

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

分担研究者 竹下誠一郎 防衛医科大学校 小児科講師

研究要旨： 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)に伴って流血中内皮細胞(circulating endothelial cells, CEC)の数が増加するという仮説を立てた。今回の研究では、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、KD20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 回復期や健康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。今回の検討より、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。

A.背景および研究目的

血管内皮細胞(endothelial cells, EC)は炎症や血管新生の生理学及び病理学的な過程において重要な役割を果たしている。EC は、感染性因子、炎症性サイトカイン、酸化ストレス等に反応する。ある病的環境において、EC は血管壁から流血中に剥離することが報告されている(Eur J Haematol 2000;65:215-20)。血栓性血小板減少性紫斑病(Thromb Haemost 1993;69:522)、地中海斑点熱(Blood 1993;82:2109-16)、サイトメガロウイルス感染症(J Infect Dis 1993;167:270-7)、鎌状赤血球症(N Engl J Med 1997;337:1584-90)、急性心筋梗塞

(Blood 1999;93:2951-8)、SLE(Curr Rheumatol Rep 2000;2:39-43)等の血管障害を伴う疾患において、流血中内皮細胞(circulating endothelial cells, CEC)の数が増加すると報告されている。これらの報告では、CEC 数の増加は血管障害の有益なマーカーになりうるとしている。

最近、Asahara ら(Science 1997;275:964-7)は、ヒトの抹消血中に骨髄由来の血管前駆細胞(endothelial progenitor cells, EPC)が出現することを発見した。さらに、EPC は臍帯血中に豊富に存在し(J Clin Invest 2000;105:1527-36)、心筋梗塞の患者の抹消血にも出現すると報告されている

(Circulation 2001;103:2776-9)。骨髄からの EPC の動員は、生理学及び病的な血管新生に関与すると考えられている。近年、EPC に対する特異的な抗原に対する monoclonal 抗体(clone AC133)を用いることによって、血管由来の EC か骨髄由来の EC かを鑑別できるようになった(Blood 2000;95:952-8、J Clin Invest 2000;105:17-9)。

川崎病(Kawasaki disease, KD)は小児特有の全身血管炎であり、冠動脈病変(coronary artery lesion, CAL)を伴うことがある。この疾患の免疫学的な特徴として各種の血中サイトカインが増加し、EC の活性化と障害を伴うことが知られている。今回の研究の目的は、EC と EPC に対する monoclonal 抗体を用いた免疫学的手法を用いて、KD の CEC 数は増加しているかどうか、さらにその細胞の由来(血管壁もしくは骨髄)を検討することである。

B. 研究方法

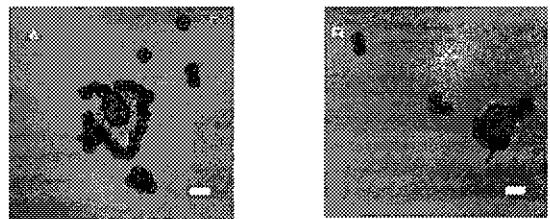
対象は、KD20 例(年齢 8 か月～6 歳、平均 26 か月、男/女 = 15/5)、健常児(healthy controls, HC)10 例(6 か月～4 歳、平均 23 か月、男/女 = 6/4)である。サンプル採取に関して、親又は養育者の informed consent が得られた。すべての KD 患児は 7 病日以内に入院し、KD 診断基準を満たしていた。また、すべての KD 患児に対して、アスピリン(30mg/kg/day)及び静注用 γ -グロブリン(IVIg, 2g/kg/dose)の投与を行った。

心エコー検査は入院中には 2～3 日間隔で施行し、退院後は 2～3 ヶ月間隔で施行した。KD20 例中の 6 例に CAL を認めた：5 例において一過性拡張(最大径 3～4 mm で発症後 3 カ月以内にいずれも正常化)、1 例にお

いて冠動脈瘤(最大径 6 mm で発症 1 年後に 3～4 mm に退縮)と認めた。KD 患児からの採血は、急性期の IVIG 治療前(第 3～7 病日)、亜急性期の IVIG 治療後(第 9～11 病日)、回復期(第 22～37 病日)において施行した。

CEC の分離抽出法は、Solovey らの報告(N Engl J Med 1997;337:1584-90)に従った。全血 1ml に対して、ヒツジ抗マウス IgG-carried magnetic beads-coated 抗 EC マウス mAb(clone P1H12)を反応させ、magnetic concentrator によって EC を抽出した。CEC の検出及び算出は、George らの方法(Blood 1993;82:2109-16)に従った。まず、May-Grünwald-Giemsa 染色によって、直径 30 μ m 以上かつ表面に magnetic beads が 10 個以上結合している細胞を CEC と定義した(図 1)。

図 1 CEC(左)と non-CEC(右)



さらに CEC の確認をするために、内皮細胞特異的な抗体(マウス抗 VE-cadherin mAb と抗 E-selectin mAb)を用いて FITC 染色し、蛍光顕微鏡下で観察した(図 2)。

