

MPO-ANCA 関連血管炎の誘発モデルによる解析と γグロブリン治療の検討

分担研究者：鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長
協力研究者：高橋 啓 東邦大学・医・大橋病院・病理 助教授
共同研究者：大野 尚仁 東京薬大・薬・免疫 教授
共同研究者：武曾 恵理 北野病院・腎臓内科 部長

Tel: 03-5285-1111 内線 2329 Fax: 03-5285-1160 E-mail: ksuzuki@nih.go.jp

研究要旨：真菌感染に由来する分子などによって、腎炎、SLE をはじめとする難治性血管炎が誘導されることが指摘されている。なかでも、好中球機能の低下は、日和見感染として引き起こされるカンジダ症やアスペルギルス症とともに、難治性血管炎の発症び要因になっていることが強く示唆されている。また、カンジダ菌体成分によって誘導される血管炎は、難治性血管炎の病態マーカーとして臨床検査として現在広く利用されている好中球自己抗体 ANCA とも連動した。*C. albicans* 由来の分子 (CAWS) は、Mannan-protein-glucan であることを特定した。一方、これまでの病理学的解析あるいは細胞機能やサイトカインによっていた病態解析に加え、腎炎モデルマウスを作製して、*in vivo* イメージング観察する系を作製した。また、さらに、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードに p38 が関与することを明らかにした。以上から、CAWS が、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であり、サイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる。一方、モデルマウスを用いた血管炎の原因解明や治療法の検討とともに、臨床において、大量ガンマグロブリン製剤 (IVIg) の有効性を検討した。IVIg による治癒機転を解析する上でも、モデルマウスを用いた評価法は、新しい *in vivo* および *in vitro* の評価系として有用であると思われる。尚、本研究は、表記協力研究者と共同研究者に加え、大川原明子、長尾朋和、越尾修（以上、国立感染症研）、直江史郎、大原関利章（以上、東邦大・医・大橋病院）、三浦典子（東京薬大）各博士の協力のもとに行なわれた。

A. 研究目的

真菌感染に由来する分子などによって、血管炎の誘導が指摘されている。われわれは、好中球機能不全による日和見感染の結果として真菌症を引き起こされることを示した (Med.Mycol.40:557, 2002, J.Infect.Dis. 185:1833,2002、J.Infect.Dis.182, 1276,

2000)。また、好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全、自己抗体の産生に関与するなど、血管炎の発症要因との関連を強く示唆していることを報告した (Inflammation 25:381,2001)。

カンジダ症やアスペルギルス症は、殺菌酵素の不全を有する好中球機能の低下による日和見感染の結果として引き起こされることをわれわれは報告してきた。それ

に加え、好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全の誘発や、自己抗体の産生に関与するなど、難治性血管炎の発症およびその要因になっていることが強く示唆されている。これらの自己免疫疾患などには、活性化好中球や病態マーカーとして臨床検査として現在広く利用されている好中球自己抗体（anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA）が関与していることを明らかにされてきている。

難治性血管炎のなかでも、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 ANCA 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。

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考えられている。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。この MPO-ANCA と活性化好中球の関与が難治性血管炎のキーになっていることがわかってきている。

臨床のデータに加えて、モデルマウスにおいても明らかにされてきている。特に、カンジダ菌成分による血管炎誘導の際に、顕著に検出される。Candida albicans derived substances (CADS) の接種によって冠状動脈炎を発症するモデルマウスにおいて、血管炎発症にともない、好中球抗体 MPO-ANCA が誘導される。この MPO-ANCA 上昇には、MPO が関与することを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種して証明した。

一方、血管炎の病態には、活性化好中球や ANCA のクロナリティーが、病態と関連していることから、 γ グロブリン治療の有効性を臨床および動物モデルで検討する必要性があった。これまでの血管炎発症機構は、*in vivo* での病理学的解析あるいは、*in vitro* での細胞機能やサイトカインの解析によっていた。そこで、本研究では、腎炎モデルマウスを作製して、イメージング観察する系を作製するとともに、真菌由来 glycoprotein, CAWS によって誘導され

る血管炎における、サイトカインの解析と、血管内皮細胞の apoptosis カスケードおよび in vivo イメージングによる直接解析を用いて、血管炎発症機構を検討した。イメージング観察系を開発して、サイトカイン産生、血管内皮細胞 apoptosis カスケードの解析とともに、血管炎発症機構を検討した。また、本モデルを用いたガンマグロブリン治療の予備的検討の成績と、臨床での治療成績を報告する。

B. 研究方法

- 1) 血管炎モデルマウスの調整: 本疾患モデルは、川崎病リスクの冠状動脈炎発症モデルとして作られ、罹患児糞便から分離した *C. albicans* 由来物質 (CADS および CAWS) により誘導した。
- 2) マウスのリコンビナント MPO の調整: マウスのリコンビナント MPO は、ヒトのリコンビナント MPO と同様に作成した。
- 3) マウス血清中の MPO-ANCA 値: ヒトおよびマウス MPO の ELISA により測定した。
- 4) MPO-KO の MPO-ANCA 産生と血管炎発症の検討: CADS 誘導の血管炎率と血清中の MPO-ANCA 値について野生型のそれと比較した。MPO-KO 群、C57BL/6 (対照群) (4 週、雄、各 5) について、CADS を

5 日間腹腔接種し、3 週間のインターバル後再び同様に接種した。3 週後心採血にて屠殺、病理標本を作製し血管炎の評価をした。MPO-ANCA はヒト MPO-III を抗原とする ELISA 法にて測定した。

