

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

## 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。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 (uM) 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に阻害できた。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。

これとは別に、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。

### A. 研究目的

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。そこで、C5a の活性を阻害する薬剤が開発できれば多臓器不全や DIC などの重篤な炎症反応の制御に活用できると考えられる。そこで、標的分子のアミノ酸配列 (ペプチド) に反応する相補性ペプチドを設計する我々が開発したコンピュータプログラムの MIMETIC を用いて、C5a を阻害するペプチドを設計し、その作用について検討した。

一方、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つ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、炎症部位に集積活性化する好中球から放出されるエラスターゼも 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と考えられた。しかし、CPR はフィブリンの C 末リジンを除去することにより、血栓などを溶解するプラスミンの生成を阻害して、血栓を溶けにくくする作用

も持つので、その様な場合には、CPR の生成を防ぐことも必要となる。そこで、proCPR から CPR の生成を防ぐ作用を持つ相補性ペプチドの創生も行った。

さらに、proCPR の生体内での役割を明らかにするために、proCPR の遺伝子をノックアウトしたマウスの作成もおこなった。

## B. 研究方法

### 相補性ペプチドの設計

相補性ペプチド設計のプログラムは以下のごとくである。標的ペプチドのアミノ酸配列について、任意に設計した同じ数のアミノ酸からなるペプチドの相補性を評価して相補性値を算出する。評価指標の一つは、疎水性値である。ペプチドの各位置のアミノ酸について、その前後のアミノ酸（前後のアミノ酸を5個ずつもしくは数個ずつ、末端アミノ酸の場合には0個）を加えて、疎水性値の平均値を算出し、その疎水性値が逆の値になっていることで評価する。+3.0であれば、-3.0をそのアミノ酸の位置での疎水性評価を満点とする。第二の評価指標は、対応する位置のアミノ酸側鎖の容積(bulkiness)の対応性である。対応するアミノ酸同士の $\alpha$ 炭素（アミノ酸の側鎖が結合している基部の炭素原子）が5オングストローム近くに相互に接近することを阻害しない側鎖容積になっていることを評価し、容積阻害を起こさない場合を満点とし、阻害の程度により減点評価する。第三の評価指標は、ペプチド骨格のバックボーン並列性(Backbone alignment)の一致度を評価指標として、評価点をつける。標的ペプチドに対して同一アミノ酸数からなる任意に設計したペプチドを候補ペプチドとして標的ペプチドに対する相補性を評価してその評価値をコンピュータメモリーに記録する。次いで上記候補ペプチドのアミノ酸配列をスクランブルして別の配列

に変えたり、アミノ酸の置換も任意に行い別の候補ペプチドを設計し、標的ペプチドに対する相補性を評価してその評価値をコンピュータメモリーに記録する。これを連続して繰り返し、理想的には満点値のペプチドが得られるまで繰り返して連続して行う。それぞれのペプチドを評価した記録を得点の高いものからソートして並べて一覧表を作り、上位のもの（例えば上位300のペプチド）を記録として残し一覧表にする。

### 相補性ペプチドの標的ペプチド

C5aについては、C5aの37番目から52番目のアミノ酸に渡る17個のアミノ酸からなるペプチド(PL37と命名している)を標的とした。PL37は、C5aレセプターに対してC5aのアゴニストとして働くと共に、PL37を多価ペプチド(PL37-MAP)とするとC5aレセプター陽性細胞にアポトーシスを誘導するなど、生物活性を発揮する部位であることは、我々が既に発表したところである。

ProCPRに対する相補性ペプチドの標的部位としては、Thrombinで切断活性化される92番目のアルギニンを含んで、87番目のアミノ酸から106番目のアミノ酸に渡る20個のアミノ酸からなるペプチドを選んだ。また、proCPRを活性化するThrombinの作用を1200倍に増強する作用を持つThrombomodulinに対しては、そのThrombin結合部位とされる408番目から426番目の渡る19個のアミノ酸からなるペプチドを標的ペプチドとした。

### 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。

#### C5a によるカルシウムインフラックス

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  $2 \times 10^7/\text{ml}$  に調製した。C5a を添加してカルシウムインフラックスを起こす実験系で、C5a を相補性ペプチドと氷上で 30 分間反応させて、C5a の作用に対する影響を調べた。

#### ProCPR から CPR への変換活性

ProCPR 阻害ペプチドの活性測定に際しては、proCPR 画分と検体ペプチドとを反応させた後、Thrombin/Thrombomodulin(T/TM) 混合液を作用させてから、生成される CPR 量を基質の 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。Thrombomodulin の作用に対する相補性ペプチドの阻害作用は、Thrombomodulin と相補性ペプチドを予め反応させておいてから、Thrombin と一緒に proCPR 画分に加えて反応させ、生成される CPR を上記のごとく測定した。また、血漿に T/TM を加えて CPR を生成させる反応系についても解析を行った。

#### ProCPR ノックアウトマウスの作成

ノックアウトマウスを作成するにあたって必要なのはノックアウトする部分を欠損させネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを作成することである。この際、ゲノム上の proCPR 遺伝子がどの制限酵素でどこが切れるのかをはっきりさせなければベクターを作成することができない。そこで proCPR 遺伝

子を含んだプラスミドを使って制限酵素マップを作成した。

各クローンを各種の制限酵素で切断、電気泳動により各フラグメントの長さを確認しマッピングを行った。さらに泳動したゲルをナイロンメンブレンに転写して、各エクソンに含まれるオリゴヌクレオチドを T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより 5'末端を RI 標識してサザンハイブリダイゼーションを行った。この結果を利用してマッピングを完成させた。

