expression of a novel RNA-splicing factor, RA301/Tra2 β , in vascular lesions and its role in smooth muscle cell proliferation. *Am J Pathol* 158:1685-1694, 2001.
 - 7) Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, Hosoda H, Shimizu W, Yamagishi M, Oya H, Koh H, Yutani C, Kangawa K: Elevated Circulating Level of Ghrelin in Cachexia Associated with Chronic Heart Failure. Relationships between Ghrelin and Anabolic/Catabolic Factors *Circulation* 104:2034-2038, 2001
 - 8) Kereveur A, Enjyoji K, Masuda K, Yutani C, Kato H: Production of Tissue Factor Pathway Inhibitor in Cardiomyocytes and Its Upregulation by Interleukin-1. *Thromb Haemost* 86:1314-1319, 2001
 - 9) Mizuno R, Fujimoto S, Yamaji K, Yutani C, Hashimoto T, Nakamura S: Myocardial ultrasonic tissue characterization for estimating histological abnormalities in hypertrophic cardiomyopathy: Comparison with endomyocardial biopsy findings. *Cardiology* 96:16-23, 2001
 - 10) Yamaji K, Fujimoto S, Yutani C, Ikeda Y, Mizuno R, Hashimoto T, Nakamura S: Does the progression of myocardial fibrosis lead to atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy? *Cardiovasc Pathol* 10:297-303, 2001
2. 学会発表
- 1) Yutani C : Histopathologic evaluations in patients with thoracic aorta endografting. Ith International Summit on Thoracic Aortic Stent Endografting. March 2-3, 2001. Tokyo, Japan
 - 2) Ikeda Y, Yutani C: Pathology of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. WHF/ISCP Joint International Symposium on Cardiomyopathy in the 21st Century. March 27-31, Kyoto, Japan
 - 3) Yutani C, Ishibashi-Ueda H, Suzuki T and Kodama A : Histologic evidences of foreign body granulation tissue and de novo lesions in patients with coronary stent restenosis, 4th International Congress on Coronary Artery Disease. October 24, 2001. Prague, Czech Republic
 - 4) Xin-hua Yin, Yutani C: Suppression of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Using Adenovirus Mediated Wild-type p53 Gene Delivery. XXIII International Congress of The Myocardial Ischemia. August 10, 2001. Seattle, U. S. A
- I. 知的財産権の出願・登録状況
なし

31. マウス胚性幹細胞(ES)由来 Fik1 陽性細胞を用いた in vivo 血管新生

分担研究者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学免疫学病害動物学
共同研究者 岳野光洋 聖マリアンナ医科大学免疫学病害動物学
宮城 司 聖マリアンナ医科大学免疫学病害動物学

研究要旨 血管炎症候群では、免疫学的機序や動脈硬化・炎症により血管の障害が引き起こされる。ES 細胞は身体各臓器に分化する多能性の幹細胞で多彩な臨床応用が想定されている。マウス ES 細胞を用いて血管系の再生を行うことを目指し、血管系の幹細胞を分化誘導しその分化調節機構の解析とモデル動物を用いた治療応用の基礎的検討を行った。マウス ES 細胞は胎児線維芽細胞との共培養により増殖させ十分量の ES 細胞を回収した。未分化 ES 細胞はメチルセルロースを用いた培養プレート上で3次元的に培養した。分化誘導後の細胞表面抗原はフローサイトメーターにより評価した。マウス ES 細胞(H2Kb)は4日間メチルセルロース上で浮遊培養を行うことで胚様体(Embryoid body; EB)を形成した。この細胞では E-cadherin(非中胚葉系細胞のマーカー)の発現は強く抑制され、約半数が Fik1 陽性の血管芽細胞に分化した。この細胞を致死量放射線照射した SCID マウス(H2Kd)に静注すると、骨髄での造血が再建された。さらにレシピエント脾臓では血管様構造物の出現を認めた。この血管様構造物は、H2Kb 陽性、VE-cadherin 陽性で ES 細胞由来と考えられた。ES 細胞から Fik1(VEGF receptor)陽性細胞を分化誘導し、静脈内に投与することで in vivo で血管を新生させることが可能になった。

