

03-06-09

## 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

清水 忠道, 清水 宏

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学分野

マクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor: MIF) はエンドトキシンショックの際マウス下垂体前葉より血中に放出される物質であり、またエンドトキシンショックによる致死率が抗 MIF 抗体投与により顕著に改善されることなどが判明し、敗血症における本タンパク質の重要性が明らかになった。その後 MIF が低濃度のグルココルチコイド刺激により誘導されることが報告され、現在では本タンパク質は炎症反応、免疫応答のイニシエーターであると考えられている。一方、MIF は水晶体の分化増殖過程と相関して発現されることから、前述の炎症反応、免疫応答のみならず、細胞の分化増殖を促す因子であることが示唆されている。このように MIF は単にマクロファージの遊走を阻止する活性を有するばかりでなく、生体に広く分布しさまざまな生理活性を有する因子であることが判明している。我々は MIF の炎症性皮膚疾患への関与について研究を進める過程で、アトピー性皮膚炎を代表とするアレルギー疾患における MIF の重要性を明らかにした。アトピー性皮膚炎患者の末梢血単核球の MIF の産生量は、無刺激時及び mitogen 刺激時共に健常人と比べ有意に高値であることが確認された。これは MIF が病変部局所にとどまらず、全身のサイトカインネットワークの中でアトピー性皮膚炎の病態に関与していることを示唆している。アトピー性皮膚炎等、炎症性皮膚疾患の MIF との関連性について皮膚細胞以外の T 細胞およびマクロファージについて解析していくことにより、これらの疾患の発症機序の解明につながるものと期待される。

03-06-10

### Th1/Th2 細胞分化のシグナル制御

中山俊憲 (研究協力者)

千葉大学大学院医学研究院 免疫細胞医学

nakayama@med.m.chiba-u.ac.jp

ヘルパーT 細胞依存性の免疫反応は、機能型の Th1/Th2 細胞によって担われています。また、Th1/Th2 細胞のバランスは多くの免疫疾患の発症や増悪と深い関係があります。Th1/Th2 細胞はナイーブ T 細胞が末梢リンパ組織で抗原を認識した後に、IL-12 や IL-4 の存在下で分化すると言われています。私たちは抗原認識を行う T 細胞レセプターの下流のシグナル伝達経路による Th1/Th2 細胞の分化の制御機構を解析しています。今回は、Ras/ERK MAPK 経路と phosphatase である SHP-1 の役割について最近の研究結果をお話します。

## 多臓器不全の発症機構におけるT細胞抗原受容体多様性からの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  
E-mail: nkimura@fukuoka-u.ac.jp

### これまでの成果

【研究要旨】多臓器不全に係わる病態解明を、免疫機能不全の角度から検討した。遺伝性疾患の家族性血球貪食症候群（FHL）の殆どや劇症肝炎では、本来のT細胞が有するT細胞抗原受容体（TCR）多様性の欠如、また複数のT細胞クローンの存在などによる免疫不全状態が共通して存在する。また、更なる検討のために、新たに機能的ab-T細胞クローンを微量レベルで追跡できる方法を開発した。

【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。多臓器不全に係わる病態解明を、免疫機能不全の角度から検討した。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病態を検討する。

【結果】多臓器不全をきたす代表的遺伝性疾患のFHLや劇症肝炎を含む肝炎後再生不良性貧血症例について、末梢血ab-T細胞のTCRを遺伝子レベルで検討し、T細胞が本来もつTCR多様性やクローンの出現の有無につき検討した。

1. FHLでT細胞における著しく偏った限定されたTCRレパートリーやオリゴクローンT細胞の存在を証明した。化学療法やアロ造血幹細胞移植による寛解状態では、T細胞におけるTCRの多様性は改善し、増悪時のクローンT細胞も消退。日本におけるFHL症例では、一部パーフォリン遺伝子異常とグランザイム発現異常例が半数、残りの半数は不明の遺伝子異常と考えられた。これらサブ分類とTCR多様性パターン・オリゴクローンT細胞の特徴は一致した。免疫抑制療法は一時的寛解をもたらすが再発する。治癒をもたらす最善療法はアロ造血幹細胞移植と思われた。

2. 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Tリンパ球クローンを検討し、発症時T細胞クローンの増加、免疫抑制剤療法後の改善時そのクローンの減少・消退を確認した。また、多臓器不全に陥るとされる劇症肝炎例において他の例より高度のT細胞のTCR多様性の欠如を認めている。

3. ab-T細胞クローンを微量残存病変（MRD）でも追跡できる方法を開発した。104～106個に1個の細胞レベルまで確認でき、ATLなどのab-T細胞腫瘍は勿論のこと、反応性・機能的T細胞（HLA拘束性CTLなど）クローンを患者の臨床病態の追跡に応用できる。

