

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

## 血管炎症候群の病態の機能ゲノム解析と創薬探索技術 の開発

所 属 国立小児病院小児医療研究センター  
研究者 阿部 淳

### 分担研究者

- (1) 国立小児病院小児医療研究センター小児生態研究部 阿部 淳  
(2) 日本製薬株式会社研究本部 西川 浩平

### 要 旨

川崎病急性期の免疫細胞での遺伝子発現パターンを DNA-Chip で解析した。またエルシニア菌由来スーパー抗原 YPM による免疫機能修飾作用を *in vivo* で解析するマウスモデルを作成した。今後この系の機能ゲノム解析結果を臨床例での結果と比較検討する予定である。

#### 1. 研究目的

原因不明の血管炎症候群の一つである川崎病は、5才未満の乳幼児に好発する急性熱性疾患である。日本では毎年約 6 千例が発症し、発症後1ヶ月の時点で全患者の約7%に冠動脈瘤などの心後遺症が発生する。川崎病の急性期治療としてはアスピリンの経口投与およびガンマグロブリン大量静注療法の有効性が確立しているが、その作用機序は未だ不明である。また治療不応例が少なからず存在するために、より有効な心後遺症の予防法の確立が望まれている。

川崎病をはじめとして血管炎症候群の疾患のいくつかは、抗好中球抗体や抗平滑筋抗体などの自己免疫が発症に関与すると考えられている。細菌感染や細菌由来物質との接触がその発症の端緒となる可能性もある。近年、スーパー抗原毒素などの分泌性蛋白や LPS、ペプチドグリカンなどの細菌細胞膜の構成分子、CpG モチーフをもつ細菌ゲノム由来の DNA などが、より特異性の低いレセプター分子によって認識され、宿主の生体防御反応に関与することが明らかになった。これらの微生物由来物質は、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-12 などの炎症性サイトカインの産生を通じて免疫系を賦活化する一方で、過剰反応による shock 症候群やトレランスと呼ばれる免疫不応答を誘導することも知られている。

本研究では第一に、川崎病の急性期に末梢血中の免疫細胞に発現される遺伝子を DNA-Chip を用いて網羅的に解析することにより、心血管障害に特異性の高い分子群を同定し、合わせてガンマグロブリン大量静注療法の作用機序を分子レベルで明らかにすることを目標とする。第二に、細菌由来物質による免疫細胞の機能修飾作用を *in vivo* および *in vitro* で解析するモデル実験系を立ち上げること、第三に、DNA-Chip を用いた機能ゲノム解析をこのようなモデル実験系に応用することにより、炎症性サイトカインや Th1 細胞の誘導、トレランスの誘導に関わる細胞内シグナル伝達分子をはじめとする多様な遺伝子群の機能を明らかにすることを目標とする。これらの臨床的および基礎的な情報を統合、解析することにより、新しい治療薬、ワクチンなどの探索に役立てたい。

#### 2. 研究方法

##### (1) DNAチップ解析

急性期の川崎病患者の末梢血単核球から RNA を抽出し、標識 cRNA を合成して Affimetrix 社の GeneChip を用いて発現量を測定した。各サンプルでの発現量は、ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin の発現量を基準として標準化し、健常成人の平均値と比較した。川崎病患者における平均発現量が健常成人の平均発現量と比べて 2.0 倍以上、あるいは 0.3 倍以下の遺伝子を抽出し、Mann-Whitney の U 検定で  $p < 0.02$  である遺伝子の発現量を有意に増加あるいは減少と判定した。

##### (2) アポトーシス関連遺伝子の発現量解析

DNA チップ解析の結果を再確認するために、急性期の川崎病患者から、ガンマグロブリン大量静注療法前後の静脈血を採取した。単核球から RNA を抽出して、アイソトープ標識した特異的プライ

マーを用いた RT-PCR 法でアポトーシス関連遺伝子の発現量を半定量した。調べた遺伝子は、FAS、FASL、Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>、Bax、Bfl-1、FLIP (FLICE-like inhibitory protein)、XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) の 8 種類である。