A. 目的

血管炎症候群では、免疫学的機序や炎症・動脈硬化により血管の障害が引き起こされる。ES細胞はほぼ無限の増殖能を持ち、身体各臓器に分化する多能性の幹細胞で多彩な臨床応用が想定されている。ここではES細胞を用いて血管系の再生を行うことを目指し、まず血管系の幹細胞を分化誘導し、その分化調節機構の解析を行い、さらに分

化誘導した血管系細胞を用いてモデル動物での治療応用の基礎的検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

細胞培養

マウス ES 細胞株 E14.1 (Dr. Klaus Rajewsky から分与) を用いた。未分化な状態を維持するため、ES 細胞は胎児線維芽細胞上で leukemia inhibitory factor

(LIF)存在下に培養した。ES細胞の分化を誘導する実験では、コラーゲン、ゲラチン、ラミニン、あるいは0.8%メチルセルロース含み、LIFを含まない培地で4日間培養した。この培養によりES細胞はembryoid body、EBと呼ばれる球状の細胞塊を形成する。このEBを回収したのちEDTA処理によりsingle cellとした。

細胞表面抗原の解析

未分化および分化誘導した細胞はEDTA処理によりsingle cellとした後、表面抗原を各種モノクローナル抗体で染色後フローサイトメーターを用いて評価した。

SCID マウスへの移植実験

Flk1を発現した分化誘導後の細胞を抗Flk1モノクローナル抗体で染色し、auto MACS法を用いてFlk1陽性と陰性に分画した。Flk1陽性分画、陰性分画、両者を含む非分画細胞を800rad放射線照射をしたSCIDマウスに経静脈的に投与した。投与後14日間、体重の推移と末梢血中のCD45陽性細胞数をもとに造血機能再建の評価をした。肝臓、脾臓、骨髄を回収し、血管の形成を組織学的、免疫組織学的に検討を加えた。

C. 研究結果

近年の発生学の進歩から、血管内皮細胞は中胚葉由来の血球血管芽細胞(hemangioblast)から分化することが明らかにされた。胎生期の卵黄嚢において血球血管芽細胞がBlood islandを形成した後、辺縁部の細胞は内皮細胞に分化し、中心部の細胞は血球細胞に分化す

ると考えられている。この血球血管芽細胞に特異的なマーカーとしてFlk1(fetal liver kinase 1)が知られている。Flk1のリガンドはVEGF(vascular endothelial growth factor)で、Flk1陽性細胞は分化するとVE-cadherin陽性の血管内皮とCD45陽性の血液細胞に分化すると考えられている。そこで、本年度は未分化ES細胞からFlk1陽性細胞の分化誘導とそのin vivoでの投与実験を行なった。

まず、未分化ES細胞をコラーゲン、ゲラチン、ラミニン、メチルセルロースなどの様々な培養条件下で、LIFを含まない培地で数日間培養した後、各種の細胞表面分子の解析を行なった。その結果、0.8%メチルセルロース存在下に4日間培養した場合のみに、造血系と血管系の表面抗原を発現することが明らかになった。

即ち、Flk1は未分化な状態では陰性だがメチルセルロースで分化誘導後は56.5%まで増加した(図1)。造血幹細胞のマーカーとして知られているCD34とほとんどの造血系のlineage 特異的なマーカーは分化誘導前後で陰性のままで変化を認めなかった。E14細胞株の起源である129系マウスのMHCクラスIに一致するH2KbでES細胞を染色すると未分化な状態では陰性だったH2Kbが分化誘導後にはその発現を認めた。分化誘導前後の細胞をメイギムザ染色を行なった(図2)。分化後には付着性を持つ細胞と円形の浮遊細胞が混在していた。