### 14年度の計画

多臓器不全状態では、Tリンパ球のTCR多様性が欠如している免疫不全状態にあつて、これらバランスの崩れが高サイトカインを導いていることが示唆された。今後、

1) 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同様なTCR多様性欠如やオリゴクローンT細胞が存在するかを検討する。

2) クローンの半定量法による臨床経過との相関を検討する。

3) その免疫コントロールにNK 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。

04-07-12

## MOF 班 分担課題名：多臓器不全因子(LECT2)の構造解析

分担者：田之倉 優 協力者：鈴木倫太郎、伊藤三恵、小田佳史

所属：東大・院農生科・応生化

分担者の e-mail: [amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

### これまでの成果

動物細胞 CHO 細胞による発現系を用いた LECT2 (leukocyto cell-derived chemotaxin 2) の X 線結晶構造解析

X 線結晶構造解析に向けて LECT2 の結晶化、X 線結晶構造解析を行っている。結晶化に用いるために CHO 細胞を宿主とし、高発現プロモーター制御下で遺伝子を発現させた。発現したタンパク質は、陽イオン交換および陰イオン交換樹脂を組み合わせ、SDS-PAGE において単一バンドの精製標品を得た。1 リットル培養液あたり約 5 mg の収量であった。Crystal Screen I および II を用いた結晶化など、様々な条件での結晶化を試みた結果、いくつかの条件で結晶が得られた。リザーバ液 0.01 M cobaltous chloride hexahydrate, 0.1M MES (pH6.5), 1.8 M ammonium sulfate において、細いが硬い結晶が得られ、X 線回折強度を測定したところ約 2Å までの回折点が観測された。

### (2) 大腸菌を用いた発現系の構築と NMR を用いた立体構造解析

核磁気共鳴 (NMR) による構造解析のために大腸菌を宿主とする発現系を構築した。発現した LECT2 は封入体を形成したので、可溶性・巻き戻しを行った。再生(His)<sub>6</sub>-LECT2 の円二色性(CD)と NMR スペクトルは、CHO 細胞で発現し精製した LECT2 のものとシグナルの分布が一致し、同じコンフォメーションを持つことが示された。また、NMR スペクトルで 5-6ppm にプロトンのシグナルが多数観測されたことから β 構造に富むことが示唆された。安定同位体標識した(His)<sub>6</sub>-LECT2 を調製し、三核三次元 NMR スペクトルを測定した。現在までに、観測可能と考えられる 130 スピン系のうち約 118 スピン系を帰属した。得られた化学シフトを基に、chemical shift index で二次構造を推定した。その結果、(His)<sub>6</sub>-LECT2 は、ヘリックスを含まない β 構造に富むタンパク質と考えられる。今後、主鎖の帰属を完了し、二次構造の分布を明らかにしたい。

### 14 年度の計画

#### (1) 動物細胞 CHO 細胞による発現系を用いた LECT2 の X 線結晶構造解析

得られた結晶の重原子同型置換体結晶を作成し、重原子同型置換法を用いて位相角を決定し、構造計算を行う。

#### (2) 大腸菌を用いた発現系の構築と NMR を用いた立体構造解析

帰属を完了し、NOE データに基づいた原子間の距離制限情報を取得し、動力学計算を行い、三次元構造を決定する。

04-07-13

## 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

山越 智

国立感染症研究所・生物活性物質部

LECT2 は主に肝細胞で産生され血中に放出される分子量約 16kDa の蛋白質である。これまで *In vitro* で LECT2 は好中球走化性活性、破骨活性抑制、軟骨細胞や骨芽細胞の増殖促進等の生物活性も持つことが分かってきたが、生体内での機能は依然不明である。我々はこれまでノックアウトマウスを用い LECT2 の肝炎、関節炎における役割について解析してきた。その結果、それぞれの炎症モデルにおいて LECT2 の関与する結果を得ている。

### <これまでの成果>

肝炎における LECT2 の役割を調べる目的で Con A 肝障害モデルを用いて LECT2 欠損による病態の変化を解析した。雌性、6 週齢の BALB/c マウスに Con A (10mg/kg) を静注し、8 時間後の血清 GPT 活性及びいくつかの炎症性サイトカインのレベルについて経時的変化を調べた。その結果、LECT2-KO マウスは野生型マウスに比べて血清 GPT 活性が約 2.5 倍の高値を示した。また、Con A 静注後 1-2 時間での IL-4 の遺伝子発現が LECT2-KO マウスで有意に亢進しており、血清中の IL-4 も同様に高値を示した。一方炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 に関しては野生型マウスとほぼ同じ変化のパターンを示した。これらの結果から LECT2 のターゲットとなる細胞として Con A 刺激後初期に IL-4 を産生する T 細胞が考えられた。