(3) リコンビナントYPMおよび変異体YPMの精製

wild-typeのYPMおよびアミノ酸置換を導入した2つの変異体YPM、D 88G (88番目のアスパラギン酸をグリシンに置換) とL7Q (7番目のロイシンをグルタミンに置換) の遺伝子を発現ベクターにクローニングし、リコンビナント蛋白の精製に用いた (Ito, et al. Eur J Biochem 263:326-337, 1999)。

(4) 実験動物およびYPMの投与

in vivoのモデル動物として、BALB/cマウス (8-14週齢、雌) およびCB-17/scidマウス (8-10週齢、雌) を用いた。D-ガラクトースを腹腔内注射した30分後に、リコンビナントYPMあるいは変異体YPMをPBSに溶解して腹腔内あるいは静脈内に注入した。コントロール・マウスには、D-ガラクトースの注射後にPBSを腹腔内あるいは静脈内に注入した。

(5) 免疫染色とフローサイトメトリー

末梢血単核球あるいは脾細胞を遠心分離し、抗CD3-perCP抗体、抗CD4-FITC抗体、抗CD8-FITC抗体、抗T細胞抗原レセプター(TCR-)Vβ4-ビオチン抗体、TCR-Vβ8-ビオチン抗体 (BD-PharMingen社) で免疫染色した後、混入したRBCを溶血してFACScan (Becton Dickinson社) で解析した。

(6) 血中サイトカインの測定

マウス末梢血中のTNF-α、IFN-γ、IL-10の濃度は、Becton Dickinson社のELISAキットを用いて測定した。

3. 研究成果

(1) 川崎病急性期患者の DNA チップ解析

急性期の患者 5 名での発現が、健常成人と比較して 2 倍以上に増加した遺伝子が 113 個、0.3 倍以下に減少した遺伝子が 108 個見出された。遺伝子の機能グループごとに分類すると、増加した遺伝子はサイトカイン・ケモカイン群 7 個、細胞周期・アポトーシス群 9 個、シグナル伝達系分子 11 個、転写因子群 22 個など、多様な

グループに分かれたのに対して、減少した遺伝子は代謝経路分子が 19 個で最も多かったほかに、機能の未同定な遺伝子が半数を占めた (表 1)。

次に急性期に増加した遺伝子の中で、サイトカイン・ケモカイン関連遺伝子および細胞周期・アポトーシス関連遺伝子を表 2 に示す。サイトカイン・ケモカイン関連では、IL-8・Pre Bcell Enhancing Factor (PBEF)・EGF-like Growth Factor・Transmembrane Activator and CAML Interactor (TACI)・

TNF-α・IL-1α・IL-6 の 7 遺伝子が、細胞周期・アポトーシス関連では、G0S2・nur77・GSPT1・Bcl-X<sub>L</sub>・cyclin T1・Retinoblastoma (Rb)・Bfl-1 (A1)・G0S3・p21<sup>Waf1</sup> の 9 遺伝子が、健常成人と比べて有意に強く発現していた (表 2)。

(2) グロブリン大量静注療法前後のアポトーシス関連遺伝子の発現量

DNA チップ解析の結果から、Bcl-X<sub>L</sub> などの抗アポトーシス作用をもつ遺伝子の発現が増加していることが分かったので、さらに 10 名の川崎病患者について、グロブリン大量静注療法前後の末梢血におけるアポトーシス関連遺伝子の発現を、RT-PCR 法を用いて解析した。検索した 8 つの遺伝子の中では、Bcl-X<sub>L</sub> と FLICE-like Inhibitory Protein (FLIP)の発現量がグロブリン大量静注療法の前後で最も大きく低下した (p=0.005、p=0.008)。Bfl-1 も弱いながら有意に低下した (p=0.025)。Bcl-2・

表 1. 川崎病急性期に発現が増加・減少した遺伝子群

機 能	増加した遺伝子	減少した遺伝子
サイトカイン・ケモカイン	7	1
細胞表面分子	11	8
シグナル伝達系分子	15	12
細胞周期・アポトーシス	9	3
代謝経路分子	8	19
遺伝子転写因子	22	0
細胞骨格分子	9	0
その他	12	9
未知	20	52
合 計	113	108

Bax・X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP)・FAS・FAS リガンドなどの遺伝子発現は治療の前後では有意に変化しなかった。