図 2 VE-cadherin 陽性細胞(左)と E-selectin 陽性細胞(右)



また、EPC の同定のために、PE-labeled AC133 抗体を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した(図3)。

図3 EPC(左)と non-EPC(右)

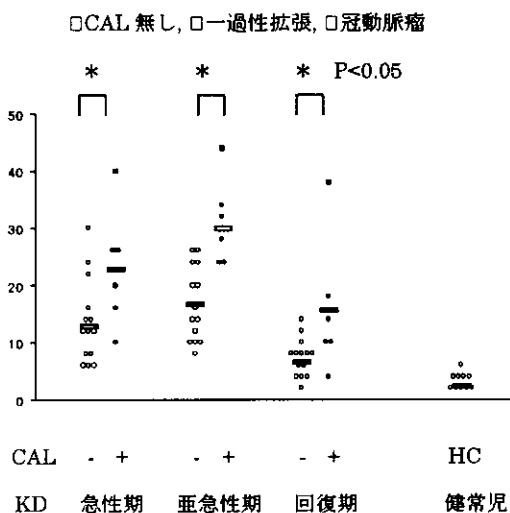


すべてのデータは、mean±SE で表示され、KD 各病期間の差は Wilcoxon signed-rank test、KD と健常児(HC)の差は Mann-Whitney test で解析した。共に、P<0.05 を有意差有りとした。

C. 研究結果

HC の CEC 数は 6 個/ml 以下であった(平均 3.2±0.4 個/ml)。KD 群は、CAL 有り群(CAL+)と CAL 無し群(CAL-)の 2 群に分類された。KD 急性期～回復期の各平均 CEC 数は、HC に比較して有意に(P<0.05)高かった(図4)。

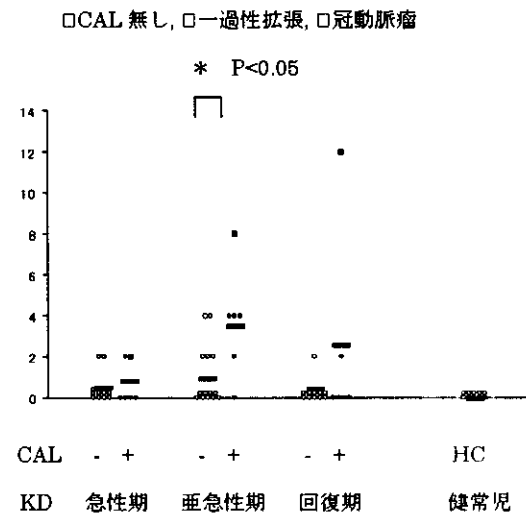
図4 CEC 数 (個/ml)



CEC 数は、KD 急性期(平均 16.4±2.1 個/ml)から亜急性期(平均 21.0±2.1 個/ml)にかけて増加し、回復期(平均 9.1±1.7 個/ml)にかけて有意に減少した。さらに、CAL 有り群の平均 CEC 数は、CAL 無し群に比較して有意に(P<0.05)高かった(急性期 23.0±4.2 vs 13.6±2.0 個/ml、亜急性期 31.0±3.1 vs 16.7±1.7 個/ml、回復期 15.7±4.9 vs 7.3±0.9 個/ml)。

HC において EPC は認められなかった(図5)が、KD 20 例中の 11 例において EPC が出現した(CAL 無し群 14 例中 6 例、CAL 有り群 6 例中 5 例)。全 CEC 数中の EPC の割合は平均で 4.4±1.2% であった(0~18%)。

図5 EPC 数(個/ml)



KD 亜急性期の平均 EPC 数(平均 1.4±0.5 個/ml)は、急性期(平均 0.4±0.2 個/ml)や回復期(平均 0.8±0.6 個/ml)に比較して有意に(P<0.05)高かった。さらに、KD 亜急性期において、CAL 有り群の EPC 数(平均 3.7±1.1 個/ml)は、CAL 無し群(平均 1.0±0.4 個/ml)に比較して有意に(P<0.05)高かった。特に、動脈瘤を認めた 1 例においては、CEC 数と EPC 数は回復期にも依然として高値を認

めた。また、CEC数とEPC数は、CRPや白血球数などの臨床データと有意な相関関係を認めなかった。

D. 考察

KDは病理学的に全身の血管炎の1つであるとの概念が確立されている。この疾患はEC障害を引き起こすが、その特異的な臨床マーカーは未だ報告されていない。現在までに、KD急性期の血清中 von Willbrand 因子、可溶性 selectin、可溶性 ICAM-1 等の高値が報告されているが (Clin Exp Immunol 1995;101: 13-7, Clin Exp Immunol 1997;108:446-50)、これらの因子の発現は血管内皮細胞に特異的なものではない (J Cell Biol 1985;101:363-71)。