ノックアウトマウスを作るためには ES 細胞にターゲティングベクターを導入して変異 ES 細胞を作る必要がある。導入されたベクターが ES 細胞のゲノムに組み込まれるときの仕組みは遺伝子の相同組み換えを利用している。そのためネオマイシン耐性遺伝子の両側には ES 細胞のゲノムと相同部分をつなげたベクターにする。このとき、一方の相同部分は 1 kb 前後としてベクターが組み込まれたかどうかを確認するための PCR で増やせるようにしておく。また相同組み換えの頻度がかなり低いので、ES 細胞にベクターが正しく組み込まれたときにだけ生き残るようにベクターにはポジティブセレクションのためのネオマイシン耐性遺伝子とネガティブセレクションのためのチミジンキナーゼ遺伝子を入れてある。ネガティブセレクションの意味は、もし相同組み換えではなく非特異的な部位にベクターが挿入された場合はチミジンキナーゼ遺伝子も同時に挿入されチミジンキナーゼが発現する。ガンシクロビル添加選択培地の中ではこの発現したチミジンキナーゼがガンシクロビルを活性化（リン酸化）し、DNA 合成を妨げ死滅してしまうという原理を利用した。

ノックアウトマウスを作成するにあたって必要なのはノックアウトする部分を欠損させネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲ

ティングベクターを作ることである。この際、ゲノム上の proCPR 遺伝子がどの制限酵素でどこが切れるのかをはっきりさせなければベクターを作ることができない。そこで proCPR 遺伝子を含んだプラスミドを使って制限酵素マップを作成した。

胚盤胞へのマイクロインジェクション〜キメラマウス誕生までのプロセスはすべて日本エスエルシー株式会社受託試験部に依頼した。エスエルシーに送った凍結クローンは CPR8E14, CPR14E14, CPR37E14, CPR61E14, CPR82E14 の計 5 クローンである。エスエルシーで実施した概要を以下に示す。過排卵処理を受け、交配したメスの C57BL/6 マウスから胚盤胞を取り出す。同時に凍結保存していた ES 細胞クローンを起こして培養しておく。状態の良好な胚盤胞約 60 個に変異体 ES 細胞を各 20 個ほどマイクロインジェクションする。インジェクション後の胚盤胞は仮親の子宮へ移植する。仮親は精管結紮を行ったオスの ICR マウスと交配させたメスの ICR マウスを使用した。産後は離乳するまで育ててから名市大医学部実験動物研究教育センターへ移した。

### C. 研究結果

相補性ペプチドを設計するコンピュータプログラムソフトである MIMETIC を用いて、C5a の部分ペプチドである PL37 に対する相補性ペプチドとして PepA と PepB とを作成した。PepB には C5a に対する作用を認めなかったが、PepA は 700pM の C5a に対して 7nM の量で C5a による好中球のカルシウムインフラックスを抑制した。さらに、LPS を感作しておいたラットに Crry に対するモノクローナル抗体である 5I2 を静脈内に投与すると 30 分以内に

補体の活性化によりショック死をするが、4mg/kg の PepA を 5I2 の 10 分前に投与しておくことと全例救命することができた。0.4mg/kg の PepA でも、半数のラットを救命できた。

ProCPR の 87 から 106 番目のアミノ酸配列に対する相補性ペプチドを MIMETIC で設計したペプチド (VGG-Pep) は 2 マイクロモルで ProCPR の活性化を抑制できた。精製した ProCPR に対してだけでなく、血漿中の ProCPR に対しても CPR への活性化を防ぐことができたので極めて高い特異性で阻害活性を発揮できると考えられた。

Thrombomodulin (TM) に対する相補性ペプチドも MIMETIC で設計し 3 種類のもペプチド (TM-1、TM-2 及び TM-3) を合成して TM による Thrombin 活性増強作用について検討をした結果、TM-3 に強い阻害活性が認められ、8 マイクロモルで TM の作用をほぼ完全に抑制した。これに対し、TM-1 には抑制活性は認められず、TM-2 による抑制活性は強くなかった。

ProCPR の遺伝子をノックアウトしたマウスの作成については、PCR を用いての解析において、完全に欠損したマウスができたことを確認した。さらに、そのマウスの血清中のカルボキシペプチダーゼ活性を解析し、ProCPR 活性が消失していることも確認できた。

### 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。この C5a の活性を強力に抑制する相補性ペプチドが作成できたことは炎症病態の制御に使用可能な薬

剤候補として期待が持てる。ラットのショック死モデルにおいても救命効果を確認することができたので、ヒトへの応用に向けてのサルでの動物実験や種々の安全性試験も実施したい。17アミノ酸から成るペプチドであるので、生体内では速やかに分解されてしまうと考えられる。多臓器不全やDICの患者の救命のために大量投与を行っても炎症病態が改善できた段階で投与を中止すれば、ペプチドは速やかに分解され、蓄積毒性などによる副作用の懸念がすくないので臨床応用にはかえって便利な薬剤となりうるだろう。

ProCPRが活性化してCPRになると炎症ペプチドのC末端アルギニン(Arg)やリジン(Lys)などの塩基性アミノ酸を切除して不活化をする。CPRはFibrinのLysを切除し、この場合は血栓溶解を阻害する。したがって、過剰にCPRが形成されると血栓による病態の増悪を引き起こすので、ProCPRの活性化を制御する必要も生じてくる。ProCPRの活性化を防ぐVGG-Pepは、その様な場合の治療法に活用できる可能性がある。

ThrombinがProCPRを切断してCPRを生成すが、このThrombinの作用はThrombomodulin(TM)によって1200倍に増強される。このTMの作用を阻害する相補性ペプチドの作成を試み、TM-3を得た。TM-3は19アミノ酸から成るペプチドであるが、8マイクロモルの濃度でTMによる増強作用をほぼ完全に抑制したので、これも血栓の防止などの治療に活用できると期待している。

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。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し、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も役割を果たす。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も寄与すると考えられる。血液凝固反応や炎症時には、ProthrombinがThrombinに活性化され、このThrombinは炎症組織から遊離したTMと複合体を形成して極めて強力な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。しかし、CPRは血栓溶解を防ぎ、多臓器不全やDIC等の病態を亢進させる可能性もある。このような生体内でのCPRの役割を明らかにする動物実験モデルに活用するためにProCPRの遺伝子をノックアウトしたマウスを作成した。このノックアウトマウスを用いて生体内でのProCPR、CPR、TMなどの役割を明確にして、血管炎や多臓器不全の病態の理解を深めると共に、その予防法や治療法の開発研究にも貢献できるだろう。