E-cadherinは非中胚葉系の細胞に発現している接着因子で、未分化なES細胞に

発現する。E-cadherinの発現をウエスタン法で検出する血管芽細胞へ分化するにつれてE-cadherinが減少した。

以上の成績から、血管芽細胞と報告されているFlk1陽性細胞が分化誘導できたので、これをマウスに投与しその後の分化を観察した。放射線照射後のSCIDマウスにFlk1陽性細胞、Flk1陰性細胞、あるいはその両者を含む非分画細胞を経静脈的に移入した。静脈投与後8日目と14日目のマウス末梢血中の白血球をフローサイトメーターで解析したところ、Flk1陽性細胞と非分画細胞を移入したマウスでは14日間通して白血球数は比較的高値を保っていた。しかしFlk1陰性細胞を投与したマウスでは白血球数は減少していた。この成績から、骨髓造血能は非分画細胞群、Flk1陽性細胞群に含まれることが分かった。

次に移入マウスの組織学的検討を行った。非分画細胞群、Flk1陽性細胞群を投与したマウスの脾臓ではそのサイズと重量が著しく増加していた。さらに組織学的に血管様の構造物の出現を認めた。これはES細胞由来のH2Kb陽性で、さらに血管内皮細胞のマーカーであるVE-cadherin発現していた。

D. 考察

現在、血管再生、血管新生を行い、治療に役立てようとする検討が多方面から進められている。一つは、血管新生を促すサイトカインであるVEGFやHGFの発現ベクターを投与する遺伝子治療であり、内因性の血管新生の促進に働く。もう一つは血管の前駆細胞を精製・純化した後、生体に投与・移植して外因性に発生血管を植え付ける方

法である。本研究ではES細胞から血管系細胞を分化誘導して、これをin vivoに投与し、実際に血管構造を形成させることが可能であるのか検討した。今回の検討は、マウスを用いた成績であるが、ES細胞から血管系の前駆細胞と考えられるFlk1陽性細胞を分化誘導できることとこれを用いて、in vivoで血管新生させることが可能であることを示した。今後は、目標とする組織・臓器にどのようにターゲットして血管を新生させるか、あるいは大動脈のような大血管を作成する方法の確立など多くの課題がある。

E. 結論

マウスES細胞を用いて血管芽細胞と考えられる造血系と血管系への分化能を持ったFlk1陽性細胞を分化誘導することができた。この細胞をSCIDマウスに移植することで、脾臓内にES細胞由来の血管構造を形成し、これは血管内皮系のマーカーを発現した。この細胞を用いて血管炎モデルマウスの治療研究を行なうことが可能になった。

[参考文献]

- Baron M. Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. *Differentiation*. 2001;68:175-85.
- Feraud O, Cao Y, Vittet D. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab Invest*. 2001;81:1669-81.
- Cho SK, Bourdeau A, Letarte M, Zuniga-Pflucker JC. Expression and function of

CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. *Blood*. 2001;98:3635-42.

Fujimoto T, Ogawa M, Minegishi N, Yoshida H, Yokomizo T, Yamamoto M, Nishikawa S. Step-wise divergence of primitive and definitive haematopoietic and endothelial cell lineages during embryonic stem cell differentiation. *Genes Cells*. 2001;6:1113-27.

Baron MH. Molecular regulation of embryonic hematopoiesis and vascular development: a novel pathway. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10:587-94.

Liang D, Chang JR, Chin AJ, Smith A, Kelly C, Weinberg ES, Ge R. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. *Mech Dev*. 2001;108:29-43.

Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. 2000;408:92-6.

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
誌上発表

1. Yokoe T, Suzuki N, Minoguchi K, Adachi M, Sakane T.: Analysis of IL-12 receptor β 2 chain expression of circulating T lymphocytes in patients with atopic asthma. *Cell Immunol* 208 : 34-42, 2001.