今回の研究の結果、KD急性期から回復期にかけてのCEC数は、健常児(HC)に比較して有意に増加していた。KDすべての症例においてIVIGで治療しているため、IVIGがCECの出現に与える影響は不明である。CAL有り群におけるCEC数のピーク値は亜急性期(第9~11病日)であり、この時期は心エコー検査においてKDのCALが通常出現する時期に一致する。さらに、全CEC数中のEPC数の割合は小さいため、これらのCECの大多数は血管壁から剥離した成熟ECと考えられる。一方、我々は、血管性紫斑病の5例においてCECを測定したが、増加を認めなかった(data not shown)。従って、CEC数の増加はKDのEC障害を反映し、KDのEC障害の有益な臨床マーカーになり得ることが示唆された。今回の検討では、血管壁からのEC剥離のメカニズムは不明だが、サイトカイン等の血清因子、プロテアーゼを介する反応、血管新生やアポトーシスのバランスの変化等が考えられる。

EPCは骨髄由来の内皮前駆細胞であり、高い

増殖能力を有し、血管新生に関与すると考えられている。Vascular endothelial growth factor (VEGF)がEPCを骨髄から流血中へ動員させる作用を有することがわかっており (EMBO J 1999;18:3964-72)、血中VEGF値はKD急性期に増加することが既に報告されている (Am J Cardiol 1999;83:337-9, Pediatr Res 1998;44:596-9)。最近、Suzukiら (Circulation 2000;101:2935-41)は、KDのCAL病変部にはactiveなremodeling processが認められることを免疫組織学的に証明した。今回の検討でも、CAL有り群のKD患児は、無し群のKD患児に比較して有意に高値の血中EPC数を有していた。さらに、EPC数のピークは、CEC数のピークに比較して病期がやや遅い傾向を認めた。これらのことから、これらのEPCは骨髄から動員された後に、KD血管炎によって引き起こされるEC障害の修復や微小血管における血管新生に関与していることが示唆される。

E. 結論

- 1) 川崎病(KD)急性期から亜急性期にかけての流血中内皮細胞(CEC)数は、KD回復期や健常児(HC)に比較して増加していた。
- 2) KDのCAL有り群のCEC数は、CAL無し群に比較して有意に高い傾向を認めた。
- 3) CECの起源は、主に血管壁から剥離した成熟ECと考えられた。
- 4) CEC数中に占めるEPC数の割合は小さかったが、特にCALを有するKD患児においてはEPC数が増加する傾向を示した。
- 5) 以上より、CECやEPC数の増加は、KD血管炎の内皮細胞障害を反映していると考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Sekine I:

Intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations induce apoptosis in TNF- α -stimulated endothelial cells via a mitochondria-dependent pathway. *Clin Exp Immunol* 127, 445-454, 2002

2) Tsujimoto H, Takeshita S, Nakatani K, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I:

Intravenous immunoglobulin therapy induces neutrophil apoptosis in Kawasaki disease. *Clin Immunol* 103, 161-168, 2002

3) 川村陽一、竹下誠一郎、中谷圭吾、辻本拓、川瀬博子、徳富智之、関根勇夫: 川崎病における血中ウリナスタチン濃度の測定に関する検討. *新薬と臨床* 51: 463-466, 2002

4) Takeshita S, Kobayashi I, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I: Characteristic profile of intestinal microflora in Kawasaki disease. *Acta Paediatr* 91, 783-788, 2002

5) 辻本 拓、竹下誠一郎、中谷圭吾、川村陽一、徳富智明、関根勇夫: エンドトキシン研究5研究と治療の進歩(望月秀隆、小野聡、小玉正智 他編),

医学図書出版株式会社, 東京, 2002

担当部分: ヒト静注用免疫グロブリン製剤によるLPS刺激好中球のアポトーシス誘導作用に関する検討(93-100)

6) 徳富智明、竹下誠一郎、川村陽一、中谷圭吾、辻本 拓、関根勇夫: 過去10年間(1991-2000年)に防衛医科大学校病院に入院した川崎病患儿262人の臨床的検討.

防衛医科大学校雑誌 27: 139-147, 2002

2. 学会発表

1) 辻本拓、竹下誠一郎、中谷圭吾、川村陽一、徳富智明、関根勇夫: 静注用免疫グロブリン製剤は川崎病の末梢血好中球のアポトーシスを誘導する. 第105回日本小児科学会学術集会、名古屋、2002

2) 川村陽一、竹下誠一郎、中谷圭吾、辻本拓、辻本拓、徳富智明、関根勇夫: 川崎病における腸内細菌の分布について. 第105回日本小児科学会学術集会、名古屋、2002

3) Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Kawamura Y, Tokutomi T: The origins of circulating endothelial cells in Kawasaki disease. 第66回日本循環器学会、札幌、2002

4) 中谷圭吾、竹下誠一郎、辻本拓、川村陽一、徳富智明: 川崎病冠動脈発生における流血中血管内皮細胞の臨床的意義. 第38回日本小児循環器学会学術集会、東京、2002