## E. 結論

アナフィラトキシンC5aを特異的に不活化できる相補性ペプチドを開発することができた。これは多臓器不全やDIC等の治療薬として活用できる可能性がある。

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が、CPRが過剰に生成されると線溶系を阻害して血栓に起因する病態を促進してしまう。そこで、ProCPRがCPRに活性化される反応を抑制するProCPRの相補性ペプチド(GVV-

Pep) を作成した。また、ProCPR を活性化する Thrombin は TM によりその活性が 1200 倍に増強される。そこで TM の Thrombin 結合部位に対する相補性ペプチドをさくせいし、8 マイクロモルで完全にその増強作用を完全に阻害できるペプチド (TM-3) もえた。これらのペプチドは多臓器不全や DIC の病態改善などに貢献できる可能性がある。

ProCPR の遺伝子をノックアウトしたマウスも作成できたので、今後の研究に活用できると考えられる。

## F. 健康危険情報

SPF マウスを用いた動物実験と、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

### 論文発表

- 1) Tani, S., Akatsu, H., Ishikawa, Y., Okada, N. and Okada, H. Preferential detection of procarboxypeptidase R by enzyme-lined immunosorbent assay. *Microbiol. Immunol.* 47: in press (2003)
- 2) Shimomura, Y., Kawamura, T., Komura, H., Campbell, W., Okada, N. and Okada, H. Modulation of procarboxypeptidase R (proCPR) activation by complementary peptides to thrombomodulin. *Microbiol. Immunol.* 47: 241-245 (2003)
- 3) Lazoula, E., Campbell, W., Okada, N. and Okada, H. Rational structure-based design of a novel carboxypeptidase R inhibitor. *Chemist. Biol.* 9: 1129-1139 (2002)
- 4) Akatsu, H., Abe, M., Miwa, T., Tateyama, H., Maeda, S., Okada, N., Kojima, K. and Okada, H. Distribution of rat C5a anaphylatoxin receptor. *Microbiol. Immunol.* 46: 863-874 (2002)
- 5) Akatsu, H., Takahashi, M., Matsukawa, N., Ishikawa, Y., Kondo, N., Sato, T., Nakazawa, H., Yamada, T., Okada, H., Yamamoto, T. and Kosaka, K. Subtype analysis of neuropathologically diagnosed patients in a Japanese geriatric hospital. *J. Neurological Sciences*, 196: 63-69 (2002)
- 6) Mizuno, M., Nishikawa, K., Okada, N., Matsuo, S. and Okada, H. Soluble CR1 rescues rats from lethal shock induced by LPS priming and anti-Crry antibody. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 127: 55-62 (2002)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) Kawamura, T., Okada, N. and Okada, H. Elastase from activated human neutrophils activates procarboxypeptidase R. *Microbiol. Immunol.*, 46: 225-230 (2002)
- 10) Komura, H., Shimomura, Y., Yumoto, M., Katsuya, H., Okada, N. and Okada, H.

H. Heat stability of carboxypeptidase R of experimental animals. *Microbiol. Immunol.*, 46: 217-223 (2002)

- 11) 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)
- 12) 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)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

- 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



## 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 教授

### 研究要旨

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。

### A. 研究目的

好中球の機能は主に種々のサイトカインによって制御されている。これまで炎症性サイトカインと呼ばれる GM-CSF、IL-1、TNF- $\alpha$  などが好中球機能を亢進させ、ARDS や SIRS 等の病態形成に深く関与することが指摘されている。特に GM-CSF については好中球の random migration を亢進させること、活性酸素の産生を亢進させること、そしてアポトーシスを制御することなどが明らかにされている。そこで GM-CSF による好中球アポトーシスの抑制が血管炎や組織傷害の一因となり得ることに注目し、アポトーシス制御機序を明らかにすることとした。

### 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を用いた。

#### 3. GM-CSF による前処置

好中球アポトーシスを誘導する 30 分前に GM-CSF を 10  $\mu$ g/ml となるように加えて前処置を行った。

#### 4. 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。

#### 5. DISC (Death-Inducing Signaling

Complex) の分離  
好中球を抗 Fas 抗体(CH-11)と cycloheximide によりアポトーシスを誘導したのち、細胞溶解後、抗 Fas 抗体(HFE7A)と protein A-sepharose bead 混在下で反応させた。Bead から蛋白を抽出し、immunoblotting に供した。

### C. 研究結果

好中球に抗 Fas 抗体 + cycloheximide で処理すると、時間経過とともにアポトーシスが誘導された(図1)。この時、GM-CSF で前処理することにより、好中球アポトーシスは著明に抑制された。

Effect of GM-CSF on neutrophil apoptosis induced by anti Fas antibody and cycloheximide

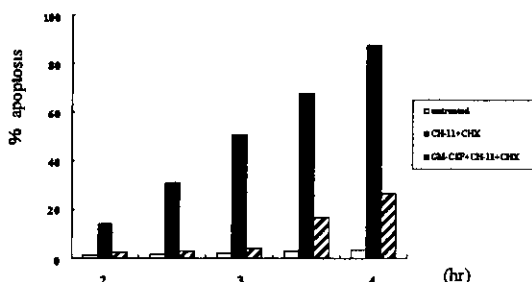


図1

同じ条件下で cPKC のインヒビターである Go6976 を加えることにより、GM-CSF による作用は有意に抑制された(図2)。このことから、GM-CSF によるアポトーシス抑制作用は cPKC を介していると考えられた。

Go6976 abolished the effect of GM-CSF

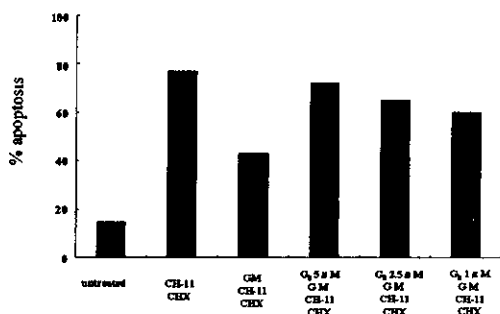


図2

抗 Fas 抗体によって導入されたシグナルは、Fas、FADD、そして pro-caspase 8 の複合体を形成し、その結果として caspase 8 を活性化すると考えられている。そこで抗 Fas 抗体を用いて DISC 形成を

誘導した時、GM-CSF 存在下でどのような変化が起こるか検討したところ、DISC 内の FADD が消失した。また Go6976 でさらに処理することにより、GM-CSF の作用は阻害された。従って図3に示すように GM-CSF はアポトーシス誘導シグナルの導入によって起こる DISC 形成を抑制すると考えられた。

How does GM-CSF inhibit DISC (Death-inducing Signaling Complex) formation?