(3) wild-type YPM および変異体 YPM の増殖刺激活性と急性毒性

wild-type YPM は 10pg/ml の濃度でヒト末梢血単核球に対する増殖活性を示し、その活性は 100pg/ml でプラトーに達した。一方、変異体 L7Q の増殖刺激活性は wild-type の約 10 分の 1、D88G は増殖刺激活性を示さなかった。

次に、それぞれのリコンビナント蛋白 100µg を BALB/c マウスに投与して、致死率を比較した。wild-type YPM は腹腔内投与では 14.3% の致死率だったが、静脈内投与すると致死率は 85.7% に上昇した。一方、変異体 L7Q、D88G ともに腹腔内投与では死亡例はみられなかったが、静脈内投与すると L7Q では 60.0%、D88G では 20.0% が死亡した。したがって、急性毒性のモデルとしては静脈内投与を、慢性暴露のモデルとしては数回の腹腔内投与を行うこととした。

(4) YPM 静脈内投与後の T 細胞レパートリーの変化

黄色ブドウ球菌由来のスーパー抗原 SEB

をマウスに投与すると、SEB によって抗原レセプターの Vβ領域特異的に刺激された T 細胞が、刺激後数時間以内に末梢血中から減少し、24 時間以降 72 時間後くらいまでは増殖刺激を受けて増加すること、また 72 時間以降では逆に clonal deletion により減少することが報告されている。YPM 投与マウスでも、このようなスーパー抗原特異的な T 細胞レパートリーの変動がみられるか否か、検討した。この結果、wild-type YPM を静脈内投与する急性モデルでは、0、2、4 時間後の末梢血中の YPM 反応性 Vβ8 陽性 T 細胞の比率は、31.4%、18.0%、10.6% と減少した。一方、3 日おきに腹腔内投与を繰り返す慢性暴露モデルでは、0、2、7、10、20 日後の Vβ8 陽性 CD4 陽性 T 細胞の比率は、20.0%、27.0%、10.6%、11.0%、12.0% と一過性の増加の後、減少状態が持続した。Vβ8 陽性 CD8 陽性 T 細胞でも同様の変動がみられたが、その幅は CD4 陽性 T 細胞より小さかった。D88G の腹腔内投与では、Vβ8 陽性 T 細胞の比率は変動しなかった。

(5) YPM 投与後の血中サイトカイン値の変動

スーパー抗原によるトキシックショック症候群では、TNF-α、IFN-γなどの炎症性サイトカインの血中濃度の上昇がみられ、組織障害の程度に直接関わっていると考えられている。YPM 投与後のこれらのサイトカイン値を測定した。

腹腔内投与および静脈内投与ともに、wild-type YPM および L7Q の投与 4 時間後に IFN-γの著明な上昇がみられたが、IL-10 の上昇はみられなかった。D88G 投与後の IFN-γの上昇は微小だった。一方、TNF-αは、wild-type YPM、L7Q、D88G の腹腔内投与 2 時間後、および wild-type YPM の静脈内投与 2 時間後に軽度の上昇が

表 2. 川崎病急性期に発現が増加したサイトカイン・ケモカイン・アポトーシス遺伝子

遺伝子	GenBank entry	発現増加率 (倍)
<サイトカイン・ケモカイン>		
IL-8	M28130	10.1
PBEF	U02020	4.9
EGF-like GF	M60278	3.5
TACI	AF023614	2.6
TNF-α	X02910	2.3
IL-1α	M28983	2.0
IL-6	X04430	2.0
<細胞周期・アポトーシス関連>		
G0S2	M69199	43.2
nur77	S77154	8.7
GSPT1	X17644	3.1
Bcl-X <sub>L</sub>	Z23115	3.0
cyclin T1	AF048730	2.6
Rb	HG4036-HT4306	2.5
Bfl-1 (A1)	U27467	2.4
G0S3	L49169	2.2
p21 <sup>Waf1</sup>	U03106	2.0

