

20020742

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成15（2003）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. 分担研究報告

1. 発症機構解析班

1-1. 病態発症機構の分子的・遺伝的解析と測定方法

1) 血管炎関連の多臓器不全の誘発モデルと *in vivo* イメージングによる血管傷害過程の解析

鈴木和男（国立感染症研究所生物活性物質部）・・・13

2) 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）・・・19

3) 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）・・・27

4) 新規好中球遊走サイトカイン *LECT2* の劇症肝炎への関連についての研究

関塚永一（国立埼玉病院）・・・31

1-2. 多臓器不全因子のヒトの遺伝的背景の解析

1) 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）・・・37

2) ミエロペルオキシダーゼコード領域の日本人集団での変異に関する研究

亀岡洋祐（国立感染症研究所遺伝子資源室）・・・41

2. モデル動物・プローブ班

1) 多臓器不全に関与するサイトカインモデルマウス

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）・・・47

2) 肝機能不全症解析：*LECT2* ノックアウトマウス

鈴木和男 山越 智（国立感染症研究所生物活性物質部）・・・51

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起炎物質の検討

高橋 啓（東邦大学医学部附属大橋病院病院病理）・・・55

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医療生態学研究部）・・・59

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）・・・63

3. 臨床研究班	
1) 多臓器不全に伴う心筋炎、動脈炎、不整脈の解析	
相澤義房（新潟大学大学院循環器学分野）	73
2) 周産期・新生児での低酸素性虚血性脳症における治療法の開発	
布井博幸（宮崎医科大学小児科）	83
3) 川崎病における血管炎の病態解明に関する研究と治療法の検討	
竹下誠一郎（防衛医科大学校小児科）	87
Ⅲ. 研究班会議資料、研究成果の刊行に関する一覧表	93
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	149

厚生労働科学研究費補助金（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・遺伝的背景の解析班

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）

亀岡洋祐（国立感染症研究所遺伝子解析室・主任研究官）

関塚永一（国立埼玉病院・部長）

2. モデル動物・網羅的遺伝子解析・解析プローブ班

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. 病態・治療法検討—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）
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）
馬淵綾子（日医大・微生物免疫・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）

研究要旨

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。多臓器不全の発症要因には、難治性の血管炎が深くかかわっていることが指摘されている。すなわち、難治性の血管炎と連動して、好中球や免疫細胞の機能破綻やそれにつづくサイトカインの異常なネットワークかく乱が、血管炎を激化させ、種々の臓器障害をもたらし、改善不能におちいってしまうと考えられるようになってきている。血管炎から多臓器不全にいたる過程で、血管内皮細胞は、サイトカインと白血球の攻撃にさらされ、また、種々の臓器内での異常反応の前線となる。したがって、多臓器不全にいたる過程の解析や治療方法の開発には、全身性の血管炎の傷害機構の解析に加え、劇症化するプロセスを生きたまままで解析する方法の開発も重要になってきている。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を開発をめざしている。具体的には、1) 多臓器不全因子の特定、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プロジェクトを構成し、以下の研究を行った。

本研究の遂行には、主任研究者らがクローニングした肝細胞高発現サイトカインLECT2 遺伝子、分担者らが開発したサイトカイン IL-1Ra および補体系活性化分子 proPCR を利用した。LECT2、IL-1Ra および proPCR ノックアウトマウスによる血管炎、多臓器不全・劇症肝炎の解析の準備が整ってきている。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、これらを用いた治療法を検討した。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、特に、難治性血管炎から多臓器不全化に移行する過程を評価する方法の開発に中心を置いた。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、シクロスポリンによる治療法の検討、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検討した。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し、起因分子の特定を行った。多臓器不全に発展する肝炎、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。また、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：新しい評価法、診断法の確立をめざして、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 の結晶化し、X線結晶構造解析を行った。