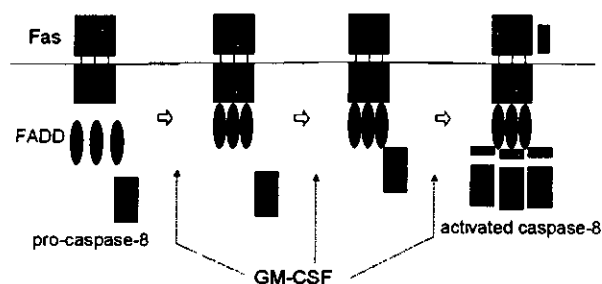


図3

### D. 考察

Fas にシグナルを導入することにより、好中球は速やかにアポトーシスを起こすことが観察される。この時 GM-CSF で前処理すると、好中球のアポトーシスは著明に抑制された。本研究では GM-CSF によるアポトーシス抑制機序を明らかにすることが目的である。検討の結果、Fas にシグナルが導入された時に認められる DISC 形成を GM-CSF が阻害すること、それは FADD の Fas に対する結合を抑制することによることを明らかにした。この GM-CSF による抑制作用は cPKC のインヒビターである Go6976 により消失したことにより、GM-CSF のアポトーシス抑制作用は cPKC を介したものであると考えられた。

### E. 結論

GM-CSF は炎症性サイトカインの1つとして位置づけられ、好中球に対してはこれまで我々が明らかにしてきたように、機能を亢進させる作用を有している。今回さらに GM-CSF が好中球のアポトーシスを抑制することを示したが、このことは好中球の機能亢進につながり、本研究

班の研究課題である「血管炎」の病態形成に深く関わる可能性がある。

GM-CSF の作用機序を一部明らかにしたが、このことは治療の観点からも有用な所見と考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshinaga-Ohara N, Takahashi A, Uchiyama T, Sasada M: Spatiotemporal regulation of moesin phosphorylation and rear release by Rho and serine/threonine phosphatase during neutrophil migration. *Exp Cell Res*, 278(1):112-122, 2002.
- 2) Kobayashi S, Yamashita K, Takeoka T, Ohtsuki T, Suzuki Y, Takahashi R, Yamamoto K, Kaufmann SH, Uchiyama T, Sasada M, Takahashi A: Calpain-mediated XIAP degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. *J Biol Chem*, 277(37):33968-33977, 2002.

### 2. 学会発表

- 1) 小林進, 高橋淳, 内山卓, 笹田昌孝: 慢性好中球性白血病における好中球アポトーシス遅延の分子機序. 第60回日本癌学会総会, 2001.9.26-28, 横浜, *Jpn J Cancer Res*, 92(Suppl):382, 2001.
- 2) 笹田昌孝: 生体防御から見た感染症治療. 第76回日本感染症学会総会学術講演会 教育講演, 2002.4.11-12, 東京, *感染症学雑誌*, 76(増刊):57, 2002.
- 3) 岡論, 高橋淳, 山本孝吉, 内山卓, 笹田昌孝: 血管内皮細胞由来一酸化窒素による好中球血管外遊走の抑制. 第64回日本血液学会総会, 2002.9.12-15, 横浜, 第64回日本血液学会総会・第44回日本臨床血液学会総会同時期開催プログラム・抄録集, 177頁.
- 4) 宮原裕子, 高橋淳, 山下浩平, 小林進, 山本孝吉, 内山卓, 笹田昌孝: GM-CSFによるヒト好中球アポトーシス抑制機構. 第64回日本血液学会総会, 2002.9.12-15, 横浜, 第64回日本血液学会総会・第44回日本臨床血液学会

総会同時期開催プログラム・抄録集, 178頁.

- 5) 笹田昌孝: 好中球と病態形成ー最近の展開. 第64回日本血液学会総会 教育講演, 2002.9.12-15, 横浜, 第64回日本血液学会総会・第44回日本臨床血液学会総会同時期開催プログラム・抄録集 (Educational Program), 47-55頁.

## 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

分担研究者 関塚永一 国立埼玉病院 副院長

研究要旨： 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でない結論を得ていない。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、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食食を制御している可能性を見出した。

### A. 研究目的

LECT2 は肝細胞により特異的に発現し産生され、好中球遊走活性を制御する分子量 16Kda のサイトカインとして近年国立感染研究所で発見された。魚からヒトまで生物種を超え広くその存在が確認されており線虫にも相同性を示す遺伝子がコードされている。In vitro の実験では好中球遊走活性を制御することに加え、軟骨細胞や骨芽細胞の増殖促進を行い、臨床的には慢性関節リウマチの重篤度によって動揺することも明らかになっている。その主たる産生臓器である肝における詳しい働き、肝疾患との関連は現時点では不明で、それを明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

ヒト LECT2 値は ELISA 系を用いた測定が医学生物学研究で開発されており、正常値は 10ng/ml である。急性肝炎、肝硬変の急性増悪、劇症肝炎といった肝疾患の急性期において LECT2 値の推移を測定、検討した。また、前提として LECT2 値に日内変動がないことを確認した上で GOT, GPT,  $\gamma$ -GTP, 血小板数, 肝線維化マーカーといった種々のメルクマールと肝疾患を中心とした 218 症例の随時 LECT2 値との相関係数を取りそれらとの関連性につき検討した。さらに健常人においてアルコールを摂取前後での LECT2 値につき検討した。In vivo においてはクッパー細胞の機能と LECT2 の関連を明らかにするために以下の実験を行った。野生型と LECT2 KO マウスにおけるクッパー細胞の食食能の差異を LPS の

