

200/0865

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

難治性血管炎に伴う多臓器不全に係る  
病態の解明および治療法の  
開発に関する研究

(H13-特疾-01)

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成14 (2002) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括報告

難治性血管炎に伴う多臓器不全に係る病態の解明および治療法の開発に関する研究

鈴木和男（国立感染症研究所生物活性物質部） . . . . . 1

## II. 分担研究者報告

### 1. 発症機構解析班

1) 炎症における *carboxypeptidase R*(CPR)の役割に関する研究

岡田秀親（名古屋市立大学医学部分子医学研究所） . . . . . 11

2) 好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延に関する研究

笹田昌孝（京都大学医療技術短期大学部） . . . . . 17

3) 多臓器不全の発症機構における T 細胞抗原受容体（TCR）多様性からの T 細胞の分子生物学的検討

木村暢宏（福岡大学医学部第一内科） . . . . . 21

4) 超高速度高感度ビデオカメラシステムを用いた微小循環観察研究

関塚永一（国立埼玉病院） . . . . . 25

### 2. モデル動物・プローブ班

1) 炎症、免疫応答に於ける *IL-1* の役割

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター） . . . . . 33

2) 血管炎病態に関与する好中球機能動物モデルを用いた解析

鈴木和男、山越 智（国立感染症研究所生物活性物質部） . . . . . 37

3) 川崎病類似マウス系統的動脈炎惹起モデルにおける動脈炎誘導遺伝子の染色体マッピング

高橋 啓（東邦大学医学部附属大橋病院病理学） . . . . . 47

4) ナノ粒子プローブによる多臓器不全の解析

山本健二（国立国際医療センター研究所） . . . . . 51

5) 多臓器不全因子(*LECT2*)の構造解析

田之倉 優（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学） . . . . . 57

### 3. 臨床研究班

1) 心筋炎におけるサイトカインの意義と遺伝子治療および多臓器不全をきたす予後不良の予測

相澤義房（新潟大学大学院・循環器学分野） . . . . . 65

2) 低酸素性脳症動物モデルにおける *cytochrome c* 測定

布井博幸（宮崎医科大学小児科） . . . . . 73

3) 川崎病における血管炎の病態解明に関する研究を治療法の検討

竹下誠一郎（防衛医科大学校小児科） . . . . . 77

III. 研究班会議、業績一覧および別刷 . . . . . 83

IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 93

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
主任者総括研究報告書

## 難治性血管炎に伴う多臓器不全に係る病態の 解明および治療法の開発に関する研究

### 主任研究者

鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質部・室長

### 分担研究者

#### 1. 発症機構解析班

岡田秀親（名古屋市立大学医学部分子医学研究所・教授）

笹田昌孝（京都大学医療技術短期大学部・部長、教授）

木村暢宏（福岡大学医学部第一内科・講師）

関塚永一（国立埼玉病院・部長）

#### 2. モデル動物・プローブ班

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター・教授）

山越 智（国立感染症研究所生物活性物質部・主任研究官）

高橋 啓（東邦大学医学部附属大橋病院病理学・助教授）

山本健二（国立国際医療センター研究所・部長）

田之倉 優（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学・教授）

#### 3. 臨床班

相澤義房（副総括責任者：新潟大学大学院・循環器学分野・教授）

布井博幸（宮崎医科大学小児科・教授）

竹下誠一郎（防衛医科大学校小児科・講師）

### 研究協力者

中山俊憲（千葉大学大学院医学研究院・教授）

野島 博（大阪大学微生物病研究所・教授）

平島光臣（香川医科大学・教授）

赤川清子（国立感染症研究所免疫部・室長）

大野尚仁（東京薬科大学薬学部・教授）

澤田 誠（藤田保健衛生大学総合医科学研究所・教授）

住本英樹（九州大学生体防御研究所・教授）

大竹英樹（獨協医科大学医学部・助教授）

岡田則子（名古屋市立大学医学部・助教授）

荒谷康昭（横浜市立大学木原生物学研究所・助教授）  
亀岡洋祐（国立感染症研究所遺伝子解析室・主任研究官）  
大川原明子（国立感染症研究所生物活性物質部・研究員）  
鳥羽 健（新潟大学医学部・講師）  
杉山稔恵（新潟大学農学部・助手）  
大原関利章（東邦大学医学部・助手）  
宮崎耕司（国立埼玉病院・医員）  
花木賢一（国立国際医療センター研究所・流動研究員）  
伊藤三恵（国立国際医療センター研究所・流動研究員）

#### アドバイザー

仁保喜之（千早病院・院長）  
直江史郎（東邦大学医学部・教授）  
岡崎富男（広島市民病院・副院長）  
厚井文一（高松病院・院長）  
藤田昌彦（帝国臓器製薬・顧問）

#### 研究概要

多臓器不全からの救命は困難で、病態が非可逆的なレベルにまで進行すると、もはや修復がきかない。多臓器不全の劇症化と修復にかかわる分子機構を明らかにすることは、多臓器不全の早期診断とその治療成績向上に極めて重要である。また、多臓器不全の準備状態であるとされる高齢者での劇症化を食いとめ、QOLの維持と自立が社会的に要請されている。多臓器不全の要因には、肝臓など重要臓器の傷害や心血管系と血球成分の反応、とりわけ好中球の活性化状態が重要であると想定される。そこで、本研究では、劇症化機転・修飾にかかわる炎症細胞の機能、因子、分子の特定、役割の解明、分子機構に基づく治療法の開発をめざしている。具体的には、1) 多機能不全因子の特定、2) モデルマウス作製と解析プローブの開発、および3) 治療法開発の3プロジェクトを発足させ、以下の研究を行った。以上の様に、本研究の遂行には、主任研究者らがクロニングした肝細胞高発現サイトカインLECT2遺伝子を利用した。LECT2ノックアウトマウスは、ConA誘導により多臓器不全・劇症肝炎様の病態をきたし、劇症化の解明の主要なモデルとなると予想されていることから利用することにした。また、インフルエンザウイルス誘導の多臓器障害におけるアポトーシス関与のチトクロームcの意義も重要になってきており、アポトーシス抑制法の開発は治療に結びつけられ、さらに、心血管の炎症性病態の解明も不可欠である。

本年度は、1) 病態と治療：多臓器不全に伴う心筋炎、動脈炎、不整脈の解析、インフルエンザ脳炎脳症の血中チトクロームcの意義を、家族性血球貪食症候群のTCRの多様性とクローンT細胞の関与、川崎病の血管炎における好中球の役割を明らかにした。2) 病態解析モデル動物：川崎病モデルマウスによる血管傷害遺伝子の染色体をマッピング

ングし、肝炎、関節炎・血管炎の発症機転を LECT2 や IL-1Ra のノックアウトマウスにより解析した。一方、多臓器不全に関わる補体 C5a の CPR による制御の重要性や、末梢好中球機能亢進とアポトーシスの遅延を解析した。3) プローブ開発と分子立体構造解析：ナノ微粒子の開発と、超高速度高感度ビデオカメラシステムを用いた微小循環測定を確立し、LECT2 の結晶化も成功した。

今後は、本年度の成果を発展させ、1) 治療法開発、2) 発症機構の解明、3) 免疫系の機能不全、4) 血管炎の多様性とその解明、5) 感染により誘発される血管炎と病態、6) 肝機能異常の病態の検討、7) 診断と治療法確立のための免疫機能・遺伝子の特定を計画している。