今後は、13, 14年度の成果を発展させ、1) 難治性血管炎から多臓器不全化機構の解明、2) 血管炎の多様性とその解明、3) 感染により誘発される血管炎・多臓器不全と病態、4) 発症・病態関連遺伝子網羅的解析とその特定、5) サイトカイン・免疫系のかく乱機構、6) 評価法と診断と治療法確立、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。これらの難治性血管炎が、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。難治性血管炎誘発モデルの開発が必要である。また、これらの病態に関与する LECT2 や、IL-Ra などのサイトカインや、補体関連分子の遺伝子のノックアウトマウスを作製することが重要である。また、これらの動物による病態の解明が不可欠である。さらに、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も必須である。

多臓器不全では肝臓の役割はきわめて大きく、劇症の肝傷害は、IFN γ 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。一方、主任者らが進めてきた難治性血管炎は、しばしば重篤な多臓器不全への移行がみられ、難治性血管炎からの移行の把握もきわめて重要な要因を占めている。

2) 目的

本研究の目的は、難治性血管炎と連動する多臓器不全の病態解析、遺伝的背景、新たな治療法の開発にある。その目的のために、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を開発する。特に、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た病態解析や治療法の開発をめざす。また、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。特に、われわれが開発中の *in vivo* イメージング法による生きた状態での多臓器不全への急激な移行過程を解析することも重要である。

この様に、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、肝炎、心筋炎、不整脈、および川崎病や難治性血管炎の誘発機構を解析し、血管炎から移行する

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る。

3) ゴール

血管炎や肝不全、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ことを支持するデータがでていいる。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血管炎や SIRS 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も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感染症誘発の新しい病態に対しても治療法の開発につながる。最終目標としては、多臓器不全にいたる過程の評価と治療法の開発をめざす。

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、Ahuja、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 や proCPR の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シトクローム *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 (in vivo イメージング) の方法を確立してきており、国内はもとより、国際的にも、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

1. 発症機構解析解明：病態発症機構の分

子的・遺伝的解析と測定方法

1) 血管炎関連の多臓器不全の誘発モデルと in vivo イメージングによる血管傷害過程の解析

2) 炎症における carboxypeptidase R(CPR)の役割の解明

3) 好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延

4) 新規好中球遊走サイトカイン LECT2 の劇症肝炎へ関与

1-2. 多臓器不全因子のヒトの遺伝的背景の解析

1) 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

2) ミエロペルオキシダーゼコード領域の日本人集団での変異に関する研究

2. モデル動物・プローブの開発

1) 多臓器不全に関するサイトカインモデルマウス

2) LECT2 ノックアウトマウス

3) 動脈炎惹起起因子分子・染色体マッピング

4) ProCPR 遺伝子ノックアウトマウス

5) ナノ粒子による多臓器不全の解析

6) 多臓器不全因子の構造解析

3. 臨床研究班

1) 多臓器不全に伴う心筋炎、動脈炎、不整脈の解析

2) 周産期・新生児での低酸素性虚血性脳症における治療法の開発

3) 川崎病における血管炎の病態解明に関する研究と治療法の検討

B. 研究結果

本年度は、昨年度の成果がさらに進展し、

「発症機構の基礎研究」―「モデル動物解析」―「病態解析」―「治療の検討」とが緊密に連携して成果が得られた。また、難治性血管炎から多臓器不全にいたる病態解析とその評価方法の確立の基礎ができた。

具体的には、以下の成果とてまとめた。

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の意義とシクロスポリンの治療効果

(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) Myeloperoxidase(MPO)コード領域の日本人集団での変異

(5) 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と網羅的遺伝子の解析

(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) プローブ開発と立体構造解析

(1) ナノ微粒子プローブ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

1-1. 病態発症機構の分子的・遺伝的解析と測定方法

1) 血管炎関連の多臓器不全の誘発モデルと *in vivo* イメージングによる血管傷害過程の解析 (鈴木和男)