刺激下で検討した。野生型と LECT2 KO 各々3匹 (BALB/c 25~30g) に Indian Ink を 0.1ml ずつ、一方のグループには Indian Ink のみを、また他方には LPS(5mg/Kg) 静注 30 分後に同量の Indian Ink を尾静脈より投与し 15 分後に犠牲死させ、肝臓を取り出し固定した後貪食された 40 倍視野内での Ink 数をカウントした。

(倫理面への配慮)

LECT2 測定のための採血において、その目的について十分な説明を行い了解を得た上で施行した。

### C. 研究結果

肝疾患の急性期において LECT2 値は低下傾向を認め回復とともに上昇を認め、特に劇症肝炎の症例において値は 0 まで低下していた (図 1~3)。種々のメルクマールと肝疾患を中心とした症例の随時 LECT2 値との相関係数では  $\gamma$ -GTP に有意差をもった若干の相関が見出された (表 1)。また、アルコール摂取前後での LECT2 値は摂取後に上昇を認めた (図 4)。In vivo の実験においては Indian Ink のみの control の状態では、LECT2 KO マウスにおいて貪食された Ink 数の低下が観察され、LPS をあらかじめ静注していた場合も同様に LECT2 KO マウスにおいて貪食数の低下が観察された。しかし低下の比率には両条件下に違いは認められなかった。(図 5) また、後者において LPS はクッパー細胞の貪食を刺激する目的で投与したのだが、量が多すぎたためか貪食された Ink の数

は逆に減少してしまい、LPS の量の再検討、また血圧等の計測の必要性が示唆された。

### D. 考察

国立感染研究所で行われた Con A 肝障害モデルにおいて、野生型マウスに比較し LECT2 のノックアウト(KO)マウスで肝障害が重症化し死に至り易く、さらに肝中 LECT2 mRNA、及びたんぱく質は肝障害が認められる 8hr に発現が減少し、回復に伴い再度発現がみられ LECT2 が肝炎症反応を抑えている可能性が明らかになっている。また、LECT2 KO マウスでは Con A 静注後 1~2hr に TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-10 といった炎症性サイトカインには差がないものの IL-4 の発現が野生型に比べて高くなっており、フローサイトメトリーにより LECT2 KO マウスの肝臓には野生型の約 2 倍の CD3int NK1.1+(NKT)細胞が含まれていることがわかった。これらの結果から LECT2 の機能として NKT 細胞の分化増殖の機能調節をしている可能性も示唆されている。また新潟大学第一外科のグループにより肝移植におけるヒト LECT2 値の検討がなされており、ドナーにおいては肝移植後 3 時間後ぐらいより LECT2 値は 0 を示し 24 から 48 時間後より徐々に回復してきており、一方レシピエントにおいてはドナーに比し、移植後 12 時間ぐらい後より同じく 0 を示しこちらは遅れて 72 時間後ぐらいよりゆっくり回復してきている。今回の結果において肝疾患の急性期に

LECT2 値は低下傾向を認め回復とともに上昇してきており、前述の Con A 肝障害及び肝移植後の LECT2 値の推移に類似していることから 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が再確認された。また、劇症肝炎の症例において LECT2 値は 0 まで低下しており最終的には死亡されたが、LECT2 が肝炎の劇症化予測のよいメルクマールとなり得る可能性も考慮された。さまざまな症例の随時 LECT2 値を測定し種々のメルクマールと相関係数をとったところで  $\gamma$ -GTP に有意差をもった若干の相関が見出された。その結果を糸口として、アルコールとの関連を検討するために我々自らが健常人としてアルコールを摂取しその前後で LECT2 値を測定したところ有意さをもって摂取後に上昇していた。アルコールは腸管のエンドトキシンへの permeability を亢進させるといわれているため、クッパー細胞の食食能に対する LECT2 の影響に着目し野生型と LECT2 KO マウスにおけるクッパー細胞の食食能の差異を LPS の刺激下で検討した。結果としては LPS の存在に左右されるか否かは別として LECT2 が肝類洞においてクッパー細胞の食食を制御している可能性は示唆された。現在 FITC でラベルされた  $1 \mu\text{m}$  の microsphere  $0.1\text{ml}(2.0 \times 10^8 \text{particle})$  を使って、前回の Indian Ink と同じ条件で LPS の量を検討しながら比較をすすめている。In vivo で蛍光顕微鏡下に録画し観察を試みると同時に、固定後の標本でクッパー細胞ご

とに食食された microsphere 数をカウント中である。今後の課題及び計画としては、現在の実験において microsphere 数の差異より野生型及び LECT2 KO マウスにおけるクッパー細胞の食食能を再評価、検討し、活性化したクッパー細胞を F4/80 等で染色することで確認する。肝灌流モデルを作成し他臓器での microsphere の食食の影響をなくした ex vivo の状態で in vivo の結果と比較検討する。野生型及び LECT2 KO マウスのそれぞれの Kupffer cell を分離し、LECT2 による反応を観察するということである。

#### E. 結論

新規好中球遊走サイトカイン LECT2 は肝炎症反応を抑え、さらには回復に関与しており、また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。そのメカニズムの一つとして LECT2 が肝類洞においてクッパー細胞の食食を制御している可能性も示唆された。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) FUNDAMENTAL STUDY OF A PARTICLE COUNTING METHOD USING LASER-LIGHT SCATTERING IN DETECTION OF PLATELET AGGREGATES UNDER DIABETES MELLITUS. Hiromichi NAKADATE, Eiichi

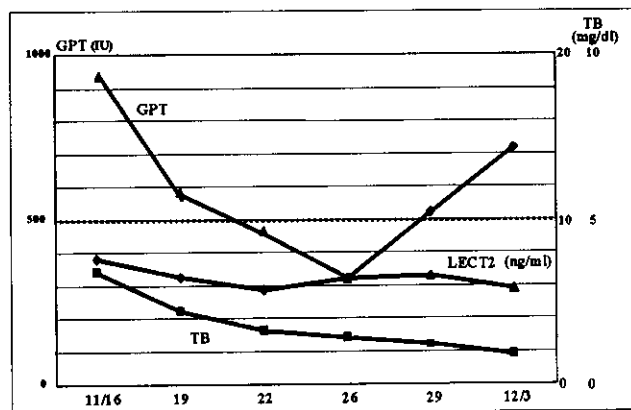
SEKIZUKA, Chikara OSHIO,  
Kosuke TSUKADA, Tomohiro  
UCHIDA, Tadashi OZAWA, and  
Haruyuki MINAMIYANI,  
Microcirculation annual, Vol.  
18,2002