一方、LECT2 は骨芽細胞の増殖因子 Chondromodulin II として報告されていること、ヒト慢性関節リウマチにおいて LECT2 の遺伝子多型が重篤度に関係することから関節炎と LECT2 との関連性を調べた。BALB/c マウスを用い関節炎用抗体カクテルを投与し関節炎を誘導したところ、LECT2 ノックアウトマウスは野生型に比べて重症になることが判明した。

### <今年度の計画>

1. ConA 肝炎発症における LECT2 関与のメカニズムの解析
2. 他の肝炎モデル (Galactosamine+TNF- $\alpha$ 、anti-Fas antibody) での解析
3. 抗体カクテルによる関節炎モデルでの LECT2 KO マウス重症化のメカニズムの解析
4. IL-1 receptor antagonist KO マウスの関節炎発症に対する LECT2 の影響
5. LPS の作用に対する LECT2 の関与の可能性

04-07-14

## 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

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

IL-1 の生体内での役割を知るために、IL-1 $\alpha$ 、 $\beta$ ノックアウト(KO)マウス、および IL-1 レセプターアンタゴニスト (Ra) KO マウスを作製した。これらのマウスを用いることにより、1) IL-1 $\alpha$ と IL-1 $\beta$ は互いに相手を誘導する能力があること、2) 炎症性ストレスを抹消に加えたとき、中枢で IL-1 が誘導されること、3) IL-1KO マウスでは発熱が抑制され、逆に IL-1RaKO では発熱が亢進し、炎症時の発熱応答において IL-1 は中心的な役割を果たしていること、4) ストレス応答に於ける、グルココルチコイドの産生も IL-1 に依存すること、5) 脳虚血の際、IL-1 は神経細胞のアポトーシスに関与していること、6) BALB/c 背景の IL-1RaKO マウスは自己免疫になり、関節炎を自然発症することなどを明らかにした。また、最近 Nicklin らは MF1 背景の IL-1Ra KO マウスが血管炎を発症する事を見いだしている。我々も Balb/c 背景 IL-1RaKO での血管炎の発症を検討したところ、50~60%のマウスが血管炎を発症することを見いだした。これに対し、関節炎は 100%のマウスで発症が認められている。関節炎の場合、自己免疫が発症の原因になっていると考えられたことから、血管炎の病態形成に対する、免疫系の関与を検討した。その結果、関節炎の発症と血管炎の発症とは必ずしも相関せず、自己免疫は主要な役割を演じていないことが示唆された。実際、自己免疫の改善、関節炎の発症阻止に効果が見られた、抗 CD40L 抗体、抗 OX40 抗体は血管炎の発症を阻止しなかった。一方、TNF $\alpha$  KO マウスとの交配により、血管炎の発症が完全に阻止されたので、TNF $\alpha$ が血管炎発症に必須であることが分かった。この結果は、抗 TNF 抗体が血管炎の治療に有効であることを示唆するものである。

05-07-15

## サイトカイン環境による心筋炎の病態制御

小玉 誠、相澤義房

新潟大学大学院医歯学総合研究科・器官制御医学講座 循環器学分野

心筋炎の発症と心筋細胞障害には炎症性サイトカインが深く関与している。ヘルパーT細胞の亜集団として、Th1型T細胞とTh2型T細胞の存在が知られている。両者は相互に拮抗的に作用するため、炎症・免疫反応は両者のバランスとして理解しなければならない。そこで、実験的自己免疫性心筋炎（EAM）におけるTh1/Th2バランスを検討した。まず、心筋組織中のサイトカインmRNAの発現については、心筋炎の発症時期と一致してIL-2のmRNAが増加し、続いてIL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1のmRNAが増加した。炎症の最盛期からIL-10の発現が高まり、治癒期に向かった。末梢血リンパ球のTh1/Th2バランスを抗CD4抗体、抗IL-4抗体、抗IFN- $\gamma$ 抗体を用いたフローサイトメトリーによって解析した。抗原感作第7日から末梢血中のTh1型T細胞の比率が増加し、心筋炎の発症時（第14日）には最高となった。次いで、末梢血中のTh2型T細胞の頻度が増加し、第21日にはTh1型T細胞の頻度を凌駕し、治癒期に向かった。EAMは心臓内に大量の抗原ミオシンが存在するにもかかわらず炎症が自然に終息する。EAMから自然治癒したラットは抗原再感作により心筋炎を再発しないが、一定期間を経過すると再発するようになる。この抗原不応期は末梢血でTh2型T細胞が優位となっている期間と一致した。また、治癒期にIL-12を投与したところ自然治癒が遅延し、心筋炎が遅延した。逆に、遺伝子導入により抗原感作時からIL-10を過剰産生させるとEAMは軽症化した。さらに、細胞増殖因子阻害薬として利用されているスラミンを投与するとEAMの発症を完全に抑制することが可能であり、この時Th2サイトカインが早期に誘導されてくることが示された。このように、Th1/Th2バランスが心筋炎の病態を制御しているものと考えられる。

### **Cytokine Balance Regulates Progression and Healing of Experimental Autoimmune Myocarditis**

Makoto Kodama, M.D. and Yoshifusa Aizawa, M.D.