- 5) In vivo イメージング: C57BL/6 マウスに CAWS を iv 投与 3 時間後に anti-mMPO を投与した。さらに、5 日後に fMet-Leu-Phe (FMLP: 細菌由来トリペプチド) を iv 投与後、FITC-dextran を用いて血流状態を観察した。
- 6) CAWS 投与によるサイトカインレベルの変動: CAWS 投与直後の spleen でのサイトカインレベルの変動を解析した。
- 7) 血管内皮細胞 (HUVEC) apoptosis にかかわるシグナルの変動の解析: 抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法により MAPK 活性および Caspase 活性を測定した。

C. 研究結果

1) CAWS によって、CADS 同様、冠状動脈炎が誘導された。その頻度は、100% 近い値を示した。

2) in vivo イメージングにおいては、CAWS のほかに、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe も加えることによって腎血管傷害が誘導された (図 1)。ま

た、in vivo イメージングの解析では、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた (図1)。



図1 CAWS 誘導の腎血管傷害 in vivo イメージング

CAWS + anti-mouseMPO+ fMet-Leu-Phe
の投与による状態

また、腎臓表面血管の流速の変化も CAWS+ anti-mouseMPO+ fMet-Leu-Phe の時に、悪化することがわかった (図2)。

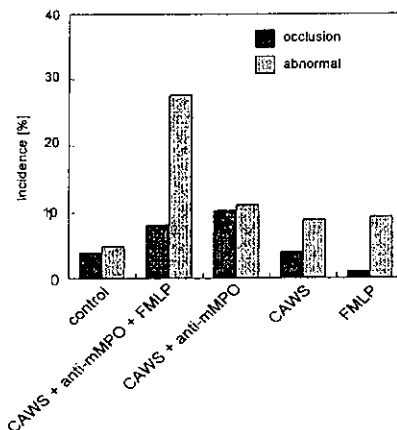


図2. 腎臓表面血管の流速の変化

さらに、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードを検討した。その結

果、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化は、Caspase8 と連動する p38MAPK の関与がしていた (図3)。また、好中球や脱顆粒成分によっても、この反応が誘導された。

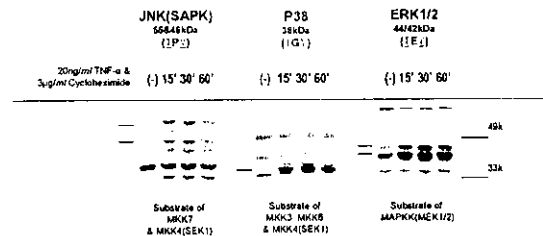


図3. 血管内皮細胞の MAP-kinase のリン酸化

さらに、CAWS 投与時の脾臓からのサイトカインの産生は、IFN γ 、IL-6 および IL-10 が血管炎と連動した。

D. 考察

これらの血管炎誘導モデルにおいては、*Candida albicans* 由来糖ペプチドが、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であることから、CAWS などの真菌由来分子がサイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる。

本モデルマウスは、今回、主としておこなった CAWS の実験の他にも CADS の接種によって誘発される冠状動脈炎を発症するモデルマウスとして、Murata

らが作製している。本動脈炎誘発モデルマウスでは、増殖性肉芽腫性炎を冠状動脈に高率に惹起させることが可能であり、病変の組織像および分布の類似性から川崎病動脈炎モデルとして考えられている。本モデルマウスは、カンジダ菌体抽出物をマウス腹腔内に接種することにより系統的動脈炎を惹起させるものである。すなわち、本実験系では、マウスの系統により C3H/HeN を代表とする高発症の冠状動脈炎が見られたり、CBA/JN を代表とする低発症マウスなど、系統により発症頻度に差が認められている。この発症の原因に MPO と MPO-ANCA にあるのではないかと考え、MPO 遺伝子欠損マウスを用いて血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べた。すなわち、MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種することで、CADS 誘導の血管炎の頻度が 40% に低下するとともに、MPO-ANCA が PBS コントロールレベルまで低下したことから、活性化した好中球から MPO が放出されて、抗原になっていることが示唆されている。

また、本研究では、CAWS によって、CADS 同様、冠状動脈炎が誘導された。その頻度は、100%近い値を示した。また、分子が mannan-protein-glucan に特定できたことは、膜成分のうち本分子が強力に炎症を惹起していることが示唆され

た。また、in vivo イメージングにおいても、CAWS、anti-mouseMPO、fMet-Leu-Phe により、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた。この in vivo での現象が、腎血管傷害の誘導を説明できると思われるが、分子機構との関係を明らかにする必要があり、今後も引き続き、検討する予定である。この血管内皮細胞の関与が示唆されることから、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化を解析し、Caspase8 と連動する p38MAPK の関与が明らかとなった。また、好中球や脱顆粒成分によっても、この反応が誘導された。このことは、内皮細胞固有のアポトーシスシグナルが存在することが示唆される。

本血管炎誘導モデルにおいて、CADS/CAWS が、MPO および MPO-ANCA 産生による発症誘導に不可欠であることから、真菌由来分子が、血管炎発症と関わる好中球の活性化に重要な役割を担っていると考えられる。一方、モデルマウスとともに、臨床において、大量ガンマグロブリン製剤 (IVIg) の有効性を検討し良好な成績を得ている (人工ポリクローナル F γ グロブリン製剤の開発に関する研究班研究報告書 13 年度 9-20, 2002.)。IVIg による治癒機転を解析する上でも、これらの評価法は、新し

い *in vivo* ならびに *in vitro* の評価系として有用であると思われる。

E. 結論

真菌感染に由来する分子などによって、腎炎、SLE をはじめとする難治性血管炎が誘導される。とりわけ、カンジダ菌体幕成分が血管炎を誘導し、難治性血管炎の病態マーカーの好中球自己抗体 ANCA も病態と連動した。そこで、*C. albicans* 由来の分子を特定 CAWS し、Mannan-protein-glucan であるがわかった。一方、CAWS 誘導の腎炎モデルマウスを作製して、*in vivo* イメージング観察する系を作製した。また、さらに、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードに p38 が関与することを明らかにした。以上から、*Candida albicans* 由来糖ペプチドが、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であり、サイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる。

本血管炎誘導モデルにおいて、CADS/CAWS が、MPO および MPO-ANCA 産生による発症誘導に不可欠であることから、真菌由来分子が、血管炎発症と関わる好中球の活性化に重要な役割を担っていると考えられる。一方、モデルマウスを用いて、われわれが開発しているイメージングやアポトーシスシグナルによる評価法は、臨床において、

IVIg を初め、血管炎の治療法の有効性を評価する上で、有用であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Mie Ito, Oda, Yamagoe S, Suzuki K, Tanokura, M. Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. Protein Expression Purif. in press.
2. Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, and Karl-Heinz Krause. The HIV-1 Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation. J Biol. Chem. 277: 42136-43, 2002.
3. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H : Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus*

fumigatus. *Med. Mycol.* 40: 557-563, 2002.