5) 竹下誠一郎、川村陽一、中谷圭吾、辻本拓、徳富智明、関根勇夫: シンポジウム・川崎病の治療戦略—古くて新しい視点から—ウリナスタチン療法は有効か? 第22回日本川崎病研究会、北九州、2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

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

平成14年度第一回班会議

会 期： 14年7月6日（土）12：00－7月7日（日）12：00
会 場： 新潟大学・有壬記念館（新潟大学医学部）他

主任研究者

鈴木和男

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

平成14年度第一回班会議

会 期： 14年7月6日(土) 13:00-7月7日(日) 12:00

会 場： 新潟大学・有壬記念館(新潟大学医学部) 他

プログラム

- 13:00-13:05 14年度の班会議にあたって
鈴木和男(主任研究者)
- 13:05-13:15 オーガナイザーから
相澤義房(新潟大院医・副総括担当)
- 13:15-13:30 あいさつ
厚生労働省・疾病対策課

1. 分担者のこれまでの成果と本年度の研究計画

1) 13:30-14:15

血管炎の発症機構解析(座長: 関塚永一)

(1) 鈴木和男(国立感染研・生物活性)

血管炎に関与する好中球機能

(1) 越尾 修(国立感染研・生物活性、朝日生命・糖尿病研究所)

血管傷害時の apoptosis における signal 伝達とその調節

(3) 長尾朋和(国立感染研・生物活性)

血管傷害のイメージング

(4) 増田弘毅(秋田大学・医・第二病理)

血管炎と血管新生: EC の由来

2) 14:15-15:15

微小循環とイメージング(座長: 中山俊憲)

(1) 関塚永一(国立埼玉病院)

超高速度高感度ビデオカメラシステムを用いた肝疾患モデルにおける微小循環研究

(2) Wayne Dawson

Determination of the structure and dynamics of LECT2

using molecular dynamics simulation and combinatorial strategies
on the secondary structure

- (3) 山本健二 (代: 花木賢一、国際医療センター・医療生態)
半導体ナノ粒子の細胞トレーサーとしての応用研究

15:15-15:45 … 休憩

3) 15:45-17:15

炎症惹起にかかわる細胞機能異常 (座長: 鳥羽 健)

- (1) 岡田秀親 (名古屋市大・医・分子医学研)
炎症における carboxypeptidase R(CPR)の役割に関する研究
- (2) 清水 宏 (代: 清水 忠道、北海道大・院医・皮膚粘膜病学)
アトピー性皮膚炎におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割
- (3) 中山俊憲 (千葉大・院医・免疫細胞医学)
Th1/Th2 細胞分化のシグナル制御
- (4) 木村暢宏 (福岡医大・一内)
多臓器不全の発症機構における T細胞抗原受體(TCR)多様性からの T細胞の分子生
物学的検討
- (5) 布井博幸 (宮崎医大・小児)
コメント

17:15-17:45

第一日目の総合討論・コメント

第2日目 7月7日 (日)

4) 08:30-09:20

炎症惹起におけるサイトカインの役割 (座長: 高橋 啓)

- (1) 田之倉 優 (東京大・院農)
多臓器不全因子の構造解析
- (2) 山越 智 (感染研・生物活性)
肝炎、関節炎モデルにおける LECT2 ノックアウトマウスを用いた病態と
発症メカニズムの解析
- (3) 岩倉洋一郎 (東京大・医科研)
IL-1 レセプターアンタゴニストノックアウトマウスに見られる血管炎の解析

09:20-09:40 … 休憩

5) 09:40-11:00

病態発症機構 (座長: 木村暢宏)

- (1) 小玉 誠、相澤義房 (新潟大・院医歯・器官制御医学・循環器学)
サイトカイン環境による心筋炎の病態制御
- (2) 笹田昌孝 (京都大・医療短大)
好中球機能亢進による血管炎惹起機序の解析
- (3) 竹下誠一郎 (防衛医大・小児科)
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
- (4) 高橋 啓 (東邦大・医・大橋病院・病理)、大野尚仁 (東京薬大・薬・免疫)
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

6) 11:00-11:50

感染症と急性・慢性炎症 (座長: 岡田秀親)

- (1) 亀岡洋祐 (国立感染症研・遺伝子資源)、Amanda Persad (国立感染症研・生物活性、南フロリダ大学)
新規 MPO 欠損症例の解析と日本における MPO 欠損症の 4 例からの考察
- (2) 荒谷康昭 (横浜市大・木原生物学研)
ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの感染防御能の異常
- (3) 布井博幸 (宮崎医大・小児科)
新生児虚血性脳症とアポトーシス

2. 14年度の方針「まとめ」

相澤義房、鈴木和男

3. コメント: 直江史郎、岡崎富男

4. 次回班会議、報告書の締め切り日について

- 1) 第二回研究班会議: 国立感染症研 平成15年1月10日(金)、11日(土)
- 2) 研究成果報告書(分担者): 3月15日(水)