Division of Cardiology, Niigata University Graduate School of Medical & Dental Sciences. Niigata, Japan.

Cytokines play important roles in the pathogenesis of inflammatory heart diseases, such as myocarditis and dilated cardiomyopathy. In order to clarify the pathogenesis of inflammatory myocardial diseases, cytokine-environment was investigated in rats with experimental autoimmune myocarditis. IL-2 mRNA appeared initially in the hearts coincident with the onset of EAM. Subsequently, mRNA of IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and MCP-1 increased. In the recovery phase, IL-10 mRNA appeared in the hearts. Th1/Th2

balance of peripheral blood lymphocytes was analyzed using flow cytometry. Frequency of T cells with Th1 function increased before the onset of EAM (day 10), then T cells with Th2 function overcame Th1 T cells during the active phase (day 21). The change of cytokine profiles, from Th1 to Th2, may determine the disease nature, from progression to recovery, in EAM. Although a large amount of antigen remained in the hearts, active inflammation of EAM subsided by day 35. In vivo administration of IL-12 produced persistent myocarditis in rats with actively-induced EAM. On the other hand, gene transfer using IL-10 was partially suppressed EAM. An unique substance, suramin, which is a growth factor blocker, also effectively prevented the induction of EAM by changing Th1/Th2 balance. EAM was able to be induced in Lewis rats which had recovered from actively-induced EAM after 2 months from the initial immunization. Until 2 months, rats were refractory to re-induction of EAM. The refractory period to recurrence agreed with the period that Th2 T cells were overcoming Th1 T cells in peripheral blood. Thus, cytokine profiles regulated the disease activity of myocarditis.



05-07-16

## 好中球機能亢進による血管炎惹起機序の解析

笹田昌孝

京都大学医療技術短期大学部

e-mail : [sasada@kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:sasada@kuhp.kyoto-u.ac.jp)

### これまでの成果

生体防御の第一次機構として好中球は中心的役割を果たす一方、好中球の機能が異常に亢進する時に組織傷害を起こすことが指摘され、実験的並びに臨床的に具体例が明示されている。しかし好中球機能亢進による組織傷害機序については、十分に明らかにされていない。

ところでGM-CSFをはじめとするサイトカインやLSPは好中球機能を修飾し、ARDS、SIRS等の病態形成に関与することが指摘されている。そこでサイトカイン、特にGM-CSFが好中球のアポトーシスを抑制する結果好中球の機能を亢進させることに注目し、好中球に対するGM-CSFの作用を解析した。

これまでの成績として、TNF- $\alpha$ は好中球アポトーシスを誘導し、活性酸素産生能を低下させた。GM-CSFはこれらのいずれも回復させた。またGM-CSFは自発的アポトーシスを部分的に抑制した。GM-CSFを作用させた好中球による組織傷害の機序の一端が明らかになったと考えられた。

### 平成14年度の計画

GM-CSFが好中球アポトーシスを抑制する機序を明らかにする計画を立てている。好中球アポトーシスの誘導とシグナル伝達系について、概要が明らかにされている。そこでこのシグナル伝達系に対してGM-CSFがどのように作用するかを検討することとした。

05-07-17

## 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

防衛医大・小児科

E-mail: peditake@me.ndmc.ac.jp

- 【背景】近年、種々の血管内皮細胞(EC)傷害を伴う疾患において、流血中に EC が出現すると報告されている。川崎病(KD)は全身性血管炎であるため、EC 傷害の程度の評価が必要不可欠である。しかし、KDの EC 傷害の特異的なマーカーは報告されていない。我々は以前に、KD の急性期の流血中において血管内皮細胞由来 E-selectin の mRNA が高頻度に検出されることを既に報告している（中谷圭吾、竹下誠一郎、川瀬博子、辻本拓、川村陽一、関根勇夫:川崎病における流血中の血管内皮細胞由来 E-selectin の mRNA 検出の試み. 日本小児科学会雑誌第 103 巻, 343-344, 1999）。
- 【目的】KD の流血中に出現する EC を同定及びその数を測定して、KD 血管炎の病態との関係を検討する。
- 【方法】KD 患児と健常児の末梢血(全血)から buffy coat 層を採取して、血管内皮細胞に対する monoclonal antibody (mAb, clone CH-11)を吸着した immunobeads によって血管内皮細胞を検出した。さらに、E-selectin 等の mAb によって血管内皮細胞であることを確認した。
- 【結果及び考察】KD 急性期～亜急性期における流血中 EC 数は、健常児や KD 回復期に比較して有意に増加していた。さらに、冠動脈病変を伴う群では多い傾向を認めた。従って、流血中 EC 数は、KD の血管炎の程度を反映するマーカーになる可能性が示唆された。
- 【今後の計画】近年、ヒトの骨髄由来の EC 前駆細胞が末梢血に出現すると報告されている。この EC 前駆細胞に特異的な mAb (clone AC133)を用いて、KD 流血中の EC は血管壁由来なのか或いは骨髄由来なのかを検討する予定である。