血管炎を伴う多臓器不全の発症要因には、サイトカインネットワークの異常反応の悪循環によって活性化された好中球を初めとする生体防御細胞の機能破綻が深く関わっている。特に、異常に活性化された血流中の白血球の動態と血管内皮細胞の反応を調べる必要がある。そこで、本研究では、血管傷害過程と血管内皮細胞の異常反応を解析することを目的とした。本年度は、昨年度に開発した真菌 *C. andida* に由来する分子 CAWS によって誘導される血管炎モデルマウスを用いて、イメージング技術の開発をめざした。また、新たに、血管内皮細胞の apoptosis にかかわる細胞内情報伝達カスケードを調べた。血管炎発症機構を解明する新たなイメージング技術として「*in vivo* イメージング」法をほぼ確立できた。腎臓の血管傷害の誘導状態を *in vivo* イメージングにより、マウスが生きた状態で、血流速度の低下、血流停止、逆流を観察し、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着を観察できた。一方、IL-1 β および TNF- α 誘導の血管傷害時における内皮細胞の apoptosis に関与する

シグナル情報伝達もあわせて解析し、p38-MAPK のカスケードの上昇が顕著であることを認めた。本血管炎誘導モデルにおいて開発した *in vivo* イメージングの評価法は、血管炎関連の多臓器不全の治療法の開発、治癒機転や発症機構を解析する上でも有用であることを示した。今後は、現在開発中の種々の新しいナノプローブを使った *in vivo* イメージング評価法を確立し、多臓器不全解析に応用する。

2) 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。その C5a は多臓器不全などの病態において、病態形成の主要な因子の一つと考えられる。その C5a の活性を阻害する相補性ペプチドの設計を我々が開発したプログラムソフトである MIMETIC をもちいて行い、そのペプチドを合成して阻害活性について検討した。その結果、7 nM の低濃度で、C5a によるカルシウムインフラックス惹起活性を阻害するペプチド (PepA) 創生することができた。PepA は 17 アミノ酸からなるペプチドであるが、ラットのショックモデルにおいても 0.4 mg/kg で救命効果を発揮し、4 mg/kg では、全例のラットを救命することができた。一方、線溶反応を阻害するカルボキシペプチダーゼ R (CPR) の前駆体の ProCPR が Thrombin で活性化される反応を防ぐ相補性ペプチドも MIMETIC を用いて創生し、2 マイクロモル (μ M) で阻害できるペプチドを作成できた。同様に、

Thrombomodulin が Thrombin の作用を高める反応を阻害する相補性ペプチドも創生し、それも 4 マイクロモルで協力を阻害できた。CPR の活性を阻害するペプチドの創生も試み、9 アミノ酸からなるペプチドも創生できた。

3) 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)

炎症性サイトカインである GM-CSF は好中球において caspase 8 の活性化を抑制し、その下流の caspase 3 および DNA 断片化を抑制した。GM-CSF によるこれらの作用は cPKC のインヒビターである Go6976 により阻害された。また Fas 刺激時に形成される Fas-FADD-caspase 8 を含む DISC 形成において、GM-CSF の添加により DISC 内の FADD が消失した。この GM-CSF の作用は Go6976 により阻害された。以上より、GM-CSF は PKC を介して DISC の形成を阻害し、この結果として好中球アポトーシスを抑制すると考えられた。

4) 新規好中球遊走サイトカイン LECT2 の劇症肝炎への関連についての研究

(関塚永一)

LECT2 (leukocyte-cell derived chemotaxin 2) は好中球遊走活性を制御するサイトカインとして近年国立感染研究所で発見された。しかし、その主たる産生臓器である肝における詳しい働き、肝疾患との関連については未だに明らかな結論を得ていない。我々は臨床的に肝疾患と LECT2 との関連について当院でのさまざまな症例の LECT2 値を測定し、LECT2 が肝炎症反応を抑えさらには回復に関与してい

る可能性、またアルコールを摂取後に LECT2 値が上昇することを明らかにした。特に劇症肝炎の症例において値は 0 まで低下しており、多臓器不全にいたる劇症化予測のよいメルクマールとなり得る可能性が示唆された。さらに in vivo の実験で LECT2 が肝類洞においてクッパー細胞の貪食を制御している可能性を見出した。