- 2) 散乱光を用いた血小板凝集能測定  
装置の基礎特性と糖尿病血小板凝  
集能亢進の検討 中楯浩康, 関塚  
永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳,  
南谷晴之 電気学会研究会資料  
医用・生体工学研究会 MBE-02-  
59~71, 53-56

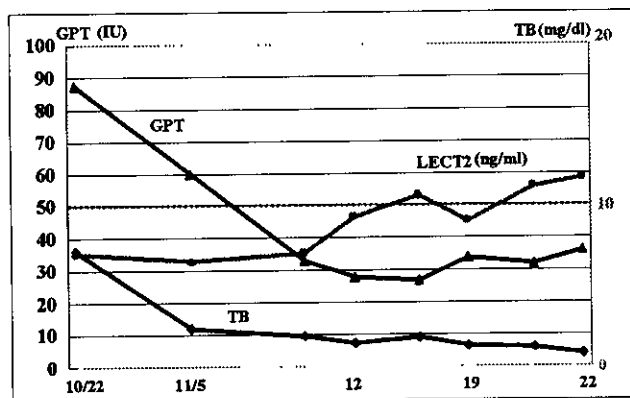
2. 学会発表

肝類洞壁細胞研究会 平成 14 年  
12 月 14,15 日 東京丸の内  
「LECT2 Effect on Kupffer Cell  
Phagocytic Activity」

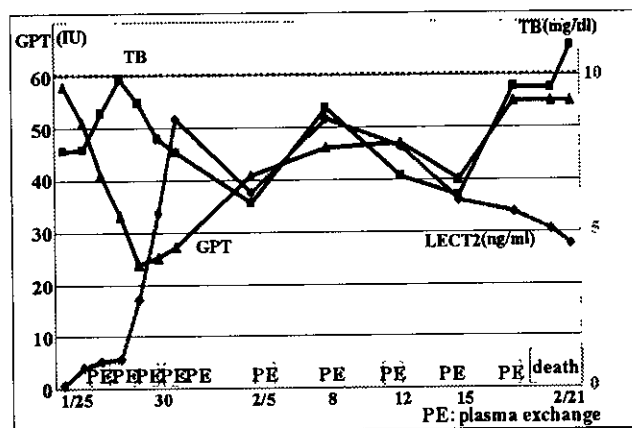
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



(図1) B型急性肝炎 31歳女性



(図2) アルコール性肝硬変急性増悪 35歳男性



(図3) 劇症肝炎 48歳女性



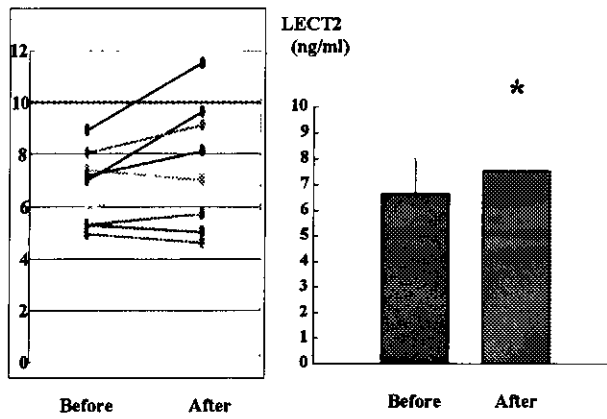
	n	PLT	GOT	GPT	$\gamma$ -GTP	AFF	PIVKA2	IVcollagen	HA
H.C.C.	7	-0.21	-0.06	0.53	0.41	0.01	0.45	0.19	0.44
LC	30	-0.18	0.20	0.13	-0.27	0.10	0.04	-0.09	-0.26
CH	85	0.11	-0.06	-0.02	-0.07	-0.12	-0.17	-0.13	-0.13
AUTO IMMUNE	21	-0.07	0.21	0.21	0.03	0.28	-0.15	-0.27	0.49
ALCOHOL	5	0.22	0.10	0.27	0.35	0.28	-0.16	-0.28	0.69
LIVER DISEASE	148	0.06	0.01	0.01	0.22	0.11	-0.12	-0.08	-0.16
OTHER DISEASE	80	-0.09	-0.01	0.16	-0.09	-0.13	0.29	0.08	-0.53
ALL	218	0.08	-0.05	-0.01	0.27	0.01	-0.15	-0.09	-0.18

H.C.C. : Hepatic Cell Carcinoma LC : Liver Cirrhosis  
 CH : Chronic Hepatitis HA : hyaluronic acid

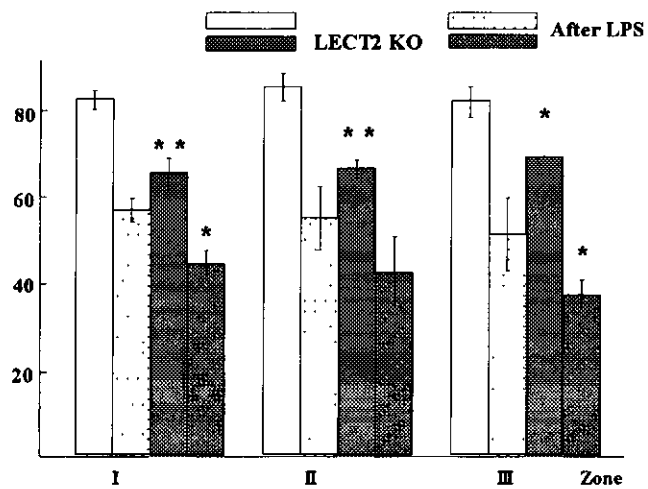
▨ |r| > 0.2  
 P < 0.05

□ |r| > 0.2

(表 1) 各種メルクマールと LECT2 の相関係数



(図 4) アルコール摂取前後での LECT2 値



(図 5) 食食された Ink 数

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：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