05-07-18

## 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、大原関利章、直江史郎、三浦典子\*、大野尚仁\*

東邦大学医学部付属大橋病院病理学講座、\*東京薬科大学薬学部免疫学教室

連絡先：高橋 啓 keitak@oha.toho-u.c.jp

川崎病は系統的血管炎を基盤とする小児の疾患である。我々は、川崎病剖検例の病理学的検索の一方で、川崎病罹患児糞便から分離された *Candida albicans* アルカリ抽出物を用いてマウス系統的動脈炎作製実験を続けている。本実験系で惹起される動脈炎は、病変分布や組織像の点で川崎病動脈炎と類似する点が多く、川崎病動脈炎モデルとしての評価を受けている。

### これまでの成果

□. *Candida albicans* (*C. albicans*) 菌体抽出物接種によるマウス系統的血管炎誘発モデルにおける、血管炎発症にかかわる関連遺伝子を明らかにするため染色体マッピングを試みた。その結果、異なるふたつの染色体上に高オッズ比を示す領域を見出した。その一方で、他の染色体上には低オッズ比を示す領域がみられた。本モデルでは冠狀動脈炎発生に関連する複数の遺伝子の存在と動脈炎を抑制する遺伝子の存在が推測された。

□. 菌体を構成する糖および蛋白成分の冠狀動脈炎発生に及ぼす影響を検討した。

【材料・方法】使用動物：C3H/HeN マウス、4 週齢、雄。川崎病罹患児糞便から分離、培養した *C. albicans* を用いて既報に従いアルカリ抽出物質 (CADS) を作製、NMR を用いてアルカリ抽出物の成分分析を行った。さらに、アルカリ抽出物から蛋白を除去したフェーリング処理検体および硫酸処理検体を作製した。また、 $\beta$ -1,6-グルカンを含む抽出残渣の次亜塩素酸処理可溶物質並びに  $\beta$ 1,3-グルカンを含む不溶物質を作製した。*C. albicans* 標準株 (IFO1385) を完全合成培地で培養し、培養濾液のエタノール沈殿物 (CAWS) を作製した。各検体を PBS に懸濁ないし溶解して、実験第 1,5 週に各々 5 日間、マウス腹腔内に連続接種 (4mg/回)、第 9 週に屠殺した。諸臓器の病理標本作製、冠狀動脈炎の有無を組織学的に検索した。

【結果】NMR の結果、アルカリ抽出物質はマンナンを主成分とし、少量の  $\beta$  グルカンおよび蛋白で構成されていた。冠狀動脈炎の発生頻度は、アルカリ抽出物質群：5/10、フェーリング処理物質群：1/10、硫酸処理物質群：4/10、次亜塩素酸処理可溶物質群：3/10、次亜塩素酸処理不溶物質群：2/10、CAWS 群：9/9 であった。各群間で冠狀動脈炎の組織像に明らかな差異は認められなかった。

【考察】本実験系における動脈炎発生には、我々がこれまで考えてきたマンナン以外にも少量のグルカン、蛋白が関与している可能性があるとして推測された。また、フェーリング処理および硫酸処理で得られた物質は、いずれもマンナンが主成分と考えられるが、これらの群間で血管炎発生率に差が見られたことから、構成糖についての詳細な解析が必要と思われる。さらに、CAWS は非常に高い血管炎誘発性を有し、川崎病血管炎発症機序を考える上で今後、更に検討を進める必要があると考えられた。