※ 経理報告書の提出は不用

参 加 者

氏名	区分	身分	所属機関	部 署
鈴木和男	主任研究者	室長	国立感染症研究所	生物活性物質部
相澤義房	分担研究者	教授	新潟大学	医学部
布井博幸	分担研究者	教授	宮崎医科大学	小児科
岡田秀親	分担研究者	教授	名古屋市立大学	医学部
笹田昌孝	分担研究者	教授	京都大学	医療技術短期大学部
岩倉洋一郎	分担研究者	教授	東京大学	医科学研究所
関塚永一	分担研究者	副院長	国立埼玉病院	
田之倉優	分担研究者	教授	東京大学	大学院農学生命科学
木村暢宏	分担研究者	講師	福岡大学	医学部・第一内科
高橋 啓	分担研究者	助教授	東邦大学	医学部・大橋病院
竹下誠一郎	分担研究者	講師	防衛医科大学校	小児科
山越 智	分担研究者	主任研	国立感染症研究所	生物活性物質部
中山俊憲	研究協力者	教授	千葉大学	大学院医学研究院
増田弘毅	研究協力者	教授	秋田大学	医学部第二病理
大竹英樹	研究協力者	助教授	獨協医科大学	生理学
赤川清子	研究協力者	室長	国立感染症研究所	免疫部
亀岡洋祐	研究協力者	主任研	国立感染症研究所	遺伝子資源室
荒谷康昭	研究協力者	助教授	横浜市立大学	木原生物学研究所
小玉 誠	研究協力者	助教授	新潟大学	院医・循環器
鳥羽 健	研究協力者	講師	新潟大学	院医・循環器
清水忠道	研究協力者	講師	北海道大学	医学部
杉山稔恵	研究協力者	助手	新潟大学	農学部
大原関利章	研究協力者	助手	東邦大学	医学部・大橋病院
花木賢一	研究協力者	流動	国立国際医療研	医療生態学研究部
宮崎耕司	研究協力者	医員	国立埼玉病院	消化器内科
Wayne Dawson	研究協力者		国立感染症研究所	生物活性物質部
Amanda Persad	研究協力者	特別研	国立感染症研究所	生物活性物質部
小田 佳史	研究協力者	院生	東京大学	大学院農学生命科学
直江史郎	アドバイザー	教授	東邦大学	医学部・大橋病院
岡崎富男	アドバイザー	院長	広島市民病院	

加藤公則	研究協力者	助手	新潟大学	院医・循環器
長尾朋和	研究協力者	流動	国立感染症研	生物活性物質部
奥村彰規	研究協力者	流動	国立感染症研	生物活性物質部
馬淵綾子	研究協力者	協力研	国立感染症研	生物活性物質部
越尾 修	研究協力者	協力研	国立感染症研	生物活性物質部
吉田 剛	研究協力者	院生	新潟大学	院医・循環器
代田和恵	秘 書		国立感染症研	生物活性物質部
栗原和記	事 務		国立感染症研	生物活性物質部
今回不参加				
仁保喜之	アドバイザー	院長	千早病院	
厚井文一	アドバイザー	院長	高松病院	
平島光臣	研究協力者	教授	香川医科大学	免疫病理学
山本健二	分担者	部長	国立国際医療研	医療生態学研究部
澤田 誠	研究協力者	教授	藤田保健衛生大	
住本英樹	研究協力者	教授	九州大学	生体防御医学研究所
野島 博	研究協力者	教授	大阪大学	微生物病研究所
大野尚仁	研究協力者	教授	東京薬大	免疫
清水 宏	研究協力者	教授	北海道大・院医	

01-06-01

平成14年度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14年度第一回班会議 平成14年7月6日(土)－7日(日) 新潟大学有任記念館他

主任研究者：鈴木 和男

分担研究者：1.発症機構解析班 岡田秀親、笹田昌孝、木村暢宏、関塚永一
2.モデル動物班 岩倉洋一郎、山越 智、高橋 啓、山本健二、田之倉優
3.臨床班 相澤義房、布井博幸、竹下誠一郎

協力研究者：中山俊憲、増田弘毅、大竹英樹、赤川清子、亀岡洋祐、荒谷康昭、小玉 誠、
鳥羽 健、清水忠道、杉山稔恵、大原関利章、花木賢一、宮崎耕司、
Wayne Dawson、Amanda Persad、小田 佳史、加藤公則、長尾朋和、
奥村彰規、馬淵綾子、越尾 修、吉田 剛

平島光臣、澤田 誠、住本英樹、野島 博、大野尚仁、清水 宏

アドバイザー：仁保喜之、直江史郎、岡崎富男、厚井文一

【目的】

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。その要因には、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想定される。そこで、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。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を維持と自立が社会的に要請されている。本研究では、劇症化機転・修飾因子の解明と治療法の開発をめざす。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、3)治療法開発の3プロジェクトからなる。本研究の遂行には、申請者らがクローニングした肝細胞高発現サイトカインLECT2遺伝子を利用する。LECT2-KOマウスは、ConA誘導により多臓器不全・劇症肝炎様の病態が認められ、劇症化の解明の主要なモデルとなり得る。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の意義を指摘してきたが、この抑制法の開発は治療に結びつく。さらに心血管の炎症性病態の解明も重要である。