## A. 研究目的

### 1) 研究の背景

多臓器不全は、白血球の再活性化で急激に発症してくる病態であり致命的である。加齢だけでも全身的な臓器機能異常がもたらされ、多臓器不全の準備状態をきたし、若年者でも全身の血管炎やリウマチ・膠原病では同様な異常が想定できる。これらが、肝不全の発症と好中球の活性化を契機に多臓器不全への進展し行くことを阻止する必要がある。このため LECT2 や、IL-1Ra などのサイトカインのノックアウトマウスやまた血管炎誘発モデルによる病態の解明が不可欠である。また、これらの機能不全にかかわる遺伝子、免疫、補体、血球、凝固、循環にかかわる集学的な解明が必須である。

多臓器不全では肝臓の役割はきわめて大きい。劇症の肝傷害は、IFN $\gamma$  や IL-1、IL-6 など炎症性サイトカイン、補体系、凝固線溶系、白血球の活性化を通して、血管、肺、腎、心臓などの多臓器を標的臓器として傷害をもたらす。そこで、主任研究者らが作製した LECT2 ノックアウトマウスを利用して劇症肝炎の誘発について検討することが重要である。

### 2) 目的

本研究の目的は、多臓器不全の主座となる肝臓での劇症肝炎誘発モデルを用いて、サイトカイン、血管炎をはじめとする炎症、免疫応答不全のモデル動物の開発、白血球の活性化機能の解析や補体の活性化のかかわりなどを多面的から検討し、診断・治療に利用可能な診断プローブやイメージングを含めた解析法を開発することである。また、各種病態モデルマウスを開発し、病態解明はもとより治療法への利用を可能にする。より具体的には、川崎病をはじめとする血管炎の誘発機構を解析し、血管炎による多臓器不全の解析を通して治療法を開発する。また、分担者が明らかにしてきたインフルエンザウイルス感染症における多臓器不全に関与するアポトーシスの誘導マーカーであるチトクローム *c* の意義とその利用を検討する。また、アポトーシス誘導機序の解明とその抑制による治療法の開発もめざす。さらに、新規遺伝子の LECT2 の結晶解析からドラッグデザインの開発をめざし、分担者が明らかにした IL-1Ra の治療への応用も視野に入れていく。

### 3) ゴール

肝不全、血管炎や炎症反応の制御に重要な役割を果たす LECT2、proCPR、IL-1Ra や活性酸素などの分子の特定は、多臓器不全症の解明の鍵となると予想している。また、これらの物質の構造からみたドラッグ・デザインへの応用は、新しい薬剤の開発の途を拓く。とりわけ多臓器不全の準備状態とされる SIRS(systemic inflammatory response syndrome)の出現臓器の解明は、早期診断と処置を可能とし、既存の血管炎やリウマチなどの免疫異常をとまなう病態との関連も明らかできる。この様な免疫療法や遺伝子治療の開発は、血管炎に関連する多臓器不全やインフルエンザウイルス感染による多臓器不全という新しい病態に対しても治療法の開発につながる。

### 4) 研究の発展

主任研究者らがクローニングした LECT2 は、肝機能異常や変形性関節症患者における異常高値、破骨細胞の破骨活性の抑制など広範な病態に関与することで注目され (Arth. & Rheum. 2000)、ドイツでも本研究は追認されている。さらに LECT2 ノックアウトマウスが条件により劇症肝炎と多臓器不全様をきたすことも注目されている。これに加え、活性酸素の関連でも、ジュネーブ大 Krause、米国テキサス大医学部 Clark、Abuja、およびアイオワ大 Nauseef との共同研究の推進が企画されているなど、国際的にも注目されている。一方、主任研究者らは、LECT2 ノックアウトマウスでは多臓器不全様の

劇症肝炎像を呈することを見出している。

この様に、多臓器不全の発症と進展における肝臓の主要な役割を知ることができるモデルマウスとしての有用性がある。また、LECT2 の結晶解析からの創薬も期待される。

一方、分担者らが独自に開発した IL-1Ra ノックアウトマウスでの血管炎の発症や、血管炎の発症関連遺伝子の染色体マッピング、CPR による炎症性ペプチドの制御、多臓器不全にかかわるインフルエンザウイルス感染症によるアポトーシス関連チトクロム c の検出法の確立、自己免疫心筋炎モデルの開発がある。それらの解析をサポートするナノプローブの開発やイメージングによる生体解析の方法の確立など、他方面からの解析準備ができており、今後の発展が期待されている。

### 5) 具体的な目標

肝臓をはじめ多臓器不全の発症や臓器障害の劇症化の早期診断と劇症化への移行を阻止するための治療法の開発をめざした。(1) 劇症化と多機能不全をもたらす因子の解明、(2) モデルマウスおよびプローブの作製、(3) 治療法開発。

具体的には、

- 1) 遺伝子ターゲティングマウス  
ノックアウト、トランスジェニック、多型解析 (系統差)、誘導マウス開発
- 2) 多臓器不全の発症機構の解明  
サイトカイン系、補体・免疫系の役割、血管炎、感染により誘発される臓器アポトーシスによる傷害、多様な肝機能の異常性の解析
- 3) 診断と治療法の確立

免疫機能、遺伝子機能の異常マーカーの選定と具体的な治療法の開発

## B. 研究結果

本年度は、以下の成果が得られた。

### 1) 病態と治療

(1) 多臓器不全を伴う心筋炎、動脈炎、不整脈の解析

(2) インフルエンザ脳炎脳症の血中チトクロームcの意義

(3) 家族性血球貪食症候群のTCRの多様性とクローンT細胞の関与

(4) 川崎病の血管炎における好中球の役割解明

### 2) 機構解析モデル動物

(1) 川崎病モデルマウスによる血管傷害遺伝子の染色体マッピング

(2) 肝炎、関節炎・血管炎の発症機転をLECT2やIL-1Raのノックアウトマウスによる解析

(3) 多臓器不全に関わる補体C5aのCPRによる制御の重要性

(4) 末梢好中球機能とアポトーシスの関連の解析

### 3) プロープ開発と立体構造解析

(1) ナノ微粒子プロープの開発と細胞の標識の実用化

(2) 超高速度高感度ビデオカメラシステムを用いた微小循環観察系確立

(3) LECT2の結晶化の成功

以下に各分担者の研究概要を記載する。詳細は、各分担者の項参照。

#### 1. 発症機構解析班

1) 炎症におけるcarboxypeptidase R(CPR)の役割に関する研究(岡田秀親)

微生物の侵入時に活性化した補体は、好中球の局所集積や活性化を司るアナフィラトキシンC5aを生成する。新鮮血清中には、カルボキシペプチダーゼN(CPN)の他に、カルボキシペプチダーゼR(CPR)が存在し、CPRはトロンピンやプラスミン等のトリプシン様酵素によって前駆体のプロカルボキシペプチダーゼR(proCPR)から生成される。CPNやCPRはアナフィラトキシン等の炎症ペプチドのC末端の塩基性アミノ酸を除去して不活性化するが、C5aオクタペプチドに対してはCPRの方が強力に不活化作用を示した。従って、CPRは炎症を抑制する機能が極めて高いと考えられる。サイトカラシンBの添加後にFMLPで好中球を刺激すると、その培養上清中にproCPRを活性化する酵素が放出されることを発見した。その活性化酵素は、微生物排除機構やエンドトキシンショックと深く関わりをもつエラスターゼであることを種々実験を重ねて明らかにした。炎症部位の活性化好中球は、放出するエラスターゼによって生体防御反応での役割を果たすだけでなく、そのエラスターゼがproCPRを活性化し過剰な炎症反応の抑制にも働くことが示唆された。このような炎症反応に対するネガティブフィードバックによる炎症抑制作用に異常があれば、難治性血管炎や多臓器不全等での深刻な過剰炎症を誘導する要因にもなりうると推察される。その機序を明らかにすることにより、新しい視点からの治療法の開発にも繋がると考えられる。そのため、実験動物を用いたモデル実験も不可欠である。そこで、モルモット、ラット及びウサギの血漿中の塩基性カルボキシペプチダーゼの特性について、ヒト血漿中のそれらとの比較解析を行い、動物実験に