1-2. 多臓器不全因子のヒトの遺伝的背景の解析

1) 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)

多臓器不全に関わる病態を T 細胞の免疫機能不全・本来もつ T 細胞抗原受容体 (TCR) の多様性から検討。前年度では、多臓器不全に陥る家族性血球貪食症候群 (FHL) や劇症肝炎において、広範な TCR 多様性欠如・オリゴ T 細胞クローンなどの免疫不全が存在し、高サイトカイン・多臓器不全へ導くことが示唆されている。本年度、川崎病 9 例と多臓器不全で死亡した 2 例 (二次性 EB-VAHS と perforin 遺伝子異常 FHL) を検討。また、Th1/Th2 を調節するとされる NK T 細胞 (V_{24J}・Q) の関与を検討した。多臓器不全と異なり川崎病症例では T 細胞全般にわたる TCR 多様性欠如は認めない。多臓器不全で死亡した EB-VAHS では、広範な TCR 多様性欠如・オリゴ T 細胞クローンを認めたが、NK T 細胞は存在した。一方、多臓器不全で死亡したパーフォリン遺伝子異常 FHL では、剖検時肝臓・脾臓にオリゴクローン CD8⁺ T 細胞がいて、NK T 細胞は感度以下であった。また、肝炎後

再貧症例における骨髄NK T細胞の検討で、重症肝障害とNK T消失とに相関が見られた。近年、NK T細胞にもCD4+, CD8+, CD4-CD8-などのサブクラスも報告されそのTh1/Th2 サイトカイン産生の違いも指摘されている。上記NK T細胞所見がサブクラスの違いを反映したものか、また原因なのか結果なのかは現段階では不明である。今後、多臓器不全の準備状況とされるSIRS (systemic inflammatory response syndrome), インフルエンザウイルス脳炎脳症、重症複合免疫不全症(SCID)、ウイルス関連血球貪食症候群(VAHS), 慢性活性EBV感染症などの症例に広げて検討したい。また、その免疫コントロールにNK T細胞やregulatory T細胞の関与があるかどうか発症機序の一端を解明したい。

2) ミエロペルオキシダーゼコード領域の日本人集団での変異に関する研究(亀岡洋祐)

ミエロペルオキシダーゼ(MPO)は抗好中球抗体(誘導)血管炎(MPO-ANCA)発症のトリガーとなる分子と考えられ、MPOの日本人集団における変異の頻度を明らかにすることは、MPO-ANCA関連血管炎治療方策を考案する際の基礎的データとして重要である。本研究においては、MPO欠損症患者および、健常者のMPO遺伝子コード領域を解析しMPOコード領域における日本人集団における変異頻度を求めた。その結果、MPOの機能に重要なエクソン9における変異頻度は1000人中7人と比較的高い頻度で観察されたことから、血管炎およびその他の炎症性疾患の背景として考慮

されなければならない要因であることが示唆された。

2. モデル動物・プローブの開発

1) 多臓器不全に関するサイトカインモデルマウス(岩倉洋一郎)

IL-1の内臓性阻害分子であるIL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)の遺伝子を欠損させたマウスは自己免疫を発症する。また、このマウスは関節炎の他、血管炎やカンセン(psoriasis)、痩せ、など多様な症状を呈する。今年度はこのうち血管炎について、発症への自己免疫の関与を検討した。その結果、自己免疫によって発症する関節炎とは対応が見られず、また、抗CD40L、あるいは抗OX40L抗体によっても症状の改善が認められなかった。この血管炎はTNF α を欠損させることにより発症が完全に抑制されることから、過剰IL-1シグナルにより発現誘導されたTNF α による炎症反応であることが示唆された。

2) 好中球機能動物モデルを用いた解析—肝機能不全症解析: LECT2ノックアウトマウス(鈴木和男、山越 智)