2. Suzuki N, Takeno M, Takeba Y, Miyagi T, Ye JM, Nagafuchi H, Sakane T.: Induction of differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells in culture. I.

Treatment with BMP-2 and BMP-4 induces chondrocyte differentiation. *The St. Marianna Medical Journal* 29 : 25-31, 2001.

3. Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai A, Sakane T.: Endorphin and enkephalin ameliorate excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 10, 2176-2183, 2001.

4. Kasiwakura J, Suzuki N, Takeno M, Itoh S, Oku T, Sakane T, Nakajin S, Toyosima S.: Evidence of autophosphorylation in Txk: Y91 is autophosphorylation site. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, in press, 2001.

5. Takeba Y, Nagafuchi H, Takeno M, Kasiwakura J, Suzuki N. : Txk, a member of non-receptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell specific transcription factor and regulates IFN-gamma gene transcription. *J Immunol*, in press, 2001.

6. Mihara S, Suzuki N, Takeba Y, Soejima K, Yamamoto Y.: Combination of molecular mimicry and aberrant autoantigen expression is important for development of anti-Fas ligand autoantibodies in patients with SLE. *Clin Exp Immunol*, in press, 2001.

7. 高井憲治, 小川賢一, 岳野光洋, 鈴木登, 坂根剛 : 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学教室において過去8年間に経験した寄生虫・衛生動物疾患の検討, 聖マリアンナ医科大学雑誌 29: 15-20, 2001.

8. 武半優子, 鈴木登 : 神経ペプチドによる炎症の制御, *臨床免疫* 35: 314-319, 2001.

9. 鈴木登 : 医学と医療の最前線. 膠原病と神経・内分泌・免疫系の関わり, *日本内科学会雑誌* 90: 153-161, 2001.

10. 鈴木登：膠原病における進歩と今後の展望:全身性エリテマトーデス患者自己抗体産生細胞のアポトーシス回避機構の解析とその是正, 炎症・再生 2001;21:635-8.
 11. 鈴木登：ループス腎炎発症関連遺伝子とレセプターエディティング, 炎症・再生 2001;21:557-63.
 12. 鈴木登: 膠原病-診断治療の進歩 Behcet 病, 医学のあゆみ 2001;199:411-5.
 13. 鈴木登：RAにおけるRAG発現異常, RA&セラピー 印刷中 2001.
 14. 鈴木登：TxkによるTh1サイトカイン発現誘導, 臨床免疫 2001;36:687-93.
 15. 鈴木登、武半優子: オピオイドペプチドと関節炎, リウマチ科 2001;25:523-7.
 16. 橋本博史・吉木敬・鈴木和男・徳永勝士・有村義宏・吉田雅治・沼野藤夫・安田慶秀・中林公正・小林茂人・居石克夫・津坂慶政・中島伸之・重松宏・小林靖・由谷親夫・能勢真人・尾崎承一・金井芳之・濱野慶朋・鈴木登・松岡康夫・吉田俊治・川崎富夫・森下竜一・東みゆき・西村泰治・稲葉裕・福原俊一：厚生労働省厚生科学特定疾患・難治性血管炎に関する調査研究報告, 日本臨床免疫学会誌 2001;24:336-46.
- 学会発表
1. Miyagi T, Suzuki N, Ye JM, Takeno M, Nagafuchi H, Takahashi M.: Successful induction of CD45+ leukocytes in the SCID mice engrafted with embryonic stem (ES) cell derived hematopoietic stem cells. The 30th annual meeting of the international society for experimental hematology, Tokyo, Japan, 2001.
 2. Takeno M, Nagafuchi H, Suzuki N, Ye JM, Matsuda H, Sakane T.: Frequency of IL-12 receptor bearing T cell is a simple marker to monitor the disease activity in Behcet's disease, American College of Rheumatology: 65th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, 2001.
 3. Ciba S, Miyagi T, Nagafuchi H, Takeno M, Suzuki N.: Development of cartilage tissue from mouse Embryonic stem cell : possible therapeutic application for degenerative and inflammatory articular diseases, American College of Rheumatology: 65th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, 2001.
 4. 鈴木登, 岳野光洋, 武半優子：シンポジウム. リウマチ性疾患におけるTh1/Th2 バランスとその制御 (txk 遺伝子発現制御) 第45回日本リウマチ学会総会, 2001.
 5. 鈴木登, 武半優子, 太田伸男, 青柳優：シンポジウム. 血管炎症候群における cANCA 対応抗原エピトープの解析, 第45回日本リウマチ学会総会, 2001.
 6. 鈴木登：シンポジウム. ステムセルからのティッシュエンジニアリング, 再生医療公開シンポジウム. 人工角膜の設計とベンチャー化. 東京歯科大学市川総合病院, 2001.
 7. Suzuki N：Symposium. Regulation by Txk, a member of Tec family tyrosine kinase, of Th1 immune responses *in vitro* and *in vivo*.: MESS symposium, Advance in immunology and allergy research in skin. 日本皮膚科学学会第108回広島地方大会, 2001.
 8. 武半優子, 鈴木登, 永瀨裕子, 岳野光洋, 金子敦史, 浅井富明：ワークショップ. ヒト Th1 細胞特異的 Tec family