必要な情報を集積した。

## 2) 好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延に関する研究 (笹田昌孝)

好中球はアポトーシスに伴って代表的機能の1つである活性酸素産生が低下した。一方アポトーシスを種々サイトカインで抑制すると、活性酸素産生が回復した。またこれらの場合に、好中球表面の諸種接着分子の発現は有意に変化した。従って好中球のアポトーシスを変化させることは、好中球機能を修飾することにつながる可能性が支持された。今後その制御機構の詳細を明らかにすること、そして好中球の機能異常が病態形成にかかわる疾患について解析すること、さらに病態の改善につなげる可能性を追求することとした。

## 3) 多臓器不全の発症機構における T 細胞抗原受容体 (TCR) 多様性からの T 細胞の分子生物学的検討 (木村暢宏)

多臓器不全に係わる病態解明を、免疫機能不全の角度から検討した 0 遺伝性疾患の家族性血球食食症候群 (FHL) の殆どや劇症肝炎では、本来の T 細胞が有する T 細胞抗原受容体 (TCR) 多様性の欠如、また襟数の T 細胞クローンなどによる免疫不全状態が共通して存在することが明らかとなった。また、更なる検討のために、新たに機能的  $\alpha$  田細胞クローンを微少レベルで追跡できる方法を開発した。

## 4) 超高速度高感度ビデオカメラシステムを用いた微小循環観察研究 (関塚永一)

血小板凝集能における検査方法として、透過率により凝集能を評価する濁度法が臨床的にも多く用いられてきた。しかし透過率による評価では、透過光の検出感度低

下による低濃度惹起の微小凝集における塊検出感度の低下が報告されている。それゆえに、臨床や臨床検査面におけるより有効な血小板凝集能評価法が求められている。この検出感度における問題点を改善すべく開発された装置が、散乱光を用いた血小板凝集能測定装置である。我々は、同装置における装置理論を明確にし、Polystyren Microsphere を用いた実験と顕微鏡画像における装置データとの相関により、この装置における有用性を検討することを本研究の目的とした。Polystyren Microsphere は、均一粒子径を持つ微小ビーズで、この粒子を用いる事で任意の大きさを作成できない血小板と異なり、既知の大きさの粒子を用いる事ができる。これにより、一定の散乱光強度を検出する事ができるメリットを持つ。以上の実験により装置における検出感度の検出有用性が確認する事ができ、また装置理論における考察からも装置の有用性を確認する事ができ、多臓器不全における血小板凝集能測定の基礎的研究を行なった。

## 2. モデル動物・プローブ班

### 1) 炎症、免疫応答に於ける IL-1 の役割 (岩倉洋一郎)

我々が発生工学手法を用いて独自に開発した関節リウマチモデルを用いて、関節炎発症に於ける IL-1 の役割について検討した。HTLV-I トランスジェニックマウスにおいては関節で IL-1 や TNF- $\alpha$ 、IL-6 など種々の炎症性サイトカインの発現が亢進しているが、このうち、IL-1、あるいは IL-6 を欠損させたときのみ、発症が強く抑制された。また、IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-



1Ra) 欠損マウスは自己免疫性の関節炎を自然発症することを先に報告したが、この発症は TNF- $\alpha$  を欠損させることにより、完全に抑制できることがわかった。また、IL-1 には免疫系を活性化する作用のあることを示し、これは T 細胞上に CD40L や OX40 などの副シグナル伝達分子の発現を誘導するためであることがわかった。

## 2) 血管炎病態に関与する好中球機能動物モデルを用いた解析 (鈴木和男、山越 智)

血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須である。血管炎に伴い血中に MPO-ANCA が上昇するモデルマウスにおいて、血管炎の発症に関連する血清中の MPO-ANCA 値、その対応分子 MPO の性状および好中球機能を解析した。腎炎や血管炎を有する NZB/WF1、MRL、SCG、IRF-8/ICSBP マウスや *Candida albicans* - derived substances (CADS) によって誘発する冠状動脈炎マウスにおいて解析した。血管炎に MPO-ANCA がどの様に関与しているかを解明するため、MPO 遺伝子欠損マウスを作製した。その解析から、MPO-ANCA が血管炎進行に関わり、また、MPO-ANCA 産生に MPO が主要な抗原の一つになっていることを示した。この結果から、MPO が MPO-ANCA 抗原になり、また、血管炎進行に関与することを明らかにした。また、好中球異常を示す転写因子 IRF-8/ICSBP の欠損マウスでも MPO-ANCA が加齢とともに上昇し、好中球異常が MPO-ANCA 産生にも関与することを認めた。一方、血管炎、腎炎の発症への好中球の関与を明らかにする目的で、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する SCG/Kj マウスを用い解析し、腎炎の発症、進行の初期段階 (尿たんぱく

300mg/dl 以下) の末梢好中球が無刺激で MPO の易放出性を示し、活性化状態になっていることを示した。また、ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を阻害するアセアノスタチンをマウスの好中球に作用させたところ無刺激 MPO 放出を阻害したことから、腎炎の治療評価として応用できる可能性が示唆された。

## 3) 川崎病類似マウス系統的動脈炎惹起モデルにおける動脈炎誘導遺伝子の染色体マッピング (高橋 啓)

*Candida albicans* 菌体抽出物接種によるマウス系統的血管炎誘発モデルにおける、血管炎発症にかかわる関連遺伝子を明らかにするため染色体マッピングを試みた。その結果、異なるふたつの染色体上に高オッズ比を示す領域を見出した。一方で、他の染色体上には低オッズ比を示す領域がみられた。本モデルでは冠状動脈炎発生に関連する複数の遺伝子の存在と動脈炎を抑制する遺伝子の存在が推測された。

## 4) ナノ粒子プローブによる多臓器不全の解析 (山本健二)

半導体ナノ粒子を表面加工し細胞培養液において凝集しないようにすることを可能とした。このプローブナノ粒子を用いヒト肝細胞に導入したところ十分な光量を得ることができまた一時間以上の蛍光を肉眼で観測できたので、多臓器不全の解析に適していると考え

## 5) 多臓器不全因子(LECT2)の構造解析 (田之倉 優)

本研究では、サイトカイン LECT2(leukocyte cell-derived chemotaxin 2)の高次構造解析を、核磁共

鳴スペクトル(NMR)と X 線結晶構造解析を用いて行っている。慢性関節リュウマチ患者においては、LECT2 の 58 番目の Val 残基が Ile 残基に置換されている患者ほど、疾病の重篤度が高いことが明らかになった。LECT2 の機能発現に 58 番目の Val 残基のメチレン基 1 つ分の役割がいかに重要かを明らかにし、LECT2 とリュウマチとの因果関係を突きとめる為に LECT2 の立体構造を明らかにする。