LECT2は主に肝細胞で産生される分子量16 kDaの血清蛋白質である。生物種をこえ魚からヒトまでに広くその存在が確認されており、線虫でもこのタンパクと相同性を示す遺伝子がコードされている。In vitroの実験からLECT2は好中球走化性活性、軟骨細胞や骨芽細胞の増殖促進等の生物活性を持つことが分かってきているが生体内での機能は不明である。そこで我々は、LECT2の生体内機能を明らかにするためにLECT2ノックアウトマウスを作

成し肝炎症モデルを用いて解析した。その結果、LECT2 ノックアウトマウスにおいて concanavalin A 誘導肝炎が重篤になり、その原因の一つとして肝臓 NKT 細胞量の増加であることが判明した。

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起因分子の検討と遺伝子の染色体マッピング (高橋 啓)

川崎病剖検例の病理学的検索の一方で、*Candida Albicans* (*C. albicans*) アルカリ抽出物をマウスの腹腔内に接種することにより川崎病に類似する系統的動脈炎を惹起させることに成功した。ここでは血管炎起炎物質である *C. albicans* 菌体抽出物の内、いかなる成分が冠状動脈炎発生に強く関与しているのかを検討した。その結果、動脈炎発生にはこれまで我々が推定してきたマンナン以外に、本物質中に少量含まれる β 1, 6-グルカンや蛋白も関与している可能性が示唆された。また、本誘導に関わる染色体マップの網羅的解析から炎症性サイトカイン群の遺伝子の関与が浮かび上がった。今後は、これらの遺伝子と発症との関連を検討する。

4) ProCPR 遺伝子ノックアウトマウスの創生 (岡田秀親)

多臓器不全に関わる病態における CPR の役割を解析する動物モデルとして、ProCPR 遺伝子をノックアウトしたマウスを創生することができた。

5) ナノ粒子プローブによる多臓器不全の解析 (山本健二)

血管炎による多臓器不全のメカニズム

を解明するため蛍光ナノプローブを用いて自己免疫疾患のモデルマウスの免疫細胞に標識し、その標識された特定細胞を、正常のマウス血管に導入しその生体内動態を解析し、疾患メカニズムを明らかにすると共に、治療に対する評価を行うことにある。本年度は、その準備段階として、既に合成手法が確立されている 5 nm の Cd/Se の半導体ナノ粒子 (量子ドット) を利用し、蛍光顕微鏡を用いそのプローブの細胞内動態評価手法確立し、その *in vitro* の有用性を確認した。

6) 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 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。NMR を用いた高次構造解析については、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。X 線結晶構造解析については、動物細胞による発現系を用いて前年度から引き続き進めており、位相決定に向けて結晶化条件の精密化を行った。その結果、以前よりも大きく良質な結晶を得ることに成

功した。

3. 臨床研究班

1) 多臓器不全に伴う心筋炎、動脈炎、不整脈の解析 (相澤義房)

重症心筋炎は劇症型で発症し多臓器不全を経て早期に死亡するものや、比較的緩慢に経過し拡張型心筋症の様相をきたしやがて心不全に陥る例がある。重症度や経過は、炎症に関わる免疫やサイトカインによって修飾され、またこれらの修飾は治療面からも意味がある。我々は当該施設で確立したラット自己免疫性心筋炎モデルを用い、細胞免疫の抑制とサイトカインなどによる自己免疫性心筋炎の治療効果を検討してきた。ここでは可溶性 CTLA-4 にラット IgG1 の Fc 部分を結合させた CTLA-4 IgG キメラ遺伝子を導入し T 細胞の副シグナルを抑制すると、血行動態、炎症像と心筋のリモデリングに改善を認めた。また、SLPI の腹腔への投与では無効であったが、遺伝子を組み込んだプラスミドベクターの遺伝子導入で有用な効果が認められた。

2) 周産期・新生児での低酸素性虚血性脳症における治療法の開発 (布井博幸)

これまで、新生児の低酸素性脳症患者で血中 cytochrome c の上昇を認め、低酸素性虚血性脳症動物モデルでも、髄液および血中 cytochrome c の上昇を確認した。このことから、低酸素性脳症患者の治療へこの動物モデルが応用できると考え、シクロスポリンの抗アポトーシス効果を 7 生日および 21 生日低酸素性虚血性脳症動物モデルを用いて検討した。その結果 21 生日ラットでは明らかなシクロスポリンの効