4. Kohji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kmeoka, Akiko Ishida-Okawara, Fumikazu Kohi and Kazuo Suzuki. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction · study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research* in press.

5. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H : Critical role of myeloperoxidase and NADPH-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 185: 1833-1837, 2002:

6. A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, Y. Hashimoto, Y. Aratani, H. Koyama, N. Maeda, S. Naoe, K. Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25: 381-387, 2001.

7. 鈴木和男 : SCG/Kj マウスと ANCA 関連血管炎—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から— *リウマチ科* 28:560-577, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ゲノム解析による、ANCA 関連血管炎の病因・病態の検討

徳永勝士（東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学）

研究要旨

ゲノム解析のアプローチから、ANCA 関連血管炎の病因・病態解明に有用な知見を得る目的で、ゲノム DNA を用いた疾患感受性遺伝子解析と、遺伝子発現解析から得られた情報を応用した解析を計画している。本年度は、平成11～13年度の当研究班（橋本博史班長）にて、多数の共同研究施設・研究協力施設の協力の下に収集された既収集検体をゲノム解析に使用するための倫理申請を行い、承認を得た。また、過去に関節リウマチ(RA)滑膜組織内の血管内皮細胞に強発現を検出した *ID* 遺伝子の炎症における役割を明らかにするために、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いた遺伝子導入実験を行った。*ID3* 遺伝子の強制発現により、HUVECに、増殖能の亢進、ICAM-1, E-selectin 発現の上昇が観察され、*ID* 遺伝子の過剰発現のみによって、HUVEC の増殖と活性化を誘導しうることが明らかになった。

A. 研究目的

ゲノム解析のアプローチを利用して、ANCA 関連血管炎の病因・病態解明上有用な情報を見出し、診断・治療法の開発に結びつけることが本研究計画全体の目的である。

われわれは、昨年度までに、平成11～13年度の当研究班（橋本博史班長）にて、多数の共同研究施設・研究協力施設の協力の下に収集された ANCA 関連血管炎検体（うち顕微鏡的多発血管炎[MPA]が50例）を用い、*HLA-DRB1*, *TNF*, *TNFR2*, *FCGR2A*, *2B*, *3A*, *3B*, *CTLA4* を候補遺伝子として関連解析を施行し、MPA と *HLA-DRB1*0901* との有意な関連を報告した (Tsuchiya et al., in press)。今回の研究班では、これらの検体を用いて、HLA 領域において *DRB1*0901* が一義的な感受性遺伝子であるのか、連鎖不平衡にあるほかの遺伝子が一義的であるのかを検討する予定である。また、加えて、HLA 領域以外に位置する候補遺伝子数個の関連解析を施行する計画である。

また、われわれは過去に、differential display を用いた実験により、変形性関節症(OA)組織と比較して、RA 滑膜組織に Id

(inhibitor of DNA binding/differentiation)

ファミリー遺伝子発現レベルが上昇していること、および、免疫組織化学染色により、Id ファミリー遺伝子産物は血管内皮細胞に局在することを報告した (Sakurai et al., 2001)。Id は、近年、細胞増殖、血管新生との関連が注目を集める転写制御因子であり、成人の炎症性組織における発現を検出したのは、われわれが初めてである。通常、成人の正常組織には発現が検出されないため、将来的な治療のターゲットとしても注目される。

血管内皮細胞は、ANCA 関連血管炎においても、病態上重要な役割を果たす。そこで、本研究では、特に炎症との関連を念頭に置き、Id の血管内皮細胞における役割を検討する。本年度は、*ID* 遺伝子強制発現によって培養血管内皮細胞に観察される表現型の変化を検討した。

B. 研究方法

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に *ID3* 遺伝子導入を行い、増殖を MTT 法にて、ICAM-1, E-selectin 発現量を RT-PCR, フローサイトメ

トリーにて測定した。また、Id 発現の生体内における誘導因子を探るため、VEGF 刺激により、HUVEC に *ID3* が誘導されるか否かを検討した。

(倫理面への配慮)

すでに連結不可能匿名化された形で保管されていた、前研究班において収集した血管炎患者検体を、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）」に則り、「遺伝子研究の同意を得た既収集匿名検体（A群試料）」として、今研究班においても使用するための研究計画の承認を、東京大学大学院医学系研究科ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会に提出、審議を受け、修正の後に、平成15年2月10日に承認を受けた。

C. 研究結果

ID3 遺伝子導入 HUVEC は、遺伝子導入 24 時間後、4.1 倍の *ID3* mRNA 発現上昇を示し、対照と比較して、1.9 倍の増殖を示した（図 1）。mRNA レベルで ICAM-1 は 24 時間後に 4.8 倍の（図 2）、E-selectin は 4.2 倍の（図 3）発現増強が見られ、細胞表面における発現にも、有意な上昇が確認された。また、VEGF 刺激により、HUVEC に *ID3* 発現が誘導された（図 4）。