分担研究者 木村 暢宏 福岡大学病院 講師

研究要旨：

多臓器不全にかかわる病態解明を、免疫機能不全・TCR多様性の角度から検討した。川崎病では広範なTCR多様性の欠如は見られなかった。肝炎後再生不良性貧血の劇症肝炎例では、発症時骨髄NK T細胞の減少・消失が認められ、肝機能の改善と共にNK T細胞も回復する傾向を示した。多臓器不全で死亡した2例（EB-V AHSやパーフォリン遺伝子異常FHL）では、前者でTCR多様性の欠如・NK T細胞+、後者ではNK T細胞の消失と異なる所見であった。多臓器不全にいたる多様性を示唆している。今後、同一症例を増やして比較検討したい。

A. 研究目的

免疫の立場から、肝臓をはじめ多臓器の機能不全機能異常あるいは臓器障害の劇症化の早期診断と劇症化への移行を克服するための病態解明と治療法の開発をめざす。多臓器不全の発症機構の解明として、免疫系の異常を（1）サイトカイン系の機能不全、（2）免疫系の機能不全、（3）遺伝性疾患や感染により誘発される疾患の病態を解析する。

本年度は、血管炎を来す川崎病症例と二次性血球貪食症候（EBVAHS）や家族性血球貪食症候群（FHL）で多臓器不全で死亡した2例を検討した。また、肝炎後再生不良性貧血においてTリンパ球のTh 1/Th 2をコントロールするとされるNK T細胞の関わりも検討した。

B. 研究方法

1. 患者の検体：川崎病9例は福岡大学小児科・濱本先生、肝炎後再生不良性貧血4例（うち劇症肝炎1例）とperforin異常FHL1例は大阪市立総合医療センター小児内科迫 正廣先生、EB-V AHS 症例は、佐賀医科大学小児科石井栄一先生より検体を得た。臨床各病期に患者より末梢血（PB）や骨髄液（BM）を採取し、フィコールによる比重遠心法にて単核細胞群（MN）を分離回収し、RNAを抽出した。
2. TCR Vレパートリーの解析：我々の開発した簡略化inverse PCR法をもちいて、サンプルRNAをcDNAとし、さらにligationし、それぞれ2種類のプライマーを用いてPCRを行い、TCR V $\beta$ 鎖やV $\alpha$ 鎖の未知の割合の可変部（V）領域を均等に増幅。Vを含む一部の遺伝子産物を<sup>32</sup>P-dCTPでラベルし、20種類のヒトV $\beta$ 遺伝子やV $\alpha$ 遺伝子が敷かれたフィルター上でプロットを行う。濃度測定器で計測し、各Vレパートリーを%で表現した。
3. V $\beta$ レパートリーのJ $\beta$ 遺伝子を13種類のプライマーを作成、V-J $\beta$  PCRを行い、多様性を検討した。
4. 上記PCR増幅産物のクローン性を検討するためにSSCP法によりバンドの有無を検討した。
5. SSCP法によりバンドを認めた場合、TCRのdirect sequencingによりCDR3領域の塩基配列を決定し、T細胞のTCR cloneの特異的clonotypic primerを作成した。

6. NKT細胞（TCR V $\beta$ 11/N $\beta$ 24J $\beta$ ）の検討は、V $\beta$ 24の中のNK T細胞の割合を、RT-PCR法にてとしてV $\beta$ 24プライマー（sense）、antisenseとしてJ $\beta$ QとC $\beta$ プライマーを作成し比較検討した。

図1. 川崎病患者PBのV $\beta$ レパートリー

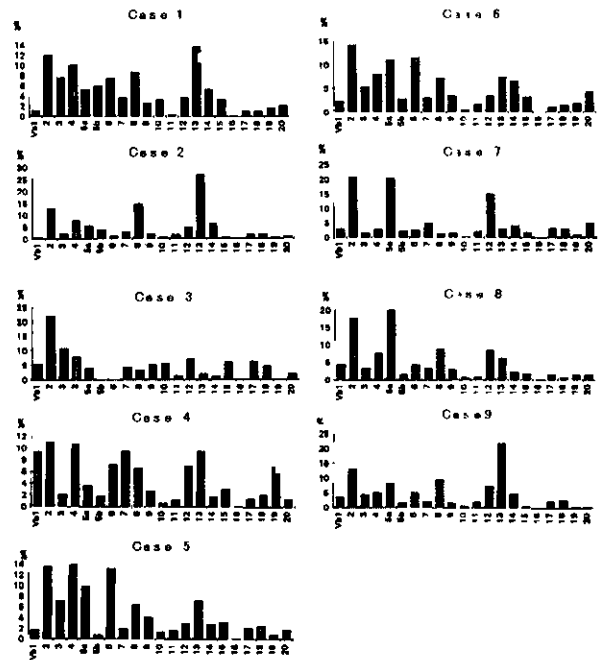


Table 1. Clinical characteristics of patients with hepatitis-associated aplastic anemia

case	age/ sex	peak			etiology	Interval between hepatitis and anemia (wk)	Lowest ANC (cells/ $\mu$ l)
		AST	ALT	TBil			
1	7M	916	1349	6.4	NANBNC	17	136
2	1M	3384	3357	13.1	NANBNC	4	34
3	9M	1971	2609	17.8	NANBNC	0	86
4	1M	1794	1488	5.7	CMV?	1	234

図2. 肝炎後再生不良性貧血の臨床病期におけるNK T細胞

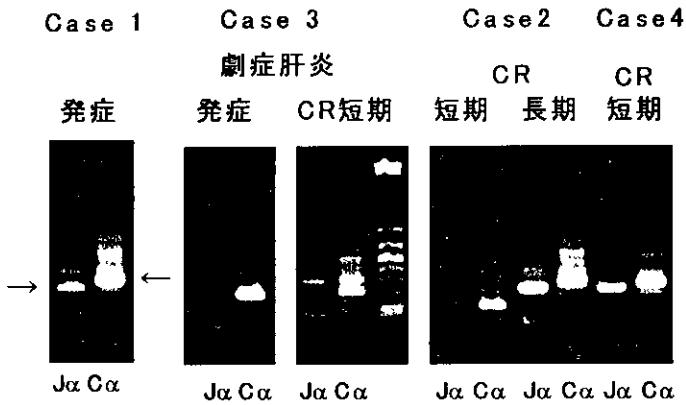


表2. NK T細胞の臨床時期における出現状態

再性不良性貧血	発症時	CR短期	CR長期
Case 1 重症型	+		
Case 2 最重症型		-	++
Case 3 最重症型 劇症肝炎	-	++	
Case 4 重症型	N.D	++	