13年度までに得られた成果

- 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。

14年度の研究計画

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。

血管内皮細胞傷害時の apoptosis における signal 伝達とその調節

越尾 修^{1,2}、長尾朋和¹、馬淵綾子^{1,3}、鈴木和男¹

¹ 国立感染症研究所・生物活性物質、² 朝日生命糖尿病研究所、³ 日医大・微生物免疫

1 4 年度の予定 (結果)

【目的】 好中球をはじめ炎症細胞の活性化に伴い血管炎が誘導され、状況によっては、多臓器不全を誘発して生存そのものにも影響する。好中球の活性化や好中球自己抗体と連動して腎炎、SLE、リウマチをはじめとする難治性血管炎が進行すると予想されている。そこで、好中球活性化による血管内皮細胞の傷害を明らかにする。具体的には、血管内皮細胞傷害時の apoptosis に関連する signal 伝達を調べ、その作用を調節する因子について検討した。

【方法】 種々の protein kinase 等のリン酸化を、リン酸化部位特異的抗体を用いた western blotting 等で明らかにし、それらに対する制御因子の1つとして insulin の影響を調べた。HUVEC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) を TNF α と cycloheximide にて処理 (TC 処理) 後、insulin 刺激をし、cell lysate 中の蛋白質の tyrosine リン酸化を見た。次に、MAPK family のリン酸化が、TC 処理およびその後の insulin 刺激で昂進されるか否かを検討した。また、apoptosis を抑制するとされる Akt/Protein kinase B の serine/threonine リン酸化に対しても、TC 処理の影響とそれに対する insulin の効果を見た。

【結果】 HUVEC を TC 処理し、MAPK family を調べたところ、15 分後には ERK 1/2、p38 および SAPK/JNK すべて Thr185/Tyr187 がリン酸化された。その内、p38 は最もリン酸化が顕著であった。一方、ERK 1/2 は、無処理でもリン酸化されており、15 分後に insulin 依存性リン酸化が認められたが、30 分後には依存性がなくなり、24 時間後には脱リン酸化された。次に、他の蛋白質の tyrosine リン酸化への insulin 効果を調べたところ、TC 処理 15 分後に 130, 100 および 65kD 付近の蛋白質が insulin 依存性にリン酸化され、30 分後には逆に insulin 依存性に脱リン酸化された。TC 処理 24 時間後には、そのうち 130 および 65kD 付近の蛋白質が、insulin 依存性に脱リン酸化された。また、Akt/Protein kinase B 1/2 は、対照とくらべ、Ser473 が強くリン酸化され、insulin 依存性に脱リン酸化された。しかし、Thr308 の方は TC 処理・insulin 刺激いずれでも変化がなかった。

【結論】 血管内皮細胞の TC 処理によって p38 MAP kinase のリン酸化が顕著に現われたことから、p38 MAP kinase を介して apoptosis が起こっている可能性が示唆された。また、insulin は Aktをはじめ 130kDa 蛋白質などのリン酸化蛋白質を脱リン酸化して apoptosis を促進する可能性が示唆された。

1 4 年度計画

好中球と血管内皮細胞傷害との関係を明らかにするため、HUVEC に直接好中球を作用させるにあたり、まず細胞傷害刺激として、TNF α と cycloheximide 以外に staurosporin や Fas-ligand 等を用い、同様に ERK 1/2, p38 および SAPK/JNK 等 MAPK family のリン酸化を見る。TC 処理では最もリン酸化が顕著だった p38 に着目し、種々の inhibitor の効果を確かめつつその上流と下流の protein kinase 等のリン酸化を追い、細胞傷害刺激と p38 と apoptosis との間の signal 伝達経路を明らかにする。

血管傷害のイメージング

長尾朋和¹、越尾 修^{1,2}、馬淵綾子^{1,3}、大野尚仁⁴、高橋啓⁵、南谷晴之⁶、鈴木和男¹

¹ 国立感染症研究所・生物活性物質、² 朝日生命糖尿病研究所、³ 日医大・微生物免疫、

⁴ 東京薬大、⁵ 東邦大・医・大橋病院、⁶ 慶応義塾大学・院基理工

【目的】好中球をはじめ炎症細胞の活性化に伴い血管炎が誘導され、状況によっては、多臓器不全を誘発して生存そのものにも影響する。好中球の活性化や好中球自己抗体と連動して腎炎、SLE、リウマチをはじめとする難治性血管炎が進行すると予想されている。そこで、好中球活性化による血管内皮細胞の傷害を明らかにする。具体的には、Candida糖ペプチドCAWSとrabbit anti-mouse MPOによって誘導される血管炎傷害の腎臓血管イメージングの基礎的検討を行う。