D. 考察

ID3 の強制発現のみによって、培養内皮細胞の増殖や活性化を誘導しうることを示された。また、VEGF による血管内皮細胞活性化に Id が関与する可能性が示唆された。過去に Wegener 肉芽腫症において、血清中 VEGF の増加が報告されていることを考え合わせると、ANCA 関連血管炎の病態に Id が関与する可能性が想定される。一般に Id は腫瘍以外の成人の組織では発現が見られないことから、Id 発現制御は血管炎の新たな治療の可能性を示すものと期待される。今後、RNAi を用いた Id の発現制御により、HUVEC の活性化制御が可能

かどうかを検討する予定である。

E. 結論

ID 遺伝子の過剰発現が血管内皮細胞活性化に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sirikong M, Tsuchiya N, Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Siriboonrit U, Tokunaga K: Association of *HLA-DRB1*1502 - DQB1*0501* haplotype with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 59: 113-117, 2002.
- 2) Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM, Tokunaga K: Association of Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: Contribution of *FCGR2B* to the genetic susceptibility to SLE. *Arthritis Rheum* 46: 1242-1254, 2002.
- 3) Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hagiwara K, Kano H, Takazoe M, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K: Polymorphisms of human *CD19* gene: Possible association with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun* 3 Suppl 1: S21-30, 2002.
- 4) Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Analysis on the association of human *BLYS (BAFF, TNFSF13B)* polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 3: 424-429, 2002.
- 5) Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Kashiwase

- K, Ishikawa Y, Arita H, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T: Association of *HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302* haplotype, but not of *TNF α* promoter and *NKp30* polymorphism, with postherpetic neuralgia (PHN) in the Japanese population. *Genes Immun* 3: 477-481, 2002.
- 6) Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, Tokunaga K: Studies on the association of Fc γ receptor IIA, IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with rheumatoid arthritis in Japanese: Evidence for a genetic interaction between *HLA-DRB1* and *FCGR3A*. *Genes Immun* 3: 488-493, 2002.
- 7) Tsuchiya N, Ohashi J, Tokunaga K. Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders. *Immunol Rev* 190: 169-181, 2002.
- 8) Kyogoku C, Tsuchiya N, Shibue T, Tokunaga K, Matsuta K. *TNFR2* position 196 polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis: comment on the article by Dieudé et al [letter]. *Arthritis Rheum* 48: 273-274, 2003.
- 9) Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K. Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of *NKG2-C* deletion in the general population. *Genes Immun* (in press)
- 10) Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, Katsushi Tokunaga K, Hashimoto H. Genetic background of Japanese patients with ANCA-associated vasculitis: Association of *HLA-DRB1*0901* with microscopic polyangiitis. *J. Rheumatol.* (in press)
- 11) Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Fujiwara K, Chandanayingyong D, Tokunaga K. Association of Fc γ receptor IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* (in press).
- ## 2. 学会発表
- 1) 土屋尚之、京極千恵子、黒木喜美子、氷上光輝、川崎綾、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：全身性エリテマトーデス疾患感受性遺伝子の検討。リウマチ 42: 237, 2002.
- 2) 山口晃弘、櫻井大祐、土屋尚之、徳永勝士、山本一彦：慢性関節リウマチ滑膜における特異的発現遺伝子の検討。リウマチ 42: 285, 2002.
- 3) 京極千恵子、土屋尚之、松多邦雄、徳永勝士：日本人慢性関節リウマチ患者におけるFc \cdot 受容体遺伝子群多型の解析。リウマチ 42: 363, 2002.
- 4) 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：BLyS(TNFSF13B)の変異解析とSLEおよびRAとの関連の検討。リウマチ 42: 367, 2002.
- 5) 黒木喜美子、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：ヒトCD19遺伝子3'非翻訳領域内反復配列多型と日本人SLE感受性との関連。リウマチ 42: 367, 2002.
- 6) 櫻井大祐、山口晃弘、土屋尚之、山本一彦、徳永勝士：慢性関節リウマチ患者滑膜における*FOSB*遺伝子の発現。リウマチ 42: 424, 2002.
- 7) Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Kashiwase K, Ishikawa Y, Arita H, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T: HLA haplotype, A*3303-B*4403-DRB1*1302 associates with postherpetic neuralgia (PHN). *Tissue Antigens* 59 (Suppl): 67, 2002.
- 8) Wakui M, Yamaguchi A, Sakurai D, Ogasawara K, Yokochi T, Hatta-Ohashi Y, Karaki S, Kurata K, Nishida N, Suyama A, Ikeda Y, Tsuchiya N, Tokunaga K: Differential display method-based gene