果が得られたが、7 生日ラットでは効果を認められなかった。生後の日数における成熟の過程に疾患感受性の差の原因があるのではないかと考えられた。

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

近年、血管障害を伴う各種疾患において流血中に内皮細胞が出現することが報告されている。川崎病(Kawasaki disease, KD)は全身の血管炎であるため、冠動脈病変(coronary artery lesion, CAL)に伴って流血中に内皮細胞(circulating endothelial cells, CEC)の数が増加するという仮説を立てた。本年度の研究では、血管内皮細胞に対する monoclonal 抗体(clone P1H12)と骨髄由来の内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells)に対する monoclonal 抗体(clone AC133)を用いた免疫組織学的方法によって、KD 20 例における CEC 及び EPC 数を測定した。KD 急性期から亜急性期における平均 CEC 数は、KD 回復期や健常児に比較して有意に($P < 0.05$)増加していた。KD の CAL 有り群(6 例)における平均 CEC 数は、CAL 無し群(14 例)に比較して有意に($P < 0.05$)増加していた。全 CEC 数中の EPC の割合は、 $4.4 \pm 1.2\%$ (0~18%)であった。CAL 有り群の亜急性期における平均 EPC 数は、CAL 無し群に比較して有意に($P < 0.05$)増加していた。本検討より、KD 血管炎に伴って CEC は増加することが判明し、CEC 数や EPC 数の増加は KD の血管内皮細胞障害を反映すると考えられた。

C. まとめ

血管炎に連動した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、MPO欠損症の日本人の頻度、川崎病の血管炎における好中球の役割を調べた。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、起因分子を特定した。肝炎、関節炎・血管炎の発症機転をLECT2、IL-1Ra、proCPRのノックアウトマウスを作製し、多臓器不全に関わる血管炎、肝炎について解析した。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) プロープ開発と立体構造解析: ナノ微粒子の開発と、in vivo イメージング法をほぼ確立した。また、LECT2の結晶化によりX線結晶構造解析にも着手した。

今後は、13, 14年度の成果を発展させ、1) 難治性血管炎から多臓器不全化機構の解明、2) 血管炎の多様性とその解明、3) 感染により誘発される血管炎・多臓器

不全と病態、4) 発症・病態関連遺伝子網羅的解析とその特定、5) サイトカイン・免疫系のかく乱機構、6) 評価法と診断と治療法確立、を計画している。

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（予定を含む）

1. 特許取得（出願中も含む）

- 1) 「活性ペプチドの自動設計と新規活性ペプチド」阻害活性のある相補性ペプチドを自動設計するプログラムとそれにより創生したペプチド: 特願 2002-93294 (平成 14 年 2 月 21 日) 出願人: 岡田秀親 及び 岡田有武
- 2) 「カルボキシペプチダーゼ R の活性を抑制する低分子ペプチド」CPR 活性を抑制する 9 個のアミノ酸から成るペプチド: 特願 2001-125665 (平成 13 年 4 月 24 日) 出願人: 岡田秀親
- 3) 「アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド」特願 2003-44850 (平成 15 年 2 月 21 日) 出願人: 岡田秀親・岡田則子
- 4) 「トロンボモジュリンを不活性化するペプチド」(平成 15 年度 2 月 28 日出願) 出願人: 岡田秀親・岡田則子
- 5) ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス
- 6) LECT2 欠損マウス

血管炎関連の多臓器不全の誘発モデルと in vivo イメージングによる血管傷害過程の解析

主任者（分担研究）：鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長
Tel: 03-5285-1111 内線 2329 Fax: 03-5285-1160 E-mail: ksuzuki@nih.go.jp