(1)NMR を用いた高次構造解析においては、安定同位体標識したサンプル調製法の確立と NMR 測定とスペクトルの解析を行った。現在までのところ、主鎖のスペクトル帰属はほぼ完了し、二次構造情報まで得られている。(2)X 線結晶構造解析においては、本年度から着手し、動物細胞を用いた発現系の導入とサンプル調製法を確立した。X 線結晶構造解析を目指した結晶化を試みた結果、結晶が得られ、X 線を当てた結果、分解能 1.8Å のデータが得られた。

### 3. 臨床研究班

1) 心筋炎におけるサイトカインの意義と遺伝子治療および多臓器不全をきたす予後不良の予測 (相澤義房)

重症心筋炎では循環不全から MOF を経て早期に死亡する重篤な疾患である。ここでは実験およびヒト心筋炎における遊走因子 MCP-1 の役割を検討し、IL10 の遺伝子導入の効果を検討した。ラット自己免疫性心筋炎モデルは心筋ミオシンによる感作によって 100% に誘導できる。感作 15 . 27 日で、ラット心筋の MCP-1 の mRNA は有意に増加した。間質に出現した単核球は MCP-1 の抗体で染まり、同時期に血清の MCP-1 も上昇した。IL10 の遺伝子導入で心筋炎を軽減した。

24 例のヒト心筋炎例でも、入院時の血清 MCP-1 は増加し、循環不全および MOF

で死亡した 8 例で最も高値であった。MCP-1 は実験モデルでもヒトの急性心筋炎でも病態の進展にかかわり、MOF に至る重症例の予知因子になると考えられた。

2) 低酸素性脳症動物モデルにおける cytochrome c 測定 (布井博幸)

多臓器不全を発症から短期間の間に引き起こすインフルエンザ脳炎脳症患者のサイトカインや血清 cytochrome c 値について検討し、脳炎脳症の初期から上昇し、重症度と有意な相関を示すことを明らかにした。このことからインフルエンザ脳炎脳症患者では全身臓器の apoptosis が誘導されていることを指示していると考えられた。今回、低酸素性脳症動物モデルで、髄液および血中 cytochrome C の上昇を確認できたこと、また低酸素性脳症患者でも同様に血中 cytochrome C が上昇することから、この動物モデルが、インフルエンザ脳炎脳症や新生児の低酸素性脳症患者の治療へも応用できるのではないかと考えている。

3) 川崎病における血管炎の病態解明に関する研究を治療法の検討 (竹下誠一郎)

川崎病(KD)急性期における末梢血好中球の自発的アポトーシスは抑制されていることを我々は既に報告した。今回の研究では、免疫グロブリン療法(IVIg)が KD 急性期の好中球のアポトーシスを誘導するかどうかを検討した。その結果、IVIg 後に末梢血好中球数は有意に減少し、自発性アポトーシスは促進した。さらに、in vitro において IVIg は治療前の好中球のアポトーシスを量依存性に誘導した。そのアポトーシス誘導作用は Fas 抑制抗体によって阻害されなかったため、Fas 非依存性の経路を介することが示唆された。

### C. まとめ

多臓器不全の劇症化と修復の分子機構を明らかにすることは、早期診断と治療成績向上に極めて重要である。多臓器不全の要因として、肝臓など重要臓器の傷害や心血管系と好中球をはじめとする炎症細胞や炎症性サイトカインの活性化状態の解明が不可欠であり、劇症化機転・修飾因子の解明と治療法の開発をめざして、1) 多機能不全因子の特定、2) モデルマウス作製、3) 治療法開発の3プロジェクトから検討した。本年度は、1) 病態と治療：多臓器不全に伴う心筋炎、動脈炎、不整脈の解析、インフルエンザ脳炎脳症の血中チトクロームcの意義、家族性血球貪食症候群のTCRの多様性とクローンT細胞の関与、川崎病の血管炎における好中球の役割を明らかにした。2) 機構解析モデル動物：川崎病モデルマウスによる血管傷害遺伝子の染色体をマッピング、肝炎、関節炎・血管炎の発症機転をLECT2やIL-1Raのノックアウトマウスにより解析した。一方、多臓器不全に関わる補体C5aのCPRによる制御の重要性や、末梢好中球機能亢進とアポトーシスの遅延を解析した。3) プローブ開発と立体構造解析：ナノ微粒子の開発と、超高速度高感度ビデオカメラシ

ステムを用いた微小循環測定を確立し、LECT2の結晶化も成功した。今後は、13年度の成果を発展させ、1) 治療法開発、2) 発症機構の解明、3) 免疫系の機能不全、4) 血管炎の多様性とその解明、5) 感染により誘発される血管炎と病態、6) 肝機能異常の病態の検討、7) 診断と治療法確立のための免疫機能・遺伝子の特定を行う予定にしている。

### D. 健康危険情報

特になし。

### E. 研究発表

・論文発表一覧および学会発表は分担者の項参照

### F. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願：

- 1) ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス
- 2) LECT2欠損マウス
- 3) カルボキシペプチダーゼRの活性を抑制するペプチド
- 4) 活性ペプチドの自動設計と新規活性ペプチド

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）分担研究報告書

難治性血管炎に伴う多臓器不全に係わる病態の解明および治療法の開発に関する研究班

炎症における carboxypeptidase R(CPR)の役割に関する研究

分担研究者 岡田 秀親 名古屋市立大学医学部分子医学研究所 教授

**研究要旨：** 微生物の侵入時に活性化した補体は、好中球の局所集積や活性化を司るアナフィラトキシン C5a を生成する。新鮮血清中には、カルボキシペプチダーゼ N(CPN)の他に、カルボキシペプチダーゼ R (CPR) が存在し、CPR はトロンビンやプラスミン等のトリプシン様酵素によって前駆体のプロカルボキシペプチダーゼ R (proCPR) から生成される。CPN や CPR はアナフィラトキシン等の炎症ペプチドの C 末端の塩基性アミノ酸を除去して不活性化するが、C5a オクタペプチドに対しては CPR の方が強力に不活化作用を示した。従って、CPR は炎症を抑制する機能が極めて高いと考えられる。サイトカリン B の添加後に FMLP で好中球を刺激すると、その培養上清中に proCPR を活性化する酵素が放出されることを発見した。その活性化酵素は、微生物排除機構やエンドトキシンショックと深く関わりをもつエラスターゼであることを種々実験を重ねて明らかにした。炎症部位の活性化好中球は、放出するエラスターゼによって生体防御反応での役割を果たすだけでなく、そのエラスターゼが proCPR を活性化し過剰な炎症反応の抑制にも働くことが示唆された。この様な炎症反応に対するネガティブフィードバックによる炎症抑制作用に異常があれば、難治性血管炎や多臓器不全等での深刻な過剰炎症を誘導する要因にもなりうるかと推察される。その機序を明らかにすることにより、新しい視点からの治療法の開発にも繋がると考えられる。そのためには、実験動物を用いたモデル実験も不可欠である。そこで、モルモット、ラット及びウサギの血漿中の塩基性カルボキシペプチダーゼの特性について、ヒト血漿中のそれらとの比較解析を行い、動物実験に必要な情報を集積した。