- expression analysis and development of a novel oligonucleotide array assay in GvHR. Tissue Antigens 59 (Suppl): 141, 2002.
- 9) Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Tsuno N, Okaji Y, Tokunaga K: Induction of proliferation and activation of human endothelial cells by overexpression of *ID* gene. Arthritis Rheum 46 (Suppl): S43, 2002.
- 10) Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, Shibue T, Tokunaga K: Analyses on the association of Fcγ receptor family and *TNFR2 (TNFRSF1B)* polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis in Japanese. Arthritis Rheum 46 (Suppl): S98, 2002.
- 11) Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, Tokunaga K, Hashimoto H: Genetic background of Japanese patients with ANCA-associated vasculitis: Association of *HLA-DRB1*0901* with microscopic polyangiitis. Arthritis Rheum 46 (Suppl): S188, 2002.
- 12) Siriboonrit U, Kyogoku C, Sirikong M, Tsuchiya N, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Chandanayingyong D, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. Arthritis Rheum 46 (Suppl): S287, 2002.
- 13) Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Studies on the association of human *BLYS (BAFF, TNFSF13B)* and *BAFF-R* polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 46 (Suppl): S288, 2002.
- 14) Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Tokunaga K: Elevated level of FosB mRNA and FosB/DeltaFosB ratio in the synovial tissues of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 46 (Suppl): S502, 2002.
- 15) Kuroki K, Tsuchiya N, Matsuta K, Fukazawa T, Juji T, Hashimoto H, Tokunaga K: Association of Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor 1 (LIR1, ILT2, LILRB1) polymorphism with susceptibility to rheumatoid arthritis in Japanese. Arthritis Rheum 46 (Suppl): S550, 2002.
- 16) Furuya T, Kotake S, Hakoda M, Ichikawa N, Nanke Y, Yamanishi Y, Kawasaki A, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani N: TNFA 5' -flanking region polymorphisms in 84 Japanese patients with myositis. Arthritis Rheum 46 (Suppl): S611, 2002.
- 17) 京極千恵子、土屋尚之、松多邦雄、渋谷司、徳永勝士：日本人関節リウマチ(RA)における Fcγ 受容体ファミリーおよび *TNFR2(TNFRSF1B)* 遺伝子多型の関連研究。日本人類遺伝学会第47回大会(2002年11月13日-15日、名古屋)。P113, 2002.
- 18) 黒木喜美子、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、十字猛夫、橋本博史、徳永勝士：Leukocyte immunoglobulin-like receptor 1 (LIR1) 多型と日本人関節リウマチ疾患感受性との関連。日本人類遺伝学会第47回大会(2002年11月13日-15日、名古屋)。P115, 2002.
- 19) 宮下リサ、土屋尚之、氷上光輝、黒木喜美子、屋部登志雄、徳永勝士：ヒト NKG2-C 遺伝子欠失の分子遺伝学的解析。日本人類遺伝学会第47回大会(2002年11月13日-15日、名古屋)。P141, 2002.
- 20) 櫻井大祐、山口晃弘、大槻祐頼、津野寛和、土屋尚之、徳永勝士：ID 遺伝子強制発現による血管内皮細胞の活性化および増殖誘導。日本人類遺伝学会第47回大会(2002年11月13日-15日、名古屋)。P172, 2002.
- 21) 宮下リサ、土屋尚之、黒木喜美子、屋部登志雄、徳永勝士：ヒト NKG2-C 遺伝子欠失の分子遺伝学的解析。日本免疫学会総会学術集会記録 32: 136, 2002.
- 22) 川崎綾、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、

長谷英徳、小端哲二、橋本博史、徳永勝士：
BLyS(TNFSF13B), BAFF-R の変異解析と SLE お
よび RA との関連の検討。日本免疫学会総会学
術集会記録 32: 210, 2002.

23) Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K,
Shibue T, Tokunaga K: Analyses on the
association of Fcγ receptor family and
TNFR2 (TNFRSF1B) polymorphisms with
susceptibility to rheumatoid arthritis in
Japanese. 日本免疫学会総会学術集会記録
32: 298, 2002.

24) Kuroki K, Tsuchiya N, Matsuta K,
Fukazawa T, Juji T, Hashimoto H, Tokunaga
K: Association of Leukocyte
Immunoglobulin-like Receptor 1 (LIR1, ILT2,
LILRB1) polymorphism with susceptibility
to rheumatoid arthritis (RA) in Japanese.
日本免疫学会総会学術集会記録 32: 298,
2002.

25) Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N,
Tsuno N, Okaji Y, Tokunaga K: Induction of
proliferation and activation of human
endothelial cells by overexpression of *ID*
gene. 日本免疫学会総会学術集会記録 32:
301, 2002.

26) 山口晃弘、櫻井大祐、土屋尚之、田中良
哉、徳永勝士、山本一彦：関節リウマチにお
ける follistatin related protein の滑膜線
維芽細胞増殖への関与。日本免疫学会総会学
術集会記録 32: 298, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

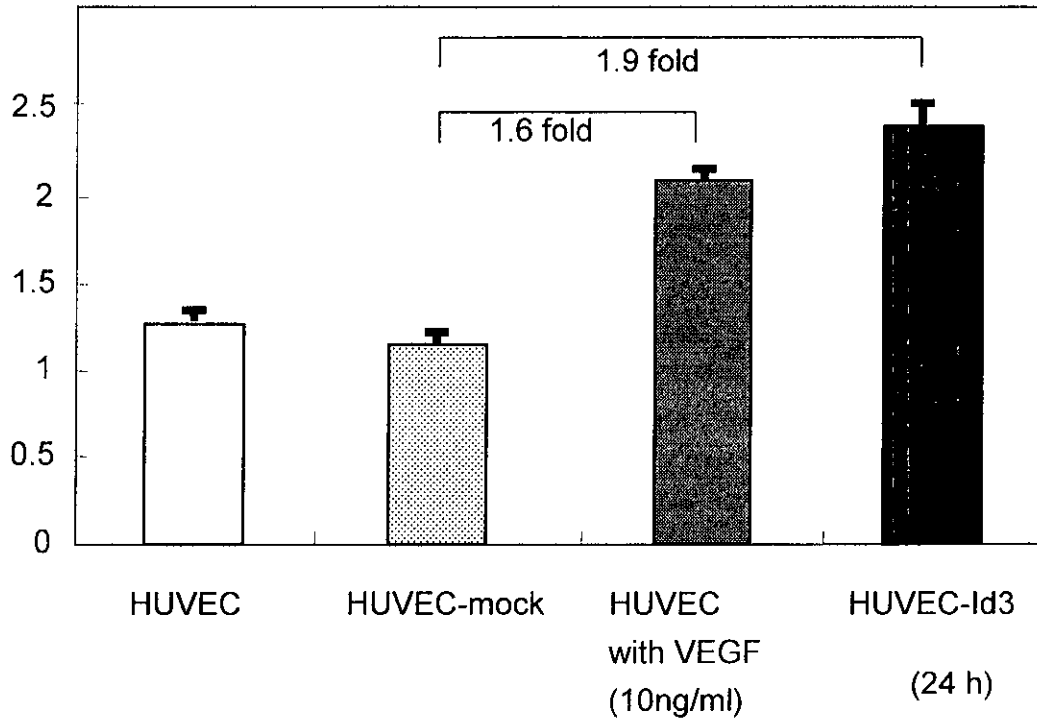
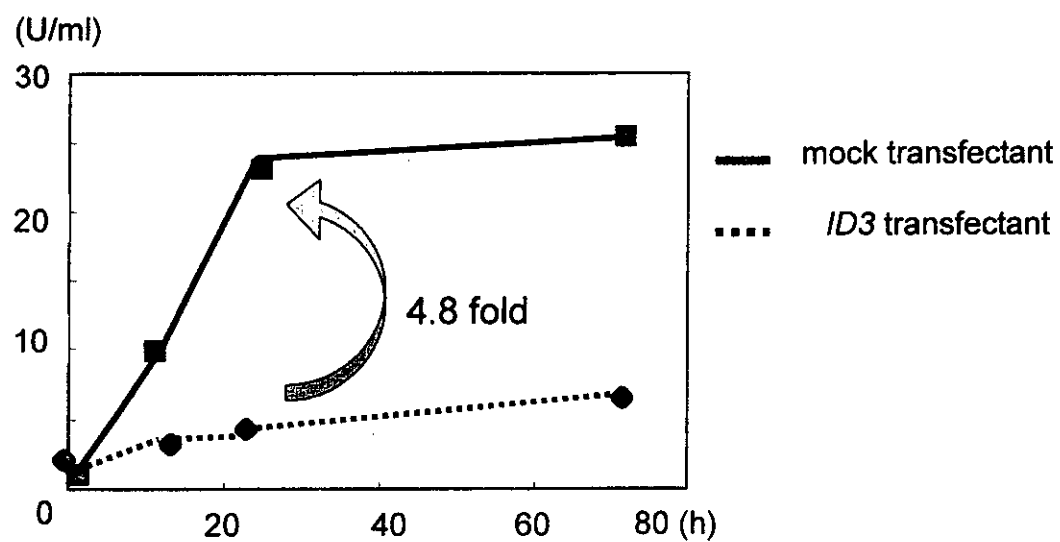