研究要旨：血管炎を伴う多臓器不全の発症要因には、サイトカインネットワークの異常反応の悪循環によって活性化された好中球を初めとする生体防御細胞の機能破綻が深く関わっている。特に、異常に活性化された血流中の白血球の動態と血管内皮細胞の反応を調べる必要がある。そこで、本研究では、血管傷害過程と血管内皮細胞の異常反応を解析することを目的とした。本年度は、昨年度に開発した真菌 *C.andida* に由来する分子 CAWS によって誘導される血管炎モデルマウスを用いて、イメージング技術の開発をめざした。また、新たに、血管内皮細胞の apoptosis にかかわる細胞内情報伝達カスケードを調べた。血管炎発症機構を解明する新たなイメージング技術として「in vivo イメージング」法をほぼ確立できた。腎臓の血管傷害の誘導状態を in vivo イメージングにより、マウスが生きた状態で、血流速度の低下、血流停止、逆流を観察し、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着を観察できた。一方、IL-1 β および TNF- α 誘導の血管傷害時における内皮細胞の apoptosis に関与するシグナル情報伝達もあわせて解析し、p38-MAPK のカスケードの上昇が顕著であることを認めた。本血管炎誘導モデルにおいて開発した in vivo イメージングの評価法は、血管炎関連の多臓器不全の治療法の開発、治癒機転や発症機構を解析する上でも有用であることを示した。今後は、現在開発中の種々の新しいナノプローブを使った in vivo イメージング評価法を確立し、多臓器不全解析に応用する。

尚、本研究は、大川原明子、長尾朋和、越尾修（以上、国立感染研）、大野尚仁、三浦典子（東京薬大）、高橋啓、大原関利章、直江史郎（以上、東邦大・医・大橋病院）、南谷晴之（慶応義塾大学・院基理工）、馬淵綾子（日医大・微生物免疫）、中山俊憲（千葉大・院医）各博士の協力のもとに行なわれた。

A. 研究目的

血管炎関連の多臓器不全の発症要因には、生体防御機能の不全により、好中球や免疫細胞の機能破綻やそれによるサイトカインの異常なネットワークかく乱が、種々の臓器障害をもたらす、改善不能におちいってしまうことがある。その時、血管内皮細胞は、サイト

カインと白血球の攻撃にさらされ、また、臓器内での異常反応の前線となる。したがって、多臓器不全にいたる全身性の血管炎の傷害機構の解析に加え、生きたままで臓器機能を解析する方法を開発することは必須である。多臓器不全にいたる過程で無視できないのは、好中球やマクロファージである。好中球殺菌

酵素の不全は、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。これまで、血管炎発症には、好中球の殺菌酵素 Myeloperoxidase (MPO)が自己抗体の産生し、血管炎発症に関与すること報告してきた (Inflammation 25:381,2001)。すなわち、好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) が好中球を活性化し、血管炎の発症に関わっているのではないかと指摘してきた。

一方、カンジダ菌成分 CAWS は、強い血管傷害を誘発し、場合によっては、免疫機能不全をきたし、全身性の多臓器不全状態におちいり投与したマウスは死亡する。

これまで、*Candida albicans* derived substances (CADS)の接種によって冠状動脈炎をを誘発させると好中球抗体 MPO-ANCA が誘導されることを示してきた。しかし、これまでの血管炎発症機構は、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。この方法では、多臓器不全が生じる状況をとらえることが難しく、生体の中で、どのように各臓器の不全状態が進展しているかを調べる必要があった。そこで、本年度は、腎炎モデルマウスを作製して、イメージング観察する系 (*in vivo*イメージング) を確立するとともに、血管内皮細胞の apoptosis カスケードを解析することにより、血管炎発症機構を検討することにした。特に、腎微小血管傷害の誘導とその血流動態について *in vivo*における好中球活性化による血管傷害機構の解明と多臓器不全状態の解析を