### 1 4 年度の計画

1. 本実験モデルにおける抗炎症剤投与による影響の検討  
CADS、CAWS 投与による差異

06-07-19

## 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

亀岡洋祐<sup>1</sup>、Amanda Persad<sup>2,3</sup>、鈴木和男<sup>2</sup>

- 1) 国立感染症研究所・遺伝子資源室
- 2) 国立感染症研究所・生物活性物質部・生体防御物質室
- 3) 生物統計・疫学、公衆衛生、南フロリダ大学

我々はこれまで日本におけるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 完全欠損症 2 例、不完全欠損症 1 例の遺伝子解析、機構解析を行ってきた。今回新たな MPO 欠損症例 1 例を見出し、遺伝子解析を行ったところ、コード領域内にアミノ酸置換を伴う新たな点突然変異と置換を伴わない変異を同定した。Non-synonymous 変異は C1658(mRNA)T で Arg499Cys、synonymous 変異は C1444A (Ser) であった。これまで解析された MPO 欠損症のうち完全欠損例 3 例のうち 2 例は点突然変異によるものでその変異は、Gly501Ser と上記症例 Arg499Cys である。成熟 MPO 蛋白の構成は 2 分子ずつの Light と Heavy Subunit 及び 1 分子のヘム蛋白により構成される。とりわけ His500 はヘム蛋白との結合にかかわっており、日本の症例においてその両隣の Arg、Gly の変異が見つかったことは、His500 は成熟 MPO 蛋白構成に重要な役割を果たしているものと考えられる。他、不完全欠損 1 例においても Alternative Splice によるアミノ酸 427 番以下の欠失として考えられ、これについても考察を加える。

### Analysis of novel MPO deficiency and review of 4 cases in Japan

Yosuke Kameoka<sup>1</sup>, Amanda Persad<sup>2,3</sup>, Kazuo Suzuki<sup>2</sup>

1)Div. Genetic Resources, NIID, 2)Lab. Bio-defence Substances, Dept. Bio-active Molecules, NIID, 3)Dept. Epidemiology Biostatistics, College of Public Health, University, of South Florida, Tampa, Florida, USA

We have reported genomic analysis and structural investigation for 2 cases of complete myeloperoxidase (MPO) deficiency and 1 case of partial MPO deficiency. A novel complete MPO deficiency was found: a non-synonymous mutation C1658(mRNA)T which causes Arg499Cys substitution. Additionally a synonymous mutation C1444A (Ser) was identified. The two other complete deficiency cases had non-synonymous point mutations, Gly501ser and novel Arg499Cys respectfully, both of which are located near His500. His500 is strongly involved in heme binding and consequently the construction of the mature MPO enzyme, thus leading to speculation that it might play a role in complete MPO deficiency. Deletion from downstream 427(amino acid) found in the one case of incomplete deficiency might a result of alternative splicing.

05-07-20

## 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

荒谷康昭

横浜市立大学木原生物学研究所

ミエロペルオキシダーゼ(MPO)は、好中球と単球に存在する活性酸素の代謝酵素である。活性化した好中球は、まず NADPH オキシダーゼによりスーパーオキシドを産生し、スーパーオキシドは過酸化水素に変換される。MPO は過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸が生成される反応を触媒する。このようにして好中球から産生された活性酸素は、真菌や細菌の初期感染に対する生体防御を営んでいるが、どの活性酸素種がどの程度殺菌に寄与しているのかは必ずしも明らかではない。

そこで、生体防御における MPO の機能を個体レベルで知るために、MPO のノックアウト (MPO-KO)マウスを作製し、このマウスの種々の真菌・細菌に対する感染防御能を解析した。その結果、1) MPO-KO マウスは野生型マウスに比べて、カンジダ菌感染に対する防御能が顕著に低下していた、2) MPO-KO は、トリコスポロンと緑膿菌の殺菌能も著しく低下し、さらにアスペルギルスとクレブシエラの殺菌能も野生型マウスとの比較において有意に低下していた。しかし、黄色ブドウ球菌と肺炎球菌に対する殺菌能の低下はほとんど認められなかった、などの知見を得た。すなわち、MPO は、多くの真菌や細菌感染に対する生体防御に重要な酵素であることが個体レベルで明らかとなった。

一方、NADPH オキシダーゼの欠損患者は慢性肉芽腫症を発症して幼少期から重篤な感染を繰り返す。また、この酵素の欠損マウス (CGD マウス) がアスペルギルス等に易感染性を示すこともすでに報告されている。そこで、MPO 欠損の感染症に対するリスクをより詳細に知るために、MPO-KO マウスと CGD マウスのカンジダ菌に対する易感染性を直接的に比較した。野生型マウス、MPO-KO マウス、および CGD マウスに、3種の異なる菌量をマウスに投与した。すると、投与量が増加するにつれて、MPO-KO マウスの生存率は CGD マウスの生存率に近接し、両マウスは同程度に易感染になることが示された。すなわち、MPO は多量の菌が感染した際の生体防御機構として、NADPH オキシダーゼに匹敵する重要性を有している酵素であることが示された。

### \*共同研究者

鈴木和男 (国立感染研)、倉 文明 (同)、赤川久義 (同)、高野幸枝 (同)、渡辺治雄 (同)、Nobuyo Maeda (Univ. of North Carolina)、Mary Dinauer (Indiana Univ.)、小山秀機 (横浜市大)