## A. 研究目的

血漿中には、カルボキシペプチダーゼ N (CPN) が常時活性型で存在するのに対し、カルボキシペプチダーゼ R (CPR) は、トロンビンやプラスミン等のトリプシン様酵素によって前駆体のプロカルボキシペプチダーゼ R (proCPR) から生成される新鮮血清でみつかった不安定な酵素である。トロンビン活性化性線溶阻害因子 (TAFI)、プロカルボキシペプチダーゼ U とも呼ばれる。この酵素はキニンやアナフィラトキシン等の炎症ペプチドの C 末端の塩基性アミノ酸を除去して不活性化する。proCPR は実験動物に LPS を投与

すると消費と発現の増強が観察され、炎症反応期に産生される酵素も proCPR 活性化に関わる可能性があると考えた。先ず、CPN 及び CPR の C3a 及び C5a に対する作用を比較解析した。更に、炎症部位に集積活性化する好中球から放出される酵素も proCPR を CPR に活性化する作用を持ち、過剰な炎症反応を制御するネガティブフィードバックシステムとして働く可能性があると考え、検討を行った。一方、CPR の生体内での役割を明らかにするためには、実験動物でのモデル実験が必要である。そこで、モルモット、ラット、及びウサギの proCPR から CPR への活性化と熱安定

性についても解析を行った。

## B. 研究方法

### C3a 及び C5a オクタペプチドの不活性化

C3a 及び C5a の C 末の 8 個のアミノ酸から成るそれぞれのオクタペプチドを合成した。これらの C 末のアルギニンを切除する CPN 及び CPR の作用を HPLC を用いて分析した。

### proCPR 画分の調製

ヒト血漿の 1/3～2/3 飽和硫酸沈殿分画を、DEAE カラムで分画した。ProCPR の検出はトリプシン処理で現れる hippuryl-L-arginine 加水分解活性を指標とした。ProCPR の蛋白濃度は ELISA で測定した。

### 好中球単離と刺激

ヒト血液から、好中球と単核白血球を比重遠心法で分画採取し、混入した赤血球を溶解除去し、Hanks' buffered salt solution で各々  $2 \times 10^7$ /ml に調製した。サイトカラシン B と FMLP で活性化した。

### ProCPR から CPR への変換活性の測定

好中球と単核白血球の培養上清や、精製した好中球エラスターゼ等の proCPR 活性化の検討を行った。コントロールとして、トリプシン、トロンビン、T-TM 複合体等を対比させて検討した。proCPR 画分と検体とを室温で 20 分反応させ基質 hippuryl-L-arginine を加えて基質分解により生成した馬尿酸を塩化シアヌルと発色反応を起こさせ、405 nm の吸光度で測定した。

### エラスターゼ活性の測定

好中球培養上清と合成基質 Suc-Ala-Ala-Ala-NA を混合して 37 °C, 1 hr 反応させた後、405 nm の吸光度を測定した。

### 血漿及び血清中等の CP 活性

CPN や CPR の解析にはヒトや実験動物の血清と、3.8%クエン酸化血漿を使用した。クエン酸化血漿中のカルボキシペプチダーゼ活性 (CP 活性)、血清中の CP 活性、クエン酸化血漿の proCPR をトロンビン-トロンボモデュリン複合体 (T-TM) で活性化させたものの CP 活性をそれぞれ測定した。CP 活性の測定には塩化シアヌルを用いた比色法を使用した。クエン酸化血漿中の CP 活性を CPN 活性、血清中の CP 活性から CPN 活性を減じたものを血清 CPR 活性 (serum CPR)、T-TM により活性化させた試料の CP 活性から CPN 活性を減じたものを T-TM CPR とした。

## C. 研究結果

C3a や C5a のオクタペプチドに対する CPN 及び CPR の不活化作用の効率について検討を加えた。その結果、C3a は CPN により効率よく不活化を受け、C5a は CPR により効率よく不活化を受けることがわかった。この結果、炎症抑制には CPN よりも CPR の方が極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。

ヒト血液より単離した好中球と単核白血球にサイトカラシン B を添加した後、FMLP で刺激した。刺激、1、2、4 時間後の好中球培養上清に CPR 生成活性 (CPR 生成活性化能) が検出された (Fig. 1)。刺激なしの上清にはその活性はなかった。単核白血球刺激後の上清における CPR 生成活性は低かった。種々の酵素阻害剤を好中球刺激後上清に加えたところ、エラスターゼ特異的阻害剤 MSAAPVCK が CPR 生成活性を完全に阻害した。

さらに、精製したエラスターゼを用いて CPR 生成活性を測定したところ、CPR 生成活性はエラスターゼ濃度依存的であり、MSAAPVCK により完全に阻害された。カテブシン G には CPR 生成活性はみられず、エラスターゼによる活性と協調的に働くこともなかった。トロンビン特異的阻害剤 pNP-pAPMS を好中球刺激後の上清に加えたところ、16%の阻害がかかったため、好中球刺激後の上清における CPR 生成活性にトロンビン、トロンボモジュリンも若干関与していると考えられた。しかし、トロンボモジュリン添加はトロンビンによる CPR 生成活性を高めるが、proCPR 分画へのトロンボモジュリン添加による CPR 活性はなかったため proCPR にトロンビンが混入している可能性は除外できた。また、好中球刺激後の上清による CPR 生成活性もトロンボモジュリン添加で上昇しなかった。

以上の結果から、好中球培養上清中の proCPR 活性化能にはトロンビンやトロンボモジュリンは直接関係なしにエラスターゼが活性化に関わっていることが明確になった。

一方、実験動物の proCPR と CPR に関する解析においては、T-TM CPR を作成するための T-TM の至適比率はすべての実験動物でヒトと同じであった。しかし、トロンボモジュリンのみでも実験動物ではやや活性化された。またモルモットではトロンビンのみでも活性化が見られた。また今回使用した T-TM の濃度はクエン酸化血漿中の proCPR を活性化させるのに十分量であった。CPN 活性は調べたすべての実験動物でヒトと同程度の値であった。serum CPR 活性はヒトと比較して、実験動物で高値であった。特にモルモットの serum CPR 活性はヒトのその 6 倍程度高値であった。T-TM CPR 活性はモルモット以外ではヒトと同程度であった。37°C と 25°C における熱安定性を検討した。CPN 活性はすべての実験

動物でヒトと同様に 37°C においても 25°C においても失活しなかった。serum CPR 活性と T-TM CPR 活性の半減期はヒトでは 37°C でそれぞれ 6.3 分と 9.1 分、25°C では T-TM CPR は 139 分であったが、serum CPR は 60 分では失活を認めなかった。モルモットの serum CPR と T-TM CPR 活性の半減期は 37°C でそれぞれ 11 分と 8.3 分、25°C では 53 分と 29 分であった。ラットでは 37°C で 16 分と 13 分、25°C では 36 分と 27 分であった。ウサギでは 37°C で 18 分と 10 分、25°C では T-TM CPR の半減期は 47 分であった。