目的として検討した。

B. 研究方法

- 1) 多臓器不全関連血管炎モデルマウスの調整: *C. albicans* 由来物質 CAWS を投与して誘導した。
- 2) *In vivo* イメージング: C57BL/6 マウス(オス、9 週齢)に CAWS (150 mg/mouse)を iv 投与し、その 3 時間後に anti-mMPO (1 mg/mouse)を iv 投与した。その 5 日後、同様に CAWS と anti-mMPO を投与した後、加えて、fMet-Leu-Phe (FMLP, 10^8 mol/mouse, 細菌由来トリペプチド)を iv 投与し、その 3 日後に腎表面における血流状態を観察した。血流の可視化には FITC-dextran を用い、各マウスの腎表面における尿細管周囲毛細血管の血流を観察した。観察される血流動態は顕微鏡に接続したビデオカメラで撮影し、DVD に録画した。
- 3) 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。これ以上の投与は、全身性の多臓器不全様ショックにて死亡した。

2) *in vivo* イメージングにおいては、CAWS、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe の投与によって、腎微小循環が悪化してくる様子が観察された (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

また、腎臓表面血管の流速の変化も、CAWS+ anti-mouseMPO+ fMet-Leu-Phe の時に悪化した。具体的には、血流速度の低下・血流停止・血液の逆流等の現象が観察され、CAWS または FMLP 単独投与の場合と比較し、両者に加えて anti-mMPO を投与した場合に血流停止が誘発され (観察した血管の約 10%)、広範囲にわたる腎表面血流の悪化が観察された (約 30%)。

さらに、この腎微小循環の悪化には血管内皮への白血球の接着を伴ったものも見られた。

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 が関与していた (図2)。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。

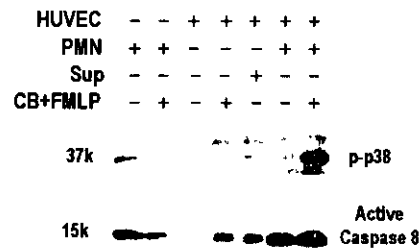


図2. 血管内皮細胞の MAP-kinase のリン酸化

D. 考察

CAWS によって、冠動脈炎が 100%近く発症した。また、投与量を増加させると、多臓器不全様ショックで死亡した。この血管炎誘導モデルにおいては、*C. 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して好中球を活性化して多臓器不全

様の症状を誘発する役割を担っているものと考えられる。その結果、急速な血管炎を誘発し、しいては、多臓器不全をきたすと考えられる。その CAWS に加え、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe を投与し、*in vivo* イメージングすることにより、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る、さらに検討する必要がある。CAWS および anti-mMPO によって誘導される腎微小血管傷害誘導モデルを用いた *in vivo* イメージングの解析から以下のような推論が得られた。まず CAWS によって好中球数の増加・好中球活性化が誘発される。この状態において投与された好中球自己抗体 (anti-mMPO) は、活性化によって細胞膜表面へ移行した MPO と複合体を形成し、更なる好中球の活性化・血管内皮細胞への接着・活性酸素種の産生を引き起こし、血管傷害にはじまる多臓器不全に至るものと考えられる。このことから、白血球の中でも特に好中球が炎症における重要な役割を担っているものと推察される。また、*in vivo* イメージングから、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、好中球関与の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。

以上から、本研究により開発された *in vivo* イメージングによる評価法は、血管炎が進行した多臓器不全の治療の評価や、治癒機転を解析する上でも、新しい *in vivo* の評価系として有用であると思われる。

E. 結論

CAWS および anti-mMPO によって誘導される多臓器不全の前段階として評価するための腎臓微小血管傷害を生体内で観察する系をほぼ確立した。また、この *in vivo* イメージング解析から、多臓器不全発症に白血球の関与が示唆された。CAWS により好中球数の増加・好中球活性化を誘発され、好中球自己抗体 (anti-mMPO) は、細胞膜表面へ移行した MPO と複合体を形成し、局所で好中球の活性化・血管内皮細胞への接着・活性酸素種の産生を引き起こし、血管傷害に至ることを推論させた。この *in vivo* イメージングによる評価法は、血管炎関連の多臓器不全の治療法の評価や治癒機構の解析として、新しい評価系として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,