表 3. YPM 投与後の血中サイトカイン値

抗原	TNF-α	IFN-γ	IL-10
<腹腔内投与>			
wild-type YPM	121.8	1772.5	337.4
L7Q	96.7	2686.9	273.7
D88G	80.9	184.1	223.5
PBS	n.d.	n.d.	n.d.
<静脈内投与>			
wild-type YPM	55.7	2282.9	252.2
L7Q	22.6	1508.8	418.2
D88G	26.8	85.3	214.5
PBS	25.2	n.d.	191.4

(単位 pg/ml)

みられたが、有意差は得られなかった。

#### (5) CB-17/*scid* マウスへの wild-type YPM 投与の効果

wild-type YPM による急性毒性の発現が T 細胞に依存することを明らかにするために、CB-17/*scid* マウスに BALB/c マウスと同量の wild-type YPM を静脈内投与した。その結果、CB-17/*scid* マウスでの致死率は 0/5 例 (0.0%) だった。さらに、投与後の血中 TNF- $\alpha$  (14.7pg/ml)、IFN- $\gamma$  (205.2pg/ml) の上昇もみられなかった。

## 4. 考 察

原因不明の血管炎症候群のなかには、自己免疫の発症機構が予想されているものも多く、細菌感染や細菌由来物質との接触がその発症の端緒となることも考えられる。近年、スーパー抗原や LPS、ペプチドグリカン、細菌ゲノム由来の DNA や double strand RNA などが、各種の組織細胞上のレセプターによって認識され、宿主の生体防御反応に関与することが明らかになった。これらの微生物由来物質は、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-12 などのサイトカイン産生を通じて炎症反応を惹起する一方で、過剰反応による shock 症候群や免疫交差反応、免疫不応答などの免疫異常の病態に関与することが知られている。

本研究では、血管炎症候群のなかでも川崎病に的を絞って、その急性期の免疫異常の病態を分子レベルで明らかにし、心血管障害の予防に繋げることを目標の一つにしている。今年度は、急性期の患者末梢血中単核球の DNA-chip 解析を行った。その結果、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの遺伝子発現の亢進が急性期に認められたことは、これまでに川崎病患者の血中サイトカイン濃度について調べられてきた結果を裏付けるとともに、DNA-chip 解析技術およびデータ処理が適正に行われたことを示唆する所見と考えられた。急性期に発現が増加していた遺伝子は 113 個、減少していた遺伝子は 108 個であり、ほぼ同数だったが、その機能を分類すると興味深い結果が得られた。すなわち増加した遺伝子は前記の炎症性サイトカインを始めとして、細胞表面ではたらくレセプター分子やシグナル伝達分子、転写因子など機能がすでに明らかなものが多く、かつ機能的にも多様性がみられたのに対して、減少した遺伝子は機能が未知のものがほぼ半数を占め、機能の明らかなものの中では代謝に関する分子への偏りがみられた。急性期に活性化した単核球は、多様な機能遺伝子の発現を強化し、一方では必須ではない代謝経路の遺伝子の一部を抑制することで、必要とされる免疫系における役割に対応している様子が推察された。

川崎病急性期に発現が増加した遺伝子には、細胞周期・アポトーシスに関連するものが 9 個含まれていた。なかでも Bcl-X<sub>L</sub>・Retinoblastoma (Rb)・Bfl-1 (A1)・p21<sup>Waf</sup> など、抗アポトーシス作用をもつ遺伝子の発現亢進が注目された。急性期の末梢血単核球の細胞寿命は、サイトカイン産生や抗体産生などに大きな影響力をもつと予想されたので、RT-PCR を用いてアポトーシス関連遺伝子の発現量を半定量解析した。その結果、グロブリン大量静注療法の前後で、Bcl-X<sub>L</sub>、Bfl-1 (A1)に加えて FLIP の発現量が有意に減少していることが明らかになった。Bcl-X<sub>L</sub> はミトコンドリアの膜の安定化を通じて、また FLIP は FAS など細胞死誘導レセプターへの caspase8 の結合を阻害することによってアポトーシスを抑制することが知られている。それぞれの抗アポトーシス分子の誘導、あるいは抑制にグロブリン大量静注療法が関与するの否か、またどのようなシグナル伝達経路や転写因子を通じてこれらの遺伝子の発現が制御されているのか、今後明らかにしたい。またこれら以外にも、発現亢進していた機能遺伝子間のネットワークを明らかにし、臨床症状とりわけ心血管障害との関連について、今後解析する予定である。