#### D. 考察

細菌感染部位において補体は微生物の侵入に反応する最初のシステムである。活性化した補体は、好中球の局所集積や活性化を司るアナフィラトキシン C5a を生成する。しかしながら、炎症は器官の恒常性維持のため、いくつかの段階で制御されるはずである。もし、好中球が感染部位に集積して活性化され炎症反応の形成増幅に働くと共に、proCPR から CPR を変換する酵素を放出すれば、過剰な炎症反応を抑制するネガティブフィードバックシステムに役割を果たすはずである。今回、サイトカラシン B の添加後、FMLP で刺激をした好中球の培養上清中に proCPR を活性化する酵素を発見した。それには、微生物排除機構やエンドトキシンショックと深く関わりをもつエラスターゼが役割を担っていることがわかった。エラスターゼが proCPR に直接的に働くか、間接的に働くかは今のところ明らかではないが、proCPR の活性化に関わっていることは重要である。炎症部位において活性化された好中球が放出するエラスターゼの働きにより proCPR を CPR に活性化し過剰な炎症反応の抑制に寄与することになる。血液凝固反応や炎症時には、プロトロンビンがトロンビンに活性化され、このトロ

ンピンは炎症組織から遊離したトロンボモジュリンと複合体 (T-TM) を形成するが、この T-TM は極めて強力な proCPR 活性化作用を持つ。これも強力な炎症抑制機序として働くと考えられる。このような作用はエラスターゼによる炎症抑制作用と一体となって炎症の過剰反応を防いでいると考えられる。従って、このメカニズムの異常は難治性血管炎あるいは多臓器不全にみられるような深刻な過剰炎症を誘導する可能性もあると考えられる。生体内での CPR の役割を明らかにすることは新しい視点からの多臓器不全に対する治療法の開発につながると考えてよい。

また、実験動物においては、proCPR と CPR に関する情報も得られた。すなわち、実験動物の proCPR もヒトと同様の測定方法が使用できることが判明した。ラットとウサギの proCPR はヒトと同様の傾向であったが、モルモットは他と比較して serum CPR 活性が高かった。これは血中のトロンピン濃度が高値の可能性が示唆された。モルモットでは、proCPR の濃度も他と比較して高値であると思われた。serum CPR と T-TM CPR の比率はそれぞれの動物種で違いが見られたが、これは凝固の際の proCPR の活性化の違いが考えられた。半減期は serum CPR の方が T-TM CPR より短かったが、これは serum CPR では阻害薬を用いてないことにより新たな活性化が進行している可能性が示唆された。25°C ではヒトと比較して実験動物では半減期が短いため、その取り扱いに注意が必要であると考えられる。これらの結果より、生体内で、CPR が血管炎や多臓器不全の抑制に関わっていることを明らかにする手がかりも得られたわけである。従って、実験動物を用いた治療法についての検討にも道がひらかれるだろう。

## E. 結論

CPR は起炎ペプチドとして働く C3a や C5a 等のアナフィラトキシン、ブラジキニン等のキニン類の C-末端の塩基性アミノ酸であるアルギニンやリジンを切除して起炎活性を失わせるので、炎症を抑制する働きをされると考えられる。この CPR は前駆体の proCPR からトロンピンやプラスミン等のトリプシン様酵素によって活性化されるので、それらの酵素が活性化される炎症局所で CPR の活性化も起こり、過度の炎症を抑制していると理解できる。これらの酵素の他に炎症局所に集積して活性化された好中球から放出されるエラスターゼも proCPR を活性化することを発見した。従って CPR による炎症抑制作用は、種々の仕組みによって生体の恒常性を保つ重要な役割等をしていることが示唆された。CPR の炎症抑制作用が充分働かないと過度の炎症を起こしてしまい、難治性血管炎や多臓器不全などの過剰炎症反応の要因として働くと考えられる。従って CPR 等により炎症抑制作用を活用することが、難治性血管炎や多臓器不全の治療に新しい方法として役立つと考えられる。

一方、それらの事象を実験動物モデルで解析をするためのモルモット、ラット及びウサギの proCPR の活性化と熱安定性等に関する知見も得られた。これらをもとに、生体内での CPR の役割を明確にして、治療法の開発に向けての研究を展開する準備が整った。

## F. 健康危険情報

ヒトや動物から採血した血液等を用いた試験管内実験であるので、実験者などの人に対して特に健康などに危険を及ぼす恐れはない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mizuno, M., Nishikawa, K., Okada, N., Matsuo, S. and Okada, H. Soluble CR1 rescues rats from lethal shock induced by LPS promoting and anti-Crry antibody. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, in press (2002)
  - 2) Campbell, W., Kleiman, L., Baranyi, L., Li, Z., Khorchid, A, Fujita, E., Okada, N. and Okada, H. A novel genetic algorithm for designing of mimetic peptides that interfere with the function of a target molecule. *Microbiol. Immunol.*, 46: 211-216 (2002)
  - 3) Farkas, I., Baranyi, L., Ishikawa, Y., Okada, N., Bohata, C., Budai, D., Fukuda, A., Imai, M. and Okada, H. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J. Physiol.*, 539: 537-545 (2002)
  - 4) Kawamura, T., Okada, N. and Okada, H. Elastase from activated human neutrophils activates procarboxypeptidase R. *Microbiol. Immunol.*, 46: 225-230 (2002)
  - 5) Komura, H., Shimomura, Y., Yumoto, M., Katsuya, H., Okada, N. and Okada, H. Heat stability of carboxypeptidase R of experimental animals. *Microbiol. Immunol.*, 46: 217-223 (2002)
  - 6) Campbell, W., Lazoura, E., Okada, N. and Okada, H. Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol. Immunol.*, 46: 131-134 (2002)
  - 7) Komura, H., Obata, K., campbell, W., Yumoto, M., Shimomura, Y., Katsuya, H., Okada, N. and Okada, H. Effect of anticoagulants in colorimetric assay for basic carboxypeptidases. *Microbiol. Immunol.*, 46: 115-117 (2002)
  - 8) Nishinaka, Y., Nakamura, H., Okada, N., Okada, H. and Yodoi, J. Redox control of EBV infection: Prevention by thiol-dependent modification of functional CD21/EBV receptor expression. *Antioxid. Redox Signal.*, 3: 1075-1087 (2001)
  - 9) Ara, Y., Saito, T., Takagi, T., Hagiwara, E., Miyagi, Y., Sugiyama, M., Kawamoto, S., Ishii, N., Yoshida, T., Hanashi, D., Koshino, T., Okada, H. and Okuda, K. Zymosan enhances the immune response to DNA vaccine for human immunodeficiency virus type-1 through the activation of complement system. *Immunology*, 103: 98-105 (2001)
  - 10) Campbell, W., Okada, N. and Okada, H. Carboxypeptidase R (CPR) is an inactivator of complement derived inflammatory peptides and an inhibitor of fibrinolysis. *Immunol. Rev.*, 180:162-167 (2001)
  - 11) Okuda, K., Xin, K., Haruki, A., Kawamoto, S., Kojima, Y., Hirashima, F., Okada, H., Klinman, D. and Hamajima, K. Transplacental genetic immunization after intravenous delivery of plasmid DNA to pregnant mice. *J. Immunol.*, 167: 5478-5484 (2001)
  - 12) Abe, M., Shibata, K., Akatsu, H., Shimizu, N., Sakata, N., Katsuragi, T. and Okada, H. Contribution of apnaphylatoxin C5a to late airway responses after repeated exposure of atnigen to allergic rats. *J. Immunol.*, 167: 4651-4660 (2001)
  - 13) Nonaka, M., Wang, G., Mori, T., Okada, H. and Nonaka, M. Expression of complement C4-binding protein  $\alpha$ -chain gene in epididymis. *J. Immunol.*, 166: 4570-4577 (2001)
- ## 2. 学会発表
- 1) 細川雅人、岡田則子、岡田秀親  
逆転写酵素活性阻害ペプチドの人工 cDNA  
による HIV-1 感染抵抗性の誘導  
第 12 回日本生体防御学会学術集会