図1 Id3 強制発現による HUVEC の増殖誘導。Id3 transfectant は、陽性対照である VEGF 刺激 HUVEC と比較して、同等以上の増殖を示した。

(A) ICAM-1 mRNA レベル



(B) 細胞表面 ICAM-1 発現レベル

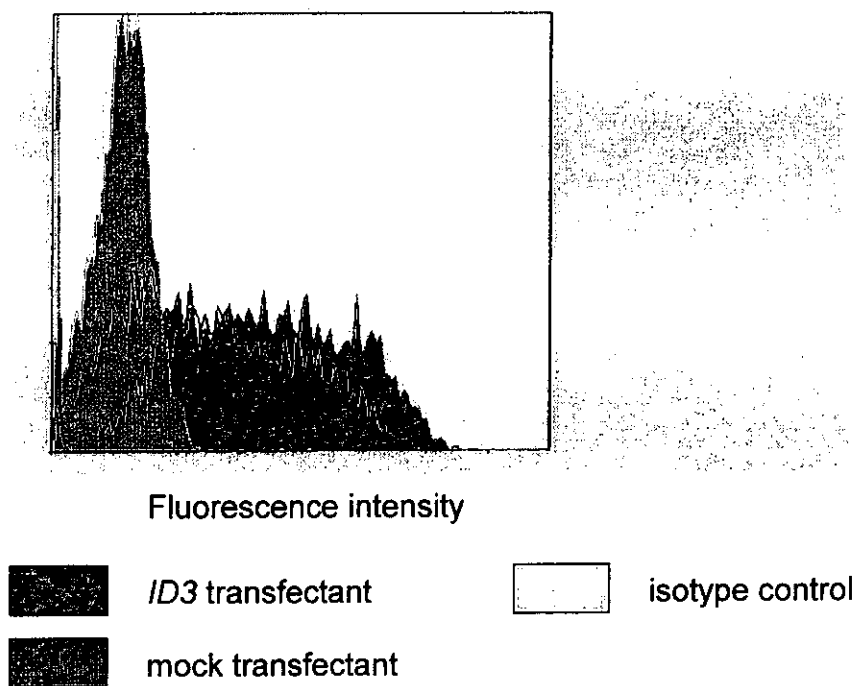
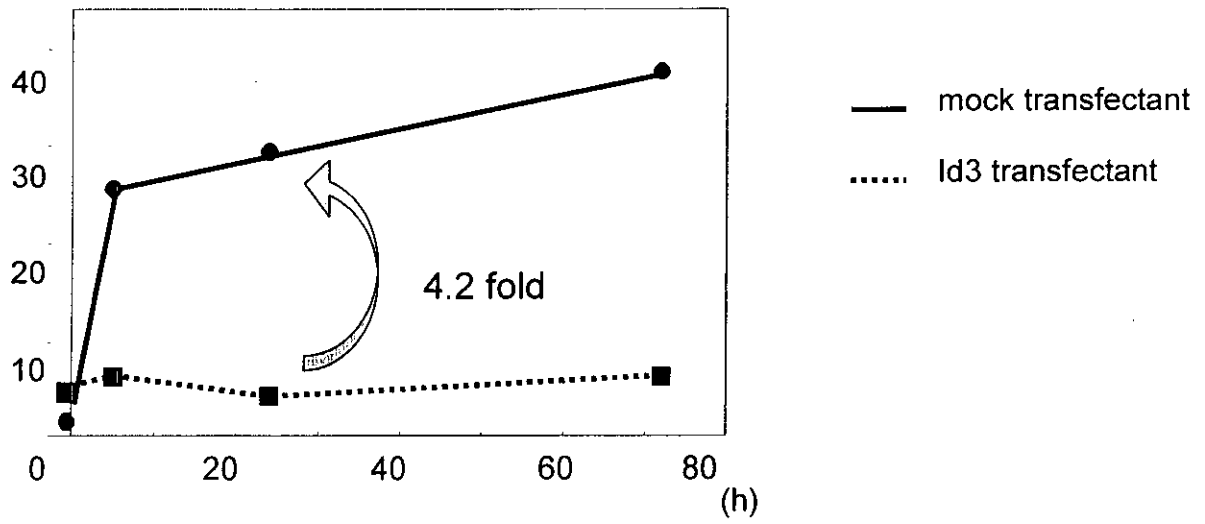