7. 希釈法による半定量的検討で微小T細胞クローン量を算定する。

8. (倫理面への配慮)

TCR遺伝子を解析する対策として患者からのインフォームド・コンセントを得る。骨髄・末梢血よりリンパ球細胞分画を採取し、Tリンパ球が細胞性免疫として働くT細胞抗原受容体(T-cell receptor; TCR)遺伝子の発現状態を分析することで、特定のクラスのTリンパ球の増減が病態に影響しているかどうかを研究する理由を説明する。この研究への参加は自由で、参加しなくても不利益は受けないこと。プライバシーや医療記録は守秘されること。決して、本人や家族・血縁者に損害が及ぶことがないことを制約、成績の公表前であればいつでも参加を取り下げる事ができること。また、今後この疾患と関わる遺伝子が判明した場合、TCR遺伝子以外の遺伝子を研究することがある事などを記載した同意文書を作成し、同意文書に自署による署名を得る。

既提供試料で同意が与えられていなかったものは、今回の同意文書に承認されたもののみを使用する。既提供試料で患者自身が死亡している場合は、倫理委員会の承認を得られた場合に限り使用する。

### C. 研究結果

- 川崎病症例では、突出する $\alpha\beta$ -T細胞クローンは一部見られたが、広範なTCR多様性の欠如は見られない(図1)。
- 多臓器不全で死亡した2例。1例のEB-VAHSでは、広範な各VレパートリーにわたりTCR多様性が欠如し、 $\alpha\beta$ -T細胞はオリゴクローンであった。NK T細胞は存在した。2例目のperforin異常FHL例(日本のFHLの約25%)で

は、末梢白血球5万となりCD8 T細胞が50%。剖検の肝臓・脾臓で壊死とCD8 T細胞が認められ、 $\alpha\beta$ -T細胞は限定されたオリゴクローンであった。NK T細胞は著明に減少していた。

- 4例の肝炎後再生不良性貧血(うち劇症肝炎1例)の発症時と治療後寛解時の臨床病期において骨髄のNK T細胞(V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q)を検討(図2, 表1, 2)。最重症型2例(Case2,3)においてNK Tリンパ球の消失・減少を見た。肝機能改善と共にNK T細胞の出現が見られた。Case3の劇症肝炎例では寛解早期にはオリゴクローン性・TCR多様性欠如が残存し、劇症期に出現したT細胞クローンは $10^4$ 以下となった。

### D. 考察

多臓器不全に係わる病態解明を、T細胞の免疫機能不全の角度から検討した。すなわち、T細胞が本来もつTCRの多様性の面から検討した。前年度では、多臓器不全に陥る代表の遺伝性疾患、家族性血球貪食症候群(FHL)の殆どや劇症肝炎において、本来のT細胞が有するT細胞抗原受容体(TCR)多様性を広範に欠如、またオリゴT細胞クローンなどによる免疫不全状態が存在し、高サイトカイン・多臓器不全を導くことが示唆されている。本年度は、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)を検討した。また、Th1/Th2を調節するとされるNK T細胞の関与を、M OFの過剰免疫反応において検討した。

M OFや前状態と異なり、川崎病症例では $\alpha\beta$ -T細胞全般にわたる明らかなTCR多様性の欠如は認めなかった。M OFで死亡したEB-VAHSでは、広範なTCR多様性の欠如を認めたが、NK T細胞は存在した。一方、M OFで死亡したもう一例のパーフォリン遺伝子異常FHLでは、剖検時の肝臓・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、肝炎後再生不良性貧血における骨髄NK T細胞(V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q)の検討で、重症肝障害とNK T消失とのあいだに相関が見られている。実験c on A 肝炎マウスの肝臓内NK T細胞によるIL-4産生による肝炎発症が報告されている。これと相反する現象であるようにもみえるが、検体臓器の違いであるのかも知れない。近年、NK T細胞にもCD4+, CD8+, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>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。パーフォリン異常からのM OFでは特殊な状況にあるため、遺伝性疾患でないM OF例の検討も必要と考えられる。

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。

## E. 結論

川崎病では広範なTCR多様性の欠如は見られなかった。肝炎後再生不良性貧血の劇症肝炎例では、発症時骨髄NKT細胞の減少・消失が認められ、肝機能の改善と共にNKT細胞も回復する傾向を示した。多臓器不全で死亡した2例（EB-VASHSやパーフォリン遺伝子異常FHL）では、前者でTCR多様性の欠如・NKT細胞<sup>+</sup>、後者ではNKT細胞の消失と異なる所見であった。多臓器不全にいたる多様性を示唆している。

## F. 健康危険情報

特記なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

特記なし。

### 2. 学会発表

- 1).  $\alpha\beta$ T細胞クローンのMRDモニタリング開発；  
とくにATLについて。

木村暢宏、一瀬一郎、高松 泰、田村和夫、鶴池直邦、岡村純。第99回日本内科学会（名古屋）  
H14年3月28-30日

### 2). ワークショップ

肝炎後再生不良性貧血患者における $\alpha\beta$ T細胞クローンの解析。迫正廣、大杉夕子、石井武文、長野光之、木村暢宏。第64回日本血液学会（於横浜）平成14年9月12日-15日

### 3). ワークショップ

皮膚ATLのIFN $\gamma$ 療法におけるATLとCD8クローンの動態。白濱重敏、木村暢宏、他7人。  
第44回日本臨床血液学会（於横浜）平成14年9月12日-15日

- 4). ATLにおけるHLA-A2拘束性 tax11-19 peptide特異的CTLの抑制。木村暢宏、一瀬一郎、鶴池直邦、宇都宮與、高松 泰、田村和夫、岡村純。  
第64回日本血液学会（於横浜）平成14年9月12日-15日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特記なし。

### 2. 実用新案登録

特記なし。

### 3. その他

特記なし。