05-07-21

### 新生児虚血性脳症とアポトーシス

布井博幸<sup>1</sup>、池田知明<sup>2</sup>、池ノ上克<sup>2</sup>

宮崎医科大学 1小児科、2産婦人科

我々はインフルエンザ脳炎脳症患者の血清シトクローム C を測定することにより、脳症の病因が何らかのサイトカインによる脳細胞のアポトーシスであることを、明らかにしてきた。また、生後 7 日目の新生児ラットの内頸動脈結紮に加え 2 時間の低酸素状態に置くことにより虚血性脳症を作製した。この新生児虚血性脳症動物モデルでも血清シトクローム C の上昇が認められたことより、アポトーシスが脳障害の病因であることが明らかになった。シクロスポリン A の抗アポトーシス作用をこの動物モデルを用いて、検討したが、脳症の程度を軽減することは出来なかった。

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わ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）

主任者：鈴木和男

班会議

会期：2003年1月10日（金）

12：00－18：00

国立感染研 共用第一会議室

プログラム

12：00－12：30 次期継続への戦略

12：30－12：40

開会：主任者 鈴木和男

厚生労働省疾病対策課挨拶：

名越 究 課長補佐

12：45－15：30 発症機構解析班・モデル動物班

1) 発症機構解析：座長 岡田秀親（名古屋市大）、木村（福岡医大）

1.1 炎症ペプチドの制御に関する研究

岡田秀親（名古屋市立大学分子医学研究所 生体高分子部門）

1.2 好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延

笹田昌孝（京都大学医療技術短期大学部内科・血液、京大短大）

1.3 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 (福岡大学病院 講師)

1.4 超高速高感度ビデオカメラシステムを用いた微小循環研究

関塚永一 (国立埼玉病院)

1.5 半導体ナノ粒子による細胞トレーシング研究

花木賢一、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)

1.6 多臓器不全因子 LECT2 の構造解析

田之倉 優 (東大・院農生科)

1.7 MPO 遺伝子エキソン9における遺伝子変異

亀岡洋祐<sup>1</sup>、Amanda Persad<sup>2,3</sup>、鈴木和男<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 国立感染症研・遺伝子資源室、<sup>2</sup>同生物活性物質部、<sup>3</sup>南フロリダ大・疫学・生物統計)

2) モデル動物：座長 岩倉洋一郎 (東大・医科研)、高橋 啓 (東邦大・医)

2.1 IL-1 レセプターアンタゴニストノックアウトマウスに自然発症する

関節炎に於ける IL-17 の役割

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)

2.2 肝炎、関節炎モデルを用いた LECT2 KO マウスの解析

山越 智 (国立感染症研究所 生物活性物質部)

2.3 CD69 ノックアウトマウスで見られた関節炎発症抑制

中山俊憲 (千葉大学大学院医学研究院)

2.4 CAWSによるマウス系統的血管炎誘発モデル

治療評価実験を行う上での諸条件の検討

高橋 啓<sup>1</sup>、大原関利章<sup>1</sup>、直江史郎<sup>1</sup>、大川原明子<sup>2</sup>、鈴木和男<sup>2</sup>、大野尚仁<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 東邦大学医学部大橋病院病理、<sup>2</sup> 国立感染症研究所、<sup>3</sup> 東京薬科大学薬学部)

2.5 病原性真菌 *Candida* 由来の可溶性糖タンパク質画分 CAWS のマウスにおける急性・慢性毒性

大野尚仁<sup>1</sup>、三浦典子<sup>1</sup>、新郷裕子<sup>1</sup>、安達禎之<sup>1</sup>、大原関利章<sup>2</sup>、高橋 啓<sup>2</sup>、直江史郎<sup>2</sup>、大川原明子<sup>3</sup>、鈴木和男<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 東京薬科大学薬学部、<sup>2</sup> 東邦大学大橋病院、<sup>3</sup> 国立感染症研究所)

2.6 血管内皮細胞の Apoptosis 誘導における p38 MAP kinase と

Caspase 8 の活性化に対する好中球および Cytokine 類の関与

越尾 修<sup>1,2)</sup>、長尾 朋和<sup>1)</sup>、石田-大川原 明子<sup>1)</sup>、馬淵 綾子<sup>1,3)</sup>、鈴木 和男<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 国立感染症研究所・生物活性物質、<sup>2)</sup> 朝日生命糖尿病研究所、

<sup>3)</sup> 日本医科大学・微生物免疫)



15:30-16:00 休憩

16:00-18:15

3. 臨床班 相澤義房（新潟大院医）、布井博幸（宮崎医大）

3.1 好酸球ペルオキシダーゼ陽性細胞（好酸球・好塩基球）の分化調節  
鳥羽健、相澤義房（新潟大院医歯 循環器・血液分野）

3.2 低酸素性虚血性脳症におけるサイクロスポリンAの効果  
布井博幸（宮崎医大・小児科）

3.3 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（防衛医大小児科）

3.4 Nef 導入ミクログリアにおける O<sub>2</sub>-産生の増大と神経障害作用の発現  
川上真紀子<sup>1</sup>、澤田 誠<sup>1</sup>、鈴木和男<sup>2</sup>、F. Vilhardt<sup>3</sup>、K-H Krause<sup>3</sup>  
（<sup>1</sup> 藤田保衛大・総医研、<sup>2</sup> 国立感染研、<sup>3</sup> ジュネーブ大）