(平成 13 年 8 月、京都)

- 2) Eliada Lazoura, William Campbell, Noriko Okada and Hidechika Okada

Rational Structure-based Design of a Novel Inhibitor of Carboxypeptidase R, a regulator of Anaphylatoxins and Fibrinolysis

第 12 回日本生体防御学会学術集会

(平成 13 年 8 月、京都)

- 3) 河合正博、藤井陽一、岡田則子、岡田秀親

ヒト染色導入マウスを用いた抗 NefIgM モノクローナル抗体の作成とその解析

第 12 回日本生体防御学会学術集会

(平成 13 年 8 月、京都)

- 4) 赤津裕康、阿部正義、三輪隆史、立山尚、前

田誠司、岡田則子、小島清秀、山本孝之、岡田秀親

ラット C5a 受容体の組織分布解析

第 12 回日本生体防御学会学術集会

(平成 13 年 8 月、京都)

- 5) 清水直美、早志友里、坂田則行、赤津裕康、

柴田和彦、桂木猛、岡田秀親

アレルギー性喘息病態における補体の関与

第 12 回日本生体防御学会学術集会

(平成 13 年 8 月、京都)

- 6) William Campbell、岡田則子、Elida Lazoura、

岡田秀親

C3a および C5a に対する Carboxypeptidase

N と Carboxypeptidase R の反応性 第 12

回日本生体防御学会学術集会 (平成 13 年 8

月、京都)

① 特願 2001-125665 「カルボキシペプチダーゼ R の活性を抑制するペプチド」 (平成 13 年 4 月出願)

② 「活性ペプチドの自動設計と新規活性ペプチド」 (平成 14 年度 2 月 21 日出願)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

# 厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

## （分担）研究報告書

### 好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延に関する研究

分担研究者 笹田昌孝 京都大学医療技術短期大学部

#### 研究要旨

好中球はアポトーシスに伴って代表的機能の1つである活性酸素産生が低下した。一方アポトーシスを種々サイトカインで抑制すると、活性酸素産生が回復した。またこれらの場合に、好中球表面の諸種接着分子の発現は有意に変化した。従って好中球のアポトーシスを変化させることは、好中球機能を修飾することにつながる可能性が支持された。今後その制御機構の詳細を明らかにすること、そして好中球の機能異常が病態形成にかかわる疾患について解析すること、さらに病態の改善につなげる可能性を追求することとした。

#### A. 研究目的

好中球の機能は生体防御に不可欠である一方、その亢進は組織障害につながる事が明らかにされている。好中球の機能は活性化によって発現につながり、そしてアポトーシスにより終息する。そこでアポトーシスの制御の乱れは好中球機能亢進につながると考え、この制御機構を明らかにすることを計画した。上記研究課題を下記の順で検討する。

①好中球アポトーシスの遅延に伴う好中球表面形質、サイトカイン産生及び機能の変化を明らかにする。

②好中球アポトーシスの遅延を起こす機序を明らかにする。

上記の成績が得られると、その制御機構を修飾することにより好中球機能亢進が解除され、血管炎等の障害を予防、修復する可能性が期待される。

#### B. 研究方法

##### 1. 好中球分離

好中球は、正常人ボランティアの血液よりパーコール遠心法を用いて分離した。分離した好中球は二時間以内に各処理を開始した。

##### 2. アポトーシス誘導

分離した好中球を10% FCSを混じたRPMI1640に $1 \times 10^7$ /mlとなるように浮遊させた。TNF- $\alpha$ によるアポトーシスは、好中球浮遊液にTNF- $\alpha$ およびcycloheximide (CHX)を最

終濃度としてそれぞれ10 IU/ml、10  $\mu$ g/mlとなるように加え、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて3時間培養して誘導した。阻害剤を用いる場合は、一時間前処理した後TNF- $\alpha$ およびCHXを加えた。自発的アポトーシスは、好中球浮遊液をそのまま、あるいはサイトカイン存在下でCO<sub>2</sub>インキュベーターにて24あるいは48時間培養して誘導した。培養容器はすべてポリプロピレン製のものを用いた。

##### 3. アポトーシスの評価

好中球アポトーシスは、propidium iodide (PI)を用いたDNA断片化を指標として評価した。200  $\mu$ lの好中球浮遊液( $2 \times 10^6$  cells)、を遠心後、70%エタノールに懸濁し-20°Cで2時間固定して洗浄後、RNaseで処理した。次にPBSに懸濁し、PI(最終濃度5  $\mu$ g/ml)を加えて暗冷所にて30分間DNAを染色し、フローサイトメトリーにて解析した。

##### 4. 好中球表面抗原の検出

好中球浮遊液( $5 \times 10^5$  cells)を遠沈し、各々の表面抗原に対する抗体5  $\mu$ lを用いて暗冷所にて30分反応させ、フローサイトメトリーにて解析した。

##### 5. 好中球貪食能の検出

貪食能はFITCラベルしたOZ (FITC-OZ)を用いたフローサイトメトリー法で評価した。好中球浮遊液( $1 \times 10^6$  cells)にFITC-OZ(500  $\mu$

g/ml)を加え37°C、15分培養したのちフローサイトメトリーを用いて測定した。

### 6. 活性酸素産生能の検出

活性酸素産生能はシトクロムc還元法またはDHR123を用いたフローサイトメトリー法で評価した。シトクロムc還元法では、好中球浮遊液( $1 \times 10^6$  cells)にシトクロムc (120  $\mu$ M)を加え、OZ (1 mg/ml)で刺激後37°C、15分培養後遠心し、上清をスペクトロメーターを用いて測定した。フローサイトメトリー法では、好中球浮遊液( $1 \times 10^6$  cells)にOZ (1 mg/ml)を加え37°C、10分培養したのちDHR123 (150 ng/ml)を加え、さらに5分培養してフローサイトメトリーを用いて測定した。

### C. 研究結果

最初に我々は、炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ が好中球アポトーシスに及ぼす影響について検討した。蛋白合成阻害剤であるCHX存在下で、好中球はTNF- $\alpha$ で刺激すると3時間で9割以上アポトーシス細胞死をおこしたが、GM-CSFはこれを濃度依存性に抑制した(図1)。またカスパーゼ阻害剤であるz-VAD-fmkはほぼ完全に好中球アポトーシスを抑制した。次に、阻害剤の存在、非存在下での好中球機能を測定した。TNF- $\alpha$ でアポトーシスを誘導すると、アポトーシスの進行に伴い活性酸素産生能は低下したが、z-VAD-fmk (100  $\mu$ M)、GM-CSF (100 ng/ml)を作用させるとコントロールに比べてむしろ亢進していた(図2)。これらの所見からGM-CSFはTNF- $\alpha$ 誘導好中球アポトーシスを抑制し、かつ好中球機能を持続させていることが示唆された。