チロシンキナーゼ蛋白、Txk の機能解析と各種免疫疾患における発現, 第 45 回日本リウマチ学会総会, 2001.

9. 鈴木登, 武半優子, 岳野光洋, 永瀧裕子 : マウス胚性幹細胞 (embryonic stem cell;ES) より誘導した軟骨細胞を用いた関節炎モデルの治療. I.軟骨細胞の分化誘導, 第 45 回日本リウマチ学会総会, 2001.

10. 岳野光洋, 鈴木登, 永瀧裕子, 松田隆秀, 坂根剛, : ベーチェット病患者 T リンパ球における IL-12 受容体の発現と Th1 型免疫応答, 第 45 回日本リウマチ学会総会, 2001.

11. 横江琢也, 美濃口健司, 小田成人, 田中明彦, 鈴木登, 足立満 : 急速減感作療法 RIT 前後での気管支喘息患者 CD 4 陽性 T リンパ球における IL-12 receptor β 2 chain 発現の検討, 第 13 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2001.

12. 武半優子, 岳野光洋, 鈴木登 : ヒト Th1 細胞特異的 Tec family チロシンキナーゼ蛋白、Txk の機能解析と各種免疫疾患における発現, 第 22 回日本炎症・再生医学会, 2001.

13. 宮城司, 葉俊明, 岳野光洋, 永瀧裕子, 鈴木登 : ES 細胞の造血系細胞への分化誘導と骨髄移植への応用, 第 22 回日本炎症・再生医学会, 2001.

14. 鈴木登, 岳野光洋, 永瀧裕子, 武半優子, 宮城司, 葉俊明 : マウス胚性幹細胞(embryonic stem cell)より誘導した軟骨細胞を用いた関節炎モデルの治療. I-軟骨細胞の分化誘導, 第 22 回日本炎症・再生医学会, 2001.

15. 岳野光洋, 鈴木登, 永瀧裕子, 松田隆秀, 坂根剛 : ベーチェット病患者 T

細胞における IL-12 受容体の発現と疾患活動性との関連, 第 22 回日本炎症・再生医学会, 2001.