3.5 難治性血管炎の臨床と治療に関する問題点と新しい治療法の可能性について  
小林茂人、橋本博史（順天堂大・医・膠原病内）

18:15-18:30 経理について、  
次年度（2003年度）の予定

18:30-20:00 懇親会・新年会（食堂）

分担者15分：今年度の成果と次年度へ向けたプラン

\*次年度は、最終年度なので、MOF との関係付けをして発表してください。

1月10日の班会議への旅費・出張費：

分担者・アドバイザーの先生に主任者からお支払いいたします。

協力者：発表者（代理を除く）について主任者からお支払いいたします。

印鑑をお忘れなくお願いします。

飛行機利用：領収書、半券が必須です。こちらも、お忘れなく。

## 班 会 議 要 旨

### 1. 発症機構解析班

#### 1.1 炎症ペプチドの制御に関する研究

岡田秀親（名古屋市立大学分子医学研究所 生体高分子部門）

Carboxypeptidase R (CPR) はアナフィラトキシン、ブラジキニンなどの炎症性ペプチドの C-末端塩基性アミノ酸 (Arg 及び Lys) を切除して不活化する酵素であるが、前駆体の ProCPR が Thrombin などによって限定分解を受けて CPR に活性化される。

蛋白質の高次構造の形成と維持に分子内におけるセンスペプチド・アンチセンスペプチドの相互反応が役割を果たしているとする基本概念に基づき、蛋白質の機能に影響を与えるペプチドの開発が可能である。この手法を用い、Carboxypeptidase R (CPR) の前駆体の ProCPR の CPR への活性化を抑制するペプチドを開発した。また、ProCPR の Thrombin による活性化は、Thrombomodulin により 1000 倍以上に増強されるが、Thrombomodulin の Thrombin 結合部位を標的にしてペプチドを設計合成し、その作用を 10  $\mu$ M で完全に抑制するペプチドも創生できた。また、アナフィラトキシン C5a の活性を抑制するペプチドの創生にも成功し、350 nM で C5a による Ca-influx を抑制することが出来た。

一方、ProCPR 遺伝子をノックアウトしたマウスも作成できたので、生体内での CPR の役割の解析に供することが出来るようになった。班員との共同研究を促進するため、このマウスを提供することも可能である。

## 1.2 好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延

笹田昌孝（京都大学医療技術短期大学部内科・血液、京大短大）

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。

方法) ヒト好中球を用いて、抗 Fas 抗体および cycloheximide でアポトーシスを誘導した。アポトーシスの検出は Propidium Iodide を用いたフローサイトメトリー法によった。GM-CSF および各種 kinase inhibitor を用いてその影響を検討した。

結果)

- GM-CSF は、pro-caspase 8 のプロセッシングを抑制し、cPKC のインヒビターである Go6976 は、GM-CSF の抑制作用を阻害した。
- DISC 形成は、アポトーシス誘導後 15 分より起こり、30 分で最大に達し、45 分で減衰した。
- GM-CSF の処理により、DISC 内の FADD が消失し、Go6976 の処理によりこの作用が阻害された。

考察)

- Fas 誘導好中球アポトーシスにおいて、GM-CSF は FADD の Fas に対する結合を抑制することにより、DISC 形成を阻害しアポトーシスを抑制したと考えられた。
- また、この抑制作用は classical PKC のインヒビターである Go6976 により消失したことより、GM-CSF のアポトーシス抑制作用は cPKC を介したものであることが示唆された。
- GM-CSF により機能亢進を示す好中球が血管炎と深く関与すると、好中球アポトーシス抑制機序を明らかにすることは治療の観点からも有用な所見と考えられた。

### 1.3 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(福岡大学病院 講師)

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。13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)多様性の欠如、また複数のT細胞クローンなどによる免疫不全状態が共通して存在することを明らかとした。また、新たに特定ab-T細胞クローンを微量レベル( $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$ )で追跡できる方法を開発した。本年度(14年度)は、多臓器不全で死亡した二次性血球貪食症候群(EBVAHS)や血管炎を来す川崎病症例を検討した。また上記症例の一部において免疫をコントロールするとされるNKT細胞の関わりを検討した。

その結果、川崎病症例では明らかなTCR多様性の欠如はなく、一方、多臓器不全状態や前状態において広範なTCR多様性の欠如を共通に認めた。また、増悪時におけるNKT細胞(Va24JaQ)の消失・減少、回復時における出現・正常化傾向をみた。

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同様な検討をしたい。また、regulatory T細胞の関与も検討したい。