本研究のもう一つの目標は、細菌由来物質による免疫細胞の機能修飾作用の機序を分子レベルで明らかにし、血管炎症候群の病態と比較検討することである。今年度は、そのための *in vivo* モデルとして、エルシニア菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 由来のスーパー抗原 YPM をマウスに投与する実験系を立ち上げた。その結果、YPM がほかの黄色ブドウ球菌由来スーパー抗原 SEB や TSST-1 と同様に、マウスにトキシックショック症候群様の致死性の急性毒性を示すことが明らかになった。T 細胞に対する増殖刺激活性をもたない、YPM の変異体 D88G では、このような急性毒性がみられなかったこと、また CB-17/*scid* マウスへ wild-type YPM を投与しても急性毒性がみられなかったことから、この急性反応は T 細胞依存性であり、とりわけ IFN- $\gamma$  の過剰産生が組織障害に関与することが推察された。黄色ブドウ球菌由来スーパー抗原を用いたこれまでの論文と異なる点は、IFN- $\gamma$  の上昇と致死率との関係が必ずしも一致しなかったことである。この点については、急性反応の局面

においては IFN- $\gamma$ の上昇だけではなく、IL-10 などの抑制性サイトカインとのバランスや、免疫制御 T 細胞の誘導、ケモカイン産生などの多様な因子が致死率と関係することが考えられる。scid マウスへの T 細胞移入実験などを通じて、T 細胞の関与の機序をさらに詳細に検討する予定である。次年度に行う予定である DNA-Chip 解析が、このように複雑なネットワークを介した反応を系統化し、整理する上で有効だと考えられる。

## 5. まとめ

- (1) 急性期川崎病患者の末梢血単核球での遺伝子発現を GeneChip を用いて解析した。発現が増加していた遺伝子 113 個、減少していた遺伝子 108 個を見出した。
- (2) 発現が増加していた遺伝子の中には、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインのほかに、ケモカインレセプターやシグナル伝達分子、転写因子など、多様な機能を示す遺伝子群が含まれていた。
- (3) 発症早期の末梢血単核球ではグロブリン大量静注療法後と比べてBcl-X<sub>L</sub>、Bfl-1、FLIPなどの抗アポトーシス作用をもつ遺伝子の発現が有意に高かった。
- (4) 川崎病急性期の初期には、単核球における抗アポトーシス分子の遺伝子発現が増加しており、IL-8、TNF- $\alpha$  などの高サイトカイン血症の持続、急性期症状の発現に関与していると考えられる。今後、患者末梢血単核球の細胞寿命、グロブリン大量静注療法との関連、遺伝子発現の制御機構について解析する予定である。
- (5) エルシニア菌由来のスーパー抗原 YPM の wild-type およびそのアミノ酸置換変異体の L7Q、D88G を BALB/c マウスに投与して、急性毒性および慢性暴露の影響を解析した。
- (6) wild-type YPM および変異体 L7Q はマウスに静脈内投与すると、ヒト T 細胞に対する増殖刺激活性に比例した急性毒性（致死作用）を示した。ヒト T 細胞に対する活性をもたない変異体 D88G は、致死作用を示さなかった。
- (7) wild-type YPM および変異体 L7Q の急性毒性は T 細胞依存性であり、血中 IFN- $\gamma$  の上昇と密接な関連を示した。黄色ブドウ球菌由来スーパー抗原とは異なって、血中 TNF- $\alpha$  の上昇は微少だった。
- (8) wild-type YPM の投与1週間後から、スーパー抗原特異的な V $\beta$ 8 陽性 T 細胞の clonal deletion がみられた。今後、急性反応における IFN- $\gamma$  などのエフェクター分子の誘導に関わる遺伝子の発現、また慢性暴露による anergy の誘導に関わる遺伝子の発現について、DNA-chip による機能ゲノム解析をすすめる予定である。

## 6. 研究発表

阿部淳. 最近の川崎病の病態と病因. 小児科診療 64, 1121-1126(2001).

---

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10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