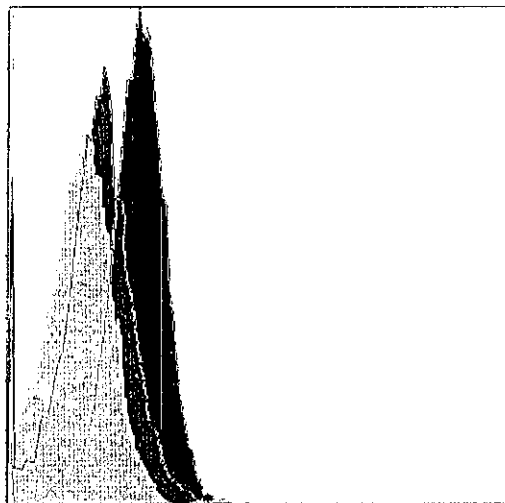
図 2 Id3 強制発現による HUVEC の CD54(ICAM-1)発現誘導

(A) E-selectin mRNA レベル

(u/ml)



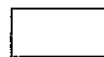
(B) 細胞表面 E-selectin 発現レベル



Fluorescence intensity



ID3 transfectant



Isotype control



mock transfectant

図3 Id3 強制発現による HUVEC の CD62E(E-selectin)発現誘導

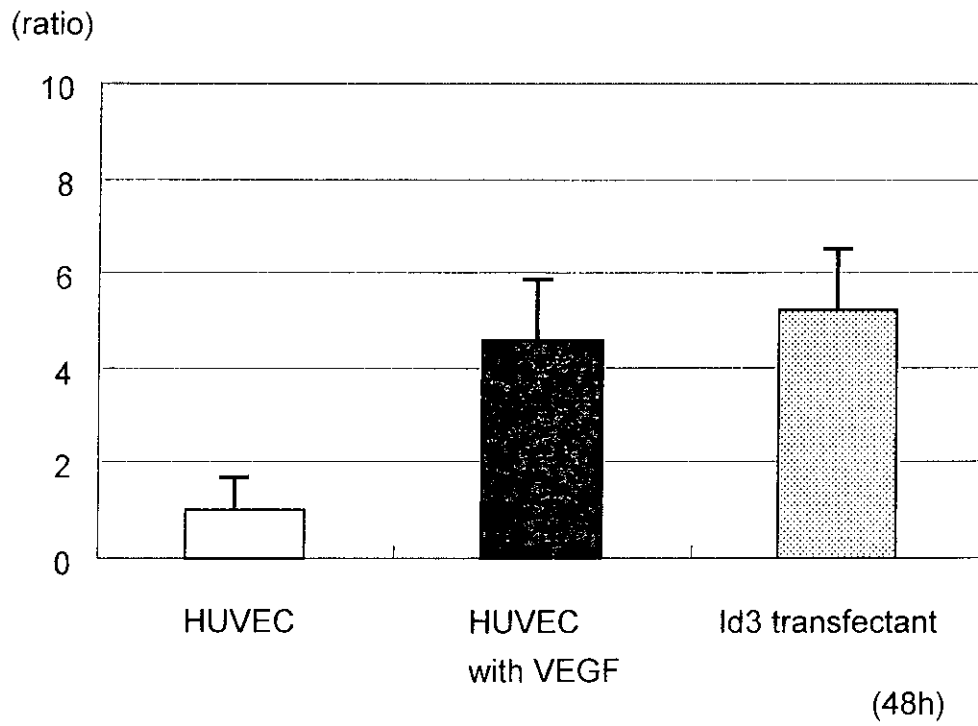


図4 HUVECのVEGF刺激によるId3発現誘導。
 VEGF刺激後48時間後に、HUVECのId3 mRNAレベルをRT-PCRにて測定した。
 陽性対照のId3 transfectantに匹敵する量のId3 mRNAの発現が検出された。

血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原に関する研究

加藤 智啓（聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 生体機能制御部門）

研究要旨

難治性血管炎の発症に重要と考えられる抗内皮細胞抗体の血管内皮細胞への結合とその影響を解明する第一歩として、これまで遅れていた対応抗原の同定をプロテオミクスを用いて網羅的に行った。各種血管炎患者血清による differential western blotting 法で約 50 個の候補抗原スポットが検出された。そのうちの 6 個を mass-fingerprinting 法により同定し、さらにそのなかには実際に組換え蛋白を調整し、抗原性を確認できたものもあった。本方法は細胞腫あるいは組織特異的に発現する自己抗原を同定するために極めて有効であり、今後の個別的解析と併せて、抗内皮細胞抗体の対応抗原の全容と、血管内皮細胞に対する作用が理解可能になる道筋が開けたと考えられた。

A. 研究目的

本研究は難治性血管炎の発症に重要と考えられる抗内皮細胞抗体の血管内皮細胞への結合とその影響を解明することを目的とする。結節性多発動脈炎など血管炎症を主体とする一群の疾患（いわゆる血管炎症候群）は、一般に難治性かつ予後不良であり、病因解明が社会的要請である。発症機序としては自己免疫機序の関与が考えられているが、その詳細は不明である。血管炎症候群で高頻度に検出される自己抗体には抗好中球細胞質抗体と抗内皮細胞抗体がある。前者においてはミエロペルオキシダーゼなど主要な対応抗原が同定され、現在その病因論的役割が研究されている。一方、抗内皮細胞抗体は血管内皮細胞に直接結合による障害を通して血管炎を発症する機序が考えられている。従って抗内皮細胞抗体の種類とそれによる内皮細胞障害の機序を解明すれば、血管炎の初期においてその進行を防ぐことができると考えられる。しかしながら、抗内皮細胞抗体の対応抗原が詳しく特定されてないために、抗内皮細胞抗体の血