【方法】C57BL/6 マウスに対して、CAWS (150 mg/mouse)および rabbit anti-mouse MPO (1 mg/mouse)を投与し、加えて5日後にFMLP(10⁻⁸ mol/mouse)を投与し、FMLP投与から0、3、6、24、72時間後の腎表面または糸球体における毛細血管の血流状態を顕微鏡観察した。

【結果】FMLP投与後、時間経過とともに腎微小循環が悪化し、具体的には血流速度の低下、血小板血栓を伴った血流の停止、血液の逆流等の現象が観察された。特にFMLP投与72時間後においてそれらの現象が顕著に見られ、広範囲にわたる腎表面血流の停止が観察された。さらに、この血流悪化は好中球の内皮への接着および血管外への浸潤を伴ったものであった。

【結論】CAWSおよびanti-MPOによって誘導される腎臓微小血管の炎症を生体内で観察し、好中球の関与を示すことができた。

14年度計画

CAWSとanti-MPOの双方を投与することによって誘発される腎臓の血管炎モデルにおいて以下の検討事項を考えている。

1. 好中球の関与をよりクリアに生体内で確認する必要があるため、生体内で好中球を可視化し、血管炎部位における好中球の存在の確認および好中球数の定量的評価を行う。

2. 血行力学的因子が血管炎の進行において重要な役割を担っている可能性があるため、血流速度、血管径、血圧等のパラメータについて検討する。

3. 好中球の血管炎の発症・進行における役割を明確化するため、活性化好中球の血管内皮細胞に対する障害性について、アポトーシスの発現も踏まえてin vivo、in vitroの両面から詳細に検討する。

4. 血管炎発症におけるMPO、O₂⁻、NOSの関与について検討するため、各因子のノックアウトマウスを利用して、CAWSおよびanti-MPOによって誘発される血管障害を比較する。

01-06-04

血管炎と血管新生：ECの由来

増田弘毅、南條博、小松正代、小林実貴夫、川村公一

秋田大学医学部第二病理

【要旨】

毛細血管新生において骨髄由来細胞が重要な役割をしていることがわかってきている。血管炎において炎症細胞が出現するが、これらの多くは骨髄細胞由来である。前者は内皮細胞が骨髄細胞由来であるため、明らかに血管炎とは異なる病態であると考えられている。一方毛細血管と動脈は場としては別の次元で捕らえられてきたため、血管炎を引き起こす主たる血管は動脈であって、血管新生を引き起こす主たる血管は毛細血管であり、この立場でも両者を異なるものであるとするのが通念である。しかし内皮細胞祖先細胞が内皮細胞へと移行する瞬間は観察されておらず、炎症細胞のすべての個性が解明されているわけではない。つまり詳細に観察していくと両者は判然と区別できなくなる。ここで二つの疑問が出てくる。1) 毛細血管新生と同等な病態は動脈にも存在するのか。2) 血管炎において血管新生が関与している病態が存在するのか。我々は1)は Yes と考えている。血流の増大による動脈のリモデリングは内皮細胞の増殖から始まることを明らかにし、増殖内皮細胞の由来が骨髄細胞であることを示唆したい。2)も Yes と考えている。おそらく川崎病がそれであろう。川崎病で出現する細胞は極めて多種多様で通常の単純なパターンの炎症細胞浸潤とは違っている。また動脈瘤の発生は単純に壁の脆弱性では解決できないものである。我々は血管炎と血管新生は判然と区別されるものではなくもっと広い概念を持つ必要があると考える。

05-06-05

超高速度高感度ビデオカメラシステムを用いた肝疾患モデルにおける微小循環研究

関塚永一¹⁾、宮崎耕司¹⁾、鈴木和男³⁾
国立埼玉病院臨床研究部¹⁾、国立感染研究所³⁾
esekizuk@wakho.hosp.go.jp

肝疾患における LECT2 値の検討

宮崎耕司¹⁾、関塚永一¹⁾、小島和夫²⁾、鈴木和男³⁾
国立埼玉病院臨床研究部¹⁾、医学生物学研究所²⁾、国立感染研究所³⁾
kmiya@wakho.hosp.go.jp

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ケモカインとして近年発見された。肝炎症反応を抑制している可能性、破骨細胞を抑制し骨吸収活性を低下させる可能性が示唆されており、臨床的には、生体肝移植直後低下し回復期には上昇し、慢性関節リウマチの重篤度によって動揺することが明らかになっている。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かな結論を得ていない。前回、我々は肝疾患急性期の LECT2 値の経時的変化を検討し回復期に LECT2 値が上昇する可能性を明らかとしたが、今回劇症肝炎を含めた数例の急性期症例について再検討した。さらに健常人のアルコール摂取前後で LECT2 値が低下する可能性についても再検討を行った。また、LECT2 と kupffer cell の関連を明らかにするために wild 及び LECT2 KO mouse の尾静脈より $1.0\mu\text{m}$ の microsphere を静注し、肝臓での kupffer cell の貪食能の差異を蛍光顕微鏡下に観察、検討した。最後に超高速度高感度ビデオカメラシステムを用いた今後の肝疾患モデルにおける微小循環研究についても言及する。

05-06-06

Determination of the structure and dynamics of LECT2 using molecular dynamics simulation and combinatorial strategies on the secondary structure

○ Wayne DAWSON^{1,2}, Mie ITO-ISHIDA³, Satoshi YAMAGOE¹, Masaru TANOKURA³, Kenji YAMAMOTO², Kazuo SUZUKI¹

¹National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo,

²International Medical Center of Japan, Shinjuku-ku, Tokyo,

³Biotechnology Research Center, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo.