**TNF- $\alpha$  triggers neutrophil apoptosis, which is inhibited by GM-CSF and caspase inhibitor**

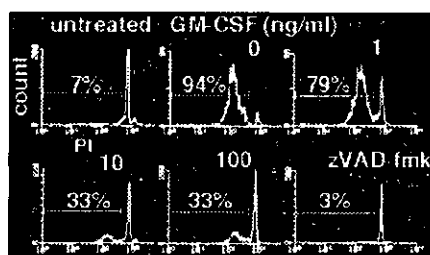


図1

**Caspase-dependent down-regulation of PMA-induced superoxide release**

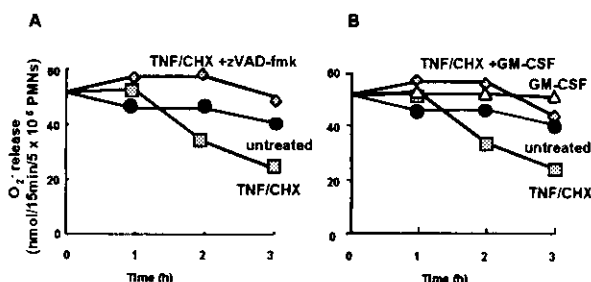


図2

次に自発的アポトーシスにおいて機能との関連を検討した。好中球は24時間培養しておくだけで約7割以上がアポトーシスに陥ったが、この自発的アポトーシスは、IFN- $\gamma$  (100 IU/ml)、GM-CSF (100 ng/ml)、およびG-CSF (100 ng/ml)といったサイトカインや、LPS (5  $\mu$ g/ml)によって部分的に抑制できた(図3)。このときの好中球の主な補体レセプター/接着分子およびFc- $\gamma$ レセプターの変化を示す(表1)。

**Effects of cytokines and LPS on neutrophil surface markers**

	spontaneous apoptosis	IFN- $\gamma$	GM-CSF	G-CSF	LPS
CD11b	↓↓	↓	↓	↓	↑
11c	↓↓	↓	↓	↓	↑
16	↓↓	↓	↓↓	↓	↓↓
18	↓↓	↓	↓↓	↓	↓↓
32	↓↓	↓	↓	↓	↓
64	↑	↑↑	↑	↑↑	↑

表1

アポトーシスに伴い、ほとんどの分子は発現量が低下するが、これらのサイトカインやLPSの作用によって部分的に保たれることが確認された。CD64はIFN- $\gamma$ 、G-CSFによって発現が上昇していた。以上の所見から、自発的アポトーシスに伴う好中球機能の低下は、サイトカインやLPSによってある程度防がれていることが予想された。

この仮説を証明するために、サイトカインやLPSの存在、非存在下で自発的アポトーシスを誘導した際の好中球機能について検討した。好中球貪食能は、24時間培養後においてもそれほどの低下は認められず、またいずれに刺激においてもコントロール群との差は認められなかった(図4)。一方、活性酸素産生能は、アポトーシスに伴い著明に低下するが、これらの刺激によってその低下が抑制されて

いた (図5)。

### Cytokines and LPS delay neutrophil apoptosis

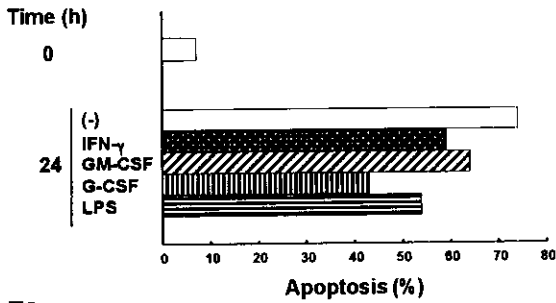


図3

### Effects of Cytokines and LPS on phagocytosis

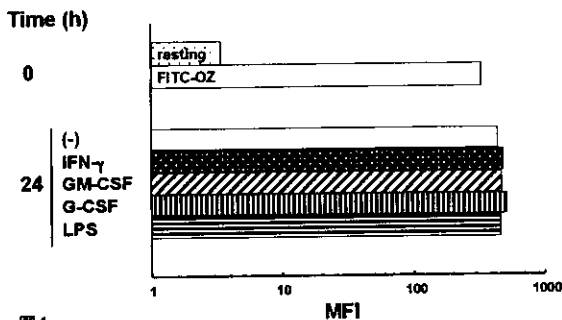


図4

以上のことから、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、G-CSF、およびLPSはOZ貪食能には影響を与えなかったが、アポトーシスに伴う活性酸素産生能の低下を抑制し、機能を維持していることが示唆された。

### Effects of Cytokines and LPS on O<sub>2</sub><sup>-</sup> release

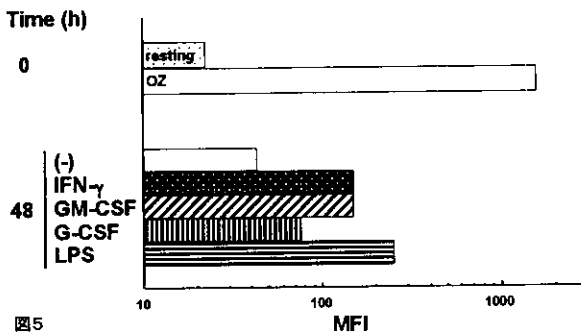


図5

## D. 考察

TNF- $\alpha$ は好中球にアポトーシスを誘導し、その場合好中球の機能の1つである活性酸素産生はアポトーシスの進行とともに低下した。この時カパーゼ阻害剤並びにGM-CSFを添加するとアポトーシスを抑制し、同時に活性酸素産生を回復させた。このことはアポトーシスの抑制が、好中球の重要な機能の1つである活性酸素産生能を保存することになる。GM-CSFと同様にIFN- $\gamma$ 、G-CSF、LPSいずれ

もTNF- $\alpha$ によって誘導される好中球アポトーシスを抑制した。この場合好中球の活性酸素産生は、程度に差異が認められるものの回復することが確認された。アポトーシス誘導のシグナル伝達系は、活性酸素産生のシグナル伝達系に抑制的に働くと考えられた。アポトーシスの抑制による活性酸素産生の回復が、発現する部位によっては組織障害につながる可能性が考えられた。一方好中球のその他の機能の1つである貪食能について検討したところ、TNF- $\alpha$ によりアポトーシスを誘導しても有意な変化を認めず、またGM-CSF、IFN- $\gamma$ 、G-CSF、LPSでアポトーシスを抑制した場合でも貪食能に変化を認めなかった。

また好中球の機能の制御は細胞表面の接着分子によるところが大であることから、アポトーシスに伴う変化並びに種々サイトカインでアポトーシスを抑制した場合の接着分子発現を定量的に検討した。その成績から、接着分子発現はアポトーシスを修飾するそれぞれによって異なり、これらの変化が好中球機能に変化を及ぼす可能性がうかがわれた。好中球のアポトーシスと諸機能の変化はそれ自体合目的なものと考えられる。一方アポトーシス制御の乱れは病態形成につながる可能性が考えられる。

## E. 結論

好中球はアポトーシスに伴って代表的機能の1つである活性酸素産生が低下した。一方アポトーシスを種々サイトカインで抑制すると、活性酸素産生が回復した。またこれらの場合に、好中球表面の諸種接着分子の発現は有意に変化した。従って好中球のアポトーシスを変化させることは、好中球機能を修飾することにつながる可能性が支持された。今後その制御機構の詳細を明らかにすること、そして好中球の機能異常が病態形成にかかわる疾患について解析すること、さらに病態の改善につながる可能性を追求することとした。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 笹田昌孝:好中球アポトーシスと病態形成. 炎症と免疫, 9(1):87-95, 2001.
- 2) Arai T, Endo N, Yamashita K, Sasada M, Mori H, Ishii H, Hirota K, Makino K, Fukuda K: 6-Formylpterin, a xanthine oxidase inhibitor,