管内皮細胞への結合と障害機序を分子レベルで解明できないのが現状である。そのため、本研究においては抗内皮細胞抗体の標的抗原の網羅的同定を最初の目標とする

B. 研究方法

プロテオミクスを用いた differential western blotting 法で、血管内皮細胞に特異的な自己抗原を網羅的に検出解析する。具体的にはヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) と比較用細胞として Hela 細胞を用い、それぞれから尿素、チオ尿素、CHAPS を含む溶液で蛋白を抽出した。これを等電点電気泳動および分子量による SDS-PAGE を組み合わせた 2 次元電気泳動法で分離展開した。その後、ニトロセルロース膜に転写し、血管炎を有する全身性自己免疫疾患患者血清を用いてエウスタンプロットを行った。血清に反応した蛋白スポット（自己抗原スポット）の蛋白を同定するために、同様に 2 次元電気泳動法で展開し、クマシー染色したゲルから、陽性蛋白スポットに一致するスポットを切り出して回収し、ト

リプシン消化後、ゲルから抽出した。これらの消化ペプチドの質量を、飛行時間型質量分析器を用いた mass-fingerprinting 法により決定し、マスコット (ソフトウェア) による蛋白データベース検索から質量の一致する候補蛋白を選定した。候補蛋白は、報告されている mRNA 配列から、PCR を用いて cDNA を増幅、クローニングし、マルトース結合蛋白 (MBP) との融合蛋白として大腸菌で発現させ、精製した。これを用いて抗原性の確認とともに、エウスタンプロット法と ELISA 法にて血管炎を有する全身性自己免疫疾患患者、血管炎を有しない全身性自己免疫疾患患者、および健常人の血清を広く検索した。

C. 研究結果

HUVEC および Hela 細胞のプロテオームを用いた Differential Western Blotting 法を行い、W e g e n e r 肉芽腫症、Henö c h - S c h ö n l i e n 紫斑、血管型ベーチェット病、結節性多発動脈炎、悪性関節リウマチなどの患者血清を用いて約 50 個の HUVEC に特異性の高い自己抗原を検出した。mass-fingerprinting 法に現在まで、6 個の候補蛋白を同定した。そのなかの 3 個について、組換え蛋白を作成し、ELISA と Western Blotting を行った結果、ひとつに血管炎患者における自己抗原性が確認された。

D. 考察

細胞腫あるいは組織特異的に発現する自己抗原を同定するために、本研究で用いた 2 次元電気泳動後と Differential Western Blotting 法の組み合わせは極めて有効であった。ひとりの血管炎患者が複数の抗内皮細胞抗体を有する可能性も示唆された。今後の個別的解析と併せて、抗内皮細胞抗体の対応抗原の全容が理解可能になると考えられる。

E. 結論

プロテオミクス手法を用いて、抗内皮細胞抗体の標的抗原を網羅的に解析することがで

きると考えられた。抗内皮細胞抗体は対応抗原の種類によってあるいはその組み合わせによって、内皮細胞への影響が異なることは容易に想像される。今後個別的解析により、抗原別および組み合わせによる内皮細胞障害の機序の解明を行っていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Okamoto N, Yotsuyanagi H, Ooka S, Matsui T, Kurokawa M, Suzuki M, Iino S, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to CD69 in patients with chronic hepatitis type C; a Candidate marker for predicting response to the IFN therapy. *Intervirology* 46:56-65, 2003

(2) Tsuruha J, Masuko-Hongo K, Kato T, Sakata M, Nakamura H, Sekine T, Takigawa M, Nishioka K. Autoimmunity against YKL-39, a human cartilage-derived protein in patients with osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 29:1459-1466, 2002

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

〔V〕

平成 14 年度研究成果に関する
刊行物一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
尾崎承一	血管炎症候群の診断と病態把握：免疫血清学的検査	長澤俊彦 監修・橋本博史 編集	血管炎	朝倉書店	東京	2001	113-118
尾崎承一	結節性多発動脈炎	竹原和彦、桑名正隆、宮地良樹	新・膠原病診断と治療の最新ポイント 皮膚から内臓へ	診断と治療社	東京	2002	100-105
尾崎承一	ANCAと血管炎	竹原和彦、桑名正隆、宮地良樹	新・膠原病診断と治療の最新ポイント 皮膚から内臓へ	診断と治療社	東京	2002	100-105
中林公正	膠原病の腎障害、ループス腎炎、強皮症腎、Goodpasture症候群、慢性関節リウマチに伴う腎障害、Sjogren症候群の腎障害	菱田 明 榎野博史	標準腎臓病学	医学書院	東京	2002	239~249
神谷康司 中林公正	シクロホスアミドパルス療法、	長澤俊彦 二瓶 宏 湯村和子	膠原病・血管炎の腎障害	東京医学社	東京	2002	254~259
中林公正 遠藤哲也 本田恒雄	腎疾患に使用する薬剤、免疫抑制薬	小山哲夫 北岡建樹 飯野安彦 五十嵐隆	腎疾患治療マニュアル	東京医学社	東京	2002	12~17
中林公正	膠原病・リウマチ性疾患、多発性動脈炎	橋本博史 西崎 統	ステロイド-効果的な選び方・使い方	総合医学社	東京	2002	34~36
中林公正	ウエゲナー肉芽腫症	井村裕夫	内科学	文光堂	東京	2002	349~351