The function of the LECT2 protein is not well established, but may play a role in cytokine activity. Polymorphism of LECT2 (V58I) has been associated with the degree of severity of rheumatoid arthritis in Japanese patients. To help understand the role of LECT2 in this process, it has been of interest to determine its structure. However, due to the sequence length and the large number of water-soluble residues in LECT2, extraction of any long-range information appears to be intractable using standard NMR approaches. The NMR chemical shift data has been able to show that LECT2 is a beta sheet protein and this is also confirmed in theoretical secondary structure calculations. There is some agreement between the locations of predicted secondary structure and the Ramachandran angles estimated from the NMR chemical shift data. To help gain further insight into the three dimensional structure, we have used a variety of strategies such as threading and alignment to help tease out the structure. Although homologous sequences of LECT2 are found throughout the animal kingdom, LECT2 has less than 20% homology with any existing proteins in the protein data bank. We found that threading combined with MD simulation was not successful. The most promising approach so far has been to use the secondary structure estimates found in the NMR data and to combine this information with a recently developed theoretical method in polymer folding [1] and beta sheet alignment strategies to drastically reduce the large number of combinatorial way that these beta sheet regions can fold and to use long MD simulation times at high temperature to finally test the stability. We have applied this method to a small subsection of the LECT2 protein where the polymorphism of the LECT2 protein has been implicated in the severity of rheumatoid arthritis. Exchanging Val58 for Ile58 does appear to have a weak effect on the stability of the beta sheet structure in this substructural region. The beta sheet regions would be an initial binding surface in any molecular recognition process of beta sheet proteins. Hence, this may reflect a reason for the loss of function of LECT2. Nevertheless, we do emphasize that these results remain tentative until we can test the additional structures that also satisfy these alignment criteria.

[1] W.K. Dawson, et al. (2001). A physical origin for functional domain structure in nucleic acids as evidenced by cross-linking entropy: parts I and II. *J. Theor. Biol.*, 213:359-386. and :387-412.

05-06-07

半導体ナノ粒子の細胞トレーサーとしての応用研究

分担者：山本健二（研究分担者）、国立国際医療センター研究所・医療生態学研究部

講演者：花木賢一（研究協力者）、国立国際医療センター研究所・医療生態学研究部

e-mail: backen@ri.imcj.go.jp

「これまでの成果」

セレン化カドミウムを核 ($\phi 4.2 \text{ nm}$) とする親水性半導体ナノ粒子について、細胞トレーシングへの応用を念頭に性状解析や細胞毒性について評価を行った。その結果、性状については (1) 親水性半導体ナノ粒子は表面にカルボキシル基を露出させているが、PBS や細胞培地 (ダルベッコ MEM) で速やかに凝集塊を形成し、その分散にはアルブミンを必要とすること、(2) アルブミンと一緒にエンドサイトーシスによって取り込まれたナノ粒子は、代謝についてもアルブミンと共動しているようで、一晩の培養で多くのナノ粒子が細胞外へ排泄されること、(3) 耐光性については有機系色素: FITC が励起開始 2 分以内に視認出来なくなる蛍光顕微鏡観察下で、励起開始 60 分以降も視認可能であることが明らかになった。細胞毒性については、ナノ粒子の合成に用いられる TOPO が粒子から脱落して析出した場合で顕著に認めるが、ナノ粒子そのものの毒性は小さいと思われた。

「14 年度の計画」

親水性半導体ナノ粒子を細胞トレーサーとして応用するための最適化を、粒子の合成と細胞への処理方法から検討していく。

- ・アルブミン非依存でナノ粒子を分散させる培地組成の検討
- ・表面修飾の異なるナノ粒子の細胞毒性と細胞内動態の解析
- ・粒径の異なる (=発光スペクトルの異なる) ナノ粒子の応用評価

03-06-08

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

hiokada@med.nagoya-cu.ac.jp

これまでの成果

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。

14 年度の計画

ProCPR は血栓溶解を阻害する因子として線溶系の研究グループによって発見された Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) と同一物質であることが明らかにされた。従って、CPR は activated TAFI (TAFIa) と同一物質であり、その過剰生成は血栓の溶解を阻害して血管炎などの病態にも関わってくると考えられる。そこで、過剰な CPR の生成を抑制することも必要になることがありうると考え、proCPR の活性化に対する阻害ペプチドの開発を行う。