16. 武半優子, 脇坂秀繁, 岳野光洋, 金子敦史, 浅井富明, 鈴木登 : 慢性関節リウマチ (RA)患者関節滑膜細胞のアポトーシス抗原の作用, 第 29 回日本臨床免疫学会, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

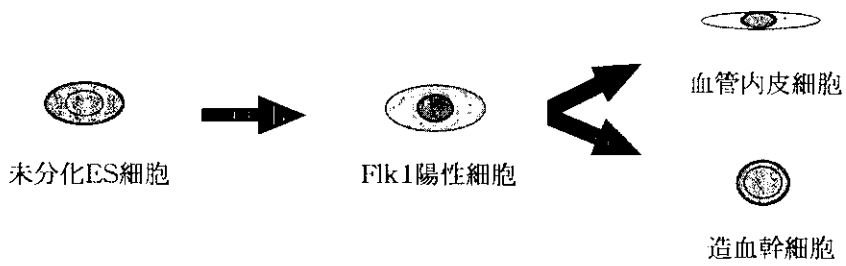


図1. 未分化ES細胞からの血管内皮細胞の分化

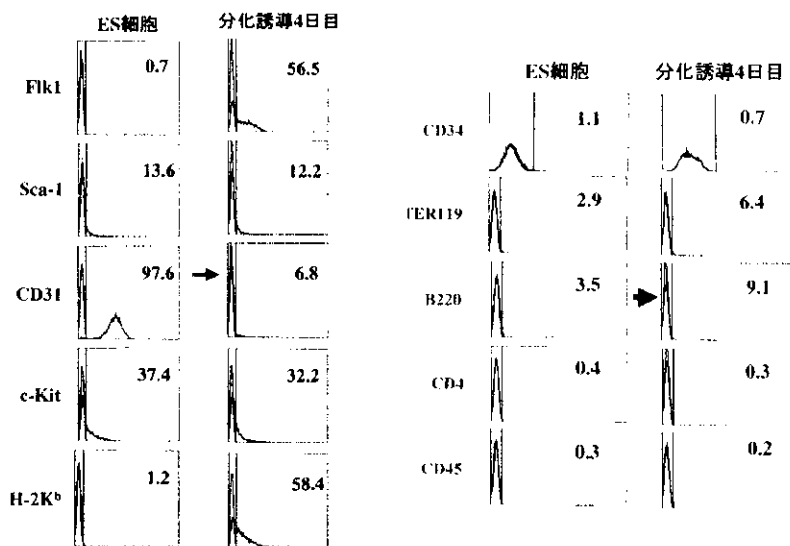


図2. メチルセルロース培養前後の細胞表面抗原の発現

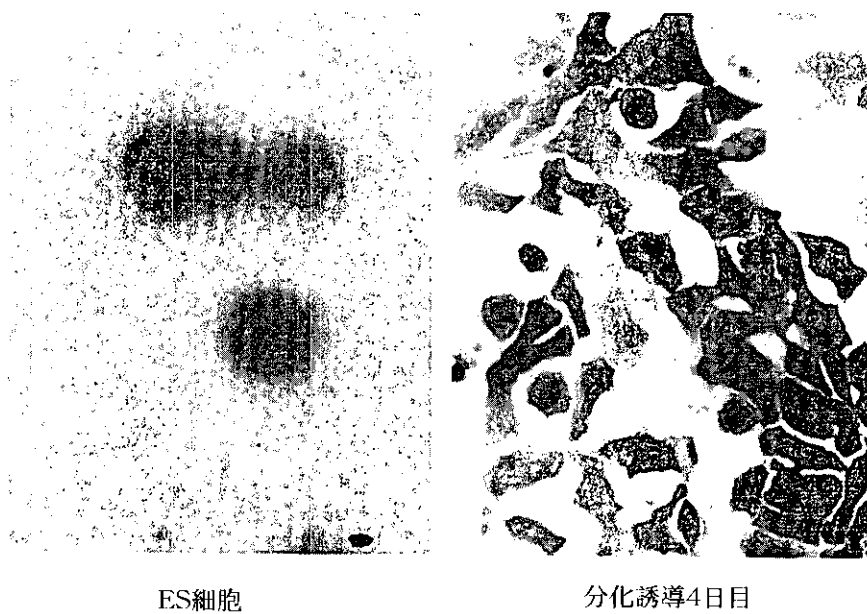


図3. メチルセルロース培養前後の細胞のメイギムザ染色